

УДК 577.321

ПОИСК ПАРТНЕРОВ НОВОГО СЕЛЕНОВОГО БЕЛКА МЛЕКОПИТАЮЩИХ (SelV) И ЭКСПРЕССИЯ ЕГО мРНК В ПРОЦЕССЕ ОНТОГЕНЕЗА И СПЕРМАТОГЕНЕЗА

© 2012 г. Е. Г. Варламова*, В. И. Новосёлов

Институт биофизики клетки Российской академии наук, Пущино, Московская обл., 142290

Поступила в редакцию 21.06.2011 г.

Принята к печати 07.07.2011 г.

Селен, биологически активный микроэлемент, входит в состав ряда белков и связан, тем самым, с деятельностью многих органов, тканей и систем организма. В настоящее время известно 25 селеновых белков млекопитающих, один из которых – селеновый белок V (Selenoprotein V, SelV). Поскольку укладка данного белка сходна с укладкой тиоредоксина и имеет консервативный мотив CXXU (где С – цистеин, U – селеноцистеин) в каталитическом центре, он относится к семейству редокс-белков, участвующих в окислительно-восстановительных реакциях. В настоящей работе показано, что редокс-белок SelV может взаимодействовать с N-ацетилглюкозаминтрансферазой (OGT) и с белками, относящимися к семейству ASB (Asb-17 и Asb-9). Методом коиммунопреципитации подтверждена специфичность взаимодействий SelV с OGT и Asb-9, но не с Asb-17. Кроме того, показано, что экспрессия мРНК SelV происходит на поздних стадиях сперматогенеза, а также в пубертатный и репродуктивный периоды развития крыс.

Ключевые слова: селеновый белок V, белок-белковые взаимодействия, сперматогенез, онтогенез.

THE SEARCH OF PARTNERS OF A NEW MAMMALIAN SELENIUM-CONTAINING PROTEIN V (SelV) AND EXPRESSION IT'S mRNA DURING ONTOGENESIS AND SPERMATOGENESIS, by E. G. Varlamova*, V. I. Novoselov (Institute of Cell Biophysics, Russian Academy of Sciences, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia; *e-mail: admin@icb.psn.ru). Selenium is a biologically active trace elements, which is part of several proteins, and thus linked with the activity of many organs, tissues and systems of organism. There are 25 mammalian selenoproteins at present, one of which is SelV (Selenoprotein V). Since this protein has thioredoxin-like folding and a conserved motif (CXXU, where C is cysteine, U-selenocysteine) in its catalytic center, it belongs to the family of redox proteins, whose members are involved in redox reactions. In this paper, we show that the redox protein SelV can interact with O-linked N-acetylglucosamine transferase (OGT) and proteins belonging to the family of ASB: Asb-17, and Asb-9. The specificity of interactions SelV with OGT and Asb-9, but not with Asb-17 is confirmed by coimmunoprecipitation. In addition, expression of SelV mRNA in the later stages spermatogenesis, as well as in puberty and reproductive periods of rats is shown.

Keywords: selenoprotein V, protein-protein interactions, spermatogenesis, ontogenesis.

К настоящему времени имеются сведения о 25 селеновых белках млекопитающих [1], одним из которых является селеновый белок V (Selenoprotein V, SelV), относящийся к новому семейству редокс-белков (Rdx). Данное семейство имеет большое число представителей, функции многих из них еще не изучены. Поскольку имеется сходство в укладке молекулы SelV и тиоредоксина, а также в структуре их консервативного мотива и

каталитического центра, предположили, что SelV участвует в окислительно-восстановительных реакциях [2]. В настоящей работе с помощью метода аффинной хроматографии в сочетании с масс-спектрометрическим анализом предпринят поиск белков-партнеров SelV. Согласно результатам, вероятные партнеры SelV – O-связанная N-ацетилглюкозаминтрансфераза (OGT) и белки, относящиеся к семейству ASB (семейство

Принятые сокращения: Sec – селеноцистеин; Cys – цистеин; SelV – селеновый белок V; OGT (O-linked N-acetylglucosamine (GlcNAc) transferase) – связанная с кислородом N-ацетилглюкозаминтрансфераза; ASB (Ankirin repeat and SOCS box) – семейство белков, содержащих анкириновые повторы; домен SOCS (suppressor of cytokine signaling) – домен-супрессор сигнализации цитокинов; Asb-17, Asb-9 – белки, относящиеся к семейству ASB; ИПТГ – изопропилтио-β-D-галактозид; ДТТ – дитиотрейтол.

* Эл. почта: lenvarlamova@rambler.ru

белков, содержащих анкириновые повторы и домен-супрессор сигнализации цитокинов, домен-SOCS), Asb-17 и Asb-9. Методом коиммунопреципитации подтверждена специфичность взаимодействий SelV только с OGT и Asb-9, но не с Asb-17. Поскольку исследуемый селеновый белок локализуется преимущественно в семенниках [1], то, по-видимому, он вовлечен в процессы сперматогенеза. Представляется интересным проследить его экспрессию в семенниках на ключевых стадиях сперматогенеза и онтогенеза. Нами показано, что экспрессия SelV происходит на поздних стадиях сперматогенеза, а также в пубертатный и репродуктивный периоды развития крыс.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

РНК из тканей семенников грызунов выделяли при помощи набора “RNeasy Mini Kit” (“Qiagen”). 30 мг ткани механически разрушали в 600 мкл буфера, содержащего 4 М гуанидинтиоцианат и 0.1% β-меркаптоэтанола. Гомогенат использовали для выделения РНК.

Плазмидную ДНК выделяли при помощи наборов “Plasmid Purification Mini Kit” и “Plasmid Purification Midi Kit” (“Qiagen”). Для высвобождения плазмидной ДНК бактериальные клетки подвергали щелочному лизису в присутствии 1% додецилсульфата натрия. Лизат нейтрализовали раствором 1М ацетата калия, рН 5.0, адсорбировали ДНК на колонки с анион-обменной мембраной, промывали раствором, содержащем 1 М хлорид натрия, 15% изопропанола, 50 мМ MOPS, рН 7.0. Очищенную плазмиду элюировали небольшим объемом Трис-буфера.

Для очистки продуктов ПЦР использовали протокол “QIAquick PCR Purification Kit Protocol” (“Qiagen”), предназначенный для очистки одно- и двухцепочечных фрагментов ДНК из реакционной смеси после ПЦР и других ферментативных реакций, и продукты ПЦР выделяли из агарозного геля следуя, протоколу фирмы (“Qiagen”).

Реакцию обратной транскрипции с помощью олиго(dT)-праймеров проводили по протоколу, приложенному к набору реактивов, предоставленных “Fermentas” (“RevertAid™ H Minus First cDNA Synthesis Kit”). Количество тотальной РНК в реакционной смеси – 3 мкг.

кДНК использовали в качестве матрицы для полимеразной цепной реакции, которую проводили в амплификаторе MJMini (“BioRad”) в следующем режиме: предварительная денатурация – 94°C, 3 мин; 25 циклов в последовательности: денатурация при 94°C, 30 с, отжиг праймеров при 56°C, 30 с, элонгация при 72°C, 1 мин; цепи достраивали при 72°C, 5 мин. Продукты полимеразной цепной реакции определяли путем электро-

фореза в 1 или 2%-ном агарозном геле, содержащем бромистый этидий в концентрации 0.5 мкг/мл. Электрофорез проводили в трис-ацетатном (ТАЕ) буфере, рН 8.0, результаты визуализировали в УФ-свете, λ = 310 нм. Размеры фрагментов ДНК определяли по маркерному набору (“СибЭнзим”, “Fermentas”).

Аmplификацию с открытой рамки считывания гена SelV мыши проводили, используя праймеры selVN и selVC. Для опытов по сайт-направленному мутагенезу, которые сопровождаются заменой селеноцистеинового остатка в 255 положении открытой рамки на цистеин, а остатков цистеина в положениях 255 и 252 – на серин, использовали праймеры sxxc, sxxs, sxxc соответственно. Для клонирования исследуемых партнеров SelV в составе вектора pET-23b(+) (“Novagen”) использовали праймеры ogtN и ogtC, asb-9N и asb-9C, asb-17N и asb-17C. Для амплификации открытых рамок считывания SelV и β-актина на различных стадиях сперматогенеза и онтогенеза крысы использовали праймеры selVratN и selVratC, actinN и actinC соответственно.

Состав олигонуклеотидных праймеров, использованных в данной работе, приведен в таблице.

Клонирование и сайт-направленный мутагенез.

Для встраивания открытой рамки считывания SelV в вектор pET28b (“Novagen”) ПЦР-фрагменты обрабатывали рестриктазами NdeI и BamHI (“Fermentas”), а при клонировании открытых рамок считывания SelV, несущих в каталитическом центре белка мутации CXXC, CXXS и SXXC, – в векторе pGEX4T-1 (“Amersham”), ПЦР-фрагменты обрабатывали рестриктазами EcoRI и XhoI (“Fermentas”). Гидролиз, необходимый для встраивания открытых рамок считывания N-концевого домена OGT, белков Asb-9 и Asb-17 в вектор pET-23b(+) (“Novagen”), проводили с использованием рестриктаз BamHI и SalI, EcoRI и XhoI, NdeI и XhoI (“Fermentas”) соответственно. От нуклеаз освобождались с помощью электрофореза, фрагменты ДНК выделяли из геля и очищали на колонках, используя набор “QIAquick Gel Extraction Kit” (“Qiagen”). Реакцию лигирования выполняли при помощи T4-ДНК-лигазы (“Fermentas”) при комнатной температуре в течение часа.

Реакции по сайт-направленному мутагенезу проводили с использованием реактивов и по протоколу, предложенному фирмой “Stratagene” (“Quick Change Kit”).

Синтез и очистка рекомбинантного белка. Мутантные формы SelV (CXXC, CXXS, SXXC) синтезировали в клетках *E. coli* штамма Rosetta (DE3) (“Novagen”). Трансформированные клетки, несущие соответствующие конструкции, инкубировали при 37°C в питательной среде LB (“Luna-Bertram”). Синтез SelV индуцировали раствором 1 мМ ИПТГ в течение 2 ч.

Последовательность олигонуклеотидов, используемых для клонирования рекомбинантных белков

Название праймера	Последовательность праймера 5' → 3'
selVN	AAATTAACATATGATGAATAACAAGGCGCGG
selVC	CTTAAGGATCCGATGGAGAAGAAGACTAGAGAAG
cxxc	GTGATGACTGTTTCCTGTGCAGCTATGGCCTTCGGTAC GTACCGAAGGCCATAGCTGCAGAGGCCACAGTACATCAC
cxxs	CGTGTGATGTACTCTGGCCTCTGCAGC CATAGCTGCAGAGGCCAGAGTACATCACAC
sxxc	CTGTGGCCTCTCAAGCTATGGCCTTCGGTAC CCGAAGGCCATAGCTTGAGAGGCCACAGTAC
ogtN	CTTAGGATCCATGGCGTCTTCCGTGGGC
ogtC	CAATATGTCGACTCAGGCTGACTCGGTGAC
asb-9N	AGTCGAATTCATGGATGGTGAACAAAGGG
asb-9C	TTGACTCGAGGAGGTGTAAGGAAGCGC
asb-17N	GTTACATATGATGAATAACTCTTCTAAATTATGCC
asb-17C	TCAACTCGAGGCTTTCTAAATTCAGGAAGTTTTG
selVratN	ATGAATAACAAGGCGCGG
selVratC	CTACCTTTTCTTGATCTCTTCATC
actinN	ATGGATGACGATATCGCTGC
actinC	CTAGAAGCATTTGCGGTGC

Примечание. Сайты рестрикции в составе праймеров подчеркнуты. Сайты, по которым произведена замена нуклеотидов, выделены полужирным.

Процедуру выделения и очистки рекомбинантного полигистидин-меченного SelV проводили методом аффинной хроматографии в нативных условиях на Ni-NTA-агарозе ("Qiagen"). Клетки ресуспендировали в 50 мл 50 мМ буфера NaH₂PO₄, pH 8.0, содержащего 300 мМ NaCl, 10 мМ имидазол и 1 мМ сериновый протеазный ингибитор (PMSF). Клетки разрушали в ультразвуковом дезинтеграторе при частоте 22 кГц в течение 3 мин при 4°C, центрифугировали при 10000 об/мин в течение 20 мин. Супернатант наносили на колонку "Poly-Prep Chromatography Columns" ("Bio-Rad"), которую промывали 10 мл 50 мМ фосфатного буфера, pH 8.0, содержащего 300 мМ NaCl. Белок элюировали тем же раствором в присутствии 250 мМ имидазола. Рекомбинантный белок анализировали при помощи электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ-электрофорез).

Идентификация белков-партнеров методами аффинной хроматографии и коиммунопреципитации. Белок-белковые взаимодействия SelV и его партнеров изучали путем аффинной хроматографии на Ni-NTA-агарозе ("Qiagen") и глутатион-сефарозе. Для этого при помощи реакций по сайт-направленному мутагенезу, которые обеспечивают замену аминокислотных оснований в каталитическом центре SelV, были созданы три варианта данного белка: CXXC, CXXS, SXXC (где

C – цистеин, S – серин, X – любая аминокислота). Полученные варианты SelV несли метку GST-tag на N-конце и His-tag – на C-конце, что необходимо для их очистки за счет специфического связывания с Ni-NTA-агарозой и глутатион-сефарозой.

На первом этапе опытов, направленных на поиск белков-партнеров SelV, связавшиеся с Ni-NTA-агарозой CXXC, CXXS и SXXC, варианты данного белка инкубировали в течение 3 ч при 4°C с безядерным клеточным экстрактом тканей семенников мыши, который получали путем дифференциального центрифугирования гомогената ткани в градиенте плотности 10% раствора сахарозы. Для удаления неспецифично связавшихся белков аффинный матрикс отмывали 10 мл 50 мМ фосфатного буфера, pH 8.0, содержащего 300 мМ NaCl, после чего на колонку добавляли тот же буфер, содержащий дополнительно 10 мМ ДТТ. Белки разделяли методом ПААГ-электрофореза. Для идентификации белков-партнеров SelV вырезанные из геля полосы анализировали при помощи масс-спектрометрии MALDI-TOF (матричная лазерная десорбционная ионизационная времяпролетная масс-спектрометрия) в ЗАО "ПИННИ" (Москва).

Для подтверждения специфичности взаимодействия SelV с его потенциальными партнерами использовали метод аффинной хроматографии в

совокупности с методом коиммунопреципитации. Рекombинантный SelV (CXXS) предварительно синтезировали в клетках *E. coli* штамма Rosetta (DE3) (“Novagen”) с добавлением 1 мМ ИПТГ. Процедура выделения белка из бактериальных клеток аналогична описанной выше. Клеточный лизат инкубировали в течение 30 мин с глутатион-сефарозой (“GE Healthcare”), приготовленной согласно протоколу, предоставленному фирмой, белок очищали на колонке “Poly-Prep Chromatography Columns” (“Bio-Rad”).

Параллельно в клетках *E. coli*, штамм Rosetta (DE3), отдельно синтезировали N-концевой домен OGT, а также белки Asb-9 и Asb-17 в составе вектора pET-23b(+) (“Novagen”), несущие His-tag на C-конце. Полученные описанным выше способом клеточные лизаты инкубировали с очищенным на глутатион-сефарозе SelV в течение 3 ч при 4°C, после чего собирали фракцию несвязавшихся с SelV белков и использовали ее в качестве одного из контролей. Результаты коиммунопреципитации анализировали с помощью Вестерн-блоттинга, используя в качестве первичных антител мышинные антитела anti-his tag (“AbD Serotec”), а в качестве вторичных – антитела ECL-Anti-mouse IgG, Horseradish Peroxidase (“GE Healthcare”).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Идентификация белков-партнеров SelV

Первая часть работы посвящена поиску партнеров SelV среди белков экстракта семенников мыши путем аффинной хроматографии в сочетании с масс-спектрометрическим анализом, в связи с чем возникла необходимость понять механизм взаимодействия этих белков друг с другом. Поскольку SelV обладает тиоредоксин-подобной укладкой, в которой отсутствует $\alpha 2$ -спираль и CXXU-мотив в каталитическом центре (где C – цистеин, U – селеноцистеин) [2], мы предположили сходство механизмов каталитического взаимодействия SelV и тиоредоксина с их белками-партнерами. В реакциях, катализируемых тиоредоксином, тиол цистеина (Cys 32) с низким рКа (6.7) атакует внутри- или межмолекулярную дисульфидную связь в белке-мишени, после чего вторая тиоловая группа тиоредоксинового каталитического центра восстанавливает тиол белка-мишени, окисляясь при этом с образованием дисульфидной связи. Механизм этих реакций описан ранее [3], но поскольку они происходят очень быстро, то для замедления этапа стабилизации межмолекулярного взаимодействия между тиоредоксином и его партнерами цистеин в положении 35 заменяют, например, на серин [4].

При изучении селеновых белков необходимо учитывать, что селеноцистеин кодируется кодоном TGA, который в универсальном генетиче-

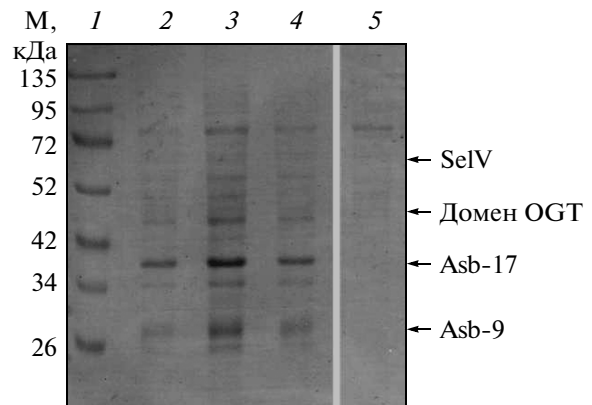


Рис. 1. ПААГ-электрофорез белков, предварительно взятых из безъядерного экстракта тестикул мыши, связавшихся с SelV, иммобилизованным на Ni-NTA-агарозе. 1 – Белковые маркеры молекулярного веса (кДа); 2–4 – белки безъядерного экстракта тестикул мыши, связавшиеся с рекombинантным SelV, имеющим следующие мутации: CXXC (2), CXXS (3), SXXC (4). 5 – Белки безъядерного экстракта тестикул мыши, связавшиеся с глутатион-S-трансферазой (контроль). Стрелками указаны полосы, соответствующие белкам, идентифицированным при масс-спектрометрии. М – маркеры.

ском коде терминирует трансляцию. Считывание данного триплета как селеноцистеинового при синтезе нативных белков осуществляется путем сложного механизма, в настоящее время до конца не изученного, в котором участвуют определенные *цис*- и *транс*-активные факторы [5]. Поэтому, чтобы избежать преждевременной терминации трансляции и получить полноразмерный рекombинантный SelV, мы провели сайт-направленный мутагенез, заменив селеноцистеин на цистеин в каталитическом центре (CXXU → CXXC), опираясь при этом на данные предыдущих работ [2, 6, 7].

В отличие от ситуации с тиоредоксином, заранее нам не было известно, какой из цистеинов каталитического центра в мутанте SelV (CXXC) атакует внутри- или межмолекулярную дисульфидную связь в белке-мишени, а какой из них восстанавливает цистеин белка-мишени, окисляясь при этом с образованием дисульфидной связи. Поэтому мы получили еще две мутантные формы исследуемого белка – CXXS и SXXC (N- и C-концевые цистеины последовательно замещены путем мутирования серинами). Все три рекombинантные формы SelV очищали при помощи аффинной хроматографии на никелевой агарозе и инкубировали с безъядерным клеточным экстрактом тканей семенников мыши, поскольку SelV локализуется исключительно в этом органе [1]. Вероятные белки-партнеры, связавшиеся с SelV, определяли с помощью масс-спектрометрического анализа, результаты которого свидетель-

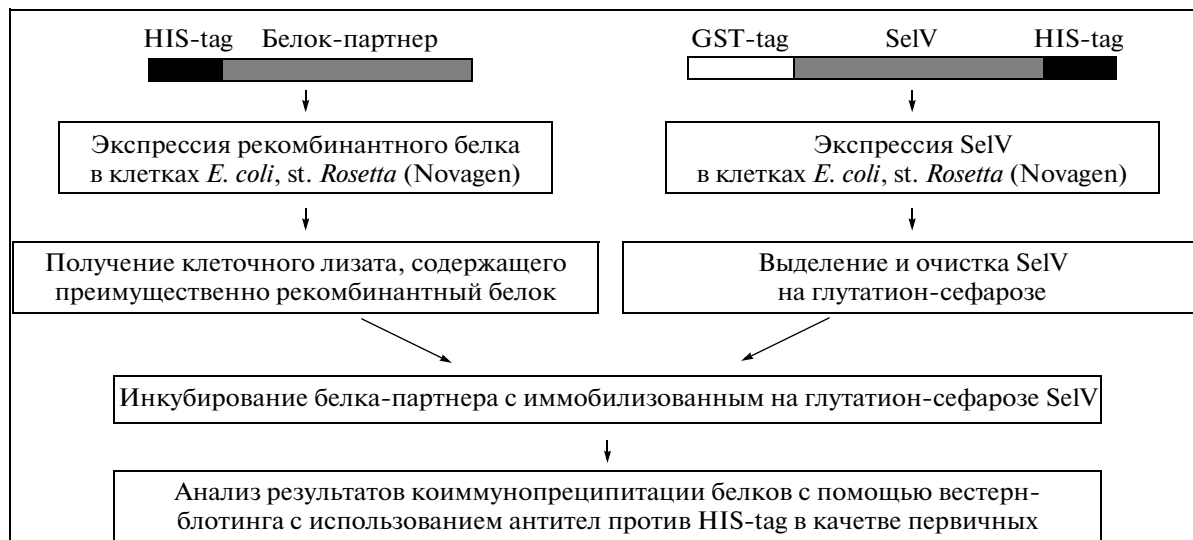


Рис. 2. Протокол опытов по коиммунопреципитации исследуемых белков.

ствуют о том, что таковыми являются OGT и белки, относящиеся к семейству ASB – Asb-17 и Asb-9.

На рис. 1. представлен ПААГ-электрофорез элюатов с соответствующих аффинных матриц.

Исследование специфичности взаимодействия SelV с его потенциальными партнерами методом коиммунопреципитации

Для подтверждения специфичности рассматриваемых взаимодействий использовали методы коиммунопреципитации. Протокол проведения этой серии опытов схематично изображен на рис. 2.

Поскольку OGT имеет консервативный N-концевой тетрапептидный домен, посредством которого, как было показано ранее [8], осуществляются белок-белковые взаимодействия, в опытах по коиммунопреципитации на аффинном матриксе SelV и OGT мы выбрали именно этот домен. Результаты, полученные с помощью Вестерн-блоттинга, свидетельствуют о том, что таким способом специфичность белок-белковых взаимодействий подтверждена лишь в случае SelV и N-концевого домена OGT, а также для SelV и Asb-9 (рис. 3а и б соответственно), тогда как Asb-17, согласно рис. 3в, не обнаруживается среди белков, связавшихся с иммобилизованным на колонке SelV.

Экспрессия мРНК SelV в семенниках крысы в процессе сперматогенеза и онтогенеза

При изучении экспрессии мРНК SelV в процессе сперматогенеза ранее [9–13] были определены интервалы возраста животного, в котором

происходят ключевые этапы созревания сперматозоидов (7, 14, 18, 23, 25, 31, 36 дней), которые, к тому же, соответствуют определенным периодам индивидуального развития крысы: периоду молочного кормления и началу периода полового созревания. Для определения мРНК SelV в процессе онтогенеза образцы тотальной РНК выделяли из семенников крысы в возрасте 2, 4 и 15 мес., соответствующих середине, завершению периода полового созревания и репродуктивного периода животного. Проводили обратную транскрипцию тотальной РНК, выделенной из семенников на указанных стадиях и полученную кДНК использовали в качестве матрицы в ПЦР с ген-специфичными праймерами. В качестве контроля, свидетельствующего о том, что в реакциях обратной транскрипции на всех интересующих нас стадиях сперматогенеза и онтогенеза использовалось одинаковое количество тотальной РНК (3 мкг), параллельно проводили амплификацию, применяя праймеры, специфичные для гена β-актина крысы. Данный ген обычно используют потому, что он относится к генам “домашнего хозяйства”, которые экспрессируются практически во всех тканях и клетках на относительно постоянном уровне и функционируют повсеместно, на всех стадиях жизненного цикла организма. При проведении ПЦР с использованием праймеров, комплементарных к 5'- и 3'-концам открытой рамки считывания гена β-актина крысы, наработка продукта реакции достигает насыщения уже на 23 цикле (рис. 4б). Далее проводили именно такое число циклов амплификации контрольного образца при изучении всех ранее установленных стадий сперматогенеза и онтогенеза крысы.

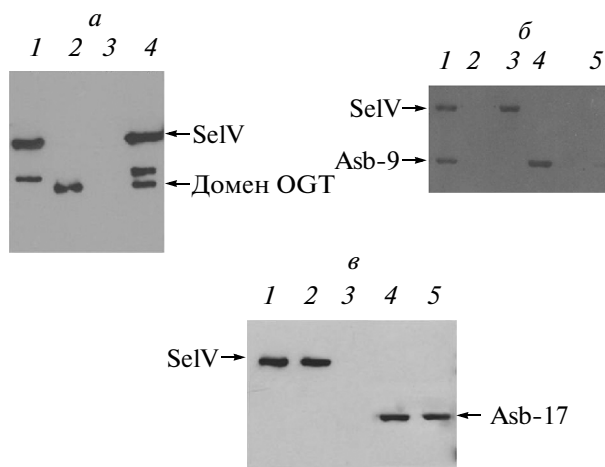


Рис. 3. Коиммунопреципитация SelV, иммобилизованного на глутатион-сефарозе, с его потенциальными белками-партнерами. *а:* 1 – SelV, аффинно-связавшийся с глутатион-сефарозой (контроль); 2 – рекомбинантный OGT домен, имеющий His-tag на С-конце (контроль); 3 – отсутствие OGT-домена на колонке с глутатион-сефарозой без SelV (контроль); 4 – OGT-домен среди белков, сорбированных на аффинный матрикс. *б:* 1 – Asb-9 среди белков, сорбированных на аффинный матрикс; 2 – отсутствие Asb-9 на колонке с глутатион-сефарозой без SelV (контроль); 3 – SelV, аффинно-связавшийся с глутатион-сефарозой (контроль); 4 – небольшое количество Asb-9 среди белков, не связавшихся с SelV (контроль). *в:* 1 – SelV, аффинно-связавшийся с глутатион-сефарозой (контроль); 2 – отсутствие Asb-17 среди белков, сорбированных на аффинный матрикс; 3 – отсутствие Asb-17 на колонке с глутатион-сефарозой без SelV (контроль); 4 – рекомбинантный Asb-17, имеющий His-tag на С-конце (контроль); 5 – Asb-17 среди белков, не связавшихся с SelV.

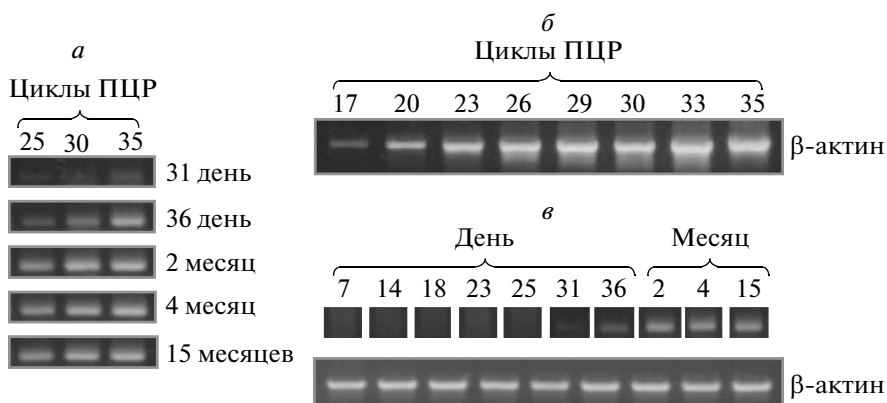


Рис. 4. Экспрессия мРНК SelV в семенниках крысы в процессе сперматогенеза и онтогенеза. *а* – Результаты амплификации открытой рамки считывания SelV после 25, 30 и 35 циклов ПЦР. В качестве матрицы в ПЦР использовали образцы кДНК, комплементарные мРНК, полученным на определенных стадиях постнатального развития крысы (31, 36 дней, 2, 4 и 15 мес.). *б* – Результаты амплификации открытой рамки считывания β -актина крысы после проведения указанных циклов ПЦР. *в* – Результаты амплификации открытой рамки считывания SelV крысы с матрицы, полученной на определенных стадиях сперматогенеза и онтогенеза, после проведения 35 циклов ПЦР. В качестве контроля, свидетельствующего о том, что в данном ПЦР-анализе на каждой стадии использовалось одинаковое количество матрицы, служат результаты амплификации открытой рамки считывания β -актина крысы, полученные после проведения 23 циклов ПЦР.

Представленные на рис. 4*а, б* результаты данной серии опытов показали, что мРНК SelV обнаруживается на поздних этапах сперматогенеза (зрелые сперматозоиды), которым, согласно [9], соответствуют 31-ый и 36-ой дни постнатального развития крысы, а также на всем протяжении периода полового созревания (2–4 мес.) и репродуктивного периода (15 мес.).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Таким образом, результаты, полученные при помощи двух независимых подходов – метода аффинной хроматографии в сочетании с масс-спектрометрическим анализом, а также метода коиммунопреципитации, – свидетельствуют о том, что SelV специфично взаимодействует с N-тетрапри-

копептидным доменом OGT и белком Asb-9. Было бы преждевременным утверждать, что связывание домена OGT с SelV свидетельствует о том, что и полноразмерный белок будет с ним взаимодействовать так же специфично, однако опубликованы экспериментальные доказательства того, что посредством именно этого домена OGT взаимодействует со своими партнерами [8].

В качестве партнера OGT, SelV может быть вовлечен в процессы, контролируемые данным белком; основным из этих процессов является участие в посттрансляционной модификации многих белков (с-Myc, с-Fos, с-Jun, p53, Sp1, tau, РНК-полимераза II, тубулин, винкулин и белки теплового шока) [14–19]. Данная регуляция обуславливается переносом N-ацетилглюкозамина к сериновым и треониновым остаткам белков-мишеней. Возможно, посттрансляционной модификации, катализируемой данным ферментом, подвергается и SelV. Помимо этого, OGT выполняет еще ряд важных функций, о чем свидетельствуют опыты по мутациям в гене данного белка, которые приводят к гибели культуры эмбриональных стволовых клеток, к нейрональной дисфункции и нарушению локомоторной активности у животных [20]. Недостаток OGT приводит к репрессии транскрипции, к модуляции белковой деградации, т.е. к регуляции белкового синтеза [15, 21, 22]. Таким образом, если наше предположение верно, а именно, что SelV принимает участие в регуляции OGT, то, скорее всего, он вовлечен в перечисленные выше метаболические процессы в клетке.

Два других белка, идентифицированных в качестве возможных партнеров SelV с помощью масс-спектрометрического анализа и относящиеся к семейству ASB, подобно SelV синтезируются преимущественно в семенниках [23, 24], поэтому рассмотрение этих белков в качестве партнеров SelV представлялось наиболее интересным. Однако в рамках данной работы подтверждена специфичность взаимодействия SelV только с Asb-9.

Asb-9 – представитель семейства белков ASB, содержащих анкириновые повторы и SOCS-домен-супрессор сигнализации цитокинов. К настоящему времени известно, что данное семейство представлено 18 белками (Asb-1 – Asb18), которые вовлечены в различные биологические процессы: пролиферацию и дифференцировку миелоидных клеток [25, 26], регуляцию мышечного роста [27, 28], инициацию процессов атеросклероза [29] и в другие. С помощью независимых подходов показано, что Asb-9 – партнер креатинкиназы головного мозга. В связи с этим высказано предположение, что Asb-9 может координировать новый молекулярный механизм посттрансляционной регуляции креатинкиназы [30]. Кроме того, при изучении уровня экспрессии

мРНК Asb-9 в процессе сперматогенеза и созревания семенников у мышей с помощью Нозерн-блот-гибридизации установлено, что мРНК данного белка в значительной степени экспрессируется в пубертатный период, соответствующий 4–6-недельному возрасту мыши, а также на протяжении всего репродуктивного периода, вплоть до 10-недельного возраста животного. Однако мРНК Asb-9 не обнаружена в эмбриональных стволовых клетках и ее экспрессия незначительна в семенниках мыши в возрасте 2 недель [23]. Сходные результаты относительно экспрессии мРНК SelV в семенниках крысы получены в настоящей работе. Конечно, на основании использованных в данной серии опытов ПЦР-анализа невозможно судить об интенсивности синтеза белка как в процессе развития сперматозоидов, так и в процессе онтогенеза в целом, однако, приведенные результаты свидетельствуют о синтезе мРНК SelV в семенниках крысы на заключительных этапах сперматогенеза, в период полового созревания и репродуктивный период. Таким образом, мРНК обоих белков присутствуют в семенниках на одних и тех же этапах сперматогенеза и онтогенеза грызунов, что, скорее всего, свидетельствует об одновременном синтезе и функционировании белков SelV и Asb-9, а также об их совместном участии в процессах, происходящих в данном органе.

Результаты коиммунопреципитации относительно белка Asb-17, показавшие, что его нет среди белков, связавшихся с иммобилизованным на колонке SelV, сложно интерпретировать на данном этапе работы. Для того, чтобы сделать достоверные выводы относительно партнерства двух белков, необходимы дополнительные опыты с использованием других независимых подходов.

Полученные в настоящей работе результаты позволяют также предположить и механизм, по которому осуществляются рассмотренные нами белок-белковые взаимодействия. Так, согласно рис. 1, мутантная форма SelV (CXXS) лучше связывается с белками-партнерами, что, скорее всего, подтверждает высказанное нами предположение о возможном сходстве механизмов каталитического взаимодействия рекомбинантного SelV (CXXC) и тиоредоксина. Это вовсе не означает, что нативный белок, который является селеноцистеиновым, будет взаимодействовать со своими партнерами аналогичным образом, так как, согласно ранее полученным данным, селеновые белки в 100–1000 раз более активны, чем их цистеиновые мутанты. Это объясняется высокой реакционной способностью селеноцистеина (pK_a свободного цистеина при нормальном pH составляет 8.18, а селеноцистеин – 5.73) [31]. Однако полученные результаты и тот факт, что SelV, наряду с другими селеновыми белками, является представителем семейства Rdx, свидетельствуют о

том, что он взаимодействует со своими партнерами по редокс-принципу. Это также подтверждается ранее полученными данными о гомологии С-концевого домена SelV, в котором находится каталитический центр белка (СХХУ), с другим селеновым белком млекопитающих – SeW [1]. Данный белок способен связываться в нативных условиях с семейством так называемых 14-3-3-белков [32], причем SelW не имеет канонических последовательностей для связывания с ними (R(S/X)XpSXP или RXXXpSXP, где X – любой аминокислотный остаток, pS – фосфорилированный сериновый остаток). Следовательно, он взаимодействует с ним по редокс-принципу, без участия электростатических сил [33].

Работа получила финансовую поддержку программы Президиума Российской академии наук “Молекулярная и клеточная биология” и программ ФЦП (ГК 02.740.11.0387 и ГК 16.512.11.2169), а также программы Президента по поддержке ведущих научных школ (НШ-3202.2010.4).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Kryukov G.V., Castellano S., Novoselov S.V., Lobanov A.V., Zehtab O., Guigor R., Gladyshev V.N. 2003. Characterization of mammalian selenoproteomes. *Science*. **300**, 1439–1443.
- Dikiy A., Novoselov S.V., Fomenko D.E., Sengupta A., Carlson B.A., Cerny R.L., Ginalski K., Grishin N.V., Hatfield D.L., Gladyshev V.N. 2007. SelT, SelW, SelH, and Rdx12: genomics and molecular insights into the functions of selenoproteins of a novel thioredoxin-like family. *Biochemistry*. **46**, 6871–6882.
- Holmgren A. 1995. Thioredoxin structure and mechanism: conformational changes on oxidation of the active-site sulfhydryls to a disulfide. *Structure*. **3**, 239–243.
- Motohashi K., Kondoh A., Stumpp M.T., Hisabori T. 2001. Comprehensive survey of proteins targeted by chloroplast thioredoxin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **98**, 11224–11229.
- Hatfield D.L., Gladyshev V.N. 2002. How selenium has altered our understanding of the genetic code. *Mol. Cell. Biol.* **22**, 3565–3576.
- Novoselov S.V., Kryukov G.V., Xu X.-M., Carlson B.A., Hatfield D.L., Gladyshev V.N. 2007. Selenoprotein H is a nucleolar thioredoxin-like protein with a unique expression pattern. *Biol. Chem.* **282**, 11960–11968.
- Castellano S., Lobanov A.V., Chapple C., Novoselov S.V., Albrecht M., Hua D., Lescure A., Lengauer T., Krol A., Gladyshev V.N., Guigó R. 2005. Diversity and functional plasticity of eukaryotic selenoproteins: Identification and characterization of the SelJ family. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **102**, 16188–16193.
- Iyer S.P., Hart G.W. 2003. Roles of the Tetratricopeptide repeat domain in O-GlcNAc transferase targeting and protein substrate specificity. *Biol. Chem.* **278**, 24608–24616.
- Leblond C.P., Clermont Y. 1952. Spermiogenesis of rat, mouse, hamster and guinea pig as revealed by the periodic acid-fuchsin sulfurous acid technique. *Am. J. Anat.* **90**, 167–215.
- Russell L.D., Alger L.E., Nequin L.G. 1987. Hormonal control of pubertal spermatogenesis. *Endocrinology*. **120**, 1615–1632.
- Meachem S.J., McLachlan R.I., Stanton P.G., Robertson D.M., Wreford N.G. 1999. FSH immunoneutralization acutely impairs spermatogonial development in normal adult rats. *J. Androl.* **20**, 756–762.
- Iguchi H., Watanabe M., Kamitani A., Nagai A., Hosoya O., Tsutsui K., Kumon H. 2002. Localization of dynamin 2 in rat seminiferous tubules during the spermatogenic cycle. *Acta Med. Okayama*. **56**, 205–209.
- Xu J., Beyer A.R., Walker W.H., McGee E.A. 2003. Developmental and stage-specific expression of Smad2 and Smad3 in rat testis. *Androl.* **24**, 192–200.
- Chou T.Y., Dang C.V., Hart G.W.J. 1995. Glycosylation of the c-Myc transactivation domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **92**, 4417–4421.
- Comer F.I., Hart G.W. 2001. Reciprocity between O-GlcNAc and O-phosphate on the carboxyl terminal domain of RNA polymerase II. *Biochemistry*. **40**, 7845–7852.
- Han I., Kudlow J.E. 1997. Reduced O glycosylation of Sp1 is associated with increased proteasome susceptibility. *Mol. Cell. Biol.* **17**, 2550–2558.
- Kamemura K., Hayes B.K., Comer F.I., Hart G.W. 2002. Dynamic interplay between O-glycosylation and O-phosphorylation of nucleocytoplasmic proteins: alternative glycosylation/phosphorylation of THR-58, a known mutational hot spot of c-Myc in lymphomas, is regulated by mitogens. *Biol. Chem.* **277**, 19229–19235.
- Kelly W.G., Dahmus M.E., Hart G.W. 1993. RNA polymerase II is a glycoprotein. Modification of the COOH-terminal domain by O-GlcNAc. *Biol. Chem.* **268**, 10416–10424.
- Miller M.W., Caracciolo M.R., Berlin W.K., Hanover J.A. 1999. Phosphorylation and glycosylation of nucleoporins. *Arch. Biochem. Biophys.* **367**, 51–60.
- Donnell N., Zachara N.E., Hart G.W., Marth J.D. 2004. Ogt-dependent X-chromosome-linked protein glycosylation is a requisite modification in somatic cell function and embryo viability. *Mol. Cell. Biol.* **24**, 1680–1690.
- Hart G.W. 1997. Dynamic O-linked glycosylation of nuclear and cytoskeletal proteins. *Annu. Rev. Biochem.* **66**, 315–335.
- McClain D.A., Lubas W.A., Cooksey R.C., Hazel M., Parker G.J., Love D.C. 2002. Altered glycan-dependent signaling induces insulin resistance and hyperleptinemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **99**, 10695–10699.
- Lee M.R., Kim S.K., Kim J.S., Rhim S.Y., Kim K.S. 2008. Expression of Murine Asb-9 During Mouse. *Mol. Cells*. **26**, 621–624.
- Guo J.H., Saiyin H., Wei Y.H., Chen S., Chen L., Bi G., Ma L.J., Zhou G.J., Huang C.Q., Yu L., Dai L.

2004. Expression of testis specific ankyrin repeat and SOCS box-containing 17 gene. *Arch. Andrology*. **50**, 155–161.
25. Guibal F.C., Moog-Lutz C., Smolewski P., Di Gioia Y., Darzynkiewicz Z., Lutz P.G., Cayre Y.E. 2002 ASB-2 Inhibits growth and promotes commitment in myeloid leukemia cells. *Biol. Chem*. **277**, 218–224.
26. Kohroki J., Fujita S., Itoh N., Yamada Y., Imai H., Yumoto N., Nakanishi T., Tanaka K. 2001. ATRA-regulated Asb-2 gene induced in differentiation of HL-60 leukemia cells *FEBS Lett*. **505**, 223–228.
27. McDanel T.G., Hancock D.L., Moody D.E. 2004. Altered mRNA abundance of ASB15 and four other genes in skeletal muscle following administration of β -adrenergic receptor agonists *Physiol. Genomics*. **16**, 275–283.
28. McDanel T.G., Hannon K., Moody D.E. 2006. Ankyrin repeat and SOCS box protein 15 regulates protein synthesis in skeletal muscle. *Am. J. Physiol*. **290**, 1672–1682.
29. Boengler K., Pipp F., Fernandez B., Richter A., Schaper W., Deindl E. 2003. The ankyrin repeat containing SOCS box protein 5: a novel protein associated with arteriogenesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. **302**, 17–22
30. Debrincat M.A., Zhang J.G., Willson T.A., Silke J., Connolly L.M., Simpson R.J., Alexander W.S., Nicola N.A., Kile B.T., Hilton D.J. 2007. Ankyrin repeat and suppressors of cytokine signaling box protein Asb-9 targets casein kinase B for degradation *Mol. Cell Biol*. **28**, 4728–4737.
31. Johansson L., Gafvelin G., Arnér E.S. 2005. Selenocysteine in proteins-properties and biotechnological use. *Biochim. Biophys. Acta*. **1726**, 1–13.
32. Aachmann F.L., Fomenko D.E., Soragni A., Gladyshev V.N., Dikiy A. 2007. Solution structure of selenoprotein W and NMR analysis of its interaction with 14-3-3 proteins. *J. Biol. Chem*. **282**, 37036–37044.
33. Rittinger K., Budman J., Xu J., Volinia S., Cantley L.C., Smerdon S.J., Gamblin S.J., Yaffe M.B. 1999. Structural analysis of 14-3-3 phosphopeptide complexes identifies a dual role for the nuclear export signal of 14-3-3 in ligand binding. *Mol. Cell*. **4**, 153–166.