

УДК 577.321

КОЛОКАЛИЗАЦИЯ СЕЛЕН-СОДЕРЖАЩЕГО БЕЛКА МЛЕКОПИТАЮЩИХ V (SelV) И ЕГО ПАРТНЕРОВ В КЛЕТКАХ МЛЕКОПИТАЮЩИХ

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

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

Поступила в редакцию 07.02.2012 г.

Принята к печати 13.03.2012 г.

Ключевые слова: селен-содержащий белок V, колокализация.

CO-LOCALIZATION OF SELENIUM-CONTAINING PROTEIN V (SelV) AND ITS PARTNERS IN MAMMALIAN CELLS, by E. G. Varlamova*, V. I. Novoselov (Institute of Cell Biophysics, Russian Academy of Sciences, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia, *e-mail: lenvarlamova@rambler.ru).

Keywords: selenoprotein V, co-localization.

Селен-содержащий белок V млекопитающих (SelV) (36.7 кДа) относится к семейству Rdx-белков: содержит консервативный мотив CXXC/CXXU (где С – цистеин, X – любая аминокислота, U – селеноцистеин) в каталитическом центре и имеет тиоредоксин-подобную укладку, что свидетельствует о его участии в окислительно-восстановительных реакциях [1]. Белок SelV – гомолог селен-содержащего белка W (SelW) и также несет дополнительный N-концевой пролин-богатый домен. Показано, что мРНК SelV экспрессируется исключительно в семенниках (сперматоцитах) [2]. Ранее нами идентифицированы возможные партнеры этого белка: O-ацетилглюкозаминтрансфераза (OGT), а также Asb-9 и Asb-17, относящиеся к семейству ASB (семейство белков, содержащих анкириновые повторы и SOCS-домен – супрессор сигнализации цитокинов). Однако специфичность этих белок–белковых взаимодействий методом коиммунопреципитации подтверждена лишь для SelV с OGT и с Asb-9, но не с Asb-17 [3, 5].

В данной работе показано, что в клетках млекопитающих линии COS-7 профили локализации SelV, N-концевого домена OGT и Asb-9 одинаковы, что может быть косвенным доказательством взаимодействия между этими белками в клетке.

Выделение нуклеиновых кислот. Выделение плазмидной ДНК проводили с использованием наборов Plasmid Purification Midi Kit (“Qiagen”). Для очистки продуктов ПЦР использовали про-

токол QIAquick PCR Purification Kit Protocol (“Qiagen”), предназначенный для очистки одной и двухцепочечных фрагментов ДНК из реакционной смеси ПЦР и других ферментативных реакций. При выделении и очистке продуктов ПЦР из агарозного геля применяли QIAquick Gel Extraction Kit Protocol (“Qiagen”).

Клонирование открытых рамок считывания генов исследуемых белков в составе вектора pEGFP-N2 (“Clontech”). Амплификацию открытых рамок считывания (ORF) генов N-концевого домена OGT, Asb-9 и Asb-17 проводили с использованием соответствующих праймеров: ogtF (5'-GATGGAATTCATGGCGTCTTCCGTGGGC-3') и ogtR (5'-CAATATGGGCCCTCAGGCTGACTCGTGA-3'), asb-9F (5'-AGTCGAATTCATGGATGTGAACAAAAGGG-3') и asb-9R (5'-CTATGGGCCCGAGGTGTAAAAGGAAGCG-3'), asb-17F (5'-GTTACTCGAGATGAATAACTCTTCTAAATATG-3') и asb-17R (5'-AATCGGGCCCGCTTCTAAATTCAGGAAG-3'). Полученные фрагменты обрабатывали рестриктазами (“Fermentas”, Литва) EcoRI и ApaI (для OGT-домена и Asb-9) или XhoI и ApaI (для Asb-17). Очистку от нуклеаз проводили с помощью горизонтального электрофореза. Реакцию лигирования выполняли, используя T4 ДНК-лигазу (“Fermentas”), при комнатной температуре в течение 3 ч. В случае с SelV использовали полученную ранее конструкцию, представленную вектором pEGFP-N2, несущую

Принятые сокращения: SelV – селен-содержащий белок V; OGT – O-ацетилглюкозаминтрансфераза; ASB – семейство белков, содержащих анкириновые повторы; SOCS-домен – супрессор сигнализации цитокинов; Asb-17, Asb-9 – белки, относящиеся к семейству ASB.

* Эл. почта: lenvarlamova@rambler.ru

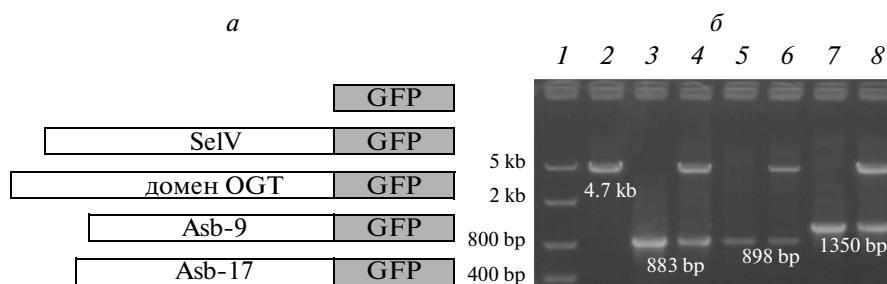


Рис. 1. Клонирование нуклеотидных последовательностей, кодирующих белки Asb-9, Asb-17 и N-концевой домен OGT, в составе вектора pEGFP-N2 (“Clontech”). *a* – Схематическое изображение конструкций, включающих гены исследуемых белков, в составе вектора pEGFP-N2 (“Clontech”). *б* – Электрофоретический анализ результатов скрининга колоний, содержащих исследуемые конструкции: ДНК-маркер (1); контрольный вектор pEGFP-N2 (2); ПЦР-анализ образцов, несущих последовательности открытых рамок считывания генов, кодирующих Asb-9, Asb-17 и N-концевой домен OGT в составе вектора pEGFP-N2 (соответственно 3, 5 и 7); рестрикционный анализ полученных образцов (4, 6 и 8).

щим ORF гена *selV*, кодирующую полноразмерный белок.

Транзиентная трансфекция и GFP-флуоресценция. Для определения внутриклеточной локализации партнеров исследуемого белка клетки млекопитающих линии COS-7 трансфицировали полученными конструкциями с помощью кальцийфосфатопосредованного метода в солевом буфере 50 мМ HEPES, pH 7.05, содержащем 280 мМ NaCl, 10 мМ KCl, 1.5 мМ Na₂HPO₄ · 2H₂O, 12 мМ декстрозу. Количество вносимой плазмидной ДНК составляло 8.8 мкг на монослой клеток на чашке Петри диаметром 60 мм. Трансфицированные клетки инкубировали при 37°C в CO₂-инкубаторе в течение 24 ч, затем отмывали в фосфатно-солевом буфере (PBS, pH 7.4), и ядра окрашивали красителем Dapi (“Promega”) в концентрации 300 нМ в течение 5 мин при комнатной температуре, после чего инкубировали с красителем, селективно проникающим в митохондрии MitoTracker Deep Red 633 (“Molecular Probe”) в концентрации 200 нМ в CO₂-инкубаторе в течение 15 мин при 37°C. Тщательно отмыв клетки в PBS (pH 7.4), фиксировали их в свежеприготовленном и охлажденном до 4°C растворе 4%-ного параформальдегида в PBS (pH 7.4) в течение 5 мин, после тщательной отмывки клетки помещали в среду глицерин : PBS (в соотношении 9 : 1). Результаты трансфекции визуализировали с помощью конфокального микроскопа Leica TCS SP5 (“Leica Microsystems”, Германия).

На рисунке 1 приведены результаты клонирования ORF генов исследуемых белков в составе вектора pEGFP-N2, а также схематично представлены полученные нами конструкции. Рисунок 2 отражает результаты трансфекции клеток линии COS-7 этими конструкциями. Ранее мы исследовали внутриклеточную локализацию SelV и отдельно его N- и C-концевых доменов в клетках млекопитающих этой же линии и показали,

что белок SelV локализуется в цитоплазме и ядрах клеток COS-7, но не в митохондриях [4].

Согласно результатам конфокальной микроскопии (рис. 2), Asb-9 и N-концевой домен OGT (последний выбран нами на основании данных о том, что именно этот тетратрикопептидный домен отвечает за белок-белковые взаимодействия OGT со своими партнерами [6]) имеют такой же паттерн внутриклеточной локализации, что и SelV. Белок Asb-17 локализован аналогично, будучи равномерно распределен в цитоплазме клеток и отсутствуя в митохондриях; однако отличие тоже имеется: этот белок не обнаружен в ядрах.

Метод колокализации белков в клетках млекопитающих – современный и достаточно распространенный метод, используемый для изучения специфичности белок-белковых взаимодействий, основным преимуществом которого считается возможность исследования таких взаимодействий в физиологических условиях – непосредственно в клетках, а не в клеточных лизатах или изолированных из них комплексах. Однако в том случае, когда внутриклеточная локализация исследуемых белков не ограничена каким-либо конкретным компартментом клетки, как, например, в случае белка SelV, достаточно сложно интерпретировать полученные результаты и с достоверностью говорить о специфичности рассматриваемых белок-белковых взаимодействий. Так, исследуемые в данной работе партнеры SelV, подобно ему, локализируются в цитоплазме и ядрах клеток, но существует большое количество других белков, которые имеют ядерно-цитоплазматическое распределение, однако далеко не все из них будут партнерами SelV. Несмотря на это, полученные результаты все-таки достаточно информативны, поскольку, подобно SelV, ни один из его потенциальных партнеров, не локализуется в митохондриях, что может служить косвенным доказательством их взаимодействия с белком SelV.

Работа поддержана грантом Президиума РАН “Молекулярная и клеточная биология” и программами ФЦП (ГК 02.740.11.0387 и ГК 16.512.11.2169), а также грантом Президента по поддержке ведущих научных школ (НШ-3202.2010.4).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. 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.
2. 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.
3. Варламова Е.Г., Новосёлов С.В., Новосёлов В.И., Фесенко Е.Е. 2011. Новый селен-содержащий белок млекопитающих V: поиск белков-партнеров. *Докл. Акад. Наук*. **441**, 399–401.
4. Варламова Е.Г. 2011. Внутриклеточная локализация селеновых белков млекопитающих: SelV (Selenoprotein V) и Grx6 (Glutathion peroxidase 6). *Фундаментальные исследования*. **9(2)**, 326–330.
5. Варламова Е.Г., Новосёлов В.И. 2012. Поиск партнеров нового селен-содержащего белка млекопитающих (SelV) и экспрессия его мРНК в процессе онтогенеза и сперматогенеза. *Молекуляр. биология*. **46**, 276–284.
6. 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.

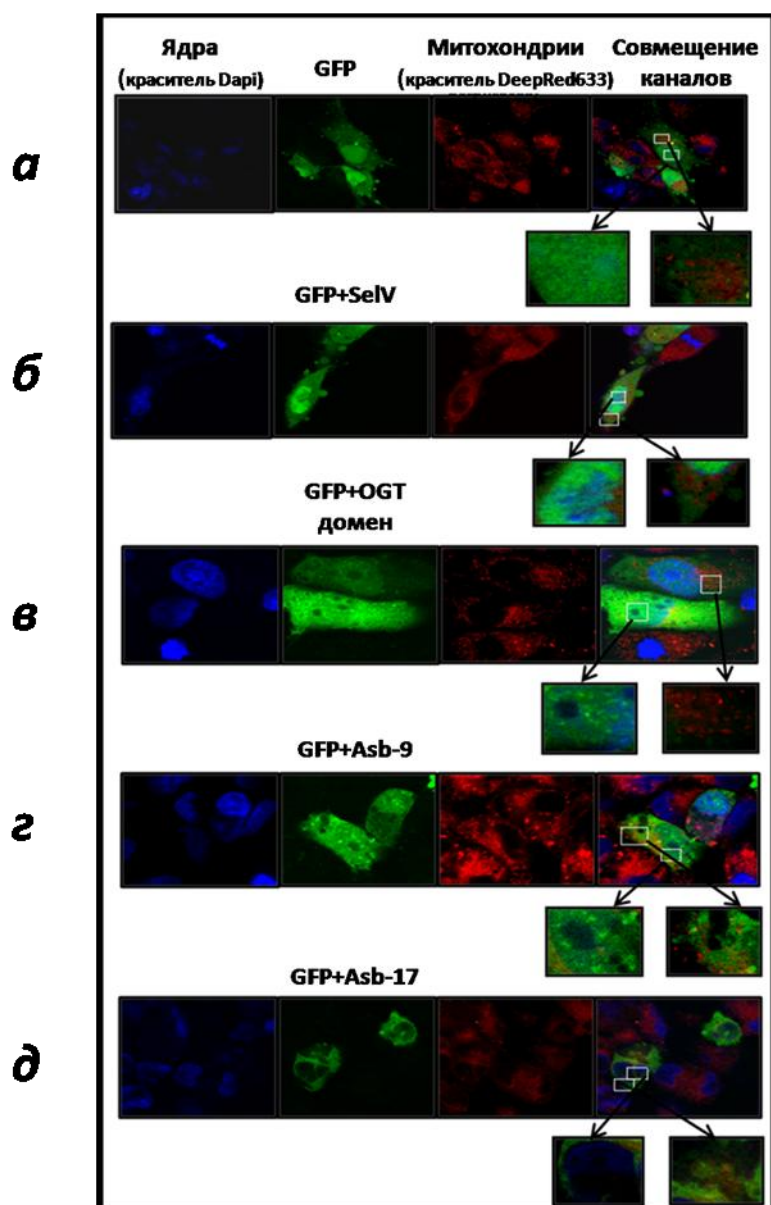


Рис. 2. Внутриклеточная локализация SelV и его потенциальных партнеров в клетках млекопитающих линии COS-7 методом кальцийфосфат-опосредованной трансфекции. *а* – GFP (контроль); *б* – SelV; *в* – N-концевой домен OGT; *г* – Asb-9; *д* – Asb-17. По вертикали: первый ряд фотографий – ядра, прокрашенные красителем Dapi (300 нМ); второй ряд – слитные с GFP белки; третий ряд – митохондрии, прокрашенные MitoTracker Deep Red 633 (200 нМ); четвертый – совмещение каналов *а–в*. Стрелками указаны фотографии, соответствующие увеличенным изображениям участков, ограниченных рамками белого цвета. Фотографии слева соответствуют изображениям участков ядер клеток; фотографии справа – участкам цитоплазмы.