

УДК 577.15.07

ВНУТРИКЛЕТОЧНАЯ ЛОКАЛИЗАЦИЯ СЕЛЕНОВЫХ БЕЛКОВ МЛЕКОПИТАЮЩИХ: SEL V (SELENOPROTEIN V) И GPX6 (GLUTATHION PEROXIDASE 6)

Варламова Е.Г.

Институт биофизики клетки Российской академии наук, Пущино, e-mail: admin@icb.psn.ru

Определена локализация новых селеновых белков SelV и GPx6 в клетках млекопитающих с помощью кальций-фосфатной трансфекции в тандеме с конфокальной микроскопией. Отдельно показано внутриклеточное распределение N-концевого и C-концевого доменов SelV. Установлено, что SelV и GPx6 локализуются в цитоплазме клеток, но не в митохондриях. Существенных отличий во внутриклеточном распределении как полноразмерного белка SelV, так и двух его доменов не наблюдается. Это может свидетельствовать об отсутствии сигнальных пептидов, обеспечивающих посттрансляционный транспорт данного белка.

Ключевые слова: внутриклеточная локализация, селеновые белки

INTRACELLULAR LOCALISATION OF MAMMALIAN SELENOPROTEINS: SEL V (SELENOPROTEIN V) AND GPX6 (GLUTATHION PEROXIDASE 6)

Varlamova E.G.

Institute of Cell Biophysics, Russian Academy of Sciences, Pushchino, e-mail: admin@icb.psn.ru

The localization of new selenoproteins SelV and GPx6 in mammalian cells by phosphate transfection in tandem with a confocal microscopy is determined. The intracellular distribution of N-terminal and C-terminal domain of SelV is separately shown. It is established that both SelV and GPx6 localize in the cytoplasm of cells but not in mitochondria. Significant differences in the intracellular distribution of a full-length protein SelV, and its two domains are not observed. It may indicate a lack of signal peptides that provide post-translational transport of the protein.

Keywords: intracellular localization, selenoproteins

В настоящее время известно 25 селеновых белков млекопитающих, однако функции большинства из них до сих пор остаются неизученными. Ранее было показано, что SelV (Selenoprotein V) локализуется исключительно в семенниках, его C-концевой домен гомологичен другому селеновому белку млекопитающих SelW (Selenoprotein W) [8]. Кроме того, SelV входит в семейство редокс белков (Rdx), представители которого характеризуются наличием тиоредоксин-подобной укладки и консервативного мотива в своём каталитическом центре, что предполагает участие SelV в окислительно-восстановительных реакциях [5]. GPx6 (глутатионпероксидаза 6) является гомологом ранее охарактеризованных белков семейства глутатионпероксидаз. Согласно *in situ* гибридизации, GPx6 экспрессируется в Боуменовых железах, где синтезируются и секретируются многие компоненты обонятельной слизи. Кроме того, было показано, что GPx6 экспрессируется в тканях млекопитающих на ранних стадиях эмбрионального развития [8].

Целью исследования настоящей работы явилось определение внутриклеточной локализации белков SelV и GPx6 мыши, а также отдельно N-концевого и C-концевого доменов SelV в клеточной линии COS-7 (фибробласты почки обезьяны *Cercopithecus aethiops*).

Материал и методы исследования

Биоинформационный анализ

Поиск нуклеотидных и аминокислотных последовательностей исследуемых белков проводили в GenBank базе данных [3, 4]. Для составления прогноза внутриклеточной локализации SelV и GPx6 по его аминокислотной последовательности использовали программу PSORTII [1, 6, 7], наличие и расположение сигнальных последовательностей белков определяли с использованием программы SignalP [2].

Выделение нуклеиновых кислот

Выделение РНК из тканей семенников и обонятельного эпителия мыши проводили с помощью набора «RNeasy Mini Kit» («Qiagen», США). Образцы гомогенизировали в 600 мкл буфера, содержащего 4М гуанидин тиоционат и 1% β-меркаптоэтанол. Полученный гомогенат использовали для выделения РНК.

Выделение плазмидной ДНК выполняли с помощью наборов «Plasmid Purification Mini Kit» и «Plasmid Purification Midi Kit» («Qiagen», США). Для высвобождения плазмидной ДНК бактериальные клетки подвергали щелочному лизису в присутствии 1% додецилсульфата натрия. Полученный лизат нейтрализовали раствором 1М ацетата калия, рН 5.0 и наносили ДНК на мембрану колонки. Для удаления примесей адсорбированную ДНК промывали раствором, содержащим 1М хлорида натрия, 15% изопропанола, 50мМ MOPS, рН 7.0. Очищенную плазмиду элюировали небольшим количеством Трис-буфера.

Методика проведения обратной транскрипции и ПЦР

Реакцию обратной транскрипции проводили по протоколу и с использованием реактивов, предо-

ставленных «Fermentas» («RevertAid™ H Minus First cDNA Synthesis Kit»). Количество общей РНК в реакционной смеси составило 3 мкг. Реакцию проводили с использованием oligodT праймеров. Полученную кДНК использовали для проведения полимеразной цепной реакции.

Клонирование и сайт-направленный мутагенез

Для встраивания нуклеотидных последовательностей полноразмерного белка SelV и его доменов, ПЦР-фрагменты обрабатывали рестриктазами EcoRI и XhoI («Fermentas»). Клонирование открытой рамки считывания гена белка Grx6 в вектор pEGFP-N2 («Clontech») проводили с использованием рестриктаз EcoRI и ApaI («Fermentas»). Реакцию лигирования выполняли, используя T4 ДНК-лигазу («Fermentas»).

Реакции по сайт-направленному мутагенезу проводились с использованием реактивов и по протоколу, предложенному «Stratagene» («Quick Change Kit»).

Транзientная трансфекция, иммунофлуоресценция, конфокальная микроскопия

Для введения плазмидной ДНК в клетки млекопитающих использовали метод кальций-фосфатной трансфекции. Для этого 8.8 мкг плазмидной ДНК (на 10^5 – 10^7 клеток) инкубировали с 2М CaCl₂ в 2х солевом буфере HEPES (280 мМ NaCl, 10 мМ KCl, 1,5 мМ Na₂HPO₄×2H₂O, 12 мМ декстрозы, 50 мМ HEPES, pH 7.05) в течение 30 минут при комнатной температуре, после чего вносили в клетки. Спустя 24 часа клетки отмывали от среды с помощью PBS (pH 7.4). Ядра клеток окрашивали 0,1%-м раствором этидиума бромидом в течение 5 минут, для определения митохондриальной локализации белков трансфицированные клетки инкубировали с красителем, селективно проникающим в митохондрии MitoTracker Deep Red 633 (Molecular Probe, USA). Фиксировали клетки раствором 4%-м параформальдегида при 4°C в течение 5 минут. Результаты трансфекции визуализировали с помощью конфокального микроскопа «Leica TCS SP5».

Результаты исследований и их обсуждение

Ранее с помощью компьютерной программы «PSORTII», позволяющей предсказывать внутриклеточную локализацию белка по его первичной структуре, и программы «SignalP», определяющей наличие и расположение сигнальных последовательностей, нами установлено, что селеновый белок V не является секреторным и с вероятностью 65,2% локализуется в митохондриях. Тогда как Grx6, согласно *in silico* анализу, является секреторным белком с вероятностью 66,7%, что согласуется с ранее полученными данными о его локализации в обонятельном эпителии [8]. Программа «PSORTII» использует k-NN алгоритм (k-Nearest Neighbor) для поиска сайтов в первичной последовательности белков, обуславливающих их расположение внутри клетки. Однако

данный поиск является не совсем эффективным в том случае, когда анализируемый белок не имеет выраженной сигнальной последовательности, что характерно и для SelV и Grx6.

Для того чтобы экспериментально проверить правильность результатов полученных *in silico*, селеноцистеин, находящийся в 255 положении открытой рамки считывания мышинового SelV, путем сайт-направленного мутагенеза был заменен на цистеин. Данная замена обусловлена особенностями встраивания селеноцистеина в синтезируемые полипептидные цепи напротив TGA кодона у эукариот, для которых характерно расположение SECIS-элемента в 3'-нетранслируемой области мРНК селенопротеиновых генов. Поскольку в данном эксперименте клонировали плазмиду, содержащую открытую рамку считывания гена SelV, не имеющую последовательности SECIS-элемента, то сайт-специфичная мутация позволила избежать терминации трансляции белка на 255 кодоне и синтезировать цистеиновый вариант SelV. Поскольку Grx6 грызунов является цистеин-содержащим ортологом, не возникло необходимости проводить сайт-направленный мутагенез, сопровождающийся заменой селеноцистеинового кодона на цистеиновый с целью предотвращения преждевременной терминации трансляции.

Для визуализации результатов с помощью конфокальной микроскопии последовательности открытых рамок считывания SelV и его N-концевого (пролин-богатого) и C-концевого доменов, а также Grx6 были клонированы в составе вектора pEGFP-N2 («Clontech»). Вышеописанные химерные конструкции SelV были приготовлены для решения вопроса о том, какой из его доменов отвечает за внутриклеточную локализацию, поскольку сигнальная последовательность у разных белков может располагаться как на N-, так и на C-концах. Как было отмечено ранее, *in silico* анализ аминокислотной последовательности SelV выявил гомологию его C-концевого домена с известным селенопротеином W (SelW), который является цитоплазматическим белком, поэтому определить внутриклеточное расположение данного домена SelV представляло особенный интерес. Схематично варианты химерных конструкций отдельно SelV и его доменов, а также Grx6 в составе вектора pEGFP-N2 представлены на рис. 1 А и Б.

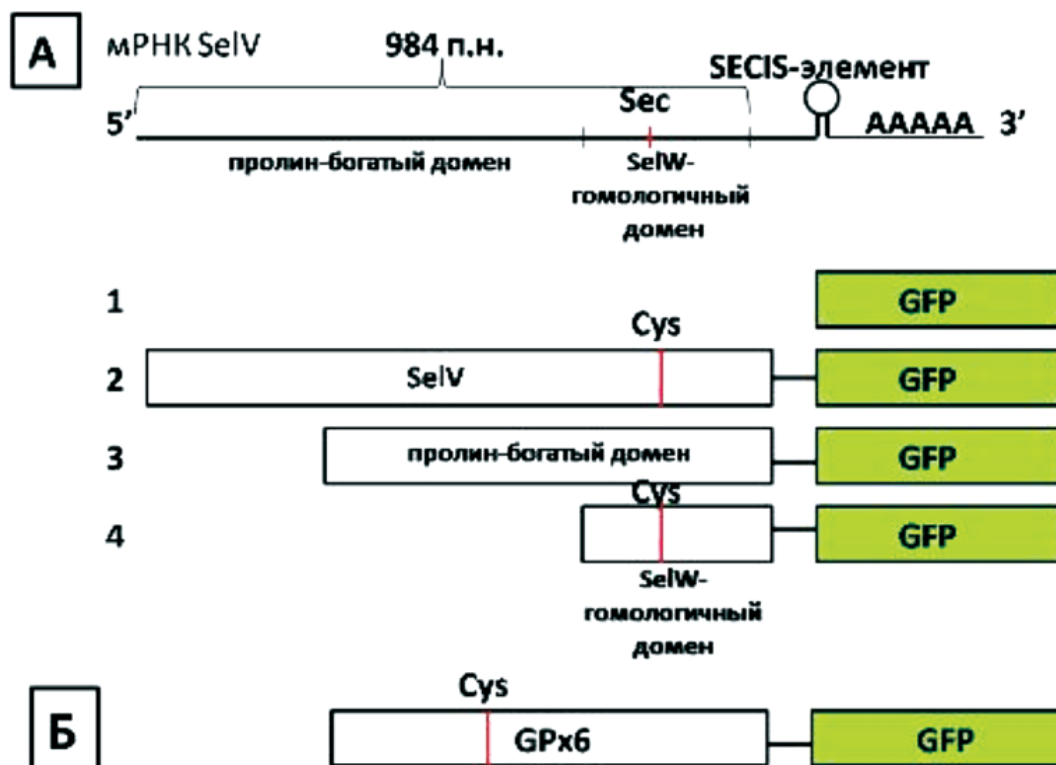


Рис. 1. Схематическое изображение химерных конструкций, включающих SelV, его домены и GPx6 в составе вектора pEGFP-N2 («Clontech»):

А – 1 – GFP-контроль; 2 – последовательность открытой рамки считывания SelV (Sec->Cys) с GFP; 3 – последовательность пролин-богатого домена SelV с GFP; 4 – последовательность C – концевой SelW-гомологичного домена с GFP;
 Б – последовательность открытой рамки считывания GPx6 с GFP

Визуализация результатов с помощью конфокальной микроскопии не выявила существенных отличий во внутриклеточной локализации полноразмерного SelV и двух его доменов (рис. 2, А). Наблюдается равномерное распределение белков в цитоплазме клеток и некоторое накопление этих белков, по сравнению с контролем, в структурах ядра.

В отличие от относительно диффузного распределения SelV в цитоплазме клеток, локализация GPx6 не является равномерной, данный белок экспрессируется в определенных клеточных органеллах – предположительно, в митохондриях (рис. 2, Б).

Для того чтобы проверить возможность экспрессии исследуемых белков в митохондриях, были проведены эксперименты по их ко-локализации с красителем, специфично окрашивающим эти клеточные органеллы. Представленные на рис. 3, А и Б результаты данной серии экспериментов свидетельствуют об отсутствии ко-локализации SelV и GPx6 с митохондриальным красителем.

Заключение

В данной работе определена локализация новых селеновых белков млекопитающих SelV и его N- и C-концевого доменов, а также GPx6 в клетках линии COS-7. Результаты, полученные с помощью конфокальной микроскопии, показали, что SelV и GPx6 являются цитоплазматическими белками, не локализующимися в митохондриях. Поскольку внутриклеточное распределение N- и C-концевого доменов не отличается от такового для SelV, можно заключить, что в первичной последовательности SelV отсутствуют сигнальные пептиды, обеспечивающие посттрансляционный транспорт данного белка, в частности, в митохондрии, что не согласуется с *in silico* предсказанием, выполненным при помощи программы PSORTII. Таким образом, подобно SelW, селенопротеин V имеет преимущественно цитоплазматическую и частично, по сравнению с контролем, ядерную локализацию.

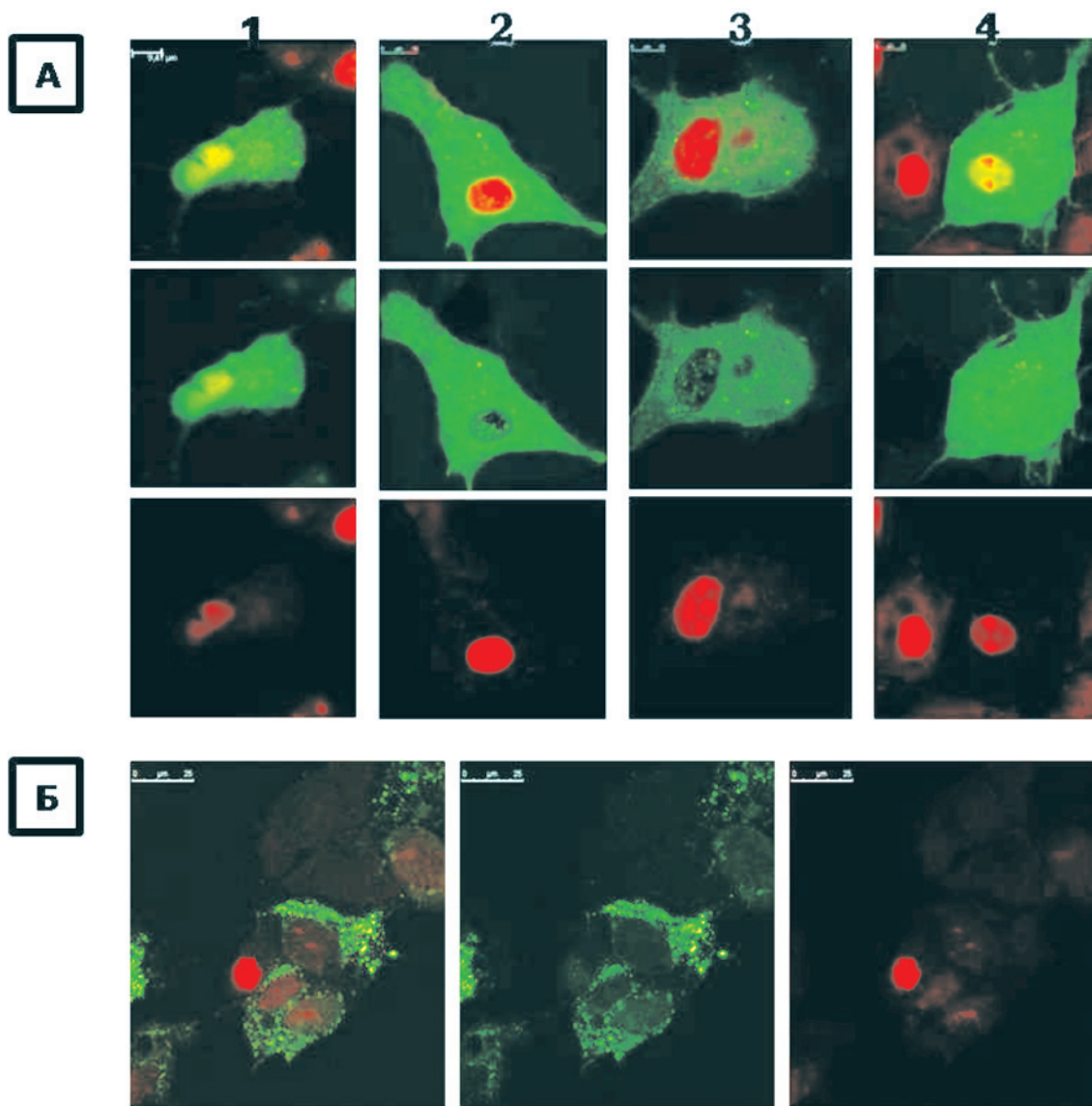


Рис. 2. Внутриклеточная локализация SelV, его доменов и GPxb в клетках млекопитающих линии COS-7: А – 1 – локализация GFP в клетках, трансфецированных вектором pEGFPN2 («Clontech») (контрольный образец); 2 – клетки, трансфецированные вектором pEGFPN2 («Clontech»), содержащим последовательность SelV; 3 – клетки, трансфецированные вектором pEGFPN2, содержащим последовательность N-концевого домена SelV; 4 – клетки, трансфецированные вектором pEGFPN2, содержащим последовательность C-концевого домена SelV. Нижний ряд фотографий: ядра клеток, прокрашенные 0,1% этидиум бромидом; средний ряд: локализация вышеописанных рекомбинантных белков совместно с GFP; верхний ряд: совмещение фотографий нижнего и среднего рядов; Б – внутриклеточная локализация GPxb. Справа-налево: ядра клеток, прокрашенные 0,1% этидиум бромидом; локализация GPxb совместно с GFP; совмещение этих фотографий

Список литературы

1. Extensive feature detection of N-terminal protein sorting signals / H. Bannai et al. // J. Bioinformatics. – 2002. – Vol. 18, №2. – P. 298–305.
2. Improved predictions of signal peptides: SignalP 3.0 / J.D. Bendtsen et al. // J. Mol. Biol. – 2004. – Vol. 340, №4. – P. 783–795.
3. GenBank / D.A. Benson, I. Karsch-Mizrachi, D.J. Lipman, J. Ostell, D.L. Wheeler // Nucleic Acid Res. – 2006. – Vol. 34. – P. 16–20.
4. Benton D.A. Recent changes in the GenBank On-line Service // J. Nucleic Acid Res. – 1990. – Vol. 18, №6. – P. 1517–1520.
5. SelT, SelW, SelH, and Rdx12: genomics and molecular insights into the functions of selenoproteins of a

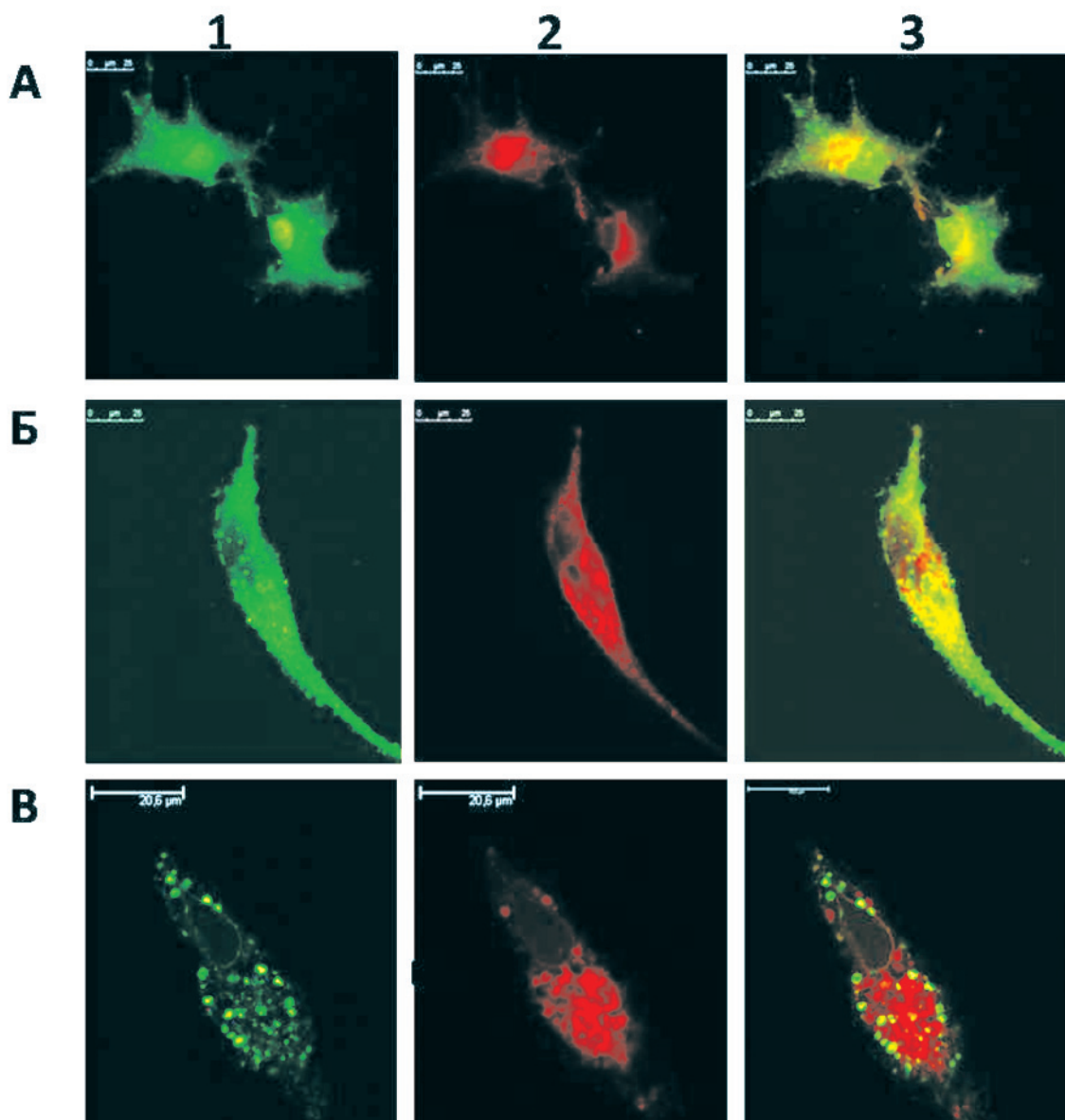


Рис. 3. Определение локализации белков SelV в GPx6, находящихся в составе вектора pEGFPN2 («Clontech») в митохондриях клеток млекопитающих линии COS-7:

A – локализация GFP в клетках, трансфицированных вектором pEGFPN2 («Clontech») (контрольный образец); B – локализация SelV, совмещенного с GFP; B – локализация GPx6, совмещенного с GFP; 1 – локализация вышеописанных рекомбинантных белков совместно с GFP; 2 – митохондрии клеток, инкубированные с красителем, селективно проникающим в митохондрии; 3 – совмещение фотографий 1 и 2

novel thioredoxin-like family / A. Dikiy, S.V. Novoselov, D.E. Forenoon, A. Sengupta, B.A. Carlson, R.L. Cerny, K. Ginalski, N.V. Grishin, D.L. Hatfield, V.N. Gladyshev // J. Biochemistry. – 2007. – Vol. 46. – P. 6871–6882.

6. Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence / O. Emanuelsson et al. // J. Mol. Biol. – 2000. – Vol. 300, №4. – P. 1005–1016.

7. Horton P., Nakai K. Better prediction of protein cellular localization sites with the *k* nearest neighbors classifier // J. Proc Int Conf Intell Syst Mol Biol. – 1997. – Vol. 5. – P. 147–152.

8. Characterization of mammalian selenoproteomes / G.V. Kryukov, S. Castellano, S.V. Novoselov, A.V. Lobanov,

O. Zehtab, R. Guigor, V.N. Gladyshev // J. Science. – 2003. – Vol. 300. – P. 1439–1443.

Рецензенты:

Озолин О.Н., д.б.н., профессор, ведущий научный сотрудник Института биофизики клетки РАН, г. Пущино;

Новоселова Е.Г., д.б.н., профессор, главный научный сотрудник Института биофизики клетки РАН, г. Пущино.

Работа поступила в редакцию 28.04.2011.