

**А.В. Брыксин, Б.П. Челобанов, Н.В. Володько, В.В. Власов,
П.П. Лактионов**

ВЛИЯНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ С НУКЛЕИНОВЫМИ КИСЛОТАМИ НА ВНУТРИКЛЕТОЧНОЕ РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ГЛИЦЕРАЛЬДЕГИД-3-ФОСФАТ ДЕГИДРОГЕНАЗЫ (GAPDH)

Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск
ГУ НИИ биохимии СО РАМН, Новосибирск

Клеточная локализация глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназы и комплексов фермента с дезоксирибоолигонуклеотидами была исследована при помощи флуоресцентной микроскопии с использованием антител против GAPDH и аффинной модификации фермента с использованием реакционно-способных производных олигонуклеотидов. Было показано, что взаимодействие с дезоксирибоолигонуклеотидами приводит к накоплению модифицированного фермента в ядрах клеток линий A431, HeLa и HaCat, в то время как немодифицированная форма GAPDH локализуется главным образом в цитоплазме клеток. Эти данные и данные о том, что окисленная форма GAPDH обладает повышенным сродством к нуклеиновым кислотам, позволяют предположить, что окисление GAPDH при окислительном стрессе может приводить к накоплению фермента в ядре за счет комплексообразования с внутриклеточными или внеклеточными нуклеиновыми кислотами.

Ключевые слова: глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназа, ядерная локализация, антитела, алкилирующие производные олигонуклеотидов, GAPDH

В настоящее время достоверно показано, что глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназа является полифункциональным белком и выполняет ряд функций как в цитоплазме, так и в ядрах клеток. Так, например, было показано, что GAPDH связывается с микротрубочками, модулирует их конденсацию и участвует в слиянии клеточных мембран [1]. GAPDH участвует в регуляции кальциевого баланса клетки связываясь с рецептором инозитол 1,4,5-трифосфата [2]. Находясь в ядре, GAPDH участвует в транскрипции генов, DNA репликации, DNA репарации и в экспорте ядерной RNA [3]. Группой Сировера было показано, что GAPDH может функционировать как урацил-DNA гликозилаза и репарировать повреждения в DNA, вызванные дезаминированием цитозина [4]. В другой работе этой же группы было показано, что концентрация GAPDH в ядре зависит от фазы клеточного цикла [5]. В работе Zheng и соавторов GAPDH была идентифицирована как необходимый компонент мультикомпонентного Oct-1 коактиватора — OCA-S, необходимого для транскрипции генов гистона H2B во время прохождения клеткой S-фазы [6]. Эти данные согласуются с сообщением о том, что GAPDH была идентифицирована как ssDNA-связывающий белок и предположительно является активатором транскрипции в нейронах [7]. В недавних исследованиях было показано, что GAPDH играет важную роль

в апоптозе, часто ассоциированным с окислительным стрессом [8]. Считается, что в ходе апоптоза происходит перераспределение GAPDH между ядром и цитоплазмой за счет транспорта GAPDH в комплексе с Siah1 протеазой из цитоплазмы в ядро. По общепринятому мнению, накопление GAPDH в ядре свидетельствует о неминуемой гибели клетки. Таким образом, очевидно, что фермент выполняет множество функций находясь в ядре клетки и изучение процессов, приводящих к накоплению GAPDH в ядрах клеток является важной задачей.

Известно, что GAPDH связывает РНК и ДНК [9, 10]. При помощи разных подходов локализованы участки связывания нуклеиновых кислот на молекуле GAPDH, выявлены мотивы, преимущественно связывающиеся с молекулой GAPDH [11]. Показано, что окисленная форма GAPDH связывает нуклеиновые кислоты с большей эффективностью, чем не окисленная [12]. Однако биология взаимодействия GAPDH с нуклеиновыми кислотами не известна, хотя, вполне вероятно, что такое взаимодействие может влиять на распределение фермента между ядром и цитоплазмой и оказывать действие на биологические процессы, в реализации которых участвует GAPDH.

Мы исследовали распределение GAPDH и комплексов GAPDH с 21-звенным дезоксири-

боолигонуклеотидом и его укороченным аналогом в ядрах и цитоплазме клеток линий A431, HeLa и HaCat. Было показано, что GAPDH локализуется преимущественно в цитоплазме клеток линий A431, HeLa и HaCat, в то время как образование комплексов GAPDH с 21-звенным дезоксирибоолигонуклеотидом приводит к накоплению значительного количества фермента в ядрах клеток. Полученные результаты свидетельствуют о том, что транслокация фермента в ядро может усиливаться в присутствии внутриклеточных либо внеклеточных нуклеиновых кислот, имеющих в своей структуре последовательности, обладающие высоким сродством к GAPDH.

Материалы и методы

Радиоактивную метку ^{32}P вводили в олигонуклеотиды 5'-pCAGTAAATATCTAGGA (p(N) $_{16}$) и 5'-pTACAGTAAATATCTAGGAATG (p(N) $_{21}$) («Биоссет», Новосибирск, Россия) обменом 5'-концевого фосфата с помощью T4-полинуклеотидкиназы. Алкилирующую группировку (CIR) вводили присоединением 4-[(N-2-хлорэтил-N-метил)амино]бензиламина к 5'-концевому фосфату олигонуклеотидов по описанному ранее методу [13].

Препарат GAPDH выделяли из эритроцитов человека как описано в [14]. Кроликов породы «Шиншилла» весом $1,7 \pm 0,3$ kg иммунизировали подкожно 500 μg препарата GAPDH (примесей $\leq 10\%$), эмульгированного с равным объемом полного адьюванта Фрейнда. Повторную иммунизацию проводили через 21 день и, затем с интервалом 2 недели 100 μg антигена, эмульгированного с равным объемом неполного адьюванта Фрейнда. Для проверки титра и выделения антител кровь забирали из краевой вены уха кролика непосредственно перед иммунизацией и через 1 неделю после 3-й и последующих иммунизаций. Антитела очищали из сыворотки преципитацией сульфатом аммония с последующей аффинной хроматографией на сорбенте с иммобилизованной GAPDH и истощением антител против неполного лизата клеток HeLa, дефицитного по GAPDH (преципитат, полученный при 50% насыщении лизата клеток HeLa сульфатом аммония) [15]. Для получения флуоресцеин-меченых козьих антител против IgG кролика (GAR-Flu) GAR инкубировали с раствором флуоресцеинизотионата в 0,1 М карбонатном буфере pH 9,5 в течение 2 ч. Избыток не прореагировавшего флуоресцеинизотионата отделяли гель-фильтрацией на сефадексе G-25sf.

Клетки линий A431 (эпидермальная карцинома человека), HeLa (карцинома шейки матки человека) и HaCat (иммортиализованные кератиноциты человека), культивировали в среде ДМЕМ

(Sigma), содержащей 10% ЭТС и антибиотики (пенициллин и стрептомицин, 100 ед/мл). Для экспериментов по аффинной модификации клетки рассеивали на 24-луночные планшеты, а для микроскопии на 8-луночные камеры (Chamber Slide, Nunc Inc.) за 1-2 дня до эксперимента. Культуры клеток использовали при плотности не более 70% от монослоя. Жизнеспособность клеток определяли окрашиванием клеток трипановым синим.

Для проведения аффинной модификации клетки дважды промывали фосфатно-солевым буфером (PBS) и инкубировали с 1 мкМ раствором производного олигонуклеотида в PBS в течение 1 ч при 37 °C. После инкубации клетки трижды промывали PBS, разделяли на мембранно-цитозольную (МЦ) и ядерную (Я) фракции и анализировали белки при помощи DS-Na-диск-электрофореза в градиентном (10 20%) ПААГ как описано ранее [16].

Для исследований локализации GAPDH при помощи флуоресцентной микроскопии клетки трижды отмывали средой ДМЕМ, фиксировали метанолом и инкубировали в среде ДМЕМ с кроличьими АТ против GAPDH в течение 2 часов. Затем трижды отмывали средой ДМЕМ и инкубировали 1 час с флуоресцеин-мечеными козьими антителами против IgG кролика. После инкубации клетки трижды отмывали PBS, отделяли предметное стекло с клетками от камеры, удаляли избыток PBS фильтровальной бумагой, наслаивали среду для поддержания флуоресценции (DACO® Fluorescent mounting medium), накрывали покровным стеклом и анализировали при помощи флуоресцентной микроскопии.

Электрофорез в нативных условиях проводили как описано в [13]. Денситометрия электрофоретических данных и данных флуоресцентной микроскопии были выполнены в программе ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>). Статистическую обработку данных проводили в программе GraphPad Prism (<http://www.graphpad.com/prism/Prism.htm>).

Результаты и обсуждение

Ранее нами было показано, что в нативных условиях олигонуклеотиды определенной последовательности (p(N) $_{21}$ и p(N) $_{16}$) способны образовывать стабильные комплексы с GAPDH при инкубации с ядерным экстрактом клеток линии HeLa [13].

Для того, чтобы выяснить является ли связывание таких олигонуклеотидов с GAPDH уникальной характеристикой клеток линии HeLa или оно наблюдается в клетках разных линий, мы инкубировали ядерные экстракты клеток линий HeLa, A431, HaCat и, в качестве контроля, очищенный препарат GAPDH с радиоактивно меченым оли-

гонуклеотидом $p(N)_{21}$. Образование комплексов олигонуклеотидов с GAPDH анализировали при помощи электрофореза в нативных условиях с последующей радиоавтографией (Рис. 1а). Как видно из рисунка, образование комплекса GAPDH- $p(N)_{21}$ наблюдается в ядерных экстрактах всех исследованных клеток и, по-видимому, является универсальным свойством глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназы.

Исследование локализации молекул GAPDH и олигонуклеотидов методом флуоресцентной микроскопии позволяет выяснить их взаимное расположение в клетке, однако не позволяет однозначно утверждать, что эти молекулы находятся в комплексе друг с другом. Для анализа распределения комплекса GAPDH с олигонуклеотидом $p(N)_{21}$ между ядерной и мембранно-цитозольной фракциями клеток мы использовали аффинную модификацию GAPDH радиоактивно-меченым алкилирующим производным олигонуклеотида (CIRp(N)₁₆), которая приводит к формированию ковалентных комплексов между белком и олигонуклеотидом, не влияя при этом на специфичность комплексообразования [13]. Ковалентные комплексы между GAPDH и CIRp(N)₁₆, полученные в результате инкубации CIRp(N)₁₆ с ядерными экстрактами клеток линий HeLa, A431 и HaCat идентифицировали после электрофореза в денатурирующем ПААГ с последующей радиоавтографией (Рис. 1б). Как видно из рисунка 1, введение алкилирующей группы в олигонуклеотид $p(N)_{21}$, а так же использование более короткого аналога олигонуклеотида $p(N)_{16}$ не влияют на специфичность комплексообразования с GAPDH.

Для локализации внутриклеточного распределения комплекса GAPDH-олигонуклеотид мы проводили инкубацию живых клеток HeLa, A431 и HaCat с алкилирующими производными CIRp(N)₁₆, как описано в материалах и методах, и, после разделения клеток на мембранно-цитозольную и ядерную фракции, анализировали содержи-

мое фракций электрофорезом в денатурирующих условиях (Рис. 2а). Анализ полученных данных свидетельствует о том, что в ходе инкубации клеток линий HeLa, A431 и HaCat с алкилирующими производными олигонуклеотида происходит накопление комплекса в ядрах клеток (Рис. 2б).

Чтобы сопоставить полученные данные о распределении комплексов GAPDH- $p(N)_{16}$ с данными по распределению GAPDH в клетках, мы выделили GAPDH из эритроцитов человека и получили кроличьи поликлональные антитела про-

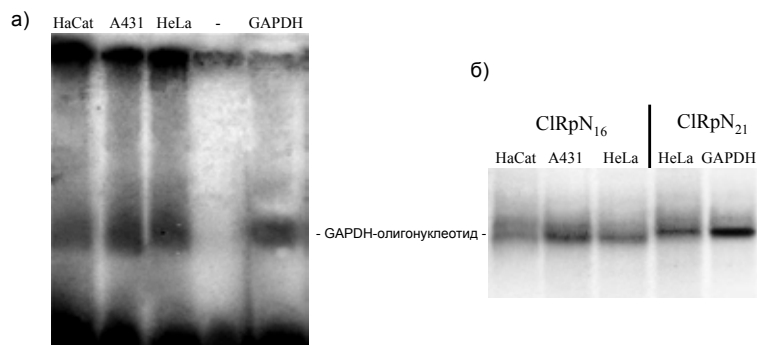


Рис. 1. Образование специфичных комплексов олигонуклеотидов $p(N)_{21}$, $p(N)_{16}$ и GAPDH

в ядерных экстрактах клеток линий HaCat, A431 и HeLa.
 а) Электрофореграмма разделения в нативных условиях ядерных экстрактов клеток линий HaCat, A431, HeLa и GAPDH эритроцитов человека после инкубации с радиоактивно меченым олигонуклеотидом $p(N)_{21}$. Разделение проводили в 4% ПААГ с последующей радиоавтографией.

б) Аффинная модификация белков ядерных экстрактов клеток линий HaCat, A431, HeLa и GAPDH эритроцитов человека алкилирующими производными олигонуклеотидов $p(N)_{16}$ и $p(N)_{21}$. Белки анализировали при помощи SDS-дискэлектрофореза в градиентном (10-20%) ПААГ с последующей радиоавтографией

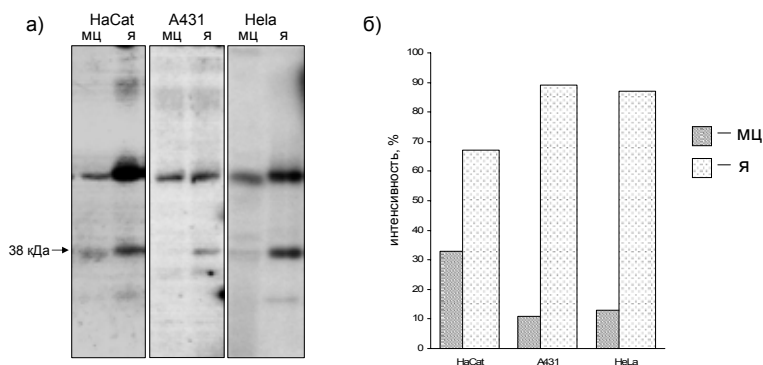


Рис. 2. Накопление комплексов $p(N)_{16}$ -GAPDH в ядерной фракции клеток HaCat, A431 и HeLa после инкубации интактных клеток с алкилирующим производным олигонуклеотида CIR-p(N)₁₆

а) Клетки инкубировали 1 час с 1 мкМ производными олигонуклеотида в PBS при 37 °С, разделяли на мембранно-цитозольную (МЦ) и ядерную (Я) фракции, как описано в материалах и методах, и анализировали содержание комплексов при помощи SDS-дискэлектрофореза в градиентном (10-20%) ПААГ с последующей радиоавтографией.

б) Количественная оценка распределения комплексов GAPDH-олигонуклеотид между мембранно-цитозольной и ядерной фракциями клеток по данным денситометрии

тив GAPDH. Для получения моноспецифичных антител против GAPDH мы провели очистку антител методом аффинной хроматографии на колонке с иммобилизированной GAPDH с последующим истощением антител на колонке с иммобилизованным клеточным лизатом, дефицитным по GAPDH. Полученные антитела были затем использованы для исследования внутриклеточной локализации GAPDH методом флуоресцентной микроскопии. Распределение GAPDH в клетках линий A431, HeLa и HaCat оценивали по отношению интенсивностей флуоресценции ядер клеток и флуоресценции цитоплазмы (Рис. 3). Оказалось, что такое распределение практически не зависит от используемой клеточной линии и, что GAPDH локализуется главным образом в цитоплазме клеток, что подтверждает данные других авторов [17].

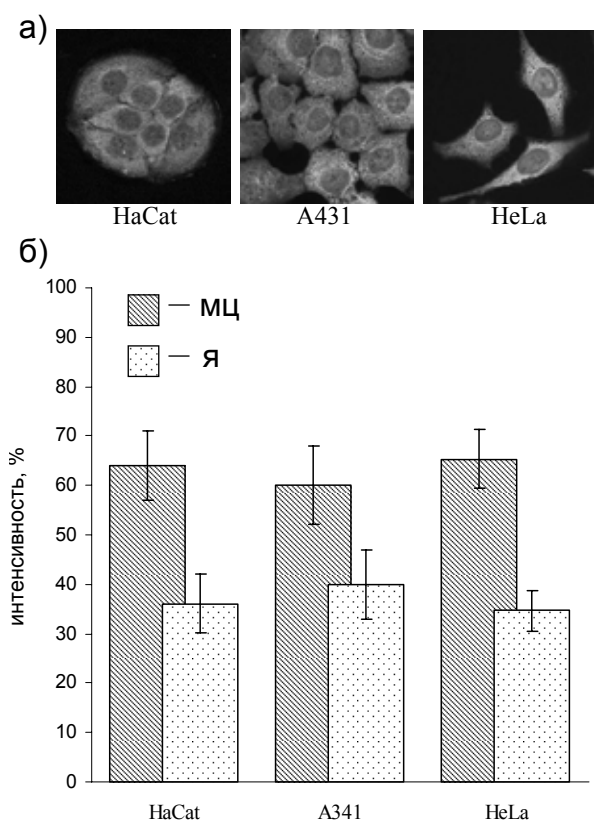


Рис. 3. Внутриклеточное распределение GAPDH в клетках линий HaCat, A431 и HeLa, наблюдаемое методом флуоресцентной микроскопии

а) Флуоресцентная микроскопия клеток линий HaCat, A431 и HeLa, выполненная с использованием кроличьих поликлональных антител против GAPDH

б) Количественная оценка интенсивности флуоресценции ядерной и мембранно-цитозольной фракций (статистические данные по распределению в 20 случайно выбранных клетках)

Полученные нами данные свидетельствуют о том, что инкубация клеток с олигонуклеотидами, специфически взаимодействующими с GAPDH, приводит к изменению внутриклеточного распределения GAPDH таким образом, что GAPDH, локализующийся в норме в цитоплазме клеток, при образовании стабильного комплекса с нуклеиновыми кислотами (каковым является ковалентный комплекс с р(N)₁₆) преимущественно локализуется в ядрах клеток.

Известно, что транспорт олигонуклеотидов в клетки происходит преимущественно по эндоцитозному пути [18]. При таком транспорте олигонуклеотиды проводят значительную часть времени в цитоплазме клеток, где скорее всего и происходит взаимодействие и модификация GAPDH. Однако, нельзя исключить ситуации при которой олигонуклеотиды проникают в ядро и модифицируют ядерную форму GAPDH.

Существование механизма циркуляции GAPDH между ядром и цитоплазмой активно обсуждается в научной литературе. GAPDH содержит в своей структуре сигнал ядерного экспорта, но в то же время, в отличие от белков, претерпевающих постоянный обмен между ядром и цитоплазмой, в нем отсутствует сигнал ядерного импорта [19]. Нага и соавторы, используя двухгибридную систему дрожжей, показали, что транслокация GAPDH в ядро происходит за счет образования комплекса с Siah1 протеазой [20]. Наблюдаемый феномен перераспределения GAPDH в ядро после образования комплекса с олигонуклеотидом свидетельствует об изменении работы такого транспортного механизма, при котором равновесие сдвигается в сторону ядерного экспорта. Такой сдвиг может быть опосредован удержанием комплекса GAPDH-олигонуклеотид в ядре за счет взаимодействия олигонуклеотидной компоненты комплекса с ядерным содержимым, либо за счет изменения аффинности фермента после образования комплекса с олигонуклеотидом к компонентам транспортной системы. Последняя гипотеза выглядит особенно привлекательной в свете того, что сигнал ядерного экспорта белка расположен в его С-концевой части [19] и пересекается с обнаруженным нами ранее олигонуклеотид-связывающим сайтом [11]. Таким образом, олигонуклеотид, связываясь с GAPDH, может блокировать сайт ядерного экспорта от распознавания специфической экспортазой и препятствовать транспорту фермента в цитоплазму приводя к его накоплению в ядре.

Ранее нами было показано, что константа диссоциации комплекса GAPDH-р(N)₂₁ составляет 0,2 мкМ [13]. Окисление GAPDH может увеличивать стабильность комплекса фермента с нук-

леиновыми кислотами более чем в 10 раз [12]. Эти данные вместе с нашими данными о транслокации комплексов GAPDH с сиквенс-специфичными олигонуклеотидами позволяют предположить существование клеточного механизма, в котором GAPDH выступает в роли сенсора окислительного стресса. Вполне вероятно, что окисление GAPDH может приводить к увеличению ее аффинности к специфическим внутриклеточным нуклеиновыми кислотами, которые и регулируют транслокацию GAPDH в ядро и, таким образом, определяют судьбу клетки.

Работа была выполнена при поддержке комплексного интеграционного проекта СО РАН № 5.1 и гранта РФФИ 06-04-49485-а.

INTERACTION WITH NUCLEIC ACIDS CAN AFFECT SUBCELLULAR LOCALIZATION OF GAPDH

A.V. Bryksin, B.P. Chelobanov, N.V. Volod'ko, V.V. Vlassov, P.P. Laktionov

Increased nuclear accumulation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) is considered to be the early, critical event in apoptosis induced by different effectors one of which is oxidative stress. Oxidation of GAPDH also increases the affinity of the protein towards the nucleic acids. In order to investigate if the formation of the complex between GAPDH and nucleic acids can affect the intracellular distribution of the protein the alkylating derivatives of oligonucleotides were employed. The intracellular distribution of GAPDH and GAPDH-oligonucleotide complexes were monitored by fluorescent microscopy or by fractionation of the cells with the consequent analysis of nuclear and cytosolic fractions by SDS-PAAG. The study revealed that unlike GAPDH which is distributed mostly in the cytoplasm of A431, HeLa and HaCat cells, GAPDH-oligonucleotide complexes have the preferential localization in the nucleus. The results suggest that oxidative stress-induced GAPDH may undergo translocation in to the nuclear as a complex with intra- or extracellular nucleic acids that can facilitate such a process.

Литература

1. Tisdale, E.J. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is phosphorylated by protein kinase Ciota /lambda and plays a role in microtubule dynamics in the early secretory pathway / E.J. Tisdale // J.Biol.Chem. — 2002. — Vol. 277. — № 5. — P. 3334-3341.
2. Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor/GAPDH complex augments Ca²⁺ release via locally derived NADH / R.L. Patterson, D.B. van Rossum, A.I. Kaplin, et al. //

Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A — 2005. — Vol. 102. — № 5. — P. 1357-1359.

3. Sirover, M. A. New nuclear functions of the glycolytic protein, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, in mammalian cells / M.A. Sirover // J. Cell Biochem. — 2005. — Vol. 95. — № 1. — P. 45-52.

4. A human nuclear uracil DNA glycosylase is the 37-kDa subunit of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase / K. Meyer-Siegler, D.J. Mauro, G. Seal, et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 1991. — Vol. 88. — № 19. — P. 8460-8464.

5. Cell cycle regulation of the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase/uracil DNA glycosylase gene in normal human cells / N.R. Mansur, K. Meyer-Siegler, J.C. Wurzer, M.A. Sirover // Nucleic Acids Res. — 1993. — Vol. 21. — № 4. — P. 993-998.

6. Zheng, L. S phase activation of the histone H2B promoter by OCA-S, a coactivator complex that contains GAPDH as a key component / L. Zheng, R.G. Roeder, Y. Luo // Cell. — 2003. — Vol. 114. — № 2. — P. 255-266.

7. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is a nonhistone protein and a possible activator of transcription in neurons / G. Morgenegg, G.C. Winkler, U. Hubscher, et al. // J. Neurochem. — 1986. — Vol. 47. — № 1. — P. 54-62.

8. Chuang, D.M. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, apoptosis, and neurodegenerative diseases / D.M. Chuang, C. Hough, V.V. Senatorov // Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. — 2005. — Vol. 45. — P. 269-290.

9. Sirover, M.A. New insights into an old protein: the functional diversity of mammalian glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase / M.A. Sirover // Biochim. Biophys. Acta. — 1999. — Vol. 1432. — № 2. — P. 159-184.

10. Ronai, Z. Glycolytic enzymes as DNA binding proteins / Z. Ronai // Int. J. Biochem. — 1993. — Vol. 25. — № 7. — P. 1073-1076.

11. Knock down of cytosolic phospholipase A2: an antisense oligonucleotide having a nuclear localization binds a C-terminal motif of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase / P. Laktionov, E. Rykova, M. Toni, et al. // Biochim. Biophys. Acta. — 2004. — Vol. 1636. — № 2-3. — P. 129-135.

12. Oxidation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase enhances its binding to nucleic acids / E.I. Arutyunova, P.V. Danshina, L.V. Domnina, et al. // Biochem. Biophys. Res. Commun. — 2003. — Vol. 307. — № 3. — P. 547-552.

13. The Rossmann fold of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) is a nuclear docking site for antisense oligonucleotides containing a TAAAT motif / C. Griffoni, P.P. Laktionov, E.Yu. Rykova, et al. // Biochim. Biophys. Acta. — 2001. — Vol. 1530. — № 1. — P. 32-46.

14. Heinz, F. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from human tissues / F. Heinz, B. Freimuller // Methods Enzymol. — 1982. — Vol. 89. — Pt D. — P. 301-305.

15. Harlow, E. Antibodies a laboratory manual / E. Harlow, D. Lane. — New York, 1988. — 231 p.

16. Исследование поверхностных олигонуклеотид-связывающих белков эукариотических клеток при помощи аффинной модификации реакционноспособ-

ными производными олигонуклеотидов / Б.П. Челобанов, П.П. Лактионов, М.В. Харькова и др. // Известия Академии Наук. Серия Химическая. — 2002. — № 7. — С. 1113-1119.

17. *Schmitz, H. D.* Reversible nuclear translocation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase upon serum depletion / H.D. Schmitz // Eur. J. Cell Biol. — 2001. — Vol. 80. — № 6. — P. 419-427.

18. Cell delivery and mechanisms of action of antisense oligonucleotides / J.P. Leonetti, G. Degols, J.P. Clarenc,

et al. // Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol. — 1993. — Vol. 44. — P. 143-166.

19. *Jenkins, J.L.* High-resolution structure of human D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase / J.L. Jenkins, J.J. Tanner // Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr. — 2006. — Vol. 62. — Pt 3. — P. 290-301.

20. S-nitrosylated GAPDH initiates apoptotic cell death by nuclear translocation following Siah1 binding / M.R. Hara, N. Agrawal, S.F. Kim, et al. // Nat. Cell Biol. — 2005. — Vol. 7. — № 7. — P. 665-674.