

УДК 577.15:577.17:612.014.22

©Кулинский, Колесниченко

## ГЛУТАТИОН ЯДРА КЛЕТКИ И ЕГО ФУНКЦИИ

*В.И. Кулинский<sup>1\*</sup>, Л.С. Колесниченко<sup>2</sup>*

Кафедры биохимии<sup>1</sup> и бионеорганической и биоорганической химии<sup>2</sup> Иркутского государственного медицинского университета, Красного Восстания ул., д. 1, Иркутск, 664047, п.я. 85; эл. почта: kulinsky@pp.irkutsk.ru

В последние годы подтверждена локализация глутатиона в ядре клетки и количественно определена эта фракция. Ядерный глутатион и метаболизирующие его ферменты выполняют самостоятельные и важные функции. Они существенно отличаются от функций гиалоплазматического и митохондриального глутатиона. Глутатион взаимодействует с регуляторными путями, передающими сигналы в ядро клетки.

**Ключевые слова:** глутатион, ферменты его метаболизма, ядро клетки.

Давно известно, что глутатион синтезируется в гиалоплазме, но затем он доставляется во все компартменты клетки. При этом глутатион химически не изменяется. Возможно поэтому долгое время вопрос о локализации GSH, о вариациях или различиях его многочисленных функций в разных органеллах клетки почти не поднимался. В последнее время ситуация начала изменяться. Установлено значение глутатиона эндоплазматического ретикулума для оксидативного фолдинга всех эукариотических секретируемых и плазмомембранных белков [1, 2]. Обращено внимание на своеобразие функций GSH митохондрий, обобщены его значительные функциональные различия с цитозольным GSH [3]. Новые и важные для ядра клетки результаты получены в основном (на 89%) с 2003 г. Им значительно предшествовало открытие участия глутатиона и глутаредоксина (наряду с системой тиоредоксина) в синтезе дезоксирибонуклеотидов – ДНК [4, 5]. Так как этих статей пока мало и они разноплановы, мы коротко их характеризуем. Обзоров этой проблемы не было.

Стандартные методы с выделением ядер и последующим анализом не позволяют правильно определить GSH ядра (nGSH). При использовании конфокальной микроскопии и флуоресцентного анализа установлено, что в пролиферирующих фибробластах в фазе S+G2/M GSH в основном локализован в ядре и отношение ядро/цитоплазма максимально ( $4,2 \pm 0,8$ ). При экспоненциальном росте клеток это отношение выше двух, а в фазе G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> – близко к единице в результате гомогенной локализации GSH в клетке, включая митохондрии. Динамика nGSH в клеточном цикле не зависит от АТФ, но может быть связана с параллельной экспрессией антиапоптозного белка Bcl-2 [6]. Эта важная и интересная работа еще не дополнена механизмами транспорта GSH в ядро.

---

*Принятые сокращения:* АФК – активные формы кислорода, ГПО – глутатионпероксидаза, ГТ – глутатионтрансфераза, nGSH – GSH ядра, PrSSG/PrSH – относительное глутатионирование белков.

\* - адресат для переписки

Функциональное значение перераспределения GSH подтверждается тем, что в культуре клеток он регулирует активность теломеразы [7]. pGSH предупреждает апоптоз и нужен для действия эстрогенов [8]. Многие белки (> 62), включая факторы транскрипции (NF-κB, AP-1, p53), требуют восстановленной среды для связывания с ДНК и изменяют ядерное редокс-состояние [9, 10]. Добавление предшественника GSH N-ацетилцистеина (NAC) резко увеличивает в костномозговых клетках уровень низкомолекулярных тиолов, вызывает сдвиг к восстановленной среде и индуцирует задержку прогрессии от фазы G<sub>0</sub>-G<sub>1</sub> к S. NAC также резко индуцирует снижение циклина D<sub>1</sub> и увеличение белка p27 и снижает фосфорилирование белка ретинобластомы. Удаление NAC приводит к противоположным изменениям, включая более окисленную среду [11].

Снижение концентрации GSH перед ионизирующим облучением вызывает хромосомные aberrации, задержку клеточного цикла и снижение уровня регуляторных белков цикла – p53 и p21. Добавление экзогенного GSH защищает от хромосомных aberrаций при низких дозах и частично – при высоких. Остаётся неясным, почему в этих опытах ингибитор синтеза GSH бутионинсульфоксимин (BSO) уменьшал задержку клеточного цикла после облучения. Однако отметим, что механизм этой задержки может быть комплексным. Быстрое истощение GSH сочетанием BSO и субстрата глутатионтрансферазы (ГТ, GST) диметилфумарата вызывает резкую (на 3 порядка) радиосенсибилизацию клеток. Это может быть обусловлено ингибированием тиоредоксинредуктазы и глутатредоксина, необходимых для синтеза ДНК, белкового гомеостаза и выживания клеток [12].

Радиочувствительность, цитотоксические ответы и выживание клеток зависят от вицинальных тиолов (HS-Pr-SH) и GSH, а также и белковых тиолов (Pr-SH) [13]. Истощение GSH ядра на 50-60% перед облучением вызывает фрагментацию ДНК и апоптоз, что свидетельствует о критической защитной роли GSH в поддержании функциональной целостности ДНК и радиочувствительности [14].

BSO в эмбриональных фибробластах максимально снижал концентрацию GSH в цитоплазме, на порядок меньше в митохондриях, а в ядре меньше на 2 порядка, и только при огромных дозах (больше, чем на 2 порядка). GSH митохондрий критически важен для дезактивации активных форм кислорода (АФК), а GSH ядра тесно ( $r > 0,95$ ) и негативно коррелирует с оксидативной модификацией ДНК. Истощение GSH в ядре ассоциировано с генотоксичностью [15]. АФК вызывают истощение GSH в нескольких типах клеток млекопитающих, что индуцирует дисфункцию хроматина и митохондрий. Возникает фрагментация ДНК (в одной и/или в двух цепях), которая увеличивается гидропероксидами полиненасыщенных жирных кислот, ведущими к некрозу. Дисфункция митохондрий через широко известные сигнальные пути вызывает апоптоз. Все эти патологические явления коррелируют с истощением GSH в клетке [16].

В цитоплазме, митохондриях и ядре функционируют две родственные, но независимые антиоксидантные тиоловые системы – GSH и тиоредоксинов. При оксидативном стрессе в эпителиальных клетках толстой кишки редокс-потенциал клеток E<sub>h</sub> (GSH/GSSG) не изменяется; в цитозоле относительно увеличивается глутатионирование белков (PrSSG/PrSH), почти полно окисляются белковые тиолы и тиоредоксин 1, в митохондриях – тиоредоксин 2. В ядре подобные изменения отсутствуют, оно сохраняет восстановленную среду. Это свидетельствует об увеличенной антиоксидантной функции ядра, о его большей резистентности к АФК [17].

В ранних стадиях развития эмбриона млекопитающих у обоих полов GSH вовлечен в защиту гамет от оксидативных повреждений. Он поддерживает морфологию мейотического веретена ооцитов, после фертилизации играет активную роль в образовании пронуклеуса самцов и полезно влияет в раннем эмбриогенезе на стадии бластоцитов. Концентрация GSH изменяется в ооцитах во время мейотического созревания и его синтез регулируется гонадотропинами.

Более того, уровень GSH в созревающих сперматоцитах постепенно снижается в сперматогенезе [18].

Дисфункцию ДНК часто определяют по динамике дезоксигуанозина, в том числе по образованию его аддуктов. Это относится и к одному из наиболее значительных и активных продуктов распада липидных гидропероксидов – 4-гидроксиноненалу (HNE), важной цитозольной мишенью которого является GSH. Параллельное сравнение показало, что конъюгат HNE-GSH образуется в количествах, на 4 порядка больших, чем аддукт ДНК. Это доказывает, что и цитозольный GSH очень эффективно защищает ДНК [19].

Злокачественный рост клетки представляет огромный интерес как источник важных экспериментальных моделей. GSH участвует в регуляции канцерогенных механизмов, чувствительности к цитотоксическим лекарствам и облучению, синтеза ДНК и пролиферации клеток. Множественную лекарственную устойчивость и радиорезистентность связывают с более высоким уровнем GSH в раковых клетках. GSH может инактивировать некоторые канцерогены, защищать ДНК от АФК, сохранять целостность тканей. BSO снижает скорость ракового роста. Высокий уровень GSH в метастатических клетках ассоциирован с устойчивостью к АФК и  $\text{NO}^\bullet$  [20].

Новой и очень интересной функцией глутатиона является его взаимодействие с регуляторными путями, передающими сигналы в ядро клетки. TGF- $\beta$  снижает уровень GSH в фибробластах, а GSH ингибирует в них TGF- $\beta$ -индуцированные сигналы активных форм кислорода и аккумуляцию коллагена, ассоциированную с фосфорилированием киназами JNK и p38. Последнее ведёт к ингибированию связывания транскрипционных факторов с AP-1, SP-1 и Smad *цис*-элементами [21]. Истощение GSH ингибитором его синтеза L-бутионин-R-S-сульфоксимином активирует MAPK-пути, что увеличивает в печени транслокацию NF- $\kappa$ B и ATF-2, а в печени и почках – Jun-фосфорилирование. В головном мозге увеличивается GSH, активируется ERK-2, в ядре аккумулируется Nrf2, увеличивается транскрипция Nrf2,  $\gamma$ -глутамилцистеинсинтетазы и тиредоксина 1. Это показывает развитие органспецифических ответов с защитой головного мозга [22]. GSH регулирует экспрессию различных сетей транскрипционных программ, вовлечённых в детоксификацию, цитопротекцию и пролиферацию, и защищает клетки от дефектов, связанных с недостаточностью Nrf2 [23]. Кроме детоксификации и регуляции клеточного редокс-статуса, антиоксидантная система GSH/ГТ имеет и другие регуляторные функции, включая контроль клеточного цикла и пролиферации [24].

$\gamma$ -Глутамилтрансфераза (GGT) играет важную роль в гомеостазе GSH. При оксидативном стрессе её увеличение как транскрипционно, так и трансляционно включает активацию Ras. Получены данные о значении и последующих сигнальных путей: Akt, p38 MAPK и MEK1 [25].

О значении GSH ядра говорит и наличие в нём активных и важных специальных ферментов метаболизма GSH. В клетке глутатионпероксидаза-4 (ГПО4, фосфолипидгидропероксидГПО, PHGP) существует в 3 изоформах: митохондриальной, ядерной и цитозольной, происходящих от одного гена. Первая из них ингибирует индуцируемый пероксидами апоптоз [26], “немитохондриальная” (очевидно, сумма двух остальных) ингибирует синтез эйкозаноидов (простаноидов и лейкотриенов) и воспаление [27]. Функциональные различия этих двух форм очевидны. ГПО4 является мультифункциональным селенопротеином. Как каталитически активный фермент он защищает от оксидантов, восстанавливая пероксиды фосфолипидов и тиолов, но в ходе сперматогенеза функционирует как структурный белок [28]. Ядерная форма ГПО4, она же ГПО ядер спермы (snGPx), вовлечена в стабилизацию хроматина спермы, наиболее вероятно тиолами к SS-окисленным цистеиновым остаткам в протаминах млекопитающих – малым ядерным базальным белкам. У человека есть только одна форма этого фермента с 34 кДа, у животных они разнообразнее [29]. ГПО4 обильно

синтезируется в сперматидях. Методами обратной генетики доказано, что Se, необходимый для синтеза, поставляется селенопротеином Р. При недостатке Se нарушается спермиогенез и развивается инфертильность. На последней стадии сперматогенеза активная селенопероксидаза трансформируется в структурный белок, который становится компонентом митохондриального футляра сперматозоидов. Трансформация параллельна потере глутатиона [30].

ГПО4 – единственный изофермент ГПО, при отсутствии которого мыши умирают в середине вынашивания. Нокаут ГПО4 в эмбриогенезе нарушает развитие мозга. Большие количества мРНК обнаружены во всех нервных слоях во время перинатального развития мозга, но экспрессия ограничивается во время постнатального развития. Во взрослом мозге ГПО4 изоформы есть в нейронах, но нет в глии. В пораженных зонах мозга фермент активируется в реактивных астроцитах, но не в нейронах [31]. Значение для функций нейронов и спермы одного и того же фермента ГПО4 и этапности развития этих столь разных клеток неожиданно и представляет большой интерес.

Различают цитозольный глутаредоксин 1 и глутаредоксин 2 (митохондриальный и ядерный) [32], но их функции ещё не идентифицированы. В ядре есть и глутатионредуктаза [33]. Отметим восстановление глутаредоксином структурного белка хроматина, участника ядерного транспорта и высокомолекулярной группы B1 (Hmgb1) [34].

В 2007 г. с помощью конфокальной микроскопии, иммунофлуоресценции и молекулярного моделирования обнаружена избирательная электростатическая ассоциация  $\alpha$ -ГТ, обладающей пероксидазной активностью (но не лишённых её  $\mu$ - и  $\pi$ -ГТ) с наружной ядерной мембраной гепатоцитов в количестве, соответствующим 10% цитозольного пула и 20%  $\alpha$ -ГТ. Подобная доля компартментализована в ядре при концентрации  $\approx 0,7$  мМ, что сравнимо с концентрацией  $\alpha$ -ГТ в цитозоле –  $\approx 0,3$  мМ (доля  $\alpha$ -ГТ в тотальной ГТ равна 43%). Это значительно превышает активность ГТ в микросомах, лизосомах и митохондриях. Очевидно, существует многослойная сборка энзима на ядерном конверте. Это свидетельствует о защитном ферментативном барьере на подступах к ядру [35]. Исследований наличия  $\gamma$ -глутамилтрансферазы в ядре (как и в митохондриях) в базе данных PubMed нами не обнаружено.

В норме [24] и при патологии  $\pi$ -ГТ часто локализована в ядре и при разных раках ассоциирована с их развитием и резистентностью к лекарствам [36, 37].

Таким образом, специфика nGSH аргументируется следующими фактами:

- 1) значительной концентрацией GSH в ядре клетки ( $\approx 0,7$  мМ);
- 2) закономерным перераспределением GSH в динамике клеточного цикла с максимумом в ядре в фазе S+G<sub>2</sub>/M и минимумом в G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>;
- 3) nGSH регулирует активность теломеразы, предупреждает апоптоз, поддерживает восстановительную среду в ядре;
- 4) снижение GSH перед облучением и/или химическими воздействиями сенситизирует к дисфункции ДНК: вызывает хромосомные aberrации, фрагментацию ДНК, задержку клеточного цикла, снижение регуляторных белков цикла (p53, p21), апоптоз;
- 5) снижение уровня GSH при ингибировании его синтеза максимально выражено в цитозоле, слабее в митохондриях и минимально в ядре;
- 6) развитие эмбриона в значительной степени зависит от оптимальных концентраций GSH;
- 7) конъюгация GSH с 4-гидроксиноненаем намного эффективнее, чем образование аддуктов с ДНК;
- 8) глутатион взаимодействует с регуляторными путями, передающими сигналы в ядро клетки;
- 9) значение системы GSH в ядре подтверждается наличием в нем изоформ основных ферментов метаболизма – глутатионпероксидазы-4, глутаредоксина-2, глутатионтрансферазы- $\alpha$  (на ядерной мембране), а также глутатионредуктазы.



Совокупность рассмотренных данных позволяет сделать вывод о появлении и развитии нового и перспективного направления в исследовании системы глутатиона – локализация и функциональная специфика GSH и ферментов его метаболизма в ядре клетки.

## ЛИТЕРАТУРА

1. *Sitia R., Molteni S.N.* (2004) *Sci. STKE*, (239), pe27.
2. *Csala M., Banhegyi G., Benedetti A.* (2006) *FEBS Lett.*, **580**, 2160-2165.
3. *Кулинский В.И., Колесниченко Л.С.* (2007) *Биохимия*, **72**, 856-859.
4. *Reichard P., Thelander I.* (1979) *Annu. Rev. Biochem.*, **48**, 133-158.
5. *Fernandes A.P., Holmgren A.* (2004) *Antioxid. Redox Signal*, **6**, 63-74.
6. *Markovic J., Ortega A., Sastre J., Vina J., Pallardo F.V.* (2007) *J. Biol. Chem.*, **282**, 20416-20424.
7. *Borras C., Esteve J.M., Vina J.R., Sastre J., Vina J., Pallardo F.V.* (2004) *Anal. Biochem.*, **217**, 323-328.
8. *Chen J., Delannou M., Odwin S., He P., Trush M.A., Jager I.D.* (2003) *Toxicol. Sci.*, **75**, 271-278.
9. *Conour I.E., Graham W.V., Gaskins H.R.* (2004) *Physiol. Genomics*, **18**, 196-205.
10. *Iang J.H., Surh Y.I.* (2003) *Biochem. Pharmacol.*, **66**, 1271-1279.
11. *Manon S.G., Sarsour E.H., Spitz D.R., Higashikubo R., Sturm M., Zhang H., Goswami P.C.* (2003) *Cancer Res.*, **63**, 2109-2117.
12. *Ray S., Chatterjee A.* (2007) *Int. J. Radiat. Biol.*, **83**, 347-354.
13. *Biaglov J.E., Ayene I.S., Tuttle S.W., Koch C. J., Donahue J., Mieyal J.J.* (2006) *Radiat. Res.*, **165**, 307-317.
14. *Morales A., Miranda M., Sanchez-Reyes A., Biete A., Fernandes-Checa J.C.* (1998) *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, **42**, 191-203.
15. *Green R.M., Graham M., O'Donovan M.R., Chipman J.K., Hodges N.J.* (2006) *Mutagenesis*, **21**, 383-390.
16. *Higachi Y.* (2004) *J. Cell. Mol. Med.*, **8**, 455-464.
17. *Go Y-M., Ziegler T.Z., Johnson J.M., Gu Li, Hansen J.M., Jones D.P.* (2007) *Free Radic. Biol. Med.*, **42**, 363-370.
18. *Luberda Z.* (2005) *Reproductive Biology*, **5**, 5-17.
19. *Falletti O., Cadet J., Favier A., Douki T.* (2007) *Free Radic. Biol. Med.*, **42**, 1258-1269.
20. *Estrella J.M., Ortega A., Obrador E.* (2006) *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.*, **43**, 143-181.
21. *Vayalil P.K., Iles K.E., Choi J., Yi A.K., Postlethwait E.M., Liu R.M.* (2007) *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.*, **293**, 1281-1292.
22. *Limuin-Pacheco J.H., Hernandez N.A., Funjul-Moles M.L., Gonsebat M.E.* (2007) *Free Radic. Biol. Med.*, **43**, 1335-1347.
23. *Reddy N.M., Kleeberger S.R., Yamamoto M., Kensler T.W., Scollic C., Biswal S., Reddy S.P.* (2007) *Physiol. Genomics*, **32**, 74-81.
24. *Ranganna K., Mathev O.P., Yatsu F.M., Yousefpour Z., Hayes B.E., Milton S.G.* (2007) *FEBS J.*, **274**, 5962-5978.
25. *Pandur S., Pankir S., Johannessen M., Moens U., Husebi N.E.* (2007) *Free Radic. Res.*, **41**, 1376-1384.
26. *Degterev A., Boyce M., Yuan J.* (2001) *J. Cell Biol.*, **155**, 695-698.
27. *Brigelius-Flohe R.* (2006) *Biol. Chem.*, **387**, 1329-1335.
28. *Savaskan N.E., Borchert A., Bruguer A.U., Kujhn H.* (2007) *Free Radic. Biol. Med.*, **43**, 191-201.
29. *Bertelsmann H., Kuehbach M., Weseloh G., Kyriakopoulos A., Behne D.* (2007) *Biochim. Biophys. Acta*, **1770**, 1459-1467. N10
30. *Flohe L* (2007) *Biol. Chem.*, **388**, 987-995.
31. *Savaskan N., Ufer C., Kujhn H., Borchert A.* (2007) *Biol. Chem.*, **388**, 1007-1017.

## ГЛУТАТИОН ЯДРА КЛЕТКИ И ЕГО ФУНКЦИИ

32. *Lundberg M., Fernandes A.P., Kumar S., Holmgren A.* (2004) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **319**, 801-809.
33. *Mannervic B., Carlberg J., Larson K.* (1989) *Glutathione: Chemical, Biochemical, and Medical Aspects. Part A* (Dolphin D., Poulson R., Avramovic O., eds), Wiley J., N.Y., 475-516.
34. *Hoppe G., Talcott K.E., Bhattacharya S.K., Crabb J.W., Sears J.E.* (2006) *Exp. Cell Res.*, **312**, 3526-3538.
35. *Stella L., Pallottini V., Moreno S., Leoni S., De Maria F., Turella P., Federici G., Fabrini G., Fabrini R., Dawood K.F., Lo Bello M., Pedersen J.Z., Ricci G.* (2007) *J. Biol. Chem.*, **282**, 6372-6379.
36. *Soh Y., Goto S., Kitayama M., Moriyama S., Kotera K., Nakayama T., Nakadgima H., Kondo T., Ishimaru T.* (2005) *Clin. Oncol. (R. Coll. Radiol.)*, **17**, 264-270.
37. *Sakai M., Muramatsu M.* (2007) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **357**, 575-578.

Поступила: 23. 01. 2008.

## NUCLEAR GLUTATHIONE AND ITS FUNCTIONS

*V.I. Kulinsky, L.S. Kolesnichenko*

Irkutsk State Medical University, 1, ul. Krasnoye Vosstaniye, Irkutsk, P.O. Box 85, 664047 Russia;  
e-mail: kulinsky@pp.irkutsk.ru

During recent years the nuclear localization of glutathione has been confirmed and this fraction has been quantitatively determined. The nuclear GSH and the enzymes of its metabolism realize independent and important functions. They considerably differ from functions of hyaloplasmic and mitochondrial GSH. Glutathione interacts with regulatory pathways, involved into signal transmission into the nucleus.

**Key words:** glutathione, enzymes of its metabolism, cellular nucleus.