

©Коллектив авторов

ЧЕТВЕРТИЧНАЯ СТРУКТУРА ЯДЕРНОГО АНТИГЕНА ДЕЛЯЩИХСЯ КЛЕТОК (PCNA) В ЦИТОПЛАЗМЕ И ЯДРЕ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА ОРГАНИЗОВАНА ОДИНАКОВО

*Н.В. Белякова, Р.А. Пантина, Р.А. Ковалев, М.В. Филатов, С.Н. Нарыжный**

Национальный исследовательский центр “Курчатовский институт”,
Петербургский институт ядерной физики имени Б.П. Константинова (ПИЯФ),
188300, Ленинградская область, Гатчина; эл. почта: snaryzhny@mail.ru

Свойства и механизмы функционирования ядерного антигена делящихся клеток (proliferating cell nuclear antigen, PCNA) исследуются довольно давно и изучены весьма детально. Наиболее известные функции PCNA (репликация ДНК, репарация ДНК, рекомбинация ДНК и др.) связаны с клеточной пролиферацией и локализацией данного белка в ядре. Тем не менее, есть веские основания считать, что PCNA свойственны также некоторые функции и в цитоплазме. Однако возможная роль и механизмы действия PCNA в цитоплазме требуют тщательного изучения и прояснения. В контексте изучения цитоплазматических функций PCNA нейтрофилы являются идеальной моделью. С одной стороны, они являются неделяющимися клетками, а с другой стороны – содержат достаточно большое количество PCNA, который локализован практически только в цитоплазме. Используя сшивки формальдегидом, мы показали, что этот PCNA сшивается одинаковым образом, то есть, организован так же, как и ядерный PCNA, который присутствует в пролиферирующих клетках. Ранее нами было показано (Naryzhny et al. (2005) J. Biol. Chem., 280, 13888), что PCNA в таких клетках может находиться в виде динамического комплекса из двойных тримеров. По-видимому, такая организация данного хаб-белка позволяют ему лучше координировать процессы, происходящие не только в ядре, но и в цитоплазме.

Ключевые слова: структура, цитоплазма, нейтрофил, PCNA, мономер, двойной тример

DOI: 10.18097/PBMC20176304356

ВВЕДЕНИЕ

Одним из хорошо известных белков-координаторов (хабов) является ядерный антиген делящихся клеток (PCNA). Он сам не обладает никакой ферментативной активностью, но способен взаимодействовать с ДНК, а также со многими белками, тем самым влияя на их активность и функции. Как уже следует из его названия, PCNA должен быть локализован в ядре, причём ядре делящихся клеток [1-4]. Эта сторона функционирования PCNA, связанная, в первую очередь, с его взаимодействием с ДНК, всесторонне изучена и характеризуется координирующим действием PCNA, прежде всего на процессы, которые происходят наиболее интенсивно в делящихся клетках, и прежде всего в хроматине. Такими процессами являются репликация ДНК, репарация ДНК и рекомбинация ДНК; структура PCNA в виде кольца (тримера), нанизанного на ДНК, прекрасно подходит для такой роли [2, 5-8]. Более того, нами было показано, что в клетках млекопитающих PCNA может быть организован не просто в виде одного кольца (тримера), а в виде динамического комплекса – двойного кольца [1, 9]. Скорее всего, именно в такой форме PCNA функционирует в клетках и участвует в процессах метаболизма ДНК, взаимодействуя с многочисленными белками-партнерами, платформой для которых он является. Догма недавнего времени состояла в том, что PCNA, участвуя в основных процессах метаболизма ДНК, преимущественно локализован в ядрах клеток млекопитающих [3-7]. Известно, что в раковых клетках, которые делятся с повышенной

интенсивностью, уровень PCNA в несколько раз выше, чем в “нормальных” [3, 4]. Однако в последнее время стало появляться всё больше данных, указывающих на то, что PCNA может участвовать в процессах, которые проходят не только в ядре, но и в цитоплазме [10-13]. Для дальнейшего выяснения того, как это происходит, хорошо подходит такой модельный объект как нейтрофилы, которые отличаются тем, что не делятся, но имеют ядро и цитоплазму. Эти клетки играют важную роль в реакции организма на инфекцию и воспаление. Причём очень интересный момент заключается в том, что и в нейтрофилах тоже содержится PCNA, и локализован он преимущественно в цитоплазме, а не в ядре. То есть нейтрофилы являются хорошей природной моделью для изучения роли PCNA в цитоплазме клеток, по своей природе не способных к делению. Недавно были получены данные, указывающие на то, что функциональная роль цитоплазматического PCNA, как и ядерного, может заключаться в координации определенных процессов за счет взаимодействия с различными белками. К числу таких процессов, по-видимому, относятся апоптоз и гликолиз [10-13]. Witko-Sarsat и др. предположили, что в отличие от ядерного, цитоплазматический PCNA функционирует в основном в виде мономера [10, 12]. Хотя аспекты структурной организации PCNA *in vivo* и *in vitro* изучены довольно детально, существует ряд противоречивых моментов. Определённо доказанным следует считать то, что PCNA как *in vivo*, так и *in vitro* организован в виде тримера [8, 14, 15]. Ситуация с мономерами, димерами и двойными тримерами не столь однозначна, и,

по-видимому, связана с состоянием PCNA, в частности с аминокислотными заменами, пост-трансляционными модификациями (*in vivo*) или физико-химическими условиями анализа (*in vitro*) [9, 14, 16, 17].

В представленной работе мы затронули аспекты четвертичной структуры PCNA в нейтрофилах, используя формальдегид, который позволяет сшивать аминокруппы, находящиеся на расстоянии 2Å друг от друга [18], то есть полипептиды, находящиеся в непосредственном контакте друг с другом. С помощью такой сшивки мы и постарались уточнить то, как организован цитоплазматический PCNA в нейтрофилах.

МЕТОДИКА

Все используемые реагенты были получены от "Sigma-Aldrich" (США), если не указан другой производитель. Остальные реагенты получены от следующих компаний: от "Pierce" (США) – дитиотриитол (DTT), коктейли ингибиторов протеаз, от "GE Healthcare" (США) – Кумасси R350, от "Bio-Rad" (США) – маркеры молекулярной массы белков для электрофореза, от "Биолот" (Россия) – среды RPMI-1640 и DMEM для роста клеток, эмбриональная сыворотка телёнка, от "Orange Scientific" (Бельгия) – культуральные флаконы Карреля.

Клеточные культуры и условия культивирования

Перевиваемые культуры клеток человека НЕК-293 культивировали в среде DMEM или RPMI-1640, содержащей 5% эмбриональной сыворотки, без антибиотиков, в атмосфере 5% CO₂ при 37°C [19]. Клетки для микроскопии выращивали на покровных стеклах, помещенных в чашку Петри, в стандартных условиях.

Подготовка проб и гель-электрофорез

Образцы готовили по описанной ранее методике [20, 21]. Клетки (~10⁷), содержащие до 2 мг белка, лизировали в 100 мкл буфера Rabillond (7 М мочевины, 2 М тиомочевина, 4% CHAPS, 1% DTT, 2% IPG буфер pH 3-10, смесь протеазных ингибиторов). Концентрацию белка в образце определяли по методу Bradford [22]. Для анализа электрофорезом в пробы добавляли 1/4 объёма буфера для образца (8% додецилсульфат лития (LDS, 260 мМ Трис pH 6,8, 4% DTT, 40% глицерин, 0,04% бромфенол голубой) [20]. Электрофорез в денатурирующих условиях с концентрацией полиакриламида 10% в разделяющем геле и 5% в концентрирующем геле выполняли на установке PowerPac Basic ("Bio Rad") [21, 23].

Иммуноблоттинг (Вестерн-блот)

Перенос белков из геля на PVDF мембрану (Hybond-P, "GE Healthcare") осуществляли "полусухим" способом в течение 2 ч при 15V между двумя листами толстой бумаги для переноса ("Bio-Rad"), пропитанной буфером для переноса (48 мМ Трис, 39 мМ глицин, 0,037% SDS, 20% этанол). После переноса мембрану обрабатывали по протоколу

Blue Dry Western [16]; вначале окрашивали в 0,1% растворе Кумасси R350, а далее высушивали и обрабатывали антителами [21]. В работе использовали следующие антитела: мышинные иммуноглобулины G козы, меченные пероксидазой хрена, в концентрации 0,5 мкг/мл (NA931V, "GE Healthcare"). Реакцию с антителами проявляли с помощью ECL (Western Lightning Ultra, "PerkinElmer", США) и рентгеновской плёнки (Amersham Hyperfilm ECL) при экспозиции от 10 с до 30 мин.

Выделение нейтрофилов

Образцы крови были получены от доноров при обследовании в Первом Санкт-Петербургском государственном медицинском университете имени И.П.Павлова. Все пациенты подписали информированное согласие на использование образцов их крови в научных исследованиях. К крови прибавляли гепарин (25 единиц/мл крови), центрифугировали 15 мин при 1500 об/мин (здесь и далее использовалась центрифуга ELMi CM-6) для осаждения форменных элементов. Супернатант удаляли, а осадок перемешивали с равным объёмом раствора Версена. Полученную смесь (8 мл) наслаивали на 2 мл раствора фиколла (1,077 г/мл) и центрифугировали при 1500 об/мин 30 мин. После центрифугирования эритроциты оказываются в осадке, а остальная часть расслаивается на плазму, лейкоциты и фиколл [24]. На границе между фиколлом и эритроцитами находятся нейтрофилы в виде узкой полосы. Их отбирали, вносили ингибиторы протеаз, осаждали (2000 об/мин, 10 мин), ресуспендировали в 5 мл буфера А (10 мМ Трис pH 7,4, 250 мМ сахароза, 1 мМ азид натрия, 2 мМ PMSF, ингибиторы протеаз), после чего осаждали (3000 об/мин 10 мин). Для лизиса оставшихся в примеси эритроцитов осадок ресуспендировали в буфере (157 мМ NH₄Cl, 7 мМ KCl, 0,1 мМ ЭДТА, pH 7,5, 2 мМ PMSF, ингибиторы протеаз) и инкубировали при комнатной температуре в течение 10 мин. Останавливали лизис добавлением NaCl до концентрации 0,9%, перемешивали, выдерживали 10 мин, осаждали (3000 об/мин, 10 мин) и полученный препарат нейтрофилов ресуспендировали в буфере А.

Сшивка формальдегидом

Сшивку белков проводили обработкой клеток или клеточных экстрактов 1,5%-ным формальдегидом при комнатной температуре в разные интервалы времени (от 10 до 90 мин). Для остановки сшивки добавляли глицин до конечной концентрации 0,25 М.

Иммунофлуоресцентное окрашивание

Суспензию нейтрофилов наносили на предметное стекло, высушивали при комнатной температуре и фиксировали в холодном этаноле 10 мин. Клетки НЕК-293 выращивали на покровных стеклах, фиксировали 4%-ным формалином в холодном фосфатно-солевом буфере (PBS), pH 7,6, отмывали PBS и обрабатывали 0,5%-ным тритоном X-100 в PBS.

Затем снова отмывали PBS и фиксировали в холодном этаноле. Иммуноокрашивание нейтрофилов и клеток HEK-293 производили по стандартной методике [25], используя первичные моноклональные мышиные антитела к PCNA (PC10, P8825-100UL, “Sigma-Aldrich”) или поликлональные кроличьи к PKM-2 (SAB4200105-25UL, “Sigma-Aldrich”) и вторичные козы (анти-мышиные, меченные FITC, (“Invitrogen”, США) или анти-кроличьи, меченные Alexa Fluor 594, (“Invitrogen”)). Клетки наблюдали на микроскопе Leica DM 2500.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее показанная цитоплазматическая локализация PCNA в нейтрофилах [10, 11] подтверждается при их иммуноокрашивании антителами к PCNA (рис. 1А). Для сравнения в качестве контроля мы использовали клетки HEK-293, где, наоборот, ярко выражена ядерная локализация PCNA (рис. 1Б). Иммуноокрашивание антителами к цитоплазматическому ферменту пируваткиназе M2, PKM, служило дополнительным контролем, подтверждающим цитоплазматическую локализацию PCNA в нейтрофилах (данные не показаны).

После выделения нейтрофилов их подвергали обработке формальдегидом и с помощью Вестерн-блота анализировали образовавшиеся сшивки PCNA (рис. 2А). Для контроля использовали клетки HEK-293 (рис. 2Б). Известно, что формальдегид сшивает остатки лизина и аргинина, находящиеся на расстоянии 2Å друг от друга [18]. Следовательно, с его помощью можно выявлять комплексы белковых молекул максимально близко контактирующие друг с другом. Как в клетках HEK-293, так и в нейтрофилах (рис. 2), исходный PCNA после электрофореза в денатурирующих условиях детектируется в виде мономера с молекулярной массой примерно 30 кДа. После сшивки белков формальдегидом PCNA уже обнаруживается в виде трёх полос, соответствующих массам 30 кДа, 90 кДа, 180 кДа. Эти полосы соответствуют

мономеру (30 кДа), тримеру (90 кДа) и двойному тримеру (180 кДа) PCNA [1, 9, 26]. Следует особо обратить внимание на то, что после определённого времени сшивки, как в клетках HEK-293, так и в нейтрофилах, практически весь PCNA наблюдается только в виде полосы, соответствующей двойному тримеру (180 кДа). Следовательно, мы можем сделать вывод, что в нейтрофилах – клетках, не способных к делению – PCNA локализован в цитоплазме, но имеет такую же структуру, как и ядерный PCNA делящихся клеток. Более того, полученные результаты находятся в согласии с ранее опубликованными данными о том, что эта структура является двойным тримером [1, 9, 26]. Другими словами, мы не нашли подтверждений тому, что PCNA в цитоплазме нейтрофилов функционирует в виде мономеров [10, 11]. Мы можем только предположить, что из-за динамичности и лабильности четвертичного комплекса PCNA возможны ситуации его частичного распада как *in vivo*, так и *in vitro*, что, в общем-то, и было ранее показано [9, 14].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ

На основании того, что цитоплазматический PCNA нейтрофилов и ядерный PCNA делящихся клеток млекопитающих сшиваются формальдегидом одинаковым образом, мы делаем вывод, что PCNA в них организован одинаково. Ранее мы показали, что PCNA млекопитающих образует динамический комплекс из двух колец – гексамер в виде двойного гомотримера [1, 9, 26]. Соответственно и PCNA в цитоплазме нейтрофилов тоже имеет такую же структуру и функционирует не в виде мономера, а в виде тримера или даже двойного тримера.

БЛАГОДАРНОСТИ

Исследование проведено в рамках выполнения Государственного задания ФГБУ “ПНЦ” на 2015-2017 годы.

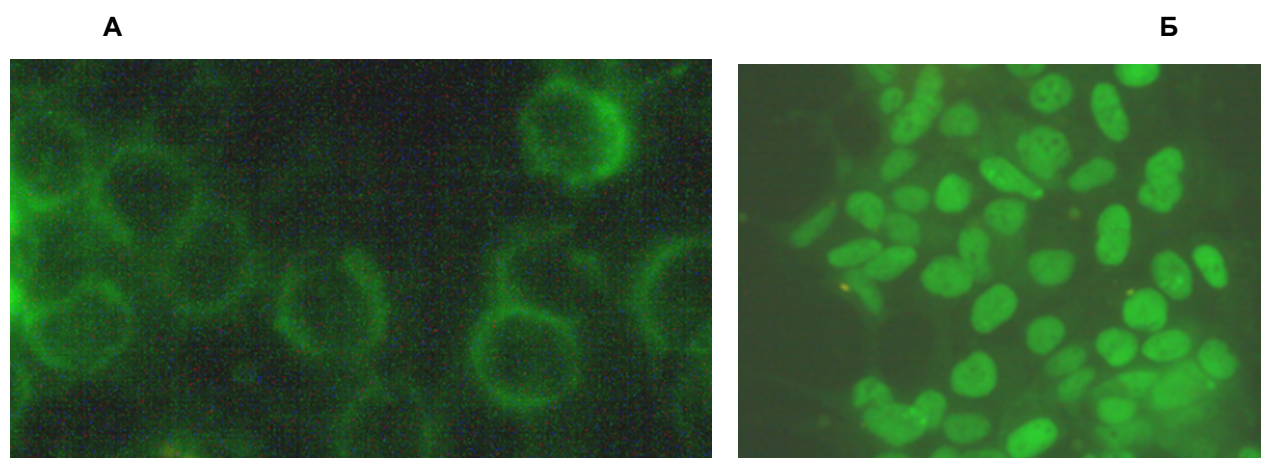


Рисунок 1. Клеточное окрашивание антителами к PCNA. (А) иммуноокрашивание нейтрофилов антителами к PCNA (PC10, 1:100), вторичные антитела анти-мышиные-FITC (1:100). Увеличение: $\times 63$. (Б) иммуноокрашивание клеток HEK-293 антителами к PCNA (PC10, 1:100), вторичные антитела анти-мышиные-FITC (1:100). Увеличение: $\times 63$.

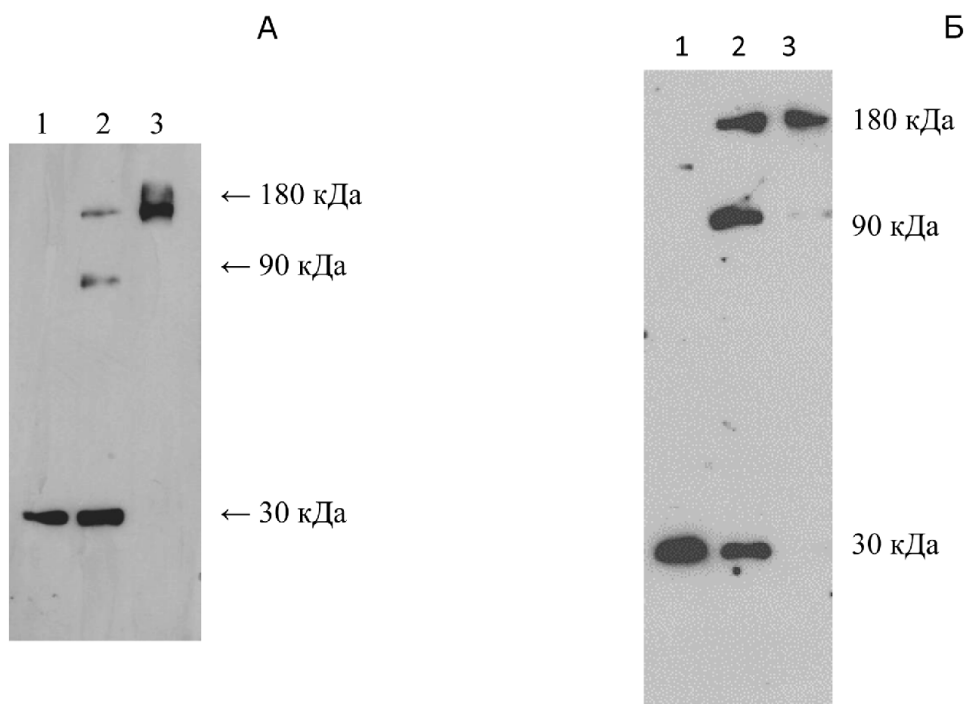


Рисунок 2. Вестерн-блот клеточных экстрактов с использованием антител к PCNA(1:1000) после сшивки 1,5% формальдегидом. На дорожку наносили по 10 мкг белка. (А) экстракты клеток HEK-293 (1 - сшивка 0 мин, 2 - сшивка 15 мин, 3 - сшивка 180 мин). (Б) экстракты клеток нейтрофилов (1 - сшивка 0 мин, 2 - сшивка 15 мин, 3 - сшивка 90 мин).

ЛИТЕРАТУРА

- Naryzhny S.N., Zhao H., Lee H. (2005) J. Biol. Chem., **280**, 13888-13894.
- Naryzhny S.N. (2008) Cell. Mol. Life Sci., **65**, 3789-3808.
- Celis J.E., Bravo R., Larsen P.M., Fey S.J. (1984) Leuk. Res., **8**, 143-157.
- Bravo R., Fey S.J., Bellatin J., Larsen P.M., Celis J.E. (1982) Prog. Clin. Biol. Res., **85**, 235-248.
- Stucki M., Stagljär I., Jonsson Z.O., Hubscher U. (2001) Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol., **65**, 261-298.
- Boehm E.M., Gildenberg M.S., Washington M.T. (2016) Enzymes, **39**, 231-254.
- Fukuda K., Morioka H., Imajou S., Ikeda S., Ohtsuka E., Tsurimoto T. (1995) J. Biol. Chem., **270**, 22527-22534.
- Krishna T.S., Kong X.P., Gary S., Burgers P.M., Kuriyan J. (1994) Cell, **79**, 1233-1243.
- Naryzhny S.N., DeSouza L.V., Siu K.W.M., Lee H. (2006) Biochem. Cell Biol., **84**, 669-676.
- Witko-Sarsat V., Ohayon D. (2016) Immunol. Rev., **273**, 344-356.
- Witko-Sarsat V., Mocek J., Bouayad D., Tamassia N., Ribeil J.-A., Candalh C., Davezac N., Reuter N., Mouthon L., Hermine O., Pederzoli-Ribeil M., Cassatella V.A. (2010) J. Exp. Med., **207**, 2631-2645.
- De Chiara A., Pederzoli-Ribeil M., Mocek J., Candalh C., Mayeux P., Millet A., Witko-Sarsat V. (2013) J. Leukoc. Biol., **94**, 723-731.
- Naryzhny S.N., Lee H. (2010) FEBS Lett., **584**, 4292-4298.
- Zhang P., Zhang S.J., Zhang Z., Woessner J.F Jr., Lee M.Y. (1995) Biochemistry, **34**(34), 10703-10712.
- Moldovan G.L., Pfander B., Jentsch S. (2007) Cell, **129**, 665-679.
- Dieckman L.M., Freudenthal B.D., Washington M.T. (2012) Subcell Biochem., **62**, 281-299.
- Jónsson Z.O., Podust V.N., Podust L.M., Hübscher U. (1995) EMBO J., **14**(22), 5745-5751.
- Orlando V. (2000) Trends Biochem. Sci., **25**, 99-104.
- Штам Т.А., Нарыжный С.Н., Ланда С.Б., Бурдаков В.С., Артамонова Т.О., Филатов М.В. (2012) Цитология, **54**, 430-438.
- Naryzhny S.N., Lee H. (2007) FEBS Lett., **581**, 4917-4920.
- Naryzhny S.N. (2009) Anal. Biochem., **392**, 90-95.
- Bradford M.M. (1976) Anal. Biochem., **72**, 248-254.
- Naryzhny S.N. (1996) Anal. Biochem., **238**, 50-53.
- Loison F., Zhu H., Karatere K., Kasorm A., Liu P., Ye K., Zhou J., Cao S., Gong H., Jenne D.E., O'Donnell E.R., Xu Y., Luo H.R. (2014) J. Clin. Invest., **124**, 4445-4458.
- Stadler C., Skogs M., Brismar H., Uhlén M., Lundberg E. (2010) J. Proteom., **73**, 1067-1078.
- Нарыжный С.Н. (2011) Ядерный антиген пролиферирующих клеток: координатор клеточных функций” LAP Lambert Academic Publishing. 194 с.

Поступила: 16. 06. 2017.
Принята к печати: 28. 06. 2017.

QUATERNARY STRUCTURES OF HUMAN CYTOPLASMIC AND NUCLEAR PCNA ARE THE SAME

N.V. Belyakova, R.A. Pantina, R.A. Kovalev, M.V. Filatov, S.N. Naryzhny

Petersburg Nuclear Physics Institute NRC Kurchatov Institute,
Leningrad region (PNPI), Gatchina, 188300, Russia; e-mail: snaryzhny@mail.ru

Properties and mechanisms of PCNA (proliferating cell nuclear antigen) functions have been investigated for a long time and are studied in great detail. As follows from its name, most known PCNA functions (DNA replication, DNA repair, DNA recombination and others) are connected with cell proliferation and localization of this protein in nuclei. In addition, there is good reason to believe that PCNA also performs some functions in the cytoplasm. However, the possible role and mechanisms of PCNA action in the cytoplasm require careful study and clarification. Interestingly, such cells as neutrophils differ in that they are non-dividing on one hand and on the other hand contain a rather large amount of PCNA, which is localized only in the cytoplasm, that is, they are an ideal model for the study of cytoplasmic PCNA. Using cross-linkages with formaldehyde, we showed that this cytoplasmic PCNA is cross-linked in a similar way, that is, organized in the same way as the nuclear PCNA that is present in the proliferating cells. Previously, we showed that PCNA in such cells is organized into a dynamic complex of double trimer on the basis of the back-to-back principle (Naryzhny S.N. et al. (2005) *J. Biol. Chem.*, 280, 13888). Apparently, such organization of this hub-protein allows it to better coordinate the processes taking place in the cytoplasm as well.

Key words: structure, cytoplasm, neutrophil, PCNA, monomer, double trimer