

Секция «Биоинженерия и биоинформатика»

Клонирование, экспрессия и идентификация белков-партнеров нового селен-содержащего белка млекопитающих V (SelV).

Варламова Елена Геннадьевна

Аспирант

Институт биофизики клетки РАН, биология клетки, Пущино, Россия

E-mail: 1928lv@mail.ru

Селен-содержащий белок млекопитающих (SelV) относится к новому семейству редокс (Rdx) белков, функции которых до конца остаются неизученными. Однако, наличие консервативного CXXC/CXXU мотива (где С-цистеин, Х-любая аминокислота, U-селеноцистеин) в каталитических центрах данных белков и тиоредоксин-подобной укладки свидетельствуют об их участии в окислительно-восстановительных реакциях [1].

Кроме того, SelV является гомологом известного селен-содержащего белка SelW, мРНК SelV экспрессируется исключительно в семенниках (сперматоцитах) [2]. Поскольку одним из основных эффектов селена считается его влияние на мужскую фертильность, выяснение механизмов функционирования данного белка является крайне актуальной проблемой.

В данной работе методом аффинной хроматографии в тандеме с масс-спектрометрическим анализом идентифицированы возможные белки-партнеры SelV, взаимодействующие с ним путем образования межмолекулярных селенид-сульфидных связей: O-связанная N-ацетилглюкозаминтрансфераза (OGT), а также Asb-9 и Asb-17, относящиеся к семейству ASB (семейство белков, содержащих анкириновые повторы и SOCS-домен-супрессор сигнализации цитокинов). Проверена специфичность данных белок-белковых взаимодействий методами ко-иммунопреципитации потенциальных партнеров на аффинном матриксе, а также путем определения паттерна их совместной локализации в клетках млекопитающих линии COS-7. Установлено наличие экспрессии мРНК SelV на ключевых стадиях онтогенеза и сперматогенеза крысы.

Литература

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. SelT, SelW, SelH, and Rdx12: genomics and molecular insights into the functions of selenoproteins of a novel thioredoxin-like family // J. Biochemistry. 2007. Vol. 46, pp. 6871-6882.
2. Kryukov G.V., Castellano S., Novoselov S.V., Lobanov A.V., Zehtab O., Guigo R., and Gladyshev V.N. Characterization of mammalian selenoproteomes // Science. 2003. Vol. 300, pp. 1439-1443.

Иллюстрации

Идентификация белков-партнеров SelV

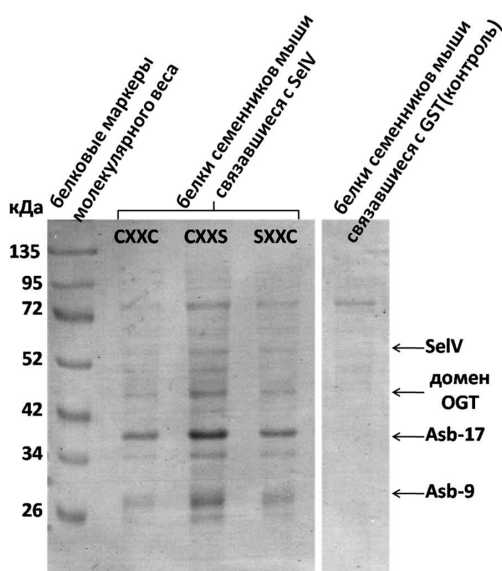


Рис. 1: ПААГ-электрофорез белков семенников мыши, связавшихся с иммобилизованным на Ni-NTA-агарозе SelV 1) белковые маркеры молекулярного веса (кДа); 2-4) белки семенников мыши, связавшиеся с рекомбинантным SelV, имеющим следующие мутации: CXXC (2), CXXS (3), SXXC (4). 5) белки семенников мыши, связавшиеся с глутатион-S-трансферазой (контроль).

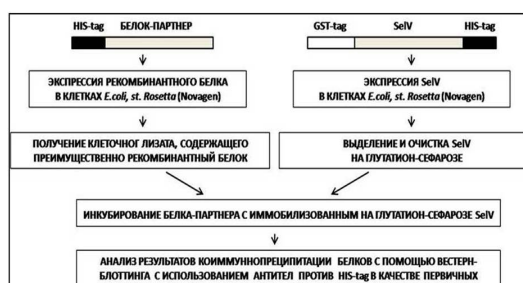


Рис. 2: Протокол экспериментов по ко-иммунопреципитации исследуемых белков

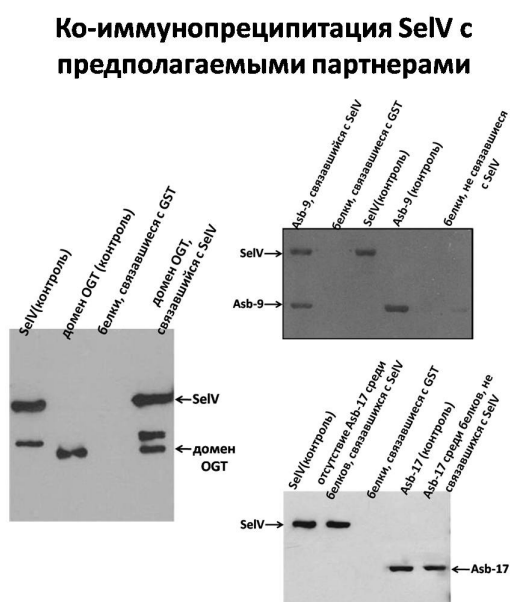


Рис. 3: Ко-иммунопреципитация SelV, иммобилизованного на глутатион-сефарозе, с его потенциальными белками- партнерами.

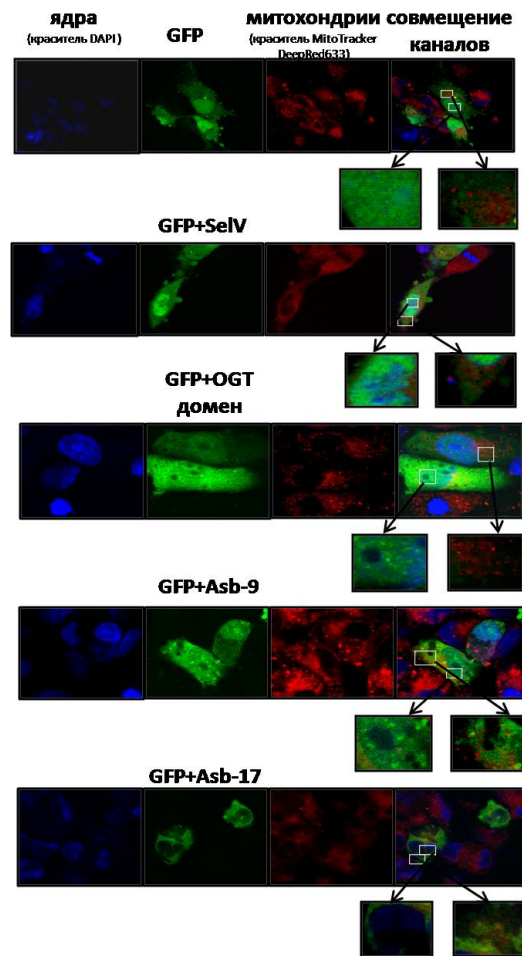


Рис. 4: Внутриклеточная локализация SelV и его белков-партнеров в клетках млекопитающих линии COS-7.

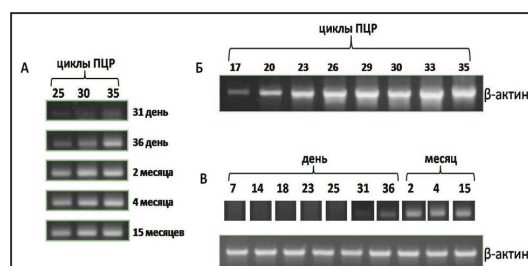


Рис. 5: Экспрессия мРНК SelV в семенниках крысы в процессе сперматогенеза и онтогенеза. А: результаты амплификации открытой рамки считывания SelV после 25, 30 и 35 циклов ПЦР. В качестве матрицы в ПЦР использовались образцы кДНК, полученные на определенных стадиях постнатального развития крысы. Б: результаты амплификации открытой рамки считывания -актина крысы после проведения указанных циклов ПЦР. В: Результаты амплификации открытой рамки считывания SelV крысы с матрицы, полученной на определенных стадиях сперматогенеза и онтогенеза, после проведения 35 циклов ПЦР.