

УДК 572.788:577.151.6

БЕЛКИ-ПАРТНЁРЫ СЕЛЕНОПРОТЕИНА SELM И РОЛЬ СОЕДИНЕНИЙ СЕЛЕНА В РЕГУЛЯЦИИ ЕГО ЭКСПРЕССИИ В РАКОВЫХ КЛЕТКАХ ЧЕЛОВЕКА

Е. Г. Варламова*, М. В. Гольтяев, член-корреспондент РАН Е. Е. Фесенко

Поступило 14.02.2019 г.

Осуществлён поиск потенциальных партнёров селенопротеина человека SELM в лизатах двух раковых клеточных линий HT-1080 (фибросаркома) и MCF-7 (аденокарцинома груди). В качестве партнёров идентифицированы две изоформы цитоплазматического актина: цитоплазматический актин 1 (β -актин цитоскелета) и цитоплазматический актин 2 (γ -актин цитоскелета). Кроме того, исследовано влияние двух широко распространённых противоопухолевых соединений селена (селенита натрия и метилселениновой кислоты) на экспрессию SELM в исследуемых раковых линиях. Показано, что 1 мкМ и 10 мкМ селенита натрия не влияли на экспрессию SELM в клетках фибросаркомы, тогда как в клетках аденокарциномы груди 1 мкМ селенита натрия незначительно усиливал экспрессию, а в концентрации 10 мкМ значительно снижал (почти в два раза). Метилселениновая кислота в обеих раковых клеточных линиях способствовала усилению экспрессии гена *hSELM*.

Ключевые слова: селенопротеин M, белок-белковые взаимодействия, селенит натрия, метилселениновая кислота, канцерогенез.

DOI: <https://doi.org/10.31857/S0869-56524882212-216>

SELM (SELENOM, Selenoprotein M) – высококонсервативный селенопротеин, встречающийся у разных видов и классов животных, преимущественно локализуется в мозге и является резидентом эндоплазматического ретикулума (ЭР) [1, 2]. Данный белок относится к классу селенопротеинов с тиоредоксин-подобной укладкой и имеет консервативный CXXU мотив в каталитическом центре (где С – цистеин, Х – две любые аминокислоты, U – селеноцистеин) [3]. мРНК SELM сверх-экспрессируется во многих раковых клеточных линиях млекопитающих [4, 5], однако практически не существует информации о его роли в регуляции процессов канцерогенеза.

В рамках данной работы осуществлён поиск потенциальных белков-партнёров SELM человека в лизатах двух раковых клеточных линий HT-1080 (фибросаркома) и MCF-7 (аденокарцинома молочных желез), поскольку ранее нами показан высокий уровень его экспрессии в данных раковых клетках [5]. Поиск выполняли методом аффинной хроматографии и масс-спектрометрии. Для этого сначала получали цистеиновый гомолог SELM путём сайт-направленного мутагенеза TGA → TGT (селеноцистеиновый триплет заменён на цистеиновый) с ис-

пользованием пары перекрывающихся праймеров (табл. 1, № 1, 2). Поскольку SELM имеет тиоредоксин-подобную укладку, предположили, что он взаимодействует со своими физиологическими партнёрами по механизму, схожему с тиоредоксином. Показано, что тиол цистеина тиоредоксина с низким рКа атакует внутри- или межмолекулярную дисульфидную связь в белке-мишени, после чего вторая тиоловая группа тиоредоксинового каталитического центра восстанавливает тиол белка-мишени, при этом окисляясь с образованием дисульфидной связи [3]. Ранее подобная серия экспериментов нами была выполнена для селенопротеина V (SELV) [6, 7], другими авторами – для селенопротеина SELW и белка Rdx12 [3], которые наряду с SELM относятся к семейству белков с тиоредоксин-подобной укладкой. Показано, что замена селеноцистеина (Sec) на цистеин (Cys) не влияет на специфику взаимодействия с другими белками, но позволяет замедлить каталитическую реакцию и стабилизировать межмолекулярные взаимодействия между ними, так как Sec является более реакционным [8].

Полученную открытую рамку считывания гена *hSELM* в составе плазмиды pET23b+ (“Novagen”, США) экспрессировали в бактериальных клетках, штамм RosettaTM 2 (DE3) (“Novagen”, США) в присутствии 1 мМ ИПТГ 3 часа. Очищали рекомбинантный SELM, несущий полигистидиновый таг на N-конце, с помощью аффинной хроматографии на никелевой агарозе в нативных условиях (рис. 1а). Параллельно получали лизаты исследуемых раковых

Институт биофизики клетки Российской Академии наук – обособленное подразделение

Федерального исследовательского центра

“Пушкинский научный центр биологических исследований Российской Академии наук”, Пушкино Московской обл.

* E-mail: 1928lv@mail.ru

Таблица 1. Последовательности праймеров, используемых для проведения реакции сайт-направленного мутагенеза и ПЦР в реальном времени

№	Название праймера	Последовательность праймера 5'→3'
1	selm_hum_reverse	GCTGACATCCCCCGCAGGTCTCTACCCG
2	selm_hum_forward	GTAGAGACCTGCGGGGGATGTCAGCTGAACCGCC
3	selm_hum_reverse RT	AGCCTCCTGTTGCCTCCG
4	selm_hum_forward RT	AGGTCAGCGTGGTCCGAAG
5	gapdh_hum_reverse RT	AACGGGAAGCTCACTGGC
6	gapdh_hum_forward RT	CACCACCCTGTTGCTGTAGC

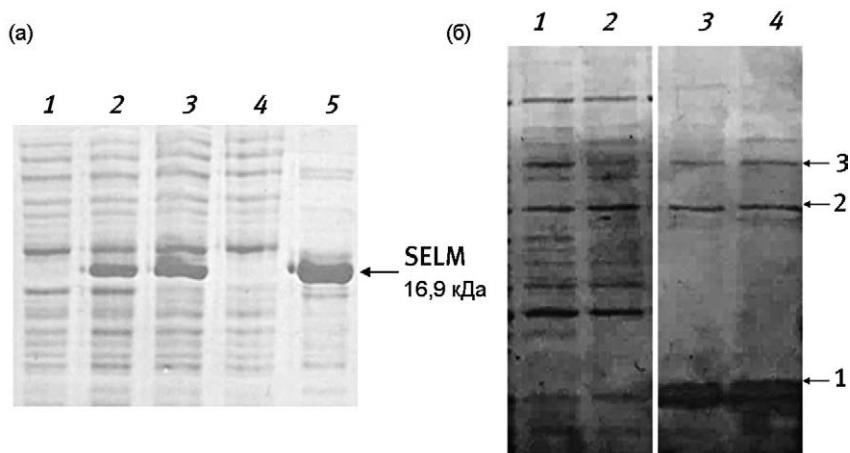


Рис. 1. Анализ белок-белковых взаимодействий SELM и его потенциальных партнёров в лизатах раковых клеток линий HT-1080 и MCF-7. а – ПААГ- электрофорез белков в 15%-м геле на разных стадиях выделения и очистки SELM из клеток *E.coli*: 1 – экспрессия гена *hSelm* до индукции, 2 – экспрессия гена *hSelm* после индукции 1 мМ ИПТГ, 3 – белки клеточного лизата, содержащего SELM, до связывания с никелевой агарозой, 4 – фракция белков, не связавшихся с никелевой агарозой, 5 – SELM, очищенный на никелевой агарозе; б – ПААГ-электрофорез белков в 12%-м геле, находящихся в лизатах раковых клеток: 1 и 2 – белки лизатов раковых клеток линий MCF-7 и HT-1080 соответственно до инкубирования с очищенным SELM, 3 и 4 – белки лизатов раковых клеток линий MCF-7 и HT-1080 соответственно, связавшиеся с SELM. Цифрами 1–3 и стрелками обозначены белки, идентифицированные методом масс-спектрометрии в качестве потенциальных партнёров SELM.

клеток путём их ресуспендирования в физрастворе, обработки УЗ (22 кГц в течение 5 мин, 4 °С), центрифугирования (4000 об/мин, 15 мин, 4 °С) и концентрирования с помощью Amicon Ultra 4–50 кДа концентраторов (“Merk Millipore”, США). Инкубировали полученные клеточные лизаты (отдельно для каждой раковой линии) с очищенным на колонке SELM 3 часа при 4 °С, для удаления неспецифично связавшихся белков аффинный матрикс тщательно отмывали 50 мМ фосфатным буфером с 300 мМ NaCl, pH 8,0, после чего на колонку добавляли тот же буфер, содержащий дополнительно 10 мМ ДТТ, необходимый для восстановления тиола белка-мишени. Образцы потенциальных партнёров SELM разделяли путем ПААГ-электрофореза, после чего проводили их идентификацию методом масс-спектрометрии MALDI-TOF (матричная лазерная десорбционная ионизационная времяпролетная масс-спектрометрия), предварительно выделив из полиакриламидного геля (рис. 1б).

Результаты данного анализа показали, что при инкубировании SELM с лизатами клеток HT-1080 и MCF-7 в качестве его потенциальных физиологических партнёров (полосы на геле № 2 и 3) идентифицированы две изоформы цитоплазматического актина: цитоплазматический актин 1 (цитоскелетный β-актин) и цитоплазматический актин 2 (цитоскелетный γ-актин). Белком под № 1 на геле оказался выделенный нами SELM, который частично смылся с колонки. Эти две основные изоформы цитоплазматического актина отличаются друг от друга всего на четыре аминокислотных остатка на N-конце и играют ключевую роль в ведущих клеточных процессах, таких как адгезия, миграция, поляризация и митоз. При опухолевой трансформации происходят патологические изменения подвижности клеток, вызванные нарушением регуляции актиновой системы, что приводит к инвазии и метастазированию опухоли.

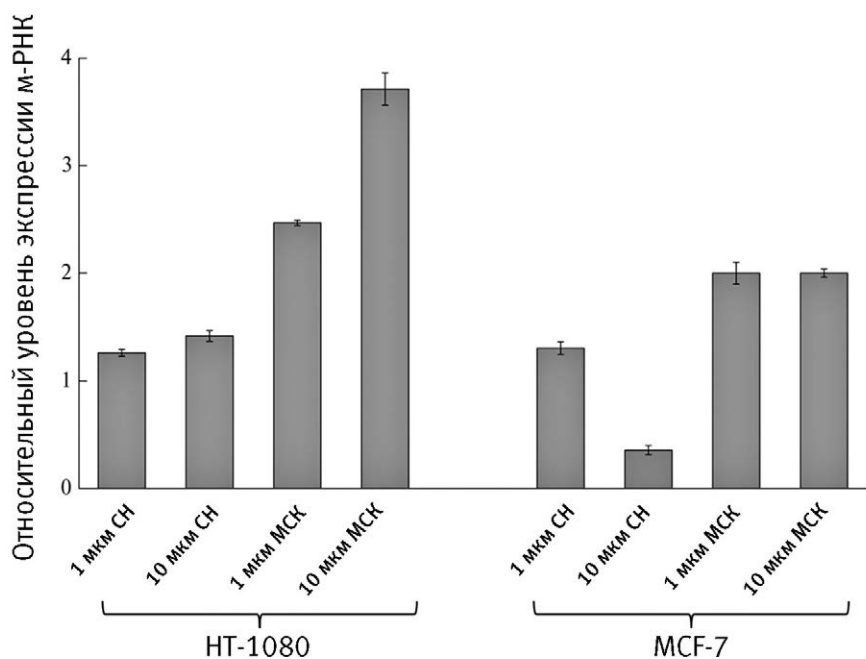


Рис. 2. Экспрессия генов *hSelM* и *hGadh* в раковых клетках линий HT-1080 и MCF-7 до и после воздействия на них СН и МСК. Уровень экспрессии генов в интактных клетках (без обработки СН и МСК) принят за единицу. $M \pm SD$, $n = 3$.

Структурным гомологом SELM, локализующимся также в ЭР, является другой селенопротеин тиоредоксин-подобного семейства SEP15 (SELENOF, Selenoprotein F) [9]. Интересно, что снижение активности SEP15 в различных раковых клетках приводил к блеббину плазматической мембраны [10], процессу, в котором важная роль отводится актину: актиновые микрофиламенты реорганизуются в связанные с мембранной периферийные кольцевые пучки, при этом клетка приобретает округлую форму, дальнейшее сокращение колец приводит к вздутиям мембраны и в итоге к апоптозу клетки. Это может свидетельствовать о том, что SEP15 функционально связан с актиновыми филаментами и участвует в регуляции работы цитоскелета в клетке. Возможно, являясь его структурным гомологом, SELM вовлечён в регуляцию аналогичных процессов в исследуемых раковых клеточных линиях человека, однако это предположение требует дальнейшего подтверждения с помощью других независимых подходов.

Кроме того, для исследования роли SELM в регуляции процессов канцерогенеза на примере двух раковых клеточных линий мы проверили, как меняется экспрессия его мРНК и самого белка при действии на клетки двух потенциальных широко используемых противоопухолевых селеновых соединений: селенита натрия (СН) и метилселениновой кислоты (МСК). Ранее нами на других клеточных линиях показано, что при действии 10 мкМ СН происходило снижение экспрессии мРНК SELM, а

также установлен диапазон концентраций данных соединений, способных снизить жизнеспособность различных раковых клеток [11, 12], поэтому в этой серии экспериментов нами выбраны максимальная и минимальная концентрации из проверенных ранее: 1 мкМ и 10 мкМ.

Полимеразная цепная реакция в реальном времени выполняли с помощью смеси qPCRmix–HS SYBR (“Евроген”, Россия), содержащей интеркалирующий краситель SYBR Green I. Для выделения тотальной РНК из клеток использовали extract tRNA reagent (“Евроген”, Россия), для синтеза кДНК – набор реактивов, содержащий ревертазу вируса лейкемии мышей MMLV и oligodT праймеры (“Евроген”, Россия). Изменение уровня экспрессии мРНК генов до и после обработки селеновыми соединениями определяли по формуле $OUЭ = 2^{-\Delta\Delta C_T}$, где $\Delta\Delta C_T$ – разница значений ΔC_T для каждого гена в клетках до и после обработки. Каждый цикл работы (выделение РНК, реакция обратной транскрипции, ПЦР в реальном времени) повторяли трижды. Количество суммарной РНК (2 мкг), используемое в реакциях обратной транскрипции, контролировали, проводя параллельно реакцию амплификации с использованием праймеров, специфичных к гену *hGapdh* человека. Иммуноблоттинг проводили с помощью коммерческих поликлональных антител против исследуемых белков (“Abcam”, США). Вторичные поликлональные антитела были мечены пероксидазой хрена.

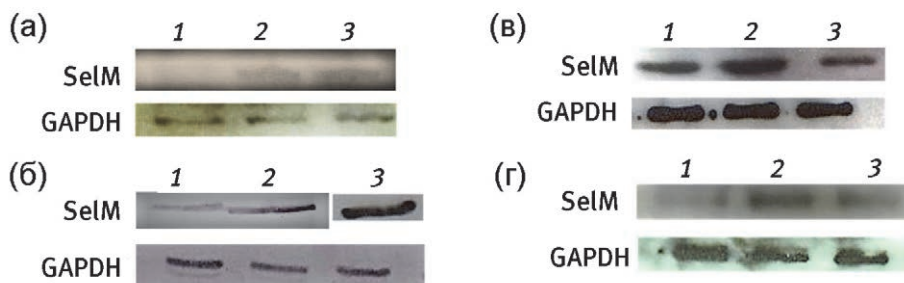


Рис. 3. Анализ лизатов раковых клеток линий HT-1080 (а, б) и MCF-7 (в, г) на наличие в них белков SELM и GAPDH методом иммуноблоттинга. а, в – до и после воздействия на клетки СН: 1 – количество белка в интактных клетках, 2 – количество белка после воздействия на клетки 1 мкМ СН, 3 – 10 мкМ СН; б, г – до и после воздействия на клетки МСК: 1 – количество белка в интактных клетках, 2 – количество белка после воздействия на клетки 1 мкМ МСК, 3 – 10 мкМ МСК.

Согласно результатам, полученным с помощью ПЦР в реальном времени (рис. 2) и Вестерн-блоттинга (рис. 3), можно заключить, что в клетках фибросаркомы СН в концентрациях 1 мкМ и 10 мкМ существенно не повлиял на экспрессию SELM, тогда как в клетках аденокарциномы молочных желез ситуация неоднозначная: 1 мкМ СН слегка усилил экспрессию, а 10 мкМ СН, наоборот, привёл к её существенному снижению (приблизительно в 2 раза). МСК в обеих раковых клеточных линиях усилила экспрессию исследуемого гена и белка, соответственно, наиболее выраженный эффект наблюдался при обработке клеток фибросаркомы 10 мкМ МСК (усиление экспрессии гена *hSelm* почти в 4 раза).

Выбор данных соединений селена обусловлен, во-первых, тем, что СН и МСК являются широко используемыми в клинических исследованиях потенциальными противоопухолевыми агентами, во-вторых, они способны вызывать стресс ЭР и индуцировать различные пути апоптоза в раковых клетках [13–15], что является важным для изучения механизма регуляции ЭР стресса и причин гибели раковых клеток при участии селенопротеинов, локализующихся исключительно в данном органоиде клетки, к числу которых относится и SELM. Поскольку полученные нами результаты выявили неоднозначную зависимость экспрессии гена *hSelm* и от концентрации СН и МСК, и от клеточной линии, то на данном этапе исследований сложно говорить о конкретных механизмах апоптоза с участием данного селенопротеина, необходимы дополнительные экспериментальные данные. Однако представленные в данной работе результаты могут послужить серьёзной предпосылкой для дальнейшего исследования роли селенопротеина SELM в регуляции процессов канцерогенеза на примере двух раковых клеточных линий человека HT-1080 и MCF-7.

Источник финансирования. Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 18–34–00118 мол_a.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Zhou J.C., Zhao H., Tang J.-Y., Li J.G., Liu X.L., Zhu Y.M. // *Genes Genom.* 2011. V. 33. P. 529–534.
2. Korotkov K.V., Novoselov S.V., Hatfield D.L., Gladyshev V.N. // *Mol. Cell Biol.* 2002. V. 22. P. 1402–1411.
3. 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. // *Biochem.* 2007. V. 46. P. 6871–6882.
4. Reeves M.A., Bellinger F.P., Berry M.J. // *Antioxid. Redox. Signal.* 2010. V. 12. P. 809–18.
5. Варламова Е.Г., Гольтяев М.В., Фесенко Е.Е. // *ДАН.* 2016. Т. 468 № 4 С. 456–458.
6. Варламова Е.Г., Новосёлов С.В., Новосёлов В.И., Фесенко Е.Е. // *ДАН.* 2011. Т. 441. № 3. С. 399–401.
7. Varlamova E.G., Novoselov V.I. // *Mol. Biol. (Mosk).* 2012. V. 46. P. 276–284.
8. Jacob C., Giles G.I., Giles N.M., Sies H. // *J. Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2003. V. 42. P. 4742–4758.
9. Ferguson A.D., Labunskyy V.M., Fomenko D.E., Arac D., Chelliah Y., Amezcua C.A., Rizo J., Gladyshev V.N., Deisenhofer J. // *J. Biol. Chem.* 2006. V. 281. P. 3536–3543.
10. Bang J.I., Jang M., Huh J.H., Na J.W., Shim M., Carlson B.A., Tobe R., Tsuji P.A., Gladyshev V.N., Hatfield D.L., Lee B.J. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2015. V. 456. P. 884–890.
11. Кузнецова Ю.П., Гольтяев М.В., Горбачева О.С., Новосёлов С.В., Фесенко Е.Е. // *ДАН.* 2018. Т. 480. № 1. С. 107–111.
12. Varlamova E.G., Goltjaev M.V. // *Biophysics.* 2018. V. 63. P. 699–704.
13. Guan L., Han B., Li Z., Hua F., Huang F., Wei W., Yang Y., Xu C. // *Apoptosis.* 2009. V. 14. P. 218–225.

14. Shigemi Z., Manabe K., Hara N., Baba Y., Hosokawa K., Kagawa H., Watanabe T., Fujimuro M. // Chem. Biol. Interact. 2017. V. 266. P. 28–37.
15. Han B., Ren Y., Guan L., Hua F., Yang Y., Yang T., Cao T., Dong H., Pan H., Xu C. // Oncol. Res. 2009. V. 17. P. 373–381.

PROTEIN-PARTNERS OF SELENOPROTEIN SELM AND THE ROLE OF SELENIUM COMPOUNDS IN REGULATION OF ITS EXPRESSION IN HUMAN CANCER CELLS

E. G. Varlamova, M. V. Goltyaev, Corresponding Member of the RAS E. E. Fesenko

Institute of Cell Biophysics of the Russian Academy of Sciences, Pushchino, Moscow region, Russian Federation

Received February 14, 2019

The search of potential partners of human SELM in lysates of two cancer cell lines HT-1080 (fibrosarcoma) and MCF-7 (breast adenocarcinoma) was carried out. Two cytoplasmic actin isoforms: cytoplasmic actin 1 (cytoskeleton β -actin) and cytoplasmic actin 2 (cytoskeletal γ -actin) was identified as partners. In addition, the influence of two widely used antitumor selenium compounds (sodium selenite and methylseleninic acid) on the expression SELM in cancer cells was studied. According to the results obtained by real-time PCR and Western blotting, we was concluded that 1 μ M and 10 μ M sodium selenite was not affected on the expression SELM in fibrosarcoma cells, whereas in breast adenocarcinoma cells 1 μ M sodium selenite slightly increased of expression and 10 μ M resulted in a significant decrease (about 2 times). Methylseleninic acid in both cancer cell lines increased the expression of SELM gene, the most pronounced effect was observed when fibrosarcoma cells were treated with 10 μ M MSC (increased expression of the hSelm gene by almost 4 times).

Keywords: selenoprotein M, protein-protein interactions, sodium selenite, methylseleninic acid, carcinogenesis.