

УДК 577.122

ИЗУЧЕНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ РАЗЛИЧНЫХ ФОРМ ГЛИЦЕРАЛЬДЕГИД-3-ФОСФАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ С ШАПЕРОНИНОМ Hsp 70¹

© 2009 М.Ю. Языкова,² Е.В. Шмальгаузен, И.Н. Налетова,
А.П. Плетень, В.И. Муронец³

С помощью твердофазного иммуноферментного анализа и иммобилизации одного из партнеров на сефарозе было исследовано взаимодействие различных форм глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (ГАФД) с шаперонином Hsp 70. Разработанная система очень удобна для анализа взаимодействия шаперона Hsp 70 с ГАФД (и, возможно, с другими белками-мишенями), а также для изучения влияния различных эффекторов на это взаимодействие. Этот подход не требует большого количества белков и лигандов и легко автоматизируется. Было показано, что ни одним из этих методов не удается обнаружить связывания нативной ГАФД с шаперонином Hsp 70. При этом добавление субстратов и кофакторов ГАФД или переводение фермента в ацилированную форму также не приводит к индукции связывания шаперонина Hsp 70. Денатурированные формы ГАФД, полученные путем диссоциации на субъединицы в воде или адсорбцией на планшете, эффективно взаимодействуют с шапероном Hsp 70. Обнаружено также связывание денатурированной ГАФД, ассоциированной с сефарозой, с растворимым шапероном Hsp 70. Таким образом, нами было установлено, что только денатурированные формы ГАФД могут взаимодействовать с шапероном Hsp 70 и предотвращать его участие в разрушении амилоидных структур (например, агрегатов хантингтина).

Ключевые слова: глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа, шаперонин Hsp 70, иммобилизация, амелоидные структуры.

¹Статья поддержана грантами Роснауки (02.512.11.2249) и РФФИ (08-04-00231a и 08-08-00540).

²Языкова Марина Юрьевна (marin@samara.ru), кафедра биохимии Самарского государственного университета, 443011, Россия, г. Самара, ул. Акад. Павлова, 1.

³Шмальгаузен Елена Викторовна (shmal@belozersky.msu.ru), Налетова Ирина Николаевна (naletova@belozersky.msu.ru), Плетень Анатолий Петрович (Anatoliy.Pleten@ucb.com), Муронец Владимир Израилевич (vimuronets@belozersky.msu.ru), НИИ Физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, 119992, Россия, г. Москва, Ленинские горы.

Введение

Функционирование системы шаперонов необходимо для обеспечения жизнедеятельности клеток, особенно в условиях стресса (температурного или окислительного). Особое внимание в последние годы уделяется роли шаперонов в развитии нейродегенеративных заболеваний амилоидной природы, так как накапливается противоречивая информация об их участии как в формировании амилоидных агрегатов, так и в их разрушении. Более того, некоторые шапероны даже вовлечены в конверсию нативных амилоидогенных белков в инфекционную прионную форму. В то же время есть наблюдения об участии глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (ГАФД) в формировании амилоидных агрегатов [6]. В частности было показано, что при хорее Гентингтона формирование амилоидных агрегатов из молекул хантингтина происходит при участии ГАФД [3, 5]. Шаперонин Hsp 70 также вовлечен в этот процесс, так как его эффективное функционирование необходимо для предотвращения агрегации хантингтина [7]. Ранее нами было показано, что денатурированные, модифицированные или окисленные формы ГАФД ингибируют шапероны (в частности GroEL) [8]. В данной работе нами было проверено предположение, согласно которому может происходить ассоциация определенных конформационных состояний ГАФД с шаперонином Hsp 70, препятствующая его нормальному функционированию, а также предложен удобный метод исследования такого рода взаимодействий.

Методы исследования

В работе были использованы следующие препараты: NAD, глицин, Трис, D-глицеральдегид-3-фосфат, ЭДТА, мочевины, сефароза 4В, сефадекс G-50 (fine), сефадекс G-200 ("Сигма"). Препарат шаперонина Hsp 70 был любезно предоставлен И. Гужевой (Институт цитологии РАН). Препараты моноклональных антител 6С5 против ГАФД и вторичные антитела против антител мыши, конъюгированные с пероксидазой фирмы ("HighTest").

В экспериментах по иммобилизации белков использовали препарат BrCN, свежесинтезированный из KCN и Br₂. Остальные реактивы были отечественного производства ("Реахим"), марки не ниже "осч". Все растворы готовились на бидистиллированной воде.

Получение фермента. Глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназу из скелетных мышц кролика выделяли по модифицированному методу Скоупса.

Определение концентраций белков. Концентрации растворимых белков определяли либо путем измерения поглощения при 280 нм ($A_{280}^{0,1\%} = 1,00$ для холоформы ГАФД), либо по методу Бредфорд [2]. Концентрации иммобилизованных белков определяли по модифицированному методу Бредфорд [1, 4].

Определение энзиматической активности. Активность ГАФД измеряли спектрофотометрически при 340 нм по скорости образования NADH. Реакционная смесь содержала 50 мМ глициновый буфер, pH 10,0, 50 мМ фосфат калия, 5 мМ ЭДТА. Пробы также содержали 1 мМ глицеральдегид-3-фосфат и 1 мМ NAD⁺. Реакцию начинали добавлением фермента.

Иммобилизация белка. Иммобилизацию ГАФД на BtCN-активированной сефарозе проводили, как описано ранее [4], используя для активации сефарозы 25 мг BtCN на 1 мл уплотненного геля.

Иммуноферментный анализ. Нами была разработана система, основанная на твердофазном иммуноферментном анализе (ИФА), позволяющая исследовать взаимодействие шаперона Hsp 70 с ГАФД. Для оценки взаимодействия шаперона с разными формами ГАФД в лунки планшета для ИФА вносили по 100 мкл раствора Hsp 70 мкг/мл в фосфатно-солевом буфере (10 мМ фосфат калия, 150 мМ NaCl, pH 7,5). Спустя 30 мин инкубации планшет трижды промывали ФСБТ (фосфатно-солевой буфер + 0,05 %-ный твин-20), после чего в лунки вносили по 100 мкл следующих растворов ГАФД в буфере, содержащем различные добавки: в качестве контроля в первую лунку добавляли ФСБТ. Планшет инкубировали с указанными растворами в течение 30 мин, после чего трижды промывали ФСБТ и окрашивали моноклональными антителами 6С5 против ГАФД согласно стандартной методике. В качестве вторичных антител использовали антитела против антител мыши, конъюгированные с пероксидазой. Оптическую плотность в лунках (492 нм, дифференциальный фильтр 630 нм) просчитывали при помощи планшетного фотометра Stat Fax 2100 (Awareness technology, USA) и рассчитывали средние значения по трем лункам ± стандартная ошибка.

Результаты и их обсуждение

Прежде всего, для проверки гипотезы относительно возможности связывания нативной (или какой-либо иной формы) глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (ГАФД) с шапероном Hsp 70 были исследованы взаимодействия между этими белками методом иммуноферментного анализа (ИФА), а также влияние субстратов и кофакторов ГАФД на эти процессы. В первой серии экспериментов мы сначала сорбировали шаперон Hsp 70 на 96-луночный планшет для ИФА, затем добавляли к нему ГАФД и определяли количество связавшегося фермента с помощью специфических антител. Для получения разных конформационных форм ГАФД белок разводили в следующих растворах: вода; фосфатно-солевой буфер; буфер с меркаптоэтанолом; буфер с меркаптоэтанолом и субстратами ГАФД (NAD⁺, 3-фосфоглицериновый альдегид (3-ФГА)). Также вместо фосфатно-солевого буфера использовали 20 мМ MOPS, pH 7,5, без добавок и в присутствии NaCl. Результаты эксперимента представлены

на рис. 1 и 2. Из приведенных на рис. 1, а данных следует, что нативная ГАФД (холоформа, содержащая 2–3 молекулы связанного кофактора) в буфере с низкой ионной силой взаимодействует с шаперонином Hsp 70, причем как в присутствии низкомолекулярных тиолов (меркаптоэтанола), так и без них. Однако это взаимодействие полностью устраняется добавлением 3-фосфоглицеринового альдегида (3-ФГА) и 3-ФГА вместе с NAD⁺. Хорошо известно, что в присутствии субстрата и кофактора ГАФД превращается в ацил-фермент, обладающий отличной от исходного белка конформацией. Никаких взаимодействий двух белков не наблюдается также при повышении ионной силы раствора (рис. 1, б). На основании приведенных экспериментов можно сделать вывод, что ГАФД в виде холофермента может связываться с шапероном, но только при низкой ионной силе, а ацил-фермент такой способностью не обладает. Из данных, приведенных на рис. 2, следует, что наиболее прочное взаимодействие с шапероном характерно для холофермента ГАФД, растворенного в воде. Вероятно, это обусловлено частичной инактивацией и/или диссоциацией ГАФД без добавления стабилизирующих ее структуру соединений.

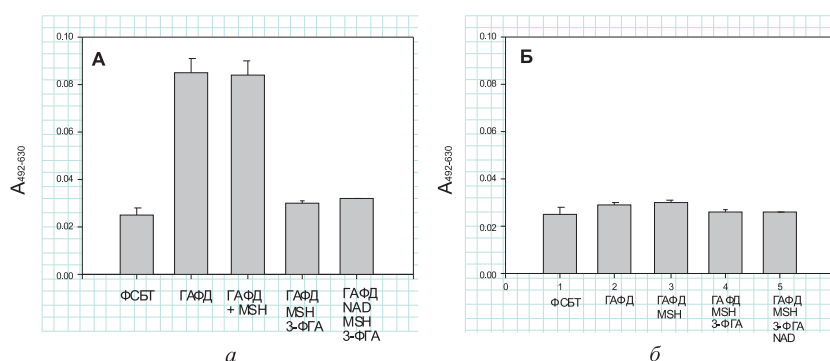


Рис. 1. Связывание ГАФД с шапероном Hsp 70, сорбированным на планшете, методом иммуноферментного анализа в зависимости от ионной силы буфера. На планшет сорбировали Hsp 70 согласно стандартной процедуре, затем планшет отмывали и в лунки вносили растворы следующего состава: 1) контроль — буфер (ФСБТ), 2) ГАФД, 3) ГАФД + MSH, 4) ГАФД + MSH + 3-ФГА и 5) GAPD + NAD⁺ + MSH + 3-ФГА в буфере 20 mM MOPS, pH 7,5 (а) или 20 mM MOPS, pH 7,5, 0,15 M NaCl (б). Пробы инкубировали 30 мин, затем планшет промывали и окрашивали антителами на ГАФД. Данные представлены в виде среднего 6 измерений ± стандартная ошибка

Во второй серии экспериментов мы сначала сорбировали на планшете ГАФД, затем добавляли к ней шаперонин и снова ГАФД (так называемый "сэндвич"), содержание которой определяли с помощью специфических антител. Для этого на 96-луночный планшет в ряды А-Д сорбировали ГАФД согласно процедуре, описанной ранее. После отмывания ФСБТ в ряды В, С и D вносили по 100 мкл раствора Hsp 70 в ФСБ. Ряд А оставляли для контроля. После 30 мин инкубации планшет отмывали от избытка белка бу-

фером ФСБТ. Затем в ряды С и D вносили раствор ГАФД в ФСБ (С) или в воде (D). Ряд В служил тестом на связывание Hsp 70 с иммобилизованной ГАФД, а ряды С и D тестом на возможность образования "сэндвича" ГАФД–Hsp 70–ГАФД. Затем планшеты окрашивали антителами 6С5 против ГАФД и вторичными антителами. Результаты эксперимента представлены на рис. 3.

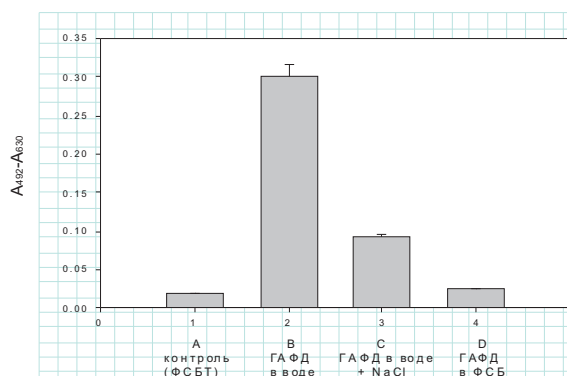


Рис. 2. Влияние предынкубации ГАФД в воде, солевом или фосфатно-солевом буфере на ее связывание с шапероном Hsp 70, сорбированным на планшете, методом иммуноферментного анализа

В лунки рядов А-D сорбировали шаперон Hsp 70. После отмывания планшета лунки ряда А инкубировали с ФСБТ (контроль), а в лунки рядов В-D добавляли растворы ГАФД в воде (В), ГАФД в 0,15 М NaCl (С), ГАФД в ФСБ (D), инкубировали 30 мин, затем отмывали и окрашивали антителами на ГАФД. Данные представлены в виде среднего \bar{x} измерений \pm стандартная ошибка

Из приведенных на рис. 3 данных следует, что происходит связывание шаперона с сорбированной ГАФД, так как часть антигенных детерминат фермента становится недоступной для специфических антител (сравните ряды А и В). Последующее добавление ГАФД снова приводит к появлению исходного количества антигенных детерминат фермента. К сожалению, однозначно трудно интерпретировать эту часть эксперимента, так как возможно как образование "сэндвича", так и вытеснение шаперонина из комплекса с сорбированной ГАФД и переход шаперонина, связанного с растворимой ГАФД, в раствор. Выяснение этого вопроса будет предметом дальнейшего изучения.

Таким образом, на основании этой части работы можно сделать два основных вывода:

- Разработанная система очень удобна для анализа взаимодействия шаперона Hsp 70 с ГАФД (и, возможно, с другими белками-мишенями), а также для изучения влияния различных эффекторов на это взаимодействие. Этот подход не требует большого количества белков и лигандов и легко автоматизируется.

- Можно сделать однозначный вывод, что ненативная форма ГАФД (диссоциированная на субъединицы в воде или адсорбированная на планшете) взаимодействует с шапероном Hsp 70, однако связывания шаперона с другими конформационными состояниями ГАФД (комплекс с кофактором или ацил-фермента) не происходит.

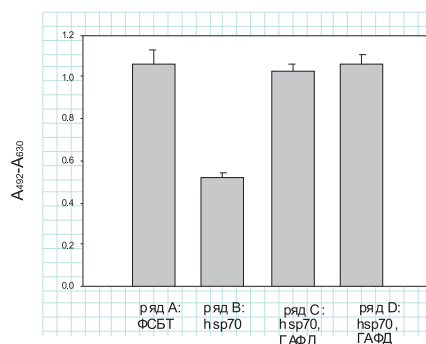


Рис. 3. Исследование связывания шаперона Hsp 70 с сорбированной ГАФД методом иммуноферментного анализа

Раствор ГАФД (1,4 мкг/мл) сорбировали на планшете для ИФА согласно стандартной методике. Затем в лунки ряда А добавляли буфер (ФСБТ), а в лунки рядов В-Д раствор Hsp 70. После 30 мин инкубации планшет отмывали, в лунки рядов А и В добавляли буфер (ФСБТ), а в лунки рядов С и D раствор ГАФД в буфере ФСБ (3) или в воде (4). После 30 мин инкубации планшет отмывали и окрашивали антителами на ГАФД. Данные представлены в виде среднего 6 измерений \pm стандартная ошибка

Для исследования взаимодействия Hsp 70 с разными формами ГАФД мы использовали метод фиксированного партнера. Для этого иммобилизовали нативную форму ГАФД за одну субъединицу на сефарозе 4В. Затем для получения ацилированной формы ГАФД иммобилизованную нативную ГАФД инкубировали в присутствии 0,23 мМ 3-ФГА. Для получения иммобилизованного денатурированного мономера ГАФД мы инкубировали иммобилизованную нативную ГАФД в присутствии 8 М мочевины и затем промывали буфером. Как видно из рис. 4, Hsp 70 взаимодействует с иммобилизованным денатурированным мономером ГАФД как в присутствии, так и в отсутствие 3-ФГА (дорожки 1 и 7, соответственно).

На дорожках 3 и 5 представлен результат инкубации иммобилизованных нативной и ацилированной форм ГАФД с Hsp 70. Как видно из рисунка, данные формы ГАФД практически не взаимодействуют с шапероном. Добавление в среду инкубации 2 мМ меркаптоэтанола устраняет даже следы адсорбции шаперона на нативных формах ГАФД. Таким образом, данным методом нами было обнаружено связывание шаперона только с денатурированными формами ГАФД.

Проведенное нами исследование показывает, что денатурированные формы глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы взаимодействуют с шаперони-

ном Hsp 70, вовлеченным в разрушение агрегированных форм хантингтина. Можно предположить, что появление таких форм фермента, например в результате его окисления при окислительном стрессе, может приводить к появлению функционально неактивного шаперонина Hsp 70 в комплексе с ГАФД. Вероятно, развитие хорей Генгигтона может провоцироваться недостаточной активностью системы шаперонов (прежде всего Hsp 70) при ее блокировании денатурированными формами белков.

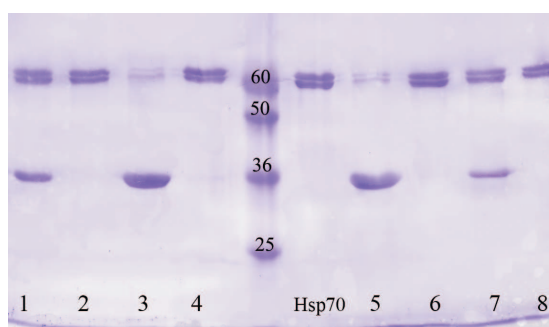


Рис. 4. Исследование взаимодействия Hsp 70 с нативной, ацилированной и денатурированной ГАФД, иммобилизованной на сефарозе 4В Hsp 70 (4,2 мкМ, 100 мкл) в 20 мМ MOPS, 1 мМ ЭДТА, pH 7,0 инкубировали с денатурированной или нативной формами ГАФД, иммобилизованными на сефарозе 4В без добавок (дорожки 1 и 3) или в присутствии 0,23 мМ ФГА (дорожки 5 и 7). Далее отбирали супернатант (дорожки 2, 4, 6, 8), отмывали сефарозу буфером и анализировали пробы при помощи ДСН-электрофореза.

1. Денатурированная ГАФД, иммобилизованная на сефарозе 4В, после инкубации с Hsp 70 (образец № 1).
2. Супернатант образца № 1.
3. Нативная ГАФД, иммобилизованная на сефарозе 4В, после инкубации с Hsp 70 (образец № 3).
4. Супернатант образца № 3.
5. Нативная ГАФД, иммобилизованная на сефарозе 4В, после инкубации с Hsp 70 в присутствии 3-ФГА (образец № 5).
6. Супернатант образца № 5.
7. Денатурированная ГАФД, иммобилизованная на сефарозе 4В, после инкубации с Hsp 70 в присутствии 3-ФГА (образец № 7).
8. Супернатант образца № 7.

Литература

- [1] Asryants R., Duszenkova I., Nagradova N.K. Determination of Sepharose-bound protein with Coomassie brilliant blue G-250 // *Analyt. Biochem.* 1985. V. 151. P. 571–574.
- [2] Bradford M.M. A rapid and sensitive method of quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding using BSA solution as the standart // *Analyt. Biochem.* 1976. V. 72. P. 248–254.

- [3] Huntingtin and DRPLA proteins selectively interact with the enzyme GAPDH / J.R. Burke [et al.] // *Nat. Med.* 1996. V. 2(3). P. 347–350.
- [4] Cherednikova T., Muronetz V., Nagradova N. Study of subunit interactions in immobilized D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase // *Biochim. Biophys. Acta.* 1980. V. 613. P. 292–308.
- [5] Transglutaminase-catalyzed inactivation of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase and alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex by polyglutamine domains of pathological length / A.J. Cooper [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1997. V. 94(23). P. 12604–12609.
- [6] Chuang De-Maw, Hough Christopher, Senatorov Vladimir. Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase Apoptosis and Neurodegenerative Diseases // *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2005. V. 45. P. 269–290.
- [7] In vitro studies show that Hsp 70 can be released by glia and that exogenous Hsp 70 can enhance neuronal stress tolerance / I.V. Guzhova [et al.] // *Brain Res.* 2001. V. 914. P. 66–73.
- [8] Naletova I.N., Muronetz V.I., Schmalhausen E.V. Unfolded, oxidized and thermoinactivated forms of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase interact with the chaperonin GroEL in different ways // *Biochim. Biophys. Acta.* 2006. V. 1764. P. 831–838.

Поступила в редакцию 28/IX/2009;
в окончательном варианте — 28/IX/2009.

**STUDY OF INTERACTIONS OF DIFFERENT FORMS
OF GLYCERALDEHYDE-3-PHOSPHATE
DEHYDROGENASE WITH THE CHAPERONIN Hsp 70⁴**

© 2009 M.Yu. Yazykova,⁵ E.V. Schmalhausen, I.N. Naletova, A.P. Pleten,
V.I. Muronets⁶

Interaction of different forms of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPD) with the chaperonin Hsp 70 was investigated using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The developed approach is convenient for investigation of the interaction between Hsp 70 and GAPD (and presumably with other target proteins) and the influence of different effectors on this interaction. The assay is automatic and does not require large amounts of the proteins and their ligands. Both methods did not detect any interactions between native GAPD and Hsp 70. The addition of the substrate or cofactor or acylation of the enzyme did not induce its binding to Hsp 70. Denatured forms of GAPD obtained by the dissociation of the enzyme into subunits in a water solution or by the sorption of the enzyme on an ELISA plate efficiently bound to the chaperonin Hsp 70. It was demonstrated that denatured GAPD immobilized on Sepharose also interacted with soluble Hsp 70. Thus, we showed that the chaperonin Hsp 70 binds denatured forms of GAPD, which must prevent its participation in decomposition of amyloid structures (for example, aggregates of the huntingtin protein).

Key words: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, chaperonin Hsp 70, immobilization, amyloid structures.

Paper received 28/IX/2009.

Paper accepted 28/IX/2009.

⁴The article is supported by the grants of Russian Science (02.512.11.2249) and Russian Foundation for Basic Research (08-04-00231a and 08-08-00540).

⁵Yazykova Marina Yurievna, (marin@samara.ru), Dept. of Biochemistry, Samara State University, Samara, 443011, Russia.

⁶Shmalhausen Elena Viktorovna (shmal@belozersky.msu.ru), Naletova Irina Nikolaevna (naletova@belozersky.msu.ru), Pleten Anatoliy Petrovich (Anatoliy.Pleten@ucb.ru), Muronets Vladimir Izraelevich (vimuronets@belozersky.msu.ru), Scientific Investigation Institute of Physico-Chemical Biology A.N.Belozersky by name, Moscow State University M.V.Lomonosov by name, Moscow, 119992, Russia.