Институт биоорганической химии им. академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН
Лаборатория молекулярных технологий
Московская школа на Юго-Западе № 1543

Дегидрогеназа D-арабинозы как инструмент для регуляции соотношения концентраций NAD^+/NADH в клетках

М. Заец
Научные руководители
к.б.н. Екатерина Сергеевна Потехина
Дина Юрьевна Басс

Москва 2022

Оглавление

Введение 3

Материалы и методы 6

Результаты и обсуждение 12

Выводы 14

Список литературы 15

Введение

NAD^+ и NADH (никотинамидадениндинуклеотид) – водорастворимые коферменты, которые выполняют в клетке важные функции. Основной задачей этих коферментов является участие в метаболических реакциях с переносом электронов. В ходе этих реакций NAD+ восстанавливается до NADH, либо наоборот, NADH окисляется до NAD^+.

Восстановление NAD^+ в клетках происходит в основном в процессе гликолиза, в цикле трикарбоновых кислот. Также NAD^+ получает водород во время β-окисления жирных кислот и в других реакциях катаболизма, например, при катаболизме аминокислот до пирувата или кетоновых тел. При гликолизе на 1 молекулу глюкозы синтезируется 2 молекулы NADH [Нельсон, Кокс, 2011].

Окисление NADH происходит на электронтранспортной цепи в процессе окислительного фосфорилирования, в которой NADH служит донором электронов для комплекса I (NADH-дегидрогеназа), с которого электроны направляются на другие комплексы дыхательной цепи. Если кислорода недостаточно для аэробного окисления пирувата, NADH может окисляться до NAD^+ при молочнокислом брожении (пируват восстанавливается до лактата).

Концентрация окисленной формы (NAD^+) в цитозоле примерно в 7-8 раз больше, чем концентрация восстановленной (NADH), что благоприятствует переносу гидрид-ионов H^- с субстрата на NAD^+. В митохондриях же, особенно в активно дышащей, соотношение [NAD H] / [NAD^+] больше единицы [Ying, 2008]

Некоторые исследования показали, что общее количество NAD понижается при старении клетки, а нарушение метаболизма NAD^+ может приводить к болезням, связанными с клеточным старением, в том числе к нейродегенеративным и онкологическим [Yaku et al, 2018].

NAD^+ является субстратом для ряда белков, регулирующих старение, в том числе для белков сиртуинов. Сиртуины участвуют во многих важных процессах, таких как поддержание постоянной концентрации глюкозы, глюконеогенез, регуляция цикла Кребса, секреция инсулина, метаболизм жиров и регуляция апоптоза. Их основной функцией является отделение ацильной группы от белков. При этом они расщепляют NAD^+ на никотинамид и АДФ-рибозу, а потом присоединяют ацильную группу к АДФ-рибозе через атом кислорода. [Zhang, Sauve, 2018]. Также среди сиртуинов есть белок SIRT1 – гистондеацетилаза, действие которого локализовано в ядре. SIRT1 необходим для отделения ацетильной группы от гистонов, что приводит к понижению экспрессии генов.

Увеличение количества NAD^+ в клетке способствует повышению активности сиртуинов, которые замедляют клеточное старение. Некоторые исследования показали, что ограничение

количества калорий, полученных с пищей, благоприятствует активности сиртуинов и таким образом увеличивает продолжительность жизни [Verdin, 2015].

Пониженное соотношение NAD^+/NADH способствует появлению митохондриального окислительного стресса (образование активных форм кислорода), который приводит к появлению диабетической болезни почек [Ogura et al, 2020].

Мы предположили, что существует способ, позволяющий изменять концентрацию NAD^+ и NADH, не влияя при этом на другие процессы метаболизма в клетке. В дальнейшем этот метод можно было бы использовать для исследования влияния соотношения NAD^+/NADH на физиологические процессы в клетке.

Для этой цели, казалось бы, можно поместить клетки в раствор, в котором содержится недостающая в клетке форма NAD. Но этот способ не подействует, так как NAD не может свободно проходить через клеточную мембрану, к тому же, при этом изменится общее количество NAD в клетке.

Есть другой вариант: добавить в клетку вещество, которое участвует в реакции с выделением NADH, например, лактат. Но появление в клетке избыточного количества лактата сильно повлияет на основные метаболические пути – в клетке возрастёт количество пирувата. К тому же лактат не будет проходить через внутреннюю мембрану митохондрий, поэтому таким образом невозможно повлиять на соотношение NAD^+/NADH в матриксе.

Наиболее эффективным способом представляется использование генетически кодируемого инструмента – это может быть фермент, который будет увеличивать соотношение [NADH]/[NAD^+], восстанавливая NAD^+ до NADH. Действие этого инструмента можно локализовать в цитозоле или в митохондриях. Для этой цели нужен белок с нетипичным для клетки млекопитающих субстратом, чтобы процесс не шёл постоянно, его можно было бы контролировать, а также он не влиял бы на основные метаболические пути клетки. Также важно, чтобы ни субстрат, ни продукт не были ядовитыми, а субстрат мог свободно проникать в клетки.

В качестве такого инструмента мы собираемся использовать белок дегидрогеназу D-арабинозы (Ara2p). Это белок дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, расщепляющий дрожжевой сахар D-арабинозу, при этом образуется D-арабиноно-1,4-лактон, а NAD^+ восстанавливается до NADH. Дрожжам данный фермент необходим для синтеза эритроаскорбиновой кислоты, аналога витамина C [Amako et al, 2006].

Существует и другой подобный инструмент – Lb NOX, NADH-оксидаза из *Lactobacillus brevis*. Этот инструмент, наоборот, увеличивает количество NAD^+ в клетке, окисляя NADH [Titov et al, 2016].

Ara2p также использовался для регуляции соотношения [NADH]/[NAD^+] в цитоплазме. В этом исследовании Ara2p была соединена линкером Gly-Ser-Gly с белком EGFP.

EGFP (Enhanced green fluorescent protein) – искусственно полученный мутантный GFP, имеет более яркую флуоресценцию по сравнению с белком дикого типа.

Химерная конструкция с флуоресцентным белком позволяет отслеживать уровень экспрессии и локализацию белка в живой клетке. Ген данной конструкции доставляли и экспрессировали в эукариотических клетках с помощью плазмиды pL-PL4-Purom под промотором CMV – это постоянно активный промотор из цитомегаловируса.

Плазмида также содержит ген устойчивости к антибиотику, который добавляли в бактериальную среду для ликвидации бактерий, в которые не встроилась плазмида.

Цель нашей работы – создать генетически кодируемый инструмент для изменения соотношения [NADH]/[NAD^+] в матриксе митохондрий на основе белка Ara2p. Для этого на N-конец белка EGFP-Ara2p требуется присоединить сигнал митохондриальной локализации tdmito, который представляет собой тандемный димер (две одинаковые последовательности аминокислот, расположенные друг за другом) сигнальной последовательности COX8 (субъединица 8 цитохром с оксидазы). Белки с такой последовательностью после трансляции направляются в матрикс митохондрий.

Для получения генноинженерной конструкции (плазмиды) pL-CMV-tdmito-EGFP-Ara2p ген Ara2p амплифицировали с помощью ПЦР и клонировали в вектор pL-CMV-tdmito-eGFP. Кроме того, получали аналогичный конструкт с мутантным неактивным Ara2p с заменой тирозина 57 на фенилаланин. Такая контрольная конструкция необходима потому, что экспрессия чужеродного (дрожжевого) белка сама по себе может повлиять на процессы в животной клетке.

Таким образом, для достижения нашей цели были поставлены следующие задачи:

1. Амплифицировать кДНК Ara2p и Ara2p-mut (мутантный неактивный белок)
2. Рестрицировать вектор pL-CMV-tdmito-EGFP и ПЦР-фрагменты для создания липких концов
3. Лигировать ПЦР-фрагменты в рестрицированный вектор (плазмиды с Ara2p, Ara2p-mut, вектор без вставки (контроль)
4. Трансформировать бактерии лигатом
5. Провести ПЦР-скрининг на бактериях, чтобы определить, в каких колониях есть целевая плазмида
6. Выделить плазмиды pL-CMV-tdmito-EGFP-Ara2p и pL-CMV-tdmito-EGFP-Ara2p-mut из бактериальной культуры
7. трансфецировать полученными конструктами эукариотические клетки
8. оценить влияние активности Ara2p на трансмембранный потенциал митохондрий с помощью флуоресцентного индикатора TMRM

Материалы и методы

Реагенты:

Бактериальные среды

1. Среда LB: 1% триптон; 0,5% дрожжевой экстракт; 0,1% NaCl; 0,01 мМ Tris-HCl; pH 8,0.

2. Среда LB-агар: 1% триптон; 0,5% дрожжевой экстракт; 0,1% NaCl; 1,5% агар; 0,01 мМ Tris-HCl, pH 8,0.

3. Среда SOB: 2% триптон; 0,55% дрожжевой экстракт; 10 мМ NaCl; 10 мМ KCl; 20 мМ Mg^{2+} (в виде $MgCl_2$ и $MgSO_4$); 0,01 мМ Tris-HCl, pH 8,0.

4. Среда RPMI-1640 с глутамином (ПанЭко): 2 мМ L-глутамин, 50 ед/мл пенициллин, 50 мкг/мл стрептомицин, 10% сыворотка крови телячья.

Буферы

1. TAE: 50 мМ Tris; 20 мМ CH_3COONa; 2 мМ ЭДТА; pH 8,0.

2. Солевой раствор HBSS для клеточных культур: 137 мМ NaCl; 5,4 мМ KCl; 1,26 мМ $CaCl_2$; 0,81 мМ $MgSO_4$; 0,35 мМ Na_2HPO_4; 0,44 мМ KH_2PO_4; 4,2 мМ $NaHCO_3$.

3. Среда для микроскопии HBSS- HEPES: 137 мМ NaCl; 5,4 мМ KCl; 1,26 мМ $CaCl_2$; 0,81 мМ $MgSO_4$; 0,35 мМ Na_2HPO_4; 0,44 мМ KH_2PO_4; 4,2 мМ $NaHCO_3$; 10 мМ HEPES, pH 7,2 – 7,4.

Праймеры

GSG-Ara2p-Fw	ATGCGGATCCGGAGTTAATGAAAAAGTGA
Ara2p-BamHI-Rv	ATGCGGATCCTTATATCATTTCTGGATGAGGAATACCTGAAG
pL-CMV-PL4-Purom-Rv_scrin	AGAGCTGTGAGGGCAGAATTG
EGFP-600-Fw	TACCTGACGACCCAGTCCGC

Методы

Препаративный ПЦР

Препаративный ПЦР проводили с полимеразой Q5 в буфере Q5 и с добавлением Q5 GC Enhancer по протоколу производителя (New England BioLabs) в объёме реакционной смеси 50 мкл. Использовали праймеры GSG-Ara2p-Fw и Ara2p-BamHI-Rv, в концентрации 0,5 мкМ, также были добавлены нуклеотиды в концентрации 0,2 мМ и деионизированная вода. В качестве матрицы использовали 50 нг плазмиды pL-CMV-mRuby-Ara2p и pL-CMV-mRuby-Ara2p-mut с мутантным геном Ara2p. Проводили ПЦР при следующих условиях: плавление

ДНК – 30 сек. при 98°C; плавление ДНК – 10 сек. при 98°C, отжиг праймеров – 20 сек. при 58°C, элонгация – 30 сек. при 72°C, 25 циклов; финальная элонгация – 2 мин. при 72°C.

Очистка фрагментов ДНК от геля и реакционной смеси

Очистку фрагментов из геля или реакционной смеси проводили с помощью набора Cleanup Standard (Евроген) по протоколу производителя.

При очистке из реакционной смеси раствор смешивали с «Связывающим раствором S», который обеспечивает связывание ДНК с хроматографическим носителем на колонке.

При очистке фрагментов из геля в начале гель растворяли в «Связывающем растворе S», после чего смесь инкубируется при 50-55°C.

После этого в обоих случаях раствор фильтруется на колонке, при этом молекулы ДНК оседают на хроматографическом носителе. Затем ДНК промывается «Промывочным раствором» и смывается с носителя элюирующим раствором (деионизированной водой).

Выделение фрагментов из геля позволяет получить ДНК заданной длины. В случае очистки фрагментов после ПЦР, нужно было отделить ПЦР-фрагменты от плазмиды.

Определяли концентрацию ДНК в полученном растворе с помощью прибора NanoDrop (ThermoFisher Scientific) по поглощению света с длиной волны 280 нм.

Электрофорез

Электрофорез проводили для определения длины фрагментов ДНК и разделения их в агарозном геле по длине. Под воздействием постоянного электрического поля отрицательно заряженные молекулы ДНК движутся к положительно заряженному электроду, при этом молекулы ДНК большей длины медленнее двигаются через агарозный гель. За счёт этого ДНК распределяется в геле по своей длине.

Электрофорез проводили в 1% агарозном геле в TAE буфере при напряжении 145 В с помощью прибора Bio-Rad PowerPac HC. Регистрировали флуоресценцию бромистого этидия, связанного с двухцепочечной ДНК, при возбуждении светом с длиной волны 280 нм с помощью трансиллюминатора Fusion Fx Vilber Lourmat. Использовали маркёр 1 kb DNA Ladder (Евроген) и буфер для нанесения проб (4x Gel Loading Dye, Blue).

Рестрикция

При рестрикции рестриктаза разрезает ДНК по специфичным последовательностям, оставляя свободные концы, через которые можно присоединить фрагменты ДНК друг к другу.

Для рестрикции использовали рестриктазу BamHI FastDigest (ThermoFisher Scientific) по протоколу производителя, которой обработали вектор pL-CMV-tdmito-EGFP (3 мкг) и ПЦР-фрагменты Ara2p (0,9 мкг) и Ara2p-mut (0,9 мкг). Вектор обрабатывали фосфатазой Fast Alkaline Phosphatase (ThermoFisher Scientific), чтобы он не замкнулся сам на себя при

лигировании. Рестриктаза BamHI оставляет липкие концы, что позволяет более эффективно проводить лигирование.

Лигирование

Для лигирования использовали лигазу из бактериофага T4 (Евроген) по протоколу производителя, лигазный буфер Quick Ligation Buffer (Евроген), которыми обработали вектор pL-CMV-tdmito-EGFP (30-40 нг) и вставки, ПЦР-фрагменты Ara2p и Ara2p-mut (по 100 нг). Лигирование проводили в растворе объёмом 20 мкл. Также проводили лигирование вектора без вставки в качестве контроля.

При лигировании лигазы соединяют фрагменты ДНК по порезанным концам, катализируя реакцию образования связей между дезоксирибозой и фосфатом, при этом вставка соединяется с вектором. В контрольной пробе вектор замыкался сам на себя, без вставки. Контрольная проба была нужна для того, чтобы оценить долю исходного вектора, который не был порезан рестриктазой или в лигировании замкнулся сам на себя, так как у него не были отщеплены фосфаты на порезанных концах ДНК.

Трансформация

Для доставки плазмид в бактерии *Escherichia coli* использовали метод электропорации, при котором ДНК проходит в бактериальные клетки под воздействием электрического тока. Отрицательно заряженные молекулы ДНК под воздействием разряда совершают резкое движение и проходят в цитоплазму бактерий. Также при этом в мембранах клеток образуются поры, что облегчает перенос ДНК в цитоплазму.

1 мкл лигатов добавили к культуре бактерий, перемешали, инкубировали 10 мин. для распределения ДНК в растворе. Поместили смесь в кюветы с электродами и пропускали ток на приборе Bio-Rad MicroPulser при напряжении ~2 кВ с продолжительностью импульса ~4 мс. После этого смешивали со средой SOB и наносили на чашки со средой LB-агар, содержащей 70 мкг антибиотика ампициллина.

ПЦР-скрининг

ПЦР-скрининг проводили для определения наличия вставки в плазмиде, доставленной в бактерии. Известно, что все выросшие колонии трансформированы вектором, так как в среде добавлен антибиотик, а в векторе присутствует ген устойчивости к нему. При отсутствии вставки амплификация не будет идти. Вставку с обоих концов рестрицировали одной рестриктазой, поэтому вставка могла встроиться в двух разных ориентациях. При ПЦР-скрининге использовали праймеры на вставку и на вектор, чтобы амплифицировалась только вставка, стоящая в правильном направлении.

ПЦР-скрининг проводили с полимеразой Tersus в буфере Tersus Red (содержит загрузочный буфер для электрофореза) по протоколу производителя (Евроген) в объёме реакционной смеси 10 мкл. Проводили ПЦР при следующих условиях: плавление ДНК – 2

мин. при 95°C; плавление ДНК – 30 сек. при 95°C, отжиг праймеров – 30 сек. при 60°C, элонгация – 30 сек. при 72°C, 20 циклов; финальная элонгация – 2 мин. при 72°C. Использовали праймеры GSG-Ara2p-Fw (на вставку) и pL-CMV-PL4-Purom-Rv_scrin (на вектор).

Выделение плазмид

После ПЦР-скрининга выбирали по 2 положительных колонии с каждым конструктом, перенесли в 5 мл среды LB, содержащий 70 мкг/мл ампициллина. Выращивали в течение ночи при температуре 37°C.

Для выделения плазмид использовали набор Plasmid Miniprep (Евроген) по протоколу производителя. В начале осаждённые при помощи центрифугирования бактериальные клетки ресуспендировали «Ресуспендирующим раствором». Далее добавляли «Лизирующий раствор» для разрушения клеточной стенки, это нужно для того, чтобы ДНК и ненужные компоненты бактериальной клетки (белки, геномная ДНК) вышли в раствор. После этого добавляли «Нейтрализующий раствор» для того, чтобы нейтрализовать щелочную среду и создать высокую ионную силу, при которой белки и геномная ДНК выпадают в осадок. Полученный препарат центрифугировали и отделяли супернатант от осадка. Перед перенесением супернатанта на колонку на носитель наносили «Раствор для удаления эндотоксинов» для улучшения связывания ДНК с носителем. Потом ДНК промывали «Промывочным раствором» и смывали с носителя «Элюирующим раствором». Чистоту полученного препарата определяли с помощью электрофореза в агарозном геле, а концентрацию ДНК – на приборе NanoDrop.

Секвенирование

Полученные плазмиды отправляли на секвенирование (секвенирование по Сенгеру) в компанию «Евроген» с праймеров pL-CMV-PL4-Purom-Rv_scrin и EGFP-600-Fw. Это нужно для того, чтобы определить последовательность ДНК и убедиться, что при ПЦР в гены белков Ara2p и Ara2p-mut не было внесено мутаций.

Работа с эукариотическими клетками

Посадка клеток HeLa Kyoto для микроскопии.

Для проведения эксперимента использовали клеточную культуру HeLa Kyoto – клетки рака шейки матки человека. Клетки HeLa культивируются в среде RPMI-1640 на матрасах. Они прикрепляются к поверхности с помощью белков адгезии.

Перед посадкой клетки промыли солевым раствором HBSS и обработали 0,25%-ным раствором трипсина (протеаза) для отделения клеток от поверхности. Инкубировали 10 мин при 37°C и 5% CO_2. Посадили приблизительно по 100000 клеток на чашку в 2 мл среды

RPMI-1640, всего использовали 2 чашки – конфокальные чашки диаметром 35 мм. Инкубировали в течение суток при 37°C и 5% CO_2.

Трансфекция

Трансфекцию плазмид в эукариотические клетки проводили с помощью липофильного трансфекционного агента FuGene HD. Он образует мицеллы (шарики из молекул липида) с ДНК внутри, которые сливаются с клеточной мембраной. Для оценки влияния Ara2p на NAD+/NADH в цитоплазме использовали плазмиду pL-CMV-mRuby-Ara2p или pL-CMV-mRuby-Ara2p-mut и pCS2+-SoNar, кодирующую белковый сенсор SoNar. Для митохондрий использовали плазмиды pL-CMV-tdmito-EGFP-Ara2p и pL-CMV-tdmito-EGFP-Ara2p-mut и сенсор SoNar с митохондриальной меткой.

Сенсор SoNar – флуоресцентный белок, который нужен для измерения соотношения концентраций NAD+ и NADH. Он связывает эти коферменты и его спектр возбуждения флуоресценции меняется в зависимости от того, с каким из коферментов он связан. При связывании NAD+ флуоресценция сенсора более эффективно возбуждается светом с длиной волны 470 нм, а при связывании NADH – светом с длиной волны 395 нм. По соотношению пиков возбуждения флуоресценции можно судить о соотношении NAD+/NADH в клетке. [Zhao et al, 2015]

Чтобы отличать флуоресценцию белка от флуоресценции сенсора SoNar в зелёном диапазоне, использовали химерную конструкцию белка Ara2p с красным флуоресцентным белком mRuby.

Приготовили трансфекционную смесь, на 1 чашку – 100 мкл среды OptiMEM, 1 мкг ДНК, 3 мкл липофильного трансфекционного агента FuGene HD (3 объёма на 1 массу плазмиды). Всего использовали 2 пробирки смеси – для нормального Ara2p и для мутантного. Трансфекционную смесь добавляли по каплям в чашки с культурой HeLa и инкубировали 24 часа в CO_2-инкубаторе.

Микроскопия

Для оценки состояния митохондрий мы использовали флуоресцентный индикатор мембранного потенциала метиловый эфир тетраметилродамина (TMRM), который накапливается в заряженных мембранах митохондрий. По интенсивности красной флуоресценции TMRM можно судить о величине потенциала. Флуоресценцию TMRM возбуждали светом с длиной волны 555 нм и регистрировали с использованием эмиссионного фильтра с пропусканием в области 595 нм. Флуоресценцию EGFP возбуждали светом с длиной волны 470 нм и регистрировали с использованием эмиссионного фильтра с пропусканием в области 515 нм. Базовую линию регистрировали в течение 5 минут.

Перед началом микроскопии клетки HeLa Kyoto, экспрессирующие pL-CMV-tdmito-EGFP-Ara2p или pL-CMV-tdmito-EGFP-Ara2p-mut, промывали солевой средой HBSS и переводили в HBSS с 20 ммоль/л HEPES и 20 нмоль/л TMRM, инкубировали клетки в CO_2-инкубаторе в течение 50 минут, затем регистрировали базовый уровень флуоресценции TMRM в течение 20 минут, затем добавляли D-арабинозу до концентрации 10 ммоль/л.

Для оценки влияния Ara2p на NAD+/NADH в цитоплазме использовали плазмиду pL-CMV-mRuby-Ara2p или pL-CMV-mRuby-Ara2p-mut и pCS2+-SoNar, кодирующую белковый сенсор SoNar.

Флуоресценцию SoNar возбуждали светом с длиной волны 395 и 470 нм и регистрировали с использованием эмиссионного фильтра с пропусканием в области 515 нм. Эмиссионный фильтр был необходим для того, чтобы регистрировались только пиковые значения длины волн флуоресценции, так как данные белки флуоресцируют в широком диапазоне и свет разных белков может совпадать по длине волны в крайних значениях, что не позволяет наблюдать их по отдельности.

Флуоресценцию mRuby возбуждали светом с длиной волны 555 нм и регистрировали с использованием эмиссионного фильтра с пропусканием в области 595 нм.

Перед началом микроскопии клетки промывали солевой средой HBSS и переводили в HBSS с 20 ммоль/л HEPES, инкубировали клетки в CO_2-инкубаторе в течение 40 минут. Затем регистрировали базовый сигнал сенсора в течение 5 минут. Затем добавляли D-арабинозу до концентрации 10 ммоль/л. В качестве положительного контроля на работу сенсора добавляли лактат натрия до концентрации 10 ммоль/л.

Съёмку клеточных культур проводили на микроскопе Eclipse Ti2-E (Nikon) с увеличением 40x.

Результаты и обсуждение

Результаты клонирования

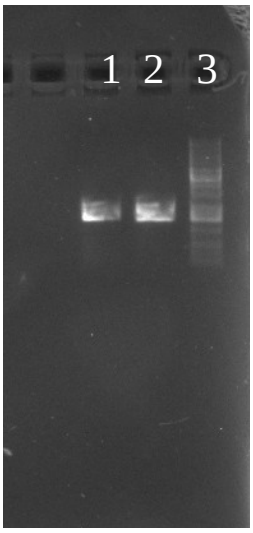

Рис.1. Электрофореграмма ПЦР-фрагментов. 1- Ara2p, 2- Ara2p-mut, 3- маркёр

Амплифицировали фрагменты ДНК, кодирующие белок Ara2p и Ara2p-mut.

Провели аналитический электрофорез полученных ампликонов, наблюдали в каждом препарате по 1 полоске длиной 1000 пар оснований. Длина соответствует гену Ara2p, полосок с другой длиной не наблюдали. (Рис.1) Из этого можно сделать вывод, что во время ПЦР были амплифицированы только необходимые фрагменты. Выделили полученные фрагменты из геля, в результате получили по 2,7 мкг каждого фрагмента.

Рестрицировали полученные фрагменты, в результате рестрикции получили по 100 нг каждого фрагмента. Также рестрицировали pL-CMV-tdmito-EGFP, получили 150 нг вектора с липкими концами, обработанного фосфатазой.

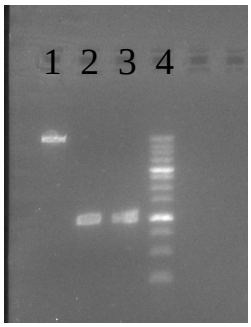

Рис.2. Электрофореграмма плазмид после лигирования. 1- контрольный вектор без вставки, 2- плазмиды, содержащие ген Ara2p, 3- плазмиды, содержащие ген Ara2p-mut, 4- маркёр

Вектор и вставки лигировали, полученным лигатом трансформировали бактерии. В контрольной чашке выросло около 200 колоний, в чашках, где бактерии были трансформированы вектором pL-CMV-tdmito-EGFP-Ara2p или pL-CMV-tdmito-EGFP-Ara2p-mut, выросло около 1000 колоний. (Рис.2)

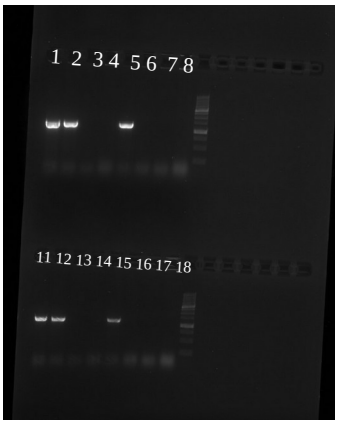

Рис.3. Электрофореграмма колоний при ПЦР-скрининге.

При ПЦР-скрининге полученных культур pL-CMV-tdmito-EGFP-Ara2p и pL-CMV-tdmito-EGFP-Ara2p-mut было выявлено по 3 колонии, содержащих плазмиду с правильно ориентированной вставкой, из 8 протестированных. (Рис.3) Получили жидкую культуру из колоний 1, 2, 11 и 12 и выделили из них около 40 мкг каждой плазмиды. С помощью аналитического электрофореза убедились, что полученные препараты не содержат геномной ДНК, так как вся ДНК из препарата при электрофорезе входила в гель, а геномная ДНК не может войти в гель из-за большой длины. (Рис.4)

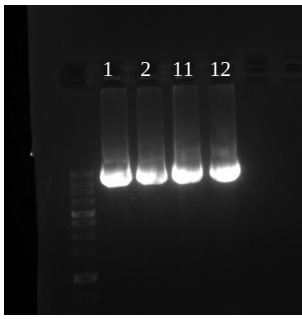

Рис.4. Электрофореграмма плазмид, выделенных из колоний

Полученные препараты отправили на секвенирование. Секвенирование показало, что клон 1 плазмиды pL-CMV-tdmito-EGFP-Ara2p и клоны 11 и 12 плазмиды pL-CMV-tdmito-EGFP-Ara2p-mut содержат требуемую нуклеотидную последовательность. Для клона 2 плазмиды pL-CMV-tdmito-

EGFP-Ara2p не удалось получить корректных данных о нуклеотидной последовательности, поэтому данный клон в дальнейшем не использовался.

Таким образом, были получены плазмиды, пригодные для доставки целевого трансгена в эукариотические клетки.

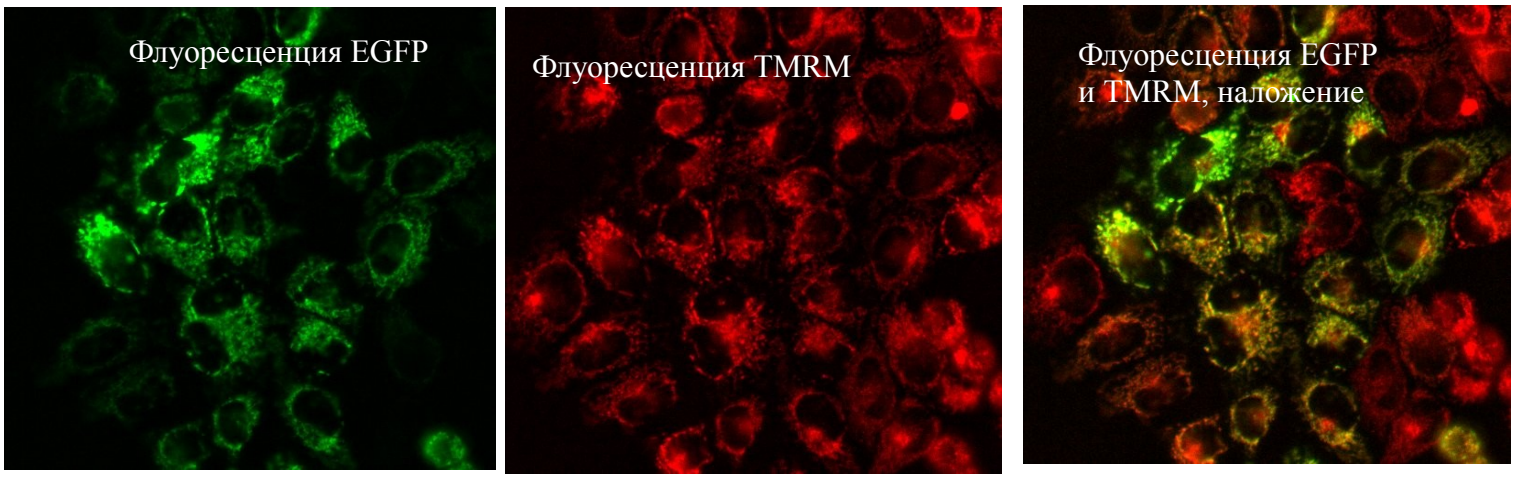

Рис.5. Флуоресценция EGFP и TMRM в митохондриях

Активность tdmito-EGFP-Ara2p не влияет на мембранный потенциал митохондрий

Клетки HeLa Kyoto трансфецировали плазмидами pL-CMV-tdmito-EGFP-Ara2p и pL-CMV-tdmito-EGFP-Ara2p-mut и окрасили индикатором мембранного потенциала митохондрий TMRM. Убедились, что tdmito-EGFP-Ara2p колокализуется с TMRM, из чего следует, что полученный белок находится в митохондриях. (Рис.5)

Однако при добавлении D-арабинозы роста мембранного потенциала в митохондриях не наблюдали, ни в клетках, экспрессирующих активную форму Ara2p, ни в клетках с контрольным мутантом. (Рис.6) Это может происходить по нескольким причинам: во-первых, неизвестно, транспортируется ли D-арабиноза через мембраны митохондрий. Внешняя мембрана содержит порины, которые свободно пропускают молекулы с массой до 3000 Да [Benz, 1990]. Транспорт веществ через внутреннюю мембрану, наоборот, строго контролируется. Внутренняя мембрана содержит белки-транспортёры, специфичные к некоторым веществам. Возможно, белка, способного транспортировать D-арабинозу, на внутренней мембране не существует. Во-

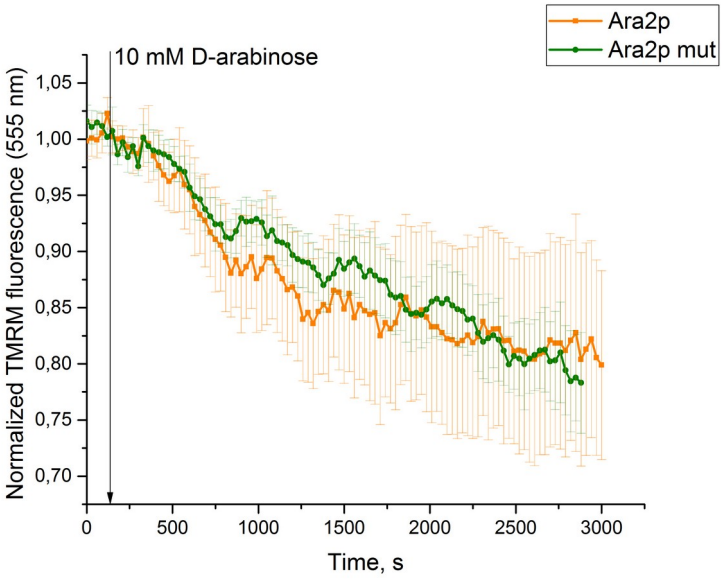

Рис.6. График флуоресценции TMRM. По оси X – время в секундах, по оси Y – интенсивность флуоресценции TMRM.

вторых, в матриксе концентрация NADH сильно превышает концентрацию NAD+, из-за чего соотношение концентраций сложно сдвинуть еще сильнее в сторону восстановленной формы. Наконец, неизвестно, активен ли tdmito-EGFP-Ara2p в условиях эксперимента. Для выяснения конкретной причины необходимы дальнейшие эксперименты.

В частности, мы проверили, что химерные конструкции из Ara2p с флуоресцентными белками активны в цитоплазме эукариотической клетки и способны сдвигать соотношение концентраций NAD+/NADH в сторону восстановленной формы. Для этого использовали mRuby-Ara2p с цитоплазматической локализацией и флуоресцентный сенсор SoNar. Добавление D-арабинозы приводило к увеличению интенсивности флуоресценции сенсора при возбуждении светом с длиной волны 395 нм и к уменьшению интенсивности флуоресценции при возбуждении 470 нм в клетках, экспрессирующих mRuby-Ara2p, но не в контрольных клетках с экспрессией mRuby-Ara2p-mut. (Рис.7) Из этого можно сделать вывод, что активность mRuby-Ara2p может приводить к изменению соотношения концентраций NAD+/NADH.

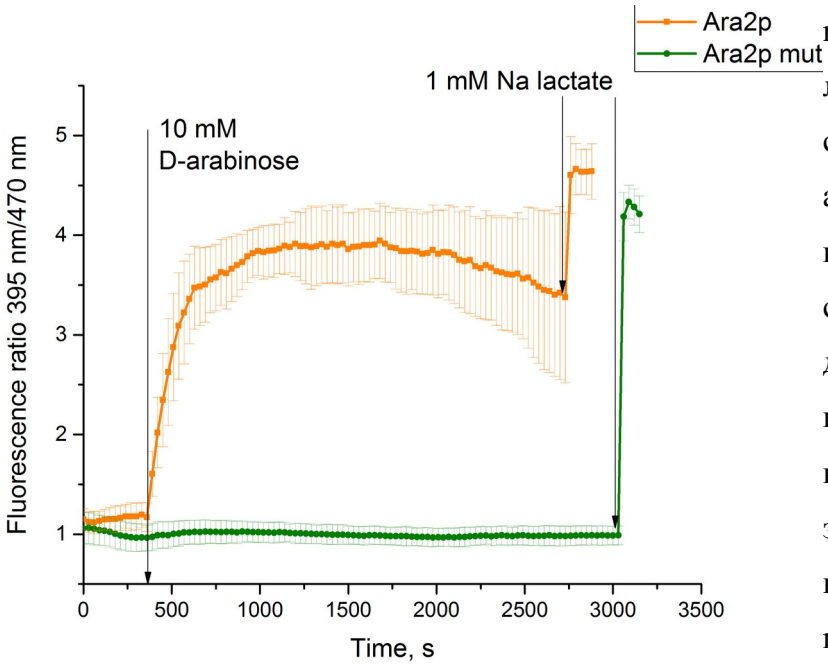

Рис.7. График флуоресценции SoNar. По оси X – время в секундах, по оси Y – отношение интенсивности флуоресценции SoNar при возбуждении светом с длиной волны 395 нм к интенсивности при 470 нм

Таким образом, активность tdmito-EGFP-Ara2p не влияет на мембранный потенциал митохондрий, скорее всего, из-за того, что D-арабиноза не транспортируется в матрикс митохондрий или из-за того, что практически весь NAD в митохондриях находится в восстановленной форме.

Выводы

- Клонирована плазмида pL-CMV-tdmito-EGFP-Ara2p и pL-CMV-tdmito-EGFP-Ara2p-mut
- Эукариотические клетки трансфецированы полученными плазмидами
- Белок нормально синтезируется в клетках и локализован в митохондриях
- Активность белка Ara2p в матриксе не влияет на мембранный потенциал митохондрий
- Активность Ara2p в цитозоле увеличивает соотношение NADH/NAD+.

Список литературы

1. Нельсон Д., Кокс М. Основы биохимии Ленинджера, в 3х томах, Москва: Бином, 2011.

2. Amako K., Fujita K., Shimohata T., Hasegawa E., Kishimoto R., Goda K. NAD+-specific D -arabinose dehydrogenase and its contribution to erythroascorbic acid production in Saccharomyces cerevisiae // FEBS Letters, Vol. 580, Issue 27, 6428–6434, 2006

3. Benz R. Biophysical properties of porin pores from mitochondrial outer membrane of eukaryotic cells // Experientia, Vol. 46, issue 2, 131-7, 1990

4. Ogura Y., Kitada M., Xu J., Monno I., Koya D. CD38 inhibition by apigenin ameliorates mitochondrial oxidative stress through restoration of the intracellular NAD+/NADH ratio and Sirt3 activity in renal tubular cells in diabetic rats // Aging (Albany NY). Vol. 12, issue 12, 11325-11336, 2020

5. Titov D., Cracan V., Goodman R., Peng J., Grabarek Z., Mootha V. Complementation of mitochondrial electron transport chain by manipulation of the NAD+/NADH ratio // Science, Vol. 352, issue 6282, 231-235, 2016

6. Verdin E. NAD+ in aging, metabolism, and neurodegeneration // Science, Vol. 350, issue 6265, 1208-1213, 2015

7. Yaku K., Okabe K., Nakagawa T. NAD metabolism: Implications in aging and longevity // Ageing Research Reviews, Vol. 47, 1-17, 2018

8. Ying W. NAD+/NADH and NADP+/NADPH in Cellular Functions and Cell Death: Regulation and Biological Consequences. // Antioxidants & Redox signaling, Volume 10, Number 2, 2008

9. Zhang N., Sauve A. Regulatory Effects of NAD+ Metabolic Pathways on Sirtuin Activity // Progress in Molecular Biology and Translational Science, Volume 154, 2018

10. Zhao Y., Hu Q., Cheng F., Su N., Wang A., Zou Y., Hu H., Chen X., Zhou H., Huang X., Yang K., Zhu Q., Wang X., Yi J., Zhu L., Qian X., Chen L., Tang Y., Loscalzo J. and YangY. SoNar, a Highly Responsive NAD+/NADH Sensor, Allows High-Throughput Metabolic Screening of Anti-tumor Agents // Cell Metabolism, volume 21, 777–789, 2015

Благодарности

Мы выражаем свою благодарность коллективу лаборатории, а также Сергею Менделевичу Глаголеву за помощь в проведении этой работы