

НАРЫЖНЫЙ

Станислав Николаевич

**ЯДЕРНЫЙ АНТИГЕН ПРОЛИФЕРИРУЮЩИХ КЛЕТОК (PCNA): КООРДИНАТОР  
КЛЕТОЧНЫХ ФУНКЦИЙ В НОРМЕ И ПАТОЛОГИИ**

03.01.04 – биохимия

**Автореферат**

диссертации на соискание ученой степени  
доктора биологических наук

Москва

2011 г.

Работа выполнена в Учреждении Российской академии наук Петербургском институте ядерной физики им. Б.П. Константинова РАН

**Научный консультант:**

доктор биологических наук,  
профессор, академик РАН

Арчаков Александр Иванович

**Официальные оппоненты:**

доктор биологических наук,  
профессор

Говорун Вадим Маркович

доктор медицинских наук,  
профессор

Ларина Ирина Михайловна

доктор биологических наук

Маргулис Борис Александрович

**Ведущая организация:**

Учреждение Российской академии наук Институт биохимии им. А.Н.Баха РАН

Защита состоится ”\_\_19\_” \_\_мая\_\_\_\_\_ 2011 г. в \_\_\_\_\_ часов на заседании совета Д 001.010.01 по защите докторских и кандидатских диссертаций при Учреждении Российской академии медицинских наук Научно-исследовательском институте биомедицинской химии имени В.Н.Ореховича РАН (ИБМХ РАН) по адресу 119121, г. Москва, Погодинская ул. д.10.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ИБМХ РАН

Автореферат разослан ”\_\_\_\_\_” \_\_\_\_\_ 2011 г.

Ученый секретарь

диссертационного совета Д 001.010.01

кандидат химических наук

Карпова Е.А.

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы.** Центральным подходом в системной биологии является объединение взаимодействующих друг с другом клеточных компонентов (белков) в многочисленные сети, образующие функциональные модули, а вся совокупность этих взаимодействий, характерная для каждого объекта, носит название “интерактома” (Sanchez, Lachaize et al. 1999). Некоторые белки отличаются особенно повышенным количеством партнеров и выглядят на картах интерактомики, как объединяющие центры или хабы. В зависимости от характера белок-белковых взаимодействий хабы подразделяются на две категории: “центры вечеринок” (party hubs), где взаимодействие происходит со многими партнерами одновременно, и “центры свиданий” (date hubs), когда взаимодействие с разными партнерами происходит в разных местах и в разное время (Han, Bertin et al. 2004). Наиболее известными хабами являются, например, такие белки с разнообразными функциями, как актин, 14-3-3 или p53. Анализ последствий, вызванных нарушениями в сети белок-белкового взаимодействия, позволил предложить некую модель организации протеома из отдельных модулей или биологических процессов. Каждый модуль регулируется через “центр вечеринок”, в то время как “центры свиданий” организуют протеом, связывая отдельные модули. Причем весь протеом является более чувствительным к нарушениям в работе date hubs, чем party hubs. Внутри модуля “репликация ДНК” особенно интересен ядерный антиген пролиферирующих клеток (PCNA, proliferating cell nuclear antigen). Этот белок долгое время был известен только как вспомогательный белок для ДНК полимераз. Однако развитие методов протеомики, возникновение интерактомики и системной биологии привели к расширению представлений о функционировании белков в общем, и PCNA в частности. Поэтому актуальной является задача по выяснению механизмов, регулирующих межбелковое взаимодействие и белковую полифункциональность. Для решения этой задачи необходимо привлечение не просто отдельных биохимических методов, а комплексный подход и системный взгляд на работу белков. Причем PCNA в этом смысле является чрезвычайно подходящим и своевременным объектом исследования.

**Целью** работы являлось выяснение структурно-функциональных аспектов организации интерактомики на примере PCNA, как хаба, обладающего широким спектром действия.

### **Основные задачи исследования.**

- 1) выявление форм, которые может принимать PCNA, подвергаясь посттрансляционным модификациям,
- 2) изучение роли данных модификаций в механизмах работы PCNA в качестве белка, взаимодействующего с множеством других белков,

- 3) оценка аспектов, касающихся роли PCNA в качестве онкогена и маркера пролиферации,
- 4) анализ, систематизация и дополнительный поиск белков, взаимодействующих с PCNA, с разработкой и использованием нетривиальных подходов,
- 6) выяснение функций PCNA не только в ядре, но и в цитоплазме,
- 7) прояснение деталей структурной организации PCNA, обеспечивающей выполнение его многообразных функций,
- 8) разработка модели (моделей) функционирования PCNA в качестве хаба широкого спектра действия.

**Научная новизна.** Детальный анализ с помощью двумерного электрофореза высокого разрешения и чувствительности выявил наличие разнообразных форм у PCNA млекопитающих (так называемый нанопротеом), вызванных пост-трансляционными модификациями.

Впервые показано, что PCNA присутствует в клетке в виде двойного тримера, более того, было доказано, что именно такая структура обеспечивает те свойства, которые делают PCNA координирующим хабом широкого спектра действия. Была предложена модель работы PCNA в качестве координатора процессов, происходящих на репликативной вилке ДНК при синтезе ДНК и сборке хроматина.

Систематический анализ белков, взаимодействующих с PCNA, привел к раскрытию совершенно новых сторон функционирования PCNA. Одна из этих сторон связана с его возможным участием в процессах гликолиза. В совокупности с тем фактом, что канцерогенез сопровождается увеличением, как уровня гликолиза, так и экспрессии PCNA, это позволяет по-новому взглянуть на процессы канцерогенеза.

#### **Основные положения, выносимые на защиту.**

Имеет место широкий спектр взаимодействий PCNA, причем не только в ядре, но и в цитоплазме.

Обнаружено, что PCNA присутствует в клетке в виде комплекса из двух колец, обеспечивающих одновременное взаимодействие с несколькими белками-партнерами, что позволило сформулировать модель координирующего действия PCNA на репликативной вилке ДНК. Также показано взаимодействие PCNA с гликолитическими ферментами и предложена модель участия PCNA в гликолизе.

Показано наличие множественных посттрансляционных модификаций PCNA, которые участвуют в регуляции взаимодействия PCNA с другими белками.

**Научно-практическая значимость** представленной работы состоит в первую очередь в существенном вкладе в дальнейшее понимание внутриклеточных процессов, в общем, и

механизмов функционирования белковых сетей, то есть интерактомики, в частности. Такое понимание важно не только в общем плане познания, но и дает ключ к нашим возможностям при необходимости вмешиваться в эти процессы. Например, знание того, что раковая клетка, содержит значительно повышенное количество PCNA и очень чувствительна к нарушениям его четвертичной структуры, указывает на возможность получения фармакологических противораковых препаратов, нарушающих структуру PCNA и тем самым вызывающих апоптоз раковых клеток. А информация о белковых сетях, образованных взаимодействиями PCNA, может служить инструментом в диагностике заболеваний, выяснении механизма их возникновения и развития, эффективности тех или иных терапевтических подходов и разработке новых лекарственных препаратов.

**Апробация работы.** Материалы данного исследования представлялись на 2 Всемирном конгрессе HUPO в Монреале, Канада, в 2003 году, на 4 Всемирном конгрессе HUPO в Мюнхене, Германия, в 2005 году, на 5 Всемирном конгрессе HUPO в Лонг Бич, США, в 2006 году, на 7 Всемирном конгрессе HUPO в Амстердаме, Голландия, в 2008 году, на 8 Всемирном конгрессе HUPO в Торонто, Канада, в 2009 году, на конференциях Канадского Общества Протеомики в Лондоне, Канада, (2004 год) и в Оттаве (2005 год), на конференциях Канадской Инициативы по Протеомике (Canadian Proteomics Initiative) в Ванкувере (2003 год) в Монреале (2004 год), в Торонто (2005 год), в Оттаве (2007 год), на Конференциях по Двумерному Электрофорезу (2-D Electrophoresis Meeting, from Genome to Proteome) в Сиене, Италия в 1996, в 1998, в 2000 и в 2002 годах, а также на Международной Конференции “Биокатализ-98” в Пушино в 1998 году и Всероссийской научной конференции “Медико-генетические проблемы онкологических заболеваний” (Стерлитамак, 2010 год). Кроме того, автор неоднократно выступал с докладами в Петербургском Институте Ядерной Физики РАН, Гатчина, Россия, Институте Биомедицинской Химии РАМН, Москва, Россия, в Лаврентьевском Университете в Садбери, Канада (Laurentian University, Sudbury, Canada) и в Онкологическом Центре при Региональном Госпитале в Садбери, Канада (Cancer Centre, Sudbury Regional Hospital, Canada).

**Публикации.** По материалам диссертации опубликовано 39 печатных работ в отечественных и зарубежных изданиях, из которых 17 статей в рекомендованных ВАК РФ изданиях.

**Структура и объем диссертации.** Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, изложения результатов работы и их обсуждения, заключения, выводов и списка литературы. Работа изложена на 265 страницах, содержит 55 рисунков, 12 таблиц. Список литературы включает 434 источника.

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовано около 20 антител, предоставленных различными компаниями, разнообразные “нормальные” и раковые клеточные линии от ATCC. Штамм *E.coli* BL21 (DE3), трансфицированный плазмидой pT7hPCNA, был получен от Доктора Стилмана (Dr. B. Stillman), плазмиды pEGFPCNA и pEGFPCNAL2 любезно предоставлены Доктором Кардосо (Dr. C. Cardoso). Рекомбинантный PCNA человека (ALX-201-234) был получен от компании Alexis Biochemicals, очищенные ферменты – от компаний Sigma и Calbiochem. Глицеральдегид-3-фосфат (G3P) дегидрогеназную активность определяли, используя набор ферментов KDalert (Ambion Incorporation) и следуя инструкциям производителя. Альдолазную активность измеряли по методу Пинто (Pinto, Kaplan et al. 1969), используя набор реагентов от компании Caldon Biotech Incorporation.

**Методы.** В работе были использованы как стандартные биохимические подходы, так и их модификации, а также ряд собственных оригинальных методов.

**Синхронизацию по клеточному циклу** проводили остановкой клеток в G0-фазе удалением из инкубационной среды изолейцина, а остановку на границе G1/S (старте S-фазы) через комбинацию удаления изолейцина и обработку ингибиторами репликации ДНК, мимозином или афидиколином (Gilbert, Neilson et al. 1995; Lee, Larner et al. 1997).

**Сортировку клеток (FACS)** проводили экстракцией клеток буфером, содержащим 10 mM Трис, pH 6.8, 100 mM NaCl, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EDTA, 10% глицерин, 0.5% Тритон X-100, 1 mM PMSF и ресуспендированием ядер в окрашивающем растворе, который содержал 0.1% цитрат натрия, 0.3% Тритон X-100, 100 мкг/мл РНКазу А и 100 мкг/мл пропидиум иодида, используя проточный цитометр Beckman Coulter Epics® Elite (Palo Alto, CA, USA).

**Мечение *in vivo***. Для метки фосфопротеинов клетки и сначала инкубировали 4 часа в MEM-среде, не содержащей фосфатов с добавлением 10% диализованной эмбриональной сыворотки коровы, а затем 9 часов при 37°C в свежей MEM-среде, содержащей [<sup>32</sup>P]ортофосфат (0.4 mCi/мл). Далее клетки дважды промывали холодным раствором PBS, собирали с помощью пластикового шпателя в раствор PBS, содержащий коктейль протеазных и фосфатазных ингибиторов. Для экспериментов по ацетилированию клетки инкубировали 6 часов в MEM-среде, содержащей [<sup>3</sup>H]ацетат натрия (0.5 mCi/ml).

**Субклеточное фракционирование** проводили, используя последовательную экстракцию разными буферами (Ramsby and Makowski 1999).

**Клеточная трансфекция.** Бактерии E.coli BL21 трансфецировали плазмидой T7hPCNA. Клетки CHO и HEK293 трансфецировали нормальными и мутантными плазмидами pEGFPCNA, используя липофектамин (Lipofectamin, Invitrogen) и следуя инструкциям производителя.

**Выделение PCNA хроматографией и электрофорезом.** Клеточные экстракты получали из трансформированных бактерий BL21 (DE3) после разрушения клеток ультразвуком в буфере, содержащем 25 мМ Трис, pH 7.4, 25 мМ NaCl, 1 мМ EDTA, 10% глицерин, 0.01% Тритон X-100 и коктейль ингибиторов протеаз. Экстракт последовательно фракционировали на колонках Sephacryl S200 (16/60), UnoQ1 и Superdex 200 10/300 GL. Выделение мономера PCNA с помощью денатурирующего электрофореза (SDS-PAGE) проводили в одну стадию на установке UDSFE (Naryzhny 1996). Фракции собирали и анализировали Вестерн-блотом, используя антитела к PCNA.

**Сшивки формальдегидом.** Клетки, выращенные на культуральной чашке, промывали один раз PBS и инкубировали при комнатной температуре в растворе PBS, содержащем 1.5% формальдегид (сшивка *in vivo*). Реакцию останавливали добавлением глицина в финальной концентрации 0.15М. При метке *in vitro* обрабатывали 1.5% формальдегидом клеточный экстракт, а не клетки.

**Денатурирующий одномерный электрофорез (SDS-PAGE)** проводили в присутствии SDS с концентрацией полиакриламида от 8 до 12% в разделяющем геле и 5% в концентрирующем геле. Концентрацию белка в образцах определяли с помощью Кумасси (Coomassie Protein Assay Reagent kit, Pierce).

**Нативный электрофорез** проводили на основе метода прерывистого электрофореза Орнштейна и Дэвиса (Davis 1964; Ornstein 1964).

**Двумерный электрофорез (2DE).** Образцы растворяли в 100 мкл лизирующего буфера (7 М мочевины, 2 М тиомочевина, 4% CHAPS, 1% ДТТ, 2% IPG буфер, pH 3–10, смесь протеазных ингибиторов, 0.1 мМ MG132). Белки разделяли изоэлектрофокусированием (ИЭФ), используя полоски DryStrip kit. Образцы в лизирующем буфере смешивали с регидрирующим буфером (7 М мочевины, 2 М тиомочевина, 2% CHAPS, 0.3% ДТТ, 2% IPG буфер, бромфенол голубой) и проводили регидратацию полосок 8 ч при 10°C в специальной кювете (Immobiline DryStrip Reswelling Tray). ИЭФ вели при 20°C, используя аппарат Multiphor II, (Amersham Biosciences). Полоски перед вторым направлением вымачивали (2 раза по 10 мин) в уравнивающем растворе (50 мМ Трис–HCl, pH 6.8, 6 М мочевины, 2% SDS и 30% глицерин), содержащем сначала 1% ДТТ, а затем 5% иодацетамид. После завершения электрофореза гель фиксировали в растворе

25%-ого изопропанола с 10%-ой уксусной кислотой. Белки в геле окрашивали аммиачным серебром (Oakley, Kirsch et al. 1980) или же Кумасси R350.

**Перенос на мембрану.** По окончании электрофореза гель опускали в буфер для переноса (48 mM Трис, 39 mM глицин, 0.037% SDS, 20% метанол) и переносили на PVDF мембрану, используя аппарат для полусухого переноса (Bio-Rad).

**Окрашивание мембран.** После переноса мембрану вымачивали в метаноле, окрашивали Кумасси R350 и высушивали.

**Иммуноосаждение** проводили в соответствии с протоколом Santa Cruz Biotechnology. Все растворы содержали коктейли протеазных и фосфатазных ингибиторов.

**Иммунодетектирование или Вестерн-блот** проводили по “классическому”, то есть общепринятому в большинстве лабораторий, методу, следуя в основном протоколу лаборатории Колд Спринг Харбора (Cold Spring Harbor) (Harlow D.L. (Ed.) 1999). Однако чаще использовали так называемый “голубой сухой Вестерн-блот” (Naryzhny 2009), когда PVDF мембрану предварительно окрашивали и высушивали.

**Фар-Вестерн** проводили на основании рекомендаций Гуше с соавторами (Guichet, Copeland et al. 1997) с некоторыми модификациями, сделанными на основании экспериментов по ренатурации белков после денатурирующего электрофореза (Naryzhnyi 1992; Naryzhny 1997). Сначала белки после 2DE или SDS-PAGE переносили на мембрану, которую промывали сначала 5 мин в TBS, затем 10 мин в TBST с 5%-ным БСА (блокирующий раствор) и оставляли на ночь при 4°C в ренатурирующем буфере (10% глицерин, 100 mM NaCl, 20 mM Трис, pH 7.6, 0.5 mM ЭДТА, 0.1% Tween-20, 3% БСА и 1 mM ДТТ). На следующий день этот буфер меняли на такой же, только содержащий PCNA (2.5 мкг/мл), и инкубировали при 4°C 4 часа. Несвязавшийся PCNA отмывали сначала инкубацией в ренатурирующем буфере (15 мин, 4°C), а затем в TBST с 3%-ным БСА (15 мин, 4°C). Далее мембрану обрабатывали практически таким же образом, как в случае “классического” Вестерн-блота.

**Иммуноокрашивание клеток** проводили на покровных стеклах. После промывки PBS клетки фиксировали, заливая холодным метанолом и выдерживая при комнатной температуре в течение 10 мин. После фиксации клетки промывали несколько раз TBS и блокировали TBS, содержащем 5% бычьей сыворотки в течение 1 часа при 4°C. Затем их последовательно обрабатывали первичными и вторичными антителами (метка FITC или родамин), разведенными в блокирующем буфере. Слайды анализировали под флуоресцентным микроскопом Zeiss Axiovert 100.



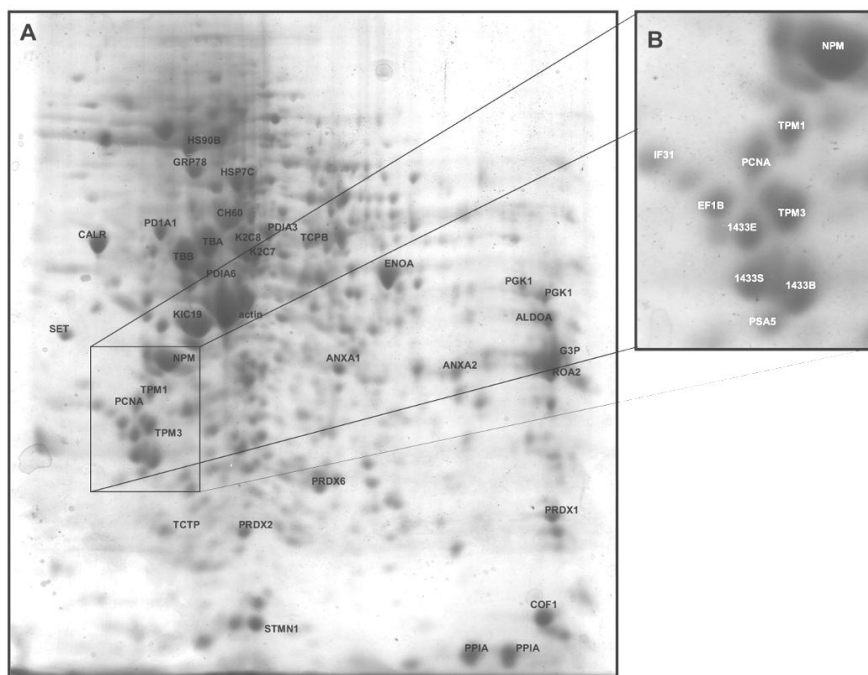
**Моделирование структуры PCNA.** Файлы с информацией о белковых структурах получали из банка PDB (Protein Data Bank). Использовали программы RasMol Version 2.7.2.1 или Swiss-PDB Viewer DeepView v4.0. Для поиска вариантов молекулярного взаимодействия использовали программу Hex 4.2 (<http://www.loria.fr/~ritchied/hex/>).

**Масс-спектрометрия.** После разделения в 2DE и окрашивания Кумасси кусочки геля, соответствующие анализируемым белковым пятнам, вырезали и частично обесцвечивали инкубацией 15 мин в 500 мкл 50%-ого ацетонитрила (ACN), содержащего 25 мМ бикарбонат аммония. Далее кусочки ужимали инкубацией в ACN. ACN удаляли, и гель высушивали на центрифуге Speed Vac. Высушенные кусочки геля вымачивали 25 мин на льду в 12 мкл 25 мМ раствора бикарбоната аммония (АБК), содержащего трипсин (Trypsin Gold, Promega, USA, 4 мкг/мл) или же Lys-C (5 мкг/мл), или Asp-N (10 мкг/мл) (Roche, Switzerland). Излишек раствора удаляли, добавляли 10 мкл раствора 25 мМ АБК и проводили протеолиз инкубацией при 37°C, как минимум 4 часа. Продукты гидролиза смешивали (1мкл +1мкл) прямо на пластинке для масс-спектропии с матриксом CHCA ( $\alpha$ -Cyano-4-hydroxycinnamic acid), растворенным в концентрации 10 мг/мл в 50%-ом ACN с 0.1%-ой трифторуксусной кислотой (TFA), кристаллизовали и анализировали на масс-спектрометре MALDI микромас MX (Waters Inc). Спектры анализировали, используя программы Mascot, FindPep, FindMod или Aldente.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### PCNA В ПРОТЕОМЕ

Первоначально был проведен детальный анализ положения PCNA на двумерной карте 2DE (Рис.1). Большинство белков, расположенных близко к PCNA, отвечают за ведение, образно говоря, “домашнего хозяйства” клетки. В частности здесь широко представлены тропомиозины и разные формы белков семейства 14-3-3 (Рис.1). Так как изоэлектрическая точка (pI) и молекулярная масса или вес (Mw) являются фундаментальными физико-химическими параметрами любого белка, их точная оценка очень важна. Изначально масса PCNA, определенная денатурирующим электрофорезом, SDS-PAGE, оказалась равной 36 кДа ([Bravo and Celis 1980](#)), хотя его теоретическая масса равна примерно 30 кДа. Действительно, PCNA мигрирует в виде одной полосы в районе 33-36 кДа при использовании 12-20%-ных полиакриламидных гелей, но в районе 30 кДа, то есть близко к теоретическим значениям, при использовании 8–9%-ных гелей ([Naryzhny, Desouza et al. 2006](#)). На 2DE видно, что PCNA детектируется в виде одного пятна. Однако более высокое разрешение и чувствительность позволяют обнаружить дополнительные,

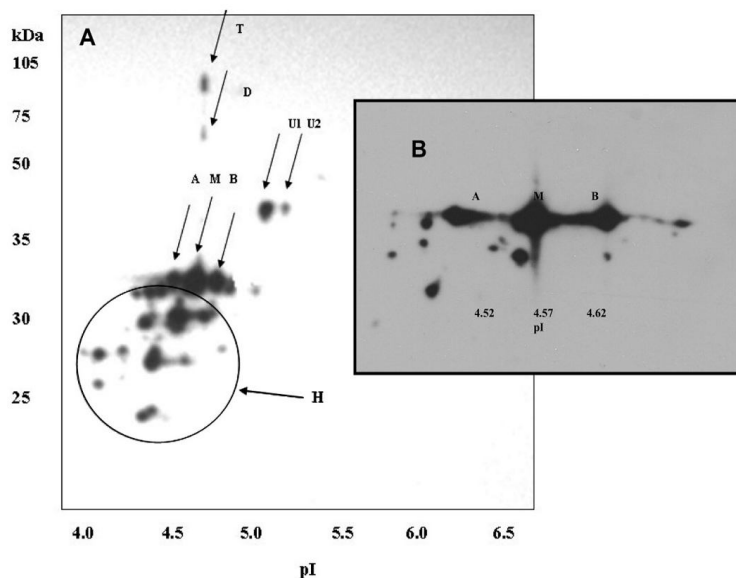


**Рисунок 1. Двумерная карта (2DE) белков эпителиальных раковых клеток MDA-MB468 и положение на ней PCNA.** (А) Клеточные белки (0.4 мг) были разделены 2DE (pH 3-10, 13см, и 10% SDS-PAGE) и окрашены Кумасси R350. Идентификацию белков проводили белковой дактилоскопией (В) Увеличенная область 2DE карты вокруг PCNA. Тропомиозин альфа-1 (TPM1\_HUMAN), тропомиозин альфа-3 (TPM3\_HUMAN), 14-3-3 белок эпсилон (1433E\_HUMAN), 14-3-3 белок сигма (1433S\_HUMAN), 14-3-3 белок бета/альфа (1433B\_HUMAN), фактор элонгации 1-бета (EF1B\_HUMAN), нуклеофосмин (NPM\_HUMAN).

сдвинутые по изоточкам, сателлитные пятна (Рис.2). Мажорное (М) пятно PCNA соответствует полипептиду с  $pI$  4.57 и массой 30 кДа. Эти числа почти с точностью соответствуют теоретическим параметрам PCNA, указывая на то, что большая часть PCNA не модифицирована. Наличие дополнительных пятен, детектированных с помощью Вестерн-блота, говорит о возможности присутствия различных модификаций.

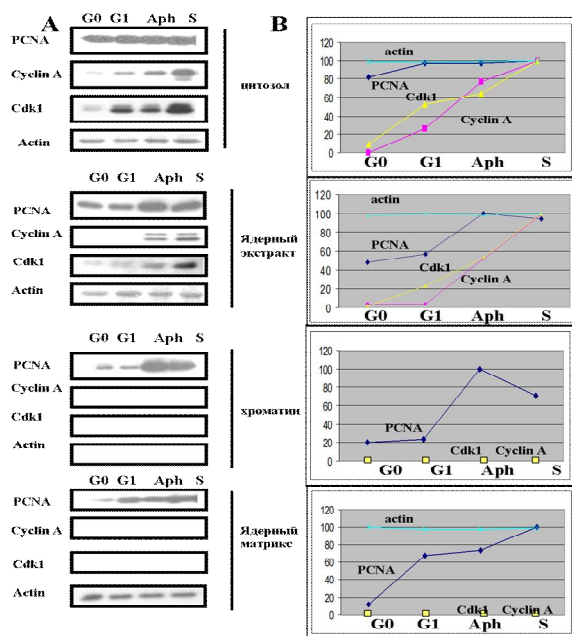
### PCNA В ФАЗАХ КЛЕТОЧНОГО ЦИКЛА

Чтобы яснее представить общую картину протеома при переходе клеток от стадии покоя (фаза G0) к стадии деления (особенно репликации ДНК, S-фазе) и место в этой картине PCNA (уровень экспрессии, локализация, модификации), была использована система синхронизации по клеточному циклу клеток яичника китайского хомячка (CHO) с дальнейшим анализом белков. Изначально экспрессия некоторых белков в разных фазах клеточного цикла (от G0- к S-фазе) была проанализирована с помощью одномерного электрофореза и Вестерн-блота. Так, циклин А не детектируется в клетках, находящихся в фазе покоя, G0, но обнаруживается через 10 часов после выхода из G0, когда клетки уже подходят к границе фаз G1 и S (G1/S). Его уровень близок к

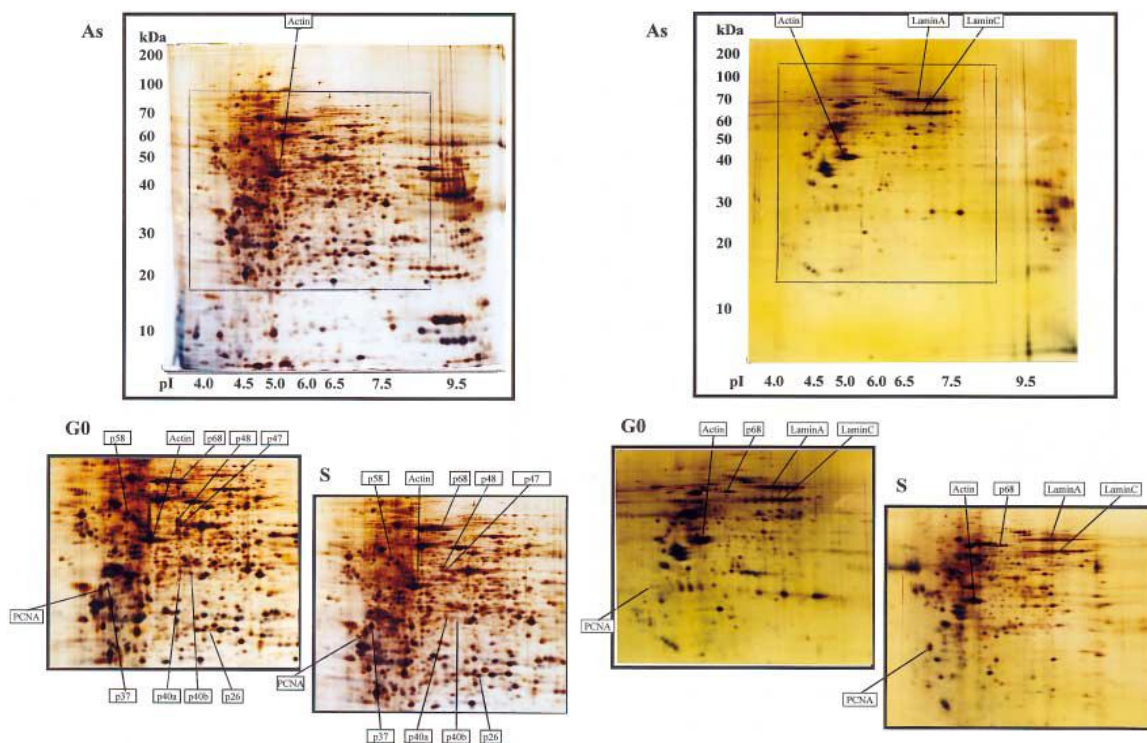


**Рисунок 2. Многочисленные пятна, соответствующие изоформам PCNA, могут быть выявлены с помощью 2DE высокого разрешения и повышенной чувствительности. Иммуноокрашивание проводили с использованием анти-PCNA антител PC10. А, М, В, Т и D обозначают, соответственно, “кислую”, мажорную, “щелочную”, тримерную и димерную формы PCNA. U1 и U2 обозначают убиквитинированные формы мономера PCNA. Н – кластер продуктов гидролиза PCNA. (А) 2DE (pH 4–7, 13 см, и 10% SDS-PAGE). (В) 2DE (pH 4–5, 18 см, и 10% SDS-PAGE).**

максимуму после 14 часов роста в полной среде, содержащей афидиколин, после выхода из G0-фазы, когда большинство клеток находится в начале S-фазы. Максимального уровня экспрессии циклин А достигает в течение 2 часов после снятия блокировки афидиколином, когда начинается активная репликация хромосом. Схожая картина наблюдается и с другим регулятором клеточного цикла, протеин киназой Cdk1, которая также не детектируется в G0-фазе клеточного цикла. Но уровень Cdk1 достаточно высок уже после 6 часов и достигает максимума после 10 часов выхода из G0-фазы, когда циклин А только начинает детектироваться. Эти данные согласуются с моделью, где основные функции Cdk1 приходятся на середину G1-фазы, а циклина А - на фазу репликации ДНК (S-фазу). Интересно то, что значительное количество PCNA обнаруживается в фазе G0. Общий уровень PCNA увеличивается примерно только в 2 раза, когда клетки входят в цикл деления, и остается таковым все время (Рис.3). Так как PCNA является одним из необходимых белков, участвующих в репликации ДНК, его сравнительно постоянный уровень в течение клеточного цикла является несколько неожиданным. Более детально функционирование и роль PCNA может прояснить клеточное фракционирование. Как видно на Рис.3, уровень PCNA в цитоплазме остается одинаковым в течение всего клеточного цикла и даже в фазе G0. Однако следует особо подчеркнуть то, что в экстрактах ядер, хроматина и ядерном матриксе этот уровень значительно отличается в разных фазах клеточного цикла. Например, уровень PCNA в образцах ядерного матрикса был очень низким в фазе G0, но значительно повышен и постоянен, начиная с середины фазы G1. А в образцах экстрактов ядер и хроматина уровень PCNA был очень низким



**Рисунок 3. Определение уровня циклина А, PCNA и Cdk1 в субклеточных фракциях клеток CHO в течение клеточного цикла. (А) SDS-PAGE белковых фракций (CF, NEF, CMF и NMF) с последующим Вестерн-блотом, используя антитела к PCNA, циклину А, Cdk1 или актину. G1 и S обозначают соответственно образцы из клеток, находившихся в середине G1 и середине S фазы. (В) Относительное количество каждого белка, детектированного Вестерн-блотом.**



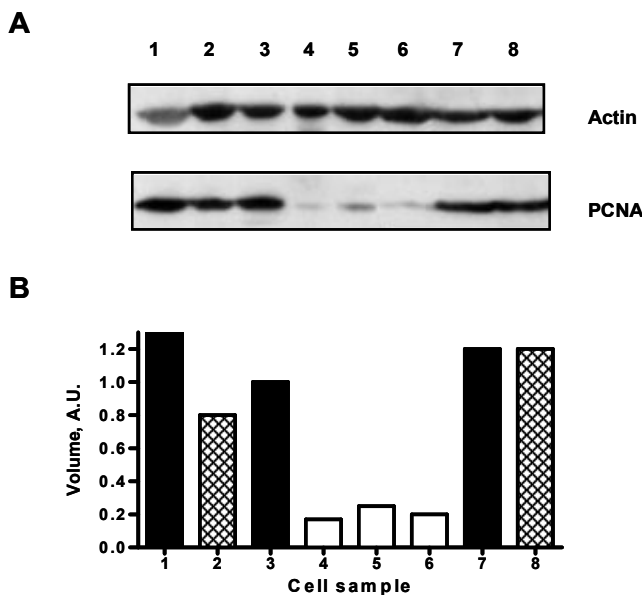
**Рисунок 4. 2DE белковые профили клеточных экстрактов (слева) и ядерного матрикса (NMF) (справа). Белки разделяли в 2DE (pH 3.0–10.0, 13см, и 11% SDS-PAGE) и окрашивали серебром. (As, G0 и S) Образцы, полученные из несинхронизированных клеток, синхронизированных в G0- или в середине S-фазы. В случае образцов (G0 и S) показаны только области геля, содержащие белки, существенно изменяющие экспрессию в клеточном цикле (соответствующая область на (As) отмечена квадратом).**

до середины фазы G1, достигая максимальных величин на границе G1/S фаз (Рис.3). Для получения более полной картины белковых изменений в зависимости от клеточного цикла был проведен анализ 2DE как всех клеточных белков, так и отдельных субклеточных фракций. Среди 1200 проанализированных 9 белков показали существенное изменение уровня экспрессии в S-фазе по сравнению с фазой G0. Анализ распределения PCNA в разных субклеточных фракциях с помощью 2DE (Рис.4) подтвердил данные одномерного Вестерн-блота и позволил более точно оценить уровень PCNA. Можно сказать, что значительные качественные изменения в белковых профилях синхронизированных клеток CHO возникают, когда клетки переходят из состояния покоя (G0) в стадию деления (G1). Дальнейший переход от G1- к S-фазе в основном приводит к количественному увеличению этих изменений. Общий уровень PCNA в клетках CHO увеличивается только в два раза во время перехода от G0- к S-фазе. Причем уровень PCNA в цитоплазме довольно высок и не меняется по фазам цикла. Однако уровень его в хроматине и ядерном матриксе возрастает до 12 раз при переходе от G0- к S-фазе. Следовательно, важным механизмом регуляции PCNA является его транспорт в места функционирования. Следует отметить, что PCNA аккумулируется в ядерном матриксе в середине фазы G1 еще до того, как перейти в хроматин на границе фаз G1/S, что указывает на возможное участие PCNA не только в синтезе, но и в инициации синтеза ДНК.

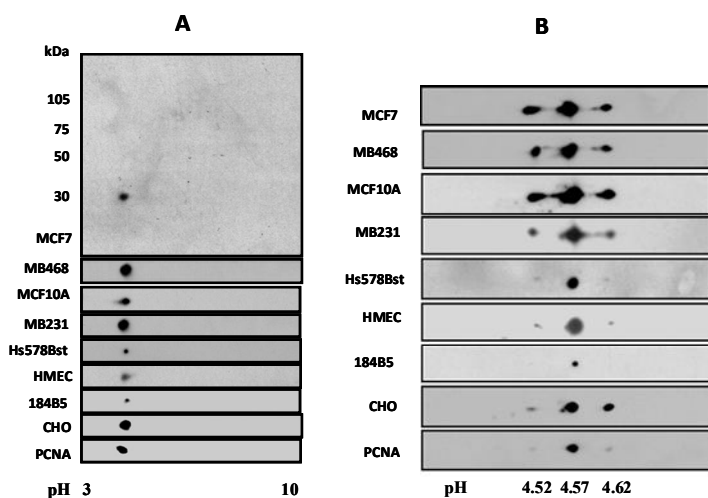
## **PCNA И КАНЦЕРОГЕНЕЗ**

### **Профили PCNA нормальных и раковых клеток.**

Анализ клеточных культур показал, что раковые клетки имеют значительно более высокий уровень PCNA, чем нормальные клетки даже в том случае, если они имеют одинаковую скорость деления. Как видно на Рис.5, первичные эпителиальные клетки (НМЕС) и две линии бессмертных нераковых клеток (Hs578Bst и 184B5) имеют очень низкий уровень PCNA. И наоборот, линии раковых клеток (MDA-MB468, MDA-MB231 и MCF-7) показывают уровень PCNA в 5-6 раз выше, чем “нормальные” клетки. Эти данные указывают на прямую связь клеточной трансформации и повышенного уровня PCNA, хотя следует сказать, что некоторые бессмертные клеточные линии также показывают высокий уровень экспрессии PCNA (MCF10A и CHO, Рис. 5). С другой стороны, количество PCNA (как минимум в диапазоне тех уровней, которые присутствуют в данных клетках) не является лимитирующим фактором, определяющим скорость пролиферации клеток. Почти у всех вышеупомянутых клеток эта скорость практически одинакова, и время удвоения количества клеток равно примерно 30 часам, за исключением клеток CHO (19 часов). По-видимому, повышенная скорость деления клеток CHO связана с какими-то иными причинами,



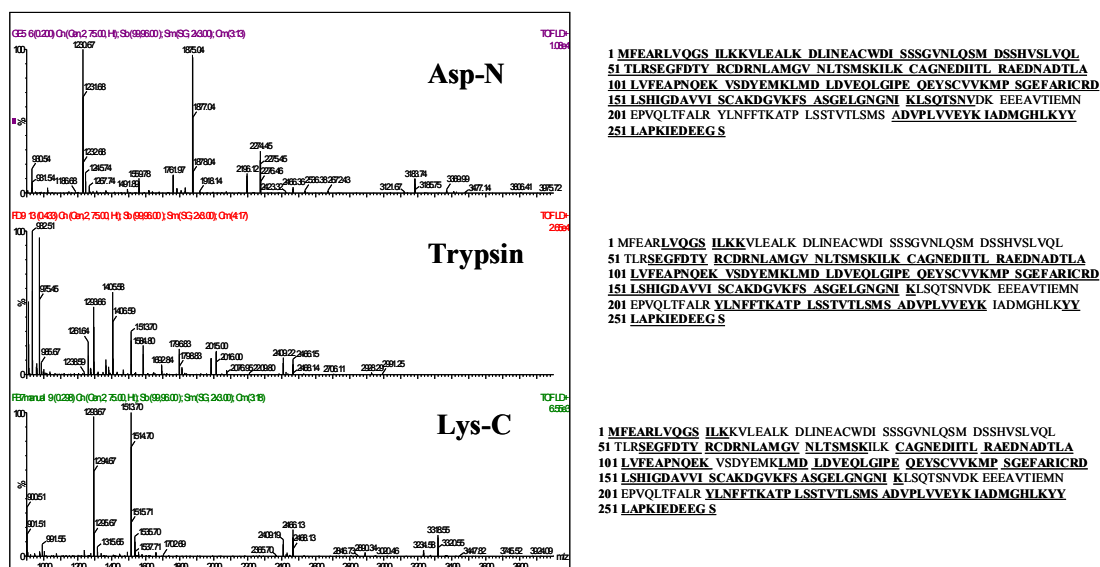
**Рисунок 5. Первичные и бессмертные нераковые клетки обычно имеют низкий уровень PCNA.** (А) Вестерн-блот клеточных экстрактов. (1–8) MDA-MB468, MCF10A, MDA-MB231, Hs578Bst, HMEC, 184B5, MCF-7, CHO). PCNA детектировали с помощью антител PC10. В качестве контроля та же мембрана была обработана антителами к актину. (В) Интенсивность сигнала в каждой полосе определяли, используя программу Phoretix 2D (Nonlinear Inc).



**Рисунок 6. PCNA из первичных, бессмертных и раковых клеток детектируется одинаковым образом с помощью 2DE.** (А) Клетки лизировали в буфере для образца и разделяли в 2DE (pH 3–10, 7см и 10% SDS-PAGE). (В) 2DE более высокого разрешения и чувствительности (pH 4–5, 18см.). PCNA детектировали с помощью антител PC10.

а не с PCNA, так как его уровень в этих клетках такой же, как и у клеток MDA-MB468, MDA-MB231 или MCF-7, которые имеют меньшую скорость пролиферации. Все вышеупомянутые клетки далее были проанализированы на предмет присутствия каких-либо специфических для раковых клеток изоформ PCNA. Вначале был проанализирован широкий спектр изоточек (Рис.6А). Данные, полученные после 2DE и Вестерн-блота показали присутствие во всех клеточных линиях только “кислой” формы PCNA (pI~4.6). Затем изоформы PCNA были проанализированы с помощью 2DE более высокого разрешения. Как видно на Рис.6В, PCNA во всех проанализированных клеточных линиях имеет 3 изоформы одной массы, но с разными изоточками (pI 4.52, 4.57 и 4.62). Мажорная форма была далее с помощью масс-спектрометрии, которая не выявила в ней никаких различий между нормальными и раковыми клетками (Рис.7). Таким образом, было показано отсутствие специфических раковых или нормальных форм PCNA.

Более того, метод белковой дактилоскопии показал практически идентичность рекомбинантного PCNA и эндогенного PCNA человека (нормальные или раковые клетки, мажорная форма, Рис.6). Причем использование различных протеаз дало возможность перекрыть всю последовательность PCNA детектированными на масс-спектрометре пептидными фрагментами (Рис.7). Так как только техническая модификация (алкилирование цистеина, возникшее в процессе анализа образца) была обнаружена в этих фрагментах, было сделано заключение, что мажорная форма представляет собой в основном немодифицированный PCNA. Это заключение хорошо согласуется с тем, что изоточка мажорной формы, *pI* 4.57, точно совпадает с теоретической изоточкой PCNA.



специфический, так как картина протеолиза PCNA из клеток китайского хомячка и из клеток человека, отличающихся только по 3 аминокислотам, практически одинакова. Это указывает на сходство метаболизма PCNA в разных клетках млекопитающих. Мажорное (М) пятно PCNA соответствует полипептиду с массой в 30 кДа и изоточкой, *pI*, 4.57. Эти данные соответствуют теоретическим параметрам PCNA. Минорные пятна образуются из-за изменений в заряде или молекулярной массе и отражают степень модификации PCNA. Причем надо иметь в виду, что эти модификации могут быть биологическими (функциональными) или техническими, то есть возникшими при анализе образца. В частности, многочисленные фрагменты PCNA образуются при протеолизе во время 2DE, и могут быть исключены добавлением протеасомного ингибитора MG132 или тиомочевины. Считается, что данный протеолиз имеет место также и *in vivo* (правда в гораздо меньшей степени, и его обнаружение требует более чувствительных методов) (Naryzhny and Lee 2003; Yamamoto, Kimura et al. 2004). Убиквитинирование PCNA является другой модификацией, которая ведет к появлению на двумерной карте пятен, соответствующих полипептидам большей массы (~40 кДа) и более щелочной изоточки, *pI*, (~5.0) (Рис.2).

#### **Низкомолекулярные фрагменты PCNA являются результатом действия протеасом.**

Протеасомный распад PCNA может быть частью общего процесса самоуничтожения, происходящего в апоптотных клетках, или же связан с функционированием PCNA *in vivo*. Возможно, верны оба этих предположения. Для ответа на эти вопросы PCNA из клеток, находящихся в различных фазах клеточного цикла, а также вошедших в процесс апоптоза, был проанализирован с помощью 2DE и иммунодетектирования. Клетки, находящиеся в фазе покоя (G0) или в процессе апоптоза, не содержат большого количества фрагментов PCNA (Naryzhny and Lee 2003). Однако образцы, взятые из делящихся клеток (S- или G2-фаза), содержат большое количество продуктов протеолиза PCNA. Эти данные указывают на связь протеолиза PCNA с его функционированием в фазах S и G2. Если клетки были лизированы и прогреты при 100°C в буфере с LDS, или же протеасомный ингибитор MG132 был добавлен при получении образцов, протеолиз не наблюдался. Причем присутствие PMSF и других протеазных ингибиторов, не влияющих на протеасомы, не сказывается на протеолизе, указывая на то, что он является протеасом-специфическим (Naryzhny and Lee 2003).

#### **Протеолиз PCNA *in vitro* может происходить во время ИЭФ.**

Хотя результаты 2DE с последующим Вестерн-блотом указывают на то, что в небольшой степени протеолиз наблюдается и *in vivo*, очевидно, что основная его часть происходит *in vitro* уже после лизиса клеток. Чтобы детально выяснить, когда происходит протеолиз, образцы белков инкубировали разное время при 37°C и анализировали Вестерн-блотом (Naryzhny and Lee 2003).



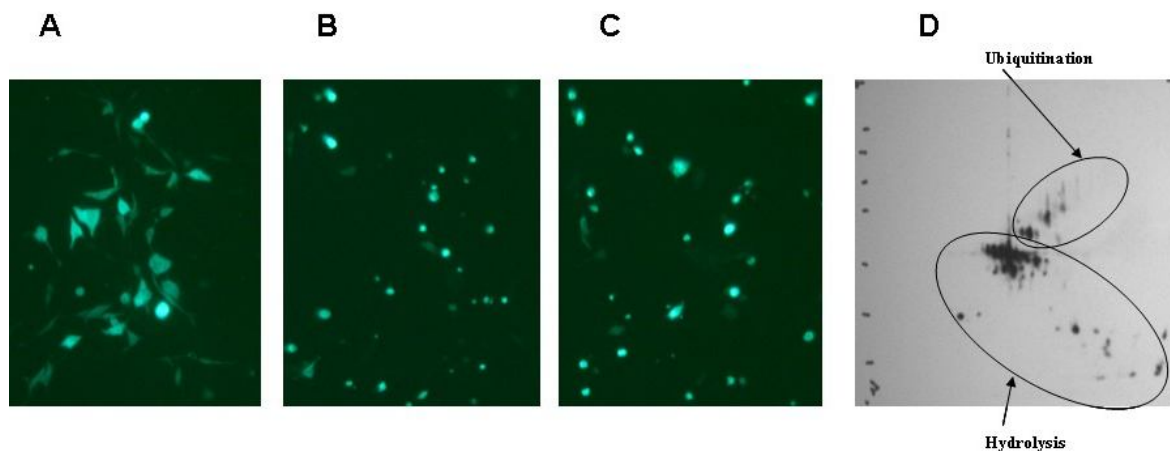
Протеолиз наблюдается после определенного инкубационного периода при 37°C, но не при 4°C. Следует отметить, что профили протеолиза всегда очень похожи, указывая на то, что гидролиз является специфическим, причем идет в основном с N-конца (Naryzhny and Lee 2003). То есть протеолиз PCNA в основном происходит во время изоэлектрофокусировки, которая идет при 20°C в течение как минимум 6 часов.

#### **Протеолиз PCNA является убиквитин-зависимым.**

На то, что гидролиз PCNA является убиквитин-зависимым, указывает присутствие убиквитинированных форм PCNA при распаде PCNA. Так как белки клеточного цикла часто регулируются через убиквитин-зависимый протеолиз, была проанализирована возможность убиквитинирования PCNA. Изначально было обнаружено, что два белка массой в 42 кДа (pI 4.85 и 4.90) детектируются при 2DE-анализе с последующим иммунодетектированием антителами к PCNA(U1 и U2 на Рис.2). Чтобы подтвердить то, что эти белки являются конъюгатом PCNA и убиквитина, 2DE и Вестерн-блот анализ были повторены с использованием анти-PCNA и анти-убиквитин моноклональных антител. Как ожидалось, были обнаружены пятна, окрашивающиеся как анти-PCNA, так и анти-убиквитин антителами, причем положение конъюгата PCNA-убиквитин на 2DE карте и вычисленные физико-химические параметры (pI/Mw) очень близки к теоретическим величинам (Naryzhny and Lee 2003).

#### **Правильная структура PCNA жизненно важна для клеточных функций.**

Классический механизм протеасомного протеолиза PCNA через полиубикитинирование обнаруживается в экспериментах по трансфекции клеток вектором, экспрессирующим GFP-PCNA (Рис.8). Повышенный уровень PCNA в клетке (даже в виде GFP-PCNA) не влияет на ее жизнеспособность (Рис.8А). Однако присутствие в клетке PCNA с нарушением четвертичной структуры, вызванным внесением мутаций приводит к апоптозу (Рис.8В и С). Причем белковый анализ этих апоптотных клеток с помощью 2DE и Вестерн-блота выявляет полиубикитинирование GFP-PCNA и его протеолиз (Рис.8D). В данном случае интересно то, что вызывает катастрофические для клетки последствия не только PCNA, имеющий большие делеции, но и PCNA всего лишь с одной аминокислотной заменой (R5A). О роли данной аминокислоты в структуре PCNA можно узнать в дальнейшем изложении (см. **Аминокислотные остатки Arg-5 и Lys-110 являются критическими для формирования двойного тримера PCNA**). Полиубикитинирование GFP-PCNA, ведущее к его протеасомной деградации, идет по любому лизину или же, по-видимому, даже по N-концу. Все протестированные конструкции с разными делециями (AA1-100, AA101-120, 121-172, AA173-183, AA184-259 и др.) одинаково эффективно подвергались полиубикитинированию и приводили к клеточной гибели.



**Рисунок 8. PCNA с нарушенной структурой вызывает апоптоз и гидролизуется в клетке через убиквитин-зависимый механизм.** Клетки CHO были трансфицированы нормальным вектором, кодирующим GFP-PCNA (A), а также мутантным, замена R5A (B) или делеция AA173-183 (C). Снимки сделаны через 36 часов после трансфекции на микроскопе Zeiss Axiovert 100 (x50). (D) Белки, экстрагированные из образца, показанного на (C), были проанализированы с помощью 2DE с последующим Вестерн-блотом, используя анти-GFP антитела (B2, Santa Cruz).

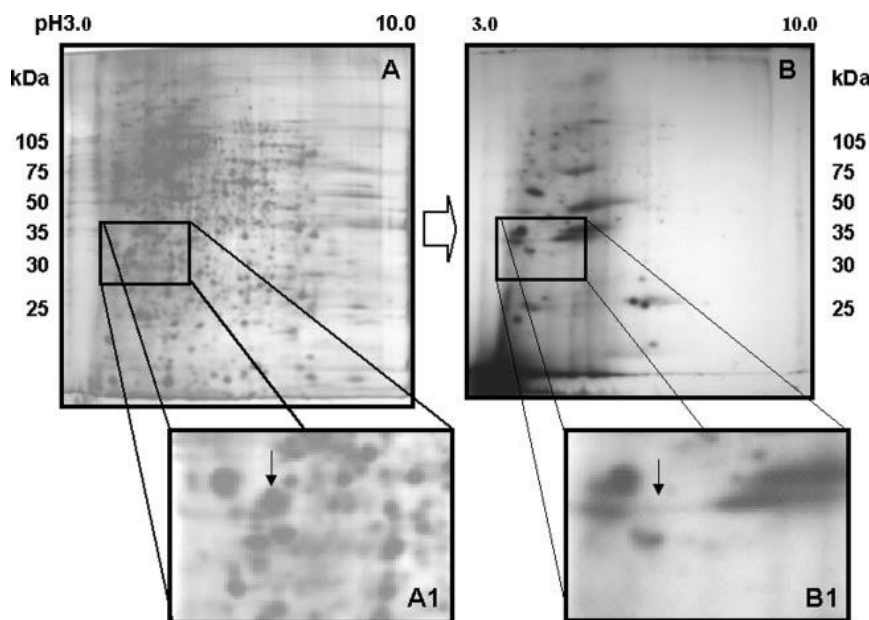
#### **PCNA не фосфорилирован *in vivo*.**

Чтобы прояснить вопрос с фосфорилированием PCNA, был использован широкий спектр экспериментальных подходов, включая изотопную метку *in vivo*, иммуноосаждение, иммуноблот в комбинации с 2DE высокого разрешения. Белки клеток CHO разделяли в 2DE, переносили на мембрану и иммуноокрашивали, используя смесь антител к фосфосерину, фосфотреонину, и фосфотирозину. Ту же самую мембрану дополнительно обрабатывали моноклональными анти-PCNA антителами. PCNA, идентифицированный с помощью PC10, не дает сигнала при использовании антител к фосфопротеинам, указывая на то, что он не фосфорилирован. Далее были проанализированы белки из клеток, которые были метаболически мечены с помощью [ $^{32}\text{P}$ ]ортофосфата (Рис.9). После разделения белков и окрашивания серебром положение PCNA было идентифицировано (стрелка на Рис.9A1). Тот же самый гель был высушен и экспонирован на рентгеновскую пленку (Рис.9B). Аналогично данным с использованием антител следов фосфорилирования PCNA обнаружено не было (стрелка на Рис.9B1). Для большей уверенности и повышения чувствительности анализа PCNA был иммуноосажден. Иммуноосажденные белки были разделены двумерным электрофорезом, окрашены серебром, а гель высушен (Рис.10A1) и экспонирован на рентгеновскую пленку (Рис.10A). Четко видно, что PCNA не фосфорилирован (стрелка на Рис.10A). Заметно, что близко к PCNA находится фосфопротеин (незакрашенная

стрелка, (A) и (A1)). Хотя относительное количество этого белка мало, уровень фосфорилирования его очень высокий. Чтобы полностью исключить отношение этого белка к PCNA, был проанализирован еще и иммунопреципитат PC10 антител в режиме максимально высокого разрешения 2DE (pH 4.0–5.0, 18-см, и 11% SDS-PAGE, 14x14-см гель). Белки были перенесены на мембрану, которая сначала была экспонирована на рентгеновскую пленку (Рис.10B), а затем иммуноокрашена с помощью антител PC10 (Рис.10B1). Опять фосфорилирования PCNA обнаружено не было (стрелка на Рис.10B). Как и в случае 2DE более низкого разрешения (незакрашенная стрелка на Рис.10A), присутствие фосфопротеина (33 кДа, *pI* 4.47) очевидно (незакрашенная стрелка на Рис.10B). Этот фосфопротеин, не дающий сигнала с PC10, немного меньше и “кислее”, чем А-форма (34 кДа, *pI* 4.52) или М-форма (34 кДа, *pI* 4.57) PCNA. Однако он осаждается вместе с антителами к PCNA (по-видимому, взаимодействует с ним), и вполне может быть принят за фосфорилированный PCNA при анализе электрофорезом невысокого разрешения. Это, по-видимому, и является причиной того, что в нескольких работах делается вывод о фосфорилировании PCNA. Однако, суммируя вышеизложенные данные, можно определенно сказать, что PCNA не фосфорилирован *in vivo*.

#### **PCNA может быть ацетилирован *in vivo*.**

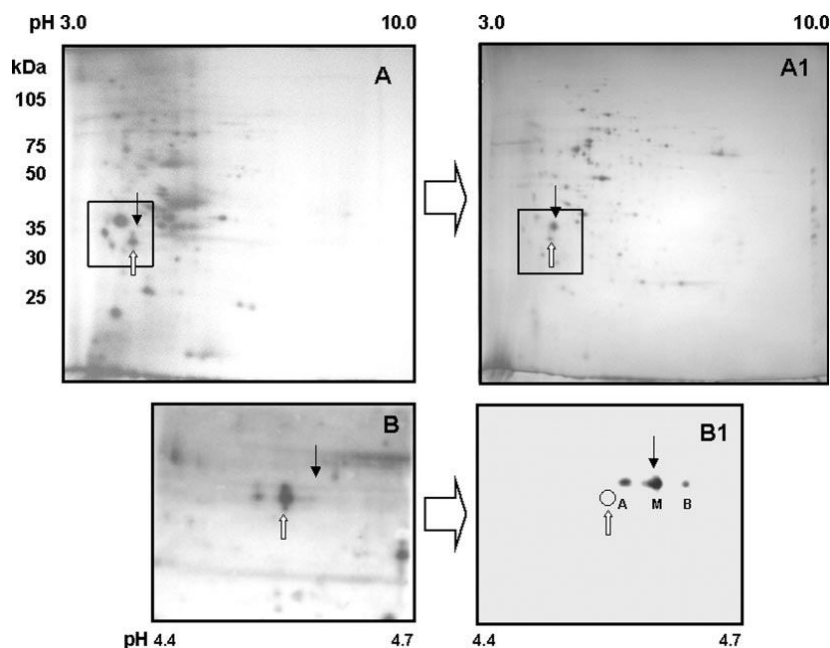
Для выяснения вопроса об ацетилировании PCNA внутриклеточные белки были сначала метаболически мечены *in vivo* добавлением [<sup>3</sup>H]ацетата натрия в ростовую культуру, а затем разделены 2DE и переведены на PVDF-мембрану. Далее, мембрана была сначала проэкспонирована на рентгеновскую пленку, а затем обработана антителами PC10. Использование одной и той же мембраны позволило идентифицировать PCNA среди <sup>3</sup>H-меченых (ацетилированных) белков. Чтобы получить дополнительные доказательства, белки были осаждены антителами PC10 и проанализированы 2DE с последующим Вестерн-блотом, используя антитела к ацетилированным пептидам и к PCNA. Полученные результаты находятся в согласии с данными эксперимента с меткой *in vivo* и четко указывают на то, что PCNA может быть ацетилирован. Чтобы определить статус ацетилирования трех основных форм PCNA (А, М, В), белки были обработаны гистон деацетилазой (HDAC1) или ингибитором деацетилаз TSA с добавлением субстрата для ацетилирования ацетил-СоА. Обработка HDAC1 ведет к увеличению количества В-формы, в то время как ацетил-СоА плюс TSA – к уменьшению количества В-формы и возрастанию количества А- и М-форм. Эти данные указывают на то, что А- и М-формы, соответственно, высоко и средне ацетилированы, а В-форма деацетилирована.



**Рисунок 9. Анализ меченных *in vivo* белков** показывает, что PCNA не фосфорилирован. Белки, метаболчески меченные [ $^{32}$ P]ортофосфатом, были разделены двумерным электрофорезом (pH 3.0–10.0, 13см, и 11% SDS-PAGE, 13x13см). Гель был окрашен серебром, высушен (А) и экспонирован на рентгеновскую пленку (В). (А1, В1) Увеличенные области, содержащие PCNA. Стрелки указывают положение PCNA.

#### **Субклеточная локализация изоформ PCNA в контексте клеточного цикла.**

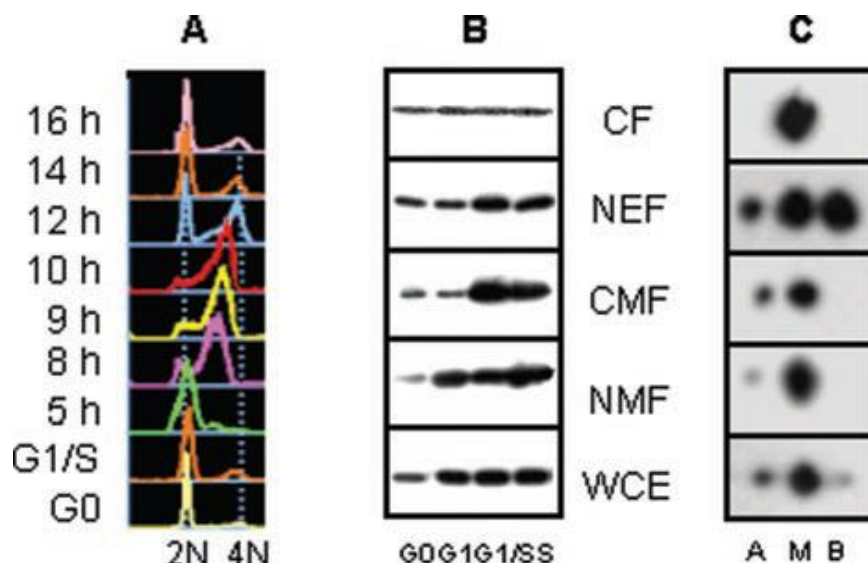
Уровень PCNA в различных субклеточных фракциях и в зависимости от положения клетки в клеточном цикле был детально проанализирован. Как видно на Рис.11В, уровень PCNA в ядерном экстракте (NEF, nuclear extract fraction), хроматине (CMF) и ядерном матриксе (NMF) меняется в течение клеточного цикла, в то время как в цитозольной фракции (CF) остается сравнительно постоянным. Уровень PCNA значительно повышен в NMF, начиная с середины G1 фазы, а в NEF начиная с границы фаз G1/S (Рис. 11В, NMF и NEF). Однако наиболее драматическое увеличение количества PCNA (до 7 раз) наблюдается в хроматиновой фракции (CMF) на границе фаз G1/S (Рис. 11В, CMF). В совокупности эти данные говорят о том, что в середине G1-фазы PCNA сначала транспортируется в ядерный матрикс, а затем, когда начинается репликация ДНК (граница фаз G1/S), переходит из ядерного матрикса в хроматин. Также был проверен и уровень модификации PCNA в разных фракциях. Как видно на Рис. 11С, только М-форма присутствует в цитоплазме, но значительное количество А-формы обнаруживается во фракциях ядерного экстракта, хроматина и ядерного матрикса (NEF, CMF и NMF). Интересно то, что В-форма присутствует только в ядерном экстракте (NEF) и на уровне сравнимом с уровнем М-формы. В совокупности это позволяет предположить, что А- и М-формы напрямую участвуют в ДНК репликации, а В-форма – нет. Относительный уровень А-формы, хоть и не намного, но выше в хроматиновой фракции по сравнению с ядерным матриксом.



**Рисунок 10. Комплексный анализ с помощью метки *in vivo*, иммунопреципитации и Вестерн-блота показывает, что PCNA не фосфорилирован *in vivo*.** (А, А1) Белки, экстрагированные из клеток, метаболически меченных [ $^{32}\text{P}$ ]ортофосфатом, подверглись иммуноосаждению с использованием антител PC10. Иммунопреципитат разделяли двумерным электрофорезом. Гель окрашивали серебром (А1), высушивали и экспонировали на рентгеновскую пленку (А). (В, В1) Тот же иммунопреципитат разделяли двумерным электрофорезом более высокого разрешения (pH 4.0–5.0, 18см, и 11%-ный SDS-PAGE, 14x14см). Затем белки переносили на мембрану, которую сначала экспонировали на рентгеновскую пленку (В) а затем иммуноокрашивали антителами к PCNA, PC10 (В1). Обведенные зоны на (А) и (А1) обозначают положение PCNA. Стрелка указывает на положение М-формы PCNA. Окружность на (В1) показывает положение фосфопротеина, обозначенного незакрашенной стрелкой на (В).

**Ацетилирование и деацетилирование PCNA может происходить с помощью ацетилазы p300 и деацетилазы HDAC.**

Чтобы определить ферменты, ответственные за ацетилирование и деацетилирование PCNA, белки клеточного экстракта были иммуноосаждены антителами к PCNA (PC10), и иммунопреципитат был проанализирован Вестерн-блотом, используя антитела к HDAC1 и p300. HDAC1 эффективно осаждается вместе с PCNA, указывая на то, что этот фермент может быть ответственен за деацетилирование PCNA (Naryzhny and Lee 2004). Фактор транскрипции, ацетилаза p300, также осаждается вместе с PCNA. Таким образом, эти результаты позволяют предположить, что PCNA может быть ацетилирован ацетилазой p300 и деацетилирован деацетилазой HDAC1. Ацетилирование PCNA с помощью p300 возможно необходимо для репликации ДНК, так как фибробласты с генотипом p300 (-/-) не способны вести синтез ДНК (Hasan, Hassa et al. 2001).



**Рисунок 11. Определение уровня PCNA в разное время клеточного цикла и распределение изоформ PCNA в различных субклеточных фракциях. (А)** Анализ положения клеток в клеточном цикле с помощью проточной цитометрии. Клетки CHO были синхронизированы в фазе G0 (G0), а затем переведены в полную среду, содержащую 200 мМ мимозин, в которой они проходили фазу G1, но останавливались на границе G1/S (G1/S). (А) Числа, показанные слева, - время выхода клеток после остановки в G1/S. (В) Белки из разных субклеточных фракций клеток, синхронизированных в фазах G0, G1, G1/S, и S (8 часов после удаления мимозина) были проанализированы SDS-PAGE с последующим иммунодетектированием антителами PC10. (С) Анализ общих белков (WCE) или белков из отдельных субклеточных фракций асинхронных клеток CHO с помощью 2DE и иммунодетектирования антителами PC10.

**Ацетилированный PCNA имеет большее сродство к ДНК-полимерадам, чем деацетилированный.**

Чтобы выяснить, насколько ацетилирование PCNA влияет на его способность взаимодействовать с ДНК-полимеразами, иммунопреципитат, полученный осаждением анти-PCNA антителами PC10 из клеточных экстрактов, обработанных деацетилазой HDAC1 или ингибитором деацетилаз, TSA, был проанализирован Вестерн-блотом с использованием антител к ДНК-полимерадам. Оказалось, что PCNA, обработанный деацетилазой HDAC1, проявляет намного меньшее сродство к ДНК-полимеразе дельта или ДНК-полимеразе бета, чем образец, обработанный TSA. Эта разница в сродстве особенно заметна в случае деацетилированного PCNA и ДНК-полимеразы дельта ([Naryzhny and Lee 2004](#)). Таким образом, ацетилирование и деацетилирование PCNA играют важную роль в его связывании с ДНК-полимеразами и, соответственно, в репликации ДНК. Кроме того, репликация ДНК была протестирована *in vitro* с использованием комплексов PCNA, иммуноосажденных из ядерных экстрактов (NEF), которые были обработаны деацетилазой HDAC1 или ацетил-CoA плюс TSA. Образцы, обработанные

HDAC1 (то есть деацетилированные), проявляют значительно более низкую ДНК-полимеразную активность, чем те, которые обработаны ацетил-СоА плюс TSA.

Суммируя вышеизложенное, можно предположить, что PCNA в виде М-формы занимает положение на ядерном матриксе, близкое к сайтам инициации репликации ДНК, в промежуток времени с середины до конца G1-фазы (Рис.11). При инициации репликации PCNA загружается на хроматин тоже в виде М-формы, так как она является доминирующей, как в хроматиновой фракции (CMF), так и во фракции ядерного матрикса (NMF) (Рис.11C). А- и В-формы, по-видимому, каким-то образом связаны репликацией ДНК, возможно загрузкой/разгрузкой PCNA на хроматин, так как они отсутствуют в цитоплазме, но присутствуют в ядерном экстракте, хроматине и ядерном матриксе (Рис.11). Следует заметить, что повышенный уровень В-формы отмечен в ядерном экстракте (Рис.11C). Так как В-форма не проявляет большого сродства к ДНК-полимерамам бета и дельта, она не может участвовать в репликации ДНК. Можно, таким образом, заключить, что М-форма PCNA участвует в синтезе ДНК, а А- и В-формы образуются в процессе снятия PCNA с ДНК или его загрузки и являются его промежуточными формами. Таким образом, полученные данные показали, что PCNA не фосфорилирован *in vivo*, однако ацетилирование и деацетилирование могут объяснить сдвиг PCNA по заряду и образование дополнительных пятен. При этом фактор транскрипции p300 и гистон-деацетилаза HDAC1 могут быть ответственны, хотя бы частично, за ацетилирование и деацетилирование PCNA. Однако вероятность того, что эти изоформы (А-, В-пятна, Рис.11) содержат еще и другие модификации, такие как окисление или метилирование, в настоящий момент исключать нельзя. В частности, метилирование глютаминовой или аспарагиновой кислоты является модификацией, которая может привести к сдвигу изоточки,  $pI$ , в щелочном направлении (В-пятно). Изоточка мажорной формы (М) точно соответствует теоретическим параметрам PCNA ( $pI$  4.57), то есть пятно представляет в основном немодифицированную форму PCNA. Однако имеется вероятность того, что часть белка в М-пятне содержит одновременно две модификации. Одна модификация образует А-форму (ацетилирование или окисление, сдвиг  $pI$  -0.05), а другая ведет к В-форме (метилирование, сдвиг  $pI$  +0.05). При одновременном наличии двух таких модификаций общий заряд белка не изменится и полипептид будет иметь все ту же изоточку - 4.57.

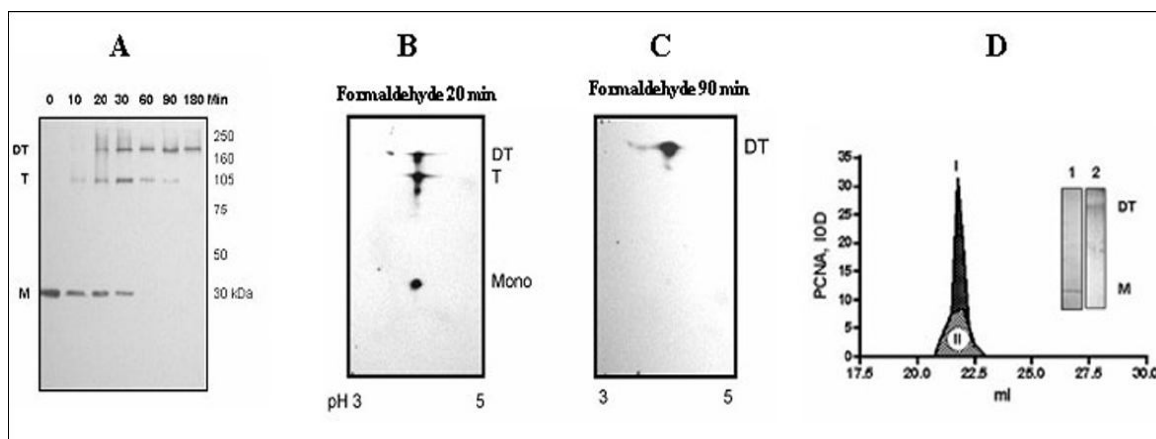
## СТРУКТУРА PCNA

### PCNA млекопитающих организован в виде двойного тримера.

Мономеры PCNA образуют тримерную структуру в виде тора (Krishna, Kong et al. 1994). Однако ряд косвенных данных свидетельствует о том, что тор PCNA является не просто

тримером, а двойным тримером (Henderson, Wiegand et al. 2000). Изначально, чтобы получить информацию о белковых взаимодействиях PCNA, эндогенный PCNA был проанализирован с помощью обычного SDS-PAGE. Как и ожидалось, только мономер с массой в ~33 кДа был обнаружен в 12% денатурирующем геле (Рис.12А, 0 мин). Однако после предварительной обработки клеток 1.5%-ным формальдегидом PCNA обнаруживается в области 33, 100 и 200 кДа. Причем четко прослеживается кинетика перехода детектирования PCNA от одной полосы в 33 кДа до практически одной полосы в ~200 кДа (Рис.12А, 90 мин). Дальнейшее увеличение времени сшивки формальдегидом не дало никаких дополнительных комплексов тяжелее 200 кДа (Рис.12А, 180 мин), прямо указывая на то, что детектируемый комплекс PCNA образован специфически и имеет определенную структуру, а не является неспецифическим конгломератом. Эксперименты со сшивками на клеточных экстрактах оказались более эффективными и показали практически те же результаты, что и с интактными клетками. Чтобы выяснить возможное участие других белков (помимо PCNA) в образовании 200-кДа комплексов, были проведены эксперименты с 2DE. Как видно на Рис.12В, уже после 20 мин обработки формальдегидом в дополнение к 33 кДа существенно присутствие белков с массой в 100 и 200 кДа. И практически все молекулы PCNA образованы в 200-кДа комплекс, когда экстракт был обработан 90 мин (Рис.12С). Следует отметить, что 100- и 200-кДа комплексы и мономер PCNA имеют очень близкие изоточки ( $pI$ ). То есть с очень большой долей вероятности можно говорить, что они содержат только молекулы PCNA, и, учитывая его молекулярную массу, 100-кДа комплекс представляет собой гомотример, а 200-кДа – двойной гомотример. Чтобы перевести все тримеры в двойные тримеры, необходимо достаточно длительное время сшивки. Возможно, это вызвано тем, что двойной тример PCNA находится в динамическом состоянии, как бы пульсирует, и необходимый контакт между аминокислотами, обеспечивающий сшивку, возможен не все время. По-видимому, это является одной из причин того, что в кристаллографических экспериментах обнаруживается только тример. Таким образом, в этих экспериментах сшивки PCNA с другими белками не наблюдается. Объясняется это, по-видимому, тем, что все молекулы PCNA находятся в клетке в виде двойных тримеров, где лизиновые и аргининовые остатки находятся в положениях, удовлетворяющих условиям сшивки формальдегидом (не далее 2Å друг от друга). С другой стороны, таких условий для сшивки между этими остатками в PCNA и в PCNA-связывающих белках не имеется. Тем более, что большинство PCNA-связывающихся белков взаимодействуют с PCNA через гидрофобную ложбину, образованную центральной петлей (41DSSH44) и петлей, соединяющей внутренние домены (121LDVEQLGIPEQE132), ни одна из которых не содержит аргинин или лизин. Таким образом, не следует ожидать сшивки PCNA с другими белками формальдегидом,





**Рисунок 12. PCNA клеток млекопитающих существует в виде двойного тримера.** (A) Человеческие раковые клетки MDA-MB231, находящиеся в PBS, были обработаны 1.5%-ным формальдегидом в течение 10, 20, 30, 60 или 180 мин. Далее, образцы были проанализированы SDS-PAGE и Вестерн-блотом с использованием антител к PCNA. “M,” “T” и “DT” обозначают соответственно мономер, тример и двойной тример PCNA. (B, C) 2DE анализ показывает, что мономер, тример и двойной тример PCNA имеют одну и ту же изоточку. (D) Сшитый двойной тример PCNA (180 мин на панели A) был хроматографически очищен и его положение (пик I) относительно несшитого рекомбинантного PCNA (пик II) при гель фильтрации было проанализировано на колонке S200. (На вставке) С помощью SDS-PAGE и окрашивания серебром показана степень чистоты очистки препаратов PCNA. 1 – рекомбинантный PCNA, 2 – сшитый PCNA. Обозначения по осям: x - объем элюирующего буфера, y – интегральная оптическая плотность (IOD) PCNA, детектированная на Вестерн-блоте.

даже зная, что такие взаимодействия имеют место *in vivo*. Чтобы окончательно подтвердить, что 200-кДа комплекс PCNA не содержит других белков, были проведены эксперименты по обработке формальдегидом очищенного PCNA. Сшивка нативного PCNA 1.0%-ным формальдегидом уже через 15 мин ведет к образованию тримеров и двойных тримеров. Масс-спектрометрический анализ дал возможность более точно определить молекулярную массу всех комплексов PCNA, которая для мономера, димера, тримера и двойного тримера равна, соответственно, 29.3, 58.6, 87.4 и 174.9 кДа. Исходя из того, что молекулярная масса мономера PCNA человека равна 28768 дальтон, полученные данные очень близко согласуются с теоретическими расчетами. Что касается поведения в растворе, то в отличие от нативного PCNA, PCNA, очищенный с помощью денатурирующего электрофореза (SDS-PAGE), образует двойные тримеры чрезвычайно неэффективно. Более того, он образует много неспецифических конгломератов при сшивках. Кроме этого следует заметить, что в отличие от нативного PCNA, PCNA, полученный с помощью SDS-PAGE, дает большое количество димеров после ренатурации. Это говорит о том, что PCNA очень сложно вернуться в нативную форму (двойной тример) после денатурации, особенно когда шапероны и другие дополнительные факторы отсутствуют при ренатурации. Это еще раз подтверждает, что нативная конформация очень важна для

формирования двойного тримера PCNA. Стабильность четвертичных структур PCNA очень сильно зависит от pH. Тример, как и двойной тример, наиболее стабилен при pH 6.8, но чрезвычайно нестабилен при pH ниже 5.5 или выше 8.5. Использование сшивки очищенного PCNA формальдегидом позволило более детально изучить стабильность двойного тримера PCNA. PCNA, тример и двойной тример наиболее стабильны в фосфатном буфере (PB, pH 7.2) независимо от добавления NaCl (до 1 M). Это указывает на то, что ионное взаимодействие между двумя тримерами не столь важно для стабильности двойного тримера. Также не имеют особого значения разные концентрации  $MgCl_2$  (1–10 mM), АТФ (0.5–2.0 mM) или даже Тритона X100 (до 5.0%). Так как добавление EDTA (1–10 mM) также не оказывает влияние на стабильность тримера или двойного тримера, следует, что ионы Mg вообще не нужны для стабильной четвертичной конформации PCNA. Формирование двойного тримера, но не тримера, понижается в 2 раза в 0.1M Трис буфере или в 0.2M мочеvine. Возможно, что это связано просто с конкуренцией аминогрупп Триса или мочевины за взаимодействие с формальдегидом. Однако 50%-ная сахароза также понижает в 2 раза образование двойного тримера при сшивках формальдегидом. Здесь можно предположить, что расстояние (не больше  $2\text{\AA}$ ) между тримерами несколько меняется из-за присутствия молекул сахарозы, не давая возможности для сшивки формальдегидом. Очень важно отметить, что 0.02%-ный SDS почти полностью дестабилизирует двойной тример, не влияя на тример. По аналогии с сахарозой 50%-ный глицерин или 10%-ный PEG значительно понижают стабильность четвертичной структуры PCNA. Также негативно сказывается и наличие стадии осаждения сульфатом аммония при очистке PCNA. Хотя механизмы дестабилизации структуры PCNA вышеуказанными факторами неизвестны, их следует учитывать при очистке PCNA и анализе его структуры.

**Аминокислотные остатки Arg-5 и Lys-110 являются критическими для формирования двойного тримера.**

Для дальнейшего изучения двойного тримера PCNA в клетках млекопитающих был использован объединенный белок GFP-PCNA, который экспрессируется в клетках CHO, трансфецированных вектором pEGFPCNA. Ранее было показано, что GFP-часть такого белка не мешает формированию функционального тримера PCNA (Leonhardt, Rahn et al. 2000). В согласии с этими данными объединенный белок, GFP с PCNA человека, ведет себя аналогично эндогенному PCNA в экспериментах по сшивкам (Рис.13А и В). Аналогично предыдущим публикациям (Leonhardt, Rahn et al. 2000) объединенный белок GFP-PCNA и в нашем случае локализован в местах репликации (фокусах) (Рис.13С). Для дальнейшей характеристики GFP-PCNA был проведен 2DE с последующим иммуоокрашиванием анти-PCNA антителами PC10.

Как было описано ранее, эндогенный PCNA детектируется в виде трех отчетливых изоформ (Рис.13D, где *M*, *A* и *B* являются соответственно мажорной (*pI* 4.57), “кислой” (*pI* 4.52), и “щелочной” (*pI* 4.62) изоформами). Объединенный GFP-PCNA белок также содержит три четкие изоформы (Рис.13D, обозначенные как *M\**, *A\**, и *B\**), которые практически идентичны трем эндогенным изоформам за исключением молекулярной массы (~66 кДа) и изоточек (*pI*, соответственно, 5.0, 4.95, и 5.05). Этот сдвиг по массе и заряду объясняется вкладом GFP. Как ожидается, 30-минутная сшивка клеточных экстрактов формальдегидом приводит к детектированию тримеров и двойных тримеров эндогенного PCNA (Рис.13E, T и DT, соответственно). Подобным же образом GFP-PCNA также формирует тримеры и двойные тримеры (Рис.13E, T\* и DT\*, соответственно). Для картирования точных точек контактов между тримерами внутри двойного тримера был проведен анализ формирования комплексов с помощью внесения мутаций на поверхности PCNA. Для этого было получено несколько векторов pEGFPCNA, несущих точечные и делеционные мутации в определенных местах PCNA. Как анти-GFP, так и анти-PCNA (PC10) антитела были использованы при иммуноокраске для того, чтобы отличить мутантные GFP-PCNA белки от эндогенных PCNA. Следующие мутации никак не влияли на образование, как тримеров, так и двойных тримеров: K13A, K14A, K254A (Рис.40A), K20A, K80A, K117A, K191A, K240A, и K248A. Следует заметить, что Lys-13 и Lys-20 находятся внутри тримерного кольца PCNA, в то время как Lys-117 и Lys-254 – на его передней поверхности. Все остальные сайты мутации находятся на обратной стороне тримера PCNA. Дальнейший мутационный анализ идентифицировал Arg-5 и Lys-110 как два критических аминокислотных остатка, участвующих в формировании стабильного двойного тримера при сшивках формальдегидом. Далее была проанализирована возможность синтетических пептидов ингибировать образование двойного тримера. Синтетические пептиды, представляющие участки PCNA, расположенные в районе Arg-5 (1MFEARLVQGSIL12) или Lys-110 (104EAPNQEKV111), ингибируют формирование двойного тримера, в то время как пептид (251LAPKIEDEEG260), соответствующий последовательности на С-конце (локализована в передней части тримера), – нет. Кроме того, ни один из этих пептидов не ингибировал формирование тримера. В согласии с данными, полученными путем мутационного анализа, эти результаты подтверждают, что остатки Arg-5 и Lys-110 являются существенными точками контакта между тримерами в двойном тримере PCNA. В дополнение необходимо отметить, что ингибирование образования двойного тримера пептидами было эффективно только в буфере, содержащем 15 mM NaCl, и не было эффективным в клеточных экстрактах, содержащих 150 mM NaCl. Это говорит о том, что PCNA существует в

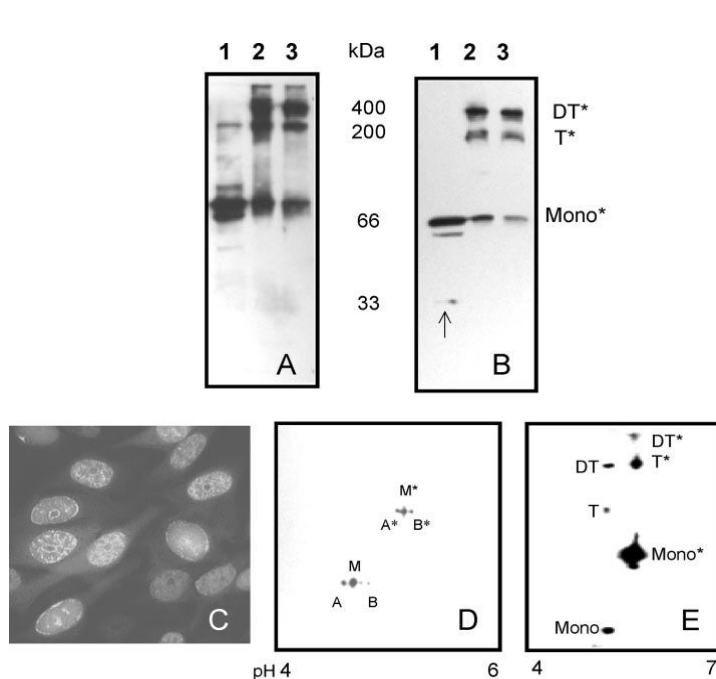
виде двойного тримера, который хотя и динамичен, но все же не может быть легко разрушен при физиологических солевых условиях синтетическими пептидами.

**Образование двойного тримерного комплекса PCNA существенно для деления и выживаемости клеток млекопитающих.**

Чтобы взглянуть на последствия нарушения формирования двойного тримера в клетках млекопитающих, клетки СНО были трансфецированы векторами, кодирующими дикий тип или же PCNA с двойной мутацией R5A/K110A (аминокислотные последовательности PCNA у человека и хомячка отличаются только по трем аминокислотам). Оказалось, что ~5 и 35% клеток, называемый округлый фенотип через 24 часа после трансфекции. Через 48 часов их содержание уже, соответственно, 10 и 70%. Анализ с помощью проточного цитофлуориметра показал, что округлые клетки в случае трансфекции мутантным вектором находятся в фазе G0/G1 и умирают через несколько дней. Однако большинство округлых клеток, наблюдаемых при трансфекции нормальным вектором, являются обычными митотическими клетками и не умирают при дальнейшем культивировании. Конструкции с одиночными мутациями R5A или K110A показали такой же эффект, как и двойные мутанты, R5A/K110A. Эти данные указывают на то, что Arg-5 и Lys-110 являются существенными аминокислотными остатками для формирования двойного тримера PCNA, что в свою очередь очень важно для клеточного роста и выживаемости.

**Только двойной, но не одиночный, тример может одновременно взаимодействовать с ДНК-полимеразой дельта и CAF-1.**

Передняя часть тримера PCNA может взаимодействовать со многими белками, включая ДНК-полимеразу дельта и CAF-1. Ранее предполагалось, что обратная сторона могла бы участвовать в регуляции различных функций PCNA через взаимодействие с другими регуляторными белками (Fukuda, Morioka et al. 1995). Однако на сегодняшний день нет никаких доказательств того, что какие-то белки связываются с тримером PCNA через его обратную сторону. Модель двойного тримера “спина-к-спине” объясняет, почему белки не взаимодействуют с обратной стороной тримера PCNA. Более того, наличие двух передних сторон в одном двойном тримере PCNA позволяет ему одновременно связываться с двумя разными белками и “координировать” различные функции, такие как репликацию ДНК, репарацию ДНК и контроль клеточного цикла. Чтобы определить, действительно ли ДНК-полимераза дельта и CAF-1 могут одновременно взаимодействовать с PCNA, клеточный экстракт клеток, экспрессирующих GFP-PCNA, был обработан ДНКазой 1 и подвергнут иммуноосаждению антителами PC10, пришитыми к агарозным шарикам. Затем иммуноосажденные вместе с PCNA белки были диссоциированы с этих шариков и подвергнуты вторичному иммуноосаждению с использованием антител к ДНК-



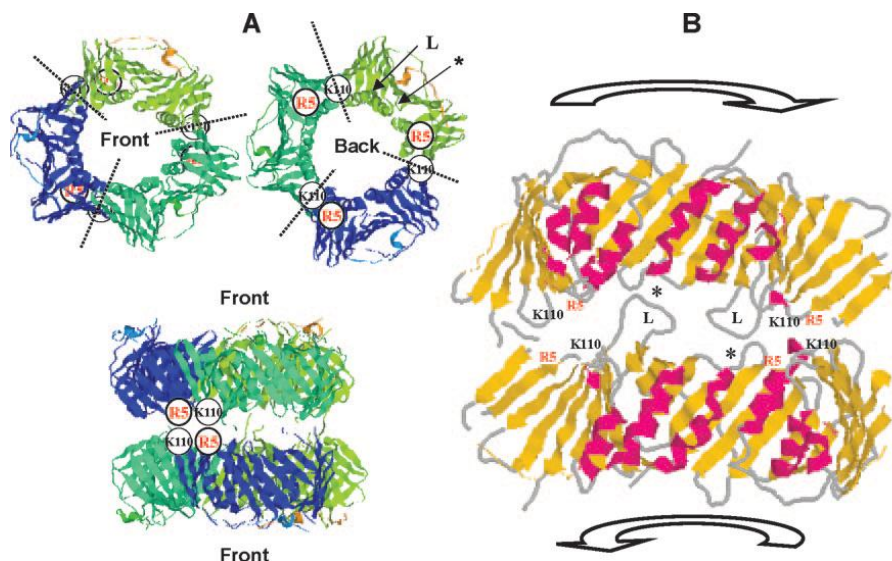
**Рисунок 13. Эктопически экспрессированный в клетках млекопитающих GFP-PCNA ведет себя аналогично эндогенному PCNA.** (А) Клеточные экстракты клеток CHO, трансфецированные вектором, экспрессирующим GFP-PCNA, были проанализированы в SDS-PAGE с последующим иммунокрашиванием анти-GFP (А) или анти-PCNA (В) антителами. Образцы сшивали формальдегидом 0, 30 или 60 мин (дорожки 1, 2, 3). Mono – мономер, Т – тример, DT – двойной тример, \* – GFP-PCNA комплексы (относительное количество эндогенного PCNA намного ниже, чем GFP-PCNA в данном эксперименте, стрелка указывает положение эндогенного PCNA). (С) Клетки со стабильной экспрессией GFP-PCNA под флуоресцентным микроскопом (увеличение x315). Обратите внимание на локализацию GFP-PCNA в репликативных фокусах. 2DE сшитого (Е) и несшитого (D) клеточного экстракта с последующим иммунокрашиванием антителами к PCNA. М – мажорная форма, А – “кислая” форма, В – “щелочная” форма

полимеразе дельта. Конечный преципитат, представляющий собой комплекс PCNA с ДНК-полимеразой дельта, был проанализирован с помощью SDS-PAGE и последующего иммуноокрашивания антителами анти-CAF-1, анти-ДНК-полимераза дельта, и анти-PCNA, PC10. Полученные результаты говорят, что PCNA – ДНК-полимеразный комплекс содержит также и CAF-1, подтверждая то, что ДНК-полимераза дельта и CAF-1 могут одновременно взаимодействовать с PCNA. Чтобы усилить доказательства наличия такого взаимодействия, было проанализировано связывание нормального и мутантного PCNA. Комплексы CAF-1 были осаждены с помощью моноклональных антител к p150-субъединице CAF-1 и с использованием клеток, трансфецированных нормальным или мутантным (R5A/K110A) вектором. Затем эти комплексы были проанализированы Вестерн-блотом, используя антитела против ДНК-полимеразы дельта, CAF-1 или PCNA. Как ожидалось, субъединица CAF-1, p150, присутствует в общем клеточном экстракте и иммунопреципитате, полученном из клеток, трансфецированных нормальным или мутантным по PCNA вектором. Существенно то, что комплекс CAF-1, иммуноосажденный из клеток, трансфецированных нормальным PCNA, также содержит ДНК-полимеразу дельта. И наоборот, комплекс CAF-1, иммуноосажденный из клеток,

трансфецированных R5A/K110A мутантным вектором, не содержит ДНК-полимеразу дельта, хотя и нормальный PCNA и R5A/K110A мутант, очевидно, имеют одинаковое сродство к CAF-1 (Naryzhny and Lee 2004). Таким образом, следует, что тример PCNA может связываться с ДНК-полимеразой дельта или с CAF-1, но не с обоими одновременно. Так как нормальный PCNA может образовывать комплекс “спина к спине” из двух тримеров, он одновременно может связаться с ДНК-полимеразой дельта и CAF-1. Однако мутант R5A/K110A, по-видимому, такого комплекса образовать не может и, соответственно, не может одновременно связать ДНК-полимеразу дельта и CAF-1. Этот набор данных вместе с данными, приведенными на Рис.41С подтверждает, что нормальный PCNA, но не мутант R5A/K110A, образует двойной тример PCNA. Важно заметить, что хотя тример PCNA содержит 3 идентичных сайта для PCNA-связывающихся белков, взаимодействие каждого конкретного белка (комплекса) происходит на конкурентной основе за счет других взаимодействующих с PCNA белков. По-видимому, это происходит потому, что один белок (комплекс) при взаимодействии оккупирует большую часть передней поверхности тримера PCNA, как например, хорошо видно в случае с ДНК-лигазой 1 (Pascal, O'Brien et al. 2004). ДНК-полимераза дельта и CAF-1 образуют достаточно большие комплексы и состоят из, соответственно, четырех (p125, p60, p50, и p12) и трех субъединиц (p150, p60, и p48). Таким образом, следует вывод, что один тример PCNA не может физически взаимодействовать одновременно и с ДНК-полимеразой дельта и с CAF-1.

#### **Функциональная модель PCNA млекопитающих.**

Формальдегид является гомобифункциональным сшивающим аминами агентом, требующим, чтобы расстояние между сшиваемыми аминокислотами было не больше, чем 2Å. Поэтому для того, чтобы обеспечить тесный контакт Arg-5 одного тримера с Lys-110 другого, петля  $\beta D_2\beta E_2$  должна найти углубление на другом тримере PCNA. Таким образом, достаточно близкий контакт между Arg-5 и Lys-110 должен достигаться через замыкание двух тримеров PCNA посредством петель и ложбин. В согласии с этой идеей топологический анализ с использованием программы Нех 4.2 показал, что стыковка двух тримеров может произойти если два тримера, расположенных симметрично напротив друг друга, немного повернуть так, что петля  $\beta D_2\beta E_2$  (Рис.14В, L) одного тримера попадает в ложбину другого тримера, образованную вокруг  $\beta A_1$  (аминокислоты 9–20, GSILKKVLEALK),  $\beta B_2$  (аминокислоты 209–211, LRYLNFFTKATPL),  $\beta H_2$  (аминокислоты 235–241, LVVEYKI), и  $\beta I_2$  (254GHLKYYL). (Рис. 14В, \*). При этом Arg-5 одного тримера и Lys-110 другого тримера оказываются достаточно близко друг к другу для того, чтобы быть сшитыми формальдегидом. В свое время Хендерсон и соавторы, изучая PCNA в модельной системе *Drosophila melanogaster*, предположили, что результаты их генетических экспериментов могут

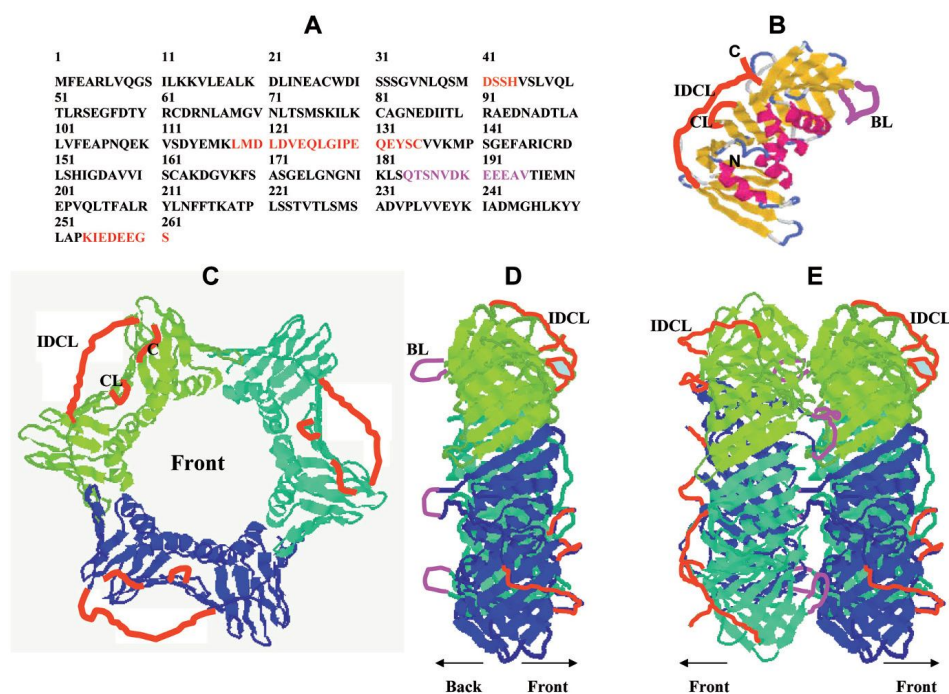


**Рисунок 14. Близкий контакт между Arg-5 (R5) и Lys-110 (K110) обеспечивается через замок петли BD2BE2 одного тримера в канавке, образованной βA1, βB2, βH2, и βI2 другого тримера. (А)** Вид спереди и сзади тримеров PCNA был получен с помощью программ RasMol и Swiss-PDB Viewer, и файла 1AXC.pdb из банка белковых структур PDB (Protein Data Bank). Затем тримеры PCNA были показаны в положении “спина к спине”, используя PhotoEditor и PowerPoint, чтобы показать точки контакта сбоку (**нижняя часть А**). Для простоты показаны только две из 6 контактных точек. **(В)** Контактное положение показано с использованием slab mode программы RasMol Version 2.7.2.1. *L* и *\** являются, соответственно, петлей BD2BE2 и канавкой вокруг βA1, βB2, βH2, и βI2 (Krishna, Kong et al. 1994).

быть объяснены, если предположить, что два тримера PCNA образуют комплекс “спина-к-спине” (Henderson, Wiegand et al. 2000). Наши данные, основанные на химических сшивках и мутагенезе, подтвердили, что PCNA в клетках млекопитающих находится в виде двойного тримера, и аминокислоты Arg5 и Lys110 играют ключевую роль в его формировании и детектировании. Более того, модель структуры двойного тримера PCNA “спина к спине” дает основание предполагать, что многие клеточные функции, такие как эпигенетический контроль, ДНК-метилирование и ДНК-репарация тесно связаны с репликацией ДНК через дуплетный комплекс PCNA. Практически все молекулы PCNA в клетке млекопитающих могут быть химически сшиты формальдегидом и обнаружены в виде двойного тримера (Рис.12, Рис.15).

## ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ PCNA

Был проведен систематизированный анализ взаимодействующих с PCNA белков на основании поиска в базах данных и в журнальных публикациях. С одной стороны такая систематизация дала возможность оценить масштаб взаимодействий PCNA, а с другой стороны – подняла ряд вопросов. Один из них касается полифункциональности белков вообще, и PCNA в



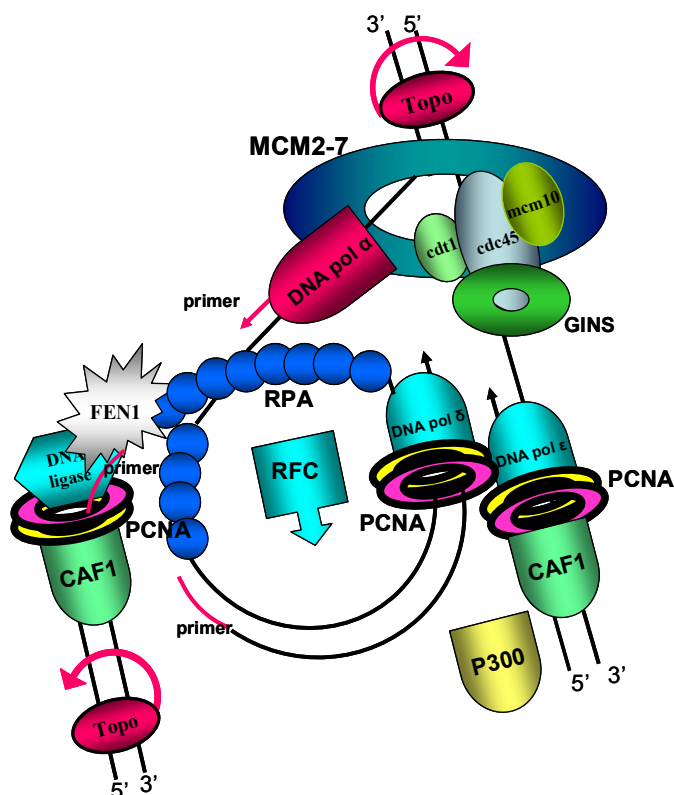
**Рисунок 15. Разные уровни организации PCNA.** (A) Аминокислотная последовательность PCNA человека. Петля, соединяющая внутренние домены, IDCL (118LMDLDVEQLGIPEQEYSC135), центральная петля, CL (41DSSH44), С-конец, С (254KIEDEEGS261) показаны красным цветом; петля обратной стороны, BL (184QTSNVDKKEEEAV195) - показана розовым цветом. (B) Трехмерная структурная модель мономера PCNA (показана цепь E из файла 1AXC, <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>). IDCL, CL, C - показаны красным; BL - розовым. Спиральные области - розовые и бета структуры - желтые. (C) Организация тримера PCNA (1XC) показана спереди. (D) Вид сбоку. (E) Модель двойного тримера PCNA. IDCL, CL, C - показаны красным; BL - розовым.

частности. Поэтому распределение связывающихся с PCNA белков по функциям, в которых они принимают участие, дает возможность оценить и возможную роль PCNA в этих процессах.

### Репликация ДНК.

Репликация ДНК является первым процессом, где было показано участие PCNA. Если изначально это участие связывали только с ролью “белка-скрепки”, помогающего работе полимераз, то сейчас PCNA рассматривается как некая платформа, на которой разворачиваются многие события, происходящие при репликации ДНК. При этом организация в виде двойного кольца идеально подходит для такой функции. Две симметричные площадки для белкового взаимодействия, направленные в противоположные стороны на реплицирующейся ДНК, позволяют PCNA, например, одновременно связываться с несколькими ферментами, обеспечивающими процессинг на запаздывающей нити ДНК (Рис.16). Кроме того, такая структура PCNA позволяет ему участвовать в синтезе ДНК и других процессах, таких как сборка хроматина или метилирование ДНК (Рис.16).





**Рисунок 16. Схематическое изображение координации работы белков при репликации ДНК млекопитающих.** Для упрощения показана репликативная вилка, образуемая при расплетании двунитевой нити ДНК хеликазным комплексом MCM2-7 – Cdc45 – GINS с помощью топоизомеразы. В реальности реплицируется хроматин (нуклеопротеид). ДНК-полимеразы дельта и эпсилон закреплены на ДНК с помощью PCNA и ведут синтез, соответственно, на запаздывающей и лидирующей нитях ДНК. На запаздывающей нити также работают ДНК-полимераза альфа/праймаза и факторы, вовлеченные в созревание фрагментов Оказаки. Показаны и другие факторы, вовлеченные в инициацию репликации (RPA, cdt1, mcm10) и сборку хроматина (CAF1, P300). RFC производит загрузку и разгрузку PCNA на ДНК, связываясь с PCNA в положении, которое на рисунке занимают ДНК-полимеразы.

### Репарация ДНК.

Репарация, также как и репликация ДНК, в конечном итоге в большой степени зависит от синтеза ДНК. Поэтому достаточная гибкость репликативного аппарата вполне естественна, и участие многих ферментов репликации ДНК в репарации ДНК объяснимо. А присутствие их в списке белков, взаимодействующих с PCNA, еще раз указывает на то, что PCNA является белком, координирующим эти процессы. Но помимо таких ферментов имеется еще и длинный список белков с чисто репаративными функциями, которые взаимодействуют с PCNA. Причем интересно то, что как следует из анализа полученных списков, координация возможна как на уровне переключения с репликации на репарацию одного фермента (например, ДНК-полимеразы дельта),

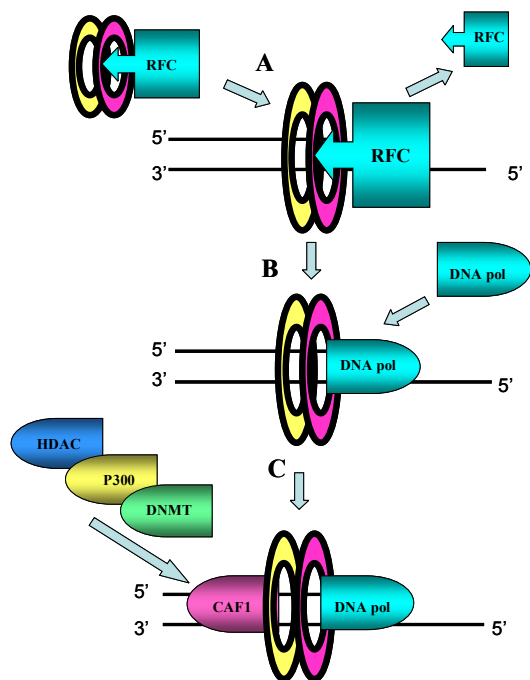
так и на уровне смены репликативного белка на репаративный белок. Так, например, происходит в случае большой группы полимераз, функционирующих только при наличии повреждений в ДНК. Это так называемые ошибочные (TLS) полимеразы (ДНК-полимераза эта, иота, каппа, лямбда), способные вести синтез в обход повреждений (Hubscher, Maga et al. 2002). Все они взаимодействуют с PCNA. Причем в данном случае с помощью убиквитинирования PCNA работает как переключатель ДНК-полимераз.

### **Контроль клеточного цикла, выживаемость.**

Как белок, количество которого изменяется в течение клеточного цикла, PCNA, возможно, участвует в его контроле через взаимодействие с циклинами, циклин-зависимыми киназами и их ингибиторами. Так как эти белки сами осциллируют по циклу, то, по-видимому, самый непосредственный путь связан с образованием мультимерных комплексов типа PCNA – Cdk – циклин D – p21 (Xiong, Zhang et al. 1993). Функции этих комплексов, возможно, могут быть как позитивными, так и негативными и заключаются в целенаправленном активировании циклин-зависимых киназ. Мишенью таких киназ могут служить самые разнообразные ключевые белки клеточного цикла, например RFC, DNA-лигаза или FEN-1. Детальные последствия этого фосфорилирования еще до конца не понятны. Возможно, что далее могут быть задействованы другие реакции, например протеолиз. Интересно то, что в случае Cdt1 его специфический протеасомный гидролиз может обеспечиваться непосредственно за счет взаимодействия PCNA с Cdt1. Как это происходит, неизвестно, показано только, что при этом идет убиквитинирование по N-концу, и в процессе участвуют белки Cul4 и Ddb1, компоненты убиквитинин-лигазы E3 (Senga, Sivaprasad et al. 2006). Возможно, по такому же принципу PCNA участвует в контроле клеточного цикла и выживаемости на уровне транскрипции, где регуляция идет под контролем p53 (Saifudeen, Marks et al. 2002). В этом случае негативным регулятором p53 выступает другая убиквитинин-лигаза, Mdm2. То есть во всех этих случаях PCNA выступает как своего рода “регулирующий”, обеспечивая необходимую акцию в нужное время и в нужном месте.

### **Сборка хроматина, эпигенетика и когезия хроматид.**

Здесь роль PCNA в первую очередь касается белок-белкового взаимодействия, в частности возможности PCNA одновременно взаимодействовать с несколькими белками и ориентации этого взаимодействия на репликативной вилке. Механизм этого взаимодействия весьма логично вписывается в модель координации синтеза ДНК и сборки хроматина, основанную на структуре PCNA в виде двойного кольца (Рис.17). Следовательно, ремоделирование, сборка хроматина и эпигенетические модификации могут происходить непосредственно в процессе репликации ДНК.



**Рисунок 17. Координирующая модель работы PCNA.** Двойной тример PCNA необходим для координации репликации ДНК и других клеточных функций (например, эпигенетика). (А) Двойной тример PCNA загружается на ДНК с помощью RFC. (В) RFC отделяется от хроматина/PCNA, а ДНК-полимераза (дельта или эpsilon) присоединяется к комплексу PCNA со стороны направления полимеразной реакции. (С) CAF-1, HDAC 1, P300 или DNMT1 могут взаимодействовать с другой лицевой стороной комплекса двойного тримера PCNA.

### **Транскрипция и другие разнообразные функции.**

На сегодняшний день все, что-нибудь более или менее касается участия PCNA в транскрипции, связано с регуляцией им факторов транскрипции, таких как p300 или p53. Причем здесь пока можно говорить только о негативной регуляции, как в случае с p53. Хотя, казалось бы, PCNA мог бы и непосредственно принимать участие в работе транскрипционного аппарата и регулировать экспрессию генов, как это делает “скользящая скрепка” gp45 бактериофага T4 (Herendeen, Kassavetis et al. 1992; Brody, Kassavetis et al. 1995). Тем более что взаимодействие PCNA с РНК-полимеразой III, во всяком случае, у дрожжей, было показано (Ho, Gruhler et al. 2002). К сожалению этот крайне интересный аспект координации репликативного и транскрипционного аппаратов прояснен крайне слабо. Причем из-за того, что для работы и того и другого белкового комплекса необходимо раскрытие хроматиновой структуры, процесс мог бы быть обоюдовыгодным – или транскрипция инициирует репликацию ДНК (MacAlpine, Rodriguez et al. 2004), или репликация ДНК индуцирует транскрипцию (Humphery-Smith 1999). При этом PCNA мог бы играть роль переключателя данных процессов.

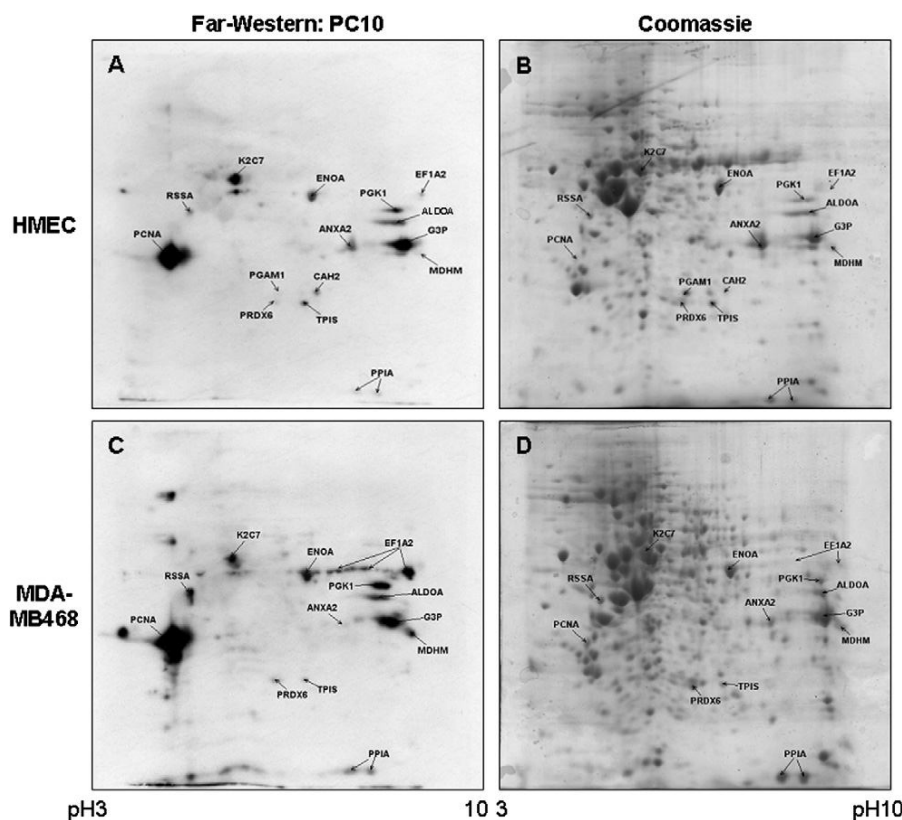
Удивительно то, что имеется большой список связывающихся с PCNA белков, которые вовлечены в клеточные функции, где роль PCNA пока еще трудно объяснить (Naryzhny 2008). В случае с мембранными и цитоскелетными белками возникает искушение предположить, что взаимодействие PCNA с ними связано с транспортом. PCNA не содержит сигналов ядерной локализации, является очень кислым белком, что не характерно для ядерных белков, но локализуется обычно в ядре. По-видимому, другие механизмы, не регулируемые по классической

схеме импортином альфа и импортином бета, отвечают за импорт PCNA в ядро. Взаимодействие PCNA с факторами трансляции (EF1A, E1F1B) или ферментами метаболизма указывает как на возможность дополнительных функций этих белков, так и на участие PCNA в метаболических процессах. Например, EF1A помимо того, что является основным фактором трансляции, возможно, является также компонентом убиквитин-зависимой системы протеолиза (Gonen, Smith et al. 1994), которая вовлечена в систему баланса между моно- и полиубиквитинированной формами PCNA (Toueille, Saint-Jean et al. 2007). PCNA регулируется через убиквитинирование и SUMO-илирование, и он сам также может управлять убиквитинированием и протеолизом других белков, таких, например, как Cdt1 (Arias and Walter 2006). Способность PCNA взаимодействовать с такими протеолитическими ферментами, как куллин-2 (CUL2\_HUMAN), фактор 6, ассоциированный с TNF (TRAF6\_HUMAN), или убиквитин-протеин-лигаза Mdm2 (Banks, Wu et al. 2006), дополняет картину участия PCNA в протеолизе других белков.

#### **Взаимодействующие с PCNA белки, обнаруженные Фар-Вестерном.**

Подход с использованием Фар-Вестерна в комбинации с 2DE выявил многочисленные пятна, представляющие белки в нормальных и раковых клетках, которые взаимодействуют с PCNA (Рис.18). Чтобы идентифицировать эти белки, каждый образец был подвергнут 2DE в дубликатах. Затем один гель был окрашен Кумасси, а другой переведен на PVDF мембрану и обработан в соответствии с протоколом Фар-Вестерна. Совмещая пленку и окрашенную мембрану, пятна, соответствующие сигналам на Фар-Вестерне были выявлены в геле, и самые мажорные из них были идентифицированы с помощью белковой дактилоскопии. Удалось идентифицировать более 16 взаимодействующих с PCNA белков, причем уровень экспрессии многих из них отличается в нормальных и раковых клетках, и они являются известными или потенциальными онкомаркерами (Табл.1). Наиболее сильно уровень экспрессии в раковых клетках по сравнению с нормальными клетками увеличен у EF1A2, чуть менее у пептидил-пролил-цис-транс-изомеразы А, митохондриальной малат-дегидрогеназы и пероксиредоксина-6. Особенно интересно то, что шесть белков в списке взаимодействующих с PCNA белков, обнаруженных Фар-Вестерном, являются гликолитическими ферментами (Табл.1). Естественным образом сразу возникает предположение об участии PCNA в гликолизе. Для получения дополнительной информации, подтверждающей это предположение, были проведены следующие эксперименты. Сначала взаимодействие ферментов гликолиза с PCNA было подтверждено с использованием чистых белков и опять же Фар-Вестерна, но в комбинации с одномерным электрофорезом. Шесть из 10 ферментов, участвующих в гликолизе, фруктозо-бифосфат альдолаза А, триозофосфатизомераза, глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназа, фосфоглицерат

киназа 1, фосфоглицерат мутаза 1, альфа-энолаза подтвердили свое взаимодействие с PCNA. Интересно то, что эти ферменты отвечают за шесть последовательных стадий гликолиза. В дополнение, взаимодействие некоторых из них с PCNA было подтверждено в экспериментах с использованием иммуноосаждения и гель фильтрации. Следует отметить, что в свое время было предложено множество гипотез и схем, объясняющих пространственную и временную организацию реакций гликолиза, который в большинстве клеток проходит в цитоплазме. Много усилий было потрачено также на обнаружение и выделение гликолизного комплекса. Однако



**Рисунок 18. PCNA-связывающие белки, обнаруженные Фар-Вестерном в нормальных, HMEC, (A, B) и раковых, MDA-MB468, (C, D) клетках. (A) Клетки лизировали в буфере для образца, белки разделяли в 2DE, переводили на мембрану, ренатурировали, инкубировали с PCNA, и PCNA-связывающие белки детектировали антителами к PCNA, PC-10 (A, C). Белки, разделенные в 2DE, окрашивали Кумасси R350 (B, D).**

убедительных доказательств его существования все еще не представлено. Трудность состоит в большом числе компонентов и их слабого взаимодействия друг с другом. Вполне возможно, что и PCNA также мог бы принимать участие в гликолизе за счет одновременного взаимодействия с разными белками-ферментами, обеспечивая эффективный переход продукт-субстрат. Структурная организация PCNA очень хорошо подходит для этой роли. Он может одновременно разместить на себе разные белки-партнеры и, возможно, играть роль координирующей станции не только для репликации ДНК, репарации ДНК и сборки хроматина, но и для ферментов гликолиза

### Локализация PCNA.

Процессы гликолиза идут в цитоплазме и, соответственно, гликолитические ферменты локализованы в основном в цитоплазме. С другой стороны, PCNA, как даже следует из его

| №  | Название                                                                                                | Функция                                     | Экспрессия при раке |
|----|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------|---------------------|
| 1  | ALDOA_HUMAN (Fructose-bisphosphate aldolase A) <i>Альдоласа</i>                                         | гликолиз, стадия #4                         | Не меняется         |
| 2  | TPIS_HUMAN (Triosephosphate isomerase) <i>Триозофосфатизомераза</i>                                     | гликолиз, стадия #5                         | Не меняется         |
| 3  | G3P_HUMAN (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) <i>Глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназа</i>       | гликолиз, стадия #6                         | Не меняется         |
| 4  | PGK1_HUMAN (Phosphoglycerate kinase 1) <i>Фосфоглицерат киназа 1</i>                                    | гликолиз, стадия #7                         | Не меняется         |
| 5  | PGAM1_HUMAN (Phosphoglycerate mutase 1) <i>Фосфоглицерат мутаза 1</i>                                   | гликолиз, стадия #8                         | Не меняется         |
| 6  | ENOA_HUMAN (Alpha-enolase A) <i>Альфа эноласа А</i>                                                     | гликолиз, стадия #9                         | Не меняется         |
| 7  | LDHA_HUMAN (L-lactate dehydrogenase A chain) <i>Лактат дегидрогеназа</i>                                | гликолиз, стадия #11                        | Не меняется         |
| 8  | MDHM_HUMAN (Malate dehydrogenase, mitochondrial precursor) <i>Малат дегидрогеназа</i>                   | Метаболизм                                  | Не меняется         |
| 9  | EF1A2_HUMAN (Elongation factor 1-alpha 2) <i>Фактор элонгации 1 альфа 2</i>                             | Биосинтез белка, миграция клеток            | Повышенная          |
| 10 | PPIA_HUMAN (Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A) <i>Пептидил-пролил цис транс изомераза А</i>         | Структура белка                             | Повышенная          |
| 11 | PRDX6_HUMAN (Peroxiredoxin-6) <i>Пероксиредоксин 6</i>                                                  | Окислительно-восстановительные реакции      | Повышенная          |
| 12 | CAH2_HUMAN (Carbonic anhydrase 2) <i>Карбоновая ангидраза 2</i>                                         | метаболизм                                  | Не меняется         |
| 13 | RSSA_HUMAN (40S ribosomal protein SA) <i>Белок SA из 40S рибосом</i>                                    | Синтез белка, передача сигналов             | Не меняется         |
| 14 | K2C7_HUMAN (Keratin, type II cytoskeletal 7) <i>Кератин из цитоскелета -7, тип 2</i>                    | Цитоскелет, клеточный рост, дифференцировка | Пониженная          |
| 15 | HNRH1_HUMAN (Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H) <i>Гетерогенный ядерный рибонуклеопротеин H</i> | Сплайсинг и процессинг мРНК                 | Не меняется         |
| 16 | ANXA2_HUMAN (Annexin A2) <i>Аннексин А2</i>                                                             | Физиология мембран                          | Пониженная          |

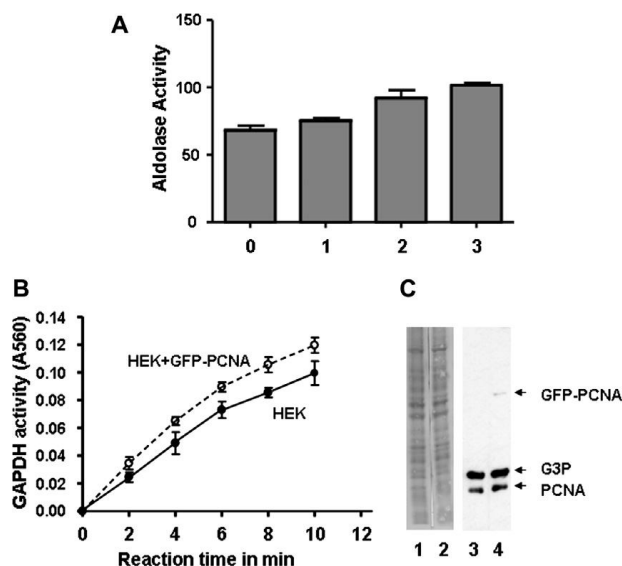
Таблица 1. PCNA-связывающиеся белки, обнаруженные Фар-Вестерном.

названия, считается ядерным белком, и если имеется функциональный вклад PCNA в гликолиз, то, по-видимому, это должно происходить в цитоплазме. Чтобы прояснить данную ситуацию, аспект локализации PCNA был проанализирован более детально, в разных клетках и при различных условиях. Оказалось, что хотя PCNA и является в основном ядерным белком, значительная часть его все-таки может присутствовать и в цитоплазме. Используя вектор,

кодирующий GFP-PCNA, можно получить клеточные линии, стабильно экспрессирующие GFP-PCNA. Что любопытно, локализация GFP-PCNA в этих линиях может быть очень разной, и в основном ядерной, и в основном цитоплазматической. Более того, распределение GFP-PCNA и ферментов гликолиза может быть очень похожим ([Naryzhny and Lee 2010](#)). Таким образом, следует отметить, что цитоплазматическая часть популяции PCNA может быть очень значительной. Однако, по-видимому, из-за того, что роль PCNA в процессах, происходящих в хроматине хорошо известна и интенсивно изучается, цитоплазматический PCNA до сего времени рассматривался в лучшем случае как артефакт, несмотря на то, что имеется много публикаций касающихся цитоплазматической локализации PCNA.

### Активность ферментов гликолиза и PCNA.

Чтобы изучить возможный вклад взаимодействия PCNA с гликолитическими ферментами, активность некоторых из них была протестирована *in vitro*. Например, была измерена активность



**Рисунок 19. Реакции гликолиза могут стимулироваться PCNA *in vitro*.** (A) Присутствие PCNA в системе ферментов, содержащих альдозазу (ALDOA), триозофосфатизомеразу (TPIS) и глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназу (G3P), представляющих стадии №4, №5, №6 гликолиза, заметно увеличивает скорость реакции. Альдозазную реакцию проводили после преинкубации (10 мин, 4°C) компонентов реакции с разными количествами PCNA (0 – нет PCNA, 1 – 2.5 мкг/мл, 2 – 5 мкг/мл, 3 – 10 мкг/мл). Использовали калориметрический набор от Caldon Biotech, Inc (Carsbad, CA, USA), содержащий TPIS, G3P, NADH и альдозазу (1мкг/мл) (B) Активерсть G3P, в экстрактах HEK клеток и в экстрактах HEK клеток, стабильно экспрессирующих GFP-PCNA. Активность G3P определяли по поглощению при 560 нм, используя набор реагентов KAlert kit и следуя инструкциям производителя (Ambion Inc, Austin, TX, USA). (C) Следует отметить, что уровень G3P в таких клетках одинаков, зато общее содержание PCNA за счет экспрессии GFP-PCNA повышено в ~1.5 раза (дорожки 3, 4 – PCNA и GFP-PCNA). На дорожки 1, 3 наносили экстракт клеток HEK 293, а на дорожки 2, 4 – экстракт клеток HEK 293, экспрессирующих GFP-PCNA. (1, 2) Окрашивание Кумасси R350. (3, 4) Иммуноокрашивание антителами к G3P, а затем антителами к PCNA (PC10).

альдолазы, используя ферментативный набор, содержащий триозофосфатизомеразу и G3P. Оказалось, что присутствие PCNA стимулирует эту активность (Рис.19). В данном случае мы имеем подражание ситуации с гликолизом *in vivo*, где вышеуказанные ферменты последовательно катализируют стадии гликолиза №4, №5, №6. А экстракт клеток, стабильно экспрессирующих цитоплазматический GFP-PCNA, показывает более высокую активность G3P по сравнению с таким же экстрактом, полученным из контрольных клеток (Рис.19). В связи с тем, что кроме ферментов гликолиза имеется еще много других, взаимодействующих с PCNA, белков, которые в основном локализованы в цитоплазме, проявляется функциональная значимость присутствия PCNA в цитоплазме. Эти функции могут быть связаны с передачей внутриклеточных сигналов и цитоскелетом через взаимодействие с такими белками, как аннексин A2, сарколектин, EF1A2, PPIA или рибосомальный белок SA. Другая область – метаболические пути и взаимодействие с такими белками, как малат дегидрогеназа, пероксиредоксин 6, карбоновая ангидраза 2, альдолаза А, триозофосфатизомеразы, G3P, фосфоглицерат киназа 1, фосфоглицерат мутаза 1 и альфа-энолаза. Большая часть этих метаболических ферментов представляет гликолиз и, соответственно, логично предположить об участии PCNA в этом процессе. Если в случае репликации хроматина роль PCNA состоит в координации различных процессов, происходящих в одном месте (на репликативной вилке ДНК), в частности, синтеза ДНК и сборки хроматина (Рис.17), то в случае гликолиза координирующая роль PCNA может заключаться в обеспечении более эффективного прохождения последовательного каскада реакций. При этом за счет локализации ферментов этого каскада на PCNA, продукт одной реакции может немедленно использоваться как субстрат в следующей.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Роль PCNA в клетке определяется способностью этого белка связываться с другими макромолекулами и координировать их функции. Эта координация обеспечивается за счет структуры PCNA в виде симметричного двойного кольца. Такое кольцо нанизывается на ДНК и обеспечивает связывание с белками, действующими в реакциях, направленных в противоположных направлениях цепи ДНК. Будучи связанным с ДНК и являясь движущейся платформой для ДНК-полимераз и других белков PCNA является своего рода “мастером-координатором” процессов, происходящих в хроматине. Во время репликации ДНК, в S-фазе клеточного цикла, координация затрагивает в первую очередь синтез ДНК, который ведется разными полимеразми. Большинство из этих полимераз имеет свою узкую специализацию и приступает к своим функциям за счет взаимодействия с PCNA. То есть, в данном случае PCNA действует как переключатель, меняющий одного партнера на другого. Причем механизм такого



переключения связан с модификациями PCNA, в первую очередь с убиквитинированием. Помимо этого PCNA также может действовать как адаптер или координатор, взаимодействуя с несколькими белками одновременно, а не по очереди. В таком режиме PCNA, находясь в хроматине, обеспечивает взаимодействия между процессами репарации/репликации ДНК и другими клеточными функциями, такими, как сборка хроматина и эпигенетические модификации. PCNA может также служить платформой для различных белков, не взаимодействуя с ДНК. В таком случае возникает вопрос о том, как это связано с локализацией PCNA внутри клетки. Взаимодействует ли PCNA со специальными структурами типа ядерного матрикса, или же свободно распределен в нуклеоплазме или цитоплазме? По-видимому, возможны все эти ситуации. Но если в ядре такие перемещения PCNA между нуклеоплазмой, ядерным матриксом и хроматином логично вписываются в картину регуляции процессов, связанных с генетическим и эпигенетическим материалом клетки, то в цитоплазме не все так очевидно. Однако обнаруженная связь PCNA с гликолизом в совокупности с тем, что повышенный уровень экспрессии PCNA и активация гликолиза являются характерными чертами раковых клеток, открывает для нас новые аспекты внутриклеточных белковых взаимодействий в нормальных и патологических ситуациях.

Среди возможных функциональных модификаций PCNA пока наиболее достоверно подтверждено убиквитинирование и ацетилирование. Высокочувствительный анализ с использованием изотопной метки показал отсутствие фосфорилирования PCNA *in vivo*. Полиубиквитинирование PCNA по любому лизину или же N-концу необходимо для его протеасомной деградации. Имеется ряд доказательств об ацетилировании PCNA и его участии в репликации ДНК и в стабилизации комплексов PCNA с другими белками.

Четвертичная структура PCNA имеет вид двойного кольца, в котором кольца (тримеры) взаимодействуют друг с другом своими обратными сторонами, а лицевые стороны остаются открытыми для взаимодействия с другими белками. Двойной тример PCNA с симметричной структурой является двухсторонней платформой, которая может скользить по ДНК и взаимодействовать одновременно с разными белками, координируя процессы, происходящие на ДНК. Кроме того, показано взаимодействие PCNA с множеством белков, часть из которых участвует в процессах, происходящих за пределами хроматина и даже за пределами ядра, в цитоплазме. Показано, что многие из этих белков связаны с канцерогенезом, а уровень самого PCNA значительно повышен в опухолевых клетках. Чрезвычайно важный вопрос состоит в том, как регулируется взаимодействие отдельных белков с PCNA в определенное время и в определенном месте. Основным механизмом этой регуляции, по-видимому, являются посттрансляционные модификации PCNA и других белков. Таким образом, выявление

сигнальных механизмов, ведущих к модификациям и ассоциации/диссоциации белковых комплексов с PCNA необходимо для раскрытия полной картины PCNA-зависимых процессов. Изучение этих процессов затруднено из-за высокой динамики ассоциации и диссоциации PCNA с другими белками. Однако выяснение механизмов этого динамического взаимодействия является чрезвычайно важным для объяснения регуляции разнообразных клеточных функций.

## ВЫВОДЫ

1) Показана многоплановая роль PCNA, как одного из ключевых белков интерактомики. Имеется несколько модулей, таких как репликация хроматина и репарация ДНК, где PCNA достоверно является координирующим хабом. Интригующим выглядит участие PCNA в канцерогенезе и гликолизе.

2) Впервые показано существование многочисленных изоформ PCNA, которые представлены на 2DE в виде набора пятен различной интенсивности (нанопротеома). Основная (мажорная) форма PCNA млекопитающих располагается на 2DE-карте в точке, соответствующей теоретическим физико-химическим параметрам PCNA, и не модифицирована, а наличие множества минорных, модифицированных, форм PCNA указывает на то, что модификации PCNA являются очень динамичными и короткоживущими образованиями, и/или очень малая часть PCNA вовлечена в процессы, где необходимы данные модификации PCNA

3) Определены некоторые модификации PCNA и их функциональная роль. Достоверно подтверждено убиквитинирование и ацетилирование PCNA. Показано отсутствие фосфорилирования PCNA *in vivo*. Ацетилирование PCNA связано с репликацией ДНК и стабилизацией комплексов PCNA с другими белками, а неспецифическое убиквитинирование связано с метаболизмом (утилизацией) PCNA.

4) Проанализирован аспект, касающийся PCNA, как онкогена и маркера пролиферации. Показано, что в раковых клетках значительно повышен общий уровень PCNA без появления каких-либо его дополнительных изоформ этого белка. Причем это повышение связано не с усилением пролиферации, а с иными причинами, скорее всего метаболизмом, в частности – с активизацией гликолиза.

5) Показано взаимодействие PCNA с множеством белков, часть из которых участвует в процессах, происходящих за пределами хроматина и ядра, в цитоплазме. Среди этих белков большую группу составляют ферменты гликолиза. Кроме того, многие из этих белков связаны с канцерогенезом.

6) Показано присутствие PCNA не только в ядре, но и в цитоплазме, причем это присутствие может быть весьма существенным. Получены данные, указывающие на то, что PCNA играет стимулирующую роль в гликолизе.

7) Показано, что полная четвертичная структура PCNA имеет вид двойного кольца, в котором кольца (тримеры) взаимодействуют обратными сторонами. Таким образом, лицевые стороны остаются открытыми для взаимодействия с другими белками. Такая структура PCNA очень динамична и может быть нарушена под воздействием различных факторов, используемых при выделении этого белка.

8) Предложена структурная модель, в которой PCNA играет роль хаб-белка с широкими функциями.

### **СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ**

1. Naryzhny S. N., Lee H. Proliferating cell nuclear antigen in the cytoplasm interacts with components of glycolysis and cancer // *FEBS Lett.* 2010. V.584. No.20. P.4292-8.
2. Richard C., Lanner C., Naryzhny S.N., Sherman L., Lee H., Lambert P., Zehbe I. The immortalizing and transforming ability of two common human papillomavirus 16 E6 variants with different prevalences in cervical cancer // *Oncogene.* 2010. V.29. P.3435-3445.
3. Naryzhny S. N. Blue Dry Western: simple, economic, informative, and fast way of immunodetection // *Anal. Biochem.* 2009. V.392. No.1. P.90-5.
4. Naryzhny S. N. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): a proteomics view (review) // *Cell. Mol. Life Sci.* 2008. V.65. No.23. P.3789-808.
5. Naryzhny S. N., Lee H. Characterization of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) isoforms in normal and cancer cells: There is no cancer-associated form of PCNA // *FEBS Lett.* 2007. V.581. No.25. P.4917-20.
6. Naryzhny S. N., DeSouza L.V., Siu K.W.M., Lee H. Characterization of the human proliferating nuclear antigen physico-chemical properties: aspects of double trimer stability // *Biochemistry and Cell Biology.* 2006. V.84. No.5. P.669-676.
7. Lee H, Naryzhny S. N. Coordination of multiple cellular functions by PCNA: Implication of the PCNA double trimer model // *Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): Research Signpost, Kerala, India,* 2006. P.163-180.
8. Naryzhny S. N., Zhao H., Lee H. Human proliferating cell nuclear antigen (PCNA) may function as a double- homotrimer complex in the mammalian cell // *J. Biol. Chem.* 2005. V.280. No.14. P. 13888-13894.
9. Naryzhny S. N., Lee H. The post-translational modifications of proliferating cell nuclear antigen (PCNA): acetylation, not phosphorylation, plays an important role in the regulation of its function // *J. Biol. Chem.* 2004. V.279. No.19. P.20194-20199.
10. Naryzhny S. N., Lee H. Observation of multiple isoforms and specific proteolysis patterns of PCNA in the context of cell-cycle compartments and sample preparations // *Proteomics.* 2003. V.3. P.930-936.
11. Naryzhny S. N., Lee H. Protein profiles of the Chinese hamster ovary cells in the resting and proliferating stages // *Electrophoresis.* 2001. V.22. P.1764-1775.
12. Naryzhny S.N., Levina V.V., Varfolomeeva E.Y., Drobchenko E.A., Filatov M.V. Active dissociation of the fluorescent dye Hoechst 33342 from DNA in a living cell: Who could do it? // *Electrophoresis.* 1999. V.20. P.1033-1038.
13. Naryzhny S.N. "Active" two-dimensional electrophoresis of rat liver DNA-polymerase alpha // *Electrophoresis.* 1997. V.18. P.553-556.

14. Нарыжный С.Н. Выделение каталитически активной субъединицы протеинкиназы из комплексной формы ДНК-полимеразы альфа печени крысы методом электрофракционирования в денатурирующих условиях // Мол.Биол. 1996. Т.30. № 6(2). С.1403-1408.
- 14a. Naryzhny S.N. Purification of protein kinase catalytic subunit from the complex form of rat liver DNA polymerase alpha by denaturing electrofractionation // Mol. Biol. 1996. V.30. No.6(2). P.845-849.
15. Naryzhny S.N. Upside-down stopped flow electrofractionation of complex protein mixtures // Anal. Biochem. 1996. V.238. P.50-53.
16. Шевелев И.В., Нарыжный С.Н., Крутяков В.М. Выделение протеинфосфокиназы из комплексной формы ДНК-полимеразы альфа печени крысы // Мол.Биол. 1993. Т.27. №3. С.531-537.
- 16a. Shevelev I.V., Naryzhny S.N., Krutyakov V.M. Isolation of a proteinphosphokinase from the complex form of rat liver DNA polymerase alpha // Mol. Biol. 1993. V.27. No.3. P.531-537.
17. Нарыжный С.Н. Обнаружение ДНК-связывающих белков в полиакриламидном геле после денатурирующего электрофореза // Мол.Биол. 1992. Т.26. №2. С.307-314.
- 17a. Naryzhny S.N. Detection of DNA-binding proteins in SDS-polyacrylamide gel electrophoresis // Mol.Biol. 1992. V.26. No.2. P.307-314.
18. Нарыжный С.Н., Крутяков В.М. Анализ белков нормальной и регенерирующей печени крысы методом двумерного электрофореза // Биохимия. 1989. Т.54. №12. С.2030-2036.
- 18a. Naryzhny S.N., Krutyakov V.M. The analysis of normal and regenerating rat liver proteins by two-dimensional gel electrophoresis // Biochemistry. 1989. V.54. No.12. P.2030-2036.
19. Нарыжный С.Н. К вопросу об онкомаркерах: о чем нам может рассказать PCNA? // Материалы Всероссийской научной конференции "Медико-генетические проблемы онкологических заболеваний". 2010. Стерлитамак. Креативная Хирургия и Онкология. 2010. №4 (Приложение). С.43.
20. Naryzhny S. N., Lee H. Role of PCNA Interactions in cancer: proteomics view // Materials of the HUPPO 8th Annual World Congress. 2009. Toronto, Canada. Clinical Proteomics. 2009. V.5. S1. P.72.
21. Naryzhny S. N., Lee H. Proteomics of PCNA: cell transformation is accompanied by up-regulation of PCNA without post-translational modifications // Materials of the HUPPO 7th Annual World Congress. 2008. Amsterdam, NL. P.85.
22. Naryzhny S. N., Lee H. Cell transformation is accompanied by up-regulated level of PCNA without post-translational modifications // Materials of CPI (Canadian Proteomic Initiative) Conference. 2007. Ottawa, Canada. P.56.
23. Naryzhny S.N. Coordination of multiple cellular functions by proliferating cell nuclear antigen (PCNA): *Structure-functional aspect* // Бреслеровские чтения II. Молекулярная генетика биофизика и медицина сегодня. С.-Петербург. 2007. С.1-13.
24. Naryzhny S.N., Lee H. The high level of PCNA may result in genetic instability // Materials of the HUPPO 5th Annual World Congress. 2006. Long Beach, USA. Molecular & Cellular Proteomics. 2006. V.5. No.10. S.76.
25. Naryzhny S.N., Lee H. Analysis of PCNA Structure and functions by proteomics approach // Materials of the CPS (Canadian Proteomic Society) Conference. Ottawa, Canada. 2005. P.44.
26. Naryzhny S.N., Zhao H., Lee H "The Lord of the Rings: PCNA can coordinate multiple cellular functions due to symmetrical double ring structure // Materials of the CPI (Canadian Proteomic Initiative) Conference. Toronto, Canada. 2005. P.65.
27. Naryzhny S.N., Lee H. Human proliferating cell nuclear antigen (PCNA) may function as a double-homotrimer complex in the mammalian cell // Materials of the HUPPO 4th Annual World Congress. Munich, Germany. Molecular & Cellular Proteomics. 2005. V.4. No.8. S.50.
28. Naryzhny S.N., Zhao H., Lee H. Mammalian proliferating cell nuclear antigen (PCNA) has a double homotrimer structure. Can it be molecular Janus? // Materials of the CPS (Canadian Proteomic Society) Conference. London, Canada. 2004. P.55.

29. Naryzhny S.N., Lee H. Post-translational modifications of proliferating cell nuclear antigen (PCNA): Acetylation, not phosphorylation, plays an important role in the regulation of PCNA function // *Materials of the CPI (Canadian Proteomic Initiative) Conference. Montreal, Canada. 2004. P.61.*
30. Naryzhny S.N., Lee H. Heterogeneity (micro-proteome) of proliferating cell nuclear antigen – where is a bottom? // *Materials of the CPI (Canadian Proteomic Initiative) Conference. Vancouver, Canada. 2003. P.18.*
31. Naryzhny S.N and Lee H. PCNA Turnover in Cell Cycle and Involvement in DNA Repair is Linked to Modification by Ubiquitin // *Materials of the HUPO 2nd Annual & IUBMB XIX World Congress. Montreal, Canada. Molecular & Cellular Proteomics. 2003. V.2. No9. P.746.*
32. Naryzhny S.N., Lee H. About multiple forms of PCNA, or proteomics (microproteomics) approach to PCNA heterogeneity // *Materials of the -5<sup>th</sup> Siena 2-D Electrophoresis Meeting, (from Genome to Proteome) Siena, Italy. 2002. P.281.*
33. Naryzhny S.N., Lee H. Protein profiles of the Chinese hamster ovary cells in the resting and proliferating stages // *Materials of the 4<sup>th</sup> Siena 2-D Electrophoresis Meeting, (from Genome to Proteome). Siena, Italy. 2000. P.402.*
34. Naryzhny S.N., Becker E.G., Sinitsyn A.P. Detection and study of cellulases and other proteins from *Chaetomium cellulolyticum*: 2D-electrophoresis maps of secreted proteins from different fungal strains // *Materials of the International Conference "Biocatalysis-98, Fundamentals and Applications". Pushchino, Russia. 1998. P.47.*
35. Нарыжный С.Н. Прибор для препаративного электрофракционирования ДНК и белков: свидетельство №4533, Российская Федерация, МПК C12P19/00. №95111359, заявл. 03.07.1995, опубл. 16.07.1997, Бюл. №7.
36. Нарыжный С.Н.; Метод препаративного электрофракционирования ДНК и белков: патент №2104082, Российская Федерация, МПК B01D57/02, G01N27/28. №95111365, заявл. 03.07.1995, опубл. 10.02.1998, Бюл. №4.
37. Naryzhny S.N. Discrete preparative electrofractionation of complex protein mixture // *PNPI Research Report 1994-1995. Gatchina. 1996. P.215-217.*
38. Naryzhny S.N., Levina V.V., Varfolomeeva E.Y., Drobchenko E.A., Filatov M.V. Active dissociation of the fluorescent dye Hoechst 33342 from DNA in a living cell: Who could do it? // *Materials of the 3<sup>th</sup> Siena 2-D Electrophoresis Meeting, (from Genome to Proteome). Siena, Italy. 1998. P.259.*
39. Naryzhny S.N. "Active" two-dimensional electrophoresis of rat liver DNA-polymerase alpha // *Materials of the 2<sup>th</sup> Siena 2-D Electrophoresis Meeting, (from Genome to Proteome). Siena, Italy. 1996. P.116.*