

На правах рукописи

ЧЕЛОБАНОВ БОРИС ПАВЛОВИЧ

**ПОВЕРХНОСТНЫЕ БЕЛКИ КЕРАТИНОЦИТОВ,
УЧАСТВУЮЩИЕ В ТРАНСПОРТЕ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ**

03.00.04 – биохимия

Автореферат
диссертации на соискание учёной степени
кандидата биологических наук



Новосибирск, 2005 г.

Работа выполнена в Институте химической биологии и фундаментальной медицины
СО РАН (бывший Новосибирский институт биоорганической химии СО РАН)

Научный руководитель.

к.б.н. **Лактионов Павел Петрович**

Официальные оппоненты.

д.х.н., профессор **Лаврик Ольга Ивановна**

к.б.н. **Таранин Александр Владимирович**

Ведущая организация.

Государственный научный центр вирусологии и
биотехнологии "Вектор" Министерства
здравоохранения и социального развития РФ

Защита состоится «29» апреля 2005 г. в 10 часов
на заседании диссертационного совета Д 003 045.01 при
Институте химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН
по адресу: 630090, г. Новосибирск-90, пр. Лаврентьева, 8

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке
Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН

Автореферат разослан «25» марта 2005 г.

Учёный секретарь диссертационного совета

д.х.н.



Фёдорова О.О.

2005-4
45456

2051864

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы.

Регуляция экспрессии генов за счет воздействия на нуклеиновые кислоты клетки интенсивно исследуется в последнее время. В частности, для регуляции экспрессии генов было предложено использовать антисмысловые олигонуклеотиды и их химические аналоги. В экспериментах на культурах тканей было показано, что антисмысловые олигонуклеотиды ингибируют экспрессию генов за счет комплементарных взаимодействий, препятствуя процессу транскрипции или трансляции. Комплементарные олигонуклеотиды были успешно использованы для коррекции точечных мутаций и ошибок сплайсинга. В последнее время для ингибирования экспрессии генов используется явление РНК интерференции – избирательного подавления экспрессии генов под действием двуцепочечных РНК, строго гомологичных мРНК мишени.

Исследование взаимодействия нуклеиновых кислот с клетками различных тканей, выявление механизмов естественного транспорта нуклеиновых кислот в клетки позволит разработать универсальные подходы к борьбе с инфекционными, онкологическими и наследственными заболеваниями. Кроме того, исследование природных механизмов транспорта нуклеиновых кислот представляет огромный интерес в связи с открытием внеклеточных нуклеиновых кислот, роль и функции которых в настоящее время практически неизвестны.

Центральную роль в транспорте молекул через биологические мембраны занимают белки, которые, собственно, и осуществляют рецепцию и транспорт. В настоящее время описаны клеточные белки, экспонированные на плазматической мембране и участвующие в связывании нуклеиновых кислот. Однако в силу того, что для выявления и идентификации белков были использованы клетки различных тканей, использованы различные подходы к визуализации белков и различные по последовательности и химическому строению олигонуклеотиды, до сих пор не ясно, насколько выявленные белки универсальны и какова их роль в рецепции и транспорте нуклеиновых кислот. Таким образом, вопрос о механизмах транспорта нуклеиновых кислот в клетки млекопитающих и белках, принимающих участие в этом процессе, до сих пор остается открытым.

Цель работы. Целью настоящей работы было исследование поверхностных белков клеток различного тканевого происхождения и в том числе кератиноцитов, участвующих в узнавании и транспорте нуклеиновых кислот в клетки. В процессе выполнения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

- Выяснить, являются ли олигонуклеотид-связывающие белки универсальными или же различные клетки экспрессируют различные олигонуклеотид-связывающие белки.
- Определить, какие факторы могут влиять на модификацию белков производными олигонуклеотидов и транспорт олигонуклеотидов в клетки.
- Разработать метод выделения поверхностных олигонуклеотид-связывающих белков, участвующих в транспорте нуклеиновых кислот в клетки.
- Выделить и идентифицировать данные белки.
- Получить против идентифицированных белков антитела и с их помощью исследовать локализацию этих белков в клетке и их роль в транспорте нуклеиновых кислот.

Научная новизна и практическая ценность работы.

Впервые было показано, что клетки различного тканевого происхождения экспрессируют одинаковый набор поверхностных олигонуклеотид-связывающих белков. Было продемонстрировано, что наиболее приемлемым методом выявления и выделения поверхностных белков клеток, связывающих нуклеиновые кислоты, является аффинная модификация живых клеток реакционноспособными олигонуклеотидами. Разработан метод выделения поверхностных олигонуклеотид-связывающих белков при помощи аффинной модификации интактных клеток производным олигонуклеотида Flu-lys-p(N)₁₆-deg-U, содержащим на одном конце реакционноспособную группу (окисленный γU), а на другом – гаптен (флуоресцеин), с последующим выделением комплексов олигонуклеотид-белок аффинной хроматографией на Ультрагеле А2 с иммобилизованными антителами против флуоресцеина. При помощи этого метода были выделены олигонуклеотид-связывающие белки с молекулярной массой 68 кДа. Белки идентифицированы масс-спектроскопическим методом как альбумин, кератин K1, кератин K10 и кератин K2e. Было продемонстрировано участие этих белков в транспорте олигонуклеотидов. Полученные данные важны для понимания механизмов транспорта нуклеиновых кислот.

Апробация работы. По материалам диссертации опубликовано 5 печатных работ. Материалы диссертации были доложены на международных конференциях:

1. XIV International Roundtable on Nucleosides, Nucleotides, and Their Biological Applications. San-Francisco september 2000.
2. Опыт введения новейших достижений супрамолекулярной химии в учебные программы средних и высших учебных заведений. Новосибирск 6-11 августа 2001.
3. RNA as therapeutic target Novosibirsk, Russia, 30 august - 2 september 2001.
4. The Third International Conference on Bioinformatics of Genome Regulation and Structure (BGRS'2002), Novosibirsk, Russia, July 14 - 20, 2002.
5. XV International Roundtable on Nucleosides, Nucleotides, and Their Biological Applications. Leuven (Belgium) September 11-14, 2002.
6. “Фундаментальная наука медицине”, Москва, Ноябрь, 2002.
7. International conference “Targeting RNA: Artificial ribonucleases, conformational traps and RNA interference”. Workshop “Biology and biochemistry of extracellular nucleic acids”, Novosibirsk, Russia, June 2003.
8. Circulating Nucleic Acids in Plasma & Serum III and Serum Proteomics 2003. Santa Monica, CA. November 9-11, 2003
9. Chemical & Biological Problems of Proteomics (CBPP-2004), Novosibirsk, Russia, July 5-9, 2004.
10. The Fourth International Conference on Bioinformatics of Genome Regulation and Structure (BGRS'2004) Novosibirsk, Russia, July 25-30, 2004.

Структура и объем работы. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, результатов и их обсуждения, выводов и списка цитированной литературы. Работа изложена на 136 страницах, содержит 24 рисунка и 5 таблиц. Библиография включает 246 литературных источника.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Модификация поверхностных белков клеток различного происхождения

Для выяснения универсальности/специфичности поверхностных олигонуклеотид-связывающих белков клеток методом аффинной модификации были исследованы поверхностные олигонуклеотид-связывающие белки клеток различного тканевого происхождения: A431 (эпидермальная карцинома), HeLa (карцинома шейки матки), KB (карцинома эпителия ротовой полости человека), MCF-7 (карцинома груди), Нер-2 (человеческая карцинома гортани), ЛЭЧ (первичные клетки легочного эпителия человека), K562 (человеческая миелогенная лейкоemia), Cos-7 (клетки почки зеленой мартышки), СПЭВ (клетки почки эмбриона свиньи) и NIH/3T3 (фибробласты мыши).

В качестве реакционноспособной группы для синтеза аффинного реагента был выбран 4-[(N-2-хлорэтил-N-метил)амино] бензиламин (CIR), ранее неоднократно использовавшийся для аффинной модификации белков и нуклеиновых кислот.

При помощи аффинной модификации было показано, что при инкубации клеток с алкилирующим производным CIRpCAGTAAATATCTAGGA (CIRp(N)₁₆) в PBS основными белками, связывающими нуклеиновые кислоты, являются белки с молекулярными массами 68, 38 и 28 кДа (рис. 1).

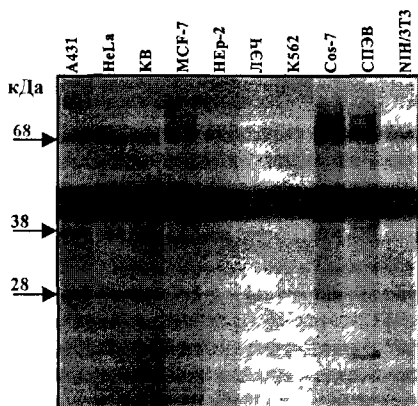


Рис. 1. Аффинная модификация мембранно-цитозольных белков, связывающих нуклеиновые кислоты, intactных клеток различных линий алкилирующим производным олигонуклеотида [³²P]-CIRp(N)₁₆ в PBS

Клетки инкубировали 1 час с 1 мкМ [³²P]-CIRp(N)₁₆ в PBS при 37 °C. Белки анализировали при помощи SDS-дискелектрофореза в градиентном (10-20%) ПААГ с последующей радиоавтографией

При инкубации с алкилирующим производным в культуральной среде увеличивается интенсивность модификации всех белков, кроме белка 38 кДа, степень модификации которого не изменяется, и наблюдается аффинная модификация белка 46 кДа и ряда минорных белков (рис. 2).

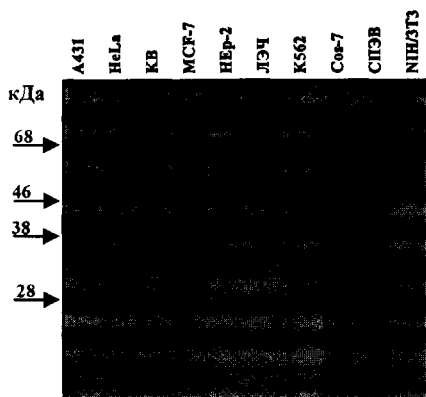


Рис. 2. Аффинная модификация мембранно-цитозольных белков, связывающих нуклеиновые кислоты, интактных клеток различных линий алкилирующим производным олигонуклеотида $[^{32}\text{P}]\text{-CIRp}(\text{N})_{16}$ в среде ДМЕМ.

Клетки инкубировали 1 час с 1 мкМ $[^{32}\text{P}]\text{-CIRp}(\text{N})_{16}$ в среде ДМЕМ при 37 °С. Белки анализировали при помощи SDS-дискэлектрофореза в градиентном (10-20%) ПААГ с последующей радиоавтографией.

Следует отметить, что интенсивность модификации белков различна для клеток различного происхождения, что может быть связано с различным уровнем экспрессии этих белков в разных клетках. При этом в клетках кератиноцитарного происхождения выявляются те же белки, что и в других исследованных клетках. Таким образом, данные аффинной модификации клеток реакционноспособными производными олигонуклеотидов свидетельствуют об универсальности поверхностных олигонуклеотид-связывающих белков.

Для выяснения специфичности взаимодействия олигонуклеотидов с клетками, клетки инкубировали с производными олигонуклеотида в присутствии потенциальных конкурентов. Было показано, что немеченые олигонуклеотиды, оц-ДНК, дц-ДНК и poly IC уменьшали степень модификации белков производным $\text{CIRp}(\text{N})_{16}$ (рис. 3) и транспорт родамин-меченых производных олигонуклеотидов (Rh-ОДН) в клетки (Рис. 4), а гепарин и декстран сульфат ингибируют транспорт олигонуклеотидов в клетки, но только частично ингибируют модификацию белков.

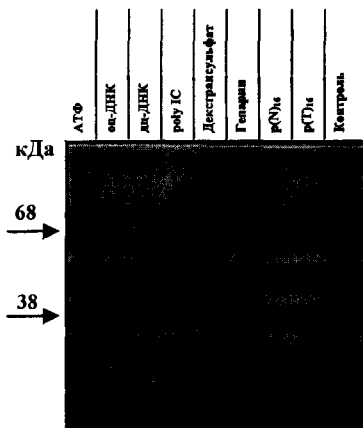


Рис. 3. Специфичность связывания производного $\text{CIR-p}(\text{N})_{16}$ с клеточными белками.

Клетки линии A431 инкубировали 1 час с 1 мкМ производными олигонуклеотида в PBS при 37 °С в присутствии потенциальных конкурентов: АТФ (100 мкМ), оц-ДНК (150 мкг/мл), дц-ДНК (150 мкг/мл), poly IC (50 мкг/мл), декстрансульфат (10 мкг/мл), гепарин (50 мкг/мл), $\text{p}(\text{N})_{16}$ (50 мкМ), $\text{p}(\text{T})_{16}$ (50 мкМ).

Белки анализировали при помощи SDS-дискэлектрофореза в градиентном (10-20%) ПААГ с последующей радиоавтографией.

Следует отметить, что полоса 68 кДа состоит, по меньшей мере, из двух белков близкой молекулярной массы, а гепарин и декстран сульфат по-разному связываются с белками, составляющими полосу 68 кДа. По-видимому, для транспорта олигонуклеотидов необходимы, оба белка из полосы 68 кДа, модификацию которых и нарушают гепарин и декстран сульфат. Полученные данные свидетельствуют о специфичности взаимодействия олигонуклеотидов с белками клеточной поверхности и дают возможность предположить участие этих белков в транспорте олигонуклеотидов в клетки.

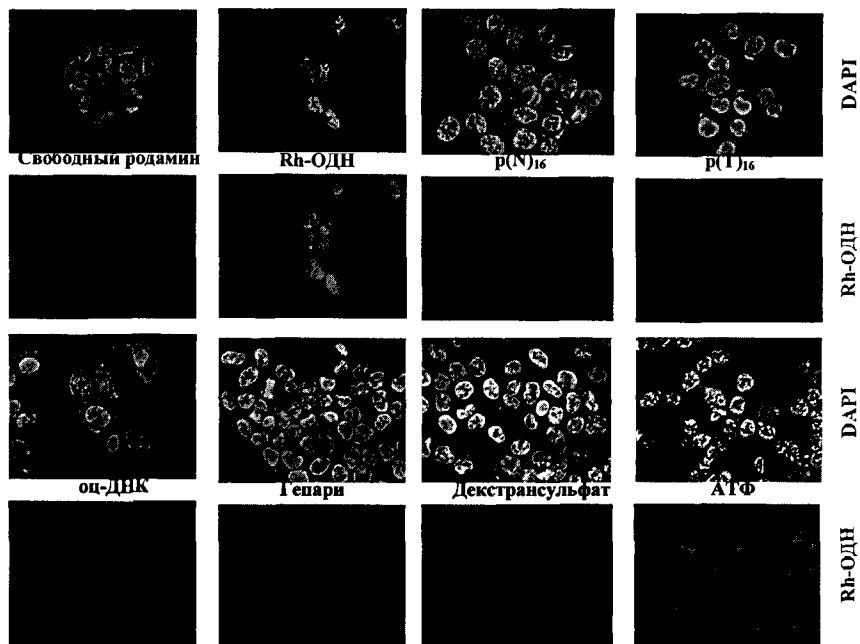


Рис. 5. Влияние потенциальных ингибиторов на транспорт родамин-меченых олигонуклеотидов в клетки линии A431.

Клетки линии A431 инкубировали с 1мкМ родамин-меченым производным олигонуклеотида Rh-lys-p(N)₁₆-deg-U 1 час при 37°C в среде ДЕМЕМ в присутствии потенциальных конкурентов: p(N)₁₆ (50 мкМ), p(T)₁₆ (50 мкМ), оц-ДНК (150 мкг/мл), гепарина (50 мкг/мл), декстрансульфата (10 мкг/мл) и АТФ (100 мкМ). В контроле клетки инкубировали со свободным родамином (отрицательный контроль) и Rh-lys-p(N)₁₆-deg-U без добавления конкурентов (положительный контроль). После инкубации клетки отмывали средой ДЕМЕМ, фиксировали 3.7% раствором формалина в PBS, окрашивали ядра раствором DAPI и анализировали при помощи флуоресцентной микроскопии.

Исследование локализации модифицированных белков

Поскольку модификация производным олигонуклеотида может происходить не только на поверхности клетки но и в различных клеточных компартментах, мы исследовали клеточную локализацию выявленных белков. Для разделения клеток на фракции была использована пермеабилзация клеток сапонином. Как известно, сапонин, встраиваясь в мембрану, формирует поры с эффективным радиусом, равным эффективному радиусу белков с мол. массой ~200 кДа. Через эти поры из клеток диффундируют компоненты цитозоля. Обработка сапонином была использована для получения цитозольной фракции (Ц), после чего пермеабилизованные и отмытые клетки разделяли на мембранную (М) и ядерную (Я) фракции.

При обработке клеток CIRp(N)₁₆ в PBS было показано, что модифицированные белки 68 и 28 кДа локализованы большей частью в мембранной фракции, присутствуют в незначительных количествах в ядерной и практически полностью отсутствуют в цитозольной. В то время как белок 38 кДа локализован в основном в цитозольной фракции, а, кроме того, присутствует в мембранной фракции и в небольших количествах в ядерной фракции (Рис. 6).

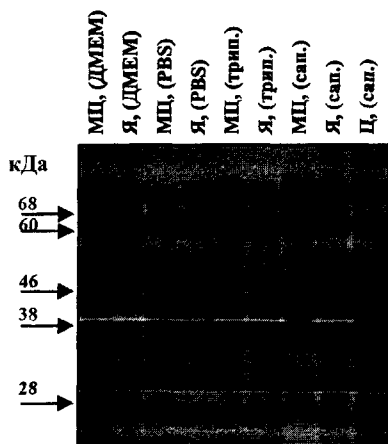


Рис. 6. Исследование клеточной локализации белков, связывающих нуклеиновые кислоты. Клетки линии A431 инкубировали с 1 мкМ [³²P]CIRp(N)₁₆ в PBS или ДМЕМ. Модифицированные в PBS клетки обрабатывали трипсином (0.25%, 5 мин.) или сапонином (40 мкг/мл, 20 мин.). Супернатант после обработки клеток сапонином собирали в качестве цитозольной фракции, а оставшиеся клетки разделяли на мембранно-цитозольную и ядерную фракции, как описано в «Материалах и методах».

Белки анализировали при помощи SDS-дискелектрофореза в градиентном (10-20%) ПААГ с последующей радиоавтографией.

Таким образом, все выявленные нами белки присутствуют, хотя бы частично, в цитоплазматической мембране клеток, однако не известно, экспонированы ли они наружу или внутрь мембраны. Для решения этого вопроса мы использовали мягкую обработку трипсином модифицированных клеток. Было показано, что часть модифицированного белка 68 кДа при

обработке трипсином деградирует до полипептида 60 кДа, что говорит об экспонировании белка на наружной поверхности клеток (Рис. 6) и подразумевает его участие в первичном узнавании и связывание олигонуклеотидов.

Влияние состояния клеточной мембраны на аффинную модификацию олигонуклеотид-связывающих белков и транспорт олигонуклеотидов в клетки

Ранее было показано, что обработки клеток, нарушающие целостность мембраны, могут приводить к усилению доставки олигонуклеотидов в клетки. Мы исследовали влияние различных предобработок клеток, нарушающих целостность клеточной мембраны, на модификацию белков реакционноспособным производным олигонуклеотида. Было показано, что обработка клеток сапонином и соскабливание клеток скрепером приводят к уменьшению аффинной модификации белков CIRp(N)₁₆ (Рис. 7) и уменьшению накопления олигонуклеотидов в клетках. Частичное нарушение клеточной поверхности соскабливанием скрепером было предложено МакНеилом и использовано в работе для доставки в клетки морфолиновых олигонуклеотидов. Однако в этой же работе было показано, что морфолиновые олигонуклеотиды проникают в клетки только в первую минуту после их соскабливания, а клетки, обработанные трипсином, не накапливают олигонуклеотиды. Мы показали, что предобработка клеток трипсином (Рис. 7) уменьшает аффинную модификацию белков CIRp(N)₁₆ и транспорт олигонуклеотидов в клетки.

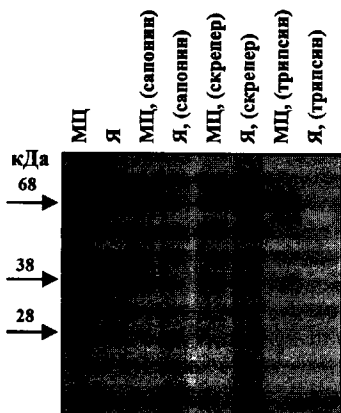


Рис. 7. Влияние факторов, нарушающих целостность клеточной мембраны на модификацию белков, связывающих нуклеиновые кислоты, производным олигонуклеотида [³²P]CIRp(N)₁₆. Интактные клетки, трипсинизированные клетки, клетки, обработанные сапонином или снятые с подложки скрепером, инкубировали 1 час с 1 мкМ [³²P]CIRp(N)₁₆ при 37 °C в PBS. Белки анализировали при помощи SDS-дискелектрофореза в градиентном (10-20%) ПААГ с последующей радиоавтографией.

Таким образом, обработки клеток, нарушающие функциональную целостность клеточной мембраны, уменьшают аффинную модификацию белков и уменьшают проникновение олигонуклеотидов в клетки.

В ряде работ для выявления и выделения белков, участвующих в связывании и транспорте нуклеиновые кислоты, было использовано взаимодействие олигонуклеотидов или ДНК с клеточными фракциями. Клетки содержат огромное количество белков, связывающих нуклеиновые кислоты, участвующих в процессах транскрипции, трансляции, репликации, репарации, и, таким образом, при взаимодействии олигонуклеотидов с клеточными фракциями должно выявляться большое число белков, не имеющих отношения к транспорту нуклеиновых кислот в клетки.

Для того чтобы оценить возможность выделения поверхностных олигонуклеотид-связывающих белков из предварительно приготовленных фракциях клеток мы исследовали аффинную модификацию клеток и клеточных фракций реакционноспособным производным CIRp(N)₁₆

Было показано, что обработка CIRp(N)₁₆ мембранно-цитозольной, цитозольной и ядерной фракций приводит к аффинному мечению большого количества белков, в отличие от модификации интактных клеток (Рис. 8). При этом во фракциях белки, связывающие нуклеиновые кислоты в интактных клетках, не выявляются или обнаруживаются, но как минорные компоненты.

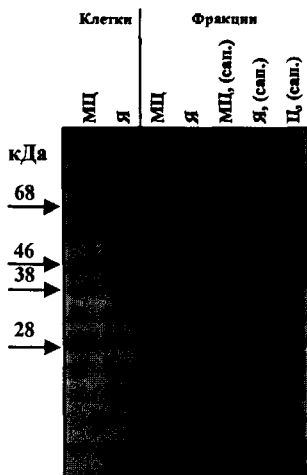


Рис. 8. Аффинная модификация клеточных фракций и живых клеток линии A431 [³²P]CIRp(N)₁₆. Клетки и клеточные фракции инкубировали 1 час с 1 мкМ [³²P]CIRp(N)₁₆. Белки анализировали при помощи SDS-дискелектрофореза в градиентном (10-20%) ПААГ с последующей радиоавтографией.

Поскольку обработки клеток, нарушающие функциональную целостность клеточной мембраны, предотвращают аффинную модификацию белков, а аффинная модификация клеточных фракций олигонуклеотидным реагентом приводит к модификации значительного количества дополнительных олигонуклеотид-связывающих белков, по сравнению с олигонуклеотид-связывающими белками, выявляемыми аффинной модификацией живых клеток то наиболее приемлемым методом выявления и выделения поверхностных белков клеток, связывающих нуклеиновые кислоты, является аффинная модификация живых клеток реакционноспособными олигонуклеотидами.

Исследование эффективности модификации поверхностных белков клеток линии A431 различными производными олигонуклеотидов.

Олигонуклеотидный реагент, пригодный для аффинной модификации поверхностных олигонуклеотид-связывающих белков клеток, с целью последующего выделения ковалентных олигонуклеотид-белковых комплексов должен содержать реакционноспособную группу для эффективной модификации белков и гаптенную группу для связывания с аффинным сорбентом.

В качестве гаптена было предложено использовать молекулу флуоресцеина (Flu), поскольку против флуоресцеина можно получить специфические антитела и с помощью флуоресцентной микроскопии следить за распределением в клетке модифицированных флуоресцеином олигонуклеотидов. Флуоресцеин присоединяли через лизинный (lys) или диаминопентановый (DAP) линкеры. В качестве реакционных групп были исследованы ClR, малеимид (MaM) и окисленный рибоурдин, присоединенный через диэтиленгликолевый (deg) линкер.

Для выяснения специфичности связывания полученных аффинных реагентов с клеточными белками клетки инкубировали с реакционноспособными производными олигонуклеотидов в присутствии потенциальных конкурентов: немодифицированного олигонуклеотида, дц-ДНК и флуоресцеина (Рис. 8).

Было показано, что немодифицированный олигонуклеотид и ДНК эффективно ингибируют аффинную модификацию белков, связывающих нуклеиновые кислоты, реакционноспособными производными олигонуклеотидов. При этом флуоресцеин не влияет на аффинную модификацию белков.

Таким образом, модификация белков реакционноспособными производными олигонуклеотидов является специфичной и связывание с белками определяется олигонуклеотидным компонентом аффинного реагента.

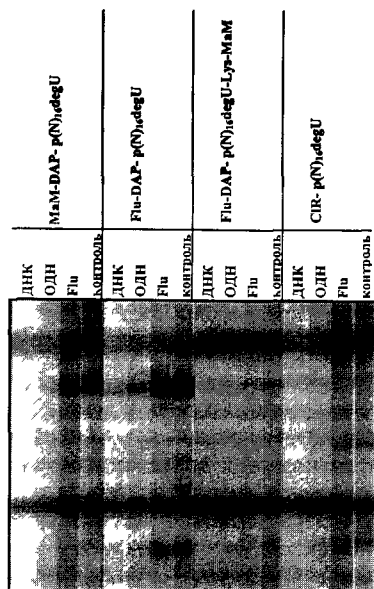


Рис. 8. Специфичность связывания реакционноспособных производных олигонуклеотида $p(N)_{16}degU$ с клеточными белками

Клетки линии A431 инкубировали 1 час с 1 мкМ производными олигонуклеотида в среде ДМЕМ при $37^{\circ}C$ в присутствии потенциальных конкурентов 150 мкг/мл плазмидной ДНК, 50 мкМ $p(N)_{16}degU$, 50 мкМ Flu и, в контроле, без добавления конкурентов.

Белки анализировали при помощи SDS-дискелектрофореза в градиентном (10-20%) ПААГ с последующей радиоавтографией

В качестве аффинного реагента был выбрано производное олигонуклеотида Flu-DAP- $p(N)_{16}degU$, содержащее на 3'-конце окисленный rU в качестве реакционной группы, а на 5'-конце — флуоресцеин в качестве гаптена.

Выделение белков, связывающих нуклеиновые кислоты

Для выделения ковалентных комплексов Flu-DAP- $p(N)_{16}degU$ с белками методом аффинной хроматографии было необходимо получить АТ против флуоресцеина. В предварительных экспериментах было обнаружено, что антитела против флуоресцеина с низкой эффективностью взаимодействуют с этим производным, однако, при замене диаминопентанового линкера на лизинный не менее 95% производного олигонуклеотида Flu-lys- $p(N)_{16}degU$ связывалось с иммобилизованными на сорбенте антителами против флуоресцеина. Данное производное было использовано для выделения белков.

Клетки (10^6) линии A431 модифицировали в среде ДМЕМ олигонуклеотидным реагентом Flu-lys- $p(N)_{16}degU$ и выделяли модифицированные белки из мембранно-цитозольной клеточной фракции на

аффинном сорбенте, содержащем антитела против флуоресцеина. Для доказательства того, что при помощи аффинной хроматографии мы выделили искомые белки, часть специфического элюата после диск-электрофореза переносили на нитроцеллюлозную мембрану и окрашивали одну серию коллоидным серебром, другую – анти-Flu-антителами. Было показано, что кроличьи анти-Flu-антитела специфично связывают те же олигонуклеотид-белковые комплексы, которые выявляются на радиоавтографе и при окраске нитроцеллюлозного фильтра коллоидным серебром (Рис. 9). Следует отметить, что модификация производным олигонуклеотида увеличивает молекулярную массу белка на ~ 5 кДа и уменьшает его электрофоретическую подвижность. Таким образом, модифицированные белки обнаруживаются на электрофореграмме существенно выше, чем те же самые белки, не модифицированные аффинным реагентом.

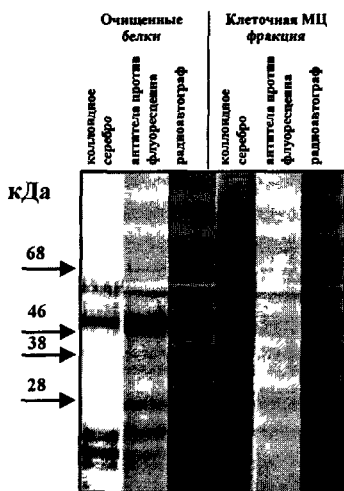


Рис. 9. Выделение поверхностных олигонуклеотид-связывающих белков при помощи аффинной модификации клеток линии A431 производным олигонуклеотида [32 P]Flu-lys-p(N) $_{16}$ -deg-rU с последующей аффинной хроматографией на сорбенте с иммобилизованными антителами против флуоресцеина. Белки разделяли при помощи SDS-дискэлектрофореза в градиентном (10-20%) ПААГ, переносили на нитроцеллюлозную мембрану и окрашивали одну серию коллоидным серебром, другую – антителами против флуоресцеина.

Оставшуюся после аналитического исследования часть специфического элюата с аффинной хроматографии разделяли диск электрофорезом, окрашивали гель Coomasi- G250 и вырезали полосу геля, соответствующую белкам 68 кДа.

Идентификация выделенных белков с молекулярными массами ~ 68 кДа проводилось масс-спектрометрическим методом в лаборатории профессора Мейера (Бохум, Германия). Было обнаружено, что полоса 68 кДа содержит 4 белка – альбумин и кератины K1, K10 и K2e.

Исследование клеточной локализации выделенных белков

Для доказательства достоверности идентификации выделенных олигонуклеотид-связывающих белков, исходя из литературных данных были выбраны иммуногенные пептиды из структуры кератинов K1 и K2e. Против этих пептидов и альбумина были получены поликлональные кроличьи антитела.

Клеточную локализацию выделенных белков исследовали с помощью полученных антител методом флуоресцентной микроскопии. Клетки линии A431, фиксированные метанолом, инкубировали с антителами против альбумина, кератина K1 и кератина K2e. В качестве положительного контроля использовались антитела против глицеральдегид-3'-фосфатдегидрогеназы (ГЗФД), а в качестве отрицательного клетки инкубировали только со вторыми антителами, мечеными флуоресцеином (контроль на конъюгат).

Кератин K2e обнаруживался в основном в перинуклеарном пространстве и в ядре, а кератин K1 в цитоплазме. ГЗФД была обнаружена в значительных количествах в цитоплазме, что соответствует ее основной функции как фермента гликолиза. Аналогичная картина наблюдалась и для клеток линий HeLa и HaCat (данные не представлены). При этом альбумин обнаружить не удалось (Рис. 10).

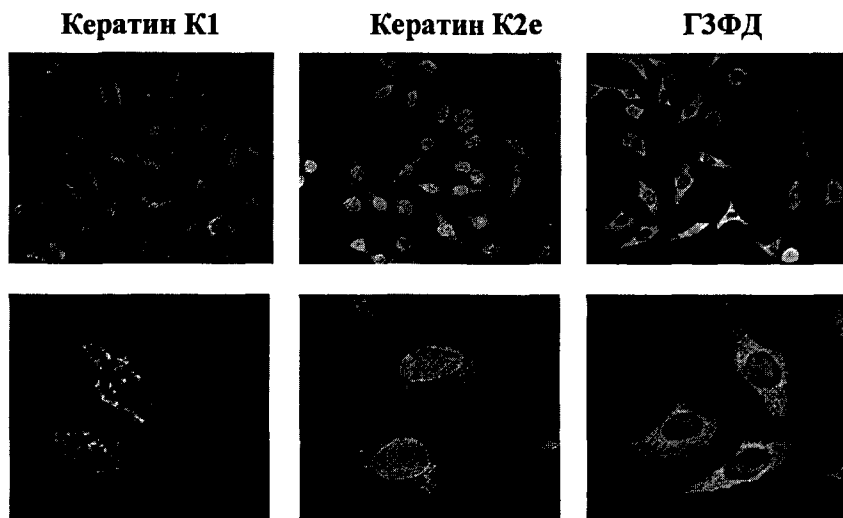


Рис. 10. Флуоресцентно-микроскопическое исследование клеточной локализации кератинов и ГЗФД в кератиноцитах линии A431.

Клетки фиксировали метанолом, инкубировали с кроличьими антителами против пептидов из состава исследуемых белков и затем с флуоресцеин-мечеными антителами против IgG кролика.

При обработке антителами клеток, предварительно инкубированных с родамин-меченым олигонуклеотидом (рис. 11) картина клеточной локализации белков изменялась: кератины K1 и K2e обнаруживались в основном в ядре, причем были колокализированы вместе с олигонуклеотидами, что говорит об участии этих белков в транспорте олигонуклеотидов. Более того, в ядрах клеток был обнаружен альбумин, колокализированный с олигонуклеотидами, что дает возможность предположить транспорт олигонуклеотидов в комплексе с альбумином с клеточной поверхности в ядро.

Таким образом, данные флуоресцентной микроскопии о колокализации в клетках альбумина и кератинов K1 и K2e с флуоресцентномечеными олигонуклеотидами свидетельствуют об участии этих белков в транспорте олигонуклеотидов в клетки.

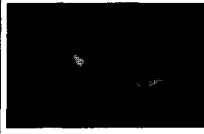
	Кроличьи антитела против альбумина	Кроличьи антитела против кератина K1	Кроличьи антитела против кератина K2e
Rh -lys -pN ₁₆ -degU			
Конъюгат флуоресцеина с антителом против IgG кролика			
Окраска ядер раствором DAPI			

Рис. 11. Колокализация родамин-меченых олигонуклеотидов с кератинами и альбумином в клетках линии A431.

Клетки линии A431 инкубировали с 1мкМ родамин-меченым производным олигонуклеотида Rh-lys-p(N)₁₆-deg-U 1 час при 37°C в среде ДМЕМ. После инкубации клетки отмывали средой ДМЕМ, фиксировали 3.7% раствором формалина в PBS, пермеабелизовали 0.02% раствором Triton X-100 в PBS и инкубировали 2 часа с антителами против альбумина, кератина K1 или кератина K2e в среде ДМЕМ. После чего клетки отмывали средой ДМЕМ и инкубировали 2 часа с антителами против IgG кролика, мечеными флуоресцеином. После инкубации клетки отмывали средой ДМЕМ, фиксировали 3.7% раствором формалина в PBS, окрашивали ядра раствором DAPI и анализировали при помощи флуоресцентной микроскопии.

Выводы

1. При помощи аффинной модификации реакционноспособным производным олигонуклеотида CIR-p(N)₁₆ показано, что клетки различного тканевого происхождения (A431 (эпидермальная карцинома), HeLa (карцинома шейки матки), KB (карцинома эпителия ротовой полости человека), MCF-7 (карцинома груди), Нер-2 (человеческая карцинома гортани), ЛЭЧ (первичные клетки легочного эпителия человека), K562 (человеческая миелогенная лейкемия), Cos-7 (клетки почки зеленой мартышки), СПЭВ (клетки почки эмбриона свиньи), NIH/3T3 (фибробласты мыши)) экспрессируют одинаковый набор поверхностных олигонуклеотид-связывающих белков. Показано, что предобработка клеток трипсином уменьшает проникновение олигонуклеотидов в клетки и предотвращает модификацию белков с молекулярной массой 68 кДа реакционноспособными производными олигонуклеотидов, а обработка аффинно модифицированных клеток трипсином приводит к частичному гидролизу белков с молекулярной массой 68 кДа. Эти данные свидетельствуют о том, что белки с молекулярной массой 68 кДа экспонированы на поверхности клеток и участвуют в связывании олигонуклеотидов с клетками.
2. Показано, что, любые обработки клеток, нарушающие функциональную целостность клеточной мембраны, предотвращают аффинную модификацию белков и уменьшают проникновение олигонуклеотидов в клетки. Кроме того, аффинная модификация клеточных фракций олигонуклеотидным реагентом приводит к модификации значительного количества дополнительных олигонуклеотид-связывающих белков, по сравнению с олигонуклеотид-связывающими белками, выявляемыми аффинной модификацией живых клеток. Таким образом, наиболее приемлемым методом выявления и выделения поверхностных белков клеток, связывающих нуклеиновые кислоты, является аффинная модификация живых клеток реакционноспособными олигонуклеотидами.
3. Разработан метод выделения поверхностных олигонуклеотид-связывающих белков при помощи аффинной модификации интактных клеток производным олигонуклеотида Flu-lys-p(N)₁₆-deg-U, содержащим на одном конце реакционноспособную группу (окисленный rU), а на другом – гаптен (флуоресцеин), с последующим выделением комплексов олигонуклеотид-

белок аффинной хроматографией на Ультрагеле А2 с иммобилизованными антителами против флуоресцеина. Выделены олигонуклеотид-связывающие белки с молекулярной массой 68 кДа. Белки идентифицированы масс-спектроскопическим методом как альбумин, кератин К1, кератин К10 и кератин К2е.

4. Исследована клеточная локализация выделенных олигонуклеотид-связывающих белков и флуоресцентно меченых олигонуклеотидов. Показано, что локализация флуоресцентно меченых олигонуклеотидов в клетках линии А431 совпадает с локализацией альбумина и кератинов К1 и К2е что подтверждает участие этих белков в транспорте олигонуклеотидов.

Основные результаты диссертации опубликованы в работах:

1. Laktionov P, Chelobanov B, Rykova E, Vlassov V. Interaction of oligonucleotides with cellular proteins. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*. **2001**, 20(4-7), 859-862.
2. Челобанов Б.П., Лактионов П.П., Харькова М. В., Рыкова Е.Ю., Пышный Д.В, Пышная И.А., Сильников В.Н., Власов В.В. Исследование поверхностных олигонуклеотид-связывающих белков эукариотических клеток при помощи аффинной модификации реакционноспособными производными олигонуклеотидов. *Известия Академии Наук. Серия Химическая*. **2002**, 7, 1113-1119.
3. Laktionov P.P., Chelobanov B.P., Kharkova M.V., Rykova E.Yu., Pyshnyi D.V., Pyshnaya I.A., Marcus K., Meyer H.E., and Vlassov V.V. Cell surface oligonucleotide-binding proteins of human squamous carcinoma A431cells. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*, **2003**, 22(5-8), 1715-1719.
4. Б. П. Челобанов, П. П. Лактионов, М. В. Харькова, Е. Ю. Рыкова, Д. В. Пышный, И. А. Пышная, К. Маркус, Г. Е. Мейер, В. В. Власов. Кератин К1 связывает нуклеиновые кислоты на поверхности клеток. *Биохимия*. **2003**, 68(11), 1540-1549.
5. Boris P. Chelobanov, Pavel P. Laktionov, Maria V. Kharkova, Elena Y. Rykova, and Valentin V. Vlassov. Isolation of Nucleic Acid Binding Proteins: An Approach for Isolation of Cell Surface, Nucleic Acid Binding Proteins. *Annals of the New York Academy of Sciences*. **2004**, 1022, 239-244.

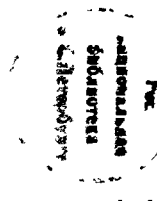
Подписано к печати "21" марта 2005г.
Формат бумаги 60х84 1/16. Объём 2,0 печ. л.
Тираж 100 экз. Заказ № 1411.
Отпечатано "Документ-Сервис", 630090,
Новосибирск, Институтская 4/1, тел. 356-600

РНБ Русский фонд

2005-4

45456

22 АПР 2005



1365