

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК

Институт биоорганической химии им. академиков

М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова

На правах рукописи

ТРУБЕЦКОЙ ДМИТРИЙ ОЛЕГОВИЧ

**ХАРАКТЕРИСТИКА БЕЛКОВЫХ ФАКТОРОВ, СВЯЗЫВАЮЩИХСЯ С
РЕГУЛЯТОРНЫМИ УЧАСТКАМИ ЭНДОГЕННЫХ РЕТРОВИРУСОВ ЧЕЛОВЕКА
СЕМЕЙСТВА К**

02.00.10-Биоорганическая химия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание учёной степени

кандидата химических наук

Москва - 2005

Работа выполнена в лаборатории структуры и функций генов человека Института биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН

Научный руководитель: кандидат биологических наук Л.Г. Николаев

Официальные оппоненты: доктор химических наук В.Л. Туницкая
кандидат химических наук М.Б. Костина

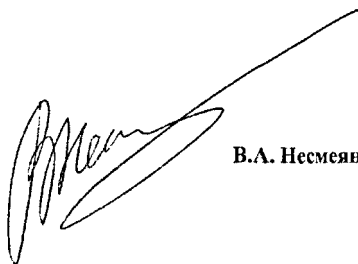
Ведущая организация: Институт биологии развития РАН

Защита состоится «27» 04 2005 г. в 10 часов на заседании
Специализированного совета Д00201901 при Институте биоорганической химии Имени
академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН по адресу: 117997, ГСП-7,
г.Москва, В-437, ул. Миклухо-Маклая 16/10.

С текстом диссертации можно ознакомиться в библиотеке Института биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН.

Автореферат разослан «25» марта 2005 г.

Учёный секретарь
Специализированного совета
доктор химических наук



В.А. Несмеянов

ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы.

Эндемические ретровирусы человека и их фрагменты, представленные несколькими семействами и составляющие до 8 % всей ДНК человеческого генома, обладают потенциальной способностью регулировать экспрессию близко расположенных генов. Благодаря их способности к перемещению по геному и к амплификации они могут быть важными инструментами эволюции и видообразования. Некоторые из них обладают способностью образовывать вирусные частицы, что свидетельствует об их участии в патогенных процессах, включая опухолевую трансформацию. Одиночные LTR некоторых семейств эндемических ретровирусов человека, образующиеся, по всей видимости, по механизму гомологичной рекомбинации, присутствуют в геноме в количествах в десятки раз больших, чем соответствующие провирусы, что многократно умножает их регуляторный потенциал. Показано, что одиночные LTR человеческих эндемических ретровирусов (HERV) могут служить промоторами и терминаторами транскрипции клеточных генов как *in vitro*, так и *in vivo*, а также обладать другими функциями. Таким образом, изучение эндемических ретровирусов человека позволило получить ряд важных новых данных о механизмах регуляции и эволюции на уровне полного генома человека. Типичный LTR ретровируса включает в себя комплекс регуляторных элементов, необходимых для эффективной транскрипции провирусной ДНК: промоторы и энхансеры, необходимые для инициации транскрипции, и сигналы терминации и полиаденилирования РНК. Наличие промоторной и энхансерной активностей LTR экзогенных и эндемических ретровирусов предполагает связывание ими специфических регуляторных белков.

Семейство К эндемических ретровирусов человека (HERV-K) считается наиболее биологически активным и, возможно, способно формировать вирионы в клетках плаценты и тератоканциномы. Нуклеотидные последовательности LTR этого семейства были проверены на наличие участков связывания белковых факторов клетки-хозяина с использованием торможения в геле и ультрафиолетовой сшивки. Было показано, что последовательности LTR двух подсемейств HERV-K содержат специфические сайты связывания по крайней мере для трёх белковых факторов - ERF1, ERF2 и ERF3 (Akorov et al., 1998). По своим характеристикам эти белки не похожи на уже известные факторы транскрипции. Участок их связывания расположен в 5'-области III-элемента LTR.

Цель работы состояла в идентификации и функциональной характеристике регуляторных участков LTR эндогенных ретровирусов человека семейства K, связывающихся с белковыми факторами, а также в выделении и характеристике белков, связывающихся с этими участками.

Объём работы.

Диссертационная работа изложена на **89** страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, результатов и их обсуждения, экспериментальной части, выводов и списка цитируемой литературы, состоящего из 151 наименования.

Научная новизна и практическая ценность.

В настоящей работе показано, что центральная и 3'-концевая области LTR HERV-K, в частности область негативного регуляторного элемента, способны специфически связываться с клеточными белковыми факторами. Было также обнаружено, что в клетках, где LTR HERV-K обладает энхансерной активностью, с центральной областью LTR связывается дополнительный клеточный фактор. Была проанализирована тканеспецифичность белковых факторов, связывающихся с определённым участком длинного концевого повтора человеческого эндогенного ретровируса семейства K. Был разработан метод аффинной элюции специфических ДНК-связывающих белков с гепарин-агарозной колонки, и с его помощью выделены белки, связывающиеся с 5'-концом области U3 LTR HERV-K. Один из белков был идентифицирован и охарактеризован методами масс-спектрометрии и иммунохимии.

Апробация полученных результатов.

Результаты диссертационной работы были представлены на следующих симпозиумах и конференциях: 7th International Symposium on Hyphenated Techniques in Chromatography and Hyphenated Chromatographic Analyzers (HTC 7), 2002; FEBS advanced course No 02-11, 2002; VI чтения, посвященные памяти академика Ю.А. Овчинникова, 2002; 2nd International Workshop "Retrotransposons and genome evolution", 2003; Cold Spring Harbor Laboratory meeting on retroviruses, 2004; 3rd European Conference & Practical course "Advanced methods for industrial production, purification, and characterization of gene vectors", 2004; Конгрессы HUPO 2003 и HUPO 2004.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 10 работ.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Клеточные белки, специфически связывающиеся с LTR HERV-K

Для изучения связывания белковых факторов нами был выбран LTR HERV-K из геномного локуса L47334 (далее LTR L47334), расположенного в области q13.2 на хромосоме 19 человека и принадлежащего к "молодому" подсемейству HERV-K, появившемуся в геноме после расхождения линий человека и шимпанзе. Структура этого LTR, в числе других, была детально проанализирована в нашей лаборатории (Lebedev, 2000), а LTR использовался для исследования его промоторной и энхансерной активностей (Domansky, 2000; Доманский, 2002).

Локализация и специфичность связывания факторов ERF1, ERF2 и ERF3 с 5'-участком области U3 LTR HERV-K

Ранее в нашей лаборатории было показано, что LTR HERV-K способен специфически связывать три белковых фактора. Белки были обозначены как ERF1, ERF2 и ERF3 (Endogenous Retrovirus Factors, эндогенные ретровирусные факторы) в соответствии с уменьшающимися молекулярными массами. Эти белки образуют комплекс, связывающийся с участком ДНК длиной около 30 п.о., расположенным вблизи 5'-конца области U3 LTR HERV-K (Akorov et al, 1998). Для дальнейшей характеристики этих факторов нами был локализован участок их связывания с большей точностью. Для этого был синтезирован набор двунитевых олигонуклеотидов, перекрывающих различные участки этой последовательности, и проверена их способность связывать комплекс ERF методом сдвига электрофоретической подвижности (EMSA) с белками ядерных экстрактов из различных клеточных линий человека и мыши (рис. 1). Из рисунка видно, что двунитевой олигонуклеотид длиной 21 п.о. (отоженные олигонуклеотиды C1 и C2, см. таблицу 1, далее олигонуклеотид C1/C2) также способен связываться специфически с клеточными белками, однако вместо одного ДНК-белкового комплекса наблюдаются два.

Для определения белкового состава комплексов с коротким (21 п.о.) олигонуклеотидом C1/C2 был проведён двумерный электрофоретический анализ с промежуточным сшиванием фрагмента ДНК с белками при помощи ультрафиолетового излучения (см. Материалы и методы). Как видно из рис. 2Б, один из комплексов с олигонуклеотидом C1/C2 длиной 21 п.о. содержит белковые факторы ERF1, ERF2 и ERF3, а другой (с большей электрофоретической подвижностью) - только факторы ERF1 и ERF2.

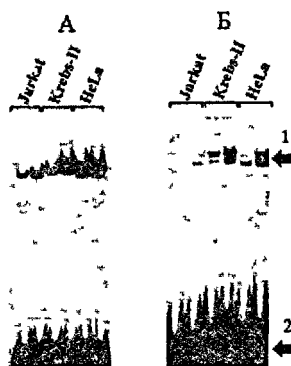


Рис. 1. Сдвиг электрофоретической подвижности (EMSA) с использованием ядерных экстрактов из клеток Jurkat, Krebs-II и HeLa. В качестве зонда использовали двунитевые олигонуклеотиды длиной 30 п.о. (А) и 21 п.о. (Б), содержащие участок связывания ERF. В соседних дорожках нанесены комплексы, образованные при добавлении 5 и 10 мкг белка соответствующего ядерного экстракта. 1 – зона сдвига комплекса олигонуклеотид-белок; 2 – свободный меченый олигонуклеотид.

Относительные количества этих двух комплексов зависят от типа клеток (рис. 1Б), количества ядерного экстракта и других неуставленных факторов. Тем не менее общий белковый состав комплекса с олигонуклеотидом C1/C2 длиной 21 п.о. не отличается от такового с более длинным олигонуклеотидом.

В то же время состав комплексов области U3 LTR HERV-K существенно зависит от состояния клеток. Хорошо известно, что тепловой шок (Moggs, 2003) и митогены, такие как фитогемагглютинин и форболовые эфиры (Gurskaya, 1996), оказывают существенное влияние на профиль экспрессии генов в клетке. Митогены, в частности, индуцируют продукцию эндогенных ретровирусов (Таске, 2003). Мы проследили влияние теплового шока и индукции клеток Jurkat митогенами на состав белкового комплекса, связывающегося с 5'-частью области U3 LTR HERV-K (рис. 2 В,Г). Как видно из рисунка, при воздействии теплового шока и митогенов ДНК-белковый комплекс теряет фактор ERF3, тогда как факторы ERF1 и ERF2 остаются связанными с ДНК. Следует отметить, что комплекс может также включать другие белки, участвующие в связывании через белок-белковые взаимодействия и не связывающиеся с ДНК.

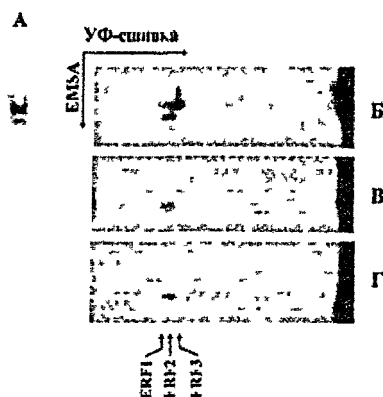


Рис. 2. Результаты эксперимента по EMSA с использованием олигонуклеотида C1/C2 длиной 21 п.о. и ядерного экстракта из клеток линии Jurkat (А), и состав белковых комплексов (Б, В, Г), полученный по результатам двумерного EMSA с ультрафиолетовой сшивкой. Подробности в тексте.

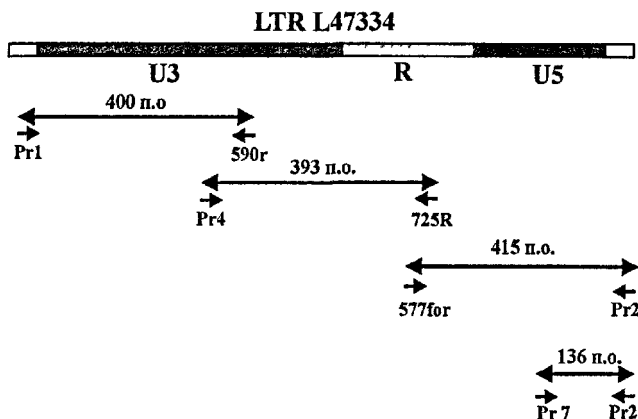


Рис. 3. Структура LTR L47334 и расположение ПЦР-фрагментов, использованных для EMSA.

Полученные результаты демонстрируют, что, по крайней мере, некоторые LTR HERV-K сохранили потенциал для специфических взаимодействий с клеточными белками, что является необходимым условием их вовлечения в функциональную регуляцию генома.

Тканеспецифическое связывание белков другими участками LTR

Для дальнейшего изучения связывания ядерных белков, при помощи ПЦР-амплификации были получены три перекрывающихся фрагмента LTR L47334 длиной 400, 393 и 415 п.о. с использованием пар праймеров, положение которых приведено на рис. 3, а последовательности - в таблице 1. Эти фрагменты были радиоактивно мечены в ходе ПЦР-амплификации и связывающиеся с ними белки выявлены при помощи EMSA с ядерными экстрактами из клеточной линии Jurkat. В эксперимент брали по 500 нг белка ядерного экстракта. Полосы, соответствующие ДНК-белковым комплексам, были обнаружены для всех трёх фрагментов LTR. Можно сделать вывод о том, что все три фрагмента LTR способны связывать белки, отличающиеся по электрофоретической подвижности, однако наиболее эффективно комплекс образуется между 5'-концевым фрагментом LTR и факторами ERF.

Белки, образующие комплексы с фрагментами LTR, были обнаружены в ядерных экстрактах многих клеточных линий. Нами были проверены линии человеческих клеток эмбриональных карцином Тера-1 и NT2/D1, клеток Jurkat, эмбриональной почки 293, нейробластомы NGP, клеток HeLa, а также асцитной опухоли мышей Krebs-П. Присутствие белков ERF в клетках мышей, геном которых не содержит HERV-K, заставляет предположить, что эти белки связываются с регуляторными последовательностями не только HERV, но и клеточных генов.

Тот факт, что белковые комплексы специфически взаимодействуют с LTR, подтверждают эксперименты по конкуренции. Суть метода конкурентного связывания заключается в том, что в реакционную смесь, наряду с радиоактивно меченым специфическим фрагментом ДНК, вносится избыток того же самого фрагмента без метки. В результате этого, из-за конкурентного взаимодействия белка с избытком специфического немеченого фрагмента, сигнал на радиоавтографе уменьшается по отношению к контролю (белок, связавшийся с меченым фрагментом). По мере увеличения концентрации немеченого специфического к белку олигонуклеотида, наблюдается исчезновение сигнала в области комплекса олигонуклеотида с белками ERF, что свидетельствует о специфичности связывания белков ERF с U3 областью LTR.

Идентификация белков, потенциально ответственных за энхансерную активность LTRHERV-K

Ранее в нашей лаборатории было показано, что энхансерная активность LTR HERV-K существенно различается в различных линиях клеток. В частности, были проанализированы близкие по происхождению клеточные линии человека Tera-1 и NT2/D1, полученные из одного и того же типа ткани (тестикулярная эмбриональная карцинома), но от разных индивидуумов. Было продемонстрировано, что в линии клеток Tera-1 LTR L47334 обладает высокой энхансерной активностью (примерно в 10 раз активирует ранний промотор вируса SV40), тогда как в клеточной линии NT2/D1 энхансерная активность LTR практически отсутствует (Domansky, 2002). Одно из возможных объяснений этого факта может состоять в том, что наборы клеточных регуляторных белков, связывающихся с LTR, различны для этих типов клеток. Чтобы проверить эту возможность, мы провели эксперименты по EMSA с использованием ядерных экстрактов из линий клеток Tera-1, NT2/D1 и Jurkat (рис. 4).

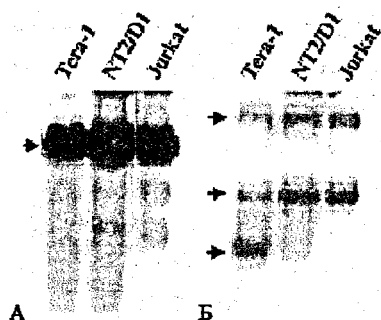


Рис. 4. Эксперимент по EMSA с использованием (А) 5'-области (амплифицирована при помощи праймеров Pr1 и 590r) и (Б) центральной части (амплифицирована при помощи праймеров Pr4 и 725R) LTR L47334 (расположение фрагментов приведено на рис. 3, а последовательности праймеров – в таблице 1). Клеточные линии, использованные для приготовления ядерных экстрактов, обозначены сверху. Стрелками указаны основные ДНК-белковые комплексы. Для наилучшего разделения ДНК-белковых комплексов несвязавшийся радиоактивный зонд был выведен из геля.

Как видно из рис. 4А, не наблюдается различий в связывании факторов ERF между ядерными экстрактами из клеток Тера-1, NT2/D1 и Jurkat. По всей видимости, комплекс с белками ERF не влияет на тканеспецифичность энхансерной активности LTR. В то же время, белковые комплексы, сформированные ядерными экстрактами линии клеток Тера-1 с центральной областью LTR, заметно отличаются от комплексов с ядерными экстрактами линии NT2/D1 или Jurkat (рис. 4Б). Появляется дополнительный ДНК-белковый комплекс с большей электрофоретической подвижностью. Можно предположить, что белок или белки, образующие комплекс с высокой электрофоретической подвижностью, могут быть ответственны за повышенную энхансерную активность LTR в клеточной линии Тера-1.

Таким образом, различие в энхансерной активности между Тера-1 и NT2/D1 может объясняться различным набором клеточных белков, связывающихся с центральной областью LTR.

Связывание белков с негативным регуляторным элементом (NRE)

Ранее в нашей лаборатории при помощи анализа активности репортёрного гена при временной (транзиентной) трансфекции было показано, что LTR HERV-K обладают промоторной активностью в клетках эмбриональной карциномы человека и могут направлять транскрипцию в обоих направлениях относительно репортёрного гена. Кроме того, по результатам делеционного анализа было показано, что 3'-концевой участок области U5 LTR HERV-K обладает свойствами негативного регуляторного элемента (negative regulatory element, NRE) (Domansky, 2000). Так, делеция фрагмента области U5 приводила к повышению промоторной активности LTR независимо от ориентации последнего. Подобные негативные регуляторные элементы были описаны для пенистого вируса (foamy virus) человека (Yang, 1997), и вируса Т-клеточного лейкоза 1 (HTLV-1) (Seiki, 1990, Okumura, 1996).

Чтобы охарактеризовать NRE более детально, нами была проверена способность содержащего NRE фрагмента специфически связывать клеточные белки. Для этого эксперимента содержащий NRE фрагмент LTR L47334 длиной 136 п.о. был амплифицирован при помощи ПЦП с использованием праймеров Pr2 и Pr7 (см. таблицу 1), радиоактивно мечен и использован для EMSA с ядерными экстрактами из нескольких клеточных линий. Белки, способные связываться с NRE-содержащим фрагментом, были обнаружены во всех проверенных клеточных линиях. Специфичность связывания была подтверждена конкуренцией с немеченым фрагментом, содержащим NRE.

По результатам полученных экспериментов можно сделать вывод, что область LTR L47334, содержащая негативный регуляторный элемент, способна связывать клеточные белки, которые, возможно, отвечают за свойства NRE.

Таблица 1. Структуры олигонуклеотидов (праймеров).

Олигонуклеотид	Описание	Структура (5'-3')
590r	Внутренний праймер LTR L47334	GCCATATTTTCAGACTATCACATGG
Pr1	Фланкирующий праймер LTR L47334	CAGTCTTATCTCCTTTACTGACC
Pr2	Фланкирующий праймер LTR L47334	CCTCGTGTTTGTGCTTG
Pr4	Внутренний праймер LTR L47334	ATTGTCCAAGGTTTCTCCC
577for	Внутренний праймер LTR L47334	GCCTTAGGGCTGGAGGTG
725R	Внутренний праймер LTR L47334	CAGCAGACAAACACGTGAAC
Pr7	Внутренний праймер LTR L47334	GGGTCCCCTTATTTCTTTCTC
C1	Зонд для EMSA	AGTAGGAGACTCCATTTTGTT
C2	Зонд для EMSA	CTAACAAAATGGAGTCTCCTA

Выделение белков ERF1, 2 и 3, специфически связывающихся с 5'-концом области U3 LTR HERV-K, и их идентификация

Получение ядерных экстрактов

Белки, специфически связывающиеся с регуляторными элементами LTR человеческих эндогенных ретровирусов семейства HERV-K, были впервые идентифицированы в нашей лаборатории в ядерных экстрактах клеток человека линий Jurkat и CHO и обозначены как ERF1, 2 и 3 (Endogenous Retrovirus Factors) (Akopov et al, 1998). Для дальнейшей функциональной характеристики этих белков необходима идентификация их генов. Наиболее прямой и распространённый до последнего времени метод идентификации генов белковых факторов заключается в очистке белка, определении его N-концевой последовательности, синтезе на основании этой последовательности вырожденных праймеров, комплементарных 5'-концевой области мРНК искомого белка, и клонировании этих мРНК путём ПЦР-амплификации с этим

праймером и олиго-сГГ-праймером на матрице кДНК, синтезированной на суммарной мРНК из содержащих искомые белки клеток. Определение первичной структуры геномов человека и других организмов привело к появлению геномных баз данных, которые уже содержат нуклеотидные последовательности большинства генов. Это позволяет во многих случаях обходиться без секвенирования белков и клонирования кДНК, пользуясь, например, методами масс-спектрометрии (см. ниже). Тем не менее, в любом случае, для нахождения соответствующего белку гена необходимо получение белка в чистом виде в определенном количестве. Основная трудность при этом состоит в весьма малом содержании регуляторных белков - обычно не более десятков или сотен молекул на клетку.

Ядерный экстракт из клеток Jurkat содержит относительно много белков ERF, тем не менее, для их очистки в необходимых количествах (5-30 мкг) требуются десятки миллилитров ядерного экстракта, что соответствует десяткам литров суспензионной культуры клеток. Получение и обработка такого количества клеток весьма трудоёмки и дорогостоящи. Поэтому на первом этапе в качестве источника исследуемых белков нами была выбрана плацента человека, как наиболее доступный тип человеческой ткани. Оказалось, что искомые белки в плаценте содержатся, однако их количество слишком мало для эффективного выделения (данные не приведены).

Так как группа факторов ERF была ранее обнаружена нами в клетках китайского хомячка, а системы регуляции транскрипции у человека и грызунов весьма похожи, мы предположили, что искомые белки могут содержаться и в опухолевых клетках грызунов. Поэтому было предложено в качестве источника ядерных белков использовать клетки асцитной карциномы мышей, которые можно получать в значительных количествах. В результате заражения мышей линии BALB/c была получена асцитная жидкость, содержащая клетки эпителиальной асцитной карциномы мышей Krebs-П, из которых был выделен ядерный экстракт. В ядерном экстракте из асцитной опухоли мышей содержится интересующий нас специфический белковый комплекс в количествах, сравнимых с содержанием его в клетках Jurkat. Таким образом, нами был подобран удобный источник ядерных белков, с высокой аффинностью связывающихся с идентифицированным ранее участком 5'-конца области U3 LTR HERV-K.

Выделение факторов ERF методом ДНК-аффинной хроматографии

Для выделения и очистки ДНК-связывающих белков из ядерных экстрактов клеток асцитной карциномы мышей Krebs-П первоначально нами был использован метод ДНК-аффинной хроматографии (Kadonaga, 1986). Известно, что белки, способные связываться

с ДНК, хорошо взаимодействуют с гепарином, так как структура его повторяющегося олигосахаридного звена напоминает углеводно-фосфатный скелет нуклеиновых кислот. На первом этапе белки, связавшиеся с гепарин-агарозой, элюировали с колонки буфером с высокой концентрацией соли (0,5 М КС1). Полученные элюаты наносили на аффинную колонку с пришитыми к носителю двунитевыми олигонуклеотидами. Аффинный носитель был получен в результате предварительного лигирования олигонуклеотидов, содержащих сайт связывания ERF белка (олигонуклеотиды C1 и C2, см. таблицу 1), с последующей их пришивкой к сефарозе (Arndt-Jovin, 1975). На колонке с таким сорбентом задерживаются белки, образовавшие комплексы разной степени сродства с пришитыми олигонуклеотидами. На следующем этапе были подобраны условия солевой элюции с сорбента белков, образующих с олигонуклеотидами наименее прочные комплексы (0,1 М КС1). Специфические белки, образующие с олигонуклеотидом прочные комплексы, элюировали с сорбента буфером с концентрацией соли 0,4–0,5 М КС1. При использовании этого метода на стадии элюции слабо связывающихся белков наблюдаются, как правило, большие потери (до 80%) специфических белков (таблица 2), что значительно снижает их окончательный выход. Таким образом, рассматриваемый метод ДНК-аффинной хроматографии достаточно трудоёмок, так как требует приготовления специального аффинного носителя для каждого выделяемого белка или комплекса белков. Кроме того, большие потери специфических белков в процессе их выделения приводят к значительному увеличению объемов исходного материала (в данном случае – ядерного

Таблица 2. Сравнение эффективности очистки ДНК-связывающих белков с помощью методов ДНК-аффинной хроматографии и аффинной элюции олигонуклеотидом.

Фракция	Белок (мкг)	Белок (%)	Связывающая активность (%)	Очистка (кратность)
Исходный ядерный экстракт	3200	100	100	1
Белки, элюированные с гепарин-агарозы	270	8,5	92	11
Белки с ДНК-аффинной колонки	0,16	0,005	10	2000
Белки, элюированные с гепарин-агарозы двухцепочечным олигонуклеотидом	1,8	0,06	80	1400

экстракта) и к масштабированию расходов сопутствующих материалов на всех этапах получения белков в количествах, необходимых для их надежной идентификации.

Хотя с помощью метода ДНК-аффинной хроматографии нам удалось выделить белковые факторы ERF1,2 и 3 в практически гомогенном виде (рис. 6Б), выход белка был невелик (таблица 2) и недостаточен для секвенирования или идентификации белков методом масс-спектрометрии.

Выделение факторов ERF методом аффинной элюции олигонуклеотидом C1/C2

Для упрощения процедуры выделения и повышения выхода факторов ERF мы разработали альтернативный метод получения связывающихся с ДНК-белков с использованием иммобилизованного на агарозе гепарина. Гепарин широко используется при выделении ДНК-связывающих белков из разных источников (Genersch, 1995; Cheng, 1997; Gadgil, 1999). Этот отрицательно заряженный полимер можно рассматривать как аналог фосфатного остова ДНК, в связи с этим большинство белков, специфически связывающихся с ДНК, имеют сродство к гепарину. Тем не менее, сродство этих белков к ДНК, содержащей последовательность их специфических участков связывания, значительно выше, чем к гепарину, что дает возможность быстро и эффективно их очищать при помощи элюции низкосолевым буфером, содержащим такую ДНК (рис. 5).

На первом этапе белки ядерного экстракта из клеток асцитной карциномы мышей Krcbs-II были сорбированы на гепарин-агарозном носителе, аналогично тому, как описано выше для первого этапа ДНК-аффинной хроматографии. Далее колонку промывали буфером, содержащим KC1 в такой концентрации, при которой специфические белки с колонки не элюируются (в нашем случае 0,2 М KC1). Белковые факторы ERF далее элюировали тем же буфером, содержащим меченый ^{32}P двунитевой олигонуклеотид с последовательностью, соответствующей участку связывания ERF (C1/C2). Элюированные с колонки фракции анализировали методом EMSA.

Олигонуклеотид вытесняет белки из комплексов с гепарином, в результате чего на выходе с колонки обнаруживаются высоко аффинные комплексы белков с олигонуклеотидом, совпадающие по электрофоретической подвижности с комплексами, получаемыми в присутствии исходного ядерного экстракта. Таким образом, предложенный нами метод очистки ДНК-связывающих белков позволяет получать эти белки в виде комплексов с олигонуклеотидом.

Для оптимизации процесса очистки факторов ERF были проделаны следующие эксперименты:

1. Определена ёмкость гепарин-агарозной колонки. Для этого колонку с гепарин-агарозой (0,5 мл) последовательно нагружали увеличивающимися количествами ядерного экстракта. Насыщение гепарин-агарозы факторами ERF происходило при нанесении на колонку 6,4 мг белка ядерного экстракта. Во всех последующих экспериментах на такую колонку наносили не более 4 мг исходного белка.
2. Проверена полнота элюции факторов ERF с колонки двунитевым специфическим олигонуклеотидом C1/C2. Для этого, после элюции факторов при помощи олигонуклеотида, колонку дополнительно промывали 0,5 М KCl. Количество факторов, элюируемых с колонки высокосолевым буфером после элюции олигонуклеотидом, незначительно.

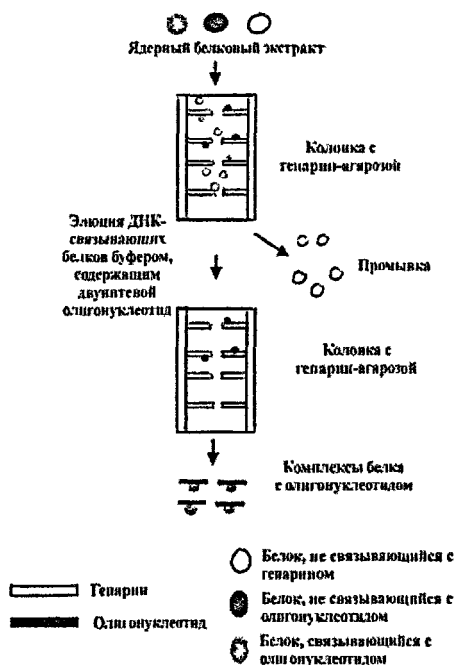


Рис. 5. Схема выделения ДНК-связывающих белков методом аффинной элюции с гепарин-агарозы.

После оптимизации условий был проведен эксперимент по выделению факторов ERF из 1 мл ядерного экстракта (концентрация тотального белка 2,5-3 мг/мл) с

использованием не содержащего радиоактивной метки олигонуклеотида C1/C2. Элюат собирали, концентрировали осаждением трихлоруксусной кислотой и анализировали при помощи белкового денатурирующего электрофореза в присутствии SDS. В состав элюата входят три мажорных белка с молекулярными массами от 60 до 70 кДа, не отличающихся от полученных методом аффинной хроматографии (рис. 6). Постатийные результаты очистки факторов ERF методом аффинной элюции в сравнении с методом ДНК-аффинной хроматографии приведены в таблице 2. Из результатов, представленных в таблице, видно, что при использовании предлагаемого метода аффинной элюции удаётся получить из ядерного экстракта в одну стадию высокоочищенные специфические ДНК-связывающие белки при кратности их очистки в 1400 раз и с выходом примерно на порядок большим, чем при ДНК-аффинной хроматографии.

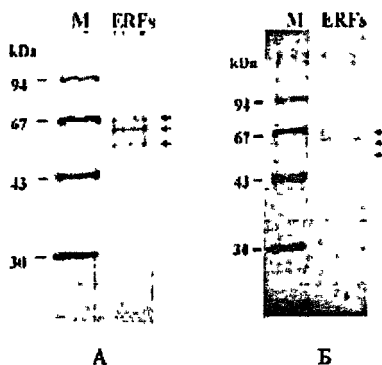


Рис. 6. Электрофорез в ПААГ белков ERF, выделенных двумя способами. (А) белковые факторы ERF, полученные при помощи аффинной элюции. Окраска бромфеноловым синим. (Б) белковые факторы ERF, полученные методом ДНК-аффинной хроматографии. Окраска серебряным реагентом. М - набор стандартных маркерных белков с известными молекулярными массами.

Основными достоинствами метода аффинной элюции по сравнению с ДНК-аффинной хроматографией являются:

1. Метод аффинной элюции намного проще и быстрее, искомым белок может быть выделен за одну стадию в течение одного дня.
2. Потери целевого белка в несколько раз меньше, чем при ДНК-аффинной хроматографии.

3. Нет необходимости в приготовлении специального аффинного носителя для каждого выделяемого белка. Более того, в принципе возможно (хотя экспериментально такая возможность не проверялась) получать несколько различных белков с различной специфичностью связывания из одной порции ядерного экстракта, проводя элюцию с одной и той же колонки различными олигонуклеотидами.

Идентификация ERF(1-3) методом масс-спектрометрии

Исследование белков ERF1, 2 и 3, полученных в результате аффинной элюции с гепарин-агарозы двунитевым олигонуклеотидом C1/C2 и затем разделенных с помощью электрофореза в ПААГ (рис. 6), проводили с помощью метода масс-спектрометрии MALDI-TOF-MS (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry) (Shevchenko, 1996). Предварительно полосу каждого из ERF(1-3) вырезали из полиакриламидного геля, расщепляли трипсином и проводили масс-спектрометрический анализ полученных пептидов. Молекулярные массы выявленных пептидов сопоставляли с молекулярными массами пептидов, входящих в базу данных MASCOT с последующей идентификацией наиболее вероятных белков, включающих выявленные пептиды. В результате такого анализа ERF1 более всего соответствовал конститутивному белку теплового шока Hsc70 (Heat shock 70kDa protein 8, isoform 1, Homo sapiens). Исследование ERF(1-3) с помощью MALDI-TOF-MS-анализа

mskgpavgidlgttyscvgvf~~qh~~gkveiian~~dqgnrtt~~psyaf~~tdter~~ligdaaknqvamnpt
ntvfdakrligrrfddawq8dinkhwpfnwndagrpkvqveykgetksfypeevssinvltkink
eiaea~~ylgk~~vtv~~naw~~tpayfndsqrqatk~~dagtiag~~lnv~~lr~~ineptaaaiaygldkkygae
rnvlifdlgggtfdvsiltiedgifevkst~~ag~~dthlggedfdnrmvnhf iaefkrkhkkdisen
kravrrlRtacerakrtls~~sst~~qasieidslyegidfytsitarfeelnadlfrgtldpveka
lrdakldksqihdivlggstripkiqklqdf fngkelnksinpdeavaygaavqaailsgdk
senvqdlll~~ld~~vtplslgi~~et~~taggvmtvllkrnttiptkqtq~~tt~~tsydnqpgvliqvyegera
mtkdnllgkfeltgippaprgvpqievtfdidangilnvsavdkstgkenkititndkgrlsk
ediermvqeackyaedekqrdkvs sknslesyafnmkatvedeklggkindedkqkildkcne
linwldknqtaekee~~feh~~qqkelekv~~cn~~piltklyqsaggmpggmpggfpgggappsggassgp
tiecevd

Рис. 7. Аминокислотная последовательность белка Hsc70 (AAH16660, Heat shock 70 kDa protein 8, isoform 1, Homo sapiens). Идентифицированные триптические пептиды подчеркнуты.

проводили 6 раз, причем для получения аффинного элюата использовали ядерный экстракт, выделенный в разное время. В результате удалось установить значительную часть аминокислотной последовательности ERF1, совпадающей со структурой белка теплового шока Hsc70 на 66% (рис. 7).

MASCOT-анализ пептидов, полученных в результате триптического гидролиза ERF-2 и ERF-3, не выявил известных белков, включая гипотетические. Это позволяет предполагать, что ERF2 и ERF3 могут быть новыми белками и, соответственно, кодироваться неизвестными пока генами.

EMSA ERF в присутствии антител к Hsc70

Поскольку в настоящее время ничего не известно о непосредственном взаимодействии белков теплового шока, и в частности Hsc70, с нуклеиновыми кислотами, возможно, эту функцию в составе комплекса ERF(1-3):fHНК выполняет ERF2 или ERF3.

Для независимого подтверждения того, что Hsc70 принимает участие в формировании комплекса ERF с LTR HERV-K, мы использовали метод дополнительного сдвига электрофоретической подвижности комплекса в присутствии антител к этому белку. Е.В. Свищевской (группа клеточных взаимодействий отдела иммунологии ИБХ РАН) были получены поликлональные антитела (IgG фракция) к рекомбинантному Hsc70 (любезно предоставлен доктором М. Ladjimi, Universite Pierre & Marie Cune, France). EMSA анализ проводили по стандартной методике (см. Материалы и методы) с той лишь разницей, что к реакционной смеси добавляли антитела. Суть метода заключается в том, что при специфическом взаимодействии антител с белками, связывающимися с меченым фрагментом, комплекс белка с ДНК и антителом будет обладать меньшей электрофоретической подвижностью, нежели просто комплекс ДНК с белком. Разница в электрофоретической подвижности свидетельствует о том, что добавленные антитела специфически связываются с белком, входящим в комплекс с ДНК. На рис. 8 можно видеть, что в присутствии антител образуется комплекс ДНК-белок-антитело, который имеет меньшую электрофоретическую подвижность, чем комплекс ДНК-белок. Полученные данные подтверждают результаты идентификации ERF1 методом MALDI-TOF-MS.

Вестерн-блот анализ ERF с антителами к Hsc70

Мы также исследовали возможность взаимодействия белков фракции ERF с моноклональными антителами к Hsc70, любезно предоставленными доктором Б.А.

Маргулисом (Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург). Анализ проводили по стандартной методике (см. Материалы и методы), предполагающей электрофоретическое разделение белков фракции ERF в ПААГ (Рис. 9А) с последующим их переносом на PVDF-мембрану и инкубацией с моноклональными антителами к Hsc70 (рис. 9Б). На дорожке 3, соответствующей смеси белков ERF1,2 и 3, полученных из ядерного экстракта Rrebs-П методом аффинной элюции, наблюдается полоса, совпадающая по электрофоретической подвижности с Hsc70 (дорожка 2).

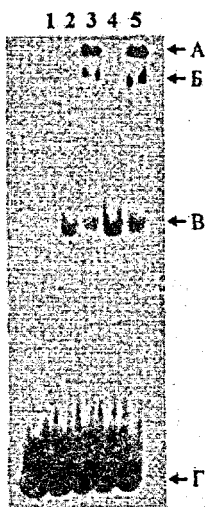


Рис. 8. Результат эксперимента по дополнительному сдвигу электрофоретической подвижности комплекса ДНК-белок в присутствии антител. А, Б, - зоны сдвига комплексов белок-ДНК-антитело; В - зона сдвига комплекса белок-ДНК; Г - свободный меченый фрагмент ДНК. 1 - свободный меченый фрагмент С1/С2 без добавления ядерного экстракта; 2 - 1 мкг общего белка ядерного экстракта из клеточной линии Jurkat; 3 - 1 мкг общего белка ядерного экстракта из клеточной линии Jurkat + 15 мкг анти-Hsc70; 4 - 1 мкг общего белка ядерного экстракта из клеточной линии HeLa; 5 - 1 мкг общего белка ядерного экстракта из клеточной линии HeLa + 15 мкг анти-Hsc70.



Рис. 9. Вестерн-блот анализ ERF с антителами к Hsc70. А - электрофореграмма белков фракции ERF в ПААГ; Б - PVDF-реплика с ПААГ (А), обработанная моноклональными антителами к Hsc70. Вторичные антитела конъюгированы с пероксидазой, в качестве субстрата использовали 4-хлор-1-нафтол. Дор. 1,6 - набор стандартных маркерных белков с известными молекулярными массами; дор. 2 - смесь Hsc70 (70 кДа), бычьего сывороточного альбумина (67 кДа) и глутаматдегидрогеназы (60 кДа); дор. 3 - белки ERF, полученные методом аффинной элюции; 4,5 - ядерный экстракт из клеток Krebs-II (20 и 40 мкг).

Эти данные также подтверждают результаты идентификации ERF1 методом MALDI-TOF-MS. Таким образом, в составе комплекса белков ERF(1-3) с 5'-концом области U3 LTR HERV-K обнаруживается белок, который по триптической пептидной карте и антигенным детерминантам идентифицируется как конститутивный белок теплового шока Hsc70.

ВЫВОДЫ

Состав комплекса 5'-области LTR HERV-K с клеточными белками изменяется при воздействии на клетку теплового шока и митогенных факторов.

Центральная и 3'-концевая области LTR HERV-K, в частности область негативного регуляторного элемента, способны специфически связываться с клеточными белковыми факторами.

В клетках Тега-1, где LTR HERV-K обладает высокой энхансерной активностью, с центральной областью LTR связывается дополнительный клеточный фактор.

Разработан новый метод выделения ДНК-связывающих белков, и с его помощью очищены до гомогенности три белка, образующие специфический комплекс с 5'-областью LTRHERV-K.

При помощи метода масс-спектрометрии MS-MALDI-TOF один из белков, образующих комплекс с 5'-областью LTR HERV-K, был идентифицирован как сходный с конститутивно экспрессирующимся белком теплового шока Hsc70.

Присутствие Hsc70 в составе комплекса с 5'-концом области U3 LTR HERV-K было подтверждено иммунохимическими методами с использованием поликлональных и моноклональных антител.

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ ДИССЕРТАЦИИ ИЗЛОЖЕНЫ В СЛЕДУЮЩИХ ПУБЛИКАЦИЯХ

D.O. Trubetskoy, L.G. Nikolaev, S.B. Akopov, L.L. Zavalova. HSC70 protein is a specifically binding protein to potential LTR HERV-K regulatory element. Mol. Cell. Proteomics, 2004, vol. 3, No. 10, p. S91.

V.M. Ruda, S.B. Akopov, P.O. Trubetskoy, N.X. Manuylov, A.S. Vetchinova, L.L. Zavalova, L.G. Nikolaev, E.D. Sverdlov. Tissue specificity of enhancer and promoter activities of a HERV-K(HML-2) LTR. Virus Res., 2004, vol. 104, No 1, p. 11-16.

D.O. Trubetskoy, L.G. Nikolaev, S.B. Akopov, L.L. Zavalova. Proteomic analysis of proteins specifically binding to potential LTR HERV-K regulatory element. Mol. Cell. Proteomics, 2003, vol. 2, No. 9, p. 992.

P.O. Trubetskoy, L.L. Zavalova, S.B. Akopov, L.G. Nikolaev. Purification of proteins specifically binding human endogenous retrovirus K long terminal repeat by affinity elution chromatography. J Chromatogr A., 2002, vol. 976, No. 1-2, p. 95-101.

P.O. Trubetskoy, L.G. Nikolaev, S.B. Akopov, L.L. Zavalova. Proteomic analysis of proteins specifically binding to potential LTR HERV-K regulatory element. 3rd European Conference & Practical course "Advanced methods for industrial production, purification, and characterization of gene vectors", 14th - 26th June 2004, Evry, France, p. 121.

V.M. Ruda, S.B. Akopov, P.O. Trubetskoy, N.L. Manuylov, A.S. Vetchinova, L.L. Zavalova, L.G. Nikolaev, E.P. Sverdlov. Negative regulatory element (NRE) of US-region of human endogenous retrovirus K LTR does not display cell type specificity. Cold Spring Harbor Laboratory 2004 meeting on retro viruses, CSH, New York, USA, p. 236.

S. Akopov, A. Pomansky, V. Ruda, N. Manuylov, A. Vetchinova, P. Trubetskoy, E. Kopantzev, L. Zavalova, L. Nikolaev, E. Sverdlov. Functional activity of human endogenous retrovirus K long terminal repeats. 2nd International Workshop "Retrotransposons and genome evolution" 20-22.04.2003 (тезисы докладов, с. 13, Сочи, Россия).

С.Б. Акопов, А.Н. Доманский, В.М. Руда, Д.О. Трубецкой, Е.П. Копанцев, Л.Л. Завалова, Л.Г. Николаев, Е.Д. Сverdlov. Длинные концевые повторы эндогенных ретровирусов человека семейства К - анализ функциональной активности. VI чтения, посвященные памяти академика Ю.А. Овчинникова, 25.11-2.12.2002 (тезисы докладов, с.45, Москва-Пушино), Россия.

P.O. Trubetskoy. Isolation of proteins binding to specific PNA sequences by affinity desorption chromatography. Students Abstracts of FEBS advanced course No 02-11, 2002, p.12.

P.O. Trubetskoy, L.G. Nikolaev, L.L. Zavalova. Isolation of proteins binding to specific PNA sequences by affinity desorption chromatography - PAGE. Book of abstracts of HTC 7, Febr.6-8, 2002, p. 161.

Заказ № 344. Объем 1 пл. Тираж 100 экз.
Отпечатано в ООО «Петроруш».
г. Москва, ул. Палиха-2а, тел. 250-92-06
www.postator.ru

OR. 10