

Учреждение российской академии наук
Институт биоорганической химии
им. академиков М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова РАН

На правах рукописи

Серебровская Екатерина Олеговна

**ГЕНЕТИЧЕСКИ КОДИРУЕМЫЙ ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОР КАК
ИНСТРУМЕНТ ВОЗДЕЙСТВИЯ НА ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ И СКОРОСТЬ
ПРОЛИФЕРАЦИИ КЛЕТОК ЭУКАРИОТ**

Специальность – 03.01.03 – молекулярная биология

АВТОРЕФЕРАТ

Диссертации на соискание ученой степени
Кандидата биологических наук

Москва 2011

Работа выполнена в лаборатории молекулярной иммунологии Института биоорганической химии им. академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН (ИБХ)

Научный руководитель:

доктор биологических наук **Сергей Михайлович Деев**

Официальные оппоненты:

Габибов Александр Габибович, доктор химических наук, профессор, чл.-корр. РАН, заведующий лабораторией биокатализа Института биоорганической химии им. М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН

Соболев Александр Сергеевич, доктор биологических наук, профессор, заведующий лабораторией молекулярной генетики внутриклеточного транспорта Института Биологии Гена РАН.

Ведущая организация:

Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН.

Защита состоится «9» ноября 2011 г. в 10:00 на заседании диссертационного совета Д.002.019.01 при Институте биоорганической химии им. академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН (ИБХ) по адресу: 117997, ГСП-7, Москва В-437, ул. Миклухо-Маклая, д. 16/10.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института биоорганической химии им. академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН (ИБХ).

Автореферат разослан «7» октября 2011 г.

**Учёный секретарь диссертационного совета,
доктор физико-математических наук**

В. А. Олейников



Характеристика работы

Актуальность проблемы

Зеленый флуоресцентный белок GFP стал основой для разработки целого набора востребованных современных технологий для молекулярной и клеточной биологии и биомедицинских исследований. Потенциал открытия GFP и его внедрения в повседневную экспериментальную практику был оценен Нобелевской премией по химии 2008 года. Наиболее широко флуоресцентные белки используются в качестве меток для наблюдения за локализацией, структурой, перемещением клеток, клеточных органелл и отдельных белков. Однако по мере продвижения фундаментальных исследований в области фотохимии флуоресцентных белков становится очевидно, что они являются фотохимически активными молекулами, то есть способны вступать во взаимодействия с окружающими веществами под воздействием света. Это открывает широкие перспективы для создания на основе флуоресцентных белков различных методов воздействия на процессы жизнедеятельности клетки, которые будут востребованы для решения как фундаментальных, так и прикладных задач.

Недавно был получен фотоактивный красный флуоресцентный белок KillerRed, способный продуцировать активные формы кислорода (АФК) при облучении зеленым светом. Было показано, что при его экспрессии в бактериальных и эукариотических клетках облучение вызывает гибель клеток с различной эффективностью. Активные формы кислорода могут повреждать клеточные мембраны, белки и ДНК, однако их действие ограничено коротким временем жизни, не позволяющим их повреждающему действию распространиться на большие расстояния. Настоящая работа посвящена разработке на основе белка KillerRed методов направленного уничтожения специфических клеточных популяций, разрушения органелл и активации механизмов, останавливающих деление клетки.

Цели и задачи работы

Целью данной работы являлась разработка методов направленной доставки генетически кодируемого фотосенсибилизатора KillerRed к опухолевым клеткам и повышение эффективности фототоксического действия KillerRed путем нацеливания его в ядро. В рамках поставленной цели были сформулированы следующие экспериментальные задачи: 1) создать генетическую конструкцию для экспрессии в бактериальных клетках гибридного белка, состоящего из анти-HER2/neu-миниантитела 4D5scFv и фотосенсибилизатора KillerRed, экспрессировать гибридный белок в *E. coli*, очистить и оценить его фототоксическое действие в отношении клеток, несущих опухолевый маркер HER2/neu; 2) создать генетическую

конструкцию для экспрессии, оценить фототоксичность и охарактеризовать механизм фототоксического действия гибридного белка, состоящего из гистона H2B на N-конце и tandemного повтора KillerRed на C-конце.

Научная новизна и практическая ценность работы

Впервые экспрессирован, выделен и очищен гибридный белок 4D5scFv-KillerRed. Продемонстрирована его специфичность к HER2/neu-антигену. Охарактеризована его фототоксичность в отношении клеток SKOV-3, гиперэкспрессирующих поверхностный HER2/neu-антиген, а также в отношении контрольных клеток СНО, не несущих данного антигена. Сконструированный белок является первым примером полностью генетически кодируемого иммунофотосенсибилизатора.

Создана генетическая конструкция, содержащая под контролем вирусного промотора гибридный ген, состоящий из нуклеотидной последовательности корового гистона H2B на N-конце и tandemно повторенной нуклеотидной последовательности гена флуоресцентного белка KillerRed на C-конце. Показано, что гистон H2B в составе такого гибридного белка (далее H2B-tKR) сохраняет свои функциональные свойства, и его экспрессия не нарушает деление клетки. Обнаружено, что облучение зеленым светом клеток, экспрессирующих такой гибридный белок, приводит к отсроченному митозу, по сравнению с клетками, находящимися в аналогичных условиях и не содержащих KillerRed. С помощью коэкспрессии белка XRCC1-YFP показано, что после облучения клеток, экспрессирующих H2B-tKR, в ядре облученных клеток возникают множественные очаги репарации ДНК, что свидетельствует о повреждении ДНК, вызванном облучением.

Структура диссертации

Диссертационная работа изложена на 119 страницах и состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, результатов и их обсуждения, выводов и списка цитируемой литературы, включающего 192 ссылки. Диссертация содержит 37 рисунков и 3 таблицы.

Апробация работы

Работа прошла апробацию на XIX Международной зимней школе молодых ученых «Перспективные направления биохимии, биофизики, молекулярной биологии и биотехнологии» (2007, Москва); XI Общероссийском форуме «Дни иммунологии в Санкт-Петербурге» (2007, Санкт-Петербург); Международной конференции молодых ученых в области биологических наук (Неймеген, Нидерланды, 2010); Конференции

молодых ученых «Фундаментальная наука для биотехнологии и медицины-2010» (Москва, 2010).

Публикации

По материалам работы опубликовано 4 статьи в рецензируемых журналах.

Содержание работы

I. Создание генетически кодируемого иммунофотосенсибилизатора

Фотодинамическая терапия является многообещающим подходом к лечению рака благодаря а) отсутствию системной токсичности применяемых веществ в отсутствие облучения светом, б) возможности облучать непосредственно опухоль, не затрагивая окружающие ткани, в) возможности одновременно воздействовать на несколько новообразований и г) возможности применения повторной терапии для улучшения ответа. При облучении фотосенсибилизатора светом соответствующей длины волны в присутствии кислорода образуются короткоживущие активные формы кислорода, которые способны с высокой эффективностью окислять клеточные компоненты вблизи того места, где они были произведены. Для достижения необходимого терапевтического эффекта процедура не должна затрагивать здоровые окружающие ткани, а следовательно, продукция активных форм кислорода должна быть пространственно ограничена опухолевой тканью. Фотодинамическая терапия предоставляет два пути контроля селективности воздействия: а) с помощью преобладающего накопления фотосенсибилизатора в опухоли; б) с помощью пространственно ограниченного облучения. Многие фотосенсибилизаторы при системном введении обладают свойством предпочтительно накапливаться в опухоли, а не в нормальных тканях. Однако такой селективности может быть недостаточно, поскольку при применении эффективных доз пациенты, независимо от успешности лечения, страдают впоследствии от фотосенсибилизации кожных покровов к солнечному свету.

Направленные макромолекулярные конъюгаты, использующие специфическую аффинность к поверхностным опухолевым маркерам (узнавание лиганда рецептором или антигена антителом), могут обладать большей специфичностью. В этом случае фотосенсибилизатор химически присоединяется, например, к моноклональному антителу. В частности, для HER2/neu-гиперэкспрессирующих клеток было создано несколько химических конъюгатов фотосенсибилизаторов с анти-HER2/neu-антителами. Основным недостатком химической конъюгации является недостаточная воспроизводимость синтеза конъюгатов, а также потеря аффинности антител или эффективности фотосенсибилизатора. Кроме того, химический подход не позволяет использовать такие перспективные пути доставки фотоиммуноконъюгатов, как

создание клеточных линий, секретирующих иммуноконъюгаты непосредственно в кровотоки. Недавно был создан фототоксический красный флуоресцентный белок KillerRed. Будучи на данный момент единственным полностью генетически кодируемым фотосенсибилизатором, KillerRed может быть использован для создания генетически кодируемого иммунофотосенсибилизатора, нацеленного на бактериальные или опухолевые клетки с помощью миниантител. Такая гибридная молекула была бы лишена недостатков химических конъюгатов антител и фотосенсибилизаторов.

Для клеток млекопитающих наибольшая фототоксичность была обнаружена при экспрессии KillerRed на внутренней стороне плазматической мембраны.

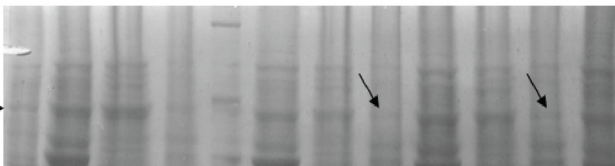
Одноцепочечные миниантитела считаются перспективными терапевтическими молекулами благодаря их высокой проникающей способности, отсутствию побочных реакций, связанных с константными доменами, а также удобству создания рекомбинантных генетических конструкций, например, scFv-связанных токсинов, ферментов для активации молекул-предшественников терапевтических веществ. Также существует возможность конструирования мультивалентных и мультиспецифических молекул с помощью димеризующих доменов различной природы. Антитело 4D5 отличается высокой термодинамической стабильностью и способностью к фолдированию, благодаря чему оно было неоднократно использовано как каркас для встройки различных антигенсвязывающих участков.

Экспрессия, выделение и очистка рекомбинантного белка 4D5 scFv-KillerRed-His₅

Для получения штаммов-продуцентов использовали генетическую конструкцию pSD-4D5 scFv-KillerRed-His₅, содержащую ген рекомбинантного белка 4D5 scFv-KillerRed-His₅ под контролем lac-промотора. Плазмида была создана в ходе данной работы на основе плазмиды PIG6, предназначенной для экспрессии иммуноглобулинов в клетках *Escherichia coli*. Белок 4D5 scFv-KillerRed-His₅ состоит из N-концевого анти-HER-2/neu мини-антитела – scFv 4D5, гибкой линкерной последовательности, белка KillerRed и олигогистидиновой метки на C-конце.

Плазмидным вектором pSD-4D5 scFv-KillerRed-His₅ трансформировали клетки *E.coli* штаммов SB536 и BL21(DE3). Уровень экспрессии целевого белка в этих штаммах, при различной температуре и концентрации индуктора изопропилтиогалактозида (ИПТГ) оценивали методами электрофореза в полиакриламидном геле в денатурирующих условиях (**Рис. 1**) и Вестерн-блот анализа (**Рис. 2, 3**). Наибольший уровень экспрессии растворимого 4D5 scFv-KillerRed-His₅ был получен в культуре продуцента *E.coli* штамм SB536 при 0.5 mM IPTG и температуре 27 °C.

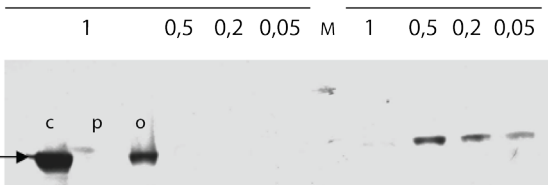
ИПТГ (мМ) 0

1				0,5				0,2				0,05			
с	о	р	M	с	о	р	с	о	р	с	о	р	с	о	р
															

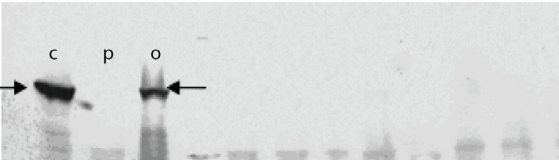
SB536

Время
индукции

ИПТГ (мМ)

3 ч					20 ч				3 ч		
1	0,5	0,2	0,05	м	1	0,5	0,2	0,05	1	0,5	0,2
											

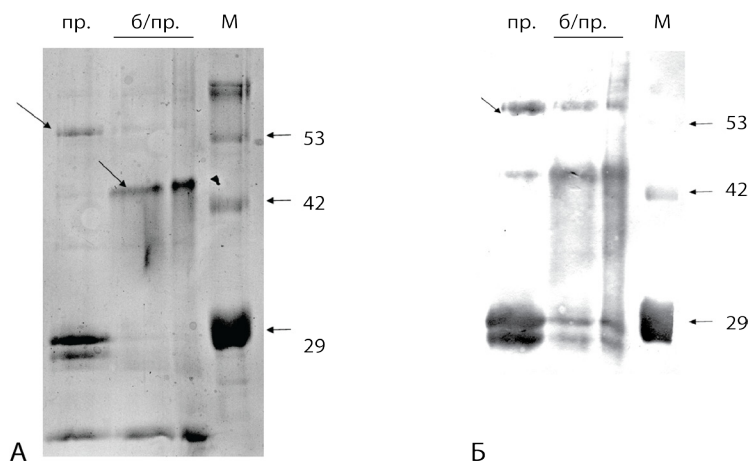
BL21(DE3)

Время индукции	3 ч					20 ч				3 ч		
ИПТГ (мМ)	1	м	0,5	0,2	0,05	1	0,5	0,2	0,05	1	0,5	0,2
												

Таким образом, в качестве продуцента белка 4D5 scFv-KillerRed-His₅ выбрали штамм SB536 *E.coli*. Целевой белок выделяли из осветленного центрифугированием лизата методом никель-аффинной хроматографии. Аутентичность полученного белка

Figure 2 consists of three panels. Panel A is an SDS-PAGE gel showing the purification of 4D5 scFv. Lane M contains molecular weight markers at 53, 42, and 29 kDa. Lanes 1 and 2 show the purified scFv, with lane 2 showing a higher concentration. Panel B is a dot blot showing the binding of barbiturate to 4D5 scFv. Lane M contains molecular weight markers. Lanes 1 and 2 show the binding of barbiturate to 4D5 scFv, with lane 2 showing a higher concentration. Panel C is a fluorescence micrograph showing the binding of 4D5 scFv to barbiturate (red spots) and KillerRed (yellow spot).

Электрофоретическое исследование показало наличие дополнительных полос, соответствующих меньшим молекулярным массам по сравнению с молекулярной массой целевого белка. Чтобы выяснить, присутствуют ли продукты разложения 4D5 scFv-KillerRed-His₅ в препарате, или их образование связано с методом подготовки образца для электрофоретического разделения, в частности, с кипячением образца в буфере для нанесения, электрофоретическое разделение и последующий Вестерн-блот анализ препарата проводили как по стандартной методике, так и без прогревания образца в буфере для нанесения (**Рис. 5, А, Б**). Обнаружили, что на электрофореграмме препарата, не подвергавшегося прогреванию, присутствует только одна дополнительная полоса (**Рис. 5, А**), которая не проявляется антителами к гистидиновой метке при Вестерн-блот анализе (**Рис. 5, Б**). Таким образом, в полученном препарате помимо целевого белка присутствует один примесный белок, а остальные дополнительные полосы на электрофореграмме являются следствием деградации 4D5 scFv-KillerRed-His₅ при прогревании в буфере для нанесения.



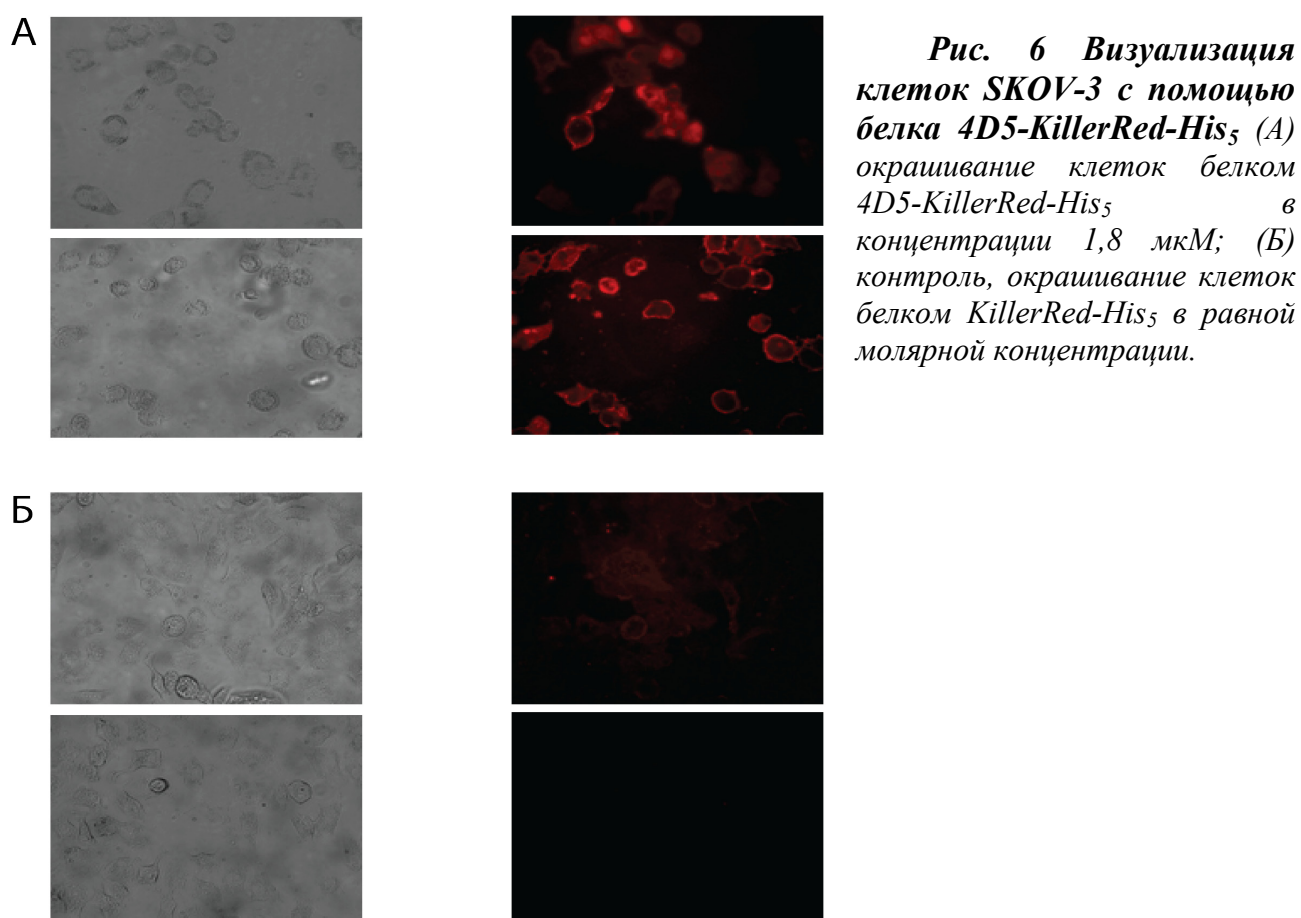
6

Явление деградации при нагревании описано ранее для флуоресцентных белков, содержащих DsRed-подобный хромофор, и выражается в гидролизе полипептидной цепи на 2 фрагмента между аминокислотными остатками, непосредственно предшествующими хромофору.

Выход 4D5 scFv-KillerRed-His₅, выделенного с помощью никель-аффинной хроматографии составлял 0,3-0,5 мг в расчете на 1 л культуры продуцента. Для дальнейшей очистки препарата использовали эксклюзионную хроматографию на колонке Superdex 200 10/300 GL.

Характеристика специфичности связывания 4D5-KillerRed-His₅.

С полученным препаратом рекомбинантного белка 4D5-KillerRed- инкубировали клетки SKOV-3 и анализировали связывание с помощью флуоресцентной микроскопии (Рис. 6, А). В качестве контроля специфичности связывания использовали препарат KillerRed-His₅ (Рис. 6, Б) в равной молярной концентрации, а также анализировали конкурентное ингибирование связывания 4D5-KillerRed-His₅ и 4D5-His₅ (Рис. 7, А, Б).



Было показано специфическое ингибирование связывания рекомбинантного белка (уменьшение интенсивности флуоресценции) при добавлении эквимоллярной концентрации мини-антитела 4D5-His₅. Полученные данные свидетельствуют о том,

что связывание рекомбинантного белка *4D5-KillerRed-His₅* с клетками, гиперэкспрессирующими опухолевый маркер HER2/neu, является специфическим. Полученный рекомбинантный белок может быть использован для визуализации опухолевых клеток.

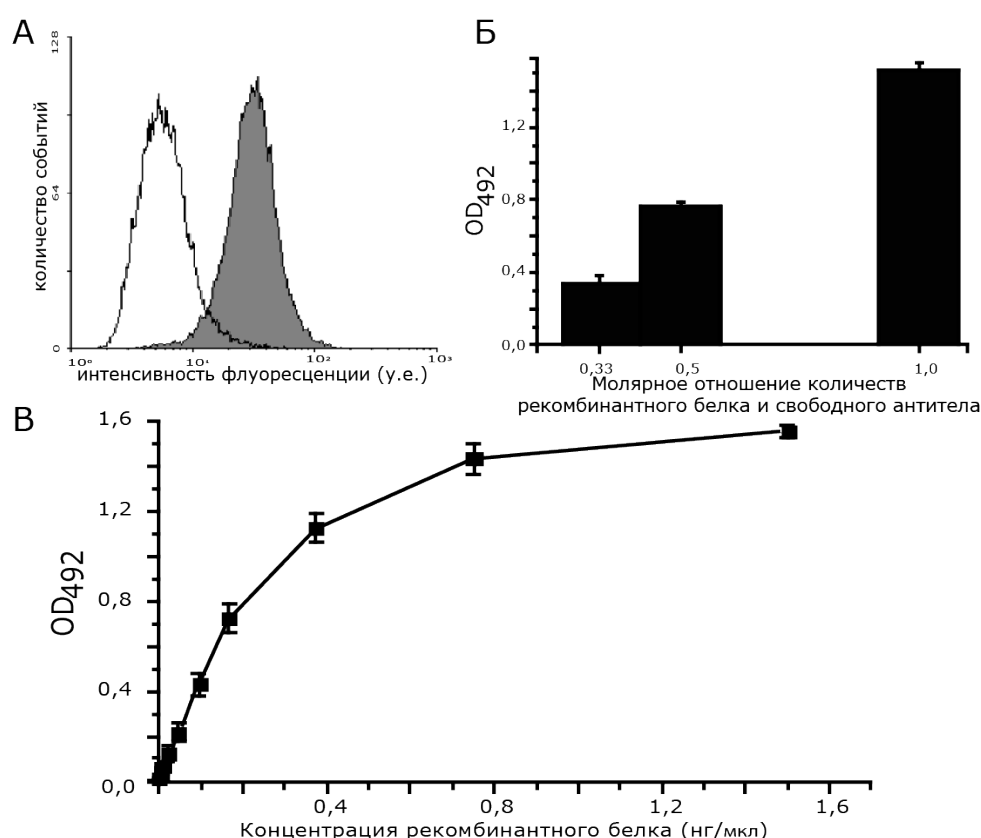
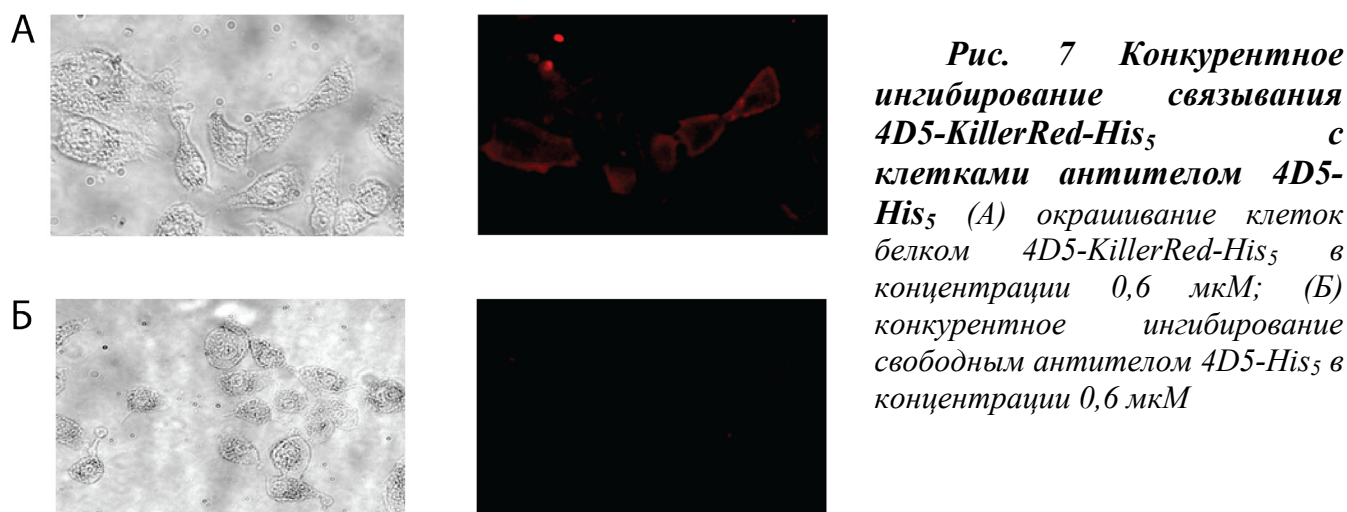


Рис. 8 Анализ специфичности связывания 4D5-KillerRed-His₅ с HER2/neu антигеном. (А) – Проточно-цитофлуориметрический анализ клеток SKOV-3 после инкубации со свободным белком KillerRed-His₅ (график без заливки), а также после инкубации с рекомбинантным белком 4D5-KillerRed-His₅ (серая заливка). (Б) – Твердофазный иммуноферментный анализ с конкуренцией. (В) – Твердофазный иммуноферментный анализ с иммобилизованным HER2/neu антигеном (\pm SD).

С помощью проточной цитофлуориметрии было показано возрастание средней интенсивности флуоресценции детектируемых событий после инкубации клеток SKOV-3 с рекомбинантным белком 4D5-KillerRed-His₅ и отсутствие такового после инкубации с KillerRed-His₅ (Рис. 8, А).

Также специфичность связывания 4D5-KillerRed-His₅ с антигеном HER2/neu была показана с помощью твердофазного иммуноферментного анализа с антителами к одноцепочечному антителу 4D5 scFv (Рис. 8, В) и с помощью иммуноферментного анализа в присутствии конкурирующего свободного антитела 4D5 с детекцией антителами к белку KillerRed (Рис. 8, Б).

Фототоксичность рекомбинантного белка 4D5-KillerRed-His₅.

Основной задачей данной части работы явилась оценка влияния рекомбинантного белка 4D5-KillerRed-His₅ на жизнеспособность клеток SKOV-3, гиперэкспрессирующих опухолевый маркер HER2/neu. Поскольку 4D5-KillerRed-His₅ – фотоактивируемый белок, анализ жизнеспособности проводили в 2 режимах: с облучением и без облучения. После связывания рекомбинантного белка с клетками, проводили облучение белым светом мощностью 1 Вт/см². Жизнеспособность клеток через 72 ч оценивали с помощью МТТ-теста. Дозозависимые кривые (Рис. 9) наглядно иллюстрируют, что снижение жизнеспособности клеток SKOV-3 наблюдалось после обработки их белком 4D5-KillerRed-His₅ и последующего облучения с помощью источника белого света мощностью 1 Вт/см² с расстояния 2 см.

При аналогичной обработке клеток, не гиперэкспрессирующих рецептор HER2/neu, снижения жизнеспособности не наблюдалось. Также не наблюдалось снижения жизнеспособности при обработке клеток SKOV-3 белками 4D5scFv и KillerRed (Рис. 10).

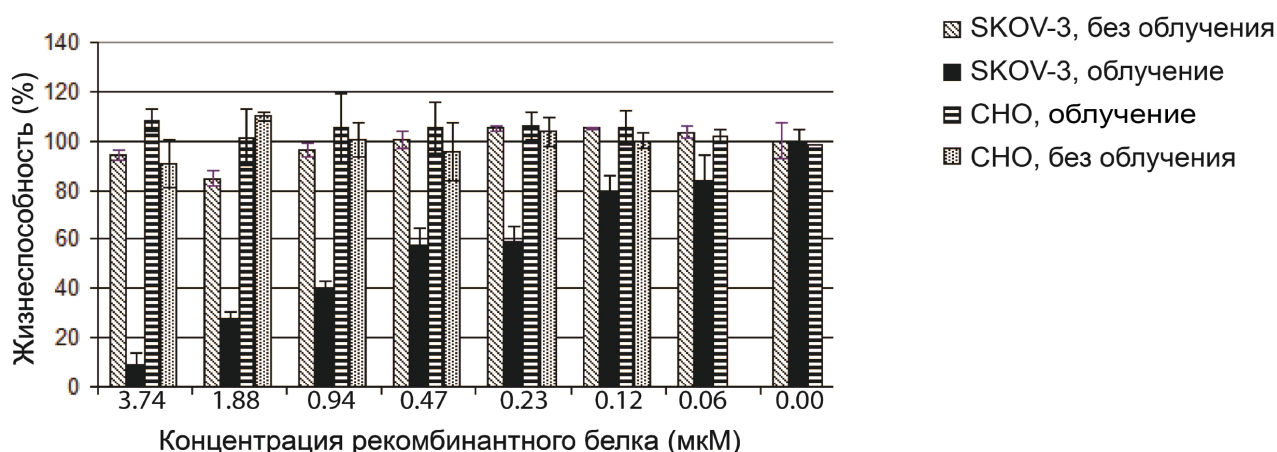


Рис. 9 Анализ жизнеспособности клеток SKOV-3 и CHO после инкубации с белком 4D5 scFv-KillerRed-His₅ и облучения(± стандартное отклонение).

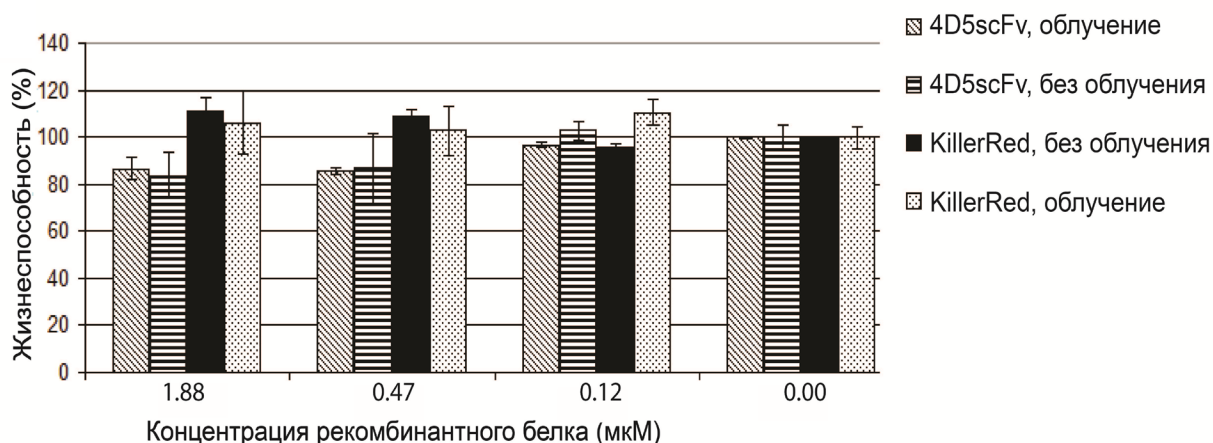


Рис. 10 Анализ жизнеспособности клеток SKOV-3 после инкубации с белками 4D5 scFv и KillerRed и облучения (\pm стандартное отклонение).

Генерация активных форм кислорода может инициировать апоптоз, например, в результате процессов, ассоциирующихся с клеточной деградацией. Определенные виды клеток (например, нейроны, гепатоциты, клетки эндотелия) подвержены такому виду апоптоза *in vivo*. Кроме того, многие *in vitro*-модели апоптоза также включают генерацию активных форм кислорода и/или нарушение клеточного гомеостаза. Поэтому именно антиоксиданты (токоферол, N-ацетилцистеин, аскорбиновая кислота) являются одними из самых эффективных агентов, предотвращающих апоптоз, что свидетельствует о том, что окислительный стресс является одним из общих медиаторов цитотоксичности.

Механизм гибели опухолевых клеток в описанной системе включает генерацию активных форм кислорода. Однако конкретные пути, приводящие к клеточной гибели в данной системе, требуют дополнительного изучения.

II. Тандем белка KillerRed в составе белка слияния с коровым гистоном H2B вызывает временную остановку клеточного цикла

В данной работе была создана генетическая конструкция для экспрессии тандемной версии белка KillerRed, слитого с коровым гистоном H2B. Известно, что слияние гистонов с димерными флуоресцентными белками приводит к нарушению функции гистонов и, как следствие, к нарушению деления клеток, экспрессирующих слитый белок. Для того, чтобы преодолеть эту проблему, был создан тандемный конструктор (tKR), включающий две копии последовательности KillerRed, соединенных с помощью гибкого линкера. Ожидалось, что KillerRed в составе такого конструктора будет преимущественно образовывать внутримолекулярные димеры и, следовательно, вести себя как псевдомонмерная метка, как это было описано для ряда других димерных флуоресцентных белков. И действительно, актин в составе белка слияния с tKR демонстрировал корректную внутриклеточную локализацию (Рис. 11, А), а клетки млекопитающих, временно трансфицированные tKR, слитым с

геном, кодирующим коровый гистон H2B, демонстрировали корректное мечение хроматина и были способны к нормальному митозу (**Рис. 11, В**).

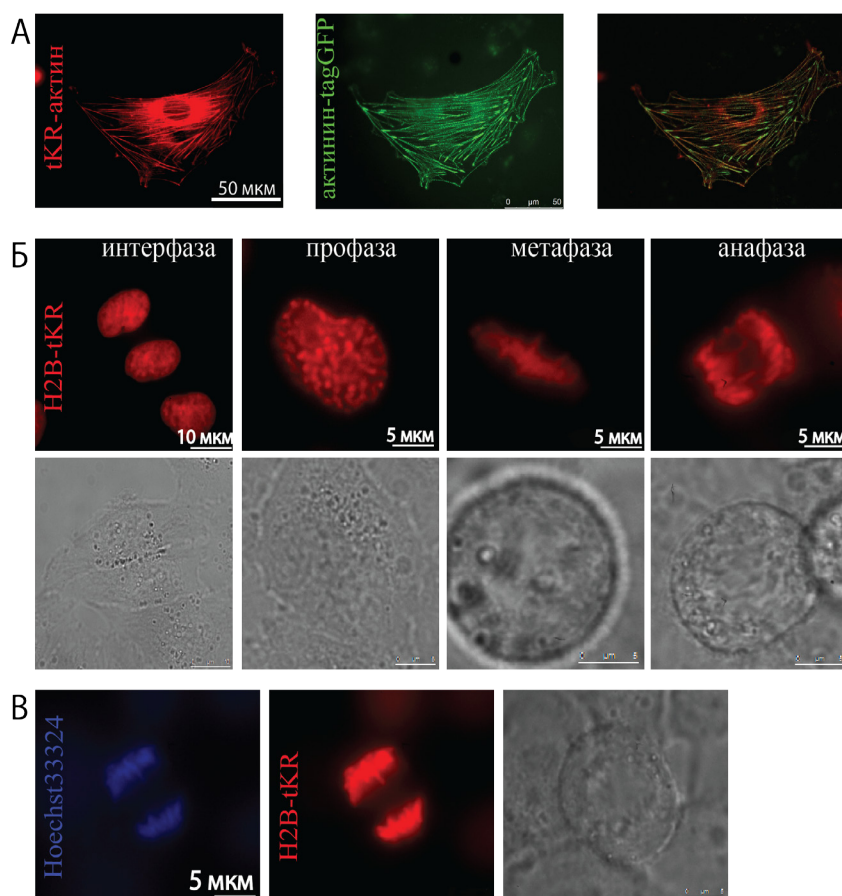


Рис. 11
Функциональность
целевых белков при
использовании тандема
KillerRed в качестве
флуоресцентной метки.
(А) Широкопольная
микрофотография клетки,
коэкспрессирующей tKR-
актин и α-актинин-TagGFP, в
красном и зеленом каналах
флуоресценции.

(Б) Клетки, стабильно
экспрессирующие H2B-tKR, на
различных стадиях
клеточного цикла. Верхний
ряд – красная флуоресценция,
нижний – проходящий свет.

(В) Окрашивание клеток,
стабильно экспрессирующих
H2B-tKR, ДНК-связывающим
красителем Hoechst-33324.

Кроме того, была создана клеточная линия, стабильно экспрессирующая генетическую конструкцию H2B-tKR, в которой встречались клетки на различных стадиях клеточного цикла, включая все стадии митоза (**Рис. 11, Б**). Это также свидетельствует о том, что экспрессия H2B-tKR не нарушает клеточное деление.

Задержка клеточного деления при облучении

Фототоксический эффект H2B-tKR первоначально изучали при помощи флуоресцентной микроскопии. В первой серии экспериментов клетки линии HeLa Kyoto, временно или стабильно экспрессирующие H2B-tKR, облучались зеленым светом с помощью флуоресцентного микроскопа (540-580 нм, 0,5 Вт/см², 2 мин). Затем продолжали наблюдение за облученными клетками с помощью флуоресцентного микроскопа в течение 12 - 48 ч. В течение первых 24 ч наблюдалось полное блокирование клеточного деления в клетках, экспрессирующих H2B-tKR (**Рис. 12, А, Б**). В течение этого времени ядра клеток сохраняли интерфазную морфологию, ни одна из клеток не поделилась. В то же время, клетки, не экспрессирующие H2B-tKR (нетрансфицированные или трансфицированные EGFP), сохраняли способность к делению, и количество их удвоилось в течение эксперимента. Все облученные клетки, как экспрессирующие H2B-tKR, так и

контрольные, не проявляли признаков клеточной гибели (открепления от субстрата, сжатия цитоплазмы, блеббинга (пузырения) мембраны). В течение последующих 24 ч клетки с H2B-tKR восстанавливали способность к делению.

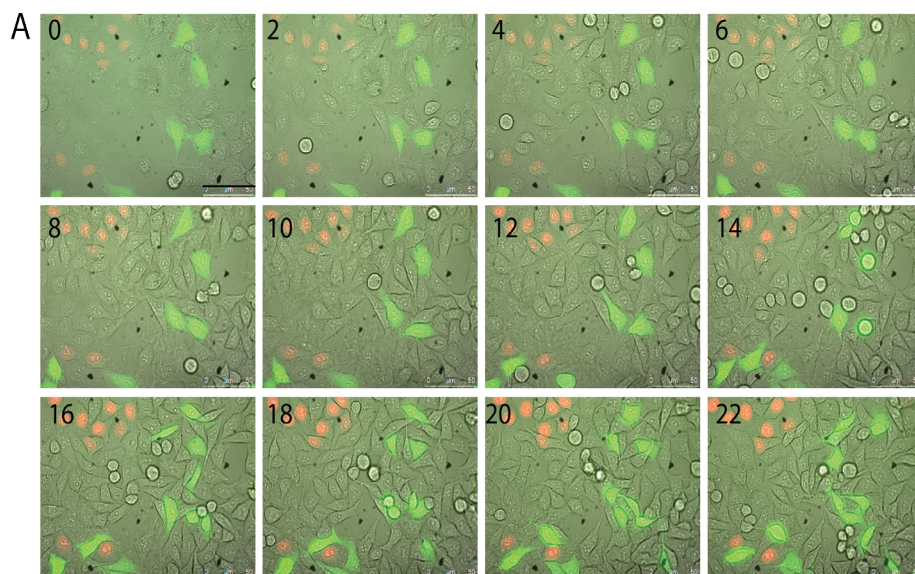


Рис. 12 *Задержка деления при облучении клеток, экспрессирующих H2B-tKR. (А) Смесь клеток, экспрессирующих H2B-tKR, EGFP и нетрансфицированных, облученная зеленым светом. Серия изображений, полученных после наложения микрофотографий в зеленом и красном каналах флуоресценции, а также в проходящем свете. Указано время с момента облучения в часах. Масштабная линейка 50 мкм. (Б) Числовое представление данных, полученных при наблюдении клеток, приведенных на панели А.*

Б	До облучения После облучения	
	11	10
Клетки, стабильно экспрессирующие H2B-tKR		
Клетки, стабильно экспрессирующие EGFP	6	14
Нетрансфицированные клетки	54	112

Для получения статистически значимых данных о воздействии света на скорость пролиферации культуры клеток с H2B-tKR, с помощью лентивирусной трансдукции клеток HeLa Kyoto была создана клеточная линия, стабильно экспрессирующая H2B-tKR. Популяция наиболее ярко флуоресцирующих клеток была выделена с помощью проточной флуоресцентной сортировки клеток, зараженных лентивирусными частицами.

Для оценки воздействия облучения на такую культуру были использованы метод оценки клеточного цикла по окрашиванию йодистым пропидием, а также клоногенный метод с подсчетом числа клеток в отдельных колониях.

Через 8 ч после облучения белым светом с интенсивностью 200 мВт/см^2 клетки открепляли от субстрата, фиксировали этанолом и окрашивали йодистым пропидием. Йодистый пропидий количественно связывается с ДНК, что позволяет оценить процентное содержание клеток, находящихся в различных фазах клеточного цикла. В культуре клеток, экспрессирующих H2B-tKR, после облучения наблюдалось увеличение доли клеток, находящихся в S-фазе клеточного цикла, за счет уменьшения доли клеток в фазах G1 и G2/M (**Рис. 13, А-Б**). При облучении нетрансфицированных клеток HeLa Kyoto подобного эффекта не наблюдалось (**Рис. 13, В-Г**).

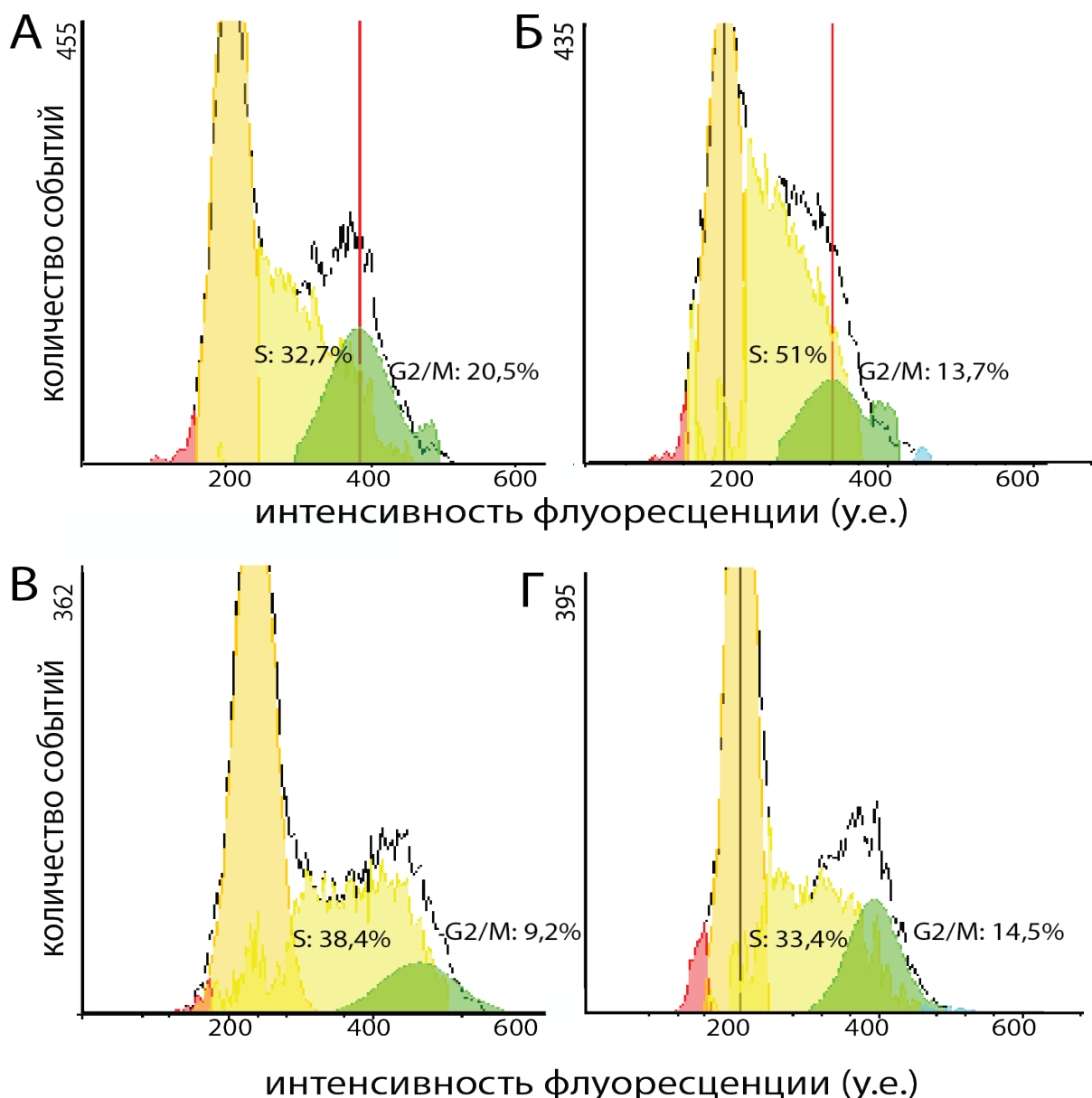


Рис. 13 Снижение доли клеток в фазе G2/M в популяции клеток, стабильно экспрессирующих H2B-tKR, после облучения. (А) Клетки HeLa Kyoto H2B-tKR без облучения. (Б) Клетки HeLa Kyoto H2B-tKR с облучением (В) Контрольные клетки HeLa Kyoto без облучения. (Г) Контрольные клетки HeLa Kyoto с облучением. Зеленая заливка показывает клетки в фазе G2/M, желтая – в фазе S.

Способность клеточной линии HeLa Kyoto к образованию колоний позволила также оценить скорость пролиферации клеточной культуры с помощью модифицированного клоногенного метода с подсчетом числа клеток в индивидуальных колониях. После облучения суспензии клеток белым светом с интенсивностью 200 мВт/см^2 клетки рассеивали на чашки с таким расчетом, чтобы после 48 ч культивации были по-прежнему различимы индивидуальные колонии, образованные потомками единичных клеток. Через 8, 22 и 29 ч после облучения подсчитывали число клеток в индивидуальных колониях. Число клеток в колонии

считали характеристикой способности к пролиферации отдельной клетки исходной суспензии. Метод показал достоверное снижение среднего числа клеток в колониях облученных клеток, стабильно экспрессирующих H2B-tKR (**Рис. 14**).

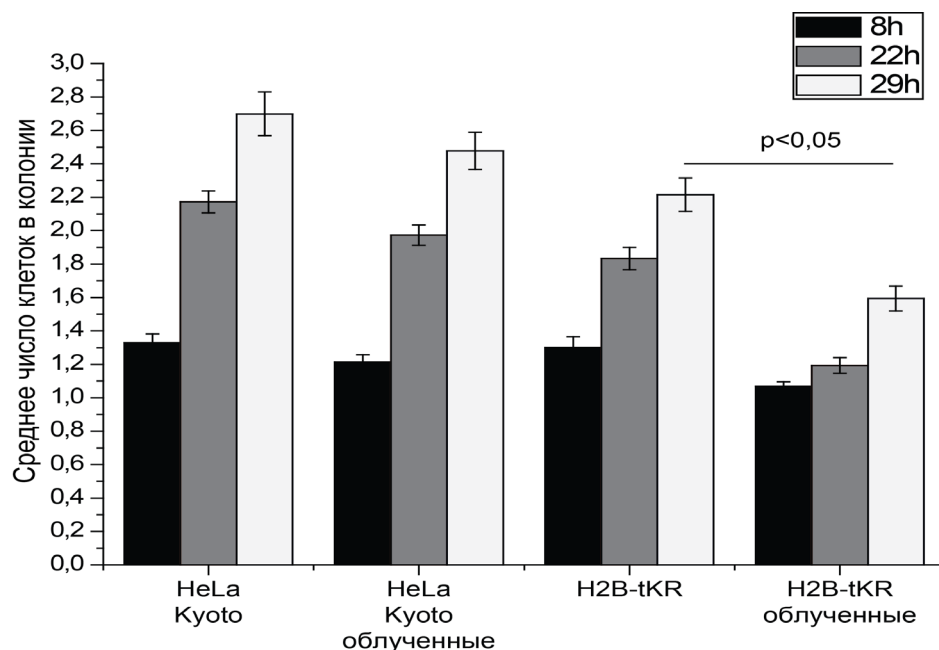


Рис. 14
Уменьшение числа клеток в индивидуальных колониях после облучения (показана стандартная ошибка среднего, $n > 100$).

Механизм, обеспечивающий задержку клеточного деления при облучении интерфазных клеток

Для того, чтобы обнаружить повреждение ДНК при облучении клеток, экспрессирующих H2B-tKR, был использован белок XRCC1 (X-ray cross complementing factor 1), слитый с желтым флуоресцентным белком (YFP). Белок XRCC1 является центральной платформой для сборки комплексов, осуществляющих репарацию ДНК. Ранее было показано, что после локального повреждения ДНК белок XRCC1 немедленно концентрируется в местах повреждения ДНК.

Клетки HeLa Kyoto были котрансфицированы плазмидными векторами для экспрессии XRCC1-YFP и H2B-tKR и анализировались с помощью флуоресцентной микроскопии до и после облучения. Как и ожидалось, до облучения флуоресцентный сигнал YFP-XRCC1 был равномерно распределен в ядрах интерфазных клеток. Кроме того, часто наблюдались единичные яркие точки, предположительно, соответствующие активным репаративным комплексам. После облучения зеленым светом XRCC1-YFP быстро (за 1-3 мин) перераспределялся и формировал множество ярких фокусов флуоресценции в ядрах клеток, экспрессирующих H2B-tKR (**Рис. 15, А**). В контрольных клетках, экспрессирующих только XRCC1-YFP, такого перераспределения не наблюдалось (**Рис. 15, Б**). Приведенные данные свидетельствуют об активации системы репарации ДНК, и, следовательно, о возникновении повреждений геномной ДНК. Повреждения ДНК, в свою очередь, вызывают активацию сверочных точек (чекпойнтов, от англ. checkpoint) клеточного

цикла, вызывающих остановку клеточного цикла. После успешной репарации ДНК интерфазные клетки могут восстанавливать способность к пролиферации.

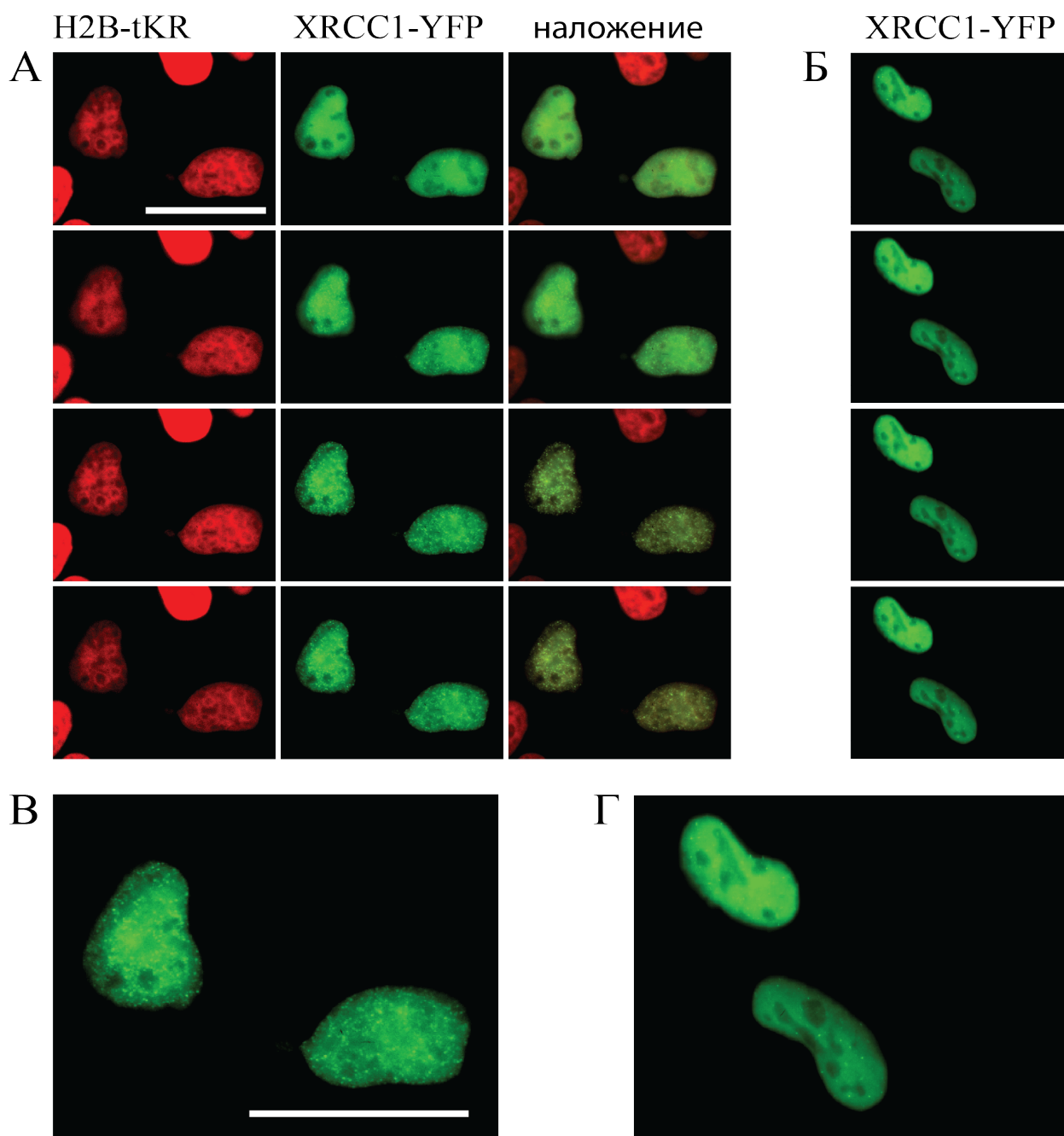


Рис. 15 Облучение вызывает активацию системы репарации ДНК в клетках, экспрессирующих H2B-tKR. (А) Серия широкопольных флуоресцентных микрофотографий клеток, коэкспрессирующих XRCC1-YFP и H2B-tKR. (Б) Серия широкопольных флуоресцентных микрофотографий клеток, экспрессирующих только XRCC1-YFP (контроль). (В, Г) Увеличенные микрофотографии опытных (В) и контрольных (Г) клеток через 3 минуты после облучения. Масштабная линейка 25 мкм.

Механизм, обеспечивающий нерасхождение хромосом при облучении метафазных клеток

Для изучения воздействия облучения на метафазные клетки, экспрессирующие H2B-tKR, клетки, находящиеся на момент начала эксперимента в метафазе митоза, облучали с помощью флуоресцентного микроскопа (540-580 нм, 0,5 Вт/см², 2 мин). Во всех случаях наблюдалось нерасхождение хромосом (**Рис. 16**). Примерно в 70% случаев (n=22) наблюдалась также существенная задержка цитокинеза. В остальных случаях, напротив, цитокинез начинался практически без задержки (по сравнению с контрольными облученными клетками, не экспрессирующими H2B-tKR, а также по сравнению с необлученными клетками, экспрессирующими H2B-tKR). В обоих случаях клетки не были способны нормально завершить деление. Хромосомы

оставались соединенными, не наблюдалось инициации анафазы, а в дальнейшем, после начала цитокинеза, образовавшаяся перетяжка либо пропадала, либо цитокинез проходил до конца, но отделялась лишь небольшая часть деконденсированного хроматина. В конечном итоге тетраплоидные клетки возвращались к интерфазной морфологии.

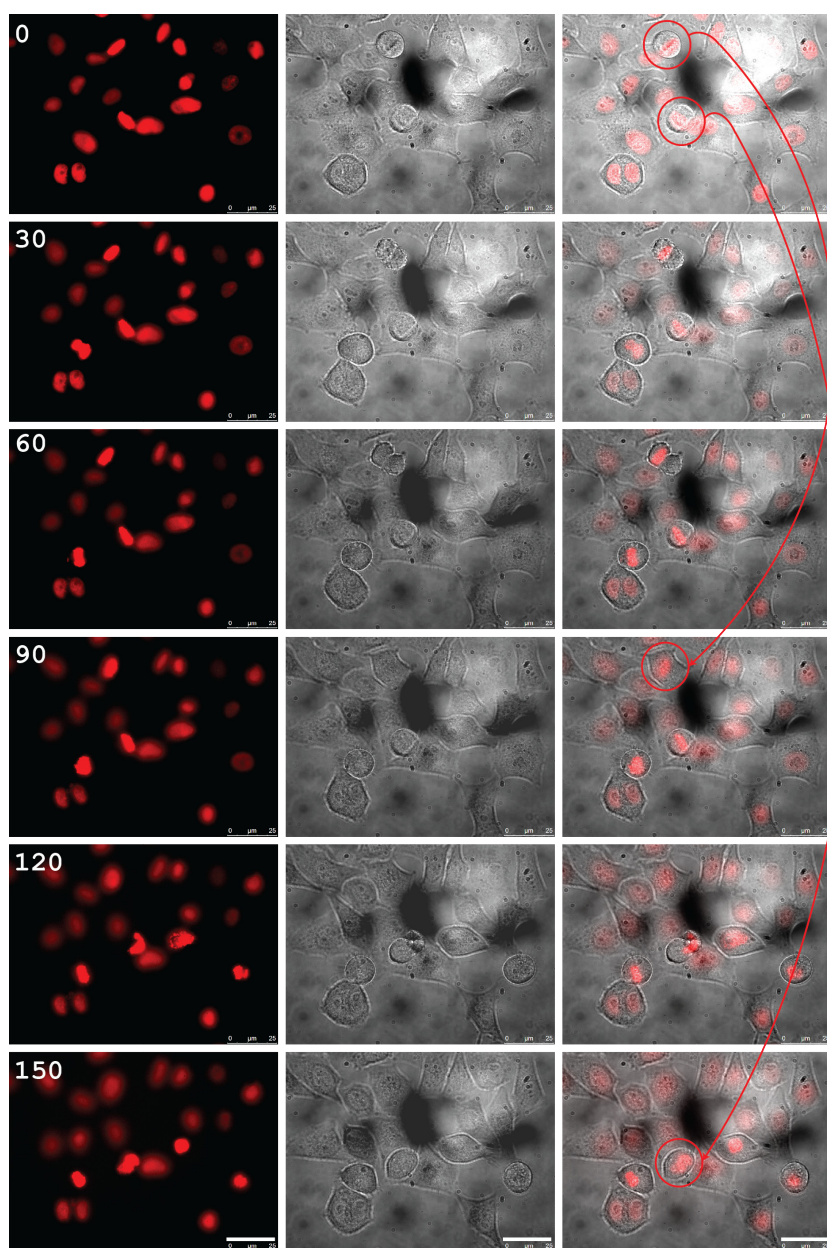


Рис. 16 *Нарушение митоза при облучении митотических клеток, экспрессирующих H2B-tKR. Левые панели – флуоресценция в красном канале, средние панели – изображение в проходящем свете, правые панели – наложение этих изображений. Указано время в минутах после облучения зеленым светом. Масштабная линейка 25 мкм.*

Для более полного понимания механизма, обеспечивающего нерасхождение хромосом в облученных клетках, были проведены две серии экспериментов.

Во-первых, наблюдали за облученными митотическими клетками, коэкспрессирующими H2B-tKR и TagGFP2- α -тубулин (**Рис. 17**) (условия облучения идентичны приведенным выше для метафазных клеток, экспрессирующих только H2B-tKR). Было обнаружено, что веретено деления в таких клетках формируется нормально, а облучение не оказывает немедленного воздействия на видимую структуру веретена деления. После инициации цитокинеза веретено деления диссоциирует.

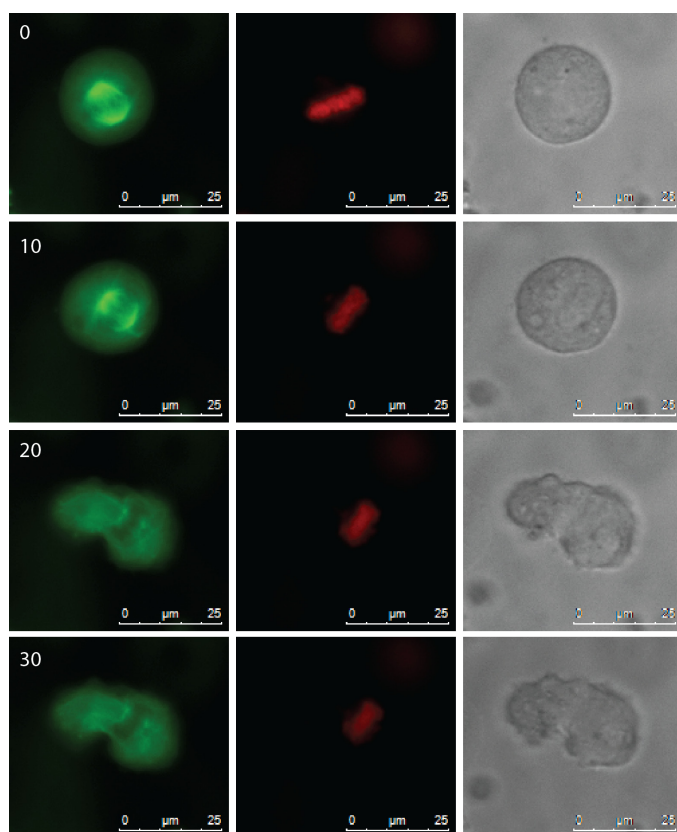


Рис. 17 Облучение не оказывает немедленного воздействия на структуру веретена деления в митотических клетках, экспрессирующих H2B-tKR.

Представлена серия широкопольных флуоресцентных микрофотографий в зеленом (TagGFP-тубулин) и красном (H2B-tKR) каналах, а также микрофотографий в проходящем свете. Указано время в минутах после облучения зеленым светом. Масштабная линейка 25 мкм.

Во-вторых, наблюдали за облученными митотическими клетками, коэкспрессирующими H2B-tKR и EGFP-секьюрин (условия облучения идентичны приведенным выше для метафазных клеток, экспрессирующих только H2B-tKR) (**Рис. 18, А, Б**). Белок секьюрин является ключевым компонентом в регуляции перехода от метафазы к анафазе и обеспечивает сохранение связи между центромерами сестринских хроматид вплоть до установления правильной ориентации хромосом в метафазе (**Рис. 18, В**). Полиубиквитинирование и последующая деградация секьюрина необходима для активации фермента сепаразы (протеазы, обеспечивающей деградацию когезина и, соответственно, разделение хроматид) и инициации анафазы. Полиубиквитинирование секьюрина регулируется в ходе так называемой сверочной точки сборки веретена деления. Не было обнаружено достоверной разницы между скоростью снижения интенсивности зеленого

флуоресцентного сигнала от EGFP-секьюрина в облученных клетках по сравнению с необлученным контролем. Тем не менее, даже после деградации EGFP-секьюрина расхождение хромосом в облученных клетках не происходило. Можно сделать вывод о том, что в большинстве случаев нерасхождение хромосом в данной экспериментальной системе не зависит от активации сверочной точки веретена деления.

Таким образом, молекулярный механизм нерасхождения хромосом в митозе, вызываемого облучением H2B-tKR, требует дальнейшего изучения. Представляется возможным, что KillerRed инактивирует хроматин-ассоциированную сепаразу, поскольку аналогичная картина нерасхождения хромосом наблюдается в клетках, не экспрессирующих сепаразу. Другим возможным механизмом является образование АФК-опосредованных сшивок между молекулами ДНК или ДНК и белка в сестринских хроматидах.

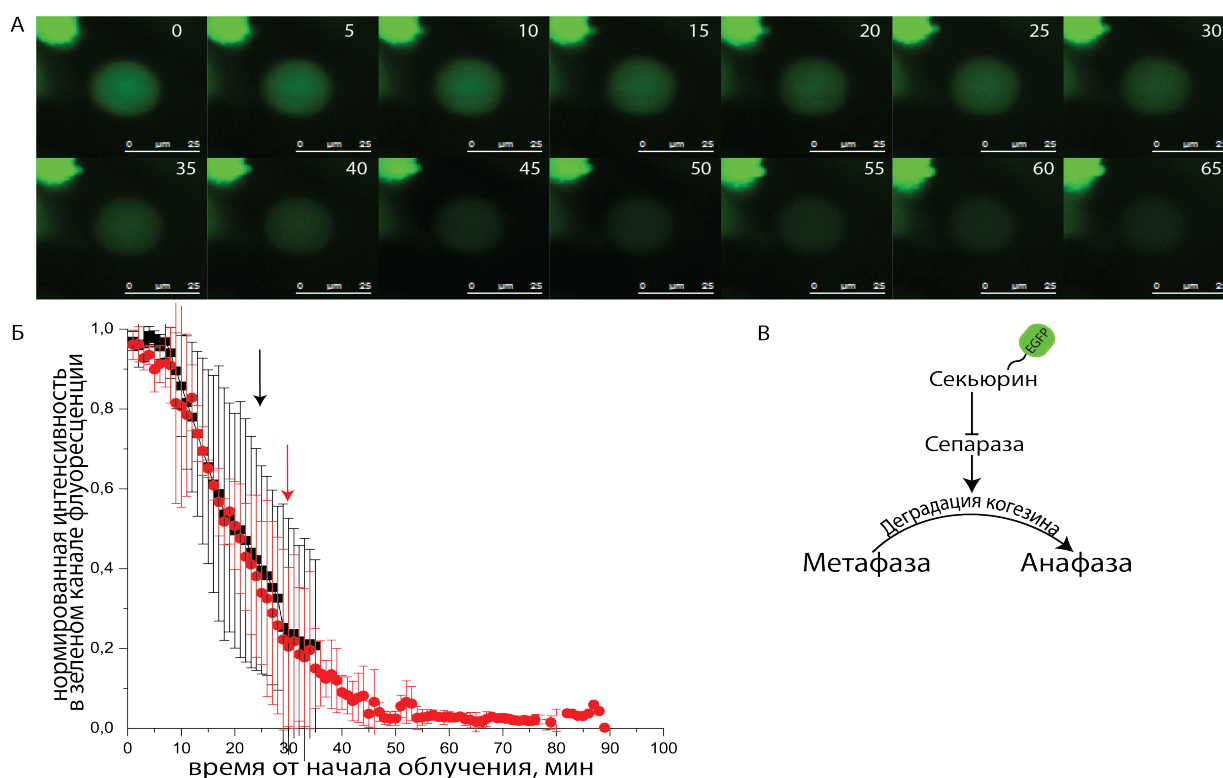


Рис. 18 Кинетика деградации EGFP-секьюрина в митотических клетках, облученных зеленым светом. (А) Серия широкопольных флуоресцентных микроизображений клеток *HeLa Kyoto*, временно экспрессирующих белки H2B-tKR и EGFP-секьюрин (флуоресценция в зеленом канале). Указано время в минутах после облучения зеленым светом. Масштабная линейка 25 мкм. (Б) График изменения интенсивности флуоресценции в зеленом канале для клеток, экспрессирующих (красные круги) и не экспрессирующих H2B-tKR (черные квадраты). Показана стандартная ошибка среднего, $n \geq 3$. Стрелки показывают момент инициации цитокинеза (красная стрелка – для клеток, экспрессирующих H2B-tKR, черная стрелка – для клеток, не экспрессирующих H2B-tKR) (В) Схематическое изображение роли белка секьюрина в регуляции перехода от метафазы к анафазе митоза (сверочная точка веретена деления).

Использование H2B-tKR для нарушения развития тканей *in vivo*

Для выяснения возможности использования H2B-tKR для нарушения развития тканей *in vivo*, совместно с лабораторией молекулярных основ эмбриогенеза ИБХ РАН (рук. д.б.н. А.Г. Зарайский) было проведено 2 серии экспериментов на эмбрионах шпорцевой лягушки *Xenopus laevis*.

Во-первых, путем инъекции мРНК H2B-tKR, смешанной с флуоресцентным декстраном, на стадии 2х бластомеров были получены эмбрионы *X. laevis*, равномерно экспрессирующие H2B-tKR во всех клетках организма. На стадии средней нейрулы 10 эмбрионов были поочередно облучены в течении 20 мин каждый зеленым светом с интенсивностью 120 мВт/см^2 через объектив с десятикратным увеличением, что приводило к существенному снижению интенсивности флуоресценции KillerRed (**Рис. 19, Б-Б'**).

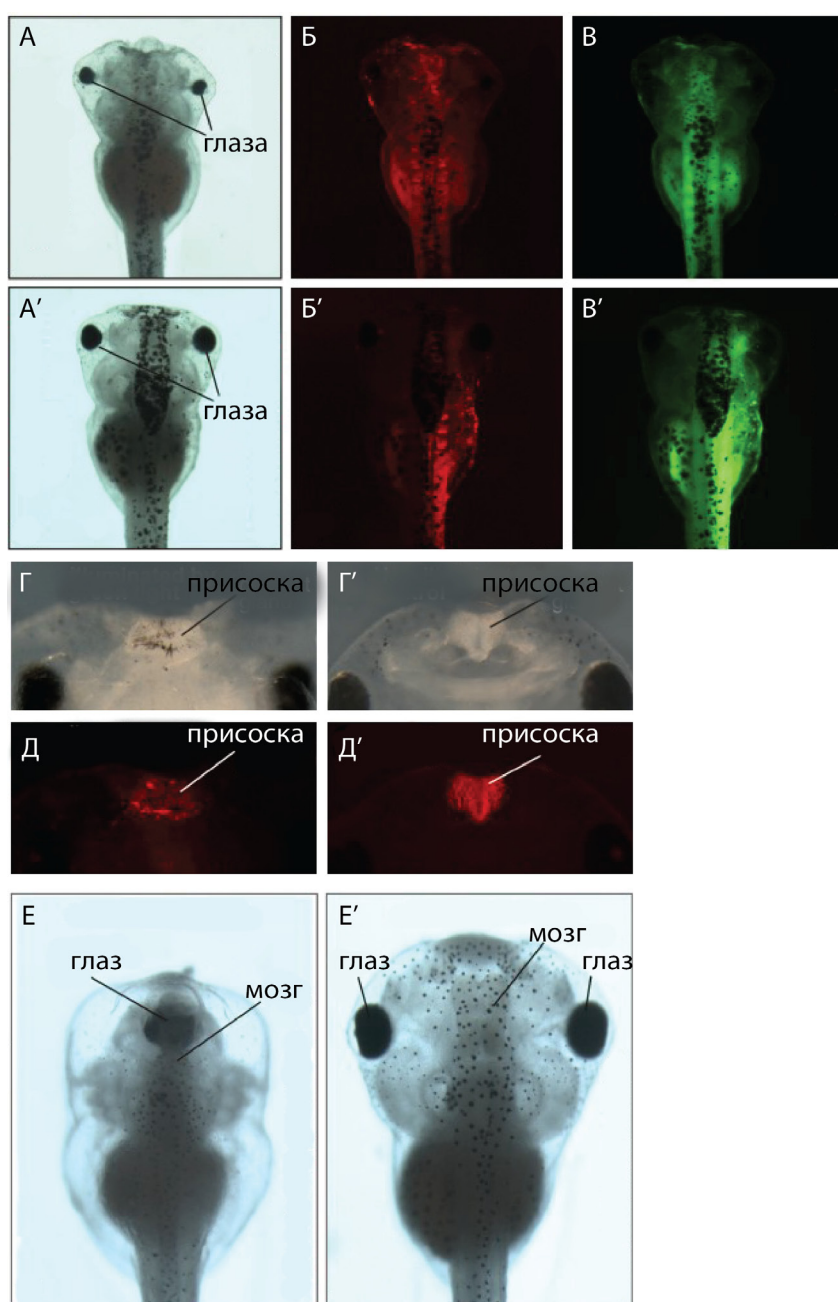


Рис. 19

Светозависимое нарушение развития эмбрионов *Xenopus laevis*, экспрессирующих H2B-tKR. (А-В) Эмбрион *X. laevis*, экспрессирующий H2B-tKR во всех клетках. Облучение зеленым светом в стадии средней нейрулы. (А'-В') То же, без облучения. (Г, Д) Эмбрион *X. laevis*, экспрессирующий H2B-tKR под контролем промотора *Hag2*. Облучение зеленым светом на стадии ранней нейрулы. (Г', Д') То же, без облучения. (Е, Е') Эмбрион *X. laevis*, экспрессирующий H2B-tKR под контролем промотора *Hanf2*. Е – Облучение зеленым светом в стадии ранней нейрулы. Е' – без облучения.

Эксперименты с эмбрионами *X. laevis* проводились в лаборатории молекулярных основ эмбриогенеза ИБХ РАН.

Затем облученные эмбрионы содержались в темноте вместе с необлученными вплоть до стадии 43. В результате во всех эмбрионах наблюдались более или менее выраженные нарушения развития глаз и переднего мозга (**Рис. 19, А-А'**). В контрольных эмбрионах, также экспрессирующих H2B-tKR, но не облученных, а также в облученных неинъектированных эмбрионах подобных нарушений развития не наблюдалось.

Таким образом, аналогично результатам, полученным на культуре клеток млекопитающих, облучение клеток эмбрионов *Xenopus laevis*, экспрессирующих H2B-tKR, приводит к временному ингибированию пролиферации или клеточной гибели, а следовательно, к недоразвитию облученных участков эмбриона.

Во второй серии экспериментов были получены трансгенные эмбрионы *Xenopus laevis*, экспрессирующие H2B-tKR под контролем эмбриональных тканеспецифических промоторов, *Xag2* и *Xanf1*.

Промотор *Xag2* специфически индуцирует экспрессию в тканях присоски, временного органа, расположенного на ростральном конце головы эмбриона. После трансфекции генетической конструкцией, несущей ген *Xag2*, половина эмбрионов была облучена при помощи набора сверхъярких светодиодов (525 нм, 45 мВт/см², 1 час) на стадии 13 (ранняя нейрула), в то время как другая половина трансфицированных эмбрионов содержалась в темноте. На стадии головастика все облученные трансгенные эмбрионы демонстрировали запаздывание дифференцировки присоски, морфология которой в целом соответствовала более ранним стадиям развития. Кроме того, не происходило элиминирование эмбриональных пигментных гранул из присоски (**Рис. 19, Г, Д**). Все описанные эффекты отсутствовали в необлученных трансгенных эмбрионах (**Рис. 19, Г', Д'**).

Промотор гомеобоксного гена *Xanf1* – слабый промотор, активный в течении небольшого временного промежутка от средней гаструлы до поздней нейрулы в клетках передней части нервного валика. Эта область впоследствии дает начало переднему мозгу, включая теленцефалон и диэнцефалон. Эмбрионы, экспрессирующие H2B-tKR под контролем промотора *Xanf1*, были облучены в начале стадии средней нейрулы (условия аналогичны вышеуказанным для *Xag2*-промотора). Далее эмбрионы развивались в темноте и исследовались на стадии головастика. У них наблюдалась более или менее выраженная редукция переднего мозга, а также различные степени дисплазии оптического стебелька, что в крайних случаях приводило к развитию циклопического фенотипа (**Рис. 19, Е-Е'**). Описанные изменения не наблюдались в трансгенных эмбрионах, развивавшихся без облучения. Интересно, что наблюдаемый циклопический фенотип соответствует описанному для эмбрионов со сниженной экспрессией *Xanf1*. В таких эмбрионах единое поле, дающее начало глазам, остается неразделенным посередине, что приводит к возникновению циклопического фенотипа.

Приведенные данные свидетельствуют о том, что описанные нарушения в облученных H2B-tKR-экспрессирующих эмбрионах могут быть вызваны нарушением нормального процесса разделения зачатков глаз, вызванного, в свою очередь, замедлением дифференцировки клеток центральной линии, связанным с совместным ингибирующим воздействием облучения и H2B-tKR на течение клеточного цикла.

Подводя итог данным, полученным на трансгенных эмбрионах, можно предположить, что тканеспецифическая экспрессия химерного белка H2B-tKR может быть уникальным инструментом для исследования роли пространственно-временных факторов дифференциации для нормального эмбрионального развития. Поскольку эмбриональная гетерохрония между различными участками эмбриона в настоящее время считается основным источником эволюционной трансформации, этот инструмент может быть интересен для разработки новых экспериментальных подходов в эволюционной биологии развития. Кроме того, H2B-tKR может быть мощным оптогенетическим инструментом для исследования протекания митоза и мейоза как таковых.

Выводы

1. Разработан полностью генетически кодируемый иммунофотосенсибилизатор, содержащий в качестве нацеливающего домена анти-HER2/neu-миниантитело 4D5, а в качестве эффекторного домена фотосенсибилизатор KillerRed. Показано специфическое связывание белка 4D5-KillerRed-His₅ с опухолевыми клетками, гиперэкспрессирующими опухолевый маркер HER2/neu.
2. Полученный рекомбинантный белок обладает избирательной фототоксичностью по отношению к опухолевым клеткам, гиперэкспрессирующим опухолевый маркер HER2/neu..
3. Разработана стратегия фотоиндуцируемого воздействия на скорость пролиферации клеток эукариот с помощью гибридного белка H2B-tKR на основе генетически кодируемого фотосенсибилизатора KillerRed. Показано снижение скорости пролиферации культуры клеток, временно или стабильно экспрессирующих H2B-tKT, при облучении зеленым светом.
4. Обнаружено, что облучение зеленым светом вызывает повреждение геномной ДНК интерфазных клеток, экспрессирующих H2B-tKR. В то же время, облучение метафазных клеток вызывает нарушение прохождения митоза и нерасхождение хромосом независимо от активации сверхочной точки сборки веретена деления.
5. H2B-tKR является перспективным инструментом для исследования роли специфических клеточных популяций в процессе эмбриогенеза *in vivo*, а также для изучения механизмов регуляции митоза и мейоза.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

Статьи

1. **Serebrovskaya E.O.**, Edelweiss E.F., Stremovskiy O.A., Lukyanov K.A., Chudakov D.M., and Deyev S.M. Targeting cancer cells by using an antireceptor antibody-photosensitizer fusion protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (2009) 23, 9221–9225
2. Lukyanov K.A., **Serebrovskaya E.O.**, Lukyanov S., Chudakov D.M. Fluorescent proteins as light-inducible photochemical partners. *Photochem. Photobiol. Sci.* (2010) 9, 1301-1306
3. **Е. О. Серебровская**, О. А. Стрёмовский, Д. М. Чудаков, К. А. Лукьянов, С. М. Деев, Генетически кодируемый иммунофотосенсибилизатор. *Биоорг. химия* (2011) 37, 137-144.
4. **Serebrovskaya E. O.**, Gorodnicheva T. V., Ermakova G. V., Solovieva E. A., Sharonov G. V., Zagaynova E. V., Chudakov D. M., Lukyanov S. A., Zaisky A. G. and Lukyanov K. A., Light-induced blockage of cell division with a chromatin-targeted phototoxic fluorescent protein. *Biochem. J.* (2011) 435, 65-71.

Тезисы докладов на конференциях

1. **Е. Акципетрова**, Э. Эдельвейс, О. Стрёмовский, С. М. Деев. Детекция маркера опухолей p185HER2/neu на клетках человеческой аденокарциномы яичника SKOV-3 с помощью белка слияния анти-p185-HER2/neu-мини-антитело-KillerRed. XIX Международная зимняя школа молодых ученых «Перспективные направления биохимии, биофизики, молекулярной биологии и биотехнологии» (2007, ИБХ РАН, Москва, Россия)
2. **Е. Акципетрова**, Э. Эдельвейс, О. Стрёмовский, Д. Чудаков, К. Лукьянов, С. М. Деев. Визуализация клеток человеческой аденокарциномы яичника SKOV-3, гиперэкспрессирующих онкомаркер HER2/neu, с помощью рекомбинантного белка анти-HER-2/NEU-мини-антитело-KillerRed. XI Общероссийский форум «Дни иммунологии в Санкт-Петербурге» (2007, Санкт-Петербург, Россия), с. 113.
3. **Serebrovskaya E. O.**, Gorodnicheva T. V., Ermakova G. V., Solovieva E. A., Sharonov G. V., Zagaynova E. V., Chudakov D. M., Lukyanov S. A., Zaisky A. G. and Lukyanov K. A. Chromatin-targeted phototoxic fluorescent protein blocks cell division. International Life Science Student's conference (2010, Неймеген, Нидерланды), с. 78-79
4. **Е.О.Серебровская**, С.А.Лукьянов. Повышение эффективности генетически кодируемого фотосенсибилизатора KillerRed и создание на его основе инструмента для ингибирования клеточного деления с помощью света. Фундаментальная наука для биологии и медицины (2010, Москва)