

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК

Институт биоорганической химии
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова

На правах рукописи

АНТИПОВА НАДЕЖДА ВИКТОРОВНА

**ИЗУЧЕНИЕ СВОЙСТВ БЕЛКОВ SURVIVIN, SMAC/DIABLO, J-CHAIN
ЧЕЛОВЕКА И ВОЗМОЖНОСТИ ИХ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В КАЧЕСТВЕ
ДИАГНОСТИЧЕСКИХ И ТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ СРЕДСТВ**

03.01.03 – Молекулярная биология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва - 2011

Работа выполнена в группе мембранных биоэнергетических систем Учреждения Российской академии наук Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН

Научный руководитель:

доктор химических наук

Шахпаронов Михаил Иванович

Официальные оппоненты:

Завриев Сергей Кириакович - д.б.н., профессор.

Бабаков Алексей Владимирович - д.б.н., профессор.

Ведущая научная организация – Государственное учреждение здравоохранения Московский научно-исследовательский институт медицинской экологии Департамента здравоохранения г. Москвы.

Защита диссертации состоится « 30 » ноября 2011 г. В _____ часов на заседании диссертационного Совета Д 002.019.01 при Учреждении Российской академии наук Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН

по адресу: 117997, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая д.16/10.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Учреждения Российской академии наук Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН

Автореферат разослан « _____ » октября 2011 г.

Ученый секретарь

диссертационного совета, доктор физ.-мат. наук

В.А.Олейников

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

Онкологические заболевания являются одной из главных причин смертности. Проблема борьбы с раком, несмотря на мобилизацию всех достижений современной биологической науки и медицинской техники, остается далекой от решения. Прогнозируется, что к 2020 году число раковых больных возрастет до 16 млн. человек. Смертность от рака непрерывно увеличивается и приближается к 10 млн. человек в год, что составляет 15% всех смертных случаев. Приоритетное значение в области онкологии имеют исследования, направленные на раскрытие молекулярных механизмов злокачественного роста и разработку чувствительных методов диагностики, позволяющих обнаружить опухоль на ранних стадиях развития. В связи с недостаточной эффективностью традиционных методов лечения раковых заболеваний (химио- и радиотерапия, хирургия и др.) необходимо развитие универсальной технологии, позволяющей выявлять экспрессируемые гены, кодируемые ими транскрипты и белки, представленные в одном типе клеток, но отсутствующие в другом, а именно в нормальных клетках и клетках, измененных вследствие различного рода наследственных и приобретенных патологий, включая опухолевую трансформацию.

Применение технологии полногеномной вычитающей гибридизации для получения дифференциальных транскриптов в сочетании с возможностями генной инженерии, бесклеточного синтеза белка и химического синтеза белков и пептидов позволяет трансформировать получаемую информацию о дифференциальных транскриптах в информацию о дифференциальных белках, создавая, таким образом, технологию дифференциальной протеомики, на базе которой возможно эффективное осуществление протеомного анализа, по результатам которого возможна разработка так называемых таргетных препаратов (от англ. target – мишень) - препаратов направленного действия, а также создание генотерапевтических препаратов и разработка сопутствующих диагностических систем.

Важным информативным показателем наличия опухолевого процесса является уровень опухолевых маркеров в сыворотке крови (Е.Р. Diamandis, 2002; Белохвостов А.С., 2003; Nakamura R.M., 2004).

В клинической онкологии онкомаркеры широко применяются для оценки эффективности терапии раковых больных, а некоторые из них играют важную роль в ранней диагностике злокачественных новообразований.

Описанные в данной работе исследования можно разделить на несколько этапов. Первый этап посвящен фундаментальным исследованиям изучения особенностей взаимодействия онкомаркера сурвивина с антиапоптозным белком Smac/Diablo.

Во второй части работы с использованием ранее полученных данных о диагностической значимости в онкологическом перерождении белков апоптоза, проведено получение рекомбинантного белка сурвивина и моноклональных антител к нему,

формирование и оценка значимости диагностической системы для определения этого белка в биологических образцах.

Третий этап описывает анализ содержания белка J-пептида в нормальных и опухолевых образцах различных тканей человека.

Представленные исследования являются частью работы в рамках проекта «Создание технологии дифференциальной протеомики и ее использование для получения новых противораковых препаратов». Номер контракта: 02.467.11.3006.

Цель и задачи работы

Целью диссертационной работы была оценка изменения уровня синтеза ряда белков, присущих опухолевым трансформациям, оценка их диагностического и терапевтического потенциала для выявления опухолей на ранних стадиях и прогноза течения опухолевого процесса.

В ходе работы были поставлены следующие задачи:

1. Изучить молекулярные основы взаимодействия сурвивина с Smac/Diablo, для этого:
 - получить и очистить рекомбинантные белки сурвивин и Smac/Diablo;
 - получить моноклональные антитела к рекомбинантным белкам сурвивин и Smac/Diablo.
2. Использовать полученные моноклональные антитела для определения содержания дифференциальных белковых продуктов (сурвивин и Smac/Diablo) в клеточных линиях и опухолевых образованиях различных тканей больных и здоровых индивидуумов.
3. Изучить аналитические характеристики полученной тест-системы для определения белка сурвивин в биологических образцах в варианте двустадийного иммунофлуоресцентного анализа, как наиболее простого и технологически приемлемого для клинического использования. Оценить диагностическую перспективность полученной тест-системы.
4. Оценить уровень белка J-пептида в образцах из различных тканей здоровых индивидуумов, при этом, используя полученные ранее поликлональные антитела, оценить так же содержание белка J-пептида в образцах из опухолевых образований различных тканей больных индивидуумов.

Научная новизна и практическая значимость работы

Универсальная технология дифференциальной протеомики является мощным инструментом для выявления различий в составе экспрессируемых генов, кодируемых ими транскриптов и белков, представленных в нормальных клетках и клетках, измененных вследствие различного рода наследственных и приобретенных патологий, включая опухолевую трансформацию. Полученные ранее библиотеки генов, дифференциально экспрессирующихся в нормальных и опухолевых тканях в виде набора упорядоченных дифференциальных клонов кДНК (более 2500 клонов), идентифицируют 179 генов с пониженной (примером может служить ген, кодирующий белок J-пептид, распределение которого изучается в данной работе) и 109 генов - с повышенной экспрессией в опухолях (к

ним относятся кодируемые дифференциально экспрессирующимися генами белки сурвивин и Smac/Diablo).

В данной работе нами были исследованы свойства белков-маркёров, относящихся к совершенно разным группам. Однако их объединяет один очень важный с нашей точки зрения факт - моментальный отклик при перерождении здоровой ткани в злокачественную опухоль. Совершенно очевидно, при диагностике какого-либо заболевания данная статистика увеличивается при выявлении как можно большего количества подобных факторов. Для этого в современной медицинской практике выявляются характерные изменения в структуре, свойствах и жизненном цикле белков-маркёров и кодирующих их генов. Особенно чувствителен к таким изменениям ключевой момент в жизни клетки, называемый апоптозом – запрограммированной гибелью клетки. В рамках данной работы проведен анализ уровня синтеза сурвивина и Smac/Diablo в различных биологических образцах, их функции и роль в опухолеобразовании. Доказано, что эти белки могут служить маркерами раковой трансформации и мишенями для противораковой терапии. Эти белки служат основой для разработки протеомных диагностикумов опухолей и выработки индивидуальных терапевтических рекомендаций, а также для прогноза течения опухолевого процесса.

Разработана методика иммунохимической диагностики присутствия прогностических белков в тканевых образцах, пригодная для анализа большого объема данных по онкологическим больным, что позволяет создавать прогностические диагностикумы. Получен набор антител для определения уровня терапевтически значимых белков сурвивина и Smac/Diablo.

В данной работе было также исследовано взаимодействие сурвивина с проапоптозным белком Smac/Diablo. Ранее было показано, что в отличие от BIR домена XIAP, BIR домен сурвивина, экспрессированный отдельно, неспособен связываться с белком Smac.

В рамках данной работы впервые продемонстрировано, что у Smac/Diablo с открытым IBM мотивом на N-концевой области возможна совместная активность с мономером сурвивина. Мы получили результаты, свидетельствующие о способности мономера сурвивина взаимодействовать с белком Smac/Diablo и отметили, что важен «участок димеризации» сурвивина. Исследование взаимодействия этих белков может в будущем оказаться полезным для создания противоопухолевых препаратов, основанных на блокировании областей связывания между этими двумя белками.

Апробация работы

По теме диссертационной работы опубликованы 3 статьи в отечественных научных журналах, 1 статья в зарубежном журнале. Результаты работы представлены на российских и международных конференциях: XIII, XIV Международная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2006, 2007» (Москва, 2006, 2007); Зимняя молодежная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии» (Москва, 2007, 2008, 2010гг); FEBS congress(Вена, 2007); Conference for young scientists, PhD students and students on molecular biology and genetics, Dedicated to 120th anniversary of

М.И. Vavilov (Киев, 2007); Десятая Всероссийская медико-биологическая конференция молодых исследователей "Человек и его здоровье" (С.-Петербург, 2007); 1-ая международная научная школа "Наноматериалы и нанотехнологии в живых системах" (Московская область - 2009); Международная конференция ИБХ, посвященная 75-летию Ю.А. Овчинникова (Москва, ИБХ, 2009), 14-ая Международная Пушинская школа-конференция молодых ученых «Биология – Наука XXI века» (Пушино, 2010); XVI Российский национальный конгресс «Человек и лекарство» (г. Москва 2010 г); Всероссийская школа-семинар студентов, аспирантов и молодых ученых по направлению «Нанобиотехнология» (Белгород, 2010); VI Международная (XV Всероссийская) Пироговская научная медицинская конференция студентов и молодых учёных (Москва, 2011).

Структура диссертации

Диссертационная работа изложена на ... страницах и состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, результатов и их обсуждения, основных выводов и списка цитируемой литературы, включающего ... ссылки. Диссертация содержит ... таблиц и ... рисунков.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Результаты исследования и их обсуждение

Создание диагностикума для определения сурвивина в биологических образцах.

кДНК гена, кодирующего сурвивин, полученную по ранее описанной методике Zhu Y.Y. и соавторов (2001) клонировали в экспрессионный вектор рЕТ28а с помощью эндонуклеаз рестрикции Sal I и Not I (Fermentas) в соответствии с рекомендациями производителя. На основе полученной экспрессионной конструкции из клеток *E.coli* BL21DE3 выделен и очищен рекомбинантный полноразмерный человеческий белок сурвивин. Уровень экспрессии целевого гена после индукции транскрипции, а также чистоту выделенного белка оценивали с помощью электрофореза в полиакриламидном геле в денатурирующих условиях (рис.1).

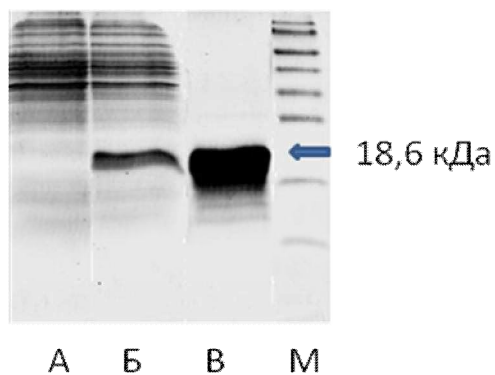


Рис. 1 Электрофорез по Лэммли в 15% ПААГ в денатурирующих условиях.

*А: лизат клеток *E.coli*, содержащих конструкцию рЕТ28а -сурвивин, без индукции транскрипции,*

*Б: лизат клеток *E.coli*, содержащих конструкцию рЕТ28а -сурвивин, с индукцией транскрипции;*

В: Очищенный рекомбинантный полноразмерный сурвивин.

М: Маркёры молекулярных масс белков.

Далее получали гибридные линии, продуцирующие моноклональные антитела против рекомбинантного сурвивина. Отбор гибридом проводили по двум критериям. Сначала отбирали линии клеток, продуцирующие моноклональные антитела с наибольшей аффинностью к рекомбинантному и эндогенному белкам. Аффинность оценивали методом

твердофазного иммуноферментного анализа по величине титра антител в культуральной жидкости. Для дальнейшей работы отбирали клеточные линии, в культуральных жидкостях которых титр антител был 1:100. С помощью иммуноблоттинга была отобрана гибридная линия клеток, продуцирующая антитела, узнающие различные природные изоформы сурвивина, которые образуются в клетке в результате альтернативного сплайсинга (рис.2).



A431 H358 H1299 H460 H566 H293 HELA HT1080

Рис. 2. Результат иммунодетекции образцов лизатов клеточных линий, полученный с помощью выбранных моноклональных антител. Электрофорез в 15%ном ПААГ проводили по Леммли.

Полученные моноклональные антитела относятся к классу IgG 1 и взаимодействуют с эпитопом общим для нескольких изоформ сурвивина (рис.2). Определение сурвивина в лизатах клеточных линий человека было использовано для стандартизации диагностической системы, подбора условий проведения эксперимента с образцами тканей и оценки воспроизводимости результатов внутри одного анализа и между анализами.

Образец для определения белков готовили следующим образом: на первой стадии эксперимента исследуемый образец обрабатывали лизирующим буфером с NP40 с 5-ти кратным замораживанием и оттаиванием, в результате чего происходило разрушение клеточных структур. Фракцию, содержащую белки, отделяли центрифугированием. Вторая стадия заключалась в сорбции белков лизата, а также контрольного образца рекомбинантного белка сурвивина на поверхность лунок полистирольного планшета. Далее проводилась детекция иммобилизованного сурвивина по методу ИФА. Содержание сурвивина в исследуемых препаратах определяли по калибровочной зависимости оптической плотности раствора от содержания белка и, соответственно, антител к нему.

По аналогичному принципу создавалась и тест-система для определения в образцах тканей белка Smac/Diablo. Интерес к нему вызван обнаруженным цитотоксическим и противоопухолевым эффектом белка Smac/Diablo, в том числе и посредством воздействия его на активность сурвивина (Arnt C.R., 2002; Chęcinska A., 2007; Petrucci E., 2007; Mao H.L., 2007). Исходя из этого, представлялось интересным создание тандемной тест-системы на основе моноклональных антител к сурвивину и белку Smac/Diablo.

Вектор, несущий ген белка Smac, был любезно предоставлен Н.А.Вайшлей (ЛСФГЧ, УРАН ИБХ). Далее ген был клонирован в экспрессионный вектор рЕТ28а. На основе полученной экспрессионной конструкции из клеток *E.coli* BL21DE3 выделен и очищен методом металлоаффинной хроматографии рекомбинантный полноразмерный человеческий белок Smac/Diablo. Уровень экспрессии целевого гена после индукции транскрипции оценивали с помощью электрофореза в ПААГ в денатурирующих условиях (рис.3).

В полиакриламидном геле по указанной методике Smac имеет массу 21 кДа, что соответствует мономерной форме этого белка (эндогенный Smac/Diablo крайне редко существует в виде мономера, чаще всего в виде димера или олигомера (Chai J, 2000)).

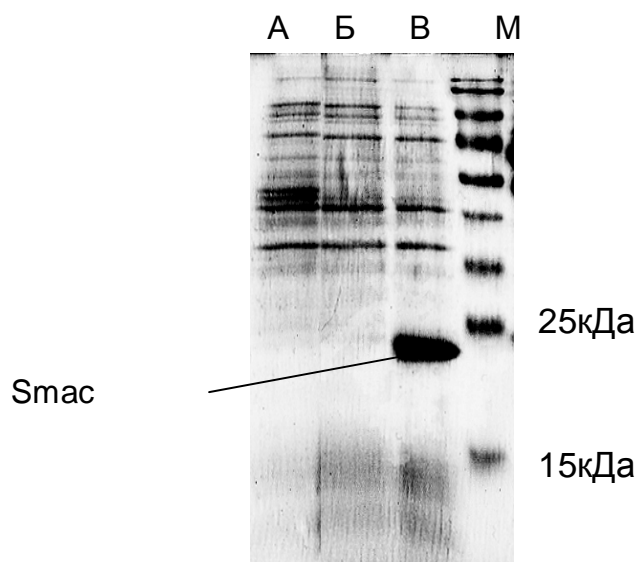


Рис.3. Электрофореграмма, демонстрирующая рекомбинантный Smac/Diablo в составе лизата клеток *E.coli* BL21DE3 в ПААГ в денатурирующих условиях.

А: лизат клеток, не содержащих конструкцию pET 28a- Smac, с индукцией ИПТГ;

Б: лизат клеток, содержащих конструкцию pET28 a- Smac/Diablo, без индукции ИПТГ;

В: лизат клеток *E.coli*, содержащих конструкцию pET28a - Smac/Diablo с индукцией ИПТГ.

М: Маркёры молекулярных масс белков.

Далее были получены гибридные линии, продуцирующие моноклональные антитела против рекомбинантного белка. Аффинность оценивали методом твердофазного иммуоферментного анализа по величине титра антител в культуральной жидкости.

Методом твердофазного иммуоферментного анализа были исследованы лизаты клеточных линий. Различий в содержании Smac/Diablo в клеточных линиях не обнаружено, отсутствует также корреляция между содержанием данного белка и сурвивина (рис.4).

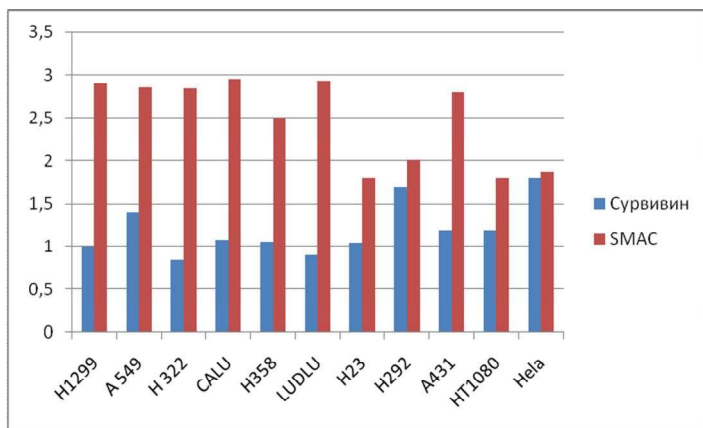


Рис 4. Гистограмма, отражающая результаты определения белков сурвивина и Smac/Diablo в лизатах клеточных линий и Smac/Diablo в лизатах клеточных линий с помощью полученных тест-систем. По оси ординат - оптическая плотность при 492нм.

Тем не менее, Smac/Diablo является прямым ингибитором сурвивина в живых системах. Поэтому полученные рекомбинантные белки Smac/Diablo и сурвивин, а также антитела к ним, могут быть применены в качестве терапевтических инструментов именно в тандеме и легли в основу тест-системы «Пептосурвим». Результаты проведенной работы показали, что созданная диагностическая система «Пептосурвим» имеет клинический потенциал, характеризует исследуемые образцы с большой точностью и воспроизводимостью и проста в проведении анализа. Пробный вариант тест-системы «Пептосурвим» выпущен в виде набора.

С помощью набора «Пептосурвим» были исследованы соскобы эндометрия, полученные в результате отдельного диагностического или лечебно-диагностического выскабливания матки у 80 женщин, поступивших в гинекологическое отделение ГКБ№33 им. А.А. Остроумова: I группа – 15 пациенток, у которых, по данным гистологического исследования, патологии эндометрия не выявлено, II группа – 20 женщин с гиперплазией эндометрия (простая и сложная без атипии), III группа – 15 человек с простой и сложной гиперплазией эндометрия с атипией, IV группа – 20 пациенток с высокодифференцированной аденокарциномой эндометрия, V группа – 10 больных с полипами эндометрия. Результаты представлены в виде таблицы 1.

Таблица 1. Результаты определения относительного количества белка сурвивина и белка Smac в исследуемых образцах эндометрия.

Группа	Суммарный белок в образце, мг/мл	Титр антител к сурвивину	Отношение кол-ва сурвивина *10 ⁻⁶ на мг суммарного белка	Титр антител к Smac/Diablo	Отношение кол-ва Smac/Diablo *10 ⁻⁶ на мг суммарного белка
I	2.5	0.400 ±0.006	20±0.5	1.107±0.05	75±4
II	2.5	0.80±0.02	30±2	0.90±0.04	68±2
III	2.5	0.760±0.046	30±4	1.00±0.03	72.0±2.6
IV	2.5	1.2±0.1	60±3.2	1.16±0.04	77.00±3.45
V	2.5	0.700±0.008	40.0±1.8	1.05±0.02	74.00 ±2.43

Выявлено присутствие сурвивина в незначительном количестве в нормальном неизменном эндометрии. Существенной разницы в изменении уровня сурвивина между патологическими состояниями не выявлено. Однако в образцах с аденокарциномой эндометрия наблюдается наиболее значительное увеличение количества этого белка относительно нормы, что еще раз подтверждает его возможное участие в онкологическом перерождении.

Важное клиническое значение гиперплазии заключается в том, что она может предшествовать развитию аденокарциномы эндометрия или сопутствовать этой патологии. Это отчетливо прослеживается по повышению онкомаркера сурвивина в группе IV, по сравнению с остальными. Дополнительные факторы, в сочетании с которыми гиперплазия эндометрия трансформируется в рак эндометрия, до сих пор полностью не изучены (Chęcinska A, 2007). По-видимому, одним из таких факторов является повышенный синтез белка сурвивина, и, как следствие, устойчивость патологических очагов эндометрия к апоптозу. Нарушение процесса апоптоза может быть связано также с изменением синтеза природных антагонистов сурвивина, участвующих в регуляции этого процесса (Н. А. Вайшля, 2007).

Особенности взаимодействия онкомаркера сурвивина с белком Smac/Diablo.

Следующим этапом представленной работы было исследование роли мономерной молекулы сурвивина в регуляции апоптоза. Для этого нами был выбран описанный ранее мутант сурвивина с заменой 101ой и 102ой аминокислот - сурвивин^{F101A/L102A}. Работы Dieuwke Engelesma, 2007, показали, что 101 и 102 аминокислоты необходимы для димеризации сурвивина, но при этом они находятся вне последовательности ядерного экспорта (NES) и их замена не ухудшает экспорт сурвивина из ядра. Более того, мономер сурвивина подвергается даже более активному транспорту из ядра, так как он значительно лучше взаимодействует с экспортным рецептором CRM1. Важно отметить, что 101 и 102 аминокислотные остатки находятся вне высоко консервативного BIR домена. Ранее Jeuprakash A.A. и соавторы в 2007г. установили: димеризация сурвивина происходит благодаря тому, что Leu98 одной молекулы входит в гидрофобный карман образованный Leu6, Trp10, Phe93, Phe101 и Leu102 другой молекулы. Как показано Dieuwke Engelesma замена Phe101 и Leu102 на Ala приводит к разрушению этого гидрофобного кармана. Чтобы окончательно убедиться в том, что сурвивин^{F101A/L102A} в растворе действительно существует в виде мономера, мы экспрессировали в E.coli рекомбинантный сурвивин дикого типа (WT) и сурвивин^{F101A/L102A} и определяли их молярную массу с помощью гель-фильтрации (рис.5). Для сурвивина WT и сурвивина^{F101A/L102A} измеренная нами молекулярная масса лежит в диапазоне 30-40 кДа и 10-20 кДа соответственно. Полученные значения близки к расчётной массе димера и мономера сурвивина (37 и 18кДа, соответственно).

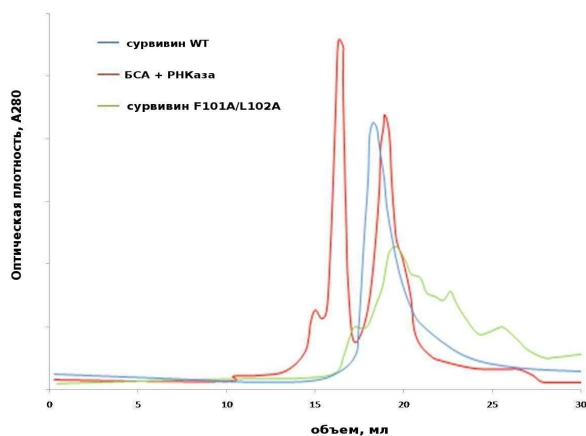


Рис. 5. Гель - фильтрационный профиль рекомбинантного сурвивина дикого типа (синий) или сурвивина^{F101A/L102A} (зелёный), а также маркёров молекулярных масс (красный): BSA (66кДа) и RNaseA (14кДа).

Эти результаты полностью подтверждают данные, полученные Dieuwke Engelesma вместе с тем убедительно доказывают, что сурвивин^{F101A/L102A} не может образовывать гомодимерные молекулы. Необходимо отметить, что хотя при гель-фильтрации сурвивина дикого типа было обнаружено, что одновременно с димером сурвивина небольшая (около 5%) часть белка находится в растворе в виде мономера, это соответствует выводам Muchmore S.W, 2000. Ещё более важным мы считаем то, что до сих пор неизвестно, какой процент сурвивина дикого типа внутри живой клетки находится в виде димера, а какой в виде мономера.

Мономер сурвивина *in vitro* и *in vivo* способен взаимодействовать с белком Smac/Diablo.

Как упоминалось выше, сурвивин может защищать клетку от апоптоза по нескольким механизмам. В первую очередь мы решили исследовать участие мономера сурвивина в наиболее изученном из этих механизмов, а именно, в ингибировании им проапоптозного белка Smac/Diablo. Зрелый Smac/Diablo (с отщепленной последовательностью митохондриальной локализации 1-55 а.к.) способен взаимодействовать с сурвивином благодаря тому, что в его N-концевой области находится IBM (IAP Binding Motif)-терминальный тетрапептид AVPI-, поэтому некоторые проапоптозные белки способны связываться с BIR доменом IAP и ингибировать их активность (Srinivasula S.M с соавторами, 2008). Сурвивин может конкурировать с другими белками семейства IAP (Inhibitor of Apoptosis Protein) за связывание со Smac/Diablo и таким образом затруднять ингибирование этих белков белком Smac/Diablo (McNeish I.A., 2005). Удаление IBM приводит к отсутствию взаимодействия между сурвивином и Smac/Diablo (McNeish I.A., 2005; Song Z., 2003). Для того чтобы определить, способен ли мономер сурвивина связываться с белком Smac/Diablo *in vitro*, в *E.coli* экспрессировали рекомбинантный зрелый Smac/Diablo и $\Delta 63$ Smac/Diablo (зрелый Smac/Diablo без первых 8 аминокислот, то есть не имеющий IBM) и использовали эти белки для «pull-down assay» с рекомбинантным сурвивином дикого типа или сурвивином^{F101A/L102A}, иммобилизованными на протеин-G сефарозе с помощью антител к сурвивину. Как видно из рисунка 6А, зрелый Smac/Diablo, но не $\Delta 63$ Smac/Diablo, способен связываться как с сурвивином дикого типа, так и с сурвивином^{F101A/L102A}. Чтобы подтвердить полученные результаты, мы трансфицировали клетки фиброкарциномы человека HT1080 плазмидой, кодирующей CFP-сурвивин или CFP-сурвивин^{F101A/L102A}. Иммунопреципитация эндогенного Smac/Diablo демонстрирует, что этот белок способен взаимодействовать как с сурвивином дикого типа, так и с его мутантом, не способным к димеризации (рис.6). Чтобы убедиться в том, что такое взаимодействие возможно не только в искусственно созданной системе, но и в живой клетке, мы исследовали эти белки *in vivo* с помощью метода регистрации FRET совместно с техникой фотообесцвечивания акцептора. Для этого клетки HT1080 были котрансфицированы двумя плазмидами, одна из которых кодирует зрелый Smac/Diablo или $\Delta 63$ Smac/Diablo с белком CFP на C-конце, а другая сурвивин или сурвивин^{F101A/L102A} с YFP на N-конце (рис.6). Как видно из рисунка 6Г в контроле: в клетках коэкспрессирующих белки CFP- и YFP-сурвивин, при фотообесцвечивании акцептора (YFP) интенсивность флуоресценции YFP резко снижается, а интенсивность флуоресценции донора (CFP) и FRET остаются почти постоянными. Такой результат соответствует отсутствию взаимодействия между CFP- и YFP-сурвивином. На рисунке 6Д приведены графики зависимости интенсивности флуоресценции CFP от времени фотообесцвечивания акцептора в клетках коэкспрессирующих YFP-сурвивин или YFP-сурвивин^{F101A/L102A} и Smac/Diablo-CFP или $\Delta 63$ Smac/Diablo-CFP. Повышение интенсивности флуоресценции донора при обесцвечивании акцептора говорит о взаимодействии исследуемой пары белков

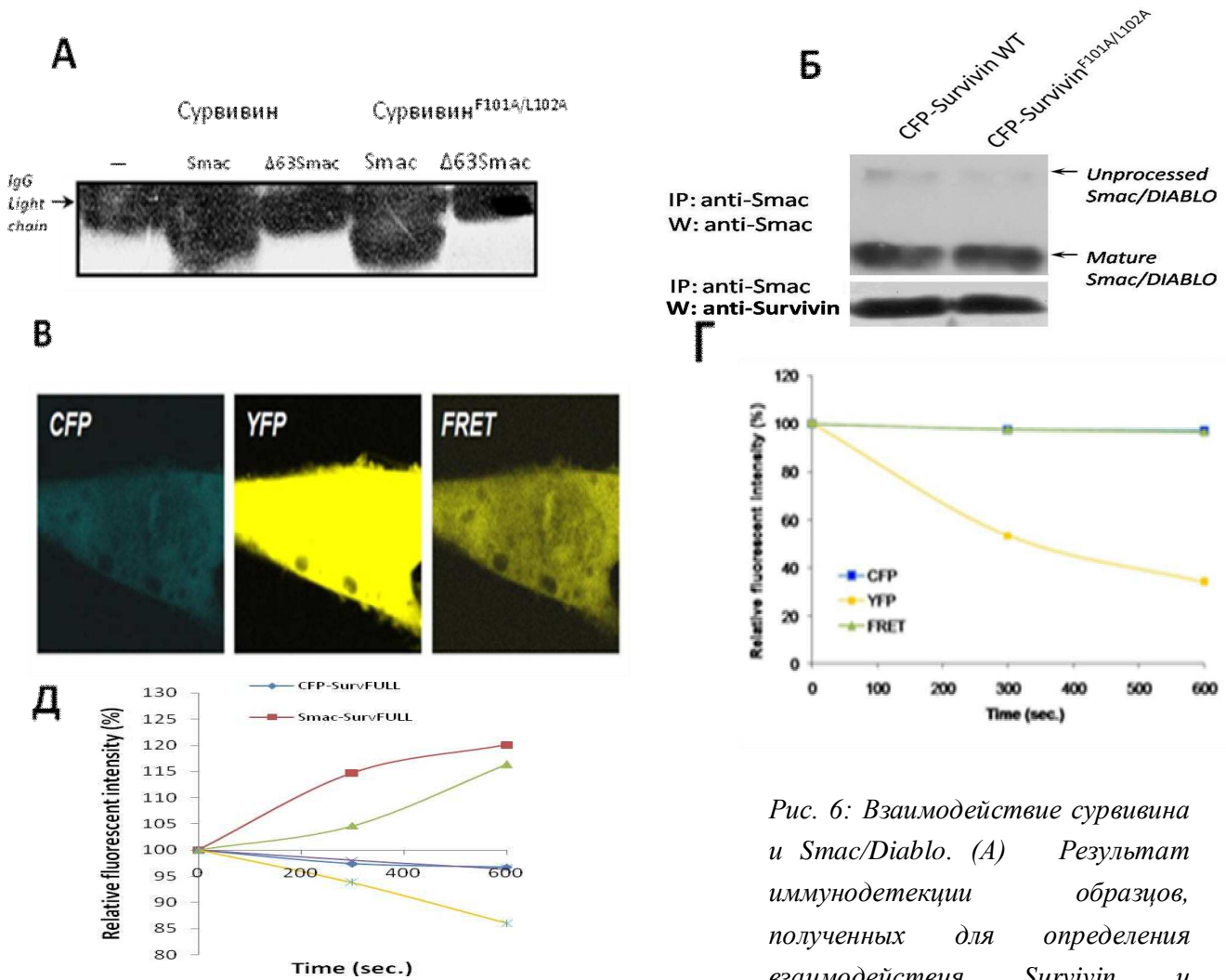


Рис. 6: Взаимодействие сурвивина и Smac/Diablo. (А) Результат иммунодетекции образцов, полученных для определения взаимодействия Survivin и Survivin^{F101A/L102A} с различными

фрагментами Smac. (Б) Ко-иммунопреципитация белков из клеток, экспрессирующих CFP-сурвивин или CFP- сурвивин^{F101A/L102A}. Клетки HT1080 были трансфицированы плазмидой pTagCFP-C-Survivin или pTagCFP-C-Survivin^{F101A/L102A}. Клетки лизировали и эндогенный Smac/Diablo был иммунопреципитирован (IP) антителами на Smac/Diablo. Преципитированные белки определяли с помощью иммуноблота (W) с первичными антителами на Smac/Diablo или на сурвивин. (В) Фотографии эмиссии CFP, YFP и FRET в клетках HT1080 котрансфицированных плазидами pTagCFP-N-Smac/Diablo и pEYFP-C-Survivin. (Г) Графики зависимости интенсивности флуоресценции в CFP при возбуждении лазером 458нм (CFP), в жёлтом канале при возбуждении лазером 488нм (YFP) и в жёлтом канале при возбуждении лазером 458нм (FRET) в клетках HT1080 коэкспрессирующих CFP и YFP-сурвивин. (Д) Графики зависимости интенсивности флуоресценции CFP от времени фотообесцвечивания акцептора в клетках HT1080, коэкспрессирующих YFP-сурвивин или YFP- сурвивин^{F101A/L102A} и CFP, Smac/Diablo-CFP или Δ63Smac/Diablo-CFP. (Е) Графики зависимости флуоресценции CFP от времени фотообесцвечивания акцептора в клетках HT1080, коэкспрессирующих фрагменты сурвивина YFP-сурвивин 1-109 или YFP-сурвивин 84-109 и Smac/Diablo-CFP. Приведены данные трех независимых экспериментов.

Результаты этого эксперимента свидетельствуют в пользу того, что сурвивин^{F101A/L102A}, как и сурвивин дикого типа способен *in vivo* взаимодействовать с зрелым Smac/Diablo, но не с Δ63Smac/Diablo, что полностью согласуется с результатами, полученными *in vitro*.

Далее представлялось интересным изучить, насколько участок димеризации сурвивина важен для связывания с белком Smac/Diablo. Ранее Song Z., 2003, было показано, что для взаимодействия этих белков необходим BIR домен сурвивина, однако BIR домен сурвивина в отдельности (1-97 а.к.), экспрессированный без участка димеризации, не способен связывать Smac/Diablo. Поэтому аналогично исследованию взаимодействия сурвивина и Smac/Diablo *in vivo* мы исследовали взаимодействие фрагмента сурвивина 1-109 а.к., в состав которого входит и BIR домен, и участок димеризации, а также фрагмента 84-109 а.к., состоящего только из участка димеризации, с белком Smac/Diablo. Полученные результаты свидетельствуют в пользу того, что участок димеризации сурвивина необходим для взаимодействия со Smac/Diablo, однако в отдельности, без BIR домена, он не способен связывать Smac/Diablo.

Сурвивин^{F101A/L102A} более эффективно защищает клетки фибросаркомы человека NT1080 от каспаз-зависимого апоптоза, вызванного цисплатином, чем сурвивин дикого типа

Для исследования роли мономера сурвивина в регуляции апоптоза нами были созданы клеточные линии, стабильно экспрессирующие сурвивин дикого типа или один из его мутантов: сурвивин^{F101A/L102A}, сурвивин^{D53A} или сурвивин^{D53A/F101A/L102A}, несущие CFP на своём N-конце. Сурвивин^{D53A} – один из наиболее хорошо охарактеризованных доминантно - негативных мутантов, способный образовывать как гомодимеры, так и гетеродимеры с эндогенным сурвивином (подтверждено Song Z., 2004). Сурвивин^{D53A/F101A/L102A} – мутант сурвивина, созданный в нашей лаборатории, содержащий не только замену 53й аминокислоты, нарушающую структуру BIR домена, но и замены 101й и 102й аминокислот, которые, как мы предполагаем, по аналогии с сурвивином^{F101A/L102A}, не позволяют этому белку образовывать димеры. Для создания стабильных клеточных линий клетки фибросаркомы NT1080 заражали лентивирусными векторами, кодирующими сурвивин дикого типа или один из его мутантов. Чтобы исключить возможные неспецифические эффекты, вызванные проникновением в клетки вирусных частиц или экспрессией CFP, нами также была создана клеточная линия, стабильно экспрессирующая только CFP. Как показано на рисунке 7А, все полученные нами клеточные линии экспрессируют целевые белки на примерно одинаковом уровне. Исключение составляет только клеточная линия, экспрессирующая CFP, в которой экзогенный белок присутствует в значительно большем количестве. Это, вероятно, связано с тем, что в отличие от CFP, сурвивин в клетках имеет достаточно короткое время жизни и подвергается быстрой деградации (McNeish I.A., 2005).

Чтобы определить, каким образом различные мутанты сурвивина влияют на апоптоз опухолевых клеток, полученные нами клеточные линии обрабатывались цисплатином. Цисплатин (цис-диаминдихлорплатина II; $[Pt(NH_3)_2Cl_2]$)- широко используемый препарат для химиотерапии различных типов опухолей. Попадая в ядро, цисплатин образует сшивки

между молекулами ДНК, что приводит к остановке репликации и запускает апоптоз по внутреннему пути через активацию каспаз и фрагментацию ДНК белком АИФ. Для оценки уровня спонтанного апоптоза, а также апоптоза, вызванного цисплатином, мы использовали антитела на активированную каспазу-3. После фиксации и окраски антителами клетки анализировали на проточном цитометре (рис.7).

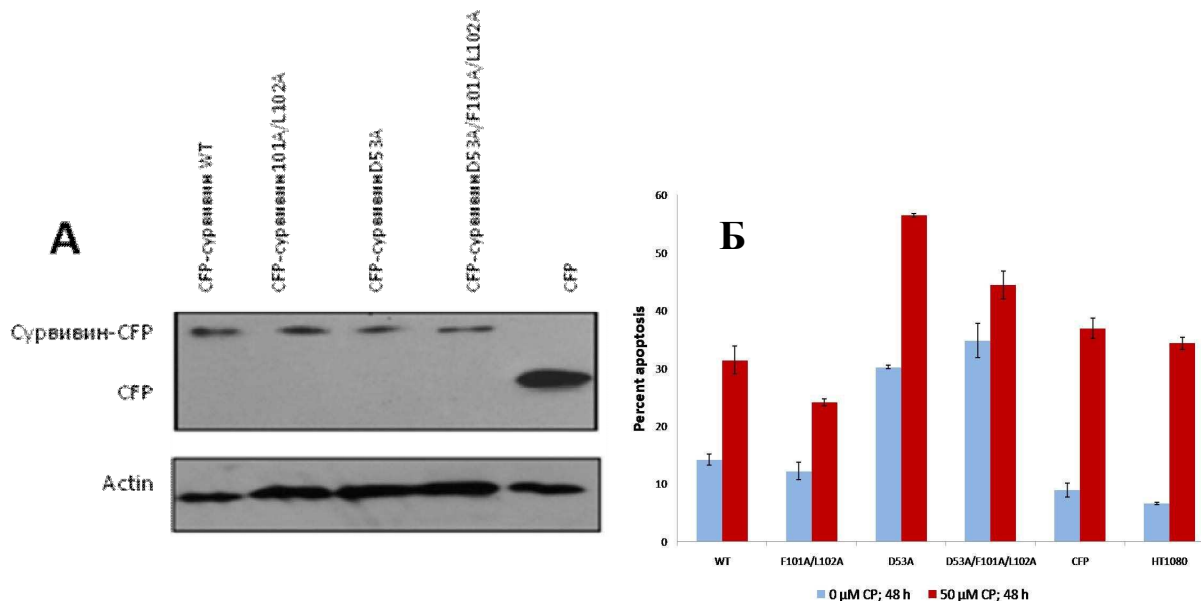


Рис. 7: Влияние различных мутантов сурвивина на каспаз-зависимый апоптоз клеток HT1080. (А) Клетки HT1080 заражали лентивирусными векторами, кодирующими сурвивин дикого типа (WT), сурвивин^{F101A/L102A} (F101A/L102A), сурвивин^{D53A} (D53A), сурвивин^{D53A/F101A/L102A} (D53A/F101A/L102A) или CFP. После отбора на селективной среде клетки, стабильно экспрессирующие сурвивин, его мутанты или CFP лизировали; лизаты анализировали с помощью иммуноблота с первичными антителами против CFP. Для обеспечения эквивалентного количества белков в анализируемых лизатах проводили также контрольный блоттинг с первичными антителами к актину. (Б) Клетки HT1080, не заражённые лентивирусными частицами (HT1080) или стабильно экспрессирующие сурвивин дикого типа (WT), сурвивин^{F101A/L102A} (F101A/L102A), сурвивин^{D53A} (D53A), сурвивин^{D53A/F101A/L102A} (D53A/F101A/L102A) или CFP (CFP), были обработаны (красные столбики) или не обработаны (синие столбики) цисплатином (CP) в концентрации 50 μM. Через 48 часов после добавления цисплатина прикреплённые и открепившиеся клетки были фиксированы и пермеабелизованы. Для оценки уровня апоптоза пермеабелизованные клетки окрашивались первичными антителами на активированную каспазу-3 и вторичными антителами, конъюгированными с Alexa Fluor 488, после чего клетки анализировали на проточном цитометре. На рисунке приведены данные, являющиеся средним из трёх независимых экспериментов ± С.О.

Видно, что экспрессия сурвивина дикого типа (WT) и сурвивина^{F101A/L102A} (F101A/L102A) незначительно повышают уровень спонтанного апоптоза (синие столбики),

что может быть объяснено нарушениями в процессе деления клеток, вызванными сверхэкспрессией этих белков. Наибольший уровень спонтанного апоптоза, более чем в 4 раза превышающий апоптоз в контрольных клетках, наблюдается в клеточных линиях, стабильно экспрессирующих сурвивин^{D53A} (D53A) и сурвивин^{D53A/F101A/L102A} (D53A/F101A/L102A). При этом в клетках, экспрессирующих сурвивин^{D53A/F101A/L102A}, уровень спонтанного апоптоза даже выше, чем при экспрессии описанного ранее доминантно негативного мутанта сурвивина, имеющего только одну аминокислотную замену. Кроме этого, из рисунка 7Б видно, что в клетках, обработанных цисплатином (красные столбики), наименьший уровень апоптоза наблюдается при экспрессии сурвивина дикого типа (WT) и его мутанта, неспособного к димеризации (F101A/L102A). Причём процент апоптоза в клетках экспрессирующих сурвивин^{F101A/L102A} ниже, чем в клетках, экспрессирующих нормальный сурвивин. Напротив, наибольший уровень апоптоза, вызванного цисплатином, наблюдается в клетках, которые приводят к экспрессии мутанты сурвивина с заменой 53ей аминокислоты. Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что сурвивин^{F101A/L102A} более эффективно, чем сурвивин дикого типа, защищает клетки фибросаркомы человека от каспаз-зависимого апоптоза, вызванного цисплатином.

Сурвивин^{F101A/L102A} более эффективно ингибирует Smac/Diablo, чем сурвивин дикого типа

Для выяснения причин различий во влиянии сурвивина и его мутантов на способность клеток к апоптозу мы исследовали ингибирование ими белка Smac/Diablo. Клетки, экспрессирующие различные мутанты сурвивина, были трансфицированы siRNA против последовательности Smac/Diablo человека для «knockdown» белка Smac/Diablo. Эффективность «knockdown» контролировали с помощью иммуоблота (рис.8). Через 24 часа после трансфекции к клеткам добавляли цисплатин и ещё через 48 часов определяли уровень активации каспазы-3 на проточном цитометре (рис.8Б).

Ожидалось, что уменьшение активации каспазы-3 при «knockdown» Smac/Diablo будет пропорционально эффективности ингибирования Smac/Diablo сурвивином или его мутантами. Обнаружилось, что в клетках, экспрессирующих сурвивин^{F101A/L102A}, не наблюдается статистически значимого уменьшения активации каспазы-3. В противоположность этому в клетках, экспрессирующих сурвивин дикого типа или CFP, было замечено сильное уменьшение количества активированной каспазы-3 в сравнении с клетками, трансфицированными контрольной siRNA. Такой результат говорит в пользу того, что в условиях эксперимента на исследуемых клеточных линиях сурвивин^{F101A/L102A} способен почти полностью ингибировать Smac/Diablo, в то время как сурвивин дикого типа ингибирует Smac/Diablo в значительно меньшей степени. Кроме этого, из рисунка 8Б видно, что ингибирование белка Smac/Diablo не оказывает статистически достоверного влияния на апоптоз клеток, экспрессирующих сурвивин^{D53A} и сурвивин^{D53A/F101A/L102A}.

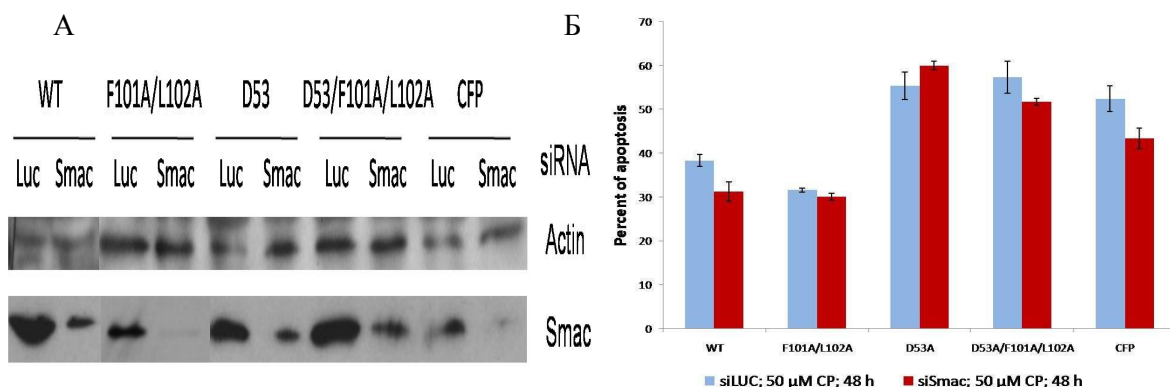


Рис. 8: Влияние «knockdown» Smac/Diablo на уровень каспаз-зависимого апоптоза, вызванного цисплатином, в клетках HT1080, экспрессирующих различные мутанты сурвивина. (А) «Knockdown» Smac/Diablo с помощью siRNA. Клетки HT1080, стабильно экспрессирующие сурвивин дикого типа (WT), сурвивин^{F101A/L102A} (F101A/L102A), сурвивин^{D53A} (D53A), сурвивин^{D53A/F101A/L102A} (D53A/F101A/L102A) или CFP (CFP), были трансфицированы контрольной siRNA (Luc) или siRNA против Smac/Diablo (Smac). Через 72 часа после трансфекции клетки были лизированы и исследованы методом иммуноблотинга с первичными антителами на Smac/Diablo и на актин. (Б) Клетки HT1080, стабильно экспрессирующие сурвивин дикого типа (WT), сурвивин^{F101A/L102A} (F101A/L102A), сурвивин^{D53A} (D53A), сурвивин^{D53A/F101A/L102A} (D53A/F101A/L102A) или CFP (CFP), были трансфицированы контрольной siRNA (синие столбики) или siRNA против Smac/Diablo (красные столбики). Через 24 часа после трансфекции к клеткам был добавлен цисплатин (CP) в концентрации 50 μM. Через 48 часов после добавления цисплатина уровень каспаз-зависимого апоптоза в клетках был определен так же, как описано выше. На рисунке приведены средние значения для двух независимых экспериментов ± С.О.

Мономер сурвивина защищает клетки как от каспаз-зависимого, так и от каспаз-независимого апоптоза, вызванного цисплатином.

Tong Liu и соавторы показали, что кроме классического каспаз-зависимого пути апоптоза сурвивин может ингибировать и каспаз-независимый апоптоз, снижая количество AIF, перемещающегося в ядро. Для того чтобы определить, влияет ли мономер сурвивина на каспаз-независимый апоптоз, ответ клеточных линий фибросаркомы на цисплатин оценивали в присутствии z-Val-Ala-Asp(oMe)-fluomethyl ketone (zVAD-fmk) -- панкаспазного ингибитора, блокирующего как инициаторные, так и эффекторные каспазы и таким образом ингибирующего каспаз-зависимый путь апоптоза. Уровень апоптоза в исследуемых клетках определялся с помощью окраски Annexin-PE и последующего анализа на проточном цитометре (Рисунок 9А). Добавления zVAD-fmk в концентрации 20 μM было достаточно для значительного понижения уровня апоптоза во всех исследуемых клеточных линиях. Однако даже в присутствии ингибитора каспаз уровень апоптоза в клетках, обработанных цисплатином, был существенно выше, чем в контроле (рис.9Б, зелёные столбики). Такой результат свидетельствует о том, что клетки HT1080 способны к апоптозу как по каспаз-зависимому, так и по каспаз-независимому пути.

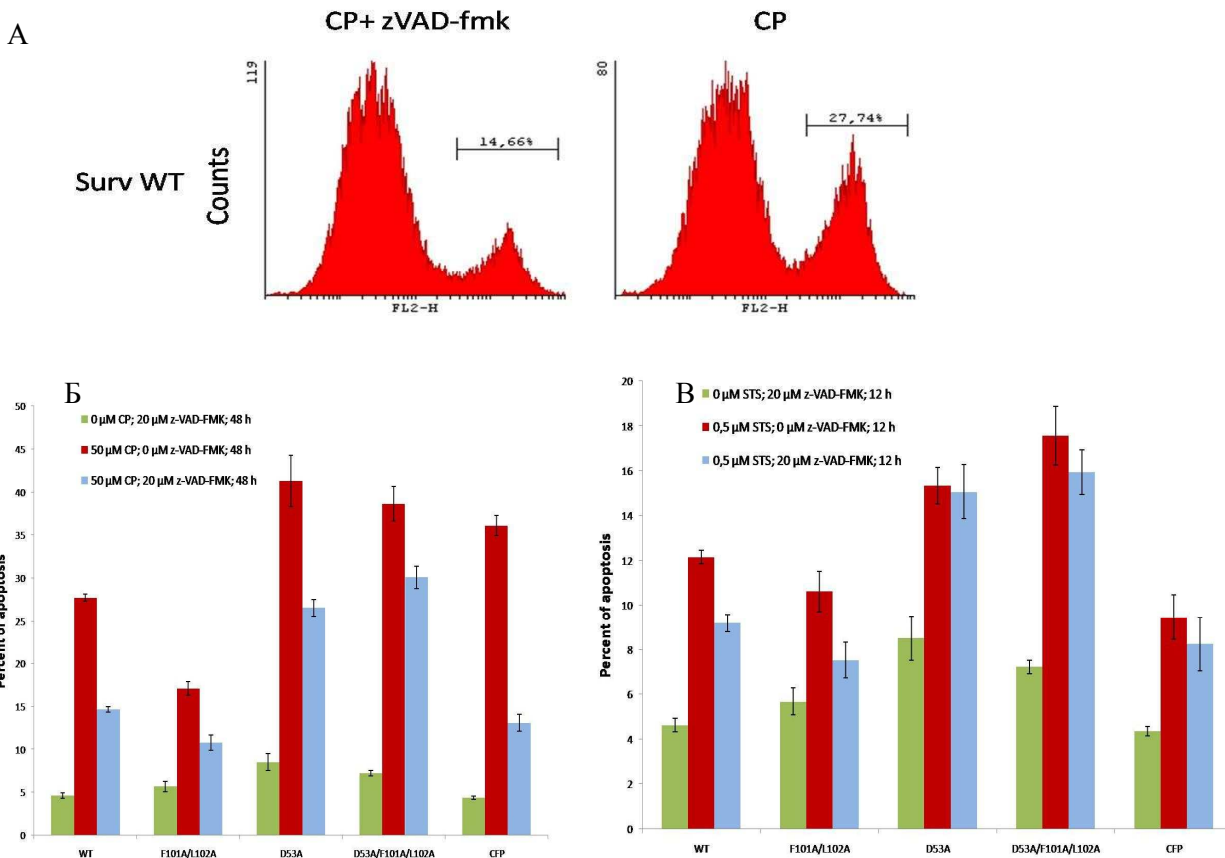


Рис.9: Влияние различных мутантов сурвивина на каспаз-независимый апоптоз, вызванный цисплатином, в клетках HT1080. (А) К клеткам HT1080, стабильно экспрессирующим сурвивин дикого типа (Surv WT), был добавлен цисплатин (CP) в концентрации 50 μM в отсутствие или присутствии 20 μM zVAD-fmk. Через 48 часов после добавления цисплатина клетки окрашивали Annexin-PE и анализировали на проточном цитометре. Увеличение уровня флуоресценции клеток (FL2) соответствует повышению количества апоптотизирующих клеток. (Б) К клеткам HT1080, стабильно экспрессирующим сурвивин дикого типа (WT), сурвивин^{F101A/L102A} (F101A/L102A), сурвивин^{D53A} (D53A), сурвивин^{D53A/F101A/L102A} (D53A/F101A/L102A) или CFP (CFP), был добавлен цисплатин (CP) в концентрации 50 μM в отсутствие (красные столбики) или присутствии (синие столбики) 20 μM zVAD-fmk, в качестве контроля использовали клетки, в среду к которым было добавлено 20 μM zVAD-fmk без цисплатина (зелёные столбики). Через 48 часов после добавления цисплатина уровень апоптоза определялся окрашиванием клеток Annexin-PE с последующим анализом на проточном цитометре. На рисунке приведены данные, являющиеся средним двух независимых экспериментов \pm С.О..(В) К клеткам HT1080, описанным в пункте (Б), добавляли стауроспорин (STS) в концентрации 0,5 μM в отсутствие (красные столбики) или присутствии (синие столбики) 20 μM zVAD-fmk, в качестве контроля использовали клетки, в среду которых было добавлено 20 μM zVAD-fmk без стауроспорина (зелёные столбики). Через 12 часов после добавления стауроспорина уровень апоптоза определяли окрашиванием клеток Annexin-PE с последующим анализом на проточном цитометре. На рисунке приведены данные, являющиеся средним из двух независимых экспериментов \pm С.О.

Из рисунка 9Б следует, что даже в присутствии ингибитора каспаз клетки, экспрессирующие сурвивин^{F101A/L102A} (F101A/L102A), менее подвержены апоптозу, чем контрольные клетки (CFP). Это свидетельствует о том, что мономер сурвивина, помимо каспаз-зависимого апоптоза, способен ингибировать и каспаз-независимый апоптоз. Важно отметить, что в наших экспериментальных условиях не наблюдалось статистически достоверных различий между уровнем апоптоза, вызванного цисплатином в присутствии zVAD-fmk в клетках, экспрессирующих сурвивин дикого типа (WT), и уровнем апоптоза в контрольных клетках (CFP). Более того, даже при добавлении zVAD-fmk уровень апоптоза в клетках, экспрессирующих мутанты сурвивина с заменой 53й аминокислоты, более чем в 2 раза превышает апоптоз в клетках других созданных нами клеточных линий. В сочетании с данными о том, что ингибирование Smac/Diablo в этих клеточных линиях не оказывает заметного влияния на уровень апоптоза, это говорит в пользу того, что сурвивин^{D53A} и сурвивин^{D53A/F101A/L102A} в клетках HT1080 усиливают апоптоз, вызванный цисплатином, преимущественно по каспаз-независимому пути. Такой результат является крайне интересным, так как ранее предполагалось (Song Z., 2004), что проапоптозное действие сурвивина^{D53A} основано исключительно на образовании нефункциональных гетеродимеров с эндогенным сурвивином, не способных ингибировать белок Smac/Diablo.

Для того чтобы убедиться в том, что результаты, полученные в этом опыте, справедливы не только для цисплатина, но и для других стимулов, активирующих митохондриальный путь апоптоза, аналогичный эксперимент был проведён с использованием в качестве индуктора апоптоза стауроспорина — алколоида, продуцируемого бактериями рода *Streptomyces* и являющегося ингибитором широкого спектра киназ. Как видно из рисунка 9В, использование стауроспорина в качестве индуктора апоптоза приводит к тем же результатам, что и использование цисплатина.

Долгое время считалось, что в клетке весь сурвивин находится только в виде димера, а мономер не имеет биологических функций (Muchmore S. W., 2000; а так же Song, 2004). Однако постепенно накапливаются данные, подтверждающие тот факт, что в некоторых процессах участвует мономер, а не димер сурвивина. Так, например, Jeyarakash A.A., 2007 показано, что именно мономер сурвивина входит в состав CPC и именно мономер взаимодействует с экспортным рецептором CRM1 (Engelsma D., 2007). Наконец, недавно полученные Wang H. и коллегами данные говорят о том, что в клетках существует специальный механизм регуляции равновесия между димерной и мономерной формой сурвивина посредством ацетилирования сурвивина по различным остаткам лизина

Исследование содержания J-пептида в нормальных и опухолевых образцах.

Отдельное место в данной работе занимает исследование содержания белка J-пептида в нормальных тканях человека с использованием широкой панели образцов тканей. Полученные данные предлагается использовать в качестве базовых при исследованиях, связанных с изменением содержания J-пептида при различных патологиях, отражающих нарушения в адаптивной иммунной системе.

Полученную ранее (Снежков, ЛСФГЧ) генно-инженерную конструкцию, кодирующую полноразмерный J-пептид, использовали для получения рекомбинантного J-пептида, который, в свою очередь, после очистки применяли для иммунизации кроликов и выработки поликлональных моноспецифических антител и в качестве контрольного образца для иммунохимического анализа. С помощью очищенных поликлональных антител нами были исследованы сыворотка крови и образцы нормальных тканей здоровых, клинически охарактеризованных людей. Анализ образцов сыворотки крови методом ИФА показал, что доля J-пептида в суммарном белке сыворотки составляет 512 нг/мг (таблица 2).

Таблица 2. Содержание J-пептида в нормальных тканях человека

№	Источник образца ткани	Содержание J-пептида, нг/мг суммарного белка экстракта ткани или сыворотки крови
2	Центральная область легких	320 ± 80
3	Периферическая область легких	40 ± 16
4	Эмбриональные лёгкие (24 недели развития)	13 ± 0.1
5	Сыворотка крови	512 ± 64
6	Тонкий кишечник	14.0 ± 0.1
7	Толстый кишечник	28.0 ± 2.3
8	Мышцы	16.0 ± 1.6

Эти результаты были подтверждены методом иммуноблотинга (рис. 10). Определенное нами содержание J-пептида в суммарном белке сыворотки крови соответствует данным литературных источников (540 нг/мг суммарного белка; Stavnezer J., 1996), рассчитанным по содержанию полимерных иммуноглобулинов в сыворотке крови человека, а также учитывающим долю секреторных форм антител в крови человека и содержание J-пептида в этих антителах.

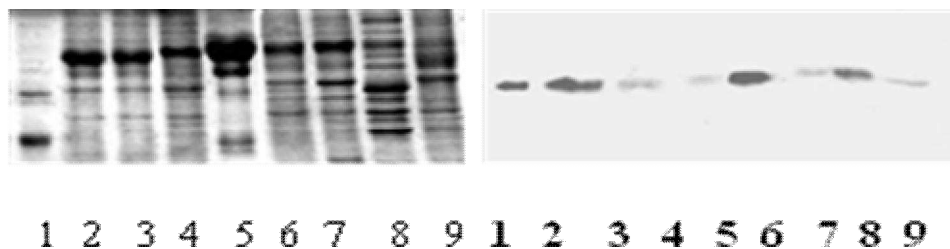


Рис. 10. Слева – электрофореграмма исследуемых образцов различных тканей здоровых людей по стандартной методике, справа – анализ тех же образцов методом иммуноблотинга. Содержание J-пептида в нормальных тканях человека: центральной области легких (2), периферической области легких (3), эмбриональных легких (4), сыворотке крови (5), тонком кишечнике (6) толстом кишечнике (7), мышцах (8), мозге (9); 1- рекомбинантный J-пептид, положительный контроль.

Анализ содержания J-пептида в суммарном белке сыворотки крови даёт возможность судить об изменениях суммарного уровня секреторных иммуноглобулинов.

Исследуемые нами образцы легочной ткани и ткани кишечника были взяты случайным образом с обширной территории соответствующих органов и включают в себя все разнообразие представленных в этих органах клеточных структур. Особенностью В-

лимфоцитов слизистых ЖКТ является преобладание так называемых несущих IgA В-клеток, для которых предопределена функция биосинтеза IgA. Кроме очаговых скоплений лимфоидной ткани имеется также диффузная сеть этой ткани, пронизывающая слизистую оболочку всего желудочно-кишечного тракта (Беляков И.М, 1997). Именно в них и содержится основная доля определяемого нами J-пептида, который обнаруживается в различных отделах ЖКТ и наиболее представлен в отделах толстого кишечника, и меньше - в отделах тонкого кишечника (рис. 10).

Исходя из специфического диффузного распределения В-клеток, мы решили сгруппировать все данные по ЖКТ в две исследуемые группы - ткани тонкого и толстого кишечника (рис. 11). В системе местного иммунитета ЖКТ особую роль играет секреторный IgA (sIgA) (Беляков И.М, 1997), в составе которого, возможно, и определяется основное количество выявленного J-пептида.

Мы определили, что содержание J-пептида в суммарном белке экстрактов тонкого кишечника составило 14 ± 0.1 , толстого кишечника - 28 ± 2.3 и мышечной ткани - 16 ± 1.6 нг/мг). Повышенный уровень J-пептида в толстом отделе кишечника также может быть объяснён большим содержанием в нём лимфоидной ткани (Беляков И.М, 1997).

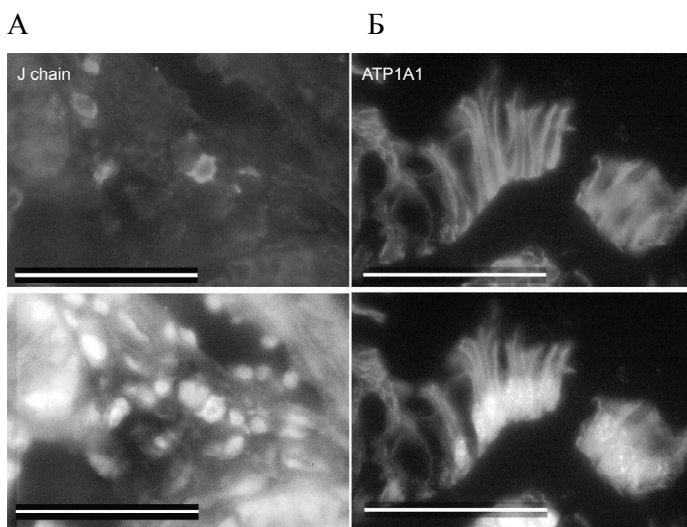


Рис.11. Иммуногистохимическое исследование фиксированных ледяным метанолом образцов тканей тонкого кишечника с окрашиванием их поликлональными антителами к J-пептиду, вторичные антитела Alexa anti-rabbit 555 (А) и (Б) аналогичное окрашивание, но с выявленными при помощи красителя (SybrGreen) клеточных ядер. (В)- окрашивание антителами к Na,K-АТФ-азе и (Г) - аналогичное окрашивание с выявленными при помощи красителя SybrGreen ядрами. Линейка – 15.0 мкм

Видимо, именно в составе так называемых, несущих IgA В-клеток J-пептид детектируется при иммуногистохимическом окрашивании препарата толстого кишечника (рис. 11).

В легочной ткани эмбриона на 24-ой неделе развития организма были обнаружены следовые количества J-пептида - 13 нг/мг белка экстракта, что составляет около 3% от его среднего содержания в центральной области легких взрослых людей и соответствует

выводам ученых о времени появления этого белка в развивающихся легких человека (Gurevich P и соавт., 2003)

Впервые нами показано высокое содержание J-пептида в образцах центральной и периферической области легких человека (рис. 12), причем основное его количество - 320 нг/мг - сосредоточено в центральной области легких (таблица 2), которая характеризуется высоким содержанием В-клеток.

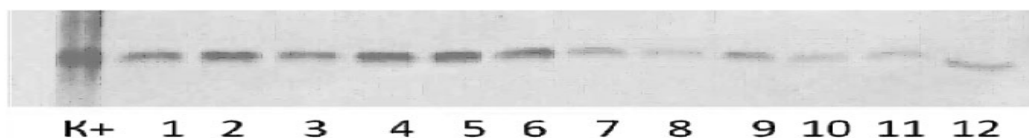


Рис.12. Анализ экстрактов центральной (1-6) и периферической области (7-12) нормальных легких человека методом иммуноблоттинга. Окрашивание с использованием поликлональных антител к рекомбинантному J-пептиду.

Проведенный анализ показал также, что J-пептид не обнаруживается использованными методами в исследованных образцах ткани мозга (рис. 10). Незначительное количество J-пептида присутствует в образцах мышечной ткани (рис. 10, 11), что можно объяснить присутствием в них остаточных количеств компонентов крови.

Результаты данной работы можно рассматривать в качестве базовых при различных исследованиях, связанных с изменением содержания J-пептида при легочных и кишечных патологиях.

Кроме того, на образцах нормальной и опухолевой тканей при плоскоклеточном раке легких человека обнаружено снижение уровня транскрипции гена J-пептида в опухоли. При этом в качестве контроля использовали рекомбинантный J-пептид. Методом иммуноблоттинга с использованием поликлональных антител к J-пептиду исследовали пары образцов (норма-N и опухоль-T – пары образцов) от 26 пациентов. Показано, что в случае наиболее представленных групп норма-N и опухоль-T как с центральной, так и с периферической локализацией опухоли наблюдалась преимущественное подавление регуляции. Исключение составила группа с центральной локализацией и ороговением опухоли, в которой для половины рассматриваемых пар не наблюдали изменений в содержании J-пептида, а оставшиеся образцы поровну распределились между вариантами регуляции. На основании этих результатов можно предположить, что неороговевающая форма опухоли на 1-2 стадии развития является более регулируемой, т.е. трансформированные клетки в этом случае легче воспринимают внешние метаболические сигналы. В то время как форма опухоли, содержащая ороговевшие клетки, находится в изолированном, более стабильном состоянии.

Таким образом, по результатам проведенной работы предложено дополнить панель онкологических диагностических наборов белком J-пептидом.

Заключение

Получены в клетках *E. coli* и очищены рекомбинантные белки сурвивин, Smac/Diablo и J-пептид. Эти белки использованы для иммунизации мышей BALB/C. С помощью гибридной технологии получены и отобраны гибридомы, продуцирующие моноклональные антитела,

взаимодействующие с соответствующими белками в иммунологических реакциях (ИФА и иммуноблотт). Показано, что моноклональные антитела к белку сурвивину распознают различные изоформы эндогенного клеточного белка. На основе полученных моноклональных антител создан диагностический набор «Пептосурвим» для определения уровня белка сурвивина в различных биологических образцах, основанный на методе ИФА и тест-система для определения уровня Smac/Diablo в различных биологических образцах, также основанная на методе ИФА. С помощью полученных тест-систем были определены белки сурвивин и Smac/Diablo в лизатах клеточных линий, сыворотке крови и соскобах эндометрия.

Проведены исследования по количественной оценке содержания J-пептида. На основании полученных результатов, а также литературных данных Vaerman J.P, 1995 и Gurevich P, 2003, подобного рода анализ предлагается использовать для характеристики и лечения различного рода легочных заболеваний и заболеваний ЖКТ. Примером тому служат фармакологические препараты National Jewish Center for Immunology and Respiratory Medicine (Denver, CO). United States Patent 5698679, имеющие J-пептид в составе секреторных полимерных иммуноглобулинов.

В рамках данной работы была исследована способность мономера сурвивина защищать клетки от апоптоза через ингибирование проапоптозного белка Smac/Diablo. С помощью «pull-down assay», коиммунопреципитации и метода регистрации FRET мы показали, что *in vitro* и *in vivo* мутант сурвивина, не способный к димеризации, может взаимодействовать с белком Smac/Diablo. Кроме того, нами было показано, что для взаимодействия этих белков необходим участок димеризации сурвивина. Используя клеточные линии, стабильно экспрессирующие различные мутанты сурвивина, а также с помощью РНК интерференции мы получили данные, говорящие в пользу того, что сурвивин^{F101A/L102A} более эффективно ингибирует Smac/Diablo, чем сурвивин дикого типа. Исследуя участие мономера сурвивина в защите от апоптоза через увеличение стабильности антиапоптозного белка XIAP, мы установили, в частности, что с XIAP способен взаимодействовать не только сурвивин дикого типа, но и его мутант, не образующий димеров.

В процессе исследования определено: сурвивин^{F101A/L102A} лучше, чем сурвивин дикого типа, ингибирует каспаз-независимый путь апоптоза в клетках фибросаркомы человека HT1080, то есть мономер сурвивина более эффективно защищает клетки от апоптоза, идущего по митохондриальному пути. Поскольку в клетке сурвивин дикого типа существует как в виде димера, так и в виде мономера, на основании полученных результатов мы можем предположить, что в защите от апоптоза в живой клетке участвует именно мономер сурвивина.

Предложенная нами модель антиапоптозного действия сурвивина также даёт возможность объяснить, каким образом сурвивин способен выполнять разные, во многом противоположные, функции в одном и том же процессе в клетке. Так, например, можно предположить, что при делении часть сурвивина, находясь в виде мономера, входит в состав

СРС и участвует в дестабилизации неправильно прикрепленных к кинетохорам микротрубочек (Delacour-Larosw M., 2007), а димерная фракция сурвивина взаимодействует с микротрубочками веретена деления и, напротив, повышает их стабильность. Такая гипотеза кажется нам крайне вероятной, так как доказано, что в состав СРС входит именно мономер сурвивина.

В рамках данной работы наблюдалось также, что только сурвивин в виде димерной молекулы влияет на стабильность микротрубочек и, вероятно, только он способен связываться с полимеризованным тубулином, играя роль адаптора между микротрубочками и другими белками (Gruss O.J., 2004). Таким образом, если предположить, что часть своих функций сурвивин выполняет в виде димера, а часть - в виде мономера, регуляция равновесия димер-мономер может служить «переключателем» между различными функциями сурвивина.

ВЫВОДЫ

1. Получены и очищены рекомбинантные белки сурвивин и Smac/Diablo. Получены моноклональные антитела к рекомбинантным белкам сурвивин и Smac/Diablo.
2. Изучив особенности взаимодействия сурвивина с белком Smac/Diablo, показано, что:
 - сурвивин^{F101A/L102A} в растворе существует в виде мономера.
 - Мономер сурвивина *in vitro* и *in vivo* способен взаимодействовать с белком Smac/Diablo.
 - Сурвивин^{F101A/L102A} более эффективно защищает клетки фибросаркомы человека HT1080 от каспаз-зависимого апоптоза, вызванного цисплатином, чем сурвивин дикого типа.
 - Сурвивин^{F101A/L102A} более эффективно ингибирует Smac/Diablo, чем сурвивин дикого типа.
 - Мономер сурвивина защищает клетки как от каспаз-зависимого, так и от каспаз-независимого апоптоза, вызванного цисплатином.
3. Определено содержание дифференциальных белковых продуктов (сурвивин и Smac/Diablo) в клеточных линиях и опухолевых образованиях различных тканей больных и здоровых индивидуумов. Оценена диагностическая перспективность дифференциальных белков сурвивина и Smac/Diablo.
4. Результат изучения образцов эндометрия 80 пациентов позволяет считать тест-систему для определения белка сурвивин в биологических образцах в варианте двустадийного иммунофлуоресцентного анализа наиболее простой и технологически приемлемой для клинического использования.
5. Определен уровень синтеза белка J-пептида в образцах из различных тканей здоровых индивидуумов, а также содержание J-пептида в образцах нормальных и опухолевых тканей 26 пациентов при плоскоклеточном раке и аденокарциноме легкого, в результате чего определено снижение уровня синтеза J-пептида в опухоли у 61% пациентов.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Pavlukov M.S., **Antipova N.V.**, Balashova M.V., Vinogradova T.V., Kopantzev E.P., Shakhparonov M.I. Survivin monomer plays an essential role in apoptosis regulation. *J. Biol. Chem.* 2011 jbc.M111.237586. First Published on May 2, 2011, doi:10.1074/jbc.M111.237586
2. Макаров И.О., Овсянникова Т. В., Шешукова Н. А., Федотова А. С., Боровкова Е. И., Шахпаронов М. И., **Антипова Н. В.** . Онкологические аспекты гиперпластических процессов в эндометрии. -Российский вестник акушера-гинеколога, 2011. №1.14-16.
3. Слижикова Д.К., Зиновьева М.В., Кузьмин Д.В., Снежков Е.В., Шахпаронов М.И., Дмитриев Р.И., **Антипова Н. В.**, Завалова Л.Л., Свердлов Е.Д.. Снижение экспрессии J-пептида человека при плоскоклеточном раке и аденокарциноме легкого. - Молекулярная биология, 2007, т.41, № 4, 659-665.
4. **Антипова Н. В.**, Снежков Е. В., Завалова Л. Л., Шахпаронов М. И. Иммунологическое исследование тканевой специфичности J-пептида секреторных полимерных иммуноглобулинов человека. - Биоорг.химия, 2010, 36 (6): 774-778.
5. **Антипова Н. В.** Диагностическая система «Пептосурвим» для определения белка сурвивина в биологических образцах. - Вестник Российского Государственного Медицинского Университета, 2011. - Спец. Выпуск №1. -Стр.233-234.

Тезисы докладов:

1. **Антипова Н.В.**, Завалова Л.Л., Копанцев Е.П., Свердлов Е.Д. J-пептид секреторных полимерных иммуноглобулинов человека при плоскоклеточном раке и аденокарциноме легких. - XIX зимняя молодежная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии», –М., 2007. -Стр.58.
2. **Антипова Н.В.** Some oncoproteins as cancer markers associated with non-small cell lung cancer. Conference for young scientists, PhD students and students on molecular biology and genetics, Dedicated to 120th anniversary of M.I.Vavilov, Киев, 2007, p.156.
3. **Антипова Н.В.** Regulation of human immunoglobulin J-peptide expression in non-small cell lung cancer (NSCLC). Conference for young scientists, PhD students and students on molecular biology and genetics Dedicated to 120th anniversary of M.I.Vavilov, Киев, 2007, pp. 157
4. **Антипова Н.В.**, Дмитриев Р.И., Шахпаронов М.И., Копанцев Е.П., Завалова Л.Л., Свердлов Е.Д. Regulation of human immunoglobulin J-peptide expression in non-small cell lung cancer (NSCLC). FEBS 2007, Вена, pp.158,
5. **Антипова Н.В.** Регуляция экспрессии j-пептида иммуноглобулинов человека при плоскоклеточном раке и аденокарциноме легких. - "Фундаментальная наука и клиническая медицина". Десятая Всероссийская медико-биологическая конференция молодых исследователей "Человек и его здоровье", С.-Петербург, 2007, стр. 11-12.
6. **Антипова Н.В.**, Копанцев Е.П., Завалова Л.Л., Свердлов Е.Д. Онкобелки: TCF-4, Smac, STAT-3, Survivin, cyclin D1 при немелкоклеточном раке легких человека. - XX зимняя международная молодежная научная школа “Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии”, Москва, 2008г. -Стр.9.

7. Антипова Н.В., Завалова Л.Л., Шахпаронов М.И. Разработка диагностической системы для определения наличия белка сурвивина в биологических образцах. Международная конференция ИБХ, посвященная 75-летию Ю.А.Овчинникова, Москва, ИБХ, 2009, тезисы докладов, стр. 117.
8. Павлюков М.С., Антипова Н.В., Завалова Л.Л., Шахпаронов М.И. Изучение взаимодействия рекомбинантных белков survivin и SMAC/DIABLO in vitro. Международная конференция ИБХ, посвященная 75-летию Ю.А.Овчинникова, Москва, ИБХ, 2009, тезисы докладов, стр.314.
9. Антипова Н.В., Завалова Л.Л., Шахпаронов М.И. «Набор для качественного определения белка сурвивин в биологических образцах методом твердофазного ИФА(ELISA). 1-ая международная научная школа "Наноматериалы и нанотехнологии в живых системах" Моск. Обл., 2009, стр.157.
10. Антипова Н.В., А.С.Федотова, Л.Л.Завалова, М.И. Шахпаронов. Определение белка сурвивина в нормальных и патологических образцах с помощью диагностического набора «Пептосурвим». 14-ая Международная Пушинская школа – конференция молодых ученых «Биология-Наука XXI века». 2010, сб. тезисов, стр. 117.
11. Антипова Н.В., Шахпаронов М.И.. ДИАГНОСТИЧЕСКАЯ СИСТЕМА «ПЕПТОСУРВИМ». Школа-конференция молодых ученых “Фундаментальная наука для биотехнологии и медицины- 2010 ”. - стр4-6.
12. Павлюков М.С., Антипова Н.В., Шахпаронов М.И. СОЗДАНИЕ НОВЫХ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ ПРЕПАРАТОВ НА ОСНОВЕ БЕЛКА СУРВИВИН. Школа-конференция молодых ученых “Фундаментальная наука для биотехнологии и медицины-2010. - стр 67.
13. Павлюков М.С., Антипова Н.В., Завалова Л.Л., Шахпаронов М.И. Изучение механизмов ингибирования апоптоза белком Сурвивин. 14-ая Международная Пушинская школа – конференция молодых ученых «Биология-Наука XXI века». 19 – 23 апреля 2010, тезисы, стр.314.
14. Антипова Н.В., А.С.Федотова, Л.Л.Завалова, М.И. Шахпаронов. Диагностический набор «Пептосурвим». - Всероссийская школа-семинар студентов, аспирантов и молодых ученых по направлению «Нанобиотехнология». 2010, стр.14.
15. Антипова Н.В., Федотова А.С., Шахпаронов М.И. Определение белка сурвивина в эндометрии с помощью диагностического набора «Пептосурвим». 12 зимняя молодежная научная школа, Москва, ИБХ, 2010, стр.67.
16. Павлюков М.С., Антипова Н.В., Шахпаронов М.И. Участие мономера сурвивина в регуляции апоптоза .12 зимняя молодежная научная школа, Москва, ИБХ, 2010, стр.47.
17. Антипова Н.В., А.С.Федотова. Онкологические аспекты гиперпластических процессов эндометрия. -XVI Российский национальный конгресс «Человек и лекарство». -М., 2010.