

ЛАПШИНА Мария Александровна

**АССОЦИАЦИЯ БЕЛКА p53 С ЯДЕРНЫМ МАТРИКСОМ  
В КЛЕТКАХ РАЗНЫХ ТИПОВ**

03.01.04 - биохимия

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Нижний Новгород - 2011

Работа выполнена в Учреждении Российской академии наук Института проблем химической физики РАН, г. Черноголовка

**Научный руководитель:**

кандидат биологических наук  
**Терентьев Алексей Алексеевич**

**Официальные оппоненты:**

доктор биологических наук, профессор  
**Новиков Виктор Владимирович**  
ГОУ ВПО Нижегородский  
государственный университет  
им. Н.И. Лобачевского

доктор биологических наук, профессор  
**Бояринова Лариса Валентиновна**  
ГОУ ВПО Нижегородская  
государственная медицинская  
академия, г. Нижний Новгород

**Ведущая организация:**

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

Защита диссертации состоится «26» мая 2011 г. в «15» часов на заседании диссертационного совета Д 212.166.15 при Нижегородском государственном университете им. Н.И.Лобачевского по адресу: 603950, г. Нижний Новгород, пр. Гагарина, 23.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Нижегородского государственного университета им. Н.И.Лобачевского.

Автореферат разослан «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2011 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета,  
к.б.н., доцент



Копылова С.В.

## **Общая характеристика работы**

### **Актуальность исследования**

Опухолевый супрессор – белок p53 – играет ключевую роль в регуляции клеточного ответа на ДНК-повреждающие факторы. Активация белка p53 в ответ на различные виды стресса приводит к остановке пролиферации или апоптозу. Мутации гена p53 обнаруживаются в 50% опухолей, его выключение методом «нокаута» нелетально, но приводит к быстрой гибели организма от спонтанного канцерогенеза, что отражает важную роль p53 в супрессии опухолей. Белок p53 относится к факторам транскрипции, и его основные функции связаны с активацией или супрессией генов, участвующих в регуляции клеточного цикла и клеточной гибели (Чумаков 2007, Joerger & Fersht 2008). Подобно другим факторам транскрипции, p53 обнаружен в составе белкового остова клеточного ядра – ядерного матрикса (Jiang et al. 2001, Okorokov et al. 2002, Peidis et al. 2011).

Ядерный матрикс (ЯМ) – структура, которая обеспечивает внутриядерное распределение макромолекул и надмолекулярных комплексов и обеспечивает пространственную координацию биохимических процессов, происходящих в клеточном ядре (Rynearson & Sussman 2011). Нарушения структуры ЯМ приводят к возникновению серьезных патологий, и мутации в генах, кодирующих белки ЯМ, связаны с нарушением репарации ДНК, регуляции клеточного роста и дифференцировки клеток. Многие наследственные заболевания (ламинопатии, липодистрофии, мышечные дисплазии, нейродегенеративные заболевания и др.) вызываются мутациями в генах ферментов, структурных белков, транскрипционных факторов, которые входят в состав ядерного матрикса (Broers et al. 2006, Jing et al. 2010, Maraldi et al. 2010). В настоящее время некоторые белки ядерного матрикса применяются в качестве молекулярных маркеров для диагностики опухолей мочевого пузыря, молочной железы и толстой кишки (Smrkolj et al. 2011, Walgenbach-Brunagel et al. 2008).

Несмотря на огромное количество литературы, посвященной структуре и свойствам белка p53, а также структуре и функциям ядерного матрикса, о взаимодействии p53 с ЯМ известно мало. Данные по ассоциации белка p53 с ядерным матриксом немногочисленны и противоречивы (Jiang et al. 2001, Okorokov et al. 2002, Ven-Jehoda et al. 2003). В то же время, механизмы этого взаимодействия исключительно важны, поскольку их нарушения, вызывая изменение субъядерной локализации белка p53, могут привести к подавлению его функций. В связи с этим, настоящая работа посвящена изучению ассоциации белка p53 с ядерным матриксом с применением разных подходов к получению ЯМ из клеток различных типов.

### **Цель и задачи работы**

Целью данной работы является исследование взаимодействия белка p53 с ЯМ в клетках разных типов и анализ матрикссвязанного пула белка p53. В соответствии с этой целью были поставлены следующие конкретные задачи:

1. С применением различных методов получить препараты ЯМ и изучить их структурные особенности.
2. Изучить субъядерную локализацию белка p53 в клетках нескольких линий при использовании разных методов получения ЯМ.
3. Изучить экстрагируемость белка p53 в присутствии слабых растворов щелочи, кислоты и неионного детергента из препаратов ЯМ клеток разных типов.

### **Научная новизна работы**

Показано, что в процессе получения препаратов ядерного матрикса в его структуре могут происходить изменения, которые приводят к его частичному разрушению. Обнаружено, что степень ассоциации p53 с ядерным матриксом зависит от типа клеток. Впервые обнаружена возможность разделения матрикссвязанного пула белка p53 на отдельные субпулы. Показано, что белок p53 в составе ядерного матрикса клеток разных типов представлен гетерогенной группой белковых молекул, которые по-разному экстрагируются из ядерного матрикса растворами щелочи, кислоты и неионным детергентом.

### **Научно-практическая значимость работы**

В связи с важными функциями белка p53 в защите многоклеточного организма от возникновения опухолей, полученные результаты представляют интерес для исследований, посвященных функционированию опухолевого супрессора p53 и регуляции его активности. Вопрос о механизмах, определяющих связь белка p53 с ядерным матриксом, интенсивно исследуется в настоящее время, и результаты работы важны для понимания межмолекулярных взаимодействий, в которых принимает участие p53 в составе ядерного матрикса.

Работа также представляет интерес для исследований в области структуры ядерного матрикса и его роли в регуляции внутриядерных процессов. Полученные в работе данные, показывающие различия в стабильности его структуры в процессе очистки из клеток разных типов, свидетельствуют о необходимости применения нескольких подходов к его получению в ходе изучения внутриядерного распределения белков.

Учитывая большое значение белка p53 и p53-зависимых процессов для противоопухолевой терапии, результаты работы могут быть использованы как для изучения процессов канцерогенеза, так и для разработки подходов к лечению онкологических заболеваний.

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

1. В клетках разных типов степень ассоциации белка p53 с ядерным матриксом различна. В зависимости от типа клеток, белок p53 может обнаруживаться либо исключительно в ядерном матриксе, либо частично присутствовать в матрикснесвязанных фракциях клеточного ядра.

2. Белок p53, связанный с ядерным матриксом, представляет собой гетерогенный пул белковых молекул, для которых характерна разная экстрагируемость в слабых растворах щелочи, кислоты и неионного детергента.

### **Апробация работы**

Результаты проведенных исследований были представлены в виде устных и стендовых докладов на российских и международных конференциях: «Биология – Наука XXI века» (Пушино, 2003, 2004, 2005), «Молодая наука в классическом университете» (Иваново, 2004), «Cell Signaling World 2006. Signal Transduction Pathways as therapeutic targets» (Luxembourg, 2006), «Conference for young scientists on molecular biology and genetics» (Kiev, 2007), «Современная химическая физика» (Туапсе, 2007) и на конкурсе молодых ученых ИПХФ РАН им. С.М. Батурина (Черноголовка, ИПХФ РАН, 2005).

### **Публикации**

По результатам работы опубликованы 3 статьи и 7 тезисов докладов, список которых приводится в конце реферата.

### **Личный вклад автора**

Автором работы выполнены очистка препаратов ядерного матрикса, очистка РНК, анализ экспрессии мРНК генов-мишеней p53 методом ОТ-ПЦР, электрофорез белков и нуклеиновых кислот, окраска белков, иммуоблотинг, иммунофлуоресцентная микроскопия. Получение клеточных лизатов, ядерных и цитозольных экстрактов были выполнены совместно с Р.И. Папиной (ИПХФ РАН). Очистка ядер из клеток была проведена совместно с И.И. Пархоменко (ИПХФ РАН).

### **Структура и объем диссертации**

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка литературных источников. Работа изложена на 116 страницах и включает 22 рисунка и 1 таблицу. Список цитируемой литературы содержит 182 источника.

## **Основное содержание работы**

### **Методы исследования**

Эксперименты проводили на клетках нескольких линий: НЕК293 – клетки почечного эпителия эмбрионов человека, трансформированные ДНК аденовируса Ad5, HeLa – аденокарцинома шейки матки человека, MCF7 – аденокарцинома молочной железы человека, COS-7 – фибробластоподобные клетки почек африканской зеленой мартышки, трансформированные ДНК вируса SV-40. Все культуры выращивались в атмосфере 5% CO<sub>2</sub> в среде

DMEM, содержащей либо 10% сыворотку новорожденных телят (РАА Laboratories), либо 10% эмбриональную сыворотку телят (Gibco).

Первичные антитела: поликлональные антитела кролика против белка p53 и поликлональные антитела козы против белка ламина В (Santa Cruz Biotechnology, США). Вторичные антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена: антитела козы против кроличьих IgG (Amersham Biosciences, Santa Cruz Biotechnology, США); мышинные антитела против IgG козы, (Amersham Biosciences, Santa Cruz Biotechnology, США). Вторичные антитела, конъюгированные с флуоресцентным красителем Texas Red: мышинные антитела против IgG козы (Santa Cruz Biotechnology, США).

Клеточные лизаты получали гомогенизацией клеток в лизирующем буфере (50 мМ Hepes, pH 7.5, 150 мМ NaCl, 1 мМ ЭДТА, 10% глицерин, 25 мМ NaF, 10 мкМ ZnCl<sub>2</sub>, 1% Triton X-100, 2 мМ ФМСФ, 1 мМ ДТТ) на льду с последующим осветлением центрифугированием при 10000 g.

Клеточные ядра очищали гомогенизацией клеток в буфере 0.25 STC (0.25 М сахараза, 50 мМ Трис-НСl (pH 9.0), 5 мМ СаСl<sub>2</sub>, 20 мМ NH<sub>4</sub>Cl, 2 мМ ФМСФ, 1 мМ ДТТ), который содержал 0.2% тритон X-100, с последующим нанесением на буфер 1 STC (тот же, что и 0.25 STC, но содержащий 1М сахаразу) (Rubin et al. 1976). Затем ядра повторно ресуспендировали в буфере 0.25 STC и очищали через буфер 1 STC. Концентрацию хроматина определяли спектрофотометрически при длине волны 260 нм.

Препараты ЯМ *in vitro* получали с применением нескольких методов. Для получения ЯМ по методу «DN» (DNase – NaCl) (Staufenbiel & Deppert 1984) очищенные ядра вначале ресуспендировали в нуклеазном буфере (0.25 М сахараза, 50 мМ Трис-НСl (pH 7.5), 5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 1 мМ СаСl<sub>2</sub>, 2 мМ ФМСФ, 1 мМ ДТТ) до концентрации хроматина 6 мг/мл, добавляли ДНКазу I (SERVA, Германия) до концентрации 250 едениц фермента на 1 мг хроматина и инкубировали 30 мин на льду. После центрифугирования получали нуклеазную матрикснесвязанную фракцию («Н»). Дальнейшую экстракцию матрикснесвязанного хроматина проводили в буфере ТМ (10 мМ Трис-НСl (pH 7.5), 0.2 мМ MgCl<sub>2</sub>, 2 мМ ФМСФ, 1 мМ ДТТ), после центрифугирования получали фракцию «ТМ». Затем хроматин экстрагировался раствором 2 М NaCl на буфере ТМ (фракция «ВС»). После отмывки буфером ТМ (фракция «О») получали конечный препарат «ЯМ».

Для получения препаратов ядерного матрикса по методу «DA» (DNase – ammonium sulfate) (He et al. 1990) хроматин обрабатывался ДНКазой I в указанных выше условиях, а затем в суспензию сразу добавляли 0.25 М (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> для экстракции матрикснесвязанного хроматина. После центрифугирования получали нуклеазно-высокосолевою матрикснесвязанную фракцию («НВС»). После отмывки (фракция «О») получали конечный препарат «ЯМ».

Для получения препаратов ядерного матрикса по методу «ND» (NaCl – DNase) (Berezney & Coffey 1977) очищенные клеточные ядра вначале подвергались высокосолевой экстракции хроматина в 1.5 М NaCl на буфере ТМ. После центрифугирования получали высокосолевою матрикснесвязанную фракцию («ВС»). Затем ядра промывались буфером ТМ (фракция «ТМ») и

обрабатывались ДНКазой I в указанных выше условиях (получали фракцию «Н»). После отмывки буфером ТМ (фракция «О») получали конечный препарат «ЯМ».

Получение ЯМ *in situ* проводилось по тем же методикам путем последовательной инкубации клеток, выращенных на обработанной 0.01% полилизинном стеклянной подложке, соответствующими экстрагирующими растворами. Иммунофлуоресцентная микроскопия проводилась после окрашивания ламина В в образцах. Для этого образцы фиксировали 4% формальдегидом и пермеабелизовали 1% тритоном X-100, а затем инкубировали в блокирующем буфере, содержащем PBS (137 мМ NaCl, 2.68 мМ KCl, 4.29 мМ Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.47 мМ KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.4) и 5% бычий сывороточный альбумин. После блокирования образцы инкубировали с первичными, а затем – вторичными антителами в блокирующем буфере в разведении 1:100. После промывки PBS и водой образцы подсушивали и укладывали на предметные стекла со средой Fluoremount-G (Southern Biotech, США). Микроскопию и фотосъемку проводили на микроскопе Leitz (Германия).

Экстракция матрикссвязанных белков проводилась путем ресуспендирования полученных образцов ЯМ в буфере ТМ, содержащем 0.02 М NaOH, 0.02 М HCl или 1% тритон X-100 с последующим перемешиванием в течение 30 мин при +4°C.

Окраску серебром и иммуноблотинг проводили после денатурирующего электрофореза белков в ПААГ. Для окраски серебром гели последовательно фиксировались в растворах 50% метанол/10% уксусная кислота и 5% метанол/7% уксусная кислота, затем вымачивались в растворе 10% глутарового альдегида, промывались водой и вымачивались в растворе аммиачного нитрата серебра (0.5% NH<sub>4</sub>OH, 0.02 М NaOH, 0.008% AgNO<sub>3</sub>). После промывки водой белковые полосы проявляли в растворе, содержащем 0.8 мМ лимоннокислого натрия и 0.009% формалина, проявление останавливали в растворе, содержащем 0.9 М Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, 0.48 М Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> и 5% уксусную кислоту.

Для иммуноблотинга белки переносили на нитроцеллюлозную мембрану Hybond-C Extra (Amersham Biosciences, Великобритания) в буфере для переноса (25 мМ Трис-HCl, 19.3 мМ глицин, 20% метанол) при +4°C и силе тока в 100 мА. После переноса мембрану инкубировали в блокирующем растворе, который содержал буфер TBST (100 мМ Трис-HCl (pH 7.5), 150 мМ NaCl, 0.1% Tween-20), 5% бычий сывороточный альбумин и 0.02% NaN<sub>3</sub>, далее мембрану инкубировали с первичными антителами в разведении 1:1000, после промывки инкубировали в блокирующем растворе (без 0.02% NaN<sub>3</sub>), содержащем вторичные антитела в разведении 1:5000. Реакцию хемилюминесценции проводили с использованием смеси ECL- растворов: в 14 мл раствора А (100 мМ Трис-HCl, pH 8.5, 1.25 мМ люминол) добавляли 140 мкл раствора В (0.68 мМ р-кумаровая кислота в DMSO) и 5 мкл 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Мембрану инкубировали в реакционной смеси в течение 1 минуты, а затем сигнал экспонировали на рентгеновскую пленку.

## Результаты исследования и обсуждение

### 1. Сравнительный анализ белковых профилей различных препаратов ядерного матрикса

Известно, что белковый состав ЯМ различен в клетках разных типов (Збарский 1988, Rynearson & Sussman 2011). Однако белковый состав ЯМ может зависеть и от метода его получения. В данной работе для изучения ЯМ использовали три подхода к его получению *in vitro*, наиболее широко представленные в современной литературе. Основные различия данных методов состоят в режимах солевой экстракции и гидролиза ДНК. На рис. 1 схематично изображены стадии очистки препаратов ЯМ с использованием разных методов, которые условно обозначены «DN», «DA» и «ND» (см. «Методы исследования»). На схеме указаны стадии фракционирования и фракции, получаемые в процессе очистки ЯМ.



**Рис. 1.** Схема стадий очистки ЯМ с использованием методов «DN», «DA» и «ND».

Сравнение белкового состава различных образцов ЯМ проводили на препаратах, полученных из клеток HeLa. Для этого белки ЯМ подвергали денатурирующему электрофорезу в полиакриламидном геле с последующей окраской серебром. Для исследования низкомолекулярных белков использовали 10% ПААГ, который позволяет разделять белки в диапазоне от 14 до 67 кДа, исследование высокомолекулярных белков проводили с помощью 7% ПААГ, который позволяет разделять белки в диапазоне от 67 до 210 кДа. На рис. 2 показаны электрофореграммы белков препаратов ЯМ, которые были получены из ядер клеток HeLa, при использовании методов «DN», «DA» и «ND».

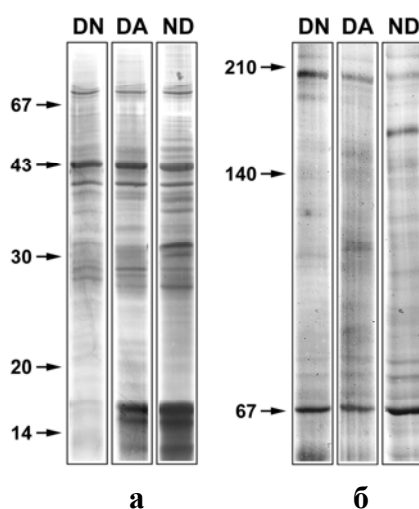
Из рис. 2 видно, что для всех препаратов ЯМ характерно наличие общих белковых полос. Общие белки находятся, в основном, в области 30 кДа, 40-43 кДа, 67-70 кДа и 200 кДа. Интенсивность окрашивания этих белковых полос в разных препаратах отличается. Помимо общих белков, препараты ЯМ, полученные в различных условиях, содержат так же белки, обнаруживаемые только в определенных препаратах. Препарат ЯМ, очищенный по методу «ND», существенно отличается по белковому составу от препаратов, полученных по методам «DN» и «DA». В препарате ЯМ «ND» более, а в ЯМ «DN» менее чем в других препаратах, выражены белки с молекулярными массами около 12-16



кДа, а также белки в области 30-35 кДа (рис. 2,*а*). Белок в области 210 кДа в значительной степени окрашивается в препарате ЯМ «DN», а белок с массой около 160 кДа отчетливо виден только в препарате ЯМ «ND» (рис. 2,*б*).

Хотя в данной работе идентификация белков в гелях не проводилась, есть основания полагать, что полосы в области молекулярных масс от 64 до 74 кДа соответствуют ламинам, в области молекулярных масс от 12 до 25 кДа – НМГ белкам, а в области 170 кДа – топоизомеразе II  $\alpha$ .

С применением различных подходов к очистке ЯМ ранее также получены препараты с разными белковыми профилями (Kallajoki & Osborn 1994, Wan & Nickerson 1999). Таким образом, полученные нами и литературные данные показывают, что белковый состав ЯМ отличается при использовании разных методов его очистки из одного источника. Различия в белковом составе ЯМ носят как качественный, так и количественный характер.



**Рис. 2.** Результаты разделения белков препаратов ЯМ, очищенных различными методами из ядер клеток HeLa, в 10% ПААГ (*а*) и 7% ПААГ (*б*) с последующей окраской белков серебром. Цифрами указаны молекулярные массы (в кДа) белковых маркеров.

## 2. Полное связывание ядерного белка р53 с ядерным матриксом клеток НЕК293

Для изучения степени ассоциации белка р53 с ЯМ сравнивали его содержание в конечных препаратах ЯМ и во фракциях матрикснесвязанного хроматина. Для контроля эффективности разделения матрикссвязанных и матрикснесвязанных макромолекул и целостности ЯМ изучение содержания р53 в различных фракциях хроматина проводилось параллельно с анализом содержания ламина В в тех же фракциях.

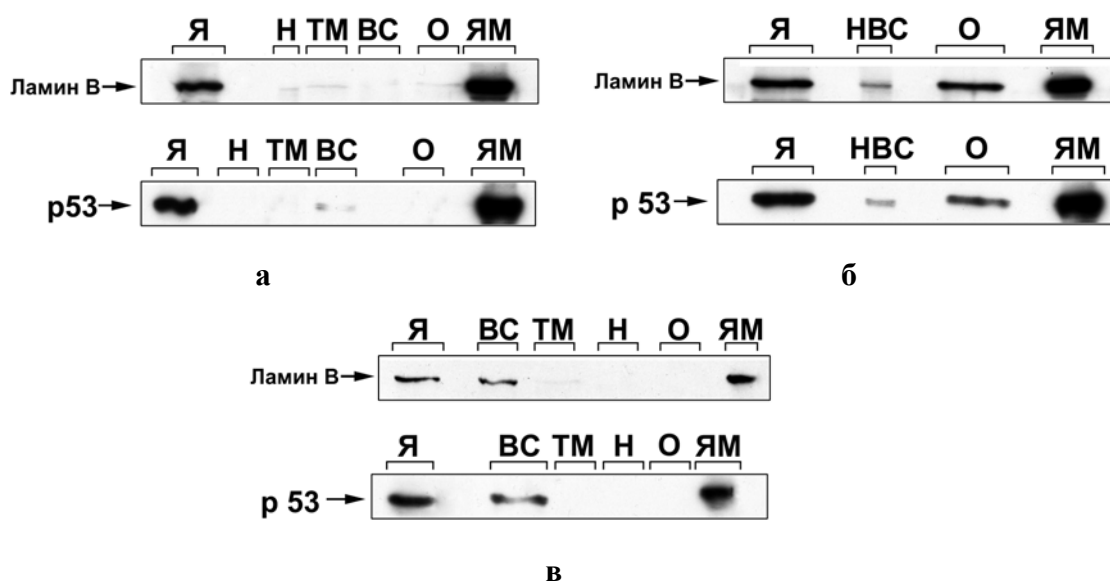
На рис. 3 показано содержание ламина В и белка р53 в очищенных клеточных ядрах, растворимых фракциях хроматина и препаратах ЯМ, полученных из клеток НЕК293. При получении ЯМ с использованием 2 М NaCl после гидролиза ДНК (метод «DN») ламин В регистрируется в ядрах и в препарате ЯМ (рис. 3,*а*). Во фракциях матрикснесвязанного хроматина ламин В практически полностью отсутствует. Отсутствие ламина В в растворимых

фракциях хроматина говорит о том, что целостность ЯМ в процессе его очистки хорошо сохраняется.

Распределение белка р53 по фракциям аналогично распределению ламина В. Белок р53 наблюдается во фракции ядер и в ЯМ. Следовательно, ядерный пул белка р53 полностью ассоциирован с ЯМ при использовании данного способа его очистки.

Применение в качестве экстрагирующего агента 0.25 М  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  для очистки ЯМ (метод «DA») приводит к получению другой картины распределения ламина В и р53. Из рис. 3,б видно, что ламин В регистрируется в ядрах и в ЯМ. Однако в значительной мере он присутствует также и во фракциях матрикснесвязанного хроматина - нуклеазно-высокосолевого фракции («HBC») и во фракции отмывки («O»). Распределение белка р53 по фракциям полностью совпадает с распределением ламина В. Так же, как и ламин В, р53 регистрируется в ядрах, ЯМ, нуклеазно-высокосолевого фракции и во фракции отмывки.

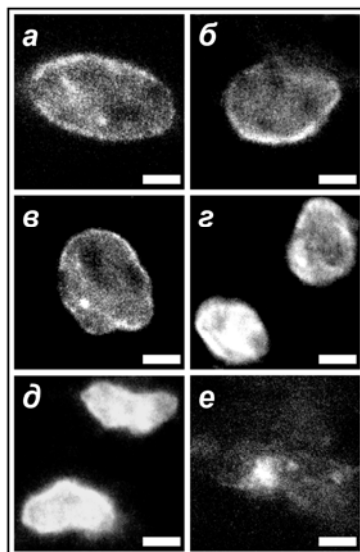
Таким образом, при использовании метода «DA» для получения ЯМ белок р53 обнаруживается в растворимых фракциях хроматина. В тех же растворимых фракциях обнаруживается ламин В, наличие которого показывает, что структура ЯМ частично дестабилизируется в ходе его очистки. В связи с этим, наличие белка р53 в матрикснесвязанных фракциях нельзя однозначно интерпретировать в пользу существования не связанного с ЯМ р53 в ядрах клеток НЕК293.



**Рис. 3.** Содержание ламина В и белка р53 в очищенных клеточных ядрах («Я»), растворимых фракциях хроматина и препаратах ядерного матрикса («ЯМ»), полученных с применением метода «DN» (а), «DA» (б) и «ND» (в) из клеток НЕК293.

На рис. 3,в в показано содержание ламина В и р53 в очищенных клеточных ядрах, растворимых фракциях хроматина и препаратах ядерного матрикса, полученных по методу «ND». Видно, что ламин В регистрируется в ядрах, ЯМ, а также определенная доля белка выходит в высокосолевою фракцию («ВС»).

Применение 1.5 М NaCl до гидролиза ДНК приводит, очевидно, к разрушению ядерной оболочки в связи с тем, что при солубилизации структурных белков хроматина ядерная ДНК сильно набухает. Подобное явление наблюдалось при микроскопии клеточных ядер после высокосолевой обработки без предварительного гидролиза ДНК (рис. 4).



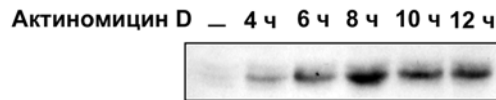
**Рис. 4.** Иммунофлуоресцентное окрашивание ламина В в клетках, ядрах и препаратах ядерного матрикса, очищенных *in situ* из клеток HEK293. Обозначения: а – ядра в необработанных клетках, б – ядра после очистки, в – ядра после гидролиза ДНК, г – ядра после гидролиза ДНК и высокосолевой экстракции 2 М NaCl, д – ядра после гидролиза ДНК и высокосолевой экстракции 0.25 М  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , е – ядра после высокосолевой экстракции 1.5 М NaCl без предварительной нуклеазной обработки. Указанная шкала соответствует 5 мкм.

Белок p53 при получении ЯМ по методу «ND» наблюдается в тех же фракциях, что и ламин В. Таким образом, p53, независимо от используемого метода очистки ЯМ, обнаруживается в тех же фракциях хроматина, где обнаруживается и структурный компонент ЯМ – ламин В. Полученные результаты показывают, что в клетках HEK293 весь белковый пул p53 связан с ЯМ, и белок p53 не обнаруживается в матрикснесвязанной форме.

Известно, что в клетках HEK293, трансформированных ДНК аденовируса, p53 взаимодействует с аденовирусными белками (Morgan 1993). Это, в свою очередь, может приводить к изменению субъядерной локализации белка p53. Для характеристики взаимодействия p53 с ЯМ в клетках, не содержащих вирусных белков, было проведено исследование его субъядерной локализации в клетках MCF7.

### **3. Полное связывание активированного ядерного белка p53 с ядерным матриксом клеток MCF7**

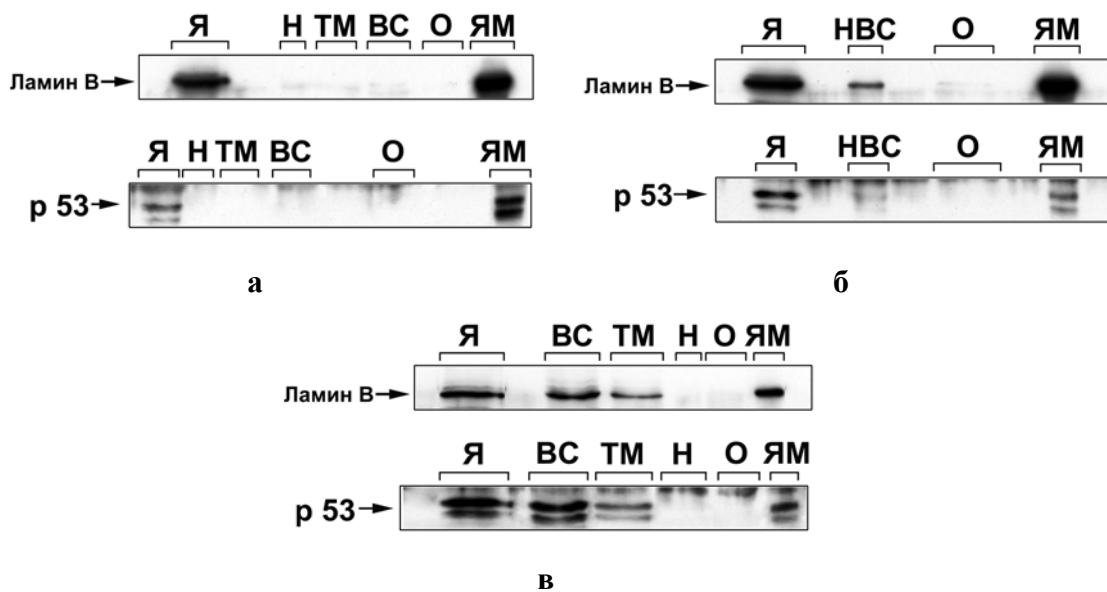
Для исследования связывания белка p53 с ЯМ в клетках MCF7 необходимо его накопление в количествах, достаточных для его регистрации. Для накопления p53 проводили обработку клеток MCF7 актиномицином D, который, как известно, активирует p53 (Kastan et al. 1991, Tishler et al. 1993).



**Рис. 5.** Содержание белка р53 в клетках MCF7 в контроле и через 4, 6, 8, 10 и 12 ч после внесения актиномицина D в инкубационную среду.

На рис. 5 показано накопление белка р53 в клетках MCF7 при обработке актиномицином D в концентрации 5 нМ. В контроле р53 практически не обнаруживается в клеточных лизатах. При действии актиномицина D р53 накапливается, и его экспрессия достигает максимума через 8 ч действия актиномицина D.

На рис. 6 показано содержание ламина В и р53 в очищенных клеточных ядрах, растворимых фракциях хроматина и препаратах ядерного матрикса, полученных из клеток MCF7. Как видно из рис. 6,а, при использовании метода «DN» ламин В обнаруживается в ядрах и ЯМ, а во фракциях матрикснесвязанного хроматина ламин В практически отсутствует. Внутрядерное распределение р53 совпадает с распределением ламина В.



**Рис. 6.** Содержание ламина В и белка р53 в очищенных клеточных ядрах («Я»), растворимых фракциях хроматина и препаратах ядерного матрикса («ЯМ»), полученных с применением метода «DN» (а), «DA» (б) и «ND» (в) из клеток MCF7.

При использовании метода «DA» для получения ЯМ наблюдаются определенные отличия в распределении ламина В и р53 во фракциях матрикснесвязанного хроматина между препаратами, полученными на клетках HEK293 и MCF7. Из рис. 6,б видно, что оба белка обнаруживаются и в ЯМ, и в матрикснесвязанной нуклеазно-высокосолевой фракции («НВС»). В отличие от препаратов, полученных из клеток HEK293 (рис. 3,б), ламин В и р53 не обнаруживаются в отмывочной фракции хроматина.

Определенные отличия между клетками этих линий наблюдаются также при сравнении распределения ламина В и р53 в матрикснесвязанных фракциях при получении ЯМ методом «ND». Оба белка содержатся во фракции «ТМ», полученной из клеток MCF7 (рис. 6,в), но не содержатся в этой же фракции из клеток HEK293 (рис. 3,в).

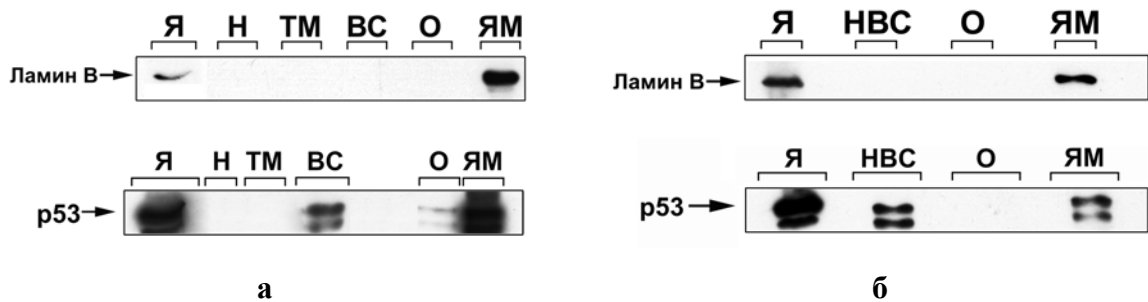
Несмотря на указанные отличия, внутриядерная локализация белка р53 в клетках MCF7 схожа с распределением р53 в клетках HEK293. Из рис. 3 и 6 видно, что в клетках обеих линий белок р53 солокализуется с ламинем В. Полученные данные показывают, что в клетках MCF7 весь ядерный пул белка р53 после его активации актиномицином D ассоциирует с ЯМ.

Из литературы известно, что р53 может обнаруживаться как в растворимых матрикснесвязанных фракциях, так и в ЯМ. При использовании метода, сходного с методом «ND» (однако в качестве экстрагирующего агента применялся не NaCl, а 0.25 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) р53 обнаруживается в высокосолевогой фракции и в ЯМ (Jiang et al. 2001), что сходно с нашими результатами (рис. 3,в и 6,в). Однако при получении ЯМ по методу «DN» р53 обнаруживается исключительно в матрикснесвязанной форме (Ben-Jehouda et al. 2003), что существенно отличается от полученных нами результатов (рис. 3,а и 6,а). Эти различия могут быть связаны с применением клеток разных типов – в работе Ben-Jehouda et al. были использованы клетки COS-1. Для исследования возможности присутствия в клеточных ядрах матрикснесвязанного белка р53 был проведен анализ его внутриядерного распределения в схожих клетках линии COS-7.

#### **4. Неполное связывание белка р53 с ядерным матриксом клеток COS-7**

Впервые белок с молекулярной массой 53 кДа был обнаружен в составе ЯМ в клетках, трансформированных большим Т-антигеном вируса SV40 (Staufenbiel et al. 1983). В настоящей работе проведено исследование взаимодействия белка р53 с ЯМ в клетках COS-7 (клетки почек африканской зеленой мартышки, трансформированные большим Т-антигеном вируса SV-40). Чтобы исследовать внутриядерное распределение белка р53, мы использовали для очистки ЯМ методы «DN» и «DA». Метод «ND» в дальнейшей работе не применялся в связи очевидным повреждением ядер при солевой экстракции хроматина до нуклеазной обработки.

На рис. 7 представлены результаты проведенного исследования. Видно, что при фракционировании ядер клеток COS-7 ламин В регистрируется только в ядрах и в ЯМ, а во фракциях матрикснесвязанного хроматина он не обнаруживается. При этом в клетках HEK293 и MCF7 при фракционировании по методу «DA» ламин В обнаруживался в матрикснесвязанных фракциях хроматина (рис. 3,б и 6,б). По-видимому, ЯМ клеток COS-7 более устойчив к действию сульфата аммония, чем ЯМ других клеток из-за специфичного для каждого типа клеток белкового состава ЯМ, что может приводить к различной прочности белок-белковых взаимодействий.



**Рис. 7.** Содержание ламин В и белка р53 в очищенных клеточных ядрах («Я»), растворимых фракциях хроматина и препаратах ядерного матрикса («ЯМ»), полученных с применением метода «DN» (а) и «DA» (б) из клеток COS-7.

Белок р53 в ядрах клеток COS-7 регистрируется в препарате ЯМ, а также, в отличие от ламин В, р53 наблюдается в растворимых фракциях. Значительная доля белка р53 экстрагируется в высокосолевую фракцию («ВС» и «НВС»), и небольшая часть – в отмывочную фракцию («О», рис. 7,а). Таким образом, в клетках COS-7 белок р53 присутствует в матрикснесвязанных фракциях хроматина и, одновременно с этим, в этих же фракциях не обнаруживается ламин В. Данная картина внутриядерного распределения р53 существенно отличается от результатов, показанных на рис. 3 и 6. В клетках НЕК293 (рис.3) и MCF7 (рис. 6) р53 всегда солокализуется с ламином В, что говорит о его полной ассоциации с ЯМ. Отсутствие подобной солокализации в клетках COS-7 показывает, что р53 в ядрах этих клеток представлен двумя пулами – матрикссвязанным и матрикснесвязанным.

### 5. Экстракция белка р53 из ЯМ клеток разных типов слабыми растворами щелочи и кислоты

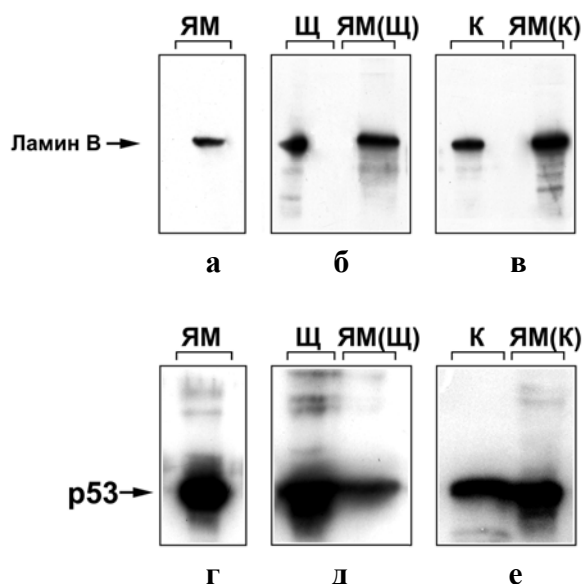
Из литературных данных известно, что основная часть белков ЯМ экстрагируется слабым раствором NaOH. Это связано с тем, что большая часть белков ЯМ представлена кислыми белками (Збарский 1988). Поскольку щелочная экстракция позволяет выявить щелочелабильные межмолекулярные взаимодействия, она может быть использована и для исследования характера связей, определяющих взаимодействие р53 с ЯМ.

Для всех экспериментов по экстракции матрикссвязанных белков применялись препараты ЯМ, полученные по методу «DN». На рис. 8 показано содержание ламин В и р53 в ЯМ и во фракциях ЯМ, экстрагируемых и не экстрагируемых растворами 0.02 М NaOH и 0.02 М HCl. Из рисунка видно, что ламин В обнаруживается как в щелоче- и кислоторастворимых, так и в щелоче- и кислотонерастворимых фракциях ЯМ. Таким образом, связи между белками ЯМ могут быть как щелоче-, так и кислотолабильными.

Из рис. 8,г-е видно, что белок р53 регистрируется в препарате ЯМ не только в виде полосы в области 53 кДа. Некоторое количество р53 в ЯМ представлено высокомолекулярными формами с массой выше 100 кДа. Эти высокомолекулярные формы белка р53 представлены, по всей видимости,

убиквитинированным p53. Хорошо известно, что белок p53 может подвергаться убиквитинированию с последующей протеасомной деградацией (Coutts et al. 2009).

Экстракция матрикссвязанных белков из ЯМ слабым раствором щелочи приводит к выходу большей части белка p53 в растворимую фракцию («Щ», рис. 8,д), при этом практически все высокомолекулярные формы белка p53 экстрагируются из ЯМ.



**Рис. 8.** Содержание ламина В (а-в) и белка p53 (г-е) в ЯМ клеток НЕК293 до (а, г) и после экстракции белков ЯМ раствором 0.02 М NaOH (б, д) и 0.02 М HCl (в, е). Условные обозначения: «ЯМ» – ядерный матрикс до экстракции, «Щ» - щелочной экстракт белков ЯМ, «ЯМ(Щ)» - щелоченерастворимый ЯМ, «К» - кислотный экстракт ЯМ, «ЯМ(К)» - кислотонерастворимый ЯМ.

Результаты кислотной экстракции белков ЯМ показаны на рис. 8,в и е. Видно, что, как и при щелочной экстракции, часть ламина В экстрагируется из ЯМ кислотой. Из рисунка 8,е видно, что при кислотной экстракции большая часть белка p53 обнаруживается в кислотонерастворимом ЯМ (фракция «ЯМ(К)»), в этой же фракции ЯМ присутствуют высокомолекулярные формы белка p53. Таким образом, высокомолекулярные формы p53 по-разному экстрагируются в слабых растворах щелочи и кислоты. После экстракции в щелочи они преимущественно обнаруживаются в растворимой фракции, а при экстракции в кислоте - преимущественно обнаруживаются в нерастворимом ЯМ.

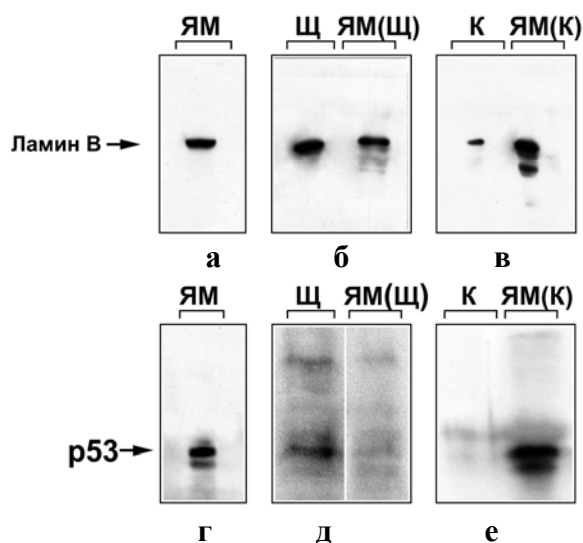
Данные результаты показывают, что ассоциация белка p53 с ядерным матриксом частично определяется щелочеллабильными и, частично, – кислотоллабильными взаимодействиями.

Присутствие белка p53 в ЯМ как в щелочерастворимой, так и кислоторастворимой форме, а также то, что высокомолекулярные формы p53 по-разному экстрагируются из ЯМ щелочным и кислым раствором, говорит о том, что белок p53 в составе ЯМ клеток НЕК293 существует в разных формах, то есть матрикссвязанный пул белка p53 не является однородным.

Подобная система экстракции была применена для исследования взаимодействия белка p53 с ЯМ в клетках MCF7 после активации p53 актиномицином D. Результаты исследования эффективности щелочной и кислотной экстракции из ЯМ белка p53, активированного актиномицином D, представлены на рис.9. Видно, что картина распределения ламина В во фракциях ЯМ клеток MCF7 схожа с распределением этого белка в ЯМ клеток НЕК293. Ламин В присутствует во всех фракциях ЯМ, независимо от экстрагирующего реагента (рис. 9,а-в). При экстракции щелочью он частично переходит в растворимую фракцию (фракция «Щ») (рис. 9,б), экстрагирование кислотой так же приводит к его частичному переходу в растворимую фракцию (фракция «К») (рис. 9,в).

Связанный с ЯМ активированный белок p53 при экстракции матрикссвязанных белков 0.02 М NaOH обнаруживается преимущественно в растворимой фракции (фракция «Щ») (рис. 9,д). В то же время, при экстракции матрикссвязанных белков ЯМ 0.02 М HCl практически весь p53 остается ассоциированным с матриксом (фракция «ЯМ(К)») и в растворимую фракцию («К») p53 не экстрагируется (рис. 9,е).

Таким образом, в клетках MCF7 наблюдается преимущественно одна форма белка p53, которая экстрагируется щелочью и не экстрагируется кислотой. Поскольку известно, что p53 в данных условиях находится в активном состоянии, можно сделать вывод о том, что активный белок p53 в клетках MCF7 связан с ЯМ щелочеллабильными связями.



**Рис. 9.** Содержание ламина В (а-в) и белка p53 (г-е) в ЯМ клеток MCF7 до (а, г) и после щелочной (б, д) и кислотной (в, е) экстракции. Условные обозначения те же, что и на рис. 7.

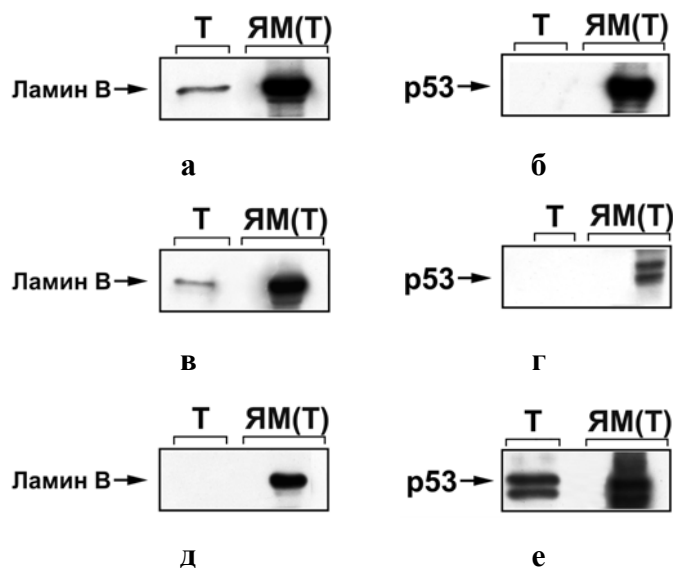
## 6. Экстракция матрикссвязанного белка p53 неионным детергентом

Использование неионных детергентов для получения препаратов ЯМ может частично дестабилизировать его структуру, и часть белков ЯМ при обработке тритоном X-100 может обнаруживаться в растворимых фракциях (Збарский 1988). Для исследования роли гидрофобных взаимодействий в ассоциации



белка p53 с ЯМ была проведена экстракция матрикссвязанного хроматина тритоном X-100 с последующим анализом содержания ламина В и p53 в экстрагируемой тритоном X-100 фракции и в нерастворимом в тритоне X-100 остаточном матриксе в клетках разных типов.

Ламин В наблюдается в тритонорастворимой фракции ЯМ (фракция «Т») в клетках НЕК293 (рис. 10,а). Таким образом, связи, определяющие взаимодействия между структурными белками ЯМ, частично разрушаются неионным детергентом. Белок p53 устойчив к экстракции неионным детергентом, и, как видно из рис. 10,б, в клетках НЕК293 он полностью ассоциирует с тритоностойчивым ЯМ (фракция «ЯМ(Т)»).



**Рис. 10.** Содержание ламина В и белка p53 в тритонорастворимой («Т») и тритоностойчивой («ЯМ(Т)») фракциях ЯМ клеток НЕК293 (а, б), МСF7 (в, г) и COS-7 (д, е) после экстракции белков ЯМ 1% тритоном X-100.

Аналогичные результаты по влиянию тритона X-100 были получены для p53, активированного актиномицином D, в клетках МСF7. Ламин В также частично экстрагируется тритоном X-100 (рис. 10,в) из ЯМ. Белок p53, как и в клетках НЕК293, не экстрагируется неионным детергентом и после обработки тритоном X-100 полностью связан с тритоностойчивым ЯМ клеток МСF7 (рис. 10,г).

Полученные данные показывают, что гидрофобные взаимодействия, разрушаемые неионным детергентом, не вносят существенного вклада в процесс ассоциации белка p53 с ЯМ клеток НЕК293 и МСF7.

На препаратах ЯМ клеток COS-7 были получены противоположные результаты. Из рис. 10,д видно, что экстракция матрикссвязанных белков неионным детергентом не приводит к выходу ламина В в растворимую фракцию. С другой стороны, значительная часть матрикссвязанного белка p53 экстрагируется неионным детергентом из ЯМ клеток (рис. 10,е). Следовательно, в клетках COS-7 p53 частично связан с ЯМ посредством гидрофобных взаимодействий, либо его связывание с ЯМ опосредуется

гидрофобным «якорным» белком, чувствительным к действию неионного детергента.

Таким образом, матрикссвязанный белок p53 может быть представлен разными формами. Не только ядерный, но и матрикссвязанный пул молекул белка p53 гетерогенен по составу. Связь белка p53 с ЯМ, в зависимости от типа клеток, может определяться щелочелабильными, кислоталабильными и тритинолабильными взаимодействиями.

Вклад различных взаимодействий в общую картину связывания белка p53 с ЯМ зависит от типа клеток, что проявляется в разной степени ассоциации p53 с ЯМ в клетках HEK293, MCF7 и COS-7.

## **7. Гетерогенный состав матрикссвязанного пула белка p53 в клетках различных типов**

В результате проведенного исследования показано, что в процессе получения ЯМ в его структуре могут происходить изменения, которые приводят не только к различию в белковом составе отдельных препаратов ЯМ, но и к его частичному разрушению. Как следствие, подобные нарушения структуры ЯМ могут вызывать искажения в картине субъядерной локализации макромолекул.

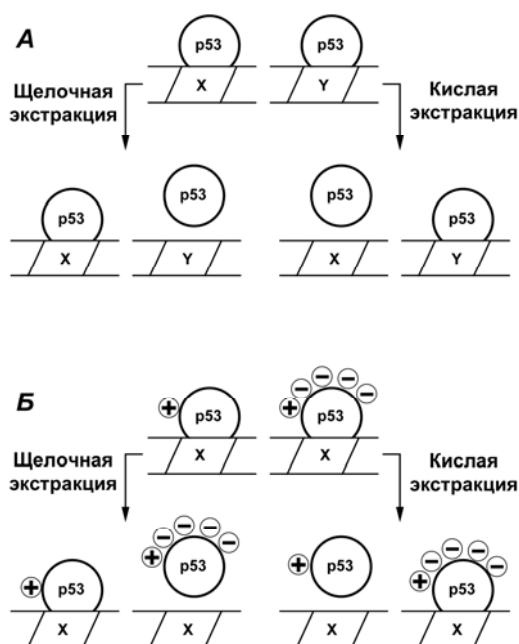
Контроль целостности ЯМ с применением специфичного маркера – ламина В – позволил выявить разную степень ассоциации белка p53 с ЯМ в клетках разных типов. Действительно, присутствие p53 во фракциях растворимого матрикснесвязанного хроматина не всегда можно интерпретировать как наблюдение матрикснесвязанной формы ядерного пула p53. Присутствие маркерного белка ЯМ ламина В в тех же фракциях хроматина показывает, что p53 обнаруживается в этих фракциях как часть его матрикссвязанного пула.

Разная степень ассоциации белка p53 с ЯМ в клетках разных типов, связана, очевидно, с тем, что в клетках определенного типа экспрессируются определенные белки, с которыми взаимодействует белок p53. Важно отметить, что от типа клеток зависит не только степень ассоциации белка p53 с ЯМ, но и устойчивость самого ЯМ к процедурам экстракции матрикснесвязанного хроматина. Это свидетельствует о серьезных отличиях в белковых составах ядер исследуемых клеток, и различия во взаимодействии макромолекул с ЯМ выглядит в этой связи вполне естественно.

Обнаружена возможность разделения матрикссвязанного пула белка p53 на отдельные субпулы. Оказалось, что p53 в составе ЯМ клеток HEK293 представлен гетерогенной группой белковых молекул, которые по-разному экстрагируются из ЯМ растворами щелочи и кислоты. Применение подобной экстракции на образцах ЯМ клеток MCF7 после активации p53 актиномицином D показало, что в условиях, когда белковый пул p53 представлен преимущественно его активной формой, в ЯМ обнаруживается преимущественно щелочелабильная кислотоустойчивая форма p53.

Данные результаты показывают, что экстракция белка p53 из ЯМ происходит не случайно, а в соответствии с разными состояниями p53. Две основные формы матрикссвязанного p53 – щелочерастворимая и

кислоторастворимая – могут образоваться по двум механизмам. Во-первых, разные формы белка p53 могут взаимодействовать с разными белками ЯМ. Белок-белковые взаимодействия в разных комплексах по-разному чувствительны к щелочи и кислоте, в связи, с чем в растворе щелочи или кислоты происходит избирательная экстракция одной из форм матрикссвязанного белка p53. Второй механизм образования различных форм белка p53 в составе ЯМ может заключаться в различных посттрансляционных модификациях p53. При этом фосфорилирование и ацетилирование приводит к образованию более кислой формы белка, что может привести к его более эффективной экстракции раствором щелочи. Схематично различные формы матрикссвязанного p53 и их экстрагируемость в растворах щелочи и кислоты представлены на рис. 11.



**Рис. 11.** Возможные формы матрикссвязанного белка p53. А - Белок p53 может быть связан с ЯМ посредством двух якорных белков, X и Y. При действии щелочи нарушаются взаимодействия между p53 и белком Y, в результате p53 выходит в растворимую фракцию. Оставшаяся часть p53, связанная с белком X, устойчива к действию щелочи. В результате кислотной экстракции в ЯМ остается p53, связанный с белком Y, а комплекс p53-белок X разрушается и p53 экстрагируется из ЯМ. Б - Белок p53 может быть фосфорилирован и ацетилирован в разной степени. Более кислая форма белка p53 может более эффективно экстрагироваться щелочью, а более основная – кислотой.

Роль гидрофобных взаимодействий в ассоциации белка p53 с ЯМ различна для разных типов клеток. Так, в клетках HEK293 и MCF7 p53 связан с ЯМ связями, стабильными при действии тритона X-100, а в клетках COS-7 связь p53 с ЯМ частично обусловлена тритонолабильными взаимодействиями.

Таким образом, ассоциация белка p53 с ЯМ имеет сложный характер и определяется различными взаимодействиями. Подобный характер связывания с ЯМ обусловлен, очевидно, тем, что белок p53 является многофункциональным ядерным белком. Помимо указанных выше трансактивирующей и трансрессирующей функций, показана ферментативная 3'-5'-экзонуклеазная активность p53 и его прямое участие в репарации ДНК (Mummenbrauer et al. 1996, Gila et al. 2003). Каждая из этих функций предполагает определенный уровень посттрансляционных модификаций p53 и его взаимодействие с

определенными белками ЯМ. В связи с этим, многообразие форм матрикссвязанного p53 может отражать разнообразие его функций.

### **Выводы**

1. Белковый состав препаратов ЯМ зависит от последовательности этапов высокосолевого экстракции и гидролиза ДНК, а также от состава экстрагирующих растворов.
2. При получении ЯМ ламин В может обнаруживаться во фракциях матрикснесвязанного хроматина, что свидетельствует о нарушении структурной целостности ЯМ в процессе его очистки. Получение ЯМ посредством экстракции хроматина хлоридом натрия после гидролиза ДНК способствует сохранению целостности ЯМ.
3. Степень взаимодействия белка p53 с ЯМ зависит от типа клеток. В клетках MCF7 через 8 ч после введения актиномицина D и в клетках НЕК293 белок p53 солокализуется с ламинем В. Это показывает, что весь ядерный пул белка p53 связан с ЯМ. В ядрах клеток COS-7 белок p53 присутствует как в матрикссвязанной, так и в матрикснесвязанной форме.
4. В клетках НЕК293 связь белка p53 с ЯМ определяется как щелочелабильными, так и кислотолабильными взаимодействиями. В клетках MCF7 белок p53, активированный актиномицином D, представлен преимущественно щелочелабильной кислотоустойчивой формой.
5. В зависимости от типа клеток, связь белка p53 с ЯМ может определяться взаимодействиями, чувствительными к неионным детергентам. В составе ЯМ клеток НЕК293 и MCF7 белок p53 устойчив к действию тритона X-100. Связь белка p53 с ЯМ в клетках COS-7 частично разрушается при экстракции неионным детергентом.
6. Разная эффективность экстракции белка p53 щелочью, кислотой и неионным детергентом из ЯМ клеток НЕК293, MCF7 и COS-7 показывает, что матрикссвязанный пул белка p53 является гетерогенным, и состав матрикссвязанного пула белка p53 зависит от типа клеток.

### **Список работ, опубликованных по теме диссертации**

1. Lapshina M.A., Parkhomenko I.I., Terentiev A.A. Two forms of the nuclear matrix bound p53 protein in the HEK293 cells // Annals of the New York Academy of Sciences. 2006. V.1090-A. P. 177-181.
2. Лапшина М.А., Пархоменко И.И., Папина Р.И., Терентьев А.А. Содержание ламина В во фракциях хроматина при очистке ядерного матрикса из клеток разных типов // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2008. № 11. С. 515-519.

3. Лапшина М.А., Пархоменко И.И., Терентьев А.А. Локализация белка p53 во фракциях хроматина и препаратах ядерного матрикса клеток различных типов // Вестник ННГУ. 2011. № 3. С. 100-106.
4. Лапшина М.А., Здобнова Т.А., Пархоменко И.И., Веселов А.П., Терентьев А.А. Сравнительный анализ белковых профилей препаратов ядерного матрикса, полученных в разных условиях // Тезисы Седьмой Пушкинской Школы-конференции «Биология – Наука XXI века», 14-18 апреля 2003 г., Пушкино, 2003.- С. 346.
5. Лапшина М.А., Здобнова Т.А., Пархоменко И.И., Терентьев А.А. Взаимодействие белка p53 с ядерным матриксом // Тезисы Восьмой Пушкинской Школы-конференции «Биология – Наука XXI века», 17-21 мая 2004 г., Пушкино, 2004.- С. 19.
6. Лапшина М.А., Здобнова Т.А., Пархоменко И.И., Терентьев А.А. Две формы матрикс-связанного белка p53 // Тезисы докладов научных конференций фестиваля студентов, аспирантов и молодых ученых «Молодая наука в классическом университете», 15-17 апреля 2004 г., Иваново, 2004.- С. 16.
7. Лапшина М.А., Пархоменко И.И., Терентьев А.А. Две формы матрикс-связанного белка p53 // Тезисы Девятой международной Пушкинской Школы-конференции «Биология – Наука XXI века», 14-18 мая 2005 г., Пушкино, 2005.- С. 36.
8. Lapshina M.A., Parkhomenko I.I., Terentiev A.A. Two states of the nuclear matrix-bound p53 in HEK293 cells // Proceeding of Conference «Cell Signaling World 2006. Signal Transduction Pathways as therapeutic targets», Luxembourg, 2006.- P. 452.
9. Lapshina M.A., Parkhomenko I.I., Terentiev A.A. Association of p53 protein with the nuclear matrix in cell of different types // Abstract book of Conference for young scientists on molecular biology and genetics, September 20-22th, Kiev, 2007.- P. 70.
10. Лапшина М.А., Пархоменко И.И., Папина Р.И., Терентьев А.А. Различная степень ассоциации белка p53 с ядерным матриксом в клетках различных типов // Тезисы докладов XIX Всероссийского симпозиума «Современная химическая физика», 22 сентября –3 октября 2007 г., Туапсе, 2007.- С. 355.