ՀԱՅԱՍՏԱՆԻ ԳԻՏՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԻ ԱԿԱԴԵՄԻԱՅԻ ԶԵԿՈՒՅՑՆԵՐ
ДОКЛАДЫ АКАДЕМИИ НАУК АРМЕНИИ

Том 93 1992 № 1

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ

УДК 577.1

Р. А. Захарян, М. А. Погосян

Мембранный механизм переноса молекул олигонуклеотидов в клетку

(Представлено чл.-корр. АН Армении К. Г. Карагезяном 16/I 1991)

Ранее нами ([1-4]), а затем и другими авторами ([5-8]) было показано, что рецепция нуклеиновых кислот, в том числе и двуспиральных РНК, олигонуклеотидов на плазматической мембране клеток млекопитающих в определенной мере специфична, обусловлена взаимодействием с протеинами и по своим характеристикам аналогична взаимодействию лиганд — рецептор.

Одновременно нами же было показано ([9]), что интерфероноиндуцирующая активность дсРНК в комплексе с Ca^{2+} (in vitro и in vivo) возрастает в 4—5 раз и Са-дсРНК обладает более высокой антивирусной активностью, что позднее было подтверждено в работе ([10]).

В данном исследовании показано, что комплексы Ca^{2+}-дсРНК и Ca^{2+}ДНК связываются с теми же участками на поверхности плазматической мембраны, что и дсРНК и ДНК, соответственно, и что трансмембранный перенос молекул нуклеиновых кислот осуществляется совместно со специфическим рецептором в составе эндоцитарной клаттринсодержащей везикулы.

В экспериментах использованы: [^{3}H]дсРНК—6,5×10^3имп/мкг/мин, дрожжевая киллерная РНК с мол. массой 1,6 МД (Ин-т вирусологии им. Д. Ивановского АМН СССР); [^{14}C] ДНК тимуса теленка 8×10^4имп/мкг/мин.; поли *dA*. поли *dT*; поли *rA*. поли *rУ*; поли *dЦ*. поли *dИ*; поли *rИ*. поли *rЦ* [^{3}H] полинуклеотиды с активностью около 6.1×10^3имп/мин/мкг были получены в тритиевой воде с У. А. 5 Кю/мл.

Кальциевые комплексы полинуклеотидов получали их инкубацией в среде МЕМ в присутствии 25мМ $CaCl_2$ при 37°С в течение 2 ч.

Получение антител к белкам 35 КД и 54 КД и 60 КД. По 300 мкг очищенного белка в 1 мл *PBS* интенсивно смешивали с 1 мл полного адъюванта Фройнда («Difeo») до получения гомогенной эмульсии. По 0,05 мл полученной эмульсии вводили подкожно кроликам в 40 уколов по поверхности спины и лапок. Эту процедуру иммунизации повторяли дважды через каждые две недели. К концу двух недель от последней иммунизации антитела выделяли во фракции иммуноглобулинов.

При изучении кинетики связывания ДНК и дсРНК с поверхностью клеток (2×10^6кл), предварительно обработанных антителами, в среду с клетками вводили [^{14}C] ДНК 0,4 мкг, 32×10^3имп/мин или дсРНК 0,48 мкг, 3×10^3 имп/мин; после инкубации радиоактивность, связавшуюся с клетками, определяли в радиосчетчике *SL*—30 (Франция).

Получение клеток и эндоцитарных везикул описано в работе ([4]).

Первичные клетки почек кролика РК выращивали в среде MEM, содержащей 10% сыворотки теленка, после достижения монослоя концентрацию сыворотки снижали до 5%. [^{32}P] поли *rИ*. поли *rЦ* и [^{32}P] поли *rA*. поли *rУ* получали 5' фосфорилированием этих полинуклеотидов T_4-полинуклеотидкиназой, согласно работе ([11]).

Ввиду большей биологической активности Са-дсРНК ([9,10]) была изучена возможная конкуренция между молекулами Са-дсРНК Са-ДНК и ДНК за места связывания на мембране.

Связывание [^{3}H] Ca^{2+}-дсРНК с клетками первичной культуры почек кролика РК существенно ингибировалось в присутствии дсРНК. Одинаковым образом связывание Са-[^{3}H] ДНК с клетками печени ингибировалось в присутствии избытка ДНК (табл. 1).

Таблица 1

Конкуренция в связывании между дсРНК и Са-[^{3}H]дсРНК (10 мкг/мл), ДНК и Са-[^{14}C]ДНК (15 мкг/мл) на клетках печени и РК-13

„Холодные" полинуклеотиды	Связывание Са-[^{3}H]дсРНК мкг/кл РК-13 2×10^6	Связывание Са-[^{14}C]ДНК мкг/кл печени $2\cdot10^6$
В отсутствие	0,42	—
дсРНК, 100 мкг/мл	0,043	—
В отсутствие	—	0,35
ДНК, 100 мкг/мл	—	0,028

Kd для Ca^{2+}-форм дсРНК и ДНК составляли около 10^{-10} и 2×10^{-10}M относительно *Kd* для дсРНК и ДНК 10^{-9}M, соответственно, что указывает на формирование в условиях комплексообразования с Ca^{2+}, по-видимому, биологически более активной конформации молекулы нуклеиновой кислоты, взаимодействующей с поверхностью клетки.

Поли *dA*. поли *dT* и поли *rA*. поли *rУ*, поли *dИ*. поли *dЦ* и поли *rИ*. поли *rЦ*, равно как и поли *rA*, поли *rУ* и поли *rИ*. поли *rЦ*, не конкурировали за места связывания на поверхности клеток первичной культуры почек кролика (табл. 2).

Полученные данные свидетельствуют о достаточной специфичности процесса связывания изученных полинуклеотидов на плазматической мембране клеток млекопитающих.

В прежних наших работах было показано, что фактор связывания ДНК тимуса быка на поверхности клеток печени крысы представлен в основном белком с мол. массой в 35 КД. фактор связывания дсРНК

из Sach. cerevisal на тех же клетках представлен в основном белком с мол. массой в 52 КД; сорбция дсРНК на клетках больших полушарий мозга крысы обусловлена взаимодействием молекул РНК преимущественно с белками в 60—54 КД.

Таблица 2

Связывание [РН] полинуклеотидов на клетках РК-13

„Холодные" полинуклеотиды 20× избыток	Связывание (имп/2×10⁶ клеток)		
	поли гА·поли гУ	поли dИ·поли dЦ	поли гИ·поли гЦ
В отсутствие	2400		
Поли dA·поли dT	2100	—	
В отсутствие	—	3100	—
Поли гИ·поли гЦ	—	2800	—
В отсутствие	—	—	2150
Поли гА·поли гУ	—	—	1900

В табл. 3 приведены данные по связыванию молекул ДНК и дсРНК с поверхностной мембраной клеток печени, предварительно обработанных антителами к ДНК-связывающему белку 35 КД и дсРНК-связывающему белку 54 КД.

Таблица 3

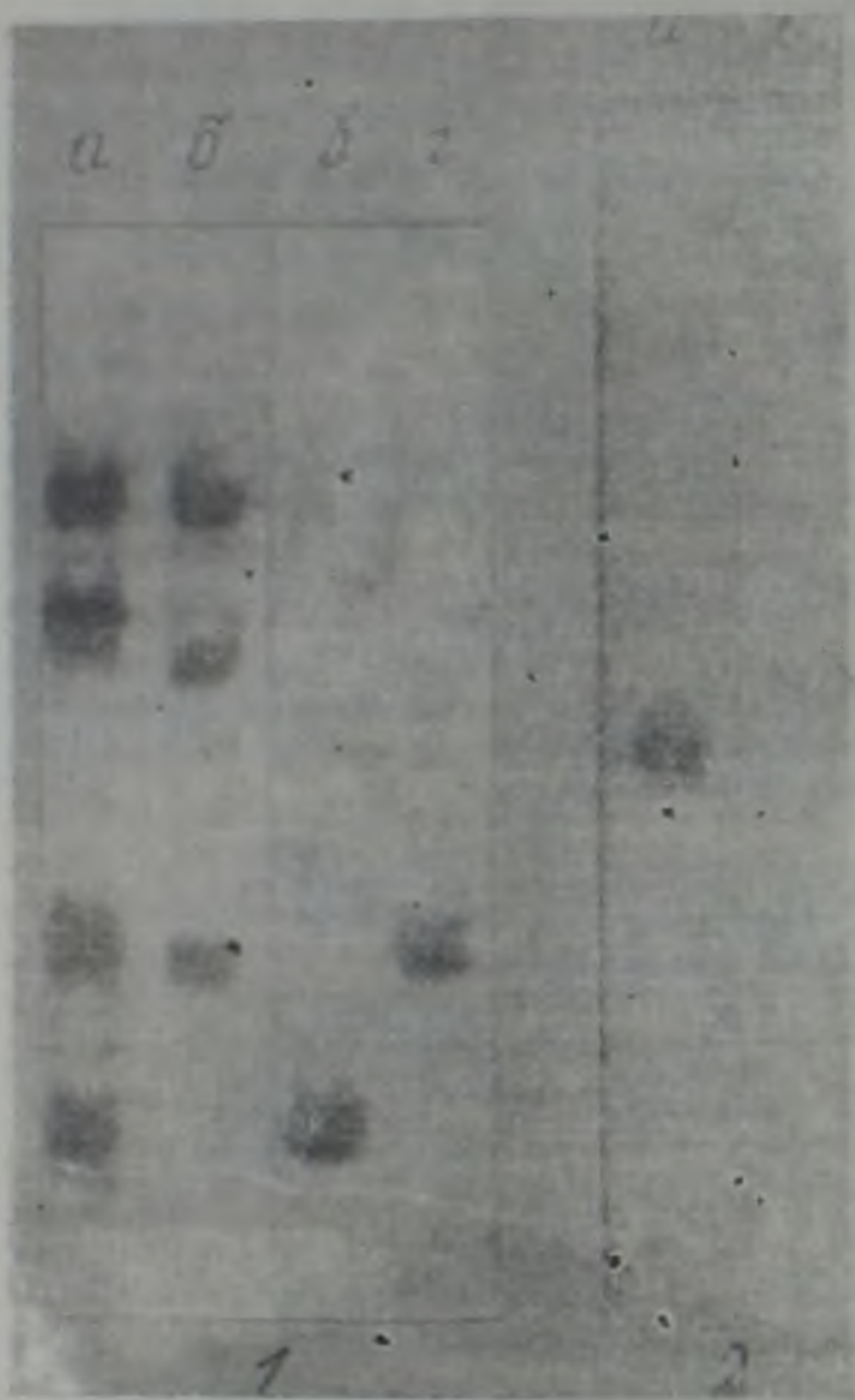
Связывание ДНК и дсРНК с поверхностной мембраной клеток печени, обработанных антителами к белку 35 и 54 КД (имп/мин/2×10⁶ кл)

Время инкубации мин	[³H] ДНК		[³H] дсРНК	
	контроль	обработка антителами	контроль	обработка антителами
5	7×10^3	6×10^2	5×10^2	60
10	12×10^3	9×10^2	11×10^2	90
20	15×10^3	11×10^2	15×10^2	120
40	16×10^3	12×10^2	17×10^2	140

Результаты свидетельствуют, что антитела к белку 35 и 54 КД значительно подавляли адсорбцию ДНК или дсРНК на поверхности клеток печени, что указывает на определенную роль этих белков в процессах адсорбции и трансмембранного переноса нуклеиновых кислот внутрь клетки. С целью возможного выявления этих белков в составе ДНК или дсРНК-клатринсодержащих эндоцитарных везикул мы изолировали последние из клеток печени крыс (4) через 45 мин после внутривенной инъекции 100 мкг ДНК или 100 мкг дсРНК в форме комплекса с Ca^{2+}.

Гель-электрофорез белков выделенных эндоцитарных везикул показал, что они содержат белок клатрин с мол. массой в 180, 33—36 КД, а также белки в 110 и 50—55 КД (⁴).

Одновременно в составе эндоцитарных везикул по Саутерну были выявлены интактные молекулы ДНК ([4]) и методом Вестерн-блота белок в 35 КД: в составе везикул, содержащих дсРНК, был обнаружен белок 54 КД (рисунок).



Вестерн блот анализ полинуклеотидсвязывающих белков плазматической мембраны в составе эндоцитарных везикул *1* — гель-электрофорез в 10% ПААГ белков эндоцитарных везикул из печени; *а* — белки эндоцитарных везикул *б* — маркеры: белки с мол массой 180, 92 и 54×10³; *в* — в составе РНК содержащих везикул идентифицирован белок 35 КД; *г* — в составе дсРНК-содержащих везикул идентифицирован белок 54 КД. *2* — гель-электрофорез в 10% ПААГ белков и перенос на нитроцеллюлозный фильтр белков эндоцитарных везикул из клеток РК, обработанных полиИ полиЦ или полиА полиУ: *а* — в составе полиИ полиЦ-содержащих везикул идентифицирован белок 60 КД; *б* — в составе полиА полиУ содержащих везикул белок 60 КД отсутствует

Ранее нами было показано, что ДНК-связывающий белок 35 КД является лигандом к А—Т парам ([4]). В аналогичном эксперименте in vitro в везикулах из клеток РК, содержащих поли *rИ*, поли *rЦ*, был выявлен рецепторный белок для поли *rИ*, поли *rЦ* в 60 КД, ранее описанный в работе ([3]) (рисунок).

Данный белок не был обнаружен в поли *rА*, поли *rУ* содержащих эндоцитарных везикулах из клеток РК—13.

Полученные данные свидетельствуют, что факторы связывания нуклеиновых кислот на плазматической мембране проявляют специфичность в узнавании конформации определенных последовательностей в структуре молекулы нуклеиновой кислоты и в составе эндоцитарной везикулы участвуют в трансмембранном переносе полинуклеотидов внутрь клетки.

Согласно устному сообщению Азума и др., обработка клеток РК—13 моноклональными антителами (к рецепторному белку для поли *rИ*. поли *rЦ* в 60 КД) подавляла индукцию интерферона в клетках РК—13. Наши исследования, проведенные в условиях эксперимента Азума в присутствии антител к белку в 60 КД, показали, что действительно индукция поли *rИ*. поли *rЦ* интерферона в РК—13 подавлена, несмотря на то, что определенная доля поли *rИ*. поли *rЦ* обнаруживается в эндоцитарных везикулах, выделенных из клеток РК—13. Вместе с тем в этих эндоцитарных везикулах не обнаруживался белок 60 КД. Этот результат позволяет заключить что рецепторный белок к полинуклеотиду не только участвует в процессе трансмембранного их переноса, но и в ряде случаев, по-видимому, в комплексе с полинуклеотидом обеспечивает узкоспецифическую биологическую активность последнего

Институт экспериментальной
биологии Академии наук Армении

Ռ. Ա. ԶԱՔԱՐՅԱՆ, Մ. Ա. ՊՈՂՈՍՅԱՆ

Բջջում օլիգոնուկլեոտիդային մոլեկուլների թաղանթային տեղափոխման մեխանիզմը

Ստացված տվյալները ցույց են տալիս, որ նուկլեինաթթուների կապվածության ֆակտորները՝ պրոտեինները ցուցաբերում են սպեցիֆիկություն նուկլեինաթթուների մոլեկուլների որոշակի հաջորդականության ճանաչման և կապվածության հանդեպ։ Ca^{2+}-երկշ. ՌՆԹ-ի և Ca^{2+}-ԴՆԹ-ի կոմպլեքսները կապվում են թաղանթի այն նույն հատվածներին, ինչ որ երկշղ. ՌՆԹ-ն և ԴՆԹ-ն համապատասխանաբար։ Նուկլեինաթթուների մոլեկուլների միջթաղանթային տեղափոխումը իրականանում է էնդոցիտար վեզիկուլի կազմի մեջ մտնող հատուկ ռեցեպտորների միջոցով։

ЛИТЕРАТУРА—ԳՐԱԿԱՆՈՒԹՅՈՒՆ

[1] *Р. А. Захарян*, Тезисы докл. IV симпозиум СССР—ФРГ «Структура и транскрипция генома», Ереван, с. 19, 1981. [2] *Р. А. Захарян, К. Г. Карагезян*, в сб.: Структура и функция белков и нуклеиновых кислот. Мат-лы VI Двустороннего симп. СССР—Франция. Цхалтубо, с. 132, 1982. [3] *Р. А. Захарян, К. А. Бакунц, Н. А. Скобелева*, Нейрохимия, т. 8, № 1, с. 34—38 (1989). [4] *Р. А. Захарян, В. А. Овсепян, А. Г. Аракелян*, Биол. журн. Армении, т. 42, № 9/10, с. 923—926 (1989). [5] *G. G. Gabor, B. M. Bennett*, Biochem. Biophys. Res. Commun. v. 122, № 3, p. 1034—1039 (1981). [6] *S. L. Loke, C. A. Stein, X. H. Zhang e. a.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, v. 86, p. 6454—6458 (1989). [7] *L. A. Yatvin, E. A. Deva, V. E. Zarytova e. a.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, v. 86, p. 6454—6458 (1989). [8] *I. Yoshida, M. Azuma, H. Kawai e. a.* J. Interferon Res. (1990). [9] *Л. А. Рухкян, Р. А. Захарян*, в сб.: Лекарственные и биологически активные вещества в животноводстве и ветеринарии, Ереван, вып. 59, с. 89—94 (1986). [10] *Т. М. Соколова, Н. А. Родонская, А. Ю. Антонов* и др., в сб.: Изучение индуктора интерферона-двуспиральной РНК в различных биологических системах, Зинатне, Рига, с. 47—53, 1989. [11] *J. R. L. Chang, K. Kleppe*, Biochemistry, v. 14, p. 1221—1225 (1975).