

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ И КЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

УДК 541.64:547.963.32:612.398.145

©Коллектив авторов

АФФИННАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ НУКЛЕОПРОТЕИНОВЫХ КОМПЛЕКСОВ.

И.Ю. РЯДНОВА¹, И.А. ЧЕРНОВА², Л.К. ШАТАЕВА², В.Х. ХАВИНСОН¹

¹ Санкт-Петербургский Институт биорегуляции и геронтологии СЗО РАМН
197110, Санкт-Петербург, Санкт-Петербургский Институт биорегуляции и
геронтологии СЗО РАМН, проспект Динамо, д. 3., тел/факс: 230-00-49

² Институт высокомолекулярных соединений РАН,
199004, Санкт-Петербург, ИВС РАН, Большой проспект ВО, д. 31

Путем инклюдирования в пористую матрицу полиакрилонитрила получен аффинный сорбент, содержащий клеточные мембраны коры головного мозга. Методом аффинной хроматографии исследовано связывание модельных и природных нуклеопротеиновых комплексов с полученным сорбентом, определены коэффициенты распределения. Показано, что природный нуклеопротеиновый комплекс из мозга обладает большей селективностью связывания с клеточными мембранами коры головного мозга по сравнению с комплексом из печени.

Ключевые слова: аффинная хроматография, клеточные мембраны, белки, ДНК, нуклеопротеиновые комплексы

ВВЕДЕНИЕ. В настоящее время методы аффинной хроматографии широко применяются для исследования специфического связывания биологических макромолекул с природными лигандами [1,2]. Клетки различных органов и тканей отличаются по характеру и спектру мембранных рецепторов. Наряду с одинаковыми по функциям рецепторами, которые необходимы для обеспечения жизни любой клетки, дифференцированная клетка обнаруживает тканеспецифические рецепторы, ответственные за связывание специфических лигандов. Мембранные рецепторы представляют собой сложные гликопротеины с

молекулярной массой 90-250 кДа. Структура узнающей части рецептора, которая экспонирована во внешнюю среду для связывания с лигандом, в значительной степени подобна структуре варибельной части иммуноглобулинов, специфических к тому же лиганду [3]. В ряде работ показано существование определенных белков на поверхности клеточных мембран, которые, взаимодействуя в качестве рецепторов с экстраклеточными олигонуклеотидами, участвуют в транспорте последних в клетку [4].

В литературе описан метод создания композиционных аффинных сорбентов на основе фрагментов клеточных мембран эритроцитов, лимфоцитов и гепатоцитов, иммобилизованных в матрицу полиакрилонитрила. Эти сорбенты проявляют высокую аффинность связывания своих природных белков-лигандов [5,6]. Исследование связывания дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК), и ее комплексов с белками с клеточными рецепторами, представляет актуальный интерес для понимания закономерности проникновения нуклеиновой кислоты и ее комплексов в клетку, а также для выяснения механизмов тканеспецифического действия эндогенных белков регуляторов.

Известно, что кора головного мозга является наиболее специфичной тканью по своим регуляторным функциям. В то же время, рецепторы клеток коры головного мозга обладают широкой перекрестной специфичностью по отношению к белкам регуляторам других систем организма, в частности, иммунной [7]. Поэтому, в данной работе в качестве функционального элемента для аффинной сорбции были использованы клеточные мембраны коры головного мозга крупного рогатого скота.

Известно, что в организме ДНК обладает функцией не только хранения генетической информации, но и выполняет роль полимера-носителя для целого ряда олигопептидов и белков. Нами было показано, что нуклеопротеиновые (НПК) комплексы ДНК-инсулин и ДНК кортексин устойчивы в широком диапазоне ионной силы растворов и физиологической области рН [8]. В данной работе методом аффинной хроматографии изучали связывание этих НПК с мембранами коры головного мозга.

МЕТОДИКА. В качестве исследуемых препаратов использовали: раствор натриевой соли ДНК из селезенки крупного рогатого скота производства НПО "Биохимреактив" (Латвия), кристаллический инсулин производства завода медпрепаратов АО "Самсон" (Россия), кортексин - специфический белок, выделенный из коры головного мозга крупного рогатого скота, содержащий негликозилированные линейные пептиды. Эти пептиды проявляют нейротрофическую активность и их молекулярные массы не превышают 10 кДа [9]. В работе исследовали комплексы ДНК с инсулином и кортексином [8], а также природные нуклеопротеиновые комплексы из мозга и печени крупного рогатого скота. Кортексин и природные НПК получали в лабораторных условиях Института биорегуляции и геронтологии [10,11]. Концентрацию ДНК в растворе определяли по поглощению в УФ-области при длине волны 260 нм. Расчет проводили по зависимости: 1 единица оптической плотности (ЕОП) соответствует концентрации нуклеиновой кислоты $0,05 \text{ мг/см}^3$. Концентрацию белка определяли по калибровочным прямым и методу Лоури.

Метод получения сорбента. По аналогии с описанным в литературе методом проводили пространственную иммобилизацию лиофилизированных клеточных мембран мозговой ткани.

Режим получения сорбента был выбран таким образом, при котором не происходит дегидратации клеточных мембран и их рецепторы при этом остаются свободными и доступными. В качестве связующего полимера использовали полиакрилонитрил марки "Нитрон" производства НПО "Нитрон" (Россия), содержащее 92,5 % акрилонитрила, 6 % метилметакрилата и 1,5% 2,3-дикарбокси-1-пропена [12]. 15% раствор полимера получали растворением волокна в 50% водном растворе роданида натрия при нагреве до 80°C. Перед работой роданид натрия перекристаллизовывали из воды при охлаждении. Лиофилизированный препарат клеточных мембран суспендировали в 50% роданиде натрия в концентрации 75 % по весу. Затем проводили смешение связующего полимера и аффинного компонента в объемном соотношении 5:1 при перемешивании. Осаждение сорбента проводили водой при охлаждении смеси до температуры 20°C и интенсивном перемешивании. После измельчения влажного осадка и многократной промывки дистиллированной водой для удаления следов роданида (контроль хлористым железом), получали аффинный сорбент со средним диаметром 300±100 мкм и специфическим объемом в набухшем состоянии 20,0±0,1 см³·г⁻¹.

Перед работой аффинный сорбент уравнивали фосфатным буфером рН 8,0 и загружали в колонки (30x1,4 см). Для установления равновесия промывали колонки 0,1 Н фосфатным буфером с добавленным NaCl до ионной силы 0,3 Н в течение 48 ч. Подача буфера осуществлялась насосом со скоростью 6 мл·ч⁻¹.

Аффинная хроматография. 1 мл исследуемого раствора ДНК, белка или НПК наносили на колонку и элюировали 0,3 Н фосфатным буфером рН 8,0. Сбор фракций осуществляли с помощью коллектора фракций FCC 60. Измеряли оптическую плотность растворов на выходе из колонки и определяли концентрацию белков по методу Лоури. Коэффициент распределения вычисляли по уравнению [13]:

$$k = \frac{(V - V_m)}{V_s} \quad (1)$$

где V - элюционный объем, соответствующий выходу ДНК, белка или НПК, см³; V_m - объем задержки колонки, см³; V_s - объем стационарной фазы, см³.

Для регенерации аффинного сорбента использовали промывание колонок 6М мочевиной, при этом десорбировались неспецифически связанные примеси. Воспроизводимость экспериментов свидетельствует о том, что не происходит деструкции или денатурации иммобилизованных клеточных мембран

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Выбор методики получения сорбента можно обосновать тем, что упаковка и конформация мембранных рецепторов может быть нарушена при контактах с органическими растворителями, используемыми при химической иммобилизации. Поэтому для сохранения нативной конформации гликопротеинов мембран подобран режим получения композиционного сорбента, при котором все процессы происходят в водной среде. При этом рецепторы клеточных мембран остаются свободными и доступными даже для высокомолекулярных лигандов [6]. Совместимость биоконпонентов и полимера, взаимное проникновение их структур и

пространственная проницаемость сформировавшегося композиционного сорбента, представляет собой отдельную проблему на границе физической химии полимеров и гистологии.

В рамках данной работы аффинная хроматография служила для оценки селективности связывания свободных белков, свободной ДНК и нуклеопротеиновых комплексов с рецепторами клеточных мембран мозга. Кроме того, коэффициент распределения k был использован для сравнения селективности связывания природных и модельных НПК.

На рис. 1 показаны выходные кривые аффинной хроматографии инсулина (а), не обладающего специфичностью связывания, и кортексина (б), который является специфическим белком мозга. Положение пиков свидетельствует о том, что инсулин не взаимодействует с аффинным сорбентом и выходит с объемом задержки колонки, тогда как кортексин демонстрирует определенную степень связывания с иммобилизованными клеточными мембранами коры головного мозга. При этом пик кортексина значительно более размыт по сравнению с пиком инсулина, что может быть косвенным признаком неоднородности рецепторов, взаимодействующих с кортексином.

На рис. 2 представлена аффинная хроматография нативной ДНК (а), модельного комплекса ДНК - кортексин (б) и природного НПК, выделенного из коры головного мозга крупного рогатого скота. Видно, что нативная ДНК обладает некоторым связыванием с использованным сорбентом. Это обусловлено не только неспецифическим связыванием ДНК с полимерной матрицей, но и возможным взаимодействием ДНК с мембранными структурами. По-видимому, подобные взаимодействия лежат в основе проникновения сателлитных ДНК через клеточные и ядерные мембраны [14]. НПК с кортексином связывается с аффинным сорбентом сильнее, чем свободная ДНК. Пик природного НПК мозга выходит позже, т.е. связывается прочнее, чем модельный нуклеопротеиновый комплекс ДНК-кортексин. По-видимому, природный НПК содержит не только пептиды, специфично связывающиеся с клеточными мембранами мозговой ткани, входящие в состав кортексина, но и другие регуляторные белки хроматина. Возможно, к ним относятся кислые фосфопротеины, содержащиеся в ядре клеток и выполняющие трофические функции [15,16].

В таблице 1 приведены значения коэффициентов распределения для исследованных белков и НПК, вычисленные по формуле (1). Анализ данных показывает, что при включении неспецифического белка инсулина в комплекс с ДНК повышается его селективность связывания с клеточными мембранами. Это является определенным аргументом в пользу возможности использования комплексообразования неядерных белков с ДНК для транспорта таких белков в клетку, а возможно и в клеточное ядро.

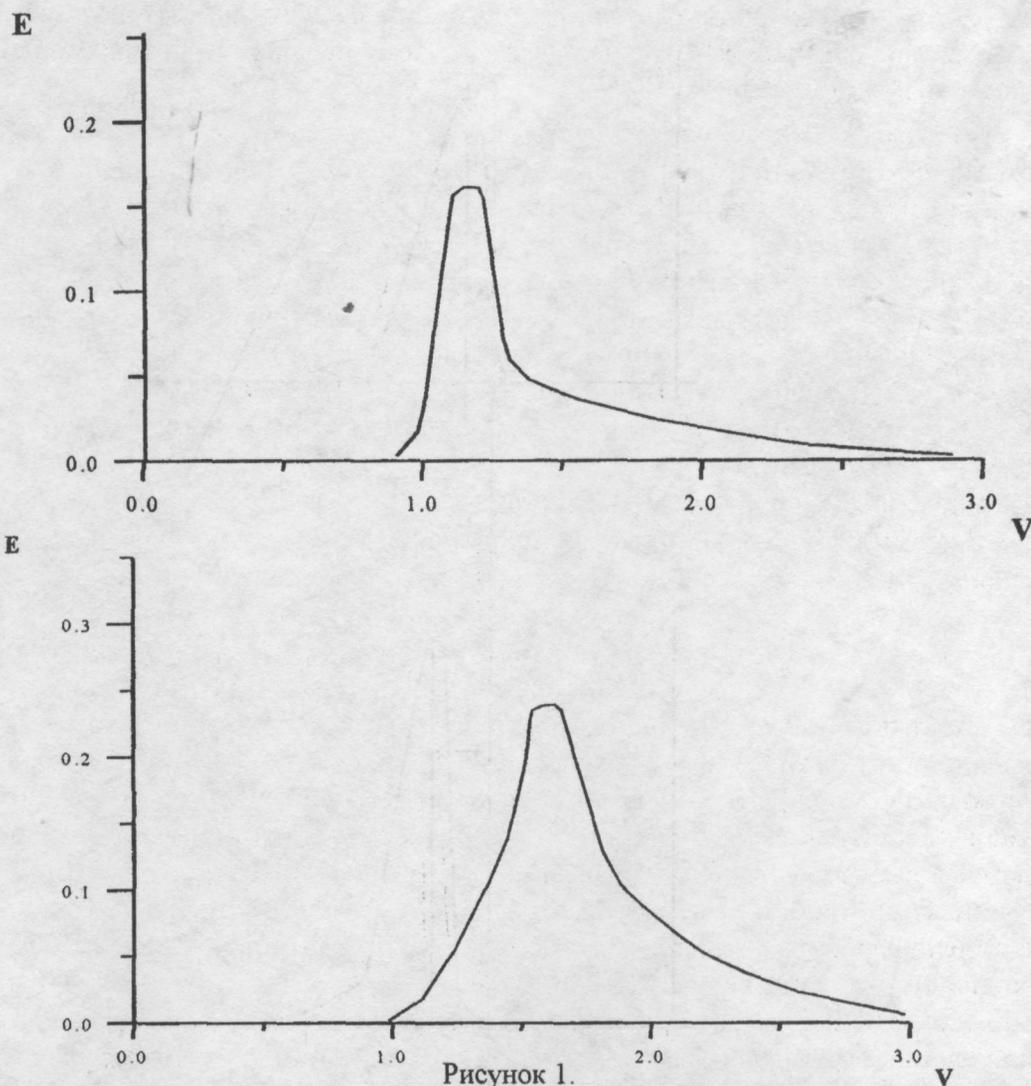
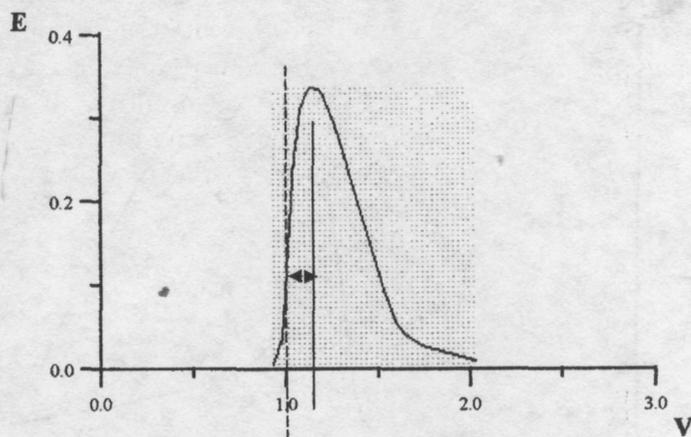


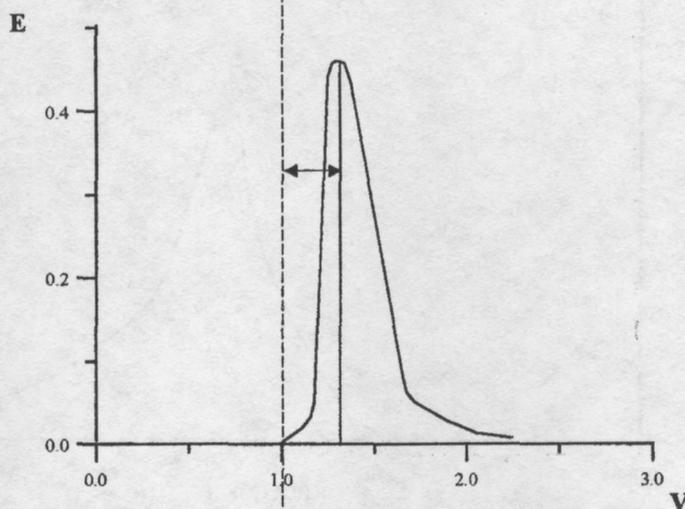
Рисунок 1. Выходная кривая после аффинной хроматографии (а) - кортексина (б) - инсулина. E - оптическая плотность при длине волны 280 нм, V - относительный объем выхода.

Таблица 1. Значение коэффициентов распределения исследованных белков и НПК, полученные методом аффинной хроматографии.

Система	Концентрация компонентов, мг·см ⁻³	Коэффициент распределения <i>k</i>
Нативная ДНК	0,5	5,4±0,6
Инсулин	4,5	4,2±0,6
Кортексин	0,8	13,1±0,8
ДНК-инсулин	0,6 / 4,2	5,6±0,6
ДНК-кортексин	0,3 / 1,8	9,2±0,8
НПК мозга	10,0	14,4±0,8
НПК печени	10,0	8,8±0,8



а



б

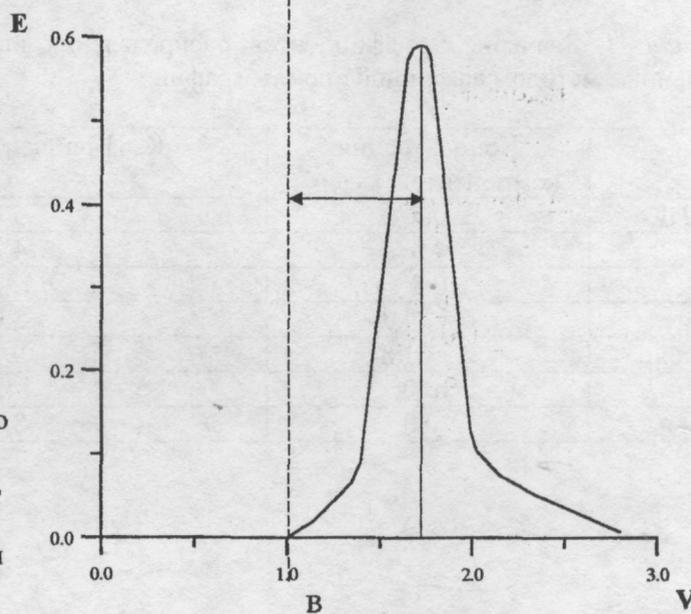


Рисунок 2.
Аффинная
хроматография:
(а) - нативной ДНК,
(б) - модельного
комплекса ДНК -
кортексин,
(в) - природного
нуклеопротеинового
комплекса из коры
головного мозга крупного
рогатого скота.
Е - оптическая плотность
при 260 нм,
V - относительный объем
выхода.

При включении кортексина в комплекс с ДНК, уменьшается селективность его связывания с клеточными мембранами. Наиболее вероятным объяснением этого факта является то, что нуклеопротеиновые комплексы имеют значительно большую молекулярную массу, чем лигандные белки, и сложную надмолекулярную структуру, в которой часть функциональных групп кортексина оказывается экранированной и не участвует в специфическом взаимодействии с рецепторами.

Сравнение констант распределения природных нуклеопротеиновых комплексов свидетельствует о том, что НПК мозга более селективно связывается с клеточными мембранами клеток мозга, чем НПК печени. По-видимому, это объясняет наличие тканеспецифичности таких комплексов, показанной экспериментами в органотипической культуре ткани [17].

ВЫВОДЫ.

1. Методом инклюдирования в пористую матрицу полиакрилонитрила получен аффинный сорбент, содержащий клеточные мембраны коры головного мозга.
2. Методом аффинной хроматографии исследованы закономерности связывания нативной ДНК, инсулина, кортексина и их нуклеопротеиновых комплексов. Показано, что максимальной селективностью обладает кортексин. Нативная ДНК также обладает некоторой селективностью связывания с клеточными мембранами $k=5.4\pm 0.6$. При включении неспецифического белка инсулина в комплекс с ДНК, повышается его связывание с клеточными мембранами.
3. При исследовании природных нуклеопротеиновых комплексов из мозга и печени крупного рогатого скота показано, что они обладают различной селективностью связывания с клеточными мембранами, что является объяснением тканеспецифичности этих комплексов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Дин П., Джонсон У., Мидл Ф. (ред) (1988). Аффинная хроматография. Методы. -М.: Мир.
2. Власов В.В., Грачев М.А., Лаврик О.А. (1983). Аффинная модификация полимеров. -Новосибирск.: Наука.
3. Кульберг А.Я. (1987). Рецепторы клеточных мембран. -М.: Высшая школа. -
4. Якубов Л.А., Шестова О.Е., Андреева А.Ю., Власов В.В. (1998). Докл. РАН. **361**, 550-553.
5. Грушка З., Тырачкова В., Тищенко Г.А., Шатаева Л.К. (1988). Collection Czechoslovak Chem. Commun., **53**, 3089-3095.
6. Chernova I.A., Gurevich K.Ya. (1996). J. Membr. Sci., **113**, 161-167.
7. Климов П.К., Барашкова Г.М. (1993). Эндогенные пептиды как единая система регуляторных веществ. Физиол. Ж-л им. И.М. Сеченова, **79**, 80-87.
8. Шатаева Л.К., Ряднова И.Ю., Хавинсон В.Х. (1999). Ж. прикл. химии, **72**, 982-985.
9. Хавинсон В.Х., Морозов В.Г., Чалисова Н.И., Окулов В.Б. (1997). Цитология, **39**, 571-576.
10. Морозов В.Г., Хавинсон В.Х. (1997) Способ получения белковой пищевой добавки. Пат. 2075944 РФ от 27.03. БИ. 1997, № 9.

11. Морозов В.Г., Хавинсон В.Х., Чайка О.В., Семенова В.И. (1998) Пат. РФ №2104702 от 20.02.
12. Бараш А.Н., Зверев М.П., Литовченко Г.Д., Костина Т.Ф. (1984). Высокомолек. соед., **26 Б**, 687-691.
13. Dunn B.M., Chaiken I.M. (1974). Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **71**, 2382-2385.
14. Кабанов А.В., Кабанов В.А. (1995). Bioconjugate Chem., **6**, 7-20.
15. Teng C.S., Teng C.T., Alfrey V.G. (1971). J. Biol. Chem., **246**, 3597-3609.
16. Чалисова Н.И., Мелькишев В.Ф., Акаев Г.Н., Людыно М.И., Куренкова Т.Ю. (1991). Цитология, **33**, 29-31.
17. Ряднова И.Ю., Шатаева Л.К., Хавинсон В.Х. (2000) Вопр. мед. химии, **46**, 62-71

Поступила 4.11.99.

AFFINITY CHROMATOGRAPHY OF DNA-PROTEIN COMPLEXES

I.Yu. RIADNOVA¹, I.A. CHERNOVA², L.K. SHATAEVA², V.KH. KHAVINSON¹

¹ St.Petersburg Institute of Bioregulation and Gerontology, North-Western Department of the Russian Academy of Medical Sciences
197110, Russia, St.Peterburg, St.Petersburg Institute of Bioregulation and Gerontology, North-Western Department of the Russian Academy of Medical Sciences, pr. Dinamo, 3.
phone/fax: 230-00-49.

² Institute of Macromolecular Compounds, Russian Academy of Sciences
199004, Russia, St. Peterburg, Institute of Macromolecular Compounds, Bolshoi pr. V.O., 31

Affinity sorbent containing cellular membranes of the cerebral cortex was obtained by means of an inclusion into porous matrix of polyacrylonitril. Sorption of model and natural nucleoprotein complexes on the obtained sorbent was studied by the method of affinity chromatography. Distribution coefficients were determined. Natural nucleoprotein complexes isolated from brain possess a greater selectivity of binding to the cellular membranes of the cerebral cortex than that from liver.

Key words: affinity chromatography, cellular membranes, proteins, DNA, DNA-protein complexes