СНИЖЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ ГАПОНИНА ПОВЫШАЕТ УСТОЙЧИВОСТЬ ЛИМФОБЛАСТОИДНЫХ КЛЕТОК ЛИНИИ NAMALVA К ДЕЙСТВИЮ ПЕРОКСИДА ВОДОРОДА

Воробьева Е.Е., Смирнова Е.В., Ракитина Т.В., Липкин В.М.

Учреждение Российской академии наук Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН (ИБХ)

Одним из ключевых патофизиологических механизмов развития социально-значимых заболеваний, включая сердечно-сосудистые, воспалительные и неврологические заболевания является окислительный стресс (ОС) [Mena, 2009; Dalle-Donne, 2006; Dhalla, 2000; Jenner, 2003; Sayre, 2001]. Причиной ОС служит нарушение баланса между образованием активных форм кислорода (АФК) и способностью клетки нейтрализовать токсичные продукты/интермедиаты окислительных реакций и восстановить нанесенные повреждения. Клетки живых организмов (в частности, человека) подвергаются постоянному воздействию АФК, как экзогенного происхождения (загрязнение окружающей среды, действие УФ и радиоактивного излучения, курение, побочные эффекты лекарственных препаратов), так и эндогенного происхождения (воспалительные и аутоиммунные процессы в организме).

Белки, участвующие в клеточным ответе на ОС, являются перспективными фармакологическими мишенями, а их изучение важной научной задачей. Одним из таких белков является гапонин [Вонаршенко, 2007; Ракитина, 2010; Богатова, 2010], регулирующий чувствительность клеток НЕК 293 к действию ОС [Смирнова, 2011].

Распределение эндогенного гапонина в тканях мыши исследовали методом иммуноблоттинга, используя поликлональные кроличьи антитела к гапонину и соответствующие вторичные антитела, меченные пероксидазой хрена. Визуализацию проводили хемилюминесцентным методом с использованием в качестве субстрата люминола. Экспрессия гапонина наблюдалась во всех исследованных тканях (надпочечники, тимус, селезенка, легкие, сердце, скелетная мышца, почка, печень, прямая кишка, желудок, задний мозг, кора головного мозга) с выраженным (более чем 5-кратным) преобладанием в лимфоидной ткани, тимусе и селезенке.

Для изучения функций гапонина в клетках лимфоидной природы на основе клеток лимфобластоидной линии Namalva была получена линия со сниженным уровнем экспрессии гапонина. Для снижения уровня экспрессии гапонина использовали метод киРНК. Плазмидой pSilencer™, несущую последовательность киРНК к гапонину (5´-AAATACCGCAAGAACATCTGG-3´), или контрольной плазмидой pSilencer™4.1-CMV puro Negative Control трансфецировали клетки линии Namalva методом электропорации. Электропорацию проводили в Gene Pulser II (BioRad), используя 1-2 мкг ДНК на 0,5 млн. клеток в 100 мкл PBS с 400 В, 125 мкФ и ∞Ω. После электропорации клетки распределеляли в 96-луночном планшете в полной среде, содержащей селективный антибиотик (пуромицин, 2 мкг/мл). Через 3 недели в стабильно растущих клонах снижение экспрессии гапонина подтверждали методами иммуноблоттинга и количественной ПЦР в реальном времени (кПЦР). Контролем служили клоны клеток, экспрессирующих контрольные киРНК. Было показано, что в клетках, экспрессирующих киРНК к гапонину, уровень его мРНК и белка был снижен более, чем на 50%.

Окислительный стресс модулировали добавлением к клеткам пероксида водорода в диапазоне концентраций 0,1 мМ — 2 мМ. Клетки Namalva, несущие киРНК к гапонину и контрольные киРНК, высевали в количестве 2x104 в полной среде без селективного антибиотика в лунки 96-луночного планшета в 4 повторах для каждой точки и подвергали воздействию перекиси водорода в указанных концентрациях. Процент выживших клеток (относительно контроля — необработанных клеток, которые принимали за 100%) определяли с помощью МТТ-теста через 48 часов после добавления пероксида водорода. В результате было показано, что снижение уровня экспрессии гапонина в клетках Namalva увеличивало устойчивость этих клеток к окислительному стрессу (IC50 для клеток, экспрессирующих контрольные киРНК, составляла 0,5±0,04 мМ, тогда как для клеток, экспрессирующих киРНК к гапонину, IC50 составляла 2±0,06 мМ).

Таким образом, аналогично клеткам НЕК 293, уровень чувствительности клеток Namalva зависит от уровня экспрессии гапонина. В клетках иммунной системы окислительный стресс играет важнейшую роль при развитии аутоиммунных и воспалительных патологических процессов. Поэтому, эти данные позволяют выделить новую потенциальную мишень - гапонин - для разработки противовоспалительных и антиаллергических лекарственных соединений.

Исследование выполнено при поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации, соглашение 14.132.21.1305.