

**Биотехнология № 5, 2015**

УДК 577.1.08

## **Внутриклеточная локальная визуализация рекомбинантного гистона H1**

**М. Н. Шапошников**

Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии имени К. И. Скрябина, г. Москва, Россия E-mail: [MN\\_Shaposhnikov@mail.ru](mailto:MN_Shaposhnikov@mail.ru)

**С. Ю. Зайцев**

доктор химических наук, доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой химии имени профессоров С. И. Афонского и А. Г. Малахова, Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии

имени К. И. Скрябина, г. Москва, Россия E-mail: [szaitsev@mail.ru](mailto:szaitsev@mail.ru)

**А. А. Ризванов**

Казанский (Приволжский) федеральный университет, г. Казань, Россия

### **Аннотация**

Исследовано проникновение и внутриклеточная локализация рекомбинантного гистона H1.3 с помощью фотоактивируемого флуоресцентного красителя на модели культур клеток *in vitro*. Установлено, что с помощью ФФК можно отслеживать внутриклеточный транспорт как всего конъюгата в клетке, так и его части, после локальной фотоактивации. Фиксированные клеточные препараты с конъюгатом «гистон H1-ФФК» можно будет исследовать методами оптической наноскопии, такими как «STORM».

**Ключевые слова:** гистон H1, внутриклеточная визуализация, флуоресцентные красители, фотоактивация.

**Biotechnology**

**Intracellular local visualization of recombinant histone H1**

**M. N. Shaposhnikov**

Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology by K. I. Scriabin, Moscow, Russia E-mail: [MN\\_Shaposhnikov@mail.ru](mailto:MN_Shaposhnikov@mail.ru)

**S. Yu. Zaitsev**

Doctor of Science, professor Moscow State Academy of Veterinary Medicine and  
Biotechnology by K. I Scriabin, Moscow,

E-mail: [szaitsev@mail.ru](mailto:szaitsev@mail.ru)

**A. A. Rizvanov**

Kazan (Volga Region) Federal University,

Kazan, Russia

**М. Н. Шапошников, С. Ю. Зайцев, А. А. Ризванов Abstract**

2015, № 5

Investigated the penetration and intracellular localization of recombinant histone H1.3 use of photoactivated fluorescent dye on the model of cell cultures in vitro. Found that using FPC, you can monitor the intracellular transport of the conjugate to the cell and its parts, after local photoactivation. Fixed cell preparations with conjugate «histone H1-FFK» can be studied by optical nanoscopy, such as «STORM».

**Keywords:** histone H1, intracellular imaging, fluorescent dyes, photoactivation.

Гистон H1 — белок в состав которого входит большое количество ФФК с аминокислотных остатков лизина (около 29%) — является катионным белком, способным эффективно проникать через цитоплазматическую мембрану [1]. Препарат на основе рекомбинантного гистона H1.3 («Онкохист») для лечения острого миелоидного лейкоза прошел в Германии I фазу клинических исследований и сейчас проходит II фазу клинических исследований в России. Помимо противоопухолевого действия, благодаря своим катионным свойствам, рекомбинантный гистон H1 можно использовать в качестве носителя для доставки лекарственных препаратов

Инкубация конъюгата «Гистон H1-ФФК» с культурами клеток и их микроскопия.

Для подтверждения проникновения конъюгата в клетки, была использована клеточная линия MDCK. Клетки культивировали на среде RPMI в CO<sub>2</sub>-инкубаторе при 37°C и концентрации CO<sub>2</sub> = 5%. В среду добавляли фетальную бычью сыворотку (FBS) 8%, L-глутамин, 300 мкг/мл, ампициллин/стрептомицин (50 мкг/мл), 2-мер-каптоэтанол (5x10<sup>-5</sup> M). Для подготовки образцов клетки наносили на стерильные покровные стекла. Клетки использовали по достижению ими

нуклеиновых кислот в клетки (ги-полуконфлюэнтного монослоя. стонофекция) [1]. В этой связи необходимо исследовать молекулярный механизм проникновения и транспорта рекомбинантного гистона в клетках человека.

Фотоактивируемые флуоресцентные красители (ФФК) изначально существуют в нефлуоресцентной форме, которая может быть преобразована флуоресцентную форму путем облучения светом с длиной волны света 405 нм [2-4]. Поэтому ФФК представляют огромный интерес для микроскопии биологических объектов и могут быть использованы для отслеживания белков [5, 6]. Микроскопию создания многоцветных приложений [7], во флуоресцентной наноскопия, например, в схемах визуализации с высокими разрешающими параметрами.

Для оценки внутриклеточной динамики конъюгата показана локальная фотоактивация тоактивируемого флуоресцентного красителя (ФФК) на модели культуры клеток *in vitro*.

Целью работы является визуализация внутриклеточного транспорта с помощью фотоактивации тоактивируемого флуоресцентного красителя (ФФК) на модели культуры клеток *in vitro*.

**Материалы и методы.** Конъюгат гистона Н1.3 (гистон Н1.3 предоставлен ОАО Институт стволовых клеток человека) с тоактивируемым флуоресцентным красителем (ФФК) — производным тетраметилпродамина, способным флуоресцировать в красной области спектра, после облучения фиолетовым светом, вследствие образования флуоресцентного продукта «Род», «Гистон Н1-ФФК» был получен ранее

**Результаты.** После 1 часа инкубации конъюгата «Гистон Н1.3-ФФК» с клетками (в концентрации около 30 мкг/мл в клеточной среде) и после двух отмывок свежей средой, была проведена прижизненная микроскопия нативных клеток. Для сравнения использовали ФФК-NHS (после гидролиза в бикарбонатном буфере и нейтрализации уксусной кислотой) с концентрацией ФФК 10 мкг в присутствии 40 мкг/мл гистона Н1.3. (Клетки приготавливали и окрашивали на покровных стеклах в 6-ти луночных планшетах, в 1 мл клеточной среды). Микроскопию осуществляли с инвертированного сканирующего микроскопа Nikon Eclipse TE2000 оснащенного лазерами 405 нм, 488 нм, 543.

[8].

Используя скоростную 5. *Lidke D. S. Caught in the Act: фотосъемку (одна микрофотография Quantifying Protein Behavior in Living в секунду), наблюдали за движением Cells // Trends Cell Biol. 2009. V. 11, pp. небольшой части конъюгата в 566-574.*

реальном времени, а также смонтировали с помощью программы 6. *Lippincott-Schwartz J. Studying микроскопа видео файлы с protein dynamics in living cells // Nat. расширением .avi, Rev. Mol. Cell Biol. 2001. V. 2, pp. 444- продолжительностью 6 секунд 456.*

(скорость 5 кадров в секунду), имеющие разрешение 512 x 512 7. *Neher R. A. Blind source separation techniques for the decomposition of multiply labeled fluorescence images // Biophys. J. 2009. V. 96, pp. 3791-3800.*

Таким образом, полученный 8. *Шапошников М. Н. Получение конъюгат может быть использован конъюгата гистона H1 с для дальнейших исследований как фотоактивированным флуоресцентным модель рекомбинантного гистона красителем и его испытание в H1.3 обладающего культурой клеток MDCK // противораковым действием, так и Ветеринария, зоотехния и для его исследования при доставке биотехнология. 2014. № 1. С. 64-69.*

лекарственных препаратов и нуклеиновых кислот в клетки (гистонофекция).

## References

**Заключение.** Исследовано проникновение и внутриклеточная локализация рекомбинантного гистона H1.3 с помощью фотоактивируемого флуоресцентного красителя на модели культур клеток in vitro. Установлено, что с помощью ФФК можно отслеживать внутриклеточный транспорт как всего конъюгата в клетке, так и его части, после локальной фотоактивации.

Фиксированные клеточные препараты с конъюгатом «гистон H1-ФФК» можно будет исследовать методами оптической наноскопии,

1. Soloveva V. V. (2011) Transfer of recombinant nucleic acids into cells (transfection) with histones and other nuclear proteins. *Cell Transplantation and Tissue Engineering*. Т. 6, no. 3, pp. 29-40.

2. Belov V., Wurm C. A, Boyarskiy V. P., Jakobs, S. and Hell, S. W. (2010). Rhodamines NN: A Novel Class of Caged Fluorescent Dyes. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 49: 3520-3523.

3. Zaitsev S. Yu. (2010) Staining new photoactivated fluorescent dyes. *Veterinary medicine*, no. 3, pp. 32-34.

такими как «STORM».

### Литература

1. Соловьева В. В. Перенос рекомбинантных нуклеиновых кислот в клетки (трансфекция) с помощью гистонов и других ядерных белков // Трансплантология и Инженерия. 2011. Т. 6. № 3. С. 29-40.
2. Belov V., Wurm C. A, Boyarskiy V. P., Jakobs S. and Hell S. W. (2010). Rhodamines NN: A Novel Class of Caged Fluorescent Dyes. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 49: 3520-3523.
3. Зайцев С. Ю. Окрашивание клеток новыми фотоактивируемыми флуоресцентными красителями // Ветеринарная медицина. 2010. № 3. С. 32-34.
4. Шапошников М. Н. Получение конъюгата хитозана фотоактивируемым флуоресцентным красителем и его применение в клеточной микроскопии // Ветеринарная медицина. 2012. № 3-4. С. 32-35.
4. Shaposhnikov M. N. (2012) Obtaining a conjugate of chitosan with photoactivated fluorescent dye and its application in cellular microscopy. *Veterinary medicine*, no. 3-4, pp. 32-35.
5. Lidke D. S. (2009) Caught in the Act: Quantifying Protein Behavior in Living Cells. *Trends Cell Biol*, V. 11, pp. 566-574.
6. Lippincott-Schwartz J. (2001) Studying protein dynamics in living cells. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*, vol. 2, pp. 444-456.
7. Neher R. A. (2009) Blind source separation techniques for the decomposition of multiply labeled fluorescence images. *Biophys. J.*, vol. 96, pp. 3791-3800.
8. Shaposhnikov M. N. (2014) Obtaining a conjugate of histone H1 with photoactivated fluorescent dye and tested in cell culture MDCK. *Veterinariya, zootekhniya i biotekhnologiya*, no. 1, pp. 64-69.