



УДК 577.112.384.4.017

ЭНДОГЕННЫЙ ФАКТОР ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ КЛЕТОК ЛИНИИ HL-60 ОБЛАДАЕТ НУКЛЕАЗНОЙ АКТИВНОСТЬЮ

© 2000 г. С. М. Драницына, И. А. Костанян[#], С. Г. Андреева, М. В. Астапова, И. И. Бабиченко*, О. В. Баева, А. П. Богачук, И. М. Молотковская, И. Л. Родионов**, Е. В. Смирнова, В. М. Липкин

Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117871, Москва, ГСП-7, ул. Миклухо-Маклая, 16/10;

* Российский государственный университет дружбы народов, Москва;

** Филиал Института биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, г. Пушкино, Московская область

Поступила в редакцию 02.09.99 г. Принята к печати 21.12.99 г.

На основании структурной гомологии эндогенного фактора дифференцировки клеток промиелоцитарного лейкоза человека линии HL-60 (HLDF) с рядом ДНК/РНК-связывающих и ДНК/РНК-гидролизующих белков и результатов исследования экспрессии его гена *hldf* в прокариотических системах была выявлена аминокислотная последовательность 8-членного фрагмента, обладающего потенциальной нуклеазной активностью. Показано, что синтетический пептид RRWHRLKE способен расщеплять РНК, линейную ДНК фага λ , все формы плазмидной ДНК. Установлено, что обработка культуры клеток HL-60 этим пептидом (10^{-6} М) приводит к увеличению в ней количества апоптотических клеток. Полученные данные позволили выдвинуть гипотезу о возможном участии HLDF в процессах апоптоза.

Ключевые слова: клетки HL-60; фактор дифференцировки HLDF; нуклеазная активность; апоптоз.

ВВЕДЕНИЕ

В основе фундаментальных процессов, протекающих в живой клетке: репликации, рекомбинации, рестрикции, транскрипции, трансляции и др. – лежат белок-нуклеиновые взаимодействия. Одним из подходов к пониманию природы этих взаимодействий является изучение молекулярного механизма функционирования экзо- и эндонуклеаз. К настоящему времени достигнуты значительные успехи в исследовании ферментов репарации, таких, как урацил-ДНК-гликозилаза (формамидопиридин-ДНК-гликозидаза [КФ 3.2.2.23]) [1], апури/апиридинэндонуклеаза (АР-эндонуклеаза [КФ 3.1.25.2]) [2–4]; ряда ДНК-полимераз, обладающих 3'–5' и 5'–3'-нуклеазными активностями [5, 6]; эндонуклеаз рестрикции [7–9]. В формировании пространственной структуры активных центров этих ферментов принимает участие большое число аминокислотных остат-

ков, индуцирующих конформационные изменения в гидролизующих молекулах. Иногда эти остатки достаточно удалены друг от друга в аминокислотной последовательности, что затрудняет исследование строения активных центров ферментов.

В последнее время ведется интенсивный поиск низкомолекулярных соединений, способных высокоэффективно и специфично деструктурировать нуклеиновые кислоты. Такие соединения, как правило, должны содержать реакционноспособные группы, формирующие в нуклеазах их активные центры: имидазольные, гуанидиновые, карбоксильные и аминогруппы. Наиболее перспективными могут оказаться пептидные молекулы, поскольку пептиды обладают низкой иммуногенностью, хорошей растворимостью, легко метаболизируются, а их синтез является рутинной процедурой. Описан ряд синтетических пептидов, способных проявлять ферментподобную активность – эстеразную либо гликозидазную. Так, трипептид KWK специфически расщепляет молекулы ДНК по апуриновым/апиридиновым сайтам, подобно АР-эндонуклеазе [10]. Поликативные пептиды, содержащие остатки основных и гидрофобных аминокислот, структурированные в β -складки, способны гидролизовать фосфодиэфирные связи олигорибонуклеотидов [11].

Сокращения: HLDF – фактор дифференцировки клеток промиелоцитарного лейкоза человека линии HL-60; DOPA – 3,4-дигидроксифенилаланин; Dns – дансил; PTC – фенилтиоцианат; C2-Cer – N'-ацетилфингозин; NBT – нитроголубой тетразолий; PBS – изотонический K/Na-фосфатный буфер; HEPES – N-(2-гидроксиэтил)пиперазин-N'-этансульфоновая кислота; DTE – 1,4-дитиоэритрит.

[#] Автор для переписки (тел.: (095) 336-55-11; факс: (095) 310-70-10; e-mail: kost@ibch.siobc.ras.ru).

<i>hldf</i>		
<i>rpS21</i>	cgcggtgtggtggcagcagggcgagcccagcctcgaa	-1
<i>hldf</i>	ATGCAGAACGACGCCGGCGAGTTCGTGGACCTGTACGTGCCGGGAAATGCTCCGCTAGCAATCGCATCATCGGTGCCAA	80
HLDF	M Q N D A G E F V D L Y V P R K C S A S N R I I G A K	26
RPS21	M Q N D A G E F V D L Y V P R K C S A S N R I I G A K	26
<i>rpS21</i>	ATGCAGAACGACGCCGGCGAGTTCGTGGACCTGTACGTGCCGGGAAATGCTCCGCTAGCAATCGCATCATCGGTGCCAA	80
<i>hldf</i>	GGACCACGCATCCATCCAGATGAACGTGGCC-AGGTTGACAAGGTCACAGGCAGGTTTAATGGCCAGTTTAAACTTATGC	160
HLDF	D H A S I Q M N V A R L T R S Q A G L M A S L K L M	52
RPS21	D H A S I Q M N V A E V D K V T G R F N G Q F K T Y A	53
<i>rpS21</i>	GGACCACGCATCCATCCAGATGAACGTGGCCGAGGTTGACAAGGTCACAGGCAGGTTTAATGGCCAGTTTAAACTTATGC	161
<i>hldf</i>	TATCTGCGGGGCCATTCGTAGGATGGGTGAGTCAGATGATCCATTCTCCGATTGGCCAAGG-CGATGGCATCGTCTCAAA	240
HLDF	L S A G P F V G W V S Q M I P F S D W P R R W H R L K	79
RPS21	I C G A I R R M G E S D D S I L R L A K A D G I V S K	80
<i>rpS21</i>	TATCTGCGGGGCCATTCGTAGGATGGGTGAGTCAGATGATCCATTCTCCGATTGGCCAAGGCCGATGGCATCGTCTCAAA	242
	Ter	
<i>hldf</i>	GAACTTTTGACTGGAGAGAATCACAGATGTGGAATATTTGTCATAATAAATAATgaaaacct	304
HLDF	E L L T G E N H R C G I F V I N K	96
RPS21	N F	82
<i>rpS21</i>	GAACTTTTGActggagagagaatcacagatgtggaatatttgtcataaataaataatgaaaacct	306
	Ter	

Рис. 1. Структура кДНК и соответствующие аминокислотные последовательности рибосомного белка S21 и предшественника фактора дифференцировки HLDF. Тер – сигнал терминации трансляции. Жирным шрифтом выделена структура зрелого фактора дифференцировки.

Конъюгат дезоксирибоолигонуклеотида с олигопептидным кластером, состоящим из чередующихся остатков лейцина и аргинина, селективно расщепляет тРНК^{Phe} *E. coli* [12, 13]. Большое число работ по созданию реагентов, имитирующих активные центры нуклеаз, посвящено синтезу минимальной модели активного центра рибонуклеазы А, содержащего два остатка гистидина, выступающих как кислотно-основной катализатор при образовании промежуточного 2',3'-циклофосфата и его гидролизе (см., например, [14]). Однако и такие синтетические трипептиды, как NGH, GGH, GKH, способны расщеплять РНК в физиологических условиях в присутствии ионов Cu^{2+} и Ni^{2+} [15, 16].

Пептидные молекулы, обладающие нуклеазной активностью, могут найти применение не только в молекулярной биологии в качестве искусственных моделей ферментов рестрикции, но и при создании новых терапевтических средств. Показано, что ряд металлхелатирующих пептидов, конъюгированных с антрахиноновыми хромофорами, принимающими участие в формировании свободных радикалов при перекисном окислении полиненасыщенных жирных кислот, дегградации белков и нуклеиновых кислот, являются антиопухолевыми агентами [17]. Поэтому поиск новых последовательностей пептидов, обладающих ДНК/РНК-гидролизующими свойствами, является важной задачей современной биологической химии и биотехнологии.

Цель настоящего исследования – идентификация фрагмента HLDF, потенциально обладающего ДНК/РНК-гидролизующей активностью, изучение свойств его синтетического аналога и возможной роли данного участка HLDF в его функционировании.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее из среды культивирования клеток промиелоцитарного лейкоза человека HL-60, обработанных *полностью-транс*-ретиноевой кислотой, нами был выделен и охарактеризован белковый фактор HLDF с молекулярной массой 8.2 кДа, индуцирующий дифференцировку исходных клеток по гранулоцитарному пути [18]. При компьютерном поиске в банке данных EMBL (www.embl-heidelberg.de) было обнаружено, что последовательность кДНК фактора дифференцировки имеет значительную гомологию с последовательностью кДНК рибосомного белка S21 (RPS21) [19]. Однако при этом никакой гомологии в первичных структурах зрелых белков не наблюдается, поскольку кДНК предшественника HLDF отличается от кДНК RPS21 отсутствием двух нуклеотидов: G – в положении 112 и C – в положении 224 (рис. 1). В результате этих точечных делеций зрелый фактор дифференцировки и рибосомный белок S21 являются продуктами трансляции с различных рамок считывания.

Попытки получения зрелого фактора дифференцировки в различных прокариотических системах не увенчались успехом. Нами были созданы экспрессирующие конструкции рЕТDF и рТНDF на основе трансляционных векторов рL2p26 [20], рЕТТ α [21] и плазмиды рТН1 (см. “Эксперимент. часть”). Во всех случаях уровень продукции рекомбинантного HLDF был чрезвычайно низок, а в некоторых клонах первоначально наблюдавшаяся продукция со временем полностью прекращалась. Хотя в ряде клонов и продуцировался белок, по молекулярной массе соответствующий рекомбинантному HLDF, однако он не обладал дифференцирующей активностью и не взаимодействовал с поликлональными антителами к С-концевому фрагменту фактора дифференцировки (данные не представлены). Было установлено, что N-концевая аминокислотная последовательность этого функционально неактивного белка полностью совпадает с таковой для зрелого фактора дифференцировки HLDF. Анализ нуклеотидной последовательности кДНК-вставок, соответствующих HLDF, выделенных из плазмидной ДНК клонов, продуцирующих этот неактивный белок, показал, что в них присутствуют точечные мутации в участке, кодирующем С-концевой фрагмент молекулы HLDF (рис. 2). Сравнение аминокислотной последовательности С-концевой области фактора дифференцировки с аминокислотными последовательностями известных белков выявило в ней фрагмент (31–38) – RRWHRLKE-, имеющий гомологию с последовательностями, встречающимися у ряда ДНК/РНК-связывающих либо ДНК/РНК-гидролизующих ферментов (рис. 3). Мы предположили, что наличие в факторе диф-

ференцировки этой аминокислотной последовательности, названной нами “ДНК-гидролизующий фрагмент”, возможно, обуславливает гидролиз кДНК, что и приводит к низкому уровню продукции белка.

С целью проверки выдвинутой гипотезы на основе ранее полученного в лаборатории [21] трансляционного вектора рЕТ-рА, содержащего нуклеотидную вставку, кодирующую IgG-связывающий домен (M 18 кДа) белка А (рА), была создана плазида рЕТ-рА1, включающая участок кДНК, кодирующий ДНК-гидролизующий фрагмент с дополнительно введенными остатками пролина по N- и С-концевым положениям пептида (см. “Эксперимент. часть”). Введение остатков пролина, которые, как известно, вызывают изгиб пептидной цепи, позволяет не только исключить возможное влияние N-концевого остатка метионина, но и обеспечить экспонирование пептида на поверхности продуцируемого химерного белка. Для контроля, вместо этого фрагмента, в плазмиду рЕТ-рА вводилась последовательность, кодирующая “инертный” пептид, состоящий из алифатических аминокислотных остатков MPGANANGGP (плазида рЕТ-рАк). Как видно из рис. 4, экспрессия наблюдалась только в случае исходной плазмиды рЕТ-рА либо конструкции рЕТ-рАк, включающей последовательность, кодирующую “инертный” пептид.

Хотелось бы обратить внимание на следующий факт. В 1998 г. была опубликована структура кДНК каспаз-активированной дезоксирибонуклеазы из лимфомы мыши и выведенная на ее основе аминокислотная последовательность [28]. Этот белок с молекулярной массой 32.9 кДа

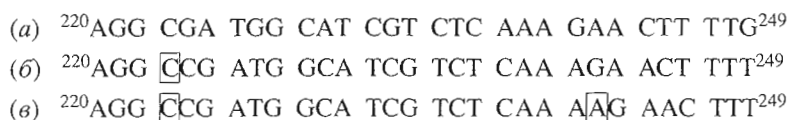


Рис. 2. Точечные инсерции в участке кДНК (220–249) фактора дифференцировки HLDF, экспрессированной в составе рекомбинантной плазмиды рЕТDF (б) и рекомбинантной плазмиды рТНDF (в). (а) – последовательность фрагмента кДНК нативного HLDF. Нумерация указана в соответствии с рис. 1. Инсерции обозначены рамками.

Фактор дифференцировки HLDF 8.2 кДа (<i>H. sapiens</i>) [18]	31	R	R	W	H	R	L	K	E	L	39
Большая субъединица фактора репликации С (<i>M. musculus</i>) [22]	600	R	N	W	H	K	S	S	P	E	608
Большая субъединица фактора репликации С (<i>H. sapiens</i>) [23]	600	R	N	W	H	K	S	S	P	E	608
ISRE-связывающий белок (<i>M. musculus</i>) (UO7157)*	614	R	N	W	H	K	S	S	P	E	622
Фактор элонгации 1 α (<i>A. adenivorans</i>) (P41745)*	210	K	G	W	H	K	E	T	K	E	218
Туг-киназа (<i>M. musculus</i>) (D17393)*	64	K	G	W	H	R	G	P	E	C	72
ДНК-связывающий белок митохондрий (<i>D. melanogaster</i>) [24]	77	T	D	W	H	R	V	V	V	F	85
ДНК-связывающий белок митохондрий (<i>H. sapiens</i>) [25]	65	T	T	W	H	R	I	S	V	F	73
Активный центр неспецифической нуклеазы G (<i>H. sapiens</i>) [26]	92	D	R	G	H	L	A	A	A	A	100
Интерлейкин-10 (<i>H. sapiens</i>) [27]	97	R	R	C	H	R	F	L	C	E	105

Рис. 3. Гомология фактора дифференцировки HLDF с рядом ДНК/РНК-связывающих/гидролизующих ферментов. Зачернены идентичные аминокислотные остатки. Звездочкой отмечены регистрационные номера в базе данных EMBL. ISRE – интерферонстимулированные ответные элементы.

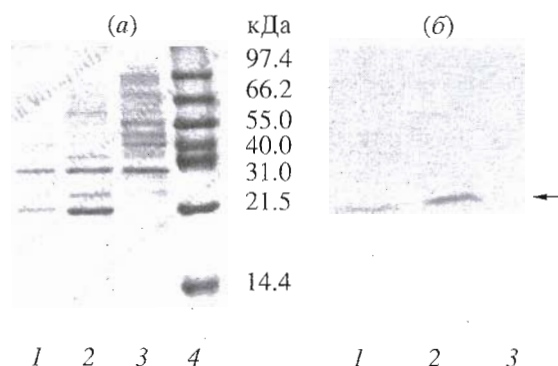


Рис. 4. Электрофореграмма белковых фракций в 12% SDS-ПААГ (а) и вестерн блот-анализ продуктов экспрессии (б) лизата ночных культур клеток *E. coli* B834, трансформированных плазмидами рЕТ-рАк (1), рЕТ-рА (2), рЕТ-рА1 (3); 4 – стандарты молекулярных масс (кДа). Стрелкой указано положение целевого продукта.

вызывает деградацию хромосомной ДНК в процессе апоптоза. Анализируя его первичную структуру, мы обнаружили последовательность (53–63) –**RRWHGGDGRLL**–, имеющую высокую степень гомологии с последовательностью (31–40)

–**RRWHRLKELL**–фактора дифференцировки, содержащей ДНК-гидролизующий фрагмент. Однако буквально через 3 месяца авторы сообщили о допущенной, по их мнению, ошибке в последовательности кДНК [29]. По сравнению с первоначальной уточненная структура кДНК имеет одну точечную делецию и одну точечную инсерцию, что приводит к изменению аминокислотной последовательности 29-членного фрагмента ДНКазы, в состав которого входила последовательность (53–63). Возможно, что эти структурные перестройки, как и наблюдаемые нами в случае экспрессии кДНК фактора дифференцировки (см. рис. 2) – результат тех же самых, пока неизвестных процессов.

Для подтверждения функциональной роли ДНК-гидролизующего фрагмента в факторе дифференцировки был синтезирован октапептид (пептид-8) со структурой RRWHRLKE, и исследована его биологическая активность. При изучении условий протекания гидролитической реакции было показано, что пептид-8 способен расщеплять матричную и рибосомальную РНК, линейную ДНК фага λ , а также все формы плазмидной ДНК *in vitro* (рис. 5). Активность пепти-

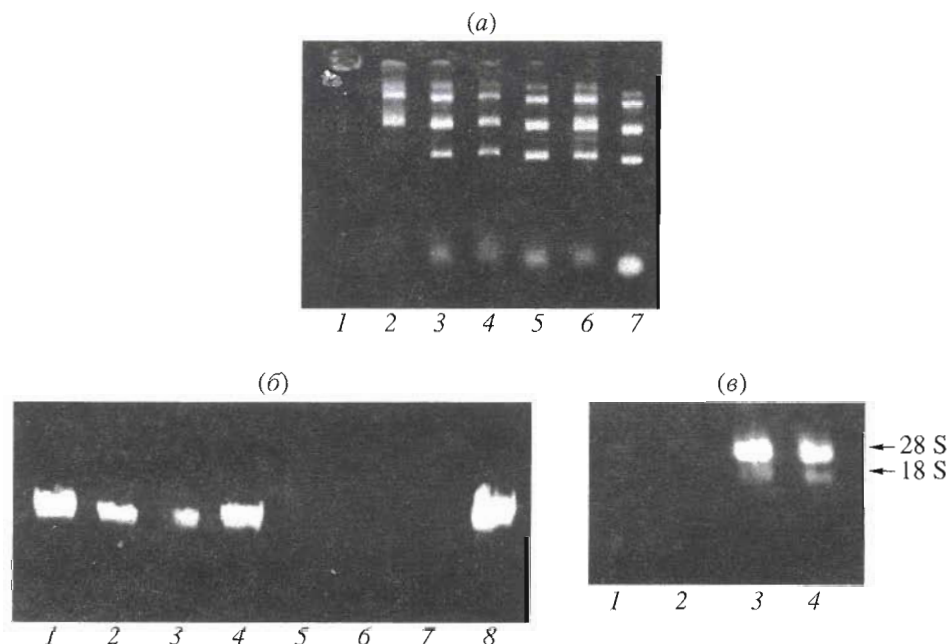


Рис. 5. Анализ нуклеазной активности пептида-8 *in vitro* в 1% агарозном геле.

(а) ДНК плазмиды рSp65 после инкубации с пептидом-8 (10^{-6} М) при 37°C в течение 1 ч: 1 – при pH 4.5 в присутствии 5 мМ $MgCl_2$ (буфер I); 2 – при pH 4.5 в присутствии 5 мМ $MgCl_2$ (буфер II); 3, 4, 5 – при pH 4.5 в присутствии 100 мМ NaCl (буфер III) в течение 1, 2, 3 ч, соответственно; 6 – ДНК плазмиды рSp65, инкубированная в буфере I при 37°C в течение 3 ч; 7 – нативная плазида.

(б) ДНК фага λ после инкубации с пептидом-8 (10^{-6} М) в буфере III: 1, 2, 3 – в присутствии 100 мМ NaCl в течение 1, 2, 3 ч, соответственно; 4 – контроль, ДНК фага λ после 3 ч инкубации в том же буфере; 5, 6, 7 – в отсутствие NaCl (буфер I) в течение 1, 2, 3 ч, соответственно; 8 – контроль, ДНК фага λ после 3 ч инкубации в том же буфере.

(в) Гидролиз рРНК пептидом-8 в течение 1 ч при pH 4.5 (буфер I) в концентрациях: 1 – 10^{-6} М, 2 – 10^{-5} М; 3 – рРНК в тех же условиях без пептида; 4 – рРНК (без предварительной инкубации).

Таблица 1. Структура синтезированных олигопептидов. Цифрами обозначено местоположение пептидов в нативном HLDF

Пептид-6		41	46
		T	G E N H R
Пептид-8	31		38
	R R W H R L K E		
Пептид-14		41	54
		T	G E N H R C G I F V I N K
Пептид-24	31		54
	R R W H R L K E L L T G E N H R C G I F V I N K		
Пептид-25	31		54
	Y R R W H R L K E L L T G E N H R C G I F V I N K		

да-8 проявляется при низкой ионной силе, в среде со слабощелочным значением $\text{pH} \leq 4.5$ (при котором остаток гистидина протонирован) и в присутствии катионов двухвалентных металлов Zn^{2+} либо Mn^{2+} . Добавление в инкубационную среду ионов Mg^{2+} препятствует проявлению нуклеазной активности пептида-8, по-видимому, приводя, как и в случае, рассмотренном в работе [30], к дестабилизации образующегося комплекса пептид-ДНК.

Необходимо отметить, что при увеличении концентрации NaCl в среде до 100 мМ пептид-8 теряет свойство гидролизовать нуклеиновые кислоты. В условиях высокой ионной силы могут нарушаться не только ионные взаимодействия между пептидом и сахарофосфатным остовом ДНК, но и стэкинг-взаимодействия между ароматическим кольцом остатка триптофана и парами комплементарных оснований. Нами было показано, что синтетический аналог пептида-8, в котором отсутствовал остаток Trp, не проявлял ДНК-гидролизующей активности. Эти данные, указывающие на важность остатка триптофана, позволили предположить, что расщепление нуклеиновых кислот под действием пептида может происходить по тому же механизму, что и в случае искусственных апуриновых нуклеаз. Как известно, искусственные апуриновые эндонуклеазы имеют в своем составе остаток триптофана, который интеркалирует в апуриновые участки молекулы ДНК и вызывает одноцепочечный разрыв ее остова в результате реакции β -элиминирования при нейтральных значениях pH [31]. Однако частичная апуринизация ДНК плазмиды pSp65 не привела к усилению нуклеазного воздействия пептида-8 (данные не представлены).

Изучение температурной зависимости гидролитической реакции показало, что пептид-8 расщепляет молекулы ДНК с одинаковой эффективностью в диапазоне температур 4–15°C и 30–37°C. Критической является комнатная температура (18–24°C), при которой связывание пептида с нуклеиновыми кислотами происходит, но их расщепления не наблюдается. Возможно, в этом случае

пептид принимает конформацию, при которой остаток триптофана оказывается спрятанным внутри молекулы.

Нами изучена роль и некоторых других аминокислотных остатков в процессе взаимодействия пептида-8 с нуклеиновыми кислотами. Показано, что дансирование пептида-8 по *N*-концевому остатку аргинина и ϵ -аминогруппе остатка лизина приводит к полной потере им нуклеазной активности, а замена остатка лизина на норвалин в синтетическом аналоге пептида-8 ее значительно снижает (данные не представлены). Гимбл с соавт. показали, что для проявления ферментативной активности собственными клеточными, или так называемыми “хозяйскими”, эндонуклеазами необходимо присутствие двух остатков лизина в активном центре [32]. Их замена на остатки аланина или аргинина снижает нуклеазную активность белков, но не влияет на способность связываться с нуклеиновыми кислотами. При кристаллографических исследованиях комплексов различных эндонуклеаз с молекулами ДНК в присутствии ионов двухвалентных металлов установлено, что роль остатка лизина заключается в правильной ориентации гидроксиланиона гидратной оболочки ионов металлов для его последующей нуклеофильной атаки на фосфатный остов ДНК [33].

Для дальнейших исследований был синтезирован фактор дифференцировки HLDF (54 а. о.) и набор пептидных фрагментов из его *C*-концевой области (табл. 1). Была проверена способность пептидов взаимодействовать с иммобилизованными олигонуклеотидами (рис. 6). Установлено, что пептид-8 удерживается на колонке с oligo(dT)-целлюлозой и элюируется в присутствии 0.2 М NaCl . *C*-Концевой тетрадекапептид (пептид-14), не обладающий ДНК-гидролизующей активностью, не способен связываться с иммобилизованными олигонуклеотидами. Однако пептид-24, имеющий в своем составе аминокислотные последовательности и пептида-8 и пептида-14, связывается с сорбентом настолько прочно, что полностью элюируется лишь в присутствии ацетонитрила. Таким образом, присоединение достаточно гидрофобных

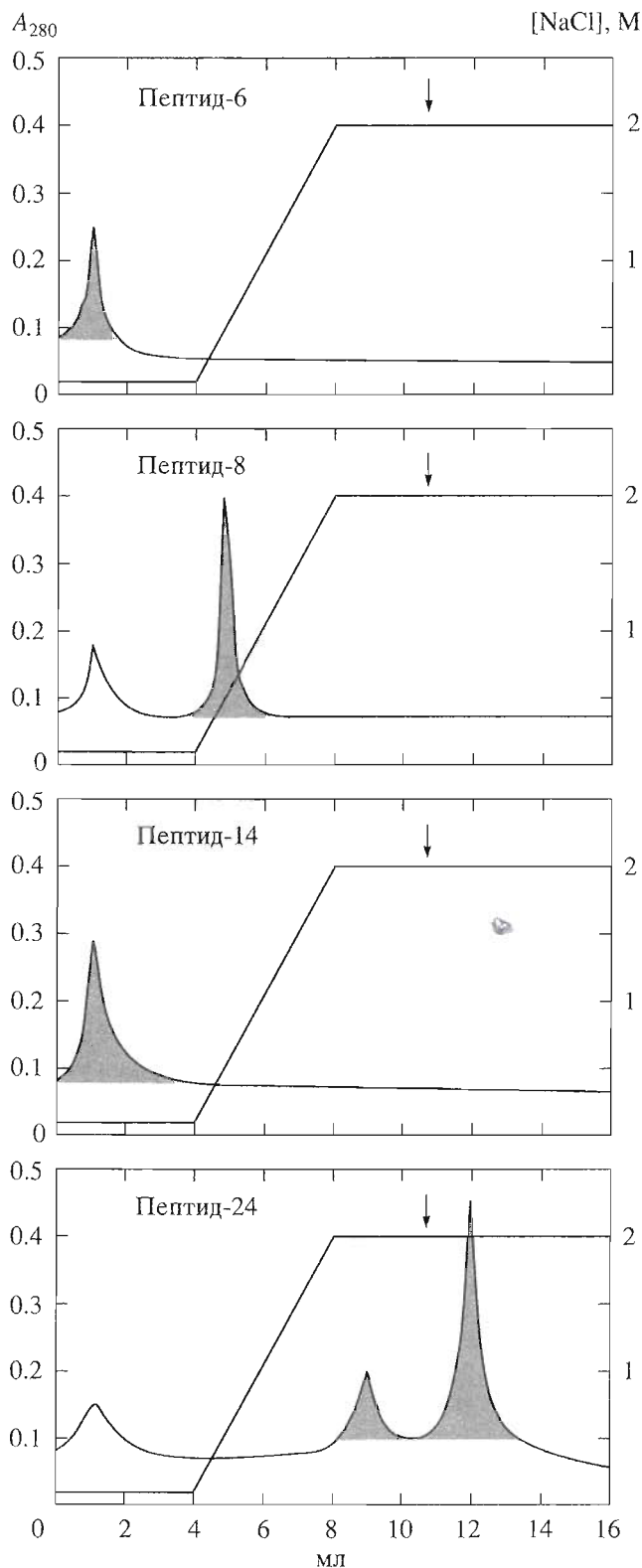


Рис. 6. Хроматографический анализ прочности связывания синтетических олигопептидов на колонке с oligo(dT)-целлюлозой. Отмечены фракции, содержащие исследуемые пептиды. Стрелка указывает начало изократической элюции 80% водным ацетонитрилом. Условия хроматографии см. "Эксперимент. часть".

С-концевых аминокислот к ДНК-гидролизующему фрагменту значительно увеличивает его сродство к ДНК.

Удлинение полипептидной цепи с С-конца приводит и к изменению гидролитической активности пептидов. Так, пептид-24 приобретает способность расщеплять ДНК не только в кислой ($\text{pH} \leq 4.5$), но и в нейтральной среде ($\text{pH} 7.5$) (рис. 7). Однако масс-спектрометрический и N-концевой аминокислотный анализ продуктов реакции показал, что при $\text{pH} 4.5$ в присутствии ДНК этот пептид неустойчив и подвергается гидролизу на ряд мелких фрагментов (данные не представлены). Этим объясняется его более высокая рабочая концентрация (10^{-5} М) по сравнению с пептидом-8 (10^{-6} М).

Введение дополнительного остатка тирозина в N-концевую область (пептид-25) стабилизирует структуру пептида и предохраняет его от гидролиза. С помощью N-концевого аминокислотного анализа было установлено, что при взаимодействии пептида-25 с ДНК его N-концевой остаток тирозина окисляется до DOPA (рис. 8). Поскольку превращение тирозина в DOPA может происходить только в присутствии активных форм кислорода, мы предположили, что в данном случае расщепление нуклеиновых кислот происходит по свободнорадикальному механизму. И фенольное кольцо остатка тирозина с его системой сопряженных двойных связей, по-видимому, выступает в роли "ловушки" одной из активных форм кислорода – гидроксид-радикала [34].

С целью проверки гипотезы свободнорадикального механизма действия пептида, ДНК плазмиды pSp65 была инкубирована с пептидом-8 в атмосфере аргона при кислых значениях pH. Как видно из рис. 9, в отсутствие кислорода ДНК-гидролизующая активность пептида-8 не проявлялась, что говорит в пользу нашего предположения. Аналогичные результаты были получены и

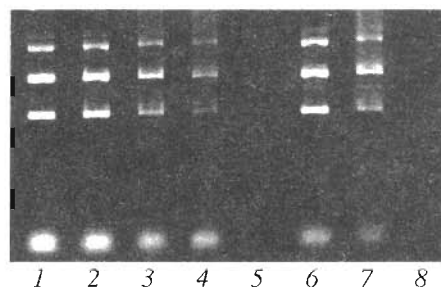


Рис. 7. Анализ нуклеазной активности пептида-24 *in vitro* в 1% агарозном геле. ДНК плазмиды pSp65 при инкубации с пептидом-24 в концентрациях 10^{-7} (3), 10^{-6} (4), 10^{-5} М (5) при $\text{pH} 4.5$ (буфер I) и 10^{-7} (6), 10^{-6} (7), 10^{-5} М (8) при $\text{pH} 7.5$ в присутствии 100 мМ NaCl (буфер IV) в течение 1 ч. 1, 2 – контроль – плаزمида pSp65 в буферах I, IV соответственно.

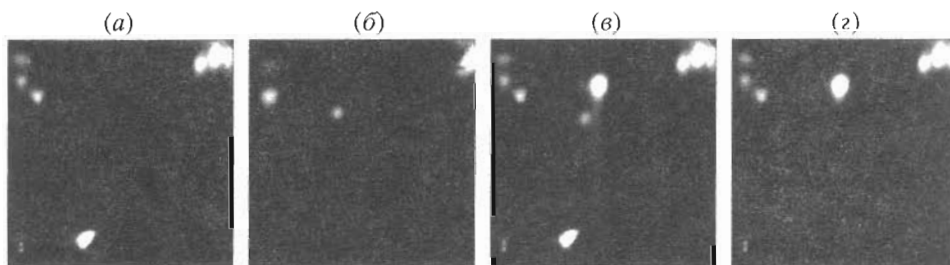


Рис. 8. N-Концевой анализ продуктов реакции гидролиза плазмиды rSp65 пептидом-25 (10^{-5} М) с помощью ТСХ на пластинках с полиамидом: (а) – плазида в буфере V; (б) – пептид-25 в буфере V; (е) – плазида rSp65 после часовой инкубации с пептидом-25 в том же буфере; (z) – продукт дансирования DOPA.

в случае пептида-24 и пептида-25 (данные не представлены).

Синтетический полноразмерный фактор дифференцировки HLDF (10^{-5} М) гидролизует плазмидную ДНК как при кислых, так и при нейтральных значениях pH даже в присутствии 0.15 М NaCl (т.е. в физиологических условиях) (рис. 10). Таким образом, можно утверждать, что низкий уровень продукции рекомбинантного HLDF связан с присущей ему нуклеазной активностью.

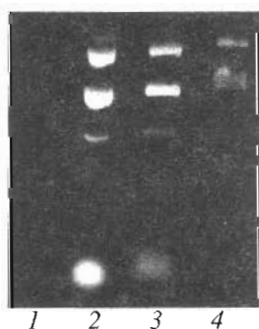


Рис. 9. Электрофорез в 1% агарозном геле ДНК плазмиды rSp65: 1 – после инкубации с пептидом-8 (10^{-6} М) в течение 1 ч в буфере I в присутствии кислорода; 2 – контроль в буфере I; 3 – контроль в буфере I в атмосфере аргона; 4 – после инкубации с пептидом-8 в буфере I в атмосфере аргона.



Рис. 10. Анализ нуклеазной активности HLDF *in vitro* в 1% агарозном геле. ДНК плазмиды rSp65 при инкубации с синтетическим HLDF в буфере III (pH 4.5) в присутствии 100 мМ NaCl в концентрациях 10^{-5} (1), 10^{-6} М (2) и в буфере IV (pH 7.5) в концентрациях 10^{-5} (3), 10^{-6} М (4) при инкубации в течение 4 ч при 37°C; контроль (5).

Иммуногистохимическое окрашивание клеток HL-60 с помощью поликлональных антител к синтетическому HLDF показало (рис. 11), что в клетках, дифференцированных под воздействием ретиноевой кислоты или введенных в апоптоз обработкой C2-Cer [35] в течение суток, наблюдается специфическое точечное окрашивание ядер. Более интенсивное окрашивание наблюдается в случае апоптотических клеток (рис. 11в).

На основании полученных данных мы предположили, что фактор HLDF участвует в процессах апоптоза. Была проверена способность пептида-8 запускать апоптоз в клетках линии HL-60. Цитофлуориметрический анализ (двойное окрашивание FITC-меченым аннексином V и пропидиййодидом) клеток, индуцированных пептидом-8 (10^{-6} М), показал, что уже после 4 ч инкубации в культуре клеток происходит достоверное увеличение числа аннексинопозитивных клеток, т.е. клеток, в которых произошла индукция апоптотического процесса (табл. 2).

Прижизненное наблюдение под микроскопом клеток линии HL-60, обработанных пептидом-8 с введенными по свободным аминокетильным группам флуоресцентными метками, показало, что Dns-производное пептида не проникает в клетки (данные не приведены). В то же время FITC-меченый пептид сначала связывается с клеточной мембраной, а затем (через 2 ч) в культуре обнаруживаются два типа окрашивания клеток: в одних клетках наблюдается флуоресцентное окрашивание ядер, в других – флуоресцентное окрашивание крупных клеточных структур в цитоплазме (рис. 12). Можно предположить, что существуют два механизма проникновения пептида-8 в клетку: 1) проникновение непосредственно в ядро с последующей фрагментацией ДНК и 2) первоначальное проникновение в цитоплазму, а затем участие клеточных органелл (митохондрий или лизосом) в

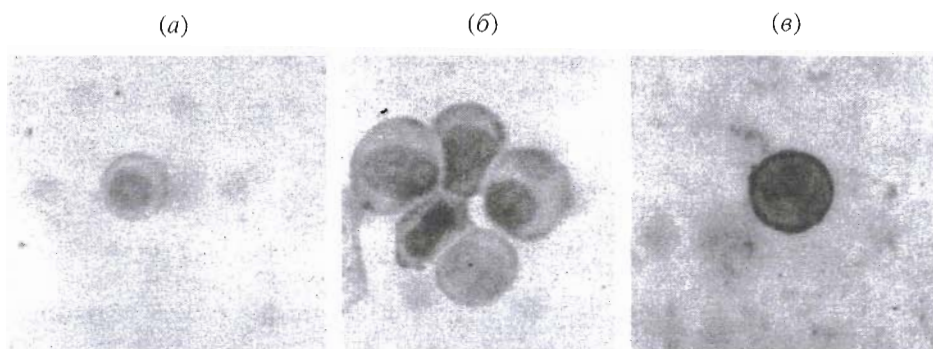


Рис. 11. Результаты иммуногистохимического окрашивания клеток HL-60 антителами к фактору дифференцировки: клетки исходной линии HL-60 (а); клетки, индуцированные к дифференцировке *полностью-транс*-ретиноевой кислотой (10^{-6} М) в течение 4 сут (б); клетки, введенные в апоптоз, через 24 ч после обработки C2-Cer (в).

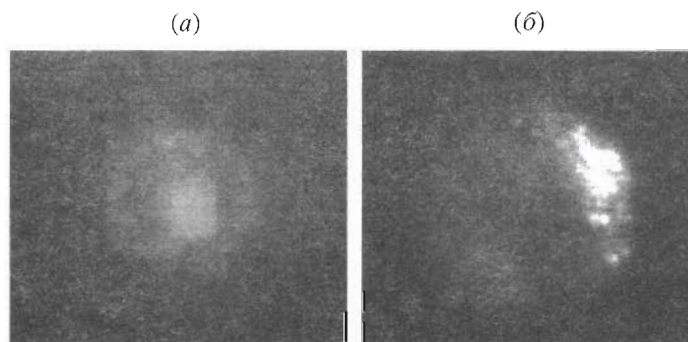


Рис. 12. Результаты прижизненного наблюдения под микроскопом клеток линии HL-60, обработанных FITC-меченым пептидом-8: флуоресцентное окрашивание ядра (а); флуоресцентное окрашивание крупных клеточных структур в цитоплазме (б).

процессах активации апоптоза. Известно, что митохондрии и лизосомы являются ключевыми органеллами в регуляции апоптоза такими классическими индукторами программируемой клеточной гибели, как FasL (лиганд фактора апоптотической чувствительности) и TNF (фактор некроза опухоли) [37, 38]. Существование двух механизмов активации и развития апоптоза под действием гранулина было также показано на клетках линии Jurkat [39]. Тот факт, что через 4 ч после обработки пептидом-8 (10^{-6} М) количество апоптотических клеток в культуре HL-60 увеличивается почти в 5 раз, а через 24 ч число клеток, вступивших в апоптоз, возрастает в 7 раз (данные не представлены) свидетельствует о разных механизмах индукции этого процесса во времени и косвенно подтверждает правомерность нашей гипотезы.

Таким образом, благодаря наличию в своем составе ДНК/РНК-гидролизующего фрагмента, HLDF, кроме первоначально обнаруженной нами функции – индукции дифференцировки клеток [18], проявляет свойства неспецифической нуклеазы и участвует, вероятно, в процессах деградации молекул ДНК и РНК, высвобождаемых клетками, подвергшимися разрушению (например, не-

кротическими клетками). Кроме того, есть все основания предполагать, что HLDF играет важную роль и при индукции апоптоза, поскольку пептид-8, входящий в его состав, способен вызывать запрограммированную гибель клеток. Это согласуется с недавно полученными данными о

Таблица 2. Изменение доли* клеток, вступивших в апоптоз под действием пептида-8 в различных концентрациях (через 4 ч инкубации)

	Пептид-8			Актиномицин D
	10^{-6} М	10^{-7} М	10^{-8} М	10^{-6} М
Доля клеток, вступивших в апоптоз, %	385	395	239	280

* Долю клеток, вступивших в апоптоз под действием различных концентраций пептида-8, рассчитывали по формуле: (Количество апоптотических клеток в опыте – количество апоптотических клеток в контроле)100%

Количество апоптотических клеток в контроле
Контроль – клетки HL-60 + PBS. Положительный контроль – клетки, обработанные актиномицином D, индуктором апоптоза [36].

том, что антитела, обладающие ДНК-гидролизующей активностью, способны индуцировать апоптоз в клетках [40]. Направление развития клетки (апоптоз или дифференцировка), по-видимому, зависит от ее физиологического состояния. К тому же, основываясь на косвенных результатах, мы предполагаем, что роль фактора дифференцировки HLDF не ограничивается индукцией апоптоза. Он (или его предшественник) может непосредственно участвовать во фрагментации ДНК в тех клетках миелоидного ряда, в которых процесс запрограммированной гибели запущен. Однако для подтверждения этой гипотезы требуется провести еще ряд дополнительных исследований.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали Трис, фосфатный буфер РМ-16 (Serva, ФРГ), среду RPMI-1640, сыворотку эмбрионов крупного рогатого скота (FCS), *L*-глутамин, гентамицин, 2-меркаптоэтанол (Flow, Англия); NaN_3 , NEPES, NaHCO_3 , DMSO, РНКазу (Sigma, США); набор красителей "Annexin V FITC kit" (Coulter, США); набор LSAB+ (Dako, США); ДНК фага λ (Ферментас, Литва); эндонуклеазы рестрикции фирм "Ферментас" (Литва), "Pharmacia" (Швеция), "Amersham" (Англия), "Promega" (США), "Boehringer Mannheim" (Германия); фрагмент Кленова ДНК-полимеразы I *E. coli* (Promega, США). С2-Сег был любезно предоставлен Ю.Г. Молотковским (Институт биорганической химии, Москва); рРНК была любезно предоставлена Л.А. Шалойко; клеточная линия HL-60 любезно предоставлена Р.Г. Васильевым (Институт биотехнологии, Москва).

Были использованы следующие сорбенты: полистирольная смола Вос-Arg(Tos)-PAM RESIN (100-200 mesh, 0.47 ммоль/г, Advanced ChemTech, США); ПерRPC™ (Pharmacia Fine Chemicals, Швеция); Ni-NTA-агароза (Quagen, ФРГ); oligo(dT)-целлюлоза (Boehringer Mannheim, ФРГ); белок А-сефароза CL-4B (Pharmacia Fine Chemicals,

Швеция); пластинки со слоем полиамида "Микрополиамид 1700" (Schleicher & Schuel, Германия).

Экспрессирующая конструкция рЕТDF была создана на основе трансляционного вектора рЕТТ α [21]. Фрагмент кДНК, кодирующий фактор дифференцировки, амплифицировали с помощью ПЦР, используя в качестве матрицы ДНК плазмиды рSp65-H7 [18]. Продукты ПЦР кинировали и обрабатывали фрагментом Кленова ДНК-полимеразы I, а затем клонировали в плазмиду рL2P26 [20], обработанную эндонуклеазами рестрикции *HincII* и *NcoI* и достроенную с помощью фрагмента Кленова ДНК-полимеразы I. В результате была получена плазида рL2.3. Из плазмиды рL2.3 по сайтам рестрикции *NcoI* и *Sall* вырезали фрагмент кДНК, кодирующий фактор дифференцировки, и клонировали его в плазмиду рЕТТ α , обработанную этими же рестриктазами. Выделение продуцированного белка из клеток *E. coli* МН-1 осуществляли с помощью аффинной хроматографии на колонке с IgG-сефарозой. IgG-сефароза была синтезирована нами по стандартной методике [41].

Экспрессирующая конструкция рТНДФ была получена на основе плазмиды рL2.3, последовательно обработанной эндонуклеазами рестрикции *NcoI*, фрагментом Кленова ДНК-полимеразы I, *EcoRI*. Полученный фрагмент кДНК фактора дифференцировки встраивали в плазмиду рТН1 по сайтам *SmaI* и *EcoRI*.

Выделение продуцированного белка из клеток *E. coli* МН-1, трансформированных плазмидой рТНДФ осуществляли с помощью хроматографии на Ni-NTA-агарозе согласно инструкции производителя.

Клонирование в вектор рЕТ-рА [21] фрагмента, кодирующего аналог ДНК-гидролизующего пептида с дополнительными остатками метионина и пролина на N-конце и двумя остатками пролина на C-конце (MPRRWHRLKEPP). Синтетический дуплекс:

(5') TATGCCAAGGCGATGGCATCGTCTCAAAGAACCACCA,

ACGGTTCGGCTACCGTAGCAGAGTTTCTTGGTGGTAGCT (5')

вводили в плазмиду рЕТ-рА по уникальным рестриктным сайтам *XhoI*. Контроль за сохранением рамки считывания проводили секвенированием рекомбинантных плазмид по методу Сэнгера.

Продукция гибридного белка в клетках *E. coli* В834. Культуры трансформированных плазмидами рЕТ-рА, рЕТ-рА1 и рЕТ-рАк бактериальных клеток выращивали на среде LB в присутствии ампициллина (50 мкг/мл). Продукцию рекомбинантного белка индуцировали добавлением изо-

пропилтиогалактозида до конечной концентрации 1 мМ. Для повышения секреции гибридного белка в культуральную среду клетки дополнительно инкубировали при температуре теплового шока (42°C) в течение 3 ч.

Анализ продуктов экспрессии проводили с помощью 12% SDS-ПААГ-электрофореза с последующим электропереносом и иммуноокрашиванием поликлональными антителами кролика, полученными к синтетическому C-концевому

фрагменту фактора дифференцировки по стандартной методике [41]. Определение *N*-концевых аминокислотных последовательностей осуществляли на твердофазном секвенаторе модели 470A (Applied Biosystems, США) согласно инструкции производителя, используя методику, предложенную в работе [42].

Поликлональные антитела к синтетическому фактору дифференцировки и его фрагментам получали иммунизацией кроликов как описано в [41]. Очистку антител осуществляли с помощью аффинной хроматографии на колонке с белок А-сефарозой.

Культивирование клеток HL-60 проводили в среде RPMI-1640 с 10% фетальной сывороткой теленка при 37°C в атмосфере 5% CO₂.

Дифференцирующую активность определяли с помощью NBT-теста на четвертые сутки после индукции дифференцировки [43].

Синтез пептидов. Пептиды синтезировали твердофазным методом с использованием Boc/Bzl-методологии. В синтезе использована полистирольная смола Boc-Arg(Tos)-PAM RESIN в количестве 250 мкмоль стартовой аминокислоты на каждый аналог. Синтез пептидилполимеров проводили в проточном реакторе переменного объема с использованием свеллографического мониторинга для определения продолжительности циклов операций [44]. Синтезированные пептиды очищали с помощью FPLC-хроматографии на колонке RepRPC™. Гомогенность полученных препаратов проверяли с помощью аминокислотного и масс-спектрометрического (MALDI-спектрометрия) анализов. Масс-спектрометрический анализ осуществляли на приборе Vision 2000 (Thermo Bioanalysis, Англия).

Определение нуклеазной активности. Синтетические пептиды (в концентрации 10⁻⁵–10⁻⁷ М) инкубировали с 0.5 мкг плазмидной ДНК либо ДНК фага λ, либо 0.5 мкг рРНК в течение 1 ч при 37°C в 10 мкл реакционной смеси. Состав и pH реакционной смеси варьировали в зависимости от цели эксперимента. Были использованы следующие буферные растворы:

буфер I: 50 мМ AcONH₄ (pH 4.5), 5 мМ MnCl₂;

буфер II: 50 мМ AcONH₄ (pH 4.5), 5 мМ MgCl₂;

буфер III: 50 мМ AcONH₄ (pH 4.5), 5 мМ MnCl₂, 100 мМ NaCl;

буфер IV: 50 мМ Трис-HCl (pH 7.5), 10 мМ MgCl₂, 100 мМ NaCl, 1 мМ DTE;

буфер V: 10 мМ Трис-HCl (pH 7.5), 10 мМ MgCl₂, 1 мМ DTE.

Продукты расщепления нуклеиновых кислот анализировали с помощью электрофореза в агарозных гелях как описано в [45].

Выделение плазмидной ДНК осуществляли как описано ранее [45].

Частичная апуринизация ДНК плазмиды pSp65 достигалась путем инкубирования ее в кислой среде (pH 4) в течение 3 ч при 70°C.

Хроматографический анализ взаимодействия синтетических пептидов с олигонуклеотидами проводили на колонке с oligo(dT)-целлюлозой. На колонку с сорбентом (V 0.8 мл), уравновешенным 10 мМ Трис-HCl-буфером, pH 7.5, содержащим 100 мМ NaCl и 1 мМ EDTA, наносили аликвоты растворов пептидов с концентрацией 1 мг/мл в исходном буфере. Элюцию осуществляли последовательно в градиенте концентрации NaCl (0.1–2 М) и 80% водным ацетонитрилом. Анализ полученных фракций проводили с помощью MALDI-спектрометрии.

Введение флуоресцентных меток в пептид-8. Дансирование пептида (1 мг/мл) проводили в 0.1 М NaHCO₃ (pH 8.5) в течение 30 мин при 45°C в присутствии 100-кратного избытка Dns-хлорида [46]. Непрореагировавший Dns-хлорид удаляли промыванием ацетоном. РИТС-мечение осуществляли при инкубации пептида в 2.5% растворе РИТС в 50% пиридине по модифицированной методике [47]. Продукты реакции экстрагировали этилацетатом.

***N*-Концевой аминокислотный анализ** проводили по стандартной методике [46]. Идентификацию Dns-производных аминокислот осуществляли ТСХ на пластинках (3 × 3 см) с полиамидом.

Иммуногистохимическое окрашивание клеток HL-60 с помощью поликлональных антител к HLDF проводили на альбуминизированных предметных стеклах, после блокирования эндогенной пероксидазной активности раствором H₂O₂ в метаноле в течение 10 мин. Первичные поликлональные антитела к HLDF вносили в разведении 1 : 800. Иммунопероксидазное выявление антигенов осуществляли с помощью АВС-метода, используя набор LSAB+ (Dako) и диаминобензидин в качестве субстрата [48]. Дополнительное окрашивание клеток осуществлялось гематоксилином. В качестве негативного контроля использовали неиммунную сыворотку кролика в том же разведении.

Оценка количества клеток, вступивших в апоптоз, цитофлуориметрическим способом проводилась на проточном цитофлуориметре EPICS ELITE (Coulter, США) по общепринятой методике [49]. После окончания инкубации с исследуемыми веществами, клетки переводили в РМ-16/HEPES, фиксировали при 4°C в этаноле (70%), дважды отмывали в РМ-16/HEPES (300 г, 10 мин, 4°C). Затем клетки ресуспендировали в растворе для окрашивания ДНК (РМ-16, содержащий 20 мкг/мл пропидийиодида и 1 мг/мл РНКазы). Регистрировали флуоресценцию не менее 1 × 10⁴ клеток. На гистограммах апоптотические клетки дифференцировали от живых по более низкой интенсивности

флуоресценции. Этот способ окрашивания применяли после инкубации клеток с пептидом в течение суток.

Цитофлуориметрический способ регистрации клеток, вступивших в апоптоз на основе FITC-меченого аннексина V, связывающегося с фосфатидилсеринном, который появляется на наружном монослое мембраны в результате флипплопа, т.е. трансбислойной миграции, уже через 1 ч после индукции апоптоза [35]. Способ использовали для изучения индукции (запуска) апоптоза в дополнение к первому способу, который основан на анализе количества клеток, в которых прошла фрагментация ДНК. Клетки одновременно обрабатывали FITC-меченым аннексином V, а также пропидиййодидом, окрашивающим ДНК. После 4 ч инкубации с индуктором апоптоза клетки дважды отмывали холодным РМ-16, ресуспендировали однократным буферным раствором А (РМ-16, содержащий 150 мМ CaCl₂), довели до концентрации 1×10^5 клеток в 100 мкл и добавляли FITC-аннексин V (5 мкл) и раствор пропидиййодида (10 мкл). После перемешивания и инкубации в темноте на холоду (15 мин) к суспензии клеток добавляли по 200 мкл буферного раствора А. Образцы анализировали на цитофлуориметре (не позднее, чем через 1 ч после окрашивания).

Прижизненное окрашивание клеток HL-60 FITC- и Dns-мечеными пептидами проводилось по стандартной методике [50]. Локализацию меченых пептидов в клетке осуществляли с помощью флуоресцентного микроскопа Orthoplan (Leitz). Для флуоресцентной микроскопии использованы бинокуляры 7.9× и флуоресцентный объектив с усилением 63.

Работа была поддержана Международным научно-техническим центром (проект № 463) и Российским фондом фундаментальных исследований (проект № 97-04-49462).

Авторы выражают благодарность Н.С. Быстрову за синтез олигонуклеотидных зондов, Ю.Ф. Леоновой и Н.И. Хорошиловой за определение N-концевых аминокислотных последовательностей пептидов и белков.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Witter C.U., Bauw G., Krokan H. // Biochemistry. 1989. V. 28. P. 780–784.
2. Shaper N.L., Grafstrom R.H., Grossman L. // J. Biol. Chem. 1982. V. 257. P. 13455–13458.
3. Hang H., Chenna A., Fraenkel-Conrat H., Singer B. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1996. V. 93. P. 13737–13741.
4. Strauss P., Holt C. // J. Biol. Chem. 1998. V. 273. P. 14435–14441.
5. Власов В.А., Дымищ Г.М., Лаврик О.И. // Молекуляр. биология. 1998. Т. 32. С. 5–18.
6. Steitz T.A. // J. Biol. Chem. 1999. V. 274. P. 17395–17398.
7. Kostrewa D., Winkler F. // Biochemistry. 1995. V. 34. P. 683–696.
8. Perona J., Martin A. // J. Mol. Biol. 1997. V. 273. P. 207–225.
9. Newman M., Strzelecka T., Dorner L., Schildkraut I., Aggarwal A. // Science. 1995. V. 269. P. 656–663.
10. Pierre J., Laval J. // J. Biol. Chem. 1981. V. 256. P. 10217–10220.
11. Barbier V., Brack A. // J. Am. Chem. Soc. 1992. V. 114. P. 3511–3515.
12. Власов В.В., Сильников В.Н., Зенкова М.А. // Молекуляр. биология. 1998. Т. 32. С. 62–71.
13. Podyminogin M., Vlassov V., Giege R. // Nucl. Acids Res. 1993. V. 21. P. 5950–5956.
14. Пышный Д.В., Пенкова М.Н., Лохов С.Г., Иванова Е.М., Венямина А.Г., Зарытова В.Ф. // Биоорг. химия. 1997. Т. 23. С. 497–504.
15. Truffert J.-C., Asseline U. // Tetrahedron. 1996. V. 52. P. 3005–3016.
16. Harford K., Sarcar B. // Biochemistry. 1996. V. 35. P. 4271–4278.
17. Morier-Teissier F., Bernier J., Lohez M., Catteau J. // Anti-Cancer Drug Design. 1990. V. 5. P. 291–305.
18. Костянян И.А., Астанова М.И., Старовойтова Е.В., Драницына С.М., Липкин В.М. // Биоорг. химия. 1995. Т. 21. С. 243–248.
19. Bhat K., Morrison S. // Nucl. Acids Res. 1992. V. 21. P. 2939.
20. Кутузов М.А., Шмуклер Б.Е., Суслов О.Н., Заргаров А.А., Абдулаев Н.Г. // Биоорг. химия. 1992. Т. 18. С. 623–634.
21. Smirnova E., Merkulova M., Rakitina T., Astapova M., Kostanyan I. // Second Advanced Course of Gene Therapy. Abstracts. Venice. Italy, 1997. P. 42.
22. Burbelo P.D., Utani A., Pan Z., Yamada Y. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1993. V. 90. P. 11543–11547.
23. Lukow B., Bunz F., Stillman B., Lichter P., Schuetz G. // Mol. Cell Biol. 1994. V. 14. P. 1626–1634.
24. Stroumbakis N., Li Z., Tolia P. // Gene. 1994. V. 143. P. 171–177.
25. Tiranti V., Rocchi M., DiDonato S., Zeviani M. // Gene. 1993. V. 126. P. 219–225.
26. Gerschenson M., Houmiel K., Low R. // Nucl. Acids Res. 1995. V. 23. P. 88–97.
27. Windsor W., Syto R., Tsarboboulos A., Zhang R., Durkin J., Baldwin S., Paliwal S., Mui P., Pramanik B., Trotta P. // Biochemistry. 1993. V. 32. P. 8807–8815.
28. Enari M., Sakahira H., Yokoyama H., Okawa K., Iwamatsu A., Nagata S. // Nature. 1998. V. 391. P. 43–50.
29. Enari M., Sakahira H., Yokoyama H., Okawa K., Iwamatsu A., Nagata S. // Nature. 1998. V. 393. P. 256.
30. Masuda Y., Bennett R., Demple B. // J. Biol. Chem. 1998. V. 273. P. 30360–30365.
31. Nachum J., Hart D. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1982. V. 105. P. 1433–1439.
32. Gimble F., Duan X., Hu D., Quioco F. // J. Biol. Chem. 1998. V. 273. P. 30524–30529.

33. Horton N., Newberry K., Perona J. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1998. V. 95. P. 13489–13494.
34. Halliwell B., Gutteridge J.M.C. // J. Lab. Clin. Med. 1992. V. 119. P. 598–620.
35. Flores I., Martinez A., Hennem Y., Myrida I. // J. Immunol. 1998. V. 160. P. 3528–3533.
36. Jia L., Dourmashkin R., Allen P., Gray A., Newland A., Kelsey S. // Br. J. Haematol. 1997. V. 98. P. 673–685.
37. Naora H., Nishida T., Shindo Y., Adachi M., Naora H. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1996. V. 5. P. 258–264.
38. Suzuki A., Tsutomi Y., Yamamoto N., Shibutani T., Akahane K. // Mol. Cell Biol. 1999. V. 19. P. 3842–3847.
39. Gamon S., Hanson D.A., Kaspar A., Naval J., Krensky A.M., Anel A. // J. Immunol. 1998. V. 161. P. 1758–1764.
40. Kozyr A., Kolesnikov A., Alexandrova E., Sashenko L., Gnuchev N., Favorov P., Gabibov A. // Biotechnol. Applied Biochem. 1999 (in press).
41. Harlow E., Lane D. Antibodies: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor; N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988.
42. Левина Н.Б., Слепак В.З., Киселев О.Г., Шемякин В.В. // Биооргани. химия. 1989. Т. 5. С. 24–31.
43. Onozaki K., Urawa H., Tamatani T., Iwamuta Y., Hashimoto T., Baba T., Suzuki H., Matsushima K. // J. Immunol. 1988. V. 140. P. 112–119.
44. Rodionov I., Baru M., Ivanov V. // Pept. Res. 1992. V. 5. P. 119–125.
45. Maniatis T., Fritsch E., Sambrook J. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor; N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1982.
46. Gray R. // Meth. Enzymol. 1967. V. 11. P. 138–151.
47. Hartley B. // Biochem. J. 1970. V. 119. P. 805–822.
48. Hsu S.M., Raine L., Fanger H. // J. Histochem. Cytochem. 1981. V. 25. P. 577–589.
49. Telford W.G., King L.E., Fraker P.J. // J. Immun. Meth. 1994. V. 172. P. 1–16.
50. Молотковская И.М., Гудима Г.О., Ляшенко В.А., Молотковский Ю.Г., Бергельсон Л.Д. // Биол. мембраны. 1989. Т. 2. С. 499–506.

The Nuclease Activity of the Endogenous Differentiation Factor of the HL-60 Cell Line

S. M. Dranitsyna*, I. A. Kostanyan#, S. G. Andreeva*, M. V. Astapova*,
I. I. Bibichenko**, O. V. Baeva*, A. P. Bogachuk*, I. M. Molotkovskaya*,
I. L. Rodionov***, E. V. Smirnova*, and V. M. Lipkin***

*Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences,
ul. Miklukho-Maklaya 16/10, GSP-7 Moscow, 117871 Russia

**University of Peoples' Friendship, ul. Miklukho-Maklaya 6, Moscow, 117198 Russia

***Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry (Pushchino Branch),
Russian Academy of Sciences, Pushchino, Moscow oblast, 142292 Russia

A structural homology between the endogenous differentiation factor of the HL-60 cell line of promyelocyte leukemia (HLDF) and several DNA/RNA-binding and DNA/RNA-hydrolyzing proteins was revealed, and expression of the *hldf* gene in prokaryotic systems was studied. On the basis of these experiments, the amino acid sequence of an 8-membered fragment of HLDF with potential nuclease activity was identified. The synthetic octapeptide RRWHRLKE was shown to be capable of the cleavage of RNA, linear DNA from phage λ , and all forms of plasmid DNA. We established that treatment of the HL-60 cell culture with this peptide (10^{-6} M) results in an increase in the number of apoptotic cells and suggested that HLDF is involved in processes of apoptosis.

Key words: apoptosis, differentiation factor HLDF, HL-60 cells, nuclease activity

To whom correspondence should be addressed; phone: +7 (095) 336-5511; fax: +7 (095) 310-7010;
e-mail: kost@ibch.siobc.ras.ru.

For the full text of English translation of this article, see *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2000, vol. 26, no. 5. It is also available (free) in PDF format through the Web Site <http://www.maik.rssi.ru/>.