



УДК 577.218

ПРЕДШЕСТВЕННИК ФАКТОРА ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ HLDF И РИБОСОМНЫЙ БЕЛОК RPS21 ИМЕЮТ ОБЩУЮ N-КОНЦЕВУЮ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ

© 2004 г. Е. В. Смирнова*, А. В. Гарковенко*, Т. В. Ракитина*,
С. Н. Бережной*, М. В. Астапова*, Е. А. Сурина*,
И. И. Бабиченко**, И. А. Костанян**, В. М. Липкин*

*Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
117997 ГСП, Москва, В-437, ул. Миклухо-Маклая, 16/10;

**Университет Дружбы народов, Москва

Поступила в редакцию 29.10.2002 г. Принята к печати 04.01.2003 г.

Зрелый фактор дифференцировки HLDF, выделяемый из культуральной среды, содержит 54 а.о., тогда как открытая рамка считывания мРНК кодирует белок из 97 а.о. Мы предположили, что трансляция белка начинается с первого АТГ-кодона, который имеет окружение, наиболее удовлетворяющее требованиям для точки инициации. В области, предшествующей фрагменту кДНК, кодирующему N-концевой фрагмент зрелого белка, находится еще два триплета АТГ – в положениях 48–50 и 100–102 (нумерация дана по структуре S21). Поскольку ранее было показано, что мРНК HLDF и рибосомного белка S21 человека высоко гомологичны, различия заключаются только в наличии двух точечных делеций в кодирующей области кДНК HLDF (остатка G в положении 112 и C в положении 224), приводящих к тому, что “зрелый” фактор дифференцировки и RPS21 являются продуктами трансляции различных рамок считывания, то в случае правильности нашего предположения фактор дифференцировки должен синтезироваться в клетке в виде предшественника и его N-концевая последовательность должна быть идентична N-концевой последовательности RPS21. Для проверки нашего предположения были получены рекомбинантный RPS21, поликлональные антитела против HLDF, полноразмерного белка RPS21 и C-концевого пептида RPS21. Иммуногистохимическое окрашивание нативных клеток HL-60 и этих же клеток, введенных в апоптоз или дифференцировку, с помощью полученных антител подтвердило, что предшественник фактора дифференцировки и рибосомный белок S21 имеют общую N-концевую последовательность, но различную клеточную локализацию.

Ни в геноме человека, ни в геноме клеточной линии HL-60 нами не было обнаружено ни одного интронсодержащего гена или псевдогена, имеющего нуклеотидную последовательность, соответствующую кДНК HLDF. На основании полученных данных предложена гипотеза молекулярного механизма биосинтеза мРНК HLDF путем посттранскрипционных модификаций пре-мРНК RPS21.

Ключевые слова: фактор дифференцировки HLDF клеточная линия HL-60; клонирование гена; клеточная дифференцировка; апоптоз; абберантный сплайсинг; РНК-редактирование.

ВВЕДЕНИЕ

Ранее из среды культивирования клеток линии HL-60 промиелоцитарного лейкоза человека, об-

работанных полностью-транс-ретиноевой кислотой, был выделен и охарактеризован фактор дифференцировки с молекулярной массой 8.2 кДа, названный нами HLDF (Human Leukemia Differentiation Factor) [1]. Путем параллельного анализа аминокислотной последовательности белка и нуклеотидной последовательности соответствующей ему кДНК была установлена, а затем уточнена первичная структура белка (регистрационный номер EMBL банка данных X79563). HLDF вызывает дифференцировку исходной клеточной линии по гранулоцитарному пути, а также обладает ДНК/РНК-гидролизующей активностью [1–3]. Полноразмерный HLDF, полученный с помощью

Сокращения: ABC – авидин-биотин пероксидазный комплекс; C2-Cer – N-ацетилсфингозин; DTT – 1,4-дитиотреит; ELISA – твердофазный иммуноферментный анализ; Gu · HCl – гуанидингидрохлорид; HLDF – фактор дифференцировки клеток линии HL-60 промиелоцитарного лейкоза человека; IPTG – изопропилтио-β-D-глюкопиранозид; MTT – 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолиумбромид; NBT – нитроголубой тетразолий; PMSF – фенолметансульфонилфторид; RPS21 – рибосомный белок S21; TFA – трифторуксусная кислота; UF – унифектин.

Автор для переписки (тел.: (095) 336-55-11; факс: (095) 310-70-10; эл. почта: iakost@mail.ibch.ru).

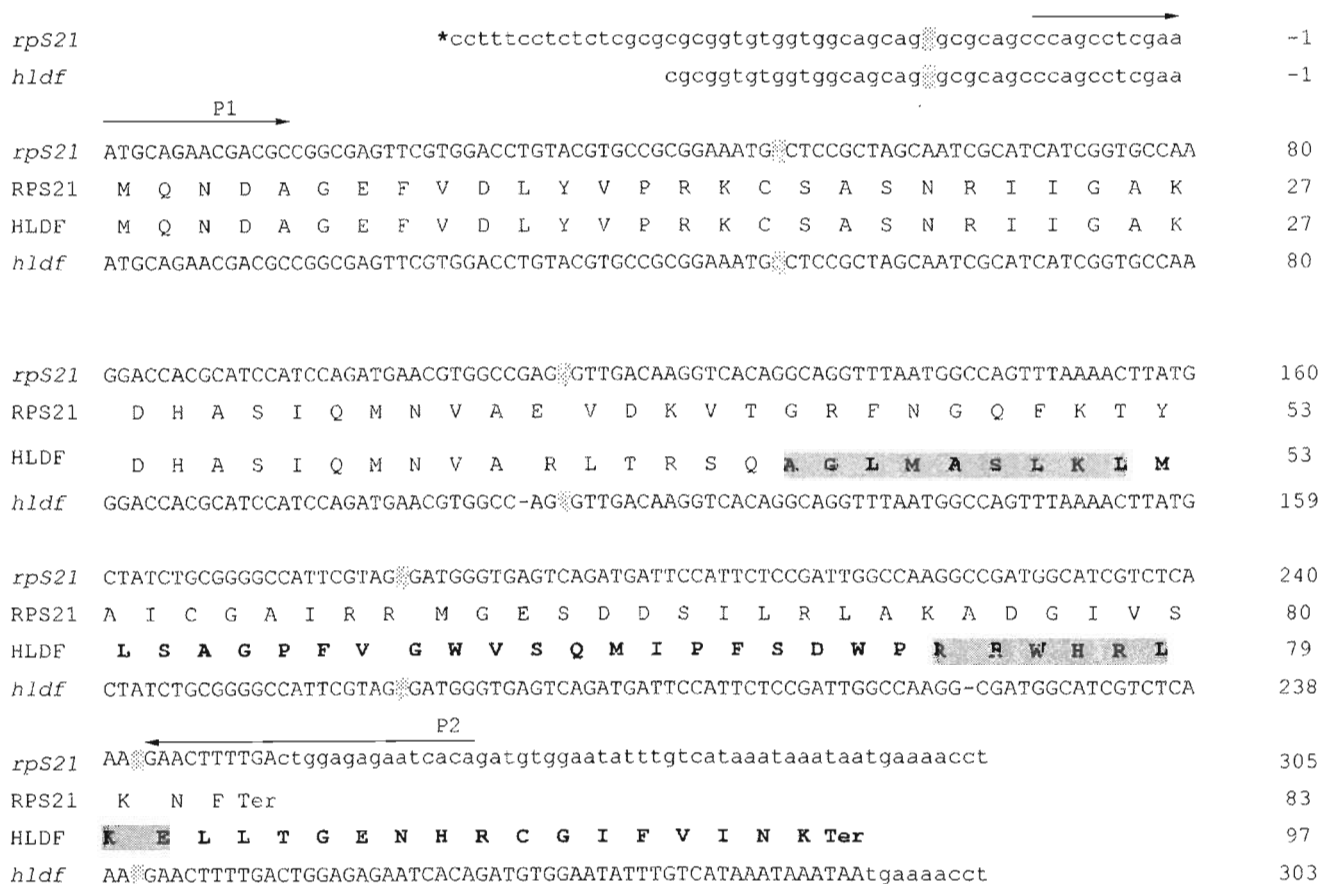


Рис. 1. Нуклеотидные последовательности кДНК и аминокислотные последовательности RPS21 и фактора HLDF человека. Жирным шрифтом выделена аминокислотная последовательность зрелого фактора. Прочерками в кДНК HLDF указаны точечные делеции, приводящие к сдвигу рамки считывания в ходе трансляции мРНК HLDF. Локализация интронов указана знаком (□), линиями со стрелками – положения олигонуклеотидов, используемых в качестве праймеров для ПЦР. Серым цветом выделены N-концевой и ДНК/РНК-гидролизующий домены HLDF.

твердофазного синтеза, имеет те же свойства, что и нативный белок [3]. Антитела к фактору дифференцировки окрашивают только клетки линии HL-60, стимулированные к дифференцировке или апоптозу [3]. Анализ последовательности кДНК HLDF выявил ее чрезвычайно высокую гомологию с кДНК рибосомного белка S21 человека (RPS21) [4, 5]. Однако аминокислотные последовательности этих белков различны вследствие наличия двух точечных делеций нуклеотидов в кодирующей области кДНК HLDF (рис. 1).

RPS21 является одним из наименее изученных компонентов рибосомы. Он локализован на поверхности бокового выступа малой субъединицы [6] и, предположительно, участвует в инициации трансляции. Полноразмерный ген *rps21* человека имеет 1417 п.о., содержит 6 экзонов и 5 интронов и локализован на 20 хромосоме [4, 7].

Зрелый фактор дифференцировки HLDF, выделяемый из культуральной среды, содержит 54 а.о., тогда как открытая рамка считывания мРНК кодирует белок из 97 а.о. Мы предположили, что

трансляция белка начинается с первого ATG-кодона, который имеет окружение, наиболее удовлетворяющее требованиям для точки инициации. В области, предшествующей фрагменту кДНК, кодирующему N-концевой фрагмент зрелого белка, находится еще 2 триплета ATG – в положениях 48–50 и 100–102 (рис. 1). Если наше предположение верно, то предшественник фактора дифференцировки является изоформой RPS21 человека и эти белки имеют общую N-концевую последовательность. Для проверки этой гипотезы были получены поликлональные антитела против RPS21 и HLDF, а также C-концевого фрагмента RPS21, и с помощью антител изучена локализация двух этих белков в исходных, дифференцированных и введенных в апоптоз клетках HL-60.

Наши исследования направлены на изучение молекулярного механизма биосинтеза HLDF в клетке и выяснение роли этого белка в нормальной и опухолевой клетке.

Таблица 1. Олигонуклеотидные праймеры, используемые для получения рекомбинантного RPS21

Праймер	Структура (5' → 3')	Координаты в кДНК, п.о.
P1	<i>NcoI</i> CCAGCCTCGCCATGGAGAACGACGC	(-11)-(+14)
P2	<i>XhoI</i> TGTGATTCTCTCGAGTCAAAAGTTC	(+243)-(+267)

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

кДНК RPS21 была получена с помощью ПЦР с использованием в качестве матрицы суммарной кДНК клеток линии HL-60. Праймерами при проведении ПЦР служили олигонуклеотидные фрагменты P1 и P2, комплементарные *N*- и *C*-концевым областям нуклеотидной последовательности кДНК белка RPS21. В праймеры были введены сайты рестрикции *NcoI* и *XhoI*. Их структура и положение в кДНК приведены в табл. 1. Полученный с помощью ПЦР фрагмент, содержащий кДНК RPS21, обрабатывали эндонуклеазами рестрикции *NcoI* и *XhoI* и лигировали с плазмидой рЕТ23d(+). Рекомбинантные клоны отбирали с помощью метода ПЦР на колониях. Нуклеотидную последовательность кДНК-вставки и прилежащих к ней областей плазмидного вектора определяли секвенированием по методу Сэнгера [8]. Для дальнейшей работы была отобрана плаزمида рЕТ23d(RPS21), содержащая под контролем

T7-промотора открытую рамку считывания, включающую в себя кодон ATG, кДНК RPS21, последовательность, кодирующую участок His₆ и стоп-кодон TAA.

Экспрессию проводили в штамме *E. coli* B834(DE-3), несущем в хромосоме ген РНК-полимеразы фага T7 под контролем индуцибельного *lac*-промотора. Рекомбинантный белок с молекулярной массой, соответствующей RPS21, был обнаружен только в водонерастворимом состоянии в составе телец включения (рис. 2). Попытки увеличить растворимость рекомбинантного белка путем понижения температуры инкубации культуры клеток до 30 и даже 24°C не привели к желаемому результату.

Выделение рекомбинантного белка из телец включения проводили с помощью аффинной хроматографии на Ni-NTA-агарозе (Qiagen, США) согласно инструкции производителя. Электрофоретический анализ фракции, полученной после аффинной хроматографии, показал в ней наличие двух белков: белка с молекулярной массой ≈10 кДа, соответствующей молекулярной массе полноразмерного рекомбинантного RPS21, и другого, более высокомолекулярного белка с *M* ≈ 18 кДа (рис. 2). Автоматическая деградация по методу Эдмана препаратов этих белков, предварительно перенесенных с помощью электроблоттинга на поливинилденфторидную мембрану (иммобилон), показала, что их *N*-концевые последовательности идентичны *N*-концевой последовательности RPS21 человека. Анализ *C*-концевого аминокислотного остатка с использованием карбоксипептидазы Y показал наличие остатка His в обоих случаях. Таким образом, верхняя полоса на электрофореграмме, по-видимому, является SDS-устойчивым димером S21 (рис. 2).

Для выяснения, имеют ли RPS21 и предшественник фактора дифференцировки общую *N*-концевую последовательность, было решено получить антитела на *C*-концевую область рибосомного белка, отличающуюся от HLDF (рис. 1). Анализ первичной структуры RPS21 [5] показал, что молекула этого белка содержит всего три остатка метионина – *N*-концевой и в положениях 34 и 62, что позволило выбрать для фрагментации белка бромциан.

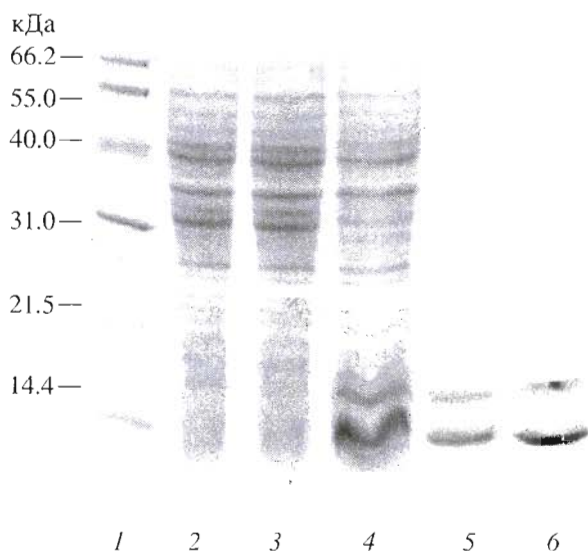


Рис. 2. Электрофорез в 15% SDS-ПААГ суммарных белков клеток *E. coli* B834(DE-3), содержащих плазмиду рЕТ23d(RPS21). Приведены электрофореграммы клеток с исходной плазмидой без вставки (2), с плазмидой до индукции IPTG (3), через 5 ч после индукции IPTG (4), очищенного препарата белка после хроматографии на Ni²⁺-NTA-агарозе (5), иммуноблот очищенного препарата белка (6), стандарты молекулярных масс (1).

Пептиды бромцианового гидролизата RPS21 разделяли ВЭЖХ на колонке Ultrasphere C18 (0.4 × 25 см) (Vydac, США) в 0.1% TFA в градиенте ацетонитрила. В результате хроматографии было получено восемь фракций (рис. 3). Данные масс-спектрометрического и N-концевого аминокислотного анализов показали, что фракция 1 представляет собой индивидуальный C-концевой пептид (остатки 62–83) RPS21.

Полученный C-концевой пептид RPS21 конъюгировали с гемоцианином из виноградной улитки (KLH). Поликлональные антитела к рекомбинантному белку RPS21, C-концевой области RPS21 и синтетическому аналогу HLDF получали иммунизацией животных (кроликов) по стандартной схеме [9].

Очистку антител осуществляли с помощью аффинной хроматографии на колонке с белок-A-сефарозой. Анализ полученных антител проводили с помощью иммуноферментного анализа (ELISA) и иммуноблоттинга.

Иммуногистохимическое окрашивание клеток HL-60 с помощью поликлональных антител к HLDF, RPS21 и C-концевому пептиду RPS21 проводили на альбуминизированных предметных стеклах. Первичные поликлональные антитела к HLDF, RPS21 и C-концевому пептиду RPS21 вносили в разведении 1 : 800, 1 : 2000 и 1 : 1000 соответственно. Иммунопероксидазное выявление антигенов осуществляли с помощью ABC-метода, используя набор LSAB+ (Dako, США) и диаминобензидин в качестве субстрата [10].

Иммуногистохимическое окрашивание клеток HL-60 с помощью поликлональных антител показало (рис. 4): 1) антитела к HLDF не окрашивают активно пролиферирующие клетки HL-60, а в клетках HL-60, индуцированных к дифференцировке или введенных в апоптоз, они вызывают специфическое точечное окрашивание ядер и цитоплазматической мембраны; 2) антитела к полноразмерному RPS21 в недифференцированных клетках HL-60 окрашивают только цитоплазму, а при дифференцировке и апоптозе в этих клетках наблюдается дополнительное окрашивание цитоплазматической мембраны, а также точечное окрашивание ядер; 3) антитела к C-концевому фрагменту RPS21 окрашивают только цитоплазму как в случае недифференцированных, так и дифференцированных или введенных в апоптоз клеток линии HL-60.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о различной локализации в клетке белков RPS21 и HLDF. Рибосомный белок обнаружен только в цитоплазме, тогда как фактор дифференцировки, появляющийся только в дифференцированных или введенных в апоптоз клетках, – в цитоплазматической мембране и ядре. Кроме того, различия в иммуногистохимическом

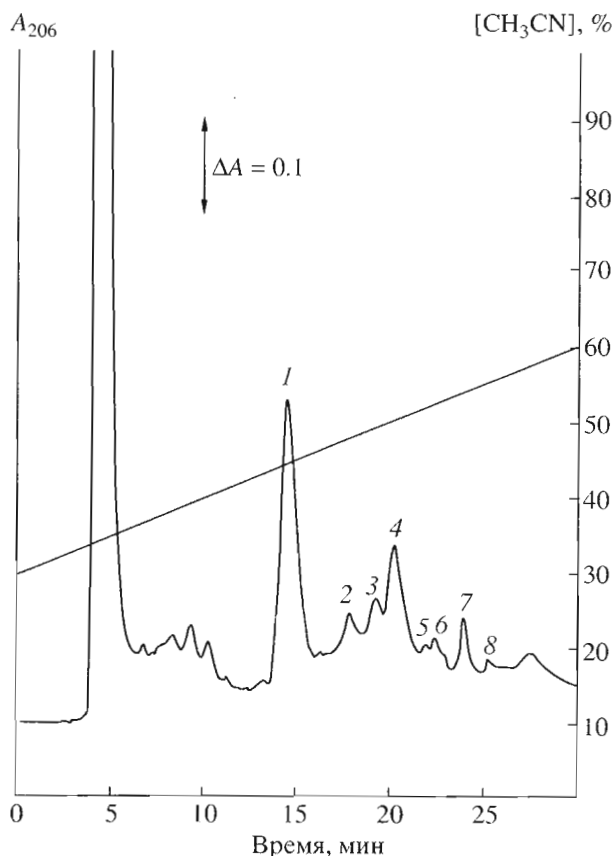


Рис. 3. Хроматографическое разделение продуктов бромцианового гидролизата очищенного препарата RPS21 на колонке Ultrasphere C18 (0.46 × 25 см) (Vydac, CIF) при элюции градиентом концентрации ацетонитрила в водном 0.1% растворе TFA.

окрашивания клеток HL-60 антителами против полноразмерного RPS21, его C-концевого участка и HLDF позволили нам заключить, что при дифференцировке клеток линии HL-60 под действием ретиноевой кислоты трансляция HLDF начинается с первого старт-кодона. Поэтому и RPS21, и “незрелый” HLDF имеют общую N-концевую последовательность, которая, по-видимому, в процессе секреции HLDF через клеточную мембрану отщепляется.

Как уже упоминалось выше, анализ последовательности кДНК HLDF выявил ее чрезвычайно высокую гомологию с кДНК RPS21 человека [3]. Однако при этом не обнаружено гомологии в аминокислотных последовательностях этих белков, что обусловлено наличием двух единичных делеций в кодирующей области кДНК HLDF (остатка G в положении 112 и C в положении 224, нумерация дана по кДНК RPS21). Эти делеции приводят к тому, что зрелый HLDF и RPS21 – продукты разных рамок считывания (рис. 1).

Возникает вопрос о происхождении двух столь близких по нуклеотидной последовательности

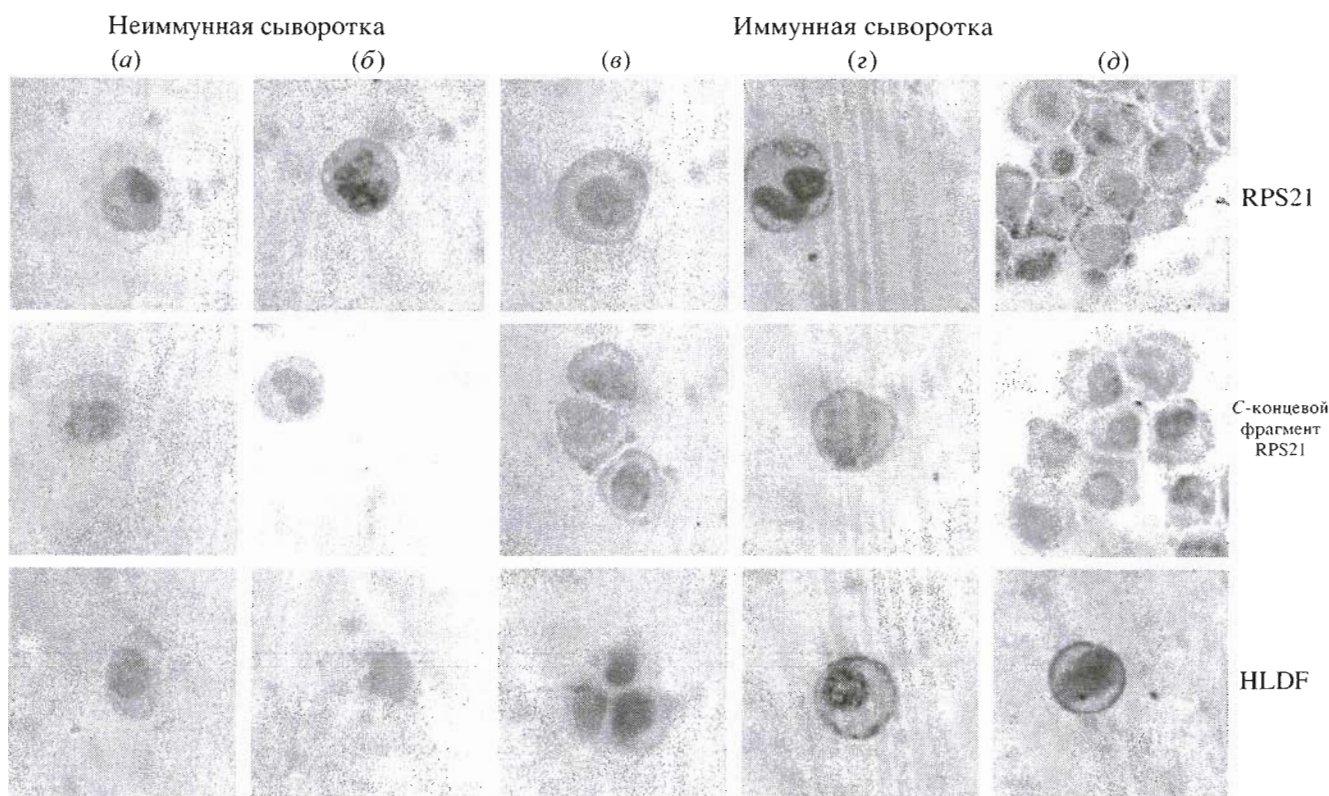


Рис. 4. Иммуногистохимическое окрашивание клеток линии HL-60 антителами к полноразмерному RPS21, С-концевому фрагменту RPS21 и HLDF: а, в – клетки исходной линии HL-60; б, г – клетки, индуцированные к дифференцировке полностью-транс-ретиноевой кислотой (10^{-6} М) в течение 4 сут.; д – клетки, введенные в апоптоз, через 24 ч после обработки С2-Сег.

мРНК. Возможно, что мРНК HLDF и RPS21 являются транскриптами одного гена или двух близкородственных генов, дивергировавших в процессе эволюции. Также нельзя было исключить наличие мутантного гена *rpS21* в клетках линии HL-60 промиелоцитарного лейкоза человека.

Известно, что геном млекопитающих содержит для каждого рибосомного белка целое семейство кодирующих последовательностей, дисперсно расположенных в геноме [11]. Но только одна из этих последовательностей, имеющая экзон-интронную структуру, является транскрипционно активным функциональным геном [12]. Единственно известное к настоящему времени исключение – белок RPS4, для которого показано наличие двух высокоомологичных, интронсодержащих и транскрипционно активных генов, локализованных на X- и Y-хромосомах [13]. Остальные представители семейств генов рибосомных белков являются безынтронными ретро-транспозонподобными псевдогенами [14].

Следует отметить, что нуклеотидные последовательности фрагментов гена *rpS21*, полученных методом ПЦР на матрице геномной ДНК из клеток HL-60, полностью соответствовали нуклеотидной последовательности гена, найденного на-

ми ранее в лейкоцитарной клонотеке [4]. Это исключает возможность существования мутантной формы гена рибосомного белка *rpS21* в клетках промиелоцитарного лейкоза линии HL-60.

Скрининг человеческой лейкоцитарной клонотеки с использованием фрагмента кДНК HLDF в качестве гибридизационной пробы выявил 17 новых положительных клонов. Рестрикционный и ПЦР-анализ фаговой ДНК этих клонов показали, что все они соответствуют девяти различным процессированным псевдогенам рибосомного белка RPS21. Однако мы не выявили ни одного псевдогена, соответствующего кДНК HLDF по нуклеотидной последовательности. Все полученные клоны принадлежали псевдогенам белка RPS21, и в их последовательностях присутствовали множественные нуклеотидные замены, делеции и вставки, poly(dA)-последовательность на 3'-конце, фланкирующие последовательность прямые повторы (данные не представлены).

Таким образом, ПЦР-анализ геномной ДНК из промиелоцитарной клеточной линии HL-60, индуцированной ретиноевой кислотой, выявляет единственный интронсодержащий ген из семейства генов белка RPS21, кодирующаяся область которого соответствует кДНК RPS21. В ходе

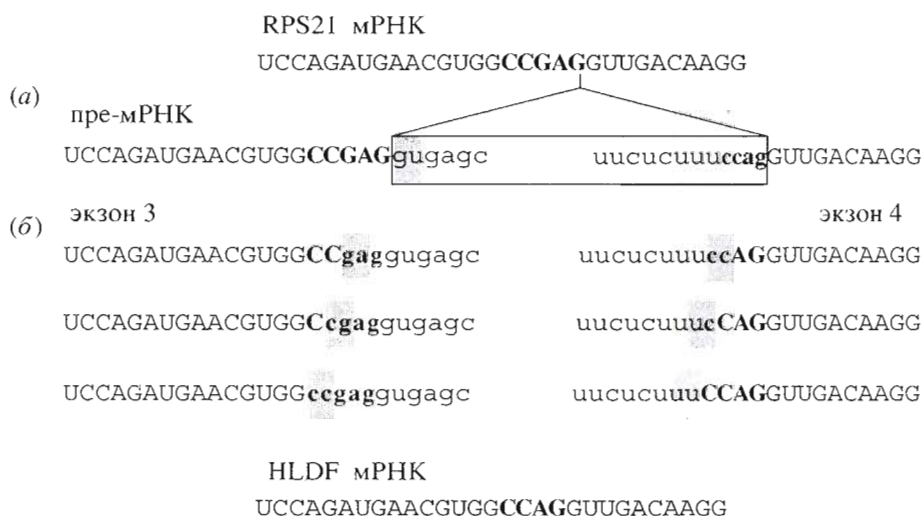


Рис. 5. Участки сплайсинга интрона 3 пре-мРНК RPS21. Схематически показаны (а) нормальный сплайсинг; (б) три возможных варианта aberrантного сплайсинга, приводящего к точечной делеции G₁₁₂. В рамке выделены границы интрона при нормальном сплайсинге, серым – 5'-донорные и 3'-акцепторные участки сплайсинга, несовершенные прямые тетра-нуклеотидные повторы – жирным шрифтом.

проделанной работы в геноме промиелоцитарной клеточной линии HL-60 нами не выявлено интронсодержащего гена или псевдогена, соответствующего по своей структуре кДНК HLDF. Поэтому очевидно, что функционально активный ген *rpS21* рибосомного белка кодирует и HLDF.

Каким образом в ходе дифференцировки клеток линии HL-60 под действием ретиноевой кислоты возникает HLDF? На рис. 1 представлены нуклеотидные последовательности кДНК RPS21 и HLDF. Две точечные делеции в кодирующей области кДНК HLDF приводят к возникновению альтернативной рамки считывания. Первая делеция (G-остаток в положении 112) приводит к изменению аминокислотной последовательности 6 аминокислотных остатков лидерного пептида предшественника HLDF и возникновению N-концевой последовательности зрелого HLDF. Вторая делеция (C-остаток в положении 224) приводит к появлению аминокислотной последовательности RRWHRLKE, которая определяет ДНК/РНК-гидролизующую активность HLDF, и C-концевого пептида LLTGENHRCGIFVINK, отвечающего за дифференцирующую активность фактора.

На рис. 5 показаны три возможных варианта абнормального процесса сплайсинга первичного транскрипта гена *rpS21*, которые могут привести к делеции G-остатка, находящегося в 3'-граничном тринуклеотиде третьего экзона гена *rpS21*. Aberrантный сплайсинг такого типа базируется на использовании неканонических 5'- и 3'-сайтов сплайсинга (в отличие от нормальных GT/AG для донорного и AG/AC для акцепторного сайтов), расположенных внутри несовершенных тетра-нуклеотидных прямых повторов или рядом с ни-

ми [15]. РНК-транскрипты подобного рода были обнаружены в ряде случаев нейродегенеративных заболеваний [16], при онкопатологиях человека [17] и, крайне редко, в периферических монукулеарных клетках здоровых людей (в соотношении 1 : 1000 или больше) [18].

Другой делетированный в мРНК HLDF остаток цитидина находится в середине экзона 5 гена *rpS21*. Эта делеция не может быть вызвана ни частичным восстановлением интрона, ни пропуском экзона при редактировании пре-мРНК или другими известными механизмами aberrантного сплайсинга.

Известен факт существования двух мРНК, отличающихся друг от друга лишь делецией одного основания и являющихся транскриптами одного гена. Это мРНК, кодирующие ядерные белки центросомы А (276 а.о., 34.5 кДа) и В (447 а.о., 45.8 кДа) [19]. Центросомы А и В имеют идентичную N-концевую последовательность длиной 272 а.о. Сдвиг рамки считывания обусловлен делецией остатка G в положении 1156 мРНК центросомы А. Однако этот остаток присутствует в структуре гена, кодирующего центросомин А. Авторы показали, что возникновение мРНК центросомы А обусловлено процессом РНК-редактирования.

Термин РНК-редактирование объединяет молекулярные процессы, приводящие к появлению в последовательности мРНК нуклеотидов, не соответствующих геномной последовательности. На данный момент известно, что РНК-редактирование встречается у рРНК, тРНК и мРНК эукариот. Этот процесс происходит как в митохондриях и хлоропластах, так и в ядре. РНК-редактирова-

Таблица 2. Сравнение цитотоксического и дифференцирующего эффектов* рекомбинантного RPS21 и синтетического HLDF на клетках HL-60 через 72 ч после индукции

Индуктор	Количество жизнеспособных клеток, % от контроля	Содержание дифференцированных клеток, %
–	100	25 ± 3
UF	82 ± 2	20 ± 2
S21 (10 ⁻⁶ M)	85 ± 2	25 ± 2
S21 (10 ⁻⁶ M) + UF (5 мкг/мл)	84 ± 2	20 ± 2
HLDF (10 ⁻⁶ M)	85 ± 2	55 ± 1
HLDF (10 ⁻⁶ M) + UF (5 мкг/мл)	45 ± 5	27 ± 2

* Количество жизнеспособных клеток определяли с помощью МТТ-теста; дифференцирующая активность оценивалась по числу NBT-положительных клеток.

ние включает в себя модификации нуклеозидов, C → U и A → I дезаминирование, так же как и нуклеотидные делеции и инсерции. Результатом РНК-редактирования является изменение аминокислотной последовательности белка, кодируемого исходным геном.

Не исключено, что мРНК HLDF является продуктом aberrантного сплайсинга в комбинации с РНК-редактированием. А так как появление HLDF было показано для клеток линии HL-60, индуцированных к дифференцировке или апоптозу, вероятно, что aberrантный процессинг пре-мРНК RPS21 происходит под воздействием индукторов дифференцировки и апоптоза, таких, как ретиноевая кислота или церамид.

Ранее Тороком с помощью инсерционного мутагена была получена слабо доминантная *l(2)k168-14* мутация у *Drosophila melanogaster*. Для личинки этих мух характерно разрастание кроветворных органов – железистых структур, в которых из стволовых клеток происходит образование и созревание гемоцитов, амeboидных клеток крови насекомых, аналогичных лейкоцитам млекопитающих. У мух дикого типа на третьей стадии развития личинки эти гемоциты созревают и выходят в гемолимфу, у личинок же мутантных мух пролиферирующие гемоциты остаются в кроветворных органах, что приводит к разрастанию желез в 50 раз [20]. После того как ген, несущий мутацию *l(2)k168-14*, был клонирован и идентифицирован, оказалось, что эта мутация затрагивает ген рибосомного белка S21, высоко гомологичного человеческому RPS21. На основании полученных результатов Тороком была высказана гипотеза об участии продукта гена *rpS21* в контроле клеточной пролиферации [21]. Мы предположили, что контроль пролиферации у дрозофилы

осуществляет белок-гомолог HLDF, транскрибирующийся с того же гена, что и рибосомный белок S21, поскольку ранее нами было установлено, что HLDF является неспецифической нуклеазой, участвующей в процессах апоптоза [3].

С целью проверки этой гипотезы мы провели трансфекцию рекомбинантного белка RPS21 человека и синтетического фактора дифференцировки в клетки промиелоцитарного лейкоза HL-60 с помощью унифектина. Цитотоксический эффект белков анализировали по количеству жизнеспособных клеток с помощью МТТ-теста, а дифференцирующий – по их способности восстанавливать NBT (табл. 2). Мы обнаружили, что RPS21 не проявляет ни дифференцирующей, ни цитотоксической активности, тогда как белок HLDF при трансфекции в клетку оказывает на них цитотоксическое действие. Поскольку белок RPS21 не обладает ни ДНК-гидролизующей, ни цитотоксической, ни дифференцирующей активностями, то причиной неограниченной пролиферации гемопоэтических органов дрозофилы при “минус”-мутации в гене *rpS21*, по-видимому, может являться не снижение продукции RPS21 в гемоцитах [21], а нарушение aberrантного сплайсинга и редактирования мРНК белка, гомологичного фактору дифференцировки. Хотя, конечно, несмотря на очень высокую степень гомологии рибосомных белков S21 млекопитающих и насекомых, нельзя исключить различие в свойствах двух этих белков. Вопрос об участии рибосомного белка S21 дрозофилы в регуляции клеточной пролиферации останется открытым до тех пор, пока этот белок не будет получен в гомогенном состоянии и не будут исследованы его антипролиферативная и дифференцирующая активности.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали: трис(гидроксиметил)аминометан (Трис), хлорид магния, ацетат натрия, хлорид кальция, уксусную кислоту, β -меркаптоэтанол; *N*-2-гидроксиэтилпиперазин-2-этансульфоновую кислоту (Hepes) (Merck, ФРГ); агарозу, *N,N*-диметилбисакриламид, акриламид, додецилсульфат натрия (SDS), *N,N,N,N*-тетраметилэтилендиамин (TEMED), нитроцеллюлозу Trans-Blot transfer medium (Bio-Rad, США); этилендиаминтетрауксусную кислоту (EDTA), Тритон X-100, гликоген, борную кислоту (Serva, ФРГ); IPTG, набор белков-маркеров для электрофореза (Promega, США); гуанидингидрохлорид, диметилсульфоксид (Fluka, Швейцария); бромфеноловый синий, ксилолцианоловый голубой (KochLight, Англия); ампициллин, борную кислоту, мочевины, глицерин, BSA, PMSF, Кумасси R-250, дитиотреит (DTT), бромистый этидий, Antifoam A (Sigma, США), триптон, дрожжевой экстракт, бакто-агар (Difco, США); дезоксирибонуклеозидтрифосфаты (dNTP) (Boehringer Mannheim, ФРГ); DEAE-целлюлозу DE-52, ватман 3ММ (Whatman, Великобритания); мембрану Hybond-NTM (Amersham, Великобритания); мембрану BiodyneTM (Pall, США); Ni²⁺-NTA-агарозу (Qiagen, США), [α -³³P]dATP, [α -³²P]dATP и [γ -³²P]dATP с удельной активностью 2000 Ки/ммоль (Изотоп, Россия). В работе использовали также штамм *E. coli*: B834(DE-3) и плазмидный вектор: pET23d(+), MMLV-фермент (обратную транскриптазу вируса лейкоза мышей Молони), эндонуклеазы рестрикции *Nco*I, *Xho*I, *Eco*RI, *Hind*III и *Pst*I (Promega, США).

Остальные реактивы соответствовали градации "х. ч." и "ос. ч.", принятой в России. Для культивирования клеток использовали среду RPMI 1640 и фетальную сыворотку теленка (Gibco, США). Дистиллированную воду дополнительно очищали с помощью системы Milli-Q (Millipore, США).

Унифектин был любезно предоставлен А.Ю. Суровым, С2-Сег – Ю.Г. Молотковским (Институт биоорганической химии РАН, Москва).

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

Выделение тотальной РНК из клеток линии HL-60 проводили с помощью RNeasy Mini Kit фирмы "Qiagen" согласно методике производителя. Количество мРНК определяли спектрофотометрически при 260 нм.

Синтез первой цепи кДНК. Выделенную тотальную РНК (5 мкг) денатурировали 5 мин при 70°C и сразу переносили на лед. Через 5 мин после охлаждения добавляли 0.5 пмоль (dT)₁₂₋₁₇ праймера и проводили отжиг в течение 5 мин при 65°C. Далее реакционную смесь (конечный объем 25 мкл) переносили на лед и добавляли 2.5 мкл

20 mM dNTP, 5 мкл 5 × MMLV-буфера (250 mM Трис-НСl, pH 8.3, 250 mM KCl, 50 mM MgCl₂, 2.5 mM спермидин (ингибитор РНКазы), 50 mM DTT), MMLV-фермент 1.5 мкл (20 ед. акт.). Реакцию проводили при 37°C 30 мин. Далее добавляли EDTA до 20 mM и SDS до 0.5% и экстрагировали нуклеиновые кислоты смесью фенол/хлороформ. Полученный осадок растворяли в буфере TE (10 mM, Трис-НСl, pH 8.0, 1 mM EDTA).

Экспрессия кДНК белка RPS21 человека в клетках *E. coli*. Для экспрессии фрагмента кДНК белка RPS21 в качестве штамма-хозяина был выбран штамм *E. coli* B834(DE-3), содержащий ген, кодирующий РНК-полимеразу фага T7 [22]. Рекомбинантная плазида pET23d(RPS21), содержащая вставку, была отобрана с помощью рестриктового анализа, и ее структура подтверждена секвенированием. Трансформацию компетентных клеток *E. coli*, а также выделение плазмид осуществляли согласно общепринятой методике [23]. Биомассу *E. coli* B834(DE-3), содержащую экспрессирующие векторы, наращивали на LB-среде с 50 мкг/мл ампициллина. Культуру растили в течение ночи при 37°C. Ночную культуру (2 мл) переносили в 250 мл среды LB с ампициллином (50 мкг/мл) и выращивали при 37°C при интенсивной аэрации до значения оптического поглощения при 600 нм, равного 0.5. Затем добавляли индуктор *lac*-промотора IPTG (конечная концентрация 1 mM) и инкубировали 3–5 ч.

Очистка рекомбинантного белка. Для выделения белка RPS21 из телец включения суспензию клеток продуцента подвергали серии отмывок: 250 мл культуры клеток оставляли во льду на 10 мин, затем центрифугировали (15 мин, 2500g). Осадок ресуспендировали в 12.5 мл охлажденного во льду буфера, содержащего 20 mM Трис-НСl, pH 8.0; 20% сахарозы, 1 mM EDTA, 2 mM PMSF и инкубировали во льду 10 мин. Полученную суспензию центрифугировали в тех же условиях. Осадок ресуспендировали в воде, очищенной на установке Milli-Q, инкубировали во льду еще 10 мин и снова центрифугировали (15 мин, 2500g), после чего осадок ресуспендировали в 2.5 мл буфера, содержащего 50 mM Трис-НСl (pH 8.0); 100 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0.2 mM PMSF. Полученную суспензию обрабатывали с помощью ультразвукового дезинтегратора-MSE (Великобритания) (8 × 20 с, интервалы 20 с, амплитуда 4, при средней мощности) и разбавляли до 12.5 мл тем же буфером и центрифугировали (30 мин, 20000g). Осадок ресуспендировали в промывочном буфере (50 mM Трис-НСl (pH 8.0); 100 mM NaCl, 1% Твин-80, 25% сахароза) и центрифугировали (10 мин, 30000g). Осадок после центрифугирования ресуспендировали в 10 мл буфера А (6 M Gu · HCl, 0.1 M (Na₂H)PO₄; 0.01 M Трис-НСl, pH 8.0) и солюбилизировали 1 ч во льду. Суспензию центрифугировали (15 мин, 25000g). Полученный таким образом

осветленный клеточный экстракт (10 мл) наносили со скоростью 250 мкл/мин на колонку (1.0 × 6 см) с Ni²⁺-NTA-агарозой, предварительно уравновешенную буфером А, согласно инструкции производителя. Колонку последовательно промывали 10 объемами (от объема колонки) буфера А и 5 объемами буфера Б (6 М Gu · HCl, 0.1 М (Na,H)PO₄, 0.01 М Трис-HCl, pH 6.3). Элюцию белка осуществляли буфером Б, содержащим 250 мМ имидазол. Фракции анализировали с помощью SDS-электрофореза по Лэммли [24].

Для получения рекомбинантного белка в нативной конформации освобождались от избытка Gu · HCl ступенчатым разбавлением 10 мл элюата в процессе диализа (30 ч, 4°C): Первая ступень: 250 мл буфера (3 М Gu · HCl, 0.05 М Трис-HCl (pH 8.0); 0.005% Твин-80, 20 мМ KCl, 3 мМ восстановленный глутатион, 0.3 мМ окисленный глутатион). Вторая и третья ступени – 500 и 1000 мл исходного буфера А соответственно, но без денатурирующего агента (Gu · HCl).

Бромциановый гидролиз RPS21. Перед проведением гидролиза полученный препарат RPS21 дополнительно очищали с помощью обращенно-фазовой ВЭЖХ на колонке KS/R475 (0.45 × 15 см) (Purolyte, Россия) в 0.1% водном растворе TFA в градиенте концентрации ацетонитрила.

К раствору 3 мг RPS21 в 500 мкл 70% муравьиной кислоты добавляли 5 мг бромциана (Pierce, США) и полученную смесь инкубировали в темноте при 40°C в течение 20 ч. Продукты гидролиза обессоливали на колонке TSK-2000 в 20% уксусной кислоте. Фракции, содержащие пептиды, упаривали до объема 0.5 мл и подвергали разделению с помощью обращенно-фазовой ВЭЖХ на колонке Ultrasphere C18 (0.46 × 25 см) (Vydac, США) в водном растворе 0.1% TFA в градиенте концентрации ацетонитрила.

Получение конъюгата для иммунизации животных. С-Концевой пептид белка RPS21 пришивали к белку-носителю KLH (гемоцианин из виноградной улитки) с помощью глутарового альдегида согласно методике [9].

Получение поликлональных антител. Для получения антисыворотки кролика проводили многоточечные инъекции (5 точек) подкожно вдоль позвоночника по следующей схеме: 1-й день 0.5 мг белка или конъюгата в 0.4 мл физиологического раствора смешивали с 0.4 мл адъюванта Фрейнда и полученную эмульсию вводили животным; 31-й день – 0.5 мг белка или конъюгата в 0.4 мл физиологического раствора смешанного с 0.8 мл неполного адъюванта Фрейнда и полученную эмульсию вводили так же подкожно. После 30 дней отдыха животным в течение 3 дней ежедневно вводили антиген внутривенно – 0.7 мл физиологического раствора, содержащего 0.5 мг антигена.

Отбор крови проводили через 7–9 дней из ушной вены кролика.

Полученную иммунную сыворотку прогревали в течение 30 мин при 37°C, а затем оставляли на 1 ч при 4°C. Осадок удаляли центрифугированием (3000 об/мин × 15 мин). Антисыворотку кролика (10 мл) разбавляли в 2 раза насыщенным раствором сульфата аммония и инкубировали 12–16 ч при 4°C. Выпавший осадок удаляли центрифугированием (3000 об/мин × 15 мин), растворяли в 5 мл фосфатного буфера PBS и затем диализовали против того же буфера в течение ночи при 4°C. Титр антител оценивали методом (ELISA) [25].

Очистку поликлональных антител проводили с помощью хроматографии на колонке с белок-А-сефарозой CL-4B (Pharmacia Fine Chemicals, Швеция) [9].

Дифференцирующую активность RPS21 и фактора HLDF на клетках HL-60 определяли по их способности восстанавливать нитроголубой тетразолий (NBT-тест) [26]. Белки добавлялись к культуре клеток в виде водных растворов. На четвертые сутки после индукции дифференцирующую активность определяли по числу NBT-положительных клеток, выраженному в процентах. Для представления результатов были просчитаны не менее 300 клеток. NBT-положительными считали клетки, содержащие не менее 10 темно-голубых гранул.

МТТ-тест. Для теста использовали клетки HL-60, претерпевшие не менее 20, но не более 40 пассажей. Через сутки после последнего пассажа клетки, находящиеся в lag-фазе, обрабатывали индуктором. Через 72 ч отбирали аликвоты (200 мкл) и помещали в 96-луночную плашку, обработанную poly(L-Lys). Затем к клеточной суспензии добавляли по 20 мкл МТТ (раствор 4 мг/мл в бессывороточной среде RPMI 1640). После чего клетки дополнительно инкубировали 3 ч при 37°C. Через 3 ч инкубационную среду отбирали, и клетки лизировали 100 мкл 0.04 н. HCl в изопропиловом спирте в течение 10 мин при комнатной температуре при постоянном встряхивании. Количество живых клеток определялось по способности МТТ проникать в митохондрии и оценивалось по разнице поглощения при 540 и 690 нм на приборе Multiscan MC/340 (Labsystem, Финляндия) [27].

N-Концевой аминокислотный анализ проводили по стандартной методике [28]. Идентификацию Dns-производных аминокислот осуществляли ТСХ на пластинках (3 × 3 см) с полиамидом.

Определение N-концевых аминокислотных последовательностей осуществляли на твердофазном секвенаторе модели 470A (Applied Biosystems, США) согласно инструкции производителя, используя методику, предложенную в работе [29].

С-Концевые аминокислотные остатки определяли с помощью карбоксипептидазы Y [30].

Электроблоттинг и иммуноокрашивание. Электроблоттинг проводили на приборе 2051 Midget Multiblot (LKB, Швеция) при постоянном токе 0.4 А в 0.1 М Трис-боратном буфере (рН 8.2) в течение 40 мин. После переноса на мембрану Immobilon-P, ее промывали водой и окрашивали в 0.02% растворе Кумасси R-250 в 50% метаноле в течение 3 мин. Избыток краски отмывали 10% уксусной кислотой, 50% метанолом, после чего тщательно промывали мембрану водой. Нитроцеллюлозу окрашивали 1% раствором амидового черного (или 0.1% раствором Ронсеау S (Sigma, США)) в 1% уксусной кислоте. Избыток краски отмывали 1% уксусной кислотой.

Иммуноокрашивание осуществляли по стандартной методике [9]. Для предотвращения неспецифической сорбции первичных антител мембрану инкубировали в буфере TBS, содержащем 3% BSA, 20% глицерин, 0.5% Твин-20, после чего ее трижды отмывали TBS + Твин-20.

Инкубацию с первичными антителами проводили в течение 2 ч при комнатной температуре.

Иммуногистохимическое окрашивание клеток HL-60 проводили с помощью поликлональных антител к HLDF, RPS21 и С-концевому пептиду на альбуминизированных предметных стеклах после блокирования эндогенной пероксидазной активности раствором H_2O_2 в метаноле в течение 10 мин. Первичные поликлональные антитела к HLDF, RPS21 и С-концевому пептиду RPS21 вносили в разведении 1 : 800, 1 : 2000 и 1 : 1000 соответственно. Иммунопероксидазное выявление антигенов осуществляли с помощью АВС-метода, используя набор LSAB+ (Dako) и диаминобензидин в качестве субстрата [10]. Дополнительное окрашивание клеток осуществляли гематоксилином. В качестве негативного контроля использовали неиммунную сыворотку кролика в том же разведении.

Трансфекцию HLDF или RPS21 в клетки HL-60 с помощью унифектина [31] проводили в 24-луночных планшетах. Водный раствор HLDF (10^{-4} М) или RPS21 предварительно инкубировали с унифектином (1 мг/мл) 30 мин при комнатной температуре, а затем его подвергали озвучиванию на приборе Ultrasonic Cleaner (Швеция). Подготовленный таким образом препарат (12.5 мкл) вносили в 2.5 мл суспензии клеток HL-60 с плотностью 1 млн/мл. Через 72 ч инкубации аликвоты клеточной суспензии отбирали для МТТ-теста.

При статистической обработке результатов достоверность различий между опытом и контролем оценивали по критерию Стьюдента.

Определение нуклеотидных последовательностей проводили по методу Сэнгера [12].

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 01-04-48633),

гранта НШ-312.2003.4 и Международного научно-технического центра (проект № 1554).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kostanyan I.A., Astapova M.V., Starovoytova E.V., Dranitsyna S.M., Lipkin V.M. // FEBS Lett. 1994. V. 356. P. 327–329.
2. Kostanyan I.A., Astapova M.I., Starovoytova E.V., Dranitsyna S.M., Lipkin V.M. // Биоорган. химия. 1995. Т. 21. С. 243–248.
3. Драницына С.М., Костанян И.А., Андреева С.Г., Астапова М.В., Бабиченко И.И., Баева О.В., Богачук А.П., Молотковская И.М., Родионов И.Л., Смирнова Е.В., Липкин В.М. // Биоорган. химия. 2000. Т. 26. С. 340–351.
4. Смирнова Е.В., Ракитина Т.В., Евтодиенко А.Ю., Костанян И.А., Липкин В.М. // Биоорган. химия. 2000. Т. 26. С. 364–368.
5. Bhat K.S., Morrison S.G. // Nucl. Acids Res. 1993. V. 21. P. 2939.
6. Lutsch G., Stahl J., Kargel H.-J., Noll F., Bielka H. // Eur. J. Cell Biol. 1990. V. 51. P. 140–150.
7. Kenmochi N., Kawaguchi T., Rozen S., Davis E., Goodman N., Hudson T.J., Tanaka T., Page D.C. // Genome Res. 1998. V. 8. P. 509–523.
8. Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1977. V. 74. P. 5463–5467.
9. Harlow E., Lane D. Antibodies. A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor; N.Y.; Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988.
10. Hsu S.M., Raine L., Fanger H. // J. Histochem. Cytochem. 1981. V. 25. P. 577–580.
11. Feo S., Davies B., Fried M. // Genomics. 1992. V. 13. P. 201–207.
12. Wagner M., Perry R.P. // Mol. Cell Biol. 1985. V. 5. P. 3560–3576.
13. Zinn A.R., Alagappan R.K., Brown L.G., Wool I., Page D.C. // Mol. Cell Biol. 1994. V. 14. P. 2485–2492.
14. Dudov K.P., Perry R.P. // Cell. 1984. V. 37. P. 457–468.
15. Tarn W.Y., Steitz J.A. // Trends Biochem. Sci. 1997. V. 22. P. 132–137.
16. Bai G., Lipton S.A. // Neuron. 1998. V. 20. P. 363–366.
17. Chang J.G., Chen Y.J., Perng L.I., Wang N.M., Kao M.C., Yang T.Y., Chang C.P., Tsai C.H. // Eur. J. Cancer. 1999. V. 35. P. 647–651.
18. Wang N.M., Chang J.G., Liu T.C., Lin S.F., Peng C.T., Tsai F.J., Tsai C.H. // Int. J. Oncol. 2000. V. 16. P. 75–80.
19. Petzelt C., Joswig G., Mincheva A., Lichter P., Stammer H., Werner D. // J. Cell Sci. 1997. V. 110. P. 2573–2578.
20. Torok T., Tick G., Alvarado M., Kiss I. // Genetics. 1993. V. 135. P. 71–80.
21. Torok I., Herrmann-Horle D., Kiss I., Tick G., Speer G., Schmitt R., Mechler B.M. // Mol. Cell Biol. 1999. V. 19. P. 2308–2321.
22. Studier F., Moffatt B. // Mol. Biol. 1986. V. 189. P. 113–130.
23. Sambrook J., Fritsch E., Maniatis T. Molecular Cloning. Gold Spring Harbor; N. Y.; Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

24. Laemmli U.K. // *Nature*. 1970. V. 227. P. 680–685.
25. Engval E., Perlmann P. // *J. Immunol.* 1972. V. 109. P. 129–135.
26. Baehner R., Nathan D. // *J. of Medicine*. 1968. V. 278. P. 971–976.
27. Carmichael J., DeGraff W.G., Gazdar A.F., Minna J.D., Mitchell J.B. // *Cancer Res.* 1987. V. 47. P. 936–942.
28. Gray R. // *Meth. Enzymol.* 1967. V. 11. P. 138–151.
29. Левина Н.Б., Слепак В.З., Киселев О.Г., Шемякин В.В. // *Биоорганическая химия*. 1989. Т. 15. С. 24–31.
30. Hayashi R. // *Meth. Enzymol.* 1976. V. 45. P. 538–568.
31. Harbottle R.P., Cooper R.G., Hart S.L., Ladhoff A., McKay T., Knight A.M., Wagner E., Miller A.D., Coultelle C. // *Hum. Gene Ther.* 1998. V. 9. P. 1037–1047.

The Precursor of Differentiation Factor HLDF and Ribosomal Protein RPS21 Have a Common N-Terminal Sequence

E. V. Smirnova*, A. V. Garkovenko*, T. V. Rakitina*,
S. N. Berezhnoi*, M. V. Astapova*, E. A. Surina*,
I. I. Babichenko**, I. A. Kostanyan**#, and V. M. Lipkin*

Phone: +7 (095) 336-5511; fax: +7 (095) 310-7010; e-mail: iakost@mail.ibch.ru

* Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences,
ul. Miklukho-Maklaya 16/10, GSP Moscow, 117997 Russia

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

The mature differentiation factor HLDF, isolated from culture fluid, comprises 54 aa, whereas the open reading frame of mRNA encodes a 97-aa protein. We presumed that the protein translation begins from the first ATG codon, whose environment mostly meets the requirements for the initiation point. Two more ATG triplets are localized in positions 48–50 and 100–102, i.e., in the area preceding the cDNA fragment that encodes the N-terminal fragment of the mature protein. The mRNAs of HLDF and the S21 ribosomal protein have previously been shown to be highly homologous, and, therefore, their differences appear to be derived from two point deletions in the cDNA of the HLDF-encoding sequence (a G residue in position 112 and a C residue in position 224). As a result, the mature differentiation factor and RPS21 may be the products of translation from different open reading frames, the differentiation factor may be synthesized in the cell as a precursor, and its N-terminal sequence may be identical to that of RPS21. To test this hypothesis, we prepared recombinant RPS21 and the polyclonal antibodies to HLDF, full-size RPS21, and the C-terminal RPS21 peptide. Immunohistochemical staining by specially produced antibodies of native HL-60 cells and the same cells brought into apoptosis or differentiation confirmed that the precursor of the differentiation factor and the ribosomal S21 protein have a common N-terminal sequence and different cellular localizations. Neither an intron-containing gene nor a pseudogene with the nucleotide sequence corresponding to the HLDF cDNA was detected in the human genome or in the HL-60 cell line genome. On the basis of these facts, we propose a hypothesis of the molecular mechanism of the HLDF mRNA biosynthesis by means of posttranslational modifications of pre-mRNA of RPS21. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2004, vol. 30, no. 2; see also <http://www.maik.ru>.

Key words: aberrant splicing, apoptosis, cell differentiation, differentiation factor HLDF, gene cloning, HL-60 cell line, RNA editing