



УДК 577.21

СТРУКТУРА И ОСОБЕННОСТИ ЭКСПРЕССИИ КДНК ГЕНА *MRPL37* ЧЕЛОВЕКА

© 2004 г. Е. В. Левшенкова, К. Э. Украинцев, В. В. Орлова, Р. А. Алибаева,
И. Е. Коврига, О. Жугдернамжилын, Е. И. Фролова[#]

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

Поступила в редакцию 11.08.2003 г. Принята к печати 30.10.2003 г.

Методом прямой селекции кДНК из активированных конканавалином А лимфоцитов человека выделен фрагмент кДНК размером 147 п.о. С помощью технологии RACE (rapid amplification of cDNA ends) получена полная копия селектированного гена, обнаружившего полную гомологию с митохондриальным рибосомным геном *MRPL37*. Используя панель ДНК из соматических клеточных гибридов человека и хомячка, ген *MRPL37* локализовали на хромосоме 1 человека. С помощью нозерн-блоттинга и ОТ-ПЦР (обратная транскрипция-полимеразная цепная реакция) показано, что мРНК человеческого гена *MRPL37* широко представлена в популяциях лимфомы В-клеток Raji и Т-клеточной лимфомы MT4, а также в поджелудочной железе, печени и в клетках легочных эмбриональных фибробластов WI-38 и LEM. Наибольший уровень экспрессии мышинового гомолога *MRPL37* выявлен в клетках скелетных мышц, сердца, а также органов репродуктивной системы: матки, яичника и яичка. Сравнительный анализ аминокислотной последовательности *MRPL37* с белками, представленными в базах данных Fasta33 и GenBank, показал наличие гомологичного участка у *MRPL37* и белка PDCD9 (programmed cell death 9, MRPS30), чей куриный гомолог интересен тем, что его суперэкспрессия вызывает апоптоз клеток мышинных фибробластов СЗН10Т1/2. Существование общего домена указывает на возможные сходные функциональные особенности генов *PDCD9* и *MRPL37* и может предполагать участие *MRPL37* в процессе апоптоза.

Ключевые слова: ген *MRPL37*; митохондриальные рибосомные белки; хромосома 1 человека; апоптоз.

ВВЕДЕНИЕ

Около половины рибосомных белков митохондрий (миторибосомных белков) человека не имеет гомологов в рибосомах прокариот, поэтому их функциональная роль и локализация в рибосомах неизвестны. Некоторые из новых миторибосомных белков могут иметь дополнительные функции, не связанные непосредственно с синтезом митохондриальных белков, такие, как обеспечение взаимодействия рибосом с внутренней мембраной митохондрий или координация процессов трансляции и экспрессии митохондриальных белков [1]. Один из примеров дополнительных функций миторибосомных белков – участие в процессе апоптоза [2, 3]. Апоптоз, или про-

граммируемая клеточная смерть, представляет собой активный процесс, который играет ключевую роль в клеточной дифференцировке, развитии многоклеточных организмов, гомеостазе тканей, а также является способом борьбы клетки с нарушениями, вызываемыми злокачественными изменениями [4, 5]. Митохондрии участвуют во многих сигнальных путях, приводящих к клеточной смерти, но точный механизм их роли в процессе апоптоза пока не изучен. Однако известно, что такое важное событие, как высвобождение цитохрома *c*, а также других проапоптозных белков из внутримембранного пространства митохондрий, является сигналом для активации путей клеточной смерти [6, 7].

На сегодняшний момент охарактеризовано два миторибосомных белка, принимающих участие в апоптозе, – DAP3 (death associated protein, MRP-S29) и PDCD9 (MRP-S30). DAP3 – медиатор апоптоза, индуцированного INF- γ , TNF- α и FAS [8, 9]. Что касается PDCD9 [10], то было обнаружено, что сверхпродукция его куриного гомолога p52 вызывает апоптоз в клетках мышинных фибробластов СЗН10Т1/2 [11].

Сокращения: DMEM – Dulbecco's modified Eagle's medium; FCS – фетальная телячья сыворотка; M-MLV – molony murine leukemia virus (вирус мышинной лейкемии Молони); ORF – открытая рамка считывания; ОТ-ПЦР – обратная транскрипция-полимеразная цепная реакция; PAC – искусственная фаговая хромосома; ПЦР – полимеразная цепная реакция; RACE – rapid amplification of cDNA ends (быстрая амплификация концов кДНК); TNF – фактор некроза опухоли; YAC – искусственная дрожжевая хромосома.

[#] Автор для переписки (тел.: (095) 330-66-56; эл. почта: eifr@ibch.ru).



Рис. 1. Анализ первичной структуры клона кДНК1. (а) – первичная структура вставки клона кДНК1; (б) – ORF, обнаруженная в кДНК1-клоне; (в) – гомология предполагаемой аминокислотной последовательности, соответствующей кДНК1, с белками MRPL37 (GenBank № NM_016491) и PDCD9 (GenBank № AF146192).

Идентификация миторибосомных белков, повышенный синтез которых индуцирует апоптоз, подтверждает представление о том, что митохондрии играют центральную роль во многих путях развития программируемой клеточной смерти.

Продукт человеческого гена *MRPL37* также относится к числу новых миторибосомных белков, отсутствующих у прокариот. Кроме того, в отличие от *DAP3* и *PDCD9*, у *MRPL37* не обнаружено соответствующего гомолога в геноме дрожжей. В настоящей работе проанализирована экспрессия гена *MRPL37* в тканях человека и мыши, а также проведены предварительные эксперименты по изучению дополнительных функций продукта гена *MRPL37*, не связанных с биосинтезом митохондриальных белков.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Получение и структурный анализ полноразмерной копии кДНК гена *MRPL37*

Методом прямой селекции кДНК [12, 13] на геномной ДНК YAC-клона 131F1 (СЕРН, Парижский центр по изучению полиморфизмов человека) из кДНК-библиотеки активированных конканавалином А лимфоцитов человека нами был

отобран клон с кДНК размером 147 п.о. (клон кДНК1), имеющий более высокий уровень экспрессии в активированных лимфоцитах по сравнению с нестимулированными клетками. Как известно, конканавалин А является митогенным активатором цитокинов [14, 15], которые стимулируют пролиферацию клеток, а также способны выступать в качестве индукторов апоптоза, таких, как например TNF- α и INF- γ [16]. Поэтому мы предположили, что ген, соответствующий селектированной кДНК, может принадлежать к семейству генов цитокинов либо его регуляция может быть опосредована их активацией.

Определив первичную структуру вставки клона кДНК1, мы обнаружили открытую рамку считывания (ORF), соответствующую 48 а.о. Сравнение предполагаемой аминокислотной последовательности, соответствующей кДНК1-клон, с белковыми базами данных Fasta33 (www.ebi.ac.uk/fasta33/) и GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast) показало наличие 100% гомологии с рибосомным белком большой субчастицы рибосомы митохондрий MRPL37, а также ~45% гомологии с проапоптозным белком PDCD9 (рис. 1), который также является миторибосомным белком, и, кроме того, интересен тем, что сверхпродукция его куриного

гомолога р52 вызывает апоптоз мышечных фибробластов. Исходя из этого мы предположили, что клон кДНК1 содержит участок гена, кодирующего митохондриальный белок MRPL37, который, имея гомологичный проапоптотическому белку домен, может быть вовлечен в процесс апоптоза. Кроме того, высокий уровень экспрессии в активированных лимфоцитах позволяет сделать предположение о том, что продукт селектированного гена является прямой либо косвенной мишенью цитокинов, то есть задействован в сигнальных путях, вызванных их активацией.

Полноразмерная копия кДНК гена *MRPL37*, размер которой составил 1430 п.о., была выделена с помощью методики RACE [17] с использованием библиотеки кДНК, полученной из РНК скелетной мышцы. После определения ее первичной структуры полученную последовательность проанализировали на наличие ORF и обнаружили, что наиболее протяженная ORF содержит 1272 п.о., что соответствует 423 а.о. Нуклеотидную и предполагаемую белковую последовательности соответственно сравнили с базами данных GenBank и Fasta33. В результате установили, что кДНК1 соответствует гену *MRPL37*, в котором не было обнаружено никаких других гомологий помимо ранее выявленной гомологии с *PDCD9*. Полученная полноразмерная копия кДНК гена *MRPL37* была депонирована в GenBank под номером AF325707.

Картирование гена *MRPL37* в геноме человека и мыши

Анализ фрагментов геномной ДНК мыши и человека, содержащих ген *MRPL37*, проведенный с пробой размером 147 п.о., соответствующей кДНК1, показал наличие девяти т.п.о. *EcoRI*-фрагмента геномной ДНК мыши и шести т.п.о. *EcoRI*-фрагмента ДНК человека (рис. 2). На основе этих результатов был сделан вывод об уникальности гена *MRPL37* в геноме, а также о его эволюционной консервативности. В настоящий момент в базе данных GenBank представлена полная копия мышечного гомолога *MRPL37* (GenBank № NM_025500.1), а в белковой базе данных Fasta33 имеются гомологичные последовательности в геномах плодовой мушки *Drosophila melanogaster* (GenBank № Q9VGW9) и нематоды *Onchocerca volvulus* (GenBank № Q9NJD6).

Для выяснения хромосомной локализации гена *MRPL37* была использована панель из соматических клеточных гибридов ДНК человека и хомяка, любезно предоставленная Копанцевым Е.П. (ИБХ РАН) [18]. ДНК гибридных клеток использовалась в качестве матрицы для ПЦР с праймерами на кДНК1. Анализ результатов ПЦР (рис. 3) показал, что ген *MRPL37* локализован на первой хромосоме человека. Эти результаты соответствуют данным, полученным международным консорциумом в ходе

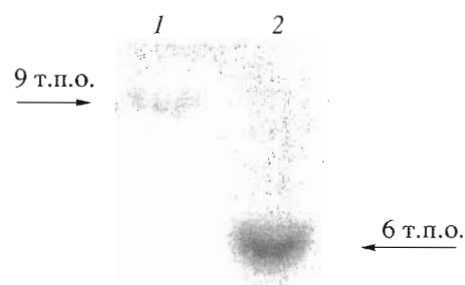


Рис. 2. Саузерн-блот-анализ *EcoRI*-фрагментов геномов мыши (1) и человека (2), гибридизующихся с кДНК1.

выполнения Программы по определению первичной структуры генома человека. В настоящий момент в базе данных GenBank htgs присутствует РАС-клон (GenBank № AL357673), картированный на первой хромосоме человека, участки которого гомологичны кДНК гена *MRPL37*. Сравнив нуклеотидную последовательность кДНК гена *MRPL37* и РАС-клона, можно достоверно определить экзон-интронную структуру гена, а именно: *MRPL37* состоит из семи экзонов и шести интронов.

Экспрессия *MRPL37* в тканях человека и мыши

Уровень экспрессии гена *MRPL37* в различных тканях человека и мыши анализировали с помощью нозерн-блот-анализа, а также ОТ-ПЦР клеточной РНК. РНК выделяли из тканей человека по методике, описанной в работе П. Хомчинского [19] и после иммобилизации на мембране гибридизовали с меченой ^{32}P пробой, соответствующей кДНК1. Для количественной и качественной оценки РНК проводили дополнительную гибридизацию с пробой, специфичной для 18S рРНК.

Нозерн-блот-анализ (рис. 4а) выявил высокий уровень экспрессии гена *MRPL37* в клетках Raji и Daudi В-клеточных лимфом и в клетках МТ4 Т-клеточной лимфомы. Самый низкий уровень экспрессии гена *MRPL37* был выявлен в эмбриональном костном мозге.

Для изучения экспрессии гена *MRPL37* в различных тканях параллельно с нозерн-блот-анализом проводился ОТ-ПЦР на РНК из эмбриональных тканей человека. Чтобы иметь большую выборку, использовали РНК, выделенную из 10 различных тканей и трех типов клеточных линий человека. Результат ОТ-ПЦР на РНК тканей человека (рис. 4б, в) подтвердил данные, полученные с помощью нозерн-блот-анализа, а именно, что наибольший уровень экспрессии гена *MRPL37* наблюдается в клетках Т-клеточной лимфомы

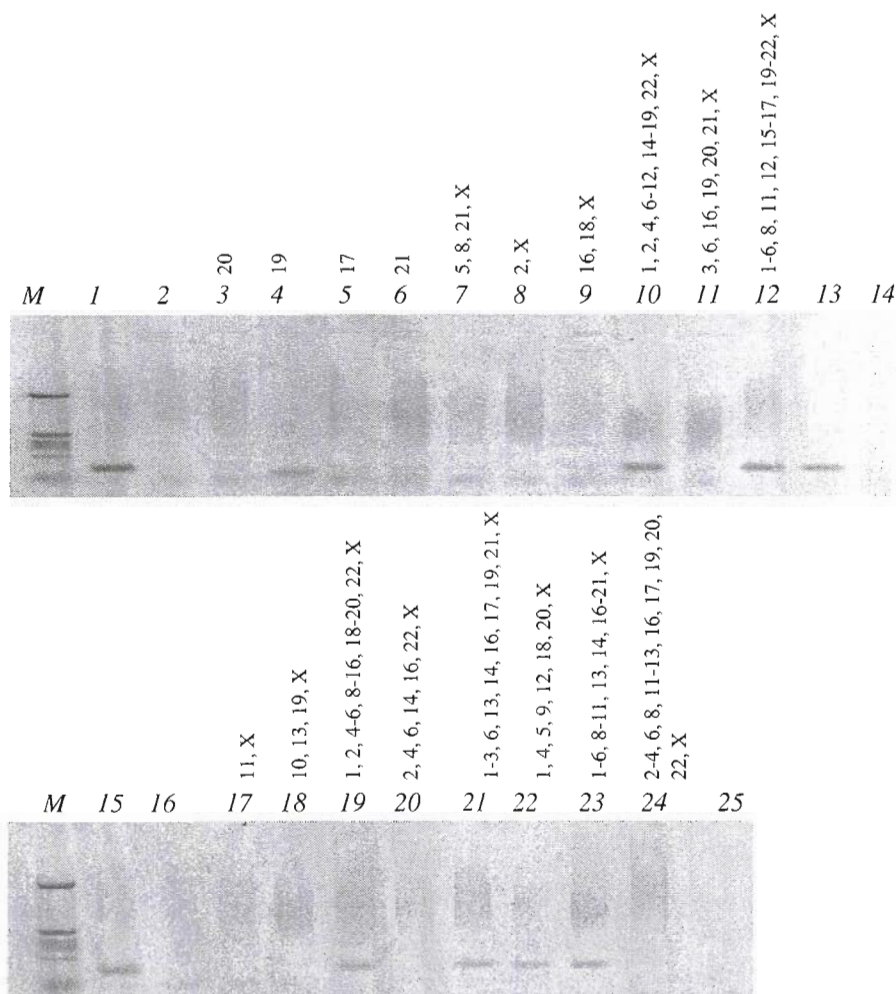


Рис. 3. ПЦР-картирование гена *MRPL37* на панели клонов гибридных клеток человека и китайского хомячка (электрофорез в 3% агарозном геле). *M* – ДНК-маркер: плаزمида рВR322, гидролизованная эндонуклеазой рестрикции *Hinf*I. 1, 13 и 15 – тотальная ДНК человека; 2 и 16 – ДНК линии CHO; 14 и 25 – отрицательный контроль ПЦР; 3–12 и 17–24 соответствуют гибридным клонам, содержащим ДНК хромосом человека, указанным на рисунке выше нумерации ячеек геля.

MT4, тогда как в клетках костного мозга экспрессия практически отсутствует. Кроме того, был выявлен еще ряд тканей и клеточных линий человека с высоким уровнем экспрессии гена: это, в частности, поджелудочная железа и клеточная линия LEH (lung embryonic fibroblasts).

Так как анализ по Саузерну показал наличие мышинового гомолога исследуемого гена, нам показалось интересным проанализировать его экспрессию в тканях мышцы. Кроме того, мышечные ткани легко доступны, что позволяет осуществить более широкое исследование. Результаты анализа экспрессии гена в мышечных тканях (рис. 4в) выявили ткани, в клетках которых наблюдается наибольший уровень мРНК гена *MRPL37*: это сердце, скелетная мышца, а также органы репродуктивной системы – яичник, матка и яичко.

Анализируя полученные данные, можно сделать следующие выводы: мышинный гомолог *MRPL37*

высоко представлен именно в тех тканях, где митохондрии несут повышенную функциональную нагрузку и соответственно наблюдается высокий уровень экспрессии большинства митохондриальных генов: это мышечные ткани – сердце и скелетная мышца, а также органы репродуктивной системы. В то же время в клетках человека наблюдается дифференциальная экспрессия гена *MRPL37*: уровень мРНК гена гораздо выше в легочных фибробластах LEH, тимусе и печени по сравнению с клетками сердца и скелетной мышцы. Такие различия в экспрессии мышинового и человеческого гена могут быть связаны, во-первых, с различным уровнем мРНК гена *MRPL37* в клетках эмбриональных тканей (человека) и тканей взрослого организма (мышь), и, во-вторых, с возможными дополнительными функциями человеческого гена, приобретенными в процессе эволюции.

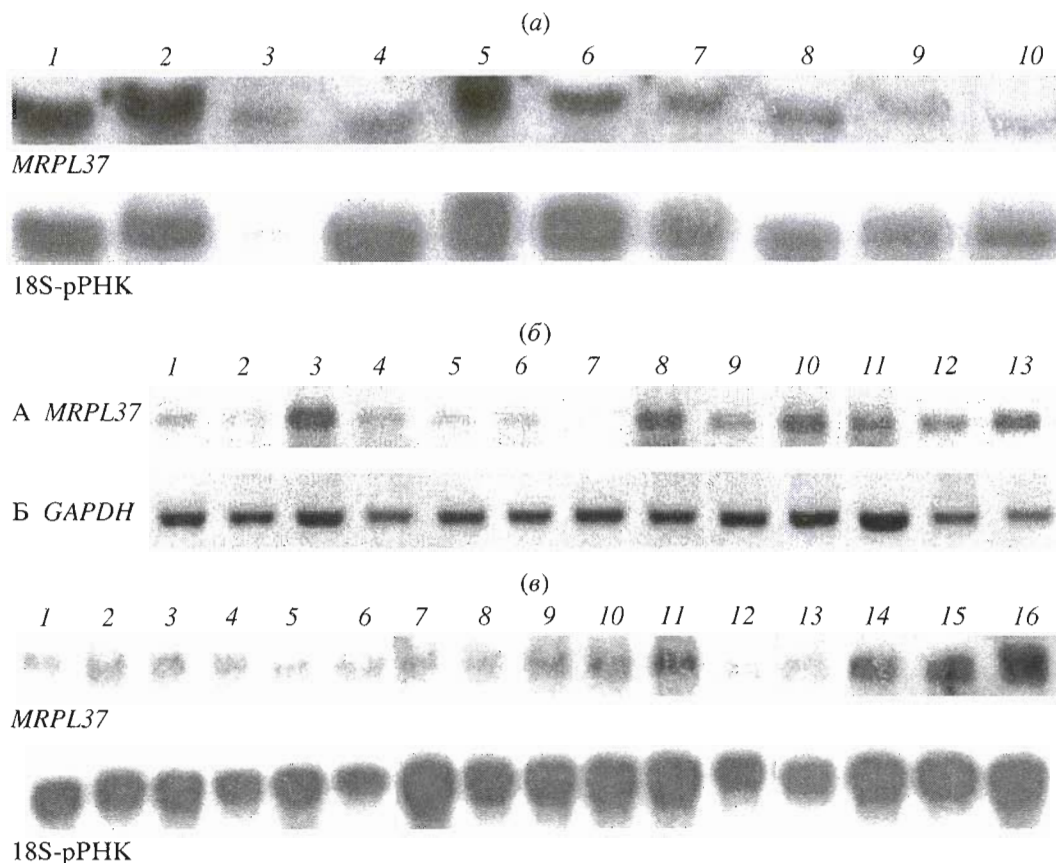


Рис. 4. Анализ экспрессии гена *MRPL37*. (а) Нозерн-блот-анализ экспрессии гена *MRPL37* в клетках человека. В каждой ячейке содержится по 10 мкг РНК (за исключением ячейки 3, где нанесено 3 мкг РНК) из эмбриональных тканей человека: 4 – тонкий кишечник, 5 – мозжечок, 6 – печень, 7 – тимус, 8 – сердце, 9 – мозг, 10 – костный мозг, а также из клеточных линий: 1 – клетки В-клеточной лимфомы Raji, 2 – клетки Т-клеточной лимфомы MT4, 3 – клетки В-клеточной лимфомы Daudi. (б) ОТ-ПЦР-анализ экспрессии гена *MRPL37* (А) и контрольного гена *GAPDH* (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) (Б) в тканях и клеточных линиях человека: 1 – печень, 2 – плацента, 3 – поджелудочная железа, 4 – скелетная мышца, 5 – сердце, 6 – эмбриональный мозг, 7 – костный мозг, 8 – мозжечок, 9 – суммарная опухолевая РНК, 10 – клетки Т-клеточной лимфомы MT4, 11 – тимус, 12 – клетки линии WI-38, 13 – клетки линии LEM. (в) Нозерн-блот-анализ экспрессии гена *MRPL37* в тканях мыши: 1 – мозг, 2 – костный мозг, 3 – легкое, 4 – щитовидная железа, 5 – селезенка, 6 – тимус, 7 – печень, 8 – плацента, 9 – почка, 10 – сердце, 11 – скелетная мышца, 12 – желудок, 13 – тонкий кишечник, 14 – яичник, 15 – матка, 16 – яичко.

Анализ содержания мРНК гена *MRPL37* в ряде опухолевых линий клеток человека позволил обнаружить высокий уровень экспрессии этого гена во всех исследованных линиях (результаты не приведены). На основании этих данных было сделано предположение об активации гена *MRPL37* в трансформированных клетках и возможном его участии в процессе пролиферации опухолевых клеток. Подтверждением данного предположения послужили результаты анализа уровня экспрессии *MRPL37* в нормальных и опухолевых клетках легкого человека, полученные с помощью ОТ-ПЦР (рис. 5). Из четырех образцов тканей, взятых от разных больных, три показали эффект увеличения уровня мРНК исследуемого гена в опухолевых клетках по сравнению с его экспрессией в клетках здоровых тканей.

Изменение экспрессии MRPL37 в клетках Hef p53^{-/-} на разных стадиях апоптоза

Тот факт, что сравнительный анализ аминокислотной последовательности *MRPL37* и белков, представленных в базах данных GenBank PDB и Fasta33, выявил гомологичный участок с проапоптозным митоторибосомным белком PDCD9, позволил предположить, что оба белка наделены сходными функциями, связанными либо с участием в синтезе митохондриальных белков, либо в процессе апоптоза. Чтобы проверить возможное участие гена *MRPL37* в процессе апоптоза, был проведен следующий эксперимент.

Известно, что удаление сыворотки (FCS) из среды для культивирования клеток вызывает их апоптоз [20, 21]. Этот факт мы использовали, чтобы проверить изменения в уровне экспрессии

гена *MRPL37* в процессе апоптоза. Для этого с помощью реакции ОТ-ПЦР в клетках, культивируемых в среде в отсутствие сыворотки в течение разных периодов времени анализировали уровень экспрессии гена. Результаты данного эксперимента (рис. 6) показали, что уровень экспрессии *MRPL37* тем больше, чем больше время культивирования клеток без FCS, то есть в процессе апоптоза уровень мРНК *MRPL37* в клетках растет. Таким образом, можно предположить, что активация *MRPL37* связана с его участием в процессе гибели клеток, вызванной удалением FCS из среды культивирования клеток Hef p53^{-/-}. При этом *MRPL37*, по-видимому, участвует в p53-независимом пути апоптоза, поскольку в клетках Hef отсутствует ген *p53*, то есть индукция апоптоза осуществляется в них по альтернативному, не связанному с функцией протонкогена p53-пути.

ВЫВОДЫ

В данной работе из кДНК-библиотеки активированных лимфоцитов человека была выделена кДНК, соответствующая гену *MRPL37*, кодирующему миторибосомный белок. Обнаружена гомология аминокислотной последовательности данного белка с проапоптозным белком PDCD9. Показано, что экспрессия *MRPL37* увеличивается на поздних стадиях апоптоза клеток Hef p53^{-/-}, то есть, по-видимому, *MRPL37*, так же как и *PDCD9*, вовлечен в процесс апоптоза. Кроме того, выявлен высокий уровень мРНК гена *MRPL37* в опухолевых клеточных линиях человека и его активация

в клетках опухолей легкого человека. На основании полученных данных сделано предположение о многофункциональности продукта гена *MRPL37*, который, по-видимому, помимо участия в синтезе митохондриальных белков, задействован в процессах опухолевой прогрессии и апоптоза, а также является мишенью для цитокинов. Выявление цитокинов – активаторов *MRPL37* и изучение сигнальных путей, в которых он принимает участие, является предметом будущих исследований.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали реактивы, соответствующие квалификации “ос.ч.” и “х.ч.”. Адапторы для амплификации кДНК-клонотеки были любезно предоставлены Лукьяновым С.А. (ИБХ РАН); клеточная линия человеческих эмбриональных фибробластов Hef p53^{-/-} – Чумаковым П.М. (ИМБ РАН); клеточные культуры Raji, Daudi, LFN, WI-38 – Дризе Н.Н. (Институт гематологии РАМН). [α -³²P]dATP была синтезирована в ИМБ РАН.

Прямая селекция кДНК. Прямая селекция кДНК была выполнена, как описано в работе [13], за исключением некоторых модификаций. В качестве геномной ДНК использовали YAC клон 131F1 (СЕРН), кДНК-библиотеку конструировали на основе РНК, выделенной из лимфоцитов человека, активированных конканавалином А. Полученную кДНК гидролизировали эндонуклеазой рестрикции *Hae*III и лигировали с адапторами:

(5') GAAGACGACAGAAAGGGCGTGACGCGTGCCCGGGCTGGT,
 (3') CTTCTGCTGTCAAACCCGCACTGCGCACGGGCCCCGACCA,
 (5') GCGTGAAGACGACAGAAAGTTCGACGCGTGCCCGGGCTGGT,
 (3') CGCTCTTCTGCTGTCTTTCAGCTGCGCACGGGCCCCGACCA.

Библиотеку кДНК амплифицировали с помощью двух этапов ПЦР со следующими праймерами на адаптор:

1 этап (внешние праймеры, 5' → 3')
 GAAGACGACAGAAAGGGCGT,
 GCGTGAAGACGACAGAAAGTC;
 2 этап (внутренние праймеры, 5' → 3')
 GCGTGACGCGTGCCCGGGCTGGT,
 AGTCGACGCGTGCCCGGGCTGGT.

Продукт ПЦР клонировали в модифицированный вектор pBluescript SKII+, из которого ранее нами был удален один из двух сайтов эндонуклеазы рестрикции *Bss*III (не опубликовано). Клонирование осуществляли по оставшемуся сайту эндонуклеазы рестрикции *Bss*III вектора и сайту эндонуклеазы рестрикции *Mlu*I адаптора, которые имеют одинаковые 5'-выступающие концы. Первичную структуру ДНК определяли, исполь-

зуя набор реактивов “Thermosequenase reaction kit” и термосеквеназу, любезно предоставленную Крамаровым В.М. (ИБХ РАН).

Саузерн-блот-анализ. Геномную ДНК выделяли из эмбриональных тканей человека и мыши по методике, описанной в работе [22]. Выделенную ДНК гидролизировали с помощью эндонуклеазы рестрикции *Eco*RI и переносили на мембрану Nybond N (Amersham) методом щелочного переноса,

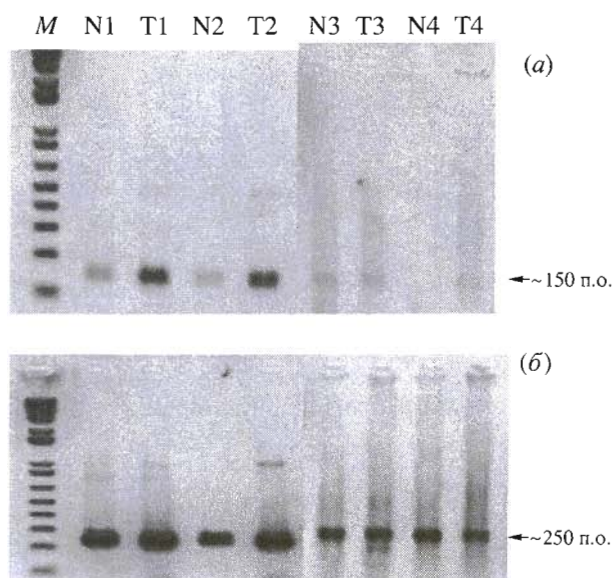
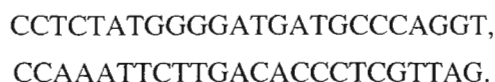


Рис. 5. ОТ-ПЦР-анализ экспрессии *MRPL37* (а) и контрольного гена *GAPDH* (б) в нормальных (N1–N4) и опухолевых (T1–T4) клетках легкого человека. М – ДНК-маркер “GeneRuler 100 bp DNA Ladder plus” (Fermentas). Одинаковые номера нормальных и опухолевых тканей соответствуют образцам, взятым у одного и того же пациента.

разработанным П. Хомчинским [23]. Иммуобилизованную ДНК гибридизовали с ПЦР-пробой, соответствующей кДНК1, меченной [α - 32 P]dATP. Для ПЦР использовали праймеры (5' \rightarrow 3'):



ДНК метили с помощью набора реактивов “HexaLabelTM DNA labeling kit” (Fermentas, Литва) и [α - 32 P]dATP (ИМБ РАН). Гибридизацию проводили в течение ночи при 65°C. Мембрану отмывали в растворе 2xSSC (0.15 M NaCl, 0.015 M цитрата натрия, pH 7.6), 0.1% SDS (додецилсульфата натрия) при 60°C в течение 30 мин и в растворе 0.1xSSC, 0.1% SDS при 60°C в течение 30 мин и после высушивания радиоавтографировали.

Нозерн-блот-анализ. Тотальную РНК выделяли из эмбриональных тканей и клеточных культур экстракцией кислым фенолом [19]. К образцам РНК (10 мкг) добавляли 20 мкл буфера (0.72 мл формамида, 0.16 мл 10xMOPS (Sigma), 0.26 мл формальдегида (37%), 0.1 мл 80% глицерина, 0.18 мл H₂O, 0.08 мл насыщенного раствора бромфенолового синего). Электрофорез проводили в 1% агарозном геле, к 100 мл которого добавляли 7.5 мл формальдегида в 1xMOPS-буфере. Перенос РНК на мембрану осуществляли по протоколу щелочного переноса [23]. В качестве пробы использовали продукт ПЦР клона кДНК1, полученный с праймерами (5' \rightarrow 3'):

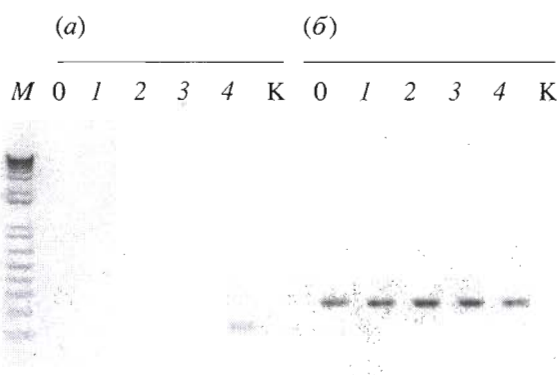
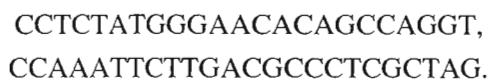


Рис. 6. Сравнение уровня экспрессии *MRPL37* (а) и *GAPDH* (б) в клетках Hef p53^{-/-}, культивируемых в среде с 10% FCS (0 ч), с его экспрессией в клетках, культивируемых в среде без FCS в течение 24 (1), 48 (2), 72 (3) и 96 ч (4). К – отрицательный контроль ПЦР.



Для гибридизации с РНК мыши использовали пробу, гомологичную кДНК1, полученную с помощью ОТ-ПЦР на матрице РНК из сердца мыши. Для ОТ-ПЦР использовали праймеры (5' \rightarrow 3'):



Пробы метили с помощью [α - 32 P]dATP и набора реактивов “HexaLabelTM DNA labeling kit”.

Для гибридизации с 18S-РНК использовали праймер, меченный [γ - 32 P]АТФ с помощью полинуклеотидкиназы фага Т4 (Fermentas). Структура праймера:



Предгибридизацию и гибридизацию проводили в течение ночи при 45°C в растворе: 5xSSC, 5x раствор Денхардта, 0.5% SDS, 150 мкг/мл ДНК из спермы лосося, 30 mM Na₂HPO₄, 5 mM EDTA, 50% формамид. Гибридизацию с меченым праймером проводили в том же растворе при 40°C. После отмывки неспецифически гибридизовавшейся пробы в растворах 2xSSC, 0.1% SDS при 50°C в течение 20 мин и затем в 0.1xSSC, 0.1% SDS при 50°C в течение 30 мин высушенный фильтр радиоавтографировали.

ОТ-ПЦР-анализ. Реакцию обратной транскрипции (ОТ) проводили с использованием праймера (dT)₂₀. Смесь 2 мкг РНК и 20 пкмоль праймера в 6 мкл прогревали при 70°C в течение 5 мин и после охлаждения во льду добавляли 4 мкл 5-кратного реакционного буфера [22], 1.25 мкл каждого dNTP (10 mM), 1 мкл обратной транскриптазы M-MLV (200 ед./мкл) (Fermentas) и воды до конечного объема 20 мкл. Смесь инкубировали 1 ч при 42°C. По окончании реакции смесь прогревали при 85°C 5 мин и разводили водой до конечного объема 300 мкл. В реакции ОТ-ПЦР использовали 3 мкл ОТ-смеси. Праймеры для ОТ-ПЦР

использовали той же структуры, что и для нозерн-блот-анализа.

Культуры клеток. Клетки Hef p53^{-/-}, LEH, WI-38 культивировали в среде DMEM (Gibco BRL) в присутствии 10% эмбриональной телячьей сыворотки (FBS, Gibco BRL).

Клетки Raji, Daudi, MT4 культивировали в среде RPMI (Gibco BRL) в присутствии 10% FBS (Gibco BRL).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Chesnick J.M., Goff M., Graham J., Ocampo C., Lang B.F., Seif E., Burger G. // Nucl. Acids Res. 2000. V. 28. P. 2512–2518.
2. Kenmochi N., Suzuki T., Uechi T., Magoori M., Kuni-ba M., Higa S., Watanabe K., Tanaka T. // Genomics. 2001. V. 77. P. 65–70.
3. Cavdar Koc E., Ranasinghe A., Burkhart W., Blackburn K., Koc H., Moseley A., Spremulli L.L. // FEBS Lett. 2001. V. 492. P. 166–170.
4. Igney F.H., Krammer P.H. // Nat. Rev. Cancer. 2002. V. 2. P. 277–288.
5. Hager J.H., Hanahan D. // Ann. N. Y. Acad. Sci. 1999. V. 887. P. 150–163.
6. Chang H.Y., Yang X. // Microbiol. Mol. Biol. Rev. 2000. V. 64. P. 821–846.
7. Hengartner M.O. // Nature. 2000. V. 407. P. 770–776.
8. Kissil J.L., Deiss L.P., Bayewitch M., Raveh T., Khaspek-ov G., Kimchi A. // J. Biol. Chem. 1995. V. 270. P. 27932–27936.
9. Kissil J.L., Cohen O., Raveh T., Kimchi A. // EMBO J. 1999. V. 18. P. 353–362.
10. Carim L., Sumoy L., Nadal M., Estivill X., Escarcel-ler M. // Cytogenet. Cell Genet. 1999. V. 87. P. 85–88.
11. Sun L., Liu Y., Fremont M., Schwarz S., Siegmann M., Matthies R., Jost J.P. // Gene. 1998. V. 208. P. 157–166.
12. Parimoo S., Patanjali S.R., Shukla H., Chaplin D.D., Weissman S.M. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1991. V. 88. P. 9623–9627.
13. Parimoo S., Patanjali S.R., Kolluri R., Xu H., Wei H., Weissman S.M. // Anal. Biochem. 1995. V. 228. P. 1–17.
14. Sai Ram M., Neetu D., Yogesh B., Anju B., Dipti P., Pauline T., Sharma S. K., Sarada S. K., Ilavazhagan G., Kumar D., Selvamurthy W. // J. Ethnopharmacol. 2002. V. 81. P. 5–10.
15. Streetz K.L., Klein C., Manns M.P., Trautwein C. // Cell. Mol. Biol. 2001. V. 47. P. 661–673.
16. Trautwein R.T., Brenner D.A., Streetz K., Licato L., Manns M.P., Tiegs G. // Gastroenterology. 1998. V. 114. P. 1035–1045.
17. Frohman M.A. // Methods Enzymol. 1993. V. 218. P. 340–356.
18. Kopantsev E.P., Nesterova T.B., Borodin A.M., Zaki-ian S.M. // Genetika. 1993. V. 29. P. 1440–1452.
19. Chomczynski P. // BioTechnique. 1993. V. 15. P. 532–537.
20. Rodriguez-Lopez A.M., Martinez-Salgado C., Eleno N., Lopez-Novoa J.M., Arevalo M. // Microvasc. Res. 2000. V. 59. P. 80–87.
21. Reinprecht K., Crailsheim K., Windisch M. // J Neural Transm. Suppl. 1998. V. 53. P. 373–384.
22. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. // Molecular Cloning. A Laboratory Manual. Second Ed. Cold Spring Harbor, N.Y.; Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
23. Chomczynski P. // Anal. Biochem. 1992. V. 201. P. 134–139.

The Structure and Specific Features of the cDNA Expression of the Human Gene *MRPL37*

E. V. Levshenkova, K. E. Ukraintsev, V. V. Orlova, R. A. Alibaeva,
I. E. Kovriga, O. Zhugdernamzhilyn, and E. I. Frolova[#]

[#]Phone: +7 (095) 330-6656; e-mail: eifr@ibch.ru

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

A 147-bp cDNA fragment was isolated from human lymphocytes activated with concanavalin A using the method of direct selection. A complete copy of the selected gene having total homology with the mitochondrial ribosomal gene *MRPL37* was obtained by the RACE (rapid amplification of cDNA ends) technique. The *MRPL37* gene was localized on human chromosome 1 using a DNA panel composed of somatic cellular human–hamster hybrids. The Northern blotting and RT–PCR (reverse transcription–polymerase chain reaction) demonstrated that the RNA of the human *MRPL37* gene is widely represented in the lymphoma populations of Raji B cells and MT4 T cells, as well as in pancreas, liver, and lung embryonic fibroblasts WI-38 and LEH. The highest expression level of the *MRPL37* mouse homologue was found in the cells of skeletal muscles, the heart, and organs of reproductive system: the uterus, ovaries, and testicles. A comparative analysis of the *MRPL37* amino acid sequence with those of proteins represented in the Fasta33 and GenBank databases showed a homologous region in *MRPL37* and *PDCD9* (programmed cell death 9, *MPRS30*) proteins. The chicken homologue of *PDCD9* is interesting because its overexpression causes apoptosis of the mouse fibroblasts C3H10T1/2. The existence of a common domain indicates possible similar functional peculiarities of the *PDCD9* and *MRPL37* genes and may imply the *MRPL37* involvement in the process of apoptosis. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2004, vol. 30, no. 5; see also <http://www.maik.ru>.

Key words: apoptosis, human chromosome 1, mitochondrial ribosomal proteins, *MRPL37* gene