

## ИДЕНТИФИКАЦИЯ И ЭКСПРЕССИЯ НОВОГО БЕЛКА ГАПОНИНА ИЗ КЛЕТОК ЛИНИИ HL-60

© 2007 г. А. В. Вонаршенко\*, В. В. Радченко<sup>#</sup>, М. В. Гапон\*, И. Л. Родионов<sup>\*\*</sup>, И. И. Бабиченко<sup>\*\*\*</sup>, Д. Л. Какуев\*, И. Д. Артамонов\*, А. В. Гарковенко\*, Л. Г. Дьячкова\*, В. М. Липкин\*, И. А. Костанян\*

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

\*\*Филиал Института биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,  
г. Пущино Московской обл.;

\*\*\*Российский университет дружбы народов, Москва

Поступило в редакцию 19.04.2007 г. Принято к печати 05.06.2007 г.

В клетках линии промиелоцитарного лейкоза человека HL-60 обнаружен новый белок гапонин (*haponin* – **HLDF-alike protein**), иммунореактивный с поликлональными антителами к фактору дифференцировки клеток HL-60. Определение частичной структуры белка позволило выявить иммунногенный пептид, на основании аминокислотной последовательности которого были синтезированы вырожденные праймеры, позволившие клонировать полноразмерную кДНК гапонина. Получена устойчивая гетерологическая экспрессия этой кДНК в клетках *E. coli* штамма Rosetta<sup>TM</sup>. Препараты природного и рекомбинантного белка давали перекрестную иммунохимическую реакцию с полученными на иммунногенный пептид антителами.

**Ключевые слова:** гапонин (*haponin* – **HLDF-alike protein**), клетки линии HL-60, HLDF, эукариотический фактор инициации трансляции *eIF1a*, фактор транскрипции *STAT1*.

Ранее из клеток линии промиелоцитарного лейкоза человека HL-60, индуцированных ретиноевой кислотой, был выделен и охарактеризован эндогенный фактор дифференцировки HLDF [1]. В составе белка было обнаружено два биологически активных фрагмента: RRWHRLKE, обладающий ДНК-гидролизующей активностью, и TGENHR, полностью воспроизводящий дифференцирующую активность полноразмерного HLDF на клетках HL-60 [2, 3]. Нуклеотидная последовательность кДНК HLDF имеет значительную гомологию со структурой кДНК рибосомного белка S21 (RPS21), а мРНК HLDF возникает в результате абнормального сплайсинга и редактирования мРНК гена RPS21 [2].

В процессе поиска гена фактора HLDF в геноме клеток HL-60 был обнаружен псевдоген, нуклеотидная последовательность которого кодирует белок, высокоомологичный HLDF. В

---

Сокращения: HLDF и HLDF $\beta$  – факторы дифференцировки клеток HL-60; eIF1a – эукариотический фактор инициации трансляции 1a; STAT1 – сигнальный переносчик и активатор транскрипции 1, ПЦР – полимеразная цепная реакция.

<sup>#</sup> Автор для связи (тел.: (095) 336-5111; факс: (095) 336-6166; эл. почта: [radchenko@mail.ibch.ru](mailto:radchenko@mail.ibch.ru)).

отличие от HLDF, у этого белка, названного HLDF $\beta$ , отсутствует ДНК-гидролизующий фрагмент, последовательность которого заменена на последовательность RPMASLQK, но сохраняется второй, дифференцирующий фрагмент. Белок был синтезирован твердофазным методом [4]. Оказалось, что HLDF $\beta$ , как и фактор дифференцировки HLDF, обладает дифференцирующей активностью при действии на клетки HL-60, поскольку содержит дифференцирующий фрагмент TGENHR. Однако, в отличие от фактора дифференцировки, он не способен деструктурировать нуклеиновые кислоты и не обладает цитотоксической активностью при действии на интактные клетки HL-60. Наоборот, при трансфекции его внутрь клеток HL-60 с помощью унифектина [5] происходит возрастание пролиферации. На HLDF $\beta$  были получены поликлональные антитела, которые, хотя и взаимодействовали с фактором дифференцировки HLDF в опытах *in vitro* (ELISA, иммуноблоттинг), при иммуногистологическом окрашивании клеток HL-60 проявляли другой тип окрашивания. Если антитела к HLDF специфически окрашивали цитоплазматическую мембрану и ядро клеток линии HL-60, введенных в апоптоз или индуцированных к дифференцировке [6], то антитела к HLDF $\beta$  окрашивали наряду с цитоплазматической мембраной еще и крупные органеллы – митохондрии, но не окрашивали ядро клеток. Такое различие в специфичности окрашивания подтверждается расчетами по методу анализа информационной структуры, позволяющему выделять иммуногенные участки в полипептидной цепи [7]. Используя антитела на HLDF $\beta$ , было решено проверить, экспрессируется ли в клетках белок, кодируемый нуклеотидной последовательностью псевдогена, или же антитела взаимодействуют с каким-то другим белком.

Целью данного исследования было выделение из митохондрий клеток HL-60, природного белка, иммунореактивного к полученным антителам, а также его характеристика и экспрессия.

Выделение белка из митохондрий клеток HL-60 осуществляли с помощью аффинной хроматографии на колонке Sepharose 4B с иммобилизованными антителами к HLDF $\beta$ . Выделенные митохондрии предварительно солибилизировали 1% октилгликозидом. Электрофоретический анализ фракции, полученной после аффинной хроматографии, показал ее неоднородность: она содержала три полосы, электрофоретическая подвижность которых соответствовала ~30, ~20 и ~6 кДа. Но только белки с молекулярной массой ~20 и ~6 кДа давали положительную реакцию с антителами на HLDF $\beta$ . Автоматическая деградация по методу Эдмана препаратов этих белков, предварительно перенесенных с помощью электроблоттинга на поливинилдендифторидную мембрану (PVDF), показала, что N-конец ~20 кДа-белка закрыт, а пептид с  $M \sim 6$  кДа имеет N-концевую последовательность VDPHEEGEKVKA. Эта последовательность отсутствовала как в HLDF, так и в HLDF $\beta$ .

Пептид VDPIEEGEKV был синтезирован и на него были получены поликлональные антитела кролика. Эти антитела специфически выявляли только одну полосу с молекулярной массой ~20 кДа на электрофореграмме общего белкового экстракта клеток линии HL-60, а также на иммуноблоте солюбилизата митохондрий. Очевидно, что выделенный нами пептид с  $M \sim 6$  кДа является продуктом ограниченного протеолиза белка с молекулярной массой ~20 кДа.

При помощи синтезированных комплиментарных друг другу вырожденных праймеров на нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид VDPIEEGEKV, а также прямого и обратного праймеров на последовательности, фланкирующие область гетерогенных кДНК-вставок вектора рACT2, в библиотеке тотальной кДНК из клеток линии HL-60 на основе вектора рACT2 (библиотека была создана в нами ранее [6]) был получен фрагмент кДНК. Этот фрагмент кДНК кодировал белок с  $M \sim 20$  кДа, состоящий из 165 а. о. (рис. 1). В его состав входил пептид VDPIEEGEKVKA. Этот белок был нами назван гапонин (haponin –**HLDF**-**alike protein**).

С использованием праймеров на концевые области фрагмента ДНК, соответствующего полноразмерному гапонину (см. рис. 1), в ходе ПЦР был получен фрагмент размером ~ 500 п. о., который был последовательно клонирован в Т-вектор pGEM<sup>®</sup>-T Easy (Promega, США), а затем в вектор для экспрессии рЕТ11-а(+) (Novagen, США) по сайтам NdeI–BamHI. В качестве прямого праймера использовали (5') TAC CAT ATG TCT CAG GCC ACC AAG AGG AAG C (подчеркнут сайт расщепления рестриктазой NdeI, жирным шрифтом выделен стартовый ATG-кодон), в качестве обратного – (5') TCT GGA TCC TCA GGC TGC CTC CTC CTC TTC ACT C (подчеркнут сайт рестриктазы BamHI, жирным шрифтом выделен терминирующий TAG-кодон).

Полученный рекомбинантный гапонин был очищен в две стадии с использованием гель-фильтрации и ионообменной хроматографии. Препарат рекомбинантного гапонина давал положительную иммунохимическую реакцию с поликлональными антителами на синтетический пептид VDPIEEGEKV, он, так же как и природный гапонин, выявлялся в виде уникальной полосы с  $M \sim 20$  кДа (рис. 2). Кроме того, рекомбинантный белок окрашивался в иммуноблоте и антителами, полученными на HLDF $\beta$ , что объясняется наличием общей антигенной детерминанты SLQK в этих белках. Кроме этой короткой последовательности, гомологии в структурах гапонина и HLDF $\beta$  выявлено не было (рис. 1). С другой стороны, анализ последовательности кДНК гапонина показал гомологию с представителями семейства рибосомальных белков eS21 млекопитающих, эукариотическим фактором инициации трансляции eIF1a и полную идентичность с последовательностью кДНК гипотетического белка человека MGC11102 (PubMed Accession number EAW74481), одного из вероятных партнеров

взаимодействия в двугибридной системе с фактором транскрипции STAT1 [8, 9], важнейшим белком регуляции гомеостаза клеток иммунной системы, и в первую очередь Т-лимфоцитов [10].

Данная работа выполнялась при финансовой поддержке гранта Международного научно-технического центра (проект 2641) и гранта Российской академии наук по молекулярной и клеточной биологии.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Костанян И.А., Астапова М.В., Старовойтова Е.В., Драницына С.М., Липкин В.М.* // Биоорганическая химия 1995. Т. 21. С. 243–248.
2. *Dranitsyna S.M., Kostanian I.A., Andreeva S.G., Astapova M.V., Babichenko I.I., Baeva O.V., Bogachuk A.P., Molotkovskaia I.M., Rodionov I.L., Smirnova E.V., Lipkin V.M.* // Russ. J. Bioorgan. Chem. 2000. V. 26. P. 306–316 (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. // Биоорганическая химия. 2000. Т. 26. С. 340–351).
3. *Kostanian I.A., Astapova M.V., Navolotskaia E.V., Lepikhova T.N., Dranitsyna S.M., Telegin G.B., Rodionov I.L., Baidakova L.K., Zolotarev Iu.A., Molotkovskaia I.M., Lipkin V.M.* // Russ. J. Bioorg. Chem. 2000. V. 26. P. 450–456 (Костанян И.А., Астапова М.В., Наволоцкая Е.В., Лепихова Т.Н., Драницына С.М., Телегин Г.Б., Родионов И.Л., Байдакова Л.К., Золотарев Ю.А., Молотковская И.М., Липкин В.М. // Биоорганическая химия. 2000. Т. 26. С. 505–511).
4. *Baidakova L.K., Rodionov I.L., Kostanyan I.A., Lipkin V.M., Ivanov V.T.* // Peptide Revolution: Genomics, Proteomics & Therapeutics / Eds Chorev M., Sawyer T.K. American Peptide Society, 2003. P. 371–372.
5. *Flechsler I., Surovoy A., Charisse K., Bayer E., Jung G.* // Adv. Exp. Med. Biol. 1998. V. 451. P. 469–472.
6. *Smirnova E.V., Garkovenko A.V., Rakitina T.V., Berezhnoi S.N., Astapova M.V., Surina E.A., Babichenko I.I., Kostanian I.A., Lipkin V.M.* // Russ. J. Bioorg. Chem. 2004. V. 30. P. 114–123 (Смирнова Е.В., Гарковенко А.В., Ракитина Т.В., Бережной С.Н., Астапова М.В., Сурина Е.А., Бабиченко И.И., Костанян И.А., Липкин В.М. // Биоорганическая химия. 2004. Т. 30. С. 130–140).
7. *Alekseeva L., Nekrasov A., Marchenko A., Shevchenko M., Benevolenskii S., Sapozhnikov A., Kurup V.P., Svirshchevskaya E.* // Vaccine. 2007. V. 25. P. 2688–2697.
8. *Rual J.F., Venkatesan K., Hao T., Hirozane-Kishikawa T., Dricot A., Li N., Berriz G.F., et al.* // Nature. 2005. V. 437. P. 1173–1178.
9. *Gil M.P., Salomon R., Louten J., Biron C.A.* // Blood. 2006. V. 107. P. 987–993.
10. *Stephanou A., Latchman D.S.* // Int. J. Exp. Pathol. 2003. V. 84. P. 239–244.

TCTTCGTTTCCTAACCCAGTGTGGGACGACTTCAGC<sup>-1</sup>

ATGTCTCAGGCCACCAAGAGGAAGCATGTGGTGAAGGAGGTGCTAGGGGAGCAC  
 M S Q A T K R K H V V K E V L G E H

ATAGTGCCCTCCGACCAGCAGCAGATTGTCAGGGTACTCAGGACCCCAGGGAAC  
 I V P S D Q Q Q I V R V L R T P G N

AATCTGCATGAGGTGGAGACAGCCCAAGGGCAGCGCTTCCTGGTGAGCATGCC  
 N L H E V E T A Q G Q R F L V S M P

TCCAAATACCGCAAGAACATCTGGATCAAGAGAGGGGACTTTCTCATTGTTGAC  
 S K Y R K N I W I K R G D F L I V D

CCCATTGAAGAGGGAGAAAAGGTGAAGGCTGAAATCTCGTTTGTGCTCTGCAAG  
P I E E G E K V K A E I S F V L C K

GACCACGTGCGCTCTCTGCAGAAGGAGGGGTTTTGGCCTGAGGCCTTCTCTGAA  
 D H V R S L Q K E G F W P E A F S E

GTGGCTGAGAAAACAACAACAGGAACAGACAAACTCAACCAGAACTCCCAGCT  
 V A E K H N N R N R Q T Q P E L P A

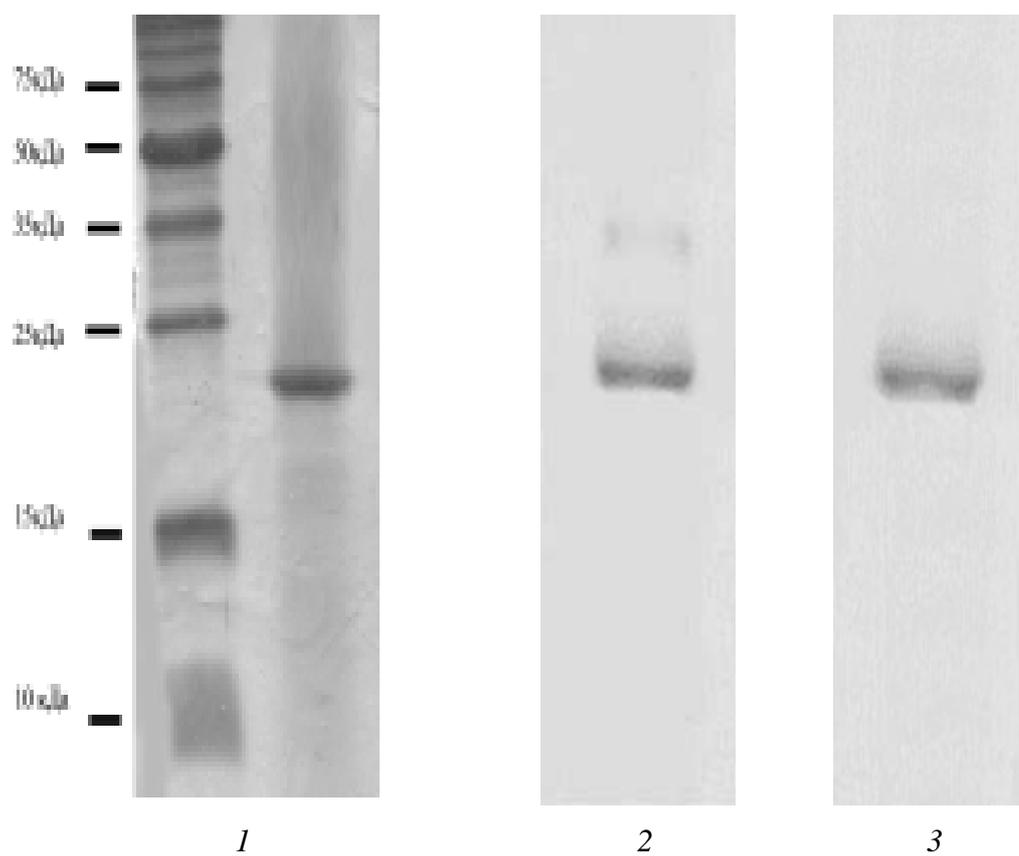
GAGCCACAGTTATCAGGAGAGGAGTCCAGCTCAGAAGATGATTCTGACCTGTTT  
 E P Q L S G E E S S S E D D S D L F

GTTAACACAAACCGCAGACAGTATCATGAGAGTGAGGAGGAGAGTGAAGAGGAG  
 V N T N R R Q Y H E S E E E S E E E

GAGGCAGCCTGA<sup>489</sup>GACTCCAGGACCCAATTCTCCACTTGCTCAGGGACTGGCCCC  
 E A A &

TGGCTCTTCTGGGCTTGGACATTCCCAGGGTGCTCTGCACATCTTCACCCCTGC  
 ATGAGGACAAAGCAGGGCACSTCTCTGAACTGATCTTTTGATTCAGAGAAATTA  
 ACCCCTGGTG<sup>649</sup>-----GTATAAAATGTTAGATTAAAAAAAAAAAAAAAAAG<sup>2011</sup>

**Рис. 1.** Нуклеотидная последовательность кДНК и выведенная аминокислотная последовательность белка гапонина. Подчеркнута последовательность, соответствующая структуре пептида с *M* 6 кДа, выделенного из митохондрий клеток HL-60, а также праймеры, используемые для создания экспрессирующей конструкции. Взята в рамку последовательность, идентичная последовательности HLDFβ.  
& – сигнал терминации трансляции.



**Рис. 2.** SDS-Электрофорез (1) и иммуноблоттинг (2, 3) фракции белка гапонина после ионообменной хроматографии на колонке MONO Q. 1 – электрофорез в 15% ПААГ; 2 – иммуноблоттинг с использованием поликлональных антител на HLDF $\beta$ ; 3 – иммуноблоттинг с использованием поликлональных антител на синтетический пептид VDPIEEGEKVKA.