



УДК 577.112.5

НОВЫЙ ФАКТОР ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ ИЗ КУЛЬТУРАЛЬНОЙ СРЕДЫ КЛЕТОК ЛИНИИ HL-60, ОБРАБОТАННЫХ РЕТИНОВОЙ КИСЛОТОЙ. ВЫДЕЛЕНИЕ И ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПЕРВИЧНОЙ СТРУКТУРЫ

© 1995 г. И. А. Костянян, М. В. Астапова, Е. В. Старовойтова,
С. М. Драницына, В. М. Липкин*

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

Поступила в редакцию 07.07.94 г.

Из культуральной среды промиелоцитарной лейкемической клеточной линии HL-60 выделен новый белковый фактор с молекулярной массой 8.2 кДа, обладающий дифференцирующей активностью по отношению к исходной клеточной линии. Путем параллельного анализа аминокислотной последовательности белка и нуклеотидной последовательности соответствующей кДНК определена первичная структура фактора. Молекула фактора дифференцировки, секретируемого клетками линии HL-60, содержит 54 аминокислотных остатка и гликозилирована.

Ключевые слова: HL-60, фактор дифференцировки, ретиновая кислота.

Поиск новых белковых факторов, останавливающих злокачественный рост опухолевых клеток и вызывающих их дифференцировку, – одна из важнейших задач современной биоорганической химии. Промиелоцитарная лейкемическая клеточная линия HL-60, полученная из крови больного острым лейкозом, является удобной моделью для изучения процессов дифференцировки. В зависимости от используемого индуктора эти клетки могут дифференцироваться в различные типы клеток миелоидного ряда, теряя при этом способность к неограниченному росту. Такие агенты, как диметилсульфоксид [1, 2], ретиновая кислота [3 - 5], вызывают дифференцировку клеток линии HL-60 в гранулоциты, а витамин D₃ [6, 7] и форболовые эфиры [8, 9] – в моноцит/макрофагоподобные клетки.

Ранее было показано, что в ходе дифференцировки клеток HL-60 под воздействием ретиновой кислоты в среде культивирования наряду с известными цитокинами, такими, как фактор некроза опухоли [10] и различные интерлейкины [11, 12], накапливаются не изученные до сих пор пептидно-белковые факторы, обладающие способностью вызывать дифференцировку исходной клеточной линии HL-60 по гранулоцитарному пути [13].

Нами был выделен и охарактеризован новый фактор дифференцировки с молекулярной массой 8.2 кДа.

Для облегчения выделения этого белкового фактора клетки HL-60 были адаптированы к росту на бессывороточной среде. Было установлено, что дифференцирующий эффект ретиновой кислоты одинаков как для адаптированных клеток HL-60, так и для клеток, культивируемых в среде с 10% эмбриональной сывороткой теленка.

К среде культивирования адаптированных клеток HL-60, обработанных ретиновой кислотой, добавляли сульфат аммония до 70% насыщения при 4°C (pH 7.0). Осажденный материал разделяли с помощью гель-фильтрации на колонке Toyopearl HW55; в результате получено 5 фракций, обладающих дифференцирующей активностью (рис. 1).

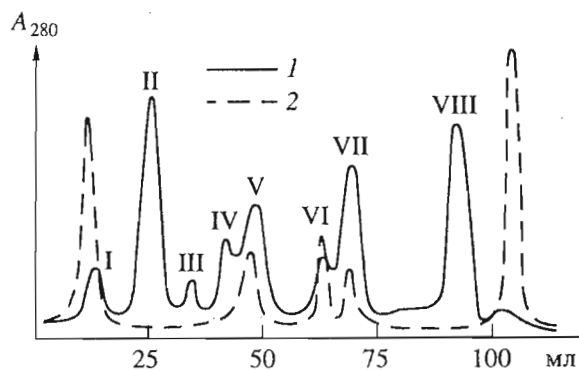


Рис. 1. Гель-фильтрация на колонке Toyopearl HW55: 1 – поглощение при длине волны 280 нм, 2 – дифференцирующая активность.

Принятые сокращения: NBT – нитроголубой тетразолий, SDS – додецилсульфат натрия.

* Автор для переписки.

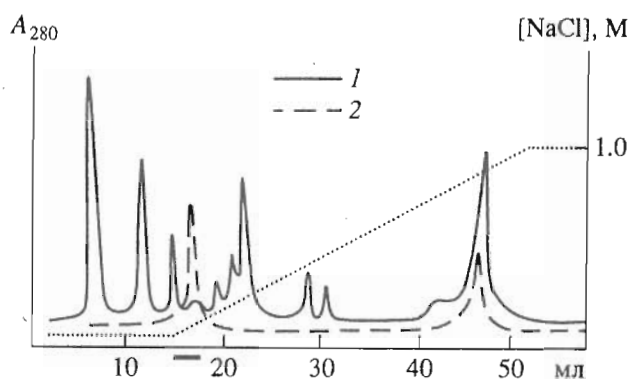


Рис. 2. Ионнообменная хроматография на колонке Mono Q фракции I рис. 1: 1 – поглощение при длине волны 280 нм, 2 – дифференцирующая активность.

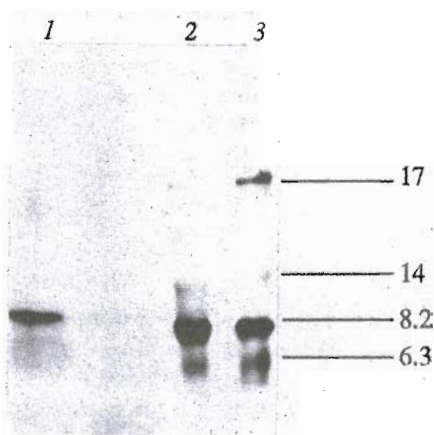


Рис. 3. SDS-электрофорез фракции, обладающей максимальной дифференцирующей активностью после ионнообменной хроматографии на колонке Mono Q (отмечена на рис. 2) (1), и препаратов, содержащих низкомолекулярные белковые стандарты (2, 3). Цифры справа означают молекулярную массу (кДа).

Фракцию I, имеющую максимальную удельную активность, диализовали и подвергли ионнообменной хроматографии на анионообменнике Mono Q при pH 9.2 в градиенте концентрации хлористого натрия (рис. 2). Дифференцирующая активность обнаруживалась в элюате при концентрации NaCl, равной 0.05 М. Электрофорети-

ческий и N-концевой аминокислотный анализы полученной фракции показали, что она содержит электрофоретически индивидуальный белок с молекулярной массой 8.2 кДа (рис. 3). Для подтверждения того, что этот белок является новым фактором дифференцировки, участок геля, содержащий белок с M 8.2 кДа, вырезали и белок экстрагировали буфером, содержащим 1% SDS и 0.15 М NaCl. После удаления детергента диализом полученную фракцию стерилизовали и проверяли на дифференцирующую активность с помощью NBT-теста [14]. В табл. 1 представлены выход и удельная активность фактора дифференцировки на разных стадиях выделения. Дифференцирующая активность исследуемого белка соотносилась со способностью снижать общий уровень пролиферации, определяемой по включению в клетки [^3H]тимидина [15] (табл. 2).

Для определения N-концевой последовательности белка был проведен электрофорез в ПААГ в присутствии SDS и белковую зону с молекулярной массой 8.2 кДа переносили на поливинилдендифторидную мембрану (иммобилон) с последующим анализом иммобилизованного белка на твердофазном секвенаторе (Applied Biosystems, США). При этом удалось определить последовательность девяти N-концевых аминокислотных остатков: Ala-Gly-Ile-Met-Ala-Ser-Leu-Leu-Lys-.

Чтобы получить дополнительную информацию о структуре молекулы фактора дифференцировки, были предприняты попытки расщепить ее с помощью трипсина, химотрипсина и лизилэндопептидазы. Однако молекула этого белка оказалась устойчивой к действию протеолитических ферментов в стандартных условиях. По-видимому, этот факт связан со значительной степенью гликозилирования данного белка. Действительно, с помощью углеводного анализа было показано, что исследуемый белок – гликопротеин, однако вследствие малого количества доступного материала полный углеводный состав белка определить пока не удалось.

Для определения полной первичной структуры белка был применен генно-инженерный подход.

Таблица 1. Выход и удельная активность фактора дифференцировки на разных стадиях выделения

Стадия выделения	Белок, мг	Полная активность, ед. акт.	Выход, %	Удельная активность, ед. акт./мг	Степень очистки
Культуральная среда	600	300	100	0.5	1
Высаливание сульфатом аммония	200	150	50	0.75	1.5
Хроматография, Тоуо-pearl HW55	0.5	75	10	150	300
Хроматография, Mono Q	0.024	4.8	0.6	2000	4000

Исходя из структуры N-концевого пептида были синтезированы следующие олигодезоксирибонуклеотидные зонды*:

(5') GCC GGA ATC ATG GCC AG (I)

(5') GCT GG_T^G ATT ATG GC_T^G AG (II)

(5') CT_T^G GCC ATG AT_T^G CCG GC (III)

При выведении нуклеотидной последовательности зондов учитывали частоту встречаемости кодонов в известных на сегодняшний день структурных генах белков человека, а также применяли подход, основанный на гипотезе неоднозначного соответствия [16].

Была создана клонотека кДНК дифференцированных клеток линии HL-60. В качестве затравки при синтезе кДНК использовали статистическую смесь гексадезоксирибонуклеотидов.

Синтезированную кДНК клонировали в плазмидный вектор pSpb5 по сайту рестриктазы *Sma*I. Полученная клонотека кДНК представительностью 3×10^5 рекомбинантов скринировалась ³²P-мечеными синтезированными зондами.

В результате скрининга было найдено пять клонов, давших положительный сигнал гибридизации. Два из них (Н7 и Е8) использовали для определения нуклеотидных последовательностей клонированных вставок (рис. 4).

Результаты определения нуклеотидной последовательности показали, что клон Н7 содержал полноразмерную кДНК изучаемого белка, включающую 5'-нетранслируемую область, кодирующую часть и следующую за ней 3'-нетранслируемую область. Клон Е8 включал фрагмент кодирующей области нуклеотидной последовательности длиной 94 п. о. и часть 3'-нетранслируемой области (78 п. о.).

На рис. 5 представлена нуклеотидная последовательность кДНК белка дифференцировки с М 8.2 кДа (регистрационный номер EMBL-банка данных X79563). Фрагмент этой последовательности (190 - 216) кодирует структуру N-концевого пептида. В области, предшествующей этому фрагменту, находятся два триплета АТГ: один в положении 61 - 63 - это первый АТГ-кодон, следующий после нонсенс-кодона TAG (16 - 18), в той же рамке считывания, что и полипептидная цепь белка, другой - в положении 158 - 160. Каждый из этих триплетов может выполнять роль иницилирующего кодона. Для точки инициации трансляции предпочтительно некоторое специфическое окружение: наличие пурина в положении -3, G в положениях -6 и -9, а также А и С в позициях -1, -2, -4, -5 [17 - 19]. Кроме того, показано, что инициация трансляции преимущественно проис-

* Префикс "d" опущен.

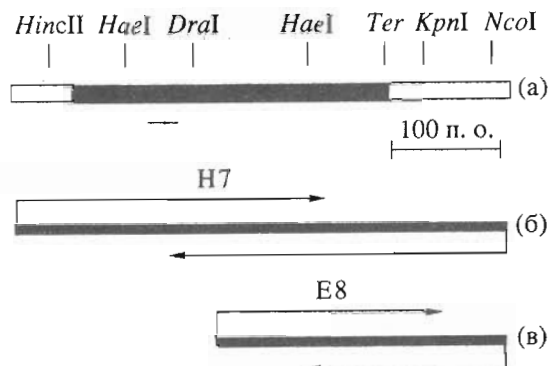


Рис. 4. Рестриктная карта кДНК белка дифференцировки с М 8.2 кДа (а) и стратегия определения нуклеотидной последовательности кДНК клонов Н7 (б) и Е8 (в). Стрелками над фрагментами кДНК показаны направления и протяженность секвенирования. Подчеркнут участок, отвечающий положению нуклеотидных зондов, использованных для скрининга клонотеки кДНК.

ходит с первого АТГ-кодона, если он удален от начала 5'-концевой области мРНК хотя бы на 12 нуклеотидов. Из двух АТГ-кодонов первый имеет окружение, наиболее удовлетворяющее перечисленным особенностям. Можно предположить, что инициация трансляции осуществляется именно с этого кодона. За кодоном ААА (349 - 351), кодирующим остаток Lys, следует терминирующий кодон ТАА (352 - 354). На участках 350 - 355 и 346 - 351 находятся последовательности ААТААА, каждая из которых может быть возможным сайтом полиаденилирования.

N-Концевой аминокислотный остаток аланина в структуре, выведенной из нуклеотидной последовательности кДНК, удален от, возможно, иницилирующего метионина на 42 аминокислоты. Это позволяет сделать предположение, что после синтеза белок подвергается протеолитическому процессингу, аналогично тому, что было описано при изучении человеческого секреторного

Таблица 2. Дифференцирующая активность исследуемого белка в NBT-тесте и способность подавлять пролиферацию, определяемая по включению в клетки [³H]тимидина

Тестируемое вещество	Включение [³ H]тимидина в клетки, %	Увеличение числа NBT-положительных клеток, %
Контроль (нестимулированные клетки)	100	--
Фактор дифференцировки с М 8.2 кДа (10 ⁻⁸ М)	66	32
Ретиноевая кислота (10 ⁻⁶ М)	30	60

```

1  tgcaggtgacgactctagaggatcccccgcggtgtggtggcagcaggcgcacggatcga
61  ATGCAGAACGACGCCGGGAGTTTCGTGGACCTGTACGTGCCCGGAAATGCTCCGCTAGC
1  M Q N D A G E F V D L Y V P R K C S A S
121  AATCGCATCATCGGTGCCAAGGACCACGCATCCATCCAGATGAACGTGGCCAGGTTGACA
21  N R I I G A K D H A S I Q M N V A R L T
181  AGGTCACAGGCAGGTATAATGGCCAGTTTACTTAAAATGCTATCTGCGGGGCCATTCGTA
41  R S Q A G I M A S L L K M L S A G P F V
241  GGATGGGTGAGTCAGATGATTCCATTCTCCGATTGGCCAAGGCGATGGCATCGTCTCAAA
61  G W V S Q M I P F S D W P R R W H R L K
301  GAACTTTTGACTGGAGAGAATCACAGATGTGGAATATTTGTCATAAATAAATAAataatg
81  E L L T G E N H R C G I F V I N K Ter
361  aaaacctcaaaaaaaaaaaaaaaaaaagatgatactgggtaccaagagggtgggggctggc
421  accatggggatctgagatttagggagaggggcgagctcgaattaa

```

Рис. 5. Нуклеотидная последовательность кДНК и выведенная аминокислотная последовательность белка дифференцировки с *M* 8.2 кДа. Подчеркнута последовательность, соответствующая структуре N-концевого пептида белка, выделенного из культуральной среды клеток HL-60, обработанных ретиноевой кислотой. Ter – сигнал терминирования трансляции.

протеогликана с *M* 20 кДа, синтезируемого в клетках линии HL-60 [20], в ходе протеолитического процессинга которого от N-конца отщепляется 27 аминокислотных остатков.

Таким образом, аминокислотная последовательность изучаемого нами фактора дифференцировки состоит из 54 аминокислотных остатков, что соответствует молекулярной массе 6.2 кДа. Различие в теоретически и экспериментально найденных значениях молекулярных масс белка, по-видимому, связано с наличием в белке углеводных остатков.

Для подтверждения того, что уровень экспрессии данного белка возрастает при стимуляции клеток к дифференцировке по гранулоцитарному пути, была проведена Нозерн-блот-гибридизация poly(A)⁺-РНК, выделенной из дифференцированных и недифференцированных клеток HL-60, с радиоактивно меченой вставкой кДНК длиной 450 п. о., кодирующей полноразмерную структуру данного белка. Как видно на автордиограмме (рис. 6), при стимуляции клеток к дифференцировке резко возрастает уровень мРНК длиной 300 - 400 нуклеотидов. Кроме того, в области мРНК длиной 1200 нуклеотидов наблюдается довольно четко выраженная полоса, которая отсутствует в дорожке, содержащей poly(A)⁺-РНК из недифференцированных клеток. Возможно, эта

высокомолекулярная РНК является предшествующей РНК длиной 300 - 400 нуклеотидов, кодирующей изучаемый белок, но быстро подвергается процессингу и превращается в последнюю.

Доступность кДНК открывает широкие возможности для дальнейших структурно-функциональных исследований этого белка с использованием методов генетической инженерии. В качестве первого шага в этом направлении мы планируем в ближайшее время осуществить экспрессию изучаемого белкового фактора с *M* 8.2 кДа.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали: акриламид, N,N'-метиленисакриламид, персульфат аммония, N,N',N,N'-тетраметилэтилендиамин, додецилсульфат натрия (SDS), β-меркаптоэтанол, набор белковых маркеров для электрофореза (LMW-kit) (Bio-Rad, США), Na-EDTA, трис(гидроксиэтил)аминоэтан (трис), N-лауроилсаркозин натрия, борную кислоту (Serva); муравьиную кислоту (Merck, ФРГ), триптон, дрожжевой экстракт, бакто-агар (Difco, США); эндонуклеазы рестрикции *EcoRI*, *HindIII*, *SmaI*, ДНК-лигазу фага T4, полинуклеотидкиназу фага T4, щелочную фосфатазу *E. coli* (BAP) (Boehringer-Mannheim); oligo(dT)-целлюлозу (Boehringer-Mannheim); N-(2-гидроксипропил)пипера-

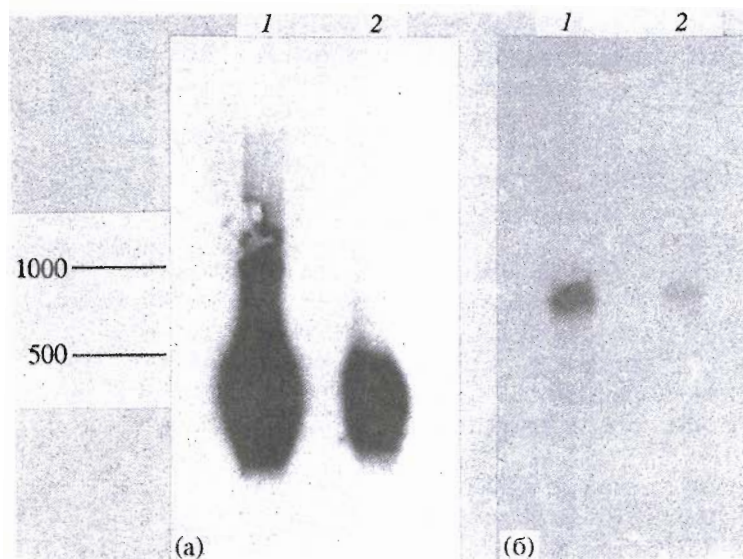


Рис. 6. Нозерн-блот-гибридизация poly(A)⁺-РНК из клеток линии HL-60 с радиоактивно меченой вставкой кДНК, кодирующей полноразмерный структурный ген фактора дифференцировки с *M* 8.2 кДа (а). Для оценки размеров РНК использовалась контрольная гибридизация с фрагментом кДНК актина длиной 500 п. о. (б). 1 – poly(A)⁺-РНК из клеток, стимулированных к дифференцировке; 2 – poly(A)⁺-РНК из нестимулированных клеток. Цифры слева указывают количество нуклеотидов РНК.

зин-N[']-(2-этансульфоновую кислоту) (HEPES), гуанидинтиоцианат (Fluka); пируват натрия и L-глутамин (Gibco).

Все остальные реагенты имели квалификацию ос. ч. Дистиллированную воду дополнительно очищали с помощью системы Milli-Q (Millipore, США).

транс-Ретиноевая кислота была любезно предоставлена А.Н. Ходоновым (Московская государственная академия тонкой химической технологии им. М.В. Ломоносова), а клеточная линия HL-60 – Р.Г. Васильевым (Институт биотехнологии, Москва).

Культивирование клеток. Клетки HL-60 были адаптированы к бессывороточной среде RPMI 1640, содержащей 20 мкМ этаноламин, аскорбиновую кислоту (3 мкг/мл), 500 мкМ цитрат железа и микроэлементы. Клетки культивировали при 37°C в атмосфере 5% CO₂.

Дифференцирующую активность определяли по способности восстанавливать нитроголубой тетразолий (NBT-тест) [14]. За единицу активности дифференцирующего фактора принимали количество белка, необходимое для увеличения числа NBT-положительных клеток на 10%.

Очистка фактора дифференцировки. Преципитат, полученный в результате высаливания 1.5 л культуральной среды, ресуспендировали в 1.5 мл 0.1 М трис-HCl, 0.2 М NaCl, pH 7.4. Гель-фильтрацию осуществляли в том же буфере на колонке (1 × 80 см) с Toyopearl HW55 (Toyosoda, Япония). Скорость элюции 3 мл/ч. Максимально

активную фракцию I диализовали против раствора аммиака и нанесли на колонку с анионообменником Mono Q HR5/5 (FPLC, Pharmacia), уравновешенную 0.01 М этаноламином, pH 9.2. Элюцию осуществляли градиентом концентрации NaCl. Количество белка во фракциях определяли по методу Бредфорда [21].

Электрофорез в ПААГ проводили по методике Леммли [22]. Окрашивание электрофореграмм осуществляли с помощью нитрата серебра [23].

Электроперенос на мембрану проводили в аппарате для полусухого блоттинга. Мембрану предварительно выдерживали 2 мин в метаноле и уравнивали в буфере для переноса (20 мМ NaHCO₃, pH 8.5), содержащем 10% метанол, в течение 2 мин [24]. После переноса мембрану промывали в воде, вырезали из нее участок, соответствующий положению белка, промывали последовательно 50 и 100% метанолом, высушивали и помещали на смоченный полибренном стеклянный фильтр твердофазного секвенатора 470A (Applied Biosystems, США).

N-Концевые аминокислотные остатки определяли в виде дансильных производных [25].

Тотальную РНК выделяли методом экстракции смесью кислый гуанидинтиоцианат-фенол-хлороформ [26]. poly(A)⁺-РНК получали на колонке с oligo(dT)-целлюлозой [27]. Синтез кДНК проводили с помощью набора для синтеза кДНК фирмы Amersham в соответствии с рекомендацией изготовителя.

Нозерн-блот-гибридизация. poly(A)⁺-РНК после электрофореза в 1% формальдегид-формамидном агарозном геле переносили на нейлоновую мембрану Hybond-N (Amersham) с помощью капиллярного блота. Фрагмент кДНК радиоактивно метили [α-³²P]dATP, используя набор для ник-трансляции (Amersham) согласно рекомендации изготовителя. Гибридизацию проводили в течение ночи при 42°C в присутствии формамида.

Нуклеотидные последовательности определяли по методу Сэнгера с помощью набора для секвенирования фирмы USB в соответствии с рекомендацией изготовителя и по методу Максама-Гилберта в твердофазном варианте [28, 29]. Эксперименты с ДНК проводили стандартными методами [27].

Данная работа выполнялась при финансовой поддержке научных программ "Геном человека" и "Белковая инженерия".

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Collins S.J., Ruscetti F.W., Gallagher R.E., Gallo R.C. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1978. V. 75. P. 2458 - 2462.
2. Collins S.J., Ruscetti F.W., Gallagher R.E., Gallo R.C. // J. Exp. Med. 1979. V. 149. P. 969 - 974.
3. Imaizumi M., Breitman T.R. // Eur. J. Haematol. 1987. V. 38. P. 289 - 302.
4. Breitman T.R., Selonic S.E., Collins S.J. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1980. V. 77. P. 2936 - 2940.
5. Douer D., Koeffler H.P. // J. Clin. Invest. 1982. V. 69. P. 277 - 283.
6. McCarthy D.M., San Miguel J.F., Frenkel H.C. // Leukemia Res. 1983. V. 7. P. 51 - 55.
7. Rovera G., Santoli D., Damsky C. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1979. V. 76. P. 2779 - 2783.
8. Miyawa C., Abe E., Kuribayashi T., Tanaka H., Kouno K., Nishii Y., Suda T. // Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1981. V. 102. P. 937 - 941.
9. Lotem J., Sachs L. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1979. V. 76. P. 5158 - 5162.
10. Aggarwal B.B., Moffat B., Harkins R.N. // J. Biol. Chem. 1984. V. 259. P. 686 - 690.
11. Resnitzki D., Yarden A., Zipori D., Kimchi A. // Cell. 1986. V. 46. P. 31 - 40.
12. Kohase M., Henriksen-DeStefano D., May L.T., Vilcek J., Sehgal P.B. // Cell. 1986. V. 45. P. 659 - 666.
13. Костанян И.А., Астапова М.В., Старовойтова Е.В., Драцицына С.М., Липкин В.М. // Цитология. 1994. Т. 36. В печати.
14. Baehner R.L., Nathan D.G. // J. Med. 1968. V. 278. № 18. P. 971 - 976.
15. Стрелков Л.А., Михайлова А.А. // Иммунология. 1989. Т. 6. С. 42 - 45.
16. Lewin B. // Genes / Eds John Willey and Sons. New York; Chichester; Brisbane; Toronto; Singapore, 1983. P. 226 - 227.
17. Kozak M. // J. Biol. Chem. 1991. V. 266. № 30. P. 19867 - 19871.
18. Cavener D.R., Ray S.C. // Nucl. Acids Res. 1991. V. 19. № 12. P. 3185 - 3192.
19. Tate W.P., Brown C.M. // Biochemistry. 1992. V. 31. P. 2443 - 2450.
20. Nicodemus C.F., Avraham S., Austen K.F., Purdy S., Jablonski I., Stevens R.L. // J. Biol. Chem. 1990. V. 265. № 10. P. 5889 - 5896.
21. Bradford M. // Anal. Biochem. 1976. V. 72. № 1 - 2. P. 248 - 254.
22. Laemmli W.N. // Nature. 1970. V. 227. P. 680 - 685.
23. Bonlikus T., Wray V.P., Hancock K. // J. Anal. Biochem. 1981. V. 118. P. 1973 - 2003.
24. Левина Н.Б., Слепак В.З., Киселев О.Г., Шемьякин В.В. // Биоорг. химия. 1989. Т. 5. № 1. С. 24 - 31.
25. Gray R. // Meth. Enzymol. 1967. V. 11. P. 138 - 151.
26. Chotczynski P., Sacchi N. // Anal. Biochem. 1987. V. 162. P. 156 - 159.
27. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. Molecular Cloning. N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
28. Chuvpilo S.A., Kravchenko V.V. // FEBS Lett. 1984. V. 179. № 1. P. 34 - 36.
29. Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1977. V. 74. № 12. P. 5463 - 5467.

A New Differentiation Factor from HL-60 Cell Culture Treated with Retinoic Acid: Isolation and Sequencing

I. A. Kostanyan, M. V. Astapova, E. V. Starovoitova, S. M. Dranitsyna, and V. M. Lipkin*

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

Abstract -- A new 8.2-kDa protein factor was isolated from cell culture of a promyelocyte leukemic HL-60 cell line that exhibited a differentiation-inducing effect upon the initial cell line. The primary structure of this factor was determined by sequencing the protein (N-terminal region) and the corresponding cDNA. A molecule of the differentiation factor secreted by HL-60 cells consisted of 54 amino acid residues and was glycosylated.

Key words: HL-60, differentiation factor, retinoic acid.

* To whom correspondence should be addressed.