

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ БЕЛКОВОГО СЕМЕЙСТВА HNRNP И ДРУГИХ БЕЛКОВ, ОБЕСПЕЧИВАЮЩИХ СПЛАЙСИНГ, В КУЛЬТИВИРУЕМЫХ КЛЕТКАХ ЧЕЛОВЕКА

Н.В. Пашинцева, Л.С. Еремина, К.В. Лисицкая, А.В. Иванов, Л.И. Ковалев, М.А. Ковалева, С.С. Шишкин

ФГУ «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН»;

Россия, 119071 Москва, Ленинский просп., 33/2

Контакты: Наталья Валентиновна Пашинцева pashintseva2009@yandex.ru

Введение. Гетерогенный ядерный рибонуклеопротеин A1 (heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1, hnRNP A1) и другие РНК-связывающие белки, участвующие в сплайсинге, играют значительную роль в реализации наследственной информации, и их представленность в клетках может сильно меняться при различных заболеваниях, в частности при злокачественных опухолях.

Цель исследования — протеомное изучение hnRNP A1 и других РНК-связывающих белков, участвующих в процессах сплайсинга, в 10 культивируемых линиях человеческих злокачественных и нормальных клеток эпителиального и мезенхимального происхождения.

Материалы и методы. Для изучения белковых профилей использовался двумерный электрофорез культивируемых клеточных линий аденокарцином (LNCaP, DU-145, PC-3, 769-P), сарком (U2-OS, SK-UT-1B, RD), а также незлокачественных мезенхимальных клеток (SC5-MSC), миобластов и линии доброкачественной гиперплазии предстательной железы (BPH-1) с последующей масс-спектрометрической идентификацией белковых фракций.

Результаты. Белок hnRNP A1 определялся как мажорный во всех исследованных линиях злокачественных опухолей человека. В культивируемых мезенхимальных клетках и нормальных миобластах человека hnRNP A1 присутствовал в существенно меньших количествах, чем в опухолевых клетках, и исчезал после индукции дифференцировки миобластов.

Выводы. Повышенное содержание белка hnRNP A1 может свидетельствовать об активном процессе пролиферации клеток, в том числе опухолевых. HnRNP A1 и другие белки, участвующие в процессах сплайсинга, представляются перспективными объектами для дальнейшего изучения в трансформированных клетках человека.

Ключевые слова: саркома, аденокарцинома, белок hnRNP A1, ядерные белки, протеомика

DOI: 10.17650/1726-9784-2017-16-2-82-90

PROTEOMIC IDENTIFICATION OF HNRNP FAMILY MEMBERS AND OTHER PROTEINS INVOLVED IN SPLICING IN HUMAN CULTURED CELLS

N.V. Pashintseva, L.S. Eremina, K.V. Lisitskaya, A.V. Ivanov, L.I. Kovalev, M.A. Kovaleva, S.S. Shishkin

A.N. Bakh Institute of Biochemistry of Russian Academy of Sciences; 33/2 Leninskiy Ave., Moscow 119071, Russia

Introduction. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 (hnRNP A1) and other RNA-binding proteins involved in splicing participate in realization of genetic information and can be greatly changed in pathological conditions including tumors.

Objective. Proteomic study of hnRNP A1 and other RNA-binding splicing proteins in 10 human malignant and non-malignant cultured cell lines of mesenchymal and epithelial origin.

Materials and methods. Two-dimensional gel electrophoresis of adenocarcinomas (LNCaP, DU-145, PC-3, 769-P) and sarcomas (U2-OS, SK-UT-1B, RD) cell lines with following protein identification by matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry have been carried out.

Results. HnRNP A1 has been identified as an abundant protein in all studied malignant cell lines. It has been revealed in lower amount in normal mesenchymal cells compared to malignant cultured cells and achieved undetectable levels in myoblasts after induction of differentiation.

Conclusion. High cellular level of hnRNP A1 can suggest high proliferative activity of cells including malignant those. Hence, hnRNP A1 and other RNA-binding splicing proteins hold promise to its further investigation in human transformed cells.

Key words: sarcoma, adenocarcinoma, protein hnRNP A1, nuclear proteins, proteomics

Введение

Сплайсинг является одним из ключевых этапов в реализации генетической информации. Принципиальным условием для вовлечения в сплайсинг первичных РНК-транскриптов в эукариотических клетках является их связывание со специальными белками и образование гетерогенных ядерных рибонуклеопротеинов (heterogeneous nuclear ribonucleoproteins, hnRNP) [1]. hnRNP, содержащие специальные РНК-связывающие домены и мотивы (RNA-recognition motifs, RRM), наряду со структурной (гистонотипической) функцией обладают и более тонкой функциональной специализацией. В настоящее время они считаются (наряду с малыми ядерными РНК) «ключевыми игроками» процессинга РНК (включая альтернативный сплайсинг) и посттранскрипционной регуляции генной экспрессии [2]. Большинство из белков hnRNP способны не только связывать молекулы РНК и участвовать в сплайсинге, но и выполнять ряд других важных функций. Так, они участвуют в регуляции длины теломерной ДНК [3], контроле синтеза миелина [4], формировании сердечной мышцы [5] и гладких мышц [6] на ранних стадиях эмбриогенеза. Семейство hnRNP включает 16 главных и 19 минорных белков, многие из которых характеризуются как повсеместно встречающиеся (в том числе и hnRNP A1), однако их представленность в клетках может сильно меняться при различных патологических состояниях, в частности, при опухолевой трансформации [7]. Имеются доказательства вовлеченности отдельных hnRNP в процессы канцерогенеза, прогрессирования и метастазирования опухолей эпителиального происхождения. Например, повышенную продукцию белка hnRNP A1 связывают с опухолевой трансформацией клеток толстого кишечника и высокой инвазивностью клеток гепатокарциномы [8, 9]. Данные о белках hnRNP в опухолевых клетках мезенхимального происхождения ограничены [10].

Надо отметить, что, хотя hnRNP широко представлены в клетках человека, данные об их исследовании протеомными методами в различных типах нормальных и злокачественных клеток крайне ограничены [10, 11]. Известно, что культивируемые клетки человека представляют собой удобные модели для изучения молекулярных механизмов нормальной клеточной дифференцировки и ее нарушений в злокачественных опухолях разного происхождения. Для решения подобных задач, включающих идентификацию представителей отдельных белковых семейств, широко используются протеомные технологии [12]. Целью данной работы стало протеомное исследование hnRNP и других РНК-связывающих белков, участвующих в процессах сплайсинга, в 10 линиях культивируемых человеческих злокачествен-

ных и нормальных клеток эпителиального и мезенхимального происхождения (линий аденокарцином и сарком, а также незлокачественных мезенхимальных клеток).

Материалы и методы

Клеточные линии и их культивирование

Материалом для исследований послужили линии аденокарцином предстательной железы LNCaP (получена от д. б. н. И.Г. Шемякина, ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии», Россия), DU-145, BPH-1, PC-3 (получены из German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH, Германия), 769-P (получена из American Type Culture Collection, США), рабдомиосаркомы RD (получена из НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского РАМН), лейомиосаркомы SK-UT-1B и остеомиосаркомы U2-OS (получены из Института цитологии РАН). Кроме того, в работе анализировали белки нормальных миобластов [13] и мезенхимальных стволовых клеток человека SCS-MSC (получены из Российской коллекции клеточных культур позвоночных Института цитологии РАН).

Для выращивания клеток линий LNCaP, DU-145, 769-P, BPH-1, PC-3 и U2-OS использовали среду RPMI-1640 с добавлением 10 % телячьей эмбриональной сыворотки (ТЭС), гентамицина и L-глутамина. Клетки линии SK-UT-1B культивировали в среде Игла MEM, а RD и мезенхимальные клетки — в среде DMEM, содержащей L-глутамин, гентамицин и ТЭС. Клетки миобластов культивировали в среде F-12. С целью инициирования процесса дифференцировки проводилось инкубирование миобластов в среде, содержащей 2 % лошадиной сыворотки. Все реагенты для культивирования были произведены в фирмах «ПанЭко» (Россия) и Biowest (Франция). Выращивание клеток производилось с использованием культурального пластика фирм Costar Group (США) и Nunc (Дания) в CO₂-инкубаторе фирмы Sanyo Electric Co. (Япония). Манипуляции, требующие стерильных условий, выполнялись в ламинарном шкафу II класса защиты фирмы Jouan Robotics (Франция). После достижения необходимой биомассы (10–20 × 10⁶ клеток) выращенные клетки механически снимали с поверхности матрасов, предварительно проинкубировав в бессывороточной среде в течение 1 ч при температуре +4 °С, чтобы смыть с поверхности клеток адсорбированные белки сыворотки, использованной при культивировании. Полученные препараты клеток до проведения протеомного анализа хранили при температуре –70 °С.

Экстракция клеточных белков и получение ядерных белков

Для экстракции белков препараты выращенных клеток гомогенизировали в 200 мкл традиционного

лизирующего раствора, который содержал 9 моль мочевины и 2 % амфолинов pH 3,5–10,0, а также неионный детергент и восстановитель дисульфидных групп. Для последующего проведения двумерного электрофореза использовали лизирующий раствор с добавлением 2 % Тритона X-100 и 5 % β -меркаптоэтанола [14].

Для получения ядерных белков культивируемые клетки суспендировали в фосфатно-солевом буфере и разрушали в мягких условиях (добавление Тритона X-100 до конечной концентрации 1 % и проведение нескольких циклов замораживания – оттаивания), затем центрифугированием осаждали клеточные ядра и 3-кратно промывали их фосфатно-солевым буфером.

Двумерный электрофоретический анализ белков

Для разделения белков использовался двумерный электрофорез с проведением неравновесного изоэлектрофокусирования (ИЭФ) в собственной модификации метода О'Фаррелла [14], которое проводилось в градиенте pH в стеклянных трубках ($2,4 \times 180$ мм), заполненных 4 % полиакриламидным гелем (ПААГ), приготовленным на 9 моль раствора мочевины с 2 % Тритона X-100 и 2 % смеси амфолинов. В основных экспериментах использовали амфолины pH 5–7 и 3,5–10,0 в соотношении 4 : 1, а для уточнения распределения белков в краевых зонах в ряде экспериментов применяли амфолины pH 4–6 (или 7–9) и 3,5–10,0 в том же соотношении. Белковые экстракты (100–150 мкл) наносили на «кислотный» край геля. ИЭФ проводили в приборе фирмы Bio-Rad Laboratories (США), модель 175, при 2400 В/ч суммарно на каждую колонку ПААГ. После ИЭФ колонки ПААГ использовали для фракционирования во 2-м направлении, проводившегося, как в 1-м варианте. Далее эта модификация, отличающаяся по условиям фракционирования от классической NEPHGE-модификации, будет обозначена как NPGE (nonequilibrium pH gradient electrophoresis – неравновесный электрофорез в градиенте pH). На каждую клеточную линию получалось от 4 (мезенхимальные стволовые клетки) до 50 и более (линия DU-145) двумерных электрофореграмм (ДЭ).

Визуализацию белков окрашиванием Кумасси бриллиантовым голубым R-250 и нитратом серебра с последующим анализом полученных ДЭ выполняли, как описано ранее [14], с небольшими модификациями. Для определения молекулярных масс (Мм) белковых фракций использовали набор рекомбинантных белков «SM0671» Мм = 10–170 кДа (Fermentas, США). Денситометрию ДЭ проводили после сканирования (сканер Epson Expression 1680) и получения цифровых изображений с помощью специализированного пакета программ ImageMaster 2D Platinum 7.0 (GE Healthcare, США).

Идентификация белков методами масс-спектрометрии

Выделение белковых фракций на пластинах ПААГ, гидролиз трипсином и экстракцию пептидов для идентификации белков с помощью времяпролетной масс-спектрометрии с ионизацией на матрице (matrix assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry, MALDI-TOF MS) проводили, как описано ранее [12], с небольшими модификациями. Образец (0,5 мкл) смешивали на мишени с таким же объемом раствора 20 % ацетонитрила, содержащего 0,1 % трифторуксусной кислоты и 20 мг/мл 2,5-дигидроксibenзойной кислоты (Sigma-Aldrich, США), и высушивали на воздухе. Масс-спектры получали на MALDI-TOF-масс-спектрометре Reflex III (Bruker, США) с ультрафиолетовым лазером (336 нм) в режиме положительных ионов в диапазоне Мм от 500 до 8000 Да. При MS/MS-анализе масс-спектры фрагментов регистрировали на масс-спектрометре в тандемном режиме при детекции положительных ионов. Фрагментация ионов индуцировалась подачей гелия в область начального участка траектории свободного дрейфа ионов (давление инертного газа 2×10^{-7} Па). Погрешность измерения масс-фрагментов для MS и MS/MS не превышала 0,005 % (50 ppm). На масс-спектре присутствовали только сигналы С-концевых фрагментов пептида, претерпевших разрыв по пептидной связи (γ -ионы). Идентификацию белков проводили с помощью программы Mascot, опция Peptide Fingerprint (Matrix Science, США) с использованием программного обеспечения FlexAnalysis Software (Bruker Daltonics GmbH, Германия) и поиском различных модификаций с помощью программы BioTools в базе данных NCBI nr.

Результаты

На типичных ДЭ клеточных линий при окраске нитратом серебра регистрировалось 550–600 фракций, подавляющее большинство которых распределялось в диапазоне Мм от 170 до 10 кДа. Используемая модификация NPGE обеспечивает достаточно высокое разрешение фракционирования, в том числе и щелочных белков с pI >8,70. Среди белков с pI >8,70, идентифицированных на всех ДЭ культивируемых клеток опухолей человека, оказались как минимум 2 изоформы белка hnRNP A1, эукариотический фактор элонгации трансляции альфа-1 (eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1, EEF1A1) и сплайсинг-фактор, богатый пролином и глутамином (splicing factor proline- and glutamine-rich, SFPQ) (рис. 1).

На рис. 2 представлены отдельные фрагменты ДЭ белков из клеток 3 аденокарцином и 3 сарком, на которых обозначен hnRNP A1. Как видно из рис. 2, белок hnRNP A1 на всех ДЭ культивируемых клеток

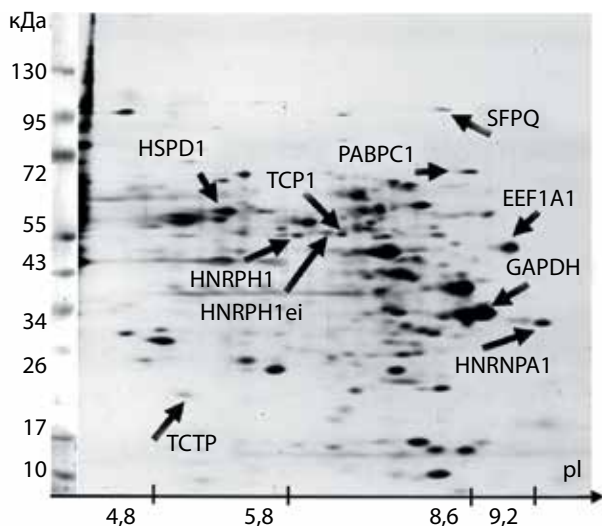


Рис. 1. Двумерная электрофореграмма РНК-связывающих белков из культивируемых клеток линии DU-145, окраска нитратом серебра: HSPD1 – шаперонин 60; TCP1 – белок T-комплекса 1 альфа; HNRPH1 – гетерогенный ядерный рибонуклеопротеин H1; HNRPH1ei – электрофоретическая изоформа гетерогенного ядерного рибонуклеопротеина H1; TCTP – фортилин; GAPDH – глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназа; SFPQ – сплайсинг-фактор, богатый пролином и глутамином; PABPC1 – полиаденилат-связывающий белок 1; EEF1A1 – эукариотический фактор элонгации трансляции альфа-1; HNRNPA1 – гетерогенный ядерный рибонуклеопротеин A1

злокачественных опухолей был представлен в виде нескольких изоформ и выявлялся даже при окрашивании ДЭ Кумасси бриллиантовым голубым R-250, что свидетельствует об относительно большом количестве этого белка в исследуемых биологических образцах. Таким образом, белок hnRNP A1 можно рассматривать как мажорный в опухолевых клетках. При компьютерной денситометрии самый высокий уровень белка hnRNP A1 определялся в лейомиосаркоме SK-UT-1B. Результаты идентификации hnRNP

A1 в различных клеточных линиях представлены в табл. 1. В качестве примера в табл. 1 приведены характеристики всех выявленных изоформ hnRNP A1 в линии 769-P.

Фракция hnRNP A1 на ДЭ мезенхимальных клеток выявлялась в существенно меньших количествах, чем в опухолевых клетках (рис. 3, а). В культивируемых миобластах человека фракция белка hnRNP A1 также выявлялась в меньшем количестве, чем в опухолевых клетках, причем она визуализировалась только на ДЭ клеток в стадии активной пролиферации и отсутствовала на гелях, где миобласты находятся в стадии дифференцировки (рис. 3, б и в). В миобластах и мезенхимальных стволовых клетках данная фракция выявлялась только на ДЭ, окрашенных нитратом серебра, и не определялась на ДЭ, окрашенных Кумасси бриллиантовым голубым R-250. Корректное сравнение содержания белка hnRNP A1 в нормальных мезенхимальных клетках и клеточных линиях злокачественных опухолей человека при денситометрии ДЭ, окрашенных нитратом серебра, не представлялось возможным, так как интенсивность окраски нитратом серебра зависит не только от количества белка в геле, но в значительной степени и от времени экспозиции красителя. Тем не менее, повышенное содержание белка hnRNP A1 свидетельствует об активном процессе пролиферации в клетках.

В большинстве исследованных клеточных линий белок hnRNP A1 был представлен сплайсинг-вариантом A1-A с экспериментальной Мм 33–36 кДа. В то же время фракция hnRNP A1, обнаруженная в мезенхимальных стволовых клетках человека, по электрофоретическим характеристикам и результатам масс-спектрометрической идентификации, вероятнее всего, соответствовала изоформе 2 hnRNP A1 (P09 651–3 по каталогу

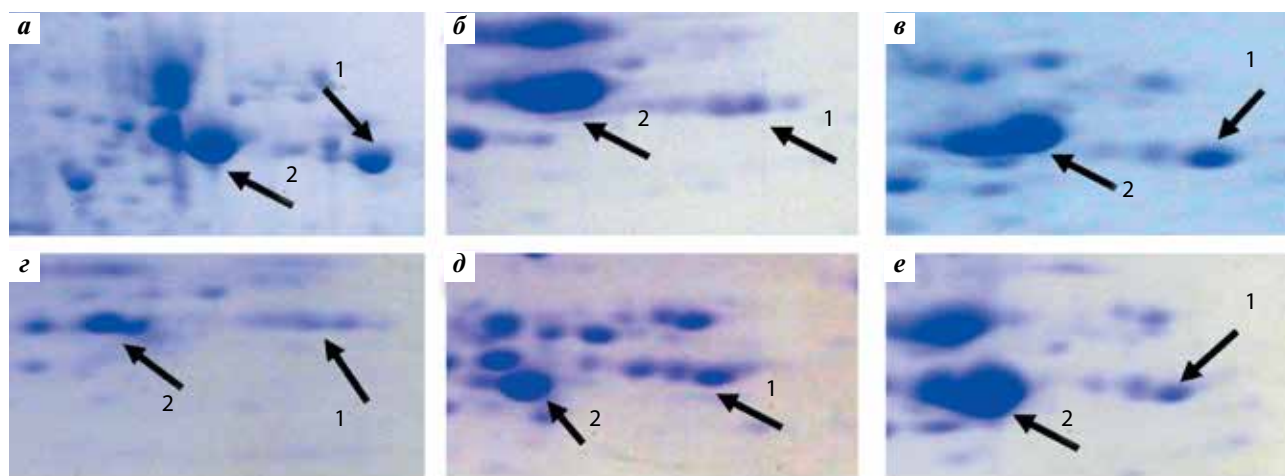


Рис. 2. Фрагменты двумерной электрофореграммы белков из культивируемых клеток 3 линий аденокарцином и 3 линий сарком, окраска Кумасси бриллиантовым голубым R-250: а – линия DU-145; б – линия 769-P; в – линия LNCaP; г – линия U2-OS; д – линия RD; е – линия SK-UT-1B; 1 – фракция белка hnRNP A1; 2 – фракция глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназы (в качестве реперной точки)

Таблица 1. Результаты масс-спектрометрической идентификации hnRNP A1 в исследуемых клеточных линиях

Клеточная линия	Название белка (обозначение гена)	Номера в Protein NCBI/UniProt	S/M/C*	Мм, кДа/pI (эксп.)**	Мм, кДа/pI (расчет.)***	
DU-145	Гетерогенный ядерный рибонуклеопротеин A1 (<i>hnRNP A1</i>)	47939618/P09651	164/16/57	34,00/9,70	34,20/9,28	
769-P			495/45/83	34,00/9,20		
			960/54/97	34,00/9,25		
			405/49/84	34,00/9,30		
			LNCaP	195/20/41		33,00/9,15
U2-OS			235/26/66	34,00/9,70		
RD			136/14/40	34,00/9,35		
SK-UT-1B			266/68/66	34,00/9,35		
SC5-MSC			349/33/79	29,40/9,35		
Миобласты	216/6/21	34,00/9,38				

*S/M/C – традиционные показатели идентификации, принятые в англоязычной литературе: Score – показатель соответствия или «счет очков»; Match peptides – количество совпавших пептидов; Coverage – % покрытия полной аминокислотной последовательности белка выявленными пептидами. **Мм/pI (эксп.) – значения определены экспериментально по электрофоретическим характеристикам; Мм – молекулярная масса белка в кДа, pI – изоэлектрическая точка этого белка. ***Мм/pI (расчет.) – значения рассчитаны по аминокислотным последовательностям из базы данных UniProt с помощью программы Compute pI/Mw ExPASy с учетом удаления сигнального пептида, но без учета других постсинтетических модификаций.

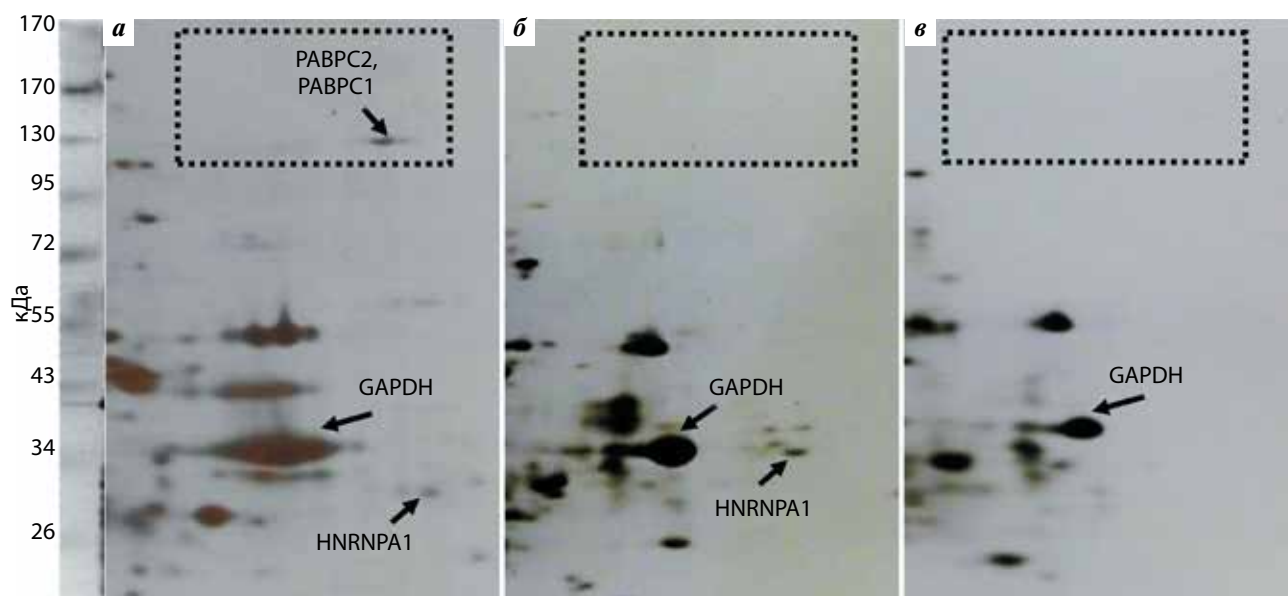


Рис. 3. Фрагменты двумерной электрофореграммы белков культивируемых незлокачественных клеток мезенхимального происхождения, окраска нитратом серебра: а – стволовые мезенхимальные клетки (SC5-MSC); б – культивируемые миобласты (нулевой день, стадия активной пролиферации); в – культивируемые миобласты (6-й день, стадия дифференцировки). PABPC1 – полиаденилат-связывающий белок 1; PABPC2 – полиаденилат-связывающий белок 2; GAPDH – глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназа; HNRNPA1 – гетерогенный ядерный рибонуклеопротеин A1

UniProt). Эта изоформа, о существовании которой на белковом уровне нет информации в базах данных и литературе, имеет расчетную Мм 29,4 кДа и отличается от изоформы A1-A отсутствием последовательности с 203-го аминокислотного остатка (а. о.) по 255-й а. о. Обнаруженная нами изо-

форма hnRNP A1 имела экспериментальную Мм около 29 кДа (рис. 3а).

Практически во всех изученных клеточных линиях были выявлены различающиеся по значениям pI электрофоретические изоформы белка hnRNP A1, существование которых, скорее всего, обусловлено

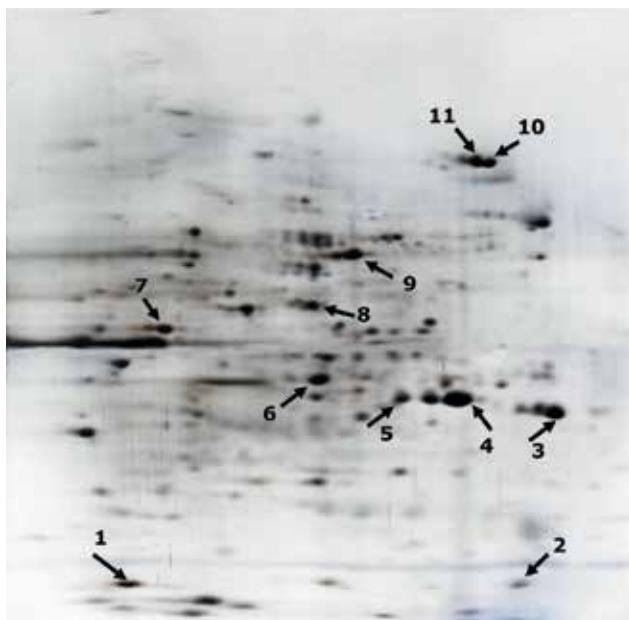


Рис. 4. Двумерная электрофореграмма белков из препаратов ядер клеток DU-145, цифрами 1–11 отмечены белки, участвующие в процессе сплайсинга мРНК

наличием каких-либо посттрансляционных модификаций, например, фосфорилирования. Прицельный анализ выявленных пептидов этого белка в различных линиях клеток человека не позволил обнаружить сайтов фосфорилирования. Однако в ходе масс-спектрометрического анализа электрофоретических изоформ белка hnRNP A1 в линии аденокарциномы почки 769-P удалось выявить ряд посттрансляционных модификаций, не встречавшихся в других линиях аденокарцином и сарком. В частности, диметилирование по аргинину было обнаружено сразу в нескольких выявленных пептидах, экспериментальная Мм которых отличалась от расчетной на 28 Да. По результатам тандемной масс-спектрометрии такая посттрансляционная модификация была подтверждена в 4 положениях: 194, 206, 218 и 225, соответствующих аминокислотному остатку аргинина (показатели Score 114, 49, 140 и 116 соответственно). Тем не менее эта модификация вряд ли существенно влияет на изоэлектрическую точку белка и в полной мере не может объяснять появление нескольких изоэлектрофоретических изоформ. Кроме hnRNP A1 в исследованных клеточных линиях были идентифицированы и другие представители семейства hnRNP, в частности, в клетках рака предстательной железы линии LNCaP удалось обнаружить hnRNP A2B1 и hnRNP G, в клетках PC-3 – hnRNP A2B1, в клетках доброкачественной гиперплазии предстательной железы BPH-1 – hnRNP A3, hnRNP G и hnRNP H1. Следует отметить, что в исследуемых злокачественных клетках был найден сплайсинг-фактор SFPQ – белок, выполняющий важные функции при реализации генетической информации

[15–17] и, возможно, вовлеченный в возникновение и прогрессию злокачественных опухолей [18, 19]. Полученные нами данные свидетельствуют о том, что белок SFPQ может представлять интерес как потенциальный биомаркер злокачественных опухолей, в том числе мезенхимального происхождения [20]. В клетках рака предстательной железы линий LNCaP и PC-3 были найдены такие участники процессов сплайсинга, как полиаденилат-связывающий белок 1 (polyadenylate-binding protein cytoplasmic 1, PABPC1) и белок NUDT21 (nudix (nucleoside diphosphate linked moiety X) – type motif 21). Ранее было показано, что подавление экспрессии гена, кодирующего белок NUDT21, способствует подавлению опухолевых лимфобластов [21]. В ряде клеточных линий, выведенных из злокачественных опухолей (LNCaP, ОКР-GS и RD), были идентифицированы 2 белка теплового шока HSPB1 (HSP 27) и HSPB5, стресс-индуцируемое фосфорилирование которых, по данным литературы, приводит к их ассоциации с ядерными пятнышками (nuclear speckles) – крупными субъядерными доменами, вовлеченными в сплайсинг РНК [22, 23].

В связи с широким динамическим диапазоном и сложным составом клеточных протеомов на общих ДЭ многие фракции ядерных белков оказываются минорными или не выявляются вовсе. Поэтому в данной работе было проведено параллельное изучение белков в препаратах ядер, полученных из культивируемых клеток аденокарцином и рабдомиосаркомы. С помощью протеомного анализа в препаратах ядерных белков при окраске нитратом серебра обычно удавалось детектировать более 400 белковых фракций. Типичная ДЭ белков из препаратов ядерных белков клеток DU-145 показана на рис. 4, и на ней отмечены те из идентифицированных белков, которые имеют отношение к процессу сплайсинга мРНК. Шесть из них оказались различными представителями семейства hnRNP, еще 2 были идентифицированы как изоформы белка SFPQ (табл. 2). Протеомное изучение ядерных белков клеток RD также позволило обнаружить белки SFPQ (S/M/C 192/15/28), hnRNP A1 (2 изоформы с S/M/C 241/21/61 и 192/18/56) и A2/B1 (2 изоформы с S/M/C 235/23/55 и 278/27/56), а кроме того, 2 изоформы белка hnRNP C1/C2 (S/M/C 144/13/32 и 121/13/29). Проведенный анализ публикаций, зарегистрированных в базе данных PubMed, не выявил сообщений об обнаружении большинства белков семейства hnRNP, перечисленных в табл. 2, в злокачественных опухолевых клетках.

Обсуждение результатов

НnRNP A1 – представитель отдельного семейства полифункциональных РНК-связывающих белков, участвующих в сплайсинге мРНК. По данным ряда

Таблица 2. Сплайсинг-белки, идентифицированные в ядерных фракциях клеток аденокарциномы линии DU-145; нумерация соответствует данным на рис. 4

№	Название белка (обозначение гена)	Номера в Protein NCBI/UniProt	S/M/C*	Мм, кДа/pI (эксп.) **	Мм, кДа/pI (расчет.) ***
1	Галектин 1 (<i>LGALS1</i>)	4504981/P09382	155/9/63	14,50/5,0	14,70/5,30
2	NHP2-подобный белок 1 (<i>NHP2L1</i>)	4826860/P55769	119/7/56	14,50/9,0	14,20/8,72
3	Гетерогенный ядерный нуклеопротеин A1, изоформа A (<i>hnRNP A1</i>)	4504445/P09651	180/18/57	34,00/9,50	34,20/9,27
4	Гетерогенный ядерный нуклеопротеин A2/B1, изоформа A2 (<i>hnRNP A2B1</i>)	4504447/P22626	292/27/70	35,80/8,70	36,00/8,67
5	Гетерогенный ядерный нуклеопротеин A2/B1, изоформа A2 (<i>hnRNP A2B1</i>), электрофоретический вариант	4504447/P22626	261/23/53	35,80/8,30	36,00/8,67
6	Гетерогенный ядерный нуклеопротеин H3 (<i>hnRNP H3</i>)	7739445/P31942	206/19/80	38,00/7,05	31,50/6,76
7	Гетерогенный ядерный нуклеопротеин F (<i>hnRNP F</i>)	4826760/P52597	164/16/37	48,00/5,70	45,70/5,37
8	Гетерогенный ядерный нуклеопротеин H1, изоформа CRA_b (<i>hnRNP H1</i>)	119574194/P31943	216/23/44	52,00/6,95	43,70/6,47
9	Гетерогенный ядерный нуклеопротеин L, изоформа a (<i>hnRNP L</i>)	52632383/P14866	153/15/42	65,00/7,95	64,10/8,46
10	Сплайсинг-фактор, богатый пролином и глутамином (<i>SFPQ</i>)	4826998/P23246	221/28/42	96,00/9,15	76,20/9,50
11	Сплайсинг-фактор, богатый пролином и глутамином, электрофоретическая изоформа (<i>SFPQ</i>)	4826998/P23246	116/18/41	96,00/8,70	76,20/9,50

*S/M/C — традиционные показатели идентификации, принятые в англоязычной литературе; Score — показатель соответствия или «счет очков»; Match peptides — количество совпавших пептидов; Coverage — % покрытия полной аминокислотной последовательности белка выявленными пептидами. **Мм/pI (эксп.) — значения определены экспериментально по электрофоретическим характеристикам; Мм — молекулярная масса белка в кДа, pI — изоэлектрическая точка этого белка. ***Мм/pI (расчет.) — значения рассчитаны по аминокислотным последовательностям из базы данных UniProt с помощью программы Compute pI/Mw ExPASy с учетом удаления сигнального пептида, но без учета других постсинтетических модификаций.

исследований, количественное содержание белка hnRNP A1 изменяется при опухолевой трансформации клеток, что указывает на его вовлеченность в процессы туморогенеза [24, 25]. Согласно полученным нами данным, белок hnRNP A1 присутствовал как мажорный (выявлялся даже при окрашивании ДЭ Кумаси бриллиантовым голубым R-250) практически во всех исследованных клеточных линиях злокачественных опухолей человека. В культивируемых мезенхимальных клетках и нормальных миобластах человека hnRNP A1 выявлялся в существенно меньших количествах, чем в опухолевых клетках (определялся только при окраске нитратом серебра), и исчезал после индукции дифференцировки миобластов. Таким образом, содержание белка hnRNP A1 в клетках может свидетельствовать об их пролиферативной активности. Наличие hnRNP A1 в активно пролиферирующих клетках объясняется тем, что он участвует в сплайсинге мРНК белков-регуляторов клеточной пролиферации, например, c-Src и CD44 [26]. По данным UniProtKB (Universal Protein Knowledgebase),

имеется 3 сплайсинг-варианта белка hnRNP A1. Каноническим вариантом считается изоформа A1-B (38,7 кДа, 372 а. о.), но наиболее распространена в клетках человека другая изоформа — A1-A (34,2 кДа, 320 а. о.), отличающаяся от канонической отсутствием фрагмента аминокислотной последовательности с 252-го а. о. по 303-й а. о. Соотношение изоформ A1-A и A1-B в клетках рака шейки матки HeLa составляет примерно 20 : 1 [27]. Третья изоформа — так называемая изоформа 2 (29,4 кДа, 267 а. о.) — отличается от канонической отсутствием а. о. с 203-го по 307-й, однако экспериментальное подтверждение существования данной изоформы до настоящего времени отсутствовало. При протеомном исследовании мезенхимальных стволовых клеток человека нам удалось обнаружить изоформу hnRNP A1, по электрофоретическим характеристикам и результатам масс-спектрометрической идентификации, вероятнее всего, соответствовавшую изоформе 2. Фракция на ДЭ, соответствующая этой изоформе, обладала Мм около 29 кДа и достаточно убедительными зна-

чениями показателей масс-спектрометрической идентификации (S/M/C 349/33/79). Однако для окончательного вывода о присутствии в мезенхимальных стволовых клетках человека именно изоформы 2 hnRNP A1 необходимо масс-спектрометрическое обнаружение диагностического для данной изоформы пептида и получение его спектра фрагментации.

Поскольку в большинстве изученных клеточных линий присутствовали различающиеся по значениям pI электрофоретические изоформы белка hnRNP A1, был осуществлен поиск посттрансляционных модификаций данного белка, в ходе которого в клеточной линии 769-Р были обнаружены ацетилирование по серину в положении 2 и диметилирование по аргинину в положениях 194, 206, 218 и 225. Для белка hnRNP A1 метилирование по аргинину является почти столь же распространенной посттрансляционной модификацией, как фосфорилирование по серину. Очевидно, что эта стабильная модификация играет важную роль в функционировании белка. Рядом авторов было показано, что метилирование вовлечено в процессы белок-белкового взаимодействия, созревания рибонуклеопротеинов и клеточного сигналинга [28]. Все обнаруженные на данный момент сайты метилирования входят в RGG-box — последовательность полипептидной цепи с 190-го а. о. по 240-й а. о., богатую аргинином и глицином, которая содержит консервативный мотив связывания нуклеиновых кислот. Очевидно, метилирование hnRNP A1 на этом участке вовлечено в регуляцию связывания нуклеиновых

кислот. Действительно, ранее было показано, что способность белка связывать нуклеиновые кислоты обратно пропорциональна степени его метилирования по аргинину [29]. В базе данных UniProt сообщается о 5 сайтах метилирования белка hnRNP A1 с присоединением 2 метильных групп в 1 сайте. Сайты диметилирования по аргинину в положениях 194, 206, 218 и 225 были обнаружены у hnRNP A1, выделенного из клеток рака шейки матки HeLa [30, 31]. Нам удалось подтвердить наличие у этого белка диметилирования по аргинину в указанных позициях в клетках рака почки человека 769-Р.

Заключение

Представленные результаты, свидетельствующие о присутствии в культивируемых клетках аденокарцином и сарком белка hnRNP A1 в качестве мажорного, указывают на возможную роль этого белка в реализации генетической информации в злокачественных опухолях. Участие данных белков в сплайсинге мРНК и других внутриклеточных процессах регулируется, в числе прочего, посттрансляционными модификациями, например, фосфорилированием и диметилированием. Соответственно, белок hnRNP A1, его различные изоформы, а также некоторые другие выявленные протеомными методами РНК-связывающие белки, вовлеченные в процессы сплайсинга, представляются интересными и перспективными объектами для дальнейшего изучения в трансформированных и нормальных клетках человека.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Kumar A., Williams K.R., Szer W. Purification and domain structure of core hnRNP proteins A1 and A2 and their relationship to single-stranded DNA-binding proteins. *J Biol Chem* 1986;261(24):11266–73. PMID: 3733753.
2. Han S.P., Tang Y.H., Smith R. Functional diversity of the hnRNPs: past, present and perspectives. *Biochem J* 2010;430(3):379–92. DOI: 10.1042/BJ20100396. PMID: 20795951.
3. Ford L.P., Wright W.E., Shay J.W. A model for heterogeneous nuclear ribonucleoproteins in telomere and telomerase regulation. *Oncogene* 2002;21(4):580–3. DOI: 10.1038/sj.onc.1205086. PMID: 11850782.
4. White R., Gonsior C., Bauer N.M. et al. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein (hnRNP) F is a novel component of oligodendroglial RNA transport granules contributing to regulation of myelin basic protein (MBP) synthesis. *J Biol Chem* 2012;287(3):1742–54. DOI: 10.1074/jbc.M111.235010. PMID: 22128153.
5. Blech-Hermoni Y., Ladd A.N. RNA binding proteins in the regulation of heart development. *Int J Biochem Cell Biol* 2013;45(11):2467–78. DOI: 10.1016/j.biocel.2013.08.008. PMID: 23973289.
6. Liu J., Beqaj S., Yang Y., Honoré B. et al. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein-H plays a suppressive role in visceral myogenesis. *Mech Dev* 2001;104(1–2):79–87. PMID: 11404082.
7. Chaudhury A., Chander P., Howe P.H. Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins (hnRNPs) in cellular processes: focus on hnRNP E1's multifunctional regulatory roles. *RNA* 2010;16(8):1449–62. DOI: 10.1261/rna.2254110. PMID: 20584894.
8. Ushigome M., Ubagai T., Fukuda H. et al. Up-regulation of hnRNP A1 gene in sporadic human colorectal cancers. *Int J Oncol* 2005;26(3):635–40. PMID: 15703818.
9. Zhou Z.J., Dai Z., Zhou S.L. et al. Overexpression of HnRNP A1 promotes tumor invasion through regulating CD44v6 and indicates poor prognosis for hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer* 2013;132(5):1080–9. DOI: 10.1002/ijc.27742. PMID: 22821376.
10. Niforou K.M., Anagnostopoulos A.K., Vougas K. et al. The proteome profile of the human osteosarcoma U2-OS cell line. *Cancer Genomics Proteomics* 2008;5(1):63–78. PMID: 18359981.
11. Ko C.C., Chen Y.J., Chen C.T. et al. Chemical proteomics identifies heterogeneous nuclear ribonucleoprotein (hnRNP) A1 as the molecular target of quercetin in its anti-cancer effects in PC-3 cells. *J Biol Chem* 2014;289(32):22078–89. DOI: 10.1074/jbc.M114.553248. PMID: 24962584.
12. Shishkin S., Kovaleva M., Ivanov A. et al. Comparative proteomic study of pro-

- teins in prostate cancer and benign hyperplasia cells. *J. Cancer Sci Ther* 2011;S1:003. DOI: 10.4172/1948.
13. Крохина Т.Б., Шишкин С.С., Раевская Г.Б. и др. Бюлл. эксп. биол. мед. 1996;122:314–7.
 14. Kovalyov L.I., Shishkin S.S., Efimochkin A.S. et al. The major protein expression profile and two-dimensional protein database of human heart. *Electrophoresis* 1995;16(7):1160–9. PMID: 7498159.
 15. Lee M., Sadowska A., Bekere I. et al. The structure of human SFPQ reveals a coiled-coil mediated polymer essential for functional aggregation in gene regulation. *Nucleic Acids Res* 2015;43(7):3826–40. DOI: 10.1093/nar/gkv156. PMID: 25765647.
 16. Rajesh C., Baker D.K., Pierce A.J. et al. The splicing-factor related protein SFPQ/PSF interacts with RAD51D and is necessary for homology-directed repair and sister chromatid cohesion. *Nucleic Acids Res* 2011;39(1):132–45. DOI: 10.1093/nar/gkq738. PMID: 20813759.
 17. Lowery L.A., Rubin J., Sive H. Whitesnake/SFPQ is required for cell survival and neuronal development in the zebrafish. *Dev Dyn* 2007;236(5):1347–57. PMID: 17393485.
 18. Dolnik A., Engelmann J.C., Scharfenger-Schmeer M. et al. Commonly altered genomic regions in acute myeloid leukemia are enriched for somatic mutations involved in chromatin remodeling and splicing. *Blood* 2012;120(18):e83–92. DOI: 10.1182/blood-2011-12-401471. PMID: 22976956.
 19. Jiang F.N., He H.C., Zhang Y.Q. et al. An integrative proteomics and interaction network-based classifier for prostate cancer diagnosis. *PLoS One* 2013;8(5):e63941. DOI: 10.1371/journal.pone.0063941. PMID: 23737958.
 20. Pashintseva N.V., Shishkin S.S., Lisitskaya K.V. et al. Study of splicing factor, proline- and glutamine-rich by proteomic techniques in human malignant and nonmalignant cell lines. *Protein Pept Lett* 2016;23(11):958–66.
 21. Gennarino V.A., Alcott C.E., Chen C.A. et al. NUDT21-spanning CNVs lead to neuropsychiatric disease and altered MeCP2 abundance via alternative polyadenylation. *Elife* 2015;8:4. DOI: 10.7554/eLife.10782. PMID: 26312503.
 22. den Engelsman J., Bennink E.J., Doerwald L. et al. Mimicking phosphorylation of the small heat-shock protein α -phaB-crystallin recruits the F-box protein FBX4 to nuclear SC35 speckles. *Eur J Biochem* 2004;271(21):4195–203. DOI: 10.1111/j.1432-1033.2004.04359.x. PMID: 15511225.
 23. Vos M.J., Kanon B., Kampinga H.H. HSPB7 is a SC35 speckle resident small heat shock protein. *Biochim Biophys Acta* 2009;1793(8):1343–53. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2009.05.005. PMID: 19464326.
 24. Ushigome M., Ubagai T., Fukuda H. et al. Up-regulation of hnRNP A1 gene in sporadic human colorectal cancers. *Int J Oncol* 2005;26(3):635–40. PMID: 15703818.
 25. Zhou Z.J., Dai Z., Zhou S.L. et al. Overexpression of hnRNP A1 promotes tumor invasion through regulating CD44v6 and indicates poor prognosis for hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer* 2013;132(5):1080–9. DOI: 10.1002/ijc.27742. PMID: 22821376.
 26. Rooke N., Markovtsov V., Cagavi E. et al. Roles for SR proteins and hnRNP A1 in the regulation of c-src exon N1. *Mol Cell Biol* 2003;23(6):1874–84. PMID: 12612063.
 27. Buoli M., Cobianchi F., Bestagno M.G. et al. Alternative splicing in the human gene for the core protein A1 generates another hnRNP protein. *EMBO J* 1990;9(4):1229–35. PMID: 1691095.
 28. Liu Q., Dreyfuss G. In vivo and in vitro arginine methylation of RNA-binding proteins. *Mol Cell Biol* 1995;15(5):2800–8. PMID: 7739561.
 29. Rajpurohit R., Paik W.K., Kim S. Effect of enzymic methylation of heterogeneous ribonucleoprotein particle A1 on its nucleic-acid binding and controlled proteolysis. *J Biochem* 1994;304(Pt 3):903–9. PMID: 7818496.
 30. Kim S., Merrill B.M., Rajpurohit R. et al. Identification of NG-methylarginine residues in human heterogeneous RNP protein A1: Phe/Gly-Gly-Gly-Arg-Gly-Gly-Gly/Phe is a preferred recognition motif. *Biochemistry* 1997;36(17):5185–92. DOI: 10.1021/bi9625509.
 31. Ong S.E., Mittler G., Mann M. Identifying and quantifying in vivo methylation sites by heavy methyl SILAC. *Nat Methods* 2004;1(2):119–26. PMID: 15782174.