

БЕЛОК DDX5 УЧАСТВУЕТ В ПРОЛИФЕРАЦИИ И ДИФФЕРЕНЦИРОВКЕ КУЛЬТИВИРУЕМЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА

© Н. В. Пономарцев,¹ Н. И. Енукашвили

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург; ¹ электронный адрес: ponomartsev@yandex.ru

Экспрессия белка DDX5 (РНК-хеликазы р68) в клетках совпадает по времени с такими процессами, как пролиферация и дифференцировка. Однако доказательств участия белка в этих процессах до сих пор не было. В настоящей работе изучали влияние инактивации белка DDX5 (методом РНК-интерференции) на пролиферацию клеток линии Jurkat и динамику экспрессии DDX5 во время дифференцировки клеток U-937, индуцированной форбол-12-мирикат-13-ацетатом (ФМА). Проточная цитометрия показала, что содержание DDX5 в клетках Jurkat, находящихся в фазах G₀ и G₁, ниже, чем в фазах G₂/M. После индукции дифференцировки клеток U-937 пик экспрессии наблюдается в течение первых 2—3 ч, а далее (4 ч) концентрация DDX5 снижается. Возрастание количества макрофагального поверхностного маркера CR3 на мембране клеток происходит только через 24 ч после индукции дифференцировки клеток ФМА. Таким образом, наши данные подтверждают следующее: 1) белок DDX5 необходим для точной пролиферации; 2) концентрация белка DDX5 в клетках U-937 возрастает в первые часы после стимуляции ФМА и далее снижается (через 4 ч), причем задолго до появления на поверхности клеток макрофагального маркера.

Ключевые слова: пролиферация, дифференцировка, белок DDX5, РНК-хеликаза р68, клеточные линии человека U-937, Jurkat.

Принятые сокращения: АТ — антитела, сатДНК — сателлитная ДНК, ФМА — форбол-12-мирикат-13-ацетат.

Семейство DEAD-box содержащих РНК хеликаз включает в себя множество консервативных мультифункциональных белков, которые вовлекаются в процессы синтеза, процессинга, экспорта, деградации РНК, сборки рибосом и др. Белки этого семейства характеризуются восемью консервативными доменами, включая АТФ-зависимый домен и мотив Asp-Glu-Ala-Asp (D-E-A-D), по которому дано название этому семейству (Gorbalenya et al., 1989; Tanner et al., 2003). Одним из белков этого семейства является белок DDX5, описанный также как РНК-хеликаза р68 (Lane, Hoefler, 1980). DDX5 — высококонсервативный белок, гомологи которого были найдены у различных представителей эукариот от дрожжей до человека. Показано, что DDX5 может принимать участие во всех этапах метаболизма РНК, начиная от транскрипции до ее деградации (Fuller-Pace, 2006). Помимо этого, он вовлекается в различные белок-белковые взаимодействия, участвуя в регуляции транскрипции некоторых генов (Ogilvie et al., 2003; Carretti et al., 2006; Yao et al., 2010). Белок DDX5 располагается как в ядрах, так и в цитоплазме клеток человека (Wang et al., 2009). На мышцах показано, что он входит во фракцию ядерного матрикса (Erukashvily et al., 2005). Известно, что распределение белка DDX5 в ядрах клеток как человека, так и мышца зависит от фазы клеточного цикла (Iggo, Lane, 1989; Nicol et al., 2000; Erukashvily et al., 2005). Исходя из этих дан-

ных можно предположить, что функции белка DDX5 зависят от фазы клеточного цикла.

Эмбриогенез мышца — единственная на сегодня модель, в которой показано увеличение экспрессии DDX5 в дифференцирующихся органах и тканях (Stevenson et al., 1998). За последнее время появились данные о взаимодействии этого белка с различными факторами, участвующими в установлении тканеспецифичной экспрессии генов. Например, показано взаимодействие DDX5 с MyoD, который регулирует скелетный миогенез. Белок DDX5 является коактиватором MyoD-зависимой транскрипции и необходим для дифференцировки скелетной мускулатуры (Carretti et al., 2006). На мышечных эмбриональных стволовых клетках, индуцированных ретиноевой кислотой, показана одновременная активация транскрипции ДНК прицетромержного мажорного сателлита и белка DDX5 (Erukashvily et al., 2009). Все эти данные позволяют предположить участие DDX5 в пролиферации и дифференцировке клеток. Однако прямые данные, подтверждающие эту гипотезу, в настоящее время отсутствуют.

Цель нашей работы заключалась в исследовании влияния инактивации транскриптов *ddx5* на пролиферативную активность клеток линии Jurkat и динамику макрофагальной дифференцировки клеток линии U-937 человека. Мы показали, что белок DDX5 необходим для

пролиферации клеток и что его экспрессия повышается во время начальной стадии дифференцировки клеток U-937.

Материал и методика

Клетки. Использовали суспензионные клеточные линии Т-лимфобластной лейкемии Jurkat и гистиоцитарной лимфомы человека линии U-937, полученные из Российской коллекции клеточных культур позвоночных Института цитологии РАН (Санкт-Петербург). Клетки выращивали при 37 °С и 5 % CO₂ в питательной среде RPMI-1640 (Биолот, Россия), содержащей 10 нг/мл гентамицина, 146 мкг/мл глутамин и 10 % сыворотки эмбрионов коров (Биолот, Россия). Пересев клеток (путем разведения клеточной суспензии свежей средой в соотношении 1 : 5) осуществляли при достижении культурой плотности свыше 10⁶ кл./мл.

Генетические конструкции. Клеточную линию Jurkat инфицировали лентивирусными конструкциями LV-shDDX5 и LV-GFP. Конструкция LV-shDDX5 под конститутивным промотором содержала последовательность для РНК-интерференции DDX5: CGCGTCCCGGGCTAGATGTGGAAGATGTTCAAGAGACATCTTCCACATCTAGCCCTTTTGGAAAT (Caretti et al., 2006). Конструкция LV-GFP была получена на основе вектора LVHTM согласно тому же экспериментальному протоколу, что и LV-shDDX5. Однако вместо бессмысленной последовательности DDX5 встраивали последовательность гена белка GFP (GenBank: FJ172221.1). Лентивирусный вектор LVHTM и плазмиды были получены от д-ра Д. Троне (D. Trono, École Polytechnique federale de Lausanne, Швейцария). Готовые вирусы (в конечных концентрациях 1,2 · 10⁷ и 5 · 10⁷ трансдуцирующих ед./мл для LV-shDDX5 и LV-GFP соответственно) для инфицирования клеток были любезно предоставлены М. А. Лисковых (Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург).

Инфицирование клеток. В лунки 24-луночного планшета переносили по 250 мкл клеточной суспензии Jurkat (содержащей приблизительно 50 тыс. клеток), добавляли по 10 мкл одного из вирусов (LV-GFP или LV-siDDX5) и инкубировали в течение 1 сут. На следующие сутки добавляли 1 мл культуральной среды, содержащей сыворотку и гентамицин, после чего клетки пересевали, как описано выше.

Индукцию дифференцировки клеток U-937 проводили в 24-луночных планшетах с помощью фобол-12-миристан-13-ацетата (ФМА) (Sigma-Aldrich, США) в концентрации 35 нг/мл и инкубировали от 1 до 24 ч.

Использовали антитела (АТ) козы против белка DDX5 и АТ осла против IgG козы, конъюгированные с FITC (Abcam, Великобритания). Для оценки количества дифференцированных U-937 клеток (в % от проанализированного числа клеток) регистрировали количество непроникнувших клеток, меченных мышиными АТ против CD11b, конъюгированными с флуорохромом Per-CP (Abcam, Великобритания). Данный маркер постоянно экспрессируется в клетке, однако появление его на поверхности клетки происходит лишь в случае макрофагальной дифференцировки, поэтому окраска АТ против CD11b непроникнувших клеток является одним из способов отслеживания макрофагоподобной дифференцировки. При этом интенсивность окраски отражает степень дифференцированности клеток (Schwende et al., 1996). Интегрин CD11b

является компонентом гетеродимерного белка CR3, который экспонируется на клеточной поверхности макрофагов.

Иммуноцитохимия и проточная цитометрия. Для окраски клеток АТ против DDX5 клетки фиксировали 4%-ным параформальдегидом на PBS, содержащем 0.2 % Tween 20, 15 мин при 4 °С, дважды отмывали тем же раствором PBS. Затем клетки в течение 30 мин пермеабелизовывали в PBS, содержащем 5 % бычьего сывороточного альбумина и 0.2 % Tween 20. После этого клетки инкубировали с первыми АТ против белка DDX5 в течение 45 мин. Далее дважды промывали в PBS и инкубировали со вторыми АТ, конъюгированными с FITC, в течение 30 мин. Затем клетки дважды промывали PBS, после этого анализ окрашенных клеток проводили на проточном цитометре Guava-5HT (Milipore, США) в диапазоне детекции флуоресценции 515—545 нм. Для контроля специфичности АТ против DDX5 проводили окраску клеток только вторыми АТ. Для исследования содержания белка DDX5 в незараженных клетках Jurkat, находящихся на разных стадиях клеточного цикла, комбинировали метод иммуноцитохимии с оценкой содержания ДНК методом проточной цитометрии. Контрольные и зараженные клетки после связывания ими АТ против DDX5 окрашивали иодистым пропидием (50 мкг/мл) в течение 15 мин при 37 °С в растворе PBS, содержащем 100 мкг/мл РНКазы. После этого клетки (1 млн/мл) анализировали на проточном цитометре (Beckman Coulter, США) в диапазонах 680—710 (иодистый пропидий) и 515—545 (DDX5) нм. Число анализируемых событий было более 10⁴. С помощью программы FCS Express 4 Plus анализировали содержание ДНК, определяли области («гейтировали»), соответствующие фазам клеточного цикла G₀/G₁, S, G₂/M и оценивали интенсивность свечения АТ против DDX5 в каждой области.

Для оценки влияния инактивации DDX5 из популяции клеток, зараженных LV-shDDX5, выделяли группу слабоокрашенных клеток, интенсивность флуоресценции которых составляла не более 100 усл. ед. на клетку. В этот диапазон попадала основная часть клеток, не детектируемых визуально с помощью обычного флуоресцентного микроскопа. Предполагалось, что в эту группу попадали клетки с инактивированным DDX5.

Для оценки интенсивности окрашивания клеток АТ против терминального маркера макрофагальной дифференцировки CR3 на клеточной мембране клеток U-937 клетки фиксировали в 4%-ном параформальдегиде на PBS в течение 15 мин при 4 °С. Затем клетки окрашивали АТ, конъюгированными с флуорохромом Per-CP, против интегрин CD11b (компонента CR3) и дважды отмывали PBS. После этого анализировали интенсивность окрашивания клеток АТ к CD11b на проточном цитометре (Guava 5HT, США) в концентрации 10⁵ кл./мл. Число анализируемых клеток составляло 5 · 10³—5 · 10⁴, что является стандартным значением для цитометров капиллярного типа.

Скорость клеточной пролиферации оценивали с помощью проточной цитометрии, используя краситель диацетат карбоксифлуоресцеинсукцинимидила (CFDA-SE, Sigma-Aldrich, США), как описано (Lyons, Doherty, 2004). Нефлуоресцирующий эфир CFDA-SE, попадая в живую клетку, гидролизуется эстеразами и начинает флуоресцировать. При делении клеток краситель равномерно распределяется между двумя дочерними клетками, в которых его флуоресценция в 2 раза ниже, чем в материнской клетке. Таким образом, по интенсивности флуоресценции клетки можно определить, сколько

раундов деления совершила клетка после окраски. Число детектируемых раундов деления зависит от клеточного типа и концентрации CFDA-SE. Мы подобрали условия так, чтобы можно было определить, прошла ли клетка 1, 2, 3, 4 или более раундов деления. В клеточную суспензию добавляли CFDA-SE (конечная концентрация 2 мкМ) на 15 мин в темноте. Затем клетки центрифугировали в течение 5 мин при 200 g, после чего осадок ресуспендировали в культуральной среде, содержащей сыворотку и антибиотик в концентрациях, указанных выше, и культивировали в течение 2 сут. Число циклов оценивали по затуханию флуоресценции и появлению характерных пиков в диапазоне 515—545 нм, которые соответствовали каждому раунду деления клеток. Для получения данных для точки «ноль раундов деления» клетки окрашивали CFDA непосредственно перед цитометрией.

Анализ экспрессии генов и транскрипции сателлитной ДНК *HS3* (Human Satellite 3). Тотальную РНК выделяли с помощью набора (Силекс, Россия), в котором используются магнитные частицы, покрытые SiO₂. Полученную согласно протоколу фирмы-производителя тотальную РНК хранили при -80 °С. кДНК к тотальной полиА-РНК (полиТ-кДНК) получали с помощью набора для обратной транскрипции (Силекс, Россия) согласно протоколу фирмы-производителя. Для получения полиТ-кДНК использовали олиго(dT)₁₅-праймеры (Силекс, Россия). Полученные образцы кДНК хранили при -20 °С. Для проведения ПЦР использовали олигонуклеотидные последовательности праймеров к гену *ddx5*: смысловой 5'-GTTCCCCGCCAACCGCAACC-3' и антисмысловой 5'-TTTCCACCTTGTGCTGTGCGC-3'; к *HS3*: смысловой 5'-AGTCCATTC AATGATTCATCCATCCAGT-3' и антисмысловой 5'-AATCATCATCCAACGGAAGСТААТG-3' и к *gapdH* (в качестве эндогенного контроля): прямой 5'-GAAGGTGAAGGTCGGAGTC-3' и антисмысловой 5'-GAAGATGGTATGGGATTTTC-3'. Амплификацию проводили в 25 мкл Таq-буфера, содержащего 0.25 мМ Mg²⁺, 0.25 мМ dNTP (каждого олигонуклеотида) (Силекс, Россия), 12.5 пкмоль каждого праймера, 1 мкл смеси, полученной в результате обратной транскрипции в качестве матрицы для ПЦР, 0.2 мкл Таq-полимеразы (500 Е/мл) (СибЭнзим, Россия). ПЦР для амплификации *HS3* и *gapdH* состояла из 25 циклов (94 °С 30 с, 55 °С 45 с и 72 °С 1 мин), завершающихся 2-минутным финальным отжигом при 72 °С. Для амплификации *ddx5* — 25 циклов (94 °С 30 с, 57 °С 45 с и 72 °С 1 мин), завершающихся 2-минутным финальным отжигом при 72 °С. В качестве контроля остаточной геномной ДНК проводили ПЦР проб РНК (без предварительной обработки ревертазой) с праймерами к *HS3*. После завершения ПЦР фрагменты ДНК разделяли электрофоретически в 1%-ном агарозном геле, содержащем 0.01 % бромистого этидия.

Статистическую обработку полученных результатов осуществляли с помощью *t*-критерия Стьюдента. Результаты на рис. 6 и 7 представлены в виде среднего значения и его стандартного отклонения. Каждый эксперимент повторяли не менее 2 раз. Каждой экспериментальной точке соответствует не менее 3 измерений.

Результаты

Эффективность заражения клеток Jurkat лентивирусами на основе векторной системы LVNTM. Через 48 ч после заражения клеток векто-

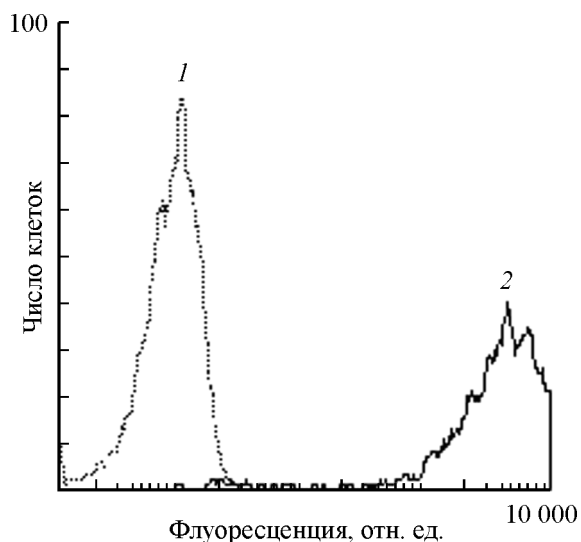


Рис. 1. Распределение контрольных незараженных (1) и зараженных (2) лентивирусом LV-GFP клеток Jurkat по интенсивности флуоресценции.

ром LV-GFP их анализировали на проточном цитометре. У 96 % клеток зараженной культуры интенсивность флуоресценции была на два порядка выше, чем у контрольных незараженных клеток (рис. 1). Таким образом, этими контрольными экспериментами мы подтвердили правильность подобранных условий для заражения клеток Jurkat и экспрессии последовательности, встроенной в линкерном участке конструкции LV-GFP. Хотя заражение клеток GFP-конструкциями на основе LVNTM происходило с большой эффективностью, в клетках, зараженных конструкцией LV-shDDX5, инактивацию DDX5 наблюдали у небольшого числа клеток. После инфицирования клеток вирусом LV-shDDX5 32.9 ± 2.3 % клеток не окрашивали АТ против DDX5, тогда как среди контрольных клеток не окрашивались только 18.6 ± 1.8 %. Разницу между этими значениями (14.3 %) мы интерпретировали как количество клеток, в которых сработала конструкция с последовательностью для инактивации DDX5. Низкая эффективность инактивации DDX5 может быть связана с низкой транскрипцией введенной последовательности LV-shDDX5 или ее быстрой деградации в клетках.

Содержание DDX5 в клетках Jurkat, находящихся в разных фазах клеточного цикла. Результаты анализа содержания DDX5 в контрольных неинфицированных клетках в зависимости от стадии клеточного цикла представлены на рис. 2. В клетках на границе фаз G₀/G₁ находилось 40.4 % клеток, в фазе S — 25.6 и в G₂/M — 34.0 (рис. 2, а). При этом интенсивность окраски клеток (определяемой с помощью цитометра) АТ против DDX5, находящихся в фазах G₀ и G₁, была ниже, чем в клетках в фазах G₂/M (рис. 2, б). Параметры прямого и бокового рассеивания для популяций клеток в этих стадиях не различались между собой, что говорит о том, что интенсивность окраски изменялась за счет увеличения именно содержания белка, а не за счет увеличения, например, размера клеток. Среднее значение интенсивности свечения АТ в клетках в фазах G₀/G₁ составило 122.96 ± 0.53 отн. ед. (среднеквадратичное отклонение 33.9 при n = 3982), в клетках фаз G₂/M — 228.00 ± 1.25 (среднеквадратичное отклонение 61.07 при n = 2381). При повторении эксперимента наблюдали ту же картину, но с мень-

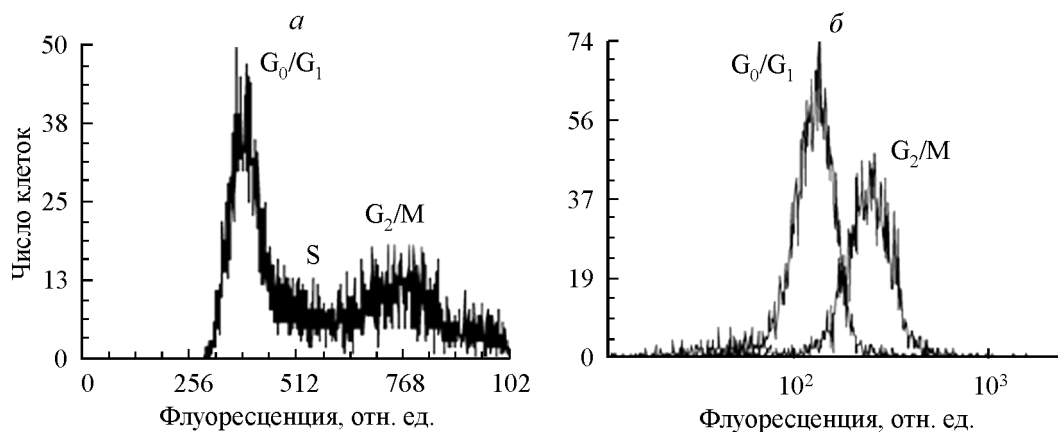


Рис. 2. Зависимость содержания DDX5 в клетках Jurkat от стадии клеточного цикла, определенной по содержанию ДНК. Проточная цитометрия.

a — гистограмма распределения клеток по фазам клеточного цикла; *б* — гистограмма распределения клеток по интенсивности окрашивания АТ против DDX5 в клетках, находящихся в фазах G_0/G_1 и G_2/M .

шей разницей по содержанию DDX5 между клетками в фазах G_0/G_1 и G_2/M (144 ± 0.8 против 231 ± 1.23).

Влияние инактивации DDX5 на распределение клеток в популяции по фазам клеточного цикла. Заражение клетки лентивирусной конструкцией на основе вектора LVTHM само по себе может влиять на пролиферативную активность клеток и, следовательно, может изменить распределение клеток по фазам клеточного цикла. Мы показали, что контрольное заражение LV-GFP не влияет на этот параметр (рис. 3). В фазах G_0/G_1 находилось $48 \pm 4\%$ незараженных клеток и $53 \pm 3\%$ клеток, зараженных LV-GFP.

В случае клеток, зараженных LV-shDDX5, мы анализировали только ту область, которая соответствовала слабо окрашивающимся АТ клеткам (рис. 4). Так, среди контрольных неинфицированных клеток в фазах G_0/G_1 находилось — $53.3 \pm 6.4\%$ (рис. 5, *a*), тогда как среди зараженных LV-shDDX5 — $76.1 \pm 1.8\%$ клеток (рис. 5, *б*). При этом на гистограмме, полученной для зараженных

клеток, пик G_2/M практически не определялся, что может быть объяснено неспособностью клетки пройти S-фазу.

Анализ пролиферативной активности клеток, трансфицированных LV-shDDX5. Анализ скорости клеточной пролиферации витальным красителем CFDA-SE показал, что среди клеток, зараженных вирусом LV-shDDX5, 52.7% клеток совершило 1 раунд деления, тогда как среди контрольных клеток — всего 11.1%. Больше половины контрольных клеток (59.2%) прошло более 4 раундов деления. В инфицированной популяции столько же раундов деления совершила значительно меньшая часть клеток (24.1%; см. таблицу). Таким образом, инактивация белка DDX5 приводила к замедлению темпов пролиферации.

Изменение содержания DDX5 во время моноцитарно-макрофагальной дифференцировки U-937. Анализ динамики изменения экспрессии белка DDX5 после индукции дифференцировки ФМА клеток U-937 показал, что его содержание в популяции

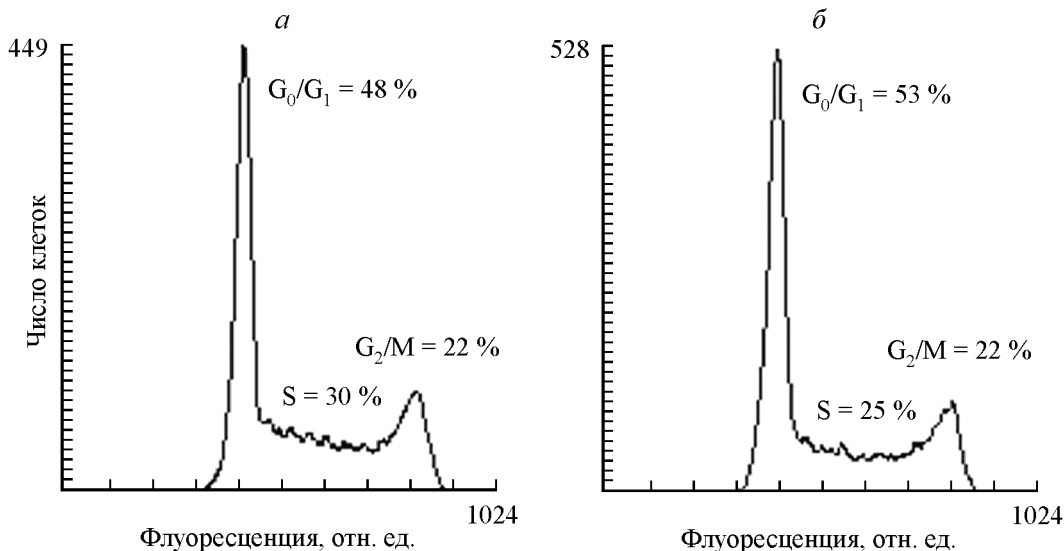


Рис. 3. Гистограммы распределения незараженных (*a*) и зараженных лентивирусом LV-GFP (*б*) клеток Jurkat по фазам клеточного цикла.

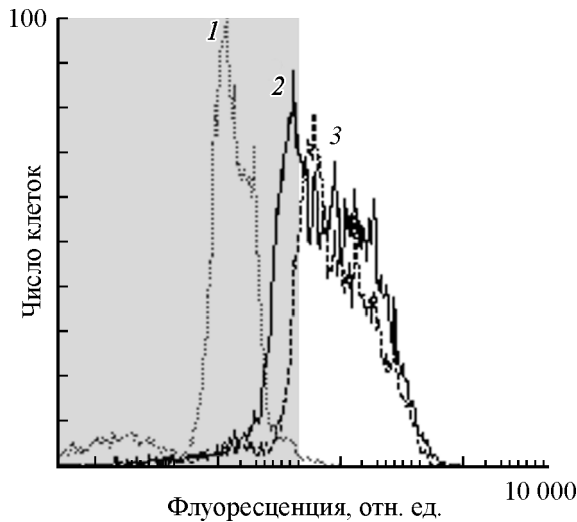


Рис. 4. Распределение интенсивности флуоресценции клеток Jurkat, меченных антителами (АТ) против DDX5.

Кривые: 1 — неокрашенные клетки (собственная флуоресценция), 2 — АТ в клетках, зараженных LV-shDDX5, 3 — АТ в незараженных клетках. Область, выделенная серым цветом, соответствует неокрашенным клеткам.

клеток возрастает, достигая максимума через 2 ч, и остается на том же уровне еще в течение 1 ч после добавления в среду ФМА, после снижается (рис. 6, а). Первые признаки дифференцировки (морфологические изменения клеток и их адгезия к дну планшета) наблюдаются уже в первые часы после добавления ФМА. Однако поверхностный маркер макрофагов CR3 появлялся только через 24 ч после индукции дифференцировки, что свидетельствует о том, что процесс дифференцировки клеток U-937 занимает не менее 24 ч (рис. 6, б). Через 24 ч после обработки клеток ФМА доля клеток в фазах G₀/G₁, обработанных и необработанных, составляла соответственно 65.4 ± 1.4 и 55.0 ± 3.8 % соответственно (рис. 7).

Изучение изменения динамики транскрипции гена *ddx5* в течение 5 ч после добавления ФМА в культуру

Проллиферативная активность клеток Jurkat до и после введения лентивируса LV-shDDX5

Число раундов деления	Доля клеток, %	
	контрольные	зараженные LV-shDDX5
0	0.29	1.66
1	11.12	52.67
2	4.44	8.66
3	8.95	5.93
4	15.27	6.41
>4	59.17	24.08

клеток показало, что уровень *ddx5* увеличивается в первые часы после добавления агента и пик транскрипции *ddx5* приходится на 3-й ч после индукции клеток к дифференцировке (рис. 8). Что касается динамики транскрипции *HS3*, то после добавления ФМА в клеточную среду уровень его кДНК сначала повышается и достигает максимума тоже через 3 ч, а далее снижается (рис. 8).

Обсуждение

Исходя из полученных результатов можно предположить, что белок DDX5 необходим для перехода клетки из фазы G₁ в фазу S. При его инактивации число клеток в фазах G₀ и G₁ увеличивается. В ряде работ показано, что нарушение экспрессии белка DDX5 может приводить к дестабилизации процессов синтеза белков (Fuller-Pace, 2006), так что белок DDX5 может запускать транскрипцию циклина D1 через взаимодействие с бета-катенином (Yang et al., 2007). В свою очередь циклин D1 входит в комплекс киназ CDK4 и CDK6, и эти комплексы функционируют в фазах G₀ и G₁. Отсюда можно предположить, что при нехватке или инактивации DDX5 экспрессия циклина D1 замедляется, и в результате уменьшается количе-

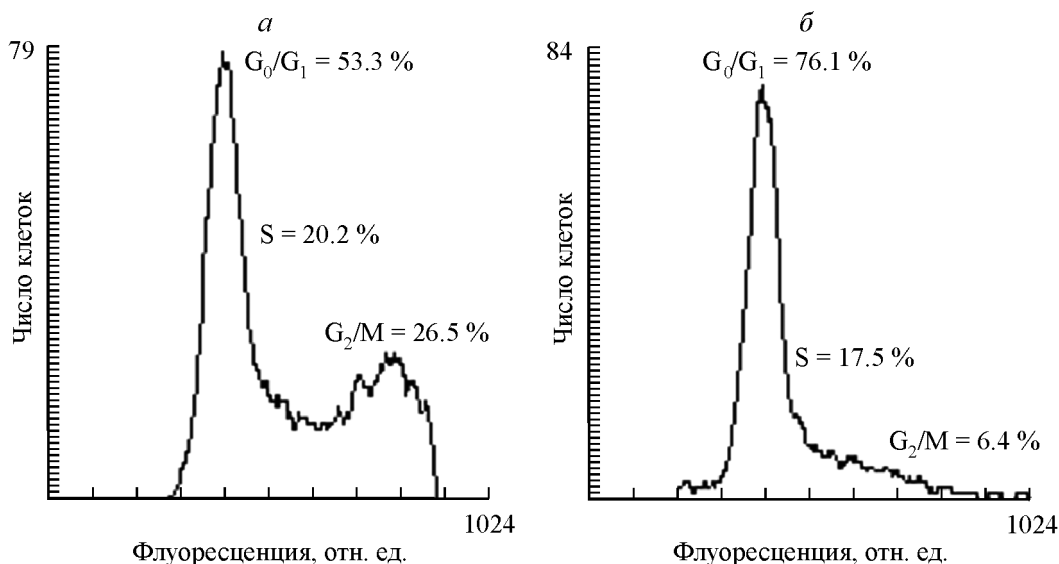


Рис. 5. Гистограммы распределения незараженных (а) и зараженных лентивирусом LV-shDDX5 (б) клеток Jurkat по фазам клеточного цикла.

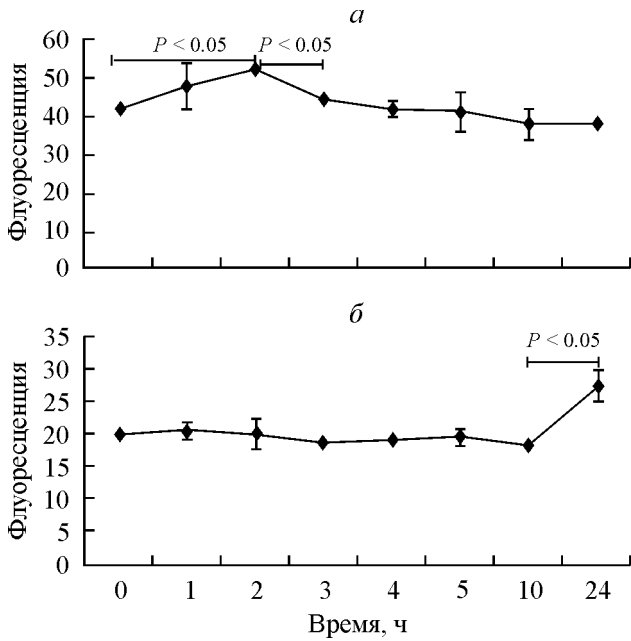


Рис. 6. Изменения количества белка DDX5 (а) и поверхностного макрофагального маркера CR3 (б), оцениваемые по изменению интенсивности флуоресценции, при действии 35 нг/мл ФМА на клетки U-937.

Приведены средние значения и их стандартные отклонения. Достоверные различия между значениями ($P < 0.05$) показаны горизонтальными отрезками.

ство его комплексов с CDK4 и CDK6, что может также приводить к задержке клеток в фазах G_0/G_1 .

Таким образом, мы показали, что DDX5 участвует в пролиферации клеток, вовлекаясь в активацию белков, непосредственно отвечающих за регуляцию клеточного цикла. Это подтверждается работами, в которых сообщается о корреляции активности пролиферации и содержания DDX5 в клетках. Показано, что при увеличении скорости клеточной пролиферации повышается содержание DDX5 (Stevenson et al., 1998). Эти авторы показали, что клетки, не пролиферирующие при культивировании в среде без сыворотки, имели низкий уровень DDX 5, после добавления сыворотки в среду пролиферативная актив-

ность возрастала, а содержание DDX5 увеличивалось. В той же работе было показано, что у мышей DDX5 конститутивно экспрессируется во всех тканях взрослого организма, хотя уровень экспрессии этого белка значительно варьировал от ткани к ткани: его наибольший уровень среди рассмотренных органов наблюдали в семенниках, где пролиферативная активность клеток исключительно высока.

В ряде работ показано изменение содержания DDX5 во время дифференцировки клеток. Так, после дифференцировки клеток U-937, вызванной такими индукторами, как TGFb (трансформирующий фактор роста) и D3 (25-дигидроксивитамин), уровень транскрипта *ddx5* через 24 ч был выше, чем в необработанных клетках (Gingras, Margolin, 2000). В настоящей работе кроме уровня транскрипта *ddx5* в клетках U-937 оценивали еще и изменение уровня белка DDX5 в клетках после индукции дифференцировки. Мы культивировали клетки U-937 в среде с ФМА различное время, но увеличение содержания белка DDX5 наблюдали только в первые часы дифференцировки, после чего оно снижалось. Отличия наших результатов от результатов авторов, упомянутых выше (Gingras, Margolin, 2000), по всей видимости, связаны с использованием различных индукторов дифференцировки. Мы предположили, что уменьшение экспрессии DDX5 после первого этапа дифференцировки может быть связано с потерей пролиферативного статуса и переходом клеток в фазу G_0 . Однако через 24 ч после добавления ФМА происходит небольшое увеличение доли клеток в фазах G_0/G_1 по сравнению с контрольными необработанными клетками. Эти данные согласуются с данными из литературы (Vrana et al., 1998).

Авторы показали, что в фазе G_1 через 24 ч после добавления ФМА доля клеток увеличивается всего на 5, а через 72 ч — на 20 % по сравнению с контролем. Эти же авторы показали, что рост клеточной популяции снижается на 40 % через 24 и на 90 — через 48 ч после добавления ФМА. Таким образом, снижение уровня белка DDX5 при обработке клеток ФМА, по всей видимости, связано с удлинением клеточного цикла, а не с остановкой клеток в фазах G_0/G_1 .

При обработке клеток U-937 ФМА в первые часы происходит изменение экспрессии ряда генов. Изменяется экспрессия интегринов $\alpha 5$ и $\beta 1$, пик которой приходит-

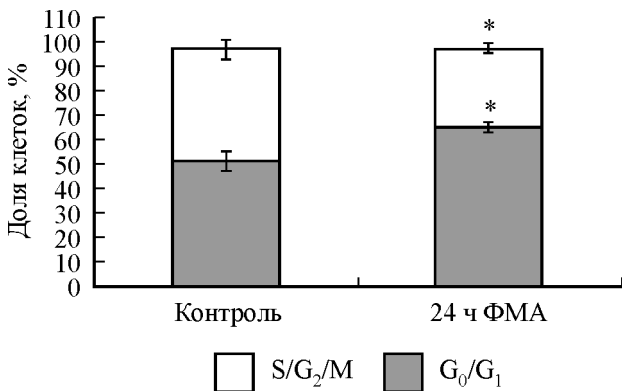


Рис. 7. Гистограмма распределения клеток U-937 по фазам клеточного цикла в контроле и после 24-часового действия ФМА (35 нг/мл).

Приведены средние значения и их стандартные отклонения. Достоверные отличия ($P < 0.05$) отмечены звездочкой.

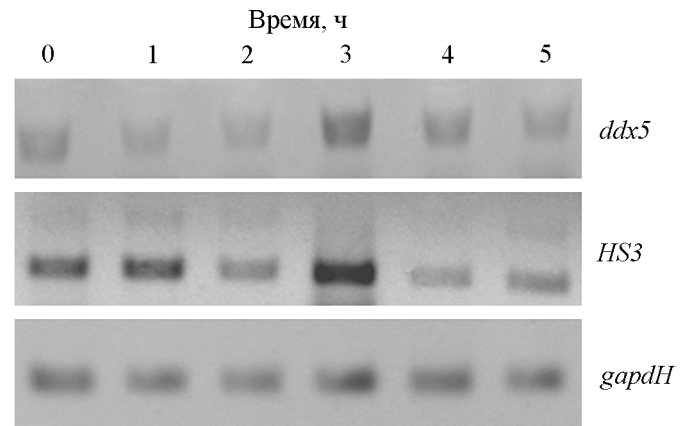


Рис. 8. Изменение уровня кДНК *HS3* и *ddx5* до и после индукции дифференцировки клеток U-937 при действии ФМА (35 нг/мл) в течение 5 ч.

ся на 4 ч после добавления ФМА (Boles et al., 2000). Кроме того, изменяются экспрессия и регуляция различных циклинов и киназы cdk2 (Vrana et al., 1998). Накопление белка DDX5 и транскрипта HS3, обнаруженное нами, совпадало во времени и также происходило в первые часы после индукции дифференцировки. Известно, что при дифференцировке эмбриональных клеток часто происходит повышение транскриптов сатДНК, инактивация которых приводит к остановке дифференцировки клеток (Probst et al., 2010). Предложена гипотеза, согласно которой транскрипты некодирующей прицентромерной ДНК могут принимать участие в эпигенетической регуляции генов экспрессии во время дифференцировки клеток (Parris, 2010). Однако для подтверждения этой гипотезы необходимы дальнейшие исследования.

Мы предполагаем, что белок DDX5 играет важную роль в переключении клеточных программ, действуя либо как вспомогательный фактор для транскрипции или сплайсинга РНК регуляторных генов, отвечающих за процесс дифференцировки, либо как фактор регуляции эпигенетического статуса генов, действующий через транскрипты некодирующих последовательностей сателлитных ДНК.

Работа выполнена при финансовой поддержке программы президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология».

Список литературы

- Boles B. K., Ritzenthaler J., Birkenmeier T., Roman J. 2000. Phorbol ester-induced U-937 differentiation: effects on integrin alpha(5) gene transcription. *Amer. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 278 : L703—L712.
- Caretti G., Schiltz R. L., Dilworth F. J., Di Padova M., Zhao P., Ogryzko V., Fuller-Pace F. V., Hoffman E. P., Tapscott S. J., Sartorelli V. 2006. The RNA helicases p68/p72 and the noncoding RNA SRA are coregulators of MyoD and skeletal muscle differentiation. *Develop. Cell.* 11 : 547—560.
- Enukashvily N. I., Donev R. M., Sheer D., Podgornaya O. I. 2005. Satellite DNA binding and cellular localization of RNA helicase P68. *J. Cell Sci.* 118 : 611—622.
- Enukashvily N. I., Malashicheva A. B., Waisertreiger I. S.-R. 2009. Satellite DNA spatial localization and transcriptional activity in mouse embryonic E-14 and IOUD2 Stem Cells. *Cytogenet. Genome Res.* 124 : 277—287.
- Fuller-Pace F. V. 2006. DEXD/H box RNA helicases: multifunctional proteins with important roles in transcriptional regulation. *Nucleic Acids Res.* 34 : 4206—4215.
- Gingras M. C., Margolin J. F. 2000. Differential expression of multiple unexpected genes during U937 cell and macrophage differentiation detected by suppressive subtractive hybridization. *Exp. Hematol.* 28 : 65—76.
- Gorbalenya A. E., Koonin E. V., Donchenko A. P., Blinov V. M. 1989. Two related superfamilies of putative helicases involved in replication, recombination, repair and expression of DNA and RNA genomes. *Nucleic Acids Res.* 17 : 4713—4730.
- Iggo R. D., Lane D. P. 1989. Nuclear protein p68 is an RNA-dependent ATPase. *EMBO J.* 8 : 1827—1831.
- Lane D. P., Hoeffler W. K. 1980. SV40 large T shares an antigenic determinant with a cellular protein of molecular weight 68000. *Nature.* 288. 167—170.
- Lyons A. B., Doherty K. V. 2004. Flow cytometric analysis of cell division by dye dilution. *Curr. Protoc. Cytom.* Chapter 9. Unit 9.11.
- Nicol S. M., Causevic M., Prescott A. R., Fuller-Pace F. V. 2000. The nuclear DEAD box RNA helicase p68 interacts with the nucleolar protein fibrillarin and colocalizes specifically in nascent nucleoli during telophase. *Exp. Cell Res.* 257 : 272—280.
- Ogilvie V. C., Wilson B. J., Nicol S. M., Morrice N. A., Saunders L. R., Barber G. N., Fuller-Pace F. V. 2003. The highly related DEAD box RNA helicases p68 and p72 exist as heterodimers in cells. *Nucleic Acids Res.* 31 : 1470—1480.
- Parris G. E. 2010. Developmental diseases and the hypothetical Master Dev. Program. *Med. Hypotheses.* 74 : 564—573.
- Probst A. V., Okamoto I., Casanova M., El Marjou F., Le Baccon P., Almouzni G. 2010. A strand-specific burst in transcription of pericentric satellites is required for chromocenter formation and early mouse development. *Develop. Cell.* 19 : 625—638.
- Schwende H., Fitzke E., Ams P., Dieter P. 1996. Differences in the state of differentiation of THP-1 cells induced by phorbol ester and 1,25-dihydroxyvitamin D3. *J. Leukoc. Biol.* 59 : 555—561.
- Stevenson R. J., Hamilton S. J., MacCallum D. E., Hall P. A., Fuller-Pace F. V. 1998. Expression of the 'dead box' RNA helicase p68 is developmentally and growth regulated and correlates with organ differentiation/maturation in the fetus. *J. Pathol.* 184 : 351—359.
- Tanner N. K., Cordin O., Banroques J., Doere M., Linder P. 2003. The Q motif. A newly identified motif in DEAD box helicases may regulate ATP binding and hydrolysis. *Mol. Cell.* 11 : 127—138.
- Vrana J. A., Saunders A. M., Chellappan S. P., Grant S. 1998. Divergent effects of bryostatin 1 and phorbol myristate acetate on cell cycle arrest and maturation in human myelomonocytic leukemia cells (U937). *Differentiation.* 63 : 33—42.
- Wang H., Gao X., Huang Y., Yang J., Liu Z.-R. 2009. P68 RNA helicase is a nucleocytoplasm shuttling protein? *Cell Res.* 19 : 1388—1400.
- Yang L., Lin C., Zhao S., Wang H., Liu Z. R. 2007. Phosphorylation of p68 RNA helicase plays a role in platelet-derived growth factor-induced cell proliferation by up-regulating cyclin D1 and c-Myc expression. *J. Biol. Chem.* 282 : 16 811—16 819.
- Yao H., Brick K., Evrard Y., Xiao T., Camerini-Otero R. D., Felsenfeld G. 2010. Mediation of CTCF transcriptional insulation by DEAD-box RNA-binding protein p68 and steroid receptor RNA activator SRA. *Genes Develop.* 24 : 2543—2555.

THE DDX5 PROTEIN IS INVOLVED IN CELL PROLIFERATION AND DIFFERENTIATION

*N. V. Ponomartsev,¹ N. E. Erukashvily*Institute of Cytology RAS, St. Petersburg; ¹ e-mail: ponomartsev@yandex.ru

The expression of DDX5 protein (RNA-helicase p68) correlates with processes of proliferation and differentiation. However there is no direct evidence of involvement of the protein in these processes. In present work, we studied the influence of DDX5 protein inactivation by si-RNA on the proliferation of Jurkat cells and dynamic of DDX5 expression during differentiation of U-937 cells induced by phorbol 12-myristate-13-acetate (PMA). We showed that the content of DDX5 in Jurkat cells is less in phases G₀/G₁ as compare to phases G₂/M. The treatment of cells with the antisense LV-shDDX5 was followed by the increase of G₀/G₁ cells. It was also shown that the increase of expression of the DDX5 protein occurred during the initial stages of differentiation, and the peak of expression was registered during the first 2—3 hours after the induction of the cells, later the DDX5 content decreases. The increase of the number of macrophage surface marker CR3 on the membrane of cells occurred only in 24 hours after induction of the cells by PMA. Thus, these data confirm that: 1) the DDX5 protein is essential for normal cell proliferation; 2) the transition from G₁ to S/G₂ phase is accompanied by an increase of DDX5 protein concentration in the cells; 3) the concentration of the DDX5 protein increases on early stages of U-937 cells differentiation and after decreases.

Key words: proliferation, differentiation, DDX5, cell cycle, RNA-helicase p68, U-937, Jurkat.
