

УДК 576.3

ПОВЫШЕННОЕ СОДЕРЖАНИЕ БЕЛКА ЯДРЫШКА SURF6 В АКТИВИРОВАННЫХ ЛИМФОЦИТАХ ДОНОРОВ И В ЛИМФОЦИТАХ БОЛЬНЫХ ЛИМФОПРОЛИФЕРАТИВНЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ

© 2020 г. А. А. Моралева¹, М. В. Малышева¹, С. В. Хайдуков¹, О. В. Зацепина^{1,*}

Представлено академиком РАН О. А. Донцовой

Поступило 16.06.2020 г.

После доработки 29.06.2020 г.

Принято к публикации 29.06.2020 г.

Пролиферация клеток млекопитающих обычно сопровождается повышением содержания ядрышковых белков, что позволяет рассматривать такие белки в качестве потенциальных активационных маркеров. Для экспериментальной проверки этого предположения мы изучили экспрессию ядрышкового фактора процессинга рРНК SURF6 в нормальных (покоящихся) лимфоцитах периферической крови доноров, лимфоцитах, активированных к пролиферации *in vitro*, а также в образцах крови больных лимфопролиферативными заболеваниями (ЛПЗ). Двумя методами – иммунофлуоресценцией и на иммуноблотах – мы впервые показали, что белок SURF6 не выявляется в нормальных лимфоцитах, но регулярно обнаруживается в лимфоцитах после ФГА-активации и при ЛПЗ. Уровень экспрессии SURF6 у больных коррелировал с агрессивностью заболевания, определяемой по содержанию Ki-67-позитивных лимфоцитов. Эти результаты позволяют рассматривать ядрышковый белок SURF6 в качестве возможного активационного маркера лимфоцитов при заболеваниях системы крови.

Ключевые слова: ядрышко, SURF6, лимфоциты, ФГА-активация, лимфолейкозы

DOI: 10.31857/S2686738920050169

Ядрышко является ключевой клеточной органеллой, служащей для образования рибосом. Как правило, в опухолевых клетках ядрышки обладают повышенной функциональной активностью, которая позволяет обеспечить более высокие потребности пролиферирующих клеток в синтезе белка. Хорошо известно, что активация ядрышек сопровождается увеличением их размеров и содержания в них белков [1, 2]. Эти фенотипические особенности ядрышек используются в клинической практике для оценки пролиферативного потенциала злокачественно трансформированных клеток [3]. На сегодняшний день основным маркером пролиферации клеток человека является ядрышковый белок Ki-67, известные функции которого связаны с биогенезом рибосом и организацией хроматина и который, по не выясненным пока причинам, в основном маркирует клетки на стадии репликации ДНК, т.е., в S-фазе клеточного цикла [4]. Однако развитие персонифициро-

ванной медицины и необходимость более точной диагностики опухолей разной этиологии требуют поиска дополнительных активационных маркеров опухолевых клеток. В онкогематологии в качестве таких маркеров были предложены ядрышковые белки NPM1 (B23, нуклеофозмин) и нуклеолин (C23). Однако в отличие от Ki-67, эти белки присутствуют в ядрышках не только опухолевых, но и многих нормальных клеток, что затрудняет оценку пула патологических лимфоцитов традиционными методами микроскопического анализа [5, 6].

Белок SURF6 млекопитающих – это жизненно необходимый ядрышковый фактор процессинга рРНК, повышенное содержание которого активирует клеточную пролиферацию [7–9]. Интересно, что дрожжевой гомолог SURF6, белок Rrp14, помимо участия в биогенезе рибосом влияет на способность дрожжевых клеток к делению, хотя молекулярные механизмы этого влияния остаются невыясненными [10, 11]. Неупорядоченная первичная структура и высокий позитивный заряд молекулы SURF6 способствуют его взаимодействию с NPM1, что, по мнению некоторых авторов, является ключевым условием формирования и функционирования ядрышка и

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, Москва, Россия

*e-mail: zatssepina_olga@mail.ru

его отдельных субдоментов [12, 13]. Поэтому можно ожидать, что содержание SURF6 будет изменяться при активации, бласттрансформации и дедифференцировке клеток. С целью проверки этого предположения, мы изучили содержания SURF6 на иммуноцитохимическом уровне и иммуноблотах с использованием двух специфических антител [14, 15] в лимфоцитах человека разных типов: нормальных, или покоящихся, активированных к пролиферации фитогемагглютинином (ФГА) *in vitro*, и нативных лимфоцитах, полученных от больных лимфопролиферативными заболеваниями (ЛПЗ). Полученные результаты впервые показали, что при определенных условиях белок ядрышка SURF6 не выявляется в нормальных лимфоцитах, но обнаруживается в активированных лимфоцитах, а также в лимфоцитах больных ЛПЗ, т.е. может служить новым активационным маркером лимфоцитов.

Лимфоциты выделяли из периферической крови по стандартной методике. Их активацию ФГА, иммуноцитохимическое окрашивание и проточную цитофлуориметрию производили, как описано нами ранее [5, 7, 9]. При постановке иммуноблотов на каждую дорожку наносили лизаты из примерно 5×10^5 клеток в стандартном буфере Лэмбли. После переноса белков на нитроцеллюлозную мембрану (диаметр пор 0.22 мкм), ее инкубировали с поликлональными кроличьими [14] или моноклональными мышинными [15] антителами к SURF6 человека. Контролем нагрузки (loading control) служили моноклональные мышинные антителами к актину ("Merck", Германия; каталожный номер MAB1501R). Мембрану инкубировали с антителами к иммуноглобулинам кролика или мыши, конъюгированными с пероксидазой хрена ("Merck"; каталожный номер AC111P). Во всех экспериментах антитела разводили в буфере TBS-T (20 мМ Трис-HCl, 150 мМ NaCl, 0.05% Твин-20, pH 7.6) до одинаковых рабочих концентраций; окрашивание длилось 1 ч

при комнатной температуре. Места связывания антител выявляли с помощью набора Pierce ECL Western Blotting Substrate ("Thermo Fisher Scientific", США, каталожный номер 32209) и рентгеновской пленки HyperFilm ECL ("Amersham Pharmacia Biotech", Великобритания, GE28-9068-37), следуя рекомендациям производителя. Окраску на Ki-67 производили согласно [2]. Иммуортиализованные клетки Т-лимфобластной лейкемии человека линии Jurkat выращивали, следуя рекомендациям поставщика ("БиолоТ", Санкт-Петербург), и использовали в качестве контроля. Всего нами были изучены нативные лимфоциты, полученные от восьми практически здоровых доноров и пяти больных ЛПЗ, образцы которых были предоставлены ФГБУ "НМИЦ гематологии" Минздрава России.

На рис. 1а, б представлены типичные варианты иммуноцитохимического окрашивания лимфоцитов периферической крови доноров антителами к SURF6 [15] до активации (а) и через 48 ч после активации ФГА (б). На рис. 1в показана окраска антителом к SURF6 [14] лимфоцитов больного с диагнозом мантийная зона селезенки. Видно, что антитела не окрашивают ядрышки в покоящихся лимфоцитах (а), но отчетливо метят ядрышки в активированных лимфоцитах (б), а также в лимфоцитах больного ЛПЗ (в). Более того, использованные антитела метили ядрышки лимфоцитов в образцах периферической крови всех онкобольных, случайным образом отобранных для анализа. Однако в зависимости от диагноза число SURF6-позитивных лимфоцитов у пациентов варьировало от 10% до 60% (табл. 1). Из таблицы также видно, что у всех больных число SURF6-позитивных лимфоцитов превышает число Ki-67-позитивных лимфоцитов, хотя между этими двумя параметрами наблюдается прямая корреляция. Эти наблюдения свидетельствуют в пользу того, что число SURF6-позитивных лим-

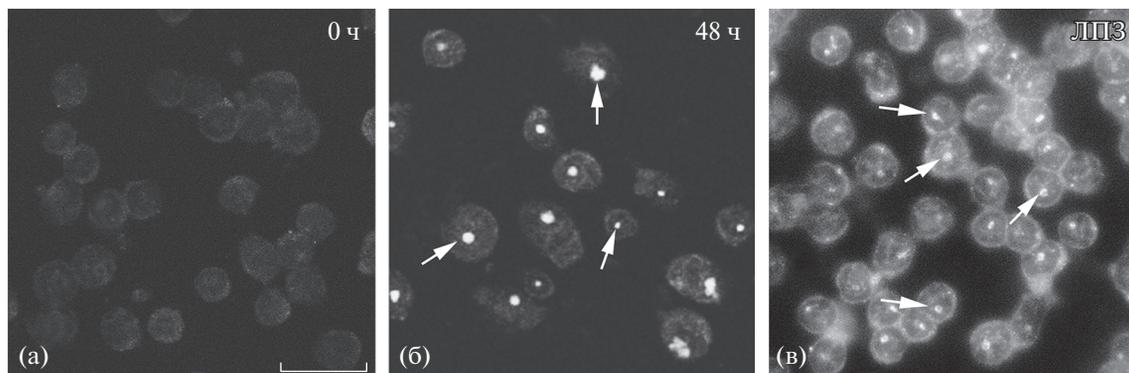


Рис. 1. Иммуноцитохимическое окрашивание антителами к SURF6 лимфоцитов периферической крови донора до активации (а), лимфоцитов донора через 48 ч после активации ФГА (б) и лимфоцитов больного ЛПЗ с диагнозом лимфома мантийной зоны селезенки (в). Стрелками указаны ядрышки. Масштабная линия – 20 мкм.

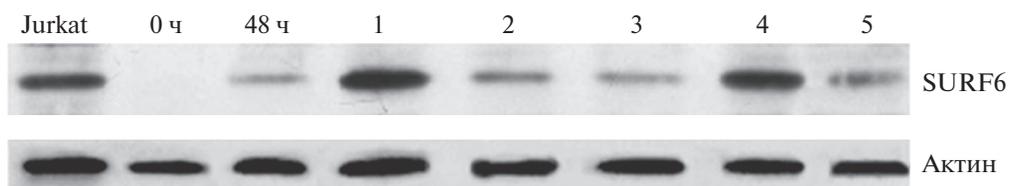


Рис. 2. Содержание белка SURF6 на иммуноблотах лимфоцитов периферической крови донора до активации (дорожка 0 ч), лимфоцитов донора через 48 ч после активации ФГА (дорожка 48 ч) и лимфоцитов больных ЛПЗ (дорожки 1–5), где 1 – лимфома мантической зоны селезенки, 2 – хронический лимфолейкоз на начальной стадии, 3 – волосатоклеточный лейкоз, 4 – хронический лимфолейкоз на прогрессирующей стадии, 5 – лимфома маргинальной зоны селезенки. На крайней дорожке слева показано положение SURF6 клетках линии Jurkat. Актин использовали в качестве контроля нагрузки. На все дорожки нанесены лизаты из примерно 5×10^5 лимфоцитов.

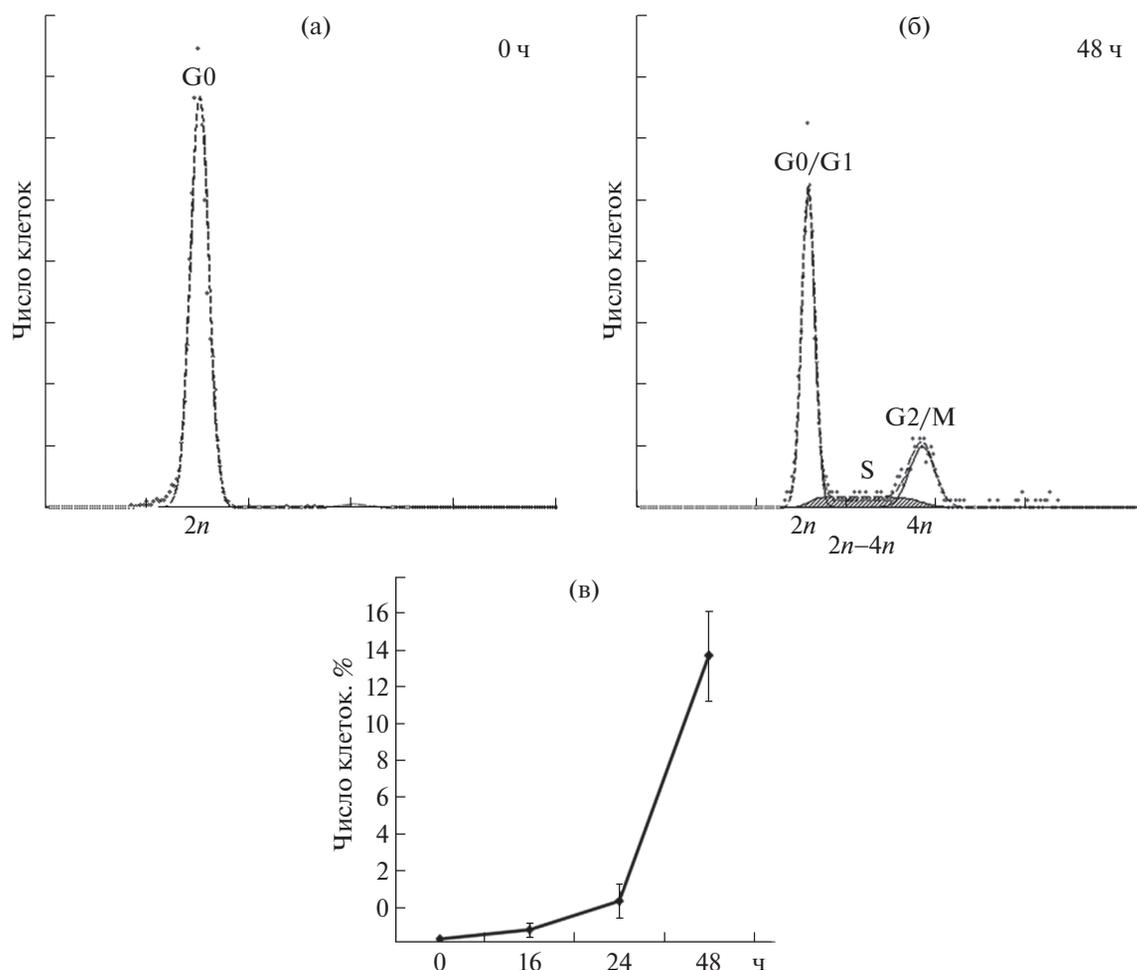


Рис. 3. Факс-анализ распределения нормальных лимфоцитов по основным фазам клеточного цикла (G0, G0/G1, S и G2/M) до активации (а) и через 48 ч после активации ФГА (б); (в) – график, отображающий число лимфоцитов в S-фазе на разные сроки ФГА-активации. На (а, б) вертикальные оси – число клеток, горизонтальные оси – содержание ДНК, где n – гаплоидное содержание ДНК. На (в) вертикальная ось – число клеток в S-периоде (в %), горизонтальная ось – время после ФГА-активации (в часах). Указаны средние значения и стандартные ошибки определения средних значений

фоцитов у больных ЛПЗ отражает агрессивность течения заболевания, традиционно определяемую по числу Ki-67-позитивных лимфоцитов.

Сходные результаты были получены при анализе содержаний SURF6 на иммуноблотах (рис. 2).

На рисунке 2 видно, что в идентичных условиях SURF6 не выявляется в нормальных лимфоцитах (дорожка 0 ч), но прекрасно виден в клетках Jurkat, активированных лимфоцитах (дорожка 48 ч), а также в лимфоцитах больных ЛПЗ (дорожки 1–5).

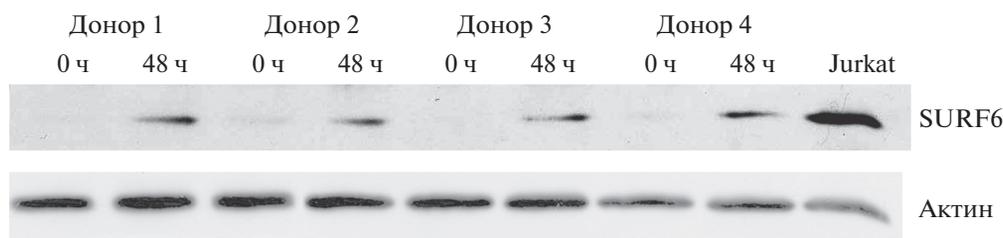


Рис. 4. Содержание белка SURF6 на иммуноблотах в лимфоцитах четырех доноров до ФГА-активации (дорожки 0 ч), через 48 часов после ФГА-активации (дорожки 48 ч). На крайней дорожке справа показано положение SURF6 клетках линии Jurkat. Актин использовали в качестве контроля нагрузки. На все дорожки нанесены лизаты из примерно 5×10^5 лимфоцитов. Блот проявлен моноклональными антителами к SURF6 человека [15].

Также, как и при иммуноцитохимическом окрашивании, на иммуноблотах содержание SURF6 у больных коррелировало с числом Ki-67 позитивных лимфоцитов (рис. 2). При визуальной оценке, наиболее высокое содержание SURF6 наблюдалось в лимфоцитах больного лимфомой мантийной зоны селезенки (дорожка 1; 13% Ki-67+ лимфоцитов) и более низкое – при хроническом лимфолейкозе (дорожка 2; 2% Ki-67+ лимфоцитов). Следует подчеркнуть, что окрашивание образцов разными антителами к SURF6 [14, 15] приводило к одинаковым результатам – в лизатах нормальных лимфоцитов SURF6 не выявлялся, а в лизатах лимфоцитов больных или активированных лимфоцитов его визуализация не представляла труда.

Таким образом, двумя методами – иммунофлуоресценцией и на иммуноблотах и с использованием двух специфических антител мы показали, что проявление SURF6 в ядрышках является признаком бластной трансформации лимфоцитов. Существенным преимуществом SURF6 перед другими ядрышковыми белками – потенци-

альными активационными маркерами лимфоцитов человека [5], является его более низкий уровень экспрессии в нормальных клетках, что облегчает идентификацию патологических, т.е. SURF6-позитивных, лимфоцитов в образцах пациентов с ЛПЗ. Выявление SURF6 в сыворотке крови может быть использовано для ранней (дооперационной) диагностики онкологических заболеваний, особенно при труднодоступности опухоли или отсутствии ее клинических проявлений.

В дополнительные материалы включены два рисунка (рис. 3 и рис. 4).

Рис. 3 характеризует распределение донорских лимфоцитов по основным фазам клеточного цикла в контроле (без активации) и после активации ФГА.

На рис. 4 показаны иммуноблоты лимфоцитов четырех доноров до и через 48 ч после активации.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность д.м.н., профессору Т.И. Бульчевой (ФГБУ “НМИЦ гематологии” Минздрава России) за предоставление образцов лимфоцитов больных ЛПЗ.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Образцы крови здоровых доноров и больных лимфопролиферативными заболеваниями, используемые в данном исследовании, были получены с информированного согласия пациентов в Федеральное государственное бюджетное учреждение “Национальный медицинский исследовательский центр гематологии” Министерства здравоохранения Российской Федерации в соответствии с разрешением этического комитета организации.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при финансово поддержке Российского Фонда Фундаментальных исследований (грант № 18-34-00767).

Таблица 1. Среднее число SURF6- и Ki-67-позитивных лимфоцитов (в %) в периферической крови доноров до ФГА-активации (0 ч), через 48 ч после ФГА-активации (48 ч), а также у больных разными формами ЛПЗ, n – число доноров.

Происхождение лимфоцитов	SURF6	Ki-67
Доноры, 0 ч (n = 8)	<3	<1
Нормальные ФГА-активированные лимфоциты (48 ч) (n = 8)	53	35
Хронический лимфолейкоз, начальная стадия	18	2
Волосатоклеточный лейкоз	10	3
Лимфома маргинальной зоны селезенки	23	3
Хронический лимфолейкоз, прогрессирующая стадия	52	7
Лимфома мантийной зоны селезенки	60	13

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Kalousek I., Otevřelová P., Röselová P.* Expression and translocation of major nucleolar proteins in relation to the transcriptional activity of the nucleolus // *J. Appl. Biomed.* 2005. V. 3. № 4. P. 175–186.
2. *Dergunova N.N., Bulycheva T.I., Artemenko E.G., et al.* A major nucleolar protein B23 as a marker of proliferation activity of human peripheral lymphocytes // *Immunology Letters.* 2002. V. 83. № 1. P. 67–72.
3. *Orsolich I., Jurada D., Pullen N., et al.* The relationship between the nucleolus and cancer: Current evidence and emerging paradigms // *Seminars in cancer biology.* 2016. V. 37–38. P. 36–50.
4. *Sun X., Kaufman P.D.* Ki-67: more than a proliferation marker // *Chromosoma.* Springer Science and Business Media Deutschland GmbH, 2018. V. 127. № 2. P. 175–186.
5. *Дейнеко Н.Л., Бульчева Т.И., Григорьев А.А., и др.* Экспрессия онкомаркерного белка B23/нуклеофозмина в различных опухолевых клетках // *Иммунология.* 2015. Т. 36. № 2. С. 153–158.
6. *Marcel V., Catez F.B., Caroline M., et al.* Expression Profiling of Ribosome Biogenesis Factors Reveals Nucleolin as a Novel Potential Marker to Predict Outcome in AML Patients // *PLOS ONE.* 2017. V. 12. № 1. P. e0170160.
7. *Моралева А.А., Малышева М.В., Магоулас Х., и др.* Ранняя экспрессия белка ядрышка SURF-6 в лимфоцитах селезенки мыши, активированных к пролиферации *in vitro* // *Бюллетень Экспериментальной Медицины и Биологии.* 2009. Т. 147. № 5. С. 507–511.
8. *Polzikov M., Zatsepina O., Magoulas C.* Identification of an evolutionary conserved SURF-6 domain in a family of nucleolar proteins extending from human to yeast // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2005. V. 327. № 1. P. 143–149.
9. *Moraleva A., Magoulas C., Polzikov M., et al.* Involvement of the specific nucleolar protein SURF6 in regulation of proliferation and ribosome biogenesis in mouse NIH/3T3 fibroblasts // *Cell Cycle.* 2017. V. 20. № 16. P. 1979–1991.
10. *Oeffinger M., Fatica A., Rout M.P., et al.* Yeast Rrp14p is required for ribosomal subunit synthesis and for correct positioning of the mitotic spindle during mitosis // *Nucleic acids research.* 2007. V. 35. № 4. P. 1354–1366.
11. *Sanghai Z.A. et al.* Modular assembly of the nucleolar pre-60S ribosomal subunit // *Nature.* 2018. V. 556. № 7699. P. 126–129.
12. *Ferrolino M.C., Mitrea D.M., Michael J.R., et al.* Compositional adaptability in NPM1-SURF6 scaffolding networks enabled by dynamic switching of phase separation mechanisms // *Nature Communications.* 2018. V. 9. № 1. P. 5064.
13. *Smetana K.* Structural features of nucleoli in blood, leukemic, lymphoma and myeloma cells // *Eur. J. Histochem.* 2002. V. 46. № 2. P. 125–132.
14. *Magoulas C., Zatsepina O.V., Jordan P.W. et al.* The SURF-6 protein is a component of the nucleolar matrix and has a high binding capacity for nucleic acids *in vitro* // *European journal of cell biology.* 1998. V. 75. № 2. P. 174–83.
15. *Polzikov M.A., Kordyukova M.Y., Zavalishina L.E., et al.* Development of novel mouse hybridomas producing monoclonal antibodies specific to human and mouse nucleolar protein SURF-6 // *Hybridoma.* 2012. V. 31. № 1. P. 48–53.

A HIGHER LEVEL OF EXPRESSION OF THE NUCLEOLAR PROTEIN SURF6 IN HUMAN NORMAL ACTIVATED LYMPHOCYTES AND IN LYMPHOCYTES OF PATIENTS WITH LYMPHOPROLIFERATIVE DISORDERS

A. A. Moraleva^a, M. A. Malysheva^a, S. V. Khajdukov^a, and O. V. Zatsepina^{a,#}

^a *Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Science, Moscow, Russian Federation*

[#]*e-mail: zatsepina_olga@mail.ru*

Presented by academician of the RAS O.A. Dontsova

Proliferation of mammalian cells is often accompanied by an increase in the content of the nucleolar proteins, which allows researchers to consider such proteins as potential activation markers. To verify this supposition experimentally, we examined the expression pattern of a nucleolar rRNA processing factor SURF6 in normal (resting) peripheral blood lymphocytes, lymphocytes activated for proliferation *in vitro*, as well as in blood samples from patients with lymphoproliferative diseases. Using two methods, immunofluorescence and immunoblot, we for the first time showed that the SURF6 protein is not detected in normal lymphocytes, but can easily be visualized in lymphocytes after PHA activation and in lymphocytes of lympholeukosis patients. The level of SURF6 expression in patients correlated with the aggressiveness of the disease development determined by the content of Ki-67-positive lymphocytes. These results allow us to consider the nucleolar protein SURF6 as a putative activation marker of lymphocytes in human blood disorders.

Keywords: nucleolus, SURF6, lymphocytes, PHA-activation, lympholeukosis