

Study of the role of PH domain of Bcr protein in the development of Ph⁺-positive leukemia

Olga Nezelyuk¹, Gennadii Telegeev²,
Liudmila Polishchuk², Oleksandr Karpov¹

¹National University of food technologies, Kyiv, Ukraine

²Institute of Molecular Biology and Genetics, National Academy of Sciences of Ukraine

Keywords:

Leukemia
Fahosom
Bcr-Abl

Article history:

Received 19.09.2012
Received in revised form
22.10.2012
Accepted 24.10.2012

Corresponding author:

G.D.Telegeev
E-mail:
g.d.telegeev@imbg.org.ua

ABSTRACT

The method of fahosom visualization using fluorescence-labeled bacteria for checking colocalization of PH domain of protein Bcr-Abl with membrane fahosom were studied in this work. Investigation of colocalization of PH domain with phagosome membrane is important for the understanding the role of this domain in cellular processes and potentially can result in development of novel targeted treatment strategies. Our pEGFP-PH vector, which encodes PH-GFP protein, has been transfected in J774 cells with use of DEAE-dextran. GFP gives green fluorescent signal that helps to visualize colocalization of the PH domain with cell organelles during fluorescence microscopy.

УДК 577.2.575

Вивчення ролі PH домену білка Bcr у розвитку Ph⁺-позитивної лейкемії

Ольга Незелюк¹, Геннадій Телегеев²,
Людмила Поліщук², Олександр Карпов¹

¹Національний університет харчових технологій, м. Київ, Україна

²Інститут молекулярної біології і генетики НАНУ

Вступ

Ph⁺-позитивні лейкемії характеризуються наявністю філадельфійської хромосоми, котра є результатом реципрокної транслокації між 9 та 22 хромосомами. Вона виявляється у 95% хворих на хронічну мієлоїдну лейкемію (ХМЛ), у 10–20% дорослих та 2–5% дітей з гострою лімфобластною лейкемією (ГЛЛ), а також при деяких випадках гострої мієлоїдної лейкемії (ГМЛ), лімфоми, мієломи та Ph⁺-позитивної хронічної нейтрофільної лейкемії (ХНЛ). Результатом цієї хромосомної аберації є утворення

гібридного гену *bcr-abl*, експресія котрого призводить до злоякісної трансформації гемопоетичних клітин [2, 3].

Відомі різні варіанти гібридного гена *bcr-abl*, що відрізняються точками розриву при транслокації. Ці варіанти характерні для різних онкогематологічних захворювань, з них експресуються різні за розміром білки p210 Bcr-Abl, p230 Bcr-Abl і p190 Bcr-Abl. Питання щодо залежності між певним варіантом Bcr-Abl та розвитком конкретного типу захворювання залишається відкритим.

Переважає більшість попередніх робіт були спрямовані на вивчення активності тирозинової кінази Abl-частини. Це дало змогу розробити і впровадити в клінічну практику перший специфічний інгібітор тирозинової кінази, однак з'являється все більше даних про виникнення мутацій, що перешкоджають дії цього лікарського засобу [4]. Таким чином, виникає проблема розробки нових специфічних агентів, як і нових підходів до блокування сигнальних шляхів, у яких бере участь гібридний білок Bcr-Abl.

Вплив частини Bcr на роль гібридного білка в пухлинній трансформації є також досить істотною. Відомо, що три різні форми білка Bcr-Abl по-різному впливають на розвиток і гостроту захворювання. Розриви в гені *abl* відбуваються таким чином, що вони не змінюють структурну частину гібридного білка, що належить Abl. На відміну від цього, ген *bcr* має три ділянки, в яких розриви відбуваються найчастіше і в залежності від точки розриву *bcr*, утворюються три різні за довжиною форми білка Bcr-Abl [1] тобто, різниця в довжині забезпечується за рахунок частини Bcr, а Abl ділянка залишається незмінною, і саме мутації Bcr-фрагмента призводить до зміни в характері захворювання та втрати відповіді на терапію.

Білок BCR приймає участь в декількох важливих процесах клітини: клатрін-залежний сигналінг [5] з контролем сортувального комплексу, контроль за активністю малих Rho ГТФ-аз [6], зв'язування з компонентами акти нового цитоскелету [7] тощо. Функції Bcr забезпечуються різними його доменами, які мають сайти зв'язування з різними білками клітини. Саме зв'язування з тими, чи іншими білками різних структур клітини при втраті внаслідок мутацій певних доменних компонентів може призводити до різної локалізації білка Bcr-Abl в клітині і обумовлювати різницю в характері та пробігу захворювання.

Детальна характеристика доменів білка Bcr може допомогти як у пошуку нових мішеней для лікарських препаратів, так і в з'ясуванні причин розвитку певного фенотипу захворювання та механізмів його прогресії. В цьому аспекті цікаво дослідити наявність Bcr-Abl на мембрані фагосом для оцінки перспективи терапії.

Мета роботи – відпрацювати метод візуалізації фагосом за допомогою флуоресцентно мічених бактерій для створення в майбутньому підходів до перевірки колокалізації PH домена білка Bcr-Abl з мембраною фагосом.

Методи досліджень

Накопичувальну (нічну) культуру отримували на середовищі Лоурі-Бертрані (LB). Інкубували при 37°C протягом ночі при інтенсивному струшуванні.

Виділення плазмід, що містять послідовності нуклеотидів, яка кодує PH домен білка Bcr і плазмідного вектора pEGFP-C3, в який буде заклоновано PH домен, здійснювали методом лужного лізису. Очищення плазмід проводили на мембранних фільтрах.

Трансформацію плазмід в бактерію *E. coli* здійснювали після приготування компетентних клітин бактерій шляхом охолодження при наявності двовалентних

катионів, наприклад Ca^{2+} (у CaCl_2), що робить клітинні мембрани більш проникними до плазмідної ДНК. Бактерії культивуються з ДНК, а потім раптово нагріваються (до 42 С протягом 30–60 секунд), що примушує ДНК до проникнення до клітини. Цей метод добре працює для кільцевої ДНК плазмід, але не для лінійних фрагментів хромосомної ДНК. В експериментах використовували плазміди, які містять ген стійкості до антибіотиків і бактеріальні штами, що не мають стійкості до цього антибіотику. Тому, тільки трансформовані бактерії можуть вижити на селективному середовищі з цим антибіотиком.

Розрізання плазмідного вектора проводили за допомогою ендонуклеаз *Bam*HI та *Hind*III. Після отримання та підготовки вставки, тобто послідовність нуклеотидів, яка кодує РН домен (включаючи перевірку на відповідність її нуклеотидної послідовності) та плазмідного вектора було проведено лігування таким чином, щоб молярне співвідношення вектора до вставки було 1:3, а також у присутності АТФ та ферменту – Т4 ДНК лігази.

Отриману плазмиду перевіряли на її відповідність очікуваного розміру. Для цього використовували електрофорез в агарозному гелі. Оцінку розмірів ДНК здійснювали, спираючись на дані про розміри рестриктів секвенованих молекул ДНК. Як правило, в якості реперних фрагментів відомої довжини використовують рестрикти ДНК фага λ , для яких виділяють одну з доріжок гелевої пластинки. Вони дозволяють визначати розміри рестриктів ДНК, що вивчається.

Культивування макрофагів мишей J774 здійснювали на середовищі DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) + 10% FBS (сироватка ембріона бика) при температурі +37°C та 5% CO_2 . Мишині макрофаги поглинають шляхом фагоцитозу клітини бактерій *E. coli*, що можна побачити за допомогою фарбування акридином оранжевим.

Візуалізацію фагосом проводили шляхом фарбування бактерій за допомогою флуоресцентного фарбника (кандидати: бромистий етидій та пропідій йодид – червоний колір флуоресценції).

Результати та обговорення

Флуоресцентна мікрофотографія мишиних макрофагів клітинної лінії J774 фарбованих акридином оранжевим, що інкубувалися з бактеріями *E.coli*. Акридин оранжевий зв'язується з нуклеїновими кислотами дав зелений колір клітинам, а у кислому середовищі фагосом став оранжевим, що дозволяє візуалізувати поглинуті за допомогою фагоцитозу бактерії. Але сам акридин оранжевий в наших дослідженнях не підходить, бо дає зелений колір клітинам, що буде перекриватися з РН-GFP. Тому в подальших дослідженнях було запропоновано використовувати такі барвники: бромистий етидій і пропідій йодид.

Результати застосування барвників: бромистого етидія (А) та пропідія йодиду, представлені на рис. 1 та рис 2. Бромистий етидій і пропідій йодид добре фарбують клітини бактерій *E.coli* (рис. 1). Крім того, бромистий етидій фарбує і живі клітини макрофагів (рис. 2), що нам не підходить оскільки ми плануємо фарбувати ним тільки бактерій, а при додаванні пофарбованих ним бактерій до макрофагів залишки фарбника можуть пофарбувати і клітини макрофагів, що нам не потрібно. Пропідій йодид не фарбує живі макрофаги (за рахунок непроникності через мембрану живої клітини), що дозволяє його використання у нашому дослідженні.

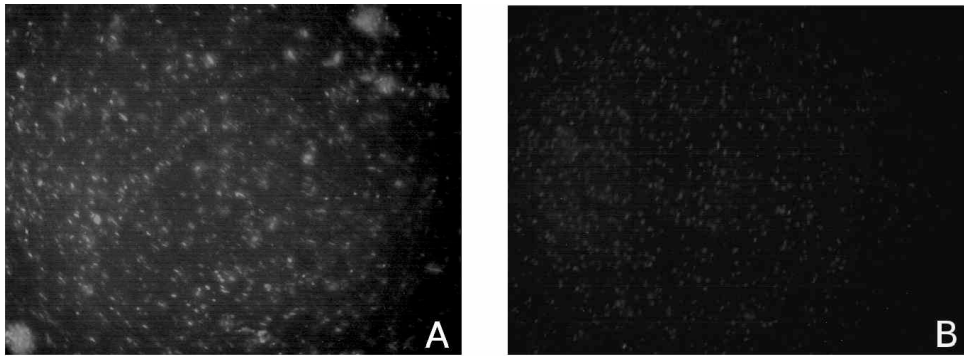


Рис. 1. Флуорисцентна мікрофотографія бактеріальних клітин E.coli, фарбованих бромістим етидієм (A) та пропідій йодидом (B)

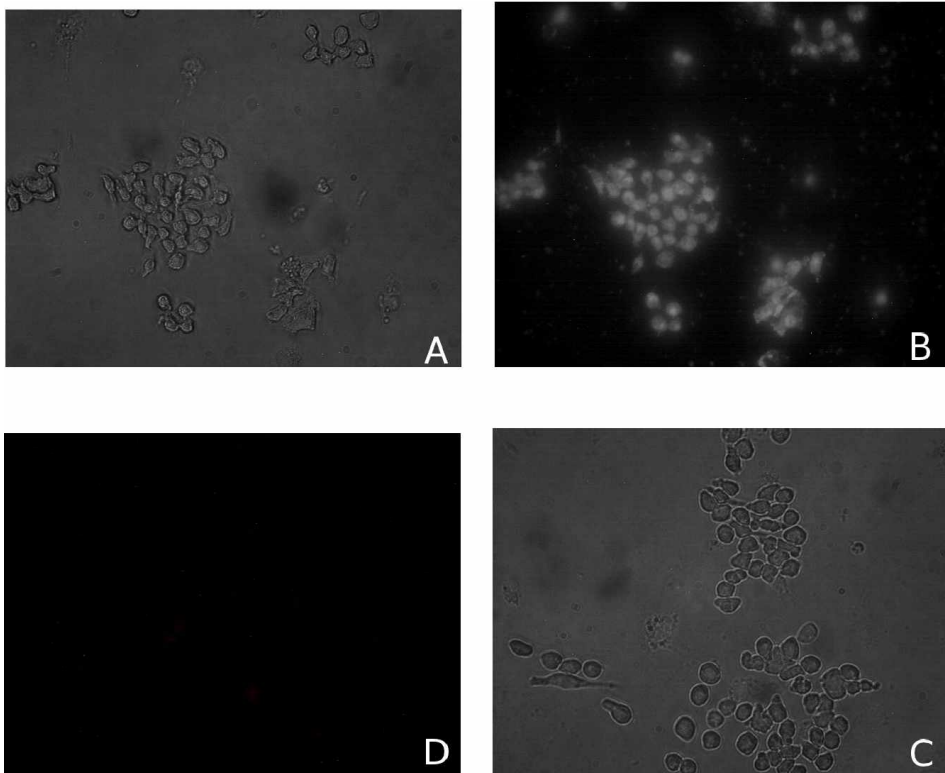


Рис. 2. Мікрофотографія мишиних макрофагів клітинної лінії J774, що фарбувалися бромістим етидієм в світлому полі (A) та в темному полі за умов флуоресценції (B), а також тих, що фарбувалися пропідій йодидом, в світлому полі (C) та в темному полі за умов флуоресценції (D)

Висновки

1. Культура клітин J774 підходить як модель для візуалізації фагосом. Мишині макрофаги поглинають шляхом фагоцитозу клітини бактерій *E.coli*, що можна побачити за допомогою фарбування акридином оранжевим (рис.1, фагосоми – оранжеві). Але сам акридин оранжевий в наших дослідженнях не підходить, бо дає зелений колір клітинам, що буде перекриватися з РН-EGFP (теж зелена флуоресценція). Планується трансфекувати макрофаги конструкцією рEGFP-РН, а візуалізацію фагосом проводити шляхом фарбування бактерій за допомогою флуоресцентного фарбника.

2. Бромістий етидій і пропідій йодид добре фарбують клітини бактерій *E.coli* (рис1)

3. Бромістий етидій фарбує живі клітини макрофагів (рис.2), що нам не підходить оскільки ми плануємо фарбувати ним тільки бактерій, а при додаванні пофарбованих ним бактерій до макрофагів залишки фарбника можуть пофарбувати і макрофаги. Пропідій йодид не фарбує живі макрофаги (за рахунок непроникності через мембрану живої клітини), що дозволяє його використання у нашому дослідженні.

Результати роботи дозволять трансфекувати макрофаги мишей вектором рEGFP-С3-РН, з якого буде синтезуватись білок РН-GFP та виявити локалізацію РН домену в клітині. Дослідження ролі РН домена у складі білків Bcr та Bcr-Abl дозволяють поглибити знання про участь цього білка у сигнальних мережах клітини. Це дає можливість пояснити вплив різних форм гібридного білка Bcr-Abl на диференціювання гемопоетичних клітин-попередників та перебіг Ph⁺- позитивних лейкемій.

Література

1. Bartram C.R., de Klein A., Hagemeijer A., van Agthoven T., Geurts v.K., Bootsma D., Grosveld G., Ferguson-Smith M.A., Davies T., Stone M. Translocation of c-abl oncogene correlates with the presence of a Philadelphia chromosome in chronic myelocytic leukaemia // Nature. – 2003. – Vol. 306, № 5940. – P. 277 – 280.
2. Charella A. Chronic Myeloid Leukaemia Biology and Treatment // Martin Dunitz Ltd. – 2001. – Vol. 123, № 29 – P. 528.
3. Cortes J., Deininger M. Chronic myeloid leukemia // Informa Healthcare USA, Inc. – 2007. – Vol. 76, № 13 – P. 163.
4. Kozubek S., Lukasova E., Mareckova A., Skalnikova M., Kozubek M., Bartova E., Kroha V., Krahulcova E., Slotova J. The topological organization of chromosomes 9 and 22 in cell nuclei has a determinative role in the induction of t(9,22) translocations and in the pathogenesis of t(9,22) leukemias // Chromosoma. – 2001. – Vol. 108, № 7. – P. 426 – 435.
5. Oyenike O. Olabisi, Gwendolyn M. Mahon, Elena V. Kostenko, Zhuoming Liu, Harvey L. Ozer and Ian P. Whitehead. Bcr Interacts with Components of the Endosomal Sorting Complex Required for Transport-I and Is Required for Epidermal Growth Factor Receptor Turnover Cancer Research 66, 6250-6257, June 15, 2006
6. Leena Haataja, John Groffen, and Nora Heisterkamp. Characterization of RAC3, a Novel Member of the Rho Family. The journal of biological chemistry.- Vol. 272, No. 33, Issue of August 15, pp. 20384 –20388, 1997.
7. Miroshnychenko D, Dubrovska A, Maliuta S, Telegeev G, Aspenström P. Novel role of pleckstrin homology domain of the Bcr-Abl protein: analysis of protein-protein and protein-lipid interactions. Exp Cell Res. 2010 Feb 15;316(4):530-42.