

ДОСЛІДЖЕННЯ ВПЛИВУ RH ДОМЕНУ БІЛКА ВСГ НА РОЗВИТОК RH'-ПОЗИТИВНОЇ ЛЕЙКЕМІЇ ТА МЕХАНІЗМ ПРОГРЕСІЇ ДАНОГО ЗАХВОРЮВАННЯ

О.І. Незелюк, О.О. Воронцов

Національний університет харчових технологій

*Білок Всг-АБІ є одним з маркерів пухлинної трансформації, що вивчається вже багато років. При чому вплив частини Всг на роль гібридного білка в пухлинній трансформації практично не вивчали. До білкових доменів, які суттєво впливають на пухлиногенний потенціал Всг-АБІ, відносять плекстрин-гомологічний (РН) домен, тому ми зосередились на вивченні структури цього домену. В даній роботі відпрацьовано метод візуалізації фагосом за допомогою флуоресцентно мічених бактерій для перевірки колокалізації РН домена білка Всг-АБІ з мембраною фагосом. Трансфекцію культури клітин мишачих макрофагів J774 проводили з використанням ДЕАЕ-декстарну генетичною конструкцією рEGFP-СЗ-РН, з якої буде синтезуватись білок РН-GFP. Цей білок за рахунок вставки GFP дає зелене забавлення при флуоресцентній мікроскопії, що дозволить виявити колокалізацію РН домену з **органелами** клітини.*

Ключові слова: домен, колокалізація, фагосома, трансфекція, макрофаг, флуоресценція

РН'-позитивні лейкемії характеризуються наявністю філадельфійської хромосоми, яка є результатом реципрокної транслокації між 9 та 22 хромосомами [1]. 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 гссп мієлоїдної лейкозії (ГМЛ), лімфоми, мієломи та Ph⁺-позитивної хронічної нейтроф-“---” лейкозії (ХНЛ) [2]. Результатом цієї хромосомної аберації є утворення гібридного I *bcr-abl*, експресія якого призводить до злоякісної трансформації гемопоетичних клітин [1]. Розриви в гені *abl* відбуваються таким чином, що не відбувається порушення кікі -частини АЫ, яка входить до гібридного білка Vcr-Abl [3]. На відміну від цього, гт.- має три ділянки, в яких розриви відбуваються найчастіше і залежно від точки розриву утворюються три різні за довжиною форми білка Vcr-Abl. Показано, що три види 5 Vcr-Abl відповідають різним формам захворювання [4].

Встановлено, що злоякісна трансформація клітин, які експресують гібридний ' Vcr-Abl, пов'язана з порушеннями регуляції тирозинової кінази АЫ. Тому **оск:**«ш частина досліджень у цій галузі спрямована на вивчення Abl-кіназної активності Vcr- -Це дало змогу розробити і впровадити в клінічну практику перший специфічний інгібітор тирозинової кінази, іматиніб, однак з'являється все більше даних про виникнення мутацій, що перешкоджають дії цього лікарського засобу [5]. Таким чином, виникає потреба розробки нових специфічних агентів, як і нових підходів до блокування сигнального шляху, у яких бере участь гібридний білок Vcr-Abl.

До білкових доменів, які суттєво впливають на пухлинотворний потенціал Vcr- відносять плекстрин-гомологічний (PH) домен. Фізіологічна роль PH домену полягає в модулюванні внутрішньоклітинного розташування онкобілка Vcr-Abl, безпосередньо завдяки зв'язуванню з мембранними фосfolіпідами. Внутрішньоклітинний розташування білка Vcr-Abl визначає його взаємодію із певним спектром сигнальних білків і **характеризує** клітинну відповідь [5, 6].

Попередні дані свідчать про те, що PH домен деяких білків крім зв'язування з ліпідами можуть також брати участь у білково-білкових взаємодіях [7]. Отже, **участь** PH домену в білково-білкових взаємодіях може відігравати важливу роль не тільки локалізації білка, але також і в його функціональній активності.

Мета даної роботи — вивчення колокалізації PH домену білка Vcr з меморіалом фагосом, що важливо для розуміння ролі цього домену у клітинних процесах і потенційно може бути використано для розробки нових цільових лікарських агентів.

Об'єктом дослідження була клітинна лінія мишачих макрофагів J774. Клітини отримано з колекції відділу молекулярної генетики Інституту молекулярної біології і генетики НАНУ. В роботі були використані клітини *E.coli*, за допомогою яких **відбуваються** розмноження цільових конструкцій. Крім цього, використано плазмідний вектор pEGFP-Г" банку плазмід Інституту молекулярної біології і генетики НАН України.

Культивування культури проводилося на середовищі DMEM (Dulbecco's **ModiSi** Eagle's Medium) + 10 % FBS (сироватка ембріона бика) та інкубувалося при температурі +37 °C та 5 % CO₂. Здійснювалося щоденне спостереження за ростом та розмноженням клітин (за допомогою інвертованого мікроскопа) та за зміною забарвлення середовища. При зміні кольору середовища з червоного на жовтий проводилося його відсмоктування заміною на свіжоприготовлене DMEM + 10 % FBS. Після досягнення клітинами щільності приблизно 70 - 80 % від площі чашки, здійснено розсів культури.

Шляхом фагоцитозу мишачі макрофаги J774 поглинають клітини бактерій *E.coli*. **Щоб** можна було побачити за допомогою фарбування акридином оранжевим. Але сам акридин оранжевий в дослідженнях не підходить, бо дає зелений колір клітинам, що перекриєть з флуоресценцією PH-GFP.

Бромистий етидій і пропідій йодид добре фарбують клітини бактерій *E.coli*. **Проте** клітини *E.coli* мають дуже малі розміри і використовувати їх в дослідженні є нецільовим, оскільки ми не зможемо побачити фагосому. Тому було використано дріжджі *S. cerevisiae*, які мають більші розміри ніж бактерії *E.coli*, але менші за розміром макрофаги і також фарбуються пропідієм йодидом.

Візуалізація фагосом проводилося шляхом фарбування дріжджів за допомогою флуоресцентного барвника (кандидати: бромистий етидій та пропідій йодид — червоно-

колір флуорисценції). Бромистий етидій фарбує і живі клітини макрофагів. На відміну від нього пропідій йодид не фарбує макрофаги (за рахунок непроницності через мембрану живої клітини), що дозволяє його використовувати у дослідженні для виявлення локалізації РН домену у клітині.

Виділення плазмідного вектора рEGFP-C3 здійснювалося методом лужного лізису. Напрацювання необхідної кількості було проведено шляхом трансформації плазмідної ДНК в компетентні клітини *EcoiI*. Рестрикцію здійснено по таким сайтам рестрикції *Hind III* і *BclI*.

Після отримання та відповідної підготовки вектора рEGFP-C3 та вставки РН домена було проведено лікування таким чином, щоб молярне співвідношення вектора до вставки було 1:3 у присутності АТФ та ферменту — Т4 ДНК лігази. В результаті було отримано генетичну конструкцію рEGFP-C3-РН. Перевірка здійснювалася за допомогою ПЛР. Після чого було проведено електрофорез отриманого ПЛР-продукту в 1 %-му агарозному гелі.

Трансфекцію культури клітин мишачих макрофагів J774 здійснено з використанням ДЕАЕ-декстарну генетичною конструкцією рEGFP-C3-РН. Білок РН-GFP за рахунок вставки GFP (зелений флуоресцентний білок) дає зелене забавлення при флуоресцентній мікроскопії, що дозволить виявити колокалізацію РН домену з органелами клітини. Через добу після трансфекції здійснювалася візуалізацію фагосом шляхом інкубування культури J774 з дріжджовими клітинами *S. cerevisiae*, які попередньо були пофарбовані пропідій йодидом. Макрофаги клітинної лінії J774 шляхом фагоцитозу поглинають клітини *S. cerevisiae* і дають червоне забарвлення, що підтверджувалося мікрофотографіями. Оцінку ефективності трансфекції було проведено шляхом флуоресцентної мікроскопії клітин через 24 год після трансфекування.

Висновок

Культура клітин J774 підходить як модель для візуалізації фагосом. Мишині макрофаги поглинають шляхом фагоцитозу дріжджі *S. cerevisiae*, що можна побачити за допомогою фарбування акридином оранжевим. Але сам акридин оранжевий в наших дослідженнях не підходить, бо дає зелений колір флуорисценції, що перекривається з РН-GFP (теж зелена флуорисценція). Тому було запропоновано використати такі барвники: бромистий етидій і пропідій йодид, які фарбують дріжджі *S. cerevisiae*, даючи червону флуорисценцію. Проте бромистий етидій фарбує живі клітини макрофагів, а оскільки планується фарбувати ним тільки *S. cerevisiae*, то при додаванні пофарбованих ним дріжджів до макрофагів залишки фарбника можуть пофарбувати і макрофаги, що робить неможливим візуалізацію фагосом. Пропідій йодид не фарбує живі макрофаги (за рахунок непроницності через мембрану живої клітини), що дозволяє його використання у дослідженні.

Трансфекцію культури клітин J774 було проведено генетичною конструкцією рEGFP-C3-РН. Оскільки візуально у мікроскоп було видно зелену флуорисценцію GFP-РН білка у більшості трансфєкованих клітин (70 %), то трансфекцію можна вважати успішною. Проте флуорисценція була слабкою, що не дозволяло зафіксувати її на камеру разом з програмою, яка стандартно використовувалась для флуоресцентної мікроскопії у відділі. Оскільки ця технічна проблема не давала можливості встановити колокалізацію РН домену білка Vsg з мембраною фагосоми, тому у майбутньому буде здійснено спроби пошуку можливих шляхів вирішення даної проблеми.

Результати даної роботи дозволять у майбутньому виявити колокалізацію РН домену в клітині, що важливо для розуміння ролі цього домену у клітинних процесах.

Література

1. Bartram C.R. Translocation of c-abl oncogene correlates with the presence of a Philadelphia chromosome in chronic myelocytic leukaemia / C.R. Bartram, A. de Klein, A. Hagemeijer, T. van Agthoven, V.K. Geurts Bootsma D., Grosveld G., Ferguson-Smith M.A., Davies T, Stone M. // Nature. — 2003. — Vol. 306, № 5940. — P. 277 - 280.
2. Charella A. Chronic Myeloid Leukaemia Biology and Treatment / A. Charella // Martin Dunitz Ltd. — 2001. — Vol. 123, № 29 — P. 528.

3. *Cortes J.* Chronic myeloid leukemia / J.Cortes, M. Deininger // Informa Healthcare USA. Inc. — 2007. — Vol. 76, № 13 — P. 163.
4. *Groffen J.* Philadelphia chromosomal breakpoints are clustered within a limited region, bcr, on chromosome 22 / J. Groffen, J.R. Stephenson, N. Heisterkamp, A. de Klein, C.R. Bartram, G. Grosveld // Cell. — 2004. — Vol.36, №1. — p. 93 - 99.
5. *Kozubek S.* 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 / S. Kozubek, E. Lukasova, A. Mareckova, M. Skalnikova, M. Kozubek, E. Bartova, V. Kroha, E. Krahulcova, J. Slotova // Chromosoma. — 2001. — Vol. 108, № 7. — P. 426 -435.
6. *Lemmon M.A.* Pleckstrin homology (PH) domains and phosphoinositides / M.A. Lemmon // Biochem. Soc. Symp. — 2007. — Vol. 74, № 3. — P. 81 - 93.
7. *Lemmon M.A.* Molecular determinants in pleckstrin homology domains that allow specific recognition of phosphoinositides / M.A. Lemmon, K.M. Ferguson // Biochem. Soc. Trans. — 2001. — Vol. 29, № 4. — P. 377 - 384.