



**БІБЛІОТЕКА ДЕРЖАВНОГО ФОНДУ  
ФУНДАМЕНТАЛЬНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ**

---

**ФУНДАМЕНТАЛЬНІ  
ОРІЄНТИРИ  
НАУКИ**

**(Біологія та науки про Землю  
і навколишнє середовище)**

*Збірник статей за матеріалами проектів ДФФД*

**Київ “Академперіодика” 2005**

УДК [504+55+57](048)

ББК 20+26+28

Ф 94

**Фундаментальні орієнтири науки (ФОН): (Біологія та науки про Землю і навколишнє середовище).** – Київ: ВД "Академперіодика", 2005. – 283 с.

Цей збірник статей містить підсумкові огляди результатів наукових досліджень за найважливішими проектами сьомого конкурсу Державного фонду фундаментальних досліджень біологічного, екологічного та геофізичного спрямувань.

У поданих матеріалах – фундаментальні дослідження, що стосуються біосинтезу, факторів росту, структурних змін генів, макромолекулярних комплексів, отримання антитіл, впливу популяції рослин, а також мікробних трансформацій і геоенергетичних ресурсів України.

Як і попередні збірники статей за іншими науковими напрямками ці матеріали ДФФД надає безкоштовно освітянським та академічним бібліотекам, а також усім зацікавленим у використанні здобутків цільових фундаментальних досліджень.

**Fundamental orientations of the science (FOS): (Biology and Sciences about the Earth and Environmental Problems).** – Kyiv: PH "Academ-periodica", 2005. – 283 p.

This collection of articles from the series "Fundamental orientations of the science" includes the summary of scientific researches results views on the most important projects of the seventh competition of the State Fund for Fundamental research in biology, ecology and geophysics directions.

Fundamental researches can be found in the given materials having to do with biosynthesis, factors of growing, structural changes in genes, macromolecular complexes, getting of antibodies, influence of plant population, and also germ transformations and geoeenergetic resources of Ukraine.

Like the previous collections of articles on the other scientific directions, SFFR gives the materials out free of charge to educational and academic libraries and to everybody who is interested in usage of the results of fundamental research.

*Збірник статей підготовлено до друку на виконання рішення Ради Державного фонду фундаментальних досліджень (протокол №3 від 09.06.05).*

*This collection of articles has been prepared for publishing in accordance with the decision of the Board of State Fund for Fundamental Research (minutes №3 from 09.06.05).*

ЗМІСТ

<b>Передмова</b>	<b>5</b>
<i>Біологія</i>	
<i>Скрипкіна І.Я., Циба Л.О., Ніколаєнко О.В., Кропивко С.В., Сопко Н.І., Нікитчина Т.В., Гордієнко І.Я., Риндич А.В.</i> <b>Експресія транскрипційних ізоформ гена інтерсектину 1 в нормі і при синдромі дауна.</b>	<b>7</b>
<i>Фільченков О.О., Завелевич М.П., Кишинська О.Г., Смирнова І.А.</i> <b>Структурні зміни апоптоз-асоційованих генів <i>BCL-2</i> та родини <i>MYC</i> в лейкозних клітинах людини при дії інгібіторів реплікації й синтезу ДНК</b>	<b>23</b>
<i>Стойка Р.С., Філяк Є.З., Філяк О.С., Чорна І.В., Федоренко О.В.</i> <b>Дослідження ролі трансформуючого фактора росту <math>\beta 1</math> у механізмах резистентності злоякісних клітин до протипухлинних препаратів</b>	<b>36</b>
<i>Малюта С.С. Телегеев Г.Д., Дубровська Г.М., Дибков М.В., Мірошніченко Д.О.</i> <b>Вплив додаткових мутацій <i>bcg/abl</i> гена на перебіг Ph' –лейкемій та їх використання як прогностичної ознаки</b>	<b>48</b>
<i>Мацелюх Б.П., Лаврінчук В.Я., Поліщук Л.В., Мацелюх А.Б., Лутченко В.А.</i> <b>Генетичний контроль біосинтезу нового протипухлинного антибіотика ландоміцину Е</b>	<b>69</b>
<i>Негруцький Б.С., Футерник П.В., Буткевич Т.В., Шалак В.Ф., Петрушенко З.М.</i> <b>Макромолекулярні комплекси і ченелінг тРНК в трансляційних компартментах ссавців</b>	<b>88</b>
<i>Дробот Л.Б., Масєвська О.М., Шувасєва Г.Ю., Бобак Я.П., Барська М.Л., Ігуменцева Н.І., Басараба О.І., Федорко О.І.</i> <b>Поліклональні та моноклональні антитіла проти адаптерного RUK/CIN85 білка: отримання, характеристика, можливості застосування</b>	<b>105</b>
<i>Костюк П.Г., Веселовський М.С., Костюк О.П., Кравченко М.О., Лук'янець О.О., Москалюк А.О., Починюк О.М., Федулова С.А.</i> <b>Шляхи регуляції синаптичної передачі через впливи на субмікроскопічну структуру синапсів</b>	<b>119</b>

Малюта С.С., Телегеев Г.Д., Дубровська Г.М., Дибков М.В.,  
Мірошниченко Д.О.

## ВПЛИВ ДОДАТКОВИХ МУТАЦІЙ ГЕНА *bcr/abl* НА ПЕРЕБІГ Ph'-ЛЕЙКЕМІЙ ТА ЇХ ВИКОРИСТАННЯ ЯК ПРОГНОСТИЧНОЇ ОЗНАКИ

Проект ДФФД: № 05.07/00236

Керівник проекту:

Малюта Станіслав Станіславович,  
доктор біол. наук, професор,  
член-кореспондент НАН України  
Інститут молекулярної біології і  
генетики НАН України

### Вступ

Різного роду лейкемії складають близько 5% від загальної кількості ракових захворювань. У загальній смертності смертність від лімфом та лейкемій становить близько 1,3–1,7%, що складає більше 10% смертності від ракових захворювань.

Хромосомні транслокації детектуються в значній кількості неоплазій людини. В більшості випадків саме вони зумовлюють один чи декілька етапів пухлинного розвитку.

Група лейкозів, що характеризується наявністю філадельфійської хромосоми — Ph'-позитивні лейкози, включає кілька нозологічних форм. Це, по-перше, хронічна мієлоїдна лейкемія (ХМЛ) при якій Ph' виявляється хромосома у більш ніж 95% випадків [1]. По-друге, це гостра лімфобластна лейкемія (ГЛЛ) — філадельфійська хромосома виявляється в даному разі у 30% дорослих пацієнтів та 2–10% дітей [2]. Крім того Ph' хромосома детектується приблизно в 2% випадків гострої мієлоїдної лейкемії та в деяких випадках лімфом та мієлом [3–5].

Філадельфійська (Ph') хромосома, описана в 1960 р. Р. Nowell та D. Hunderford [1], була першим цитогенетичним маркером, асоційованим із певним типом пухлинного захворювання системи крові. Утворення даної хромосоми зумовлене реципрокною транслокацією між 9 і 22 хромосомами  $t(9;22)(q34;q11)$  [2].

На молекулярному рівні реципрокна транслокація  $t(9;22)(q34;q11)$  супроводжується утворенням двох гібридних генів - гена *bcr/abl* на Ph' хромосомі (представленого на 5'-кінці ділянкою гена *bcr*, а на 3'-кінці - ділянкою гена *abl*) та *abl/bcr* на хромосомі 9q+ [4]. Як свідчать числені експерименти, саме продукт транскрипції гена *bcr/abl* є головним етіологічним чинником у розвитку Ph<sup>+</sup>-лейкемії [3-5]. У разі Ph'-негативних лейкемій ген *bcr/abl* був знайдений на хромосомах 1, 12 або 20, проте механізм подібних транспозицій невідомий [6]. Підвищена тирозинкіназа

активність гібридного білку BCR/ABL порівняно з його нормальним клітинним гомологом c-AbI призводить до запускання механізмів пухлинної трансформації: конститутивної активації мітогенних сигналів, гальмування запрограмованої клітинної загибелі — апоптозу, зменшення адгезії до стромальних клітин та екстрацелюлярного матриксу. Трансформуючі властивості білку BCR/ABL модулюються конформаційними характеристиками, які впливають на його внутрішньоклітинну локалізацію і на здатність до фосфорилування певного спектру білкових субстратів. Мутаційним аналізом було ідентифіковано декілька локусів білкової молекули BCR/ABL які суттєво впливають на здатність до клітинної трансформації, а саме: SH1, SH2 та актинзв'язуючий домен білку ABL [4, 5]; в той час як для Bcr області гібридного білку це домен олігомеризації [7,8], залишок тирозину у позиції 177 [9] та фосфосеринтреонін-багаті ділянки, обмежені амінокислотними залишками 192-242 та 298-413 [10, 11]. Останнім часом до “проблематичних” доменів білку BCR/ABL, які суттєво впливають на його пухлиногенний потенціал, відносять і домен DbI-гомологічний (DH) та плекстрин – гомологічний (PH), які представлені лише в p210, але відсутні в p190 формі білку BCR/ABL (498-866 а.з.). Наявність зазначених доменів корелює з характером перебігу захворювання: якщо експресія p190 виявляється лише у хворих на ГЛЛ, то p210 з однаковою частотою виявляється як у хворих на ГЛЛ, так і у хворих на ХМЛ [4, 5]. Фізіологічна роль доменів DH та PH полягає у модуляції внутрішньоклітинного розташування онкобілку BCR/ABL опосередковано через регуляцію актинових комплексів (DH) [12] або безпосередньо завдяки зв'язуванню з мембранними фосфоліпідами (PH) [13]. Внутрішньоклітинний розподіл білку BCR/ABL визначає його взаємодію із певним спектром сигнальних білків і характер клітинної відповіді.

### Структура і функція гена *bcr* та його білкового продукту

Ген *bcr* (від breakpoint cluster region) уперше ідентифікований як частина гібридного гена у хворих із хронічною мієлоїдною лейкемією з філадельфійською хромосомою. Подальші дослідження дозволили картувати його на довгому плечі хромосоми 22 (22q11) [14]. Ген *bcr* людини розміром 130 т.п.н. містить 23 екзони, із яких для 1 і 2 екзонів існують додаткові альтернативні екзони, що призводить до появи транскриптів різної довжини – 4,5 та 7,0 т.п.н. [15].

5'-область гена *bcr*, що не транслюється, має важливе значення для регуляції транскрипції генів *bcr* та *bcr/abl*. В межах регіону в 1 т.п.н. вище точки старту транскрипції гена *bcr* було знайдено сигнальні послідовності, які упізнаються транскрипційними факторами і регулюють промоторну активність, а саме: СААТ бокс у позиції –644, інвертована СААТ послідовність у позиції –718, ТАТА бокс (ТТТАА) у позиції –524, який доповнюється консенсусною послідовністю ТСАТСГ, необхідною для 5' –

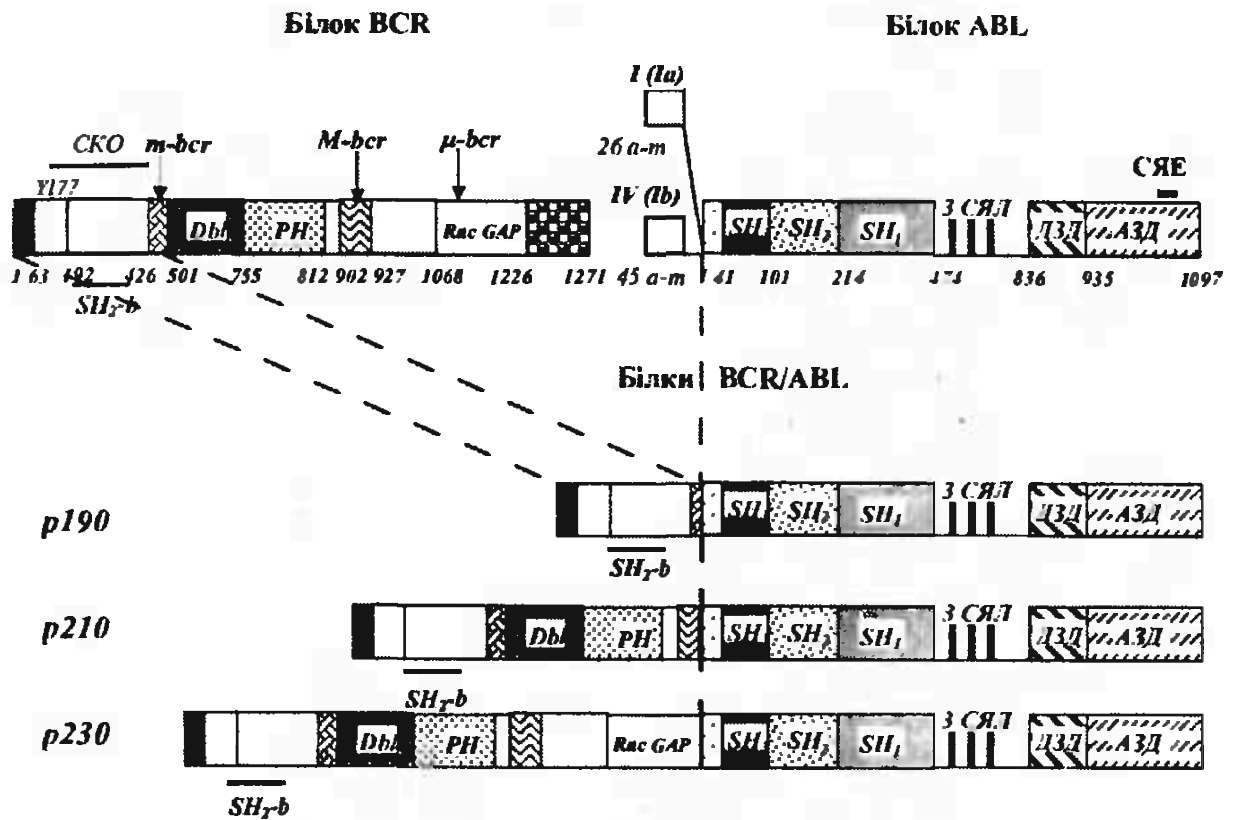
кепування транскрипту [16]. Методом ДНК-відбитку та в експериментах по байнд-шифтінгу було знайдено послідовності, які є сайтами зв'язування факторів транскрипції – консенсусна послідовність GGGCCGG для транскрипційного фактора SP1 та послідовність TAGGGCCTCAGTTTCCCAAAAGGCA, для якої білку, що з нею зв'язується, ще не знайдено [16]. 5'-область гена *bcr*, що не транлюється, збагачена на GC пари, на які припадає 80% загального нуклеотидного складу. Цей GC регіон містить послідовність довжиною 18 нуклеотидів (сайт розташування від -376 до -393) GCGGCGGCGGCGGCGGCG, яка разом з інвертованим повтором (сайт розташування від -13 до -30) утворює вторинні структури та петлі [17]. Цілком ймовірно, що ці структури відіграють певну роль в регуляції транскрипції, до того ж їх знайдено у багатьох генах “домашнього господарства”. Окрім нормального кодона АУГ, вище був знайдений ще один сайт початку трансляції, який, однак, має коротку відкриту рамку зчитування. Припускають, що короткий пептид, що утворюється, може залучатися в регуляцію білкової трансляції [18].

Внаслідок альтернативного сплайсингу гена *bcr* можуть утворюватися транскрипти розміром 7,0 та 4,5 т.п.н. [15], яким відповідають білкові продукти з молекулярною масою Mr 160,000 та Mr 130,000 відповідно [19–21]. Також були описані білки BCR з молекулярною масою Mr 190,000, Mr 185,000, Mr 155,000, Mr 135,000, Mr 125,000, та Mr 108,000 [22].

Ген *bcr* експресується конститутивно. Проте, як в тканинах курячих ембріонів, так і в мишачих та людських тканинах, його експресія має максимальний рівень у клітинах мозку та гематопоетичних клітинах. На відміну від свого нормального гомолога білок BCR/ABL виявляється лише в клітинах крові. Білок BCR експресується переважно на ранніх стадіях мієлоїдного дифференціювання, і його рівень значно зменшується в зрілих поліморфноядерних лейкоцитах. Через те, що білок BCR/ABL експресується під промотором гена *bcr*, його експресія теж залежить від стадії мієлоїдного дифференціювання – під час індукції клітинного дозрівання рівень експресії гібридного гена зменшується [23, 24, 25].

Білок BCR містить багато різноманітних функціональних доменів (рис. 1). Аміно-кінцева частина білку BCR (1-63 амінокислоти) включає домен олігомеризації, який містить скупчення гідрофобних залишків між амінокислотами 28 та 68. Точкові мутації або делеції у послідовності гена, що кодує цю область білку, послаблюють тирозинкіназну активність BCR/ABL, нівелюють здатність мутантних білків формувати BCR/ABL, BCR/ABL-BCR олігомер [8] і зв'язуватися з F-актином, що послаблює трансформаційні властивості гібридного білку. [11].

Цікаво, що ген *tel*, який теж може бути партнером гена *abl* під час транслокації t(9;12) і утворювати онкоген *tel/abl*, також має послідовність, що кодує домен олігомеризації. Білки TEL/ABL та TEL утворюють олігомерні комплекси, що корелює з підвищенням тирозинкіназної активності білку TEL/ABL і збільшенням його трансформуючої здатності [26].



**Рис. 1.** Структурно-функціональна організація білків BCR, ABL та гібридних білків BCR/ABL p190, p210 та p230.

Білок BCR (1271 амінокислота): 1–63 – домен олігомеризації, посилює зв'язування з актином; Y177 - точка зв'язування з доменом Grb2-SH2; CKO - серин-треонін кіназна область; SH2-b (192-413) SH2-зв'язуючий домен; Dbp - ділянка гомології з протоонкогеном Dbp; PH - ділянка гомології до плекстрину; Rac-GAP домен (1068-1226) – домен, що активує ГТФазу для p21 ras.

Білок ABL (1097 амінокислот + альтернативні домени Ia (26 амінокислот) или Ib (45 амінокислот)): SH3 (42-101) и SH2 (101-214) (src homology) - некаталітичні домени, 3 СЯЛ - сигнал ядерної локалізації, що визначає імпорт білка в клітину, ДЗД (836-935) - ДНК-зв'язуючий домен, АЗД (935-1097) - актинзв'язуючий домен, СЯЭ (1057-1067) - область, що визначає експорт білка з ядра.

Стрілками вказані місця розривів при різних BCR/ABL перебудовах (p190, p210 та p230).

Пунктиром показано утворення білку p190 BCR/ABL.

Друга область білку BCR (176-427 амінокислоти) визначає серин-треонін-кіназну активність [27] і включає декілька функціональних ділянок. У межах цього домена знаходиться консенсусна послідовність, гомологічна АТФ – зв'язуючому сайту інших кіназ, а також область, гомологічна фосфотрансферазному сайту домена [17, 22]. Білок BCR автофосфорилується за сериновими та треоніновими залишками, а також трансфосфорилує казеїн та гістони *in vitro* [27]. У межах білку BCR/ABL автофосфорилування поширюється більшою мірою на BCR частину гібридного білку на відміну від тирозинкіназної активності ABL, яка розповсюджується на всю білкову молекулу BCR/ABL [28].

Область, обмежена амінокислотними залишками 192-413, містить декілька SH2-зв'язуючих доменів [10]. SH2 домени є високо консервативними некаталітичними білковими ділянками розміром приблизно 100 амінокислотних залишків, які розпізнаються SH2 – зв'язуючими сайтами, що містять 3–5 амінокислотних залишків, включаючи фосфотирозин. SH2 – зв'язуючі сайти білку BCR унікальні тим, що SH2 домени інших білків можуть приєднуватися як до фосфотирозинових залишків, так і до фосфорильованих залишків серину та треоніну [10, 29]. Один із SH2-зв'язуючих доменів білку BCR забезпечує зв'язування з ABL частиною химерного білку [10], і причетний тим самим до регуляції онкогенної активації BCR/ABL. Інший SH2-зв'язуючий сайт – тирозин 177, фосфорилування якого забезпечує взаємодію з адапторним білком Grb 2 [9]. Втрата цієї ділянки в гібридному білку BCR/ABL призводить до значного зниження його трансформуючих властивостей, а також посилює залежність від факторів росту [30].

Білок p210 містить частину білку BCR не представлену в p185 BCR/ABL білку. Ця область починається з 427 амінокислоти білку BCR і закінчується, у більшості випадків, 902 чи 927 амінокислотами (область Major-BCR) [4,5]. Окрім ще маловивченої області між 427 і 498 амінокислотами білку BCR (що кодується II та III екзонами гена), тут представлені два добре схарактеризовані функціональні домени. Це, по-перше, db1-гомологічний (DH) домен (498-691 амінокислоти), названий так через високий ступінь гомології із продуктом db1 протоонкогена. Ця область білку є гуанін-нуклеотидобмінюючим фактором (ГЗФ, GEF) для підродини Rho ГТФаз (Rho, Rac, CDC42) [12], залучених до регуляції функціонального стану актинового цитоскелету і необхідних для стабілізації актинових волокон і утворення фокальних контактів. Активація білку Rho, у першу чергу, забезпечує утворення F-актин стресових волокон і фокальну адгезію.

Останні дослідження білок-білкової взаємодії із застосуванням двогібридної системи довели можливість взаємодії DH домена білків Bcr та Bcr/Abl із білком системи ДНК репарації – XPB (xeroderma pigmentosum group B). Під час коекспресії білку BCR/ABL p210 із білком XPB, останній фосфорилується і стає нездатним корегувати дефекти ДНК репарації, що підвищує геномну нестабільність під час ХМЛ і може лежати в основі клональної селекції і пухлинної прогресії під час цього захворювання. Відразу за Db1-гомологічною областю розташовується і інша функціональна область, що має гомологію із широко розповсюдженим мотивом – PH доменом (pleckstrin homology). PH домен присутній у різноманітних білків, включаючи тирозинкінази, зв'язані з цитоскелетом молекули, ферменти ліпідного обміну, адапторні білки й регулятори G-білків. Він складається приблизно з 100 амінокислот, формуючи тривимірну структуру, представлену 7 антипаралельними  $\beta$ -ланцюгами і C-кінцевою  $\alpha$ -спіраллю. У білку Db1 він представлений 703-812 амінокислотами, у білку Bcr – 708-870 амінокислотними залишками. Припускають, що PH-домен забезпечує

зв'язування білку, що його містить, з цитоплазматичною мембраною через взаємодію з фосфоліпідами.

Поруч з РН гомологічним доменом розташовується  $\text{Ca}^{2+}$ -зв'язуючий мотив (870-1002 амінокислотні залишки). Вперше подібний домен був знайдений у різних ізоформ  $\text{Ca}^{2+}$  - залежної протеїнкінази С ссавців. Його роль для BCR полягає, можливо, у забезпеченні фіксації на поверхні клітинних мембран завдяки здатності зв'язувати фосфатидилсерін та фосфатидилінозитол. Такий домен разом із РН-гомологічним доменом є характерним для багатьох білків - регуляторів ГТФазної активності.

СООН-кінцева частина Bcr містить область гомології з білком, що активує ГТФазу, (ГАБ, GAP) для білку p21Rac. Найбільша область гомології представлена 1068-1212 амінокислотами білку BCR. Активація цього домена інгібує опосередковане білком Rac зморщування мембрани - утворення ламелоподій. Білок Rac, як відомо, відіграє важливу роль у "окисному вибуху" у нейтрофілах *bcr*- мишей. Тобто, білок BCR може регулювати активність Rac. Миші з гомозиготним порушенням гена *bcr* життєздатні. Таким чином, білок BCR виконує обидві - ГЗФ та ГАБ функції, що свідчить про його подвійну роль у регуляції G – білок-асоційованих сигнальних шляхів. У клітинах білок BCR є субстратом для нерецепторної тирозинкінази *c-Fes*, яка регулює ріст і диференціювання мієлоїдних клітин. Фосфорилування спричиняє асоціацію білку BCR із SH2 доменами різних білків, включаючи GRB2 (активує *Ras* сигнальний шлях), *Ras* ГТФаз-активуєчий білок, фосфоліпазу C- $\gamma$ , p85 субодиницю PI-3 кінази, стимулює аутофосфорилування самого *c-Fes*. Серед білків, із якими взаємодіє BCR є також представники родини 14-3-3 білків, які беруть участь у контролі клітинного поділу. BCR взаємодіє із двома ізоформами цієї білкової родини,  $\beta$  та  $\tau$ , остання відома також як VAP-1. Фосфорильований Bcr пригнічує серин-треонін кіназу активність у VAP-1 зменшуючи взаємодію останнього з Raf-1. Таким чином, BCR є поліфункціональним білком, який взаємодіє з багатьма клітинними білками, що визначає його роль у передачі внутрішньоклітинних сигналів і організації цитоскелету.

### Химерний ген *bcr/abl* та продукти його експресії

Злиття генів *bcr* і *abl* призводить до появи транскриптів різних розмірів, що є наслідком як варіювання сайтів розриву-злиття, так і альтернативного сплайсингу генів-партнерів (рис. 1).

Точка розриву гена *abl* знаходиться в ділянці розміром 300 т. п. н. або між першим (Ib) та другим (Ia) альтернативними екзонами, або в межах першого інтрону розміром 200 т. п. н. Незалежно від точки розриву гена *abl*, в молекулі мРНК послідовність *bcr* завжди злита із другим екзоном *abl*, що пояснюється обов'язковим сплайсингом I екзона в первинному гібридному транскрипті *bcr/abl* [27].

На відміну від гена *abl*, сайти розриву гена *bcr* більш варіабельні. На сьогоднішній день відомі три таких сайти, так звані регіони кластеру розривів (breakpoint cluster regions, bcr): макро- (M-bcr) сайт розривів, який залучається у Ph'- транслокацію майже у всіх хворих на хронічний мієлолейкоз та у третини хворих на гостру лімфобластну лейкемію, у решти хворих на ГЛЛ розрив гена *bcr* відбувається у мінісайті (m-bcr), а у випадках відносно доброякісної моноцитарної лейкемії ген *bcr* розривається у локусі "мікро" ( $\mu$ -bcr) [7].

Регіон M-bcr охоплює ділянку гена *bcr* від 12 до 16 екзона (e12-e16), які історично названо b1-b5 відповідно. Під час процесінгу первинних транскриптів, з другим екзоном гена *abl* найчастіше з'єднуються екзони b2(e13) або b3(e14) з утворенням двох типів молекул мРНК: b2/a2 або b3/a2 відповідно, трансляція яких призводить до появи гібридного білку з молекулярною масою приблизно 210 кДа. Питання про можливу кореляцію між типом мРНК транскрипту та характером перебігу захворювання і подальшими прогнозами щодо стану хворих залишається відкритим. Регіон m-bcr знаходиться в межах інтрону довжиною 54,4 т.п.н. між двома альтернативними екзонами e2 та e2' гена *bcr*. В результаті сплайсингу екзони e1' та e2' видаляються, і у химерному *bcr/abl* транскрипті екзон e1 гена *bcr* зливається із другим екзоном гена *abl* (e1/a2 перебудова), що супроводжується експресією у клітинах хворих гібридного білку BCR/ABL із молекулярною масою 190 кДа. У 1990 році Saglio та ін. описали випадок хронічного мієлобластного лейкозу з розривом гена *bcr* між екзонами e19 та e20 (які оригінально було названо c3 та c4) [33]. *bcr/abl* мРНК транскрипт, який містить сполучені екзони e19/a2 транслюється у гібридний білок з молекулярною масою 230 кДа. Хоча вперше подібна перебудова була описана для хронічного мієлолейкозу, проте більшість випадків e19/a2 перебудови супроводжується розвитком більш доброякісної хронічної нейтрофільної лейкемії. Вважають, що існування різних типів *bcr/abl* мРНК є наслідком альтернативного сплайсингу первинних транскриптів, тому що транскрипт із перебудовою e1/a2 детектується у багатьох випадках класичного хронічного мієлолейкозу з експресією р210 BCR/ABL. Відомо, що альтернативний сплайсинг лежить в основі багатьох типів туморогенезу. Клітинний субклон, який експресує р190, має селективні переваги над р210 позитивними клітинами і його поява є несприятливим прогнозом для хворих на Ph'-лейкемію. Окрім зазначених типів *bcr/abl* перебудови детектовано також b2/a3, b3/a3, e1/a3, e6/a2 або e2/a2 сполучення генів *bcr* та *abl* у випадках ХМЛ або ГЛЛ, хоча такі повідомлення є поодинокими і певного зв'язку між різними перебудовами в межах одного сайту розривів і характером перебігу захворювання досі не встановлено.

Проте на сьогоднішній день встановлено певну кореляцію між характером пухлинного розвитку та сайтом розриву гена *bcr* – M-bcr, m-bcr, або  $\mu$ -bcr. Чим більша довжина транскрипту і, відповідно, гібридного білку, що експресується, тим більш сприятливі прогнози щодо подальшого перебігу

захворювання. Це пояснюється тим, що різні гібридні білки BCR/ABL відрізняються за своєю модульною структурою, яка впливає на їх трансформуючі властивості. p210 BCR/ABL, на відміну від p190, містить домени Db1- та плекстрин- гомологічні (DH, PH) – модулятори актинового цитоскелету [4,5]. p230 BCR/ABL, окрім зазначених DH та PH доменів, містить частину домена з функцією активатора ГТФази p21Rac, а також кальцій-фосфоліпідзв'язуючий домен C2. Під час перевірки біологічних властивостей трьох типів химерних білків на гемопоетичних клітинних лініях та на первинних кістковомозкових клітинах виявилось, що, по-перше, на відміну від p190 BCR/ABL та p210 BCR/ABL експресуючих клітин кісткового мозку, p230 BCR/ABL - експресуючі клітини додатково потребували для оптимального росту гемопоетичних ростових факторів; по-друге, кожний тип гібридного білку виступає індуктором певного типу диференціювання кістковомозкових клітин *in vitro*: p190 індукує формування цитокін-незалежних лімфоїдних попередників, в той час як експресія p210 та p230 направляє клітини кісткового мозку на формування моноцитарних та мієлоїдних клітин. На користь існування зв'язку між функціональними характеристиками Bcr частини білку BCR/ABL та пухлинним фенотипом свідчать випадки гострого лімфолейкозу, індукованого TEL/ABL химерним білком, а також гострого мієлолейкозу, який супроводжувався експресією гібридних білків TEL/ARG. Білок ARG є тирозинкіназою ABL родини, а ген *tel(etv6)* кодує транскрипційний фактор, який, як і BCR, здатний до олігомеризації. Утворення олігомерних білкових комплексів, можливо, змінює кіназу активність онкобілку TEL/ABL і призводить до хронічного мієлопроліферативного захворювання.

Аналіз мутацій в DH та PH доменах та дослідження їхнього впливу на фізіологію клітини буде сприяти більш глибокому розумінню молекулярних механізмів пухлинної прогресії та переходу ХМЛ до бластної кризи.

### Матеріал та основні методи дослідження

Матеріалом для експериментальних досліджень слугували зразки крові хворих, що проходили лікування у гематологічних клініках м. Києва та ряду областей України.

**Виділення РНК** проводили за Хомчинським [31].

**Синтез кДНК** здійснювали за допомогою праймера A<sub>1</sub> (5'-TGATTATAGCСТААGACCCCGGA-3'). Реакційна суміш загальним об'ємом 40 мкл містила 2 мкг РНК, 10 рМ праймера A<sub>1</sub>, 20 одиниць зворотньої транскриптази M-MLV (GibcoBRL), 10–20 од РНазіну, 1мМ dNTP, буфер для зворотньої транскриптази. Синтез проводили при 37°C протягом 1 год. Аліквоту реакційної суміші (5 мкл) використовували для проведення ампліфікації.

**Виявлення Ph'-хромосоми** проводили за допомогою двораундової ПЛР з використанням праймерів для першого етапу A<sub>1</sub> 5'-TGATTATAGCСТААGACCCCGGA-3';

$B_1$  5'-GAAGTGTTCAGAAGCTTCTCC-3' і проводили реакцію ампліфікації 30 циклів (94°C–30 сек, 55°C–30 сек, 72°C–1,5 хв). Відбирали 1 мкл суміші першого етапу ПЛР і проводили другий етап з використанням праймерів

$A_3$  5'-TCAGACCCTGAGGCTCAAAGTC-3'

$B_2$  5'-GAGCTGCAGATGCTGACCAAC-3'

**Ампліфікацію** проводили двораундовою ПЛР. Для дослідження *dbl* ділянки на першому етапі проводили ПЛР з використанням праймерів *ext1 dbl* (5'-GGCTGCCCTACATTTGATGACTCGC-3') та *ext-r1 dbl* (5'-GATGTTGGGCACTGCCTCCAGTTC-3') 30 циклів (94°C–30 сек, 55°C–30 сек, 72°C–1,5 хв). На другий етап брали 1 мкл реакційної суміші і проводили ампліфікацію з використанням праймерів *ext dbl* (5'-AAGCTTGCCCTGGAGTCCACTAAAG-3') та *ext-r dbl* (5'-GAATTCTGCCTCCAGTTCATCCAC-3') за аналогічних умов.

#### **Розщеплення гідроксиламіном.**

Для формування гетеродуплексів готували суміш, що містить еквівалентну кількість (50–100 мкг) ПЛР-ампліфікатів *dbl* - кодуючої ділянки гена *bcr/abl* від здорового і хворого донора в буфері Н (300 мМ NaCl, 3,5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 3 мМ трис-HCl, рН 7,7). ДНК у буфері Н денатурували 5 хв при 100°C і відпалювали 1 год при 42°C. Гетеродуплекси ДНК переосажувалися етанолом і оброблялися 2,5 М гідроксиламіном протягом 2 год при 37°C. Реакцію зупиняли додаванням стоп-буферу (0,3 М NaAc, 0,1 М Na<sub>2</sub>EDTA (рН 5,2), 25 мкг/мл тРНК *Saccharomyces cerevisiae*). Після преципітації етанолом ДНК оброблялася 1 М піперидином при 90°C 30 хв., відмивалася й осаджувалася спиртом, після чого зразки інкубували при 100°C 4 хв у буфері для нанесення (60% формаїд, 0.1% ксиленцианол, 0.1% бромфеноловий синій, 35 мМ Na<sub>2</sub>EDTA, рН 7.4). Продукти розщеплення аналізувалися електрофорезом у 12% денатуруючому ПААГ (U = 90V, t = 12ч.).

**Клонування продуктів ПЛР.** Отриманий продукт обробляли фрагментом Кленова (MBI Fermentas) в присутності 0,2мМ dNTP 15 хв при 37°C. Після переосадження етанолом зразок обробляли полінуклеотидкиназою фага Т4 (MBI Fermentas) в присутності 1мМ АТФ 30 хв при 37°C. Далі проводили фенол-хлороформну очистку. Отриманий фрагмент клонували по тупих кінцях в вектор pUC19, розщеплений ферментом HincII за допомогою Т4 ДНК-лігази (MBI Fermentas). Для трансформації використовували компетентні клітини XL1-Blue MRF' Kan (Stratagene). Трансформацію проводили за [32]. Плазмиди з рекомбінантних клонів виділяли лужним методом.

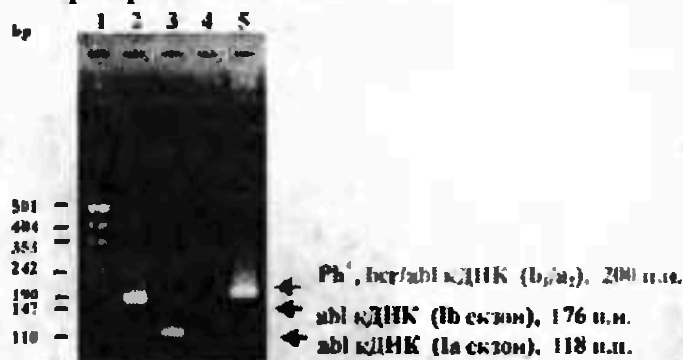
**Сиквенування** отриманих клонів проводили за допомогою набору "T<sup>7</sup>Sequencing KIT" (Amersham) за умов, що рекомендовані виробником, з використанням стандартних прямого та зворотнього M13 праймерів, а також праймерів *ser-3' dbl* (5'-CCAGAAGCAACAAGATGCC-3') *ser-5' dbl* (5'-GCATCTTTGTTGCTTCTGGC-3').

### Результати і обговорення

Виявлення гена *bcr/abl* у хворих з підозрою на Рh'-позитивні лейкемії. Верифікація діагнозу за допомогою зворотньо-транскриптажної полімеразної ланцюгової реакції.

Як згадувалось вище, розриви в генах *bcr* та *abl* можуть відбуватися на значних за розміром ділянках, що робить проблематичним застосування ДНК ПЛР технології. В той же час, з врахуванням того, що мРНК *bcr/abl* мають розмір 8,5 та 7 т.п.н. та включають злиті екзони I гена *bcr* та II гена *abl* (при ГЛЛ) або 13,14 екзони гена *bcr* та II екзон гена *abl* (при ГЛЛ та ХМЛ), можливо використовувати ЗТ-ПЛР для виявлення цих перебудов.

Діагностику провадили за допомогою зворотньої транскрипції з подальшим проведенням двораундової ПЛР. кДНК отримували з використанням праймера до гена *abl* і таким чином отримували гібридні *bcr/abl* та *abl* кДНК. В ПЛР окрім 2-х пар праймерів, які дозволяють виявити ділянку *bcr/abl* перебудови, використовували праймери до нормального гена *abl* як позитивний контроль. Результати детекції Рh'-хромосоми у пацієнта наведено на рис. 2. У даному випадку було виявлено фрагмент розміром 200 п.н. (розрив в ділянці М-*bcr* гена *bcr* —  $b_3/a_2$  транслокація).



**Рис. 2.** Виявлення химерного гена *bcr/abl* за допомогою зворотньо-транскриптажної полімеразної ланцюгової реакції.

1 - маркер молекулярної маси рUC19/MspI, 2,3 - виявлення нормального гена *abl* (позитивний контроль), 4 - реакція без РНК (негативний контроль) 5 - виявлення химерного гена *bcr/abl*.

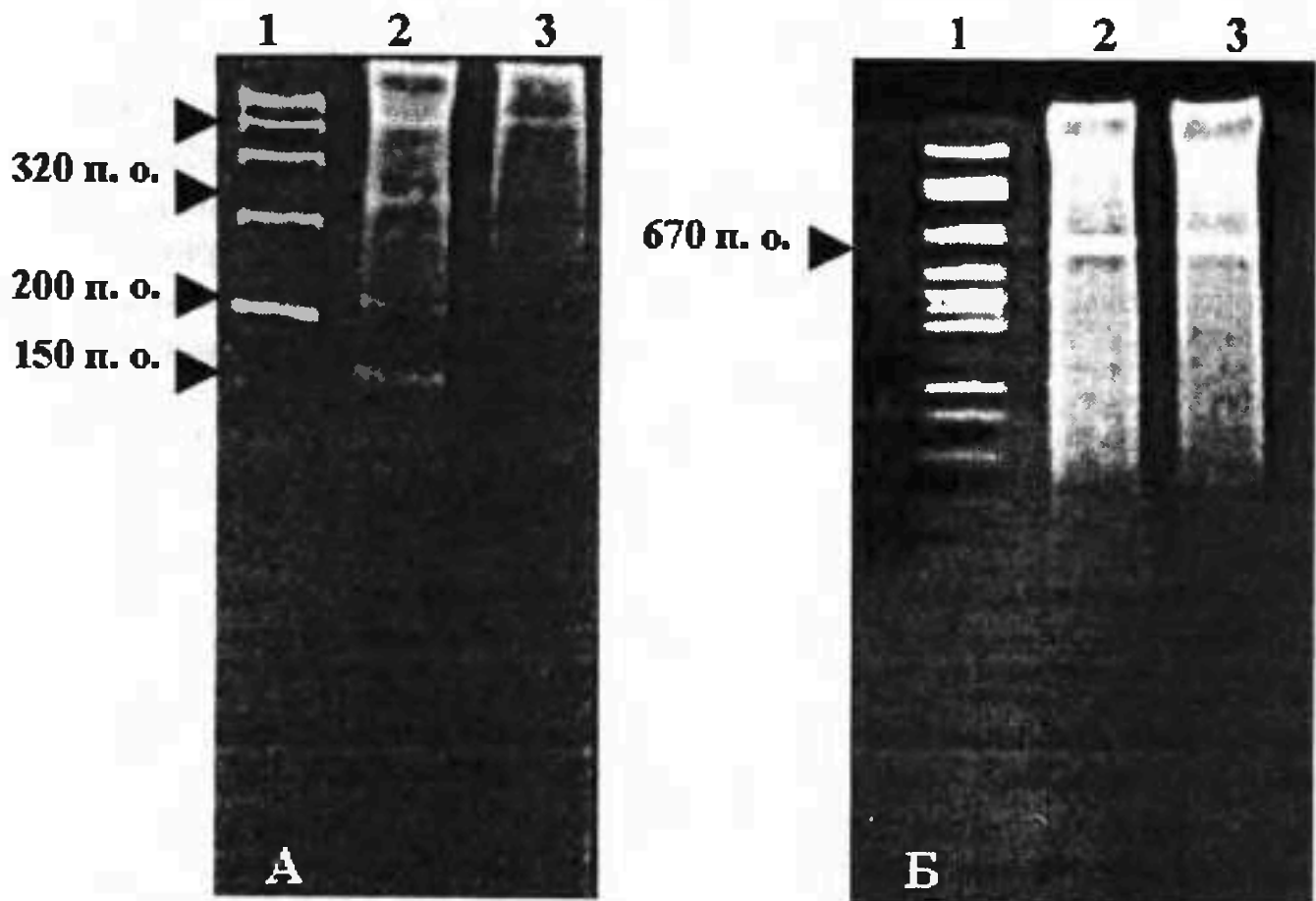
Загалом за час проведення роботи було проаналізовано більш ніж 200 зразків хворих з підозрою на Рh'-позитивну лейкемію.

Аналіз мутацій *dbl* - кодуючої ділянки *bcr/abl* гена методом хімічного розщеплення ДНК-ДНК гетеродуплексів.

**Розщеплення тетроксидом осмію.**

Виявлення мутацій в *dbl* регіоні гена *bcr/abl* навіть в окремих випадках бластної кризи ХМЛ було б важливим доповненням до розуміння природи цього захворювання. З цією метою було проведено аналіз кДНК хворих С., Ф., К. і клітинної лінії U937. Як "дику" форму використовували *dbl* регіон гена *bcr* здорового донора А. В основу підходу було покладено метод хімічного розщеплення неспарених

основ гідроксиламіном і осмієм тетроксидом, запропонований R.G. Cotton [11]. Після РТ-ПЦР ампліфікації і отримання *dbl* фрагментів гена *bcr/abl* розміром 670 п.н. для зразків, які було згадано вище, проводилося хімічне розщеплення ДНК дуплексів А+К, А+Ф, А+С, А+U937. Продукти розщеплення було проаналізовано за допомогою електрофорезу в 12% денатуруючому ПААГ (рис. 3).



**Рис. 3.** Виявлення мутаційних змін в *dbl*-гомологічної ділянки гена *bcr/abl* методом хімічного розщеплення ДНК-ДНК гетеродуплексів.

А: 1 — ДНК-маркер PCR Marker ("Promega", США); 2 — гетеродуплекси, що утворені продуктами ампліфікації *dbl* району гена *bcr/abl*, А+К; 3 — гетеродуплекси А+Ф;

Б: 1 — ДНК-маркер pGEM®; 2 — гетеродуплекси А+С; 3 — гетеродуплекси А+U937.

Серед проаналізованих зразків тільки гетеродуплекси А+К утворювали продукти розщеплення розміром приблизно 320, 200 та 150 п.н. Тобто, за даними аналізу мутацій методом хімічного розщеплення ДНК-ДНК гетеродуплексів, мутація в положенні 2126 п. о. (нумерацію нуклеотидів тут і надалі наведено згідно Human *bcr* protein mRNA, 5' end.(Genbank, HUMBCRD, Accession: M24603)), спільна для випадків К. та К562, доповнюється в *dbl* фрагменті гена *bcr/abl* хворого К. ще однією точковою мутацією, що може свідчити про зв'язок між зміною структури актинового цитоскелету і акумуляцією мутацій в *dbl* домені *bcr/abl* гена у випадку хворого К.

### Сиквенування db1 ділянки гібридного гена *bcr/abl*

Для уточнення положення мутаційних змін у Db1 ділянці було клоновано фрагменти 1929–2608 п.н. кДНК гена *bcr/abl* і сиквенувано. У клітин культури K562 і у випадку хворого К. було встановлено трансверсії у Db1 - кодуєчому регіоні гена *bcr/abl* в положенні 2127 (заміна Т на С), а у хворого К. - додаткову мутацію у положенні 2449 (трансверсія С→А). Дані сиквенування узгоджуються з попередніми даними з хімічного розщеплення ДНК-ДНК гетеродуплексів.

У деяких зразках окрім повнорозмірного ампліфікату db1-ділянки було виявлено менші за розміром фрагменти. Зміна умов ПЛР (підвищення температури "відпалювання" праймерів, зменшення часу добудови фрагментів) істотно не впливала на присутність цих смуг. Для подальшого аналізу дані продукти ПЛР було клоновано в вектор pUC19. У результаті цього було отримано ряд клонів, які несли вставки, що відповідали за розміром фрагментам, виявленим на електрофорезі. Дані клони було просиквенувано і встановлено, що зміна розміру фрагментів пов'язана з делеціями в даному регіоні. Дані делеції не призводили до зміни рамки зчитування. На рис.4 показано локалізацію делецій у порівнянні зі структурою повнорозмірного db1 домена *bcr/abl*. Можливі зміни на рівні білку (при даних делеціях) наведено в таблиці 1.

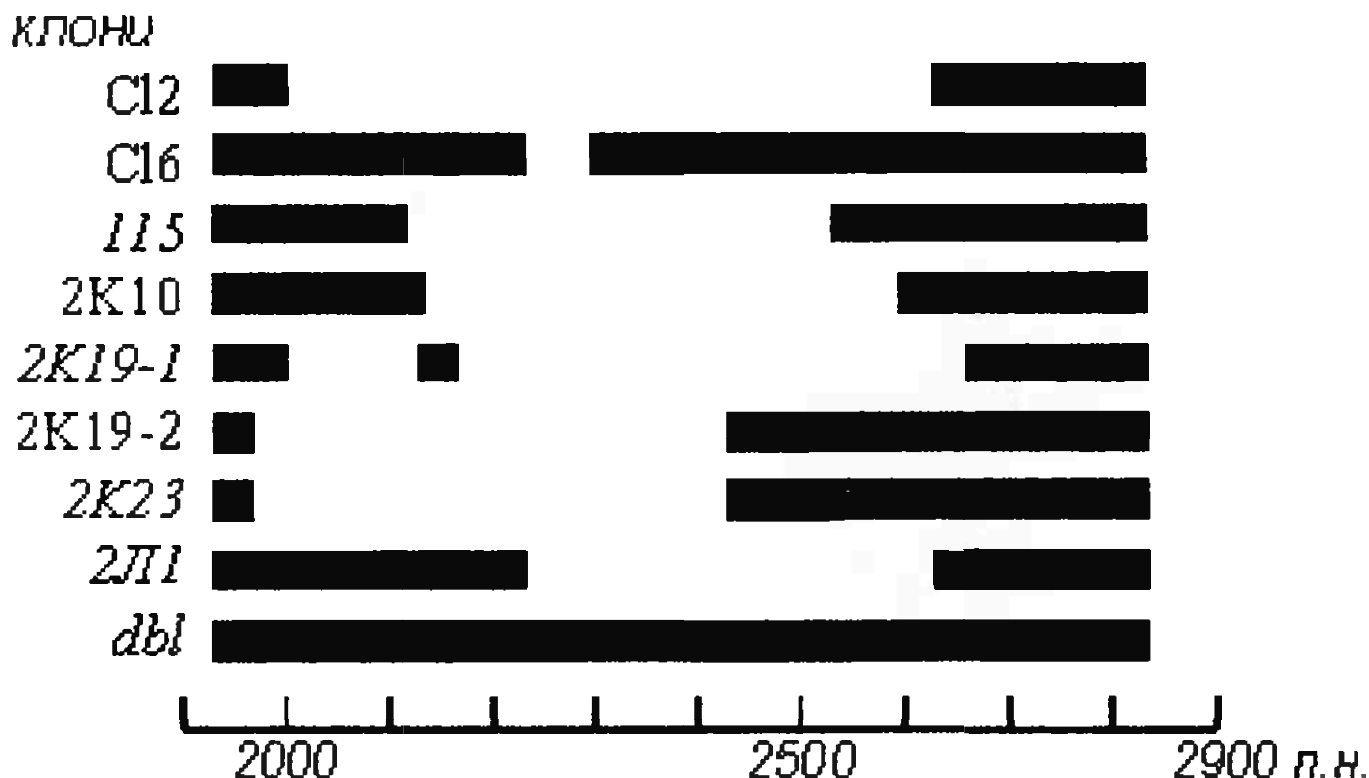


Рис. 4. Локалізація делецій в db1-гомологічній ділянці гена *bcr/abl* (зліва вказано номери клонів). Нумерацію нуклеотидів наведено згідно Human *bcr* protein mRNA, 5' end. (Genbank, HUMBCRD, Accession: M24603)

Таблиця 1

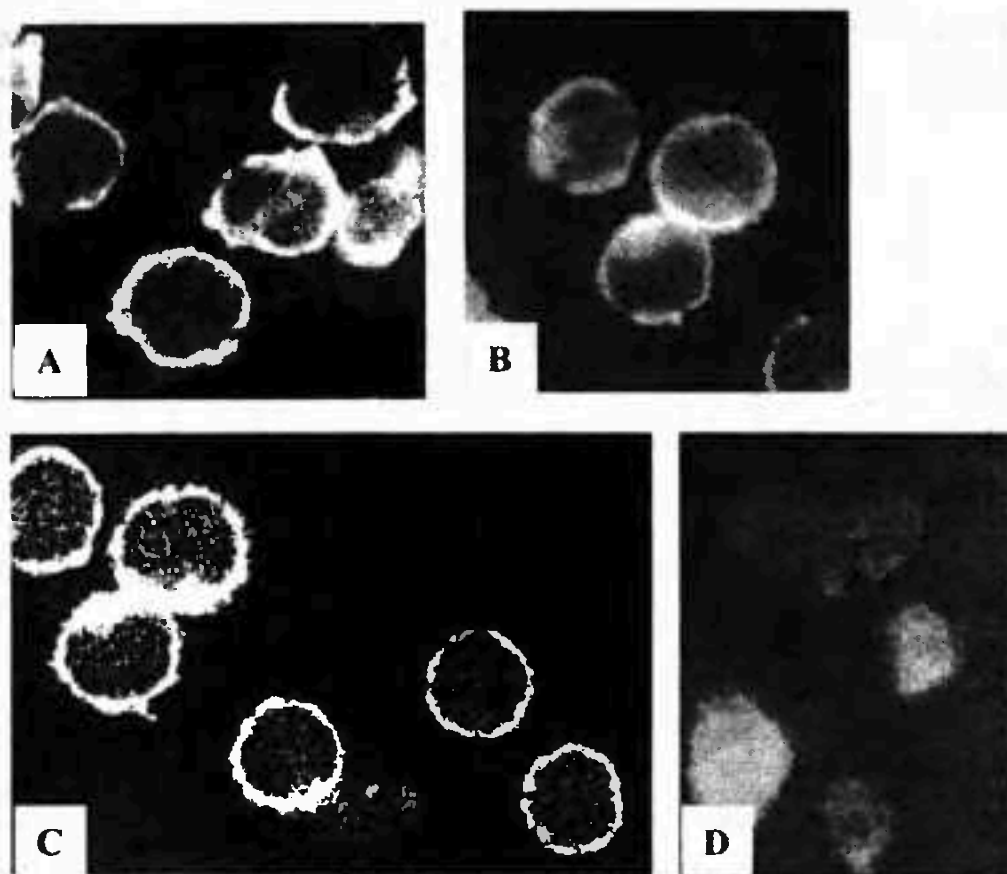
**Результати аналізу клонів (dbl регіон білка BCR/ABL),  
які отримано із зразків крові хворих на ХМЛ та ГЛЛ**

Пацієнт (тип захворювання)	Номер клону	Делетовано ділянку (розмір делеції), амінокислотних залишків
Пацієнт Я., (ГЛЛ)	C12	514–733 (220)
	C16	585–620 (36)
	115	556–683 (129)
Пацієнт К., (ХМЛ)	2K10	558–712 (155)
	2K19-1	517–573 (57) + + 581–734 (154)
	2K19-2	493–660 (168)
	2K23	493–660 (168)
Пацієнт Л., (ХМЛ)	2Л1	582–729 (148)

**Дослідження внутрішньоклітинного розподілу актину в лейкоцитах хворих на Ph'-позитивні лейкемії**

Після верифікації клінічних діагнозів "Ph'-позитивний ХМЛ" і "Ph'-позитивна ГЛЛ" методом ЗТ-ПЛР було відібрано зразки клітин крові хворих на лейкемії, у яких експресується р210 BCR/ABL, для дослідження організації актинового цитоскелету. Поліморфноядерні лейкоцити периферійної крові хворих С. і К. (бластна криза ХМЛ), хворих Ф. і Я. (ГЛЛ), здорових донорів А. і В., Ph'-позитивні клітини лінії K562, Ph'-негативні клітини лінії U937 були використані для приготування цитологічних препаратів. Порівняльний аналіз структури актинового цитоскелету в поліморфноядерних лейкоцитах різних донорів дозволив виділити 3 типи розподілу забарвлення – паракортикальне, дифузний та dot-like подібний (рис.5).

У клітинах ліній K562, U937, як і в клітинах хворих на Ph'-позитивні лейкемії, найбільш яскраво виявлявся кортикальний цитоскелет, в той час як в клітинах здорових донорів кортикальний цитоскелет менш виражений. Цілком можливо, що виявлені особливості організації актинового цитоскелету пов'язані із проліферативним статусом клітин у культурі та поліморфноядерних лейкоцитів хворих, що вимагає активації багатьох сигнальних шляхів за участю білків, які асоційовані із мембранними актиновими комплексами. В ряді випадків, крім кортикального F-актину, нам вдалось детектувати крупні пунктати (хворий К., бластна криза ХМЛ). Наявні дані літератури свідчать на користь припущення, що виявлені зміни в організації актинового цитоскелету можуть бути пов'язані із нагромадженням мутацій у dbl-гомологічному районі гена bcr/abl і



**Рис.5.** Порівняльний аналіз розподілу актину в клітинах крові пацієнтів хворих на Ph<sup>+</sup>-позитивні лейкемії та клітинних лініях K562 (Ph<sup>+</sup>- позитивна) та U 937 (Ph<sup>-</sup>-негативна).

A - паракортикальний розподіл актину у клітин клітинної лінії K562

B - паракортикальний розподіл в клітинах пацієнта С (ХМЛ).

C - "dot-like" структури в клітинах пацієнта К. (ХМЛ, бластна криза)

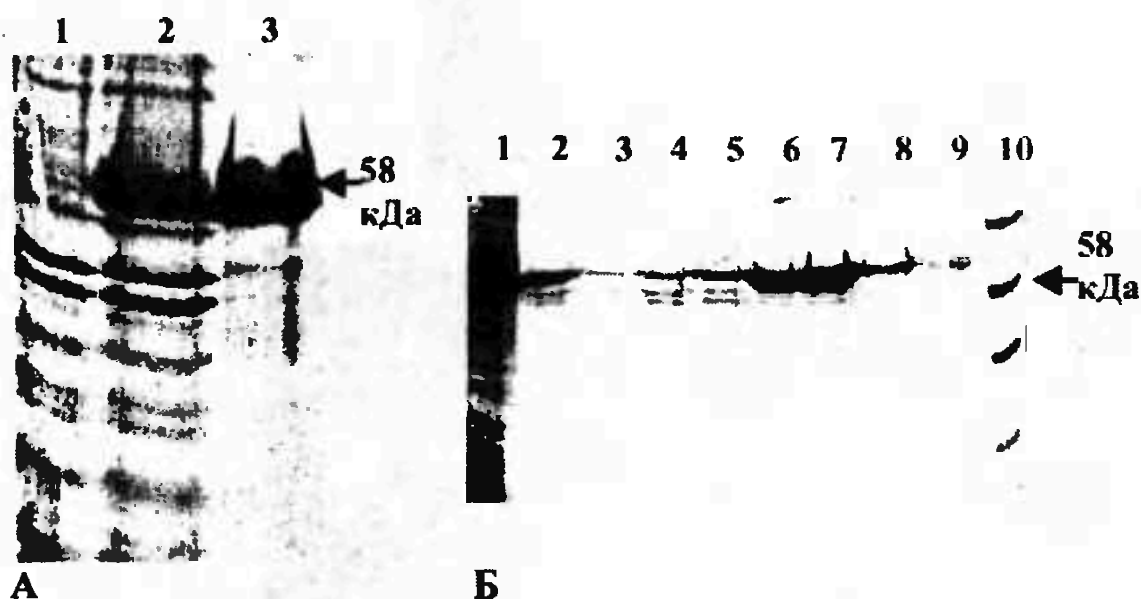
D – дифузний розподіл, клітини крові нормального донора

дисфункцією DN домена. DN домен білку BCR виконує функцію фактора, що стимулює обмін гуанілових нуклеотидів в нуклеотидзв'язуючому центрі ГТФаз підродино Rho, залучених до регуляції функціонального стану актинового цитоскелету і необхідних для стабілізації актинових стресових волокон.

**Клонування db1 регіону гена *bcr* у вектор для бактеріальної експресії pET32b, експресія та виділення рекомбінантного білку DDBA3**

Для одержання рекомбінантного Db1 – гомологічного домена білку BCR/ABL на основі вектора pET32b було зібрано конструкцію pDDBA3 для бактерійної експресії рекомбінантного білку db1-гомологічний регіон гена *bcr* розміром 834 п.н. було ампліфіковано у реакції Pfu ПЛР із використанням ДНК здорового донора і клоновано у вектор pGEMv-T. Скринінг рекомбінантів здійснювали методом біло-блакитної селекції. Відібрані рекомбінанти було проаналізувано рестрикційним картуванням. У подальшому Db1 фрагмент було переклоновано у вектор pET32b. Первинний скринінг рекомбінантів здійснювали методом ПЛР з подальшим

проведенням рестрикційного аналізу відібраних конструкцій. Часткове сиквенування отриманої конструкції підтвердило коректність рамки зчитування.



**Рис. 6.** Експресія та очищення рекомбінантного білку DDVA3.

А — експресія білку: 1 — сумарні бактерійні білки до індукції експресії рекомбінантного білку ІПТГ; 2 — сумарні бактерійні білки після індукції експресії рекомбінантного білку; 3 — очищені білкові тілця включення;

Б — виділення рекомбінантних білків афінною хроматографією в денатуруючих умовах з використанням Ni-NTA агарози:

1 — сумарні бактерійні білки після індукції експресії рекомбінантного білку; 2 — очищені білкові тілця включення, які наносилися на хроматографічну колонку; 3–5 — стадії відмивання зв'язаного рекомбінантного білку буферами С2, С3, С4 відповідно; 6-9 — стадії елюції; 10 — білкові стандарти LMW

Аналітична експресія конструкції рDDVA3 в клітинах BL21(DE3) показала наявність білку розміром 58 кДа (рис.6), а аналіз розчинності рекомбінантного білку виявив, що приблизно 90% рекомбінантного білку DDVA3 знаходиться у нерозчинній фракції. Для отримання білку достатньої чистоти для одержання поліклональних антитіл, білок DDVA3 було очищено у вигляді тілець включення і додатково очищено з використанням металхелатної хроматографії на Ni-NTA агарозі в денатуруючих умовах в присутності 2М сечовини. Об'єм культури для препаративного виділення білку DDVA3 складав 200мл. Вихід білку за спектрофотометричними даними після очищення тілець включення складав 9 10 мг/мл. За електрофоретичними даними чистота білку після очищення тілець включення оцінювалася як 80–85%, після хроматографії на Ni-NTA агарозі — 90%. Молекулярна вага, розрахована за даними амінокислотної послідовності з використанням програми "GenRunner" складала 58 кДа, що збігається з електрофоретичними даними.

### Клонування РН регіону гена *bcr/abl* у вектор для бактеріальної експресії рЕТ32b, експресія та виділення рекомбінантного білку PDBA138

З метою отримання антитіл до різних епітопів, які впізнавали б нормальний білок BCR і білок BCR/ABL, нами було зібрано експресуючу конструкцію рPDBA138 на основі вектора рЕТ32b, що містить РН домен білку BCR (фрагмент кДНК гена *bcr/abl* з 2744 п. о. по 3333 п. о. включно). Ця послідовність кДНК гена *bcr/abl*, окрім РН домену, включає в себе фрагмент з 3'-кінця 171 п.о. регіону гена *bcr*, що кодує Ca<sup>2+</sup>-зв'язуючий мотив (С2 домен) та 63 п.о. послідовності гена *abl*.

Фрагмент ДНК для клонування було ампліфіковано в реакції ЗТ-ПЛР із використанням зворотньої транскриптази та термостабільної полімерази Pfu. Одержаний фрагмент розміром 589 п. о. було фосфорильовано Т4 полінуклеотидкіназою і лігровано у вектор рЕТ32b/EcoRV за тупими кінцями Трансформанти було відібрано за допомогою ПЛР-скринінгу і проаналізовано за допомогою рестрикційного аналізу з використання ендонуклеаз рестрикції Pst I та Nco I.

Аналітична експресія показала наявність рекомбінантного білку розміром 44 кДа, що відповідало молекулярній вазі, яку було вираховано за даними амінокислотної послідовності з використанням програми "GenRunner". Часткове сиквенування конструкції, яка дістала назву рPDBA138, показало вірне розташування рамки зчитування заклонованої послідовності.

Аналіз розчинності рекомбінантного білку показав, що близько 25–30% білку складають розчинну фракцію. Об'єм культури для препаративного виділення білку PDBA138 складав 200мл. Вихід білку за спектрофотометричними даними після очищення тілець включення складав 80–90 мг/літр культурального середовища, для розчинної фракції — 15–20 мг/л.

Спроби очищення нерозчинної фракції рекомбінантного білку металхелатною хроматографією на Ni-NTA агарозі в денатуруючих умовах в присутності 2 М сечовини з наступною ступінчастою ренатурацією на колонці не дали бажаних результатів — білок елюювався із значною кількістю супутніх домішок. В той же час очищення розчинної білкової фракції хроматографією на Ni-NTA агарозі в нативних умовах дало задовільні результати і дозволяло отримувати рекомбінантний білок PDBA138 з чистотою 95–98% в концентрації 200–250 мкг/мл, що було цілком достатнім для використання його як антигена для імунізації, а також створювало перспективи для вивчення функціональної активності рекомбінантного білку PDBA138.

### Клонування Іb/BCR фрагмента гена *abl/bcr* у вектор для бактеріальної експресії рЕТ32b; експресія та виділення рекомбінантного білку 1BAb7

На першому етапі за допомогою ЗТ-ПЛР було виявлено мРНК *abl/bcr* у хворих на ХМЛ. Так було показано наявність Іb/bcr транскрипту в 4 випадках

з 5. У той же час Ia/bcr транскрипт було виявлено лише в одному випадку (разом з Ib/bcr транскриптом). Ці дані, в цілому, не суперечать даним, які було отримано в інших лабораторіях [14,15].

Для отримання поліклональних антитіл до білку ABL/BCR було створено рекомбінантну конструкцію p1BAB7 на основі вектора pET32b в який було клоновано фрагмент, що включав 49 нуклеотидів гена *abl* гібридного гена *abl/bcr* та 240 нуклеотидів гена *bcr* (відповідно 16 та 80 амінокислотних залишків).

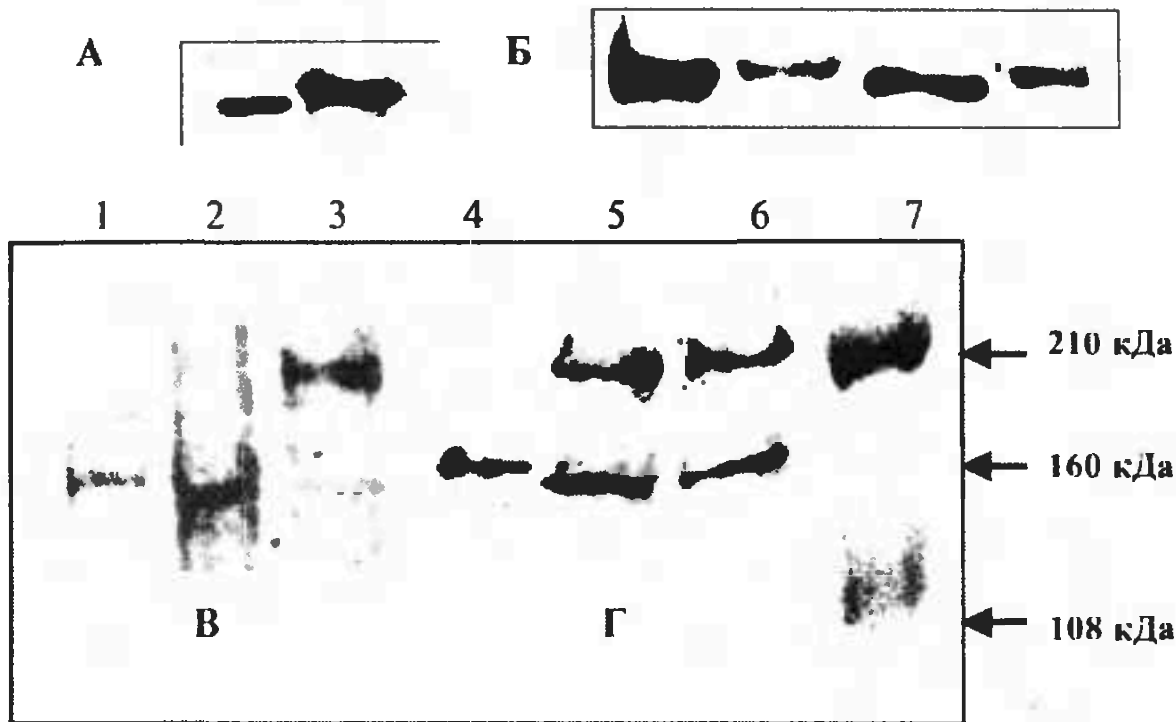
Після проведення аналітичної експресії оцінювали рівень та водорозчинність гібридного білку. Очищення білку проводили аналогічно до очищення білку DDBA3. Вихід білку 1BAB7 за спектрофотометричними даними після очищення складав 1,43 мг/мл.

#### **Отримання поліклональних антитіл до різних ділянок білків BCR та ABL/BCR**

Для одержання поліклональних антитіл використовували очищені рекомбінантні білки DDBA3, PDBA138 та 1BAB7. Кролям-самцям вагою 2 кг робили підшкірну ін'єкцію суміші 1:1 повного ад'юванта Фрейнда I розчину рекомбінантного білку у забуференому фосфатному розчині (ЗФР) із розрахунку 500 мкг (для білків DDBA3 та 1BAB7) або 100 мкг для білку PDBA138 на одного кроля. Через 8 тижнів проводили повторну імунізацію з такою ж кількістю антигена, а через 4 тижні кроликів імунізували третій раз дозою 1 мг (для білків DDBA3 та 1BAB7) або ж 200 мкг для білку PDBA138. На восьмий день після третьої імунізації визначали титр специфічних антитіл до рекомбінантних білків DDBA3, PDBA138 та 1BAB7 у сироватці кролів імуноферментним аналізом (ІФА). Сумарну імуноглобулінову фракцію отримували висолюванням насиченим (4М) розчином  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , додаючи його у відношенні 1:3 до загального об'єму сироватки. Отриманий осад розчиняли у дистильованій воді і знову висолювали  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . Осад розчиняли у воді і діалізували проти ЗФР, рН 7,4 протягом ночі. Для усунення реактивності антисироватки до бактерійних білків і константної частини рекомбінантних білків, сироватку виснажували пропусканням крізь афінну колонку з імобілізованими на BgCN-активованій сефарозі сумарними білками клітин штаму *E. coli* BL21(DE3) та константною частиною рекомбінантних білків. Для виснаження сироватки розчин сумарних імуноглобулінів у ЗФР наносили на колонку і інкубували при м'якому погойдуванні при 4°C протягом ночі. До виснаженої сироватки додавали  $\text{NaN}_3$  до концентрації 0.3%, рівний об'єм гліцерину і зберігали при 4°C. Специфіка отриманих антитіл тестувалися Вестерн-блот аналізом.

#### **Виявлення білків BCR та BCR/ABL методом Вестерн-блот аналізу в лейкоцитарних лізатах хворих на хронічну мієлоїдну лейкемію**

Після підтвердження за допомогою ЗТ-ПЛР діагнозу "Ph'-позитивна лейкемія" лейкоцитарні лізати хворих використовувалися для Вестерн-блот аналізу з використанням поліклональних антитіл, які було згадано вище. Результати вестерн-блотингу показано на рис.7 (А,В,Г). На рис.7В показано



**Рис. 7.** Результати Вестерн-блотингу із використанням поліклональних антитіл проти рекомбінантних білків DDBA3 та PDBA138.

А, Б — результати експерименту по перехресному впізнаванню рекомбінантних білків PDBA138 та DDBA3 антитілами до них:

А — впізнавання білку PDBA138 анти-DDBA3 антитілами: 1 — білок PDBA138, 2-білок DDBA3;

Б — впізнавання білку DDBA3 анти-PDBA138 антитілами: 1, 3 — білок PDBA138; 2, 4 - білок DDBA3;

В, Г – детекція химерного білку BCR/ABL (210 кДа) та його нормального гомолога (160 кДа) у поліморфноядерних лейкоцитах хворих та здорових донорів методом Вестерн блотингу із використанням поліклональних антитіл проти DDBA3 (Б) та проти PDBA 138 (В): 2, 3, 6 – хворі В., П., Л., відповідно. на ХМЛ; 5 – клітини лінії K562; 1,4 – здорові донори; 7 – білкові стандарти NMW (“Sigma”, США)

результати імуноблот-аналізу для хворих В., П. та нормального донора з використанням анти-DDBA3 антитіл. На рис.7Г показано результати Вестерн-блотингу із використанням анти-PDBA138 антитіл для хворого Л., Ph<sup>+</sup>- позитивної клітинної лінії K562 та нормального донора. Поруч наведено електрофореграму білкових стандартів NMW (“Sigma”, США). У всіх хворих, окрім В., та у клітин лінії K562 виявляється патологічний білок BCR/ABL розміром 210 кДа. У всіх донорів виявляється нормальний клітинний гомолог патологічного білку — білок BCR розміром 160 кДа.

Таким чином, у результаті виконання проекту в клітинах крові хворих із діагнозом Ph-позитивна лейкемія виявлено делеції в *dbl* регіоні химерного гена *bcr/abl*. Частина з виявлених делецій носила множинний характер, що свідчить про поліклональний характер ХМЛ. Виявлено також точкові мутації (заміни нуклеотидів). Делеційні мутації виявлені тільки у пацієнтів з гострим перебігом захворювання, що підтверджує висунуте нами припущення про

“вторинні” мутації у злитому гені, як можливий чинник пухлинної прогресії при ХМЛ.

Клонування, експресія в бактеріальних системах клонуваних *dbl-* та РН-доменів гена *bcr* дали можливість отримати поліклональні антитіла до відповідних білків та використати їх для вивчення експресії злитих генів за допомогою вестерн-блотингу.

Порівняльний аналіз розподілу актину в полінуклеарних лейкоцитах хворих на хронічну мієлоїдну лейкемію поряд із вестерн-блот аналізом дає можливість використовувати ці підходи як додаткові засоби для уточнення діагнозу, вироблення прогнозу розвитку хвороби та опрацювання терапевтичних протоколів.

### ПЕРЕЛІК ПОСИЛАНЬ

1. Nowell P.C., Hunderford D.A. A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia // *Science*.- 1960.- Vol. 132.-P.1497-1499.
2. Rowley J.D. A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining // *Nature*.- 1973.- Vol. 243, №5405.-P.290-293.
3. Телегеев Г.Д., Дыбков М.В., Карпенко О.И., Черепенко Е.И. Молекулярные основы Ph-лейкемий и пути их лечения // *Биополимеры и клетка*.- 1994.- Т. 10, №5.- С.78-92.
4. Gishizky M.L. Molecular mechanisms of Bcr-Abl-induced oncogenesis // *Cytokines Molular Therapy*.- 1996.- Vol. 2, №4.-P.251-261.
5. Butturini A., Arlinghaus R.B., Gale R.P. BCR/ABL and leukemia // *Leukemia Research*.- 1996.- Vol. 20, №6.-P.523-529.
6. Kimio T., Mansyur A., Taichi K., Hiroo D., Nanao K. Transposition of duplicated chromosomal segment involving fused BCR/ABL gene or oncogene alone in chronic myelocytic leukemia and Ph chromosome-positive acute leukemia with complex karyotypes // *Cancer Genet Cytogenet*.- 2000.- Vol. 119.-P.8-14
7. Heisterkamp N., Stam K., Groffen J., de Klein A., Grosveld G. Structural organization of the *bcr* gene and its role in the Ph' translocation // *Nature*.- 1985.- Vol. 315, №6022.- P.758-761.
8. McWhirter J.R., Galasso D.L., Wang J.Y. A coiled-coil oligomerization domain of Bcr is essential for the transforming function of Bcr-Abl oncoproteins // *Mol Cell Biol*.- 1993.- Vol. 13, №12.-P.7587-7595.
9. Pendergast A.M., Quilliam L.A., Cripe L.D. BCR/ABL -induced oncogenesis is mediated by direct interaction with SH2 domain of the GRB-2 adaptor protein // *Cell*.- 1993.- Vol. 75, №1.-P.175-185.
10. Pendergast A.M., Muller A.J., Havlik M.H., Maru Y., Witte O.N. BCR sequences essential for transformation by BCR-ABL oncogene bind to the ABL SH2 regulatory domain in a non-phosphotyrosine-dependent manner // *Cell*.- 1991.- Vol. 66, №1.- P.161-171.

11. Muller A.J., Young J.C., Pendergast A.M. BCR first exon sequences specifically activate the BCR/ABL tyrosine kinase oncogene of Philadelphia chromosome-positive human leukemias // *Mol Cell Biol.*- 1991.-Vol. 11, №4.-P.1785-1792.
12. Chuang T.H., Xu X., Kaartinen V., Heisterkamp N. Abr and Bcr are multifunctional regulators of the Rho GTP-binding protein family // *Proc Natl Acad Sci U S A.*- 1995.- Vol. 92, N22.-P.10282-10286.
13. Shaw G. The pleckstrin homology domain: an intriguing multifunctional protein module // *Bioessays.*- 1996.- Vol. 18, №1.-P.35-46.
14. Groffen J., Stepherson J.R., Heisterkamp N., de Klein A., Bartram C.R., Grosveld G. Philadelphia chromosomal breakpoints are clustered within a limited region, bcr, on chromosome 22 // *Cell.*- 1984.- Vol. 36.-P.93-99.
15. Romero P., Beran M., Shtalrid M., Andersson B., Talpaz M., Blick M. Alternative 5' end of the BCR-ABL transkript in chronic myelogenous leukemia // *Oncogene.*- 1989.- Vol. 4.-P.93-98.
16. Zhu Q-S, Heisterkamp H., Groffen J. Unique organization of the human BCR gene promoter // *Nucleic Acids Res.*- 1990.- Vol. 18.-P.7119-7125.
17. Lifshitz B., Fainstein E., Marcelle C., Shtivelman E., Amson R., Gale R.P., Canaani E. Bcr genes and transcripts // *Oncogene.*- 1988.- Vol. 2.-P.113-117.
18. Muller A.J., Witte O.N. The 5' noncoding region of the human leukemia-associated oncogene BCR/ABL is a potent inhibitor of in vitro translation // *Mol. Cell. Biol.*-1989.- Vol. 9.-P.5234-5238.
19. Dhut S., Dorey E.L., Horton M.A., Ganesan T.S., Young B.D. Identification of two normal BCR gene products in the cytoplasm. // *Oncogene.*- 1988.- Vol. 3.-P.561-566.
20. Stam K., Heisterkamp N., Reynolds F.H., Groffen J. Evidence that the PHL gene encodes a 160,000-dalton phosphoprotein with associated kinase activity // *Mol. Cell. Biol.*- 1987.- Vol. 7.-P.1955-1987.
21. Amson R.B., Marcelle C., Telerman A. Identification of a 130 kDa BCR related gene product // *Oncogene.*- 1989.- Vol. 4.-P.243-247.
22. Li W., Dreazen O., Kloetzer W., Gale R.P., Arlinghaus RB. Characterization of BCR gene products in hematopoietic cells // *Oncogene.*- 1989.- Vol. 4.-P.127-138.
23. Heisterkamp N., Stam K., Groffen J., de Klein A., Grosveld G. Structural organization of the BCR gene and its role in the Ph<sup>1</sup> translocation // *Nature (London).*- 1985.- Vol. 315.-P.758-761.
24. Collins S., Coleman H., Groudine M. Expression of BCR and BCR/ABL fusion transcripts in normal and leukemic cells // *Mol. Coll. Biol.*- 1987.- Vol. 7.-P.2870-2876.
25. Wetzler M., Talpaz M., Van Etten R.A., Hirsh-Ginsberg C., Beran M., Kurzrock R. Subcellular localization of Bcr, Abl and Bcr/Abl proteins in normal and leukemic cells and correlation of expression with myeloid differentiation // *J. Clin. Investig.*- 1993.- Vol. 92.-P.1925-1939.

26. Okuda K., Golub T.R., Gilliland D.G., Griffin J.D. p210 BCR/ABL, p190 BCR/ABL, and TEL/ABL activate similar signal transduction pathways in hematopoietic cell lines // *Oncogene*.- 1996.- Vol. 13.-P.1147-1152.
27. Maru Y., Witte O.N. The BCR gene encodes a novel serine/threonine kinase activity within a single exon // *Cell*.- 1991.- Vol. 67, №3,-P.459-468.
28. Liu J., Campbell M., Guo J.Q., Lu D., Xian T.M., Anderson B.S., Arlinghaus R.B. Bcr-Abl tyrosine kinase is autophosphorylated or transphosphorylated p160 Bcr on tyrosine predominantly within the first Bcr exon // *Oncogene*.- 1992.- Vol. 8.-P.101-109.
29. Muller A.J., Pendergast A.M., Havlik M.H., Puil L., Pawson T., Witte O.N. A limited set of SH2 domains binds Bcr through a high-affinity phosphotyrosine-independent interaction // *Mol. Cell. Biol*-. 1992.- Vol. 12.-P.5087-5093.
30. Cortez D., Kadlec L., Pendergast A.M. Structural and signaling requirements for BCR-ABL-mediated transformation and inhibition of apoptosis // *Mol Cell Biol*.- 1995.- Vol. 15, №10.-P.5531-5541.
31. Chomczynski P., Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction // *Analyt. Biochem*.-1987.-162, P.156-159.
32. Mandel M., Higa A. Calcium dependent bacteriophage DNA infection // *J. Mol.Biol*. 1970.- 53, P.154.
33. Saglio G, Pane F, Gottardi E, Frigeri F, Buonaiuto MR, Guerrasio A, de Micheli D, Parziale A, Fornaci MN, Martinelli G, Salvatore F. Consistent amounts of acute leukemia-associated P190BCR/ABL transcripts are expressed by chronic myelogenous leukemia patients at diagnosis // *Blood*.- 1996.- V.87.-N.3, P.1075-1080.

Наукове видання

**ФУНДАМЕНТАЛЬНІ ОРІЄНТИРИ НАУКИ**  
**(Біологія та науки про Землю і навколишнє середовище)**

*Збірник статей за матеріалами проектів ДФФД*

Відповідальний за випуск *Б.Р. Кияк*  
Редактор *Л.А. Палій*  
Комп'ютерна верстка *Н.І. Клеуко*

Видавничий дім "Академперіодика" НАН України  
01004, Київ-4, вул. Терещенківська, 4.  
Свідоцтво про внесення до Державного реєстру  
суб'єкта видавничої справи серії ДК № 544 від 27.07.2001.

Підписано до друку 20.09.2005. Формат 70 × 100/16.  
Папір офсетний. Друк різнографічний.  
Ум. друк. арк. 23,07. Обл. вид. арк. 23,04.  
Наклад 300 прим. Зам. 1480

---

Друкарня Видавничого дому "Академперіодика" НАН України  
01004, Київ-4, вул. Терещенківська, 4