

ВИВЧЕННЯ РОЛІ ЕНДОГЕННИХ ЧИННИКІВ В ПАТОГЕНЕЗІ ЛЕЙКЕМІЙ ПРИ ТРАНСЛОКАЦІЇ (9;22)

Хромосомні аберації є маркерами значної кількості захворювань людини, включаючи неопластичні. Філадельфійська хромосома (Ph⁺) була першою визначеною хромосомною аномалією пов'язаною з пухлинним захворюванням, а саме — хронічною міелоїдною лейкемією (ХМЛ) [1]. Пізніше вона була охарактеризована як продукт реципрокної транслокації t(9;22)(q34;q11), внаслідок якої утворюється гібридний ген *bcr/abl*. Саме він обумовлює початкові етапи захворювання. Показано, що BCR/ABL впливає на перебіг сигналу в Ras/MAPK, PI3-K/Akt, STAT 1, STAT 5 шляхах [2], крім того він впливає на клітинну адгезію та рухливість клітин [3].

В даній роботі вивчалась роль двох доменів BCR/ABL, а саме DN, PH. Окрім того, ми зосередились також на вивченні важливих, з нашої точки зору, компонентах патогенезу — білках родини Fox, що експресується переважно в клітинах крові, а також на факторах, що зумовлюють підвищений рівень теломеразної активності та зміну розмірів теломер.

Матеріали і методи

Для отримання поліклональних антитіл до білка FoxO3 було ампліфіковано фрагмент гена *foxO3* (1806–2085 п.н.), який клоновано в вектор рЕТ32а. Рекомбінантні клони було перевірено сиквенуванням. Отриманий білок було очищено у вигляді тілець включення і додатково доочищено з використанням металхелатної хроматографії на Ni-NTA агарозі в денатуруючих умовах в присутності 2М сечовини. Антитіла до рекомбінантного білку було отримано після імунізації кролів. Робочий титр антитіл визначали за допомогою ІФА.

Зонд з послідовністю (CCСТАА)_n було отримано за допомогою тандемного лігування двох комплементарних олігонуклеотидів з наступним клонуванням у плазмиду рUC 19. Послідовність рекомбінантних клонів перевіряли сиквенуванням. Відібраний клон з теломерним повтором 350 п.н виділяли в препаративній кількості та використовували для отримання зонду. Зонди мітили за допомогою α P³²dCTP або digoxigenin-11-dUTP в ПЛР. Визначення довжини теломер проводили з використанням методу Southern-гібридизації.

Для вивчення рівня теломеразної активності було використано модифікований неізотопний TRAP протокол [4]. До клітинного лізату, приблизно 10⁴ кл/мкл лізуючого буферу, інкубували на льодяній бані 30 хвилин та додавали олігонуклеотидні праймери. Наявність теломеразної активності забезпечує подовження цього олігонуклеотиду. Проводили 30 циклів ПЛР з подальшим розділенням ампліфікатів в акриламідному гелі. Візуалізацію проводили за допомогою EtBr, SYBR Green та Varva NA.

Фрагмент PH домену гена *bcr* було отримано за методом ЗТ-ПЛР із банку кДНК хворих на ХМЛ та клоновано у вектор рUC19. Для бактері-

альної експресії РН регіон було переклоновано у вектор рЕТ32а. Реконбінантний білок було експресовано в клітинах *E. coli* BL21 та очищено на колонці з Ni-NTA в нативних умовах. Зв'язування з фосфоліпідами оцінювали за допомогою PIP Strip (Echelon). Зв'язані His-РН білки детектували у Вестерн блоті за допомогою anti-His антитіл (Clontech).

ДН домен (481–707 а.а.) BCR та тандем з двох доменів DHR (481–869 а.а.) було проклоновано в векторі рЕТ32а. Відповідні реконбінантні білки використовували для оцінки їх GEF активності щодо ГТФаз (RhoA, Rac1 і Cdc42). Зв'язування (³H)GDP детектували на нітроцелюлозних фільтрах в сцинтиляційній камері. In vivo GEF активність вивчалась в pull-down експерименті. Для цього клітини 293Т були котрансфековані конструкціями, що несли ДН (або DHR) та ГТФазу (Rac 1, RhoA або Cdc42) в рRK5-myc векторі. Лізати інкубували з ГТФаз-зв'язуючим доменами білків Pak1 та Rhotekin і детектували у Вестерн блоті.

Вивчення ролі FoxO3A в Ph-залежному лейкогенезі. Протягом останніх років почала з'являтися інформація про роль FoxO факторів у Vst/Abl залежному лейкогенезі. Дослідження гемопоетичних клітинних культур доводять, що втрата цими білками функціональної активності може бути ключовим моментом в набутті клітинами фенотипу, характерного для клітин пухлини.

Поліфункціональність гібридного BCR/ABL протеїну в клітині обумовлює його участь в різних шляхах перебігу сигналу в клітинах лейкоцитів, зокрема через PI3 кіназу з залученням Akt кінази, однією з можливих реалізацій якої є проникнення в ядро та взаємодія з ядерними протеїнами, зокрема з факторами транскрипції з родини FoxO. FoxO3 бере участь у таких клітинних процесах як інгібування апоптозу (через TRAIL фактор), взаємодія з циклінами, ДНК репаруючою системою, антиоксидантною системою клітин, диференціюванні [5, 6].

Для отримання поліклональних антитіл до білку FoxO3 було ампліфіковано фрагмент гена *foxO3* (1806–2085 п.н.). Вибір саме цієї ділянки був обумовлений тим, що цей регіон давав змогу вивчати ген FoxO3а, що експресується в гемопоетичних клітинах. Отриманий ампліфікат було клоновано в експресуючий вектор рЕТ32а. Аналітична експресія конструкції рЕТ32а-FoxO3а в клітинах BL21(DE3) показала наявність білку розміром 25 кДа (рис.1), що збігалось з молекулярною вагою, розрахованою за даними амінокислотної послідовності.

Результати ІФА аналізувалися на рідері для імунологічних планшетів Anthos 2001 ("Bio-Rad", США) при довжині хвилі 405 нм; отримані дані дозволили визначити робочий титр антитіл

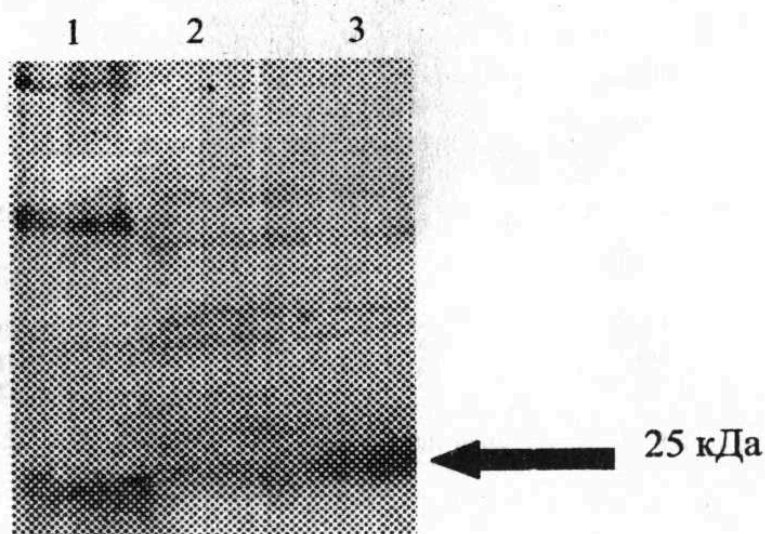


Рис. 1. Бактеріальна експресія реконбінантного білка FoxO3а

1 — маркер молекулярної ваги; 2 — сумарні бактеріальні білки до індукції IPTG; 3 — сумарні бактеріальні білки після індукції IPTG

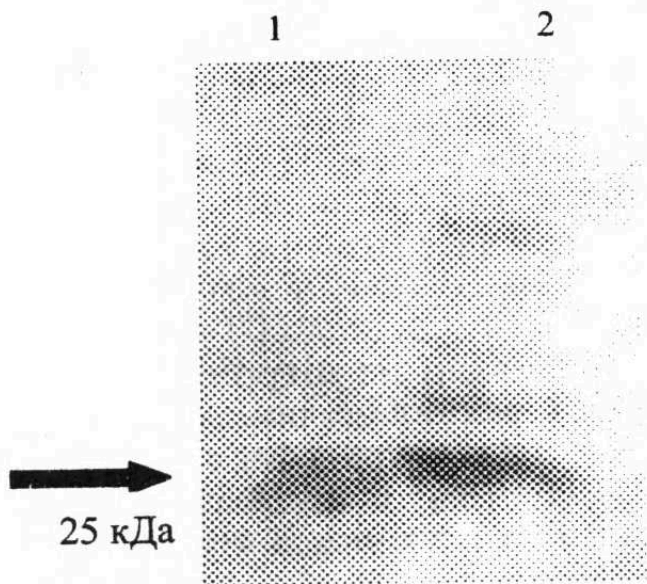


Рис. 2. Вестерн-блотинг з використанням поліклональних антитіл до FoxO3a 1 — маркер молекулярної ваги; 2 — рекомбінантний білок FoxO3a масою 25 кДа.

Відомо кілька різних механізмів подовження теломер у клітинах. У людини та усіх інших еукаріотів синтез теломерних послідовностей в основному забезпечує особливий фермент — теломераза. Теломераза — ДНК-полімераза, що добудовує 3'-кінці лінійних молекул ДНК невеликими (6–8 нуклеотидів) послідовностями (у хребтних TTAGGG). Теломераза — це рибонуклеопротеїн, який складається з РНК компонента (hTR у людини), білкової каталітичної субодиниці hTERT (human telomerase reverse transcriptase) та білків [8]. Теломеразна РНК (у людини — 450 нуклеотидів) являє собою матрицю для нарощування теломерної ДНК. Це дозволяє віднести її до зворотної транскриптази. Незначну кількість теломеразу виявлено практично в усіх диференційованих клітинах людини. Вважається, що її функція полягає в уповільненні темпу скорочення теломерів. Теломеразну активність виявлено у стовбурових, гемопоетичних, статевих та 85% ракових клітин [9].

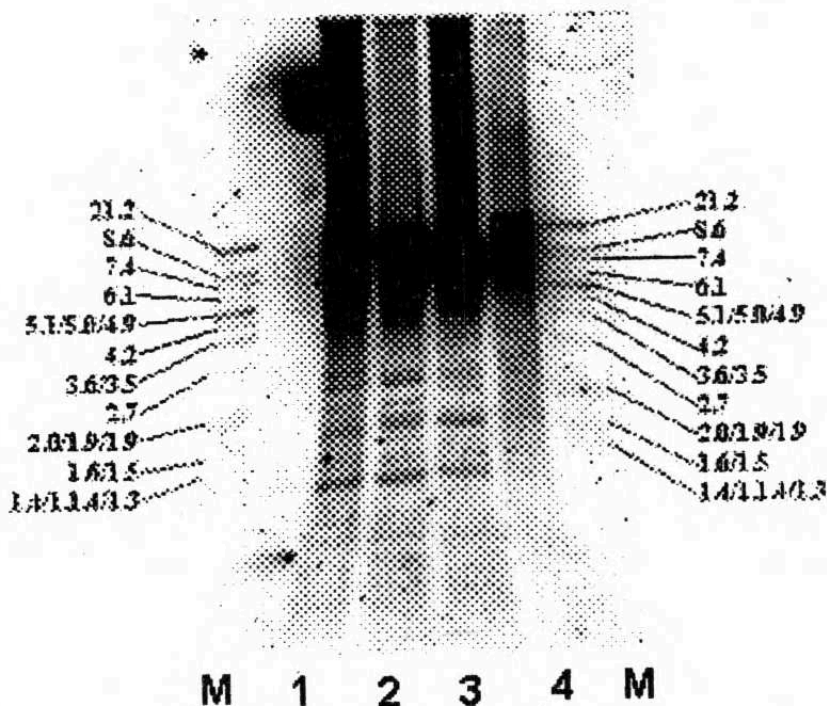


Рис. 3. Оцінка довжини теломер за допомогою Southern — гібридизації.

1, 2, 3, 4 — зразки крові хворих на ХМЛ; М — маркери

Визначення довжини теломер проводили з використанням методу Southern-гібридизації (рис. 3).

Рівень теломеразної активності детектували за допомогою неізотопного ТРАР протоколу, який дає змогу оцінити функціональний стан клітин крові. Підвищення рівня теломеразної активності свідчить про високу вірогідність пухлинної трансформації.

Розроблені протоколи використовуються для підтвердження пухлинної природи при мієлопроліферативних процесах.

Вивчення ролі ДН та РН доменів BCR. За допомогою PIP Strip було показано, що РН домен зв'язується з PtdIns(3)P, PtdIns(4)P, PtdIns(5)P. Ці результати дозволяють зробити висновок про переважне розташування білку BCR у клітині, оскільки відомо, що PtdIns(4)P є головним PIP у апараті Гольджі, а PtdIns(3)P домінує в ранніх ендосомах. Реконбінантні білки, що містять ДН чи ДНРН домени, використовували для оцінки їх GEF активності щодо ГТФаз RhoA, Rac1 і Cdc42.

Отримані дані свідчать, що ДН домен білку BCR не виявляє GEF активності щодо даних ГТФаз *in vitro* та *in vivo*. Також показано, що присутність РН в реконбінантній молекулі не впливає на GEF активність ДН-домени BCR.

Література

1. Nowell P. C., Hungerford D. A. A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia. // *Science* 1960, vol.1 32, P. 1497–1499.
2. Sonoyama J., Matsumura I., et al Functional Cooperation among Ras, STAT5, and Phosphatidylinositol 3–Kinase Is Required for Full Oncogenic Activities of BCR/ABL in K562 Cells // *The Journal of Biological Chemistry*.— 8 March 2002, vol. 227, №.10, P. 8076–8082.
3. McWhirter J. R., Wang J. Y. Effect of bcr sequences on the cellular function of the Bcr/Abl oncoprotein // *Oncogene*.— 1997.— vol.1 5.— P. 1625–1634.
4. Terasaki T., Kyo S., Takakura M., et al Analysis of telomerase activity and telomere length in bone and soft tissue tumors // *Oncology Reports* 2004; vol. 11: P. 1307–1311.
5. de Mattos S. F., Essafi A., et al FoxO3a and BCR-ABL Regulate cyclin D2 Transcription through a STAT5/BCL6–Dependent Mechanism // *Molecular and Cellular Biology*.— November 2004, vol.24, № .22, P. 10058–10071.
6. Birkenkamp K U, Essafi A. et al. FOXO3a Induces Differentiation of Bcr-Abl-transformed Cell through Transcriptional Down-regulation of Id1 // *The Journal of Biological Chemistry*.— , January 26, 2007, vol. 282, No.4, P. 2211–2220.
7. Богданов А.А. Теломеры и теломераза. Соросовский образовательный журнал 1998; том 12: С. 12–18.
8. Harley C, Futcher A. B, Greider C. W. Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. // *Nature* 1990; vol. 346: P. 866–868.
9. Shay J. W., Zou Y., Hiyama E., Wright W. E. Telomerase and cancer // *Hum. Mol. Genet.* 2001; vol.10: P. 677–685.

Резюме

Представлены данные о факторах, определяющих развитие ХМЛ ДН, РН доменов BCR, транскрипционном факторе FoxO3a, теломерах и теломеразной активности.

Data about factors of CML development are presented.

Національна академія наук України
Українська академія аграрних наук
Академія медичних наук України
Українське товариство генетиків і селекціонерів
ім. М.І. Вавилова

ДОСЯГНЕННЯ І ПРОБЛЕМИ ГЕНЕТИКИ, СЕЛЕКЦІЇ ТА БІОТЕХНОЛОГІЇ

Збірник наукових праць

ТОМ 1

Присвячено:

120-літтю
від дня народження
академіка НАН України
М.І. Вавилова

40-літтю від часу заснування
Українського товариства генетиків і селекціонерів
ім. М.І. Вавилова

Київ
ЛОГОС
2007