

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

ФАКТОРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ ЕВОЛЮЦІЇ ОРГАНІЗМІВ

ФАКТОРЫ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ
ЭВОЛЮЦИИ ОРГАНИЗМОВ

TOPICS IN EXPERIMENTAL
EVOLUTION OF ORGANISMS

Збірник наукових праць

ТОМ 9

Присвячено

*110-річчю від дня народження
Теодосія Григоровича Добржанського*

Київ
ЛОГОС — 2010

ББК 28.02я43

Ф18

УДК 578.08.631.52

РЕДАКЦІЙНА КОЛЕГІЯ

Кунах В.А.— д-р біол. наук, чл.-кор. НАНУ (головний редактор); Дубровна О.В.— д-р біол. наук (заст. головного редактора); Блюм Я.Б.— д-р біол. наук, академік НАНУ; Вагіна І.М.— канд. біол. наук; Глеба Ю.Ю., д-р біол. наук, академік НАНУ; Єльська Г.В., д-р біол. наук, академік НАНУ; Кучук М.В.— д-р біол. наук, чл.-кор. НАНУ; Лялько І.І.— канд. біол. наук; Лукаш Л.Л.— д-р біол. наук; Малюта С.С.— д-р біол. наук, чл.-кор. НАНУ; Михайлов В.Г.— д-р с.-г. наук, чл.-кор. НААНУ; Моргун В.В.— д-р біол. наук, академік НАНУ; Сиволап Ю.М.— д-р біол. наук, академік НААНУ; Созінов О.О.— д-р с.-г. наук, академік НАНУ, академік НААНУ

Затверджено до друку рішенням вченої ради Інституту молекулярної біології і генетики НАН України (протокол №5 від 17 травня 2010 р.)

Ф18 **Фактори експериментальної еволюції організмів: зб. наук. пр. / НАН України, НААН України, АМН України, Укр. т-во генетиків і селекціонерів ім. М.І. Вавилова; редкол.: В.А. Кунах (голов. ред.) [та ін.]— К.: Логос, 2003–2010.**

Т. 9: Присвяч. 110-річчю від дня народж. Теодосія Григоровича Добржанського.— 2010.— 512 с.: іл.— Укр., рос.— Бібліогр. в кінці ст. ISBN 978-966-171-281-1 (Т.9)

У збірнику представлено наукові праці вітчизняних та зарубіжних спеціалістів, написані спеціально для даного видання, присвяченого 110-річчю від дня народження Т.Г. Добржанського. В оглядових і експериментальних статтях наведено дані з основних напрямів генетико-біотехнологічного розширення генетичної мінливості живих організмів, генетики господарсько — цінних ознак рослин і тварин, сучасних методів біотехнології і генетичної інженерії при створенні нового покоління сортів і гібридів культурних рослин, ДНК-технологій і молекулярних маркерів у селекції рослин і тварин, генетики людини та медичної генетики; результати аналізу та оцінки генетичних ресурсів.

Для спеціалістів у галузі генетики, селекції, біотехнології, екології, а також викладачів і студентів вищих навчальних закладів III–IV рівнів акредитації.

ББК 28.02я43

ISBN 978-966-171-281-1 (Т.9)

© Українське товариство генетиків і селекціонерів ім. М.І. Вавилова, 2010

Резюме

В работе представлены результаты изучения поведения мышиных бластоцист при длительном культивировании в определенных условиях на слое митомицин С инактивированных мышиных фибробластов (MIF). Для поддержания плюрипотентного состояния ES-клеток в культуре в среду, добавляли LIF (лейкемия ингибирующий фактор). Цитохимическим окрашиванием по Гомори выявлена высокая активность щелочной фосфатазы в мышиных ES-клетках.

В роботі представлені результати вивчення поведінки бластоцисти миші при довготривалому культивуванні у визначених умовах на шарі інактивованих мітоміцином С фібробластів миші (MIF). Для підтримання плюрипотентного стану ES-клітин в середовище додавали LIF (лейкемія інгубуючий фактор). Цитохімічним забарвленням за Гоморі виявлена висока активність лужної фосфативи у ES-клітинах миші.

Results of the mouse blastocyst behaviour study during their long-time cultivation under definite conditions on the layer of mytomicin C — inactivated mouse fibroblasts (MIF) are presented in the article. To support pluripotent state of ES cells in culture, LIF (leukemia inhibitor factor) has been added to the medium. High alkaline phosphatase activity has been revealed in mouse ES cells by cytochemical Homori staining.

ДИБКОВ М.В., МАЛЮТА С.С., ТЕЛЕГЕСВ Г.Д.

Институт молекулярної біології і генетики НАН України,

вул. акад. Заболотного, 150, м. Київ, 03680, Україна

e-mail: m.v.dybkov@imbg.org.ua

ВИЯВЛЕННЯ МУТАЦІЇ V617F В ГЕНІ *jak2* ХВОРИХ НА ХРОНІЧНІ МІЄЛОПРОЛІФЕРАТИВНІ НЕОПЛАЗМИ ЗА ДОПОМОГОЮ T-ARMS ПЛР

Однією з головних відмінностей нової, четвертої ревізії класифікації та діагностичних критеріїв ВОЗ є використання при постановці діагнозів генетичних маркерів. Зокрема, згідно цього документу генетичні маркери мають використовуватись і при діагностиці мієлопроліферативних неоплазм [1] — гетерогенної групи неопластичних захворювань, які характеризуються множинною гіперплазією гемопоетичних клітин кісткового мозку. Згідно останньої ревізії до мієлопроліферативних неоплазм відносять: хронічну мієлоїдну лейкемію (ХМЛ), хронічну нейтрофільну лейкемію, справжню поліцитемію, ідіопатичний мієлофіброз, есенціальну тромбо-цитемію, хронічну еозинофільну лейкемію, мастоцитоз та хронічні мієлопроліферативні захворювання, некласифіковані. Введенню генетичних маркерів у діагностичну практику при мієлопроліферативних неоплазмах передували кілька відкриттів. Відомо, що донедавна лише для ХМЛ було описано чіткий цитологічний маркер — філадельфійську хромосому, та відповідний молекулярний маркер — злитий ген *bcr/abl*. Але в 2005 році одночасно кілька груп

авторів [2–5] описали мутацію в чотирнадцятому екзоні гена *jak2*, що призводила до заміни валіну на фенілаланін у позиції 617. Мутація V617F виявляється у 95% хворих на справжню поліцитемію, приблизно і приблизно у 50% хворих на есенціальну тромбоцитемію та ідіопатичний мієлофіброз. І хоча функціональна роль цієї мутації не встановлена (вважають, що дана мутація в псевдокіназному домені призводить до порушення регуляції кіназної активності, що призводить до конститутивної активації тирозинкінази JAK2, і, відповідно, до збільшення кількості еритроцитів, тромбоцитів та гранулоцитів), однак висока частота даної мутації дозволила включити її як важливий діагностичний критерій. Так виявлення цієї мутації відноситься до головних критеріїв при встановленні діагнозів “справжня поліцитемія”, “ідіопатичний мієлофіброз” та “есенціальна тромбо-цитемія” [1]. Також її наявність виключає вторинну поліцитемію, реактивний тромбоцитоз чи вторинний фіброз кісткового мозку тощо.

У даній роботі наводиться метод виявлення мутації V617F за допомогою tetra-primer amplification refractory mutation system ПЛР (T-ARMS ПЛР).

Матеріали і методи

У роботі використовували зразки крові хворих (за інформованої згоди), що проходили лікування в гематологічних клініках м. Києва. РНК виділяли згідно [6]. Зворотну транскрипцію проводили в об'ємі 30 мкл у суміші, що містила буфер для зворотної транскриптази, 1 мМ dNTP, 0,1 мкг праймера Random Hexamer Primer, 300 од зворотної транскриптази RevertAid™ M-MuLV Reverse Transcriptase (Fermentas), 20 од РНАзіну та 1–3 мкг РНК. Реакцію проводили при 42 °С протягом 1 год і зупиняли прогріванням при 70 °С 10 хв. Праймери підбирали за допомогою он-лайн утиліти http://cedar.genetics.soton.ac.uk/public_html/primer1.html. Полімеразну ланцюгову реакцію проводили в об'ємі 30 мкл продовж 30 циклів (94 °С — 35 с, 60 °С — 40 с, 72 °С — 35 с) з використанням буферу для ПЛР (100 мМ трісОН 8,0 50 мМ КСl); 10 pmol праймерів J4-FO (GAAGAGAAGTAGGAGACTACGGTCAAC) та J4-RO (ATAAGCAGAATATT TTTGGCACATACAT); 30 pmol праймерів J4-FI (GCAATTTGGTTTTAAATTATGGAGT ATATG) та J4-RI (ACCAGAATAT TCTCGTCTCCASAAAA); 200 мкМ dNTP та 2 мкл суміші для отримання кДНК. Продукти ампліфікації аналізували в 2% агарозному гелі.

Результати та обговорення

Існує кілька підходів до виявлення мутації V617F в гені *jak2* — це і ПЛР ампліфікація відповідного регіону з подальшим його секвенуванням чи рестрикційним аналізом, проведення кількісної ПЛР, тощо. Однак як було показано раніше [7] є доцільним використання саме ЗТ-ПЛР задля уніфікації початкових процедур виявлення генетичних маркерів, наприклад, для виявлення злитого гена *bcr/abl* [8], делецій в 12-му екзоні гена *jak2* тощо. Раніше нами було запропоновано тест-систему для виявлення мутації V617F за допомогою ПЛР та прямого секвенування ампліфікатів [7]. І хоча даний підхід має певні переваги, насамперед виявлення мінорних мутацій в даному регіоні даний аналіз вимагає значного часу і є коштовним. Тому для експрес тесту нами

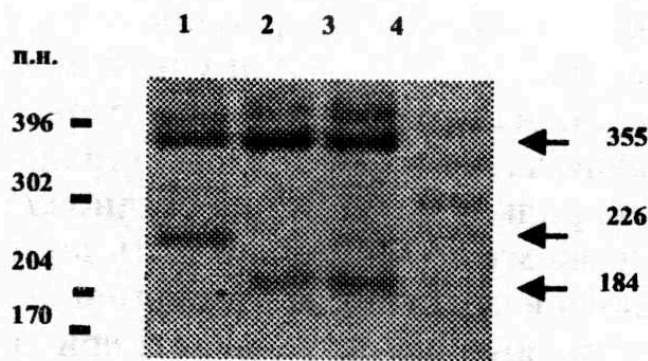


Рис. Електрофореграма продуктів T-ARMS ПЛР, що були отримані при дослідженні крові:

1 — здорового донора (G-алель), 2 — хворого М (Т-алель), 3 — хворого П (G- та Т-алелі); 4 — маркер молекулярних мас рЕТ32а/HinI. Праворуч стрілками показано відповідні алелі

пропонується метод виявлення мутації V617F за допомогою методу tetra-primer amplification refractory mutation system PCR (T-ARMS-PCR), який базується на використанні двох зовнішніх геноспецифічних праймерів та двох алельспецифічних внутрішніх праймерів. В результаті проведення ПЛР із усіма чотирма праймерами напрацьовується повнорозмірний контрольний фрагмент та один чи два алельспецифічні фрагменти. Праймери підбирають так, щоб алельспецифічні фрагменти різнились за розміром і їх можна було б виявити за допомогою простого електрофорезу в агарозному гелі. Так в нашому випадку розмір продукту для G-алеля (норма) складає 226 п.н., для Т-алеля (відповідає мутації V617F) — 184 п.н., контрольний геноспецифічний фрагмент — 355 п.н.

На рисунку представлено електрофореграму продуктів T-ARMS ПЛР хворих П., 1950 року народження та М, 1942 р.н., (діагнози встановлені на підставі клініко-гематологічних досліджень) та здорового донора. Як видно з рисунку у всіх трьох зразках виявляється контрольний геноспецифічний алель. У здорового донора виявляється лише G-алель, у хворого П — Т-алель і у хворого М — обидва маркери (G- та Т-алелі). Тому можна стверджувати, що ген *jak2* гомозиготний за мутацією V617F у пацієнта П і гетерозиготний — у пацієнта М. Оскільки у обох хворих виявлено мутацію V617F, то діагноз, який був поставлений за клініко-гематологічними показниками підтверджується наявністю генетичних маркерів згідно чинних діагностичних критерії ВОЗ [1].

Таким чином, запропонована методика виявлення мутації V617F за допомогою T-ARMS ПЛР може використовуватись для генетичної діагностики мієлопроліферативних неоплазм.

Література

1. Swerdlow, S.H., Campo, E., Harris, et al. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues, Fourth Edition.— 2008.— IARC.— 439 p.
2. Baxter E.J., Scott L.M., Campbell P.J., et al. Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders // Lancet 2005.— V.365, N9464.— P. 1054–1061.

3. *Kralovics R., Passamonti F., Buser A.S., et al.* A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders // *N. Engl. J. Med* 2005.— V.352, N17.— P. 1779–1790.

4. *Levine R.L., Wadleigh M., Cools J., et al.* Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis // *Cancer Cell* 2005.— V.7, N4.— P. 387–397.

5. *Zhao R., Xing S., Li Z., et al.* Identification of an acquired JAK2 mutation in polycythemia vera // *J. Biol Chem.* 2005.— V.280, N24.— P. 22788–22792.

6. *Chomczynski P., Sacchi N.* Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction // *Analyt. Biochem.*— 1987.— V.162.— P. 156–159.

7. *Дибков М.В., Гартовська І.Р., Телегеев Г.Д., Малюта С.С.* Розробка тест-системи для виявлення мутації V617F гена *jak2* у хворих на хронічні мієлопроліферативні захворювання // *Наука та інновації.*— 2009.— Т.5, №6.— С. 59–63.

8. *Телегеев Г.Д., Дибков М.В., Божко М.В., Демиденко Д.В., Малюта С.С., Третьяк Н.М., Бондар М.В.* Моніторинг хронічного мієлолейкозу за допомогою молекулярно-біологічних методів (методичні рекомендації) // *Республіканський центр науково-медичної інформації.*, Київ, 1997, 20 стор.

Резюме

Мутація V617F гена *jak2* є важливим діагностичним критерієм при хронічних мієлопроліферативних захворюваннях. Запропоновано методику для її виявлення за допомогою T-ARMS ПЛР.

Мутация V617F гена *jak2* является важным диагностическим критерием при диагностике хронических миелопролиферативных заболеваний. Предложена методика ее выявления с помощью T-ARMS ПЦР.

V617F mutation *jak2* gene is an important diagnostic criterion for the diagnostics of chronic myeloproliferative disorders. The method of detection using T-ARMS PCR was proposed.

ЗЕЛЕНЬКИЙ С.Б.¹, БОБЫК В.И., МАНДРЫК С.Я., СИДОРИК Л.Л., ПОГРЕБНОЙ П.В.

¹ *ИЕПОР им. Р.Е. Кавецкого НАН Украины,*

Украина, 03022, Киев, ул. Васильковская, 45, e-mail: now15green@yahoo.com

ПОЛУЧЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА ПОЛИКЛОНАЛЬНЫХ МОНОСПЕЦИФИЧЕСКИХ АНТИТЕЛ ПРОТИВ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНОГО, НИЗКОИММУНОГЕННОГО И ВЫСОКОКАТИОННОГО ПЕПТИДА *HVD-2*

Антимикробные пептиды (дефенсины) являются неотъемлемой частью так называемого неадаптивного, врожденного иммунитета. Все они действуют на широкий спектр микроорганизмов, грибов и вирусов, имеющих оболочку. Кроме того, исследования последних лет, показали, что что опухолям

ВИВЧЕННЯ ВПЛИВУ ДН/РН ДОМЕНІВ БІЛКА BCR НА СУБКЛІТИННУ ЛОКАЛІЗАЦІЮ ОНКОПРОТЕЇНУ BCR-ABL

Ген *bcr* (від англ. breakpoint cluster region) бере участь у патогенезі двох типів лейкемій, що мають філадельфійську хромосому (t 9:22). Ця хромосома детектується в 95% випадків у хворих на ХМЛ та 25–30% випадків у хворих на ГЛЛ (дорослих). Розвиток хвороби обумовлений експресією гібридного білку, що складається з доменів Bcr (амінокінцева частина, з 22 хромосоми) та Abl (карбоксильна частина, з 9 хромосоми) [1].

Відмінність перебігу хронічної та гострої форми обумовлена наявністю різних форм гібридного білку, а саме p190 при ГЛЛ та p210 при ХМЛ. Остання відрізняється від p190 тим, що має 2 додаткові домени (ДН та РН)

Таким чином, визначення структурно-функціональної ролі цих доменів дасть змогу пояснити різні типи лейкемій, розробити нові терапевтичні підходи.

Матеріали і методи

Трансфекція клітин еукаріотів проводили згідно [2]. Для експресії білків ДН, ДНРН, РН було використано конструкції на основі вектора pRK5-мус. Для експресії білків p190Bcr-Abl та p210Bcr-Abl було використано вектори pSG5 та pGDE.

Імунофлуоресцентна мікроскопія. Для використання в мікроскопії клітини вирощували на скельцях для мікроскопії в 6-лунковій культуральній плащі у відповідному середовищі при +37 °С та 5% CO₂. Через 24 год. після трансфекції клітини переносили в середовище без сироватки і інкубували 16 год. Реакцію мічення антитілами проводили за [4]. Для отримання флуоресцентного сигналу різні компоненти клітини фарбували декількома способами: ядро — DAPI 1:1000, актин — TRITC-мічений фалоїдин 1:200, комплекс Гольджі — маркером GM130 1:100 і TRITC-міченими антитілами anti-mouse IgG 1:500, білки Bcr-Abl (p190, p210) — anti-Abl антитілами 1:100 і вторинними Cy2-міченими anti-rabbit IgG антитілами.

Результати та обговорення

Дослідження локалізації білків p190 і p210 Bcr-Abl. Як було зазначено, білки p190 і p210 відрізняються тим, до складу останнього додатково входять домени ДН і РН. Ми встановили, що РН домен зв'язує фосфатиділінозитол-монофосфати з високою афінністю [3]. Відомо, що в клітині існує розподіл ліпідів за компартментами, тому наявність в складі білка РН домену може впливати на його локалізацію. Клітини Cos-1 були трансфіковані конструкціями, які експресували p190 або p210 Bcr-Abl. Через 36 годин після трансфекції клітини фіксували і фарбували (рис. 1). Було показано, що білки p190 і p210 Bcr-Abl мають відмінності в локалізації. Обидва білки знаходяться в цитоплазмі, але помітно, що p190 Bcr-Abl має більш рівномірний розподіл

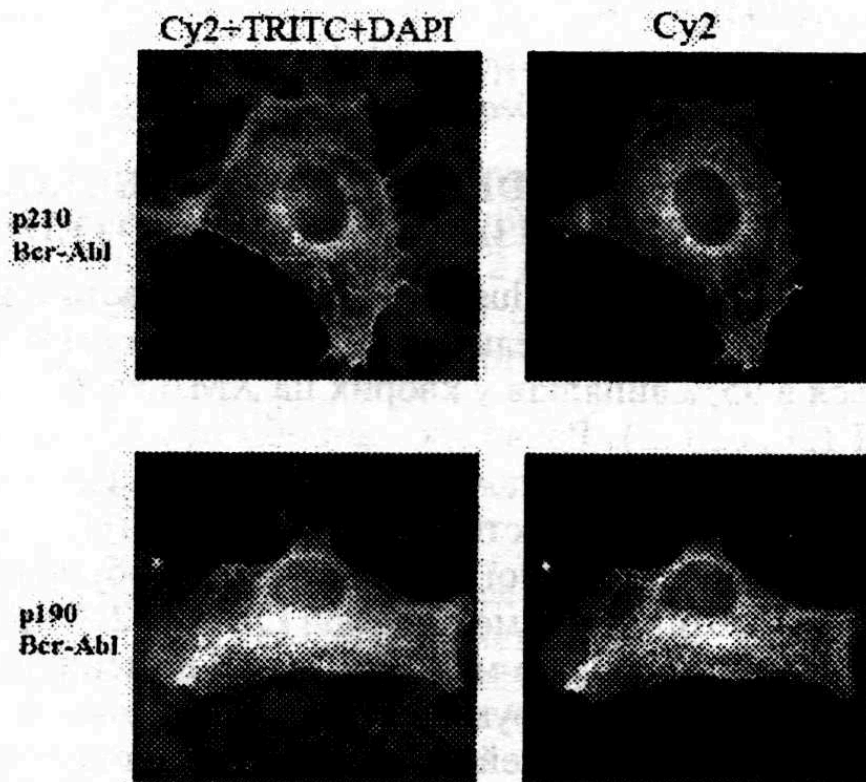


Рис. 1. Імунофлуоресцентний аналіз розподілу білків p210 і p190 Bcr-Abl в клітинах Cos-1: візуалізація: Bcr-Abl — анти-Abl антитіла 1:100; вторинні Cy2-мічені антитіла 1:500; актин — TRITC-мічений фалоїдин 1:200; ядро — DAPI 1:1000

по цитоплазмі клітини. Білок p210, навпаки є більш концентрованим навколо ядра, і хоча також присутній по всій цитоплазмі, його локалізація явно пов'язана з ядром. Отже, можна зробити висновок, що ділянка Bcr, яка входить до складу p210 і не входить до p190 Bcr-Abl, має певний вплив на розподіл зазначених білків. Найбільш вірогідним є участь PH домену в локалізації білка Bcr-Abl. Морфологія клітин Cos-1 не змінювалась при трансфекції. Клітини мали округлу форму, рівномірний розподіл актину без виражених філаментів, мембрана клітин не утворювала ламелоподій або філоподій. Це може означати, що ГТФази родини Rho, які беруть участь у реорганізації актинового цитоскелету, у цьому випадку не були активовані, чого слід було б очікувати, якщо DH домен білка p210 Bcr-Abl має GEF-активність.

Дослідження локалізації GFP білків, що несуть DH і PH домени білка BCR.

Було помічено, що розподіл білків p190 та p210 відрізняється. Додатково трансформували клітини Cos-1 GFP-конструкціями, що несли DH, PH або DHPH домени Bcr і вивчали локалізацію відповідних GFP-білків, а також розподіл актину (рис. 2). Не спостерігалось виникнення ламелоподій або філоподій, що виникають при активації Rho ГТФаз, актинові філаменти не були чітко вражені. Білки з PH доменом і без нього мали різну локалізацію. Так, білок DH знаходився в цитоплазмі клітин, а обидві конструкції з PH доменом крім цитоплазми, були також детектовані в області ядра клітини. Природа такого розподілу не з'ясована, але такі відмінності в локалізації

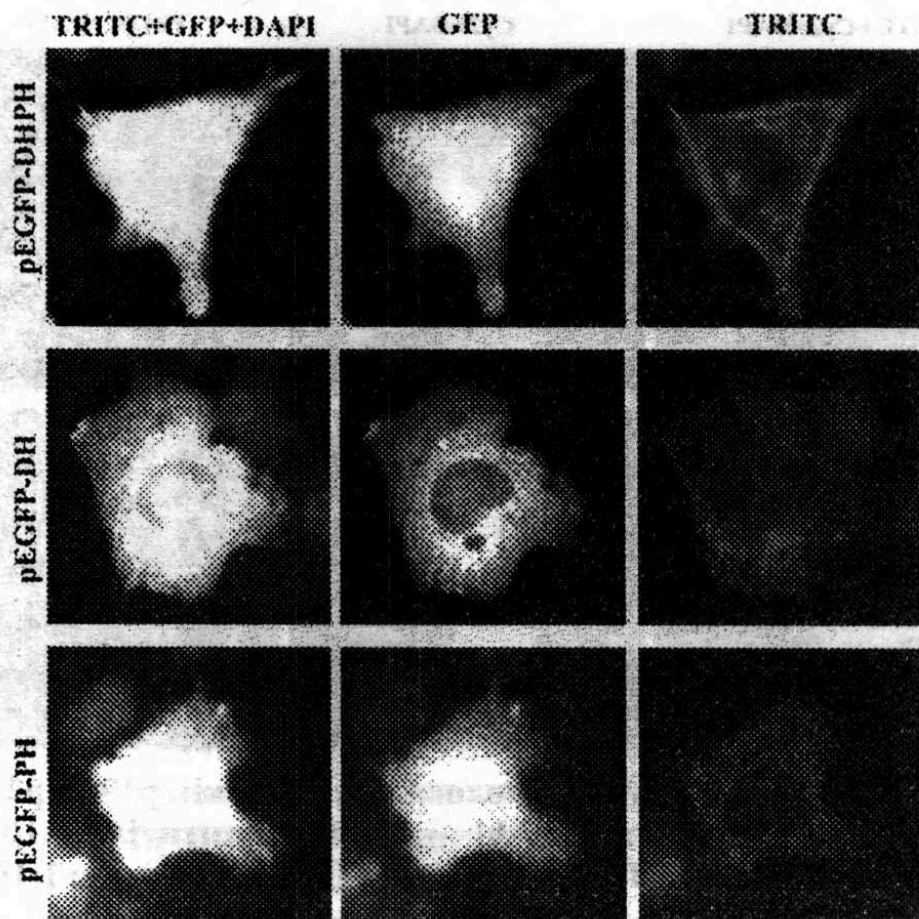


Рис. 2. Імунофлуоресцентний аналіз субклітинної локалізації GFP-білків, що несуть DH і PH домени Vcr: клітини Cos-1 трансфіковані плазмідами рEGFP, що експресують DH; PH і DHPH фрагменти Vcr з GFP-послідовністю; актин візуалізовано за допомогою TRITC- кон'югованого фалоеїдину 1:200; ядро — DAPI 1:1000

відповідних білків ілюструють вплив PH домену на місце знаходження білка, до складу якого він входить, і, таким чином, на його роль у передачі сигналів в клітині.

Локалізація білків р190 і р210 Vcr-Abl в клітині відносно апарату Гольджі. Ми показали, що PH домен має властивість зв'язувати PI(4)P, який є основним компонентом мембран комплексу Гольджі [3]. Тому було вирішено дослідити локалізацію білків р190 і р210 відносно апарату Гольджі (рис. 3).

Клітини Cos-1 трансформували конструкціями, що несли білки р190 і р210 Vcr-Abl. Для візуалізації апарату Гольджі було використано антитіла до матричного білка GM130, що є його специфічним маркером. Було відмічено, що локалізація білка р210 пов'язана з апаратом Гольджі, крім того, що він також знаходиться в цитоплазмі. Але в районі комплексу Гольджі спостерігалась найбільш висока концентрація білка. В свою чергу, білок р190 Vcr-Abl не має такого явного розташування навколо ядра, він є розподіленим рівномірно по всій цитоплазмі клітини.

Таким чином, показано, що наявність PH домену впливає на субклітинну локалізацію цього протеїну, обумовлює взаємодію з різними органелами та білками клітини.

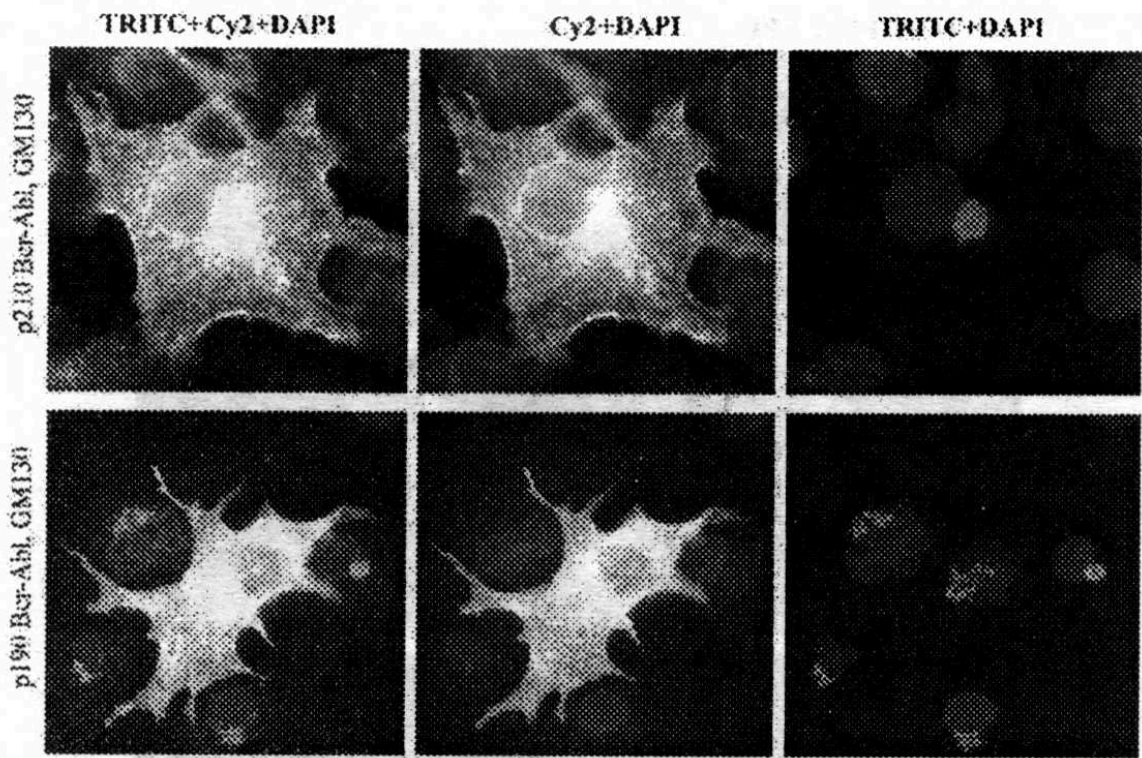


Рис. 3. Імунофлуоресцентний аналіз колокалізації білків p190 і p210 Bcr-Abl і апарату Гольджи: візуалізація: Bcr-Abl — анти-Abl антитіла 1:100, вторинні Cy2-мічені антитіла; комплекс Гольджи — анти-GM130 антитіла 1:100, вторинні TRITC-мічені антитіла; ядро — DAPI 1:1000

Література

1. Quintas-Cardama A., Cortes J. Molecular biology of bcr-abl positive chronic myeloid leukemia // *Blood*.— 2009.— V.113, N8.— P. 1619–1630.
2. Chen C., Okayama H. High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA // *Mol. Cell. Biol.*—1987.— V.7.— P. 2745–2752.
3. Мірошниченко Д.О., Дубровська А.М., Телегесв Г.Д., Малиута С.С. Визначення специфічності білок-ліпідних і білок-білкових взаємодій PH домену білка Bcr, пов'язаного з хронічною мієлоїдною лейкемією // *Біополімери і клітина*.— 2007.— Т.23, №5.— С. 405–409.
4. Miroshnychenko D., Dubrovskaya A., Maliuta S., Telegeev G., Aspenstrom P. Novel role of pleckstrin homology domain of the Bcr-Abl protein: Analysis of protein-protein and protein-lipid interactions // *Exp Cell Res.*— 2010.— 316.— N4.— P. 530–542.

Резюме

Вивчали вплив DH, PH доменів білка Bcr на розподіл онкопротеїну Bcr-Abl в клітині. Показано, що наявність PH домену впливає на субклітинну локалізацію цього протеїну, обумовлює взаємодію з різними органелами та білками клітини.

Изучали влияние DH, PH доменов Bcr белка на локализацию Bcr-Abl в клетке. Установлено, что наличие PH домена определяет внутриклеточную локализацию этого белка, обуславливает его взаимодействие с клеточными белками и органеллами.

We studied role of PH, DH domains of Bcr on localization of Bcr-Abl in cell. It was detected that PH domain determines its subcellular position and interaction with cells organelles and proteins.