

**МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ**  
**НАЦІОНАЛЬНА МЕДИЧНА АКАДЕМІЯ**  
**ПІСЛЯДИПЛОМНОЇ ОСВІТИ імені П.Л. ШУПИКА**



**ЗБІРНИК**  
**НАУКОВИХ ПРАЦЬ**  
**СПІВРОБІТНИКІВ НМАПО**  
**імені П.Л. Шупика**

**ВИПУСК 19**  
**КНИГА 3**

**Київ – 2010**

УДК: [616-073.916+616-056.3] (061)

ББК: [53.6+54.1] з-41

## **Збірник наукових праць співробітників НМАПО імені П.Л. Шупика**

Київ, 2010 р. - 952 с.

19 випуск збірника наукових праць виходить у вигляді 4 книг. В третій книзі висвітлені актуальні питання серцево-судинної хірургії, кардіології, терапії, акушерства і гінекології, педіатрії, неврології, офтальмології, фтизіатрії, клінічної імунології та алергології, судової медицини, стоматології, гематології і трансфузіології, інфекційних хвороб, фармації та наукові роботи молодих вчених.

Збірник розрахований на хірургів, кардіологів, терапевтів, гінекологів, педіатрів, неврологів, офтальмологів, фтизіатрів, імунологів, алергологів, стоматологів, гематологів, лікарів судової медицини, інфекційних хвороб, фармацевтів, сімейних лікарів, а також на викладачів вищих навчальних медичних закладів.

**Головний редактор:** член-кор. НАМН України, професор **Ю.В. Вороненко**

**Науковий редактор:** д.мед.н., професор **І.С. Зозуля**

**Редакційна колегія:** **Л.Я. Бабиніна** - д.мед.н., проф.; **Г.В. Бекетова** - д.мед.н., проф.; **В.В. Бережний** - д.мед.н., проф.; **В.І. Біда** - д.мед.н., проф.; **О.І. Білогорцева** - д.мед.н., проф.; **Г.Ф. Білоклицька** - д.мед.н., проф.; **В.О. Бобров** - член-кор. НАМН України, проф.; **М.І. Борщевська** - д.мед.н., проф.; **Ю.П. Вдовиченко** - д.мед.н., проф.; **Н.О. Ветютнева** - д.мед.н., проф.; **С.В. Видиборець** - д.мед.н., проф.; **А.П. Волоха** - д.мед.н., проф.; **Р.М. Вітовський** - д.мед.н., проф.; **Т.І. Гавриленко** - д.мед.н., проф.; **С.М. Гайдукова** - д.мед.н., проф.; **В.В. Гебеш** - д.мед.н., проф.; **Ю.І. Головченко** - д.мед.н., проф.; **Р.І. Гош** - к.біол.н., с.наук.с.; **О.М. Гриценко** - д.мед.н., проф.; **С.А. Гусєва** - д.мед.н., проф.; **Л.Л. Давтян** - д.мед.н., проф.; **І.В. Дзюблик** - д.мед.н., проф.; **О.Я. Дзюблик** - д.мед.н., проф.; **М.М. Долженко** - д.мед.н., проф.; **О.І. Жарінов** - д.мед.н., проф.; **В.А. Загорій** - д.мед.н., проф.; **К.М. Ігрунова** - д.мед.н., проф.; **В.К. Казимирко** - д.мед.н., проф.; **Г.П. Козинець** - д.мед.н., проф.; **В.В. Камінський** - д.мед.н., проф.; **В.М. Коваленко** - член-кор. НАМН України, проф.; **О.Є. Коваленко** - д.мед.н., проф.; **Ю.М. Кондратенко** - д.мед.н., проф.; **Р.С. Коритнюк** - д.мед.н., проф.; **Г.В. Книшов** - академік НАМН України, проф.; **В.М. Кузнецов** - д.мед.н., проф.; **Л.В. Кузнецова** - д.мед.н., проф.; **В.І. Мамчич** - д.мед.н., проф.; **Є.Л. Мачерет** - член-кор. НАМН України, проф.; **В.Д. Мішалов** - д.мед.н., проф.; **О.М. Охотнікова** - д.мед.н., проф.; **О.В. Павленко** - д.мед.н., проф.; **В.І. Паламарчук** - д.мед.н., проф.; **М.С. Пономаренко** - д.мед.н., проф.; **А.П. Радзіховський** - д.мед.н., проф.; **С.О. Риков** - д.мед.н., проф.; **Д.В. Самарін** - д.мед.н., проф.; **В.П. Сільченко** - д.мед.н., проф.; **М.М. Сергієнко** - член-кор. НАМН України, проф.; **О.В. Ткаченко** - д.мед.н., проф.; **О.О. Тимофєєв** - д.мед.н., проф.; **Ю.І. Фещенко** - академік НАМН України, проф.; **Н.В. Харченко** - д.мед.н., проф.; **Л.І. Чернишова** - д.мед.н., проф.; **Н.І. Швець** - д.мед.н., проф.; **Н.М. Шуба** - д.мед.н., проф.; **Є.Є. Шунько** - д.мед.н., проф.; **Ю.П. Шупик** - д.мед.н., проф.; **О.М. Юзько** - д.мед.н., проф..

### **РЕКОМЕНДОВАНО**

Вченою радою Національної медичної академії післядипломної освіти імені П.Л. Шупика МОЗ України

Протокол №6 від 16.06.10 р.

### **АТЕСТОВАНО**

Вищою атестаційною комісією України:

**медичні, фармацевтичні науки**

Затверджено постановою президії ВАК України від 10.02.2010 р. № 1-05/1

Відповідальна за комплектування, редагування та випуск: к.біол.н., с.наук.с. **Р.І. Гош**  
Комп'ютерне упорядкування та верстка: **І.І. Кондрачук, В.П. Кондрачук**

Рецензенти: **В.Г. Коляденко** - член-кор. АПН України, професор;  
**М.М. Сергієнко** - член-кор. НАМН України, професор.

Редакційна колегія зберігає авторський текст без істотних змін, звертаючись до коректування в окремих випадках.

Відповідальність за вірогідність фактів, цитат, прізвищ, імен та інших даних несуть автори.

ISBN 978-966-391-084-0

© Національна медична академія  
післядипломної освіти імені П.Л. Шупика

## FEATURES OF THE STATE OF IMMUNE SYSTEM IN PATIENTS WITH MULTIPLE MYELOMA

*N.I. Kostyukova, S.V. Vydyborets*

*Summary.* The article presents the results of the study of immune system in patients with multiple myeloma (MM). It is concluded that patients with MM have disorders of humoral and cellular immunity. These disorders depend on the stage of tumor.

*Key words:* multiple myeloma, immune system, diagnosis.

## ВИВЧЕННЯ ДОМЕНІВ ОНКОПРОТЕЇНУ BCR/ABL, ЯК ШЛЯХ ДО РОЗУМІННЯ ПАТОГЕНЕЗУ ТА РОЗРОБКИ АЛЬТЕРНАТИВНОЇ ТЕРАПІЇ ПРИ ЛЕЙКЕМІЯХ 3 t (9;22)

*Кравчук<sup>1</sup> І.В., Малюта<sup>2</sup> О.В., Тютюнникова<sup>1</sup> А.П.,  
Поліщук<sup>1</sup> Л.О., Лисецька<sup>1</sup> Т.Ю., Дибков<sup>1</sup> М.В.,  
Телегєєв<sup>1</sup> Г.Д.*

<sup>1</sup> Інститут молекулярної біології і генетики НАН України,

<sup>2</sup> Київський національний університет  
імені Тараса Шевченка.

**Резюме.** Деякі онкогематологічні захворювання характеризуються наявністю хромосомної транслокації t(9;22). Результатом цієї хромосомної аномалії є експресія гібридного білка BCR/ABL, який є, вірогідно, ключовим фактором злоякісної трансформації. Вивчення структури та функцій доменів цього протеїну дозволить не тільки отримати нові фундаментальні знання щодо молекулярних механізмів трансформації, спричиненої BCR/ABL, але також може послужити основою для розробки нових терапевтичних підходів. У даній роботі отримано та перевірено такі рекомбінантні конструкції, які містять послідовності ДНК, що відповідають P1 та C2 доменам білка BCR/ABL. Здійснено експресію, очищення та рефолдинг білків, що відповідають P1 та C2 доменам. Отримано рекомбінантні конструкції, що містять послідовності ДНК, які кодують білки IKK $\beta$ , HSP27, кортактин, для підтвердження взаємодій цих білків із P1 доменом. Проаналізовано роль BCR у процесах фаго-, ендо- та екзоцитозу.

**Ключові слова:** лейкемія, третинна структура, Bcr-Abl, рекомбінантні білки, сигнальні мережі клітин, філадельфійська хромосома.

### ВСТУП

Розвиток більшості пухлинних захворювань пов'язаний з виникненням генетичних порушень (мутацій) які приводять до безконтрольної проліферації

клітин і порушення їх диференціювання. Одним із проявів подібних генетичних порушень є так звана Філадельфійська хромосома (Ph'). Ця хромосомна аномалія утворюється в результаті реципрокної транслокації між 9 і 22 хромосомами, внаслідок чого формуються два гібридні гени - ген *bcr/abl* на 22q-(Ph') хромосомі та ген *abl/bcr* на 9q+ хромосомі. Філадельфійська хромосома виявляється при хронічній мієлоїдній лейкемії (ХМЛ) більш ніж у 95% випадків, а також часто зустрічається при гострому лімфобластному лейкозі (ГЛЛ), хронічній нейтрофільній лейкемії (ХНЛ) та в деяких випадках лімфом і мієлом. Продукт гена *bcr/abl* (онкобілок BCR/ABL) є нерегульованою, постійно активною, тирозинкіназою, експресія якої в клітині призводить до розвитку пухлинного фенотипу [1].

Оскільки при транслокації розриви можуть відбуватися у різних точках гена *BCR*, то існують різні за розміром варіанти *BCR/ABL* (p190, p210 та p230). Важливо відзначити, що наявність конкретної форми *BCR/ABL*, зазвичай, чітко корелює з конкретними захворюваннями. Так, найкоротший варіант гібридного білка (p190) детектується у пацієнтів з ГЛЛ, трохи довший варіант p210 знаходять при ХМЛ, а найдовший p230 експресується у хворих на ХНЛ.

На сьогоднішній день створено ряд препаратів (імаїніб, нілотініб тощо), що взаємодіють з *ABL* ділянкою білка *BCR/ABL*, які є інгібіторами його тирозинкіназної активності та застосовуються у терапії Ph'-позитивних лейкемій. Проте, внаслідок мутацій змінюється конформація центру зв'язування АТФ, а тому з'являються нові резистентні клони, що є нечутливими до згаданих препаратів. Внаслідок цього, актуальним є пошук альтернативних мішеней для терапії. Перспективними в цьому плані виглядають домени *BCR* частини білка *BCR/ABL*. Встановлення третинної структури доменів цього білка, а також виявлення взаємодії конкретних доменів з іншими молекулами клітини та органелами наближує розуміння молекулярного патогенезу цього захворювання.

В даній роботі було отримано рекомбінантні білки, що відповідають PH, C2 доменам *BCR*, отримано рекомбінантні конструкції для білків (IKK $\beta$ , Hsp27, кортактин), запропоновано модель участі *BCR* в "окисному вибуху" та формуванні фагосоми.

**Мета роботи.** Дослідити структуру та функцію PH та C2 доменів і їх роль в патогенезі ХМЛ.

## МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Рекомбінантні конструкції створювали за допомогою методів генетичної інженерії (дизайн специфічних олігонуклеотидних праймерів, ПЛР, клонування ампліфікованого фрагмента в вектор експресії, перевірка отриманих конструкцій за допомогою автоматичного секвенсу). Для синтезу необхідних ДНК-фрагментів використовувались такі праймери: для послідовності C2 домена (Ca2-forward 5'-AGAAGCTTCTCCCTGACATCCGTG-3' та Ca2-reverse 5'-CTGGCCCTTCCCCATGAGTCTG-3'),

# ПРОБЛЕМНІ ПИТАННЯ ПРАКТИЧНОЇ МЕДИЦИНИ

для PH домена (PHsf 5'-AAAGGATCCCACCGGCAG-  
3' та PHsr 5'-CCCCCAAGCTTCTGAATCACT-3'), для  
Hsp27 (H27f AGAGCAGAGTCAGCCAGCATGACC, H27r  
TТАACTTGGCGGCAGTCTCATCGGA), для кортактина  
(Cor-f GAAAGATGTGGAAAGCTTCAGCAG, Cor-  
r CTGATCTGTAGTGTGAGGATCCAG), для IKK $\beta$  (для  
N-кінцевого фрагменту: IKKn-f AGTATGAGCTGGTCACTTCCCTG,  
IKKn-r GAAGAAATCCAACTTGGCCTTGAG; для C-кінцевого  
фрагменту IKKc-f CAGCTCAAGGCCAAGTTGGATTTC,  
IKKc-r AGCAGGAACCACCATGTGAGAGCC). В якості матриці для ПЛР  
використовувались кДНК хворих, що проходили діагностику в відділі  
молекулярної генетики ІМБіГ НАНУ за направленнями медичних установ.

Оптимізація експресії рекомбінантних білків здійснювалась шляхом  
підбору найбільш ефективної системи для експресії, умов культивування на  
мінімальному середовищі. Очищення білків здійснювалось на Ni-NTA агарозі.  
Рефолдинг білків проводили, як шляхом діалізу елюйованих з колонки  
фракцій, так і завдяки промиванню зв'язаних із носієм білків буферами із  
градієнтом детергенту.

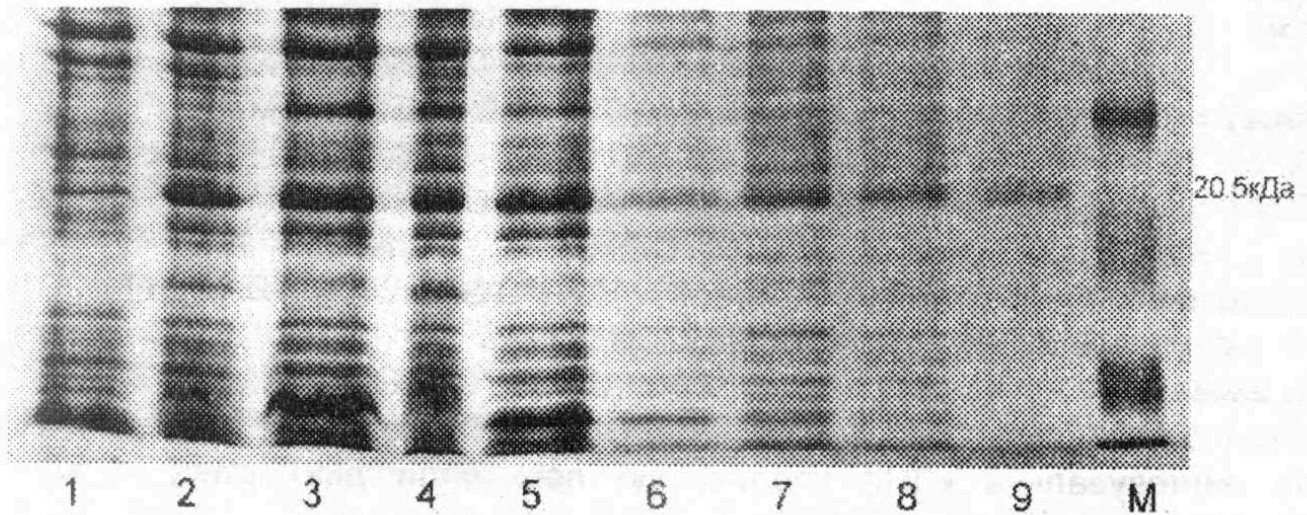
## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

### *Отримання рекомбінантних білків, що відповідають С2 домену Vcr*

Перший представник родини С2 доменів був ідентифікований у  
протеїнкіназі С [1]. Пізніше вони були виявлені у багатьох білках еукаріотів,  
що відіграють ключову роль у процесах передачі сигналу, мембранному  
транспорті. Окремі С2 домени зв'язують іони Ca<sup>2+</sup>, фосфатидилінозитолі  
і деякі внутрішньоклітинні білки. Ці домени унікальні тим, що в багатьох з  
них зв'язування з фосфатидилінозитолами регулюється іонами кальцію. С2  
домен білка VCR знаходиться на С-кінці біля PH домену. До нього відносяться  
амінокислоти 870-1002 [2].

Наші дослідження дозволяють зрозуміти функції цього домену в клітині  
відповісти на низку питань щодо механізмів участі окремих доменів і всього  
онкобелка VCR/ABL в розвитку лейкемій. Дослідження механізмів взаємодії  
С2 домену з модельними мембранними системами, які містять, у тому числі,  
молекули різних фосфатидилінозитолів, дозволяють встановити роль білок-  
мембранних взаємодій у розвитку цих захворювань.

Ділянку, що відповідає С2 регіону Vcr гена було напрацьовано за  
допомогою ПЛР. Отримано та перевірено рекомбінантну конструкцію pET28a/  
2, яка містить послідовність ДНК, що відповідає С2 домену білка Vcr/AbI.  
Проведено експресію, очищення та рефолдинг білка. Вихід білка С2 склав  
5 мг/л (рис.1.). Конструкція pET28a/C2 (експресована у штамі BL21(DE3)  
coli) виявились найбільш ефективною для культивування та подальшого  
отримання білка для ЯМР спектроскопії.

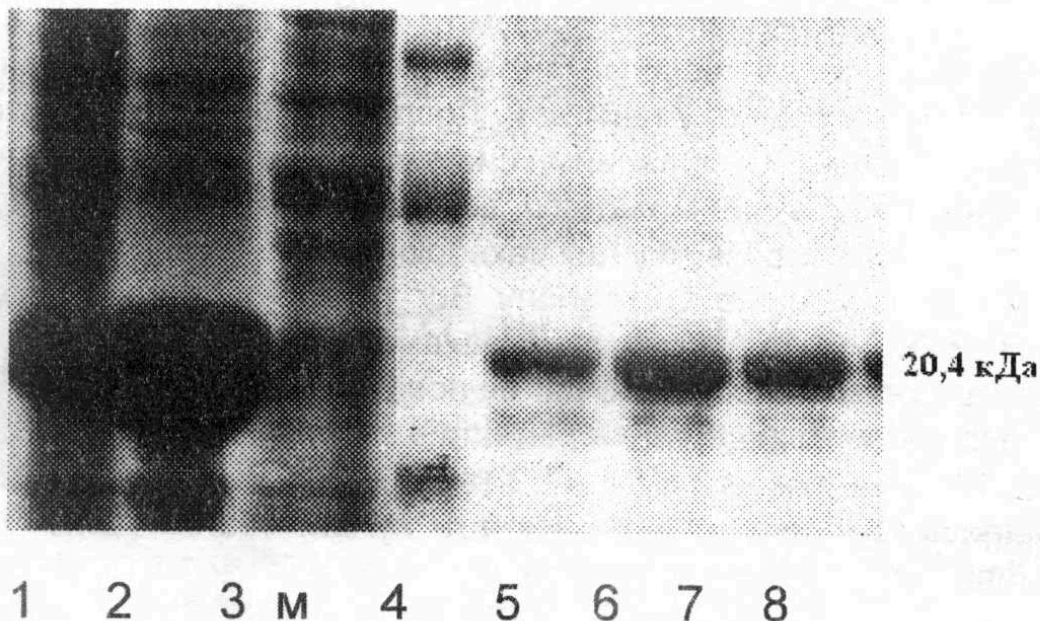


**Рис 1. Електрофореграма продуктів експресії та очищення білка С2 домена в нативних умовах.**

*Примітка:* 1 – лізат клітин до індукції експресії; 2 – лізат клітин після індукції; 3 – розчинна фракція білка; 4 – не розчинна фракція білка; 5 – білки, які не зв'язались з колонкою; 6-9 – стадії елюції; М – маркер молекулярної маси.

**Отримання і характеристика рекомбінантного протеїну, що відповідає РН домену BCR.**

Просторова структура РН-домену онкобілка BCR/ABL в даний час невідома. Дослідження структури цього домену методом ЯМР спектроскопії у водному розчині і мембрано-моделюючому оточенні дозволяє вивчити зв'язок його структури і функції в онкобілку BCR/ABL, а також встановити просторову організацію його функціональних центрів. Визначення структури РН-домену допоможе в створенні нових препаратів для терапії лейкозів та інших онкологічних захворювань.



**Рис.2. Очистка білка РН домену в нативних умовах.**

**Примітка:** 1. фракція розчинних білків; 2. фракція не розчинних білків; 3. білки, що не зв'язались з Ni-NTA агарозою; 4. фракція промивання; 5.-8. фракції елюції; м. маркерна суміш.

PH домен відсутній у найкоротшому варіанті BCR/ABL (p190), але присутній у всіх інших, C2 домена немає як у p190, так і в p210, але він є у p230.

PH-домени широко розповсюджені в білках людини. При виконання проекту "Геном людини" було виявлено більш ніж 250 білків, які мають у своєму складі один чи декілька PH-доменів. Більшість з цих білків є поверхневозв'язаними мембранними білками, саме наявність PH-доменів визначає їх локалізацію та шлях транспорту в клітині. Визначальну роль в мембранній активності PH-доменів має зв'язування з фосфатидилінозитолами мембран, причому для деяких PH-доменів (~10%) спостерігається дуже висока специфічність зв'язування ( $K_d \sim 10$  нМ). Незважаючи на незначну гомологію PH-доменів (10-30%), їх вторинна та третинна структури вельми консервативні. Всі PH- домени, що дослідженні на сьогодні (~30) представляють собою beta-сендвічі, що складаються з семи beta-тяжів, на С-кінці яких знаходиться alpha-спіраль. За селективну взаємодію з фосфатидилінозитолами, можливо, відповідають варіабельні петлі, що знаходяться між жорсткими елементами вторинної структури.

Отримано та перевірено рекомбінантну конструкцію pQE30/PH, яка містить послідовності ДНК, що відповідають PH домену білка Bcr/Abl. Проведено експресію, очищення та рефолдинг білка; вихід білка PH склав 22 мг з 1 л культури, вирощеної на мінімальному середовищі (Рис.2.). Конструкції pQE30/PH (експресована у штамі TG1 *E. coli*) виявилась найбільш ефективною для культивування та подальшого отримання білків для ЯМР спектроскопії.

**Аналіз білків, що взаємодіють з PH доменом Bcr та отримання генно-інженерних конструкцій.**

У попередніх наших дослідженнях вивчались партнери по взаємодії з PH доменом білка Bcr/Abl. За допомогою двовимірного електрофорезу з подальшою MALDI TOF мас-спектрометрією ідентифіковано 23 білків-кандидати, що можуть зв'язуватись з PH доменом. Далі проводили підтвердження цих взаємодій. Проте, взаємодія з низкою протеїнів (IKK $\beta$ , Hsp27, кортактин) ще потребує підтвердження [3].

Серед визначених можливих білків-партнерів можна виділити IKK $\beta$ , який є кіназою інгібітора NF $\kappa$ B і бере безпосередню участь у запуску сигнального шляху, що закінчується родиною транскрипційних факторів NF $\kappa$ B. Це видається особливо цікавим з огляду на той факт, що даний сигнальний шлях задіяний і є важливим у випадку Bcr/Abl-опосередкованої трансформації, хоча точний механізм його активації поки невідомий [4]. Було показано, що інгібітор IKK PS1145 інгібує проліферцію K562 та KCL клітин, мононуклеарних клітин кісткового мозку з пацієнтів з ХМЛ. Автори говорять

про можливу перспективу застосування комбінації іматинібу та інгібітора ІКК PS1145 для резистентних пацієнтів з ХМЛ. [5]

Білок Hsp27 цікавий тим, що є можливим регулятором активації ІККβ. Фосфорилування Hsp27 за допомогою р38 MAPK посилює зв'язування цього білка з ІККβ і, як наслідок, - зменшення ІКК активності [6].

Інший білок EMS1 (кортактин) задіяний у ряді важливих клітинних процесів, зокрема він залучений у інтерналізації рецепторів, що може бути одним з важливих етапів появи цитокінової незалежності у клітинах, що експресують Vcr/Abl. Окрім цього він бере участь в ендоцитозі.

Після дизайну специфічних праймерів до ДНК-послідовностей білків ІККβ, Hsp27, кортактин було створено відповідні рекомбінантні конструкції на основі вектора pGEX-4T.

### ***Роль BCR в ендо-, екзоцитозі***

Фізіологічна роль білка BCR різноманітна. BCR тісно пов'язаний з клатриновим ендоцитозом і сигналінгом [8, 12, 10]. Клатрин, в свою чергу, грає важливу роль в переформуванні апарату Гольджі (протягом телофази), і є необхідним для його побудови [9]. Клатринові структури також беруть участь у сортуванні білків на транс-мережі комплексу Гольджі [8, 11]. Участь BCR в клатриновому ендоцитозі починається взаємодією з білком TSG101 [10]. TSG101 грає центральну роль в ендосомальному сортувальному комплексі ESCRT-I, який розпізнає убіквітиновані білки на ендосомальній мембрані і приводить до їх розподілу у мультивезикулярних тільцях [13, 14]. ESCRT-I комплекс необхідний для регулювання рецепторів ростових факторів, він мобілізується з цитоплазми в мультивезикулярні тільця у відповідь на стимуляцію факторів росту [13, 15, 16, 17].

Роль BCR визначається тим великим набором сайтів зв'язування з іншими білками й ліпідами і власною ферментною активністю. У BCR RhoGEF ділянка стимулює обмін GTP на GDP Rho сім'ї, тим самим переводячи їх в біологічно активний стан [18]. Нами було встановлено, що PH домен з високою афінністю взаємодіє з фосфатидилінозитолами PI(3)P, PI(4)P і PI(5)P [3]. GAP домени, в тому числі один у Vcr, стимулюють питому швидкість гідролізу GTPаз, перетворюючи їх у неактивну GDP-пов'язану форму [20]. Vcr містить PDZ-зв'язуючий домен, за допомогою якого взаємодіє з кількома цитоплазматичними білками, в тому числі AF-6 і Mint3 [21, 22]. AF-6 вважається посередником взаємодії між плазматичною мембраною і актиновим цитоскелетом [22]. Білок Mint3, який є партнером для Vcr, знаходиться головним чином у відділенні Гольджі, яке залучене до обробки білка і везикулярного трафіку в дистальних секреторних шляхах, а оскільки PI(4)P теж знаходиться на мембранах Гольджі, то можна припустити, що Vcr може відігравати певну роль у везикулярному трафіку й екзосомній секреції [21].

Таким чином, Vcr виявляється активною ланкою майже на всьому шляху ендоцитозу-сортування, в везикулярному транспорті та екзоцитозі. Згідно наших даних, маючи сайти зв'язування з тубуліном й фосфоліпідом PtdIns(3)P [3], Vcr потенційно здатний супроводжувати ендосому вздовж мікротубул

і, взаємодіючи послідовно з компонентами ендосомального шляху, здатний ініціювати ті, чи інші процеси за допомогою фосфорилування відповідних білків, з якими послідовно з'єднується і потім вимикати, коли процеси завершуються. І тому, за цією логікою, втрата частини специфічних сайтів зв'язування РН-домену онкобілка BCR/ABL з тими, чи іншими компонентами цих шляхів змінює процес передачі сигналу, локалізацію патологічного білка в клітині.

### Роль BCR у фагоцитозі

Фагоцитоз починається із взаємодії Fc-рецепторів (FcR), розташованих на плазматичній мембрані фагоцита, із Fc-ділянкою імуноглобулінів, які вкривають (опсонізують) поверхню частинки, що поглинається [23]. Крім FcR, фагоцитоз запускають також рецептори комплементу [23]. Перехресне поєднання Fc-рецепторів є першим кроком у каскаді сигналів, результатом якого є огортання частинки псевдоподіями фагоцита та, зрештою, формування фагосоми. Під час перехресного поєднання рецепторів тирозинкінази Lyn та Hck фосфорилують FcR в межах послідовності ITAM, після чого активований сайт ITAM взаємодіє із кіназою Syk [24] (рис.3-А).

Для утворення фагосоми необхідною є реорганізація актинового цитоскелету [27]. Полімеризації актину сприяють білки Cdc42, Rac, WASP, фосфоліпаза C, WAVE, PAK1 тощо [24]. Білки родини Vav, які взаємодіють із Rho, здійснюють негативний вплив на Rac; крім цього, вони є необхідними для активування компоненту НАДФ-оксидазного комплексу - p40phox [26]. Білок Vsg, завдяки своїй GEF- та GAP-активності взаємодіючи із Rac, Rho та Cdc42, також може здійснювати вплив на процес формування фагосоми. Дослідження мутантів, у яких Vsg був відсутній, показали, що фагоцитоз у таких тварин значно посилений [25].

Фагосома, що утворилась, проходить крізь серію подій дозрівання, поступово набуваючи маркерів ранньої та пізньої фагосоми [24]. Важливим моментом у знешкодженні поглинених частинок є вироблення активних форм кисню (АФК) завдяки функціонуванню НАДФ-оксидазного комплексу. Цей комплекс складається із двох субодиниць, зв'язаних із мембраною – gp91phox та p22phox (він же цитохром b558) – і чотирьох цитоплазматичних білків – Rac, p40phox, p47phox та p67phox [24, 26, 29] (Рис.3-Б). Злагоджена робота НАДФ-оксидазного комплексу забезпечує зниження рН всередині фагосоми, що веде до деградації її вмісту. Знижена експресія Vsg веде до конститутивної активності Rac у клітині та посиленого утворення АФК, на відміну від клітин із нормальним рівнем експресії [25]. Це підтверджено дослідженнями із гібридним білком Bcr/Abl, експресія якого в гемопоетичних клітинах вела до значного підвищення концентрації АФК [28]. Надмірне утворення АФК може призводити до пошкоджень ДНК та спричиняти виникнення додаткових мутацій [29], що приводить до бластної кризи.

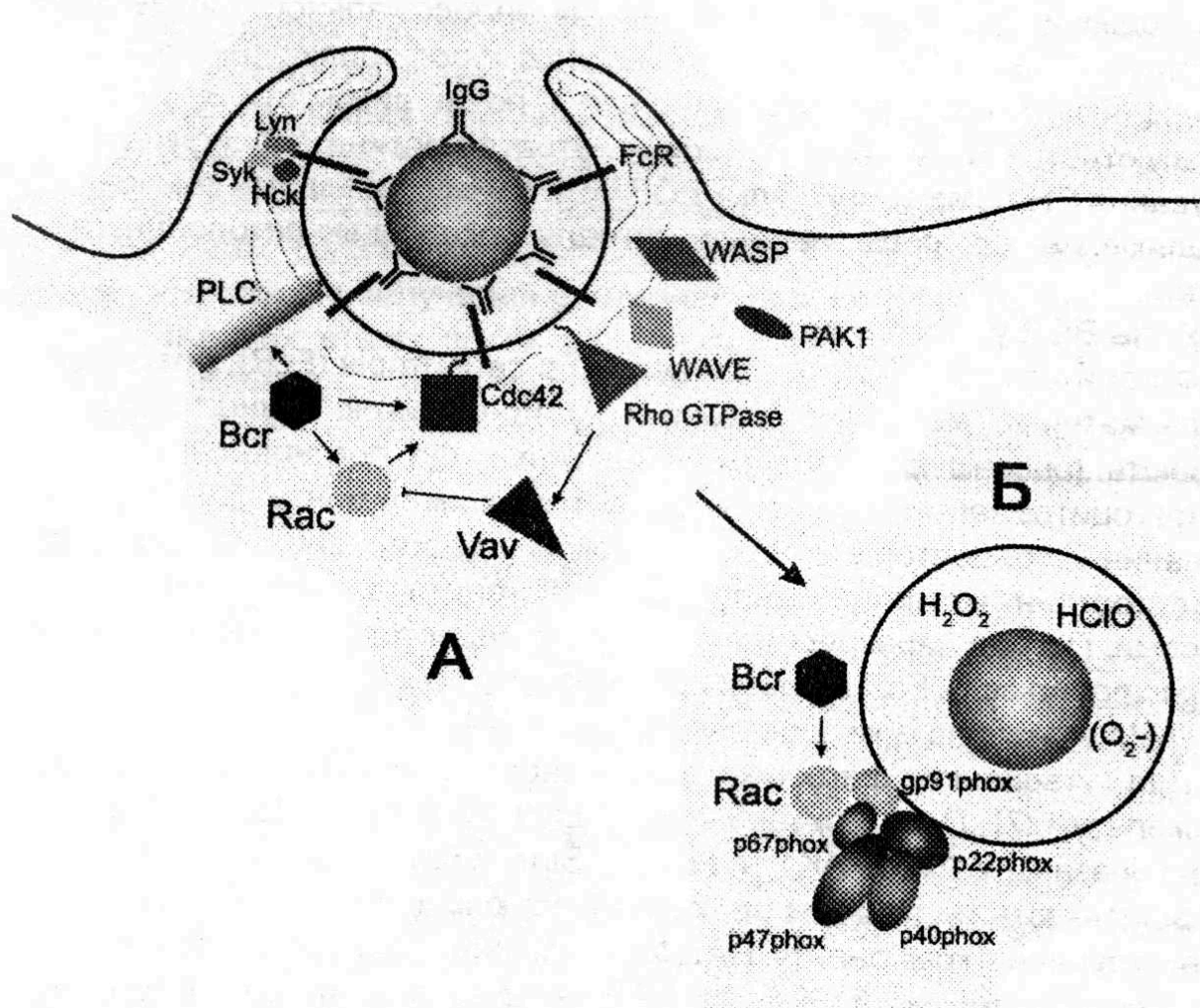


Рис. 3. Модель участі BCR в формуванні фагосоми та “окисному вибуху”.

### Література

1. Nishizuka Y., The molecular heterogeneity of protein kinase C and its implications for cellular regulation. // Nature. – 1988. – Vol. 334. – P. 661-665.
2. Nalefski E., Falke J., The C2 domain calcium-binding motif: structural and functional diversity. // Protein Science. - 1996, P. 2395-2390
3. Daria Miroshnychenko, Anna Dubrovskaya, Stanislav Maliuta, Gennady Telegueev and Pontus Aspenström Novel role of pleckstrin homology domain of the Bcr-Abl protein: Analysis of protein-protein and protein-lipid interactions // Experimental Cell Research Volume. - 2010, P. 530-542.
4. Kirchner D, Duyster J, Ottmann O, et al. Mechanisms of Bcr-Abl-mediated NF-kappaB/Rel activation. // Experimental Hematology. – 2003. – Vol. 31. – P. 504–511.
5. Cilloni D, Messa F, Arruga F et al The NF-kB pathway blockade by the IKK inhibitor PS1145 can overcome Imatinib resistance. // Leukemia. – 2006. – Vol. 20. – P. 61–67.
6. Park KJ, Gaynor RB, Kwak YT. Heat shock protein 27 association with the I kappa B kinase complex regulates tumor necrosis factor alpha-induced NF-kappa B activation. // JBC. – 2003. – Vol. 278, № 37. – P. 35272–35278.

7. **Мирошниченко Д.А., Дубровская А.Н., Телегеев Г.Д., Малюта С.С.** Определение специфичности белково-липидных и белково-белковых взаимодействий РН-домена белка Vsg, связанного с хронической миелоидной лейкемией. // Биополимеры и клетка. – 2007. – Т. 23, №5. – С. 405-409.

8. **Brodsky FM, Chen CY, Knuehl C, Towler MC, and Wakeham DE.** Biological basket weaving: formation and function of clathrin-coated vesicles. // Annu Rev Cell Dev Biol. – 2001. – Vol. 17. – P. 517–568.

9. **Radulescu A.E., Siddhanta A., Shields D.** A role for clathrin in reassembly of the Golgi apparatus. // Mol Biol Cell. – 2007. – Vol. 18. – P. 94–105.

10. **Schmid SL.** clathrin-coated vesicle formation and protein sorting: an integrated process. // Annu Rev Biochem. – 1997. – Vol. 66. – P. 511–548.

11. **Le Roy C and Wrana JL.** Clathrin- and non-clathrin-mediated endocytic regulation of cell signaling. // Nat Rev Mol Cell Biol. – 2005. – Vol. 6. – P. 112–126.

12. **Xie W, Li L, Cohen SN.** Cell cycle-dependent subcellular localization of the TSG101 protein and mitotic and nuclear abnormalities associated with TSG101 deficiency. // Proc Natl Acad Sci. USA. – 1998. – Vol.95. – P.1595–600.

13. **Babst M, Odorizzi G, Estepa EJ, Emr SD.** Mammalian tumor susceptibility gene 101 (TSG101) and the yeast homologue, Vps23p, both function in late endosomal trafficking. // Traffic. – 2000. – Vol.1. – P. 248–258.

14. **Katzmann DJ, Babst M, Emr SD.** Ubiquitin-dependent sorting into the multivesicular body pathway requires the function of a conserved endosomal protein sorting complex. // ESCRT-I. Cell. – 2001. – Vol.106. – P.145–155.

15. **Bishop N, Horman A, Woodman P.** Mammalian class E vps proteins recognize ubiquitin and act in the removal of endosomal protein-ubiquitin conjugates. // J Cell Biol. – 2002. – Vol.157. – P. 91–101.

16. **Bache K.G., Slagsvold T., Cabezas A., Rosendal K.R.** The growth-regulatory protein HCRP1/hVps37A is a subunit of mammalian ESCRT-I and mediates receptor down-regulation. // Mol Biol Cell. – 2004. – Vol.15. – P.4337–4346.

17. **Lu Q, Hope LW, Brasch M, Reinhard C, Cohen SN.** TSG101 interaction with HRS mediates endosomal trafficking and receptor down-regulation. // Proc Natl Acad Sci USA. – 2003. – Vol.100. – P.7626–7631.

18. **S. Hassel, A. Eichner, M. Yakymovych, U. Hellman, P. Knaus and S. Souchelnytskyi,** Proteins associated with type II bone morphogenetic protein receptor (BMPR-II) and identified by two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. // Proteomics. – 2004. – Vol. 4. -P. 1346–1358.

19. **T. Kanamoto, U. Hellman, C.H. Heldin and S. Souchelnytskyi,** Functional proteomics of transforming growth factor-beta1-stimulated Mv1Lu epithelial cells: Rad51 as a target of TGFbeta1-dependent regulation of DNA repair. // EMBO J. – 2002. – Vol. 21. - P. 1219–1230.

20. **J. Gobom, E. Nordhoff, E. Mirgorodskaya, R. Ekman and P. Roepstorff,** Sample purification and preparation technique based on nano-scale reversed-phase columns for the sensitive analysis of complex peptide mixtures by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. // J. Mass

Spectrom. – 1999. – Vol. 34. - P. 105–116.

21. **Malmberg EK, Andersson CX, Gentzsch M**, et al. Bcr (breakpoint cluster region) protein binds to PDZ-domains of scaffold protein PDZK1 and vesicle coat protein Mint3. // J Cell Sci. – 2004. – Vol.117. – P.5535–5541.

22. **Radziwill G., Erdmann R.A., Margelisch U., Moelling K.** The Bcr kinase downregulates Ras signaling by phosphorylating AF-6 and binding to its PDZ domain. // Mol Cell Biol. – 2003. – Vol.23. – P.4663–4672.

23. **Sean D. Conner & Sandra L. Schmid.** Regulated portals of entry into cell. // Nature. – 2003. - Vol. 422. - P. 37-44.

24. **Joel A. Swanson and Adam D. Hoppe.** The coordination of signaling during Fc receptor-mediated phagocytosis. // Journal of Leukocyte Biology. – 2004. – Vol. 76. - P. 1093–1103.

25. **Young Jin Cho, Jess M. Cunnick, Sun-Ju Yi, Vesa Kaartinen, John Groffen, and Nora Heisterkamp.** Abr and Bcr, Two Homologous Rac GTPase-Activating Proteins, Control Multiple Cellular Functions of Murine Macrophages. // Molecular and cell biology. - 2007, P. 899-911.

26. **Ahmad Utomo, Xavier Cullere, Michael Glogauer, Wojciech Swat, and Tania N. Mayadas.** Vav Proteins in Neutrophils Are Required for FcγR-Mediated Signaling to Rac GTPases and Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate Oxidase Component (phox). // The Journal of Immunology. – 2006. - Vol.177, № 9, P.6388-6397.

27. **Maria Diakonova, Gary Bokoch, and Joel A. Swanson.** Dynamics of Cytoskeletal Proteins during Fcγ Receptor-mediated Phagocytosis in Macrophages. // Molecular Biology of the Cell. – 2002. - Vol. 13. – P. 402-411.

28. **Martin Sattler, Shalini Verma, Gautam Shrikhande, Christopher H. Byrne, Yuri B. Pride, Thomas Winkler, Edward A. Greenfield, Ravi Salgia, and James D. Griffin** The BCR/ABL Tyrosine Kinase Induces Production Of Reactive Oxygen Species in Hematopoietic Cells. // The Journal of Biological Chemistry. – 2007. – Vol. 275, № 32. - P. 24273–24278.

29. **Rodrigues MS, Reddy MM, and Sattler M.** Cell cycle regulation by oncogenic tyrosine kinases in myeloid neoplasias: from molecular redox mechanisms to health implications. // Antioxid Redox Signal. – 2008. – Vol. 10. – P. 1813–1848.

## ИЗУЧЕНИЯ ДОМЕНОВ ОНКОПРОТЕИНУ BCR/ ABL КАК ПУТЬ К ПОНИМАНИЮ ПАТОГЕНЕЗА И РАЗРАБОТКИ АЛЬТЕРНАТИВНОЙ ТЕРАПИИ ПРИ ЛЕЙКЕМИЯХ С t (9;22)

**Кравчук И.В., Малюта О.В., Тютюнникова А.П.,**

**Полищук Л.А., Лисецкая Т.Ю., Дибков М.В., Телегеев Г.Д.**

*Резюме.* Некоторые онкогематологические заболевания характеризуются наличием хромосомной транслокации t (9; 22). Результатом этой хромосомной аномалии является экспрессия гибридного белка BCR/ABL,

который является, вероятно, ключевым фактором злокачественной трансформации. Изучение структуры и функций доменов этого протеина позволит не только получить новые фундаментальные знания о молекулярных механизмах трансформации, вызванной BCR/ABL, но также может послужить основой для разработки новых терапевтических подходов. В данной работе получено и проверено такие рекомбинантные конструкции, которые содержат последовательности ДНК, соответствующие PH и C2 доменам белка BCR/ABL. Осуществлена экспрессия, очистка и рефолдинг белков, отвечающих PH и C2 доменам. Получены рекомбинантные конструкции, содержащие последовательности ДНК, кодирующие белки IKK $\beta$ , Hsp27, кортактин, для подтверждения взаимодействий этих белков с PH доменом. Проанализирована роль Bcr в процессах фаго-, эндо-и экзоцитоза.

**Ключевые слова:** лейкемия, треть структуры, BCR/ABL, рекомбинантные белки, сигнальные сети клеток, филадельфийская хромосома.

### STUDYING DOMAINS OF ONCOPROTEINS BCR/ABL AS A WAY OF UNDERSTANDING PATHOGENESIS AND DEVELOPING ALTERNATIVE THERAPY IN LEUCEMIDS WITH t (9; 22)

*I.V. Kravchuk, O.V. Malyuta, A.P. Tyutyunnikova,*

*L.O. Polischuk, T.Yu. Lisezkaya, M.V. Dibkov, G.D. Telegeev*

**Summary.** Chromosomal translocation t (9; 22) is detected in some oncohaematological diseases. This chromosomal abnormality results in expression of hybrid protein BCR/ABL, which is believed to be the key factor of malignant transformation. Study of structure and function of domains of this protein will not only gain new fundamental knowledge about the molecular mechanisms of transformation caused by BCR/ABL, but also can serve as a basis for developing new therapeutic approaches. In this work recombinant constructions that contain DNA sequences corresponding to PH and C2 domains of BCR/ABL protein has been designed and verified. An expression, protein purification and refolding of recombinant PH and C2 domains has been performed. Recombinant constructions that encode IKK $\beta$ , Hsp27, cortactin has been designed to confirm interaction of this proteins with PH domain. The role of BCR in phago-, endo- and exocytosis has been analysed.

**Key words:** leukemia, tertiary structure, BCR/ABL, recombinant signal cellular network, Philadelphia chromosome.