

**ТЕЛЕГЄВ Г.Д., МІРОШНИЧЕНКО Д.О., ДИБКОВ М.В., МАЛЮТА С.С.**  
*Інститут молекулярної біології і генетики НАН України,  
Україна, 03680, Київ, вул. Заболотного, 150; e-mail: g.d.telegeev@imbg.org.ua*

## **ВИВЧЕННЯ ВПЛИВУ ДН/РН ДОМЕНІВ БІЛКА ВСR НА СУБКЛІТИННУ ЛОКАЛІЗАЦІЮ ОНКОПРОТЕЇНУ ВСR-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 *Vcr* (амінокінцева частина, з 22 хромосоми) та *Abl* (карбоксільна 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.

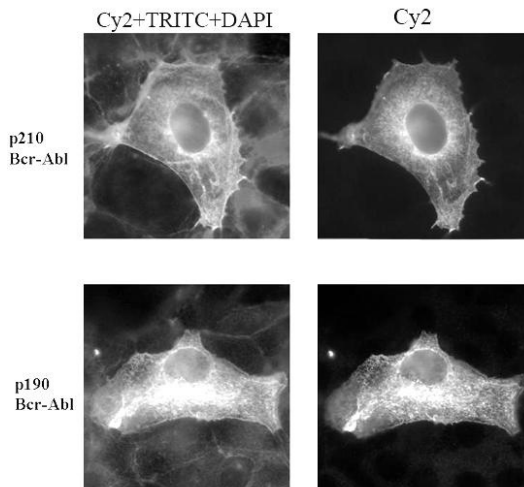
### **Матеріали і методи**

*Трансфекція клітин* еукаріотів проводили згідно [2]. Для експресії білків ДН, DPN, РН було використано конструкції на основі вектора pRK5-мус. Для експресії білків p190Vcr-Abl та p210Vcr-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% CO<sub>2</sub>. 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-міченим фалоїдин 1:200, комплекс Гольджі — маркером GM130 1:100 і TRITC-міченими антитілами anti-mouse IgG 1:500, білки Vcr-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 Vcr-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 фосфатиділінозитолмонофосфати 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 Vcr-Abl. Через 36 годин після трансфекції клітини фіксували і фарбували (рис. 1). Було показано, що білки p190 і p210 Vcr-Abl мають відмінності в локалізації. Обидва білки знаходяться в цитоплазмі, але помітно, що p190 Vcr-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 фаллоїдин 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

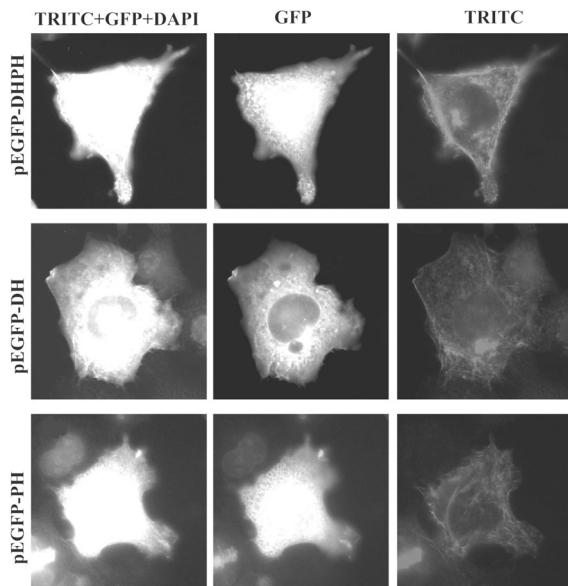


Рис. 2. Імунофлуоресцентний аналіз субклітинної локалізації GFP-білків, що несуть DH і PH домени Bcr: клітини Cos-1 трансфіковані плазмідами pEGFP, що експресують DH; PH і DHPH фрагменти Bcr з GFP-послідовністю; актин візуалізовано за допомогою TRITC- кон'югованого фаллоїдину 1:200; ядро — DAPI 1:1000

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 p190 і p210 Bcr-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 p190 і p210 відносно апарату Гольджі (рис. 3).

Клітини Cos-1 трансформували конструкціями, що несли білки p190 і p210 Bcr-Abl. Для візуалізації апарату Гольджі було використано антитіла до матричного білка GM130, що є його специфічним маркером. Було відмічено, що локалізація білка p210 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 p190 Bcr-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.

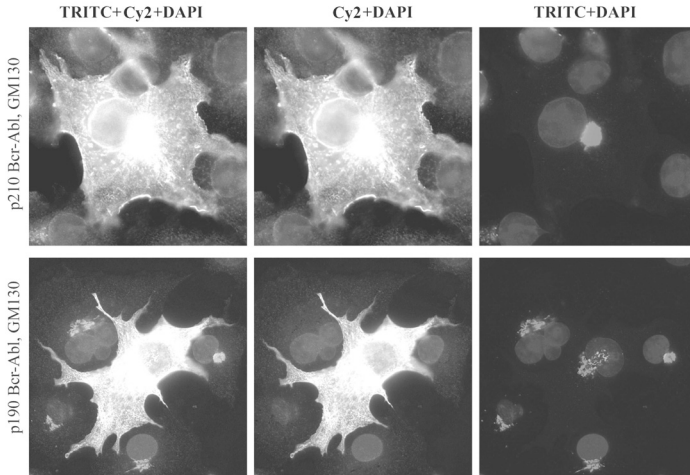


Рис. 3. Імунофлуоресцентний аналіз колокалізації білків p190 і p210 Bcr-Abl і апарату Гольджи: візуалізація: Bcr-Abl — анти-Abl антитіла 1:100, вторинні Cy2-мічені антитіла; комплекс Гольджи — анти-GM130 антитіла 1:100, вторинні TRITC-мічені антитіла; ядро — DAPI 1:1000

### 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., Телегеев Г.Д., Малюта 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., Dubrovska 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.

**ТЕРПИЛЯК О.І., ЗАСТАВНА Д.В., ЗАГАНЯЧ Я.Ю., ГЕЛЬНЕР Н.В.**

*ДУ "Інститут спадкової патології АМН України"*

*Україна, 79000, м. Львів, вул. М. Лисенка, 31а, e-mail: root@ihp.lviv.ua*

## **АСОЦІАЦІЯ МІЖ ГЕНЕТИЧНИМИ ПОЛІМОРФІЗМАМИ ПРОМОТОРНОЇ ДІЛЯНКИ ІЛ-10 ТА РЕПРОДУКТИВНИМИ ВТРАТАМИ У ЖІНОК**

Роботи останніх років [1, 2] засвідчують, що продукція цитокінів знаходиться під генетичним контролем, і жінки з репродуктивними втратами мають генетичну предриспованість до типу імунної відповіді, яка власне відповідає за втрату вагітності. Цитокіни індують зміни в експресії генів в клітинах-мішенях і діють як імуномодулятори [3, 4]. Вони впливають на репродукцію безпосередньо через втручання в процеси гаметогенезу, імплантацію, інвазію трофобласта, децидуалізацію, розвиток плаценти та імунотолерантність вагітності. Th1-цитокіни опосередковують цитотоксичну, запальну та ембріотоксичну реакцію, Th2-цитокіни через гуморальний імунітет запобігають Th1-відповіді проти зародка [5, 6]. Отже, протікання вагітності залежить від типу та концентрації цитокінів, вони можуть як охороняти плід, так і впливати пагубно на нього.

Серед Th2-цитокінів ключову роль відіграє ІЛ-10. Підтримуючи Th2-цитокінове оточення, він є критичним цитокіном для пролонгування вагітності. Ген ІЛ-10 локалізований на хромосомі 1 в регіоні 1q31-q32, в промоторній ділянці якого (пІЛ-10) знаходиться багато SNP (single-nucleotide polymorphisms), котрі і забезпечують рівень його продукції. Найбільш дослідженими є SNP –1082 G→A, –819 T→C та –592 A→C. Результати по асоціації алельних поліморфізмів SNP з рівнем продукції ІЛ-10, отримані різними авторами [7, 8], неоднозначні, відповідно, такого роду дослідження є актуальними.

Отже, виходячи з вище сказаного, метою роботи було вивчення особливостей розподілу поліморфних варіантів SNP –819 T→C та –592 A→C промоторної ділянки гена ІЛ-10 в групі жінок з непліддям.

### **Матеріал і методи**

Матеріалом для дослідження була ДНК, виділена з периферійної крові жінок з непліддям, які звернулися для медико-генетичного консультування у Львівський міжобласний медико-генетичний центр. Обстежено 22 жінки з навиковим невиношуванням вагітності (ННВ), 41 жінка з первинним непліддям (ПН) та 106 жінок контрольної групи без обтяженого акушерсько-генетичного анамнезу, котрі мають не менше двох здорових дітей.

Досліджувану промоторну ділянку гена ІЛ-10 ампліфікували за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) згідно методу, описаного Giorgani L. et al. [9] з використанням реактивів "МВІ Fermentas". Детекція проводилася методом ПДРФ з використанням ендонуклеази рестрикції Eam1401 ("МВІ Fermentas") згідно інструкцій фірми-виробника. Фрагменти ПЛР-продукту, отримані методом ПДРФ, розділяли у агарозному гелі (3%, 0,5 мг