

## STUDY OF PH DOMAIN OF BCR PROTEIN INFLUENCE ON THE DEVELOPMENT OF PH<sup>+</sup>-POSITIVE LEUKEMIA AND ON THE MECHANISM OF ITS PROGRESSION

O. Nezeluk, O. Vorontsov

National University of Food Technologies

<b>Key words:</b> Domain Colocalization Phagosome Transfection Macrophage Fluorescence	<b>ABSTRACT</b> Bcr-Abl protein is one of the markers of malignant transformation, which has been studied for many years. However, the effect of Bcr on tumor transformation has not been studied yet. Among protein domains that significantly affect the neoplastigenic potential Bcr-Abl is pleckstrin-homology (PH) domain, so we focused on the study of the structure of this domain. The method of phagosome visualization using fluorescence-labeled bacteria for checking colocalization of PH domain of protein Bcr-Abl with membrane phagosome was studied in this work. Our pEGFP-PH vector, which encodes PH-GFP protein, has been transfected in J774 cells with the use of DEAE-dextran. GFP gives green fluorescent signal that helps to visualize the colocalization of the PH domain with cell organelles during fluorescence microscopy.
<b>Article history:</b> Received 15.04.2013 Received in revised form 27.04.2013 Accepted 1.06.2013	
<b>Corresponding author:</b>  E-mail: npnuht@ukr.net	

## ДОСЛІДЖЕННЯ ВПЛИВУ PH ДОМЕНУ БІЛКА BCR НА РОЗВИТОК PH<sup>+</sup>-ПОЗИТИВНОЇ ЛЕЙКЕМІЇ ТА МЕХАНІЗМ ПРОГРЕСІЇ ДАНОГО ЗАХВОРЮВАННЯ

О.І. Незелюк, О.О. Воронцов

Національний університет харчових технологій

*Білок Bcr-Abl є одним з маркерів пухлинної трансформації, що вивчається вже багато років. При чому вплив частини Bcr на роль гібридного білка в пухлинній трансформації практично не вивчали. До білкових доменів, які суттєво впливають на пухлиногенний потенціал Bcr-Abl, відносять плекстрин-гомологічний (PH) домен, тому ми зосередились на вивченні структури цього домену. В даній роботі відпрацьовано метод візуалізації фагосом за допомогою флуоресцентно мічених бактерій для перевірки колокалізації PH домена білка Bcr-Abl з мембраною фагосом. Трансфекцію культури клітин мишачих макрофагів J774 проводили з використанням ДЕАЕ-декстарну генетичною конструкцією pEGFP-C3-PH, з якої буде синтезуватись білок PH-GFP. Цей білок за рахунок вставки GFP дає зелене забавлення при флуоресцентній мікроскопії, що дозволить виявити колокалізацію PH домену з органелами клітини.*

**Ключові слова:** домен, колокалізація, фагосома, трансфекція, макрофаг, флуоресценція

Ph<sup>+</sup>-позитивні лейкемії характеризуються наявністю філадельфійської хромосоми, яка є результатом реципрокної транслокації між 9 та 22 хромосомами [1]. Вона виявляється у 95 % хворих на хронічну мієлоїдну лейкемію (ХМЛ), у 10 – 20 % дорослих та 2 – 5 %

дітей з гострою лімфобластною лейкемією (ГЛЛ), а також при деяких випадках гострої мієлоїдної лейкозії (ГМЛ), лімфоми, мієломи та Ph<sup>+</sup>-позитивної хронічної нейтрофільної лейкозії (ХНЛ) [2]. Результатом цієї хромосомної аберації є утворення гібридного гену *bcr-abl*, експресія якого призводить до злоякісної трансформації гемопоетичних клітин [1]. Розриви в гені *abl* відбуваються таким чином, що не відбувається порушення кіназної частини Abl, яка входить до гібридного білка Vcr-Abl [3]. На відміну від цього, ген *bcr* має три ділянки, в яких розриви відбуваються найчастіше і залежно від точки розриву *bcr*, утворюються три різні за довжиною форми білка Vcr-Abl. Показано, що три види білка Vcr-Abl відповідають різним формам захворювання [4].

Встановлено, що злоякісна трансформація клітин, які експресують гібридний білок Vcr-Abl, пов'язана з порушеннями регуляції тирозинової кінази Abl. Тому основна частина досліджень у цій галузі спрямована на вивчення Abl-кіназної активності Vcr-Abl. Це дало змогу розробити і впровадити в клінічну практику перший специфічний інгібітор тирозинової кінази, іматиніб, однак з'являється все більше даних про виникнення мутацій, що перешкоджають дії цього лікарського засобу [5]. Таким чином, виникає проблема розробки нових специфічних агентів, як і нових підходів до блокування сигнальних шляхів, у яких бере участь гібридний білок Vcr-Abl.

До білкових доменів, які суттєво впливають на пухлиногенний потенціал Vcr-Abl, відносять плекстрин-гомологічний (PH) домен. Фізіологічна роль PH домену полягає у модулюванні внутрішньоклітинного розташування онкобілка Vcr-Abl, безпосередньо завдяки зв'язуванню з мембранними фосfolіпідами. Внутрішньоклітинний розподіл білка Vcr-Abl визначає його взаємодію із певним спектром сигнальних білків і характер клітинної відповіді [5, 6].

Попередні дані свідчать про те, що PH домени деяких білків крім зв'язування з ліпідами можуть також брати участь у білково-білкових взаємодіях [7]. Отже, участь PH домену в білково-білкових взаємодіях може відігравати важливу роль не тільки в локалізації білка, але також і в його функціональній активності.

Мета даної роботи — вивчення колокалізації PH домену білка Vcr з мембранною фагосомою, що важливо для розуміння ролі цього домену у клітинних процесах і потенційно може бути використано для розробки нових цільових лікарських агентів.

Об'єктом дослідження була клітинна лінія мишачих макрофагів J774. Клітини було отримано з колекції відділу молекулярної генетики Інституту молекулярної біології і генетики НАНУ. В роботі були використані клітини *E.coli*, за допомогою яких відбувалося розмноження цільових конструкцій. Крім цього, використано плазмідний вектор pEGFP-C3 з банку плазмід Інституту молекулярної біології і генетики НАН України.

Культивування культури проводилося на середовищі DMEM (Dulbeco's Modified Eagle's Medium) + 10 % FBS (сироватка ембріона бика) та інкубувалося при температурі +37 °C та 5 % CO<sub>2</sub>. Здійснювалося щоденне спостереження за ростом та розмноженням клітин (за допомогою інвертованого мікроскопа) та за зміною забарвлення середовища. При зміні кольору середовища з червоного на жовтий проводилося його відсмоктування і заміна на свіжоприготовлене DMEM + 10 % FBS. Після досягнення клітинами щільності приблизно 70 – 80 % від площі чашки, здійснено розсів культури.

Шляхом фагоцитозу мишині макрофаги J774 поглинають клітини бактерій *E.coli*, що можна було побачити за допомогою фарбування акридином оранжевим. Але сам акридин оранжевий в дослідженнях не підходить, бо дає зелений колір клітинам, що перекривається з флуоресценцією PH-GFP.

Бромистий етидій і пропідій йодид добре фарбують клітини бактерій *E.coli*. Проте клітини *E.coli* мають дуже малі розміри і використовувати їх в дослідженні є недоцільним, оскільки ми не зможемо побачити фагосому. Тому було використано дріжджі *S. cerevisiae*, які мають більші розміри ніж бактерії *E.coli*, але менші ніж макрофаги і також фарбуються пропідій йодидом.

Візуалізація фагосомою проводилося шляхом фарбування дріжджів за допомогою флуоресцентного барвника (кандидати: бромистий етидій та пропідій йодид — червоний

колір флуорисценції). Бромистий етидій фарбує і живі клітини макрофагів. На відміну від нього пропідій йодид не фарбує макрофаги (за рахунок непроникності через мембрану живої клітини), що дозволяє його використовувати у дослідженні для виявлення локалізації РН домену у клітині.

Виділення плазмідного вектора рEGFP-C3 здійснювалося методом лужного лізису. Напрацювання необхідної кількості було проведено шляхом трансформації плазмідної ДНК в компетентні клітини *E.coli*. Рестрикцію здійснено по таким сайтам рестрикції *Hind III* і *Bam HI*.

Після отримання та відповідної підготовки вектора рEGFP-C3 та вставки РН домена було проведено лігування таким чином, щоб молярне співвідношення вектора до вставки було 1:3 у присутності АТФ та ферменту — Т4 ДНК лігази. В результаті було отримано генетичну конструкцію рEGFP-C3-РН. Перевірка здійснювалася за допомогою ПЛР. Після чого було проведено електрофорез отриманого ПЛР-продукту в 1 %-му агарозному гелі.

Трансфекцію культури клітин мишачих макрофагів J774 здійснено з використанням ДЕАЕ-декстарну генетичною конструкцією рEGFP-C3-РН. Білок РН-GFP за рахунок вставки GFP (зелений флуоресцентний білок) дає зелене забавлення при флуоресцентній мікроскопії, що дозволить виявити колокалізацію РН домену з органелами клітини. Через добу після трансфекції здійснювалася візуалізацію фагосом шляхом інкубування культури J774 з дріжджовими клітинами *S. cerevisiae*, які попередньо були пофарбовані пропідій йодидом. Макрофаги клітинної лінії J774 шляхом фагоцитозу поглинають клітини *S. cerevisiae* і дають червоне забарвлення, що підтверджувалося мікрофотографіями. Оцінку ефективності трансфекції було проведено шляхом флуоресцентної мікроскопії клітин через 24 год після трансфекування.

### Висновок

Культура клітин J774 підходить як модель для візуалізації фагосом. Мишині макрофаги поглинають шляхом фагоцитозу дріжджі *S. cerevisiae*, що можна побачити за допомогою фарбування акридином оранжевим. Але сам акридин оранжевий в наших дослідженнях не підходить, бо дає зелений колір флуоресценції, що перекривається з РН-EGFP (теж зелена флуоресценція). Тому було запропоновано використати такі барвники: бромистий етидій і пропідій йодид, які фарбують дріжджі *S. cerevisiae*, даючи червону флуоресценцію. Проте бромистий етидій фарбує живі клітини макрофагів, а оскільки планується фарбувати ним тільки *S. cerevisiae*, то при додаванні пофарбованих ним дріжджів до макрофагів залишки фарбника можуть пофарбувати і макрофаги, що робить неможливим візуалізацію фагосом. Пропідій йодид не фарбує живі макрофаги (за рахунок непроникності через мембрану живої клітини), що дозволяє його використання у дослідженні.

Трансфекцію культури клітин J774 було проведено генетичною конструкцією рEGFP-C3-РН. Оскільки візуально у мікроскоп було видно зелену флуоресценцію GFP-РН білка у більшості трансфєкованих клітин (70 %), то трансфекцію можна вважати успішною. Проте флуоресценція була слабкою, що не дозволяло зафіксувати її на камеру разом з програмою, яка стандартно використовувалась для флуоресцентної мікроскопії у відділі. Оскільки ця технічна проблема не давала можливості встановити колокалізацію РН домену білка Vsg з мембраною фагосоми, тому у майбутньому буде здійснено спроби пошуку можливих шляхів вирішення даної проблеми.

Результати даної роботи дозволять у майбутньому виявити колокалізацію РН домену в клітині, що важливо для розуміння ролі цього домену у клітинних процесах.

### Література

1. Bartram C.R. Translocation of c-ab1 oncogene correlates with the presence of a Philadelphia chromosome in chronic myelocytic leukaemia / C.R. Bartram, A. de Klein, A. Hagemeyer, T. van Agthoven, V.K. Geurts Bootsma D., Grosveld G., Ferguson-Smith M.A., Davies T., Stone M. // Nature. — 2003. — Vol. 306, № 5940. — P. 277 – 280.
2. Charella A. Chronic Myeloid Leukaemia Biology and Treatment / A. Charella // Martin Dunitz Ltd. — 2001. — Vol. 123, № 29 — P. 528.

3. Cortes J. Chronic myeloid leukemia / J.Cortes, M. Deininger // Informa Healthcare USA, Inc. — 2007. — Vol. 76, № 13 — P. 163.

4. Groffen J. Philadelphia chromosomal breakpoints are clustered within a limited region, bcr, on chromosome 22 / J. Groffen, J.R. Stephenson, N. Heisterkamp, A. de Klein, C.R. Bartram, G. Grosveld // Cell. — 2004. — Vol.36, №1. — P. 93 – 99.

5. Kozubek S. The topological organization of chromosomes 9 and 22 in cell nuclei has a determinative role in the induction of t(9,22) translocations and in the pathogenesis of t(9,22) leukemias / S. Kozubek, E. Lukasova, A. Mareckova, M. Skalnikova, M. Kozubek, E. Bartova, V. Kroha, E. Krahulcova, J. Slotova // Chromosoma. — 2001. — Vol. 108, № 7. — P. 426 – 435.

6. Lemmon M.A. Pleckstrin homology (PH) domains and phosphoinositides / M.A. Lemmon // Biochem. Soc. Symp. — 2007. — Vol. 74, № 3. — P. 81 – 93.

7. Lemmon M.A. Molecular determinants in pleckstrin homology domains that allow specific recognition of phosphoinositides / M.A. Lemmon, K.M. Ferguson // Biochem. Soc. Trans. — 2001. — Vol. 29, № 4. — P. 377 – 384.

## **ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ PH ДОМЕНА БЕЛКА BCR НА РАЗВИТИЕ PH<sup>+</sup>- ПОЗИТИВНОЙ ЛЕЙКЕМИИ И МЕХАНИЗМ ПРОГРЕССИИ НАСТОЯЩЕГО ЗАБОЛЕВАНИЯ**

**О.И. Незелюк, А.А. Воронцов**

*Национальный университет пищевых технологий*

*Белок Bcr-Abl является одним из маркеров опухолевой трансформации, который изучается уже много лет. Причем влияние части Bcr на роль гибридного белка в опухолевой трансформации практически не изучали. К белковым доменам, которые существенно влияют на пухлиногенный потенциал Bcr-Abl, относят плекстрин-гомологический (PH) домен, поэтому мы сосредоточились на изучении структуры этого домена. В данной работе отработаны метод визуализации фагосом с помощью флуоресцентно меченых бактерий для проверки колокализации PH домена белка Bcr-Abl с мембраной фагосом. Трансфекции культуры клеток мышинных макрофагов J774 проводили с использованием ДЭАЭ-декстарну генетической конструкцией pEGFP-C3-PH, с которой будет синтезироваться белок PH-GFP. Этот белок за счет вставки GFP (зеленый флуоресцентный белок) дает зеленое забавления при флуоресцентной микроскопии позволит выявить колокализацию PH домена с органеллами клетки.*

*Ключевые слова:* домен, колокализация, фагосомы, трансфекция, макрофаг, флуоресценция.