

models of liver cirrhosis in rats of Wistar 3 and 8 months of age, and was carried out by intraperitoneal injection of 30 % animal oil solution of  $\text{CCl}_4$  (0.001 ml/kg) 1 day a week. The dynamics of the disease studied biochemical (measurement of ALT, AST), histological and radiological (SPL) methods. **Results.** By intraperitoneal injection of experimental mouse 1 times a week for 4 months, 30 % carbon tetrachloride solution in sunflower oil at the rate of 1 l per 1 g was formed liver fibrosis caused by cytotoxic membrane-action poison. Characteristic of liver fibrosis were: violation of lobular structures alternate with layers of connective tissue, the presence of areas of necrosis parenchymal organ, a significant expansion of portal hypertension and portal vein diameter. During natural pathomorphism liver fibrosis in two months after seeding showed signs characteristic of deep liver fibrosis, but the percentage of damaged tissue visually reduced. This is also evidenced liver ultrasound. Significantly decreased performance ALT and AST 1.95 times to 1.46 times. Decreased liver weight 1.35 times and 2.44 times in the spleen. Thymus weight conversely increased 0.95 times. **Conclusions.** Thus, the presence of regenerative processes in the liver, as a result of which she maintains the balance indicates the need for monitoring and control of processes occurring in it, which will improve the results of treatment of the disease and its complications. *Key words:* hepatic necrosis, fibrosis, regeneration, mouse.

### УДК 577.3

**ГУР'ЯНОВ Д.С., ЛИСЕЦЬКА Т.Ю., АНТОНЕНКО С.В., КРАВЧУК І.В., ТЕЛЕГЄЄВ Г.Д.**

*Інститут молекулярної біології і генетики НАН України,*

*Україна, 03680, м. Київ, вул. Академіка Заболотного, 150, e-mail: dmitriy.gurianov@gmail.com*

### **РОЛЬ ДОМЕНУ PH БІЛКА BCR У КЛІТИННИХ ПРОЦЕСАХ, ЩО ВИЗНАЧАЮТЬ ФЕНОТИП Ph<sup>+</sup>-ПОЗИТИВНИХ МІЄЛОПРОЛІФЕРАТИВНИХ ЗАХВОРЮВАНЬ**

Хромосомні порушення є однією з причин розвитку злоякісних захворювань, в тому числі і мієлопроліферативних. Хромосомна транслокація довгими плечима 9 та 22 хромосом призводить до злиття генів *Bcr* та *Abl*. При цьому, за рахунок різних місць розриву у гені *bcr*, утворюються різні варіанти химерного гена *bcr/abl*, що відрізняються наявністю або відсутністю певних функціональних доменів, зокрема доменів PH та DH. Це призводить до генерації химерних білків різної молекулярної маси – *BCR/ABL<sup>p190</sup>*, *BCR/ABL<sup>p210</sup>*, *BCR/ABL<sup>p230</sup>*. Вони призводять до розвитку відповідно гострої лімфобластної лейкемії, хронічної мієлоїдної лейкемії, та хронічної нейтрофільної лейкемії. Таким чином спостерігається закономірність, що при короткій формі білка хвороба протікає у гострій формі, при довгих – у хронічній [1]. В зв'язку з цим, важливо визначити в яких молекулярних процесах задіяні функціональні домени, що характерні для *BCR/ABL<sup>p210</sup>*, але не *BCR/ABL<sup>p190</sup>*. Це дозволить виявити, що саме дозволяє перебувати онкобілку в активній формі, але при цьому призводити до менш агресивного фенотипу.

У попередніх дослідженнях було визначено 23 білки, що є кандидатами на взаємодію з доменом PH білка *BCR* [2]. Серед них білки, що належать до різних

функціональних груп. Зокрема можна виділити групу білків елементів цитоскелету, реорганізаторів цитоскелету та цитоплазматичної мембрани, та білків, що задіяні в процесах протеолітичної деградації. Так, кортактин (СТТН) та *FBP17* здійснюють перебудови актинового примембранного цитоскелету, що має важливе значення для багатьох сигнальних процесів, зокрема, для рецепторно-опосередкованого ендоцитозу [3]. *FBP17* сприяє *CDC42*-індукованій полімеризації актину, активації *N-WASP-WIP* комплексу і, отже, приймає участь у сигналінгу від поверхні клітини до актинового цитоскелету [4]. Кортактин розгалуджує актинові філаменти після його активації фосфорилуванням у пролін-багатій ділянці та зв'язуванні з *Arg2/3* комплексом [5]. Відомо, що і СТТН, і *FBP17* взаємодіють з динаміном через *SH2* домен та забезпечують розгалуження актинових філаментів на пізніх стадіях формування клатринової везикули [3]. Домен PH взаємодіє з фосфоінозитол-4,5-фосфатами, що є одними з основних складових цитоплазматичної мембрани та комплексу Гольджі [6]. Таким чином може забезпечуватись розділення мембранних каналців для формування ендоцитозних пухирців.

Запобігання протеолітичній деградації є

одним з можливих шляхів збереження онкобілка BCR/ABL в активній формі. Білок убіквітин специфічна протеаза 1 (USP1) є білком цистеїнової групи протеаз. Він складається з трьох консервативних доменів, перші два – внутрішньоклітинні пептидази, третій – карбоксил-термінальна пептидаза. Основною функцією даного білка є деубіквітування за рахунок руйнування ізопептидних зв'язків, що забезпечується внутрішньоклітинними пептидазами [5]. Таким чином, підтвердження взаємодії домену PH білка BCR з USP1 може означати, що сам BCR/ABL, або його білки партнери зазнають деубіквітинізації, а також те, що USP1 може бути фосфорильований за рахунок тирозин-кіназної активності ABL частини.

Серед елементів цитоскелету, що можуть взаємодіяти з доменом PH, присутні такі білки як  $\beta$ -тубулін (TUBB) та цитокератин 10 (KRT10). Перший є компонентом мікротрубочок, другий – належить до проміжних філаментів. Зв'язування з цими клітинними структурами може мати декілька наслідків. По-перше, білки партнери можуть бути фосфорильовані по залишкам тирозину з боку Abl частини BCR/ABL. По-друге – участь у формуванні білкових комплексів, що закорені на елементах цитоскелету, а також обмеження тирозин-кіназної активності BCR/ABL. Фосфорилування є одним із основних модифікацій, що змінює активність білка та його здатність бути залученим до сигнального шляху. Таким чином, фосфорилування  $\beta$ -тубуліну може призвести до зміни динаміки збору мікротрубочок, а також до здатності певних білкових комплексів формуватись на їх поверхні [8]. А фосфорилування цитокератину 10 – до перебудови кератинових філаментів та вивільненню білків, що зв'язані з цитокератином 10 [9]. Роботи J. Paramio et al. показують, що цитокератин 10 інгібує АКТ, тому інактивація першого може мати наслідком активацію Акт-кіназного шляху [10], а це є характерним для клітин, що експресують Bcr/Abl p210, але не p190 [1].

Ще однією важливою особливістю мієлоїдних клітин є передчасне від'єднання від стромы кісткового мозку за рахунок порушення адгезії [1]. У цьому випадку важливу роль відіграють матриксні білки, до яких належить колаген 4 типу (COL4A1). Цей білок формує мереживні структури, що зв'язуються з клітинами через інтегрини та фібронектини за допомогою NC домену [11]. Оскільки BCR/ABL має

внутрішньоклітинне розташування, а колаген 4 знаходиться в позаклітинному матриксі, то доцільно припустити, що якщо взаємодія між ними має місце, то це відбувається на етапі дозрівання колагену 4.

### Матеріали і методи

Для ампліфікації послідовності кортактину було підібрано праймери CTTN fwd (5'-tatagaattcAGATGTGGAAGCTTCAGCAG) та CTTN rev (5'-tatagatccAAAGAAGGCCTGATCTGTAGTG). Для ампліфікації послідовності бета-тубуліну було підібрано праймери TUBB fwd (5'-TTAACCATGAGGGAATCGTGC) TUBB rev (5'-TAAGGGAAGTGAAGCCTGAG). Матрицею для підбору праймерів та ПЛР служили генетичні конструкції pOTB7-COR (люб'язно надана Pontus Aspenstrom, Швеція) та pCMV-SPORT6-TUBB (Open Biosystems), що містять кДНК цілових послідовностей. Для ампліфікації USP1 було підібрано праймери USP1 fwd (AATTGCCTGGTGTACATACCTAGTG) та USP1 rev (GAGAGACCAATAATATCCAGTAGC). в якості матриці використано генетичну конструкцію із банку плазмід відділу Молекулярної генетики ІМБГ НАНУ (pCMV-XL5-USP1). Підбір праймерів проводився за допомогою програми PerlPrimer. Компоненти ПЛР були відповідно умовам виробника (Thermo Scientific) з використанням Pfu полімерази. Створення генетичних конструкцій для експресії цільових послідовностей та рестрикційний аналіз були змодельовані програмою Serial Cloner 2.6.1. Для клонування ампліфіковані послідовності кортактину та бета-тубуліну було лігровано в вектор pBluescriptSKII+ по сайтам EcoRI-BamHI та EcoRV відповідно. Після цього, послідовність кортактину було вирізано з pBluescriptSKII+ по сайтам EcoRI-NotI та лігвано у вектор pGEX4T2, а також вирізано по сайтах EcoRI-BamHI та лігвано по цим же сайтам у вектори pCMV-мус та pECFP-C3. Послідовність бета-тубуліну було вирізано з pBluescriptSKII+ та лігвано у вектор pCDNAHisMaxC по сайтах SalI(затуплений)/EcoRV-NotI, у вектор pGEX4T3 по сайтах SalI-NotI та у вектор pECFP-C3 по сайтах HindIII-EcoRI. Кодуючу послідовність цитокератину 10 було вирізано з вектора pCMV-SPORT6-K10 (Open biosystems) по сайтам EcoRI-NotI та лігвано у вектори pCMV-NA та pGEX4T2 по цим же сайтам. Для лігування у вектор pECFP-C3 послідовність цитокератину 10, вирізану з вектора pCMV-SPORT6-K10, було затуплено фрагментом

Кленова по NotI сайту, а вектор рЕСFP-C3 було розрізано по EcoRI-BamHI та затуплено по BamHI сайту. Послідовність альфа 1 поліпептидного ланцюгу колагену 4 типу було вирізано з вектора рCMV-SPORT-COL4A1 (Open Biosystems) по сайтах AscI-HindIII та лігвано у вектор рЕСFP-C1 по затупленому сайту XhoI та HindIII. Послідовність RH домену було вирізано з вектора рET32a-RH, створеного у нашому відділі, та лігвано у рmCitrine-C1 по BmHI/BglII-HindIII та у рCMV-Tag2b по BamHI – HindIII. Для перевірки наявності та орієнтації вставки було використано метод аналітичного розрізання ендонуклеазами рестрикції за умовами виробника. Для еукаріотичної експресії було використано плазмиди рJ3H-FBP17 та рEGFP-C3-RH, взяті з банку плазмід відділу молекулярної генетики ІМБГ НАНУ. Трансфекція клітин 293T конструкціями рJ3H-FBP17 та рEGFP-C3-RH була проведена за допомогою Turbofect (Thermo Scientific) за умовами виробника. Коїмунопреципітація здійснювалась за допомогою Protein G сефарози за протоколом E. Goldemis. Вестерн-блотинг був проведений за стандартним протоколом.

#### Результати та обговорення

Всі напрацьовані методом ПЛР цільові послідовності були очікуваного розміру: USP1 – 2500 п.н., TUBB – 1400 п.н., CTTN – 1600 п.н. (рис. 1).

Після лігування послідовностей TUBB, CTTN та USP1 у вектор рBluescriptSKII(+) наявність вставки перевірялась аналітичним розрізанням ендонуклеазами рестрикції та ПЛР. Після підтвердження плазмиди були просеквеновані та підтверджена їх ідентичність очікуваним послідовностям за допомогою порівняння результатів секвенсу з цільовою послідовністю у програмі Serial Cloner. Відповідність отриманих бактеріальних та еукаріотичних експресуючих векторів також була підтверджена за допомогою аналітичного розрізання (рис. 2) та секвенування.

Відповідність насинтезованих білків при еукаріотичній експресії була підтверджена ПАГЕ та вестерн-блотингом зі специфічними антитілами. За допомогою коїмунопреципітації

та вестерн-блоту було підтверджено взаємодію між FBP-17 та RH (рис. 3).

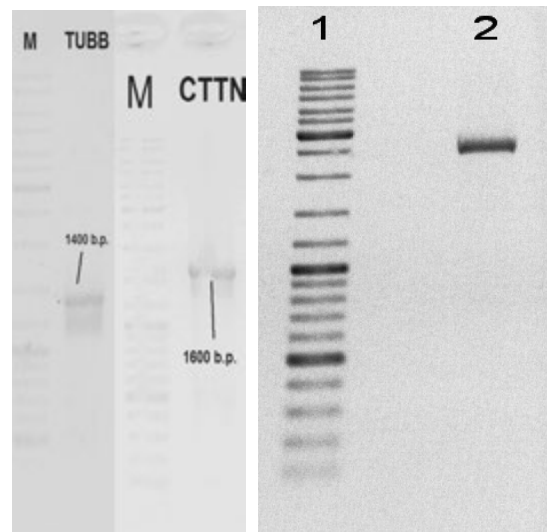


Рис. 1. Ампліфікати цільових послідовностей. М, 1 – маркер молекулярної маси Gene Ruler, TUBB –  $\beta$ -тубулін, CTTN – кортактин

Отже, можна стверджувати, що BCR/ABL може зв'язуватись з FBP17 через RH домен та відігравати роль в сигналінгу та реорганізації мембрани та примембранного цитоскелету при клатрин-опосередкованому ендоцитозі. Окрім цього, отримані конструкції можна буде використати для бактеріальної та еукаріотичної експресії та визначення наявності білок-білкової взаємодії між RH доменом та USP1, CTTN, TUBB, KRT10, COL4A1 за допомогою вестерн-болту та флуоресцентної мікроскопії.

#### Висновки

1. Створено генетичні конструкції для бактеріальної експресії: рGEX4T-3-TUBB, рGEX4T-2-KRT10, рGEX4T2-CTTN.

2. Створено генетичні конструкції для еукаріотичної експресії: рCMV-HA-USP1, рЕСFP-C1-COL4A1, рЕСFP-C3-KRT10, рЕСFP-C3-TUBB, рЕСFP-C3-CTTN, рCMVмус-CTTN, рсDNA4HisMaxC-TUBB, рCMV-HA-KRT10.

3. Показано, що RH домен BCR здатен взаємодіяти з FBP17 в еукаріотичних клітинах.

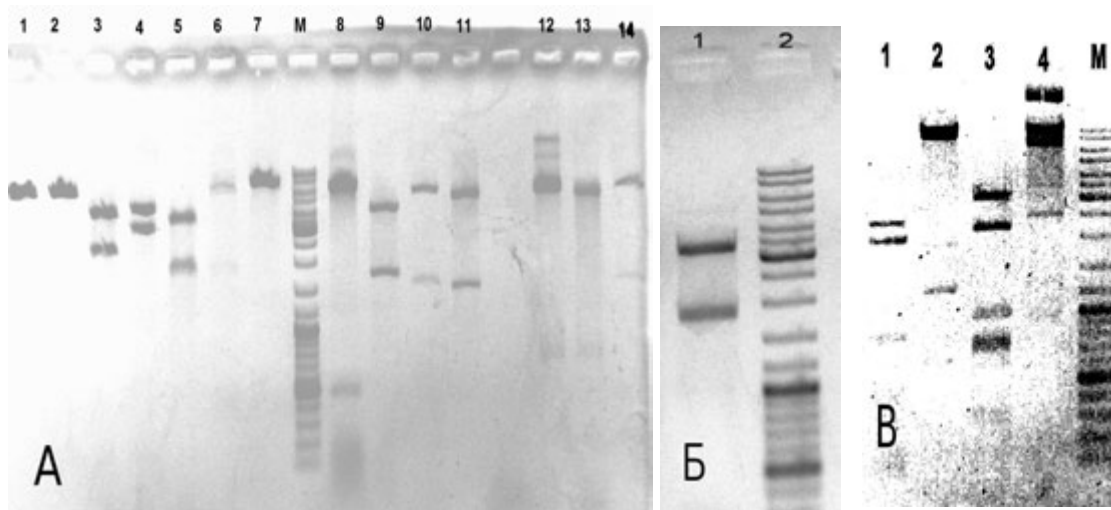


Рис. 2. Рестрикційний аналіз отриманих генетичних конструкцій. А: 1-2 – pECFP-C3-KRT10 (EcoRI); 3 – pCMV-HA-KRT10 (EcoRI-NotI); 4 pGEX4T2-KRT10(EcoRV); 5 – pBluescriptSKII-CTTN (EcoRI-NotI); 6 – pGEX4T2-CTTN (EcoRI-NotI); 7 – pECFP-C3-CTTN (SmaI); 8 – pCMV-мус-CTTN (XhoI); 9 – pcDNA4HisMaxA-CTTN (EcoRI-NotI); 10 – pGEX4T3 –TUBB (Sall-NotI); 11 – pECFP-C3-TUBB (EcoRI – HindIII); 12 – pmCitrine-PH (Sall); 13 - pCMV-Tag2b – PH (Sall); 14 – pcDNAHisMaxC-TUBB (EcoRI); М – маркер молекулярної маси O'GeneRuler. Б: 1 – pCMV-HA-USP1 (HincII); 2 - маркер молекулярної маси O'GeneRuler. В: 1 – HhaI; 2 AccI; 3 – ApoI; 4 – непорізаний вектор; М – маркер молекулярної маси O'GeneRuler

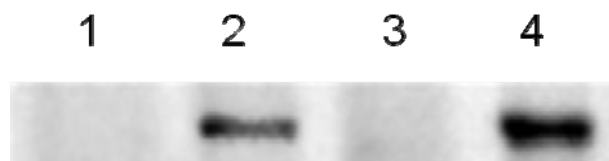


Рис. 3. Вестерн-блот аналіз взаємодії домену PH з FBP17 у культурі клітин 293T, котрансфектованих рJ3H-FBP17 та рEGFP-C3-PH, з анти-HA антитілами: 1 – лізат клітин 293T, які не було трансфектовано; 2 – лізат клітин 293T, які було котрансфектовано рEGFP-PH та рJ3H-FBP17; 3 – лізат клітин 293, які було котрансфектовано рEGFP-PH та порожнім рJ3H; 4 – коімунопреципітація EGFP-PH з HA-FBP17

### Література

1. Charella A. Chronic Myeloid Leukaemia Biology and Treatment // Martin Dunitz Ltd. – 2001. – P. 3–39.
2. Miroschnychenko D., Dubrovskaya A., Maliuta S., Telegeev G., Aspenström P. Novel role of pleckstrin homology domain of the Bcr-Abl protein: Analysis of protein-protein and protein-lipid interactions // Experimental Cell Research – 2010. – 316. – P. 530–542.
3. Taylor M.J., Perrais D., Merrifield C.J. A High Precision Survey of the Molecular Dynamics of Mammalian Clathrin-Mediated Endocytosis // PLoS Biology. – 2011. – 9. – P. 1–23.
4. Takano K., Toyooka K., Suetsugu S. EFC/F-BAR proteins and the N-WASP-WIP complex induce membrane curvature-dependent actin polymerization // The EMBO Journal. – 2008. – 27. – P. 2817–2828.
5. Garcıa-Santisteban E., Peters G.J., Giovannetti E., Rodriguez J.A. USP1 deubiquitinase: cellular functions, regulatory mechanisms and emerging potential as target in cancer therapy // Molecular Cancer. – 2013, 12:91.
6. Gatesman A.A., Weed S.A. Cortactin Branches Out: Roles in Regulating Protrusive Actin Dynamics // Cell Motil Cytoskeleton. – 2008. – 65, N 9. – P. 687–707
7. Cesareni M. et al. Modular Protein Domains // Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. – 2005. – P. 337–363.
8. Gunderson G.G., Cook T.A. Microtubules and signal transduction // Curr. Opin. in Cell Biol. – 1999. – 11. – P. 81–94.
9. Paramio J.M. A role of phosphorylation in the dynamics of keratin intermediate filaments // Europ. J. of Cell Biol. – 1998. – 78. – P. 33–43.

10. Paramio J.M., Segrelles C., Ruiz S., Jorcano J.L. Inhibition of Protein Kinase B (PKB) and PKC ж Cycle Arrest Mediates Keratin K10-Induced Cell // *Molecular and Cellular Biology*. – 2001. – 21. – P. 7449–7459.
11. Sudhakar A. et.al. Human 61 type IV collagen NC1 domain exhibits distinct antiangiogenic activity mediated by 61b1 integrin // *J. Clin. Invest.* – 2005. – 115. – P. 2801–2810.

**GURIANOV D.S., LYSETSKA T.YU., ANTONENKO S.V., KRAVCHUK I.V., TELEGEEV G.D.**

*Institute of Molecular Biology and Genetics of NAS of Ukraine,*

*Ukraine, 03680, Kyiv, Zabolotnogo str., 150, e-mail: dmitriy.gurianov@gmail.com*

### **ROLE OF PH DOMAIN OF BCR PROTEIN IN CELLULAR PROCESSES THAT DETERMINE THE PHENOTYPE OF Ph<sup>+</sup>-POSITIVE MYELOPROLIFERATIVE DISORDERS**

**Aims.** Three forms of fusion protein BCR/ABL differ by the presence or absence of PH and DH domains of BCR protein and cause different phenotypes of myeloproliferative disorders. To date, 23 proteins-candidates were identified as possible interaction partners of PH domain of BCR protein. Among them are different functional groups, such as cytoskeletal proteins, those involved in reorganization of cytoskeleton and clathrine-mediated endocytosis, matrix proteins and proteins involved in inhibition of proteolytic degradation. Therefore it is crucial to verify those interactions with more sensible and reliable methods as this will give clue to the functional differences, which lead to onset of different disorders. **Methods.** We used restriction enzyme-based ligation, coimmunoprecipitation and western-blot for creation of genetic constructs and verification of protein-protein interactions between PH domain of BCR and putative partners. **Results.** Different genetic constructs were created, that will be used for the expression of target sequences (USP1, CTTN, TUBB, KRT10, COL4A1) in bacterial and mammalian expression systems. Also we demonstrate that FBP17 protein interacts with PH domain in mammalian cell line 293T. **Conclusions.** Demonstrated interaction of PH domain and FBP17 shows its' important role in endocytosis and related cytoskeleton organization. All derived genetic constructs will be used in future research to verify interaction of target sequences with PH domain of BCR by far-Western blot, coimmunoprecipitation and fluorescent microscopy. It will be important in the future to check whether full-length BCR/ABL p210 interacts with USP1, CTTN, TUBB, KRT10, COL4A1, and FBP17, to study how it affects their phosphorylation state, and to determine their localization in the cell.

**Key words:** chronic myelogenous leukemia, myeloproliferative disorders, BCR/ABL, endocytosis, cytoskeleton reorganization, proteasomal degradation.

**УДК 577.352.3:616-006.04:57.02:661.859**

**ДИБКОВА С.М., ГРУЗИНА Т.Г., РЄЗНІЧЕНКО Л.С., УЛЬБЕРГ З.Р.**

*Інститут біологічної хімії ім. Ф.Д. Овчаренка НАН України,*

*Україна, 03142, м. Київ, бульв. Академіка Вернадського, 42, e-mail: sdybkova@gmail.com*

### **ВЗАЄМОДІЯ НАНОЧАСТИНОК ЗОЛОТА ТА СРІБЛА З ПЛАЗМІДНОЮ ДНК**

Вивчення особливостей впливу наночастинок металів на генетичний апарат живої клітини є одним з актуальних завдань сучасної нанобіотехнології. Його вирішення відкриває нові перспективи у практичному застосуванні наночастинок металів [1, 2]. Відомо, що наночастинки золота є перспективними засобами діагностики та адресної доставки лікарських засобів у кардіології, онкології, а наночастинки срібла – ефективні антимікробні агенти. [3, 4].

Раніше нами було показано генотоксичну дію наночастинок золота розміром 20 нм та її відсутність для наночастинок золота розміром

30 нм, наночастинок срібла розмірами 30 та 50 нм. [5]. У зв'язку з цим виник ряд питань пов'язаних з впливом наночастинок металів на ДНК залежно від їх природи та розміру.

Відомо, що однією із важливих характеристик плазмід є їх здатність елімінуватися із бактеріальної клітини під дією певних хімічних речовин [6]. Перспективним підходом до вирішення проблеми подолання стійкості до антибіотиків у клінічних ізолятів збудників інфекційних захворювань є використання хімічних речовин, які забезпечують ефективну елімінацію плазмід антибіотикорезистентності (R-плазмід). Для R-