

в виде презентаций. Цветные слайды, выполненные как схемы с выносками или как таблицы, подробно комментируются преподавателем в ходе объяснения материала, что позволяет активировать два сенсорных уровня восприятия студента: визуальный и звуковой. Также студенты могут ознакомиться с образцами веществ, материалов, готовых препаратов получаемых биотехнологическим путем или предназначенных для реализации на практике инновационных лечебных подходов с которыми они могут столкнуться на практике. Следует отметить неуклонный рост интереса студентов-медиков к предмету, если шесть-восемь лет назад вопрос о необходимости предлагаемой информации активно дискутировался по поводу посещать или прогуливать, то сейчас пропуски занятий имеют только уважительные причины. Многие студенты высказывают заинтересованность в продолжении изучения БТ в различных направлениях на постдипломном уровне или в общем курсе специальности.

То, что интересует завтрашних врачей, не может и не должно оставлять равнодушными будущих провизоров. Поскольку, ключевым звеном формирования спроса на БЛП и биотехнологические медицинские услуги являются врачи, то компетенция провизоров в области биотехнологии должна позволять полностью удовлетворять спрос на весь спектр БЛП и сопровождающую его фармацевтическую информацию.

После завершения тем курса проводятся контрольные работы в форме теста, который позволяет в короткий срок оценить и в полной мере охарактеризовать полученные знания студентов. Тесты помогают студентам выделить главные аспекты, на которые необходимо обратить внимание при подготовке к экзамену.

Резюме

Статья посвящена методическим подходам к организации учебного процесса, проведению занятий и оценке качества полученных студентами знаний в ходе освоения ими фармацевтической и медицинской биотехнологии. В статье приводится способ контрольного анализа знаний студентов по предметам «Медицинская биотехнология» и «Фармацевтическая биотехнология» на медицинском факультете Российского университета дружбы народов. Основной курс преподавания предмета разбит на 4 авторских модуля включающих теоретический лекционный материал сопровождающийся мультимедийными показами, решение ситуационных задач по изучаемым темам, ознакомление с образцами реальных биотехнологических объектов. После завершения тем курса проводятся тестовые контрольные работы, который помогает быстро оценить полученные знания студентов. Использование этого метода позволяет повысить эффективность учебного процесса.

ТЕЛЕГЕСВ Г.Д., МИРОШНИЧЕНКО Д.О., МАЛЮТА О.В., КРАВЧУК І.В., ЛИСЕЦЬКА Т.Ю., ДИБКОВ М.В., МАЛЮТА С.С.

Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины, Украина, 03680, Київ, вул. Заболотного, 150 e-mail: g.d.telegeev@imbg.org.ua

ВИВЧЕННЯ *Bcr* ЧАСТИНИ ГІБРИДНОГО ГЕНА *Bcr-AbL* ЯК ШЛЯХ ДО РОЗУМІННЯ ПАТОГЕНЕЗУ ЛЕЙКЕМІЙ ПРИ ТРАНСЛОКАЦІЇ (9:22)

Хронічна мієлоїдна лейкемія (ХМЛ) зустрічається приблизно у 20% хворих на лейкемії у дорослих (1). Головну роль в патогенезі цього захворювання відіграє гібридний ген *bcr-abl*, продукт реципрокної транслокації t(9:22). Він кодує дві кінази (серин-треонин кіназу в *bcr* частині, та тирозинкіназу в *abl* частині) гібридного гена. Головна увага у попередніх дослідників була зосереджена на вивченні та блокуванні

Abl кіназної активності. Це призвело до розробки специфічних інгібіторів Abl кінази, що значно поліпшило лікування хворих на цю патологію. Проте, дуже часто, під час лікування селектуються патологічні клони, що є нечутливими до інгібіторів. Це обумовлює необхідність подальшого вивчення молекулярного патогенезу хвороби, пошук нових цілей для терапії.

Дана робота присвячена вивченню іншої, важливої частини онкопротеїну, а саме продукту гена *bcr*. В нашому полі зору був один з кількох доменів цього протеїну, а саме PH домен.

Матеріали і методи

Отримання ДНК-конструкцій. PH ділянку *bcr* було отримано методом ЗТ-ПЛР з клітин крові пацієнтів (за інформованої згоди останніх). Фрагмент розміром 648 п.о. було клоновано в вектор для бактеріальної експресії рЕТ-32а. Всі конструкції було перевірено автоматичним сиквенуванням.

Виділення білків, що зв'язуються з PH доменом Bcr, методом афінної хроматографії. Білок PH експресували в клітинах *E.coli* лінії BL21 DE3 і виділяли на колонці Ni-NTA (Qiagen, USA) згідно протоколу виробника. Для аналізу білок-білкових взаємодій PH домену було використано колонку зі зв'язаним білком. На колонку зі зв'язаним PH білком наносили 0,5 мл лізата клітин K562 з загальною концентрацією білка 1 мг/мл і інкубували 12 год при +4°C. Після інкубації і промивки зразки аналізували методом двомірного електрофорезу. В якості контролю використовували білок, експресований з “порожнього” вектора рЕТ32а.

Аналіз білків, що були преципітовані PH доменом. Білки розділяли методом двомірного електрофорезу з градієнтом рН 3-10. Детекцію радіоактивно-мічених білків клітин K562 проводили на сканері Fuji X2000. Зразки вирізали із гелю, обробляли трипсином і аналізували методом мас-спектрометрії MALDI TOF MS на спектрометрі Bruker Biflex. Для ідентифікації пептидних спектрів було застосовано програму ProFound.

Імунопреципітація білків, що зв'язуються з PH доменом Bcr. Для аналізу було використано клітини 293T, трансфековані конструкціями, що експресували PH домен і відповідний білок-мішень (*zizimin1* або PLCε). В якості негативного контролю було використано конструкцію, яка не містила PH домену. Білок PH мав епітоп мус на N-кінці, *zizimin1* – HA фрагмент, PLCε – flag-фрагмент для полегшення їх детекції. Імунопреципітацію проводили з anti-мус антитілами.

Результати та обговорення

PH домен (від “pleckstrin homology”) - один з найбільш представлених у протеомі людини, він знайдений у 252 протеїнах, має близько 100-120 амінокислотних залишків і відіграє роль в клітинному сигналіngu, транспорті мембран, організації цитоскелету, модифікації фосфоліпідів (2). В попередній роботі ми показали, що PH домен Bcr з високою афінністю взаємодіє з Ptd Ins(3)P, Ptd Ins(3)P, Ptd Ins(5)P (3). Це дозволяє визначити переважне розташування BCR у клітині, що обумовлює його участь в клітинних процесах. Взаємодія з клітинними ліпідами є характерною для приблизно 10-15% всіх PH доменів, крім того вона не виключає можливість взаємодії з клітинними білками.

Для визначення білків, що зв'язуються з PH доменом Bcr *in vitro*, клітини K 562 (бластна криза ХМЛ) вирощували у середовищі з [S³⁵] - метіоніном. Усі білки, в такому випадку, мали радіоактивний сигнал, що дозволяє відрізнити їх від бактеріальних, присутніх у препараті білка PH, зв'язаного з колонкою Ni-NTA. Отримані білки розділяли методом двовимірного електрофорезу з подальшим аналізом методом мас-спектрометрії. Всього було ідентифіковано 23 білки, що потенційно можуть зв'язуватись з PH (табл. 1).

Таблиця 1.

Ідентифікація білків за результатами мас-спектрометрії

№	Назва білку	Номер в базі NCBI	Вирогідність ідентифікації пептидного мас-спектру	Est'Z	Перекриття послідовності пептиду	Теоретичні параметри	
						pI	Mr(кДа)
1	Ribosomal protein P2	NP_000995.1	9.7e+001	0.62	45	4.4	11.65
2	F-actin binding protein	NP_065910.1	1.0e+000	1.11	10	8.1	218.24
3	SMC1	NP_006297.2	9.6e+001	1.02	21	7.6	143.84
4	Keratin10, type1, cytoskeletal	KRHU0	1.0e+000	1.91	27	5.2	59.74
5	hypotetical protein	CAD38623.1	1.0e+000	1.80	18	9.4	198.11
6	pRb-interacting protein RbBP-36	AAN73272.1	6.5e+001	0.67	22	6.3	61.20
7	Oncogene EMS1	NP_612632.1	1.0e+000	1.40	27	5.2	57.62
8	Collagen IV, α -1 polypeptide	NP_001836.1	1.0e+000	1.85	21	8.9	161.73
9	Heat shock protein 27	AAA62175.1	1.0e+000	2.16	48	8.1	22.42
10	Formin-binding protein 17	AAK49824.1	9.7e+001	0.67	17	5.9	78.53
11	Interferon-responding finger protein 1 long form	BAB17050.1	5.7e+001	0.28	13	8.4	99.81
12	Hypotetical protein	CAD38684.1	1.0e+000	1.78	20	6.5	87.64
13	β 5-tubulin	NP_821133.1	1.0e+000	2.39	32	4.8	50.11
14	Ubiquitin specific protease 1	NP_003359.1	1.0e+000	1.29	23	5.4	89.22
15	Zizimin 1	CAC27814.1	1.0e+000	1.34	22	7.6	178.03
16	PLC ϵ	NP_006217.1	1.0e+000	1.06	27	5.4	114.54
17	Rho-GTPase activating protein 7	NP_872584.1	9.5e+001	1.21	16	6.0	172.29
18	Golgi sialoglycoprotein MG-160	Q92896	9.8e+001	0.63	18	6.5	138.46
19	Nuclear factor NF-kappa-B inhibitor kinase β	O14920	9.7e+001	1.20	26	5.6	87.57
20	β 2-tubulin	NP_006079.1	1.0e+000	1.94	23	4.8	50.27
21	Zinc finger protein 217	NP_006517.1	1.0e+000	1.30	18	9.3	117.14
22	KIAA0853	NP_055885.2	1.0e+000	1.36	11	9.6	185.2

23	Hypotetical protein	CAD898999.1	1.0e±000	1.72	18	9.4	4 198.0 0
----	---------------------	-------------	----------	------	----	-----	-----------------

Найбільш представленими у вищезазначеному переліку є білки, що беруть участь у метаболічних процесах клітини і складають 25% (рис. 1), мембранному транспорті – 19%, передачі сигналу- 17%.

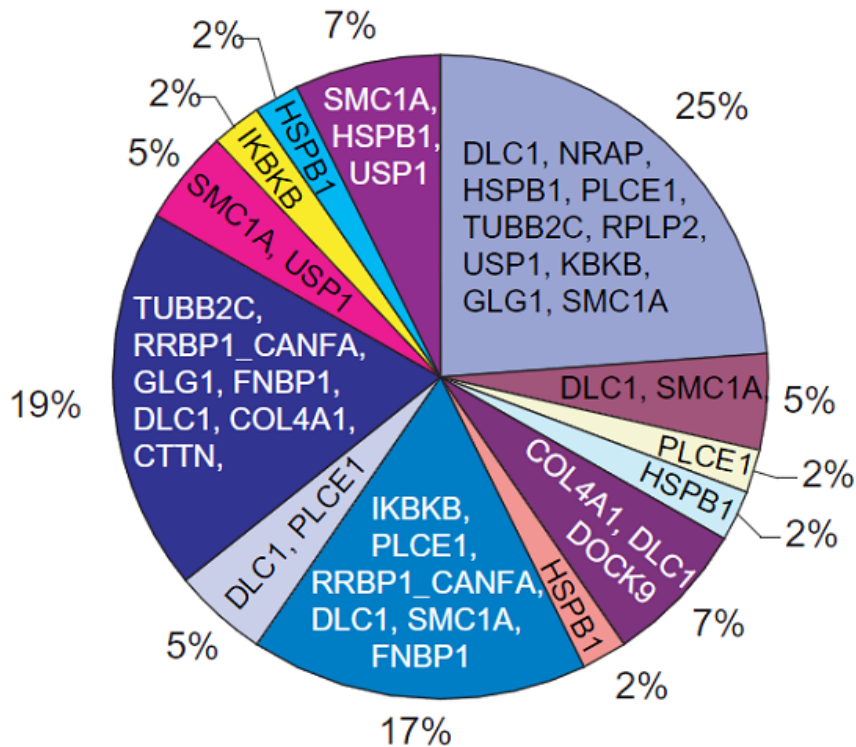


Рис. 1. Функціональний розподіл білків, що взаємодіють з PH доменом

Для подальшого вивчення білок-білкових взаємодій були відібрані : SMC1 (structure maintenance chromosome), Tubulin β , Zizimin 1, PLC ϵ (Pospholipase C ϵ). За допомогою гібридизації із специфічними антитілами (SMC1, Tubulin β) та імунопреципітацією PH домену з Zizimin 1 і PLC ϵ була підтверджена їх взаємодія.

Серед визначених можливих білків-партнерів можна виділити ІКК β , який є кіназою інгібітора NF κ B і бере безпосередню участь у запуску сигнального шляху, що закінчується родиною транскрипційних факторів NF κ B. Це видається особливо цікавим з огляду на той факт, що даний сигнальний шлях задіяний і є важливим у випадку Vcr/Abl-опосередкованої трансформації, хоча точний механізм його активації поки невідомий. 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. На основі наявних даних розроблені можливі схеми сигнальних шляхів, залучених в канцерогенез.

Наступним кроком у цих дослідженнях мають бути встановлення не тільки нових партнерів по зв'язуванню, але і конкретні частини молекул, які відповідають за взаємодію з PH доменом. Також важливим є виявлення молекулярних наслідків цих білкових взаємодій та їх можливий внесок у трансформацію клітини.

Відомо, що після стимуляції CSF відбувається активація РІЗК, а також міграція Rac2 до фагосоми (5, 6), де вже розташований Vcr, за рахунок взаємодії PH домену з Ptd Ins3P (3). Це дозволяє пояснити існування так званого "oxidative burst" в нейротрофілах

bcr-null трансгенних мишей (6). Втрата GTP-аз активуючої активності Bcr призводить до постійної активації Rac2, з подальшою активацією NADPH оксидазного комплексу (7,8). Роль саме білку Bcr-Abl в такому процесі ще потрібно прояснити, хоча відомо, що при ХМЛ спостерігається зниження рівня секреції внутрішньоклітинних гранул та фагоцитозу (9,10).

Література

1. Quintás-Cardama A., Cortes J. Molecular biology of bcr-abl1-positive chronic myeloid leukemia // *Blood*.– 2009.– V.113, N 8.– P.1619–1630.
2. Lemmon M.A. Pleckstrin homology (PH) domains and phosphoinositides // *Biochem Soc Symp*.– 2007.– 74.– P. 81–93.
3. Телегеев Г.Д., Мірошниченко Д.О., Мельникова О.Є., Романова І.О., Дибков М.В., Малюта С.С. Вивчення ролі ендогенних чинників в патогенезі лейкемії при транслокації (9;22) // *Досягнення і проблеми генетики, селекції та біотехнології. Збірник наукових праць*.– Київ, "Логос", 2007. Т.1.– С. 530–533.
4. Ellson C.D., Anderson K.E., Morgan G., Chilvers E.R., Lipp P., Stephens L.R., Hawkins P.T. Phosphatidylinositol 3-phosphate is generated in phagosomal membranes // *Curr Biol*.– 2001.– V. 11, N20.– P.1631–1635.
5. Cho Y.J., Cunnick J.M., Yi S.J., Kaartinen V., Groffen J., Heisterkamp N. Abr and Bcr, two homologous Rac GTPase-activating proteins, control multiple cellular functions of murine macrophages. // *Mol Cell Biol*.– 2007.– V.27, N3.– P. 899–911.
6. Voncken J.W., van Schaick H., Kaartinen V., Deemer K., Coates T., Landing B., Pattengale P., Dorseuil O., Bokoch G.M., Groffen J. Increased neutrophil respiratory burst in bcr-null mutants // *Cell*.– 1995.– V.80, N5.– P. 719–728.
7. Bokoch G.M., Diebold B.A. Current molecular models for NADPH oxidase regulation by Rac GTPase // *Blood*.– 2002.– V.100, N8.– P. 2692–2696.
8. Kaartinen V., Gonzalez-Gomez I., Voncken J.W., Haataja L., Faure E, Nagy A, Groffen J, Heisterkamp N. Abnormal function of astroglia lacking Abr and Bcr RacGAPs // *Development*.– 2001.– V. 128, N21.– P. 4217–4227.
9. Nuyanzina V.A., Nabokina S.M. Identification of exocytosis mediator proteins in peripheral blood neutrophils of patients with chronic myeloid leukemia // *Bull Exp Biol Med*.– 2004.– V. 137, N.4.– P. 361–363.
10. Kobayashi S.D., Voyich J.M., Burlak C., DeLeo F.R. Neutrophils in the innate immune response // *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* .– 2005.– V. 53, N6.– P. 505–517.

Резюме

Bcr є складовою частиною гібридного гену *bcr-abl*, що утворюється при лейкеміях t(9;22). Саме він є модулюючим фактором, що визначає гостроту і характер захворювання. У роботі, за допомогою очищеного рекомбінантного PH домена Bcr, вивчали його взаємодію з білками клітини. Встановлена взаємодія з 23 клітинними білками, а більш детально з'ясовано зв'язок з SMC1, Tubulin β , Zizimin 1, PLC ϵ . Обговорюється роль білка Bcr у патогенезі при ХМЛ.

Bcr является составной частью гибридного гена *bcr-abl*, образующегося при лейкемиях t(9;22). Именно он является модулирующим фактором определяющим остроту и характер заболевания. В работе с помощью очищенного рекомбинантного PH домена Bcr, изучали его взаимодействие с белками клетки. Установлено взаимодействие с 23 клеточными белками, а более детально установлена связь с SMC1, Tubulin β , Zizimin 1, PLC ϵ . Обсуждается роль белка Bcr в патогенезе при ХМЛ.

Bcr is the essential component of the hybrid *bcr-abl* founded in t(9;22) leukemias. Namely *Bcr* modulates the development of the different forms of leukemias. In this work, using recombinant PH domain of Bcr, the interaction with 23 cellular proteins was identified and binding with SMC1, Tubulin β , Zizimin 1, PLC ϵ was confirmed. Role of Bcr protein in CML pathogenesis was discussed.