

6. Jordan M. A., Wilson L. Microtubules as a target for anticancer drugs // Nat. Rev. Canc. – 2004. – 4. – P. 253–265.
7. Тронько М. Д., Пушкарьов В. М. Механізм дії таксолу та перспективи його використання для лікування злоякісних пухлин щитоподібної залози // Ендокринологія. – 2003. – 8, № 2. – С. 228–243.
8. Пушкарьов В. М., Ковзун О. І., Тронько М. Д. та ін. Участь фосфоінозитидів, протеїнкіназ С та А у передачі регуляторного сигналу K^+ в адренкортикальних клітинах людини // Укр. біохім. журн. – 2005. – 77, № 1. – С. 65–71.
9. Копнин Б. П. Мишени действия онкогенов и опухолевых супрессоров: ключ к пониманию базовых механизмов канцерогенеза // Биохимия. – 2000. – 65, № 1. – С. 5–33.
10. Russo A. J., Magro P. G., Hu Z. et al. E2F-1 overexpression in U2OS cells increases cyclin B1 levels and cdc2 kinase activity and sensitizes cells to antimetabolic agents // Cancer Res. – 2006. – 66, No 14. – P. 7253–7260.
11. Тронько М. Д., Левчук Н. І., Попадюк І. Д. та ін. Дія протипухлинного препарату таксолу на клітини анапластичного раку щитовидної залози // Доп. НАН України. – 2006. – № 8. – С. 204–206.
12. Sherr C. J., Roberts J. M. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression // Genes and Development. – 1999. – 13. – P. 1501–1512.
13. Sherr C. J. The Pezcoller lecture: cancer cell cycles revisited // Cancer Res. – 2000. – 60. – P. 3689–3695.
14. Blagosklonny M. V., Schulte T. W., Nguyen P. et al. Taxol induction of p21WAF1 and p53 requires c-raf-1 // Cancer Res. – 1995. – 55, No 20. – P. 4623–4626.
15. Pushkarev V. M., Starenki D. V., Saenko V. A. et al. Molecular mechanisms of the effects of low concentrations of taxol in anaplastic thyroid cancer cells // Endocrinology. – 2004. – 145, No 7. – P. 3143–3152.

Інститут ендокринології та обміну речовин
ім. В. П. Комісаренка АМН України, Київ

Надійшло до редакції 27.10.2006

УДК 576.535.2

© 2007

Є. З. Філяк, О. С. Філяк, С. І. Сушельницький,
член-кореспондент НАН України Р. С. Стойка

Протеоміка активації Т-лімфоцитів мишей, позбавлених гена *pttg*

T lymphocytes play a key role in functioning the immune systems of a man and other mammals. We found 18 proteins, whose expression was changed in pttg-knockout T lymphocytes as compared with wild-type T lymphocytes. We showed that pttg-knockout was accompanied by a decreased expression of interleukin-4 and an enhanced expression of interferon-gamma in activated T lymphocytes.

Онкоген *pttg* (Pituitary Tumor Transforming Gene) вперше був виявлений у пухлинних клітинах гіпофіза щура в 1997 р. На сьогодні відомо, що цей ген активно експресується в пухлинних клітинах гіпофіза (більше ніж 90% випадків аденом гіпофіза), але майже не експресується в нормальних клітинах, що дозволяє вважати його одним із найкращих маркерів пухлин (аденом) гіпофіза [1, 2]. Результати проведених досліджень вказують на те, що надмірна експресія продукту цього гена — білка РТТГ — добре корелює зі злоякісною трансформацією клітин також в інших видах пухлин, зокрема при раку щитоподібної залози, молочної залози, прямої кишки та багатьох інших [1, 2]. Кількість повідомлень щодо ролі

РТТГ та його внутрішньоклітинних молекулярних партнерів у виникненні тих чи інших видів злоякісних пухлин постійно зростає [1].

Білок РТТГ ще іменують секуруином, оскільки він здатний перешкоджати розходженню сестринських хроматид в анафазі під час мітозу, інгібуючи активність іншого спеціального білка, задіяного в цьому процесі, — сепарази [3]. Специфічне розщеплення білка РТТГ є необхідною умовою для запуску анафази. Завдяки цьому РТТГ бере участь у регуляції таких ключових для клітини подій, як мітоз, клітинний цикл, репарація ДНК та апоптоз [1, 3]. У мишей із делецією (нокаутом) гена білка РТТГ спостерігаються аномалії в рості бета-клітин острівців Лангерганса, а також клітин тимуса і яєчок [1, 4].

У нормальних, неактивованих Т-лімфоцитах білок РТТГ практично відсутній, тоді як фізіологічна активація цих імунних клітин супроводжується його надмірним утворенням [6]. Така активація відбувається після розпізнавання антигенної детермінанти Т-клітинним рецептором (TCR), що ініціює передачу регуляторного сигналу всередину клітини за участю спеціального мембранного глікопротеїнового комплексу — CD3 [5]. Антигенні детермінанти презентуються TCR за допомогою головного комплексу гістосумісності (MHC) на поверхні клітин-мішеней.

Втрата гена білка РТТГ (*pttg*-KO) у миші призводить до гіперплазії тимуса та гіпоплазії селезінки [7]. Нещодавно нами встановлено, що відсутність цього гена спричинює інгібування як лектиніндукованої, так і CD3- та TCR-залежної бласт-трансформації (активації) ізольованих Т-лімфоцитів [8, 9].

Нами проведено пошук білків, які можуть відігравати певну роль у РТТГ-залежній регуляції активації Т-лімфоцитів. Використання протеомної техніки дозволило виявити 18 білків, експресія яких змінена у нокаутних за геном *pttg* активованих Т-лімфоцитах у порівнянні з активованими Т-лімфоцитами дикого типу.

Методи та матеріали. Об'єктом дослідження були Т-лімфоцити, виділені з селезінки мишей лінії BL6/C57 дикого типу (*pttg*-WT) та нокаутних за геном білка РТТГ (*pttg*-KO). Тварини отримані в рамках співпраці з Науково-дослідним інститутом при Медичному центрі “Синайський Кедр” (Лос-Анджелес, США). Мишей, гомозиготних за нормальним чи мутантним геном *pttg*, отримували шляхом схрещування особин, гетерозиготних за цим геном (*pttg*+/-).

Наявність/відсутність гена білка РТТГ у мишей визначали за допомогою полімеразної ланцюгової реакції з використанням праймерів, специфічних до послідовності гена *pttg* та до вставки (“інсерту”), що була поміщена в геном миші замість смислової ділянки гена *pttg* [3]. Специфічність даних праймерів перевіряли методом Нозерн-блот-аналізу з використанням специфічних зондів, мічених ³²P (дані не наведено).

У дослідних мишей після знерухомлення видаляли селезінку, з якої вимивали спленоцити. Останні відділяли від еритроцитів центрифугуванням у градієнті густини з використанням реактиву Lymphoprep (“Nycomed Pharma AS Diagnostics”, Норвегія). Т-лімфоцити відділяли з популяції спленоцитів імуномагнітною негативною селекцією з використанням набору Mouse T-cell Negative Isolation Kit (“Dyna”, Норвегія) і культивували в середовищі RPMI-1640 із додаванням 10% (за об'ємом) сироватки крові великої рогатої худоби (обидва реактиви отримано від “Sigma-Aldrich”, США/Німеччина) при 37 °C в атмосфері 5% CO₂.

Активацію Т-лімфоцитів здійснювали шляхом інкубування останніх протягом 72 год у присутності іммобілізованих на чашках для культивування Т-лімфоцитів моноклональних анти-CD3 антитіл. Кількість активованих Т-лімфоцитів перевіряли, підраховуючи кількість

бласт-трансформованих клітин у гемоцитометричній камері Фукса-Розенталя. Контрольні та активовані Т-лімфоцити промивали 250 мМ розчином сахарози та лізували протягом 4 хв при 2 °С 1% розчином Triton-X100 у присутності коктейлю з інгібіторів протеаз без EDTA (“Roche”). Білки лізатів клітин розділяли методом двовимірного електрофорезу (ізо-електрофокусування/денатуруючий електрофорез).

Ізоелектрофокусування (рН 3–10) здійснювали з використанням реактивів та обладнання компанії “Amersham” при напрузі 8000 В протягом 12 год. Після ізоелектрофокусування проводили хімічну модифікацію йодацетамідом вільних SH-груп цистеїну білків, використовуючи метод, рекомендований компанією “Amersham”. Електрофорез білків (у другому вимірі) проводили у 12% поліакриамідному гелі в присутності додецилсульфату натрію, дитіотреїтолу і 7 М сечовини за протоколом, рекомендованим компанією “Amersham”. Після завершення електрофорезу білки забарвлювали сріблом (за Шевченком), висушували та сканували. Для сканування та подальшого аналізу використовували обладнання та програмне забезпечення від компанії “Amersham”, а також протокол, рекомендований цією компанією. Скановані зображення гелів калібрували щодо інтенсивності забарвлення сріблом та аналізували щодо виявлення білкових плям, інтенсивність яких достовірно змінена при порівнянні гелів, отриманих при розділенні лізатів активованих Т-лімфоцитів дикого типу, з гелями, отриманими при розділенні лізатів активованих Т-лімфоцитів, нокаутних за геном *pttg*. Відбирали білкові плями, інтенсивність яких змінювалась не менш, ніж на 280–300% і була статистично достовірною ($p \leq 0,05$). Відібрані білкові плями вирізали з гелю, гідролізували трипсином, і елюйовані пептиди детектували методом MALDI-TOF мас-спектрометрії. Для ідентифікації білкових плям за отриманими спектрами MALDI-TOF використовували пошуковий Інтернет-ресурс ProFound (Rockefeller Institute, США).

Результати дослідження та їх обговорення. Нещодавно нами було показано, що за відсутності гена *pttg* у миші пригнічується активація (бласт-трансформація) ізольованих Т-лімфоцитів. На даному етапі досліджень нами виявлено 18 білків, експресія яких змінена в нокаутних за геном *pttg* активованих Т-лімфоцитах у порівнянні з активованими Т-лімфоцитами дикого типу.

Білки лізатів активованих Т-лімфоцитів розділяли двовимірним електрофорезом: ізоелектрофокусуванням (рН 3–10) у першому вимірі та денатуруючим електрофорезом — у другому. Отримано по п'ять гелів хорошої якості для лізатів контрольних і активованих Т-лімфоцитів дикого типу та нокаутних за геном *pttg* (рис. 1, а, б). Визначено ступінь кореляції кількості нанесення лізату (за тотальною кількістю білка, отриманою шляхом підсумовування інтенсивності усіх білкових плям, виявлених в одному гелі) у межах кожної групи гелів та між різними групами гелів (табл. 1). Статистично достовірної різниці в кількості нанесеного загального білка на гель при порівнянні різних груп гелів не виявлено

Таблиця 1. Дані кореляційного аналізу рівномірності нанесення лізатів у межах однієї групи гелів та між різними групами гелів

Група	Контроль			CD3		
	Кількість білкових плям	Кореляція		Кількість білкових плям	Кореляція	
		у межах групи	з іншими групами		у межах групи	з іншими групами
WT	1135	0,983	—	1433	0,936	0,952
КО	1062	0,96	0,978	1287	0,957	0,968

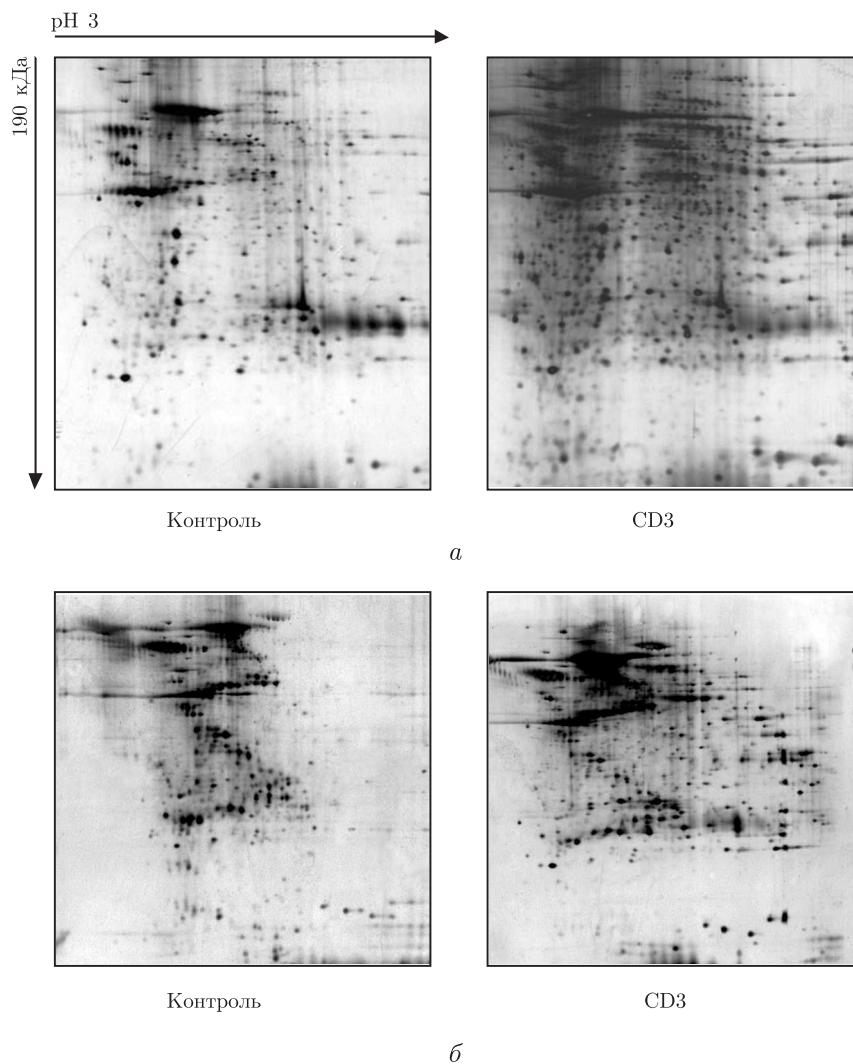


Рис. 1. Гелі лізатів контрольних та активованих Т-лімфоцитів, ізольованих із селезінки мишей дикого типу (а) та нокаутних за геном *pttg* (б), отримані методом двовимірного електрофорезу

(див. табл. 1). За даними детекції білкових плям встановлено, що при активації ізольованих Т-лімфоцитів середньоарифметична кількість білкових плям, виявлених в їх лізатах, збільшується з 1135 до 1433 для Т-лімфоцитів дикого типу та з 1062 до 1287 для Т-лімфоцитів, нокаутних за геном *pttg* (див. табл. 1). Цю різницю можна пояснити тим, що неактивовані (контрольні) Т-лімфоцити мають знижену інтенсивність метаболізму, і після активації Т-лімфоцитів відбувається посилення їх метаболізму і запуск синтезу специфічних білків, що беруть участь у регуляції та реалізації імунної відповіді. Крім того, встановлено, що середньоарифметична кількість білкових плям, виявлених у лізатах Т-лімфоцитів, нокаутних за геном *pttg* (*pttg*-КО), є нижчою як для контрольних (1062 проти 1135), так і для активованих Т-лімфоцитів (1287 проти 1433) у порівнянні з Т-лімфоцитами дикого типу (див. табл. 1). На даному етапі ми не можемо повністю пояснити, чим зумовлена ця різниця, проте можемо припустити, що вона викликана негативним впливом відсутності гена *pttg* на функції Т-лімфоцитів, зокрема на їх функціональну активацію. Це припущення

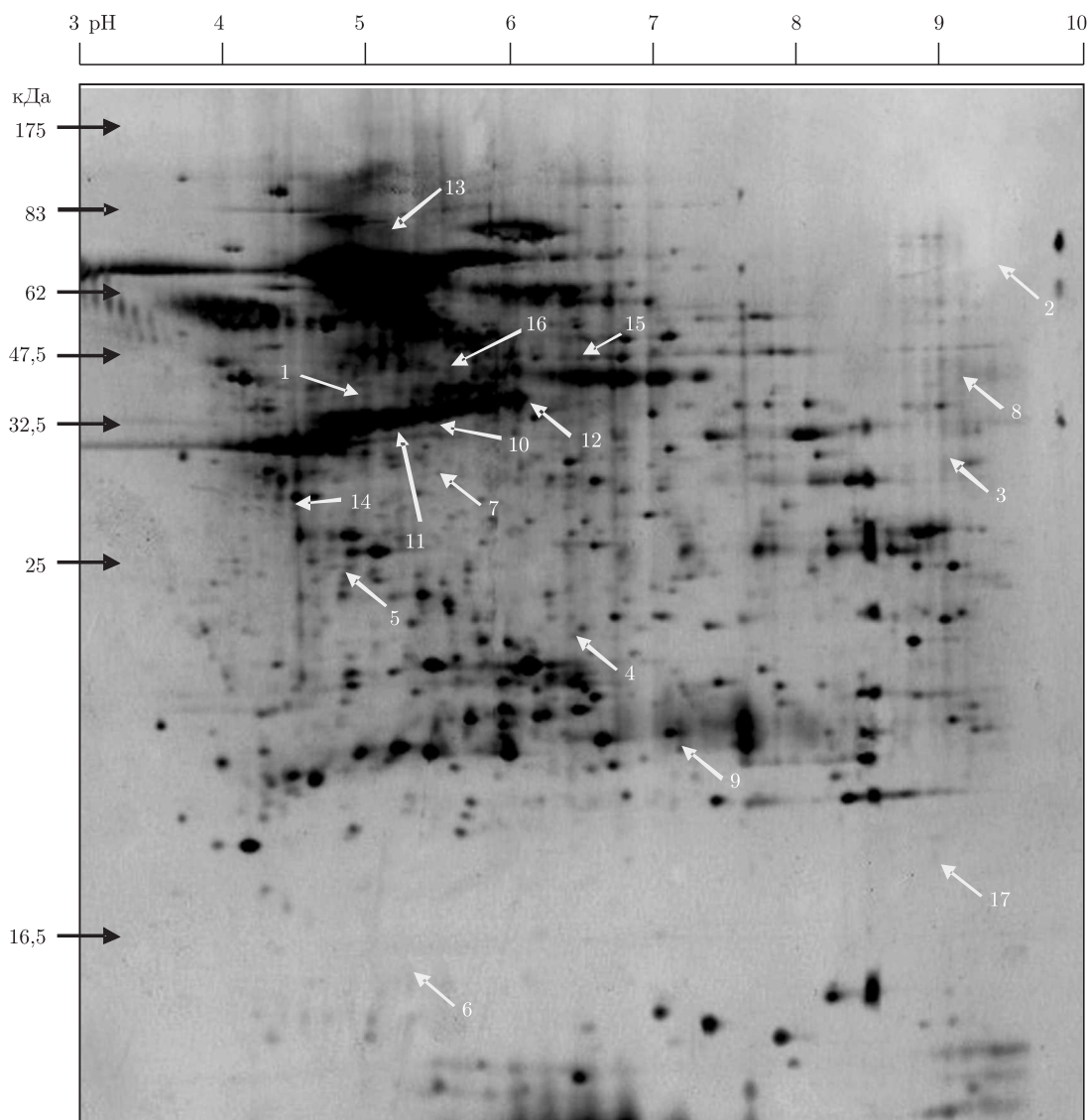
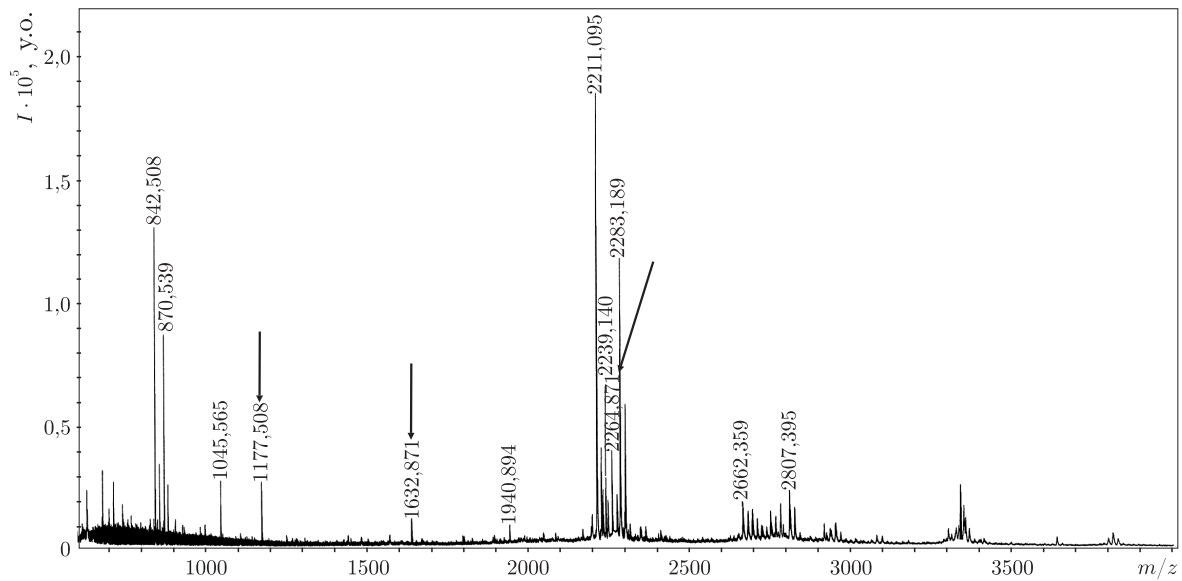


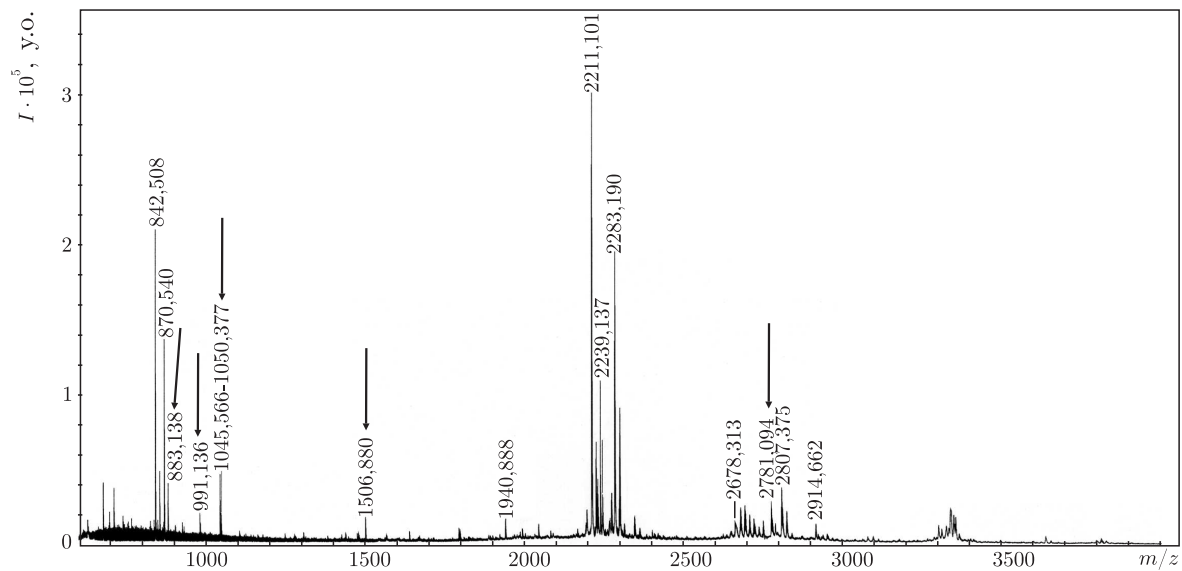
Рис. 2. Білкові плями, інтенсивність яких була змінена при порівнянні гелів, отриманих при розділенні лізатів активованих Т-лімфоцитів дикого типу, із гелями, отриманими при розділенні лізатів активованих Т-лімфоцитів, нокаутних за геном *pttg*. Стрілками вказано білкові плями, інтенсивність яких статистично достовірно змінювалася при порівнянні даних двох груп гелів (номери біля стрілок відповідають номеру ідентифікованого білка в табл. 2)

підтверджується також і тим фактом, що при активації ізольованих Т-лімфоцитів відносна різниця виявлених білкових плям при порівнянні Т-лімфоцитів дикого типу і Т-лімфоцитів з *pttg*-КО помітно зростає.

Нами проведено комп'ютерний аналіз гелів щодо виявлення білкових плям (рис. 2 і дані, які не опубліковані), інтенсивність яких змінена при порівнянні активованих Т-лімфоцитів дикого типу і Т-лімфоцитів з *pttg*-КО. Виявлені білкові плями (26 плям) вирізали і проводили їх розщеплення трипсином. Детекцію пептидів здійснювали за допомогою методу мас-спектрометрії MALDI-TOF (рис. 3). Білкові плями ідентифікували за детектованим набором пептидних мас (за спектрами MALDI-TOF) з використанням Інтернет-ресурсу



a



б

Рис. 3. Спектри MALDI-TOF двох білкових плям, ідентифікованих як інтерлейкін-4 (а) та інтерферон-гамма (б). Стрілками помічено піки пептидів, що відповідають ідентифікованим нами білкам, не помічені піки відповідають пептидам, отриманим при ауторозщепленні трипсину

ProFound. Ідентифіковано 21 білкову пляму, що являли собою 18 білків (табл. 2). Зокрема, було ідентифіковано такі цитокіни імунної відповіді, як інтерферон-гамма та інтерлейкін-4. Показано, що за відсутності гена *pttg* посилюється експресія інтерферону-гамма та пригнічується експресія інтерлейкіну-4 активованими ізольованими Т-лімфоцитами. Оскільки обидва ці цитокіни задіяні у процесах запалення і їх експресія в нормі зростає під час активації Т-лімфоцитів, можна припустити, що за відсутності гена *pttg* порушується регуляція імунної відповіді на антиген. Для того щоб визначити, наскільки ці порушення вагомі і до

Таблиця 2. Список білкових плям, інтенсивність яких змінена більше як у 2,8 раза (при порівнянні гелів різних груп) і які були ідентифіковані методом мас-спектрометрії MALDI-TOF при використанні пошукового Інтернет-ресурсу ProFound (Rockefeller Institute, США)

Номер білкової плями	Назва білка	Послідовність	Достовірність ідентифікації (за ProFound), %	Перекриття, %	pI	Мол. маса, кДа
1	9130022A01Rik protein	AAH61228.1	100	10	4,8	41,96
2	Zinc finger protein mkr5	AAA37120.1	95	7	9,9	72,76
3	Unnamed protein product Dimethylaniline monooxygenase [N-oxide forming] 3 (Hepatic flavin-containing monooxygenase 3) (Dimethylaniline oxidase 3)	BAC34077.1	100	13	9	32,29
4	Similar to Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 (Helix-destabilizing protein) (Single strand binding protein) (hnRNP core protein A1)	XP_356697.1	100	27	6,5	20,54
5	Transcription factor Mlr 1 protein (Mblk1-related protein-1)	AAH66151.1	100	28	4,7	24,97
6	Lectin, galactose binding, soluble 1	AAH02063.1	100	21	5,3	15,2
7	Biliary glycoprotein	CAA47695.1	100	18	5,5	30,48
8	Unnamed protein product	BAB26620.1	99	13	9,2	38,28
9	Ccn1 protein	AAH07177.1	100	17	7,1	18,89
10	Pyrophosphatase	AAH10468.1	99	14	5,4	33,11
11	Capping protein alpha subunit Capping protein (actin filament) musculi Z-line, alpha-1	AAC00566.1 AAH16232.1	100	42	5,3	32,9
12	Pitpnb protein phosphatidylinositol transfer protein beta isoform	AAH34676.1 AAA87593.1	72	18	6	31,94
13	Calpain 9	Q9D805	100	9	5,1	79,59
14	Unnamed protein product	BAC37121.1	100	15	4,5	27,16
15	Histone deacetylase11	AAH16208.1	99	15	6,6	39,37
16	Similar to actin, gamma, cytoplasmic	XP_134663.2	100	15	5,6	41,34
17	Interferon-gamma	NP_032363.1	100	0	9,3	18,12
18	IL-4	NP_067258.1	100	31	8,8	16,2

Примітка. Номер білкової плями у таблиці відповідає номеру білкової плями на рис. 2. У графі “Перекриття” вказано, скільки відсотків первинної послідовності ідентифікованого білка “перекривається” детектованими методом мас-спектрометрії пептидами. У графах “pI” та “Мол. маса” наведено теоретично обчислену ізоелектричну точку та мол. масу ідентифікованого білка.

яких наслідків вони можуть призвести, необхідно виконати додаткові дослідження з використанням блокуючих антитіл до інтерлейкіну-4 та інтерферону-гамма, а також ДНК-векторів, які б забезпечили надекспресію цих цитокінів.

Автори висловлюють щирі вдячність проф. Ш. Мелмеду (м. Лос-Анджелес, США) за надання мишей із нокаутом гена *pttg*. Окремі частини дослідження виконано за фінансової підтримки фондів INTAS (Європейський Союз) та WUBMRC (Україна – США).

1. *Tfelt-Hansen J., Kanuparthi D., Chattopadhyay N.* The emerging role of Pituitary Tumor Transforming Gene in tumorigenesis // *Clin. Med. and Res.* – 2006. – **4**, No 2. – P. 130–137.
2. *Donangelo I., Melmed S.* Pathophysiology of pituitary adenomas // *J. Endocrinol. Invest.* – 2005. – **28**, Suppl. 11. – P. 100–105.
3. *Stemmann O., Gorr I. H., Boos D.* Anaphase topsy-turvy: Cdk1 a securin, separase a CKI // *Cell Cycle.* – 2006. – **5**, No 1. – P. 11–13.
4. *Wang Z., Moro E., Kovacs K. et al.* Pituitary tumor transforming gene-null male mice exhibit impaired pancreatic beta cell proliferation and diabetes // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* – 2003. – **100**, No 6. – P. 3428–3432.
5. *Якобисяк М.* Імунологія. – Вінниця: Нова Книга, 2004. – С. 35–68, 248–672.
6. *Stoika R., Melmed S.* Expression and function of pituitary tumour transforming gene for T-lymphocyte activation // *Brit. J. Haematol.* – 2002. – **119**, No 4. – P. 1070–1074.
7. *Wang Z., Yu R., Melmed S.* Mice lacking pituitary tumor transforming gene show testicular and splenic hypoplasia, thymic hyperplasia, thrombocytopenia, aberrant cell cycle progression, and premature centromere division // *Mol. Endocrinol.* – 2001. – **15**, No 11. – P. 1870–1879.
8. *Філяк Є., Філяк О., Афанасьєв С., Стойка Р.* Дефіцит гену білка секурину (РТТГ) знижує рівень активації Т-лімфоцитів, індукованої лектином // *Експерим. та клін. фізіологія та біохімія.* – 2006. – № 4. – С. 18–24.
9. *Філяк Є., Держко І., Філяк О., Стойка Р.* Втрата гену білка секурину (РТТГ) веде до пригнічення активації Т-лімфоцитів // *Мед. хімія.* – 2007. – № 1. – С. 11–19.

*Інститут біології клітини
НАН України, Львів
Людвігівський інститут ракових досліджень,
Уппсала, Швеція*

Надійшло до редакції 25.12.2006