 Для заказа доставки данной работы воспользуйтесь поиском на сайте по ссылке: <http://www.mydisser.com/search.html>

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ

**Інститут експериментальної патології, онкології і**

**радіобіології ім**. **Р.Є. Кавецького**

**Ковалевська Лариса Миколаївна**

УДК 612.42;616-006.441,443

**Експресія протеїнкінази D2 в нормальних та злоякісно трансформованих В-лімфоцитах ЛЮДИНИ**

14.01.07 – онкологія

**АВТОРЕФЕРАТ**

дисертації на здобуття наукового ступеня

кандидата біологічних наук

Київ - 2009

Дисертацією є рукопис

Робота виконана в Інститутi експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України.

**Науковий керівник** - доктор біологічних наук

**Сидоренко Світлана Павлівна,**

провідний науковий співробітник відділу регуляторних механізмів клітини Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України.

**Офіційні опоненти:** - доктор біологічних наук

**Залєток Софія Петрівна,**

завідувач відділу біохімії пухлинного росту Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України;

* доктор біологічних наук, професор

**Філоненко Валерій Вікторович**

завідувач відділу сигнальних систем клітини Інституту молекулярної біології і генетики НАН України.

Захист дисертації відбудеться 10 червня 2009 року о 13 годині 30 хвилин на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.155.01 в Інституті експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України за адресою: 03022, м. Київ, вул. Васильківська, 45.

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці ІЕПОР ім. Р.Є. Кавецького НАН України.

Автореферат розісланий \_\_\_ травня 2009 р.

Вчений секретар

спеціалізованої вченої ради

кандидат біологічних наук Л.М. Шлапацька

**ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ**

**Актуальність проблеми.** Дослідженнями останніх років переконливо доведено, що канцерогенез є багатоетапним та багаторівневим процесом, який залежить від геномної нестабільності, ендогенних та екзогенних факторів (R. Kuppers, 2005; C. Goodnow et al., 2006; U. Klein et al., 2008). Накопичення незалежних мутацій та епігенетичних порушень, які ведуть до дисбалансу регуляції сигнальних шляхів, що контролюють проліферацію, ріст клітин, диференціювання, анергію та апоптоз, обумовлюють злоякісну трансформацію клітин. В той же час, злоякісна трансформація клітин супроводжується високим ступенем кооперації сигнальних каскадів, що забезпечує їх синергізм на різних рівнях регуляції, включаючи експресію генів. Ідентифікація сигнальних каскадів і пошук нових ефекторних молекул, які задіяні в процесах злоякісної трансформації клітин і патогенезі пухлин, є пріоритетним напрямком сучасної онкології. Саме завдяки глибокому розумінню механізмів внутрішньоклітинної передачі сигналів останнім часом створено ряд препаратів цільової дії, які з успіхом використовуються в онкологічних клініках або проходять останні стадії доклінічних випробувань (H. Shen et al., 2009, D. Teachey et al., 2009).

Інтеграцію і координацію ключових сигнальних каскадів, що передають інформацію від поверхневих рецепторів до генетичного апарату клітин, забезпечують вторинні месенжери, адапторні білки та ферменти, зокрема протеїнкінази (L. Steelman et al., 2008, J. McCudrey et al., 2008). До таких регуляторів сигнальної мережі можна віднести і представників нової родини серин-треонінових протеїнкіназ D (PKD), що входить до групи кальцій-кальмодулін залежних протеїнкіназ (САМК) (A. Manning 2002 et al.,, J. Van Lint et al., 2002). До родини PKD належать протеїнкінази PKD1/PKC, PKD2 і PKD3/PKC. Вони експресовані в клітинах ссавців, мають високу структурну гомологію, але відрізняються за клітинно-специфічною експресією, внутрішньоклітинним розподілом і, вірогідно, за субстратною специфічністю та функціями (J. Van Lint et al., 2002).

Протеїнкінази родини PKD задіяні в регуляції ключових сигнальних каскадів клітин і транспорті білків із апарату Гольджі, що свідчить про участь цих ферментів в контролі основних біологічних процесів клітини. З використанням експериментальних моделей отримано беззаперечні свідоцтва, що протеїнкінази родини PKD беруть участь в процесах проліферації, апоптозу, клітинної адгезії та інвазивності пухлинних клітин (J. Chen et al., 2008, J. Song et al., 2009). Враховуючи ці дані, можна допустити, що протеїнкінази родини PKD можуть бути використані в якості мішені для створення засобів таргетної терапії при лікуванні хворих, зокрема, на кардіоваскулярні та онкологічні захворювання (E. Rozengurt et al., 2005). В той же час, тільки поодинокі з опублікованих робіт присвячені дослідженню експресії та активності протеїнкіназ цієї родини в нормальних та пухлинних клітинах *in situ* (M Jaggi 2007 et al., P. Mak et al., 2008), а експресія та функції цих протеїнкіназ, зокрема PKD2, в злоякісно трансформованих клітинах при лейкозах та лімфомах не вивчались. Беручи до уваги те, що в останні роки кінази родини PKD опинились в центрі уваги трансляційних досліджень в онкології (M Jaggi et al., 2007), було вирішено дослідити особливості експресії PKD2 в нормальних і злоякісно трансформованих В-лімфоцитах та з‘ясувати функціональну роль PKD2 в сигнальних каскадах лімфоцитів.

**Зв’язок роботи з науковими програмами, планами, темами.** Дисертаційна робота виконана у відповідності з планом науково-дослідної роботи Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України за темами: „Експресія та функції протеїн-кіназ D в нормальних та злоякісних клітинах” (2003-2005 рр., державний реєстраційний номер 010U000784), „Роль PKD2 в регуляції сигнальних шляхів в нормальних та злоякісно-трансформованих В-лімфоцитах людини” (2006-2008 рр., державний реєстраційний номер 0105V005557). Крім того, дослідження, що представлені в роботі, було виконано за підтримки гранту Національної академії наук України для молодих вчених “Роль BКР та CD150 в регуляції сигнальних каскадів В-лімфоцитів” (2005-2006 рр.), грантів від фонду Цивільних Досліджень і Розвитку США UKB2-2831-KV-06 (2004-2006 рр.) Міжнародної Асоціації сприяння кооперації вчених INTAS 11-2118 (2002-2004 рр.) та INTAS 03-55-1350 для молодих вчених (2004 – 2007 рр.).

**Мета дослідження.** Проаналізувати експресію та аутофосфорилювання протеїнкінази PKD2 в нормальних В-лімфоцитах та злоякісно трансформованих клітинах при лімфомах В-клітинного походження, а також з’ясувати роль PKD2 в регуляції сигнальних шляхів лімфоцитів.

**Задачі дослідження.**

1. Визначити експресію протеїнкінази PKD2 в лімфоїдних лініях клітин людини.

2. З’ясувати рівень експресії та аутофосфорилювання PKD2 в субпопуляціях В-клітин мигдаликів.

3. Вивчити кінетику активації PKD2 через В-клітинний рецептор в нормальних та злоякісно трансформованих В-лімфоцитах людини.

4. Визначити рівень експресії, аутофосфорилювання та внутрішньоклітинну локалізацію PKD2 в лімфоїдних клітинах при різних формах неходжкінських злоякісних лімфом та при лімфомі Ходжкіна.

5. З’ясувати вплив надекспресії протеїнкінази С II (PKС II) на рівень активації PKD2.

6. Перевірити гіпотезу, що надекспресія PKD2 в лімфоцитах може призводити до активації транскрипційного фактору NF-kB.

*Об’єкт дослідження*: біопсійний матеріал умовно нормальних лімфатичних вузлів, лімфатичних вузлів хворих на неходжкінські злоякісні лімфоми (НХЛ) та лімфому Ходжкіна (ЛХ); мигдалики людини, клітинні лінії з В-лімфоцитів людини.

*Предмет дослідження:* експресія, фосфорилювання, внутрішньоклітинна локалізація та функції PKD2.

*Методи дослідження:* методи клітинної та молекулярної біології (культивування та трансфекція еукаріотичних клітин; імуногістохімічні та імунофлуоресцентні методи; метод проточної цитофлуориметрії, зворотня транскриптазна реакція; полімеразна ланцюгова реакція); біохімічні методи (електрофорез нуклеїнових кислот в агарозному гелі; електрофорез білків в поліакриламідному гелі; Вестерн-блот аналіз; люциферазна система аналізу активності NF-B).

**Наукова новизна одержаних результатів.** Вперше показано, що PKD2 експресована в нормальних та злоякісно трансформованих В-лімфоцитах людини. Виявлені особливості експресії та аутофосфорилювання PKD2 в субпопуляціях нормальних зрілих В-клітин людини: рівень експресії та аутофосфорилювання PKD2 в В-лімфоцитах залежить від стадії їх диференціювання. Визначено, що лігація В-клітинного рецептора на нормальних і злоякісно трансформованих В-лімфоцитах призводить до активації та внутрішньоклітинної релокалізації PKD2.

Вперше досліджена експресія, внутрішньоклітинна локалізація та аутофосфорильовання PKD2 в злоякісно трансформованих В-клітинах хворих на неходжкінські злоякісні лімфоми та лімфому Ходжкіна. В цитоплазмі злоякісно трансформованих клітин хворих на лімфоми з малих лімфоцитів, лімфоми з клітин мантійної зони та лімфоми Беркітта виявлено помірний рівень експресії PKD2 та низький рівень її аутофосфорилювання. Виявлено відмінності у внутрішньоклітинній локалізації, рівні експресії та аутофосфорилювання PKD2 в пухлинних клітинах при дифузній крупноклітинній В-клітинній лімфомі (ДКВЛ), на основі яких виділено три групи ДКВЛ, що також відрізняються за рівнем диференціювання злоякісно трансформованих клітин та експресією PKCII - прогностичного маркера для цього гістологічного варіанту лімфом.

Вперше показано синергізм PKD2 та CARMA1 (CARD домен та MAGUK домен білок 1), ключового компонента NF-B сигнального каскаду, в антиген-ініційованій активації транскрипційного фактора NF-B**.**

**Практичне значення роботи**:

Результати дисертаційної роботи розширюють сучасні уявлення про механізми злоякісної трансформації клітин і можуть служити підгрунтям для створення підходів до оцінки рівня диференціювання та активаційного статусу як нормальних, так і злоякісно трансформованих В-лімфоцитів людини. Отримані дані щодо диференційної експресії та аутофосфорилювання PKD2 при НХЛ, а також ролі PKD2 в антиген-індукованій активації NF-B, вказують на те, що PKD2, імовірно, може бути прогностичним фактором та потенційною мішенню для направленої терапії хворих на НХЛ.

**Особистий внесок здобувача.** При виконанні дисертаційної роботи здобувачем зібрано та проаналізовано наукову літературу за темою дисертації. За допомогою зворотньої транскриптазної реакції, полімеразної ланцюгової реакції, Вестерн-блот аналізу та імуногістологічних досліджень автором досліджено експресію та активацію PKD2 в клітинних лініях та злоякісно трансформованих клітинах лімфом. Використовуючи проточну цитофлуориметрію та світлову мікроскопію з деконволюцією, автором було досліджено експресію та внутрішньоклітинну локалізацію PKD2 в умовно нормальних В-лімфоцитах людини. Автор особисто провів люциферазний тест оцінки активності NF-B. Дисертантом виконано аналіз отриманих результатів, проведено їх статистичну обробку, підготовлено ілюстративний матеріал, здійснено узагальнення результатів досліджень, сформульовано висновки.

**Апробація результатів дисертації.** Результати дисертаційної роботи були представлені і обговорені на: конгресі FEBS (Брюссель, Бельгія, 2003); конференції молодих вчених Інституту молекулярної біології та генетики (Київ, 2003); 5th Parnas Conference "Molecular mechanisms of cellular signaling" (Київ, 2005); VII Міжнародній конференції молодих онкологів „Сучасні проблеми експериментальної і клінічної онкології” (Київ, лютий 2006); ІХ Українському біохімічному з’їзді (Харків, 2006); 6th Parnas Conference "Molecular mechanism of cellular signaling" (Краків, Польща, 2007); 2-му з’їзді Українського товариства клітинної біології (Київ, 2007); Міжнародному симпозіумі “14th symposium on signals and signal processing in the immune system”, (Балатон, Угорщина, 2007); конференції „Актуальні проблеми біохімії та біотехнології – 2008” (Київ, 2008); Міжнародній конференції “Tumor hypoxia and malignant progression” (Київ, 2008).

**Публікації.** За матеріалами дисертаційної роботи опубліковано 14 наукових робіт, з них 4 статті у фахових наукових журналах, рекомендованих ВАК України, та 10 тез доповідей у збірках матеріалів наукових конференцій і з’їздів.

**Структура та обсяг дисертації.** Дисертаційна робота складається зі вступу, огляду літератури, розділу матеріалів та методів досліджень, семи підрозділів результатів власних досліджень, аналізу та узагальнення результатів, висновків і списку використаної літератури. Основний зміст дисертації викладено на 130 сторінках машинописного тексту, містить 3 таблиці та 48 рисунків. Список використаної літератури включає 204 джерела, в тому числі 201 зарубіжних.

**Основний зміст роботи**

**Матеріали та методи дослідження.** Імуногістохімічні дослідження проводили на зрізах тканин реактивних лімфатичних вузлів (11 випадків) та мигдаликів (18 випадків), а також на біопсійному матеріалі пухлин пацієнтів з неходжкінськими злоякісними лімфомами В-клітинного походження (74 випадки) та класичною лімфомою Ходжкіна (43 випадки). Діагноз лімфом був встановлений у відповідності до класифікації ВООЗ на основі стандартних морфологічних, клінічних та імуногістохімічних критеріїв двома незалежними патогістологами і верифікований к.б.н., с.н.с. Юрченко О.В. Усі пацієнти були попереджені про дослідження та дали свою поінформовану згоду на участь у їх проведенні.

В роботі було використано наступні лінії клітин людини: MP-1, LDN, CESS (В-лімфобластоїдні клітинні лінії, трансформовані вірусом Епштейна-Барр), RPMI-8226 (мієлома), REH, BLIN-1 та Nalm-6 (пре-В-клітинний лейкоз), BJAB, Ramos, Raji, Daudi (лімфома Беркітта), Jurkat, CCRF-HSB2 (гострий Т-лімфобласний лейкоз), KM-Н2 та L428 (лімфомаХоджкіна), Corinna II (хронічний лімфолейкоз), SUDHL5, SUDHL8, SUDHL9, OCILY3, OCILY10 та NUDHL1 (дифузні крупноклітинні В-клітинні лімфоми), НТВ119 (дрібноклітинний рак легені) та MCF-7 (рак молочної залози). В якості контролю для біохімічних досліджень було використано лізати клітин лінії НЕК293-Т, трансфікованих плазмідами pcDNA3.1-PKD1 та pcDNA3.1-PKD2. Лінії клітин культивували у поживному середовищі RPMI-1640 з додаванням 10% ембріональної сироватки телят, 2 мM L-глутаміна, 1 мМ пірувата натрію, амінокислотних добавок і антибіотиків. Для культивування клітинної ліній LDN до культурального середовища додатково вносили 50 мМ -меркаптоетанолу. Клітинні лінії A431 (недрібноклітинний рак легені), HEK293-T культивували в середовищі DMEM з додаванням 10% ембріональної сироватки телят, 2 мM L-глутаміну, 1 мМ пірувата натрію, амінокислотних добавок, антибіотиків та, відповідно, 4 г/л і 1 г/л глюкози.

Для імунофенотипування нормальних та злоякісно трансформованих клітин людини в роботі були використані моноклональні антитіла (МКАТ) проти CD3, CD5, CD7, CD10, CD19, CD20, CD22, CD23, CD38, CD45, CD95, CD150, IPO-38 (ІЕПОР), CD30 (Dako Cytomation, Данія).

Експресію PKD1 та PKD2 на рівні білка визначали за допомогою специфічних кролячих поліклональних анти-PKD1/2 антитіл, що розпізнають як PKD1, так і PKD2, які були люб’язно надані проф. Ванлінтом (Католицький Університет, Льовен, Бельгія). Для ідентифікації PKD2 були використані специфічні кролячі поліклональні анти-PKD2 антитіла (Calbiochem, США). Рівень трансфосфорилювання і аутофосфорилювання PKD2 визначали за допомогою кролячих поліклональних антитіл анти-Ser706/710 PKD2 (Upstate, США) та анти-Ser876 PKD2 (Cell Signaling, США), відповідно. Експресію PKCІІ виявляли з використанням кролячої анти-PKCІІ (С-18) сироватки (Santa Cruz Biotechnology, США). В якості вторинних антитіл для Вестерн-блот аналізу були використані ослині анти-кролячі IgG-HRP (Santa Cruz Biotechnology, США), а при імунофлуоресцентному дослідженні – ослині антитіла проти імуноглобулінів кролика, мічені Alexa 488, та ослині антитіла проти імуноглобулінів кози, мічені Alexa 594 (Invitrogen, США). Для візуалізації продукта реакції в імуногістохімічних дослідженнях застосовували EnVision System (Dako Cytomation, США), або ослині анти-козячі IgG-HRP (Santa Cruz Biotechnology, США), DAB (Sigma-Aldrich, США) та АЕС (Sigma-Aldrich, США).

Рівень експресії білків при імуногістохімічних дослідженнях оцінювали за допомогою балів (Н-score), які визначали формулою Н-score = 1ХСЛ + 2Х ПОМ + 3ХСИЛ, де СЛ – відсоток клітин із забарвленням слабкої інтенсивності; ПОМ – відсоток клітин із забарвленням помірної інтенсивності, СИЛ – відсоток клітин із забарвленням сильної інтенсивності. В межах від 0 до 50 балів ступінь експресівважали за негативну; від 51 до 100 – низьку; від 101 до 200 – помірну; 201 та вище – високу (А. Упоров, 2000).

Для цитофлуориметричних досліджень при одномоментному фарбуванні клітин та подальшому їх сортуванні, а також внутрішньоклітинного виявлення рівня експресії PKD2 в субпопуляціях В-клітин мигдаликів були використані МКАТ анти-CD138-FITC та анти-CD27-APC (eBioscience, San Diego, США), анти-CD19-PE-Cy7 (Biolegend, San Diego, США), анти-CD38-PerCP-Cy5.5 та анти-IgD-біотин (BD Pharmingen, San Diego, США), стрептовідин-Alexa Fluor 700 (Invitrogene, Carlsbad, США) і ослині анти-кролячі IgG-RPE (Jackson ImmunoResearch, West Grove, США).

Для стимуляції В- і Т-клітин застосовували лігацію антиген-розпізнаючих рецепторів козячими F(ab’)2 проти IgM людини (Jackson ImmunoResearch, США), або анти-CD28 (BD Biosciences, США) та анти-CD3 (надані доктором С.Зіглер, Benaroya Research Institute, США), відповідно.

Для стимуляції клітин через В-клітинний рецептор (ВКР) були використані В-лімфоцити 14 пар мигдаликів та лінії клітин В-клітинного походження. Рівень експресії та фосфорилювання білків в клітинах вивчали за допомогою Вестерн-блот аналізу.

**Для визначення субпопуляцій В-клітин використовували метод проточної цитофлуориметрії з одномоментним виявленням п’яти поверхневих маркерів. При визначенні внутрішньоклітинної експресії PKD2 в субпопуляціях В-клітин, після одномоментного виявлення 5 поверхневих антигенів проводили фіксацію та пермеабілізацію клітин з використанням набору Cytofix/Cytoperm (BD Biosciences, США). Сортування клітин виконували на проточному цитофлуориметрі/сортері FACSAria (BD Biosciences, США), а оцінку рівня інтенсивності флуоресценції – на проточному цитофлуориметрі LSR II (BD Biosciences, США) з використанням програми FACS Diva 6.0 (BD Biosciences, США). Отримані дані аналізували з використанням програм FACS Diva 6.0 (BD Biosciences, США) та FlowJo (Tree Star, Inc., США).**

Для отримання препаративної кількості плазмід pcDNA3.1-PKD1 та pcDNA3.1-PKD2 був використаний штам *E. coli* TOP10 (Invitrogen, США). Плазмідну ДНК виділяли за допомогою набору реактивів Qiagen Plasmid Miniprep Kit (Sigma, США) згідно протоколу виробника.

Для ідентифікації PKD1 та PKD2 на рівні мРНК було підібрано наступні праймери: для PKD1 прямий 5’GCGCTACAGTGTGGATAAGACCTTG-3’, зворотній 5’AGGAGTGTCACTGTGGCTAGCACTT-3’, для PKD2 прямий 5’-GCCAATGCCACCTACTTCGT-3’, зворотній 5’-GCTGGGTGCGTCCTGAA-3’. Контроль ЗТ-ПЛР проводили з використанням праймерів для гліцеральдегід-3-фосфат дегідрогенази: прямий 5’-TGAAGGTCGGAGTCAACGGATTTGGT-3’, зворотній 5’-CATGTGGGCCATGAGGTCCACCAC-3’.

Для секвенування, продукти ПЛР були виділені з агарозного гелю за допомогою набору реактивів для очищення Quigen gel isolation kit (Quigen, США). Для секвенування продукту, кДНК було клоновано у вектор pCAPs (Roche, США).

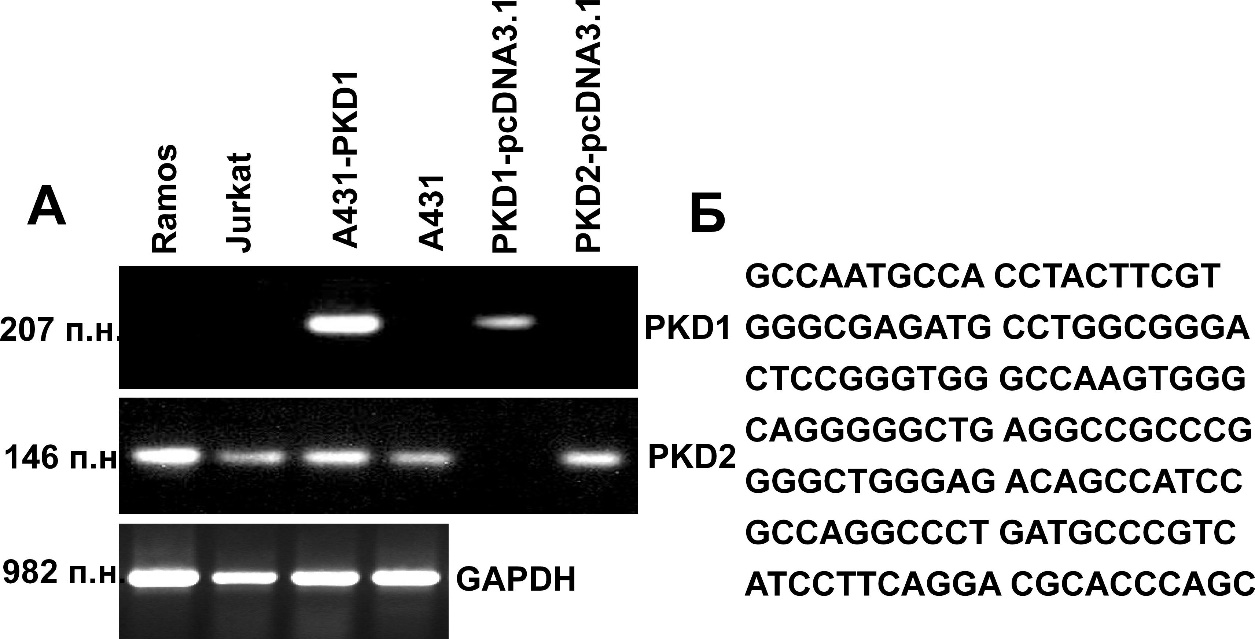
Секвенування проводили на капілярному секвенаторі Perkin-Elmer 310 в Університеті міста Ульм, Німеччина. Пошук в базі даних та порівняння послідовності ПЛР продукту та кДНК PKD2 (gi:4506968) проводили в опції nucleotide-nucleotide alignment (blastn) в Інтернет програмі BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/> ).

Створення стабільних ліній клітин з надекспресією PKCII здійснено за допомогою лентивірусної системи на основі вектора MSCV (Clontech, США).

Для вивчення впливу PKD2 на активність NF-B проводили люциферазний тест оцінки активності NF-B за допомогою набору Dual-Luciferase Reporter 1000 Assay System (Promega, Madison, США) згідно рекомендаціям виробника. В роботі були використані конструкції pcDNA3.1-PKD2-WT (PKD2 дикого типу), pcDNA3.1-PKD2-DA (PKD2 з постійно активованим кіназним доменом), pcDNA3.1-PKD2-KD (PKD2 в неактивованому стані), що були люб‘язно надані проф. T. Seufferlein (Німеччина) та pcDNA3.1-CARMA1-WT (CARMA1 дикого типу) проф. D.J. Rawlings (США). Суміш ДНК готували в середовищі без сироватки та за допомогою реагента Superfect (Qiagen, США) проводили трансфекцію плазмід IFN-Ig-Luc та TK-Renilla разом з конструкціями PKD2 та/або САRMA1 в pcDNA3.1. В якості контролю використовували порожній вектор pcDNA3.1. Через 40 годин після трансфекції проводили стимуляцію клітин антитілами до CD3 та CD28, половину кожного зразка відбирали для негативного контролю. Через 6 годин проводили лізис клітин в лізисному буфері фірми Promega (США). Рівень люмінесценції оцінювали за допомогою спектрофотометра Program Wallac Victor 3 tm 1420 multilabel counter (Perkin Elmer, США), використовуючи програмне забезпечення Wallac 1420 (Perkin Elmer Life Sciences, США). Кожен експеримент повторювали не менше трьох разів. Для всіх експериментів активність люциферази світлячка була нормалізована відносно люциферази Renilla. Для аналізу та інтерпретації даних використовували програму Excel (Microsoft, Redmond, США).

**Результати досліджень та їх обговорення.** Високий ступінь гомології PKD1 та PKD2 і відсутність специфічних антитіл для виявлення експресії цих кіназ сприяло початково створенню уявлень, що в В-лімфоцитах людини експресована PKD1. Однією з поставлених нами задач було з’ясування особливостей експресії PKD1 та PKD2 в клітинах лімфоїдного походження як на рівні білка, так і на рівні мРНК. Базуючись на різниці в молекулярній масі між PKD1 та PKD2, при використанні специфічних антитіл проти PKD2 у Вестерн-блот аналізі нами було з’ясовано, що в клітинних лініях лімфоїдного походження (досліджено 20 ліній клітин) та в зразках пухлин при різних формах неходжкінських злоякісних лімфом і при лімфомі Ходжкіна на рівні білка експресована PKD2, а не PKD1.

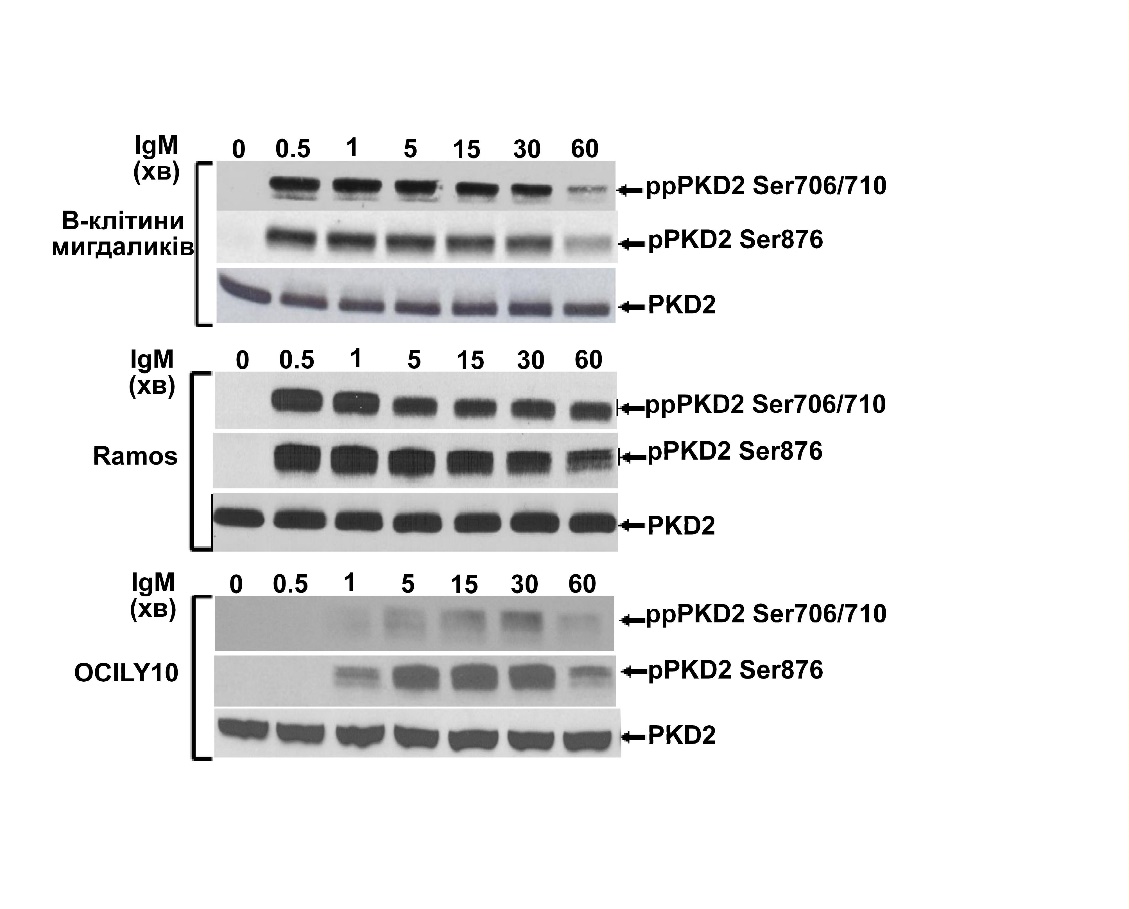
Наступним етапом досліджень стало підтвердження факту експресії PKD2 в клітинах лімфоїдного походження на рівні мРНК. Для цього спочатку були сконструйовані оптимальні праймери, специфічні для PKD1 та PKD2, і відпрацьовано умови проведення ЗТ-ПЛР із застосуванням плазмід pcDNA3.1.-PKD1 та pcDNA3.1-PKD2. Після проведення ЗТ-ПЛР у клітинах ліній Ramos, Jurkat, А431, А431/PKD1 та в плазміді pcDNA3.1-PKD2, яка була використана в якості позитивного контролю, візуалізували продукт ПЛР розміром 146 п.н, що відповідав довжині специфічного фрагменту мРНК PKD2 (рис. 1А). Фрагмент мРНК PKD1 довжиною 207 п.н. було виявлено в клітиній лінії А431 з надекспресією PKD1 та в плазміді pcDNA3.1-PKD1, яку було використано як позитивний контроль для PKD1 (рис. 1А). Для верифікації отриманих нами результатів щодо експресії PKD2 в лімфоїдних клітинах, необхідно було провести секвенування продукту ПЛР. Для цього було виділено та очищено кДНК з гелю для подальшого сіквенсу. Так як продукт ЗТ-ПЛР мав малий розмір, і його дуже складно просеквенувати окремо, для секвенування було використано вектор pCAPS.Було проведено клонування продуктів ПЛР, отриманих в трьох незалежних ЗТ-ПЛР з клітин Ramos, для подальшого сіквенсу. Послідовності секвенованих клонів було проаналізовано за допомогою програми BLAST і з‘ясовано, що всі три секвеновані плазміди містили послідовність, яка є специфічною виключно для PKD2 (рис. 1Б).



**Рис. 1.** А-Експресія PKD1 та PKD2 на рівні мРНК в клітинних лініях Ramos, Jurkat, А431 та А431-PKD1 за допомогою диференційної ЗТ-ПЛР. Б-Послідовність секвенованого фрагменту PKD2.

Таким чином, нами було з’ясовано, що в клітинних лініях лімфоїдного походження на рівні мРНК присутня PKD2, а не PKD1.

В даній роботі була показана ВКР-залежна активація PKD2 (рис. 2). Важливо, що нами було виявлено фосфорилювання як сайту трансфосфорилювання, який локалізований в активаційній петлі кіназного домену фермента, так і сайту аутофосфорилювання, фосфорилювання якого свідчить про активацію PKD2. Активація PKD2 була виявлена як в нормальних В-лімфоцитах, виділених з мигдаликів, так і в злоякісно трансформованих В-клітинних лініях, що походять з різних НХЛ, а саме в лініях клітин Ramos (лімфома Беркітта) та OСILY10 (ДКВЛ). Зазначимо, що клітини лінії Ramos не відрізнялись від нормальних В-лімфоцитів мигдаликів за кінетикою ВКР-опосередкованого фосфорилювання PKD2: відмічено фосфорилювання PKD2 вже через 30 сек, яке поступово зменшувалось протягом 60 хв активації через ВКР. Клітини лінії OСILY10 відрізнялись за кінетикою активації PKD2 від вище зазначених клітин, що може бути обумовлено біологічними характеристиками цих клітин.



**Рис. 2.** Індукція фосфорилювання PKD2 в нормальних та злоякісно трансформованих В-лімфоцитах при стимуляції через ВКР.

Нами встановлено, що ВКР-опосередкована активація PKD2 в нормальних В-лімфоцитах мигдаликів супроводжується внутрішньоклітинною релокалізацією цієї кінази. Активація PKD2 відбувається в місцях її зв’язування з ВКР, після чого аутофосфорилювання цієї кінази поширюється по цитоплазмі клітин і вже через 30 хв аутофосфорильовану PKD2 можна виявити в ядрі клітин. Більш того, кількість активованої PKD2 в ядрі В-лімфоцитів зростала протягом години активації через ВКР. Через дванадцять годин активна PKD2 була присутня в ядрі В-лімфоцитів, в той час як в цитоплазмі клітин PKD2 вже була неактивною. Ці дані щодо релокалізації активної PKD2 мають велике значення для розуміння функцій цієї кінази в різних компартментах лімфоцитів. Якщо в цитоплазмі PKD2 відіграє критичну роль в регуляції формування, відшнуровування і транспорту везикул від апарату Гольджі, то в ядрі функції кіназ родини PKD пов’язують з процесами апоптозу, організації хроматину та епігеномною регуляцією роботи генів, а саме їх участю у фосфорилюванні гістондеацетилаз (HDAC) та c-jun (R. Waldron et al., 2007, Q.Huynh et al., 2006 ).

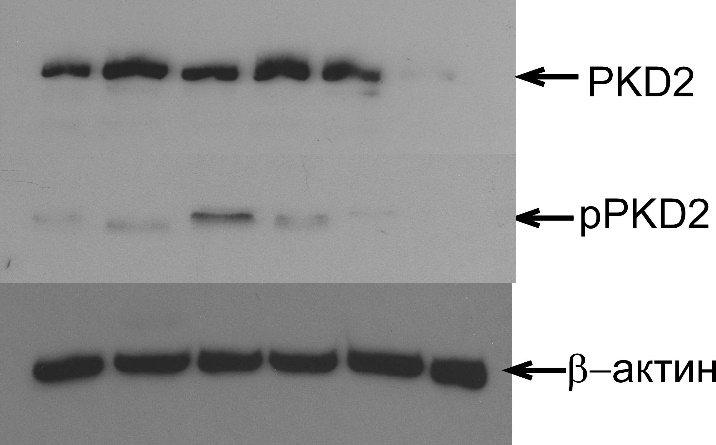
Оскільки результати по внутрішньоклітинній релокалізації PKD2 було отримано в модельних експериментах *in vitro,* важливо було з’ясувати, чи відбувається подібна активація PKD2 також в лімфоцитах *in situ*. Для цього було проведено імуногістохімічні дослідження експресії PKD2 на зрізах тканин мигдаликів та реактивно змінених лімфатичних вузлів. Аналіз експресії, внутрішньоклітинної локалізації та аутофосфорилювання PKD2 свідчить про те, що в мантійній зоні лімфоїдних фолікулів, де присутні малі неактивовані лімфоцити, PKD2 експресована переважно в цитоплазмі і не виявлено її аутофосфорилювання. В клітинах зародкового центру активована/аутофосфорильована PKD2 експресована як в цитоплазмі, так і в ядрі клітин, причому найвищий рівень активованої PKD2 виявлено в ядрі В-лімфоцитів світлої зони зародкового центру.

Для з‘ясування рівня експресії та аутофосфорилювання PKD2 в різних субпопуляціях зрілих В-клітин нами був проведений Вестерн-блот аналіз рівня експресії та аутофосфорилювання PKD2 у виділених із мигдаликів субпопуляціях В-клітин, а саме: наївних В-лімфоцитах (CD19+IgD+CD27-CD38-CD138-), клітинах зародкових центрів (CD19+IgD-CD27+/-CD38+CD138-), В-клітинах пам’яті (CD19+IgD+/-CD27+CD38-CD138-), плазмабластах (CD19+/-IgD-CD27+highCD38+high CD138-) та плазматичних клітинах (CD19+/-CD138+). Показано, що майже однаковий рівень експресії PKD2 спостерігається на різних стадіях диференціювання В-клітин: від наївних В-клітин, що є попередниками В-клітин зародкових центрів лімфоїдних фолікулів, до плазмабластів. В той же час, в плазматичних клітинах рівень експресії PKD2 був суттєво нижчим (рис. 3А). Ці результати були підтверджені з використанням проточної цитофлуориметрії шляхом одномоментного фарбування п’яти різних поверхневих рецепторів та внутрішньоклітинної PKD2 (рис. 3Б).

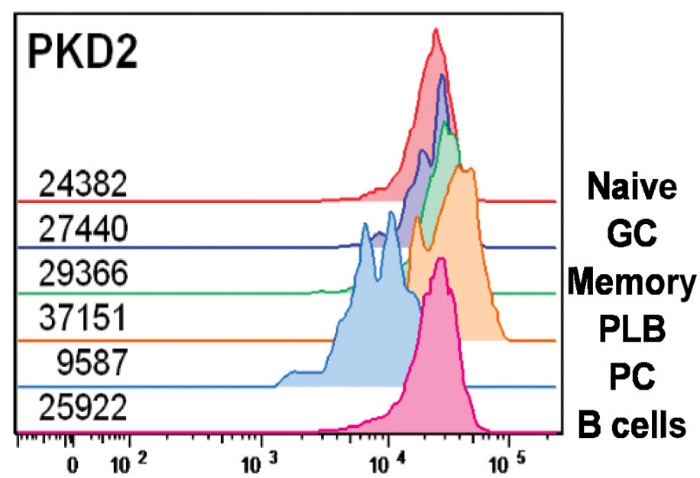
В той же час, найвищий рівень аутофосфорилювання PKD2 було відмічено в В-клітинах зародкових центрів, для яких характерним є поверхневий фенотип активованих В-клітин. Таким чином, нами продемонстровано, що рівень аутофосфорилювання PKD2 корелює з фенотипом зрілих В-клітин.

Оскільки нами був виявлений неоднаковий рівень експресії та аутофосфорилювання PKD2 в різних субпопуляціях нормальних В-лімфоцитів, виникло запитання щодо рівня експресії та аутофосфорилювання PKD2 в злоякісно трансформованих В-лімфоцитах. Для відповіді на це запитання було проведено імуногістохімічний аналіз біопсійного матеріалу лімфатичних вузлів пацієнтів з різними гістологічними варіантами класичної лімфоми Ходжкіна та різними формами неходжкінських злоякісних лімфом.

При лімфомі Ходжкіна характерна низька частота злоякісно трансформованих клітин Ходжкіна та Березовcького-Штернберга (ХБШ), які знаходяться в мікрооточенні реактивних Т- і В-лімфоцитів, еозинофілів, макрофагів, гістіоцитів та інш. У всіх досліджених випадках лімфоми Ходжкіна нами виявлено підвищену активність PKD2 лише в клітинах Ходжкіна та Березовcького-Штернберга, проте експресія PKD2 була відмічена як в злоякісно трансформованих, так і в лімфоїдних клітинах уражених лімфатичних вузлів.



**В Н ЗЦ КП ПБ ПК**



Н

ЗЦ

КП

ПБ

ПК

В

**A**

**Б**

**Рис. 3.** Експресія PKD2 та аутофосфорильованої PKD2 (pPKD2) в субпопуляціях нормальних В-лімфоцитів.

В- В-клітини, КП – В-клітини пам’яті, Н – наївні В-клітини, ЗЦ – клітини зародкових центрів, ПБ – плазмабласти, ПК – плазматичні клітини.

А- Вестерн-блот аналіз субпопуляцій В-лімфоцитів людини, що були виділені за допомогою сортування на проточному цитофлуориметрі.

Б-Цитофлуориметричний аналіз внутрішньоклітинної експресії PKD2 в субпопуляціях В-клітин після одномоментного виявлення п‘яти поверхневих антигенів.

Нами було показано, що при НХЛ з малих лімфоцитів, лімфомах з клітин мантійної зони та лімфомі Беркітта спорадичного типу експресія РКD2 спостерігалась в цитоплазмі клітин, причому в абсолютній більшості випадків РКD2 була неактивною (відсутнє аутофосфорилювання), що корелювало з рівнем експресії та аутофосфорилювання РКD2 в наївних В-лімфоцитах, В-клітинах пам’яті та мантії лімфоїдних фолікулів, які є нормальним аналогом злоякісно трансформованих клітин при цих формах НХЛ (табл.1).

Дифузні крупноклітинні В-клітинні лімфоми є найбільш поширеним гістологічним варіантом НХЛ. До ДКВЛ відносять різні В-клітинні НХЛ, які можуть виникати *de novo* в результаті клональної експансії антиген-активованих В-клітин, або шляхом прогресії та трансформації фолікулярних НХЛ.

В нашій роботі було виявлено гетерогенність ДКВЛ за рівнем експресії, аутофосфорилювання та внутрішньоклітинної локалізації PKD2, що дало змогу виділити три групи ДКВЛ, злоякісні клітини яких також відрізнялись за рівнем експресії PKСІІ, а також транскрипційних факторів, які характеризують різні стадії диференціювання В-клітин.

Таблиця 1

**Експресія та аутофосфорилювання PKD2 при різних формах неходжкінських злоякісних лімфом та лімфомі Ходжкіна**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Лімфома | Імунофенотип злоякісно трансформованих клітин | PKD2 | pPKD2 |
| ЛМЛ  (n = 17) | IgM+, CD5+, CD10-, CD19+(нр), CD20+(нр), CD22+(нр), CD23+. | ++/+++ | -/+ |
| ЛМЗ  (n = 2) | IgM+, CD5+, CD10-, CD19+, CD20+, CD22+, CD23-. | -/+ | -/+ |
| ЛБ  (n = 3) | IgM+, CD5-, CD19+, CD20+, CD22+, CD23-, CD10+/-. | + | -/+ |
| ЗЦ-ДКВЛ  (n = 44) | IgM+/-, CD5+/-, CD10+/-, CD19+, CD20+, CD22+ | ++/+++ | ++ |
| АВК-ДКВЛ  (n = 7) | IgM+/-, CD5-, CD10-, CD19+, CD20+/-, CD22+, CD30+, CD150+ | +++ | +++ |
| ЛПЛ  (n = 1) | sIgM+, cyIgM+, CD5-, CD10-, CD19+, CD20+, CD22+ | ++ | + |
| ЛХ (клітини ХБШ)  (к = 43) | IgM-, CD19-, CD20-, CD22-, CD30+/-, CD150+ | +++ | ++ |

нр – низький рівень

ЛМЛ – лімфома з малих лімфоцитів,

ЛМЗ – лімфома з клітин мантійної зони,

ЛБ – лімфома Беркітта спорадичного типу,

ЗЦ-ДКВЛ – дифузна крупноклітинна В-клітинна лімфома з клітин зародкового центру,

АВК-ДКВЛ – дифузна крупноклітинна В-клітинна лімфома з фенотипом активованих В-клітин,

ЛПЛ – лімфоплазмацитарна лімфома,

ЛХ – лімфома Ходжкіна.

В першій групі з низьким рівнем фосфорилювання PKD2 та високим рівнем експресії IFR4 і Bcl-6 в цитоплазмі, не була виявлена експресія PKCII. В другій групі ДКВЛ при помірному рівні фосфорилювання PKD2 в цитоплазмі клітин було відмічено помірний рівень експресії PKCII, а також відсутність IFR4 на фоні високого рівня експресії Bcl-6. Для третьої групи ДКВЛ був характерний високий рівень фосфорилювання PKD2 як в цитоплазмі, так і в ядрі, високий рівень експресії PKCII в цитоплазмі та IFR4 в ядрі клітин, а також відсутність Bcl-6 (табл. 2).

Таблиця 2

**Розподіл хворих на ДКВЛ за рівнем експресії, аутофосфорилювання та внутрішньоклітинною локалізацією PKD2 (H-score)**

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Група | #випадок | PKD2 | pPKD2 | PKC | IRF4 | Bcl-6 |
| I | 5 | 104 (Ц)\* | 68(Ц) | 32 | 245(Ц) | 232(Ц) |
| I | 101 | 123 (Ц) | 55(Ц) | 21 | 234(Ц) | 254(Ц) |
| I | 102 | 167 (Ц) | 78(Ц) | 16 | 265(Ц) | 225(Ц) |
| I | 117 | 115 (яЦ)\*\* | 62(яЦ) | 18 | 221(Ц) | 238(Ц) |
| I | 181 | 156(яЦ) | 67(яЦ) | 22 | 258(Ц) | 247(Ц) |
| I | 189 | 129 (Ц) | 72 (Ц) | 24 | 268(Ц) | 260(Ц) |
| I | 207 | 161 (Ц) | 63(Ц) | 11 | 260(Я) \*\*\*\* | 210(Ц) |
|  |  |  |  |  |  |  |
| II | 17 | 132 (Ц) | 123 (Ц) | 143(Ц) | 59 | 235(ЯЦ) |
| II | 104 | 168(ЯЦ)\*\*\* | 156 (ЯЦ) | 129(Ц) | 67 | 224(ЯЦ) |
| II | 143 | 123 (Ц) | 129 (Ц) | 163(Ц) | 42 | 181(ЯЦ) |
| II | 147 | 131(Ц) | 138(Ц) | 112(Ц) | 26 | 241(ЯЦ) |
| II | 160 | 164 (ЯЦ) | 179(ЯЦ) | 181(Ц) | 24 | 221(ЯЦ) |
|  |  |  |  |  |  |  |
| III | 2 | 261 (ЯЦ) | 211 (ЯЦ) | 224(Ц) | 285(Я) | 24 |
| III | 4 | 254 (ЯЦ) | 247(ЯЦ) | 251(Ц) | 46(Я) | 31 |
| III | 46 | 271(ЯЦ) | 262(ЯЦ) | 263(Ц) | 279(Я) | 42 |
| III | 103 | 262(ЯЦ) | 258 (ЯЦ) | 242(Ц) | 265(Я) | 59 |
| III | 105 | 253(ЯЦ) | 246(ЯЦ) | 257(Ц) | 44(Я) | 14 |
| III | 172 | 249(ЯЦ) | 271(ЯЦ) | 249(Ц) | 278(Я) | 31 |

\*Ц – продукт імуногістохімічної реакції, локалізований в цитоплазмі;

\*\*яЦ- експресія білка спостерігається переважно в цитоплазмі і частково в ядрі;

\*\*\*ЯЦ- експресія білка спостерігається в ядрі і цитоплазмі на однаковому рівні;

\*\*\*\*Я - експресія білка спостерігається в ядрі.

Стадії диференціювання зрілих В-клітин людини характеризуються різною експресією факторів транскрипції IFR4 та Bcl-6 (U. Klein, R. Dalla-Favera, 2008). Так, маркером термінальних стадій диференціювання В-клітин є ядерна експресія IFR4 при відсутності Bcl-6 (I. Lossos, 2007). Тому можна вважати, що в третій групі ДКВЛ злоякісно трансформовані клітини походять з активованих В-клітин і плазмабластів. Це підтверджується тим, що злоякісно трансформовані клітини в зразках цього варіанту ДКВЛ мали фенотип активованих В-лімфоцитів. В той же час, для клітин зародкового центру, як і для злоякісно трансформованих клітин при другому варіанті ДКВЛ, характерною є експресія Bcl-6 (A. Shaffer, et al., 2000). Стосовно походження злоякісно трансформованих клітин при першому варіанті ДКВЛ можна зробити два припущення: можливо, вони походять з клітин-засновників зародкових центрів, в яких G. Cattoretti et al. (2006) виявили коекспресію IFR4 та Bcl-6. З іншого боку, ряд дослідників вважає коекспресію IFR4 та Bcl-6 в частині випадків ДКВЛ результатом аномальної регуляції експресії IFR4 та Bcl-6 на ранній стадії диференціювання клітин зародкових центрів (R.Dalla-Favera et al., 2007). Враховуючи вище зазначене, можна вважати, що виділені нами три групи ДКВЛ відрізняються за рівнем диференціювання злоякісно трансформованих клітин. Більше того, рівень фосфорилювання РКD2 та її внутрішньоклітинна локалізація корелює з рівнем диференціювання злоякісно трансформованих клітин. Важливо зазначити, що ці групи ДКВЛ відрізнялись і за рівнем експресії PKC, яка вважається прогностичним маркером для цієї форми НХЛ (Hans et al., 2005; Schaffel et al., 2007).

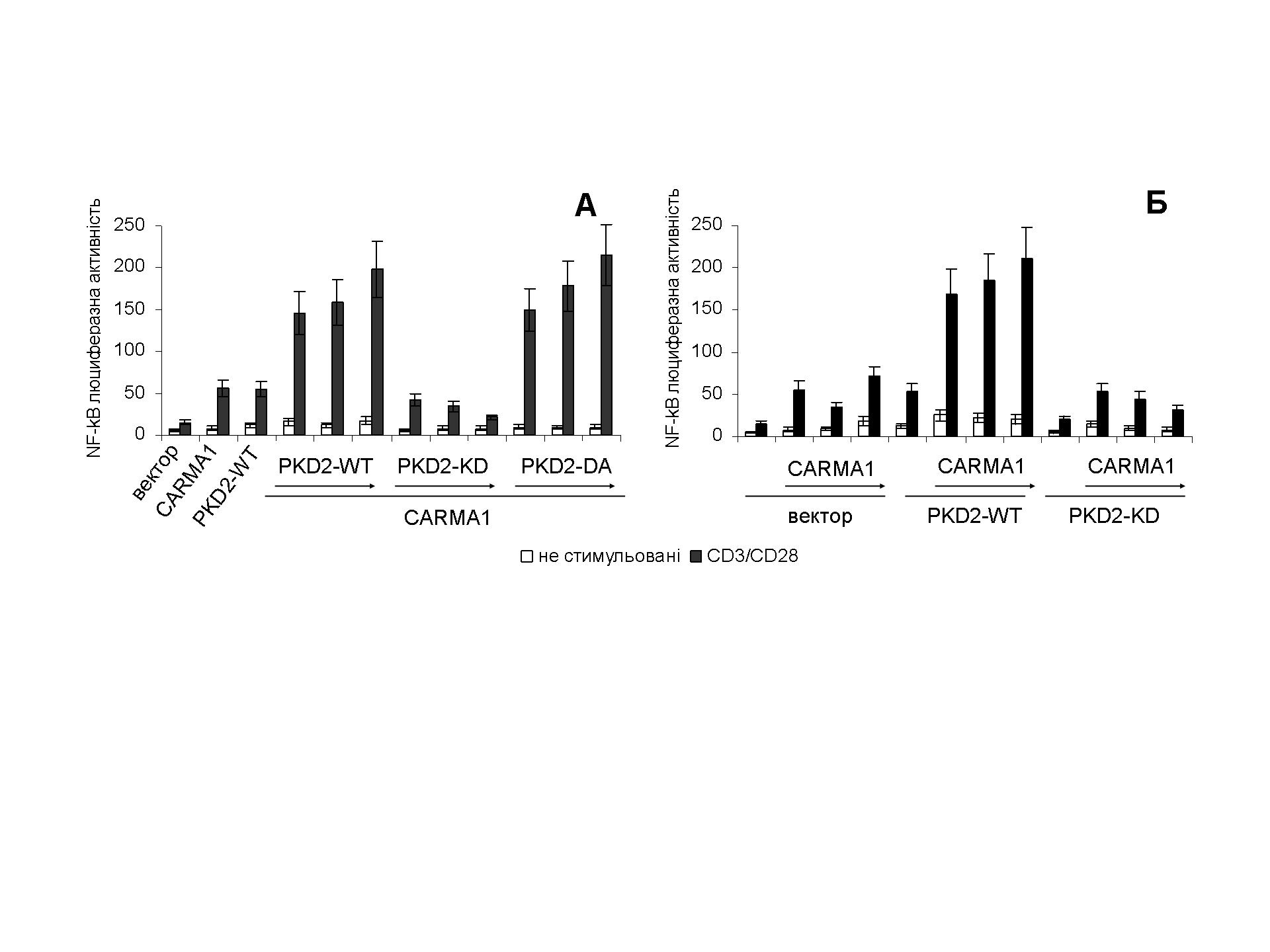
Таким чином, нами було з’ясовано, що як за рівнем експресії, так і за внутрішньоклітинною локалізацією РКD2, злоякісно трансформовані клітини при В-клітинних НЗЛ нагадують їх нормальні аналоги.

Для отримання відповіді на запитання чи існує функціональний зв’язок між експресією PKCβІІ та активністю PKD2, було розроблено модельну систему з надекспресією PKCβІІ. Для цього клітинні лінії SUDHL9 і Ramos були інфіковані за допомогою експресуючого лентівірусного вектора, який вміщував послідовність PKCβІІ. Лігація ВКР та стимуляція РМА/іономіцином призводила, відповідно, до підвищення рівня фосфорилювання PKD2 в клітинних лініях Ramos і SUDHL9 з надекспресією PKCβІІ. Більше того, підвищувався також рівень фосфорилювання HDAC, які є субстратом PKD2.

Оскільки активована PKD2 була виявлена при лімфомах, для яких характерний високий рівень активації NF-B, було зроблене припущення щодо участі PKD2 в NF-B сигнальному каскаді. Цю гіпотезу перевіряли на модельній системі в клітинах лінії Jurkat за допомогою люциферазної системи аналізу активності NF-B.

В даній роботі нами вперше було показано, що серин/треонін протеїнкіназа PKD2 бере участь у антиген-індукованій активації NF-B в злоякісно трансформованих клітинах (рис. 4А). Більше того, нами виявлено синергізм PKD2 з CARMA1 при активації канонічного CARMA1-NF-B каскаду (рис. 4Б). В наших дослідженнях було з’ясовано, що участь PKD2 в антиген-індукованій активації NF-B в злоякісно трансформованих Т-клітинах та її синергізм з CARMA1 повністю залежать від кіназної активності PKD2 (рис. 4Б).

Як видно з рис. 4, однієї тільки гіперекспресії CARMA1 та/або PKD2 недостатньо для активації NF-B в нестимульованих клітинах, що свідчить про необхідність додаткових антиген-опосередкованих сигналів для активації цього сигнального каскаду в злоякісно трансформованих клітинах. Механізм синергічної дії PKD2 і CARMA1 в антиген-опосередкованому канонічному каскаді активації NF-B поки ще невідомий. З одного боку, відомо, що PKD2 залучена до епігенетичної регуляції експресії генів через фосфорилювання HDAC, яка призводить до ядерного експорту цих ферментів і активації транскрипції генів, ймовірно, і генів субодиниць NF-B. З іншого, потенційними субстратами PKD2 можуть бути CARMA1 та IKKβ кіназа – компоненти NF-B сигнального каскаду.



**Рис. 4.** Синергізм PKD2 та CARMA1 в антиген-індукованій активації NF-B в клітинах Jurkat.

**А, Б** – надекспресія PKD2 підвищує рівень антиген-індукованої активації NF-B; синергізм PKD2 з CARMA1 при активації канонічного CARMA1-NF-B каскаду. **А** -трансфекцію проводили при сталій концентрації CARMA1(35 нг) та при збільшенні концентрацій (35, 65 та 133 нг) конструкцій PKD2-WT, PKD2-KD (неактивна) тa PKD2-DA (постійно активована). Б-дозозалежна трансфекція CARMA1-WT (дикий тип) при сталій концентрації вектора, PKD2-WT та PKD2-KD (35, 65 та 133 нг).

Таким чином, можливі два варіанти кооперації PKD2 з антиген-опосередкованим канонічним шляхом активації NF-B: в цитоплазмі на рівні взаємодії з CARMA1 сигналосомою чи інгібіторними білками ІB, або в ядрі клітин через епігенетичні механізми, наприклад, PKD2-опосередкованого фосфорилювання HDAC. Отримані нами дані свідчать, що генетичні та епігенетичні порушення, які можуть призвести до надекспресії та гіперактивації PKD2, недостатньо для активації сигнального шляху NF-B в злоякісно трансформованих лімфоцитах людини. В той же час, гіперактивація PKD2 на фоні антигенної стимуляції лімфоцитів може призводити до прогресії пухлинного процесу.

Важливість сигнального каскаду NF-B для фізіологічної активації проліферації лімфоцитів та їх виживання добре відома (G. Packham, 2008). Але не так давно стало зрозумілим, що виникнення та патогенез злоякісних лімфом людини тісно пов’язаний з порушеннями цього сигнального каскаду (P. Jost, J. Ruland, 2007; G. Packham, 2008). Результати експериментальних та доклінічних досліджень свідчать про доцільність спрямування терапії хворих на лімфоми шляхом пригнічення сигнального шляху NF-B. Широкий спектр ендогенних та екзогенних факторів може впливати на сигнальний каскад NF-B. Хоча були виявлені деякі генетичні порушення в генах, що кодують білки NF-B та їх безпосередні регулятори, роль і механізми регуляції інших білків, що також можуть бути залучені до активації цього сигнального каскаду, ще не з’ясовані. Отримані нами дані щодо експресії і аутофосфорилювання PKD2 в нормальних та злоякісно трансформованих В-клітинах людини, гетерогенності ДКВЛ по рівню аутофосфорилювання та внутрішньоклітинній локалізації цього фермента, а також можливої участі PKD2 в активації сигнального шляху NF-B, свідчать про перспективність використання цього фермента в якості потенційного прогностичного маркера та мішені для направленої терапії певних гістологічних варіантів лімфом з підвищеним рівнем активності NF-B.

**ВИСНОВКИ**

В результаті комплексного дослідження встановлено, що рівень експресії, аутофосфорилювання та внутрішньоклітинна локалізація PKD2 залежать від рівня диференціювання та активації нормальних і злоякісно трансформованих В-лімфоцитів. Підвищення активності PKD2 в злоякісно трансформованих лімфоцитах може сприяти виживанню пухлинних клітин шляхом активації NF-B сигнального каскаду.

1. Встановлено, що в нормальних та злоякісно трансформованих В-лімфоцитах людини експресована PKD2, а не PKD1.

2. З’ясовано, що окремі субпопуляції зрілих В-лімфоцитів людини відрізняються за рівнем експресії PKD2. Найвищий рівень експресії PKD2 відмічено в плазмабластах та В-клітинах пам’яті, а найнижчий - в плазматичних клітинах. Виявлена залежність між стадією диференціювання первинних В-лімфоцитів і рівнем аутофосфорилювання PKD2.

3. Виявлено BКР-залежну активацію та релокалізацію PKD2 з цитоплазми до ядра в нормальних і злоякісно трансформованих В-лімфоцитах людини.

4. З‘ясовано, що для злоякісно трансформованих клітин хворих на лімфому з малих лімфоцитів, лімфому з клітин мантійної зони та лімфому Беркітта спорадичного типу характерна цитоплазматична експресія PKD2 та низький рівень її аутофосфорилювання. При лімфомі Ходжкіна високий рівень експресії та аутофосфорилювання PKD2 виявлено переважно в цитоплазмі та ядрі клітин Ходжкіна та Березовського-Штернберга.

5. Виділено три групи хворих на дифузну крупноклітинну В-клітинну лімфому, злоякісні клітини яких мають різний рівень диференціювання і відрізняються за внутрішньоклітинною локалізацією, рівнем експресії і аутофосфорилюванням PKD2 і експресією відомого прогностичного маркера цього гістологічного варіанта лімфом – PKCII.

6. Встановлено, що надекспресія PKCII в злоякісно трансформованих В-клітинах призводить до підвищення рівня активації PKD2 і фосфорилювання HDAC.

7. З’ясовано, що надекспресія PKD2 підвищує рівень антиген-індукованої активації NF-B. Показано синергізм дії PKD2 з CARMA1 в активації NF-B, що повністю залежить від кіназної активності PKD2.

**СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ**

1. Immunohistochemical studies of protein kinase D (PKD) 2 expression in human lymphomas / L.M.Kovalevska, O.V. Yurchenko, L.M. Shlapatska, G.G. Berdova, S.V. Mikhalap, J. Van Lint, S.P. Sidorenko // Experimental Oncology. – 2006. – V. 25, № 3. – P. 186-190. (Особистий внесок дисертанта: імуногістохімічні та біохімічні дослідження, участь в аналізі результатів та написанні статті).

2. Експресія та аутофосфорилювання протеїнкінази D2 в дифузних В-крупноклітинних лімфомах / Л.М. Ковалевська, О.В. Юрченко, С.В. Міхалап, Л.М. Шлапацька, Г.Г. Бердова, Е.М. Алексик, С.П. Сидоренко // Онкологія.- 2008. - T. 10, № 2. - C. 221-224. (Особистий внесок: імуногістохімічні дослідження, участь в аналізі результатів та написанні статті).

3. Протеїнкіназа D2 (PKD2) бере участь в TCR-опосередкованому сигнальному каскаді активації ядерного фактору транскрипції NF-B / Л.М. Ковалевська, С.В. Міхалап, Л.М. Шлапацька, Г.Г. Бердова, Д.Дж. Ролінгс, М.Морено-Гарсія, С.П. Сидоренко // Укр. журнал гематології та трансфузіології. - 2008 - Т. 8, № 4, -C. 15-19. (Особистий внесок: люциферазний аналіз активності NF-B, участь в аналізі результатів та написанні статті).

4. Міхалап С.В. Kінази родини PKD у регуляції посттрансляційних модифікацій білків / С.В. Міхалап, Л.М. Ковалевська, С.П. Сидоренко // Укр. Біохім. Журнал. - 2008, Т. 80. № 4, C. 13-20. (Особистий внесок: автор здійснив пошук наукової літератури за темою огляду).

5. Evaluation of activated serine/theonine kinase PKD in normal and malignant lymphocytes in situ / L.М. Kovalevska, O.V. Yurchenko, G.G. Berdova, S.V. Mikhalap // The FEBS Journal. -2003. -V. 270, № 1. - P. 189.

6. The level of PKD expression and phosphorylation in lymphocytes / L.М. Kovalevska, O.V. Yurchenko, G.G. Berdova, S.V. Mikhalap, J. Van Lint., S.P. Sidorenko // Abstract book Conference for young scientists of molecular biology and genetics.- Кyiv, Ukraine, 2003. -P.160.

7. The role protein kinases D in B cell signaling / S.V. Mikhalap, L.M. Kovalevska, O.V. Yurchenko, J.R.Vandenheede, J. Van Lint, T. Seufferlein, S.P. Sidorenko // Український біохімічний журнал. - 2005. – T. 77, № 2. - C. 27.

8. Експресія і активність PKD2 при неходжкінських злоякісних лімфомах / С.В. Міхалап, Л.М. Ковалевська**,** О.В. Юрченко, Г.Г. Бердова, С.П. Сидоренко // Гематологія і трансфузіологія: фундаментальні та прикладні питання. -2005, - T. 5, № 4. -Р.53-54.

9. Визначення рівня експресії та фосфорилювання протеїнкінази D2 *in situ* / Л.М. Ковалевська, С.В. Міхалап, О.В. Юрченко, Г.Г. Бердова, С.П. Сидоренко // Тези VII Міжнародної конференціі молодих онкологів „Сучасні проблеми експериментальної і клінічної онкології”. - Київ, 2006. – C. 42.

10. Протеїнкіназа D2 (PKD2) приймає участь в сигнальному каскаді активації ядерного фактора транскрипції NF-B / Л.М. Ковалевська, Л.М. Шлапацька, С.В. Міхалап, М. Морено-Гарсія, К. Соммерс, Д.Дж. Ролінгс, С.П. Сидоренко // Збірник тез 2-го з’їзду Українського товариства клітинної біології. Київ, 2007. -С.158.

11. The role of protein kinase D2 in BCR mediated signaling in normal and malignant B lymphocytes / S.P. Sidorenko, S.V. Mikhalap, L.M. Kovalevska, L.M. Shlapatska, G.G. Berdova, D.J. Rawlings // In: 14th symposium on signals and signal processing in the immune system. Balatonoszod, Hungary. – 2007. -Р. 56.

12. PKD2 expression and autophosphorylation in primary normal B lymphocytes and diffuse large B cell lymphomas / L. Kovalevska, S. Mikhalap, O. Yurchenko, G. Berdova, S. Sidorenko // Acta Biochimica Polonica. Poland. -2007. - V. 54, № 2. - Р. 20.

13. Експресія та функції протеїнкінази D2 в нормальних та злоякісно трансформованих В-лімфоцитах / Л.М. Ковалевська, С.В. Міхалап, О.В. Юрченко, Л.М. Шлапацька, Г.Г. Бердова, С.П. Сидоренко // Тези доповідей конференції „Актуальні проблеми біохімії та біотехнології - 2008”. - Київ, Україна. - 2008. - С. 20.

14. Kinases of PKD family as a potential object of translational research in oncology / S.P. Sidorenko, L.M. Kovalevska, M.Y. Shabelnik, G.G. Berdova, L.M. Shlapatska, S.V. Mikhalap // Abstracts of international conference “Tumor hypoxia and malignant progression”. Kiev, Ukraine. -2008. -P.20.

АНОТАЦІЯ

**Ковалевська Л.М. Експресія протеїнкінази D2 в нормальних та злоякісно трансформованих В-лімфоцитах людини.** – Рукопис.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 14.01.07 – онкологія. Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України, Київ - 2009.

Дисертація присвячена вивченню експресії, аутофосфорилювання та внутрішньоклітинної локалізації серин/треонін протеїнкінази D2 (PKD2) в нормальних та злоякісно трансформованих В-лімфоцитах людини. Показано, що як на рівні мРНК, так і на рівні білку В-лімфоцити людини експресують PKD2, а не PKD1.

Були досліджені рівні експресії та аутофосфорилювання PKD2 в різних субпопуляціях нормальних В-лімфоцитів. Виявлено антиген залежну активацію PKD2 як в нормальних, так і в злоякісно трансформованих В-клітинах. Показано, що при ВКР-індукованій активації В-клітин відбувається внутрішньоклітинна релокалізація PKD2 з цитоплазми до ядра.

На біопсійному матеріалі було показано, що для злоякісно трансформованих клітин при лімфомі з малих лімфоцитів, лімфомі з клітин мантійної зони та лімфомі Беркітта спорадичного типу характерним є помірний рівень експресії PKD2 та низький рівень її аутофосфорилювання. При класичній лімфомі Ходжкіна високий рівень експресії та аутофосфорилювання PKD2 відмічено в цитоплазмі та ядрі переважно в клітинах Ходжкіна та Березовського-Штернберга.

Дифузні крупноклітинні В-клітинні лімфоми (ДКВЛ) були гетерогенними за внутрішньоклітинною локалізацією, рівнем експресії і аутофосфорилюванням PKD2. Нами було виділено три групи ДКВЛ, злоякісні клітини яких мали різний рівень диференціювання і відрізнялись за внутрішньоклітинною локалізацією, рівнем експресії і аутофосфорилюванням PKD2 і експресією PKCII, яка, як відомо, є прогностичним маркером для даної форми лімфом.

Лігація ВКР та стимуляція РМА/іономіцином в пухлинних В-клітинних лініях з надекспресією PKCβІІ призводила до підвищення рівня фосфорилювання PKD2 та гістондеацетилаз, які є субстратом кіназ родини PKD.

В дослідах *in vitro* з’ясовано, що PKD2 бере участь в антиген-індукованій активації NF-B в злоякісно трансформованих клітинах. Нами виявлено синергізм PKD2 з CARMA1 при активації канонічного CARMA1-NF-B каскаду, який повністю залежить від кіназної активності PKD2.

*Ключові слова:* протеїнкіназа D2, аутофосфорилювання, неходжкінські злоякісні лімфоми, лімфома Ходжкіна, NF-B.

АННОТАЦИЯ

**Ковалевская Л.М. Экспрессия протеинкиназы D2 в нормальных и злокачественно трансформированных В-лимфоцитах человека.** – Рукопись.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 14.01.07 – онкология. Институт экспериментальной патологии, онкологии и радиобиологии им. Р.Е. Кавецкого НАН Украины, Киев – 2009.

Диссертация посвящена исследованию уровня экспрессии, аутофосфорилирования и внутриклеточной локализации серин/треонин протеинкиназы D2 (PKD2) в нормальных и злокачественно трансформированных В-лимфоцитах человека.

Показано, что как на уровне мРНК, так и на уровне белка, В-лимфоциты человека экспрессируют PKD2, а не PKD1.

Были исследованы уровни экспрессии и аутофосфорилирования PKD2 в разных субпопуляциях нормальных В-лимфоцитов. Клетки зародышевых центров имели высокий уровень экспрессии аутофосфорилированной PKD2 при отсутствии такой в плазматических клетках.

Выявлено антиген-зависимую активацию PKD2 как в нормальных, так и злокачественно трансформированных В-клетках. В модельных экспериментах *in vitro* было показано, что внутриклеточная релокализация PKD2 из цитоплазмы в ядро происходит при ВКР-индуцированной активации В-клеток.

На биопсийном материале лимфатических узлов было выявлено, что злокачественно трансформированные клетки лимфомы из малых лимфоцитов, лимфомы из клеток мантийной зоны и лимфомы Беркитта спорадического типа характеризовались средним уровнем экспрессии PKD2 и низким уровнем ее аутофосфорилирования. В классической лимфоме Ходжкина высокий уровень експресии и аутофосфорилирования PKD2 выявлены в цитоплазме и ядрах клеток Ходжкина и Березовского –Штернберга.

Диффузные крупноклеточные В-клеточные лимфомы (ДКВЛ) были гетерогенными по внутриклеточной локализации, уровню экспрессии и аутофосфорилирования PKD2, что послужило основанием для выделения трех групп ДКВЛ. Кроме того, злокачественно трансформированные клетки отличались по уровню экспрессии PKCII, которая является прогностическим маркером для данного вида лимфом, а также факторов транскрипции IRF4 и Bcl-6.

Для ответа на вопрос о существовании функциональной связи между экспрессией PKCβІІ и активностью PKD2, была разработана модельная система с гиперэкспрессией PKCβІІ на основе злокачественно трансформированных клеток Ramos (лимфома Беркитта) и SUDHL9 (диффузная крупноклеточная В-клеточная лимфома). Лигация ВКР и стимуляция РМА/иономицином опухолевых клеток вела к увеличению уровня фосфорилирования PKD2 в клетках с гиперэкспрессией PKCβІІ, более того, она приводила к повышению уровня фосфорилирования гистондеацетилаз, которые являются субстратами PKD2.

На модельной системе лимфоидных клеток с использованием люциферазного теста для анализа активности NF-B было выяснено, что PKD2 принимает участие в антиген-индуцированной активации NF-B. Более того, нами выявлено синергизм PKD2 с CARMA1 при активации канонического пути CARMA1 - NF-B каскада. В наших исследованиях было показано, что участие PKD2 в антиген-индуцированной активации NF-B в злокачественно трансформированных клетках и ее синергизм с CARMA1 полностью зивисит от киназной активности PKD2.

Таким образом, было показано, что повышенная активность PKD2 в злокачественно трансформированных лимфоцитах человека может способствовать выживанию опухолевых клеток путем активации NF-B сигнального каскада.

*Ключевые слова:* протеинкиназа D2, аутофосфорилирование, неходжкинские злокачественные лимфомы, лимфома Ходжкина, NF-B.

Summary

**Kovalevska L.M. Expression of protein kinase D2 in normal and malignant human B lymphocytes**. – Manuscript.

Thesis for the Degree of Doctor of Philosophy (PhD) in biology, Speciality 14.01.07 – oncology. – R.E. Kavetsky Institute of Experimental Pathology Oncology and Radoibiology of National Academy of Sciences of Ukraine. Kyiv – 2009.

The work was aimed on the study of expression, autophosphorylation and intracellular localization of protein kinase D2 (PKD2) in normal and malignant human B lymphocytes. We found that the PKD2, but not the PKD1, is expressed on mRNA and protein level in normal and malignant human B cells.

The level of PKD2 expression and autophosphorylation was studied in different subpopulations of normal mature B cells. Our studies indicate that PKD2 is a downstream target of BCR signals in normal B lymphocytes, as well as in malignant B cells. BCR activation initiates PKD2 autophosphorylation and progressive sustained nuclear relocalization in primary normal B lymphocytes.

Using biopsies of primary tumors we showed that tumor cells in small lymphocytic lymphoma, mantle cell lymphoma and sporadic Burkitt’s lymphoma had the moderate level of PKD2 expression and low level of PKD2 autophosphorylation. The high level of PKD2 expression and autophosphorylation was found in Reed-Sternberg cells in classical Hodgkin’s lymphoma.

Diffuse large B cell lymphomas (DLBCL) were heterogenic by PKD2 intracellular localization, expression level and autophophosphorylation. We subdivided DLBCL cases in three groups based on the level of cell differentiation, PKD2 intracellular localization, expression level and autophophosphorylation, and expression level of PKCII, known to be a prognostic factor for DLBCL.

It was shown that PKC overexpression led to a marked BCR-dependent increase in PKD2 autophosphorylation in human B cell lines. Moreover, it also promoted receptor-driven phosphorylation of HDACs, which are suggested to be substrates for PKDs.

Using experimental model system we demonstrated *in vitro* that PKD2 is involved in antigen induced activation of NF-B and can synergize with CARMA1 to promote antigen receptor triggered NF-B transcriptional activity.

*Key words:* protein kinase D2, autophosphorylation, Non-Hodgkin’s lymphoma, Hodgkin’s lymphoma, NF-B.

 Для заказа доставки данной работы воспользуйтесь поиском на сайте по ссылке: <http://www.mydisser.com/search.html>