

*Пашкова О.Л.¹, Рукша К.Г.², Северин И.Н.³, Портянко А.С.^{2,3},
Дорошенко Т.М.^{1,3}*

Изучение тубулинов клеточных линий лимфом человека

¹ ГУ «РНПЦ трансфузиологии и медицинских биотехнологий»,
г. Минск, Беларусь

² УО «Белорусский государственный медицинский университет»,
г. Минск, Беларусь

³ ГУ «РНПЦ онкологии и медицинской радиологии
им. Н.Н. Александрова», г. Минск, Беларусь

Микротрубочки представляют собой полые длинные филаменты, состоящие из димеров α - и β -тубулина, которые могут быть представлены различными изотипами. Они являются динамичными структурами, которые постоянно укорачиваясь и удлиняясь, обеспечивают в клетке ряд жизненно важных процессов, таких как сегрегация хромосом

в процессе деления, внутриклеточный транспорт, подвижность, поддержание формы и тургора клетки. Различные изменения в составе и пост-трансляционной модификации клеточных тубулинов происходят в канцерогенезе как солидных, так и гематологических опухолей. Эти изменения часто ассоциированы с химиорезистентностью и плохим прогнозом для целого ряда нозологий. Показана роль β_{III} -тубулина как маркера плохого прогноза и ответа на широкий круг цитостатических препаратов при целом ряде эпителиальных раков. Нормальная лимфоидная ткань лимфоузлов экспрессирует свой уникальный набор тубулинов, с преобладанием β_I - и β_{IV} -тубулина, однако необходимо знать, что происходит с экспрессией тубулинов при злокачественной трансформации и лимфоме, для установления возможной прогностической ценности ответа на терапию.

Целью нашего исследования было изучить экспрессию основных изоформ тубулина в клеточных линиях неходжкинских лимфом человека методами вестерн-блоттинга и иммунофлуоресценции.

Материалы и методы. Клетки линий лимфом человека Daudi, Namalwa, U-937, Raji культивировали в полной среде RPMI1640, содержащей 5% эмбриональной телячьей сыворотки в температуре +37°C и в атмосфере, содержащей 5% CO₂. В качестве контроля использовали лимфоциты здоровых доноров. Из клеточной суспензии готовили цитоспины на центрифуге Cytospin 4 (Termo scientific) согласно рекомендациям производителя и клеточные лизаты с лизирующим буфером (RIPA). Лизат подвергали электрофоретическому разделению по методу Лэмли в полиакриламидном геле (12,5%) в денатурирующих условиях с додецилсульфатом натрия, после чего белковые фракции переносили с помощью электроэлюции из геля на нитроцеллюлозные мембраны «Hybond C». Их инкубировали с антителами мыши к ацетилированному α -тубулину, β_{IV} -, β_{III} -тубулину, β_I -тубулину или β -актину в концентрации 2-5 мкг/мл в течение 18 ч на холоду, затем отмывали и инкубировали с антителами против мышиных иммуноглобулинов, меченных полипероксидазой («EnVision», DAKO) и проявляли с помощью хромогена диаминобензидин (BioGenex). Мембраны после окраски анализировали на Kodak Image Station 2000R. Иммунофлуоресценцию проводили с использованием аналогичных первичных антител, далее цитоспины инкубировали с анти-мышинными антителами, меченными Alexa 488. Ядра окрашивались DAPI. Препараты заключались в специальную среду, содержащую анти-выцветающий агент (ProLong, Molecular Probes). Исследование стекол производилось в микроскопе с флуоресцентной осью Leica DM5000B.

Результаты. Обоими методами исследования установлено, что все клеточные линии характеризуются высоким уровнем экспрессии β_I -тубулина в сравнении с контролем (лимфоциты доноров), в то же время различаются по экспрессии β_{III} -тубулина и ацетилированного α -тубулина. Линии наиболее злокачественной В-лимфомы – Namalwa и Daudi характеризовались экспрессией β_{III} -тубулина и отсутствием либо слабовыраженной экспрессией ацетилированного α -тубулина, В контроле β_{III} -тубулин отсутствовал. Ранее было показана экспрессия β_{III} -тубулина в опухолевых клетках у 75% включенных в исследование пациентов с лимфомой Беркетта (Yoon S.O., 2010), однако в литературе отсутствующим данным об экспрессии изотипов тубулина в клеточных линиях лимфом. Также методом вестерн-блоттинга нам удалось визуализировать экспрессию β_{IV} -тубулина – она наблюдалась во всех линиях, но была разной степени выраженности.

Выводы. Таким образом, нами отработаны методы визуализации основных изотипов тубулина в клетках лимфом человека для последующего изучения изменений, происходящих в процессе формирования химиорезистентности *in vitro* и проведения исследований на клиническом материале. Показано, что в отличие от нормальных клеток, высокозлокачественные лимфомные клетки экспрессируют β_{III} -тубулин – изотип, ассоциированный с опухолевой прогрессией.