

ШВАЧКО Л.П.[✉], КРАВЧУК І.В., ТЕЛЕГЕСЬВ Г.Д.

Інститут молекулярної біології і генетики НАН України,

Україна, 03680, м. Київ, вул. Акад. Заболотного, 150, e-mail: shvachko.imbg@gmail.com

[✉]shvachko.imbg@gmail.com

ОСОБЛИВОСТІ МОЛЕКУЛЯРНОЇ ЕКСПРЕСІЇ ГЕНА ЛУЖНОЇ ФОСФАТАЗИ ПРИ ХРОНІЧНІЙ МІЄЛОЇДНІЙ ЛЕЙКЕМІЇ

Лужна фосфатаза (EC 3.1.3.1), орто-фосфат-моно-ефір фосфогідролаза (дефосфорилаза) відносяться до мембранно-зв'язаних глікопротеїнів та є показником фосфорно-кальцієвого обміну у клітині. За фізіологічного балансу клітинних процесів фосфорилування-дефосфорилювання лужна фосфатаза експресується на досить низькому рівні. Варто відзначити, що в організмі людини 4 гени кодують відомі 4 типи ізоферментів лужної фосфатази, а саме: IALP (intestinal) – кишкова, PLALP (placental-like) – плацентарно-подібна, GALP (germinal) – гермінальна, або ембріонально-подібна та TNSALP (tissue non-specific bone/kidney/liver) – тканинно-неспецифічна, кісток, нирок та печінки [1, 2]. Для перших 3-х типів лужної фосфатази (кишкової, плацентарної та гермінальної) характерні висока гомологія на рівні білка (86–98 %) та експресія відповідних генів на одній хромосомі 2 (2q34-37) на відміну від тканинно-неспецифічної TNSALP з гомологією на рівні білка 52–56 %, ген якої експресується на хромосомі 1 (1p36.1-34) [3, 4]. Відомо, що лужна фосфатаза розглядається неспецифічним онкологічним маркером [5, 6], однак молекулярні особливості і механізм дії пухлинно-асоційованої лужної фосфатази лишаються наразі мало з'ясованими. Зміна активності лужної фосфатази у лейкоцитах є характерною ознакою хронічної мієлоїдної лейкемії (ХМЛ). Наша увага сфокусована на вивченні молекулярних особливостей та механізму дії лужної фосфатази в лейкомогенезі, а саме у хворих на ХМЛ.

Матеріали і методи

У роботі використовували зразки периферійної крові хворих на ХМЛ (n=8) з Національного інституту раку. Первинну культуру крові від хворих на ХМЛ обробляли бутиратом натрію у концентрації 10 мМ при 37°C упродовж 24 годин. Виділення тотальної РНК проводили за допомогою Три-реагенту (Sigma-Aldrich) згідно з

протоколом. Концентрацію зразків РНК вимірювали на спектрофотометрі Nanodrop 2000 (Thermo Scientific, USA). Синтез кДНК проводили за концентрації РНК від 300 до 400 нг/мкл за стандартною методикою з використанням ферменту зворотної транскриптази. ЗТ-ПЛР у реальному часі проводили за допомогою SYBR Green (BioLab) на ампліфікаторі CFX96 Real-Time System (Bio-Rad) за використання дезоксиолігонуклеотидних праймерів для дослідження рівня експресії мРНК відповідних генів: IALP (forward – 5'-AAGGGCAGAAGAAGGACA AA-3'; reverse – 5'-GTCGTGTTGCACTGGTTA AAG-3'; G-CSFR (forward – 5'-ACAAGCCGCA GCGTGGAGAAG-3'; reverse – 5'-TTCTGAAG GCAGGTGGAAGGTG-3'. GAPDH – референтний ген (forward – 5'-CGCTCTCTGCTCC TCCTGTT-3'; reverse – 5'-CCATGGTGTCTGAG CGATGT-3'. Бутират натрію, гістондеацетилазний інгібітор (HDACi), люб'язно синтезовано С. Тарнавським (ІМБіГ НАНУ). Кількісний аналіз отриманих результатів проводили за формулою $2^{-\Delta\Delta CT}$ [7]. Амплікони ALP оцінювали за допомогою електрофорезу в агарозному 2,5 % гелі за стандартних умов.

Результати та обговорення

У роботі досліджувалися три типи лужної фосфатази за використання відповідних праймерів до тканинно-неспецифічної (TNAP), плацентарної (ALPP) та кишкової (ALPHI). Аналіз експресії мРНК відповідних генів за допомогою ЗТ-ПЛР у реальному часі показав, що у хворих на ХМЛ відповідні продукти їх експресії були надзвичайно низькими і майже не виявлялися, як показано на рисунку 1. Однак, натомість кишкової лужної фосфатази, нами виявлено інтенсивний нетиповий амплікон за розміром 410 п. н. (рис. 1).

Після елюції з гелю та проведеного секвінування цього амплікону з використанням праймерів до кишкової лужної фосфатази, за

допомогою яких цей продукт був апліфікований, нами виявлено не кишковий, а гермінальний, ембріонально-подібний тип лужної фосфатази (GALP) у хворих на хронічну мієлоїдну лейкемію..

У порівнянні з справжньою поліцитемією, неонкологічною формою мієлопроліферативного захворювання, рівень експресії цієї аберантної гермінальної лужної фосфатази був значно нижчим від ХМЛ (рис. 2)

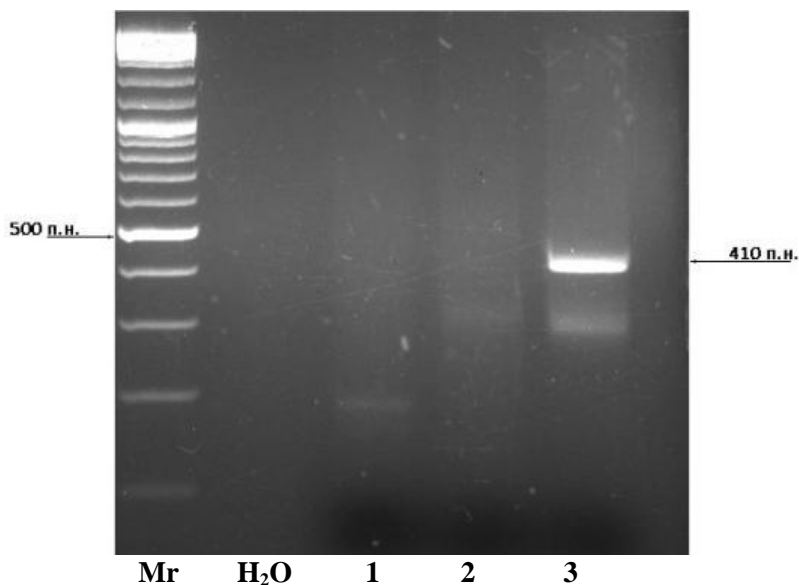


Рис. 1. Електрофореграма продуктів ампліфікації мРНК гена лужної фосфатази в ході real-time PCR за використанням праймерів до: 1 – PALP; 2 – TNSALP; 3 – IALP у хворого з прогресією на ХМЛ – бластний криз.

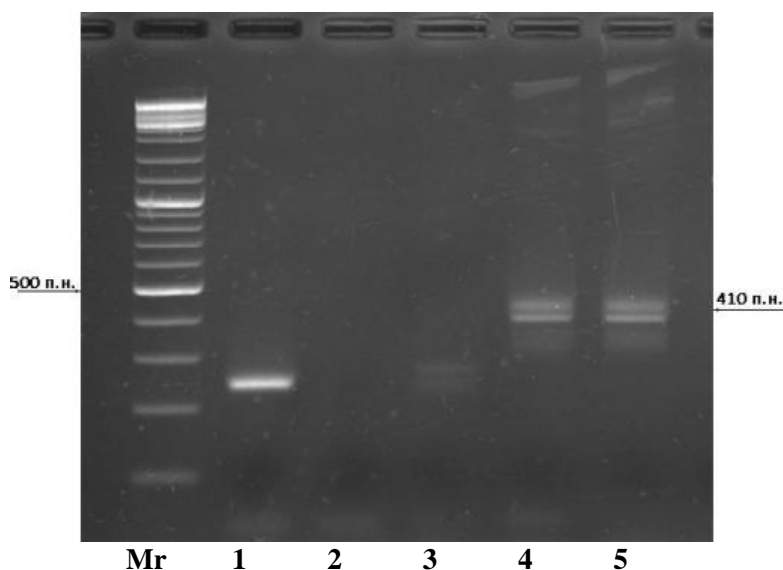


Рис. 2. Електрофореграма продукту ампліфікації мРНК гена аберантної гермінальної лужної фосфатази (GALP) в ході real-time PCR у хворого на справжню поліцитемію: 1 – GAPDH; 2 – H₂O; 3 – TNSALP; 4, 5 – (GALP).

Таким чином, з одного боку, виявлена нами аберантна ембріонально-подібна форма лужної фосфатази може, імовірно, поєднуватися з патогенезом мієлопроліферативних лейкемій. З іншого боку, підходи до її регуляції можуть лежати в площині епігенетичних досліджень. Ва-

жливо те, що епігенетичні зміни є потенційно зворотними, оскільки не пов'язуються ні з генетичними мутаціями, ні зі змінами в самій нуклеотидній послідовності ДНК [8, 9]. Виходячи з цього, у подальших експериментальних дослідженнях ми вивчали вплив епігенетичного регу-

лятора, а саме гістондеацетилазного інгібітора (HDACi) бутирату натрію на рівень експресії ембріонально-подібної лужної фосфатази за умов культивування клітин периферійної крові від хворих на ХМЛ у присутності 10 мМ бутирату натрію упродовж 24 годин. Відомо, що посттрансляційні модифікації гістонів регулюють рівень активності хроматину, тому є ключовими в регуляції генної експресії та ядерних процесів [10, 11]. Окрім того, гістондеацетилазні інгібітори відносяться до нових препаратів, що мають дозвіл на використання у лікуванні лейкемій та солідних пухлин [12], що стало передумовою їх використання у наших дослідженнях.

На рисунку 3 представлені результати мРНК експресії гена аберантної ALP у хворих на ХМЛ за умов культивування клітини периферійної крові з бутиратом натрію (10 мМ) при 37°C упродовж 24 годин.

Окрім того, нами показано, що така епігенетична, за дії бутирату натрію, down-регуляція

аберантної гермінальної лужної фосфатази (GALP) принципово поєднується з up-регуляцією рецептора гранулоцит-колоній-стимулюючого фактора (G-CSFR), що, імовірно, опосередковує активацію G-CSF сигналіngu, який асоціюється з гемопоетичною диференціацією клітин крові [13] (рис. 4).

За результатами проведених досліджень нами показана одночасна епігенетична down-регуляція аберантної GALP та up-регуляція G-CSFR у хворого на ХМЛ прогресію при дії бутирату натрію. Відомо, що обробка клітин K-562 бутиратом натрію призводить до диференціювання бластних клітин [14]. Отримані результати можуть узагальнювати спрямовану дію бутирату натрію в активації G-CSF сигналіngu гемопоетичної диференціації при патогенезі ХМЛ, що може мати подальшу можливість сигнального регулювання патогенезу на рівні терапії та лікування лейкемій.

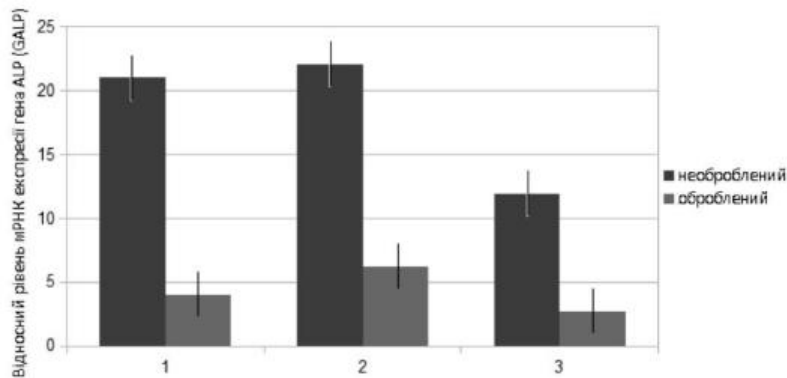


Рис. 3. Відносний рівень експресії мРНК гена аберантної гермінальної лужної фосфатази (GALP) у хворих на ХМЛ (1-3) при обробці первинної культури клітин крові 10 мМ бутиратом натрію у порівнянні з контролем – первинна культура без обробки бутиратом натрію.

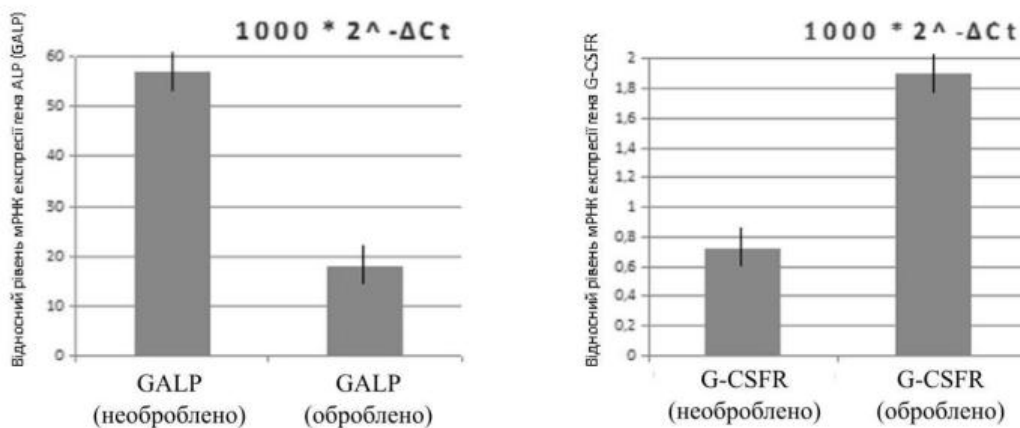


Рис. 4. Відносний рівень мРНК експресії гена аберантної гермінальної лужної фосфатази (GALP) та гена рецептора гранулоцит-колоній-стимулюючого фактора (G-CSFR) у хворого на ХМЛ при культивуванні клітин периферійної крові з бутиратом натрію (10 мМ), 37°C упродовж 24 годин.

Висновки

Показано, що при ХМЛ прогресії має місце аберантна експресія мРНК гена лужної фосфатази, а саме зміна (переключення) кишкового типу лужної фосфатази на гермінальну, ембріонально-подібну лужну фосфатазу за даними секвінування продукту ампліфікації у хворих на ХМЛ (n=8). Встановлена епігенетична регуляція та взаємозв'язок аберантного типу ALP у хворих на ХМЛ та рецептором гранулоцит-колоній-стимулюючого фактора (G-CSFR) на рівні мРНК

експресії при дії гістондеацетилазного інгібітора бутирату натрію (10мМ) на первинну культуру клітин крові хворих на ХМЛ. Показана одночасна епігенетична down-регуляція аберантної GALP та up-регуляція G-CSFR у хворих на ХМЛ прогресію при дії бутирату натрію. Отримані результати можуть узагальнювати спрямовану дію бутирату натрію в активації G-CSF сигналіngu гемо поетичної диференціації при патогенезі ХМЛ.

Література

1. Millán J.L. Mammalian alkaline phosphatases: from biology to applications in medicine and biotechnology. – Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH, 2006. – 337 p.
2. Tsai L.Ch., Hung M.W., Chen Y.H., Su W.Ch., Chang G.G., Chang T.Ch. Expression and regulation of alkaline phosphatases in human breast cancer MCF-7 cells // Eur. J. Biochem. – 2000. – V. 267. – P. 1330–1339.
3. Millan J.L. Multisystemic functions of alkaline phosphatases // Methods Mol Biol. – 2013. – V. 1053. – P. 27–51.
4. Linder C.H., Englund U.H., Narisawa S., Millan J.L., Magnusson P. Isozyme profile and tissue-origin of alkaline phosphatase in mouse serum // Bone. – 2013. – V. 53. – P. 399–408.
5. Saif M.W., Alexander D.A., Wicox Ch.M. Serum Alkaline Phosphatase Level as a Prognostic Tool in Colorectal Cancer: A Study of 105 patients // J Appl Res. – 2005. – V. 5. – P. 88–95.
6. Rao S.R., Snaith A.E., D.Marino D., Cheng X., Lwin S.T., Omiss I.R., Handy F.C., Edwards C.M. Tumour-derived alkaline phosphatase regulates tumour growth, epithelial plasticity and disease-free survival in metastatic prostate cancer // British Journal of Cancer. – 2017. – V. 116. – P. 227–236.
7. Schmittgen Th.D., Livak K.J. Analyzing real-time PCR data by the comparative Ct method // Nature Protocols. – 2008. – V. 3. – P. 1101–1108.
8. Christine B.Y., Peter A.J. Epigenetic therapy of cancer: past, present and future // Nature Reviews Drug Discovery. – 2006. – V. 5. – P. 37–50.
9. Stengel K.R., Hiebert S.W. Class I HDACs Affect DNA Replication, Repair, and Chromatin Structure: Implications for Cancer Therapy // Antioxid Redox Signal. – 2015. – V. 23. – P. 51–65.
10. Olzscha H., Bekheet M.E., Sheikh S., La Thangue N.B. HDAC Inhibitors // Methods Mol Biol. – 2016. – V. 1436. – P. 281–303.
11. Ahmadzadeh A., Khodadi E., Shahjahani M., Bertacchini J., Vosoughi T., Saki N. The Role of HDACs as Leukemia Therapy Targets using HDI // Int J Hematol Oncol Stem Cell Res. – 2015. – V. 9. – P. 203–214.
12. Glass E., Viale P.H. Histone deacetylase inhibitors: novel agents in cancer treatment // Clin J Oncol Nurs. – 2013. – V. 17. – P. 34–40.
13. Tsuji K., Ebihara Y. Expression of G-CSF receptor on myeloid progenitors // Leuk. Lymphoma. – 2001. – V. 42. – P. 1351–1357.
14. Sutherland J.A., Turner A.R., Mannoni P., McGann L.F., Ture J.M. Differentiation of K562 leukemia cells along erythroid, macrophage, and megakaryocyte lineages // J. Biol Responce Mod. – 1986. – V. 5. – P. 250–262.

SHVACHKO L.P., KRAVCHUK I.V., TELEHEEV G.D.

Institute of Molecular Biology and Genetics, NAS of Ukraine,

Ukraine, 03680, Kyiv, Akad. Zabolotny str., 150, e-mail: shvachko.imbg@gmail.com

FEATURES OF THE MOLECULAR EXPRESSION OF ALKALINE PHOSPHATASE GENE IN CHRONIC MYELOID LEUKEMIA

Aim. To study expression of alkaline phosphatase gene in chronic myeloid leukemia. **Methods.** Short-term primary cell culture, real-time PCR. **Results.** We have investigated the aberrant expression type ALP in CML progression. We have found that the intestinal type ALP is switched to germinal type embrional-like ALP in the patients with clinical CML progression (n=8) resulted from the sequencing analyse. Moreover, we have shown the interconnected epigenetic regulation of aberrant embrional-like type ALP and G-CSFR (granulocyte colony stimulation factor receptor) on the level of mRNA gene expression in CML patients under sodium butirate (HDACi) culture blood treatment (10 mM). We have revealed simultaneously the epigenetic down-regulation mRNA gene expression of aberrant germinal GALP and up-regulation of G-CSFR by sodium butirate in CML progression. **Conclusions.** On the data obtained have been concluded that sodium butirate targeted induces the hemopoietic differentiation blood cell potential in CML pathogenesis by the G-CSF signaling pathway activation.

Keywords: CML, alkaline phosphatase, G-CSFR (granulocyte colony stimulation factor receptor), sodium butirate.