

ШВАЧКО Л.П.

Інститут молекулярної біології і генетики НАН України,
Україна, 03680, м. Київ, вул. Акад. Заболотного, 150, e-mail: shvachko.imbg@gmail.com

ЕМТ-МЕХАНІЗМ В ІНДУКЦІЇ СТОВБУРОВОГО ФЕНОТИПУ МІЄЛОПРОЛІФЕРАТИВНИХ ЛЕЙКЕМІЙ

Феномен епітеліально-мезенхімальної трансформації (ЕМТ) пов'язується з механізмом індукції ракових стовбурових клітин. Однак, ЕМТ-перехід асоціювався, зазвичай, із солідною етіологією злякисних пухлин, тоді як у прогресії лейкемії феномен ЕМТ довго не брався до уваги, хоча стовбурові клітини були відкриті, завдячуючи саме прогресії лейкемії. **Мета і методи.** Метою роботи є дослідження експресії ЕМТ-індукуючих маркерів – генів Snail, Twist та N-кадгерину у прогресії мієлопроліферативних неоплазій методом ЗТ-ПЛІР з подальшою денситометрією продуктів ампліфікації у прорамі TotalLab v. 2.01. **Результати.** За результатами проведеного дослідження рівня мРНК експресії генів N-кадгерину, Snail та Twist показано, що в механізмі індукції лейкемічного стовбурового фенотипу, який асоціюється з неконтрольованою проліферацією незрілих бластних стовбурових клітин-носіїв Bcr-Abl трансформованого генотипу, має місце спрямована активація ЕМТ-маркерів: N-кадгерину, Snail та Twist як регуляторів епітеліально-мезенхімального репрограмування за лейкемогенезу. **Висновки.** Феномен ЕМТ має місце у прогресії лейкемічних стовбурових клітин.

Ключові слова: епітеліально-мезенхімальна трансформація (ЕМТ), ЕМТ-індукуючі фактори, N-кадгерин, Snail, Twist, мієлопроліферативна лейкемія.

Зрозуміти біологічні механізми появи ракових стовбурових клітин в інвазивно-метастазуючому фенотипі пухлин [1] – означає перейти на біологічні шляхи регуляції онкопрогресії, мішенями якої стають не самі стовбурові клітини, а ті молекулярні механізми, що супроводжують їх індукцію. Концепція автора полягає в тому, що феномен епітеліально-мезенхімальної трансформації (ЕМТ) – переходу [2–4] в мікрооточенні пухлини – є універсальною ключовою програмою інвазивно-метастазуючого фенотипу, що забезпечує індукцію ракових стовбурових клітин [5–7], то-

му, цілком вірогідно, може вважатися специфічним логотипом стовбурового фенотипу як солідної, так і лейкемічної природи канцерогенезу.

Механізм ЕМТ був відкритий та ототожнювався тільки з солідними епітеліальними пухлинами [8, 2], тоді як у прогресії лейкемії феномен ЕМТ взагалі довго не брався до уваги. Так, дійсно, епітеліально-мезенхімальна трансдукція (перехід) пов'язується, насамперед, із втратою ключового епітеліального маркера E-кадгерину в міжклітинному адгезивному сигналінгу [9] шляхом абераційного епігенетичного ДНК-гіперметилування його промотору [10]. Це стає основним тригером морфологічної та сигнальної трансформації епітеліальних соматичних клітин у мезенхімальні стовбурові клітини [11]. Тому ЕМТ поряд зі зниженням експресії епітеліальних маркерів, зокрема таких, як E-кадгерин, цитокератин, десмоплакін та інші, набуває мезенхімальні маркери; такі, як транскрипційні фактори Snail, Slug, Twist, що стають, у свою чергу, негативними регуляторами E-кадгерину [12]. Окрім того, особливою ознакою для ЕМТ переходу стає переключення епітеліального E-кадгерину на ембріональний N-кадгерин [13, 14], що стало суттєвим доказом клітинного репрограмування в основі механізму ЕМТ трансформації як в ембріогенезі, так і в канцерогенезі [15].

Другий феномен ЕМТ полягає у дозріванні мезенхімальних стовбурових клітин до канцер-асоційованих стовбурових клітин, що супроводжується активацією ряду сигнальних шляхів: таких, як бета-катенін/Wnt, TGF-beta, Notch та інші [16, 17]. Таким чином, порушення контрольованого балансу епітеліальних клітин у мікрооточенні пухлини та, як наслідок, індукція механізму ЕМТ в ініціації стовбурового потенціалу ракових клітин може бути цільовою мішенню клітинної регуляції в протипухлинній терапії. Наприклад, втрата експресії E-кадгерину – ключової молекули міжклітинного адгезивного сигналінгу – та переключення на бета-катенін-Wnt сигналінг розглядається нами як фундаментальна подія в феномені ЕМТ за канцero-

генезу [11, 17]. Таким чином, EMT як біологічний механізм пластичної клітинної регуляції стовбурового фенотипу ракових клітин, у тому числі і лейкоемічних, що втрачають термінальну диференціацію у прогресії незрілих бластних стовбурових клітин за хронічних та гострих форм мієлопроліферативних лейкоемій (до 80% усіх нозологій), може відкривати шляхи до зворотної, насамперед, епігенетичної регуляції цих процесів у протипухлинній терапії як солідних пухлин, так і лейкоемій [18].

Метою роботи є дослідження EMT-індукуючих маркерів генів Snail, Twist та N-кадгерину у прогресії мієлопроліферативних неоплазій.

Матеріали і методи

У роботі використовували зразки периферійної крові хворих на мієлопроліферативні неоплазії – істинну тромбоцитемію, хронічну мієлоїдну лейкоемію, гостру мієлоїдну лейкоемію, гостру лімфоцитарну лейкоемію з Національного інституту раку. Видулення тотальної РНК проводили за допомогою Три-реагенту (Sigma-Aldrich, USA) згідно з протоколом. Концентрацію зразків РНК вимірювали на спектрофотометрі Nanjdrop 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 проводили на ампліфікаторі Master Cycler Eppendorf (USA) за використання відповідних дезокси-олігонуклеотидних праймерів для дослідження рівня експресії мРНК генів N-кадгерину та EMT-транскрипційних факторів Snail, Twist:

N-кадгерин:

5'-GATGTTGAGGTACAGAATCGT-3' (прямий);

5'-GGTCGGTCTGGATGGCGA-3' (зворотний);

Snail: 5'-CAGACCCACTCAGATGTCAA-3' (прямий);

5'-CATAGTTAGTCACACSTCGT-3' (зворотний);

Twist: 5'-GGGAGTCCGCAGTCTTAC-3' (прямий);

5'-CCTGTCTCGSTTTCTSTTT-3' (зворотний).

Аналіз ЗТ-ПЛР проводили за використання електрофорезу в агарозному гелі (2,5%, TAE буфер, pH 7,6) для візуалізації ампліконів та програми TotalLab v. 2.01 для денситометрії продуктів ЗТ-ПЛР.

Результати та обговорення

У роботі досліджувалися відносні рівні експресії мРНК генів N-кадгерину/E-кадгерину

[14] у хворих на хронічну мієлоїдну лейкоемію (ХМЛ), гостру мієлоїдну лейкоемію (ГМЛ) та гостру лімфобластну лейкоемію (ГЛЛ) (рис. 1, 2).

Також у роботі досліджувалися відносні рівні експресії мРНК генів EMT-транскрипційних факторів Snail [19] та Twist [20] у хворих на істинну поліцитемію (ІП), хронічну мієлоїдну лейкоемію (ХМЛ) та гостру мієлоїдну лейкоемію (ГМЛ). Істинна поліцитемія – Vcr-Abl – негативне мієлопроліферативне захворювання, що, зазвичай, не пов'язується з лейкоемічним стовбуровим фенотипом, носіями якого є бластні стовбурові клітини з характерною Vcr-Abl перебудовою (t(9;22) злитих Vcr- та c-Abl-кіназних генів у хронічній та гострій мієлоїдній лейкоеміях [21, 22] (рис. 3, 4).

Як видно з рисунків 1 та 2, досліджені нами зразки периферійної крові у хворих із Vcr-Abl позитивними лейкоеміями – ХМЛ, ГМЛ та ГЛЛ, що характеризуються стовбуровим фенотипом бластної прогресії з Vcr-Abl-опосередкованою резистентністю [22], пов'язуються з виявленим E-кадгерин/N-кадгерин переключенням, що асоціюється з механізмом епітеліально-мезенхімальної трансформації (EMT) в індукції стовбурового фенотипу [14].

Як видно з рисунків 3 та 4, мРНК експресія генів Snail та Twist, що безпосередньо асоціюються з індукцією епітеліально-мезенхімального переходу і тому в літературі мають назву EMT-транскрипційних факторів, динамічно зростала з прогресією лейкоемій. Так, відносний рівень експресії мРНК генів Snail та Twist зростає у хворих на хронічну мієлоїдну лейкоемію (ХМЛ) з Vcr-Abl бластним стовбуровим фенотипом у порівнянні з Vcr-Abl-негативним мієлопроліферативним захворюванням – істинною поліцитемією (ІП). Однак рівня надекспресії генів Snail та Twist досягали хворі на гостру мієлоїдну лейкоемію (ГМЛ), що, вірогідно, підкреслює потенціал стовбурового фенотипу в патогенезі гострої мієлоїдної лейкоемії у площині механізму активації EMT репрограмування.

Таким чином, за результатами проведеного дослідження можемо стверджувати, що в механізмі індукції лейкоемічного стовбурового фенотипу, який асоціюється з неконтрольованою проліферацією незрілих бластних стовбурових клітин-носіїв Vcr-Abl трансформованого генотипу, має місце спрямована активація EMT-маркерів: N-кадгерину, Snail та Twist як регуляторів епітеліально-мезенхімального репрограмування за лейкоеміогенезу.

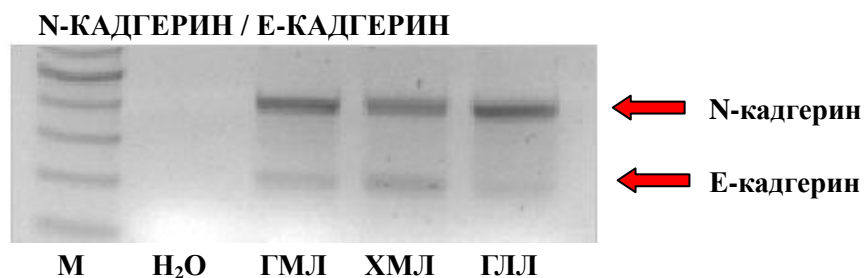


Рис. 1. Электрофореграми агарозного гелю (2,5%) ампліконів мРНК експресії генів N-кадгерину (400 п. н.) та E-кадгерину (210 п. н.) у хворих на прогресію лейкемії: ГМЛ – гостра мієлоїдна лейкемія; ХМЛ – хронічна мієлоїдна лейкемія; ГЛЛ – гостра лімфоцитарна лейкемія.

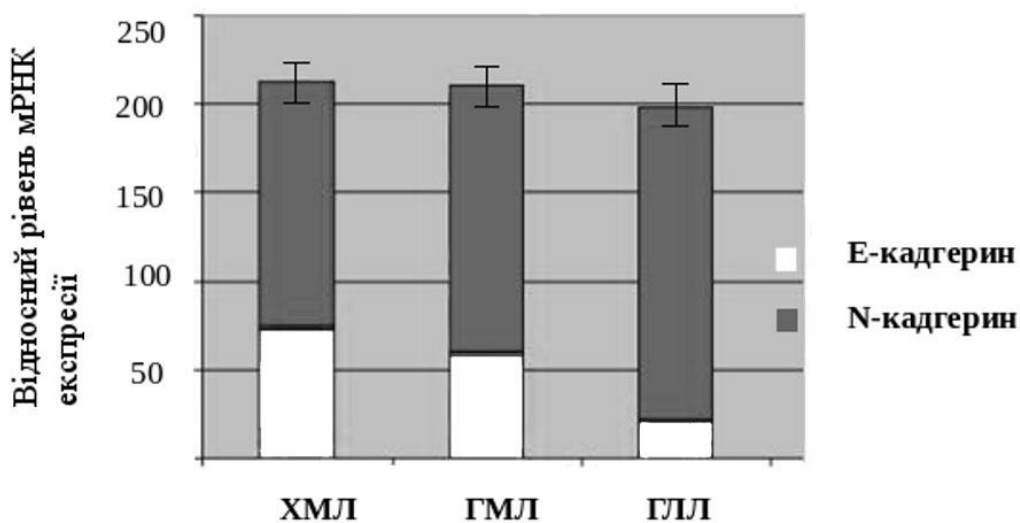


Рис. 2. Відносний рівень мРНК експресії N-кадгерину / E-кадгерину у хворих на хронічну мієлоїдну лейкемію (ХМЛ), гостру мієлоїдну лейкемію (ГМЛ) та гостру лімфоцитарну лейкемію (ГЛЛ).

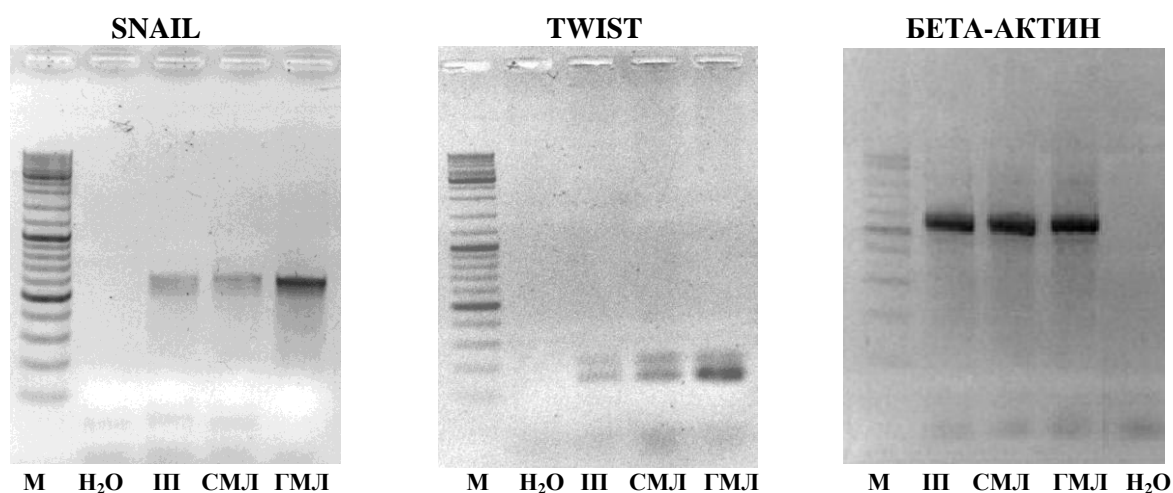


Рис. 3. Электрофореграми ампліконів мРНК експресії генів Snail (568 п. н.), Twist (130 п. н.) та бета-актину (550 п. н.) методом ЗТ-ПЛР у хворих із різним типом мієлопроліферативних неоплазій: III – істинна поліцитемія, ХМЛ – хронічна мієлоїдна лейкемія, ГМЛ – гостра мієлоїдна лейкемія.

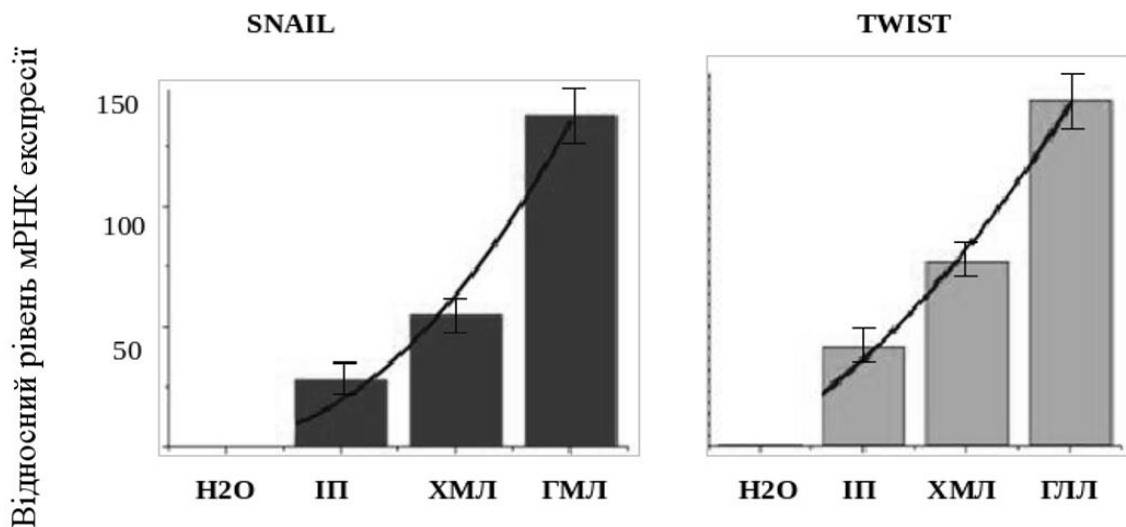


Рис. 4. Відносний рівень мРНК експресії генів EMT-транскрипційних факторів Snail та Twist у хворих на істинну поліцитемію (ІП), хронічну мієлоїдну лейкоїю (ХМЛ) та гостру мієлоїдну лейкоїю (ГМЛ).

Висновки

За результатами проведеного дослідження показано, що в механізмі індукції лейкоїчного стовбурового фенотипу на прикладі гострих та хронічних мієлоїдних лейкоїей, який асоціюється з неконтрольованою проліферацією не-

зрілих бластних стовбурових клітин-носіїв Bcr-Abl трансформованого генотипу, має місце спрямована активація EMT – молекулярних індукторів – N-кадгерину, Snail та Twist, що, вірогідно, поєднується з феноменом епітеліально-мезенхімального переходу в лейкоїогенезі.

Література

1. Reya T., Morrison S.J. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature*. 2001. Vol. 414. P. 105–111.
2. Thiery J. Epithelial-mesenchymal transition in tumor progression. *Nature Reviews Cancer*. 2002. Vol. 2. P. 442–454.
3. Kalluri R., Weinberg R.A. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J. Clin. Invest.* 2009. Vol. 119. P. 1420–1428.
4. Ye X., Weinberg R.A. Epithelial-Mesenchymal Plasticity: A Central Regulator of Cancer Progression. *Trends Cell Biol.* 2015. Vol. 25. P. 675–686.
5. Mani S.A., Guo W., Liao M.J. et al. The EMT generates cells with properties of stem cells. *Cell*. 2008. Vol. 133. P. 704–715.
6. Singh A., Settleman J. EMT, cancer stem cells and drug resistance: an emerging axis of evil in the war on cancer. *Oncogene* 2010. Vol. 29. P. 4741–4751.
7. Jung H.Y., Yang J. Unraveling the TWIST between EMT and cancer stemness. *Cell Stem Cell*. 2015. Vol. 16. P. 1–2.
8. Tsuji T., Ibaragi S., Hu G.F. Epithelial-mesenchymal transition and cell cooperativity in metastasis. *Cancer Res.* 2009. Vol. 69. P. 7135–7139.
9. Hirohashi S. Inactivation of the E-cadherin-mediated cell adhesion system in human cancers. *Am J Pathol.* 1998. Vol. 153. P. 333–339.
10. Melki J.R., Vincent P.C., Brown R.D. et al. Hypermethylation of E-cadherin in leukemia. *Blood*. 2000. Vol. 95. P. 3208–3213.
11. Швачко Л.П., Холод О.В. Епітеліально-мезенхімальна трансформація в канцерогенезі. *Онкологія*. 2014. Т. 16. С. 4–12.
12. Lamouille S., Xu J., Derynck D. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2014. Vol. 15. P. 178–196.
13. Hazan R.B., Qiao R., Keren R., Badano I., Suyama K. Cadherin switch in tumor progression. *Ann NY Acad Sci.* 2004. Vol. 1014. P. 155–163.
14. Gravdal K., Halvorsen O.J., Haukaas S.A., Akslen L.A. A Switch from E-Cadherin to N-Cadherin Expression Indicates Epithelial to Mesenchymal Transition and Is of Strong and Independent Importance for the Progress of Prostate Cancer. *Clin Cancer Res.* 2007. Vol. 13. P. 7003.
15. Micalizzi D.S., Farabaugh S.M. Epithelial-mesenchymal transition in cancer: parallels between normal development and tumor progression. *Gland Biol Neoplasia*. 2010. Vol. 15. P. 117–134.
16. Thiery J.P., Sleeman J.P. Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2006. Vol. 7. P. 131–142.
17. Nelson W.J., Nusse R. Convergence of Wnt, beta-catenin, and cadherin pathways. *Science*. 2004. Vol. 5. P. 1483–1487.
18. Sun L., Fang J. Epigenetic regulation of epithelial-mesenchymal transition. *Cell Mol Life Sci.* 2016. Vol. 73. P. 4493–4515.
19. Dang H., Ding W., Emerson D. et al. Snail1 induces epithelial-to-mesenchymal transition and tumor initiating stem cell characteristics. *BMC Cancer*. 2011. Vol. 11. P. 1–13.

20. Yang J., Mani S.A., Donaher J.L. et al. Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis. *Cell*. 2004. Vol. 117. P. 927–939.
21. Chin J-H., Tang J-L., Chen R-L., Li Ch-Ch., Lee Ch.P. Detection of BCR-ABL gene mutations in Philadelphia chromosome positive leukemia patients resistant to STI-571 cancer therapy. *Leukemia Res*. 2008. Vol. 32. P. 1724–1734.
22. Soverinia S., Branford S., Nicolini F.E., Talpaz M., Deininger M.W.N., Martinelli G., Muller M.C., Radich J.P., Shahj N.P. Implications of BCR-ABL1 kinase domain-mediated resistance in chronic myeloid leukemia. *Leukemia Res*. 2014. Vol. 38. P. 10–20.

References

1. Reya T., Morrison S.J. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature*. 2001. Vol. 414. P. 105–111.
2. Thiery J. Epithelial-mesenchymal transition in tumor progression. *Nature Reviews Cancer*. 2002. Vol. 2. P. 442–454.
3. Kalluri R., Weinberg R.A. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J. Clin. Invest*. 2009. Vol. 119. P. 1420–1428.
4. Ye X., Weinberg R.A. Epithelial-Mesenchymal Plasticity: A Central Regulator of Cancer Progression. *Trends Cell Biol*. 2015. Vol. 25. P. 675–686.
5. Mani S.A., Guo W., Liao M.J. et al. The EMT generates cells with properties of stem cells. *Cell*. 2008. Vol. 133. P. 704–715.
6. Singh A., Settleman J. EMT, cancer stem cells and drug resistance: an emerging axis of evil in the war on cancer. *Oncogene* 2010. Vol. 29. P. 4741–4751.
7. Jung H.Y., Yang J. Unraveling the TWIST between EMT and cancer stemness. *Cell Stem Cell*. 2015. Vol. 16. P. 1–2.
8. Tsuji T., Ibaragi S., Hu G.F. Epithelial-mesenchymal transition and cell cooperativity in metastasis. *Cancer Res*. 2009. Vol. 69. P. 7135–139.
9. Hirohashi S. Inactivation of the E-cadherin-mediated cell adhesion system in human cancers. *Am J Pathol*. 1998. Vol. 153. P. 333–339.
10. Melki J.R., Vincent P.C., Brown R.D. et al. Hypermethylation of E-cadherin in leukemia. *Blood*. 2000. Vol. 95. P. 3208–3213.
11. Shvachko L.P., Holod O.V. The epithelial-to-mesenchymal transformation in carcinogenesis. *Oncologia*. 2014. Vol. 16. P. 4–12 (Ukrainian).
12. Lamouille S., Xu J., Derynck D. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*. 2014. Vol. 15. P. 178–196.
13. Hazan R.B., Qiao R., Keren R., Badano I., Suyama K. Cadherin switch in tumor progression. *Ann N Y Acad Sci*. 2004. Vol. 1014. P. 155–163.
14. Gravdal K., Halvorsen O.J., Haukaas S.A., Akslen L.A. A Switch from E-Cadherin to N-Cadherin Expression Indicates Epithelial to Mesenchymal Transition and Is of Strong and Independent Importance for the Progress of Prostate Cancer. *Clin Cancer Res*. 2007. Vol. 13. P. 7003.
15. Micalizzi D.S., Farabaugh S.M. Epithelial-mesenchymal transition in cancer: parallels between normal development and tumor progression. *Gland Biol Neoplasia*. 2010. Vol. 15. P. 117–134.
16. Thiery J.P., Sleeman J.P. Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*. 2006. Vol. 7. P. 131–142.
17. Nelson W.J., Nusse R. Convergence of Wnt, beta-catenin, and cadherin pathways. *Science*. 2004. Vol. 303. P. 1483–1487.
18. Sun L., Fang J. Epigenetic regulation of epithelial-mesenchymal transition. *Cell Mol Life Sci*. 2016. Vol. 73. P. 4493–4515.
19. Dang H., Ding W., Emerson D. et al. Snail1 induces epithelial-to-mesenchymal transition and tumor initiating stem cell characteristics. *BMC Cancer*. 2011. Vol. 11. P. 1–13.
20. Yang J., Mani S.A., Donaher J.L. et al. Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis. *Cell*. 2004. Vol. 117. P. 927–939.
21. Chin J-H., Tang J-L., Chen R-L., Li Ch-Ch., Lee Ch.P. Detection of BCR-ABL gene mutations in Philadelphia chromosome positive leukemia patients resistant to STI-571 cancer therapy. *Leukemia Res*. 2008. Vol. 32. P. 1724–1734.
22. Soverinia S., Branford S., Nicolini F.E., Talpaz M., Deininger M.W.N., Martinelli G., Muller M.C., Radich J.P., Shahj N.P. Implications of BCR-ABL1 kinase domain-mediated resistance in chronic myeloid leukemia. *Leukemia Res*. 2014. Vol. 38. P. 10–20.

SHVACHKO L.P.

*Institute of Molecular Biology & Genetics of NAS of Ukraine,
Ukraine, 03680, Kyiv, Akad. Zabolotnogo str., 150, e-mail: shvachko.imbg@gmail.com*

EMT-MECHANIZM INDUCES THE LEUKEMIC STEMNESS PHENOTYPE IN MYELOID LEUKEMIAS

Aim. To study the targeted expression EMT-induced markers N-cadherin, Snail and Twist in patients with the chronic and acute myeloid leukemias. **Methods.** RT-PCR, electroforesis in agarose gel, TotalLab v. 2.01 densitometry. **Results.** Have been investigated the relative levels of mRNA expression of N-cadherin and transcriptional factors Snail and Twist, associated with epithelial-to-mesenchymal induction (EMT) in patients with the essential polycythemia (EP), the chronic myeloid leukemia CML), the acute myeloid leukemia (AML) and the acute lymphoblastic leukemia (ALL). **Conclusions.** Have been highlighted the EMT stemness mechanism in Leukemic stem cell progression.

Keywords: the epithelial-to-mesenchymal transition (EMT), EMT-inducer marker, N-cadherin, Snail, Twist, myeloid leukemias, leukemic stem cell progression.