

МАТВЄЄВА А.С., КОВАЛЕВСЬКА Л.М., КАШУБА О.В.✉

Інститут експериментальної патології, онкології та радіобіології ім. Р.С. Кавецького НАН України, Україна, 03022, м. Київ, вул. Васильківська, 45, e-mail: alinamtve@gmail.com

✉ lenakash@yahoo.com, (044) 259-01-83, (098) 237-83-27

## ФАКТОР ТРАНСКРИПЦІЇ SMAD4 ЛОКАЛІЗОВАНО У ЦИТОПЛАЗМІ В-КЛІТИН ПАЦІЄНТІВ, ХВОРИХ НА ХРОНІЧНИЙ ЛІМФОЛЕЙКОЗ (ХЛЛ)

**Мета.** Висвітлення причин неактивності шляху TGFB-SMAD2/3 у клітинах ХЛЛ. **Методи.** Клітини ХЛЛ виділяли з периферичної крові пацієнтів, хворих на ХЛЛ, за допомогою градієнтного центрифугування на фіколі. Експресію і клітинну локалізацію білків SMAD2, 3 і 4 аналізували за допомогою флуоресцентної мікроскопії з використанням специфічних антитіл. **Результати.** На відміну від В-клітин здорового донора, білок SMAD2 майже не експресувався у клітинах ХЛЛ. Більше того, протеїни SMAD3 і SMAD4 локалізувалися лише у цитоплазмі (SMAD3 частково у мембрані) клітин ХЛЛ. **Висновки.** Сигнальний шлях TGFB-SMAD2/3 не є активним у клітинах ХЛЛ. Нами було встановлено, що SMAD2 майже не експресується, а також не формуються ядерні гетеродимери протеїнів SMAD3 і SMAD4.

**Ключові слова:** хронічний лімфолейкоз (ХЛЛ), гострий мієлоїдний лейкоз (ГМЛ), В-клітини периферичної крові, SMAD, сигнальний шлях TGFB-SMAD2/3.

Хронічний В-клітинний лімфолейкоз (ХЛЛ) є найпоширенішою формою лейкозу в Європі та США (близько 30 %). Частота захворюваності становить приблизно 3,5 на 100000 населення (5,0 для чоловіків та 2,5 для жінок) [1, 2]. Більшості випадків ХЛЛ, якщо не всіх, передують моноклональний В-клітинний лімфоцитоз (МВЛ), який трапляється у 5–10 % людей у віці від 40 років і прогресує до ХЛЛ із частотою близько 1 % на рік. В осіб, молодших 50 років, ХЛЛ трапляється дуже рідко, а у дітей цю хворобу не діагностовано [3].

Незважаючи на тривалу історію діагностованого ХЛЛ, досі не відомі механізми виникнення та розвитку цього захворювання.

Однією із гіпотез походження ХЛЛ як онкологічного захворювання є накопичення довгоживучих імунологічно некомпетентних В-лімфоцитів, які практично не проліферують. Більше того, клітини ХЛЛ не проліферують у

культури та не активуються лігандами.

Незважаючи на те, що клітини ХЛЛ не проліферують, вони експресують певні рецептори інтерлейкінів (IL2R, IL4R, IL6R, IL10R, IL13R), рецептори фактора некрозу пухлини альфа (TNFA), інтерферонів альфа (INFA) та гамма (INFG), а також фактора росту пухлини бета (TGFB).

У лімфоїдних клітинах активний канонічний шлях TGFB призводить до апоптозу. Активация шляху TGFB призводить до індукції проапоптотичних *BMF*, *BIM* і, як наслідок, *BAX*. Цікаво, що у клітинах ХЛЛ рівень *BCL2* не відрізняється від рівня експресії цього гена у В-клітинах периферичної крові здорових донорів. Раніше нами було показано, що рецептори TGFB (*TGFBRI*) експресуються приблизно однаково у клітинах CLL та В-лімфоцитах периферичної крові [4, 5].

Відомо, що активний ліганд TGFB зв'язується з гомодимерами рецепторів, *TGFBRI* і *TGFBRII*. Потім утворюється тетрамер рецепторів, і автофосфорильований *TGFBRII* може переносити фосфатну групу на *TGFBRI*, починаючи передачу сигналу через білки SMAD.

Білки SMAD є гомологами протеїнів *D. melanogaster*, названих «Mothers against decapentaplegic» (MAD). Сімейство SMAD складається щонайменше з 8 протеїнів. SMAD1, -2, -3, -5 та -8 є регуляторними білками (R-SMADs), які можуть бути фосфорильовані. SMAD8 кодується геном *SMAD9*. Важливо відзначити, що тільки SMAD2 та SMAD3 функціонують як R-SMADs в канонічному шляху TGFB.

SMAD4 (також називається co-SMAD) утворює комплекси з фосфорильованими SMAD2 і SMAD3. Ці гетеродимери, що містять SMAD4, імпортуються до ядра, де вони зв'язуються з ДНК, разом з іншими кофакторами для трансактивації (або, навпаки, пригнічення) набору відповідних генів, а саме: *ATF3*, *ID1*, *CMYC* тощо.

Нами нещодавно було показано [5], що

© МАТВЄЄВА А.С., КОВАЛЕВСЬКА Л.М., КАШУБА О.В.

експресію декількох генів, які стимулюють проліферацію, а саме *MYC* та *NFκB1*, було знижено у клітинах ХЛЛ (у 3,26 та 4,23 рази, відповідно). Не тільки *MYC*, але й фактори транскрипції *ID1* та *HIF1A* експресуються на вельми низьких рівнях.

Загалом багато генів, які індукуються в результаті активації шляху TGFB-SMAD2/3, а саме *BCL2L1* (*BCL-XL*), *CCND2* (циклін *D2*), *ID1*, *MYC*, *ATF3*, *TGIF1*, *KLF10* (*TIEG*), практично не експресовано в клітинах ХЛЛ.

Із метою подальшого висвітлення причин неактивності шляху TGFB-SMAD2/3 нами було проведено дослідження клітинної локалізації білків SMAD2, 3 і 4 у клітинах ХЛЛ та у В-клітинах здорових донорів.

### Матеріали і методи

Зразки периферичної крові 9 хворих на ХЛЛ та одного хворого на гострий мієлоїдний лейкоз (ГМЛ) отримано у відділі онкогематології (завідувач – професор Д.Ф. Глузман) в Інституті експериментальної патології, онкології і радіобіології (ІЕПОР) ім. р.С. Кавецького Національної академії наук (НАН) України. З метою верифікації ХЛЛ використовували ензімоцитохімічні та імуноцитохімічні методи із застосуванням антитіл проти лужної фосфатази (АРААР), міченого стрептавідину-біотину і лужної фосфатази (LSAB-AP) та широку панель моноклональних антитіл для типування патологічних клітин. Для контролю В-клітини виділено з периферичної крові здорового донора. Т-клітини було відокремлено за допомогою формування розеток з еритроцитами крові барана з наступним центрифугуванням. Схему експерименту затверджено Комітетом з біоетики при ІЕПОР ім. р.С. Кавецького НАН України.

Клітини ХЛЛ, виділені з периферичної крові за допомогою градієнтного центрифугування на фіколі, наносили у кількості 50 000 на предметне скло для подальшого аналізу методом імунофлуоресценції.

Використовували подвійне забарвлення за такою схемою: кролячі антитіла проти SMAD4 (Cell Signaling, США); вторинні анти-кролячі антитіла, продуковані у свині і кон'юговані із флуоресцеїн-5-ізотіоціанатом (FITC, DAKO, Данія); потім мишачі антитіла проти SMAD2 або SMAD3 (Cell Signaling, США); вторинні анти-мишачі антитіла, продуковані у коня і кон'юговані з техаським червоним (TR, DAKO,

Данія). ДНК фарбували за допомогою препарату Hoechst 3321 (Sigma-Aldrich, США).

Фото знімали за допомогою камери CCD (Hamamatsu, Японія). Аналізували зображення за допомогою програми Photoshop.

### Результати та обговорення

У контрольних зразках – В-клітинах здорового донора – білок SMAD4 показує як цитоплазматичну, так і ядерну локалізацію (рис. 1, сигнал зеленого кольору). Білок SMAD2 експресується на низькому рівні і також спостерігається у цитоплазмі (рис. 1, верхня панель, сигнал червоного кольору). Білок SMAD3 спостерігали майже у ядрі (рис. 1, нижня панель, сигнал червоного кольору).

Важливо відзначити, що білки SMAD3 і SMAD4 частково ко-локалізувалися, що може свідчити про формування у ядрі гетеродимерів, здатних до активації транскрипції залежних генів.

У зразках клітин ХЛЛ у 9 донорів було відмічено, що білок SMAD4 локалізовано у цитоплазмі (рис. 2, сигнал зеленого кольору). Проте експресія протеїну SMAD4 є дуже низькою у порівнянні з В-клітинами здорового донора (рис. 2, верхня панель) або майже відсутня (рис. 2, нижня панель).

Сигнал білка SMAD2 був дуже слабким (або відсутнім) у всіх 9 зразках клітин ХЛЛ, тобто формування димерів між SMAD2 і SMAD4 є неможливим.

Важливо відзначити, що білок SMAD3 експресувався у клітинах ХЛЛ (рис. 2, сигнал червоного кольору), причому, навіть якщо сигнал протеїну SMAD3 був сильним (рис. 2, нижня панель, сигнал червоного кольору), білок локалізувався лише тільки у цитоплазмі клітин ХЛЛ та/або у клітинній мембрані. Нам не вдалося зареєструвати гетеродимери SMAD3 і SMAD4 у ядрі, як у контрольних В-клітинах здорового донора.

У зразках крові хворих на ХЛЛ можна побачити й інші клітини (рис. 2, вказано стрілками білого кольору). Як видно з рисунка, у таких клітинах (не ХЛЛ) білки SMAD3 і SMAD4 ко-локализуються. Також можна помітити інші структури, які не містять ядра (рис. 2, відмічено на нижній панелі стрілками жовтого кольору). Можливо, це тромбоцити. Проте це питання буде уточнене в майбутньому.

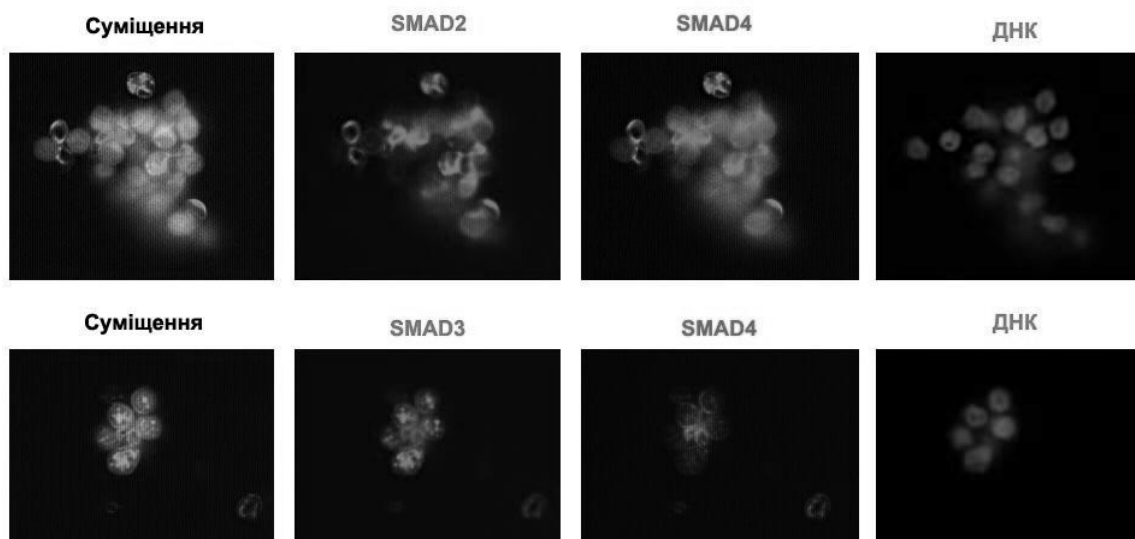


Рис. 1. Патерн клітинної локалізації білків SMAD2, SMAD3 та SMAD4 у В-клітинах здорового донора (контроль). ДНК показано у крайній справа колонці.

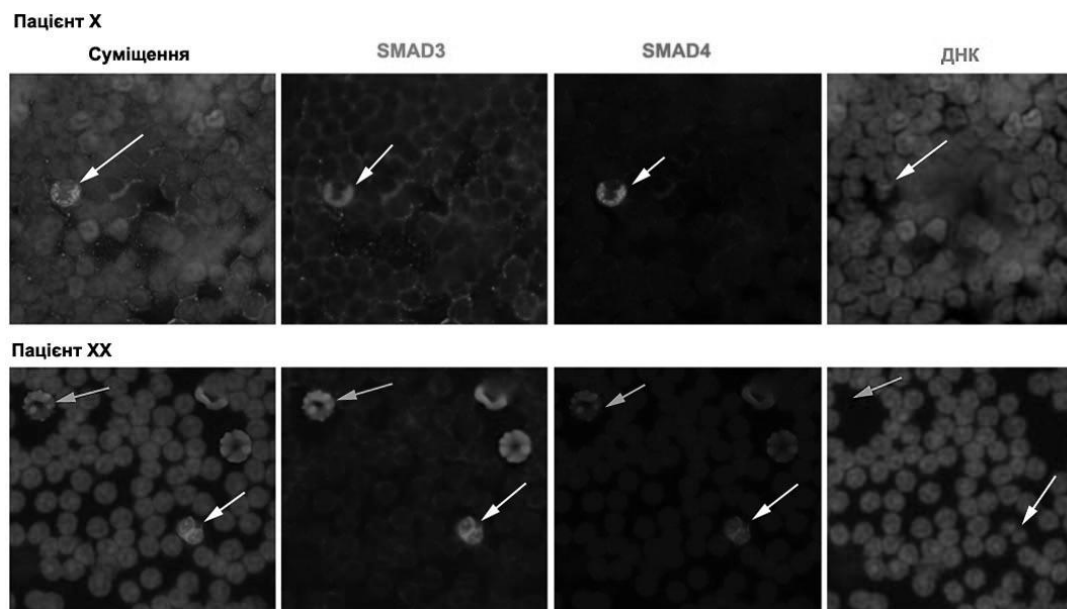


Рис. 2. Патерн клітинної локалізації білків SMAD3 та SMAD4 у клітинах ХЛЛ. ДНК показано у крайній справа колонці.

Для того, щоб вилучити можливе перекривання сигналів від антитіл, було проаналізовано експресію вищевказаних білків у зразках клітин пацієнта з ГМЛ. Важливо відзначити, що білок SMAD4 локалізувався як у цитоплазмі, так і у ядрі (рис. 3, сигнал зеленого кольору). Протеїн SMAD2 майже не експресувався (рис. 3, верхня панель, сигнал червоного кольору). А для білка SMAD3 було задетектовано досить сильний сигнал, проте майже тільки ци-

топлазматичний (рис. 3, нижня панель, сигнал червоного кольору). Причому сигнали SMAD3 і SMAD4, якщо і перекривалися, то тільки частково і лише у цитоплазмі (рис. 3, нижня панель, відмічено стрілками).

Отже, у клітинах периферичної крові пацієнтів, хворих на ХЛЛ і ГМЛ, а також у В-клітинах здорової особи спостерігали різні патерни локалізації білків SMAD2, 3 і 4.

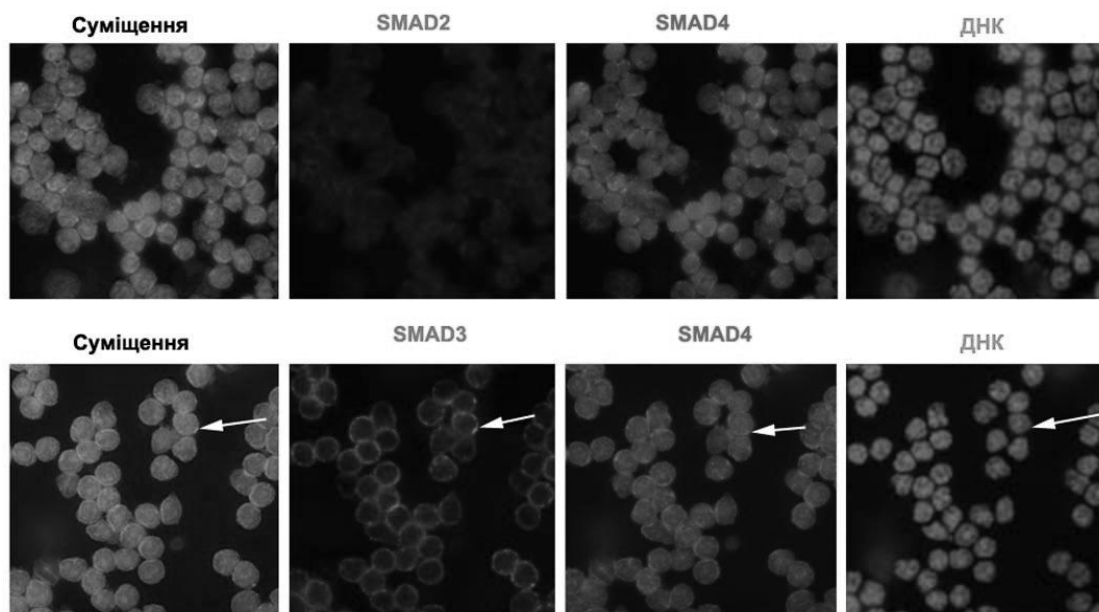


Рис. 3. Патерн клітинної локалізації білків SMAD2, 3 та 4 у клітинах периферичної крові хворого на ГМЛ. ДНК показано у крайній справа колонці.

У В-клітинах здорового донора реєстрували ко-локалізацію SMAD3 і SMAD4 у ядрі, що може свідчити про формування активного фактора транскрипції. У випадку ХЛЛ у клітинах не спостерігали протеїни SMAD3 та/або SMAD4 у ядрі. Білок SMAD2 практично не експресувався, тобто активні ядерні гетеродимери не формувалися у клітинах ХЛЛ. Це може бути поясненням, чому сигнальний шлях TGF $\beta$ -SMAD2/3 є неактивним у клітинах ХЛЛ.

Відкритим залишається питання причини такої клітинної локалізації досліджених білків SMAD. На локалізацію протеїнів, безумовно,

впливає статус їх фосфорилування. У майбутньому планується вивчити статус фосфорилування білків SMAD2 і SMAD3 до і після взаємодії поверхневого TGF $\beta$ R з відповідним лігандом (TGF $\beta$ ) у клітинах ХЛЛ.

### Висновки

Як було з'ясовано раніше, сигнальний шлях TGF $\beta$ -SMAD2/3 не є активним у клітинах ХЛЛ. Нами було встановлено, що SMAD2 майже не експресується, а також не формуються ядерні гетеродимери протеїнів SMAD3 і SMAD4.

### Література

1. Jemal A., Siegel R., Xu J., Ward E. Cancer statistics 2010. *CA Cancer J. Clin.* 2010. Vol. 60. P. 277–300. doi: 10.3322/caac.20073
2. Глузман Д.Ф., Скляренко Л.М., Нагорная В.А. Диагностическая онкогематология. К.: ДИА, 2011. 256 с.
3. Scarfo L., Dagklis A., Scielzo C., Fazi C., Ghia P. CLL-like monoclonal B-cell lymphocytosis: are we all bound to have it? *Semin. Cancer Biol.* 2010. Vol. 20. P. 384–390. doi: 10.1016/j.semcancer.2010.08.005.
4. Матвеева А.С., Ковалевська Л.М., Поліщук О.С., Муштак М., Кашуба О.В. Профіль експресії факторів транскрипції у зразках крові хворих на хронічний лімфолейкоз. *Онкологія.* 2016. Т. 18. Р. 311–315.
5. Matveeva A., Kovalevska L., Kholodnyuk I., Ivanivskaya T., Kashuba E. The TGF $\beta$ -SMAD pathway is inactivated in chronic lymphocytic leukemia cells. *Exp. Oncol.* 2017. Vol. 39. P. 286–290.

### References

1. Jemal A., Siegel R., Xu J., Ward E. Cancer statistics 2010. *CA Cancer J. Clin.* 2010. Vol. 60. P. 277–300. doi: 10.3322/caac.20073
2. Gluzman D.F., Skljarenko L.M., Nagornaja V.A. Diagnostic oncohematology. K.: DIA, 2011. 256 p.
3. Scarfo L., Dagklis A., Scielzo C., Fazi C., Ghia P. CLL-like monoclonal B-cell lymphocytosis: are we all bound to have it? *Semin. Cancer Biol.* 2010. Vol. 20. P. 384–390. doi: 10.1016/j.semcancer.2010.08.005.
4. Matvieieva A.S., Kovalevska L.M., Polishchuk O.S., Mushaq M., Kashuba E.V. Expression profile of transcription factors in the blood samples of patients with the chronic lymphocytic leukemia. *Oncology.* 2016. Vol. 18. P. 311–315.
5. Matveeva A., Kovalevska L., Kholodnyuk I., Ivanivskaya T., Kashuba E. The TGF $\beta$ -SMAD pathway is inactivated in chronic lymphocytic leukemia cells. *Exp. Oncol.* 2017. Vol. 39. P. 286–290.

**MATVIEIEVA A., KOVALEVSKA L., KASHUBA E.**

*RE Kavetsky Institute of Experimental Pathology, Oncology and Radiobiology, National Academy of Sciences of Ukraine,*

*Ukraine, 03022, Kiev, Vasylkivska, 45, e-mail: alinamtve@gmail.com, lenakash@yahoo.com*

**THE SMAD4 TRANSCRIPTION FACTOR SHOWS CYTOPLASMIC RETENTION IN B-CELLS OF PATIENTS WITH CHRONIC LYMPHOCYTIC LEUKEMIA (CLL)**

**Aim.** To illuminate the reason of inactivity of the TGFB-SMAD2/3 pathways in CLL cells. **Methods.** CLL cells were isolated from peripheral blood of CLL patients, using gradient centrifugation at the ficoll. Expression and cellular localization of SMAD2, 3 and 4 proteins were analyzed by fluorescence microscopy, using specific antibodies. **Results.** The SMAD2 protein was basically not expressed in CLL cells, in contrast to B cells, isolated from the peripheral blood of a healthy donor. Moreover, the SMAD3 and SMAD4 proteins were localized exclusively in the cytoplasm (a proportion of SMAD3 was detected in the membrane) of CLL cells. **Conclusions.** The TGFB-SMAD2/3 signaling pathway is not active in CLL cells. We have found that SMAD2 is not expressed. Also, the nuclear heterodimers that consisted of SMAD3 and SMAD4 proteins, were not detected.

**Keywords:** chronic lymphocytic leukemia (CLA), acute myeloid leukemia (AML), peripheral blood B-cells, SMAD, the TGFB-SMAD2/3 signaling pathway.