

Г.С. Маслак¹, О.В. Костюк¹, Д.О. Мінченко^{2,3}, О.З. Бразалук¹, А.І. Шевцова¹,
О.Г. Мінченко²

Сіальованість глікопротеїнів і рівень експресії нейрамінідази NEU1 та сіалілтрансферази ST6GAL1 у лімфоцитах хворих на еритремію

¹Дніпропетров. нац. мед. академія МОЗ України; ²Ін-т біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України, Київ; ³Нац. мед. ун-т ім. О.О. Богомольця, Київ; E-mail: ominchenko@yahoo.com

Досліджено вміст сіалілгліканів на поверхні мембрани лімфоцитів та експресії генів нейрамінідази NEU1 і сіалілтрансферази ST6GAL1 у лімфоцитах хворих на еритремію, а також концентрацію сіалових кислот у плазмі крові, ступінь сіальованості α 1-кислого глікопротеїну та фібронектину, тип зв'язування сіалових кислот з їхніми гліканами, який визначали за допомогою сіалоспецифічних лектинів MAA та SNA. Встановлено, що вміст вільних сіалових кислот у плазмі крові та активність нейрамінідази за еритремії зростали порівняно зі здоровими донорами на тлі зниження MAA-II-зв'язувальної активності досліджуваних глікопротеїнів. За допомогою методів протокової цитометрії та конфокальної мікроскопії з використанням сіалоспецифічних лектинів показано підвищення експонування α 2,6- та α 2,3-сіальованих глікокон'югатів на поверхні мембрани лімфоцитів у хворих на еритремію. У лімфоцитах за еритремії виявлено також підвищення рівня експресії мРНК NEU1 та ST6GAL1. Отримані результати розкривають механізми порушень глікобіологічних процесів за еритремії і можуть сприяти розробці адекватних засобів лікування цього захворювання.

Ключові слова: сіальованість, глікопротеїни, експресія генів, NEU1, ST6GAL1, лімфоцити, плазма, еритремія.

ВСТУП

Сіальованість є одним із поширених та універсальних типів термінального глікозилювання N- та O-гліканів [1]. Сіалові кислоти (в основному, N-ацетил-5-нейрамінова кислота) зазвичай займають кінцеві невідновлювальні позиції на олігосахаридних ланцюгах і можуть існувати у двох ізомерних формах: як α 2,3- та α 2,6-зв'язані сполуки [2]. Функції цих кінцевих моносахаридів надзвичайно різноманітні: вони впливають на період напіврозпаду багатьох циркулюючих глікопротеїнів, відіграють важливу роль у міжклітинних зв'язках, а також у взаємодії клітин з міжклітинним матриксом, беруть участь у розвитку та прогресуванні багатьох патологічних процесів [3, 4].

Зміни вмісту сіалових кислот у складі глікопротеїнів часто корелюють з їх функціональною активністю. Так, протизапальні та імуномодулювальні властивості α 1-кислого глікопротеїну значною мірою залежать від ступеня сіальованості його N-гліканових структур, причому десіальовані форми α 1-кислого глікопротеїну викликають значно нижчу оксигензалежну відповідь, ніж сіальовані [5]. Показано, що глікоформи α 1-кислого глікопротеїну амніотичної рідини плоду, які мають у своєму складі велику кількість α 2,3-зв'язаних сіалових кислот, захищають його від шкідливої дії медіаторів запалення [4]. Інший глікопротеїн фібронектин є низькогліколізованим (5–9 %) протеїном міжклітинного матриксу та плазми крові,

© Г.С. Маслак, О.В. Костюк, Д.О. Мінченко, О.З. Бразалук, А.І. Шевцова, О.Г. Мінченко

що відіграє важливу роль у процесах росту і диференціювання, а також міграції пухлинних клітин [6, 7]. Його біологічна активність також може змінюватися залежно від ступеня сіальованості. Як стверджують Pan та Song [8], зміни сіальованості N-гліканів у складі послідовності III₉₋₁₀ фібронектину та I-подібного домену β 1-інтегрину викликають у них значні конформаційні перебудови та впливають на взаємодію цих двох глікопротеїнів.

Як експресія так і активність сіалілтрансфераз та сіалідаз, істотно впливають на сіальованість глікопротеїнів. Ці форми гліканів утворюються під дією сіалілтрансфераз, родина яких включає 20 специфічних ензимів, що приєднують сіалові кислоти до глікопротеїнів та гліколіпідів з утворенням α 2,3-, α 2,6- і α 2,8-зв'язків [2]. За типом зв'язку, який утворюється між сіаловими кислотами та акцепторним моносахаридом, ці ферменти класифікуються як ST3GAL, ST6GAL, ST6GALNAC і ST8SIA [9]. ST6GAL1, що використовує GAL β 1 \rightarrow 4GLCNAC-R як акцептор сіалових кислот, задіяний у канцерогенезі [10, 11]. Видалення α -глікозидних залишків сіалових кислот від вуглеводних складових глікопротеїнів і гліколіпідів проходить під дією сіалідаз. У свавців були ідентифіковані та охарактеризовані чотири типи сіалідаз або нейрамінідаз (NEU1-4), які відрізняються за своєю внутрішньоклітинною локалізацією та ферментативними властивостями. NEU1 бере участь у клітинній сигналізації та імунних реакціях [12]. Цей ензим локалізується у лізосомах, але він може транспортуватися і на поверхню плазматичної мембрани клітин [10]. Його каталітична активність змінюється при онкологічних захворюваннях, що може значно впливати на деякі біологічні процеси через зміну конформації, розпізнавання та маскування функціональних ділянок молекул на поверхні мембран [13].

Еритремія – мієлопроліферативне захворювання крові, при якому кістковий мозок виробляє занадто багато червоних кров'яних клітин. Воно найчастіше спостерігається у

літніх людей віком від 60 років, але в останні роки збільшилася частота цього захворювання у молодих людей і дітей, для яких ця хвороба може переходити у злоякісну форму.

Метою роботи було дослідити вміст, синтез, особливості структури сіалілгліканів на поверхні лімфоцитів та експресію генів нейрамінідази NEU1 і сіалілтрансферази ST6GAL1 у лімфоцитах хворих на еритремію, а також концентрацію сіалових кислот у плазмі крові, ступінь сіальованості α 1-кислого глікопротеїну та фібронектину, а також зв'язування сіалових кислот з їхніми гліканами.

МЕТОДИКА

Матеріалом дослідження була кров, а саме плазма (з гепарином чи з ЕДТА) та лімфоцити хворих на еритремію віком від 58 до 66 років (n=20) та гематологічно здорових волонтерів віком від 55 до 65 років (n=20). Клінічне обстеження пацієнтів проводили згідно зі стандартами медичної допомоги в умовах спеціалізованого стаціонару: гематологічного відділення комунального закладу «Міська багатопрофільна клінічна лікарня № 4» м. Дніпропетровськ. Всі пацієнти давали письмову згоду на участь у обстеженні.

Ступінь глікозильованості фібронектину та α 1-кислого глікопротеїну вивчали методом лектин-ферментного аналізу з використанням антитіл до цих речовин, що були деглікозильовані за допомогою N-Glycosidase F («US Biological», США), причому відсутність вуглеводів у складі цих імуноглобулінів, їх афінність і специфічність перевіряли лектин- та імунодот-аналізом. Використовували лектин маакії амурської – МАА II («Sigma», США), бузини чорної – SNA («Лектинотест», Україна), що були кон'юговані з пероксидазою хрину. Специфічність зв'язування лектинів із вуглеводними детермінантами фібронектину та α 1-кислого глікопротеїну контролювали додаючи у реакційну суміш відповідні моносахариди-інгібітори у концентрації 0,1

моль/л. Щоб вивчити лектинзв'язувальну активність фібронектину і $\alpha 1$ -кислого глікопротеїну їх вносили у лунку по 200 та 500 нг. Рівень адсорбції вимірювали на апараті Numareader («Human», Німеччина) при довжині хвилі 405 нм.

Концентрацію фібронектину та $\alpha 1$ -кислого глікопротеїну у плазмі визначали методом імунодоту з використанням відповідних поліклональних кролячих антитіл. Отримані результати обчислювали за допомогою програми GelProAnalyser 3.1.

Вміст загальних сіалових кислот вимірювали за допомогою набору «СіалоТест» (НПЦ «Еко-Сервіс», Росія) згідно з протоколом виробника. Для цього в пробірку вносили 0,6 мл сироватки, 2 мл дистильованої води і 1 мл реагенту А, ретельно перемішували і ставили у водяну баню на 5 хв при 37°C, потім центрифугували при 3000 хв⁻¹ протягом 6 хв. Відбирали 2 мл супернатанту, додавали 0,4 мл реагенту В, інкубували на киплячій водяній бані впродовж 15 хв, охолоджували, додавали 2 мл дистильованої води, перемішували і вимірювали оптичну густину (Е) у кюветах з довжиною оптичного шляху 10 мм при довжині хвилі 540 нм і виражали в міліграмах на 100 мл.

Активність нейрамінідази визначали за аглютинацією еритроцитів лектином арахісу в діапазоні концентрацій від 2 до 15,6 мкг/мл [14]. Для цього у пробірку вносили по 50 мкл попередньо відмитої 10%-ї суспензії еритроцитів людини першої групи крові, додавали 50 мкл плазми та 100 мкл 0,2 М ацетатного буферного розчину з рН 5,0, залишали на 2 год при 30 °С у термостаті, після чого центрифугували протягом 30 с при 3000 хв⁻¹. Відбирали надосадову рідину, додаючи 200 мкл розчину бичачого сироваточного альбуміну в забуференому фізіологічному розчині. Процедуру повторювали, після чого проводили калібрування активності нейрамінідази в діапазоні від 50 до 100.00 ОД/мл, використовуючи ензим холерного ембріона («Serva, Heidelberg», Німечина) як стандарт. Утворення 1 мкмоль/л

N-ацетилнейрамінової кислоти з NAN-лактози або бичачого підщепленого муцину за 1 хв при рН 5,0 та 37 °С прийнято за одиницю активності нейрамінідази (U). Отримані результати переводили в цифровий формат за допомогою програми GelProAnalyser 32.

Лімфоцити з гепаринізованої крові (20–25 ОД гепарину на 1 мл) виділяли за методом, який базується на седиментації клітин у градієнті густини фікол-урографіну ($\rho = 1,077$ г/мл). Для цього у центрифужну пластикову пробірку наливали 2–3 мл фікол-урографіну, на нього нашаровували 4–6 мл відстояної плазми, попередньо розведеної вдвічі у фізіологічному розчині, і зверху шар клітин крові. Пробірки центрифугували упродовж 40 хв з прискоренням 200 g (1500–1800 хв⁻¹) за кімнатної температури. Інтерфазне кільце із лімфоцитів відбирали в суху конічну центрифужну пробірку. Отриману суспензію клітин двічі відмивали в забуференому фізіологічному розчині таким чином: до суспензії лімфоцитів додавали 3–4 мл цього розчину, вміст пробірки ретельно перемішували та центрифугували з прискоренням 200–300 g за кімнатної температури, потім рідину над осадом відбирали. Після відмивання отримані клітини ресуспендували в забуференому фізіологічному розчині, підраховували їх кількість у камері Горяєва. Життєздатність клітин визначали за допомогою триптанового синього (їх було понад 90 %) та готували робочу концентрацію лімфоцитів (300 тис./мл у кожному зразку).

Локалізацію фібронектину та $\alpha 1$ -кислого глікопротеїну визначали методом проточної цитофлуориметрії з використанням сіалоспецифічних лектинів МАА II та SNA, кон'югованих з флуоресцеїнізотіоціанатом («EU Laboratories», Швеція). Кількість мертвих клітин контролювали за їх зв'язуванням із йодидом пропідіуму. Результати реєстрували на проточному цитометрі Beckman Coulter EPICS, обробляли за допомогою програми FCS3 Express.

Експресію NEU1 і ST6GAL1 аналізували за допомогою кількісної полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі, використовуву-

ючи «Mx 3000P QPCR» («Stratagene», США) та SYBRGreen Mix («AB gene», Велика Британія). Для цього із лімфоцитів виділяли РНК як описано раніше [15]. Її осад промивали 75%-м етанолом, розчиняли у воді, вільний віз рибонуклеаз, переосаджували етанолом для позбавлення препаратів рибонуклеїнових кислот від залишків реагенту Trisol, знову розчиняли у воді та використовували для синтезу комплементарної ДНК. Синтез кДНК проводили за допомогою QuantiTect Reverse Transcription Kit («QIAGEN», Німеччина) згідно з протоколом виробника.

Для ампліфікації кДНК NEU1 були використані прямий (5'-ccctatgagctcccagatgg-3' та зворотний (5'-actgtctctttccgcatga-3') праймери. Нуклеотидні послідовності цих праймерів відповідають послідовності 955–974 та 1338–1219 кДНК NEU1 людини (GenBank номер NM_000434). Розмір ампліфікованого фрагмента 284 пари нуклеотидних залишків. Ампліфікацію кДНК ST6GAL1 (ST6 beta-galactosamide alpha-2,6-sialyltransferase 1; SIAT1) проводили за допомогою прямого (5'-aggaccagcatcaagttca-3') та зворотного (5'-ggaggacttcagagatccc-3') праймерів, які відповідають послідовності 697 – 716 та 898 – 879 кДНК ST6GAL1 людини (GenBank номер NM_003032). Розмір ампліфікованого фрагмента 202 пари нуклеотидних залишків.

Кількість РНК, взятої для аналізу, оцінювали за рівнем експресії мРНК β-актину (ACTB). Ампліфікацію кДНК β-актину проводили за допомогою прямого – 5'-ggacttcgagcaagatgg-3' та зворотного – 5'-agcactgtgtggcgtacag-3' праймерів. Нуклеотидні послідовності цих праймерів відповідають послідовності 747–766 та 980–961 кДНК ACTB людини (GenBank номер NM_001101). Розмір ампліфікованого фрагмента 234 пари нуклеотидних залишків. Праймери були отримані від фірми “Sigma-Aldrich” (США).

Аналіз результатів дослідження експресії генів NEU1 та ST6GAL1 виконували з допомогою спеціальної комп'ютерної програми “Differential expression calculator”, а статисти-

чний аналіз – за допомогою програмного забезпечення Statistics 6.0. Значення експресії генів NEU1 та ST6GAL1 нормалізували за рівнем експресії β-актину і представляли у відсотках від контролю (100 %). Використано середні значення $M \pm m$ чотирьох експериментів. Достовірність відмінностей у групах порівняння встановлювали з використанням критерію t Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Сіальованість глікопротеїнів плазми крові. Лектини SNA (*Sambucus nigra* lectin) та МАА (*Maackia amurensis* lectin) II – найкращі інструменти для дослідження сіальованості протеїнів, оскільки SNA має високу афінність до $\alpha(2 \rightarrow 6)$ -сіалових кислот біантенних N-гліканів та O-гліканів, а МАА-II взаємодіє з тими сіаловими кислотами, що зв'язані з $\alpha(2 \rightarrow 3)$ -галактозою [15]. Ми дослідили сіальованість двох глікопротеїнів плазми крові хворих на еритремію, а саме $\alpha 1$ -кислого глікопротеїну та фібрoneктину, участь яких у розвитку онкологічних процесів відома, але недостатньо вивчена. З першого погляду між цими протеїнами мало спільного, але їх особливістю є майже однакова кількість N-гліканових ланцюгів у структурі, вони мають імуномодулювальні властивості та залучені у процеси пухлинного росту [6, 16–18]. Більше того, $\alpha 1$ -кислий глікопротеїн як представник білків гострої фази першим реагує на будь-які запальні або проліферативні процеси, які виникають в організмі хворої людини [3], а фібрoneктин залучається переважно на стадії розповсюдження та метастазування пухлинних клітин [19].

З рис. 1 видно, що у хворих на еритремію рівень зв'язування $\alpha 1$ -кислого глікопротеїну зі SNA знижений на 61 % ($P < 0,001$), а з МАА-II – на 42 % ($P < 0,05$), в той час як зв'язування фібрoneктину, навпаки, підвищується на 58 % ($P < 0,05$), а з МАА II знижений на 71 % ($P < 0,001$). Кореляційний аналіз показав наявність позитивного зв'язку між змінами

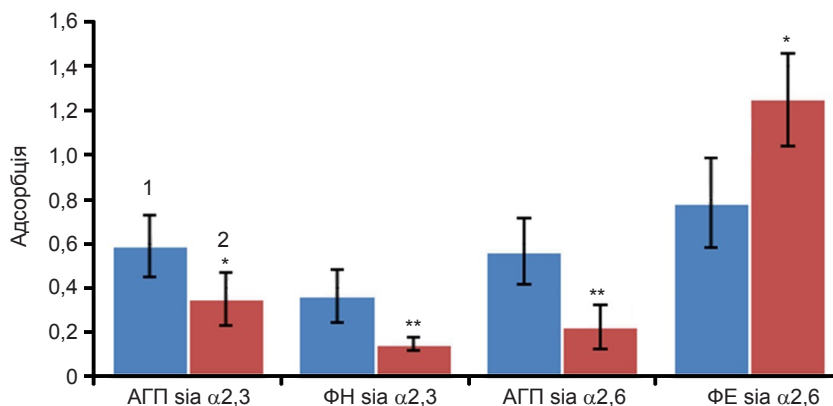


Рис. 1. Ступінь зв'язування α₁-кислого глікопротеїну (АГП) та фібронектину (ФН) плазми крові хворих на еритремію з лектинами маакії амурської та бузини чорної. 1 – контроль, 2 – еритремія. *P<0,05, **P<0,01 порівняно з контролем

МАО II і SNA-зв'язувальних активностей як α₁-кислого глікопротеїну, так і фібронектину (r = 0,610; P<0,05 і 0,654; P<0,05) відповідно.

Таким чином, нами встановлено, що сіальованість цих білків за еритремії змінюється по-різному, і підвищення вмісту десіальованих форм α₁-кислого глікопротеїну часто є ознакою розвитку патологічного процесу, що і підтверджують інші автори [5, 20].

Вміст сіалових кислот і активність NEU1. Показало, що у плазмі крові хворих на еритремію достовірно (P<0,05) підвищується вміст сіалових кислот (таблиця), а також суттєво посилюється і активність NEU1.

Сіальованість поверхневих глікокон'югатів лімфоцитів за еритремії. За допомогою проточної цитофлуориметрії з використанням сіалоспецифічних лектинів виявлено зміни вуглеводних компонентів у складі глікокон'югатів на поверхні плазматичної мембрани лімфоцитів порівняно з контролем.

Так, зв'язування SNA з поверхневими α₂,6-сіальованими глікокон'югатами лімфоцитів було в 3,3 рази більш інтенсивним (рис. 2,а), що підтверджено з використанням методів конфокальної мікроскопії (рис. 3). Водночас інтенсивність зв'язування МАО-II (див. рис. 2,б) збільшувалася меншою мірою: експонування α₂,3-сіальованих глікокон'югатів на поверхні плазматичної мембрани лімфоцитів крові зростало тільки на 38 % (P<0,05).

Зміни сіальованості фібронектину представляють особливий інтерес, оскільки, як відомо, N-глікани плазмової його форми в нормі мають приблизно вдвічі більше α₂,6-зв'язаних сіалових кислот, ніж α₂,3-зв'язаних [21]. Більше того, сіальовані глікани перерозподіляються: знижується α₂,3- та підвищується α₂,6-сіальованість, а їх співвідношення зменшується більше ніж у 4 рази. Можливою причиною таких змін можуть бути конформаційні порушення

Вміст сіалових кислот і активність нейрамінідази у плазмі крові хворих на еритремію та гематологічно здорових донорів

Групи	Сіалові кислоти, мг/100мл	Нейрамінідаза, ОД/мл 10 ⁻³
Контроль (здорові донори)	63,74 ± 12,3	53,78 ± 12,19
Хворі на еритремію	91,25 ± 14,6*	72,48 ± 5,68*

*P<0,05 порівняно з контрольною групою.

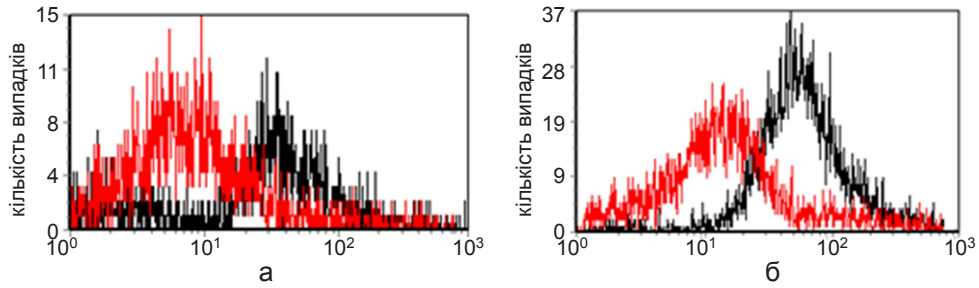


Рис. 2. Інтенсивність флуоресценції бузини чорної-SNA (а) і маакії амурської-MAА II (б) на лімфоцитах гематологічно здорового донора (світла лінія) і хворого на еритремію (темна лінія), протокова цитометрія на апараті («Beckman Coulter EPICS»)

цього протеїну, що робить недоступними гліканові структури для дії глікозидаз. Це узгоджується з даними інших авторів [19, 22, 23], які продемонстрували можливість таких змін конформації фібронектину за умов росту пухлин, в результаті яких активні модулі маскуються та втрачають свої функції, а також порушується взаємодія фібронектину і колагенових фібрил.

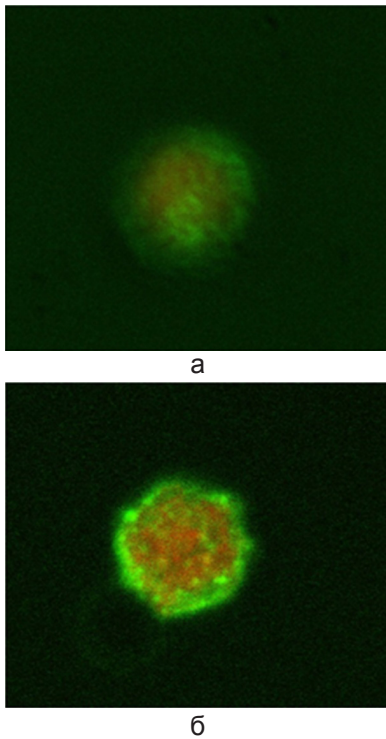


Рис. 3. Інтенсивність флуоресценції ФІТЦ-SNA на лімфоцитах гематологічно здорового донора (а) і хворого на еритремію (б), конфокальна мікроскопія

Сіальованість розчинних форм глікопротеїнів, у тому числі $\alpha 1$ -кислого глікопротеїну та фібронектину, залежить від активності нейрамінідаз, що циркулюють у крові людини. Виявлене нами підвищення активності нейрамінідази у плазмі крові хворих на еритремію корелює з високим вмістом сіалових кислот та посиленням експресії NEU1, яка, як відомо, бере участь у багатьох патологічних процесах, у тому числі метастазуванні пухлинних клітин через десіалювання інтегрину β -4 [24–28].

Експресія мРНК NEU1 і ST6GAL1 у лімфоцитах крові. Дослідження рівня експресії генів NEU1 та ST6GAL1 за допомогою кількісної полімеразної ланцюгової реакції показали наявність мРНК для обох ферментів у лімфоцитах крові як здорових донорів, так і хворих на еритремію (рис. 4). Встановлено, що у хворих на еритремію істотно підвищується рівень експресії мРНК NEU1 (на 79 %) та

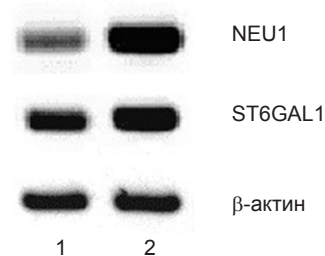


Рис. 4. Експресія мРНК нейрамінідази та сіалілтрансферази у лімфоцитах здорових донорів (1) та хворих на еритремію (2) за допомогою полімеразної ланцюгової реакції. Рівень експресії мРНК β -актину визначали для контролю кількості РНК, взятої для аналізу

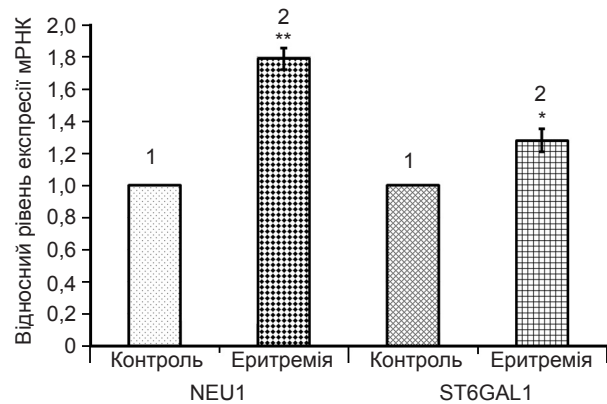


Рис. 5. Кількісна оцінка експресії нейрамінідази (NEU1) та сіалілтрансферази (ST6GAL1) у лімфоцитах здорових донорів (1) та хворих на еритремію (2) за допомогою полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі. Рівень експресії мРНК NEU1 та ST6GAL1 нормалізували за експресією β -актину і виражали у відсотках відносно контролю; $n = 5$; * $P < 0,01$, ** $P < 0,001$ порівняно з контролем

ST6GAL1 на 28 % порівняно зі здоровими донорами у розрахунку на експресію β -актину як контрольного гена (рис. 5).

Нами також виявлено зростання рівня експресії мРНК сіалілтрансферази ST6GAL1 (β -галактозид: $\alpha 2$ -6-сіалілтрансферази), що забезпечує утворення $\alpha 2,6$ -зв'язку між сіаловою кислотою та галактозою (SIA $\alpha 2$ -6GAL $\beta 1$ -4GLCNAC $\beta 1$ -R). Це узгоджується з даними інших дослідників [19, 29], які показали підвищення експресії ST6GAL1 за багатьох онкологічних захворюваннях: аденокарциномі товстої кишки, грудної залози та шийки матки, хоріокарциномах, гострому мієлоїдному лейкозі та деяких пухлинах головного мозку. Цей ензим є медіатором пухлинної прогресії, оскільки призводить до гіперсіальованості $\beta 1$ -інтегринів, внаслідок чого змінюється їх конформація та порушуються процеси активації рецепторів і сигналізації, а це в свою чергу підвищує рухливість та інвазивність клітин [29].

Результати, представлені на рис. 2, 3 та 4, свідчать про наявність прямого зв'язку між розвитком пухлин та підвищенням $\alpha 2,6$ -сіальованості поверхневих глікокон'югатів і експресії ST6GAL1, що узгоджується з даними літератури [2]. Підвищення експресії нейрамінідази можна розглядати також як включення захисних механізмів за умов

еритремії, що може частково нівелювати ефекти високосіальованих вуглеводних гілок у складі як плазмових, так і поверхневих глікокон'югатів. Підтвердженням тому є подовження майже втричі часу ремісії у хворих на гострий мієлоїдний лейкоз, які між проходженням курсів хіміотерапевтичного лікування отримували ін'єкції оброблених нейрамінідазою мієлобластних клітин [30]. Таким чином, отримані результати можуть бути корисними для розуміння процесів глікозилювання протеїнів за еритремії та пошуку шляхів використання сіалових кислот або відповідних ензимів для розробки нових стратегій лікування онкологічних захворювань.

ВИСНОВКИ

1. У плазмі крові хворих на еритремію сіальованість вуглеводних антен α -1-кислого глікопротеїну знижується, причому спостерігається перерозподіл сіальованих гліканів фібронектину: у положенні $\alpha 2,3$ знижується, а $\alpha 2,6$ – підвищується.

2. Вміст сіалових кислот у плазмі крові за еритремії підвищується і позитивно корелює з активністю нейромінідази.

3. Рівень експресії мРНК NEU1 та ST6GAL1 у лімфоцитах крові, а також експонування $\alpha 2,6$ - та $\alpha 2,3$ -сіальованих глікокон'югатів на

поверхні мембрани лімфоцитів хворих на еритремію збільшується порівняно зі здоровими донорами.

**А.С. Маслак, О.В. Костюк, Д.А. Минченко,
А.З. Бразалук., А.И. Шевцова, А.Г. Минченко**

СИАЛИРОВАННОСТЬ ГЛИКОПРОТЕИНОВ И ЭКСПРЕССИЯ НЕЙРАМИНИДАЗЫ NEU1 И СИАЛИЛТРАНСФЕРАЗЫ ST6GAL1 У БОЛЬНЫХ ЭРИТРЕМИЕЙ

Изучено содержание сиалилгликанов на поверхности мембраны лимфоцитов и экспрессии генов нейраминидазы NEU1 и сиалилтрансферазы ST6GAL1 в лимфоцитах больных эритремией, а также концентрацию сиаловых кислот в плазме крови, степень сиалированности α 1-кислого гликопротеина и фибронектина, тип связывания сиаловых кислот с их гликанами, который определяли с помощью сиалоспецифических лектинов MAA и SNA. Установлено, что содержание свободных сиаловых кислот в плазме крови и активность нейраминидазы увеличивались при эритремии по сравнению со здоровыми донорами на фоне снижения MAA-II-связывающей активности исследованных гликопротеинов. С помощью методов проточной цитометрии и конфокальной микроскопии с использованием сиалоспецифических лектинов показано повышение экспонирования α 2,6- та α 2,3-сиалированных гликоконъюгатов на поверхности мембраны лимфоцитов у больных эритремией. При этом в лимфоцитах выявлено также повышение уровня экспрессии мРНК NEU1 и ST6GAL1. Полученные результаты раскрывают механизмы нарушения гликобиологических процессов при эритремии и могут содействовать разработке адекватных способов лечения этого заболевания.

Ключевые слова: сиалирование, гликопротеины, экспрессия генов, NEU1, ST6GAL1, лимфоциты, плазма, эритремия.

**H.S. Maslak¹, O.V. Kostjuk¹, D.O. Minchenko^{2,3},
O.Z. Brazaluk¹, A.I. Shevtsova¹, O.H. Minchenko²**

GLYCOPROTEIN SIALYLATION AND NEU1 AND ST6GAL1 EXPRESSIONS IN ERYTHREMIA DISEASE

We studied the levels of lymphocyte surface-associated sialylglycans and the expression of neuraminidase NEU1 and sialyltransferase ST6GAL1 genes in lymphocytes in erythremia patients and healthy donors as well as the levels of sialic acids in plasma and sialylation of alpha-acid glycoprotein and fibronectin. Moreover, we also investigated the type of sialic acids binding with its glycans using sialospecific lectins MAA and SNA. fibronectin protein in lymphocytes and its cell surface in erythremia disease as compared to healthy donors. It was shown that the levels of free sialic acids and neuraminidase

activity in plasma are increased in erythremia disease as compared to healthy donors; however, MAA-II-binding activity of tested glycoproteins is decreased. fibronectin-1 mRNA expression in lymphocytes is increased in patients with erythremia. The decreasing of plasma fibronectin concentration and its heparin-binding activity as well as increasing of lymphocyte content with surface-associated and intracellular fibronectin were revealed in erythremia disease in comparison with healthy donors. Positive correlation between plasma fibronectin level and its heparin-binding activity and negative correlation between plasma fibronectin level and quantity of lymphocytes which express fibronectin inside the cell and on cell surface was detected. Enhanced levels of α 2,3- and α 2,6-linked residues of glycoconjugates were detected on lymphocyte cell surface in erythremia disease using sialospecific lectins and flow cytometer as well as fluorescent confocal microscope. The level of NEU1 and ST6GAL1 mRNA expressions is significantly increased in lymphocytes in erythremia disease. Results of this study are clarified the mechanisms of disturbed in erythremia disease glyco-biological processes and may therefore present new approaches for therapeutic opportunities. Key words: sialylation, glycoproteins, gene expressions, NEU1, ST6GAL1, lymphocytes, plasma, erythremia.

REFERENCES

- Schwarzkopf M, Knobloch KP, Rohde E, Hinderlich S, Wiechens N, Lucka L, Horak I, Reutter W, Horstkothe R. Sialylation is essential for early development in mice. Proc Natl Acad Sci USA 2002 Apr 16; 99(8): 5267-5270.
- Wang PH, Lee WL, Juang CM, Yang YH, Lo WH, Lai CR, Hsieh SL, Yuan CC. Altered mRNA expressions of sialyltransferases in ovarian cancers. Gynecol Oncol 2005 Dec; 99(3): 631-9.
- Ceciliani F, Pocacqua V. The acute phase protein alpha1-acid glycoprotein: a model for altered glycosylation during diseases. Curr Protein Pept Sci 2007 Feb; 8(1): 91-108.
- Orczyk-Pawilowicz M, Hirnle L, Katnik-Prastowska I. Alterations of N-glycan branching and expression of sialic acid on amniotic fluid alpha-1-acid glycoprotein derived from second and third trimesters of normal and prolonged pregnancies. Clin Chim Acta 2006 May; 367(1-2): 86-92.
- Gunnarsson P, Fornander L, Pahlsson P, Grenegård M. Sialic acid residues play a pivotal role in alpha(1)-acid glycoprotein (AGP)-induced generation of reactive oxygen species in chemotactic peptide pre-activated neutrophil granulocytes. Inflamm Res 2010 Feb; 59(2): 89-95.
- Han S, Ritzenthaler JD, Wingerd B, Rivera HN, Roman J. Extracellular matrix fibronectin increases prostaglandin E₂ receptor subtype EP4 in lung carcinoma cells through multiple signaling pathways: the role of AP-2. J Biol Chem 2007; 282(11): 7961-72.
- Pankov R, Yamada KM. Fibronectin at a glance. J Cell Sci 2002 Oct 15; 115(Pt 20): 3861-3.
- Pan D, Song Y. Role of altered sialylation of the I-like domain of β 1 integrin in the binding of fibronectin to β 1 integrin: thermodynamics and conformational analyses.

- Biophys J 2010 Jul 7; 99(1): 208-17.
9. Patel RY, Balaji PV. Identification of linkage-specific sequence motifs in sialyltransferases. *Glycobiology* 2006 Feb; 16(2): 108-16.
 10. Miyagi T. Aberrant expression of sialidase and cancer progression. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* 2008; 84(10): 407-18.
 11. Raval GN, Parekh LJ, Patel DD, Jha FP, Sainger RN, Patel PS. Clinics usefulness of alterations in sialic acid, sialyltransferase and sialoproteins in breast cancer. *Indian J Clin Biochem* 2004 Jul; 19(2): 60-71.
 12. Katoh S, Maeda S, Fukuoka H, Wada T, Moriya S, Mori A, Yamaguchi K, Senda S, Miyagi T. A crucial role of sialidase Neu1 in hyaluronan receptor function of CD44 in T helper type 2-mediated airway inflammation of murine acute asthmatic model. *Clin Exp Immunol* 2010 Aug; 161(2): 233-41.
 13. Cross AS, Hyun SW, Miranda-Ribera A, Feng C, Liu A, Nguyen C, Zhang L, Luzina IG, Atamas SP, Twaddell WS, Guang W, Lillehoj EP, Puche AC, Huang W, Wang L-X, Passaniti A, Goldblum SE. NEU1 and NEU3 sialidase activity expressed in human lung microvascular endothelia: NEU1 restrains endothelial cell migration, whereas NEU3 does not. *J Biol Chem* 2012 May 4; 287(19): 15966-80.
 14. Nakano V, Fontes Piazza RM, Avila-Campos MJ. A rapid assay of the sialidase activity in species of the bacteroides fragilis group by using peanut lectin gemagglutination. *Anaerobe* 2006 Oct-Dec; 12(5-6): 238-41.
 15. Minchenko OH, Ochiai A, Opentanova IL, Ogura T, Minchenko DO, Caro J, Komisarenko SV, Esumi H. Overexpression of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase-4 in the human breast and colon malignant tumors. *Biochimie* 2005 Nov; 87(11): 1005-10.
 16. Sata T, Roth J, Zuber C, Stamm B, Heitz PU. Expression of alpha 2,6-linked sialic acid residues in neoplastic but not in normal human colonic mucosa. A lectin-gold cytochemical study with Sambucus nigra and Maackia amurensis lectins. *Am J Pathol* 1991 Dec; 139(6): 1435-48.
 17. Tajiri M, Yoshida S, Wada Y. Differential analysis of site-specific glycans on plasma and cellular fibronectins: application of a hydrophilic affinity method for glycopeptide enrichment. *Glycobiology*. 2005 Dec; 15(12): 1332-40.
 18. Higai K, Aoki Y, Azuma Y, Matsumoto K. Glycosylation of site-specific glycans of α 1-acid glycoprotein and alterations in acute and chronic inflammation. *Biochim Biophys Acta* 2005 Aug 30; 1725(1): 128-35.
 19. Nakano M, Kakehi K, Tsai M, Lee YC. Detailed structural features of glycan chains derived from alpha1-acid glycoproteins of several different animals: the presence of hypersialylated, O-acetylated sialic acids but not disialyl residues. *Glycobiol* 2003 May; 14(5): 431-441.
 20. Videira PA, Amado IF, Crespo HJ, Algueró MC, Dall'Olivo F, Cabral MG, Trindade H. Surface alpha 2-3- and alpha 2-6-sialylation of human monocytes and derived dendritic cells and its influence on endocytosis. *Glycoconj J*. 2008 Apr; 25(3): 259-68.
 21. Kałtnik-Prastowska I, Kratz EM, Faundez R, Chełmońska-Soyta A. Lower expression of the alpha2,3-sialylated fibronectin glycoform and appearance of the asialo-fibronectin glycoform are associated with high concentrations of fibronectin in human seminal plasma with abnormal semen parameters. *Clin Chem Labor Med* 2006; 44(9): 1119-25.
 22. Erat MC, Schwarz-Linek U, Pickford AR. Implications for collagen binding from the crystallographic structure of fibronectin 6FnI1-2FnII7FnI. *J Biol Chem* 2010 Oct 29; 285(44): 33764-70.
 23. Crostek L, Cylwik B, Krawiec A, Korcz W, Szmikowski M. Relationship between serum sialic acid and sialylation glycoproteins in alcoholics. *Alcohol Alcoholism* 2007 Nov-Dec; 42(6): 588-92.
 24. Uemura T, Shiozaki K, Yamaguchi K, Miyazaki S, Satomi S, Kato K, Sakuraba H, Miyagi T. Contribution of sialidase NEU1 to suppression of metastasis of human colon cancer cells through desialylation of integrin beta4. *Oncogene*. 2009 Mar 5; 28(9): 1218-29.
 25. Nanetti L, Vignini A, Raffaelli F, Taffi R, Silvestrini M, Provinciali L, Mazzanti L. Sialic acid and sialidase activity in acute stroke. *Dis Markers* 2008; 25(3): 167-73.
 26. Sönmez H, Süer S, Güngör Z, Baloglu H, Kökçüoğlu E. Tissue and serum sialidase levels in breast cancer. *Cancer Lett* 1999 Feb 8; 136(1): 75-8.
 27. Miyagi T, Wada T, Yamaguchi K, Hata K. Sialidase and malignancy: a minireview. *Glycoconj J* 2004; 20(3): 189-98.
 28. Miyagi T, Wada T, Yamaguchi K, Shiozaki K, Sato I, Kakugawa Y, Yamanami H, Fujiya T. Human sialidase as a cancer marker. *Proteomics* 2008 Aug; 8(16): 3303-11.
 29. Hedlund M, Hg E, Varki A, Varki NM. Alpha 2-6-Linked sialic acids on N-glycans modulate carcinoma differentiation in vivo. *Cancer Res* 2008 Jun 15; 68(2): 388-94.
 30. Vakonakis I, Staunton D, Ellis IR, Sarkies P, Flanagan A, Schor AM, Schor SL, Campbell ID. Motogenic sites in human fibronectin are masked by long range interactions. *J Biol Chem*. 2009 Jun 5; 284(23): 15668-75.

Дніпропетров. нац. мед. академія МОЗ України;
 Ін-т біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України, Київ;
 Нац. мед. ун-т ім. О.О. Богомольця, Київ
 E-mail: ominchenko@yahoo.com

Матеріал надійшов
 до редакції 17.03.2014