

## ЕКСПРЕСІЯ ЦИРКАДІАЛЬНИХ ГЕНІВ У ЛІМФОЦИТАХ КРОВІ ЗА ЕРИТРЕМІЇ

Г. С. МАСЛАК<sup>1</sup>, О. Г. МІНЧЕНКО<sup>2,\*</sup>

<sup>1</sup>Кафедра біохімії, медичної та фармацевтичної хімії ДЗ «Дніпропетровська медична академія МОЗ України»;

<sup>2</sup>Відділ молекулярної біології, Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна Національної Академії наук України;

\* e-mail: ominchenko@yahoo.com

Біологічні ритми лежать в основі всіх аспектів життєдіяльності більшості організмів, причому біологічний годинник контролює широкий спектр як фізіологічних, так і метаболічних процесів, підтримуючи енергетичний обмін, циклічність секреції гормонів та імунної відповіді, а також процеси проліферації клітин. Циркадіальна система біологічного годинника представляє собою комплексну програму взаємопов'язаних між собою прямих і зворотних шляхів, що підтримують метаболічний гомеостаз, причому дисрегуляція біологічних ритмів причетна до розвитку різноманітних захворювань. Важливу роль циркадіальні ритми у тісній взаємодії зі стресом ендоплазматичного ретикулуму відіграють у підтриманні функцій імунної системи, особливо за пухлинного росту, причому порушення експресії генів *BMAL1*, *PER1* та *PER2* причетне до пухлинного росту, в тому числі і до розвитку гострої мієлоїдної лейкемії. У зв'язку з цим, метою даної роботи було дослідити експресію ключових генів біологічного годинника у лімфоцитах крові пацієнтів з еритремією (*polycythemia vera*), яка є одним із найбільш поширених мієлопроліферативних захворювань кровотворної системи, у порівнянні з лейкоцитами здорових донорів. Рівень експресії генів *PER1*, *PER2*, *CLOCK*, *BMAL1*, *BMAL2* та *CRY1*, які є основними молекулярними компонентами біологічного годинника у людини та тварин, визначали у лімфоцитах крові хворих на еритремію пацієнтів у порівнянні з контролем, лімфоцитах гематологічно здорових донорів, за допомогою кількісної полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі. Встановлено, що у лімфоцитах крові хворих на еритремію пацієнтів порівняно із здоровими донорами спостерігається істотне підвищення рівня експресії мРНК *PER1* майже у 2,5 рази, *CLOCK* – на 42 %, *BMAL1* – на 19 %, *BMAL2* – на 16 % та *CRY1* – на 27 %, у той час як рівень експресії мРНК *PER2* у лімфоцитах крові цих хворих істотно не змінювався. Отримані результати вказують на значні порушення у функціонуванні основних генів біологічного годинника і метаболічних процесах, пов'язаних із цим годинником, у лімфоцитах крові за еритремії, розкривають механізми порушень процесів проліферації за цього захворювання і можуть сприяти ідентифікації генів-мішеней для розробки принципово нових стратегій лікування онкологічних захворювань, у тому числі і еритремії.

*Ключові слова:* еритремія, лімфоцити крові, *PER1*, *PER2*, *CLOCK*, *BMAL1*, *BMAL2*, *CRY1*.

**Вступ.** Біологічні ритми лежать в основі всіх аспектів життєдіяльності людини. Відомо, що біологічний годинник контролює, оркеструє, широкий спектр фізіологічних та метаболічних процесів, підтримуючи енергетичний обмін та температура тіла, циклічність секреції гормонів та імунної відповіді, а також контролює процеси проліферації (Kondratov et al. 2007; Bray and Young, 2009; Kennaway et al., 2013; Wunderer et al., 2013; Al-Nuaimi et al., 2014; St John et al., 2014). Циркадіальна система біологічного годинника представляє собою комплексну програму взаємопов'язаних між собою прямих і зворотних шляхів, що забезпечують взаємодію центральної нервової системи з периферичними тканинами і підтримують метаболічний гомеостаз, а дисрегуляція біологічних ритмів причетна до розвитку захворювань (Green et al., 2008; Ando et al., 2009, 2011; Karbovskiy et al., 2011; Minchenko et al., 2012; Yamaoka et al., 2014). З іншого боку, метаболічні сигнали також істотно впливають на циркадіальну систему,

модулюючи експресію генів біологічного годинника (Kovac et al., 2009; Huang et al., 2011).

Біологічний годинник представлений у всіх клітинах організму, але є і центральний годинник, розташований у ссавців в супрахіазматичних ядрах гіпоталамуса, який синхронізує молекулярні, біохімічні та фізіологічні процеси у всьому організмі та дозволяє йому адаптуватися до змін у довкіллі (Morse and Sassone-Corsi, 2002; Reppert and Weaver, 2002; Schibler et al., 2003; Gatfield and Schibler, 2007). Молекулярними компонентами системи біологічного годинника є фактори груп *BMAL* (*BMAL1* та *BMAL2*), *period* (*PER1*, *PER2* та *PER3*), *cryptochromes* (*CRY1* та *CRY2*), а також *CLOCK* та деякі інші, але ключовим регулятором є транскрипційний фактор *CLOCK:BMAL1*, який ритмічно відкриває хроматин, модифікує його і надає можливість іншим транскрипційним факторам змінювати транскрипцію та регулювати біологічні функції (Takahashi, 2004; Menet et al., 2014; Zhou et al.,

2014). Важливу роль у підтриманні правильної роботи біологічного годинника відіграє також протеасома, яка, при необхідності, швидко знищує ті чи інші білкові компоненти годинника (Gatfield and Schibler, 2007).

Встановлено важливу роль циркадіальних ритмів у підтриманні належного функціонування імунної системи у тісній взаємодії зі стресом ендоплазматичного ретикулу, особливо за пухлинного росту (Arjona and Sarkar, 2006; Gamaleia et al., 2006; Maurel et al., 2014; Plaquet et al., 2014). Більше того, для генів *BMAL1*, *PER1* та *PER2* було виявлено їх причетність до пухлинного росту, в тому числі і до розвитку гострої мієлоїдної лейкемії (Gery et al., 2005, 2006; Hua et al., 2006; Jung et al., 2013).

Метою цієї роботи було дослідження експресії ключових генів біологічного годинника у лімфоцитах крові пацієнтів з еритремією (polycythemia vera), яка є одним із найбільш поширених мієлопроліферативних захворювань кровотворної системи, у порівнянні з лейкоцитами здорових донорів.

**Матеріали та методи.** Матеріалом дослідження були лімфоцити хворих на еритремію пацієнтів віком від 58 до 66 років ( $n = 5$ ) та гематологічно здорових волонтерів віком від 55 до 65 років ( $n = 5$ ). Клінічне обстеження пацієнтів проводили згідно зі стандартами медичної допомоги в умовах спеціалізованого стаціонару: гематологічного відділення комунального закладу «Міська багатoproфільна клінічна лікарня № 4» міста Дніпропетровськ. Всі обстежувані давали письмову згоду на участь у дослідженні.

Аналіз експресії *PER1*, *PER2*, *CLOCK*, *BMAL1*, *BMAL2* та *CRY1* проводили за допомогою кількісної полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) у реальному часі, використовуючи „Mx 3000P QPCR” (Stratagene, США) та SYBRGreen Mix (AB gene, Велика Британія). Для цього із лімфоцитів виділяли РНК за допомогою реагенту Trisol (Invitrogen, США). Осаджували РНК рівним об’ємом ізопропанолу, а осад РНК промивали 75 % етанолом, розчиняли у воді, вільній від рибонуклеаз, переосаджували етанолом для позбавлення препаратів РНК залишків реагенту Trisol, знову розчиняли у воді і використовували для синтезу комплементарної ДНК. Синтез кДНК проводили за допомогою QuantiTect Reverse Transcription Kit (QIAGEN, Німеччина) згідно протоколу виробника. У цьому наборі передбачено етап позбавлення препаратів РНК від можливих залишків геномної ДНК.

Для ампліфікації кДНК гена *PER1* (period 1) були використані такі праймери: прямий 5'-caccctgatgaccactctt -3' та зворотний 5'-

ggtaaggctggactggatga -3'. Нуклеотидні послідовності цих праймерів відповідають послідовностям 3878 – 3897 та 4086 – 4067 кДНК *PER1* людини (GenBank accession number NM\_002616); довжина фрагмента ампліфікації – 209 п.н.з.).

Ампліфікацію кДНК гена *PER2* проводили з прямим праймером 5'-cgtgccaaagcagttgactta -3' та зворотним праймером 5'-cagcaaggctcaacaatca -3'. Нуклеотидні послідовності цих праймерів відповідають послідовностям 6000 – 6019 та 6207 – 6188 кДНК *PER2* людини (GenBank accession number NM\_022817); довжина фрагмента ампліфікації – 208 п.н.з.).

Два інших праймери були використані для кількісного ПЛР аналізу експресії гена *BMAL1* (aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like, *ARNTL1*): прямий – 5'-agtaggtcaggacggagggt -3' і зворотний – 5'-cacacaaggaagcctctagc -3'. Нуклеотидні послідовності цих праймерів відповідають послідовностям 41 – 60 та 262 – 243 кДНК *BMAL1* людини (GenBank accession number NM\_001178); довжина фрагмента ампліфікації – 222 п.н.з.).

Для ампліфікації кДНК гена *BMAL2* (*ARNTL2*) були використані такі праймери: прямий 5'-gagtcaggagcaagaccaca -3' та зворотний 5'-ctctccgcttttcagtttg -3'. Нуклеотидні послідовності цих праймерів відповідають послідовностям 105-124 та 377-358 кДНК *BMAL2* людини (GenBank accession number NM\_020183); довжина фрагмента ампліфікації – 273 п.н.з.).

Ампліфікацію кДНК гена *CLOCK* проводили з використанням таких праймерів: прямого 5'-aggtttgatcacagcccaac -3' та зворотного 5'-tatcatgcgtgtccgttgg -3'. Нуклеотидні послідовності цих праймерів відповідають послідовностям 1605 – 1624 та 1949 – 1930 кДНК *CLOCK* людини (GenBank accession number NM\_004898); довжина фрагмента ампліфікації – 345 п.н.з.).

Для ампліфікації кДНК гена *CRY1* (cryptochrome 1, photolyase-like) були використані такі праймери: прямий – 5'-ttgcttgatgcagattggag -3' та зворотний – 5'-ttttgcagggaagcctctta -3'. Нуклеотидні послідовності цих праймерів відповідають послідовностям 2012 – 2031 та 2185 – 2166 кДНК *CRY1* людини (GenBank accession number NM\_004075); довжина фрагмента ампліфікації – 174 п.н.з.). Відносну кількість транскриптів досліджених генів нормалізували по рівню експресії бета-актину (*ACTB*), для ампліфікації якого використовували наступні праймери: прямий - 5'-ggacttcagcaagatgg -3' та зворотний - 5'-agcactgtgtggcgtacag -3', що починаються із 747-го (5'-позиція) та 980-го (3'-

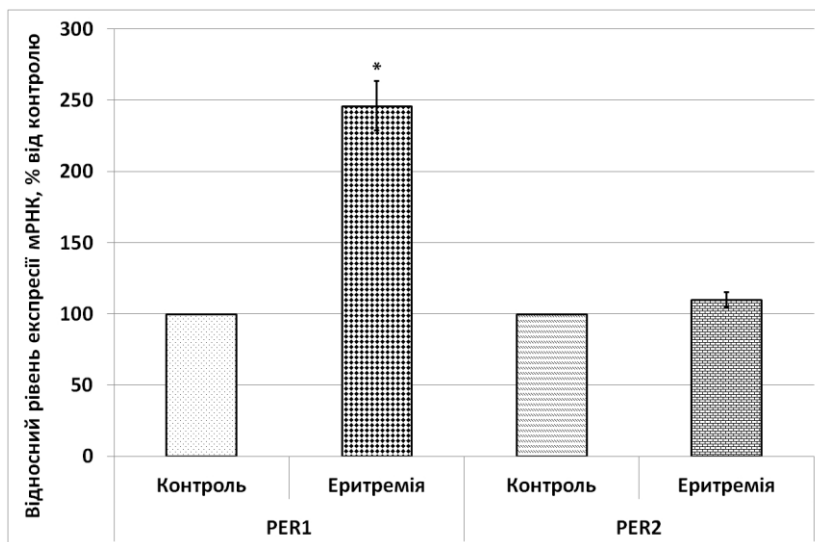
позиція) нуклеотидних залишків, відповідно; GenBank номер NM\_001101; довжина фрагмента ампліфікації – 234 п.н.з.).

Аналіз результатів дослідження експресії генів *PER1*, *PER2*, *CLOCK*, *BMAL1*, *BMAL2* та *CRY1* виконували з допомогою спеціальної комп'ютерної програми "Differential expression calculator", а статистичний аналіз – за допомогою програмного забезпечення Statistics 6.0. Значення експресії генів *PER1*, *PER2*, *CLOCK*, *BMAL1*, *BMAL2* та *CRY1* нормалізували по рівню експресії гена бета-актину і представляли у відсотках від контролю, який приймали за 100 %. Представлені середні значення  $M \pm m$  п'яти експериментів. Достовірними вважали зміни при значенні  $P < 0,05$ .

**Результати та їх обговорення.** Дослідження рівня експресії мРНК *PER1*, *PER2*, *CLOCK*, *BMAL1*, *BMAL2* та *CRY1* за допомогою полімеразної ланцюгової реакції показали наявність мРНК для всіх факторів у лімфоцитах крові як здорових донорів, так і хворих на еритремію. Кількісний аналіз експресії генів *PER1* та *PER2*, проведений методом полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі, показав, що у лімфоцитах хворих на еритремію пацієнтів порівняно із здоровими донорами спостерігається значне підвищення рівня мРНК *PER1* (у 2,45 рази;  $P < 0,001$ ), в той час як рівень мРНК *PER2* при цьому істотно не змінювався (рис. 1), в розрахунку на експресію мРНК бета-актину, як контрольного гена.

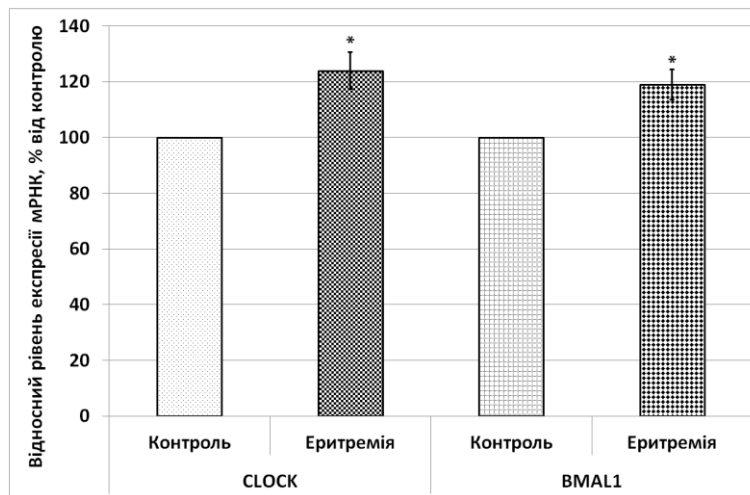
За літературними даними *PER1* і *PER2*, як і *PER3*, задіяні у регуляції численних метаболічних процесів та клітинних функцій, в тому числі і за злоякісного росту, причому для них притаманна і пухлино-супресорна функція та активація про-апоптотичних процесів (Gery et al., 2006; Hua et al., 2006; Cao et al., 2009; Eisele et al., 2009; Im et al., 2010). Таким чином, отримані нами дані про підвищення рівня експресії гена *PER1* у лімфоцитах за еритремії узгоджується з даними про посилення експресії цього гена у пухлинних клітинах, причому підвищена експресія гена *PER1* у трансформованих клітинах пригнічує ростові процеси та збільшує апоптоз викликаний іонізуючим випромінюванням, в той час як гальмування *PER1* – його знижує (Gery et al., 2006; Cao et al., 2009). І хоча у наших експериментах рівень експресії гена *PER2* у лімфоцитах за еритремії істотно не змінювався, разом з тим, у клітинах аденокарциноми легень лінії Lewis (LLC) та аденокарциноми грудної залози лінії EMT6 виявлено підвищення експресії гена *PER2*, що можливо призводить до зниження проліферації цих клітин та їх апоптозу (Hua et al., 2006).

Як видно із даних, представлених на рис. 2, у лімфоцитах крові хворих на еритремію пацієнтів порівняно із здоровими донорами спостерігається підвищення рівня експресії двох інших циркадіальних генів – *CLOCK* (на 42 %;  $P < 0,05$ ) та *BMAL1* (на 19 %;  $P < 0,05$ ), що встановлено методом кількісної ПЛР у реальному часі.



**Рис. 1.** Рівень експресії генів *PER1* та *PER2* у лімфоцитах здорових донорів (Контроль) та хворих на еритремію (Еритремія) за допомогою кількісної полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі. Величину експресії генів *PER1* та *PER2* нормалізували по рівню експресії гена  $\beta$ -актину і виражали у % по відношенню до контролю, прийнятого за 100 %;  $M \pm m$ ;  $n = 5$ ; \* –  $P < 0,001$  у порівнянні з контролем.

**Fig. 1.** The expression level of *PER1* and *PER2* genes in lymphocytes of healthy donors (Control) and patients with erythremia (Erythremia) using quantitative polymerase chain reaction in real time. Values of *PER1* and *PER2* genes expression were normalized to the level of beta-actin gene and represented as percent for control (100 %);  $M \pm m$ ;  $n = 5$ ; \* –  $P < 0,05$  as compared to control.



**Рис. 2.** Рівень експресії генів *CLOCK* та *BMAL1* у лімфоцитах здорових донорів (Контроль) та хворих на еритремію (Еритремія) за допомогою кількісної полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі.

**Fig. 2.** The expression level of *CLOCK* and *BMAL1* genes in lymphocytes of healthy donors (Control) and patients with erythremia (Erythremia) using quantitative polymerase chain reaction in real time.

Величину експресії генів *CLOCK* та *BMAL1* нормалізували по рівню експресії гена  $\beta$ -актину і виражали у % по відношенню до контролю, прийнятого за 100 %;  $M \pm m$ ;  $n = 5$ ; \* –  $P < 0,05$  у порівнянні з контролем.

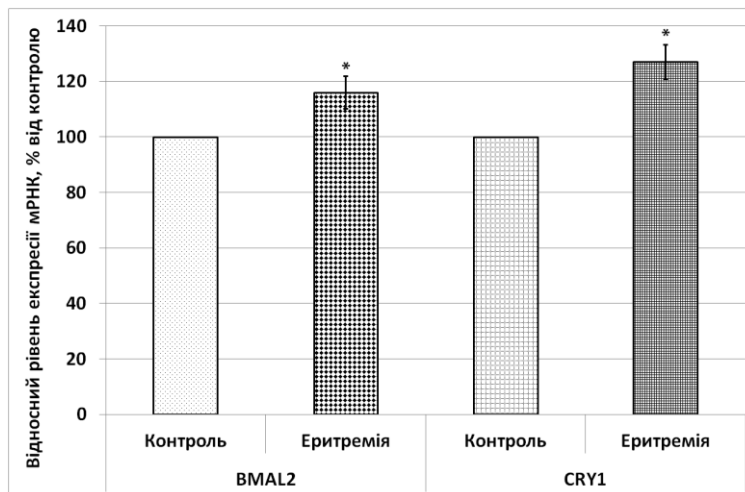
Values of *CLOCK* and *BMAL1* genes expressions were normalized to the level of beta-actin gene and represented as percent for control (100 %);  $M \pm m$ ;  $n = 5$ ; \* –  $P < 0,05$  as compared to control.

Таким чином, за еритремії у периферичних лейкоцитах експресія цих тісно взаємопов'язаних генів також порушується, що може вносити певний вклад у розвиток еритремії, оскільки транскрипційний фактор *CLOCK:BMAL1*, є гетеродимерним ключовим регулятором, який згідно функції біологічного годинника забезпечує ритмічне відкривання хроматину, модифікує його і надає можливість іншим транскрипційним факторам впливати на транскрипцію певних генів та регулювати біологічні функції клітин (Takahashi, 2004; Menet et al., 2014; Zhou et al., 2014).

На рис. 3 представлені результати дослідження рівня експресії ще двох циркадіальних генів, *BMAL2* та *CRY1*, у лімфоцитах крові пацієнтів, хворих на еритремію, у порівнянні із здоровими донорами. Методом кількісної полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі було встановлено, що рівень експресії генів як *BMAL2*, так і *CRY1*, підвищується: гена *BMAL2* на 16 % ( $P < 0,05$ ), а гена *CRY1* на 27 % ( $P < 0,05$ ). Таким чином, у периферичних лейкоцитах пацієнтів із еритремією порушується експресія і цих двох генів, що також може вносити певний вклад у розвиток цього захворювання, оскільки *BMAL2* може замінити у певних випадках *BMAL1* у гетеродимерному транскрипційному факторі *CLOCK:BMAL1* і, відповідно, модифікувати особливості регуляції експресії генів, хоча це питання є дискусійним (Sasaki et al., 2009; Shi et

al., 2010). Отримані нами результати про зміни в експресії гена *CRY1* узгоджуються з даними літератури (Eisele et al., 2009) про роль цього циркадіального фактора у протіканні хронічної лімфоцитарної лейкемії. Циркадіальний фактор *CRY1* є тісно пов'язаним з іншими факторами біологічного годинника, зокрема *BMAL1*, *CRY2* та *PER2*, причому такі фактори як *CRY1*, *CRY2* та *PER2* посилюють експресію *BMAL1* (Yu et al., 2002).

Отже, у лімфоцитах хворих на еритремію підвищується рівень експресії більшості ключових циркадіальних генів (*PER1*, *CLOCK*, *BMAL1*, *BMAL2* та *CRY1*) у порівнянні з контрольною групою. Разом з тим, за різних онкопроліферативних захворювань експресія більшості ключових циркадіальних генів має свої особливості в залежності від часу доби та типу пухлини (Cao et al., 2009; Yang et al., 2011; Savvidis et al., 2012; Rana et al., 2014). За даними Yang et al. (2011) рівень експресії дев'яти генів циркадіального годинника у хворих на хронічний мієлоїдний лейкоз у фазі бластного кризу, які проходили лікування імаїнібом, був порушений і залежав від ступеню цитогенетичної та молекулярної відповіді організму на лікування, причому значно більший рівень експресії генів біологічного годинника та більш високий ризик виникнення ускладнень було виявлено у хворих на хронічний лімфоїдний лейкоз, які працювали у нічну зміну та мали низький рівень мелатоніну (Rana et al., 2014).



**Рис. 3.** Рівень експресії генів *BMAL2* та *CRY1* у лімфоцитах здорових донорів (Контроль) та хворих на еритремію (Еритремія) за допомогою кількісної полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі.

Величину експресії мРНК *BMAL2* та *CRY1* нормалізували по рівню експресії гена  $\beta$ -актину і виражали у % по відношенню до контролю, прийнятого за 100%;  $M \pm m$ ;  $n = 5$ ; \* –  $P < 0,05$  у порівнянні з контролем.

Експериментальні дослідження на тваринах показали, що біологічний годинник є дуже чутливою до різних факторів системою, що порушується за дії низьких доз метил-третбутилового ефіру або під впливом наночасток срібла (Minchenko et al., 2012, 2014).

Таким чином, отримані нами результати вказують на можливі молекулярні механізми порушення функції біологічного годинника у лімфоцитах крові хворих на еритремію і можуть сприяти розробці більш адекватних засобів лікування цього захворювання.

#### Висновки.

1. Рівень експресії генів ключових циркадальних факторів *PER1*, *CLOCK*, *BMAL1*, *BMAL2* та *CRY1* у лімфоцитах крові хворих на еритремію збільшується у порівнянні з лімфоцитами контрольної групи.
2. У лімфоцитах крові хворих на еритремію пацієнтів порівняно із здоровими донорами не спостерігається істотних змін рівня експресії гена *PER2*.

#### Список літератури:

1. Al-Nuaimi Y., Hardman J.A., Biro T., Haslam I.S., Philpott M.P., Toth B.I., Farjo N., Farjo B., Baier G., Watson R.E., Grimaldi B., Kloepper J.E., Paus R. A meeting of two chronobiological systems: circadian proteins Period1 and BMAL1 modulate the human hair cycle clock. // *J. Invest. Dermatol.* – 2014. – 134, N 3. – P. 610-619.

**Fig. 3.** The expression level of *BMAL2* and *CRY1* genes in lymphocytes of healthy donors (Control) and patients with erythremia (Erythremia) using quantitative polymerase chain reaction in real time.

Values of *BMAL2* and *CRY1* mRNA expressions were normalized to the level of beta-actin gene and represented as percent for control (100%);  $M \pm m$ ;  $n = 5$ ; \* –  $P < 0,05$  as compared to control.

2. Ando H., Kumazaki M., Motosugi Y., Ushijima K., Maekawa T., Ishikawa E., Fujimura A. Impairment of peripheral circadian clocks precedes metabolic abnormalities in ob/ob mice. // *Endocrinology.* – 2011. – 152. – P. 1347–1354.
3. Ando H., Takamura T., Matsuzawa-Nagata N., Shima K.R., Eto T., Misu H., Shiramoto M., Tsuru T., Irie S., Fujimura A., Kaneko S. Clock gene expression in peripheral leucocytes of patients with type 2 diabetes. // *Diabetologia.* – 2009. – 52. – P. 329–335.
4. Arjona A., Sarkar D.K. Evidence supporting a circadian control of natural killer cell function. // *Brain. Behav. Immun.* – 2006. – 20. – P. 469–476.
5. Bray M.S., Young M.E. The role of cell-specific circadian clocks in metabolism and disease // *Obes. Rev.* – 2009. – 10, Suppl 2. – P. 6–13.
6. Cao Q., Gery S., Dashti A., Yin D., Zhou Y., Gu J., Koeffler H.P. A role for the clock gene *per1* in prostate cancer. // *Cancer Res.* – 2009. – 69, N 19. – P. 7619-7625.
7. Eisele L., Prinz R., Klein-Hitpass L., Nuckel H., Lowinski K., Thomale J., Moeller L.C., Duhrsen U., Durig J. Combined *PER2* and *CRY1* expression predicts outcome in chronic lymphocytic leukemia. // *Eur. J. Haematol.* – 2009. – 83, N 4. – P. 320-327.
8. Gamaleia N.F., Skivka L.M., Fedorchuk A.G., Shishko E.D. Circadian rhythms of cytotoxic activity in peripheral blood mononuclear cells of patients with malignant melanoma. // *Exp. Oncol.* – 2006. – 28. – P. 54–60.
9. Gatfield D., Schibler U. Proteasome keeps the circadian clock ticking. // *Science.* – 2007. – 316. – P. 1135–1136.

10. Green C.B., Takahashi J.S., Bass J. The meter of metabolism. // *Cell*. – 2008. – 134, N 5. – P. 728-742.
11. Gery S., Gombart A.F., Yi W.S., Koeffler C., Hofmann W.K., Koeffler H.P. Transcription profiling of C/EBP targets identifies PER2 as a gene implicated in myeloid leukemia. // *Blood*. – 2005. – 106. – P. 2827-2836.
12. Gery S., Komatsu N., Baldjyan L., Yu A., Koo D., Koeffler H.P. The circadian gene PER1 plays an important role in cell growth and DNA damage control in human cancer cells. // *Mol. Cell*. – 2006. – 22. – P. 375-382.
13. Hua H., Wang Y., Wan C., Liu Y., Zhu B., Yang C., Wang X., Wang Z., Cornelissen-Guillaume G., Halberg F. Circadian gene mPER2 overexpression induces cancer cell apoptosis. // *Cancer Sci*. – 2006. – 97. – P. 589-596.
14. Huang W., Ramsey K.M., Marcheva B., Bass J. Circadian rhythms, sleep, and metabolism. // *J. Clin. Invest*. – 2011. – 121. – P. 2133-2141.
15. Im J.S., Jung B.H., Kim S.E., Lee K.H., Lee J.K. Per3, a circadian gene, is required for Chk2 activation in human cells. // *FEBS Lett*. – 2010. – 584, N 23. – P. 4731-4734.
16. Jung C.H., Kim E.M., Park J.K., Hwang S.G., Moon S.K., Kim W.J., Um H.D. Bmal1 suppresses cancer cell invasion by blocking the phosphoinositide 3-kinase-Akt-MMP-2 signaling pathway. // *Oncol. Rep*. – 2013. – 29, N 6. – P. 2109-2113.
17. Karbovskiy L.L., Minchenko D.O., Danylovskiy S. V., Moenner M., Minchenko O.H. Endoplasmic reticulum-nuclei signaling enzyme-1 knockdown modulates effect of hypoxia and ischemia on the expression of circadian genes in glioma cells. // *Studia Biologica*. – 2011. – 5, N 2. – P. 37-50.
18. Kennaway D.J., Varcoe T.J., Voultzios A., Boden M.J. Global loss of bmal1 expression alters adipose tissue hormones, gene expression and glucose metabolism. // *PLoS One*. – 2013. – 8, N 6. – P. e65255.
19. Kondratov R.V., Gorbacheva V.Y., Antoch M.P. The role of mammalian circadian proteins in normal physiology and genotoxic stress responses. // *Curr. Top. Dev. Biol*. – 2007. – 78. – P. 173-216.
20. Kovac J., Husse J., Oster H. A time to fast, a time to feast: the crosstalk between metabolism and the circadian clock. // *Mol. Cells*. – 2009. – 282. – P. 75-80.
21. Maurel M., Samali A., Chevet E. Endoplasmic reticulum stress: at the crossroads of inflammation and metabolism in hepatocellular carcinoma development. // *Cancer Cell*. – 2014. – 26, N 3. – P. 301-303.
22. Menet J.S., Pescatore S., Rosbash M. CLOCK:BMAL1 is a pioneer-like transcription factor. *Genes Dev*. – 2014. – 28, N 1. – P. 8-13.
23. Minchenko D.O., Yavorovsky O.P., Paustovskiy Y.O., Bashta Y.M., Lypova N.M., Minchenko O.H. Expression of key circadian genes as sensitive marker of *in vivo* toxic action of methyl tertial butyl ether. // *Appl. Cell Biol*. – 2014. – 3, N 4. – P. 129-138.
24. Minchenko O.H., Yavorovsky O.P., Minchenko D.O., Zinchenko T.O., Komisarenko S.V. Expression of circadian genes is a sensitive marker of *in vivo* silver nanoparticles action. // *IOP Conf. Ser.: Mater. Sci. Eng*. – 2012. – 40. – P. 012001.
25. Morse D., Sassone-Corsi P. Time after time: inputs to and outputs from the mammalian circadian oscillators. // *Trends Neurosci*. – 2002. – 25. – P. 632-637.
26. Pluquet O., Dejeans N., Chevet E. Watching the clock: endoplasmic reticulum-mediated control of circadian rhythms in cancer. // *Ann. Med*. – 2014. – 46, N 4. – P. 233-243.
27. Rana S., Munawar M., Shahid A., Malik M., Ullah H., Fatima W., Mohsin S., Mahmood S. Deregulated expression of circadian clock and clock-controlled cell cycle genes in chronic lymphocytic leukemia. // *Mol. Biol. Rep*. – 2014. – 41, N 1. – P. 95-103.
28. Reppert S.M., Weaver D.R. Coordination of circadian timing in mammals. // *Nature*. – 2002. – 418. – P. 935-941.
29. Robles M. S., Cox J., Mann M. In-vivo quantitative proteomics reveals a key contribution of post-transcriptional mechanisms to the circadian regulation of liver metabolism. // *PLoS Genet*. – 2014. – 10, N 1. – P. e1004047.
30. Sasaki M., Yoshitane H., Du N.H., Okano T., Fukada Y. Preferential inhibition of BMAL2-CLOCK activity by PER2 reemphasizes its negative role and a positive role of BMAL2 in the circadian transcription. // *J. Biol. Chem*. – 2009. – 284, N 37. – P. 25149-25159.
31. Savvidis C., Koutsilieris M. Circadian rhythm disruption in cancer biology. // *Mol. Med*. – 2012. – 18. – P. 1249-1260.
32. Schibler U., Ripperger J., Brown S.A. Peripheral circadian oscillators in mammals: time and food. // *J. Biol. Rhythms*. – 2003. – 18. – P. 250-260.
33. Shi S., Hida A., McGuinness O.P., Wasserman D.H., Yamazaki S., Johnson C.H. Circadian clock gene Bmal1 is not essential; functional replacement with its paralog, Bmal2. // *Curr. Biol*. – 2010. – 20, N 4. – P. 316-321.
34. St John P.C., Hirota T., Kay S.A., Doyle F.J. 3rd. Spatiotemporal separation of PER and CRY posttranslational regulation in the mammalian circadian clock. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A*. – 2014. – 111, N 5. – P. 2040-2045.
35. Takahashi J.S. Finding new clock components: past and future. // *J. Biol. Rhythms*. – 2004. – 19. – P. 339-347.
36. Wunderer F., Kuhne S., Jilg A., Ackermann K., Sebesteny T., Maronde E., Stehle J.H. Clock gene expression in the human pituitary gland. // *Endocrinology*. – 2013. – 154, N 6. – P. 2046-2057.
37. Yamaoka M., Maeda N., Takayama Y., Sekimoto R., Tsushima Y., Matsuda K., Mori T., Inoue K., Nishizawa H., Tominaga M., Funahashi T., Shimomura I. Adipose hypothermia in obesity and its association with period homolog 1, insulin sensitivity, and inflammation in fat. // *PLoS One*. – 2014. – 9, N 11. – P. e112813.
38. Yang M.Y., Yang W.C., Lin P.M., Hsu J.F., Hsiao H.H., Liu Y.C., Tsai H.J., Chang C.S., Lin S.F. Altered expression of circadian clock genes in human chronic myeloid leukemia. // *J. Biol. Rhythms*. – 2011. – 26, N 2. – P. 136-148.

39. Yu W., Nomura M., Ikeda M. Interactivating feedback loops within the mammalian clock: BMAL1 is negatively autoregulated and upregulated by CRY1, CRY2, and PER2. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2002. – 290. – P. 933–941.
40. Zhou B., Zhang Y., Zhang F., Xia Y., Liu J., Huang R., Wang Y., Hu Y., Wu J., Dai C., Wang H., Tu Y., Peng X., Wang Y., Zhai Q. CLOCK/BMAL1 regulates circadian change of mouse hepatic insulin sensitivity by SIRT1. // *Hepatology.* – 2014. – 59, N 6. – P. 2196-2206.

## EXPRESSION OF CIRCADIAN GENES IN LYMPHOCYTES IN ERYTHREMIA

H. S. Maslak, O. H. Minchenko

*Biological rhythms are important in the regulation of almost all aspects of the life of most organisms. Biological clock controls wide spectra both physiological and metabolic processes supporting energy balance, cyclic character of hormone secretion and immune response as well as cell proliferation. Circadian system of biological clock represents a complex program of tightly interconnected direct and feed-back pathways for supporting of metabolic homeostasis. Its dysregulation leads to development of various diseases. Biological rhythms are tightly interconnected with endoplasmic reticulum stress and play an important role in the regulation of immune system, especially in tumor growth. Moreover, alterations in BMAL1, PER1, and PER2 genes expression are related to tumor growth including development of acute myeloid leukemia. Thus, the aim of this study was investigation of the expression of key genes of biological clock in lymphocytes of patients with erythremia (polycythemia vera), which is mostly prevalent myeloproliferative disease, in comparison to lymphocytes of healthy donors. The expression level of PER1, PER2, CLOCK, BMAL1, BMAL2, and CRY1 genes, which are the major components of biological clock in human and animals, were measured in blood lymphocytes of patients with erythremia in comparison to control (lymphocytes of healthy donors) using quantitative polymerase chain reaction in real time. It was shown that in lymphocytes of erythremia patients significantly increases the expression level of PER1 (almost in 2.5 fold), CLOCK (+42 %), BMAL1 (+19 %), BMAL2 (+16 %) and CRY1 (+27 %) mRNA as compared to lymphocytes of healthy donors. At the same time, the expression level of PER2 mRNA in lymphocytes of patients with erythremia significantly does not changed compared to healthy donors. Results of this study are shown significant dysregulations in the function of major circadian genes in lymphocytes of peripheral blood of patients with erythremia and may help to identify target genes for creation of new strategies for cancer treatment including erythremia.*

*Keywords: erythremia, lymphocytes, PER1, PER2, CLOCK, BMAL1, BMAL2, CRY1.*

*Одержано редколлегією 04.03.2015*