

УДК: 616.98[578.825-616.155.392]:614.876

Н. І. Білоус, І. В. Абраменко✉, А. А. Чумак, І. С. Дягіль, З. В. Мартіна

*Державна установа «Національний науковий центр радіаційної медицини Національної академії медичних наук України», вул. Мельникова, 53, м. Київ, 04050, Україна*

## ЕКСПРЕСІЯ ГЕНА ЛІПОПРОТЕЇНЛІПАЗИ І ОНКОГЕНА *c-MYC* У ХВОРИХ НА ХРОНІЧНУ ЛІМФОЦИТАРНУ ЛЕЙКЕМІЮ, ЯКІ ПОСТРАЖДАЛИ ВНАСЛІДОК АВАРІЇ НА ЧОРНОБИЛЬСЬКІЙ АЕС

**Мета:** визначити асоціацію між експресією генів ліпопротеїнліпази (*LPL*) і *c-MYC* у периферичній крові хворих на хронічну лімфоцитарну лейкемію (ХЛЛ), які постраждали внаслідок Чорнобильської катастрофи, залежно від мутаційного статусу *IGHV* генів.

**Методи.** Дослідження проведено у групі 69 хворих на ХЛЛ, опромінених внаслідок аварії на Чорнобильській АЕС (58 учасників ліквідації наслідків аварії 1986 р., 6 мешканців територій, контамінованих радіонуклідами, 5 евакуйованих). Мутаційний статус *IGHV* генів досліджували за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) з наступним секвенуванням. Експресію генів *LPL* і *c-MYC* оцінювали методом ПЛР у реальному часі. Отримані дані аналізували у статистичній програмі SPSS software package, version 20.0.

**Результати.** Відносний рівень експресії гена *LPL* коливався в межах від 0 до 1663,5 ( $138,47 \pm 30,69$ , медіана 26,1). Виявлена достовірною кореляція між окремими рівнями експресії *LPL* і мутаційним статусом *IGHV* генів ( $r = 0,684$ ;  $p < 0,0001$ ). Відносний рівень експресії *c-MYC* становив  $5,7 \pm 0,87$  (медіана 2,86; коливання від 0 до 48,5). Асоціації між рівнем *c-MYC* експресії та мутаційним статусом *IGHV* генів не виявлено. Серед хворих на ХЛЛ з немутуваними *IGHV* генами спостерігалась кореляційна залежність між експресією генів *LPL* і *c-MYC* ( $r = 0,351$ ;  $p = 0,013$ ).

**Висновки.** Отримані дані підтверджують домінуючу концепцію відносно більшої чутливості випадків ХЛЛ з немутуваними *IGHV* генами, порівняно з мутованими, до дії проліферативних стимулів, що супроводжується підвищенням експресії функціонально значущого *LPL*, одного з найбільш чітких маркерів негативного прогнозу перебігу ХЛЛ.

**Ключові слова:** хронічна лімфоцитарна лейкемія, гени *LPL*, *c-MYC*, *IGHV*, аварія на Чорнобильській АЕС.

*Проблеми радіаційної медицини та радіобіології. 2020. Вип. 25. С. 421–429. doi: 10.33145/2304-8336-2020-25-421-429*

✉ Абраменко Ірина Вікторівна, e-mail: [abramenko\\_iryana@ukr.net](mailto:abramenko_iryana@ukr.net)

N. I. Bilous, I. V. Abramenko✉, A. A. Chumak, I. S. Diagil, Z. V. Martina

State Institution «National Research Center for Radiation Medicine of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine», 53 Yurii Illienka St., Kyiv, 04050, Ukraine

## EXPRESSION OF LIPOPROTEIN LIPASE AND *c-MYC* ONCOGENE IN PATIENTS WITH CHRONIC LYMPHOCYTIC LEUKEMIA AFFECTED BY THE CHORNOBYL ACCIDENT

**Objective:** to determine the association between the expression of lipoprotein lipase (*LPL*) and *c-MYC* genes in peripheral blood cells of chronic lymphocytic leukemia (CLL) patients affected by the Chernobyl catastrophe depending on the mutational status of *IGHV* genes.

**Methods.** Analysis was performed in the group of 69 CLL patients irradiated due to the Chernobyl NPP accident (58 clean-up workers of 1986 year, 6 inhabitants of radionuclide contaminated areas, and 5 evacuees). The *IGHV* gene mutational status was studied by polymerase chain reaction (PCR) followed by direct sequencing. *LPL* and *c-MYC* expression was evaluated by Quantitative Real-time PCR. Data were analyzed with the SPSS software package, version 20.0.

**Results.** Relative *LPL* expression levels in CLL samples ranged from 0 to 1663.5 (mean  $138.47 \pm 30.69$ , median 26.1). A strong correlation between individual *LPL* expression levels and *IGHV* mutational status was found ( $r = 0.684$ ;  $p < 0.0001$ ). The average relative *c-MYC* expression level was  $5.7 \pm 0.87$  (median 2.86; range 0–48.5). No association between *c-MYC* expression and *IGHV* mutational status was found. Among unmutated *IGHV* cases, a correlation between *LPL* and *c-MYC* gene expression levels was identified:  $r = 0.351$ ;  $p = 0.013$ .

**Conclusions.** Our data confirm the dominant concept that unmutated *IGHV* CLL cases are more sensitive to the action of proliferative stimuli compared to mutated *IGHV* CLL cases. This is manifested by an increase in the expression of a functionally significant *LPL* gene, is one for the strongest negative prognostic markers in CLL.

**Key words:** chronic lymphocytic leukemia, *LPL*, *c-MYC*, *IGHV* genes, Chernobyl NPP accident.

*Problems of Radiation Medicine and Radiobiology. 2020;25:421-429. doi: 10.33145/2304-8336-2020-25-421-429*

### ВСТУП

Хронічна лімфоцитарна лейкемія (ХЛЛ) В-клітинного походження належить до найбільш поширених онкогематологічних захворювань у групі ліквідаторів наслідків аварії (ЛНА) на Чорнобильській АЕС [1–4]. Одним з найважливіших маркерів прогнозу ХЛЛ є мутаційний статус генів важких ланцюгів імуноглобулінів (*IGHV* генів). Експресія на поверхні лейкоцитарних клітин немутованих (UM) *IGHV* генів асоційована зі скороченням безрецидивного і загального виживання хворих [5–7]. Причини цього остаточно не з'ясовані. Припускається, що у випадках ХЛЛ з UM *IGHV* генами відбувається більш інтенсивна передача внутрішньоклітинного сигналу при зв'язуванні В-клітинного рецептора (ВКР), пов'язаного з кіназою ZAP-70. Це призводить до підвищеної проліферативної активності лейкоцитарних клітин і агресивнішого перебігу хвороби [8]. Крім наявності білка ZAP-70, лейкоцитарні клітини при немутованому статусі *IGHV* генів характеризуються активацією експресії гена ліпопротеїніліпази (lipoprotein lipase,

### INTRODUCTION

Chronic lymphocytic leukemia (CLL) of B cell origin is one of the most common oncohematologic diseases in the clean-up workers of Chernobyl accident group [1–4]. One of the most important markers for the prognosis of CLL is the mutational status of the immunoglobulin heavy chain genes (*IGHV* genes). The expression of non-mutated (UM) *IGHV* genes is associated with a worse relapse-free and overall survival of patients [5–7]. The reasons for this are not fully understood. It is suggested that in UM *IGHV* CLL cases, a more intense transmission of the intracellular signal occurs upon binding of the B-cell receptor (BCR), which associated with ZAP-70 kinase. This leads to increased proliferative activity of leukemic cells and more aggressive course of disease [8]. In addition to the presence of ZAP-70, leukemic cells with UM *IGHV* gene are characterized by activation of lipoprotein lipase (*LPL*) gene expression [9–11]. *LPL* is the central enzyme of

✉ Iryna V. Abramenko, e-mail: [abramenko\\_iryna@ukr.net](mailto:abramenko_iryna@ukr.net)

LPL) [9–11]. LPL – центральний фермент метаболізму ліпідів. У вигляді гомодимера він гідролізує тригліцериди та ліпопротеїди дуже низької щільності. Вважають, що LPL відіграє суттєву роль в реалізації негативного прогностичного значення UM *IGHV* генів: вона активує ліполіз, використання ліпопротеїдів як джерела енергії та сприяє проліферації клітин. Водночас LPL сприяє зв'язку В-лімфоцитів при ХЛЛ з мікрооточенням та отриманню додаткових проліферативних і антиапоптичних стимулів, з'єднуючи, як міст, протеоглікани на поверхні злоякісно трансформованих В-клітин з іншими клітинами (макрофагами, Т-лімфоцитами, ендотелієм судин тощо) [12]. Перевагу віддають саме неферментативній функції LPL, оскільки є дані щодо низької її ферментативної активності, незважаючи на високу концентрацію мРНК і відповідного білка [13]. Відомо, що активація В-лімфоцитів через ВКР супроводжується підвищенням експресії гена *c-MYC* [14]. Однак, чи корелює підвищення експресії *LPL* з експресією гена *c-MYC* у клітинах пацієнтів з ХЛЛ за різного мутаційного статусу *IGHV* генів остаточно невідомо.

## МЕТА

Метою даної роботи було визначення асоціації між експресією генів *LPL* і *c-MYC* у клітинах периферичної крові пацієнтів з ХЛЛ, які постраждали внаслідок Чорнобильської катастрофи, з урахуванням мутаційного статусу *IGHV* генів.

## МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Проведено обстеження 69 пацієнтів з ХЛЛ, опромінених внаслідок Чорнобильської катастрофи (61 чоловіків та 8 жінок), які перебували на лікуванні в Державній установі «Національний науковий центр радіаційної медицини Національної академії медичних наук України» (ННЦРМ). П'ятдесят вісім хворих були учасниками ліквідації наслідків Чорнобильської аварії у 1986 р., шість – мешканцями територій України, забруднених радіонуклідами, п'ять – евакуйованими. Дослідження було схвалено комітетом з медичної етики ННЦРМ. Діагноз ХЛЛ встановлювали за клініко-гематологічними даними, морфологічними особливостями клітин і результатами імунофенотипування. Більшість пацієнтів ( $n = 64$ ; 92,7 %) на момент проведення дослідження ще не отримували лікування, п'ять – були раніше лікованими та обстеженими в рецидиві захворювання перед курсом терапії.

Геномну ДНК і загальну РНК отримували з мононуклеарів периферичної крові, використовуючи на-

lipid metabolism. As homodimer, it hydrolyzes triglycerides and very low-density lipoproteins. It is believed that LPL plays a central role in realizing the negative prognostic value of UM *IGHV* genes: it activates lipolysis, the usage of lipoproteins as an energy source, and promotes cell proliferation. At the same time, LPL contributes in the binding of CLL cells to the microenvironment and obtaining additional proliferative and anti-apoptotic stimuli, acting as a bridge between proteoglycans on the surface of leukemic cells and other cells (macrophages, T lymphocytes) [12]. It is possible that the non-enzymatic function of LPL is the main one, since there is evidence of its low enzymatic activity, despite the high cellular concentration of mRNA and the corresponding protein [13]. It is known that activation of B lymphocytes through BCR is accompanied by increased expression of *c-MYC* gene [14]. However, whether *LPL* gene expression correlates with the expression of *c-MYC* gene in CLL patients with different mutational status of *IGHV* genes is still unknown.

## OBJECTIVE

Therefore, the purpose of this work was to determine the association between the expression of *LPL* and *c-MYC* genes in peripheral blood cells of CLL patients affected by the Chernobyl catastrophe, considering the mutational status of *IGHV* genes.

## MATERIAL AND METHODS

The studied cohort included 69 IR exposed CLL patients (61 males and 8 females), referred to the State Institution «National Research Center for Radiation Medicine of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine». Fifty-eight of 69 CLL patients were clean-up workers of 1986 year, six – inhabitants of radionuclide contaminated areas, and five patients – evacuees. The study was approved by the local Ethics Review Committee, and all patients gave informed consent prior to participation in it. The diagnosis of CLL was based on clinical history, lymphocyte morphology, and immunophenotypic criteria. The majority of patients ( $n = 64$ , 92.7%) were untreated at the time of blood collection and five were treated with various therapeutic regimens. Previously treated patients were observed in relapse before the next course of therapy.

Genomic DNA and total RNA were extracted from peripheral blood mononuclear cells with the

бори QIAamp Blood Mini Kit (Qiagen, Crawley, United Kingdom) і TRI Reagent® (Molecular Research Center Inc., Cincinnati, OH), відповідно.

Мутаційний статус *IGHV* генів визначали в усіх хворих методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) з наступним секвенуванням, як описано раніше [15]. Аналіз отриманих нуклеотидних послідовностей проводили з використанням бази даних IMGT [16]. *IGHV* послідовності з гомологією до найближчого гермінативного гена  $\geq 98\%$  розцінювали як немутовані, а з гомологією  $< 98\%$  – як мутовані (М) [6, 7].

Для аналізу експресії генів синтезували кДНК з 5  $\mu\text{g}$  РНК за допомогою набору реагентів RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific) згідно з інструкціями виробника. ПЛР у реальному часі проводили на ампліфікаторі Bio-Rad Real-time IQ Detector System (Bio-Rad). Для ампліфікації використовували 2  $\mu\text{l}$  кДНК у 25  $\mu\text{l}$  реакційної суміші, яка містила 1  $\mu\text{M}$  кожного праймера і реагент Absolute Blue qPCR SYBR Green Fluorescein Mix (Thermo Scientific). Умови ПЛР були такими: етап первинної денатурації – 95 °C за 15 хв і наступні 45 циклів ампліфікації (95 °C – 15 сек, 60 °C – 30 сек, 72 °C – 30 сек). Всі реакції проводили в дуплеті.

Були використані праймери: для ампліфікації гена *c-MYC* – прямий праймер – 5'-TCGGATTCTCTGCTCTCCTC-3' і зворотній праймер 5'-GAGCCTGCCTCTTTCCAC-3' (згідно з Caraballo зі співавт. [17]); для ампліфікації гена *LPL* – прямий праймер 5'-CAGCAGCAAACCTTCATGGT-3' та зворотній праймер 5'-AGTTTTGGCACCCAACTCTCA-3' (згідно з van Bockstaele зі співавт. [18]).

Рівні експресії генів *c-MYC* і *LPL* нормалізували щодо експресії контрольного гена *ABL1* (v-abl Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1) згідно з рекомендаціями Європейської протиракової програми [19]: прямий праймер – 5'-TGGAGATAAACTCTAAGCATAACTAAAGGT-3' та зворотній праймер 5'-GATGTAGTTGCTTGGGACCCCA-3'. Відносну експресію генів *LPL* і *c-MYC* розраховували за  $\Delta\Delta\text{C}$  методом [20]. Калібратором експресії генів *LPL* і *c-MYC* були зразки периферичної крові практично здорового донора.

Для визначення граничного рівня експресії гена *LPL* за М і UM *IGHV* генів застосовували ROC-аналіз (receiver operating characteristic; операційна характеристика спостерігача). Порівняння експресії генів *LPL* і *c-MYC* у випадках ХЛЛ з М та UM *IGHV* генами проводили за допомогою ANOVA та тесту ксі-квадрат. Асоціацію між експресією генів

QIAamp Blood Mini Kit (Qiagen, Crawley, United Kingdom) and TRI Reagent® (Molecular Research Center Inc., Cincinnati, OH), respectively.

The *IGHV* gene mutational status was assessed in all patients by PCR amplification followed by direct sequencing as reported previously [15]. Sequence analysis was performed using the IMGT database [16]. *IGHV* sequences with  $\geq 98\%$  homology to the closest germ-line gene were considered as unmutated, and cases with  $< 98\%$  homology were considered as mutated (M) [6, 7].

For gene expression analysis, cDNA was synthesized from 5  $\mu\text{g}$  RNA using RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific), according to the supplier's instructions. Quantitative Real-time PCR (RT-qPCR) was performed with the Bio-Rad Real-time IQ Detector System (Bio-Rad). Amplification was carried out with 2  $\mu\text{l}$  of cDNA in a 25  $\mu\text{l}$  reaction mixture containing 1  $\mu\text{M}$  of each primer and Absolute Blue qPCR SYBR Green Fluorescein Mix (Thermo Scientific). PCR cycling conditions were: an initial denaturation step of 95 °C for 15 min, and 45 cycles of 95 °C for 15 s, 60 °C for 30 s and 72 °C for 30 s. All reactions were done in duplicate.

The following primers were used: for *c-MYC* forward primer – 5'-TCGGATTCTCTGCTCTCCTC-3' and reverse primer 5'-GAGCCTGCCTCTTTCCAC-3' (according to Caraballo et al. [17]); for *LPL* – forward primer 5'-CAGCAGCAAACCTTCATGGT-3' and reverse primer 5'-AGTTTTGGCACCCAACTCTCA-3' (according to van Bockstaele et al. [18]).

The expression levels of *c-MYC* and *LPL* genes were normalized to the expression of the housekeeping gene *ABL1* (v-abl Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1) according to recommendation of the Europe Against Cancer program [19]: forward primer – 5'-TGGAGATAAACTCTAAGCATAACTAAAGGT-3' and reverse primer 5'-GATGTAGTTGCTTGGGACCCCA-3'. The relative *LPL* and *c-MYC* expression were calculated using the  $\Delta\Delta\text{C}$  method [20]. The *LPL* and *c-MYC* expression of peripheral blood sample of healthy donor was used as a calibrator for relative quantification.

Receiver operating characteristic (ROC) curve analyses was performed to determine the *LPL* expression cut-off values that best distinguished between *IGHV* M and UM cases. ANOVA analysis and chi-square test were used to compare *LPL* and *c-MYC* expression between UM and M *IGHV* CLL cases. Associations between *LPL* and *c-MYC* expres-



*LPL* і *c-MYC* визначали методом кореляційного аналізу. Всі розрахунки проведені у статистичній програмі SPSS software package, версія 20.0.

## РЕЗУЛЬТАТИ

Серед обстежених хворих на ХЛЛ у 47 випадках (68,1 %) в лейкомічних клітинах була визначена експресія UM *IGHV* генів, а у 22 випадках (31,9 %) – M *IGHV* генів. Відносний рівень експресії гена *LPL* у зразках периферичної крові хворих коливався від 0 до 1663,5 ( $138,47 \pm 30,69$ , медіана 26,1). Випадки ХЛЛ з UM *IGHV* генами мали значно вищу експресію гена *LPL* ( $204,93 \pm 44,45$ , медіана 84,5; розкид 0,3–1663,5), порівняно з мутованими випадками ( $17,86 \pm 12,69$ ; медіана 1,1; розкид 0–27,9),  $p < 0,0001$ . Виявлена чітка достовірна кореляція між рівнями індивідуальної експресії *LPL* і мутаційним статусом *IGHV* генів ( $r = 0,684$ ;  $p < 0,0001$ ). Ми застосували метод ROC-аналізу для розрахунку граничного рівня експресії гена *LPL*, який дозволяє розрізнити випадки ХЛЛ з UM і M *IGHV* генами. Відносний показник експресії 17,0 мав найкращий ступінь дискримінації. Враховуючи цей показник рівня експресії гена *LPL*, 60 із 69 пацієнтів з ХЛЛ (86,9 %) коректно були віднесені до груп з мутованим і немутованим статусом *IGHV* генів (табл. 1).

Експресія гена *c-MYC* була значно нижчою за експресію гена *LPL*. Середній відносний рівень експресії гена *c-MYC* склав  $5,7 \pm 0,87$  (медіана 2,86; розкид 0–48,5). Згідно з рекомендаціями Stasik зі співавт. [21], за середнім показником (5,7) проведено диференціацію низької та підвищеної експресії *c-MYC*: 22 (31,8 %) випадків були класифіковані як випадки з підвищеною експресією гена *c-MYC*, а 47 (68,2 %) випадків – з низьким рівнем експресії. Асоціації експресії *c-MYC* з мутаційним статусом *IGHV* генів не виявлено. У хворих з UM *IGHV* генами середній рівень *c-MYC* експресії становив  $5,76 \pm 1,19$  (медіана 2,86), а у пацієнтів з M *IGHV* –  $5,22 \pm 1,04$  (медіана 1,04);  $p = 0,773$ .

### Таблиця 1

Експресія генів ліпопротеїналіпази і *c-MYC* у пацієнтів з хронічною лімфоцитарною лейкоїєю залежно від мутаційного статусу *IGHV* генів лейкомічних клітин

Table 1

Expression of lipoprotein lipase gene and *c-MYC* gene in chronic lymphocytic leukemia patients depending on *IGHV* mutational status of leukemic cells

Мутаційний статус <i>IGHV</i> генів <i>IGHV</i> mutational status	Рівень експресії гена <i>LPL</i> <i>LPL</i> expression level		Рівень експресії гена <i>c-MYC</i> <i>c-MYC</i> expression level	
	високий/high ( $\geq 17,0$ )	низький/low ( $< 17,0$ )	високий/high ( $\geq 5,7$ )	низький/low ( $< 5,7$ )
UM <i>IGHV</i> гени / UM <i>IGHV</i> genes, n = 47	40 (85,1 %)	7 (14,9 %)	12 (25,5 %)	35 (74,5 %)
M <i>IGHV</i> гени / M <i>IGHV</i> genes, n = 22	2 (9,1 %)	20 (90,9 %)	5 (22,7 %)	17 (99,3 %)
Вірогідність	0,0001		0,801	

tion were assessed with correlation analysis. All analyses were performed with the SPSS software package, version 20.0.

## RESULTS

There were 47 cases (68.1 %) with UM *IGHV* genes and 22 cases (31.9 %) with M *IGHV* genes among observed CLL patients. Relative *LPL* expression levels in CLL samples ranged from 0 to 1663.5 (mean  $138.47 \pm 30.69$ , median 26.1). UM *IGHV* cases showed a significantly higher *LPL* expression (mean  $204.93 \pm 44.45$ ; median 84.5, range 0.3–1663.5) in comparison with mutated cases (mean  $17.86 \pm 12.69$ ; median 1.1, range 0–27.9),  $p < 0.0001$ . A strong correlation between individual *LPL* expression levels and *IGHV* mutational status was found ( $r = 0.684$ ;  $p < 0.0001$ ). We applied ROC curve analysis to calculate cut-off value for the expression *LPL* to distinguish UM and M *IGHV* CLL cases. The cut-off value of 17.0 showed the best degree of discrimination. With this expression value 60 of 69 patients (86.9 %) were classified correctly into the *IGHV* mutated and unmutated group (Table 1).

*c-MYC* expression was significantly lower. The average relative *c-MYC* expression level was  $5.7 \pm 0.87$  (median 2.86; range 0–48.5). The overall mean *c-MYC* value (5.7) was used as the cut-off value to designate increased vs low expression, following Stasik et al. [21]. Thus, 22 (31.8 %) cases were classified as cases with increased *c-MYC*, while 47 (68.2 %) cases – as low *c-MYC* expressed. No association between *c-MYC* expression and *IGHV* mutational status was found. For UM *IGHV* cases mean of *c-MYC* expression was  $5.76 \pm 1.19$  (median 2.86), for M *IGHV* cases mean of *c-MYC* expression was  $5.22 \pm 1.04$  (median 1.04),  $p = 0.773$ .

Серед випадків ХЛЛ з UM *IGHV* генами виявлена кореляція між рівнями експресії генів *LPL* і *c-MYC* ( $r = 0,351$ ;  $p = 0,013$ ). У випадках з підвищеною *c-MYC* експресією спостерігали значно вищу експресію гена *LPL* ( $371,59 \pm 78,79$ ; медіана 238,9), порівняно з випадками низької експресії *c-MYC* ( $149,09 \pm 34,08$ ; медіана 71,4),  $p = 0,013$ . Серед пацієнтів з ХЛЛ з M *IGHV* генами така залежність була відсутня і рівень експресії гена *LPL* не розрізнявся серед випадків з підвищеною ( $59,03 \pm 57,33$ ; медіана 1,8) і низькою ( $6,92 \pm 2,05$ ; медіана 1,2) експресією гена *c-MYC*:  $r = 0,086$ ;  $p = 0,689$ .

## ОБГОВОРЕННЯ

Отримані нами дані щодо експресії генів *LPL* і *c-MYC* збігаються з результатами інших дослідників. Ген *LPL* ідентифікований як один з генів, експресія якого значно розрізняється між випадками ХЛЛ, залежно від мутаційного статусу *IGHV* генів [12, 13, 22]. Згідно з даними більшості дослідників, експресія гена *c-MYC* у периферичній крові хворих на ХЛЛ низька і не корелює з мутаційним статусом *IGHV* генів. Водночас Antosz зі співавт. [23] виявили підвищення експресії гена *c-MYC* при прогресуванні ХЛЛ. У дослідженні Caraballo зі співавт. [17] рівень експресії *c-MYC* у периферичній крові пацієнтів з ХЛЛ був обернено пов'язаний з концентрацією в клітинах білка p27, інгібітора комплексу цикліни/циклінзалежні кінази. Відомо, що експресія *c-MYC* активується під впливом різноманітних мітогенних стимулів, асоційованих з MAPK/ERK кіназами (протеїнкінази, що активуються мітогенами і позаклітинними сигналами; protein kinases activated by mitogens and extracellular signals), ВКР, CD40 антигеном, JAK/STAT кіназами, NOTCH and Wnt сигнальними шляхами [24]. Rombout зі співавт. [25] показали, що стимуляція ВКР під впливом анти-IgM антитіл індукує експресію *c-MYC*, що супроводжується й підвищенням експресії гена *LPL*, однак тільки у первинно (до стимуляції) *LPL*-позитивних випадках. Мутаційний статус *IGHV* генів у цьому дослідженні не визначали.

У нашій роботі ми оцінювали експресію генів *c-MYC* і *LPL* залежно від мутаційного статусу *IGHV* генів і виявили позитивну кореляцію між ними тільки у пацієнтів з UM *IGHV* генами. У пацієнтів з M *IGHV* генами експресія *LPL* була незалежною від експресії гена *c-MYC*. Раніше Abreu зі співавт. [26] показали, що підвищена експресія гена *LPL* при UM *IGHV* випадках ХЛЛ була наслідком деметилювання CpG острівців у першому екзоні та перших нуклеотидів 1-го інтрону гена *LPL*. Можна припустити, що за UM *IGHV* генів експресія гена *LPL* має

Among UM *IGHV* cases, a correlation between *LPL* and *c-MYC* gene expression levels was identified:  $r = 0.351$ ;  $p = 0.013$ . Cases with elevated *c-MYC* expression showed a significantly higher *LPL* expression ( $371.59 \pm 78.79$ , median 238.9) compared with low *c-MYC* expressed cases ( $149.09 \pm 34.08$ , median 71.4),  $p = 0.013$ . Among M *IGHV* cases, such dependence was not revealed: *LPL* gene expression levels did not differ between cases with elevated ( $59.03 \pm 57.33$ , median 1.8) and low ( $6.92 \pm 2.05$ , median 1.2) *c-MYC* gene expression,  $r = 0.086$ ;  $p = 0.689$ .

## DISCUSSION

Our data on *LPL* and *c-MYC* gene expression are consistent with those of other authors. *LPL* was identified as one of the most differentially expressed genes between mutated and unmutated CLL [12, 13, 22]. According to data of the most researchers, *c-MYC* gene expression in the peripheral blood of CLL patients was low and did not correlate with *IGHV* mutational status. At the same time, Antosz et al. [23] found an increase in *c-MYC* gene expression during CLL progression. In the study of Caraballo et al. [17] *c-MYC* expression level in peripheral blood of CLL patients was inversely related to the concentration of the p27 protein, an inhibitor of the cyclin/cyclin-dependent kinase complex. It is known, that *c-MYC* expression is activated by various mitogenic stimuli associated with MAPK/ERK kinases (protein kinases activated by mitogens and extracellular signals), B cell receptor, CD40 antigen, JAK/STAT kinases, NOTCH and Wnt pathways [24]. Rombout et al. [25] shown that BCR stimulation with immobilized anti-IgM antibodies induced *c-MYC* expression, which was accompanied by an increase in *LPL* expression, but only in initially *LPL*-positive cases. *IGHV* mutational status was not evaluated in this study.

In our work, we evaluated *c-MYC* and *LPL* gene expression depending on the *IGHV* mutational status, and found a positive correlation between them only in patients with UM *IGHV* genes. In cases with M *IGHV* genes, *LPL* expression was independent of *c-MYC* expression. Earlier Abreu et al. [26] demonstrated that elevated expression of *LPL* gene in UM *IGHV* CLL cases results from the lack of methylation in the CpG island involving the whole exon 1 and the first nucleotides of intron 1 of *LPL*. It can be assumed that in UM *IGHV* cases *LPL* gene

можливість зростати при дії активаційних стимулів (що супроводжується й підвищенням експресії гена *c-MYC*) саме завдяки гіпометильованому стану промоторної ділянки. У *M IGHV* випадках цей механізм не задіяний внаслідок неактивного стану гена *LPL*.

## ВИСНОВКИ

Наші дані підтверджують домінуючу концепцію відносно більшої чутливості до дії проліферативних (активаційних) стимулів лейкемічних клітин у пацієнтів з ХЛЛ з *UM IGHV* генами, на відміну від випадків з *M IGHV* генами. Це проявляється підвищенням експресії функціонально значущого гена *LPL* – одного з найбільш негативних маркерів прогнозу перебігу ХЛЛ.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. The Ukrainian-American study of leukemia and related disorders among Chernobyl cleanup workers from Ukraine: III. Radiation risks / A. Romanenko, S. Finch, M. Hatch et al. *Radiat. Res.* 2008. Vol. 170, no. 6. P. 711–720. URL: <https://doi.org/10.1667/RR1404.1>
2. Radiation and the risk of chronic lymphocytic and other leukemias among Chernobyl clean-up workers / L. B. Zablotska, D. Bazyka, J. H. Lubin et al. *Environ. Health Perspect.* 2013. Vol. 121, no. 1. P. 59–65. doi: 10.1289/ehp.1204996.
3. Cancers after Chernobyl: from epidemiology to molecular quantification / D. Bazyka, N. Gudzenko, I. Dyagil et al. *Cancers (Basel)*. 2019 Vol. 11, no. 9. pii E1291. doi: 10.3390/cancers11091291.
4. Gluzman D. F., Sklyarenko L. M., Nadgornaya V. A., Zavelevich M. P. Mature B-cell neoplasms in Chernobyl clean-up workers of 1986–1987: summary of cytomorphological and immunocytochemical study in 25 years after Chernobyl accident. *Exp. Oncol.* 2011. Vol. 33, no. 1. P. 47–51.
5. Unmutated Ig V(H) genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia / T. J. Hamblin, Z. Davis, A. Garddiner et al. *Blood*. 1999. Vol. 94, no. 6. P. 1848–1854.
6. Ig V gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia / R. N. Damle, T. Wasil, F. Fais et al. *Blood*. 1999. Vol. 94, no. 6. P. 1840–1847.
7. Multidisciplinary diagnostics of chronic lymphocytic leukemia: European Research Initiative on CLL – ERIC recommendations / I. Zalcberg, M. G. D'Andrea, L. Monteiro et al. *Hematol. Transfus. Cell Ther.* 2019. pii: S2531-1379(19)30132-4. doi: 10.1016/j.htct.2019.07.006.
8. Rozovski U., Keating M. J., Estrov Z. Why is the immunoglobulin heavy chain gene mutation status a prognostic indicator in chronic lymphocytic leukemia? *Acta Haematol.* 2018. Vol. 140, no. 1. P. 51–54. doi: 10.1159/000491382.
9. Gene expression profiling of B cell chronic lymphocytic leukemia reveals a homogeneous phenotype related to memory B cells / U. Klein, Y. Tu, G. A. Stolovitzky et al. *J. Exp. Med.* 2001. Vol. 194, no. 11. P. 1625-638. doi: 10.1084/jem.194.11.1625.

expression has the ability to rise under the influence of activation stimuli (which is accompanied by increased *c-MYC* expression) precisely due to hypomethylation of its promoter region. In *M IGHV* cases, a similar mechanism is not involved due to the inactive status of the *LPL* gene.

## CONCLUSION

Thus, our data confirm the dominant concept that *UM IGHV* CLL cases are more sensitive to the action of proliferative stimuli compared to *M IGHV* CLL cases. This is manifested by an increase in the expression of a functionally significant *LPL* gene, is one for the strongest negative prognostic markers in CLL.

## REFERENCES

1. Romanenko A, Finch S, Hatch M, Lubin JH, Bebesko VG, Bazyka DA, et al. The Ukrainian-American study of leukemia and related disorders among Chernobyl cleanup workers from Ukraine: III. Radiation risks. *Radiat Res.* 2008;170(6):711-720. URL: <https://doi.org/10.1667/RR1404.1>.
2. Zablotska LB, Bazyka D, Lubin JH, Gudzenko N, Little MP, Hatch M, et al. Radiation and the risk of chronic lymphocytic and other leukemias among Chernobyl clean-up workers. *Environ Health Perspect.* 2013;121(1):59-65. doi: 10.1289/ehp.1204996.
3. Bazyka D, Gudzenko N, Dyagil I, Iliencko I, Belyi D, Chumak V, et al. Cancers after Chernobyl: from epidemiology to molecular quantification. *Cancers (Basel)*. 2019 Sep;11(9). pii E1291. doi: 10.3390/cancers11091291.
4. Gluzman DF, Sklyarenko LM, Nadgornaya VA, Zavelevich MP. Mature B-cell neoplasms in Chernobyl clean-up workers of 1986-1987: summary of cytomorphological and immunocytochemical study in 25 years after Chernobyl accident. *Exp Oncol.* 2011; 33(1):47-51.
5. Hamblin TJ, Davis Z, Garddiner A, Oscier DG, Stevenson FK. Unmutated Ig V(H) genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 1999;94(6):1848-1854.
6. Damle RN, Wasil T, Fais F, Ghiotto F, Valetto A, Allen SL, et al. Ig V gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 1999;94(6): 1840-1847.
7. Zalcberg I, D'Andrea MG, Monteiro L, Pimenta G, Xisto B. Multidisciplinary diagnostics of chronic lymphocytic leukemia: European Research Initiative on CLL – ERIC recommendations. *Hematol Transfus Cell Ther.* 2019 Sep. pii: S2531-1379(19) 30132-4. doi: 10.1016/j.htct.2019.07.006.
8. Rozovski U, Keating MJ, Estrov Z. Why is the immunoglobulin heavy chain gene mutation status a prognostic indicator in chronic lymphocytic leukemia? *Acta Haematol.* 2018;140(1):51-54. doi: 10.1159/000491382.
9. Klein U, Tu Y, Stolovitzky GA, Mattioli M, Cattoretti G, Husson H, et al. Gene expression profiling of B cell chronic lymphocytic leukemia



10. Relation of gene expression phenotype to immunoglobulin mutation genotype in B cell chronic lymphocytic leukemia / A. Rosenwald, A. A. Alizadeh, G. Widhopf et al. *J. Exp. Med.* 2001. Vol. 194, no. 11. P. 1639–1647. doi: 10.1084/jem.194.11.1639.
11. Gene expression profiling of chronic lymphocytic leukemia can discriminate cases with stable disease and mutated Ig genes from those with progressive disease and unmutated Ig genes / Y. Vasconcelos, J. De Vos, L. Vallat et al. *Leukemia.* 2005. Vol. 19, no. 11. P. 2002–2005. doi: 10.1038/sj.leu.2403865.
12. Prieto D., Oppezio P. Lipoprotein lipase expression in chronic lymphocytic leukemia: new insights into leukemic progression. *Molecules.* 2017. Vol. 22, no. 12. P. 2083. 10.3390/molecules22122083.
13. Hartman M. L., Kilianska Z. M. Lipoprotein lipase: a new prognostic factor in chronic lymphocytic leukaemia. *Contemp. Oncol. (Pozn).* 2012. Vol. 16, no. 6. P. 474–479. doi: 10.5114/wo.2012.32476.
14. An early Myc-dependent transcriptional program orchestrates cell growth during B-cell activation / A. Tesi, S. de Pretis, M. Furlan et al. *EMBO Rep.* 2019. Vol. 20, no. 9. e47987. doi: 10.15252/embr.201947987.
15. Chronic lymphocytic leukemia patients exposed to ionizing radiation due to the Chernobyl NPP accident – with focus on immunoglobulin heavy chain gene analysis / I. Abramenko, N. Bilous, A. Chumak et al. *Leuk. Res.* 2008. Vol. 32, no. 4. P. 535–545. URL: <https://doi.org/10.1016/j.leukres.2007.08.013>.
16. Lefranc M.-P., Lefranc G. IMGT® and 30 years of immunoinformatics insight in antibody V and C domain structure and function. *Antibodies (Basel).* 2019. Vol. 8, no. 2. pii: E29. doi: 10.3390/antib8020029.
17. High p27 protein levels in chronic lymphocytic leukemia are associated to low Myc and Skp2 expression, confer resistance to apoptosis and antagonize Myc effects on cell cycle / J. M. Caraballo, J. C. Acosta, M. A. Cortes et al. *Oncotarget.* 2014. Vol. 5, no. 13. P. 4694–4708.
18. Lipoprotein lipase mRNA expression in whole blood is a prognostic marker in B cell chronic lymphocytic leukemia / F. van Bockstaele, V. Pede, A. Janssens et al. *Clin. Chem.* 2007. Vol. 53, no. 2. P. 204–212.
19. Evaluation of candidate control genes for diagnosis and residual disease detection in leukemic patients using «real-time» quantitative reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RQ-PCR) – a Europe against cancer program / E. Beillard, N. Pallisgaard, V. H. van der Velden et al. *Leukemia.* 2003. Vol. 17, no. 12. P. 2474–2486.
20. Taking qPCR to a higher level: Analysis of CNV reveals the power of high throughput qPCR to enhance quantitative resolution / S. Weaver, S. Dube, A. Mir et al. *Methods.* 2010. Vol. 50, no. 4. P. 271–276. doi: 10.1016/j.ymeth.2010.01.003.
21. Increased MYC gene copy number correlates with increased mRNA levels in diffuse large B-cell lymphoma / C. J. Stasik, H. Nitta, reveals a homogeneous phenotype related to memory B cells. *J Exp Med.* 2001;194(11):1625-1638. doi: 10.1084/jem.194.11.1625.
10. Rosenwald A, Alizadeh AA, Widhopf G, Simon R, Davis RE, Yu X, et al. Relation of gene expression phenotype to immunoglobulin mutation genotype in B cell chronic lymphocytic leukemia. *J Exp Med.* 2001;194(11):1639-1647. doi: 10.1084/jem.194.11.1639.
11. Vasconcelos Y, De Vos J, Vallat L, Reme T, Lalanne AI, Wanherdrick K, et al. Gene expression profiling of chronic lymphocytic leukemia can discriminate cases with stable disease and mutated Ig genes from those with progressive disease and unmutated Ig genes. *Leukemia.* 2005;19(11):2002-2005. doi: 10.1038/sj.leu.2403865.
12. Prieto D, Oppezio P. Lipoprotein lipase expression in chronic lymphocytic leukemia: new insights into leukemic progression. *Molecules.* 2017;22(12):2083. doi: 10.3390/molecules22122083.
13. Hartman ML, Kilianska ZM. Lipoprotein lipase: a new prognostic factor in chronic lymphocytic leukaemia. *Contemp Oncol (Pozn).* 2012;16(6):474-479. doi: 10.5114/wo.2012.32476.
14. Tesi A, de Pretis S, Furlan M, Filipuzzi M, Morelli MJ, Andronache A, et al. An early Myc-dependent transcriptional program orchestrates cell growth during B-cell activation. *EMBO Rep.* 2019; 20(9):e47987. doi: 10.15252/embr.201947987.
15. Abramenko I, Bilous N, Chumak A, Davidova E, Kryachok I, Martina Z, et al. Chronic lymphocytic leukemia patients exposed to ionizing radiation due to the Chernobyl NPP accident – with focus on immunoglobulin heavy chain gene analysis. *Leuk Res.* 2008;32(4):535-545. URL: <https://doi.org/10.1016/j.leukres.2007.08.013>.
16. Lefranc M-P, Lefranc G. IMGT® and 30 years of immunoinformatics insight in antibody V and C domain structure and function. *Antibodies (Basel).* 2019;8(2):29. doi: 10.3390/antib8020029.
17. Caraballo JM, Acosta JC, Cortes MA, Albajar M, Gomez-Casares MT, Battle-Lopez A, et al. High p27 protein levels in chronic lymphocytic leukemia are associated to low Myc and Skp2 expression, confer resistance to apoptosis and antagonize Myc effects on cell cycle. *Oncotarget.* 2014;5(13):4694-4708.
18. van Bockstaele F, Pede V, Janssens A, Callewaert F, Offner F, Verhasselt B, Phillippe J. Lipoprotein lipase mRNA expression in whole blood is a prognostic marker in B cell chronic lymphocytic leukemia. *Clin Chem.* 2007;53(2):204-212.
19. Beillard E, Pallisgaard N, van der Velden VH, Bi W, Dee R, van der Schoot E, et al. Evaluation of candidate control genes for diagnosis and residual disease detection in leukemic patients using 'real-time' quantitative reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RQ-PCR) – a Europe against cancer program. *Leukemia.* 2003; 17(12):2474-2486.
20. Weaver S, Dube S, Mir A, Qin J, Ramakrishnan R, Jones RC, Livak K J. Taking qPCR to a higher level: Analysis of CNV reveals the power of high throughput qPCR to enhance quantitative resolution. *Methods.* 2010;50(4):271-276. doi: 10.1016/j.ymeth.2010.01.003.
21. Stasik CJ, Nitta H, Zhang W, Mosher CH, Cook JR, Tubbs RR, et al. Increased MYC gene copy number correlates with increased



- W. Zhang et al. *Haematologica*. 2010. Vol. 95, no. 4. P. 597–603. doi: 10.3324/haematol.2009.012864.
22. LPL gene expression is associated with poor prognosis in CLL and closely related to NOTCH1 mutations / L. Kristensen, T. Kristensen, N. Abildgeerd et al. *Eur. J. Haematol.* 2016. Vol. 97, no. 2. P. 175–182. doi: 10.1111/ejh.12700.
23. Alterations in TP53, cyclin D2, c-Myc, p21WAF1/CIP1 and p27KIP1 expression associated with progression in B-CLL / H. Antosz, A. Paterski, B. Marzec-Kotarska et al. *Folia Histochem. Cytobiol.* 2010. Vol. 48, no. 4. P. 534–541. doi: 10.2478/v10042-010-0048-5.
24. The number of signaling pathways altered by driver mutations in chronic lymphocytic leukemia impacts disease outcome / C. Brieghel, C. da Cunha-Bang, C. W. Yde et al. *Clin. Cancer Res.* 2020. Vol. 26, no. 6. P. 1507–1515. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-18-4158.
25. Mimicking the tumour microenvironment of chronic lymphocytic leukaemia in vitro critically depends on the type of B-cell receptor stimulation / A. Rombout, S. Lust, F. Offner et al. *Eur. J. Cancer.* 2016. Vol. 114, no. 6. P. 704–712. doi: 10.1038/bjc.2016.35.
26. Methylation status regulates lipoprotein lipase expression in chronic lymphocytic leukemia / C. Abreu, P. Moreno, F. Palacios et al. *Leuk. Lymphoma.* 2013. Vol. 54, no. 8. P. 1844–1848. doi: 10.3109/10428194.2013.796057.
- mRNA levels in diffuse large B-cell lymphoma. *Haematologica*. 2010;95(4):597-603. doi: 10.3324/haematol.2009.012864.
22. Kristensen L, Kristensen T, Abildgeerd N, Royo C, Frederiksen M, Mourits-Andersen T, et al. LPL gene expression is associated with poor prognosis in CLL and closely related to NOTCH1 mutations. *Eur J Haematol.* 2016;97(2):175-182. doi: 10.1111/ejh.12700.
23. Antosz H, Paterski A, Marzec-Kotarska B, Sajewicz J, Dmoszynska A. Alterations in TP53, cyclin D2, c-Myc, p21WAF1/CIP1 and p27KIP1 expression associated with progression in B-CLL. *Folia Histochem Cytobiol.* 2010;48(4):534-541. doi: 10.2478/v10042-010-0048-5.
24. Brieghel C, da Cunha-Bang C, Yde CW, Schmidt AY, Kinalis S, Nadeu F, et al. The number of signaling pathways altered by driver mutations in chronic lymphocytic leukemia impacts disease outcome. *Clin Cancer Res.* 2020;26(6):1507-1515. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-18-4158.
25. Rombout A, Lust S, Offner F, Naessens E, Verhasselt B, Philippe J. Mimicking the tumour microenvironment of chronic lymphocytic leukaemia in vitro critically depends on the type of B-cell receptor stimulation. *Eur J Cancer.* 2016;114(6):704-712. doi: 10.1038/bjc.2016.35.
26. Abreu C, Moreno P, Palacios F, Borge M, Morande P, Landoni AI, et al. Methylation status regulates lipoprotein lipase expression in chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma.* 2013;54(8):1844-1848. doi: 10.3109/10428194.2013.796057.

## ІНФОРМАЦІЯ ПРО АВТОРІВ

**Білоус Надія Іванівна**, кандидат біологічних наук, старший науковий співробітник лабораторії молекулярної біології відділу клінічної імунології, Інститут клінічної радіології, ННЦРМ, м. Київ

**Абраменко Ірина Вікторівна**, доктор медичних наук, професор, головний науковий співробітник лабораторії молекулярної біології відділу клінічної імунології відділу клінічної імунології, Інститут клінічної радіології, ННЦРМ, м. Київ

**Чумак Анатолій Андрійович**, доктор медичних наук, професор, завідувач відділу клінічної імунології, директор Інституту клінічної радіології, ННЦРМ, м. Київ

**Дягіль Ірина Сергіївна**, доктор медичних наук, професор, завідувач відділення радіаційної онкогематології та трансплантології стовбурових клітин відділу гематології та трансплантології, Інститут клінічної радіології ННЦРМ, м. Київ

**Мартіна Зоя Володимирівна**, кандидат медичних наук, завідувач відділення радіаційної гематології клініки, Інститут клінічної радіології ННЦРМ, м. Київ

## INFORMATION ABOUT AUTHORS

**Nadiia I. Bilous**, Candidate of Biological Sciences, senior scientific Researcher of the Molecular Biology Laboratory, Department of Medical Immunology, Institute of Clinical Radiology, NRCRM, Kyiv, Ukraine

**Iryna V. Abramenko**, Doctor of Medical Sciences, Professor, Chief Research Associate, Laboratory of Molecular Biology, Department of Clinical Immunology, Clinical Radiology Institute, NRCRM, Kyiv, Ukraine

**Iryna S. Dyagil**, Doctor of Medical Sciences, Professor, Head of the Unit of Radiation Oncohematology and Stem Cell Transplantation, Department of Hematology and Transplantation, Clinical Radiology Institute, NRCRM, Kyiv, Ukraine

**Anatolii A. Chumak**, Doctor of Medical Sciences, Professor, Head of the Clinical Immunology Department, Director of Clinical Radiology Institute, NRCRM, Kyiv, Ukraine

**Zoya V. Martina**, PhD, Head of Department of Radiation Hematology of Hospital for Adults NRCRM, Kyiv, Ukraine