

## WPLYW FTALANU DIBUTYLU (DBP) NA POZIOM METYLACJI I EKSPRESJI GENU *p53* W WĄTROBIE SZCZURÓW *WISTAR*

### THE EFFECT OF DIBUTYL PHTHALATE (DBP) ON THE METHYLATION AND EXPRESSION LEVEL OF *p53* GENE IN THE LIVER OF *WISTAR* RATS

Katarzyna Urbanek-Olejniki, Monika Liszewska, Grażyna Kostka

Zakład Toksykologii i Oceny Ryzyka, Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego - Państwowy Zakład Higieny, Warszawa

**Słowa kluczowe:** DBP, *p53*, metylacja DNA, ekspresja genu, wątroba

**Key words:** DBP, *p53*, DNA methylation, DNA, gene expression, liver

#### STRESZCZENIE

**Wprowadzenie.** Indukowane niegenotoksycznymi kancerogenami (NGCs) zmiany metylacji DNA rozpatrywane są jako mechanizm ich toksycznego, w tym rakotwórczego działania.

**Cel badań.** Celem podjętych badań była ocena statusu metylacji rejonu promotorowego i ekspresji genu *p53* na poziomie mRNA oraz białka w wyniku oddziaływania ftalanu dibutyli (DBP). Badania zmierzały do oceny zależności pomiędzy ekspresją genu *p53* a poziomem metylacji jego rejonu promotorowego.

**Material i metody.** Samce szczurów szczepu *Wistar* otrzymywały DBP w dawce 1800 mg/kg m.c. x dzień<sup>-1</sup> jednorazowo, 3-krotnie i 14-krotnie. Ocenę stopnia zmian metylacji badanych sekwencji CpG rejonu promotorowego genu *p53* dokonano metodą MSRA (ang. *Methylation-Sensitive Restriction Enzyme Analysis*). Analizę względnego poziomu transkryptów badanego genu przeprowadzono metodą PCR w czasie rzeczywistym natomiast ocenę ekspresji genu na poziomie białka - techniką Western Blot.

**Wyniki.** W wyniku oddziaływania DBP wykazano wzrost metylacji genu *p53* po jednorazowym narażeniu zwierząt badanym związkiem. Nie stwierdzono bezpośredniej zależności pomiędzy poziomem ekspresji genu *p53* a metylacją badanych sekwencji rejonu promotorowego genu *p53*. Obniżony poziom białka *p53* obserwowano przez cały okres doświadczalny.

**Wnioski.** Wykazano brak zależności pomiędzy poziomem ekspresji genu *p53* a zmianami metylacji jego rejonu promotorowego. Obniżony poziom białka *p53*, był prawdopodobnie efektem represyjnego oddziaływania białka c-myc, uczestniczącego w tych samych szlakach transdukcji sygnału.

#### ABSTRACT

**Background.** Currently, nongenotoxic carcinogens-induced changes in DNA methylation profile are considered as mechanism of their toxicity, including carcinogenic action.

**Objective.** The aim of the study was to determine the effect of dibutyl phthalate (DBP) on the methylation levels of the *p53* promoter region, as well as mRNA and protein level of this gene.

**Material and method.** Male *Wistar* rats received DBP in one, three or fourteen daily oral doses (at 24-h intervals) of 1800 mg/kg b.w. x day<sup>-1</sup>. The methylation level of *c-myc* gene was determined by PCR-based methylation sensitive restriction enzyme analysis (MSRA). The expression of gene was assessed by Real-Time PCR (at mRNA level) and Western blot (at protein level) analysis.

**Results.** There was observed the hypermethylation of *p53* promoter region after short (1 day) exposure of the animals to DBP. No correlation was found between mRNA expression and methylation level of *p53* gene. The present study showed decreased level of *p53* protein, during the whole period of study.

**Conclusions.** No direct correlation was observed between the methylation and expression level of *p53*. The decreased protein level might be a consequence of the repressive effect of c-myc, which was involved in signal transduction pathways, the same as *p53* protein.

**Adres do korespondencji:** Grażyna Kostka, Zakład Toksykologii i Oceny Ryzyka, Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego - Państwowy Zakład Higieny, 00-791 Warszawa, ul. Chocimska 24, tel. +48 22 54 21 356, fax: +48 22 849 74 41, e-mail: gkostka@pzh.gov.pl

## WSTĘP

Ftalan dibutyli (DBP), należący do estrów kwasu ftalowego (ftalany), jest szeroko stosowany w przemyśle chemicznym, głównie jako plastyfikator nitrocelulozy, octanu poliwinylu, jak również jako rozpuszczalnik farb drukarskich, środek przeciwpierwiotyczny, składnik lakierów do paznokci oraz lakierów do włosów [32, 15]. Wszystkie ftalany charakteryzują się niską ostrą toksycznością ( $LD_{50}$  w zakresie 1-30 g/kg m.c.). W krótko- i długookresowych badaniach przeprowadzonych na gryzoniach wykazano, że indukują szkodliwe efekty w wątrobie, nerkach a także w gonadach [6, 7]. W testach na mutagenność i/lub genotoksyczność dają wyniki negatywne [1, 9]. W ich kompleksowych mechanizmach działania (MOA - ang. *Mode of Action*) uwzględniana jest aktywacja receptora PPAR $\alpha$  (ang. *Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- $\alpha$* ), co prowadzi do zmian w transkrypcji wielu genów metabolizmu komórkowego, wzrostu liczby i masy peroksysomów w parenchymalnych (mięszkowych) komórkach wątroby, indukcji proliferacji komórkowej, supresji apoptozy, jak również wtórnie do stresu oksydacyjnego, którego efektem mogą być uszkodzenia DNA [14]. W ostatnich latach w mechanizmach toksycznego, w tym rakotwórczego działania PPs (ang. *Peroxisome Proliferators*), do których zaliczany jest również DBP uwzględniane są zmiany we wzorze metylacji DNA [20, 27, 28, 30]. Sądzi się, że nieprawidłowa metylacja DNA, dotycząca protoonkogenów oraz genów supresorowych, przyczynia się do zahamowania procesu transkrypcji i ekspresji genów, tym samym może być rozważana jako czynnik uniemożliwiający pełnienie ich fizjologicznych funkcji [5]. Wychodząc z tych przesłanek, przeprowadzono badania mające na celu ustalenie czy DBP wpływa na zmiany poziomu metylacji rejonu promotorowego genu supresorowego *p53*, kodującego białko zaangażowane w regulację cyklu komórkowego i apoptozy. Podjęto również próbę oceny zależności pomiędzy ekspresją *p53*, a stopniem metylacji rejonu promotorowego badanego genu.

## MATERIAŁY I METODY

### Odczynniki

Ftalan dibutyli (DBP) - Sigma, USA; Hin6I, Bsh1236I - enzymy restrykcyjne, DNA faga  $\lambda$  oraz Genomic DNA Purification Kit - Fermentas, Litwa; FastStart Taq Polimeraza - Roche, Szwajcaria; RNeasy® Mini Kit - Zestaw do izolacji RNA - Qiagen, Niemcy; RT-PCR - Advantage® RT-for-PCR Kit - Zestaw do odwrotnej transkrypcji RT-PCR - Clontech, USA; Kapa™ SYBR® Fast qPCR Kit - Zestaw do Real-Time

PCR - Kapa Biosystem, USA; T-PER Tissue Protein Extraction Reagent - bufor do izolacji białek - Pierce, USA; Immobilon™ Western Chemiluminescent HRP Substrate - Millipore, USA; Przeciwciała: mysie I-rzędowe (*p53*,  $\beta$ -aktyna), kozie anty-mysie II-rzędowe (HRP) - Santa Cruz, USA; Oligonukleotydy do reakcji amplifikacji genu *p53* oraz do PCR w czasie rzeczywistym zaprojektowane przy użyciu programu FastPCR były zsyntetyzowane w Pracowni Sekwencjonowania DNA i Syntezy Oligonukleotydów Instytutu Biochemii i Biofizyki PAN w Warszawie. Wszystkie inne stosowane odczynniki - Sigma Chemical Company, USA były o najwyższej czystości i jakości.

### Schemat doświadczeń

Badania przeprowadzono na dojrzałych samcach szczurów szczepu *Wistar-Crl:WI(Han)* o masie ciała  $200 \pm 10$ g. Szczury o masie 50-60g umieszczano (po 5 sztuk) w plastikowych klatkach, w pomieszczeniu o standardowych warunkach klimatycznych (temperatura 20 - 24°C; względna wilgotności powietrza  $55 \pm 10\%$ ), z 12-godzinnym rytmem świetlnym. Zwierzęta w okresie adaptacji (okres 2-tygodniowy) i w trakcie doświadczeń otrzymywały paszę standardową - LSM i wodę *ad libitum*. Ftalan dibutyli podawano szczurom *per os*, sondą do żołądka w oliwie jadalnej jednorazowo, 3-krotnie i 14-krotnie w odstępach dobowych w dawce 1800 mg/kg m.c. x dzień<sup>-1</sup>. Grupy kontrolne szczurów otrzymywały równoważną objętość oliwy jadalnej. W odpowiednich punktach czasowych wątroby szczurów badanych i kontrolnych izolowano, przemywano i ważono. Materiał badawczy stanowił prawy płąt wątroby.

Warunki utrzymywania zwierząt w okresie doświadczeń były zgodne z obowiązującym rozporządzeniem Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi z dnia 10 marca 2006 roku w sprawie szczegółowych warunków utrzymywania zwierząt laboratoryjnych w jednostkach doświadczalnych, jednostkach hodowlanych i u dostawców (Dz. Ustaw Nr 50, poz. 368/2006). Badania przeprowadzone były po uzyskaniu zgody Lokalnej Komisji Etycznej (pozwolenia Nr 6A/01 oraz NR 23/2010)

### Ocena metylacji wybranych sekwencji CpG rejonu promotorowego genu *p53*

W celu zbadania obecności metylacji w obrębie rejonu promotorowego genu *p53* zastosowano niezależne trawienia DNA przy użyciu metylozależnych endonukleaz restrykcyjnych Hin6I, Bsh1236I (Metoda MSRA - ang. *Methylation Sensitive Restriction Enzyme Analysis*). Kontrolę pozytywną stanowiło niemetylowane (dam<sup>-</sup>, dcm<sup>-</sup>) DNA faga  $\lambda$ , poddawane trawieniu ww. enzymami, w celu potwierdzenia działania endonukleaz. Wyizolowane DNA poddawano niezależnym trawieniom endonukleazami restrykcyjnymi w tempe-

raturze 37°C przez 16 godz. w buforze zalecanym przez producenta (Y<sup>+</sup>Tango/Hin6I; R<sup>+</sup>/Bsh1236I). Otrzymane produkty trawienia stanowiły matryce w reakcji PCR. Produkty PCR wielkości 418 pz (pz, par zasad) poddawano analizie w 6% żelu akrylamidowym.

#### *Analiza ekspresji wytypowanych do badań genów*

Ocenę poziomu ekspresji genów w komórkach wątroby szczurów grupy badanej i kontrolnej, przeprowadzano na poziomie mRNA i białek. Pomiaru względnego poziomu transkryptu *p53* dokonano techniką PCR w czasie rzeczywistym (Real-Time PCR), z zastosowaniem niespecyficznego interkalatora dwuniciowych kwasów nukleinowych, SYBR Green I. Ocenę ekspresji genów na poziomie białek przeprowadzano techniką Western Blot.

#### *Reakcja Real-Time PCR*

W reakcji Real-Time PCR wykorzystywano zestaw KAPA SYBR® FAST qPCR (Kapa Biosystem). Analiza przyrostu produktu amplifikacji w czasie rzeczywistym została przeprowadzona przy pomocy aparatu Mini Opticon Bio-Rad. W reakcji do ilościowego PCR zastosowano 2 µl cDNA dla genu badanego i genu referencyjnego *β-aktyny*. Profil czasowo-temperaturowy wyznaczono przy użyciu oprogramowania dla systemu Mini Opticon (Bio-Rad). Do pomiarów ilościowych stosowano następujący protokół: 1) wstępna denaturacja w 95°C/2min.; 2) 40 cykli właściwej amplifikacji w następujących etapach: 95°C/30s (denaturacja), 54°C/20s (przyłączanie oligonukleotydów), 72°C/30s (synteza nici), 80°C/5s (odczyt fluorescencji); 3) wyznaczenie krzywej topnienia (ang. Melting Curve) 95°C/0s, 65°C/15s, z powolnym podgrzewaniem próbek 0,5°C/s do 95°C i ciągłym pomiarem fluorescencji; 4) chłodzenie w 40°C/30s. Specyficzność produktów sprawdzano analizując krzywą topnienia i rozdział w 6% żelu poliakrylamidowym. Wartości Ct (ang. threshold value) zostały wyznaczone przy użyciu oprogramowaniem dla systemu Mini Opticon Bio-Rad. Wykorzystano następujące oligonukleotydy p53Exp1-F, 5'-GACAGGCAGACTTTTCGGC-3', p53Exp1-R, 5'-GCCGTGATGATGGTAAGGATGG-3', ActExp1-F, 5'-GTGGGTATGGGTCAGAAGG-3', ActExp1-R, 5'-CAATGCCGTGTTCAATGGGG-3'.

Do analizy zmian w ilości mRNA genu zastosowano model Pfaffl [22], w którym poziom mRNA genu w próbach badanych jest szacowany relatywnie do poziomu tego samego genu w próbach kontrolnych i normalizowany w stosunku do poziomu mRNA wybranego genu referencyjnego (*β-aktyny*) z uwzględnieniem różnic w wydajności amplifikacji poszczególnych transkryptów. Program REST-384© (ang. *Relative Expression Software Tool- 384*) posłużył do wyznaczenia relatywnych poziomów mRNA poszczególnych genów.

#### *Przygotowywanie ekstraktów białkowych*

Izolację białek z wątroby zwierząt grup kontrolnych i badanych przeprowadzono z wykorzystaniem komercyjnego zestawu do izolacji białek T-Per Mamalian Tissue Reagent (ThermoFisher Scientific, USA). Rozdział białek prowadzono przy wykorzystaniu elektroforezy w 10% żelach poliakrylamidowych w 1x stężonym buforze Tris-Glicyna w aparatach pionowych pod napięciem 120V w warunkach denaturujących, w obecności siarczanu dodecylu sodu (SDS).

Przeniesienie białek z żelu na membranę przeprowadzono w drodze elektrotransferu półsuchego w czasie 1 godz. przy stałym napięciu 1 mA/cm<sup>2</sup>. Przed transferem membranę PVDF (ang. *Polyvinylidene Fluoride*) aktywowano w alkoholu metylowym. Po transferze w celu zablokowania niespecyficznymi wiążącymi miejscami inkubowano membranę w 5% odtłuszczonego mleku w buforze 1xTBST przez 1 godz. w temp. pokojowej. Następnie membranę inkubowano ze specyficznym dla danego białka I-rzędowym przeciwciałem (1:5000 odpowiednio dla p53, *β-aktyna*) przez 16-18 godz. w 4°C. Po hybrydyzacji membranę płukano 4x10 min. w buforze 1xTBST i kolejno inkubowano z odpowiednim przeciwciałem II-rzędowym skoniugowanym z peroksydazą chrzanową (w rozcieńczeniu 1:5000) w odtłuszczonego 5% mleku w buforze 1xTBST przez 1 godzinę. Tak przygotowaną membranę płukano 4x10 min. buforem 1xTBST. Uzyskany metodą chemiluminescencji sygnał, utrwalany na błonie fotograficznej firmy Kodak, po zeskanowaniu poddawano analizie w programie Image Quant, wersja 5.2. Odczyty normalizowano względem ekspresji białka *β-aktyny*. Dla każdego badanego białka analizę Western Blot przeprowadzano w trzech powtórzeniach.

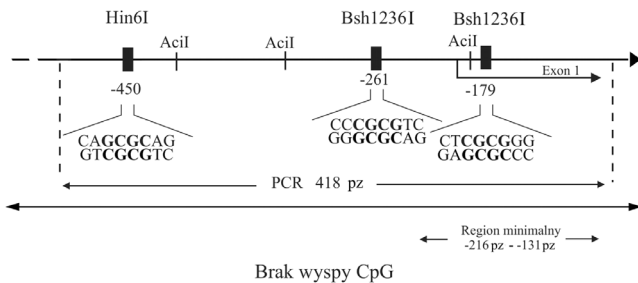
#### *Analiza statystyczna*

Częstość występowania zmian metylacji w rejonach promotorowych badanych genów w odniesieniu do kontroli oceniano stosując test Fischera. Przyjęte kryterium znamienności,  $p < 0,05$ . Wyniki z zakresu poziomu białka przedstawiono jako średnie wyniki z 5 zwierząt  $\pm$  SEM stosując test *t-Studenta*. Testowanie istotności statystycznej wykazanych różnic w poziomach mRNA w ilościowym PCR przeprowadzono z zastosowaniem testów randomizacji (ang. *Pair-Wise Fixed Reallocation Randomization Test*) [21].

## WYNIKI

Zastosowana technika MSRA do oceny poziomu metylacji rejonu promotorowego genu *p53* polega na wykorzystaniu zdolności metylozależnych endonukleaz

restrykcyjnych do rozpoznawania i cięcia sekwencji, w których nie występuje metylacja cytozyny w pozycji piątej (5-MeC). Uproszczony schemat rejonu promotorowego genu *p53* uwzględniający badane sekwencje CpG przedstawiono na ryc. 1.



Ryc. 1. Schemat rejonu promotorowego genu *p53*  
A scheme of the *p53* gene promoter region

W obrębie rejonu promotorowego genu *p53* zlokalizowane są dwa miejsca rozpoznawane przez endonukleazę Bsh1236I (-261 pz i -179 pz) oraz jedno miejsce rozpoznawane przez Hin6I w pozycji -450 pz. Cechą charakterystyczną przedstawionego rejonu jest brak wyspy CpG [24].

Wyniki trawienia DNA endonukleazą Bsh1236I oraz Hin6I przedstawiono w tabeli 1.

Tabela 1. Sumaryczne wyniki trawienia metylo-wrażliwymi endonukleazami Bsh1236I i Hin6I DNA izolowanego z wątroby szczurów narażonych na DBP przez 1, 3 i 14 dni.

Summary of methylation-sensitive digestion with Bsh1236I and Hin6I of DNA isolated from the liver of rats treatment with DBP for 1, 3 or 14 days.

Grupa szczurów		Liczba dawek		
		1	3	14
DBP	Bsh1236I	0/16 <sup>a</sup>	0/16 <sup>a</sup>	0/16 <sup>a</sup>
	Hin6I	8/16 <sup>a*</sup>	4/16 <sup>a</sup>	4/16 <sup>a</sup>
Kontrola		0/8	0/8	0/8

<sup>a</sup> Stosunek liczby prób DNA, w których badane sekwencje *p53* były metylowane do ogólnej liczby analizowanych prób DNA; Ogólna liczba prób DNA (16) stanowiła 100%; (\*) różnice statystycznie istotne w stosunku do kontroli,  $p < 0,05$ .

<sup>a</sup> The proportion of DNA samples in which investigated sequences of the *p53* gene were methylated to the number of DNA samples analyzed; 100% - all DNA samples (16); (\*) values significantly different from control  $p < 0,05$ .

Przeprowadzona analiza restrykcyjna DNA, izolowanego z wątroby szczurów narażonych na ftalan dibutyli, z wykorzystaniem endonukleazy restrykcyjnej Bsh1236I nie wykazała zmian metylacji cytozyny w badanych sekwencjach DNA zarówno po jednorazowym, jak i wielokrotnym narażeniu zwierząt na DBP.

Zmiany poziomu metylacji badanych sekwencji CpG wykazano w analizie z wykorzystaniem enzymu

Hin6I. Po jednorazowej dawce związku metylacja cytozyny wystąpiła w 8 próbach na 16 badanych (50%). Dalsze narażenie zwierząt na badany związek (3 i 14 dni) skutkowało obniżeniem częstości występowania zmetylowanej cytozyny w pozycji -450 pz, w porównaniu do wyników uzyskanych po 1 dawce DBP. Stwierdzone występowanie 5-MeC tylko w 25% przebadanych prób, zarówno po 3 i 14 dniach DBP było statystycznie nieistotne.

Reprezentatywne wyniki dla przeprowadzonych badań, odzwierciedlające zmiany poziomu metylacji w czasie, jako funkcji liczby dawek DBP, na które były narażone zwierzęta przedstawia ryc. 2.

W żadnej z prób DNA (B1-B4) poddanych trawieniu endonukleazą Bsh1236I, nie uzyskano produktu PCR (Ryc. 2). Z kolei po jednej dawce DBP, w wyniku trawienia DNA endonukleazą Hin6I w dwóch spośród czterech przeanalizowanych prób (B1, B2) otrzymano produkt PCR wielkości 418 pz. Ten sam wynik uzyskano w dwóch niezależnych trawieniach (1, 2). W wyniku kontynuowania narażenia zwierząt na DBP (3 i 14 dni) tylko analiza restrykcyjna DNA z wykorzystaniem endonukleazy Hin6I wykazała obecność produktu PCR odpowiednio w próbie B2 i próbie B1, w wymienionych wyżej punktach czasowych.

Ze względu na fakt, że we wszystkich próbach DNA izolowanego z wątroby zwierząt kontrolnych nie otrzymano produktu PCR (418 pz), co świadczyło o braku metylacji cytozyny w badanych sekwencjach, wyniki dla każdej z prób DNA zwierząt kontrolnych (K1-K4) zilustrowano tylko dla jednej reakcji PCR.

Analizy względnych zmian w ilości mRNA genu *p53* w wątrobie zwierząt narażonych na DBP przedstawiono w tabeli 2.

Tabela 2. Wpływ ftalanu dibutyli (DBP) na poziom mRNA genu *p53* w wątrobie szczurów Wistar.

The effect of dibutyl phthalate (DBP) on mRNA level of *p53* gene in Wistar rats liver.

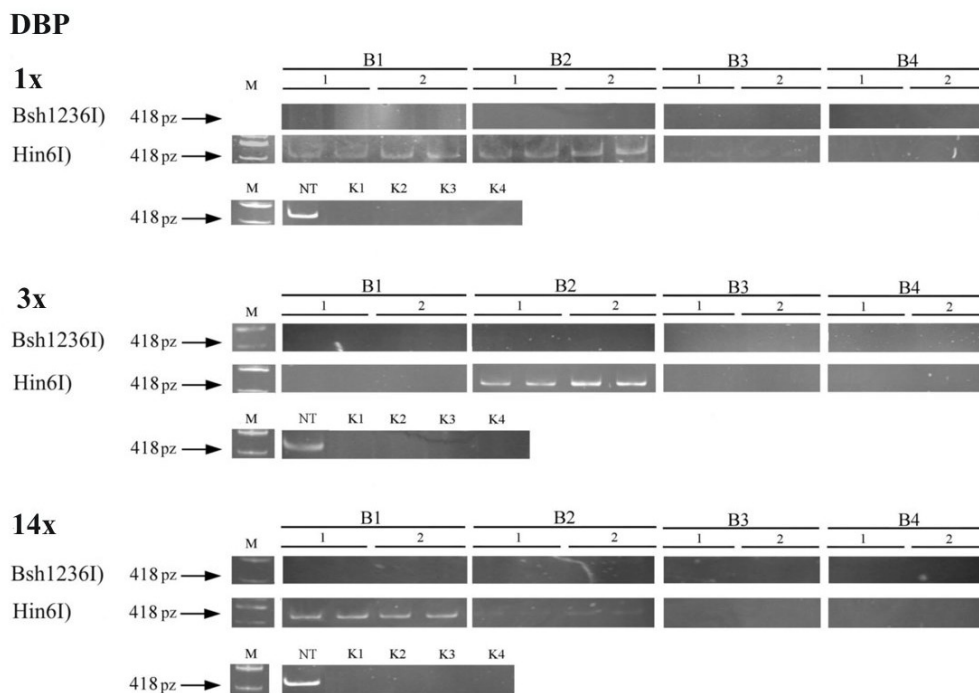
Grupa szczurów	Poziom względnej <sup>1</sup> ekspresji genów		
	1	3	14
DBP	0,588 (0,018)	0,809 (0,310)	0,546 (0,010)

Względny poziom mRNA *p53* w wątrobie szczurów narażonych na 1, 3 i 14 dawek DBP (1800 mg/kg m.c. x dzień<sup>-1</sup>)

<sup>1</sup> Poziom względnej ekspresji genu *p53* normalizowany w stosunku do poziomu mRNA genu referencyjnego  $\beta$ -aktyny; ( ) w nawiasach podano wartości  $p$ ; analiza statystyczna została przeprowadzona z wykorzystaniem testu randomizacji.

Relative mRNA quantification of *p53* in rats liver treated with DBP for 1, 3 and 14 days (1800 mg/kg b.w. x day<sup>-1</sup>).

<sup>1</sup> Expression ratios are relative to  $\beta$ -actin endogenous control;  $p$ -values are given in brackets ( ); statistical analyses were done using randomization test.



Ryc. 2. Reprezentatywne żełe przedstawiające wpływ ftalanu dibutyłu (DBP) na poziom metylacji rejonu promotorowego genu *p53* w wątrobie szczurów.

Genomowe DNA trawiono enzymami restrykcyjnymi: Bsh1236I albo Hin6I. Obecność produktu 418 pz dla prób DNA izolowanych z wątroby szczurów narażonych na DBP (B1-B4) przez 1, 3 i 14 dni, w dwóch powtórzeniach (1 i 2) odzwierciedla wzrost metylacji rejonu promotorowego genu *p53*. K1- K4, DNA izolowane z wątroby szczurów kontrolnych; NT - DNA nie trawione, kontrola pozytywna PCR; M - marker wielkości.

Representative gels showing effect of dibutyl phthalate (DBP) on the methylation level of the *p53* promoter region in rat liver.

DNA was digested with methylation-sensitive restriction endonucleases Bsh1236I and Hin6I. The present of the 418 bp product for DNA isolated from the livers of rats administered with DBP (B1-B4), in two independent repetitions (1 and 2), represented the increase of methylation of the *p53* gene promoter region. K1-K4, DNA isolated from the livers of control rats; NT - not digested DNA, positive control of PCR; M - size of marker.

W wyniku oddziaływania DBP (1800 mg/kg m.c. x dzień<sup>-1</sup>) wykazano zmiany względnej ekspresji *p53*. Po jednorazowym narażeniu zwierząt na badany związek stwierdzono znaczące obniżenie w stosunku do kontroli poziomu transkryptu *p53*,  $p < 0,05$ . Przy kontynuowaniu narażenia zwierząt na DBP (3 i 14 dni) obserwowano utrzymujący się spadek ekspresji genu *p53*, jednak tylko w przypadku 14 dawek związku, obniżona w stosunku do kontroli ekspresja genu *p53* (o 50%) była statystycznie istotna,  $p < 0,05$ .

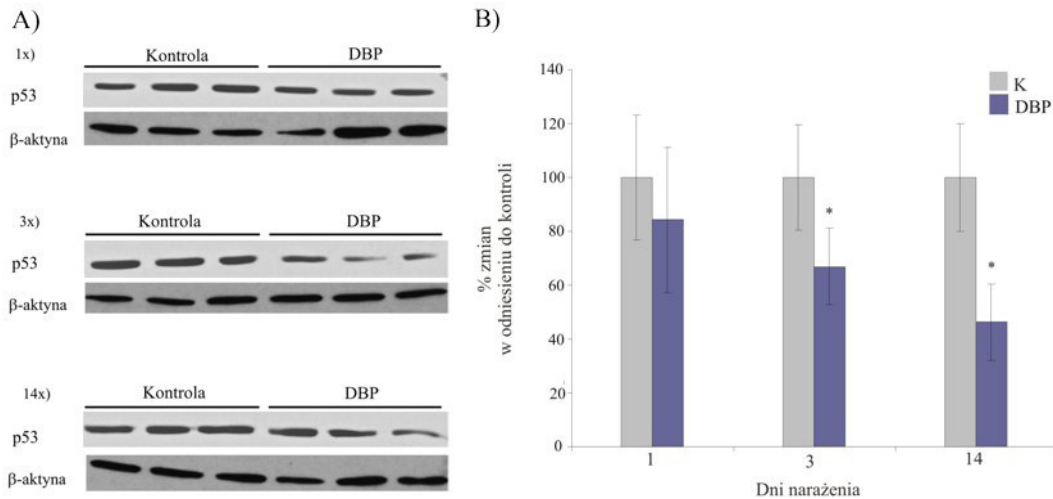
Uzyskane wyniki z zakresu wpływu DBP na mRNA *p53* weryfikowano poprzez analizę Western Blot (Ryc. 3).

Analiza porównawcza ilości białka *p53* w wątrobie szczurów narażonych na DBP w dawce 1800 mg/kg m.c. x dzień<sup>-1</sup> wykazała różnice w jego poziomie w porównaniu do odpowiednich grup kontrolnych. Po jednorazowej dawce DBP, obniżony poziom białka *p53*, był statystycznie nieistotny. Narażenie zwierząt na DBP w ciągu 3 i 14 dni powodowało dalsze obniżenie ilości produktu białkowego genu *p53*; odpowiednio o 33 i 54% w odniesieniu do wartości kontrolnych,  $p < 0,05$ .

## DYSKUSJA

Piśmiennictwo ostatnich lat wskazuje, że wykrywanie wczesnych zmian w genomie komórki, związanych z ekspresją genów, stanowić może podstawę oceny potencjału kancerogennego czynników chemicznych o epigenetycznych mechanizmach działania [24]. W tym kontekście, szczególne znaczenie mogą mieć wyniki badań oceniających wpływ niegenotoksycznych kancerogenów (NGCs) na poziom metylacji kluczowych genów uczestniczących w regulacji cyklu komórkowego i apoptozy, ze względu na rolę metylacji DNA w regulacji ekspresji genów [2, 4], brak równowagi pomiędzy tymi procesami w najwcześniejszych fazach rozwoju procesu nowotworowego [18] i zdolność NGCs do ingerowania w te procesy [9, 23].

W niniejszej pracy podjęto próbę zdefiniowania wpływu ftalanu di-butylu (DBP) na poziom metylacji genu *p53* i określenia zależności pomiędzy statusem metylacji a ekspresją genu *p53* na poziomie mRNA i białka.



Ryc. 3. Analiza ilościowa (Western Blot) białka *p53* w wątrobie szczurów szczepu *Wistar* narażonych na DBP kolejno przez 1, 3 i 14 dni w dawce 1800 mg/kg m.c. x dzień<sup>-1</sup>

A) Obraz białka *p53* po analizie Western Blot. Rozdział badanych białek prowadzono przy wykorzystaniu elektroforezy SDS-PAGE i analizowano z wykorzystaniem techniki Western Blot. Uzyskany metodą chemiluminescencji sygnał na kliszach RTG poddano analizie w programie *Image Quant*. Odczyty białka *p53* normalizowano względem białka  $\beta$ -aktyny.

B) Analiza ilościowa poziomu białka *p53*. Wartości kontrolne, w badanych pkt. czasowych, wyrażone jako 100%. K - kontrola; (\*) różnice statystycznie istotne w odniesieniu do kontroli,  $p < 0,05$ ;

Western blots analysis of *p53* protein in the liver of *Wistar* rats following DBP administration for 1, 3 and 14 days at a dose of 1800 mg/kg b.w. x day<sup>-1</sup>.

A) Representative western immunoblot images of *p53* protein. Liver tissue lysates were separated by SDS-PAGE and subjected to Western immunoblotting. The signal intensity from the chemiluminescent detection was analyzed by *Image Quant* software. The *p53* protein level was normalized to  $\beta$ -actin signal.

B) Quantitative analysis of *p53* protein level. Control values at each time point were considered as 100%. (\*) Significantly different from the control at the same time point,  $p < 0,05$ ;

Gen *p53*, supresor transformacji nowotworowej, oprócz udziału w regulacji cyklu komórkowego i apoptozy, pełni również funkcje represora transkrypcji genów zaangażowanych w proliferację komórkową (*myc*), progresję cyklu komórkowego (*cyklina B1*) [10, 12, 29]. Z uwagi natomiast na brak wyspy CpG w rejonie promotorowym genu *p53*, sądzi się [25], że jest on bardziej wrażliwy na miejscowo-specyficzną metylację sekwencji CpG.

W przeprowadzonych badaniach wykazano, że DBP indukował przejściową zmianę statusu metylacji rejonu promotorowego genu *p53*. Jednocześnie stwierdzono utrzymujący się w przebiegu doświadczenia, obniżony poziom transkryptu i białka *p53*. Tym samym, obniżoną ekspresję badanego genu trudno przyczynowo wiązać ze zwiększonym poziomem jego metylacji, który był wykazany tylko po jednorazowej dawce DBP.

W naszych wcześniejszych badaniach [16], przeprowadzonych w identycznych warunkach doświadczalnych wykazano, że DBP indukował przejściowy wzrost syntezy DNA i aktywności metylotransferaz DNA (DNMTs), z których DNMT1 i DNMT3 odpowiedzialne są za zachowanie prawidłowego wzoru metylacji w okresie kolejnych rund replikacji DNA,

poprzedzających podziały komórkowe [11, 28]. Wyniki te wskazują na prawdopodobny udział DNMTs w mechanizmach indukowanej DBP metylacji cytozyny w sekwencjach *p53* uprzednio niemetylowanych.

Należy w tym miejscu zaznaczyć, że przy oddziaływaniu DBP wykazano również wzrost transkryptu oraz poziomu białka *c-myc* (dane niepublikowane).

Białko *c-myc* odgrywa istotną rolę zarówno w fizjologii jak i patologii komórki, działając jako aktywator/represor wielu genów, w tym genów biorących udział w regulacji cyklu komórkowego [8, 19]. 15-20% genów w genomie komórki znajduje się pod kontrolą białka *c-myc*. Przypisywane jest mu również współdziałanie z DNMT3 [3] jak i deacetylazami histonowymi [17]. Sądzi się również, że aktywny protoonkogen *c-myc* zwiększa generację RFT (Reaktywne Formy Tlenu), co prowadzi do uszkodzeń DNA i osłabienia lub zahamowania funkcji biologicznych *p53* [31]. Jednocześnie wiadomo, że białko *p53* bierze udział w odpowiedzi komórki na bodźce stresowe takie jak np. nieprawidłowe sygnały proliferacyjne, związane z aktywacją onkogeny.

Wszystkie te zależności sugerują, że obniżony poziom białka *p53*, wykazany przy oddziaływaniu DBP

mógł być wynikiem raczej represyjnego działania aktywowanego białka c-myc niż krótkotrwałej, wykazanej tylko po 1 dawce DBP zmiany w poziomie metylacji supresorowego genu *p53*.

## WNIOSKI

1. Wyniki przeprowadzonych badań wskazują, że indukowane zmiany ekspresji genu *p53* nie były bezpośrednio wynikiem zmian poziomu metylacji badanych sekwencji rejonu promotorowego genu.
2. Obniżony poziom białka *p53*, może wynikać z represyjnego oddziaływania białka c-myc, uczestniczącego w tych samych szlakach transdukcji sygnału.

## Podziękowania / Acknowledgements

Niniejsza praca została sfinansowana przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego (grant nr 2 P05D 028 26) oraz Narodowe Centrum Nauki (grant nr N N404 143438).

Autorki składają podziękowania Pani Prof. dr hab. Barbarze Tudek z Instytutu Biochemii i Biofizyki PAN za udostępnienie sprzętu laboratoryjnego i możliwość wykonania części badań.

## PIŚMIENNICTWO

1. Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR): Toxicological profile for Di-*n*-butyl Phthalate. Update. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service 2001.
2. Ballestar E., Esteller M.: The impact of chromatin in human cancer: linking DNA methylation to gene silencing. *Carcinogenesis* 2002, 23, 1103-9.
3. Brenner C., Deplus R., Didelot C., Lorient A., Viré E., De Smet C., Gutierrez A., Danovi D., Bernard D., Boon T., Pelicci P.G., Amati B., Kouzarides T., de Launoit Y., Di Croce L., Fuks F.: Myc represses transcription through recruitment of DNA methyltransferase corepressor. *EMBO J.* 2005, 24, 336-346.
4. Brenner C., Fuks F.: A methylation rendezvous: reader meets writers. *Dev. Cell* 2007, 12, 843-844.
5. Cedar H., Bergman Y.: Linking DNA methylation and histone modification: patterns and paradigms. *Nat. Rev. Genet.*, 2009, 10, 295-304.
6. Dobrzyńska M. M., Tyrkiel E. J., Hernik A., Derezińska E., Góralczyk K., Ludwicki J.K.: The effects of di-*n*-butyl phthalate on the germ cells of laboratory mice. *Rocz Panstw Zakł Hig* 2010, 61, 13-19.
7. Dobrzyńska M. M., Tyrkiel E.J., Hernik A., Derezińska E., Góralczyk K., Ludwicki J.K.: Wpływ ftalanu di-*n*-butyłu (DBP) na komórki somatyczne myszy laboratoryjnych. *Rocz Panstw Zakł Hig* 2009, 60, 317-324.
8. Dominguez-Sola D., Ying C.Y., Grandori C., Ruggiero L., Chen B., Li M., Galloway D.A., Gu W., Gautier J. and Dalla-Favera R.: Non-transcriptional control of DNA replication by c-Myc. *Nature* 2007, 448, 445-451.
9. Heudorf U., Mersch-Sundermann V., Angerer J.: Phthalates: toxicology and exposure. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 2007, 210, 623-34.
10. Ho J.S.L., Ma W., Mao D.Y.L and Benchimol S.: p53-Dependent Transcriptional Repression of c-myc Is Required for G1 Cell Cycle Arrest. *Mol. Cell. Biol.* 2005, 25, 7423-7431.
11. Hsieh C.L.: The de novo methylation activity of Dnmt3a is distinctly different than that of Dnmt1. *BMC Biochemistry* 2005, 6, 6.
12. Imbriano C., Gurtner A., Cocchiarella F., Di Agostino S., Basile V., Gostissa M., Dobbelstein M., Del Sal G., Piaggio G., Mantovani R.: Direct p53 transcriptional repression: In vivo analysis of CCAAT-containing G2/M promoters. *Mol. Cell Biol.* 2005, 25, 3737-3751.
13. Kang S.C., Lee B.M.: DNA methylation of estrogen receptor-gene by phthalates. *J Toxicol Environ Health* 2005, A 68:1995-2003.
14. Klaunig J.E., Kamendulis L.M.: The role of oxidative stress in carcinogenesis. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2004, 44, 239-67.
15. Koo H.J., Lee B.M.: (2004) Estimated exposure to phthalates in cosmetics and risk assessment. *J. Toxicol. Environ. Health* 2004, Part A: 67, Issue 23-2.
16. Kostka G., Urbanek-Olejnik K., Wiadrowska B.: Di-butyl phthalate-induced hypomethylation of the *c-myc* gene in rat liver. *Toxicol. Ind. Health*, 2010, 26, 407-16.
17. Kurland J.F., Tansey W.P.: Myc-mediated transcriptional repression by recruitment of histone deacetylase. *Cancer Res.* 2008, 68, 3624-3629.
18. Kutanzi K.R., Koturbash I., Bronson R.T., Pogribny I.P., Kovalchuk O.: Imbalance between apoptosis and cell proliferation during early stages of mammary gland carcinogenesis in ACI rats. *Mut. Res.* 2010, 694, 1-6.
19. Lin Ch., Liu Ch., Lee Ch., Chan T., Liu H.E.: Targeting c-Myc as a novel approach for hepatocellular carcinoma. *World J. Hepatol.* 2010, 27, 16-20.
20. Pereira M.A., Wang W., Kramer P.M., Tao L.: DNA hypomethylation induced by non-genotoxic carcinogens in mouse and rat colon. *Cancer Letters* 2004, 30, 145-151.
21. Pfaffl M.W., Graham W., Horgan G.W., Dempfle L.: Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res.* 2002, 30, e 36.
22. Pfaffl M.W.: A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research* 2001, 29, e45.
23. Phillips J.M., Goodman J.I.: Identification of genes that may play critical roles in phenobarbital (PB)-induced liver tumorigenesis due to altered DNA methylation. *Toxicol. Sci.*, 2008, 104, 86-99.
24. Plant N.: Can systems toxicology identify common biomarkers of non-genotoxic carcinogenesis? *Toxicology* 2008, 254, 164-169.
25. Pogribny I.P., James S.J.: Reduction of p53 gene expression In human primary hepatocellular carcinoma is asso-

- ciated with promoter region methylation without coding region mutation. *Cancer Lett.* 2002, 176, 169-174.
26. Pogribny I.P., Pogribna M., Christman J.K and Jame S.J.: Single-Site Methylation within the p53 Promoter Region Reduces Gene Expression in a Reporter Gene Construct: Possible in Vivo Relevance during Tumorigenesis. *Cancer Research*, 2000, 60, 588-594.
27. Pogribny I.P., Tryndyak V.P., Boureiko A., Melnyk S., Bagnyukova T.V., Montgomery B., Rusyn I.: Mechanisms of peroxisome proliferator-induced DNA hypomethylation in rat liver. *Mutat. Res.* 2008, 26, 644, 17-23.
28. Pogribny I.P.: Epigenetic events in tumorigenesis: putting the pieces together. *Exp. Oncol.* 2010, 32, 132-136
29. Scoumanne A. and Chen X.: Protein methylation: a new mechanism of p53 tumor suppressor regulation. *Histol. Histopathol.* 2008, 23, 1143-9.
30. Tao L., Wang W., Li L., Kramer P.K., Pereira M.A.: DNA hypomethylation induced by drinking water disinfection by-products in mouse and rat kidney. *Toxicol. Sci.* 2005, 87, 344-52.
31. Vafa O., Wade M., Kern S., Beeche M., Pandita T.K., Hampton G.M., Wahl G.M.: c-Myc can induce DNA damage, increase reactive oxygen species, and mitigate p53 function: a mechanism for oncogene-induced genetic instability. *Mol. Cell* 2002, 9, 1031-1044.
32. WHO (World Health Organization). International Programme on Chemical Safety Environmental Health Criteria 189 di-n-butyl Phthalate. Geneva, 1997

Otrzymano: 06. 04.2012

Zaakceptowano do druku: 09.09.2012