

**ШАПОШНИК Л.А., ЛИЛО В.В., ЛУКАШ Л.Л.**

*Інститут молекулярної біології і генетики НАН України,  
Україна, 03680, Київ-143, вул. Акад. Заболотного, 150,  
e-mail: lukash@imbg.org.ua*

## **ОПТИМІЗАЦІЯ МЕТОДІВ ЛІКУВАННЯ ОНКОЛОГІЧНИХ ЗАХВОРЮВАНЬ В ЗАЛЕЖНОСТІ ВІД РІВНЯ ЕКСПРЕСІЇ O<sup>6</sup>-АЛКІЛГУАНІН-ДНК АЛКІЛТРАНСФЕРАЗИ У КЛІТИНАХ ПУХЛИНИ**

Різноманітні алкілувальні сполуки, як природні, так і штучно синтезовані, надзвичайно поширені у навколишньому середовищі. Одним з найнебезпечніших їхніх впливів на спадковий матеріал є алкілування O<sup>6</sup>-позиції гуаніну в клітинній ДНК. При подальшій реплікації це призводить до помилкового розпізнавання такого гуаніну ДНК-полімеразою як тиміну і спарювання із аденіном, що призводить до мутації ГЦ→АТ типу транзиції. У відновленні таких пошкоджень важливу роль відіграє фермент O<sup>6</sup>-алкілгуанін-ДНК алкілтрансфераза (АГТ, MGMT) [1]. Якщо на цьому етапі ензим з якихось причин не виконує своєї функції, то, з високою долею ймовірності, клітина втягуватиметься в апоптоз або онкогенну трансформацію [2]. Таким чином, чутливість клітини до алкілюючих агентів залежить від рівня експресії та активності АГТ. Це має велике значення при лікуванні злоякісних пухлин, тому що найбільш поширені групи хіміопрепаратів (похідні нітрососечовини, хлоретилуючі сполуки) мають саме алкілувальний механізм дії [3]. Отже, вивчення індивідуальних особливостей експресії АГТ допоможе оптимізувати схеми лікування таких захворювань.

Про фермент АГТ, що кодується геном *MGMT*, відомо вже досить багато. Ген картований на довгому плечі 10 хромосоми [4]. Розшифрована структура ензиму у різних класів живих організмів. АГТ виявляється у ядрі і цитоплазмі клітини. Він взаємодіє з ДНК, не порушуючи її структуру, переносить алкілну групу від гуаніну на свій активний цистеїновий залишок, внаслідок чого незворотньо інактивується.

Численні дослідження виявили, що вміст ензиму у різних людей та у різних органах і тканинах однієї людини неоднаковий: найвищий — у печінці, найнижчий — у нервовій тканині та кістковому мозку. Рівень експресії АГТ у злоякісних клітинах часто відрізняється від рівню експресії у нормальних клітинах данного організму і подібних пухлинних клітин інших пацієнтів [5]. За ознакою наявності експресії виділяють АГТ-позитивні та АГТ-негативні генотипи (Mer<sup>+</sup> та Mer<sup>-</sup> відповідно). Доля пухлин, що не експресують ензим, найбільша серед гліом (33–40%) та колоректальних карцином (40%) [6, 7]. Інактивацію гена *MGMT* найчастіше пов'язують із гіперметилуванням промотора, особливо сайту 25 CpG. В 43% АГТ-дефіцитних клітин виявлено метилування більш, ніж 50% сайтів промотора, тоді як серед АГТ-позитивних клітин таких лише 9% [8–12]. Відомо безліч факторів, що впливають на експресію гена *MGMT*. Серед таких зазначаються

одноланцюгові розриви ДНК, мутації у промоторі. Важливу роль у регуляції експресії гена відіграє білок p53 [13, 14]. А нещодавно встановлено, що, наприклад, наявність ядерного фактору NF-kB в ядерному матриксі спричиняє експресію MGMT у гліомах і культурах пухлинних клітин незалежно від метилування промотора [15]. Фосфорилування інгібує ензим, дефосфорилювання лужними фосфатами — підвищує його активність [16].

Пухлини, клітини яких не експресують MGMT, високочутливі до хіміопрепаратів із алкілувальним механізмом дії. Але значний відсоток пухлин виявляє дуже високі рівні активності ензиму, не характерні для жодної з нормальних тканин [17]. У таких випадках проблему підвищення ефективності лікування намагаються вирішити за допомогою різних інгібіторів активності ензиму (псевдосубстратів). Вони мають високу спорідненість до АГТ і після введення в організм зв'язуються з ензимом та інактивують його. Здатність цих речовин проникати через гематоенцефалічний бар'єр важлива для лікування мозкових пухлин [18]. При їх комбінації з хіміопрепаратами досягаються значно кращі результати. На цей час синтезовано багато псевдосубстратів, які відрізняються за активністю і токсичністю [19]. До фази клінічних випробовувань дійшов поки тільки O<sup>6</sup>-бензилгуанін. Істотним недоліком всіх інгібіторів активності є їхня невибірковість. В першу чергу від виснаження запасів АГТ страждають тканини з низьким рівнем ферменту (гемопоетичні клітини, особливо — клони з коротким мітотичним циклом CD34<sup>+</sup>). Активність фермента у них знижується майже до нуля [20]. Це робить кістковий мозок значно чутливішим до шкідливої дії хіміопрепаратів — дозозалежна мієлосупресія з'являється при введенні нижчих доз, частіше виникають вторинні пухлини, в т.ч. гострі мієлоїдні лейкози.

Зараз ведеться пошук псевдосубстратів із більш вибірковою дією. Нині вони ще не знайдені, тому пригнічення гемопоезу намагаються уникнути за допомогою методів генної інженерії та клітинної терапії [21]. Для цього використовують мутантні форми АГТ, які не зв'язуються з O<sup>6</sup>-бензилгуаніном (G156A, Y158H, I140K). Гемопоетичні клітини з таким геном трансплантуються хворим і функціонують під час курсу хіміотерапії. Рівень активності АГТ в них не змінюється під впливом O<sup>6</sup>-бензилгуаніну, і клітини кісткового мозку значно менше уражуються через мутагенну та цитотоксичну дію алкілувальних препаратів [22–24].

Після закінчення курсу хіміотерапії виникає необхідність відновити активність АГТ, зокрема, шляхом стимуляції експресії гена. Зараз пропонуються різні методи, але вони поки що не набули широкого розповсюдження. Наприклад, підвищення рівня ензиму у людських лейкоцитах після використання O<sup>6</sup>-бензилгуаніну було отримано за допомогою попередників цистеїну (2-оксотіазолідін-4-карбоксильна кислота, N-ацетил-L- цистеїн), природних антиоксидантів (куркумін, сілімарин та ін.) [25], водних та спиртових екстрактів деяких лікарських рослин (орегано, м'ята, базилік, *Azadirachta indica*, *Osimum sanctum*, *Withania somnifera* та ін.) [26].

## Література

1. *Pegg A. E.* Mammalian O<sup>6</sup>-alkylguanine-DNA alkyltransferase: regulation and importance in response to alkylating carcinogenic and therapeutic agents // *Cancer Res.*— 1990.— №50.— P. 6119–6129.
2. *Tong G.T., Kirk M.C., Ludlum D.B.* Formation of the cross-link 1-N<sup>3</sup>-deoxycytidyl,2-[N<sup>1</sup>-deoxyguanosinyl]ethane in DNA treated with N,N-bis(2-chloroethyl)-N-nitrosourea // *Cancer Res.*— 1982.— Vol.42, №8.— P. 3102–3105.
3. *Drablos F., Hoppel C.L., Willson J.K.V.* Alkylation damage in DNA and RNA-repair mechanisms and medical significance // *DNA Repair (Amst).*— 2004.— Vol.3, №4.— P. 1389–1407.
4. *Natarajan A.T., Vermeulen S., Darroudi F., Valentine M.B., Brent T.P., Sankar Mitra A.S., Tano K.* Chromosomal localization of human O<sup>6</sup>-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) gene by in situ hybridization // *Mutagenesis.*— 1992.— Vol.7, №1.— P. 83–85.
5. *Citron M., Graver M., Schoenhaus M., Chen S., Decker R., Kleynerman L., Kahn L.B., White A., Fornace A.J., Yarosh D.* Detection of messenger RNA from O<sup>6</sup>-methylguanine-DNA methyltransferase gene MGMT in human normal and tumor tissues // *J. Natl. Cancer Inst.*— 1992.— Vol.84, №5.— P. 337–340.
6. *Silber J.R., Blank A., Bobola M.S., Muelleri B.A., Kolstoe D.D., Ojemann G.A., Berger M.S.* Lack of the DNA repair protein O<sup>6</sup>-methylguanine-DNA methyltransferase in histologically normal brain adjacent to primary human brain tumors // *Biochemistry.*— 1996.— №93.— P. 6914–6946.
7. *Herman J.G., Esteller M., Hamilton S.R., Burger P.C., Baylin S.B.* Inactivation of the DNA repair gene O<sup>6</sup>-methylguanine-DNA methyltransferase by promoter hypermethylation is a common event in primary human neoplasia // *Cancer Res.*— 1999.— №59.— P. 793–797.
8. *Zawlik I., Vaccarella S., Kitaa D., Mittelbronn M., Franceschia S., Ohgaki H.* Promoter methylation and polymorphisms of the MGMT gene in glioblastomas: A population-based study // *Neuroepidemiology.*— 2009.— №32.— P. 21–29.
9. *Karayan-Tapon L., Long L.* Correlation of clinical features and methylation status of MGMT gene promoter in glioblastomas // *J. NeuroOncol.*— 2004.— Vol.68, №3.— P. 274–283.
10. *Smith-Sorensen B., Lind G.E., Skotheim R.I., Fossa S.D., Fodstadl Q., Stenwig A.-E., Jakobsen K.S., Lothe R.A.* Frequent promoter hypermethylation of the O<sup>6</sup>-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) gene in testicular cancer // *Oncogene.*— 2002.— Vol.21, №57.— P. 8878–8884.
11. *Mollemann M., Wolter M., Jorg Felsberg J., Collins V.P., Reifemberger G.* Frequent promoter hypermethylation and low expression of the MGMT gene in oligodendroglial tumors // *Intern. J. Cancer.*— 2004.— Vol.113, №3.— P. 379–385.
12. *Ingold B., Schraml P., Stopatschinskaja S., Heppner F.L., Moc H.* Frequent MGMT gene promoter methylation in brain metastases of melanoma, lung, breast and renal carcinoma // *J. Clin. Oncol.*— 2008.— №26.— P. 2063.
13. *Ogino F., Shuji S.A., Hazra O., Aditi T., Tranah S.C., Gregory J., Kirkner G., Gregory J., Kawasaki D., Takako C., Noshio N., Katsuhiko B., Ohnishi N., Mutsuko A., Suemoto B., Yuko X., Meyerhardt F., Jeffrey A., Hunter, David J., Fuchs R., Charles S.* MGMT germline polymorphism is associated with somatic MGMT promoter methylation and gene silencing in colorectal cancer // *Carcinogenesis.*— 2007.— №9.— P. 1985.
14. *Grombacher T., Eichhorn U., Kaina B.* p53 is involved in regulation of the DNA repair gene O<sup>6</sup>-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) by DNA damaging agents // *Oncogene.*— 1998.— Vol.17, №7.— P. 845–851.

15. Lavon I., Fuchs D., Zrihan D., Efroni G., Zelicovitch B., Fillig Y., Siegal T. Novel mechanism whereby nuclear factor kB mediates DNA damage repair through regulation of O<sup>6</sup>-methylguanine-DNA methyltransferase // *Cancer Res.*— 2007.— Vol.67, №18.— P. 8952–8959.
16. Srivenugopal K.S. Mullapudi S.R.S., Shou J., Hazra T.K., Ali-Osman F. Protein phosphorylation is a regulatory mechanism for O<sup>6</sup>-alkylguanine-DNA alkyltransferase in human brain tumor cell // *Cancer Res.*— 2000.— Vol.60, №2.— P. 282–287.
17. Bobola M.S., Berger M.S., Ellenbogen R.G., Roberts T.S., Geyer J.R., Silber J.R. O<sup>6</sup>-methylguanine-DNA methyltransferase in pediatric primary brain tumors // *Clin. Cancer Res.*— 2001.— №7.— P. 613–619.
18. Dolan M.E., Moschel R.C., Pegg A.E. Metabolism of O<sup>6</sup>-benzylguanine, an inactivation of O<sup>6</sup>-alkylguanine-DNA alkyltransferase // *Cancer Res.*— 1994.— Vol.91, №9.— P. 5123–5130.
19. Nelson M.E., Dowlati A., Haaga J., Remick S.C., Spiro S.L. 2-amino-O4-benzylpteridine derivatives: potent inactivators of O<sup>6</sup>-alkylguanine-DNA alkyltransferase // *J. Med. Chem.*— 2004.— Vol.47, №15.— P. 3887–3891.
20. Gerson S.L., Phillips W., Kastan M., Dumenco L.L., Donovan C. Human CD34<sup>+</sup> hematopoietic progenitors have low cytokine-unresponsive O<sup>6</sup>-alkylguanine-DNA alkyltransferase and are sensitive to O<sup>6</sup>-benzylguanine plus BCNU // *Blood.*— 1996.— Vol.88, №5.— P. 1649–1655.
21. Licht T., Koc O.N., Davis B.M., Gupta E. *In vivo* drug-selectable genes: a new concept in gene therapy // *Stem Cells.*— 1997.— Vol.15, №2.— P. 104–111.
22. Wibley J.E., Pegg A.E., Moody P.C. Crystal structure of the human O<sup>6</sup>-alkylguanine-DNA alkyltransferase // *Nucl. Acids Res.*— 1993.— Vol.32, №45.— P. 11998–12006.
23. Xu-Welliver M., Kanugula S., Pegg A.E. Isolation of human O<sup>6</sup>-alkylguanine-DNA alkyltransferase mutants highly resistant to inactivation by O<sup>6</sup>-benzylguanine // *Cancer Res.*— 1998.— Vol.58, №9.— P. 1936–1945.
24. Rabik C.A., Njoku M.C., Dolan M.E. Inactivation of O<sup>6</sup>-alkylguanine-DNA alkyltransferase as a means to enhance chemotherapy // *Cancer Treat. Rev.*— 2006.— №32.— P. 261–276.
25. Niture S.K., Velu C.S., Smith Q.R., Bhat G.J., Srivenugopal K.S. Increased expression of the MGMT repair protein mediated by cysteine prodrugs and chemopreventative natural products in human lymphocytes and tumor cell lines // *Carcinogenesis.*— 2007.— Vol.28, №2.— P. 378–389.
26. Niture S.K., Rao U.S., Srivenugopal K.S. Chemopreventative strategies targeting the MGMT repair protein: augmented expression in human lymphocytes and tumor cells by ethanolic and aqueous extract of several Indian medicinal plants // *Intern. J. Oncol.*— 2006.— №29.— P. 1269–1278.

### Резюме

Данная работа посвящена рассмотрению работ, в которых показана зависимость эффективности химиотерапии от уровня экспрессии репаративного энзима АГТ.

Дана робота присвячена огляду робіт, в яких розглядається залежність ефективності хіміотерапії від рівня експресії репаративного ензиму АГТ.

This article deals with consideration of the works describing the dependence of chemotherapeutical efficiency on the expression level of the repair enzyme MGMT in tumor cells.

**ШВАЧКО Л.П.**

*Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины,  
Украина, г. Киев, 03143, ул. Заболотного, 150, e-mail: l.p.shvachko@imb.org.ua*

## **ПРЕЖДЕВРЕМЕННОЕ РАЗДЕЛЕНИЕ ЦЕНТРОМЕР В РАННЕМ МЕХАНИЗМЕ АНЕУПЛОИДИЙ ПРИ ОНКОЛОГИЧЕСКОЙ ПРОГРЕССИИ**

Анеуплоидия — аномальное изменение количества хромосом в кариотипе, ключевая стадия в цитогенетике рака (1–3). Анеуплоидии возникают при нарушении сегрегации реплицированных хромосом между двумя дочерними клетками. Существует целый ряд молекулярных механизмов, индуцирующих анеуплоидии (Gebhart, Liehr, 2000, Fenech, 2002, Leach et al., 2004, Gollin, 2005, Iarmarcovai et al., 2006). Центральное место в механизме анеуплоидий занимает дисфункция центромеры. При делении клетки именно к *центромерам* прикрепляются тянущие нити митотического веретена в ходе *разделения* набора хромосом на два генома, из которых в дальнейшем формируются ядра двух дочерних клеток (Wolfe, 1961; Kubai, 1975). Таким образом, дисфункции *центромеры и связанной с ней кинетохоры* способны вызывать отставание целых хромосом в митотическом делении клетки.

Нами показано, что нарушение функции центромеры при онкологическом процессе носит эпигенетический характер и проявляется в преждевременном разделении центромер и сестринских хроматид на стадии метафазы. Преждевременное разделение центромер можно отнести к скрытой и ранней хромосомальной нестабильности, при которой отсутствуют какие-либо цитогенетические перестройки и число хромосом в кариотипе остается, как правило, неизменным. Нами установлено, что феномен преждевременного разделения центромер при онкологическом процессе ассоциирован с нарушением эпигенетического ДНК метилирования, а именно, существенным деметилированием центромерной сателлитной ДНК.

### **Материалы и методы**

Объектом исследования были соматические лимфоциты периферической крови у пациентов с солидным типом опухолей, карцинома щитовидной железы (n=100), колоректальный рак (n=75), нейробластома (n= 8) и опухоль Вильмса (n=6) у детей.

Контролем служили условно здоровые доноры (n=24), в возрасте от 25 до 40 лет.

Митогенстимулированную фитогемагглютинином (РНА “Р”, Sigma-Aldrich) культуру лимфоцитов получали как описано (4). Геномные ДНК из лимфоцитов крови получали стандартной фенол-хлороформной экстракцией (5). Метил-специфическую эндонуклеазную рестрикцию геномных ДНК с помощью HpaII рестриктазы и Саузери — гибридизацию с флуоресцентным DIG-pUC(Alu) плазмидным зондом проводили (6). Для анализа использовали флуоресцентную и световую микроскопию, а также электрофорез и электрофоретический перенос на мембрану Hybond из 1,2% агарозного геля.