

УДК 577.151.3:616.12–006.326–003.9

© Колектив авторів, 2012

ВИВЧЕННЯ РІВНЮ ЕКСПРЕСІЇ РЕПАРАТИВНОГО ЕНЗИМУ О6-МЕТИЛГУАНІН-ДНК МЕТИЛТРАНСФЕРАЗИ У МІКСОМАХ СЕРЦЯ

Л.А. Шапошник¹, Є.В. Кузенко², Р.М. Вітовський³, В.В.Лило¹, Л.Л. Лукаш¹

¹Відділ генетики людини (зав. – проф. Л.Л. Лукаш), Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, м. Київ; ²кафедра патоморфології (зав. – А.М. Романюк), медичний факультет Сумського державного університету, м. Суми; ³кафедра хірургії серця та магістральних судин (зав. – проф. Г.Н. Книшов), Національна медична академія післядипломної освіти ім. П.Л.Шупика, м. Київ.

STUDY OF EXPRESSION LEVEL OF REPAIR ENZYME O6-METHYLGUANINE-DNA METHYLTRANSFERASE IN HEART MYXOMAS

L.A. Shaposhnyk, Y.V. Kuzenko, R.M. Vytovskiy, V.V.Lylo, L.L. Lukush

SUMMARY

The expression level of repair enzyme O6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) have been studied in the samples of heart myxoma. Low level of this enzyme increases the risk of carcinogenesis. The overall level of MGMT in the samples and the percentage of cells that synthesize it were detected. Tumors were very different for these characteristics. This suggests that a gene *MGMT* was involved in etiopathogenesis of some of these tumors.

ИЗУЧЕНИЕ УРОВНЯ ЭКСПРЕССИИ РЕПАРАТИВНОГО ЭНЗИМА О6-МЕТИЛГУАНИН-ДНК МЕТИЛТРАНСФЕРАЗЫ В МИКСОМАХ СЕРДЦА

Л.А. Шапошник, Е.В. Кузенко, Р.М. Витовский, В.В.Лыло, Л.Л. Лукаш

РЕЗЮМЕ

В данной работе изучался уровень экспрессии репаративного энзима О6-метилгуанин-ДНК метилтрансферазы в образцах миксом сердца. Низкий уровень этого энзима повышает риск канцерогенеза. Определялся общий уровень MGMT в пробах и процент синтезирующих его клеток. Исследованные опухоли оказались довольно разнообразными по этим характеристикам. Это говорит о том, что ген *MGMT* был задействован в этиопатогенезе не всех изученных опухолей.

Ключові слова: О6-метилгуанін-ДНК метилтрансфераза, MGMT, міксома серця, репаративний ензим, канцерогенез.

Міксома серця “це рідкісна доброякісна пухлина, що зустрічається з частотою 1:1 млн чол. на рік, але складає при цьому 66-72 % усіх пухлин серця. 5 % випадків пов’язано з мутацією гена PRKAR1-α. Ця мутація є причиною синдрому Карні, що успадковується аутосомно-домінантно і характеризується множинними доброякісними пухлинами [2]. Проте, 95 % міксом серця – спорадичні.

Відомо, що однією з причин виникнення пухлин є генні мутації. Існує ряд генів, порушення функції яких корелює з онкогенною трансформацією клітини. Зміни їх експресії (зокрема, через мутації) можуть привести до надмірної проліферації клітини, накопиченню у структурі її ДНК помилок і, зрештою, до онкогенної трансформації. Найчастіше у пухлинних клітинах знаходять мутації генів *p53*, *K-ras*, *p16^{INK4a}*, *APC*, *p14^{ARF}*, *p19^{ARF}* [3]. Більшість із них є регуляторами клітинного циклу. Так, супресорні мутації гена *p53* виявляються у більш ніж 50 % пухлин [4], активаторні мутації гена *K-ras* – приблизно у 80 % пухлин [5].

Часто причиною мутацій зі зміною або втратою функції гена є метилування нуклеотидів, що викликане дією різноманітних метилувальних сполук,

які надзвичайно поширені у зовнішньому середовищі. Головним ензимом, який видаляє метильні групи з ДНК, є О6-метилгуанін-ДНК метилтрансфераза (MGMT). Він забирає метильний радикал від О6-позиції гуаніну ДНК. Саме вона є найбільш критичною в плані виникнення мутацій або апоптозу. Від рівня MGMT залежить чутливість клітини до метилувальних агентів і частота виникнення мутацій типу транзицій типу GC->AT. Саме такі транзиції є наслідком метилування ДНК [6]. Відомо, що низька активність MGMT корелює з високою частотою вищевказаних транзицій у протоонкогенах і генах-супресорах (*p53*, *K-ras*, *APC* і *β-катеніну*) [7, 8]. Генетичні аспекти етіопатогенезу вивчені для багатьох типів пухлин. Зазвичай, це широко розповсюджені пухлини – карцинома легень, гліобластома, рак молочної залози тощо. Через рідкісність міксом серця, дуже мало робіт по дослідженню генетичних особливостей цих пухлин.

Метою нашої роботи було вивчення особливостей експресії гена *MGMT* на рівні білку у міксомах серця для того, щоб оцінити можливу роль цього гена у механізмі онкотрансформації досліджуваних пухлин.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Матеріалом дослідження слугували зразки були зразки пухлин хворих, прооперованих у Інституті серцево-судинної хірургії ім. Н. А. Амосова НАМН України. Діагноз було верифіковано гістологічно. Після резекції зразки пухлин були одразу заморожені і зберігалися при температурі -80°C . У нашій роботі ми використовували два різні методи оцінки наявності білка у зразках – Вестерн блот аналіз та імуногістохімічний метод.

Для Вестерн блот аналізу білок зі зразків виділявся згідно протоколу [1]. Концентрацію загального білка у клітинному екстракті вимірювали за методом Бредфорда. Білковий екстракт досліджували за допомогою SDS-електрофореза у 12%-поліакріламідному гелі за Леммлі. Ідентифікацію MGMT в клітинному екстракті проводили за допомогою Вестерн блот аналізу з моноклональними антитілами проти MGMT виробництва “Novus Biologicals Littleton, Co” (США) У якості вторинних використовували видоспецифічні коньюговані з пероксидазою хріна антитіла виробництва “Jackson ImmunoResearch” (США) Ідентифікацію MGMT проводили за рекомендацією фірми-виробника [9].

Для імуногістохімічний методу парафінові зрізи депарафінізували за стандартною методикою. Демаскування проводилося у 0,1% розчині трипсину з 0,1% КСІ. Для блокування ендогенної пероксидази зрізи інкубували у 1% розчині H_2O_2 , а для блокування неспецифічного зв'язування “ у 5 % розчині знежиреного сухого молока. Первинні та вторинні антитіла були тими ж, що й для Вестерн блот аналізу. Візуалізація комплексу антиген-антитіло проводилася за допомогою активатора пероксидази аміноетилкоразолу. Оцінку результатів проводили підрахунком відсотка клітин з позитивною реакцією ядра на 1000 клітин у двох різних ділянках зрізу.

Статистична обробка даних проводилася прикладними статистичними програмами, які використовуються в біології і медицині. Враховувався та аналізувався основний параметр коефіцієнта кореляції (r) з квантилями розподілу (P).

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Ми проаналізували зразки 15 пухлин. При Вестерн блот аналізі MGMT був виявлений у 8 зразках: у 5 зразках знайдено стандартну (24 кДа) і важку (48 кДа) форми ензима, у зразках – лише стандартну (24 кДа) форму. У 7 зразках білок не виявлено взагалі (Рис. 1).

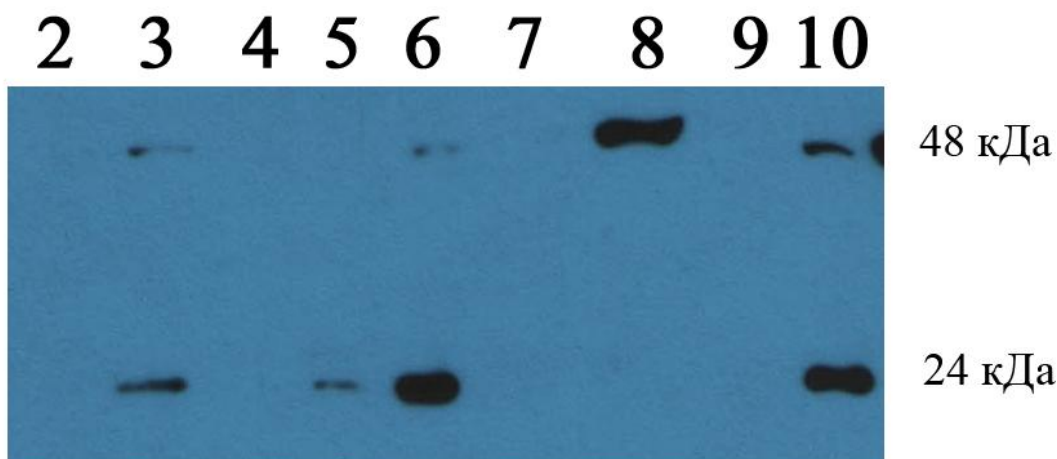


Рис. 1. Вестерн блот аналіз. 2-7, 9, 10"міксоми серця; 8–позитивний контроль.

Через порушену функцію репаративних систем для пухлинних клітин характерна генетична нестабільність – дочірні клітини можуть відрізнитися від материнської за своїми генетичними особливостями, формуючи, таким чином, клітинні клони. Це призводить до того, що будь-яка пухлина є неоднорідною за своєю морфологією, біохімічними і генетичними характеристиками. Певна частина клітин може синтезувати білок, а інша частина – ні. Для аналізу відсотка клітин міксом, які експресують MGMT нами було використано імуногістохімічний метод. MGMT – це, переважно, ядерний білок, а вміст його у цитоплазмі настільки низький, що він не має суттєвого значення. Щодо наявності реакції міксом

виявилися гетерогенними. Поряд із ядрами в яких відбулася реакція можна побачити незабарвлені ядра. Як показано [10], лише при наявності не менше ніж 20 % клітин з пофарбованими ядрами у тканині, рівень ензиму в цілому високий, тканина нечутлива до метилувальних речовин і її можна вважати MGMT-позитивною. Тому нам було важливо визначити саме відсоток MGMT-позитивних клітин у зразках. Відсоток ядер із реакцією за результатами імуногістохімії коливався від 14 % до 73 % у різних зразках. З них MGMT-позитивними були 9 пухлин (Рис. 2). У 8 з них ензим виявлений і при Вестерн блот аналізі.

При статистичному аналізі (коефіцієнт кореляції Пірсона) з'ясувалось $r=0.755$ при квантілях розподілу

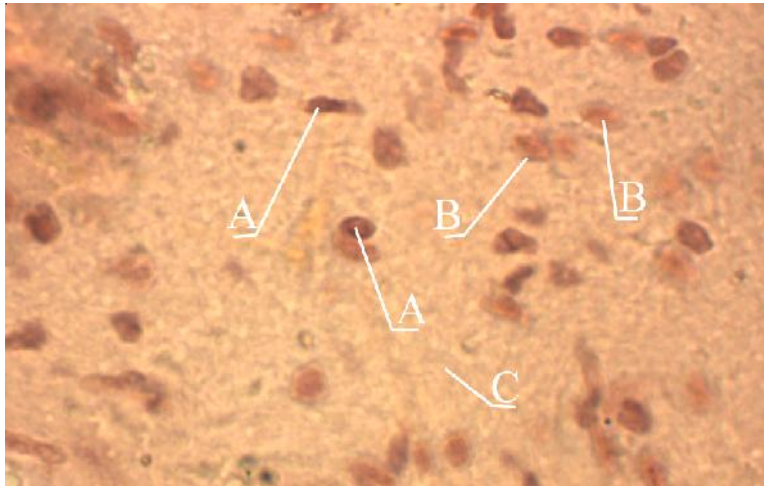


Рис. 2. Міксома серця, збільшення об'єктива 100х. А – ядра з MGMT, В – ядра без MGMT, С – поле слизу.

$P < 0,001$. Різниця розходження між результатами Вестерн блот аналізу і імуногістохімічного аналізу склала $13,33 \pm 2,5$ %. Це входить в межі допустимих розбіжностей з результатами молекулярно-генетичних досліджень, адже при морфологічному у зрізі можна виявити інфільтрацію клітинами гемопоетичного походження, які дають позитивну реакцію.

ВИСНОВКИ

Генні та хромосомні перестройки є причиною канцерогенезу. Ензим MGMT захищає клітини від мутагенної, канцерогенної і цитотоксичної дії метилувальних сполук. Зміни його експресії дуже часто виявляються в пухлинних клітинах. Вже вивчені особливості експресії MGMT в багатьох типах пухлин людини. Через рідкісність міксом серця поки мало відомо про рівень цього білка в них. Нами було проаналізовано 15 міксом серця на наявність білка MGMT. Високий рівень білку був виявлений двома різними методами. При Вестерн блот аналізі ензим виявлений у 9 зразках. При імуногістохімічному дослідженні кількість клітин з позитивною реакцією була різною, а їх розподіл у тканині нерівномірним. MGMT-позитивними виявилися 9 зразків. Кореляція між результатами цих двох досліджень дозволяє вважати їх достовірними $r = 0,755$ при $P < 0,001$.

ЛІТЕРАТУРА

1. Шапошник Л. А. Некоторые особенности белкового спектра нормальных и опухолевых клеток человека / Л. А. Шапошник, В. В. Лыло, Л. Л. Лукаш // Фактори експериментальної еволюції організмів. – 2011. – Т. 11. – С. 554–557.
2. Stratakis C. A. Clinical and molecular features of the Carney complex: diagnostic criteria and

recommendations for patient evaluation / C. A. Stratakis, L. S. Kirschner, J. A. Carney // J. Clin. Endocrinol. Metab. – 2001. – Vol. 86, № 9. – P. 4041–4046.

3. Fridman A. L. Critical pathways in cellular senescence and immortalization revealed by gene expression profiling / A. L. Fridman, M. A. Tainsky // Oncogene. – 2008. – Vol. 27, № 46. – P. 5975–5987.

4. p53 mutations in human cancers / M. Hollstein, D. Sidransky, B. Vogelstein [et al.] // Science. – 1991. – Vol. 253, № 5015. – P. 49–53.

5. Analysis of lung tumor initiation and progression using conditional expression of oncogenic *K-ras* / E. L. Jackson, N. Willis, K. Mercer [et al.] // Genes. Dev. – 2001. № 15. – P. 3243–3248.

6. Kaina B. Mechanisms and consequences of methylating agent-induced SCEs and chromosomal aberrations: a long road traveled and still a far way to go / B. Kaina // Cytogenet. Genome Res. – 2004. – № 104. – P. 77–86.

7. Osanai T. Inverse correlation between the expression of O6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) and p53 in breast cancer / T. Osanai, Y. Takagi, Y. Toriya // Jpn. J. Clin. Oncol. – 2005. – Vol. 35, № 3. – P. 121–125.

8. O6-methylguanine methyltransferase in colorectal cancers: detection of mutations, loss of expression, and weak association with G:C>A:T transitions / S. Halford, A. Rowan, E. Sawyer [et al.] // Gut. – 2005. – № 54. – P. 797–802.

9. <http://www.novusbio.com/support/protocols/protocol-specific-for-mgmt-antibody-nb100-168.html>

10. Quantitative analysis of O⁶-alkylguanine-DNA alkyltransferase in malignant glioma / J. A. Maxwell, S. P. Johnson, J. A. Quinn [et al.] // Mol. Cancer Ther. – 2006. – Vol. 10, № 5. – P. 2531–2539.