

ПОВЫШЕНИЕ АКТИВНОСТИ ПОЛИ(АДФ-РИБОЗА)-ПОЛИМЕРАЗ В УСЛОВИЯХ НОКДАУНА БЕЛКА PML – НОВЫЕ ПЕРСПЕКТИВЫ ТЕРАПИИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ НОВООБРАЗОВАНИЙ

Сергей Васильевич Бойчук^{1,2*}, Булат Рашитович Рамазанов¹, Ильшат Ганиевич Мустафин¹, Джоеран Оле²

¹Казанский государственный медицинский университет,

²Раковый центр университета г. Питтсбурга, США

Реферат

Цель. Изучение взаимосвязи между экспрессией белка PML и активностью поли(АДФ-рибоза)-полимераз в физиологических условиях, а также в условиях генотоксического стресса, вызываемого химиопрепаратами и ионизирующим излучением.

Методы. Исследование проводили на фибробластах человека линии BJ, культивированных в среде DMEM/199 с добавлением эмбриональной телячьей сыворотки, глутамина и антибиотиков. Снижения уровня экспрессии белка PML достигали в результате трансфекции коротких интерферирующих рибонуклеиновых кислот. Для индукции повреждений дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) использовали химиопрепараты (доксорубин и гидроксимочевину) и ионизирующее излучение. Образование двунитевых разрывов ДНК, их репарацию, а также активность поли(АДФ-рибоза)-полимеразы оценивали методами иммуноблоттинга и иммунофлуоресценции.

Результаты. Нокдаун белка PML в фибробластах человека сопровождался повышением активности поли(АДФ-рибоза)-полимеразы, о чём свидетельствовало увеличение уровня экспрессии полимеров. В условиях нокдауна белка PML и повреждений ДНК, вызываемых химиопрепаратами и ионизирующим излучением, происходит значительное увеличение уровня экспрессии полимеров, а также их фокального распределения.

Вывод. Увеличение активности поли(АДФ-рибоза)-полимеразы в условиях нокдауна PML и воздействия факторов, повреждающих ДНК, свидетельствует о развитии компенсаторной реакции в условиях несостоятельности процессов гомологичной рекомбинации; обнаруженный феномен позволяет расширить спектр злокачественных новообразований, потенциально восприимчивых к терапии ингибиторами поли(АДФ-рибоза)-полимеразы.

Ключевые слова: мутагенез, PML, поли(АДФ-рибоза)-полимеразы, репарация повреждений ДНК, противоопухолевые средства, радиотерапия.

INCREASED ACTIVITY OF POLY(ADP-RIBOSE)-POLYMERASE IN PML-DEPLETED CELLS – NOVEL PERSPECTIVES FOR CANCER THERAPY S.V. Boichuk^{1,2}, B.R. Ramazanov¹, I.G. Mustafin¹, Gjoerup O.² ¹Kazan State Medical University, Kazan, Russia, ²University of Pittsburgh Cancer Institute, Pittsburgh, USA. **Aim.** To investigate the relationship between PML expression and poly(ADP-ribose)-polymerase (PARP) activity in physiological conditions and at genotoxic stress induced by chemotherapy and ionizing radiation. **Methods.** The study was conducted on BJ fibroblasts cultured in DMEM/199 medium supplemented with fetal bovine serum, L-glutamine and antibiotics. PML down-regulation was achieved by short interfering ribonucleic acid transfection. To induce deoxyribonucleic acid (DNA) damage in BJ fibroblasts, doxorubicin and hydroxyurea or ionizing radiation were used. PARP activity, formation of DNA double-strand breaks and DNA damage response were examined by Western blotting and immunofluorescence microscopy. **Results.** PML knockdown was accomplished with an increased PARP activity, confirmed by an increased expression of poly-ADP-ribose (PAR) polymers. At PML knockdown and DNA damage caused by chemotherapy and ionizing radiation, there is a significant increase in PAR polymers expression as well as increase in the number of cells containing PAR foci. **Conclusion.** Increased activity of poly(ADP-ribose)-polymerase at PML knockdown and DNA damaging conditions indicates the compensatory response due to insufficiency of the homologous recombination mechanisms. The phenomenon found widens the spectrum of malignancies that might be potentially sensitive to the therapy with poly(ADP-ribose)-polymerase inhibitors. **Keywords:** mutagenesis, PML, poly(ADP-ribose)-polymerase, DNA damage response, anticancer agents, radiotherapy.

Известно, что дефекты в системе репарации дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) не только обуславливают повышенную частоту возникновения злокачественных новообразований, но и способны влиять на восприимчивость опухолевых клеток к воздействию ионизирующей радиации, химиопрепаратов, определяя таким образом эффективность терапии. К примеру, большинство случаев наследственных форм рака молочной железы (РМЖ) и яичника в настоящее время обусловлено мутациями генов *BRCA1* и *BRCA2* [1], играющих, как известно, одну из ключевых ролей в процессах гомологичной рекомбинации ДНК. Исследования последних лет показали, что не-

смотря на высокую частоту РМЖ в популяции, носительницы герминативных мутаций *BRCA1/2* восприимчивы к лечению ингибиторами поли(АДФ-рибоза)-полимераз (ПАРП) и препаратами платины (цисплатин), повреждающими ДНК [2]. Чувствительность к препаратам первой группы объясняется концепцией «синтетической летальности» (см. ниже), в то время как восприимчивость к препаратам платины обусловлена их способностью вызывать двунитевые разрывы ДНК, которые репарируются преимущественно по механизму *BRCA1/BRCA2*-опосредованной гомологичной рекомбинации [11].

Таким образом, изучение молекулярных механизмов репарации повреждений ДНК – актуальная задача как с точки зрения уточнения молекулярных механизмов поддержания целост-

ности клеточного генома, так и с точки зрения понимания механизмов чувствительности/резистентности злокачественных новообразований к проводимой химио- и радиотерапии, определения наиболее эффективных методов лечения.

Настоящее исследование выполнено на фибробластах человека линии VJ, культивированных в среде DMEM/199 с добавлением эмбриональной телячьей сыворотки, глутамина и антибиотиков (Lonza, MD, USA). Снижения уровня экспрессии белка PML достигали в результате трансфекции коротких interfering рибонуклеиновых кислот (киРНК) против PML (SMARTPool, Dharmacon). Трансфекцию киРНК против PML или контрольной РНК осуществляли с помощью реагента «RNAiMAX» (Invitrogen). Нокдаун белка PML подтверждали методом иммуноблоттинга с использованием соответствующих антител (клон PG-M3 и H-92, Santa Cruz). Спустя 24 ч вызывали повреждение ДНК с помощью химиопрепаратов – доксорубицина (0,25 мкг/мл, Sigma), гидроксимочевины (5 мМ, Calbiochem) – или воздействия ионизирующего излучения (10 Гр). Активность ПАРП оценивали через 48 ч с помощью иммуноблоттинга и иммунофлуоресцентной микроскопии с использованием моноклональных антител к поли(АДФ-рибоза)-полимерам (ПАР-полимерам, клон 10H, Genetex), традиционно используемых в качестве маркёров активности ПАРП [8]. Количественную оценку клеток, имеющих фокальное распределение ПАР-полимеров, осуществляли, как минимум, в 10 полях зрения. Для выявления двунитевых разрывов ДНК и активации репарации возникших повреждений оценивали уровень экспрессии фосфорилированных форм гистона 2А (H2AX Ser139) и АТМ-киназы (pATM Ser1981) (Cell Signaling и Epitomics соответственно). В качестве контроля уровня экспрессии белков использовали моноклональные антитела к общим формам вышеназванных белков (Cell Signaling и Epitomics) и актину (Sigma). Активацию репаративных процессов также оценивали методом иммунофлуоресценции с использованием моноклональных антител к фосфорилированным формам гистона 2А (H2AX Ser139, Millipore), АТМ-киназы (pATM Ser1981, 200-301-400, Rockland) и белка 53BP1 (Ab-1, Calbiochem). В качестве вторичных антител использовали антитела, меченые Alexa-Fluor-488 (Invitrogen) и Cy3+ (Jackson ImmunoResearch).

Результаты исследований обрабатывали с помощью программы «Statistica 6.0» (StatSoft Inc., США), для оценки достоверности различий изучаемых выборок использовали t-критерий Стьюдента.

Результаты проведённых исследований показали, что нокдаун белка PML в фибробластах человека приводит к увеличению активности ПАРП, о чём свидетельствует увеличение уровня экспрессии поли-АДФ-рибозы. На рис. 1 показано, что через 72 ч после трансфекции киРНК против PML уровень экспрессии ПАР-полимеров

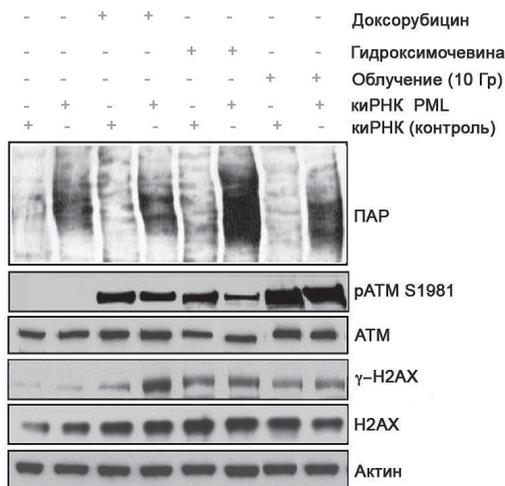


Рис. 1. Уровень экспрессии поли-АДФ-рибозы (ПАР), общей и фосфорилированных форм АТМ-киназы и гистона 2А, а также актина в фибробластах человека линии VJ. Через 24 ч после трансфекции контрольной короткой interfering рибонуклеиновой кислоты (киРНК) или киРНК против PML фибробласты были подвергнуты воздействию ионизирующего излучения или инкубированы с химиопрепаратами (доксорубицином или гидроксимочевинной). Уровень экспрессии белков оценивали через 48 ч после индукции повреждений дезоксирибонуклеиновой кислоты.

был существенно выше во всех исследуемых образцах (колонки 2, 4, 6 и 8) по сравнению с контролем (клетки, подвергнутые трансфекции контрольной киРНК). Кроме того, было отмечено существенное увеличение уровня экспрессии ПАР-полимеров в данных клетках после индукции повреждений ДНК (колонки 4, 6 и 8) по сравнению с клетками, не подвергнутыми генотоксическому воздействию (контроль, колонка 2). Полученные нами данные согласуются с современными представлениями об активации ПАРП и накоплении в клетках ПАР-полимеров в условиях повреждений ДНК: количество полимеров в неповреждённых клетках обычно мало, и поли-АДФ-рибоза находится в форме моно- или олигомеров, но при наличии одно- и двунитевых разрывов ДНК активность ПАРП и, следовательно, содержание поли-АДФ-рибозы в клетках может возрастать в 10–500 раз.

Наличие повреждений ДНК в результате воздействия химиопрепаратов и ионизирующего излучения подтверждалось значительным повышением уровня экспрессии фосфорилированной формы гистона 2А, являющегося, как известно, суррогатным маркёром двунитевых разрывов ДНК [13]. В фибробластах, подвергнутых генотоксическому воздействию химиопрепаратов и ионизирующего излучения, также происходила активация репаративных процессов, о чём свидетельствует повышение уровня экспрессии фосфорилированной формы АТМ-киназы (pATM Ser 1981) (см. рис. 1) – одной из ключевых киназ, участвующих в привлечении, активации и

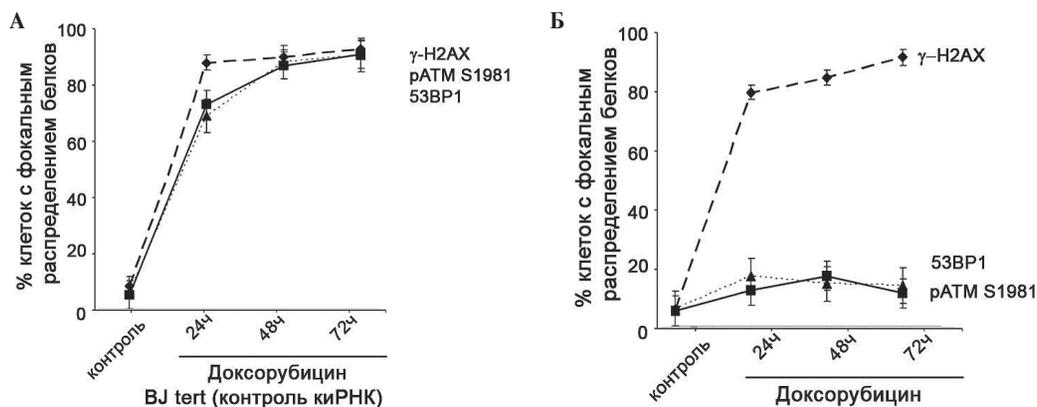


Рис. 2. Количество клеток с фокальным распределением белков, участвующих в репарации повреждений дезоксирибонуклеиновой кислоты (53BP1 и pATM S1981) до воздействия доксорубина (контроль) и после его воздействия в течение 72 ч. Экспрессия фосфорилированной формы гистона 2A (γ -H2AX) использовалась как маркер двуниевых разрывов. За 24 ч до воздействия клетки были подвергнуты трансфекции контрольной короткой интерферирующей рибонуклеиновой кислоты (киРНК) (А) или киРНК против PML (Б).

фосфорилировании белков-репарантов в местах повреждений ДНК [4]. Кроме увеличения уровня экспрессии ПАР-полимеров, в пользу активации спасательных путей репарации повреждений ДНК, возникших в результате воздействия генотоксических факторов (в частности, доксорубина), также свидетельствует существенное увеличение количества клеток с фокальным распределением фосфорилированной формы вышеуказанной АТМ-киназы и белка 53BP1 (рис. 2А). Важно отметить, что несмотря на наличие фокального распределения фосфорилированной формы гистона 2А, свидетельствующего о наличии двуниевых разрывов ДНК, в клетках с нокаутом PML не происходило фокального накопления вышеуказанных белков после воздействия доксорубина (рис. 2Б). Аналогичные результаты были получены в результате воздействия гидроксимочевины и ионизирующего излучения.

Учитывая полученные данные, а также ранее обнаруженные нами факты многочисленных нарушений процессов гомологичной рекомбинации в условиях нокаута и нокаута белка PML [5], мы полагаем, что активация ПАРП в данных экспериментальных условиях обусловлена именно нарушениями процессов гомологичной рекомбинации. Это может служить компенсаторным механизмом, способствующим выживанию клеток в условиях генотоксического стресса и PML-опосредованной несостоятельности механизмов гомологичной рекомбинации ДНК.

О несостоятельности процессов гомологичной рекомбинации ДНК в условиях внешнего повреждающего воздействия (химиопрепараты и/или ионизирующее излучение) и нокаута белка PML также свидетельствуют данные об отсутствии положительной динамики фокального распределения белков-репарантов (pATM Ser1981 и 53BP1) в условиях нокаута PML (см. рис. 2Б).

Важно отметить, что результаты иммунофлюоресцентного анализа в данном случае более информативны по сравнению с данными иммуноблоттинга, так как наиболее точно отражают молекулярные механизмы нарушений процессов гомологичной рекомбинации в условиях нокаута PML. В частности, в условиях внешнего повреждения фибробластов, вызванного воздействием химиопрепаратов и ионизирующего излучения, нами не было обнаружено различий в уровне экспрессии фосфорилированной формы АТМ-киназы между клетками, подвергнутыми трансфекции контрольной киРНК и киРНК против PML (см. рис. 1, колонки 3–8). В то же время, несмотря на увеличение уровня экспрессии данного белка в условиях генотоксического стресса, фокальное распределение данной формы киназы, а также белка 53BP1 происходит исключительно в клетках с нормальным уровнем экспрессии белка PML (см. рис. 2).

Факт умеренного повышения активности ПАРП в условиях нокаута белка PML был выявлен в фибробластах даже при отсутствии воздействия химиопрепаратов или ионизирующего излучения (см. рис. 1, колонки 1 и 2). Это может свидетельствовать о развитии компенсаторных механизмов, препятствующих образованию разрывов ДНК в процессе её репликации, что является опасным в условиях функциональной недостаточности процессов гомологичной рекомбинации ДНК.

Для подтверждения полученных результатов, свидетельствующих о гиперактивации ПАРП в условиях генотоксического стресса на фоне нокаута белка PML, был произведен подсчет количества клеток с признаками фокального накопления поли-АДФ-рибозы в фибробластах, находившихся в аналогичных экспериментальных условиях. Результаты иммунофлюоресцентной микроскопии, представленные в табл. 1, показы-

Количество поли(АДФ-рибоза)-положительных фибробластов человека в условиях генотоксического стресса, % (M±m)

	Контроль	Доксорубицин	Гидроксимочевина	Ионизирующее облучение
Контрольная киРНК	9,23±2,32	16,82±1,14*	19,81±0,50*	12,40±0,71
киРНК против PML	17,25±3,28 [†]	33,82±4,64* ^{†1}	45,38±4,48* ^{†1}	37,22±2,82* ^{†1}

Примечание: киРНК – короткая интерферирующая рибонуклеиновая кислота; *показатель статистически значимо отличается от контроля, $p \leq 0,05$; [†]показатель статистически значимо отличается от соответствующего опыта с контрольной киРНК, $p \leq 0,05$.

вают значительное увеличение количества ПАР-позитивных клеток в условиях одновременного нокадауна белка PML и генотоксического стресса, индуцированного доксорубицином, гидроксимочевиной и воздействием ионизирующего излучения. Таким образом, данные иммунофлуоресцентной микроскопии коррелируют с данными иммуноблоттинга и подтверждают факт гиперактивации ПАРП в фибробластах, имеющих повреждение ДНК в условиях «дефицита» белка PML.

Полученные нами результаты коррелируют с данными современной зарубежной литературы, свидетельствующими о тесной взаимосвязи между активностью ПАРП и процессами гомологичной рекомбинации ДНК. К примеру, эта зависимость находит отражение в концепции «синтетической летальности», иллюстрирующей тот факт, что в условиях неэффективности процесса гомологичной рекомбинации по причине мутаций генов *BRCA1/2* клетки оказываются чрезвычайно «зависимыми» от функциональной активности ПАРП [8]. Установлено, что данный тип полимераз участвует в репарации различного рода повреждений ДНК, а также устраняет дефекты ДНК, возникающие в процессе её репликации. Последние могут привести к дуплетным разрывам ДНК, репарируемым, как известно, по механизму гомологичной рекомбинации. В связи с вышеизложенным логичными выглядят данные о значительном повышении уровня активности ПАРП в условиях нокаута и нокадауна *BRCA1/2*, обуславливающих несостоятельность процессов гомологичной рекомбинации [7]. Следовательно, опухолевые клетки, имеющие генетические дефекты в системе гомологичной рекомбинации (например, у больных с наследственными формами РМЖ и рака яичника вследствие мутаций генов *BRCA1/2*), будут чрезвычайно зависимыми от функционального состояния ПАРП и подвержены гибели при ингибировании второго «спасательного» (то есть ПАРП-опосредованного) пути репарации повреждений ДНК [7].

Получив экспериментальное подтверждение, концепция «синтетической летальности» послужила основанием для проведения клинических испытаний по оценке эффективности использования ингибиторов ПАРП при лечении отдельных групп больных злокачественными

новообразованиями (в первую очередь больных с наследственными формами РМЖ и яичника, упомянутыми выше) [10]. Была показана эффективность ингибиторов ПАРП (олапариб, МК4827, INO-1001, CEP-9722 и др.) как в качестве монотерапии [3], так и в комбинации с химиопрепаратами и радиотерапией, традиционно используемыми при лечении отдельных форм злокачественных новообразований (например, тройного негативного РМЖ, меланомы, рака кишечника, глиом и пр.) [12]. Использование ингибиторов ПАРП позволяло увеличить чувствительность злокачественных новообразований к химио- и радиотерапии (то есть факторам, инициирующим повреждение ДНК).

Важно отметить, что группа злокачественных новообразований с дефектами процессов гомологичной рекомбинации, а следовательно, потенциально чувствительных к лечению ингибиторами ПАРП, может быть значительно шире и не ограничиваться наследственными формами РМЖ и рака яичника, обусловленными мутациями генов *BRCA1* и *BRCA2*. К «*BRCA1/2*-независимым» механизмам, обуславливающим неполноценность процессов гомологичной рекомбинации, относят гиперметилирование промотора гена *BRCA1*, соматические мутации генов *BRCA1/2*, метилирование гена *FANCF* [14], амплификацию гена *EMSF*, кодирующего белок, взаимодействующий с белком *BRCA2* [15], а также мутации других генов, кодирующих белки, вовлечённые в процессы репарации повреждений ДНК, например *ATM*, *NBS1* и *PALB2* [6].

В связи с этим полученные нами данные о взаимосвязи между активностью ПАРП и уровнем экспрессии белка PML углубляют понимание о молекулярных механизмах «синтетической летальности» и существенным образом расширяют спектр злокачественных новообразований со скрытыми (то есть «*BRCA1/2*-независимыми») дефектами гомологичной рекомбинации повреждений ДНК. Это позволяет рассматривать злокачественные новообразования со сниженной экспрессией белка PML в качестве потенциальных кандидатов для использования ингибиторов ПАРП в качестве монотерапии, а также в комбинации с химио- и радиотерапией. Спектр злокачественных новообразований, имеющих PML-зависимые дефекты процессов гомологичной рекомбинации, достаточно велик. В частнос-

ти, иммунохимические исследования злокачественных опухолей различного происхождения показали, что экспрессия белка PML может полностью утрачиваться или значительно снижаться у 17% аденокарцином толстой кишки, 21% опухолей лёгких, 27% аденокарцином предстательной железы, 31% опухолей молочной железы, 49% опухолей центральной нервной системы (100% медуллобластом и более 90% олигодендроглиальных опухолей) и 68% неходжскинских лимфом [9].

ВЫВОДЫ

1. Обнаруженный нами феномен повышения активности ПАРП в «PML-дефицитных» клетках, находящихся как в «физиологических» условиях, так и в условиях генотоксического стресса, существенным образом расширяет группу больных злокачественными новообразованиями, потенциально восприимчивых к ингибиторам ПАРП.

2. Помимо повышения эффективности химио- и радиотерапии, внедрение ингибиторов ПАРП в практическую онкологию позволит снизить дозы химиопрепаратов, что, безусловно, уменьшит частоту побочных эффектов.

3. Для подтверждения правомочности данных предположений необходимо проведение дальнейших исследований.

Выполнение данной работы частично финансировалось ФЦП Министерства образования и науки Российской Федерации (№14.А18.21.1930).

ЛИТЕРАТУРА

1. Antoniou A., Pharoah P.D., Narod S. et al. Average risks of breast and ovarian cancer associated with *BRCA1* or *BRCA2* mutations detected in case series unselected for family history: a combined analysis of 22 studies // *Am. J. Hum. Genet.* — 2003. — Vol. 72, N 5. — P. 1117-1130.

2. Alli E., Sharma V.B., Hartman A.R. Enhanced sensitivity to cisplatin and gemcitabine in *Brcal*-deficient murine mammary epithelial cells // *BMC Pharmacol.* — 2011. — Vol. 11. — P. 7.

3. Audeh M.W., Carmichael J., Penson R.T. et al. Oral poly(ADP-ribose)-polymerase inhibitor olaparib in patients with *BRCA1* or *BRCA2* mutations and recurrent ovarian cancer: a proof-of-concept trial // *Lancet.* — 2010. — Vol. 376, N 9737. — P. 245-251.

4. Bakkenist C.J., Kastan M.B. DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation // *Nature.* — 2003. — Vol. 421, N 6922. — P. 499-506.

5. Boichuk S.V., Hu L., Makielski K. et al. Functional connection between Rad51 and PML in homology-directed repair // *PLOS One.* — 2011. — Vol. 6. — P. 10.

6. Buisson R., Dion-Cote A.M., Coulombe Y. et al. Cooperation of breast cancer proteins PALB2 and piccolo *BRCA2* in stimulating homologous recombination // *Nat. Struct. Mol. Biol.* — 2010. — Vol. 17. — P. 1247-1254.

7. Farmer H., McCabe N., Lord C.J. et al. Targeting the DNA repair defect in *BRCA* mutant cells as a therapeutic strategy // *Nature.* — 2005. — Vol. 434. — P. 917-921.

8. Gottipati P., Vischioni B., Schultz N. et al. Poly(ADP-ribose)-polymerase is hyperactivated in homologous recombination-defective cells // *Cancer Res.* — 2010. — Vol. 70, N 13. — P. 5389-5398.

9. Gurrieri C., Capodieci P., Bernardi R. et al. Loss of tumor suppressor PML in human cancers of multiple histologic origins // *J. Nat. Cancer Inst.* — 2004. — Vol. 96. — P. 269-279.

10. Kummar S., Chen A., Parchment R.E. et al. Advances in using PARP Inhibitors to treat cancer // *BMC Medicine.* — 2012. — Vol. 10. — P. 25.

11. Moynahan M.E., Jasin M. Mitotic homologous recombination maintains genomic stability and suppresses tumorigenesis // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* — 2010. — Vol. 11. — P. 196-207.

12. Penning T.D., Zhu G.D., Gandhi V.B. et al. Discovery of the poly(ADP-ribose)-polymerase (PARP) inhibitor 2-[(R)-2-methyl pyrrolidin-2-yl]-1H-benzimidazole-4-carboxamide (ABT-888) for the treatment of cancer // *J. Med. Chem.* — 2009. — Vol. 52. — P. 514-523.

13. Rogakou E.P., Pilch D.R., Orr A.H. et al. DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139 // *J. Biol. Chem.* — 1998. — Vol. 273, N 10. — P. 5858-5868.

14. Taniguchi T., Tischkowitz M., Ameziane N. et al. Disruption of the Fanconi anemia-*BRCA* pathway in cisplatin-sensitive ovarian tumors // *Nat. Med.* — 2003. — Vol. 9. — P. 568-574.

15. Turner N., Tutt A., Ashworth A. Hallmarks of «BRCAness» in sporadic cancers // *Nat. Rev. Cancer.* — 2004. — Vol. 4 — P. 814-819.