

СОСТОЯНИЕ СИСТЕМЫ РЕПАРАЦИИ ПОВРЕЖДЕНИЙ ДНК В ГАСТРОИНТЕСТИНАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ ОПУХОЛЯХ И ПЕРСПЕКТИВЫ ИХ ТЕРАПИИ

Сергей Васильевич Бойчук^{1,2*}, Булат Рашитович Рамазанов¹, Айгуль Рафиковна Галембикова¹,
Оскар Рустемович Галеев¹, Ильшат Ганиевич Мустафин¹, Аннет Дусинг²

¹Казанский государственный медицинский университет,

²Раковый центр университета г. Питтсбурга, США

Реферат

Цель. Изучить уровень экспрессии белков, участвующих в различных путях репарации повреждений дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) в гастроинтестинальных стромальных опухолях с целью выявления дефектов в системах репарации повреждений ДНК и поиска эффективных средств их терапии.

Методы. Исследования проводили на фибробластах человека, иматиниб-чувствительных и резистентных линиях гастроинтестинальных стромальных опухолей, а также линиях лейомиосарком. Клетки культивировали в чашках Петри в соответствующих культуральных средах с добавлением эмбриональной телячьей сыворотки, L-глутамин и антибиотиков в условиях CO₂-инкубатора (37 °C и 5% CO₂). Уровень экспрессии белков оценивали методом иммуноблоттинга.

Результаты. Было выявлено значительное снижение уровня экспрессии белка BRCA1 у подавляющего большинства линий гастроинтестинальных стромальных опухолей, сопровождавшееся увеличением уровня экспрессии рекомбиназы Rad51, что может свидетельствовать о нарушениях процессов гомологичной рекомбинации. Данный феномен был характерен для гастроинтестинальных стромальных опухолей и не наблюдался в клетках лейомиосарком. Кроме того, во всех изученных гастроинтестинальных стромальных опухолях (в отличие от лейомиосарком) отмечено значительное увеличение уровня экспрессии O⁶-метилгуанин ДНК-метилтрансферазы, служащей ключевым фактором восстановления O⁶-алкилированных повреждений ДНК. У большинства гастроинтестинальных стромальных опухолей также был отмечен повышенный уровень экспрессии МНМ6, участвующего в репарации ошибочно спаренных оснований ДНК. Примечательно, что у всех гастроинтестинальных стромальных опухолей было выявлено повышение уровня экспрессии топоизомераз.

Вывод. Выявленные нарушения экспрессии некоторых белков-репарантов повреждений ДНК в гастроинтестинальных стромальных опухолях (например, топоизомераз) позволяют их рассматривать в качестве перспективных мишеней в данных опухолях, определяющих их чувствительность к соответствующим ингибиторам.

Ключевые слова: ГИСО (GIST), репарация повреждений ДНК, химиотерапия.

DNA REPAIR PROFILE IN GASTROINTESTINAL STROMAL TUMORS (GISTS) – NOVEL PERSPECTIVES FOR THERAPY

S.V. Boichuk^{1,2}, B.R. Ramazanov¹, A.R. Galemnikova¹, O.R. Galeev¹, I.G. Mustafin¹, A. Duensing²

¹Kazan State Medical University, Kazan, Russia,

²University of Pittsburgh Cancer Institute, Pittsburgh, USA

Aim. To assess the expression of various types of DNA repair proteins in gastrointestinal stromal tumors (GISTS) to identify the possible defects in DNA repair pathways and therapeutic targets.

Methods. The study was performed on the human fibroblasts, иматиниб-sensitive vs иматиниб-resistant GISTS and leiomyosarcomas (LMS) cell lines, as well. The cell lines indicated above were cultured in the corresponding culture medium supplemented with fetal bovine serum, L-glutamine and antibiotics (37 °C и 5% CO₂). Protein expression level and its intracellular localization were assessed by Western blotting.

Results. The reduced BRCA1 expression was observed in most of the GIST cell lines, which was associated with an up-regulation of Rad51, thereby indicating about the potential abnormalities of homologous recombination pathway in these cells. This phenomenon was typical for GISTS and was not observed in LMS cells lines. In contrast to LMS cell lines, all GIST cells showed an upregulation of O⁶-methylguanine DNA methyltransferase (MGMT), the key enzyme involved in alkylated DNA damage repair pathway. Most GIST cells exhibited high level of MSH6 known as a key member of mismatch repair pathway. Most notably, topoisomerases were over-expressed in all of GIST cell lines.

Conclusions. We found several striking alterations in expression levels of DDR pathway enzymes in GISTS. For instance, an up-regulation of topoisomerases in all GISTS indicates that these cells might be sensitive to topoisomerase II inhibitors and could be potentially targeted therapeutically.

Keywords: GIST, DNA damage repair, chemotherapy.

Очевидно, что дефекты в системе поддержания целостности клеточного генома и устранения (репарации) возникающих повреждений дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) – один из ключевых факторов, способствующих опухолевой трансформации. В то же время наличие в опухолевых

клетках дефектов в системе репарации повреждений ДНК может определять восприимчивость опухолевых клеток к воздействию химиопрепаратов и ионизирующего излучения. Следовательно, наличие дефектов в различных путях репарации повреждений ДНК справедливо можно считать одним из главных факторов, определяющих эффективность химио- и радиотерапии, а

следовательно, и прогноз больных с онкологическими заболеваниями.

Гастроинтестинальные стромальные опухоли (ГИСО, GIST – от. англ. gastrointestinal stromal tumors) представляют собой наиболее распространённую группу мезенхимальных (стромальных или соединительнотканых) опухолей желудочно-кишечного тракта, наиболее часто выявляемых в желудке (60–70%) и тонкой кишке (20–35%). Одно из ведущих звеньев патогенеза данного заболевания – активирующая мутация в гене тирозинкиназного рецептора *c-Kit* (CD117), результатом чего становится бесконтрольная стимуляция митотической активности и пролиферации опухолевых клеток [6, 10]. Обнаружение описанной выше мутации явилось основанием для внедрения в клиническую практику таргетного препарата – специфического ингибитора тирозинкиназной активности иматиниба (гливек), показавшего свою эффективность в качестве препарата адъювантной терапии более чем у 80% больных с ГИСО [4]. Однако, несмотря на высокую эффективность иматиниба, стабилизация опухолевого процесса наблюдается лишь у каждого третьего больного, длительные ремиссии бывают чрезвычайно редкими, а более чем у 50% пациентов развивается резистентность к иматинибу через 2 года после начала таргетной терапии [11].

Разработка и внедрение в практическую онкологию препаратов второй и третьей линии – сунитиниба (сутент) [9] и регорафениба (стривага) [3], ингибирующих активность сразу нескольких типов тирозинкиназ (в том числе, *c-Kit*), а также рецепторов тромбоцитарного фактора роста и эндотелия сосудов, лишь частично решила проблему развивающейся резистентности, которая обусловлена развитием вторичных мутаций, способствующих прогрессированию заболевания [5]. Следовательно, поиск новых лекарственных препаратов, обладающих потенциальной эффективностью в отношении ГИСО, – актуальная научно-практическая задача.

Важно подчеркнуть, что существовавшая долгое время точка зрения о резистентности ГИСО к большинству химиопрепаратов в настоящее время подвергается пересмотру. Основанием для этого стали результаты некоторых, в том числе наших, клинико-экспериментальных исследований последних лет, показавших высокую эффективность некоторых химиопрепаратов (например, ингибиторов топоизомераз) как *in vitro*, так и *in vivo* [1, 8].

Учитывая тот факт, что подавляющее большинство современных химиопрепаратов вызывает гибель клеток по механизму апоптоза за счёт невозможности репарации повреждений ДНК, анализ состояния репаративной системы в клетках ГИСО (в том числе резистентных к таргетным препаратам) важен с научно-практической точки зрения и может способствовать оптимизации терапии данной группы больных.

Высокая частота и многообразие возникающих в клетках повреждений ДНК обуславливает наличие нескольких путей их репарации. К ним относятся гомологичная рекомбинация (*homologous recombination – HR*) и негомологичное связывание концов ДНК (*non-homologous end-joining – NHEJ*), репарация неспаренных оснований (*mismatch repair – MMR*), эксцизионная репарация оснований (*base excision repair – BER*), эксцизионная репарация ошибочно спаренных нуклеотидов (*nucleotide excision repair – NER*), прямая обратная репарация (*direct reversal repair – DRR*).

Целью настоящего исследования было комплексное изучение уровня экспрессии белков-репарантов всех вышеуказанных путей репарации повреждений ДНК в клетках ГИСО, чувствительных (GIST882 и T-1) и резистентных (GIST430, 48 и 48B) к таргетным препаратам (иматинибу). В качестве группы сравнения были выбраны фибробласты человека и клеточные линии лейомиосарком (SK-LMS и SK-UT-1), традиционно считающихся резистентными к химиотерапии. Клетки культивировали в соответствующих культуральных средах с добавлением эмбриональной телячьей сыворотки, L-глутамин и антибиотиков («Lonza», MD, USA).

Уровень экспрессии белков-репарантов повреждений ДНК оценивали методом иммуноблоттинга с использованием соответствующих антител, например BRCA1, BRCA2 («Calbiochem», San Diego, CA), DNAPK, Ku70, Ku80, MGMT, MSH2, MSH6, Topoisomerase II («Cell Signaling», Beverly, MA), Mre11, Rad50 («Novus», Littleton, CO), Rad17, Rad51, Topoisomerase IIβ («Santa Cruz»). В качестве контроля использовали антитела к актину («Sigma»).

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

В результате проведённых исследований было выявлено снижение уровня экспрес-

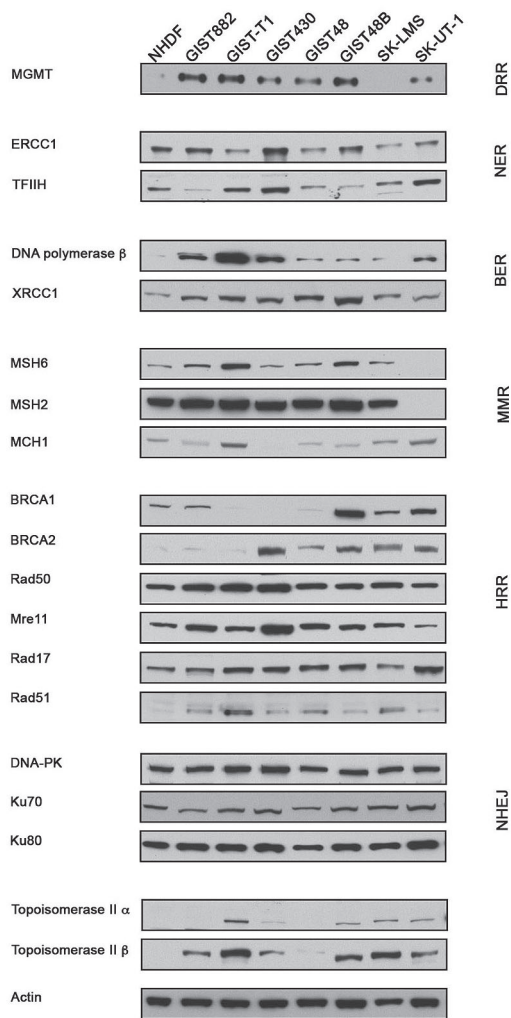


Рис. 1. Уровень экспрессии белков, участвующих в различных сигнальных путях репарации поврежденной дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК), а также актина (контроль) в фибробластах человека, клетках иматиниб-чувствительных и резистентных линий гастроинтестинальных стромальных опухолей, а также двух линий лейомиосарком (описание клеточных линий и репаративных путей ДНК см. выше).

сии белка BRCA1 практически во всех исследованных клеточных линиях ГИСО, что свидетельствовало о возможных нарушениях в системе гомологичной рекомбинации, определяющей эффективность репарации двуниевых разрывов ДНК, являющихся одним из наиболее опасных повреждений ДНК. Интересно, что в клетках ГИСО со сниженной экспрессией BRCA1 отмечалось компенсаторное увеличение уровня экспрессии рекомбиназы Rad51, взаимодействующей, как известно, с белками BRCA1 и 2. Уровень экспрессии всех остальных белков, участвующих в процессах гомологичной рекомбинации и негомологичного связыва-

ния концов ДНК (RAD17, RAD50, RAD51, MRE11, DNA-PK, KU70, KU80), не различался между клетками ГИСО и фибробластами, а также клетками лейомиосарком.

Во всех клеточных линиях ГИСО нами было выявлено значительное увеличение уровня экспрессии ДНК-полимеразы β и XRCC1, участвующих в процессах эксцизионной репарации оснований (BER). В то же время уровень экспрессии ферментов ERCC1 и TFIIH, участвующих в вырезании поврежденных нуклеотидов (NER), варьировал между различными линиями ГИСО и не отличался от контроля (фибробласты) и лейомиосарком.

Уровень экспрессии белков, участвующих в репарации ДНК путём вырезания ошибочно спаренных нуклеотидов (MMR), варьировал между различными линиями ГИСО (рис. 1).

Примечательно, что уровень экспрессии MSH6 был повышен практически во всех линиях ГИСО (за исключением GIST430), в то время как в клетках лейомиосарком он был сниженным. Данный факт представляет безусловный интерес, так как процесс вырезания ошибочно спаренных нуклеотидов традиционно считают одним из основных механизмов, препятствующих опухолевой трансформации клетки. В то же время обнаруженное нами в клетках ГИСО значительное повышение уровня экспрессии белков, участвующих в MMR, может указывать на обилие генетических дефектов данного характера и попытки ГИСО «справиться» с данными генетическими нарушениями.

Наиболее значимым изменением уровня экспрессии белков-репарантов было обнаруженное нами увеличение уровня экспрессии в клетках ГИСО O⁶-метилгуанин ДНК-метилтрансферазы (MGMT), служащей ключевым ферментом процесса репарации поврежденной ДНК за счёт восстановления O⁶-алкилированных её повреждений. Данный феномен выявлялся во всех без исключения клеточных линиях ГИСО и не был типичен для нормальных фибробластов и лейомиосарком. Учитывая тот факт, что повышение уровня экспрессии MGMT в опухолевых клетках различного происхождения коррелирует с их устойчивостью к алкилирующим соединениям, можно предположить, что одним из молекулярных механизмов устойчивости ГИСО к таким препаратам будет повышение уровня экспрессии данного фермента.

Интересно, что у большинства клеточ-

ных линий ГИСО было отмечено повышение уровня экспрессии топоизомераз $\text{P}\alpha$ или β , что позволяет предположить их повышенную чувствительность к ингибиторам топоизомераз II типа. К примеру, было показано, что уровень экспрессии топоизомераз в опухолевых клетках коррелирует с их чувствительностью к ингибиторам топоизомераз II типа [7]. Низкий уровень экспрессии топоизомеразы II типа в опухолях коррелирует с их резистентностью к соответствующим ингибиторам, в то время как повышение уровня данного фермента в опухолях обуславливает их высокую чувствительность к данному классу противоопухолевых препаратов [2]. Более того, было установлено, что низкий уровень экспрессии топоизомеразы I типа в злокачественных новообразованиях также коррелирует с их повышенной чувствительностью к ингибиторам топоизомеразы II типа [2].

ВЫВОДЫ

1. Проведённые исследования выявили существенные изменения в уровне экспрессии ряда белков, участвующих в репарации повреждённых дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК), что позволяет их рассматривать в качестве перспективных средств терапии пациентов с гастроинтестинальными стромальными опухолями, особенно на фоне резистентности к таргетным препаратам.

2. Изучение молекулярных механизмов репарации повреждений ДНК — актуальная задача как с точки зрения изучения молекулярных механизмов, направленных на поддержание целостности клеточного генома, так и с точки зрения понимания механизмов чувствительности/резистентности злокачественных новообразований и определения наиболее эффективных схем хирургической терапии пациентов с гастроинтестинальными стромальными опухолями.

*Работа финансировалась
грантом Российского
Научного Фонда (РНФ) № 14-15-00342*

ЛИТЕРАТУРА

1. Boichuk S., Lee D.J., Mehalek K.R. et al. An unbiased compound screen identifies unexpected drug sensitivities and novel treatment options for gastrointestinal stromal tumors (GISTs) // *Cancer Res.* — 2014. — Vol. 74, N 4. — P. 1200–1213.
2. Burgess D.J., Doles J., Zender L. et al. Topoisomerase levels determine chemotherapy response *in vitro* and *in vivo* // *Proc. Nat. Acad. Sci.* — 2008. — Vol. 105. — P. 9053–9058.
3. Demetri G.D., Reichardt P., Kang Y.-K. et al. GRID study investigators, efficacy and safety of regorafenib for advanced gastrointestinal stromal tumours after failure of imatinib and sunitinib (GRID): an international, multicentre, randomised, placebo-controlled, phase 3 trial // *Lancet.* — 2013. — Vol. 381. — P. 295–302.
4. Demetri G.D., von Mehren M., Blanke C.D. et al. Efficacy and safety of imatinib mesylate in advanced gastrointestinal stromal tumors // *N. Engl. J. Med.* — 2002. — Vol. 347. — P. 472–480.
5. Gramza A.W., Corless C.L., Heinrich M.C. Resistance to tyrosine kinase inhibitors in gastrointestinal stromal tumors // *Clin. Cancer Res.* — 2009. — Vol. 15. — P. 7510–7518.
6. Hirota S., Isozaki K., Moriyama Y. et al. Gain-of-function mutations of c-kit in human gastrointestinal stromal tumors // *Science.* — 1998. — Vol. 279. — P. 577–580.
7. Kellner U., Sehested M., Jensen P.B. et al. Culprit and victim — DNA topoisomerase II // *Lancet Oncol.* — 2002. — Vol. 3. — P. 235–243.
8. Maurel J., Martins A.S., Poveda A. et al. Imatinib plus low-dose doxorubicin in patients with advanced gastrointestinal stromal tumors refractory to high-dose imatinib // *Cancer.* — 2010. — Vol. 116. — P. 3692–3701.
9. Rock E.P., Goodman V., Jiang J.X. et al. Food and Drug Administration drug approval summary: Sunitinib malate for the treatment of gastrointestinal stromal tumor and advanced renal cell carcinoma // *Oncologist.* — 2007. — Vol. 12. — P. 107–113.
10. Rubin B.P., Singer S., Tsao C. et al. KIT activation is a ubiquitous feature of gastrointestinal stromal tumors // *Cancer Res.* — 2001. — Vol. 61. — P. 8118–8121.
11. Verweij J., Casali P.G., Zalcberg J. et al. Progression-free survival in gastrointestinal stromal tumours with high-dose imatinib: randomised trial // *Lancet.* — 2004. — Vol. 364. — P. 1127–1134.