

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 Саузерн — 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.

Результаты и обсуждение

Сателлитная ДНК в составе центромерного и перицентромерного гетерохроматина максимально метилирована и постоянно конденсирована (7), что определяет эти два процесса эпигенетическими и взаимно-обусловленными в механизме митотического деления клетки. Нами показано глобальное гипометилирование сателлитных ДНК повторов в составе центромерного — перицентромерного гетерохроматина при онкологической прогрессии. На рис. 1 методом метил-специфической HpaII-эндонуклеазной рестрикции геномной ДНК с последующей Саузерн-гибридизацией с флуоресцентным молекулярным зондом — DIG-pUC19 (Alu) приведено существенное деметилирование Alu (Sat2) повторов, консенсусных последовательностей, фланкирующих α -сателлитные центромерные ДНК (8, 9).

Как следствие деметилирования центромерной сателлитной ДНК нами обнаружена существенная деконденсация центромерного гетерохроматина метафазных хромосом у пациентов с солидным типом рака (рис. 2, а).

Было показано, что подобное эпигенетическое нарушение структуры центромерного гетерохроматина ассоциируется с видимой декомпактизацией центромер и нарушением их митотической функции как аномальное преждевременное разделение центромер сестринских хроматид на стадии метафазы клеточного цикла (рис. 2, б). С увеличением степени онкологической прогрессии наблюдали появление лимфоцитов с С-анафазным кариотипом (полным преждевременным разделением центромер метафазных хромосом в кариотипе) (рис. 2, с). Нами показано, что появление С-анафаз в популяции метафазных лимфоцитов имеет прогностическое значение в динамике онкологического процесса (10).

Таким образом, результаты исследования могут свидетельствовать о ключевой причинной роли эпигенетического гипометилирования сателлитной

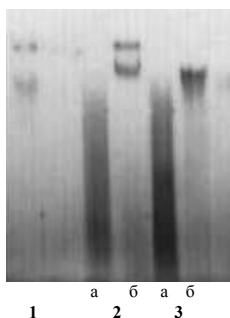


Рис. 1. HpaII-эндонуклеазная рестрикция геномных ДНК с последующей Саузерн-гибридизацией с центромерным Alu ДНК-повтором в составе DIG-pUC (Alu) плазмидного зонда:

1 — Контроль (геномная ДНК донора после HpaII-рестрикции); 2 — эмбриональная ДНК (а — после HpaII-рестрикции, б — до рестрикции); 3 — геномная ДНК пациента с колоректальным раком (а — после HpaII-рестрикции, б — до рестрикции)

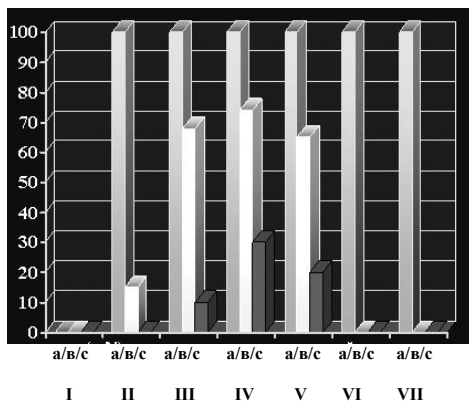


Рис. 2. Особенности нарушения хромосомальной организации центромерного гетерохроматина в популяции соматических лимфоцитов периферической крови при солидном типе онкологического процесса:

а — деконденсация центромерного гетерохроматина, в — преждевременное разделение центромер сестринских хроматид, с — С-анафазный кариотип на стадии метафазы. I — контроль (n=24); II — микрокарцинома щитовидной железы (n=90); III — карцинома щитовидной железы 1–2 стадии (n=60); IV — карцинома щитовидной железы 3–4 стадии (n=40); V — колоректальный рак (n=75); VI — нейробластома (n=8); VII — опухоль Вильямса (n=6)

ДНК в индукции деконденсации и декомпактизации центромерного гетерохроматина и центромерной нестабильности, связанной с феноменом преждевременного разделения центромер сестринских хроматид на стадии метафазы. Такой механизм ассоциативно связан с развитием анеуплоидий и их прогрессии при онкологическом процессе.

Литература

1. Duesberg P., Rausch C., Rasnick D., Haehlmann R. Genetic instability of cancer cells is proportional to their degree of aneuploidy // Proc. Natl. Acad. Sci.— 1998.— Vol.95, №6.— P. 13692–13697.
2. Duesberg P., Li R. Multistap carcinogenesis: a chain reaction of aneuploidization // Cell Cycle.— 2003.— Vol.2, №1.— P. 202–210.
3. Rajagopalan H., Lengauer C. Aneuploidy and cancer // Cancer Nature.— 2004.— Vol.432.— P. 338–341.
4. McGregor H.C., Varley J.M. Working with Animal chromosomes // Wiley, New York, 1983.— 280 p.
5. Анализ генома. Методы / Под ред. Дейвиса. Мир, 1990.— 246 с.
6. Маниатис Т., Фрич Э., Сембрук Дж. Молекулярное клонирование. Методы генетической инженерии // Москва: Мир, 1984.— 487 с.
7. Вайсертрейгер С.П., Подгорная О.И., Енукашвили Н.И. ДНК прицентромерных участков конститутивного гетерохроматина деметилирована и деконденсирована в клетках MRC5 и A431 // Цитология.— 2007.— Т.49, №1.— С. 1–5.

8. *Cooper K.F., Fisher R.B., Tyler-Smith C.* Structure of the sequences adjacent to the centromeric alphoid satellite DNA array on the human Y chromosome // *J. Mol. Biol.*— 1993.— Vol.230, N3.— P. 787–799.
9. *Ten Hagen K.G., Gilbert D.M., Willard H.F., Cohen S.N.* Replication timing of DNA sequences associated with human centromeres and telomeres // *Mol. Cell. Biol.*— 1990.— Vol.10, N12.— P. 6348–6355.
10. *Швачко Л.П., Бух И.Г., Степаненко А.П., Гульчий Н.В., Цымбалюк С.Н., Процик В.С., Кыкоть В.А., Климяк Г.И.* Способ ранней диагностики злокачественных опухолей // Декларационный патент Украины на изобретение, 2007, UA 64533.

Резюме

Показано, на уровне лимфоцитов периферической крови при солидной онкопатологии, что принципиальным фактором в индукции центромерной нестабильности — появлении преждевременного разделения центромер сестринских хроматид на стадии метафазы, является потеря эпигенетического метилирования сателлитной ДНК и связанной с этим деконденсации и декомпактизации центромер при онкологическом процессе. Преждевременное разделение центромер рассматривается как механизм канцер-ассоциированных анеуплоидий.

The centromeric heterochromatin can be identified by associated with high DNA methylation of centromeric satellite DNA and its highly condensed. On the level of somatic peripheral blood lymphocytes from the patients with some certain solid cancers have been commonly shown that crucial centromeric satellite DNA demethylation causal linked with centromere decondensation and decompactization resulting in the centromeric instability as the premature centromere division of the metaphase chromosomes as early predisposition to cancer aneuploidy.

ШТАНДЕЛЬ С.А.

ГУ “Институт проблем эндокринной патологии

им. В.Я.Данилевского АМН Украины”,

Украина, 61002, Харьков, ул. Артема, 10, e-mail: shtandel@mail.ru

ЕСТЕСТВЕННЫЙ ОТБОР И САХАРНЫЙ ДИАБЕТ 2 ТИПА. РАСПРОСТРАНЕННОСТЬ И ГЕТЕРОГЕННОСТЬ

Естественный отбор — процесс, который, будучи наиболее важным фактором эволюции, способствует повышению приспособленности и предотвращает разрушительные последствия всех остальных процессов [1]. При рассмотрении больших популяций человека различают следующие типы отбора: 1) внутригрупповой, основанный на межиндивидуальных различиях в приспособленности (дифференциальное размножение генотипов) и 2) межгрупповой, принимающий во внимание различия в средней приспособленности популяций (дифференциальный естественный прирост отдельных групп) [2–4]. Изменение давления внутригруппового отбора путем успеш-