

И.В. Абраменко
А.В. Завгородняя
В.И. Балан
И.А. Крячок
А.А. Чумак

Научный центр радиационной
медицины АМН Украины,
Киев, Украина

Ключевые слова: хронический
лимфолейкоз, ионизирующее
излучение, p53-зависимый
апоптоз, вестерн-блот анализ

ИНДУКЦИЯ p53-ЗАВИСИМОГО АПОПТОЗА ПОД ДЕЙСТВИЕМ ИОНИЗИРУЮЩЕГО ИЗЛУЧЕНИЯ В ЛИМФОИДНЫХ КЛЕТКАХ БОЛЬНЫХ В-КЛЕТОЧНЫМ ХРОНИЧЕСКИМ ЛИМФОЛЕЙКОЗОМ

Резюме. Проведено изучение ответа лимфоидных клеток периферической крови 45 больных хроническим лимфолейкозом на действие ионизирующего излучения (ИИ). Изучали жизнеспособность клеток и экспрессию белков p53, p21 и MDM2, используя вестерн-блот анализ. У большей части больных (34 человека; 75,6%) выявлен нормальный характер ответа на ИИ: нарастающая с течением времени гибель облученных клеток, индукция экспрессии белков p53 и p21, повышение базального уровня белка MDM2. У 11 больных (24,4%) найдены различные нарушения, связанные с функциональной некомпетентностью белка p53, что может усложнять проведение химиотерапевтического лечения таких пациентов.

ВВЕДЕНИЕ

Важную роль в функционировании клеток играет система репарации нуклеиновых кислот, которая активируется в ответ на повреждение геномной ДНК при действии различных генотоксических агентов, в том числе ионизирующего излучения (ИИ). Ключевыми ферментами для ее запуска являются внутриядерные киназы — АТМ (ataxia-telangiectasia mutated), DNA-ПК (DNA protein kinase) и АТР (ataxia telangiectasia and Rad3-related protein), которые фосфорилируют различные белки, прежде всего белок p53 [1]. Фосфорилированный p53 поступает в РМЛ-тельца (внутриядерные образования, описанные у больных промиелоцитарным лейкозом), где вступает во взаимодействие с активатором транскрипции СВР-РМЛ, что вызывает ацетилирование p53 [2]. Такая посттрансляционная модификация белка удлиняет период его полураспада и приводит к накоплению p53 в ядре без существенного повышения уровня транскрипции, а также значительно повышает его активность как активатора экспрессии различных генов [3]. Мишенями p53 являются гены белков p21 (ингибитор циклинзависимой киназы) [4], ВАХ [5], ВСЛ-2 [6]. Скоординированное функционирование этих и ряда других белков вызывает остановку клеточного цикла, что дает возможность репарировать генетические повреждения, а при невозможности осуществить процессы репарации — индуцирует p53-зависимый апоптоз [7].

Способность к индукции p53-зависимого апоптоза во многом определяет поведение опухолевой клетки при различных видах новообразований [8]. Мутации гена p53 относятся к наиболее частым при опухолевом процессе. При хроническом лимфолейкозе (ХЛЛ) В-клеточной природы мутации гена p53

(делеция хромосомы p17), которые выявляются у 10–15% больных, являются самостоятельным негативным фактором прогноза заболевания [9]. Помимо этого, у больных ХЛЛ дисфункцию p53 могут вызвать делеции гена АТМ (делеции 11q22–23 хромосомы, отмечают у 5–8% больных), а также гиперэкспрессия гена MDM2, что приводит к повышению содержания в клетке соответствующего белка, который взаимодействует с p53 и способствует его убиквитинзависимой деградации в протеосомах [10, 11].

Группой исследователей под руководством Т. Stankovic [12] был предложен функциональный подход к исследованию нарушений в системе p53-зависимого апоптоза у больных ХЛЛ. Он основывается на оценке жизнеспособности клеток и содержания внутриклеточных белков (p53, p21, MDM2) при воздействии ИИ. Нарушения в любом звене системы p53 приводит к развитию резистентности клеток к индукции апоптоза, а по характеру экспрессии отдельных белков можно установить уровень генетических нарушений.

Цель настоящего исследования заключалась в изучении частоты нарушений p53-зависимого апоптоза у больных ХЛЛ, находившихся на стационарном лечении в отделении гематологии и трансплантации костного мозга Научного центра радиационной медицины АМН Украины, и оценке характера выявленных нарушений.

ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Обследовано 45 больных В-ХЛЛ, 35 мужчин и 10 женщин в возрасте от 42 до 78 лет (средний возраст $56,1 \pm 8,8$ года). Диагноз устанавливали на основании клинико-гематологических критериев

[13–15] и иммунофенотипирования лимфоцитов периферической крови. В исследование взяты пациенты с содержанием субстратных лимфоидных клеток ($CD5^+CD20^+CD23^+HLA-DR^+CD22^{low}$) в периферической крови не менее 80%.

Полученные мононуклеары периферической крови культивировали на протяжении ночи при 37 °С в атмосфере 5% CO_2 в питательной среде RPMI с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки, L-глутамина, пенициллина и стрептомицина. Облучали опытные культуры в дозе 5 Гр в течение 110 с с помощью источника цезий-137 (аппарат для облучения препаратов крови IBL437C CIS Bio International, Франция), продолжали культивирование в тех же условиях и оценивали жизнеспособность клеток через 24, 48 и 72 ч методом окрашивания трипановым синим. Через 10 ч после облучения часть клеток (2×10^6) лизировали для последующего вестерн-блот анализа. Лизис проводили в течение 30 мин в холодном литическом буфере, содержащем 25 мМ Tris HCl, pH 7,5; 5 мМ EDTA, 1 мМ PMSF, 100 мкг/мл апротинина, 200 мкг/мл леупептина, 50 мМ NaF, (Sigma, Германия) и 1% детергента NP-40. Супернатант центрифугировали при 15 000 об./мин в течение 15 мин при температуре 9 °С. Полученные экстракты ресуспендировали в равном объеме 2-кратного буфера для электрофореза, прогревали на водяной бане и проводили вертикальный электрофорез в 5% полиакриламидном геле по Laemmli [16]. После переноса белков на нитроцеллюлозную мембрану определяли экспрессию белков методом вестерн-блот анализа и усиленной хемилюминесценции (ECL). Использовали следующие моноклональные антитела (МКАТ): анти-MDM2 (клон HMDM2-323), анти-p21 (клон CP74), анти-p53 (клон P5813), а также кроличьи антитела против фосфорилированного p53 (все реагенты производства «Sigma», США).

Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием программы SPSS 13.0 (SPSS, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Большая часть опухолевых В-лимфоцитов периферической крови у больных ХЛЛ, как известно, находится в фазе покоя G_0 и резистентна к митогенной стимуляции [17]. Поэтому при оценке клеточного ответа на действие ИИ мы ориентировались на количество погибших клеток, а не на показатели задержки клеточного цикла.

В контрольных необлученных культурах морфологическая характеристика клеток существенно не менялась, а число погибших клеток достоверно не различалось в различные сроки наблюдения ($p > 0,05$). Клеточный субстрат был представлен в основном лимфоцитами малого и среднего размера. После облучения, начиная с 24 ч после начала опыта, в культурах появлялись клетки с фрагментацией ядра, зернистостью в цитоплазме (остатки ядерной

субстанции), апоптотические тельца. Одновременно возрастало количество погибших клеток, что устанавливали по их окраске трипановым синим. Разница между числом погибших клеток в контрольных и опытных культурах была достоверной ($p < 0,001$) во все сроки наблюдения (рис. 1).

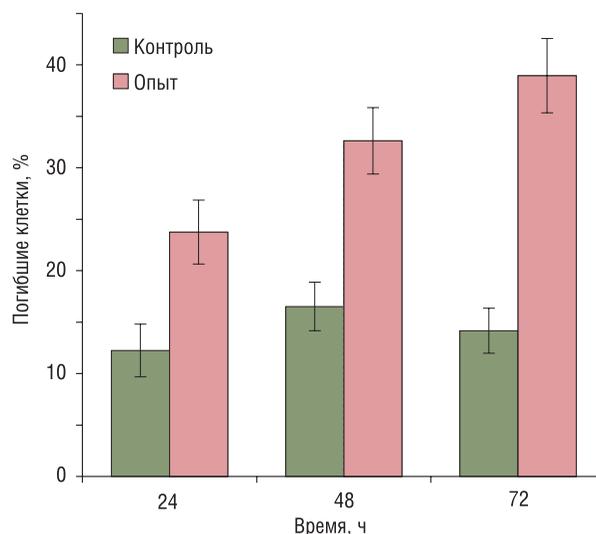


Рис. 1. Жизнеспособность лимфоидных клеток больных В-ХЛЛ в различные сроки после воздействия ИИ (опыт) по сравнению с необлученными культурами (контроль)

Для каждого из больных рассчитывали вероятность различий в жизнеспособности клеток в контрольных и опытных культурах по критерию χ^2 (таблица). Для большинства обследованных больных (34 человека; 75,6%) эти различия были достоверными ($p < 0,001$).

Таблица

Жизнеспособность клеток в контрольных и облученных культурах клеток больных ХЛЛ в зависимости от достоверности различий при парном сравнении

Время после облучения, ч	Различия достоверны (n = 34)		Различия недостоверны из-за высокой гибели клеток в контрольных культурах (n = 7)		Различия недостоверны из-за резистентности клеток к индукции апоптоза (n = 4)	
	Контроль	Опыт	Контроль	Опыт	Контроль	Опыт
24	8,71 ± 1,66	21,34 ± 3,36	27,17 ± 5,86	33,83 ± 8,17	7,95 ± 1,48	9,15 ± 1,71
48	14,96 ± 1,74	32,79 ± 3,13	30,05 ± 5,07	36,75 ± 5,89	5,76 ± 1,13	2,04 ± 0,67
72	17,68 ± 1,86	36,98 ± 2,26	31,23 ± 4,35	38,11 ± 5,04	6,45 ± 1,78	5,38 ± 1,47

У 4 больных (8,9%) клетки оставались резистентными к индукции апоптоза, и число погибших клеток было низким как в контроле, так и в опыте, причем на протяжении эксперимента оно достоверно не изменялось. Еще у 7 больных (15,5%) процент погибших клеток был одинаково высоким как в контроле, так и при воздействии ИИ. Таким образом, у 34 больных отмечали адекватный (нормальный) клеточный ответ на облучение, тогда как у 11 больных он был нарушен (атипичный ответ).

Исследование экспрессии белков проводили в лизатах клеток через 10 ч после облучения, когда индукция p53 достигает максимума [3].

У больных с нормальным характером клеточного ответа на облучение экспрессия фосфорилирован-

ного и нефосфорилированного p53 в клетках контрольных культур не определялась, но появлялась после облучения (рис. 2).

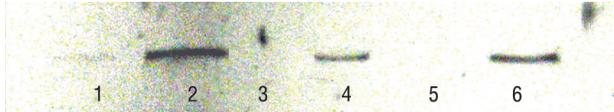


Рис. 2. Результаты исследования экспрессии фосфорилированного белка p53 в клеточных лизатах при помощи вестерн-блот анализа. Дорожки 1, 3, 5 — лизаты контрольных клеток. Дорожки 2, 4, 6 — лизаты клеток через 10 ч после облучения

Результатом активности p53 как фактора транскрипции является индукция экспрессии ряда генов-мишеней. Мы проводили определение белкового продукта одного из них, а именно белка p21. Он принимает участие в регуляции клеточного цикла, которая во многом определяется присутствием специфических белков — циклинов. Циклины образуют комплексы с циклинзависимыми киназами (Cdk), в составе которых выполняют регуляторную функцию, а киназы — ферментативную. Клеточный цикл связан с последовательной активацией различных Cdk. Их активность проявляется в комплексе с циклинами, а также регулируется низкомолекулярными ингибиторами, к которым относится и белок p21. p21 входит в состав семейства p21^{WAF1/Cip1} и принимает участие в угнетении перехода клетки из фазы G1 в фазу S. Белок p21 связывается с комплексами циклин E/Cdk2, циклин D/Cdk4 и циклин A/Cdk2. Кроме того, p21 угнетает функцию ядерного антигена пролиферирующих клеток (PCNA) и белка Rb, необходимого для пролиферации клеток [18].

У больных с адекватным клеточным ответом на облучение экспрессия p21 не отличалась от характера экспрессии p53: отсутствовала в контрольных клетках и появлялась после воздействия ИИ (рис. 3).

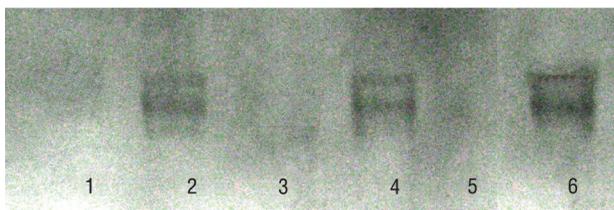


Рис. 3. Результаты определения экспрессии белка p21 в клеточных лизатах при помощи вестерн-блот анализа. Дорожки 1, 3, 5 — лизаты контрольных клеток. Дорожки 2, 4, 6 — лизаты клеток через 10 ч после облучения

В подгруппе больных с отсутствием индукции апоптоза под действием ИИ (4 человека) выявлено 2 типа экспрессии исследуемых белков. У 2 больных белки p53 и p21 отсутствовали в контрольных культурах и не индуцировались в опытных. В данном случае можно предположить наличие делеции 17p хромосомы с инактивацией второй аллели гена p53 или менее вероятно — мутаций гена ATM, нарушающих его киназную активность [19]. Еще у 2 больных выявлена гиперэкспрессия белка p53 как в контроле, так и в опыте (рис. 4).

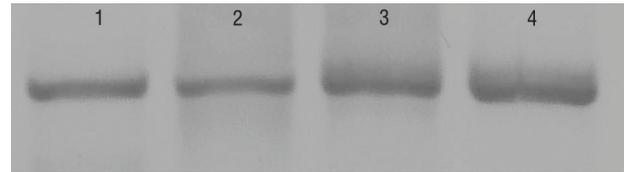


Рис. 4. Результаты определения экспрессии белка p53 в клеточных лизатах при помощи вестерн-блот анализа. Дорожки 1, 3 — лизаты контрольных клеток. Дорожки 2, 4 — лизаты клеток через 10 ч после облучения

Это свидетельствует об увеличении периода полураспада p53 в результате мутаций, которые нарушают конформационную структуру белка [20]. Кроме того, у этих больных не произошла индукция p21 (белок не выявлен в контрольных или опытных культурах клеток). Это связано с тем, что мутантный белок, хотя он и присутствует в значительном количестве, не может регулировать экспрессию генов-мишеней, так как утрачивает способность связываться со специфическими последовательностями в составе ДНК [20].

Наиболее гетерогенным был характер экспрессии белков в подгруппе больных с нарушенным клеточным ответом на действие ИИ вследствие повышенной клеточной гибели в контрольных культурах (7 человек). В 2 случаях полученные данные свидетельствовали о наличии мутаций гена p53 — гиперэкспрессия белка p53 в контроле, отсутствие индукции p21. У 5 больных белки p53 и p21 отсутствовали в контроле, после облучения отмечали слабую экспрессию белка p53, белок p21 в виде слабой полосы был выявлен только у 3 из них, а в 2 случаях не индуцировался. Предположительно такой тип ответа может быть связан со снижением функциональной активности белка ATM. Так, снижение уровня белка ATM выявили в опухолевых клетках 30–40% больных ХЛЛ [21, 22], причем у части больных отмечали мутации гена [23].

Как уже отмечалось выше, белок MDM2 может выступать как негативный регулятор функции p53. MDM2 связывается с p53 в консервативной области (аминокислотные остатки 17–27) и способствует переходу последнего из ядра в цитоплазму, где белок p53 подвергается деградации [11]. В нашем исследовании экспрессия MDM2 была выявлена как в контрольных, так и в облученных клетках всех больных приблизительно на одинаковом уровне, хотя и была несколько выше в лизатах облученных клеток у больных с адекватным клеточным ответом на облучение (рис. 5).

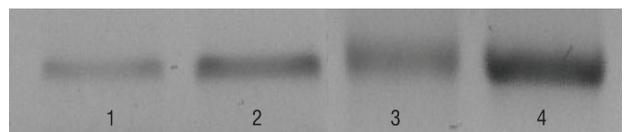


Рис. 5. Результаты определения экспрессии белка MDM2 в клеточных лизатах при помощи вестерн-блот анализа. Дорожки 1, 3 — лизаты контрольных клеток. Дорожки 2, 4 — лизаты клеток через 10 ч после облучения

Возможно, это связано с тем, что белок p53 является активатором экспрессии MDM2 [24]. Одна-

ко ни у одного из больных, независимо от характера клеточного ответа на облучение, не выявлено гиперэкспрессии этого белка и, следовательно, возможного влияния MDM2 на изменение чувствительности к индукции p53-зависимого апоптоза.

ВЫВОДЫ

Таким образом, в результате проведенных исследований выявлены следующие типы клеточного ответа на действие ИИ:

1. Адекватный характер клеточного ответа, выявленный у большинства обследованных больных (75,6%). Характеризуется нарастающей с течением времени гибелью облученных клеток, индукцией в них экспрессии белков p53 и p21, повышением базального уровня белка MDM2.

2. Атипичный характер ответа, связанный скорее всего с мутациями p53 (с или без делеции второй аллели); характеризуется отсутствием достоверной разницы в количестве погибших клеток в контрольных и облученных культурах, высоким базальным уровнем p53, отсутствием индукции p21. Выявлен у 4 больных (8,9%).

3. Атипичный характер ответа, вероятнее всего связанный с делециями гена p53 (делеции 17p) с инактивацией второй аллели: резистентность к индукции ИИ-опосредованного апоптоза, отсутствие экспрессии p53 и p21 в контроле и после облучения. Выявлен у 2 больных (4,4%).

4. Атипичный характер ответа, возможно связанный с нарушениями гена ATM: отсутствие достоверной разницы в количестве погибших клеток в контрольных и облученных культурах, слабая индукция p53, p21 или ее отсутствие под влиянием облучения. Выявлен у 5 больных (11,1%).

Полученные данные свидетельствуют, что в группе больных ХЛЛ, нуждающихся в проведении стационарного лечения, достаточно часто, примерно в 25% случаев, отмечают различные аномалии в системе индукции p53-зависимого апоптоза. Учитывая тот факт, что многие химиотерапевтические средства, применяемые для лечения ХЛЛ, в том числе и флударабин, вызывают именно p53-зависимый апоптоз [24], можно предположить у таких больных отсутствие позитивного ответа (или недостаточно эффективный устойчивый ответ) на проводимую терапию.

ЛИТЕРАТУРА

1. Zakian VA. ATM-related genes: why do they tell us about functions of the human gene? Cell 1995; **82**: 685–7.
2. Kastan MB, Onyekwere O, Sidransky D, et al. Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage. Cancer Res 1991; **51**: 6301–11.
3. Fritsche M, Haessler C, Brandner G. Induction of nuclear accumulation of the tumour suppressor protein p53 by DNA-damaging agents. Oncogene 1993; **8**: 307–18.
4. El-Deiry WS, Tokino T, Velculescu VE, et al. WAF1, a potential mediator of p53 tumour suppression. Cell 1993; **75**: 817–25.

5. Miyashita T, Reed J. Tumour suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human *bax* gene. Cell 1995; **80**: 293–9.
6. Miyashita T, Harigai M, Hanada M, Reed JC. Identification of a p53-dependent negative response element in the *bcl-2* gene. Cancer Res 1994; **54**: 3131–5.
7. Carbone R, Pearson M, Minucci S, Pelicci RG. PML NBs associate with the hMre11 complex and p53 at sites of irradiation induced DNA damage. Oncogene 2002; **21**: 1633–40.
8. Lane DP. p53 and human cancers. Brit Med Bull 1994; **50**: 582–99.
9. Dewald GW, Brockman SR, Paternoster SF, et al. Chromosome anomalies detected by interphase fluorescence in situ hybridization: correlation with significant biological features of B-cell chronic lymphocytic leukaemia. Brit J Haematol 2003; **121**: 287–95.
10. Dohner H, Stilgenbauer S, James MR, et al. 11q deletions identify a new subset of B-cell chronic lymphocytic leukemia characterized by extensive nodal involvement and inferior prognosis. Blood 1997; **89**: 2516–22.
11. Prives C. Signaling to p53: breaking the MDM2-p53 circuit. Cell 1998; **98**: 5–8.
12. Pettitt ER, Sherrington PD, Stewart G, et al. p53 dysfunction in B-cell chronic lymphocytic leukemia: inactivation of ATM as an alternative to TP53 mutation. Blood 2001; **98**: 814–22.
13. Rai KR, Sawitzky A, Cronkite EP, et al. Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia. Blood 1975; **46**: 219–24.
14. Binet JL, Auquier A, Dighiero G, et al. A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis. Cancer 1981; **48**: 198–205.
15. International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia. Chronic lymphocytic leukemia: recommendations for diagnosis, staging, and response criteria. Ann Intern Med 1989; **110**: 236–8.
16. Work TS, Work E. Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology. Vol 1, part 1. North Holland Publishing Co, 1969: 320 p.
17. Reed JC. Molecular biology of chronic lymphocytic leukemia. Semin Oncol 1998; **25**: 11–8.
18. Dulic V, Lees E, Reed SI. Association of human cyclin E with periodic G1-S phase protein kinase. Science 1992; **257**: 1958–61.
19. Stankovic T, Stewart GS, Fegan Ch, et al. Ataxia telangiectasia mutated-deficient B-cell chronic lymphocytic leukemia occurs in pregerminal center cells and results in defective damage response and unrepaired chromosome damage. Blood 2002; **99**: 300–9.
20. Prives C. How loops, β sheets, and α helices help us to understand p53. Cell 1994; **78**: 543–6.
21. Starostik P, Manshuri T, O'Brien S, et al. Deficiency of the ATM protein expression defines an aggressive subgroup of B-cell chronic lymphocytic leukemia. Cancer Res 1998; **58**: 4552–7.
22. Stankovic T, Weber P, Stewart G, et al. Inactivation of ataxia telangiectasia mutated gene in B-cell chronic lymphocytic leukaemia. Lancet 1999; **353**: 26–9.
23. Schaffner C, Stilgenbauer S, Rappold GA, et al. Somatic ATM mutations indicate a pathogenic role of ATM in B-cell chronic lymphocytic leukemia. Blood 1999; **94**: 748–53.
24. Rosenwald A, Chuang E, Davis R, et al. Fludarabine treatment of patients with chronic lymphocytic leukemia induces a p53-dependent gene expression response. Blood 2004; **104**: 1428–34.

**INDUCTION OF p53-DEPENDENT
APOPTOSIS BY IONIZING RADIATION
IN LYMPHOID CELLS OF PATIENTS
WITH B-CELL CHRONIC LYMPHOCYTIC
LEUKEMIA**

*I.V. Abramenko, A.V. Zavgorodnyaya, V.I. Balan,
I.A. Kryachouk, A.A. Chumak*

Summary. *The response of peripheral blood lymphocytes from 45 patients with chronic lymphocytic leukemia (CLL) on ionizing radiation (IR) was evaluated. Cell viability and expression of some proteins (p53, p21, MDM2) by Western-blot analysis have been studied. The most of patients (34; 75.6%) showed typical*

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

response on IR: death of irradiated cells, induction of p53 and p21, increasing of basal level of MDM2 expression. Eleven patients (24.4%) had different disturbances in the system of p53-dependent apoptosis that might complicate treatment of such CLL patients.

Key Words: chronic lymphocytic leukemia, ionizing radiation, p53-dependent apoptosis, Western-blot analysis.

Адрес для переписки:

Абраменко И.В.
03115, Киев, просп. Победы, 119/121
Научный центр радиационной медицины
АМН Украины