

**Б.В. Холодов¹, В.В. Шахтарин¹, Е.Г. Суворова¹,
О.В. Горючева¹, А.А. Абрамов¹, А.Р. Зарецкий¹,
С.К. Горелышев², Л.В. Шишкина², Е.А. Хухлаева²,
А.С. Белохвостов¹, С.С. Жилина¹, А.Г. Притыко¹**

¹ Научно-практический центр медицинской помощи детям с пороками развития черепно-лицевой области и врожденными пороками развития нервной системы Департамента здравоохранения г. Москвы

² НИИ нейрохирургии им. Н.Н. Бурденко, Москва

Исследование мутаций гена *p53* и метилирования MGMT при глиальных опухолях головного мозга у детей

Изучены мутации гена *p53* и метилирование промотора гена MGMT у 23 детей с глиальными опухолями головного мозга. Наблюдались следующие сочетания генетических изменений гена *p53* и MGMT: мутация гена *p53* и метилирование MGMT – 5 (22%) случаев; мутация гена *p53* и неметилированный MGMT – 3 (13%) случая; метилированный MGMT с геном *p53* дикого типа – 3 случая с учетом незначимой мутации гена *p53* у одного больного, к данной группе относятся 4 (17%) случая; неметилированный MGMT и ген *p53* дикого типа – 11 (48%) случаев. Имеются существенные основания для клинического исследования сравнительной эффективности различных схем адъювантной химиолучевой терапии при первичной глиобластоме у пациентов (взрослых и детей) с различным статусом генов *p53* и MGMT.

Ключевые слова: глиомы, дети, мутации, ген *p53*, метилирование, ген MGMT, химиотерапия.

Контактная информация: Жилина Светлана Сергеевна. E-mail: szhylina@mail.ru
© Коллектив авторов, 2011

Глиальные опухоли головного мозга – одни из наиболее часто встречающихся злокачественных новообразований у детей. При глиобластоме условно-радикальное удаление опухоли способно обеспечить ме-

диану выживаемости около 5 месяцев [1], адъювантная лучевая терапия (ЛТ) увеличивает ее до 10 месяцев [2], при использовании химиолучевой терапии с темозоломидом этот показатель приближается к 15 месяцам [3].

B.V. KHOLODOV, V.V. SHAKHTARIN, E.G. SUVOROVA, O.V. GORYUCHEVA, A.A. ABRAMOV, A.R. ZARETSKYI, S.K. GORELYSHEV, L.V. SHISHKINA, E.A. KHUKHLAEVA, A.S. BELOKHVOSTOV, S.S. ZHILINA, A.G. PRITYKO

A study of gene *p53* mutations and methylation of the MGMT gene promoter in glial brain tumors in children

Mutations of the *p53* tumor suppressor gene and methylation of MGMT gene promoter in 23 children with glial brain tumors have been investigated. The following combinations of genetic variations of *p53* gene and MGMT emerged from the study: mutation of *p53* gene and methylation of MGMT-5 cases (22 percent); mutation of *p53* gene and unmethylated MGMT promoter – 3 cases (13 percent); methylated MGMT with wild type *p53* – 3 cases and given negligible mutation of *p53* gene in one patient – 4 cases (17 percent) may belong to this group; unmethylated MGMT and wild type *p53* gene – 11 cases (48 percent). There exist substantial grounds for clinical investigation of comparative efficacy of different treatment schemes of adjuvant radiochemotherapy in primary glioblastoma in both adult and pediatric patients with varying *p53* and MGMT status.

Key words: gliomas, children, mutations, *p53* gene, methylation, MGMT gene, chemotherapy.

Исследования последних лет показывают ярко выраженную зависимость степени ответа опухоли на химиотерапию от статуса ряда генов. В частности, при глиобластоме эффективность комбинированного лечения с темозоломидом значимо выше в группе пациентов с метилированным промотором гена *MGMT* по сравнению с пациентами с неметилированным промотором этого гена [4]. Аналогичные данные имеются и относительно эффективности производных нитрозомочевины при злокачественных глиомах [5, 6], а также использования темозоломида при других злокачественных опухолях [7].

Однако статус метилирования промотора гена *MGMT* – не единственный молекулярный маркер, который определяет эффективность химиопрепаратов. Важную роль могут играть мутации гена *p53*, ключевого клеточного супрессора, который, по данным консорциума *The Cancer Genome Atlas* [8], повреждается при злокачественных глиомах примерно в 50% случаев. Инактивация гена *p53* (путем мутационных изменений) уменьшает эффективность темозоломида, но увеличивает эффективность производных нитрозомочевины [9–11].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В рамках настоящего исследования проведено изучение мутаций гена *p53* и метилирования промотора гена *MGMT* у 23 детей (14 мальчиков, 9 девочек) с глиальными опухолями головного мозга, получавших лечение в НИИ НХ им. Н.Н. Бурденко РАМН и НППЦ медицинской помощи детям Департамента здравоохранения г. Москвы в период 2003–2007 годов. Морфологический диагноз был установлен специалистами НИИ НХ им. Н.Е. Бурденко РАМН, молекулярно-генетические исследования выполнены в НППЦ медицинской помощи детям. Возраст обследованных детей – от 9 мес до 18 лет (медиана – 11 лет). Морфологический диагноз: астроцитомы – 5, пилоцитарная астроцитомы – 1, анапластическая астроцитомы – 2, плеоморфная ксантоастроцитомы – 1, глиобластомы – 14 случаев.

В качестве биологического материала использовали опухолевую ткань из парафиновых блоков. После депарафинизации к опухолевому материалу добавляли одну часть двукратного лизирующего буфера (1%-ный додецилсульфат натрия; 500 мМ Трис-Cl, pH 8,0; 20 мМ EDTA, pH 8,0; 10 мМ NaCl) и протеиназу К до концентрации 500 мкг/мл, затем выдерживали 24 ч при 56 °С. Далее проводили обычную фенол-хлороформную депротеинизацию и этанольную преципитацию.

Мутации в 5–8 экзонах гена *p53* выявляли путем секвенирования ПЦР-амплификатов соответствующих экзонов.

ПЦР для амплификации анализируемых последовательностей проводили в аппарате *GeneAmp PCR System 9700 (AppliedBioSystems)* по следующей схеме: к 3 мкл ДНК добавляли 22 мкл буфера для ПЦР, содержащего dNTP 200 мкМ, однократный буфер *Thermostar* (1x buf: TrisHCl pH8,3 67мМ, (NH₄)₂SO₄ 17 мМ, MgCl₂ 2,5 мМ, Tween 20 0,1%, BSA 0,12 мг/мл, *Glycerol* 8%), по 200 нМ каждого олигопраймера, 2,5 е.а. термофильной ДНК-полимеразы *Thermostar*.

Программа ПЦР: активация полимеразы – 94 °С (15 мин) – один цикл. Отжиг праймеров (специфическая гибридизация с последовательностью ДНК-матрицы) – 64 °С (30 с); синтез цепей (элонгация) – 72 °С (30 с); плавление – 94 °С (30 с) – 40 циклов. Избыточный отжиг – 64 °С (3 мин) – один цикл. Избыточный синтез – 72 °С (4 мин) – один цикл. Гомогенность продуктов амплификации проверяли при помощи стандартного электрофореза в 8%-ном полиакриламидном геле (ПААГ) при его визуализации этидия бромидом.

SSCP-электрофорез продуктов амплификации проводили в 12%-ном ПААГ в вертикальном аппарате при напряжении 230 В в течение 5 ч при комнатной температуре. Для приготовления геля для электрофореза (ПААГ 12%-ный) использовали: 6,6 мл (для 8%-ного ПААГ) или 10 мл (для 12%-ного ПААГ) 30%-ного акриламид/бис-акриламид (29/1) (*Sigma, Molecular Biology Grade*), 2,5 мл 10xTBE, 10%-ный ПСА – 200 мкл (*Sigma, Molecular Biology Grade*), TEMED – 12 мкл (*Sigma, Molecular Biology Grade*), ddH₂O – до 25 мл. Для SSCP-электрофореза 8 мкл амплификата инкубировали 5 мин при 99 °С в равном объеме денатурирующего буфера (на 1 мл буфера: 980 мкл формамида, 20 мкл 0,5 М ЭДТА pH 8,0, 0,25 мг ксилена цианола и 0,25 мг бромфенолового синего). После прогревания пробы немедленно помещали в лед, затем наносили на полиакриламидный гель.

В качестве положительного контроля с охарактеризованными мутациями в гене *p53* использовали ДНК-культуры злокачественных клеток человека CEM, KG-1, Colo320, A-431, а в качестве отрицательного контроля – ДНК группы доноров. Результат SSCP-электрофореза визуализировали с помощью окрашивания нитратом серебра.

Нуклеотидную последовательность ПЦР-амплификатов определяли с помощью секвенирования ДНК (*ABI Prism 3130xl, AppliedBioSystems*). В качестве положительного контроля с охарактеризованными мутациями в гене *p53* использовали ДНК-культуры злокачественных клеток человека CEM, KG-1, Colo320, A-431, а в качестве отрицательного контроля – ДНК группы доноров.

Метилирование промотора гена *MGMT* исследо-

экзоне – в трех случаях. При секвенировании 5–8-го экзона у всех обследуемых больных было установлено 8 мутаций: 5-й экзон – две мутации в 175-м кодоне (CGC→CGC); 6-й экзон – мутация в 196-м (CGA→TGA) и 213-м (CGC→CGC) кодонах; 7-й экзон – мутация в 244-м (GGC→CGC) и 258-м (CGG→TGG) кодонах; 8-й экзон – две мутации в 273-м кодоне (CGT→TGT). Таким образом, в семи случаях установлена миссен-мутация, в одном – стоп-кодон и в одном – молчащая мутация. Сравнительная оценка результатов исследования гена *p53* методом SSCP и секвенирования свидетельствует об их достаточно высокой конкордантности на предмет выявления мутаций, однако характеристика мутаций возможна только при проведении секвенирования интересующего фрагмента гена. Метилирование промотора гена MGMT установлено у обследуемых больных в 9 случаях. Наблюдались следующие сочетания генетических изменений гена *p53* и MGMT:

- ▶ мутация гена *p53* и метилирование MGMT – 5 (22%) случаев;
- ▶ мутация гена *p53* и неметилированный MGMT – 3 (13%) случая;
- ▶ метилированный MGMT с геном *p53* дикого типа – 3 случая, а с учетом незначимой мутации гена *p53* у одного больного – 4 (17%) случая;
- ▶ неметилированный MGMT и ген *p53* дикого типа – 11 (48%) случаев.

С учетом приведенной выше зависимости степени ответа опухоли на химиотерапию от статуса рассматриваемых генов следует ожидать эффективность применения темозоломида в стандартной дозировке только у 17% больных, а препаратов нитрозомочевины – у 48% больных обследованной группы. У остальных пациентов в силу имеющихся генетических изменений в опухолевых клетках нельзя ожидать эффективности от применения указанных препаратов. Следует отметить, что резистентность к терапии, обусловленная статусом гена MGMT, носит количественный характер и в принципе может быть преодолена с помощью увеличения дозы препарата или использования *dose-dense* режима. Для сравнения: резистентность, обусловленная статусом гена *p53*, носит качественный характер и может быть «преодолена» только путем замены препарата.

Выводы

Имеются существенные основания для клинического исследования сравнительной эффективности различных схем химиотерапии при первичной глиобластоме у пациентов (взрослых и детей) с различным статусом генов *p53* и MGMT.

Литература

1. Walker M.D., Green S.B., Byar D.P., et al. Randomized comparisons of radiotherapy and nitrosoureas for the treatment of malignant glioma after surgery. *N Engl J Med* 1980; 303 (23): 1323–9.
2. Kristiansen K., Hagen S., Kollevold T., et al. Combined modality therapy of operated astrocytomas grade III and IV. Confirmation of the value of postoperative irradiation and lack of potentiation of bleomycin on survival time: a prospective multicenter trial of the Scandinavian Glioblastoma Study Group *Cancer* 1981; 47 (4): 649–52.
3. Stupp R., Mason W.P., van den Bent M.J., et al. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med* 2005; 352 (10): 987–96.
4. Stupp R., Hegi M.E., Mason W.P., et al. Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. *Lancet Oncol* 2009; 10 (5): 459–66; Epub 2009 Mar 9.
5. Balaña C., Ramirez J.L., Taron M., et al. O6-methyl-guanine-DNA methyltransferase methylation in serum and tumor DNA predicts response to 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea but not to temozolamide plus cisplatin in glioblastoma multiforme. *Clin Cancer Res* 2003; 9 (4): 1461–8.
6. Silvani A., Gaviani P., Lamperti E.A., et al. Cisplatin and BCNU chemotherapy in primary glioblastoma patients. *J Neurooncol* 2009; 94 (1): 57–62; Epub 2009 Feb 11.
7. Kulke M.H., Hornick J.L., Fraumeni C., et al. O6-methyl-guanine DNA methyltransferase deficiency and response to temozolomide-based therapy in patients with neuroendocrine tumors. *Clin Cancer Res* 2009; 15 (1): 338–45.
8. McLendon R., et al. Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. *Nature* 2008; 455 (7216): 1061–8; Epub 2008 Sep 4.
9. Srivenugopal K.S., Shou J., Mullapudi S.R., et al. Enforced expression of wild-type p53 curtails the transcription of the O(6)-methylguanine-DNA methyltransferase gene in human tumor cells and enhances their sensitivity to alkylating agents. *Clin Cancer Res* 2001; 7 (5): 1398–409.
10. Fruehauf J.P., Brem H., Brem S., et al. In vitro drug response and molecular markers associated with drug resistance in malignant gliomas. *Clin Cancer Res* 2006; 12 (15): 4523–32.
11. Batista L.F., Roos W.P., Christmann M., et al. Differential sensitivity of malignant glioma cells to methylating and chloroethylating anticancer drugs: p53 determines the switch by regulating xpc, ddb2, and DNA double-strand breaks. *Cancer Res* 2007; 67 (24): 11886–95.