

УДК 616-006

## ВЗАИМОСВЯЗЬ АКТИВНОСТИ ЭКСПРЕССИИ АТИПИЧЕСКИХ ИЗОФОРМ ПРОТЕИНКИНАЗЫ C С МЕТИЛИРОВАНИЕМ ПРОМОТЕРА ГЕНА MGMT И КО-ДЕЛЕЦИЕЙ 1P/19Q В ДИФFUЗНЫХ ГЛИОМАХ

Никитин П.В., Рыжова М.В., Галстян С.А., Хохлова Е.А.

ФГАУ «НМИЦ нейрохирургии имени акад. Н.Н. Бурденко», Москва, e-mail: redseadog@gmail.com

Все чаще молекулярные факторы становятся предметом не только для фундаментальных научных работ, но также для диагностических разработок в практической клинической плоскости. В рамках предыдущих работ нам довелось показать, что протеинкиназа М $\zeta$  (ПК М $\zeta$ ) и протеинкиназа C iota (ПК Ci) принимают непосредственное участие в канцерогенезе диффузных глиом, в то же время данные молекулярные факторы взаимосвязаны с выживаемостью пациентов. В рамках данной работы проведено дополнительное сравнительное изучение взаимосвязи активности экспрессии ПК М $\zeta$  (АЭ ПК М $\zeta$ ) и ПК Ci (АЭ ПК Ci) с метилированием промотера гена MGMT, в диффузных астроцитомах (ДА) и анапластических астроцитомах (АА), глиобластомах (ГБ) а также олигодендроглиомах и анапластических олигодендроглиомах, и с ко-делецией 1p/19q в олигодендроглиомах и анапластических олигодендроглиомах на материале операционных биопсий пациентов. Было выявлено, что АЭ ПК М $\zeta$  статистически значимо выше в ДА, АА и ГБ, а также олигодендроглиомах без метилирования промотера гена MGMT по сравнению с опухолями такого же гистогенетического происхождения, но с наличием метилирования. Тем не менее АЭ ПК Ci статистически значимо выше только в ГБ с отсутствием метилирования промотера гена MGMT по сравнению с ГБ с наличием метилирования, в то время как в остальных разновидностях диффузных глиом различий не выявлено. Также не различаются по АЭ ПК М $\zeta$  и АЭ ПК Ci олигодендроглиомы и анапластические олигодендроглиомы с наличием и отсутствием ко-делеции 1p/19q. Таким образом, мы показали наличие фундаментальной взаимосвязи между метилированием промотера гена MGMT и активностью атипических изоформ протеинкиназы C, что не только углубляет наши фундаментальные представления, но также расширяет горизонты для практических разработок.

**Ключевые слова:** протеинкиназа М $\zeta$ , протеинкиназа C iota, диффузная астроцитома, метилирование MGMT, олигодендроглиома

## CORRELATION BETWEEN THE EXPRESSION ACTIVITY OF ATYPICAL PROTEIN KINASE C ISOFORMS WITH METHYLATION OF THE MGMT GENE PROMOTER AND CO-DELETION OF 1P/19Q IN DIFFUSE GLIOMAS

Nikitin P.V., Ryzhova M.V., Galstyan S.A., Khokhlova E.A.

Burdenko Neurosurgical Institute, Moscow, e-mail: redseadog@gmail.com

More and more often, molecular factors are becoming a subject not only for fundamental scientific developments, but also for diagnostic developments in the practical clinical plane. In previous studies, it was shown that protein kinase М $\zeta$  (PK М $\zeta$ ) and protein kinase C iota (PK Ci) are directly involved in the carcinogenesis of diffuse gliomas, while these molecular factors are interrelated with patient survival. Within the framework of this study, an additional comparative study of the relationship between the expression activity of PK М $\zeta$  (PK М $\zeta$  EA) and PK Ci (PK Ci EA) with methylation of MGMT gene promoter in diffuse astrocytomas (DA) and anaplastic astrocytomas (AA), glioblastomas (GB), and also oligodendrogliomas and anaplastic oligodendrogliomas, and with 1p / 19q co-deletion in oligodendrogliomas and anaplastic oligodendrogliomas on patient biopsies. It was found that the PK М $\zeta$  EA was statistically significantly higher in DA, AA, and GB, as well as in oligodendrogliomas without methylation of MGMT gene promoter as compared with tumors of the same histogenetic origin, but with methylation. Nevertheless, the PK Ci EA was statistically significantly higher only in unmethylated GB compared to methylated GB, while no differences were found in other types of diffuse gliomas. Also, oligodendrogliomas and anaplastic oligodendrogliomas with the presence and absence of 1p/19q co-deletion do not differ in the PK М $\zeta$  EA and PK Ci EA. Thus, we have shown the existence of a fundamental relationship between methylation of MGMT gene promoter and the activity of atypical protein kinase C isoforms, which not only deepens our fundamental concepts, but also broadens the horizons for practical development.

**Keywords:** protein kinase М $\zeta$ , protein kinase C iota, diffuse astrocytoma, MGMT methylation, oligodendroglioma

Молекулярные свойства все больше привлекают к себе внимание при диагностике новообразований, постепенно переходя из разряда фундаментально-научных изысканий в практическую плоскость. Непосредственным отражением данного процесса являются современные классификации ВОЗ опухолей различных локализаций, в том числе опухолей центральной нервной системы (ЦНС). В частности, это касается

и одной из самых часто встречающихся категорий новообразований данной области – диффузных глиальных опухолей [1]. В рамках существующей классификации 2016 г. выделен ряд молекулярных факторов, имеющих принципиальное диагностическое значение и включенных в названия и определения нозологических форм [2].

В предшествующих работах нами проведено исследование по участию атипических

изоформ протеинкиназы C, в частности протеинкиназы M $\zeta$  (ПК M $\zeta$ ) и протеинкиназа C iota (ПК Ci), в патогенезе диффузных глиом. Более того, мы также охарактеризовали особенности влияния данных факторов на прогноз пациентов с данными нозологиями [3]. Данные протеинкиназы характеризуются тем, что не требуют для своей активации ни Ca<sup>2+</sup>, ни диацилглицерола [4]. Притом рассматриваемые протеинкиназы характеризуются более высокой каталитической активностью, являются абсолютно мозгоспецифичными и обладают свойством самоподдержания собственной активности, что дает возможность автономного функционирования данных протеинкиназ [5].

Ранее мы подробно охарактеризовали экспрессию ПК M $\zeta$  и ПК Ci в диффузных астроцитомах (ДА), анапластических астроцитомах (АА) и глиобластомах (ГБ), установив взаимосвязь с наличием одного из ключевых молекулярно-генетических событий в данных новообразованиях в виде мутации в генах *IDH1* и *IDH2*. Тем не менее помимо мутаций в генах *IDH1* и *IDH2* существуют и другие важные молекулярные события в диффузных глиомах, которые либо включены в классификацию ВОЗ, либо упоминаются в ней и обладают выраженной прогностической ценностью, в частности ко-делеция 1p/19q и метилирование промотера гена *MGMT*. Ко-делеция участков хромосом 1p/19q является своего рода диагностическим маркером, указывающим на две родственные в гистогенетическом плане формы новообразований, получивших название олигодендроглиомы и анапластические олигодендроглиомы. Наличие указанного молекулярного события является важнейшим признаком данных опухолей и определяет более благоприятный прогноз в сравнении с аналогичными глиомами астроцитарного гистопатологического ряда [6].

Важным прогностическим значением обладает также и статус метилирования промотера гена *MGMT*, который наряду с мутацией в генах *IDH1* и *IDH2* входит в диагностический минимум молекулярного обследования диффузных глиальных опухолей. Наличие метилирования промотера гена *MGMT* ассоциировано с рядом молекулярных особенностей данных опухолей. Кроме того, рассматриваемая молекулярная модификация сопровождается существенно лучшей выживаемостью пациентов, а также лучшим ответом на химиотерапию [6]. В рамках настоящей работы мы решили проанализировать взаимосвязь данных молекулярных факторов с продукцией ПК M $\zeta$  и ПК Ci.

Целью настоящей работы явилось изучение взаимосвязи активности экспрессии

ПК M $\zeta$  и ПК Ci со статусом метилирования промотера гена *MGMT* и ко-делецией 1p/19q в диффузных глиомах.

### Материалы и методы исследования

#### Группа для исследования

В рамках данной работы были сформированы несколько групп пациентов, при этом все пациенты подвергались хирургическому вмешательству в НМИЦ нейрохирургии им. акад. Н.Н. Бурденко в 2016–2018 гг. Для изучения влияния метилирования промотера гена *MGMT* были сформированы шесть групп, которые сравнивались попарно друг с другом, группы формировались по принципу патогистологического и молекулярного родства опухолей и включали в себя группу ДА и АА с наличием метилирования промотера гена *MGMT* (ДА и АА *MGMT*-meth), группу ДА и АА без метилирования промотера гена *MGMT* (ДА и АА *MGMT*-unmeth), ГБ с наличием метилирования промотера гена *MGMT* (ГБ *MGMT*-meth), ГБ без метилирования промотера гена *MGMT* (ГБ *MGMT*-unmeth), олигодендроглиомы и анапластические олигодендроглиомы с наличием метилирования промотера гена *MGMT* (олигодендроглиомы *MGMT*-meth), олигодендроглиомы и анапластические олигодендроглиомы без метилирования промотера гена *MGMT* (Олигодендроглиомы *MGMT*-unmeth), в состав каждой из групп вошло по 30 образцов пациентов, причем в группах с двумя видами опухолей количество образцов между ними распределялось поровну. Диагноз был подтвержден при проведении патогистологического и молекулярно-генетического исследований тремя опытными патологами. Для определения статуса метилирования применялся метод метил-специфической ПЦР. Для исследования значимости ко-делеции 1p/19q были сформированы дополнительные две группы по 30 пациентов, в первую группу включались образцы пациентов с диагнозом олигодендроглиома и анапластическая олигодендроглиома с наличием ко-делеции 1p/19q, во вторую группу – пациенты с аналогичными диагнозами без ко-делеции 1p/19q. Наличие ко-делеции 1p/19q устанавливали с помощью исследования копийности данных хромосом с использованием метода флуоресцентной гибридизации *in situ*, полученные препараты анализировались патологами с опытом работы с флуоресцентными препаратами.

#### Проведение иммуногистохимического исследования

При проведении иммуногистохимического исследования из парафиновых бло-

ков с фиксированными в них образцами опухолей изготавливали срезы толщиной 3 мкм, далее депарафинировали данные образцы с использованием ксилола и повторно гидратировали с помощью различных концентраций этанола, затем срезы высушивали в термостате при 45 °С. После того проводили инкубацию с кроличьими моноклональными антителами против антигена ПК Мζ (Abcam, Великобритания), ПК Сі человека (Abcam, Великобритания) и конъюгировали с антикроличьими мышинными IgG антителом против пероксидазы хрена (Cell Marque, «Sigma-Aldrich», США). Визуализацию сайтов связывания антител проводили с помощью тетрагидрохлорида 3,3'-диаминобензидина («Ventana Medical Systems», США), ядра клеток окрашивали гематоксилином.

#### *Проведение анализа*

Все полученные препараты были проанализированы на предмет того, насколько высока в них активность экспрессии ПК Мζ (АЭ ПК Мζ) и ПК Сі (АЭ ПК Сі). Для данной цели применялся полуколичественный метод подсчета параметра, учитывавший количество позитивных клеток и интенсивность экспрессии маркеров в каждой клетке. Для этого препараты оцифровывались с помощью сканера Aperio 3T (Leica Biosystems, GmbH). Далее полуавтоматическим методом под контролем оператора проводилось определение процента клеток, в которых экспрессируется данный маркер, а также средней цветности всех позитивных меток в процентах. После чего полученные показатели складывались и усреднялись.

#### *Статистический анализ*

Для проведения статистического процессинга и анализа использовалось программное обеспечение SPSS Statistics 22 (IBM, США). Сравнение средних двух выборок производилось с использованием U-теста Манна – Уитни. Значения  $p < 0,05$  считались статистически значимыми.

#### **Результаты исследования и их обсуждение**

##### *Результаты сравнительного анализа ПК Мζ и ПК Сі в ДА и АА*

При проведении сравнительного анализа активности экспрессии ПК Мζ и ПК Сі в ДА и АА с наличием и отсутствием метилирования промотера гена *MGMT* был выявлен ряд закономерностей. В частности, нам удалось показать, что АЭ ПК Мζ в среднем в ДА и АА *MGMT-meth* составляет

$64,26 \pm 2,42\%$ , при этом в ДА и АА *MGMT-unmeth* данный параметр больше и составляет  $68,52 \pm 2,86\%$ . При этом различия между группами носили статистически значимый характер ( $p = 0,004268$ ). В то же время АЭ ПК Сі в среднем в ДА и АА *MGMT-meth* составила  $62,76 \pm 4,24\%$ , в ДА и АА *MGMT-unmeth* данный показатель равнялся  $64,68 \pm 4,32\%$ . При том различия не были значимыми ( $p = 0,064244$ ) (рис. 1).

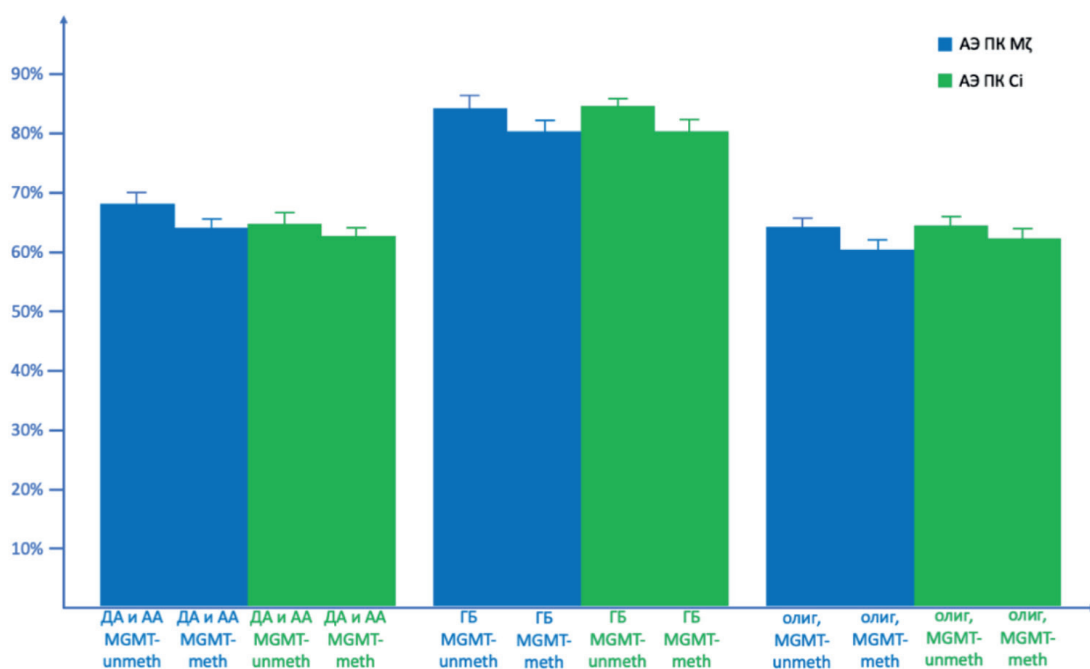
##### *Сравнительный анализ ПК Мζ и ПК Сі в ГБ*

В рамках проведенного сравнительного анализа в образцах ГБ было выявлено, что АЭ ПК Мζ в среднем в ГБ *MGMT-meth* составляет  $80,22 \pm 2,28\%$ , в то время как в ГБ *MGMT-unmeth* данный параметр был выше и равнялся  $84,46 \pm 4,42\%$ . При этом различия между группами были статистически значимыми ( $p = 0,002648$ ). Также было показано, что АЭ ПК Сі была ниже в ГБ *MGMT-meth* и составила  $80,34 \pm 4,72$ , в ГБ *MGMT-unmeth* данный параметр составил  $84,62 \pm 2,28\%$ , различия были статистически значимыми ( $p = 0,004284$ ).

##### *Результаты сравнительного анализа ПК Мζ и ПК Сі в олигодендроглиомах*

При сравнении показателей средних значений АЭ ПК Мζ и АЭ ПК Сі в олигодендроглиомах было выявлено, что АЭ ПК Мζ в среднем в олигодендроглиомах, *MGMT-meth* составила  $60,42 \pm 2,76\%$ , в то время как данный параметр в олигодендроглиомах, *MGMT-unmeth* равнялся  $64,22 \pm 4,72\%$ . При этом различия между группами носили статистически значимый характер ( $p = 0,004228$ ). В то же время АЭ ПК Сі в олигодендроглиомах, *MGMT-meth* составила  $62,38 \pm 6,18\%$ , в олигодендроглиомах, *MGMT-unmeth* данный параметр составил  $64,48 \pm 2,36\%$ , различия не были статистически достоверными ( $p = 0,246488$ ) (рисунок).

Данный параметр изучался в диффузных астроцитомах и анапластических астроцитомах с отсутствием метилирования промотера гена *MGMT* (ДА и АА *MGMT-unmeth*) и наличием метилирования промотера гена *MGMT* (ДА и АА *MGMT-meth*), глиобластомах с отсутствием метилирования промотера гена *MGMT* (ГБ *MGMT-unmeth*) и наличием метилирования промотера гена *MGMT* (ГБ *MGMT-meth*), олигодендроглиомах и анапластических олигодендроглиомах с отсутствием метилирования промотера гена *MGMT* (олиг, *MGMT-unmeth*) и наличием метилирования промотера гена *MGMT* (олиг, *MGMT-meth*).



Взаимосвязь молекулярных модификаций с активностью экспрессии ПК Мз (АЭ ПК Мз) и ПК Сi (АЭ ПК Сi)

*Сравнительный анализ протеинкиназ при модификации 1p/19q*

При рассмотрении вопроса взаимосвязи количественных изменений фрагментов хромосом 1p/19q с АЭ ПК Мз было выявлено, что данный параметр в олигодендроглиомах с наличием сочетанной делеции 1p/19q составил  $62,43 \pm 4,64\%$ , в то время как в олигодендроглиомах без делеции данный параметр составил  $64,35 \pm 2,68\%$ . Различия между группами не были статистически значимыми ( $p = 0,260846$ ). В то же время АЭ ПК Сi в аналогичных группах составила в среднем  $60,37 \pm 4,27\%$  и  $62,59 \pm 4,38\%$  соответственно. При этом различия между данными группами не носили статистически значимого характера ( $p = 0,068244$ ).

Результаты в рамках данного сравнительного анализа дают основания для крайне любопытных выводов. Необходимо заметить, что ПК Мз достоверно активнее в диффузных глиомах без наличия метилирования промотора гена *MGMT*, то есть во всех гистологических видах глиом метилирование промотора гена *MGMT* взаимосвязано со снижением продукции ПК Мз. Данная закономерность хорошо согласуется с ранее установленными особенностями участия ПК Мз в патогенезе диффузных глиом. В частности, нами было показано, что рассматриваемая протеинкиназа становится

значимо активнее при повышении степени злокачественности опухоли. То есть рост агрессивности онкологического процесса сопровождается повышением продукции ПК Мз, что находит свое отражение и в клинической плоскости: активность экспрессии ПК Мз влияет на выживаемость пациентов с диффузными глиомами.

В данном исследовании указанная закономерность находит свое дополнительное подтверждение. Хорошо известно, что, как уже указывалось выше, метилирование промотора гена *MGMT* сопровождается лучшим прогнозом для пациентов и лучшим ответом на лечение. Более того, метилирование промотора данного гена ведет к снижению злокачественных потенциалов диффузной глиомы [7]. Таким образом, активность ПК Мз варьирует во взаимосвязи не только со злокачественным потенциалом опухоли в целом, но и с важными отдельными его маркерами и компонентами, в частности с метилированием промотора гена *MGMT*.

В то же время ПК Сi не демонстрирует такой же однозначной корреляции с типичными метилиационными чертами диффузных глиом. Данная протеинкиназа не изменяет свою активность в зависимости от наличия или отсутствия метилирования промотора гена *MGMT* в ДА и АА, а также в олигодендроглиомах, но активность ПК Сi повышается при метилировании про-



мотера данного гена в ГБ. Представленные результаты также хорошо согласуются с нашими предыдущими исследованиями, которые демонстрируют значимую роль ПК Сi именно в патогенезе ГБ, причем в клинической плоскости прогноз пациентов с ГБ также взаимосвязан с продукцией данной протеинкиназы.

В вопросе взаимосвязи ко-делеции 1p/19q с активностью ПК Мζ и ПК Сi ситуация обстоит иначе, значимых различий данное генетическое событие не вызывает. В целом подобная картина может объясняться особенностями происхождения и развития глиом, возникающих из клеток со стволовыми свойствами. В ходе этого процесса ПК Мζ, по-видимому, выступает в качестве ключевого эффектора, через который реализуются злокачественные потенции опухоли и поддерживаются в гиперактивном состоянии многие ключевые функции клеток. В то же время ко-делеция 1p/19q, по-видимому, в большей степени ассоциирована не столько с функциональными особенностями клеток, сколько с гистогенетическими характеристиками, в результате чего данный параметр не взаимосвязан с активностью ПК Мζ [8]. Возможно также, что существуют и другие факторы, не связанные с ПК Мζ, которые включатся в процесс обеспечения злокачественного потенцирования опухоли в олигодендроглиомах. Тем не менее ряд вопросов взаимосвязи рассматриваемого генетического параметра с активностью ПК Мζ требует дополнительного анализа в разных моделях.

### Заключение

В рамках данного исследования мы подтвердили наши предшествующие выводы о роли ПК Мζ и ПК Сi в прогрессировании и реализации злокачественного потенциала диффузных глиом. Более того, нам удалось расширить понимание механизмов взаимодействия данных протеинкиназ с важнейшими молекулярными факторами в патогенезе глиом, в частности метилированием промотера гена *MGMT* и модификацией фрагментов хромосом 1p/19q в различных

гистологических видах глиом. Данные результаты позволяют сформировать более комплексное понимание роли рассматриваемых протеинкиназ в прогрессировании и развитии диффузных глиом. Кроме того, полученные данные усиливают имеющуюся научную базу для создания принципиально новых персонализированных подходов к диагностике и лечению глиальных новообразований.

*Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 18-29-01034 мк.*

### Список литературы

1. Louis D.N., Perry A., Reifenberger G., von Deimling A., Figarella-Branger D., Cavenee W.K., Ohgaki H., Wiestler O.D., Kleihues P., Ellison D.W. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathol.* 2016. Vol. 131. No. 6. P. 803–20. DOI: 10.1007/s00401-016-1545-1.
2. Ostrom Q.T., Gittleman H., Liao P., Vecchione-Koval T., Wolinsky Y., Kruchko C., Barnholtz-Sloan J.S. CBTRUS Statistical Report: Primary brain and other central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2010-2014. *Neuro Oncol.* 2017. Vol. 19. No. 5. P. v1–v88. DOI: 10.1093/neuonc/nox158.
3. Никитин П.В., Рыжова М.В., Галстян С.А., Зубова И.В., Хохлова Е.А. Протеинкиназа М ζ и протеинкиназа С iota в диффузных астроцитомах, анапластических астроцитомах и глиобластомах // *Современные проблемы науки и образования.* 2020. № 3. [Электронный ресурс]. URL: <http://science-education.ru/ru/article/view?id=29819> (дата обращения: 13.07.2020). DOI: 10.17513/spno.29819.
4. Hirai T., Chida K. Protein kinase Czeta (PKCzeta): activation mechanisms and cellular functions. *J Biochem.* 2003. Vol. 133. No. 1. P. 1–7.
5. Zhang Y., Zong W., Zhang L., Ma Y., Wang J. Protein kinase M ζ and the maintenance of long-term memory. *Neurochem Int.* 2016. Vol. 99. P. 215–220.
6. Chen R., Smith-Cohn M., Cohen A.L., Colman H. Glioma Subclassifications and Their Clinical Significance. *Neurotherapeutics.* 2017. Vol. 14. No. 2. P. 284–297. DOI: 10.1007/s13311-017-0519-x.
7. Kessler T., Sahn F., Sadik A., Stichel D., Hertenstein A., Reifenberger G., Zacher A., Sabel M., Tabatabai G., Steinbach J., Sure U., Krex D., Grosu A.L., Bewerunge-Hudler M., Jones D., Pfister S.M., Weller M., Opitz C., Bendszus M., von Deimling A., Platten M., Wick W. Molecular differences in IDH wildtype glioblastoma according to MGMT promoter methylation. *Neuro Oncol.* 2018. Vol. 20. No. 3. P. 367–379. DOI: 10.1093/neuonc/nox160.
8. Cahill D.P., Louis D.N., Cairncross J.G. Molecular background of oligodendroglioma: 1p/19q, IDH, TERT, CIC and FUBP1. *CNS Oncol.* 2015. Vol. 4. No. 5. P. 287–294. DOI: 10.2217/cns.15.32.