

## ГЕНЫ КОНТРОЛЬНОЙ ТОЧКИ ВЕРЕТЕНА ДЕЛЕНИЯ И ИХ ЗНАЧЕНИЕ ПРИ ЛЕЙКОЗАХ

© К. В. Богданов

С.-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И. П. Павлова;  
электронный адрес: bogdanov\_konstantin@yahoo.co.uk

Лейкоз — это клональное пролиферативное заболевание, которое затрагивает гемопоэтические стволовые клетки и приводит к нарушению их роста и (или) дифференцировки. Характерным признаком болезни является выявление экспрессии одного или нескольких онкогенов в костном мозге или периферической крови, что связано с возникновением хромосомных транслокаций в опухолевой клетке. Развитие лейкоза и его прогрессия представляют собой многоступенчатый процесс с вовлечением ряда молекулярных событий, предшествующих возникновению хромосомной нестабильности и анеуплоидии. К таким событиям относятся появление дополнительных хромосомных перестроек, активация других онкогенов, ранее не экспрессируемых, инактивация опухолевых супрессоров, амплификация центросом и дисфункция генов, ответственных за правильное расположение хромосом в метафазе и их сегрегацию в анафазе митоза. Последние два события осуществляются непосредственно под контролем генов контрольной точки веретена деления. Их участие в лейкогенезе и возможное вовлечение в апоптоз обсуждаются в этой статье.

Ключевые слова: контрольная точка веретена деления, митоз, дисфункция, лейкоз, опухолевая прогрессия.

Принятые сокращения: APC/C — циклосома, HTLV-I — Т-лимфотропный вирус человека I типа, КТВД — контрольная точка веретена деления.

Лейкоз представляет собой клональное пролиферативное заболевание, затрагивающее полипотентную гемопоэтическую популяцию стволовых клеток. По характеру поражения очага гемопоэза лейкозы подразделяются на миелоидные или лимфоидные, а также острые или хронические в зависимости от течения заболевания. Как правило, при острых лейкозах пролиферирующие клетки недостаточно дифференцированы, тогда как при хронических лейкозах популяция дифференцированных клеток заметно выражена. Основной причиной возникновения лейкозов является активация онкогенов, приводящая к неограниченной пролиферации и нарушению в некоторых случаях терминальной дифференцировки (Kiselev, 1985). Чаще всего активация онкогенов является следствием возникновения хромосомных перестроек (транслокаций), сопровождающихся реаранжировкой генов (Sawyers et al., 1991; Nichols, Nimer, 1992; Amikam et al., 1995). К настоящему времени описаны различные типы хромосомных нарушений, которые приводят к активации онкогенов и рассматриваются в качестве специфических маркеров для той или иной формы или варианта лейкоза (Bartram, 1993).

Прогрессированию лейкоза способствует индукция дополнительных молекулярно-генетических событий. К ним относятся активация новых онкогенов, ранее не экспрессируемых, инактивация опухолевых супрессоров (PP2A, pRb и p53), дерегуляция факторов транскрипции (c-Myc и c-Myb) и трансляции (eIF4E) и др. (Sawyers, 1993; Guo et al., 2000; Emambokus et al., 2003; Topisirovic et al., 2003; Neviani et al., 2005). Характерным признаком

прогрессии лейкоза является выявление у больных в костном мозге дополнительных цитогенетических аномалий, ранее не регистрируемых: потерь хромосом или их добавок, увеличение числа центросом или центров организации микротрубочек веретена деления. Названные события, как правило, происходят у больных, находящихся на поздней стадии развития лейкоза или в период прогрессии онкогематологического заболевания. Исключение составляет только амплификация центросом, выявляемая у больных лейкозом как на ранних, так и поздних стадиях болезни. Во всех случаях изменение числа хромосом происходит по причине нарушения их расхождения в анафазе. Гены, кодирующие белки, ответственные за правильное расхождение сестринских хроматид во время митоза, получили название генов контрольной (сверочной) точки веретена деления (КТВД). Недавно появились данные о роли этих генов в возникновении анеуплоидии при лейкозах. Однако они оказались настолько разрозненными для разных форм лейкозов, что потребовалось их объединить и провести детальный сравнительный анализ. Кроме того, в настоящем исследовании необходимо было получить ответ на вопросы о том, какие факторы могут приводить к дисфункции генов КТВД при лейкозах и могут ли нарушения функции этих генов способствовать прогрессированию онкогематологических заболеваний.

Впервые гены КТВД были обнаружены у дрожжевых грибов *Saccharomyces cerevisiae*. Ключевыми игроками системы КТВД являются гены семейства *Mad* (*mad1*, *mad2* и *mad3*), нехватка которых обуславливает задержку митоза у *S. cerevisiae*. Сюда же относятся гены семейства

Ключевые гены контрольной точки веретена деления и кодируемые ими белки

Ген; хромосома; кодируемый белок, его молекулярная масса (гомолог дрожжей)	Функция белка <sup>a</sup>
<i>bub1</i> ; 2q14; Bub1(Bub1), 122 кДа (серин/треонин киназа)	Обеспечивает кинетохорную локализацию белков BubR1, Mad1, Mad2, AF15q14 и Sgo-PP2A; корректирует образование биполярных взаимодействий между кинетохорами и микротрубочками фосфорилирует Cdc20, ингибирует работу APC/C, индуцирует переход от метафазы к анафазе; принимает участие в каспазозависимой митотической гибели клеток
<i>bubr1</i> ; 15q14; BubR1(Mad3), 120 кДа (серин/треонин киназа)	Взаимодействует с Bub3 и AF15q14; контролирует присоединение микротрубочек к кинетохорам; прямо связывается с Cdc20 и ингибирует активность APC/C
<i>bub3</i> ; 10q24—q26; Bub3 (Bub3), 37 кДа	Взаимодействует с Bub1 и BubR1; блокирует продвижение митоза после дисфункции микротрубочек
<i>mad1</i> ; 7pter—7p15; Mad1 (Mad1), 83 кДа	Локализуется в области ядерных пор и на кинетохорах, взаимодействует с Mad2
<i>mad2</i> ; 7pter—7p15; Mad2 (Mad2), 23 кДа	Локализуется в области ядерных пор и на кинетохорах, ассоциирует с Mad1; прямо связывается с Cdc20 и ингибирует активность APC/C
<i>mps1/ttk</i> ; 6q13—q21; Mps1 (Mps1), 97 кДа (серин/треонин- и тирозинкиназа)	Локализуется в области ядерных пор, центросом и на кинетохорах; контролирует сборку и дубликацию центросом; локализуется в области APC/C и участвует в его регуляции; вовлечен в регуляцию внутриклеточной локализации c-Abl, фосфорилирует его и повышает сродство c-Abl к 14-3-3

<sup>a</sup> Из работ: Chan et al., 1999; Campbell et al., 2001; Skoufias et al., 2001; Sudakin et al., 2001; Fisk et al., 2003; Liu et al., 2003; Maiato et al., 2004; Meraldi, Sorger, 2005; Tang et al., 2006; Kiyomitsu et al., 2007; Nihira et al., 2008.

*Bub* (*bub1*, *bubr1* и *bub3*), которые контролируют почкование у дрожжевых грибов, ингибируемое бензимидазолом, деполимеризующим микротрубочки и ген *mps1*, обеспечивающий работу митотического веретена деления клетки (Hoyt et al., 1991; Li, Murray, 1991; Wells et al., 1996). Белки, кодируемые генами КТВД, по своей структуре и выполняемой функции высококонсервативны. Их гомологи были также обнаружены у высших эукариот, включая человека (табл. 1). Обычно эти белки локализуются в области кинетохоров, в прицентромерных районах хромосом или в местах присоединения микротрубочек веретена деления к хромосомам, а также на полюсах клеток, в области центросом, где происходит формирование микротрубочек (Novak et al., 2002). Названные белки системы КТВД представляют собой внутриклеточные ферменты, обладающие только серин-треониновой киназной активностью (семейство генов *Bub* и *Mad*) или двойственной серин-треониновой и тирозиновой киназной активностью (ген *mps1* или *ttk*).

В нормальной клетке белки системы КТВД осуществляют контроль за правильным присоединением микротрубочек веретена деления к кинетохору и состоянием натяжения микротрубочек. Система КТВД защищает нормальные, неопухольевые, клетки от ошибок неправильного расхождения хромосом, приводящих к монотеличной и (или) синтетичной сегрегации хромосом во время анафазы митоза. В норме при возникновении дефектов в присоединении микротрубочек веретена деления к кинетохору система КТВД становится активированной и останавливает клеточный цикл. После активирования система КТВД запускает ингибирование белкового комплекса APC/C, или циклосомы, что приводит к накоплению в

клетке белка секурина. Секурин в свою очередь ингибирует работу фермента сепаразы, субстратом которого является когезин, что способствует сохранению сцепления между сестринскими хроматидами. Таким образом, ингибирование комплекса APC/C при участии системы КТВД блокирует дальнейшее прохождение анафазы митоза и тем самым предотвращает возникновение анеуплоидии. Следует отметить, что разъединение сестринских хроматид в анафазе происходит только тогда, когда все микротрубочки будут присоединены к своим кинетохорам.

Иногда возникают ситуации, когда работа системы КТВД не может быть восстановлена после длительной задержки митоза (Rieder, Maiato, 2004). В этом случае судьба нормальных, неопухольевых, клеток развивается по одному из трех возможных сценариев: одни клетки гибнут в митозе, некоторые выходят из митоза жизнеспособными, но гибнут благодаря апоптозу в G<sub>1</sub>, другие выходят из митоза жизнеспособными, но оказываются тетраплоидными и гибнут после вступления в следующий митоз. Появление дефектов в системе КТВД способствует развитию не только анеуплоидии, но и хромосомной нестабильности и, таким образом, является одной из причин возникновения рака и его прогрессии. При лейкозах такие дефекты или мутации обнаруживаются редко (табл. 2), по крайней мере они встречаются реже, чем при солидных опухолях, например в случае рака толстой кишки, легких или молочной железы у женщин, где частота встречаемости этих мутаций составляет не более 5 % (Cahill et al., 1998; Kors et al., 2005).

В настоящее время известны делеции в кодирующей области гена *bub1*, обуславливающей кинетохорную локализацию белка Bub1 в клетках млекопитающих, вклю-

Т а б л и ц а 2

## Изменения, приводящие к дисфункции генов контрольной точки веретена деления, развитию анеуплоидии и хромосомной нестабильности при лейкозах

Изменения	Ген	Характеристика	Лейкоз
Мутации генов КТВД	<i>bub1</i>	Миссенс-мутации Делеции в кинетохорном домене	Т-ОЛЛ (Ohshima et al., 2000) ОЛЛ, НХЛ (Arnautov, Dasso, 2003)  (ОЛЛ): MOLT3 и MOLT4A3; (ХМЛ): K562 (Ru et al., 2002)
	<i>bubr1</i>	Миссенс-мутации	Т-ОЛЛ (Ohshima et al., 2000)
	<i>mad1</i>	Точечные мутации	(Т-ОЛЛ): HOS, Ht161 и SJSA (Tsu-kasaki et al., 2001)
Экспрессия гена КТВД	<i>bub1</i>	Повышена Понижена	ХМЛ, БК, Ph+ (Nowicki et al., 2003) ОМЛ, FAB M2; ОМЛ, FAB M4 (Gal et al., 2006; Boyapati et al., 2007)
	<i>bubr1</i>		
	<i>mad1</i>	Повышена	ОЛЛ, пре-В-ОЛЛ (Andersson et al., 2005)
	<i>mad2</i>	»	
	<i>mps1</i>		ХМЛ, БК, Ph+ (Nowicki et al., 2003)
Активация онкогена	<i>BCR-ABL</i>	Повышен уровень экспрессии <i>bub1</i> , <i>mad1</i> и <i>mps1</i>	
	<i>AML1-ETO</i>	Понижен уровень экспрессии <i>bubr1</i>	ОМЛ, FAB M2 (Boyapati et al., 2007)
	<i>E2A-PBX1</i>	Повышен уровень экспрессии <i>mad1</i> и <i>mad2</i>	ОЛЛ, пре-В-ОЛЛ (Andersson et al., 2005)
Дисфункция опухолевого супрессора	<i>rb1</i>	Гиперметилирование	ОМЛ (Guo et al., 2000)
	<i>p53</i>	Точечные мутации	ОМЛ, FAB M4 (Gal et al., 2006)
Дупликация центросом	<i>mps1</i>	Амплификация центросом	ХМЛ, ОМЛ (Neben et al., 2004; Giehl et al., 2005)

Примечание. НХЛ — неходжкинская лимфома, ОЛЛ — острый лимфобластный лейкоз, Т-ОЛЛ — Т-клеточный лейкоз, ОМЛ — острый миелолейкоз, ХМЛ — хронический миелолейкоз, БК — бластный криз.

чая гемопоэтические клеточные линии человека (Ru et al., 2002). Эти делеции были выявлены в лейкозной клеточной линии K562, происходящей от больного хроническим миелолейкозом, а также в лимфоидных клеточных линиях человека MOLT3 и MOLT4A3. Аналогичные делеции были обнаружены у одного больного острым лимфобластным лейкозом и у двух больных, страдающих неходжкинской лимфомой (Arnautov, Dasso, 2003). Также известны миссенс-мутации генов *bub1* и *bubr1*. Они были выявлены только в группе больных, страдающих Т-клеточным лейкозом (Ohshima et al., 2000). По-видимому, мутации генов *bub1* и *bubr1* могут способствовать развитию лимфом и лейкозов с преимущественным вовлечением в опухолевый процесс клеток лимфоидного ряда. Однако проведение дополнительных экспериментов с включением в исследование большей выборки больных все же необходимо для подтверждения или отклонения этой гипотезы. Интересно отметить, что белок Bub1 может взаимодействовать *in vivo* с кинетохорным белком AF15q14, который ассоциирует с микротрубочками веретена деления, обеспечивая правильное расположение хромосом в метафазе, и, по-видимому, участвует в поддержании функционального состояния системы КТВД (Bogdanov, Takimoto, 2008; Kitagawa, Niikura, 2008). Хотя делеции гена *AF15q14* не были обнаружены до сих пор, только недавно стало известно о вовлечении этого гена в реципрокную

хромосомную транслокацию t(11;15)(q23;q11) вследствие слияния *AF15q14* и *MLL*. Это приводит к появлению химерного онкобелка MLL-AF15q14 у больных острым миелолейкозом (FAB M4) и Т-клеточным лейкозом (Hayette et al., 2000; Chinwalla et al., 2003; Kuefer et al., 2003).

В настоящее время белок AF15q14 рассматривается как одна из основных и возможных мишеней системы КТВД. Полагают, что Bub1 один или в комплексе с AF15q14 может активировать процессы, препятствующие индукции каспазозависимой митотической гибели опухолевых клеток (Tang et al., 2004; Kitagawa, Niikura, 2008). Понимание молекулярного механизма индукции каспазозависимого апоптоза особенно важно для создания лекарственных препаратов, способствующих гибели опухолевых клеток благодаря активированию системы КТВД.

Нарушение работы системы КТВД при лейкозах может быть связано не только с мутациями генов КТВД, но и с активацией онкогенов, приводящей как к изменениям в уровнях экспрессии генов КТВД, так и к изменениям во внутриклеточной локализации белков, кодируемых этими генами. Так, например, индукция онкогена *Tax* Т-лимфотропного вируса человека I типа (HTLV-I), вызывающего Т-клеточный лейкоз, приводит к анеуплоидии вследствие ингибирования функции белка Mad1 (Jin et al., 1998). Кроме того, было отмечено, что белки Mad1 и Mad2, обычно

локализуемые в ядре нормальной клетки, обнаруживаются исключительно в цитоплазме, в гемопоэтических клеточных линиях человека, трансформированных HTLV-I (Kasai et al., 2002). Механизм дислокации белков системы КТВД при Т-клеточном лейкозе остается неизвестным, тем не менее было показано, что такие опухолевые клетки склонны к повышенной анеуплоидии и устойчивы к ингибиторам сборки микротрубочек, например нокадазолу.

Также известен белок AЕtr, вызывающий лейкоз у мышей и почти идентичный онкобелку AML1-ЕТО у больных острым миелолейкозом (FAB M2) с хромосомной транслокацией t(8;21)(q22;q22), теряющий 200 аминокислот на С-конце AML1-ЕТО (Воуарати et al., 2007). Показано, что AЕtr ослабляет работу системы КТВД и приводит к снижению экспрессии гена *bub1* в AЕtr-позитивных лейкозных клетках. Следует также отметить, что пониженная экспрессия гена *bub1* была обнаружена в опухолевых клеточных линиях Kasumi-1 и SKNO-1, происходящих от больных острым миелолейкозом (FAB M2; t(8;21)). Полагают, что такое изменение экспрессии *bub1* приводит к потере сцепления между сестринскими хроматидами в метафазе и способствует развитию анеуплоидии.

У больных разными формами лейкоза экспрессия генов системы КТВД может быть как понижена, так и повышена. По-видимому, это изменение экспрессии связано со степенью злокачественности лейкозного клона, активацией некоторых онкогенов, плохим прогнозом заболевания, низкой выживаемостью, а также высоким риском развития рецидива. Так, у больных острым миелолейкозом (FAB M2 и M4), у которых в периферической крови регистрируют преобладание популяции незрелых стволовых клеток CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> над их дифференцированной копией CD34<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup>, экспрессия генов системы КТВД *bub1* и *bub1* значительно понижена (Gal et al., 2006). У больных хроническим миелолейкозом (Ph<sup>+</sup> и *bcr-abl*<sup>+</sup>), находящихся на терминальной стадии развития болезни — бластный криз, у которых нарушена клеточная дифференцировка, экспрессия генов *bub1*, *mad2* и *mps1* была, напротив, повышена (Nowicki et al., 2003). В группе больных детей острым лимфобластным лейкозом с высоким риском развития рецидива, у которых были обнаружены хромосомная транслокация t(1;19)(q23;p13) и химерный ген *E2A-PBX1*, экспрессия генов КТВД *mad2* и *mad1* была также повышена (Andersson et al., 2005). У всех перечисленных больных лейкозом оценка экспрессии генов КТВД была выполнена с использованием метода микрочипов.

Механизмы, лежащие в основе изменения экспрессии генов системы КТВД, остаются неизвестными до настоящего времени. Однако по повышению экспрессии генов КТВД, в частности за их сверхэкспрессию, могут отвечать мутационные или эпигенетические изменения в некоторых опухолевых супрессорах. Это в конечном итоге может приводить к ослаблению функции генов КТВД. Несмотря на то что сверхэкспрессия генов КТВД при лейкозах до сих пор не обнаружена, она была выявлена для широкого спектра солидных опухолей у человека: рака почек (*bub1* и *bub1*), рака щитовидной железы (*bub1*), рака желудка (*bub1*, *bub1* и *bub3*), а также для опухолей разных органов и тканей у мыши (Grabsch et al., 2003; Shigeishi et al., 2006; Sotillo et al., 2007; Pinto et al., 2008). Следует отметить, что трансгенные линии мышей, у которых повышенная экспрессия гена *mad2* была подтверждена,

оказались склонными к развитию опухолей печени и легких, различных сарком и лимфом, причем опухолевые клетки лимфомы этих мышей, сверхэкспрессирующие *mad2* и характеризующиеся повышенной агрессивностью, а также высоким риском развития анеуплоидии, несли мутацию гена *rb1*, кодирующего белок ретинобластомы pRb. Несмотря на отсутствие мутаций гена *rb1* у больных В-клеточным лейкозом и острым миелолейкозом, у них было выявлено повышенное метилирование промоторной области этого гена (Guo et al., 2000). Также следует отметить, что у больных хроническим миелолейкозом частота встречаемости мутаций гена *rb1* крайне редка, а о метилировании промотора этого гена до сих пор ничего неизвестно. Однако показано, что у этой группы больных существенную роль в ингибировании митоза играет статус фосфорилирования белка ретинобластомы, который находится под контролем тирозинкиназы c-Abl (Nagano et al., 2006).

Известно, что белок pRb может ассоциировать с микротрубочками веретена деления во время митоза, а также взаимодействовать с кинетохорными белками Ndc80 и AF15q14/D40 (Thomas et al., 1996; Zheng et al., 2000; Bogdanov, Takimoto, 2008). Это комплексное образование при участии pRb определяет правильное расположение хромосом в метафазе и обеспечивает точную сегрегацию сестринских хроматид в анафазе. Недавно было обнаружено, что pRb может также взаимодействовать с транскрипционным фактором E2F, участвующим в регуляции экспрессии генов КТВД (Polager et al., 2002). В опухолевых клетках фосфорилирование белка ретинобластомы приводит к освобождению фактора E2F и его активации, что, как полагают, инициирует сверхэкспрессию *mad2* и способствует возникновению анеуплоидии и хромосомной нестабильности (Hernando et al., 2004). Следует отметить, что статус фосфорилирования белка pRb, определяющий сродство между pRb и E2F, вовлекается не только в регуляцию экспрессии генов системы КТВД, но также в дубликацию центросом и репликацию ДНК (Meraldi et al., 1999). По-видимому, нарушение функции другого опухолевого супрессора, в частности гена *p53*, может также приводить к ослаблению работы системы КТВД при лейкозах. По крайней мере, у больных острым миелолейкозом (FAB M4, Ph<sup>-</sup>) с deregулируемой экспрессией генов КТВД мутации гена *p53* были недавно обнаружены (Gal et al., 2006).

С другой стороны, снижение экспрессии генов системы КТВД может быть обусловлено изменением уровня метилирования промоторных областей самих генов КТВД. Так, известны случаи, когда гиперметилирование промоторных последовательностей генов КТВД *mad2* и *bub1* приводит к понижению их экспрессии при карциноме печени и раке толстой кишки (Jeong et al., 2004; Park et al., 2007). Хотя о метилировании генов системы КТВД при лейкозах до сих пор ничего неизвестно, недавно появились данные о гиперметилировании промоторной области гена *rb1*, роль которого в регуляции экспрессии генов КТВД не вызывает сомнения. В частности, у больных острым миелолейкозом было обнаружено значительное гиперметилирование промотора этого гена (Guo et al., 2000).

Немалую роль в процессе возникновения анеуплоидии и хромосомной нестабильности играют также нарушения, связанные с дубликацией центросом. Известно, что центросомы локализуются на полюсах клетки, где инициируется процесс формирования микротрубочек ве-

ретена деления. Каждая centrosoma состоит из пары центриолей, окруженных перичентриольной субстанцией. В нормальной, неопухолевой, клетке эта органелла дублируется только 1 раз в течение S-фазы клеточного цикла. Во время клеточного деления обе centrosomas ассоциируют с микротрубочками веретена деления на противоположных полюсах клетки и обеспечивают bipolarность митотического веретена. Centrosomas и система КТВД взаимосвязаны друг с другом и, по-видимому, совместно участвуют в регуляции клеточного деления. В пролиферирующих клетках процессы дубликации centrosom и репликации ДНК, зависящие от статуса фосфорилирования pRb и требующие участия транскрипционных факторов E2F и Cdk2, скоординированы. Отставание одного процесса от другого неизбежно приводит к изменению ploidy, образованию монополярного или мультиполярного веретена деления и как следствие — к нарушению сегрегации хромосом. Дубликация centrosom, как известно, осуществляется под контролем *mps1*, который отвечает за сборку centrosom, с одной стороны, и участвует в регуляции работы микротрубочек веретена деления — с другой (Jones et al., 1999; Castillo et al., 2002). Следует отметить, что белок Mps1 локализуется в области centrosom во время интерфазы и ассоциирует с кинетохорным комплексом во время метафазы и анафазы (Winey, Huneucutt, 2002; Jones et al., 2005). По-видимому, такая локализация объясняется двойственной киназной активностью белка Mps1 и необходима как для инициации формирования centrosom, так и для регуляции работы микротрубочек веретена деления во время сегрегации хромосом.

В отличие от дефектов в работе системы КТВД, происходящих, как правило, на поздних стадиях развития рака или в период его прогрессии, нарушения дубликации centrosom, приводящие к их амплификации, встречаются как на поздних стадиях, так и в начальный период онкогенеза. Так, в группе больных хроническим миелолейкозом, находящихся в начале заболевания, выявляемая амплификация centrosom может приводить к возникновению анеуплоидии и развитию терминальной фазы болезни, бластного криза (Giehl et al., 2005). У больных острым миелолейкозом изменение количества centrosom, приводящее к возникновению анеуплоидии, обнаруживается как в начале заболевания, так и во время его прогрессии (Neben et al., 2004). Недавно было также высказано предположение о том, что амплификация centrosom у больных миелодиспластическим синдромом и апластической анемией, по-видимому, может способствовать возникновению популяции анеуплоидных клеток и предшествовать развитию лейкоза (Kearns et al., 2004). Другие исследователи считают, что появление в клетке более чем двух centrosom, по-видимому, является нормальным и неслучайным событием (Brinkley, 2001). Как правило, большая часть таких centrosom, образовавшихся в ходе дубликации, оказывается неспособной выполнять свою основную функцию. Однако в ходе серии последовательных слияний таких centrosom в каждой отдельно взятой клетке остаются только две функционирующие centrosomas, которые способствуют нормальному прохождению митоза.

Таким образом, нарушения функции генов КТВД, контролирующих работу микротрубочек как в прицентромерных районах хромосом (в области кинетохоров), так и на полюсах клеток (в области centrosom), приводят к возникновению анеуплоидии и хромосомной нестабильности. При лейкозах эти дефекты могут быть обусловле-

ны мутационными или эпигенетическими изменениями генов КТВД (*bub1*, *bubr1*, *bub3*, *mad1*, *mad2* и *mps1*) и генов *rb1* и *p53*, кодирующих опухолевые супрессоры pRb и p53, а также активацией онкогенов (*Tax*, *AML1-ETO*, *BCR-ABL* и *E2A-PBX1*). Система КТВД защищает нормальные, неопухолевые, клетки от ошибок неправильного расхождения хромосом. Длительная задержка митоза в этих клетках приводит к супрессии генов КТВД и их последующей неминуемой гибели. В опухолевых клетках система КТВД deregulirovana, что приводит к ингибированию каспазезависимой митотической гибели, находящейся под контролем p73, EndoG, Bub1. Однако даже в таких условиях система КТВД может быть снова активирована и способна вызывать задержку митоза. Для этого требуется наличие в опухолевой клетке хотя бы минимального количества белка Bub1. Так, недавно было показано, что действие некоторых микротрубочковых модуляторов, приводящих к активированию Bub1, возможно, при участии AF15q14 может приводить к остановке митоза и способствовать каспазезависимой митотической гибели опухолевых клеток (Niikura et al., 2007; Kitagawa, Niikura, 2008).

Таким образом, поиск путей, ведущих к восстановлению угнетенной функции системы КТВД при лейкозах и препятствующих развитию анеуплоидии и хромосомной нестабильности, поможет прояснить механизмы ответственные за опухолевую прогрессию, и разработать новые направления в терапии, способствующие торможению или остановке опухолевого роста.

#### Список литературы

- Amikam D., Henig C., Carter A., Sharoti R., Beti-Ishai Z. 1995. A correlation between the expression of the bcr-abl chimeric gene and severity of the clinical state of CML patients with time. *Scand. J. Immunol.* 41 : 529—533.
- Andersson A., Olofsson T., Lindgren D., Nilsson B., Ritz C., Eden P., Lassen C., Rade J., Fontes M., Morse H., Heldrup J., Behrendtz M., Mitelman F., Hoglund M., Johansson B., Fioretos T. 2005. Molecular signatures in childhood acute leukemia and their correlations to expression patterns in normal hematopoietic subpopulations. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 102 : 19 069—19 074.
- Arnaoutov A., Dasso M. 2003. The Ran GTPase regulates kinetochore function. *Dev. Cell.* 5 : 99—111.
- Bartram C. R. 1993. Application of molecular genetics to diagnosis in leukaemia. *Haematology trends*'93. 280—296.
- Bogdanov K. V., Takimoto M. 2008. Involvement of c-Abl and D40 (AF15Q14/CASC5) proteins in the regulation of cell proliferation and cancer. *Cell Tissue Biol.* 2 : 354—359.
- Boyapati A., Yan M., Peterson L.F., Biggs J.R., Le Beau M.M., Zhang D.E. 2007. A leukemia fusion protein attenuates the spindle checkpoint and promotes aneuploidy. *Blood.* 109 : 3963—3971.
- Brinkley B. R. 2001. Managing the centrosome numbers game: from chaos to stability in cancer cell division. *Trends Cell Biol.* 11 : 18—21.
- Cahill D. P., Lengauer C., Yu J., Riggins G. J., Willson J. K., Markowitz S. D., Kinzler K. W., Vogelstein B. 1998. Mutations of mitotic checkpoint genes in human cancers. *Nature.* 392: 300—303.
- Campbell M. S., Chan G. K., Yen T. J. 2001. Mitotic checkpoint proteins HsMAD1 and HsMAD2 are associated with nuclear pore complexes in interphase. *J. Cell Sci.* 114 : 953—963.
- Castillo A. R., Meehl J. B., Morgan G., Schutz-Geschwendter A., Winey M. 2002. The yeast protein kinase Mps1p is required for assembly of the integral spindle pole body component Spc42p. *J. Cell Biol.* 156 : 453—465.
- Chan G. K., Jablonski S. A., Sudakin V., Hittle J. C., Yen T. J. 1999. Human BUBR1 is a mitotic checkpoint kinase that monitors

- CENP-E functions at kinetochores and binds the cyclosome/APC. *J Cell Biol.* 146 : 941—954.
- Chinwalla V., Chien A., Odero M., Neilly M. B., Zeleznik-Le N. J., Rowley J. D. 2003. A t(11;15) fuses MLL to two different genes, AF15q14 and a novel gene MPFYVE on chromosome 15. *Oncogene.* 22 : 1400—1410.
- Emambokus N., Vegiopoulos A., Harman B., Jenkinson E., Anderson G., Frampton J. 2003. Progression through key stages of haemopoiesis is dependent on distinct threshold levels of c-Myb. *EMBO J.* 22 : 4478—4488.
- Fisk H. A., Mattison C. P., Winey M. 2003. Human Mps1 protein kinase is required for centrosome duplication and normal mitotic progression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 100 : 14 875—14 880.
- Gal H., Amariglio N., Trakhtenbrot L., Jacob-Hirsh J., Margalit O., Avigdor A., Nagler A., Tavor S., Ein-Dor L., Lapidot T., Domany E., Rechavi G., Givol D. 2006. Gene expression profiles of AML derived stem cells; similarity to hematopoietic stem cells. *Leukemia.* 20 : 2147—2154.
- Giehl M., Fabarius A., Frank O., Hochhaus A., Hafner M., Hehlmann R., Seifarth W. 2005. Centrosome aberrations in chronic myeloid leukemia correlate with stage of disease and chromosomal instability. *Leukemia.* 19 : 1192—1197.
- Grabsch H., Takeno S., Parsons W.J., Pomjanski N., Boecking A., Gabbert H.E., Mueller W. 2003. Overexpression of the mitotic checkpoint genes BUB1, BUBR1, and BUB3 in gastric cancer-association with tumour cell proliferation. *J. Pathol.* 200 : 16—22.
- Guo S. X., Taki T., Ohnishi H., Tabuchi K., Bessho F., Hanada R., Yanagisawa M., Hayashi Y. 2000. Hypermethylation of p16 and p15 genes and RB protein expression in acute leukemia. *Leukemia Res.* 24 : 39—46.
- Hayette S., Tigaud I., Vanier A., Martel S., Corbo L., Charrier C., Beillard E., Deleage G., Magaud J.P., Rimokh R. 2000. AF15q14, a novel partner gene fused to the MLL gene in an acute myeloid leukaemia with a t(11;15)(q23;q14). *Oncogene.* 19 : 4446—4450.
- Hernando E., Nahlú Z., Juan G., Diaz-Rodriguez E., Alaminos M., Hemann M., Michel L., Mittal V., Gerald W., Benzra R., Lowe S. W., Cordon-Cardo C. 2004. Rb inactivation promotes genomic instability by uncoupling cell cycle progression from mitotic control. *Nature.* 430 : 797—802.
- Hoyt M. A., Totis L., Roberts B. T. 1991. *Saccharomyces cerevisiae* genes required for cell cycle arrest in response to loss of microtubule function. *Cell.* 66 : 507—517.
- Jeong S. J., Shin H. J., Kim S. J., Ha G. H., Cho B. I., Baek K. H., Kim C. M., Lee C. W. 2004. Transcriptional abnormality of the hSMAD2 mitotic checkpoint gene is a potential link to hepatocellular carcinogenesis. *Cancer Res.* 64 : 8666—8673.
- Jin D. Y., Spencer F., Jeang K. T. 1998. Human T cell leukemia virus type 1 oncoprotein Tax targets the human mitotic checkpoint protein MAD1. *Cell.* 93 : 81—91.
- Jones M. H., Bachant J. B., Castillo A. R., Giddings T. H. J., Winey M. 1999. Yeast Dam1p is required to maintain spindle integrity during mitosis and interacts with the Mps1p kinase. *Mol. Biol. Cell.* 10 : 2377—2391.
- Jones M. H., Huneycutt B. J., Pearson C. G., Zhang C., Morgan G., Shokat K., Bloom K., Winey M. 2005. Chemical genetics reveals a role for Mps1 kinase in kinetochore attachment during mitosis. *Curr. Biol.* 15 : 160—165.
- Kasai T., Iwanaga Y., Iha H., Jeang K. T. 2002. Prevalent loss of mitotic spindle checkpoint in adult T-cell leukemia confers resistance to microtubule inhibitors. *J. Biol. Chem.* 277 : 5187—5193.
- Kearns W. G., Yamaguchi H., Young N. S., Liu J. M. 2004. Centrosome amplification and aneuploidy in bone marrow failure patients. *Genes Chromosomes Cancer.* 40 : 329—333.
- Kitagawa K., Niikura Y. 2008. Caspase-independent mitotic death (CIMD). *Cell Cycle.* 7 : 1001—1005.
- Kiselev F. L. 1985. Malignant cell transformation and oncogenes. *Genetika.* 21 : 885—895.
- Kiyomitsu T., Obuse C., Yanagida M. 2007. Human Blinikin/AF15q14 is required for chromosome alignment and the mitotic checkpoint through direct interaction with Bub1 and BubR1. *Develop. Cell.* 3 : 663—676.
- Kops G. J., Weaver B. A., Cleveland D. W. 2005. On the road to cancer: aneuploidy and the mitotic checkpoint. *Nat. Rev. Cancer.* 5 : 773—785.
- Kuefer M. U., Chinwalla V., Zeleznik-Le N. J., Behm F. G., Nave C. W., Rakestraw K. M., Mukatira S. T., Raimondi S. C., Morris S. W. 2003. Characterization of the MLL partner gene AF15q14 involved in t(11;15)(q23;q14). *Oncogene.* 22 : 1418—1424.
- Li R., Murray A. W. 1991. Feedback control of mitosis in budding yeast. *Cell.* 66 : 519—531.
- Liu S. T., Chan G. K., Hittle J. C., Fujii G., Lees E., Yen T. J. 2003. Human MPS1 kinase is required for mitotic arrest induced by the loss of CENP-E from kinetochores. *Mol. Biol. Cell.* 14 : 1638—1651.
- Maiato H., DeLuca J., Salmon E. D., Earnshaw W. C. 2004. The dynamic kinetochore-microtubule interface. *J. Cell Sci.* 117 : 5461—5477.
- Meraldi P., Lukas J., Fry A.M., Bartek J., Nigg E. A. 1999. Centrosome duplication in mammalian somatic cells requires E2F and Cdk2-cyclin A. *Nat. Cell Biol.* 1 : 88—93.
- Meraldi P., Sorger P. K. 2005. A dual role for Bub1 in the spindle checkpoint and chromosome congression. *EMBO J.* 24 : 1621—1633.
- Nagano K., Itagaki C., Izumi T., Nunomura K., Soda Y., Tani K., Takahashi N., Takenawa T., Isobe T. 2006. Rb plays a role in survival of Abl-dependent human tumor cells as a downstream effector of Abl tyrosine kinase. *Oncogene.* 25 : 493—502.
- Neben K., Tews B., Wrobel G., Hahn M., Kokocinski F., Giesecke C., Krause U., Ho A. D., Kramer A., Lichter P. 2004. Gene expression patterns in acute myeloid leukemia correlate with centrosome aberrations and numerical chromosome changes. *Oncogene.* 23 : 2379—2384.
- Nevisani P., Santhanam R., Trotta R., Notari M., Blaser B. W., Liu S., Mao H., Chang J. S., Galiotta A., Uttam A., Roy D. C., Valtieri M., Bruner-Klisovic R., Caligiuri M. A., Bloomfield C. D., Marcucci G., Perrotti D. 2005. The tumor suppressor PP2A is functionally inactivated in blast crisis CML through the inhibitory activity of the BCR/ABL-regulated SET protein. *Cancer Cell.* 8 : 355—368.
- Nichols J., Nimer S. D. 1992. Transcription factors, translocations and leukemia. *Blood.* 80 : 2953—2963.
- Nihira K., Taira N., Miki Y., Yoshida K. 2008. TTK/Mps1 controls nuclear targeting of c-Abl by 14-3-3-coupled phosphorylation in response to oxidative stress. *Oncogene.* 27 : 7285—7295.
- Niikura Y., Dixit A., Scott R., Perkins G., Kitagawa K. 2007. BUB1 mediation of caspase-independent mitotic death determines cell fate. *J. Cell Biol.* 178 : 283—296.
- Novak B., Sible J. C., Tyson J. J. 2002. Checkpoints in the cell cycle. In: *Encyclopedia of life sciences.* Macmillan Publ. Ltd. Nature Publ. Group. 1—8.
- Nowicki M. O., Pawlowski P., Fischer T., Hess G., Pawlowski T., Skorski T. 2003. Chronic myelogenous leukemia molecular signature. *Oncogene.* 22 : 3952—3963.
- Ohshima K., Haraoka S., Yoshioka S., Hamasaki M., Fujiki T., Suzumiya J., Kawasaki C., Kanda M., Kikuchi M. 2000. Mutation analysis of mitotic checkpoint genes (hBUB1 and hBUBR1) and microsatellite instability in adult T-cell leukemia/lymphoma. *Cancer Lett.* 158 : 141—150.
- Park H. Y., Jeon Y. K., Shin H. J., Kim I. J., Kang H. C., Jeong S. J., Chung D. H., Lee C. W. 2007. Differential promoter methylation may be a key molecular mechanism in regulating BubR1 expression in cancer cells. *Exp. Mol. Med.* 39 : 195—204.
- Pinto M., Vieira J., Ribeiro F. R., Soares M. J., Henrique R., Oliveira J., Jerynimo C., Teixeira M. R. 2008. Overexpression of the mitotic checkpoint genes BUB1 and BUBR1 is associated with genomic complexity in clear cell kidney carcinomas. *Cell Oncol.* 30 : 389—395.
- Polager S., Kalma Y., Berkovich E., Ginsberg D. 2002. E2Fs up-regulate expression of genes involved in DNA replication, DNA repair and mitosis. *Oncogene.* 21 : 437—446.

- Rieder C. L., Maiato H. 2004. Stuck in division or passing through: what happens when cells cannot satisfy the spindle assembly checkpoint. *Develop. Cell.* 7 : 637—651.
- Ru H. Y., Chen R. L., Lu W. C., Chen J. H. 2002. hBUB1 defects in leukemia and lymphoma cells. *Oncogene.* 21 : 4673—4679.
- Sawyers C. L. 1993. Molecular consequences of the bcr-abl translocation in chronic myeloid leukemia. *Leukemia and Lymphoma.* 11 : 101—103.
- Sawyers C. L., Denny C. T., Witte O. N. 1991. Leukemia and the disruption of normal hematopoiesis. *Cell.* 64 : 337—350.
- Shigeishi H., Yoneda S., Taki M., Nobumori T., Ohta K., Higashikawa K., Yasui W., Kamata N. 2006. Correlation of human Bub1 expression with tumor-proliferating activity in salivary gland tumors. *Oncol. Rep.* 15 : 933—938.
- Skouftas D. A., Andreassen P. R., Lacroix F. B., Wilson L., Margolis R. L. 2001. Mammalian mad2 and bub1/bubR1 recognize distinct spindle-attachment and kinetochore-tension checkpoints. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 98 : 4492—4497.
- Sotillo R., Hernando E., Dyaz-Rodriguez E., Teruya-Feldstein J., Cordyn-Cardo C., Lowe S. W., Benezra R. 2007. Mad2 overexpression promotes aneuploidy and tumorigenesis in mice. *Cancer Cell.* 11 : 9—23.
- Sudakin V., Chan G.K., Yen T.J. 2001. Checkpoint inhibition of the APC/C in HeLa cells is mediated by a complex of BUBR1, BUB3, CDC20, and MAD2. *J. Cell. Biol.* 154 : 925—936.
- Tang Z., Shu H., Oncel D., Chen S., Yu H. 2004. Phosphorylation of Cdc20 by Bub1 provides a catalytic mechanism for APC/C inhibition by the spindle checkpoint. *Mol. Cell.* 16 : 387—397.
- Tang Z., Shu H., Qi W., Mahmood N. A., Mumby M. C., Yu H. 2006. PP2A is required for centromeric localization of Sgo1 and proper chromosome segregation. *Develop. Cell.* 10 : 575—585.
- Thomas R. C., Edwards M. J., Marks R. 1996. Translocation of the retinoblastoma gene product during mitosis. *Exp. Cell Res.* 223 : 227—232.
- Topisirovic I., Guzman M. L., McConnell M. J., Licht J. D., Culjkovic B., Neering S. J., Jordan C. T., Borden K. L. 2003. Aberrant eukaryotic translation initiation factor 4E-dependent mRNA transport impedes hematopoietic differentiation and contributes to leukemogenesis. *Mol. Cell. Biol.* 23 : 8992—9002.
- Tsukasaki K., Miller C. W., Greenspun E., Eshaghian S., Kawabata H., Fujimoto T., Tomonaga M., Sawyers C., Said J. W., Koefler H. P. 2001. Mutations in the mitotic check point gene, MAD1L1, in human cancers. *Oncogene.* 20 : 3301—3305.
- Wells W. A., Murray A. W. 1996. Aberrantly segregating centromeres activate the spindle assembly checkpoint in budding yeast. *J. Cell Biol.* 133 : 75—84.
- Winey M., Huneycutt B. J. 2002. Centrosomes and checkpoints: the MPS1 family of kinases. *Oncogene.* 21 : 6161—6169.
- Zheng L., Chen Y., Riley D. J., Chen P. L., Lee W. H. 2000. Retinoblastoma protein enhances the fidelity of chromosome segregation mediated by hHec1p. *Mol. Cell. Biol.* 20 : 3529—3537.

Поступила 27 IV 2009

#### SIGNIFICANCE OF MITOTIC SPINDLE CHECKPOINT GENES IN LEUKEMIA

K. V. Bogdanov

I. P. Pavlov St. Petersburg State Medical University;  
e-mail: bogdanov\_konstantin@yahoo.co.uk

Leukemia is a clonal proliferative disorder of the multipotent hematopoietic stem cells that leads to abnormal cell growth and (or) differentiation. The hallmark of the disease is the presence of oncogene expression in bone marrow or peripheral blood as a result of some chromosome translocations. The development of leukemia with transfer to disease progression presents a multistage process implicating series of molecular changes leading to chromosomal instability and aneuploidy. The most possible of these changes include the followings: appearance of additional chromosome translocations, activation of other not previously expressed oncogenes, loss of tumor suppressor genes, abnormal centrosome duplication, and dysfunction of the genes which coordinate the accurate chromosome alignment and chromosome segregation during mitosis. The two latter molecular changes which are controlled by mitotic spindle checkpoints play the role in leukemogenesis and are probably involved in apoptosis.

Key words: mitotic spindle checkpoint, mitosis, dysfunction, leukemia, tumor progression.