

На правах рукописи

ШУМИЛОВА СВЕТЛАНА ВИКТОРОВНА

**МАТРИЧНАЯ РНК БЕЛКОВ СИСТЕМЫ
«ИНТЕРЛЕЙКИН-2 – РЕЦЕПТОР ИНТЕРЛЕЙКИНА-2»
В ОПУХОЛЕВЫХ ОЧАГАХ
03.01.04 – биохимия**

**Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук**

**Нижний Новгород
2012**

Работа выполнена в ФГБОУ ВПО «Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского».

Научный руководитель:

кандидат биологических наук, доцент Г.А. Кравченко

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук, профессор К.Н. Конторщикова

доктор медицинских наук С.Н. Лавровский

Ведущая организация:

Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина РАМН,

г. Москва

Защита состоится «___» _____ года в ___ часов на заседании диссертационного совета Д 212.166.15 при Нижегородском государственном университете им. Н.И. Лобачевского по адресу: 603950, Нижний Новгород, пр. Гагарина, 23.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ННГУ

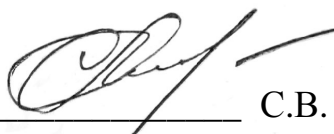
им. Н.И. Лобачевского

Автореферат разослан «___» _____ 2012 года

Ученый секретарь

диссертационного совета,

кандидат биологических наук, доцент



С.В. Копылова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

Понимание фундаментальных биохимических процессов, лежащих в основе канцерогенеза, является необходимым звеном в борьбе с онкологическими заболеваниями. Возникающие в ходе канцерогенеза мутации приводят к глубоким изменениям транскриптома (совокупности РНК) опухолевых клеток. Изменения характерны чаще всего для транскриптов генов, кодирующих белки, участвующие в передаче внутриклеточных и межклеточных сигналов, биохимических механизмах прохождения по клеточному циклу. Так, в опухолевых клетках обнаруживаются матричные РНК, кодирующие белки системы «интерлейкин-2 – рецептор интерлейкина-2» («IL-2 – IL-2R»), которая является одним из ключевых звеньев в активации и пролиферации иммунокомпетентных клеток (Новиков В.В., 2010).

Система «IL-2 – IL-2R» наряду с IL-2 включает три белковые субъединицы его рецептора, кодируемые разными генами (IL-2RA, IL-2RB, IL-2RG) и синтезируемые на разных мРНК. Решающую роль в запуске системы играет альфа-субъединица рецептора интерлейкина-2 (IL-2R α). Известно, что высокая экспрессия IL-2R α в неопластических клетках приводит к повышению их пролиферативной, трансформирующей активности, устойчивости к лекарственным препаратам и коррелирует с плохим прогнозом для пациента (Kuhn D., Dou Q., 2005). Показано существование ряда альтернативных форм матричной РНК альфа-субъединицы IL-2R (CD25, CD25Exo4Del, CD25Exo4-5Del и др.) (Cosman D., 1984; Choi S., 1997). Они кодируют белки, которые могут выполнять различные функции, влияя на связывание IL-2 с рецептором и, как следствие, на развитие опухоли и на механизмы противоопухолевого иммунитета.

Изменения в транскриптоме опухолевых клеток могут происходить как за счет включения или выключения гена в целом, так и на уровне альтернативного сплайсинга пре-матричной РНК. Изучение связанных с многообразием мРНК системы «IL-2 – IL-2R» изменений транскриптома клеток опухолевых очагов при развитии новообразований позволит расширить представления о биохимических основах опухолевого роста.

Цель работы

Изучение особенностей транскриптома клеток опухолевых очагов, связанных с многообразием мРНК системы «IL-2 – IL-2R», в сопоставлении с картиной опухолевого роста.

Задачи

1. Разработать метод одновременной детекции трех альтернативных форм мРНК альфа-субъединицы рецептора интерлейкина-2 и методы идентификации мРНК интерлейкина-2, а также бета- и гамма-субъединиц рецептора интерлейкина-2.
2. Провести анализ частоты выявления трех альтернативных форм мРНК IL-2R α в опухолевых очагах больных раком толстого кишечника (РТК), раком легкого (РЛ) и раком тела матки (РТМ).
3. Оценить частоту определения мРНК интерлейкина-2, а также бета- и гамма-субъединиц рецептора интерлейкина-2 в опухолевых очагах больных раком тела матки.
4. Сопоставить картину экспрессии генов системы «IL-2 – IL-2R» в клетках опухолевых очагов со встречаемостью мРНК раково-тестикулярных белков, мРНК белков ICAM-1, CD38 и Fas, с картиной опухолевого роста и показателями иммунитета.
5. Исследовать наличие мРНК белков системы «IL-2 – IL-2R» в клетках перевиваемых линий.

Научная новизна работы

Впервые разработан метод одновременной детекции трех альтернативных форм мРНК альфа-субъединицы рецептора интерлейкина-2 человека с использованием ОТ-ПЦР.

Впервые показано присутствие сплайсированного варианта мРНК IL-2R α CD25Exo4-5Del в периферической крови здоровых добровольцев и установлена первичная структура данной мРНК.

Впервые продемонстрировано присутствие альтернативных форм мРНК IL-2R α CD25Exo4Del и CD25Exo4-5Del в опухолевых очагах больных РТК, РЛ, РТМ и периферической крови онкологических больных. Чаще всего в опухолевых очагах обнаруживается полноразмерная форма мРНК IL-2R α , а затем в порядке убывания мРНК CD25Exo4Del и CD25Exo4-5Del. Такая закономерность продемонстрирована для онкологических больных,

находящихся на разных стадиях заболевания, с метастазами и без метастазов, с разной локализацией и гистологической формой опухоли.

Показано, что альтернативные варианты мРНК CD25, CD25Exo4Del, CD25Exo4-5Del встречаются в опухолевых очагах при РТК чаще, чем при РТМ.

Впервые исследованы особенности транскриптома клеток опухолевых очагов в сравнении со встречаемостью альтернативных форм мРНК IL-2R α . При РТК показано, что транскриптом клеток опухолевых очагов, характеризующийся присутствием мРНК mFas, Fas del 5, Fas del 3,4, sFas, Fas del 4,6, Fas del 3,4,6, CD38, GAGE1-8, PAGE1, SSX1,2,4, NY-ESO-1, MAGEA1-6, статистически значимо чаще содержал мРНК полноразмерной формы CD25, нежели мРНК CD25Exo4-5Del. Кроме того, мРНК полноразмерной формы CD25 достоверно чаще, в сравнении с мРНК CD25Exo4-5Del, обнаруживается при отсутствии в опухолевых очагах мРНК Fas del 4, Fas del 4,6, Fas del 5, Fas del 3,4,6, CD38Exo3Del, sICAM-1, GAGE1-8, CT7, XAGE1, SSX1,2,4, NY-ESO-1. Форма мРНК CD25Exo4-5Del, в сравнении с мРНК CD25Exo4Del, выявляется реже в Fas del 5 и Fas del 3,4-позитивных и CD38Exo3Del-негативных опухолевых очагах.

Впервые установлено, что в опухолевых очагах больных РТК мРНК CD25Exo4Del встречается чаще совместно с мРНК SSX1,2,4, а мРНК CD25Exo4-5Del детектируется чаще совместно с мРНК ICAM-1.

При РЛ впервые показано, что мРНК CD25Exo4-5Del в опухолевых очагах чаще детектируется совместно с мРНК XAGE1 и SSX1,2,4, а метастазирование в 2 раза реже сопровождается присутствием в опухолевых очагах мРНК CD25Exo4-5Del.

Впервые обнаружено, что особенности экспрессии гена IL-2RA, связанные с продукцией альтернативных форм мРНК в опухолевых очагах больных РТК, не отражаются на сывороточном содержании растворимых дифференцировочных молекул CD25, являющихся продуктом посттрансляционной модификации белка.

В опухолевых очагах больных раком тела матки впервые зафиксирована экспрессия генов IL-2RA, IL-2RB, IL-2RG. Присутствие мРНК бета-субъединицы IL-2R показано в 100% случаев, мРНК IL-2, альфа-субъединицы IL-2R и гамма-субъединицы IL-2R обнаруживаются с частотой от 57 до 87%.

Впервые показано, что относительное содержание CD4⁺, CD8⁺, CD25⁺ и CD95⁺ мононуклеарных клеток крови больных РТМ и сывороточное

содержание растворимых молекул CD25 не меняется при наличии или отсутствии альтернативных форм мРНК IL-2R α в опухолевых очагах.

Присутствие в опухолевых очагах больных РТМ мРНК IL-2 как правило сопровождается наличием мРНК трех субъединиц его рецептора, кодирующих полноценную систему «интерлейкин-2 – его рецептор».

Впервые продемонстрировано, что наличие мРНК всех четырех генов системы «IL-2 – IL-2R» в опухолевых очагах больных РТМ сопровождается сниженным сывороточным содержанием растворимых молекул ICAM-1. В отсутствие экспрессии хотя бы одного из данных генов повышается сывороточная концентрация растворимых молекул CD25, что свидетельствует о развитии иммунного ответа на опухоль.

Впервые охарактеризован профиль экспрессии генов системы «IL-2 – IL-2R» в клетках перевиваемых линий HuT78, A549, NCI-H23, COLO 205, HCT116, HCT15, SW620.

Практическая значимость работы

Разработанный в рамках настоящей работы метод одновременного определения трех альтернативных форм мРНК IL-2R α в опухолевых очагах онкологических больных может быть использован при создании новых подходов к оценке прогноза течения заболевания и эффективности проводимой терапии. В частности, показано, что наличие мРНК CD25Exo4-5Del в опухолевых очагах больных раком толстого кишечника можно рассматривать как показатель благоприятного течения заболевания.

Полученные данные могут быть применены в преподавании курсов по биохимии для студентов вузов биологического и медицинского профиля.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Развитие рака толстого кишечника, рака легкого, рака тела матки сопровождается появлением в опухолевых очагах трех альтернативных форм мРНК IL-2R α в различных комбинациях.

2. В опухолевых очагах чаще всего выявляется полноразмерная форма мРНК CD25, затем в порядке убывания мРНК CD25Exo4Del и мРНК CD25Exo4-5Del.

3. Сплайсированные варианты мРНК IL-2R α клеток опухолевых очагов с различной частотой встречаются совместно с другими транскриптами, в частности с мРНК раково-тестикулярных белков и белков, реализующих иммунный ответ.

4. Вариации в экспрессии четырех генов системы «IL-2 – IL-2R» в опухолевых очагах больных РТМ сопровождаются изменениями в сывороточном содержании растворимых дифференцировочных молекул.

Апробация работы

Результаты работы были представлены на: I Всероссийском с международным участием конгрессе студентов и аспирантов-биологов «Симбиоз – Россия 2008» (Казань, 2008), III Всероссийском с международным участием конгрессе студентов и аспирантов-биологов «Симбиоз – Россия 2010» (Н. Новгород, 2010), IX Всероссийской научно-практической конференции «Отечественные противоопухолевые препараты» (Н. Новгород, 2010), XV Нижегородской сессии молодых ученых (Н. Новгород, 2010), II Всероссийской научной конференции с международным участием «Наноонкология» (Тюмень, 2010), научно-практической конференции молодых ученых Роспотребнадзора «Инновационные технологии в противозидемической защите населения» (Н. Новгород, 2011), X Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Отечественные противоопухолевые препараты» (Москва, 2011), III Всероссийской научной конференции с международным участием «Наноонкология» (Саратов, 2011), Всероссийской научно-практической конференции «Современные проблемы военной медицины, обитаемости и профессионального отбора» (С. Петербург, 2011), XI Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Отечественные противоопухолевые препараты (экспериментальная онкология)» (Н. Новгород, 2012).

Апробация диссертации состоялась на расширенном заседании кафедры молекулярной биологии и иммунологии ННГУ им. Н.И. Лобачевского 12 сентября 2012 года.

Публикации

По теме диссертации опубликовано 10 печатных работ, в том числе 7 в изданиях, рекомендуемых ВАК Министерства образования и науки РФ.

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа в объеме 138 листов состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследований, собственных результатов и их обсуждения, выводов и списка цитированной

литературы. Диссертационная работа иллюстрирована 15 рисунками и 26 таблицами. Библиографический указатель включает 182 источника литературы (7 отечественных и 175 иностранных).

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

В исследование включено 49 образцов опухолевых очагов и 49 образцов периферической крови больных РТК, проходивших лечение в хирургическом отделении ГУЗ Нижегородская областная клиническая больница им. Н.А. Семашко; 34 образца опухолевых очагов больных РЛ, находившихся на лечении в ГУЗ Нижегородский областной онкологический диспансер; 40 образцов опухолевых очагов и 17 образцов периферической крови больных РТМ, проходивших лечение в 1-ом гинекологическом отделении ГУЗ Нижегородская областная клиническая больница им. Н.А. Семашко, а также в гинекологическом отделении ФГУ Приволжский окружной медицинский центр ФМБА. В работе использовали 73 образца периферической крови здоровых добровольцев, полученные в клинических лабораториях городских больниц №34 и №5 (г. Нижний Новгород). Исследовали лизаты клеток перевиваемых линий HuT78, H9, Kit225 K6, Ramos, A549, NCI-H23, COLO 205, HCT116, HCT15, SW-620, T84, CaCo2, предоставленные Российским онкологическим научным центром им. Н.Н. Блохина РАМН.

Выделение суммарной РНК из клеток периферической крови, опухолевого очага или лизата клеток культуры осуществляли методом фенол-хлороформной экстракции. Детекцию матричных РНК проводили с помощью полимеразной цепной реакции, сопряженной с обратной транскрипцией. Определение первичной структуры кДНК осуществляли в автоматическом режиме с помощью прибора ABI Prizm 3130 Genetic Analyzer («Applied Biosystems», США). Иммунофенотипирование мононуклеарных клеток периферической крови проводили в реакции непрямой иммунофлуоресценции с использованием моноклональных антител серии ИКО (РОНЦ РАМН). Сывороточный уровень растворимых форм дифференцировочных молекул CD25 и CD54 определяли двухсайтовым иммуноферментным методом (Новиков В.В. и др., 2008).

Для компьютерного анализа данных в работе использовали пакет программ Lasergene (<http://www.dnastar.com>) согласно рекомендациям

производителя. Анализ первичных структур ДНК и матричной РНК осуществляли с использованием программы MapDraw данного пакета. Сравнение нуклеотидных последовательностей проводили в программе MegAlign. Олигонуклеотидные праймеры конструировали, используя программы PrimerSelect пакета Lasergene и Oligo Calculator v10 (Россия).

Статистическую обработку результатов проводили с помощью пакета программ Statistica v. 8.0. Анализ различий относительных частот обнаружения мРНК в группах проводили с использованием статистического критерия сравнения пропорций. Для представления исследованных количественных показателей были использованы медиана, 25 и 75 процентиля. Межгрупповой анализ количественных показателей проводили с использованием непараметрического критерия Манна-Уитни. При анализе качественных и количественных признаков различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение

Известно, что ген альфа-субъединицы рецептора интерлейкина-2 способен давать несколько транскриптов, образующихся путем альтернативного сплайсинга пре-мРНК. Анализ литературных данных позволил сделать заключение, что 4-й экзон гена IL-2RA играет ключевую роль в связывании интерлейкина-2 и представляет наибольший интерес при изучении частоты встречаемости альтернативных вариантов матричной РНК IL-2R α . Основываясь на первичной структуре мРНК IL-2R α , мы осуществили дизайн олигонуклеотидных праймеров и провели подбор условий постановки ОТ-ПЦР, что позволило одновременно определять три формы мРНК IL-2R α в одной пробирке. Разработанный метод апробировали на образцах клеток периферической крови здоровых добровольцев. С помощью данного метода детектировали кДНК, соответствующую фрагментам трех альтернативных форм матричной РНК IL-2R α : полноразмерной формы (CD25), формы с делетированным 4-м экзоном (CD25Exo4Del) и формы с делецией экзонов 4 и 5 (CD25Exo4-5Del) (Рис. 1).

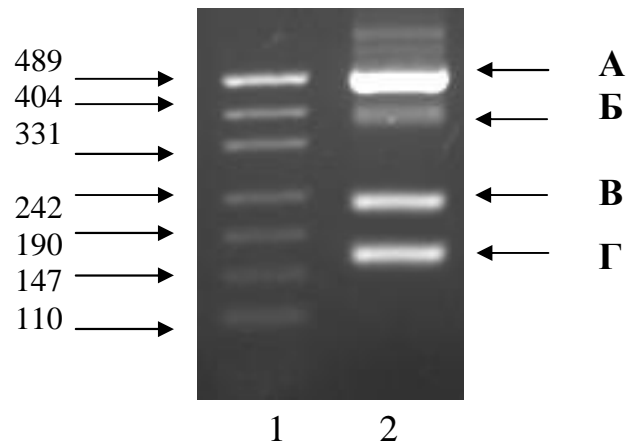


Рис. 1. Электрофореграмма фрагментов кДНК

Комплементарная ДНК, синтезированная на матрице: А – полноразмерной формы мРНК IL-2R α ; Б – альтернативной формы мРНК IL-2R α с делецией размером 28 н.о.; В – альтернативной CD25Exo4Del формы мРНК IL-2R α ; Г – альтернативной CD25Exo4-5Del формы мРНК IL-2R α

1 – маркер размерности ДНК, выраженный в парах нуклеотидных оснований; 2 – кДНК IL-2R α

Нуклеотидные последовательности полученных фрагментов кДНК были определены в ходе секвенирования и сопоставлены с помощью программы MegAlign с последовательностями вариантов мРНК IL-2R α , аннотированными и размещенными в базах данных Ensembl и ASPicDB. Установлено соответствие фрагментов заявленным вариантам мРНК.

С использованием разработанного метода определена частота выявления трех сплайсированных вариантов мРНК IL-2R α в образцах опухолевых очагов больных РТК, РЛ, РТМ. Набор альтернативных форм мРНК IL-2R α в опухолевых очагах варьировал как у больных внутри данных групп, так и между группами (рис. 2).

Экспрессия гена IL-2RA была зафиксирована в 100% тестированных опухолевых очагов больных РТК, в 94% случаев – у больных РЛ, в 83% – у больных РТМ. В данных образцах опухолевых очагов обнаружено присутствие от одного до трех вариантов сплайсинга мРНК IL-2R α в различных комбинациях. При всех трех онкологических заболеваниях полноразмерная форма мРНК CD25 встречалась статистически значимо чаще, чем CD25Exo4-5Del ($p=0,002$ для РТК, $p=0,042$ для РЛ, $p<0,001$ для РТМ). Наблюдалась тенденция к снижению частоты обнаружения матричных РНК в ряду «CD25 – CD25Exo4Del – CD25Exo4-5Del». Каждая из трех

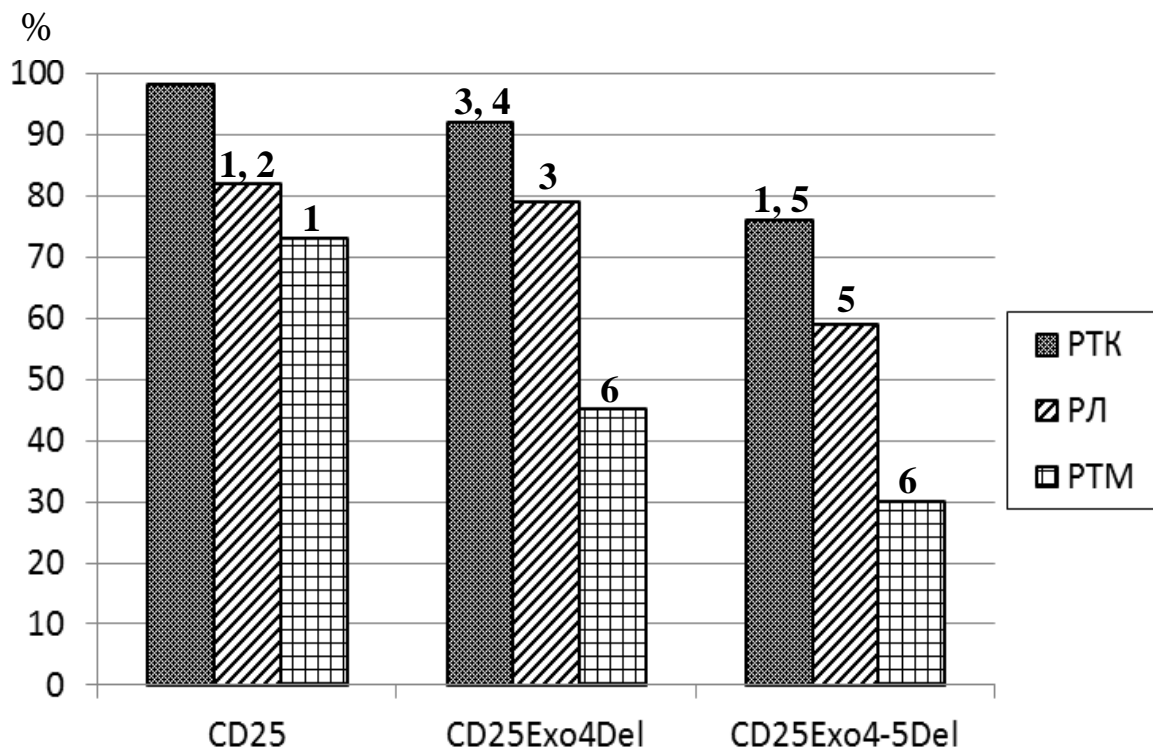


Рис. 2. Частота обнаружения мРНК IL-2R α в опухолевых очагах больных

Статистически значимые различия по сравнению с частотой детекции:

- 1 – мРНК CD25 при РТК ($p < 0,05$)
- 2 – мРНК CD25Exo4-5Del при РЛ ($p = 0,042$)
- 3 – мРНК CD25Exo4Del при РТМ ($p < 0,05$)
- 4 – мРНК CD25Exo4-5Del при РТК ($p = 0,032$)
- 5 – мРНК CD25Exo4-5Del при РТМ ($p < 0,05$)
- 6 – мРНК CD25 при РТМ ($p < 0,05$)

альтернативных форм мРНК IL-2R α выявлялась чаще при раке толстого кишечника, чем при раке тела матки ($p = 0,008$ для CD25, $p < 0,001$ для CD25Exo4Del и CD25Exo4-5Del). В опухолевых очагах больных РЛ полноразмерная форма мРНК CD25 детектировалась реже, чем при РТК ($p = 0,012$), но частота ее обнаружения не отличалась от таковой при РТМ. Обратная картина наблюдалась при сравнении частоты детекции мРНК, кодирующих формы IL-2R α , не способные связывать лиганд. Частота обнаружения мРНК CD25Exo4Del и CD25Exo4-5Del была выше в опухолевых очагах больных РЛ, чем при РТМ ($p = 0,004$ и $p = 0,014$, соответственно), но не отличалась от частоты их детекции при РТК.

Различия в локализации первичного опухолевого узла и гистологическом типе опухоли не сопровождалось изменениями в частоте встречаемости альтернативных форм мРНК CD25 и CD25Exo4Del. Однако наблюдались различия в частоте обнаружения мРНК CD25Exo4-5Del. При РТК она чаще встречалась в опухолевых очагах, локализованных в прямой кишке, чем в ректо-сигмовидном отделе ($p=0,012$) и сигмовидной кишке ($p=0,037$). Кроме того, в опухолевых очагах мужчин, но не женщин, выявлена статистически значимо меньшая частота обнаружения мРНК CD25Exo4-5Del по сравнению с частотой детекции мРНК CD25 ($p=0,004$).

Все три сплайсированные варианты мРНК IL-2R α встречались в опухолевых очагах на разных стадиях онкологических заболеваний. Если при РТК развитие заболевания от стадии к стадии не сопровождалось изменениями в частоте определения мРНК IL-2R α , то при РЛ обнаружена выраженная тенденция к снижению частоты детекции альтернативных форм мРНК CD25Exo4Del и CD25Exo4-5Del от 1 к 3 стадии заболевания (табл. 1).

Таблица 1

Частота обнаружения альтернативных форм мРНК IL-2R α в клетках опухолевых очагов на разных стадиях РТК и РЛ

Заболевание	Стадия	мРНК CD25	мРНК CD25Exo4Del	мРНК CD25Exo4-5Del
РТК	1	10/10 (100%)	9/10 (90%)	7/10 (70%)
	2	24/25 (96%)	23/25 (92%)	20/25 (80%)
	3	9/9 (100%)	8/9 (89%)	8/9 (89%)
	4	5/5 (100%)	5/5 (100%)	2/5 (40%)
РЛ	1	6/7 (86%)	7/7 (100%)	5/7 (71%)
	2	5/7 (71%)	6/7 (86%)	3/7 (43%)
	3	5/6 (83%)	5/6 (83%)	2/6 (33%)

Заметим, что мРНК CD25Exo4Del и CD25Exo4-5Del кодируют функционально не активные варианты альфа-субъединицы рецептора интерлейкина-2. Если предположить, что частота выявления таких белков является характеристикой баланса функционально активных и неактивных форм рецептора IL-2 в опухолевых клетках больных РЛ, то снижение частоты их присутствия в опухолевых очагах может быть отражением

смещения этого баланса в сторону образования функциональных рецепторов и, следовательно, усиления пролиферативной активности раковых клеток по ходу прогрессирования заболевания. Образование метастазов при РЛ также характеризовалось выраженной тенденцией к снижению частоты выявления мРНК CD25Exo4-5Del, а также CD25Exo4Del (рис. 3).

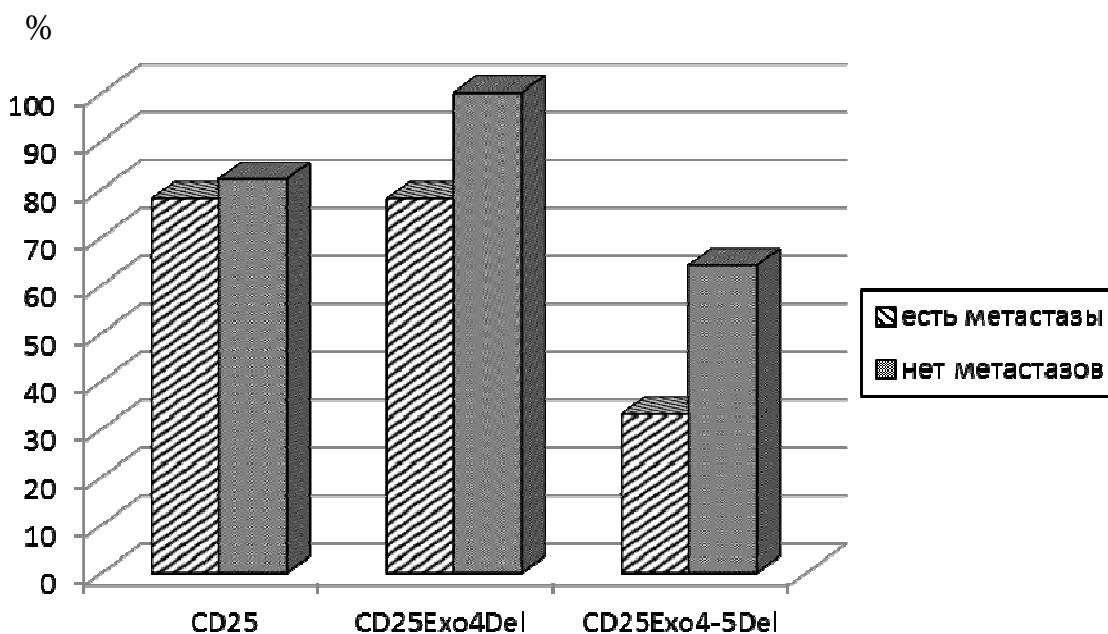


Рис. 3. Частота выявления альтернативных форм мРНК IL-2Rα в клетках опухолевых очагов больных РЛ с метастазами и без метастазов

Известно, что в клетках нормальных тканей толстого кишечника, легкого и тела матки отсутствует экспрессия гена IL-2RA. Появление мРНК IL-2Rα в опухолевых очагах может быть следствием активации гена IL-2RA в злокачественно трансформированных клетках или присутствия в очагах активированных лимфоцитов. При раке толстого кишечника нами проведена оценка частоты встречаемости трех альтернативных форм мРНК IL-2Rα в периферической крови больных. У всех тестируемых больных, как и у здоровых лиц, обнаруживались три альтернативные формы мРНК IL-2Rα. Неполный спектр форм мРНК в опухолевых очагах большинства больных указывает на то, что их источником являются или опухолевые клетки или инфильтрирующие опухоль лимфоциты с неполным набором мРНК IL-2Rα, например CD4+CD25^{high} Т-регуляторы. Однако информация о спектре альтернативных форм мРНК IL-2Rα в инфильтрирующих опухоль лимфоцитах в литературе отсутствует.

В образцах опухолевых очагов было проведено сопоставление частоты обнаружения мРНК IL-2R α с особенностями транскриптома раковых клеток. В частности, осуществлено сравнение частоты детекции мРНК IL-2R α с частотой обнаружения мРНК 22 раково-тестикулярных белков, а также 11 альтернативных вариантов мРНК трех дифференцировочных молекул – CD38, CD54 (ICAM-1), CD95 (Fas).

Установлено, что при РТК мРНК CD25Exo4Del встречается чаще совместно с мРНК раково-тестикулярного белка SSX1,2,4 ($p=0,013$). Кроме этого, транскриптом клеток опухолевых очагов, характеризующийся присутствием ряда альтернативных вариантов мРНК белка Fas, опосредующего апоптоз (mFas, Fas del 5, Fas del 3,4, sFas, Fas del 4,6, Fas del 3,4,6), мРНК активационного белка CD38, а также мРНК восьми раково-тестикулярных белков семейства GAGE (GAGE1-8), мРНК PAGE1, мРНК трех белков семейства SSX (SSX1,2,4), мРНК NY-ESO-1 и мРНК шести раково-тестикулярных генов семейства MAGEA (MAGEA1-6), статистически значимо чаще содержал мРНК полноразмерной формы CD25, нежели мРНК CD25Exo4-5Del ($p<0,05$). Матричная РНК полноразмерной формы CD25 достоверно чаще в сравнении с мРНК CD25Exo4-5Del обнаруживалась при отсутствии в опухолевых очагах мРНК Fas del 4, Fas del 4,6, Fas del 5, Fas del 3,4,6, CD38Exo3Del, sICAM-1, GAGE1-8, CT7, XAGE1, SSX1,2,4, NY-ESO-1 ($p<0,05$). Форма мРНК CD25Exo4-5Del в сравнении с мРНК CD25Exo4Del выявлялась реже в Fas del 5 и Fas del 3,4-позитивных и CD38Exo3Del-негативных опухолевых очагах ($p<0,05$).

При РЛ мРНК CD25Exo4-5Del обнаруживалась чаще совместно с мРНК раково-тестикулярных белков XAGE1 и мРНК SSX1,2,4 ($p=0,008$ и $p=0,049$, соответственно). При РТМ выявлена обратная тенденция к снижению частоты выявления матричной РНК с делетированными экзонами в образцах, содержащих мРНК XAGE1 и SSX1,2,4 (табл. 2). Таким образом, при всех трех онкологических заболеваниях вариации в частоте детекции делетированных форм мРНК IL-2R α сопровождаются изменениями в частоте выявления мРНК раково-тестикулярных белков XAGE1 и SSX1,2,4, характерных для опухолевых клеток.

Таблица 2

Частота обнаружения альтернативных форм мРНК IL-2R α в опухолевых очагах, содержащих и не содержащих мРНК раково-тестикулярных белков

Заболевание	мРНК				
	IL-2R α	SSX1,2,4 ⁺	SSX1,2,4 ⁻	XAGE1 ⁺	XAGE1 ⁻
РТК	CD25	29/29(100%)	18/19(95%)	16/16(100%)	31/32 (97%)
	CD25Exo4Del	29/29(100%) *	15/19(79%)	16/16(100%)	28/32 (88%)
	CD25Exo4-5Del	24/29 (83%)	13/19(68%)	13/16(81%)	24/32 (75%)
РЛ	CD25	21/24(88%)	6/8 (75%)	15/16(94%)	15/16(94%)
	CD25Exo4Del	19/24 (79%)	6/8 (75%)	13/16(81%)	12/16(75%)
	CD25Exo4-5Del	13/24 (54%) ▼	1/8 (13%)	11/16 (69%) **	3/16 (19%)
РТМ	CD25	10/11 (91%)	13/20(65%)	5/7 (71%)	16/22(72%)
	CD25Exo4Del	4/11 (36%)	12/20(60%)	4/7 (57%)	11/22 (50%)
	CD25Exo4-5Del	2/11 (18%)	9/20 (45%)	2/7 (29%)	9/22 (41%)

Статистически значимые различия по сравнению с частотой детекции:

* – мРНК CD25Exo4Del при SSX1,2,4⁻ (p=0,013)

▼ – мРНК CD25Exo4-5Del при SSX1,2,4⁻ (p=0,049)

** – мРНК CD25Exo4-5Del при XAGE1⁻ (p=0,008)

Обнаружено, что в образцах опухолевых очагов больных РТК, содержащих мРНК CD25Exo4-5Del, мРНК белка ICAM-1 детектируется в 2,1 раза чаще, чем в CD25Exo4-5Del-негативных образцах (p<0,001). Показано, что при раке толстого кишечника повышенный уровень экспрессии ICAM-1 клетками опухолей ассоциирован с высоко дифференцированными новообразованиями, а также с высокой восприимчивостью к лизису цитотоксическими Т-лимфоцитами (Wang Q. et al., 2009; Hamai A. et al., 2008). То есть, наличие мРНК CD25Exo4-5Del в опухолевых очагах больных раком толстого кишечника можно рассматривать как показатель благоприятного течения заболевания.

Наряду с определением частоты выявления экспрессии генов, принимающих участие в реализации иммунного ответа, было проведено

сравнение особенностей экспрессии гена IL-2RA в опухолевых очагах с показателями состояния иммунитета больных. При раке толстого кишечника было осуществлено сопоставление частоты обнаружения альтернативных вариантов мРНК IL-2R α с сывороточной концентрацией продуктов посттрансляционной модификации продуктов гена IL-2RA – растворимыми дифференцировочными молекулами CD25. Однако никаких статистически значимых изменений выявлено не было. При раке тела матки проведено более детальное исследование связи вариаций в экспрессии гена IL-2RA в опухолевых очагах с иммунным ответом. Наряду с сывороточным содержанием суммарной и олигомерной фракций растворимых дифференцировочных молекул CD25 оценивали популяционный состав периферической крови больных, в том числе содержание CD25, CD8, CD4, CD95-положительных клеток. Однако и в этом случае никаких статистически значимых изменений выявлено не было, что свидетельствует об отсутствии прямой связи между характером экспрессии гена IL-2RA в опухолевых очагах и тестируемыми показателями иммунитета.

Альфа-субъединица рецептора интерлейкина-2 является одним из белков, входящих в состав высокоаффинного рецептора IL-2, полноценно работающего в активно пролиферирующих клетках. Более полная картина о функциональных возможностях IL-2R α может быть получена при совместном изучении экспрессии гена IL-2RA и трех других генов, входящих в систему «IL-2 – IL-2R». В рамках настоящего исследования были разработаны методы детекции матричной РНК IL-2, IL-2R β , IL-2R γ и с помощью данных методов был проведен анализ встречаемости данных мРНК в опухолевых очагах больных раком тела матки (рис. 4).

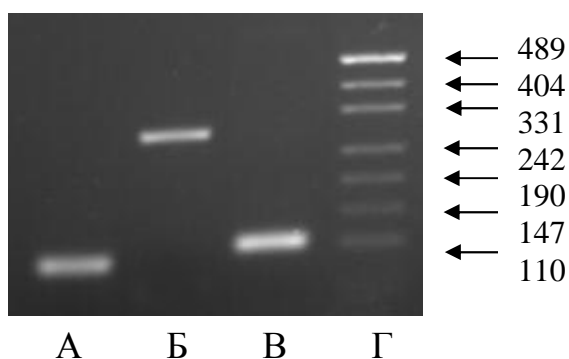


Рис. 4. Электрофореграмма фрагментов ДНК

А – κДНК IL-2; Б – κДНК IL-R β ; В – κДНК IL-R γ ; Г – маркер размерности ДНК, выраженный в парах нуклеотидных оснований

Установлено, что частота обнаружения матричной РНК компонентов системы «IL-2 – IL-2R» в опухолевых очагах больных РТМ варьирует (рис. 5). Во всех тестируемых образцах была обнаружена мРНК бета-

субъединицы IL-2R. Присутствие мРНК альфа- и гамма-субъединиц зафиксировано в меньшем количестве образцов, а мРНК IL-2 – лишь в 57% (13/23) образцов. При этом присутствие мРНК IL-2 во всех случаях кроме одного сопровождалось наличием мРНК трех субъединиц его рецептора. В остальных 10 образцах, характеризующихся отсутствием мРНК IL-2, наблюдались различные сочетания мРНК компонентов системы «IL-2 – IL-2R».

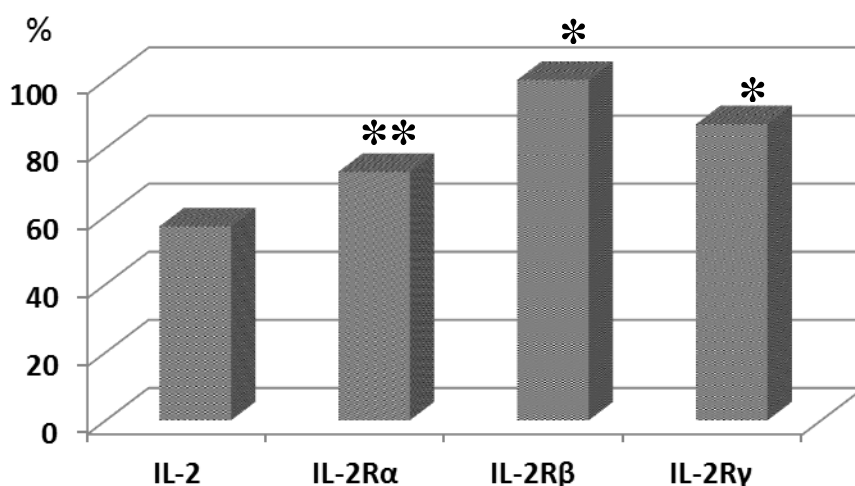


Рис. 5. Частота обнаружения мРНК IL-2, IL-2R α , IL-2R β , IL-2R γ в опухолевых очагах больных РТМ

Статистически значимые различия по сравнению с частотой детекции:

* – мРНК IL-2 ($p < 0,05$)

** – мРНК IL-2R β ($p = 0,008$)

Отсутствие мРНК одной или нескольких субъединиц рецептора IL-2 в 12 тестированных опухолевых очагах свидетельствует о том, что использованные нами методы детектируют в этих случаях мРНК системы «IL-2 – IL-2R», продуцируемые не лимфоцитами, а опухолевыми клетками.

Выявленные особенности экспрессии генов системы «IL-2 – IL-2R» в опухолевых очагах больных РТМ были сопоставлены с сывороточным содержанием суммарной и олигомерной фракций растворимых дифференцировочных молекул CD25 (sCD25) и ICAM-1 (sCD54) (табл. 3). У больных, в опухолевых очагах которых было зафиксировано отсутствие хотя бы одной из мРНК IL-2, IL-2R α , IL-2R β или IL-2R γ , сывороточный уровень суммарной фракции растворимых дифференцировочных молекул CD25 был

повышен в сравнении с больными с полной экспрессией в опухолевых очагах всех генов системы «IL-2 – IL-2R» ($p=0,009$). Подъем сывороточного содержания растворимых дифференцировочных молекул CD25 у больных, в опухолевых очагах которых гены системы «IL-2 – IL-2R» экспрессируются не в полном составе, служит отражением иммунного ответа, направленного на элиминацию опухолевых клеток.

Таблица 3

Сывороточный уровень растворимых дифференцировочных молекул CD25 и CD54 у больных РТМ, U/ml

Дифференцировочная молекула	Норма	Особенности транскриптома клеток опухолевых очагов	
		Присутствуют мРНК IL-2, IL-2R α , IL-2R β и IL-2R γ	Нет хотя бы одной из мРНК IL-2, IL-2R α , IL-2R β , IL-2R γ
sCD25, суммарная фракция	400 (361; 446)	339 (311; 379)	665 (372; 882) *
sCD25, олигомерная фракция	358 (267; 434)	416 (219; 534)	463 (183; 616)
sCD54, суммарная фракция	78 (54; 165)	26 (18; 39)**	80 (68; 155)*
sCD54 олигомерная фракция	138 (92; 178)	136 (55; 158)	146 (116; 193)

* - статистически значимые различия по сравнению с группой, где присутствуют мРНК IL-2, IL-2R α , IL-2R β и IL-2R γ ($p<0,05$)

** - статистически значимые различия по сравнению с нормой ($p<0,001$)

Больные РТМ, опухолевые очаги которых характеризовались присутствием мРНК всех белков системы «IL-2 – IL-2R», имели пониженный сывороточный уровень растворимых молекул ICAM-1 ($p<0,001$). При отсутствии мРНК хотя бы одного из компонентов системы «IL-2 – IL-2R» сывороточное содержание растворимых дифференцировочных молекул ICAM-1 (CD54) оставалось в пределах нормы. То есть, координированная экспрессия всех генов системы «IL-2 – IL-2R» способна угнетать иммунный ответ, что выражается в снижении сывороточного содержания sICAM-1.

Вероятно, это связано с присутствием на злокачественно трансформированных клетках полноценного рецептора IL-2, синтезом эндогенного IL-2 и ростом опухоли, приводящим к иммуносупрессии.

Для оценки конститутивной экспрессии генов системы «IL-2 – IL-2R» непосредственно в опухолевых клетках был проведен анализ встречаемости мРНК IL-2, IL-2R α , IL-2R β , IL-2R γ в клеточных линиях, полученных от больных лимфомами, а также раком толстого кишечника и легкого (табл. 4).

Таблица 4

Матричная РНК IL-2, IL-2R α , IL-2R β , IL-2R γ в перевиваемых клеточных линиях, полученных от больных онкологическими заболеваниями

Название клеточной линии	Источник	мРНК IL-2	мРНК IL-2R α	мРНК IL-2R β	мРНК IL-2R γ
HuT78	Т-клеточная лимфома	–	+++	+	+
H9		+	+++	+	+
Kit225 K6		–	++–	+	+
Ramos	лимфома Беркитта	–	+++	–	+
A549	рак легкого	–	–	+	–
NCI-H23		–	–	+	–
COLO 205	рак толстого кишечника	–	–	+	+
HCT116		+	–	+	–
HCT15		–	–	+	+
SW-620		–	–	–	+
T84		–	–	–	+
CaCo2		–	–	–	+

+ : показано присутствие мРНК

– : мРНК не обнаружена

Наличие мРНК IL-2 зарегистрировано в клетках линий H9 (Т-клеточная лимфома) и HCT116 (рак толстого кишечника). Полученные результаты подтверждают способность к продукции одного из ведущих цитокинов иммунной системы – интерлейкина-2 – опухолевыми клетками, имеющими происхождение как от Т-клеток, так и от эпителия толстого кишечника. В клетках остальных 10-ти тестированных линий не обнаружена мРНК IL-2.

Отсутствие экспрессии гена IL-2 в данных типах клеток является свидетельством независимости их пролиферации от эндогенного IL-2.

Присутствие альтернативных форм мРНК IL-2R α было выявлено в клетках всех тестируемых линий, происходящих от Т-клеточных лимфом (HuT78, H9, Kit225 K6) и лимфомы Беркитта (Ramos). При этом в клетках линии Kit225 K6, источником которой явились Т-лимфоциты больного Т-клеточной лимфомой, были обнаружены лишь два сплайсированных варианта мРНК IL-2R α – полноразмерный и с делетированным 4-м экзоном. В образцах клеток остальных трех линий лимфом показано одновременное присутствие всех трех изучаемых альтернативных форм мРНК.

В клетках всех исследованных линий, полученных от больных раком легкого и раком толстого кишечника, не зафиксировано конститутивной экспрессии гена альфа-субъединицы IL-2R. Можно предположить, что синтез мРНК IL-2R α в данных изолированных культурах опухолевых клеток не происходит из-за отсутствия активатора, подобного активаторам синтеза IL-2R α в клетках гемопоетической системы (TGF- β , CD28, интерлейкин-1 и др.) (Rothenberg E., Diamond R., 1994; Kim H. et al., 2005). Возможно также, что индукция экспрессии гена IL-2RA в тестируемых типах клеток происходит только после воздействия экзогенного IL-2.

мРНК бета-субъединицы рецептора интерлейкина-2 обнаружена в клетках всех линий больных Т-клеточными лимфомами и раком легкого. Среди клеточных линий, полученных от больных раком толстого кишечника, присутствие мРНК IL-2R β было зафиксировано в клетках COLO 205, HCT116 и HCT15. В остальных случаях (линии SW-620, T84, CaCo2) экспрессии гена IL-2RB не обнаружено. Также отсутствие мРНК IL-2R β показано в клетках линии Ramos (лимфома Беркитта).

Экспрессия гена гамма-субъединицы рецептора интерлейкина-2 зафиксирована в клетках всех тестируемых линий, полученных от больных лимфомами. В образцах клеток двух линий, полученных от больных раком легкого, мРНК IL-2R γ не обнаружена. Экспрессия гена IL-2RG зафиксирована во всех исследованных клеточных линиях больных раком толстого кишечника, кроме линии HCT116.

Исходя из вышеизложенного, можно заключить, что экспрессия генов бета- и гамма-субъединиц IL-2R в клетках линий, полученных от больных раком толстого кишечника и раком легкого, варьировала (табл. 4). При этом одновременное присутствие мРНК IL-2R β и IL-2R γ в клетках двух линий указывает на возможность формирования на поверхности клеток рецептора

средней аффинности. Вероятным объяснением наличия мРНК лишь одной субъединицы из трех в клетках шести линий является их принадлежность к рецепторам других цитокинов. Так, рецепторы интерлейкина-2 и интерлейкина-15 содержат бета-субъединицы одинакового строения, а гамма-субъединица входит в состав рецепторов IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 и IL-21 (Waldmann T., O'Shea J., 1998; Asao H. et al., 2001).

Таким образом, в линиях неопластических клеток, полученных из опухолевых очагов больных раком толстого кишечника и раком легкого, показано молчание гена IL-2RA. В предыдущих разделах работы была обнаружена экспрессия гена IL-2RA в образцах опухолевых очагов больных РТК и РЛ. Наличие мРНК IL-2R α в клетках опухолевых очагов больных данными заболеваниями может иметь следующие причины. Во-первых, источником мРНК IL-2R α могут являться лимфоциты, инфильтрирующие опухоль, в частности Т-регуляторы. Их характерной чертой является высокий уровень экспрессии гена альфа-субъединицы IL-2R. Во-вторых, экспрессия гена IL-2RA может происходить в опухолевых клетках, находящихся в условиях *in vivo*, но теряться при переводе в культуру. Для поддержания гена во включенном состоянии нередко необходимы особые условия микроокружения раковых клеток, отсутствующие в клеточной культуре, но присутствующие в организме. Хорошо известен феномен изменения профиля экспрессии генов при переводе клеток в культуру (Bellot G. et al., 2012). При этом происходит включение одних и выключение других генов. В-третьих, присутствие мРНК IL-2R α может являться индивидуальной особенностью каждой конкретной опухоли. В пользу этого говорит выявленное нами отсутствие мРНК IL-2R α в ряде опухолевых очагов больных раком легкого и раком тела матки. Наконец, источником исследуемой мРНК могут быть опухоль-инфильтрирующие лимфоциты и раковые клетки одновременно.

ВЫВОДЫ

1. С использованием разработанного метода одновременной детекции трех альтернативных форм мРНК альфа-субъединицы рецептора интерлейкина-2 показано, что мРНК CD25, CD25Exo4Del, CD25Exo4-5Del в различных сочетаниях присутствуют в опухолевых очагах больных раком толстого кишечника, раком легкого, раком тела матки, в периферической крови здоровых волонтеров и онкологических больных.

2. Обнаружено, что сплайсированные варианты мРНК CD25, CD25Exo4Del, CD25Exo4-5Del детектируются в опухолевых очагах чаще при раке толстого кишечника, чем при раке тела матки, при этом в опухолевых очагах больных раком толстого кишечника, раком легкого, раком тела матки мРНК CD25Exo4-5Del встречается реже, чем мРНК CD25.

3. Установлено, что в опухолевых очагах больных раком толстого кишечника форма мРНК CD25Exo4Del детектируется чаще совместно с мРНК раково-тестикулярного белка SSX1,2,4, а форма CD25Exo4-5Del чаще совместно с мРНК белка ICAM-1. При раке легкого мРНК CD25Exo4-5Del обнаруживается в опухолевых очагах чаще совместно с мРНК раково-тестикулярных белков SSX1,2,4 и XAGE1.

4. Выявлено, что в опухолевых очагах больных раком тела матки, а также в клетках линий, полученных от больных лимфомами, раком толстого кишечника и раком легкого, присутствуют мРНК всех четырех генов системы «интерлейкин-2 – рецептор интерлейкина-2» в различных комбинациях.

5. Показано, что одновременная экспрессия генов IL-2, IL-2RA, IL-2RB, IL-2RG в опухолевых очагах больных раком тела матки сопровождалась сниженным сывороточным содержанием растворимых дифференцировочных молекул ICAM-1. В отсутствие экспрессии хотя бы одного из данных генов повышалась сывороточная концентрация растворимых дифференцировочных молекул CD25.

Благодарности

Автор выражает благодарность за помощь в выполнении работы проф. Алясовой А.В., к.м.н. Конторщиковой Е.Ю., к.б.н. Новикову Д.В., к.б.н. Шаховой К.А., Пресняковой Н.Б., Сахарнову Н.А., Перенкову А.Д., Калугину А.В.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

I. Работы, опубликованные в ведущих рецензируемых научных журналах и изданиях, определенных ВАК:

1. Новикова С.В. (**Шумилова С.В.**) Разработка и апробация метода детекции мРНК альфа-цепи рецептора интерлейкина-2 в клетках опухолевых очагов человека / Новикова С.В., Алясова А.В., Новиков Д.В. // Вестник Нижегородского университета им. Н.И. Лобачевского. – 2010. – Т. 2, № 2. – С. 563–565.

2. Новикова С.В. (**Шумилова С.В.**) Анализ экспрессии гена α -цепи рецептора ИЛ-2 в клетках опухолевых очагов больных КРР / Новикова С.В., Сахарнов Н.А., Новиков Д.В., Алясова А.В. // Российский биотерапевтический журнал. – 2010. – Т. 9, № 2. – С. 56.

3. Сахарнов Н.А. Анализ встречаемости транскриптов гена АРТ-1 в опухолевых клетках больных РТК / Сахарнов Н.А., Новиков Д.В., Алясова А.В., Новикова С.В. (**Шумилова С.В.**), Уткин О.В., Новиков В.В. // Российский биотерапевтический журнал. – 2010. – Т. 9, № 2. – С. 58.

4. Новикова С.В. (**Шумилова С.В.**) Анализ экспрессии гена альфа-цепи рецептора интерлейкина-2 в клетках опухолевых очагов больных раком легкого / Новикова С.В., Новиков Д.В., Белова Т.В., Плеханова Е.С., Пегов Р.Г., Алясова А.В. // Российский биотерапевтический журнал. – 2010. – Т. 9, № 3. – С. 18.

5. Новиков Д.В. Анализ экспрессии гена CD38 в опухолевых очагах онкогинекологических больных / Новиков Д.В., Перенков А.Д., Конторщикова Е.Ю., Новикова С.В. (**Шумилова С.В.**), Коровушкина К.А., Барышников А.Ю., Новиков В.В. // Российский биотерапевтический журнал. – 2010. – Т. 9, № 3. – С. 17.

6. Новикова С.В. (**Шумилова С.В.**) Анализ встречаемости альтернативных форм мРНК гена IL-2A в клетках опухолевых очагов больных колоректальным раком / Новикова С.В., Алясова А.В., Новиков Д.В. // Российский биотерапевтический журнал. – 2011. – Т. 10, № 1. – С. 42.

7. **Шумилова С.В.** Анализ экспрессии генов системы IL-2 – IL-2R в клеточных линиях аденокарциномы легких A549 и NCI-H23 / Шумилова С.В., Новиков Д.В., Барышников А.Ю., Новиков В.В. // Российский биотерапевтический журнал. – 2012. – Т. 11, № 2. – С. 64.

II. Тезисы докладов региональных и международных конференций:

1. Новикова С.В. (Шумилова С.В.) Метод одновременной детекции двух форм мРНК альфа-цепи рецептора интерлейкина-2 в клетках опухолевых очагов / Новикова С.В. // Сборник тезисов III Всероссийского с международным участием конгресса студентов и аспирантов-биологов «Симбиоз-Россия 2010», Н. Новгород. – 2010. – С. 107.

2. Новикова С.В. (Шумилова С.В.) Продукты транскрипции гена альфа-цепи рецептора интерлейкина-2 в клетках опухолевых очагов больных колоректальным раком / Новикова С.В. // XV Нижегородская сессия молодых ученых, Н. Новгород, 19-23 апреля 2010 г. Труды молодых ученых по естественнонаучным дисциплинам. – 2010. – С.19.

3. Новикова С.В. (Шумилова С.В.) Метод детекции двух форм матричной РНК гена IL-2RA / Новикова С.В. // Мат-лы научно-практической конференции молодых ученых Роспотребнадзора, посвященной 90-летию со дня рождения академика РАМН И.Н. Блохиной «Инновационные технологии в противоэпидемической защите населения», Н. Новгород. – 2011. – С. 56-58.

Список сокращений

кДНК	– комплементарная ДНК
мРНК	– матричная РНК
ОТ-ПЦР	– обратная транскрипция/полимеразная цепная реакция
РЛ	– рак легкого
РТК	– рак толстого кишечника
РТМ	– рак тела матки
IL-2	– интерлейкин-2
IL-2R	– рецептор интерлейкина-2
IL-2RA	– ген альфа-субъединицы рецептора интерлейкина-2
IL-2R α	– альфа-субъединица рецептора интерлейкина-2
IL-2RB	– ген бета-субъединицы рецептора интерлейкина-2
IL-2R β	– бета-субъединица рецептора интерлейкина-2
IL-2RG	– ген гамма-субъединицы рецептора интерлейкина-2
IL-2R γ	– гамма-субъединица рецептора интерлейкина-2
U/ml	– количество условных единиц в мл