

УДК 571.27

**АЛЬТЕРНАТИВНЫЙ СПЛАЙСИНГ мРНК Fas В КЛЕТКАХ ОПУХОЛЕВОГО
ОЧАГА ПРИ РАКЕ ТОЛСТОГО КИШЕЧНИКА**© 2010 г. **Н.А. Сахарнов¹, Д.В. Новиков¹, А.В. Алясова², В.В. Новиков¹**¹ Нижегородский госуниверситет им. Н.И. Лобачевского² Нижегородская государственная медицинская академия

mbre@mail.ru

Поступила в редакцию 07.04.2010

В клетках опухолевых очагов больных раком толстого кишечника выявлены 7 альтернативных форм мРНК молекулы Fas и 15 различных спектров мРНК. На III стадии рака толстого кишечника в образцах опухолей не обнаруживается мРНК Fas с делецией 5 экзона, а на IV стадии отсутствует мРНК Fas с делецией 4 экзона.

Ключевые слова: молекула Fas, альтернативный сплайсинг мРНК, рак толстого кишечника.

Введение

К настоящему времени известно, что при опухолевой трансформации наблюдаются изменения, направленные на блокаду Fas-зависимого пути апоптоза в опухолевой клетке, с большой частотой обнаруживаются мутации в гене Fas, приводящие к потере функциональных свойств кодируемого им белкового продукта [1, 2]. Молекула Fas (CD95) является трансмембранным белком I типа, который относится к суперсемейству рецептора фактора некроза опухолей. Молекула Fas экспрессируется на поверхности клеток многих тканей [3]. При взаимодействии со специфическим лигандом Fas передает сигнал к апоптозу в клетку, на поверхности которой он экспрессируется [4]. Передача апоптотического сигнала через Fas играет важную роль в регуляции численности клеток иммунной системы по пути негативной селекции [5–7]. Альтернативный сплайсинг пре-мРНК Fas вовлечен в регуляцию Fas-зависимого апоптоза. Альтернативные изоформы мРНК Fas, кодирующие растворимые формы рецептора, способны ингибировать Fas-зависимый сигнальный путь апоптоза, конкурируя с мембранным рецептором за связывание с Fas-лигандом или вызывая гибель клеток, экспрессирующих на поверхности Fas лиганд [8, 9]. Молекулы Fas вовлечены в патогенез многих заболеваний, включая аутоиммунные и онкологические заболевания [10].

Цель настоящей работы – исследование спектра альтернативных форм матричных РНК молекул Fas в образцах солидных опухолей толстого кишечника на разных стадиях заболевания.

Экспериментальная часть

Пациенты. Материалом для исследования явились 49 образцов опухолевых очагов больных раком толстого кишечника, полученных из Нижегородского областного онкологического диспансера после резекции опухолей. Из них 35 образцов от больных с I или II стадией и 14 образцов от больных с III или IV стадией заболевания.

Выделение РНК. Сразу после резекции образцы клеток опухолевых очагов помещали в лизирующий буфер (4 М гуанидинтиоционат, 0.1 М ацетат калия (рН 5.0), тритон X-100%, β-меркаптоэтанол 2%) и замораживали. Выделение тотальной РНК из образцов проводили с помощью фенол-хлороформного метода [11]. Перед выделением РНК из тканей опухолевого очага, образцы подвергали трехкратному замораживанию-оттаиванию.

Обратная транскрипция – полимеразная цепная реакция (ОТ–ПЦР). Реакцию обратной транскрипции проводили с использованием обратной транскриптазы M-MuLV (*Promega*, США), согласно рекомендациям производителя. В качестве обратного праймера применяли олигонуклеотид, обозначенный как Fas GR-20. Нуклеотидные последовательности использованных в работе праймеров представлены в табл. 1.

Реакционная смесь для полимеразной цепной реакции содержала следующие компоненты: ПЦР буфер (85 мМ ацетата калия, 25 мМ трицина, рН 8.7, 8% глицерина, 1% диметилсульфоксида), 1.5 мМ Mg²⁺, по 0.4 мМ каждого из дНТФ, по 10 пМ прямого и обратного праймеров, 5 мкл ДНК и 5 единиц активности Taq-

Таблица 1

Первичная структура использованных в работе праймеров

Праймеры	Нуклеотидная последовательность (5'-3')
0F	CggAggATTgCTCAACAACC (20 н.о.)
GR-20	ggATTTAAGgTTggAgATT (19 н.о.)
1F	ATCCTgggCATCTggACCCT (20 н.о.)
Fas A	TTCCTTTCTCTTCACCCAA (19 н.о.)
Fas B	TTCCTTTCTCTTCACTTCC (19 н.о.)

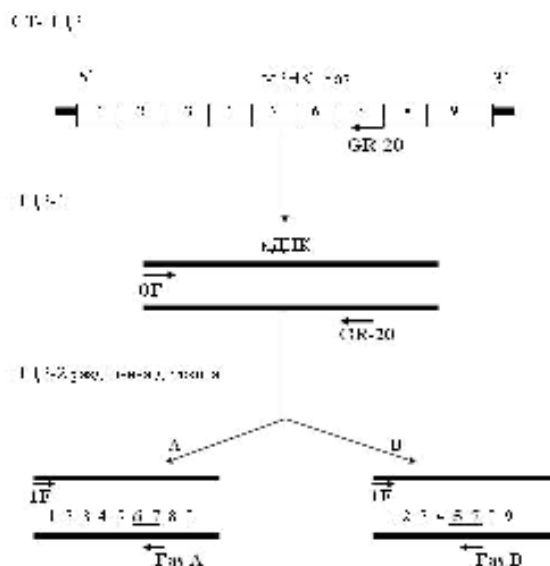


Рис. 1. Принцип метода дифференциальной детекции мембранной и альтернативных форм мРНК Fas-антигена

полимеразы. Реакционную смесь покрывали минеральным маслом и проводили 35 циклов первой ПЦР при условиях: 94°C – 30 сек, 55°C – 30 сек, 72°C – 45 сек и 25 циклов второй ПЦР при условиях: 94°C – 30 сек, 60°C – 30 сек, 72°C – 45 сек. Результаты анализировали методом электрофореза в 1.5%-ном агарозном геле в присутствии бромид этидия.

Определение нуклеотидной последовательности. Для определения нуклеотидной последовательности фрагменты кДНК вырезали из агарозного геля с последующей элюцией и очищали с использованием набора *DNA Extraction Kit* («*Fermentas*», Латвия) согласно рекомендациям производителя. Реакцию терминирования дидезоксинуклеозидтрифосфатами, меченными флюоресцентными красителями, проводили с использованием набора *BigDye Terminator v3.1 cycle sequencing kit* («*Applied Biosystems*», USA). К 5 мкл ДНК добавляли 1 мкл *BigDye Terminator*, 2 мкл буфера и 0.5 мкл праймера, инкубировали при 94°C в течение 5 мин и проводили 25 циклов ПЦР по следующей программе: 94°C – 10 сек, 50°C – 10 сек, 62°C – 4 мин. Реакционную смесь пересаждали изoproпанолом, разводили в 20 мкл деионизован-

ного формамида и прогревали при 94°C в течение 5 мин. Затем проводили анализ нуклеотидной последовательности одноцепочечной ДНК с использованием генетического анализатора *ABI Prizm 3130 Genetic Analyzer* («*Applied Biosystems*», USA).

Результаты и их обсуждение

Для изучения характера экспрессии гена, кодирующего молекулу Fas, нами были подобраны праймеры, позволяющие отдельно детектировать матричные РНК мембранной формы и альтернативных форм с различными комбинациями делеций кодирующих экзонов. В основе предложенного метода лежит использование в ПЦР олигонуклеотидных праймеров, комплементарных местам соединения экзонов мРНК молекулы Fas (рис. 1). 5' концевая область олигонуклеотидов комплементарна 7 экзону, а пять нуклеотидных оснований, расположенных на 3' конце праймера – разным олигонуклеотидным последовательностям. Для выявления мРНК, кодирующей мембранную форму молекулы Fas, использовали праймер Fas A, который отжигался на месте

соединения 6 и 7 экзонов, а для выявления мРНК доминирующей растворимой формы молекулы Fas (Fas TM Del) использовали праймер Fas B, комплементарный месту соединения 5 и 7 экзонов. Применение таких праймеров позволило одновременно проводить детекцию и других форм мРНК, образующихся в результате альтернативного сплайсинга. Подобранные праймеры были апробированы для анализа альтернативного сплайсинга мРНК молекулы Fas в лимфоцитах периферической крови здоровых волонтеров. При детекции мРНК, соответствующей мембранной форме молекулы Fas, обнаруживались также мРНК Fas с единичными или комбинированными делециями 3, 4 и 5 экзонов. Таким способом в одном и том же образце наряду с мРНК мембранной формы Fas выявлялись три альтернативные формы: мРНК Fas Del 5; мРНК Fas Del 4 и мРНК Fas Del 3,4. При детекции мРНК Fas TM Del, кодирующей доминирующую растворимую форму молекулы Fas, дополнительно выявлялись мРНК Fas Del 4,6 и мРНК Fas Del 3,4,6 (рис. 2). Наличие альтернативных форм мРНК Fas подтверждали путем прямого определения первичной структуры полученных ампликонов, элюированных из агарозного геля. Во всех случаях нуклеотидная последовательность тестированных ампликонов соответствовала ожидаемой.

Разработанный метод был использован для изучения характера альтернативного сплайсинга молекулы мРНК Fas в образцах опухолевых очагов больных раком толстого кишечника. Как видно на рис. 3, в образцах опухолевых очагов больных раком толстого кишечника в разных комбинациях обнаруживались 7 вариантов мРНК молекулы Fas. Матричная РНК мембранной формы молекулы Fas детектировалась у 100% больных. Матричная РНК доминирующей растворимой формы молекулы Fas с делецией 6 экзона обнаруживалась у 47 из 49 больных (95.9% случаев). Матричные РНК пяти минорных форм с делециями 3, 4, 5 и 6 экзонов в различных комбинациях встречались с частотой от 26.5 до 89.8%. Всего было выявлено 15 различных спектров альтернативных форм мРНК Fas, различающихся по числу и составу форм.

Приведен анализ встречаемости различных форм мРНК Fas в опухолевых клетках больных раком толстого кишечника на разных стадиях заболевания. На I или II стадиях матричная РНК мембранной и доминирующей растворимой формы молекулы Fas детектировались в 100% случаев, а мРНК пяти минорных форм в различных сочетаниях встречались с частотой от

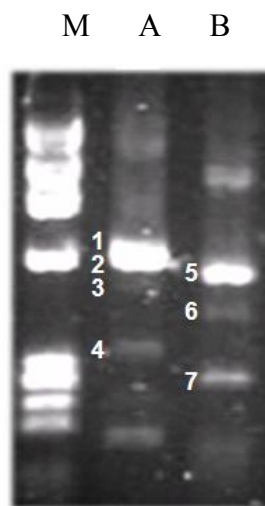


Рис. 2. Электрофореграмма детекции мРНК Fas-антигена методом ОТ-ПЦР с использованием подобранных праймеров в лимфоцитах периферической крови человека. М – ДНК PhiX 174/ Hae III – маркер молекулярных масс; А – применение обратного праймера Fas A для детекции форм мРНК Fas, содержащих последовательность 6 трансмембранного экзона; 1 – mFas – мРНК мембранной формы Fas; 2 – Fas del 5 – мРНК Fas с делецией 5 экзона; 3 – Fas del 4 – мРНК Fas с делецией 4 экзона; 4 – Fas del 3,4 – мРНК Fas с делециями 3 и 4 экзонов; В – применение праймера Fas B для детекции форм мРНК Fas, не содержащих нуклеотидную последовательность 6 трансмембранного экзона; 5 – Fas TM del – мРНК доминирующей растворимой формы Fas с делецией 6 трансмембранного экзона; 6 – Fas del 4,6 – мРНК Fas с делециями 4 и 6 экзонов; 7 – Fas del 3,4,6 – мРНК Fas с делециями 3, 4 и 6 экзонов

22.9 до 91.4%. Чаще всего обнаруживалась мРНК Fas с делециями 3 и 4 экзонов (91.4% больных), реже всего встречалась форма с делецией 4 экзона (22.9% больных) (табл. 2). Всего в образцах опухолевых очагов больных раком толстого кишечника на I или II стадиях заболевания выявлено 12 различных сочетаний (спектров) мРНК Fas на III или IV стадиях рака толстого кишечника матричная РНК мембранной формы молекулы Fas также детектировалась в 100% случаев. Однако на третьей стадии мРНК доминирующей растворимой формы не обнаруживалась у двух из 9 больных (22.2%). Матричная РНК пяти минорных форм с делециями 3, 4, 5 и 6 экзонов в различных комбинациях встречались у больных на III или IV стадиях рака толстого кишечника с частотой от 14.3% до 85.7%. (табл. 2). При этом ни у одного больного на третьей стадии заболевания не детектировалась мРНК Fas с делецией 5 экзона, а на четвертой стадии рака толстого кишечника в образцах опухоли всех обследованных больных отсутст-

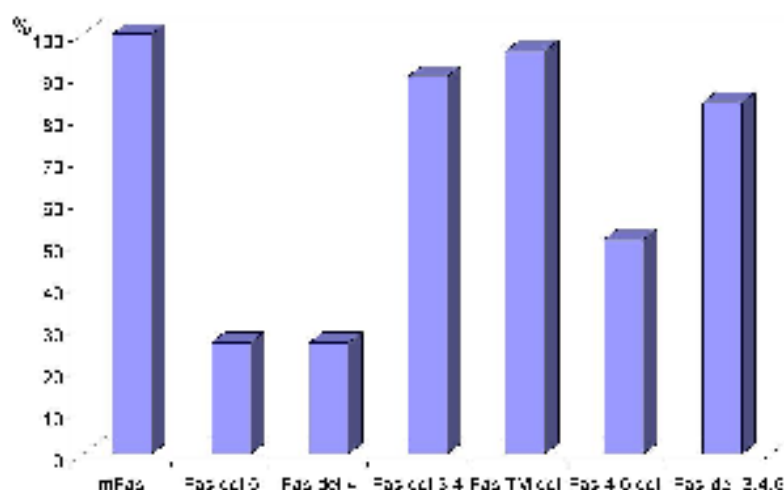


Рис. 3. Частота встречаемости мРНК альтернативных форм молекулы Fas в клетках опухолевого очага при раке толстого кишечника. mFas – мРНК мембранной формы Fas; Fas del 5 – мРНК Fas с делецией 5 экзона; Fas del 4 – мРНК Fas с делецией 4 экзона; Fas del 3,4 – мРНК Fas с делециями 3 и 4 экзонов; sFas/Fas TM del – мРНК доминирующей растворимой формы Fas с делецией 6 трансмембранного экзона; Fas del 4,6 – мРНК Fas с делециями 4 и 6 экзонов; Fas del 3,4,6 – мРНК Fas с делециями 3, 4 и 6 экзонов

Таблица 2

Частота встречаемости мРНК альтернативных форм Fas в клетках опухолевых очагов на I или II и III или IV стадиях заболевания

Альтернативная форма мРНК Fas	Относительная частота встречаемости формы, % на I или II стадиях	Абсолютная частота встречаемости формы на I или II стадиях	Относительная частота встречаемости формы, % на III или IV стадиях	Абсолютная частота встречаемости формы на III или IV стадиях
mFas	100.0	35 из 35	100.0	14 из 14
Fas TM del	100.0	35 из 35	85.7	12 из 14
Fas del 5	31.4	11 из 35	14.3	2 из 14
Fas del 4	22.9	8 из 35	35.7	5 из 14
Fas del 3,4	91.4	32 из 35	85.7	12 из 14
Fas del 4,6	48.6	17 из 35	57.1	8 из 14
Fas del 3,4,6	85.7	30 из 35	78.6	11 из 14

Таблица 3

Частота встречаемости мРНК альтернативных форм Fas в клетках опухолевых очагов на III и IV стадиях заболевания

Альтернативная форма мРНК Fas	Относительная частота встречаемости формы на III стадии, %	Абсолютная частота встречаемости формы на III стадии	Относительная частота встречаемости формы на IV стадии, %	Абсолютная частота встречаемости формы на IV стадии
mFas	100.0	9 из 9	100	5 из 5
Fas TM del	88.9	8 из 9	80.0	4 из 5
Fas del 5	0	0 из 9	40.0	2 из 5
Fas del 4	55.6	5 из 9	0	0 из 5
Fas del 3,4	77.8	7 из 9	20.0	1 из 5
Fas del 4,6	55.6	5 из 9	60.0	3 из 5
Fas del 3,4,6	77.8	7 из 9	80.0	4 из 5

вовала мРНК Fas с делецией 4 экзона (табл. 3). Всего в образцах опухолевых очагов от больных раком толстого кишечника с III и IV стадией заболевания было обнаружено 8 различных спектров мРНК, отличающихся как по

числу, так и составу форм мРНК Fas. Выявленные различия в спектрах мРНК Fas являются, вероятно, характерной особенностью альтернативного сплайсинга мРНК молекулы Fas в опухолевых клетках больных раком толстого ки-

шечника на поздних стадиях заболевания. Таким образом, изучение спектров мРНК Fas позволило выявить особенности транскриптома опухолевых клеток больных раком толстого кишечника на разных стадиях заболевания. Отсутствие мРНК Fas с делециями 5 и 4 экзонов соответственно на третьей и четвертой стадиях заболевания возможно определяет разный характер работы сигнальных путей, связанных с реализацией апоптотических процессов в опухолевых клетках.

Работа выполнена при поддержке ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009–2013 годы.

Список литературы

1. Gazin C., Wajapeyee N., Gobeil S. et al. An Elaborate Pathway Required for Ras-Mediated Epigenetic // *Silencing Nature*. 2007. V. 449. № 7165. P. 1073–1077.
2. Muschen M., Warsculat U., Beckmann M.V. Defining CD95 as a tumor suppressor gene // *J. Mol. Med*. 2000. V. 78. P. 312–325.
3. Carlile G.W., Smith D.H., Wiedmann M. A non-apoptotic role for Fas/FasL in erythropoiesis // *FEBS Letters*. 2009. V. 583. P. 848–854.
4. O' Reilly L.A., Tai L., Lee L. et al. Membrane-bound Fas ligand only is essential for Fas-induced apoptosis // *Nature*. 2009. V. 461. P. 659–663.
5. Otsuki T., Sakagushi H., Tomokuni A. et al. Detection of alternatively spliced variant messages of Fas gene and mutational screening of Fas and Fas ligand coding regions in peripheral blood mononuclear cells derived from silicosis patients // *Immunology Letters*. 2000. V. 72. P. 137–143.
6. Bidère N., Su H.C., Lenardo M.J. Genetic disorders of programmed cell death in the immune system // *Annual Review of Immunology*. 2006. V. 24. P. 321–352.
7. Aggarwal B. B. Signaling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword // *Nat. Rev. Immunol*. 2003. V. 3. P. 745–756.
8. Schulze-Osthoff K., Ferrari D., Los M. et al. Apoptosis signaling by death receptors // *Eur. J. Biochem*. 1998. V. 254. P. 439–459.
9. Рыжов С.В., Новиков В.В. Молекулярные механизмы апоптотических процессов // *Росс. биотерап. журн*. 2002. Т. 1. № 3. С. 27–33.
10. Proussakova O.V., Rabaya N.A., Moshnikova A.B. et al. Oligomerization of soluble Fas antigen induces in cytotoxicity // *J. Biol. Chem*. 2003. V. 278. P. 36236–36241.
11. Sambrook J., Russel D.W. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* // NY, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. P. 603–757.

Fas mRNA ALTERNATIVE SPLICING IN COLORECTAL CANCER TUMOR CELLS

N.A. Sakharnov, D.V. Novikov, A.V. Alyasova, V.V. Novikov

Seven alternative forms and 15 different spectra of Fas mRNA molecule have been revealed in the tumor cells of colorectal cancer patients. Tumor cells of colorectal cancer stage III patients have not shown the presence of Fas mRNA molecule with the deletion of exon 5, and in those of stage IV patients, Fas mRNA molecule with the deletion of exon 4 has not been detected.

Keywords: Fas molecule, alternative mRNA splicing, colorectal cancer.