

ВОЛКОМОРОВ ВИКТОР ВЛАДИМИРОВИЧ

**ИДЕНТИФИКАЦИЯ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МАРКЕРОВ
АДЕНОКАРЦИНОМЫ ЖЕЛУДКА РАЗЛИЧНЫХ
ГИСТОЛОГИЧЕСКИХ ТИПОВ**

03.01.04 – биохимия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Новосибирск – 2015

Работа выполнена в Томском НИИ онкологии и Томском государственном университете

Научные руководители:

доктор биологических наук,
профессор

Стегний Владимир Николаевич

доктор биологических наук,
профессор

Чердынцева Надежда Викторовна

Официальные оппоненты:

Гуляева Людмила Федоровна, доктор биологических наук, профессор, руководитель лаборатории молекулярных механизмов канцерогенеза ФГБНУ «Научно-исследовательский институт молекулярной биологии и биофизики»

Рукша Татьяна Геннадьевна, доктор медицинских наук, профессор, заведующая кафедрой патологической физиологии им. проф. В.В.Иванова ГБОУ ВПО «Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого» МЗ РФ

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научно-исследовательский институт онкологии имени Н.Н. Петрова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (г. Санкт-Петербург)

Защита состоится «25» ноября 2015 года в 10.00 часов на заседании диссертационного совета Д 001.034.01 при Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Научно-исследовательский институт биохимии» по адресу: 630117, г. Новосибирск, ул. Тимакова, 2

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт биохимии» по адресу: <http://www.niibch.ru>

Автореферат разослан «__» _____ 2015 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук

Русских Г.С.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

Одним из важных направлений совершенствования диагностики и лечения злокачественных новообразований является поиск дифференциально экспрессируемых в опухолевой и нормальной ткани молекулярно-биологических маркеров, которые могут быть использованы для ранней диагностики, оценки прогноза течения заболевания, радикальности операции и эффективности лечения, а также раннего выявления рецидивов после проведенного лечения. Для их поиска используются методы, основанные на сравнительном анализе геномов, транскриптомов и протеомов опухолевых и нормальных клеток. Особенности биологического поведения каждой опухоли определяются специфическими биохимическими и молекулярно-генетическими изменениями. Идентификация патогенетически значимых мутаций и особенностей экспрессии генов в опухоли важна для модификации лечения при возникновении лекарственной резистентности (Hanahan, Weinberg, 2011; Dawson et al., 2013; Имянитов, 2007; Diamandis, 2014). Важным также представляется выявление активированных сигнальных путей, обеспечивающих биологическое поведение опухолевых клеток, на основе сравнительной оценки генной экспрессии, что может обозначить не только эффективные маркеры рака, но и мишени для патогенетической терапии (Yu et al., 2012)

Для получения подобного рода информации широко применяются различные транскриптомные методы исследования, результаты которых содержатся в электронных базах данных (Oncomine, dbEST, NCBI, Gene Ontology и др.). Каждый из этих методов обладает рядом недостатков, которые необходимо учитывать при работе с упомянутыми электронными ресурсами (Diamandis et al., 2006, Букурова и др., 2013).

Надежность и достоверность полученных результатов можно повысить, применяя комплексный подход, учитывающий данные как можно большего числа из перечисленных ресурсов. Подобный анализ способен выявить мРНК-маркеры, которые могут быть использованы для ПЦР-анализа биопсийного материала, в котором мРНК достаточно стабильны, однако их использование для ранней диагностики практически невозможно. Поэтому на практике в качестве опухолевых маркеров (ОМ) чаще всего выступают белки, обычно липо- и гликопротеины, которые можно выявлять не только в ткани, но и в циркуляции (Pavlou, Diamandis, Blasutig, 2013). При этом непосредственно судить о состоянии протеома ткани по данным о соответствующем транскрипционном профиле затруднительно. Однозначная связь между изменениями на уровне мРНК и белка наблюдается далеко не всегда (Unwin, Whetton, 2006). Поэтому изучение молекулярного патогенеза злокачественных новообразований требует более комплексного подхода, включающего оценку особенностей сигнальных путей как на транскриптомном, так и на протеомном уровне функционирования (Zhang, et al., 2014).

В настоящем исследовании представлены результаты поиска маркеров, ассоциированных с раком желудка (РЖ), с использованием указанного комплексного подхода. РЖ занимает одну из ведущих позиций среди злокачественных новообразований и 2-е место по показателям смертности в РФ (Давыдов, Аксель 2014). В настоящее время в клинической практике отсутствуют молекулярно-генетические тесты, обеспечивающие эффективную раннюю диагностику путем детекции специфичных для РЖ биологических маркеров. В 95% случаев РЖ представлен аденокарциномой двух разных гистотипов - интестинального и диффузного, имеющих существенные различия по прогнозу и молекулярному патогенезу (Имянитов, 2009, 2013; Wang *et al.*, 2009; Nagini, 2012). Последнее обстоятельство делает актуальной работу по планомерному поиску генов, белковые продукты которых могут служить маркерами ранней диагностики или прогноза клинического течения рака желудка разных гистологических типов. Наибольшее число исследований по поиску маркеров РЖ на транскрипционном и трансляционном уровнях проведено в популяциях Японии, Китая и Латинской Америки, в которых РЖ занимает лидирующие позиции по показателям заболеваемости и смертности, при этом спектры ассоциированных с РЖ генов, выявленных в разных популяциях, существенно различаются (Maconi, 2008; Watanabe, 2009; Yasui, 2004). Исследований подобного рода в России практически нет, что указывает на актуальность их проведения, которая подчеркивается фактом наличия популяционных особенностей.

Цель работы: Идентификация генов, вовлеченных в патогенез аденокарциномы желудка интестинального и диффузного типов, на основе комплексного биоинформационного поиска и валидации дифференциальной экспрессии выявленных генов в опухолевой и нормальной ткани на клиническом материале больных раком желудка

Задачи исследования

1. Проведение биоинформатического поиска с использованием баз данных микроРНК и мРНК (TargetScan, SAGE, Oncomine, Gene Ontology, Cancer Genome Atlas) для выявления генов, характеризующихся повышенным уровнем экспрессии на транскрипционном и трансляционном уровне в аденокарциномах желудка.

2. Оценка уровня экспрессии выявленных при биоинформатическом анализе генов в парных образцах опухолевой и нормальной ткани у больных с диффузным и интестинальным типом рака желудка.

3. Изучение связи экспрессии генов - потенциальных маркеров рака желудка с основными патогенетическими признаками злокачественного процесса у больных с аденокарциномой диффузного и интестинального типов.

4. Исследование прогностической значимости транскрипционной активности выявленных генов.

5. Получение высокочувствительных антител для детекции белка РМЕРА1 в биологических образцах человека.

6. Характеристика содержания и внутриклеточной локализации PМЕРА1 в опухолевой ткани с использованием полученных в работе антител у больных с аденокарциномой диффузного и интестинального типов и оценка его потенциальной прогностической значимости.

Научная новизна

Для выявления генов, потенциально вовлеченных в патогенез аденокарциномы желудка, впервые применен оригинальный комплексный подход, включающий анализ баз данных микроРНК, мРНК и литературных источников, с последующей валидацией дифференциальной экспрессии на транскрипционном уровне с использованием коллекции биологических образцов больных с различными гистологическими типами рака желудка. Выявлено 8 генов: *WNT4*, *HSPG2*, *CTGF*, *EFEMP1*, *SPARC*, *SULF1*, *PМЕРА1* и *FGF12*, ассоциированных с РЖ.

Впервые для российской популяции проведен количественный анализ экспрессии выявленных с помощью биоинформационного анализа генов *WNT4*, *HSPG2*, *CTGF*, *EFEMP1*, *SPARC*, *SULF1*, *PМЕРА1* и *FGF12* в парных образцах опухолевой и нормальной ткани желудка и показана их дифференциальная экспрессия в опухоли и нормальной слизистой желудка.

Впервые показана более высокая экспрессия генов *WNT4* и *CTGF* в ткани аденокарциномы желудка диффузного типа по сравнению с интестинальным типом.

Впервые с использованием оригинального биоинформатического подхода, основанного на анализе данных базы TCGA, выявлено два гена (*PМЕРА1* и *SPARC*), преимущественно экспрессирующихся в опухолях желудка интестинального типа. На коллекции собственных клинических образцов аденокарциномы желудка показано повышение транскрипционной активности генов *PМЕРА1* и *SPARC* в ткани опухоли желудка интестинального гистологического типа. Впервые выявлена связь экспрессии гена *PМЕРА1* с регионарным метастазированием.

На примере гена *PМЕРА1* выявлено несоответствие транскрипционной и трансляционной активности гена. Впервые для белка PМЕРА1 показан более низкий уровень экспрессии в аденокарциноме желудка по сравнению с соответствующей нормальной тканью. Получены новые данные о связи выраженности диспластических изменений слизистой желудка, аденомы и аденокарциномы желудка с уменьшением доли PМЕРА1-позитивных клеток в эпителии.

Теоретическая и практическая значимость

Показана вовлеченность генов *CTGF* и *FGF12* в патогенез аденокарцином диффузного, а генов *WNT4*, *SPARC* и *PМЕРА1* – в патогенез аденокарцином желудка интестинального гистологического типа. Полученные данные определяют актуальность их дальнейшего изучения для прояснения механизмов формирования и прогрессии рака желудка, необходимость проведения оценки их прогностической значимости и возможности использования в качестве мишеней для химиотерапии.

Полученные в работе оригинальные антитела к белку РМЕРА1, специфичность которых подтверждена с использованием вестерн-блот анализа и иммуноцитохимии, могут быть рекомендованы для коммерциализации с целью их использования для детекции белка РМЕРА1 в биологических образцах в соответствующих клинических ситуациях.

Пилотные данные о дифференциальной экспрессии белка РМЕРА1 в ряду «нормальная слизистая – аденома – аденокарцинома желудка» свидетельствуют о перспективности дальнейших исследований по валидации прогностической значимости этого маркера в отношении прогноза малигнизации диспластических изменений слизистой желудка.

Положения, выносимые на защиту

1. Комплексный метод с использованием биоинформатического поиска по базам данных микро РНК и мРНК (TargetScan, SAGE, Oncomine, dbEST Gene Ontology, Cancer Genome Atlas) и валидации полученных результатов на клинических образцах с помощью оценки транскрипционной активности методом ПЦР в реальном времени может служить инструментом для выявления высокоэкспрессируемых генов, ассоциированных со злокачественными новообразованиями.

2. Ассоциация экспрессии генов *WNT4*, *HSPG2*, *CTGF*, *EFEMP1*, *SPARC*, *РМЕРА1* и *FGF12* с различными гистологическими типами аденокарциномы желудка свидетельствует об их вовлечении в патогенез данного заболевания.

3. Ген *РМЕРА1* является потенциальным маркером аденокарциномы желудка интестинального гистологического типа. Полученные в работе антитела к белку РМЕРА1 являются инструментом для его выявления в ткани желудка и валидации его прогностической значимости в качестве маркера при оценке риска малигнизации эпителия желудка.

Апробация работы

Основные результаты диссертационной работы были представлены на VI-VIII Региональной конференции молодых ученых-онкологов «Актуальные вопросы экспериментальной и клинической онкологии» (Томск, 2011, 2012, 2013), 49 и 50й Международной научной студенческой конференции "Студент и научно-технический прогресс" (Новосибирск, 2011, 2012), первой всероссийской научной конференции молодых ученых-медиков «Инновационные технологии в медицине XXI века» (Москва 2012), 38-м Конгрессе Федерации Европейских Биохимических Обществ (FEBBS) (Санкт-Петербург, 2013), 8-й и 10-й конференции по фундаментальной онкологии "Петровские чтения" (Санкт-Петербург, 2012, 2014), международной конференции «Клеточные и молекулярные механизмы, взаимоотношения опухоли и микроокружения» (Томск, 2015), международной конференции молодых ученых биотехнологов, молекулярных биологов и вирусологов в рамках площадки открытых коммуникаций OpenBio (Кольцово, 2015).

Работа выполнена при поддержке Федеральной целевой программы «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития

национально-технологического комплекса России на 2014-2020 годы», Соглашение № 14.575.21.0064 от 05 августа 2014 года (RFMEFI57514X0064).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 14 печатных работ, отражающих основные положения диссертации, из них 3 журнальные статьи в рецензируемых научных журналах и 11 тезисных работ в материалах региональных, всероссийских и международных съездов и конференций, получен патент на изобретение.

Объем и структура диссертации. Диссертационная работа изложена на 149 страницах машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, собственных результатов и их обсуждения, заключения и выводов. Данные проиллюстрированы 15 таблицами, 20 рисунками. Библиографический список включает 304 источника, из них 13 работ отечественных авторов.

Личный вклад автора

Основные результаты работы получены при непосредственном участии автора в планировании и проведении исследований, им проведена статистическая обработка данных, обсуждены и интерпретированы полученные результаты, написаны статьи.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Научные положения диссертации соответствуют паспорту специальности 03.01.04 – биохимия, конкретно – пункту 11.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Биоинформатический поиск. Поиск проводился на основе баз данных и литературных источников с целью выявления микроРНК, уровень синтеза которых значительно понижается в опухолях по сравнению с нормой с последующей идентификацией и ранжированием регулируемых ими мРНК с использованием оригинального алгоритма с помощью электронных ресурсов TargetScan (<http://genes.mit.edu/tscan/targetscanS.html>) и SAGE (<http://cgap.nci.nih.gov/SAGE>) (Bukurova et. al., 2011). Поиск генов с дифференциальной экспрессией в опухолевой и нормальной ткани на транскрипционном уровне проводили в двух повторностях: с использованием баз данных мРНК Oncomine, SAGE, dbEST и NCBI и с использованием баз данных Gene Ontology и TCGA.

Материал. В исследование включено 126 парных образцов опухолевой ткани и нормальной слизистой желудка от 63 больных с аденокарциномой желудка стадии IA-IV, получивших лечение в клинике Томского НИИ онкологии в 2008-2011 годах. Работа проведена с соблюдением принципов добровольности и конфиденциальности в соответствии с «Основами законодательства РФ об охране здоровья граждан» (Указ Президента РФ от 24.12.1993 № 2288), получено разрешение этического комитета института и информированные согласия пациентов. Средний возраст больных 58,3±1,5 лет, 55,6% - пациенты с интестинальным, 44,4% – с диффузным типом опухоли. Глубину инвазии опухоли T1-2 имели 35% пациентов, T3-4 – 65%, метастазы в региональные лимфоузлы отмечены у 60% пациентов. Образцы опухолевой и немалигнизированной ткани слизистой желудка были

получены при оперативном вмешательстве, помещались в раствор «RNAlater» (Ambion, USA) и сохранялись при температуре -80°C . Тотальная РНК была выделена из образцов тканей с помощью набора RNeasy Plus mini Kit, содержащего ДНК-азу I (Qiagen, Germany, #74134). Для получения кДНК на матрице РНК проводили реакцию обратной транскрипции с помощью набора RevertAidtm (Fermentas, Латвия).

Оценка экспрессии генов. Экспрессию генов оценивали при помощи количественной ПЦР с обратной транскрипцией в режиме реального времени (ОТ-ПЦР, англ. RT-qPCR) по методу ΔC_q (пороговый метод сравнения графиков накопления ДНК). Для нормализации уровней экспрессии использовали ген-рефери *ACTB* (Rajkumar T. et. al., 2010). Последовательность праймеров и зондов (FAM-BHQ) подбирали при помощи программы Vector NTI 11.5 с использованием генетического банка данных NCBI GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>).

Статистический анализ. Статистическую обработку данных проводили с помощью пакета программ “STATISTICA 6.0”. Оценка различий уровня генной экспрессии в парных образцах нормальной слизистой и опухоли проводилась с помощью U-критерия Манна-Уитни. Оценку безрецидивной выживаемости проводили с помощью лог-рангового критерия. Значимость различий в количестве больных с повышенной/пониженной экспрессионной активностью гена в опухоли оценивали с помощью критерия χ^2 с поправкой Йетса.

Получение моноклональных антител (мкАТ) к белку РМЕРА1. В качестве иммуногена при иммунизации крыс использовался синтетический пептид 275WSKEKDKQKGHPL287, представляющий из себя С-концевую цитоплазматическую часть РМЕРА1, конъюгированный с БСА и овалбумином (Peptide Specialty Laboratories, Heidelberg, Германия). Очистка препаратов антител проводилась с помощью аффинной хроматографии на колонке HiTrap MabSelect (GE Healthcare).

Иммуноблотинг. Белковые экстракты, содержащие 20 мкг белка в 10-15 мкл, подвергали электрофоретическому разделению по методу Лэммли в градиентном полиакриламидном геле (10-20%) и электропереносу на поливинил-дифторидную мембрану Immobilon-P Transfer Membrane (Millipore, США). При исследовании образцов тканей специфическую реакцию оценивали на пленке для выявления хемолюминесценции с помощью ECL Plus Western Blotting Detection System.

Иммуногистохимическое исследование (ИГХ) осуществлялось по стандартной методике на срезах нормальной и опухолевой тканей желудка. Использовали антитела фирмы “Novocastra” и систему визуализации “Liquid DAB” (Dako, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

1.1 Поиск молекулярных маркеров аденокарциномы желудка с использованием баз данных микроРНК

Используемый в данной работе подход основан на двойном отборе – идентификации генов, для которых повышение экспрессии в опухоли по

сравнению с нормальной слизистой происходит как на уровне транскрипции, так и на уровне трансляции (Bukurova IuA et. al., 2011). Также проведена оценка степени влияния микроРНК, как с пониженным, так и с повышенным уровнем экспрессии в опухоли. В качестве окончательных кандидатов отобрано 16 генов, для которых увеличение уровня экспрессии происходит наиболее вероятно как на уровне транскрипции, так и на уровне трансляции, из которых для дальнейшего транскрипционного анализа были выбраны: *WNT4*, *FGF12*, *EFEMP1*, *CTGF*, и *HSPG2*. Эти пять генов участвуют в регуляции таких процессов, как митотическая активность, апоптоз, миграция, генная экспрессия, пролиферация и регенерация. Кроме того, некоторые из этих генов функционально связаны между собой посредством важных в онкогенезе регуляторных белков: TGF β (transforming growth factor beta) и HSPG (heparan-sulfate proteoglycan), - и, ввиду тех функций, которые они выполняют, вовлечены в патогенез злокачественных новообразований, в том числе и РЖ. Для валидации данных биоинформатического анализа мы оценили уровень транскрипции указанных генов в парных образцах опухолевой и нормальной ткани желудка методом количественной ПЦР с обратной транскрипцией в режиме реального времени.

1.2 Поиск молекулярных маркеров аденокарциномы желудка с использованием транскрипционных баз данных

Поиск генов с дифференциальной экспрессией в опухолевой и нормальной ткани на транскрипционном уровне проводили в двух повторностях: с использованием баз данных мРНК Oncomine, SAGE, dbEST и NCBI (Bukurova IuA, , et. al. 2011) и с использованием баз данных Gene Ontology и TCGA. В результате поиска на основе баз данных Oncomine и dbEST были выявлены гены *GPNMB*, *SPARC*, *SULF1*, *CLDN4*, *AKR1B10*, *PMEPA1* и *INHBA*, в то время как при анализе баз данных Gene Ontology и TCGA - *SULF1*, *PMEPA1* и *SPARC*. Присутствие генов *SULF1*, *PMEPA1* и *SPARC* как в том, так и в другом списке говорит о наибольшей вероятности их повышенной транскрипционной активности в опухолевой ткани. В настоящей работе проведено подтверждение дифференциальной генной экспрессии генов *SULF1*, *SPARC* и *PMEPA1* с использованием образцов опухолей от больных с аденокарциномой желудка.

1.3 Подтверждение дифференциальной экспрессии генов *WNT4*, *FGF12*, *EFEMP1*, *PMEPA1*, *SPARC*, *SULF1*, *CTGF* и *HSPG2* методом ОТ-ПЦР

При сравнении уровней экспрессии исследуемых генов в нормальной слизистой и аденокарциноме желудка относительно *ACTB*, в общей группе пациентов, то есть независимо от гистотипа, для генов *WNT4*, *PMEPA1*, *HSPG2*, *SULF1*, *SPARC*, *CTGF*, *EFEMP1* и *FGF12* статистически значимой разницы отмечено не было ($p > 0,05$, данные не представлены).

Индивидуальный анализ показал, что у большинства пациентов не наблюдается изменений экспрессии изучаемых генов в опухоли по сравнению с нормой, а число больных с повышенной или пониженной экспрессией в 2 и более раз, было практически одинаковым. Лишь для гена

FGF12 у 42,5% больных выявлено повышение экспрессии в опухолевой ткани, в то время как для 27,5% пациентов показано уменьшение и для 30% - равная экспрессия в опухоли и нормальной слизистой ($p=0,01$).

В опухолях интестинального гистологического типа была показана значимо более низкая экспрессия гена *WNT4* по сравнению с нормальной тканью (в 2,7 раза, $p<0,05$). В то же время выявлено статистически значимое повышение транскрипционной активности генов *PMEPA1* и *SPARC* в опухоли ($p<0,001$), двукратное для *PMEPA1* и более чем двукратное, для *SPARC* (рисунок 1).

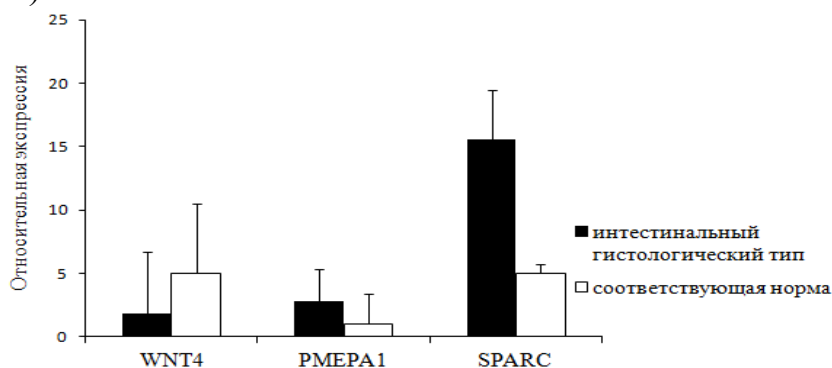


Рисунок 1 - Уровень экспрессии генов *WNT4*, *PMEPA1* и *SPARC* в опухолевой и нормальной ткани желудка больных с интестинальным типом аденокарциномы желудка ($Me\pm StD$, $p<0,05$, U-тест Манна-Уитни).

Более высокий уровень экспрессии генов *PMEPA1* и *SPARC* был характерен только для интестинального типа аденокарциномы желудка.

При сравнении диффузного и интестинального гистологического типа опухоли между собой была выявлена значимо более высокая экспрессионная активность генов *CTGF* и *FGF12* в опухолях диффузного типа ($p<0,0$ U-тест Манна-Уитни). Было выявлено, что больные без метастазов в регионарные лимфоузлы характеризуются значимо более низкой экспрессией гена *HSPG2* в опухоли. У больных с наличием метастазов в регионарные лимфоузлы (N1-N3) наблюдалось значимое повышение в опухоли уровня экспрессии генов *CTGF* и *PMEPA1* по сравнению с соответствующей нормой, для пациентов с локализованным процессом такой закономерности отмечено не было (рисунок 2).

При разделении больных в соответствии с глубиной инвазии опухоли, наблюдалась более высокая экспрессия в опухоли генов *PMEPA1* и *SPARC*, в группе больных с T₁₋₂ ($p<0,05$, данные не представлены).

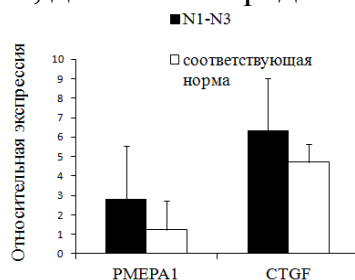


Рисунок 2 - Уровень экспрессии генов *PMEPA1* и *CTGF* в опухолевой и нормальной ткани желудка больных с наличием метастазов в регионарные лимфоузлы

Таким образом, при проведении оценки уровня транскрипции выбранных с помощью биоинформатического поиска генов в аденокарциномах желудка, были выявлены существенные изменения экспрессии генов *FGF12*, *WNT4*, *CTGF*, *HSPG2*, *PMEPA1* и *SPARC*.

1.4 Оценка прогностической значимости уровня экспрессии выявленных генов

В соответствии с отдаленными результатами лечения выборка больных была подразделена на две группы: с выявленными и не выявленными на момент последнего осмотра отдаленными метастазами. В результате анализа уровня экспрессии генов *WNT4*, *PMEPA1*, *HSPG2*, *CTGF*, *EFEMP1*, *FGF12*, *SPARC*, *SULF1* в группах больных с неблагоприятным и благоприятным исходом не было выявлено различий экспрессии для всех тестируемых генов. При анализе общей выживаемости пациентов не выявлено различий показателя между группами больных с повышенной или пониженной экспрессией исследуемых генов.

Многими исследователями отмечается относительно низкая прогностическая значимость уровня мРНК (Pavlou et al, 2013), что связано с возможными посттранскрипционными модификациями и регуляцией экспрессии гена на уровне трансляции. Подобная ситуация была показана нами на примере гена циклофилина А (*CYPA*). Для этого мы провели работу по сравнительной оценке прогностической значимости генной и белковой экспрессии *CYPA*. В результате проведения относительного количественного анализа экспрессии данного гена по уровню мРНК в ткани аденокарциномы и нормальной слизистой желудка в общей группе больных, а также в зависимости от лимфогенного метастазирования, глубины инвазии опухоли или ее гистологического типа, значимых различий показано не было. Однако была показана специфичная по отношению к гистологическому типу опухоли ассоциация негативной белковой экспрессии циклофилина с рецидивированием заболевания. Так, при интестинальном гистологическом типе негативная экспрессия *CYPA* была ассоциирована с локорегионарными рецидивами, а при диффузном – с гематогенным метастазированием.

Полученные результаты говорят о том, что экстраполяция данных об экспрессии какого-либо гена, полученных с помощью ОТ-ПЦР, на его трансляционную активность в опухоли весьма затруднительна. Наличие связи его дифференциальной экспрессии с тем или иным клинико-патологическим параметром может являться лишь предпосылкой к наличию такой же закономерности на белковом уровне его экспрессии. Поэтому для суждения о вовлеченности любого гена в патогенез РЖ и влиянии его продукта на клиническое течение заболевания, необходим анализ не только его транскрипционной, но и трансляционной активности с помощью специфических мкАТ.

1.5. Получение моноклональных антител к белку PMEPA1 и тестирование их специфичности

Для получения собственных специфичных мкАТ, нами был выполнен поиск участков локализации антигенных детерминант, стерически наиболее доступных для взаимодействия с АТ.

В качестве антигена использовался синтетический пептид 275 WSKEKDKQKGHPL 287 , представляющий из себя С-концевую цитоплазматическую часть белка РМЕРА1. В результате были отобраны три клона гибридом, продуцирующие анти-РМЕРА1 мкАТ различных подклассов иммуноглобулинов класса G (10А7 - IgG2с, 2Е1 - IgG2b, 6С6 - IgG2а). Полученные мкАТ были очищены с помощью сорбента MabSelect (GE Healthcare, USA) и протестирована их способность специфически связывать рекомбинантный белок РМЕРА1 в лизатах клеток линии Нек293Т, экспрессирующих РМЕРА1, методом вестерн-блот анализа (рисунок 3).

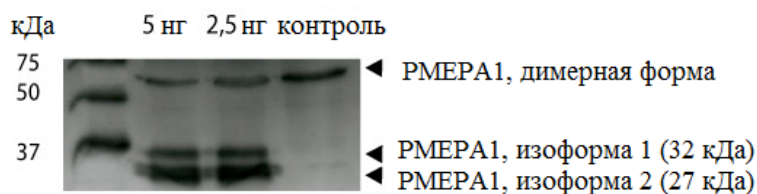


Рисунок 3 – Результат трансфекции клеток линии Нек293Т различным количеством экспрессионного вектора.

Для этого клетки линии Нек293Т трансфицировали экспрессионным вектором pIRES, содержащим вставку, кодирующую полноразмерный РМЕРА1 изоформы а, после чего лизировали RIPA буфером. Антитела клонов 2Е1 и 6С6 – помимо связывания с двумя изоформами РМЕРА1 (рисунок 3), специфически связывают белок, молекулярная масса которого приблизительно равна 65 kDa. Вероятно, этот бенд соответствует димерной форме белка РМЕРА1.

Способность полученных антител распознавать целевой белок в интактных клетках оценивали с помощью метода иммуноцитохимии. В иммуноцитохимическом исследовании полученные антитела выявляют цитоплазматическую локализацию РМЕРА1.

Чтобы установить возможность использования полученных мкАТ для оценки экспрессии методом иммуногистохимии, были проведены ИГХ исследования образцов ткани предстательной железы человека. При оценке экспрессии РМЕРА положительная реакция наблюдалась только в образцах при использовании мкАТ клона 10А7, при этом отмечена ядерно-цитоплазматическая экспрессия РМЕРА (рисунок 5).

Специфичность полученных антител была подтверждена методами иммуноблота и иммуноцитохимии. Клоны α РМЕРА1 mAb проявляли различную эффективность при их использовании в этих методиках. Наибольшую активность в иммуноблоте показали антитела клона 2Е1, в то время как с помощью клона 10А7 РМЕРА1 мог быть эффективно выявлен при иммуноцитохимическом анализе трансфицированных клеток линии Нек293Т.

1.6 Содержание РМЕРА1 в клинических образцах ткани желудка.

Определение характера экспрессии РМЕРА1 с помощью полученных мкАТ в парных клинических образцах больных аденокарциномой желудка методом вестерн-блот анализа показало значительное снижение содержания белка в опухолевой ткани по сравнению с соответствующей нормой (рисунок 4).

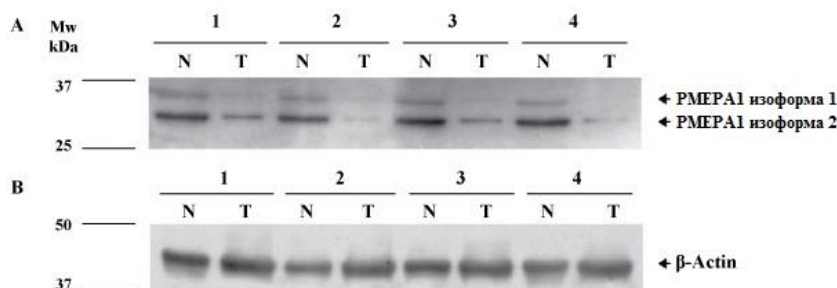


Рисунок 4– Вестерн-блот анализ РМЕРА1 в парных образцах нормальной (N) и опухолевой (T) ткани больных аденокарциномой желудка.

Чтобы установить возможность использования полученных АТ для выявления РМЕРА1 в опухолевой ткани, была проведена оценка экспрессии белка на срезах нормальной ткани и аденокарциномы желудка (рисунок 5). Выявляемая ядерно-цитоплазматическая экспрессия РМЕРА является характерной и для некоторых других белков, имеющих в своей структуре мотивы, взаимодействующие с WW-доменами убиквитин лигазы Nedd4 (Harvey et al 2002).

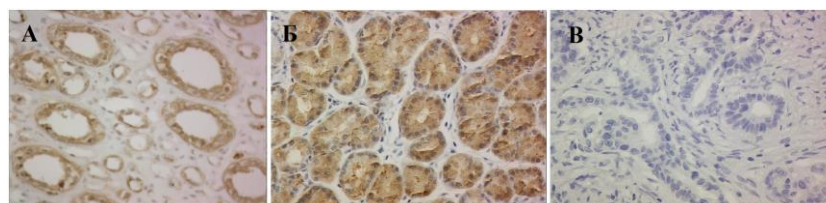


Рисунок 5 – Иммуногистохимическое исследование с использованием мкАТ клона 10А7 в разведении 1:100. А-нормальная ткань предстательной железы, Б - нормальная слизистая желудка; В - аденокарцинома желудка интестинального гистологического типа, Ув.х 200.

Для оценки вовлечения РМЕРА1 в патогенез рака желудка был проведен анализ его экспрессии в опухолевой ткани *in situ* в образцах аденомы, аденокарциномы и нормального эпителия желудка. Обнаружена высокая экспрессия РМЕРА1 в нормальной слизистой желудка, однако при оценке препаратов аденомы и аденокарциномы желудка, клетки, содержащие белок РМЕРА1, практически отсутствуют (рисунок 6). При этом важным является тот факт, что клетки эпителия желудка теряют экспрессию РМЕРА1 с момента возникновения морфологических признаков тяжелых диспластических изменений. Препарат аденомы на рисунке 6 характеризуется дисплазией высокой степени тяжести, а исследование срезов с диспластическими локусами легкой и средней степени тяжести выявило экспрессию РМЕРА1 на уровне нормального эпителия.

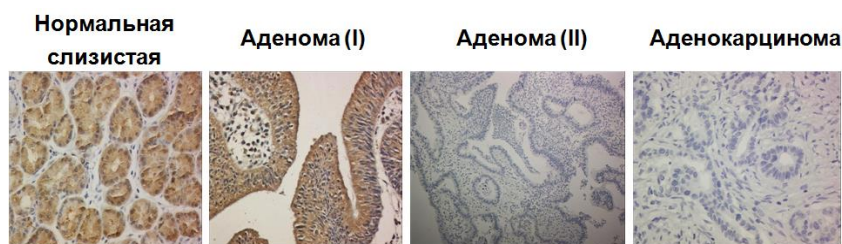


Рисунок 6 – Экспрессия PMP21 в железах подслизистого слоя желудка, в аденоме с дисплазией тяжелой степени и аденокарциноме желудка. Ув. х 200.

Заключение

Изучение молекулярного патогенеза злокачественных новообразований предполагает не только выявление генетических и эпигенетических нарушений, приводящих к активации онкогенов и выключению генов опухолевой супрессии, но также и идентификацию активированных сигнальных путей, определяющих биологическое поведение опухоли. В настоящем исследовании впервые апробирован подход по биоинформационному поиску генов, вовлеченных в патогенез РЖ, с использованием разработанного алгоритма с помощью электронных ресурсов баз данных микроРНК и мРНК (TargetScan, SAGE, Oncomine, dbEST, Gene Ontology и TCGA). В результате биоинформационного поиска были выявлены гены *WNT4*, *GPNMB*, *CLDN4*, *AKR1B10*, *PMP21*, *INHBA*, *HSPG2*, *CTGF*, *SPARC*, *SULF1*, *PMP21* и *FGF12*, вовлеченность которых в патогенез аденокарцином желудка различных гистотипов высоко вероятна. Впервые для российской популяции проведен количественный анализ экспрессии наиболее перспективных из указанных генов (*WNT4*, *FGF12*, *EFEMP1*, *PMP21*, *SPARC*, *SULF1*, *CTGF* и *HSPG2*). Для шести из них подтверждена дифференциальная экспрессия в парных образцах нормальной и опухолевой ткани желудка интестинального и диффузного гистологического типа, а также их связь с клинико-патологическими характеристиками опухолевого процесса.

Полученные данные определяют актуальность дальнейшего изучения роли генов *FGF12*, *WNT4*, *CTGF*, *HSPG2*, *PMP21* и *SPARC* в патогенезе рака желудка, а также выявления на их основе новых диагностических и прогностических маркеров и мишеней терапии. Одним из продуктивных подходов для поиска потенциальных диагностических онкомаркеров является идентификация генных транскриптов или белков, преимущественно синтезируемых в опухолях определенного типа, но не в нормальных тканях. Мы оценили прогностическую значимость тестирования генной экспрессии изучаемых генов в отношении клинического течения заболевания (безрецидивная выживаемость, длительность безрецидивного периода и т.д.) и не нашли статистически значимых связей между уровнем экспрессии генов и объективными критериями оценки агрессивности опухолевого процесса, определяющего клиническое течение заболевания. На примере гена циклофилина А мы показали, что при отсутствии значимости генной экспрессии, тестирование белковой экспрессии в опухоли с помощью специфических моноклональных антител дало возможность установить ее

связь с риском гематогенного метастазирования. Принимая во внимание литературные данные о низкой прогностической эффективности уровня генной экспрессии, наряду с собственными данными, мы сочли целесообразным продолжить исследование прогностической значимости белковой экспрессии. В качестве наиболее перспективного объекта для дальнейшего изучения, на основе данных о его ассоциации с интестинальным гистологическим типом аденокарциномы желудка и опухолевой прогрессией, был выбран ген *PMERAI*. Для выявления белка *PMERAI* в клинических образцах нами были получены оригинальные моноклональные антитела, которые проявляли специфическую активность по отношению к данному белку. Проведенный анализ экспрессии *PMERAI* в клинических образцах желудка и в ткани *in situ* позволяет говорить о потенциальной возможности использования данного белка в качестве маркера риска злокачественной трансформации эпителия желудка.

ВЫВОДЫ

1. Биоинформатический поиск с использованием баз данных микроРНК и мРНК (TargetScan, SAGE, Oncomine, dbEST, Gene Ontology и TCGA) позволил выявить восемь генов, потенциально вовлеченных в патогенез аденокарциномы желудка: *WNT4*, *HSPG2*, *CTGF*, *EFEMP1*, *SPARC*, *SULF1*, *PMERAI* и *FGF12*.

2. Показана дифференциальная экспрессия генов *WNT4*, *HSPG2*, *CTGF*, *SPARC*, *PMERAI* и *FGF12* в аденокарциноме и нормальной слизистой оболочке желудка при исследовании парных клинических образцов опухоли и нормальной ткани больных с аденокарциномой желудка разных гистологических типов методом ПЦР с обратной транскрипцией в режиме реального времени.

3. Установлено значимое повышение уровня экспрессии генов *CTGF* и *FGF12* в аденокарциномах диффузного гистологического типа по сравнению с интестинальным. Экспрессия гена *WNT4* значимо снижена при аденокарциноме желудка интестинального гистологического типа.

4. Установлено, что уровень экспрессии гена *SPARC* повышен в ткани аденокарциномы желудка интестинального гистологического типа при отсутствии метастазов в регионарные лимфоузлы. Ген *PMERAI* дифференциально экспрессирован только в аденокарциноме желудка интестинального типа у пациентов с метастазами в регионарных лимфатических узлах, что указывает на его связь с опухолевой прогрессией и перспективность в качестве опухоли-ассоциированного маркера.

5. Не выявлено статистически-значимой связи повышения транскрипционной активности изучаемых генов в опухоли с наличием рецидива заболевания, длительностью безрецидивного периода и показателями общей выживаемости. На примере циклофилина А показана прогностическая значимость тестирования белкового продукта, но не генной экспрессии в опухолевой ткани.

6. Получены моноклональные антитела, детектирующие *PMERAI* в клинических образцах. С помощью полученных мкАТ показана более низкая

экспрессия белка РМЕРА1 в аденокарциноме по сравнению с соответствующей нормальной слизистой желудка.

7. Анализ *in situ* экспрессии РМЕРА1 в образцах нормальной слизистой, аденомы и аденокарциномы желудка выявил его ядерно-цитоплазматическую экспрессию. Наблюдалась обратная зависимость уровня экспрессии данного белка в ткани желудка от тяжести диспластического процесса, что указывает на его значимость в качестве потенциального маркера злокачественной трансформации.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Григорьева. Е.С. Циклофиллин А как потенциальный маркер рака желудка [Текст] / Е.С. Григорьева, М.А. Булдаков, И.Г. Степанов, М.В. Завьялова, **В.В. Волкоморов**, С.В. Вторушин // Актуальные вопросы экспериментальной и клинической онкологии: материалы VI региональной конференции молодых ученых-онкологов им. академика РАМН Н.В. Васильева 28 апреля 2011 г Сибирский онкологический журнал. – 2011. - Приложение 1. - С. 36-37.

2. **Волкоморов В.В.** Сравнительный анализ генной экспрессии потенциальных онкомаркеров в опухолевой ткани желудка и нормальном желудочном эпителии [Текст] / В.В. Волкоморов, Е.С. Григорьева, М.М. Цыганов, М.А. Булдаков, Ю.А. Букурова, А.А. Иванова, Г.С. Краснов // Актуальные вопросы экспериментальной и клинической онкологии: материалы VI региональной конференции молодых ученых-онкологов им. академика РАМН Н.В. Васильева 28 апреля 2011 г. - Сибирский онкологический журнал. – 2011. - Приложение 1.- С. 29-30.

3. **Волкоморов В.В.** Оценка генной экспрессии потенциальных онкомаркеров у больных раком желудка [Текст] / В.В. Волкоморов, М.М. Цыганов, Е.С. Григорьева, М.А. Булдаков // Материалы XLIX международной научной студенческой конференции. – 2011. – С. 226.

4. **Волкоморов В.В.** Поиск потенциальных маркеров рака желудка и анализ уровня их генной экспрессии в опухолевой и нормальной ткани желудка [Текст] / В.В. Волкоморов, Е.С. Григорьева, М.М. Цыганов, М.А. Булдаков, Г.С. Краснов // Актуальные вопросы экспериментальной и клинической онкологии: материалы VII региональной конференции молодых ученых-онкологов им. академика РАМН Н.В. Васильева. - Сибирский онкологический журнал. – 2012. – Приложение 1. – С. 36-37.

5. Григорьева. Е.С. Идентификация и отбор потенциальных белковых маркеров для диагностики и прогнозирования рака желудка [Текст] / Е.С. Григорьева, **В.В. Волкоморов**, М.С. Карбышев, И.В. Степанов, М.В. Завьялова, И.Г. Соловьева, С.Г. Афанасьев, Н.В. Чердынцева, Н.А. Лисицын, С.Ф. Берестень // Петровские чтения–2012: материалы конференции по фундаментальной онкологии – 2012, 20 апреля. – СПб, 2012. - С.57-59.

6. Григорьева. Е.С. Разработка прогностических маркеров рака желудка на основе протеомных и биоинформатических подходов [Текст] / Е.С. Григорьева, М.С. Карбышев, **В.В. Волкоморов**, И.В. Степанов, М.В.

Завьялова // Инновационные технологии в медицине XXI века: материалы первой всероссийской научной конференции молодых ученых-медиков. – Москва, 2012. – С. 270-271.

7. **Волкоморов В.В.** Анализ уровня генной экспрессии потенциальных маркеров желудка в опухолевой и нормальной ткани желудка [Текст] / В.В. Волкоморов, М.М. Цыганов, Е.С. Григорьева, М.С. Карбышев // Материалы 50-й международной научной студенческой конференции – Новосибирск, 2012. - С. 155.

8. Karbyshev M.S. Understanding of transmembrane prostate androgen-induced protein (PMEPA1) role in stomach cancer by immunochemical approach [Text] / M.S. Karbyshev, E. S. Grigorieva, **V. V. Volkomorov**, E. Kremmer, Y. P. Lim, A. A. Epanchintsev, O. S. Stronin, N. V. Cherdyntseva // Special Issue: 38th FEBS Congress, Saint Petersburg, Russia, July 6–11, 2013, V 280, Supplement s1 P. 1–661

9. **Волкоморов В.В.** Получение поликлональных и моноклональных антител к онкоассоциированному рекомбинантному белку PMEPA1 для его выявления в ткани рака желудка [Текст] / В.В. Волкоморов, М.С. Карбышев, Е.С. Григорьева, Н.В. Чердынцева // Актуальные вопросы экспериментальной и клинической онкологии: материалы VIII региональной конференции молодых ученых-онкологов им. академика РАМН Н.В. Васильева. - Сибирский онкологический журнал. – 2013. – Приложение 1. – С. 23-24.

10. **Volkomorov V.V.** Search for potential gastric cancer markers using miRNA databases and their gene expression analysis [Text] / **V.V. Volkomorov**, E.S. Grigoryeva, G.S. Krasnov, N.V. Litviakov, M.M. Tsyganov, M.S. Karbyshev, M.S. Zavyalova, S.G. Afanasyev, N.V. Cherdyntseva N.A. Lisitsyn, S.F. Beresten // *Exp Oncol.* – 2013. – Vol. 35., № 1. - P. 2-7

11. **Volkomorov V.V.** Expression of Cyclophilin A in Gastric Adenocarcinoma Patients and Its Inverse Association with Local Relapses and Distant Metastasis [Text] / E.S. Grigoryeva, N.V. Cherdyntseva, M.S. Karbyshev, **V.V. Volkomorov** I.V. Stepanov, M.V. Zavyalova, V.M. Perelmuter, M.A. Buldakov, S.G. Afanasjev, S.A. Tuzikov, Y.A. Bukurova, N.A. Lisitsyn., S.F. Beresten // *Pathol Oncol Res.* – 2013. – № 2. - P. 467-473.

12. **Волкоморов В.В.** Новое моноклональное антитело для детекции опухоль-ассоциированного белка PMEPA1 [Текст] / В.В. Волкоморов, Е.С. Григорьева, М.С. Карбышев, И.В. Митрофанова, Е.В. Кайгородова, Н.В. Чердынцева // Сибирский онкологический журнал. – 2014. – № 3. – С. 72-77.

13. **Волкоморов В.В.** Идентификация PMEPA1 как потенциального маркера рака желудка [Текст] / В.В. Волкоморов, М.С. Карбышев, Е.С. Григорьева, Н.В. Чердынцева // Петровские чтения-2014: тезисы 10-й конференции по фундаментальной онкологии. – СПб, 2014. – С. 19.

14. **Волкоморов В.В.** Идентификация и оценка прогностической значимости PMEPA1 при раке желудка [Текст] / В.В. Волкоморов, Е.С. Григорьева, М.С. Карбышев, Е.В. Кайгородова // Актуальные вопросы

экспериментальной и клинической онкологии: материалы IX конференции молодых ученых-онкологов, посвященная памяти академика РАМН Н.В. Васильева. - Сибирский онкологический журнал. – 2014. – Приложение 1.– С. 32.

15. Пат. 2493568 Российская Федерация, МПК⁷ G 01 N 33/53. Способ прогнозирования гематогенного метастазирования при диффузном типе рака желудка [Текст] : / М.В. Завьялова, В.М. Перельмутер, И.В. Степанов, Н.В. Чердынцева, Н.В. Литвяков, С.В. Вторушин, С.Г. Афанасьев, А.В. Августинович, О.В. Савенкова, Е.С. Григорьева, С.Ф. Берестень, **В.В. Волкоморов**. – № 2012129593/15; Заявл. 12.07.12; Оpubл. 20.09.13, Бюл. № 26 – 6 с. : ил.

Благодарности

Автор выражает глубокую признательность и благодарность д.б.н. Берестеню С.Ф., д.х.н. Лисицыну Н.А, к.б.н. Краснову Г.С., к.б.н. Букуровой Ю.А., к.б.н. Кропотовой Е.С., проф. Перельмутеру В.М., проф. Завьяловой М.В., к.м.н. Степанову И.В., проф. Тузикову С.А., проф. Афанасьеву С.Г., д.б.н. Литвякову Н.В., к.х.н. Ищенко А.М., к.б.н. Карбышеву М.С, к.м.н. Григорьевой Е.С. за помощь, оказанную при проведении исследования и обсуждении результатов.

Список сокращений

ACTB – Actin beta;
AKR1B10 – альдокеторедуктаза 1, В 10;
CLDN4 – клаудин 4;
CTGF – ростовой фактор соединительной ткани;
EFEMP1 – EGF-содержащий фибулино-подобный экстрацеллюлярный матриксный белок 1;
FGF12 – фактор роста фибробластов 12;
GPNMB – трансмембранный гликопротеин nmb;
HSPG2 – гепарансульфат-протеогликан 2;
INHBA – ингибин бета А;
МАТ – моноклональное антитело;
PMEPA1 – андроген-индуцируемый трансмембранный белок простаты 1;
SPARC – остеонектин;
SULF1 – сульфатаза 1;
WB - иммуноблот;
WNT4 – wingless-type MMTV integration site family, member 4;
ИГХ - иммуногистохимический анализ;
РЖ – рак желудка.