

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. ЛОМОНОСОВА

Биологический факультет

Направлениях рукописи

САВЧЕНКО Марина Сергеевна

ИССЛЕДОВАНИЕ АБЕРРАНТНОЙ ЭКСПРЕССИИ РЕКОВЕРИНА

03.00.04-биохимия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Москва-2005

Работа выполнена в отделе сигнальных систем клетки НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ им. М.В. Ломоносова.

Научный руководитель:

доктор биологических наук, профессор П.П. Филиппов

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник Э.Н. Григорян

доктор медицинских наук, старший научный сотрудник А.А. Штиль

Ведущая организация:

Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А.Овчинникова РАН

Защита диссертации состоится 30 мая 2005 г. в 14 часов на заседании Диссертационного совета Д.501.001.71 при Московском государственном университете им. М.В. Ломоносова по адресу: 119992, Москва, Ленинские горы, МГУ, биологический факультет, большая биологическая аудитория (ББА).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова.

Автореферат разослан 29 апреля 2005 г.

Ученый секретарь

Диссертационного совета,

кандидат биологических наук



МВ. Медведева

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Рековерин - Ca^{2+} -связывающий белок позвоночных животных с молекулярной массой 23,3 кДа, состоящий из 201 аминокислотного остатка [Dizhoor et al., 1991; Lambrect, Koch, 1991]. В норме рековерин локализован в фоторецепторных клетках сетчатки глаза, где Ca^{2+} -зависимым образом регулирует фосфорилирование родопсина, ингибируя активность родопсинкиназы. В пределах сетчатки рековерин экспрессируется преимущественно в наружных сегментах палочек и колбочек, а также в нейронах более высокого порядка - в биполярных и ганглиозных клетках. Кроме того, рековерин обнаружен в эпифизе. В молекуле рековерина присутствуют 4 потенциальных Ca^{2+} -связывающих участка типа EF-hand; его N-конец ацилирован остатками жирных кислот [Dizhoor et al., 1992; Flaherty et al., 1993].

Рековерин также относят к паранеопластическим, или онконевральным, антигенам, которые представляют собой белки, в норме экспрессирующиеся исключительно в пределах нервной системы. Однако при злокачественной трансформации клеток экспрессия этих белков выявляется также и в опухолях, локализованных вне нервной системы. Иммунная система организма реагирует на aberrantную экспрессию нейрональных белков в опухоли выработкой аутоантител, которые в некоторых случаях могут приводить к специфическим неврологическим нарушениям, развивающимся на значительном удалении от места локализации опухоли и ее метастазов, и быть причиной развития соответствующего неврологического синдрома.

К началу данной работы было известно, что при паранеопластической дегенерации сетчатки, ассоциированной с мелкоклеточной карциномой легких (МККЛ), в крови пациентов присутствует высокий титр аутоантител против рековерина, а в опухоли экспрессируется рековерин.

В то же время оставалось неизвестным,

- экспрессируется ли рековерин в опухолях при немелкоклеточной карциноме легких (НМККЛ), которая составляет более 80% от всех регистрируемых случаев рака легких?
- какова частота экспрессии рековерина в опухолях легких?
- каковы молекулярные механизмы, лежащие в основе aberrantной экспрессии рековерина в злокачественных опухолях?
- какова частота встречаемости аутоантител против рековерина при раке легких, а также при других злокачественных заболеваниях?

Цель и задачи исследования. Цель настоящей работы - изучение aberrантной экспрессии рековерина при злокачественной трансформации. В соответствии с этой целью в работе решались следующие задачи.

- Изучение aberrантной экспрессии рековерина в опухолях легких и определение частоты этой экспрессии.
- Исследование молекулярных механизмов, лежащих в основе aberrантной экспрессии рековерина в злокачественных опухолях.
- Определение частоты встречаемости аутоантител против рековерина в сыворотке крови пациентов с различными злокачественными заболеваниями.

Научная новизна и практическая значимость работы. В процессе выполнения настоящей работы впервые определена частота экспрессии рековерина в опухолях легких, которая составляет 76%. Получены данные, свидетельствующие о том, что мРНК рековерина может быть выявлена в тканях, не относящихся к тканям нервной системы. Установлено, что демстилирование участков промотора и первого экзона гена рековерина вовлечено в регуляцию экспрессии рековерина в клеточной линии рака легких *in vitro*. Продемонстрировано, что ацетилирование гистонов не участвует в проявлении aberrантной экспрессии рековерина *in vitro*. Показано, что аутоантитела против рековерина могут присутствовать в сыворотке крови больных различными злокачественными заболеваниями, причем наибольшая частота их встречаемости составляет 17% при раке легких.

Полученные результаты по обнаружению аутоантител против рековерина в сыворотке крови пациентов с различными злокачественными заболеваниями при полном отсутствии аутоантител против рековерина в сыворотке крови здоровых индивидов, а также тот факт, что рековерин экспрессируется в большей части проанализированных опухолей рака легких, создают основу для последующего клинического применения рековерина в качестве маркера злокачественной трансформации тканей.

Апробация работы. Результаты работы были доложены на заседании кафедры биохимии биологического факультета МГУ, на семинарах НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ (НИИФХБ МГУ) и отдела сигнальных систем клетки НИИФХБ МГУ, а также на ряде научных конференций: XIII и XIV зимних международных молодежных научных школах "Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии" (Москва, 2001 и 2002), Национальных конгрессах по болезням органов дыхания (Москва, 2001 и 2002; Санкт-Петербург, 2003), Европейских респираторных конгрессах (Берлин, 2001; Стокгольм, 2002; Вена, 2003) и других.

Публикации. Результаты работы представлены в 5 статьях, опубликованных в научных журналах, и в 11 тезисах докладов.

Структура и объём работы. Диссертация изложена на 111 страницах машинописного текста и содержит следующие разделы: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты и их обсуждение, выводы и список цитируемой литературы. Материал иллюстрирован 20 рисунками и 6 таблицами. Библиографический указатель включает 133 цитированных работы.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

К моменту начала данной работы в литературе сложилось устойчивое мнение, что экспрессия рековерина в опухоли возможна только при одновременном присутствии у пациента аутоантител против рековерина с высоким титром и паранеопластической дегенерации сетчатки. Однако в нашей лаборатории были получены данные, свидетельствующие о возможности существования антител к рековерину в сыворотке крови пациентов с диагнозом рак легких и в отсутствие синдрома паранеопластической дегенерации сетчатки, что поставило под сомнение описанную выше схему. Кроме того, подробное изучение литературы по рассматриваемому вопросу показало, что экспериментальные данные, подтверждающие эту гипотезу, были получены не всегда корректно и в объеме, удовлетворяющем условиям статистического анализа. Это дало нам основание полагать, что существующая теория не учитывает все возможное разнообразие процессов, потенциально способных происходить при раке легких, и, возможно, применима только для такого частного случая, как развитие синдрома ретинопатии, ассоциированной с раком легких, вследствие аутоиммунного ответа организма на экспрессию рековерина в опухоли.

Наряду с тем, что полученные нами предварительные данные не укладывались в общепринятую теорию, следует также отметить, что имевшаяся информация об экспрессии рековерина в норме и при злокачественной трансформации была крайне ограниченной. Например, оставалось неизвестным, возможна ли экспрессия рековерина в нормальных тканях, отличных от сетчатки, или же она появляется только в опухолях. Также ничего не было известно о возможных молекулярных механизмах, лежащих в основе aberrантной экспрессии рековерина в злокачественных опухолях. Поэтому в задачи настоящего исследования входило, прежде всего, определение экспрессии рековерина в опухолях, а также выяснение механизма появления - или увеличения - этой экспрессии при злокачественной трансформации.

1. Рековерин в раковых опухолях и нормальных тканях.

1.1. Иммуногистохимический анализ срезов опухолей легких.

Нами было проведено цитоиммуногистохимическое изучение экспрессии рековерина в парафинированных срезах опухолей рака легких. При этом в исследование были включены опухоли как МККЛ, так и НМККЛ. На рис. 1 представлены типичные примеры проведенного нами цитоиммуногистохимического исследования экспрессии рековерина в срезах опухолей легких с использованием поликлональных (моноспецифических) антител к нему. Видно, что экспрессия рековерина присутствует как в опухоли МККЛ (рис. 1А), так и НМККЛ (рис. 1Б). О наличии рековерин-положительной реакции в клетках опухоли на рис. 1А и рис. 1Б свидетельствует коричневое окрашивание цитоплазмы (реже - клеточных ядер). Опухолевые клетки, дающие рековерин-положительную реакцию, располагаются гетерогенно, группами, они выявляются по границам опухоли с прилежащей тканью, а также в зонах опухоли вокруг фокусов детрита и вокруг стенок кровеносных сосудов опухоли. Отметим, что окрашивание отсутствует в зоне стромы.

Следует подчеркнуть, что как по данным иммуногистохимического анализа, имеющимся в литературе [Dizhoor et al., 1992], так и по результатам нашего цитоиммуногистохимического исследования срезов здоровых легких (данные не показаны), в нормальной ткани легких экспрессия рековерина отсутствует. Кроме того, было проведено контрольное окрашивание срезов, полученных от пациентов с МККЛ и НМККЛ, которое выполнялось в отсутствие антител против рековерина (рис. 1В) и с использованием антител, преобработанных «экзогенным» рековерином (рис. 1Г). Отсутствие коричневого окрашивания в этих контролях свидетельствует о специфичности наблюдаемой нами реакции.

Таким образом, результаты цитоиммуногистохимического исследования свидетельствуют о том, что экспрессия рековерина присутствует как в опухолях МККЛ, так и НМККЛ. Отметим, что экспрессия рековерина в опухолях НМККЛ продемонстрирована нами впервые.

Следует особо подчеркнуть тот факт, что наличие рековерина в опухоли было выявлено нами как при МККЛ, так и при НМККЛ. Известно, что МККЛ относится к опухолям, имеющим нейроэндокринное происхождение, в то время как НМККЛ является собирательным названием для опухолей, происходящих из эпителиальных и железистых клеток легких. Одним из основных свойств опухолей нейроэндокринного происхождения является экспрессия большого спектра антигенов нейрональной дифференцировки. Поскольку экспрессия рековерина обнаружена нами как в опухолях МККЛ, так и НМККЛ, очевидно, что она с происхождением опухоли не связана.

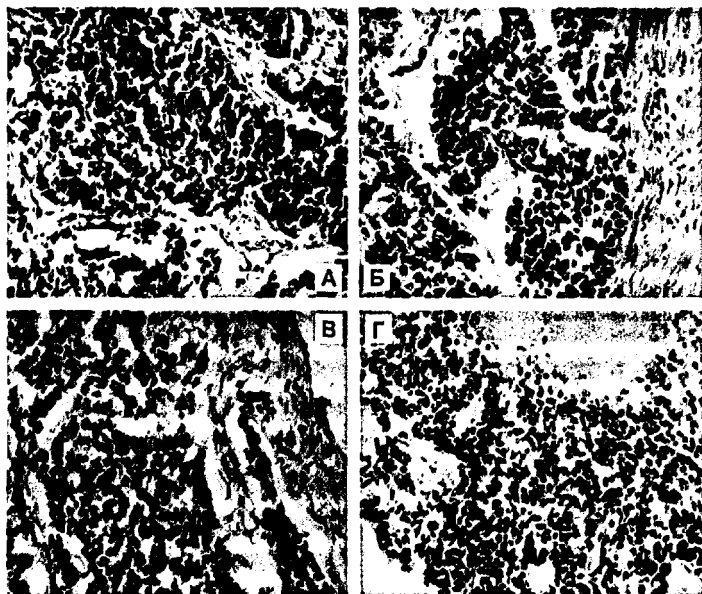


Рис. 1. Иммуногистохимический анализ экспрессии реоверина в опухолях у пациентов с МККЛ/НМККЛ. А. Срез опухоли МККЛ, инкубированный с поликлональными (моноспецифическими) антителами против реоверина (5 мкг/мл). Б. Срез опухоли НМККЛ, инкубированный с поликлональными (моноспецифическими) антителами против реоверина (5мкг/мл). В. Срез опухоли МККЛ, инкубированный без первичных антител. Г. Срез опухоли МККЛ, инкубированный с первичными антителами против реоверина, истощенными по реоверину. Во всех случаях срезы окрашивали с помощью вторичных антител, конъюгированных с пероксидазой хрена. Увеличение x200.

Далее мы провели определение частоты экспрессии реоверина в опухолях легких. В исследование было взято 84 среза, полученных от пациентов с диагнозом рак легких. В их число входило 44 среза от пациентов с МККЛ и 40 срезов, полученных от пациентов с НМККЛ. При МККЛ экспрессия реоверина была отмечена в 30 из 44 срезов, что составляет 68% частоты экспрессии реоверина. При НМККЛ - в 34 из 40 срезах, что составляет 85% частоты экспрессии. Средняя частота экспрессии реоверина в опухолях легких составила 76%.

1.2. Анализ экспрессии мРНК рековерина в раковых опухолях.

На следующем этапе нашей работы мы провели определение мРНК рековерина в опухолях методом ПЦР с обратной транскриптазой. Для анализа экспрессии мРНК рековерина в раковых опухолях использовали образцы опухолей легких, молочной железы и кожи (меланомы). После выделения кДНК из соответствующих образцов и ее амплификации для подтверждения того, что полученная нами кДНК действительно принадлежит рековерину, проводилось секвенирование продуктов ПЦР. Данные, полученные в ходе определения экспрессии рековерина в опухолях легких, молочной железы и при меланоме, представлены в таблице 1.

Таблица 1. Экспрессия мРНК рековерина в раковых опухолях.

Тип рака	Количество образцов	Рековерин-негативные		Рековерин-позитивные	
		Количество	%	Количество	%
Рак легких*	27	9	33	18	67
Рак молочной железы	14	6	43	8	57
Меланома	45	16	36	29	64

*Графа «Рак легких» представляет сводные данные по МККЛ и НМККЛ.

Как видно из таблицы 1, мРНК рековерина синтезируется в опухолях рака легких с частотой 67%. Эта величина близка к частоте экспрессии рековерина в опухолях легких, полученной нами методом цитоиммуногистохимии (76%). Сходные величины получены и при определении частоты экспрессии мРНК рековерина в опухолях других тканей: при меланоме эта частота составляет 64%, при раке молочной железы - 57%.

Таким образом, можно заключить, что в злокачественных опухолях легких (как в МККЛ, так и в НМККЛ) экспрессируется рековерин. Этот вывод сделан на основании цитоиммуногистохимических исследований с использованием поликлональных (моноспецифиче-

ских) антител против реоверина и анализа присутствия мРНК реоверина в опухолях. Анализ опухолей на наличие в них мРНК реоверина свидетельствует о том, что мРНК реоверина экспрессируется в опухолях не только при раке легких, но также и при раке молочной железы и меланоме. При этом как сам факт экспрессии, так и ее величина варьируют от образца к образцу и, по-видимому, не имеют четкой корреляции с видом ткани (частота экспрессии во всех опухолях примерно одинакова и составляет 60-70%).

1.3. Анализ экспрессии мРНК реоверина в тканях в норме.

В настоящее время принято считать, что в норме реоверин синтезируется только в сетчатке глаза. Наличие реоверина в тимусе и в эпифизе является своего рода исключением, подтверждающим общее правило, т.к. в эпифизе присутствуют клетки, аналогичные фоторецепторным клеткам сетчатки. По литературным данным, реоверин не встречается в других видах нормальных тканей [Maeda et al., 2000]. Однако следует заметить, что выводы об отсутствии экспрессии гена реоверина в нормальных тканях были сделаны в этой работе на основании анализа всего лишь одного образца каждого вида ткани.

В предыдущем разделе мы показали, что частота экспрессии реоверина в трансформированных тканях составляет около 70%. Можно предложить две равновероятных гипотезы, объясняющие возрастание количества реоверина в опухолях по сравнению с нормальными тканями. Согласно первой гипотезе, реоверин вообще не экспрессируется в норме, и его экспрессия появляется только после злокачественной трансформации клеток. По второй гипотезе, реоверин может экспрессироваться также и в норме, однако уровень его экспрессии при этом крайне низок; когда же происходит злокачественная трансформация клеток, количество реоверина резко возрастает.

Одним из доводов в пользу второго предположения является существование в организме диффузной эндокринной системы, представленной совокупностью одиночных гормонпродуцирующих клеток или их групп, расположенных во всех органах; эту систему еще называют APUD-система (от Amine Precursor Uptake and Decarboxylation). Апудоциты, или нейроэндокринные клетки, характеризуются активным синтезом биогенных аминов и полипептидных гормонов таких, как серотонин, допамин, бомбезин, гастрин-релизинг пептид, кальцитонин и энкефалин. Как считают некоторые исследователи, апудоциты имеют общее происхождение с клетками нервной системы, в которых, как говорилось выше, может синтезироваться реоверин. В этой связи мы решили исследовать, действительно ли в некоторых нормальных тканях, отличных от сетчатки, присутствует экспрессия реоверина.

Мы провели определение мРНК рековерина в образцах нормальных тканей легких, молочной железы и кожи (т.е. в тех органах, в опухолях которых мРНК рековерина определялась нами ранее - см. таблицу 1). Результаты анализа представлены в таблице 2. Из таблицы видно, что мРНК рековерина присутствует приблизительно в половине проанализированных образцов.

Таблица 2. Экспрессия мРНК рековерина в нормальных тканях.

Тип ткани	Количество образцов	Рековерин-негативные		Рековерин-позитивные	
		Количество	%	Количество	%
Легкие	8	4	50	4	50
Молочная железа	5	3	60	2	40
Кожа	2	1	50	1	50

Таким образом, мы впервые продемонстрировали, что в нормальных тканях, отличных от сетчатки, присутствует мРНК рековерина.

На следующем этапе работы методом количественного ПЦР нами было проведена оценка количества мРНК рековерина в отдельных образцах здоровой ткани легких, молочной железы и кожи, а также в соответствующих опухолях. Результаты определения представлены на рис. 2.

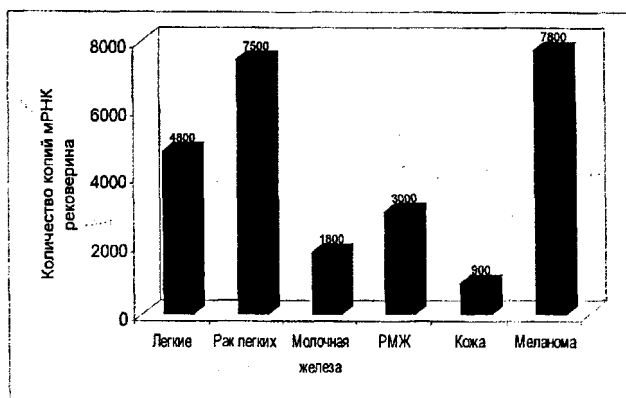


Рис. 2. Количественное определение мРНК рековерина в нормальных тканях и раковых опухолях.

На рис. 2 видно, что среди проанализированных нами образцов нормальной ткани самый высокий уровень мРНК рековерина наблюдался в легких; количество мРНК рековерина в коже и в молочной железе было несколько ниже. Заметим, что хотя определенное нами в нормальных тканях количество мРНК рековерина и имело тот же порядок, что и в опухолях, уровень мРНК рековерина в тканях в норме был заметно ниже уровня мРНК рековерина в соответствующих опухолях.

Таким образом, рековерин способен синтезироваться в тканях, подвергшихся злокачественной трансформации. Кроме того, наши данные свидетельствуют о возможности экспрессии мРНК рековерина и в нормальных тканях, отличных от сетчатки. Следует подчеркнуть, что факт присутствия мРНК рековерина в нормальных тканях показан нами впервые. Выше мы рассмотрели две гипотезы, которые могут объяснить появление экспрессии рековерина в опухолях, локализованных вне нервной системы. Согласно первой гипотезе, рековерин вообще не синтезируется в норме, а его наличие в раковых опухолях является следствием процессов злокачественной трансформации, происходящих в клетках. Вторая гипотеза предполагает, что рековерин присутствует в норме и вне тканей нервной системы (возможно, в клетках APUD-системы). Наши данные свидетельствуют в пользу второй гипотезы, предполагающей, что экспрессия рековерина при раке является следствием увеличения экспрессии белка, уже существующей в норме.

2. Исследование молекулярных механизмов, лежащих в основе аберрантной экспрессии реоверина в злокачественных опухолях.

Известно, что синтез белков в тканях в процессе развития или при злокачественной трансформации может быть связан с такими процессами, как деметилирование CpG-участков промотора гена соответствующего белка или ацетилирование гистонов. При этом процесс экспрессии гена может регулироваться как исключительно одним, так и несколькими механизмами одновременно.

Ген реоверина человека локализован на коротком плече хромосомы 17p13.1 [Wiechman et al., 1994; McGinnis et al., 1995]. Промотор гена реоверина относится к классу промоторов, бедных CpG-парами. Известно, что тканеспецифичные гены с промоторами такого типа часто демонстрируют высокий уровень метилирования в тканях, где они не экспрессируются, по сравнению с тканями, в которых осуществляется их экспрессия.

Для того, чтобы выяснить, что именно лежит в основе регуляции экспрессии мРНК реоверина при злокачественной трансформации, мы провели исследование влияния различных агентов на уровень экспрессии реоверина в модельной системе, которой стала клеточная линия рака легких NCI-H82, экспрессирующая мРНК реоверина. В ходе исследования использовали следующие вещества: 5'-аза-2'-деоксицитидин, который, будучи ингибитором метилтрансферазы, является деметилирующим агентом; трихостатин А - ингибитор гистондеацетилазы, а также бутират натрия, который является неспецифическим ингибитором гистондеацетилазы и веществом, вызывающим преодоление «молчания генов», обусловленного метилированием.

В ходе исследования клеточную линию NCI-H82 культивировали в присутствии 5'-аза-2'-деоксицитидина, трихостатина А или бутирата натрия, либо без них. Также был изучен эффект совместного действия на NCI-H82 их следующих комбинаций: 5'-аза-2'-деоксицитидин совместно с трихостатином А и 5'-аза-2'-деоксицитидин совместно с бутиратом натрия. После инкубации в исследуемых клетках определяли изменение уровня экспрессии мРНК реоверина. Результаты определения представлены на рис. 3. Из рисунка видно, что 5'-аза-2'-деоксицитидин и бутират натрия стимулируют увеличение экспрессии мРНК реоверина в исследуемой клеточной линии, в то время как инкубация в присутствии трихостатина А на уровень экспрессии не влияет.

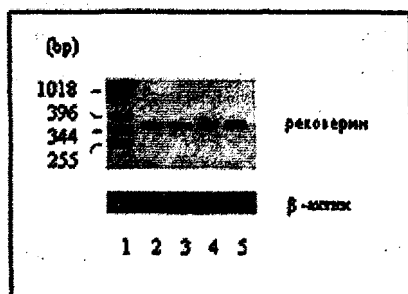


Рис. 3. Электрофореграмма продуктов ПЦР, полученных из клеточной линии NCI-H82.
1 - ДНК маркеры, 2 - до обработки, 3 - 5 после инкубации в присутствии трихостатина А (3), бутирата натрия (4) и 5'-аза-2'-деоксцитидина (5).

Для количественной оценки эффектов 5'-аза-2'-деоксцитидина, трихостатина А, бутирата натрия, а также комбинаций 5'-аза-2'-деоксцитидин + трихостатин А и 5'-аза-2'-деоксцитидин + бутират натрия, на уровень синтеза мРНК рековерина в клеточной линии NCI-H82 мы использовали метод количественного ПЦР. Результаты представлены на рис. 4. Как видно из рисунка, культивирование в присутствии 5'-аза-2'-деоксцитидина индуцирует пятикратное увеличение количества мРНК рековерина в исследуемых клетках ($p=0,006$). Инкубация в присутствии бутирата натрия приводит лишь к небольшому (двукратному) эффекту стимулирования экспрессии гена рековерина ($p=0,05$). Трихостатин А не вызывает дополнительного увеличения уровня синтеза мРНК рековерина как в случае, когда применяется отдельно, так и в сочетании с 5'-аза-2'-деоксцитидином. Одновременное воздействие на клетки 5'-аза-2'-деоксцитидина и бутирата натрия дает синергический эффект, который выражается в шестикратной стимуляции синтеза мРНК рековерина ($p=0,015$).

Таким образом, аберрантная экспрессия гена рековерина в клеточной линии NCI-H82 стимулируется деметилирующим агентом 5'-аза-2'-деоксцитидином и - в меньшей степени - бутиратом натрия. Напротив, специфический ингибитор гистондеацетилазы, трихостатин А, не влияет на синтез мРНК рековерина *in vitro*.

Итак, 5'-аза-2'-деоксцитидин, который является деметилирующим агентом, увеличивает количество мРНК рековерина в клетках рака легких. Этот факт указывает на возможную взаимосвязь изменения количества мРНК рековерина и уровня метилирования участков промотора и первого экзона гена рековерина в исследуемых клетках. Эффект незначительной стимуляции экспрессии мРНК рековерина бутиратом натрия остается пока без объясне-

ний в связи с тем, что механизм действия этого вещества до сих пор не изучен. В то же время, отсутствие влияния трихостатина А на увеличение количества мРНК рековерина *in vitro* говорит о том, что процесс ацетилирования гистонов, скорее всего, не вовлечен в aberrантную экспрессию рековерина в раковых клетках.

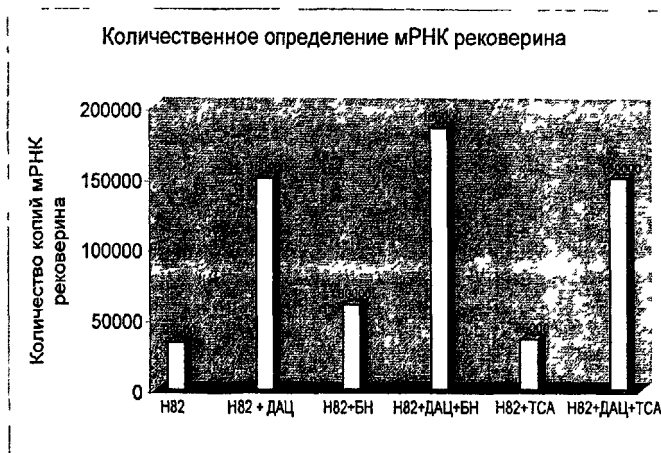


Рис. 4. Изменение уровня синтеза мРНК рековерина в клеточной линии NCI-H82 под воздействием различных агентов. Над столбцами указано количество копий мРНК рековерина; внизу показаны условия инкубации. ДАЦ - 5'-аза-2'-деоксицитидин; ТСА - трихостатин А; БН - бутират натрия.

Далее мы провели исследование влияния 5'-аза-2'-деоксицитидина на уровень метилирования участков промотора и первого экзона гена рековерина в клеточной линии NCI-H82, а именно на уровень метилирования 13 CpG-участков, присутствующих в этой области. С помощью метода бисульфитного сиквенса нами были получены профили метилирования области промотора и первого экзона гена рековерина в клетках NCI-H82 до и после культивирования в присутствии 5'-аза-2'-деоксицитидина (рис. 5). Как можно видеть из рисунка, область промотора и первого экзона гена рековерина в клетках NCI-H82 после культивирования клеток в присутствии 5'-аза-2'-деоксицитидина метилирована гораздо меньше, чем в его отсутствие. Определение уровня метилирования для каждого CpG-участка показало, что 5'-аза-2'-деоксицитидин вызывает снижение уровня метилирования для всех CpG-участков, кроме 310 и 314, для которых разница в уровне метилирования до и после инкубации в присутствии 5'-аза-2'-деоксицитидина статистически недостоверна (рис. 6).

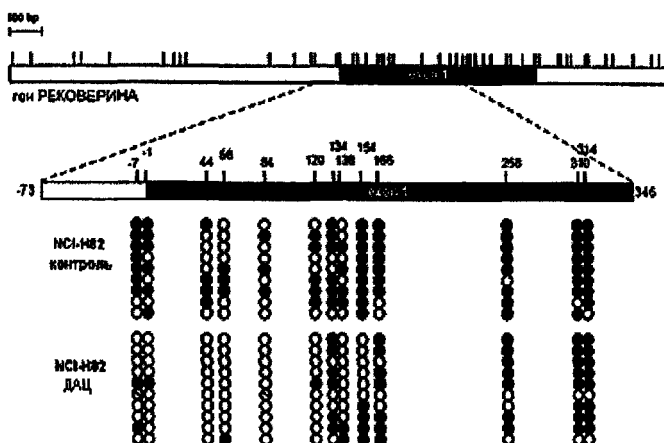


Рис. 5. Профиль метилирования промотора гена рековерина в клеточной линии NCI-H82 до и после обработки 5'-аза-2'-деоксцитидином. Количество кружков по вертикали соответствует количеству исследованных образцов. Черные кружки обозначают метилированный цитозин, белые - неметилированный цитозин.

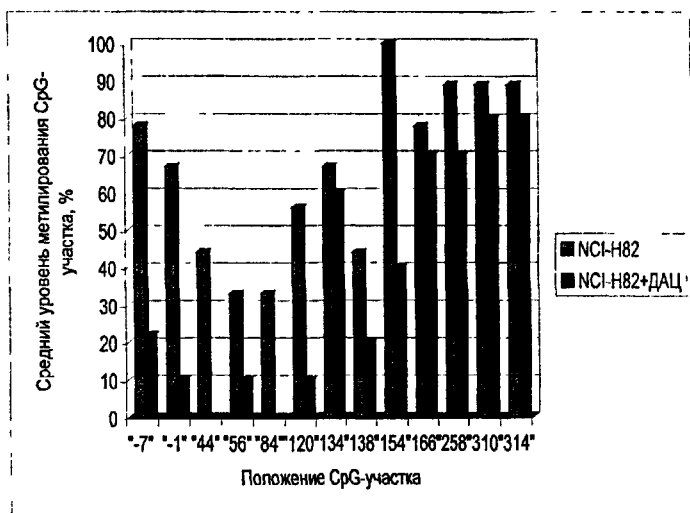


Рис. 6. Уровень метилирования области промотора и первого экзона гена рековерина в клеточной линии NCI-H82 до и после инкубации в присутствии 5'-аза-2'-деоксцитидина.

Таким образом, можно полагать, что деметилирование промотора и первого экзона гена рековерина может быть вовлечено в aberrantную экспрессию рековерина.

Далее мы проанализировали уровень экспрессии рековерина в клеточной линии NCI-H82 до и после воздействия различных агентов (рис. 7). Как видно из рисунка, экспрессия рековерина выявляется только после культивирования клеточной линии NCI-H82 в присутствии бутирата натрия (рис. 17, дорожка 6). Культивирование же клеток с 5'-аза-2'-деоксицитидином, которое вызывало даже большее, чем после инкубации с бутиратом натрия, увеличение уровня мРНК рековерина (рис. 3), к экспрессии самого рековерина не приводит (рис. 7, дорожка 4).

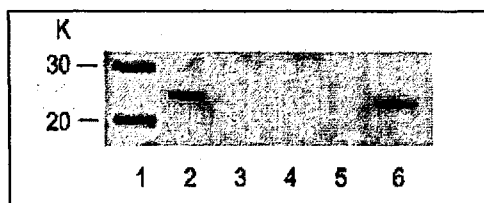


Рис. 7. Иммуноблот белковых экстрактов клеточной линии NCI-H82 после действия различных агентов, окрашенный поликлональными (моноклониальными) антителами к рековерину. 1 - маркеры; 2 - экстракт сетчатки; 3-6 - NCI-H82 до (3) и после культивирования с 5'-аза-2'-деоксицитидином (4), трихостатином А (5) и бутиратом натрия (6).

Из полученных нами данных следует, что экспрессия мРНК рековерина в клетках рака легких *in vitro* не является достаточным условием для экспрессии соответствующего белка в этих же условиях. Механизм, с помощью которого бутират натрия стимулирует экспрессию рековерина, остается, однако, неизвестным. Хотя на основании наших данных по измерению уровня мРНК рековерина в клеточной линии NCI-H82 методом количественного ПЦР (напомним, что количество мРНК рековерина после инкубации клеток в присутствии бутирата натрия увеличивалось всего лишь в два раза - см. рис. 4), можно предположить, что стимулирующее действие бутирата натрия на экспрессию рековерина реализуется, скорее всего, не на уровне транскрипции, а на уровне трансляции.

3. Аутоантитела против рековерина в качестве потенциального маркера злокачественной трансформации.

Ранее в нашей лаборатории было показано, что аутоантитела против рековерина присутствуют в сыворотке крови больных раком легких и в отсутствие паранеопластической дегенерации сетчатки. Однако недостаточное количество имеющихся данных не давало возможности для корректной оценки частоты встречаемости аутоантител против рековерина как при раке легких, так и при других онкологических заболеваниях. Мы провели определение частот встречаемости аутоантител против рековерина в образцах сыворотки крови пациентов с диагнозом рак легких, а также с другими различными онкологическими заболеваниями. Для анализа применяли метод иммуноблоттинга, в качестве антигена использовали рековерин. Инкубацию блотов рековерина в присутствии сыворотки крови проводили при начальном разведении 1:20. Иммунохимический сигнал регистрировали с помощью диаминобензидина, в некоторых случаях - с помощью хемолуминесцентного метода (ECL-system). Применение различных методов визуализации таких, как диаминобензидиновый или метод ECL, не влияло на количество рековерин-положительных образцов сыворотки. В дальнейшем при серийном анализе образцов сыворотки крови пациентов с различными доброкачественными и злокачественными заболеваниями мы использовали диаминобензидиновый метод как более удобный. Пример определения аутоантител против рековерина в образцах сыворотки крови представлен на рис. 8. Из рисунка видно, что при начальном разведении 1:20 сыворотка крови пациентов с аутоантителами против рековерина окрашивает рековерин на иммуноблоте.

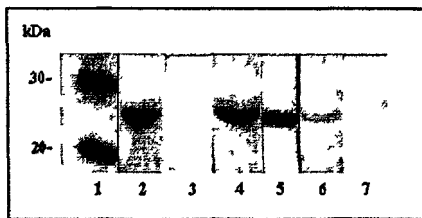


Рис. 8. Определение аутоантител против рековерина в сыворотках крови методом иммуноблоттинга. 1 - блот белковых маркеров (окраска Ponceau S); 2-3 - контрольные пробы: блот рековерина, окрашенного (2) кроличьими поликлональными (моноспецифическими) антителами против рековерина (1 мкг/мл) или (3) сывороткой крови здорового индивида; 4-7 - блот рековерина, окрашенного сывороткой крови, содержащей аутоантитела против рековерина и полученной от пациентов с МККЛ (4), НМККЛ (5), раком молочной железы (6) и сывороткой крови пациента с раком печени (7), не содержащей аутоантитела против рековерина. Разведение всех образцов сыворотки крови составляло 1:20.

С помощью описанного подхода мы проанализировали 229 образцов сыворотки крови пациентов с МККЛ, НМККЛ и пациентов с неопухолевыми легочными заболеваниями на присутствие в них аутоантител против реоверина. Оказалось, что аутоантитела против реоверина обнаруживаются в крови 15 пациентов с МККЛ из 99 (соответствует частоте встречаемости антител 15%). Анализ образцов сыворотки крови пациентов с НМККЛ на присутствие в них аутоантител против реоверина выявил их у 9 пациентов из 44, что составляет около 20% случаев. Отметим, что аутоантитела против реоверина присутствовали в крови представителей всех гистологических типов НМККЛ - плоскоклеточного рака, крупноклеточного рака и аденокарциномы. Ни один из 150 контрольных образцов сыворотки крови, полученных от здоровых индивидов, положительной реакции на аутоантитела против реоверина не дал. У пациентов с неопухолевыми заболеваниями легких аутоантитела против реоверина были обнаружены только в двух случаях из 86 (2%). Заметим, однако, что этими пациентами были ликвидаторы последствий аварии на Чернобыльской АЭС и их пульмонологические заболевания могут быть потенциально предраковыми.

Далее нами было проведено определение титра аутоантител против реоверина в 536 образцах сыворотки крови пациентов с другими онкологическими заболеваниями различной этиологии и локализации. В исследование были взяты пациенты со злокачественными опухолями молочной железы, кожи, пищеварительного тракта, выделительной системы, а также женской и мужской половой системы. Оказалось, что наиболее часто аутоантитела против реоверина встречаются у больных раком легких - 24 положительных случая из 143 проанализированных, частота встречаемости аутоантител против реоверина при этом равна 17%. На втором месте по частоте встречаемости аутоантител против реоверина в сыворотке крови пациентов находится рак яичника - 4 позитивных случая из 40, что составляет 10% встречаемости. Соответствующие цифры при других видах рака были следующие: рак шейки матки - 3 из 40 (8% встречаемости); меланома кожи - 2 из 36 (6%); рак молочной железы - 5 из 94, рак тела матки - 2 из 43, рак желудка - 2 из 42, рак мочевого пузыря - 1 из 21 (все это соответствует 5% встречаемости аутоантител против реоверина). При раке пищевода аутоантитела против реоверина были обнаружены у 1 пациента из 10, при раке мужской половой системы - у 1 из 13. Также аутоантитела против реоверина были обнаружены в двух случаях у пациенток с миомой матки. Следует заметить, что аутоантитела против реоверина не были обнаружены ни в одном из образцов сыворотки крови, взятой от пациентов с заболеваниями щитовидной железы (рак, аденома, киста, узловой зоб, тиреоидит), толстого кишечника (рак и аденома), раком почки и раком печени.

Таким образом, методом серийного анализа образцов сыворотки крови пациентов с

чаемости аутоантител против рековерина наблюдается при раке легких (17%), а в остальных случаях не превышает 10%. При этом ни у одного из больных раком легких не было зафиксировано паранеопластической дегенерации сетчатки. Аутоантитела против рековерина впервые обнаружены при раке шейки матки, желудка, пищевода, семенников и мочевого пузыря. Отметим, что в сыворотке крови здоровых индивидов аутоантитела против рековерина не выявляются.

В литературе описаны случаи, когда антитела против паранеопластических антигенов, в том числе и рековерина, встречались раньше, чем у этих пациентов обнаруживали опухоль. Хорошо известно, что чем раньше выявлен рак, тем выше шансы на то, что терапия сможет подавить развитие опухоли, или даже на то, что болезнь будет излечена. Факт, что аутоантитела против рековерина могут быть детектированы задолго до того, как рак будет обнаружен с помощью традиционных диагностических методов, позволяет рассматривать эти аутоантитела как перспективный маркер злокачественной трансформации клеток. Что же касается экспрессии рековерина в опухолях легких (см. раздел 1.1), высокая частота этой экспрессии позволяет рассматривать рековерин как потенциальную мишень для иммунотерапии рака легких.

ВЫВОДЫ

1. Показано, что рековерин экспрессируется в опухолях немелкоклеточной карциномы легких.
2. мРНК рековерина выявлена в нормальных тканях, не относящихся к тканям нервной системы.
3. Получены данные, указывающие на вовлечение деметилирования участков промотора и первого экзона гена рековерина в регуляцию экспрессии рековерина в клеточной линии рака легких *in vitro*.
4. Установлено, что ацетилирование гистонов не участвует в проявлении аберрантной экспрессии рековерина *in vitro*.
5. Определены частоты экспрессии рековерина в опухолях легких и встречаемости аутоантител против рековерина в сыворотке крови пациентов при раке легких, которые составляют, соответственно, 76% и 17%.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Бажин А.В., Савченко М.С., Шифрина О.Н., Филиппов П.П. Серийный анализ образцов сыворотки крови больных мелкоклеточной карциномой легких на присутствие в них антител против рековерина. *Тезисы докладов на XIII зимней международной научной школе "Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии"*, Москва, 2001, стр. 97.
2. Bazhin A.V., Shifiina O.N., Savchenko M.S., Tikhomirova N.K., Goncharskaia M.A., Gorbunova V.A., Senin I.I., Chuchalin A.G., Philippov P.P. Low titre autoantibodies against recoverin in sera of patients with small cell lung cancer but without a loss of vision. *Lung Cancer* 2001; 34(1), 99-104.
3. Shifrina O.N., Bazhin A.V., Savchenko M.S., Chuchalin A.G., Philippov P.P. Detection of antibodies against recoverin in the serum of patients with small cell lung cancer in the absence of cancer-associated retinopathy. *Proc. of 11-th European respiratory congress*, Berlin, 2001, p. 395s.
4. Бажин А.В., Шифрина О.Н., Савченко М.С., Чучалин А.Г., Филиппов П.П. Серийный анализ образцов сыворотки крови больных мелкоклеточной карциномой легких на присутствие в них антител против рековерина в отсутствие синдрома ретинопатии. *Тезисы докладов на II Национальном конгрессе по болезням органов дыхания*, Москва, 2001, стр. 11.
5. Савченко М.С., Гончарская М.А., Бажин А.В., Филиппов П.П. Серийный анализ образцов сыворотки крови пациентов с различными онкологическими заболеваниями на присутствие в них аутоантител против рековерина. *Тезисы докладов на XIV зимней международной научной школе "Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии"*, Москва, 2002, стр. 114.
6. Shifrina O.N., Bazhin A.V., Savchenko M.S., Chuchalin A.G., Philippov P.P. Antirecoverin autoantibodies in sera of patients with non-small cell lung cancer in the absence of cancer-associated retinopathy. *Proc. of 12-th European respiratory congress*, Stockholm, 2002, p. 156.
7. Шифрина О.Н., Демура С.А., Бажин А.В., Савченко М.С., Коган Е.А., Филиппов П.П. Экспрессия рековерина в ткани рака легких. *Тезисы докладов на 12 Национальном конгрессе по болезням органов дыхания*, Москва, 2002, стр. 180.
8. Bazhin A.V., Savchenko M.S., Shifiina O.N., Goncharskaia M.A., Jaques G., Chuchalin A.G., Philippov P.P. Frequencies of the presence of anti-recoverin autoantibodies in sera of patients with different kinds of cancer. *Proc. Of 7-Th European Symposium On Calcium Binding Proteins In Normal And Transformed Cells*, Brussels, 2002, p. 233.
9. Savchenko M.S., Bazhin A.V., Shifiina O.N., Demoura S.A., Kogan E.A., Chuchalin A.G., Philippov P.P. Antirecoverin autoantibodies in the patient with non-small cell lung cancer but without cancer-associated retinopathy. *Lung Cancer* 2003; 41 (3); 363-367.
10. Бажин А.В., Шифрина О.Н., Савченко М.С., Тихомирова Н.К., Чучалин А.Г. Исследование применимости методов ELISA и иммуноблота для выявления аутоантител против рековерина в сыворотке крови больных мелкоклеточной карциномой легких. *Пульмонология* 2003; 3; 62-65.
11. Bazhin A.V., Savchenko M.S., Kobljakova I.V., Philippov P.P., Belousov E.V., Jaques G. Stimulation of the aberrant expression of the paraneoplastic antigen recoverin in small-cell lung cancer cell lines. *Abstracts Of The 10th World Conference On Lung Cancer*, Vancouver, 2003, p. S125.

12. Savchenko M.S., Bazhin A.V., Shifrina O.N., Chikina S.Y., Demoura S.A., Kogan E.A., Chuchalin A.G., Philippov P.P. Recoverin as a paraneoplastic antigen in lung cancer. *Abstracts Of European Respiratory Society Annual Congress*, Vienna, 2003, p. 199s.
13. Shifrina O.N., Bazhin A.V., Savchenko M.S., Philippov P.P., Chuchalin A.G. Clinical and prognostic significance of autoantibodies against recoverin in non small cell lung cancer. *Abstracts of European Respiratory Society Annual Congress*, Vienna, 2003, p. 394s.
14. Бажин А.В., Савченко М.С., Жак Г., Филиппов П.П. Индукция экспрессии паранеопластического антигена рековерина в клеточных линиях мелкоклеточного рака легких. *Тезисы докладов на 13 Национальном конгрессе по болезням органов дыхания*, С-Петербург, 2003, стр. 136.
15. Bazhin A.V., Savchenko M.S., Shifrina O.N., Demoura S.A., Chikina S.Y., Jaques G., Kogan E.A., Chuchalin A.G., Philippov P.P. Recoverin as a paraneoplastic antigen in lung cancer: the occurrence of anti-recoverin auto-antibodies in sera and recoverin in tumors. *Lung Cancer* 2004; 44(2); 193-198.
16. Bazhin A.V., Savchenko M.S., Belousov E.V., Jaques G., Philippov P.P. Stimulation of the aberrant expression of a paraneoplastic antigen, recoverin, in small cell lung cancer cell lines. *Lung Cancer* 2004; 45(3); 299-305.

Отпечатано в копицентре

Москва, Ленинские горы, МГУ, 1 Гуманитарный корпус.
www.stprint.ru e-mail: zakaz@stprint.ru тел. 939-3338
тираж 100 экз. Подписано в печать 26.04.2005 г.



716

07 MAR 2005