

Вдовиченко Константин Константинович

**Выявление мутаций
в генах *k-ras*, *b-raf* и *APC*
при некоторых онкологических заболеваниях**

03.06.15 – генетика

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

**Москва
2006**

Работа выполнена в Федеральном государственном учреждении
«Федеральный научно - клинический центр детской гематологии, онкологии и
иммунологии» Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию РФ

Научный руководитель:

доктор медицинских наук

Белохвостов Александр Сергеевич

Официальные оппоненты:

доктор медицинских наук,

профессор

Чеботарев Александр Николаевич

доктор медицинских наук

Шахтарин Владимир Васильевич

Ведущая организация:

Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования
«РГМУ» Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию РФ

Защита состоится << ____ >> _____ 2006 г. в ____ час.

на заседании диссертационного совета Д 212.203.05

при Российском университете дружбы народов по адресу:

117198, Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 8

С диссертацией можно ознакомиться в Научной библиотеке Российского университета
дружбы народов по адресу:

117198, Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 6.

Автореферат разослан << ____ >> _____ 2006 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
кандидат биологических наук,
доцент

О. Б. Гигини

2006А
3316

Актуальность проблемы

В России и других развитых странах смертность от рака стоит на втором месте после смертности от сердечно-сосудистых заболеваний. Известно, что при выявлении опухоли на ранних этапах развития заболевания клинический прогноз является наиболее благоприятным, вероятность излечения многих форм рака при этом высока, объем оперативного или иного лечебного вмешательства в таких случаях имеет ограниченную травматичность для больного. Вследствие этого диагностика злокачественных новообразований на доклинических стадиях развития опухолевого процесса является одной из приоритетных задач в современной онкологии.

В последние несколько десятилетий наука добилась больших успехов в раскрытии молекулярных механизмов канцерогенеза, однако большинство исследований в данной области не выходит за рамки академической науки. В последние годы наметилась тенденция интеграции фундаментальных и прикладных лабораторных исследований и медицинской практики для нужд медицины в диагностике и выборе тактики лечения онкологических заболеваний. Раскрытие молекулярных механизмов канцерогенеза позволяет создавать новые высокоспецифичные нетоксичные агенты, действующие непосредственно при повреждениях тех или иных генов, повреждающихся при возникновении неоплазий. При таком подходе увеличивается терапевтический эффект лечения и уменьшается проявление побочных эффектов. Применение целевых агентов имеет смысл при известной молекулярной картине опухоли, что требует разработки новых, применимых в клинике методов обнаружения генетических мутаций

Хотя современная медицина обладает большим арсеналом методов инструментальной клинической диагностики онкологических заболеваний, раннее обнаружение опухолей возможно не всегда. Кроме того, многие «инструментальные» диагностические процедуры имеют инвазивный характер.

В связи с отсутствием в современной клинической практике «инструментов» для установки точного молекулярно-генетического «диагноза» при опухолевых заболеваниях возникает задача поиска новых, чувствительных и надежных методов диагностики и мониторинга онкологических заболеваний. К числу таких методов относится новое направление в современной медицине — молекулярно-генетическая диагностика. В отличие от иммунохимических онкомаркеров, молекулярно-генетические онкомаркеры обычно являются мутантными генами опухолевого происхождения, попадающие в кровоток, изменения в которых имеют как качественный, так и количественный характер. Основным исследуемым материалом при этом служит плазма крови. Факт присутствия нуклеиновых кислот в плазме крови был обнаружен еще в 1948 году (Mandel P et al., 1948). При более поздних исследованиях состава и происхождения нуклеиновых кислот плазмы крови было обнаружено, что опухолевые клетки выделяют свою ДНК в кровоток (Stroun M et al., 1989), причем количество

РОС. НАЦИОНАЛЬНАЯ
БИБЛИОТЕКА
С.Петербург
09 100 акт 133

ДНК в плазме крови онкологических пациентов обычно намного больше, чем у здоровых (Stroun M et al., 1989; Shapiro B et al., 1983).

При исследовании ДНК из опухоли и плазмы крови обнаруживаемые мутации в генах-онкомаркерах идентичны, в то время как при исследовании ДНК плазмы крови здоровых пациентов (не имеющих онкологического диагноза) такие мутации не выявляются (Vasioukhin V et al., 1994; Anker P et al., 1997). Отсутствие в норме и присутствие при раке в плазме крови мутантных генов опухолевого происхождения является принципиальным преимуществом молекулярно-генетических онкомаркеров перед иммунохимическими. Преимуществом является и более высокая чувствительность молекулярно-генетических маркеров (в тысячу и более раз).

Молекулярно-генетический анализ позволяет выявить мутации в онкозначимых генах, когда трансформированных клеток в организме еще менее миллиона, то есть на доклинических этапах онкологического заболевания. Несмотря на большое количество научных работ, методы диагностики онкологических заболеваний, описанные в литературе и позволяющие проводить исследования в условиях хорошо оснащенных научных лабораторий, в широкой клинической практике до сих пор не применяются. В настоящей работе мы оптимизировали такие методы для применения в условиях клиничко-диагностических лабораторий.

Цель и задачи исследования

Целью настоящей работы являлось усовершенствование существующих методов анализа генов *K-ras*, *B-raf* и *APC* для использования их в диагностике и мониторинге некоторых онкологических заболеваний. Для достижения этой цели были поставлены следующие **задачи**:

- 1) адаптация метода обогащенной ПЦР гена *K-ras* для выявления мутаций этого гена в различных биологических образцах, в том числе и в плазме крови;
- 2) оптимизация условий проведения ПЦР и последующего анализа конформационного полиморфизма одонитевых фрагментов (SSCP) для выявления мутаций в гене *B-raf*;
- 3) разработка праймеров и подбор условий проведения ПЦР и SSCP-анализа для выявления мутаций в гене *APC*;
- 4) оценка применимости разработанных методических приемов к анализу различных биологических образцов, включая плазму крови, для массового обследования.

Научная новизна

Научная новизна данного исследования заключается в:

- 1) адаптации методов исследования молекулярно-генетических онкомаркеров, известных для опухолевых тканей, к ДНК плазмы крови;
- 2) разработке методики определения мутаций в гене *B-raf* (15-й экзон) в различных биологических образцах методом SSCP-анализа;

3) разработке праймеров и подбора условий определения мутаций в гене *APC* (15-й экзон, район 1309-го кодона) в различных биологических образцах методом SSCP-анализа.

Практическая значимость работы

1) методики анализа генов *K-ras*, *B-raf* и *APC* адаптированы к использованию в научно-исследовательских медицинских учреждениях и молекулярно-диагностических центрах. Методы анализа генов *K-ras* и *B-raf* внедрены в работу Казанского Государственного Университета, Ростовского Медицинского Университета, Саратовского Медицинского Института; ООО «Центр молекулярно-генетической диагностики» (г. Тюмень).

2) на основе полученных данных сформировано новое прикладное исследование – «Создание набора для диагностики ряда онкологических заболеваний желудочно-кишечного тракта».

Апробация работы

Материалы диссертации апробированы на совместной научно-практической конференции сотрудников лаборатории регуляции кроветворения, отделения онкогематологии, отдела нейроонкологии и лаборатории молекулярной генетики НИИ детской гематологии г. Москвы от 30 сентября 2004 г.

Публикации: по теме диссертации опубликовано 8 печатных работ.

Структура и объем диссертации. Материал диссертации изложен в одном томе на 200 страницах машинописного текста и состоит из следующих разделов: введение, обзор литературы, методы исследования, результаты собственных исследований, обсуждение результатов, заключение, выводы библиографический список (2 источника отечественной и 232 источника зарубежной литературы) и приложение. Работа содержит 7 таблиц, 38 рисунков. Работа выполнена в НИИ детской гематологии МЗ РФ (директор НИИ ДГ – член-корреспондент РАМН, доктор медицинских наук, профессор А. Г. Румянцев), на базе лаборатории молекулярной генетики (зав. лабораторией – доктор медицинских наук А. С. Белохвостов).

Содержание работы

Материалы и методы исследования. Стандартные биологические образцы с охарактеризованными генами. В качестве положительных контролей для исследования гена *K-ras* использовали ДНК клеточной линии SW480. В качестве положительного контроля при исследовании гена *B-raf* использовали ДНК клеточных линий HT29 и SK-MEL-28, любезно предоставленных П. М. Чумаковым. Кроме того, в целях проверки качества определения мутантного гена *K-ras* и как межлабораторный контроль использовали ДНК, полученную из послеоперационного материала от больного опухолью толстой кишки с установленным наличием в этой ДНК мутантной формы гена *K-ras*. Аликвота этой ДНК была любезно предоставлена профессором А. Руссо (Antonio Russo), онкологический

институт г. Палермо, Италия, а также ДНК, полученную из послеоперационного материала с охарактеризованной мутацией в гене *K-ras*, алиquota которой была любезно предоставлена М. Г. Якубовской, РОНЦ РАМН. В качестве образцов, имеющих мутации в гене *B-raf* и *APC*, использовали ДНК из послеоперационного материала, характер мутаций в котором был установлен методом прямого секвенирования. В качестве отрицательных контролей при исследовании гена *K-ras* использовали ДНК клеточных линий Н-9, предоставленные А. А. Ставровской, РОНЦ РАМН, а также линий HT29 и SK-MEL-28, в которых ген *K-ras* представлен аллелями дикого типа. Отрицательным контролем при исследовании гена *B-raf* служила ДНК клеточной линии SW480.

Оптимизацию условий проведения анализа вышеперечисленных генов проводили как с использованием контрольных препаратов, так и с использованием клинических образцов.

Биологические образцы из клинического материала. Клинический материал был любезно предоставлен отделением опухолей головы и шеи НИИ онкологии им. Герцена, лабораторией патоморфологии 62-ой городской больницы, отделением оперативной лапароскопии 31-ой больницы г. Москвы, НИИ гастроэнтерологии, НИИЦ проктологии, отделением онкологии РДКБ, амбулаторным отделением и отделением преливания крови НИИ детской гематологии МЗ РФ и заводским здравпунктом ОАО «Стерлитамак-каучук».

Клиническими образцами служили препараты ДНК, полученные из послеоперационного материала (свежая ткань и парафинированные блоки для гистологических исследований), плазмы и клеток крови, клеточного осадка мочи, а также буккальных клеток (соскоб со щеки).

Для оценки пригодности выбранных условий проведения анализов генов *K-ras*, *B-raf* и *APC* использовали различные биологические образцы, полученные от обследуемых пациентов. При этом пациентов условно разделили на 4 группы: здоровые доноры; лица без онкологического диагноза; лица, работающие во вредных условиях, связанных с канцерогенной опасностью; онкологические и онкогематологические больные со злокачественными новообразованиями.

В первую группу (здоровые доноры) вошли 34 человека, у которых анализировали ДНК из плазмы и/или клеток крови, а иногда ДНК выделенную из буккальных клеток слизистой внутренней поверхности щеки.

Вторую группу составляли лица без онкологического диагноза, обратившиеся самостоятельно или по направлению врача для исключения или обнаружения возможности онкологического заболевания (94 человека).

Третью группу составляли лица, работающие во вредных условиях, связанных с канцерогенной опасностью (386 человек). Эти лица работают в условиях загрязнения воздуха цехов парами органических растворителей и промежуточными продуктами химического органического синтеза искусственных каучуков.

Четвертую группу составляли онкологические и онкогематологические больные со злокачественными новообразованиями (233 человека). Эта группа была разделена на подгруппы в зависимости от локализации опухоли и других характеристик.

Выделение ДНК. Плазму крови получали из венозной крови путем трехступенчатого центрифугирования. Плазму крови обрабатывали протеиназой K и затем выделяли ДНК методом фенольно-хлороформной экстракции с последующей этанольной преципитацией.

Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили либо по стандартной схеме с использованием соответствующих пар праймеров (15-й экзон гена *B-raf*, район 1309 кодона гена *APC*), либо по трехпраймерной схеме (ген *K-ras*) на термоциклере MasterCycler (Eppendorf, Германия). Последовательности праймеров для амплификации участка 1-го экзона гена *K-ras* приведены в Vasioukhin et al., 1994, гена *B-raf* в работе Davies et al., 2002. Нуклеотидные последовательности праймеров для анализа района 1309-го кодона гена *APC* были подобраны с использованием программ Premier Primer 5.0 (PREMIER Biosoft International) и Fast PCR 2.5.39 ("PCR Team", Institute of Biotechnology, University of Helsinki, Finland)

SSCP-анализ. Поиск точковых мутаций проводили методом регистрации конформационного полиморфизма одноцепочечных фрагментов ДНК (SSCP-анализ). Визуализацию ДНК в ПААГ проводили при помощи окрашивания нитратом серебра.

Определение нуклеотидной последовательности (секвенирование). Для подтверждения специфичности получаемого амплифицируемого фрагмента проводили определение его нуклеотидной последовательности методом секвенирования с использованием аппарата ABI Prism 373a.

Статистическая обработка результатов. Оценку достоверности различий между частотами встречаемости качественных признаков проводили с помощью расчета непараметрической статистики χ^2 и точного критерия Фишера с использованием программы STATISTICA v. 6.0 («StatSoft»).

Результаты и их обсуждение

Оптимизация условий проведения обогащенной ПЦР для выявления мутаций в 12-ом кодоне гена *K-ras*. Содержание ДНК в плазме крови здоровых доноров в среднем составляет около 20 нг/мл, т. е. примерно в 2500 раз меньше, чем в клетках из того же объема крови. Этот факт потребовал адаптации условий проведения ПЦР применительно к ДНК плазмы крови.

Для оптимизации анализа проводили подбор условий для отдельных этапов. Оптимизировали параметры ПЦР: количество ДНК-полимеразы, кратность буфера для проведения ПЦР, температуру отжига праймеров и временные характеристики проведения ПЦР.

В эксперименте по подбору условий анализа использовали ДНК плазмы крови. Было показано, что оптимальными условиями проведения первой ПЦР (в 25 мкл) при анализе гена *K-ras* являются: 2 ед Taq-полимеразы,

кратность буфера для ПЦР 1,5. Подбор оптимальной температуры отжига праймеров в первой ПЦР проводили, варьируя температуру от 48°C до 58°C. Наилучшее соотношение по количеству амплификата и отсутствием дополнительных неспецифических продуктов наблюдали при температуре 54°C.

При малых концентрациях ДНК использование стандартной концентрации праймеров (обычно 200 нМ) нарушает оптимальное соотношение ДНК-матрицы и праймеров. Поэтому в целях оптимизации методики варьировали концентрацию праймеров. Была изучена воспроизводимость результатов ПЦР при выявлении мутаций в 12-м кодоне гена *K-ras* в условиях изменения концентрации праймеров. Показано, что чувствительность анализа максимальна при концентрации праймеров 20 нМ на первом этапе ПЦР. Для подбора концентрации праймеров в первом этапе ПЦР и выявления влияния этой концентрации на результаты анализа провели три этапа анализа обогащенной ПЦР: первую ПЦР (различные концентрации праймеров), первую рестрикцию и вторую ПЦР, условия которой оставались постоянными. (рис. 1).

Из рисунка видно, что концентрация праймеров менее 10 нМ недостаточна. В то же время увеличение концентрации праймеров в первом этапе ПЦР до 30 нМ увеличивает количество неспецифических продуктов (рис. 1, дорожка 14). Увеличение концентрации праймеров более 30 нМ увеличивает количество неспецифических продуктов в условиях малых концентраций ДНК (электрофореграмма не приведена). Количество и «чистота» целевого продукта при концентрации 20 нМ являются оптимальными. Эти условия были использованы для анализа образцов ДНК плазмы крови, поскольку количества ДНК в этих образцах сопоставимы с таковыми в эксперименте.

Таким образом, оптимальными для выявления мутантной формы гена *K-ras* (мутация в двух первых нуклеотидах 12-го кодона) оказались следующие условия ПЦР (с «горячим» стартом):

Первый этап: $T_{отж}$ – 54°C, 1 мин; элонгация – 72°C, 1 мин, плавление цепей – 94°C, 1 мин, количество циклов – 25. Концентрация праймеров – 20 нМ, 2 ед полимеразы. (1,5 x буфер для ПЦР).

Первая обработка эндонуклеазой рестрикции BstNI 60 °C, 60 мин.

Второй этап (ПЦР с «горячим» стартом): $T_{отж}$ – 54°C, 1 мин, элонгация цепи – 72°C, 1 мин, плавление цепей – 94°C, 40 с, количество циклов – 35, конечный отжиг – 54°C, 3 мин. Концентрация праймеров – 100 нМ, 2 ед полимеразы.

Вторая обработка эндонуклеазой рестрикции BstNI 60 °C, 60 мин.

Была исследована чувствительность выявления мутантной формы гена *K-ras* при оптимальных условиях проведения ПЦР. Показано, что в охарактеризованном образце ДНК из опухоли толстой кишки, содержащем не более 10% мутантной формы гена *K-ras*, мутации выявлялись при анализе уже 30 геном-эквивалентов (рис. 2).

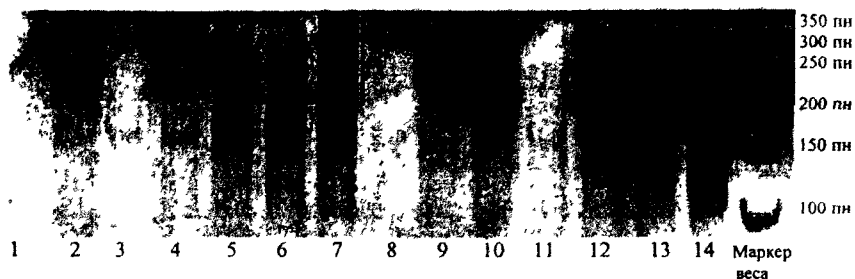


Рис. 1. Электрофореграмма эксперимента по подбору концентрации праймеров в первом этапе ПЦР для анализа гена *K-ras*.

Дорожки 1-7 – количество вносимой в смесь для первого этапа ПЦР ДНК* равно 900 пкг, дорожки 8-14 – количество вносимой в смесь для первого этапа ПЦР ДНК* равно 300 пкг. Концентрация праймеров в смеси для первого этапа ПЦР (условия рестрикции и второго этапа ПЦР постоянны):

Номера дорожек	1, 8	2, 9	3, 10	4, 11	5, 12	6, 13	7, 14
Концентрация праймеров, нМ	0	1	5	10	15	20	30

* - ДНК из послеоперационного материала опухоли толстой кишки (ДНК была любезно предоставлена профессором А. Руссо (Antonio Russo), онкологический институт г. Палермо, Италия)

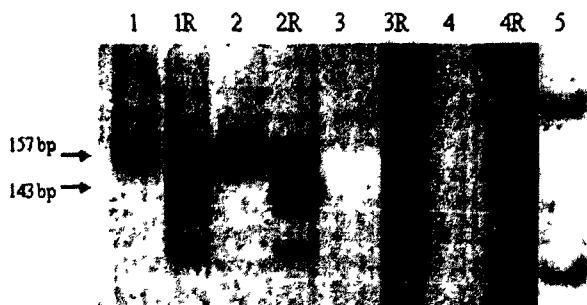


Рис. 2. Определение чувствительности анализа при выявлении мутантной формы гена *K-ras*.

1-4 – результаты третьего этапа анализа (вторая ПЦР);

1R – 4R – результаты четвертого этапа анализа (обработка BstN I);

5 – маркер длины нуклеотидных фрагментов.

Количество геномной ДНК для выявления мутантной формы гена, пкг:

1 – 5280 или 1600 геном-эквивалентов; 2 – 528 или 160 геном-эквивалентов;

3 – 106 или 30 геном-эквивалентов;

4 – 53 или 15 геном эквивалентов.

Специфичность ПЦР гена *K-ras* с мутациями в 12-м кодоне и характер точковых мутаций. Для подтверждения специфичности амплифицируемого фрагмента гена *K-ras* методом прямого секвенирования использовали клинический образец (биологический материал больного аденокарциномой поджелудочной железы), в котором при исследовании данного гена методом обогащенной ПЦР была обнаружена мутация.

Часть секвенограммы продуктов амплификации и расшифровка нуклеотидной последовательности для образца ДНК из опухолевого материала этого больного приведена на рис. 3. При секвенировании этого образца в нуклеотидной последовательности гена *K-ras* в позиции, отвечающей 12-му кодону, находится триплет СТА, что соответствует комплементарной последовательности GAT – триплету, кодирующему аминокислотный остаток аспарагиновой кислоты. В норме в данном кодоне должен находиться аминокислотный остаток глицина, кодируемого триплетом GGT (ССА на данной секвенограмме). Таким образом, из секвенограммы видно, что в нуклеотидной последовательности гена *K-ras* в исследуемом образце произошла нуклеотидная замена во второй позиции 12-го кодона гена.

Такая замена основания нуклеотида С→Т (цитозин на тимин) приводит к синтезу мутантного белка Ras с заменой аминокислоты глицин на аспарагиновую кислоту. Замещение глицина на аспарат ведет, вероятно, к изменению конформации белкового продукта гена *K-ras* вследствие появления в регуляторном сайте отрицательного заряда, мимикрирующего GTP, при связывании с которым этот белок переходит в активную форму. Это ведет к постоянной активации этого белка и неконтролируемой стимуляции клеточного деления.

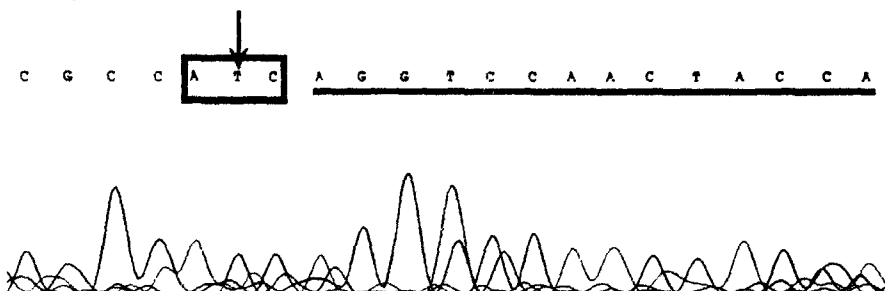


Рис. 3. Часть секвенограммы исследуемого участка гена *K-ras* из ДНК послеоперационного опухолевого материала больного Т. Приведена 5'-3' последовательность антисмысловой цепи. Жирной линией подчеркнута часть последовательности праймера «5'». Рамкой обведен 12-й кодон, стрелка указывает на нуклеотидную замену С→Т, приводящую к аминокислотной замене в 12-й позиции Gly→Asp белкового продукта гена *K-ras*.

Всего в представленной работе на присутствие мутантной формы гена *K-ras* было проанализировано образцов от 194 пациентов с различными онкологическими заболеваниями и 90 больных с неонкологическими заболеваниями; опухолевая ткань 54 больных из парафинированных блоков с диагнозом, подтвержденным морфологически; а также группа обследуемых (386 человек), работающих в условиях вредного производства.

Хотя в задачу исследования не входила оценка частоты возникновения мутаций гена *K-ras* у отдельных групп онкологических больных, небольшие группы больных, для которых характерно наличие или отсутствие данной мутации, были проанализированы для оценки пригодности метода в клинико-диагностической практике. Так у больных с опухолями молочной железы, где такая мутация по литературным сведениям практически не встречается, присутствие мутантной формы гена *K-ras* не выявлено ни в образцах ткани самих опухолей (40 образцов), ни в образцах ДНК плазмы крови (56 образцов).

Таким образом, при опухолях молочной железы мутации 12-м кодоне гена *K-ras* по данным нашего исследования не характерны, что согласуется с литературными сведениями. В образцы ДНК опухолей толстой кишки мутации в 12-м кодоне гена *K-ras* удалось обнаружить в 2-х случаях из 5-ти, причем присутствие мутантной формы гена обнаруживалось и в соответствующих образцах ДНК плазмы крови. По данным литературы частота встречаемости мутантного гена *K-ras* в популяции северной Европы мала для колоректальных опухолей (15%), тогда как в США и в западной Европе эта цифра составляет около 70%. В данной работе полученная цифра, которая ни в коей мере не претендует на значение частоты встречаемости мутантной формы гена *K-ras* при колоректальных раках в российской популяции, тем не менее занимает промежуточное положение среди таковых, приводимых для популяций северной Европы и США.

При исследовании материала ДНК опухолей поджелудочной железы мутации в гене *K-ras* выявили в 9 случаях из 15, что составляет 60%. При обследовании ДНК плазмы крови от 7-ми пациентов с подозрением на опухоль поджелудочной железы мутантная форма гена *K-ras* была выявлена в 4 случаях (57%). При обследовании двух пациентов, прооперированных по поводу удаления опухоли поджелудочной железы через неделю после проведения операции в ДНК плазмы крови этих пациентов обнаруживалась мутантная форма гена *K-ras*. Имеются литературные данные о том, что ДНК опухолевого происхождения может циркулировать в кровотоке до двух недель после удаления опухоли, по-этому присутствие в плазме крови мутантного гена может иметь прогностическую ценность только после этого срока.

При папиллярном раке щитовидной железы мутации в гене *K-ras* были обнаружены в 4 образцах опухолевого материала из 6. В плазме крови таких больных – в 4 случаях из 18.

Анализ, проведенный у 33 больных онкогематологическими заболеваниями, показал, что в 8 (24%) случаях в клетках крови

присутствовала мутантная форма гена *K-ras*. Это относилось к большим лейкозами и неходжкинскими лимфомами, тогда как при лимфогранулематозе мутаций в гене *K-ras* не встречалось. В литературе приводятся данные о возможности активации генов *ras*-семейства при онкогематологических заболеваниях: при этом описывается возможность активации генов *H-ras* и *N-ras*, а мутации в гене *K-ras* – при миелодисплазиях. Данные, полученные в этой работе при обследовании онкогематологических больных, несколько отличаются от приводимых в литературе для западноевропейской популяции, однако для подтверждения достоверности этих различий необходимо провести массовое обследование.

Таким образом, разработанная схема анализа гена *K-ras* в ДНК плазмы крови пригодна для использования в клинической диагностике.

Оптимизация условий анализа 15-го экзона гена *B-raf*. Исследование изменений в 15-м экзоне гена *B-raf* проводили методом ПЦР-SSCP-анализа. Использование такой методики вместо секвенирования значительно удешевляет анализ, что делает его доступным для применения в практических лабораториях. При использовании конформационного анализа для исследования изменений в нуклеотидной последовательности требуется ампликат, содержащий минимальное (в идеале нулевое) количество неспецифических фрагментов. Для получения ампликата 15-го экзона гена *B-raf* такого качества потребовалось оптимизировать условия ПЦР, а также условия SSCP-электрофореза.

Для минимизации количества неспецифических фрагментов при проведении ПЦР варьировали температуры отжига праймеров в интервале температур 53 - 59°C. Оказалось, что оптимальная температура отжига в использованных условиях была 57°C.

Было найдено, что оптимальными условия SSCP-электрофореза продуктов ПЦР-амплификации являются:

- плотность ПААГ – 15% (акриламид : бисакриламид = 29 : 1, весовое соотношение);
- напряженность электрического поля – 16,3 В/см;
- температура проведения электрофореза - +4 °C;
- время проведения электрофореза в камере для вертикального электрофореза с высотой стекол 15 см – 8 час.

Сравнение режимов проведения SSCP-анализа продуктов амплификации 15-го экзона гена *B-raf* представлено на рис. 4. Как видно из рисунка, при большей напряженности электрического поля амплифицированные фрагменты ДНК как нормальной последовательности гена *B-raf* (образцы 1а и 2а), так и имеющие замену в 599 кодоне (V599E, образцы 3а и 4а), не отличаются на электрофореграмме по расхождению конформеров, имеющих и не имеющих данной замены. При уменьшении напряженности электрического поля, увеличении плотности ПААГ и увеличении времени проведения электрофореза наблюдаются четкие различия между

конформерами, соответствующими последовательности «дикого типа» и последовательности, имеющей замену в 599 кодоне.

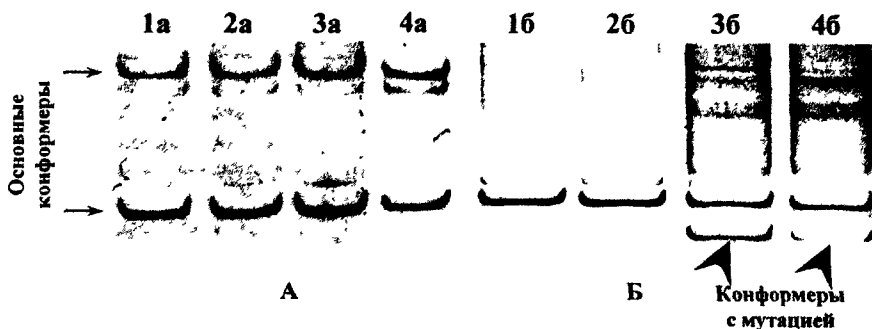


Рис. 4. Сравнение режимов проведения SSCP-анализа продуктов амплификации 15-го экзона гена *B-raf*.

А – 12% ПААГ, +4°C, 20.7 В/см, 5 час; Б – 15% ПААГ, +4°C, 16.3 В/см, 8 час.

Цифрами обозначены: 1а, б и 2а, б – продукт амплификации ДНК гена *B-raf* «дикого типа»; 3а, б – продукт амплификации ДНК гена *B-raf* с мутацией в 599 кодоне (ДНК из клеточной линии HT29, V599Е); 4а, б – продукт амплификации ДНК гена *B-raf* с мутацией в 599 кодоне (ДНК из клеточной линии SK-MEL-28, V599Е).

Применимость анализа гена *B-raf* при использовании клинических образцов. Для оценки применимости выбранных условий анализа исследовали наличие изменений в 15-ом экзоне гена *B-raf* в различных биологических образцах, полученных либо от больных с установленным онкологическим диагнозом (различные типы опухолей), находящихся на лечении в различных медицинских учреждениях России, либо от здоровых доноров или лиц с неустановленным или неподтвержденным онкологическим заболеванием. Отдельную группу обследуемых составили пациенты с опухолями щитовидной железы, в которых по данным американских и европейских исследователей наблюдается высокая встречаемость мутаций в гене *B-raf*.

Всего на присутствие мутантной формы гена *B-raf* проанализировано биологических образцов от 129 человек. Было показано, что в 12 случаях из 55 мутантный ген *Braf* выявился в ДНК из опухолевой ткани, в 13 случаях из 110 – в ДНК плазмы крови.

У пациентов с опухолями щитовидной железы (все гистологические типы) измененный ген *B-raf* выявили в опухолевой ткани в 2 случаях из 5, а в плазме крови ни в одном из 14, тогда как по данным американских и европейских исследователей наблюдается более высокая встречаемость

мутаций в гене *B-raf* при этой патологии. К сожалению, приведенные данные не могут быть статистически достоверными из-за малого числа исследованных случаев, и по полученным результатам выводы о частоте встречаемости мутантной формы гена *B-raf* при опухолях щитовидной железы у российских больных сделать нельзя.

Из 15 образцов опухолей поджелудочной железы мутации в 15-м экзоне гена *B-raf* обнаружить не удалось.

Из 6 проанализированных образцов опухолей от больных кожной меланомой изменения в 15-м экзоне гена *B-raf* выявлены в 3 случаях, в отличие от увеальных меланом (0/5), что соответствует встречаемости мутаций этого гена у больных в США.

Специфичность ПЦР 15-го экзона гена *B-raf* и характер мутаций. Специфичность амплификации ДНК 15-го экзона гена *B-raf* была подтверждена прямым секвенированием. Секвенирование образцов подтвердило наличие изменений в нуклеотидной последовательности, выявленное методом SSCP-анализа (рис. 5-9). Так, при исследовании различных биологических образцов двух больных кожной меланомой у первого пациента мутантная форма гена не была найдена ни в ДНК из опухолевого материала, ни в ДНК плазмы крови. У второго больного мутация в опухолевой ткани совпала с мутацией, найденной в отдаленном метастазе этой опухоли.

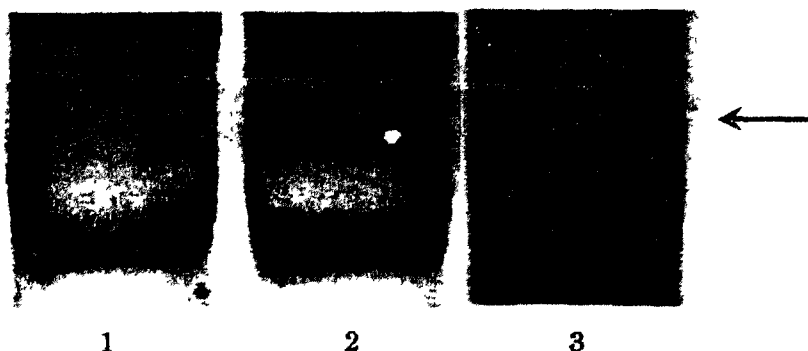


Рис. 5. SSCP-электрофореграмма продуктов амплификации гена *B-raf*. 1 – из препарата ДНК плазмы крови здорового донора, 2 – из препарата ДНК плазмы крови больной 1 (кожная меланوما, мутантной формы гена не выявлено), 3 – из препарата ДНК плазмы крови больного 2 (кожная меланوما, выявлено присутствие мутантной формы гена (указана стрелкой)).

Таким образом, анализ изменений в гене *B-raf* может производиться не только в опухолевой ткани, но и в плазме крови, что дает основу для оценки изменений гена *B-raf* как молекулярно-генетического онкомаркера для

мониторинга заболевания, а возможно и для ранней диагностики некоторых типов опухолей.

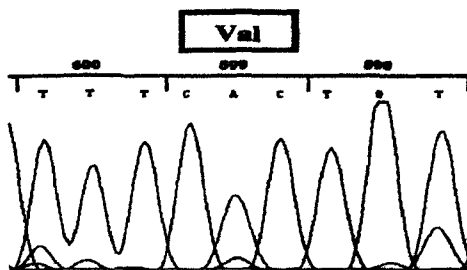


Рис. 6. Фрагмент секвенограммы амплифицированной ДНК 15-го экзона гена *B-raf*. Пациент 1. Материал ДНК опухоли.

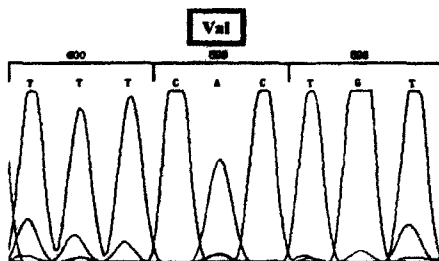


Рис. 7. Фрагмент секвенограммы амплифицированной ДНК 15-го экзона гена *B-raf*. Пациент 1. Материал ДНК плазмы крови.

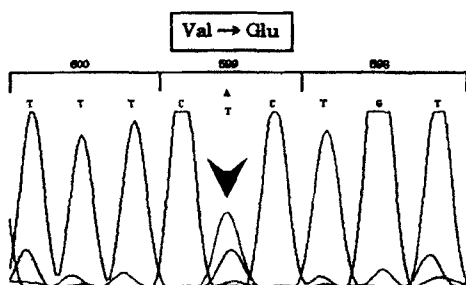


Рис. 8. Фрагмент секвенограммы амплифицированной ДНК 15-го экзона гена *B-raf*. Пациент 2. Материал ДНК опухоли.

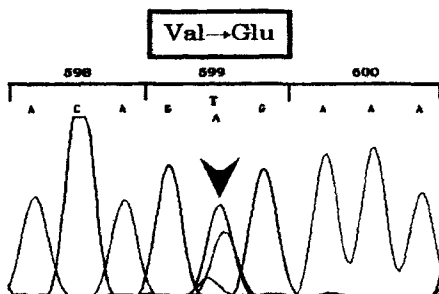


Рис. 9. Фрагмент секвенограммы амплифицированной ДНК 15-го экзона гена *B-raf*. Пациент 2. Материал ДНК метастаза.

Разработка новых эффективных средств целевой терапии на основе ингибиторов серин-треониновой киназы, кодируемой геном *B-raf*, делает актуальным исследование этого гена у онкологических больных для обоснования лечения такими препаратами.

При исследовании образцов ДНК плазмы крови пациента, страдающего неоперабельной злокачественной фиброзной гистиоцитомой, а также пациента, оперированного по поводу аденокарциномы придаточных пазух носа, в 15-ом экзоне гена *B-raf* обнаружили гомозиготную делецию (рис. 10).

Стоит отметить, что заболевание у этих пациентов носило тяжелый характер. В литературе на сегодняшний день не описано подобных случаев

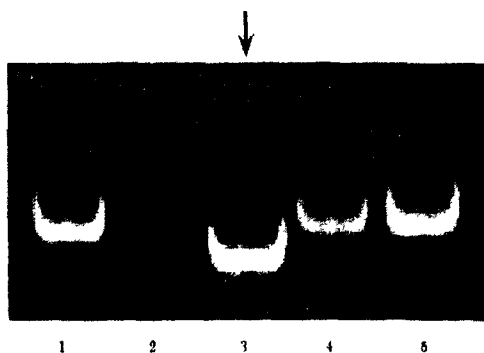


Рис. 10. Электрофореграмма продуктов амплификации гена *B-raf* от различных онкологических больных. Материал ДНК плазмы крови. 1 – Опухоль яичника; 2 – Нет онкологического диагноза; 3 – Злокачественная фиброзная гистиоцитома; 4 – Онкологический диагноз не установлен; 5 – Опухоль яичника.

Ген *APC*. Анализ гена аденоматозного полипоза кишечника – *APC* – получил широкое распространение в развитых странах, где опухоли толстой кишки – одно из наиболее частых онкологических заболеваний. Широко распространена эта патология и в нашей стране. Известно, что профилактика и раннее выявление данной опухоли многократно увеличивают шанс на успешное лечение.

Однако для массовых исследований гена *APC*, как и для оценки гена *B-raf*, целесообразно использовать относительно недорогой SSCP-анализ. В данной работе были разработаны и оптимизированы условия исследования гена *APC* методом ПЦР-SSCP-анализа.

Наиболее эффективное разделение конформеров при электрофорезе наблюдали в 15% ПААГ при температуре проведения электрофореза +4°C, напряженности электрического поля – 17 В/см и времени проведения электрофореза – 5 час.

Было показано, что ген *APC* в этих условиях может быть проанализирован не только в опухолевой ткани, но и в ДНК из плазмы крови. При этом выявленные при SSCP-анализе изменения нуклеотидной последовательности были подтверждены при прямом секвенировании соответствующих образцов.

Специфичность ПЦР гена *APC*. При секвенировании продукта амплификации гена *APC* получили специфическую для данного гена последовательность. Результат секвенирования материала ДНК плазмы крови здорового донора представлен на рис. 11. Из рисунка видно, что нуклеотидная последовательность ПЦР-продукта амплифицируемого фрагмента гена *APC* полностью соответствует нуклеотидной последовательности этого гена, приведенной в международных базах данных по геному человека (<http://www.ensembl.org>; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

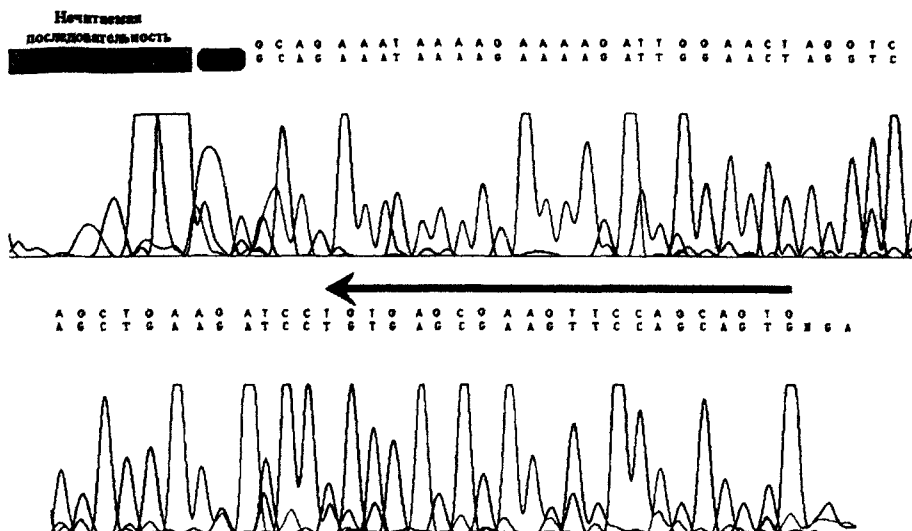
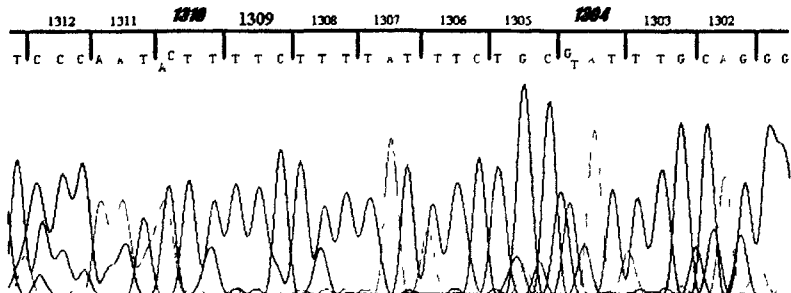


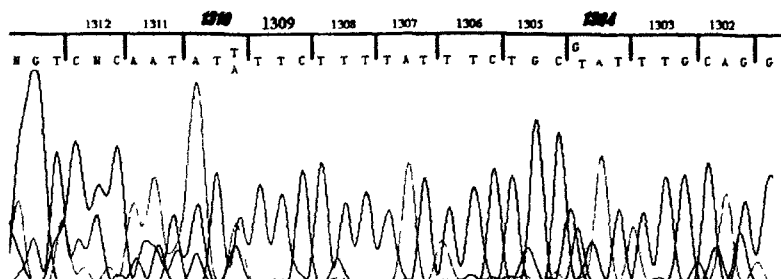
Рис. 11. Секвенограмма ПЦР-продукта гена *APC* (район 1309-го кодона). Над пиками приведена нуклеотидная последовательность участка гена *APC* (верхняя строка) и соответствующая пикам последовательность (нижняя строка). Стрелкой обозначена последовательность 3'-прайма. В овал обведена неуверенно читаемая последовательность, примыкающая к 5'-праймеру.

У больного A092 с аденокарциномой толстой кишки, где с помощью SSCP-анализа обнаружили дефект гена *APC*, в ДНК опухоли и плазмы крови присутствие изменений в нуклеотидной последовательности в районе 1309 кодона гена *APC* было подтверждено секвенированием (рис. 12).

ДНК опухолевого материала



ДНК плазмы крови



ДНК клеток крови

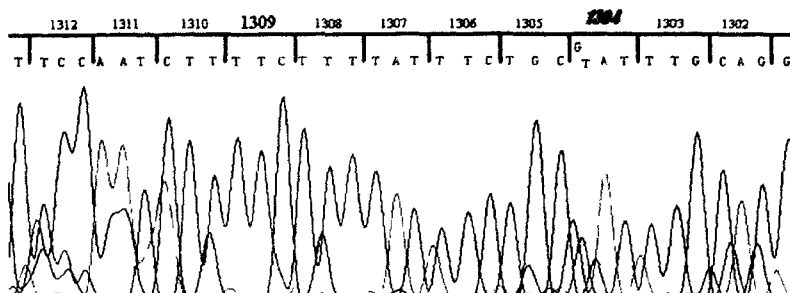


Рис. 12. Фрагмент секвенограммы района 1309 кодона гена *APC* в ДНК плазмы крови (второе исследование), опухолевого материала и клеток крови пациента А092. Представлена комплементарная ревертированная последовательность

Особенностью этого случая явилось наличие сразу 2-х мутаций: одной - наследственной и второй - приобретенной. Из рисунка видно, что в ДНК плазмы крови в данном образце присутствуют фракции мутантного гена в 1310 кодоне, которые приводят к нескольким заменам аминокислот в белковом продукте. Возможной причиной множественности имеющихся последовательностей является клоновая природа опухоли. Из данной секвенограммы можно сделать вывод, что количество фракции, несущей триплет АТТ в 1310 кодоне (вместо СТТ) значительно больше, чем фракции АТА. Вероятно, первая мутация возникла раньше, чем и вызвано ее относительно большое количество по отношению ко второй. В клетках крови этого больного, как и в остальных его биологических образцах, присутствует фракция с заменой в 1304 кодоне триплета ТАТ на GAT. Такая замена не ведет к изменению в аминокислотной последовательности белкового продукта гена. В то же время основная фракция с заменой в 1310 кодоне в опухолевом материале (и в плазме крови, соответственно) приводит к замене положительно заряженной аминокислоты лизин на нейтральный аспарагин,

что может приводить к конформационным изменениям в белке и как следствие – изменению или потере его функции.

Всего были обследованы ДНК-образцы от 7 больных с колоректальными опухолями. При этом изменения в гене APC были найдены в 2 из 6 образцов ДНК плазмы крови и в 3 из 4 образцах опухолевой ДНК. При обследовании 72 онкологических больных с другими опухолями мутации в гене APC были найдены в 4 из 49 образцов ДНК плазмы крови и в 7 из 36 образцов опухолевой ткани. Наличие мутаций в гене APC при различных опухолях, помимо опухолей толстой кишки, объясняется тем, что ген APC является геном-супрессором опухолевого роста и может экспрессироваться в целом ряде тканей.

Полученные результаты показывают, что SSCP-анализ пригоден для предварительной оценки наличия мутаций в гене APC, также как и в случае гена *B-raf* и позволяет заместить на первом этапе лабораторной диагностики онкологических заболеваний более трудоемкий и требующий дорогого оборудования метод секвенирования.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Анализ дефектных генов опухолевого происхождения помогает решать широкий круг вопросов диагностики, мониторинга и прогноза эффективности тех или иных средств химиотерапии. Более того, такой анализ является совершенно необходимым в случае использования нового направления лечения онкологических заболеваний – целевой терапии (таргет-терапии), включающей замещение или исправление функций дефектных генов в злокачественных клетках. Тем не менее методы, используемые в научных исследованиях ДНК опухолевого происхождения, как правило, трудоемки и требуют дорогостоящего оборудования, что затрудняет анализ дефектных генов в условиях онкологических клиник.

Выбор, адаптация и оптимизация методических приемов, выполненные в данной работе, позволяют использовать более пригодные для клинко-лабораторной диагностики методы. Более того показано, что в выбранных условиях возможен анализ не только образцов самой опухоли, но и других образцов, содержащих ДНК опухолевого происхождения, например, плазмы крови. Использование для выделения ДНК из биологических образцов протеиназы К повышает чувствительность и специфичность последующих анализов как показано на примере ПЦР гена *K-ras*.

Показано, что при выбранных условиях проведения реакции «обогащенной» ПЦР с трехпраймерной схемой для оценки мутаций в 12-м кодоне гена *K-ras* чувствительность метода может достигать три мутантных копии гена в образце. Это важно при анализе генетического материала в плазме крови и других биологических жидкостях и может лечь в основу ранней доклинической диагностики рака. Благодаря очень высокой чувствительности метода теоретически становится возможным выявление даже небольшой группы клеток, вставших на путь малигнизации, которые обычно элиминируются при благоприятных условиях. Вероятно, этим можно

объяснить тот факт, что у двух неонкологических больных из 90 обследованных однократное выявление мутантного гена *K-ras* в плазме крови не подтвердилось при повторном заборе крови через 2 недели, то есть метод при однократном применении может привести к гипердиагностике. Для исключения последней при положительном результате анализа гена *K-ras* в плазме крови у клинически здоровых лиц следует проводить повторный анализ через 2-3 недели.

Проведенное в настоящей работе исследование в плазме крови гена *K-ras* у лиц, контактирующих с органическими растворителями и канцерогенными веществами в условиях вредного производства, показало, что мутантная форма этого гена у таких лиц встречается намного чаще, чем у здоровых людей ($p=0,0049$, по данным этого исследования). Такого рода данные описаны также в литературе, и интерпретируются как возможность определения предраковых изменений или диагностики начинающегося заболевания. Вследствие этого можно заключить, что оценка гена *K-ras* у лиц, работающих в условиях вредного производства, может стать основой для разработки новых норм допустимых вредных канцерогенных воздействий с одной стороны, и служить полезной информацией при формировании групп риска для выявления и профилактики онкологических заболеваний с другой стороны.

Разработанные условия анализа позволяют создать диагностический набор для оценки гена *K-ras* в широком круге биологических образцов по сравнению с уже существующими коммерческими наборами для анализа гена *K-ras* в кале («12K-RAS», AB Analitica; «AA464-469», Biowar и др.).

В случае анализа гена *B-ras* до настоящего времени использовались приемы, не подходящие для выполнения массовых клинических тестов. Введенное нами использование SSCP-анализа для выявления мутантных аллелей гена *B-ras* позволяет упростить методику проведения подобных тестов. Прямое секвенирование продуктов ПЦР показало, что выбранные условия выявления мутаций в гене *B-ras* пригодны для оценки наличия мутантной формы гена как в тканях, так и в плазме крови. Примененный нами ПЦР-SSCP-анализ не требует сложного оборудования и дорогих реактивов как другие методики, и таким образом может выполняться на базе клиничко-диагностической лаборатории. Аналогичные преимущества имеет использование SSCP-анализа для выявления мутантных аллелей гена *APC*.

Важно отметить, что прямое секвенирование позволяет выявить мутантный ген, если его содержание превышает 15-20% от гена дикого типа, тогда как для SSCP-анализа достаточно 5-7%, а при использовании капиллярного электрофореза для такого анализа или денатурирующей ВЭЖХ с флуоресцентной детекцией достаточно 0,1%, что особенно важно для выявления мутантного гена в плазме крови, лимфоузлах, клетках мочи для ранней онкодиагностики и мониторинга заболевания.

Подводя итог данной работы, можно считать, что предложенные методики определения мутаций в исследованных генах могут быть применены в условиях клиничко-диагностических лабораторий.

Выводы

1. Предварительная обработка биологических образцов протеиназой K повышает точность определения мутантных форм генов *K-ras*, *B-raf* и *APC* в плазме крови.

2. Установлены оптимальные условия проведения обогащенной полимеразной цепной реакции с тремя праймерами для выявления мутаций в гене *K-ras* при исследовании ДНК плазмы крови.

3. Анализ мутаций гена *K-ras* в ДНК плазмы крови может быть использован для оценки риска онкологических заболеваний на предприятиях с вредными условиями производства.

4. Определены оптимальные условия анализа гена *B-raf* - другого ключевой гена RAS-сигнального внутриклеточного регуляторного каскада.

5. Наибольшая частота встречаемости мутаций в гене *B-raf* приходится на опухоли щитовидной железы, меланомы и опухоли толстой кишки. В случае опухолей щитовидной железы и меланом наличие мутаций в гене *B-raf* не исключает наличие в тех же опухолевых клетках мутантной формы гена *K-ras*.

6. Определены оптимальные условия анализа *APC* - гена другого сигнального каскада - WNT.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Белохвостов А. С., Цветкова И. А., Маркова С. И., Вдовиченко К. К. Методические особенности анализа мутаций гена *K-ras* в ДНК плазмы крови онкологических больных // Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии.- 2002.- т. 1, № 2.- с. 79.
2. Хохлов А. П., Доценко А. Н., Осипова Е. Ю., Астрелина Т. А., Белохвостов А. С., Вдовиченко К. К., Сидорова И. К. Цитотоксический эффект препарата Севит-Ф на культуру клеток Н-9 лимфолейкоза человека // Российский Биотерапевтический журнал.- 2002.-т.1, №2.- с. 148.
3. Бартновский А. Э., Вдовиченко К. К., Белохвостов А. С., Котус Е. В., Сесина Н. В. Мутантные гены опухолевого происхождения в плазме крови больных в диагностике и мониторинге онкологических заболеваний // 9-й Росс. нац. конг. «Человек и лекарство»: Тез. докл.- М., 8-12 апр. 2002.- с. 559.
4. Вдовиченко К. К., Белохвостов А. С., Котус Е. В., Цветкова И. А., Чичканова Ю. В. Особенности и стандартизация анализа мутаций гена *K-ras* в ДНК плазмы крови онкологических больных при использовании двух эндонуклеаз рестрикции *Bst*NI и *Alu*I // Проблемы стандартизации.- 2002.- №3.
5. Вдовиченко К. К., Цветкова И. А., Чичканова Ю. В. Методические особенности анализа мутаций гена *K-ras* в ДНК плазмы крови онкологических больных // 9-й Росс. нац. конг. «Человек и лекарство»: Тез. докл.- М., 8-12 апр. 2002.- с. 559.
6. Вдовиченко К. К., Маркова С. И., Цветкова И. А., Белохвостов А. С.. Особенности выявления мутантной формы гена *K-Ras* в плазме крови при некоторых типах онкологических заболеваний // Вопросы гематологии/онкологии и иммунологии в педиатрии.- 2003.- т. 2(1).- сс 71-75.
7. Вдовиченко К. К., Белохвостов А. С., Маркова С. И., Абрамов А. А., Румянцев А. Г. Особенности выявления мутантной формы гена *B-raf1* в плазме крови при онкологических заболеваниях // Вопросы гематологии/онкологии и иммунологии в педиатрии.- 2004.- т. 3(2).- сс 37-39.
8. Vdovichenko KK, Markova SI, Belokhvostov AS. Mutant Form of *BRAF* Gene in Blood Plasma of Cancer Patients // Ann N Y Acad Sci.- 2004.- v 1022.- pp 228-231.

Вдовиченко Константин Константинович
«Выявление мутаций в генах *K-Ras*, *B-raf* и *APC* при некоторых онкологических заболеваниях»

В настоящей работе методики анализа генов *K-ras*, *B-raf* и *APC* были адаптированы к использованию в научно-исследовательских медицинских учреждениях и молекулярно-диагностических центрах.

Продемонстрирована возможность использования молекулярно-генетических методов для анализа различных биологических образцов.

Показано, что полученные в ходе исследования результаты не противоречат данным исследований, проведенных в различных научно-исследовательских лабораториях мира. В то же время в настоящем исследовании получены новые данные, не описанные в литературе.

На основе полученных данных сформировано новое прикладное исследование – «Создание набора для диагностики ряда онкологических заболеваний желудочно-кишечного тракта».

Konstantin K. Vdovichenko
«Revelation of mutations in *K-Ras*, *B-raf* and *APC* genes at some oncological disorders»

In this study *K-ras*, *B-raf*, and *APC* genes analyzing techniques were adapted in order to could be used in medical clinics and research centers too.

An utilization ability of molecular-genetic methods to analyze different biological samples was demonstrated.

It has been shown, that results obtained in this study, do not contrary to world wide research data. At the same time some new data were obtained in this work.

Novel applied investigation based on acquired data was formed. It is "Development of the kit for diagnostics of intestinal tract oncological malignancies"

2006A
3316

■ - 33 16

Подписано в печать *20.02.06* Формат 60×84/16.
Тираж *100* экз. Усл. печ. л. *1.25*. Заказ *122*

Типография Издательства РУДН
117923, ГСП-1, г. Москва, ул. Орджоникидзе, д. 3