

ВСТРЕЧАЕМОСТЬ СПЛАЙСИРОВАННЫХ ВАРИАНТОВ МАТРИЧНОЙ РНК DR3/LARD ПРИ РАКЕ ТОЛСТОЙ КИШКИ

© 2013 г. О. В. Уткин^{1,2}, В. Д. Старикова^{1,2*}, А. Д. Перенков¹, О. С. Янченко³,
А. Ю. Барышников⁴, В. В. Новиков^{1,2}

¹Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, Нижний Новгород, 603950

²Нижегородский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии
им. академика И.Н. Блохиной, Нижний Новгород, 603950

³Нижегородская государственная медицинская академия, Нижний Новгород, 603005

⁴Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина Российской академии медицинских наук,
Москва, 115478

Поступила в редакцию 20.02.2013 г.

Принята к печати 16.04.2013 г.

Известно множество вариантов мРНК «рецептора смерти» DR3/LARD, образующихся в результате альтернативного сплайсинга. Различные мРНК DR3/LARD кодируют мембранные и растворимые формы рецептора, выполняющие разные функции. Методом ОТ-ПЦР определяли встречаемость мРНК сплайсированных вариантов DR3/LARD в клетках больных раком толстой кишки и в клетках опухолевых линий. В исследуемых образцах с различной частотой выявляли 4 формы мРНК DR3/LARD. Две формы кодировали мембранные молекулы (мРНК LARD 1a, мРНК DR3β), а две другие соответствовали растворимым формам рецептора (мРНК LARD 3, мРНК растворимого DR3β). В крови здоровых волонтеров выявлено 11 комбинаций (спектров) форм мРНК DR3/LARD и доминировал спектр, включающий все четыре варианта мРНК DR3/LARD («полный» спектр). В крови и в опухолевых очагах больных раком толстой кишки обнаружено 6 спектров форм мРНК DR3/LARD. Уменьшение разнообразия спектров в клетках больных обусловлено снижением встречаемости мРНК растворимой формы DR3β. В образцах опухолевых очагов доминировал спектр с отсутствием только мРНК этой формы DR3β. В крови больных преобладали два спектра: «полный» спектр и представленный мРНК LARD 1a и мРНК LARD 3. Только эти два спектра мРНК DR3/LARD обнаружены и в клетках опухолевых линий. Различия во встречаемости спектров мРНК DR3/LARD у здоровых волонтеров и больных могут определять разную восприимчивость иммунокомпетентных и опухолевых клеток к сигналам апоптоза.

Ключевые слова: мРНК DR3/LARD, ОТ-ПЦР, клетки периферической крови, опухолевые очаги, клеточные линии, рак толстой кишки, апоптоз.

DR3/LARD mRNA SPLICED VARIANTS' FREQUENCY AT COLORECTAL CANCER, by O. V. Utkin^{1,2}, V. D. Starikova^{1,2*}, A. D. Perenkov¹, O. S. Yanchenko³, A. Y. Baryshnikov⁴, V. V. Novikov^{1,2} (¹Lobachevsky State University of Nizhni Novgorod, National Research University, Nizhni Novgorod, 603950 Russia, *e-mail: mbre@mail.ru; ²Blokhina Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology of Nizhny Novgorod, Nizhny Novgorod, 603950 Russia; ³Nizhny Novgorod State Medical Academy, Nizhni Novgorod, 603005 Russia; ⁴Blokhin Russian Cancer Research Center, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow, 115478 Russia). There are a lot of "death receptor" DR3/LARD mRNA variants that are formed during the alternative splicing. Membrane and soluble forms of the receptor are encoded with various types of the DR3/LARD mRNA and perform different functions. Using RT-PCR, the DR3/LARD mRNA spliced variants' frequency was measured in colon cancer patients' samples and cancer cell lines. In samples under investigation, four forms of the DR3/LARD mRNA were found with various frequencies. Two of them encoded the membrane receptors (LARD 1a mRNA and DR3β mRNA) and other two expressed the soluble molecules (LARD 3 mRNA and soluble DR3β mRNA). In blood of healthy volunteers 11 combinations (spectrums) of the DR3/LARD mRNA forms were revealed, and the "full" spectrum including all four variants of DR3/LARD mRNA dominated. In blood of colon cancer patients and tumour tissue samples, 6 DR3/LARD mRNA spectrums were found. The diversity of the DR3/LARD mRNA spectrums was decreased in colon cancer patients because of the frequency reduction of soluble DR3β mRNA. Reduction of a variety of spectrums in cells of the patients was caused by decrease in occurrence of mRNA of the soluble DR3β form. In samples of the tumor centers the spectrum with

Принятые сокращения: РТК — рак толстой кишки.

* Эл. почта: homulichka@rambler.ru

absence only mRNA of the soluble DR3 β form dominated. In blood of patients two spectrums prevailed: “full” range and presented mRNA LARD 1a and mRNA LARD 3. Only these two spectrums of mRNA DR3/LARD were also found in the tumor cell lines. Distinctions in occurrence of spectrums of DR3/LARD mRNA at healthy volunteers and colon cancer patients can define a different susceptibility of immunocompetent and tumor cells for apoptosis signals.

Keywords: mRNA DR3/LARD, RT-PCR, peripheral blood cells, tumor tissue, cell line, colorectal cancer, apoptosis.

DOI: 10.7868/S0026898413050200

В инициации программируемой гибели клетки (апоптоза) принимают участие представители белкового семейства «рецепторов смерти» [1]. К одним из таких рецепторов относится DR3/LARD, который экспрессируется в основном в лимфоидных клетках. Его экспрессия также обнаружена на поверхности эпителиальных клеток и остеобластов [2, 3]. В зависимости от типа клеток стимуляция DR3 приводит или к активации сигнальных событий апоптоза, или к пролиферации клеток.

Существует множество вариантов мРНК “рецепторов смерти”, образующихся в результате альтернативного сплайсинга [4]. Известно 14 различных вариантов зрелых мРНК DR3. Четыре из них кодируют мембранные формы DR3, а 10 соответствуют растворимым вариантам рецептора [5–7]. При активации клеток набор мРНК, кодирующих мембранные и растворимые формы DR3, меняется. Показано, что наивные Т- и В-клетки экспрессируют преимущественно растворимые формы рецептора, тогда как активация клеток сопровождается повышением уровня экспрессии мембранных вариантов DR3 [5, 6]. Предполагается, что растворимые формы DR3 – это природные ингибиторы апоптоза, инициированного с помощью мембранных форм рецептора [5–7]. Таким образом, различные формы DR3, образующиеся в результате альтернативного сплайсинга, участвуют в модуляции сигнальных событий апоптоза и пролиферации. Нарушения в тонкой регуляции баланса сигналов связаны с патогенезом многих заболеваний, в том числе онкологических [7]. Одно из самых распространенных онкологических заболеваний у мужчин и женщин – рак толстой кишки (РТК) [8]. Это определяет актуальность всестороннего изучения молекулярных механизмов апоптоза как части иммунного ответа при этом заболевании.

Цель представленной работы – проанализировать встречаемость мРНК мембранных и растворимых форм DR3 в клетках больных РТК.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

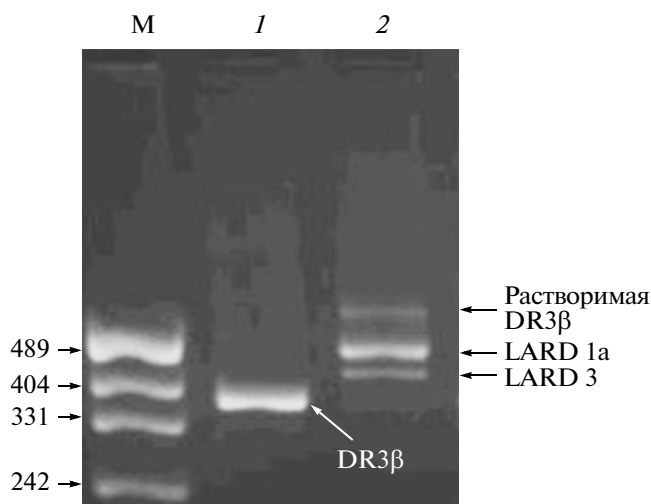
Исследовано 30 образцов клеток опухолевых очагов и 23 образца периферической крови больных РТК, поступивших на лечение в Нижегород-

ский областной онкологический диспансер. В работе также использованы линии злокачественно трансформированных клеток РТК CaCo2, T84p18, HCT-15, SW-620, HCT116, Colo205, хранящиеся в банке клеток Российского онкологического научного центра им. Н.Н. Блохина РАМН. В качестве контроля использовали 40 образцов крови здоровых волонтеров.

Выделение тотальной РНК из исследуемых образцов проводили методом фенол-хлороформной экстракции [9]. Суммарную РНК выделяли из 200 мкл периферической крови или 300 мкл суспензии клеток вышеуказанных линий (около 5 млн. клеток/мл). Для выделения суммарной РНК использовали также фрагменты опухолевых очагов диаметром 0.5–1 см, которые после извлечения помещали в 1 мл лизирующего буфера (4 М гуанидинтиоцианат, 0.025 М цитрат натрия, 0.5% Тритон X-100) и замораживали при 20°C. Для проведения дальнейших экспериментов брали 200-мкл аликвоты полученного лизата клеток. Обычно из каждого образца выделяли около 10 мкг суммарной РНК.

Для одновременной детекции четырех форм мРНК DR3 (LARD 1a, LARD 3, DR3 β , растворимый DR3 β) нами разработан способ, базирующийся на использовании гнездового варианта ОТ-ПЦР. Этот метод успешно применяется в случае низкой концентрации кДНК и позволяет свести к минимуму количество побочных продуктов реакции. Праймеры подбирали с учетом возможности амплификации в первом раунде ПЦР фрагментов кДНК, соответствующих всем четырем формам мРНК DR3. Во втором раунде ПЦР при использовании различных комбинаций обратных праймеров происходило разделение и амплификация фрагментов каждого из сплайсированных вариантов DR3. Кроме того, в результате двурундной ПЦР концентрация продуктов амплификации многократно возрастала.

Для синтеза кДНК на матрице мРНК проводили реакцию обратной транскрипции [10]. Для этого в пробирку добавляли 2 мкг экстрагированной тотальной РНК, обратный праймер DR3R6 (5'-CAGCGCTTGAGCATCTCGTA-3') и обратную транскриптазу M-MuLV (“Fermentas”, Латвия).



Электрофореграмма фрагментов кДНК DR3, полученная с помощью метода одновременной детекции мРНК мембранных и растворимых форм рецептора. 1, 2 – образцы крови здоровых волонтеров; М – маркер молекулярных масс.

В состав реакционной смеси (25 мкл) первого раунда ПЦР входили следующие компоненты: 5 мкл 5X ПЦР-буфера (67 мМ Трис-НСl, рН 8.3; 17 мМ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2.5 мМ MgCl_2 , 0.1% Твин-20, 0.12 мг/мл БСА, 8% глицерина) (“ИнтерЛабСервис”, Россия), 0.2 мМ каждого из дезоксинуклеозидтрифосфатов (“Силекс”, Россия), по 5 пмоль прямого и обратного праймера (“Синтол”, Россия), 2.5 ед. активности Таq-полимеразы (“Синтол”) и матрица в количестве не менее 100 нг кДНК. Второй раунд ПЦР проводили в реакционной смеси того же состава, но в качестве матрицы использовали ПЦР-продукт первого раунда (3 мкл с содержанием фрагмента ДНК, используемого в качестве матрицы, не менее 100 нг). В работе использовали амплификатор “Терцик” (“ДНК-Технология”, Россия).

Первый раунд ПЦР проводили с использованием прямого DR3F0 (5'-GTGACTTCCACAA-GAAGATT-3') и обратного DR3R6 праймеров при следующих температурных условиях: денатурация при 94°C 30 с, отжиг праймера при 50°C 30 с, элонгация при 72°C 50 с. Общее количество циклов для первого раунда ПЦР равнялось 30.

Во втором раунде применяли прямой DR3F1S (5'-CTGGGAGAACCACCATAAAT-3'), а также обратные DR3R3b (5'-GAACACACCTACTCTGCTC-3') и DR3TMR4 (5'-CCCAGCTTCATCTGCA-GTAA-3') праймеры при следующих оптимальных условиях проведения реакции амплификации: денатурация при 94°C 30 с, отжиг праймера при 62°C 30 с, элонгация при 72°C 40 с. Общее количество циклов для второго раунда ПЦР составляло 25.

Для детекции продуктов, образовавшихся в ходе двух раундов ПЦР, проводили электрофорез в 2%-ном агарозном геле, содержащем бромид этидия.

Определение нуклеотидной последовательности фрагментов кДНК, вырезанных из агарозного геля и очищенных с использованием набора DNA Extraction Kit (“Fermentas”, Латвия), проводили реакцией терминирования с использованием набора BigDye Terminator v3.1 cycle sequencing kit (“Applied Biosystems”, США) согласно рекомендациям производителя. Результаты секвенирования регистрировали на генетическом анализаторе ABI Prizm 3130 Genetic Analyzer (“Applied Biosystems”). Нуклеотидные последовательности сравнивали с последовательностями мРНК мембранных и альтернативных растворимых форм DR3, зарегистрированными в базе данных NCBI GenBank (AF026070.1, AF026071.1, U94501.1, U94504.1).

Статистическую обработку результатов проводили с помощью пакета программ Statistica v. 8.0. Для оценки встречаемости мРНК мембранных и растворимых форм DR3 в клетках крови здоровых волонтеров, а также в клетках крови и опухолевых очагах больных РТК рассчитывали абсолютную и относительную частоты. Анализ различий относительных частот обнаружения мРНК в группах проводили с использованием статистического критерия сравнения пропорций. Различия считали статистически значимыми при $p < 0.05$. Для анализа взаимосвязи выявленных различий в вариантах мРНК DR3 с полом пациентов, а также с клиническими особенностями течения РТК использовали критерий Фишера.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Одновременная детекция мРНК мембранных и растворимых форм DR3

На основе анализа нуклеотидных последовательностей мРНК DR3 сконструированы праймеры, позволяющие выявлять с помощью ОТ-ПЦР 4 формы мРНК DR3. Расчетная длина продуктов ПЦР при одновременной детекции мРНК LARD 1a и DR3β соответствовала 481 и 371 н. Расчетная длина продуктов ПЦР при определении мРНК LARD 3 и растворимой формы DR3β составляла соответственно 425 и 602 н. При одновременной детекции мРНК мембранных и растворимых форм получали 4 фрагмента кДНК, мигрировавшие в геле с разной скоростью (рисунок).

Определена последовательность полученных фрагментов кДНК, которые сопоставили с нуклеотидными последовательностями мРНК DR3. Сравнительный анализ показал соответствие анализируемых и референс-последовательностей, что позволило идентифицировать формы мРНК DR3 как LARD 1a, LARD 3, DR3β и растворимую DR3β. Разработанный метод обнаружения сплай-

сированных вариантов мРНК DR3 апробировался на образцах крови здоровых волонтеров, а также на образцах крови и опухолевых очагах больных РТК.

Спектры мРНК DR3 в образцах крови здоровых волонтеров

В клетках крови здоровых волонтеров мРНК мембранных и растворимых форм DR3 выявляли приблизительно с одинаковой частотой, причем как у мужчин, так и у женщин. В целом, у здоровых волонтеров мРНК LARD 1a обнаружена в 93% (37/40) образцов, что в 1.2 раза превышало частоты выявления мРНК DR3β и растворимой формы DR3β (75%; 30/40; $p = 0.031$). Не обнаружено статистически значимых корреляционных связей в частотах выявления различных форм мРНК DR3 с полом здоровых волонтеров. Вместе с тем, у мужчин мРНК LARD 1a и мРНК LARD 3 обнаружены в 95% (19/20) образцов, что в 1.4 раза превышало встречаемость мРНК DR3β (70%; 14/20; $p = 0.044$).

Всего у здоровых волонтеров выявлено 11 различных комбинаций форм мРНК DR3. Доминирующим оказался спектр, состоящий из всех четырех исследуемых форм рецептора. Такой “полный” спектр обнаружен в 55% (22/40) образцов крови: у 60% мужчин (12/20) и у 50% женщин (10/20). У 10% (4/40) здоровых волонтеров выявлены спектры, состоящие только из трех (LARD 1a, LARD 3, растворимый DR3β) или из двух (LARD 1a, LARD 3) форм мРНК DR3. Другие спектры форм мРНК DR3 встречались с меньшей частотой.

Спектры мРНК DR3 в образцах крови больных РТК

В образцах крови больных РТК четыре варианта мРНК DR3 выявляли с различной частотой (табл. 1). Показано, что мРНК растворимой фор-

мы DR3β встречается в 2.8 и в 2.3 раза реже, чем соответственно мРНК LARD 1a и мРНК LARD 3 ($p < 0.001$ и $p = 0.005$). Наряду с этим обнаружено, что в образцах крови больных РТК встречаемость мРНК растворимой формы DR3β в 2.2 раза ниже, чем у здоровых волонтеров ($p = 0.003$).

На первой и второй стадиях РТК мРНК растворимой формы DR3β детектировали в образцах крови в 2.2 раза реже, чем мРНК LARD 1a ($p = 0.009$). На третьей и четвертой стадиях РТК мРНК растворимой формы DR3β встречается в 4.5 раза реже, чем мРНК LARD 1a и LARD 3. И на ранних, и на поздних стадиях РТК встречаемость мРНК растворимой формы DR3β была в 1.7 и в 3.4 раза ниже, чем у здоровых волонтеров ($p = 0.047$ и $p = 0.005$ соответственно). мРНК растворимой формы DR3β выявляли в крови больных реже, чем другие сплайсированные варианты мРНК DR3 вне зависимости от степени дифференцировки опухоли (табл. 1).

У больных РТК выявлены различия в частоте встречаемости других вариантов мРНК DR3. Так, в крови больных на третьей и четвертой стадиях заболевания, а также при умеренно дифференцированной опухоли мРНК DR3β регистрировали в 1.7–2.3 раза реже, чем мРНК LARD 1a ($p < 0.05$). На поздних стадиях РТК мРНК DR3β выявляли в 2.3 раза реже, чем мРНК LARD 3. При этом комбинации встречающихся форм варьировали. Всего в образцах крови больных РТК обнаружено 6 спектров форм мРНК DR3.

Как и у здоровых волонтеров, в крови больных РТК доминировали спектры, включающие четыре и два варианта мРНК DR3 (табл. 2). Остальные четыре комбинации форм мРНК DR3 выявляли с меньшей частотой. По сравнению со здоровыми волонтерами в крови больных реже детектировали “полный” спектр форм мРНК, но чаще нахо-

Таблица 1. Встречаемость сплайсированных вариантов мРНК DR3 в образцах крови больных РТК

Наименование мРНК	Здоровые волонтеры (Всего 40 чел.)	Больные РТК (Всего 23 чел.)	Стадии рака		Степень дифференцировки опухоли	
			I + II	III + IV	ВД ^а	УД ^б
DR3β	30	13	9/14	4/9	3/5	10/18
растворимая DR3β	30	8 ^в	6/14 ^в	2/9 ^в	2/5	6/18 ^в
LARD 1a	37	22 ^{г, д}	13/14 ^г	9/9 ^{г, д}	5/5	17/18 ^{г, д}
LARD 3	34	18 ^г	9/14	9/9 ^{г, д}	4/5	14/18 ^г

^а ВД – высокодифференцированная опухоль.

^б УД – умеренно дифференцированная опухоль.

^в Статистически значимые различия во встречаемости мРНК растворимой формы DR3β по сравнению со здоровыми волонтерами ($p < 0.05$).

^г Статистически значимые различия в сравнении с частотой детекции мРНК растворимой формы DR3β ($p < 0.05$).

^д Статистически значимые различия в сравнении с частотой детекции мРНК DR3β ($p < 0.05$).

дили состоящий только из мРНК LARD 1a и LARD 3.

Спектры мРНК DR3 в опухолевых очагах больных РТК

В опухолевых очагах больных РТК четыре варианта мРНК DR3 также выявляли с различной частотой (табл. 3). Реже всего встречалась мРНК растворимой формы DR3β – ее детектировали в 4.1, в 3.6 и в 3.4 раза реже, чем соответственно мРНК LARD 1a, DR3β, LARD 3 ($p < 0.001$).

Оценили встречаемость мРНК DR3 на ранних стадиях РТК (I+II) в сравнении с поздними стадиями заболевания (III+IV). На ранних стадиях РТК мРНК растворимой формы DR3β встречалась в 4 раза, в 3.6 раза и в 3.2 раза реже, чем мРНК LARD 1a, мРНК DR3β и мРНК LARD 3 соответственно ($p < 0.001$). Кроме того, мРНК LARD 1a выявляли в 1.3 раза чаще, чем мРНК LARD 3 ($p = 0.042$). На поздних стадиях заболевания мРНК растворимой формы DR3β также выявлялась в 4.5 раза, в 3.5 раза и в 4 раза реже других сплайсированных форм мРНК DR3 ($p < 0.05$) (табл. 2).

При высокодифференцированном РТК в опухолях больных мРНК растворимой формы DR3β выявляли в 6.0 раз реже мРНК LARD 1a ($p = 0.015$) и в 5.0 раз реже мРНК DR3β и LARD 3 ($p = 0.015$ и $p = 0.043$). При умеренно дифференцированной опухоли мРНК растворимой формы DR3β детектировали в 4 раза реже мРНК LARD 1a и в 3.4 раза реже мРНК DR3β и LARD 3 ($p < 0.001$).

Как и в крови, в опухолевых очагах обнаружено 6 спектров форм мРНК DR3 (табл. 2). При этом встречаемость “полного” спектра в опухолевых очагах была в 2.7 раза ниже, чем в крови ($p > 0.05$). В опухолевых очагах доминировал спектр, в состав

которого не было только мРНК растворимой формы DR3β, но присутствовали три остальных варианта мРНК DR3.

В опухолевых очагах мРНК DR3β выявляли в 1.5 раза чаще (57%; 13/23; $p = 0.037$), чем в крови больных (табл. 3). Других статистически значимых различий во встречаемости сплайсированных вариантов мРНК DR3 в образцах опухолевых очагов и периферической крови не обнаружено.

Спектры мРНК DR3 в линиях опухолевых клеток человека

Исследована встречаемость мРНК DR3 в клетках шести линий рака толстой кишки. В клетках линии SW-620 не обнаружена мРНК только растворимой формы DR3β при наличии трех других форм мРНК DR3, что согласуется с литературными данными [11]. Такой же набор мРНК DR3 выявлен в 60% образцов клеток опухолевых очагов (табл. 2). В клетках линий CaCo2, HCT-15, HCT116, Colo205 и T84p18 обнаружены все четыре варианта мРНК DR3 – такой спектр занимает второе место по встречаемости в образцах опухолевых очагов.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Известно, что рецептор DR3 играет важную проапоптотическую роль в малигнизированных клетках рака простаты и РТК [11]. При совместном культивировании натуральных киллеров и опухолевых клеток в последних наблюдается повышение экспрессии DR3, что сопровождается ингибированием их роста. Рецептор DR3 также участвует в инициации апоптоза клеток нейроblastомы [12]. Показано, что мутации в лиганд-связывающем домене DR3 определяют измене-

Таблица 2. Встречаемость спектров форм мРНК DR3 в образцах крови, опухолевых очагах и опухолевых клеточных линиях

Спектр форм мРНК DR3*	Больные РТК		Наименование клеточной линии
	образцы крови, %	образцы опухолевых очагов, %	
(1, 2, 3, 4)	35 (8/23)	13 (4/30)	CaCo2, HCT-15, HCT116, colo205 и T84p18
(3, 4)	30 (7/23)	3 (1/30)	0
(1, 3, 4)	13 (3/23)	60 (18/30)	SW-620
(3)	13 (3/23)	10 (3/30)	0
(1, 2, 3)	0	10 (3/30)	0
(1, 3)	4 (1/23)	0	0
(1)	4 (1/23)	0	0
(4)	0	3 (1/30)	0

* 1 – DR3β; 2 – растворимая форма DR3β; 3 – LARD 1a; 4 – LARD 3; 0 – отсутствие спектра.

Таблица 3. Встречаемость сплайсированных вариантов мРНК DR3 в образцах опухолевых очагов больных РТК

Наименование мРНК	Больные РТК	Стадии рака		Степень дифференцировки опухоли		
		I + II	III + IV	ВД ^а	УД ^б	НД ^в
DR3 β	25/30 ^г	18/20 ^г	7/10 ^г	5/6 ^г	17/21 ^г	3/3
Растворимая форма DR3 β	7/30	5/20	2/10	1/6	5/21	1/3
LARD 1a	29/30 ^г	20/20 ^{г,д}	9/10 ^г	6/6 ^г	20/21 ^г	3/3
LARD 3	24/30 ^г	16/20 ^г	8/10 ^г	5/6 ^г	17/21 ^г	2/3

^а ВД – высокодифференцированная опухоль.

^б УД – умеренно дифференцированная опухоль.

^в НД – низкодифференцированная опухоль.

^г Статистически значимые различия в сравнении с частотой детекции мРНК растворимой формы DR3 β ($p < 0.05$).

^д Статистически значимые различия в сравнении с частотой детекции мРНК LARD 3 ($p = 0.045$).

ние чувствительности клеток остеогенной саркомы линии MG63 к проапоптотическим сигналам [13].

Понимание патофизиологической роли DR3 осложняется высоким полиморфизмом на уровне мРНК и кодируемых ими белков. В рамках данной работы из 14 известных сплайсированных вариантов исследованы 4 формы мРНК DR3. Две мРНК: LARD 1a и DR3 β – кодируют мембранные белки и состоят из 10 экзонов. Первые 6 экзонов соответствуют внеклеточному участку рецептора, содержащему сайт связывания лиганда, седьмой экзон кодирует трансмембранный домен, а остальные соответствуют внутриклеточному участку, содержащему домен смерти. мРНК DR3 β отличается от мРНК LARD 1a наличием двух инсерций размером 20 и 7 н. в последовательности, соответствующей внеклеточному участку DR3. Экспрессия двух транскриптов различается в нормальных и злокачественно трансформированных клетках.

Матричные РНК LARD 3 и растворимой формы DR3 β кодируют растворимые формы рецептора. Первая мРНК образуется в результате делеции шестого экзона, приводящего к сбою рамки считывания первичного транскрипта с образованием стоп-кодона в седьмом экзоне рецептора, а вторая мРНК – в результате 95-нуклеотидной инсерции в седьмом экзоне с образованием стоп-кодона. В составе обеих растворимых форм сохраняется участок связывания лиганда [5–7]. Описано повышение уровня экспрессии мРНК LARD 3 в регуляторных Т-клетках [14].

Предполагается, что растворимые формы DR3 блокируют передачу сигналов, взаимодействуя с лигандом мембранных рецепторов [13]. Кроме того, можно предположить, что по аналогии с рецептором смерти Fas/CD95, также отличающимся высоким полиморфизмом мРНК и белков, растворимые формы DR3 способны встраиваться в состав тримерных и олигомерных мембранных

форм рецептора, переводя их в нефункциональное состояние [15].

Тонкий баланс про- и антиапоптотических сигналов, в том числе опосредованный участием мембранных и растворимых форм DR3, определяет функциональное состояние клетки. В норме такой баланс представлен мультивариантными формами, о чем свидетельствует высокое разнообразие спектров форм мРНК DR3, выявленных в крови здоровых волонтеров. В целом доминирует спектр, характеризующийся преобладанием всех четырех вариантов мРНК DR3, т.е. “полный” спектр. У мужчин и женщин он встречается приблизительно с одинаковой частотой.

При РТК наблюдалось уменьшение числа спектров мРНК DR3 как в крови, так и в опухолевых очагах и основной причиной этого, по-видимому, следует считать снижение встречаемости мРНК растворимой формы DR3 β . Вероятно, эта форма мРНК DR3 вносит разный вклад в регуляцию апоптоза у больных и здоровых волонтеров. Различия в частоте выявления минорных форм мРНК у больных РТК и здоровых волонтеров ранее обнаружены для рецептора смерти Fas/CD95 [16].

У больных РТК спектр форм мРНК DR3 варьировал в зависимости от типа клеток. В образцах опухолевых очагов доминировал спектр с отсутствием только мРНК растворимой формы DR3 β . В образцах крови превалировали два спектра: “полный” и с повышенной встречаемостью мРНК LARD 1a и мРНК LARD 3. Таким образом, для больных РТК выявлена общая тенденция: снижение частоты растворимых форм мРНК DR3 в опухолевых клетках в сравнении с кровью. Можно предположить, что преобладание тех или иных спектров мРНК DR3 определяет разную восприимчивость иммунокомпетентных и опухолевых клеток к сигналам апоптоза и пролиферации.

В клетках опухолевых линий обнаружены только два спектра форм мРНК DR3. И эти же спектры

доминировали в клетках опухолевых очагов больных РТК, хотя последние все-таки более разнообразны по комбинациям форм мРНК, что может быть связано с инфильтрацией опухолевых клеток Т-лимфоцитами, экспрессирующими рецептор DR3. С другой стороны, присутствие определенного набора мРНК DR3 может быть индивидуальной особенностью каждой конкретной опухоли — и это подтверждают различия в профилях экспрессии мембранных и растворимых форм DR3 в ряде образцов опухолевых очагов больных РТК. Кроме того, спектры форм мРНК могут меняться при переводе опухолевых клеток, находящихся в условиях *in vivo*, в культуру. Этот феномен подробно освещен в литературе [17].

Таким образом, в крови и опухолевых очагах больных РТК обнаружены различия во встречаемости форм мРНК DR3. В крови больных РТК по сравнению со здоровыми волонтерами в значительной степени снижена встречаемость мРНК растворимой формы DR3 β и обнаружены вариации в частоте других форм мРНК DR3. В образцах опухолевых очагов состав спектров форм мРНК DR3 отличался большим разнообразием, чем в линиях злокачественно трансформированных клеток человека.

Работа выполнена при финансовой поддержке ФЦП “Научные и научно-педагогические кадры инновационной России” на 2009–2013 годы и РФФИ (проект №11-04-97088р_Поволжье_a).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Ozören N., El-Deiry W.S. 2003. Cell surface death receptor signaling in normal and cancer cell. *Semin. Cancer Biol.* **13**, 4615–4619.
- Borysenko C.W., Furey W.F., Blair H.C. 2005. Comparative modeling of TNFRSF25 (DR3 predicts receptor destabilization by a mutation linked to rheumatoid arthritis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **328**, 794–799.
- Gout S., Morin C., Houle F., Huot J. 2006. Death receptor-3, a new E-selectin counter-receptor that confers migration and survival advantages to colon carcinoma cells by triggering p38 and ERK MARK activation. *Cancer Res.* **66**, 9117–9124.
- Уткин О.В., Новиков В.В. 2007. Регуляция апоптоза с помощью альтернативного сплайсинга матричной РНК. *Российский биотерапевт. журнал.* **2**, 13–20.
- Warzocha K., Ribeiro P., Charlot C., et al. 1998. A new death receptor 3 isoform: expression in human lymphoid cell lines and non-hodgkin's lymphomas. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **242**, 376–379.
- Screaton G.R., Xu X.-N., Olsen A.L. et al. 1997. LARD: A new lymphoid-specific death domain containing receptor regulated by alternative pre-mRNA splicing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **94**, 4615–4619.
- Уткин О.В., Новиков В.В. 2012. Рецепторы смерти в модуляции апоптоза. *Успехи современной биологии.* **4**, 381–390.
- Ананьев В.С., Кулушев В.М., Короткова О.В., и др. 2006. Иммунологическая коррекция препаратом галавит больных колоректальным раком. *Российский биотерапевт. журнал.* **2**, 81–84.
- Chomyszynskii P., Sacchi N. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate–phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochem.* **162**, 156–159.
- Sambrook J., Frith E.F., Maniatis T. 1989. *Molecular cloning: A laboratory manual.* Cold Spring Harbor Lab. Press.
- Park M.H., Song M.J., Cho M.-C., et al. 2011. Interleukin-32 enhances cytotoxic effect of natural killer cells to cancer cells via activation of death receptor 3. *Immunol.* **135**, 63–72.
- Wang E.C., Thern A., Denzel A., et al. 2001. DR3 Regulates negative selection during thymocyte development. *Mol. Cell. Biol.* **21**, 3451–3461.
- Borysenko C.W., A-Palacios V.N., Griswold R.D., et al. 2006. Death receptor-3 mediates apoptosis in human osteoblasts under narrowly regulated conditions. *J. Cell. Physiol.* **209**, 1021–1028.
- Pappu B.P., Borodovsky A., Zheng T.S., et al. 2008. TL1A–DR3 interaction regulates Th17 cell function and Th17-mediated autoimmune disease. *J. Exp. Med.* **205**, 1049–1062.
- Papoff G., Cascino I., Eramo A., et al. 1996. An N-terminal domain shared by Fas/Apo-1 (CD95) soluble variants prevents cell death *in vitro*. *J. Immunol.* **156**, 4622–4630.
- Сахарнов Н.А., Новиков Д.В., Алясова А.В., Новиков В.В. 2010. Альтернативный сплайсинг мРНК Fas в клетках опухолевого очага при раке толстого кишечника. *Вестник ННГУ им. Н.И. Лобачевского (Серия биол.)* **2**, 580–584.
- Bellot G.L., Tan W.H., Tay L.L., et al. 2012. Reliability of tumor primary cultures as a model for drug response prediction: expression profiles comparison of tissues versus primary cultures from colorectal cancer patients. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **138**, 463–482.