

Ю.К. Карнаухова^{1,2}, Д.Е. Полев^{1,3}, Л.Л. Круковская^{1,2}, А.П. Козлов^{1,2}

Изучение экспрессии гена *Orthopedia homeobox* в различных опухолевых и нормальных тканях человека

¹ Биомедицинский центр,

² Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого,

³ Санкт-Петербургский государственный университет,
г. Санкт-Петербург

Изучена экспрессия гена *OTP* в различных нормальных и опухолевых тканях человека методом ПЦР со специфическими праймерами. Ген *OTP* экспрессируется в 23 из 29 опухолевых образцов, а интронный фрагмент гена *OTP* (последовательность AI267901) в 49 из 59 опухолевых образцов различных локализаций. Изучаемые нами фрагменты гена *OTP* практически не транскрибируются в нормальных и эмбриональных тканях за исключением нормальной ткани яичка, то есть могут быть отнесены к категории раково-тестикулярных транскриптов. По предварительным данным РНК AI267901 и мРНК гена *OTP* транскрибируются с разных нитей ДНК. Таким образом, с локуса гена *OTP* получается два независимых опухолеспецифических транскрипта, являющихся потенциальными маркерами для диагностики онкологических заболеваний.

Ключевые слова: опухолеспецифическая экспрессия, *Orthopedia homeobox* (*OTP*), опухолевые маркеры, диагностика онкологических заболеваний

В 2001 году нами была разработана программа HSAAnalyst для поиска в электронных базах данных нуклеотидных последовательностей с опухолеспецифической экспрессией. С ее помощью был обнаружен целый ряд нуклеотидных последовательностей, которые экспрессируются преимущественно в опухолях, но не в нормальных тканях [1, 5]. Впоследствии, часть компьютерных результатов была подтверждена экспериментально методом ПЦР на панелях кДНК из нормальных и опухолевых тканей [6]. В процессе этой работы были обнаружены две, предположительно опухолеспецифические, нуклеотидные последовательности: мРНК гена *Homo sapiens Orthopedia homeobox* (*OTP*) и РНК AI267901 (идентификационный номер в базе данных GenBank).

Впоследствии оказалось, что AI267901 транскрибируется с области второго интрона гена

OTP. При этом остается неясным, является ли указанная РНК самостоятельным транскриптом или альтернативным экзоном мРНК гена *OTP* в опухолях.

В данной работе представлены результаты по анализу экспрессии гена *OTP*, включая его интронную область, в различных опухолевых и нормальных тканях человека.

Материалы и методы

Образцы кДНК

В работе применялись коммерческие наборы кДНК Multiple Tissue cDNA (MTC) panels (Clontech, Mountain View, CA). Были использованы следующие панели: Human MTC Panel I, Human MTC Panel II, Human Immune System MTC Panel, Human Fetal MTC Panel, Human Digestive System MTC Panel и Human Tumor MTC Panel. Данные наборы не содержат примесей геномной ДНК и нормализованы по четырём генам домашнего хозяйства. Образцы нормальных тканей представляют собой суммарные препараты кДНК от разных доноров (от двух до 550 доноров). Эмбриональная панель содержит образцы кДНК тканей плода человека от 16 до 36 недель развития. Образцы кДНК опухолевых тканей получены из опухолей человека, ксенотрансплантированных бестимусным мышам. Помимо набора кДНК опухолевых тканей фирмы Clontech, в работе применялись коммерческие образцы кДНК опухолевых тканей, полученные от различных пациентов (BioChain Institute, USA) и кДНК клинических образцов опухолевых тканей, полученная в нашей лаборатории. Клинические образцы были представлены следующими опухолями: инвазивный протоковый рак молочной железы (МЖ) II–III стадии (4 образца), аденокарцинома молочной железы III стадия (2 обр.), инвазивный протоковый рак МЖ III стадия (1 обр.), плоскоклеточный рак шейки матки IV ст. (1 обр.) и его метастазы в тело матки, большого сальника, правого и левого яичника (4 обр.), миосаркома шейки матки II–III стадия (1 обр.), низкодифференцированная бластома яичника IV стадия (1 обр.), рак яичника (2 обр.), умеренно дифференцированная аденокарцинома эндометрия II стадия (1 обр.), умеренно дифференцированная аденокарцинома эндометрия с метастазами III стадия (1 обр.), плоскоклеточный рак легкого (2 обр.), рак бронха III стадия (1 обр.), рак легкого (1 обр.), рак желудка (3 обр.), семинома яичка (1 обр.), опухоль краниоспинального стыка (1 обр.), менингиома (2 обр.), хронический лимфолейкоз IV стадия (1 обр.), неходжкинская Т-клеточная лимфома IV стадия (1 обр.), злокачественная лимфома II стадия, лимфогрануломатоз, рецидив IV стадия (1 обр.), неходжкинская лимфома

из клеток мантийной зоны IV стадия (1 обр.). Информированное согласие пациентов было получено. Работа была одобрена этическими комитетами Военно-медицинской академии и Биомедицинского центра.

Выделение РНК

Выделение тотальной РНК из опухолевых тканей проводили по стандартной методике [2]. Выделенную РНК обрабатывали ДНКазой I, свободной от РНКазы (Sigma, USA).

Концентрацию РНК определяли на спектрофотометре Ultrospec® 3100 pro. Качество препаратов РНК оценивали по соотношению оптических плотностей A_{260}/A_{280} и гель-электрофорезом по соотношению количества 28s и 18s рРНК в 1% агарозном геле [9].

Отсутствие примесей ДНК определяли с помощью ПЦР с использованием образца тотальной РНК и праймеров к фрагменту гена домашнего хозяйства G3PDH. При обнаружении сигналов после 40 циклов амплификации обработку ДНКазой I повторяли.

Синтез кДНК

Синтез кДНК проводили с помощью набора Revert Aid® First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas) с использованием гексануклеотидных праймеров согласно рекомендациям производителя.

ПЦР

Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили в растворе, содержащем 2,5 мкл кДНК, 1-кратный ПЦР-буфер (Fermentas), $MgCl_2$ (4 mM), dNTP (200 μ M каждого), 0,2 μ M каждого праймера и 1 единицу Taq ДНК-полимеразы в общем объеме 25 мкл при следующих условиях: 1 мин. при 95°C, 35 циклов, включавших 30 сек. при 95°C, 30 сек при температуре отжига праймеров и 1 мин при 72°C. В завершение проводили достройку фрагментов в течение 5 мин при 72°C. Продукты ПЦР разделяли электрофорезом в 2% агарозе и окрашивали бромистым этидием. Присутствие искомой мРНК в образце определяли по наличию продукта амплификации соответствующего размера.

Качество всех панелей кДНК проверяли с помощью ПЦР с использованием праймеров к фрагменту гена домашнего хозяйства G3PDH (Прямой 5'- TGAAGGTCGGAGTCAACGGATTTGGT -3', обратный 5'- CATGTGGGCGATGAGGTCCACCAC -3'), Температура отжига праймеров 68°C, 30 циклов, размер амплифицируемого фрагмента 983 п.о.

Прямой праймер к изучавшемуся фрагменту OTP-2 (OTP-2forv) имел последовательность: 5'- AGGCGGTGAAGTGTAAGCTG -3', а обратный OTP-2rev 5'- CGCTTCTGCTTCTGTTGGC -3', температура отжига праймеров — 65°C. Длина ожидаемого фрагмента амплификации составляла 244 п.н.

Праймеры к изучаемому фрагменту OTP-in были подобраны по последовательности AI267901, прямой in-forv 5'- ACTCCCTCCTCAACAACA -3' и обратный in-rev 5'- GTGTCGGCGATGGATAAACA -3', температура отжига праймеров — 65°C. Длина ожидаемого фрагмента амплификации составляла 389 п.н.

Результаты и обсуждение

С помощью интернет ресурса UCSC Genome Browser последовательность AI267901 была картирована на геном человека. Изучаемая последовательность встречается в геноме человека только один раз в районе 5q14.1 и располагается в области второго интрона гена *Homo sapiens Orthopedia homeobox (OTP)* (рис.1).

Для изучения экспрессии гена *OTP* в тканях человека использовали, как отмечалось, ком-

мерческие панели кДНК нормальных и опухолевых тканей (Clontech, BioChain), так и панель кДНК, полученную нами из РНК клинического материала опухолей человека. Экспрессию гена определяли методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) со специфическими праймерами к гену *OTP*. Для этого были подобраны праймеры к последовательности второго экзона гена *OTP* (фрагмент OTP-2) и к последовательности AI267901, экспрессирующей с интронной областью гена *OTP* (фрагмент OTP-in) (рис. 1).

При амплификации фрагмента OTP-2 на наборах кДНК нормальных и эмбриональных тканей человека слабый специфический сигнал 224 п.н. наблюдался только в одном образце ткани яичка. Результаты представлены на рис. 2 и сведены в табл. 1.

При амплификации фрагмента OTP-2 на наборе кДНК опухолевых тканей (BioChain) сигналы наблюдались в образцах опухолей пищевода, желудка, тонкого кишечника, мочевого пузыря и матки. Слабые сигналы различимы в образцах опухоли мозга, молочной железы, яичка и уретры. Данный фрагмент мРНК гена не обнаружен в аденокарциномах толстой кишки и яичников, а также в карциномах легкого, печени, почки и фаллопиевых труб (рис.3(а)).

Дополнительно было проведено исследование экспрессии фрагмента OTP-2 на клиническом материале опухолей человека. Для этого из образцов опухолей была выделена тотальная РНК и синтезирована кДНК. Полученная кДНК была использована для проведения ПЦР с праймерами, специфическими к фрагменту OTP-2. Результаты эксперимента приведены на рис.3(б) и сведены в табл.2. Амплификация наблюдается в образцах всех изучавшихся опухолей: рака шейки матки, молочной железы, легкого, бронха, желудка, а также в лимфомах и семиноме.

Результаты проведенной полимеразной цепной реакции фрагмента OTP-in на матрице кДНК коммерческих панелей нормальных тканей человека представлены на рис.4 и сведены в табл.1. Специфический фрагмент, соответствующий последовательности AI267901, также обнаружен только в одном из двух исследованных образцов яичка (45 доноров на один образец кДНК) и не обнаружен ни в одном из образцов иммунной и эмбриональной панели (рис.4, табл.1).

Экспрессию фрагмента OTP-in в опухолях исследовали, используя амплификацию со специфическими праймерами на трех коммерческих панелях кДНК опухолевых тканей (Clontech, BioChain). Результаты на панели кДНК опухолевых тканей (Clontech) представлены на рис.5(а). Результаты амплификации OTP-in на панели кДНК опухолевых тканей (BioChain) представлены на рисунке 5(б,в). Сигналы амплификации

наблюдаются в четырех образцах карциномы легкого, в трех образцах карциномы молочной железы, в двух образцах аденокарциномы яичников, а также в опухолях пищевода, желудка, тонкой и толстой кишки, почки, мочевого пузыря, матки, уретры и простаты. Специфический фрагмент не обнаружен в двух из трех аденокарцином толстой кишки, а также в астроцитоме мозга, аденокарциноме поджелудочной железы, семиноме, карциномах печени и фаллопиевых труб и в лейомиоме матки.

При исследовании экспрессии последовательности AI267901 в клиническом материале опухолей человека оказалось, что амплификация последовательности AI267901 наблюдается в большинстве образцов опухолей молочной железы, тела и шейки матки, а также во всех исследуемых образцах опухолей лёгкого, желудка, яичка, мозговых оболочек и в лимфомах (рис.5(г)). Все результаты по экспрессии последовательности AI267901 в опухолевых тканях сведены в табл.2.

Специфичность амплификации изучаемых фрагментов гена *OTP* выборочно была подтверждена секвенированием (результаты не представлены).

Обсуждая полученные данные, следует подчеркнуть, что в настоящее время большое внимание уделяется исследованиям, направленным на поиск молекулярных маркеров опухолей, позволяющих выявлять заболевание на ранних стадиях, когда существующие методы лечения бывают наиболее эффективными. Для этого в общемировой практике используется ряд достаточно трудоемких и дорогостоящих методов анализа [3]. Созданная нами в 2001 году программа HSAAnalyst открывает новые возможности для сравнительного изучения экспрессии генов. С ее помощью мы провели компьютерное сравнение электронных библиотек кДНК, полученных из опухолей, с библиотеками кДНК из нормальных тканей человека. В результате этой работы был выявлен целый ряд опухолеспецифических транскриптов [1]. Среди них были мРНК гена *OTP* и нуклеотидная последовательность AI267901, закодированная в области второго интрона гена *OTP* (рис.1).

Ген *OTP* человека является гомологом гена *Orthopedia* мыши и принадлежит к семейству гомеобокс-содержащих генов. Его функции у человека пока до конца не выяснены, однако, по всей видимости, он является ключевым звеном в определении судьбы клеток в развитии организма, как и все гомеобокс-содержащие гены. Его экспрессия была выявлена в мозге 17-недельного плода, что позволяет предположить роль *OTP* в развитии мозга. Ген *OTP* человека закодирован в «минус» нити 5 хромосомы и включает три экзона и два интрона [7].

В настоящей работе получены экспериментальные данные, подтверждающие компьютерные результаты. Нами была изучена экспрессия гена *OTP* в различных нормальных и опухолевых тканях человека методом ПЦР со специфическими праймерами к гену *OTP* (рис.1). Для исследования были выбраны: фрагмент OTP-2, соответствующий второму экзону гена *OTP*, и фрагмент OTP-in, соответствующий последовательности AI267901, экспрессирующейся с интронной области гена *OTP*.

В табл. 2 сведены данные по экспрессии гена в различных опухолях человека. Из таблицы видно, что изучаемые фрагменты представлены в большинстве образцов опухолей, за исключением карциномы печени, фаллопиевых труб и поджелудочной железы. Фрагмент OTP-2 экспрессируется в 23 из 29 опухолевых образцов, а фрагмент OTP-in в 49 из 59 опухолевых образцов. Экспрессия ни одного из этих фрагментов не обнаружена только в аденокарциноме поджелудочной железы, карциноме печени и фаллопиевых труб.

В табл. 1 сведены данные по экспрессии изучаемых последовательностей гена в различных нормальных тканях взрослого человека и в эмбриональных тканях. Таблица наглядно показывает, что изучаемые нами фрагменты гена *OTP* практически не транскрибируются в нормальных и эмбриональных тканях. Так, фрагмент OTP-2 и последовательность AI267901 обнаруживаются только в нормальных тканях яичка, т.е. могут быть отнесены к категории раково-тестикулярных транскриптов. Следует учесть, что каждый образец нормальной ткани объединяет в себе кДНК от нескольких доноров, что даёт возможность обнаружения транскриптов, которые присутствуют лишь в части проб.

Фрагмент OTP-in относится к интронной области гена *OTP* и в процессированной мРНК *Orthopedia homeobox* должен отсутствовать [7]. В то же время, наши результаты свидетельствуют о том, что последовательность AI267901 и ген *OTP* имеют схожий профиль экспрессии как в нормальных тканях, так и в изучаемых опухолях (табл.1, 2). Из данных фактов следует, что последовательность AI267901 может являться либо альтернативным экзоном гена *OTP* в опухолях, либо самостоятельным транскриптом.

В данный момент мы проводим эксперименты по определению полной нуклеотидной последовательности этого транскрипта и направлению его синтеза. По предварительным данным последовательность AI267901 транскрибируется с обратной по отношению к гену *OTP* нити ДНК и является частью более протяженного самостоятельного транскрипта (результаты не представлены).

Таблица 1. Экспрессия фрагментов гена *OTP* в нормальных и эмбриональных тканях человека

| Ткань/орган | OTP-2 Положительные образцы/ общее кол-во образцов | OTP-in По- ложительные образцы/ общее кол-во образцов | Кол-во до- норов на образец | Ткань/орган | OTP-2 Положительные образцы/ общее кол-во образцов | OTP-in По- ложительные образцы/ общее кол-во образцов | Кол-во до- норов на образец |
|-------------------------------------|--|---|-----------------------------------|---------------------------------|--|---|-----------------------------------|
| Мозг | 0/1 | 0/2 | 4 | Слепая кишка | 0/1 | 0/1 | 29 |
| Лёгкое | 0/1 | 0/2 | 2-4 | Восходящая обо- дочная кишка | 0/1 | 0/1 | 5 |
| Сердце | 0/1 | 0/2 | 16 | Нисходящая обо- дочная кишка | 0/1 | 0/1 | 7 |
| Селезёнка | 0/2 | 0/4 | 6-11 | Поперечная обо- дочная кишка | 0/1 | 0/1 | 19 |
| Тимус | 0/2 | 0/4 | 9-18 | Двенадцатиперст- ная кишка | 0/1 | 0/1 | 30 |
| Лейкоциты пери- ферической крови | 0/2 | 0/4 | 550 | Пищевод | 0/1 | 0/1 | 39 |
| Лимфатический узел | 0/1 | 0/2 | 12 | Подвздошно-сле- пая кишка | 0/1 | 0/1 | 19 |
| Миндалевидная железа | 0/1 | 0/2 | 5 | Подвздошная кишка | 0/1 | 0/1 | 8 |
| Красный костный мозг | 0/1 | 0/2 | 74 | Тощая кишка | 0/1 | 0/1 | 6 |
| Почка | 0/1 | 0/2 | 14 | Прямая кишка | 0/1 | 0/1 | 6 |
| Печень | 0/2 | 0/3 | 4 | Желудок | 0/1 | 0/1 | 7 |
| Поджелудочная железа | 0/1 | 0/2 | 20 | Фетальный мозг | 0/1 | 0/2 | 10 |
| Тонкая кишка | 0/1 | 0/2 | 32 | Фетальное сердце | 0/1 | 0/2 | 13 |
| Толстая кишка | 0/1 | 0/2 | 20 | Фетальная печень | 0/2 | 0/4 | 32 |
| Яичник | 0/1 | 0/2 | 14 | Фетальная почка | 0/1 | 0/2 | 17 |
| Простата | 0/1 | 0/2 | 32 | Фетальное лёгкое | 0/1 | 0/2 | 38 |
| Яичко | 1/1 | 1/2 | 45 | Фетальные мышцы | 0/1 | 0/2 | 13 |
| Плацента | 0/1 | 0/2 | 10 | Фетальная селе- зёнка | 0/1 | 0/2 | 17 |
| Скелетная мышца | 0/1 | 0/2 | 35 | Фетальный тимус | 0/1 | 0/2 | 17 |

Жирным шрифтом отмечены образцы, в которых выявлена экспрессия соответствующих фрагментов гена *OTP*.

Таблица 2. Экспрессия фрагментов гена *OTP* в различных опухолях человека

| Локализация опухоли | Фрагмент гена <i>OTP</i> | OTP-2 | OTP-in |
|-----------------------|--------------------------|-------|--------|
| Головной мозг | | 1/1 | 0/1 |
| Краниоспинальный стык | | - | 1/1 |
| Молочная железа | | 2/2 | 8/9 |
| Легкое | | 3/4 | 6/6 |
| Бронх | | 1/1 | 1/1 |
| Пищевод | | 1/1 | 1/1 |
| Желудок | | 3/3 | 2/2 |
| Поджелудочная железа | | - | 0/1 |
| Тонкая кишка | | 1/1 | 1/1 |
| Толстая кишка | | 0/1 | 2/4 |
| Печень | | 0/1 | 0/1 |
| Почка | | 0/1 | 2/2 |
| Мочевой пузырь | | 1/1 | 1/1 |
| Матка | | 1/1 | 3/4 |
| Шейка матки | | 2/2 | 1/2 |
| Фаллопиевы трубы | | 0/1 | 0/1 |
| Яичники | | 0/1 | 5/5 |
| Яичко | | 2/2 | 1/2 |
| Уретра | | 1/1 | 2/2 |
| Простата | | - | 1/1 |
| Менингиома | | - | 2/2 |
| Лимфома | | 4/4 | 5/5 |

Таким образом, оба изучаемых фрагмента гена *OTP* экспрессируются в подавляющем большинстве опухолей (табл. 2) и практически не обнаруживаются в нормальных тканях человека (табл. 1). При этом с локуса гена *OTP* мы получаем два независимых опухолеспецифических транскрипта, являющихся перспективными маркерами для диагностики онкологических заболеваний.

В качестве потенциального маркера раннего выявления рака ген *OTP* впервые начал рассма-

триваться в 2012 году, когда M.S. Kim и соавт. показали наличие атипичного метилирования гена *OTP* в опухолях молочной железы [4].

В настоящее время ген *OTP* активно исследуется несколькими группами ученых, как прогностический маркер для карциноидных опухолей легкого [8, 10]. Опубликованы данные об экспрессии гена *OTP* только в опухолях легкого [8, 10] и мочевого пузыря [8], тогда как нами показана экспрессия гена *OTP* в широком спектре опухолей почти всех локализаций.

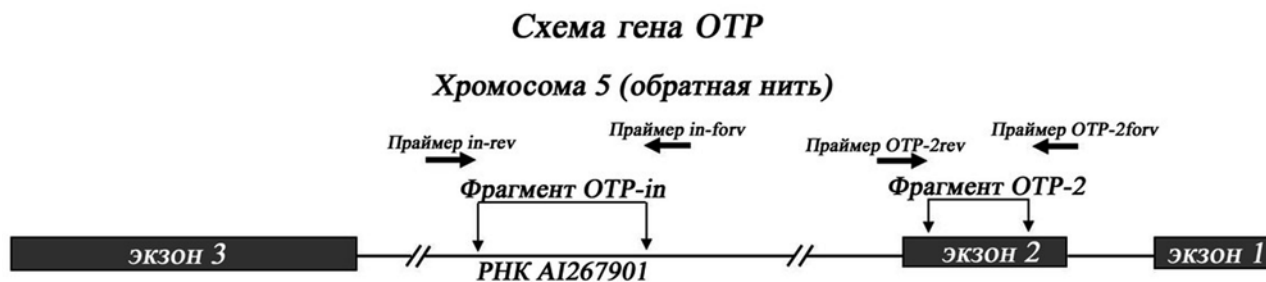


Рис. 1. Схема гена *OTP*
Жирными стрелками показаны места посадки праймеров для амплификации соответствующих фрагментов гена *OTP*.

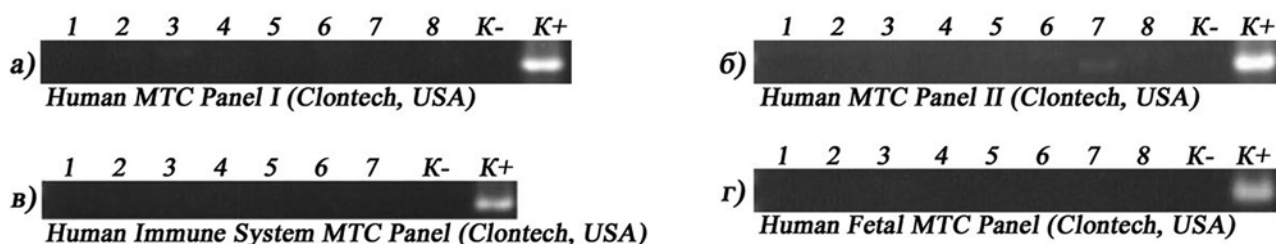


Рис. 2. Результаты амплификации фрагмента *OTP-2* в нормальных тканях человека
а) 1 – мозг, 2 – сердце, 3 – почка, 4 – печень, 5- легкое, 6 – поджелудочная железа, 7 – плацента, 8 – скелетная мышца, К- – ПЦР без матрицы, К+ – ПЦР на геномной ДНК человека;
б) 1 – толстая кишка, 2 – яичник, 3 – лейкоциты периферической крови, 4 – предстательная железа, 5 – тонкая кишка, 6 – селезенка, 7 – яичко, 8 – тимус, К- – ПЦР без матрицы, К+ – ПЦР на геномной ДНК человека;
в) 1 – костный мозг, 2 – фетальная печень, 3 – лимфатический узел, 4 – лейкоциты периферической крови, 5 – селезенка, 6 – тимус, 7 – миндалинная железа, К- – ПЦР без матрицы, К+ – ПЦР на геномной ДНК человека;
г) 1 – фетальный мозг, 2 – фетальное сердце, 3 – фетальная почка, 4 – фетальная печень, 5 – фетальное легкое, 6 – фетальная скелетная мышца, 7 – фетальная селезенка, 8 – фетальный тимус, К- – ПЦР без матрицы, К+ – ПЦР на геномной ДНК человека.

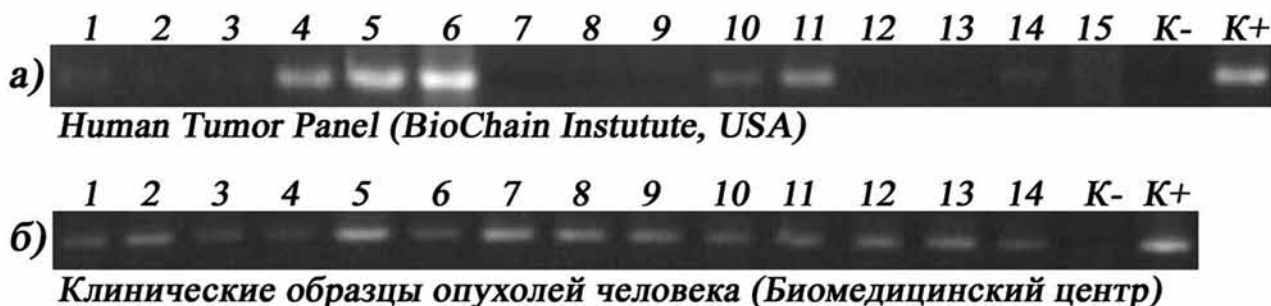


Рис. 3. Результаты амплификации фрагмента *OTP-2* в опухолевых тканях человека
а) 1- астроцитома головного мозга, 2- карцинома молочной железы, 3- карцинома легкого, 4- аденокарцинома пищевода, 5- аденокарцинома желудка, 6- аденокарцинома тонкой кишки, 7- аденокарцинома толстой кишки, 8- карцинома печени, 9- карцинома почки, 10- карцинома мочевого пузыря, 11- аденокарцинома матки, 12- карцинома фаллопиевых труб, 13- аденокарцинома яичников, 14- семинома яичка, 15- карцинома уретры, К- – ПЦР без матрицы, К+ – ПЦР на геномной ДНК человека;
б) 1 – рак шейки матки, 2- семинома, 3 – миосаркома шейки матки, 4,5 – плоскоклеточный рак легкого, 6 – рак бронха, 7- рак легкого, 8- аденокарцинома молочной железы, 9,10,12,13- лимфомы, 11,14 – рак желудка, К- – ПЦР без матрицы, К+ – ПЦР на геномной ДНК человека.

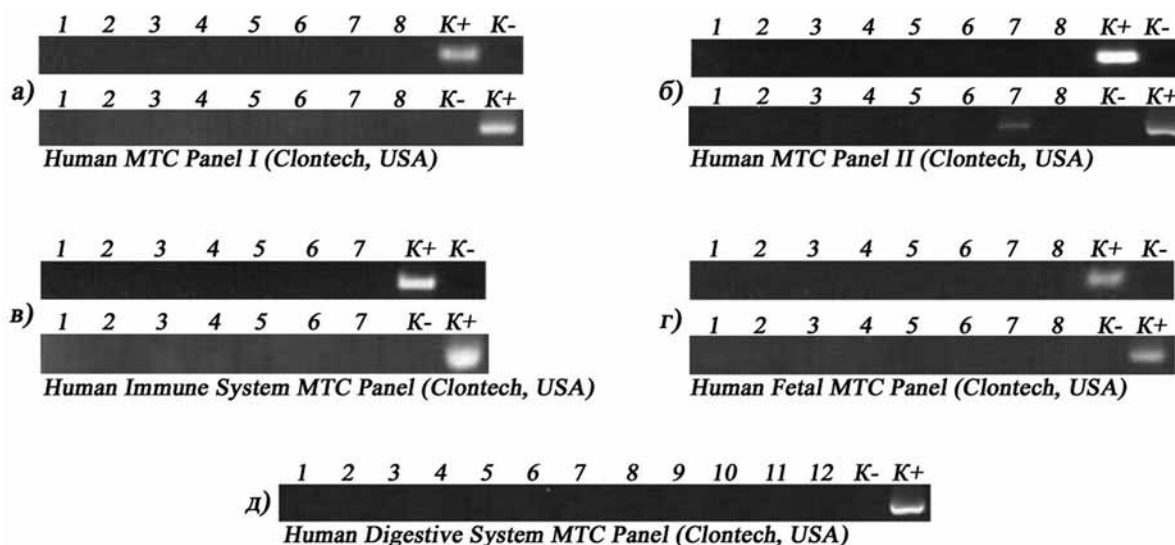


Рис. 4. Результаты амплификации фрагмента ОТР-in в нормальных тканях человека

- а) 1 — мозг, 2 — сердце, 3 — почка, 4 — печень, 5- легкое, 6 – поджелудочная железа, 7 – плацента, 8 – скелетная мышца, К- – ПЦР без матрицы, К+ – ПЦР на геномной ДНК человека;
- б) 1 – толстая кишка, 2 – яичник, 3 – лейкоциты периферической крови, 4 – предстательная железа, 5 – тонкая кишка, 6 – селезенка, 7 – яичко, 8 – тимус, К- – ПЦР без матрицы, К+ – ПЦР на геномной ДНК человека;
- в) 1 – костный мозг, 2 – фетальная печень, 3 – лимфатический узел, 4 – лейкоциты периферической крови, 5 – селезенка, 6 – тимус, 7 – миндалинная железа, К- – ПЦР без матрицы, К+ – ПЦР на геномной ДНК человека;
- г) 1 – фетальный мозг, 2 – фетальное сердце, 3 – фетальная почка, 4 – фетальная печень, 5 – фетальное легкое, 6 – фетальная скелетная мышца, 7 – фетальная селезенка, 8 – фетальный тимус, К- – ПЦР без матрицы, К+ – ПЦР на геномной ДНК человека;
- д) 1 – слепая кишка, 2 – восходящая ободочная кишка, 3 – нисходящая ободочная кишка, 4 – поперечная ободочная кишка, 5 – двенадцатиперстная кишка, 6 – пищевод, 7 – подвздошно-слепая кишка, 8 – подвздошная кишка, 9 – тощая кишка, 10 – печень, 11 – прямая кишка, 12 – желудок, К- – ПЦР без матрицы, К+ – ПЦР на геномной ДНК человека.

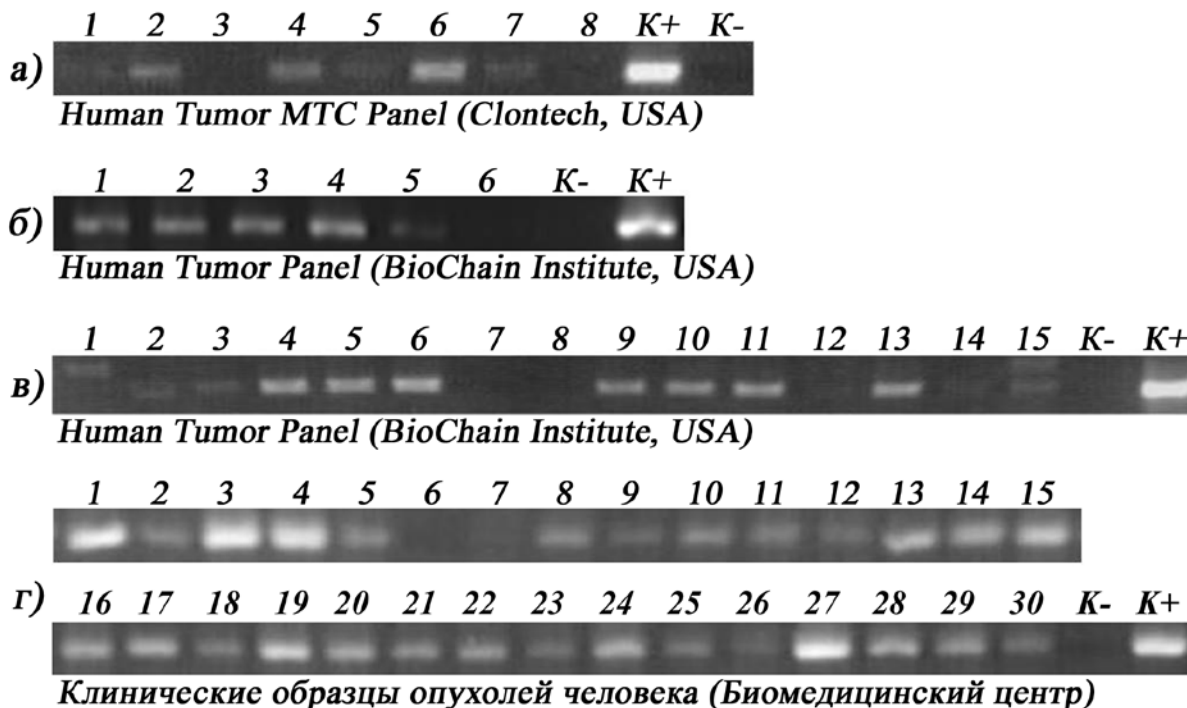


Рис. 5. Результаты амплификации фрагмента ОТР-in в опухолевых тканях человека

- а) 1 – карцинома молочной железы, 2 – карцинома лёгкого, 3 – аденокарцинома толстой кишки, 4 – рак лёгкого, 5 – аденокарцинома простаты, 6 – аденокарцинома толстой кишки, 7 – карцинома яичника, 8 – аденокарцинома поджелудочной железы, К- – ПЦР без матрицы, К+ – ПЦР на геномной ДНК человека;
- б) 1 – карцинома молочной железы, 2 – аденокарцинома толстой кишки, 3 – карцинома почки, 4 – карцинома лёгкого, 5 – аденокарцинома желудка, 6 – лейомиома матки, К- – ПЦР без матрицы, К+ – ПЦР на геномной ДНК человека;
- в) 1- астроцитома головного мозга, 2- карцинома молочной железы, 3- карцинома легкого, 4- аденокарцинома пищевода, 5- аденокарцинома желудка, 6- аденокарцинома тонкой кишки, 7- аденокарцинома толстой кишки, 8- карцинома печени, 9- карцинома почки, 10- карцинома мочевого пузыря, 11- аденокарцинома матки, 12- карцинома фаллопиевых труб, 13- аденокарцинома яичников, 14- семинома яичка, 15- карцинома уретры, К- – ПЦР без матрицы, К+ – ПЦР на геномной ДНК человека;
- г) 1-6 рак молочной железы, 7 – рак шейки матки, 8-11 – метастазы в тело матки, большого сальника, правого и левого яичника от №7, 12 – миосаркома шейки матки, 13-15 рак яичника, 16-17 – аденокарцинома эндометрия матки, 18-19 – плоскоклеточный рак легкого, 20 – рак бронха, 21 – рак желудка, 22 – рак яичка, 23-24 – менингиома, 25– опухоль краниоспинального стыка, 26-30 лимфомы, К- – ПЦР без матрицы, К+ – ПЦР на геномной ДНК человека.

Другими авторами было показано существование белка, кодируемого геном *OTP* [7, 10], что дает нам основание предполагать возможность использования продуктов этого гена не только в качестве опухолевого маркера, но и для иммунотерапии рака.

В нашей лаборатории продолжают эксперименты, направленные на подробное изучение экспрессии транскриптов гена *OTP* в различных тканях, а также работа по определению структуры и полной нуклеотидной последовательности транскрипта AI267901, представляющая не только научный, но и практический интерес.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают свою признательность Т.В. Курбатовой за ценные консультации и А.Э. Машиарскому за помощь в секвенировании.

Работа выполнена при поддержке гранта №6.833.2014/К проектной части государственного задания в сфере научной деятельности Минобрнауки РФ

ЛИТЕРАТУРА

- Baranova A.V., Lobashev A.V., Ivanov D.V. et al. In silico screening for tumour-specific expressed sequences in human genome // *FEBS Lett.* – 2001. – Vol. 508. – № 1. – P. 143-148.
- Chirgwin J.M., Przybyla A.E., MacDonald R.J., Rutter W.J. Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease // *Biochemistry.* – 1979. – V. 18. – № 24. – P. 5294-5299.
- Joe W. Gray, Colin Collins. Genome changes and gene expression in human solid tumors // *Carcinogenesis.* – 2000. – Vol. 21. – № 3. – P. 443-452.
- Kim MS, Lee J, Oh T, Moon Y, Chang E, et al. Genome-wide identification of *OTP* gene as a novel methylation marker of breast cancer // *Oncol Rep.* – 2012. – Vol. 27. – P.1681–1688.
- Kozlov A.P. Expression of evolutionarily novel genes in Tumors // *Infectious Agents and Cancer.* – 2016. – Vol. 11. – № 34. – DOI 10.1186/s13027-016-0077-6.
- Krukovskaja L.L., Baranova A., Tyezelova T. et al. Experimental study of human expressed sequences newly identified in silico as tumor specific// *Tumour Biol.* – 2005. – V. 26. – № 1. – P. 17-24.
- Lin X, State MW, Vaccarino FM, Grealley J, Hass M, Leckman JF. Identification, chromosomal assignment, and expression analysis of the human homeodomain-containing gene *Orthopedia (OTP)* // *Genomics.* – 1999. – Vol. 60. – № 1. – P. 96-104.
- Nonaka D, Papaxoinis G, Mansoor W. Diagnostic Utility of *Orthopedia Homeobox (OTP)* in Pulmonary Carcinoid Tumors // *Am J Surg Pathol.* – 2016. – Vol. 40. – № 6. – P.738-744.
- Sambrook J., Russel D.W. *Molecular cloning: a laboratory manual.* 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 2001.
- Swarts D.R., Henfling M.E., Van Neste L. et al. CD44 and *OTP* Are Strong Prognostic Markers for Pulmonary Carcinoids // *Clinical Cancer Research.* – 2013. – Vol. 19. – P. 2197-2207.

Поступила в редакцию 30.08.2016г.

Yu.K.Karnaukhova^{1,2}, D.E.Polev^{1,3}, L.L.Krukovskaya^{1,2}, A.P.Kozlov^{1,2}

The study of *Orthopedia homeobox* gene expression in different tumor and normal human tissues

¹Biomedical center

²Peter the Great St. Petersburg State Polytechnic University

³St. Petersburg State University
St. Petersburg

There was studied the *OTP* gene expression in different normal and tumor human tissues using PCR with specific primers. *OTP* gene is expressed in 23 of 29 tumor samples and intron fragment of *OTP* gene (sequence AI267901) is expressed in 49 of 59 tumor samples of different localization. Studied fragments of *OTP* gene are not transcribed in normal and embryonic tissues except for normal testis tissue, i.e. they can be classified as cancer-testis transcripts. According to preliminary data AI267901 RNA and *OTP* gene mRNA are transcribed from different DNA strands. Thus locus of *OTP* gene provides two independent tumor specific transcripts which are potential markers for the cancer diagnostics.

Key words: tumor specific expression, *Orthopedia homeobox (OTP)*, tumor markers, cancer diagnostics