

ТЕХНОЛОГИЯ БИОЧИПИРОВАНИЯ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ У ПАЦИЕНТОВ С АКАНТОЛИТИЧЕСКОЙ ПУЗЫРЧАТКОЙ

Колос Ю.В.

*Белорусский государственный медицинский университет,
кафедра кожных и венерических болезней, г. Минск*

Ключевые слова: акантолитическая пузырчатка, биочипы, экспрессия генов

Резюме: целью данного исследования было изучение экспрессии генов периферических мононуклеаров у пациентов с акантолитической пузырчаткой методом биочипирования. Наибольшее повышение экспрессии установлено у гена функциональной группы иммуноглобулинов и их рецепторов: Fcy рецептора 1A (в 22,8 раза по сравнению с контрольной группой, $p=0,00001$).

Resume: the objective of this study was to investigate the gene expression of peripheral mononuclear cells in patients with acantholytic pemphigus using microarray technology. The greatest increase in

gene expression was found in functional gene group of immunoglobulins and their receptors: Fcγ receptor 1A (22.8 times compared with the control group, p = 0,00001).

Актуальность. Одной из революционных молекулярных технологий конца XX века стала технология биочипов (microarray), позволяющая с высокой точностью проводить многопараметрический анализ биологических данных [1,2]. Биочипы представляют собой матрицу множества (от десятка до нескольких миллионов) микроочагов, каждая из которых содержит определенные молекулярные зонды. В зависимости от содержания данных зондов различают олигонуклеотидные биочипы, ДНК-биочипы, белковые, клеточные, тканевые биочипы, микрофлюидальные биочипы, биочипы на основе малых молекул, а также ряд других [1,2,3].

Область применения технологии биочипов чрезвычайно широка. Биочипы позволяют в десятки раз быстрее выявлять возбудителей ряда инфекционных заболеваний, в том числе лекарственно-устойчивых форм туберкулеза, токсины для мониторинга окружающей среды и определения качества пищевых продуктов. С помощью биочипов возможна ранняя диагностика и типирование онкологических заболеваний, а также определение чувствительности к определенной терапии. Биочипы позволяют выявить генетическую предрасположенность к развитию определенных заболеваний, а также изучить полиморфизм определенных генов [1-6].

Одним из перспективных направлений технологии биочипов является определение экспрессии генов в тканях в норме и при патологии для изучения молекулярных механизмов развития заболевания, а также установления роли определенных молекул в патогенезе заболевания с последующим поиском новых потенциальных мишеней таргетной терапии [2,4,5].

На ресурсе PubMed проблеме изучения экспрессии генов при акантолитической пузырьчатке с помощью технологии биочипов (microarray) посвящено только несколько статей. Между тем акантолитическая пузырьчатка является одним из наиболее тяжелых дерматозов и характеризуется выработкой аутоантител к компонентам десмосом (преимущественно к антигенам десмоглеину 1 и 3), которые разрушают межклеточные контакты, что клинически проявляется пузырьным синдромом на слизистых оболочках и/или коже [7-10].

Пузырчатка является ургентной дерматологической патологией, отличается тяжестью клинического течения, значительным снижением качества жизни и может иметь летальный исход при отсутствии адекватной иммуносупрессивной терапии [7-10].

В этой связи вопросы дальнейшего изучения патогенетических механизмов развития заболевания, в том числе молекулярно-генетических аспектов, с целью поиска новых подходов к диагностике и лечению являются очень актуальными.

Цель: выявить изменения в экспрессии генов периферических мононуклеаров у пациентов с акантолитической пузырьчаткой.

Задачи: 1. Изучить экспрессию генов периферических мононуклеаров у пациентов с акантолитической пузырьчаткой и в контрольной группе доноров методом биочипирования; 2. Провести сравнительный анализ полученных при биочипировании данных в группе пациентов с акантолитической пузырьчаткой и в контрольной

группе и определить гены, статистически значимо изменившие свою экспрессию ($p < 0,01$).

Материал и методы. В группу исследования вошли 8 пациентов (3 мужчин и 5 женщин) с серологически верифицированным (с помощью ИФА с рекомбинантными антигенами десмоглеином 1 и 3) диагнозом акантолитической пузырчатки со следующими нозологическими формами (по МКБ-10):

1. L 10.0 Вульгарная пузырчатка ($n=4$);
2. L 10.1 Вегетирующая пузырчатка ($n=2$);
3. L 10.2 Листовидная пузырчатка ($n=2$).

Возраст пациентов в группе исследования варьировал от 19 до 62 лет, $M (s) - 44,5 (16,6)$ лет. Стаж заболевания составлял от 2 месяцев до 13 лет, $Me (25\%-75\%) - 21 (4,5-54)$ месяца.

В контрольную группу были включены 13 практически здоровых доноров, сопоставимых по гендерным и возрастным характеристикам ($p > 0,05$).

У каждого пациента из группы исследования и контрольной группы забирали венозную кровь в объеме 10 мл, помещали ее в пластиковую пробирку с гепарином и в течение 24 часов доставляли в лабораторию. Для получения мононуклеарных лейкоцитов венозную гепаринизированную кровь пациентов в объеме 6 мл наслаивали на 3,0 мл фиколл-верографина и центрифугировали в течение 30 минут при скорости 3000 об/мин при комнатной температуре. Отбирали беловатое кольцо мононуклеаров, образующееся на границе раздела слоев градиента. Мононуклеары дважды отмывали в растворе фосфатно-солевого буфера следующего состава (в mM): NaCl – 137, Na_2HPO_4 – 8, KCl – 2,7, KH_2PO_4 – 1,5. Затем клетки подсчитывали в камере Горяева.

Для выделения РНК из мононуклеаров периферической крови применяли «TRI-reagent» («SigmaAldrich», США) в соответствии с инструкцией производителя.

Качество выделенной РНК проверяли электрофоретически, концентрацию РНК и ДНК определяли с помощью спектрофотометра Nanodrop.

Комплементарную полученной РНК ДНК (кДНК), меченную AlexaFluor 555, получали в реакции обратной транскрипции с использованием набора SuperScript Plus Direct cDNA Labeling System (Invitrogen), содержащего фермент Superscript III (обратная транскриптаза вируса лейкемии мышей Молонея) в соответствии с инструкцией производителя. После окончания реакции кДНК очищали с помощью колонок (Low Elution cDNA) и элюировали в 20 мкл дистиллированной воды. Концентрация однострочной кДНК в пробах составляла не менее 10 мкг/мкл.

Гибридизацию проводили с использованием биочипов e-Chips, разработанных совместно с компанией ArrayIT (США) и представляющих собой стеклянные слайды, на поверхности каждого из которых размещался массив из 652 генов. 5мкл синтезированной меченной кДНК денатурировали в 10 мкл гибридизационного буфера ArrayIT (США) и наносили на реакционную зону биочипа. Биочип помещали во влажную гибридизационную камеру на 12 часов при температуре $42^{\circ}C$. После инкубации слайды отмывали и высушивали.

Сканирование биочипов проводили на сканере Innoscan 700 (Carbone, Франция) с разрешением 3 мкм и мощности сканера 40% от номинальной при длине волны 540 нм. Изображение и относительные значения интенсивности флюоресценции для каждого гена получали с помощью программного обеспечения Mappix v.4.5.0 и сохраняли в текущем формате для последующего анализа и обработки в пакете Microsoft Office 2010. Данные нормализовали по суммарной интенсивности 652 элементов методом регрессивного анализа с использованием программного обеспечения SigmaPlot v.12. Статистические расчёты и кластерный анализ проводили в программе Multi Experiment Viewer Mev v4.8. Статистически значимыми различия считали при уровне $p < 0,01$.

Результаты и их обсуждение. По результатам анализа экспрессии периферическими мононуклеарами 652 генов на биочипах был выявлен 91 ген, статистически значимо ($p < 0,01$) изменивший свою экспрессию у пациентов с акантолитической пузырьчаткой по сравнению с контрольной группой: 56 генов имели повышенную экспрессию, 35-пониженную.

При функциональном распределении генов, модифицировавших свою экспрессию, изменения были выявлены в группах генов, ответственных за:

1. Цитокины, ростовые факторы, хемокины (гены CCL13, CCL18, CCL21, CCL23, CXCL9, IFI35, IFNA10, IFNT1, IRF7, NFATC4, vascularendothelialgrowthfactorC, XCL2 имели повышенную экспрессию, гены IFNA2, IFNA7, IL29, IL8.3, interleukin 8, interleukin 11 –пониженную);

2. Рецепторы цитокинов, хемокинов (гены AXLreceptortyrosinekinase, CXCR4, inositol 1.4.5-triphosphatereceptortype 1, insulinreceptorsubstrate 2, interleukin 6 signal-transducer (gp130 oncostatinMreceptor), neurotrophictyrosinekinasereceptortype 2 имели повышенную экспрессию, гены BCAP31, CCR1, chemokine (C-X-Cmotif) receptor 4 (fusin), fms-relatedtyrosinekinase 1 – пониженную);

3. Клеточный цикл, дифференцировку и апоптоз (caspase 9 apoptosis-relatedcysteineprotease, BCL2-interactingkiller (apoptosis-inducing), CDC-likekinase 2 – имели повышенную экспрессию; гены celldivisioncycle 2-like 5 (cholinesterase-related cell), proteasome (prosome. macropain) 26Ssubunit. ATPase. 4 - пониженную);

4. Сигнальные пути;

5. Онкогены;

6. Toll-like рецепторы (TLR2, TLR6, TLR7 –имели повышенную экспрессию);

7. ДНК, РНК (процессы репликации, транскрипции, процессинга);

8. Молекулы адгезии (ген catenin (cadherin-associated protein) alpha 1 (102kD) имел повышенную экспрессию, гены cadherin 15. M-cadherin (myotubule), cadherin 5. type 2. VE-cadherin (vascular epithelium) – пониженную);

9. Мембранные каналы клетки, транспорт;

10. Белки компонентов организации и структуры клеток (цитоплазма, органеллы);

11. Белки внеклеточного матрикса (ген matrixmetalloproteinase 15 имел повышенную экспрессию);

12. Систему комплемента;

13. CD антигены.

Наибольшее повышение экспрессии (в 22,8 раза по сравнению с контрольной группой, $p=0,00001$) наблюдалось у гена FCGR1A.1, который относится к группе генов, ответственных за иммуноглобулины и их компоненты.

Ген FCGR1A.1 (Fc γ рецептор 1A) кодирует белок CD64A, мембранный гликопротеин, являющийся высокоафинным Fc рецептором к мономерным IgG. Данный протеин играет важную роль в иммунном ответе и опосредует фагоцитоз, антителозависимую клеточную цитотоксичность, высвобождение метаболитов арахидоновой кислоты, гистамина и других медиаторов воспаления, выработку и секрецию лимфокинов, а также клеточную пролиферацию и дифференцировку.

Возможная роль данного белка при пузырчатке требует дальнейшего изучения.

Выводы:

1. У пациентов с акантолитической пузырчаткой наблюдаются статистически значимые ($p<0,01$) изменения в экспрессии 91 гена периферическими мононуклеарами крови. У 56 генов установлено повышение экспрессии, у 35 – понижение;

2. Наибольшее повышение экспрессии наблюдается у гена функциональной группы иммуноглобулинов и их рецепторов: Fc γ рецептора 1A – FCGR1A.1 (в 22,8 раза по сравнению с контрольной группой, $p=0,00001$). Данный ген требует дальнейшего изучения для выявления его патогенетической роли в развитии заболевания, а также определения новых потенциальных мишеней таргетной терапии.

Литература

1. Разумов, А.С. Медицина XXI века: биочипы / А.С. Разумов // Медицина в Кузбассе. – 2009. – № 2. – С. 3–11.
2. Биочипы для медицинской диагностики / В.Р. Четкин [и др.] // Рос. нанотехнологии. – 2006. – Т. 1, №1-2. – С. 13–27.
3. Мирзабеков, А.Д. Биочипы в биологии и медицине XXI века / А.Д. Мирзабеков // Вестн. Рос. АН. – 2003. – Т. 73, № 5. – С. 412.
4. Gene expression microarray analysis in cancer biology, pharmacology and drug development: progress and potential / P.A. Clarke [et al.] // Biochem. Pharmacol. – 2001. – Vol. 62, №10. – P. 1311.
5. Lockhart, D.J. Genomics: gene expression and DNA arrays / D.J. Lockhart, E.A. Winzeler // Nature. – 2000. – Vol. 405, № 6788. – P. 827.
6. Microarray technology: an increasing variety of screening tools for proteomic research / D. Stoll [et al.] // Targets. – 2004. – Vol. 3, № 1. – P. 24.
7. Autoimmune Diseases of the Skin. Pathogenesis, Diagnosis, Management/ M. Hertl. 3rd ed. Springer, 2011. 469p.
8. Bologna Dermatology 2 volume set / J. L. Bologna [et al.]; editors: J. L. Bologna, J. L. Jorizzo, R. P. Rapini. 2nd ed. Elsevier Limited, 2008. 2500p.
9. Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine 2 volume set. / K. Wolff [et al.]; editors: K. Wolff [et al.]. 7th ed. NY: McGraw-Hill Professional, 2007. 2402p.
10. Rook's Textbook of Dermatology (2010) / T. Burns [et al.]. editors: T. Burns, S. Breathnach, N. Cox, C. Griffiths. 8nded. UK: WILEY-BLACKWELL, 2010. 4362p.