

УДК 575:599.9

УРОВЕНЬ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА *RASSF1A* В ПЕРВИЧНЫХ ЭПИТЕЛИАЛЬНЫХ ОПУХОЛЯХ РАЗНОЙ ЛОКАЛИЗАЦИИ

© 2012 г. И. В. Пронина^{1*}, В. И. Логинов¹, Д. С. Ходырев¹, Т. П. Казубская², Э. А. Брага^{1**}

¹Государственный научный центр “ГосНИИгенетика”, Москва, 117545

²Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина Российской академии медицинских наук, Москва, 115478

Поступила в редакцию 11.05.2011 г.

Принята к печати 05.07.2011 г.

С помощью нокаут-мутаций в клетках мыши показано, что ген *RASSF1A* способен подавлять рост опухолевых клеток *in vitro* и *in vivo*. Данные о метилировании промоторного района гена *RASSF1A* и о снижении экспрессии этого гена получены ранее главным образом на клеточных линиях опухолей. Методом полуколичественной ОТ-ПЦР нами впервые проанализированы изменения содержания мРНК *RASSF1A* в образцах первичных злокачественных эпителиальных опухолей пяти локализаций, полученных от 130 больных. Изучены представительные выборки образцов рака почки, легкого и молочной железы. Приведены также предварительные данные об экспрессии гена *RASSF1A* при раке яичника и толстой кишки. Наши системные исследования выявили неожиданную картину, а именно, в эпителиальных опухолях почки, молочной железы, яичника и толстой кишки содержание мРНК *RASSF1A* чаще повышалось (в 2–7 раз), чем снижалось. Заметно чаще наблюдали повышение количества мРНК этого гена при почечно-клеточном раке (24/38, 63% против 8/38, 21%, $P = 0.0004$ по Фишеру) и раке яичников (8/13, 62% против 2/13, 15%, $P = 0.0114$). Только при немелкоклеточном раке легкого и увеличение, и уменьшение экспрессии *RASSF1A* встречалось с одинаковой частотой (16/38, 42%). Примечательно, что на ранних стадиях плоскоклеточного рака легкого и аденокарциномы легкого преобладало повышение, а на поздних – понижение экспрессии *RASSF1A*. И на ранних, и на поздних стадиях светлоклеточного почечно-клеточного рака повышение экспрессии *RASSF1A* встречалось чаще и на поздних стадиях было статистически значимым ($P = 0.0094$). Эти данные указывают на опухолевую специфичность изменений экспрессии гена *RASSF1A*. Отмеченные закономерности можно интерпретировать и как свидетельство двойственности функций гена *RASSF1A* в опухолях разной локализации – не только как супрессора опухолевого роста, но и как протоонкогена.

Ключевые слова: хромосома 3, ген *RASSF1A*, экспрессия гена, уровень мРНК, светлоклеточный почечно-клеточный рак, немелкоклеточный рак легкого, аденокарцинома и плоскоклеточный рак легкого, рак молочной железы, яичников, толстой кишки.

ALTERATIONS OF EXPRESSION LEVEL OF *RASSF1A* GENE IN PRIMARY EPITHELIAL TUMORS OF VARIOUS LOCATIONS, by I. V. Pronina^{1*}, V. I. Loginov¹, D. S. Khodyrev¹, T. P. Kazubskaya², E. A. Braga^{1**} (¹State Research Centre “GosNIIGenetika”, Moscow, 117545 Russia; *e-mail: *zolly_sten@mail.ru; **ebraga@genetika.ru; ²Blokhin Cancer Research Centre, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow, 115478 Russia). Tumor-suppressor activity was established for *RASSF1A* gene by *in vitro* and *in vivo* including studies of knock-out mutated mice cells. Data on methylation of promoter region and expression decrease revealed mainly in cancer cell lines were reported. Here, analysis of *RASSF1A* mRNA quantity was performed for the first time in primary epithelial malignant tumors of five various locations from 130 patients by semi-quantitative RT-PCR. Representative sets of kidney, lung and breast carcinomas samples were studied. Preliminary data for *RASSF1A* expression in ovarian and colorectal carcinomas are also reported. Our system studies showed unexpected expression profiles, namely mRNA level increase more frequently (2–7 times) than decrease in renal, breast, ovarian, and colorectal carcinomas. Increasing *RASSF1A* mRNA level was revealed significantly more frequently in renal cell carcinoma (24/38, 63% vs. 8/38, 21%, $P = 0.0004$, by

Принятые сокращения: АК – аденокарцинома легкого; НМРЛ – немелкоклеточный рак легкого; ОТ-ПЦР – (здесь) полимеразная цепная реакция на кДНК, полученной с помощью обратной транскрипции РНК; ПКР – почечно-клеточный рак; ск-ПКР – светлоклеточный почечно-клеточный рак; ПРЛ – плоскоклеточный рак легкого; РМЖ – рак молочной железы; РТК – рак толстой кишки; РЯ – рак яичника; LUCA (Lung Cancer) – район кандидатов в гены-супрессоры рака легкого; МЕСА3 (Major Epithelial Cancer region 3) – третий район кандидатов в гены-супрессоры основных видов рака.

* Эл. почта: zolly_sten@mail.ru; **ebraga@genetika.ru

Fisher exact test) and ovarian carcinomas (8/13, 62% vs. 2/13, 15%, $P = 0.0114$). Only in non-small cell lung cancer decreasing and increasing of *RASSF1A* expression were observed with equal frequency (16/38, 42%). Noteworthy, for early clinical stages prevalence of increasing expression both in squamous cell lung cancer and in adenocarcinoma was revealed, and for advanced clinical stages evident prevalence of decreasing *RASSF1A* expression was established. Cases with increasing expression both in early and advanced stages of clear cell renal cell carcinoma were in prevalence, in advanced stages it was proved significantly ($P = 0.0094$). These data suggested that *RASSF1A* expression alterations were tumor specific. Mentioned above regularity could point onto ambivalent *RASSF1A* functions in tumors – a tumor-suppressor gene and a proto-oncogene as well.

Keywords: chromosome 3, gene expression, mRNA level, *RASSF1A* gene, primary tumor, clear cell renal cell carcinoma, non-small cell lung carcinoma, adenocarcinoma and squamous cell lung carcinoma, breast carcinoma, ovarian carcinoma, colorectal carcinoma.

На коротком плече хромосомы 3 (3p) локализованы “критичные” районы, наиболее часто повреждаемые в опухолях: LUCA (3p21.31), AP20 (3p21.33) и MECA3 (3p21.31, интервал D3S2409–D3S3667), дистальные районы (3p26–3p23) и прицентромерные области (3p14–3p12), в том числе участок ломкости хромосомы 3 – FRA3B, содержащий ген *FHIT* (в области 3p14.2), а также область частых делеций в районе 3p12.2 [1–6]. Район LUCA (lung cancer) был локализован по перекрытию гомозиготных делеций в ряде клеточных линий мелкоклеточного рака легкого [7]. Полное секвенирование участка LUCA (630 т.п.н.) и компьютерный анализ позволили еще до завершения международной программы HUGO (Human Genome Organization, Международная программа по расшифровке структуры генома человека) идентифицировать в нем 25 генов [2]. В составе “критичного” района LUCA выявлены целые кластеры новых генов, в том числе ряд онкогенов [2, 8–13]. Уровень экспрессии многих генов этого района изменен в опухолях, обнаружено метилирование их промоторной области, получены подтверждения функциональной активности этих генов [12–16].

В области LUCA идентифицирован и охарактеризован ген *RASSF1*, кодирующий белок с RAS-ассоциированным доменом (Ras association domain family 1) [2, 17]. Известно несколько вариантов альтернативного сплайсинга этого гена. Два CpG-богатых промотора обеспечивают образование двух основных транскриптов – *RASSF1A* и *RASSF1C*. Гены *RASSF1A* и *RASSF1C* имеют четыре общих экзона (3–6), кодирующих RAS-ассоциированный домен – гомолог RAS-эффекторного белка NORE1 млекопитающих [2, 17, 18]. N-концевая часть белка *RASSF1A* (в отличие от *RASSF1C*) содержит дополнительный (DAG)-связывающий домен, который обладает высокой гомологией с консервативной областью 1 протеинкиназы C (C1), содержащей мотив “цинковых пальцев”. Присутствие этих функциональных доменов говорит о том, что белки *RASSF1* могут играть важную роль в передаче сигнала от клеточной поверхности в ядро. *RASSF1A* и *RASSF1C* от-

носятся к цитоплазматическим белкам. Белок *RASSF1A* выполняет в клетке разнообразные функции. Например, он участвует в задержке клеточного цикла на стадии перехода G1/S, воздействуя на содержание циклина D1 и фосфорилирование белка pRb [19]. *RASSF1A* вовлечен в индукцию апоптоза и в стабилизацию микротрубочек [20]. К настоящему времени установлено, что ген *RASSF1A* способен подавлять рост опухолевых клеток в опытах *in vitro* и *in vivo* [14–16]. Супрессорная активность гена *RASSF1A* подтверждена и с помощью нокаут-мутаций в клетках мыши [21].

Во многих опухолях активен только ген *RASSF1C*, а экспрессия гена *RASSF1A* снижена или отсутствует [17]. Опубликованы данные, свидетельствующие о том, что снижение экспрессии гена *RASSF1A* может быть связано с метилированием его промоторной области [14–17, 22, 23]. Установлена ассоциация между метилированием промоторного района гена *RASSF1A* и аллельными делециями, что указывает на “двухударный” механизм инактивации этого гена – за счет делеций и метилирования [24, 25].

Однако в этих работах экспрессию гена анализировали, главным образом, на линиях опухолевых клеток [14–17, 22, 23, 26]. В представленной работе впервые проведен системный анализ изменения количества мРНК гена *RASSF1A* в первичных злокачественных опухолях эпителиального происхождения пяти локализаций. Исследования выполнены на представительных выборках опухолей почки, легкого и молочной железы. Приведены также предварительные данные об экспрессии гена *RASSF1A* при раке яичника и толстой кишки.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Образцы первичного почечно-клеточного рака, рака молочной железы, немелкоклеточного рака легкого, рака яичника и толстой кишки собраны и клинически охарактеризованы в РОНЦ РАМН. Анализировали полученные от 38 больных парные образцы почечно-клеточного рака (ПКР) и

прилежащей к опухоли гистологически нормальной ткани, включая 34 образца светлоклеточного ПКР (ск-ПКР), а также 38 образцов немелкоклеточного рака легкого (НМРЛ), включая 23 образца плоскоклеточного рака (ПРЛ), 15 образцов аденокарциномы (АК), 28 – рака молочной железы (РМЖ) и по 13 – рака яичника (РЯ) и толстой кишки (РТК). Всего анализировали парные образцы (опухоль/норма), полученные от 130 человек. Принципы отбора образцов описаны ранее [5, 27, 28]. Экспрессию гена *RASSF1A* определяли также в шести постмортальных образцах нормальной ткани легкого, молочной железы, яичника и в пяти образцах ткани почки, полученных от лиц без онкологических заболеваний в анамнезе.

Суммарную РНК выделяли из ткани опухоли и прилежащей гистологически нормальной ткани с помощью модифицированного метода гуанидинизотиоцианат-фенол-хлороформенной экстракции [29] как описано ранее [30]. Концентрацию раствора РНК определяли спектрофотометрически ($\lambda = 260$ нм). Качество РНК определяли по соотношению интенсивностей полос 28S и 18S рРНК при электрофоретическом разделении в 1%-ном денатурирующем агарозном геле. Отсутствие ДНК в образцах контролировали с помощью полуколичественной ПЦР с праймерами к гену главного комплекса гистосовместимости *MHCI* как описано ранее [30].

кДНК синтезировали на матрице суммарной РНК с использованием обратной транскриптазы вируса лейкоза мышей Молони (M-MuLV Reverse Transcriptase, “Fermentas”, Литва) и вырожденных гептамеров (random heptamer) в качестве праймеров [30].

Праймеры, условия проведения полуколичественной ОТ-ПЦР и анализ данных. В реакцию брали по 2 мкл кДНК и по 0.2 мкМ праймеров. ПЦР проводили в буфере, содержащем по 0.2 мМ каждого dNTP, 2.5 мМ $MgCl_2$, 16.6 мМ $(NH_4)_2SO_4$, 0.01% Твин-20, 67 мМ Трис-НСI-буфер, pH 8.8, а также 1 ед. рекомбинантной термостабильной ДНК-полимеразы Taq (“Fermentas”). ПЦР фрагмента гена *RASSF1A* проводили в присутствии 5% диметилсульфоксида (DMSO). Праймеры к гену

RASSF1A и контрольному гену *B2M* (β 2-микроглобулин) приведены в табл. 1. Реакцию амплификации проводили по программе: +95°C, 5 мин; 35 циклов: +94°C, 15 с, $T_{отж.}$ (табл. 1), 25 с, +72°C, 45 с; +72°C, 2 мин – на термоциклере Терцик (“ДНК-технология”, Россия).

Соответствие амплификатов гена *RASSF1A* фрагментам кДНК этого гена (по данным базы NCBI) подтверждено анализом их нуклеотидной последовательности с помощью прямого секвенирования продуктов ПЦР.

Обработку данных ОТ-ПЦР выполняли с использованием программы ViTran [28]. В реакцию брали одинаковый объем кДНК. Учитывали изменение содержания мРНК *RASSF1A* (увеличение или уменьшение) в образцах опухолей по сравнению с образцами нормальной ткани того же больного в 5 и более раз.

Статистический анализ проводили с применением точного критерия Фишера. Уровень значимости принимали равным 0.05.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В опухолях почки, молочной железы, яичника и толстой кишки преобладает повышенная экспрессия гена RASSF1A

Ген *RASSF1A* протяженностью 7.6 т.п.н. содержит пять экзонов и кодирует мРНК длиной 2 т.н. [14, 15]. Праймеры для анализа экспрессии *RASSF1A* методом ОТ-ПЦР относились к экзонам 1 и 3 (рис. 1), чтобы отличать продукт ОТ-ПЦР от возможного продукта амплификации, образованного на примеси геномной ДНК.

Экспрессию гена *RASSF1A* мы оценивали по содержанию мРНК в парных образцах опухолевых и гистологически нормальных тканей, а также в постмортальных образцах нормальных тканей легкого, почки, молочной железы и яичника, полученных от индивидов без онкологических заболеваний в анамнезе. Анализировали представительные выборки образцов НМРЛ, ПКР и РМЖ (по 28–38 случаев). Кроме того, нами изучено по 13 образцов РЯ и РТК. На рис. 2 представлены репрезентативные примеры продуктов

Таблица 1. Характеристика праймеров, условий и продуктов ОТ-ПЦР

Ген	Праймер	$T_{отж.}$, °C	Продукт ПЦР, п.н.
<i>RASSF1A</i> *	F: АСТТСАТСТГГГГСГТСГТГ (экз. 1) R: ГГГТГГСТТСТТГСТГГАГГГ (экз. 3)	57	341
<i>B2M</i> **	F: ТГАСТТТГТСАСАГССААГАТАГ (экз. 3) R: САААТГСГГСАТСТТСАААССТС (экз. 4)	64	80

*R-праймер к *RASSF1A* взят из статьи [14] (R182); F-праймер подобран с помощью программы Primer Select из пакета программ LaserGene7 и обозначен далее как F182 (см. ниже рис. 1).

**Праймеры к *B2M* взяты из статьи [31].

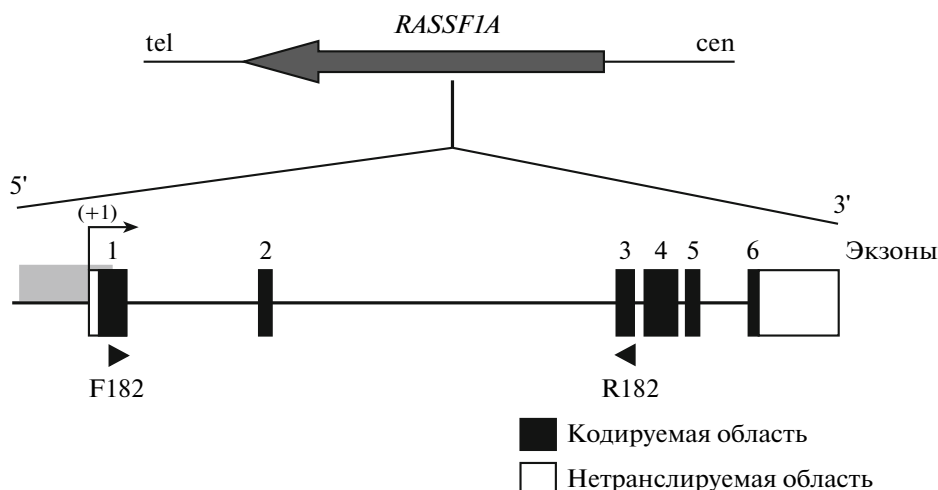


Рис. 1. Схема структурно-функциональной организации гена *RASSF1A* и транскрипта *RASSF1A* (обозначен как ген *RASSF1A*). Показаны экзоны, интроны, транслируемые и нетранслируемые области, старт транскрипции и позиции праймеров, использованных в ОТ-ПЦР (F182, R182). tel — теломера; cen — центромера.

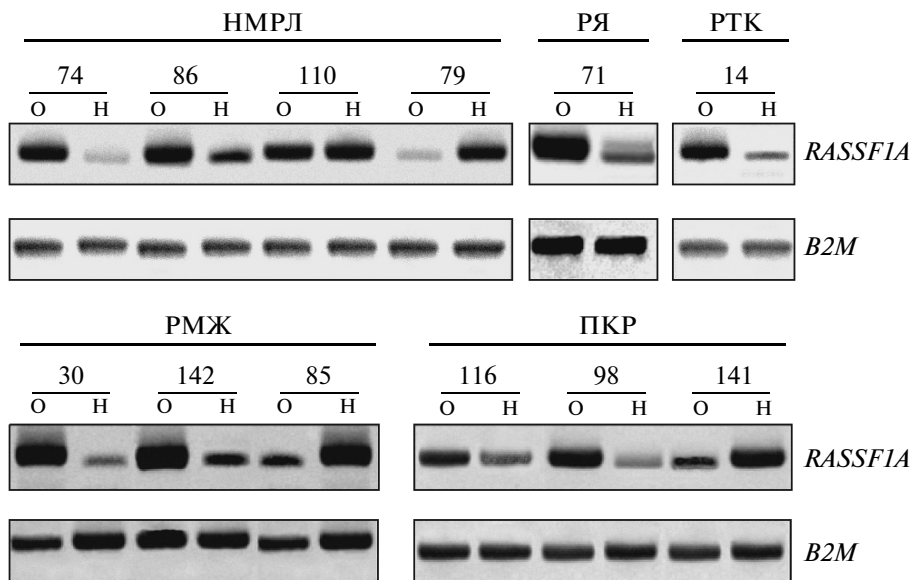


Рис. 2. Репрезентативные примеры амплификации продуктов ОТ-ПЦР гена *RASSF1A* и контрольного гена *B2M* в парных (опухоль/норма) образцах первичных опухолей пяти локализаций. Продукты ПЦР разделяли в 2%-ном агарозном геле. Условия ПЦР и размер амплифицированных фрагментов приведены в табл. 1.

амплификации методом ОТ-ПЦР гена *RASSF1A* и контрольного гена *B2M* из парных (опухоль/норма) образцов каждого из этих видов рака.

На рис. 3а–д графически представлены результаты сравнения содержания мРНК *RASSF1A* в 130 парных образцах опухолевых (пять видов рака) и гистологически нормальных тканей. Учтено увеличение или уменьшение содержания мРНК *RASSF1A* в образцах опухолей по сравнению с нормальной тканью в 5 раз или более. Примечательно, что количество мРНК этого гена в значительной доле образцов каждого вида рака суще-

ственно увеличивалось — до 1000 раз (рис. 2а–д), а снижение составляло только 10–100 раз. Например, в опухолях легкого количество мРНК было в 5–1000 раз больше, чем в нормальной ткани, а в образцах со сниженным количеством мРНК — в 10–100 раз меньше (рис. 2а). В целом, практически при всех пяти видах рака степень повышения уровня мРНК *RASSF1A* оказалась существенно выше, чем степень уменьшения (рис. 2а–д).

Сопоставление частот повышения и понижения содержания мРНК *RASSF1A* также показало неожиданную картину, а именно, более частое (в

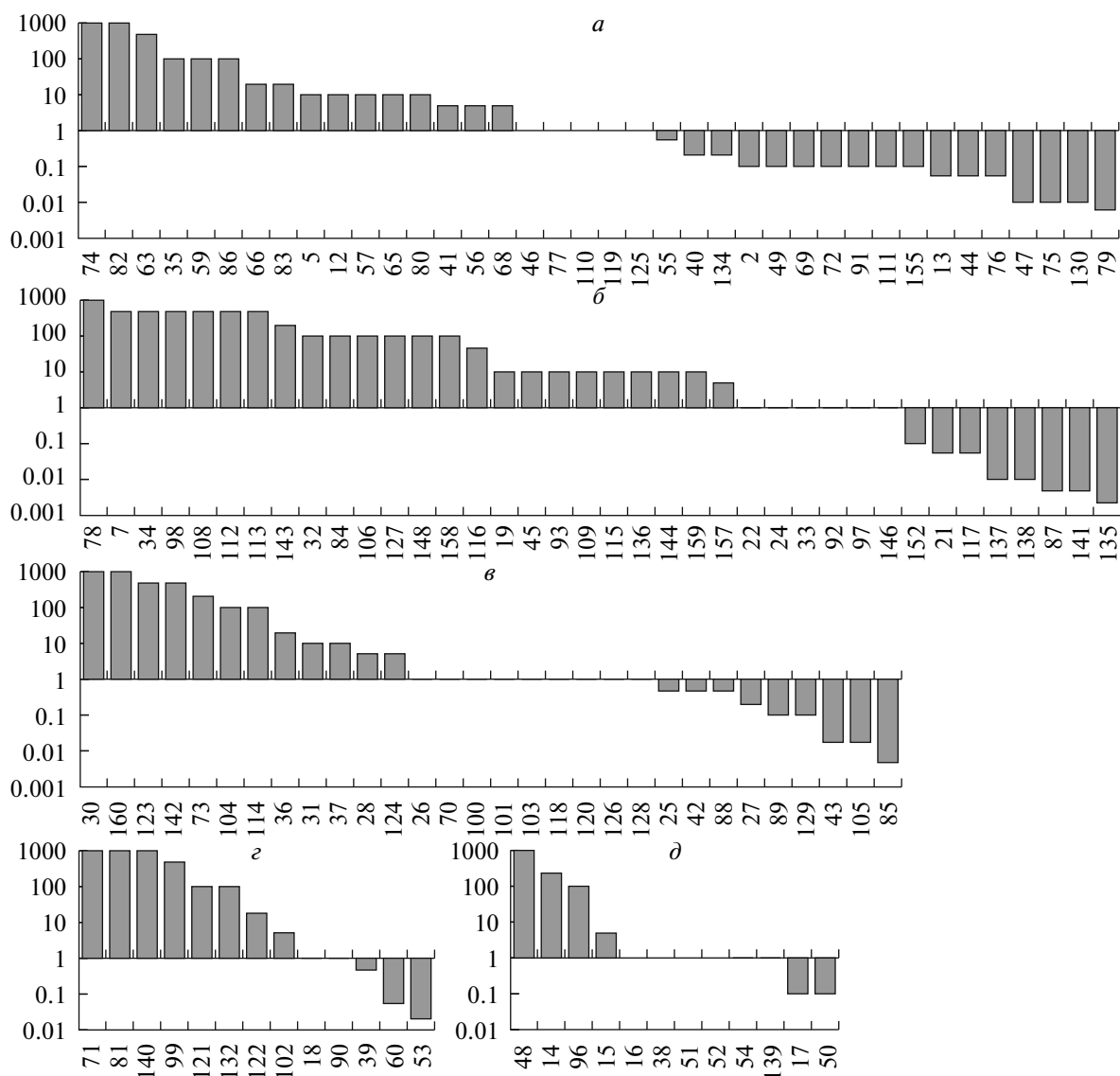


Рис. 3. Данные по соотношению количества мРНК (интенсивностей полос продукта ОТ-ПЦР) гена *RASSF1A* в образцах опухолей и соответствующих образцах гистологически нормальной ткани. Значения интенсивностей полос продукта ОТ-ПЦР гена *RASSF1A* нормировали относительно продукта ОТ-ПЦР контрольного гена *B2M*. Приведены данные для 130 парных образцов пяти видов рака. *а* – НМРЛ, 38 образцов; *б* – ПКР, 38 образцов; *в* – РМЖ, 28 образцов; *г* – РЯ, 13 образцов; *д* – РТК, 13 образцов.

2–7 раз) повышение количества мРНК *RASSF1A* по сравнению с его снижением в первичных эпителиальных опухолях почек, молочной железы, яичника и толстой кишки. Частоты увеличения или уменьшения уровня экспрессии этого гена в пяти видах опухолей эпителиального происхождения суммированы в табл. 2. Повышение экспрессии этого гена статистически чаще наблюдали при ПКР (24/38, 63% против 8/38, 21%, $P = 0.0004$ по Фишеру) и РЯ (8/13, 62% против 2/13, 15%, $P = 0.0114$). Повышение содержания мРНК *RASSF1A* выявлялось вдвое чаще, чем понижение и при РМЖ (12/28, 43% против 6/28, 21%), и при РТК (4/13, 31% против 2/13, 15%). Только при

НМРЛ и увеличение, и уменьшение экспрессии *RASSF1A* встречалось с одинаковой частотой (16/38, 42%), в том числе только при ПРЛ уменьшение количества мРНК наблюдалось несколько чаще, чем увеличение (11/23, 48% против 8/23, 35%), а при АК содержание мРНК *RASSF1A* чаще повышалось, чем снижалось (8/15, 53% против 6/15, 40%).

мРНК гена *RASSF1A* обнаружена в 83% (5 из 6) постмортальных образцов нормальных тканей легкого, яичников и молочной железы, и в 80% (4 из 5) образцов тканей почки, полученных от лиц без онкопатологии. Количество мРНК *RASSF1A* в опухолях на порядки (в 5–1000 раз) от-

личается от содержания в гистологически нормальной ткани того же больного. Эти изменения встречаются с высокой частотой, причем при ПКР, РМЖ, РЯ и РТК в два (или более) раза чаще отмечается повышение экспрессии гена *RASSF1A*.

Изменения уровня экспрессии *RASSF1A* на ранних и поздних стадиях ПРЛ, АК и ск-ПКР

Интересную картину можно наблюдать при рассмотрении разных гистологических видов опухолей легкого (ПРЛ и АК) и почки (ск-ПКР) на ранних (I и II) и поздних (III и IV) стадиях канцерогенеза по отдельности (табл. 3).

Наиболее показательны различия при АК. Так, на ранних стадиях количество мРНК *RASSF1A* в АК увеличивается в 71% (5/7) образцов, а уменьшается – в 29% (2/7) образцов. На поздних стадиях доля образцов, в которых повышено количество мРНК *RASSF1A*, составляет лишь 37% (3/8), а снижение наблюдается, наоборот, несколько чаще – в 50% (4/8) случаев (табл. 3).

Картина, наблюдаемая при ПРЛ, имеет свои особенности (табл. 3). Всего, без разделения по стадиям, содержание мРНК увеличивается в 35% (8/23) образцов, а уменьшается – в 48% (11/23). На ранних стадиях ПРЛ количество мРНК и повышается, и снижается с одинаковой частотой – в 7/16 образцов, 44%. На поздних стадиях количество мРНК гена *RASSF1A* возрастает только в 14% (1/7) образцов, а уменьшается в 57% (4/7) образцов (табл. 3).

При ск-ПКР количество мРНК возрастает с высокой частотой практически независимо от стадии: на ранних (I и II) стадиях – в 59% (13/22) образцов, на поздних (III и IV) стадиях – в 67% (8/12). Доля образцов, в которых снижено количество мРНК, составила на ранних стадиях 32% (7/22), а на поздних – в 4 раза меньше, 8% (1/12).

Таким образом, для АК характерно выраженное преобладание повышенной экспрессии *RASSF1A* (71 *против* 29%) на ранних стадиях, доля таких образцов на поздних стадиях значительно ниже (37%) и заметно увеличивается доля образцов со сниженной экспрессией (до 50%). При ПРЛ выражено преобладание пониженной экспрессии *RASSF1A* (57 *против* 14%) на поздних стадиях развития опухоли. При ск-ПКР повышение экспрессии *RASSF1A* наблюдалось и на ранних (59 *против* 32%), и на поздних (67 *против* 8%) стадиях, причем на поздних стадиях это повышение было статистически значимым ($P = 0.0094$).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Промоторные районы двух главных транскриптов (*RASSF1A* и *RASSF1C*) содержат CpG-островки, разделенные 3.5 т.н. Детальное изуче-

Таблица 2. Частоты повышения и снижения уровня мРНК *RASSF1A* в опухолях, происходящих из пяти разных тканей

Опухоль	<i>P</i> (по Фишеру)	Экспрессия <i>RASSF1A</i>	
		повышение	снижение
НМРЛ	>0.05	16/38, 42%	16/38, 42%
ПКР	0.0004*	24/38, 63%	8/38, 21%
РМЖ	> 0.05	12/28, 43%	6/28, 21%
РЯ	0.0114*	8/13, 62%	2/13, 15%
РТК	>0.05	4/13, 31%	2/13, 15%

* Статистически значимые (≤ 0.05) значения *P*.

ние метилирования CpG-островка гена *RASSF1A*, выполненное ранее, показало, что высокая степень метилирования этого гена присуща опухолям разной локализации [14–18, 22–27, 34, 35]. Особенно высокая степень метилирования, близкая к 60–90%, выявлена в клеточных линиях опухолей легкого и почки [14–18]. Особенности метилирования и изменения экспрессии гена *RASSF1A* в линиях опухолевых клеток, а также данные о способности этого гена подавлять развитие опухолей [14–18, 21, 26] позволили предположить, что и в первичных опухолях содержание мРНК гена *RASSF1A* должно преимущественно снижаться.

Однако результаты проведенного системного исследования показали обратную картину, а именно, более частое (в 2–7 раз) повышение количества мРНК *RASSF1A* в опухолях четырех локализаций. Доля образцов рака почки и РЯ, в которых увеличено содержание мРНК гена *RASSF1A* (63 и 62% соответственно), статистически значимо ($P < 0.05$) в 3–4 раза превышала долю образцов с уменьшенным содержанием мРНК *RASSF1A* (21 и 15%). Доля образцов РМЖ и РТК, в которых увеличено количество мРНК *RASSF1A*, вдвое превышала долю образцов с уменьшенным содержанием мРНК *RASSF1A* (43 *против* 21% при РМЖ и 31 *против* 15% при РТК).

При НМРЛ и повышение, и снижение уровня экспрессии *RASSF1A* встречалось с одинаковой частотой (42%), а при ПРЛ уменьшение количества мРНК наблюдали даже несколько чаще, чем увеличение (48 *против* 35%).

Эти данные указывают на опухоль-специфичность изменения экспрессии гена *RASSF1A*. Ранее мы выявили опухоль-специфичные различия в экспрессии гена *SEMA3B* [30]. Количество мРНК *SEMA3B* значимо часто снижалось при ПКР, сравнительно часто – при РЯ и РТК, однако в опухолях легкого и молочной железы экспрессия повышалась примерно с той же частотой, как и снижалась. Выраженное преобладание повышенной экспрессии гена *RASSF1A*, напротив, от-

мечено в четырех видах опухолей – ПКР, РЯ, РТК и РМЖ. Сходные особенности экспрессии этих генов можно отметить при НМРЛ, при котором не выявлено преимущественного повышения или понижения экспрессии генов *RASSF1A* или *SEMA3B* [30].

Показанное нами изменение экспрессии гена *RASSF1A* при НМРЛ и РЯ хорошо согласуется с данными других авторов. Так, количество мРНК этого гена снижается при НМРЛ (67%) [36], причем при ПРЛ несколько чаще, чем при АК. В нашей работе содержание мРНК гена *RASSF1A* уменьшалось в 48% (11/23) образцов ПРЛ и в 40% (6/15) АК. Согласно [36], снижение количества мРНК этого гена коррелирует с прогрессией ПРЛ (на уровне тенденции) и АК (статистически значимо). Аналогичные закономерности прослеживаются и нами – число образцов со сниженной экспрессией гена *RASSF1A* выше на более поздних стадиях и ПРЛ, и АК, причем корреляция между изменением экспрессии и клинической стадией АК более выражена – по мере прогрессии заболевания возрастает доля образцов со сниженным количеством мРНК – от 29 до 50%. Кроме того, при прогрессии АК доля образцов с повышенной экспрессией гена *RASSF1A* снижается от 71 до 29%.

Метилирование *RASSF1A* обнаружено в половине (53%) образцов РЯ [37], причем в значительной доле образцов с метилированным *RASSF1A* снижена экспрессия этого гена. Мы анализировали выборку из 13 образцов РЯ, в 15% (2/13) из которых обнаружено снижение и в 62% (8/13) – повышение уровня мРНК *RASSF1A*.

Отмеченное преобладание повышенной экспрессии *RASSF1A* в опухолях почки, молочной железы, яичника и толстой кишки можно рассматривать как указание на двойственные функции этого гена в эпителиальных опухолях. А именно, роль этого гена может заключаться не только в подавлении опухолевого роста, но и при определенных условиях, например при отдельных мутациях, в стимуляции онкогенеза. С другой стороны, можно предположить, что опреде-

ленные мутации могут приводить и к повышенной транскрипции, и к нарушению структуры и функции белкового продукта гена, что не противоречит способности данного гена участвовать в подавлении опухолевого роста [15–17, 21]. Обе версии возможны в контексте сведений о повышенном уровне мутаций гена *RASSF1A* в опухолях [38].

Следует отметить, что увеличение экспрессии *RASSF1A* в опухоли по сравнению с нормальной тканью может быть частично связано и с другими факторами, например, с возможной гиперэкспрессией этого гена в стромальных компонентах опухоли, а также с компенсаторным повышением экспрессии оставшегося аллеля при потере гетерозиготности или метилировании одного из аллелей.

Известно также, что классический ген-супрессор *p53* в результате определенных мутаций приобретает свойства онкогена [39]. Повышенное содержание мРНК ряда других генов-супрессоров (обладающих способностью подавлять рост линий опухолевых клеток и рост опухолей в мышцах с иммунодефицитом), например гена *RBSP3/CTDSPL*, обнаружено в первичных опухолях, что сопряжено с мутациями [38, 40].

Таким образом, в представленной работе изучена экспрессия гена *RASSF1* (транскрипта *RASSF1A*) в различных эпителиальных опухолях. Показано, что в опухолях разного типа может наблюдаться как инактивация, так и гиперэкспрессия *RASSF1A*. Кроме того, изменение уровня экспрессии *RASSF1A* при раке легкого ассоциировано с прогрессией первичной опухоли.

До недавнего времени ген *RASSF1* считали “классическим” геном-супрессором, инактивация которого происходит в соответствии с двухударной моделью Кнадсена. Данные о гиперэкспрессии *RASSF1A* в части образцов рака почки, молочной железы, яичника и толстой кишки заставляют по-новому рассматривать возможные функции этого гена и как супрессора, и как протоонкогена, в различных внутриклеточных сигнальных путях.

Таблица 3. Частоты изменения уровня мРНК *RASSF1A* на ранних и поздних стадиях плоскоклеточного рака легкого (ПРЛ), аденокарциномы легкого (АК) и светлоклеточного почечноклеточного рака (ск-ПКР)

Стадия	Вид рака	НМРЛ*		ск-ПКР
		ПРЛ	АК	
I + II	<i>P</i> (по Фишеру)	>0.05	>0.05	>0.05
	Повышение экспрессии	7/16, 44%	5/7, 71%	13/22, 59%
	Снижение экспрессии	7/16, 44%	2/7, 29%	7/22, 32%
III + IV	<i>P</i> (по Фишеру)	>0.05	>0.05	<u>0.0094**</u>
	Повышение экспрессии	1/7, 14%	3/8, 37%	8/12, 67%
	Снижение экспрессии	4/7, 57%	4/8, 50%	1/12, 8%

* НМРЛ – немелкоклеточный рак легкого.

** Статистически значимые (≤ 0.05) значения *P*.

Можно отметить, что принятое разделение на онкогены и гены-супрессоры в целом достаточно условно, поскольку с появлением новых методов и подходов наши представления о роли тех или иных генов и их взаимосвязи могут значительно меняться.

Полученные нами данные могут найти применение в диагностике и прогнозе течения РЯ и ПКР. Кроме того, получены предварительные данные о новых возможных критериях прогрессии АК и ПЛР.

Работа получила финансовую поддержку Российского фонда фундаментальных исследований (10-04-01213-а, 11-04-00269) и Минобрнауки в рамках Федеральных целевых программ “Научные и научно-педагогические кадры инновационной России” (ГК 16.740.11.0173) и “Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технического комплекса России на 2007–2013 годы” (ГК № 16.552.11.7029).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kok K., Naylor S.L., Buys C.H.C.M. 1997. Deletions of the short arm of chromosome 3 in solid tumors and the search for suppressor genes. *Adv. Cancer Res.* **71**, 27–92.
2. Lerman M.I., Minna J.D. 2000. The 630-kb lung cancer homozygous deletion region on human chromosome 3p21.3: identification and evaluation of the resident candidate tumor suppressor genes. *Cancer Res.* **60**, 6116–6133.
3. Braga E., Pugacheva E., Bazov I., Ermilova V., Kazubskaya T., Mazurenko N., Kissel'ov F., Liu J., Garkavtseva R., Zabarovsky E., Kisselev L. 1999. Comparative allelotyping of the short arm of human chromosome 3 in epithelial tumors of four different types. *FEBS Lett.* **454**, 215–219.
4. Braga E., Senchenko V., Bazov I., Loginov W., Liu J., Ermilova V., Kazubskaya T., Garkavtseva R., Mazurenko N., Kissel'ov F., Lerman M., Klein G., Kisselev L., Zabarovsky E. 2002. Critical tumor-suppressor gene regions on chromosome 3P in major human epithelial malignancies: allelotyping and quantitative real-time PCR. *Int. J. Cancer.* **100**, 534–541.
5. Логинов В.И., Базов И.В., Ходырев Д.С., Пронина И.В., Казубская Т.П., Ермилова В.Д., Гарькавцева Р.Ф., Забаровский Е.Р., Брага Э.А. 2008. Районы потенциальных генов-супрессоров эпителиальных опухолей почки, молочной железы и яичников на хромосоме 3 человека. *Генетика.* **44**, 250–256.
6. Braga E., Loginov W., Hodyrev D., Pronina I., Kazubskaya T., Bogatyrova O., Kashuba V.I. 2011. A novel MECA3 region in human 3p21.3 harboring putative tumor suppressor genes and oncogenes. *Exp. Oncol.* **33**, 33–41.
7. Wei M.-H., Latif F., Bader F., Kashuba V., Chen J.-J., Duh F.-M., Sekido Y., Lee C.-C., Geil L., Kuzmin I., Zabarovsky E., Klein G., Zbar B., Minna J.D., Lerman M.I. 1996. Construction of a 600-kilobase cosmid clone contig and generation of a transcriptional map surrounding the lung cancer tumor suppressor gene (TSG) locus on human chromosome 3p21.3: progress toward the isolation of a lung cancer TSG. *Cancer Res.* **56**, 1487–1492.
8. Брага Э.А., Кашуба В.И., Малукова А.В., Логинов В.И., Сенченко В.Н., Базов И.В., Киселев Л.Л., Забаровский Е.Р. 2003. Новые гены-супрессоры опухолевого роста в горячих точках хромосомы 3 человека: новые методы идентификации. *Молекуляр. биология.* **37**, 194–211.
9. Брага Э.А., Киселев Л.Л., Забаровский Е.Р. 2004. От идентификации геномного полиморфизма к диагностическим и прогностическим маркерам эпителиальных опухолей человека. *Молекуляр. биология.* **38**, 179–190.
10. Senchenko V., Liu J., Braga E., Mazurenko N., Loginov W., Seryogin Y., Bazov I., Kissel'ov F., Kashuba V., Lerman M.I., Klein G., Zabarovsky E. 2003. Deletion mapping of cervical carcinomas using quantitative real-time PCR identifies two frequently affected regions in 3p21.3. *Oncogene.* **22**, 2984–2992.
11. Senchenko V., Liu J., Loginov W., Bazov I., Angeloni D., Seryogin Y., Ermilova V., Kazubskaya T., Garkavtseva R., Zabarovska V., Kashuba V., Kisselev L.L., Minna J.D., Lerman M.I., Klein G., Braga E., Zabarovsky E.R. 2004. Discovery of frequent homozygous deletions in chromosome 3p21.3 LUCA and AP20 regions in renal, lung and breast carcinomas. *Oncogene.* **23**, 5719–5728.
12. Li J., Wang F., Haraldson K., Protopopov A., Duh F.-M., Geil L., Kuzmin I., Minna J.D., Stanbridge E., Braga E., Kashuba V., Klein G., Lerman M.I., Zabarovsky E.R. 2004. Functional characterization of the candidate tumor suppressor gene *NPRL2/G21* located in 3p21.3C. *Cancer Res.* **64**, 6438–6443.
13. Kashuba V.I., Li J., Wang F., Senchenko V.N., Protopopov A., Malyukova A., Kutsenko A.S., Kadyrova E., Zabarovska V.I., Muravenko O.V., Zelenin A.V., Kisselev L.L., Kuzmin I., Minna J.D., Winberg G., Ernberg I., Braga E., Lerman M.I., Klein G., Zabarovsky E.R. 2004. *RBSP3 (HYA22)* is a tumor suppressor gene implicated in major epithelial malignancies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **101**, 4906–4911.
14. Burbee D.G., Forgacs E., Zochbauer-Muller S., Shivakumar L., Fong K., Gao B., Randle D., Kondo M., Virmani A., Bader S., Sekido Y., Latif F., Milchgrub S., Toyooka S., Gazdar A.F., Lerman M.I., Zabarovsky E., White M., Minna J.D. 2001. Epigenetic inactivation of *RASSF1A* in lung and breast cancers and malignant phenotype suppression. *J. Natl. Cancer Inst.* **93**, 691–699.
15. Dreijerink K., Braga E., Kuzmin I., Geil L., Duh F.-M., Angeloni D., Zbar B., Lerman M.I., Stanbridge E.J., Minna J.D., Protopopov A., Li J., Kashuba V., Klein G., Zabarovsky E. 2001. The candidate tumor suppressor gene, *RASSF1A*, from human chromosome 3p21.3 is involved in kidney tumorigenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **98**, 7504–7509.
16. Zabarovsky E.R., Lerman M.I., Minna J.D. 2002. Tumor suppressor genes on chromosome 3p involved in the pathogenesis of lung and other cancers. *Oncogene.* **21**, 6915–6935.
17. Dammann R., Li C., Yoon J.H., Chin P.L., Bates S., Pfeifer G.P. 2000. Epigenetic inactivation of a RAS association domain family protein from the lung tumour suppressor locus 3p21.3. *Nat. Genet.* **25**, 315–319.

18. Пфайфер Г.П., Дамманн Р. 2005. Метилирование гена опухолевого супрессора *RASSF1A* в человеческих опухолях. *Биохимия*. **70**, 699–708.
19. Shivakumar L., Minna J., Sakamaki T., Pestell R., White M.A. 2002. The *RASSF1A* tumor suppressor blocks cell cycle progression and inhibits cyclin D1 accumulation. *Mol. Cell Biol.* **22**, 4309–4318.
20. Vos M.D., Ellis C.A., Bell A., Birrer M.J., Clark G.J. 2000. Ras uses the novel tumor suppressor *RASSF1* as an effector to mediate apoptosis. *J. Biol. Chem.* **275**, 35669–35672.
21. Tommasi S., Dammann R., Zhang Z., Wang Y., Liu L., Tsark W.M., Wilczynski S.P., Li J., You M., Pfeifer G.P. 2005. Tumor susceptibility of *Rassf1a* knockout mice. *Cancer Res.* **65**, 92–98.
22. Hu J., Li H., Shi T., Ma X., Wang B., Xu H., Ai X., Ju Z., Wang C., Zhang G., Zhang X. 2008. Relationship between the expression of *RASSF1A* protein and promoter hypermethylation of *RASSF1A* gene in bladder tumor. *J. Huazhong Univ. Sci. Technol. Med. Sci.* **28**, 182–184.
23. Lorente A., Mueller W., Urdangarín E., Lázcoz P., Lass U., von Deimling A., Castresana J.S. 2009. *RASSF1A*, *BLU*, *NORE1A*, *PTEN* and *MGMT* expression and promoter methylation in gliomas and glioma cell lines and evidence of deregulated expression of de novo DNMTs. *Brain Pathol.* **19**, 279–292.
24. Логинов В.И., Ходырев Д.С., Пронина И.В., Казубская Т.П., Ермилова В.Д., Гарькавцева Р.Ф., Брага Э.А. 2009. Метилирование промоторной области гена *RASSF1A* и частота аллельных дисбалансов в критических районах хромосомы 3 коррелируют с прогрессией светлоклеточного рака почки. *Молекуляр. биология*. **43**, 429–438.
25. Chou C.H., Lee K.-M., Choi J.J., Kim T.-J., Kim W.Y., Lee J.-W., Lee S.-J., Lee J.-H., Bae D.-S., Kim B.-G. 2007. Hypermethylation and loss of heterozygosity of tumor suppressor genes on chromosome 3p in cervical cancer. *Cancer Lett.* **255**, 26–33.
26. Liu X., Dai X., Wu B. 2009. Study of 5-Aza-CdR on transcription regulation of *RASSF1A* gene in the BIU87 cell line. *Urol. Int.* **82**, 108–112.
27. Логинов В.И., Малукова А.В., Серегин Ю.А., Ходырев Д.С., Казубская Т.П., Ермилова В.Д., Гарькавцева Р.Ф., Киселев Л.Л., Забаровский Е.Р., Брага Э.А. 2004. Уровень метилирования гена *RASSF1A* в эпителиальных опухолях почки, молочной железы и яичников. *Молекуляр. биология*. **38**, 654–667.
28. Брага Э.А., Логинов В.И., Климов Е.А., Килосанидзе Г., Ходырев Д.С., Каганова Н.Л., Казубская Т.П., Ермилова В.Д., Гарькавцева Р.Ф., Пронина И.В., Рудько О.И., Забаровский Е.Р., Сулимова Г.Е., Киселев Л.Л. 2006. Активация транскрипции гена *RHOA* в эпителиальных опухолях может быть вызвана умножением копий гена и/или деметилированием его промоторной области. *Молекуляр. биология*. **40**, 865–877.
29. Chomczynski P., Sacchi N. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* **162**, 156–159.
30. Пронина И.В., Логинов В.И., Прасолов В.С., Климов Е.А., Ходырев Д.С., Казубская Т.П., Гарькавцева Р.Ф., Сулимова Г.Е., Брага Э.А. 2009. Изменение уровня экспрессии гена *SEMA3B* в эпителиальных опухолях. *Молекуляр. биология*. **43**, 439–445.
31. Angeloni D., ter Elst A., Wei M.H., van der Veen A.Y., Braga E.A., Klimov E.A., Timmer T., Korobeinikova L., Lerman M.I., Buys C.H. 2006. Analysis of a new homozygous deletion in the tumor suppressor region at 3p12.3 reveals two novel intronic noncoding RNA genes. *Genes Chromosomes Cancer.* **45**, 676–691.
32. Ходырев Д.С., Логинов В.И., Пронина И.В., Казубская Т.П., Забаровский Е.Р., Брага Э.А. 2011. Изменение метилирования генов из критических районов хромосомы 3 в эпителиальных опухолях. *Молекуляр. медицина*. **1**, 3–10.
33. Zabarovsky E.R., Braga E.A., Loginov V., Senchenko V., Kudryavtseva A., Dmitriev A., Khodyrev D., Pavlova T., Rynditch A.V., Lerman M.I., Kashuba V. 2010. Novel methylation-dependent markers/tumor suppressor genes involved in the development of renal cell cancer. *Horizons in Cancer Research*. Nova Sci. Publ., Inc., **42**, 1–18.
34. Karray-Chouayekh S., Trifa F., Khabir A., Boujelbane N., Sellami-Boudawara T., Daoud J., Frikha M., Jlidi R., Gargouri A., Mokdad-Gargouri R. 2010. Aberrant methylation of *RASSF1A* is associated with poor survival in Tunisian breast cancer patients. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **136**, 203–210.
35. Onay H., Pehlivan S., Koyuncuoglu M., Kirkali Z., Ozkinay F. 2009. Multigene methylation analysis of conventional renal cell carcinoma. *Urol. Int.* **83**, 107–112.
36. Senchenko V.N., Anedchenko E.A., Kondratieva T.T., Krasnov G.S., Dmitriev A.A., Zabarovska V.I., Pavlova T.V., Kashuba V.I., Lerman M.I., Zabarovsky E.R. 2010. Simultaneous down-regulation of tumor suppressor genes *RBSP3/CTDSPL*, *NPRL2/G21* and *RASSF1A* in primary non-small cell lung cancer. *BMC Cancer.* **10**, 75.
37. Ma L., Guo Q., Ma Y., Liu F.R., Shen X.Y. 2009. Clinicopathological implications of inactivation of *RASSF1A* in serous epithelial ovarian cancers. *Eur. J. Gynaecol. Oncol.* **30**, 370–374.
38. Kashuba V.I., Pavlova T.V., Grigorieva E.V., Kutsenko A., Yenamandra S.P., Li J., Wang F., Protopopov A.I., Zabarovska V.I., Senchenko V., Haraldson K., Eshchenko T., Kobliakova J., Vorontsova O., Kuzmin I., Braga E., Blinov V.M., Kisselev L.L., Zeng Y.X., Ernberg I., Lerman M.I., Klein G., Zabarovsky E.R. 2009. High mutability of the tumor suppressor genes *RASSF1* and *RBSP3 (CTDSPL)* in cancer. *PLoS One.* **4**, e5231.
39. Jenkins J.R., Rudge K., Chumakov P., Currie G.A. 1985. The cellular oncogene p53 can be activated by mutagenesis. *Nature.* **317**, 816–818.
40. Kashuba V.I., Li J., Wang F., Senchenko V.N., Protopopov A., Malyukova A., Kutsenko A.S., Kadyrova E., Zabarovska V.I., Muravenko O.V., Zelenin A.V., Kisselev L.L., Kuzmin I., Minna J.D., Winberg G., Ernberg I., Braga E., Lerman M.I., Klein G., Zabarovsky E.R. 2004. *RBSP3 (HYA22)* is a tumor suppressor gene implicated in major epithelial malignancies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **101**, 4906–4911.