

УДК 577.29:616-006.66

ГЕТЕРОГЕННАЯ ЭКСПРЕССИЯ ГЕНА *CD38* В ОПУХОЛЕВЫХ ОЧАГАХ БОЛЬНЫХ РАКОМ ТОЛСТОГО КИШЕЧНИКА

© 2012 г. А. Д. Перенков^{1*}, Д. В. Новиков¹, Н. А. Сахарнов¹, А. В. Алясова², О. В. Уткин¹, А. Ю. Барышников³, В. В. Новиков¹

¹Научно-исследовательский институт молекулярной биологии и региональной экологии Нижегородского государственного университета им. Н.И. Лобачевского, Нижний Новгород, 603950

²Нижегородская государственная медицинская академия, Нижний Новгород, 603005

³Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина Российской академии медицинских наук, Москва, 115478

Поступила в редакцию 10.02.2012 г.

Принята к печати 14.03.2012 г.

Ген *CD38* кодирует мембранный белок, участвующий в адгезии клеток и катализирующий образование циклической АДФ-рибозы. Методом ОТ-ПЦР определяли, имеются ли полноразмерная и альтернативная формы мРНК гена *CD38* в образцах опухолевых очагов больных раком толстого кишечника и в клетках опухолевых линий. Показано, что в опухолевых очагах больных присутствуют клетки, в которых происходит устойчивая экспрессия гена *CD38*, причем альтернативная форма мРНК этого гена обнаруживается реже, чем полноразмерная. Клетки линий Colo-205, Т-84, НСТ15 и НСТ116 содержат мРНК, в клетках линий Сасо-2 и SW-620 ее нет. На стадии I рака толстого кишечника ген *CD38* экспрессируется в клетках опухолевых очагов во всех случаях. На стадиях II, III и IV заболевания экспрессия гена наблюдается статистически реже. Частота обнаружения мРНК гена *CD38* не зависит от локализации опухолевых очагов, степени дифференцировки опухоли и наличия метастазов. Методом рестрикционного анализа во всех тестированных образцах опухолевых очагов — независимо от наличия или отсутствия мРНК гена *CD38* — обнаружено метилирование CpG в областях связывания транскрипционного фактора Sp1 и рецептора ретиноевой кислоты (RARE). Эти данные свидетельствуют о гетерогенной экспрессии гена *CD38* в опухолевых клетках больных раком толстого кишечника.

Ключевые слова: белок CD38, ген *CD38*, альтернативные формы мРНК CD38, метилирование ДНК, опухолевые очаги, клеточные линии, рак толстого кишечника.

HETEROGENEOUS EXPRESSION OF *CD38* GENE IN TUMOR TISSUE IN PATIENTS WITH COLORECTAL CANCER, by A. D. Perenkov^{1*}, D. V. Novikov¹, N. A. Sakharnov¹, A. V. Alyasova², O. V. Utkin¹, A. Yu. Baryshnikov³, V. V. Novikov¹ (¹Institute of Molecular Biology and Regional Ecology, Lobachevsky State University of Nizhni Novgorod, Nizhni Novgorod, 603950 Russia, *e-mail: mbre@mail.ru; ²Nizhny Novgorod State Medical Academy, Nizhni Novgorod, 603005 Russia; ³Blokhin Russian Cancer Research Center, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow, 115478 Russia). The *CD38* gene codes a membrane protein which takes part in cell adhesion and catalyzes the formation of cyclic ADP-ribose. Using RT-PCR method we tested the presence of full-size and alternative forms of mRNA *CD38* in samples of tumor tissue of patients with colorectal cancer and in tumor cell lines. It was shown that there are the cells in the tumor tissue which expressed *CD38* gene. In tumor tissue of patients the alternative form of mRNA *CD38* was detected less frequently than full-size form. Cells of lines Colo-205, T-84, HCT15 and HCT116 contained mRNA *CD38*, in cells of lines Caco-2 and SW-620 mRNA *CD38* was absent. In cells of tumor tissue on the first stage of colorectal cancer *CD38* gene was expressed in 100% of cases. On the second, third and fourth stages of the disease gene expression was observed less often. The frequency of mRNA *CD38* detection did not depend on tumor localization, tumor grade and presence of metastases. Using method of restriction analysis the CpG methylation was detected in binding sites of transcription factor Sp1 and receptor of retinoic acid (RARE) in all tested samples of tumor tissue independently of the presence or absence of mRNA *CD38*. The obtained data suggest that in the tumor cells of patients with colorectal cancer the expression of the *CD38* gene is heterogeneous.

Keywords: protein CD38, *CD38* gene, alternative forms of mRNA *CD38*, methylation, tumor tissue, cell line, colorectal cancer.

* Эл. почта: Perenkov@yandex.ru

Рак толстого кишечника одно из самых распространенных онкологических заболеваний. Многие гены генома раковой клетки толстого кишечника гипо- и гиперметилированы. Это приводит к активации одних генов, молчащих в нормальной ткани, и подавлению других [1]. У человека ген *CD38* расположен на четвертой хромосоме (4p15) и состоит из восьми экзонов. Его промотор не имеет классического ТАТА-бокса и содержит на 5'-конце CpG-островок длиной 900 п.н., который включает в себя первый экзон и 5'-конец интрона, содержит сайты связывания транскрипционных факторов. Предполагается, что метилирование участков связывания с транскрипционными факторами задействовано в регуляции экспрессии гена *CD38* [2, 3].

Наряду с мРНК, кодирующей полноразмерную форму молекулы *CD38*, в клетках образуется альтернативная форма мРНК, в которой делетирован третий экзон. Эта делеция (136 н.) приводит к сбою рамки считывания и образованию стоп-кодона в начале четвертого экзона. Предполагается, что альтернативный вариант мРНК – регуляторный по отношению к полноразмерной форме [4].

Ген *CD38* кодирует трансмембранный гликопротеин второго типа, который обнаруживается на поверхности многих типов клеток и, как предполагают, является маркером активации лимфоцитов. Белок обладает энзиматической активностью и катализирует образование циклической ADP-рибозы, а также выполняет функцию молекулы адгезии [5]. Лигандом молекулы *CD38* служит белок *CD31*. Наряду с мембранной формой, имеется растворимая форма молекулы *CD38*, образующаяся путем протеолитического отщепления с поверхности клетки. Содержание этой формы повышается при активации иммунной системы и при некоторых онкологических заболеваниях, что позволяет судить по ее концентрации о прогнозе течения хронического лимфолейкоза [3], лимфогранулематоза и рака молочной железы [6].

На сайте <http://www.proteinatlas.org> представлена информация о том, что в клетках железистой ткани кишечника белок *CD38* иммунологическими методами не обнаруживается. Однако известно, что ткань толстого кишечника пронизана лимфоидной тканью и инфильтрована лимфоидными клетками с активированным геном *CD38* [3]. Анализ клеточных линий, ведущих свое происхождение от злокачественных опухолей толстого кишечника, показал, что на поверхности клеток линии HR8348 имеется белок *CD38* [7], а в базе данных (<http://www.genecards.org>) указано присутствие мРНК гена *CD38* в клетках линии НСТ116. Это свидетельствует о том, что в опухолевых клетках больных раком толстого кишечника может происходить экспрессия гена *CD38*, однако частота этого события и роль гена в развитии опухоли остаются не исследованными.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Исследовали 47 образцов опухолевых очагов и 10 образцов периферической крови больных раком толстого кишечника, проходивших лечение в Нижегородской областной клинической больнице им. Н.А. Семашко и Нижегородском областном онкологическом диспансере. В работе использовали клеточные линии Сасо-2, Colo-205, SW-620, Т-84, НСТ15, НСТ116, хранящиеся в банке клеток Российского онкологического научного центра РАМН, а также 10 образцов периферической крови здоровых добровольцев. Суммарную РНК выделяли из 200 мкл периферической крови или 300 мкл суспензии клеток указанных выше линий (около 5 млн. клеток/мл). Для выделения суммарной РНК использовали также фрагменты опухолевых очагов диаметром 0.5–1 см, которые после извлечения помешали в 1 мл лизирующего буфера (4 М гуанидинтиоцианат, 0.025 М цитрат натрия, 0.5% Тритон Х-100) и замораживали при -20°C. Далее в опытах использовали по 200 мкл полученного лизата клеток.

РНК из исследуемых образцов выделяли, как описано ранее [8]. В реакцию обратной транскрипции добавляли по 2 мкл тотальной РНК, обратный праймер *CD38-R1* (5'-AAgAAACTTgTCaggTCTgT-3') и обратную транскриптазу М-MuLV ("Fermentas", Латвия). кДНК амплифицировали методом ПЦР в два раунда. В первом проводили 35 циклов с праймерами *CD38-F1* (5'-СТАТGGССААСТGCGAGT-TC-3') и *CD38-R1* при следующих температурных условиях: 94°C – 30 с, 57°C – 30 с, 72°C – 45 с. Во втором раунде для одновременной детекции полноразмерной и альтернативной форм мРНК гена *CD38* проводили 25 циклов ПЦР с праймерами *CD38-F2* (5'-АТGAGACATGТАGACT-GCCA-3') и *CD38-R2* (5'-АТССАТТGAGCATCA-CATGG-3') при следующих условиях: 94°C – 30 с, 62°C – 30 с, 72°C – 45 с. Для выявления только альтернативной формы мРНК гена *CD38* проводили 25 циклов ПЦР с праймерами *CD38-F2* (5'-АТGAGACATGТАGACTGССА-3') и *CD38-R3* (5'-GATAGTTTATTTCTGTTC-3') при следующих условиях: 94°C – 30 с, 60°C – 30 с, 72°C – 25 с. Продукты ОТ-ПЦР определяли электрофоретически в 2%-ном агарозном геле.

Для секвенирования фрагменты кДНК вырезали из агарозного геля, очищали с использованием набора DNA Extraction Kit ("Fermentas") и проводили реакцию терминирования с использованием набора BigDye Terminator v3.1 cycle sequencing kit ("Applied Biosystems", USA), согласно рекомендациям производителя. Результаты реакции регистрировали на генетическом анализаторе ABI Prizm 3130 Genetic Analyzer ("Applied Biosystems", USA).

При анализе метилирования CpG геномную ДНК выделяли из биологических образцов, используя смеси фенола с хлороформом, и осажда-

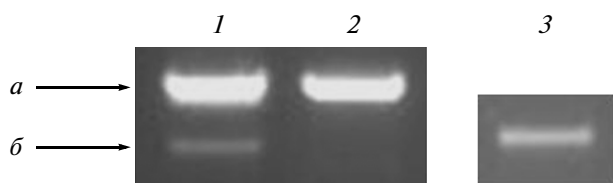


Рис. 1. Электрофореграммы фрагментов кДНК гена *CD38*, полученных с помощью метода одновременной детекции полноразмерной и альтернативной форм мРНК в крови доноров (1); при анализе этим же методом одного из опухолевых очагов (2); при использовании метода детекции только альтернативной формы мРНК в крови доноров (3). *a* – полноразмерная форма кДНК *CD38*; *b* – альтернативная форма кДНК *CD38*.

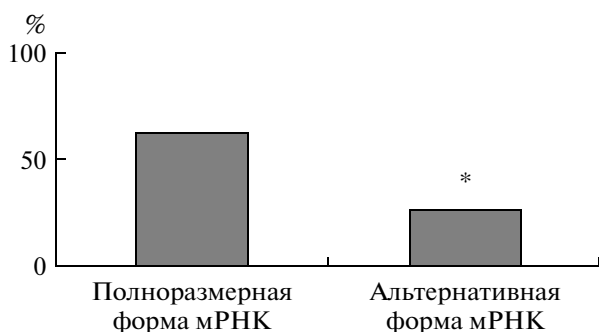


Рис. 2. Частота обнаружения мРНК гена *CD38* у больных раком толстого кишечника.

* – Статистически значимые различия ($p < 0.05$).

ли этанолом. Для контроля полноты гидролиза препарат ДНК смешивали с ДНК плазмиды pPicZα2alb, которая описана ранее [9], и проводили дополнительную очистку ДНК с использованием набора DNA Extraction Kit (“Fermentas”). ДНК гидролизовали эндонуклеазами рестрикции AciI и HpaII (“Fermentas”). Результаты реакции оценивали методом ПЦР. Для изучения метилирования гена *CD38* использовали праймеры CD38FR (5'-AGATGCAGGGTGTCTGCTGAC-3') и CD38RR (5'-AACCCTTAAGTGTCTCTG-3'), для плазмиды pPicZα2alb – праймеры AOXF (5'-ACTGGTTC-CAATTGACAAGC-3') и AOXR (5'-CAAATGGCAT-TCTGACATCC-3'). Нуклеотидные последовательности мРНК *CD38* (NM001775.2 и D84277.1) анализировали, используя компьютерные программы пакета DNASTAR.

Для статистической обработки данных использовали пакет программ Statistica 8.0. Для сравнения относительных частот исследуемых признаков в группах использовали критерий “%”. Различия считали статистически значимыми при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

На первом этапе был разработан метод обнаружения мРНК гена *CD38*. На основе анализа нук-

леотидных последовательностей мРНК *CD38* сконструировали праймеры, позволяющие выявлять с помощью ОТ-ПЦР полноразмерную и альтернативную форму мРНК *CD38* с делецией третьего экзона. Расчетная длина продуктов ПЦР при одновременной детекции полноразмерной и альтернативной форм мРНК составляет 403 п.н. для полноразмерной мРНК *CD38* и 267 п.н. для альтернативной. Расчетная длина продукта ПЦР при определении только альтернативной формы мРНК *CD38* составляет 147 п.н. При одновременной детекции полноразмерной и альтернативной форм мРНК получали два фрагмента кДНК, мигрировавших в геле с разной скоростью. С помощью второго метода получен один фрагмент (рис. 1). Далее определяли последовательности полученных фрагментов, которые сравнивали с нуклеотидной последовательностью мРНК *CD38*. Эти последовательности соответствуют полноразмерной или альтернативной формам мРНК гена. Метод обнаружения только альтернативной формы использовали как дополнительный при тестировании материала, исследованного первым методом.

Разработанные методы испытывали на 10 образцах периферической крови здоровых волонтеров и 10 больных раком толстого кишечника. Во всех образцах крови обнаруживали как полноразмерную форму мРНК, так и альтернативную.

При тестировании образцов опухолевых очагов больных раком толстого кишечника на присутствие мРНК гена *CD38* показано, что полноразмерная форма обнаруживается в 62% случаев (29 из 47 образцов), а альтернативная – в 26% (12 из 47 образцов), т.е. альтернативная форма мРНК гена *CD38* регистрируется с помощью разработанных методов статистически реже (в 2.4 раза), чем полноразмерная ($p < 0.001$). При этом альтернативная форма обнаруживается только, если имеется и полноразмерная форма. У больных, клетки опухолевых очагов которых дают положительный результат на мРНК гена *CD38*, только в 42% случаев обнаруживаются обе формы мРНК, а у остальных выявляется лишь полноразмерная форма мРНК (рис. 2).

мРНК определяли в клетках шести линий, происходящих от опухолевых клеток больных раком толстого кишечника. В линиях Caco-2 и SW-620 мРНК гена *CD38* не выявляется, в то время как в линиях Colo-205, T-84, HCT15 и HCT116 обнаруживается полноразмерная форма мРНК. В клетках линии Colo-205 найдена и альтернативная форма (рис. 3).

Далее анализировали частоту обнаружения мРНК гена *CD38* в опухолевых очагах больных при разной степени дифференцировки опухоли, при наличии или отсутствии метастазов, при разной локализации опухоли и на разных стадиях опухолевого процесса.

Различий при сравнении частоты выявления мРНК гена *CD38* у больных с разной степенью дифференцировки опухолевых клеток практически не обнаружилось (табл. 1). Частота составляет от 75% при низкодифференцированной форме до 67% при высокодифференцированной. Частота обнаружения альтернативной формы мРНК гена *CD38* во всех случаях была меньше, чем полноразмерной формы, но лишь в случае умеренно дифференцированной опухоли эти различия были статистически значимы.

Частота встречаемости мРНК гена *CD38* статистически существенно не отличается также у больных с разной локализацией опухоли (табл. 1), за тем исключением, что она в два раза выше у больных раком ректо-сигмовидного отдела (86%), чем у больных раком ободочной кишки (44%). В зависимости от диагноза, частота встречаемости альтернативной формы мРНК гена *CD38* ниже в 1.7–6.0 раз. При раке прямой кишки и раке сигмовидной кишки различия статистически значимы ($p < 0.05$).

Частоты выявления мРНК гена *CD38* в опухолевых очагах у больных с метастазами и у больных без метастазов не отличаются (табл. 2). Оказалось также, что локализация метастазов не связана с частотой встречаемости мРНК гена *CD38* в опухолевых очагах больных. При отдаленных метастазах тестируемую мРНК находили в 60% случаев, а при регионарных – в 70%. Альтернативной формы во всех случаях было в 2–3 раза меньше, чем полноразмерной ($p > 0.05$). Альтернативная форма во всех случаях определяется в 2–3 раза реже, чем полноразмерная ($p > 0.05$).

Результаты сравнения частоты обнаружения мРНК гена *CD38* у больных раком толстого кишечника на разных стадиях заболевания представлены на рис. 4. На стадии I заболевания мРНК гена *CD38* выявляется во всех образцах опухолевых очагов (100%). На следующих стадиях частота статистически значимо понижается и составляет от 52 до 70% ($p < 0.05$). Частота обнаружения мРНК альтернативной формы на всех стадиях опухолевого роста в 1.8–3.0 раза ниже частоты выявления полноразмерной формы. На стадиях рака I и II различия были статистически значимы, а на стадиях III и IV – незначимы, хотя прослеживалась тенденция.

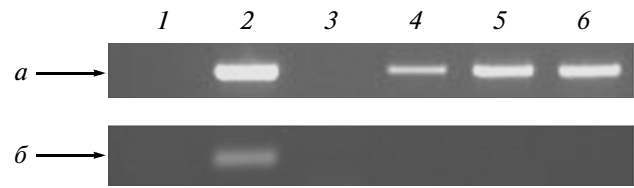


Рис. 3. Электрофореграммы фрагментов кДНК гена *CD38*, определяемых в клетках опухолевых линий. 1 – Сасо-2; 2 – Colo-205; 3 – SW-620; 4 – Т-84; 5 – НСТ15; 6 – НСТ116; а – полноразмерная форма кДНК *CD38*; б – альтернативная форма кДНК *CD38*.

Для исследования роли метилирования CpG в местах связывания транскрипционного фактора Sp1 и рецептора ретиноевой кислоты в экспрессии гена *CD38* сформировали выборку, состоящую из 10 образцов опухолевых очагов больных раком толстого кишечника. В очагах пяти больных мРНК гена *CD38* обнаруживается, в опухолевых очагах других пяти больных ее нет. Так же исследовали метилирование CpG клеток шести представленных выше линий, произошедших от опухолевых клеток больных раком толстого кишечника. В качестве контроля использовали 10 образцов периферической крови здоровых доноров. При исследовании всех образцов опухолевых очагов больных раком толстого кишечника, клеточных линий и образцов периферической крови здоровых доноров с помощью рестриктазы AclI показано, что происходит метилирование динуклеотидов CpG (позиции +754, +761, +765) в области связывания транскрипционного фактора Sp1. Анализ хромосомной ДНК в области связывания рецептора ретиноевой кислоты (регуляторная последовательности ДНК гена *CD38* RARE) с помощью рестриктазы HpaII также выявил метилирование динуклеотида CpG (позиция +791) во всех образцах опухолевых очагов, клеточных линиях и периферической крови.

Таблица 1. Частота обнаружения мРНК гена *CD38* при разной локализации и степени дифференцировки опухоли (%)

Форма мРНК	Степень дифференцировки			Диагноз			
	низкая (n = 4)	умеренная (n = 35)	высокая (n = 6)	рак ректосигмовидного отдела (n = 7)	рак прямой кишки (n = 19)	рак сигмовидной кишки (n = 10)	рак ободочной кишки (n = 9)
Полноразмерная	75	69	67	86	79	60	44
Альтернативная	50	26*	17	29	47*	10*	11

* – Статистически значимые различия между частотой обнаружения мРНК полноразмерной и альтернативной форм ($p < 0.05$). n – Число тестируемых образцов.

Таблица 2. Частота обнаружения мРНК гена *CD38* у больных раком толстого кишечника при наличии и отсутствии метастазов (%)

Форма мРНК	Метастазы		
	отсутствуют <i>n</i> = 32	присутствуют	
		региональные <i>n</i> = 10	отдаленные <i>n</i> = 5
Полноразмерная	66	70	60
Альтернативная	22	40	20

n – Число тестируемых образцов.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Результаты, полученные при определении мРНК гена *CD38* в крови здоровых добровольцев, соответствуют данным литературных источников, в которых обнаруживали полноразмерную форму мРНК в периферической крови человека [3]. Альтернативную форму находили при лимфоме, инсулиноме, нейробластоме, а также в клетках линий HeLa, NB-1. Имеются данные о ее присутствии в нормальных тканях печени, поджелудочной железы, почек и слизистой кишечника, в составе которых нет клеток иммунной системы [4]. Во всех случаях альтернативная форма наблюдается вместе с полноразмерной формой. Наши данные свидетельствуют о том, что в опухолевых клетках больных раком толстого кишечника происходит включение гена *CD38* с образованием как полноразмерной формы мРНК совместно с альтернативной, так и с образованием только полноразмерной формы без альтернативного варианта. Анализ мРНК *CD38* в клетках опухолевых линий подтверждает такое заключение.

Дискуссионным остается вопрос о причинах того, почему отсутствует в тестируемом материале только альтернативная форма мРНК гена *CD38*. Обсуждая экспрессию гена *CD38* в опухолевых очагах, необходимо отметить, что при раке толстого

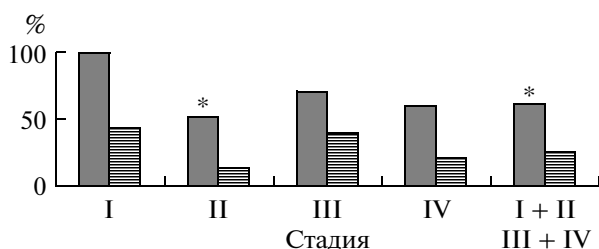


Рис. 4. Частота обнаружения мРНК гена *CD38* у больных раком толстого кишечника на разных стадиях заболевания. * – Статистически значимые различия в сравнении с первой стадией ($p < 0.05$). Серые столбики – полноразмерная форма мРНК; полосатые столбики – альтернативная форма мРНК.

кишечника часто происходит инфильтрация опухоли Т-лимфоцитами, несущими на поверхности молекулы *CD38*; известно также, что и в нормальной ткани толстого кишечника имеются лимфоциты с “включенным” геном *CD38* [10, 3]. То есть, частично положительные результаты могут быть обусловлены присутствием в опухолевых очагах достаточного для детекции мРНК *CD38* количества активированных лимфоцитов. Однако, в соответствии с полученными нами данными, для клеток крови как здоровых добровольцев, так и больных раком толстого кишечника характерен полный спектр экспрессии гена *CD38*, включающий мРНК полноразмерной и альтернативной форм. В то же время более чем у половины больных раком толстого кишечника в опухолевых очагах обнаруживается лишь полноразмерная форма, что подтверждается при анализе клеточных линий, где лишь в одной линии из четырех наблюдалась экспрессия мРНК обеих форм.

Приведенные результаты свидетельствуют об отсутствии взаимосвязи между экспрессией мРНК гена *CD38* и степенью дифференцировки клеток опухоли, развитием метастазов и локализацией опухолевого очага. В то же время, показано, что ген *CD38* в 100% случаев экспрессируется в опухолевых очагах на стадии I рака толстого кишечника – в отличие от последующих стадий. Отметим, что мРНК гена *CD38* может быть продуктом как опухолевых клеток, так и инфильтрирующей опухоль лимфоцитов. Белковый продукт гена *CD38* обладает циклазной активностью в отношении АДФ-рибозы, которая служит вторичным мессенджером внутриклеточной передачи сигналов [3]. Кроме того, мембранная молекула *CD38*, располагаясь на клеточной поверхности, модифицирует адгезионные возможности клеток и может служить потенциальным источником растворимых молекул *CD38*. Последние, выходя в межклеточное пространство, препятствуют миграции в опухолевый очаг активированных Т-лимфоцитов и натуральных киллеров [6]. Наконец, ряд свойств, важных для опухолевого роста, может приводить к отбору *CD38*-положительных клонов опухолевых клеток. Другими словами, на стадии I опухолевого процесса экспрессия гена *CD38*, вероятно, играет важную роль в развитии опухоли и ее защите от иммунного надзора. На стадиях II–IV приведенные выше механизмы могут терять свое значение, и экспрессия гена *CD38* в опухолевых очагах происходит лишь у части больных.

Известно, что в регуляции экспрессии генов важную роль играют процессы метилирования. В промоторном регионе гена *CD38* имеются сайты связывания транскрипционного фактора Sp1 и рецептора ретиноевой кислоты [3]. Транскрипционный фактор Sp1 принадлежит к семейству Sp/KLF, имеет “цинковый палец”, повсеместно экспресси-

руется и характерен для генов “домашнего хозяйства”. Связывание транскрипционного фактора Sp1 вблизи сайта метил-чувствительной рестриктазы HpaII препятствует распространению метилирования на область промотора [11]. В связи с этим, полученные нами данные о метилировании участка связывания транскрипционного фактора Sp1 во всех исследуемых образцах дают возможность высказать предположение о метилировании всего промоторного региона гена *CD38*.

Еще один регуляторный элемент в экспрессии гена *CD38* — ретиноевая кислота. В индукцию экспрессии гена *CD38* ретиноевыми кислотами вовлекается RAR-рецептор ретиноидов. RAR-рецепторы образуют гетеродимеры с RXR-рецепторами; затем RXR/RAR-гетеродимер взаимодействует с последовательностями ДНК, называемыми RARE (Retinoic Acid Response Element), которые также вовлекаются в транскрипцию, индуцированную ретиноидами. Ретиноевая кислота — это агент, который определяет высокий уровень экспрессии поверхностного клеточного антигена CD38 в некоторых миелоидных и лимфоидных лейкозных клетках. Индуцированная ретиноевой кислотой экспрессия гена *CD38* в этих клетках специфична, происходит быстро, зависит от дозы и высокочувствительна [12]. Тот факт, что происходит метилирование регуляторной последовательности комплекса RARE, находящейся вблизи участка связывания транскрипционного фактора Sp1, подтверждает предположение о метилировании промоторного региона гена *CD38* в клетках опухолевых очагов больных раком толстого кишечника.

Однако связи между присутствием мРНК гена *CD38* и метилированием областей связывания приведенных выше транскрипционных факторов нет, что подтверждается при анализе метилирования в использованных в работе клеточных линиях. Примененный метод обладает высокой чувствительностью и позволяет выявлять метилирование последовательностей CpG в единичных молекулах ДНК. То есть, метилирование промоторного участка гена *CD38* в геноме лишь некоторых опухолевых клеток в общей опухолевой массе может давать положительную реакцию. Данные о метилировании регуляторных элементов, отвечающих за инициа-

цию транскрипции гена *CD38* в образцах, содержащих мРНК данного гена, свидетельствуют о неоднородности его метилирования в клетках опухолевых очагов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Migliore L., Migheli F., Spisni R., Copped F. 2011. Genetics cytogenetics, and epigenetics of colorectal cancer. *J. Biomed. Biotechnol.* 792362.
2. Ferrero E., Saccucci F., Malavasi F. 2000. The making of a leukocyte receptor: origin, genes and regulation of human *CD38* and related molecules. *Chem. Immunol.* 75, 1–19.
3. Malavasi F., Deaglio S., Funaro A., et al. 2008. Evolution and function of the *ADP ribosyl cyclase/CD38* gene family in physiology and pathology. *J. Physiol.* 88, 841–886.
4. Nata K., Takamura T., Karasawa T., et al. 1997. Human gene encoding CD38 (ADP-ribosyl cyclase/cyclic ADP-ribose hydrolase): organization, nucleotide sequence and alternative splicing. *Gene.* 186, 285–92.
5. Deaglio S., Mehta K., Malavasi F. 2001. Human *CD38*: a (r)evolutionary story of enzymes and receptors. *Leukemia Res.* 25, 1–12.
6. Новиков В.В., Алясова А.В., Уткин О.В., и др. 2005. Растворимые антигены CD38 и CD95 при раке молочной железы. *Рос. биотерапевт. журн.* 3, 48–53.
7. Yang S.L., Tang Y.M., Shen H.Q., et al. 2004. Expression of leucocyte cell-surface antigens on colon cancer cell line HR8348. *J. Zhejiang University. Medical Sciences.* 33, 118–120.
8. Chomzynski P., Sacchi N. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162, 156–159.
9. Новиков Д.В., Первушкин П.М., Новиков В.В. Патент на изобретение RU №2306333 С2. 2006. Опубликовано: 20.09.2007, Бюллетень. № 26.
10. Ellmark P., Belov L., Huang P., et al. 2006. Multiplex detection of surface molecules on colorectal cancers. *Proteomics.* 6, 1791–1802.
11. Mummaneni P., Walker K.A., Bishop P.L., Turker M.S. 1995. Epigenetic gene inactivation induced by a *cis*-acting methylation center. *J. Biol. Chem.* 270, 788–792.
12. Riebold M., Mankuta D., Lerer E., et al. 2011. All-trans retinoic acid upregulates reduced *CD38* transcription in lymphoblastoid cell lines from Autism spectrum disorder. *Mol. Med.* 17, 799–806.