

УДК 575:599.9

АКТИВАЦИЯ ТРАНСКРИПЦИИ ГЕНА *RHOA* В ЭПИТЕЛИАЛЬНЫХ ОПУХОЛЯХ МОЖЕТ БЫТЬ ВЫЗВАНА УМНОЖЕНИЕМ КОПИЙ ГЕНА И/ИЛИ ДЕМЕТИЛИРОВАНИЕМ ЕГО ПРОМОТОРНОЙ ОБЛАСТИ

© 2006 г. Э. А. Брага^{1*}, В. И. Логинов¹, Е. А. Климов², Г. Килосанидзе³, Д. С. Ходырев¹, Н. Л. Каганова², Т. П. Казубская⁴, В. Д. Ермилова⁴, Р. Ф. Гарькавцева⁴, И. В. Пронина¹, О. И. Рудько⁵, Е. Р. Забаровский^{3,6}, Г. Е. Сулимова², Л. Л. Киселев⁶

¹Государственный научный центр Российской Федерации “ГосНИИгенетика”, Москва, 117545

²Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук, Москва, 119991

³Microbiology and Tumor Biology Center and Center for Genomics and Bioinformatics, Karolinska Institute, Stockholm, 17177 Sweden

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

⁵Биологический факультет Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, Москва, 119899

⁶Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва, 119991

Поступила в редакцию 23.12.2005 г.

Белок RHOA относится к семейству малых GTPаз и участвует в процессах морфогенеза и адгезии клеток, а также в регуляции клеточного цикла. Ген *RHOA* (3p21.31) может вызывать злокачественную трансформацию клеток, и его рассматривают как потенциальный онкоген. Цель данной работы – исследование механизмов активации транскрипции гена *RHOA* в ряде эпителиальных опухолей. Методом полуколичественной ОТ-ПЦР обнаружено, что транскрипция гена *RHOA* увеличивается в опухолях (45 опухолей, включая карциномы молочной железы, почечно-клеточные карциномы и эпителиальные опухоли яичников; $p < 10^{-4}$). Впервые показано, что активация транскрипции гена *RHOA* в опухолях достоверно ассоциирована с умножением копий этого гена ($p = 10^{-7}$). С помощью четырех метилспецифичных рестриктаз (HpaII, HhaI, AclI и Bsh1236I) и последующей ПЦР выявлено изменение степени метилирования промоторной области гена *RHOA* в половине образцов опухолей (23/45), причем гипометилирование этого гена в ДНК опухолей наблюдали вдвое чаще, чем гиперметилирование. Деметилирование промоторной области гена сопряжено с увеличением в 2–10 раз уровня транскрипции гена. Таким образом, в данной работе впервые показан двойной механизм нарушения регуляции при транскрипции потенциального онкогена *RHOA* в эпителиальных опухолях, а именно, путем увеличения числа копий гена и путем деметилирования промоторной области.

Ключевые слова: хромосома 3, ген *RHOA*, транскрипция, мультипликация копий гена, CpG-островки, промоторная область, метилирование ДНК, эпителиальные опухоли молочной железы, почки и яичников.

ACTIVATION OF *RHOA* GENE TRANSCRIPTION IN EPITHELIAL TUMORS MAY BE CAUSED BY GENE AMPLIFICATION AND/OR DEMETHYLATION PROMOTOR REGION, by E. A. Braga^{1*}, W. I. Loginov¹, E. A. Klimov², G. Kilosanidze³, D. S. Hodyrev¹, N. L. Kaganova², T. P. Kazubskaya⁴, V. D. Ermilova⁴, R. F. Garkavtseva⁴, I. V. Pronina¹, O. I. Rud'ko⁵, E. R. Zabarovsky^{3,6}, G. E. Sulimova², L. L. Kisselev⁶ (¹Russian State Research Centre, “GosNIIGenetika”, Moscow, 117545 Russia; *e-mail: ebraga@genetika.ru, ebraga@mail.ru; ²Vavilov Institute of General Genetics, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia; ³Microbiology and Tumour Biology Centre and Centre for Genomics and Bioinformatics, Ka-

Принятые сокращения: BC (Breast Carcinoma) – рак молочной железы; GTPазы – гуанозинтрифосфатазы; LUCA (Lung Cancer) – район кандидатов в супрессорные гены рака легкого; МЧРА – анализ с использованием метилчувствительных рестриктаз и последующей ПЦР; ОТ-ПЦР – (здесь) полимеразная цепная реакция на кДНК, полученной с помощью обратной транскрипции РНК; EOC (Epithelial Ovarian Carcinoma) – эпителиальная карцинома яичников; *RHOA* (Ras Homolog Gene Family, member A) – член A-семейства генов, гомологичных онкогену *Ras*; RCC (Renal Cell Carcinoma) – почечноклеточный рак; SAGE (Serial Analysis of Gene Expression) – серийный анализ экспрессии генов; tag (tag) – (здесь) 10-членная олигонуклеотидная проба на данный ген; TSG (Tumor Suppressor Gene) – ген-супрессор опухолевого роста.

*Эл. почта: ebraga@genetika.ru, ebraga@mail.ru

rolinska Institute, Stockholm, 17177 Sweden; ⁴Blokhin Cancer Research Centre, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow, 115478 Russia; ⁵Moscow State University, Biological Department, Moscow, 119899 Russia; ⁶Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia). *RHOA* protein, a member of small GTPases family, is implicated in cell morphogenesis, adhesion, and in cell cycle regulation. *RHOA* gene (3p21.31) exhibits cell transformation activity, and therefore gene is considered as a potential oncogene. The aim of this study was to investigate *RHOA* transcription and copy number changes in three epithelial tumors (breast, renal cell and epithelial ovarian carcinomas, 45 tumor/normal pairs altogether). Enhanced *RHOA* gene transcription was revealed by semi-quantitative RT-PCR in 25 of the studied cases ($p < 10^{-4}$). For the first time it was shown that transcriptional activation of *RHOA* in tumors was significantly associated with gene copy multiplication ($p = 10^{-7}$). Alterations in the *RHOA* promoter region methylation were revealed in half of tumor cases (23/45) using methyl-sensitive PCR with 4 restriction enzymes (*HpaII*, *HhaI*, *AclI* и *BshI236I*). Hypomethylation of the *RHOA* promoter region in tumor DNA was observed two times more frequently than increased methylation. Moreover, all (15) cancer cases with hypomethylation of the *RHOA* gene showed a 2–10 fold increased expression of *RHOA*. It was concluded that gene copy multiplication and demethylation of the *RHOA* promoter region can contribute to transcription activation of this gene in epithelial tumors.

Key words: chromosome 3, *RHOA* gene, transcription, gene amplification, CpG-island, promoter region, DNA methylation density, epithelial tumors of breast, kidney and ovary.

Ген *RHOA* (Ras Homolog Gene Family, member A) кодирует белок, относящийся к известному суперсемейству Ras-гомологических малых гуанозинтрифосфатаз (GTPаз), активность которых зависит от связывания GTP или GDP [1, 2]. Ген *RHOA* участвует в процессах, связанных с формированием актинового цитоскелета, с адгезией и подвижностью клеток, с регуляцией клеточного цикла [3–6], а также с трансформацией клеток *in vitro* и *in vivo* и инвазией и метастазированием опухолей [7–10]. Угнетение экспрессии этого гена при транскрипции, при трансляции и/или на посттрансляционном уровне может обращать злокачественный фенотип опухолевых клеток, подавлять их пролиферацию и опосредованно вызывать апоптоз [11–14]. Таким образом, ген *RHOA* и его белковый продукт играют важную роль в развитии и прогрессии эпителиальных опухолей [15–20]. Кроме того, опубликованы данные о роли белкового продукта этого гена в развитии саркомы [21] и лейкоза [22]. В ряде работ приводятся результаты, подтверждающие увеличение экспрессии гена *RHOA* в опухолях молочной железы, толстой кишки, яичников, головы и шеи, желудка, мочевого пузыря и яичек, причем возрастает как количество белкового продукта, так и мРНК [15–20]. Иногда утверждают [19], что повышение уровня транскрипции, например, в опухолях молочной железы невелико, однако эти данные вступают в противоречие с результатами других исследований [15–20], в частности, показавшими подавление роста клеток опухолей и соответственно угнетение экспрессии гена *RHOA* при трансформации клеток опухолей молочной железы конструкциями, содержащими анти-*RHOA* малые интерферирующие РНК (siRNAs) [12]. Таким образом, вопрос об активации гена *RHOA* на стадии транскрипции в опухолях требует дальнейшего выяснения.

С другой стороны, точечных мутаций, приводящих к активации этого потенциального онкогена, выявить не удалось [19, 23–25], и вообще – возможные пути регуляции транскрипции гена *RHOA* изучены крайне мало. Промоторный район этого гена, согласно данным, приведенным на сервере WWWCPG (<http://www.itb.cnr.it/sun/web-gene/>), содержит протяженный CpG-островок (95 CpG на 1301 п.н.). Этот CpG-островок функционально важен, так как в соответствии с данными, приведенными на сервере MatInspector (<http://www.genomatix.de/products/MatInspector/index.html>), он содержит потенциальные участки связывания более 50 транскрипционных факторов. Нам не удалось найти сообщений, касающихся метилирования этого участка и его роли в изменении транскрипции гена *RHOA* в опухолях.

В данной работе мы сообщаем первые данные о возможности регуляции транскрипции гена *RHOA* как на геномном, так и на эпигенетическом уровнях. Нами выявлено повышение транскрипции гена *RHOA* в образцах злокачественных опухолей молочной железы (BC), почечно-клеточного рака (RCC) и эпителиальных карцином яичников (EOC) в 2–10 и более раз, с достоверностью $p \leq 0.5 \times 10^{-4}$. Впервые показано, что активация транскрипции гена *RHOA* в эпителиальных опухолях может быть вызвана умножением копий этого гена, а также посредством деметилирования его промоторной области.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Анализ данных клонотек SAGE (серийный анализ экспрессии генов). Профили транскрипции генов рассчитаны на основе данных SAGE (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SAGE>) [26]. При использовании базы данных “Tag to UniGene Mapping” [27] маркерные последовательности клоно-

тек SAGE, так называемые “таги” (“tags”), картированы по отношению к UniGene-кластерам района 3p21.3; при этом из анализа исключали те из них, которые приписаны к двум или более UniGene-кластерам, либо некластеризованным EST. Значения экспрессии маркерных последовательностей (Tag Expression Count) определяли с использованием программы Comparative Count Display [28] сервера SAGE-map (<ftp://ncbi.nlm.nih.gov/pub/sage>) и ряда программ на языке Perl (согласованных с задачей). Экспрессию всех отобранных генов в опухолевых клетках сравнивали с их двойниками в нормальных тканях. Проанализированы SAGE-кломатеки из восьми тканей (мозг, молочная железа, простата, кожа и желудок), что позволило вычислить величины вероятности (p) двукратного различия значений “Tag Count” для опухоли (Т) и нормы (N), причем к рассмотрению приняты только те маркерные последовательности, у которых вероятность двукратной разности в экспрессии норма–опухоль превышала уровень 0.40.

Образцы опухолевой и прилежащей гистологически нормальной ткани собраны и клинически охарактеризованы в РОНЦ РАМН. Использовали ткани только тех больных, которые до операции не получали лучевую или химиотерапию. Все опухоли классифицированы в соответствии с TNM-классификацией Международного противоракового союза (UICC, версия 2002 г. [29]) и типированы гистологически на основании классификации Всемирной Организации Здравоохранения (ВОЗ) [30, 31]. В данной работе изучены 19 образцов светлоклеточного почечноклеточного рака, RCC, 18 образцов рака молочной железы, BC (15 – протоковой и 3 – дольковой гистологии) и 8 образцов эпителиальных карцином яичников, ЕОС (разной гистологии, включая 3 серозные аденокарциномы). Для отбора образцов с высоким содержанием опухолевых клеток проводили дополнительный гистологический анализ микро-срезов (толщина 3–5 мкм), окрашенных эозином и гематоксилином. Отбирали образцы с содержанием опухолевых клеток не менее 70%. Образцы тканей хранили при -70°C . В качестве дополнительного контроля использовали лимфоциты периферической крови 15 здоровых доноров.

Высокомолекулярную ДНК выделяли из ткани по стандартной методике, включающей обработку клеток протеиназой К при 50°C в течение ночи, последующую экстракцию смесью фенола и хлороформа и осаждение этанолом. ДНК хранили при -20°C . Качество и концентрацию ДНК проверяли с помощью электрофореза в 0.8%-ном агарозном геле с использованием ДНК фага λ (“MBI Fermentas”, Литва) в качестве эталона сравнения.

Выделение РНК из тканей. Тотальную РНК выделяли из нормальных и опухолевых тканей человека с использованием коммерческого набора реагентов Trizol RNA Prep 100 (“Изоген”, Россия) после растирания ткани под жидким азотом. Концентрацию выделенной РНК измеряли на приборе BioPhotometr (“Eppendorf”, Germany). К препарату РНК добавляли 40 ед. ингибитора РНКаз RNasin (“Promega”, USA) и хранили при -70°C .

Синтез кДНК на тотальной РНК проводили с помощью набора GenePakTM RT Coe в соответствии с прописью изготовителя (“Изоген”, Россия). Использовали тройной реакционный объем (количество РНК в такой реакции обратной транскрипции составляло 900 нг). Пробу инкубировали 1.5 ч при 37°C , затем помещали на -20°C .

Полуколичественную ОТ-ПЦР проводили на основе кДНК с использованием набора GenePakTM PCR Universal (“Изоген”, Россия). Проба содержала 3 мкл кДНК, что соответствовало 90 нг исходной тотальной РНК. Состав праймеров, использованных для амплификации фрагментов гена *RHOA* (*RHOA1*) и контрольного гена *GAPDH* (*K1*), приведены в табл. 1. Реакцию ПЦР проводили в амплификаторе iCycler (“BioRad”, США) согласно прописи, предоставленной фирмой-изготовителем набора по программе: 95°C , 40 с; 35 циклов (95°C , 20 с; $T_{\text{отж}}$ (табл. 1), 10 с, 72°C , 30 с) и 72°C , 3 мин. Продукты ПЦР разделяли путем электрофореза в 2%-ном агарозном геле.

Обработка данных ОТ-ПЦР с использованием программы ViTran. Электрофореграммы после разделения продуктов ОТ-ПЦР анализировали с использованием программного обеспечения ViTran (“Биоком”, Россия). Данная программа позволяет учитывать интенсивность свечения продукта каждой реакции на одинаковой для всех полос площади геля и переносить эти данные в программу Excel. Данные нормировали относительно гена *GAPDH* для опухоли и нормы. Далее, значения для опухоли соотносили с соответствующими значениями нормы. Уровень транскрипции гена *RHOA* в нормальной ткани принимали за 1.

Копийность гена *RHOA* определяли с помощью мультиплексной ПЦР локуса из промоторной 5'-области этого гена (*RHOA2*, 437 п.н., табл. 1) и фрагмента 3-го экзона гена *RAR β 2*, контролирующего содержание ДНК (*K1*, 229 п.н., табл. 1). ПЦР проводили на приборе Tercik (“ДНК-Технология”, Россия). Продукты мультиплексной ПЦР исследуемого и контрольного фрагментов генов разделяли с помощью электрофореза в 1.5%-ном агарозном геле. Каждую ПЦР-пробу повторяли трижды и далее определяли средние значения искомым величин и их средние квадратичные отклонения (не превышавшие 15%). Интенсивность полос анализировали с по-

Таблица 1. Характеристика праймеров, условий и продуктов ПЦР

Метод	Маркер	Структура праймеров	$T_{отж}/Mg$, мМ	Продукт ПЦР, п.н.
Анализ уровня транскрипции методом ОТ-ПЦР	RHOA1 (экзоны 2 и 3)	F: CTGGTGATTGTTGGTGATGG R: GCGATCATAATCTTCCTGCC	52°C 2.5 ¹	183
	GAPDH (K1)*	F: ACCACAGTCCATGCCATCACTGC R: TCCACCACCCTGTTGCTGTAGC	53°C 2.5 ¹	452
Изменение числа копий/анализ метилирования методом МЧРА	RHOA2 (5'-район)	F: GGGAAGCCGAGCACCACCAG R: GCTCGGGCGCACTCTCCAG	64.2°C 3.0 ²	437
	RAR-β2 (экзон 3, K2**)	F: AGAGTTTGGATGGAGTTGGGT R: CATTCGGTTTGGGTCAATCC	62°C 3.0 ²	229
	β-3A-адаптин, (K3***)	F: TGCCCTCTGGACTGGAACCT R: CCTGAGCCCAGCCCAAGTC	64°C 1.5 ³	445

*K1 – контроль содержания мРНК (кДНК).

** K2 – контроль содержания ДНК (при анализе изменения числа копий) и контроль сохранности ДНК при ее гидролизе метил-специфичными рестриктазами в процессе анализа метилирования методом МЧРА (см. “Экспериментальную часть”).

*** K3 – контроль полноты гидролиза ДНК рестриктазами, использованный при анализе метилирования методом МЧРА (см. раздел “Экспериментальная часть”).

Состав буферных растворов: ¹ реакцию проводили согласно прописи, предоставленной фирмой-изготовителем набора; ² 67 мМ Трис-НCl, pH 8.8, 16.7 мМ (NH₄)₂SO₄, 0.01% твин-20, 3.0 мМ MgCl₂; ³ 60 мМ Трис-НCl, pH 8.5, 10 мМ 2-меркаптоэтанол, 25 мМ KCl, 0.1% Тритон X-100, 1.5 мМ MgCl₂.

мощью видеосистемы GelImager и программы GelAnalysis (“ДНК-Технология”, Россия).

Анализ метилирования промоторного района гена *RHOA* с использованием набора метил-чувствительных рестриктаз (МЧРА). Метод, примененный для оценки статуса метилирования, основан на способности метилчувствительных рестриктаз гидролизовать только неметилированные участки узнавания этих рестриктаз [32]. При этом участки узнавания, содержащие 5-метилцитозин, остаются нерасщепленными. Использовали четыре метилчувствительные рестриктазы: HpaII (CCGG), HhaI (GCGC), AciI (CCGC) и Bsh1236I (CGCG). Геномную ДНК (0.5 мкг) обрабатывали 5 ед. рестриктазы в 25 мкл инкубационной смеси в течение ночи. В последующей амплификации использовали 2.5 мкл смеси, содержащей продукт гидролиза. Ферменты получены из МБИ “Fermentas” (Литва), условия приведены в протоколах фирмы.

Образцы ДНК до и после гидролиза каждой из рестриктаз использовали в качестве матрицы для амплификации фрагмента промоторной области гена *RHOA* (RHOA2, 437 п.н., табл. 1), содержащего шесть участков узнавания рестриктазой HpaII, шесть – HhaI, один участок – Bsh1236I и 11 участков – AciI (рис. 1, см. ниже). Участок Bsh1236I содержит две CpG-пары, участки узнавания трех других рестриктаз – по одной CpG-паре. Таким образом, с использованием четырех рестриктаз исследован статус метилирования фрагмента RHOA2, перекрывающего суммарно 25 CpG-пар.

Сохранность ДНК до и после гидролиза оценивали с использованием фрагмента экзона 3 гена *RAR-β2*, не содержащего участков узнавания указанных рестриктаз, в качестве контроля (K2, 229 п.н., табл. 1) [33]. Полноту гидролиза оценивали, используя ПЦР-фрагмент промоторной области гена β-3A-адаптина (K3, 445 п.н., табл. 1, ID GenBank AF247736.2), который содержит участки узнавания используемых рестриктаз с неметилированными CpG-парами (как в норме, так и в опухоли) [33]. Праймеры и условия ПЦР приведены в табл. 1. Амплификацию фрагментов RHOA2 и экзона 3 гена *RAR-beta2* (K2) проводили по программе: 95°C, 5 мин; 35 циклов (94°C, 30 с; $T_{отж}$ (табл. 1) – 40 с; 72°C, 30 с) и 72°C, 5 мин. Амплификацию фрагмента гена β-3A-адаптина (K3, 445 п.н., табл. 1) проводили по программе: 95°C, 5 мин; 30 циклов (95°C, 30 с; 64°C, 1 мин, 72°C, 40 с) и 72°C, 7 мин. Для амплификации использовали ДНК-полимеразу *Taq*, dATP, dCTP, dGTP, dTTP (“СибЭнзим”, Россия). ПЦР проводили на приборе Tercik (“ДНК-Технология”). Продукты ПЦР исследуемых и контрольных фрагментов генов разделяли одновременно путем электрофореза в 2%-ном агарозном геле.

Полуколичественный МЧРА. Данные ПЦР фрагмента RHOA2 после гидролиза ряда парных образцов ДНК ВС и РСС рестриктазой HpaII оценивали полуколичественно, во-первых, относительно интенсивности свечения продуктов ПЦР на ДНК тех же образцов, но не гидролизованных HpaII, и, во-вторых, относительно искусственно

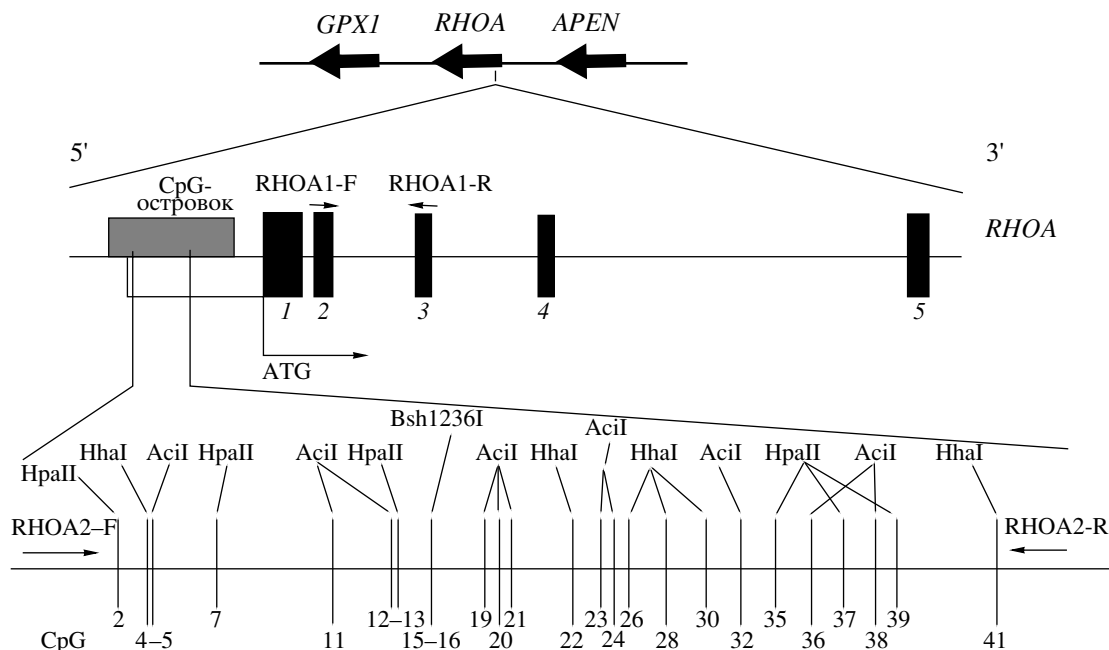


Рис. 1. Схематическое изображение геномного локуса, содержащего ген *RHOA*, и структурной организации гена *RHOA*: положение экзонов, старта транскрипции и CpG-островка; (использованы данные: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=gene&cmd=retrieve&dopt=default&list_uids=387). Показаны также позиции праймеров для амплификации фрагмента *RHOA1* (183 п.н., экзоны 2 и 3) и фрагмента *RHOA2* (437 п.н.) из центральной части CpG-островка (1307 п.н.) промоторной области гена и приведена рестрикционная карта фрагмента *RHOA2* для четырех метилчувствительных рестриктаз (*HpaII*, *HhaI*, *AclI* и *Bsh1236I*), 24 участка узнавания которых содержат 25 CpG-пар.

метилованных с помощью метилтрансферазы *SssI* (“СибЭнзим”, Россия; в условиях фирмы-изготовителя) и далее гидролизованных рестриктазой *HpaII* образцов ДНК *RCC4T* и *RCC4N*. Свечение продуктов ПЦР определяли с помощью видео системы *Gellmager* и программы *GelAnalysis* (“ДНК-Технология”). Количество циклов ПЦР минимизировали до 27 раундов амплификации, чтобы соотношение продуктов ПЦР было ближе к соотношению копий фрагмента в геномной ДНК; при 27 циклах еще сохранялась возможность четкой визуализации продукта ПЦР и его количественной оценки.

Статистический анализ данных проводили с использованием критерия Фишера. Для более объективной оценки исходных данных полуколичественной ОТ-ПЦР и при оценке изменения количества копий гена каждую ПЦР повторяли трижды и далее определяли средние значения искомым величин и их средние квадратичные отклонения (не превышавшие 15%).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Анализ клонотек *SAGE*

Анализ клонотек *SAGE* (описан в разделе “Экспериментальная часть”) для гена *RHOA* показал, что в опухолях уровень транскрипции повышается; это тестируется по содержанию мРНК

гена в шести из восьми исследованных типов опухолей по сравнению с соответствующими нормальными тканями (табл. 2). Это опухоли мозга, молочной железы, яичников, предстательной железы, желудка и поджелудочной железы. Однако в опухолях кишечника и кожи результаты были противоположными: наблюдали снижение уровня транскрипции этого гена.

Анализ количества мРНК гена *RHOA* в первичных опухолях

Структурная организация гена *RHOA*, положение экзонов, старта транскрипции и CpG-островка схематически представлены на рис. 1. Там же указаны позиции праймеров, использованных для амплификации фрагментов *RHOA1* (экзоны 2 и 3, анализ транскрипции гена) и *RHOA2* (в CpG-островке промоторной области гена, анализ метилирования и копийности гена, см. ниже).

Изменения в уровне транскрипции гена *RHOA* в опухолях выявляли, исследуя амплификацию фрагмента *RHOA1* (183 п.н., табл. 1, рис. 1) методом полуколичественной ОТ-ПЦР с использованием в качестве контроля данных ОТ-ПЦР для фрагмента гена *GAPDH* (K1, 452 п.н., табл. 1). На рис. 2а показаны четыре репрезентативных случая ВС, при изучении которых обнаружили повышение транскрипции гена *RHOA* в сравнении с

Таблица 2. Экспрессия гена *RHOA* (UniGene 77273) из данных клонотек SAGE

<i>p</i> *	<i>T</i> **		<i>N</i> **	Маркерные олигонуклеотиды (“таги”)**	Орган/источник ткани
0.59	7	>	0	GAGTGTTCAG	Мозг
0.65	432	>	82	GGTGGCACTC	
0.85	21	>	1	AAGGTAACCTT	Молочная железа
0.59	15	<	16	TTAGTTACCT	
0.45	4	>	0	CCATCCGTGG	
0.4	3	>	0	GAGTGTTCAG	
0.43	4	>	0	GCTTGGCTCC	Яичники
0.67	11	>	0	TTAGTTACCT	Поджелудочная железа
0.66	29	>	1	TTAGTTACCT	Желудок
0.6	9	>	0	GCTTGGCTCC	Предстательная железа
0.42	18	<	12	TTAGTTACCT	
0.41	16	<	10	GCTTGGCTCC	Толстая кишка
0.51	4	<	4	GGGCCGAAAA	
0.44	0	<	1	GGGCCGAAAA	Кожа
0.45	3	<	2	GCTTGGCTCC	

* Вероятность того, что частота встречаемости маркерных олигонуклеотидов (“тагов”) в клонотеках SAGE (кДНК и РНК) данной опухоли в два раза выше, чем в клонотеках соответствующей нормальной ткани (выделено жирным шрифтом) или, наоборот, в два раза ниже, чем в норме (показано белым на сером фоне). ** Значения частот встречаемости данного “тага” для гена *RHOA* в клонотеках SAGE (кДНК и РНК) данной опухоли (Т) или, соответственно, нормальной ткани (N). *** “Таг” – это 10-членный маркерный олигонуклеотид, гомологичный участку гена и используемый в качестве пробы на данный ген.

нормальной тканью. Транскрипция контрольного гена *GAPDH* не претерпела существенных изменений в исследованных образцах опухолей (рис. 2б). При расчетах степени изменения транскрипции гена *RHOA* учтены данные, полученные для контрольного маркера *GAPDH*.

На рис. 3 приведен профиль изменения транскрипции гена *RHOA* в опухолях ВС, RCC и ЕОС. Согласно этим данным, в первичных опухолях ВС транскрипция гена *RHOA* увеличивается в 12 из 18 случаев (67%) и только в единственном случае (BC18, 1/18) наблюдали снижение транскрипции этого гена ($p = 3 \times 10^{-4}$). В образцах RCC обнаружено как повышение (9/19, 47%), так и снижение уровня мРНК (4/19, 21%). Суммарно, среди 45 исследованных случаев ВС, RCC и ЕОС повышение транскрипции гена *RHOA* выявлено достоверно чаще, чем ее снижение (25/45 vs. 6/45, $p \leq 0.5 \times 10^{-4}$). Амплитуда изменений варьирует, главным образом, в пределах от 2 до 10 раз; в единичных случаях (BC1 и RCC1) уровень транскрипции в опухоли был выше почти в 70 раз (рис. 3).

Изменение количества геномных копий гена RHOA в опухолях и его связь с транскрипционной активностью

Изменение относительного количества геномных копий гена *RHOA* оценивали на основе дан-

ных по амплификации фрагмента *RHOA2* из промоторной области гена с использованием ДНК из опухолей и соответствующих нормальных тканей (табл. 1, рис. 1). Изменение копийности фрагмента *RHOA2* сравнивали с копийностью фрагмента из экзона 3 гена *RARβ2* [33] (K2, табл. 1). На рис. 2в приведены репрезентативные результаты разделения в агарозном геле продуктов мультиплексной ПЦР этих генов. В ряде образцов ВС наблюдали существенное увеличение копийности гена *RHOA* по сравнению с ДНК гистологически нормальной ткани. Количество ПЦР-продукта контрольного гена *RARβ2* не изменяется.

В опытах по изучению 45 образцов опухолей (ВС, RCC и ЕОС), в которых было исследовано изменение уровня транскрипции гена *RHOA*, определяли также изменение числа геномных копий этого гена относительно нормальной ткани (рис. 3). Показано, во-первых, что умножение копий гена (в 2–10 и более раз) в исследуемых образцах опухолей наблюдается существенно чаще, чем уменьшение копийности (28/45 vs. 5/45, $p = 0.7 \times 10^{-6}$). Во-вторых, умножение числа копий гена в большинстве случаев наблюдали в тех же образцах опухолей, в которых было отмечено повышение уровня транскрипции гена *RHOA*. Такую закономерность наблюдали в 10 из 12 случаев изучения ВС, 9/9 RCC и 3/4 ЕОС (рис. 3). Суммарно, в опытах по изучению опухолей всех трех типов, мультиплика-

ция гена *RHOA*, в сочетании с его повышенной транскрипцией, выявлена в 22 из 25 опухолей, что достоверно чаще, чем число случаев с повышением уровня транскрипции гена без умножения его копий – 3 из 25 (BC5, BC12, EOC4, рис. 3) ($p = 0.9 \times 10^{-7}$).

В единичных образцах опухолей (EOC8 и RCC: 13, 14, 17 и 18) наблюдали приблизительно 10-кратное снижение уровня амплификации фрагмента *RHOA2* (см. рис. 3). Одной из причин уменьшения количества продукта ПЦР могут быть гомозиготные делеции.

Плотность метилирования промоторной области гена RHOA в опухолях и ее связь с транскрипционной активностью

Плотность метилирования исследовали в случае фрагмента *RHOA2*, расположенного в центральной части CpG-островка промоторной области гена *RHOA* и составляющего примерно треть этого островка (табл. 1, рис. 1). Весь CpG-островок характеризуется большой протяженностью (1301 п.н.) и высоким содержанием G/C (включая 95 CpG-пар). Рестрикционная карта фрагмента *RHOA2*, содержащая участки узнавания четырехметил-чувствительных рестриктаз (HpaII, HhaI, AciI и Bsh1236I), включающих 25 CpG-пар, представлена на рис. 1.

На рис. 4а приведен типичный результат анализа плотности метилирования фрагмента гена *RHOA* (*RHOA2*) с помощью метода МЧРА и с использованием рестриктазы HhaI в ДНК опухоли BC1 и парной к ней нормальной ткани. Как видно на этом примере, амплификация фрагмента гена *RARβ2*, подтверждающая сохранность ДНК, наблюдается до и после гидролиза рестриктазами. Продукт амплификации фрагмента гена β-3А-адаптина (445 п.н.) выявляется только при использовании негидролизованых образцов ДНК опухоли и нормы и не выявляется в них после обработки рестриктазами, что подтверждает полноту гидролиза. В дорожках с негидролизованной ДНК (Т/Н) виден продукт амплификации исследуемого фрагмента гена *RHOA* (*RHOA2*, 437 п.н.) и обоих контрольных генов (445 и 229 п.н., рис. 4а). После гидролиза ДНК рестриктазой HhaI (Т+/Н+) продукт амплификации фрагмента *RHOA2* присутствует только в случае ДНК нормальной ткани (анализируемые участки метилированы) и отсутствует в случае ДНК опухоли (анализируемые участки не метилированы).

На рис. 5 суммированы данные изучения 23 образцов ДНК (из 45 исследованных), в которых наблюдали изменение уровня метилирования в локусе *RHOA2*: для 8 случаев ВС, 11 случаев RCC и 4 случаев ЕОС. Результаты по ДНК опухолей показаны слева, а ДНК парной нормальной ткани – справа. Оказалось, что выявленные 23 случая метилирования гена *RHOA* можно разбить на две

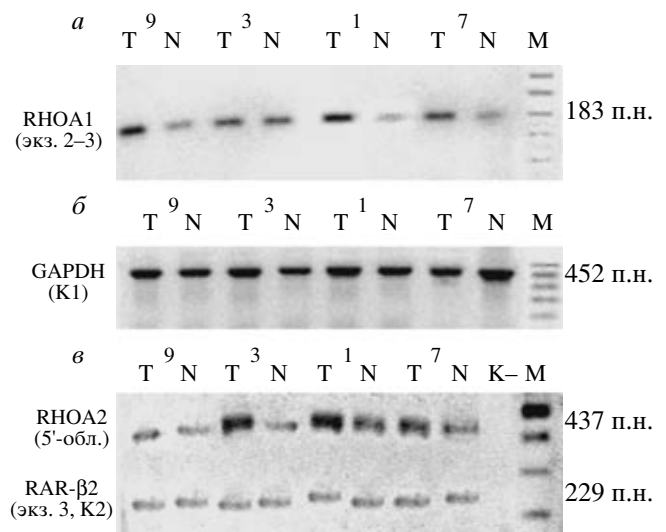


Рис. 2. Репрезентативные примеры электрофоретического разделения в 1.5%-ном агарозном геле продуктов ОТ-ПЦР генов *RHOA* (а – фрагмент *RHOA1*) и *GAPDH* (б – фрагмент K1, контроль уровня транскрипции) и продуктов мультиплексной ПЦР генов *RHOA* (в – фрагмент *RHOA2*) и *RARβ2* (фрагмент K2, контроль сохранности матричной ДНК). Во всех случаях использованы одни и те же образцы (1, 3, 7 и 9) опухолей (Т) и морфологически нормальной ткани молочной железы (N) от того же пациента. Нумерация исследованных образцов унифицирована при построении профилей транскрипции гена *RHOA* в опухолях ВС, RCC и ЕОС (см. рис. 3). Относительное изменение числа геномных копий гена *RHOA* оценивали на основе сравнительного анализа уровня амплификации фрагмента *RHOA2* при использовании ДНК из образцов ВС и ДНК из соответствующих образцов нормальной ткани. М – маркеры длин.

группы: с пониженным (15 случаев) и повышенным (8 случаев) уровнем плотности метилирования промоторной области гена в ДНК опухолей по сравнению с ДНК соответствующей нормальной ткани (верхняя и нижняя часть рис. 5). Полное или частичное деметилирование локуса *RHOA2* в ДНК опухолей наблюдается вдвое чаще, чем повышение уровня метилирования: 15/45 vs. 8/45 случаев. Важно, что деметилирование локуса *RHOA2* во всех 15 случаях сопровождается повышением транскрипционной активности гена в 2–10 и более раз (рис. 5, верхняя часть).

В другой группе опухолей (рис. 5, нижняя часть) частота (8/45 vs. 2/45) и плотность метилирования гена *RHOA* повышаются, что сопряжено с потерей транскрипционной активности гена в 5 из 8 случаев (BC18, RCC17, 18, 19 и EOC8). Почти 7-кратную потерю транскрипционной активности гена *RHOA* в образце BC18 при 5-кратном повышении его копийности можно объяснить плотным метилированием гена в этой опухоли (рис. 3).

Для сравнения исследовали метилирование локуса *RHOA2* с применением рестриктазы HpaII в

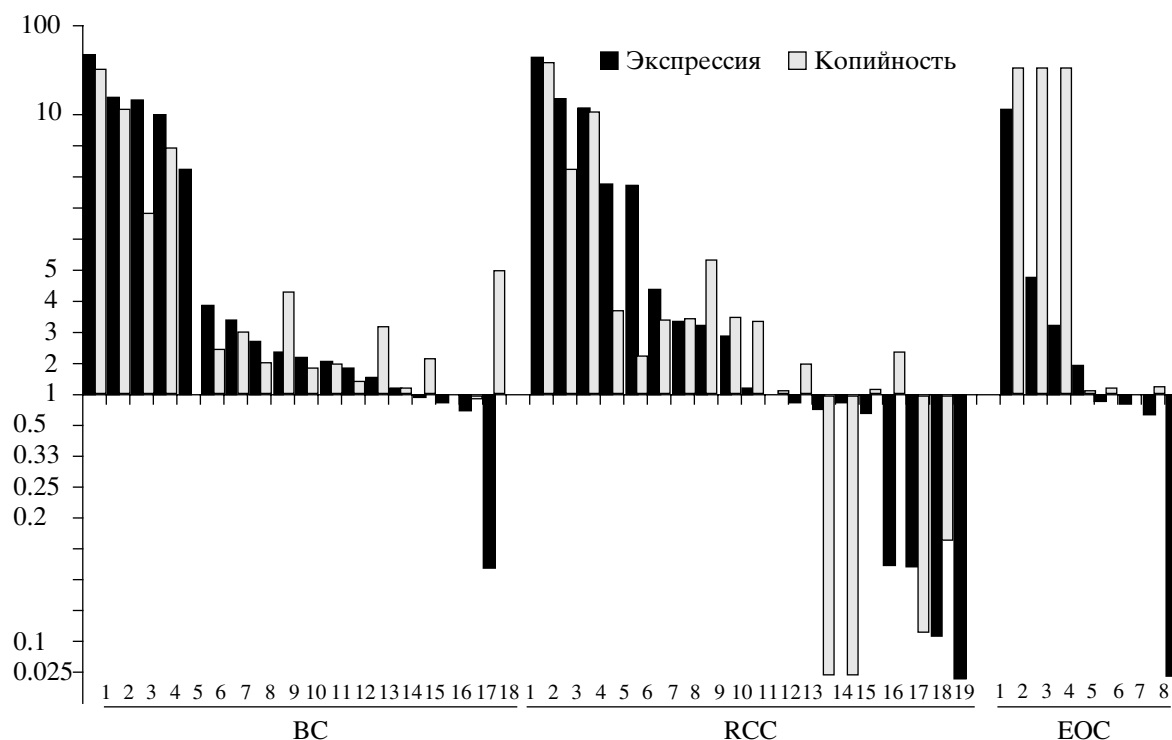


Рис. 3. Профиль относительного изменения уровня транскрипции гена *RHOA* и относительного изменения количества его геномных копий в образцах опухолей по сравнению с образцами ДНК нормальной ткани. Уровень транскрипции и уровень копийности гена *RHOA* в норме приняты за 1 (см. в главе “Экспериментальная часть”). Исследования проведены для образцов ВС (18 случаев), RCC (19 случаев) и ЕОС (8 случаев). Все ОТ-ПЦР и мультиплексные ПЦР повторены трижды и в расчетах учтены средние величины из трех определений. По оси абсцисс – порядковые номера образцов, последовательно: ВС, затем RCC и ЕОС; по оси ординат – соотношение уровня транскрипции (черные столбики) и копийности (серые столбики) гена *RHOA* в опухоли и в гистологически нормальной ткани. Праймеры и условия ПЦР приведены в табл. 1.

15 образцах ДНК из лейкоцитов периферической крови здоровых доноров. Метилирование гена *RHOA* наблюдалось во всех 15 образцах ДНК крови здоровых доноров.

Чтобы приблизительно оценить в исследуемом образце долю клеток, вовлеченных в метилирование гена *RHOA*, измеряли степень метилирования промоторного фрагмента этого гена с помощью полуколичественного МЧРА. Для этого использовали два подхода. Во-первых, сравнивали количество продукта ПЦР в образцах ДНК до и после гидролиза рестриктазой *HpaII* (рис. 4б). Во-вторых, получали полностью метилированную ДНК с помощью метилтрансферазы (*SssI*) и применяли ее (после гидролиза рестриктазой *HpaII*) в качестве эталона сравнения (рис. 4в). Как видно из табл. 3, результаты двух принципиально разных подходов почти совпали. В трех парах ВС и четырех парах RCC выявилось 8 образцов (Т или N), в которых методом МЧРА показано метилирование *HpaII*-участков (ВС: 5Т, 5N, 8Т, 8N, 17Т и RCC: 4N, 12Т и 18Т, сравни табл. 3 и рис. 5). Согласно полуколичественному МЧРА, в семи из восьми образцов степень метилирования варьирует от 70% до 100%. В единственном образце ВС17 степень метилирования была ниже 50%

(38–42%, табл. 3). Таким образом, можно предположить, что обнаружение метилирования методом МЧРА свидетельствует о вовлечении более 50% клеток в эпигенетическую модификацию гена *RHOA*. Это означает, что изменение метилирования промоторного района этого гена в половине исследованных образцов (23/45), по-видимому, может вносить вклад в нарушение транскрипционной активности этого гена в опухолях.

Согласно данным МЧРА, снижение плотности метилирования фрагмента *RHOA2* наблюдали в 33% (15/45) случаев, а деметилирование всегда (15/15) сопрягается с активацией транскрипции гена *RHOA*. Повышение уровня метилирования этого гена в опухолях наблюдали вдвое реже (8/45) и лишь в 60% случаев (5/8) оно сопровождается уменьшением транскрипционной активности.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Ген *RHOA* локализован в цитогенетическом районе 3p21.3 [34], который содержит не менее трех участков, связанных с развитием эпителиальных опухолей разной локализации. Это – LU-CA, AP20, а также новый сегмент, локализованный между маркерами D3S2409 и D3S3667. Со-

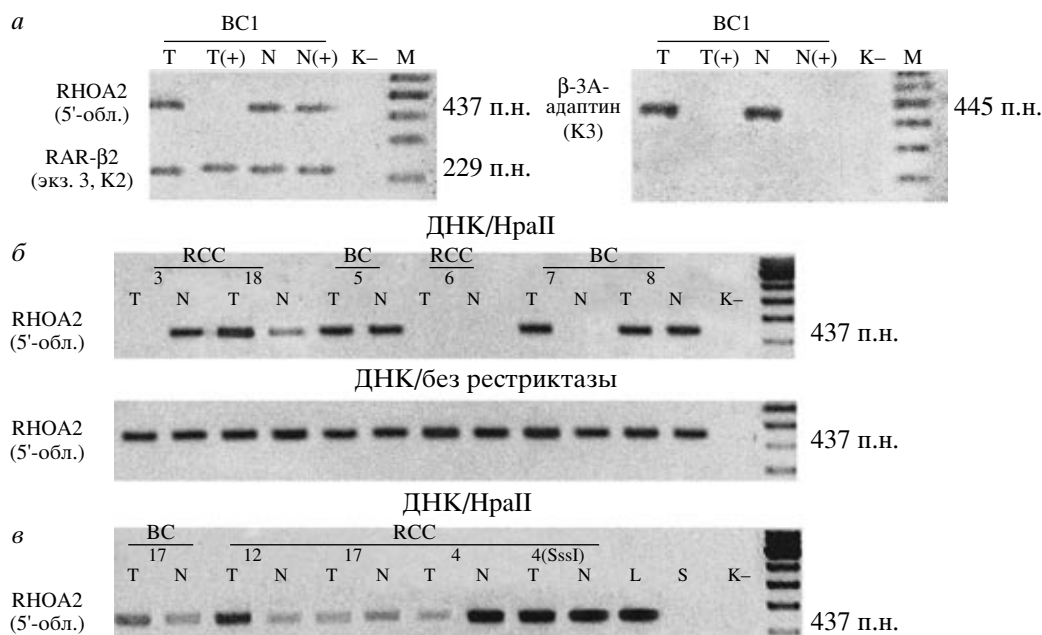


Рис. 4. *а* – Типичный результат анализа плотности метилирования фрагмента гена *RHOA* (*RHOA2*, 437 п.н.) методом МЧРА с использованием рестриктазы *HpaII* в образцах ДНК опухоли BC1 и парной нормы. Фрагмент экзона 3 гена *RARβ2* (K2, 229 п.н.), не содержащий участков узнавания использованных рестриктаз, применен в качестве контроля сохранности ДНК до (Т/Н) и после (Т(+)/Н(+)) гидролиза. ПЦР-фрагмент гена β-3А-адаптина (K3, 445 п.н.), содержащий участки узнавания использованных рестриктаз, но с неметилированными CpG-парами (как в норме, так и в опухоли), применяли для оценки полноты гидролиза. (К–) – контрольная ПЦР в отсутствие ДНК. Праймеры и условия ПЦР приведены в табл. 1 и в главе “Экспериментальная часть”. М – маркеры длин. *б* – Полуколичественный анализ метилирования фрагмента *RHOA2* на основании сравнения интенсивности свечения продуктов ПЦР фрагмента *RHOA2* на образцах ДНК после их расщепления рестриктазой *HpaII* и ПЦР на тех же образцах ДНК, инкубированных в условиях рестрикции, но в отсутствие фермента. (К–) – контрольная ПЦР в отсутствие ДНК. ПЦР включала 27 циклов, остальные условия и программы аналогичны описанным в пункте *а*. Справа показаны маркеры длин. *в* – Полуколичественный МЧРА при использовании в качестве эталона сравнения образцов ДНК RCC4T и RCC4N, искусственно метилированных метилтрансферазой *SssI* и далее гидролизованных рестриктазой *HpaII*. L, S – ДНК лейкоцитов и ДНК спермы человека после гидролиза рестриктазой *HpaII*, соответственно. (К–) – контрольная ПЦР в отсутствие ДНК. ПЦР включала 27 циклов, остальные условия и программы аналогичны описанным в пункте *а*. Справа показаны маркеры длин.

гласно данным UCSC Browser, этот сегмент, охватывающий 600 т.п.н., плотно покрыт UniGene-кластерами, насчитывающими более 30 генов [35]. Среди этих генов, кроме *RHOA/ARHA*, содержатся гены *MST1*, *MSTR1/RON*, *GPX1*, *USP4* и *DAG*, которые, как предполагается, играют роль в выполнении таких жизненно важных функций клетки, как деление, морфогенез, адгезия, подвижность, передача сигналов, апоптоз, ангиогенез и регуляция клеточного цикла, и которые связаны с развитием опухолей или, напротив, с супрессией онкогенеза [35]. Ген *RHOA* играет важную роль в разнообразных биологических процессах [3–6], его белковый продукт (малая GTPаза) представляет собой точку пересечения многих сигнальных путей клетки [36–39]. В частности, описаны сигнальные пути для Rho-индуцированной реорганизации актинового цитоскелета: активный Rho дает сигнал эффектору ROCK1, который фосфорилирует и активирует LIM-киназу; LIM-киназа, в свою очередь, фосфорилирует кофилин, тормозящий актин-деполимеризующую активность [38]. Повышение синтеза активной фор-

мы малой GTPазы индуцирует активацию рецептора эпидермального ростового фактора, что способствует увеличению подвижности клеток [39].

Множество работ посвящено изучению роли белкового продукта гена *RHOA* и посттрансляционным механизмам регуляции его активности, например, посредством фосфорилирования Ser-188 с помощью cAMP-активируемой протеинкиназы А (РКА) [40, 41]. Можно привести и другие примеры, и все они указывают на важную регуляторную роль белкового продукта гена *RHOA* в жизнедеятельности клеток и его связь со злокачественным перерождением клеток.

Повышенная транскрипция гена *RHOA* в эпителиальных опухолях

В данной работе оценивали уровень экспрессии гена *RHOA* в образцах первичных опухолей эпителиального происхождения методом полуколичественной ОТ-ПЦР и с помощью компьютерного анализа баз данных SAGE. Результаты, полученные с применением принципиально разных

№ образца	Опухоль				Норма				Экспрессия
	HpaII 6 CpG	HhaI 6 CpG	Bsh1236I 2 CpG	AciI 11 CpG	HpaII 6 CpG	HhaI 6 CpG	Bsh1236I 2 CpG	AciI 11 CpG	
BC	1								68.7
	2								26.3
	5								8.2
	7								3.4
	8								2.7
	11								2.0
RCC	1								68.3
	3								16.8
	4								7.8
	5								7.7
	6								4.4
	7								3.4
	8								3.2
	2								4.8
EOC	3								3.2
BC	17								0.67
	18								0.15
RCC	12								0.81
	17								0.15
	18								0.11
	19								0.06
EOC	7								0.61
	8								0.07

Рис. 5. Паттерн метилирования фрагмента RHOA2 (437 п.н., 25 CpG-пар) промоторной области гена *RHOA* в 23 парных образцах ДНК опухолей и соответствующих морфологически нормальных тканей, установленный методом МЧРА. Черный прямоугольник указывает на наличие продукта ПЦР после гидролиза данного образца ДНК соответствующей рестриктазой и на метилирование CpG-пар, содержащихся в участках рестрикции этого фермента; белый прямоугольник означает, что продукт ПЦР отсутствует и одна или более CpG-пара в составе участков узнавания данной рестриктазы не метилированы. В верхней части рисунка сгруппированы 15 случаев, для которых методом МЧРА показано снижение частоты и плотности метилирования фрагмента RHOA2 в опухолях. В нижней части представлены 8 случаев повышения уровня метилирования гена *RHOA* в опухолях. Справа приведены данные об изменении (повышении или понижении) транскрипционной активности гена *RHOA* в опухолях по сравнению с нормой.

подходов, хорошо согласуются между собой, что видно на примере изучения опухолей BC и EOC. Согласно анализу клонотек SAGE, для гена *RHOA* характерна более интенсивная транскрипция в опухолях, что отмечено в случае шести из восьми типов опухолей. При этом продукт гена *RHOA* не претерпевает альтернативного сплайсинга: и в опухолях, и в нормальных тканях обнаруживается одна форма мРНК. Из 45 опухолей BC, RCC и EOC, исследованных нами методом ОТ-ПЦР, достоверно чаще выявляются образцы с повышенным, а не пониженным уровнем транскрипции гена *RHOA* (24/45 vs. 6/45, $p \leq 0.5 \times 10^{-4}$). Эти данные подтверждают, что для гена *RHOA*, имеющего явный онкогенный потенциал [7, 8], более характерно то, что его транскрипция в эпителиальных опухолях усиливается, что типично для онкоге-

нов. Однако механизм активации гена на уровне транскрипции до сих пор неясен. Не удалось выявить мутации в гене *RHOA*, которые характерны для активации протоонкогенов, как, например, в случае генов *Kras* и *p53* [19, 23–25]. Одним из возможных механизмов активации протоонкогенов в опухолях может быть увеличение числа геномных копий гена, что наблюдали в случае онкогенов *N-myc* и *c-erbB*, степень амплификации которых достигает нескольких десятков копий на клетку [42, 43]. Недавно такой механизм активации описан для гена *PIK3CA*, кодирующего p110 α , каталитическую субъединицу фосфатидилинозиткиназы 3, в опухолях щитовидной железы [44]. Однако копийность гена *RHOA* в опухолях до сих пор не исследовали.

Таблица 3. Полуколичественный МЧРА*

Образец	ДНК(HpaII)/ДНК(-)**	ДНК (HpaII)/ДНК RCC4(T-N) (мет + HpaII)***
RCC4T (мет + HpaII)	0.99	1.01
RCC4N (мет + HpaII)	0.98	0.99
ДНК лейкоцитов(HpaII) ¹	0.88	0.98
ДНК спермы	0	0
BC5T	0.89	0.8
BC5N	0.94	0.98
BC8T	0.76	0.8
BC8N	0.92	1.00
BC17T	0.38	0.42
BC17N	0.12	0.12
RCC4T	0.06	0.04
RCC4N	0.98	1
RCC12T	0.85	0.97
RCC12N	0.08	0.10
RCC18T	0.73	0.79
RCC18N	0.16	0.2
RCC17T	0.09	0.12
RCC17N	0.18	0.23

* Приведено соотношение интенсивности свечения продуктов ПЦР после их разделения в 2%-ном агарозном геле; использованы образцы ДНК, расщепленные HpaII; проводили 27 циклов ПЦР. ** В качестве эталона сравнения использована ДНК соответствующего образца, инкубированная в тех же условиях, что и при расщеплении HpaII, но в отсутствии фермента. *** В качестве эталона сравнения использована ДНК RCC4T и RCC4N после обработки метилтрансферазой SssI в условиях фирмы-изготовителя и последующего расщепления HpaII; усредненные данные взяты за единицу, а материал обозначен как RCC4T-N (мет + HpaII). ¹ Все последующие образцы ДНК (приведенные ниже) также обработаны HpaII.

Умножение геномных копий гена RHOA в опухолях коррелирует с повышением уровня его транскрипции

В данной работе впервые исследована копияность гена *RHOA* и показано, что число копий исследуемого гена в эпителиальных опухолях BC, RCC и ЕОС больше (в среднем от 2 до 10 раз, в отдельных случаях до 70 раз) по сравнению с нормальными тканями. Причем умножение копий гена происходит существенно чаще, чем уменьшение копияности (28/45 vs. 5/45, $p = 0.7 \times 10^{-6}$). Более того, мультипликация гена *RHOA* в ДНК этих опухолей ассоциирована с повышенной транскрипционной активностью гена, что показано с высоким уровнем достоверности (22/25 vs. 3/25, $p = 0.9 \times 10^{-7}$).

Ген *RHOA* окружен полиморфными микросателлитными маркерами D3S2409 и D3S2456. Ранее нами показано, что в эпителиальных опухолях (BC, RCC и других) потере одного аллеля микросателлита с повышенной частотой (16% vs. 10%) сопутствует амплификация второго аллеля (Брага и соавт., неопубл. данные). Этот факт установлен ранее для случая амплификации участков 3p-плеча в немелкоклеточной карциноме легкого на основании данных аллелотипирования и флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH) [45]. Умножение копий гена *RHOA* может происходить по такому же или по иному пути, на-

пример, по пути “транслокация-вырезание-амплификация” и через многочисленные двунитевые разрывы, как показано для других онкогенов [46].

Таким образом, в данной работе впервые показано, что одним из возможных механизмов активации транскрипции гена *RHOA* в эпителиальных опухолях может быть увеличение числа его геномных копий. Степень увеличения числа копий гена *RHOA* (в 2–10 и более 50 раз) позволяет сделать такое предположение, поскольку она вполне сопоставима с данными по другим онкогенам (до нескольких десятков копий на клетку), для которых характерен такой механизм активации [42–44].

Деметилирование как фактор активации экспрессии гена RHOA в опухолях

Исследования метилирования ДНК в последнее десятилетие привлекают широкое внимание мирового научного сообщества как с позиций изучения механизмов эпигенетической модификации в жизненно важных биологических процессах, включая дифференцировку, старение, так и с целью выявления новых генов, связанных с онкогенезом [47, 48].

Промоторная область гена *RHOA* содержит протяженный CpG-островок с высоким содержанием CpG-пар (95 CpG на 1301 п.н.). Этот островок,

по-видимому, функционально важен, так как он содержит потенциальные участки для связывания более 50 транскрипционных факторов. Например, в промоторной области гена *RHOA* локализован участок (pCRE, проксимальный cAMP-зависимый элемент), взаимодействующий с транскрипционным фактором CREB и активирующий промотор гена *RHOA* [49]. Взаимодействие транскрипционных факторов с соответствующими участками узнавания в промоторной области гена *RHOA* может регулироваться их уровнем метилирования, хотя пока не было данных о роли метилирования в изменении транскрипции гена *RHOA* в опухолях.

Мы определили статус метилирования фрагмента промоторной области гена *RHOA* с помощью четырех метил-специфичных рестриктаз (HpaII, HhaI, AclI и Bsh1236I) и последующей ПЦР и показали, что паттерн метилирования этого гена, действительно, может играть роль в изменении его транскрипционной активности в опухолях. Степень метилирования промоторной области гена изменяется в 23 из 45 исследованных образцов опухолей (или нормы). Эти 23 случая распадаются на две группы: в 15 случаях наблюдается деметилирование и в 8 случаях – плотность метилирования в опухолях увеличивается. Случаи деметилирования гена *RHOA* строго соответствуют 2–10-кратному (и более) увеличению экспрессии гена (15/15). Напротив, в группе опухолей, где наблюдали возрастание частоты и плотности метилирования гена *RHOA*, оно было сопряжено с потерей транскрипционной активности гена в 5 из 8 случаев.

Таким образом, в данной работе впервые получены данные, свидетельствующие о возможной активации транскрипции онкогена *RHOA* в опухолях как за счет умножения копий гена, так и посредством деметилирования CpG-островков промоторного района.

Работа получила финансовую поддержку Российского фонда фундаментальных исследований (Э.А.Б. 04-04-48112), Президента Российской Федерации “Поддержка научных школ” (Г.Е.С. НШ-10122.2006.4) и “Поддержка молодых кандидатов наук” (Е.А.К. МК-963.2005.4), а также фонда INTAS (03-51-4983), Шведского онкологического общества, Шведской Королевской академии наук и Каролинского института (Е.Р.З.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Etienne-Manneville S., Hall A. 2002. Rho GTPases in cell biology. *Nature*. **420**, 629–635.
- Sahai E., Marshall C.J. 2002. Rho-GTPases and cancer. *Nature Rev.* **2**, 133–142.
- Hall A. 1998. Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science*. **279**, 509–514.
- Vial E., Sahai E., Marshall C.J. 2003. ERK-MAPK signaling coordinately regulates activity of Rac1 and RhoA for tumor cell motility. *Cancer Cell*. **4**, 67–69.
- Liberto M., Cobrinik D., Minden A. 2002. Rho regulates p21(CIP1), cyclin D1, and checkpoint control in mammary epithelial cells. *Oncogene*. **21**, 1590–1599.
- Vidal A., Millard S.S., Miller J.P., Koff A. 2002. Rho activity can alter the translation of p27 mRNA and is important for RasV12-induced transformation in a manner dependent on p27 status. *J. Biol. Chem.* **277**, 16433–16440.
- Avraham H., Weinberg R.A. 1989. Characterization and expression of the human rhoH12 gene product. *Mol. Cell Biol.* **9**, 2058–2066.
- Paterson H.F., Self A.J., Garrett M.D., Just I., Aktories K., Hall A. 1990. Microinjection of recombinant p21rho induces rapid changes in cell morphology. *J. Cell Biol.* **111**, 1001–1007.
- Kamai T., Kawakami S., Koga F., Arai G., Takagi K., Arai K., Tsujii T., Yoshida K.I. 2003. RhoA is associated with invasion and lymph node metastasis in upper urinary tract cancer. *BJU Int.* **91**, 234–238.
- Kamai T., Tsujii T., Arai K., Takagi K., Asami H., Ito Y., Oshima H. 2003. Significant association of Rho/ROCK pathway with invasion and metastasis of bladder cancer. *Clin. Cancer Res.* **9**, 2632–2641.
- Liu N., Bi F., Pan Y., Sun L., Xue Y., Shi Y., Yao X., Zheng Y., Fan D. 2004. Reversal of the malignant phenotype of gastric cancer cells by inhibition of RhoA expression and activity. *Clin. Cancer Res.* **10**, 6239–6247.
- Pille J.Y., Denoyelle C., Varet J., Bertrand J.R., Soria J., Opolon P., Lu H., Pritchard L.L., Vannier J.P., Malvy C., Soria C., Li H. 2005. Anti-RhoA and anti-RhoC siRNAs inhibit the proliferation and invasiveness of MDA-MB-231 breast cancer cells *in vitro* and *in vivo*. *Mol. Ther.* **11**, 267–274.
- Li X., Liu L., Tupper J.C., Bannerman D.D., Winn R.K., Sehti S.M., Hamilton A.D., Harlan J.M. 2002. Inhibition of protein geranylgeranylation and RhoA/RhoA kinase pathway induces apoptosis in human endothelial cells. *J. Biol. Chem.* **277**, 15309–15316.
- Kang W.K., Lee I., Ko U., Park C. 2005. Differential effects of RhoA signaling on anticancer agent-induced cell death. *Oncol. Rep.* **13**, 299–304.
- Fritz G., Just I., Kaina B. 1999. Rho GTPases are over-expressed in human tumors. *Int. J. Cancer*. **819**, 682–687.
- Kamai T., Arai K., Tsujii T., Honda M., Yoshida K. 2001. Overexpression of RhoA mRNA is associated with advanced stage in testicular germ cell tumor. *BJU Int.* **87**, 227–231.
- Kamai T., Yamanishi T., Shirataki H., Takagi K., Asami H., Ito Y., Yoshida K. 2004. Overexpression of RhoA, Rac1, and Cdc42 GTPases is associated with progression in testicular cancer. *Clin. Cancer Res.* **10**, 4799–4805.
- Horiuchi A., Imai T., Wang C., Ohira S., Feng Y., Nikaide T., Konishi I. 2003. Up-regulation of small GTPases, RhoA and RhoC, is associated with tumor progression in ovarian carcinoma. *Lab. Invest.* **83**, 861–870.
- Fritz G., Brchetti C., Bahlmann F., Schmidt M., Kaina B. 2002. Rho GTPases in human breast tumours: expression and mutation analyses and correlation with clinical parameters. *Br. J. Cancer*. **87**, 635–644.
- Pan Y., Bi F., Liu N., Xue Y., Yao X., Zheng Y., Fan D. 2004. Expression of seven main Rho family members in gastric carcinoma. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **315**, 686–691.

21. Leabu M., Uniyal S., Xie J., Xu Y.Q., Vladau C., Morris V.L., Chan B.M. 2005. Integrin $\alpha 2 \beta 1$ modulates EGF stimulation of Rho GTPase-dependent morphological changes in adherent human rhabdomyosarcoma RD cells. *J. Cell Physiol.* **202**, 754–766.
22. Kristelly R., Gao G., Tesmer J.J.G. 2004. Structural determinants of RhoA binding and nucleotide exchange in leukemia-associated Rho guanine-nucleotide exchange factor. *J. Biol. Chem.* **279**, 47352–47362.
23. Moscow J.A., He R., Gnarr J.R., Knutsen T., Weng Y., Zhao W.P., Whang-Peng J., Linehan W.M., Cowan K.H. 1994. Examination of human tumors for *rhoA* mutations. *Oncogene*. **9**, 189–194.
24. Rihet S., Vielh P., Camonis J., Goud B., Chevillard S., de Gunzburg J. 2001. Mutation status of genes encoding RhoA, Rac1, and Cdc42 GTPases in a panel of invasive human colorectal and breast tumors. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **127**, 733–738.
25. Nakamoto M., Teramoto H., Matsumoto S., Igishi T., Shimizu E. 2001. *K-ras* and *rhoA* mutations in malignant pleural effusion. *Int. J. Oncol.* **19**, 971–976.
26. Velculescu V.E., Zhang L., Vogelstein B., Kinzler K.W. 1995. Serial analysis of gene expression. *Science*. **270**, 484–487.
27. Schuler G.D., Boguski M.S., Stewart E.A. et al. 1996. A gene map of the human genome. *Science*. **274**, 540–546.
28. Lash A.E., Tolstoshev C.M., Wagner L., Schuler G.D., Strausberg R.L., Riggins G.J., Altschul S.F. 2000. SAGEmap: a public gene expression resource. *Genome Res.* **10**, 1051–1060.
29. *UICC TNM classification of malignant tumours*. Eds Sobin L.Y. et al. N.Y.: Wiley-Liss INC Publ., 2002.
30. *World Health Organization. International histological classification of tumours. Pathology and genetics of tumours of the breast and female genital organs*. Eds Tavassoli F.A., Devilee P. Lyon: IARC Press, 2003.
31. *World Health Organization. International histological classification of tumours. Pathology and genetics. Tumours of the urinary system and male genital organs*. Eds Eble J.N., Sauter G.S., Epstein J.I., Susterhenn I.A. Lyon: IARC Press, 2004.
32. Логонов В.И., Малюкова 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.
33. Ivanova E., Petrenko A., Gritskov T., Vinokourova S., Eshilev E., Kobzeva V., Kisseliov F., Kisseljo N. 2002. Methylation and silencing of the retinoic acid receptor-beta 2 gene in cervical cancer. *BMC Cancer*. **2**, 4 (el).
34. Kiss C., Li J., Szeles A., Gizatullin R.Z., Kashuba V.I., Lushnikova T., Protopopov A.I., Kelve M., Kiss H., Kholodnyuk I.D., Imreh S., Klein G., Zabarovsky E.R. 1997. Assignment of the *ARHA* and *GPX1* genes to human chromosome bands 3p21.3 by *in situ* hybridization and with somatic cell hybrids. *Cytogenet. Cell. Genet.* **79**, 228–230.
35. Брага Э.А., Киселев Л.Л., Забаровский Е.Р. 2004. От идентификации геномного полиморфизма к диагностическим и прогностическим маркерам эпителиальных опухолей. *Молекуляр. биология*. **38**, 145–154.
36. Sahai E., Olson M.F., Marshall C.J. 2001. Cross-talk between *Ras* and *Rho* signalling pathways in transformation favours proliferation and increased motility. *EMBO J.* **20**, 755–766.
37. Du J., Jiang B., Coffey R.J., Barnard J. 2004. *Raf* and *RhoA* cooperate to transform intestinal epithelial cells and induce growth resistance to transforming growth factor beta. *Mol. Cancer Res.* **2**, 233–241.
38. Maekawa M., Ishizaki T., Boku S., Watanabe N., Fujita A., Iwamatsu A., Obinata T., Ohashi K., Mizuno K., Narumiya S. 1999. Signaling from Rho to the actin cytoskeleton through protein kinases ROCK and LIM-kinase. *Science*. **285**, 895–898.
39. Caceres M., Guerrero J., Martinez J. 2005. Overexpression of RhoA-GTP induces activation of the epidermal growth factor receptor, dephosphorylation of focal adhesion kinase and increased motility in breast cancer cells. *Exp. Cell Res.* **309**, 229–238.
40. Dong J.-M., Leung T., Manser E., Lim L. 1998. cAMP-induced morphological changes are counteracted by the activated RhoA small GTPase and the Rho kinase ROK α . *J. Biol. Chem.* **273**, 22554–22562.
41. Rolli-Derkinderen M., Sauzeau V., Boyer L., Lemichez E., Baron C., Henrion D., Loirand G., Pacaud P. 2005. Phosphorylation of Serine 188 protects RhoA from ubiquitin/proteasome-mediated degradation in vascular smooth muscle cells. *Circ. Res.* **96**, 1152–1160.
42. Татосян А.Г. 2000. Онкогены. Сборник обзорных статей “Канцерогенез”. Под ред. Заридзе Д.Г. М.: Научн. мир, 57–74.
43. Зборовская И.Б. 2000. Молекулярно-биологические исследования онкогенов и генов-супрессоров опухолевого роста в клинической практике. Сборник обзорных статей “Канцерогенез”. Под ред. Заридзе Д.Г. М.: Научн. Мир, 361–379.
44. Wu G., Mambo E., Guo Z., Hu S., Huang X., Gollin S.M., Trink B., Ladenson P.W., Sidransky D., Xing M. 2005. Uncommon mutation, but common amplifications, of the *PIK3CA* Gene in Thyroid Tumors. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **90**, 4688–4693.
45. Varella-Garcia M., Gemmill R.M., Rabenhorst S.H., Lotto A., Drabkin H.A., Archer P.A., Franklin W.A. 1998. Chromosomal duplication accompanies allelic loss in non-small cell lung carcinoma. *Cancer Res.* **58**, 4701–4707.
46. van Roy N., Vandesompele J., Menten B., Nilsson H., De Smet E., Rocchi M., De Paepe A., Pahlman S., Speleman F. 2006. Translocation-excision-deletion-amplification mechanism leading to nonsyntenic coamplification of *MYC* and *ATBF1*. *Genes chromosom. cancer*. **45**, 107–117.
47. Киселева Н.П., Киселев Ф.Л. 2005. Деметилирование ДНК и канцерогенез. *Биохимия*. **70**, 900–911.
48. Miyamoto K., Fukutomi T., Akashi-Tanaka S., Hasegawa T., Asahara T., Sugimura T., Ushijima T. 2005. Identification of 20 genes aberrantly methylated in human breast cancers. *Int. J. Cancer*. **116**, 407–414.
49. Sauzeau V., Rolli-Derkinderen M., Marionneau C., Loirand G., Pacaud P. 2003. *RhoA* expression is controlled by nitric oxide through cGMP-dependent protein kinase activation. *J. Biol. Chem.* **278**, 9472–9480.