

Потенційна супресорна роль гена TSC-22 в пухлинах головного мозку людини

К. О. Шостак, В. В. Дмитренко, О. М. Гарифулін, В. Д. Розуменко¹,
О. В. Хоменко¹, Ю. П. Зозуля¹, Г. Цехетнер², В. М. Кавсан

Інститут молекулярної біології і генетики НАН України
Вул. Академіка Заболотного, 150, Київ, 03143, Україна

¹ Інститут нейрохірургії ім. А. П. Ромоданова АМН України
Вул. Мануїльського, 32, Київ, 04050, Україна

² Інститут молекулярної генетики Макса Планка
Берлін-Харлоттенбург 140059, Нойбнервег 6, Німеччина

Значну частину супресорних генів астроцитарних пухлин до цих пір не ідентифіковано, незважаючи на те, що докази їхнього існування на різних хромосомах людини були підтверджені останніми роками численними дослідженнями. Тому пошук нових генів, активація або інактивація яких асоційована з прогресією гліальних пухлин, є метою інтенсивних досліджень. У даній роботі диференційна гібридизація «грид» упорядкованих бібліотек кДНК ембріонального і постнатального головного мозку людини показала різницю в рівні сигналу з пробами тотальної кДНК нормального головного мозку і мультиформної гліобластоми для більш ніж сотні клонів кДНК. Повторна диференційна гібридизація відібраних первинним скринінгом клонів, а також аналіз РНК зразків нормального головного мозку і гліальних пухлин дозволили виявити 16 нуклеотидних послідовностей, вміст яких змінюється в пухлинах. Серед мРНК, вміст яких зменшується в астроцитарних пухлинах, було ідентифіковано мРНК TSC-22, відповідна кДНК якої міститься в клоні ICRFr507J1041 бібліотеки кДНК ембріонального головного мозку людини. Нозерн-гібридизація тотальних РНК чотирьох зразків нормального головного мозку та 17 зразків різних пухлин головного мозку виявила значне зменшення експресії гена TSC-22 в більшості зразків мультиформної гліобластоми, анапластичної астроцитоми, астроцитоми II ступеня злоякісності, а також у деяких інших новоутвореннях — загалом, в 12 індивідуальних пухлинах. В декількох пухлинах головного мозку експресія гена TSC-22 була відсутня повністю. Саузерн-гібридизація геномної ДНК виявила делеції в геномному локусі гена TSC-22 в двох із трьох досліджених зразків анапластичних астроцитом. Показаний у даній роботі суттєво зменшений рівень продукції мРНК TSC-22 в пухлинах головного мозку, описаний раніше зменшений вміст мРНК TSC-22 в пухлинах слинної залози, делеції в локусі гена TSC-22 в анапластичних астроцитомах, негативна роль білка TSC-22 в процесі проліферації клітин, локалізація гена TSC-22 на ділянці 13q14 поряд з геном ретинобластоми (Rb) — все це свідчить про потенційну супресорну роль зазначеного гена.

Вступ. Сучасні уявлення щодо молекулярних основ пухлин головного мозку людини відображають комплексну взаємодію між численними генетичними подіями, які включають хромосомні аномалії, активацію протоонкогенів, інактивацію супресорних генів пухлин, аберантну експресію факторів росту і їхніх рецепторів. Різними науковими група-

ми були отримані цитогенетичні і молекулярно-генетичні докази інактивації в пухлинах головного мозку потенційних супресорних генів пухлин, які знаходяться на хромосомах 1p, 9p, 10, 11p, 13q, 17p, 19q та 22q [1—7]. Однак значну частину цих генів ще й досі не ідентифіковано.

Більш інформативний підхід до вивчення молекулярних основ пухлин головного мозку включає вивчення експресії генів з метою концентрування уваги не лише на структурних змінах, а й на регуляторних відмінностях. Варіації в експресії

генів є важливими показниками нормальної клітинної фізіології, і при порушеннях роблять прямий внесок у клітинні аномалії, до яких входить і пухлинний процес. У цьому контексті можна очікувати, що ідентифікація, клонування і характеристика генів із зміненою в пухлинних клітинах експресією забезпечать важливу інформацію для кращого розуміння механізмів виникнення і прогресії злоякісних новоутворень. Краще розуміння цих процесів має важливе значення для удосконалення діагностики і прогностичної оцінки, для визначення біологічних мішеней при розробці хімотерапевтичних препаратів. Таким чином, пошук нових генів, активація або репресія яких асоційована з прогресією астроцитарних пухлин, є на сьогодні метою інтенсивних досліджень.

Для виявлення змін в експресії генів в астроцитарних пухлинах головного мозку людини нами була використана диференційна гібридизація «грид» упорядкованих бібліотек кДНК ембріонального та постнатального головного мозку людини з пробами тотальних кДНК нормального головного мозку та мультиформної гліобластоми. Клоні кДНК, для яких виявлено різницю в інтенсивності гібридизації з використаними пробами, були охарактеризовані за допомогою аналізу нуклеотидної послідовності вставок кДНК. Розміри транскриптів і рівні експресії відповідних генів в астроцитарних пухлинах різного ступеня злоякісності, а також в інших типах пухлин головного мозку визначали Нозерн-гібридизацією РНК, виділеної з хірургічних зразків пухлин.

Серед генів, рівень експресії яких зменшується в астроцитарних пухлинах, виявлено ген TSC-22. Вперше цей ген виділено з лінії мишачих остеобластів як ген, що стимулюється трансформуючим фактором росту $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$ stimulated clone 22) [8]. Він кодує білок, який містить «лейцинову блискавку», і є транскрипційним репресором [9]. Раніше було показано, що рівень експресії гена TSC-22 суттєво знижений в пухлинах слинної залози, а також, що даун-регуляція гена TSC-22 значно посилює ріст клітинної лінії раку слинної залози [10, 11]. Ці дані, а також отримані нами результати стосовно зменшеного рівня експресії TSC-22 в пухлинах головного мозку і виявлені делеції в локусі гена TSC-22 в анапластичних астроцитомах свідчать про потенційну супресорну роль цього гена в онкогенезі.

Матеріали і методи. Диференційну гібридизацію «грид» упорядкованих бібліотек кДНК ембріонального та постнатального головного мозку людини, одержаних з Центру ресурсів і бази даних проекту «Геном людини» Німеччини (RZPD, Re-

source Zentrum/Primary Data Base), з пробами тотальних кДНК нормального головного мозку і мультиформної гліобластоми здійснювали, як описано в наших попередніх роботах з визначення генів з різною специфічністю експресії [12–14]. Нуклеотидні послідовності вставок кДНК визначали за методом Сенгера [15]. Нозерн-гібридизацію РНК, виділеної гуанідинтіоціанатним методом [16] із заморожених у рідкому азоті хірургічних зразків пухлин головного мозку та нормального головного мозку, які отримані в Інституті нейрохірургії ім. А. П. Ромоданова АМН України, проводили згідно із стандартними методиками [17]. Синтез міченої дигоксигеніном проби кДНК ICRFp507J1041 за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) та Саузерн-гібридизацію геномної ДНК з міченою дигоксигеніном пробую проводили згідно з інструкцією виробника («Boehringer Mannheim», Німеччина).

Результати і обговорення. Диференційна гібридизація упорядкованих бібліотек кДНК ембріонального і постнатального головного мозку людини показала різницю в гібридизації з пробами тотальної кДНК нормального головного мозку і мультиформної гліобластоми для більш ніж сотні клонів кДНК. Подібно до віднімальної гібридизації [18], цей метод має перевагу в тому, що не потребує попередньої інформації про нуклеотидні послідовності, однак є унікальним, оскільки дозволяє порівнювати як загальні, так і специфічні мРНК в декількох тканинах або зразках клітин одночасно [19]. Таким чином, в одному експерименті можна ідентифікувати гени, які експресуються лише в нормальних тканинах, іншими словами це потенційні супресорні гени пухлин, а також гени, які, навпаки, мають пухлинспецифічну експресію, тобто є маркерами пухлин, або ж активованими онкогенами.

Повторна диференційна гібридизація відібраних первинним скринінгом клонів, а також аналіз РНК зразків нормального головного мозку і гліальних пухлин дозволили виявити 16 нуклеотидних послідовностей, вміст яких змінюється в пухлинах. Серед мРНК, вміст яких зменшується в пухлинах головного мозку, було ідентифіковано мРНК TSC-22, відповідна кДНК якої міститься в клоні ICRFp507J1041 бібліотеки кДНК ембріонального головного мозку людини. Нуклеотидна послідовність кДНК ICRFp507J1041 (рис. 1) є ідентичною опублікованій раніше нуклеотидній послідовності кДНК TSC-22 [20, 21], однак 3'-нетрансльований район кДНК ICRFp507J1041 коротший на два нуклеотиди порівняно з 3'-нетрансльованим районом кДНК TSC-22 в цих роботах. Аналогічна гетеро-

генність сайтів поліаденілювання первинного транскрипту з використанням одного й того ж сигналу поліаденілювання була описана нами для трьох генів (альбуміну, $^G\gamma$ -глобіну та $^A\gamma$ -глобіну) в клітинах печінки людини [22], а також опублікована іншими авторами для декількох інших генів [23—27].

Ген TSC-22 є еволюційно консервативним. За допомогою Саузерн-гібридизації геномних ДНК з різних організмів, так званого зоо-блота, було виявлено нуклеотидні послідовності цього гена у хребетних — людини, миші, корови, курки, жаби та риби [21]; його було клоновано у людини [20, 21], миші [8], щура [28], курки [29]. Крім того, комп'ютерний аналіз показав, що білок TSC-22 має 69 % гомології з коротшим за розміром пептидом DSIP (delta-sleep-inducing peptide) свині [30] і 52 % гомології — з білком короткозорості дрозофіли shs (shortsighted) [31]. Білок TSC-22 і його гомологи містять мотив «лейцинової блискавки». Це вказує на їхню можливу функцію як транскрипційних факторів, хоча на відміну від відомих транскрипційних факторів родини bZIP та bHLH-Zip TSC-22 не має класичного ДНК-зв'язуючого домену. TSC-22 є транскрипційним регулятором промотора гена натрійуретичного пептиду С (CNP, C-type natriuretic peptide), взаємодіючи з GC-багатим районом цього промотору [21]. Нещодавно було знайдено, що TSC-22 є транскрипційним репресором, функціонуючи як гомодимер, який утворюється за рахунок «лейцинової блискавки» [9]. Не виключено, що TSC-22 може утворювати гетеродимери з іншими партнерами, які містять «лейцинову блискавку», і, таким чином, або репресува-

ти класичні транскрипційні активатори, як це роблять, наприклад, домінантно-негативні білки Id1 — Id4 з родини факторів, що мають мотив спіраль-петля-спіраль (helix-loop-helix) [32], або змінювати свою репресорну функцію.

Ген TSC-22 спочатку був виявлений в бібліотеці кДНК остеобластами миші як клон, що стимулюється TGF- β 1 [8] і належить до родини генів ранньої відповіді. Експресія цього гена також швидко зростає при обробці клітин іншими цитокінами, фактором некрозу пухлин α , γ -інтерфероном і деякими індукторами, такими як дексаметазон, токсин холери або 12-міристан, 13-ацетатдієфір форболу, ліпополісахариди [20]. Вивчення механізму дії пригнічення прогестероном росту клітинної лінії T47D карциноми молочної залози людини і індукції диференціювання цих клітин показало, що ген TSC-22 є однією з мішеней прогестерону [33]. Індукція прогестероном свідчить про наявність нуклеотидних послідовностей в промоторі гена TSC-22, які відповідають за зв'язування з рецептором прогестерону, так званих елементів PRE (progesterone response element). Експресія гена зростала у відповідь на дексаметазон — синтетичний активатор рецептора глюкокортикоїду [8]. Останній, подібно до рецептора прогестерону, активує промотори деяких генів у результаті взаємодії з послідовностями GRE (glucocorticoid response element), аналогічними PRE.

Для визначення рівня експресії гена TSC-22 в пухлинах головного мозку з хірургічних зразків гліальних пухлин виділено тотальну РНК і проведено Нозерн-гібридизацію з радіоактивно міченою пробкою кДНК ICRFp507J1041. На рис. 2 наведено

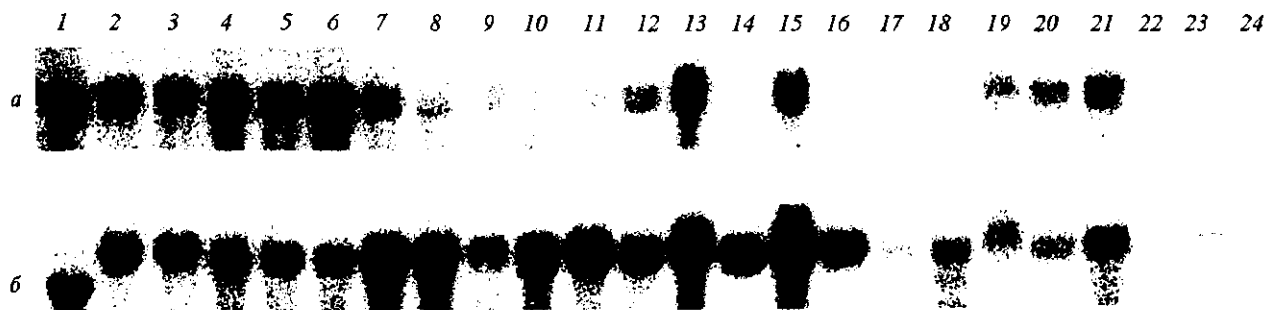


Рис. 2. Аналіз експресії гена TSC-22 в нормальних тканинах людини і пухлинах головного мозку людини: а — Нозерн-гібридизація з міченою радіоізотопом ^{32}P кДНК ICRFp507J1041; б — гібридизація з контрольною пробкою кДНК бета-актину. Кожна доріжка містить 20 мкг тотальної РНК (1 — серце; 2 — нирка; 3—6 — зразки нормального головного мозку; 7—10 — зразки мультиформної гліобластоми; 11—15, 21 — зразки анапластичної астроцитоми; 16 — ембріональний мозок (вік 6 тижнів); 17, 19 — зразки менинголіальної менингіоми; 18, 20 — зразки астроцитоми 2-го ступеня злякисності; 22 — саркоматозна менингіома; 23 — саркома мозку; 24 — олигодендрогліома 2—3-го ступеня злякисності

результати Нозерн-гібридизації РНК, одержаної з хірургічних зразків гліальних пухлин різного ступеня злоякісності. В усіх зразках виявляється транскрипт розміром 1,8 тис. нуклеотидів. Як показано [20, 21], ген TSC-22 експресується у вигляді одного транскрипту розміром 1,8 тис. нуклеотидів у широкому асортименті клітин, за винятком периферійних лейкоцитів, причому найвищий рівень експресії — в клітинах серця, мозку і легень, а також товстої кишки. В наших експериментах найінтенсивніший гібридизаційний сигнал був з РНК головного мозку дорослої людини, зразки 58А, 55А, 54А, 52А (доріжки 3—6 відповідно), трохи слабший — з РНК серця і нирок дорослої людини (доріжки 1 і 2 відповідно). Більшість зразків РНК пухлин головного мозку виявила гібридизаційні сигнали меншої інтенсивності, ніж РНК нормального головного мозку.

Порівняння інтенсивності гібридизації РНК з пробюю кДНК TSC-22 відносно гібридизації з контрольною пробюю кДНК β -актину однозначно демонструє значне зменшення вмісту мРНК TSC-22 в трьох зразках мультиформної гліобластоми (зразки 56, 93, 106; доріжки 8—10 відповідно). Знижений рівень цієї РНК спостерігається і в четвертому зразку мультиформної гліобластоми (зразок 59, доріжка 7). Значно зменшений рівень мРНК TSC-22 відмічено в трьох з п'яти анапластичних астроцитом (зразки 99, 92, 55; доріжки 11—12, 14 відповідно), причому в двох з них мРНК TSC-22 майже відсутня. Дуже низьким є вміст мРНК TSC-22 в одній з двох астроцитом II ступеня злоякісності (зразок 52, доріжка 18) і в одній з двох доброякісних менінгіом (зразок 36, доріжка 17). Практично відсутня мРНК TSC-22 і в інших типах злоякісних пухлин головного мозку — в саркоматозній менінгіомі, саркомі, а також олігодендрогліомі II—III ступеня (зразки 18, 4, 62; доріжки 22, 23 і 24 відповідно).

Таким чином, проведена нами Нозерн-гібридизація РНК показала, що ген TSC-22 інактивується більш ніж в половині астроцитарних пухлин, а також в інших типах пухлин головного мозку, навіть на ранніх стадіях їхнього формування.

Аналіз експресії гена TSC-22 в доброякісних і злоякісних пухлинах слинної залози [10] виявив зменшений вміст мРНК TSC-22 порівняно з нормальними клітинами, а в деяких пухлинах — її повну відсутність. Ці результати свідчать про те, що зменшений рівень TSC-22 може відігравати мажорну роль у пухлинному процесі клітин слинної залози. TSC-22 є негативним регулятором проліферації, виконуючи роль посередника в цьому процесі, передаючи сигнал від TGF- β 1 [34]. Транс-

фекція клітин HSC-39 конструкцією, яка експресує TSC-22, призводила до суттєвого зниження життєдайності клітин і спричиняла їхній апоптоз, дуже вірогідно, за участю протеазної активності типу CPP32. Специфічний синтетичний пептидний інгібітор протеази CPP32 пригнічував апоптоз клітин як TGF- β 1-опосередкований, так і той, що був результатом дії TSC-22. Отже, TSC-22 напевне викликав апоптоз клітин карциноми шлунка людини шляхом активації CPP32-подібної протеазної активності, а також, можливо, брав участь в апоптозі клітин, який індукувався під дією TGF- β 1. Введення до клітин TYS раку слинної залози, оброблених веснарїноном (новий протипухлинний лікарський засіб), антисенс-олігонуклеотиду проти мРНК TSC-22 стимулює ріст клітин TYS за пасивних умов [10]. Однак в умовах росту клітин антисенс-олігонуклеотид не впливає на ріст клітин. Більше того, антисенс-олігонуклеотид супресує антипроліферативний ефект веснарїнону. Ці результати показують, що TSC-22 є негативним регулятором росту і може відігравати важливу роль в антипроліферативному ефекті веснарїнону [10].

Для з'ясування ролі зростання або зниження експресії TSC-22 на ріст клітин TYS *in vitro* та *in vivo* було проведено трансфекцію клітин векторами, які експресують смислову і антисмислову РНК TSC-22, і проаналізовано ріст клітин *in vitro* та їхній пухлинний потенціал в експериментах з «голими мишами» [11]. Експресія білка TSC-22 була підвищеною в смислових трансфектантах і зниженою — в антисмислових. Всупереч очікуваному, підвищений рівень білка TSC-22 не впливає на ріст клітин *in vitro* та *in vivo*, однак знижений рівень білка TSC-22 помітно посилює ріст клітин TYS як *in vitro*, так і *in vivo*.

Ген TSC-22 людини був картований на довгому плечі 13-ї хромосоми в районі q14 [20]. Приблизно в 50 % астроцитом відбувається втрата довгого плеча хромосоми 13, що свідчить про присутність супресорного гена на цій хромосомі [35—38]. Гетерозиготність в локусі гена ретинобластоми (Rb) на ділянці 13q14 відсутня в 30 % астроцитом високого ступеня злоякісності і її не знайдено ні в одній з астроцитом низького ступеня [35]. Ці результати свідчать про те, що локус гена Rb є однією з мішеней делецій на ділянці 13q14, однак вказують і на можливість існування іншого супресорного гена астроцитом на цій ділянці.

Для виявлення потенційних делецій в локусі гена TSC-22 нами був здійснений аналіз геномної ДНК, одержаної з трьох зразків анапластичних астроцитом, одного зразка нормального головного мозку і одного зразка нормального нирки. Саузерн-

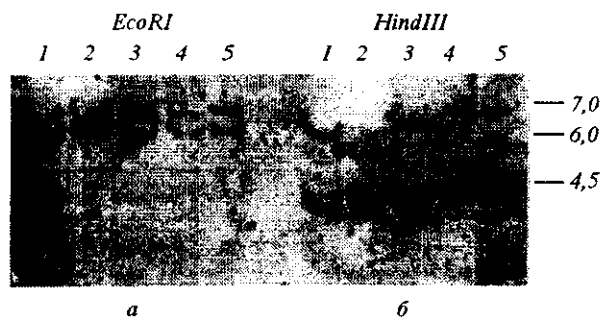


Рис. 3. Саузерн-гібридизація геномних ДНК з міченим дигокси-геніном фрагментом ICRFp507J1041. Кожна доріжка містить 10 мкг геномної ДНК, розщепленої рестрикційною ендонуклеазою *EcoRI* (а), або *HindIII* (б): 1 — нирка; 2, 3, 5 — зразки анапластичної астроцитомі; 4 — нормальний головний мозок. Праворуч вказано приблизні розміри фрагментів у тис. п. н.

гібридизація геномних ДНК з міченим дигокси-геніном фрагментом кДНК ICRFp507J1041, отриманим за допомогою ПЛР з праймерами рГ1 та рГ2 (позиції праймерів позначено на рис. 1), показала відсутність *HindIII*-фрагмента розміром 7,0 тис. п. н. у ДНК двох анапластичних астроцитом (рис. 3, доріжки 2 і 3). Це свідчить про втрату генетичного матеріалу в локусі гена TSC-22 в цих двох пухлинах.

Отримані нами результати щодо суттєвого зменшення вмісту мРНК TSC-22 в пухлинах головного мозку, показана раніше іншими авторами відсутність експресії гена в пухлинах слинної залози, негативна роль білка TSC-22 в процесі проліферації клітин, делеції в геномному локусі гена TSC-22, що знаходиться на довгому плечі хромосоми 13 — відомій мішені делецій в астроцитарних пухлинах, все це разом свідчить про потенційну супресорну роль згаданого гена в пухлинному процесі.

Геноінженерні конструкції з геном TSC-22 можуть мати практичне використання при хіміотерапії пухлин. В експериментах з трансфекції клітинної лінії TYS раку слинної залози людини та в експериментах з «голими мишами» було показано, що надекспресія TSC-22 посилює індукований 5-бромурацилом апоптоз клітин TYS [39], а також чутливість пухлин *in vivo* до 5-бромурацилу [40].

Робота частково фінансувалася за рахунок гранта Фонду фундаментальних досліджень 5.4.46 «Транскрипційне картування окремих районів 21-ї хромосоми людини».

K. O. Shostak, V. V. Dmitrenko, O. M. Garifulin,
V. D. Rozumenko, O. V. Khomenko, Yu. A. Zozulya, G. Zehetner,
V. M. Kavsan

Potential tumour suppressor role of TSC-22 gene in human brain tumours

Summary

At present some biological mechanisms assumed to initiate and promote astrocytoma formation have been partly revealed. Several putative genes in regions strongly suggested to harbour tumour suppressors should be identified. For example, these are the regions on the chromosomal arms 1p, 10p, 13q, 19q and 22q. More comprehensive approach in the analysis of astrocytomas includes gene expression determination in order to focus not only on the structural alterations but on the regulatory differences as well. Such changes in gene expression are important determinants of normal cellular physiology and, if disturbed, directly contribute to abnormal cellular physiology, including cancer. The search of new genes, the activation or inactivation of which is associated with the progression of astrocytic tumours, is still a goal of intensive investigations. In this work, more than a hundred cDNA clones differed in hybridization signals between human normal brain and glioblastoma multiform have been found by screening of high density grids of arrayed human fetal brain and human postnatal brain cDNA libraries. The repeated differential hybridization of the clones selected by primary screening, as well as the analysis of RNA from human adult normal brain and glial tumour samples have revealed 16 nucleotide sequences, which content had changed in tumours. The decreased content in astrocytic tumours has been determined for TSC-22 mRNA corresponding to cDNA in ICRFp507J1041 clone from the library of human fetal brain cDNAs. The Northern blot hybridization of RNA from different human brain tumours has shown very low amount of TSC-22 mRNA in a bulk of the investigated samples of glioblastoma multiform, anaplastic astrocytoma, WHO grade II astrocytoma and some other tumours. The expression of TSC-22 gene has not been detected at all in astrocytoma WHO grade II as well as in meningioma, brain sarcoma, sarcomatous meningioma and oligodendroglioma (one sample of each tumor kind). The Southern blot hybridization has revealed the deletions in genomic loci of TSC-22 gene in two of three anaplastic astrocytomas analyzed. A significantly decreased level of the production of TSC-22 mRNA in the human brain tumours and, as it was shown previously, in the salivary gland tumours, an antiproliferative role of TSC-22 protein, the localization of TSC-22 gene in 13q14 region close to the known tumour suppressor retinoblastoma (*Rb*) gene, and the deletions in this genomic locus strongly evidence TSC-22 to be a tumour suppressor.

Е. А. Шостак, В. В. Дмитренко, О. М. Гарифулин,
В. Д. Розуменко, О. В. Хоменко, Ю. П. Зозуля, Г. Цехетнер,
В. М. Кавсан

Потенциальная супресорная роль гена TSC-22 в опухолях головного мозга человека

Резюме

Значительная часть супресорных генов астроцитарных опухолей до сих пор не идентифицирована, несмотря на то, что доказательства их существования на разных хромосомах человека были подтверждены в последние годы многочисленными исследованиями. Поэтому поиск новых генов, активация или инактивация которых ассоциирована с прогрессией глиальных опухолей, является целью интенсивных исследований. В данной работе дифференциальная гибридизация «грид» упорядочен-

ных библиотек кДНК эмбрионального и постнатального головного мозга человека показала разницу в уровне гибридизационного сигнала с пробамми тотальной кДНК нормального головного мозга и мультиформной глиобластомы для более чем сотни клонов кДНК. Повторная дифференциальная гибридизация отобранных первичным скринингом клонов, а также анализ РНК образцов нормального головного мозга и глиальных опухолей позволили определить 16 нуклеотидных последовательностей, содержание которых изменяется в опухолях. В астроцитарных опухолях с пониженным содержанием мРНК была идентифицирована мРНК TSC-22, соответствующая кДНК которой содержится в клоне ICRFp507J1041 библиотеки кДНК эмбрионального головного мозга человека. Позерн-гибридизация тотальных РНК четырех образцов нормального головного мозга и 17 образцов различных опухолей головного мозга выявила значительное снижение экспрессии гена TSC-22 в большинстве образцов мультиформной глиобластомы, анапластической астроцитомы, астроцитомы II степени злокачественности, а также в некоторых других новообразованиях — в целом, в 12 индивидуальных опухолях. В нескольких опухолях головного мозга экспрессия гена TSC-22 отсутствовала полностью. Саузерн-гибридизация геномной ДНК выявила делеции в геномном локусе гена TSC-22 в двух из трех исследованных образцов анапластических астроцитом. Показанный в данной работе значительно пониженный уровень продукции мРНК TSC-22 в опухолях головного мозга, описанный ранее пониженный уровень мРНК TSC-22 в опухолях слюнной железы, делеции в локусе гена TSC-22 в анапластических астроцитомах, негативная роль белка TSC-22 в процессе пролиферации клеток, локализация гена TSC-22 на участке 13q14 рядом с геном ретинобластомы (Rb) — все это свидетельствует о потенциальной супрессорной роли этого гена.

ПЕРЕЛІК ЛІТЕРАТУРИ

- Maier D., Zhang Z., Taylor E., Hamou M.-F., Gratzl O., Van Meir E. G., Scott R. G., Merlo A. Somatic deletion mapping on chromosome 10 and sequence analysis of PTEN/MMAC1 point to the 10q25-26 region as the primary target in low-grade and high-grade gliomas // *Oncogene*.—1998.—16.—P. 3331—3335.
- Rosenberg E. J., Lisle D. K., Burwick J. A., Ueki K., von Deimling A., Mohrenweiser H. W., Louis D. N. Refined deletion mapping of the chromosome 19q glioma tumor suppressor gene to the D19S412-STD interval // *Oncogene*.—1996.—13.—P. 2483—2485.
- Ino Y., Silver J. S., Blazejewski L., Nishikawa R., Matsutani M., von Deimling A., Louis D. N. Common regions of deletions on chromosome 22q12.3q13.1 and 22q13.2 in human astrocytomas appear related to malignancy grade // *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*—1999.—58.—P. 881—885.
- Simons A., Jeuken J. W., Eleweld M. J., Boerman R. H., Geurts Van Kessel A. Isolation and characterization of glioblastoma-associated homozygously deleted DNA fragments from chromosomal region 9p21 suggests involvement of multiple tumour suppressor genes // *J. Pathol.*—1999.—189.—P. 402—409.
- Smith J. S., Tachibana I., Allen C., Chiappa S. A., Lee H. K., McIver B., Jenkins R. B., Raffel C. Cloning of a human ortholog (RPH3AL) of (RNO)Rph3al from a candidate 17p13.3 medulloblastoma tumor suppressor locus // *Genomics*.—1999.—59.—P. 97—101.
- Farrell W. E., Clayton R. N. Tumor suppressor genes in pituitary tumour formation // *Baillieres Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.*—1999.—13.—P. 81—93.
- Bello M. J., de Campos J. M., Vaquero J., Kusak M. E., Sarasa J. L., Rey J. A. High-resolution analysis of chromosome arm 1p alterations in meningioma // *Cancer Genet. Cytogenet.*—2000.—20.—P. 30—36.
- Shibanuma M., Kuroki T., Nose K. Isolation of a gene encoding a putative leucine zipper structure that is induced by transforming growth factor beta1 and other growth factors // *J. Biol. Chem.*—1992.—267.—P. 10219—10224.
- Kestler H. A., Blanchetot C., den Hertog J., van der Saag P. T., van der Burg B. Transforming growth factor beta stimulated clone TSC-22 is a member of a family of leucine zipper proteins that can homo- and heterodimerize and has transcriptional repressor activity // *J. Biol. Chem.*—1999.—274.—P. 27439—27447.
- Kawamata H., Nakashiro K., Uchida D., Hino S., Omotehara F., Yoshida H., Sato M. Induction of TSC-22 by treatment with a new anti-cancer drug, vesnarinone, in a human salivary gland cancer cell // *Brit. J. Cancer*.—1998.—77.—P. 71—78.
- Nakashiro K., Kawamata H., Hino S., Uchida D., Miwa Y., Hamano H., Omotehara F., Yoshida H., Sato M. Down-regulation of TSC-22 (transforming growth factor beta-stimulated clone 22) markedly enhances the growth of a human salivary gland cancer cell line *in vitro* and *in vivo* // *Cancer Res.*—1998.—58.—P. 549—555.
- Дмитренко В. В., Гарифулин О. М., Смикодуб А. И., Кавсан В. М. Анализ экспрессии генома человека при помощи библиотек кДНК различных органов // *Цитология и генетика*.—1995.—29.—С. 64—71.
- Дмитренко В. В., Гарифулин О. М., Шостак Е. А., Смикодуб А. И., Кавсан В. М. Характеристика различных типов мРНК, экспрессирующихся в головном мозге человека // *Цитология и генетика*.—1996.—30.—С. 41—47.
- Дмитренко В. В., Шостак К. О., Гарифулин О. М., Зозуля Ю. П., Кавсан В. М. Зміни експресії генів у клітинах астроцитарного головного мозку людини // *Експерим. онкологія*.—1998.—20.—С. 191—197.
- Sanger F. S., Nicklen S., Coulson A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*.—1977.—74.—P. 6463—6467.
- Chomchinsky P., Sacchi N. Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction // *Anal. Biochem.*—1987.—162.—P. 156—159.
- Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T. *Molecular cloning. A laboratory manual*.—New York: Cold Spring Harbor Lab. press, 1989.
- Diachenko L., Lau Y.-F. C., Campbell A. P., Chenchik A., Mogadam F., Huang B., Lukyanov S., Gurskaya N., Sverdlov E. D., Siebert P. D. Suppression subtractive hybridization. A method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*.—1996.—93.—P. 6025—6030.
- Nguyen C., Rocha D., Granjeaud S., Baldit M., Bernard K., Naquet P., Jordan B. R. Differential gene expression in the murine thymus assayed by quantitative hybridization of arrayed cDNA clones // *Genomics*.—1995.—29.—P. 207—216.
- Jay P., Ji J. W., Marsollier C., Taviaux S., Berge-Lefranc J.-L., Berta P. Cloning of the human homologue of the TGFbeta-stimulated clone 22 gene // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*—1996.—222.—P. 821—826.
- Ohta S., Shimakeke Y., Nagata K. Molecular cloning and characterization of a transcription factor for the C-type natriuretic peptide gene promoter // *Eur. J. Biochem.*—1996.—242.—P. 460—466.
- Dmitrenko V. V., Kavsan V. M. Variability of polyadenylation sites in mRNAs from human fetal liver // *FEBS Lett.*—1991.—280.—P. 284—286.
- Simonsen C. C., Levinson A. D. Analysis of processing and polyadenylation signals of the hepatitis B virus surface antigen

- gene by using simian virus 40 — hepatitis B virus chimeric plasmids // *Mol. and Cell. Biol.*—1983.—3.—P. 2250—2258.
24. *Sasavage N. L., Smith M., Gillam S., Woychick R. P., Rotmann F. M.* Variation in polyadenylation site of bovine prolactin mRNA // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1982.—79.—P. 223—227.
 25. *Wiedemann L. M., Perry R. P.* Characterization of the expressed gene and several processed pseudogenes for the mouse ribosomal protein L30 gene family // *Mol. and Cell. Biol.*—1984.—4.—P. 2518—2528.
 26. *Aho S., Tate V., Boedtker H.* Multiple 3' ends of the chicken pro $\alpha 2(I)$ collagen gene // *Nucl. Acids Res.*—1983.—11.—P. 5443—5450.
 27. *Hernandez-Lucas C., Royo J., Paz-Ares J., Ponz F., Garcia-Olmedo F., Carbonero P.* Polyadenylation site heterogeneity in mRNA encoding the precursor of the barley toxin β -hordeothionin // *FEBS Lett.*—1986.—200.—P. 103—106.
 28. *Hamil K. G., Hall S. H.* Cloning of rat Sertoli cell follicle-stimulating hormone primary response complementary deoxyribonucleic acid: regulation of TSC-22 gene expression // *Endocrinology.*—1994.—134.—P. 1205—1212.
 29. *Sawada K., Agata K., Eguchi G.* Characterization of terminally differentiated cell state by categorizing cDNA clones derived from chicken lens fibers // *Int. J. Dev. Biol.*—1996.—40.—P. 531—535.
 30. *Sillard R., Schulz-Knappe P., Vogel P., Raida M., Bensch K. W., Forssman W. G., Mutt V.* A novel 77-residue peptide from porcine brain contains a leucine-zipper motif and is recognized by an antiserum to delta-sleep-inducing peptide // *Eur. J. Biochem.*—1993.—216.—P. 429—436.
 31. *Treisman J. E., Lai Z. C., Rubin G. M.* Short-sighted acts in the decapentaplegic pathway in Drosophila eye development and has homology to a mouse TGF-beta-responsive gene // *Development.*—1995.—121.—P. 2835—2845.
 32. *Riechmann V., van Cruchten J., Sablitzky F.* The expression pattern of Id4, a novel dominant negative helix-loop-helix protein, is distinct from Id1, Id2 and Id3 // *Nucl. Acids Res.*—1994.—22.—P. 749—55.
 33. *Kestler H. A., van der Leebe B.-J. M., van der Saag P. T., van der Burg B.* Novel progesterone target genes identified by an improved differential display technique suggest that progesterone-induced growth inhibition of breast cancer cells coincides with enhancement of differentiation // *J. Biol. Chem.*—1997.—272.—P. 16637—16643.
 34. *Ohta S., Yanagihara K., Nagata K.* Mechanism of apoptotic cell death of human gastric carcinoma cells mediated by transforming growth factor beta // *Biochem. J.*—1997.—324.—P. 777—782.
 35. *Henson J. W., Schnitker B. L., Correa K. M., von Deimling A., Fassender F., Xu H. J., Benedict W. F., Yandell D. W., Louis D. N.* The retinoblastoma gene is involved in malignant progression of astrocytomas // *Ann. Neurol.*—1994.—36.—P. 714—721.
 36. *Huhn S. L., Mohapatra G., Bollen A., Lamborn K., Prados M. D., Feuerstein B. G.* Chromosomal abnormalities in glioblastoma multiforme by comparative genomic hybridization: correlation with radiation treatment outcome // *Clin. Cancer Res.*—1999.—5.—P. 1435—1443.
 37. *Venkatraj V. S., Begemann M., Sobrino A., Bruce J. N., Weinstein I. B., Warburton D.* Genomic changes in glioblastoma cell lines detected by comparative genomic hybridization // *J. Neurooncol.*—1998.—36.—P. 141—148.
 38. *Harada K., Nishizaki T., Ozaki S., Kubota H., Ito H., Sasaki K.* Intratumoral cytogenetic heterogeneity detected by comparative genomic hybridization and laser scanning cytometry in human gliomas // *Cancer Res.*—1998.—58.—P. 4694—4700.
 39. *Uchida D., Kawamata H., Omotehara F., Miwa Y., Hino S., Begum N. M., Yoshido H., Sato M.* Over-expression of TSC-22 (TGF-beta stimulated clone-22) markedly enhances 5-fluorouracil-induced apoptosis in a human salivary gland cancer cell line // *Lab. Invest.*—2000.—80.—P. 955—963.
 40. *Omotehara F., Uchida D., Hino S., Begum N., Yoshida H., Sato M., Kawamata H.* In vivo enhancement of chemosensitivity of human salivary gland cancer cells by overexpression of TGF-beta stimulated clone-22 // *Oncol. Rep.*—2000.—7.—P. 737—740.

УДК 577.21:577.214.622
Надійшла до редакції 21.12.99