

Національна академія наук України
Інститут молекулярної біології і генетики НАН України

На правах рукопису

РУДЕНКО ЄВГЕНІЯ ЄВГЕНІЇВНА

УДК 577.218, 616.006.6

**ПОШУК ПОТЕНЦІЙНИХ ГЕНІВ-СУПРЕСОРИВ ПУХЛИННОГО
РОСТУ ДЛЯ СВІТЛОКЛІТИННОЇ КАРЦИНОМИ НИРКИ ЛЮДИНИ**

03.00.22 – молекулярна генетика

Дисертація на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Науковий керівник:
Кашуба Володимир Іванович
доктор біологічних наук,
старший науковий співробітник.

КИЇВ – 2016

ЗМІСТ

Перелік умовних скорочень.....	5
Вступ.....	6
РОЗДІЛ 1. Огляд літератури.....	11
1.1. Онкологічна ситуація в Україні.....	11
1.2. Доброякісні і злоякісні епітеліальні пухлини.....	12
1.3. Молекулярні основи канцерогенезу.....	13
1.3.1. Роль онкогенів і генів-супресорів росту злоякісних пухлин в розвитку злоякісних новоутворень.....	13
1.3.2. Генетичні механізми інактивації генів-супресорів росту злоякісних пухлин.....	16
1.3.3. Епігенетичні модифікації генів-супресорів пухлин при канцерогенезі	20
1.3.4. Гени-супресори росту пухлин та їх інактивація при раку нирок людини.....	26
1.4. Нові молекулярно-біологічні підходи в дослідженні раку.....	29
1.4.1. Аналіз широкомаштабних досліджень генома в злоякісних пухлинах	29
1.4.2. Перспективи використання генів-супресорів пухлин в клінічній практиці.....	30
РОЗДІЛ 2. Матеріали і методи досліджень.....	35
2.1. Забір зразків.....	35
2.2. Виділення геномної ДНК.....	35
2.3. Приготування проб для гібридизації з NotI-мікрочіпами.....	36
2.4. Виділення тотальної РНК.....	41
2.5. Синтез першого ланцюга кДНК.....	41
2.6. Визначення відносної експресії генів на рівні мРНК.....	42
2.7. Бісульфітна модифікація геномної ДНК.....	44
2.8. Аналіз алельного поліморфізму локусів D3S1287, D3S4182, A002C09, MARC_15661, RH76369, RH12810 в популяційній вибірці.....	46
2.9. Аналіз кількості копій досліджуваних генів.....	47

2.10. Аналіз кількості тринуклеотидних повторів.....	48
2.11. Статистичний аналіз.....	49
РОЗДІЛ 3. Результати експериментальних досліджень.....	51
3.1. Широкомаштабний аналіз змін експресії генів на рівні мРНК при раку нирки.....	51
3.1.1. Використання NotI-мікропанелей для ідентифікації змін експресії генів, розташованих у районах, які задіяні у розвитку раку нирки.....	51
3.1.2 Аналіз відкритих біоінформатичних баз даних.....	54
3.2. Аналіз експресії, а також генетичних і епігенетичних змін генів людини, відібраних на основі попереднього аналізу мікрочіпів і біоінформатичних даних.....	55
3.2.1 Профіль метилування промоторних ділянок генів <i>NKIRAS1</i> , <i>PPM1M</i> , <i>PRICKLE2</i> та сімейства генів <i>GPXs</i> і втрата гетерозиготності в зразках тканин СККН.....	55
3.2.2. Ген людини <i>NKIRAS1</i>	56
3.2.2.1. Аналіз експресії гена <i>NKIRAS1</i>	56
3.2.2.2. Аналіз кількості копій гена <i>NKIRAS1</i>	58
3.2.3. Ген людини <i>PPM1M</i>	60
3.2.3.1. Аналіз експресії гена <i>PPM1M</i>	60
3.2.3.2. Аналіз кількості копій гена <i>PPM1M</i>	61
3.2.4. Ген людини <i>PRICKLE2</i>	64
3.2.4.1. Аналіз експресії гена <i>PRICKLE2</i>	64
3.2.4.2. Аналіз кількості копій гена <i>PRICKLE2</i>	65
3.2.5. Ген людини <i>GPX1</i>	68
3.2.5.1. Аналіз експресії гена <i>GPX1</i>	68
3.2.5.2. Аналіз кількості копій гена <i>GPX1</i>	69
3.2.5.3. Аналіз поліморфізму тринуклеотидних повторів і кількості копій гена <i>GPX1</i>	72
3.2.6. Ген людини <i>GPX3</i>	77
3.2.6.1. Аналіз експресії гена <i>GPX3</i>	78

3.2.6.2. Аналіз кількості копій гена <i>GPX3</i>	79
3.2.7. Ген людини <i>GPX4</i>	81
3.2.7.1. Аналіз експресії гена <i>GPX4</i>	82
3.2.7.2. Аналіз кількості копій гена <i>GPX4</i>	82
3.2.8. Вивчення інших генів родини <i>GPX</i> у людини.....	85
3.3. Гіпотетичні зміни у кількості копій генів, визначені за допомогою веб-ресурсу cBioPortal.....	87
РОЗДІЛ 4. Аналіз та узагальнення отриманих результатів.....	94
Висновки.....	103
Список використаних джерел.....	105

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

ЗКК – (copy number variation, CNV) – зміна кількості копій гена

К-ПЛР – кількісна полімеразна ланцюгова реакція

СККН – світлоклітинна карцинома нирки

LOH (loss of heterozygosity) – втрата гетерозиготності

NCBI – Національний центр біотехнологічної інформації

NMA – NotI-мікрочіпи

SAGE – (serial analysis of gene expression) – послідовний аналіз експресії генів

SNP (single-nucleotide polymorphisms) – однонуклеотидний поліморфізм

TSG (tumor suppressor gene) – гени-супресори пухлинного росту

ВСТУП

Актуальність теми. Захворюваність пухлинами сечостатевої системи в світі становить понад 200 тис. випадків щорічно. Протягом 2011 року рак нирки був діагностований в 5622 пацієнтів в Україні. Для близько чверті цих пацієнтів період з моменту постановки діагнозу до смерті становить менше, ніж один рік [1]. Серед урологічних пухлин світлоклітинна карцинома нирки (СККН) займає третє місце по частоті захворюваності, після раку простати і раку сечового міхура. При цьому СККН займає перше місце по смертності і складає близько 85% всіх випадків раку нирки [2]. Це захворювання характеризується негативним прогнозом і, як правило, погано піддається хіміо- та радіотерапії [3]. Тому діагностика і лікування світлоклітинної карциноми нирки залишається складною проблемою в Україні і в світі.

Таким чином, рак органів уrogenітальної системи залишається складною проблемою, і дослідження особливостей канцерогенезу на молекулярному рівні може сприяти виявленню нових специфічних онкомаркерів для зазначених форм злоякісних новоутворень. Що, в перспективі, сприятиме ранній діагностиці, вибору оптимального лікування та подальшому контролю захворювання [4].

Фундаментальні дослідження клітинних і молекулярних механізмів онкогенезу виявили ряд структурних генетичних і епігенетичних змін, які супроводжують процес пухлиноутворення [5]. Наприклад, делеції та гіперметилування промоторних ділянок генів-супресорів та ампліфікації онкогенів і їх транслокації в більш транскрипційно активні регіони. Такі зміни призводять до зниження або блокування експресії генів-супресорів пухлин і надекспресії протоонкогенів.

Вищевказані зміни часто спостерігаються на хромосомі 3 людини у випадку розвитку епітеліальних пухлин і, зокрема, при СККН. Так, при СККН частими є інактивації генів *VHL* [6] та *FHIT* [7, 8]. Також на 3-й

хромосомі знаходяться кілька генів, для яких супресія пухлин показана тільки на клітинних лініях. Зокрема, на ділянці 3p21.3 був відкритий ген-супресор *RASSF1A* (Ras association domain family 1A). Реекспресія гена *RASSF1A* в лініях клітин раку легені інгібувала ріст пухлин у безтимусних мишей при інокуляції модифікованими сублініями [9, 10]. Ген *NPRL2/G21* (nitrogen permease regulator - like 2) є негативним регулятором кіназної активності. Було показано інактивуючі мутації цього гена для ряду злоякісних пухлин, а також виявлено гомозиготні делеції на 3'-кінці у клітинах ліній карциноми нирки, легені і шийки матки. Супресію росту пухлин було показано *in vitro* [11]. Ген *hMLH1* (human mutL homolog 1) бере участь у репарації ДНК. Було показано, що для гена *hMLH1* спостерігається зниження експресії білка при недрібноклітинному раку легені [12, 13, 14]. Ще один ген - *BAP1* (BRCA associated protein 1) показує часту втрату гетерозиготності і інтрагенні гомозиготні делеції в клітинних лініях раку легені. Було висунуто припущення, що цей ген-супресор бере участь в сигнальних шляхах, які контролюються протеїном BRCA1 [15]. Нещодавно потенційним геном-супресором став ген *FUS1*, що містить внутрішні гомозиготні делеції в клітинах раку молочної залози і легені. Підвищена експресія даного гена призводила до зменшення кількості колоній на 60-80%, сформованих лінією клітин в тесті на формування колоній [16].

Розуміння молекулярних механізмів онкосупресії дозволить створювати діагностичні панелі та отримувати лікарські препарати для стримування росту пухлин. В зв'язку з цим, дослідження відомих генів, що мають функції онкосупресорів, та пошук нових генів-супресорів росту пухлин є перспективним напрямком онкогенетики.

Зв'язок з науковими програмами, планами, темами. Роботу виконано в рамках наукових проектів відділу функціональної геноміки Інституту молекулярної біології та генетики НАН України «Ідентифікація генів-супресорів, картованих на 3-й хромосомі для створення маркерів – ключових для певних видів злоякісних пухлин епітеліального походження»

(2007-2011 рр., номер державної реєстрації 0107U000337), та «Дослідження властивостей молекулярно-генетичних маркерів як основи для діагностики онкологічних патологій» (2007-2009 рр., номер державної реєстрації 0107U0004941), а також в рамках наукової теми відділу молекулярної онкогенетики «Вивчення генетичних та епігенетичних змін в злоякісних пухлинах епітелиального походження» (2010-2015 рр., номер державної реєстрації 0110U000691).

Мета та завдання дослідження. Метою роботи було виявити потенційні гени-супресори росту пухлин для світлоклітинної карциноми нирки людини та визначити вплив генетичних порушень і епігенетичних змін на їх експресію.

Для досягнення мети необхідно було вирішити такі завдання:

1. Виявити за допомогою методів широкомаштабного скрінгу потенційні гени-супресори для СККН.
2. Провести аналіз рівня експресії найбільш перспективних генів-супресорів у зразках СККН людини;
3. Встановити статус метилування промоторних ділянок генів зі зміненою експресією в зразках пухлин для з'ясування можливої причини змін рівня їхньої експресії у пухлинних тканинах порівняно з нормальними тканинами.
4. Перевірити наявність делецій в гомо- та гетерозиготному стані і змін кількості копій для відібраних генів у пухлинних тканинах.

Об'єкт дослідження – генетичний та епігенетичний контроль росту пухлин.

Предмет дослідження – потенційні гени-супресори пухлинного росту світлоклітинної карциноми нирки.

Методи дослідження – молекулярно-біологічні методи, що включають NotI-мікрочіпи (NMA), полімеразну ланцюгову реакцію в реальному часі (К-ПЛР), визначення втрати гетерозиготності в поліморфних локусах (ЛОН-

аналіз), метилспецифічну полімеразну ланцюгову реакцію (МС-ПЛР), аналіз кількості копій гена, а також біоінформатичні і статистичні методи.

Наукова новизна одержаних результатів. За допомогою нової технології NotI-мікрочіпів були виявлені зміни в генах/локусах 3-ї хромосоми людини, а також досліджений рівень експресії потенційних генів-супресорів пухлинного росту на рівні мРНК *NKIRAS1*, *PPM1M*, *PRICKLE2* в карциномах нирок. Вперше досліджено рівень експресії родини селеновмісних глутатіонпероксидаз (*GPX 1-4,6*) в карциномах нирок. Показано, що гени *GPX2* і *GPX6* не експресуються в пухлинах і нормальній тканині нирки. Вперше показано зміни кількості копій певних генів, а також відсутність взаємозв'язку між експресією генів на рівні мРНК та метилуванням їх промоторних ділянок. Так, зменшення кількості копій в зразках СККН було показано для генів *NKIRAS1*, *PPM1M*, *PRICLE2* та *GPX1*. Збільшення кількості копій було виявлено для гена *GPX3*, а кількість копій гена *GPX4* залишалася незмінною.

Практичне значення одержаних результатів. Отримані нами результати підтверджують ефективність і перспективність нової технології – NotI-мікрочіпів – для масштабного скринінгу геному з метою виявлення потенційних пухлиносупресорних генів і наборів онкомаркерів для ранньої діагностики раку. Виявлені генетичні порушення в генах *NKIRAS1*, *PPM1M*, *PRICLE2* та *GPX1* в пухлинах хворих на СККН свідчать про можливість застосування цих генів як компонентів мультимаркерної панелі для ідентифікації даного типу карцином.

Особистий внесок здобувача. Усі дослідження проводилися за безпосередньої участі здобувача. Отримання геномної ДНК із зразків хірургічно видалених тканин епітеліальних пухлин та оточуючих тканин, а також аналіз отриманих результатів, були виконані автором особисто. Безпосередньо здобувачем виконано вивчення експресії генів та аналіз кількості копій генів у епітеліальних пухлинах нирки людини методом К-ПЛР. Бісульфітна обробка геномної ДНК, виділення РНК зі зразків пухлин та

МС-ПЛР проводилися спільно зі ст. н. с. Геращенко Г.В. та н. с. Кондратовим О.Г. Визначення кількості тринуклеотидних повторів виконано спільно з ст. н. с. Кравченко С.А. Цикл експериментів, які пов'язані з технологією NotI-мікрочіпів, виконано у співробітництві з Каролінським інститутом, Стокгольм, Швеція.

Апробація результатів дисертації. Результати досліджень були представлені на поточних наукових семінарах відділів молекулярної онкогенетики і функціональної геноміки ІМБіГ та на наукових конференціях: Біологічні дослідження молодих учених в Україні (Київ, 2012); Біотехнологія XXI століття (Київ, 2013); Шевченківська Весна (Київ, 2013). Молодь і поступ в біології (Львів, 2014).

Публікації за темою дисертації: опубліковано 11 праць, з них 7 статей у фахових наукових журналах та тези 4 доповідей на наукових конференціях.

Структура та обсяг роботи. Дисертація складається із вступу, огляду літератури, матеріалів і методів досліджень, результатів експериментальних досліджень, аналізу та узагальнення отриманих результатів, висновків, списку використаних джерел. Загальний обсяг дисертації - 134 сторінки. Робота містить 16 рисунків, 10 таблиць. Список використаної літератури охоплює 288 найменувань.

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Онкологічна ситуація в Україні

Структура онкологічних захворювань в Україні наступна: для чоловіків 75% усіх випадків злоякісних новоутворень складають новоутворення дихальних шляхів, рак шкіри, органів травної системи, передміхурової залози, сечового міхура, нирок і гортані; для жінок 77% усіх випадків злоякісних новоутворень складають рак молочної залози, шкіри, органів травної системи, дихальних шляхів, тіла і шийки матки, яєчників [1]. Рак нирок має найвищий рівень смертності серед пухлин сечостатевої системи. Близько третини пацієнтів на момент виявлення хвороби мають метастази. Упродовж останніх років кількість хворих нирково-клітинною карциномою щорічно зростає на 2,5%. [20]. В Україні захворюваність раком нирок серед чоловіків у віці 30-54 років складає 5,3% від усіх злоякісних новоутворень [1].

Таким чином, рак органів уrogenітальної сфери в Україні залишається серйозною проблемою у зв'язку з його поширеністю і високим показником смертності. При цьому молекулярні особливості даного виду раку досліджені порівняно мало, формування груп ризику і рання діагностика ускладнені. Вивчення на молекулярному рівні особливостей канцерогенезу для цих нозологічних форм злоякісних новоутворень може сприяти їх ранній діагностиці.

1.2. Доброякісні і злоякісні епітеліальні пухлини

Залежно від здатності пухлин до прогресії і клініко-морфологічних особливостей їх розділяють на дві основні групи - доброякісні і злоякісні. Доброякісним (зрілим) пухлинам властивий експансивний ріст: вони розсовують але не ушкоджують навколишні тканини. Внаслідок атрофії тканин на межі з пухлиною формується оболонка. Небезпечні маса або локалізація доброякісних утворень, але вони порівняно легко можуть бути видалені при операції. Міра диференціації клітин таких пухлин дозволяє визначити їх тканинну приналежність. До доброякісних пухлин, наприклад, відносяться: аденоми (залозистий епітелій), папіломи (покривний епітелій), ліпоми (жирова тканина), остеома (кісткова тканина), хондрома (хрящова тканина) [17].

Злоякісне новоутворення у патологічній фізіології визначається як аномальне розростання тканини із спадково закріпленою здатністю до необмеженого і неконтрольованого росту. Злоякісним пухлинам властивий інвазивний ріст: вони врастають в прилеглі тканини, руйнують їх, дають метастази. Для них характерна анаплазія - повернення до більш примітивного типу.

Хірургічне видалення злоякісних пухлин ускладнене, для раку характерні часті рецидиви. Нині прийнята міжнародна TNM-класифікація злоякісних новоутворень (T (tumor) - поширення первинної пухлини, N (nodes) - інвазія в регіонарні лімфовузли, M (metastases) - наявність метастазів) [18].

До обов'язкових властивостей злоякісної пухлини слід віднести також системну дію на організм. Будова пухлини і її функціональні зв'язки з нормальним оточенням складні: вона проявляє себе як особливий орган і здатна рекрутувати нормальні клітини для ангиогенезу, підготовки метастатичних ніш і для захисту від імунної відповіді.

Карцинома або власне рак утворюється виключно з епітеліальних клітин (наприклад, рак передміхурової залози, легень, молочної залози), інші види злоякісних захворювань прийнято розрізняти за типом тканини походження: меланома (меланоцити), саркома (сполучна тканина, кісткова і м'язова тканина), лейкоз (стовбурові клітини кісткового мозку), лімфома (лімфатична тканина), тератома (зародкові клітини), гліома (гліальні клітини) [17].

Злоякісні новоутворення нирок представлені світлоклітинним (гіпернефроїдним), папілярним нирковоклітинним, хромофобним нирковоклітинним, уротеліальним раком і раком епітелію збиральних трубочок. Близько 85% випадків раку нирок відносяться до світлоклітинних карцином [19].

1.3. Молекулярні основи канцерогенезу

1.3.1. Роль онкогенів і генів-супресорів росту злоякісних пухлин в розвитку злоякісних новоутворень. На сьогодні визнано, що рак виникає в результаті комплексного процесу, заснованого на змінах і відборі. Логарифмічна залежність частоти виникнення раку від віку припускає, що відбувається безліч подій [21]. У 1954 році Armitage і Dall опублікували залежність частоти захворювань від віку для 17 типів раку [22]. На підставі цих даних можна зробити висновок про те, що канцерогенез - це складний багатостадійний процес.

Існує 4 типи генів, що задіяні в канцерогенезі: онкогени, активація яких призводить до розвитку пухлин, гени, що супресують пухлинний ріст (TSG), гени-мутатори, активація яких підвищує частоту мутацій і гени-блокатори апоптозу, які забезпечують виживання трансформованих клітин [23].

Важливу роль в канцерогенезі грають онкогени. Протоонкогени кодують білки, які є компонентами шляхів передачі сигналів в клітині. У нормальній клітині експресія протоонкогенів ретельно регулюється, і їх

транскрипція відбувається строго на певних стадіях росту і розвитку клітин. Мутації в цих генах діють як домінантні і призводять до втрати оригінальної функції, внаслідок чого виникає неконтрольоване прискорене ділення клітин. Онкогени були відкриті при інфекції ретровірусами, зокрема, було доведено, що продукти цих генів провокують виникнення пухлини. Було встановлено, що ретровірусні онкогени заміщають собою клітинні гени і є зміненою версією останніх [24].

Активування протоонкогенів призводить до формування нових, домінантних фенотипів і відбувається за різними механізмами: точкові мутації; транслокації хромосомних ділянок, що призводить до утворення злитих білків або появи перебудованих чи укорочених форм білку; зміни експресії білка внаслідок ампліфікації, збільшеної активності промотора або стабілізації білку. Протоонкогени зазвичай мають функцію факторів росту, рецепторів факторів росту, передавачів сигналу ядерних протоонкогенів і транскрипційних факторів [25].

Один онкоген не здатний призвести до трансформації. Проте, спільна дія декількох онкогенів може закінчитися трансформацією клітини [26, 27]. Ці мінімальні зміни включають інактивацію p53 і Rb шляхів, підтримку постійної довжини теломер за допомогою hTERT і отримання постійного мітогенного сигналу, створеного онкогенним *ras*.

Важливим фактором розвитку пухлин є не лише активація протоонкогенів, а й інактивація генів супресорів - алелів генів дикого типу, які грають негативну регулюючу роль, зокрема в проліферації і диференціюванні клітин, а також в інших клітинних процесах. Онкогенною є втрата або інактивація таких алелів. Це було виявлено при створенні гібридів, отриманих злиттям нормальних і пухлинних клітин [28-32]. Спочатку гібриди були не онкогенними, оскільки, подібно до нормальних клітин, вони не проліферували в імуносумісних реципієнтах. Проте, після того, як гібридні клони пройшли декілька пасажів в культурі, певні

хромосоми були втрачені, і клітини відновлювали свою здатність формувати пухлину.

У більшості випадків достатнім для пригнічення росту *in vitro* або пригнічення пухлини *in vivo* є введення однієї копії нормальної хромосоми. Кнудсон запропонував модель [33], згідно якої виникнення ретинобластоми є результатом двох послідовних мутаційних подій на обох аллелях одного гена. Ця модель дістала назву гіпотези двох ударів (two-hits hypothesis). З часу відкриття гена, відповідального за виникнення ретинобластоми (*RB*) в 1986, було ідентифіковано сотні онкоасоційованих генів (<http://bioinfo.mc.vanderbilt.edu/TSGene/>) [34]. TSG беруть участь в контролі клітинного циклу, регулюють ріст і транскрипцію, передачу сигналів, а також ангиогенез. Передбачається, що TSG можуть широко використовуватися в антипухлинній терапії.

Також існують так звані генетичні мутагени або гени-мутатори, які підвищують частоту мутацій в окремій клітині. До них відносяться інсерційні сегменти (IS), які є регуляторними послідовностями (вони впливають на активність інших генів), і транспозони, що містять структурні гени (наприклад, ген, відповідальний за стійкість до антибіотика). І ті, і інші можуть переміщатися між різними ділянками хромосом, між ядром і цитоплазмою, між різними клітинами і навіть між різними таксонами [35]. Діапазон їх дії дуже широкий: перенесення структурних генів, блокування (або, навпаки активування) окремих ділянок хромосом, підвищення (у 100 - 1000 разів) частоти мутацій у фіксованих ділянках.

Особливу роль в підвищенні рівня мутацій грають механізми репарації. Перші експериментальні дані відносяться до прокаріот, але, як і слід було очікувати, механізм цей виявився загальним і для еукаріот (включаючи ссавців і людину). Мутації або делеції генів-мутаторів, залучених в "ремонт" ДНК, призводять до специфічного мультиракового синдрому. Мутації в генах-мутаторах спричиняють підвищення частоти мутацій і також дозволяють накопичувати мутації в інших генах, як *p53* або *APC*. В

результаті імовірність розвитку пухлини значно зростає. Потенційними генами-мутаторами вважають *MSH2* на людській хромосомі 2p21 (цей ген - гомолог бактеріального *MutS* і дріжджового *MSH2*), а також функціонально подібний ген *hMLH1* на хромосомі 3p21.3 [36, 37].

Після трансформації клітини наступними критичними етапами формування пухлини є зміни генів, що беруть участь в апоптозі, ангиогенезі і метастазуванні пухлин. Ракова клітина містить, як правило, велику кількість пошкоджень генетичного матеріалу, і за нормальної роботи механізмів апоптозу така клітина буде знищена шляхом програмованої загибелі. Тільки тоді, коли механізми апоптозу заблоковані, функціонально порушена трансформована клітина отримує можливість розвиватися.

Ангиогенез також є критичним етапом розвитку неоплазії. При цьому лише незначна частина клонів трансформованих клітин має здатність стимулювати ангиогенез в умовах гіпоксії. [38]. Клітини секретують в середовище як позитивний, так і негативний модулятори ангиогенезу, зокрема, проангиогенним фактором є VEGF, а антиангиогенним - тромбоспондин. Ангиогенез тісно пов'язаний з гіпоксією, їх регуляція складна і визначається динамічною взаємодією всіх про- та антиангиогенних факторів як в клітинах самої пухлини, так і в її мікросередовищі [39, 40].

Наступним критичним моментом в розвитку пухлини є набуття здатності до метастазування. Для цього важливими є втрата адгезивних функцій, формування рухливого фенотипу і можливість лізису оточуючих тканин для виходу в кров'яне русло (стадія формування інвазивного фенотипу пухлини). [35-37; 41-43].

Таким чином, процес злоякісної трансформації клітин є багатостадійним та різнонаправленим процесом, для якого необхідна як інактивація генів-супресорів, так і надмірна активація онкогенів.

1.3.2. Генетичні механізми інактивації генів-супресорів росту злоякісних пухлин. Для малігнізованих клітин характерні всі відомі види генетичних порушень: як хромосомні – анеуплоїдії, делеції, транслокації,

ампліфікації, інверсії, так і менш масштабні – точкові мутації, однонуклеотидні поліморфізми (SNP) або мутації зсуву рамки зчитування. Ампліфікації та транслокації в більш транскрипційно активні ділянки забезпечують раковій клітині активацію онкогенів. Анеуплоїдія, делеції великих ділянок або промоторних регіонів, транслокації в неактивні частини геному, точкові мутації – відповідно призводять до інактивації генів-онкосупресорів.

Генетична мінливість людини представлена як усередині так і між популяціями, і більшість генетичних варіантів не викликають явних захворювань, але роблять свій внесок у сприйнятливість до хвороби, а також визначають міру відповіді на лікарські препарати. Протягом минулого століття різні генетичні варіанти, такі як варіації, числа копій, були вперше пов'язані з різними розладами у людини. [44, 45] Такі варіації були визнані генетичними варіаціями, що отримали назву зміна кількості копій (ЗКК) – (copy number variation, CNV) [46-48]. ЗКК - спадкові або *de novo* структурні зміни, в тому числі всі види геномних варіацій >1 кб, наприклад інсерції, делеції, інверсії, транслокації [49, 50]. Загалом, було зареєстровано понад 350 тис. ЗКК в Базі Даних Геномних Варіантів (Database of Genomic Variants, <http://dgv.tcag.ca/dgv/app/home>) в жовтні 2014 року. Підраховано, що 75,6% екзонів і 91,2% транскриптів перекриваються принаймі одним ЗКК-регіоном, отже, ЗКК може мати значні біологічні наслідки [51].

Дослідження з використанням неалельного гомологічного секвенування (NGS-технології) показують, що неалельні гомологічні рекомбінації і приєднання негомологічних кінців є основним механізмом, що формує ЗКК [52]. Більше 99% ЗКК успадковуються, в той час як інші створюються *de novo* під час мейозу. Ван Оммен виміряв частоту *de novo* ЗКК великих фрагментів ДНК у новонароджених і встановив, що частота делецій зустрічається у 1 з 8, а дуплікації у 1 з 50 немовлят [53].

Крім того, зміна кількості копій, як генетична варіація, призводить до ефекту дози гена. ЗКК обумовлює індивідуальні відмінності в ризику

виникнення хвороб через кілька механізмів, які впливають на експресію генів, наприклад інактивація або перестановка гена [44, 45]. ЗКК також визначають за допомогою CGH-мікрочіпів, SNP-мікрочіпами для всього геному та/або сиквенуванням цілого генома. Вивчення генетичних варіацій в масштабах цілого геному допомагають відкрити нові гени, які впливають на сприйнятливість до різних захворювань [54, 55]. Дійсно, деякі ЗКК пов'язані з онкологічними або аутоімунними хворобами [56-59], і їх дослідження може бути корисним для розуміння патогенезу хвороб та виявлення нових мішеней для лікарських препаратів [60].

Вважається, що втрата певної ділянки хромосоми свідчить про присутність на цій ділянці гена-супресора. Тому метод ЛОН є одним з найпоширеніших методів для визначення локалізації генів-супресорів. Згідно з цією гіпотезою, багато генів-супресорів пухлин ще не відкрито [61].

Втрата гетерозиготності може відбуватися за різними механізмами. До втрати гетерозиготності призводять наступні структурні зміни: мітозні рекомбінації, делеції, конверсія генів, двониткові розриви хромосом, злиття хромосом або теломерні злиття типу кінець-до-кінця і навіть втрата цілої хромосоми. Втрата цілої хромосоми призводить, як правило, до дефектів в сегрегації хромосом. Було показано, що в пухлинах втрата хромосом пов'язана зі збільшенням кількості копій хромосом, які залишилися, що часто призводить до гомозиготності. Втрата плеча або великого фрагмента може бути результатом дволанцюгових розривів ДНК, транслокацій або мітозної рекомбінації [62, 63]. Втрата одного алеля або гена може бути обумовлена делеціями, що відбуваються внаслідок дволанцюгових розривів ДНК або мітозної рекомбінації гомологічних плечей хромосом.

Відома також така генетична особливість як поліморфізм локусів. Локус називається поліморфним, якщо в популяції існує два або більше алелів цього локусу. Поліморфні гени - це гени, які представлені в популяції різноманітним алелів (різні форми одного і того ж гена), що обумовлює різноманітність внутрішньовидових ознак. Будь-які зміни в ДНК ведуть до

виникнення генетичного поліморфізму. Але зазвичай локус визначається як поліморфний, якщо частота найбільш поширеного аллеля менше 0,99. Такий поділ носить досить умовний характер і в літературі можна знайти інші критерії поліморфності. В переважній більшості випадків поліморфізми мають нейтральний ефект. Існують також поліморфізми, здатні вплинути на ступінь експресії генів, активність функціональних продуктів (білків, РНК) і структуру білків. Відмінності між алелями одного і того ж гена, як правило, полягають в незначних варіаціях його генетичного коду. Генетичні поліморфізми зазвичай являють собою заміни одного нуклеотиду на інший і зміни числа повторюваних фрагментів ДНК, які можуть знаходитись в усіх структурних елементах геному: екзонах, інтронах, регуляторних ділянках. За функціональними наслідками для організму поліморфізми поділяють на чотири основні категорії: 1) фенотипово не виражені (напр., поліморфні ділянки ДНК, які використовуються для ідентифікації особи молекулярно-генетичними методами); 2) викликають фенотипові відмінності (напр., колір волосся або зріст), але не схильність до захворювання; 3) грають деяку роль у патогенезі захворювання (напр., при полігенних хворобах); 4) які відіграють основну роль у розвитку захворювання (при моногенних хворобах) [64].

Окремо виділяють такий різновид генетичних поліморфізмів як однонуклеотидний поліморфізм - SNP. Ці поліморфізми визначають генетичну унікальність кожної особи, в тому числі індивідуальну схильність до хвороб [65]. Певний поліморфізм може бути спадковою властивістю індивіда або набути клітинами пухлини в процесі злоякісної трансформації. Деякі спадкові поліморфізми можуть бути факторами ризику певних захворювань, а набуті в процесі канцерогенезу – можуть використовуватись як онкомаркери. Якщо поліморфізм є особливістю геному пухлини і не співпадає з генотипом особи, то він представляє собою додатковий механізм зміни генетичного матеріалу з можливими функціональними наслідками. Міжнародний консорціум HarMap (human haplotype map) почав проект по визначенню однонуклеотидного поліморфізму в жовтні 2002 року. На

сьогоднішній день число кандидатів на роль SNP виросло до кількох мільйонів (<http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov>) [66].

1.3.3. Епігенетичні модифікації генів-супресорів пухлин при канцерогенезі. Основними епігенетичними модифікаціями геному є метилування ДНК і модифікації гістонів, причому ці два явища пов'язані між собою. Хромосоми еукаріот складаються з активних регіонів, в яких структура хроматину є «відкритою» (еухроматин) і доступною для білків, що зв'язуються з ДНК. Така ДНК активно транскрибується. На відміну від них, в регіонах «умовчання» щільно упакований хроматин (гетерохроматинові ділянки) закриває доступ до ДНК. Ацетилювання гістонів передуює транскрипції і завершується деконденсацією хроматину з подальшим зв'язуванням факторів транскрипції з ДНК. Ацетилтрансфераза гістонів і деацетилаза гістонів відіграють важливу роль в цьому процесі. Ацетилювання гістонів пов'язане з активною транскрипцією [67]. У різних системах був виявлений високий ступінь кореляції між гіперметилуванням ДНК, інгібуванням транскрипції і щільно упакованим хроматином [68]. Процес інгібування транскрипції спершу був пояснений фізичним ефектом метильних груп, що виступають над ДНК і впливають на механізм транскрипції [69]. Нині вважають, що механізм інгібування полягає в зв'язуванні певних білків з метильованою ДНК.

Ацетилювання гістонів і метилування ДНК взаємопов'язані між собою через білок MeCP2 [70]. Він впізнає і переважно зв'язується з метильованою CpG групою незалежно від нуклеотидної послідовності. MeCP2 містить також домен репресії транскрипції (TRD), який формує комплекс з різними репресорними молекулами (наприклад, mSin3A) і деацетилазою гістонів (наприклад, HDAC1, HDAC2). Слід зазначити, інгібітор деацетилази гістонів, трихостатин (TSA), може активувати транскрипцію деяких генів [71]. Таким чином, був уперше показаний прямий зв'язок між двома шляхами репресії транскрипції. Тепер зрозуміло, що саме білки, що зв'язуються з метилом, -

MBD1, MBD2, MBD3, MBD4 і MeCP2, відповідальні за зв'язування деацетилази гістонів (HDACs) і інших факторів хроматину.

Геном ссавців може бути зручно розділений на дві фракції відносно метилування ДНК [72, 73]. У головній фракції динуклеотида CpG (приблизно 98% загальної кількості) розташовані на відстані 50-100 п.н. і сильно метиловані. У меншій фракції (приблизно 2%), CpG динуклеотиди розташовані приблизно через 10 п.н. і неметиловані. Менша фракція розподілена по геному в 45 000 коротких областей по 1 т.п.н., відомих як CpG острівці. Вони колокалізуються з 5' кінцями генів [74]. У геномі людини приблизно 60% генів пов'язані з острівцями CpG, включаючи усі проаналізовані на сьогодні гени домашнього господарства (хаускіпінг) і приблизно 40% тканинспецифічних генів. Різні комп'ютерні програми намагаються ідентифікувати острівці CpG на основі однієї тільки первинної послідовності, не перевіряючи наявності метилування цитозина [75].

Щільність CpG острівців істотно відрізняється для різних хромосом. Більшість хромосом мають 5-15 острівців на 1 м.п.н., з середнім значенням 10,5 острівців на 1МБ. На Y хромосомі має місце незвично низька щільність острівців – 2,9 на 1 МБ. Відносна щільність острівців CpG корелює з відносною щільністю генів на цих хромосомах. CpG острівці є ефективними маркерами ідентифікації генів, і їх клонування допомагає в картуванні. Більше того, кожен CpG острівець, на відміну від транскриптів, представлених в кДНК бібліотеках, присутній в геномній ДНК в еквімолярній кількості. Таким чином визначення CpG острівців забезпечило б доступ до великої кількості генів, незалежно від стадії розвитку або специфічності експресії в тканинах [76].

При метилуванні цитозинів в CpG-острівцях приєднання метильної групи відбувається ензиматичним шляхом, в якому метильна група передається від S - adenosylmethionine (SAM) до вуглецю 5 цитозина [77]. Більшість 5'-метилцитозинів у ДНК ссавців є присутніми в 5'-CpG-3' динуклеотидах [78]. Не-CpG послідовності типу 5'-CpNpG-3' чи

асиметричні 5' - CpA - 3' і 5' - CpT - 3' [79, 80] можуть також бути метиловані, проте з набагато нижчою частотою. Метилювання ДНК спостерігається в організмах від бактерій до людини. Метилювання у бактерій є частиною механізму зниження трансферу генів між видами. Специфічні мутанти бактерій, у яких не виявляють метилювання, виживають і проліферують. У клітинах ссавців ідентифіковані три ДНК метилтрансферази - DNMT1, DNMT3A, і DNMT3B [81, 82]. На відміну від бактерій, видалення будь-якого з трьох генів метилтрансферази у мишей летальне. Можна припустити, що метилювання має додаткову і обов'язкову функцію у ссавців. У дорослих кількість і малюнок метилювання є тканинспецифічними і залежать від типу клітин [83]. Існують дані про метилювання цитозинів в CpG острівцях промоторів генів, що вказують на вікові зміни, включаючи ген рецептора естрогену і MYOD1 [84, 85].

Спочатку вважали, що головними подіями, що призводять до інактивації TSG, є точкові мутації і хромосомні перебудови. Відкриття інактивації багатьох TSG за рахунок метилювання цитозинів у CpG острівцях їх промоторних областей, вказує що епігенетичні зміни також грають дуже важливу роль в інактивації TSG при онкогенезі [86].

Організація метилювання ДНК і статус хроматину, які регулюють нормальний клітинний гомеостаз і експресію генів, порушені в ракових клітинах. Для деяких генів, метилювання забезпечує селекційну перевагу при розвитку неплізій так само, як і мутації або делеції; гіперметилювання треба розглядати як один з механізмів інактивації в моделі Knudson для TSG [87].

Ця модель відповідає опублікованим даним: деякі гени, пов'язані з раком, інактивуються біаллельним метилюванням послідовностей CpG [88, 89]. Вивчення метилювання потенційних генів-супресорів часто виявляє зміну метилювання генів, пов'язаних з раком, особливо таких, що не мають генетичних змін. Таким чином, існує достатньо доказів, що метилювання в CpG острівцях вносить вклад в малігнізацію [90, 91].

Обробка клітин 5-азацитидином і його деокси- версією 5-аза-2'-деоксицитидином призводить до прогресивної втрати метилування ДНК з кожним циклом ділення клітини [92]. Така обробка показала, що багато генів могли бути реактивовані, хоча проявлялась певна специфіка в цьому ефекті. Можливо, відбувалася адаптація до умов росту клітинної культури, і саме це "абнормальне", або асоційоване з клітинною культурою метилування видалялося при обробці 5-азацитидином [93, 94]. Хоча обидві сполуки відносно слабкі хемотерапевтичні засоби, вони надзвичайно цінні для вивчення ролі метилування ДНК в експресії генів.

Відомо, що в ракових клітинах спостерігається зміна малюнка метилування ДНК. Існують як великі області гіпометилування повного генома, так і локальні регіони гіперметилування специфічних сайтів, наприклад, в CpG острівцях і в промоторних регіонах генів [95, 96]. В нашій роботі коротко розглянуто глобальне гіпометилування і основна увага приділена гіперметилуванню CpG острівців у TSG.

Оскільки неметильовані сайти рестрикції рестриктаз, що щеплять великі фрагменти, типу NotI (GCGGCCGC, фермент, чутливий до метилування), EagI (CGGCCG), SacII (CCGCGG),(GCGCGC), SmaI (CCCGGG), NaeI (GCCGGC) і NarI (GGCGCC) сконцентровані в CpG острівцях [97], вони були використані для визначення CpG острівців і пошуку генів. Також було створено бібліотеки на основі NotI сиквенсів в межах CpG острівців і запропоновані різні методи для створення NotI зв'язуючих бібліотек [98-102].

Різними методами показано, що одночасно з гіперметилуванням CpG острівців геном ракової клітини піддається глобальному гіпометилуванню. Ракова клітина може мати на 20-60% менше геномних 5'-метилцитозинів, ніж нормальна [103, 104]. Втрата метильних груп відбувається головним чином в кодуючих регіонах і інтронах генів. Міра гіпометилування генома в пухлинах часто корелює з мірою малігнізації, хоча це залежить також від типу пухлини. Було опубліковано, що при раку грудей, яєчників, матки і

мозку гіпометилування прогресує зі зростанням міри малігнізації [105-108]. Таким чином, гіпометилування може служити біологічним маркером з прогностичним характером.

Існує декілька механізмів впливу глобального гіпометилування ДНК на канцерогенез. Ці механізми - хромосомна нестабільність, реактивація транспозонних елементів і втрата імпринтингу. Недометилування ДНК може посилити мітотичну рекомбінацію, що призводить до втрати гетерозиготності, детектуються також каріотипічні зміни. Крім того, велике деметилування в центромерних послідовностях - часте явище в людських пухлинах і, напевно, грає роль в анеуплоїдії. Гіпометилування ДНК малігнантних клітин може також активувати внутрішньогеномну паразитну ДНК. [109]. Транспозони, які раніше мовчали, набувають здатності рухатися в інші геномні регіони, де можуть порушувати нормальну роботу генів. Нарешті, втрата метильних груп може впливати на імпринтингові гени. Найбільш вивчений випадок - це H19/IGF-2, локус на хромосомі 11p15 [110], де порушення метилування може призвести до надекспресії антиапоптозного фактора росту (IGF - 2) і втрати РНК гена H19, потенційного гена-супресора при пухлині Вільма.

Було показано, що CpG сайти є гарячими точками мутацій і, можливо, складають близько 30% усіх точкових мутацій в статевих клітинах [111]. Крім того, CpG сайти в кодуючих регіонах TSG є гарячими точками для набутих соматичних мутацій, що призводять до раку [112, 113]. Один із запропонованих механізмів, що пояснює аберантне метилування цитозинів у CpG острівцях ракових пухлин, припускає втрату факторів, які зазвичай захищають CpG острівці від метилування. [114, 115].

Крім зміни метилування цитозинів в CpG острівцях, існують модифікації гістонів, що також не змінюють первинну послідовність ДНК, але впливають на її функціональну активність. Відомо, наприклад, метилування лізинових амінокислотних залишків в складі молекул гістонів. Ця модифікація пов'язана як з активацією, так і з репресією транскрипції, в

залежності від локалізації залишку і ступеня метилування. Як правило, монометилування гістона H3 по залишках лізину 9 або 27 (H3K9 або H3K27) або гістона H4 по 20 залишку лізину (H4K20) пов'язано з «мовчанням генів». Навпаки, приєднання однієї метильної групи до H3K4, H3K36 і H3K79 корелює з активацією транскрипції. Також метилування гістонів може бути ініціатором для інших модифікацій хроматину, зокрема метилування *H3K36* є сигналом для деацетилювання гістонів [116]. Дані свідчать, що різні типи раку характеризуються різними, часто навіть протилежними, модифікаціями гістонів [117].

Відома і така високомобільна модифікація, притаманна гістонам H1 і H3, як фосфорилювання. Вона має відношення до двох протилежних процесів: деконденсації хроматину при активації транскрипції та конденсації хромосом у процесі поділу клітини або апоптозу. Гістонам H2A і H2B властива також модифікація, яка характеризується приєднанням убіквітину. Цей процес регулюється убіквітин-лігазами та протеазами [118].

Ще однією модифікацією гістонів є SUMO-лювання. SUMO (small ubiquitin-related modifier) являють собою клас убіквітин-подібних білків, які за допомогою клітинних ферментів приєднуються до різних білків, в тому числі і до гістонів, при цьому, на противагу убіквітину, не викликають їх деградації. Із усіх вищезгаданих модифікацій SUMO-лювання є найменш вивченою, тим не менш, відомо, що приєднання убіквітин-подібних білків до гістону H4 призводить до пригнічення транскрипції, шляхом рекрутування деацетилази гістонів та білка HP1 (Heterochromatin Protein 1) [119].

Одним з недавніх відкриттів став спосіб негативної регуляції генів без зміни послідовності ДНК - регуляція за допомогою мікроРНК. Пригнічення транскрипції може відбуватися за участю молекул мікроРНК – класу некодуючих РНК, що мають довжину близько 18-22 нуклеотидів та впливають на експресію генів у нормі і при патології. Механізм полягає в тому, що ці молекули зв'язуючись із комплементарною мРНК, призводять до її деградації і блокування трансляції. В геномі людини існує більше тисячі

генів мікроРНК і відомо, що канцерогенез часто супроводжується зміною їх експресії. Тому ці молекули можуть використовуватись в якості маркерів для діагностування раку [120].

1.3.4. Гени-супресори росту пухлин та їх інактивация при раку нирок людини. Очевидно, що генетичні зміни відіграють важливу роль в патогенезі первинних спорадичних СККН, хвороби вон Хіппеля-Ліндау, раку легені і інших злоякісних пухлин [121-123]. Інактивация генів-супресорів пухлин і втрата гетерозиготності в локусах 3p12, 3p14.2, 3p21.3 і 3p25 часто описується для різних типів пухлин [124, 125].

Томас з колегами у своїх дослідженнях показали, що в регіоні 3pter-3p21.31, втрата числа копій спостерігалася у 91% випадків СККН [126]. На підставі широкого спектру даних припускають, що на 3p може бути декілька TSG. Дослідження передачі хромосом, ініційованих в мікроклітинах, показали здатність пригнічення пухлини хромосоною 3 в СККН, аденокарциномі легені, раку яєчника і носоглотковій карциномі [127-132].

Не лише уся хромосома 3, але і її частина виявила таку ж активність. Sanchez повідомив, що область 3p14 - p12 виявила супресію в непапілярній нирковій карциномі [133]. Killary виявив гомозиготну делецію фрагмента хромосоми 3p21.3 розміром 2 м.п.н. у SCLC (дрібноклітинний рак легені) і раку грудей [134]. Цей фрагмент пригнічував онкогенність мишачої фіброкарциноми A9 у безтимусних мишах. Пізніше було виявлено, що онкогенну активність має клон розміром близько 80 т.п.о. - P1/294 в цьому ж регіоні, що містить гени SEMA3F, GNAT1, G17 і GNAT2 [135]. Нещодавно було показано, що гени, розташовані на ділянках 3p14.2-p21, 3p12-21.1 і 3p21.3-p22 супресують теломеразну активність в СККН і в раку грудей [136, 137].

Часто знаходять втрату гетерозиготності на 3p в різних людських пухлинах, особливо при раку легені і нирок, що виникає за рахунок термінальних і внутрішніх делецій [138-142]. Класичний хромосомний аналіз з диференційним забарвленням зафіксував часті втрати 3p через делеції чи

незбалансовані транслокації, зазвичай з хромосомою 5. Транслокація 3;5 призводить до збільшення дистального кінця плеча 5q. Наявні дані, що пацієнти з таким типом перебудов мають значно кращий прогноз перебігу захворювання, ніж пацієнти з делетованим фрагментом [143]. Загалом, інактивація регіону 3p характерна для СККН так само, як і для інших пухлин. [126, 144-146].

На даний час картування делецій з використанням мікросателітних маркерів LOH і визначення гомозиготних делецій є найпотужнішими методами локалізації потенційних TSG [147]. Хоча в зразках пухлин визначено декілька регіонів LOH, було показано, що найчастіше зустрічаються втрати в трьох ділянках третьої хромосоми - 3p25, 3p21.3 и 3p14, що вказує на присутність більше, ніж одного гена-супресора на цьому плечі [148].

Раніше було показано, що внутрішні втрати гетерозиготності характерні для неоплазій і можуть вказувати на можливі ранні події канцерогенезу [149, 150]. Shridhar et al., використовуючи множинні клони 3p14.2, виявив високий рівень 3p LOH в невітлоклітинній карциномі [151].

Ген *FHIT* (3p14.2) був запропонований в якості гена-супресора в ряді поширених типів раку. Виявлено також гіперметилування промоторної ділянки цього гена в СККН [152]. Проте асоціація між малігнантними властивостями клітини і аберацією білка FHIT, що має функцію динуклеозид поліфосфат гідролази, так і не пояснена повністю [6].

Ген *VHL*, розташований на ділянці 3p25-p26, зв'язують з регуляцією транскрипційної відповіді на гіпоксію [153]. Цей ген пов'язаний з домінантною спадковістю або хворобою вон Хіппель-Ліндау [154], при якій спостерігається розвиток багатьох типів раку. Для спонтанних СККН цей ген розглядають як основну мішень при втратах в регіоні 3p. Ген *VHL* демонструє від 50% до 80% соматичних мутацій в спонтанних СККН [155]. Проте, *VHL*-статус не може бути асоційований зі стадією розвитку пухлини. Thrash - Bingham у своїх дослідженнях не відмітив кореляції між LOH і

алельною незбалансованістю з розміром пухлини, ураженістю лімфовузлів, метастазами чи ступенем поліморфізму ядер [156].

Хромосома 3p, крім добре описаного *VHL* містить також деякі інші TSG, такі як *FOXP1*, *FHIT*, *TUSC2*, *MLH1*, *SETD2*, *NPRL2*, *RASSF1A* [157-164].

Зміни метилування ДНК в умовах виникнення передракових станів не виникають безладно, крім того, вони підвищують схильність клітин до накопичення епігенетичних і генетичних змін, можуть зумовлювати більш агресивне протікання хвороби і навіть визначати майбутній результат лікування для пацієнта. Показано, що середня кількість генів, інактивованих за допомогою метилування вища в СККН, не пов'язаних з мутаціями в *VHL*. В таких пухлинах частіше, ніж в пухлинах з інактивованим *VHL*, гіперметильовані промотори таких генів як: *RASSF1* (Ras association domain family member 1), *TWIST1* (twist homolog 1), *PITX2* (paired - like homeodomain 2), *CDH13* (cadherin 13), *HS3ST2* (heparan sulfate (glucosamine) 3 - O - sulfotransferase 2), *TAL1* (T - cell acute lymphocytic leukemia 1), *WT1* (Wilms' tumor 1), *matrix MMP2* (metallopeptidase 2), *DCC* (deleted in colorectal carcinoma), *ICA1* (islet cell autoantigen 1) і *TUSC3* (tumor suppressor candidate 3). У той час як для пацієнтів з мутантним типом *VHL* характерне гіперметилування лише для гена *GABRB3* (gamma - aminobutyric acid A receptor, beta 3) [165].

Щодо гіпометилування ДНК в СККН наявна на даний час інформація досить обмежена. Виявлено гіпометилування *CA9* (Carbonic anhydrase IX). Також гіпометильованими бувають паразитичні елементи геному, такі як LINE-1 і HERV-K. І хоча це може призводити до їх спонтанного вбудовування у внутрішньогенний простір, не схоже, що дані події відіграють значну роль в прогресуванні СККН [166].

Оскільки технологія аналізу модифікації гістонів в клінічних зразках тканини не була повністю встановлена на сьогодні, повна картина модифікацій гістонів в клінічних зразках різних онкопатологій, що

включають СККН, неясна. Проте, рівень метилування гістонів був оцінений імуногістохімічним методом. Інтенсивність фарбування H3K4-монометилу, -диметилу і -триметилу, зворотно корелювали з агресивністю СККН. Також було показано, що комбінований показник фарбування модифікації H3K4 (монометилу в триметил) може бути незалежним показником виживаності у хворих на СККН [167, 168].

Щодо дискусії про значення генетичних змін і модифікацій гістонів, недавній аналіз 3544 білкових генів в СККН виявив соматичні мутації (делеції) в гені SETD2, який кодує H3K36 метилтрансферазу гістонів, а також в гені KDM5C/JARID1C, що кодує деметилазу гістонів H3K4. Істотні (вдвічі або більше) відмінності в рівні експресії 298 генів були відмічені в СККН, що мали мутацію *SETD2* відносно тих, не що не несли мутацій, тоді як СККН, мутантні по *KDM5C* показали істотні відмінності в рівні експресії всього 18 генів відносно тих СККН, що мали *KDM5C* дикого типу [169]. Логічно припустити, що подібні масштабні зміни не могли не вплинути на процеси епігенетичних модифікацій і при наявності достатніх даних про значення цих змін в патогенезі, епігенетичні модифікації можуть бути цінними в лікуванні і діагностиці.

1.4. Нові молекулярно-біологічні підходи в дослідженні раку

1.4.1. Аналіз широкомаштабних досліджень генома в злоякісних пухлинах. Традиційно в біологічних дослідженнях вивчається досить обмежена кількість генів (лише один або кілька генів одночасно). На відміну від цього, методи сканування з високою пропускнуою здатністю для дослідження геномів і протеомів та біоінформатичні підходи сканування (наприклад, мікрочіпи для дослідження експресії і промотерів, технологія ChIP-on-CHIPs і т.д.) дозволяють провести широкомаштабний пошук перспективних маркерів серед баз даних досліджених генів. З'являються альтернативні технології, які дозволяють дослідникам одночасно оцінювати

зміни та регуляцію генів по всьому геному за певних біологічних умов. Ці високопродуктивні технології зазвичай генерують великі списки генів (від сотень до тисяч генів), що можуть становити інтерес для дослідника.

За останні кілька десятиліть з'явилися біоінформатичні методи, які використовуючи загальнодоступні бази біологічних даних, наприклад, Gene Ontology [170], дозволяють виділяти найбільш відповідні інтересам дослідника гени з тисяч публікацій, на які посилається ресурс. Також створюються великі бібліотеки геномів (ncbi genbank), протеомів (UniProtKB/Swiss-Prot), транскриптомів (бібліотеки RNA-seq кодуючих і некодуючих РНК), причому не лише для різних видів, але й для окремих захворювань.

Тому виникає необхідність також в створенні інструментів пошуку та орієнтування в цих величезних масивах даних. В наш час ця галузь надзвичайно активно розвивається. Станом на 2005 рік було описано 14 подібних інструментів пошуку. Вже через 3 роки було близько 68 біоінформатичних інструментів в публічному доступі [171]. Одним з найбільш перспективних напрямків вдосконалення інструментів біоінформатичного пошуку є функціональний аналіз великих списків генів, отриманих за допомогою сканування геномів і протеомів біоінформатичними методами з високою пропускнуою здатністю (широкомаштабний скрінінг). Така стратегія для методів з високою пропускнуою здатністю, орієнтована не лише на кількісний відбір, а й на функціональні критерії, збільшує імовірність для дослідників ідентифікувати біологічні процеси, найбільш актуальні для їх подальших досліджень. Зокрема, подібні технології активно використовуються для повногеномного пошуку відмін пухлинних і нормальних геномів [172,173].

1.4.2. Перспективи використання генів-супресорів пухлин в клінічній практиці. Пухлинні маркери (онкомаркери) – це біохімічні речовини, що можуть бути виміряні в лабораторних умовах і пов'язані з канцерогенезом. Вони можуть продукуватися як пухлинними клітинами

(маркери пухлинного походження), так і здоровими клітинами у відповідь на пухлинні процеси в організмі (пухлинно-асоційовані).

Крім походження, онкомаркери можна поділити на групи за різними ознаками [174], зокрема:

За призначенням:

Діагностика, в т.ч. уточнення стадії захворювання і типу пухлини

Прогноз перебігу захворювання

Прогноз відповіді на лікування, вибір терапевтичних методів

Контроль наявності відповіді пухлини на лікування

Контроль за можливим рецидивом

По молекулярному типу:

Білок, Ген(ДНК), експресія гена (РНК), міРНК

По матеріалу, в якому аналізують маркер:

Біопсія, фізіологічні рідини (наприклад кров, сеча), кал.

Оскільки пухлинні маркери можуть бути використані для прогнозу і оцінки реакції пухлини на лікування, є підстави сподіватися, що вони також могли б бути корисними у скринінгових тестах, спрямованих на раннє виявлення раку до появи будь-яких симптомів, оскільки СККН, як правило, не має специфічних симптомів і детектується випадково, коли у пацієнта вже наявні метастази [175, 176]. Основною вимогою до скринінг-тесту є дуже висока чутливість (здатність правильно ідентифікувати людей, які мають захворювання) і специфічність (здатність правильно ідентифікувати людей, які не мають захворювання). Якщо тест дуже чутливий, він буде визначати більшість людей із захворюванням, тобто буде приводити до дуже низьких показників помилково негативних результатів. Якщо тест високо специфічний, тільки невелика кількість людей, які не мають хвороби будуть мати позитивний результат тесту. Іншими словами, це призведе до небагатьох помилково-позитивних результатів.

На жаль, не існує "універсального" пухлинного маркера, який може виявити будь-який тип раку. Крім того, дуже мало пухлинних маркерів, що

були б високо специфічні для певного типу раку [175, 176]. Пухлинні маркери є надзвичайно корисними у визначенні наявності реакції пухлини на лікування і контролю можливого рецидиву, але наразі не виявлено жодного маркера пухлин, що є достатньо чутливим і специфічним для незалежного використання у виявленні раку.

Втім, зміни деяких з пухлинних маркерів були досить суттєві, щоб бути використаними в якості мішеней у клінічних випробуваннях. Хоча підвищений рівень маркера пухлини може свідчити про наявність онкопатології, це не є достатньою підставою для постановки діагнозу. Тому пухлинні маркери використовуються в поєднанні з іншими методами діагностики, наприклад, біопсією та рентгенологічними дослідженнями. Хоча є безліч пухлинних маркерів, дуже мало з них знайшли застосування у клінічній практиці через відсутність специфічності. Тим не менш, деякі з цих неспецифічних маркерів успішно використовуються в моніторингу раку, в основному це білкові маркери, що секретуються і можуть бути виміряні в біологічних рідинах. В клінічних дослідженнях успішно використовують такі маркери як: СА 9, α - фетопротейн, СА 19-9, СА 27-29, СЕА, кальцитонін, CD20, HE4 [174, 177-181]. Ці маркери допомагають у вирішенні таких задач як допомога в діагностиці, контроль за ремісією, моніторинг прогресування хвороби, уточнення стадії, визначення груп ризику, оцінка ефективності лікування.

Рівень пухлинного маркера слід вимірювати до початку лікування, щоб допомогти лікарям планувати курс терапії. У деяких видів раку рівень пухлинного маркера відображає стадію захворювання і/або прогноз перебігу хвороби пацієнта. Висновки, засновані на результатах випробувань пухлинних маркерів, що зроблені за результатами одного тесту, матимуть мінімальну інформативність. Тому використовують, як правило, ряд випробувань, так званих серійних вимірювань. Динаміка збільшення або зменшення значення в серії є більш інформативною, ніж одиничний замір.

Лише такі маркери, що показали підвищення до початку лікування, повинні використовуватись для моніторингу пацієнта під час або після лікування. Терміни вимірювань також важливі. Кожен маркер пухлини має унікальну тривалість життя в крові. Для об'єктивного контролю успіху лікування має пройти достатньо часу для розпаду маркера і зниження його кількості в крові відносно початкового рівня. Випробування, проведені занадто рано, можуть дати помилково підвищені результати, бо ще присутній маркер, що був в крові до початку лікування (<http://www.cancer.gov/about-cancer/diagnosis-staging/diagnosis/tumor-markers-fact-sheet>) [174].

Також дослідження молекулярних шляхів канцерогенезу можуть бути використані у розробці препаратів для таргетної терапії. Таргетна терапія – це лікування онкологічних захворювань препаратами, що засновані на безпосередньому впливі на конкретні молекули всередині ракової клітини та впливають на ріст пухлини і метастазів. З огляду на це існує також інша назва – молекулярна таргетна терапія. Таргетна терапія відрізняється від хіміотерапії тим, що має мінімальні побічні ефекти, оскільки практично не впливає на життєдіяльність здорових клітин. Тож, щоб звести до мінімуму ефекти цитотоксичності, були розроблені стратегії, де терапевтичний агент спрямований на пухлинні клітини через кон'югацію з лігандом конкретних низькомолекулярних речовин на поверхні пухлинних клітин, тим самим зменшуючи доставку в нормальні клітини [182]. На даний час активно розробляються і ліганди-кон'югати, і ліганди-терапевтичні агенти.

Також вивчення молекулярних змін в пухлинах необхідне для профілювання пухлин. Зокрема, вважається, що незадовільні результати для деяких таргетних препаратів на III фазі клінічних випробувань пов'язані з відсутністю такого профілювання для пацієнтів, що приймали участь у дослідженнях [183]. Тому при майбутніх клінічних випробуваннях слід використовувати молекулярне профілювання окремих пухлин, щоб визначити оптимальне використання таргетної терапії в попередньо обраних пацієнтів.

Підсумовуючи огляд, відмітимо, що процес утворення та розвитку пухлин супроводжується рядом генетичних та епігенетичних змін. Основою злоякісної трансформації слугують пошкодження генетичного матеріалу клітини, наслідком яких може стати трансформація протоонкогенів в онкогени, інактивація генів-супресорів або порушення системи реплікації ДНК. Крім того, при канцерогенезі відіграють важливу роль епігенетичні фактори, що забезпечують регуляцію експресії генів на транскрипційному та трансляційних рівнях – метилування ДНК, модифікації хроматину та функціонування молекул мікроРНК. Дослідження генетичних та епігенетичних змін трансформованих клітин є актуальною задачею молекулярної біології, оскільки ці знання є необхідним фундаментом для розробки методів ранньої діагностики та лікування пухлин.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

В роботі використовували хімічні реактиви компаній "Sigma"(США), "Silex" (Росія), "Serva"(Німеччина), "NEB (Великобританія)", "Bio Rad" (США), "Amersham Pharmacia Biotech" (Швеція/Великобританія), "Difco" (США), "ZYMO RESEARCH" (США). Також використовували ферменти Таq-полімераза, зворотня транскриптаза, лігаза, кіназа Т4, рестриктази NotI, Sau3AI компаній "Thermo Scientific" (США), "Roshe" (Німеччина), "NEB (Великобританія)", "USB" (США).

2.1. Забір зразків

Видалені хірургічним шляхом пухлини і оточуючі їх умовно нормальні тканини були отримані в Київському національному урологічному центрі (Київ, Україна). Зразки зберігали в рідкому азоті. Пухлини гістологічно класифікували відповідно до критеріїв ВООЗ по TNM класифікації. Всі зразки були зібрані відповідно до принципів, викладених в Гельсінкській декларації та згідно з інструкціями Етичного Комітету ІМБІГ.

2.2. Виділення геномної ДНК

Для виділення ДНК використовували GeneJET™ Genomic DNA Purification Kit "Thermo Scientific" згідно протоколу виробника. Зразки пухлин і умовно нормальних тканин вагою 25-30 мг гомогенізували в рідкому азоті у фарфоровій ступці. Отриманий матеріал поміщали в 1,5 мл пробірки і ресуспендували в 180 мкл Digestion Solution. Потім додавали 20

мкл розчину протеїнази K і перемішували суміш на вортексі до отримання однорідної суспензії. Інкубацію проводили при 56°C протягом ночі.

Зразки обробляли 20 мкл розчину RNase A Solution, перемішували і інкубували протягом 10хв. Після перемішування додавали 200 мкл Lysis Solution, перемішували на вортексі до отримання однорідної суміші. Додавали 400 мкл 50% етанолу і ретельно перемішували. Отриманий лізат переносили до колонки GeneJET™ Genomic DNA Purification із пробіркою для збору рідини. Колонку центрифугували протягом 1 хв при 6000 g, переносили в нову пробірку для збору рідини і додавали 500 мкл Wash Buffer I, змішаного з етанолом. Центрифугували при 8000 g. протягом 1 хв. Відцентрифуговану колонку вставляли знову у пробірку для збору рідини.

В колонку додавали 500 мкл Wash Buffer II (з етанолом), центрифугували 3 хв на максимальній швидкості (12000 g). При наявності залишку рідини в колонці процедуру центрифугування повторювали, після чого колонки переносили в стерильні 1,5 мл пробірки і додавали 200 мкл Elution Buffer в центр мембрани колонки. Інкубували протягом 2 хв при кімнатній температурі, потім центрифугували 2 хв на 8000 g. Отримані зразки зберігали при -20°C.

2.3. Приготування проб для гібридизації з NotI-мікрочіпами

Обробка проб NotI-рестриктазою. Для обробки рестриктазою NotI брали 3мкг геномної ДНК, 10x буфер 3 (NEB), 100xBSA (NEB) (10мг/мл), 10 од. NotI (NEB), доводили об'єм dH₂O до 40 мкл. Інкубували при 37°C на протязі 4 годин, зупиняли реакцію рідким азотом і нагріванням до 65°C 3 рази. Контроль продукту здійснювали в 0,8% агарозном гелі (брали 1мкл продукту після обробки).

Лігування з NotI-лінкером. Для лігування брали 39 мкл розчину ДНК після обробки NotI, 10x лігуючий буфер (NEB), 0,5 мкл NotI-anti-link, 5 од.

лігази (NEB), доводили dH₂O до 110 мкл, інкубували при 4°C на протязі ночі (рис. 2.1).

Приготування NotI-anti-link. Брали 10 мкл NotAntBio*, 10 мкл NotAntComp*, 10x буфер (Roshe), доводили буфером 1x TE до 100 мкл, нагрівали на водяній бані на протязі 2 хв., охолоджували. Брали 5 мкл приготованого розчину, 10x кіназний буфер (NEB), 10 од. кінрази T4, доводили буфером 1x TE до 100 мкл, інкубували при 37°C на протязі 30 хв.

* Олігонуклеотиди:

NotAntBio 5'-Biotin-cagcactgacccttttgggaccgc-3' 24bp

NotAntComp 5'-ggccgcggtcccaaaagggtcagtgctg-3' 28bp

Осаджування з PEG. Для осаджування брали 110 мкл розчину ДНК після лігування з *NotI*-лінкером, 33 мкл 5М NaCl, 71,5 мкл 20% PEG 8000. Суміш охолоджували 1 годину на льоду, центрифугували 20 хв. на 8000 g при 4°C, осад розчинили в 30мкл1xTE. Контроль продукту здійснювали в 0,8% агарозному гелі (брали 1 мкл осаду і 10 мкл супернатанту).

Обробка *Sau3AI*. Для обробки *Sau3AI* брали 29 мкл ДНК після осаджування з PEG, 10x буфер *Sau3A* (NEB), 20 од. *Sau3AI* (NEB), доводили dH₂O до 40 мкл, інкубували при 37°C на протязі 3 годин.

Імобілізація на кульках (Dynabeads M-280 Streptavidin "Dyna"). 5 мкл кульок відмивали 3 рази в 2xV&W буфері (10мМоль Tris-HCl (pH 7,5), 1мМоль EDTA, 2М NaCl) і розчинили в 50 мкл 2xV&W буфера. Потім додали до цих кульок в 2xV&W буфері 40 мкл ДНК, обробленої *Sau3AI*. Помістили усі пробірки в одну пробірку 50мл і на протязі 20-ти хв. крутили його на ролері, потім ставили на 2 хв. на магніт. Додавали 50 мкл 2xV&W буферу і ресуспендували за допомогою мірної піпетки. Ставили знову на 2 хв. на магніт, видаляли супернатант. Відмивання кульок повторили 3 рази в 2xV&W буфері. Потім промили кульки двічі в 50 мкл 1xV&W буфера і 3 рази в TE буфері. Розчинили кульки в 20мкл1xTE.

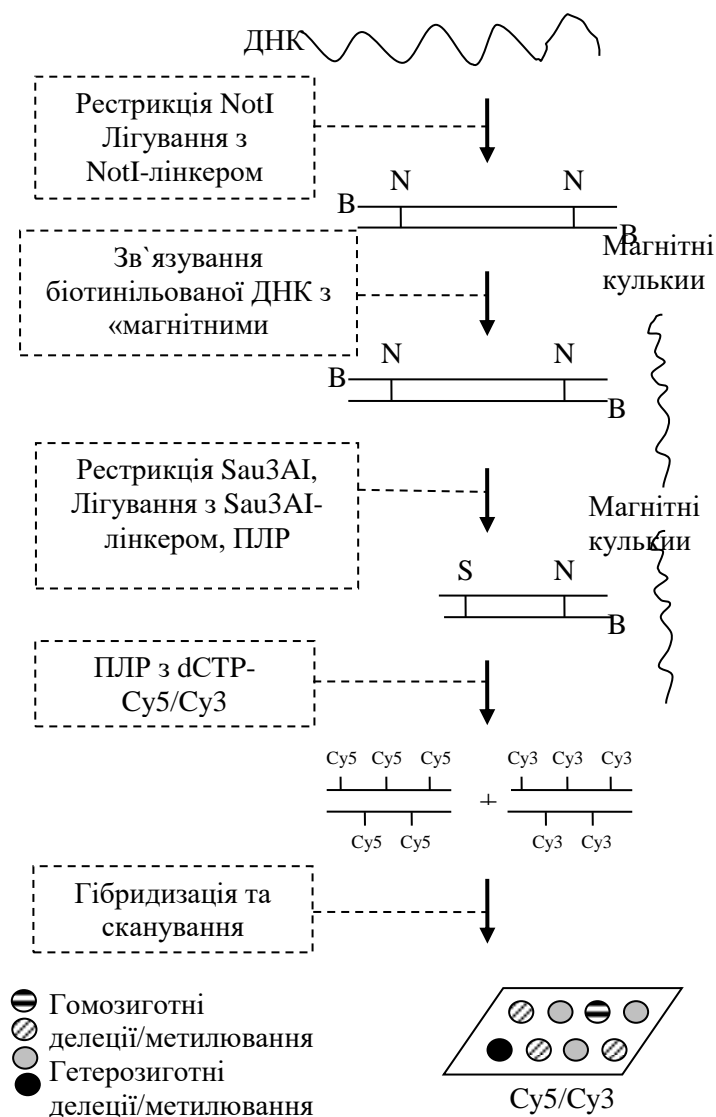


Рис. 2.1. Схема NotI-мікрочіпів. N – рестриктаза NotI, S – рестриктаза Sau3AI, B – біотин, Cy5/Cy3- мічений dCTP (включення при ПЛР-ампліфікації)

Приготування SauZgt99link. Брали 10 мкл SauZgtBlock*, 10 мкл SauZgtComp*, 10x буфер (Roshe), доводили буфером 1x TE до 100 мкл, нагрівали на водяній бані на протязі 2 хв., охолоджували на воді. Брали 20 мкл приготованого розчину, 10x кіназний буфер (NEB), 10 од. кінази (NEB),

доводили до 100 мкл буфером 1x TE, інкубували при 37°C на протязі 10 хвилин.

* Олігонуклеотиди:

SauZgtBlock 5'-gacacctcaaacgcgt-block-3' 15bp

SauZgtComp 5'-ggcgatctatcctagagcccgtacgcggtttgag-3' 33bp

Лігування з *Sau3AI*-лінкером. Для лігування брали 20 мкл ДНК на кульках з попереднього етапу, 10x буфер для лігування (NEB), 0,5 мкл SauZgt99link, 5 од. лігази (NEB), доводили dH₂O до 50 мкл, інкубувати при 4°C на протязі ночі. Потім промили 3 рази в 50 мкл буфера TE, з використанням магніту. Осад розчинили в 50 мкл TE.

Ампліфікація ДНК (ПЛР): Брали 1 мкл ДНК з попереднього кроку разом з кульками, 5x ПЛР буфер#9, 200 мкМ dNTP, 1 мкл Primer anti-univ* (20μМ), 1 мкл Primer Zgt99* (20μМ), 1 од. (1 мкл)_Taq-полімерази (NEB), доводили dH₂O до 30 мкл. Контроль продукта здійснювали в 0.8% агарозном гелі (наносили 3μl продукту ПЛР).

Умови ПЛР: Ампліфікацію ДНК (35 циклів) здійснювали на приладі Percin-Elmer 2720 (95°C-45 сек., 64°C-40 сек., 72°C-2хв. 20 сек.) з ініціацією денатурації при 95°C на протязі 2 хв. Фінальну елонгацію проводили при 72°C на протязі 4 хв..

*Праймери:

Anti-univ 5'-cagcactgacccttttgggacc-3' 22bp

Zgt99 5'-ggcgatctatcctagagcccgt-3' 22bp

Осаджування продукту ПЛР. Брали 27 мкл продукту ПЛР, 2,7 мкл 5M NaCl, 81 мкл 99 % етанолу, тримали 15 хв при -80°C, центрифугували 20 хв. При 8000 g, видаляли супернатант; додавали 150 мкл 70% EtOH, центрифугували 20 хв при 8000 g, осад розчиняли в 50 мкл буфера 1xTE.

Мічення ДНК Cy3 і Cy5 за допомогою ПЛР (усі наступні етапи проводили без доступу світла). Брали 3мкл (200-400нг) ДНК, 5xПЛР буфер#9, 200 мкМ dNTP (усі, крім dCTP), 80 мкМ dCTP, 1,2 мкл (1,25 нМ) dCTP Cy3 (або 1,5 мкл (1,5 нМ) dCTP Cy5), 1 мкл праймера anti-univ* (20

мМ), 1 мкл праймера Zgt99* (20 мМ), 1 од. (1 мкл) Taq-полімерази (NEB), доводили dH₂O до 30 мкл.

Умови ПЛР: Ампліфікацію ДНК (35 циклів) здійснювали на приладі Perkin-Elmer 2720 (95 С-45 с, 60 С-40 с, 72 С-2 хв 20 с) з ініціацією денатурації при 95 С протягом 2 хв. Фінальну елонгацію проводили при 72 С протягом 4 хв.

Для ДНК з нормальних тканин використовували флуоресцентний барвник Cy3 (зелений), а для ДНК з пухлин – Cy5 (червоний), Amersham.

Осаджування продукту ПЛР. Брали 30 мкл продукту ПЛР, 3 мкл 5М NaCl, 90 мкл 99% етанолу, витримували 1 годину при -80°C, 20 хв центрифугували при 8000 g, видаляли супернатант. Додавали 150 мкл 70% етанолу, інкубували 20 хв при кімнатній температурі, 20 хв центрифугували при 8000 g, сушили близько 1 хв; осад розчиняли в 20мкл dH₂O (зразки готові для гібридизації).

Безпосередньо перед гібридизацією об'єднували проби, які були приготовані з ДНК пухлин та нормальних тканин, по 50 мкл. Додавали 100 мкл 2,5х гібридизаційного буфера (5х SSC, 5х розчин Денхарта, 1 мМ пірофосфат Na, 50 мМ Тріс, рН 7,5) та 100 мкл формаміду. Інкубували при 95°C протягом 5 хв, охолоджували суміш 1 хв. на льоду, додавали 2,5 мкл 10% SDS. Суміш проб вносили у гібридизаційну камеру.

Гібридизацію NotI-мікрочіпів з міченими пробами проводили на приладі TECAN100 і сканували на приладі GenPix400. Обрахунок результатів проводили за допомогою програми GenPix4.0.

Значення відносної гібридизації оцінювали за співвідношенням інтенсивності флуоресценції Cy5 і Cy3. Якщо відношення Cy5/Cy3 менше, ніж 0,35, то зразок розглядається як такий, що містить гомозиготну делецію/метилування, у інтервалі від 0,35 до 0,85 – як гетерозиготну делецію/метилування, якщо відношення понад 1,5, ми вважаємо, що має місце ампліфікація.

2.4. Виділення тотальної РНК

Для виділення тотальної РНК використовували RNeasy Mini Kit. Заморожені зразки тканин нирок розтирали у фарфоровій ступці у рідкому азоті і вносили 25-30 нг в 600 мкл RLT-буфера, отриманий лізат обробляли ультразвуком Ultra Sonic Homogenizer 4710 Series Cole Parmer. Далі отриманий розчин центрифугували протягом 3хв. на максимальній швидкості. Отриманий супернатант обережно переносили в нову пробірку мірною піпеткою та додавали рівний об'єм 70% етанолу і перемішували піпеткою. В колонку RNeasy spin з пробіркою для збору рідини вносили 700 мкл рідини з першої пробірки, включаючи осад. Центрифугували 15 с при 8000g. Після центрифугування на матрикс колонки RNeasy spin зі збиральною пробіркою наносили 500мкл буфера RPE. Обережно закривали колонку, щоб уникнути струшування, і центрифугували 15 с при 8000 g, щоб промити мембрану колонки. Процедуру повторювали ще раз, центрифугуючи 2 хв при 8000 g. Впевнившись, що мембрана колонки не містить рідини, колонку переносили в нову збиральну пробірку і центрифугували 1 хв на максимальній швидкості для повного видалення можливих залишків буфера. Потім колонку переносили в нову збиральну пробірку і додавали 30-50 мкл води, обробленої DEPC, безпосередньо на матрикс колонки. Центрифугували протягом 1 хв. при 8000 g для елюції тотальної РНК. При необхідності останній крок виконували повторно, використовуючи елюат з попереднього кроку.

2.5. Синтез першого ланцюга кДНК

Перед початком процедури синтезу кДНК тотальну РНК попередньо обробляли ДНКазою (Thermo Scientific) з метою видалення домішок геномної ДНК. Для цього в пробірку, вільну від РНКазиди додавали 1 мкг РНК

і 1 мкл 10X буфера з MgCl₂, 1 мкл DNase I і воду, оброблену DEPC до 10 мкл загального об'єму. Інкубували 30 хв. при 37°C, після чого додавали 1 мкл 50мМоль EDTA і продовжували інкубацію при 65°C ще 10хв.

Для синтезу першого ланцюга кДНК використовували RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific) згідно протоколу виробника.

В стерильну пробірку на льоду додавали 2 мкг тотальної РНК, праймери oligo (dT)₁₈ -1 мкл, водою, вільною від нуклеаз, об'єм доводили до 12 мкл. Отриманий розчин обережно перемішували, центрифугували при малих обертах і інкубували 65°C протягом 5 хв. Після інкубування переносили на лід, обережно перемішували.

Наступні компоненти додавали в таких об'ємах: 5X Reaction Buffer - 4 мкл, RiboLock™ RNase Inhibitor (20 од/мкл) - 1 мкл, 10 мМоль dNTP Mix - 2 мкл, RevertAid™ H Minus M-MuLV Reverse Transcriptase (200 од/мкл) - 1 мкл. Загальний об'єм реакції має становити при цьому 20мкл. Отриманий об'єм обережно перемішували і центрифугували. Інкубували 60 хв при 42°C. Термінація реакції здійснювалася нагріванням до 70°C протягом 5 хв. Отримані проби кДНК зберігали при -20°C.

2.6. Визначення відносної експресії генів на рівні мРНК

Рівень відносної експресії генів визначали методом кількісної ПЛР в реальному часі на приладі Bio-Rad iQ5. Праймери були підібрані за допомогою онлайн-ресурсу Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>). В якості референсного гену, згідно з даними літератури, використовували ТВР [184]. Реакції виконували використовуючи реактиви фірми «Thermo Scientific» 2x SYBR Green PCR Master Mix. Кожна проба містила 20 мкл реакційної суміші. Концентрація прямого і зворотнього праймерів складала 400 нМоль, концентрація кДНК складала 10 нг/мкл. Реакції виконували за програмою:

денатурація 10хв при 95 °С, потім 35 циклів за такою схемою: денатурація 95 °С 20 с, відпал праймерів 60 °С протягом 20 с і елонгація 72 °С 40 с. Для обчислення ефективності реакції створювали стандартну логарифмічну криву серії розведень для праймерів досліджуваних і референсного генів. Для цього виконували серію розведень матриці від 1 до 100 нг. Кожний зразок аналізували у триплетах, для кожної пари праймерів робили негативний контроль. Результати обраховували за формулою для відносної кількісної ПЛР в реальному часі ($\Delta\Delta C_t$ -метод).

Праймери, що використовувались для К-ПЛР:

NKIRAS1_expr

For 5' -CTTTCAAAGAGTGGAGCTTCTG -3',

Rev 5' - TTTCCGATCTGTAACAGTCACC -3'.

PPM1M_expr

For 5'-GATGTA CTGTCCAACGAGCAG-3,

Rev 5'-TGTCTTCCTTTCCCTGTGTG-3.

PRICKLE2_expr

For 5' - TGCCCTATTGAGGAGAAGGA - 3',

Rev 5' - TAATGGTTGTGATGGAGGAAT - 3'.

GPX1_expr

For 5'-CCAAGCTCATCACCTGGTCT-3',

Rev 5'-TCGATGTCAATGGTCTGGAA-3'.

GPX2_expr

For 5'-TTTTGGACAAGGGTGAAGGT-3',

Rev 5'-TGCAACCAATTTGGACATCA-3'.

GPX3_expr

For 5'-TACGAGTACGGAGCCCTCAC-3',

Rev 5'-CCAGAATGACCAGACCGAAT-3'.

GPX4_expr

For 5'-ATGTCCTTGGCGGAAAАCTC-3',

Rev 5'-CCTTGGGTTGGATCTTCATC-3'.

GPX6_expr

For 5'-AGGGTGAGGGCTCCATACTC-3',

Rev 5'-AGTTCCAGGCCTCCTGTCTT-3'.

TBP_expr

For 5' - GAACCACGGCACTGATTTTC - 3',

Rev 5' - CACAGCTCCCCACCATATTC-3'.

2.7. Бісульфитна модифікація геномної ДНК

Для бісульфитної модифікації використовували EZ DNA Methylation™ Kit (ZYMO RESEARCH). До 500 нг геномної ДНК пухлин і умовно нормальних тканин додавали 5 мкл M-Dilution Buffer і доводили об'єм до 50 мкл водою. Перемішаний зразок інкубували протягом 15 хв при 37°C. Потім до кожного зразка додавали 100 мкл підготовленого CT Conversion Reagent і перемішували. Зразки інкубували в темряві, при 50°C протягом 15 годин (на ніч).

Після інкубації зразки переносили на лід на 10 хв. Далі додавали 400 мкл M-Binding Buffer до колонки Zymo-Spin™ IC Columni, ставили колонку в пробірку для збору рідини, після чого наносили зразок на колонку і перемішували. Центрифугували при максимальних обертах (>10,000 g) протягом 30 с. До колонки додавали 100 мкл M-Wash Buffer і знову центрифугували при тих же умовах. Далі в колонку додавали 200 мкл M-Desulphonation Buffer і залишали при кімнатній температурі на 15-20 хв. Після інкубації центрифугували 30 с. на повній швидкості. Потім до колонки додавали 200 мкл M-Wash Buffer. Центрифугували за тих же умов і додавали повторно 200 мкл M-Wash Buffer, після чого центрифугували 30 с. при максимальних обертах. Далі колонки переносили до стерильних 1,5мл пробірок, вносили 10 мкл M-Elution Buffer, прямо в центр матриксу колонки.

Центрифугували при максимальній швидкості 30 с. для елюції ДНК. Отримані зразки зберігали при -20°C для подальшого використання.

Модифікована ДНК (100 нг) була використана в якості матриці для ПЛР з праймерами, які були підібрані за допомогою онлайн-інструменту MethPrimer (<http://www.urogene.org/methprimer/>). Полімеразна ланцюгова реакція проводилась у 1x ПЛР буфері (Thermo scientific) з 0,2 мМоль dNTPs, 0,3 мкМоль праймерами, 100 нг модифікованої ДНК і 1,5U DreamTaq-полімерази (Thermo scientific). Ампліфікація (35 циклів) здійснювалась на приладі BIS Термосуслер 30 с. при 95°C, 30 с. при 60°C і 30 с. при 72°C з ініціацією денатурації при 95°C впродовж 4 хв. Фінальна елонгація при 72°C проводилась на протязі 5 хв. Електрофоретичний аналіз зразків ДНК після ПЛР проводився у 2% агарозному гелі.

Праймери для визначення статусу метилування:

***NKIRAS1* для метилованої матриці**

For 5'-ATGTAATGTTCGCGTTACGCGTTCGTT-3'

Rev 5'-CGCGTATCCGCCTCTAACTCGATTC-3'

***NKIRAS1* для не метилованої матриці**

For 5'-TGTAATGTTGTGTTATGTGTTTGTTT-3'

Rev 5'-CCACATATCCACCTCTAACTCAATTC-3'

***PPM1M* для метилованої матриці**

For 5'-CGTGTTTTATCGACGGTTTC-3'

Rev 5'-AACGTACGTCCTCGTACGAA-3'

***PPM1M* для неметилованої матриці**

For 5'-AGT TTT GTGTTTTATTGATGGTTTT-3'

Rev 5'-ССААААТААСАТАСАТССАТАСА-3'

***GPX1* для метилованої матриці**

For 5'-СТААССГААСААСАСАСАТААСГ-3'

Rev 5'-GAGGCGGGATTTTTAGGTTC-3'

***GPX1* для неметилованої матриці**

For 5'-ACCAAACAACACACATAACACA-3'

Rev 5'-ATGAGGTGGGATTTTTAGGTTT-3'

***GPX3* для метилованої матриці**

For 5'-GTTGAGGGTAAGTCGCGTTC-3'

Rev 5'-GTCCGTCTAAAATATCCGACG-3'

***GPX3* для неметилованої матриці**

For 5'-GAGTTGAGGGTAAGTTGTGTTTGT-3'

Rev 5'-CCATCCATCTAAAATATCCAACACT-3'

***GPX4* для метилованої матриці**

For 5'-GTTGGAAATTTTCGGATTACGC-3'

Rev 5'-ACCGTAATCAAAACTACGCG-3'

***GPX4* для неметилованої матриці**

For 5'-GGGTTGGAAATTTTGGATTATGT -3'

Rev 5'-CCAAAAACCATAATCAAAACTACAA-3'

2.8. Аналіз алельного поліморфізму локусів D3S1287, D3S4182, A002C09, MARC_15661, RH76369, RH12810 в популяційній вибірці

Полімеразна ланцюгова реакція проводилась у DreamTaq 1x ПЛР буфері (Thermo Scientific) з 0,2 мМоль dNTPs, 0,3 мкМоль праймерів, 100 нг ДНК і 1,5U DreamTaq-полімерази (Thermo Scientific). Ампліфікація (28 циклів) здійснювалась на приладі BIS Термосуслер (30 с. при 95°C, 30с. при 60°C і 1хв. при 72°C) з ініціацією денатурації при 95°C протягом 4хв. Фінальна елонгація при 72°C проводилась протягом 5 хв. Для реакції використовували праймери з бази даних NCBI: D3S1287, D3S4182, A002C09, MARC_15661, RH76369, RH12810 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/probe>). Аналіз отриманих продуктів ПЛР проводили в 6% поліакріламідному гелі протягом 3 год. при 150В.

2.9. Аналіз кількості копій досліджуваних генів

Аналіз кількості копій гена виконували за допомогою кількісної ПЛР в реальному часі на приладі Bio-Rad iQ5. Праймери були підібрані за допомогою онлайн-ресурсу Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>). Для генів *NKIRAS1*, *PPM1M*, *PRICKLE2* в якості референсного гена використовували *TBP*. Для генів *GPX1*, 3, 4 використовували референсний ген *COL2A1*. Реакції виконували використовуючи реактиви фірми «Thermo Scientific» 2x SYBR Green PCR Master Mix. Кожна проба містила 20мкл реакційної суміші. Концентрація прямого і зворотнього праймерів складала 400 нМоль, концентрація кДНК складала 10 нг/мкл. Реакції виконували за програмою: денатурація 10 хв при 95°C, потім 35 циклів за такою схемою: денатурація 95°C 20с., відпал праймерів 60°C протягом 20 с. і елонгація 72°C 40с. Кожний зразок аналізували у триплетах.

Згідно з гістологічним аналізом, забруднення пухлинного зразка тканинами строми і лімфоцитами може досягати 30–40%. Таким чином, якщо розраховане відношення числа копій гена у пухлині відносно до нормальної тканини було нижче 0,35, вважали, що має місце гомозиготна делеція, як гетерозиготну делецію визначали зразки, що мали значення у діапазоні 0,35-0,85. Аллель вважали ампліфікованим, якщо значення було вище 1,5 [185]. Зразки, що мали значення 0,85-1,5 вважали такими, що не мають змін кількості копій гена.

Праймери для визначення кількості копій гена:

***NKIRAS1*_copy**

For 5'-TGCAATTTGGAATGGAGTGT-3'

Rev 5'-CATTTCCCACTTTCCCTAC-3'

***PPM1M*_copy**

For 5'-TCCGAATCCTGACAACCTC-3'

Rev 5'-CCGAATGCTGGAACTCTA -3'

PRICKLE2_copy

For 5'- ATGTTTGCTCCTGGTTTCA -3'

Rev 5'- ACTCAGACCCTCAGTTCAC -3'

TBP_copy

For 5'- ATAAAGCAGCAGCAGGGTTT-3'

Rev 5'- AGTCAGTGTGGCAAACCTTCG-3'

GPX1_copy

For 5'- ACCAAACAACACACATAACACA-3

Rev 5'- ATGAGGTGGGATTTTTAGGTTT-3

GPX3_copy

For 5'- GAGTTGAGGGTAAGTTGTGTTTGT-3

Rev 5'- CCATCCATCTAAAATATCCAACACT-3

GPX4_copy

For 5'- GGGTTGGAAATTTTGGATTATGT-3

Rev 5'- CCAAAAACCATAATCAAAACTACAA-3

COL2A1_copy

For 5'- GTAATGTTAGGAGTATTTTGTGGGA-3

Rev 5'- CTACCCCAAAAAAAAA CCCAATCCTA-3

2.10. Аналіз кількості тринуклеотидних повторів

Для аналізу кількості тринуклеотидних повторів GCG (аланінові повтори) проводили ампліфікацію ділянки, що містила поліморфний локус. На 5'-кінці прямого праймера містилася флуоресцентна мітка Cy5. Для реакції була використана наступна пара праймерів:

For 5'- Cy5-GAAAACCTGCCTCTGCCACGTGACC - 3'

Rev 5'- CGAGAAGGCATACACCGACTGGGC - 3'

ПЛР здійснювали в об'ємі 25 мкл реакційної суміші, яка містила: 1x ПЛР буферу з 15 мМоль Mg²⁺, 0,2 мМоль dNTPs, 0,3 мкМоль праймерів, 1,5U DreamTaq-полімерази та 100 нг ДНК. Реакції виконували за програмою:

попередня денатурація 4 хв. при 95 °С, потім 28 циклів за такою схемою: денатурація 95°С 30 с., відпал праймерів 59°С протягом 30 с. і елонгація 72°С 60 с.

Для встановлення точних розмірів продуктів ампліфікації, їх розділяли в 6% денатуруючому поліакриламідному гелі. Для цього аліквоту міченого продукту (0,5-3 мкл) змішували з 3 мкл розчину для нанесення на гель, що містив 95 % розчин формаїду та розчин бромфенолового синього з концентрацією 5 мг/мл, та два внутрішні маркери відомого розміру. Приготовану суміш денатурували, після чого наносили на гель. Флуоресценцію фіксували за допомогою автоматичного лазерного секвенатора ALF-express. Електрофорез проводили при температурі 50°С, при 1000 V, 50 mA, 30 W протягом 90 хв. Після сканування ALF-гель аналізували за допомогою програми FM2.1 (Fragment Manager Software V2.1, Pharmacia, Швеція).

2.11. Статистичний аналіз

Непараметричний тест Вілкоксона використовували для порівняння відносного рівня експресії мРНК у зразках СККН і умовно нормальних тканин. Для обрахування похибки вимірювання рівня відносної експресії генів в триплетах використовували похибку середнього.

Частоти алелей та теоретично очікуваний розподіл генотипів розраховували за методом запропонованим Лі [186]. Показник достовірності P для відповідності рівновазі Харді-Вайнберга було розраховано із використанням методу ланцюгів Маркова за Guo та Thompson [187].

Показники фактичної і теоретичної гетерозиготності та стандартну похибку розраховували за формулами, запропонованими Неєм [188]. Визначення дефіциту чи надлишку гетерозигот розраховували за методом запропонованим Росе та Раймондом [189]. Різницю між найбільшими та

найменшими показниками гетерозиготності оцінювали за допомогою t-критерія Стьюдента [190].

Статистична обробка результатів проводилась за допомогою загальнодоступних онлайн онлайн ресурсів <http://www.openepi.com>, а також програмного забезпечення Statistica v.10.0, власного програмного забезпечення ATG [191] і NIMAN [192], а також програмного забезпечення фірми BioStat [193]. Для всіх статистичних тестів в якості критерію статистичної достовірності розглядали 95%-й рівень значущості.

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

3.1. Широкомаштабний аналіз змін експресії генів при раку нирки

Нещодавно була розроблена чутлива технологія, заснована на NotI-мікрочіпах, для ідентифікації генетичних (делеції/ампліфікації) і епігенетичних (метилування/деметилування) змін ДНК [194]. Ця технологія була успішно використана для аналізу метилування/делецій в раку легень, яєчників і раку шийки матки [195-197]. Суть цього методу полягає у здатності ферменту NotI-рестриктази впізнавати і розрізати тільки неметилований мотив 5'-GCGGCCGC-3, що часто зустрічається в CpG-острівцях. CpG-острівці розташовані в промоторній області багатьох генів, в тому числі пов'язаних з раком, і їх гіперметилування являє собою поширений механізм інактивації TSGs, що сприяє злоякісній трансформації [198].

3.1.1. Використання NotI-мікропанелей для ідентифікації змін експресії генів, розташованих у районах, які задіяні у розвитку раку нирки. Для пошуку потенційних генів-супресорів росту пухлин нирки, ми використовували NotI-мікропанелі для хромосоми 3 людини. За допомогою технології NMA було проаналізовано 23 зразка раку нирки для виявлення метилування, делецій або ампліфікацій в NotI-сайтах хромосоми 3 людини. Відносні сигнали гібридизації ДНК із 23 зразків раку нирки представлені на рис. 3.1.

Результати гібридизації 23-х ДНК-зондів з хромосоми 3, що містили NotI-сайти із парних проб тканини нирки норма/пухлина, представлені на рис. 3.1. Як видно з рис. 3.1., основними змінами ДНК є метилування або делеції (M/D). Ампліфікації та/або деметилування було задетектовано вкрай рідко, тому такі випадки було проігноровано в подальшому аналізі. Аналіз

виявив 19 NotI-сайтів, пов'язаних з 22 генами, в яких встановлено метилування/делеції у більш ніж 17% випадків (рис. 3.1., таблиця 3.1.). П'ять з 23 зразків (22%) показали одночасні M/D в більш ніж 9 з 19 NotI-сайтів з високою частотою, і, меншою мірою, у 12 NotI-сайтах (Зразки №8, 11, 16, 17, 22 з рис. 3.1.).

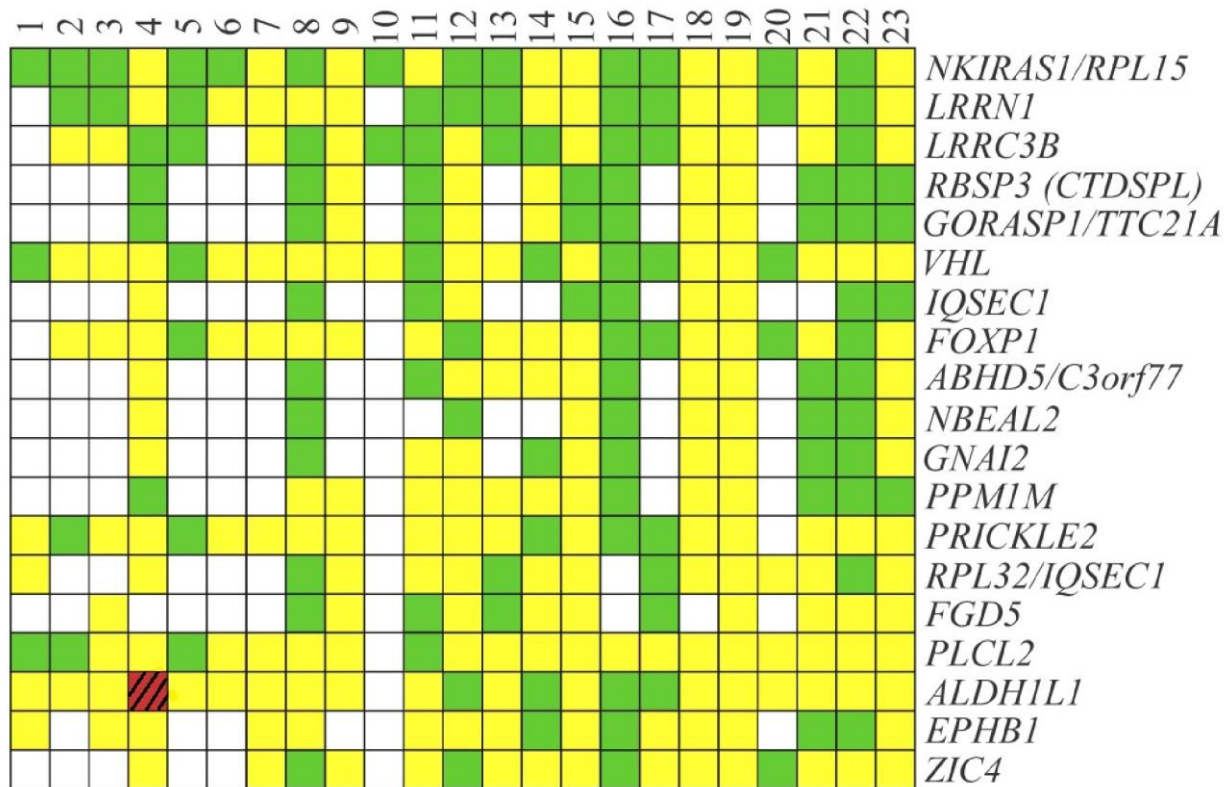


Рис. 3.1. Результати аналізу даних NotI-мікрочіпів для генів з високою частотою метилування та/або делецій в СККН. Вертикаль: NotI-сайти, упорядковані по частоті змін, і у яких частота метилування/делецій варіює від 57% до 17%. Горизонталь: 23 зразка СККН. Темно-сірі квадрати вказують метилування та/або делеції ДНК; Світло-сірі – без змін, квадрат зі штриховкою - ампліфікацію/деметилування, білий - не інформативні дані

Як зазначено вище, для 22 генів зміни присутні в більш ніж 17% випадків. Згідно з даними літератури, 6 з них асоційовані з різними типами карцином (*LRRN1*, *GORASP1*, *FOXP1*, *FGD5*, *PLCL2* і *ALDH1L1*). Так, у 57% випадків присутня гетерозиготна делеція/метилування в локусі,

асоційованому з геном *NKIRAS1*, а також рибосомальним геном *RPL15*, що може призводити до зниження або втрати експресії цих генів. *NKIRAS1* належить до нещодавно відкритого класу еволюційно консервативних Ras-подібних білків, що регулюють активність фактора транскрипції NF-κB за рахунок зниження рівня деградації його інгібіторів [199]. Оскільки вважається, що NF-κB діє як фактор, який протидіє p53-залежному апоптозу трансформованих клітин, стимулює процеси запалення та імунної відповіді, зменшення експресії гена *NKIRAS1* може призводити до активації транскрипції факторів ініціації запалення і блокування апоптозу, що сприяє злоякісній трансформації.

Таблиця 3.1.

Список NotI-сайтів на хромосомі 3 з частотами метилування/делецій вище 17% у світлоклітинному раку нирки.

NotI-сайт	Назва гена	Локус	Частота метилування/делецій, %
NL1-CJ4R (C)	<i>NKIRAS1/RPL15</i>	3p24.2	57 (13/23)
NL6-FJ5R (C)	<i>LRRN1</i>	3p26.2	43 (10/23)
NL3-CA11RS	<i>LRRC3B</i>	3p24	43 (10/23)
NLJ-003RD	<i>RBSP3 (CTDSPL)</i>	3p21.3	35 (8/23)
NL3003R (U)	<i>GORASP1/TTC21A</i>	3p22-p21.33	35 (8/23)
NRLA404R (U)	<i>VHL</i>	3p25.3	30 (7/23)
NR1-XM13C	<i>IQSEC1</i>	3p25.2	26 (6/23)
NL1-BA6R	<i>FOXP1</i>	3p14.1	26 (6/23)
NR1-AN24RS	<i>ABHD5/C3orf77</i>	3p21	22 (5/23)
NL3A006R (D)	<i>NBEAL2</i>	3p21.31	22 (5/23)
NL3A001R (D)	<i>GNAI2</i>	3p21.31	22 (5/23)
NR1-NC7RS	<i>PPM1M</i>	3p21.2	22 (5/23)
NR1-NJ9R (C)	<i>PRICKLE2</i>	3p14.1	22 (5/23)
HSJ4-AB7R (C)	<i>RPL32/IQSEC1</i>	3p25.2	17 (4/23)
NL4-DP2RS	<i>FGD5</i>	3p25.1	17 (4/23)

Продовження таблиці 3.1.

NL4-AP18R (C)	<i>PLCL2</i>	3p24.3	17 (4/23)
NL4-BC8R (C)	<i>ALDH1L1</i>	3q21.3	17 (4/23)
NL1A079R (D)	<i>EPHB1</i>	3q21-q23	17 (4/23)
NR1-PD1R	<i>ZIC4</i>	3q24	17 (4/23)

Для більш детального вивчення були відібрані гени *NKIRAS1*, *PPM1M* і *PRICKLE2*. Решта генів, що показують зміни більше, ніж у 17%, були описані нами раніше, або немає даних про їх зв'язок з захворюваннями на рак.

3.1.2 Аналіз відкритих біоінформатичних баз даних. Одним з підходів для ідентифікації потенційних TSG є аналіз відкритих біоінформатичних баз даних, наприклад, бази даних олігонуклеотидних мікрочіпів (мікрочіпів) і SAGE. Технологія ДНК-мікрочіпів (на основі кДНК або олігонуклеотидів) дозволяє отримати кількісну інформацію про рівень експресії генів у досліджуваних зразках. SAGE - це технологія для кількісної характеристики транскриптому, тобто кількість мРНК в конкретному типі клітин або тканини [200, 201].

З метою пошуку потенційних маркерів СККН, було досліджено рівень експресії всіх генів людини у СККН, використовуючи біоінформатичний аналіз даних мікрочіпів кДНК. Аналіз було проведено для 11 баз даних (такі, як GSE11985, GSE12114, GSE781, GSE12630 та інші), результати аналізу порівнювали з даними, які було отримано при гібридизації 84 зразків нормальної тканини та 83 зразків пухлини нирки. З метою ідентифікації генів, які беруть участь у розвитку раку нирки, було використано бібліотеку, створену з пухлини нирки та 2 бібліотеки з нормальної тканини, використовуючи SAGE Digital Gene Expression Displayer (DGED). Біоінформаційний аналіз показав, що ген *TBP* може бути використано в якості контрольного гена для вивчення експресії генів в карциномі нирки з метою перевірки результатів, опублікованих раніше [184].

Було ідентифіковано 12 генів, експресія яких співпадала за даними гібридизації мікрочіпів і у базах даних SAGE. Два гена - глутатіон пероксидази *GPX1* та *GPX3* було обрано для вивчення генетичних і епігенетичних змін, у зв'язку з їх показаною участю у прогресії і метастазуванні пухлин. Ми припустили, що й інші гени цього сімейства можуть брати участь у розвитку СККН. Тому для подальшого аналізу також було взято інші гени сімейства селеноцистеїнвмісних глутатіон пероксидаз, таких як *GPX2*, *GPX4* і *GPX6*.

Результати досліджень, поданих в підрозділі, опубліковані в праці:

1. Epigenetic Alterations of Chromosome 3 Revealed by NotI-Microarrays in Clear Cell Renal Cell Carcinoma / A. A. Dmitriev, E. E. Rudenko, A. V. Kudryavtseva, G. S. Krasnov, V. V. Gordiyuk, N. V. Melnikova, E. O. Stakhovsky, O. A. Kononenko, L. S. Pavlova, T. T. Kondratieva, B. Y. Alekseev, E.A. Braga, V. N. Senchenko, V. I. Kashuba // BioMed Research International 2014, Article ID 735292.

3.2. Аналіз експресії, а також генетичних і епігенетичних змін генів людини, відібраних на основі попереднього аналізу мікрочіпів і біоінформатичних даних. Метилування промоторної ділянки та делеції є частими механізмами інактивації генів-супресорів. В даному розділі розглянуто можливий зв'язок даних процесів з експресією генів людини, що були відібрані на основі NMA та біоінформатичного пошуку: *NKIRAS1*, *PPM1M*, *PRICKLE2* та *GPX1*, *GPX2*, *GPX3*, *GPX4*, *GPX6*.

3.2.1. Профіль метилування промоторних ділянок генів *NKIRAS1*, *PPM1M*, *PRICKLE2* та сімейства генів *GPXs* і втрата гетерозиготності в зразках тканин СККН. CpG острівці в промоторних ділянках генів *NKIRAS1*, *PPM1M*, *PRICKLE2* та сімейства генів *GPX* було визначено за

допомогою онлайн-інструменту для пошуку CpG острівців (<http://www.uscnorris.com/cpgislands2/cpg.aspx>). Ми виявили CpG острівці в промоторних областях генів *NKIRAS1*, *PPM1M*, *GPX1*, *GPX3* і *GPX4*, але не у генів *PRICKLE2*, *GPX2* і *GPX6*. Було проаналізовано 25 зразків СККН і відповідних нормальних тканин, використовуючи метилспецифічну ПЛР і специфічні праймери для неметильованих і метильованих нуклеотидних послідовностей генів *NKIRAS1*, *PPM1M*, *GPX1*, *GPX3* і *GPX4*. . Нами було встановлено, що промотори вказаних генів не метиловані ані в зразках пухлин, ані в умовно нормальних тканинах.

Тому, з метою виявлення делецій в гомо- та гетерозиготних делецій використано метод аналізу втрати гетерозиготності (LOH) для *NKIRAS1*, *PPM1M*, *PRICKLE2* і *GPXs*. З метою визначення інформативності аналізу даних локусів проведено аналіз алельного поліморфізму у вибірці умовно здорових індивідів з України (n=25). Для кожного з перерахованих генів перевірено по 25 зразків умовно нормальних тканин зразків пацієнтів з СККН. За відомими поліморфними локусами досліджуваних генів не виявлено гетерозиготності, що вказує на низьку інформативність цих локусів. Таким чином, досліджувані поліморфні маркери не є поліморфними у пацієнтів з СККН або гетерозиготи зустрічаються з дуже низькою частотою, тому подальший аналіз зразків пухлин не проводився.

3.2.2 Ген людини *NKIRAS1*. Ген Ras1-подібний інгібітор транскрипційного фактору NF-κB (*NKIRAS1*), що локалізований на 3p24.2, кодує білок карраВ-Ras. Цей білок взаємодіє в клітині з транскрипційним фактором NF-κB і регулює його активність [199].

3.2.2.1. Аналіз експресії гена *NKIRAS1*. Для зразків світлоклітинної карциноми нирок був виконаний широкомасштабний скринінг 3-ї хромосоми за допомогою технології NotI-мікрочіпів. Проведені дослідження показали, що найбільший відсоток генетичних/епігенетичних змін спостерігається в промоторній зоні гену *NKIRAS1* (57%, 13 з 23), причому такий відсоток змін

спостерігається лише в світлоклітинних карциномах (рис. 3.1.). Фактично, отримані дані свідчать, що ген *NKIRAS1* можна вважати потенційним геном-супресором пухлинного росту в регіоні 3p24. Щоб підтвердити і уточнити дані NotI-мікрочіпів, була проведена К-ПЛР, оскільки в цьому гені спостерігалася одна з найвищих частот змін [202].

Оцінка рівня експресії гена *NKIRAS1* на рівні мРНК була виконана за допомогою відносної кількісної ПЛР в реальному часі. Експресія *NKIRAS1* виявилась зниженою в 75% зразків СККН (9 з 12), порівняно з оточуючими тканинами (рис. 3.2.).

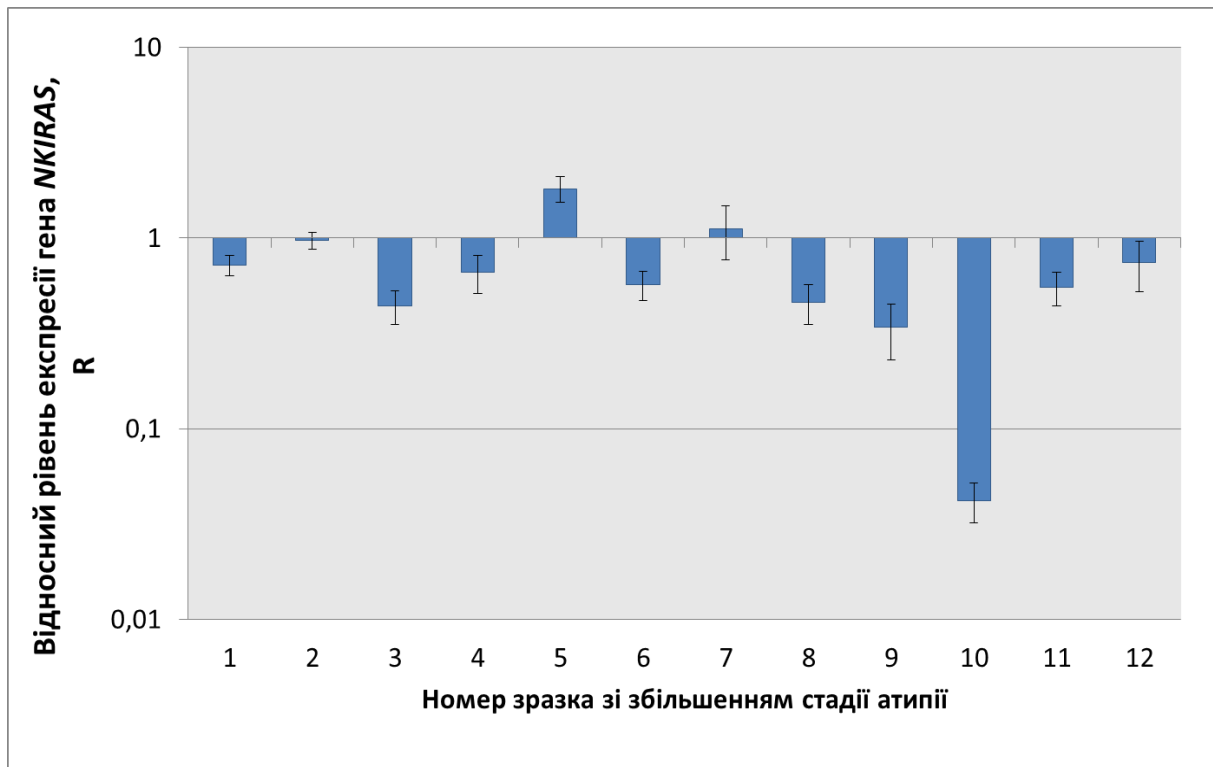


Рис. 3.2. Відносна експресія гена *NKIRAS1* на рівні мРНК (12 зразків) у світлоклітинних карциномах нирок. Зразки 1-7 стадії 1-2, 8-12 – стадії 3-4

Експресія референсного гену *TBP* була сталою в зразках пухлин і норми. Суттєвого зв'язку між експресією *NKIRAS1* і віком чи статтю пацієнтів виявлено не було, але такий зв'язок виявлено між стадією розвитку пухлини і рівнем експресії *NKIRAS1*. Дійсно, в пухлинах 3-4 стадії експресія була нижчою, ніж для стадій 1-2.

3.2.2.2. Аналіз кількості копій гена *NKIRAS1*. Встановлено, що зменшення кількості копій гена *NKIRAS1* спостерігалось в 78,6% (11 з 14) зразків СККН: в 9 зразках зафіксовано значення у діапазоні від 0,35 до 0,85, що було оцінено, як гетерозиготні делеції, 2 зразки мали значення менше 0,35, що було визначено, як гомозиготні делеції. В 3 зразках були зафіксовані значення від 0,85 до 1,5, що вказувало на незмінений статус числа копій гена в даних зразках, ампліфікацій гена *NKIRAS1* у досліджених зразках СККН не виявлено (табл. 3.2.).

Таблиця 3.2.

Клініко-морфологічні дані та результати аналізу кількості копій гена *NKIRAS1* у зразках СККН.

Номер зразка	Стать	Стадія атипії	Вік	TNM класифікація	Результати аналізу кількості копій гена <i>NKIRAS1</i> (min і max значення)
1	Ж	1	52	T3N0M0	0,36 (0,30-0,43)
2	Ч	1	46	T2N0M0	0,74 (0,68-0,82)
3	Ж	1	57	T2N0M0	0,58 (0,56-0,61)
4	Ч	1	57	T2N0M0	0,54 (0,53-0,55)
5	Ж	2	66	T3N0M0	0,44 (0,37-0,52)
6	Ж	2	60	T2N0M0	0,57 (0,56-0,59)
7	Ч	2	66	T3N0M0	0,35 (0,27-0,43)
8	Ч	2	55	T2N0M0	1,09 (1,08-1,1)
9	Ч	3	65	T3N0M0	1,01 (0,72-1,28)
10	Ч	3	56	T3N0M0	0,79 (0,68-0,89)
11	Ч	3	46	T2N0M0	0,34 (0,33-0,35)
12	Ж	3	60	T3N0M0	0,34 (0,33-0,35)
13	Ч	4	60	T2N0M0	0,41 (0,37-0,46)

Продовження таблиці 3.2.

14	Ж	4	61	T3N0M0	0,89 (0,72-1,06)
----	---	---	----	--------	------------------

Примітка: Вважали, що при значенні розрахованого діапазону нижче 0,35 має місце гомозиготна делеція; 0,35-0,85 - гетерозиготна делеція; 0,85-1,5 – нормальна кількість копій гена; якщо значення було вище 1,5 – ампліфікація.

Відомо, що продукт гена *NKIRAS1*, білок карраВ-Ras, належить до еволюційно консервативного підкласу Ras-подібних малих G-білків, має молекулярну вагу 22 кДа і складається з 192 амінокислот (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/NP_065078.1).

На даний час роль гена *NKIRAS1* в канцерогенезі не відома. Однак, виходячи з його функцій, можна зробити низку припущень, стосовно його ролі в розвитку СККН. Так, інгібуючи NF- κ B, він призводить в тому числі, до відсутності транскрипції генів, відповідальних за процеси запалення [203]. А зниження експресії *NKIRAS1* дає можливість активному NF- κ B стимулювати процеси запалення навколо пухлини, що дійсно є частим явищем при злоякісних новоутвореннях. Крім того, однією з найголовніших функцій NF- κ B є регуляція загибелі клітин через TNF [204]. Разом з цим, NF- κ B є транскрипційним фактором для понад 100 різних генів, через які контролює клітинний цикл, диференціацію і міграцію [205]. Отже, впливаючи на цей транскрипційний фактор, карраВ-Ras може регулювати широкий спектр клітинних процесів.

Таким чином, методом NotI-мікрочіпів нами було виявлено гетерозиготні делеції або метилування гена *NKIRAS1* у 57% зразків пухлин. Показано зниження рівня експресії мРНК гена *NKIRAS1* в 75% зразків СККН у порівнянні з оточуючою нормальною тканиною. Аналіз кількості копій гена підтвердив наявність делецій гена *NKIRAS1* у 78,6% зразків. Загалом, дані NotI-мікрочіпів, аналізу експресії та кількості копій гена добре узгоджуються. Отримані результати вказують на те, що для гена *NKIRAS1* характерне зниження експресії в СККН, імовірно, основною причиною

зниження експресії є делеції. Враховуючи функції продукта гена *NKIRAS1* та його інгібуючий вплив на один з центральних пухлинно-асоційованих молекулярних шляхів, цей ген може розглядатися як кандидат в гени-супресори росту пухлин.

3.2.3. Ген людини *PPM1M*. Ген *PPM1M* локалізований на ділянці 3p21.1 і кодує одноіменний білок PPM1M (Mg^{2+}/Mn^{2+} -залежна протеїн фосфатаза 1M) – протеїн-фосфатаза, яка локалізована переважно в ядрі і має консервативні фосфатазні домени, що дає можливість припустити, що PPM1M дефосфорилує специфічні субстрати в ядрі [206].

3.2.3.1. Аналіз експресії гена *PPM1M*. Згідно з даними аналізу NotI-мікрочіпів, було виявлено зміни (делеції/метилювання) у локусі, асоційованому з промоторною зоною гена *PPM1M* (зміни було знайдено у 22% (5/23) зразків, рис. 3.1.). Щоб підтвердити дані NotI-мікрочіпів, було проведено дослідження експресії гена *PPM1M* за допомогою К-ПЛР (рис. 3.3.).

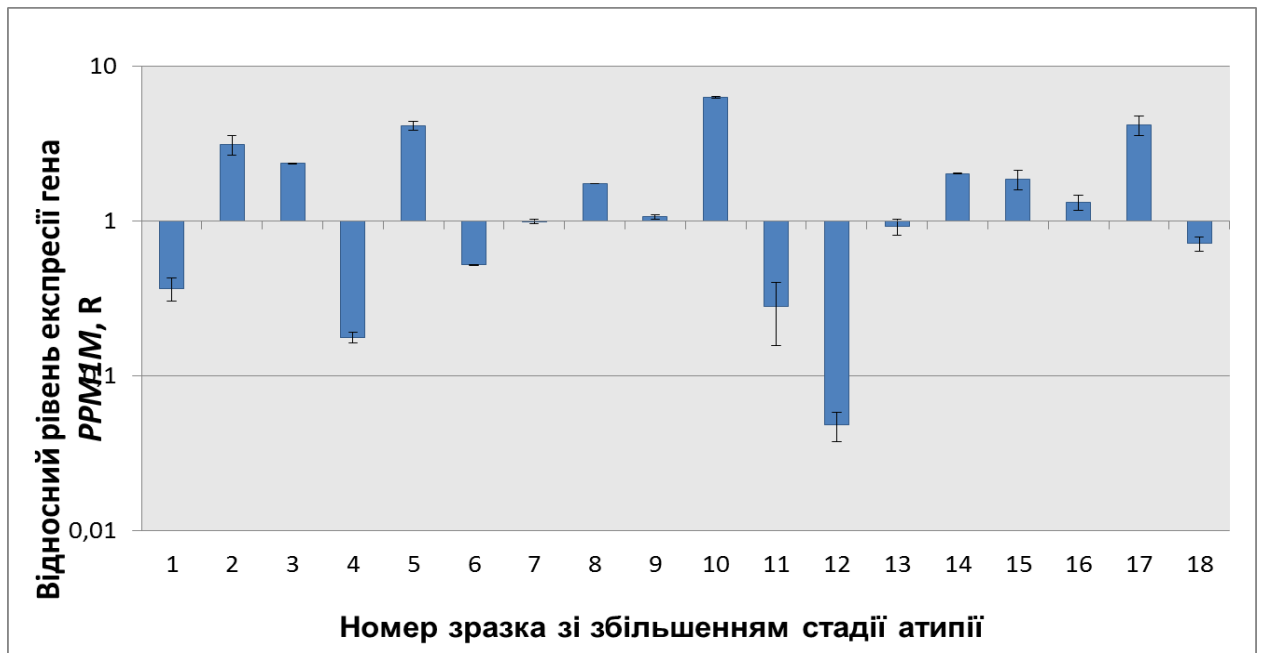


Рис. 3.3. Відносна експресія гена *PPM1M* (18 зразків) у світлоклітинних карциномах нирок. Зразки 1-14 стадії 1-2, 15-18– стадії 3-4

Для даного дослідження були використані мРНК з 18 зразків СККН і відповідних їм умовно нормальних тканин. Досліджені зразки були згруповані по стадіям розвитку пухлин і розташовані в порядку зростання атипії.

При аналізі рівня відносної експресії за допомогою К-ПЛР спостерігалось підвищення експресії у 50% зразків (9 з 18), зниженою експресія була у 33% зразків (6 з 18), у 3 зразках експресія виявилась незмінною. У всіх випадках зниження експресії спостерігалось на ранніх стадіях атипії.

3.2.3.2. Аналіз кількості копій гена *PPM1M*. Перевірка наявності метилування у промоторній області гена *PPM1M* методом метилспецифічної не виявила. Відсутність кореляції між результатами експресії та метилування свідчить про те, що зміни експресії гену *PPM1M* у світлоклітинних карциномах мають іншу причину.

Оскільки пошук гомозиготних делецій також не дав результатів, був проведений аналіз кількості копій гена (табл. 3.3.).

Таблиця 3.3.

Клініко-морфологічні дані та результати аналізу кількості копій гена *PPM1M* у зразках СККН.

Номер зразка	Стать	Стадія атипії	Вік	TNM класифікація	Результати аналізу кількості копій <i>PPM1M</i> (min і max значення)
1	Ч	1	38	T2NxM0	0,98 (0,98-0,98)
2	Ч	1	47	T2NxM0	2,76 (2,72-2,80)
3	Ж	1	43	T3N0M0	0,68 (0,61-0,74)
4	Ч	1	38	T2NxM0	1,21 (1,05-1,38)

Продовження таблиці 3.3.

5	Ж	2	46	T2NxM0	0,76 (0,71-0,81)
6	Ж	2	46	T2NxM0	0,93 (0,90-0,97)
7	Ч	2	41	T3NxM0	0,71 (0,44-0,97)
8	Ч	2	50	T2NxM0	0,97 (0,94-1,01)
9	Ж	2	45	T2NxM0	2,42 (1,95-2,89)
10	Ж	2	66	T3N0M0	0,51 (0,41-0,61)
11	Ч	2	68	T2NxM0	0,63 (0,60-0,67)
12	Ч	2	38	T2NxM0	0,37 (0,32-0,42)
13	Ч	3	45	T2NxM0	0,85 (0,81-0,88)
14	Ч	3	67	T2NxM0	0,40 (0,37-0,38)
15	Ч	3	46	T2N0M0	0,71 (0,70-0,70)
16	Ж	4	61	T3N0M0	0,88 (0,69-1,08)
17	Ч	4	51	T3N0M0	1,68 (1,41-1,95)
18	Ч	4	62	T2NxM0	0,22 (0,21-0,23)

Примітка: Вважали, що при значенні розрахованого діапазону нижче 0,35 має місце гомозиготна делеція; 0,35-0,85 - гетерозиготна делеція; 0,85-1,5 – нормальна кількість копій гена; якщо значення було вище 1,5 – ампліфікація.

Ген *PPM1M* частково делетований у 50% випадків (8 випадків гетерозиготних делецій і 1 гомозиготна делеція). Ампліфікація спостерігалася у 16,7% (3 з 18) зразків, у той час як у 33,3% випадків (6 зразків) не спостерігалосі змін у кількості копій.

Фосфорилювання є ефективним засобом для контролю клітинної відповіді на внутрішні і зовнішні сигнали: воно проходить дуже швидко, не вимагає синтезу чи деградації білків, і може бути легко скасоване. Білки

фосфорилування беруть участь в регулюванні різних клітинних процесів, таких як міграція, проліферація, апоптоз, диференціювання, метаболізм, імунітет, зміни клітинного циклу. Оскільки фосфатази разом з кіназами модулюють рівень фосфорилування білків, жирів і вуглеводів в еукаріотичних клітинах, серед фосфатаз часто виявляються онкоасоційовані білки [207, 208].

Ген *PPM1M* складається з 10 екзонів, що утворюють 4 ізоформи завдяки альтернативному сплайсингу мРНК. Білок складається з 270 амінокислотних залишків. Білок *PPM1M* вибірково і нековалентно взаємодіє з йонами мангану (Mn^{+2}), а також, як зазначалось вище, має фосфатазну активність (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/132160>). Участь *PPM1M* у канцерогенезі наразі не відома.

Фізіологічна роль даної фосфатази на даний час досліджена тільки у мишей. Відомо, що *PPM1M* бере участь в IL1-індукованому шляху активації запалення через NF- κ B. *PPM1M* дефосфорилує I κ B, що блокує активацію NF- κ B, запобігаючи індукції білків, що беруть участь у процесі запалення [209].

Підсумовуючи розділ констатуємо, що зміни у локусі гена *PPM1M* було виявлено у 22% (5 з 23) зразків СККН за даними NotI-мікрочіпів. Зниження експресії гена *PPM1M* спостерігалось в 33% зразків СККН, однак, експресія в 50% зразків була підвищена. Метилування промоторного регіону гена *PPM1M* не знайдено. Аналіз кількості копій гена показав наявність делецій у *PPM1M* в 50% зразків СККН, хоча також спостерігалися і ампліфікації у 16,7% зразків. Очевидно, для даного гена характерна складна регуляція активності. Проте, враховуючи його можливу участь в одному з ключових молекулярних шляхів канцерогенезу (IL1-індукованому шляху активації запалення через NF- κ B) та високий відсоток змін як в експресії, так і в кількості копій гена, ген *PPM1M* можна віднести до пухлиноасоційованих. Механізми регуляції експресії та точні функції цього гена в нормі і при СККН потребують подальшого вивчення.

3.2.4. Ген людини *PRICKLE2*. Ген *PRICKLE2* локалізований на Зр14.1. Ген кодує білок *prickle-like 2*, що є гомологом гену *prickle* у *Drosophila* і проявляє значну консервативність у різних видів, від дрозофіли до людини. Цей білок локалізований в апікальній частині мембрани і в ядрі, він може зв'язувати йони цинку та мангану, а також є ланкою у Wnt-сигнальному шляху [210, 211].

3.2.4.1. Аналіз експресії гена *PRICKLE2*. Аналіз гібридизації ДНК, виділеної з хірургічно видалених пухлин нирок, з NotI-клонами показав зміни у 22% (5/23) зразків (рис.3.1.). Дослідження відносної експресії гена *PRICKLE2* виконали на 18 зразках, виявило зниження експресії в 83% (15 з 18) зразків СККН. Виявлено також 3 зразки з підвищеною експресією (рис. 3.4.).

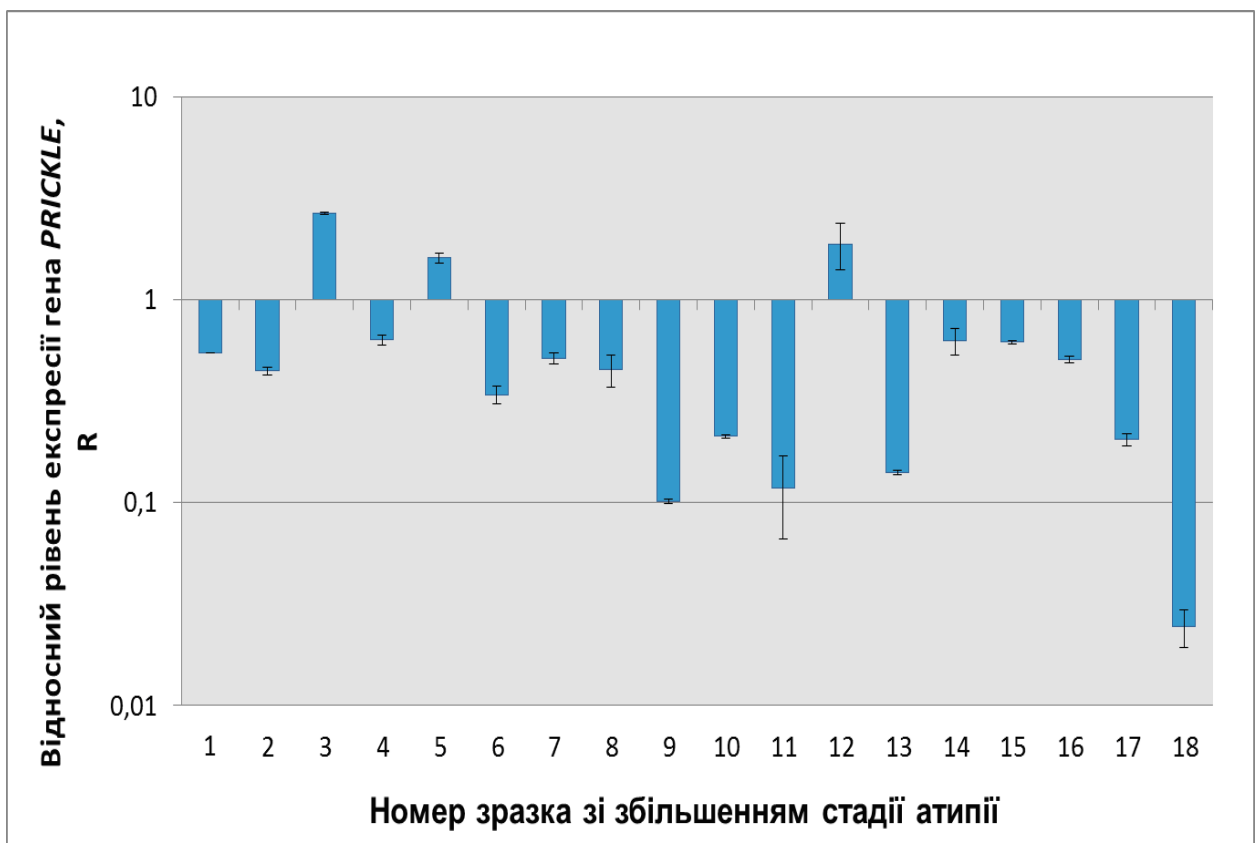


Рис. 3.4. Відносна експресія гена *PRICKLE2* (18 зразків) у світлоклітинних карциномах нирок. Зразки 1-14 стадія 1-2, 15-18 – стадії 3-4

3.2.4.2. Аналіз кількості копій гена *PRICKLE2*.

Оскільки CpG-острівців у промоторній зоні гена *PRICKLE2* не виявлено, отже, метилування промоторної зони не могло бути причиною зниження експресії гена. Таким чином, був проведений аналіз кількості копій гена (табл. 3.4.).

Таблиця 3.4.

Клініко-морфологічні дані та результати аналізу кількості копій гена *PRICKLE2* у зразках СККН.

Номер зразка	Стать	Стадія атипії	Вік	TNM класифікація	Результати аналізу кількості копій <i>PRICKLE</i> (min і max значення)
1	Ч	1	38	T2NxM0	0,41 (0,40-0,41)
2	Ч	1	47	T2NxM0	0,97 (0,98-0,99)
3	Ж	1	43	T3N0M0	1,29 (1,15-1,43)
4	Ч	1	38	T2NxM0	0,85 (0,78-0,91)
5	Ж	2	46	T2NxM0	0,81 (0,79-0,83)
6	Ж	2	46	T2NxM0	1,01 (0,91-1,11)
7	Ч	2	41	T3NxM0	0,81 (0,73-0,89)
8	Ч	2	50	T2NxM0	1,63 (1,58-1,69)
9	Ж	2	45	T2NxM0	0,58 (0,53-0,63)
10	Ж	2	66	T3N0M0	0,93 (0,88-0,99)
11	Ч	2	68	T2NxM0	0,47 (0,47-0,47)
12	Ч	2	38	T2NxM0	0,43 (0,36-0,50)
13	Ч	3	45	T2NxM0	1,04 (0,85-1,24)
14	Ч	3	67	T2NxM0	1,03 (0,97-1,08)
15	Ч	3	46	T2N0M0	1,15 (0,99-1,30)
16	Ж	4	61	T3N0M0	1,43 (1,26-1,59)

Продовження таблиці 3.4.

17	Ч	4	51	T3N0M0	0,53 (0,51-0,54)
18	Ч	4	62	T2NxM0	0,37 (0,31-0,42)

Примітка: Вважали, що при значенні розрахованого діапазону нижче 0,35 має місце гомозиготна делеція; 0,35-0,85 - гетерозиготна делеція; 0,85-1,5 – нормальна кількість копій гена; якщо значення було вище 1,5 – ампліфікація.

За результатами дослідження 18 зразків СККН делеції гена *PRICKLE2* було знайдено у 44,4% зразків (8 випадків гетерозиготних делецій). У 50% (9 проб) не було змін у кількості копій, в одному зразку виявлено ампліфікацію, 5,6% .

Вперше білок *PRICKLE* було ідентифіковано у дрозофіли як ген, що бере участь у визначенні полярності клітин. Прикладом визначення площинної полярності у таких комах, як дрозофіла, є визначення напрямку, в якому ростуть мікріволоски на крилах комахи [212]. Площинна полярність відрізняється від базально-апикальної і є перпендикулярною до неї.

У хребетних цей ген було відкрито на пацюках, як білок, що зв'язується з транскрипційним фактором *NRSF* (neuron-restrictive silencer factor). Тоді ж було визначено, що у хребетних, в тому числі у миші і людини, наявні 2 гени, гомологічні гену *Prickle* у дрозофіл. У миші експресію *Prickle-2* виявили в зрілих нейронах разом з іншими мишиними гомологами генів полярності клітин дрозофіли (*flamingo* і *dischevelled*) [210, 213].

У дрозофіли *prickle* присутній у декількох формах, які утворюються завдяки альтернативному сплайсингу мРНК, причому співвідношення різних форм може регулюватися, що впливає на полярність [214]. У сигнальних шляхах, що беруть участь у визначенні плоскої полярності, беруть участь білки, кодовані генами комплексу *frizzled* і *dishevelled*, проте не білки комплексу актина. Некласичні кадгерини (*fat*, *dachsous*, і *flamingo*) модулюють функції гена *frizzled*. Інші білки, включаючи *prickle*, *strabismus*, *rhoA* і *rho*-кіназу включаються в сигнальний шлях пізніше; *frizzled* і

dishevelled регулюють модифікації цитоскелету і, відповідно, визначають площинну полярність [215]. Деякі з перерахованих генів відповідають у хребетних за гастрюляцію. Зокрема, генами, що одночасно контролюють напрямок росту волосків у дрозоділі і гастрюляцію у хребетних через регуляцію актинових філаментів, є G-білки Rho і Rac [216, 217].

В 2003 році Katoh зі співробітниками, шукаючи гомологи гену *prickle*, показали наявність гена *PRICKLE2* у людини. Виявлена послідовність з 844 амінокислот містила N-кінцевий PET домен слідом за трьома LIM доменами і C-кінцевий домен гомологічності *prickle*. Ген *PRICKLE2* показує 51,9% гомології з геном *PRICKLE1* і 79,3% - з N-кінцевим PET і LIM доменами. Також було встановлено, що *PRICKLE2* містить принаймні 8 екзонів і що 5'-нетрансльований регіон переривається інтроном 1 [210].

В 2011 році група Тао підтвердила наявність експресії *PRICKLE2* в гіпокампі і спинно-мозковому кортексі миші. Також цією групою вчених було виявлено гетерозиготні делеції гена *PRICKLE2* у чоловіків з затримкою розвитку, епілепсією та аутичними розладами [218].

В нервовій системі Pk2 тісно пов'язаний з фракцією постсинаптичної густини (PSD), отриманої субклітинним фракціонуванням. Імунноелектронна мікроскопія показала, що Pk2 локалізується в постсинаптичній густині асиметричних синапсів в гіпокампальному CA1 регіоні. Біохімічний аналіз виявив, що Pk2 формує комплекс з PSD білками, включаючи PSD-95 і субодиниці рецептора NMDA через пряме зв'язування з C-кінцем гуанілаткіназного домену PSD-95. Ці результати говорять про те, що Pk2 є новим PSD білком, який шляхом формування білкового комплексу взаємодіє з PSD-95 і рецептором NMDA в тканинах мозку [219].

Експресія *PRICKLE2* спостерігається також, крім такнин головного мозку, у тканинах, ока і тестикул, диференційованих хрящових тканинах, острівцях підшлункової залози, злоякісних пухлинах шлунку і матки. Доведена також локалізація білка *PRICKLE2* в синапсах, проте його роль залишається неясною [210].

Отже, методом NotI-мікрочіпів нами виявлено 22% (5 з 23) змін у локусі гена *PRICKLE2* у зразках СККН. Експресія гена *PRICKLE2* була знижена у 83% зразків СККН. Оскільки промоторна зона даного гена не містить CpG острівців, метилування промоторного регіону не могло бути причиною зниження експресії *PRICKLE2*. Аналіз втрат гетерозиготності (LOH) у регіоні гена *PRICKLE2* не виявив поліморфних локусів. Визначення кількості копій гена виявило делеції у 44,4% зразків СККН. Таким чином, аналіз отриманих даних дозволяє вказати на делеції, як одну з можливих причин зниження експресії. Оскільки *PRICKLE2* приймає участь в Wnt-сигнальному шляху визначення площинної клітинної поляризації, інактивація цього гена може відображати процеси дедиференціації та втрати клітинами пухлин морфологічних ознак тканини, з якої вони походять. Отже, *PRICKLE2* також можна вважати потенційним геном-супресором росту пухлин.

3.2.5. Ген людини *GPX1*. Ген *GPX1* локалізований на 3p14.1. Він кодує білок глутатіон пероксидазу 1, що є одним з найбільш важливих ферментів-антиоксидантів для людини. Основною функцією генів даного сімейства є детоксикація пероксиду водню шляхом окиснення глутатіону [220].

3.2.5.1. Аналіз експресії гена *GPX1*. Для даного гена було виконане дослідження експресії методом ПЛР в реальному часі. Було встановлено, що експресія *GPX1* знижена у 75% (9 з 12) зразків СККН, порівняно з оточуючими тканинами, причому на більш пізніх стадіях зниження більш суттєве. В 3 зразках (25%) спостерігалось незначне підвищення експресії (рис. 3.5.).

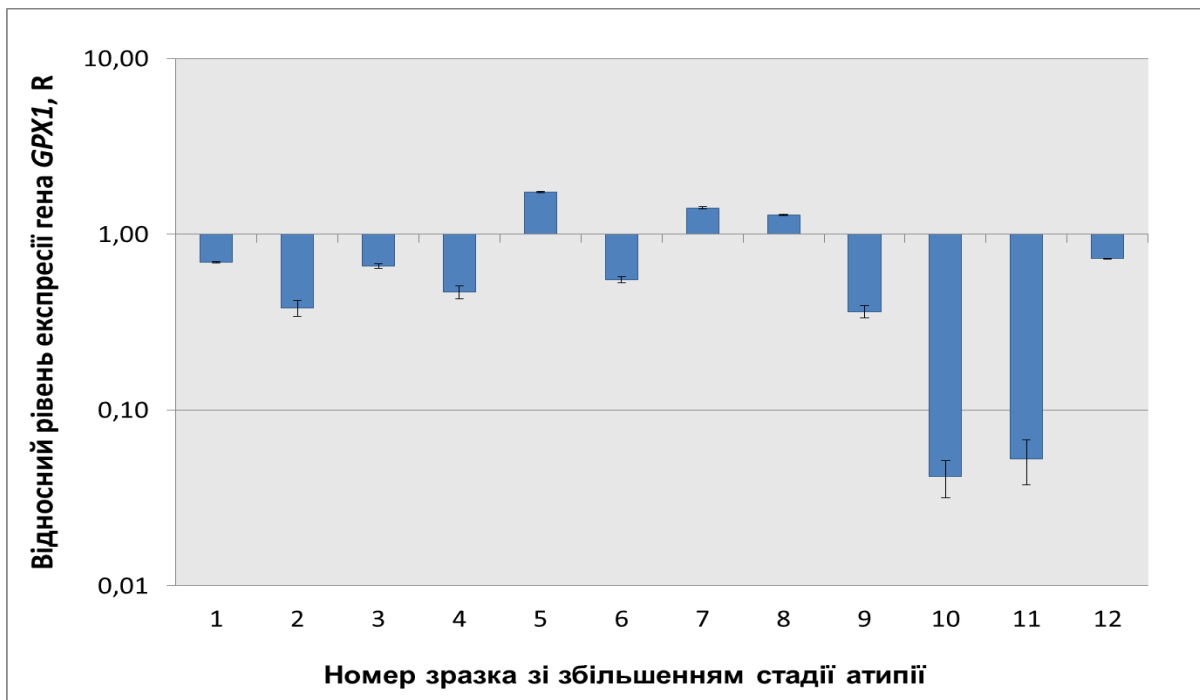


Рис. 3.5. Відносна експресія гена *GPX1* (12 зразків) у світлоклітинних карциномах нирок. Зразки 1-7 стадії 1-2, 8-12 – стадії 3-4

3.2.5.2. Аналіз кількості копій гена *GPX1*. Оскільки ні метилспецифічна ПЛР, ні ЛОН аналіз не виявили змін в СККН порівняно з умовно-нормальними тканинами, було проведено аналіз кількості копій гена (табл. 3.5.). В ході аналізу виявлено 91,7% зразків з делеціями (1 гомозиготна і 10 гетерозиготних), 1 зразок з 12 (8,3%) не мав змін кількості копій гена *GPX1*. Очевидно, гомо- і гетерозиготні делеції в гені *GPX1* є одним з механізмів зниження його експресії при СККН.

Слід зазначити, що ген *GPX1* є найбільш вивченим і типовим представником родини. Молекулярна маса відповідного білка близько 83кДА, він є тетрамером, що складається з 4 однакових субодиниць по 202-204 а.к. Білок GPX1 локалізований в цитоплазмі, мітохондріях, пероксисомах [221].

**Клініко-морфологічні дані та результати аналізу кількості копій гена
GPX1 у зразках СККН.**

Номер зразка	Стать	Стадія атипії	Вік	TNM класифікація	Результати аналізу кількості копій GPX1 (min і max значення)
1	Ж	3	55	T4N _x M ₀	1,23 (1,12-1,34)
2	Ч	3	61	T _{2a} N _x M ₁	0,46 (0,41-0,51)
3	Ч	4	46	T ₂ N _x M ₁	0,24 (0,2-0,28)
4	Ч	3	50	T _{2a} N _x M ₁	0,77 (0,68-0,86)
5	Ж	4	60	T ₄ N _x M ₀	0,36 (0,28-0,44)
6	Ж	3	59	T ₄ N ₀ M ₁	0,44 (0,39-0,49)
7	Ч	2	66	T _{3b} N _x M ₀	0,79 (0,71-0,87)
8	Ж	2	56	T _{3b} N _x M ₀	0,78 (0,71-0,85)
9	Ж	2	49	T _{1b} N _x M ₀	0,47 (0,35-0,59)
10	Ж	3	52	T ₃ N ₁ M ₀	0,43 (0,39-0,47)
11	Ч	3	66	T ₃ N ₀ M ₀	0,36 (0,31-0,41)
12	Ч	3	62	T ₃ N ₀ M ₀	0,60 (0,52-0,68)

Примітка: Вважали, що при значенні розрахованого діапазону нижче 0,35 має місце гомозиготна делеція; 0,35-0,85 - гетерозиготна делеція; 0,85-1,5 – нормальна кількість копій гена; якщо значення було вище 1,5 – ампліфікація.

Даний білок унікальний тим, що містить селеноцистеїн (Sec) в активному сайті глутатіон пероксидази і кодується триплетом UGA, що зазвичай є стоп кодоном і припиняє трансляцію. Вставка селеноцистеїну відбувається лише в 25 білках і їх ізоформах у різних ссавців. 3' UTR генів, що містять селеноцистеїн, має загальну структуру стеблової петлі, SECIS (sec insertion sequence), або послідовність вставки селеноцистеїну, яка потрібна для розпізнавання UGA як селеноцистеїнового кодону замість стоп кодону. Структурно, ця амінокислота подібна до Cys, але з селеном Se замість сірки S. За функціями селеноцистеїн, як і Cys, є активним елементом окисно-

відновних реакцій. Додаткові регіони в 3'UTR абсолютно необхідні для процесу вставки селену [222, 223].

Хоча у більшості транскриптів, що містять UGA-кодон, не відбувається вставки селеноцистеїну, вставки 3' UTR з елементом SECIS до неспоріднених генів з кодоном UGA, що потрапляє у відкриту рамку зчитування, достатньо для вставки селеноцистеїну. Роль структури стеблової петлі в елементі SECIS – рекрутувати специфічні РНК-зв'язуючі білки, які регулюють вставку селеноцистеїну. Одним з найголовніших з цих обов'язкових SECIS - зв'язуючих білків є SBP2 (SECIS binding protein-2). Очевидно SBP2, зв'язуючись з SECIS-елементами, полегшує взаємодію між Sec фактором елонгації (eEFsec) і специфічною tRNA селеноцистеїну (tRNA^{sec}), які необхідні для вставки селеноцистеїну. Інші SECIS-binding білки, які, можливо, модулюють вставки селеноцистеїну, це - рибосомний L30, nucleolin, NSEP1, і eIF4a3 [224-226].

Було показано, що SBP2 містить окисно-активний цистеїн, який обумовлює внутрішньоклітинну локалізацію, більше того, окисні умови можуть ізолювати цей протеїн в ядрі і обмежити вставку селеноцистеїну в деяких селенопротеїнах [227].

Існує теорія щодо функції селену в активному сайті GPXs, вона полягає в тому, що присутність селеноцистеїну замість Cys в активному сайті збільшує норму реакції з водневим перекисом, тому що Sec депротонований при фізіологічному рН [228, 229].

Транскрипцію *GPX1* також регулює окисний потенціал. Особливо у людини, ген *GPX1*, який має два елементи ORE (oxygen response elements), що за нормальних окисних умов бере участь у транскрипції [230]. Послідовності ORE зв'язують ядерний комплекс, який включає ядерний фактор, Ku. У кардіоміоцитах, вирощених в культурі, хронічна тенденція до зменшення кисневого навантаження зменшила кількість субодиниць кінази p70 (кіназа, що регулює цитоскелет), зв'язаних з ORE, що дало авторам

дослідження підстави припустити, що цей протеїн, можливо, модулює зменшення експресії *GPX1* в цих клітинах впродовж гіпоксії [231].

Цікаво, що гіпероксія збільшує транскрипцію *GPX1* в клітинах ендотелію пуповинної вени через механізм, незалежний від ORE, що наводить на думку, що транскрипція *GPX1* у відповідь на кисневе навантаження регулюється більш, ніж одним механізмом [232].

3.2.5.3. Аналіз поліморфізму тринуклеотидних повторів і кількості копій гена *GPX1*. Для глутатіонпероксидази 1 описано поліаланіновий поліморфізм в N-кінцевому регіоні, який включає три алеля з п'ятьма, шістьма або сімома аланінами (*Ala5*, *Ala6*, *Ala7*) в цій послідовності. Відповідно до цього, під час ПЛР-реакції для кожного зразка, що аналізується утворюється по 1 продукту різної довжини для гомозиготних індивідів або 2 продукти у випадку гетерозигот (рис. 3.6.).

Оскільки досліджуваний локус містить поліморфні триклеотидні повтори, а їх алельні варіанти можуть відрізнятися один від одного лише на 1 повтор (3 п.н.), для встановлення точних розмірів продуктів ампліфікації конкретних алелів використовували аналіз за допомогою автоматичного лазерного флуориметра ALF express II (Amersham Biosciences, Швеція).

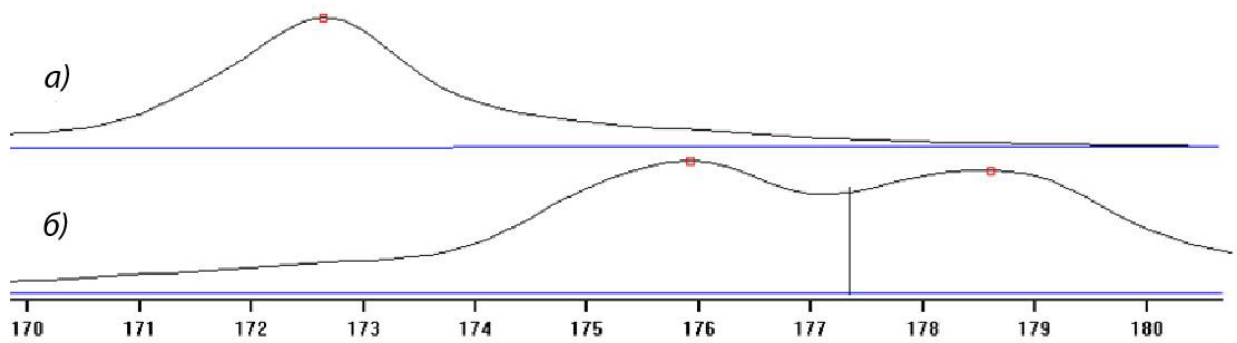


Рис. 3.6. Приклад електрофореграми флуоресцентно мічених продуктів ПЛР алельних варіантів поліаланінового поліморфізму гена *GPX1* за допомогою автоматичного лазерного флуориметру ALF-express II, отриманої з використанням програми Fragment Manager v 2.0. а) *Ala5/Ala5* (гомозигота), б) *Ala6/Ala7* (гетерозигота)

Алель *Ala5* для деяких видів раку пов'язаний з підвищеним ризиком виникнення онкологічних хвороб. Це може пояснюватися тим, що цей алель більш чутливий до індукції селеном [233]. Однак, наявні дані для раку грудей і простати досить суперечливі [234, 235]. Тому в даній роботі проведено дослідження можливої асоціації алеля *Ala5* і генотипу *Ala5/Ala5* з ризиком виникнення СККН.

Щоб перевірити інформативність даного поліморфізму, було проведено аналіз даного алельного поліморфізму в 41 зразку плазми крові умовно здорових індивідів, старших за 60 років, без онкологічних захворювань в анамнезі, які проживали на території України.

Розподіл частот алелів та генотипів в цій групі суттєво не відрізнявся від даних для європейських популяцій [236]. Фактична гетерозиготність 58,54% достовірно не відрізнялась від розрахованої за рівнянням Харді-Вайнберга – 63,62 (табл. 3.6.).

Таблиця 3.6.

Розподіл частот алелів та генотипів поліаланінового поліморфізму гена *GPX1* в контрольній групі (n=41).

Алелі, %								Гетерозиготність	P
Фактична частота	<i>Ala5</i>		<i>Ala6</i>		<i>Ala7</i>				
	47,56		26,83		25,61				
Генотипи, %							Гетерозиготність	P	
Частота	<i>Ala5/Ala5</i>	<i>Ala5/Ala6</i>	<i>Ala6/Ala6</i>	<i>Ala6/Ala7</i>	<i>Ala7/Ala7</i>	<i>Ala5/Ala7</i>			
Фактична	26,83	26,83	4,88	17,07	9,76	14,63	58,54	0,3593	
Очікувана	22,62	25,52	7,20	13,74	6,56	24,36	63,62		

Відсутність відхилення від рівняння Харді-Вайнберга, свідчить про те, що окремі генотипи даного поліморфізму не знаходяться під впливом

екзогенних факторів та внутрішньопопуляційних процесів в досліджуваній вибірці, а вибірка є репрезентативною. Отримані частоти алелів та генотипів та показник гетерозиготності, є достовірно значущими, тому даний поліморфізм може бути використаний в подальших дослідженнях.

Для дослідження асоціації певних алелів та генотипів поліморфного локусу гена *GPX1* з розвитком СККН, використовувалась вибірка з 40 пар зразків пухлинних та відповідних їм умовно нормальних тканин. Зразки нормальних тканин пацієнтів були залучені до аналізу з метою виявлення можливої втрати гетерозиготності внаслідок гетерозиготних делецій в зразках пухлин. За результатами проведеного аналізу в парах пухлина-норма не виявлено втрати гетерозиготності, що свідчить на користь того, що делеції даного локусу не є частим явищем для даного типу пухлин. Розподіл частот генотипів в зразках пухлин 40 пацієнтів з СККН також не мав відхилень від очікуваних за законом Харді-Вайнберга (табл. 3.7.), що вказує на відсутність селективної переваги жодного генотипу в процесі розвитку цього типу пухлин.

Таблиця 3.7.

Розподіл частот алелів та генотипів поліаланінового поліморфізму гена *GPX1* в групі пацієнтів з СККН (n=40).

Алелі, %								
Фактична частота	<i>Ala5</i>		<i>Ala6</i>		<i>Ala7</i>		Гетерозиготність	<i>P</i>
	48,75	30,00	21,25					
Генотипи, %							Гетерозиготність	<i>P</i>
Частота	<i>Ala5/Ala5</i>	<i>Ala5/Ala6</i>	<i>Ala6/Ala6</i>	<i>Ala6/Ala7</i>	<i>Ala7/Ala7</i>	<i>Ala5/Ala7</i>		
Фактична	25,00	25,00	10,00	15,00	2,50	22,50	62,50	0,8261
Очікувана	23,77	29,25	9,00	12,75	4,52	20,72	62,76	

Нами проведено порівняння частот алелів (рис. 3.7.) та генотипів (рис. 3.8.) за поліаланіновим поліморфізмом для пацієнтів із СККН та здорових донорів, старших 60 років. Алель з 5 аланіновими повторами як в групі з СККН, так і у здорових донорів є мажорним.

Розподіл частот алелів за поліаланіновим поліморфізмом для пацієнтів із СККН і для контрольної групи донорів, старших 60 років без онкологічних хвороб в анамнезі, статистично достовірно не відрізнявся. Можна зазначити, що за нашими даними, у хворих на СККН мажорний алель *Ala5* зустрічався з частотою $48,8\% \pm 5,6$, а для контрольної групи частота *Ala5* становила $47,6\% \pm 5,5$, при цьому виявлена різниця не є статистично достовірною ($p=0,34$). Відсоток гомозиготних зразків при СККН становив 55%, у контрольній групі – 40%, проте достовірної різниці не знайдено ($p=0,29$). Згідно з нашими дослідженнями, найбільшою виявилась різниця між контрольною та дослідною групою за алелем *Ala7* (25,6% та 21,3%, відповідно), проте цей показник також не досягнув статистично достовірної значущості ($p=0,22$).

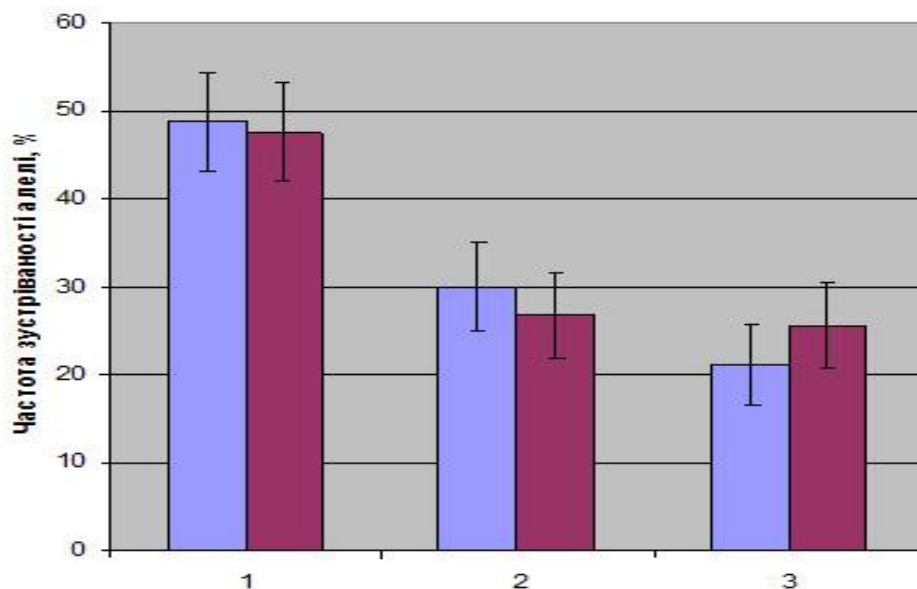


Рис. 3.7. Розподіл алелів за поліаланіновим поліморфним локусом у хворих на СККН та осіб без онкологічних захворювань. 1. - *Ala5*. 2. - *Ala6*. 3.

- *Ala7*. | ■ СККН ■ Контроль |

При порівняльному аналізі розподілів частот генотипів виявлено ті самі закономірності, які описані нами вище для частот алелів. Статистично достовірно частоти генотипів в контрольній та дослідній групах не відрізнялися. Проте, важливо відмітити, що генотип *Ala7/Ala7* в групі пацієнтів з СККН виявлено лише у 1 індивіда на протигагу 4 індивідам, які мали цей генотип в контрольній групі ($p=0,11$). Можливо, алель *Ala7* має онкопротекторні властивості, які більшою мірою проявляються в гомозиготному стані (рецесивна модель). Проте, оскільки в нашій популяції частота цього алеля (25,6%) та особливо гомозиготного генотипу (9,8%) низька, для встановлення статистично достовірної різниці необхідно дослідити більшу кількість зразків.

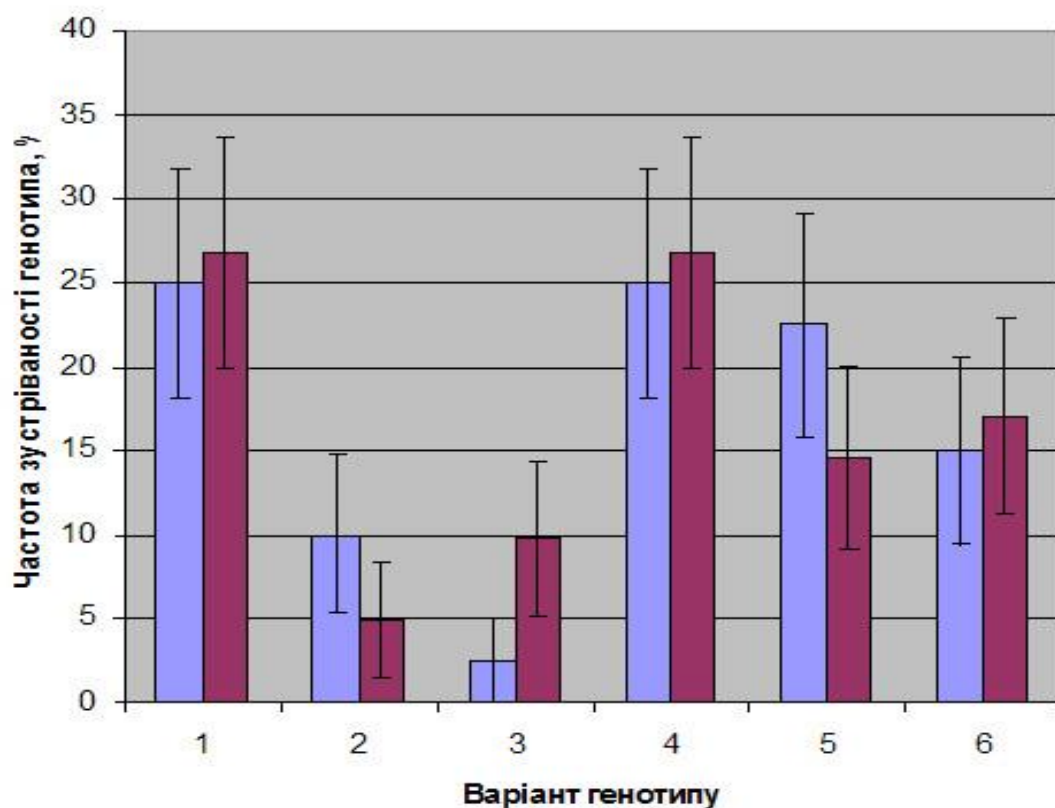


Рис. 3.8. Розподіл генотипів за поліаланіновим поліморфним локусом у хворих на СККН та осіб без онкологічних захворювань. 1. - *Ala5/Ala5*. 2. - *Ala6/Ala6*. 3. - *Ala7/Ala7*. 4. - *Ala5/Ala6*. 5. - *Ala 5/Ala7*. 6. - *Ala6/Ala7*.

■ СККН ■ Контроль

Таким чином, при СККН, так само, як і при раку молочної залози та простати, найчастіше зустрічається алель гена *GPX1* з п'ятьма аланіновими повторами. Проте достовірних відмінностей між частотою алеля *Ala5* у хворих на СККН та осіб контрольної групи без онкологічних захворювань в нашому дослідженні не виявлено ($p=0,44$). Попри дані літератури, отримані в дослідженнях інших видів раку, які свідчать про підвищений ризик розвитку деяких онкологічних захворювань у індивідів, які мають алель з 5 аланіновими повторами, не підтверджено для СККН. Згідно наших результатів, поліаланіновий поліморфізм не має прогностичного значення для СККН.

Отже, наші дані свідчать, що експресія гена *GPX1* була знижена у 75% зразків СККН, причому на пізніх стадіях захворювання зниження більш значне. Це добре погоджується з даними, що експресія *GPX1* знижується в умовах зниження рівня кисню, оскільки на пізніх стадіях канцерогенезу характерне наростання гіпоксії. Метилування промоторної ділянки гена *GPX1* не було виявлено, однак гомо- та гетерозиготні делеції гена *GPX1* спостеігалися в 91,7% зразків СККН. Ми вважаємо, що делеції цього гена є додатковим механізмом, який паралельно з регуляцією на рівні РНК та білка можуть впливати на рівень експресії *GPX1* в СККН. Таким чином, ген *GPX1* також можна віднести до потенційних генів-супресорів СККН пухлин.

3.2.6. Ген людини *GPX3*. Ген *GPX3* розташований на 5q33.1 і кодує глутатіонпероксидазу 3 – білок, що бере участь у відповіді на наявність гідропероксидів жирів, і, як *GPX1*, містить селеноцистеїн та має антиоксидантні властивості. Основною відмінністю *GPX3* є те, що він локалізований в позаклітинному просторі, тобто є білком плазми, а секретують даний білок в основному клітини проксимальних збиральних трубочок нирки [237-239]. Цей антиоксидантний фермент підтримує геномну цілісність шляхом інактивації реактивних кисневих радикалів (ROS), відомих ушкоджуючих агентів ДНК і посередників відповіді на хіміотерапію при

захворюванні на рак. Наявна також інформація, що *GPX3* може перешкоджати антираковій терапії [240, 241].

Регулювання експресії білка *GPX3* залишається не охарактеризованим, але є роботи по вивченню його транскрипції і трансляції в культурах клітин. Аналіз послідовності промотора гена *GPX3* показав сайти зв'язування з факторами транскрипції Sp-1 і HIF1A. Гіпоксія була ідентифікована як сильний регулятор транскрипції і експресії *GPX3* [242].

3.2.6.1. Аналіз експресії гена *GPX3*. Для цього гена було виконане дослідження експресії при СККН. Експресія гена *GPX3* виявилась зниженою у всіх досліджених зразках (рис.3.9.), при чому на пізніх стадіях спостерігається тенденція до більш значного зниження, ніж для стадій 1-2.

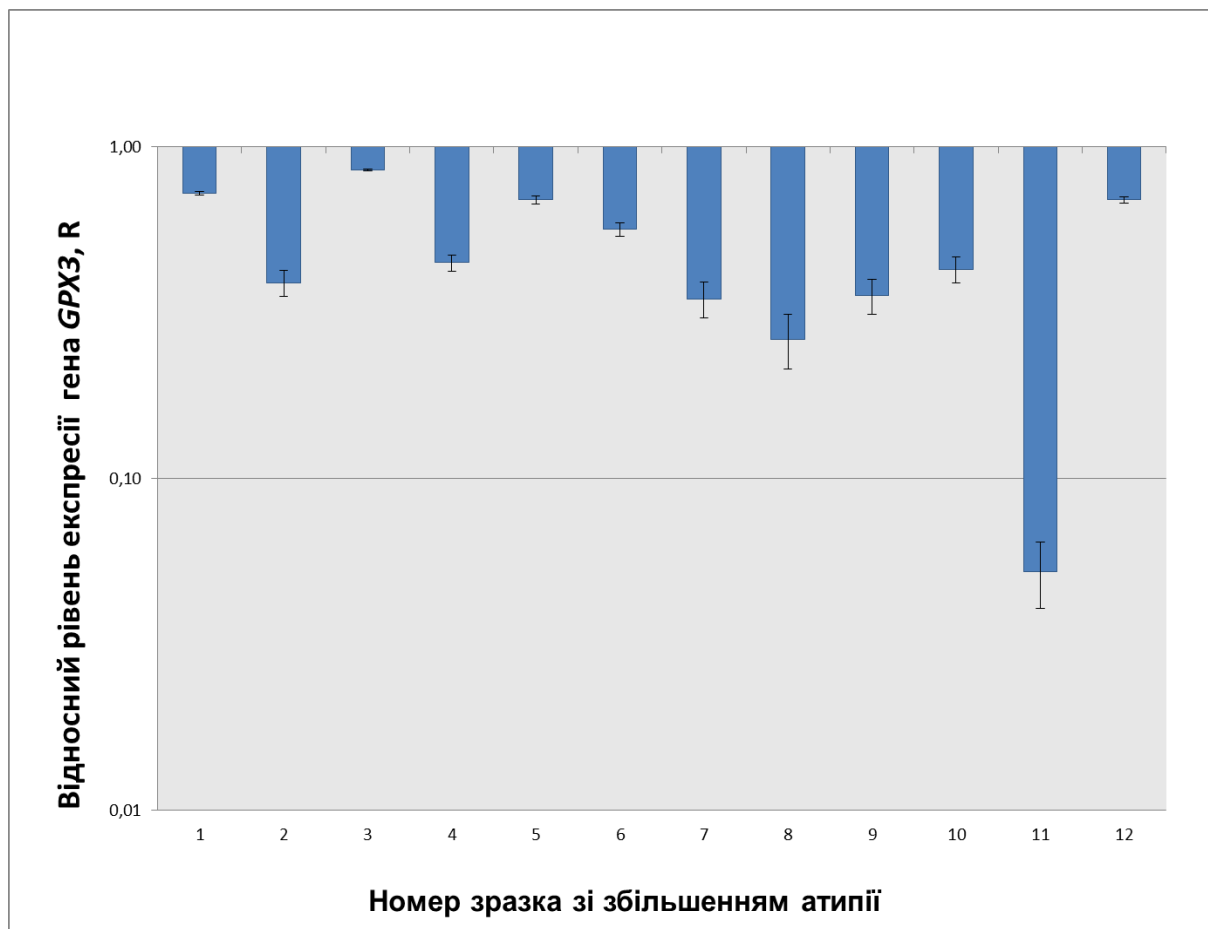


Рис. 3.9. Відносна експресія гена *GPX3* (12 зразків) у світлоклітинних карциномах нирок. Зразки 1-6 стадії 1-2, 7-12 – стадії 3-4

3.2.6.2. Аналіз кількості копій гена *GPX3*. Щоб встановити можливі причини змін експресії гена у зразках СККН, нами було проведено дослідження метилування промоторного регіону гена, але змін метилування не спостерігалось. Тому для цього гена був виконаний аналіз кількості копій гена (табл. 3.8.).

Таблиця 3.8.

Клініко-морфологічні дані та результати аналізу кількості копій гена *GPX3* у зразках СККН.

Номер зразка	Стать	Стадія атипії	Вік	TNM класифікація	Результати аналізу кількості копій <i>GPX3</i> (мін і мах значення)
1	Ж	3	55	T4N _x M ₀	1,12 (1,02-1,22)
2	Ч	3	61	T _{2a} N _x M ₁	1,48 (1,41-1,55)
3	Ч	4	46	T ₂ N _x M ₁	2,23 (1,40-3,06)
4	Ч	3	50	T _{2a} N _x M ₁	1,18 (0,99-1,37)
5	Ж	4	60	T ₄ N _x M ₀	0,89 (0,83-0,95)
6	Ж	3	59	T ₄ N ₀ M ₁	1,5 (1,39-1,61)
7	Ч	2	66	T _{3b} N _x M ₀	0,90 (0,86-0,94)
8	Ж	2	56	T _{3b} N _x M ₀	0,97 (0,89-1,05)
9	Ж	2	49	T _{1b} N _x M ₀	1,04 (0,92-1,16)
10	Ж	3	52	T ₃ N ₁ M ₀	1,42 (1,31- 1,53)
11	Ч	3	66	T ₃ N ₀ M ₀	1,57 (1,41-1,73)
12	Ч	3	62	T ₃ N ₀ M ₀	1,53 (1,4-1,66)

Примітка: Вважали, що при значенні розрахованого діапазону нижче 0,35 має місце гомозиготна делеція; 0,35-0,85 - гетерозиготна делеція; 0,85-1,5 – нормальна кількість копій гена; якщо значення було вище 1,5 – ампліфікація.

Аналіз кількості копій гена виявив 33,3% (4 з 12) зразків СККН, що були ампліфіковані, решта 66,7% зразків не мали змін кількості копій гена.

Послідовність геномної ДНК, що кодує білок *GPX3*, була ізольована японськими вченими в 1994 році. При цьому встановили, що ген складається з

5 екзонів [243]. Аналіз значної кількості зразків виявив мРНК гена *GPX3* в печінці, нирках, серці, легені і молочній залозі людини. Також мРНК гена *GPX3* виявили в тканинах, ізольованих з кардіоміоцитів пацюка, серця, легені та тканин молочної залози миші. Цей результат вказує, що, можливо, немає ніякої видоспецифічної різниці у експресії *GPX3* [244]. Дефіцит білка *GPX3* асоційовано з серцево-судинною хворобою і паралічем [242].

Також було уточнено роль ко-факторів трансляції, таких, як tRNASec, SECIS-зв'язуючого протеїну-2 і SelD (selenophosphate synthetase D) в регуляції експресії *GPX3*. Було виявлено, що tRNASec і SelD значно пригнічували експресію *GPX3*, тоді як SECIS-зв'язуючий протеїн-2 показав тенденцію до підвищення експресії. Ці результати демонструють присутність нових функцій старту транскрипції гена *GPX3*, що має промотор, регульований гіпоксією [245].

Дані щодо участі гена *GPX3* в канцерогенезі досить суперечливі. Результати досліджень підтримують гіпотезу, що дефекти антиоксидантної системи, можливо, сприяють утворенню злоякісних пухлин широкого спектру [241, 245]. Метилування промотора гена *GPX3* корелює з хіміорезистентністю при раку голови та шиї і, можливо, служить індикатором ефективності лікування хімотерапевтичними засобами на основі цисплатини для пацієнтів, хворих на рак голови та шиї [241].

Локус 5q33-34, де розташований *GPX3*, часто асоціюється з раком простати. Наявні дослідження, що підтверджують делеції в екзонах гена *GPX3*. За допомогою різних методів – ПЛР, кількісної ПЛР та FISH показано наявність гомозиготних делецій в 10% зразків. Гетерозиготні делеції були виявлені в 52% пухлин простати. За результатами цих же досліджень, метилування в регіоні екзону 1 *GPX3* спостерігалось в 90% зразків раку простати, що не мали делецій. Усі три лінії клітин раку простати (PC-3, Du145, і LNCaP) показували метилування [246].

Наявні також дані про значне зниження експресії мРНК гена *GPX3* в аденокарциномах Баретса (епітелій шлунка), яке спостерігали у 91% зразків

пухлин. Механізмом інактивації виявилось біалельне метилювання гена. Причому в сформованих карциномах гіперметилювання спостерігали частіше, ніж у метаплазіях [247].

Наші дослідження також виявили зниження експресії мРНК гена *GPX3* на рівні мРНК у 100% зразків СККН (рис. 3.9.), але метилювання промоторного регіону гена *GPX3* відсутнє. Отримані результати можна пояснити, якщо враховувати функції гена *GPX3*. Дійсно, при канцерогенезі пухлина переживає наростання гіпоксії, тож інактивація перексиду втрачає актуальність і клони пухлини, що не несуть пероксидаз, залишаються життєздатними. В той же час, для знешкодження наслідків хіміотерапії, пероксидаза необхідна, і клітини, що мають цей ген, демонструють більшу виживаність, а отже, хіміорезистентність. Блокування даного гену призводить до збільшення чутливості до лікування препаратами на основі платини.

Таким чином, експресія *GPX3* була знижена у 100% зразків СККН, порівняно з оточуючими тканинами. Метилювання промоторної ділянки гена *GPX3* не було виявлено. Однак аналіз кількості копій гена виявив ампліфікації у 33,3% (4 з 12) зразків СККН. Механізми регуляції експресії гена *GPX3* в СККН залишаються незрозумілими і потребують подальших досліджень. Можливо, експресія даного гена пригнічується за рахунок білкової регуляції або малими РНК. Отже, ген *GPX3* може бути кандидатом у гени-супресори пухлинного росту в СККН.

3.2.7. Ген людини *GPX4*. Ген *GPX4*, локалізований на хромосомі 19p13.3, кодує основну пероксидазу для знешкодження фосфоліпідних гідропероксидів. Зазвичай кодований цим геном білок функціонує всередині мембран [248]. Нокаут цього гена летальний для ембріонів мишей, а гетерозиготні особини мають знижену життєздатність [249].

Схоже, що *GPX4* є найбільш ефективним ферментом, що пригнічує 12,15 LOX і видаляє продукти її діяльності. Це робить *GPX4* ефективним

партнером в регулюванні важливого, але, потенційно шкідливого фермента - ліпоксигенази. Логічно припустити, що летальні наслідки від нокауту гена *GPX4* є результатом порушення чутливої рівноваги ферментативного перекисного окиснення ліпідів і видалення його продуктів [250].

3.2.7.1. Аналіз експресії гена *GPX4*. Дослідження відносної експресії гена *GPX4* у СККН проведена на 18 парах зразків пухлин та умовно нормальних тканин (рис. 3.10.). Експресія даного гена була знижена у 61% випадків (11 з 18) зразків СККН. У 28% зразків (5 з 18) експресія була підвищена, 2 зразки не мали змін.

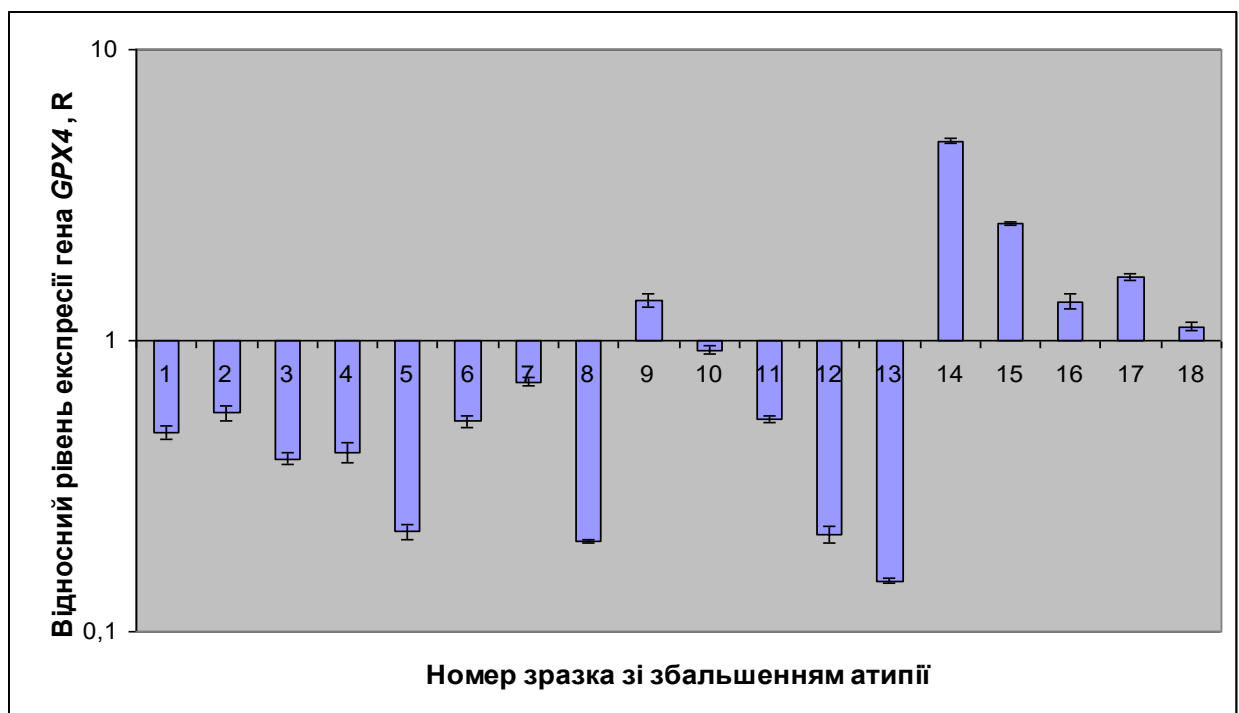


Рис. 3.10. Відносна експресія гена *GPX4* (16 зразків) у світлоклітинних карциномах нирок. Зразки 1-12 стадії 1-2, 13-16 – стадії 3-4

3.2.7.2. Аналіз кількості копій гена *GPX4*. Оскільки дослідження метилування промоторної ділянки змін не виявило, був проведений аналіз кількості копій гена (табл. 3.9.) Як видно з таблиці 3.7., ген *GPX4* не мав змін кількості копій гена.

**Клініко-морфологічні дані та результати аналізу кількості копій гена
GPX4 у зразках СККН.**

Номер зразка	Стать	Стадія атипії	Вік	TNM класифікація	Результати аналізу кількості копій <i>GPX4</i> (min і max значення)
1	Ж	3	55	T4N _x M ₀	1,14 (0,94-1,34)
2	Ч	3	61	T _{2a} N _x M ₁	1,13 (0,87-1,39)
3	Ч	4	46	T ₂ N _x M ₁	1,18 (0,89-1,47)
4	Ч	3	50	T _{2a} N _x M ₁	1,21 (0,98-1,44)
5	Ж	4	60	T ₄ N _x M ₀	0,98 (0,79-1,17)
6	Ж	3	59	T ₄ N ₀ M ₁	1,17 (0,96-1,38)
7	Ч	2	66	T _{3b} N _x M ₀	1,11 (0,87-1,35)
8	Ж	2	56	T _{3b} N _x M ₀	1,04 (0,83-1,25)
9	Ж	2	49	T _{1b} N _x M ₀	0,93 (0,81-1,05)
10	Ж	3	52	T ₃ N ₁ M ₀	0,99 (0,79-1,19)
11	Ч	3	66	T ₃ N ₀ M ₀	1,03 (0,86-1,20)
12	Ч	3	62	T ₃ N ₀ M ₀	1,08 (0,87-1,29)

Примітка: Вважали, що при значенні розрахованого діапазону нижче 0,35 має місце гомозиготна делеція; 0,35-0,85 - гетерозиготна делеція; 0,85-1,5 – нормальна кількість копій гена; якщо значення було вище 1,5 – ампліфікація.

Основною відмінністю білка *GPX4* є те, що він здатен метаболізувати гідропероксиди ліпідів та працювати всередині клітинної мембрани. Існує у 3 формах, що локалізуються в мітохондріях, цитозолі і ядрі сперматозоїдів. Нокаут гена *GPX4* за мітохондріальною ізоформою не летальний, але самці мишей з такою модифікацією стерильні. Миші, нокаутні за ізоформою гена *GPX4*, що локалізована в ядрі сперматозоїдів, були життєздатні, стерильні, і мали дефекти компактизації хроматину в ядрах сперматозоїдів [251].

Нокаут гена *GPX4* за цитозольною формою є летальним, ембріони гинуть на ранніх етапах розвитку. Блокування цієї ізоформи у дорослих

мишей призводить до загибелі особин протягом 2 тижнів. Це вказує на те, що білок GPX4, окрім антиоксидантних властивостей повинен мати певні життєвонеобхідні функції. З усіх глутатіонпероксидаз тільки GPX4 може знижувати кількість гідропероксидів в мембранах, чим, можливо, впливає на процеси окиснення в мембрані. В дослідях на мишах показано, що GPX4 дійсно протидіє діяльності 12,15-ліпоксигенази (LOX) [252]. Зазначена ліпоксигеназа каталізує утворення гідропероксидів в мембранах без попереднього видалення жирних кислот, чим забезпечує широкий діапазон субстратів для GPX4. Вона викликає апоптоз через активацію AIF (apoptosis inducing factor), замість активації каспаз. При розщепленні кальпаїном-1, AIF транслокується від внутрішньої мембрани мітохондрій в ядро і індукує фрагментацію ДНК за допомогою активації полі (ADP рибоза) полімерази-1 poly (ADP ribose) polymerase-1 [253].

Трансфекція ембріональних фібробластів мишей, отриманих з GPX4 нокаутів нормальним геном *GPX4*, приводила до інгібування GPX4KO-індукованої загибелі клітин, незважаючи на набагато більш низьку питому активність фермента у мутантів. Крім того, порівняння впливу рівної кількості білка дикого типу і Sec/Cys мутантів показав, що збільшення експресії білка дикого типу, але не мутантного, призводило до зменшення швидкості проліферації. Це говорить про те, що білок GPX4 впливає не лише на виживання клітин, а й на їх проліферацію [254].

Накопичення гідроперексидів ліпідів є характеристикою нейродегенеративних захворювань, і, відповідно, рівень експресії гена *GPX4* був знижений в мозку мишей з моделлю хвороби Альцгеймера [255]. Ці дані підтверджують висновок, що білок GPX4 відіграє вирішальну нейропротекторну роль, контролюючи виробництво гідроперексидів ліпідів і апоптоз.

Апоптоз в пост-мітотичних клітинах, таких, як нейрони або кардіоміоцити може мати згубні наслідки, але, в той же час, апоптоз видаляє пошкоджені і дисфункціональні клітини. Підвищена чутливість

гетерозиготних *GPX4*^{+/-} тварин до апоптозу, імовірно, призводить до сповільнення прогресії фатальної лімфоми в поєднанні зі збільшенням тривалості життя [256].

Загалом, для пухлин характерне зниження рівня експресії гена *GPX4*, зокрема, показано зниження в клітинних лінях раку підшлункової залози; при раку молочної залози рівень білка *GPX4* знижується зі збільшенням стадії розвитку пухлини і корелює з накопиченням мутантного p53. Надекспресія гена *GPX4*, як правило, пригнічує ріст пухлин, зокрема, клітинних ліній фібросаркоми L929 та клітинних ліній підшлункової залози [245].

За даними наших досліджень експресія гена *GPX4* була знижена у 61% зразків СККН, порівняно з оточуючими тканинами. Метилування промоторної ділянки гена *GPX4* не було виявлено, змін кількості його копій не спостерігалось. Не зважаючи на те, що механізм зниження експресії гена *GPX4* залишається не яким і потребує подальших досліджень, цей ген може бути кандидатом в гени-супресори росту пухлин. В подальшому доцільно дослідити вплив регулюючих білків і некодуєчих РНК на експресію даного гена.

3.2.8. Вивчення інших генів родини *GPX* у людини. Ген *GPX2*, що локалізований на 14q24.1 та ген *GPX6*, що локалізований на 6p22.1, є представниками сімейства глутатіон пероксидаз і кодують селеномісні глутатіонпероксидази. Передбачається що білки *GPX2* і *GPX7* захищають стравохід, відповідаючи за знешкодження пероксиду водню в епітелії шлунково-кишкового тракту [257, 258]. Показано роль білка *GPX2* в канцерогенезі аденокарциноми Барретта, плоскоклітинному раку, колоректальному раку, раку легенів [259-262].

Експресія гена *GPX6* обмежується назофаренгіальним епітелієм у ембріонів і дорослих. Ген *GPX6* вивчений вкрай мало, він, можливо, експресується у нервовій системі, нюховому нерві [263-265].

Проте, як було показано нами, ген *GPX2* має дуже низьку експресію як в нормі так і в раку нирки, що не дозволяє визначити достовірну різницю. Експресія гена *GPX6* методом кількісної ПЛР не вдалося детектувати.

Результати досліджень, поданих в підрозділі, опубліковано в працях:

1. Genetic and epigenetic changes of *NKIRAS1* gene in human renal cell carcinomas / E. E. Rudenko, G.V. Gerashchenko, O.O. Bogatyrova, A.G. Kondratov // *Experimental Oncology* 2010, 71-75.
2. *PPM1M* як потенційний ген супресор росту пухлин у світлоклітинних карциномах нирок людини / Є.Є. Руденко, Г.В.Геращенко, В.В.Гордіюк, А.Г.Кондратов, В.І.Кашуба // *Фактори Експериментальної Еволюції Організмів*. Київ. 2011. Збірник наукових праць. Т.11. С.522-526.
3. Genetic and epigenetic changes of *GPX1* and *GPX3* in human clear-cell renal cell carcinoma / E. E. Rudenko, G. V. Gerashchenko, Y. V. Lapska, O. O. Bogatyrova, S. O. Vozianov, Y. M. Zgonnyk, V. I. Kashuba // *Biopolymers and Cell* 2013, 395–401.
4. *PPM1M* and *PRICKLE2* are potential tumor suppressor genes in human clear-cell renal cell carcinoma / E. E. Rudenko, G. V. Gerashchenko, Y. V. Lapska, S. O. Vozianov, Y. M. Zgonnyk, V. I. Kashuba // *Biopolymers and Cell* 2014, 229–233.
5. Heterozygous deletions are main cause of expression alterations of *PPM1M* and *PRICLE2* genes in human clear cell renal cell carcinomas / E. E. Rudenko, Y. V. Lapska, G. V. Gerashchenko, E. O. Stakhovsky, M. V. Vikarchuk, V. I. Kashuba // *Biopolymers and Cell* 2015, 29–33.
6. Aberrant expression of selenium-containing glutathione peroxidases in clear cell renal cell carcinomas / E. E. Rudenko, O. Kondratov, G. Gerashchenko, Y. Lapska, S. Kravchenko, O. Koliada, S. Vozianov, Y. Zgonnyk, V. Kashuba // *Exp Oncol* 2015, 105–110.

3.3. Гіпотетичні зміни у кількості копій генів, визначені за допомогою веб-ресурсу cBioPortal

Щоб підтвердити отримані результати, було проведено біоінформатичний аналіз даних, використовуючи веб-ресурс cBioPortal [266, 267]. cBioPortal містить дані по молекулярному профілюванню тканин різних ракових пухлин, а також інші бази даних (наприклад, дані гібридизацій мікрочіпів, RNAseq, і т.д.). Проекти геноміки раку, проведені у великому масштабі, такі, як Атлас генома раку (The Cancer Genome Atlas, TCGA) та Міжнародний консорціум генома раку (the International Cancer Genome Consortium, ICGC) генерують велику кількість даних при використанні багатьох технічних платформ. Така множина даних є дуже складною для аналізу, особливо для вчених, які не володіють біоінформатикою на достатньому рівні.

cBioPortal для геноміки ракових пухлин (<http://cbioportal.org>) був спеціально створений з метою понизити бар'єр доступу для аналізу великих масивів даних. Це, в свою чергу, сприятиме прискоренню трансляції даних аналізу геному у нові біологічні гіпотези, терапію і клінічні випробування.

Таким чином, використання cBioPortal полегшує вивчення молекулярних механізмів канцерогенезу, тому що на порталі зібрано дані по експресії генів, що були отримані за допомогою різних технологій, а також надано можливість проводити аналіз, порівнюючи гени, зразки різних пухлин і різні масиви даних. Наприклад, можна наочно представити зміни у експресії генів, порівнюючи дані, отримані декількома лабораторіями і при вивченні різних типів злоякісних пухлин. Портал також дозволяє дослідити різні сигнальні клітинні шляхи, провести аналіз виживаності пацієнтів, проаналізувати наявність кореляцій геномних альтерацій і отримати виборку певних даних. cBioPortal дає доступ до програмного забезпечення, завантаження певної виборки даних, а також продукує результати аналізу у вигляді готових для публікації чартів і схем.

Дані аналізу геному на cBioPortal включають у себе соматичні мутації, зміни кількості копій ДНК (copy-number alterations, CNA), експресію мРНК і мікроРНК (міРНК), метилування ДНК, кількість білка, а також наявність фосфорильованих протеїнів. Для кожного зразка пухлини доступні дані, отримані за допомогою декількох технологічних платформ при аналізі геному. Концепцією спрощеного доступу до результатів є інтеграція різних типів даних на рівні одного гена, що дає можливість отримати всю наявність специфічних біологічних явищ для кожного зразка простим пошуковим алгоритмом. Такий підхід дозволяє користувачам знайти генетичні зміни для певного гена або зразка та перевірити гіпотези щодо геномних змін в конкретних типах раку.

Нами було проаналізовано генетичні зміни в 415 зразках СККН, використовуючи cBioPortal. Як видно з рис. 3.11, для гена *NKIRAS1* найбільш характерними є гетерозиготні делеції, хоча зустрічаються також зразки без змін та з гомозиготними делеціями.

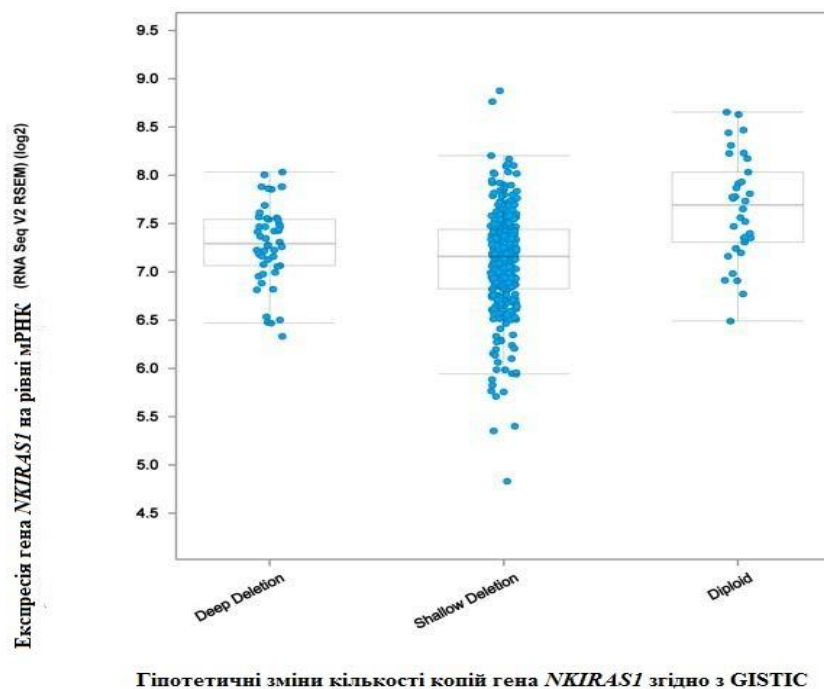
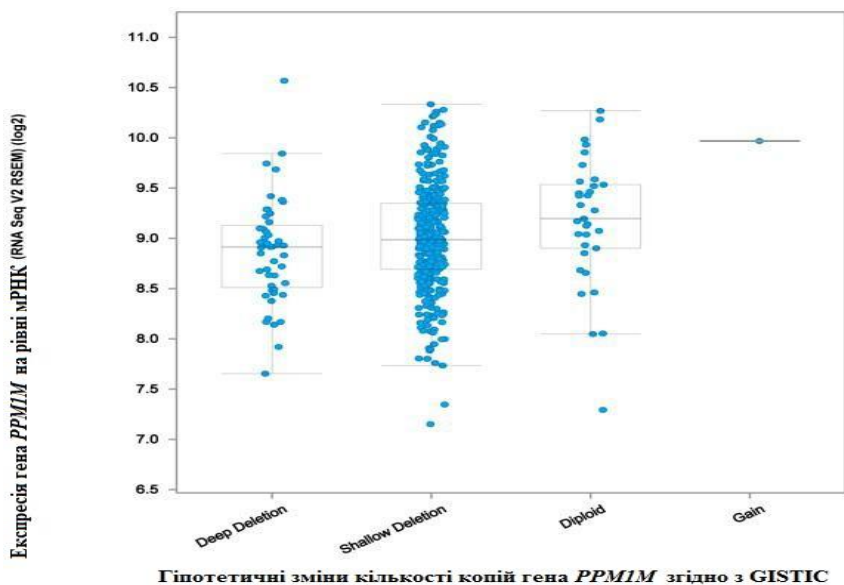
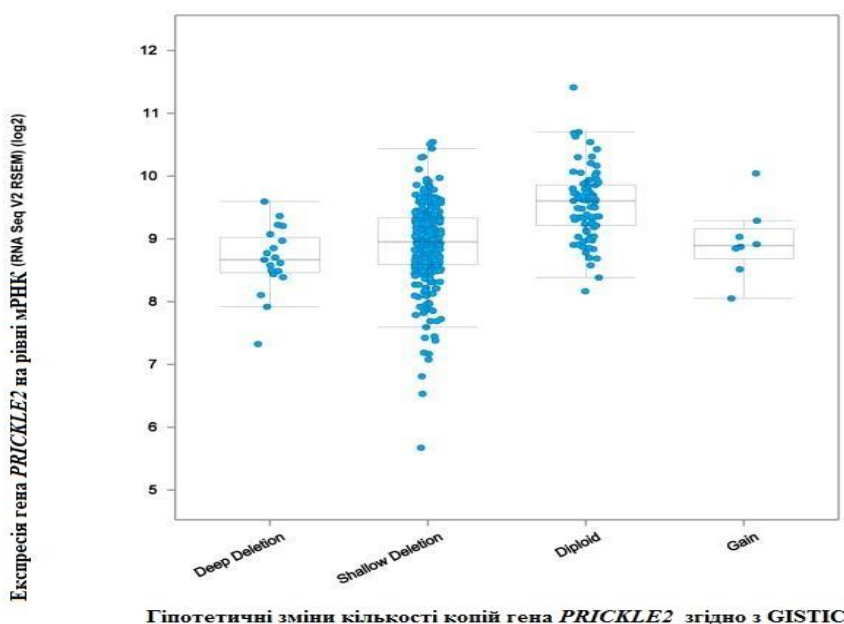


Рис. 3.11. Відносний рівень експресії в залежності від відносного числа копій гена *NKIRAS1*. Deep deletion - гомозиготні делеції; shallow deletion - гетерозиготні делеції; Diploid - присутні обидва алелі

Для генів *PPM1M*, *PRICKLE2* та *GPX1* переважають гетерозиготні делеції, для *PPM1M* і *PRICKLE2* зрідка спостерігаються ампліфікації, як в наших дослідженнях, так і згідно з результатами біоінформатичного аналізу (рис. 3.12. а, б та рис. 3.13.)

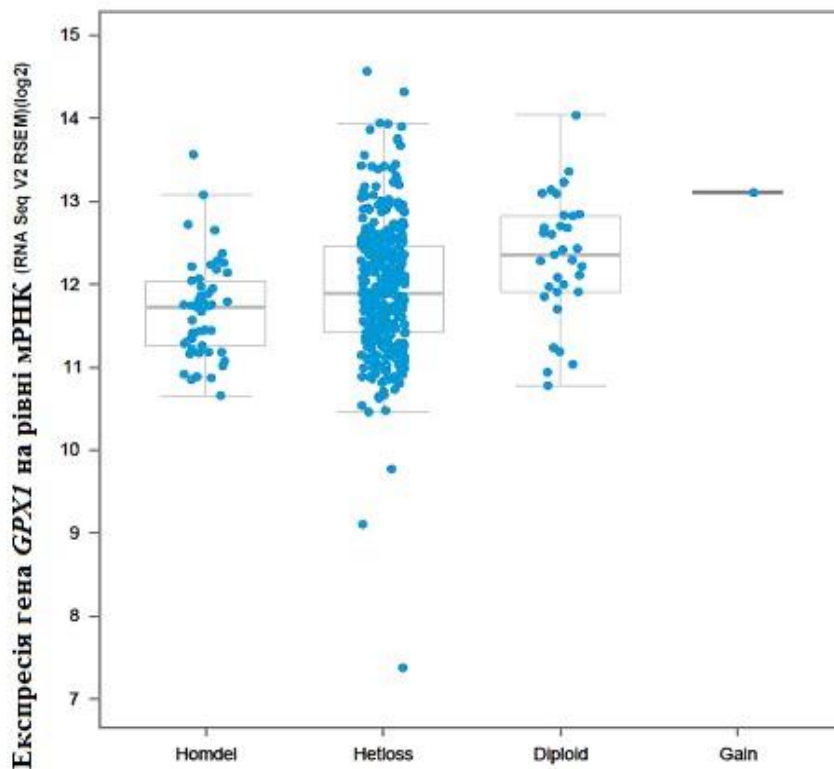


а)



б)

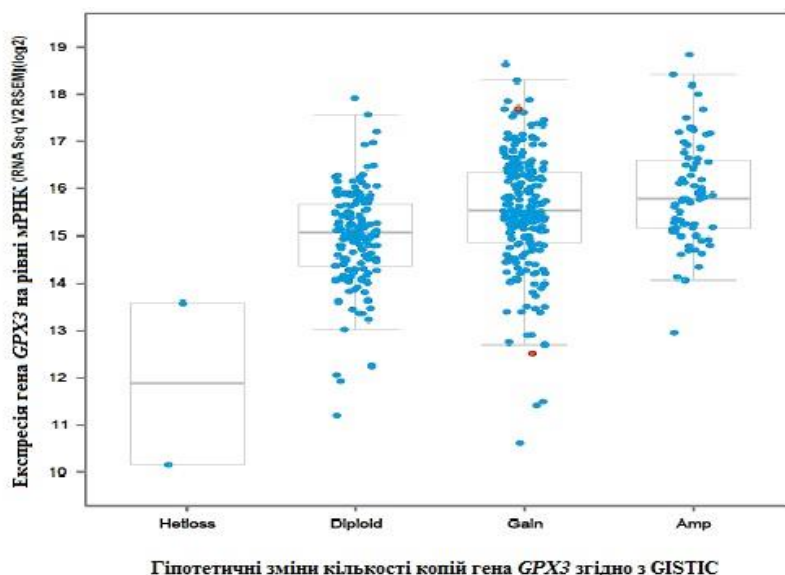
Рис. 3.12. Відносний рівень експресії в залежності від відносного числа копій генів а) *PPM1M* і б) *PRICKLE2*. Deep deletion - гомозиготні делеції; shallow deletion - гетерозиготні делеції; Diploid - присутні обидва алелі; Gain - незначна ампліфікація гена



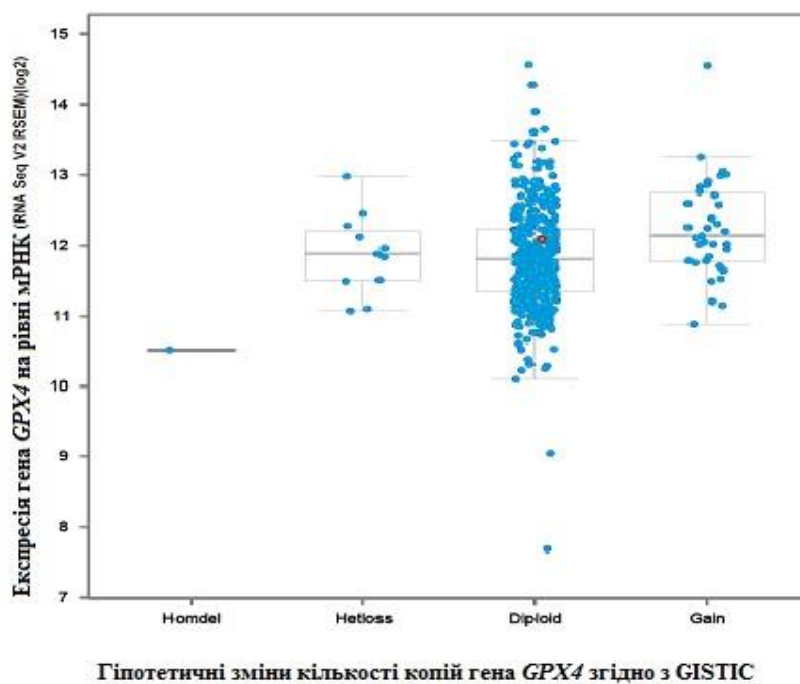
Гіпотетичні зміни кількості копій гена *GPX1* згідно з GISTIC

Рис. 3.13. Відносний рівень експресії в залежності від відносного числа копій гена *GPX1*. Homdel - гомозиготні делеції; Hetloss - гетерозиготні делеції; Diploid - присутні обидва алелі; Gain - незначна ампліфікація гена

Ген *GPX3* в наших дослідженнях був ампліфікований або не мав змін, результат підтверджений біоінформатичними даними (рис. 3.14.а). Для гена *GPX4* нами не було виявлено жодних змін (рис. 3.14.б). Біоінформатичний аналіз виявив невелику кількість ампліфікованих та делетованих зразків. Але переважна більшість зразків була диплоїдна.



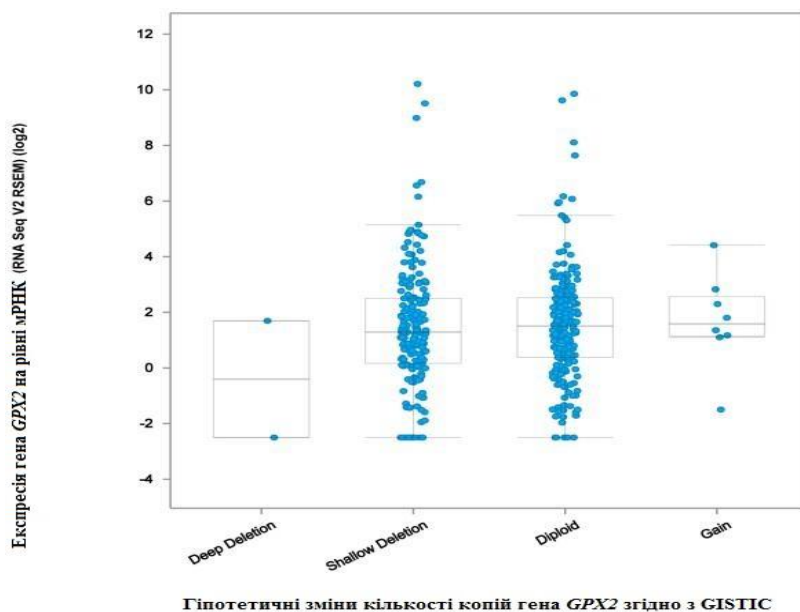
a)



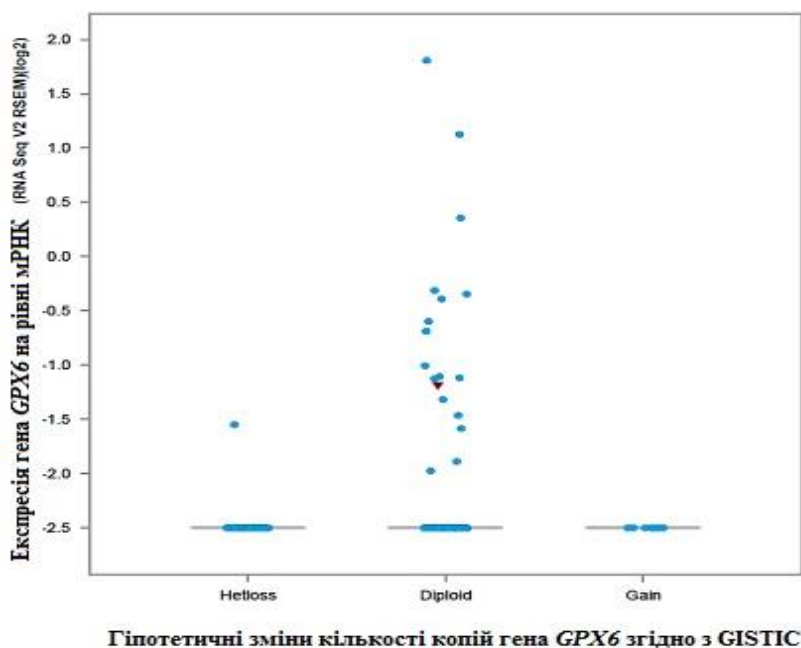
б)

Рис. 3.14. Відносний рівень експресії в залежності від відносного числа копій генів а) *GPX3* і б) *GPX4*. Homdel - гомозиготні делеції; Hetloss- гетерозиготні делеції; Diploid - присутні обидва алелі; Gain - незначна ампліфікація гена, Amp – суттєва ампліфікація гена

Ген *GPX2* має надзвичайно слабку експресію, а *GPX6* не експресується в СККН (рис. 3.15. а, б).



а)



б)

Рис. 3.15. Відносний рівень експресії в залежності від відносного числа копій генів а) *GPX2* і б) *GPX6*. Deep deletion - гомозиготні делеції; Hetloss, shallow deletion - гетерозиготні делеції; Diploid - присутні обидва алелі; Gain - незначна ампліфікація гена;

Таким чином, дослідження генетичних і епігенетичних змін за допомогою сучасних молекулярно-біологічних технологій дозволяє

реалізувати наукові досягнення в медичній практиці, особливо, в онкології. Отримані результати на пухлинах яєчників, нирки і зразках раку шийки матки підтверджують ефективність і перспективність нового методу - NotI-мікропанелей для масштабного аналізу з метою виявлення як потенційних генів-супресорів пухлин, так і наборів онкомаркерів в контексті ранньої діагностики. Дані дослідження - тільки перший крок у пошуку маркерів епітеліальних пухлин. ДНК-мікропанелі служать для створення масиву даних і вибору об'єктів для подальших досліджень. Для виокремлення найбільш перспективних кандидатів необхідно залучення додаткових методів скринінгу. В якості таких методів оцінки потенційного маркера можна використовувати гібридизацію *in situ* на тканинних чіпах і оцінку рівня та / або стану білкового продукту цього гена в клітинах. При цьому головна вимога - необхідність довести клінічну значимість виявленого феномена, оскільки далеко не кожен ген, навіть якщо він кардинально міняє рівень експресії, може розглядатися як маркер.

Результати досліджень, поданих в підрозділі, опубліковано в праці:

1. Aberrant expression of selenium-containing glutathione peroxidases in clear cell renal cell carcinomas / E. E. Rudenko, O. Kondratov, G. Gerashchenko, Y. Lapska, S. Kravchenko, O. Koliada, S. Vozianov, Y. Zgonnyk, V. Kashuba // *Exp Oncol* 2015, 105–110.

РОЗДІЛ 4. АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ ОТРИМАНИХ РЕЗУЛЬТАТІВ

Загальною ланкою у виникненні пухлин є онкоген, внесений в клітину вірусом, або трансформований з протоонкогена в результаті мутації чи виведений з-під контролю стримуючих генів хромосомної транслокацією. Група генів, що за своїми функціями протилежні дії онкогенів і пригнічують їх активність, отримала назву гени-супресори пухлин або антионкогени [268]. Дефект цих генів призводить до прогресії, а відновлення функції - до істотного уповільнення проліферації або навіть реверсії розвитку пухлини.

Крім того, зазначалося, що нокаутовані по гену TP53 миші зазвичай розвиваються нормально, а порушення у них з'являлися в більш пізньому віці і призводили до лейкозів і сарком [269]. На думку деяких авторів, (, подібні факти вказують на наявність надмірності механізмів контролю, що дозволяють підтримувати нормальне ділення клітин при нестачі або відсутності ключових супресорів проліферації [270]. Зазначені механізми контролю ділення клітин, імовірно, виникли в процесі еволюції ссавців як способи захисту організму від неоплазій на репродуктивній стадії.

Ще в 80-90-х роках було виявлено гени, що здійснюють негативний контроль клітинної проліферації, тобто запобігають виходу клітин з диференційованого стану та відновленню у них здатності до поділу [271].

Нормальне розмноження клітин контролюється складною взаємодією генів, що стимулюють проліферацію (протоонкогенів), і генів, що її пригнічують (гени-супресори чи антионкогени). Порушення цього балансу призводить до виникнення злоякісного росту, при якому відбувається активація протоонкогенів і перетворенню їх в онкогени, та інактивіація генів-супресорів, що звільняють клітину від механізмів, які обмежують її проліферацію. Таким чином, протоонкогени і гени-супресори утворюють складну систему позитивно-негативного контролю клітинної проліферації і

диференціювання, а злаякісна трансформація реалізується через порушення цієї системи.

Відсутність продукту гена-супресора стимулює утворення пухлини. На відміну від онкогенів, мутантні алелі генів-супресорів рецесивні. Відсутність чи пошкодження одного з алелів, за умови, що другий нормальний, не призводить до зняття інгібування утворення пухлини. Згідно двохударної ударної моделі канцерогенезу, запропонованої Knudson в 1971 році [33], для переходу нормальної клітини в пухлинну необхідно дві мутаційні події. Першою подією є мутація, яка призводить до утворення клітини з підвищеним ризиком виникнення пухлини. Такі мутації можуть виникати як в соматичних, так і в статевих клітинах. Другою подією, що відбувається в соматичній клітині, є мутація в непошкодженому алелі гена і перетворення клітини з підвищеним ризиком трансформації на пухлинну, яка починає безупинно ділитися, що призводить до виникнення злаякісного новоутворення. Надалі гіпотеза була підтверджена дослідженнями, які показали, що в ряді випадків в пухлинах спостерігається гомозиготність за деякими маркерами, в той час як в крові за цими ж маркерами відзначалася гетерозиготність. Таким чином, було встановлено, що втрата непошкодженою копії гена - це друга подія з теорії Knudson.

Проте, навіть при пошкодженні обох алелів одного гена, злаякісна трансформація клітини не забезпечується. Формування злаякісного новоутворення – багатостадійний і складний процес, що вимагає послідовного і швидкого набуття клітиною нових властивостей. Вони включають в себе: отримання постійного мітотичного сигналу, уникнення контролю супресорних генів, блокування апоптозу, позбавлення ліміту поділів, стимуляцію ангиогенезу, активацію здатності до метастазування, перепрограмування метаболізму, ухилення від знищення імунною системою і підтримання постійного запалення навколо пухлини, що забезпечує створення навколо неї певного мікросередовища [270]. Необхідною умовою для динамічних і кардинальних змін такого роду є нестабільність геному, що

прискорює генерацію генетичної різноманітності [272]. Гени, що забезпечують підвищену мутабільність геному називають генами-мутаторами. Гени, що відповідають за апоптоз, блокують протоонкогени, перешкоджають ангиогенезу називають генами загального контролю.

Тому, у осіб, що успадкували один пошкоджений алель гена-мутатора, який відповідає за контроль генетичної стабільності, утворення пухлини може бути ініційоване соматичною мутацією в непошкодженому алелі. Отже, в разі спадкових форм пухлин, коли є гермінальна мутація, для початку захворювання необхідна всього одна соматична мутаційна подія - пошкодження єдиного функціонального алеля гена-мутатора. Спорадичні випадки виникнення пухлини того ж типу вимагають двох незалежних мутаційних подій в обох алелях. У підсумку, для носіїв мутантного алеля гена-мутатора ймовірність розвитку пухлини значно вище, ніж в середньому по популяції.

Якщо ж особа є носієм одного успадкованого дефектного алеля гена з групи загального контролю, то ризик виникнення хвороби буде на порядок нижчим, ніж для осіб з дефектним алелем гена-мутатора. Адже для ініціації пухлинного процесу потрібна соматична мутація другого алеля гена загального контролю і інактивація обох алелів будь-якого гена-мутатора. Таким чином, для розвитку пухлини в цьому випадку необхідні три незалежні мутаційні події. Спорадичні пухлини, що обумовлені соматичними мутаціями генів загального контролю зустрічаються найрідше і для їх виникнення та розвитку необхідно чотири незалежні мутації [273].

Багато, якщо не більшість пухлин людини виникають шляхом ступінчастої еволюції, на початку якої лежить інактивація гена-супресора *p53* шляхом його випадкової чи індукованої мутації. Цей ген, вірніше, його продукт, жорстко контролює активність протоонкогенів і апоптоз. Інактивація його веде до звільнення клітинних протоонкогенів, скасування апоптозу і тим самим до накопичення життєздатних мутацій в клітині. Такі клітини являють собою сприятливий матеріал для відбору на автономність, тобто до виходу на

шлях, що веде до утворення пухлин [274, 275]. Прикладами генів-супресорів також є: - ген *Rb1* (відповідає за розвиток ретинобластоми) [276]; два гена, що відповідають за розвиток раку молочної залози і яєчників- ген *BRCA2* і ген *BRCA1* [277]; також до генів-супресорів можна віднести ген *WT1* для гліобластом [278]; гени *CDKN2A* і *CDKN2B*, відповідальні за розвиток меланоми і онкологічні захворювання крові відповідно [279, 280]; інактивація гена *hMLH1* призводить до виникнення карциноми шлунка і товстого кишківника [281, 282].

Таким чином, своєчасне виявлення осіб, що мають підвищений ризик захворювання може значно знизити кількість хворих, у яких злоякісні захворювання були діагностовані на пізніх стадіях. Особливо це важливо для неоплазій, що на ранніх стадіях не мають клінічних проявів – рак легень, нирок, підшлункової залози, простати. Виявлення неоплазії на 1-2 стадії значно підвищує шанси на успішне лікування. Крім того, білки, що є продуктами генів-супресорів мають перспективу у таргетній протипухлинній терапії. Деякі гени-супресори можуть бути використані в якості маркерів у діагностичних панелях для діагностики, прогнозу, перевірки ефективності лікування при підборі терапевтичних засобів та контролю стану здоров'я пацієнтів під час ремісії. Спостереження пацієнта після терапії для вчасного виявлення рецидиву раку - ще одна причина для використання онкомаркерів. Періодичні вимірювання можуть виявити рецидив часто на місяці раніше, ніж ультразвук, рентгенівське або фізичне обстеження (<http://www.cancer.gov/about-cancer/diagnosis-staging/diagnosis/tumor-markers-fact-sheet>).

Маркери для прогностики, розробки індивідуального плану лікування, контролю захворювання після хірургічного втручання та перевірки ефективності призначених ліків для хворих на СККН знаходяться на стадії пошуку і клінічних випробувань. Також перспективними, але поки безуспішними є пошуки маркера для виявлення пухлин малого розміру і здешевлення моніторингу пацієнтів з високим онкологічним ризиком.

Надзвичайно актуальним є пошук маркерів, що дозволили б відрізнити світлоклітинну карциному нирки від менш агресивного типу раку – хромофобної карциноми та доброякісної пухлини – онкоцитоми. Це дало б можливість уникнути непотрібного хірургічного втручання і зберегти орган, за умови постійного моніторингу хворого [283]. Наразі не відомо жодного маркера, що використовувався б в медичній практиці для пацієнтів з СККН [284]. Найбільш вивченими і перспективними поки залишаються карбонангідраза IX, VEGF, лактат дегідрогеназа та деякі SNP (single-nucleotide polymorphisms) [285-288].

Тому, нами був проведений пошук потенційних генів-супресорів для світлоклітинної карциноми нирок, оскільки ця хвороба має пізню симптоматику і погано піддається лікуванню. Попередній скрінінг був проведений за допомогою технології NotI-мікрочіпів та біоінформатичного пошуку. Таким чином були відібрані 4 гени: *NKIRAS1*, *PPM1M*, *PRICKLE2* та *GPX1*. Оскільки роль сімейства *GPXs* в канцерогенезі є загальновідомою, було прийнято рішення розширити дослідження на всіх представників цієї родини, що мають неканонічну амінокислоту – селеноцистеїн, а саме : *GPXs* 2,3,4,6.

Таким чином, методом NotI-мікрочіпів нами було виявлено гетерозиготні делеції або метилування гена *NKIRAS1* у 57% зразків пухлин. Як і очікувалось, враховуючи інгібуючий вплив продукту гена *NKIRAS1* на білок NF-κB, один з центральних пухлинно-асоційованих білків, експресія мРНК була знижена в 75% зразків СККН у порівнянні з оточуючою нормальною тканиною. Аналіз кількості копій гена підтвердив наявність делецій гена *NKIRAS1* у 78,6% зразків. Загалом, дані NotI-мікрочіпів, аналізу експресії та кількості копій гена добре узгоджуються. Отримані результати вказують на те, що для гена *NKIRAS1* характерне зниження експресії в СККН, однією з можливих причин зниження експресії є делеції.

Показано, що фосфатази грають важливу роль у регулюванні клітинних функцій, в тому числі, регуляції клітинного циклу, та потенційно є

генами-супресорами росту пухлин [205, 206]. *PPM1M* має фосфатазну активність і фосфорилує специфічні субстрати в ядрі. Участь *PPM1M* у канцерогенезі наразі невідома. Однак, враховуючи його можливу участь в одному з ключових молекулярних шляхів канцерогенезу (IL1-індукованому шляху активації запалення через NF- κ B) та високий відсоток змін як в експресії, так і в кількості копій гена, його можна віднести до пухлиноасоційованих. За даними NotI-мікрочіпів зміни було виявлено у промоторній зоні гена *PPM1M* у 22% (5 з 23) зразків СККН. Зниження експресії гена *PPM1M* спостерігалось в 33% зразків СККН, аналіз кількості копій гена показав наявність делецій у 50% зразків. Однак, для половини зразків експресія була підвищена, а при аналізі кількості копій гена ампліфікації спостерігалися лише в 16,7% зразків (табл. 4.1.). Метилування промоторного регіону гена *PPM1M* не є причиною зниження експресії. Очевидно, для даного гена характерна складна регуляція активності.

Таблиця 4.1.

Дані аналізу відносної експресії та кількості копій генів.

Назва гена	Зміни експресії, %	Результати аналізу кількості копій гена			
		Гомозиготні делеції з загального числа зразків	Гетерозиготні делеції з загального числа зразків	Зразки без змін з загального числа зразків	Дуплікації з загального числа зразків
<i>NKIRAS</i>	75%↓	2/14	9/14	3/14	0
<i>PPM1M</i>	33%↓, 50%↑	1/18	8/18	6/18	3/18
<i>PRICKLE2</i>	83%↓	0/18	8/18	9/18	1/18
<i>GPX1</i>	75%↓	1/12	10/12	1/12	0
<i>GPX2</i>	Слабка	-	-	-	-
<i>GPX3</i>	100%↓	0	0/12	6/12	6/12
<i>GPX4</i>	61%↓	0	0	12/12	0
<i>GPX6</i>	Не виявлено	-	-	-	-

Ген *PRICKLE2* також був відібраний в ході аналізу даних NotI-мікрочіпів. Продукт цього гена приймає участь в Wnt-сигнальному шляху визначення площинної клітинної поляризації, тому, інактивация цього гена може відображати процеси дедиференціації та втрати клітинами пухлин морфологічних ознак тканини, з якої вони походять [209]. Як і слід було очікувати згідно з даними NMA, експресія гена *PRICKLE2* була знижена. Причому, зниження спостерігалось у 83% зразків СККН (табл. 4.1.). Оскільки промоторна зона гена *PRICKLE2* не містить CpG острівців, метилування промоторного регіону не може бути причиною зниження експресії *PRICKLE2*. Визначення кількості копій гена виявило делеції у 44,4% зразків СККН. Імовірно, делеції є однією з причин зниження експресії *PRICKLE2* в клітинах СККН.

За даними літератури відомо, що експресія *GPXs* знижується в умовах нестачі кисню. Дані гени містять спеціальні сайти, що регулюють активність транскрипції [228]. Оскільки на пізніх стадіях канцерогенезу характерне наростання гіпоксії, слід було очікувати зниження експресії генів родини *GPX*. Дійсно, наші дані свідчать, що експресія гена *GPX1* була знижена у 75% зразків СККН, для *GPX3* - у 100% досліджених зразків, експресія *GPX4* була знижена у 61% зразків СККН, порівняно з оточуючими тканинами (табл. 4.1.). Експресія генів *GPX2* і *GPX6* була занадто низькою або була відсутня, як в СККН, так і в нормальних тканинах нирки. Тому, надалі ці 2 гени в дослідженні не розглядалися. Для решти генів родини *GPX* метилування промоторної ділянки виявлено не було.

При аналізі кількості копій гена, делеції гена *GPX1* спостеігалися в 91,7% зразків СККН. Ми вважаємо, що делеції є додатковим механізмом, який паралельно з білковою регуляцією впливає на рівень експресії *GPX1* в СККН.

Для генів *GPX3* і *GPX4* дані аналізу кількості їх копій не пояснюють виявлені зниження експресії. В гені *GPX3* виявлено 50% ампліфікацій, а для гена *GPX4* змін кількості копій не спостерігалось (табл. 4.1.). Механізми

регуляції експресії цих генів в СККН залишаються незрозумілими і потребують подальших досліджень. В подальшому доцільно дослідити вплив білків і некодуєчих РНК на експресію даних генів.

Також нами був досліджений розподіл алелів гена *GPX1* за поліаланіновим поліморфізмом у пацієнтів із СККН і контрольній групі донорів, старших 60 років і без онкологічних хвороб в анамнезі. Не зважаючи на дані літератури для інших видів раку [232], підвищений ризик захворювання серед людей, що мають алель з 5 аланіновими повторами у випадку СККН не підтверджено. Таким чином, згідно з нашими дослідженнями, поліаланіновий поліморфізм не має прогностичного значення для СККН.

Загалом, перспективними кандидатами в гени-супресори є гени *NKIRAS1*, *PRICKLE2* та *GPX1,3*, оскільки їх експресія була знижена у переважній більшості зразків СККН, порівняно з оточуючими умовно нормальними тканинами. Гени *GPX3* і *GPX4* потребують додаткового дослідження молекулярних механізмів зниження експресії. Показано, що гени *GPX2* і *GPX6* не експресуються, або мають занадто низьку експресію в нормальних тканинах нирки та в СККН, і навряд чи мають суттєвий вплив на процес канцерогенезу. Також показано, що поліаланіновий поліморфізм гена *GPX1* не має прогностичного значення для формування груп ризику по СККН.

Ген *PPM1M* являє собою потенційно цікавий ген для подальшого дослідження його ролі в канцерогенезі. У подальшому доцільно дослідити його експресію на різних стадіях захворювання для можливого використання при уточненні діагнозу. В подальшому доцільно зосередити увагу на генах, що мають значні відміни в ДНК, оскільки діагностичні маркери, як правило, вимірюють в біологічних рідинах пацієнта. Для використання вибраних генів у таргетній терапії слід провести дослідження, що підтверджують пухлиносупресуючі властивості їх білкових продуктів. Можливо також в

подальшому перейти від вимірювання ДНК в біологічних рідинах до вимірювання і порівняння рівня білкових продуктів.

Відкриття генів-супресорів клітинного ділення і злоякісного росту - одине з найважливіших досягнень останніх років в області біології. Воно безумовно покликане внести помітний внесок у вирішення багатьох проблем, що стоять як перед медициною, так і перед фундаментальною наукою.

ВИСНОВКИ

Використовуючи технологію широкомаштабного скрінінгу за допомогою NotI-мікрочіпів та біоінформатичного пошуку у відкритих базах даних, було відібрано 8 генів (*NKIRAS1*, *PPM1M*, *PRICKLE2*, *GPXs 1, 2, 3, 4*), що можуть бути задіяні в процесі виникнення СККН. Оцінка експресії генів *NKIRAS1*, *PRICKLE2*, *GPXs 1, 3, 4* в зразках СККН підтвердила їх можливу приналежність до потенційних генів-супресорів даного типу пухлин. Подальші дослідження виявили генетичні порушення, що можуть впливати на процес канцерогенезу.

1. Гени *NKIRAS1*, *PRICKLE2* та *GPXs 1* і *3* є кандидатами на роль супресорів для СККН, оскільки для них характерне зниження експресії в більшості досліджених зразків СККН у людини (*NKIRAS1* – 75%, *PRICKLE2* – 83%, *GPX 1* – 75% і *GPX3* – 100% зразків).
2. Ген *PPM1M* є онкоасоційованим геном, для якого спостерігалася як підвищена (50% зразків), так і знижена (33% зразків) експресія при СККН порівняно з умовно-нормальною тканиною.
3. Метилування цитозинів у CpG-острівцях промоторних регіонів не виявлено для жодного з досліджених генів, що вказує на наявність інших механізмів змін їх експресії.
4. Алель з 5 Ala-повторами гена *GPX1* є мажорним в контрольній групі (47,56%) та групі пацієнтів з СККН (48,75%). Частота цього алеля в досліджуваних групах достовірно не відрізнялась ($p = 0,44$). Не виявлено також достовірної різниці в частотах всіх алелей та генотипів даного поліморфізму між контрольною групою та групою пацієнтів з СККН. Таким чином, даний поліморфізм не має прогностичного значення для СККН.
5. Гени *NKIRAS1*, *PPM1M*, *PRICKLE2* та *GPX1* характеризуються високою частотою делецій в гомо- та гетерозиготному стані. Дуплікацію гена *GPX3* виявлено в 50% зразків пухлин, а змін кількості

копій гена *GPX4* не спостерігалось. Отримані дані підтверджено за допомогою веб-ресурсу cBioPortal.

6. Для генів *NKIRAS1* та *GPX1* зафіксовано найбільший відсоток делецій (78,6% та 91,7% відповідно), що дозволяє розглядати їх як потенційні молекулярні маркери для СККН.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. БЮЛЕТЕНЬ НАЦІОНАЛЬНОГО КАНЦЕР-РЕЕСТРУ УКРАЇНИ
Видання № 14 КИЇВ – 2013 http://www.ncru.inf.ua/publications/BULL_14/
2. Comparisons of outcome and prognostic features among histologic subtypes of renal cell carcinoma / J. C. Cheville, C. M. Lohse, H. Zincke, A. L. Weaver, M. L. Blute // *Am J Surg Pathol.* – 2003. – V. 27, N 5. – P. 612-624.
3. Renal cell carcinoma / N. M. Tannir // Oxford: Oxford University Press. – 2014.
4. The promise of biomarkers in cancer screening and detection / R. S. Negm, M. Verma, S. Srivastava // *Trends Mol Med.* – 2002. – V. 8, N 6. – P. 288-293
5. The genetic basis of renal cell carcinoma / C. P. Pavlovich, L. S. Schmidt, J. L. Phillips // *Urologic Clinics of North America.* – 2003. – V. 30, N. 3. P. 437-454.
6. VHL and FHIT Locus Loss of Heterozygosity Is Common in All Renal Cancer Morphotypes But Differs in Pattern and Prognostic Significance / M. Velickovic, B. Delahunt, S. Storkel, S. K. Grebem // *Cancer research.* – 2001. – V. 61, N 12. P. 4815-4819.
7. FHIT and FRA3B 3p14.2 allele loss are common in lung cancer and preneoplastic bronchial lesions and are associated with cancer-related FHIT cDNA splicing aberrations / K. M. Fong, E. J. Biesterveld, A. Virmani [et al.] // *Cancer Res.* – 1997. – V. 57, N 11. – P. 2256-2267.
8. The FHIT gene, spanning the chromosome 3p14.2 fragile site and renal carcinoma-associated t(3;8) breakpoint, is abnormal in digestive tract cancers / M. Ohta, H. Inoue, M.G. Cotticelli [et al.] // *Cell.* – 1996. – V. 84, N 4. – P. 587-597.
9. Epigenetic inactivation of a RAS association domain family protein from the lung tumour suppressor locus 3p21.3 / R. Dammann, C. Li, J. H. Yoon [et al.] // *Nat. Genet.* – 2000. – V. 25, N 3. – P. 315-319.
10. Hypermethylation of the cpG island of Ras association domain family 1A (RASSF1A), a putative tumor suppressor gene from the 3p21.3 locus, occurs in a

large percentage of human breast cancers / R. Dammann, G. Yang, G. P. Pfeifer // *Cancer Res.* – 2001. – V. 61, N 7. – P. 3105-3109.

11. Functional characterization of the candidate tumor suppressor gene NPRL2/G21 located in 3p21.3C / J. Li, F. Wang, K. Haraldson, A. Protopopov, F.-M. Duh, L. Geil, I. Kuzmin, J. D. Minna, E. Stanbridge, E. Braga, V. I. Kashuba, G. Klein, M. I. Lerman, E. R. Zabarovsky // *Cancer Res.* – 2004. – V. 64, N 18. – P. 6438-6443.

12. Microsatellite instability and loss of heterozygosity at the hMLH1 locus on chromosome 3p21 occur in a subset of nonsmall cell lung carcinomas / I. Wieland, T. Ammermuller, M. Bohm [et al.] // *Oncol. Res.* – 1996. – V. 8, N 1. – P. 1-5.

13. hMLH1 and hMSH2 expression correlates with allelic imbalance on chromosome 3p in non-small cell lung carcinomas / G. Xinarianos, T. Liloglou, W. Prime [et al.] // *Cancer Res.* – 2000. – V. 60, N 15. – P. 4216-4221.

14. Methylation of the hMLH1 promoter correlates with lack of expression of hMLH1 in sporadic colon tumors and mismatch repair-defective human tumor cell lines / M. F. Kane, M. Loda, G. M. Gaida [et al.] // *Cancer Res.* – 1997. – V. 57, N 5, № 3. – P. 808-811.

15. BAP1: a novel ubiquitin hydrolase which binds to the BRCA1 RING finger and enhances BRCA1-mediated cell growth suppression / D. E. Jensen, M. Proctor, S. T. Marquis [et al.] // *Oncogene.* – 1998. - V. 16, N 9. – P. 1097-1112.

16. Overexpression of candidate tumor suppressor gene FUS1 isolated from the 3p21.3 homozygous deletion region leads to G1 arrest and growth inhibition of lung cancer cells / M. Kondo, L. Ji, C. Kamibayashi, Y. Tomizawa, D. Randle, Y. Sekido, J. Yokota, V. Kashuba, E. Zabarovsky, I. Kuzmin, M. Lerman, J. Roth, J. D. Minna // *Oncogene.* – 2001. – V. 20, N 43. – P. 6258-6262.

17. Руководство по общей онкологии / Ред. Петрова // Медгиз. – 1958. – 367с.

18. TNM atlas: illustrated guide to the TNM. pTNM classification of malignant tumours / B. Speissel, O. H. Beahrs, P. Hermanek, R. V. P Hutter, O. Scheibe // Berlin New York: Springer-Verlag. – 1989.

19. Comparisons of outcome and prognostic features among histologic subtypes of renal cell carcinoma / J. C. Cheville, C. M. Lohse, H. Zincke, A. L. Weaver, M. L. Blute // *Am J Surg Pathol.* – 2003. - V. 27, N 5. – P. 612-624.
20. Renal cell carcinoma: current status and future directions / C. L. Martel, P. N. Lara // *Crit Rev Oncol Hematol.* – 2003. - V. 45, N 2. – P. 177-190. 2. 1.2.1
21. On evolutionary origin of cancer / A. V. Lichtenstein // *Cancer Cell Int.* – 2005. – V. 5, N 5.
22. The age distribution of cancer and a multi-stage theory of carcinogenesis. / P. Armitage, B. Doll // *British Journal of Cancer.* – 1954. – V. 8, N 1. – P.1-12
23. Resisting Cancer / George Klein // *The Scientist* – 2015. April
<http://www.the-scientist.com/?articles.view/articleNo/42469/title/Resisting-Cancer/>
24. Disruption of oncogene/tumor suppressor networks during human carcinogenesis / K. Munger // *Cancer Invest.* – 2002. – Vol. 20, N 1. – P. 71-81.
25. Cellular oncogenes and multistep carcinogenesis / H. Land, L. F. Parada, R. A. Weinberg // *Science.* – 1983. – V. 18, N 222. – P 771-778.
26. Creation of human tumour cells with defined genetic elements / W. C. Hahn, C. M. Counter, A. S. Lundberg [et al.] // *Nature.* – 1999. – Vol. 400, N 6743. – P. 464-468.
27. Human breast cancer cells generated by oncogenic transformation of primary mammary epithelial cells / B. Elenbaas, L. Spirio, F. Koerner [et al.] // *Genes Dev.* – 2001. – V. 1, N 1. – P. 50-65.
28. Genetic suppression of tumor formation / R. Sager // *Adv. Cancer. Res.* – 1985. – V. 44. – P. 43-68.
29. Genetic suppression of tumor formation: a new frontier in cancer research / R. Sager // *Cancer Res.* – 1986. – V. 46, N 4. – P. 1573-1580.
30. The genetic analysis of malignancy / H. Harris // *J. Cell. Sci. Suppl.* – 1986. – V. 4. – P. 431-444.
31. The analysis of malignancy by cell fusion: the position in 1988 / H. Harris // *Cancer Res.* – 1988. - V. 48, N 12. – P. 3302-3306.

32. The approaching era of the tumor suppressor genes / G. Klein // *Science*. – 1987. – V. 238, N 4833. – P. 1539-1545.
33. Knudson A.G.Jr. Hereditary cancer, oncogenes, and antioncogenes / A.G.Jr. Knudson // *Cancer Res*. – 1985. – V. 45, N 4. – P. 1437-1443
34. TSGene 2.0: an updated literature-based knowledgebase for tumor suppressor genes / M. Zhao, P. Kim, R. Mitra, J. Zhao, Z. Zhao // *Nucleic Acids Res*. – 2015. Epub ahead of print
35. Transposable elements as drivers of genomic and biological diversity in vertebrates / A. Böhne, F. Brunet, D. Galiana-Arnoux [et al.] // *Chromosome Res*. – 2008. – V. 16, N 1. – P. 203-215
36. Misfolding, Aggregation, and Disordered Segments in c-Abl and p53 in Human / A. P. Oliveira, L. P. Rangel, D. C. Costa, J. L. Silva // *Cancer Front Oncol*. – 2015. – V. 5, N 97.
37. hMLH1 and hMSH2 expression correlates with allelic imbalance on chromosome 3p in non-small cell lung carcinomas / G. Xinarianos, T. Liloglou, W. Prime [et al.] // *Cancer Res*. – 2000. – V. 60, N 15. – P. 4216-4221
38. Role of angiogenesis in human tumor dormancy: animal models of the angiogenic switch. / G. N. Naumov, L. A. Akslen, J. Folkman // *Cell Cycle*. – 2006. – V. 5. – P. 1779–1787.
39. A model of human tumor dormancy: an angiogenic switch from the nonangiogenic phenotype / G. N. Naumov, E. Bender, D. Zurakowski, S. Y. Kang, D. Sampson, E. Flynn, R. S. Watnick, O. Straume, L. A. Akslen, J. Folkman, N. Almog // *J. Natl. Cancer Inst*. – 2006. – V. 98. – P. 316–325.
40. Thrombospondins in cancer / S. Kazerounian, K. O. Yee // *J. Cell Mol Life Sci*. – 2008. – V. 65, N 5. – P. 700-712.
41. Dissecting tumor cell invasion: epithelial cells acquire invasive propeties after the loss of uvomorulin-mediated cell-cell adhesion / J. Behrens, M. M. Mareel, F. M. Van Roy, W. J. Birchmeier // *Cell Biol*. – 1989. – V. 108. – P. 2435-2447.

42. Role of urokinase plasminogen activator receptor in thrombospondin 1-mediated tumor cell invasion / D. Albo, D. H. Berger, V. L. Rothman, G. P. Tuszynski // *J. Surg. Res.* – 1999. – V. 82. – P. 331-338.
43. Cadherin signaling: keeping cells in touch / O. Klezovitch, V. Vasioukhin // *F1000Research.* –2015, –V. 4
44. Copy-number variation and association studies of human disease / S. A. McCarroll, D. M. Altshuler // *Nat Genet.* – 2007. – V.39, Suppl. 7. – P. S 37- S 42.
45. Copy number variations in East-Asian population and their evolutionary and functional implications / S. H. Yim, T. M. Kim, H. J. Hu, et al. // *Hum Mol Genet.* – 2010. – V. 19. – P. 1001-1008.
46. Common deletion polymorphisms in the human genome / S. A. McCarroll, T. N. Hadnott, G. H. Perry // *Nat Genet.* – 2006. - V. 38. – P. 86-92.
47. Detection of large-scale variation in the human genome / A. J. Iafrate, L. Feuk, M. N. Rivera, et al // *Nat Genet.* – 2004. –V. 36. – P. 949-951.
48. Large-scale copy number polymorphism in the human genome / J. Sebat, B. Lakshmi, J. Troge, et al // *Science.* – 2004. – V. 305. – P. 525-528.
49. Structural variation in the human genome / L. Feuk, A. R. Carson, S. W. Scherer// *Nat Rev Genet.* – 2006. –V. 7. – P. 85-97.
50. Human Genome Structural Variation Working Group. Completing the map of human genetic variation / E. E. Eichler, D. A. Nickerson // *Nature.* – 2007. – V. 447. – P. 161-165.
51. The Centre for Applied Genomics. Database of genomic variants Toronto (ON): The Centre for Applied Genomics; 2014. [cited 2015 Feb 2]. Available from <http://dgv.tcag.ca/dgv/app/statistics?ref>
52. Detection of structural DNA variation from next generation sequencing data: a review of informatic approaches / H. J. Abel, E. J. Duncavage // *Cancer Genet.* – 2013. – V. 206. – P. 432-440.
53. Frequency of new copy number variation in humans / G. J. Ommen // *Nat Genet.* – 2005. – V. 37. – P. 333-334.

54. Genome-wide association studies for common diseases and complex traits / Hirschhorn J. N, Daly M. J. // *Nat Rev Genet.* – 2005. – V. 6. – P. 95-108.
55. Genome-wide association study of CNVs in 16,000 cases of eight common diseases and 3,000 shared controls / N Craddock, M. E. Hurles, et al. // *Nature.* – 2010. – V. 464. – P. 713-720.
56. Genome-wide association study meta-analysis identifies seven new rheumatoid arthritis risk loci / E. A. Stahl, S. Raychaudhuri, E. F. Remmers // *Nat Genet.* – 2010. – V. 42. P. 508-514.
57. Genetic variants near TNFAIP3 on 6q23 are associated with systemic lupus erythematosus / R. R. Graham, C. Cotsapas, L. Davies, et al. // *Nat Genet.* – 2008. – V. 40. – P. 1059-1061.
58. Genome-wide copy number variation analysis identifies deletion variants associated with ankylosing spondylitis / S. H. Jung, S. H. Yim, H. J. Hu, et al. // *Arthritis Rheumatol.* – 2014. – V. 66. – P. 2103-2112.
59. Deletion variants of RABGAP1L, 10q21.3, and C4 are associated with the risk of systemic lupus erythematosus in Korean women / J. H. Kim, S. H. Jung, J. S. Bae, et al. // *Arthritis Rheum.* – 2013. – V.65. – P. 1055-1063.
60. Genetics of rheumatoid arthritis contributes to biology and drug discovery / Y. Okada, D. Wu, G. Trynka, et al. // *Nature.* – 2014. – V. 506. – P. 376-381.
61. An allele-specific polymerase chain reaction method for the determination of the D85Y polymorphism in the human UDP-glucuronosyltransferase 2B15 gene in a case-control study of prostate cancer / S. L. MacLeod, S. Nowell, J. Plaxco, et al. // *Ann. Surg. Oncol.* – 2000. – V. 7, N 10. – P. 777-782
62. Genome architecture and its roles in human copy number variation / L. Chen, W. Zhou, L. Zhang, F. Zhang // *Genomics Inform.* – 2014. – V. 12. – P.136-144.
63. Mapping and sequencing of structural variation from eight human genomes / J. M. Kidd, G. M. Cooper, W. F. Donahue // *Nature.* – 2008. – V. 453. – P. 56-64.
64. <http://humbio.ru/humbio/canc-horm/00054606.htm>
65. http://www.eupedia.com/genetics/medical_dna_test.shtml

66. International HapMap Consortium. A haplotype map of the human genome. *Nature*. 2005;437:1299–1320.
67. Histone deacetylase: a regulator of transcription / A. P. Wolffe // *Science*. – 1996. – V. 272, N 5260. – P. 371-372
68. How does DNA methylation repress transcription? / S. U. Kass, D. Pruss, A. P. Wolffe // *Trends Genet.* – 1997. – V. 13, N 11. – P. 444-449.
69. DNA methylation and gene function / A. Razin, A. D. Riggs // *Science*. – 1980. – V. 210, N. 4470. – P. 604-610.
70. The impact of chromatin in human cancer: linking DNA methylation to gene silencing / E. Ballestar, M. Esteller // *Carcinogenesis*. – 2002. – V. 23, N 7. – P. 1103-1109
71. Synergy of demethylation and histone deacetylase inhibition in the re-expression of genes silenced in cancer / E. E. Cameron, K. E. Bachman, S. Myohanen, et al. // *Nat. Genet.* – 1999. – V. 21, N 1. – P. 103-107
72. Unmethylated domains in vertebrate DNA / D. N. Cooper, M. H. Taggart, A. P. Bird // *Nucleic Acids Res.* – 1983. – V. 11, N 3. – P. 647-658.
73. A fraction of the mouse genome that is derived from islands of nonmethylated, CpG-rich DNA / A. Bird, M. Taggart, M. Frommer, et al. // *Cell*. – 1985.- V. 40, N 1. – P. 91-99
74. CpG-rich islands and the function of DNA methylation / A. P. Bird // *Nature*. – 1986. – V. 321, N 6067. – P. 209-213
75. CpG islands in vertebrate genomes / M. Gardiner-Garden, M. Frommer // *J. Mol. Biol.* – 1987. – V. 196, N 2. – P. 261-282
76. The distribution of CpG islands in mammalian chromosomes / J. M. Craig, W. A. Bickmore // *Nat. Genet.* – 1994. – V. 7, N 3. – P. 376-382
77. DNA methylation and gene activity / W. Doerfler // *Annu Rev Biochem.* – 1983. – V. 52. – P. 93-124
78. 5-methylcytosine, gene regulation, and cancer / A. D. Riggs, P. A. Jones // *Adv. Cancer Res.* – 1983. – V. 40. – P. 1-30.

79. High sensitivity mapping of methylated cytosines / S. J. Clark, J. Harrison, C. L. Paul et al. // *Nucleic Acids Res.* – 1994. – V. 22, N 15. – P. 2990-2997
80. Asymmetric methylation in the hypermethylated CpG promoter region of the human L1 retrotransposon / D. M. Woodcock, C. B. Lawler, M. E. Linsenmeyer et al. // *J. Biol. Chem.* – 1997. – V. 272, N 12. – P. 7810-7816
81. Cloning and sequencing of a cDNA encoding DNA methyltransferase of mouse cells. The carboxyl-terminal domain of the mammalian enzymes is related to bacterial restriction methyltransferases / T. Bestor, A. Laudano, R. Mattaliano, et al. // *J. Mol. Biol.* – 1988. – V. 203, N 4. – P. 971-983.
82. DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development / M. Okano, D. W. Bell, D. A. Haber, et al. // *Cell.* – 1999. – V. 99, N 3. – P. 247-257
83. Epigenetics: the DNA methylation profile of tissue-dependent and differentially methylated regions in cells / J. Ohgane, S. Yagi, K. Shiota // *Placenta.* – 2008. – Suppl. A. – P. 29-35.
84. CpG-island methylation in aging and cancer / J. P. Issa // *Curr Top Microbiol. Immunol.* – 2000. – V. 249. – P. 101-118.
85. Hypermethylation of the MYOD1 gene is a novel prognostic factor in patients with colorectal cancer / C. Hiranuma, K. Kawakami, K. Oyama et al. // *Int. J. Mol. Med.* – 2004. – V. 13, N 3. – P. 413-417.
86. Age-related methylation in normal colon mucosa differs between the proximal and distal colon in patients who underwent colonoscopy / J. Horii, S. Hiraoka, J. Kato et al. // *Clin. Biochem.* – 2008. – V. 41, N 18. – P. 1440-1448.
87. Alterations in DNA methylation: a fundamental aspect of neoplasia / S. B. Baylin, J. G. Herman, J. R. Graff et al. // *Adv. Cancer Res.* – 1998. – V. 72. – P. 141-196
88. Frequent and selective methylation of p15 and deletion of both p15 and p16 in T-cell acute lymphoblastic leukemia / A. Batova, M. B. Diccianni, J. C. Yu et al. // *Cancer Res.* – 1997. – V. 57, N 5. – P. 832-836.

89. Biallelic inactivation of hMLH1 by epigenetic gene silencing, a novel mechanism causing human MSI cancers / M. L. Veigl, L. Kasturi, J. Olechnowicz et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1998. – V. 95, N 15. – P. 8698-8702
90. Searching for genetic determinants in the new millennium / N. J. Risch // *Nature.* – 2000. – V. 405, N 6788. - P. 847-856.
91. The DNA methylation paradox / P. A. Jones // *Trends Genet.* – 1999. – V. 15, N 10. – P. 34-37
92. Toxicity of 5-aza-2'-deoxycytidine to mammalian cells is mediated primarily by covalent trapping of DNA methyltransferase rather than DNA demethylation / R. Juttermann, E. Li, R. Jaenisch // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1994. – V. 91, N 25. – P. 11797-11801
93. Altering gene expression with 5-azacytidine / P. A. Jones // *Cell.* – 1985. – V. 40, N 3. – P. 485-486.
94. High levels of de novo methylation and altered chromatin structure at CpG islands in cell lines / F. Antequera, J. Boyes, A. Bird // *Cell.* – 1990. – V. 62, N 3. – P. 503-514.
95. Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts / A. P. Feinberg, B. Vogelstein // *Nature.* – 1983. – V. 301, N5895. – P. 89-92.
96. DNA methylation patterns of the calcitonin gene in human lung cancers and lymphomas / S. B. Baylin, J. W. Hoppener, A. de Bustros et al. // *Cancer Res.* – 1986. – V. 46, N 6. – P. 2917-2922
97. Long-range restriction site mapping of mammalian genomic DNA / W. R. Brown, A. P. Bird // *Nature.* – 1986. – V. 322, N 6078. – P. 477-481
98. Construction and characterization of a NotI-BsuE linking library from the human X chromosome / H. P. Arenstorf, R. P. Kandpal, N. Baskaran et al. // *Genomis.* – 1991. – V. 11, N 1. – P. 115-123.
99. Sequence-tagged NotI sites of human chromosome 21: sequence analysis and mapping / M. Hattori, A. Toyoda, H. Ichikawa et al. // *Genomics.* – 1993. – V. 17, N 1. – P. 39-44.

100. Direct construction of a chromosome-specific NotI linking library from flow-sorted chromosomes / M. R. Wallace, J. W. Fountain, A. M. Brereton et al. // *Nucleic Acids Res.* – 1989. – V. 17, N 4. – P. 1665-1677.
101. A novel procedure for selective cloning of NotI linking fragments from mammalian genomes / T. Ito, Y. Sakaki // *Nucleic Acids Res.* – 1988. – V. 16, N 19. – P. 9177-9184.
102. Construction and characterization of a NotI linking library of human chromosome 21 / A. Saito, J. P. Abad, D. N. Wang et al. // *Genomics.* – 1991. – V. 10, N 3. – P. 618-630
103. 5-Methylcytosine content of nuclear DNA during chemical hepatocarcinogenesis and in carcinomas which result / J. N. Lapeyre, F. F. Becker // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1979. – V. 87, N 3. – P. 698-705.
104. DNA hypomethylation in Morris hepatomas / L. J. Lu, E. Randerath, K. Randerath // *Cancer Lett.* – 1983. – V. 19, N 2. – P. 231-239.
105. Global DNA hypomethylation increases progressively in cervical dysplasia and carcinoma / Y. I. Kim, A. Giuliano, K. D. Hatch et al. // *Cancer.* – 1994. – V. 74, N 3. – P. 893-899.
106. The 5-methylcytosine content of DNA from human tumors / M. A. Gama-Sosa, V. A. Slagel, R. W. Trewyn et al. // *Nucleic Acids Res.* – 1983. – V. 11, N 19. – P 6883-6894.
107. Frequent hypomethylation in Wilms tumors of pericentromeric DNA in chromosomes 1 and 16 / G. Z. Qu, P. E. Grundy, A. Narayan et al. // *Cancer Genet. Cytogenet.* – 1999. – V. 109, N 1. - P. 34-39.
108. Hypomethylation of pericentromeric DNA in breast adenocarcinomas / A. Narayan, W. Ji, X. Y. Zhang et al. // *Int. J. Cancer.* – 1998. – V. 77, N 6. – P. 833-838
109. Differential methylation of human LINE-1 retrotransposons in malignant cells / G. Alves, A. Tatro, T. Fanning // *Gene.* – 1996. – V. 176. N 1-2. – P. 39-44.

110. Imprinting of a genomic domain of 11p15 and loss of imprinting in cancer: an introduction / A. P. Feinberg // *Cancer Res.* – 1999. – V. 59, N 7 Suppl. – P. 1743s-1746s
111. Uromodulin: a unique 85-kilodalton immunosuppressive glycoprotein isolated from urine of pregnant women / D. N. Cooper, H. Youssoufian // *Hum. Genet.* – 1985. – V. 229, N 4712. – P. 479-481.
112. 5-Methylcytosine as an endogenous mutagen in the human LDL receptor and p53 genes / W. M. Rideout 3rd, G. A. Coetzee, A. F. Olumi et al. // *Science.* – 1990. – V. 249, N 4974. – P. 1288-1290.
113. Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis / M. S. Greenblatt, W. P. Bennett, M. Hollstein et al. // *Cancer Res.* – 1994. – V. 54, N 18. – P. 4855-4878
114. The unmethylated state of CpG islands in mouse fibroblasts depends on the poly(ADP-ribosylation) process / G. Zardo, P. Caiafa // *J Biol Chem.* – 1998. – V. 273, N 26. – P. 16517-16520.
115. Sp1 elements protect a CpG island from de novo methylation / M. Brandeis, D. Frank, I. Keshet [et al.] // *Nature.* – 1994. – V. 371, N 6496. – P. 435-438.
116. A site to remember: H3K36 methylation a mark for histone deacetylation / J. S. Lee, A. A. Shilatifard // *Mutation Research / Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis.* – 2007. – T. 618. – N. 1. – P. 130–134.
117. Histone lysine methylation and demethylation pathways in cancer / R. A. Varier, H. T. Timmers // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)–Reviews on Cancer.* – 2011. – T. 1815. – №. 1. – P. 75–89.
118. Епігенетичні механізми регуляції роботи генів / В. М. Запорожан, Ю. І. Бажора, М. М. Чеснокова – Одеса: Одес. держ. мед. ун-т, 2008. – 432 с.
119. Histone sumoylation is associated with transcriptional repression / Y. Shiio, R. N. Eisenman // *Proceedings of the National Academy of Sciences.* – 2003. – T. 100. – №. 23. – С. 13225–13230.

120. Экспрессия генов и малые РНК в онкологии / А. М. Дейчман, С. В. Зиновьев, А. Ю. Барышников // Рос биотер журн. – 2009. – Т. 8. – №. 3. – С. 107–118
121. Consistent chromosome 3p deletion and loss of heterozygosity in renal cell carcinoma / G. Kovacs, R. Erlandsson, F. Boldog et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1988. – V. 85, N 5. – P. 1571-1575
122. Genetic and epigenetic alterations during renal carcinogenesis / E. Arai, Y. Kanai Int J Clin Exp Pathol // – 2011. – V. 4, N 1. – P. 58-73
123. Deletion of a DNA sequence at the chromosomal region 3p21 in all major types of lung cancer / K. Kok, J. Osinga, B. Carritt et al. // Nature. – 1987. – V. 330, N 6148. – P. 578-581.
124. Role of chromosome 3p12–p21 tumour suppressor genes in clear cell renal cell carcinoma: analysis of VHL dependent and VHL independent pathways of tumorigenesis / A. Martinez, P. Fullwood, K. Kondo, T. Kishida, M. Yao, E. R. Maher, F. Latif // Clin Pathol: Mol Pathol. – 2000. – V. 53. – P. 137–144
125. An Integrated Physical and Gene Map of the 3.5-Mb Chromosome 3p21.3 (AP20) Region Implicated in Major Human Epithelial Malignancies / A. Protopopov, V. I. Kashuba, V. I. Zabarovska, O. V. Muravenko, M. I. Lerman, G. Klein, E. R. Zabarovsky Cancer research. – 2003. – V. 63. – P. 404–412.
126. Loss of Heterozygosity and Copy Number Abnormality in Clear Cell Renal Cell Carcinoma Discovered by High-Density Affymetrix 10K Single Nucleotide Polymorphism Mapping Array / M. I. Toma, M. Grosser, A. Herr, D. E. Aust, A. Meye, C. Hoefling, S. Fuessel, D. Wuttig, M. P. Wirth, G. B. Baretton // – 2008. – V. 10, N 7. – P 634-642.
127. Introduction of normal chromosome 3p modulates the tumorigenicity of a human renal cell carcinoma cell line YCR / M. Shimizu, J. Yokota, N. Mori et al. // Oncogene. – 1990. – V. 5, N 2. – P. 185-194.
128. Restoration of the cellular senescence program and repression of telomerase by human chromosome 3 / H. Ohmura, H. Tahara, M. Suzuki [t al.]// Jpn. J. Cancer Res. – 1995. – V. 86, N 10. – P. 899-904.

129. Transfer of human chromosome 3 to an ovarian carcinoma cell line identifies three regions on 3p involved in ovarian cancer / P. Rimessi, F. Gualandi, C. Morelli et al. // *Oncogene*. – 1994. – V. 9, N 12. – P. 3467-3474.
130. Suppression of tumorigenicity of A549 lung adenocarcinoma cells by human chromosomes 3 and 11 introduced via microcell-mediated chromosome transfer / H. Satoh, P. W. Lamb, J. T. Dong et al. // *Mol. Carcinog.* – 1993. – V. 7, N 3. – P. 157-164.
131. Functional evidence for a nasopharyngeal carcinoma tumor suppressor gene that maps at chromosome 3p21.3 / Y. Cheng, N. E. Poulos, M. L. Lung et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 1998. – V. 95, N 6. – P. 3042-3047
132. A functional investigation of tumor suppressor gene activities in a nasopharyngeal carcinoma cell line HONE1 using a monochromosome transfer approach / Y. Cheng, E. J. Stanbridge, H. Kong et al. // *Genes Chromosomes Cancer*. – 2000. – 1. 28, N 1. – P. 82-91
133. A tumor suppressor locus within 3p14-p12 mediates rapid cell death of renal cell carcinoma in vivo / Y. Sanchez, A. el-Naggar, S. Pathak et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 1994. – V. 9, N 8. – P. 3383-3387
134. Definition of a tumor suppressor locus within human chromosome 3p21-p22 / A. M. Killary, M. E. Wolf, T. A. Giambenedi et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 1992. – V. 89, N 22. – P. 10877-10881.
135. An 80 Kb P1 clone from chromosome 3p21.3 suppresses tumor growth in vivo / M. C. Todd, R. H. Xiang, D. K. Garcia et al. // *Oncogene*. – 1996. – V. 13, N 11. – P. 2387-2396
136. Evidence for a putative telomerase repressor gene in the 3p14.2-p21.1 region / H. Tanaka, M. Shimizu, I. Horikawa et al. // *Genes Chromosomes Cancer*. – 1998. – V. 23, N 2. – P. 123-133.
137. Telomerase repressor sequences on chromosome 3 and induction of permanent growth arrest in human breast cancer cells / A. P. Cuthbert, J. Bond, D. A. Trott et al. // *J. Natl. Cancer. Inst.* – 1999. – V. 91, N 1. – P. 37-45.

138. Deletions of the short arm of chromosome 3 in solid tumors and the search for suppressor genes / K. Kok, S. L. Naylor, C. H. Buys // *Adv. Cancer Res.* – 1997. – V. 71. – P. 27-92.
139. Comparative allelotyping of the short arm of human chromosome 3 in epithelial tumors of four different types / E. Braga, E. Pugacheva, I. Bazov et al. // *FEBS Lett.* – 1999. – V. 454, N 3. – P. 215-219.
140. Critical tumor-suppressor gene regions on chromosome 3P in major human epithelial malignancies: allelotyping and quantitative real-time PCR / E. Braga, V. Senchenko, I. Bazov et al. // *Int. J. Cancer.* – 2002. – V. 100, N 5. – P. 534-541.
141. High resolution chromosome 3p allelotyping of human lung cancer and preneoplastic/preinvasive bronchial epithelium reveals multiple, discontinuous sites of 3p allele loss and three regions of frequent breakpoints / I. I. Wistuba, C. Behrens, A. K. Virmani et al. // *Cancer Res.* – 2000. – V. 60, N 7. – P. 1949-1960.
142. Genome-wide allelotyping of lung cancer identifies new regions of allelic loss, differences between small cell lung cancer and non-small cell lung cancer, and loci clustering / L. Girard, S. Zochbauer-Muller, A. K. Virmani et al. // *Cancer Res.* – 2000. – V. 60, N 17. – P. 4894-4906
143. Combined Classical Cytogenetics and Microarray-based Genomic Copy Number Analysis Reveal Frequent 3;5 Rearrangements in Clear Cell Renal Cell Carcinoma / J. Pei, M. M. Feder¹, T. Al-Saleem, Z. Liu, A. Liu, G. R. Hudes, R. G. Uzzo¹, J. R. Testa // *Genes Chromosomes Cancer.* – 2010. – V. 49, N 7. – P. 610-619.
144. Allelic loss of 3p25 associated with alterations of 5q22.3 approximately q23.2 may affect the prognosis of conventional renal cell carcinoma / K. Nagao, S. Yamaguchi, H. Matsuyama, Y. Korenaga, H. Hirata, S. Yoshihiro, K. Fukunaga, K. Oba, K Naito // *Cancer Genet Cytogenet.* – 2005. – V. 160. – P. 43-48.
145. Histopathology and molecular genetics of renal tumors: toward unification of a classification system / N. R Zambrano, I. A Lubensky, M. J Merino, M. W Linehan, M. M Walther // *J. Urol.* – 1999. – V. 162. – P. 1246-1258.

146. Molecular mechanisms of lung cancer. Interaction of environmental and genetic factors. Giles F. Filley Lecture / T. R. Devereux, J. A. Taylor, J. C. Barrett // *Chest*. – 1996. – V. 109, N 3. – P. 14S-19S.
147. Combined LOH/CGH analysis proves the existence of interstitial 3p deletions in renal cell carcinoma / A Alimov, M. Kost-Alimova, J. Liu, C. Li, U. Bergerheim, S. Imreh, G Klein, E. R. Zabarovsky // *Oncogene*. – 2000. – V. 19. – P. 1392-1399.
148. Three distinct regions involved in 3p deletion in human lung cancer / K. Hibi, T. Takahashi, K. Yamakawa, R. Ueda., Y. Sekido, Y. Ariyoshi, M. Suyama, H. Takagi, Y. Nakamura, T. Takahashi // *Oncogene*. – 1992. – V. 7, N 7. – P. 445-449.
149. Allele-specific chromosome 3p deletions occur at an early stage in the pathogenesis of lung carcinoma / J Hung, Y. Kishimoto, K. Sugio, A. Virmani, D. D. McIntire, J. D. Minna, A. F. Gazdar // *J. Am. Med. Assoc.* – 1995. – V. 273, N 24. – P. 1908.
150. Deletion of Chromosome 3p14.2-p25 Involving the VHL and FHIT Genes in Conventional Renal Cell Carcinoma / F. Sukosd, N. Kuroda, T. Beothe, A. P. Kaur, G. Kovacs // *Cancer research*. – 2003. – V. 63, – P.455-457.
151. Frequent breakpoints in the region surrounding FRA3B in sporadic renal cell carcinomas / V Shridhar, L. Wang, R. Rosati, W. Paradee, R. Shridhar, C. Mullins, W. Sakr, D. Grignon, O. J. Miller, Q. C. Sun, J. Petros, D. I. Smith // *Oncogene* 1997. – V. 14.– P. 1269-1277.
152. Hypermethylation of the 5'CpG island of the FHIT gene in clear cell renal carcinomas / S. Kvasha, V. Gordiyuk, A. Kondratov, D. Ugryn, Y. M. Zgonnyk, A. V. Rynditch, A. F. Vozianov. *Cancer Lett.* – 2008. – V. 265. – P. 250-257
153. Identification of the von Hippel-lindau tumor-suppressor protein as part of an active E3 ubiquitin ligase complex / K. Iwai, K. Yamanaka, T. Kamura et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 1999. – V. 96, N 22. – P. 12436-12441

154. Identification of the von Hippel-Lindau disease tumor suppressor gene / F. Latif, K. Tory, J. Gnarra et al. // *Science*. – 1993. – V. 260, N 5112. – P. 1317-1320
155. Kidney cancer: identification of novel targets for therapy / R. H Weiss, P.Y. Lin // *Kidney Int.* - 2006. – V.69. – P. 224-232.
156. Genomic alterations and instabilities in renal cell carcinomas and their relationship to tumor pathology / C. A. Thrash-Bingham, H. Salazar, J. J. Freed, R. E. Greenberg, K. D. Tartof // *Cancer Res.* – 1995. – V. 55. – P. 6189-6195.
157. Expression of FOXP1 and Colorectal Cancer Prognosis / L. De Smedt, S. Palmans, O. Govaere, M. Moisse, B. Boeckx , G. De Hertogh, H. Prenen, E. Van Cutsem, S. Tejpar, T. Tousseyn, X. Sagaert // *Lab Med.* – 2015. – V. 46, N 4. – P. 299-311.
158. Quantitative detection of methylation of FHIT and BRCA1 promoters in the serum of ductal breast cancerpatients / L. Liu, L. Sun, C. Li, X. Li, Y. Zhang, Y. Yu, W. Xia // *Biomed Mater Eng.* – 2015. – V. 17, N 26. Suppl 1:S2217-22.
159. FUS1 acts as a tumor-suppressor gene by upregulating miR-197 in human glioblastoma / J Xin, X. K. Zhang, D. Y. Xin, X. F. Li, D. K. Sun, Y. Y. Ma, L. Q. Tian // *Oncol Rep.* – 2015. – V.34, N 2. – P. 868-76.
160. AID, p53 and MLH1 expression in early gastric neoplasms and the correlation with the background mucosa / S. Kawata, K. Yashima, S. Yamamoto, S. Sasaki, Y. Takeda, A. Hayashi, K. Matsumoto, K. Kawaguchi, K. Harada, Y. Murawaki // *Oncol Lett.* – 2015. – V. 10, N 2. – P. 737-743.
161. Decreased Expression of SETD2 Predicts Unfavorable Prognosis in Patients With Nonmetastatic Clear-Cell Renal Cell Carcinoma / W. Liu, Q. Fu, H. An, Y. Chang, W. Zhang, Y. Zhu, L. Xu, J. Xu // *Medicine (Baltimore)* – 2015. - V.94, N 45. e2004.
162. Downregulation of nitrogen permease regulator like-2 activates PDK1-AKT1 and contributes to the malignant growth of glioma cells / N. Huang, S. Cheng, X. Mi, Q. Tian, Q. Huang, F. Wang, Z. Xu, Z. Xie, J. Chen, Y. Cheng // *Mol Carcinog.* – 2015. – V. 12. Epub ahead of print.

163. Epigenetic inactivation of a RAS association domain family protein from the lung tumour suppressor locus 3p21.3 / R. Dammann, C. Li, J. H. Yoon [et al.] // *Nat. Genet.* – 2000. – V. 25, N 3. – P. 315-319.
164. Hypermethylation of the cpG island of Ras association domain family 1A (RASSF1A), a putative tumor suppressor gene from the 3p21.3 locus, occurs in a large percentage of human breast cancers / R. Dammann, G. Yang, G.P. Pfeifer // *Cancer Res.* – 2001. – V. 61, N 7. – P. 3105-3109.
165. CpG methylation profiling in VHL related and VHL unrelated renal cell carcinoma / F. E. McRonald, M. R. Morris, D. Gentle, L. Winchester, D. Baban, J. Ragoussis, N. W. Clarke, M. D. Brown, T. Kishida, M. Yao, F. Latif, E. R. Maher. *Mol Cancer.* – 2009. – V. 8. – P. 31.
166. DNA methylation and expression of LINE-1 and HERV-K provirus sequences in urothelial and renal cell carcinomas / A. R. Florl, R. Löwer, B. J. Schmitz-Dräger, W. A. Schulz // *Br J Cancer.* – 1999. – V. 80. – P. 1312-1321.
167. Prognostic relevance of global histone H3 lysine 4 (H3K4) methylation in renal cell carcinoma / J. Ellinger, P. Kahl, C. Mertens, S. Rogenhofer, S. Hauser, W. Hartmann, P. J. Bastian, R. Büttner, S. C. Müller, A. Ruecker // *Int J Cancer.* – 2010. – V. 127, N 10. – P. 2360-2366.
168. Histone lysine methylation and demethylation pathways in cancer / R. A. Varier, H. T. Timmers // *Biochimica et Biophysica Acta.* – 2011. – V. 1815, N 1. – P. 75–89.
169. Systematic sequencing of renal carcinoma reveals inactivation of histone modifying genes / G. L. Dalgliesh, K. Furge, C. Greenman, L. Chen, G. Bignell, A. Butler, H. Davies, S. Edkins, C. Hardy, C. Latimer, J. Teague, J. Andrews, S. Barthorpe, D. Beare, G. Buck, P. J. Campbell, S. Forbes, M. Jia, D. Jones, H. Knott, C. Y. Kok, K. W. Lau, C. Leroy, M.L. Lin, D. J. McBride, M. Maddison, S. Maguire, K. McLay, A. Menzies, T. Mironenko, L. Mulderrig, L. Mudie, S. O'Meara, E. Pleasance, A. Rajasingham, R. Shepherd, R. Smith, L. Stebbings, P. Stephens, G. Tang, P. S. Tarpey, K. Turrell, K. J. Dykema, S. K. Khoo, D. Petillo,

B. Wondergem, J. Anema, R. J. Kahnoski, B. T. Teh, M. R. Stratton, P. A. Futreal // *Nature*. – 2010. – V. 463. – P 360-363.

170. Gene ontology: tool for the unification of biology The Gene Ontology Consortium / M. Ashburner, C. A. Ball, J. A. Blake, D. Botstein, H. Butler, J. M. Cherry, A. P. Davis, K. Dolinski, S. S. Dwight, J. T. Eppig, et al. *Nat. Genet.* – 2000. – V. 25, N 1. – P. 25-29

171. Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists / Da W. Huang, B. T. Sherman, R. A. Lempicki // *Nucleic Acids Res.* – 2009. –V. 37, N 1. – P. 1–13.

172. Cancer genome sequencing: a review / E. R. Mardis, R. K. Wilson // *Hum Mol Genet.* – 2009. – V. 18(R2) – P. R163–R168.

173. Integration and analysis of genome-scale data from gliomas / G. Riddick, H. A. Fine // *Nat Rev Neurol.* – 2011. – V. 7, N 8. – P. 439-450.

174. Молекулярная диагностика опухолей: фундаментальные основы и практическое применение / Монография С.П. Осинский, Д.Ф. Глузман, Й. Клифф, Н.А. Гизе, Г. Фрисс, 2007 // Киев, DIA. – 2007. – 248с.

175. A systematic review of predictive and prognostic biomarkers for VEGF-targeted therapy in renal cell carcinoma / T. Funakoshi, Ch. H. Lee, J. J. Hsieh // *Cancer Treat Rev.* – 2014. – V. 40, N 4. – P. 533-547.

176. Management of metastatic kidney cancer in the era of personalized medicine / J. G. Monzona, D. Y. Heng // *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences.* – 2014. – V. 51, N 2. – P. 85-97.

177. Overexpression of Carbonic Anhydrase IX is a Dismal Prognostic Marker in Breast Carcinoma in Egyptian Patients / R. M. Samaka, M. M. Abd El-Wahed, D. R. Al Sharaky, M. A. Shehata, S. E. Hegazy, M. A. Aleskandarany // *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* – 2015. Epub ahead of print

178. Serum Tumor Marker Use in Patients With Advanced Solid Tumors / M. K. Accordino, J. D. Wright, S. Vasan, A. I. Neugut, A. Tergas, J. C. Hu, D. L. Hershman // *J Oncol Pract.* – 2015. Epub ahead of print.

179. Prognostic Value of Serum Tumor Markers in Medullary Thyroid Cancer Patients Undergoing Vandetanib Treatment / R. A. Werner, J. S. Schmid, D. O. Muegge, K. Lückerath, T. Higuchi, H. Hänscheid, I. Grelle, C. Reiners, K. Herrmann, A. K. Buck, C. Lapa // *Medicine (Baltimore)*. – 2015. - V. 94, N 45. e2016.
180. Cancer stratification by molecular imaging / J. Weber, U. Haberkorn, W. Mier // *Int J Mol Sci*. – 2015. – V. 16, N 3. – P. 4918-4946.
181. Overexpression of HE4 (human epididymis protein 4) enhances proliferation, invasion and metastasis of ovarian cancer / L. Zhu, H. Zhuang, H Wang, M. Tan, C. L. Schwab, L. Deng, J. Gao, Y. Hao, X. Li, S. Gao, J. Liu, B Lin // *Oncotarget*. – 2015. Epub ahead of print.
182. Principles in the design of ligand-targeted cancer therapeutics and imaging agents / M. Srinivasarao, Ch. V. Galliford, Ph. S. Low // *Nature Reviews Drug Discovery*. – 2015. – V. 14. – P. 203–219
183. From molecular classification to targeted therapeutics: the changing face of systemic therapy in metastatic gastroesophageal cancer / A. Murphy, R. J. Kelly // *Gastroenterol Res Pract*. – 2015. – V. 2015, Article ID 896560, 11 pages
184. In search of suitable reference genes for gene expression studies of human renal cell carcinoma by real-time PCR / M. Jung, A. Ramankulov, J. Roigas, M. Johannsen, M. Ringsdorf, G. Kristiansen, K. Jung // *BMC Mol. Biol.* – 2007. –V. 8. – P. 47
185. Discovery of frequent homozygous deletions in chromosome 3p21.3 LU CA and AP20 regions in renal, lung and breast carcinomas / V. N. Senchenko, J. Liu, W. Loginov, et al. // *Oncogene*. – 2004. – V. 23, N 34. – P. 5719-5728.
186. Введение в популяционную генетику / Ч. Лі. – М.: Мир, 1978. – 555 с.
187. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportions for multiple alleles / Guo S.W., Thompson E.A // *Biometrics*. – 1992. – Vol. 48. – P. 361-372.
188. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals / Nei M. // *Genetics*. – 1978. – Vol. 89. – P. 583-590.

189. Testing heterozygote excess and deficiency / Rousset F., Raymond M. // *Genetics*. – 1995. – Vol. 140. – P.1413-1419.
190. Биометрия / Лакін Г.Ф. - М.: Высш. шк., 1980.-291 с.
191. Differential expression of CHL1 Gene during development of major human cancers / V. N. Senchenko, G. S. Krasnov, A. A. Dmitriev et al. // *PLoS ONE*. – 2011. – V. 6, N 3. IDe15612.
192. Genetic and epigenetic analysis of non-small cell lung cancer with NotI-microarrays / A. A. Dmitriev, V. I. Kashuba, K. Haraldson et al. // *Epigenetics*. – 2012. - V. 7, N 5. – P. 502–513.
193. *Primer of Biostatistics* / S. A. Glantz // New York, NY, USA - 2005.
194. NotI subtraction and NotI-specific microarrays to detect copy number and methylation changes in whole genomes / J. Li, A. Protopopov, F. Wang, et al. // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2002. – V. 99, N 16. – P. 10724-10729.
195. Genetic and epigenetic analysis of non-small cell lung cancer with NotI-microarrays / A. A. Dmitriev, V. I. Kashuba, K. Haraldson et al. // *Epigenetic*. – 2012. – V. 7, N. 5. – P. 502-513.
196. NotI microarrays: novel epigenetic markers for early detection and prognosis of high grade serous ovarian cancer / V. I. Kashuba, A. A. Dmitriev, G. S. Krasnov, et al. // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2012. – V. 13, N 10. – P. 13352-13377.
197. V. N. Senchenko, N. P. Kisseljova, T. A. Ivanova, et al. / Novel tumor suppressor candidates on chromosome 3 revealed by NotI-microarrays in cervical cancer // *Epigenetics*. – 2013. - V. 8, N. 4.
198. The fundamental role of epigenetic events in cancer / P. A. Jones, S. B. Baylin // *Nature Reviews Genetics*. – 2002. – V. 3, N. 6. – P 415-428.

199. Inhibition of NF- κ B Activity by I κ B β in Association with κ B-Ras / Y. Chen, S. Vallee, J. Wu, D. Vu, J. Sondek, G. Ghosh // *Mol Cell Biol.* – 2004. – V 24, N 7. – P. 3048-3056.
200. A continuum model for tumour suppression / A. H. Berger, A. G. Knudson, P. P. Pandolfi // *Nature.*–2011. – V. 476, N 7359. – P. 163-169.
201. DNA microarray technology in cancer research / D. A. Rew // *Eur. J. Surg. Oncol.* – 2001. – V. 27, N 5. – P. 504-508.
202. Epigenetic alterations of chromosome 3 revealed by NotI-microarrays in clear cell renal cell carcinoma / A. A. Dmitriev, E. E. Rudenko, A. V. Kudryavtseva, G. S. Krasnov, V. V. Gordiyuk, N. V. Melnikova, E. O. Stakhovsky, O. A. Kononenko, L. S. Pavlova, T. T. Kondratieva, B. Y. Alekseev, E. A. Braga, V. N. Senchenko, V. I. Kashuba // *BioMed Research International.* – 2014. 9 p
203. NF-kappaB as a critical link between inflammation and cancer / M. J. Karin // *Cold Spring Harb Perspect Biol.* – 2009. – V. 1, N 5. a000141..
204. Nuclear factor-kappaB in cancer development and progression / M. J. Karin // *Nature.* – 2006. – V. 441, N 7092. – P. 431-436.
205. Control of oncogenesis and cancer therapy resistance by the transcription factor NF-kappaB / A. S. Baldwin // *Clin Invest.* – 2001. – V. 107, N 3. – P. 241-246
206. Molecular cloning of PP2C η , a novel member of the protein phosphatase 2C family / K. Komaki, K. Katsura, M. Ohnishi, M. G. Li, M. Sasaki, M. Watanabe, T. Kobayashi, S. Tamura // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression.* – 2003. – V. 1630, N 2-3. – P. 130-137.
207. Protein kinases and phosphatases in the control of cell fate / A. Bononi, Ch. Agnoletto, E. Marchi, S. Marchi, S. Patergnani, M. Bonora, C. Giorgi, S. Missiroli, F. Poletti, A. Rimessi, P. Pinton // *Enzyme Res.* – 2011. Epub Sep 4.

208. Внутриклеточная сигнализация / В. П. Зинченко, Л. П. Долгачева // Пушино. - 2003.- 84с
209. A mechanism for the suppression of interleukin-1-induced nuclear factor kappaB activation by protein phosphatase 2Ceta-2 / T. Henmi, K. Amano, Y. Nagaura, et al. // *Biochem J.* – 2009. – V. 423, N 1. – P. 71–78.
210. Identification and characterization of human PRICKLE1 and PRICKLE2 genes as well as mouse Prickle1 and Prickle2 genes homologous to Drosophila tissue polarity gene prickle / M. Katoh, M. Katoh // *Int J Mol Med.* – 2003. – V. 11, N 2. – P. 249-256.
211. Mink1 regulates β -catenin-independent Wnt signaling via Prickle phosphorylation / A. M. Daulat, O. Luu, A. Sing, L. Zhang, J. L. Wrana, H McNeill, R. Winklbauer, S. Angers // *Mol Cell Biol.* – 2012. – V. 32, N 1. – P. 173-85.
212. Planar polarity from flies to vertebrates / M Fanto, H. McNeill // *J. Cell. Sci.* – 2004. – V. 1, N 117. – P. 527-33.
213. Expression of planar cell polarity genes during development of the mouse CNS / F. Tissir, A. M. Goffinet // *Eur. J. Neurosci.* – 2006. – V 23, N3. – P. 597-607.
214. The balance between isoforms of the prickle LIM domain protein is critical for planar polarity in Drosophila imaginal discs / Gubb D, Green C, Huen D, et al. // *Genes Dev.* – 1999. – V. 13, N 17. – P. 2315-2327
215. Genetic Evidence That Drosophila frizzled Controls Planar Cell Polarity and Armadillo Signaling by a Common Mechanism / M. Povelones, R. Howes, M. Fish, R. Nusse // *Genetics.* - 2005. - V. 171, N 4. – P. 1643-1654.
216. Coactivation of Rac and Rho by Wnt/Frizzled signaling is required for vertebrate gastrulation / R. Habas, I. B. Dawid, X. He // *Genes Dev.* – 2003. – V. 17, N 2. – P. 295-309.

217. Mouse *prickle1*, the homolog of a PCP gene, is essential for epiblast apical-basal polarity / H. Tao, M. Suzuki, H. Kiyonari, T. Abe, T. Sasaoka, N. Ueno // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2009. – V. 106, N 34. – P. 14426-14431.
218. Mutations in *prickle* orthologs cause seizures in flies, mice, and humans / H. Tao, J. R. Manak, L. Sowers, X. Mei, H. Kiyonari // *Am J Hum Genet.* – 2011. – V. 88, N 2. – P. 138-149.
219. *Prickle2* is localized in the postsynaptic density and interacts with PSD-95 and NMDA receptors in the brain / Y. Hida, M. Fukaya, A. Hagiwara, M. Deguchi-Tawarada, T. Yoshioka, I. Kitajima // *J Biochem.* – 2011. – V. 149, N 6. – P. 693-700.
220. Metabolic regulation and function of glutathione peroxidase-1 / X. G. Lei, W. H. Cheng, J. P. McClung // *Annu Rev Nutr.* – 2007. – V 27. – P. 41-61.
221. Glutathione peroxidase-1 in health and disease: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities / E. Lubos, J. Loscalzo, D. Handy // *Antioxid Redox Signal.* – 2011. – V. 15. – P. 1957-1997.
222. Unique features of selenocysteine incorporation function within the context of general eukaryotic translational processes / A. L. Small-Howard, M. J. Berry // *Biochem Soc Trans.* – 2005. – V. 33. – P. 1493-1497.
223. Regulation and function of selenoproteins in human disease / F. P. Bellinger, A. V. Raman, M. A. Reeves, M. J. Berry // *Biochem J.* – 2009. – V.422. – P. 11–22.
224. Eukaryotic initiation factor 4a3 is a selenium-regulated RNA-binding protein that selectively inhibits selenocysteine incorporation / M. E. Budiman, J. L. Bubenik, A. C. Miniard, L. M. Middleton, C. A. Gerber, A. Cash, D. M. Driscoll // *Mol Cell.* – 2009. – V. 35, N 4. – P. 479-489.
225. Threading the needle: getting selenocysteine into proteins / J. Donovan, P. R. Copeland // *Antioxid Redox Signal.* – 2010. – V. 12. – P. 881-892.

226. The redox state of SECIS binding protein 2 controls its localization and selenocysteine incorporation function / L. V. Papp, J. Lu, F. Striebel, D. Kennedy, A. Holmgren, K. K. Khanna // *Mol Cell Biol.* – 2006. – V. 26. – P. 4895-4910.
227. The redox state of SECIS binding protein 2 controls its localization and selenocysteine incorporation function / L. V. Papp, J. Lu, F. Striebel, D. Kennedy, A. Holmgren, K. K. Khanna // *Mol Cell Biol.* – 2006. – V. 26. – P. 4895-4910.
228. Selenium-containing amino acids as direct and indirect antioxidants / A. S. Rahmanto, M. J. Davies // *IUBMB Life.* – 2012. – V. 64, N. 11. – P. 863-871.
229. Selenocysteine versus cysteine reactivity: a theoretical study of their oxidation by hydrogen peroxide / B. Cardey, M. Enescu // *J Phys Chem.* – 2007. – V. A 111. – P. 673-678.
230. Identification of oxygen responsive elements in the 5'-flanking region of the human glutathione peroxidase gene / D. B. Cowan, R. D. Weisel, W. G. Williams, D. A. Mickle // *J Biol Chem.* – 1993. – V. 268. – P. 26904-26910.
231. The characterization and purification of a human transcription factor modulating the glutathione peroxidase gene in response to oxygen tension / F. Merante, S. M. Altamentova, D. A. Mickle, R. D. Weisel, B. J. Thatcher, B. M. Martin // *Mol Cell Biochem.* – 2002. – V. 229. – P. 73-83.
232. Hyperoxia, unlike phorbol ester, induces glutathione peroxidase through a protein kinase C-independent mechanism / L. Jornot, A. F. Junod // *Biochem J.* – 1997. – V. 326, N 1. – P. 117-123.
233. Molecular consequences of genetic variations in the glutathione peroxidase 1 selenoenzyme / P. Zhuo, M. Goldberg, L. Herman, B. S. Lee, H. Wang // *Cancer Res.* – 2009. – V. 69, N 20. – P. 8183-8190.
234. Genetic variants of GPX1 and SOD2 and breast cancer risk at the Ontario site of the Breast Cancer Family Registry / J. A. Knight, U. V. Onay, S. Wells, H. Li, E. J. Shi, I. L. Andrulis, H. Ozcelik // *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* – 2004. – V. 13, N 1. – P. 146-149.

235. Association between the GCG polymorphism of the selenium dependent GPX1 gene and the risk of young onset prostate cancer / Z. Kote-Jarai, F. Durocher, S. M. Edwards, R. Hamoudi, R. A. Jackson, A. Ardern-Jones // *Prostate Cancer Prostatic Dis.* – 2002. V. 5. – P. 189-192.
236. The antioxidant enzyme GPX1 gene polymorphisms are associated with low BMD and increased bone turnover markers / S. J. Mlakara, J. Osredkara, J. Prezeljb, J. Marcc // *Dis. Markers.* – 2010. – V. 29, N 2. – P. 71-80.
237. Modified expression of plasmaglutathione peroxidase and manganese superoxide dismutase in human renal cell carcinoma / C. Sarto, S. Frutiger, F. Cappellano, et al. // *Electrophoresis.* – 1999. – V. 20. – P. 3458-3466.
238. Human kidney proximal tubules are the main source of plasma glutathione peroxidase / N. Avissar, D. B. Ornt, Y. Yagil, S. Horowitz, R. H. Watkins // *Am J Physiol.* – 1994. – V. 266, N Pt 1. – P. C367-375.
239. Extracellular glutathione peroxidase is secreted basolaterally by human renal proximal tubule cells / J. C .Whitin, S. Bhamre, D. M. Tham, H. J. Cohen // *Am J Physiol Renal Physiol.* – 2002. – V. 283, N 1. – P. F20-8.
240. Glutathione peroxidase 3 is a candidate mechanism of anticancer drug resistance of ovarian clear cell adenocarcinoma / Y. Saga, M. Ohwada, M Suzuki, R. Konno, J. Kigawa, *Oncology Reports.* – 2008. – V. 20. – P. 1299-1303.
241. GPx3 promoter hypermethylation is a frequent event in human cancer and is associated with tumorigenesis and chemotherapy response / B. Chen, X. Rao, M. G. House, K. P. Nephew, K. J. Cullen, Z. Guo // *Cancer Lett.* – 2011. – V. 309, N 1. – P. 37-45.
242. Determinants of human plasma glutathione peroxidase (GPx-3) expression / C.Bierl, B. Voetsch, R. C. Jin, D. E. Handy, J. Loscalzo // *Biol Chem.* – 2004. – V. 279, N 26. – P. 26839-26845.
243. The human plasma glutathione peroxidase-encoding gene: organization, sequence and localization to chromosome 5q32 / Y. Shinichi, S. Hiroshi, T.

Yasushia, A. Kaori, K. Noboru, M. Tetsuyaa // *Gene*. – 1994. V. 145, N 2. – P. 293-297.

244. Expression of plasma glutathione peroxidase in human liver in addition to kidney, heart, lung, and breast in humans and rodents / F. F. Chu, R. S. Esworthy, J. H. Doroshov, K. Doan, X. F. Liu // *Blood*. – 1992. – V. 79, N 12. – P. 3233-3238.

245. Glutathione peroxidases in different stages of carcinogenesis / Brigelius-Flohé R, Kipp A. // *Biochim Biophys Acta*. – 2009. – V. 1790, N 11. – P.1555-1568.

246. Glutathione Peroxidase 3, Deleted or Methylated in Prostate Cancer, Suppresses Prostate Cancer Growth and Metastasis / Y. P. Yu, G. Yu, G. Tseng, K. Cieply, J. Nelson // *Cancer Res*. – 2007. – V. 67, N 17. – P. 8043-8050.

247. Hypermethylation and loss of expression of glutathione peroxidase-3 in Barrett's tumorigenesis / O. J. Lee, R. Schneider-Stock, P. A. McChesney, D. Kuester, A. Roessner // *Neoplasia*. – 2005. – V. 7, N 9. – P. 854-861.

248. Reactivity of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase with membrane and lipoprotein lipidhydroperoxides / M. Maiorino, J. P. Thomas, A. W. Girotti, F. Ursini // *Free Radic Res Commun*. – 1991. – V. 12-13, N 1. – P. 131-135.

249. The selenoprotein GPX4 is essential for mouse development and protects from radiation and oxidative damage insults / L. J. Yant, Q. Ran, L. Rao, H. Van Remmen, T. Shibatani // *Free Radic Biol Med*. – 2003. – V. 34, N 4. – P. 496-502.

250. Early embryonic lethality caused by targeted disruption of the mouse PHGPx gene / H. Imai, F. Hirao, T. Sakamoto, K. Sekine, Y. Mizukura // *Biochem Biophys Res Commun*. – 2003. – V. 305, N 2. – P. 278-286.

251. Mitochondrial glutathione peroxidase 4 disruption causes male infertility / M. Schneider, H. Förster, A. Boersma, A. Seiler, H. Wehnes, et al // *FASEB J*. – 2009. – V. 23, N 9. – P. 3233-3242.

252. . Glutathione peroxidase 4 senses and translates oxidative stress into 12/15-lipoxygenase dependent- and AIF-mediated cell death / A. Seiler, M. Schneider, H. Förster, S. Roth, E. K. Wirth, et al // *Cell Metab.* – 2008. – V. 8, N 3. – P. 237-248.
253. Mitochondrial regulation of cell death: processing of apoptosis-inducing factor (AIF) / E. Norberg, S. Orrenius, B. Zhivotovsky // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2010. – V. 396. – P. 95-100.
254. Cysteine mutant of mammalian GPx4 rescues cell death induced by disruption of the wild-type selenoenzyme / A. M. Mannes, A. Seiler, V. Bosello, M. Maiorino, M. Conrad // *FASEB J.* – 2011. – V. 25. – P. 2135-2144.
255. Delineating the role of glutathione peroxidase 4 in protecting cells against lipid hydroperoxide damage and in Alzheimer's disease / M. H. Yoo, X. Gu, X. M. Xu, J. Y. Kim, B. A. Carlson, et al // *Antioxid. Redox Signal.* – 2010. – V. 12. – P. 819–827.
256. Reduction in glutathione peroxidase 4 increases life span through increased sensitivity to apoptosis / Q. Ran, H. Liang, Y. Ikeno, et al. // *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med.* – 2007. – V. 62, N 9. – P. 932-942.
257. Cellular and subcellular localization of gastrointestinal glutathione peroxidase in normal and malignant human intestinal tissue/ S. Florian, K. Wingler, K. Schmehl, G. Jacobasch, O. J. Kreuzer, W. Meyerhof, R. Brigelius-Flohé // *Free Radic Res.* – 2001. – V. 35, N 6. – P. 655-663.
258. GPX2, a direct target of p63, inhibits oxidative stress-induced apoptosis in a p53-dependent manner / W. Yan, X. Chen // *J Biol Chem.* – 2006. – V. 281, N 12. – P. 7856-7862.
259. Glutathione peroxidase isoforms as part of the local antioxidative defense system in normal and Barrett's esophagus / H. Mörk, M. Scheurlen, O. Al-Taie, A. Zierer, M. Kraus, et al // *J Int J Cancer.* – 2003. – V. 105, N 3. – P. 300-304.

260. Alterations in gene expression and activity during squamous cell carcinoma development / M. M. Serewko, C. Popa, A. L. Dahler, L. Smith, G. M. Stratton, et al // *Cancer Res.* – 2002. – V. 62. – P. 3759–3765.
261. Inverse mRNA expression of the selenocysteine-containing proteins GI-GPx and SeP in colorectal adenomas compared with adjacent normal mucosa / H. Mörk, O. H. al-Taie, K. Bahr, A. Zierer, C. Beck, et al // *Nutr. Cancer.* – 2000. – V. 37. – P. 108-116.
262. Smoking and cancer-related gene expression in bronchial epithelium and nonsmall-cell lung cancers / M. Wönckhaus, L. Klein-Hitpass, U. Grepmeier, J. Merk, M. Pfeifer, et al // *J. Pathol.* – 2006. – V. 210. – P. 192-204.
263. Characterization of mammalian selenoproteomes / G. V. Kryukov, S. Castellano, S. V. Novoselov, A. V. Lobanov, O. Zehtab, et al // *Science.* - 2003. – V. 300. – P. 1439-1443.
264. New mammalian selenocysteine-containing proteins identified with an algorithm that searches for selenocysteine insertion sequence elements / G. V. Kryukov, V. M. Kryukov, V. N. Gladyshev // *J Biol Chem.* – 1999. – V. 274, N 48. – P. 33888-33897.
265. Molecular cloning of putative odorant-binding and odorant-metabolizing proteins / T. N. Dear, K. Campbell, T. H. Rabbitts // *Biochemistry.* – 1991. – V.30, N 43. – P. 10376-10382.
266. The cBio cancer genomics portal: an open platform for exploring multidimensional cancer genomics data / E. Cerami, J. Gao, U Dogrusoz et al. // *Cancer Discov.* – 2012. – V. 2. – P. 401-404.
267. Integrative analysis of complex cancer genomics and clinical profiles using the cBioPortal / J. Gao, B. A. Aksoy, G. Dogrusoz, et al. // *Sci Signal.* – V. 2013. – P. 6: p11.

268. Албертс Б., Брей Д., Льюис Дж., Рэфф М., Робертс К., Уотсон Дж. Молекулярная биология клетки: В 3-х т. 2-е изд., перераб. М75 и доп. Том. 3. Пер. с англ.-М.: Мир, 1994.-517 с., ил.
269. Mouse models in tumor suppression / N. Ghebraniou, L.A. Donehower // *Oncogene* – 1998. – V. 17. – P. 3385-3400.
270. Hallmarks of cancer: the next generation / D. Hanahan, R. A. Weinberg // *Cell*. – 2011. – V. – 144, N 5. – P. 646-674.
271. Онкологія. Вибрані лекції для студентів і лікарів / За редакцією В.Ф. Чехуна. — Київ: Здоров'я України, 2010. — 768 с.3
272. Targeting the DNA Damage Response in Cancer / M. J. O'Connor // *Mol Cell*. – 2015. – V. 60, N 4. – P. 547-560.
273. <http://medbiol.ru/medbiol/gensupr/00011445.htm#000078c7.htm>
274. Tetramer formation of tumor suppressor protein p53: Structure, function, and applications / R. Kamada, Y. Toguchi, T. Nomura, T. Imagawa, K. Sakaguchi // *Nature*. Author manuscript; available in PMC 2012 Jul 19.
275. Clonal evolution in cancer / M. Greaves, C. C. Maley // *Nature*. – 2012. – V. 481, N 7381. – P. 306-313.
276. RB1 dual role in proliferation and apoptosis: cell fate control and implications for cancer therapy / P. Indovina, F. Pentimalli, N. Casini, I. Vocca, A. Giordano // *Oncotarget*. – 2015. – V. 6, N 20. – P. 17873-17890.
277. Cancer risks among BRCA1 and BRCA2 mutation carriers / E. Levy-Lahad, E. Friedman // *Br J Cancer*. – 2007. – V. 96, N 1. – P. 11-15.
278. Wilms tumor 1 gene, CD97, and the emerging biogenetic profile of glioblastoma / A. Somasundaram, N. Ardanowski, C. F. Opalak, H. L. Fillmore, A. Chidambaram, W. C. Broaddus // *Neurosurg Focus*. – 2014. – V. 37, N 6. – P. E14.
279. Melanoma genetics / J. Read, K. A. Wadt, N. K. Hayward // *J Med Genet*. – 2015. Sep 3. Epub ahead of print

280. The diagnostic value of DNA methylation in leukemia: a systematic review and meta-analysis / D. Jiang, Q. Hong, Y. Shen, Y. Xu, H. Zhu, et al. // *PLoS One*. – 2014. – V. 9, N 5. – P. e96822.
281. Genetics and epigenetics of colorectal cancer / M. L. Pellegrini, P. Argibay, D. E. Gómez // *Acta Gastroenterol Latinoam*.- 2011. – V. 41, N 3. – P. 247-261.
282. Role of methylation of the hMLH1 gene promoter in the development of gastric and colorectal carcinoma in the elderly / T. Arai, I. Kasahara, M. Sawabe, N. Honma, J. Aida, K. Tabubo // *Geriatr Gerontol Int*. – 2010. – Jul;10 Suppl 1:S207-12.
283. Prognostic Biomarkers for Response to Vascular Endothelial Growth Factor-Targeted Therapy for Renal Cell Carcinoma / A. G. Winer, R. J. Motzer, A. A. Hakimi // *Urol Clin North Am*. – 2016. – V. 43 N 1. – P. 95-104.
284. Molecular Marker For Predicting Treatment Response in Advanced Renal Cell Carcinoma: Does the Promise Fulfill Clinical Need? / M. Garcia-Roig, N. Ortiz, V. Lokeshwar // *Curr Urol Rep*. – 2014. – V. 15, N 1. – P. 375.
285. Differentiation of oncocytoma from chromophobe renal cell carcinoma (RCC): can novel molecular biomarkers help solve an old problem? / K. L. Ng, R. Rajandram, C. Morais, N. Y. Yap, H. Samaratunga // *J Clin Pathol*. – 2014. – V. 67, N 2. – P. 97-104.
286. Carbonic anhydrase expression in kidney and renal cancer: implications for diagnosis and treatment / E.Oosterwijk // *Subcell Biochem*. – 2014. – V. 75. – P. 181-198.
287. Molecular biomarkers in advanced renal cell carcinoma / P. Maroto, B. Rini // *Clin Cancer Res*. – 2014. – V. 20, N 8. – P. 2060-2071.
288. The association between the rs11549465 polymorphism in the hif-1 α gene and cancer risk: a meta-analysis / Y. Li, C. Li, H. Shi, L. Lou, P. Liu // *Int J Clin Exp Med*. – 2015. – V. 8, N 2. – P. 1561-1574.