

На правах рукописи

ПРОНИНА ИРИНА ВАЛЕРЬЕВНА

**ИЗМЕНЕНИЕ УРОВНЕЙ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ ИЗ КРИТИЧНЫХ РАЙОНОВ
ХРОМОСОМЫ 3 ЧЕЛОВЕКА В ЭПИТЕЛИАЛЬНЫХ ОПУХОЛЯХ РАЗНЫХ
ЛОКАЛИЗАЦИЙ**

03.01.03 - Молекулярная биология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2010

Работа выполнена в Лаборатории молекулярной диагностики и геномной дактилоскопии ФГУП Государственного научно-исследовательского института генетики и селекции промышленных микроорганизмов (ФГУП «ГосНИИгенетика»).

Научный руководитель:

доктор биологических наук
ФГУП «ГосНИИгенетика»

Брага Элеонора Александровна

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук, профессор
ГОУ ВПО Российский государственный
медицинский университет Росздрава

Фаворова Ольга Олеговна

доктор биологических наук, профессор
ГУ Медико-генетический научный центр РАМН

Карпухин Александр Васильевич

Ведущая организация:

**Учреждение Российской академии наук
Институт биологии гена РАН**

Защита состоится « 6 » апреля 2010г. в 14⁰⁰ часов на заседании Диссертационного совета Д.217.013.01 при Государственном научно-исследовательском институте генетики и селекции промышленных микроорганизмов по адресу: 117545, Москва, 1-й Дорожный проезд, д.1.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГУП «ГосНИИгенетика».

Автореферат разослан « 4 » марта 2010 г.

Ученый секретарь
Диссертационного совета
кандидат химических наук

Т.Л. Воюшина

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. По прогнозам ВОЗ заболеваемость и смертность от онкологических заболеваний во всем мире неуклонно растет и за период с 1999 года по 2020 год может увеличиться еще в 2 раза: с 10 до 20 млн. новых случаев. Основная причина высокой смертности связана с поздним выявлением многих солидных опухолей. В развитых странах наблюдается тенденция к замедлению роста заболеваемости и снижению смертности от злокачественных опухолей (как за счет антираковых программ и профилактики онкологических заболеваний, так и за счет улучшения ранней диагностики и лечения), следовательно, основной прирост придется на развивающиеся страны, к которым сегодня следует отнести и Россию.

С тех пор как было показано, что нуклеиновые кислоты, выделенные из плазмы крови, могут способствовать неинвазивной диагностике рака, с помощью молекулярно-генетических методов проводится идентификация новых молекулярных мишеней, которые в конечном итоге могут быть использованы в клинике как маркеры рака. С другой стороны, никаких реальных тестов для раннего выявления, например, рака легкого, молочной железы и почки не существует. Общепринятые опухолевые маркеры, являясь протеинами, недостаточно чувствительны, не строго специфичны и редко увеличиваются на ранних стадиях малигнизации.

Исследование молекулярно-биологических причин возникновения рака представляет одну из наиболее актуальных проблем здравоохранения. Несмотря на значительные успехи в идентификации генов, участвующих в злокачественной трансформации клетки и в ее подавлении, мы еще далеки от понимания взаимодействия между этими генами и их белковыми продуктами. Данное исследование посвящено изучению изменения экспрессии шести генов в эпителиальных опухолях почки, молочной железы и немелкоклеточного рака легкого, а также связи изменения экспрессии этих генов с метилированием их промоторных районов, делециями в них (потерей гетерозиготности), амплификациями и другими событиями на генетическом и эпигенетическом уровнях. Проанализирована зависимость изменений экспрессии исследуемых генов с прогрессией данных видов рака. В данной работе проведен подбор маркеров для выявления и мониторинга социально-опасных видов рака, что является важной задачей молекулярной медицины и практической онкологии.

Цель и задачи исследования. Данная работа направлена на изучение экспрессии генов, эпигенетически и генетически измененных в эпителиальных опухолях, обнаруженных ранее при сканировании короткого плеча хромосомы 3 человека с помощью картирования аллельных дисбалансов и технологии NotI-микропанелей и изученных нами на уровне ДНК. В соответствии с указанной целью нами были поставлены следующие задачи:

1. Анализ изменения экспрессии шести генов хромосомы 3 (*RASSF1A*, *SEMA3B*, *RAR-beta2*, *RHOA*, *GPXI*, *NKIRAS1*) в эпителиальных опухолях.
2. Изучение связи изменения экспрессии исследуемых генов с изменением их статуса метилирования.
3. Выявление возможных корреляций между уровнем экспрессии этих генов и прогрессией опухоли, а также отбор молекулярных маркеров прогноза течения онкозаболевания.
4. Определение профилей изменения экспрессии для социально-значимых видов рака на основании данных для шести опухоль-специфичных генов хромосомы 3.

Научная новизна работы. В ходе работы впервые получены данные об изменении уровней экспрессии генов *SEMA3B*, *RASSF1A*, *RAR-beta2*, *GPXI*, *RHOA*, *NKIRAS* из критичных (часто подвергающихся аллельным делециям) районов хромосомы 3 человека в пяти видах эпителиальных опухолей. Показана дифференциальная экспрессия генов в различных видах тканей, например, ген *RHOA* повышает экспрессию при раке молочной железы и раке яичников, а при раке толстого кишечника не выявлено значимых изменений экспрессии данного гена. Для генов *RASSF1A*, *RAR-beta2*, *GPXI*, *RHOA* впервые показана дифференциальная экспрессия не только в опухолях различных локализаций, но и при разных гистологических типах опухолей легкого: аденокарцинома и плоскоклеточный рак легкого. Впервые обнаружена зависимость изменения содержания мРНК генов *SEMA3B*, *RASSF1A*, *RAR-beta2*, *GPXI*, *RHOA*, *NKIRAS* от клинической стадии развития рака и степени анаплазии ткани. Впервые на основании системного подхода определена степень влияния метилирования и делеций/амплификаций на регуляцию количества мРНК. Впервые показана корреляция изменения содержания мРНК гена *SEMA3B* с изменением уровня метилирования его промоторного CpG-островка. В данной работе выявлена взаимосвязь изменений экспрессии некоторых генов в опухолях (например, генов *GPXI* и *RHOA*).

Практическая ценность работы. В работе показана связь изменения экспрессии некоторых генов с началом онкогенеза и с прогрессией онкологических заболеваний. Построены профили экспрессии ряда генов хромосомы 3, специфичные для опухолей пяти локализаций. Учитывая опухоль-специфичность и обнаруженную связь с прогрессией, значимые изменения экспрессии исследованных генов можно использовать как новые диагностические и прогностические маркеры эпителиальных опухолей. Это крайне важно для раннего выявления и своевременного лечения социально значимых заболеваний и для прогноза и возможного предупреждения рецидивов. Выявленные закономерности можно применять и для мониторинга и коррекции проводимой терапии. Для ряда генов показана дифференциальная экспрессия не только в опухолях различных локализаций, но и при разных гистологических типах опухолей, например, при аденокарциноме и плоскоклеточном раке легкого, – что может быть использовано в дальнейшем для уточнения диагноза и назначения соответствующей терапии.

Апробация работы. Диссертационная работа была представлена на заседании Секции молекулярной биологии Ученого Совета ФГУП “ГосНИИ генетика” от 15 апреля 2009г. Результаты настоящей работы доложены автором диссертации на международной конференции «Генетика в России и мире» (Москва, 2006), Пушкинской школе-конференции молодых ученых (Пушино, 2007), конференции молодых ученых в области молекулярной биологии и генетики, посвященной 120-й годовщине со дня рождения М.И. Вавилова (Киев, Украина, 2007), Российской конференции по фундаментальной онкологии “Петровские Чтения” (Санкт-Петербург, 2007, 2008). Автор диссертации награжден премией издательства МАИК-НАУКА за лучшие публикации в журнале Молекулярная биология в 2006 году.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 8 статей, а также материалы докладов и сообщений (16) на отечественных и международных конференциях.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из следующих разделов: введения, обзора литературы, описания использованных материалов и методов, результатов и их обсуждения, выводов и списка литературы. Материалы диссертации изложены на 150 страницах машинописного текста и содержат 85 иллюстраций (таблиц, диаграмм и рисунков). Список литературы включает 177 источников.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

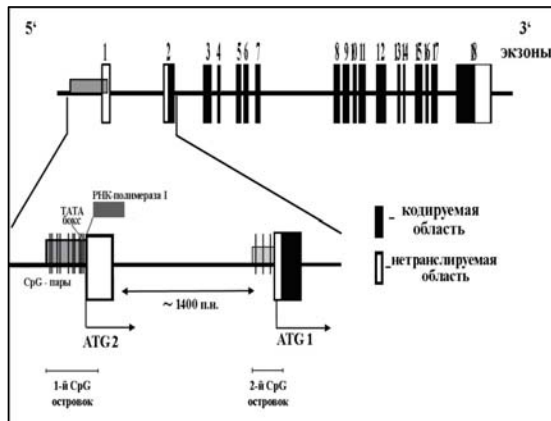
1. Выборка образцов и методы исследований. Образцы опухолевой и прилежащей к ней гистологически нормальной ткани собраны, гистологически и клинически охарактеризованы в лаборатории онкогенетики и в отделе патоморфологии опухолей НИИ клинической онкологии ГУ РОНЦ РАМН. В данной работе была использована выборка парных (ткань опухоли и прилежащая к ней гистологически нормальная ткань) образцов РНК пяти эпителиальных тканей. Выборка включает образцы рака легкого 43 случая (в т.ч. плоскоклеточный рак легкого 24 случая, аденокарциному легкого 16 случаев и другие виды рака легкого 3 случая); образцы рака почки 38 случаев (в т.ч. светлоклеточный рак почки 28 случаев, другие виды рака почки 10 случаев); образцы рака молочной железы 49 случаев (в т.ч. инфильтративно-протоковый рак молочной железы 40 случаев, другие виды рака молочной железы 9 случаев); образцы рака яичников различных видов 13 случаев; образцы рака (аденокарцинома) различных отделов толстого кишечника 12 случаев. Кроме того, были использованы 6 образцов нормальной ткани легкого, 5 образцов ткани почки, 6 образцов молочной железы, 6 образцов яичника от скоропостижно скончавшихся в результате несчастных случаев пациентов, не имеющих в анамнезе онкологических заболеваний.

Из собранных образцов выделялась РНК модифицированным методом гуанидинтиоцианат-фенол-хлороформенной экстракции (*Chomczynski and Sacchi, 1987*). Для исследования экспрессии (содержания мРНК) генов применялся метод обратной транскрипции с вырожденными праймерами и ПЦР продуктов обратной транскрипции со специфичными к кДНК исследуемых генов праймерами (полуколичественная ОТ-ПЦР). Основные статистические методы – критерий Фишера, ранговая корреляция Спирмана с использованием t-теста Стьюдента.

2. Анализ изменения экспрессии шести генов (SEMA3B, RASSF1A, RAR-beta2, GPX1, RHOA, NKIRAS) в эпителиальных опухолях.

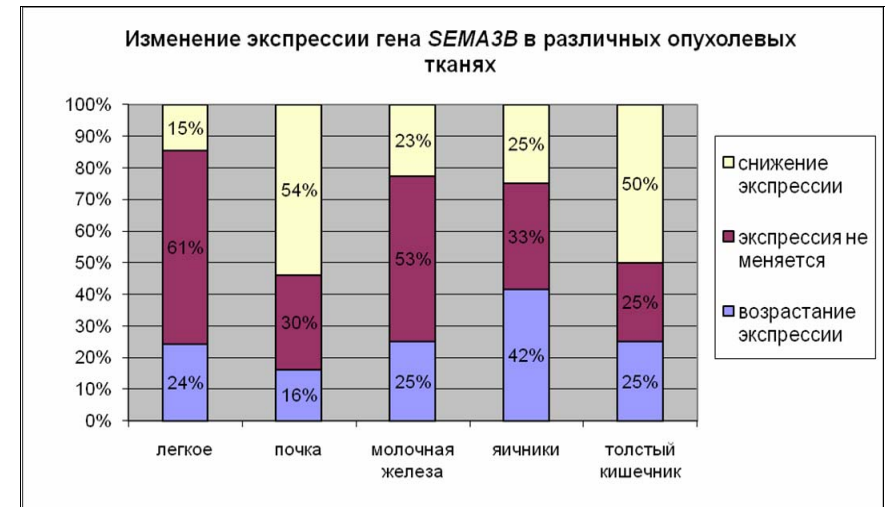
Ген *SEMA3B* локализован в области 3p21.31. Он состоит из 18-ти экзонов, (9533 п.н., NCBI, Build 36), кодирует мРНК длиной 3,4 т.н. и белок 750 а.о. (*Lerman&Minna, 2000*). Функции гена *SEMA3B* разнообразны и связаны с онкогенезом. Ген *SEMA3B* может подавлять рост клеточной линии рака легкого NCI-H1299 и образование опухолей в мышцах с иммунодефицитом (*Tomizawa et al., 2001; Tse et al., 2002*). Белок *SEMA3B* способен ингибировать активацию онкобелков MET и RON, индуцировать

апоптоз и подавлять неоангиогенез в опухолях (Киселев и др., 2005). Во многих линиях клеток мелкоклеточного и немелкоклеточного рака легкого выявлено метилирование CpG-островка в 5' области гена (Tomizawa et al., 2001; Kuroki et al., 2003; Ito et al., 2005), которая, как выяснилось позднее, соответствовала области первого интрона гена (NCBI, Build 36). Мы обнаружили локализованный в промоторной области протяженный CpG-островок (дистальный) с более высокой плотностью CpG-динуклеотидов (22 CpG/772 п.н.) по сравнению с проксимальным (8 CpG/400 п.н.), способный к связыванию ряда факторов транскрипции, содержащих участки взаимодействия с CpG-динуклеотидами (NCBI Build 36).



Структурная организация гена SEMA3B. Показаны 2 CpG-островка: проксимальный (2-й CpG-островок) — в области интрона между не транскрибируемым экзонем 1 и транскрибируемым экзонем 2 (перед ATG1, по Tomizawa et al., 2001), и дистальный (1-й CpG-островок) — в промоторной области гена (перед ATG2 по базе данных NCBI, версия 36). 1-й CpG-островок содержит 22 CpG-динуклеотида на участке 772 п.н., а 2-й CpG-островок — восемь CpG на участке 400 п.н.

Исследовано изменение количества мРНК гена SEMA3B в опухолях и прилежащих гистологически нормальных тканях легкого, почки, молочной железы, яичников и толстого кишечника. Также исследовано содержание мРНК гена в нормальных тканях легкого, почки, молочной железы и яичников, полученных от скоропостижно скончавшихся в результате несчастных случаев пациентов, не имеющих в анамнезе онкологических заболеваний.



Показано, что количество мРНК гена SEMA3B не меняется в 61% образцов рака легкого. Повышение содержания мРНК наблюдали в 15% образцов, а снижение - в 24% образцов, причем как возрастание, так и снижение количества мРНК не превышало два порядка. При аденокарциноме легкого на ранних стадиях заболевания повышается количество мРНК гена SEMA3B в 29% случаев, а на поздних стадиях снижается в 25% случаев, при этом наблюдаются также 12% случаев с повышением количества мРНК. При плоскоклеточном раке легкого на ранних стадиях обнаруживается дифференциальная экспрессия гена SEMA3B: в 33% случаев повышение содержания мРНК, в 20% случаев снижение, а на поздних стадиях наблюдается только снижение количества мРНК гена в 12% случаев, в остальных случаях содержание мРНК гена SEMA3B не меняется.

На I и II стадиях светлоклеточного рака почки уменьшение количества мРНК гена SEMA3B происходит в 60% образцов, а на III и IV стадиях только в 33% образцов, причем доля образцов с возрастающим количеством мРНК увеличивается до 22%.

При раке молочной железы ген SEMA3B имеет дифференциальную экспрессию: в половине случаев содержание мРНК гена не менялось, в 25% случаев возрастало, а 23% случаев снижалось. При раке яичников и раке толстого кишечника ген SEMA3B также имеет дифференциальную экспрессию. Однако при раке яичников чаще наблюдается

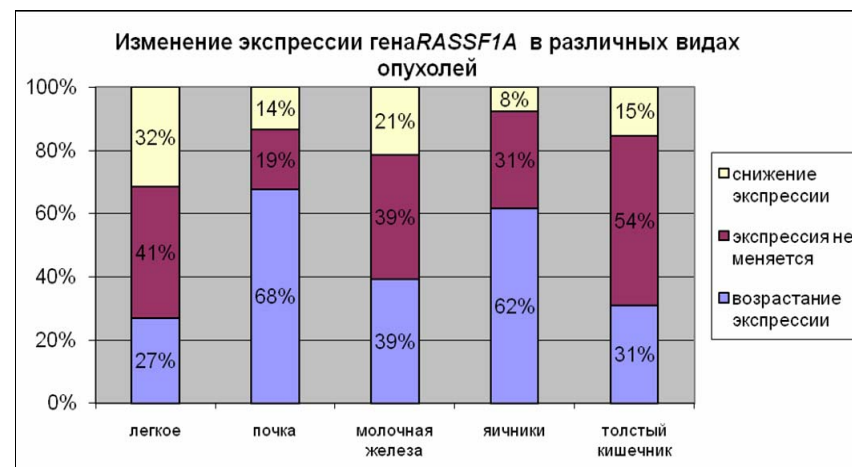
повышение содержания мРНК (42% случаев), а при раке толстого кишечника - снижение содержания мРНК (50% случаев).

Во всех случаях изменение количества мРНК в опухоли по сравнению с нормой не превышало 1-2 порядка, максимально в 200 раз.

Получены данные для светлоклеточного рака почки о понижении содержания мРНК гена *SEMA3B* при появлении метилирования в промоторном CpG-островке (Пронина и др., 2009, Логинов и др., 2009), что позволяет предположить роль промоторного CpG-островка в инактивации гена-супрессора *SEMA3B* при почечноклеточном раке.

Ген *RASSF1A* (Ras Association Domain Family 1A) локализован в районе 3p21.31 короткого плеча 3 хромосомы (3p). Этот ген протяженностью 7,6 т.п.н. содержит 5 экзонов и кодирует м-РНК длиной 2 т.н. Белковый продукт *RASSF1A* относится к цитоплазматическим белкам. Выявлено многообразие функций этого белка в клетке, например, задержка клеточного цикла (Shivakumar et al., 2002), участие в индукции апоптоза за счет взаимодействия с продуктом онкогена *ras* (Vos et al., 2000) или гена *MST1* (Oh et al., 2006), стабилизация микротрубочек (Пфайфер и Дамманн., 2005). Супрессорная активность гена *RASSF1A* подтверждена с помощью нокаут-мутаций гена в клетках мыши (Tommasi et al., 2005).

Экспрессию гена *RASSF1A* исследовали в тканях опухолей легкого, почки, молочной железы, яичника и толстого кишечника и прилежащих гистологически нормальных тканях этих органов, полученных от тех же пациентов, а также в нормальных тканях легкого, почки, молочной железы и яичника, полученных от скоропостижно скончавшихся в результате несчастных случаев пациентов, не имеющих в анамнезе онкологических заболеваний.



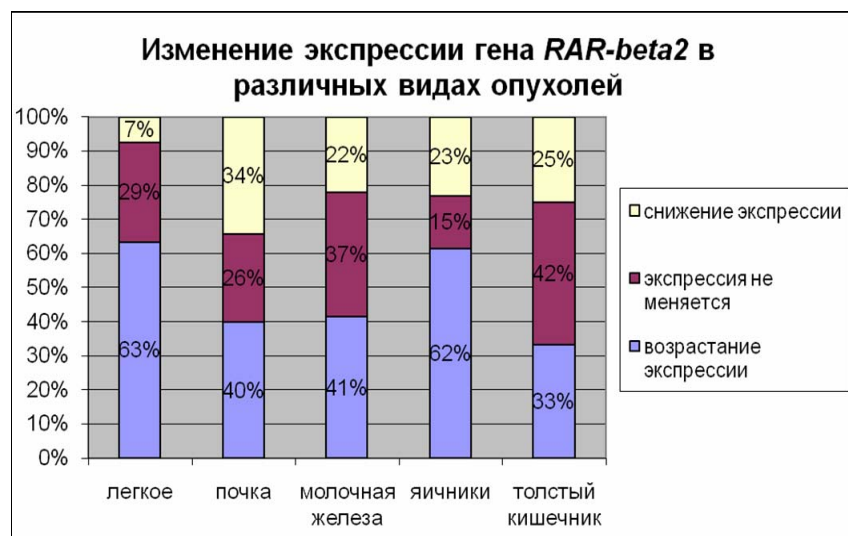
При раке легкого содержание мРНК гена *RASSF1A* повышается в 27% случаев, в 32% случаев снижается и в 41% случаев не меняется. При аденокарциноме легкого наблюдается явная зависимость изменения содержания мРНК гена *RASSF1A* от стадии развития опухоли: на ранних стадиях количество мРНК возрастает в 10-1000 раз в 71% образцов и не обнаруживается ни одного образца со снижением количества мРНК, на поздних стадиях количество мРНК возрастает только в 12% случаев и в 25% случаев снижается. При плоскоклеточном раке легкого и при опухолях в других органах (тканях) зависимость от стадии онкологического заболевания не обнаруживается.

При раке почки и при раке яичников доля образцов с повышением содержания мРНК гена в опухоли значительно больше (68% и 62%, соответственно), чем доля образцов со снижением содержания мРНК (14% и 8%). При раке молочной железы и раке толстого кишечника доля образцов с повышением количества мРНК в опухоли примерно вдвое больше доли образцов со снижением количества мРНК (39% / 21% при раке молочной железы и 33% / 17% при раке толстого кишечника).

Ген *RAR-beta2* локализован в районе 3p24 и относится к суперсемейству ядерных рецепторов, которые служат лиганд-активируемыми транскрипционными факторами (Chambon et al., 1996). Лигандами для рецепторов класса RAR являются ретиноиды – витамин А и его биологически активные метаболиты. Известно, что ретиноиды способны ингибировать пролиферацию клеток и индуцировать клеточную дифференцировку. В связи с этим, их используют для профилактики и терапии

различных опухолей (*Hong et al., 1995*). Во многих случаях метилирование промоторной области данного гена было обнаружено в предраковых новообразованиях, и частота метилирования возрастала с прогрессией заболевания и образованием карцином (*Feng et al., 2007; Fendri et al., 2009; Garcia et al., 2009*).

Нами было исследовано содержание мРНК гена *RAR-beta2* в опухолях и прилежащих гистологически нормальных тканях легкого, почки, молочной железы, яичника и толстого кишечника. Также было исследовано содержание мРНК в нормальных тканях легкого, почки, молочной железы и яичников, полученных от скоропостижно скончавшихся в результате несчастных случаев пациентов, не имеющих онкологических заболеваний в анамнезе.



При раке легкого в 63% случаев наблюдали увеличение количества мРНК гена *RAR-beta2* в опухоли по сравнению с нормой на три порядка (в 1000 раз), в 30% случаев количество мРНК гена не менялось и лишь в 7% случаев наблюдали снижение количества мРНК менее, чем в 50 раз. Т.е. выявлялась значительная доля образцов с увеличением количества мРНК гена *RAR-beta2* в опухоли по сравнению с нормой, особенно при аденокарциноме легкого. Прослеживалась зависимость изменения доли образцов с повышением содержания мРНК гена *RAR-beta2* в ткани опухоли от стадии

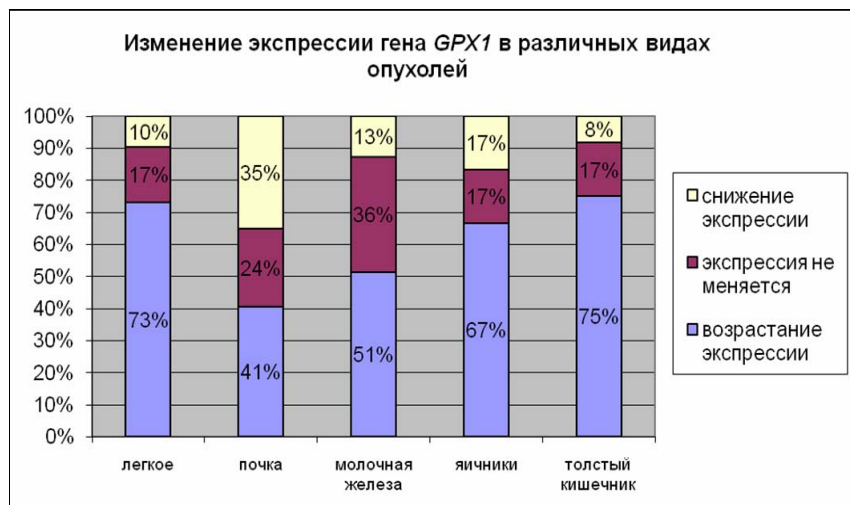
развития заболевания. Доля таких образцов возрастает на поздних стадиях развития рака. Кроме того, отмечено, что возрастание количества мРНК происходит на 3 порядка (до 1000 раз), а снижение, где оно есть, на 1 порядок (5-10 раз, в одном случае в 50 раз). Снижение количества мРНК гена *RAR-beta2* в ткани опухоли по сравнению с нормой наблюдали только при плоскоклеточном раке легкого только на ранних стадиях развития заболевания.

При светлоклеточном раке почки доля образцов с повышением содержания мРНК гена *RAR-beta2* больше на ранних стадиях заболевания (55%), а на поздних стадиях заболевания снижается до 43%. Доля образцов со снижением количества мРНК в опухоли существенно не меняется (27 и 29%). В нормальной ткани почки, полученной от пациентов, не имеющих в анамнезе онкологических заболеваний, в отличие от других исследованных нами тканей экспрессия гена *RAR-beta2* обнаруживалась в 80% случаев (в других тканях 50% и менее).

Интерес представляют предварительные данные, полученные для образцов рака яичников. Доля случаев с повышением содержания мРНК гена *RAR-beta2* при раке яичников составляет 62%, причем велико число образцов с увеличением количества мРНК на 3 порядка. Снижение содержания мРНК происходит в 23% случаев и составляет 1-2 порядка. При раке молочной железы и раке толстого кишечника (предварительные данные) наблюдается дифференциальная экспрессия гена *RAR-beta2*.

Ген *GPXI*. Продукт гена *GPXI* (glutathione peroxidase 1) восстанавливает перекись водорода и ее производные и представляет наиболее распространенный член семейства глутатионпероксидаз. Этот белок локализован в митохондриях, ядре и цитоплазме (*Diwadkar-Navsariwala and Diamond, 2004*). Как антиоксидантный селенопротеин он играет центральную роль в защите клеток от окислительного стресса и разрушения. Выявлено снижение белкового продукта гена *GPXI* в злокачественных опухолях легкого (плоскоклеточный рак и аденокарцинома, *Korotkina et al., 2002*) и снижение мРНК в опухолях щитовидной железы (*Hasegawa et al., 2002*), а также способность подавлять рост эндотелиальной линии клеток ECV304 (*Faucher et al., 2003*). Показана связь определенных полиморфных аллелей гена с развитием разных форм рака, например, рака молочной железы (*Hu et al., 2003*). Предполагается, что промоторная область гена *GPXI* связывает p53 (как транскрипционный фактор), что сопровождается повышением экспрессии *GPXI* и стимуляцией апоптоза (*Hussain et al., 2004*).

Исследовали изменение содержания мРНК гена *GPX1* при различных видах рака и нормальных тканях легкого, почки, молочной железы, яичников и толстого кишечника.



При раке легкого количество мРНК гена *GPX1* в ткани опухоли возрастает по сравнению с прилегающей гистологически нормальной тканью, полученной от того же пациента, в 73% случаев, снижается в 10% случаев и в 17% случаев не меняется.

При аденокарциноме легкого количество мРНК гена *GPX1* увеличивается в 67% случаев, уменьшается в 20% случаев и остается неизменной в 13% случаев. Причем на ранних стадиях развития рака (I и II стадии) доля образцов с повышающимся количеством мРНК составляет 86%, а на поздних стадиях (III и IV стадии) - 50%. В то же время доля образцов со снижающимся количеством мРНК на ранних стадиях составляет 14%, а на поздних стадиях - 25%.

При плоскоклеточном раке легкого повышение количества мРНК гена *GPX1* в опухоли по сравнению с нормой наблюдается в 74% случаев, в 4% случаев количество мРНК снижается и в 22% случаев не меняется. Причем на ранних стадиях развития рака доля образцов с повышением содержания мРНК составляет 80%, а на поздних - 63%; доля образцов с понижением содержания мРНК - 7% и 0%, соответственно.

Содержание мРНК гена *GPX1* в опухолевой ткани по сравнению с прилегающей гистологически нормальной тканью изменяется в пределах четырех порядков в случаях увеличения (до 10 000 раз) и только на один порядок в случаях снижения (в 10 раз).

В нормальной ткани легкого, полученной от пациентов, не имеющих в анамнезе онкологических заболеваний, экспрессия гена *GPX1* выявлена в 83% случаев (5 из 6 образцов).

При раке почки количество мРНК гена *GPX1* в опухоли возрастает в 40% случаев, снижается в 35% случаев и в 24% случаев не меняется. Основную часть проанализированных нами образцов составлял светлоклеточный рак почки, который был рассмотрен отдельно от других видов рака почки.

При светлоклеточном раке почки повышение количества мРНК гена *GPX1* в опухоли наблюдается в 45% случаев, в 28% случаев количество мРНК снижается и в 28% - не меняется. На ранних стадиях развития рака (I и II) доля случаев с возрастанием количества мРНК достигает 50%, на поздних стадиях (III и IV) снижается до 33%. Доля случаев со снижением количества мРНК наоборот возрастает на поздних стадиях с 25% (на I и II стадиях) до 33% (на III и IV стадиях).

При рассмотрении отдельно I и II стадий были выявлены еще более значительные различия в содержании мРНК гена. Так, на I стадии светлоклеточного рака почки количество мРНК в опухоли возрастает в 78% случаев. А уже на II стадии доля случаев с возрастанием количества мРНК уменьшается до 27%, на III и IV составляет 33%.



Количественно содержание мРНК гена *GPXI* в опухолях почки меняется в пределах четырех порядков (до 10 000 раз).

В нормальной ткани почки, полученной от пациентов, не имеющих онкологических заболеваний в анамнезе, экспрессия гена *GPXI* не была выявлена (проанализировали 6 образцов).

При раке молочной железы количество мРНК гена *GPXI* в опухоли возрастает в 5-1000 раз в 51% случаев. В 13% случаев количество мРНК в опухоли по сравнению с нормой снижается в 1000-2000 раз. В 36% случаев содержание мРНК гена *GPXI* не меняется. В нормальной ткани молочной железы, полученной от пациентов, не имеющих в анамнезе онкологических заболеваний, экспрессия гена *GPXI* обнаружена в 83% случаев (5 из 6).

При раке яичников возрастание в пределах четырех порядков (в 5-5000 раз) содержания мРНК гена *GPXI* происходит в 67% случаев, снижение в пределах трех порядков (10-500 раз) - в 17% случаев, и в 17% случаев содержание мРНК не меняется. В нормальной ткани яичника, полученной от пациентов, не имеющих в анамнезе онкологических заболеваний, экспрессия гена *GPXI* выявляется в 50% случаев (3 из 6).

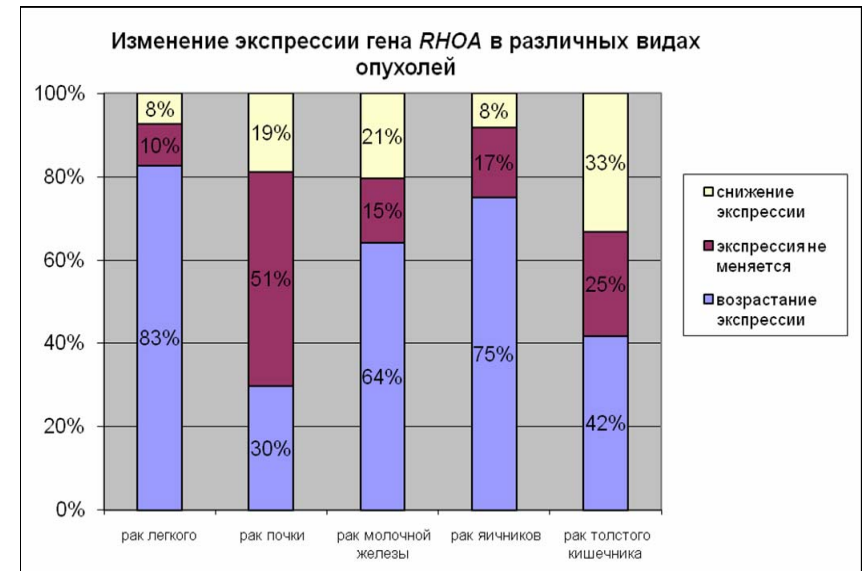
При раке толстого кишечника (аденокарцинома ободочной или прямой кишки) содержание мРНК гена *GPXI* возрастает в опухоли по сравнению с нормой в 5-100 раз в 75% случаев. В 8% случаев содержание мРНК снижается в 70 раз. В 17% случаев не меняется. Данные по экспрессии гена *GPXI* в нормальной ткани толстого кишечника отсутствуют.

Таким образом, содержание мРНК гена *GPXI* возрастает в опухоли по сравнению с прилегающей гистологически нормальной тканью при всех рассмотренных заболеваниях - при раке молочной железы в несколько меньшей степени. Особенно часто возрастание количества мРНК происходит на ранних стадиях рака (I и II), а при светлоклеточном раке почки уже на I стадии. На поздних стадиях рака содержание мРНК гена снижается (уменьшается доля образцов с возрастанием количества мРНК и увеличивается доля образцов со снижением количества мРНК). Изменения содержания мРНК, как правило, значительны (до 10 000 раз).

Ген *RHOA* кодирует белок суперсемейства Ras-гомологических малых гуанозинтрифосфатаз (*Sahai and Marshall, 2002*). Играет роль в адгезии, в регуляции

клеточного цикла и апоптоза, а также в сигнальных путях клетки (*Vial et al., 2003; Liu et al., 2004*). Вызывает онкогенную трансформацию клеток *in vitro* и *in vivo*; усиливает инвазию опухолей (*Kamai et al., 2003, 2004*).

Исследованы образцы опухолей и прилежащих гистологически нормальных тканей пяти видов рака: легкое, почка, молочная железа, яичники и толстый кишечник. Кроме того, исследованы образцы тканей легкого, почки, молочной железы и яичника, полученные от пациентов, не имеющих в анамнезе онкологических заболеваний.



При раке легкого количество образцов с повышением содержания мРНК гена *RHOA* в опухоли по сравнению с нормой достигает 83%. Повышение наблюдалось на 3 порядка (в 1000 раз). Снижение содержания мРНК приблизительно на 1 порядок (в одном случае в 100 раз) обнаруживалось в 7% образцов. При аденокарциноме легкого не выявлено ни одного образца со снижением количества мРНК гена *RHOA* в опухоли. На ранних стадиях развития аденокарциномы повышение количества мРНК наблюдается в 100% случаев, а на поздних стадиях доля образцов с повышением содержания мРНК уменьшается до 86%. При плоскоклеточном раке легкого в большей части образцов (73%) выявляется повышение количества мРНК гена *RHOA*, однако в 14% образцов

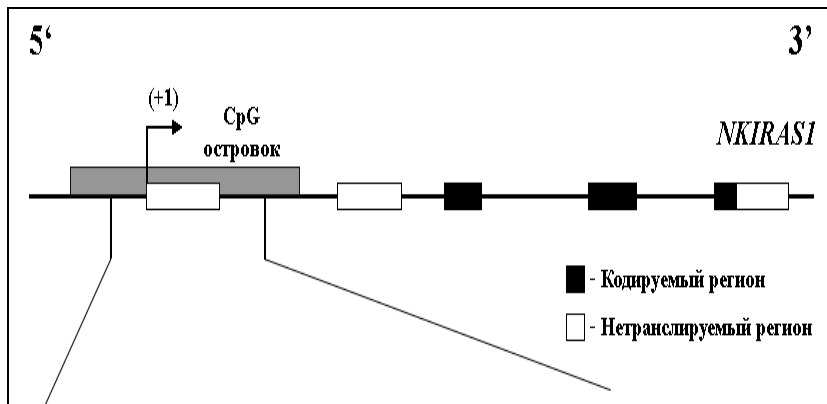
обнаружено снижение количества мРНК. Зависимости в изменении количества мРНК от стадии не наблюдается.

При светлоклеточном раке почки доля образцов с повышением количества мРНК гена *RHOA* возрастает с 25% на ранних стадиях до 45% на поздних стадиях. Доля образцов со снижением количества мРНК (10%) не зависит от стадии.

При раке молочной железы и раке яичников, как правило, происходит увеличение содержания мРНК гена *RHOA* (64% и 75%, соответственно). Стоит отметить, что уменьшение содержания мРНК наблюдалось в доброкачественной опухоли яичника и не наблюдалось в злокачественных опухолях.

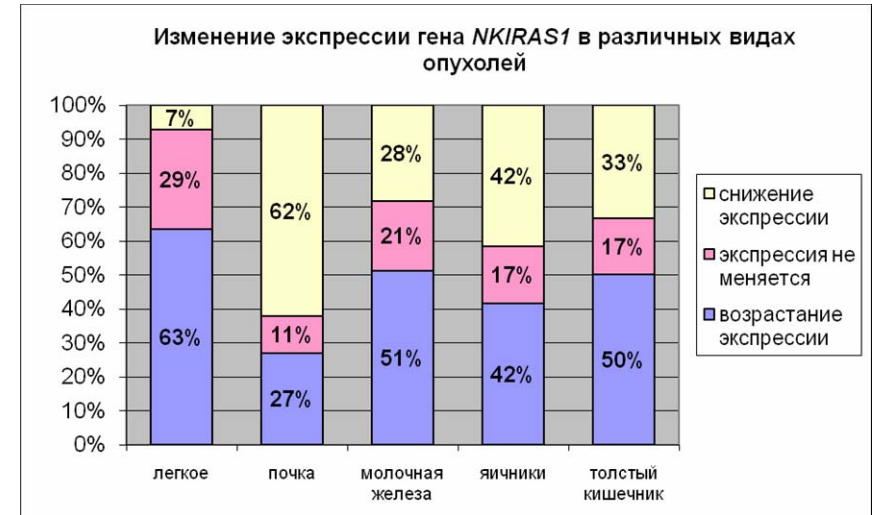
При аденокарциномах толстого отдела кишечника выявлена дифференциальная экспрессия гена *RHOA*.

Ген *NKIRAS1* – NFKB inhibitor interacting Ras-like 1, или гомолог онкогена Ras, взаимодействующий с фактором некроза NF-κappaB. Его другие названия: KBRAS1 и kappaB-Ras 1. Белковый продукт гена функционирует как G-белки, связанные с GTP/GDP и проявляющие GTP-азную активность. Показано, что белок NKIRAS1 участвует в регуляции деградации IκappaB (Fenwick et al., 2000) и в комплексе с IκappaB подавляет активность NF-κappaB (Chen et al., 2004). Ген *NKIRAS1* содержит протяженный CpG-островок (1800 п.н.), окружающий первый нетранслируемый экзон.



На рисунке показана структурная организация гена *NKIRAS1*: экзоны гена, начало 1-го экзона (+1), положение CpG-островка.

Было исследовано содержание мРНК гена *NKIRAS1* в парных образцах опухолевой и прилежащей гистологически нормальной ткани легкого, почки, молочной железы, яичников и толстого кишечника. Также было исследовано содержание мРНК гена *NKIRAS1* в нормальной ткани легкого, почки, молочной железы и яичника, полученной от пациентов, не имеющих в анамнезе онкологических заболеваний.



При раке легкого содержание мРНК гена *NKIRAS1* возрастает в 63% случаев, в 7% случаев снижается, а в 29% случаев не меняется. При аденокарциноме легкого наблюдается снижение доли образцов с увеличенным количеством мРНК гена *NKIRAS1* в опухоли по сравнению с нормой при повышении стадии заболевания: на ранних стадиях 71%, на поздних стадиях 50%. При плоскоклеточном раке легкого доля образцов с повышенным содержанием мРНК в опухоли не меняется в зависимости от стадии. Однако при плоскоклеточном раке легкого на ранних стадиях происходит снижение содержания мРНК в опухолях в 20% образцов; на поздних стадиях случаев снижения содержания мРНК не выявлено. При аденокарциноме легкого не обнаруживается ни одного образца со снижением количества мРНК гена в опухоли. Т.е. на ранних стадиях различных видов немелкоклеточного рака легкого мы наблюдаем противоположные картины: увеличение доли образцов с повышенным содержанием мРНК при аденокарциноме и наличие образцов со сниженным содержанием мРНК при

плоскоклеточном раке легкого. Соответственно, с повышением стадии развития рака наблюдается также противоположная картина: при аденокарциноме легкого доля образцов с увеличением количества мРНК снижается (можно говорить о снижении экспрессии), при плоскоклеточном раке легкого снижается доля образцов с уменьшением количества мРНК (экспрессия повышается).

При светлоклеточном раке почки происходит одновременное снижение доли образцов с уменьшением количества мРНК гена *NKIRAS1* и повышение доли образцов с увеличением количества мРНК в опухоли по сравнению с нормой с развитием заболевания.

При раке молочной железы повышение содержания мРНК происходит чаще, чем снижение. Зависимость от стадии проследить не представлялось возможным, т.к. имеющаяся выборка состояла в основном из образцов II стадии инфильтративно-протокового рака. При раке яичников наблюдается дифференциальная экспрессия гена *NKIRAS1*, причем доля случаев со снижением количества мРНК в опухоли и доля случаев с повышением количества мРНК равны. При раке толстого кишечника также наблюдается дифференциальная экспрессия, но повышение содержания мРНК выявляется чуть чаще, чем снижение.

3. Связь изменения экспрессии генов *SEMA3B* и *RHOA* с генетическими и эпигенетическими событиями в опухолях.

Влияние метилирования промоторной области гена *SEMA3B* на изменение количества мРНК гена в опухолях. С применением полуколичественной ОТ-ПЦР показано частое снижение уровня мРНК гена *SEMA3B* (в 5-100 раз) в клеточных линиях рака молочной железы, яичников и почки (4/11, 36%) (Логинов и др., 2009) и образцах первичных опухолей светлоклеточного рака почки (15/29, 52%). Показана обратная корреляция между метилированием CpG-островка промоторной области гена *SEMA3B* и уровнем мРНК этого гена в образцах первичных опухолей RCC ($P=5 \times 10^{-6}$ по Спирману).

Зависимость изменения экспрессии гена *RHOA* от умножения копий гена и деметилирования его промоторного района. Угнетение экспрессии гена *RHOA* при транскрипции, трансляции и/или на посттрансляционном уровне может обращать злокачественный фенотип опухолевых клеток, подавлять их пролиферацию и опосредованно вызывать апоптоз. По данным предварительного скрининга изменения транскрипционной активности гена в опухолях с помощью программы SAGE (серийный

анализ экспрессии генов) ген *RHOA* проявил повышенный уровень транскрипции в опухолях 7 из 9 исследованных типов тканей (кровь, мозг, молочная железа, яичник, поджелудочная железа, простата, кожа, желудок, толстый кишечник).

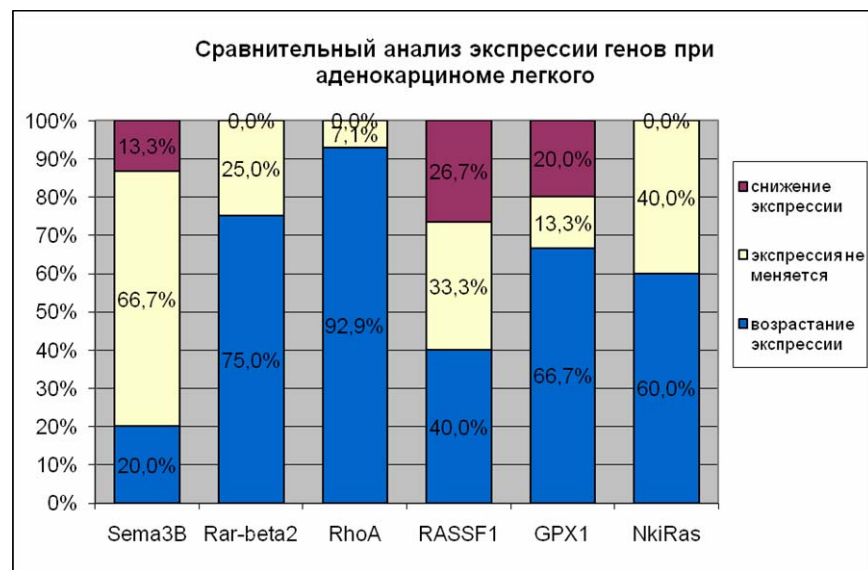
Методом полуколичественной ОТ-ПЦР обнаружено, что транскрипция гена *RHOA* увеличивается в опухолях (18 из 45 опухолей, включая рак молочной железы, светлоклеточный рак почки и эпителиальные опухоли яичников; $p < 10^{-4}$). Впервые показано, что активация транскрипции гена *RHOA* достоверно ассоциирована с умножением копий этого гена ($p = 10^{-7}$) в опухолях относительно нормальной ткани. Промоторная область гена *RHOA* содержит протяженный CpG-островок с высоким содержанием CG-пар (95 CpG на 1301 п.н.). Этот островок, по-видимому, функционально важен, т.к. он содержит потенциальные участки связывания более 50 транскрипционных факторов. Взаимодействие транскрипционных факторов с соответствующими участками узнавания в промоторной области гена *RHOA* может регулироваться уровнем их метилирования. С помощью четырех метилспецифических рестриктаз (HpaII, HhaI, AciI и Bsh1236I) и последующей ПЦР выявлено изменение степени метилирования промоторной области гена *RHOA* в половине образцов опухолей (23/45), причем гипометилирование этого гена в ДНК опухолей наблюдали вдвое чаще, чем гиперметилирование. Деметилирование промоторной области гена сопряжено с увеличением в 2-10 раз уровня транскрипции гена.

Таким образом, в нашей работе впервые показан двойной механизм нарушения регуляции при транскрипции потенциального онкогена *RHOA* в эпителиальных опухолях, а именно, путем увеличения числа копий гена и путем деметилирования промоторной области.

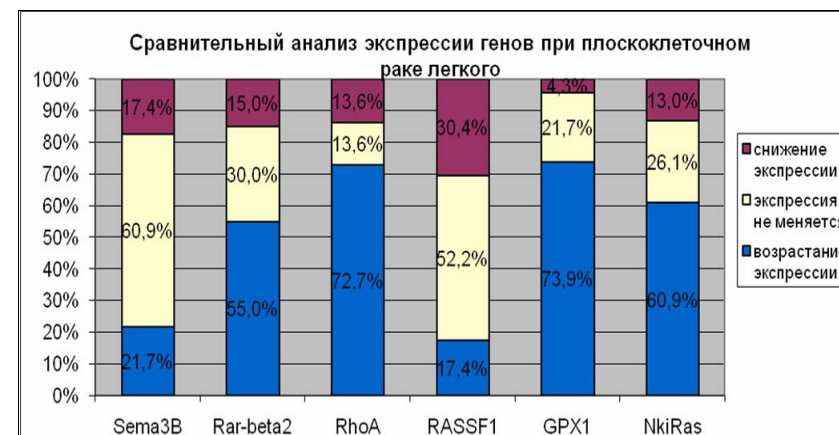
4. Сравнение экспрессии шести генов (*SEMA3B*, *RASSF1A*, *RAR-beta2*, *GPX1*, *RHOA*, *NKIRAS1*) из критичных районов хромосомы 3 в эпителиальных опухолях.

Нами проанализировано изменение экспрессии (количества мРНК) исследуемых генов в эпителиальных опухолях пяти локализаций: рак легкого (в т.ч. аденокарцинома и плоскоклеточный рак), рак почки, рак молочной железы, рак яичников и рак толстого кишечника. Наибольший интерес представляют профили экспрессии аденокарциномы и плоскоклеточного рака легкого и светлоклеточного рака почки, т.к. эти виды опухолей представлены равномерными по стадиям и степени анаплазии выборками.

Нами показана разница в профилях экспрессии исследованных генов при различных гистологических типах рака легкого.



При аденокарциноме легкого в отличие от плоскоклеточного рака легкого не наблюдается случаев со снижением экспрессии генов *RAR-beta2*, *RHOA* и *NKIRASI*. В то же время доля образцов с повышением экспрессии выше при аденокарциноме для генов *RAR-beta2* и *RHOA*, чем при плоскоклеточном раке легкого, и такая же для гена *NKIRASI*. Для гена *RASSF1A* доля образцов с повышением экспрессии вдвое выше при аденокарциноме, чем при плоскоклеточном раке; а доля образцов со снижением содержания мРНК в двух видах немелкоклеточного рака легкого совпадает. Для гена *GPX1* характерно повышение экспрессии при немелкоклеточном раке легкого, причем при плоскоклеточном раке содержание мРНК гена повышается несколько чаще (74%), чем при аденокарциноме (67%). С другой стороны, для *GPX1* наблюдается заметно большая доля образцов со снижением количества мРНК гена в опухоли по сравнению с нормой при аденокарциноме, чем при плоскоклеточном раке. Экспрессия гена *SEMA3B* существенно не меняется в зависимости от гистологического типа рака легкого.



При светлоклеточном раке почки частое повышение экспрессии наблюдается для гена *RASSF1A* (69% случаев). Содержание мРНК гена *RAR-beta2* повышается в 50% случаев. Количество мРНК гена *SEMA3B* возрастает только в 17% случаев. Доля образцов с повышением экспрессии для генов *RHOA*, *GPX1*, *NKIRASI* составляет, соответственно, 31%, 45%, 35%. Содержание мРНК генов *SEMA3B* и *NKIRASI* снижается в 52% и 55% случаев. Для генов *RAR-beta2* и *GPX1* уменьшение количества мРНК наблюдается в 28% образцов. Для генов *RHOA* и *RASSF1A* случаи снижения экспрессии довольно редки (10% и 14%, соответственно). Заметим, что ген *RHOA* не меняет свою экспрессию в опухоли в 59% случаев.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ДАЛЬНЕЙШИЕ ПЕРСПЕКТИВЫ

В настоящее время накоплено много экспериментальных данных о роли эпигенетических модификаций ДНК и гистонов в неоплазиях у человека. Сотни работ посвящены определению профилей метилирования генов при разнообразных видах рака и так называемых «ДНК гиперметилом» (см. обзор Esteller, 2007). Все эти работы вносят важный вклад в фундаментальную биологию и практическую онкологию, поскольку их результаты находят применение и для ранней диагностики опухолей, и для прогноза, и в так называемой «таргетной терапии» некоторых видов рака.

Однако в этих работах проводили анализ метилирования генов как маркеров опухолей, и не было уделено должное внимание связи метилирования с изменением экспрессии этих генов в опухолях. Как правило, такие исследования ограничивались анализом уровня мРНК опухоль-супрессорных генов в клеточных линиях рака, в которых действительно наблюдали частую потерю мРНК гена супрессора, которая в большинстве клеточных линий была ассоциирована с метилированием. (См. например, *Dreijerink et al., 2001; Tomizawa et al., 2001; Kuroki et al., 2003*; и в обзорах: *Angeloni et al., 2007; Hesson et al., 2007*). Однако и при анализе клеточных линий рака выявлялись случаи метилирования гена без снижения экспрессии (например, *Dreijerink et al., 2001*).

При анализе экспрессии группы опухоль ассоциированных генов хромосомы 3 на представительных выборках образцов первичных опухолей нами установлено, что снижение уровня мРНК ассоциировано с метилированием + делеции в 30-60% случаев и именно с метилированием – в среднем прил. в 25% случаев. Более того, нами установлено, что в определенных видах рака такие типичные онкосупрессоры как *RASSF1A* (при ПКР) и *RAR-beta2* (при НМКРЛ) не снижают, а с высокой частотой (68% и 63%, соотв.) повышают уровень мРНК.

На основании наших результатов о частом повышении экспрессии типичных онкосупрессоров *RASSF1A* и *RAR-beta2* при некоторых видах рака, нами предложена гипотеза о том, что мутации в одном из аллелей гена-супрессора превращают его из супрессора опухолевого роста в активный онкоген с повышенной экспрессией, что способствует дальнейшему развитию рака. В пользу такой концепции свидетельствуют также данные по преобразованию онкосупрессора p53 в онкоген (*Чумаков, 2007; Masuda et al., 2009*) и выявленная в опухолях высокая частота мутаций в генах *RASSF1A*

и *RBSP3*, ассоциированная с повышенной экспрессией этих генов (*Kashuba et al., 2004, 2009*). Однако, такие предположения требуют дальнейших исследований.

Можно отметить, что в последнее десятилетие научное сообщество уделяет существенно большее внимание анализу эпигенетических изменений ДНК при онкогенезе (чему посвящены сотни публикаций), чем исследованию экспрессии генов, которое отражает функциональное состояние гена. Так, например, в отношении НМРЛ за 2004-2009 гг. опубликовано более 30 работ, посвященных анализу профилей метилирования генов и формированию систем маркеров на основе данных по метилированию. В базах данных содержится в 2-3 раза меньше публикаций по определению профилей экспрессии при этом виде рака. Причем, эти работы большей частью основаны на применении микропанелей, например, *Boelens et al., 2009; Larsen et al., 2007; Taniwaki et al., 2006*. Стало общепринятым мнение, что эпигенетические изменения строго отражают изменение экспрессии гена и более удобны в качестве молекулярных маркеров опухолей. Проведенное в нашей лаборатории комплексное исследование профилей изменения экспрессии и профилей изменения метилирования для шести генов при трех видах рака показало, что изменения содержания мРНК более однозначны и наблюдаются с более высокой частотой (до 80% и более), чем изменения метилирования этих же генов (включая известные гены-супрессоры: *RASSF1A, RAR-beta2, SEMA3B*). На основании полученных нами данных можно заключить, что анализ изменений содержания мРНК не менее, а более перспективен для диагностики и прогноза опухолей, чем анализ метилирования опухоль ассоциированных генов.

ВЫВОДЫ

1. Установлены опухоль-специфичные изменения экспрессии шести генов хромосомы 3: *RASSF1A*, *SEMA3B*, *RAR-beta2*, *RHOA*, *GPXI*, *NKIRASI* - при немелкоклеточном раке легкого, светлоклеточном раке почки и инфильтративно-протоковом раке молочной железы.

2. При немелкоклеточном раке легкого показано повышение количества мРНК в 5-1000 раз с достоверно высокой частотой для генов *RHOA* (в 80% случаев), *GPXI* (73%), *RAR-beta2* (63%) и *NKIRASI* (63%).

3. При светлоклеточном раке почки установлено достоверно частое снижение экспрессии генов *SEMA3B* (54%) и *NKIRASI* (62%) и достоверно частое повышение экспрессии гена *RASSF1A* (68%).

4. При раке молочной железы показано частое увеличение содержание мРНК генов *RHOA* (64%), *GPXI* (51%) и *NKIRASI* (51%).

5. Установлена корреляция изменения содержания мРНК генов *RHOA* и *GPXI* при немелкоклеточном раке легкого и раке молочной железы.

6. С учетом клинико-гистологических данных образцов опухолей выявлены ассоциации изменения экспрессии генов с начальной стадией и прогрессией рака. Полученные данные могут быть использованы для диагностики и прогноза течения онкозаболеваний.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ.

1. **И.В. Пронина**, В.И. Логинов, В.С. Прасолов, Е.А. Климов, Д.С. Ходырев, Т.П. Казубская, Р.Ф. Гарькавцева, Г.Е. Сулимова, Э.А. Брага Изменение уровня экспрессии гена *SEMA3B* в эпителиальных опухолях. *Молекулярная биология*, 43, №3: 439-445.

2. В.И. Логинов, Д.С. Ходырев, **И.В. Пронина**, А.В. Малюкова, Т.П. Казубская, В.Д. Ермилова, Р.Ф. Гарькавцева, Е.Р. Забаровский, Э.А. Брага Два CpG-островка гена *SEMA3B*: метилирование при светлоклеточном раке почки. *Молекулярная биология*, 43, №6: 1088-1092.

3. В.И. Логинов, Д.С. Ходырев, **И.В. Пронина**, Т.П. Казубская, В.Д. Ермилова, Р.Ф. Гарькавцева, Э.А. Брага Метилирование промоторной области гена *RASSF1A* и

частота аллельных дисбалансов в критичных районах хромосомы 3 коррелируют с прогрессией светлоклеточного рака почки. *Молекулярная биология*, 2009,43, №3:429-438.

4. Т.В. Павлова, В.И. Кашуба, О.В. Муравенко, S.P. Yenamandra, Т.А. Иванова, В.И. Забаровская, Э.Р. Рахманалиев, Л.А. Петренко, **И.В. Пронина**, В.И. Логинов, О.Ю. Юркевич, Л.Л. Киселев, А.В. Зеленин, Е.Р. Забаровский Технология анализа эпигенетических и структурных изменений хромосомы 3 человека. *Молекулярная биология*, 2009, 43, №2: 339-347.

5. Д.С. Ходырев, В.И. Логинов, **И.В. Пронина**, Т.П. Казубская, Р.Ф. Гарькавцева, Э.А. Брага Метилирование промоторной области гена *RAR-beta2* в опухолях почки, молочной железы и яичников. *Генетика*, 2008, 44, №8: 1126-1132.

6. В.И. Логинов, И.В. Базов, Д.С. Ходырев, **И.В.Пронина**, Т.П. Казубская, В.Д. Ермилова, Р.Ф. Гарькавцева, Е.Р. Забаровский, Э.А. Брага Районы потенциальных генов-супрессоров эпителиальных опухолей почки, молочной железы и яичников на хромосоме 3 человека. *Генетика*, 2008, 44, №2: 250-256.

7. Э.А. Брага, В.И. Логинов, Е.А. Климов, Г. Килосанидзе, Д.С. Ходырев, Н.Л. Каганова, Т.П. Казубская, В.Д. Ермилова, Р.Ф. Гарькавцева, **И.В. Пронина**, О.И. Рудько, Е.Р. Забаровский, Г.Е. Сулимова, Л.Л. Киселев Активация транскрипции гена *RHOA* в эпителиальных опухолях может быть вызвана умножением копий гена и/или деметилированием его промоторной области. *Молекулярная биология*, 2006, 40, №5: 865-877.

8. А.В. Малюкова, В.И. Логинов, Д.С. Ходырев, Е.Л. Кадырова, **И.В. Пронина**, Т.А. Иванова, Ф.Л. Киселев, Е.Р. Забаровский, Н.П. Киселева, Э.А. Брага Метилирование предполагаемого гена-супрессора *RASSF1A* в опухолях шейки матки. *Молекулярная биология*. 2004, 38, №6: 1005-1013.

9. **И.В. Пронина**, Д.С. Ходырев Анализ изменения экспрессии генов *SEMA3B* и *RHOA* в эпителиальных опухолях человека. *Материалы XVI Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов»*, Москва, Апрель, 2009. Секция «Фундаментальная медицина», стр. 30-31.

10. Д.С. Ходырев, В.И. Логинов, **И.В. Пронина**, О.Г. Губина, Р.Ф. Гарькавцева, Э.А. Брага Анализ метилирования промоторных областей генов *RAR-beta2* и *SEMA3B* для диагностики и прогноза эпителиальных опухолей почки, молочной железы и яичников.

Материалы V конференции молодых ученых России с международным участием «Фундаментальные науки и прогресс клинической медицины», Москва, 2008, стр. 456.

11. В.И. Логинов, Д.С. Ходырев, **И.В. Пронина**, О.Г. Губина, Р.Ф. Гарькавцева, Э.А. Брага Анализ метилирования промоторных областей генов *RAR-beta2* и *SEMA3B* для диагностики и прогноза эпителиальных опухолей почки, молочной железы и яичников. *IV съезд Российского общества биохимиков и молекулярных биологов*, Новосибирск, Май, 2008, стр. 230.

12. Г.И. Разумнова, Н.Л. Каганова, В.И. Логинов, Д.С. Ходырев, **И.В. Пронина**, Э.А. Брага, Е.А. Климов Оценка экспрессии генов *RHOA* и *SKAP2* человека в норме и при онкозаболеваниях. *IV съезд Российского общества биохимиков и молекулярных биологов*, Новосибирск, Май, 2008, стр. 108.

13. Д.С. Ходырев, В.И. Логинов, Е.А. Климов, **И.В. Пронина**, О.Г. Губина, Т.П. Казубская, Р.Ф. Гарькавцева, Г.Е. Сулимова, Е.Р. Забаровский, Э.А. Брага Метилирование промоторной области гена *SEMA3B* при почечноклеточном раке. Материалы 4-й Российской конференции по фундаментальной онкологии “Петровские Чтения”, Санкт-Петербург, Апрель, 2008, // «*Вопросы Онкологии*» 2008, т.54, №2: стр. 31.

14. Д.С. Ходырев, В.И. Логинов, **И.В. Пронина**, О.Г. Губина, Т.П. Казубская, Р.Ф. Гарькавцева, Э.А. Брага Метилирование промоторной области гена *RAR-beta2* в опухолях почки, молочной железы и яичников. Материалы 4-й Российской конференции по фундаментальной онкологии “Петровские Чтения”, Санкт-Петербург, Апрель, 2008, // «*Вопросы Онкологии*» 2008, т. 54, № 2: стр. 31. (стенд)

15. **И.В. Пронина**, В.И. Логинов, Д.С. Ходырев, Р.Ф. Гарькавцева, Э.А. Брага Связь метилирования CpG-островка промоторного района гена *SEMA3B* с прогрессией эпителиальных опухолей. *Материалы докладов на “11-й Пуцинской школе - конференции молодых ученых”*, Пушино, Ноябрь, 2007, стр.108. (стенд)

16. В.И. Логинов, **И.В. Пронина**, Д.С. Ходырев, О.Г. Губина, Р.Ф. Гарькавцева, Е.Р. Забаровский, Э.А. Брага Метилирование промоторного района гена *USP4* в эпителиальных опухолях разных локализаций. *Материалы докладов на “11-й Пуцинской школе - конференции молодых ученых”*, Пушино, Ноябрь, 2007, стр.98.

17. **I.V. Pronina**, D.S. Hodyrev, N.L. Kaganova, E.A. Klimov, G. Kilosanidze, E.R. Zabarovsky, W.I. Loginov, G.E. Sulimova, E.A. Braga Activation of RHOA transcription in epithelial tumors may be caused by gene amplification or demethylation of the promoter

region. Abstract book: *Conference for young scientists, PhD students and students of molecular biology and genetics, dedicated to 120th anniversary of M.I. Vavilov*. Kyiv, Ukraine, 2007, 20-22 september. (стенд)

18. Д.С. Ходырев, В.И. Логинов, **И.В. Пронина**, В.Д. Ермилова, Т.П. Казубская, Р.Ф. Гарькавцева, Е.Р. Забаровский, Л.Л. Киселев и Э.А. Брага. Роль метилирования промоторных районов генов хромосомы 3 в эпителиальных опухолях человека. Материалы 3-ей Российской конференции по фундаментальной онкологии “Петровские Чтения”, Санкт-Петербург, Апрель, 2007, // «*Вопросы Онкологии*» 2007, т. 53, № 1: стр. 27-28.

19. **И.В. Пронина**, В.И. Логинов, Т.А. Иванова, Т. Павлова, Д. Сараев, Р.Ф. Гарькавцева, О.В. Муравенко, Э.А. Брага, А.В. Зеленин, Л.Л. Киселев, В.И. Кашуба, Е.Р. Забаровский. Поиск новых онкозначимых генов с использованием NotI микропанелей и NotI-репрезентативных проб. Материалы 3-ей Российской конференции по фундаментальной онкологии “Петровские Чтения”, Санкт-Петербург, Апрель, 2007, // «*Вопросы Онкологии*» 2007, т. 53, № 1: стр. 21. (доклад)

20. **И.В.Пронина**, Д.С. Ходырев, Н.Л. Каганова, Е.А.Климов, Г. Килосанидзе, Р.Ф. Гарькавцева, Е.Р. Забаровский, Л.Л.Киселев, В.И. Логинов, Г.Е. Сулимова, Э.А. Брага. Активация транскрипции протоонкогена RHOA может быть вызвана умножением копий гена и/или деметилированием его промоторной области. Материалы 3-ей Российской конференции по фундаментальной онкологии “Петровские Чтения”, Санкт-Петербург, Апрель, 2007, // «*Вопросы Онкологии*» 2007, т. 53, № 1: стр. 21

21. Д.С. Ходырев, В.И. Логинов, **И.В. Пронина**, Е.А. Климов, Н.Л. Каганова, Р.Ф. Гарькавцева, Г.Е. Сулимова, Э.А. Брага. Изменение копийности и метилирования промоторного района протоонкогена RHOA в эпителиальных опухолях. *Материалы докладов на международной конференции “Генетика в России и мире”*, Москва Июль, 2006, стр. 209.

22. **И.В. Пронина**, В.И. Логинов, Т.А. Иванова, Т. Павлова, Д. Сараев, Р.Ф. Гарькавцева, О.В. Муравенко, Э.А. Брага, А.В. Зеленин, Л.Л. Киселев, В.И. Кашуба, Е.Р. Забаровский. NotI-микропанели и NotI-репрезентативные пробы для скрининга онкозначимых генов. *Материалы докладов на международной конференции “Генетика в России и мире”*, Москва, Июль, 2006, стр. 160. (доклад)

23. E.R. Zabarovsky, T. Pavlova, T. Ivanova, L. Petrenko, E. Rakhmanaliev, O. Muravenko, **I. Pronina**, W. Loginov, D. Saraev, S.P. Yenamandra, V. Senchenko, V. Zabarovska, E. Braga, I. Skrypkina, A. Rynditch, E. Grigorieva, N. Kiseljova, F.L. Kiseljov, L.L. Kisselev, G. Klein, V. Kashuba, A.V. Zelenin Epigenetic analysis of cancer cells using NotI microarrays. *Abstracts of Human Genome Meeting*, 2006 (HGM2006), Helsinki, Finland, May 31 - June 3, 2006, page 215.

24. W. Loginov, E. Klimov, **I. Pronina**, D. Hodirev, G. Kilosanidze, A. Malyukova, R.F. Garkavtseva, G.E. Sulimova, E.R. Zabarovsky, E.A. Braga Expression and methylation analysis of some chromosome 3p “hot spots” genes in epithelial tumors. *31th Meeting of the Federation of European Biochemical Societies*, Istanbul, Turkey, October 2005, *FEBS J.*, 2005, 269: 126, A4-034P.