

# Характеристика генів зі зниженою експресією у гліомах людини – потенційних пухлиносупресорних генів

В. В. Дмитренко, О. І. Бойко, К. О. Шостак, Н. Я. Вітак, Т. В. Букрєєва,  
В. Д. Розуменко<sup>1</sup>, Т. А. Малишева<sup>1</sup>, М. І. Шамасв<sup>1</sup>, Ю. П. Зозуля<sup>1</sup>, В. М. Кавсан

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

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

dmitrenko@imbg.org.ua

---

*У результаті порівняння профілів експресії генів у нормальному головному мозку і гліобластомі з використанням бази даних серійного аналізу генної експресії (Serial Analysis of Gene Expression, SAGE) виявлено 129 генів з більш ніж п'ятиразовою зміною рівня експресії ( $P < 0,05$ ) у гліобластомі, з яких 85 генів – зі зниженою експресією. У дифузній та анапластичній астроцитомі кількість генів із зниженою в п'ять разів експресією менша. Лише для дев'яти генів п'ятиразове зниження експресії відбувається в дифузних астроцитомах і виявляється приблизно на такому ж рівні в анапластичних астроцитомах і в гліобластомах. Для переважної більшості інактивованих генів рівень експресії знижується в дифузних астроцитомах і послідовно зменшується на подальших стадіях злоякісної прогресії астроцитом, причому в гліобластомах – найзлоякіснішому прояві гліальних пухлин – експресія деяких генів дуже низька або зовсім відсутня. Нозерн-гібридизація і ЗТ-ПЛР (зворотна транскрипція–полімеразна ланцюгова реакція) підтвердили знижену експресію в гліобластомах доволно відібраних генів. Деякі описані в цій роботі гени можуть кодувати пухлинні супресори і їхня знижена експресія, очевидно, відіграє важливу роль в ініціації і прогресії гліом людини.*

*Ключові слова: гліома, астроцитома, гліобластома, знижена експресія генів, потенційні пухлиносупресорні гени.*

---

**Вступ.** Для ідентифікації диференційної експресії генів розроблено декілька методів, серед яких дві найпотужніші технології – гібридизація ДНК-мікрочипів та серійний аналіз генної експресії (Serial Analysis of Gene Expression, SAGE) – корінним чином змінили біомедичні дослідження зі встановлення ролі генів при різних патологіях, зокрема, у пухлинному процесі. Картину експресії генів і інформацію про

гени, які диференційно експресуються в різних пухлинах, отримано за допомогою сучасного мультифакторного аналізу, що, в кінцевому підсумку, дає можливість використовувати комбінацію ідентифікованих генів для визначення специфічного типу пухлини в межах даної пухлинної категорії, вдосконалити діагностику і встановити обґрунтовані критерії вибору лікування для кожного пацієнта [1]. Доступність ранніх діагностичних маркерів значно зменшить частоту онкозахворюваності і смертність від неї.

В. В. ДМИТРЕНКО, О. І. БОЙКО, К. О. ШОСТАК, Н. Я. ВИТАК,  
Т. В. БУКРЄЄВА, В. Д. РОЗУМЕНКО, Т. А. МАЛИШЕВА,  
М. І. ШАМАСВ, Ю. П. ЗОЗУЛЯ, В. М. КАВСАН, 2007

У попередніх роботах за допомогою SAGE ми дослідили та охарактеризували гени із значним підвищенням рівня експресії в гліобlastомах [2, 3]. При порівнянні SAGE-бібліотек астроцитом II–IV ступенів злоякісності і нормального головного мозку знайдено, що кількість генів, експресія яких підвищується або знижується у пухлинних клітинах, зростає при злоякісній прогресії. У цій роботі ми зробили спробу охарактеризувати гени зі зменшеним рівнем експресії в астроцитарних пухлинах.

**Матеріали і методи.** Дев'ять SAGE-бібліотек гліобlastом (астроцитом IV ступеня злоякісності за класифікацією WHO), 11 SAGE-бібліотек анапластичних астроцитом (астроцитом III ступеня злоякісності), вісім SAGE-бібліотек дифузних астроцитом (астроцитом II ступеня злоякісності) та п'ять SAGE-бібліотек нормального головного мозку проаналізовано для порівняння експресії генів з використанням пошукової програми DGED (Digital Gene Expression Displayer) і бази даних на веб-сайті SAGE Genie (<http://cgap.nci.nih.gov/SAGE>). Базу даних Unigene (National Center of Biotechnological Information, NCBI) використано для пошуку клонів кДНК, які містять кодуючі ділянки виявлених мРНК. Відібрані клони кДНК одержано з Центру ресурсів і баз даних (Resource Center/Primary DataBase, RZPD) проекту «Геном людини» (ФРН).

Хірургічні зразки гліальних пухлин та нормального головного мозку (гістологічно нормальна тканина головного мозку, прилегла до пухлини, яка вимушено видалається разом з пухлиною під час операції) одразу після резекції заморожували в рідкому азоті і зберігали до використання при  $t -70^{\circ}\text{C}$ .

Тотальну РНК із заморожених тканин виділяли екстракцією кислим гуанідинізоціанат-фенол-хлороформним розчином [4] і аналізували Нозерн-гібридизацією, як описано [2, 3]. Денситометричний аналіз гібридизаційних сигналів здійснювали за допомогою програми Scion Image 1.62с.

кДНК синтезували з використанням праймера оліго(dT) та зворотної транскриптази (ЗТ) RevertAid («Fermentas», Литва) на однаковій кількості тотальної РНК (10 мкг для кожного зразка). Напівкількісну полімеразну ланцюгову реакцію (ПЛР) проводили за Рає і співавт. [5] в об'ємі 20 мкл реакційної суміші, яка містила кДНК, син-

тезовану на 0,5 мкг РНК, 2 од. Таq-полімерази, 1 x ПЛР буфер, 0,2 мМ dNTPs, 1 мкМ праймери для відповідних генів:

*CPNE6* (for TGTCCCACCTGCACACGTTTG, rev CGTGTCAATTCACCACTTGGGG);

*DRD1P* (for CAGCAGAATTTCCCTGACCTGG, rev ACGCGCTGGTCACAGGAGCTG);

*FAT2* (for GGAAGGAAGGAACATAATTCTTC, rev CTCTACACATGTGTACACACG);

*GRIN1* (for TTCGGCATAGGCATGCGCAAAG, rev CACAGACAAGGCGCCCGTTAG);

*GRM4* (for GTACACCACTTGCATCGTCTGG, rev ACGCAGGTTCTTGTGGTAGCCT);

*SLC12A5* (for CATCAAGGACTCATCAAGGACT, rev AACTGGCACTGAGGAGCTCTGG).

Параметри ПЛР були такими: денатурація при температурі  $94^{\circ}\text{C}$  протягом 30 с; відпалювання при температурі, відповідній для кожної пари праймерів (1 хв); синтез –  $72^{\circ}\text{C}$ , 1 хв (30 циклів) і синтез –  $72^{\circ}\text{C}$ , 7 хв. Кількість циклів надалі зменшували, поки ампліфікація ПЛР-продукту залишалася на проміжку лінійної фази (27 циклів). Продукти ПЛР детектували, забарвлюючи їх бромистим етидієм після електрофорезу в 2 %-му агарозному гелі.

**Результати і обговорення.** Для порівняння відносних рівнів експресії генів в астроцитарних пухлинах різних ступенів злоякісності та нормальному головному мозку за допомогою SAGE ми використали публічну базу даних CGAP (Cancer Genome Anatomy Project). За допомогою опції DGED був заданий коефіцієнт зміни експресії, який дорівнював 5 для зростання або зниження рівня експресії кожного гена, при статистичній вірогідності  $P < 0,05$ . Порівняння взятих разом дев'яти SAGE-бібліотек гліобlastом з п'ятьма взятими разом SAGE-бібліотеками нормального головного мозку дорослої людини виявило 199 генних «ярликів» (tags) з п'ятиразовою різницею в їхньому розподілі у цих двох пулах [2]. Якщо більш ніж один «ярлик» відповідав одному гену, то обирали найвірогідніший. Після видалення «ярликів» для неохарактеризованих нуклеотидних послідовностей, що експресуються (ESTs), «ярликів» без нуклеотидних послідовностей в кластерах Unigene, «ярликів» мітохондріальних генів і генів гіпотетич-

них білків п'ятиразові зміни експресії в гліобластомах виявлено загалом для 129 генів. 85 генів відповідали критерію «надекспресовані в нормальному головному мозку», або «потенційні пухлиносупресорні гени». В табл. 1 передостання колонка для кожного гена показує співвідношення вмісту «ярликів» у досліджуваних SAGE-бібліотеках гліобластом, узятих разом, до вмісту «ярликів» у всіх узятих разом SAGE-бібліотеках нормального головного мозку. Як можна бачити, у переважній більшості випадків експресія генів знижувалася більш ніж у 10 разів.

Наше дослідження ґрунтувалося на існуючих у базі даних SAGE Genie дев'яти SAGE-бібліотеках гліобластом і п'яти SAGE-бібліотеках нормального головного мозку дорослої людини. Звичайно, розширення наборів бібліотек може спричинити зміни в картині диференційного вираження генів. Однак зіставлення отриманих у цій роботі даних з результатами порівняння п'яти SAGE-бібліотек гліобластом і двох SAGE-бібліотек нормального головного мозку [6] показало, що більшість із 117 генів, визначених в згаданій роботі, входять до існуючого переліку 129 генів [2].

При порівнянні взятих разом 11 SAGE-бібліотек анапластичних астроцитом і восьми бібліотек астроцитом з п'ятьма SAGE-бібліотеками нормального головного мозку за тих же умов аналізу загальна кількість «ярликів» з п'ятиразовою різницею розподілу була дещо меншою, ніж при порівнянні гліобластом та нормального головного мозку – 118 і 83 «ярликів» відповідно. Після вищезгаданої обробки результатів виявлено 66 генів зі зміненою більш ніж у 5 разів експресією в анапластичних астроцитомах, з яких 48 були із зниженим рівнем експресії та 42 із зміненою більш ніж у 5 разів експресією в астроцитомах, 26 із яких – зі зниженим рівнем експресії. Таким чином, кількість генів, експресія яких значно зменшується, зростає із злоякісною прогресією астроцитарних гліом.

Два головних питання є критичними для сучасних досліджень: вище за який поріг зміни експресії певного гена можуть вважатися істотними і вірогідними та які діагностичні, патофізіологічні і терапевтичні наслідки зазначених змін? Поки немає однозначної відповіді на друге питання, кожна

група дослідників робить свій власний вибір. Наприклад, Лал і співавт. [7], вивчаючи диференційну експресію генів у гліобластомі і нормальному головному мозку за допомогою SAGE, описали гени, зміни експресії яких були більш ніж п'ятиразовими з  $P < 0,001$ , Лоджінг і співавт. [1] використали той же підхід і проаналізували гени з більш ніж 10-разовою зміною у рівні експресії, Маркерт і співавт. [8], Любімова і співавт. [9], а також деякі інші дослідники обговорювали можливу участь в ініціації і прогресії пухлин генів навіть з менш ніж дворазовою зміною рівня експресії. Звичайно, зменшення порогу зміни експресії дозволяє визначити більшу кількість генів, що диференційно експресуються, проте переважаюче число генів із значними змінами рівня експресії, можливо, є важливішими у біологічному плані.

Зіставлення списків генів з п'ятиразово зменшеним рівнем експресії в астроцитарних пухлинах показало, що деякі експресійні зміни виявляються на однаковому рівні на всіх стадіях розвитку астроцитом, а для більшості генів значне зниження експресії відбувається лише на останніх, найзловякісніших стадіях розвитку пухлини. Так, рівень експресії генів *CA11*, *DLG4*, *EEF1A2*, *RPH3A*, *MICAL2*, *EPHB6*, *NRIP3* і *TTR* (група I у табл. 2) знижується в дифузних астроцитомах і залишається приблизно таким же на наступних етапах розвитку астроцитарних гліом, а «ярликів» гена *FAT2* (FAT tumor suppressor homolog 2 (Drosophila)) взагалі немає в жодній із SAGE-бібліотек астроцитом II–IV ступеня злоякісності. У той же час рівень експресії 31 гена (група II в табл. 2) знижується більше, ніж у 5 разів, у дифузних астроцитомах, а потім ще більше зменшується на подальших стадіях розвитку астроцитом. Деякі гени (*CPNE6*, *KCNQ2*, *GALNT9*, *SLC1A6*, *GRM4*, *FSTL5*, *NEUROD1*) взагалі перестають експресуватися в гліобластомах, що можна бачити з табл. 1. Зменшення рівня експресії 35 генів досягає більш ніж п'ятиразової величини лише в гліобластомі (група III в табл. 2). Рівень експресії 10 генів (група IV в табл. 2) варіює на різних стадіях розвитку астроцитом – в анапластичних астроцитомах (а для генів *ZIC4* та *SYT5* – навіть і в гліобластомах) рівень експресії вищий порівняно з астроцитомами.



Таблиця 1  
Перелік генів зі зменшеним рівнем експресії в гліобластомі порівняно з нормальним головним мозком (НГМ)

№	«Ярлик»	Назва гена	Умовне позначення гена	Кількість бібліотек, у яких присутній «ярлик»		Кількість «ярлика» в об'єднаному пулі «ярликів»		Відносний вміст «ярлика» гена в пулі порівняно з НГМ	P
				А	Б	А	Б		
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	TGGGAAGTGG	Maternally expressed 3	<i>MEG3</i>	7	5	70	163	0,15	0,04
2	CCCCCAATTC	Vesicle-associated membrane protein 2 (synaptobrevin 2)	<i>VAMP2</i>	8	5	63	158	0,14	0,01
3	GTCGCTGAGA	Carbonic anhydrase XI	<i>CA11</i>	9	5	48	123	0,13	0,02
4	AAGCATTAAA	Protein kinase, cAMP-dependent, regulatory, type I, beta	<i>PRKAR1B</i>	8	5	40	113	0,12	0,01
5	CGGGGAGATG	NDRG family member 2	<i>NDRG2</i>	7	5	43	118	0,12	0,01
6	ATTAAAGTCA	Regulating synaptic membrane exocytosis 3	<i>RIMS3</i>	7	5	21	65	0,11	0,04
7	GTTTAAAAAAG	Stathmin-like 2	<i>STMN2</i>	8	5	21	63	0,11	0,05
8	TGGACACTCA	Neurochondrin	<i>NCDN</i>	9	5	81	252	0,11	0,00
9	ATCCGTGCCC	Calmodulin 3 (phosphorylase kinase, delta)	<i>CALM3</i>	8	5	28	106	0,09	0,00
10	CCCTTCCTTT	ATPase, H <sup>+</sup> transporting, lysosomal 13 kDa, V1 subunit G isoform 2	<i>ATP6V1G2</i>	5	5	15	58	0,09	0,01
11	GCCTCAATAA	Mitogen-activated protein kinase 8 interacting protein 2	<i>MAPK8IP2</i>	7	5	23	87	0,09	0,00
12	AGTGGGAAGGT	Discs, large homolog 4 (Drosophila)	<i>DLG4</i>	7	5	17	77	0,08	0,00
13	ATCCCTTCCC	Septin 5	<i>SEPT5</i>	7	5	16	69	0,08	0,00
14	CTTCAGGACC	Syntaxin binding protein 1	<i>STXBP1</i>	8	5	24	104	0,08	0,00
15	TAATATTAATA	Synaptosomal-associated protein, 25 kDa	<i>SNAP25</i>	5	5	25	104	0,08	0,00
16	TCTGCACCTC	Eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 2	<i>EEF1A2</i>	8	5	44	184	0,08	0,00
17	TGCCCAAATG	Leucine-rich repeat LGI family, member 3	<i>LGI3</i>	4	5	10	42	0,08	0,03
18	TGGGACGTGA	EPHB6	<i>EPHB6</i>	6	3	9	41	0,08	0,02
19	AAAGGGAATG	Solute carrier family 17 (sodium-dependent inorganic phosphate cotransporter), member 7	<i>SLC17A7</i>	2	4	21	100	0,07	0,00
20	CTCTGGCTCT	Secretory carrier membrane protein 5	<i>SCAMP5</i>	6	5	10	48	0,07	0,01
21	GAATTTGGGA	Junctophilin 4	<i>JPH4</i>	4	5	9	44	0,07	0,01
22	AATAAAGCTA	Synuclein, beta	<i>SNCB</i>	6	5	21	128	0,06	0,00
23	AGAATACCTT	Sparc/osteonectin, cwcv and kazal-like domains proteoglycan (testican)	<i>SPOCK</i>	2	5	6	34	0,06	0,02
24	GCCTGAGGGC	Phytoanoyl-CoA hydroxylase interacting protein	<i>PHYHIP</i>	5	5	17	92	0,06	0,00
25	AGTGCCCTC	ProSAPiP1 protein	<i>ProSAPiP1</i>	5	4	8	44	0,06	0,01
26	CCCATTCCTC	Plakophilin 4	<i>PKP4</i>	5	5	8	43	0,06	0,01
27	CCGGCCCTC	Septin 4	<i>SEPT4</i>	7	5	27	152	0,06	0,00
28	CGGTTTCCAA	Protein kinase C, zeta	<i>PRKCZ</i>	6	5	10	57	0,06	0,00
29	CGTGTCCAGG	Progesterin and adipoQ receptor family member VI	<i>PAQR6</i>	6	5	15	80	0,06	0,00
30	GTCTCTACGA	Transgelin 3	<i>TAGLN3</i>	3	5	6	37	0,06	0,01
31	TCTGTGACCT	Flavoprotein oxidoreductase MICAL2	<i>MICAL2</i>	5	4	7	38	0,06	0,02
32	TGTAACAATA	Neuritis with brachial predilection	<i>NAPB</i>	5	5	14	79	0,06	0,00
33	TTCCGGGAAA	Sulfotransferase family 4A, member 1	<i>SULT4A1</i>	3	5	6	32	0,06	0,04
34	TTCCGACTGC	Synaptogyrin 3	<i>SYNGR3</i>	4	5	5	31	0,06	0,03
35	CACAACCACC	Rabphilin 3A homolog (mouse)	<i>RPH3A</i>	5	5	6	41	0,05	0,00
36	CGGCTGCCCCA	Synuclein, gamma (breast cancer-specific protein 1)	<i>SNCG</i>	6	5	7	48	0,05	0,00
37	GAGGCTGGAA	Glutamate receptor, ionotropic, N-methyl D-aspartate 2C	<i>GRIN2C</i>	2	5	4	27	0,05	0,04
38	GCCTGTGGTG	Lymphocyte antigen 6 complex, locus H	<i>LY6H</i>	4	3	4	29	0,05	0,02
39	GGGGTGCTGT	Dynamin 1	<i>DNM1</i>	8	5	32	223	0,05	0,00
40	TCGGGGCCCC	Complexin 1	<i>CPLX1</i>	4	5	17	122	0,05	0,00
41	TCTATTAATA	Myelin basic protein	<i>MBP</i>	6	5	41	308	0,05	0,00
42	TGAGGTTATC	Guanine nucleotide binding protein (G protein), gamma 3	<i>GNG3</i>	4	5	6	41	0,05	0,00
43	TGGAGTGAAA	SH3-domain GRB2-like 2	<i>SH3GL2</i>	6	5	9	59	0,05	0,00
44	TGGCTGGAAG	Phosphoinositide-binding protein PIP3-E	<i>PIP3-E</i>	4	5	4	26	0,05	0,05
45	TACCTCTCA	ATPase, Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> transporting, alpha 3 polypeptide	<i>ATPIA3</i>	2	5	5	42	0,04	0,00
46	AAATAAAGCC	Gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor, delta	<i>GABRD</i>	2	5	5	42	0,04	0,00
47	ACAACACTAC	RAB3A, member RAS oncogene family	<i>RAB3A</i>	7	5	15	115	0,04	0,00

Закінчення табл. 1

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
48	CAAAAAGTTA	Myelin-associated oligodendrocyte basic protein	<i>MOBP</i>	3	4	5	42	0,04	0,00
49	CCAAGGCCCC	Pleckstrin and Sec7 domain containing	<i>PSD</i>	2	5	8	65	0,04	0,00
50	CCTGACTCGG	Nuclear receptor interacting protein 3	<i>NRIP3</i>	3	5	3	26	0,04	0,03
51	GGCTGGATGG	Cholecystokinin	<i>CCK</i>	1	3	3	24	0,04	0,04
52	GTGCGAATCC	Calcium/calmodulin-dependent protein kinase (CaM kinase) II alpha	<i>CAMK2A</i>	2	4	9	88	0,04	0,00
53	TGACTGTGCT	Neurogranin (protein kinase C substrate, RC3)	<i>NRGN</i>	7	2	61	475	0,04	0,00
54	TGCCGCACGT	Kinesin 2 60/70kDa	<i>KNS2</i>	6	5	9	80	0,04	0,00
55	TTAACTTTAT	Reticulon 1	<i>RTN1</i>	3	4	7	64	0,04	0,00
56	GCGCTGCATT	Zic family member 4	<i>ZIC4</i>	3	2	4	36	0,04	0,00
57	AGACATTGTA	Synaptotagmin XIII	<i>SYT13</i>	2	5	2	26	0,03	0,01
58	CTGGATGTTA	Myelin transcription factor 1-like	<i>MYT1L</i>	1	5	2	22	0,03	0,04
59	CTGGCCAACC	Synaptotagmin V	<i>SYT5</i>	3	4	3	31	0,03	0,01
60	GCTGTTCTTG	Bruno-like 4, RNA binding protein (Drosophila)	<i>BRUNOL4</i>	3	4	4	50	0,03	0,00
61	GTAAGTCTCA	Neurofilament, light polypeptide 68 kDa	<i>NEFL</i>	2	4	3	39	0,03	0,00
62	GTGCAAGTCAA	Synaptophysin	<i>SYT</i>	2	5	3	31	0,03	0,01
63	TACAAGGCCA	Dopamine receptor D1 interacting protein	<i>DRD1IP</i>	2	5	2	25	0,03	0,02
64	TGGCTGGAGG	Fas apoptotic inhibitory molecule 2	<i>FAIM2</i>	5	5	9	98	0,03	0,00
65	TAACCAAGAG	Transthyretin (prealbumin)	<i>TTR</i>	2	1	4	47	0,03	0,00
66	CTTATGACAA	Chromogranin B (secretogranin 1)	<i>CHGB</i>	2	5	2	36	0,02	0,00
67	TCCATTCAAG	Solute carrier family 12 (potassium-chloride transporter), member 5	<i>SLC12A5</i>	1	5	1	19	0,02	0,04
68	TCCGCCCCAG	Calcium binding protein 1 (calbrain)	<i>CABP1</i>	3	4	4	64	0,02	0,00
69	TTAGCACTTC	Williams-Beuren syndrome chromosome region 17	<i>WBSR17</i>	1	5	2	39	0,02	0,00
70	AATAAATTGC	Synaptotagmin IV	<i>SYT4</i>	1	5	1	50	0,01	0,00
71	ATTGTGTAAT	Protein kinase C and casein kinase substrate in neurons 1	<i>PACSINI</i>	1	5	1	34	0,01	0,00
72	CACAGTTTGC	Neurofilament 3 (150 kDa medium)	<i>NEF3</i>	1	4	1	51	0,01	0,00
73	CTGGACAAGG	Parvalbumin	<i>PVALB</i>	1	4	1	30	0,01	0,00
74	CTTCAATAGT	Internexin neuronal intermediate filament protein, alpha	<i>INA</i>	1	5	1	33	0,01	0,00
75	GCCCCAGCTG	Glutamate receptor, ionotropic, N-methyl-D-aspartate 1	<i>GRIN1</i>	1	5	2	61	0,01	0,00
76	GCTCCTGTCT	Protein kinase C, gamma	<i>PRKCG</i>	1	4	1	33	0,01	0,00
77	TGGAATGAGC	Creatine kinase, mitochondrial 2 (sarcomeric)	<i>CKMT2</i>	1	4	1	30	0,01	0,00
78	CGGCTGTCTG	Copine VI (neuronal)	<i>CPNE6</i>	0	5	0	25	0	0,00
79	CTCCAAAGAA	Potassium voltage-gated channel, KQT-like subfamily, member 2	<i>KCNQ2</i>	0	4	0	18	0	0,03
80	GACAGCGACA	UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 9 (GalNAc-T9)	<i>GALNT9</i>	0	5	0	18	0	0,03
81	GCACAGGAGA	Solute carrier family 1 (high affinity aspartate/glutamate transporter), member 6	<i>SLC1A6</i>	0	3	0	18	0	0,03
82	GTTTTGCAAA	Glutamate receptor, metabotropic 4	<i>GRM4</i>	0	4	0	29	0	0,00
83	TGGATGCTCT	Follistatin-like 5	<i>FSTL5</i>	0	2	0	18	0	0,03
84	CGAGAGGGAG	FAT tumor suppressor homolog 2 (Drosophila)	<i>FAT2</i>	0	2	0	34	0	0,00
85	TAAAATGCAG	Neurogenic differentiation 1	<i>NEUROD1</i>	0	2	0	24	0	0,00

Примітка. Параметри DGED-аналізу: кількість «яриликів» у пулі А (гліобластоми) – 791621; пулі Б (НГМ) – 271584, F (фактор зміни експресії) 5X; P (вірогідність)  $\leq 0,05$ .

Нозерн-аналіз індивідуальних незалежних зразків пухлин є найпридатнішим і найнадійнішим методом для підтвердження результатів порівняння профілів експресії генів. Проведена нами Нозерн-гібридизація для довільно відібраних генів загалом відповідала результатам SAGE. Як видно з рис. 1, гени *DNMI* і *NRGN* мажорно експресуються у більшості зразків нормального головного мозку, однак у гліобластомах вміст їхніх мРНК значно нижчий або ж вони повністю відсутні. Високий рівень

вмісту мРНК *MBP* спостерігався в нормальному головному мозку і був набагато нижчим в астроцитарних гліомах II–IV ступенів злоякісності; у гліобластомах цю мРНК часто зовсім не виявляли (рис. 2). Для генів *SNAP25* і *STXBP1* результати SAGE не підтвердилися Нозерн-гібридизацією: ген *SNAP25* експресується на значному рівні як у нормальному головному мозку, так і в астроцитоммах II–IV ступеня злоякісності, а вміст мРНК *STXBP1* є дуже низьким і в нормальному головному мозку, і в



Таблиця 2

Розподіл рівнів експресії генів на всіх стадіях розвитку астроцитом

№	«Ярлик»	Назва гена	Умовне позначення гена	Надлишок «ярлика» гена в пухлинні порівняно з нормальним головним мозком		
				Астроцитом	Анапластична астроцитом	Глоблостома
1	2	3	4	5	6	7
<i>I</i>						
1	GTCGCTGAGA	Carbonic anhydrase XI	<i>CA11</i>	0,16	0,21	0,13
2	AGTGGAAGGT	Discs, large homolog 4 (Drosophila)	<i>DLG4</i>	0,13	0,10	0,08
3	TCTGCACCTC	Eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 2	<i>EEF1A2</i>	0,12	0,06	0,08
4	CACAACCACC	Rabphilin 3A homolog (mouse)	<i>RPH3A</i>	0,11	0,08	0,05
5	TCTGTGACCT	Flavoprotein oxidoreductase MICAL2	<i>MICAL2</i>	0,09	0,09	0,06
6	TGGGACGTGA	EPH receptor B6	<i>EPHB6</i>	0,07	0,10	0,08
7	CCTGACTCGG	Nuclear receptor interacting protein 3	<i>NRIP3</i>	0,06	0,03	0,04
8	TAACCAAGAG	Transthyretin (prealbumin)	<i>TTR</i>	0,05	0,02	0,03
9	CGAGAGGGAG	FAT tumor suppressor homolog 2 (Drosophila)	<i>FAT2</i>	0,00	0,00	0,00
<i>II</i>						
10	GTCTCTACGA	Transgelin 3	<i>TAGLN3</i>	0,19	0,18	0,06
11	TGGACACTCA	Neurochondrin	<i>NCDN</i>	0,19	0,21	0,11
12	ATCCGTGCCC	Calmodulin 3 (phosphorylase kinase, delta)	<i>CALM3</i>	0,17	0,10	0,09
13	AGTGCCCTC	ProSAPiP1 protein	<i>ProSAPiP1</i>	0,16	0,17	0,06
14	TCGGGGCCCC	Complexin 1	<i>CPLX1</i>	0,16	0,08	0,05
15	TGCCGCACGT	Kinesin 2 60/70 kDa	<i>KNS2</i>	0,16	0,14	0,04
16	CCCATTCCCT	Plakophilin 4	<i>PKP4</i>	0,15	0,19	0,06
17	TTCCCGGAAA	Sulfotransferase family 4A, member 1	<i>SULT4A1</i>	0,15	0,09	0,06
18	GAGGCTGGAA	Glutamate receptor, ionotropic, N-methyl-D-aspartate 2C	<i>GRIN2C</i>	0,15	0,08	0,05
19	TGGCTGGAAG	Phosphoinositide-binding protein PIP3-E	<i>PIP3-E</i>	0,17	0,14	0,05
20	ACAACACTAC	RAB3A, member RAS oncogene family	<i>RAB3A</i>	0,17	0,17	0,04
21	TGAGGTTATC	Guanine nucleotide binding protein (G protein), gamma 3	<i>GNG3</i>	0,14	0,08	0,05
22	CGTGTCCAGG	Progesterin and adipoQ receptor family member VI	<i>PAQR6</i>	0,14	0,04	0,06
23	CTTCAGGACC	Syntaxin binding protein 1	<i>STXBP1</i>	0,16	0,19	0,08
24	TGACTGTGCT	Neurogranin (protein kinase C substrate, RC3)	<i>NRGN</i>	0,15	0,27	0,04
25	GGGGTGCTGT	Dynamin 1	<i>DNM1</i>	0,14	0,13	0,05
26	CACAGTTTGC	Neurofilament 3 (150kDa medium)	<i>NEF3</i>	0,13	0,14	0,01
27	CGGCTGCTGG	Copine VI (neuronal)	<i>CPNE6</i>	0,12	0,04	0,00
28	TCGCCCCCAG	Calcium binding protein 1 (calbrain)	<i>CABP1</i>	0,12	0,12	0,02
29	CTCCAAAGAA	Potassium voltage-gated channel, KQT-like subfamily, member 2	<i>KCNQ2</i>	0,10	0,10	0,00
30	GCTGTTCTTG	Bruno-like 4, RNA binding protein (Drosophila)	<i>BRUNOL4</i>	0,11	0,14	0,03
31	TGGCTGGAGG	Fas apoptotic inhibitory molecule 2	<i>FAIM2</i>	0,11	0,07	0,03
32	GTGCGAATCC	Calcium/calmodulin-dependent protein kinase (CaM kinase) II alpha	<i>CAMK2A</i>	0,11	0,14	0,04
33	GTGCAGTGAA	Synaptophysin	<i>SYP</i>	0,09	0,08	0,03
34	TACAAGGCCA	Dopamine receptor D1 interacting protein	<i>DRD1IP</i>	0,07	0,06	0,03
35	GCTCCTGTCT	Protein kinase C, gamma	<i>PRKCG</i>	0,07	0,03	0,01
36	GCCCCAGCTG	Glutamate receptor, ionotropic, N-methyl D-Aspartate 1	<i>GRIN1</i>	0,05	0,03	0,01
37	TGGAATGAGC	Creatine kinase, mitochondrial 2 (sarcomeric)	<i>CKMT2</i>	0,05	0,07	0,01
38	TAAAATGCAG	Neurogenic differentiation 1	<i>NEUROD1</i>	0,03	0,02	0,00
39	GCACAGGAGA	Solute carrier family 1 (high affinity Aspartate/glutamate transporter), member 6	<i>SLC1A6</i>	0,03	0,01	0,00
40	GTTTTGCAAA	Glutamate receptor, metabotropic 4	<i>GRM4</i>	0,01	0,02	0,00
<i>III</i>						
41	CGGGGAGATG	NDRG family member 2	<i>NDRG2</i>	0,64	0,34	0,12
42	CTTATGACAA	Chromogranin B (secretogranin 1)	<i>CHGB</i>	0,62	0,27	0,02
43	TAAACTTAT	Reticulon 1	<i>RTN1</i>	0,50	0,55	0,04
44	TGGAGTGAAA	SH3-domain GRB2-like 2	<i>SH3GL2</i>	0,42	0,46	0,05
45	GGCTGGATGG	Cholecystokinin	<i>CCK</i>	0,42	0,37	0,04
46	CCCCAATTC	Vesicle-associated membrane protein 2 (synaptobrevin 2)	<i>VAMP2</i>	0,42	0,33	0,14

Закінчення табл. 2

1	2	3	4	5	6	7
47	CCCTTCCTTT	ATPase, H <sup>-</sup> transporting, lysosomal 13 kDa, VI subunit G isoform 2	<i>ATP6V1G2</i>	0,36	0,37	0,09
48	TGGATGCTCT	Follistatin-like 5	<i>FSTL5</i>	0,35	0,16	0,00
49	GCCTCAATAA	Mitogen-activated protein kinase 8 interacting protein 2	<i>MAPK8IP2</i>	0,34	0,20	0,09
50	TGTAACAATA	Neuritis with brachial predilection	<i>NAPB</i>	0,31	0,26	0,06
51	CGGCTGCCCA	Synuclein, gamma (breast cancer-specific protein 1)	<i>SNCG</i>	0,31	0,20	0,05
52	AAAGGGAATG	Solute carrier family 17 (sodium-dependent inorganic phosphate cotransporter), member 7	<i>SLC17A7</i>	0,29	0,23	0,07
53	TCTATTAATA	Myelin basic protein	<i>MBP</i>	0,29	0,50	0,05
54	AATAAAGCTA	Synuclein, beta	<i>SNCB</i>	0,28	0,20	0,06
55	AGAATACCTT	Sparc/osteonectin, cwcv and kazal-like domains proteoglycan (testican)	<i>SPOCK1</i>	0,28	0,33	0,06
56	CAAAAAGTTA	Myelin-associated oligodendrocyte basic protein	<i>MOBP</i>	0,26	0,18	0,04
57	TTCCGACTGC	Synaptogyrin 3	<i>SYNGR3</i>	0,26	0,21	0,06
58	AAATAAAGCC	Gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor, delta	<i>GABRD</i>	0,25	0,09	0,04
59	TAATATTA AAA	Synaptosomal-associated protein, 25 kDa	<i>SNAP25</i>	0,25	0,27	0,08
60	GCCTGAGGGC	Phytoenyl-CoA hydroxylase interacting protein	<i>PHYHIP</i>	0,24	0,09	0,06
61	TTAGCACTTC	Williams-Beuren syndrome chromosome region 17	<i>WBSCR17</i>	0,24	0,11	0,02
62	CCGGCCCCCTC	Septin 4	<i>SEPT4</i>	0,24	0,10	0,06
63	GCCTGTGGTG	Lymphocyte antigen 6 complex, locus H	<i>LY6H</i>	0,23	0,19	0,05
64	AATAAATGTC	Synaptotagmin IV	<i>SYT4</i>	0,22	0,08	0,03
65	TGGGAAGTGG	Maternally expressed 3	<i>MEG3</i>	0,22	0,16	0,15
66	ATTGTGTAAT	Protein kinase C and casein kinase substrate in neurons 1	<i>PACSINI</i>	0,21	0,21	0,01
67	TGCCCAAATG	Leucine-rich repeat LGI family, member 3	<i>LGI3</i>	0,21	0,31	0,08
68	AAGCATTA AA	Protein kinase, cAMP-dependent, regulatory, type I, beta	<i>PRKAR1B</i>	0,21	0,20	0,12
69	ATCCCTTCCC	Septin 5	<i>SEPT5</i>	0,21	0,15	0,08
70	ATTAAAGTCA	Regulating synaptic membrane exocytosis 3	<i>RIMS3</i>	0,21	0,17	0,11
71	CGGTTTCCAA	Protein kinase C, zeta	<i>PRKCZ</i>	0,20	0,11	0,06
72	GAATTTGGGA	Junctophilin 4	<i>JPH4</i>	0,20	0,25	0,07
73	CCAAGGCCCC	Pleckstrin and Sec7 domain containing	<i>PSD</i>	0,20	0,18	0,04
74	CTGGATGTTA	Myelin transcription factor 1-like	<i>MYTIL</i>	0,20	0,17	0,03
75	CTCTGGCTCT	Secretory carrier membrane protein 5	<i>SCAMP5</i>	0,18	0,20	0,07
<i>IV</i>						
76	CTTCAATAGT	Internexin neuronal intermediate filament protein, alpha	<i>INA</i>	0,17	0,24	0,01
77	GTTTAAAAAG	Stathmin-like 2	<i>STMN2</i>	0,16	0,24	0,11
78	GTAAGTCTCA	Neurofilament, light polypeptide 68 kDa	<i>NEFL</i>	0,14	0,34	0,03
79	TCCATTC AAG	Solute carrier family 12, (potassium-chloride transporter) member 5	<i>SLC12A5</i>	0,08	0,14	0,02
80	AGACATGTA	Synaptotagmin XIII	<i>SYT13</i>	0,06	0,14	0,03
81	GACAGCGACA	UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 9 (GalNAc-T9)	<i>GALNT9</i>	0,05	0,19	0,00
82	TACCCTCTCA	ATPase, Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> transporting, alpha 3 polypeptide	<i>ATPIA3</i>	0,04	0,10	0,04
83	CTGGACAAGG	Parvalbumin	<i>PVALB</i>	0,01	0,06	0,01
84	GCGCTGCATT	Zic family member 4	<i>ZIC4</i>	0,01	0,03	0,04
85	CTGGCCAACC	Synaptotagmin 5	<i>SYT5</i>	0,00	0,02	0,03

гліобlastомах. Різниця в рівнях експресії генів в індивідуальних зразках пухлин і нормального головного мозку, напевне, відображує гетерогенність біологічних властивостей пухлин і індивідуальний поліморфізм.

Варто відмітити, що в головному мозку експресується найбільша кількість генів стосовно інших тканин [10, 11]. Лише для порівняно невеликої

кількості генів, як наприклад, *MBP*, *DNM1* і *NRGN*, представленість їхніх мРНК у загальному пулі інформаційних РНК є достатньою для аналізу Нозерн-гібридизацією. Для визначення вмісту в пухлинних клітинах збіднених транскриптів ми використали напівкількісну ЗТ-ПЛР. Для гена *FAT2* результати ЗТ-ПЛР загалом відповідають результатам SAGE. Продукт ПЛР виявлено в п'яти

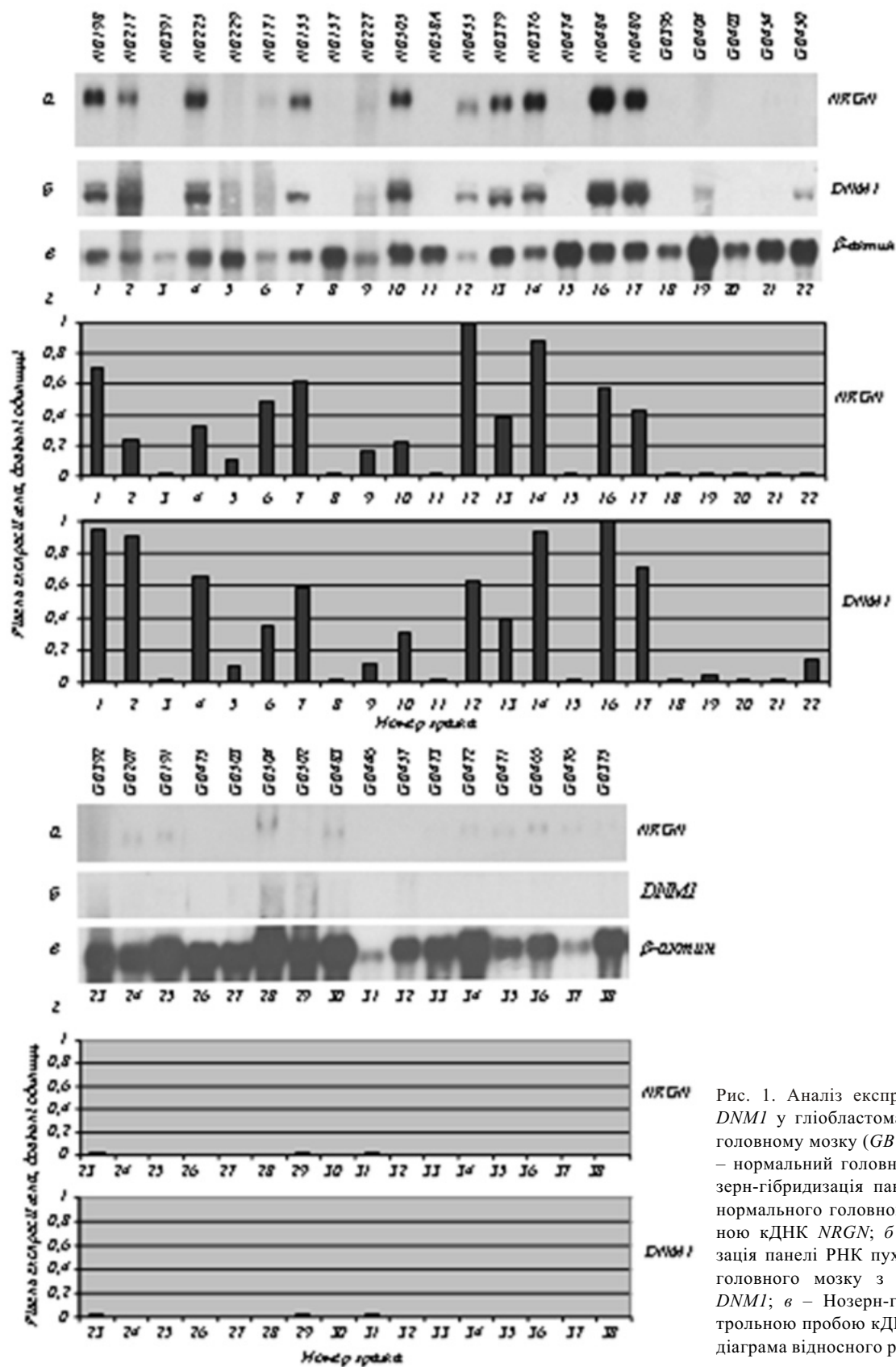


Рис. 1. Аналіз експресії генів *NRG1* і *DNMI* у гліобластомах та нормальному головному мозку (*GB* – гліобластома; *NB* – нормальний головний мозок): *a* – Нозерн-гібридизація панелі РНК пухлин і нормального головного мозку з  $^{32}\text{P}$ -міченою кДНК *NRG1*; *б* – Нозерн-гібридизація панелі РНК пухлин і нормального головного мозку з  $^{32}\text{P}$ -міченою кДНК *DNMI*; *в* – Нозерн-гібридизація з контрольною пробою кДНК бета-актину; *г* – діаграма відносного рівня експресії генів



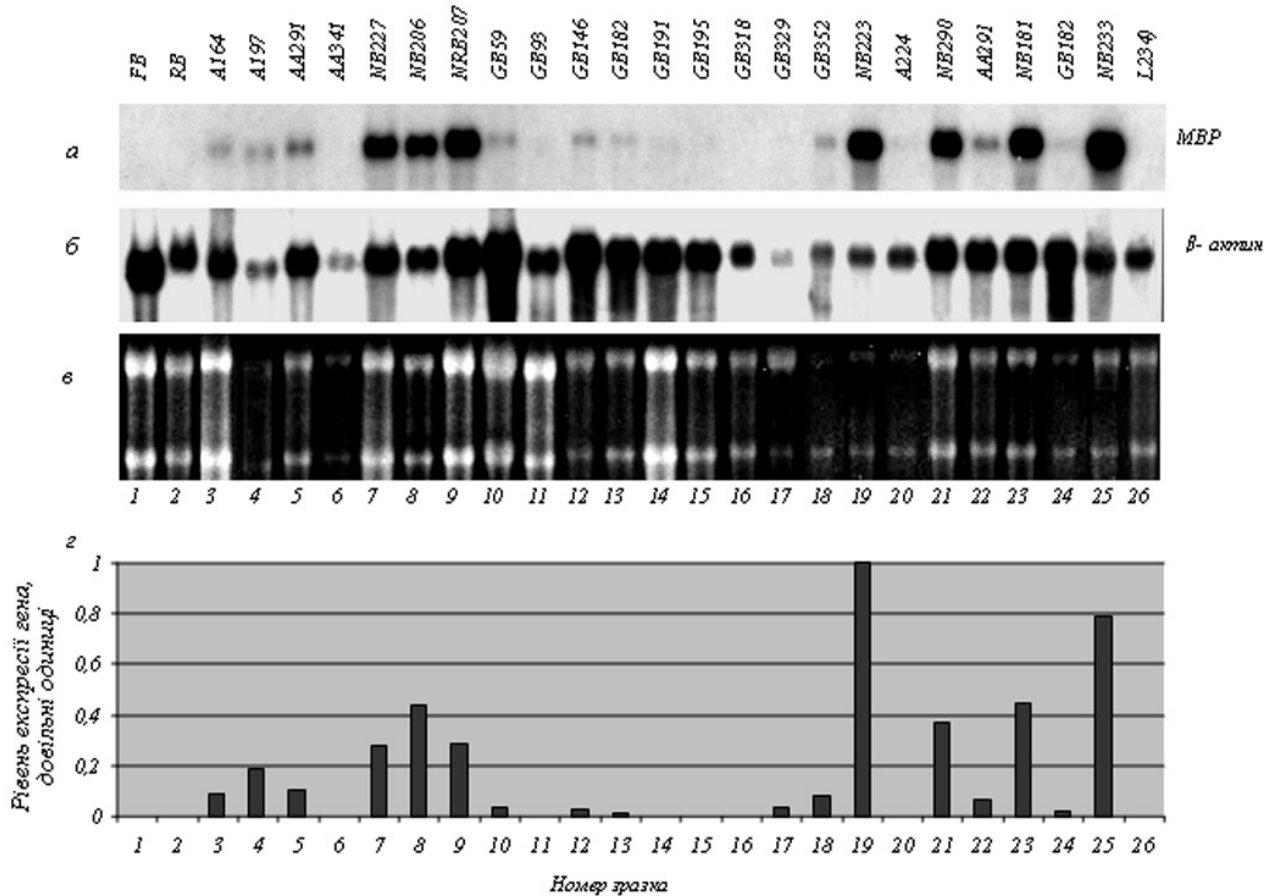


Рис. 2. Аналіз експресії гена *MBP* у пухлинах і нормальному головному мозку (*FB* – головний мозок ембріона; *RB* – головний мозок щура; *A* – астроцитоза; *AA* – анапластична астроцитоза; *NB* – нормальний головний мозок; *NRB* – нейробластома, *GB* – гліобластома; *L* – лімфома): *a* – Нозерн-гібридація панелі РНК пухлин і нормального головного мозку з  $^{32}$ P-міченою кДНК *MBP*; *b* – Нозерн-гібридація з контрольною пробою кДНК бета-актину; *c* – фотографія агарозного гелю, пофарбованого бромистим етидієм; *d* – діаграма відносного рівня експресії гена

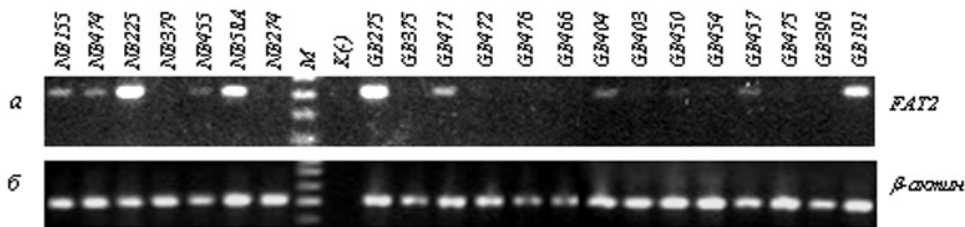


Рис. 3. Аналіз експресії гена *FAT2* в гліобластомах і нормальному головному мозку за допомогою напівкількісної ЗТ-ПЛР (*GB* – гліобластома; *NB* – нормальний головний мозок): *a* – електрофорез продуктів ПЛР з праймерами для гена *FAT2*; *b* – електрофорез продуктів ПЛР з праймерами для гена бета-актину

із семи зразків нормального головного мозку і в шести з 14 зразків гліобластом (рис. 3).

Результати ЗТ-ПЛР для гена *CPNE6* навіть більше відповідають результатам SAGE: продукт ПЛР знайдено у восьми з дев'яти зразків нормального головного мозку і в чотирьох з 10 зразків гліобластом, причому лише в одній гліобластомі

рівень експресії гена виявився таким же, як у нормальному головному мозку, а в трьох інших зразках він був набагато нижчим (рис. 4). Для гена *GRM4* ЗТ-ПЛР не підтвердила результати SAGE – продукт ПЛР отримано лише в одному з 11 зразків нормального головного мозку і в трьох з дев'яти зразків гліобластом.

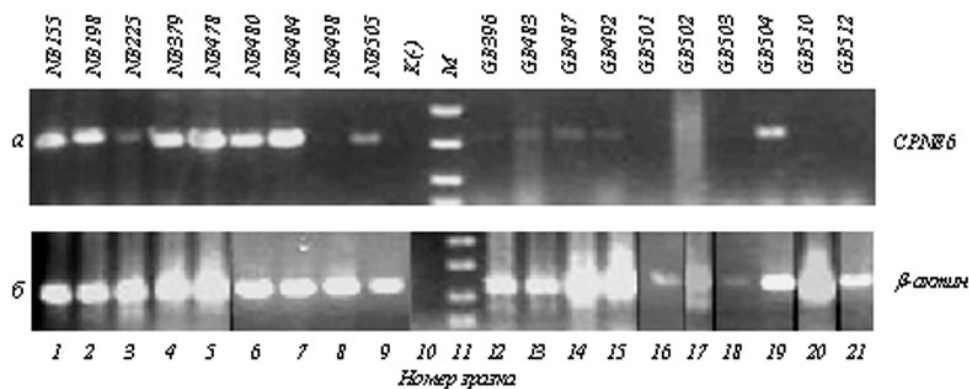


Рис. 4. Аналіз експресії гена *CPNE6* у гліобlastомах і нормальному головному мозку за допомогою напівкількісної ЗТ-ПЛР (*GB* – гліобlastома; *NB* – нормальний головний мозок): *а* – електрофорез продуктів ПЛР з праймерами для гена *CPNE6*; *б* – електрофорез продуктів ПЛР з праймерами для гена бета-актину

Зміни транскрипційної активності генів, що виявляються при порівняннях подібного роду, як правило, мають різний генез: вони можуть спричиняти злякiсну трансформацію клітин, можуть бути наслідком цієї трансформації або не мати до неї прямого відношення. Безумовно, такий розподіл на групи є в деякій мірі суб’єктивним, зважаючи на те, що білкові продукти цих генів у своїй більшості поліфункціональні і питання про те, які з їхніх функцій причетні (якщо причетні) до формування астроцитом, часто залишається без відповіді.

Символ гена використано для ідентифікації генів у базі даних CGAP (<http://cgap.nci.nih.gov/SA-GE/AnatomicViewer>) і визначення потенційних функцій білкового продукту в різних базах даних і публікаціях по кожному гену, що дозволило згрупувати гени з потенційно схожими функціями (табл. 3). Як можна було очікувати, більша частина генів зі зниженим рівнем експресії в гліомах кодують білки, які беруть участь у процесах нейрогенезу, синаптичної передачі, утворення оболонки нервів та нейрофіламента. Зниження рівнів експресії генів згаданих функціональних груп з великою вірогідністю можна віднести до третього класу експресійних змін, хоча імовірною є й можливість опосередкованої їхньої участі у розвитку пухлин. Вони експресуються переважно в нейральних клітинах, відносна кількість яких зменшується в гліальних пухлинах. Тому зниження вмісту такої мРНК, вірогідно, відображує зменшення відсотку нейральних клітин в астроцитомах. Для більш ніж половини переглянутих генів, приналежних до цих

груп, немає повідомлень щодо їхньої причетності до пухлинного процесу. Проте деякі гени можуть бути використані для характеристики злякiсних новоутворень і мати прогностичний потенціал.

Значна кількість генів зі зниженою експресією в гліобlastомі кодує продукти, залучені до транспортної активності та переносу клітинного сигналу (табл. 3). Як відомо, молекулярні порушення механізмів передачі сигналу в клітині відіграють важливу роль у розвитку гліальних пухлин. Деякі знайдені в цій роботі експресійні зміни були визначені раніше в пухлинах головного мозку для гена *CCK*, який кодує холецистокінін – пептид мозку і кишки (brain/gut peptide), гена *EPHB6*, що кодує рецептор ефрину В6, та гена нейрограніну *NRGN*, який кодує субстрат протеїнкінази С.

Холецистокінін залучений у мозку до різних функцій, таких як поведінка при харчуванні, неспокій і пам’ять. Експресія гена *CCK* регулюється у процесі розвитку: вміст мРНК *CCK* у мозку низький перед народженням, але помітно зростає незабаром після народження і досягає максимального, характерного для дорослого віку, через три тижні після народження протягом завершального дозрівання центральної нервової системи. У дорослих декілька субстанцій індують синтез нейрональної мРНК *CCK* через активацію транскрипційних факторів, які зв’язуються з регуляторними елементами в промоторі гена *CCK* [13].

Хоча показано вплив спорідненого з холецистокініном білка гастрину на ріст і рухливість клітин гліобlastоми [14], однак у гліомах не знайдено про-

Таблиця 3

Потенційні супресорні гени гліальних пухлин, об'єднані у функціональні групи

Назва гена	Символ гена	Назва гена	Символ гена
1	2	1	2
<i>Регуляція клітинного циклу</i>		Synaptogyrin 3	<i>SYNGR3</i>
Septin 5	<i>SEPT5</i>	Synaptophysin	<i>SYP</i>
Septin 4	<i>SEPT4</i>	Synaptotagmin V	<i>SYT5</i>
<i>Регуляція транскрипції/трансляції</i>		Synaptotagmin XIII	<i>SYT13</i>
Bruno-like 4, RNA binding protein (Drosophila)	<i>BRUNOL4</i>	<i>Перенос сигналу</i>	
Eukaryotic translation elongation factor 1 alpha	<i>EEF1A2</i>	Calcium binding protein 1 (calbrain)	<i>CABP1</i>
Myelin transcription factor 1-like	<i>MYT1L</i>	Cholecystokinin	<i>CCK</i>
Neurogenic differentiation 1	<i>NEUROD1</i>	Discs, large homolog 4 (Drosophila)	<i>DLG4</i>
<i>Нейрогенез</i>		EPH (Ephrin) receptor B6	<i>EPHB6</i>
Copine VI (neuronal)	<i>CPNE6</i>	Gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor, delta	<i>GABRD</i>
Discs, large homolog 4 (Drosophila)	<i>DLG4</i>	Guanine nucleotide binding protein (G protein), gamma 3	<i>GNG3</i>
Lymphocyte antigen 6 complex, locus H	<i>LY6H</i>	Mitogen-activated protein kinase 8 interacting protein 2	<i>MAPK8IP2</i>
Myelin-associated oligodendrocyte basic protein	<i>MOBP</i>	Neurogranin	<i>NRGN</i>
Neurogranin	<i>NRGN</i>	Protein kinase C and casein kinase substrate in neurons 1	<i>PACSN1</i>
Transgelin 3	<i>TAGLN3</i>	Protein kinase, cAMP-dependent, regulatory, type I, beta	<i>PRKAR1B</i>
<i>Мієлінова оболонка</i>		Protein kinase C, gamma	<i>PRKCG</i>
Myelin basic protein	<i>MBP</i>	Protein kinase C, zeta	<i>PRKCZ</i>
Myelin-associated oligodendrocyte basic protein	<i>MOBP</i>	Plakophilin 4	<i>PKP4</i>
<i>Нейрофіламент</i>		Reticulon 1	<i>RTN1</i>
Internexin neuronal intermediate filament protein, alpha	<i>INA</i>	SH3-domain GRB2-like 2	<i>SH3GL2</i>
Neurofilament 3 (150 kDa medium)	<i>NEF3</i>	<i>Транспортна активність</i>	
Neurofilament, light polypeptide 68 kDa	<i>NEFL</i>	ATPase, Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> transporting, alpha 3 polypeptide	<i>ATP1A3</i>
<i>Синаптична передача</i>		ATPase, H <sup>+</sup> transporting, lysosomal 13 kDa, VI subunit G isoform 2	<i>ATP6V1G2</i>
Calcium/calmodulin-dependent protein kinase (CaM kinase) II alpha	<i>CAMK2A</i>	Potassium voltage-gated channel, KQT-like subfamily, member 2	<i>KCNQ2</i>
Complexin 1	<i>CPLX1</i>	Solute carrier family 17	<i>SLC17A7</i>
Copine VI (neuronal)	<i>CPNE6</i>	Protein kinase C and casein kinase substrate in neurons 1	<i>PACSN1</i>
Discs, large homolog 4 (Drosophila)	<i>DLG4</i>	Synaptotagmin IV	<i>SYT4</i>
Dopamine receptor D1 interacting protein	<i>DRD1IP</i>	Synaptotagmin XIII	<i>SYT13</i>
Gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor, delta	<i>GABRD</i>	Vesicle-associated membrane protein (VAMP)/synaptobrevin	<i>VAMP2</i>
Glutamate receptor, ionotropic, N-methyl D-aspartate 1	<i>GRIN1</i>	Transthyretin (prealbumin)	<i>TTR</i>
Glutamate receptor, ionotropic, N-methyl D-aspartate 2C	<i>GRIN2C</i>	Phosphoinositide-binding protein PIP3-E	<i>PIP3-E</i>
Glutamate receptor, metabotropic 4	<i>GRM4</i>	Neuritis with brachial predilection	<i>NAPB</i>
Myelin basic protein	<i>MBP</i>	RAB3A, member RAS oncogene family	<i>RAB3A</i>
Myelin-associated oligodendrocyte basic protein	<i>MOBP</i>	Rabphilin 3A homolog (mouse)	<i>RPH3A</i>
Neuronal pentraxin 1	<i>NPTX1</i>	Secretory carrier membrane protein 5	<i>SCAMP5</i>
Regulating synaptic membrane exocytosis 3	<i>RIMS3</i>	<i>Аномоз</i>	
Solute carrier family 1 (high affinity aspartate/glutamate transporter), member 6	<i>SLC1A6</i>	Fas apoptotic inhibitory	<i>FAIM2</i>
Solute carrier family 12, (potassium-chloride transporter) member 5	<i>SLC12A5</i>	Septin 4	<i>SEPT4</i>
Synaptosomal-associated protein, 25 kDa	<i>SNAP25</i>		
Syntaxin binding protein 1	<i>STXBPI</i>		



Закінчення табл. 3

1	2	1	2
Neurogranin	<i>NRGN</i>	Solute carrier family 1 (high affinity aspartate/glutamate transporter), member 6	<i>SLC1A6</i>
Creatine kinase, mitochondrial 2	<i>CKMT2</i>	Septin 4	<i>SEPT4</i>
<i>Ендоцитоз</i>		<i>Зв'язування іонів</i>	
Dynamin 1	<i>DNMI</i>	Follistatin-like 5	<i>FSTL5</i>
Protein kinase C and casein kinase substrate in neurons 1	<i>PACSINI</i>	Parvalbumin	<i>PVALB</i>
<i>ГТФазна активність</i>		<i>Гормональна активність</i>	
Dynamin 1	<i>DNMI</i>	Chromogranin B (secretogranin 1)	<i>CHGB</i>
Guanine nucleotide binding protein (G protein), gamma 3	<i>GNG3</i>	Transthyretin (prealbumin)	<i>TTR</i>
RAB3A, member RAS oncogene family	<i>RAB3A</i>	<i>Некласифіковані</i>	
Septin 5	<i>SEPT5</i>	Carbonic anhydrase 11	<i>CA11</i>
Septin 4	<i>SEPT4</i>	Leucine-rich repeat LGI family, member 3	<i>LGI3</i>
<i>Клітинна адгезія/рухливість</i>		Junctophilin 4	<i>JPH4</i>
FAT tumor suppressor homolog 2 (Drosophila)	<i>FAT2</i>	Maternally expressed 3	<i>MEG3</i>
<i>Метаболізм ліпідів</i>		Flavoprotein oxidoreductase MICAL2	<i>MICAL</i>
Synuclein, beta	<i>SNCB</i>	Neurochondrin	<i>NDCN</i>
Sulfotransferase family 4A, member 1	<i>SULT4A1</i>	NDRG family member 2	<i>NDRG2</i>
<i>Цитоскелет</i>		Nuclear receptor interacting protein 3	<i>NRIP3</i>
Kinesin 2 60/70kDa	<i>KNS2</i>	Progesterin and adipoQ receptor family member VI	<i>PAQR6</i>
Septin 5	<i>SEPT5</i>	Phytanoyl-CoA hydroxylase interacting protein	<i>PHYHIP</i>
<i>Мембранні білки</i>		ProSAPiP1 protein	<i>ProSAPiP1</i>
UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine: polypeptide N-acetylgalactosaminyl-transferase 9 (GalNAc-T9)	<i>GALNT9</i>	Pleckstrin and Sec7 domain containing	<i>PSD</i>
		Synuclein, beta	<i>SNCB</i>
		Synuclein, gamma (breast cancer-specific protein 1)	<i>SNCG</i>
		Sparc/osteonectin, cwcv and kazal-like domains proteoglycan (testican)	<i>SPOCK</i>
		Stathmin-like 2	<i>STMN2</i>
		Sulfotransferase family 4A, member 1	<i>SULT4A1</i>
		Zic family member 4	<i>ZIC4</i>
		Williams-Beuren syndrome chromosome region 17	<i>WBS Cri17</i>

дукції рецептора холецистокініну [15]. Імуногістохімічний аналіз виявив зменшений вміст холецистокініну в злоякісних астроцитомах порівняно з добре диференційованими астроцитомами (I–II ступеня злоякісності) [16]. Цей білок детектовано в нейрональних клітинах, що збереглися в семи проаналізованих супратенторіальних анапластичних астроцитомах, однак він відсутній в інших гліомах – трьох дифузних астроцитомах і восьми гліобластомах [17] та в субependимальних гігантоклітинних астроцитомах [18]. Можливо, інактивація експресії гена *ССК* відбувається на рівні транскрипції або трансляції, або ж посттрансляційного процесингу при злоякісній прогресії гліом. Про це ж свідчать і наші результати, отримані за допомогою SAGE («ярлики» гена *ССК* присутні лише в одній із дев'яти SAGE-бібліотек гліобластом). В експериментах *in vivo* показано, що холецистокінін може індукувати сигнальні процеси із залученням протеїнкінази С

в клітинній лінії щурячої гліоми С6, для якої виявлено експресію рецепторів типу ССКВ [19]. Холецистокінін стимулює ріст клітин С6, активуючи ізоферменти 1, 2, і протеїнкінази С [20].

Рецептори ефрину і їхні ліганди, ефрини, опосередковують численні процеси розвитку, зокрема, в нервовій системі. Залежно від структури і амінокислотної послідовності ефрини поділяють на клас А (EFNA), зчеплених з мембраною глікозилфосфатидил-інозитольним зв'язком, та клас В (EFNB), які є трансмембранними білками. Рецептори ефрину поділяють на дві групи, грунтуючись на подібності амінокислотних послідовностей їхніх екстраклітинних доменів і афінності відносно зв'язування А- і В-ефринів. Рецептори ефринів складають найбільшу підгрупу родини рецепторів тирозинкіназ. Вони беруть участь у процесах розвитку нервової системи, таких як формування зв'язків, васкулогенез і міграція клітин. Знайдено, що над-

експресія одного з них, *EphB2*, у клітинах гліом призводить до зниження клітинної адгезії і підвищення інвазії клітин [22]. Крім того, *R-Ras* відіграє ключову роль у регуляції цим рецептором активності інтегринів за рахунок асоціації з ним і наступного фосфорилування. Інгібування експресії ендогенного *R-Ras* малою інтерферуючою РНК (siRNA) анулювало ефект *EphB2* на клітинну адгезію, проліферацію та інвазію в мозку. Ступінь фосфорилування *R-Ras* позитивно корелює із ступенем фосфорилування *EphB2* в клітинах гліобластоми. Ці результати демонструють можливість терапевтичного впливу на сигнальний шлях *EphB2/R-Ras* [22]. Рецептор ефрину В6, який кодується геном *EPHB6*, не має кіназної активності, властивої більшості тирозинкіназних рецепторів, і зв'язує В-ефрини. Зниження рівня експресії *EPHB6* знайдено в клітинах раку простати [23], молочної залози [24], меланоми [25]. Визначено, що причиною інактивації гена *EPHB6* у пухлинних клітинах є збільшення рівня метилювання його промотору. Деметилювання цього промотору відновлювало нормальний рівень експресії гена [24]. Наявність експресії гена *EPHB6* є одним із сприятливих факторів прогнозу нейробластом [26]. Встановлено також підвищення рівня транскрипції *EPHB6* у клітинній лінії нейробластоми після трансфекції антисенсовою кДНК *MIF* (Macrophage migration inhibitory factor). Наслідком такої трансфекції було зменшення на 80 % росту клітин нейробластоми, а також на 90 % порівняно з контролем знизилася ріст пухлин і рівень метастазування у мишей, яким ін'єктували ці трансфектанти [27].

*NRGN* (*neurogranin; protein kinase C substrate; RC3*) людини є гомологом нейронспецифічного гена *RC3/neurogranin* щура. Цей ген кодує постсинаптичний субстрат протеїнкінази С, який зв'язує кальмодулін за відсутності кальцію [28]. Виявлено, що нейрогранін – можливий проапоптичний фактор, який бере участь в індукції апоптозу Т-клітин після видалення інтерлейкіну-2 за рахунок підвищення внутрішньоклітинної концентрації  $Ca^{2+}$  [29]. *NRGN* ідентифіковано серед генів, які регулюються геном ранньої ростової відповіді *EGR1* у клітинній лінії раку простати [30]. Автори висловили припущення, що надекспресія *EGR1* може бути причет-

ною до нейроендокринної диференціації, яка часто супроводжує прогресію рака простати. Зниження експресії *NRGN* у гліобластомі (разом з іншими 44 генами) виявлено при зіставленні профілів експресії генів у гліобластомі і нормальному головному мозку людини за допомогою кДНК-мікроареїв, що містили 25344 гени, і підтверджено напівкількісною ЗТ-ПЛР [31]. Можливо, знижена експресія *NRGN* пов'язана з інгібуванням апоптозу в гліобластомах або є відображенням зменшення кількості нейральних клітин у пухлинах чи їхньою ослабленою функцією.

Інактивацію генів іонного транспорту в гліальних пухлинах знайдено раніше. Так, Маркерт і співавт. [8] при профілюванні експресії генів у гліобластомах за допомогою аналізу олігонуклеотидних мікроареїв визначили зниження експресії декількох генів, які кодують білки іонного транспорту, зокрема, субодиниць GRIN1 і GRIN2С рецептора NMDA, що узгоджується з нашими результатами.

Порушення контролю клітинного циклу є однією з ознак злоякісної прогресії астроцитом. Воно опосередковується інактивацією антионкогенів *TP53* на хромосомі 17р, *CDKN2/p16* на хромосомі 9р та *Rb* на хромосомі 13q [32]. Ослаблений контроль клітинного циклу може бути причиною надзвичайної стійкості гліобластом до радіо- та хіміотерапії [33]. До групи генів регуляції клітинного циклу належать гени *SEPT4* та *SEPT5* (табл. 3), які кодують білки родини септинів. Імуногістохімічний аналіз виявив відсутність білка SEPT4 (*ARTS*) у нормальних астроцитах і збільшення його продукції з ростом злоякісності астроцитом [34]. Зростання експресії цього гена корелює з вищим ступенем апоптозу в пухлинах. Можливо, наявність SEPT4 відображує здатність пухлинних клітин до апоптозу і може бути незалежним прогностичним фактором. Можливо також, що відмінності в результатах білкового аналізу і SAGE демонструють різницю в стабільності та здатності до трансляції цієї мРНК у нормальних і пухлинних астроцитах.

«Ярликів» гена *FAT2* (*MEGF1*) взагалі немає в жодній SAGE-бібліотеці астроцитом II–IV ступеня злоякісності. Цей білок є членом родини кадгеринів – групи білків інтегральної мембрани, які ха-

рактизуються наявністю повторів кадгеринового типу. Крім 34 тандемних повторів кадгеринового типу, білок містить два EGF-подібних повтори і один домен ламініну G [35, 36]. Він є другим ідентифікованим людським гомологом гена *FAT* дрозофіли, який кодує пухлинний супресор, що має важливу функцію контролю клітинної проліферації упродовж розвитку дрозофіли. Гібридизація *in situ* показала продукцію мРНК у гранулярних клітинах (нейронах малого розміру) внутрішнього екстернального гермінального шару і мігруючих гранулярних клітинах, у той час як у проліферуючих клітинах зовнішнього екстернального гермінального шару *FAT2* не експресується [37]. Вірогідно, білок *FAT2* відповідає за клітинну адгезію, яка контролює клітинну проліферацію і відіграє важливу роль у розвитку головного мозку.

Результати, отримані нами в цій роботі, підтверджують і розширюють дані інших авторів, стимулюють пошук нових терапевтичних мішеней для гліальних пухлин. Гени, експресія яких зовсім не визначається в гліобlastомах (*CPNE6*, *KCNQ2*, *GALNT9*, *SLC1A6*, *GRM4*, *FSTL5*, *FAT2*, *NEUROD1*), є найвірогіднішими кандидатами на роль пухлиносупресорних генів серед 85 генів, визначених методом SAGE.

Таким чином, в даній роботі ми ідентифікували близько 100 генів із зниженою більш ніж у 5 разів експресією в астроцитарних гліомах II–IV ступеня злоякісності. Деякі з них є потенційними пухлиносупресорними генами. Аномалії, які призводять до інактивзації пухлиносупресорних генів, часто пов'язані із зменшенням рівня їхньої експресії. У певних пухлинах або клітинних лініях можуть відбуватися делеції в одній або обох копіях гена, метилювання промотору, мутації сайту сплайсингу, нонсенс-мутації або комбінації цих подій, що ініціюють передчасну термінацію трансляції і дестабілізують мРНК-транскрипти. Такі мутації часто пов'язані з повною відсутністю або частковим зниженням рівня експресії пухлиносупресорного гена [38].

Використання методу SAGE допомагає у виявленні подібних генів і розумінні їхніх функцій [39]. Однак визначити знижені рівні експресії генів у пухлині – це лише перший крок на початку довгого ланцюга експериментів з ідентифікації пухлино-

супресорних генів. Другий етап включає функціональні дослідження для поглиблення розуміння зв'язку молекулярних подій і їхньої взаємодії. Подальша характеристика дозволить використовувати ці гени для діагностики і лікарського прогнозу, протипухлинної терапії і молекулярної класифікації злоякісних новоутворень.

Роботу частково профінансовано Національною академією наук України в рамках програм «Новітні медико-біологічні проблеми та оточуюче середовище людини» і «Фундаментальні основи генетики, протеоміки та новітніх біотехнологій», а також Міністерством освіти і науки у рамках програми спільних дій між Україною і Францією в галузі науково-технологічного співробітництва «Дніпро».

*V. V. Dmitrenko, O. I. Bojko, K. O. Shostak, N. Ya. Vitak, T. V. Bukreeva, V. D. Rozumenko, T. A. Malysheva, M. I. Shamayev, Yu. P. Zozulya, V. M. Kavsan*

Characterization of genes, down-regulated in human glioma, potential tumor suppressor genes

#### Summary

*Comparison of gene expression profiles in human normal brain and glioblastoma using SAGE database revealed 129 genes with 5-fold difference of expression level in glioblastoma ( $P < 0.05$ ), 85 of them were down-regulated. The number of genes with 5-fold down-regulated expression is lower in the diffuse and anaplastic astrocytomas. Five-fold decrease in the expression in the diffuse astrocytoma and nearly the same expression levels in the anaplastic astrocytoma and glioblastoma were revealed for 9 genes only. For overwhelming majority of inactivated genes in the low-grade astrocytoma the expression decreased progressively in the subsequent stages of malignant progression of astrocytoma, expression levels of some genes were very low or undetectable in glioblastoma, the most aggressive brain tumor. The decreased expression of selected genes in glioblastoma was confirmed by Northern analysis and RT-PCR. Some genes, described in this work, may encode the tumor suppressors and their decreased expression may play an important role in initiation and progression of human glioma.*

*Keywords: glioma, astrocytoma, glioblastoma, down-regulated genes, potential tumor suppressors.*

*V. V. Дмитренко, О. І. Бойко, Е. А. Шостак, Н. Я. Витак, Т. В. Букреева, В. Д. Розуменко, Т. А. Малышева, М. И. Шамаев, Ю. П. Зозуля, В. М. Кавсан*

Характеристика генов со сниженной экспрессией в глиомах человека – потенциальных опухолесупрессорных генов

#### Резюме

*В результате сравнения профилей экспрессии генов в нормальном головном мозге и глиобlastоме с использованием базы данных серийного анализа геной экспрессии (Serial Analysis of*



*Gene Expression, SAGE*) виявлені 129 генів з більш ніж п'ятикратним зменшенням рівня експресії ( $P < 0,05$ ) в гліобластомі, з яких 85 генів – со зниженою експресією. В дифузійній і анапластичній астроцитомах кількість генів со зниженою в п'ять раз експресією менше. Лише для дев'яти генів п'ятикратне зниження експресії происходит в дифузійних астроцитомах і виявляється приблизительно на такому ж рівні в анапластичних астроцитомах і в гліобластомах. Для подавляючого більшості інактивованих генів рівень експресії зменшується в дифузійних астроцитомах і послідовательно зменшується на дальніших стадіях злокачественної прогресії астроцитома, причем в гліобластомах – найбільше злокачественних проявленнях гліальних опухолей – експресія окремих генів очень низка или совсем отсутствует. Нозерн-гібридизация і ОТ-ПЦР (обратная транскрипция–полимеразная цепная реакция) подтвердили зменшеную експресію в гліобластомах произвольно отобранных генів. Некоторые гены, описанные в этой работе, могут кодировать опухолевые супрессоры и их зменшенная експресія, очевидно, играет важную роль в инициации и прогрессии глиом человека.

Ключевые слова: гліома, астроцитома, гліобластома, зменшенная експресія генів, потенціальні опухолесупрессорные гены.

#### ПЕРЕЛІК ЛІТЕРАТУРИ

1. Loging W. T., Lal A., Siu I. M., Loney T. L., Wikstrand C. J., Marra M. A., Prange C., Bigner D. D., Strausberg R. L., Riggins G. J. Identifying potential tumor markers and antigens by database mining and rapid expression screening // *Genome Res.*–2000.–**10**.–P. 1393–1402.
2. V. Kavsan, K. Shostak, V. Dmitrenko, Y. Zozulya, V. Rozumenko, J. Demotes-Mainard. Characterization of genes with significantly increased expression in human glioblastomas // *Цитология и генетика.*–2005.–**39**, № 6.–С. 37–49.
3. Дмитренко В. В., Бойко О. І., Шостак К. О., Смирченко О. Т., Букресва Т. В., Розуменко В. Д., Малишева Т. А., Шамаєв М. І., Зозуля Ю. П., Кавсан В. М. Надекспресія генів на різних стадіях розвитку астроцитарних гліом // *Біополімери і клітина.*–2006.–**22**, № 1.–С. 38–48.
4. Chomczynski P., Sacchi N. Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction // *Anal. Biochem.*–1987.–**162**.–P. 156–159.
5. Rae F. K., Stephenson S. A., Nicol D. L., Clements J. A. Novel association of a diverse range of genes with renal cell carcinoma as identified by differential display // *Int. J. Cancer.*–2000.–**88**.–P. 726–732.
6. Kavsan V., Shostak K., Dmitrenko V., Chausovskiy T., Zozulya Y., Demotes-Mainard J. Peculiarities of molecular events in human glial tumors revealed by serial analysis of gene expression (SAGE) // *Exp. Oncol.*–2004.–**26**.–P. 196–204.
7. Lal A., Lash A. E., Altschul S. F., Velculescu V., Zhang L., McLendon R. E., Marra M. A., Prange C., Morin P. J., Polyak K., Papadopoulos N., Vogelstein B., Kinzler K. W., Strausberg R. L., Riggins G. J. A public database for gene expression in human cancers // *Cancer Res.*–1999.–**59**.–P. 5403–5407.
8. Markert J. M., Fuller C. M., Gillespie G. Y., Bubien J. K., McLean L. A., Hong R. L., Lee K., Gullans S. R., Mapstone T. B., Benos D. J. Differential gene expression profiling in human brain tumors // *Physiol. Genomics.*–2001.–**5**.–P. 21–33.
9. Ljubimova J. Y., Lakhter A., Loksh A., Yong W. H., Riedinger M. S., Miner J. H., Sorokin M. L., Ljubimov A. V., Black K. L. Overexpression of a4 chain-containing laminins in human glial tumors identified by gene microarray analysis // *Cancer Res.*–2001.–**61**.–P. 5601–5610.
10. Ryffel G. U., McCarthy B. J. Complexity of cytoplasmic RNA in different mouse tissues measured by hybridization of polyadenylated RNA to complementary DNA // *Biochemistry.*–1975.–**14**.–P. 1379–1385.
11. Croizat B., Berthelot F., Felsani A., Gros F. Complexity of polysomal polyadenylated RNA in mouse whole brain and cortex // *FEBS Lett.*–1979.–**103**.–P. 138–143.
12. Ekstrand A. J., Longo N., Hamid M. L., Olson J. J., Liu L., Collins V. P., James C. D. Functional characterization of an EGF receptor with a truncated extracellular domain expressed in glioblastomas with *EGFR* gene amplification // *Oncogene.*–1994.–**9**.–P. 2313–2320.
13. Hansen T. V., Nielsen F. C. Regulation of neuronal cholecystokinin gene transcription // *Scand. J. Clin. Lab. Invest. Suppl.*–2001.–**234**.–P. 61–67.
14. Camby I., Salmon I., Danguy A., Pasteels J. L., Brotchi J., Martinez J., Kiss R. Influence of gastrin on human astrocytic tumor cell proliferation // *J. Nat. Cancer Inst.*–1996.–**88**.–P. 594–600.
15. Lefranc F., Chaboteaux C., Belot N., Brotchi J., Salmon I., Kiss R. Determination of RNA expression for cholecystokinin/gastrin receptors (CCKA, CCKB and CCKC) in human tumors of the central and peripheral nervous system // *Int. J. Oncol.*–2003.–**22**.–P. 213–219.
16. Allen J. M., Hoyle N. R., Yeats J. C., Ghati M. A., Thomas D. G., Bloom S. R. Neuropeptides in neurological tumours // *J. Neurooncol.*–1985.–**3**.–P. 197–202.
17. Przedborski S., Goldman S., Schiffmann S. N., Vierendeels G., Depierreux M., Levivier M., Hildebrand J., Vanderhaeghen J. J. Neuropeptide Y, somatostatin, and cholecystokinin neurone preservation in anaplastic astrocytomas // *Acta Neuropathol.*–1988.–**76**.–P. 507–510.
18. Lopes M. B., Altermatt H. J., Scheithauer B. W., Shepherd C. W., VandenBerg S. R. Immunohistochemical characterization of subependymal giant cell astrocytomas // *Acta Neuropathol.*–1996.–**91**.–P. 368–375.
19. Kaufmann R., Schoneberg T., Lindschau C., Haller H., Ott T. Cholecystokinin induced signaling in rat glioma C6 cells // *Neuropeptides.*–1995.–**29**.–P. 251–256.
20. Kaufmann R., Schafberg H., Zieger M., Henklein P., Nowak G. Protein kinase C is involved in cholecystokinin octapeptide-induced proliferative action in rat glioma C6 cells // *Neuropeptides.*–1998.–**32**.–P. 185–189.
21. Hafner C., Schmitz G., Meyer S., Bataille F., Hau P., Langmann T., Dietmaier W., Landthaler M., Vogt T. Differential gene expression of Eph receptors and ephrins in benign human tissues and cancers // *Clin. Chem.*–2004.–**50**.–P. 490–499.
22. Nakada M., Niska J. A., Tran N. L., McDonough W. S., Berens M. E. EphB2/R-Ras signaling regulates glioma cell adhesion, growth, and invasion // *Amer. J. Pathol.*–2005.–**167**.–P. 565–576.
23. Fox B. P., Tabone C. J., Kandpal R. P. Potential clinical relevance of Eph receptors and ephrin ligands expressed in

- prostate carcinoma cell lines // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*–2006.–**342**.–P. 1263–1272.
24. Fox B. P., Kandpal R. P. Transcriptional silencing of EphB6 receptor tyrosine kinase in invasive breast carcinoma cells and detection of methylated promoter by methylation specific PCR // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*–2006.–**340**.–P. 268–276.
  25. Hafner C., Bataille F., Meyer S., Becker B., Roesch A., Landthaler M., Vogt T. Loss of EphB6 expression in metastatic melanoma // *Int. J. Oncol.*–2003.–**23**.–P. 1553–1559.
  26. Tang X. X., Robinson M. E., Riceberg J. S., Kim D. Y., Kung B., Titus T. B., Hayashi S., Flake A. W., Carpentieri D., Ikegaki N. Favorable neuroblastoma genes and molecular therapeutics of neuroblastoma // *Clin. Cancer Res.*–2004.–**10**.–P. 5837–5844.
  27. Ren Y., Chan H. M., Fan J., Xie Y., Chen Y. X., Li W., Jiang G. P., Liu Q., Meinhardt A., Tam P. K. Inhibition of tumor growth and metastasis *in vitro* and *in vivo* by targeting macrophage migration inhibitory factor in human neuroblastoma // *Oncogene*.–2006.–**25**.–P. 3501–3508.
  28. Prichard L., Deloulme J. C., Storm D. R. Interactions between neurogranin and calmodulin *in vivo* // *J. Biol. Chem.*–1999.–**274**.–P. 7689–7694.
  29. Devireddy L. R., Green M. R. Transcriptional program of apoptosis induction following interleukin 2 deprivation: identification of RC3, a calcium/calmodulin binding protein, as a novel proapoptotic factor // *Mol. Cell Biol.*–2003.–**23**.–P. 4532–4541.
  30. Svaren J., Ehrig T., Abdulkadir S. A., Ehrenguber M. U., Watson M. A., Milbrandt J. *EGFR* target genes in prostate carcinoma cells identified by microarray analysis // *J. Biol. Chem.*–2000.–**275**.–P. 38524–38531.
  31. Yokota T., Kouno J., Adachi K., Takahashi H., Teramoto A., Matsumoto K., Sugisaki Y., Onda M., Tsunoda T. Identification of histological markers for malignant glioma by genome-wide expression analysis: dynein, alpha-PIX and sorcin // *Acta Neuropathol.*–2006.–**111**.–P. 29–38.
  32. Louis D. N. A molecular genetic model of astrocytoma histopathology // *Brain Pathol.*–1997.–**7**.–P. 755–764.
  33. Trog D., Moenkemann H., Breipohl W., Schueller H., Schild H., Golubnitschaja O. Non-sufficient cell cycle control as possible clue for the resistance of human malignant glioma cells to clinically relevant treatment conditions // *Amino Acids*.–2006. Nov 3; [Epub ahead of print]
  34. Gottfried Y., Voldavsky E., Yodko L., Sabo E., Ben-Itzhak O., Larisch S. Expression of the pro-apoptotic protein ARTS in astrocytic tumors: correlation with malignancy grade and survival rate // *Cancer*.–2004.–**101**.–P. 2614–2621.
  35. Nakayama M., Nakajima D., Nagase T., Nomura N., Seki N., Ohara O. Identification of high-molecular-weight proteins with multiple EGF-like motifs by motif-trap screening // *Genomics*.–1998. – **51**.–P. 27–34.
  36. Nollet F., Kools P., van Roy F. Phylogenetic analysis of the cadherin superfamily allows identification of six major subfamilies besides several solitary members // *J. Mol. Biol.*–2000.–**299**.–P. 551–572.
  37. Nakayama M., Nakajima D., Yoshimura R., Endo Y., Ohara O. MEGF1/fat2 proteins containing extraordinarily large extracellular domains are localized to thin parallel fibers of cerebellar granule cells // *Mol. Cell Neurosci.*–2002.–**20**.–P. 563–578.
  38. Louro I. D., Bailey E. C., Ruppert J. M. Suppression subtractive hybridization for identification and functional analysis of tumor suppressor genes // *Methods Mol. Biol.*–2003.–**222**.–P. 453–462.
  39. Boon K., Riggins G. J. SAGE as a strategy to isolate cancer-related genes // *Methods Mol. Biol.*–2003.–**222**.–P. 463–479.

УДК 577.21:577.214.622+616-006.484.04  
Надійшла до редакції 26.12.06