

## ИСПОЛЬЗОВАНИЕ NotI-МИКРОЧИПОВ ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ ИЗМЕНЕНИЙ В ЛОКУСАХ ГЕНОВ, ПОТЕНЦИАЛЬНО УЧАСТВУЮЩИХ В РАЗВИТИИ РАКА ШЕЙКИ МАТКИ

В. И. КАШУБА<sup>\*1,2</sup>, И. Я. СКРИПКИНА<sup>\*1,2</sup>, Д. В. САРАЕВ<sup>3</sup>, В. В. ГОРДИЮК<sup>1</sup>, А. Б. ВИННИЦКАЯ<sup>4</sup>, Л. А. ЦЫБА<sup>1,2</sup>, П. В. ПОГРЕБНОЙ<sup>5</sup>, В. М. БЛИНОВ<sup>3</sup>, Е. Р. ЗАБАРОВСКИЙ<sup>2</sup>, А. В. РЫНДИЧ<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины, Киев;  
e-mail: a.v.rynditch@imbg.org.ua, iskripkina@yahoo.com;

<sup>2</sup>Microbiology and Tumor Biology Center, Karolinska Institute, Stockholm, Sweden;

<sup>3</sup>Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор», Кольцово, Россия;

<sup>4</sup>Институт онкологии Академии медицинских наук Украины, Киев, Украина;

<sup>5</sup>Институт экспериментальной патологии, онкологии и радиобиологии им. Р. Е. Кавецкого НАН Украины, Киев

*Изучение структурных и эпигенетических изменений клеточного генома, ассоциированных с раковыми заболеваниями, является важнейшим направлением в понимании механизмов канцерогенеза. Для исследования этих изменений была разработана технология ДНК-микрочипов на основе NotI-связывающих клонов. С помощью данной технологии были проанализированы 28 образцов хирургически удаленных опухолей рака шейки матки для выявления метилирования, делеций или амплификаций в NotI-клонах хромосомы 3 человека. Идентифицированы изменения в 109 из 182 NotI-клонах с различной частотой встречаемости. Для 17 локусов генов эти изменения встречаются более чем в 35% случаев, что указывает на возможную связь этих генов с развитием данного заболевания.*

*Ключевые слова:* микрочипы, геномная ДНК, дифференциальная экспрессия генов, NotI-клоны, гомозиготная делеция, гемизиготная делеция, метилирование, хромосома 3 человека, биологические маркеры опухолей.

Технология микрочипов эволюционировала от базовой гибридизации проба-мишень, ген-ген и от скрининга кДНК-библиотек на гридах к гибридизации огромного (до десятков тысяч) количества генов. Эта быстро развивающаяся технология позволила не только изучать дифференциальную экспрессию генов, но и показала себя как мощный инструмент в поиске новых генов, детекции однонуклеотидного полиморфизма (SNP, Signal Nucleotide Polimorphysm), изучения экзон-интронного строения генов, филогенетическом анализе, идентификации опухолевых маркеров, установления мишеней воздействия, определения механизмов действия препаратов, применяющихся в лечении онкологических заболеваний и диагностики генов, ассоциированных со специфическими заболеваниями [1].

В частности, благодаря недавним достижениям в исследованиях онкологических заболеваний с использованием микрочипов, были

установлены более четкие различия между острым миелоидным лейкозом и острым лимфоцитарным лейкозом, что непосредственно повлияло на терапию этих заболеваний [2]. На основании анализа профилей экспрессии генов предложена новая молекулярная классификация 10 видов карцином, а также проведен ряд исследований, позволяющих дифференциально диагностировать рак молочной железы, меланому и аденокарциному легкого [1].

Для изучения структурных изменений в геноме человека, связанных с различными онкологическими заболеваниями, предложены ДНК-микрочипы, основанные на клонах P1, PAC и BAC (искусственные хромосомы с геномным фрагментом до 1 млн.п.н.) [3]. Однако конструирование таких микрочипов требует значительных материальных и временных затрат и не применимо для изучения эпигенетических изменений. Между тем использование небольших клонированных геномных фрагментов позволяет значительно уменьшить затраты и сделать микрочипы инструментом, доступным широкому кругу исследователей.

Кроме этого, в большинстве экспериментов ДНК-пробы метят флуоресцентными

\*Вклад этих авторов в данную работу был равнозначный.

красителями [4]. При этом метится тотальная геномная ДНК, включая повторяющиеся элементы (SINE, LINE), что значительно ухудшает разрешающую способность при гибридизации, а методика “блокирования” этих повторов с помощью CotI-ДНК существенно занижает силу сигнала.

В данной работе мы предлагаем новую технологию приготовления ДНК-микрочипов, основанную на NotI-связывающих клонках и гомологичных им коротких пробах, лишённую перечисленных недостатков.

Ранее нами было показано, что хромосомные аберрации на хромосоме 3 человека часто встречаются при различных типах опухолей [5], поэтому предметом нашего исследования были выбраны структурные (делеция или амплификация) и эпигенетические (метилование) изменения ДНК хромосомы 3 в образцах эпителиальных опухолей.

В данной работе мы попытались идентифицировать такие изменения в 28 образцах тканей хирургически удалённых опухолей рака шейки матки.

### Материалы и методы

Геномную ДНК из образцов тканей опухолей выделяли, как описано Маниатисом и соавт. [6]. Для экстракции геномной ДНК навески тканей по 0,3–0,5 г, хранившиеся при –60 °С, гомогенизировали в жидком азоте, переносили в пробирки, куда добавляли 10 объёмов экстракционного буфера (10мМ трис-НСl, рН 8,0; 0,1 М ЕДТА, рН 8,0; 0,5% SDS), панкреатическую РНК-азу до 20 мкг/мл и протеиназу К (фирмы «Fermentas») до 100 мкг/мл. Лизат клеток помещали в водяную баню на 3 часа при 50 °С, периодически перемешивая. Раствор охлаждали до комнатной температуры, мягко смешивали в течение 10 мин с равным объёмом фенола (рН 8,0), центрифугировали 15 мин при 3000 об/мин. Отбирали вязкую водную фазу и дважды повторяли экстракцию фенолом, затем проводили одну экстракцию смесью фенол-хлороформ (1 : 1) и хлороформом. ДНК осаждали в присутствии 0,2 объёма 10 М ацетата аммония и 2 объёмов этанола. Нити геномной ДНК промывали 70%-м этанолом и просушивали не более 1 мин на воздухе. ДНК растворяли в ТЕ (10 мМ трис, рН 8,0; 1 мМ ЕДТА, рН 8,0), медленно перемешивая на роллере в течение 24 часов при комнатной температуре.

Качество препаратов ДНК контролировали спектрометрически и при помощи электрофореза в 0,6%-м агарозном геле. Контроль

рестрикции проводили с EcoRI («Fermentas»), согласно рекомендации изготовителя.

Препараты геномной ДНК хранились при –20 °С.

Подготовку проб осуществляли, следуя рекомендации [7]. Для этого 3 мкг ДНК из образцов обрабатывали рестриктазой NotI и лигировали с NotI-линкером, используя олигонуклеотиды NotAntBio 5'-Biotin-caggactgacccttttggaccgc-3' и NotAntComp 5'-ggccgcggtcccaaaagggtcagtctg-3'. Далее ДНК обрабатывали рестриктазой Sau3AI и иммобилизовали на магнитных шариках Dynabeads M-280 Streptavidin (Dyna). После отмывки несвязавшейся ДНК пробы лигировали с Sau3AI-линкером, применяя олигонуклеотиды SauZgtBlock 5'-gatcctcaaacgcgt-block-3' и SauZgtComp 5'-ggcgatctatcctagacccttacgcgtttgag-3'. Введение флуоресцентной метки (опухоль – dCTP-Cy5, норма – dCTP-Cy3) осуществлялось с помощью ПЦР с использованием праймеров Anti-univ 5'-cagcactgacccttttggacc-3' и Zgt99 5'-ggcgatctatcctagaccctt-3'.

Слайды готовили на споттере Q-Array Mini, GENETIX согласно протоколу производителя. Гибридизация образцов проводилась на приборе Lucidea Base, «Amersham Pharmacia» (Великобритания) Biotech, следуя руководству производителя. Слайды анализировали, используя сканер (GenePix 4000B) и программное обеспечение (GenePix Pro) фирмы «Amersham Pharmacia Biotech» (Великобритания).

### Результаты и обсуждение

Для приготовления микрочипов нами были использованы NotI-связывающие клоны – фрагменты геномной ДНК вокруг сайта рестрикции NotI длиной до 15 т.п.н. [8]. Большинство NotI-сайтов локализуется в областях генов и являясь потенциальными генетическими маркерами структурных изменений хромосомы [9]. Кроме того, каждый сайт NotI (GCGGCCGC) содержит два CpG-динуклеотида, цитозин в котором может быть метилирован. Рядом авторов показано, что такие CpG-островки связаны с промоторными областями ряда генов (например таких, как *RB*, *p16*, *VHL*, *RASSF1A*) и часто метилированы в различных типах опухолей человека [10].

Таким образом, использование NotI-микрочипов позволяет идентифицировать не только структурные (делеции и амплификации), но и эпигенетические изменения (метилование) в ДНК опухолевых образцов.

Подготовка ДНК проб осуществлялась с помощью модифицированной методики [7],

при которой метится только 0,1–0,5% ДНК полного генома и не содержатся повторяющиеся последовательности. Схема приготовления пробы представлена на рис. 1.

Отличительными преимуществами нашего метода является то, что, во-первых, в эксперименте использовалась рестриктаза NotI, чей сайт узнавания содержит два CpG-динук-

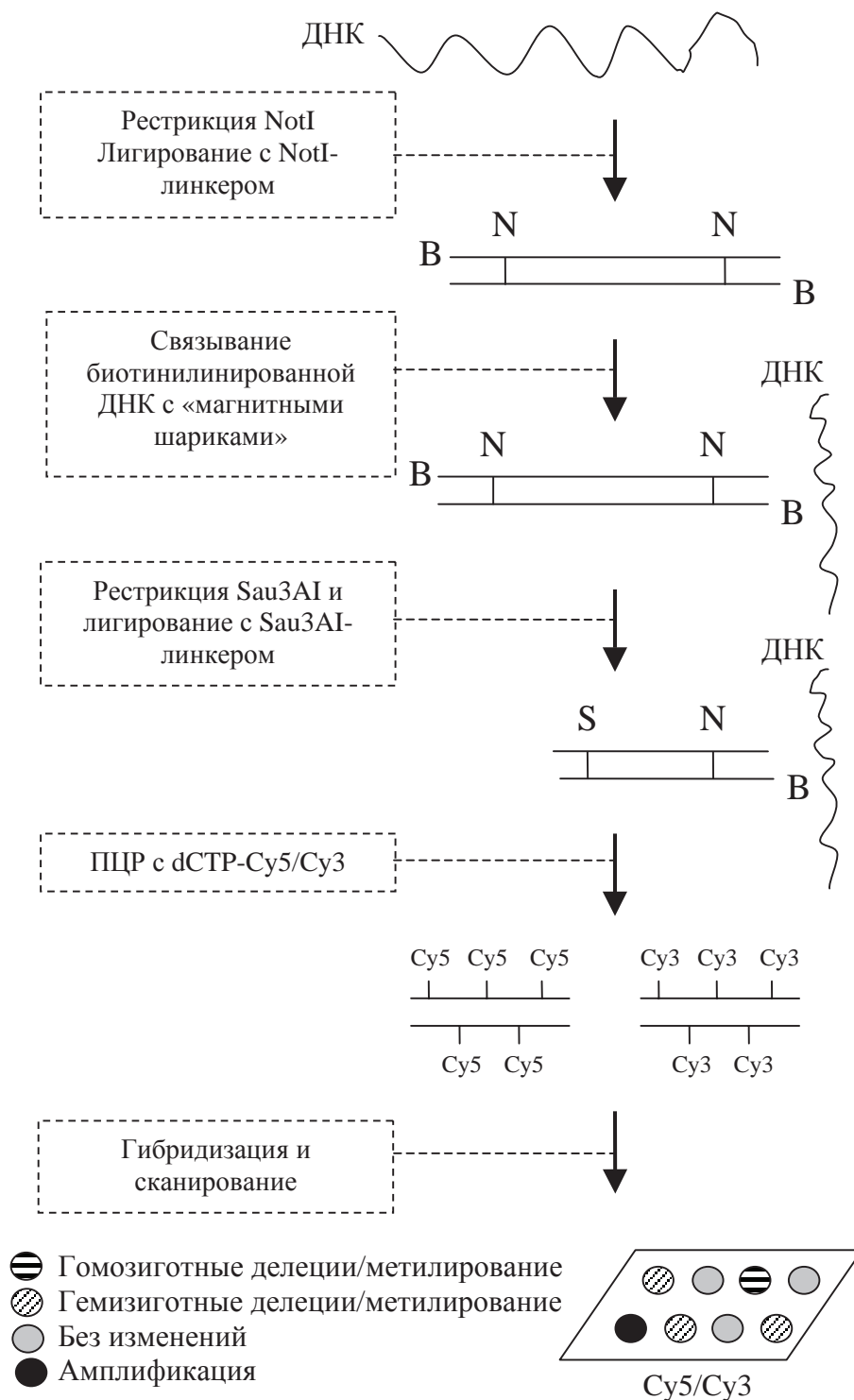


Рис. 1. Схема приготовления пробы для гибридизации: N- рестриктаза NotI, S - рестриктаза Sau3AI, В - биотин, Cy5/Cy3, меченный dCTP-Cy5/Cy3.

леотида, метилирование цитозина в которых препятствует узнаванию рестриктазой. Так, в случае гомо- или гемизиготного метилирования NotI-сайта в меченой пробе будет отсутствовать этот локус полностью или частично.

Во-вторых, использование рестриктазы Sau3AI позволило получить фрагменты меченой ДНК размером от 100 до 2000 п.н., а биотинилированный NotI-линкер дал возможность избавиться от фрагментов ДНК, не связавшихся с магнитными шариками. Таким образом, в полученной пробе содержатся только короткие NotI-Sau3AI фрагменты ДНК, гомологичные NotI-связывающим клоном, расположенным на микрочипе.

После приготовления проб в ДНК опухолевых и нормальных клеток вводилась метка, содержащая нерадиоактивный флуоресцентный краситель Cy5 или Cy3 соответственно. Меченые ДНК-пробы смешивались и затем гибридизовались. Результаты гибридизации регистрировались при помощи сканера и обрабатывались с помощью компьютерной программы GenePix, позволяющей провести псевдоокраску изображений в красный и зеленый цвет и представить наглядно разницу в содержании тех или иных изменений в молекулах образцов опухолевых клеток относительно нормы.

Отношения сигналов гибридизации ДНК из 28 образцов рака шейки матки представлены на рис. 2. Коэффициенты отношения сгруппированы в следующие интервалы: до 0,35 — гомозиготная делеция/метилирование, от 0,35 до 0,85 — гемизиготная делеция/метилирование, свыше 1,5 — амплификация.

В результате, из 182 NotI-сайтов хромосомы 3 изменения были зафиксированы в 109, причем с различной частотой встречаемости. На рис. 2 прямоугольниками с различными видами закрашивания отмечены отношения интенсивности сигнала гибридизации ДНК опухоли к нормальной ДНК. Четко видно, что гомозиготная делеция/метилирование встречается только в 4 случаях, амплификация отмечена в 24, а наиболее часто встречаются гемизиготные делеции/метилирование (81 случай).

В таблице представлены упорядоченные по частоте встречаемости локусы генов хромосомы 3 человека, которые имеют хотя бы одно структурное или эпигенетическое изменение. Для 17 генов такие изменения присутствуют более чем в 35% случаев. Причем, по данным литературы, 7 локусов генов (в таблице выделены курсивом) ассоциированы с различными видами карцином.

Так, в 71% случаев присутствует гемизиготная делеция/метилирование в так называемом локусе MINT24. Данный локус располагается в участке 3p26.2 хромосомы 3 и содержит дифференциально метилированный островок, ассоциированный с раком толстого кишечника [11].

В 64% случаев наблюдаются изменения в NotI-сайте, расположенном в области гена *BHLHB2* (альтернативные названия: *DEC1*; *STRA13*; *Stra14*; *SHARP-2*), который непосредственно вовлечен в механизмы контроля клеточной дифференциации. Кроме того, семейство этих генов связывают с развитием рака поджелудочной железы [12].

Представляется интересным тот факт, что локус, ассоциированный с рибосомальным геном *RPL15*, имеет гемизиготные делеции/метилирование в 43% образцов, что может приводить к снижению или даже к прекращению его экспрессии. Однако другими авторами [13] в случае рака пищевода отмечена вероятность различной экспрессии этого гена, наблюдаемая в клетках различного вида опухолей, хотя нельзя исключить, что эти различия связаны со стадиями их развития. Гемизиготные делеции/метилирование гена *RARBeta1* было обнаружено в 43% исследованных образцов. Гиперметилирование этого гена было отмечено как для рака шейки матки [14], так и для многих других видов опухолей, включая рак пищевода и рак печени [15].

Следующие 3 гена (*ITGA9*, *RBSP3*, *VHL*) при росте опухоли имеют изменения, встречающиеся в нашем случае с частотой 46, 39 и 36% соответственно [16]. *RBSP3* (альтернативные названия: *CTDSPL*; *PSR1*; *SCP3*; *HYA22*; *C3orf8*) был локализован в AP20-регионе и является геном-супрессором при развитии рака почки [17]. Опухолевый супрессор *VHL* регулирует реакцию на гипоксию и ингибирует ангиогенез. Наследование инактивированного аллеля гена *VHL* вызывает предрасположение к развитию синдрома фон Хиппеля-Линдау. Инактивация гена *VHL* характерна и для ряда форм ненаследственных опухолей. Так, мутации и/или гиперметилирование обеих аллелей гена *VHL* наблюдаются примерно в 80% случаев светлоклеточного рака почки [15].

Для остальных 10 локусов генов, в которых также наблюдаются изменения более чем в 35% случаев, либо нет данных о четкой связи с онкозаболеваниями или нет информации о функции гена. Однако эти гены могут потенциально участвовать в канцерогенезе исследуемого типа рака.

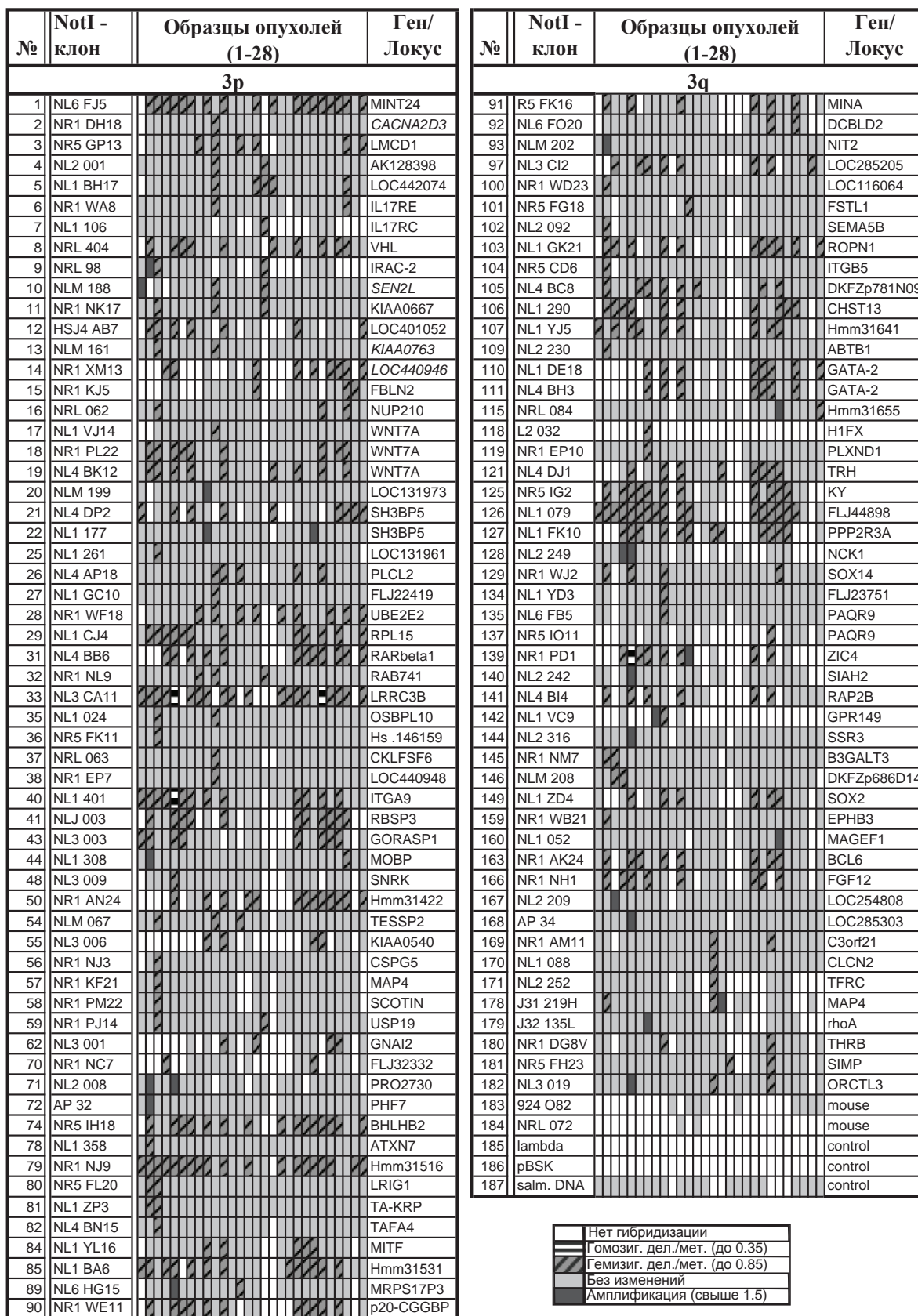


Рис. 2. Профиль гибридизации хирургически удаленных образцов рака шейки матки с NotI-клонами хромосомы 3 человека. Различной расцветкой показано отношение силы сигнала гибридизации ДНК опухоли к нормальной ДНК пациентов.

Изменения (делеция, метилирование, амплификация) в опухолях

№ клона	Ген/ Локус	Количество изменений (дел/мет/ампл)	%
3р			
NotI0033	LRRC3B	20	71
NotI0079	Hmm31516	19	68
<b>NotI0001</b>	<b>MINT24</b>	<b>18</b>	<b>64</b>
<b>NotI0074</b>	<b>BHLHB2</b>	<b>15</b>	<b>54</b>
<b>NotI0040</b>	<b>ITGA9</b>	<b>13</b>	<b>46</b>
NotI0050	Hmm31422	13	46
NotI0085	Hmm31531	13	46
<b>NotI0029</b>	<b>RPL15</b>	<b>12</b>	<b>43</b>
<b>NotI0031</b>	<b>RARBeta1</b>	<b>12</b>	<b>43</b>
<b>NotI0041</b>	<b>RBSP3</b>	<b>11</b>	<b>39</b>
NotI0090	p20-CGGBP	11	39
<b>NotI0008</b>	<b>VHL</b>	<b>10</b>	<b>36</b>
NotI0014	LOC440946	9	32
NotI0018	WNT7A	9	32
NotI0019	WNT7A	9	32
NotI0021	SH3BP5	9	32
NotI0028	UBE2E2	9	32
NotI0043	GORASP1	8	29
NotI0012	LOC401052	7	25
NotI0003	LMCD1	6	21
NotI0005	LOC442074	5	18
NotI0026	PLCL2	5	18
NotI0084	MITF	5	18
NotI0055	KIAA0540	4	14
NotI0062	GNAI2	4	14
NotI0009	IRAC-2	3	11
NotI0010	SEN2L	3	11
NotI0011	KIAA0667	3	11
NotI0015	FBLN2	3	11
NotI0016	NUP210	3	11
NotI0032	RAB741	3	11
NotI0054	TESSP2	3	11
NotI0004	AK128398	2	7
NotI0006	IL17RE	2	7
NotI0013	KIAA0763	2	7
NotI0022	SH3BP5	2	7
NotI0035	OSBPL10	2	7
NotI0044	MOBP	2	7
NotI0059	USP19	2	7
NotI0070	FLJ32332	2	7
NotI0071	PRO2730	2	7
NotI0080	LRIG1	2	7
NotI0081	TA-KRP	2	7
NotI0089	MRPS17P3	2	7
NotI0002	CACNA2D3	1	4
NotI0007	IL17RC	1	4
NotI0017	WNT7A	1	4
NotI0020	LOC131973	1	4
NotI0025	LOC131961	1	4
NotI0027	FLJ22419	1	4
NotI0036	Hs_146159	1	4
NotI0037	CKLF6	1	4
NotI0038	LOC440948	1	4
NotI0048	SNRK	1	4
NotI0056	CSPG5	1	4
NotI0057	MAP4	1	4
NotI0058	SCOTIN	1	4
NotI0072	PHF7	1	4
NotI0078	ATXN7	1	4
NotI0082	TAF4	1	4

№ клона	Ген/ Локус	Количество изменений (дел/мет/ампл)	%
3q			
NotI0126	FLJ44898	17	61
NotI0127	PPP2R3A	12	43
NotI0103	ROPN1	11	39
NotI0125	KY	11	39
NotI0106	CHST13	10	36
NotI0107	Hmm31641	9	32
NotI0139	ZIC4	9	32
NotI0097	LOC285205	8	29
NotI0105	DKFZp781N0997	8	29
NotI0110	GATA-2	8	29
NotI0121	TRH	8	29
NotI0163	BCL6	8	29
NotI0166	FGF12	8	29
NotI0111	GATA-2	7	25
NotI0091	MINA	6	21
NotI0141	RAP2B	6	21
NotI0149	SOX2	6	21
NotI0129	SOX14	4	14
NotI0178	MAP4	3	11
NotI0182	ORCTL3	3	11
NotI0092	DCBLD2	2	7
NotI0115	Hmm31655	2	7
NotI0118	HIFX	2	7
NotI0128	NCK1	2	7
NotI0142	GPR149	2	7
NotI0145	B3GALT3	2	7
NotI0146	DKFZp686D14170	2	7
NotI0169	C3orf21	2	7
NotI0180	THR3	2	7
NotI0181	SIMP	2	7
NotI0093	NIT2	1	4
NotI0100	LOC116064	1	4
NotI0101	FSTL1	1	4
NotI0102	SEMA5B	1	4
NotI0104	ITGB5	1	4
NotI0109	ABTB1	1	4
NotI0119	PLXND1	1	4
NotI0134	FLJ23751	1	4
NotI0135	PAQR9	1	4
NotI0137	PAQR9	1	4
NotI0140	SIAH2	1	4
NotI0144	SSR3	1	4
NotI0159	EPHB3	1	4
NotI0160	MAGEF1	1	4
NotI0167	LOC254808	1	4
NotI0168	LOC285303	1	4
NotI0170	CLCN2	1	4
NotI0171	TFRC	1	4
NotI0179	rhoA	1	4

Сравнение полученных данных с данными литературы свидетельствует о том, что по крайней мере два потенциальных кандидата в гены-супрессоры роста опухолей, *RBSP3* и *ITGA9*, локализованных на хромосоме 3, чьи изменения были продемонстрированы при раке шейки матки другими методами [18], находятся в числе 17 локусов генов, наиболее часто измененных по нашим данным. Изменения в других генах-супрессорах опухолевого роста, таких как *RASSF1A* [19], *GOLGA4*, *APRG1*, *VILL* [18], *FHIT* [20], также картированных на хромосоме 3 и отмеченных как потенциально перспективные маркеры рака шейки матки, не были выявлены нами в числе наиболее измененных генов. Это связано с отсутствием NotI-сайтов в перечисленных локусах генов.

Данные исследования – только первый шаг в поиске маркеров эпителиальных опухолей. ДНК-микрочипы служат для создания массива данных и выбора объектов для дальнейших исследований. Для вычленения наиболее перспективных кандидатов необходимо привлечение дополнительных методов скрининга. В качестве таких методов оценки потенциального маркера можно использовать гибридизацию *in situ* на тканевых чипах и оценку уровня и/или состояния белкового продукта этого гена в клетках. При этом главное требование – необходимость доказать клиническую значимость выявленного феномена, поскольку далеко не всякий, пусть даже кардинально меняющий уровень экспрессии ген, может рассматриваться как маркер.

Работа выполнялась по грантам:

1. № 03-51-4983 - “NotI microarrays for identification of new cancer-causing genes” (“Ин-тас”); 2. № 6/2004 - “Идентификация молекулярно-генетических маркеров для диагностики онкологических заболеваний”.

## ВИКОРИСТАННЯ NotI-МІКРОЧИПІВ ДЛЯ ІДЕНТИФІКАЦІЇ ЗМІН У ЛОКУСАХ ГЕНІВ, ЩО ПОТЕНЦІЙНО ЗАДІЯНІ В РОЗВИТКУ РАКА ШИЙКИ МАТКИ

В. І. Кашуба<sup>1,2</sup>, І. Я. Скрипкина<sup>1,2</sup>,  
Д. В. Сараєв<sup>3</sup>, В. В. Гордиюк<sup>1</sup>,  
А. Б. Вінницька<sup>4</sup>, Л. О. Ціба<sup>1,2</sup>,  
П. В. Погрібний<sup>5</sup>, В. М. Білінов<sup>3</sup>,  
Є. Р. Забаровський<sup>2</sup>, А. В. Риндич<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Інститут молекулярної біології і генетики  
НАН України, Київ;

e-mail: a.v.rynditch@imbg.org.ua, iskripkina@yahoo.com;

<sup>2</sup>Microbiology and Tumor Biology Center,  
Karolinska Institute, Stockholm, Sweden;

<sup>3</sup>Державний науковий центр вірусології і  
біотехнології «Вектор», Кольцово, Росія;

<sup>4</sup>Інститут онкології АМН України, Київ;

<sup>5</sup>Інститут експериментальної патології,  
онкології і радіобіології ім. Р. Є. Кавецького  
НАН України, Київ

Вивчення структурних та епігенетичних змін геному клітини, які асоційовані з раковими захворюваннями, є найважливішим напрямом у визначенні механізмів канцерогенезу. Для дослідження цих змін було розроблено технологію микрочипів на основі NotI-зв'язуючих клонів. За допомогою цієї технології проаналізовано 28 зразків хірургічно вилучених візців раку шийки матки на наявність метилювання, делецій чи ампліфікацій в NotI-клонах хромосоми 3 людини. Ідентифіковані зміни в 109 із 182 NotI-клонів із різною частотою проявів. Для 17 локусів генів ці зміни зустрічаються більш ніж у 35% випадків, що свідчить про можливий зв'язок цих генів із розвитком цього захворювання.

Ключові слова: микрочипи, геномна ДНК, диференційна експресія генів, NotI-клони, гомозиготна делеція, гемізиготна делеція, метилювання, хромосома 3 людини, біологічні маркери пухлин.

**IDENTIFICATION OF CHANGES  
IN GENE LOCI POTENTIALLY  
ASSOCIATED WITH CERVICAL  
CANCER USING NotI MICROARRAYS**

V. I. Kashuba<sup>1,2</sup>, I. Ya. Skrypkina<sup>1,2</sup>,  
D. V. Saraev<sup>3</sup>, V. V. Gordiyuk<sup>1</sup>,  
A. B. Vinnytska<sup>4</sup>, L. O. Tsyba<sup>1,2</sup>,  
P. V. Pogrebnoy<sup>5</sup>, V. M. Blinov<sup>3</sup>,  
E. P. Zabarovsky<sup>2</sup>, A. V. Rynditch<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institute of Molecular Biology and Genetics,  
National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv;  
e-mail: a.v.rynditch@imbg.org.ua, iskripkina@yahoo.com;

<sup>2</sup>Microbiology and Tumor Biology Center,  
Karolinska Institute, Stockholm, Sweden;

<sup>3</sup>State Research Centre of Virology  
and Biotechnology VECTOR, Koltsovo, Russia;

<sup>4</sup>Institute of Oncology, Academy of Medical  
Sciences of Ukraine, Kyiv;

<sup>5</sup>Kavetsky Institute of Experimental Pathology,  
Oncology and Radiobiology, National  
Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

**S u m m a r y**

The investigation of the cancer-associated structural and epigenetic changes in cell genome is a major approach for understanding mechanisms of cancerogenesis. To investigate these genome changes, novel technique of microarrays comprising NotI-linking genome clones was developed. Twenty eight samples from patients with cervical cancer were analyzed using NotI microarrays of human chromosome 3. Deletions, amplifications and methylation were detected for 109 out of 182 NotI clones with different frequency. Notably, 17 NotI-linking clones showed genomic changes in more than 35% of tumor samples investigated, which suggests involvement of genes associated with these clones in development of cervical cancer.

**Key words:** microarrays, genomic DNA, differential gene expression, NotI clones, homozygous deletion, hemizygous deletion, DNA methylation, human chromosome 3, biological tumor markers.

1. *Khimani A. H., Mhashilkar A. M., Mikulskis A. et al. // BioTechniques. — 2005. — 38. — P. 739–745.*

2. *Su A. I., Welsh J. B., Sapinoso L. M. et al. // Cancer Res. — 2001. — 61, N 20. — P. 7388–7393.*
3. *Hui A. B. // Lab. Invest. — 2001. — 81, N 5. — P. 717–23.*
4. *Pollack J. R., Perou T., Alizadeh A. A. et al. // Nat. Genet. — 1999. — 23. — P. 41–46.*
5. *Zabarovsky E. R., Lerman M. I., Minna J. D. // Oncogene. — 2002. — 21. — P. 6915–6935.*
6. *Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Молекулярное клонирование. — Мир, 1984. — С. 479.*
7. *Li J., Protopopov A., Wang F. et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 2002. — 99, N 16. — P. 10724–10729.*
8. *Zabarovsky E. R. // Nucl. Acids Res. — 1990. — 18. — P. 6319–6324.*
9. *Zabarovsky E. R., Gizatullin R., Podowski R. M. et al. // Ibid. — 2000. — 28. — P. 1635–1639.*
10. *Zochbauer-Muller S., Fong K. M., Virmani A. K. et al. // Cancer Res. — 2001. — 61. — P. 249–255.*
11. *Toyota M., Ho C., Ahuja N. et al. // Ibid. — 1999. — 59, N 10. — P. 2307–12.*
12. *Yoon D. Y., Buchler P., Saarikoski S. T. et al. // Biochem. Biophys. Res. Commun. — 2001. — 288, N 4. — P. 882–886.*
13. *Wang Q. // Gene. — 2001. — 263, N 1–2. — P. 205–209.*
14. *Feng Q., Balasubramanian A., Hawes S. E. et al. // J. Natl. Cancer. Inst. — 2005. — 97, N 4. — P. 273–278.*
15. *Kuroki T., Trapasso F., Yendamuri S. et al. // Cancer Res. — 2003. — 63, N 13. — P. 3724–3728.*
16. *Hibi K., Yamakawa K., Ueda R. et al. // Oncogene. — 1994. — 9, N 2. — P. 611–619.*
17. *Kashuba V. I., Li J., Wang F., Senchenko V. N. et al. // PNAS. — 2004. — 101, N 14. — P. 4906–4911.*
18. *Senchenko V., Liu J., Braga E. et al. // Oncogene. — 2003. — 22, N 19. — P. 2984–2992.*
19. *Maliukova A. V., Loginov V. I., Khodyrev D. S. et al. // Mol. Biol. — 2004. — 38, N 6. — P. 1005–1013.*
20. *Holschneider C. H., Baldwin R. L., Tumber K. et al. // Clin. Cancer Res. — 2005. — 11, N 16. — P. 5756–5763.*

Получено 16.03.2006