

## Експресія субодиниць мультибілкового комплексу факторів елонгації трансляції eEF1H у карциномах нирок людини

М. В. Верем'єва, Ю. М. Згоннік<sup>1</sup>, Б. С. Негруцький, А. В. Єльська

Інститут молекулярної біології і генетики НАН України  
Вул. Академіка Заболотного, 150, Київ, Україна, 03680

<sup>1</sup>Державна установа «Інститут урології Національної академії медичних наук України»  
Вул. Ю. Коцюбинського, 9-А, Київ, Україна, 04053

m.v.veremieva@imbg.org.ua

**Мета.** Проаналізувати експресію всіх субодиниць комплексу eEF1 на рівні мРНК та білка в карциномах нирок людини. **Методи.** Вміст білкових компонентів та мРНК субодиниць комплексу eEF1 досліджували у 18 клінічних зразках карцином нирок в порівнянні з відповідними зразками нормальних тканин нирок людини за допомогою Вестерн-блот або Нозерн-блот аналізу. **Результати.** Зміни рівня білків, що складають комплекс eEF1, або мРНК, що кодують ці білки, у зразках карцином нирок людини виявилися несуттєвими порівняно з нормою. **Висновки.** Отримані результати свідчать на користь того, що в тканині нирок субодиниці комплексу eEF1 не мають додаткових функцій, пов'язаних з пухлиноутворенням, та вказують на можливість залежності виникнення канцер-індукованих змін в експресії субодиниць eEF1H від локалізації пухлин людини.

*Ключові слова:* синтез білка, фактор елонгації трансляції eEF1H, карцинома нирок людини.

**Вступ.** Дослідження молекулярних програм, які контролюють трансформацію клітин, протягом багатьох років було спрямоване, головним чином, на транскриптоміку раку. Разом з тим, подібні роботи залишили майже недоторканим трансляційний рівень експресії генів, розуміння важливості якого зростає в сучасній молекулярній біології пухлин у геометричній прогресії [1]. Усвідомлення наявності механізму постгеномної регуляції канцерогенезу може мати фундаментальні наслідки для розвитку нових підходів до терапії раку, направлених на корекцію аберантної трансляції у ракових клітинах. Таким чином, вивчення впливу пухлиноутворення на експресію основних компонентів апарату білкового синтезу людини є досить актуальним.

Трансляційний комплекс eEF1H складається з чотирьох субодиниць: eEF1A, eEF1B $\alpha$ , eEF1B $\beta$  та eEF1B $\gamma$ . eEF1A-ГТФ відповідає за доставку аміноацил-тРНК до А-сайта рибосоми та реалізацію коректного кодон-антикодонного впізнавання завдяки гідролізу ГТФ, зв'язаного з цим білком. Таким чином, eEF1A переходить у ГДФ-зв'язану форму, здатну до взаємодії з деацильованою тРНК. eEF1A-ГДФ може відповідати за доставку тРНК до аміноацил-тРНК синтетази з наступним синтезом аміноацил-тРНК. Обмін ГДФ на ГТФ у молекулі eEF1A, тобто відновлення здатності цього білка взаємодіяти з аміноацил-тРНК, відбувається завдяки мультибілковому комплексу eEF1B, що містить субодиниці eEF1B $\alpha$ , eEF1B $\beta$  і eEF1B $\gamma$  [2, 3].

Окрім канонічної ролі у біосинтезі білка, субодиниці фактора eEF1 можуть брати участь у проце-

сах, не пов'язаних безпосередньо з трансляцією мРНК [4, 5]. Зокрема, субодиниці eEF1 або весь комплекс у цілому можуть бути залученими до процесів канцерогенезу. Так, підвищену експресію тієї чи іншої субодиниці такого комплексу неодноразово спостерігали за різних типів раку [6–12], але, на жаль, ці дані не давали уявлення про те, чи відбуваються при онкогенезі координовані зміни всіх компонентів eEF1. Крім того, майже в усіх попередніх роботах визначали кількість мРНК, проте зміни рівня відповідних білків практично не вивчали.

Підвищення кількості мРНК, які кодують певні субодиниці eEF1H, у пухлинах різної локалізації інтерпретували як необхідне для інтенсивного білкового синтезу у ракових клітинах. Однак наразі стає явним, що дерегуляція білкового синтезу є неодмінною умовою не лише для загального забезпечення росту ракових клітин, але й для канцер-пов'язаного сигналіngu на будь-якій стадії ініціації і розвитку раку [1].

Варто зазначити, що в процесі біосинтезу білка всі субодиниці eEF1 вочевидь функціонують як мультибілковий комплекс, тобто поява підвищеної кількості певної субодиниці комплексу може свідчити як про можливість дерегуляції трансляції, так і про ймовірну нетрансляційну роль такої субодиниці в пухлинних тканинах.

Нещодавно нами вперше досліджено експресію всіх субодиниць фактора елонгації eEF1H комплексу при кардіоезофагеальному раку людини [13]. Показано некоординовані зміни експресії всіх компонентів комплексу, що вказує на можливість існування субодиниць у вільному стані, окремо від комплексу. Залишилось невідомим, чи є така особливість функціонування eEF1A специфічною лише для кардіоезофагеального раку? Карцинома нирок – це достатньо поширена пухлина людини, у тому числі й в Україні. Однак дані стосовно експресії субодиниць eEF1H у таких пухлинах у світовій літературі відсутні.

Отже, в даній роботі вперше досліджено рівні експресії субодиниць фактора елонгації 1H у карциномі нирок людини порівняно з нормою, а також оцінено можливість координованих змін експресії різних компонентів комплексу eEF1 у пухлинах цієї локалізації.

**Матеріали і методи.** *Зразки тканин.* Зразки раку нирок отримано з Інституту урології НАМН України. Критерії ВООЗ використано для класифікації пухлин. Хірургічні зразки гістологічно нормальних тканин нирок, які межують з пухлинами, слугували джерелом мРНК і білків норми. Загалом проаналізовано 18 зразків пухлинних тканин нирок людини та відповідних до них зразків умовно нормальних тканин нирок. Протокол дослідження схвалено комісією з біоетики ІМБіГ НАН України.

*Плазміди.* Плазміди із вставками кДНК eEF1A1, eEF1A2, eEF1B $\alpha$ , eEF1B $\beta$  і eEF1B $\gamma$  отримано від В. Шалака (ІМБіГ НАН України), Ш. Кнудсен (Університет м. Орхус, Данія) та Г. Шеу (Чун Шан, Медичний університет, Тайвань).

*Виділення РНК та Нозерн-блот аналіз.* Тотальну РНК виділяли з 200–500 мг свіжозаморожених у рідкому азоті пухлинних та умовно нормальних тканин нирок людини за допомогою TRI RAGENT («Sigma», США), згідно з рекомендаціями виробника. Тотальну РНК (10 мкг на доріжку) фракціонували в горизонтальному 1,5 %-му агарозному гелі за присутності 2,2 М формальдегіду в боратному буфері (0,2 мМ ЕДТА, рН 8,0, 30 мМ борна кислота, 3,3 мМ тетраборат натрію, рН 7,5), а потім перенесли на нейлонові мембрани Hybond-N (GE Healthcare Bio-Sciences Corp., США). [<sup>32</sup>P]-мічені проби продуковано за допомогою фрагмента Кленова методом RandomPrimer-мічення фрагментів кДНК eEF1A1, eEF1A2, eEF1B $\alpha$ , eEF1B $\beta$  і eEF1B $\gamma$ , отриманих після гідролізу плазмід відповідними ендонуклеазами, як описано в [14].

Мембрану з іммобілізованою РНК інкубували з [<sup>32</sup>P]-міченими пробами кДНК в розчині, що містив 50 %-й формамід, 5  $\times$  SSC (розчин 0,15 М хлориду натрію та 0,015 М цитрату натрію), 5  $\times$  розчину Денхардта, 0,5 % SDS та 100 мкг/мл ДНК сперми лосося за температури 42 °С протягом ночі. Фільтри відмивали двічі по 30 хв за кімнатної температури в розчині 2  $\times$  SSC, 0,1 % SDS; один раз – протягом 30 хв у розчині 2  $\times$  SSC, 0,1 % SDS (65 °С) і остаточно – в розчині 0,2  $\times$  SSC, 0,1 % SDS упродовж 30 хв (65 °С).

Експозицію мембран на рентгенівську плівку проводили з використанням підсилюючого екрану за  $t = -70$  °С. Мембрани відмивали і гібридували

повторно з <sup>32</sup>P-міченою кДНК β-актину людини для контролю нанесення РНК на агарозний гель.

**Вестерн-блот аналіз.** Заморожені зразки тканин гомогенізували за присутності рідкого азоту та буфера для лізису (10 мМ K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 100 мМ NaCl, 1 % NP-40, 1 мМ DTT, 0,1 мМ PMSF, pH 7,4). Отриману суспензію інкубували на льодовій бані протягом 30 хв та центрифугували при 13000 g упродовж 20 хв за температури 4 °С.

Концентрацію білків у лізатах вимірювали методом Бредфорд [15]. Однакову кількість білка кожного лізату фракціонували електрофорезом у 12,5 %-му SDS-поліакриламідному гелі, потім переносили на нітроцелюлозні мембрани. Мембрани блокували 5 %-м сухим знежиреним молоком у сольовому фосфатному буфері з Tween-20 (PBS-T: 1,47 мМ KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 4,29 мМ Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 137 мМ NaCl, 2,68 мМ KCl, 0,1 % Tween-20, pH 7,3) протягом 1 год з наступною інкубацією з первинними антитілами. Мишачі моноклональні антитіла проти eEF1A («Upstate», США), поліклональні антитіла проти eEF1Bα та eEF1Bβ, а також поліклональні антитіла кроля проти eEF1Bγ використовували для визначення відповідних білків у тканинних лізатах [9]. Після кожної обробки мембран ECL реагентом («Pierce», США) мембрани промивали розчином PBS-T та інкубували з антитілами проти β-актину («Santa Cruz», США). Ендогенний β-актин слугував контролем завантаження препарату.

Денситометричний аналіз сигналів проводили, використовуючи програму Scion Image. Зміни вмісту досліджуваної мРНК чи білка оцінювали як відношення мРНК або білка субодиниці комплексу eEF1H до мРНК чи білка β-актину.

**Результати і обговорення.** Можливі зміни експресії субодиниць фактора елонгації eEF1H на рівні мРНК або білка вивчали у 18 клінічних зразках карцином нирок порівняно з відповідними зразками нормальних тканин нирок людини за допомогою Нозерн- або Вестерн-блот аналізу (рис. 1, 2). Важливо, що рівні мРНК і відповідного білка досліджували у тих самих зразках пухлинних і нормальних тканин.

Як внутрішній контроль навантаження використано β-актин. Рівень його дещо різнився від зразка до зразка, що підтверджує відому генетичну та епі-

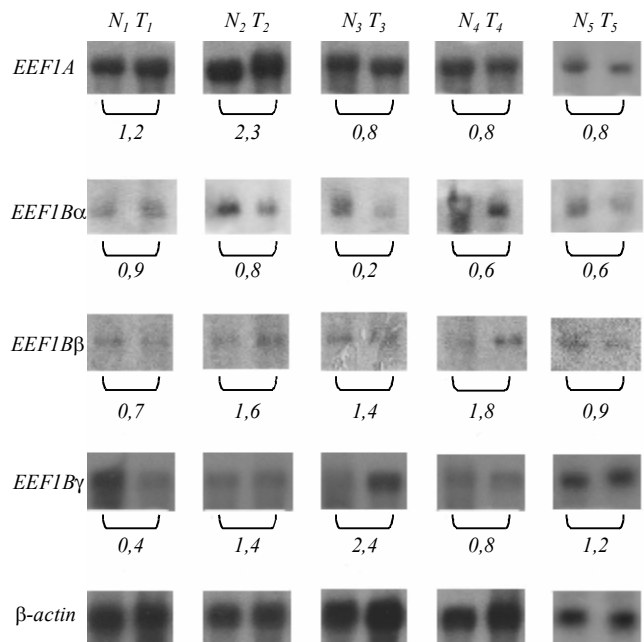


Рис. 1. Нозерн-блот аналіз експресії мРНК субодиниць комплексу eEF1H при карциномі нирок людини. Експресію мРНК досліджуваної субодиниці оцінювали як відношення інтенсивності сигналів мРНК компонента комплексу до мРНК β-актину; N<sub>n</sub>, T<sub>n</sub> – зразки нормальної та пухлинної тканин нирки людини відповідно; n – нумерація зразків (згідно з даними таблиці)

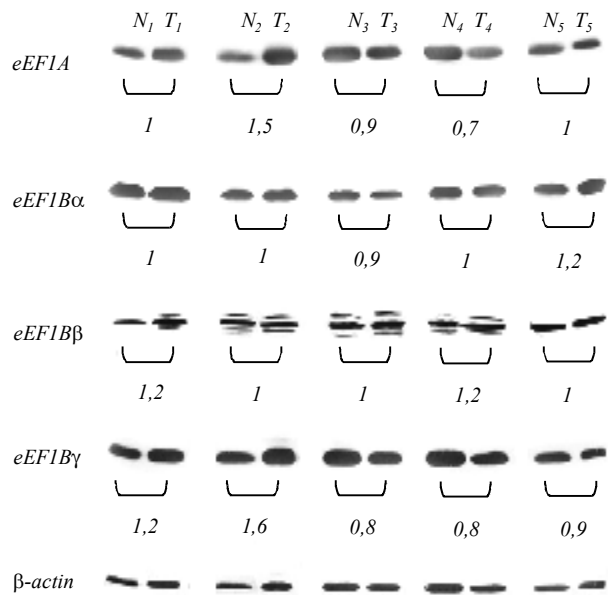


Рис. 2. Вестерн-блот аналіз вмісту білкових компонентів комплексу eEF1H при карциномі нирок людини. Денситометричний аналіз сигналів проводили з використанням програми Scion Image. Експресію досліджуваних білків оцінювали як відношення інтенсивності сигналів компонента комплексу до β-актину; N<sub>n</sub>, T<sub>n</sub> – зразки нормальної та пухлинної тканин нирки людини відповідно; n – нумерація зразків (згідно з даними таблиці)

*Порівняльний аналіз змін експресії мРНК субодиниць комплексу eEF1H та відповідних білків при карциномі нирок людини*

№ зразка	Вік	Стать	Ступінь	Зміна експресії, рази							
				eEF1A		eEF1B $\alpha$		eEF1B $\beta$		eEF1B $\gamma$	
				мРНК	Білок	мРНК	Білок	мРНК	Білок	мРНК	Білок
1	58	Ж	III	1,2	1	0,9	1	0,7	1,2	0,4	1,2
2	49	Ч	II	2,3	1,5	0,8	1	1,6	1	1,4	1,6
3	70	Ж	I	0,8	0,9	0,2	0,9	1,4	1	2,4	0,8
4	60	Ч	II	0,8	0,7	0,6	1	1,8	1,2	0,8	0,8
5	49	Ч	II	0,8	1	0,6	1,2	0,9	1	1,2	0,9
6	50	Ж	II	1	2	0,9	1,2	1,2	1,6	0,7	0,8
7	32	Ж	I	0,4	1,2	1,3	0,9	0,5	4	1,5	1,3
8	49	Ж	I	0,8	1,4	0,7	1,3	2,9	1	0,8	1
9	50	Ч	I	0,8	1,4	1,3	0,8	0,7	1,5	0,9	0,7
10	57	Ч	I	0,9	1,3	1,6	1,2	1,1	1,2	1,5	2,5
11	55	Ч	II	1	1,2	0,7	1	1,3	0,8	0,5	0,6
12	61	Ч	I	1,2	0,9	0,9	0,3	2,6	0,7	1	0,9
13	73	Ж	I	1	1,4	0,7	1,1	1,4	1,8	1,1	1,4
14	57	Ч	I	1,3	1,1	0,9	1,6	0,8	1,2	1,2	1,8
15	49	Ч	I	0,7	1,5	0,9	0,9	1,2	1,5	0,8	0,3
16	47	Ч	I	1,2	0,9	1,6	1,3	1,1	1,3	2,6	0,9
17	22	Ж	I	2,6	1,3	1,2	0,9	0,2	1,2	1,3	0,9
18	50	М	II	1	1,4	0,9	1	1,2	1,4	1,1	1,3

генетичну гетерогенність пухлин [16, 17]. Однак сигнали актину у пухлинних та умовно нормальних зразках тканин одного пацієнта виявилися порівняно однаковими, що дозволило застосувати цей загальновідомий контроль для нормалізації рівнів мРНК та білків і в наших дослідженнях.

Показано, що зміни рівня експресії субодиниць комплексу eEF1 або мРНК, що кодує компоненти цього комплексу, відбувалися лише в незначній кількості зразків карцином нирок людини (таблиця). Беручи до уваги лише ті зразки, у яких відмічено зростання рівня хоча б однієї субодиниці eEF1H, можна зробити висновок, що підвищення експресії на рівні мРНК спостерігається у 33 % зразків та на рівні білка – у 22 % зразків карциноми нирок. Зниження експресії субодиниць комплексу на рівні мРНК зафіксовано у 33 % випадків карцином нирок.

Цікаво, що рівень продукування eEF1B $\alpha$  і мРНК, що кодує цю субодиницю, взагалі не збільшувався у жодному зразку. У пухлинних тканинах шлунка [13] та головного мозку [8, 9] також найменші зміни рівня експресії серед субодиниць eEF1H були характерними для eEF1B $\alpha$ , що може свідчити про найстабільнішу експресію цієї субодиниці комплексу і відносну незалежність кількості eEF1B $\alpha$  у клітинах від індукованих пухлиною змін. Таким чином, можна прогнозувати, що саме ця субодиниця комплексу eEF1H у першу чергу відповідає за ГДФ/ГТФ-обмін у молекулі eEF1A і її перебування в комплексі eEF1H є конститутивним.

Важливим є спостереження, що навіть у тих зразках, де зареєстровано зміни експресії субодиниць комплексу, ці зміни відбуваються некоординовано, незалежно одна від одної, тобто якщо рівень експе-

сії однієї субодиниці підвищується, то рівень решти субодиниць комплексу залишається незмінним або навіть знижується. Подібну тенденцію відмічено як при аналізі експресії мРНК, так і відповідних їм білків, але кількість зразків з такою тенденцією є незначною, що не дозволяє зробити статистично вірогідний висновок щодо наявності некоординованих змін кількості субодиниць eEF1A в пухлинах нирок людини.

Не зафіксовано чіткого зв'язку між змінами вмісту мРНК, що кодує ту чи іншу субодиницю, і відповідного білка. Аналогічну ситуацію спостерігали і в дослідженнях eEF1H при кардіоезофагеальному раку та гліобlastомах [8, 9, 13].

Не виявлено впливу віку, статі і ступеня захворювання на зміни експресії субодиниць eEF1H.

Оскільки тканиноспецифічна ізоформа A2 фактора елонгації трансляції 1 є протоонкогенною і пов'язана з виникненням пухлин у тканині, в якій вона зазвичай відсутня, важливо було перевірити можливість підвищеної експресії ізоформи A2 у карциномах нирок. Нозерн-блот аналіз не виявив мРНК, що кодує цю ізоформу, в препараті тотальної РНК карциноми нирок (результати не представлено). Це свідчить на користь того, що ізоформа eEF1A2 не бере участі у пухлиногенезі нирок людини.

Отримані результати дозволяють зробити висновок стосовно того, що тканина нирок не є тканиною, у якій субодиниці комплексу eEF1 мають додаткові функції, пов'язані з пухлиноутворенням. До того ж, на відміну від кардіоезофагеального раку, карцинома нирок вочевидь не є випадком, коли субодиниці eEF1B можуть проявляти індивідуальний характер функціонування. Здається цілком вірогідним, що всі вони залучені лише до забезпечення ефективного функціонування етапу елонгації трансляції під час злоякісної трансформації ниркових клітин.

**Висновки.** Проведено порівняльне дослідження експресії всіх субодиниць мультибілкового комплексу факторів елонгації трансляції eEF1 на рівні мРНК та білка у пухлинних та відповідних нормальних тканинах нирок людини за допомогою Нозерн-блот або Вестерн-блот аналізу.

Не виявлено суттєвого впливу пухлин на продукування субодиниць комплексу eEF1H, що може вказувати на відсутність зв'язків між рівнем експе-

сії компонентів комплексу eEF1H і пухлиногенезом при карциномі нирок.

Відсутність істотних змін кількості різних субодиниць eEF1H може свідчити про певну стабільність такого комплексу у пухлинах карциноми нирок. Беручи до уваги отримані нами раніше дані стосовно появи індивідуальних субодиниць eEF1H при кардіоезофагеальному раку [13], можна ствержувати, що стабільність комплексу eEF1H та/або можливість індивідуального існування його субодиниць неоднакові в пухлинах різної локалізації.

Дослідження частково виконано за рахунок коштів Програм PICS, GDRI, цільової комплексної міждисциплінарної програми наукових досліджень НАН України «Фундаментальні основи молекулярних та клітинних біотехнологій» та коштів Державної ключової лабораторії молекулярної і клітинної біології ДФФД.

*M. V. Veremieva, Yu. M. Zgonnik<sup>1</sup>, B. S. Negrutskii, A. V. El'skaya*

Expression of the subunits of multiprotein translation elongation complex eEF1H in human renal carcinomas

Institute of Molecular Biology and Genetics, NAS of Ukraine  
150, Akademika Zabolotnoho Str., Kyiv, Ukraine, 03680

<sup>1</sup>State Institution «Institute of Urology of NAMS of Ukraine»  
9-a, Yu. Kotsubyns'koho Str., Kyiv, Ukraine, 04053

Summary

**Aim.** To investigate the expression of all eEF1 complex subunits at the mRNA and protein levels in human renal cancer. **Methods.** The protein content and mRNA level of the eEF1 complex components were analyzed in 18 clinical human renal carcinoma specimens and correspondingly paired normal tissues by Western blot and Northern blot techniques. **Results.** The changes in the level of protein components of the eEF1 complex or mRNAs coding for these proteins in human renal carcinoma specimens were found to be not essential. **Conclusions.** This study suggests that eEF1 subunits have no additional cancer-related functions in renal tissue. The data indicate that the occurrence of cancer-induced changes in the eEF1 subunits expression may depend on the tumor localization.

**Keywords:** protein synthesis, translation elongation factor eEF1H, human renal cell carcinoma.

*М. В. Веремьева, Ю. М. Згонник, Б. С. Негруцкий, А. В. Ельская*

Экспрессия субъединиц мультибелкового комплекса факторов элонгации трансляции eEF1H в карциномах почек человека

Резюме

**Цель.** Проанализировать экспрессию всех субъединиц комплекса eEF1 на уровне мРНК и белка в карциномах почек человека. **Методы.** Содержание белковых компонентов и мРНК субъе-

диниці комплексу eEF1 досліджували в 18 клінічних зразках карцином нирок в порівнянні з відповідними зразками нормальних тканин нирок людини з допомогою Вестерн-блоту або Нозерн-блоту аналізу. **Результати.** Зміни рівня білків, що входять до комплексу eEF1, або мРНК, що кодують ці білки, в зразках карцином нирок людини виявилися несуттєвими в порівнянні з нормою. **Висновки.** Отримані результати свідчать на користь того, що в тканині нирок суб'єдиниці комплексу eEF1 не мають додаткових функцій, пов'язаних з онкогенезом, і вказують на можливість залежності появи канцер-індукованих змін в експресії суб'єдиниць eEF1H від локалізації пухлин людини.

**Ключові слова:** синтез білка, фактор елонгації трансляції eEF1H, карцинома нирок людини.

#### ПЕРЕЛІК ЛІТЕРАТУРИ

1. Stumpf C. R., Ruggero D. The cancerous translation apparatus // *Curr. Opin. Genet. Dev.*—2011.—**21**, N4.—P. 474-483.
2. Negrutskii B. S., El'skaya A. V. Eukaryotic translation elongation factor 1alpha: structure, expression, functions, and possible role in aminoacyl-tRNA channeling // *Prog. Nucl. Acid Res. Mol. Biol.*—1998.—**60**—P. 47-78.
3. Prokaryotic and eukaryotic translation factors. Ad Hoc Nomenclature Subcommittee Report // *Biochimie.*—1996.—**78**, N 11-12.—P. 1119-1122.
4. Liu G., Grant W. M., Persky D., Latham V. M. Jr., Singer R. H., Condeelis J. Interactions of elongation factor 1 $\alpha$  with F-actin and  $\beta$ -actin mRNA: implications for anchoring mRNA in cell protrusions // *Mol. Biol. Cell.*—2002.—**13**, N 2.—P. 579-592.
5. Chuang S. M., Chen L., Lambertson D., Anand M., Kinzy T. G., Madura K. Proteasome-mediated degradation of cotranslationally damaged proteins involves translation elongation factor 1A // *Mol. Cell. Biol.*—2005.—**25**, N 1.—P. 403-413.
6. Ogawa K., Utsunomiya T., Mimori K., Tanaka Y., Tanaka F., Inoue H., Murayama S., Mori M. Clinical significance of elongation factor-1 delta mRNA expression in oesophageal carcinoma // *Br. J. Cancer.*—2004.—**91**, N 2.—P. 282-286.
7. Al-Maghrebi M., Anim J. T., Olalu A. A. Up-regulation of eukaryotic elongation factor-1 subunits in breast carcinoma // *Anti-cancer Res.*—2005.—**25**, N 3c.—P. 2573-2577.

8. Veremieva M. V., Shostak K. O., Malysheva T. A., Zozulya Y. P., Rozumenko V. D., Kavsan V. M., Negrutskii B. S. Investigation of expression of different subunits of eukaryotic translation elongation factor eEF1 in human glial brain tumors // *Biopolym. Cell.*—2008.—**24**, N 4.—P. 310-317.
9. Veremieva M. V., Malysheva T. A., Zozulya Y. P., Rozumenko V. D., Sidorik L. L., Kavsan V. M., Negrutskii B. S., El'skaya A. V. Multisubunit complex eEF1H in human glial tumors: from mRNA to protein // *Biopolym. Cell.*—2010.—**26**, N 4.—P. 317-321.
10. Chi K., Jones D. V., Frazier M. L. Expression of an elongation factor 1 gamma-related sequence in adenocarcinomas of the colon // *Gastroenterology.*—1992.—**103**, N 1.—P. 98-102.
11. Mimori K., Mori M., Tanaka S., Akiyoshi T., Sugimachi K. The overexpression of elongation factor 1 gamma mRNA in gastric carcinoma // *Cancer.*—1995.—**75**, Suppl. 6.—P. 1446-1449.
12. Lew Y., Jones D. V., Mars W. M., Evans D., Byrd D., Frazier M. L. Expression of elongation factor-1 gamma-related sequence in human pancreatic cancer // *Pancreas.*—1992.—**7**, N 2.—P. 144-152.
13. Veremieva M., Khoruzhenko A., Zaicev S., Negrutskii B., El'skaya A. Unbalanced expression of the translation complex eEF1 subunits in human cardioesophageal carcinoma // *Eur. J. Clin. Invest.*—2011.—**41**, N 3.—P. 269-276.
14. Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T. *Molecular cloning: A laboratory manual.*—New York: Cold Spring Harbor Lab. press, 1989.
15. Bradford M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // *Anal. Biochem.*—1976.—**72**—P. 248-254.
16. Heng H. H., Bremer S. W., Stevens J. B., Ye K. J., Liu G., Ye C. J. Genetic and epigenetic heterogeneity in cancer: a genome-centric perspective // *J. Cell Physiol.*—2009.—**220**, N 3.—P. 538-547.
17. Ishibashi Y., Hanyu N., Nakada K., Suzuki Y., Yamamoto T., Yanaga K., Ohkawa K., Hashimoto N., Nakajima T., Saito H., Matsushima M., Urashima M. Profiling gene expression ratios of paired cancerous and normal tissue predicts relapse of esophageal squamous cell carcinoma // *Cancer Res.*—2003.—**63**, N 16.—P. 5159-5164.

UDC 577.112.7:577.217

Received 10.06.11