

**МИНИСТЕРСТВО ВЫСШЕГО И СРЕДНЕГО СПЕЦИАЛЬНОГО
ОБРАЗОВАНИЯ РЕСПУБЛИКИ УЗБЕКИСТАН**

**НАЦИОНАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ УЗБЕКИСТАНА
ИМЕНИ МИРЗО УЛУГБЕКА**

на правах рукописи

УДК: 577.1:616.006

Кадырова Роза Сиражиддиновна

**ИЗУЧЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫХ ОСНОВ
ПРЕДРАСПОЛОЖЕННОСТИ К РАКУ ЖЕЛУДКА**

5A420120-Молекулярная биология

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание академической степени магистра

Научный руководитель:

к.б.н., доцент

Г.Б. Умарова

Ташкент-2012

СОДЕРЖАНИЕ

Список использованных сокращений	3
ВВЕДЕНИЕ.....	4
ГЛАВА I. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	6
1.1. Эпидемиология рака желудка.....	6
1.2. Генетические полиморфизмы и рак желудка.....	9
1.3. L-тус ген EcoRI полиморфизм.....	9
ГЛАВА II. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	17
2.1. Метод выделения ДНК.....	20
2.2. Метод ПЦР (Полимеразно-цепная реакция).....	22
2.3. Метод ПДРФ (Полиморфизм длин рестрикционных фрагментов).....	26
2.4. Метод Гель-электрофореза.....	30
2.5. Статистическая обработка полученных результатов.....	36
ГЛАВА III. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ.....	37
3.1. Генотипирование образцов по гену L-тус.....	37
3.2. Связь между S аллелем гена L-тус и раком желудка.....	52
4. ЗАКЛЮЧЕНИЕ	53
5. СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ	54

Список принятых сокращений:

РОНЦ-Республиканский Онкологический Центр

EcoRI-Эндонуклеаза (рестриктаза) выделенной из ешериха коли.

ДНК-Дезоксирибонуклеиновая кислота

ПДРФ-Полиморфизм Длин Рестрикционных Фрагментов

TNM-(Tumor Nodulus Metastasis)Опухоль Узель Метастазы

H-Pylori-Helicobacter-Pylori

КТ-кишечный тип рака желудка

ДТ-диффузный тип рака желудка

L-(long) короткий

S-(short) длинный

bp-пар нуклеотидов

ПЦР-Полимеразно цепная реакция

TBE-(Tris-boric-Acid)Трис-Борная кислота

TAE-(Tris-Atsetate)Трис-Уксусная кислота

G-гуанин

A-аденин

T-тимин

C-цитозин

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность работы. Рак желудка остается одним из наиболее распространенных заболеваний в мире. Ежегодно регистрируется почти 1 млн. новых случаев и более 700 тысяч смертей от этого заболевания. Странами - «лидерами» являются Япония, Россия, Чили, Корея, Китай, Коста-Рика, Филиппины. Странами с низкой заболеваемостью являются США Австралия, Новая Зеландия. В Японии, численность населения которой составляет 169 млн., заболеваемость у мужчин составляет 120,9, а у женщин 33,3 на 100 тыс. населения (3).

Узбекистан является одним из регионов с высоким выявлением случаев рака желудка в Средней Азии. Случаи летального исхода составляют 60 случаев на 100 000 населения, в сравнении с 20 на 100 000 в среднем в мире. По данным РОНЦ МЗ РУз в 2010 год, в структуре онкопатологии в Республике Узбекистан рак желудка составлял 9,5 %, занимая 1-место среди мужчин и 2-место среди женщин.

Цель магистерской диссертационной работы:

- Изучение связи EcoRI полиморфизма L-мус гена и генетической предрасположенности к развитию рака желудка у населения Узбекистана.

Задачи исследования:

1. Выделение и идентификация геномной ДНК образцов крови больных раком желудка и здоровых лиц.
2. Полимеразно-цепная реакция на L-мус ген и детекция пцр-продуктов для отобранных образцов.
3. Проведение изучения полиморфизма путем детекции ПДРФ-фрагментов при помощи рестриктазы EcoRI .
4. Генотипирование и выявление связи между EcoRI полиморфизмом L-мус гена и предрасположенностью к раку желудка по полученным результатам.

Научная новизна настоящей магистерской диссертации является то, что впервые проведено молекулярное исследование гена L-тус при раке желудка в узбекской популяции, создание банка ДНК.

Практическая значимость работы:

Изучение молекулярных основ предрасположенности к раку желудка создаст новые возможности для медико-генетического консультирования и профилактики заболевания.

Структура магистерской диссертации: работа изложена на 64 страницах компьютерного текста, состоит из списка сокращений, введения, литературного обзора, материалов и методов исследования, собственных результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка использованной литературы, который включает 61 первоисточника. Обсуждение включает 4 таблицы, 17 рисунков.

ГЛАВА I. Литературный обзор

1.1. Эпидемиология рака желудка

Канцерогенез желудка является многоэтапным и мультифакториальным процессом как результат комплексных воздействий между окружающей средой и генетическими факторами(1).

Самым распространенным симптомом рака желудка является расстройство пищеварения. К другим симптомам относятся дискомфорт или ощущение тяжести в верхней части живота после еды с возможными тошнотой и рвотой: утрата аппетита; потеря массы тела и иногда наличие крови в рвотных массах или стуле.

Причины рака желудка можно разделить на несколько видов:

- Алиментарные - связанные с особенностями питания;
- Курение и алкоголь;
- Предшествующие хронические заболевания желудка: язвенная болезнь, эрозивный и атрофический гастриты;
- Генетические факторы.

С другой стороны, было выявлено, что высокий риск к развитию рака желудка у семейных раков желудка(2).

Согласно классификации, принятой Европейским региональным бюро ВОЗ, возраст от 60 до 74 лет считается пожилым, от 75 до 89 — старческим. Лица 90 лет и старше определены как долгожители. Максимальные показатели заболеваемости раком желудка приходятся на возрастные группы 60—62 года у мужчин и 64—65 лет у женщин. Статистические данные свидетельствуют о том, что больные раком желудка пожилого и старческого возраста составляют почти половину всех заболевших в старшей возрастной группе — 43,4% [4, 5, 6,7]

Международная классификация рака желудка - TNM

Самая важная классификация рака желудка (как и любой другой злокачественной опухоли) – это классификация TNM. Она разработана Международным противораковым союзом и используется во всем мире. С ее

помощью определяется распространенность опухоли по желудку и организму человека и статистический прогноз результата лечения.

Буквы TNM – эта аббревиатура латинских слов: Tumor (опухоль), Nodus (узел – в данном случае имеются в виду лимфатические узлы), Metastasis (метастазы).

Данная классификация может применяться только для гистологически подтвержденного диагноза рак желудка.

Классификация анатомических областей: кардиальный отдел, дно, тело, антральный и пилорический отделы.

TNM - клиническая классификация состояния опухоли

T – первичная опухоль:

- Tx – выявление опухоли невозможно из-за недостатка данных;
- T0 – первичная опухоль не определена;
- Tis – *carcinomainsitu* или преинвазивная карцинома: определена внутриэпителиальная опухоль при отсутствии поражения собственной пластинки слизистой оболочки;
- T1 – со стороны опухоли происходит инфильтрация собственной пластинки слизистой оболочки или подслизистой основы;
- T2 – инфильтрация мышечной или серозной оболочки;
- T3 – прорастание опухолью серозной оболочки; инвазия в соседние структуры отсутствует;
- T4 - распространение опухоли на соседние структуры.

N – регионарные лимфатические узлы. К данной категории относят гепатодуоденальные узлы, а также узлы, расположенные вдоль общей печеночной, селезеночной и чревной артерий, а также малой и большой кривизны. Вовлечение других лимфатических узлов внутри брюшины (ретропанкреатические, мезентериальные и парааортальные), классифицируется как отдаленные метастазы:

- Nx – оценка состояния регионарных лимфатических узлов невозможна из-за нехватки данных;

- N0 – признаки метастазов в регионарных лимфатических узлах отсутствуют;

- N1 – в 1-6 лимфатических узлах присутствуют метастазы;
- N2 – 7-15 лимфатических узлах присутствуют метастазы;
- N3 – более 15 лимфатических узлов поражены метастазами.

M – обнаружено наличие отдаленных метастатических поражений:

- Mx – отдаленные метастатические поражения не могут быть определены из-за нехватки данных,
- M0 – признаки отдаленных метастазов отсутствуют;
- M1 – выявлено наличие отдаленных метастазов.(48)

Как и при многих других видах рака, исход и эффективность лечения рака желудка в настоящее время зависит от стадии заболевания. В различных исследованиях была показана значительная взаимосвязь между заболеваниями желудка и предраковых состояний с *H.pylori* инфицированностью. Так, в странах высокой заболеваемостью раком желудка инфицированность *H.pylori* намного выше, чем в группах с низкой заболеваемостью им. Частота инфицирования в развитых странах составляет около 15 % населения, в менее развитых странах - до 100 % . В тех популяциях, где снизилась зараженность *H. pylori*, также снизился показатель заболеваемости раком желудка. (49). Относительный риск заболевания у лиц, которые вскармливались грудью матери менее года, в 3–4 раза выше, чем у лиц, вскармливаемых более года, что возможно, обусловлено снижением защитной функции слизистой желудка из-за недостатка иммуноглобулина А и более ранним инфицированием *H. pylori*.(50)

К предраковым заболеваниям желудка относятся: аденоматозные полипы, хронический гастрит. (51) В то же время предполагается некоторая генетическая предрасположенность хозяина к развитию рака желудка и двенадцатиперстной кишки. (8, 9, 10)

1.2. Генетические полиморфизмы и рак желудка

В исследованиях последних лет показано, что генетический полиморфизм хозяина ассоциирован с воспалительными процессами, метаболизмом канцерогенов, антиоксидантной защитой и регуляцией клеточной пролиферации.

Полиморфизмы генов вовлеченных в развитие этих процессов были исследованы в качестве биомаркеров предрасположенности к раку желудка (РЖ). Однако описанные данные являются относительно противоречивыми. (11, 12, 13)

По классификации Лаурену (**The Lauren Classification of Gastric Cancer**) различают два типа рака желудка – кишечный (КТ) и диффузный (ДТ). КТ начинается с хронического гастрита с кишечными метаплазиями, структурально подходит к раку кишечника и встречается у людей пожилого возраста, у мужчин. ДТ развивается только в желудке, у молодых лиц, особенно у женщин(14).

Также было продемонстрировано, что генетические механизмы, приводящие к диффузному и кишечному типу рака желудка отличаются друг от друга(15).

L-тус ген EcoRI полиморфизм

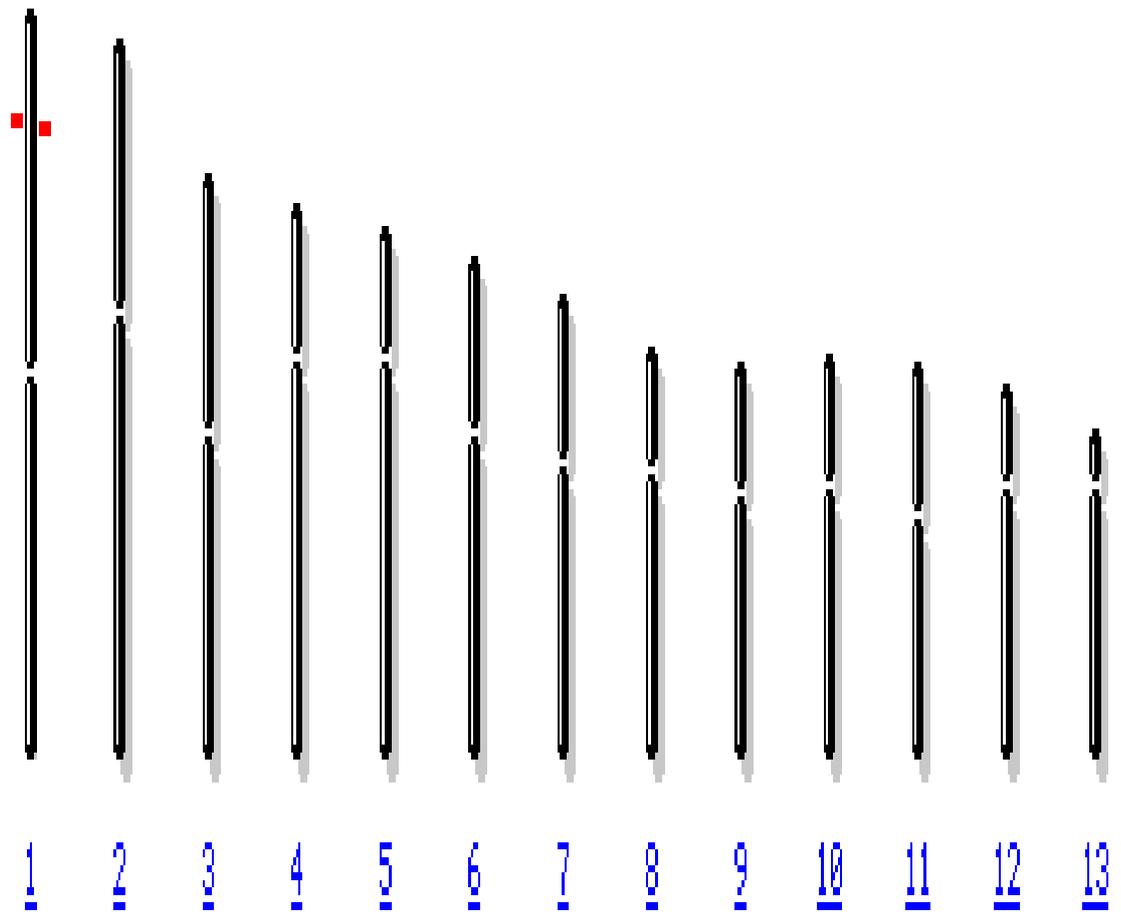
В результате мета-анализа было выявлено широко изученный генетический полиморфизм EcoRI гена L-тус (16).

Семейство генов *тус* человека объединяет шесть генов: *c-тус*, *N-тус*, *L-тус*, *S-тус*, *B-тус* и *P-тус*. Известно, что активация генов *c-тус*, *Nтус* или *L-тус* приводит к злокачественному перерождению клеток.(52). Гены семейства *тус*, кодирующие транскрипционные факторы MYC, рассматриваются как перспективные терапевтические мишени, поскольку их повышенная экспрессия наблюдается во многих типах опухолей человека, и имеются данные, что она напрямую связана с активацией пролиферации клеток и их злокачественной трансформацией. (53) Гиперэкспрессия гена *c-тус* наблюдается в таких опухолях, как миеломы, лимфомы, карциномы,

нейробластомы, повышенный уровень мРНК гена *L-тус* выявляется при раке. Протоонкогены семейства *Мус* участвуют в развитие рака. Транскрипционные факторы семейства *МУС* находятся в начале каскада сигнальных событий, приводящих к злокачественному перерождению клетки. Ингибирование экспрессии *МУС* регулируемых генов, также обладающих трансформирующей активностью, будет в меньшей степени влиять на развитие опухоли, чем ингибирование экспрессии самого *тус*.(54)

Постоянная экспрессия *тус* наблюдается только в делящихся клетках, которые составляют меньшую часть клеточной популяции в большинстве органов. Еще одним подходом, направленным на ингибирование онкогенной функции *МУС*, является использование агентов, вызывающих нарушение образования комплекса *МУС/МАХ*.(55) Впервые *Nau* и другие определили *L-тус* ген, который имеет аналогичную структуру с *C-тус* и *N-тус* гены из клеточной линии рака легких человека(17). *Кауе* и др. изучили всю нуклеотидную последовательность *L-тус* гена (18).

Ген *L-тус*, который активируется в конце малигнизации, был обнаружен в 1- хромосоме человека. В этом полиморфизме произошла трансверсия – место Гуанина вставился Тимин (**G/T**) в 3109 нуклеотиде (19).



Hits: 2

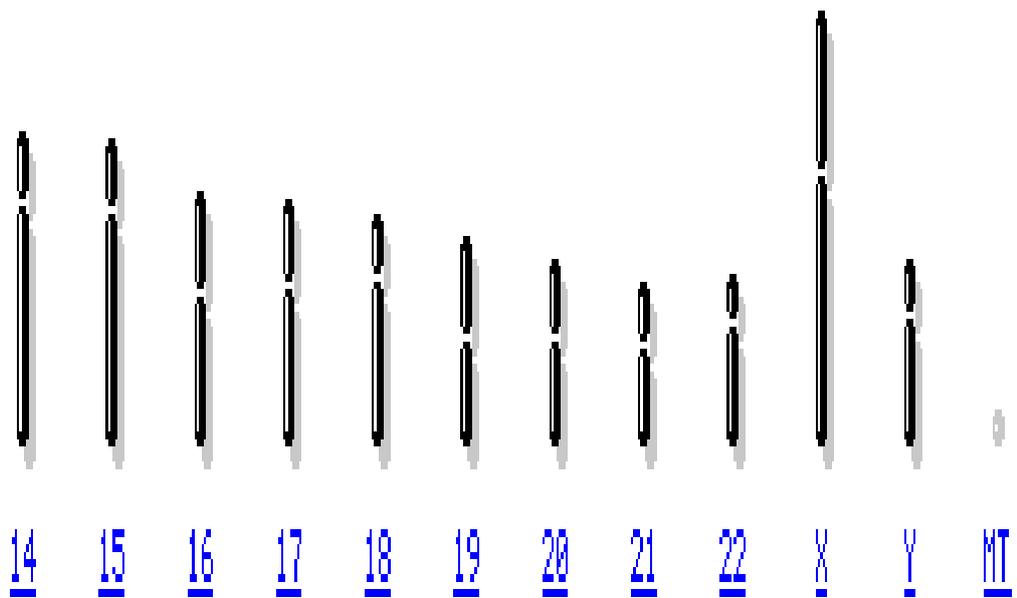


Рисунок.1 *Homo sapiens (human)* genome view

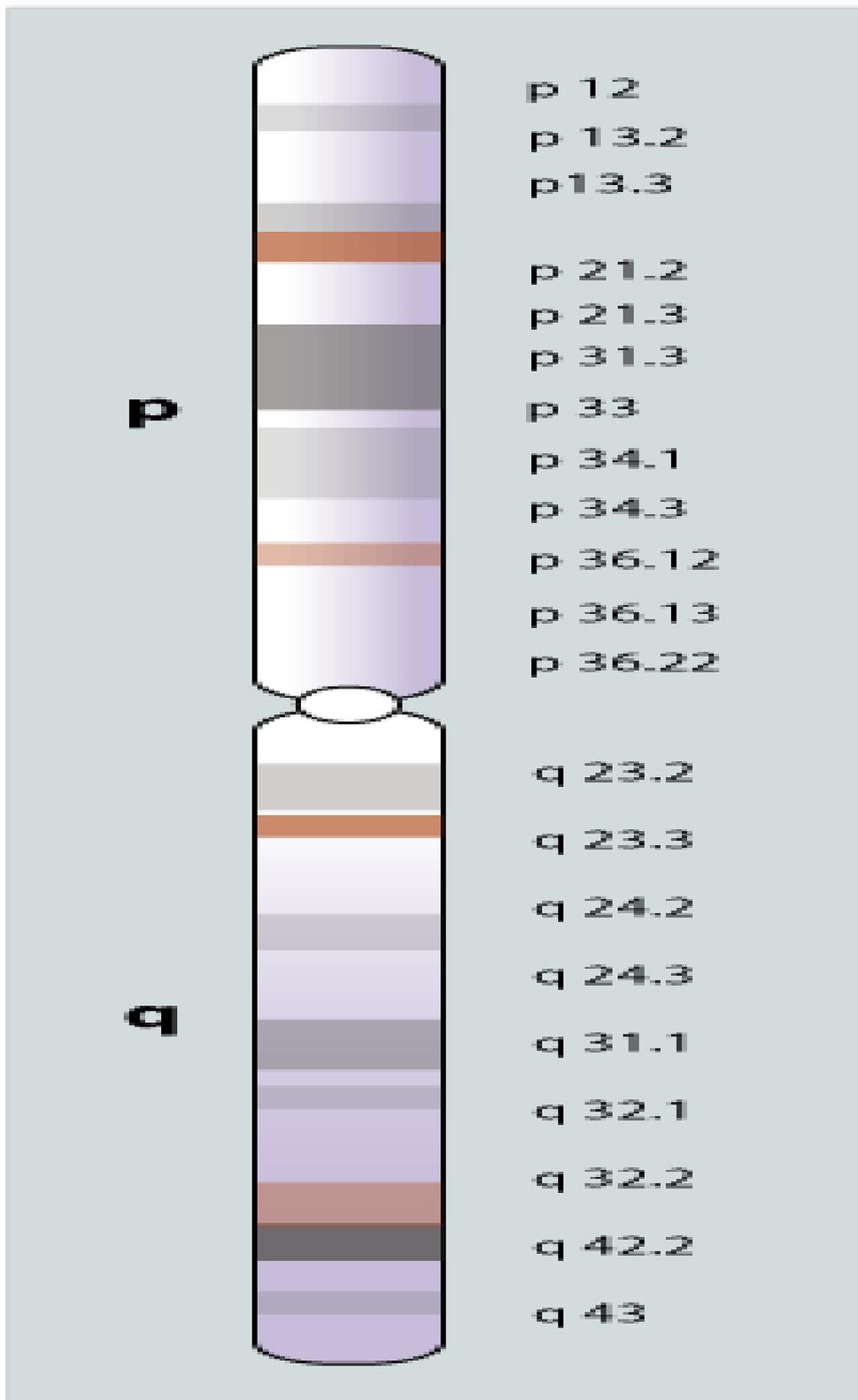


Рисунок.2. Хромосома 1p34.2.- L-мус

GGGGCTAGGGGCTGGGTAAGACAGAA[G/T]TCCAAACACAGCGTAATCAGCCAAT

Рисунок.3. Одно нуклеотидная замена G на T на втором интроне гена L-мус rs3134613 [*Homo sapiens*]

Протоонкогены, являясь нормальными клеточными генами, обладают высокой эволюционной консервативностью, что указывает на их участие в жизненно важных клеточных функциях. Полученный к настоящему времени обширный экспериментальный материал говорит о том, что протоонкогены образуют позитивную систему контроля роста, деления и дифференцировки клеток.

L-мус ген имеет 2-х аллельный полиморфизм, rs3134613,L/S, выявляющий после расщепления с помощью рестрикционного фермента EcoRI с сайтом узнавания GAATTC 3109 - нуклеотидной позиции второго интрона этого гена. (20,21,22)

На рисунки № 4. показана схематическая структура гена L-мус. EcoRI полиморфизм находится на втором интроне.

L-мус - это обычный ген, который может стать онкогеном в последствии мутаций или повышения экспрессии. Многие протоонкогены кодируют белки, которые регулируют клеточный рост и дифференцировку. Примерами продуктов протоонкогенов являются белки, вовлеченных в сигнальные пути— белок Мус, а также белки [WNT](#), [RAS](#), [ERK](#) и [TRK](#). L-мус - ген-регулятор клеточного цикла

Мус (L-Мус) — кодирует белок, связывающийся с ДНК и являющийся фактором транскрипции. Продукт гена Мус регулирует экспрессию до 15 % всех генов, связывается черезэнхансерные последовательности (E-boxes) и усиливает активность ацетилтрансфераз гистонов. Мутантные версии гена Мус обнаружены во многих опухолях, при этом ген экспрессируется постоянно, что приводит к нарушению регуляции многих генов, в том числе, отвечающих за пролиферацию клеток.

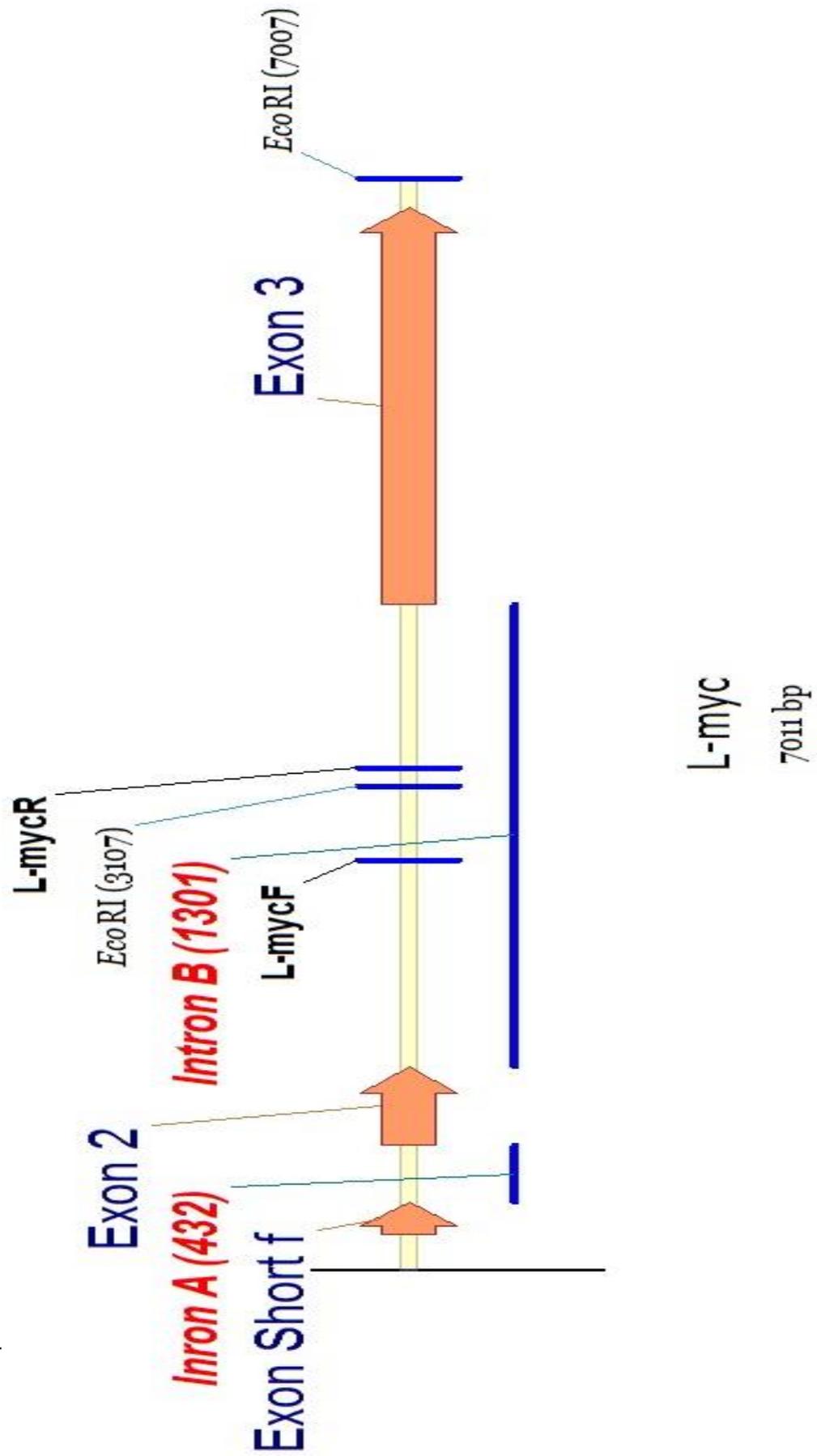


Рисунок 4

Превращение клеточных протоонкогенов в онкогены может происходить в результате: мутаций кодирующей последовательности протоонкогена, что приведет к образованию измененного белкового продукта, или (и) в результате повышения уровня экспрессии протоонкогена, вследствие чего в клетке увеличивается количество белка.

Литературный анализ показывает, что больные с гомозиготой SS или гетерозиготой LS генотипами имели высокую частоту метастазов и плохого диагноза опухоли.(23)

ГЛАВА II. Материалы и методы исследования

Сбор образцов крови пациентов с доказанным диагнозом рака желудка 30(16 мужчин, 14 женщин, возраст: от 28 до 82 , средний возраст: 55) образцов был осуществлен из абдоминального отделения Ташкентского Областного Онкологического Диспансера в период 2010-2011 гг. Отбор пациентов осуществлялся на основе поставленного в клинике диагноза и с согласия пробанда.

Контрольную группу составили 30 здоровых людей (13 мужчин, 17 женщин, возраст: от 19 до 57, средний возраст: 38), у которых не было случаев рака желудка. Венозная кровь в количестве 1мл отбирался в 0,1мл раствора цитрата натрия (антикоагулянт) и храниться в -20°C.

Таблица 1.

Список больных

№	№ ТООД	ФИО	пол	возраст	TNM	Генотипирование
1	8	Эшманов Р.	муж	82	T3 N2 M1	LS
2	1	Миразимов Мурат	муж	62	T3 N2 M0	LS
3	3	Хакимова Шафоат	жен	66	T3 N2 M0	LS
4	4	Холматов Тулан	муж	60	T3 N2 M1	SS
5	5	Абдуллаев Тохир	муж	53	T3 Nx M1	LS
6	6	Тожикулов Туйчибек	муж	54	T3 N2 M0	LL
7	7	Юсупов Талъат	муж	74	T3 N2 M0	LS
8	10	Ахмедов Икромхон	муж	66	T2 N2 M0	LS
9	11	Эгамбердиев Тохир	муж	61	T2 N1 M0	LS
10	2	Юсупалиева Яхшигуль	жен	54	T3 N1 M0	LL
11	4	Хушвактова Тухтагуль	жен	46	T4 N2 M1	SS
12	1	Искалова Зухра	жен	43	T3 N2 M0	LS
13	2	Абдусаматова Динара	жен	28	T3 N2 M1	LS
14	1	Хасанова Умида Э.	жен	29	T4 N2 M1	LS
15	5	Хайдарова Махбуба	жен	69	T4 N2 M1	LS
16	9	Раимов Валиджон Т.	муж	41	T3 N2 M0	SS
17	11	Мухаммадиева Дилором	жен	48	T4 N2 M0	LS
18	12	Солиев Ганижон Р.	муж	51	полипоз	SS
19	3	Жураев Эркин	муж	70	T4 N2 M1	LL
20	5	Баубеков Хамиджон М.	муж	62	?	SS
21	6	Ахмедов Фархад Х.	муж	34	T4 N2 M1	LS
22	3	Холбаев Гуломиддин	муж	56	T2 N2 M0	LS
23	4	Атакулова Камола	жен	38	T3 N2 M1	LL
24	1	Юсупов Аликул Солиевич	муж	53		LL

рус

1	2	Денисова НинаВ	жен	75	T3 N2 M1	LL
2	3	Семенова Надежда	жен	70	T3 N2 M1	LS

корейс

1	9	Ли Мария	жен	74	T4 N1 M0	SS
2	1	Шегай Зинаида	жен	54	полип	LL

татар

1	2	Ягъяев Талят	муж	63	T2 N2 M0	LL
---	---	--------------	-----	----	----------	----

казах

1	2	Акбердиева Малу	жен	49	T4 N2 M0	SS
---	---	-----------------	-----	----	----------	----

Контрольная группа

№	№ пробы	ФИО	пол	возраст	диагноз	Генотипирование
1	1	Убайдуллаева Мухаббат Искандаровна	женс	31	здоров	LL
2	2	Шеримбетов Санжар	мужс	29	здоров	LS
3	3	Ибрагимов Зафар	мужс	27	здоров	LS
4	4	Мухамедов Рустам Султанович	мужс	57	здоров	LL
5	6	Адылов Бахтиёр	мужс	34	здоров	LS
6	7	Якубов Миракбар	мужс	40	здоров	LL
7	9	Далимова Дилбар Акбаровна	женс	37	здоров	LL
8	15	Ибрагимов Кахрамон	мужс	28	здоров	LS
9	16	Ахмедов Баходир	мужс	23	здоров	LS
10	18	Муминова Шахло	женс	23	здоров	LL
11	20	Мирхайдарова Малика Дамировна	женс	29	здоров	LS
12	21	Турдикулова Шахло Уткуровна	женс	37	здоров	LL
13	22	Абдурахимов Аброр	мужс	34	здоров	SS
14	25	Отаева Зарина	женс	26	здоров	SS
15	26	Нурматова Саида	женс	23	здоров	SS
16	28	Адилов Бегзод	мужс	25	здоров	LS
17	29	Урманова Гулноза	женс	22	здоров	SS
18	31	Ибрагимов Аваз	мужс	21	здоров	LS
19	32	Рустамова Шохиста	женс	22	здоров	LS
20	33	Артикходжаева Дурдона	женс	28	здоров	LL
21	34	Назарова Матлюба	женс	19	здоров	LS
22	35	Исломов Анвар	мужс	24	здоров	LS
23	36	Кадырова Роза	женс	25	здоров	LS
24	37	Юнусова Наргиза	женс	25	здоров	LS
1	23	Давлетчурин Дамир	мужс	26	здоров	SS
2	10	Бурнашева Амина	женс	28	здоров	LL
3	14	Нишанова Севара	женс	33	здоров	LS
1	11	Ким Дина	женс	27	здоров	SS
2	12	Ким Алексей	мужс	33	здоров	SS
1	24	Хужабекова Гулноза	женс	24	здоров	LS

2.1. Метод выделения ДНК

Выделение ДНК проводилась с использованием сухого набора реагентов Diatom™ DNA Prep 200 (Москва)

Характеристика набора

1. ДНК, выделенная из свежего биологического материала (цельной крови, клеточной культуры, гомогената ткани и т.д.), является высокомолекулярной, 40-50 тысяче нуклеотидных пар.

2. Набор реагентов обеспечивает высокую чистоту выделенной ДНК OD (оптическая единица) 260/280 нм 1,6-2,0.

3. Выход чистой ДНК из цельной крови составляет 5-10 мкг из 200 мкл крови.

Выделение ДНК был осуществлен по протоколу выделения ДНК:

1. Приготовили рабочий раствор Солевого буфера. Содержимое флакона с 10-кратным Солевым буфером-10мл, перенесли в мерный цилиндр, довели бидистиллированной водой до метки 100 мл и 96% этиловым спиртом до метки 300 мл и перемешали. Готовый рабочий раствор Солевого буфера хранили в герметично закрытой посуде при температуре 4° С.

2. В пробирку объемом 1,5 мл внесли 200 мкл исследуемой пробы, добавили 800 мкл Лизирующего реагента и перемешали содержимое пробирки переворачиванием (10 раз).

3. Термостатировали пробирку со смесью 7 мин. при температуре 65°С. Если выделение ДНК проводится из твердого сухого мелкоизмельченного материала, то следует термостатировать 30-40 мин.

4. В пробирку с чистой смесью добавили 20 мкл суспензии сорбента NucleoS™ (40 мкл, если выделение ДНК проводится из цельной крови или другой богатой ДНК жидкости). Перед использованием NucleoS™ интенсивно перемешивали до гомогенной суспензии на вортексе.

5. Пробирку поместили на ротатор и перемешивали 10 мин (10 об/мин)

6. Центрифугировали 10 секунд при 5000 оборотов в минуту.

7. Осторожно, не задевая осадок, удаляли супернатант.
 8. К осадку добавили 400 мкл Лизирующего реагента, тщательно перемешивали на вортексе до полного гомогенного состояния.
 9. Добавили в пробирку 1 мл рабочего раствора Солевого буфера (см. пункт 1).
 10. Перемешивали содержимое пробирки переворачиванием пробирки 10 раз.
 11. Центрифугировали 10 секунд при 5000 об/мин.
 12. Осторожно удаляли супернатант, не задевая осадок.
 13. Добавили в пробирку 1 мл Солевого буфера, перемешивали содержимое пробирки на вортексе, центрифугировали 10 секунд при 5000 об/мин., осторожно удаляли супернатант, не задевая осадок.
 14. Повторяли положение 13.
 15. Посушили осадок при температуре 65°C в течение 4 мин.
 16. В эту же пробирку внесли 200 мкл ЭкстраГенаЕ™. ЭкстраГенЕ™ отбирали от общего объема при постоянном перемешивании!
 17. Суспендировали содержимое пробирки на вортексе 10 сек до получения гомогенной суспензии, затем термостатировали 5 мин при 65°C.
 18. Еще раз суспендировали содержимое пробирки на вортексе перед центрифугированием.
 19. Центрифугировали 1 минут при 10000 об. в мин.
 20. Перенесли супернатант с ДНК в чистую пронумерованную пробирку. ДНК храниться при температуре -20°C.
- Для детекций выделенных геномных ДНК использовали 0,9%-агарозный Гель-Электрофорез.

2.2. Метод полимеразно-цепной реакции

Полимеразная цепная реакция (ПЦР, PCR) – высокая чувствительность и специфичность - изобрел в 1983 году американский ученый Кэри Мюллис. В настоящее время ПЦР-диагностика является, пожалуй, самым точным и чувствительным методом диагностики инфекционных заболеваний.

В основе метода ПЦР лежит многократное удвоение определенного участка ДНК. В результате нарабатываются количества ДНК достаточные для визуальной детекции. Можно сказать, что метод ПЦР имитирует в пробирке естественную репликацию ДНК, повторяющуюся много раз и столько, сколько это необходимо для исследования. Метод включает несколько этапов. Сначала происходит расплетение двойной спирали ДНК, расхождение нитей ДНК и последующее комплементарное дополнение (достройку) обеих с помощью специального фермента. Репликация ДНК может начаться не в любой точке, а только в определенных "стартовых блоках" - коротких двунитевых участках. Для проведения такого процесса используют две генетические пробы - праймеры, которые служат в качестве затравки для синтеза второй цепи на однострессовой ДНК.

Праймер (англ. *primer*) — это короткий фрагмент нуклеиновой кислоты (олигонуклеотид), комплементарный ДНК или РНК мишени, служит затравкой для синтеза комплементарной цепи с помощью ДНК-полимеразой, а также при репликации ДНК. Затравка необходима ДНК-полимеразам для инициации синтеза новой цепи, с 3'-конца (гидроксильной группы) праймера. ДНК-полимераза последовательно добавляет к 3'-концу праймера нуклеотиды, комплементарные матричной цепи (18).

Для амплификации гена L-тус использовались следующие праймеры (Синтол, Россия) (16).

Праймер форвард:

5'-ACGGCTGGTGGAGTGGTAGA-3'

Праймер реверс:

5'-AAGCTTGAGCCCTTTGTCA-3'

Следующая стадия заключается в удлинении новой цепочки ДНК посредством присоединения имеющихся в реакционной смеси дезоксирибонуклеотидтрифосфатов. Процесс удлинение начинается от праймеров и осуществляется при помощи фермента - ДНК-полимеразы при температуре 72⁰С (специфический бактериальный фермент - Taq-полимераза, устойчивая к высоким температурам). Полимераза осуществляет синтез вторых цепей ДНК на каждой из двух денатурированных цепей после нового прогрева. Вновь синтезированные фрагменты ДНК служат в качестве матрицы для синтеза новых нитей в следующем цикле амплификации - это и есть полимеразная цепная реакция (ПЦР).

Процедура ПЦР включает несколько высокотемпературных этапов, поэтому используются термостабильные ДНК-полимеразы. В ходе реакции последовательно меняют температуру: при температуре 90-95 градусов происходит разделение цепей ДНК, при температуре 40-60 градусов - присоединение праймера (отжиг), при температуре 72 градуса - синтез цепей ДНК.

Расчет рабочих концентраций праймеров

Поставка ПЦР- праймеров производителем осуществляется в количествах, измеряющихся в оптических единицах (ОЕ) в лиофилизированном виде. Для расчета рабочих концентраций праймеров ОЕ перевели в мкмоль. Определили концентрацию праймера, исходя из того, что 1 ОЕ олигонуклеотида соответствует концентрации 33 мкг/мл.

Для праймера, имеющего длину n пар нуклеотидов (п.н.), поставляемого в количестве (ОЕ), пересчет осуществлялся по этой формуле:

$$X = MW / 10 / (ОЕ) \times 33;$$

Приготовление рабочего раствора праймеров L-тус

Рабочий раствор (10 мкМолярный) праймеров L-тус из лиофильного стока-праймера приготавливали по следующему расчету:

50 мкл сток + 450 мкл ddH₂O

Протокол проведение ПЦР-реакции с использованием сухого набора реагентов GenePak™ PCR Core (производство ООО «Лаборатория ИзоГен», Россия)

1. Перед проведением реакции вынули из холодильника нужное количество пробирок МастерМикса;
2. Промаркировали соответствующим образом необходимое количество пробирок Мастер-Микса: (+), (-) контроли и исследуемые пробы;
3. Добавили во все пробирки по 5 мкл смеси праймеров.
4. Добавили во все пробирки, включая и контроли, по 10 мкл ПЦР растворителя.
5. Добавили в соответствующие пробирки МастерМикса по 5 мкл исследуемой ДНК. В качестве (-) контроля следует использовать бидистилл. воду.
6. Перенесли пробирки в термоблок программируемого термостата и запустили соответствующую программу амплификации.
7. После окончания амплификации все пробирки перенесли в комнату для проведения электрофореза (детекции) ДНК.
8. 5-10 мкл ПЦР продукта использовать для анализа гель-электрофорезом без дополнительного разбавления краской для нанесения.

ПЦР амплификация проводилась следующими условиями:

Начальная денатурация 94°C - 5 мин: основная денатурация 94°C -20 сек, отжиг 60°C – 40 сек, элонгация 72°C 40 сек, финальная элонгация 72°C – 8 мин, общий цикл ПЦР – 30 цикл, на ПЦР-термоцикле.

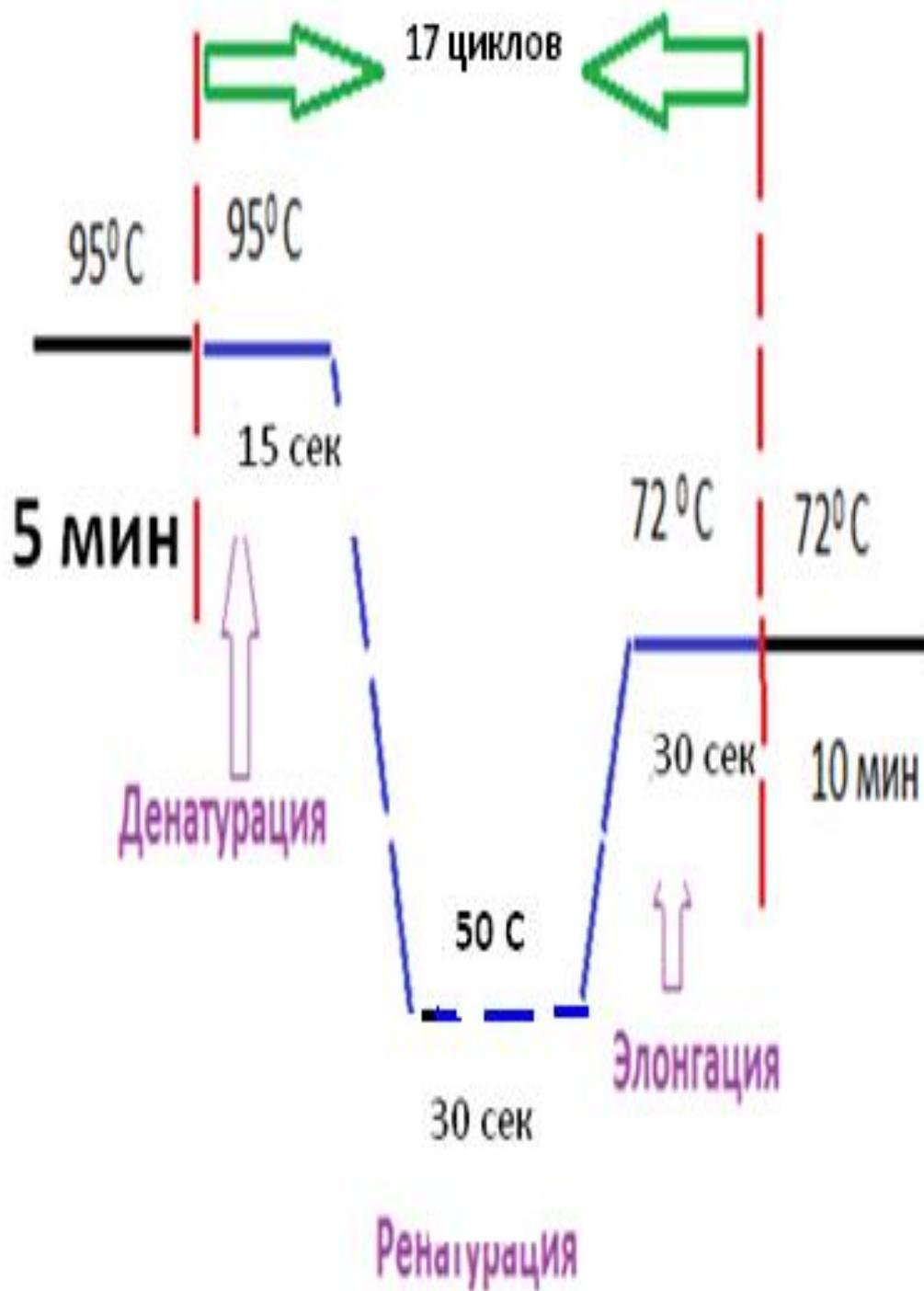


Рисунок.6 Схема ПЦР амплификации

2.3. Метод ПДРФ

Для определения генетического дефекта нужно знать, какой из генов затронут и где расположен этот ген. Мощным инструментом для определения пораженных генов и скрининга популяции людей на наличие измененного гена считается анализ полиморфизма длины рестриционных фрагментов (ПДРФ). ферменты, названные эндонуклеазами рестрикции, разрезают ДНК по специфичным последовательностям — сайтам рестрикции. Две молекулы ДНК будут разрезаны на фрагменты одинаковой длины, если молекулы идентичны. Но если в одной молекуле есть сайт рестрикции, а другой нет, то фрагменты будут различной длины. Если в одной молекуле будет больше пар оснований до сайта рестрикции, чем в другой, то фрагменты также будут различными и т.д.

На практике это означает, что, разрезая эндонуклеазами рестрикции часть генома двух индивидуумов одного вида, можно получить фрагменты различной длины, в зависимости от строения проверяемой части генома индивидуума. Это также значит, что при сравнении гомологичных районов обеих хромосом пары можно получить фрагменты различной длины. Такая картина наблюдается, если в хромосоме есть делеция, или где-нибудь между сайтами рестрикции существует инсерция — мутация, убирающая сам сайт рестрикции, а также если аллели генов различны между сайтами рестрикции. Как только расположение гена установлено, его можно клонировать, определить природу дефекта, вызывающего генетическую болезнь, разработать новые методы лечения.

Полиморфизм длин рестриционных фрагментов (ПДРФ, Restriction fragment length polymorphism, RFLP) — это способ исследования геномной ДНК, путем разрезания ДНК с помощью эндонуклеаз рестрикции и дальнейшего анализа размеров образующихся фрагментов (рестриктов) путем гель-электрофореза (ДНК электрофореза).

При использовании данного исследования получают различные результаты от различных образцов, и при помощи ПДРФ можно

идентифицировать некоторые различия в последовательности нуклеотидов ДНК, в случае, когда они располагаются в сайте рестрикции. В виду того, что технологии секвенирования ДНК могут охарактеризовать ДНК очень точно, ПДРФ был разработан как первый и дешевый метод для массового применения. Анализ разнообразия ПДРФ является важным инструментом в картировании генома, локализации генов, ответственных за генетические заболевания, определения риска заболевания, получения генетических отпечатков (genetic fingerprinting) и определения родства.

В настоящее время известно более 500 типов рестриктаз бактериального происхождения, причем каждый из этих ферментов узнает свою специфическую последовательность. Рестриктазы выделяют путем биохимической очистки из различных видов бактерий и обозначают тремя буквами, соответствующими первым трем буквам латинского названия вида бактерий, и римской цифрой, соответствующей хронологии открытия этого фермента у данного вида. В зависимости от частоты встречаемости сайтов рестрикции в молекуле ДНК различают три класса рестриктаз: часто-, средне- и редкощепящие.

РЕСТРИКТАЗЫ (эндодезоксирибонуклеазы рестрикции), ферменты класса гидролаз, катализирующие гидролиз фосфодиэфирных связей чужеродных ДНК в большинстве прокариотических (бактерии и сине-зеленые водоросли) и некоторых др. организмах и выполняющие тем самым "иммунную" функцию.

Распознавание чужеродной ДНК осуществляется в специфических нуклеотидных последовательностях (сайтах), которые в собственной ДНК клетки "отмечены" благодаря модификации (чаще всего метилированию) спец. ферментами (напр., метилазами); иногда такой модифицирующей активностью обладают и сами Р.

По принятой номенклатуре Р. обычно обозначают сокращенным назв. их продуцента, в котором первая буква-начальная буква название . рода, две следующие-начальные буквы назв. вида и последующие - обозначение

штамма и номера выделенной из него Р., напр.: HindIII—третья Р. из *Haemophilus influenzae* d.

Р. подразделяют на 3 класса. К первому классу принадлежат ферменты (напр., EcoK из *Escherichia coli* K12), узнающие специфические последовательность сайта, но разрывающие нить ДНК в произвольной точке (по-видимому, после образования комплекса с ДНК фермент неспецифически взаимодей. с удаленной областью ДНК или передвигается вдоль нити ДНК). Ко второму классу принадлежат ферменты (напр., EcoRI), расщепляющие ДНК в строго определенной точке по отношению к сайту узнавания. К третьему классу относят ферменты промежуточного типа (напр., EcoPI), разрывающие нить ДНК в нескольких точках на разном удалении от сайта узнавания.

Наибольшее значение имеют Р. второго класса, широко применяемые в [генетической инженерии](#) и при установлении структуры ДНК. Эти ферменты (молекулярная масса, рН оптим. каталитич. активности и *pI* значительно варьируют в зависимости от источника) расщепляют обе нити ДНК. При этом разрыв осуществляет иногда одна молекула Р. в обеих нитях, иногда-две молекулы фермента (каждая атакует лишь одну нить, как, напр., EcoRI). В большинстве случаев 3', 5'-фосфодиэфирные связи в ДНК расщепляются с образованием 5'-фосфатов на месте разрыва молекулы (см. [Нуклеиновые кислоты](#)), лишь немногие Р. (напр., NciI) образуют фрагменты с 3'-фосфатными группами. Все Р. второго класса-Mg²⁺-зависимые ферменты. Для некоторых Р. (напр., EcoRI) установлена первичная структура.

Расщепление ДНК происходит обычно в пределах сайта узнавания, редко-на определенном расстоянии от него. При этом образуются фрагменты ДНК либо с ровными (тупыми) концами, либо с выступающими (липкими) 5'-или 3'-концами (см. рис.). Р. с одинаковыми сайтами узнавания наз. изошизомерами.

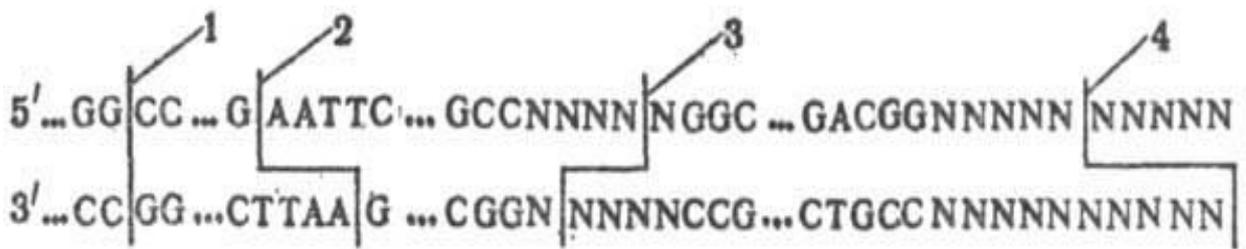


Схема расщепления ДНК разными рестриктазами: А, С, G и Т-соотв. дезоксиаденозин, дезоксицитидин, дезоксигуанозин и дезокситимидин; N-любой дезоксинуклеозид, ферменты; 1-HaIII, 2-EcoI, 3-BglI, 4-HgaI.

Применение Р. второго класса позволяет вырезать из ДНК определенные фрагменты, а также встраивать их в заданные места векторных молекул ДНК, т. е. направленно конструировать молекулы с новой генетич. информацией. (56)

Сайты рестрикции могут быть использованы в качестве генетических маркеров ДНК. Действительно, образующиеся в результате рестрикции фрагменты ДНК могут быть упорядочены по длине путем электрофореза в агарозном или полиакриламидном геле, и тем самым может быть определена их молекулярная масса, а значит, и физическое расстояние между сайтами.

Для проведения ПДРФ использовали рестрикционный фермент – **EcoRI (FERMENTAS INTERNATIONAL INC)** (16).

Концентрация EcoRI - 5000 у (10 у/μl), сайт узнавания этого фермента



Состав рестрикционной смеси:

- 1) ddH₂O – 8 мкл;
- 2) 10xBuffer – 1,5 мкл;
- 3) EcoRI – 0,5 мкл;

Все компоненты осторожно перемешивали и добавляли в каждую пробирку (0,1 мкл) по 10 мкл рестрикционной смеси и 5 мкл ПЦР-продукта, рестрикционный анализ проводился в термостате (Bio-Rad, Китай) при +37°C

в течении 16 часов. Полученные фрагменты разделялись с помощью 3%-агарозной геля-электрофореза с этидиум бромидом.

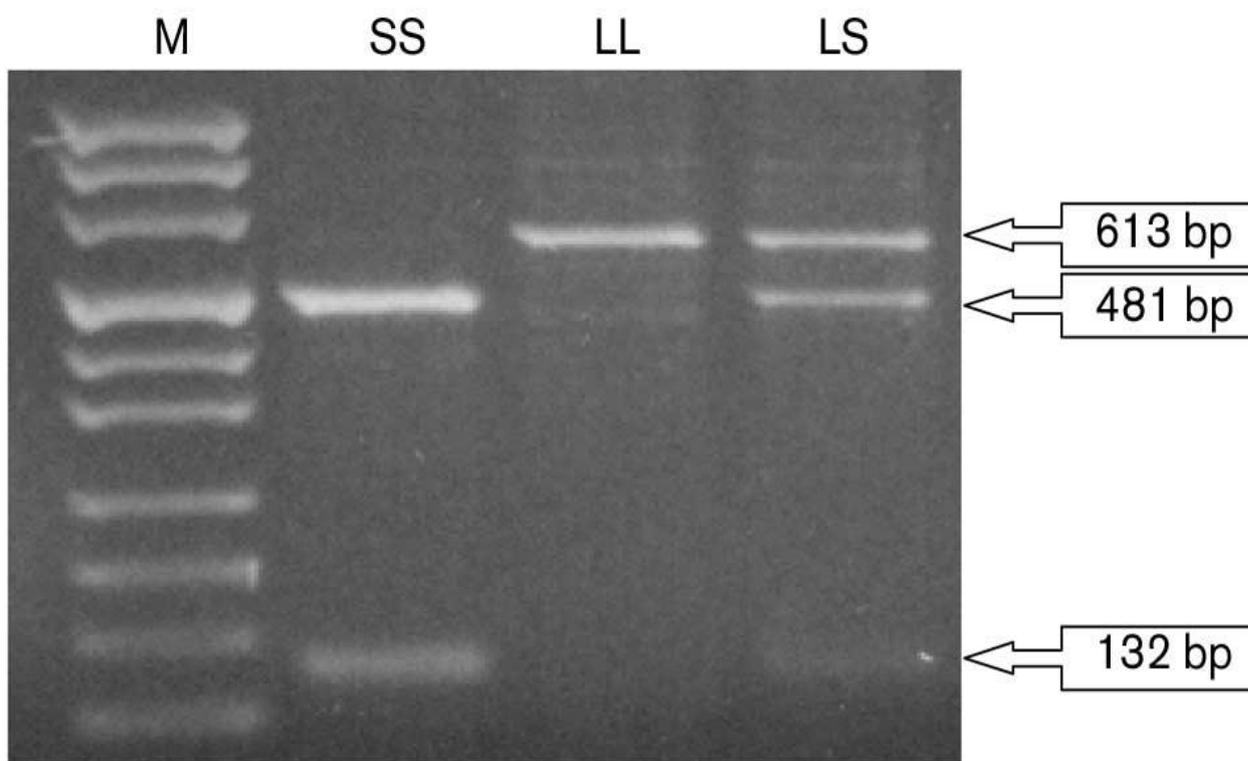


Рисунок 7. Анализ L-туса полиморфизма. Маркер-ДНК молекулярный вес маркера VIII (Roche Applied Science, Mannheim, Germany) (19).

2.4. Метод Геля-Электрофореза

Электрофорез ДНК, ПЦР-продукта, Рестрикционных фрагментов — это аналитический метод, применяемый для разделения фрагментов ДНК по размеру (длине) и форме (в случае, если ДНК образует вторичные структуры, например шпильки). Силы электрического поля, прикладываемого к образцам, заставляют фрагменты ДНК мигрировать через гель. Сахарофосфатный остов молекул ДНК заряжен отрицательно и поэтому цепи ДНК двигаются от катода, заряженного отрицательно, к положительному аноду. Скорость движения молекулы в поле единичной напряжённости называется электрофоретической подвижностью и является важной характеристикой вещества. При движении молекулы в электрическом

поле её подвижность зависит от заряда, силы сопротивления среды и характера растворителя, который сам, чаще всего, является электролитом. В этих условиях вокруг макромолекулы образует ионная атмосфера. Благодаря механической прочности и достаточно большому размеру пор агарозные гели нашли широкое применение при разделении крупных макромолекул, таких как ДНК. Варьируя концентрацию агарозы, можно менять средний размер пор в геле.(57) Более длинные молекулы мигрируют медленнее, так как задерживаются в геле, более короткие молекулы двигаются быстрее.

К образцам обычно добавляют низкомолекулярный кислый краситель (например, динитрофенол, бромфеноловый синий), чтобы визуализировать ход электрофореза в процессе. Краситель также необходим для того, чтобы определить, когда стоит остановить процесс.

Разделение ДНК в агарозных гелях чаще всего проводят в буферах, приготовленных на основе Трис-Уксусная кислота_ЭДТА(Tris-Acetate-EDTA, или ТАЕ) или Трис-Борная кислота-ЭДТА(Tris Boric Acid-EDTA, или ТВЕ) с рабочим диапазоном pH в интервале 7.0-9.2 Трис это краткое название соединения трис-(оксиметил)-аминометан.(trishydroxymethylaminomethane, или 2-амино 2-гидроксиметил-1.3-пропандиол-С₄ Н₁₁ N О₃). Оно представляет собой молекулу метана, в которой три атома водорода замещены на три остатка метанола (-СН₂ОН), а четвертый – на амино (-NH₂) группу: NH₂С(СН₂ОН)₃. В растворе трис принимает протонированную форму. Буфер необходим для повышения ионной силы раствора, в котором будет происходить разделение молекул ДНК под действием приложенного электрического поля.

По сравнению с ТВЕ, в буфере ТАЕ линейная ДНК обладает большей подвижностью, а суперспиральная форма несколько лучше разделяется. Однако по своей буферной ёмкости ТАЕ значительно уступает ТВЕ, и по этой причине ТАЕ не годится для длительных форезов и экспериментов, требующих высоких напряжений.

После разделения (иногда краситель вносят в расплавленную агарозу) фрагменты ДНК разной длины визуализируют при помощи флюоресцентных красителей, специфично взаимодействующих с ДНК, например, агарозные гели обычно красят бромистым этидием, который интеркалирует между азотистыми основаниями дуплекса и флюоресцирует в УФ-лучах.

Определение размеров производят путем сравнения коммерчески доступных фрагментов ДНК (DNA ladder, «линейка»), содержащий линейные фрагменты ДНК известной длины.

Для электрофоретического анализа ДНК обычно используют агарозные (для относительно длинных молекул ДНК) и полиакриламидные (для высокого разрешения коротких молекул ДНК, например, в случае секвенирования) гели.

Принцип гель-электрофореза

Нуклеиновые кислоты имеют суммарный отрицательный заряд. Под действием электрического поля отрицательно заряженные молекулы ДНК двигаются в геле в сторону положительного заряда, при этом более короткие молекулы ДНК двигаются быстрее больших молекул, таким образом они распределяются в геле в соответствии с молекулярным весом.

Химический состав агарозы - D-galactose 3,6-anhydro L-galactose.

Постановка гель-электрофореза

1. Приготавливали агарозный гель в % по ниже приведенному протоколу.
2. Добавили 0,5xTBE буфера и нагревали до полного растворения. Добавляли по 5 мкл Этидиум Бромид. При добавление этидиум бромид в гель происходит связывание с нуклеиновыми кислотами с образованием низкомолекулярного соединения.
3. Агарозный раствор переливали в специальную форму, где при охлаждении происходило застывание геля.
4. После полимеризации геля вынимали и опускали в камеру с 0,5xTBE буфером.

5. Гребенок осторожно вынимали. Образовывались лунки для нанесения образца.
6. Перемещивали по 5 мкл краски (бромфенолсиний+глицерин) и 5 мкл ДНК, ПЦР-продукта, Рестрикционного фрагмента и начиная с 2-лунки нанесли их в лунки геля.
7. Для детекции ПЦР-продуктов и Рестрикционных фрагментов использовали Маркер - 100 bp DNA Ladder RTU(Ready to Use) (GeneDireX, Тайвань). Наносили маркер в 1-ю лунку.
8. Закрывали крышку камеры, прогоняли образцов 30-45 минут под действием электрического тока 120 Вольт, 70 ампер.

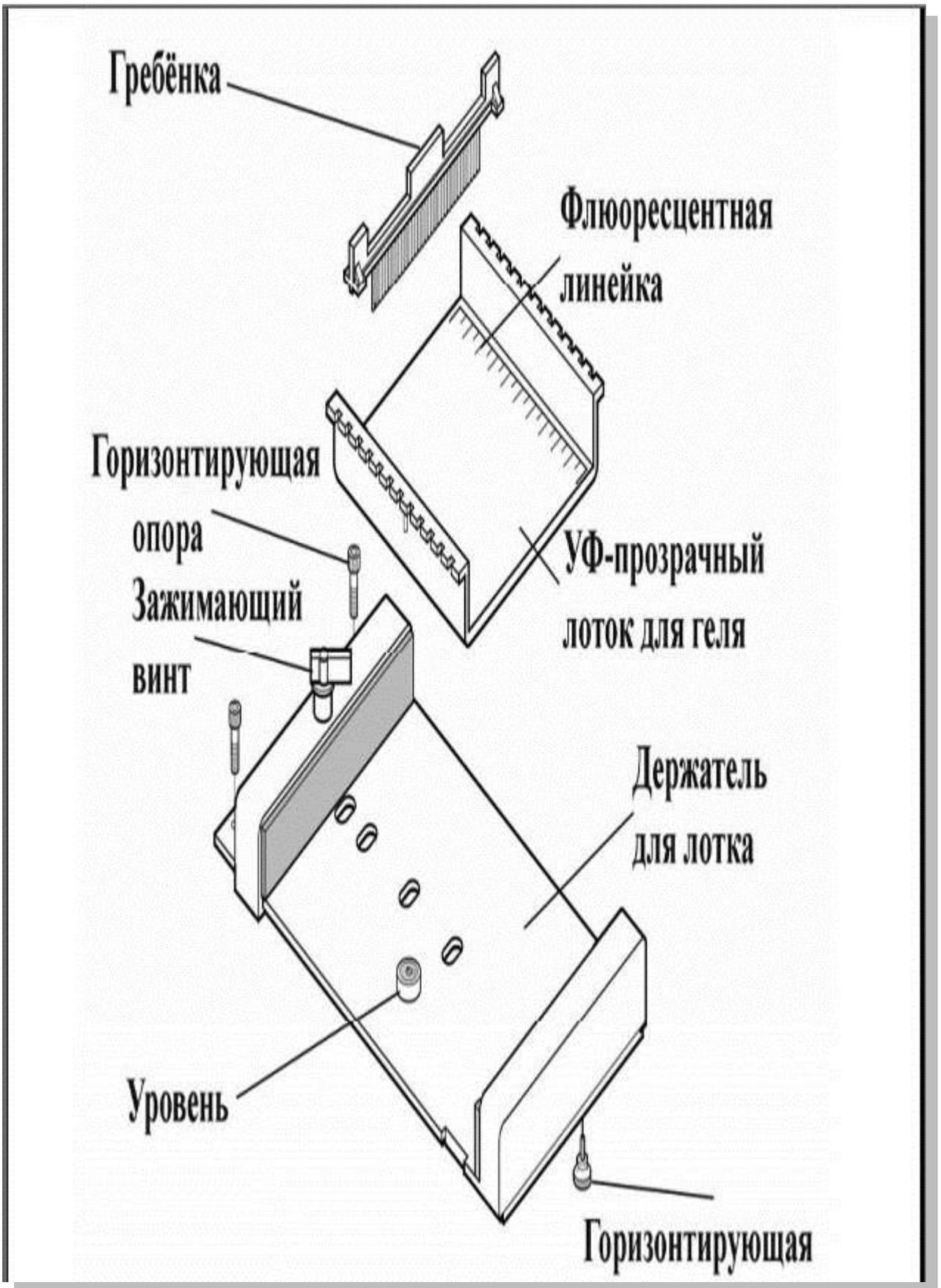


Рисунок.8

Визуализация результатов гель-электрофореза

Под действием ультрафиолетового света, этидиум бромид связанный с нуклеиновой кислотой обладает способностью к свечению. Используя “Гель-документирующую систему” визуализируется и фотодокументируется гель. Мы использовали современную систему гель документирования. (Bio-Rad, Китай).

Приготовление растворов

1. Цитрат натрия (3,8%) антикоагулянт для образцов крови при транспортировке

3,8 гр - Цитрата натрия

100 мл - дис. воды

Перемешать на вортексе. Хранить при +4°C.

2. 0.9% агароза для детекции ДНК образцов

0,9 гр - Агарозы

100 мл - 0.5x TBE буфер

Растопить в микроволновой печи. Добавить 7мкл раствора Этидиума Бромиды (1мг\мл). Хранить при комнатной температуре.

3. 10xTBE буфер (1 л)

121 гр - Трис

55 гр - Борная кислота

7,55 гр - ЭДТА

Растворить в небольшом объеме дис. воды (около 500мл) при помощи магнитной мешалки и довести дис. водой до отметки 1л. Хранить при комнатной температуре.

4. 5xTBE буфер (100 мл)

5 мл - 10xTBE буфер

95 мл - ddH₂O

Перемещать при помощи магнитной мешалки. Хранить при комнатной температуре.

5. 2% агароза для детекции ПЦР-продукта

2 гр - Агарозы

100 мл - 0.5xTBE

Растопить в микроволновой печи. Добавить 7мкл раствора Этидиума Бромид (1мг\мл). Хранить при комнатной температуре.

6. 3% агароза для детекции ЦДФФ-продукта

3 гр - Агарозы

100 мл - 0.5xTBE

Растопить в микроволновой печи. Добавить 7мкл раствора Этидиума Бромид (1мг\мл). Хранить при комнатной температуре.

7. Краситель для нанесения проб в гель – Бромфенол Синий и Ксиленцианол

2,5 гр - Бромфенол Синий

2,5 гр - Ксиленцианол

10 мл - 30% глицерина

Перемешать на вортексе. Хранить при -20°C.

8. Этидиум Бромид (1мг\мл)

1 мг - Этидиума Бромид

1 мл - дис. воды

Перемешать на вортексе. Хранить при комнатной температуре.

2.5. Статистическая обработка полученных результатов.

Оценку погрешностей экспериментальных данных проводили, определяя среднее квадратичное отклонение m по формуле:

$$\frac{\sigma}{\sqrt{n}} = \sqrt{\frac{\sum |\varepsilon|^2}{n(n-1)}}$$

где σ - средняя квадратичная ошибка;

n – число измерений;

$\sum |\varepsilon|^2$ - отклонение от среднего.

Конечный результат выражали как $M \pm m$, где M - средняя величина.

ГЛАВА III. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Генотипирование образцов по гену L-тус

Генетические и иммунологические маркеры являются важными инструментами для выявления предрасположенности к опухоли и определению группы риска развития рака.

Известно, что прото-онкогены семейства Мус участвуют в развитии многих типов опухолей. Некоторые исследования дали связь между полиморфизмом EcoRI и предрасположенности к разным неоплазмам, такие как, рак молочной железы и рак пищевода и саркома костной ткани. Но не была обнаружена корреляция между раком мочевого пузыря, рак почек и других органов.(58)

Достоверная связь было выявлено в пациентах рака желудка Турции и Японии, тогда как в Европейской и Российской популяции отсутствовала эта ассоциация с полиморфизмом EcoRI L-тус гена.(59)

Причина того, как интроник полиморфизм этого гена может воздействовать развитию раковых клеток, пока еще не известно. Потому что вовремя сплайсинга происходит вырезания интронов ДНК – некодирующих генов и сшиваются только экзоны – белок кодирующие гены. Само по себе после сплайсинга исчезает интроны и все полиморфизмы внутри этих интронов. Как некодирующий полиморфизм внутри интрона L-тус гена, локус не приводит к перестройке белка L-тус гена; зато это может привести к генетической предрасположенности к раку желудка диффузного типа через следующие механизмы: (1) прекращения регуляции экспрессии белка L-тус, этот процесс может привести к существенным изменениям структуру хроматина (Knoepfler и др., 2006), (2) модуляция транскрипцию генов-мишени способствует к неустойчивости хромосомы (Eilers и Eisenman, 2008); (3) другие близрасположенные полиморфизмы находящиеся в неравновесном сцеплении с rs3134613 могут иметь функциональную роль(Spinola и др., 2001, 2007).

В наших экспериментах пцр-продукт весом 613 bp, имеющий EcoRI полиморфичный сайт гена L-тус был амплифицирован с помощью метода полимеразной цепной реакции. L аллель не имел рестрикционного сайта, а внутри S аллеля находится 1 рестрикционный сайт.

В результате проведенных исследований выяснено то, что при помощи праймеров 2-го интрона выяснено наличие в геномная ДНК человека наличие именно L-тус гена, имеющего полиморфизм к EcoRI и проведена амплификация этих участков. Полученные пцр-продукты L-тус гена были подвергнуты рестрикции. В результате рестрикции при наличии сайтов рестрикции фрагмент поделён на 2 фрагмента, при его отсутствии наблюдался один фрагмент.

Рисунок 3.1.1. ПЦР-продукты из образцов больных раком желудка.

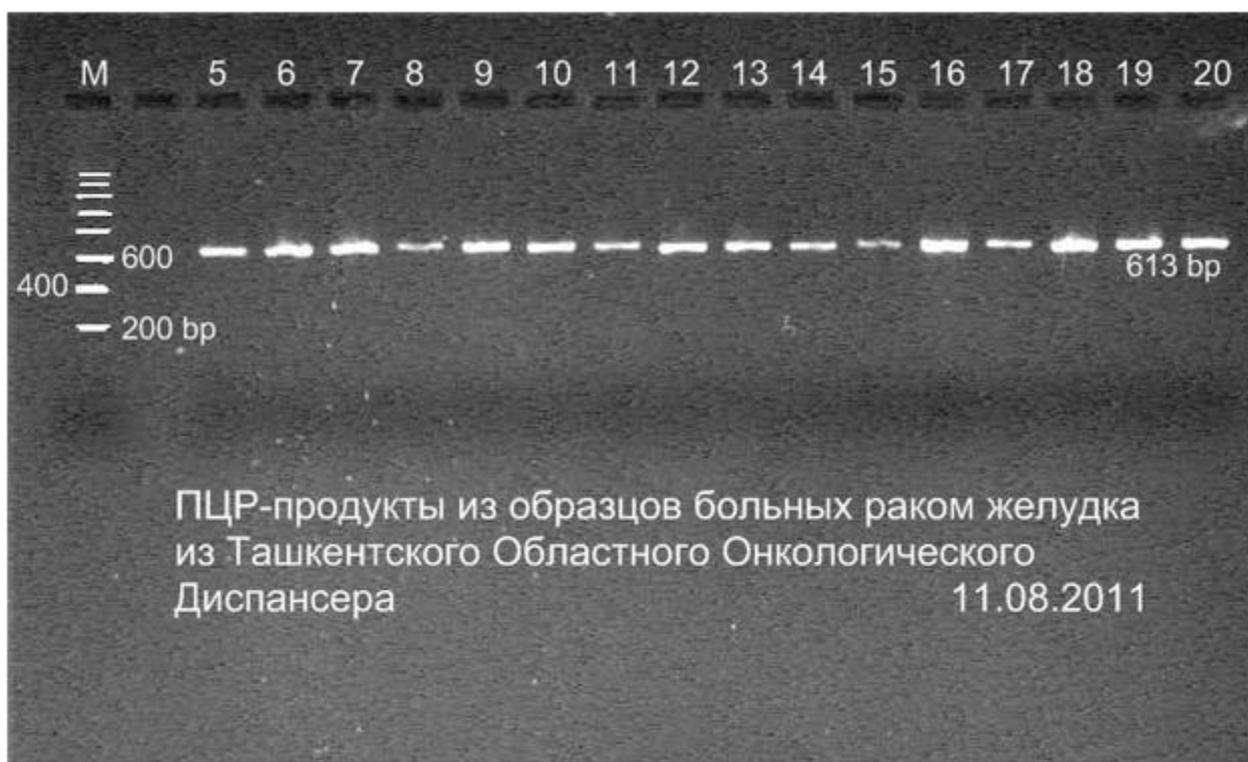
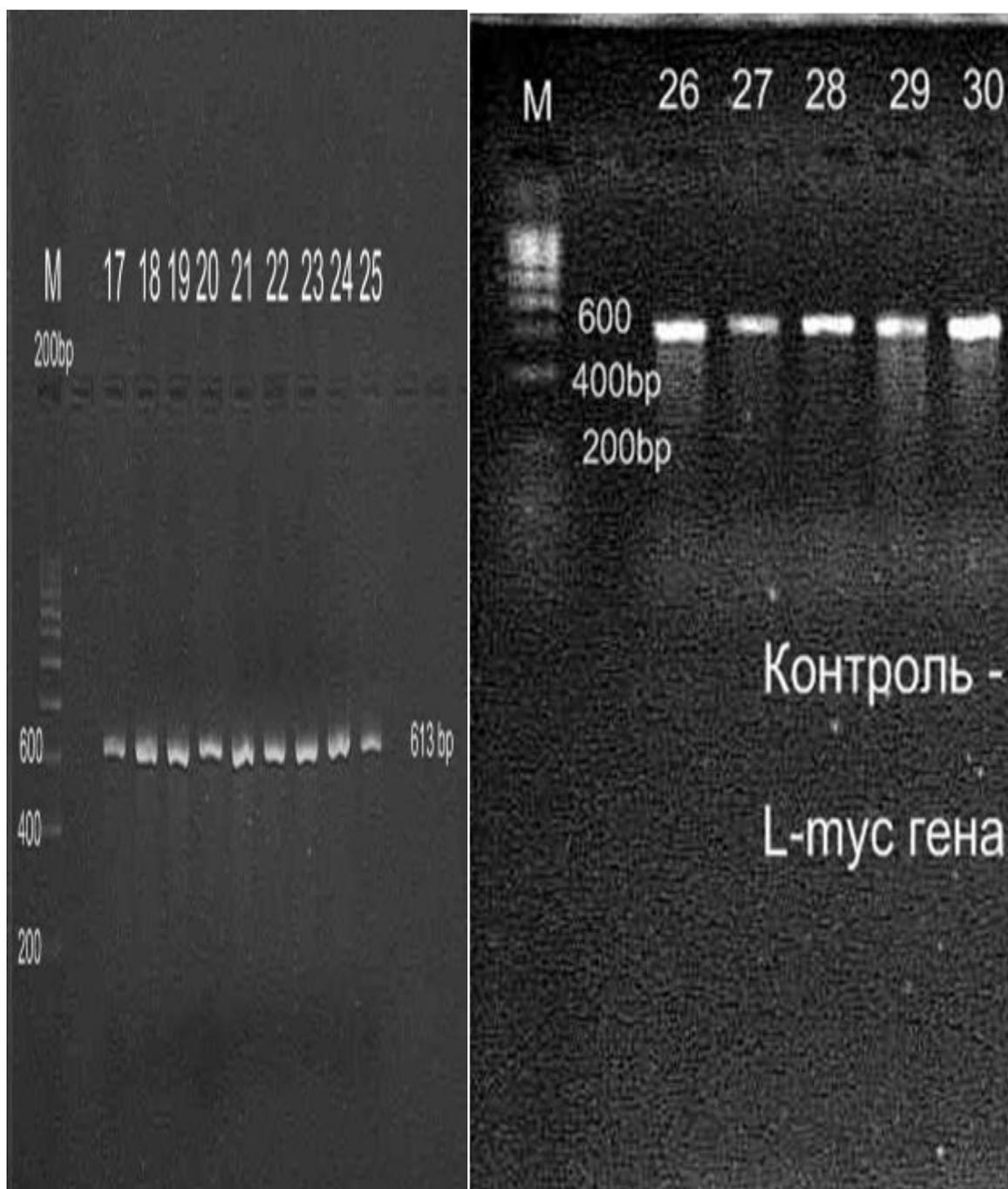


Рисунок 3.1.2. Контроль-ПЦР продукт.



Рисунок 3.1.3. Контроль-ПЦР продукт.



После обработки рестрикционного энзима EcoRI, были получены три генотипа: L/L – гомозигота, фрагмент весом 613 bp,; L/S – гетерозигота, продуцирующий 613-, 481- и 132-bp фрагментов; и S/S – гомозигота мутант, с 481- и 132-bp фрагментами (рисунок. Анализ L-тус полиморфизма. Маркер-ДНК молекулярный вес маркера VIII (Roche Applied Science, Mannheim, Germany) .

Предыдущих научных исследованиях была выявлена ассоциация полиморфизма rs3134613 с клинико-патологическими признаками в разных опухолей, например, раках легких, почки и колоректального рака. Тогда как другие исследования не обнаруживали значительную связь в тех же типов рака (60)

Основная функция продуктов MYC – это ингибирование клеточную завершающую дифференциацию и активизировать пролиферацию (61)

В исследованиях Chen и др. (2010) предполагали, что в раке желудка, S аллель может иметь сильное воздействие на ингибирующую функцию, чем G аллель.

Возможно, что белок L-тус вовлечен в ткане-специфик регуляции клеточного роста и изменения в экспрессии этого белка могут участвовать формировании опухоли. Также, вероятно, что L-тус онкоген непосредственно включает себя. Как основной транскрипт, L-тус ген часто участвует в процессах много численных созревших мРНК, которые могут, кодировать в структурно – индивидуальных белков. (18)

Długosza и др. (2002) изучали связь L-тус полиморфизма с предрасположенностью и развитию к раку желудка. Не было обнаружено различие в распределении генотипов L-тус между больной и контрольной группе, и сделали вывод, что присутствие S аллеля в гене L-тус не является фактором риска развития рак желудка у больных раком желудка Европейской. (23)

В контрасте с результатами Dlugosz и др., L-мус локус является ассоциированным с генетической склонности к раку желудка у Японской популяции. (20)

В других исследованиях, этническое отличие в частотах L-мус генотипов было обнаружено между Китайской и Афро-Американской популяции: Афро-Американская популяция имела высокую частоту S аллеля. (37, 44).

Однако, в мета-анализе Crossen и др., частота аллелей были сходными среди Норвежских, Японских, Индийских, Америка-Европейских, Английско-Европейских и гериатрических Австралийских пациентах Европейского происхождения, но различались от Афро-Американских пациентов. (45)

Возможное объяснение этих конфликтующих результатов – или факторы окружающей среды, или этническое происхождение изученных пациентов.

Young и др. обнаружили пониженную частоту L аллеля у старых пациентов. Пока SS генотип может показать предрасположенность к развитию рака, таким образом, объясняя значительную разницу между старыми больными рака и молодыми здоровыми лицами, существует и другое объяснение, что L аллель может провоцировать раннюю смерть, возможно ожидаемый от сердечных заболеваний. (46)

Такие тенденции были обнаружены в полиморфизме 5,10-метилентетрагидрофолат редуктаз (MTHFR) гена C677T у пациентов с инфарктом миокарда. Генотип TT этого полиморфизма был возможно исключен из популяции, потому что был ассоциирован с смертельным исходом от инфаркта миокарда. (47)

В контрасты с результатами Shibuta и др.(1998), в нашем исследовании не было выявлено достоверная корреляция между L-мус EcoRI полиморфизмом и предрасположенностью к раку желудка у популяции Узбекистана. Хотя узбекская популяция относится к Азиатскому

происхождению. Эти противоречивые результаты могут быть причиной из-за этнического разнообразия, количеством образцов, или разновидности методов исследования.

Рисунок 3.2.1. Образцы РЖ. Рестрикционные фрагменты.



Рисунок 3.2.2. Образцы РЖ. Рестрикционные фрагменты.



Рисунок 3.2.3. Образцы РЖ. Рестрикционные фрагменты.

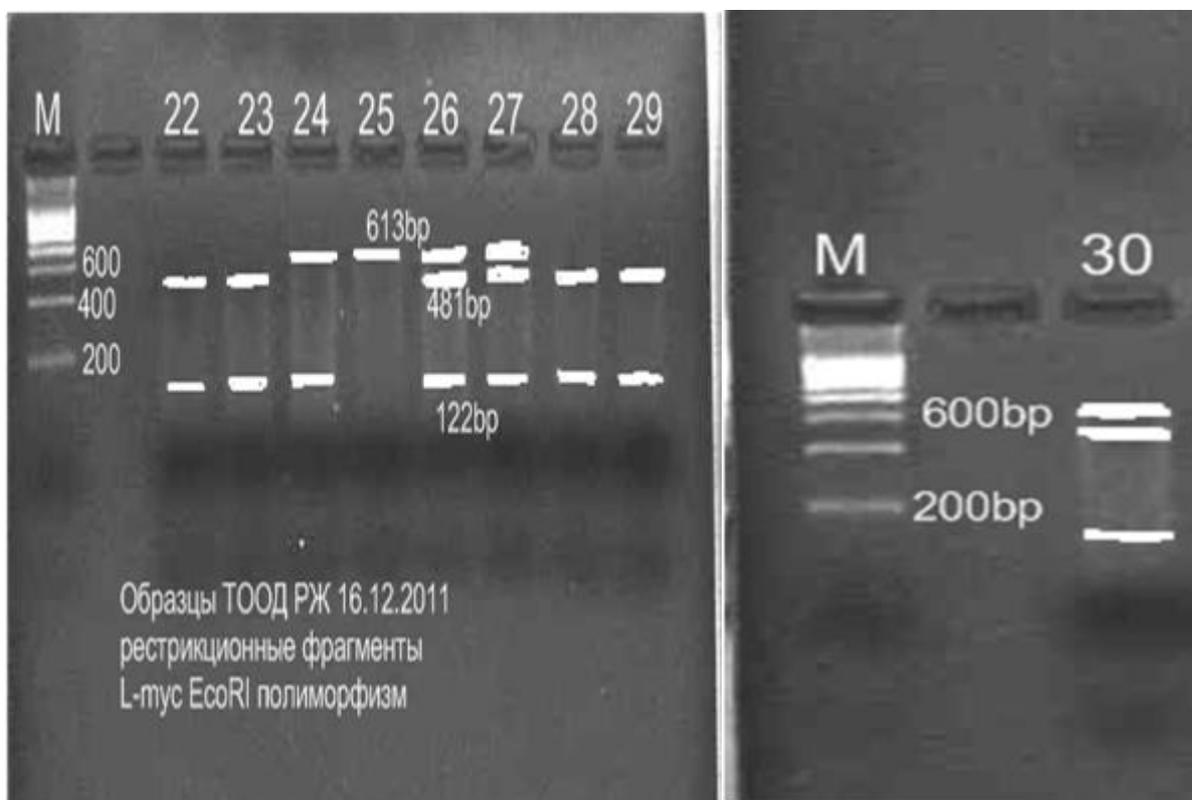


Рисунок 3.2.4. Контроль-рестрикционные фрагменты



Рисунок 3.2.5. Контроль-рестрикционные фрагменты

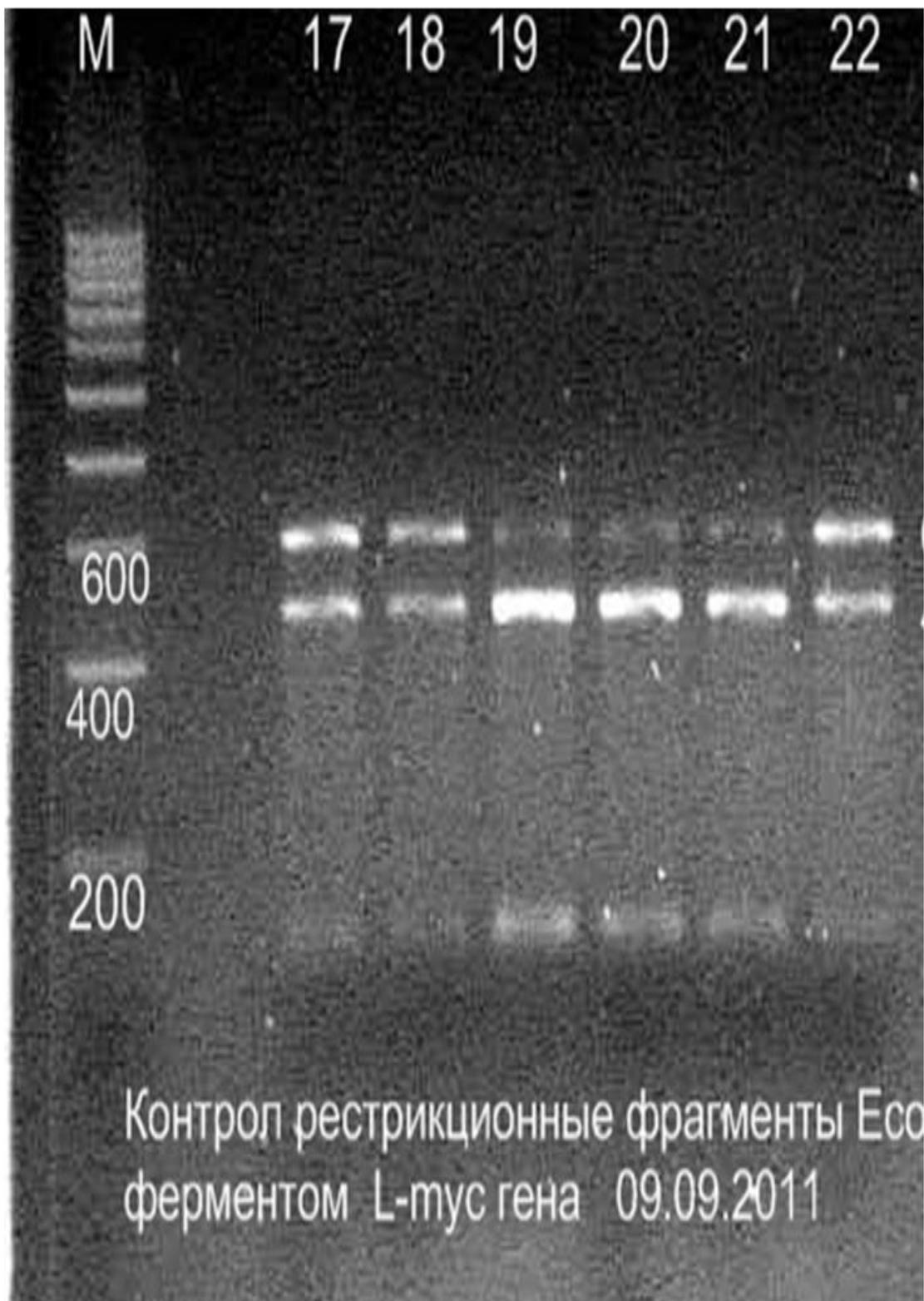


Рисунок 3.2.6. Контроль-рестриционные фрагменты

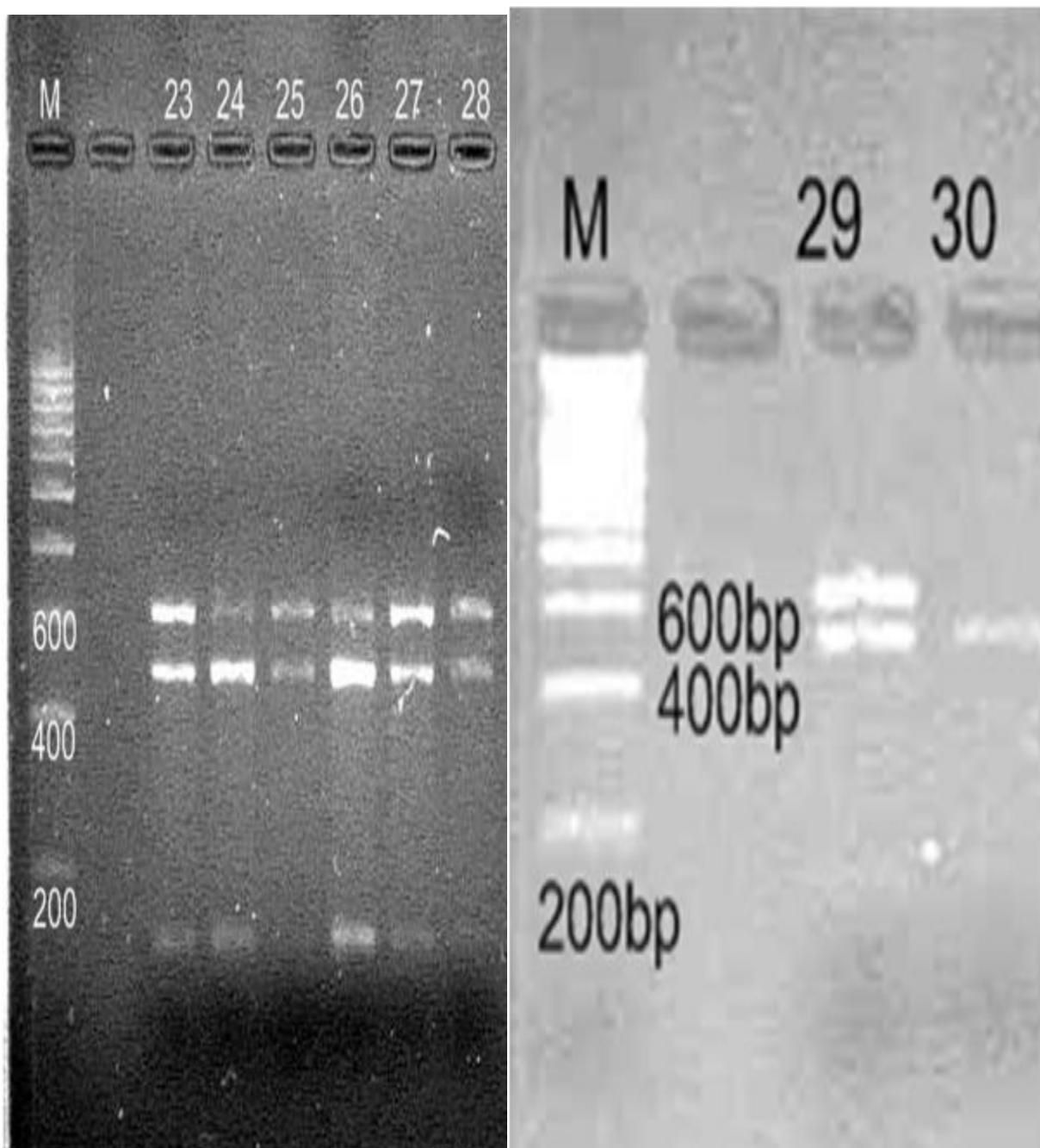


Таблица 3.1.

Частоты генотипов больной и здоровой группы показаны

	N	Распределение генотипов		
		SS	LS	LL
Болезная группа	30	7(23.3%)	15(50%)	8(26.7%)
Здоровая группа	30	7(23.3%)	15(50%)	8(26.7%)

Таблица 3.2.

Частоты генотипов и аллелей rs3134613 группы больных раком желудка и здоровых

	Количество L тус аллели		
	L	S	P
Болезная группа	31	29	-
Здоровая группа	31	29	-

Связь между S аллелем гена L-тус и раком желудка

Ассоциация полиморфизма rs3134613 гена L-тус с развитием рака желудка

В работе 30 больных раком желудка и 30 здоровых лица были генотипированы по rs3134613 полиморфизму, как видно из Таблиц 1 и 2. Распределение генотипов в группе больных: LL - 26,6%, LS - 50%, SS – 23,3% и контрольной группе: LL – 26,7%, LS - 50%, SS – 23,3%. Сравнения случаев и контроли показывает, что значительной разницы в распределении генотипов и частоты аллелей rs3134613 не выявлено ($p > 0.05$).

Ассоциация полиморфизма rs3134613 L-тус гена с клинико-патологическими данными рака желудка

Пациенты, болевшие раком желудка, были подразделены на группы основными клинико-патологическими признаками – гистология, стадия и место расположения, плюс возраст и пол пациентов. Анализ Пирсона χ^2 -теста показали, что между генотипами и клиническими показателями, такие как расположения и величина рака желудка не имеется значительная статистически достоверная связь (все $p > 0.05$).

Далее пациенты были классифицированы на два генотипа: 'LS + SS тип' и 'LL тип'. Здесь результаты анализов показали незначительную связь между S аллелем (LS+SS) и метастазами лимфатических узлов ($P > 0.05$).

ВЫВОДЫ

1. Проведено молекулярно-генетическое исследование EcoRI полиморфизма во втором интроне прото-онкогена L-тус среди 30 пробандов с раком желудка и 30 здоровых пробандов узбекской популяции.
2. Проведено генотипирование по следующим генотипам: LL, LS, SS- группа больных и контрольных групп по методу полиморфизма длин рестрикционного фрагмента.
3. Разница между распределениями генотипов между больной и контрольной группами не обнаружена, т.к. значение Пирсон chi-square теста=0.02, степень свободы 1- df = 1, p= 0.89, OR (S аллель) = 0,98 , OR(L аллель)= 1,02, в связи с чем можно утверждать, что S аллель L-тус гена не может служить маркером в развитии рака желудка популяции Узбекистана.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Correa P., Schneider B.G. Etiology of gastric cancer: what is new? *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **2005**, *14*: 1865-1868.
2. Zagari R.M., Bazzoli F. Gastric cancer: who is at risk? *Dig. Dis.* **2004**, *22*: 302-305.
4. Аксель Е.М., Давыдов М.И. Статистика заболеваемости и смертности от злокачественных новообразований в 2000 году. Злокачественные новообразования в России и странах СНГ. М 2002;85—106.
5. Давыдов М.И., Аксель Е.М. Структура заболеваемости злокачественными новообразованиями в странах бывшего СССР. Злокачественные новообразования в России и странах СНГ в 2000 г.М 2001; 107—111.
6. Долгушин Б.И., Нечушкин М.И., Черкасов В.А. и др. Восстановление проходимости стриктур трубчатых органов металлическими сетчатыми протезами у неоперабельных онкологических больных пожилого возраста. *Клин геронтол* 2005; *6*: 15—25.
7. Мерабишвили В.М. Рак желудка: эпидемиология, профилактика, оценка эффективности лечения на популяционном уровне. *Практ. Онкол.*, 2001; *3*: 3—8.
8. El-Omar E.M., Carrington M., Chow W. H. et al. “Interleukin-1 polymorphisms associated with increased risk of gastric cancer”. *Nature*, 2000; *404*: 398–402.
9. Gonzalez C.A., Sala N., Capella G. “Genetic susceptibility and gastric cancer risk”. *Int. J. Cancer* 2002; *100*: 249–260.
10. Silva F., Carvalho F., Peixoto A. et al. “MUC1 gene polymorphism in the gastric carcinogenesis pathway”. *Eur.J. Hum. Genet.*, 2001; *9*:548–552.
11. Zhang J., Dou C., Song Y. et al. “Polymorphisms of tumor necrosis factor-alpha are associated with increased susceptibility to gastric cancer: a meta-analysis”. *J Hum Genet* 2008; *53*: 479–489.

12. Wang G.Y., Lu C.Q., Zhang R.M., Hu X.H., Luo Z.W. “The E-cadherin gene polymorphism 160C-4A and cancer risk: a huge review and meta-analysis of 26 case-control studies”. *Am J Epidemiol* 2008; 167: 7– 14.
13. Sun L., Sun Y.H., Wang B., Cao H.Y., Yu C.: “Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms and susceptibility to gastric cancer in Chinese populations: a meta-analysis”. *Eur J Cancer Prev.*, 2008; 17: 446– 452.
14. **Lauren P.** The two histological main types of gastric carcinoma: diffuse and so-called intestinal-type carcinoma. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.* 64:31-49, 1965.
15. Hamilton, J.P., Meltzer, S.J. “A review of the genomics of gastric cancer”. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* **2006**, 4: 416-425.
16. Lei G., Alexandra N., Hermann B. “Cell proliferation-related genetic polymorphisms and gastric cancer risk: systematic review and meta-analysis”. *E. J. Human Genetics*, 2009, 17, 1658 – 1667.
17. Nau M. Brooks B.J., Battey J., Sausville E., Gazdar A.F., Kirsch I.R., et al. “L-myc, a new myc-related gene amplified and expressed in human small cell lung cancer”. *Nature* 1985; 318:69–73.
18. Kaye F., Battey J., Nau M., Brooks B., Seifter E., De Greve J., et al. “Structure and expression of the human L-myc gene reveal a complex pattern of alternative mRNA processing. *Mol. Cell Biol.* 1988; 8:186–195.
19. Ge H., Lam W.K., Lee J., Wong M.P., Yew W.W., Lung M.L. “Analysis of L-myc and GSTM1 genotypes in Chinese non-small cell lung carcinoma patients. *Lung Cancer* 1996; 15:355–366.
20. Shibuta K., Mori M., Haraguchi M., Yoshikawa K., Ueo H., Akiyoshi T. “Association between restriction fragment length polymorphism of the L-myc gene and susceptibility to gastric cancer. *Br J Surgery* 1998; 85:681–684.
21. Spinola M., Nomoto T., Manenti G., Falvella S., Brega Massone P.P., Conti B., et al. “Linkage disequilibrium pattern in the L-myc gene in Italian and Japanese non-small-cell lung-cancer patients”. *Int. Cancer*, 2001; 95:329—331.

22. Кнорре Д. Г., Мызина С. Д. Биологическая химия. — 3. — Москва: Высшая школа, 2000. — 479 с., Глик Б., Пастернак Дж. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение. — Москва: Мир, 2002. 589 с.
23. Dlugosz A., Adler G., Ciechanowicz A., Jaroszewicz-Heigelmann H., Starzynska T. “EcoRI polymorphism of the L-myc gene in gastric cancer patients”. *E. J. Gastr. Hep.* 2002, 14:1231–1235
24. Kakehi, Y., and Yoshida, O. “Restriction fragment length polymorphism of the MYCL1 gene and susceptibility to metastasis in renal cancer patients”. *Int.J. Cancer*, 1989, 43, 391–394.
25. Kato M., Toguchida J., Honda K., Sasaki M.S., Ikenaga M., Sugimoto M., Yamaguchi T., Kotoura Y., Yamamuro T., Ishizaki K. “Elevated frequency of a specific allele of the MYCL1 gene in male patients with bone and soft-tissue sarcomas”. *Int. J. Cancer*, 1990, 45, 47–49.
26. Taylor J.A., Bell D.A., Nagorney D. “MYCL1 protooncogene alleles and susceptibility to hepatocellular carcinoma”. *Int. J. Cancer*, 1993, 54, 927–930.
27. Shibuta K., Inoue H., Sato K., Matsuyama A., Ueo H., Tanaka Y., Mafune K., Barnard G.F., Mori M. “MYCL1 restriction fragment length polymorphism in Japanese patients with esophageal cancer”. *Jpn. J. Cancer Res.*, 2000, 91, 199–203.
28. Ishizaki K., Kato M., Ikenaga M., Honda K., Ozawa K., Toguchida J. “Correlation of MYCL1 genotypes to metastasis of gastric cancer and breast cancer”. *J. Natl Cancer Inst.*, 1990, 82, 238–239.
29. Mironov N.M., Aguelon A.M., Potapova G.I., Gorbunov O.V., Klimenkov A.A., Yamasaki H. “MYCL1 allele polymorphism and prognosis for metastases in Russian gastric cancer patients”. *Eur J Cancer*, 1994, 30A, 1732.
30. Onda M., Matsukura N., Matsukura N., Tokunaga A., Matsuda N., Yamashita K., Shields P.G. “Genetic polymorphisms of the cancer related gene and *Helicobacter pylori* infection in Japanese gastric cancer patients. An age and gender matched case-control study”. *Cancer* 77, Suppl 8, 1996, 1654–1661.

31. Isbir T., Yaylim I., Arikan S., Kaytan E., Karsidag T., Bayrak S., Camlica H. "Close correlation between restriction fragment length polymorphism of MYCL1 gene and susceptibility to gastric cancer". *Cancer Detect Prev* 6, 2002, 454–457.
32. Knoepfler P.S., Zhang X.Y., Cheng P.F., Gafken P.R., McMahon S.B., Eisenman R.N. "Myc influences global chromatin structure". *EMBO J.* 25, 2006, 2723–2734.
33. Eilers, M., Eisenman R.N. "Myc's broad reach". *Genes Dev.*, 2008, 22, 2755–2766.
34. Spinola M., Falvella F.S., Galvan A., Pignatiello C., Leoni V.P., Pastorino U., Paroni R., Chen S., Skaug V., Haugen A., Dragani T.A. "Ethnic differences in frequencies of gene polymorphisms in the MYCL1 region and modulation of lung cancer patients' survival". *Lung Cancer*, 2007, 55, 271–277.
35. Ikeda I., Ishizaka Y., Ochiai M., Sakai R., Itabashi M., Onda M., Sugimura T., Nagao M. "No correlation between MYCL1 restriction fragment length polymorphism and malignancy of human colorectal cancers". *Jpn. J. Cancer Res.*, 1988, 79, 674–676.
36. Kawashima K., Nomura S., Hirai H., Fukushi S., Karube T., Takeuchi K., Naruke T., Nishimura S. "Correlation of MYCL1 RFLP with metastasis, prognosis and multiple cancer in lung-cancer patients". *Int. J. Cancer*, 1992, 50, 557–561.
37. Ge H., Lam W.K., Lee J., Wong M.P., Yew W.W., Lung M.L. "Analysis of MYCL1 and GSTM1 genotypes in Chinese non-small cell lung carcinoma patients". *Lung Cancer*, 1996, 15, 355–366.
38. Presti J.C., Hinckley J., Reuter V.E. "MYCL1 allelotype in renal cell carcinoma". *Cancer Genet. Cytogenet.*, 1996, 88, 66–68.
39. Spinola M., Pedotti P., Dragani T.A., Taioli E. Meta-analysis suggests association of MYCL1 EcoRI polymorphism with cancer prognosis. *Clin Cancer Res* 2004, 10, 4769–4775.
40. Schwab M., Alitalo K., Klempnauer K.H., Varmus H.E., Bishop J.M., Gilbert F., Brodeur G., Goldstein M., Trent J. "Amplified DNA with limited homology to

myc cellular oncogene is shared by human neuroblastoma cell lines and a neuroblastoma tumour”. *Nature*, 1983, 305, 245–248.

41. Bishop J.M. “The molecular genetics of cancer (review)”. *Science*, 1987, 235, 305–311.

42. Chen Sh., Lin X., Zhu J., Tang Y., Lin J. Association of a MYCL1 Single Nucleotide Polymorphism, rs3134613, with Susceptibility to Diffuse-Type Gastric Cancer and with Differentiation of Gastric Cancer in a Southeast Chinese Population. *DNA CELL BIO.*, Vol. 29, Number 12, 2010, 739-743.

43. Hanahan D., Weinberg R.A. “The hallmarks of cancer (review)”. *Cell*, 2000, 100, 57–70.

44. Weston A., Ling-Cawley H.M., Caporaso N.E., Bowman E.D., Hoover R.N., Trump B.F., et al. “Determination of the allelic frequencies of an L-myc and p53 polymorphism in human lung cancer”. *Carcinogenesis*, 1994; 15:583–587.

45. Crossen PE, Morrison MJ, Colls BM. Increased frequency of the S allele of L-myc oncogene in non-Hodgkin’s lymphoma. *Br. J. Cancer*, 1994; 69: 759–761.

46. Young J, Buttenshaw R, Butterworth L, Ward M, Searle J, Leggett B, et al. Association of the SS genotype of the L-myc gene and loss of 18q sequences with a worse clinical prognosis in colorectal cancers. *Oncogene*, 1994; 9:1053–1056.

47. Goracy I., Goracy J., Suliga M., Ciechanowicz A. “C677T gene polymorphism of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) in patients with myocardial infarction”. *Pol. Arch. Med. Wewn.*, 1999; 4:849–854.

48. С. С. Харнас, В. В. Левкин, Г. Х. Мусаев. Рак желудка: клиника, диагностика, лечение

49. [www.eurolab.ua]

50. Щепотин И.Б., Эванс С.Р. Рак желудка: практическое руководство по профилактике, диагностике и лечению. Киев «Книга Плюс» 2000.–227с.

51. М.С.Абдуллаходжаева «Основы патологии человека» часть 2 Ташкент 1997г.

52. DePinho R.A., Schreiber-Agus N., Alt F.W. myc family oncogenes in the development of normal and neoplastic cells // *Adv.Cancer Res.* 1991. V. 57. P. 1—46.
53. Dang C.V. c-Myc target genes involved in cell growth, apoptosis, and metabolism // *Mol. Cell Biol.* 1999. V. 19. P. 1—11
54. Iversen P.L., Arora V., Acker A.J., et al. Efficacy of antisense morpholino oligomer targeted to c-myc in prostate cancer xenograft murine model and a Phase I safety study in humans // *Clin. Cancer Res.* 2003. V. 9. P. 2510—2519
55. Soucek L., Helmer-Citterich M., Sacco A., et al. Design and properties of a Myc derivative that efficiently homodimerizes // *Oncogene.* 1998. V. 17. P. 2463—2472
56. Корнбсрг А., Синтез ДНК, пер. с англ., М., 1977, с. 298-305; Баев А. А., Таняшин В.И., Федор И., в сб.: Итоги науки и техники, сер. Молекулярная биология, т. 12, ч. 1. Генетическая инженерия, М., 1979; Kessler Oh, Neumaier P.S, Wolf W., "Gene", 1985, v. 33, № 1, p. 1-102.
57. Askers G.K. Steere R.L. (1962) Restricted diffusion macromolecules through agar-gel membranes. *Biochim. Biophys. Acta*, 59(1), 137-149
58. Kakehi и Yoshida, 1989; Kato и др., 1990; Taylor и др., 1993; Shibuta и др., 2000; Spinola и др., 2001.
59. Ishizaki и др., 1990; Mironov и др., 1994; Onda и др., 1996; Shibuta и др., 1998; Dlugosz и др., 2002; Isbir и др., 2002.
60. Ikeda и др., 1988; Kawashima и др., 1992; Ge и др., 1996; Presti и др., 1996; Spinola и др., 2004
61. Schwab и др., 1983; Bishop, 1987; Hanahan и Weinberg, 2000

ПРИМЕЧАНИЕ

Нуклеотидная последовательность гена L-MYC

CGGGCCGCATCAGCCCTCCTCCTGTTTGGCGCTCCCCAGCGTGCAATTTA
TTTGGGGGGGCTACCGGGGATTGAACGGAGCGGGCGAGCGCTGCCAGGA
GGTGGGGCCGGCCCCACCTGTCGACTGCCCGTAGTAGGCAGGGAGAGG
GCGGGGTTTGTCCATAGGGCCCCGCCCCCAGTCCCTGGGTCCCGGGCG
CGCGACGAGATATAAGGCAGTCAGGAAACAATGCGCCTGCAGCTCGCG
CTCCCGCGCCGATCCCGAGAGCGTCCGGGGCCGCCGTGCGCGAGCGAGG
GAGGGCGCGCGCGCGGGGGGGGGCGCGCTCGTGAGTGCGGGCCGCGCTC
TCGGCGGGCGCGCATGTGCGTGTGTGCTGGCTGCCGGGCTGCCCCGAGC
CGGCGGGGAGCCGGTCCGCTCCAGGTGGCGGGGCGGCTGGAGCGAGGTG
AGGCTGCGGGTGGCCAGGGCACGGGCGCGGGTCCCGCGGTGCGGGCTG
GCTGCAGGCTGCCTTCTGGGCACGGCGCGCCCCCGCCGGCCCCGCCG
GGCCCTGGGAGCTGCGCTCCGGGGCGGCGCTGGCAAAGTTTGCTTTGAA
CTCGCTGCCACAGTCGGGTCCGCGCGCTGCGATTGGCTTCCCCTACCA
CTCTGACCCGGGGCCCCGGCTTCCCGGGACGCGAGGACTGGGCGCAGGC
TGCAAGCTGGTGGGGTTGGGGAGGAACGAGAGCCCGGCAGCCGACTGT
GCCGAGGGACCCGGGGACACCTCCTTCGCCCCGGCCGGCACCCGGTCAG
CACGTCCCCCCTTCCCTCCCGCAGGGAGCGGACATGGACTACGACTCGT
ACCAGCACTATTTCTACGACTATGACTGCGGGGAGGATTTCTACCGCTC
CACGGCGCCCAGCGAGGACATCTGGAAGAAATTCGAGCTGGTGCCATC
GCCCCCACGTCGCCGCCCTGGGGCTTGGGTCCCGGCGCAGGGGACCC
GGCCCCCGGGATTGGTCCCCCGGAGCCGTGGCCCCGGAGGGTGCACCGG
AGACGAAGCGGAATCCCGGGGGCCACTCGAAAGGCTGGGGGCAGGAACT
ACGCCTCCATCATAACGCGTGACTGCATGTGGAGCGGCTTCTCGGCCCCG
GGAACGGCTGGAGAGAGCTGTGAGCGACCGGCTCGCTCCTGGCGCGCC
CCGGGGGAACCCGCCCAAGGCGTCCGCGCCCCCGGACTGCACTCCCAG
CCTCGAAGCCGGCAACCCGGCGCCCCGCGCCCCCTGTCCGCTGGGCGA
ACCCAAGACCCAGGCCTGCTCCGGGTCCGAGAGCCCAAGCGACTCGGG
TAAGGACCTCCCCGAGCCATCCAAGAGGGGGCCACCCCATGGGTGGCC

AAAGCTCTGCCCCTGCCTGAGGTCAGGCATTGGCTCTTCTCAAGCTCTT
GGGCCATCTCCGCCTCTCTTTGGCTGAAGCTGCCCGTGTAGTCCCCAAC
CGTGTCTGTCTGGCACGTGGGTGTGTTGGTAAACAGTTTGGAAAAGTGG
CGTGGGAGCCAGCCTCCCTTTGATGATTATTGGAGCCCCAGGGGACAA
GGGATTTGAGGTGAGGGTTGGCGCTTAGAGAGGACAATACTGGGGTTG
GACTGTAAGGGATTGAAGGGGGTACCTTAAGAGACACTCCAAACCTGA
AGTTTTTTTGCTGCTGCCTCTTTCCCTAGGAAACTCACACTCCCCTAGGG
GGAGAAGAAGCCGAGAGCCTTTTGTGCAAAGCCAAAACCTTCGTCCTT
TTAAAAACCTAGGTCTCCAGTTGGCTTTACTTTAAAATGCCAATAATAA
ATGCCCTCTTCTCGTGCCTCCCCACCACCTTACCACTCGTGCATCCCT
GAGACAGGGAGGGAAGAATGAACACTCCCCATTAACAGATGGAAAAA
CTGAGGCTTAGAGATAGACAATCACTACAAGTCAGCTCCAGCTTTCTGC
CATCTAGCCAGCCCCTCTTCCCCAATGCTCCATCCCAACCAGGCACCTC
TTCCTTGATGTTTGGGGTCTTTGTGGTAGCTTATCTTAGAAGCACTACAC
CTTGCCTTGCTGTTTGTCTGAGATGGAAAAGTGTCTTCTTGCTCCCCC
TCAATAGATCTCCAGCGTCAGCTGCTCCCTGGCATTCAACAAATATTCA
CTGGCCCCTACTTTGTGGCAATCTGTGGGCTACATGCTGGGGTCAAGGC
AGTAGAACTCCAGGCCCTCCTCTCCCATCCTTGATGCAAGTGCAACCTC
GCTGAGGGCAGACTGGGGCATCCTGTGCCACTAAACTACATTGTTCTTA
TTCTGGCATCTTAGACCTCCACACCCGTGAGAAATCCTGGAGAGGGTAT
TTTTGTAGAGTGTAGACTGTGGCTAGTGACAAATAAATTAGGACCAAG
AAAGCTCACTGTAGCTTTTAGGAATAACTTTTACACGACCATTTGATAG
GGAACCTGGGGAATGGGGTATGGAAGTTTTCTTACACTTGAGAGAAAAA
ATAGGATAACAAAAATTA AAAAGTCTTTTTTTTCTGGTCCACTGTGTTAA
GGTCATTTTTAACCAGCTTGCTTTCTACACCAAGAGTTTATGTTTGTTTA
ATGGCTGGAAAGAGAATCTTGAGATCAAAAAACCAATAAAGATGTATC
TCTACAACGGCTGGTGGAGTGGTAGAGTGGAAAGAGCATTGCTTTGGA
AGTTGGAACATTTTAGTTTGTAGATCCAGAACGTTACAAAGGTGATATGT
GGAACCTCGCTGATCTGGGCCTCAGTTTCCCCATTTGCACACGATGGGGT
TGGACTTGATTGTCCTGCTGATGACATTTCTTGTCTGGATAGAGTAAG

ACACTACTCTCTGAAAGGGAGAATGGTGTGCTTAAATTATTTCTTTCTT
AGATAGAATCTTCCTGAGCCACGAGGCTTAACACTGAAAATTAAGGT
TTGGGATGTAGGAAAGCCTGCTGAATCATTTTCTAACCTACCCTTTAAC
CTGAACCTGTTTGTGAGCTTCTAGTTCACTCACAGGCCACATGGCCTGG
AACAAAATGCAACAGATTGCAAACAATGAGGGCGGGGGGTGGGGAAAG
TGATTGGCAGCAGAGCTCACCCAATAGGGGCTAGGGGCTGGGTAAGAC
AGAATTCCAAACACAGCGTAATCAGCCAATCATGGGCTTTGGGGCCAG
GAGGGCTGAATGGTCAGGTTTATTAATGGAGAAATAATGCGATTGTCC
ACACAATGGAAGCCTTCCTGACAAAGGGGCTCAAGCTTCCTGATATGC
AAAGAAGCTGAGAACGGAGCTCTTCCTTTGCCGAGGCCGAGATCCATT
AAGGTCGGACTTCTGTGTGGAGGCTGCAAAAATGTGTGGAGCAGGAGGA
GACTTTTCTCCCAATTGCCCTCTCCTGGTTAGGTTAACCTAAGAGACC
TTCAAGCCAGTGAATGAGAAGGGCGTGTCCAGGTGTCTCCAGGTCTCT
GGTGTTATGAGCCCCATATCTGGGACATTCTGCTGCCCAGTCTCTGCCT
CTGGTGCAGGTAGTTTGGAAATGGTCGCTTGTACCTTTGTGAAGTTCCT
GCAGCTTCGCCGACCTATGATTACAAATCTAACCTTCTAGTCCAGGGAA
GGAGGTGGGGCAGGCGACCTATAAATGATGGATGACTTTAGAAACCCA
TTGAACCCAGGAGCAAAAATGCTCCTAAGGGAAACCCTTTCCCTCCCCTC
TGTGGGTGAAGAGGGATGGGTTGTAGCCCTCCCTTCTCTGAATCTTCAG
CTGAAAGGGATGGCAGAATAGAGAGGTGGGGGAATAATAGGATTTAT
AACTTGTGAAAAGTAACAATTCCTCAAGTGCAGGCTGTGCTGGGCAGG
AACAAAGGGCAGCTCTGCCACAGACCCCTCATTTACAATTCTGATGG
GGCATGAAAGAGCCCGACTGGGGAAGATCTTTATAGCTAAACTTTGTC
CCAGGCCGGTAGCTCTTTCTCTCCAACCCCTCCGTGGGGGAGGGGAGA
GCCTTTGCAGACTGGGGGCTGTTGGCTTGGGTCTGCCTTTTGTTCCTTATC
TAAGCCTTGCTGTGCAAAAAGGAAATTGGAGAATATTTTCTTCTTGCTA
ATGTCCCCTCCTTTCTTCACTGTGCCCTTACCACATTACAAATGAATCA
GCTTTCTGCTCACCTCGATTTGTATATATCTAAATTGGAAAAATGTCTCC
TACCTTCCCAAGCACCAGCGTAGACAGCTAAAGCTGTAGGGTCTATGTT
TGTGTTTCTCATGGGATGTGTTTCTTCTTGTGATCTCTTTTCTCGGACAG

AGAATGAAGAAATTGATGTTGTGACAGTAGAGAAGAGGCAGTCTCTGG
GTATTCGGAAGCCGGTCACCATCACGGTGCGAGCAGACCCCCTGGATC
CCTGCATGAAGCATTTCACATCTCCATCCATCAGCAACAGCACAACTA
TGCTGCCCCGTTTTCTCCAGAAAGCTGCTCCCAAGAAGAGGCTTCAGAG
AGGGGTCCCCAAGAAGAGGTTCTGGAGAGAGATGCTGCAGGGGAAAA
GGAAGATGAGGAGGATGAAGAGATTGTGAGTCCCCCACCTGTAGAAAG
TGAGGCTGCCCAGTCCTGCCACCCCAAACCTGTCAGTTCTGATACTGAG
GATGTGACCAAGAGGAAGAATCACAACCTTCTGGAGCGCAAGAGGCG
GAATGACCTGCGTTCGCGATTCTTGGCGCTGAGGGACCAGGTGCCAC
CCTGGCCAGCTGCTCCAAGGCCCCCAAAGTAGTGATCCTAAGCAAGGC
CTTGGAATACTTGCAAGCCCTGGTGGGGGCTGAGAAGAGGATGGCTAC
AGAGAAAAGACAGCTCCGATGCCGGCAGCAGCAGTTGCAGAAAAGAA
TTGCATACCTCAGTGGCTACTAACTGACCAAAAAGCCTGACAGTTCTGT
CTTACGAAGACACAAGTTTATTTTTTAACTCCCTCTCCCCTTTAGTAAT
TTGCACATTTTGGTTATGGTGGGACAGTCTGGACAGTAGATCCCAGAAT
GCATTGCAGCCGGTGCACACACAATAAAGGCTTGCATTCTTGAAACC
TTGAAACCCAGCTCTCCCTCTTCCCTGACTCATGGGAGTGCTGTATGTT
CTCTGGCGCCTTTGGCTTCCCAGCAGGCAGCTGACTGAGGAGCCTTGGG
GTCTGCCTAGCTCACTAGCTCTGAAGAAAAGGCTGACAGATGCTATGC
AACAGGTGGTGGATGTTGTCAGGGGCTCCAGCCTGCATGAAATCTCAC
ACTCTGCATGAGCTTTAGGCTAGGAAAGGATGCTCCCAACTGGTGTCTC
TGGGGTGATGCAAGGACAGCTGGGCCTGGATGCTCTCCCTGAGGCTCC
TTTTTCCAGAAGACACACGAGCTGTCTTGGGTGAAGACAAGCTTGCAG
ACTTGATCAACATTGACCATTACCTCACTGTCAGACACTTTACAGTAGC
CAAGGAGTTGGAACCTTTATGTATTATGATGTTAGCTGACCCCCTTCC
TCCCCTCCCAATGCTGCGACCCTGGGAACACTTAAAAAGCTTGGCCTC
TAGATTCTTTGTCTCAGAGCCCTCTGGGCTCTCTCCTCTGAGGGAGGGA
CCTTTCTTTCCTCACAAGGGACTTTTTTGTTCATTATGCCTTGTTATGC
AATGGGCTCTACAGCACCTTTCCACAGGTCAGAAATATTTCCCAAG
ACACAGGGAAATCGGTCCTAGCCTGGGGCCTGGGGATAGCTTGGAGTC

CTGGCCCATGAACTTGATCCCTGCCAGGTGTTTTCCGAGGGGCACTTG
AGGCCCAGTCTTTTCTCAAGGCAGGTGTAAGACACTCAGAGGGAGAAC
TGTACTGCTGCCTCTTTCCCACCTTCCTCATCTCAATCCTTGAGCGGCAA
GTTTGAAGTTCTTCTGGAACCATGCAAATCTGTCCTCCTCATGCAATTC
CAAGGAGCTTGCTGGCTCTGCAGCCACCTCTGGGCCCCTTCCAGCCTGC
CATGAATCAGATATCTTTCCCAGAATCTGGGCGTTTCTGAAGTTTTGGG
GAGAGCTGTTGGGACTCATCCAGTGCTCCAGAAGGTGGACTTGCTTCTG
GGGGTTTTAAAGGAGCCTCCAGGAGATATGCTTAGCCAACCATGATG
GATTTTACCCCAGCTGGACTCGGCAGCTCCAAGTGGAATCCACGTGCA
GCTTCTAGTCTGGGAAAGTCACCCAACCTAGCAGTTGTCATGTGGGTAA
CCTCAGGCACCTCTAAGCCTGTCCTGGAAGAAGGACCAGCAGCCCCTC
CAGAACTCTGCCCAGGACAGCAGGTGCCTGCTGGCTCTGGGTTTTGGAA
GTTTGGGGTGGGTAGGGGGTGGTAAGTACTATATATGGCTCTGGAAAA
CCAGCTGCTACTTCCAAATCTATTGTCCATAATGGTTTCTTTCTGAGGTT
GCTTCTTGGCCTCAGAGGACCCCAGGGGATGTTTGGAAATAGCCTCTCT
ACCCTTCTGGAGCATGGTTTACAAAAGCCAGCTGACTTCTGGAATTGTC
TATGGAGGACAGTTTGGGTGTAGGTTACTGATGTCTCAACTGAATAGCT
TGTGTTTTATAAGCTGCTGTTGGCTATTATGCTGGGGGAGTCTTTTTTTT
TTATATTGTATTTTTGTATGCCTTTTGCAAAGTGGTGTAACTGTTTTTG
TACAAGGAAAAAACTCTTGGGGCAATTTCTGTTGCAAGGGTCTGATT
TATTTTGAAAGGCAAGTTCACCTGAAATTTTGTATTTAGTTGTGATTACT
GATTGCCTGATTTTAAAATGTTGCCTTCTGGGACATCTTCTAATAAAAAG
ATTTCTCAAACATGTCAGAGTGGGGGCAGCTTATGCCACCTGAGTCCTC
CTCAACCACGGAAAACTATTTAGGGTAGCCACAAGTGATCCAGAGGG
CTGCACTTCTCTAACCATGTTGCTAACCTGGTCATTCCACTCTGGGTTC
TGAAATGCCATTTAGACATGTTGAAACAATGTAGGCTCAGTACTCAGT
GAACACGGAATTC