

TARTU ÜLIKOOL
BIOLOOGIA-GEOGRAAFIATEADUSKOND
MOLEKULAAR-JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT
BIOTEHNOLOOGIA ÕPPETOOL

Kristjan Väk

**Mitteväikserakulise kopsuvähi diferentsiaalselt
ekspresseeruvate geenide analüüs cDNA
mikrokiipidel**

Magistritöö

Juhendajad: dotsent Ants Kurg, Ph.D.
prof. Andres Metspalu, M.D., Ph.D.

TARTU 2005

Sisukord

SISSEJUHATUS	4
LÜHENDID.....	6
1 KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	7
1.1 HINGAMISELUNDKOND, SELLE EHITUS, TALITLUS JA FUNKTSIOON	7
1.2 TNM KLASSIFIKATSIOON	9
1.3 KOPSUVÄHI HISTOLOOGILINE KLASSIFIKATSIOON	10
1.4 KOPSUVÄHI EPIDEMIOLOOGIA	11
1.5 KOPSUVÄHI PATOLOOGIA.....	12
1.6 KOPSUVÄHI GEENIEKSPRESSIOONI UURINGUD	13
1.6.1 Mitteväikserakulise kopsuvähiga seotud üksikute geenide ekspressiooni uuringud	13
1.6.2 Mikrokiibi platvormil teostatud kopsukasvajaga seotud tuumorsupressorgeenide ekspressiooni uuringud	14
1.6.3 Mikrokiibil baseeruvad geeniekspressiooni uuringud kopsuvähi molekulaarseks klassifikatsiooniks	15
1.7 MIKROKIIBI TEHNOLOOGIA	16
1.7.1 Kandjamaterjalid ja proovi molekulid.....	18
1.7.2 Sihtmärkmolekulid ja nende valmistamine.....	18
1.7.3 Sihtmärkmolekulide märgistamine kiibikatsete tarvis.....	20
1.7.4 Mikrokiibi hübriidisatsioon ja signaalide detekteerimine.....	20
1.7.5 Andmete analüüs	21
1.7.6 Kirjeldav statistika.....	22
2 KÄESOLEVA MAGISTRITÖÖ EESMÄRK.....	23
3 MATERJAL JA METOODIKA	24
3.1 BIOLOOGILISE MATERJALI SÄILITAMINE JA ANDMED	24
3.2 RNA ERALDAMINE JA SÄILITAMINE, KVALITEEDI JA KVANTITEEDI KONTROLL	25
3.3 ARNA SÜNTEES.....	26
3.4 KASUTATUD KIIBID.....	26
3.5 HÜBRIDISATSIOON.....	27
3.6 KIIPIDE HÜBRIDISATSIOONIJÄRGNE PESU	27
3.7 MIKROKIIBI FLUORESTSENTSSIGNAALIDE DETEKTEERIMINE	27
3.8 KIIBIANDMETE ANALÜÜS	28

4 TULEMUSED JA ARUTELU	29
4.1 EKSPRESSIOONITASET MUUTNUD GEENID	29
4.1.1 <i>STEAP- Six Transmembrane Epithelial Antigen of the Prostate</i>	30
4.1.2 <i>DAPK1- Death-Associated Protein Kinase 1</i>	30
4.1.3 <i>TNFSF10- Tumor Necrosis Factor Superfamily, member 10</i>	31
4.1.4 <i>EDG1- Estrogen Down-regulted Gene 1</i>	31
4.2 HIERARHILISE KLAUSTERANALÜÜSI TULEMUSED.....	32
4.3 PERSPEKTIIVID	34
5 KOKKUVÕTE	35
6 SUMMARY	36
7 TÄNUD.....	37
8 VIITED.....	38
9 LISAD.....	47

Sissejuhatus

Vähk, sealhulgas ka kopsuvähk on ülemaailmne probleem. Surevus kopsuvähki on nii Eestis kui mujal maailmas vähki surevuse hulgas esikohal. Kopsuvähi prognoos on äärmiselt halb. Üldine viie aasta elulemus on olenevalt staadiumist 5–15%. Eestis registreeritakse igal aastal ~700 uut kopsuvähi juhtu. Kopsuvähki haigestumise suhe meeste ja naiste vahel on 4:1. Haigestumine suureneb naiste arvel (Alberg and Samet, 2003; Vähiregister, 2003).

Tartu Ülikooli Kliinikumi Kardiovaskulaar- ja Torakaalkirurgia Kliinikus ravitakse aastas kirurgiliselt radikaalselt keskmiselt 70 haiget. Tulenevalt kasvaja staadiumist järgneb või eelneb kirurgilisele ravile enamikul haigusjuhtudest kiiritusravi, adjuvantne või neoadjuvantne keemiaravi (Robinson et al., 2003; Smythe, 2003)

Kuigi varajases staadiumis on kopsuvähk enamasti kirurgiliselt ravitav, ei kuulu ligikaudu 80% patsientidest kasvaja leviku või metastaaside tõttu ainult kirurgilisele ravile. Olukorras, kus kasvaja ei ole kirurgiliselt radikaalselt eemaldatav, kasutatakse keemia- ja/või kiiritusravi (Jett et al., 2003). Vaatamata sellele, et kombineeritud ravis on saavutatud mõningast edu, piiravad selle pikaajalist rakendamist enamikul patsientidest ravi suhtes arenev resistentsus ja ravi kõrvaltoimed (Persidis, 1999).

Kopsuvähi diagnostikas kasutatakse tänapäeval kliinilises praktikas histoloogilist klassifikatsiooni, mille kohaselt jaguneb kopsuvähk väikserakuliseks (20% kopsuvähkidest) (SCLC- *Small Cell Lung Carcinoma*) ja mitteväikserakuliseks vähiks (80% kopsukasvajatest) (NSCLC-*Non Small Cell Lung Carcinoma*) (Mitsuuchi and Testa, 2002).

Mitteväikserakuline kopsuvähk on nii kliiniliselt kui ka histoloogiliselt väikserakulisest kopsuvähist selgesti eristatav. Histoloogiliselt jaotatakse mitteväikserakuline vähk lamerakuliseks vähiks (20-35%), suurerakuliseks vähiks (4,5-15%) ning adenokartsinoomiks, (30-50%) millest viimane on ka kõige sagedasem (Shields, 2000).

Vaatamata histoloogiliste alavormide täpsele diagnostikale on sama staadiumi patsientide haiguskulg väga varieeruv (Beer et al., 2002). See lubab väita, et kasvaja

histoloogiline vorm ei võimalda haiguse kulgu piisavalt täpselt prognoosida. Sellest tulenevalt ei ole kaasajal vähi ravitaktika ja prognoosi seisukohalt küllaldane piirduda vaid histoloogilise diagnoosiga vähkkasvaja mikroskoopiliselt raskestieristatavate variantide rohkuse tõttu (Bhattacharjee et al., 2001; Golub et al., 1999). Hiljutised arengud molekulaarbioloogias ja geenitehnoloogias, mis muuhulgas on suunatud varajasele diagnostikale, turvalisemate ja vähem invasiivsete ravi- ja ka diagnostikameetodite väljatöötamisele, lubavad uusi ja täpsemaid uurimismeetodeid ja sellest tulenevalt ka ravitaktikaid kopsuvähi korral.

Üheks uueks võimaluseks vähkkasvaja diagnostikas, haiguse kulu prognoosimises ja raviskeemi valimisel on uurida vastava kasvaja geeniekspressiooni signatuuri, mis võimaldab välja tuua eelsoodumust vastava kasvaja tekkeks, vähkkasvaja alamgrupe ning nende järgi hinnata, metastaaside teket ja levikut, aga ka võimalikku ravivastust (Kettunen et al., 2004; Liotta and Petricoin, 2000).

Antud töö on osa Eesti Teadusfondi grandist Nr. 6465 (grandi hoidja professor Andres Metspalu), mille eesmärgiks on mitteväikserakulise kopsuvähi diferentsiaalselt ekspresseeruvate geenide avastamine, kasvajate molekulaarne fenotüpiseerimine varajase diagnostika ja ravistrateegiate optimeerimiseks. Projekt on saanud Tartu Ülikooli Eetika Komitee heakskiidu (protokoll nr. 129/21, 23.08.04).

Lühendid

A.- adenokartsinoom

aRNA- *antisense* RNA

BA.- bronhioloalveolaarne kopsuvähk

cDNA- mRNA suhtes komplementaarne DNA ahel

cRNA- cDNA-lt sünteesitud RNA

Cy3TM- tsüaniinvärv 3

Cy5TM- tsüaniinvärv 5

ddH₂O- kahekordselt destilleeritud vesi

dNTP- desoksünukleotiidtrifosfaat

K- kilo, tuhat

LOWESS- *Locally Weighted Regression and Smoothing Scatterplots*

MeV- mitme eksperimendi vaatleja (*Multi Experiment Viewer*)

MIDAS- Mikrokiibi andmete analüüsi süsteem (*Microarray Data Analysis System*)

nm- nanomeeter

NSCLC- Mitteväikserakuline kopsukasvaja (*Non-Small Cell Lung Cancer*)

PCA- peakomponent analüüs (*Principal Component Analysis*)

R- korrelatsioonikordaja

RB- Retinoblastoomi geen

RNAas- ribonukleaas

rpm- rootori pööret minutis

SCLC- Väikserakuline kopsuvähk (*Small Cell Lung Cancer*)

Spot- kiibile kantud või sünteesitud proov, sellelt detekteeritav signaal

tif- pildiformaat (*tagged information file*)

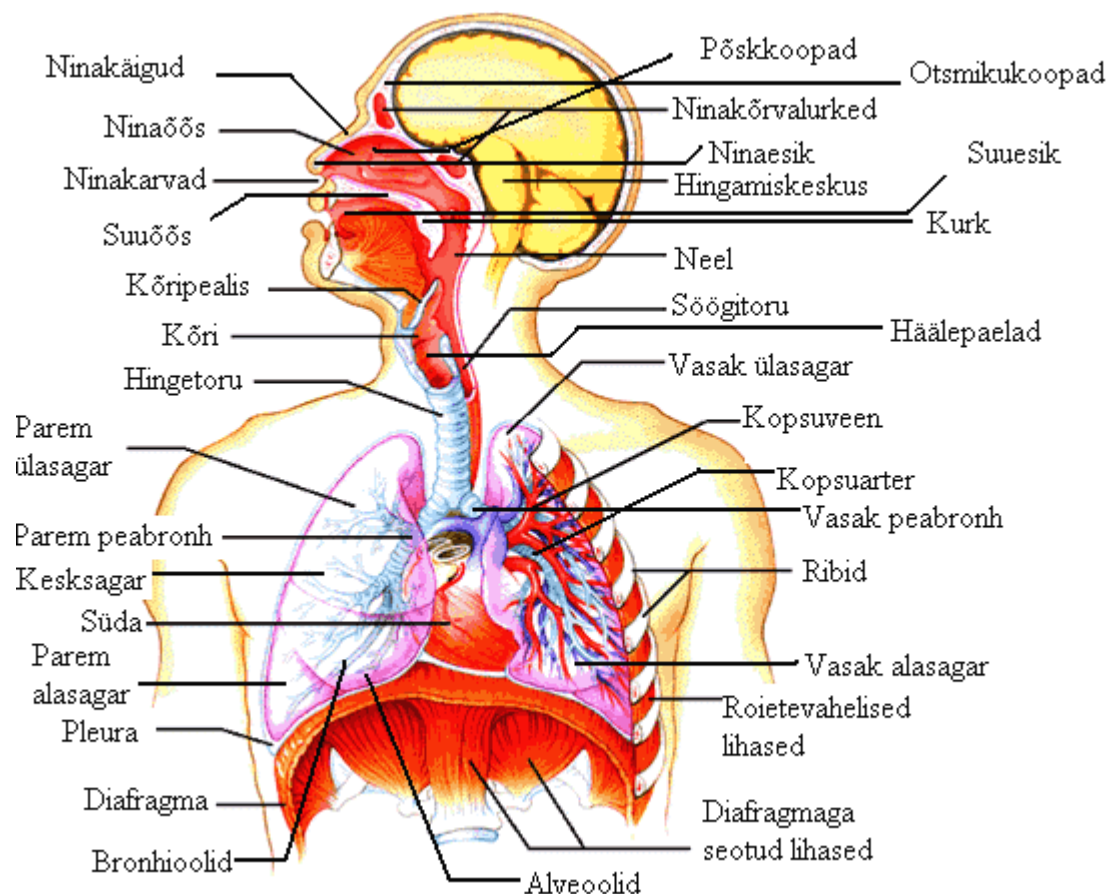
TIGR- Genoomsete Uuringute Instituut (Rockville, MD, USA) (*The Institute for Genomic Research*)

1 Kirjanduse ülevaade

1.1 Hingamiselundkond, selle ehitus, talitus ja funktsioon

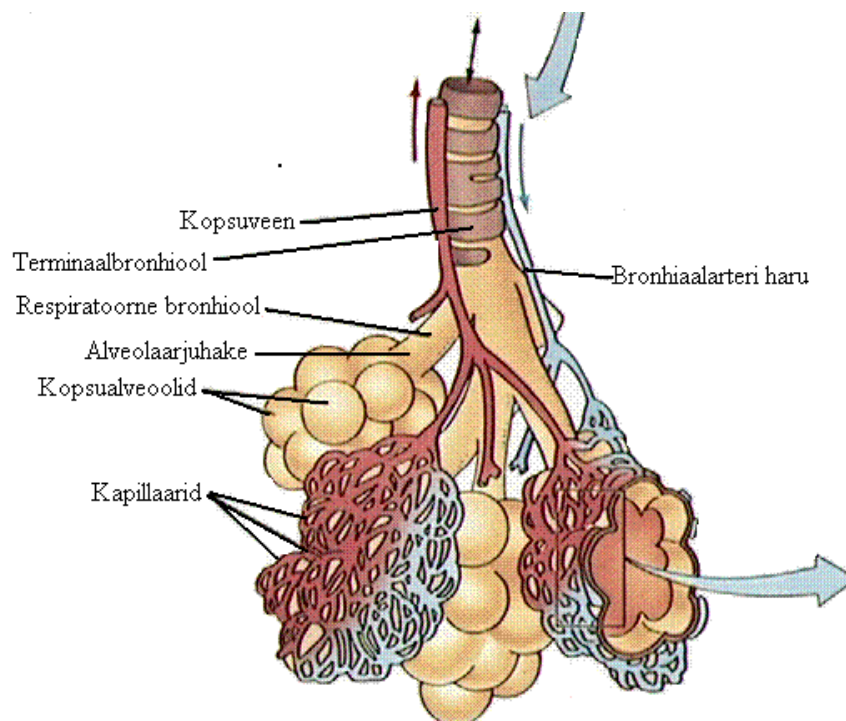
Hingamiselundkond jaotatakse ülemisteks ja alumisteks hingamisteedeks (Joonis 1). Ülemised hingamisteed moodustavad ninaesik, ninaõõs, ninakäigud, suuesik, suuõõs, ninaneel, suuneel, nina kõrvalkoopad, põskkoopad, otsmikukoopad, kiilluu urge, eesmised ja tagumised sõelluurakud, kuulmetoru ja keskkõrv. Ülemiste hingamisteede hulka kuuluvad ka kurk, kõriesik, kõri ning häälepaelad.

Alumised hingamisteed moodustavad hingetoru, bronhid, bronhiolid ning kopsude funktsionaalsed üksused-alveoolid.



Joonis 1. Hingamiselundkond ja sellega seotud struktuurid.

Sissehingamisel liigub õhk ninaõõnde ning sealt läbi ninaneelu ja kõri hingetorru. Hingamise tagab diafragma ehk vahelihase ja roiete (rinnakorvi) liikumine. Kõri piirkonnas ristuvad imetajatel seede- ja hingamisteed. Kõri koosneb erinevatest kõhredest, mis on omavahel seotud lihaste ja sidemete abil. Vältimaks toidu sattumist hingamisteedesse, paikneb kõris kurgunibu, mis toitu neelates sulgeb hingetoru. Kõris asuvad häälekurrud ehk häälepaelad. Need hakkavad õhu liikumisega võnkuma ning võimaldavad tekitada heli. Hingetoru on täiskasvanud inimesel ~9-11 cm pikk ning 1,5-2 cm lai, mis lõpeb 4-5-nda rinnalüli vaheketta kõrgusel, jagunedes vasemaks ja paremaks peabronhiks. Kopsutorud ehk bronhid juhivad õhu kopsudesse, mida katab õhuke, libe ja sidekoeline kopsukelme. Nende vahele jääv õõs on täidetud vedelikuga, mis vähendab hingamisel hõõrdumist. Kopsud asuvad paarina rinnaõõnes. Parempoolne kops jaguneb kolmeks ja vasak kaheks kopsusagaraks. Bronhid hargnevad seal harudeks ning lõpevad alveoolidega. Imetajate kopsu sisepindala on naha pinnast 50-100 korda suurem. Kopsudes olevate pisikeste kopsusompude ehk alveoolide seinad on kapillaariderikkad, neis toimub gaasivahetus kopsude ja vere vahel (Joonis 2). Kopsudes on alveoole kokku 300-400 miljonit ning nende üldpind on 100 m².



Joonis 2. Kopsu funktsionaalse üksuse- alveoolide ehitus.

1.2 TNM klassifikatsioon

Korrektne kasvaja klassifikatsioon on eelduseks parima raviskeemi valimisel, kuna kliiniline tulem on tihedalt seotud kasvaja tüübi ja staadiumiga. Tänapäeval jaotatakse kopsuvähk leviku alusel vastavalt „*The International System for Staging Lung Cancer*” printsiipidele (Mountain, 2000). Selle kohaselt jaotatakse kõik vähid primaarse tuumori ulatuse (T), regionaalsete lümfisõlmede haaratuse (N) ja võimalike metastaaside olemasolu (M) alusel (Beadsmoore and Screatton, 2003). I staadiumi kasvajakas ei ole metastaseerunud. IA kasvajate läbimõõt on alla 3 cm ning IB staadiumi kasvajate suurim läbimõõt ületab 3 cm. IIA staadiumi kasvajakas on mõõtmelt T1 (alla 3 cm), kuid on metastaseerunud regionaalsetesse lümfisõlmedesse. IIB staadiumi kasvajakas on samuti metastaseerunud regionaalsetesse lümfisõlmedesse ja primaarse kasvaja läbimõõt ületab 3 cm. IIB staadiumi kasvajakas loetakse ka T3 tuumorid (suurus ei ole oluline), mis on levinud rindkere seinale, diafragmasse, keskeinandisse või perikardi, jättes puutumata südame, suured veresooned, hingetoru ja söögitoru (T3N0M0) ning ei ole levinud kaugemale värti lümfisõlmedest. IIIA staadiumi kasvajakas loetakse T3N1/N2M0 ja T1/T2N2M0 tüüpi kasvajakas, kus N1 tähistab kopsuvärti lümfisõlmi ja N2 tähistab sama poole mediastinaalseid lümfisõlmi. IIIB staadiumi kasvajakas võivad olla erineva suurusega olles levinud keskeinandisse, südamesse, suurtesse veresoontesse, hinge- ja söögitoru (T1-T4). Kasvaja on levinud lümfisõlmedesse N0-N2 tasemel, kuid distaalsed metastaasid puuduvad. IIIB staadiumi kasvajakas loetakse ka T4N1/N2/N3M0 staadiumi tuumoreid, kus N3 tähistab vastaspoole lümfisõlmede haaratust. IV staadiumi kasvajakas loetakse mistahes suuruse ja lümfisõlmede haaratusega kopsuvähke, millel on kaugmetastaasid.

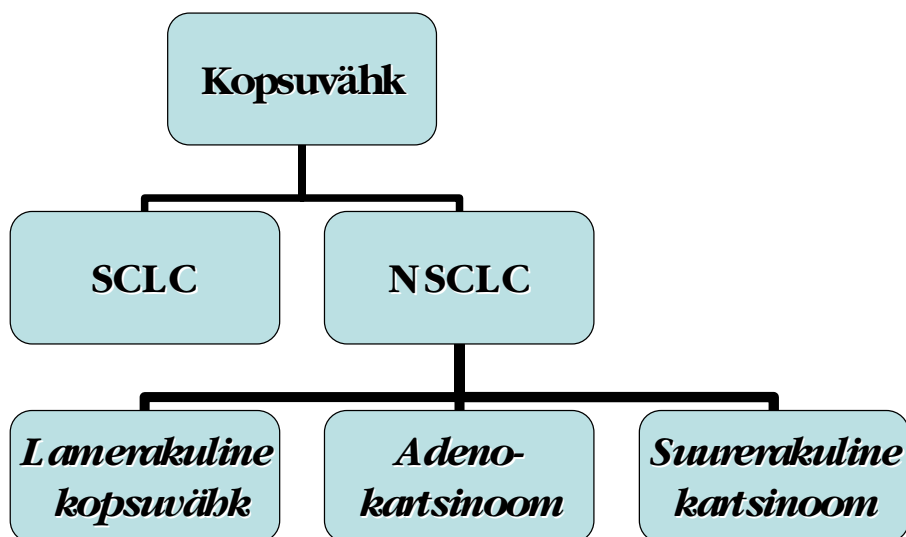
Tabel 1. TNM kopsukasvaja klassifikatsioon

STAADIUM	T	N	M
0 Staadium	<i>T in situ</i>	NO	M0
IA Staadium	T1	NO	M0
IB Staadium	T2	NO	M0
IIA Staadium	T1	N1	M0
IIB Staadium	T2	N1	M0
	T3	N0	M0
IIIA Staadium	T1, T2	N2	M0
	T3	N1, N2	M0
IIIB Staadium	T1-T4	N2	M0
	T4	N1-N3	M0
IV Staadium	T1-T4	N1-N3	M1

1.3 Kopsuvähi histoloogiline klassifikatsioon

Kopsuvähk on epiteelkoest lähtunud kasvaja, mis jaotatakse histoloogilise morfoloogia alusel kahte suurde gruppi: väikserakuline kopsuvähk (*Small Cell Lung Cancer*, SCLC), mis moodustab ~20% kõigist kopsuvähi juhtudest ja omab endokriinseid molekulaarseid markereid ning mitteväikserakuline kopsuvähk (*Non-Small Cell Lung Cancer*, NSCLC), mis moodustab ~80% kõigist kopsuvähkidest (Mitsuuchi and Testa, 2002; Rosell et al., 2004), (Joonis 3).

Mitteväikserakuline kopsuvähk on nii kliiniliselt kui ka histoloogiliselt väikserakulisest kopsuvähist selgesti eristatav. Histoloogiliselt jaotatakse mitteväikserakuline vähk lamerakuliseks vähiks (20-35%), suurerakuliseks vähiks (4,5-15%) ning adenokartsinoomiks, (30-50%) mis on kõige sagedasem (Shields, 2000). Adenokartsinoomi alamtüübiks on bronhioloalveolaarne kopsuvähk.



Joonis 3. Kopsuvähi histoloogiline klassifikatsioon.

Lamerakuline kartsinoom asetseb kopsus enamasti tsentraalselt ja saab alguse suuremate või keskmise suurusega bronhitorude epiteelist, olles tihti seotud suitsetamisega ja tuumorsupressor geeni TP53 erinevate mutatsioonidega (Nacht et al., 2001; Niklinska et al., 2001).

Adenokartsinoom saab alguse bronhioolidest ja alveoolidest ning asetseb kopsu perifeerias, kuid reeglina ei haara kopsukelmet. Viimasel aastakümnel on täheldatud adenokartsinoomide esinemissageduse märgatavat tõusu, mida ei saa seostada suureneva suitsetamisega, sest adenokartsinoom on kõige vähem mõjutatud suitsetamise poolt (Travis et al., 1995).

Suurerakulise kartsinoomi lähtekude ei ole üheselt selge, kuid on leitud, et ta omab neuroendokriinseid molekulaarseid markereid (Franklin, 2000).

Erinevad kopsuvähi tüübid vajavad erinevaid ravimeetodeid. NSCLC puhul kasutatakse tihti kirurgilisi meetodeid, samas SCLC puhul annab paremaid tulemusi kemoteraapia ja radioteraapia. Kopsukasvaja patsientide elulemusandmed on äärmiselt halvad. Viie aasta elulemusprotsent on 50% I staadiumi korral ning 10% III astme korral (adenokartsinoomi korral isegi alla 10%).

1.4 Kopsuvähi epidemioloogia

20. sajandi lõpuks on kopsuvähk muutunud maailmas üheks enim esinevaks ennetatava vähi liigiks. Sajandi alguses oli see haigus väga harva esinev, kuid seoses tubakatööstuse arenguga ja laialdase kasutusega oli juba 1950. a. teada sigaretisuitsu ja kopsuvähi omavaheline otsene seos (Doll and Hill, 1950; Levin et al., 1950; Wynder and Graham, 1950).

Sigareti suitsetamine on kopsukasvaja kujunemisel kõige suurem riskifaktor, suurendades suhtelist riski üle 20 korra võrreldes mitteduitsetajatega (IARC, 2004). 90% kopsuvähi patsientidest on suitsetajad või endised suitsetajad. Samas haigestub suitsetajatest vaid 11% kopsuvähki, mis tuleneb arvatavasti individuaalsest vastuvõtlikusest (Amos et al., 1999). Need individuaalse vastuvõtlikuse determinandid on tänaseni jäänud identifitseerimata. Perekondliku taustaga kopsuvähk suurendab

kopsuvähi või ka mõne teise suitsetamisest sõltumatu vähi teket 2,4 korda. Retinoblastoomi (RB) tuumorsupressorgeeni mutatsiooni kandjatel on 15 korda suurem risk kopsuvähi kujunemiseks ning vastava geeni mutatsioone on leitud sagedamini SCLC ja harvemini NSCLC korral.

Väike osa (3-17%) kopsuvähke on seotud kokkupuutest radooni, raskmetallide ja asbestiga (Coulton and Samet, 1992). Esimesed kirjanduslikud viited radoonist kui potentsiaalse kopsuvähi põhjustajast ilmusid alles kaheksakümnendatel aastatel (Henderson, 1989; Roscoe et al., 1989; Samet, 1989) ning enamasti olid patsientideks kaevurid ja mäetöölised. Tänapäevaks on teada kopsuvähki haigestumise juhud elu- ja tööruumides, kus hilisema uurimise tulemusel on leitud radooni (Poffijn et al., 1989; Samet, 1989).

Asbestiga kokku puutunud suitsetajate vähki haigestumise suhteline risk on võrdeline nende kake faktori suhteliste riskide korrutisega (Vainio and Boffetta, 1994). Sellise mehhanismi seletuseks võib olla mudel, mille kohaselt asbesti kiud käituvad kui transpordid, mis soodustavad tubakatoodetes sisalduvate kartsinogeenide transporti rakutuumas (Menard et al., 1986).

Sigaretisuitsu poolt indutseeritud kopsukasvajad asuvad tavaliselt ülemistes hingamisteedes ning asbestiga seotud kopsukasvajad alumistes (Karjalainen et al., 1993; Vainio and Boffetta, 1994)

1.5 Kopsuvähi patoloogia

Sigaretisuits on kopsuvähi kujunemisel oluline faktor ning seda on intensiivselt uuritud kopsu patoloogia seisukohalt. Sigaretisuits sisaldab üle 60 kartsinogeense ühendi. Neist kartsinogeenseimad on tubakatoodetele spetsiifilised nitrosoamiinid, aromaatsed amiinid ja polütsükliilised aromaatsed süsivesikud (Hecht, 2003). DNA katked ja mutatsioonid, kartsinogeenide biomarkerid, moodustuvad kartsinogeenide ja/või nende metaboliitide ja DNA vahel. Tubakasuits põhjustabki DNA ahelates mutatsioone ja on seega kopsukasvaja peamiseks tekitajaks. Kui selliseid mutatsioone ei ole võimalik mingil põhjusel DNA ahelast DNA reparatsiooniaparaadi poolt eemaldada, siis

mutatsioonid, mis on tekkinud näiteks tuumorsupressorgeenides või proto-onkogeenides, võivad põhjustada kasvaja teket. Isegi välise morfoloogia baasil normaalseks bronhi epiteeliks peetud suitsetaja hingamisteede rakust võib leida kromosoomi, milles on toimunud molekulaarseid ümberkorraldusi, nagu näiteks heterosügootsuse kadu ja ebanormaalne metülatsoonimuster, mis on sarnased transformeerunud rakkudega (Wistuba et al., 2002).

Samuti loetakse potentsiaalseks vähk-kasvaja tekkega seotud mehhanismiks tuumorsupressorgeenide ja/või DNA reparatsiooni geenide promootoralades paiknevate CpG saarte hüpermetülatiooni, mille tulemusel vastavate geenide transkriptsioon peatub või aeglustub (Burbee et al., 2001; Tang et al., 2000).

Lisaks tubakas sisalduvatele kartsinogeenidele esineb tubakasuitsus ka vabu radikaale, mis indutseerivad oksüdatiivseid kahjustusi (Caporaso, 2003).

1.6 Kopsuvähi geeniekspressiooni uuringud

1.6.1 Mitteväikserakulise kopsuvähiga seotud üksikute geenide ekspressiooni uuringud

Paljud uuringud on keskendunud kopsuvähi tekkega seotud spetsiifilise geeni üles- või allaindutseeritud efekti uuringutele. Selliste katsete eelduseks on olnud veendumus, et just vastav geen on oluline kopsuvähi tekkes ja arengus või siis prognoosis (Caputi et al., 2002; Hommura et al., 2002; Shoji et al., 2002). Samas peab aga arvestama, et kopsus on ekspresseeritud üle 13.000 geeni ning vähemalt 70% neist on avaldunud ka teistes kudedes (Brentani et al., 2003). Tänapäeval ei ole veel teada, kui paljude geenide ekspressioonitase on muutunud kopsuvähi korral. Samuti ei ole identifitseeritud esmase ega sekundaarse vastuse geene, mis on seotud tumorigeneesi tekke ja arenguga.

Esimene kirjanduslik allikas, milles käsitleti muutunud ekspressioonitasemega geeni, tsütokroom P450 perekonna liikme CYP1A1 alaekspressiooni kopsuvähi korral, ilmus 1979 aastal (Gahmberg et al., 1979). Avastust kinnitasid peagi ka teised uurimisrühmad (Kouri et al., 1982).

Individaalsete geenide ekspressioonitasemete uuringutes on leitud üle 300 geeni, mille ekspressiooni tase kopsuvähi korral on muutunud. Leitud geenidest 70% ekspressiooni tase on tõusnud. Selliste geeniproduktide, nagu näiteks CCNA2, CCNE1, WNT7A, ERBB2, E2F1, MOS, TP73, JUN ja MDM2 ülesregulatsioon, võivad põhjustada otseselt rakkude proliferatsiooni, kuid enamuse geenide ekspressioonitasemete muutusi ja sellest tulenevaid tagajärgi tänapäeval veel täielikult mõista ei suudeta.

1.6.2 Mikrokiibi platvormil teostatud kopsukasvajaga seotud tuumorsupressorgeenide ekspressiooni uuringud

Üks võimsamaid meetodeid kopsukasvaja geeniekspressiooni uurimisel on mikrokiibi platvorm, mis võimaldab kiiresti ja efektiivselt uurida kogu genoomi geeniekspressiooni tasemeid. DNA kiibid kujutavad endast robotite abil korrapärase matriksina tahkele kandjale kinnitatud teadaolevaid oligonukleotiididseid või cDNA järjestusi, millele hübridiseeritakse märgitud uuritav cDNA (Granjeaud et al., 1999; Lockhart and Winzeler, 2000).

Kuna TP53 on üks enim iseloomustatud tuumorsupressor geen, siis teostati ka esimesed mikrokiibil baseeruvad kopsukasvaja uuringud TP53 induktsiooni tagajärgede identifitseerimisena (Kannan et al., 2000; Song et al., 1999). Uuringute tulemusel leiti, et p53 stimuleeris paljude rakutsükli inhibiitorite ja apoptoosi regulaatorite ekspressioonitasemeid. Hilisemates katsetes uuriti esmaseid ja sekundaarseid vastuseid p53 induktsiooni korral (Kannan et al., 2001). Leiti, et lisaks rakutsükli (CDKN1A, CCNE1, TGFB) ja apoptoosiga seotud (TNFRSF6, BAK1) geenidele olid p53 induktsiooni esmase vastuse korral mõjutatud ka adhesiooniga seotud geen TMSB4X, signaalgeen HRAS ja DNA reprintsioonigeenid BTG2 ning DDB2. P53 induktsiooni edasisel uurimisel leiti, et ta aktiveerib proapoptootilisi ja rakutsükli inhibiitorgeene ning pidurdab anti-apoptootiliste ja rakutsükli geenide ekspressiooni taset.

Teise sarnase uuringuna on teostatud PTEN geeni ülesekspressiooni mõju kopsukasvaja rakuliinis. Selle tulemusel leiti, et PTEN geeni ülesekspressioon inhibeerib

kopsuvähi invasiooni, kuna põhjustab paljude teiste kasvuks oluliste geenide ekspressiooni langust (Hong et al., 2000).

Analoogne katse teostati ka tuumorsupressorgeeni STK11 ülesekspressiooni uurimiseks (Jimenez et al., 2003) adenokartsinoomi rakuliinis. Tulemused nii Hongi kui ka Jimeneze uuringutest näitasid ~100 proliferatsiooni, apoptoosi või adhesiooniga seotud geeni ekspressiooni muutusi.

1.6.3 Mikrokiibil baseeruvad geeniekspressiooni uuringud kopsuvähi molekulaarseks klassifikatsiooniks

Mikrokiibil baseeruva geeniekspressiooni analüüsi tulemusel on molekulaarselt võimalik eristada SCLC ja NSCLC (Manda et al., 2000; Petersen and Petersen, 2001), erinevaid NSCLC alamtüüpe (Kikuchi et al., 2003; Petty et al., 2004) ja isegi vastava kopsuvähi (adenokartsinoom) erinevaid molekulaarseid fenotüüpe (Bhattacharjee et al., 2001; Garber et al., 2001) ja neuroendokriinseid kasvaja (Jones et al., 2004). Garber'i töögrupp suutis jaotada kasvaja erinevatesse klastritesse vastavalt diferentseerumise astmele ja kliinilisele tulemile. Bhattacharjee töögrupp uuris samuti adenokartsinoomide geeniekspressiooni profiile ning kahe töö võrdlusena võib täheldada paljude geenide, nagu näiteks TITF1, SFTPB, SFTPC, SFTPD, CYB5, SELENBP1, CTSB ja MUC1 sarnast ekspressioonitaset paralleelsete klastrite vahel. Samuti täheldasid mõlemad töögrupid, et adenokartsinoomides oli kõrgelt ekspresseeritud detoksifikatsiooni ja antioksüdantsiivsete omadustega geenid.

Ühes laiaulatuslikumas kopsukasvaja geeniekspressiooni uuringus (Yamagata et al., 2003) kasutati normaalset kopsukudet, erinevaid primaarseid NSCLC kasvaja ja metastaseerunud kopsuvähi proove, mille tulemusel leiti igale kasvajatüübile iseloomulikud geeniekspressiooni profiilid. BPAG1 ja KRT5 olid kõrgelt ekspresseeritud lamerakulistes kartsinoomides ning FOLR1 ja MUC1 adenokartsinoomide korral. Kõige problemaatilisemaks osutus suurerakulise kartsinoomi korrektne klasterdamine, kuna ta omab sarnaseid molekulaarseid markereid nii adenokartsinoomi kui ka lamerakulise kopsuvähiga.

Kopsuvähkide geeniekspressiooni on uuritud ka tumorigeneesi seisukohast (McDoniels-Silvers et al., 2002). Analüüsi tulemusena leiti tendentse, mis põhinesid onkogeenide, apoptoosi regulaatorgeenide ja DNA sünteesi ning reparatsioonigeenide ekspressiooni langusel. Suurenenud oli aga stressivastuse ja adhesioonimolekulide transkriptsioon.

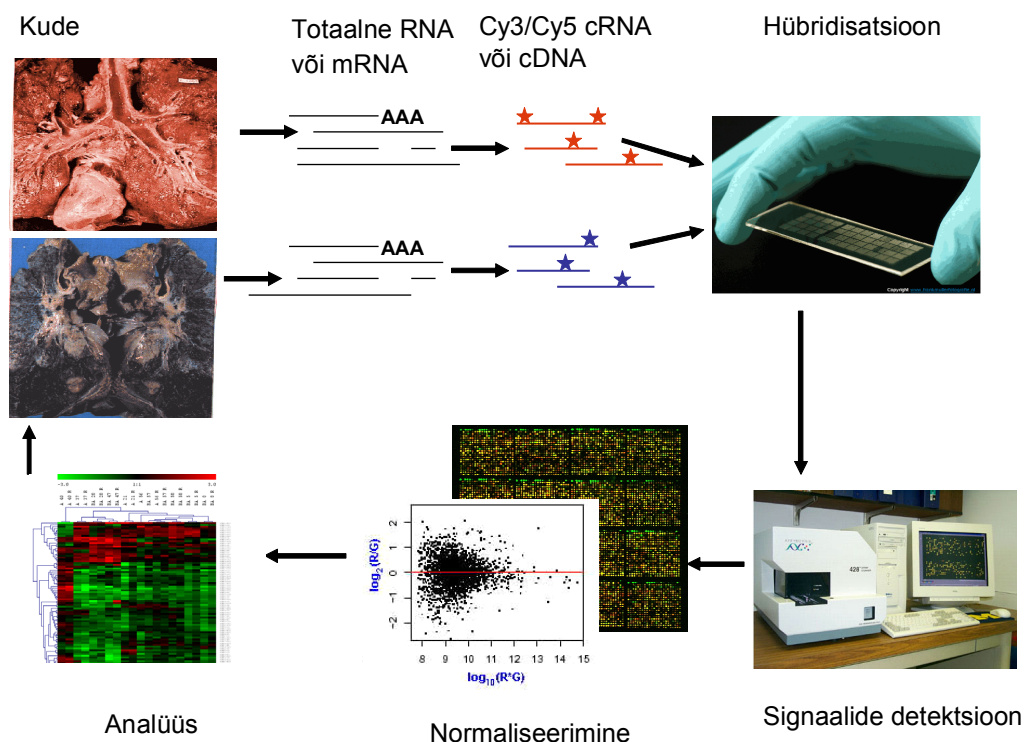
Uurimaks erinevate kartsinoomide sarnasusi molekulaarsel tasemel, kasutasid Chung ja kaastöötajad kopsu- ja rinnavähi proove ning teostasid geeniekspressiooni analüüsi, mille tulemusel leidsid sarnaseid geeniekspressiooni profiile (Chung et al., 2002). Klastritesse kuuluvate geenide hulgas oli nii rakutsükli, DNA replikatsiooni kui ka kromosoomi modelleerumises olulisi faktoreid. Identifitseeritud geene ja nende ekspressiooni profiili hakati nimetama „proliferatiivseks klastriks” ning *in silico* analüüsid on leidnud sarnaseid mustreid ka teiste kasvajate geeniekspressiooni andmetest.

Eelpool kirjeldatud uuringud on kopsuvähi geeniekspressiooni seisukohast väga olulised, kuid moodustavad siiski vaid väikese osa tööst, mis on antud vallas tehtud. Näiteks on uuritud kopsuvähi tumorigeneesi seisukohast apoptoosi vähenemist (Singhal et al., 2003), rakkude invasiivsuse suurenemist (Chen et al., 2001; Lader et al., 2004), angiogeneesi (Tanaka et al., 2002), dediferentseerumist (Creighton et al., 2003), rakkudevahelisi liiduseid (Fromigue et al., 2003), kliinilist tulemit (Beer et al., 2002; Wigle et al., 2002), vähk-kasvaja taasteket (Gordon et al., 2003), resistentsust kemo- ja radioteraapiale (Hennes et al., 2004) ning metastaaside tekkimise võimet (Gemma et al., 2001; Kikuchi, 2003; Peng et al., 2004).

1.7 Mikrokiibi tehnoloogia

DNA kiibitehnoloogia rakendamist geeniekspressiooni uuringuteks on kasutatud juba 1995. aastast alates (DeRisi et al., 1996; Schena et al., 1995). cDNA mikrokiibi tehnoloogia põhineb märgistatud cDNA või cRNA hübridisatsioonil tahkele planaarsele kandjale, millele on korrapärase asetusega kinnitatud või sünteesitud teadaoleva järjestusega spetsiifilised cDNA või oligonukleotiidsed proovi molekulid, mida võib tinglikult nimetada spotiks (joonis 4). Kui klassikaliste hübridisatsioonimeetodite korral

nimetatakse prooviks lahuses olevaid teadaoleva järjestusega märgitud molekule ja sihtmärgiks kandjamaterjalile kinnitatud tundmatu järjestusega molekule, siis mikrokiipide puhul on kokku lepitud, et prooviks nimetatakse kandjale kinnitatud molekule ja märklauaks uuritavat materjali (Phimister, 1999).



Joonis 4. Mikrokiibil baseeruva geeniekspressiooni uuringu tööetapid

Kiibitehnoloogia võimaldab korraga ja kiiresti uurida tuhandeid erinevaid gene suhteliselt väikeste algmaterjali ja -reagentide hulgaga. Seetõttu kasutatakse kiibitehnoloogial baseeruvaid platvorme nii mutatsioonide detekteerimisel (Yim et al., 2005) ja resekveneerimisel (Kaminski et al., 2005; Wong et al., 2004; Yim et al., 2005) kui ka DNA koopiaarvu uurimisel (Schraders et al., 2005) ja metülatsioonimustri analüüsil (Gao et al., 2005; Kimura et al., 2005).

Globaalne geeniekspressiooni analüüs on üks peamistest funktsionaalse genoomika meetoditest, sest raku, koe või organismi füsioloogiline staatus on otseses sõltuvuses geenide ekspressioonist. Enamike bioloogiliste organismide kasv, diferentseerumine, homeostaas ja vastus erinevatele väliskeskkonna mõjutustele on peegelduv mRNA transkriptide hulgas. Geeniekspressiooni profiilide analüüs aitab seega

mõista rakus toimuvaid muudatusi ja signaale, erinevate metaboolsete ja regulatoorsete radade aktiveerumisi ning bioloogilise süsteemi vastuseid erinevatele keskkonnamõjuritele. Selliste erinevuste detekteerimine suuremahuliste geenispetsiifiliste DNA proove sisaldavate kiipidega on parim moodus ravimite ja haiguste prognoosimiseks tänapäeva meditsiinis.

Üks olulisemaid aspekte katse ülesehitusel ja uuringu planeerimisel on kontrollmaterjali valik. Eriti hoolikas peab olema kasvajate geeniekspressiooni uuringute korral, kus kontrollmaterjali valik on väga varieeruv (normaalse raku RNA, erinevat tüüpi või ka erinevate indiviidide või rakuliinide RNA-de segu) (Novorodovskaya et al., 2004; Yang et al., 2002).

1.7.1 Kandjamaterjalid ja proovi molekulid

Enim kasutatav kandjamaterjal mikrokiibi tehnoloogias on klaas. Klaasil on mitmeid sobilikke omadusi (keemiline ja füüsiline stabiilsus, väike soojuspaisuvus ja autofluorestsents, keemiline ühtsus, poleeritavus ja kogu nähtava spektri efektiivne läbivus), mis muudavad ta sobivaks mikrokiibi kandjamaterjalina. Nähtava spektri efektiivne läbivus on eriti oluline, sest enamus mikrokiibi detekteerimissüsteeme põhineb erinevate fluorestsentssignaalide emissioonspektrite registreerimisel.

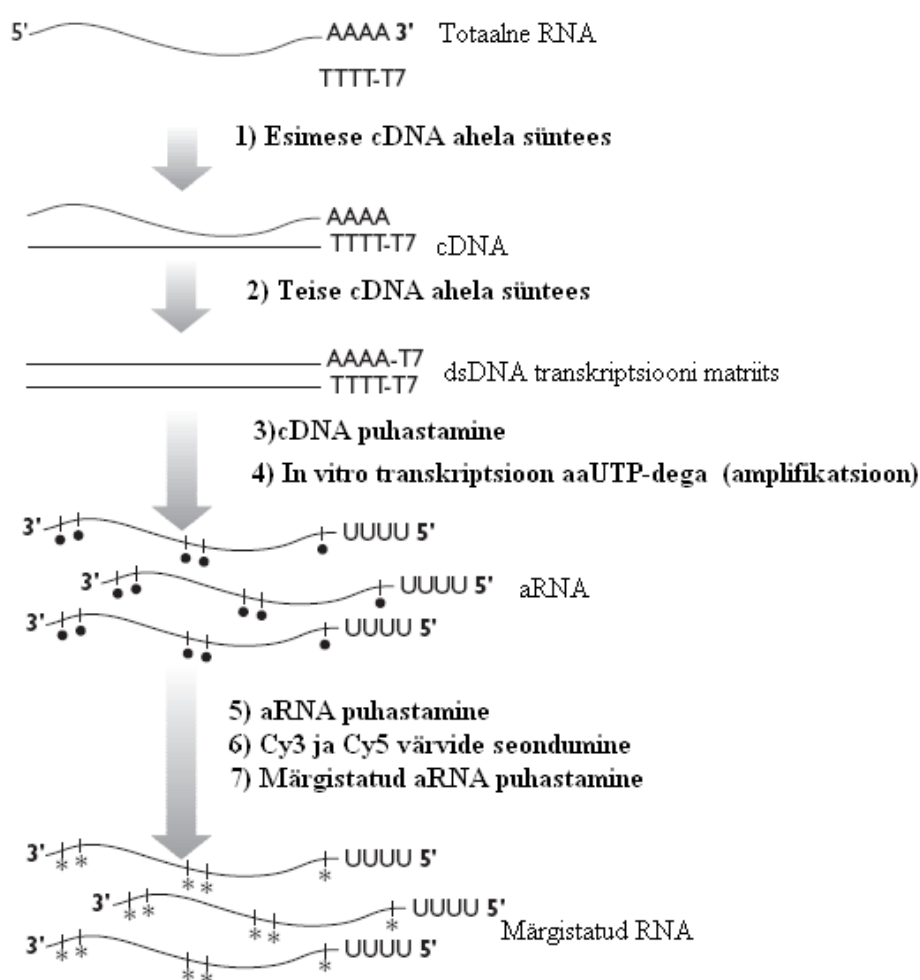
Proovi molekule võib jaotada mitmeti, kuid levinuimaks on klassifikatsioon päritolu järgi. Siinkohal eristatakse cDNA-l baseeruvaid ja oligonukleotiidseid proovi molekule. cDNA molekulid on oluliselt pikemad (100-2000bp tavaliselt) kui oligonukleotiidsed järjestused (alla 100bp). Oligonukleotiidsete proovi molekulide eeliseks on võimalus *in silico* disainiks ning kuna järjestus on lühem, siis ka alternatiivse *splaissingu* detekteeritavus (Tomiuk and Hofmann, 2001).

1.7.2 Sihtmärkmolekulid ja nende valmistamine

mRNA-l baseeruva geeniekspressiooni analüüsi märklauana võib kasutada nii cDNA-d kui ka RNA-d (t Hoen et al., 2003). cDNA sünteesimiseks kasutatakse pöördtranskriptaasi ning matriitsiks võib olla totaalne RNA või eukarüootide korral

mRNA. Praimeritena võib kasutada nii varieeruva järjestusega oktameere, mis seonduvad juhuslikult RNA-le kui ka oligo-dT praimerit, mis seondub vaid mRNA polü-A sabale.

Lisaks kasvajates leitud spetsiifilisele mikrokeskkonnale (De Wever and Mareel, 2003; Fromigue et al., 2003) sisaldab iga koeproov ka veresooni ning teiste kudede spetsiifilisi rakke. Seepärast kasutatakse tänapäeval teatud juhtudel mikrodisektsiooni meetodit, mis võimaldab rakke üksikhaaval koelõigust eemaldada (Mohr et al., 2004; Wang et al., 2000). Kuna sellistest väikestest kogustest eraldatav RNA hulk on limiteeritud, järgneb reeglina RNA eraldusele lineaarse amplifikatsiooni etapp (Eberwine, 1996), (joonis 5).



Joonis 5. RNA amplifikatsiooni etapid. Modifitseeritud Ambion „Amino Allyl MessageAmp™ aRNA” käsiraamatu joonis.

RNA amplifikatsiooni meetod võimaldab teostada kiibikatseid vähem kui ühest mikrogrammist RNA-st (Luo et al., 1999; Yue et al., 2001). Mitmed töögrupid on uurinud amplifikatsioonist tulenevate vigade tekkimist ning jõudnud järeldusele, et meetod annab häid ja usaldusväärseid tulemusi (Feldman et al., 2002; Li et al., 2004; Polacek et al., 2003). Teatud juhtudel on isegi märgatud amplifitseeritud RNA-ga teostatud kiibikatsete suuremat reprodutseeruvust kui klassikalise cDNA geeniekspressiooni kiibikatse korral (Feldman et al., 2002; Polacek et al., 2003). Seega võib RNA amplifitseerimist kiibikatse tarvis pidada tänapäeval juba standardmeetodiks (Eberwine et al., 2001; Kacharina et al., 1999; Pabon et al., 2001).

1.7.3 Sihtmärkmolekulide märgistamine kiibikatsete tarvis

Enne hübridisatsiooni peab toimuma ka sihtmärkmolekulide märgistamine. Selleks võib kasutada otsest või kaudset märkimismeetodit. Esimese korral lisatakse värvi molekul sihtmärkmolekuli külge kovalentselt juba sünteesi käigus, mis võib pärssida sünteesi efektiivsust (Hardiman, 2002). Kaudse märkimise korral toimub cDNA sünteesi käigus modifitseeritud nukleotiidide lülitamine nukleiinhappe ahelasse ning alles peale sünteesi seonduvad keemilise reaktsiooni käigus kovalentselt värvi molekulid nukleiinhappes esinevatele modifitseeritud nukleotiididele.

1.7.4 Mikrokiibi hübridisatsioon ja signaalide detekteerimine

Mikrokiibi hübridisatsiooniks kasutatakse spetsiaalseid katteklasse ja kambreid ning mitmed firmad pakuvad ka vastavaid aparate. Hübridisatsioonimasinad võimaldavad hübridiseeruvat lahust voolutada, mille tulemusel väheneb hübridisatsiooni aega ja suureneb efektiivsus. Samuti on võimik hiljem kiibid automaatselt pesta ning kuivatavad.

Tavaliselt toimub hübridisatsioon 14-20h 65°C ning mittespetsiifilise hübridisatsiooni vähendamiseks lisatakse hübridisatsioonisegule purustatud ja denatureeritud heeringa sperma DNA-d, pärmi tRNA-d või *Cot-1* DNA-d (Watson et al.,

1998). Mikrokiipidelt ebaspetsiifiliselt hübridiseerunud materjali ja liigse soola eemaldamiseks pestakse klaase pesulahustega, mis sisaldavad SSC-d ja SDS-i.

Mikrokiibi signaalide detekteerimiseks kasutatakse spetsiaalseid aparate, mis oma ehituselt võib jagada 2 gruppi: konfokaalmikroskoobil põhinevad skännerid ja CCD (*charge-coupled device*) tüüpi mikrokiibi detektorid. Konfokaalmikroskoobil põhinevad kiibi lugejad ergastavad ja detekteerivad signaali (emissiooni) igast punktist eraldi, mis nõuab suure kiibi lugemisel suhteliselt palju aega. CCD kaameratel põhinevad mikrokiibi detektorid ergastavad ja loevad kogu kiibi korraga. Enamikul mikrokiibi lugejatel on võimalik ise määrata, kui suure lahutusvõimega pilti soovitakse. Standardiks on kujunenud 16 bit failid, mis on võimalised eristama 65536 halltooni (Schen, 2000).

1.7.5 Andmete analüüs

Mikrokiibi andmete analüüs hõlmab mitmeid erinevaid meetodeid, mis on koondatud nii vabavara kui ka kommertsiaalsetesse tarkvaraprogrammidesse (Saeed et al., 2003; Xu et al., 2004).

Esimese etapina geeniekspressiooni andmete analüüsimisel muudetakse pildifailis kajastuvad signaaliintensiivsused arvandmeteks. Enamasti võimaldab seda mikrokiibi lugejaga kaasas käiv tarkvara, kuid võib kasutada ka spetsiifilisi programme, mis põhimõtteliselt on siiski kõik analoogse sisu ja võimalustega. Pildifailist signaalitugevuste eraldamiseks moodustatakse esmalt võrgustik, mis asetatakse spottidele, määratakse orienteeruv spoti suurus ja kuju ning sobiv tausta identifitseerimise meetod. Seejärel arvutab programm signaalide ja tausta intensiivsused ning moodustab väljundfaili. Tavaliselt lahutatakse seejärel signaalidest tausta intensiivsus.

Teine etapp kiibiandmete analüüsimisel on normaliseerimine, mille eesmärgiks on muuta kiibiandmed võrreldavateks nii kiibi siseselt (Cy3 ja Cy5 kanal) kui ka erinevate kiipide vahel. Normaliseerimiseks võib kasutada nii spetsiifilisi kui ka kõiki kiibile immobiliseeritud spotte (globaalne normaliseerimine). Spetsiifiliste spottidena kasutatakse koduhoidjaid geene. Samas on aga näidatud, et ka koduhoidja geenide ekspressioonitase võib muutuda (Savonet et al., 1997). Seega peab olema ettevaatlik normaliseerimismeetodi valikul. Globaalne normaliseerimine sobib eelkõige

suuremahuliste geeniekspressiooni kiipide korral, kuna eeldab, et vaid väikesel osal geenidest muutub ekspressiooni tase.

Kiibiandmeid võib normaliseerida ka *spiking* meetodiga. Sellisel juhul on kiibile spotitud kontrolljärjestused, mis ei oma uuritava materjaliga homoloogsust ning nukleiinhappe märkimisreaktsioonil lisatakse kindel kogus kontrolljärjestustega komplementaarseid nukleiinhappe molekule, mida saab hiljem kasutada normaliseerimiseks (Eickhoff et al., 1999).

Kuna geeniekspressiooni analüüsi eesmärgiks on tuvastada geenid, mis on oma ekspressiooni muutnud, või siis vastupidi- just muutumatuks jäänud, siis järgmiseks etapiks on kontroll ja uuritava materjali geeniekspressiooni signaalide võrdlemine. Tavaliselt kasutatakse selleks normaliseeritud signaalitugevuste suhteid. Üldlevinud reeglilik on, et erinevalt ekspresseerunuks loetakse geenid, mille ekspressioonitase on muutunud vähemalt kaks korda (Quackenbush, 2002). Levinud on ka täiendav filtreerimine, mille käigus eemaldatakse madala ekspressioonitasemega geenid.

1.7.6 Kirjeldav statistika

Mikrokrokiibi analüüsi üheks fundamentaalsemaks väljundiks on geeniekspressiooni profiil, mis moodustub kõikide analüüsitud transkriptide tasemete võrdlusel. Geeniekspressiooni andmete suure maatriksi tõttu ei ole võimalik tavameetoditega näha erinevaid suundi ja mustreid. Selleks on kasutusele võetud erinevad klasterdusmeetodid ja visuaalsed tööriistad. Klasterdamise tulemusel võib ennustada tundmatu geeni funktsiooni, grupeerida patsiente vastavalt haiguse kulu ja tüübi järgi (Hughes et al., 2000).

Üldiselt võib jagada kõik klasterdusmeetodid alanevateks või ülenevateks. Alaneva klasterdamise korral alustatakse protsessi suurest grupist geenidest või erinevatest katsetest (mis on 1 klastris) ning arvutuste käigus jagatakse need sarnasuse alusel järjest väiksemateks gruppideks. Üleneva klasterduse korral eeldatakse, et iga geen või katse on unikaalne ning otsitakse sarnasusi, kuni lõpuks on kõik klasterpuu harud omavahel seotud.

Klasterdamise meetodeid võib jagada ka selle alusel, kas on olemas või puudub eelnev informatsioon uurimisobjekti kohta. Kui klasterduse aluseks on ainult ekspressioonimaatriksis sisalduvad andmed, siis saab kasutada juhendumatuid (*unsupervise*) meetodeid. Kui on võimalik juba eelnevalt määratleda mingi grupp geene või bioloogiline materjal teatud klastrisse, siis saab kasutada juhitud (*supervise*) klasterdamise meetodit.

Üheks meetodiks geeniekspressiooni andmetes mustrite leidmisel on peakomponentanalüüs (*principal component analysis*, PCA). Peakomponent analüüsi eesmärgiks on muuta andmed kahe või kolmedimensionaalseks hajuvusgraafikuks (*scatter-plot*), kus iga telg kujutab ühte peakomponenti ehk suunda, milles andmed varieeruvad kõige rohkem (Raychaudhuri et al., 2000).

Enim kasutatud klasterdusmeetodiks geeniekspressiooni andmete analüüsimisel võib pidada ülenevat hierarhilist klasterdust (Eisen et al., 1998). Enamikus programmides on võimalik valida, kas klasterdatakse eksperimente, geene või mõlemaid korraga. Vastavalt sarnasusele ühendatakse kõik puu harud, mille tulemusel tekib eksperimentaatoril ülevaade andmete struktuurist.

K-means klasterdamist võib pidada üheks levinumaks alaneva klasterdamise meetodiks (Brazma and Vilo, 2000). Sellise meetodi suurimaks eeliseks on võimalus valida, mitmeks klastriks geenid või eksperimendid jaotatakse. Arvutuse alguses jaotatakse geenid või eksperimendid juhuslikult K klastritesse ning seejärel hakatakse neid ümber paigutama, kuni saabub stabiilsus ja klastrite sisu enam ei muutu.

2 Käesoleva magistritöö eesmärk

Käesolev magistritöö on osa suuremast projektist, mille käigus uuritakse mitteväikserakuliste kopsukasvajate histoloogiliste alavormide geeniekspressiooni profiile. Antud töö eesmärgiks oli töötada välja ja tulevikus juurutada igapäevasesse kliinilisse praktikasse mikrokiibi katsed ning valida sobivad analüüsiprogrammid ja meetodid projekti tarvis.

Töö teostati pilootuuringuna, mille käigus analüüsiti 4 adenokartsinoomi ja 6 bronhioloalveolaarse kopsuvähi geeniekspressiooni profiile.

3 Materjal ja metoodika

3.1 Bioloogilise materjali säilitamine ja andmed

Kopsuvähi geeniekspressiooni uuringuks kasutatud koeproovid eemaldati operatsiooni käigus SA Tartu Ülikooli Kliinikumis doktor Tõnu Vooderi poolt ning külmutati koheselt vedelas lämmastikus ja säilitati -80°C külmikus hilisemate uuringute tarvis. Histoloogilise analüüsi teostas SA Tartu Ülikooli Kliinikumi Patoloogiateenistuse patoloog Mari-Ann Reintam. Antud töös uuriti 10 patsiendi kopsuvähi geeniekspressiooni mustri erinevusi kahe tehnilise replikaadina (kokku kasutati käesolevas töös 20 mikrokiipi). Kontrollmaterjalina kasutati sama patsiendi visuaalselt normaalse kopsukoe tükist eraldatud RNA-d, mis oli samuti külmutatud vedelas lämmastikus ja töödeldi hilisemates katsetes analoogselt kasvajakoe proovidega. Kontrollmaterjaliks valiti sama indiviidi visuaalselt normaalne kopsukude eesmärgiga elimineerida bioloogilisest variatsioonist tulenevad geeniekspressiooni muutused.

Adenokartsinoomiga patsiente oli uuringus 4 ja bronhioloalveolarse vähiga patsiente 6 (Tabel 2).

Tabel 2. Uuringus kasutatud patsientide kasvajate tüübid, vanus, sugu, sigareti suitsetamise hulk pakk-aastates ning kasvajate staadiumid. Tabelis BA ja A tähistavad vastavalt bronhioloalveolaarset kasvajat ja adenokartsinoomi.

Kasvaja tüüp	Patsiendi Nr.	Vanus ja sugu	Suitsetab	TNM	Staadium
BA	5	48M	10 pk/a	pT2N0M0	Ib
BA	28	73M	50 pk/a	pT2N1M0	Ila
BA	47	64M	18 pk/a	pT1N0M0	Ia
BA	57	55M	35 pk/a	pT2N0M0	Ib
BA	58	74M	40 pk/a	pT1N0M0	Ia
BA	8	38M	25 pk/a	pT2N3M0	IIIb
A	21	52M	35 pk/a	pT1N0M0	Ia
A	37	55M	30 pk/a	pT2N0M0	Ib
A	40	61N	20 pk/a	pTNM1pul	IV
A	56	61M	40 pk/a	pT2N0M0	Ib

3.2 RNA eraldamine ja säilitamine, kvaliteedi ja kvantiteedi kontroll

Eelnevalt vedelas lämmastikus külmutatud ja -80°C säilitatud koetükkidele, mille vähemalt üks külg oli $\leq 0,5$ cm (vajadusel lõigati külmunud koetükid väiksemaks), lisati 10 mahtu -20°C jahutatud RNAlater-ICE™ lahust (Ambion Inc., Austin, TX, USA) ning inkubeeriti segu -20°C 18h. RNAlater-ICE™ sisaldab komponente, mis on võimelised difundeeruma väikese (0,5 cm) koetüki sulamisel rakkudesse ja inaktiveerima RNAasid. Töötamise tulemusena võib koetükke toatemperatuuril kaaluda ja tükeldada, säilitada hilisemateks katseteks -20°C või jätkata RNA eraldamise protokollidega, kartmata seejuures RNA kvantiteedi ega kvaliteedi langust.

RNA eraldamiseks kasutati RiboPure™ komplekti (Ambion Inc.) ning rakkude purustamiseks firma IKA Ultra-Turrax T8 homogenisaatorit. Ribonukleinhappe eraldamine teostati vastavalt tootja firma poolt ettenähtud protokollile.

RNA kvantiteedi määramiseks lahustati RNA TE-s (pH=8.0) ning mõõdeti lahuse absorptsioon 260 ja 280nm juures spektrofotomeetriga (Biochrom Ultraspec 3100 pro, Amersham, Bucks, UK), (Tabel 3). Kui saadud väärtus jääb vahemikku 1,9-2,2, siis on RNA lahus puhas valkudest ja muudest rakus sisalduvatest molekulidest. RNA kvaliteeti kontrolliti elektroforeesil 2% denatureerivas agarosgeelis (vastavalt RiboPure™ protokollile).

Tabel 3. Tabelis on välja toodud katsetes kasutatud vastava patsiendi kasvaja- ja kontrollkoe (tähistatud +) kaalud, eraldatud totaalse RNA spektrofotomeetrilise analüüsi tulemus ning RNA saagis µg-des. Samuti on märgitud aRNA kogus, mis saadi amplifikatsiooni käigus ning kiibikatsel kasutatud fluorestsentsmolekuli nimi.

Järjekorra nr.	X mg kude	260/280nm	X ug RNA	X ug aRNA	Värv
5	36	2,2	370	50	Cy5
5+	35	2,2	23	47	Cy3
28	32	2,1	79	27	Cy5
28+	31	1,9	21	30	Cy3
47	38	2,2	100	40	Cy5
47+	36	2,1	130	30	Cy3
57	32	2,2	58	40	Cy5
57+	31	2,2	29	40	Cy3

58	39	2,2	49	39	Cy5
58+	37	2,1	28	36	Cy3
21	75	2,2	90	64	Cy5
21+	60	2,1	40	24	Cy3
37	80	2,1	96	28	Cy5
37+	50	2,1	50	63	Cy3
40	52	2,1	23	19	Cy5
40+	47	2,1	85	21	Cy3
56	67	2,1	50	38	Cy5
56+	53	2,1	70	36	Cy3

3.3 aRNA süntees

Kuna katsetes kasutatud bioloogilise materjali hulk oli piiratud, siis teostati enne kiibikatset *antisense* RNA (aRNA) amplifikatsioon (Joonis 5). Selleks kasutati „Amino Allyl MessageAmp™ aRNA” komplekti (Ambion Inc.).

Amplifikatsiooni protsess põhineb pöördtranskriptaasi reaktsioonil, kus antud juhul kasutatakse oligo-(dT) praimerit, mille 3'otsa on lisatud bakteriofaag T7 promootor (5'-TTCTAATACGACTCACTATAGGCTCACACTTGTATAGATCTACT-3'). Seejärel sünteesitakse saadud cDNA-st *in vitro* transkriptsiooni käigus T7 polümeraasi poolt sadu kuni tuhandeid aRNA koopiaid. Polümerisatsiooni käigus inkorporeeritakse aRNA ahelasse modifitseeritud aaUTP 5-(3aminoallüül)UTP nukleotiide mis on võimelised reageerima monoreaktiivsete fluorestseeruvate värvidega (nt. Cy3 või Cy5). Antud katsetes kasutati amplifikatsiooni matriitsina 3µg totaalselt RNA-d, mille tulemusel saadi keskmiselt ~40µg aRNA-d. Kuna mRNA moodustab totaalsest RNA-st ~5%, siis toimus keskmiselt 270-kordne amplifikatsioon.

3.4 Kasutatud kiibid

Kopsukasvaja geeniekspressiooni profiili uurimiseks kasutati 29800 elemendiga inimese cDNA kiipe (HUM29,8K cDNA), mis olid valmistatud Rootsi Kuningliku Tehnoloogia Instituudi Biotehnoloogia Õppetoolis (Stockholm, Rootsi) (<http://www.biotech.kth.se/molbio/microarray/>), (Lisa 1). Mikrokiip oli spotitud 48 blokina (*sub-grid*, *sub-array*), milles igaüks koosnes 25×25 maatriksina prinditud

unikaalsetest cDNA järjestustest (1 blokis 625 spotti). Kahe spoti tsentrite vaheline kaugus oli 170µm ning keskmiseks mikrokiibi elemendi läbimõõduks 110µm. Kiipide protsessimine, hübridisatsioon ja pesu toimus vastavalt tootja protokollile.

3.5 Hübridisatsioon

Mikrokiibile hübridiseeritav märgistatud aRNA (kokku 6µg) ruumala vähendati vaakumkuivatis Maxi Dry Plus (Heto, Allerød, Denmark) 13,6µl-ni ning lisati 51,5µl hübridisatsioonipuhvrit (5×SSC, 50% formamiid, 0,1%SDS, 0,1µg/µl tRNA-d, 0,2µg/µl inimese *Cot-1* DNA-d). Segu kuumutati 95°C 3 minutit ning asetati 5 minutiks jääle, et vältida sekundaarstruktuuride moodustumist. Samal ajal asetati mikrokiibile katteklaas (LifterSlip™, Erie Scientific, Portsmouth, NH, USA) ning lisati modifitseeritud hübridisatsioonikambrisse HybChamber™ (GeneMachines, San Carlos, CA, USA) 30µl ddH₂O-d. Hübridisatsioonisegu kanti mikrokiibile ning inkubeeriti 18h 42°C vesivannis (Polystat, Newton Road, Henley-on-Thames, UK).

3.6 Kiipide hübridisatsioonijärgne pesu

Peale hübridisatsiooni pesti mikrokiipe alanevas soola gradiendis, et eemaldada hübridiseerumata mittespetsiifilised sihtmärkmolekulid ja liigne sool, mis vastasel juhul annaks kiipide detekteerimisel tugeva mittespetsiifilise fluorestsentssignaali. Antud katsetes kasutati esimese pesulahusena 2×SSC ja 0,1%SDS-i lahust, mis soojendati eelnevalt 42°C. Teine pesulahus sisaldas 0,1×SSC ja 0,1% SDS. Kahe esimese pesu aeg oli 5 minutit. Kolmanda lahusega pesti klaase 5 korda 1 minut ning see sisaldas 0,1% SDS-i. Peale kiipide pesu tsentrifuugiti klaasid kuivaks Jouan CR422 (Thermo Electron Corporation) tsentrifuugiga 1000 rpm.

3.7 Mikrokiibi fluorestsentssignaalide detekteerimine

Kiipide lugemiseks kasutati Affymetrix 428 Array Scanner`it (Affymetrix Inc., Santa Clara, CA, USA), mille käigus saadi kaks 16 bit`i must-valget .tif faili (Lisa 2), (üks Cy3 ja teine Cy5 värvitud nukleiinhappe kohta). Cy3 ergastamiseks kasutati laserit, mille lainepikkus $\lambda=532$ nm ja Cy5 ergastati lainepikkusega $\lambda=635$ nm.

3.8 Kiibiandmete analüüs

Pildifailis kajastuvate geeniekspressiooni signaalitugevuste kvantiseerimiseks kasutati arvutiprogrammi *Array-Pro Analyzer* 4.0 (Media Cybernetics). Spottide intensiivsuste ja tausta arvutamisel kasutati vastavaid keskväärtusi ning taust defineeriti lokaalse nurga meetodil. *Array-Pro Analyzeri* väljundifailiks on Microsoft Exceli fail, kus on märgitud spoti taust ja intensiivsus, järjekorra number ja kõik muud geeni identifitseerivad parameetrid, mis eelnevalt on mikrokiibi annotatsioonifailist *Array-Pro Analyzer* programmi sisestatud.

Kiibikatsetest saadud toorandmete (signaali intensiivsus, millest on lahutatud tausta intensiivsus) normaliseerimiseks viidi esmalt andmed sobivasse formaati ning muudeti Excel failid tav failideks. Seejärel kasutati TM4 paketti kuuluvat programmi TIGR MIDAS (versioon 2.19, *The Institute for Genomic Research, Microarray Data Analysis System*), (Saeed et al., 2003) ja LOWESS (*Locally Weighted Regression and Smoothing Scatterplots*), (Frederiksen et al., 2003; Quackenbush, 2002) funktsiooni mikrokiibi andmete normaliseerimiseks.

Järgnevalt arvutati replikaatide vaheline keskmine signaalitugevuste suhe. Oluliselt üles või alla ekspresseerituks loeti need geenid, mille keskmine ekspressiooniväärtuste suhe kontroll ja kasvajakoe vahel erines vähemalt kaks korda. Seejärel filtreeriti välja geenid, mille ekspressioon oli muutunud vähemalt 3 patsiendi korral ning klasteranalüüsil kasutati vaid neid geene.

Hierarhilise klasteranalüüsi teostamiseks kasutati TIGR MeV (versioon 3.0, *MultiExperiment Viewer*) programmi (Saeed et al., 2003). Enne klasteranalüüsi normaliseeriti erinevad eksperimendid omavahel, ning rakendati filtrit madala ekspressioonitasemega (signaali intensiivsus alla 100) geenide eemaldamiseks.

4 Tulemused ja arutelu

Käesolevas magistritöös kasutati 29.8 K cDNA mikrokiipe adeno- ja bronhioloalveolaarsete kopsuvähkide geeniekspressiooni profiilide uurimiseks. RNA-d eraldati kirurgilist ravi saanud 10 patsiendi kartsinoomist ja kontrollkoest. Bronhioloalveolaarsete kasvajate proove oli uuringus 6 ja adenokartsinome 4. Kõik katsed teostati kahe tehnilise replikaadina, mille tulemusel analüüsiti ühtekokku 20 mikrokiipi.

4.1 Ekspressioonitaset muutnud geenid

Mikrokiibi signaalide detekteerimisel saadud toorandmed normaliseeriti ja filtreeriti, mille tulemusena leiti 314 geeni, mis olid vähemalt 3-l juhul kümnest (10 patsienti) 2 korda üles või alla ekspresseerunud. Nendest 314-st geenist 52 olid kasvajates üles ja 262 alla ekspresseerunud. 52-st kasvajates üles ekspresseerunud geenist 30-l ning 262-st alla ekspresseerunud geenist 146-l puudus analüüsides teostamise hetkel annotatsioon. Selliste tundmatu funktsiooniga geenide edasine uurimine võib viia uute potentsiaalsete kasvajaga seotud markerite tuvastamiseni. Antud töös on välja toodud 43 kasvajas alla ja 5 üles ekspresseerunud geeni, mis omasid annotatsiooni baasil seost tumorigeensete protsessidega. (Lisa 3 ja Lisa 4). Allpool kirjeldan lähemalt STEAP geeni, mille ekspressioonitase oli kasvajates tõusnud ning DAPK1, TNFSF10 ja EDG1 geeni, mille ekspressioonitase oli kasvajates langenud.

4.1.1 STEAP- *Six Transmembrane Epithelial Antigen of the Prostate*

STEAP kirjeldati esimesena kui eesnäärme spetsiifilist rakupinna antigeeni, mille ekspressioon oli suurenenud eesnäärme vähi korral (Hubert et al., 1999). Edasistel uuringutel on leitud sama geeni muutunud ekspressiooni ka põie, munasarja, käärsoole ja eesnäärme vähkkasvajates (Yang et al., 2001). STEAP ei oma homoloogiat ühegi teadaoleva valguga, kuid biokeemilised analüüsid ja sekundaarstruktuuri ennustuse baasil võib oletada, et tegemist on 6 transmembraanset ala omava rakupinna molekuliga. Sellise struktuuriga molekulid on enamasti ioonkanalid (Dolly and Parcej, 1996) või akvaporiinid (Reizer et al., 1993). Struktuuruuringud on näidanud selliste kanalite tetrameerset ehitust (Christie, 1995; Walz et al., 1997). Immunohistokeemilise analüüsi tulemusel lokaliseeriti STEAP rakuliiduste lähedal. Kuna STEAP ekspressioon on tuumorrakkude spetsiifiline ning ta lokaliseerub rakupinnal, siis on vastav marker sobilik nii vähkkasvaja diagnoosiks kui ka antikehadel põhinevaks teraapiaks ning vähivastaste vaktsiinide väljatöötamiseks (Hubert et al., 1999).

4.1.2 DAPK1- *Death-Associated Protein Kinase 1*

DAPK1 on gamma-interferooni poolt indutseeritud programmeeritud rakusurmale viiva signaaliraja positiivne mediaator. DAPK1 kodeerib 160kD valku, mis sisaldab 8 anküriini kordust ja 2 ennustatavat P-lingu konsensusala. Kopsuvähkides on leitud DAPK1 promootoralas asuvate CpG saarte aberantset metülatsioonimustrit ja sellega seotud geeni inaktiveerumist (Pulling et al., 2004). DAPK1 hüpermetülatsiooni on uuritud ka käärsoole ja eesnäärme vähi korral, kus samuti on täheldatud geeni ekspressiooni langust, kuid hüpermetülatsiooni pole vastavates töödes käsitletud (Xu et al., 2004; Yegnasubramanian et al., 2004). Kusepõie vähi uuringus aga leiti, et DAPK1

hüpermetülatatsioon omab olulist prognostilist väärtust vähi taastumise seisukohast (Tada et al., 2002).

4.1.3 TNFSF10- *Tumor Necrosis Factor Superfamily, member 10*

TNFSF10 kodeerib valku, mis kuulub TNF (tuumor nekroosi faktor) ligandide perekonda. Selle valgu ülesandeks on apoptoosi induksioon transformeerunud ja kasvavalikes rakkudes. On teada, et TNFSF10 on ekspresseeritud märkimisväärsel tasemel ka normaalsetes rakkudes, kuid seal ta apoptoosi ei indutseeri. TNFSF10 on võimelise seonduma mitmete TNF superperekonna liikmetega (TNFRSF10A/TRAILR1, TNFRSF10B/TRAILR2, TNFRSF10C/TRAILR3, TNFRSF10D/TRAILR4, TNFRSF11B/OPG)(TRAIL- *TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand*). TNFSF10 seondumisel TNFRSF10C/TRAILR3, TNFRSF10D/TRAILR4 ja TNFRSF11B/OPG toimub apoptoosi induksiooni pärssimine. TNFSF10 aktivatsiooni järgselt indutseeritakse MAPK8/JNK, kaspaas 8 ja kaspaas 3, mis viivad raku apoptoosi.

4.1.4 EDG1- *Estrogen Down-regulated Gene 1*

EDG1 on sarnane G-valkudega seotud retseptoritega ning on kõrgelt ekspresseerunud endoteeli rakkudes. EDG1 ligandiks on sfingosiin-1-fosfaat, millega toimub väga spetsiifiline ja tugev seondumine. EDG1 täpne funktsioon pole teada, kuid arvatakse, et ta on seotud protsessidega, mis reguleerivad endoteeli diferentseerumist ning aktivatsiooni korral indutseeritakse rakk-rakk sidemete formeerumist.

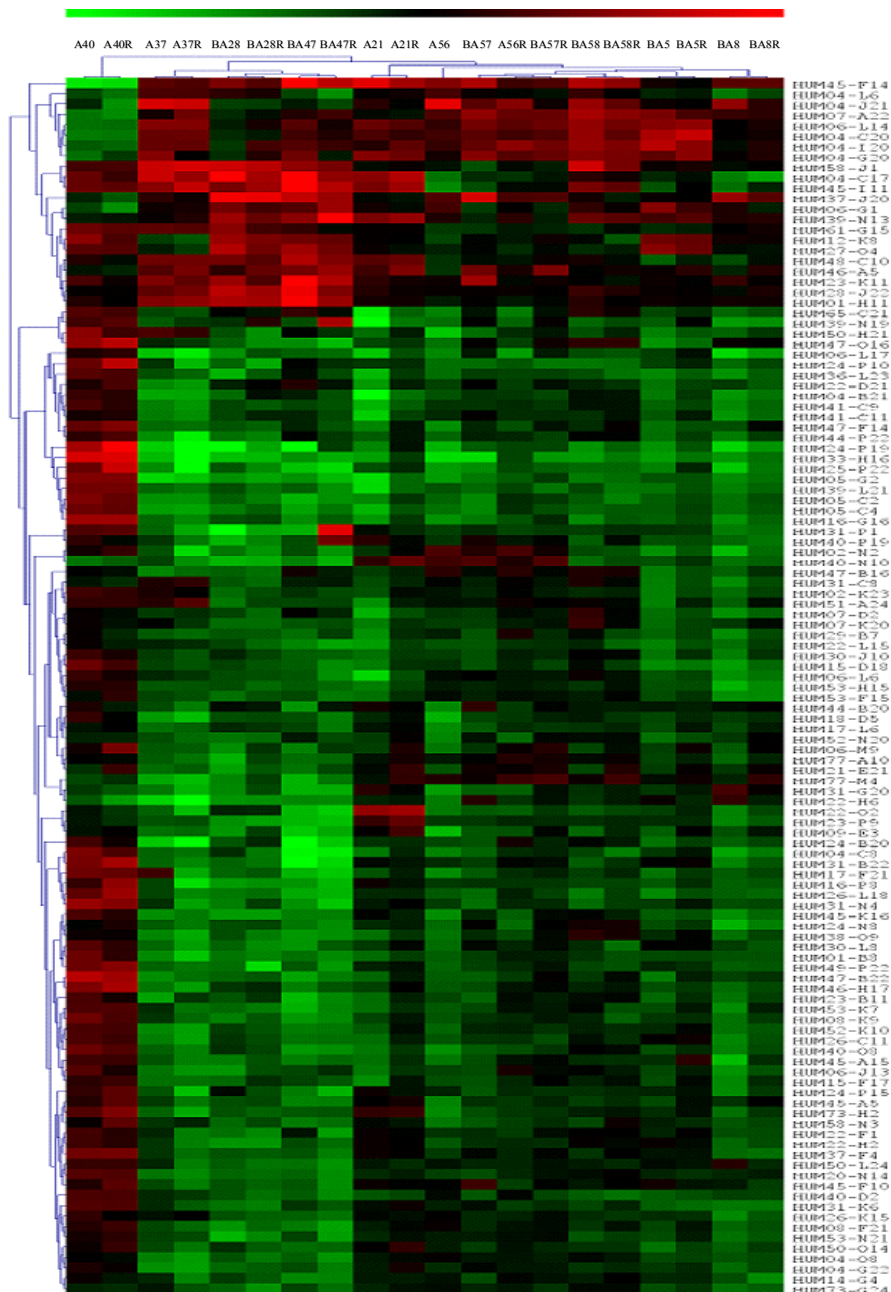
2003 aasta augustis avaldasid Bryan M. Wittmann ja kaastöötajad artikli, kus otsiti uusi rinnavähki põhjustavaid molekulaarseid markereid (Wittmann et al., 2003). Töö käigus leiti, et EDG1 tase normaalsetes rakkudes oli oluliselt kõrgem kui rinnavähi rakkudes. Samuti täheldati, et kunstlikult üleseksprimeeritud EDG1 korral on rakkude proliferatsioon pärsitud ning EDG1 inhibitsiooni korral kiireneb rakkude kasv. Seega võib pidada EDG1 uueks prognostiliseks markeriks kasvaja tekkes ja arengus.

4.2 Hierarhilise klasteranalüüsi tulemused

Teostatud katsete tulemusel leitud geeniekspressiooni andmete hierarhilisel klasterdamisel (joonis 6) võib näha, et patsient nr. 40, kellel oli diagnoositud adenokartsinoom, omab täiesti erinevat molekulaarset signatuuri. Selle põhjuseks võib olla asjaolu, et antud patsient on ainus naissoost esindaja uuritavas grupis, kuid veelgi veenvamaks põhjuseks on fakt, et vastav kasvaja oli kirurgilise ravi ajaks metastaseerunud (patsient oli ainus, kes omas metastaseeruvat kasvajat antud grupis). Hetkel veel teostamisel olevad täiendavad histoloogilised analüüsid on näidanud soole epiteeli kasvajale omaseid tunnuseid. Tulevikus plaanime uurida täiendavalt metastaasi ja kontrollkoe geeniekspressiooni profiili.

Programm on klasterdanud kokku adenokartsinoomiga patsiendi nr. 56 ja bronhioloalveolaarse kasvajaga patsiendi nr. 57. Sellest võib järeldada, et vastavad vähk-kasvajad on molekulaarselt väga sarnased, vaatamata erinevale histoloogilisele klassifikatsioonile.

Üldiselt on klasteranalüüsi tulemusel joonistunud välja kolm molekulaarselt erinevat kindlapiirilist gruppi ja võib oletada, et eksisteerib ka neljas, mis arvatavasti ei tule esile suhteliselt vähesel patsientide hulgal tõttu. Sarnaseid tulemusi on saanud ka teised töögrupid (Beer et al., 2002; Bhattacharjee et al., 2001; Garber et al., 2001), kes on suutnud siduda vastava molekulaarse fenotüübi haiguse edaspidise kulgemise ja diagnoosiga. Antud töös kasutatud patsientide kirurgiline ravi toimus vähem kui kaks aastat tagasi ja seega ei ole veel võimalik elulemusandmeid ja molekulaarset signatuuri omavahel võrrelda.



Joonis 6. Geeniekspressiooniprofiilide hierarhiline klasterdamine. Punasega on tähistatud kasvajas üles ja rohelisega alla ekspresseerunud geenid.

4.3 Perspektiivid

Kuigi käesolevas magistritöös joonistusi välja erinevate bronhioloalveolaarsete ja adenokartsinoomide geeniekspressiooni profiilid, mis peegeldavad vähkides esinevaid erinevaid molekulaarseid signatuure, on 10 patsiendi materjalide kasutamine sellistes uuringutes siiski liiga väike arv, et kaugeleulatuvaid järeldusi teha. Seetõttu plaanime täiendavaid uuringuid, mille käigus teostame 100 kopsuvähi patsiendi geeniekspressiooni profiilide analüüsi, kus on uurimisobjektiks ka kõik teised kopsuvähi histoloogilised alamtüübid.

Geeniekspressiooni analüüsi tulemusel leitud tundmatu funktsiooniga transkriptide edasine analüüs võimaldab identifitseerida uusi prognostilise ja diagnostilise väärtusega molekulaarseid markereid, mis on üheks eelduseks uute diagnostiliste testide ja vähiravimite väljatöötamisel. Käesoleva magistritöö katsete tulemusel tuvastatud patsiendi nr. 40 geeniekspressiooni profiil, mis on seotud metstaasiga ja pärineb tõenäoliselt soolevähist, näitab ilmekalt mikrokiibi platvormil teostatud katsete täpsust ja vajalikkust tuleviku vähidiagnostikas. Käesolevas töös kasutatud molekulaarbioloogilised meetodid on rakendatavad ka teiste haiguslike protsesside uuringutes, mis viib lähemale personaalse meditsiini rakendumisele.

Siiski ei võimalda geeniekspressiooni analüüs seletada kõiki vähkkasvaja tekkes ja arengus olulisi aspekte. Seetõttu plaanime tulevikus uurida ka ühenukleotiidilisi polümorfisme ning võrrelda geeniekspressiooni ja SNP-de (*Single Nucleotide Polymorphism*) mustreid eesmärgiga leida kopsuvähi tekkes ja arengus olulisi prognostilisi molekulaarseid markereid, mida saaks hiljem kasutada mikrokiibil baseeruva testi väljatöötamiseks. Lisaks eelpool nimetatud meetoditele võimaldab geenitehnoloogia uurida ka erinevaid epigeneetilisi markereid ning kogu reguloomi struktuuri, mis on väga olulised kaasaja ühiskonda kimbutavate haiguste uurimisel ja ravimisel.

5 Kokkuvõte

Käesolevas magistritöös uuriti 4 adenokartsinoomi ja 6 bronhioolialveolaarse kasvaja geeniekspressiooni profile 29800 elemendiga inimese cDNA mikrokiibil. Analüüsi tulemusena leiti 314 geeni, mis olid vähemalt 3-l juhul kümnest 2 korda üles või alla ekspresseerunud. Nendest 314-st geenist 52 olid kasvajates üles ja 262 alla ekspresseerunud. 52-st kasvajates üles ekspresseerunud geenist 30-l ning 262-st alla ekspresseeritud geenist 146-l puudus analüüside teostamise hetkel annotatsioon. Selliste tundmatu funktsiooniga geenide edasine uurimine võib viia uute potentsiaalsete kasvajaga seotud markerite tuvastamiseni. 43 kasvajas alla ja 5 üles ekspresseeritud geeni omasid annotatsiooni baasil seost tumorigeensete protsessidega.

Hierarhilise klasteranalüüsi tulemusel eristus ekspressiooniprofiili baasil teistest metastaase põhjustanud primaarne adenokartsinoom (täiendav esialgne histoloogiline uuring viitab sooleepiteelist metastaseerunud kartsinoomile) ning teised patsiendid jagunesid 3 erinevasse klastrisse. Enamus replikaate (va. patsient nr. 56 ja 57) klasterdusid kõrvuti, mis näitab replikaatide vahelist homogeensust.

Katsete tulemusel võib öelda, et geeniekspressiooni mikrokiibi tehnoloogia abil on võimalik kasvajaid molekulaarsel tasemel fenotüpiseerida ning erinevaid alavorme eristada.

6 Summary

In the current study of the human non-small cell lung cancer we have used microarrays with 29,800 cDNA's to monitor gene expression pattern of 4 adenocarcinoma and 6 bronchioloalveolar carcinomas. We found 314 genes, which were significantly changed their expression pattern. Among these were 52 up-regulated genes and 262 down-regulated genes. 30 down- and 146 up-regulated genes had no annotation in database of present time, which means that these genes are new potential genes associated with cancer and are worth to study in future. Also we found 5 up and 43 down-regulated genes, which are shown to be associated with cancer.

In conclusion we can say that it is very useful to detect gene expression patterns in aim to subtype cancers as we were able to separate 3 distinct molecular phenotypes of adeno- and bronchioloalveolar carcinomas as well as malignant tumor from benign ones. As our patients had surgical resections only maximum of 2 years ago, we are not able to study the outcome of different cancers yet, but this analysis will be performed in future.

7 Tänud

Käesolev magistritöö valmis Eesti Teadusfondi toetusel (grant 6465). Suur tänu kõigile, kes töö valmimisel abiks olid. Eriti soovin tänada oma juhendajat dotsent Ants Kurge, professor Andres Metspalu ning doktor Tõnu Vooderit asjalike nõuannete ja meeldiva koostöö eest.

8 Viited

- Alberg, A. J., and Samet, J. M., 2003, Epidemiology of lung cancer, *Chest* **123**(1 Suppl):21S-49S.
- Amos, C. I., Xu, W., and Spitz, M. R., 1999, Is there a genetic basis for lung cancer susceptibility? *Recent Results Cancer Res* **151**:3-12.
- Beadsmoore, C. J., and Screaton, N. J., 2003, Classification, staging and prognosis of lung cancer, *Eur J Radiol* **45**(1):8-17.
- Beer, D. G., Kardia, S. L., Huang, C. C., Giordano, T. J., Levin, A. M., Misek, D. E., Lin, L., Chen, G., Gharib, T. G., Thomas, D. G., Lizyness, M. L., Kuick, R., Hayasaka, S., Taylor, J. M., Iannettoni, M. D., Orringer, M. B., and Hanash, S., 2002, Gene-expression profiles predict survival of patients with lung adenocarcinoma, *Nat Med* **8**(8):816-24.
- Bhattacharjee, A., Richards, W. G., Staunton, J., Li, C., Monti, S., Vasa, P., Ladd, C., Beheshti, J., Bueno, R., Gillette, M., Loda, M., Weber, G., Mark, E. J., Lander, E. S., Wong, W., Johnson, B. E., Golub, T. R., Sugarbaker, D. J., and Meyerson, M., 2001, Classification of human lung carcinomas by mRNA expression profiling reveals distinct adenocarcinoma subclasses, *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(24):13790-5.
- Brazma, A., and Vilo, J., 2000, Gene expression data analysis, *FEBS Lett* **480**(1):17-24.
- Brentani, H., Caballero, O. L., Camargo, A. A., da Silva, A. M., da Silva, W. A., Jr., Dias Neto, E., Grivet, M., Gruber, A., Guimaraes, P. E., Hide, W., Iseli, C., Jongeneel, C. V., Kelso, J., Nagai, M. A., Ojopi, E. P., Osorio, E. C., Reis, E. M., Riggins, G. J., Simpson, A. J., de Souza, S., Stevenson, B. J., Strausberg, R. L., Tajara, E. H., Verjovski-Almeida, S., Acencio, M. L., Bengtson, M. H., Bettoni, F., Bodmer, W. F., Briones, M. R., Camargo, L. P., Cavenee, W., Cerutti, J. M., Coelho Andrade, L. E., Costa dos Santos, P. C., Ramos Costa, M. C., da Silva, I. T., Estecio, M. R., Sa Ferreira, K., Furnari, F. B., Faria, M., Jr., Galante, P. A., Guimaraes, G. S., Holanda, A. J., Kimura, E. T., Leerkes, M. R., Lu, X., Maciel, R. M., Martins, E. A., Massirer, K. B., Melo, A. S., Mestriner, C. A., Miracca, E. C., Miranda, L. L., Nobrega, F. G., Oliveira, P. S., Paquola, A. C., Pandolfi, J. R., Campos Pardini, M. I., Passetti, F., Quackenbush, J., Schnabel, B., Sogayar, M. C., Souza, J. E., Valentini, S. R., Zaiats, A. C., Amaral, E. J., Arnaldi, L. A., de Araujo, A. G., de Bessa, S. A., Bicknell, D. C., Ribeiro de Camaro, M. E., Carraro, D. M., Carrer, H., Carvalho, A. F., Colin, C., Costa, F., Curcio, C., Guerreiro da Silva, I. D., Pereira da Silva, N., Dellamano, M., El-Dorry, H., Espreafico, E. M., Scattone Ferreira, A. J., Ayres Ferreira, C., Fortes, M. A., Gama, A. H., Giannella-Neto, D., Giannella, M. L., Giorgi, R. R., Goldman, G. H., Goldman, M. H., Hackel, C., Ho, P. L., Kimura, E. M., Kowalski, L. P., Krieger, J. E., Leite, L. C., Lopes, A., Luna, A. M., Mackay, A., et al., 2003, The generation and utilization of a cancer-oriented representation of the human transcriptome by using expressed sequence tags, *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(23):13418-23.

- Burbee, D. G., Forgacs, E., Zochbauer-Muller, S., Shivakumar, L., Fong, K., Gao, B., Randle, D., Kondo, M., Virmani, A., Bader, S., Sekido, Y., Latif, F., Milchgrub, S., Toyooka, S., Gazdar, A. F., Lerman, M. I., Zbarovsky, E., White, M., and Minna, J. D., 2001, Epigenetic inactivation of RASSF1A in lung and breast cancers and malignant phenotype suppression, *J Natl Cancer Inst* **93**(9):691-9.
- Caporaso, N., 2003, The molecular epidemiology of oxidative damage to DNA and cancer, *J Natl Cancer Inst* **95**(17):1263-5.
- Caputi, M., Groeger, A. M., Esposito, V., De Luca, A., Masciullo, V., Mancini, A., Baldi, F., Wolner, E., and Giordano, A., 2002, Loss of pRb2/p130 expression is associated with unfavorable clinical outcome in lung cancer, *Clin Cancer Res* **8**(12):3850-6.
- Chen, J. J., Peck, K., Hong, T. M., Yang, S. C., Sher, Y. P., Shih, J. Y., Wu, R., Cheng, J. L., Roffler, S. R., Wu, C. W., and Yang, P. C., 2001, Global analysis of gene expression in invasion by a lung cancer model, *Cancer Res* **61**(13):5223-30.
- Christie, M. J., 1995, Molecular and functional diversity of K⁺ channels, *Clin Exp Pharmacol Physiol* **22**(12):944-51.
- Chung, C. H., Bernard, P. S., and Perou, C. M., 2002, Molecular portraits and the family tree of cancer, *Nat Genet* **32** **Suppl**:533-40.
- Coultas, D. B., and Samet, J. M., 1992, Occupational lung cancer, *Clin Chest Med* **13**(2):341-54.
- Creighton, C., Kuick, R., Misek, D. E., Rickman, D. S., Brichory, F. M., Rouillard, J. M., Omenn, G. S., and Hanash, S., 2003, Profiling of pathway-specific changes in gene expression following growth of human cancer cell lines transplanted into mice, *Genome Biol* **4**(7):R46.
- De Wever, O., and Mareel, M., 2003, Role of tissue stroma in cancer cell invasion, *J Pathol* **200**(4):429-47.
- DeRisi, J., Penland, L., Brown, P. O., Bittner, M. L., Meltzer, P. S., Ray, M., Chen, Y., Su, Y. A., and Trent, J. M., 1996, Use of a cDNA microarray to analyse gene expression patterns in human cancer, *Nat Genet* **14**(4):457-60.
- Doll, R., and Hill, A. B., 1950, Smoking and carcinoma of the lung, *BMJ* **2**:739-748.
- Dolly, J. O., and Parcej, D. N., 1996, Molecular properties of voltage-gated K⁺ channels, *J Bioenerg Biomembr* **28**(3):231-53.
- Eberwine, J., 1996, Amplification of mRNA populations using aRNA generated from immobilized oligo(dT)-T7 primed cDNA, *Biotechniques* **20**(4):584-91.
- Eberwine, J., Kacharina, J. E., Andrews, C., Miyashiro, K., McIntosh, T., Becker, K., Barrett, T., Hinkle, D., Dent, G., and Marciano, P., 2001, mRNA expression analysis of tissue sections and single cells, *J Neurosci* **21**(21):8310-4.
- Eickhoff, B., Korn, B., Schick, M., Poustka, A., and van der Bosch, J., 1999, Normalization of array hybridization experiments in differential gene expression analysis, *Nucleic Acids Res* **27**(22):e33.
- Eisen, M. B., Spellman, P. T., Brown, P. O., and Botstein, D., 1998, Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns, *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(25):14863-8.
- Feldman, A. L., Costouros, N. G., Wang, E., Qian, M., Marincola, F. M., Alexander, H. R., and Libutti, S. K., 2002, Advantages of mRNA amplification for microarray analysis, *Biotechniques* **33**(4):906-12, 914.

- Franklin, W. A., 2000, Diagnosis of lung cancer: pathology of invasive and preinvasive neoplasia, *Chest* **117**(4 Suppl 1):80S-89S.
- Frederiksen, C. M., Aaboe, M., Dyrskjot, L., Laurberg, S., Wolf, H., Orntoft, T. F., and Kruhoffer, M., 2003, Technical evaluation of cDNA microarrays, *APMIS Suppl* (109):96-101.
- Fromigue, O., Louis, K., Dayem, M., Milanini, J., Pages, G., Tartare-Deckert, S., Ponzio, G., Hofman, P., Barbry, P., Auberger, P., and Mari, B., 2003, Gene expression profiling of normal human pulmonary fibroblasts following coculture with non-small-cell lung cancer cells reveals alterations related to matrix degradation, angiogenesis, cell growth and survival, *Oncogene* **22**(52):8487-97.
- Gahmberg, C. G., Sekki, A., Kosunen, T. U., Holsti, L. R., and Makela, O., 1979, Induction of aryl hydrocarbon hydroxylase activity and pulmonary carcinoma, *Int J Cancer* **23**(3):302-5.
- Gao, L., Cheng, L., Zhou, J. N., Zhu, B. L., and Lu, Z. H., 2005, DNA microarray: a high throughput approach for methylation detection, *Colloids Surf B Biointerfaces* **40**(3-4):127-31.
- Garber, M. E., Troyanskaya, O. G., Schluens, K., Petersen, S., Thaesler, Z., Pacyna-Gengelbach, M., van de Rijn, M., Rosen, G. D., Perou, C. M., Whyte, R. I., Altman, R. B., Brown, P. O., Botstein, D., and Petersen, I., 2001, Diversity of gene expression in adenocarcinoma of the lung, *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(24):13784-9.
- Gemma, A., Takenaka, K., Hosoya, Y., Matuda, K., Seike, M., Kurimoto, F., Ono, Y., Uematsu, K., Takeda, Y., Hibino, S., Yoshimura, A., Shibuya, M., and Kudoh, S., 2001, Altered expression of several genes in highly metastatic subpopulations of a human pulmonary adenocarcinoma cell line, *Eur J Cancer* **37**(12):1554-61.
- Golub, T. R., Slonim, D. K., Tamayo, P., Huard, C., Gaasenbeek, M., Mesirov, J. P., Coller, H., Loh, M. L., Downing, J. R., Caligiuri, M. A., Bloomfield, C. D., and Lander, E. S., 1999, Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring, *Science* **286**(5439):531-7.
- Gordon, G. J., Richards, W. G., Sugarbaker, D. J., Jaklitsch, M. T., and Bueno, R., 2003, A prognostic test for adenocarcinoma of the lung from gene expression profiling data, *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **12**(9):905-10.
- Granjeaud, S., Bertucci, F., and Jordan, B. R., 1999, Expression profiling: DNA arrays in many guises, *Bioessays* **21**(9):781-90.
- Hardiman, G., 2002, Microarray technologies -- an overview. The University of California San Diego Extension, Bioscience, Microarray Technologies -- an overview, March 13-15, 2002, *Pharmacogenomics* **3**(3):293-7.
- Hecht, S. S., 2003, Tobacco carcinogens, their biomarkers and tobacco-induced cancer, *Nat Rev Cancer* **3**(10):733-44.
- Henderson, R. F., 1989, Symposium on lung cancer risk of exposure to radon, *Fundam Appl Toxicol* **13**(4):624-34.
- Hennes, S., Davey, M. W., Harvie, R. M., Banyer, J., Wasinger, V., Corthals, G., and Davey, R. A., 2004, Changes in gene expression associated with stable drug and radiation resistance in small cell lung cancer cells are similar to those caused by a single X-ray dose, *Radiat Res* **161**(5):495-503.

- Hommura, F., Furuuchi, K., Yamazaki, K., Ogura, S., Kinoshita, I., Shimizu, M., Moriuchi, T., Katoh, H., Nishimura, M., and Dosaka-Akita, H., 2002, Increased expression of beta-catenin predicts better prognosis in nonsmall cell lung carcinomas, *Cancer* **94**(3):752-8.
- Hong, T. M., Yang, P. C., Peck, K., Chen, J. J., Yang, S. C., Chen, Y. C., and Wu, C. W., 2000, Profiling the downstream genes of tumor suppressor PTEN in lung cancer cells by complementary DNA microarray, *Am J Respir Cell Mol Biol* **23**(3):355-63.
- Hubert, R. S., Vivanco, I., Chen, E., Rastegar, S., Leong, K., Mitchell, S. C., Madraswala, R., Zhou, Y., Kuo, J., Raitano, A. B., Jakobovits, A., Saffran, D. C., and Afar, D. E., 1999, STEAP: a prostate-specific cell-surface antigen highly expressed in human prostate tumors, *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(25):14523-8.
- Hughes, T. R., Marton, M. J., Jones, A. R., Roberts, C. J., Stoughton, R., Armour, C. D., Bennett, H. A., Coffey, E., Dai, H., He, Y. D., Kidd, M. J., King, A. M., Meyer, M. R., Slade, D., Lum, P. Y., Stepaniants, S. B., Shoemaker, D. D., Gachotte, D., Chakraburtt, K., Simon, J., Bard, M., and Friend, S. H., 2000, Functional discovery via a compendium of expression profiles, *Cell* **102**(1):109-26.
- IARC, 2004, Tobacco smoke and involuntary smoking, *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum* **83**:1-1438.
- Jett, J. R., Scott, W. J., Rivera, M. P., and Sause, W. T., 2003, Guidelines on treatment of stage IIIB non-small cell lung cancer, *Chest* **123**(1 Suppl):221S-225S.
- Jimenez, A. I., Fernandez, P., Dominguez, O., Dopazo, A., and Sanchez-Cespedes, M., 2003, Growth and molecular profile of lung cancer cells expressing ectopic LKB1: down-regulation of the phosphatidylinositol 3'-phosphate kinase/PTEN pathway, *Cancer Res* **63**(6):1382-8.
- Jones, M. H., Virtanen, C., Honjoh, D., Miyoshi, T., Satoh, Y., Okumura, S., Nakagawa, K., Nomura, H., and Ishikawa, Y., 2004, Two prognostically significant subtypes of high-grade lung neuroendocrine tumours independent of small-cell and large-cell neuroendocrine carcinomas identified by gene expression profiles, *Lancet* **363**(9411):775-81.
- Kacharina, J. E., Crino, P. B., and Eberwine, J., 1999, Preparation of cDNA from single cells and subcellular regions, *Methods Enzymol* **303**:3-18.
- Kaminski, S., Ahman, A., Rusc, A., Wojcik, E., and Malewski, T., 2005, MilkProtChip--a microarray of SNPs in candidate genes associated with milk protein biosynthesis--development and validation, *J Appl Genet* **46**(1):45-58.
- Kannan, K., Amariglio, N., Rechavi, G., and Givol, D., 2000, Profile of gene expression regulated by induced p53: connection to the TGF-beta family, *FEBS Lett* **470**(1):77-82.
- Kannan, K., Amariglio, N., Rechavi, G., Jakob-Hirsch, J., Kela, I., Kaminski, N., Getz, G., Domany, E., and Givol, D., 2001, DNA microarrays identification of primary and secondary target genes regulated by p53, *Oncogene* **20**(18):2225-34.
- Karjalainen, A., Anttila, S., Heikkila, L., Kyyronen, P., and Vainio, H., 1993, Lobe of origin of lung cancer among asbestos-exposed patients with or without diffuse interstitial fibrosis, *Scand J Work Environ Health* **19**(2):102-7.
- Kettunen, E., Anttila, S., Seppanen, J. K., Karjalainen, A., Edgren, H., Lindstrom, I., Salovaara, R., Nissen, A. M., Salo, J., Mattson, K., Hollmen, J., Knuutila, S., and

- Wikman, H., 2004, Differentially expressed genes in nonsmall cell lung cancer: expression profiling of cancer-related genes in squamous cell lung cancer, *Cancer Genet Cytogenet* **149**(2):98-106.
- Kikuchi, A., 2003, Tumor formation by genetic mutations in the components of the Wnt signaling pathway, *Cancer Sci* **94**(3):225-9.
- Kikuchi, T., Daigo, Y., Katagiri, T., Tsunoda, T., Okada, K., Kakiuchi, S., Zembutsu, H., Furukawa, Y., Kawamura, M., Kobayashi, K., Imai, K., and Nakamura, Y., 2003, Expression profiles of non-small cell lung cancers on cDNA microarrays: identification of genes for prediction of lymph-node metastasis and sensitivity to anti-cancer drugs, *Oncogene* **22**(14):2192-205.
- Kimura, N., Nagasaka, T., Murakami, J., Sasamoto, H., Murakami, M., Tanaka, N., and Matsubara, N., 2005, Methylation profiles of genes utilizing newly developed CpG island methylation microarray on colorectal cancer patients, *Nucleic Acids Res* **33**(5):e46.
- Kouri, R. E., McKinney, C. E., Slomiany, D. J., Snodgrass, D. R., Wray, N. P., and McLemore, T. L., 1982, Positive correlation between high aryl hydrocarbon hydroxylase activity and primary lung cancer as analyzed in cryopreserved lymphocytes, *Cancer Res* **42**(12):5030-7.
- Lader, A. S., Ramoni, M. F., Zetter, B. R., Kohane, I. S., and Kwiatkowski, D. J., 2004, Identification of a transcriptional profile associated with in vitro invasion in non-small cell lung cancer cell lines, *Cancer Biol Ther* **3**(7):624-31.
- Levin, M. L., Goldstein, H., and Gerhardt, P. R., 1950, Cancer and tobacco smoking: a preliminary report, *JAMA* **143**:336-338.
- Li, Y., Li, T., Liu, S., Qiu, M., Han, Z., Jiang, Z., Li, R., Ying, K., Xie, Y., and Mao, Y., 2004, Systematic comparison of the fidelity of aRNA, mRNA and T-RNA on gene expression profiling using cDNA microarray, *J Biotechnol* **107**(1):19-28.
- Liotta, L., and Petricoin, E., 2000, Molecular profiling of human cancer, *Nat Rev Genet* **1**(1):48-56.
- Lockhart, D. J., and Winzeler, E. A., 2000, Genomics, gene expression and DNA arrays, *Nature* **405**(6788):827-36.
- Luo, L., Salunga, R. C., Guo, H., Bittner, A., Joy, K. C., Galindo, J. E., Xiao, H., Rogers, K. E., Wan, J. S., Jackson, M. R., and Erlander, M. G., 1999, Gene expression profiles of laser-captured adjacent neuronal subtypes, *Nat Med* **5**(1):117-22.
- Manda, R., Kohno, T., Niki, T., Yamada, T., Takenoshita, S., Kuwano, H., and Yokota, J., 2000, Differential expression of the LAMB3 and LAMC2 genes between small cell and non-small cell lung carcinomas, *Biochem Biophys Res Commun* **275**(2):440-5.
- McDoniels-Silvers, A. L., Stoner, G. D., Lubet, R. A., and You, M., 2002, Differential expression of critical cellular genes in human lung adenocarcinomas and squamous cell carcinomas in comparison to normal lung tissues, *Neoplasia* **4**(2):141-50.
- Menard, H., Noel, L., Khorami, J., Jouve, J. L., and Dunnigan, J., 1986, The adsorption of polyaromatic hydrocarbons on natural and chemically modified asbestos fibers, *Environ Res* **40**(1):84-91.
- Mitsuuchi, Y., and Testa, J. R., 2002, Cytogenetics and molecular genetics of lung cancer, *Am J Med Genet* **115**(3):183-8.

- Mohr, S., Bottin, M. C., Lannes, B., Neuville, A., Bellocq, J. P., Keith, G., and Rihn, B. H., 2004, Microdissection, mRNA amplification and microarray: a study of pleural mesothelial and malignant mesothelioma cells, *Biochimie* **86**(1):13-9.
- Mountain, C. F., 2000, The international system for staging lung cancer, *Semin Surg Oncol* **18**(2):106-15.
- Nacht, M., Dracheva, T., Gao, Y., Fujii, T., Chen, Y., Player, A., Akmaev, V., Cook, B., Dufault, M., Zhang, M., Zhang, W., Guo, M., Curran, J., Han, S., Sidransky, D., Buetow, K., Madden, S. L., and Jen, J., 2001, Molecular characteristics of non-small cell lung cancer, *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(26):15203-8.
- Niklinska, W., Chyczewski, L., Laudanski, J., Sawicki, B., and Niklinski, J., 2001, Detection of P53 abnormalities in non-small cell lung cancer by yeast functional assay, *Folia Histochem Cytobiol* **39**(2):147-8.
- Novoradovskaya, N., Whitfield, M. L., Basehore, L. S., Novoradovsky, A., Pesich, R., Usary, J., Karaca, M., Wong, W. K., Aprelikova, O., Fero, M., Perou, C. M., Botstein, D., and Braman, J., 2004, Universal Reference RNA as a standard for microarray experiments, *BMC Genomics* **5**(1):20.
- Pabon, C., Modrusan, Z., Ruvolo, M. V., Coleman, I. M., Daniel, S., Yue, H., and Arnold, L. J., Jr., 2001, Optimized T7 amplification system for microarray analysis, *Biotechniques* **31**(4):874-9.
- Peng, Z. M., Tang, F. Q., and Wu, E. S., 2004, [Study of gene expression difference in lung carcinogenesis by cDNA microarray], *Ai Zheng* **23**(2):150-4.
- Persidis, A., 1999, Cancer multidrug resistance, *Nat Biotechnol* **17**(1):94-5.
- Petersen, I., and Petersen, S., 2001, Towards a genetic-based classification of human lung cancer, *Anal Cell Pathol* **22**(3):111-21.
- Petty, R. D., Nicolson, M. C., Kerr, K. M., Collie-Duguid, E., and Murray, G. I., 2004, Gene expression profiling in non-small cell lung cancer: from molecular mechanisms to clinical application, *Clin Cancer Res* **10**(10):3237-48.
- Phimister, B., 1999, A note on nomenclature, *Nature Genetics Supplement* **21**(1).
- Poffijn, A., Mak, R., Van Hoorne, M., Weynants, P., and Prignot, J., 1989, Indoor radon exposure and lung cancer in Belgium, *Arch Belg* **47**(1-4):104-6.
- Polacek, D. C., Passerini, A. G., Shi, C., Francesco, N. M., Manduchi, E., Grant, G. R., Powell, S., Bischof, H., Winkler, H., Stoeckert, C. J., Jr., and Davies, P. F., 2003, Fidelity and enhanced sensitivity of differential transcription profiles following linear amplification of nanogram amounts of endothelial mRNA, *Physiol Genomics* **13**(2):147-56.
- Pulling, L. C., Vuilleminot, B. R., Hutt, J. A., Devereux, T. R., and Belinsky, S. A., 2004, Aberrant promoter hypermethylation of the death-associated protein kinase gene is early and frequent in murine lung tumors induced by cigarette smoke and tobacco carcinogens, *Cancer Res* **64**(11):3844-8.
- Quackenbush, J., 2002, Microarray data normalization and transformation, *Nat Genet* **32** **Suppl**:496-501.
- Raychaudhuri, S., Stuart, J. M., and Altman, R. B., 2000, Principal components analysis to summarize microarray experiments: application to sporulation time series, *Pac Symp Biocomput*:455-66.
- Reizer, J., Reizer, A., and Saier, M. H., Jr., 1993, The MIP family of integral membrane channel proteins: sequence comparisons, evolutionary relationships, reconstructed

- pathway of evolution, and proposed functional differentiation of the two repeated halves of the proteins, *Crit Rev Biochem Mol Biol* **28**(3):235-57.
- Robinson, L. A., Wagner, H., Jr., and Ruckdeschel, J. C., 2003, Treatment of stage IIIA non-small cell lung cancer, *Chest* **123**(1 Suppl):202S-220S.
- Roscoe, R. J., Steenland, K., Halperin, W. E., Beaumont, J. J., and Waxweiler, R. J., 1989, Lung cancer mortality among nonsmoking uranium miners exposed to radon daughters, *Jama* **262**(5):629-33.
- Rosell, R., Felip, E., Garcia-Campelo, R., and Balana, C., 2004, The biology of non-small-cell lung cancer: identifying new targets for rational therapy, *Lung Cancer* **46**(2):135-48.
- Saeed, A. I., Sharov, V., White, J., Li, J., Liang, W., Bhagabati, N., Braisted, J., Klapa, M., Currier, T., Thiagarajan, M., Sturn, A., Snuffin, M., Rezantsev, A., Popov, D., Ryltsov, A., Kostukovich, E., Borisovsky, I., Liu, Z., Vinsavich, A., Trush, V., and Quackenbush, J., 2003, TM4: a free, open-source system for microarray data management and analysis, *Biotechniques* **34**(2):374-8.
- Samet, J. M., 1989, Radon and lung cancer, *J Natl Cancer Inst* **81**(10):745-57.
- Savonet, V., Maenhaut, C., Miot, F., and Pirson, I., 1997, Pitfalls in the use of several "housekeeping" genes as standards for quantitation of mRNA: the example of thyroid cells, *Anal Biochem* **247**(1):165-7.
- Schena, M., 2000, Microarray Biochip Technology, Eaton Pub Co.
- Schena, M., Shalon, D., Davis, R. W., and Brown, P. O., 1995, Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray, *Science* **270**(5235):467-70.
- Schraders, M., Pfundt, R., Straatman, H. M., Janssen, I. M., van Kessel, A. G., Schoenmakers, E. F., van Krieken, J. H., and Groenen, P. J., 2005, Novel chromosomal imbalances in mantle cell lymphoma detected by genome-wide array-based comparative genomic hybridization, *Blood* **105**(4):1686-93.
- Shields, W., 2000, Pathology of Carcinoma of the Lung, *General Thoracic Surgery*:1251 - 1256.
- Shields, W., 2000, Pathology of Carcinoma of the Lung, in: *General Thoracic Surgery*, pp. 1251-1256.
- Shoji, T., Tanaka, F., Takata, T., Yanagihara, K., Otake, Y., Hanaoka, N., Miyahara, R., Nakagawa, T., Kawano, Y., Ishikawa, S., Katakura, H., and Wada, H., 2002, Clinical significance of p21 expression in non-small-cell lung cancer, *J Clin Oncol* **20**(18):3865-71.
- Singhal, S., Amin, K. M., Krukltis, R., Marshall, M. B., Kucharczuk, J. C., DeLong, P., Litzky, L. A., Kaiser, L. R., and Albelda, S. M., 2003, Differentially expressed apoptotic genes in early stage lung adenocarcinoma predicted by expression profiling, *Cancer Biol Ther* **2**(5):566-71.
- Smythe, W. R., 2003, Treatment of stage I non-small cell lung carcinoma, *Chest* **123**(1 Suppl):181S-187S.
- Song, S., MacLachlan, T. K., Meng, R. D., and El-Deiry, W. S., 1999, Comparative gene expression profiling in response to p53 in a human lung cancer cell line, *Biochem Biophys Res Commun* **264**(3):891-5.
- t Hoen, P. A., de Kort, F., van Ommen, G. J., and den Dunnen, J. T., 2003, Fluorescent labelling of cRNA for microarray applications, *Nucleic Acids Res* **31**(5):e20.

- Tada, Y., Wada, M., Taguchi, K., Mochida, Y., Kinugawa, N., Tsuneyoshi, M., Naito, S., and Kuwano, M., 2002, The association of death-associated protein kinase hypermethylation with early recurrence in superficial bladder cancers, *Cancer Res* **62**(14):4048-53.
- Tanaka, F., Ishikawa, S., Yanagihara, K., Miyahara, R., Kawano, Y., Li, M., Otake, Y., and Wada, H., 2002, Expression of angiopoietins and its clinical significance in non-small cell lung cancer, *Cancer Res* **62**(23):7124-9.
- Tang, X., Khuri, F. R., Lee, J. J., Kemp, B. L., Liu, D., Hong, W. K., and Mao, L., 2000, Hypermethylation of the death-associated protein (DAP) kinase promoter and aggressiveness in stage I non-small-cell lung cancer, *J Natl Cancer Inst* **92**(18):1511-6.
- Tomiuk, S., and Hofmann, K., 2001, Microarray probe selection strategies, *Brief Bioinform* **2**(4):329-40.
- Travis, W. D., Travis, L. B., and Devesa, S. S., 1995, Lung cancer, in: *Cancer*, pp. 191-202.
- Vainio, H., and Boffetta, P., 1994, Mechanisms of the combined effect of asbestos and smoking in the etiology of lung cancer, *Scand J Work Environ Health* **20**(4):235-42.
- Walz, T., Hirai, T., Murata, K., Heymann, J. B., Mitsuoka, K., Fujiyoshi, Y., Smith, B. L., Agre, P., and Engel, A., 1997, The three-dimensional structure of aquaporin-1, *Nature* **387**(6633):624-7.
- Wang, E., Miller, L. D., Ohnmacht, G. A., Liu, E. T., and Marincola, F. M., 2000, High-fidelity mRNA amplification for gene profiling, *Nat Biotechnol* **18**(4):457-9.
- Watson, A., Mazumder, A., Stewart, M., and Balasubramanian, S., 1998, Technology for microarray analysis of gene expression, *Curr Opin Biotechnol* **9**(6):609-14.
- Wigle, D. A., Jurisica, I., Radulovich, N., Pintilie, M., Rossant, J., Liu, N., Lu, C., Woodgett, J., Seiden, I., Johnston, M., Keshavjee, S., Darling, G., Winton, T., Breitkreutz, B. J., Jorgenson, P., Tyers, M., Shepherd, F. A., and Tsao, M. S., 2002, Molecular profiling of non-small cell lung cancer and correlation with disease-free survival, *Cancer Res* **62**(11):3005-8.
- Wistuba, II, Mao, L., and Gazdar, A. F., 2002, Smoking molecular damage in bronchial epithelium, *Oncogene* **21**(48):7298-306.
- Wittmann, B. M., Wang, N., and Montano, M. M., 2003, Identification of a novel inhibitor of breast cell growth that is down-regulated by estrogens and decreased in breast tumors, *Cancer Res* **63**(16):5151-8.
- Wong, C. W., Albert, T. J., Vega, V. B., Norton, J. E., Cutler, D. J., Richmond, T. A., Stanton, L. W., Liu, E. T., and Miller, L. D., 2004, Tracking the evolution of the SARS coronavirus using high-throughput, high-density resequencing arrays, *Genome Res* **14**(3):398-405.
- Vähiregister, 2003, Vähiaigestumus Eestis 2000, Eesti Vähiregister, Tallinn.
- Wynder, E. L., and Graham, E. A., 1950, Tobacco smoking as a possible etiologic factor in bronhiogenic carcinoma: a study of six hundred and eighty-four proved cases., *JAMA* **143**:329-336.
- Xu, L., Maresh, G. A., Giardina, J., and Pincus, S. H., 2004, Comparison of different microarray data analysis programs and description of a database for microarray data management, *DNA Cell Biol* **23**(10):643-51.

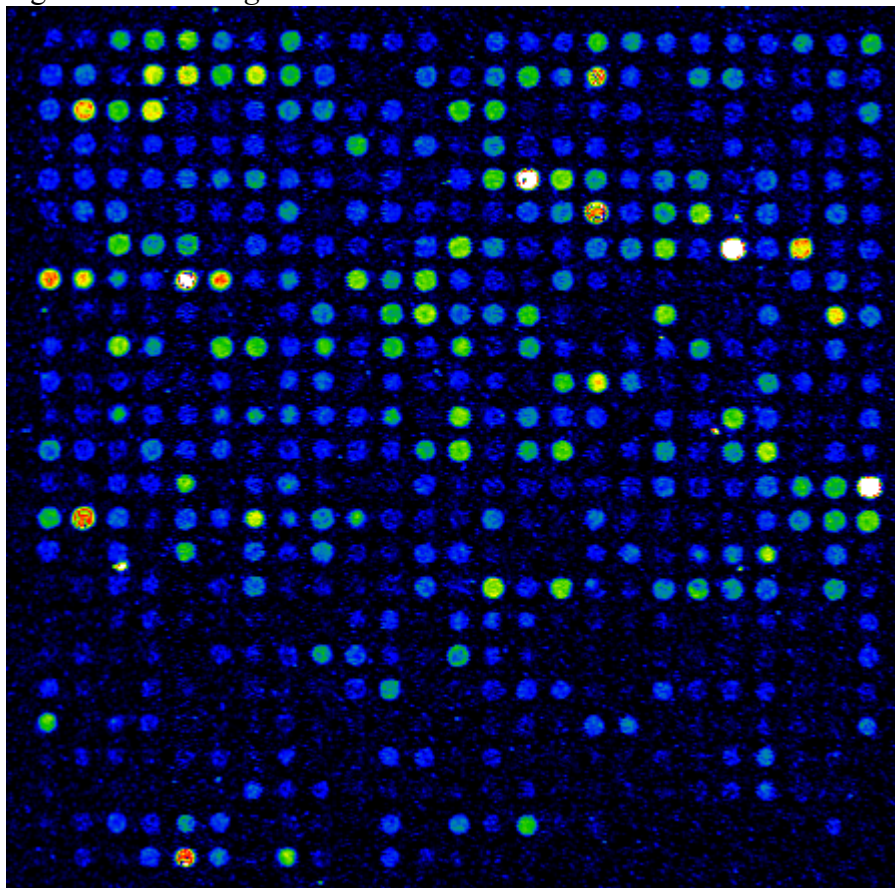
- Xu, X. L., Yu, J., Zhang, H. Y., Sun, M. H., Gu, J., Du, X., Shi, D. R., Wang, P., Yang, Z. H., and Zhu, J. D., 2004, Methylation profile of the promoter CpG islands of 31 genes that may contribute to colorectal carcinogenesis, *World J Gastroenterol* **10**(23):3441-54.
- Yamagata, N., Shyr, Y., Yanagisawa, K., Edgerton, M., Dang, T. P., Gonzalez, A., Nadaf, S., Larsen, P., Roberts, J. R., Nesbitt, J. C., Jensen, R., Levy, S., Moore, J. H., Minna, J. D., and Carbone, D. P., 2003, A training-testing approach to the molecular classification of resected non-small cell lung cancer, *Clin Cancer Res* **9**(13):4695-704.
- Yang, D., Holt, G. E., Velders, M. P., Kwon, E. D., and Kast, W. M., 2001, Murine six-transmembrane epithelial antigen of the prostate, prostate stem cell antigen, and prostate-specific membrane antigen: prostate-specific cell-surface antigens highly expressed in prostate cancer of transgenic adenocarcinoma mouse prostate mice, *Cancer Res* **61**(15):5857-60.
- Yang, I. V., Chen, E., Hasseman, J. P., Liang, W., Frank, B. C., Wang, S., Sharov, V., Saeed, A. I., White, J., Li, J., Lee, N. H., Yeatman, T. J., and Quackenbush, J., 2002, Within the fold: assessing differential expression measures and reproducibility in microarray assays, *Genome Biol* **3**(11):research0062.
- Yegnasubramanian, S., Kowalski, J., Gonzalgo, M. L., Zahurak, M., Piantadosi, S., Walsh, P. C., Bova, G. S., De Marzo, A. M., Isaacs, W. B., and Nelson, W. G., 2004, Hypermethylation of CpG islands in primary and metastatic human prostate cancer, *Cancer Res* **64**(6):1975-86.
- Yim, S. C., Park, H. G., Chang, H. N., and Cho, D. Y., 2005, Array-based mutation detection of BRCA1 using direct probe/target hybridization, *Anal Biochem* **337**(2):332-7.
- Yue, H., Eastman, P. S., Wang, B. B., Minor, J., Doctolero, M. H., Nuttall, R. L., Stack, R., Becker, J. W., Montgomery, J. R., Vainer, M., and Johnston, R., 2001, An evaluation of the performance of cDNA microarrays for detecting changes in global mRNA expression, *Nucleic Acids Res* **29**(8):E41-1.

9 Lisad

Lisa 1. Katsetes kasutatud mikrokiibi skeem.



Lisa 2. Väljavõte patsiendi nr. 56 mikrokiibi detekteerimisel saadud tif failist. Mikrokiibi lugemisel kasutati *gain* väärtust 50.



Lisa 3. Kasvajad alla ekspresseerunud geenid

Geeni nimi	Lokalisatsioon	Geeni annotatsioon
WIF1	12q14.3	<i>WNT proteins are extracellular signaling molecules involved in the control of embryonic development. This gene encodes a secreted protein, which binds WNT proteins and inhibits their activities. This protein contains a WNT inhibitory factor (WIF) domain and 5 epidermal growth factor (EGF)-like domains. It may be involved in mesoderm segmentation.</i>
SEPP1	5q31	<i>Selenoprotein P is an extracellular glycoprotein and is the only selenoprotein known to contain multiple selenocysteine residues. Two isoforms of this protein are Sep51 and Sep61. Sep51 lacks part of the C-terminal sequence. Selenoprotein P binds heparin and associates with endothelial cells. They are implicated as an oxidant defense in the extracellular space and in the transport of selenium.</i>
DAPK1	9q34.1	<i>Death-associated protein kinase 1 is a positive mediator of gamma-interferon induced programmed cell death. DAPK1 encodes a structurally unique 160-kD calmodulin dependent serine-threonine kinase that carries 8 ankyrin repeats and 2 putative P-loop consensus sites. It is a tumor suppressor candidate.</i>
TNFRSF10	3q26	<i>The protein encoded by this gene is a cytokine that belongs to the tumor necrosis factor (TNF) ligand family. This protein preferentially induces apoptosis in transformed and tumor cells, but does not appear to kill normal cells although it is expressed at a significant level in most normal tissues. This protein binds to several members of TNF receptor superfamily including TNFRSF10A/TRAILR1, TNFRSF10B/TRAILR2, TNFRSF10C/TRAILR3, TNFRSF10D/TRAILR4, and possibly also to TNFRSF11B/OPG. The activity of this protein may be modulated by binding to the decoy receptors TNFRSF10C/TRAILR3, TNFRSF10D/TRAILR4, and TNFRSF11B/OPG that cannot induce apoptosis. The binding of this protein to its receptors has been shown to trigger the activation of MAPK8/JNK, caspase 8, and caspase 3.</i>
COLEC12	18pter-p11.3	<i>This gene encodes a member of the C-lectin family, proteins that possess collagen-like sequences and carbohydrate recognition domains. This protein is a scavenger receptor, a cell surface glycoprotein that can bind to carbohydrate antigens on microorganisms facilitating their recognition and removal. In addition, these receptors can recognize oxidized phospholipids so they may also participate in removing oxidatively damaged or apoptotic cells. Two transcripts have been identified for this gene.</i>
PML	15q22	<i>The protein encoded by this gene is a member of the tripartite motif (TRIM) family. The TRIM motif includes three zinc-binding domains, a RING, a B-box type 1 and a B-box type 2, and a coiled-coil region. This phosphoprotein localizes to nuclear bodies where it functions as a transcription factor and tumor suppressor. Its expression is cell-cycle related and it regulates the p53 response to oncogenic signals. The gene is often involved in the translocation with the retinoic acid receptor alpha gene associated with acute promyelocytic leukemia (APL). Extensive alternative splicing of this gene results in several variations of the protein's central and C-terminal regions; all variants encode the same N-terminus. Fourteen transcript variants for this gene have been described; however, the full length nature of three of the variants has not been determined.</i>
EDIL3	5q14	<i>The protein encoded by this gene is an integrin ligand. It plays an important role in mediating angiogenesis and may be important in vessel wall remodeling and development. It also influences endothelial cell behavior.</i>
TNFAIP3	6q23	<i>This gene was identified as a gene whose expression is rapidly induced by the tumor necrosis factor (TNF). The protein encoded by this gene is a zinc finger protein, and has been shown to inhibit NF-kappa B activation as well as TNF-mediated apoptosis. Knockout studies of a similar gene in mice suggested that</i>

		<i>this gene is critical for limiting inflammation by terminating TNF-induced NF-kappa B responses.</i>
PDGFRA	4q11-q13	<i>This gene encodes a cell surface tyrosine kinase receptor for members of the platelet-derived growth factor family. These growth factors are mitogens for cells of mesenchymal origin. The identity of the growth factor bound to a receptor monomer determines whether the functional receptor is a homodimer or a heterodimer, composed of both platelet-derived growth factor receptor alpha and beta polypeptides. Studies in knockout mice, where homozygosity is lethal, indicate that the alpha form of the platelet-derived growth factor receptor is particularly important for kidney development since mice heterozygous for the receptor exhibit defective kidney phenotypes.</i>
EDG1	1p21	<i>The protein encoded by this gene is structurally similar to G protein-coupled receptors and is highly expressed in endothelial cells. It binds the ligand sphingosine-1-phosphate with high affinity and high specificity, and suggested to be involved in the processes that regulate the differentiation of endothelial cells. Activation of this receptor induces cell-cell adhesion.</i>
ALDH1A1	9q21.13	<i>This protein belongs to the aldehyde dehydrogenases family of proteins. Aldehyde dehydrogenase is the second enzyme of the major oxidative pathway of alcohol metabolism. Two major liver isoforms of this enzyme, cytosolic and mitochondrial, can be distinguished by their electrophoretic mobilities, kinetic properties, and subcellular localizations. Most Caucasians have two major isoforms, while approximately 50% of Orientals have only the cytosolic isoform, missing the mitochondrial isoform. A remarkably higher frequency of acute alcohol intoxication among Orientals than among Caucasians could be related to the absence of the mitochondrial isoform. This gene encodes a cytosolic isoform, which has a high affinity for aldehydes.</i>
EFEMP1	2p16	<i>This gene spans approximately 18 kb of genomic DNA and consists of 12 exons. Two transcripts with distinct 5' UTR have been described; the resulting proteins have distinct N-terminal amino acid sequences. Translation initiation from internal methionine residues was observed with in vitro translation. A signal peptide sequence is predicted for translation initiation sites 1, 2, and 4. The protein isoforms contain 5 or 6 calcium-binding EGF2 domains and 5 or 6 EGF2 domains. Mutations in this gene cause the retinal disease Malattia Leventinese.</i>
CRIM1	2p21	<i>Motor neurons are among the earliest neurons to appear after the commencement of cell patterning and the beginning of cell differentiation. Differentiation occurs in a ventral-to-dorsal gradient and is mediated, at least in part, by the concentration of ventrally expressed sonic hedgehog protein (SHH; MIM 600725). Dorsally expressed factors, such as members of the bone morphogenic protein (e.g., BMP4; MIM 112262) and transforming growth factor-beta (e.g., TGFBI; MIM 190180) families, can repress the induction of these neurons. CRIM1 may interact with growth factors implicated in motor neuron differentiation and survival (Kolle et al., 2000 [PubMed 10642437]).[supplied by OMIM]</i>
CCL18	17q11.2	<i>This gene is one of several Cys-Cys (CC) cytokine genes clustered on the q arm of chromosome 17. Cytokines are a family of secreted proteins involved in immunoregulatory and inflammatory processes. The CC cytokines are proteins characterized by two adjacent cysteines. The cytokine encoded by this gene displays chemotactic activity for naive T cells, CD4+ and CD8+ T cells and nonactivated lymphocytes, but not for monocytes or granulocytes. This chemokine attracts naive T lymphocytes toward dendritic cells and activated macrophages in lymph nodes. It may play a role in both humoral and cell-mediated immunity responses.</i>
PAG	8q21.13	<i>The protein encoded by this gene is a type III transmembrane adaptor protein that binds to the tyrosine kinase csk protein. It is thought to be involved in the</i>

		<i>regulation of T cell activation.</i>
PPP2CB	8p12-p11.2	<i>This gene encodes the phosphatase 2A catalytic subunit. Protein phosphatase 2A is one of the four major Ser/Thr phosphatases, and it is implicated in the negative control of cell growth and division. It consists of a common heteromeric core enzyme, which is composed of a catalytic subunit and a constant regulatory subunit, that associates with a variety of regulatory subunits. This gene encodes a beta isoform of the catalytic subunit. Two transcript variants encoding the same protein have been identified for this gene.</i>
TACC1	8p11	<i>The function of this gene has not yet been determined; however, it is speculated that it may represent a breast cancer candidate gene. It is located close to FGFR1 on a region of chromosome 8 that is amplified in some breast cancers.</i>
PTPNS1	20p13	<i>The protein encoded by this gene is a member of the signal-regulatory-protein (SIRP) family, and also belongs to the immunoglobulin superfamily. SIRP family members are receptor-type transmembrane glycoproteins known to be involved in the negative regulation of receptor tyrosine kinase-coupled signaling processes. This protein can be phosphorylated by tyrosine kinases. The phospho-tyrosine residues of this PTP have been shown to recruit SH2 domain containing tyrosine phosphatases (PTP), and serve as substrates of PTPs. This protein was found to participate in signal transduction mediated by various growth factor receptors. CD47 has been demonstrated to be a ligand for this receptor protein. This gene and its product share very high similarity with several other members of the SIRP family. These related genes are located in close proximity to each other on chromosome 20p13.</i>
PCNA	20pter-p12	<i>The protein encoded by this gene is found in the nucleus and is a cofactor of DNA polymerase delta. The encoded protein acts as a homotrimer and helps increase the processivity of leading strand synthesis during DNA replication. In response to DNA damage, this protein is ubiquitinated and is involved in the RAD6-dependent DNA repair pathway. Two transcript variants encoding the same protein have been found for this gene. Pseudogenes of this gene have been described on chromosome 4 and on the X chromosome.</i>
CAV2	7q31.1	<i>The protein encoded by this gene is a major component of the inner surface of caveolae, small invaginations of the plasma membrane, and is involved in essential cellular functions, including signal transduction, lipid metabolism, cellular growth control and apoptosis. This protein may function as a tumor suppressor. CAV1 and CAV2 are located next to each other on chromosome 7 and express colocalizing proteins that form a stable hetero-oligomeric complex. Two transcript variants encoding distinct isoforms have been identified for this gene. By using alternative initiation codons in the same reading frame, two isoforms (alpha and beta) are encoded by one transcript.</i>
ALOX5AP	13q12	<i>This gene encodes a protein which, with 5-lipoxygenase, is required for leukotriene synthesis. Leukotrienes are arachidonic acid metabolites which have been implicated in various types of inflammatory responses, including asthma, arthritis and psoriasis. This protein localizes to the plasma membrane. Inhibitors of its function impede translocation of 5-lipoxygenase from the cytoplasm to the cell membrane and inhibit 5-lipoxygenase activation.</i>
PAPPA	9q33.2	<i>This gene encodes a secreted metalloproteinase which cleaves insulin-like growth factor binding proteins (IGFBPs). It is thought to be involved in local proliferative processes such as wound healing and bone remodeling. Low plasma level of this protein has been suggested as a biochemical marker for pregnancies with aneuploid fetuses.</i>
REV1L	2q11.1-q11.2	<i>REV1L is the human homolog of the S. cerevisiae mutagenesis protein Rev1. The REV1 protein is conserved from yeast to humans. All REV1 proteins contain a BRCT domain, which is important in protein-protein interactions.[supplied by OMIM]</i>

DLC1	8p22	<i>This gene is deleted in the primary tumor of hepatocellular carcinoma. It maps to 8p22-p21.3, a region frequently deleted in solid tumors. It is suggested that this gene is a candidate tumor suppressor gene for human liver cancer, as well as for prostate, lung, colorectal, and breast cancers. Alternative splicing at this locus results in several transcript variants encoding different isoforms.</i>
IL8	4q13-q21	<i>The protein encoded by this gene is a member of the CXC chemokine family. This chemokine is one of the major mediators of the inflammatory response. This chemokine is secreted by several cell types. It functions as a chemoattractant, and is also a potent angiogenic factor. This gene is believed to play a role in the pathogenesis of bronchiolitis, a common respiratory tract disease caused by viral infection. This gene and other ten members of the CXC chemokine gene family form a chemokine gene cluster in a region mapped to chromosome 4q.</i>
AREG	4q13-q21	<i>The protein encoded by this gene is a member of the epidermal growth factor family. It is an autocrine growth factor as well as a mitogen for astrocytes, Schwann cells, and fibroblasts. It is related to epidermal growth factor (EGF) and transforming growth factor alpha (TGF-alpha). This protein interacts with the EGF/TGF-alpha receptor to promote the growth of normal epithelial cells and inhibits the growth of certain aggressive carcinoma cell lines. This encoded protein is associated with a psoriasis-like skin phenotype.</i>
SLPI	20q12	<i>This gene encodes a secreted inhibitor which protects epithelial tissues from serine proteases. It is found in various secretions including seminal plasma, cervical mucus, and bronchial secretions, and has affinity for trypsin, leukocyte elastase, and cathepsin G. Its inhibitory effect contributes to the immune response by protecting epithelial surfaces from attack by endogenous proteolytic enzymes; the protein is also thought to have broad-spectrum anti-biotic activity.</i>
TIMP3	22q12.1-q13.2	<i>This gene belongs to the TIMP gene family. The proteins encoded by this gene family are natural inhibitors of the matrix metalloproteinases, a group of peptidases involved in degradation of the extracellular matrix. The expression of this gene is induced in response to mitogenic stimulation and subject to cell cycle regulation. Mutations in this gene cause the autosomal dominant disorder Sorsby's fundus dystrophy.</i>
S100A8	1q21	<i>The protein encoded by this gene is a member of the S100 family of proteins containing 2 EF-hand calcium-binding motifs. S100 proteins are localized in the cytoplasm and/or nucleus of a wide range of cells, and involved in the regulation of a number of cellular processes such as cell cycle progression and differentiation. S100 genes include at least 13 members which are located as a cluster on chromosome 1q21. This protein may function in the inhibition of casein kinase and as a cytokine. Altered expression of this protein is associated with the disease cystic fibrosis.</i>
IL1RAP	3q28	<i>Interleukin 1 induces synthesis of acute phase and proinflammatory proteins during infection, tissue damage, or stress, by forming a complex at the cell membrane with an interleukin 1 receptor and an accessory protein. This gene encodes an interleukin 1 receptor accessory protein. Alternative splicing of this gene results in two transcript variants encoding two different isoforms, one membrane-bound and one soluble.</i>
IFNGR1	6q23-q24	<i>IFNGR1 encodes the ligand-binding chain (alpha) of the heterodimeric gamma interferon receptor. IFNGR2 encodes the non-ligand-binding partner of the heterodimeric receptor.</i>
CLIC4	1p36.11	<i>Chloride channels are a diverse group of proteins that regulate fundamental cellular processes including stabilization of cell membrane potential, transepithelial transport, maintenance of intracellular pH, and regulation of cell volume. Chloride intracellular channel 4 (CLIC4) protein, encoded by the CLIC4 gene, is a member of the p64 family; the gene is expressed in many</i>

		<i>tissues and exhibits a intracellular vesicular pattern in Panc-1 cells (pancreatic cancer cells).</i>
FOXP1	3p14.1	<i>This gene belongs to subfamily P of the forkhead box (FOX) transcription factor family. Forkhead box transcription factors play important roles in the regulation of tissue- and cell type-specific gene transcription during both development and adulthood. Forkhead box P1 protein contains both DNA-binding- and protein-protein binding-domains. This gene may act as a tumor suppressor as it is lost in several tumor types and maps to a chromosomal region (3p14.1) reported to contain a tumor suppressor gene(s). While several transcript variants may exist for this gene, the full-length nature of only one has been described to date.</i>
SOCS2	12q	<i>This gene encodes a member of the STAT-induced STAT inhibitor (SSI), also known as suppressor of cytokine signaling (SOCS), family. SSI family members are cytokine-inducible negative regulators of cytokine signaling. The expression of this gene can be induced by a subset of cytokines, including erythropoietin, GM-CSF, IL10 and interferon (IFN)-gamma. The protein encoded by this gene is found to interact with the cytoplasmic domain of insulin-like growth factor-1 receptor (IGF1R), and thus is thought to be involved in the regulation of IGF1R mediated cell signaling. Knockout studies in mice also suggested a regulatory role of this gene in IGF-1 related growth control.</i>
CYP4B1	1p34-p12	<i>This gene encodes a member of the cytochrome P450 superfamily of enzymes. The cytochrome P450 proteins are monooxygenases which catalyze many reactions involved in drug metabolism and synthesis of cholesterol, steroids and other lipids. This protein localizes to the endoplasmic reticulum. In rodents, the homologous protein has been shown to metabolize certain carcinogens; however, the specific function of the human protein has not been determined.</i>
XLKD1	11p15	<i>This gene encodes a type I integral membrane glycoprotein. The encoded protein acts as a receptor and binds to both soluble and immobilized hyaluronan. This protein may function in lymphatic hyaluronan transport and have a role in tumor metastasis.</i>
THBS1	15q15	<i>The protein encoded by this gene is a subunit of a disulfide-linked homotrimeric protein. This protein is an adhesive glycoprotein that mediates cell-to-cell and cell-to-matrix interactions. This protein can bind to fibrinogen, fibronectin, laminin, type V collagen and integrins alpha-V/beta-1. This protein has been shown to play roles in platelet aggregation, angiogenesis, and tumorigenesis.</i>
CDH5	16q22.1	<i>This gene is a classical cadherin from the cadherin superfamily and is located in a six-cadherin cluster in a region on the long arm of chromosome 16 that is involved in loss of heterozygosity events in breast and prostate cancer. The encoded protein is a calcium-dependent cell-cell adhesion glycoprotein comprised of five extracellular cadherin repeats, a transmembrane region and a highly conserved cytoplasmic tail. Functioning as a classic cadherin by imparting to cells the ability to adhere in a homophilic manner, the protein may play an important role in endothelial cell biology through control of the cohesion and organization of the intercellular junctions.</i>
TNFAIP3	6q23	<i>This gene was identified as a gene whose expression is rapidly induced by the tumor necrosis factor (TNF). The protein encoded by this gene is a zinc finger protein, and has been shown to inhibit NF-kappa B activation as well as TNF-mediated apoptosis. Knockout studies of a similar gene in mice suggested that this gene is critical for limiting inflammation by terminating TNF-induced NF-kappa B responses.</i>
TM4SF2	Xp11.4	<i>The protein encoded by this gene is a member of the transmembrane 4 superfamily, also known as the tetraspanin family. Most of these members are cell-surface proteins that are characterized by the presence of four</i>

		<i>hydrophobic domains. The proteins mediate signal transduction events that play a role in the regulation of cell development, activation, growth and motility. This encoded protein is a cell surface glycoprotein and may have a role in the control of neurite outgrowth. It is known to complex with integrins. This gene is associated with X-linked mental retardation and neuropsychiatric diseases such as Huntington's chorea, fragile X syndrome and myotonic dystrophy.</i>
TIMP3	22q12.1-q13.2	<i>This gene belongs to the TIMP gene family. The proteins encoded by this gene family are natural inhibitors of the matrix metalloproteinases, a group of peptidases involved in degradation of the extracellular matrix. The expression of this gene is induced in response to mitogenic stimulation and subject to cell cycle regulation. Mutations in this gene cause the autosomal dominant disorder Sorsby's fundus dystrophy.</i>
TEK	9p21	<i>The TEK receptor tyrosine kinase is expressed almost exclusively in endothelial cells in mice, rats, and humans. This receptor possesses a unique extracellular domain containing 2 immunoglobulin-like loops separated by 3 epidermal growth factor-like repeats that are connected to 3 fibronectin type III-like repeats. The ligand for the receptor is angiopoietin-1. Defects in TEK are associated with inherited venous malformations; the TEK signaling pathway appears to be critical for endothelial cell-smooth muscle cell communication in venous morphogenesis. TEK is closely related to the TIE receptor tyrosine kinase.</i>
IFNGR1	6q23-q24	<i>IFNGR1 encodes the ligand-binding chain (alpha) of the heterodimeric gamma interferon receptor. IFNGR2 encodes the non-ligand-binding partner of the heterodimeric receptor.</i>
BMP2	20p12	<i>BMP2 belongs to the transforming growth factor-beta (TGFB) superfamily. Bone morphogenic protein induces bone formation. BMP2 is a candidate gene for the autosomal dominant disease of fibrodysplasia (myositis) ossificans progressiva.</i>

Lisa 4. Kasvajaja üles ekspresseerunud geenid

Geeni nimi	Lokali- satsioon	Geeni annotatsioon
STEAP	7q21	<i>This gene is predominantly expressed in prostate tissue, and is found to be upregulated in multiple cancer cell lines. The gene product is predicted to be a six-transmembrane protein, and was shown to be a cell surface antigen significantly expressed at cell-cell junctions.</i>
UCHL1	4p14	<i>UCHL1 is a member of a gene family whose products hydrolyze small C-terminal adducts of ubiquitin to generate the ubiquitin monomer. Expression of UCHL1 is highly specific to neurons and to cells of the diffuse neuroendocrine system and their tumors. It is present in all neurons (Doran et al., 1983 [PubMed 6343558]).[supplied by OMIM]</i>
AKR1C3	10p15- p14	<i>This gene encodes a member of the aldo/keto reductase superfamily, which consists of more than 40 known enzymes and proteins. These enzymes catalyze the conversion of aldehydes and ketones to their corresponding alcohols by utilizing NADH and/or NADPH as cofactors. The enzymes display overlapping but distinct substrate specificity. This enzyme catalyzes the reduction of prostaglandin (PG) D₂, PGH₂ and phenanthrenequinone (PQ), and the oxidation of 9alpha,11beta-PGF₂ to PGD₂. It may play an important role in the pathogenesis of allergic diseases such as asthma, and may also have a role in controlling cell growth and/or differentiation. This gene shares high sequence identity with three other gene members and is clustered with those three genes at chromosome 10p15-p14</i>
TLR3	4q35	<i>The protein encoded by this gene is a member of the Toll-like receptor (TLR) family which plays a fundamental role in pathogen recognition and activation of innate immunity. TLRs are highly conserved from Drosophila to humans and share structural and functional similarities. They recognize pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) that are expressed on infectious agents, and mediate the production of cytokines necessary for the development of effective immunity. The various TLRs exhibit different patterns of expression. This receptor is most abundantly expressed in placenta and pancreas, and is restricted to the dendritic subpopulation of the leukocytes. It recognizes dsRNA associated with viral infection, and induces the activation of NF-kappaB and the production of type I interferons. It may thus play a role in host defense against viruses. Use of alternative polyadenylation sites to generate different length transcripts has been noted for this gene.</i>
C20orf114	20q11.21	<i>The protein encoded by this gene may be involved in the innate immune response to bacterial exposure in the mouth, nasal cavities, and lungs. The encoded protein is secreted and is a member of the BPI/LBP/PLUNC protein superfamily. This gene is found with other members of the superfamily in a cluster on chromosome 20.</i>