

DOI: 10.12731/2218-7405-2013-9-28

УДК 61

## ПОТЕНЦИАЛЬНАЯ РОЛЬ ЭПИГЕНЕТИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ В ИНАКТИВАЦИИ ГЕНА *DUSP9* ПРИ СВЕТЛОКЛЕТОЧНОЙ КАРЦИНОМЕ ПОЧКИ

Якубович Е.И., Лавникевич Д.М., Евтушенко В.И.

*DUSP9* относится к семейству биспецифических протеинфосфатаз, которые могут дефосфорилировать, и таким образом инактивировать различные MAP-киназы. *DUSP9* преимущественно экспрессируется в плаценте и эмбриональной печени. В постнатальный период экспрессия гена в основном происходит в почке. Ранее было показано, что уровень экспрессии *DUSP9* значительно снижен в ткани светлоклеточной карциномы почки. Целью данной работы является выяснение роли эпигенетических факторов, таких как метилирование ДНК и модификация гистонов, в регуляции тканеспецифичной экспрессии *DUSP9*. Используя метод COBRA, мы исследовали характер метилирования ДНК в промоторном и внутригенном районах *DUSP9* в различных тканях, отличающихся по экспрессии гена. Нами не было выявлено различий в метилировании геномных участков между тканями. Независимо от уровня транскрипции *DUSP9*, ДНК в геномном локусе во всех проанализированных тканях гипометилирована. Анализируя данные эпигеномных исследований ENCODE, была выявлена связь активности *DUSP9* с определенными модификациями гистонов в локусе гена. В клетках, в которых ген активен, хроматин связан с H3K4me3, в то время как в клетках, в которых ген не экспрессируется, хроматин ассоциирован с маркером репрессии H3K27me3. Таким образом, возможно, что активность гена *DUSP9* может регулироваться путем модификации гистонов.

**Ключевые слова:** DUSP9, светлоклеточная карцинома почки.

## **THE POTENTIAL ROLE EPIGENETIC FACTORS IN INACTIVATION GENE DUSP9 AT RENAL CELL CARCINOMA**

Yakubovich E.I., Lavnikovich D.M., Yevtushenko V.I.

DUSP9 is a member of the dual specificity protein phosphatase subfamily, which can dephosphorylate and thus inactivate the differential MAP-kinases. *DUSP9* is predominantly expressed in the placenta and fetal liver. Postnatal *DUSP9* expression is restricted by kidney. Recently it has been shown that the *DUSP9* expression is down regulated in clear cell renal cell carcinoma. The purpose of this study was to uncover the mechanism of the tissue-specific expression of *DUSP9*, focusing on its epigenetic regulation, including DNA methylation and histone methylation. We used methods COBRA to characterize *DUSP9* DNA methylation in subsets of cell tissues with differential expression. We found no DNA methylation differences in the *DUSP9* promoter and gene body regions between tissues. These gene regions are hypomethylated in all analyzed tissues independently of gene activity in these tissues. Our results are in agreement with ENCODE data. Using ENCODE chromatin immunoprecipitation data we found a correspondence between levels of H3K4 and H3K27 methylation and *DUSP9* transcription level. The histone H3 lysine 27 tri-methylation of *DUSP9* was enrichment in cells with repressed gene, and in cells with active gene the chromatin was associated with H3 lysine 4 tri-methylation. Thus, the histone modifications can regulate the *DUSP9* expression.

**Keywords:** DUSP9, renal cell carcinoma.

Светлоклеточная карцинома почки (СКП) является самым распространенным гистологическим вариантом в гетерогенной группе злокачественных опухолей почки (60-80%). Особенностью этой формы рака

является высокий метастатический потенциал, устойчивость к облучению и лекарственному воздействию. Несмотря на то, что за последние годы, благодаря новым методам визуальной диагностики, выросло количество случайно выявленных опухолей маленького размера, показатель общей смертности среди пациентов с СКП практически не изменился. По-видимому, опухоль приобретает потенцию к метастазированию на более ранних стадиях, когда она визуально еще не детектируется. Перспективным подходом для ранней диагностики и скрининга может быть использование молекулярных биомаркеров - характерных для определенного типа опухоли функционально-значимых молекулярных изменений, которые возможно оценить. В связи с этим выяснение молекулярных механизмов инициации и прогрессии светлоклеточной карциномы почки является одним из основных направлений биомедицинских исследований.

Одним из потенциальных биомаркеров светлоклеточной карциномы почки является ген *DUSP9*. Ранее рядом исследовательских групп, включая нашу, было показано, что характерной особенностью светлоклеточной карциномы почки является значительное снижение экспрессии гена *DUSP9* [1, 2, 17]. По-видимому, потеря функции гена происходит на самых ранних этапах канцерогенеза, и является одной из значимых мутаций, ассоциированных с возникновением опухоли [3]. *DUSP9* входит в семейство биспецифических протеинфосфатаз MAP-киназ (МКР). МКР инактивируют MAP-киназы (ERK, JNK и p38), ключевые молекулы MAPK-сигнальных каскадов, путем одновременного дефосфорилирования фосфотреониновых/фосфосериновых и фосфотирозиновых остатков [8]. Ген *DUSP9* имеет узкоспецифичный характер экспрессии, который изменяется в процессе развития. В эмбриональный период высокая транскрипционная активность гена выявляется только в плаценте и эмбриональной печени, а во взрослом организме - исключительно в почке [13]. Хотя детального исследования того, в каких именно клетках почки экспрессируется *DUSP9*, не проводилось, данные, опубликованные в работе

Hirota с соавторами, свидетельствуют о том, что ген активен в эпителии проксимального отдела трубочек, т.е. в тех клетках, из которых развивается светлоклеточная карцинома [5]. Какова физиологическая роль *DUSP9* в почке и каким образом потеря его функции может способствовать образованию опухоли, пока не известно. Исследования последних лет выявили ассоциацию гена с метаболическими путями, в частности с возникновением инсулинрезистентности [4,16]. На модели клеточных культур и экспериментальных животных продемонстрирована способность *DUSP9* проявлять свойства опухолевого супрессора [11]. Ген является ключевой молекулой, участвующей в поддержании плюрипотентного состояния эмбриональных клеток мыши [10]. В настоящее время практически ничего не известно о том, как осуществляется регуляция гена *DUSP9*. Знание молекулярных механизмов, обеспечивающих тканеспецифичный характер экспрессии, поможет понять причины нарушения работы гена. Кроме того, эти знания могут быть полезными для создания генотерапевтических систем под контролем промотора *DUSP9* для направленной доставки нуклеиновых кислот в клетки почки.

Известно, что эпигенетические изменения, включая метилирование ДНК и модификацию гистонов, являются ключевыми регуляторами тканеспецифичной экспрессии [14, 15].

Чтобы лучше понять регуляцию гена, участвующего в поддержании дифференциального фенотипа эпителия почки, мы проанализировали как соотносится экспрессия гена с метилированием ДНК в локусе гена и модификацией гистонов.

## **Материалы и методы**

**Образцы тканей.** Образцы тканей и органов были получены во время хирургических вмешательств, выполненных в клинике ФБГУ «РНЦ РХТ».

Образцы плаценты любезно предоставлены доктором Кузнецовой Т.В. из ФГБУ «НИИАГ» им. Д.О. Отта.

**Выделение ДНК и РНК.** ДНК из крови выделяли набором AXUPREP BLOOD GENOMIC DNA MINIPREP KIT (Axygen biosciences, США), согласно прилагаемой инструкции. Для выделения ДНК из тканей, ткань гомогенизировали в жидком азоте и лизировали при 50<sup>0</sup>С в течение ночи в буфере, содержащем 20мМ ТрисНСl рН 8.0, 5мМ ЭДТА рН 8.0, 100мМ NaCl, 1% SDS и протеиназу К (50 мкг/мл). После фенол-хлороформной экстракции ДНК осаждали спиртом и растворяли в воде.

Суммарную клеточную РНК выделяли стандартным методом с использованием кислого гуанидин-тиоцианата. После осаждения спиртом РНК растворяли в воде.

Концентрацию нуклеиновых кислот определяли спектрофотометрически. Качество препаратов оценивали по соотношению  $A_{260}/A_{280}$  и электрофорезом в 1% агарозном геле.

**ОТ-ПЦР.** Уровень мРНК в клетках оценивали методом полуколичественной ОТ-ПЦР. В качестве внутреннего стандарта при нормировании использовали ген домашнего хозяйства *бета-актин*. Синтез кДНК проводили в 25 мкл реакционной смеси следующего состава: 2 мкг суммарной РНК, 0.5 мкг олиго (dT)<sub>12-18</sub>, 5 мкл 5х буфера для обратной транскриптазы, 200 ед обратной транскриптазы MMLV («Promega»), по 500 мкМ каждого дНТФ, 25 ед ингибитора РНКаз («Promega»). Реакцию проводили 1,5 часа при 42<sup>0</sup>С. 1 мкл синтезированной кДНК использовали в реакции ПЦР, содержащей 2.5 мкл х1 буфера для Taq полимеразы без Mg (Литех), 0.25 ед. Taq-полимеразы («Литех»), 400 нМ каждого праймера, 200 мкМ каждого дНТФ, 1.5 мМ MgCl<sub>2</sub>. Для амплификации фрагмента гена *DUSP9* добавляли в реакцию DMSO (5% по объему). В работе были использованы следующие праймеры: *бета-актин*: 5'-TGCCACCACACCTTCTACAA-3' (прямой) и ACAGCGAGGCCAGGATGGAG-3' (обратный); *DUSP9*, 5'-

GTTCCGGTGGCGTTAGGCTG -3` (прямой) и 5`-  
CAGGTAGCCTTCCTCTCGCA -3` (обратный). Праймеры были подобраны к разным экзонам для того, чтобы дифференцировать геномный фрагмент от синтезированного на матрице кДНК. Реакцию проводили в амплификаторе AB 9700 (Applied Biosystems) по следующей программе: для актина-: 95<sup>0</sup>С, 1 мин; затем 25 циклов- 94<sup>0</sup>С, 30 сек; 55<sup>0</sup>С, 30 сек; 72<sup>0</sup>С, 30 сек. Заключительный цикл – 72<sup>0</sup>С 8 мин. Для *DUSP9*: 95<sup>0</sup>С, 3 мин; затем 35 циклов: 94<sup>0</sup>С, 1 мин; 60<sup>0</sup>С, 50 сек; 72<sup>0</sup>С, 2 мин. Заключительный цикл – 72<sup>0</sup>С 8 мин. После окончания реакции продукты ПЦР анализировали в 1,2%-ном агарозном геле.

**Анализ метилирования.** Для выделения ДНК клетки лизировали при 50<sup>0</sup>С в течение ночи в буфере, содержащем 20мМ ТрисНСl рН 8.0, 5мМ ЭДТА рН 8.0, 100мМ NaCl, 1% SDS и протеиназу К (50мкг/мл). После фенол-хлороформной экстракции ДНК осаждали спиртом и растворяли в воде. Бисульфитную модификацию проводили с использованием набора methylSEQrTM (Applied Biosystems), следуя рекомендациям производителя. Амплификацию модифицированной ДНК проводили в 2 раунда. 1 раунд: 2 мкл модифицированной ДНК вносили в реакционную смесь (общий объем 50 мкл), содержащую 5 мкл 10х буфера для Taq-полимеразы, 1.5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 200 мкМ каждого дНТФ, 400 нМ каждого праймера и 1 ед. Taq-полимеразы (Литех). Условия реакции: 95<sup>0</sup>С, 4 мин; затем 25 циклов - 95<sup>0</sup>С 30 сек, 60<sup>0</sup>С 50 сек, 72<sup>0</sup>С 1 мин. Заключительный цикл –72<sup>0</sup>С 4 мин. И использованные праймеры: для промоторного участка: BSP3-L, 5`-GTT GGG GTG TTA GTG TAG ATT TT-3` (прямой); BSP3-R 5`-AAA ACG CCA CTA CTA CAA CCT A-3` (обратный). Для внутригеномного участка: BSP5-F 5' -TTT AGT AGA AAG TGG ATT TGG TGG- 3' (прямой); BSP5-R 5' -TCA ATT TCC AAA ATC AAA ACT C- 3' (обратный). По окончании реакции 1 мкл из реакционной смеси использовали в качестве матрицы во втором раунде ПЦР. Состав реакционной смеси и программный режим 2-го раунда амплификации аналогичен 1-му раунду. Праймеры, используемые во втором раунде ПЦР: для промоторного участка:

BSP3-L-nested, 5'-AGA GAA TAG AGG TTT GTA GGT GG-3' (прямой), BSP3-R, 5'-AAA ACG CCA CTA CTA CAA CCT A-3' (обратный). Для внутригенного: BSP5-F-nested, 5'- TTG TGT TTT TGG TTA TGT GAT T- 3' (прямой); BSP5-R, 5'- TCA ATT TCC AAA ATC AAA ACT C- 3' (обратный). Специфичный ПЦР-продукт выделяли из легкоплавкой агарозы и анализировали.

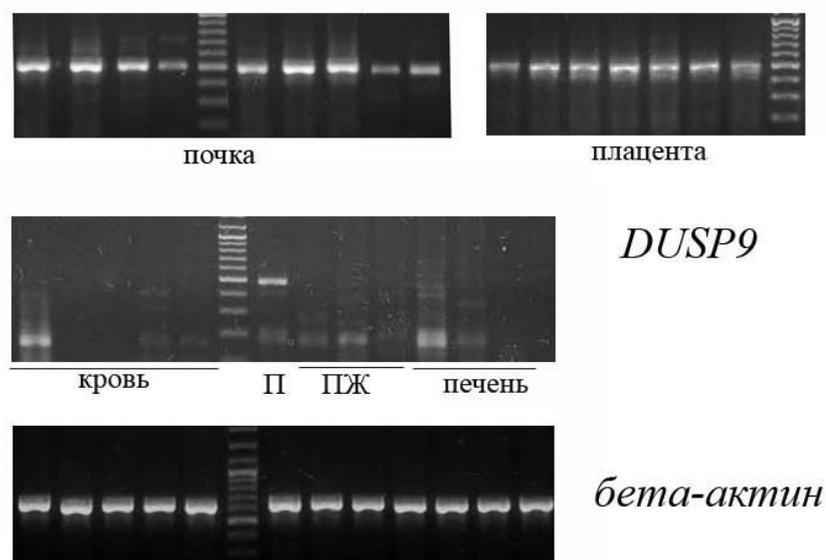
Для анализа метилирования по методу COBRA амплифицированные фрагменты гидролизовали рестриктазой Bsh1236I (BstUI) (Fermentas) и рестрикционную смесь разделяли электрофорезом в 6% полиакриламидном геле. Визуализацию фрагментов рестрикции проводили в ультрафиолетовом свете после окрашивания геля SYBR Green. Полноту конверсии оценивали гидролизом ампликонов HpaII.

**Биоинформационный анализ.** В работе использовали интернет-ресурсы базы данных NCBI и UCSC Genome Browser. В качестве референсной последовательности была выбрана нуклеотидная последовательность генома человека NC\_000023 (hg19, GRCh37).. Для подбора праймеров к исходной и модифицированным последовательностям использовали программы Primer-Blast и Methyl Primer Express V.1.0 (Applied Biosystems), соответственно.

### **Результаты и обсуждения**

Метилирование ДНК является ключевым механизмом регуляции активности генов. Чаще всего метилирование промоторного участка ассоциировано с репрессией гена, в то время как метилирование внутригенного района, так называемого «тела» гена, – с активацией [7,12]. Для того чтобы выяснить, не связана ли тканеспецифичная экспрессия *DUSP9* с дифференциальным метилированием ДНК, был исследован статус метилирования гена в промоторном участке и внутригенном районе в клетках с разной транскрипционной активностью *DUSP9*. Последовательности для анализа были выбраны на основе сведений о гене, представленных на сайте UCSC Genome Browser database (<http://genome.ucsc.edu>). В последовательности

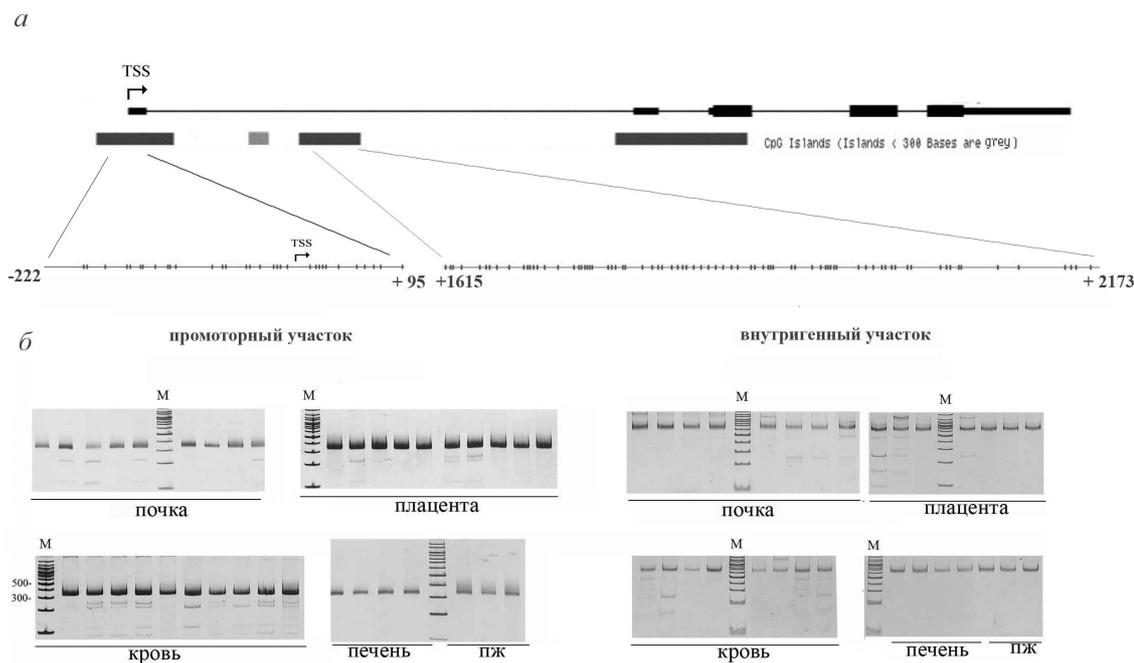
гена есть несколько CpG-островков (рис.2а). Один из них расположен рядом с сайтом инициации транскрипции, остальные – внутри гена. Мы исследовали статус метилирования ДНК в районе промоторного (-222/+95, TSS +1) и одного из внутригенных CpG-островков (+1615/+2173) в разных тканях и сопоставили результаты с экспрессией *DUSP9* в этих тканях. В работе были использованы следующие образцы тканей человека: печень (4 образца), простата (3), плацента (10), почки (10), кровь (10). Уровень мРНК гена в разных тканях был определен методом ОТ-ПЦР (рис.1).



**Рис. 1.** Экспрессия *DUSP9* в разных тканях.

ПЖ – предстательная железа; П – почка.

Как и ожидалось, согласно опубликованным данным, на высоком уровне *DUSP9* экспрессируется только в почке и плаценте, в остальных тканях транскрипции не выявлено. Далее был проанализирован статус метилирования фрагментов промоторного участка (длина 315 пар оснований) и внутригенного (536 п.о.) в различных тканях методом COBRA (рис.2а).



**Рис. 2.** Метилирование промоторного и внутригенного участков гена *DUSP9* в разных тканях

*a* – геномная локализация анализируемых фрагментов. TSS, точка инициации транскрипции. Вертикальными линиями отмечено положение CpG-сайтов. Указаны координаты анализируемых локусов относительно точки инициации транскрипции; *б* – паттерн метилирования геномных локусов в разных тканях; ПЖ – предстательная железа. М – маркер, 100 bp Plus DNA Ladder, Fermentas

Метод основан на том, что в присутствии бисульфита натрия неметилированные цитозины в ДНК превращаются в урацил, в то время как метилированные не подвергаются конверсии. После амплификации модифицированной ДНК урацил заменяется на тимин. Таким образом, в амплифицированном фрагменте, на месте цитозина, который был в исходной ДНК метилирован, останется цитозин, а вместо неметилированного нуклеотида появится тимин. Используя рестриктазы, в сайт узнавания которых входит динуклеотид CpG, можно дифференцировать метилированный сайт, который

сохранится, от неметилированного, который в ходе конверсии утратится. После амплификации бисульфитмодифицированной ДНК, ампликон гидролизовали рестриктазой BstU1. В промоторном фрагменте есть два сайта для этой эндонуклеазы, во внутригенном - 13. На рис. 2б приведены результаты анализа метилирования в разных тканях. В ткани печени и простаты метилированных аллелей не выявлено ни в одном из исследованных образцов. Различный характер метилирования в обоих участках выявлен в образцах плаценты, почки и крови, однако количество метилированных аллелей во всех случаях незначительно, и поэтому вряд ли может оказать влияние на уровень экспрессии гена в этих пробах. Вариабельность метилирования можно объяснить несколькими причинами. Это может отражать вариабельное метилирование данных участков среди доноров. С другой стороны, тканевые образцы очень гетерогенны по своему составу, и метилированные аллели могут быть ассоциированы с дифференциальным метилированием в разных типах клеток в образцах. Поскольку использованный нами метод позволяет определить статус метилирования только тех CpG-сайтов, которые узнаются рестриктазой BstU1, то на основании полученных данных нельзя исключить, что с активностью гена может быть связано метилирование других сайтов в исследованных локусах, либо что на транскрипцию гена влияет метилирование других участков генома.

Для более детального анализа особенностей метилирования локуса *DUSP9* в клетках с разной экспрессионной активностью, мы воспользовались базой данных изучения генома, представленной на сайте USCS Genome Browser. На этом сайте собраны результаты широкомасштабных исследований эпигенома человека, выполняемых в рамках проекта ENCODE (<http://genome.ucsc.edu/ENCODE/index.html>). Используя технологии секвенирования нового поколения Illumina (платформа на основе микрочипа Illumina 450K Infinium Array и Reduced Representation Bisulfite Sequencing (RRBS) был определен метилом различных типов клеток. Из базы результатов

были выбраны данные о метилировании генома в локусе расположения гена *DUSP9*. Мы сравнили профиль метилирования в районе гена *DUSP9* в разных тканях и клетках. Дополнительно к тканям, которые мы исследовали в работе, в анализ были включены клеточные линии, для которых в геномной базе есть данные по транскрипционной активности *DUSP9*: GM12878, HepG2, Hela-S3, K562, HUVEC, HSMM, NHEK и NHLF. На рис.3а представлен паттерн метилирования гена *DUSP9* в разных клетках. Результаты, полученные обоими методами секвенирования, аналогичны: независимо от экспрессионной активности гена, последовательность в районе *DUSP9* почти во всех тканях и клетках не метилирована, за исключением линии Hela-S3. В клетках этой линии выявлено гиперметилирование внутригенного участка. В связи с этим интересно было бы проверить, не является ли метилирование «тела» гена причиной активации экспрессии гена *DUSP9* в этих раковых клетках. Транскрипция генов является хроматин-зависимым процессом. Существует корреляция между определенными модификациями гистонов, изменяющими структуру хроматина, и активностью либо репрессией генов [9]. Считается, что из всех модификаций гистонов, метилирование гистоновых лизинов играет наиболее важную роль в эпигенетической регуляции генов [18]. С транскрипционной активностью гена ассоциировано триметилирование лизина 4 гистона H3 (H3K4me3). Маркером гетерохроматина и «молчащих» генов является триметилирование лизина 27 гистона H3 (H3K27me3). Мы проанализировали данные ENCODE по этим модификациям гистона в семи клеточных линиях с известным уровнем транскрипции *DUSP9* (рис.3б). Обнаружен разный паттерн гистоновой модификации в клетках с разной транскрипционной активностью. В клетках HepG2, Hela-S3 и K562, в которых ген экспрессируется, геномный локус связан с маркером активного хроматина H3K4me3, а в клетках GM12878, HUVEC, HSMM, NHEK и NHLF, в которых экспрессия гена подавлена, хроматин ассоциирован с H3K27me3, часто выявляемым в генах, находящихся в состоянии репрессии. На основании

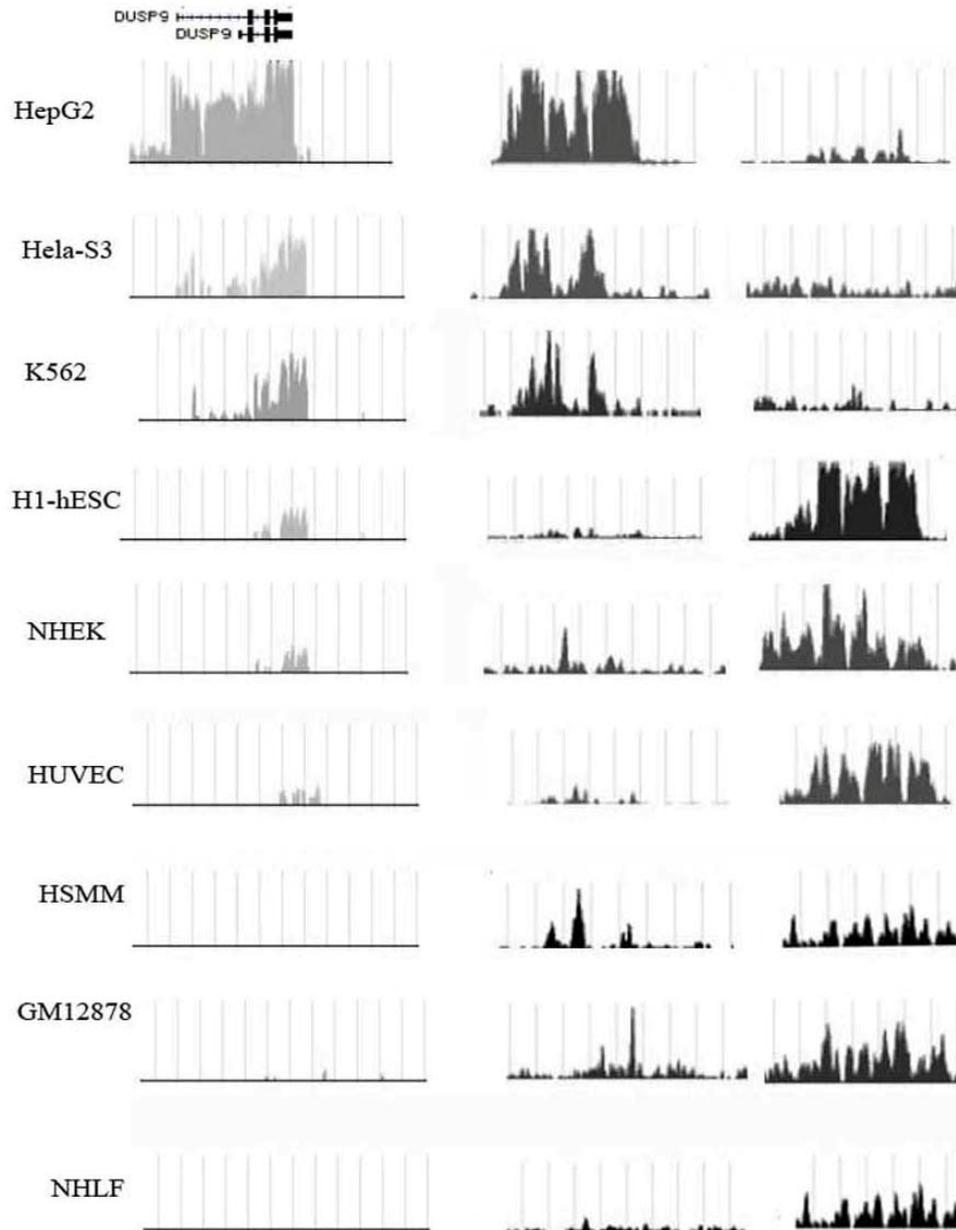
выявленной корреляции можно предположить, что экспрессия гена *DUSP9* может регулироваться путем модификацией гистонов.

*a*



б

Уровень транскрипции      H3K4m3      H3K27m3



**Рис. 3.** Эпигеномный профиль локуса гена *DUSP9* в разных типах тканей и клеток по данным ENCODE. *a* – статус метилирования ДНК в гене *DUSP9*.

Серым цветом отмечены неметилированные CpG-сайты, черным – метилированные. *б* – экспрессия *DUSP9* и паттерн модификации гистонов на участке гена *DUSP9* в различных клетках.

Таким образом, в данном исследовании была проанализирована роль эпигенетических факторов, включая метилирование ДНК и модификацию гистонов, в регуляции специфичной экспрессии гена *DUSP9* в разных клетках. Был использован подход, объединяющий собственные экспериментальные исследования и биоинформационный анализ данных об эпигенетических особенностях локуса гена *DUSP9* в разных типах клеток. Показано, что специфическая экспрессия гена *DUSP9* скорее всего не связана с дифференциальным метилированием ДНК. На основании анализа данных, представленных в ENCODE, установлена связь между экспрессией гена и определенными модификациями гистонов в локусе гена *DUSP9*. Это значит, что транскрипционная активность *DUSP9* может регулироваться на уровне структуры хроматина.

*Работа выполнена при финансовой поддержке Минобрнауки России в рамках ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007-2013 годы» с использованием оборудования ЦКП «Биотехнологический центр исследования экспрессии генома» ФГБУ РНЦРХТ Минздрава России в рамках государственного контракта № 14.512.11.0044.*

### **Список литературы**

1. Гранов А.М., Якубович Е.И., Евтушенко В.И. Множественный параллельный анализ экспрессии генов как инструмент молекулярной диагностики рака почки и предстательной железы // Медицинский Академический Журнал. 2006. Т.6. №1. С. 131-138.
2. Чебуркин Ю.В., Князева Т.Г., Петер Ш., и др. Молекулярный портрет карцином почки человека, полученный на основе экспрессии протеин-тирозинкиназ и тирозин-фосфатаз, контролирующих передачу регуляторных сигналов в клетках // Молекулярная биология. 2002. Т.36. №.3 С. 480-490.

3. Якубович Е.И., Евтушенко В.И. DUSP9 - новый driver-ген светлоклеточной карциномы почки? // Врач-аспирант 2012. №4.3 (53). С. 404-410.
4. Emanuelli B, Eberle D, Suzuki R, Kahn CR. Overexpression of the dual specificity phosphatase MKP-4/DUSP-9 protects against stress-induced insulin resistance // Proc Natl Acad Sci U S A. 2008. 105(9). P.3545-3550.
5. Hirota E, Yan L, Tsunoda T, Ashida Sh, et al. Genome-wide gene expression profiles of clear cell renal cell carcinoma: Identification of molecular targets for treatment of renal cell carcinoma // Int J oncology. 2006. V. 29. P.799-827.
6. Janzen NK, Kim HL, Figlin RA, Beldegrun AS. Surveillance after radical or partial nephrectomy for localized renal cell carcinoma and management of recurrent disease // Urol Clin North Am. 2003. V. 30. P.843-852.
7. Jones P.A. The DNA methylation paradox // Trends Genet. 1999. V.15. P. 34–37.
8. Keyse S.M. Dual-specificity MAP kinase phosphatases (MKPs) and cancer // Cancer Metastasis Rev. 2008. V.27(2). P.253-256.
9. Kouzarides T. Chromatin modifications and their function // Cell. 2007. V.128(4). P.693 –705.
10. Li Zh., Fei T., Zhang J, et al. BMP4 Signaling Acts via Dual-Specificity Phosphatase 9 to Control ERK Activity in Mouse Embryonic Stem Cells // Cell Stem Cell. 2012. V. 10 (2). P. 171–182.
11. Liu Y, Lagowski J, Sundholm A, Sundberg A, Kulesz-Martin M. Microtubule disruption and tumor suppression by mitogen-activated protein kinase phosphatase 4 // Cancer Res. 2007. V.67(22). P.10711-10719.
12. Maruyama R, Choudhury S, Kowalczyk A, Bessarabova M, Beresford-Smith B, et al. Epigenetic Regulation of Cell Type–Specific Expression Patterns in the Human Mammary Epithelium// PLoS Genet. 2011. V. 7(4): e1001369. doi:10.1371/journal.pgen.1001369

13. Muda M, Boschert U, Smith A, et al. Molecular cloning and functional characterization of a novel mitogen-activated protein kinase phosphatase, MKP-4 // *J Biol Chem*. 1997. V.272(8). P.5141-5151.

14. Ohgane J., Yagi S., and Shiota K. Epigenetics: the DNA methylation profile of tissue dependent and differentially methylated regions in cells// *Placenta*. 2008. 29 (Suppl A):S29-S35.

15. Shiota K DNA methylation profiles of CpG islands for cellular differentiation and development in mammals// *Cytogenet Genome Res*. 2004. V.10. P.325–334.

16. Voight BF, Scott LJ, Steinthorsdottir V, et al. Twelve type 2 diabetes susceptibility loci identified through large-scale association analysis // *Nat Genet*. 2010. V.42(7). P.579-589.

17. Wu S., Wang Y., Sun L., Zhang Z., et al. Decreased expression of dual-specificity phosphatase 9 is associated with poor prognosis in clear cell renal cell carcinoma// *BMC Cancer*. 2011. V. 11. P. 413-421.

18. Zhu B. and Reinberg D. Epigenetic inheritance: uncontested?// *Cell Res*. 2011. V.21(3). P. 435-441.

## References

1. Granov A.M., Yakubovich E.I., Evtushenko V.I. Mnozhestvennyy parallel'nyy analiz ekspressii genov kak instrument molekulyarnoy diagnostiki raka pochki i predstatel'noy zhelezy [Multiple parallel gene expression analysis as a tool for molecular diagnosis of kidney cancer and prostate cancer]. *Meditinskiy Akademicheskyy Zhurnal* [Academic Medical Journal] 6, no. 1 (2006): 131-138.

2. Cheburkin Yu.V., Knyazeva T.G., Peter Sh. et al. Molekulyarnyy portret kartsinom pochki cheloveka, poluchenny na osnove ekspressii protein-tirozin-kinaz i tirozin-fosfataz, kontroliruyushchikh peredachu regulyatornykh signalov v kletkakh [Molecular portrait of human renal cell carcinomas obtained by expression of protein tyrosine kinases and tyrosine phosphatases that control the transfer of regulatory

signals in the cells]. *Molekulyarnaya biologiya* [Molecular Biology] 36, no. 3 (2002): 480-490.

3. Yakubovich E.I., Evtushenko V.I. DUSP9 - novyy driver-gen svetlokletchnoy kartsinomy pochki? [DUSP9 - a new driver-gene clear cell renal carcinoma?]. *Vrach-aspirant*, no. 4.3 (2012): 404-410.

4. Emanuelli B, Eberle D, Suzuki R, Kahn CR. Overexpression of the dual specificity phosphatase MKP-4/DUSP-9 protects against stress-induced insulin resistance // *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008. 105(9). P.3545-3550.

5. Hirota E, Yan L, Tsunoda T, Ashida Sh, et al. Genome-wide gene expression profiles of clear cell renal cell carcinoma: Identification of molecular targets for treatment of renal cell carcinoma // *Int J oncology*. 2006. V. 29. P.799-827.

6. Janzen NK, Kim HL, Figlin RA, Beldegrun AS. Surveillance after radical or partial nephrectomy for localized renal cell carcinoma and management of recurrent disease // *Urol Clin North Am*. 2003. V. 30. P.843-852.

7. Jones P.A. The DNA methylation paradox // *Trends Genet*. 1999. V.15. P 34-37.

8. Keyse S.M. Dual-specificity MAP kinase phosphatases (MKPs) and cancer // *Cancer Metastasis Rev*. 2008. V.27(2). P.253-256.

9. Kouzarides T. Chromatin modifications and their function // *Cell*. 2007. V.128(4). P.693-705.

10. Li Zh., Fei T., Zhang J, et al. BMP4 Signaling Acts via Dual-Specificity Phosphatase 9 to Control ERK Activity in Mouse Embryonic Stem Cells // *Cell Stem Cell*. 2012. V. 10 (2). P. 171-182.

11. Liu Y, Lagowski J, Sundholm A, Sundberg A, Kulesz-Martin M. Microtubule disruption and tumor suppression by mitogen-activated protein kinase phosphatase 4 // *Cancer Res*. 2007. V.67(22). P.10711-10719.

12. Maruyama R, Choudhury S, Kowalczyk A, Bessarabova M, Beresford-Smith B, et al. Epigenetic Regulation of Cell Type-Specific Expression Patterns in

the Human Mammary Epithelium// PLoS Genet. 2011. V. 7(4): e1001369.  
doi:10.1371/journal.pgen.1001369

13. Muda M, Boschert U, Smith A, et al. Molecular cloning and functional characterization of a novel mitogen-activated protein kinase phosphatase, MKP-4 // J Biol Chem. 1997. V.272(8). P.5141-5151.

14. Ohgane J., Yagi S., and Shiota K. Epigenetics: the DNA methylation profile of tissue dependent and differentially methylated regions in cells// Placenta. 2008. 29 (Suppl A):S29-S35.

15. Shiota K DNA methylation profiles of CpG islands for cellular differentiation and development in mammals// Cytogenet Genome Res. 2004. V.10. P.325–334.

16. Voight BF, Scott LJ, Steinthorsdottir V, et al. Twelve type 2 diabetes susceptibility loci identified through large-scale association analysis // Nat Genet. 2010. V.42(7). P.579-589.

17. Wu S., Wang Y., Sun L., Zhang Z., et al. Decreased expression of dual-specificity phosphatase 9 is associated with poor prognosis in clear cell renal cell carcinoma// BMC Cancer. 2011. V. 11. P. 413-421.

18. Zhu B. and Reinberg D. Epigenetic inheritance: uncontested?// Cell Res. 2011. V.21(3). P. 435-441.

## **ДАнные ОБ АВТОРАХ**

**Якубович Елена Игоревна**, к.м.н., вед.н.с. лаборатории генной инженерии  
*Российский научный центр радиологии и хирургических технологий МЗ России*  
*Ленинградская ул., 70, пос. Песочный, г. Санкт-Петербург, 197758, Россия*

**Лавникевич Дмитрий Михайлович**, научный сотрудник лаборатории генной инженерии

*Российский научный центр радиологии и хирургических технологий МЗ России*  
*Ленинградская ул., 70, пос. Песочный, г. Санкт-Петербург, 197758, Россия*

**Евтушенко Владимир Иванович**, д.б.н., руководитель лаборатории генной инженерии

*Ленинградская ул., 70, пос. Песочный, г. Санкт-Петербург, 197758, Россия*

*Российский научный центр радиологии и хирургических технологий МЗ России*

*arxiator@mail.ru*

#### **DATA ABOUT THE AUTHORS**

**Yakubovich Elena Igorevna**, Candidate of Medical Sciences, Senior Research

*Russian Research Center of Radiology and Surgical Technologies of Ministry of Health of Russia*

*70, Leningradskaya Str., Pesochny, St. Petersburg, 197758, Russia*

**Lavnikovich Dmitry Mikhaylovich**, Research Associate

*Russian Research Center of Radiology and Surgical Technologies of Ministry of Health of Russia*

*70, Leningradskaya Str., Pesochny, St. Petersburg, 197758, Russia*

**Yevtushenko Vladimir Ivanovich**, Doctor of Biological Sciences

*Russian Research Center of Radiology and Surgical Technologies of Ministry of Health of Russia*

*70, Leningradskaya Str., Pesochny, St. Petersburg, 197758, Russia*

*arxiator@mail.ru*

**Рецензент:**

**Войтенков В.Б.**, к.м.н.