

Титов Л. П.

РЕГУЛЯЦИЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ И ЕЕ ОЦЕНКА МЕТОДОМ МИКРОЭРРЕЙ

*Республиканский научно-практический центр эпидемиологии
и микробиологии, г. Минск, Беларусь*

«Характерную черту науки составляет то,
что она требует сильной деятельности»

И. И. Мечников

Иммунология в целом и научные исследования в этой области в настоящее время претерпевают значительные концептуальные и методологические преобразования. Зародившись в конце XIX в. как новое направление в микробиологии, изучающее физиологические феномены противoinфекционной защиты человека, к 70-м гг. XX в. иммунология развилась в самостоятельную биомедицинскую и клиническую дисциплину, предметом изучения которой является иммунная система (органы, клетки, молекулы) и заболевания, обусловленные изменениями ее функций. Вместе с тем, механизмы и закономерности функционирования иммунной

системы, определяющие стабильность состояния здоровья индивидуума в течение жизни, равно как и разнообразных вариантов дизадаптации к факторам неблагоприятной окружающей среды и развития иммунопатологии, еще раскрыты недостаточно [4, 8, 9].

На кафедре микробиологии, вирусологии, иммунологии Белорусского государственного медицинского университета с момента ее организации Б. Я. Эльбертом (1923–1961 гг.) [3], а в последующие периоды возглавляемой А. П. Красильниковым (1962–1986 гг.) [5], Л. П. Титовым (1986–2005 гг.) [7] и Т. А. Канашковой (2005, настоящее время), успешно разрабатываются актуальные направления современной иммунологии.

Геном человека и иммунная система. В последние десятилетия все больше внимания уделяется изучению молекулярно-генетических механизмов и закономерностей функционирования генов иммунной системы [4, 11, 12, 15, 16]. Завершение в 2000 г. международного проекта «Геном человека» стало для всей мировой науки важным стимулом, открыло перспективы использования геномических данных с целью установления структуры и функции как отдельных генов иммунной системы, их комплексов (сетей), так и их белковых продуктов, реализующих многообразные иммунобиологические функции и процессы [8, 13, 16]. Геном человека включает около 23 000 генов, значительная часть которых детерминирует разнообразные семейства молекул иммунной системы, включая пути запуска и механизмы естественного и приобретенного иммунитета. Гены иммунной системы (ГИС) характеризуются полиморфизмом и высокой частотой мутаций, обеспечивая адаптацию человека к неблагоприятным факторам внешней среды и способность развивать высокоспецифичный и эффективный протективный противoinфекционный иммунитет. Ряд генов и генных локусов, кодирующих антигенраспознающие молекулы (рецепторы В- и Т-клеток), в процессе активации претерпевают рекомбинационные изменения (gene rearrangement) и соматический мутагенез, что обеспечивает значительное повышение разнообразия молекул [10]. Уровень, динамика экспрессии ГИС и концентрация их пептидных продуктов в тканях и жидкостях организма варьируют в физиологических пределах, но значительно меняются при инфекционных заболеваниях и патологических иммуновоспалительных состояниях (при одних возрастает в 1,5–5 раз, при других — в 100 и более раз, а при третьих снижается) [6, 10, 20]. В 2007 г. стартовал проект «Иммунологический геном» (ImmGen), объединяющий ученых 15 иммунологических и киберлабораторий, целью которого является разработка «дорожной карты» по изучению экспрессии генов популяциями и субпопуляциями иммунокомпетентных клеток (<http://ImmGen.org/protokols>) [17, 31].

Современный человек является результатом и продуктом многовековой эволюции, его геном включает не только совокупность генов, детер-

минирующих многочисленные функции и связи с окружающей средой, но и содержит огромную информационную базу эволюционных событий на уровне индивидуума, этнических групп и популяций людей, населяющих разные регионы планеты. Внутригеномные различия индивидов в популяции в среднем варьируют от 0,01 до 0,1 %. Подавляющее большинство генетических вариантов (аллелей) отдельных генов человека селективно нейтральны. Они указывают не столько на патогенетическую роль и ассоциацию с заболеваниями, сколько отражают природную сбалансированность/несбалансированность совокупности полиморфизмов с противоположными функциями (например, супрессоров/индукторов), прошедшими естественный отбор и закрепившимися в геноме [11, 18, 22, 27]. Большинство заболеваний человека являются полигенными. Однако некоторые гены могут иметь большее значение, например, гены ключевых рецепторов метаболических путей могут участвовать в генезе многих заболеваний. Так, ген рецептора витамина D принимает участие в транскрипции 900 генов, а ген рецептора гормона эстрогена — в экспрессии 6000 генов или 26 % генома человека. Для многих генов иммунной системы и их продуктов (цитокинов, их рецепторов) характерна плейотропность или множественность действия, часто разнонаправленного, компенсаторного и/или антагонистического [10, 15, 16]. Бум в области медицинской геномики наблюдается с 1990 гг., и в настоящее время это направление исследований входит в стадию стабильного развития, публикации растут в экспоненциальной прогрессии, иммунные эррей-технологии становятся доступными широкому кругу исследователей [29, 37]. В то время как геномика направлена на идентификацию роли генов в клеточных процессах посредством парадигмы трансформации мРНК в комплементарную ДНК (кДНК) и гибридизации на биочипе, целью функциональной геномики является идентификация роли химических/биологических мишеней, вовлекаемых в иммунологические процессы посредством парадигмы специфических механизмов клеточного и гуморального иммунного ответа, индуцируемого антигенами [28, 29].

Эпигенетическая регуляция экспрессии генов иммунной системы.

В многоклеточном организме регуляция экспрессии генов первостепенна для реализации и поддержания процессов и этапов специализации клеток (например, от стволовой полипотентной клетки до зрелых форм нейтрофилов, макрофагов, Т- и В-лимфоцитов). Различия между типами клеток объясняются дифференцированной экспрессией генов, т. е. экспрессией разных генов клетками с одним и тем же геномом. При этом нарушение паттернов экспрессии генов, детерминирующих определенный тип дифференцированных клеток, может привести к изменению их функциональной роли и быть причиной возникновения патологических состояний, включая сердечно-сосудистые, нейродегенеративные или даже злокачественные но-

вообразования. В организме человека существуют механизмы, поддерживающие стабильную репрессию одних генов и дерепрессию других на протяжении всей жизни. В то же время адаптивная регуляция активности генов, обеспечивает своевременное реагирование организма в ответ на меняющиеся условия внутренней и внешней среды [7, 22, 34].

Дезоксирибонуклеиновая кислота генома человека распределена в 23 парах хромосомах. Суммарно, в молекуле ДНК содержится около 3,3 млрд пар нуклеотидов. В ядрах дифференцированных клеток ДНК (гены) упакованы с молекулами белков и образуют хроматин, так что только небольшое число генов (менее 1 %) доступны для транскрипции. Суперспирализованный хроматин выполняет барьерную функцию, препятствует связыванию факторов транскрипции с участками ДНК и транскрипции. Большая часть основных белков хроматина представлена пятью типами гистонов (H1, H2a, H2b, H3, H4), которые имеют сайты связывания с ДНК и образуют нуклеосомы. Каждая нуклеосома состоит из ядра, образованного 8 белками, вокруг которого ДНК делает 1,65 оборота. В структуре хроматина различают участки с более конденсированным (гетерохроматин) и деспирализованным состоянием элементарных дезоксирибонуклеопротеидных нитей (эухроматин). Эухроматин — более релаксированное состояние хроматина, т. е. менее компактная форма, ДНК этой области менее метилирована, а гистоны более ацетилированы, гены доступны для экспрессии. Гетерохроматин, с другой стороны, более конденсированная форма, ДНК сильно метилирована, гистоны деацелированы, а гены выключены. В нуклеопротеидных комплексах с ДНК связано множество негистоновых белков — РНК-полимеразы, ДНК-топоизомеразы, белки-активаторы и белки-репрессоры транскрипции. Петли хроматина отдельных и разных хромосом располагаются в определенных участках ядра, обогащенных факторами транскрипции и РНК полимеразой. Молекулы РНК-полимеразы катализируют синтез всех типов РНК клетки. Разнообразие клеток и сложность клеточных процессов нуждается в большом разнообразии механизмов регуляции [1].

В структуре гена различают регуляторные и кодирующие белок последовательности. Кодирующий участок гена состоит из экзонов (кодируют мРНК) и интронов (не кодируют мРНК). Экзоны содержат точную инструкцию, какой по структуре должна быть мРНК, и в итоге тот или иной белок. Регуляторные последовательности (промоторы и энхансеры) определяют, какие регуляторные белки (транскрипционные факторы) способны взаимодействовать с ними и изменять активность гена. Промоторы — действующие регуляторные элементы, представлены короткими последовательностями нуклеотидов, с которыми связывается РНК-полимераза. Локализованные непосредственно перед кодирующим сиквенсом или более дистанционно, они инициируют экспрессию генов. Имеются различия в количестве, ориентации и расстоянии между промоторами разных генов.

Различают несколько типов цис-регуляторных элементов — ТАТА box (25–30 пар оснований), СААТbox (70–80 пар оснований), GCbox (110 пар оснований) и октамер — 120–130 пар оснований. Полиморфизм и наличие мутаций в промоторной области генов имеет гораздо большее значение для эффективной экспрессии, чем в белоккодирующей. Энхансеры — участки ДНК размером 10–20 пар оснований, присоединение к которым регуляторных белков усиливает скорость транскрипции [1].

Химическая модификация гистонов влияет на структуру хроматина и, соответственно, на экспрессию генов. Функция гистонов при конденсации-деконденсации ДНК регулируется биохимически через ацетилирование, метилирование и фосфорилирование. Ацетилирование гистонов осуществляется присоединением ацетильных групп к положительно заряженному лизину, инициирует транскрипцию. Метилирование оснований ДНК, наоборот, конденсирует хроматин и тормозит экспрессию генов. В ДНК животных метилировано от 2 до 7 % остатков цитидина. Фосфорилирование аминокислот гистонов также приводит к утрате структуры хроматина. Хотя эффекты метилирования/деметилирования изучены недостаточно, очевидна связь степени экспрессии генов с отсутствием в них метильных групп, способных стереохимически затруднять экспрессию. Ферменты, модифицирующие хроматин, контролируют экспрессию генов в участках эухроматина [1].

Роль факторов транскрипции. Транскрипция представляется наиболее важным этапом жизненного цикла мРНК. Она ответственна не только за синтез транскриптов, но также за 5' кэпирование, сплайсинг, 3' формирование поли-А хвоста, конвертацию пре-мРНК, трансляцию и деградацию, а также регулирует длину 5' и 3' нетранслируемых областей. Разные гены экспрессируются с разной интенсивностью в разные временные промежутки. Наивные В- и Т-лимфоциты, моноциты, макрофаги и дендритные клетки активируются сигналами, запускающими программу пролиферации и дифференциации субпопуляций клеток, в основе которой лежит усиление или угнетение экспрессии множества эффекторных и регуляторных генов [1, 34]. Для начала транскрипции белок-кодирующих генов РНК полимеразы нуждается в помощи специальных белков — факторов транскрипции (ФТ). Один из путей регуляции — взаимодействие факторов транскрипции, или транс-факторов, с цис-действующими элементами — регуляторными последовательностями, расположенными на той же двухцепочечной молекуле ДНК, что и регулируемый ген. Цис-элементы находятся поблизости от сайта инициации транскрипции в 5' направлении. Минимальный синтез любого белка поддерживается в том случае, если к ТАТА участку промотора присоединяется ТАТА-связывающий белок, факторы транскрипции и РНК-полимераза, т. е. инициирующий синтез определенного количества мРНК комплекс. Белки активаторы имеют два

домена, один для связывания с энхансером, а другой — с ДНК. В то же время, некоторые из ФТ функционируют как репрессоры и способны ингибировать функцию генов. Ряд из активаторов и репрессоров косвенно влияют на экспрессию генов, изменяя структуру хроматина. При комбинаторной активации генов контролирующие элементы активируются только в присутствии соответствующего белка-активатора. При скоординированной активации генов на разных хромосомах копии белка-активатора связываются с регуляторными элементами и вызывают транскрипцию [1, 34].

Известно, что в процесс активации иммунокомпетентных клеток вовлекаются протеин-киназы и кальций-зависимые сигнальные пути, включая тирозин и серин/треониновые киназы, фосфатазы, протеин-киназу С и кальциневрин [3]. Образование сигналов и их передача в ядро включает несколько этапов: 1) связывание активаторов с рецепторами клеток; 2) активация (фосфорилирование) Jak-киназ и цитокиновых рецепторов; 3) связывание фосфорилированными участками протеинкиназ и рецепторов цитокинов STAT-белков посредством SH2 доменов и переноса димеров STAT-белков в ядро; 4) взаимодействие димерных белков с ДНК. Следствием этих взаимодействий является вовлечение в ответную реакцию семейств факторов транскрипции — NF-κB, NF-AT, AP-1 и др. [3, 26], которые участвуют в активации транскрипции генов цитокинов (ИЛ-1, ИЛ-2, ИЛ-6, ФНО, КСФ и др.), ускоряют или ингибируют синтез мРНК. Проникая в ядро, STAT-1 активирует более 100 генов, участвующих в противовирусном, а выключение этого пути нарушает развитие иммунного ответа. При активации лимфоцитов синтез РНК увеличивается уже через 6 часов, через 24 часа ее количество удваивается, а через 96 часов ее концентрация возрастает еще в два раза. Ответ клеток на стимуляцию антигенами и митогенами характеризуется разной временной и клеточно-типичной динамикой и специфичностью синтеза мРНК и изменяется в значительных пределах (10–100 и более раз) [6, 21, 30]. На рис. 1 представлены этапы взаимодействия клетки с факторами внешней среды и реализация генетической программы в рамках центральной догмы молекулярной биологии.

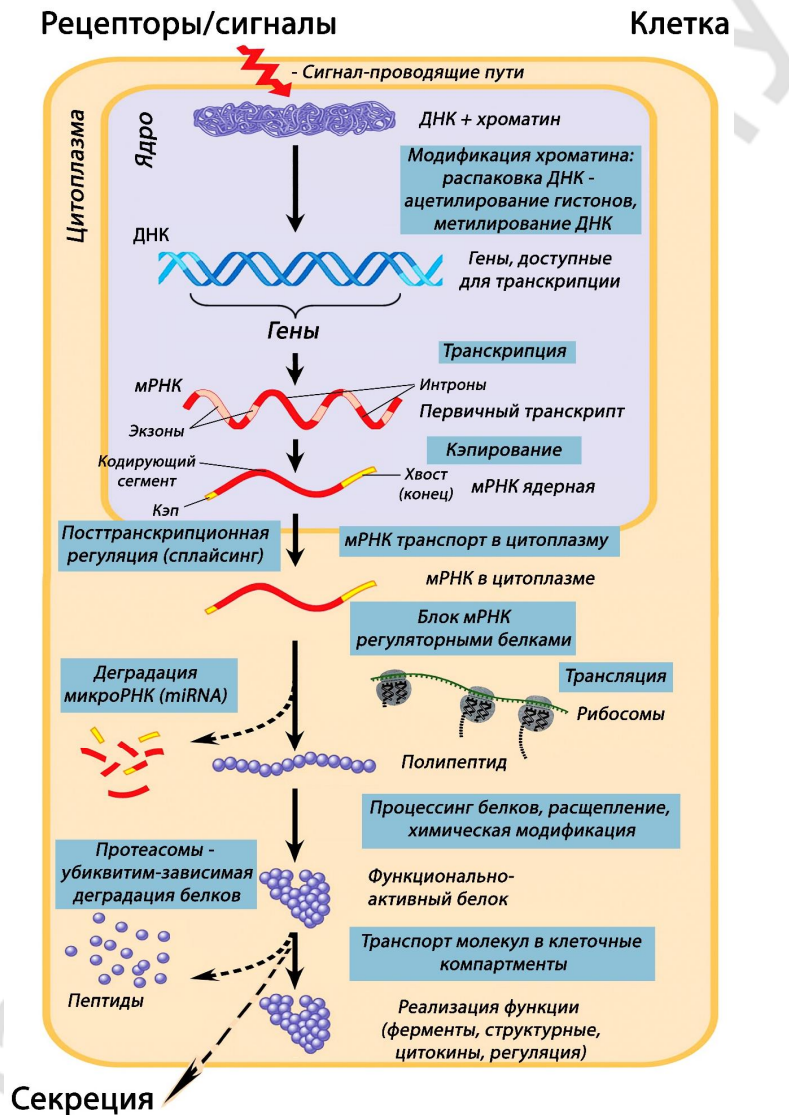


Рис. 1. Основные этапы реализации генетической программы клетки

Посттранскрипционная регуляция экспрессии генов. Экспрессия генов является сложным процессом, регулируемым на различных этапах, таких как транскрипция, процессинг и стабильность мРНК, скорость трансляции. В случаях стабильности окружающей клетку среды скорость синтеза мРНК и ее дегрэдации равны. Варьирование количественного содержания мРНК в клетке может быть следствием как изменения скорости транскрипции, так и разрушения ее молекул. В обеспечении разнообразия жизненно важных белков ведущую роль играет посттранскрипционный процессинг мРНК или ее созревание. Основным механизмом данного типа регуляции являются альтернативный сплайсинг, редактирование мРНК и изменение стабильности молекул [1].

Альтернативный сплайсинг (от англ. splice — сращивать или склеивать концы чего-либо). Большинство генов иммунной системы имеют полиэкзонное и полиинтронное строение. В процессе созревания из пре-мРНК вырезаются интроны, а экзоны сшиваются, при этом молекула су-

щественно укорачивается. Длина зрелой молекулы мРНК может колебаться от нескольких сотен до нескольких тысяч нуклеотидов. Более того, при сплайсинге из первичного транскрипта мРНК (пре-мРНК) образуется множество разных молекул мРНК в зависимости того, какие комбинации экзонов сшиты в зрелую молекулу. В результате из кодируемой одним геном генетической информации синтезируется некая совокупность структурно и функционально различающихся полипептидов. Сплайсингу подвержено до 94 % генов человека. Таким образом, при наличии 22–23 тысяч генов в одной клетке может синтезироваться не менее 100 000 белков [1, 36].

«*Редактирование РНК*» — молекулярно-биологический процесс, при котором в молекуле РНК путем химических модификаций точно изменяются основания. Редактирование происходит в ядре, цитозоле и митохондриях. Разнообразие механизмов редактирования мРНК включает модификацию, вставки и выпадения отдельных нуклеотидов, в результате чего может меняться структура и функция конечного белкового продукта.

Стабильность мРНК. Молекулы мРНК после их синтеза в ядре через поры транспортируются в цитоплазму клетки. Количественный набор мРНК в ядре (транскриптом) разнообразнее такового в цитоплазме, что связано с их частичным разрушением нуклеазами. Функционально способными в цитоплазме являются мРНК, защищенные белками. Время жизни мРНК в цитоплазме — критический фактор биосинтеза белков. Последовательности нуклеотидов, влияющие на время полужизни, локализуются в нетранслируемой области 3' конца молекулы (UTR). Стабильность мРНК сказывается на трансляции и содержании белкового продукта. Продолжительность жизни мРНК варьирует в широких пределах. Некоторые мРНК кодируют продукт с большой продолжительностью жизни (10 и более часов), а другие — с короткой (например, мРНК факторов роста) [1].

Роль микро-РНК в регуляции транскрипции генов. Важнейшим механизмом посттранскрипционной регуляции экспрессии генов являются молекулы микро-РНК. На их долю приходится только 1 % транскриптов клетки, но они регулируют экспрессию более 60 % генов [2]. МикроРНК представляют собой некодирующие РНК длиной 21–22 нуклеотида. Они связываются со специфическими последовательностями мРНК 3' нетранслируемой области, ингибируют трансляцию, удаляют поли(А)-хвост [12, 17]. Из-за неполного спаривания с молекулами мРНК-мишенями они ингибируют трансляцию широкого спектра мРНК со сходными последовательностями и изменяют экспрессию генов без изменений структуры ДНК, т. е. осуществляют эпигенетический контроль реализации генетической информации. Данное явление получило название РНК-интерференции, или подавления экспрессии гена, на стадии транскрипции, трансляции, деаденирования или дегградации мРНК. Сайленсинг (от англ. silencer — глушитель, от лат. silentum — молчание) — процесс снижения (подавления,

выключения) транскрипции генов, индуцированный микроРНК (induced transcriptional silencing, RITS), химическими веществами, вирусами, регулируется комплексом белков и представляется важнейшим механизмом биологической регуляции функции генов. При этом для сохранения существующих районов гетерохроматина RITS образует комплексы с малыми, интерферирующими РНК, комплементарными соответствующим генам. Именно этот комплекс вызывает деградацию пре-мРНК, синтезируемых РНК-полимеразой, блокируя транскрипцию [14]. Установление роли эпигенетических событий, влияющих на устойчивость/восприимчивость индивидуума к возбудителям инфекций, иммунопатологическим процессам и онкопатологии является важнейшим направлением персонализированной медицины [14, 28].

Белковые молекулы по завершении трансляции накапливаются в цитоплазме, секретируются в межклеточное пространство, транспортируются в кровь и органы или подвергаются деградации. Процесс их деградации происходит в протеасомах цитоплазмы (гигантских белковых комплексах) с участием белка убиквитина.

Оценка экспрессии генов с помощью ДНК-микрочипов. Термин «микрээррей» впервые предложен в 1995 г. М. Schena [45]. ДНК микрочипы (англ. DNA microarray; греч. micros — малый; англ. array — эррей — упорядоченное расположение, матрица) — новый метод одновременной оценки экспрессии большого числа генов (сотен или даже тысяч). Метод основан на нанесении микродоз фрагментов однонитчатой ДНК (олигонуклеотидов) на плотную поверхность слайда (например, стеклянное предметное стекло) в виде микроскопических точек в определенном порядке, с которыми могут взаимодействовать комплементарные им фрагменты смеси кДНК. Предметные стекла для микрээррей должны обладать рядом физико-химических свойств (устойчивостью к растворителям, механическим и термическим воздействиям, низкой аутофлуоресценцией). Для обеспечения фиксации олигонуклеотидов в точках нанесения поверхность стекол обрабатывают поли-L-лизином или другими модификаторами. Каждая такая точка содержит пикомоли специфичной последовательности зонда ДНК (олигонуклеотида), диаметром 5–150 мкм. Олигонуклеотиды — короткие цепочки ДНК (фрагменты генов) длиной примерно 35–70 нуклеотидов, способны к гибридизации с комплементарными последовательностями ДНК(кДНК) исследуемой пробы при строго определенных условиях. Каждый олигонуклеотид для усреднения результата принтируется в виде 2 или 3 точек. При изготовлении микрочипов выделяют несколько стадий: а) селекция последовательностей (сиквенсов) генов из баз данных; б) амплификация специфичных фрагментов ДНК генов, используя универсальные или геноспецифические праймеры; в) очистка, определение концентрации ДНК и стандартизация; г) печатание раствора фрагментов ДНК

(олигонуклеотидов) на предметное стекло; д) высушивание ДНК слайдов при комнатной температуре; е) обработка слайдов ультрафиолетом для усиления химического связывания [32, 39].

Принципы подготовки экспериментов ДНК микроэррей. При использовании готовых чипов выделяют ряд этапов: а) забор материала для исследования; б) выделение мРНК; в) синтез комплементарной ДНК; г) мечение кДНК флуорохромами; д) гибридизация; е) отмывание; ж) сканирование слайдов для оценки интенсивности флуоресценции точек; з) нормализация данных; и) статистический анализ и визуализация результатов; к) интерпретация данных [32] (рис. 2).

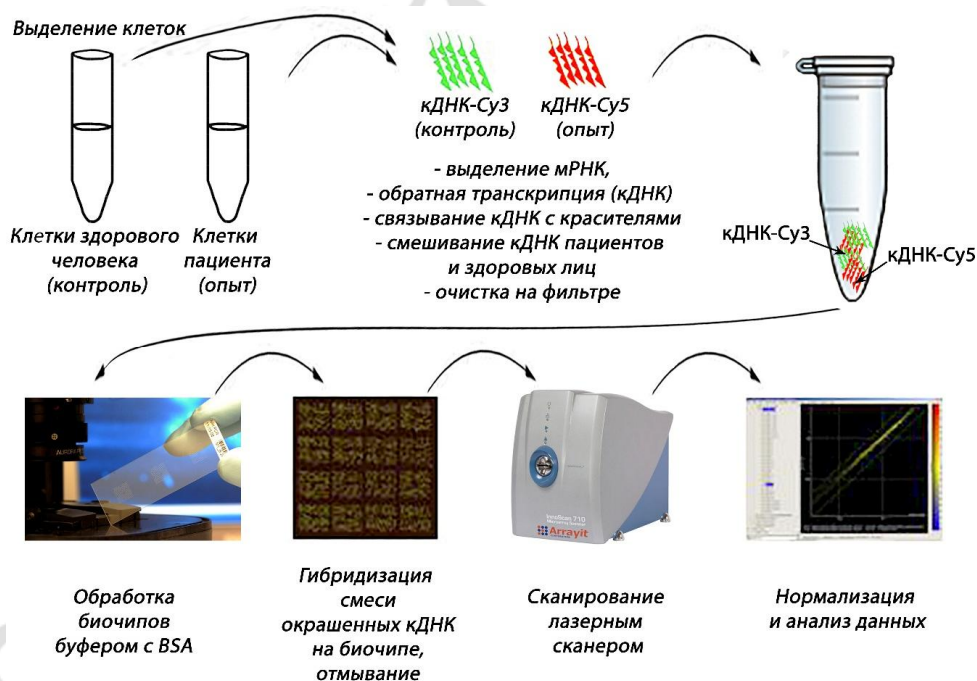


Рис. 2. Схема постановки опыта ДНК-микрэррей

Материал для исследования. В качестве биоматериала для исследования используют биоптаты тканей органов, клетки периферической крови (моноклеарные, полинуклеарные), а также отдельные популяции и субпопуляции, полученные разными методами выделения, например, с помощью сортировщика клеток FACS, магнитосепарацией, адгезией, градиентным центрифугированием, лизированием и др. В экспериментальных исследованиях часто используют культуры лимфоидных или миелоидных клеток [46, 47].

Биологические и химические модификаторы экспрессии генов. В целях изучения влияния биологических или химических модификаторов экспрессии генов широко применяются компоненты бактериальных клеток (липолисахариды, пептидогликаны, экзотоксины, ДНК, РНК, адьюванты (ДНК + цитокины), CpG мотивы, цитокины (интерлейкины, интерфероны), колониестимулирующие факторы, аллергены, а также химические стимуляторы — иономицин, циклоспорин А, моноклональные антитела к CD

антигенам (анти-CD3 и др.). Вновь создаваемые и официальные лекарственные препараты также могут быть активными модификаторами экспрессии генов [10].

Выделение РНК. Из подготовленного для исследования биологического материала в соответствии с протоколом специальными наборами выделяют общую фракцию РНК, содержащую совокупность мРНК разных типов или транскриптом в определенном количестве [36]. При этом необходимо стандартизовать содержание РНК в опытной и контрольной пробах. Количественное содержание РНК проверяют спектрофотометрически при длине волны 260 нм и 280 нм, концентрацию определяют исходя из того, что 40 микрограмм РНК имеет экстинкцию при 260 нм равную 1.0. Более точно содержание РНК определяют методом количественной ПЦР. Оценку чистоты препарата рассчитывают по соотношению A260:A280 [18, 33], а также исследуют методом агарозного гель-электрофореза. От качества и количества выделенной РНК зависит успех постановки всего опыта. Чистота препарата в смысле гомогенности мРНК является лимитирующим фактором эффективности гибридизации, поскольку примеси клеточных липидов, белков и углеводов могут впоследствии связаться с меченой кДНК и матриксом поверхности чипа, влияя на результат измерений.

Получение комплементарной мРНК ДНК (кДНК). Образцы мРНК в концентрации 1–5 мкг, экстрагированные из опытной и контрольной проб, по отдельности конвертируют в комплементарные нити ДНК (кДНК), используя смесь предварительно меченных флуоресцирующими метками дезоксинуклеотидтрифосфатов (прямое мечение) либо аминоксигнализированные dNTP, способные присоединять к аминоксигналу одиночные молекулы красителя (непрямое мечение), фермент обратную транскриптазу и праймеры, иницирующие синтез кДНК. Остаточные количества мРНК инактивируют 0,1 М раствором NaOH. По завершении реакции кДНК очищают на колоночных фильтрах [45].

Окрашивание молекул кДНК. Образцы кДНК референтной (контроль) и опытной проб окрашивают флуоресцентными красителями (Cy3 и Cy5), после чего опытную и контрольную пробы смешивают и подвергают дополнительной очистке для удаления контаминантов (праймеров, одиночных нуклеотидов [25]). Допускается окрашивание кДНК одним красителем, однако для контроля качества результатов предпочтительнее использование двуцветной смеси с учётом на конфокальном сканере.

Гибридизация — процесс соединения двух комплементарных цепей ДНК с образованием двуцепочечной молекулы по принципу спаривания оснований. До начала гибридизации микроэрей слайды инкубируют при высокой температуре в физиологическом растворе, содержащем додецилсульфат натрия и бычий сывороточный альбумин для блокирования активных групп и предотвращения неспецифического связывания красителей.

Смесь кДНК наносят на реакционную зону биочипа для конкурентной гибридизации с геноспецифичными олигонуклеотидами (зондами), иммобилизованными в точках нанесения. Процесс гибридизации осуществляют во влажной камере в температурном диапазоне от 20 до 65 °С, в среднем, в течение 6 часов. В идеале, молекулы меченой кДНК связываются только с комплементарной ей сиквенсом-мишенью биочипа. Чем больше комплементарных пар оснований между двумя цепочками, тем прочнее сила нековалентного связывания и тем больше окрашенных флюорохромом молекул кДНК связывается. По завершении гибридизации обязательным этапом является отмывание не связавшихся молекул кДНК. Отмывание проводят в буферных растворах, варьируя их температуру и ионную силу [39].

Сканирование интенсивности флуоресценции микрочипов. Наличие гибридизации между последовательностями зонда с кДНК выявляют и количественно оценивают, измеряя интенсивность флуоресценции присоединившихся меченых молекул путем сканирования биочипа ридерами разных типов. Наиболее часто используются двухканальные сканеры на основе конфокального микроскопа. При разрешении 10 микрон/пиксель процесс подробного сканирования биочипа занимает менее 10 минут. Сканирование позволяет не только оценить интенсивность флуоресценции точек свечения зондов, но и снизить негативный эффект флуоресценции поверхности биочипа на конечный результат. Для этого слайды после отмывания высушивают, используя специальную центрифугу, а затем помещают в стеклоприёмник конфокального сканера, достигая количественной оценки содержания меченых кДНК, связавшихся с одигонуклеотидами каждой точки-мишени. Краситель Су3, возбуждаясь «синим» лазером с излучением в 540 нм, испускает излучение с длиной волны в 570 нм, краситель Су5, адсорбируя излучение «красного» лазера (640 нм), испускает сигнал с длиной волны 670 нм. Сканирование проводят, фиксируя излучение на двух длинах волн, варьируя мощность и разрешение, доступное для используемого ридера. При визуальной оценке изображения микрочипов на мониторе Су3 эмиссию представляют как зеленый цвет (проба 1), а Су5 — красный (проба 2). Если интенсивность флуоресценции Су5 > Су3 — экспрессия выше в пробе 2, если флуоресценция Су5 < Су3, то экспрессия выше в пробе 1, а если интенсивность флуоресценции спотов Су5 равна таковой Су3, то это означает равноценную экспрессию генов в обеих пробах [33].

Нормализация результатов сканирования. Нормализация необходимый этап предобработки данных микроэррей для минимизации влияния системных различий небиологического характера между данными измерений разных биочипов. Эти различия могут быть обусловлены разным содержанием выделенной из биологического материала РНК, варьированием концентрации используемых реагентов, отличиями в проведении обратной

транскрипции, окрашивании флюорохромами, гибридизации, а также опытом работы персонала и условиями лаборатории. Обычно при нормализации используют множество генов (так называемое опорное множество), экспрессия которых не должна меняться в условиях эксперимента. В этих целях можно использовать данные интенсивности флуоресценции проб генов домашнего хозяйства (housekeeping genes). Необходимо нормировать данные и максимально повысить соотношение сигнал/шум, так как изменения профилей экспрессии генов в сравниваемых образцах могут оказаться небольшими. Перед началом обработки данные представляют собой цифровое изображение интенсивности флуоресценции геноспецифичных точек микрочипа разных каналов. На первом этапе необходимо вычесть флуоресценцию подложки из значения интенсивности флуоресценции каждой пробы. При этом используют два подхода: а) из значения флуоресценции каждой точки вычитают сигнал подложки непосредственно рядом с ней; б) определяют среднюю интенсивность флуоресценции подложки и вычитают ее из интенсивности каждой точки. Проводят также нормирование интенсивностей флуоресценции красителей. Данный тип нормализации выполняют, основываясь на интенсивности флуоресценции проб, соответствующих генам домашнего хозяйства (внутренний контроль), или внося на микрочип и в образец известное количество экзогенной, несвойственной исследуемым клеткам мРНК (внешний контроль). Индекс качества микрочипа определяется уровнем различия значений данных для идентичных образцов в разных пробах. Все методы нормализации предполагают, что большая часть генов в сравниваемых образцах экспрессируется одинаково и доля генов, снизивших экспрессию (down regulated) более или менее равна доле повысивших ее (up regulated) [32].

Подчистка данных и их преобразование (трансформация). При анализе данных микроэрейд измерения интенсивности флуоресценции трактуют как непрерывные величины (лог-нормальное распределение). Данные интенсивности флуоресценции точек микрочипа подвергают некоторой трансформации. Наиболее часто в этих целях применяют логарифмирование показателей флуоресценции по основанию 2. Для этой цели применяют метод МА-плота или участка Мягкого–Альтмана для визуализации данных экспрессии генов двухканального ДНК микрочипа, который был трансформирован на M , где $M = \log_2(R/G) = \log_2(R) - \log_2(G)$. $A = \frac{1}{2}\log_2(RG) = \frac{1}{2}(\log_2(R) + \log_2(G))$, имеющихся в пакетах программ Bioconductor, R, MatLab, Mevi др. [32]. Предполагается, что ген считается дифференциально экспрессируемым, если относительное изменение его экспрессии (интенсивности флуоресценции) превысило некоторый порог в сравнении с контролем (обычно в 2 раза). Соотношение логарифмов имеет естественную симметрию, которая отражает биологические основы функции генов, но которое не наблюдается при анализе первичных («сырых») данных ска-

нирования. Например, двукратно увеличенные (2 fold up) и двукратно сниженные (2 fold down) значения имеют колебания от 2 до 0,5, а различия интенсивности флуоресценции нерегулируемых генов составляют 1.0. Log₂ шкалы 2-кратно возросших и сниженных соответствуют значениям +1 и -1, а логарифм нерегулируемых генов будет равен 0. Например, если при соотношении первичных значений интенсивности флуоресценции Cy5/Cy3 гена со сниженной экспрессией равно 4, то значение log₂ будет равно -2, а если соотношение первичных значений интенсивности флуоресценции Cy5/Cy3 гена с повышенной экспрессией равно 4, то значение log₂ этого числа равно +2.0 [33, 39, 47].

Сравнительный анализ дифференциальной экспрессии генов. Сравнение экспрессии генов разных популяций клеток, определенной совокупности или фрагментов ткани является необходимым инструментом исследователя для выявления молекулярных закономерностей фенотипических изменений в норме и при разнообразной патологии, выявления ключевых этапов патогенеза, эффективности/неэффективности применения лекарственных средств, ответа на вакцинацию или инфекцию. Имеется три основных подхода анализа экспрессии генов: а) установление закономерностей экспрессии определенного гена в зависимости от условий эксперимента или при заболеваниях; б) выявление кластеров генов по их общей функциональности, взаимодействию и совместной регуляции, скоординированном ответе на внешние стимулы; в) уровень системной биологии — выявление функциональных сетей взаимодействия генов и их продуктов, ассоциированных с определенными физиологическими и патологическими состояниями, инфекционным процессом, иммунным ответом и др. [25, 32, 33, 45]. С целью визуализации результатов микроэрепей часто используют цветное графическое изображение (heat map) в виде дендрограмм (рис. 3), где индивидуальные значения измерений, содержащиеся в матрице, представлены разным цветом и разной интенсивностью в соответствии со шкалой (+2 – -2) (рис. 3). Дендрограмма дополняется сверху обозначениями взаимосвязи между данными пациентов и донорами (контролем), а сбоку — взаимосвязи (кластеры) между исследованными генами. При интерпретации результатов оценки экспрессии генов рекомендуется использовать информацию баз данных, описывающие гены и генные продукты в их ассоциации с биологическими процессами, клеточными компонентами и молекулярной функцией (<http://www.geneontology.org>; www.microarray).

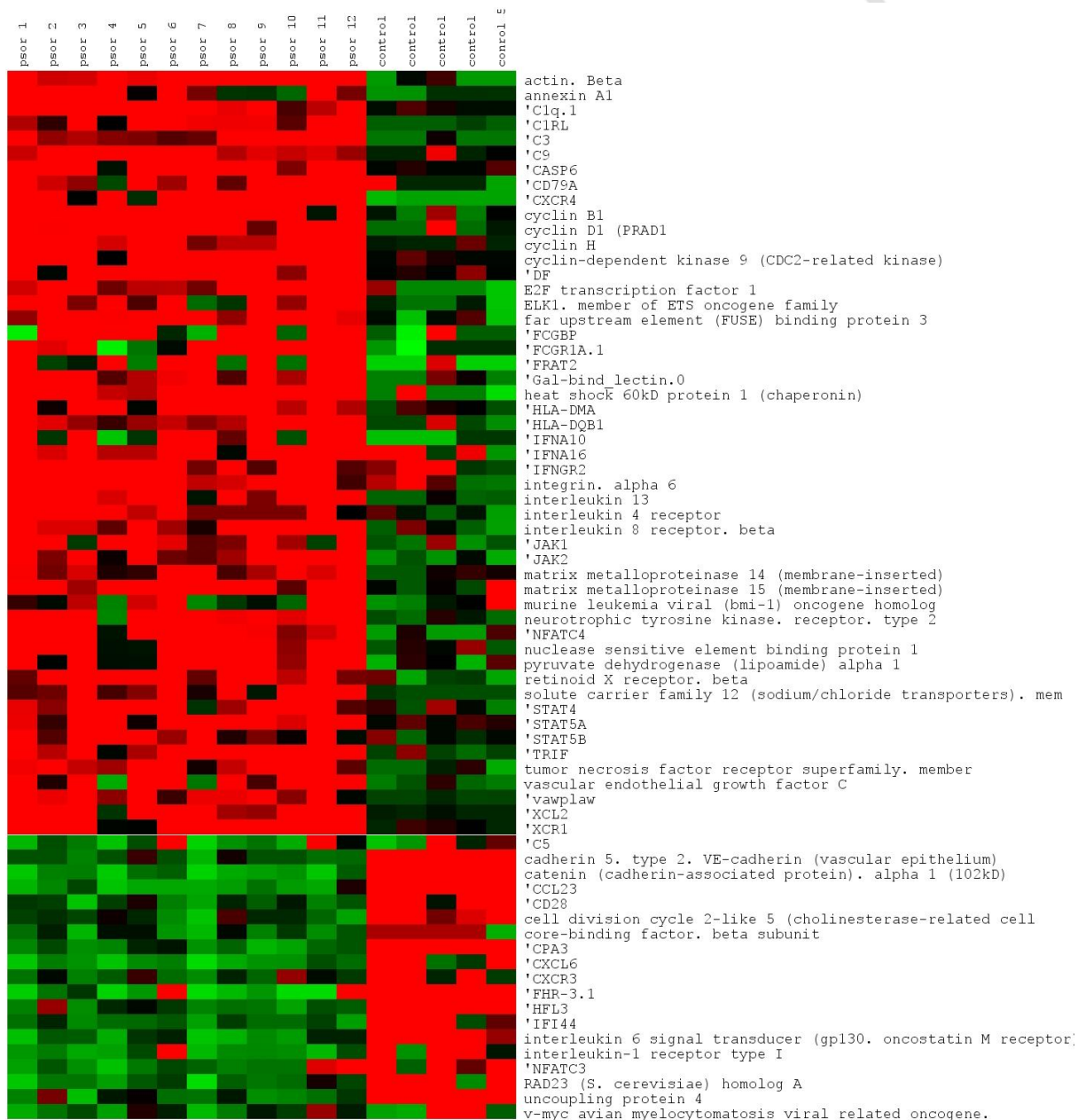


Рис. 3. Диаграмма (heat map), отражающая характер экспрессии генов иммунной системы пациентов с псориазом в сравнении с донорами

Клиническое значение оценки профилирования генов методом микроэррей. Популярность метода микроэррей среди исследователей растет, что способствует его внедрению в практику многих лабораторий. Преимуществом метода является возможность одномоментного исследования сотен и тысяч генов в биологических пробах в повторах в зависимости от длительности воздействия или применяемых концентраций терапевтических средств. Он может быть применен как для количественного профилирования экспрессии генов, так и для определения полиморфизма одиночных нуклеотидов (SNPs), идентификации генов, генотипирования. Все это позволяет исследователю получить ответы на многие фундаментальные

вопросы молекулярной биологии, такие как «где, когда и какие гены экспрессированы». Понятно, что если ген не экспрессируется в определенное время или в определенных условиях или степень его экспрессии снижается, то это возможно зарегистрировать и, возможно, он не играет важной роли в этом процессе. Это положение основано на том, что экспрессия генов в клетке наблюдается в ответ на определенные стимулы или состояние окружающей клетку(и) среды, и что профиль экспрессии генов представляет собой совокупность транскриптов, детерминированных особенностями патогенеза заболевания, триггерных факторов или возбудителями инфекций (внутри- и внеклеточными патогенами). В дополнение к этому, профилирование экспрессии генов методом микроэррей обеспечивает получение информации для количественного измерения изменений мультигенных специфичных паттернов экспрессии, позволяющих лучше понять регуляторные механизмы, более широко представить биологические функции генов, выявить новые гены, проверить уже известные гипотезы и генерировать на основе собственных данных новые [39, 43, 45].

При анализе данных сканирования интенсивности флуоресценции геноспецифичных участков микрочипов важна не только оценка, но и их адекватная интерпретация. При этом необходимо получить ответ как минимум на два вопроса: 1) какие гены дифференциально экспрессированы в одних пробах биологического материала по отношению к другим (например, пациентов к донорам); 2) каков характер взаимосвязей между экспрессией генов и/или исследуемыми группами пациентов, или клиническими фенотипами заболеваний.

Так как транскриптом представляет собой совокупность всех молекул РНК (мРНК, рРНК, тРНК), включая и некодирующие РНК (микроРНК), продуцируемых одной клеткой или популяцией клеток, то он отражает уровень активности генов в определенный период времени, например, в разные фазы инфекционного процесса (инкубационный период, разгар заболевания, реконвалесценция), стадии развития онкологического заболевания, сердечно-сосудистой патологии. Профилирование экспрессии генов — систематическая идентификация и биологическая характеристика экспрессии генов в норме и при патологии — фактически является современным методом мониторинга функционирования генома. Например, в транскриптом лимфобластоидных клеток содержится от 50 000 до 300 000 транскриптов, закономерности формирования и особенности которого еще не изучены [36].

Оценка экспрессия генов методом микроэррей при псориазе. Вышеизложенные соображения можно проиллюстрировать на примере иммунопатогенеза псориаза. Псориаз — широко распространенное хроническое иммуновоспалительное заболевание кожи неустановленной этиологии. Методом микроэррей исследована экспрессия генов 223 проб от паци-

ентов с псориазом. Обнаружено 179 уникальных дифференцированно экспрессированных генов [30]. Показано, что активность процесса ассоциирована с генами транскрипционных факторов (геном альфа-рецептора активатора периксосом — PPARA; геном, кодирующий связывающий стерол белок — SREBF и геном; рецептора эстрогена 2 — ESR2). Внимание обращено на ген Wnt, контролирующей пролиферацию стволовых клеток и иммунный ответ [42]. Выявлены маркерные гены, экспрессируемые Т-клетками активированными интерфероном — STAT-1 и ISG15 (3-кратное увеличение экспрессии). На то, что псориаз — аутоиммунное Т-зависимое заболевание указывают клинические данные и генетические исследования, такие как ассоциация с HLA-C*06, ERAP1, IL23 и NF-κB сигнальными путями [35]. Гиперстимуляция IGFL1 вызывает пролонгированную ассоциацию фосфоинозитол 3 киназы (PI3K) с рецептором IGFL1, что усиливает пролиферацию кератиноцитов [40].

Исследованиями псориаза последних лет в разных хромосомах выявлено 9 генных локусов, получивших название PSORS1-9 (psoriasis susceptibility genes). Многие из этих генов кодируют рецепторы сигнальных путей, ответственных за воспаление и иммунные реакции. Показано, что стрептококковые тонзиллиты и их реактивация ассоциируется с возникновением и обострениями псориаза [19]. При активизации тонзиллярной стрептококковой инфекции имеет место реаранжировка генов варибельной области бета цепи рецептора Т-клеток (TCR), выявляются одинаковые клонотипы Т-клеток в миндалинах, крови и участках поражения в коже [23]. Все это указывает на наличие Т-клеточной экспансии, индуцированной антигенами стрептококков, и косвенно подтверждается эффективностью тонзилэктомии и антибиотикотерапии при псориазе [23].

В лаборатории клинической и экспериментальной микробиологии Республиканского научно-практического центра эпидемиологии и микробиологии в период 2010–2013 гг. разработан иммуночип, включающий 652 гена иммунной системы, относящихся к кластерам дифференцировки клеток, рецепторам, сигнальным путям, хемокинам, интерферонам, лимфокинам, комплементу [46]. Исследование экспрессии генов мононуклеарами периферической крови пациентов с псориазом и доноров позволило выявить гены иммунной системы с измененной экспрессией (рис. 3).

Заключение. Получение новых знаний и достижений в области иммунологии в ближайшей перспективе ожидается в таких новых направлениях как геномика/иммуномика и протеомика, тесно ассоциированных с компьютерными технологиями и биоинформатикой [11, 12]. Иммуномика — новое направление иммунологии, изучающее регуляцию иммунных механизмов и ответа иммунной системы, используя подходы анализа генома [28, 29]. Термин «иммуном» относится ко всем генам и белкам, принимающим участие в иммунном ответе, за исключением генов, которые

экспрессируются в клетках других типов [6]. В соответствии с Settle et al. [44], все иммунные реакции, участвующие во взаимодействии между организмом хозяина и антигенными пептидами, описываются как «реакции иммунома». Примером является новая технология — МНС микроэррей или искусственный биочип, позволяющий изучать антиген-презентацию (комплексы рекомбинантные пептид-МНС и костимуляторные молекулы, иммобилизованные на поверхности). Для оценки иммунного ответа популяции Т-клеток инкубируют с таким биочипом. Преимуществом использования комплексов МНС – пептиды является возможность картирования рестрикции Т-клеточных эпитопов. Данный метод применим для диагностики и оценки эффективности лечения аутоиммунных и аллергических заболеваний, трансплантации органов, картирования В- и Т-клеточных эпитопов, оценки иммунологической эффективности новых вакцин и вакцинации. Иммуномный и геномный микроэррей отличаются по своим параметрам, так как имеют разный дизайн. Первый позволяет одновременно измерить два или более сигналов, детерминированных одним антигеном (пептидом/эпитопом), а второй (ДНК микроэррей) измеряет интенсивность ответа каждого гена в пробе, т. е. концентрацию мРНК соответствующего гена.

Важной ветвью иммуномики и биоинформатики становится компьютерная иммунология, основанная на таких концепциях и подходах как анализ последовательностей нуклеотидов генов иммунной системы в норме и при заболеваниях [12], анализе последовательностей аминокислот белков, предсказание структуры и функции белков, моделировании репертуара антител [20], Т-клеточной иммуносупрессии, миграции периферических лимфоцитов [38], иммунологической памяти, толерантности [24], функции тимуса [38], сети антител [26]. Все вышеперечисленное позволяет надеяться на быстрый прогресс фундаментальной и прикладной иммунологии, представляет возможности сотрудникам кафедры для реализации самых фантастических идей и замыслов.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Бокуть, С. Б.*, Молекулярная биология / С. Б. Бокуть, Н. В. Герасимович, А. А. Милютин. Минск : Выш. шк., 2005. 463 с.
2. *Гонзвгло, М.* МикроРНК как биомаркер для диагностики рака мочевого пузыря / М. Гонзвгло, Г. Ишханова // Молекулярная медицина. 2014. № 2. С. 18–24.
3. *Красильников, А. П.* Б. Я. Эльберт. К 70-летию со дня рождения и 45-летию научно-исследовательской деятельности / А. П. Красильников // Здравоохранение Беларуси. 1961. № 2. С. 65–66.
4. *Пинегин, Б. В.* Роль клеток иммунной системы и цитокинов в развитии псориаза / Б. В. Пинегин, О. Л. Иванов, В. Б. Пинегин // Иммунология. 2012. Т. 33, № 4. С. 213–219.
5. *Титов, Л. П.* Проблемы иммунологии хронических инфекций / Л. П. Титов // А. П. Красильников. Биобиблиография. Минск : Бизнеспрогресс, 2001. 91 с.
6. *Титов, Л. П.* Молекулярные механизмы активации Т- и В-лимфоцитов / Л. П. Титов // Современные проблемы инфекционной патологии человека : материалы 2-й науч.-практ. конф. Минск, 2001. С. 287–317.

7. *Титов, Л. П.* Медицинская биотехнология в борьбе с инфекциями, микробио- и иммунозависимой патологией человека : состояние и перспективы / Л. П. Титов // Наука и инновации. 2003. № 3–4. С. 104–107.
8. *Титов, Л. П.* Антигенный гомеостаз и аутоиммунные заболевания / Л. П. Титов // Изв. НАН Беларуси. Сер. мед.-биол. наук. 2003. № 1. С. 89–103.
9. *Титов, Л. П.* Противовирусный иммунитет: молекулярно-клеточные механизмы, закономерности развития и иммунопатология / Л. П. Титов, И. А. Карпов // Мед. журнал. 2007. № 1. С. 4–14.
10. *Титов, Л. П.* Иммунология : терминологический словарь. М. : МИА, 2008. 521 с.
11. *Титов, Л. П.* Вирусы и эукариотические клетки : стадии взаимодействия, стратегия геномов, репродукция и исходы инфекции / Л. П. Титов // Мед. журнал. 2008. № 1. С. 10–16.
12. *Титов Л. П.* Компьютерная иммунология : сравнительный анализ нуклеотидных замен в CDR и FR фрагментах генов иммуноглобулинов при гепатите С, криоглобулинемии и лейкозах / Л. П. Титов, Т. А. Столярова, Е. А. Столярова // Весці НАН Беларусі. Мед серыя. 2010. № 3. С. 10–18.
13. *Титов, Л. П.* Геномико-протеомические основы эволюции и молекулярной эпидемиологии вирусов / Л. П. Титов, В. И. Вотяков // Изв. НАН Беларуси. Сер. мед. наук. 2011. № 1. С. 109–124.
14. *Титов, Л. П.* Микро-РНК : новый класс регуляторных молекул иммунного ответа и инфекционного процесса / Л. П. Титов // Современные проблемы инфекционной патологии человека : сб. науч. тр. 2012. Вып. 5. С. 256–261.
15. *Хромов-Борисов, Н. Н.* Эволюционная медицинская геномика / Н. Н. Хромов-Борисов, А. В. Рубанович // Молекулярная медицина. 2014. № 2. С. 13–17.
16. *Структурная геномика и медицина / И. Е. Ясный [и др.] // Молекулярная медицина. 2009. № 6. С. 15–20.*
17. *Consortium biology in immunology : the perspective from the Immunological Genome Project / C. Benoist [et al.] // Nature Reviews Immunology. 2012. P. 1–6.*
18. *Braga-Neto U. M.* From Genomics to Functional Immunomics : New challenges, Old problems, Big Rewards / U. M. Braga-Neto, E. T. A. Marques // Plos computational biology. 2006. Vol. 2. Issue 7. eB1. P. 0651–0662.
19. *Bucolo, S.* Effects of Tonsillectomy on psoriasis and tonsil histopathology-ultrastructure / S. Bucolo // INTECH. 2013. <http://dx.doi.org/10.5772/55978>.
20. *Antibody repertoire development in fetal and neonatal piglets. XVI. Influenzae stimulates adaptive immunity, class switch and diversification of the IgG repertoire encoded by downstream C gamma genes / J. E. Butler [et al.] // Immunology. 2012. Vol. 138. P. 134–144.*
21. *Chong, Y.* Evidence of B cell clonal expansion in HIV type-1-infected patients / Y. Chong, H. Ikematsu, I. Ariyama // AIDS Res. Hum. Retroviruses. 2001. Vol. 17. P. 1507–1515.
22. *Microbiome Composition by Pyro sequencing in Mesenteric Lymph Nodes of Rats with CCL4-induced Cirrhosis / S. Cuenca [et al.] // J. Innate Immun. 2014. Vol. 6. P. 263–271.*
23. *Identical TCR beta-chain rearrangements in Streptococcal angina and skin lesions of patients with psoriasis vulgaris / L. Diluvio [et al.] // The Journal of Immunology. 2006. Vol. 176. P. 7104–7111.*
24. *Dolezal, J.* A contribution to mathematical modeling of immunologic tolerance / J. Dolezal, T. Hrabá // Arch. Ther. Exp. Vol. 36. N 1. P. 23–30.
25. *Expression profiling using cDNA microarrays / D. J. Duggan [et al.] // Nat.Genetics. 1999. Vol. 21. P. 10–14.*

26. *Faro, J.* Further studies on the problem of immune network modeling / J. Faro, J. Carneiro, S. Valasco // *J. Theor. Biol.* Vol. 184, N 4. P. 405–421.
27. *An Immunomics Approach to Schistosome antigen discovery : antibody signatures of naturally resistant and chronically infected individuals from endemic areas / S. Gaze [et al.] // PLOS Pathogens.* 2014. Vol. 10. Issue 3. E1004033. P. 1–16.
28. *Grander, D. I.* Immunomics: principles and practis / D. I. Grander // *IRTI.* 2004. Vol. 2. P. 1–6.
29. *Groot, A. S. D.* Immunomics discovering new targets for vaccine and therapeutics / A. S. D. Groot // *Drug Discov. Today.* 2006. Vol. 11. P. 203–209.
30. *Global gene expression analysis reveals evidence for decreased lipid biosynthesis and increased innate immunity in uninvolved psoriatic skin / J. E. Gudjonsson // J. Invest. Dermatol.* 2009. Vol. 129. P. 2795–2804.
31. *Heng, T. S. P.* The immunological Genome Project : network of gene expression in immune cells / T. S. P. Heng, M. W. Painter // *Immunology.* 2008. Vol. 4, N 10. P. 091–1094.
32. *Hoheisel, J. D.* Microarray technology : beyond profiling and analysis / J. D. Hoheisel // *Nature Reviews. Genetics.* 2004. Vol. 7. P. 200–208.
33. *Yeast microarrays for genome wide parallel genetic and gene expression analysis / D. A. Lashkari [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci.* 1997. Vol. 94. P. 13057–13062.
34. *Epigenetic regulation of inducible gene expression in the immune system / P. S. Lim [et al.] // Immunology.* Vol. 139. P. 285–293.
35. *Anti-apoptotic effects of suppressor of cytokine signaling 3 and 1 in psoriasis / S. Madonna [et al.] // Cell death Dis.* 2012. Vol. 3. e334.
36. *From single — cell to cell pool transcriptomes : stochasticity in gene expression and RNA splicing / G. K. Maurinov [et al.] // Genome Research.* 2011. Vol. 24. P. 496–510.
37. *Malaspina, A.* Deleterious effect of HIV-1 plasma viremia on B-cell costimulatory function / A. Malaspina, S. Moir, S. Kottili // *J. Immunol.* 2003. Vol. 170. P. 5965–5972.
38. *Colonization of the thymus by T-cell progenitors : models for cell-cell interactions / R. Mehr [et al.] // J. Theor. Biol.* Vol. 170. N 4. P. 247–257.
39. *Miller, M. B.* Basic concept of microarrays and potential application in clinical microbiology / M. B. Miller, Y. W. Tang // *Clin. Microbiol. Reviews.* 2009. Vol. 22(4). P. 611–633.
40. *Collaborative association study of genome-wide scan reveals association of psoriasis with IL-23 and NF-kappa B pathways / R. P. Nair [et al.] // Nat. genetics.* 2009. Vol. 41. P. 199–204.
41. *Ortutay, C.* Immonomic Knowledge base (IKB) : an integrated service for immune research / C. Ortutay, M. Vikinen // *BMC Immunol.* 2009. Vol. 10. doi 101186/1471-2172-10-3.
42. *Perez-Ortin, J. E.* Genomics of mRNA turnover / J. E. Perez-Ortin // *Briefing in functional genomics and proteomics.* 2007. Vol. 6. N 4. P. 282–291.
43. *Increased expression of Wnt5a in psoriatic plaques / J. Reischl [et al.] // J. Invest. Dermatol.* 2007. Vol. 127. P. 163–169.
44. *A roadmap for the immunomics of category A-C pathogens / A. Sette [et al.] // Immunity.* 2005. Vol. 22. P. 155–161.
45. *Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray / M. Schena [et al.] // Science.* 1995. Vol. 270. P. 467–470.
46. *Titov, L. P.* Gene expression profiles of the peripheral blood mononuclear leukocytes from patients with psoriasis / L. P. Titov, M. V. Liauchenia, L. M. DuBuske // *Allergy.* 2013. Vol. 68. S. 9. P. 353.
47. *Tusler, V. G.* Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response / V. G. Tusler, R. Tibshirani, G. Chu // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2001. Vol. 98. P. 5116–5121.