

СВЯЗЬ ДЕЛЕЦИЙ И ТОЧЕЧНЫХ МУТАЦИЙ ГЕНА P53 С РЕЗИСТЕНТНОСТЬЮ КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЙ МЕТАСТАТИЧЕСКОЙ МЕЛАНОМЫ КОЖИ ЧЕЛОВЕКА К АРАНОЗЕ

А.В. Пономарев¹, А.А. Солодовник¹, А.С. Мкртчян², Ю.П. Финашутина¹, А.А. Турба²,
В.А. Мисюрин^{1,2}, А.В. Мисюрин¹, М.А. Барышникова¹

¹ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115478 Москва, Каширское шоссе, 24;

²ООО «ГеноТехнология»; Россия, 117485 Москва, ул. Профсоюзная, 104

Контакты: Александр Васильевич Пономарев kl8546@yandex.ru

Введение. Одним из химиопрепаратов, применяемых для лечения меланомы, является араноза, препарат из класса производных нитрозомочевины — метилирующий ДНК агент. Действие аранозы связано с повреждением ДНК, после которого включаются механизмы апоптоза. Важную роль в этом процессе должен осуществлять белок p53, а различные нарушения данного белка могут приводить к лекарственной устойчивости.

Цель исследования — изучить мутационный статус белка p53 в клеточных линиях метастатической меланомы кожи человека и оценить его связь с резистентностью клеточных линий к аранозе.

Материалы и методы. Исследование проводили на 14 клеточных линиях метастатической меланомы кожи человека. Методом МТТ-теста была определена ИК₅₀ аранозы для клеточных линий. С помощью флуоресцентной гибридизации *in situ* оценили состояние короткого плеча хромосомы 17, на котором находится ген p53. С помощью секвенирования по Сэнгеру изучили наличие точечных мутаций в ДНК-связывающем домене гена p53.

Результаты. Клеточные линии метастатической меланомы кожи имели разную чувствительность к аранозе. Практически все клеточные линии были неоднородны по состоянию хромосомы 17. В 2 линиях были обнаружены точечные мутации в гене p53. При этом часть устойчивых клеточных линий почти не имели мутационных нарушений p53, а другая часть устойчивых линий, наоборот, несла множество нарушений гена p53.

Выводы. Для части клеточных линий метастатической меланомы кожи можно установить корреляцию резистентности с мутациями гена p53. Однако для других клеточных линий метастатической меланомы кожи резистентность, скорее всего, обусловлена и иными механизмами.

Ключевые слова: араноза, меланома, p53, мутации, флуоресцентная гибридизация *in situ*, секвенирование

DOI: 10.17650/1726-9784-2018-17-1-64-69

RELATIONSHIP BETWEEN DELETION AND POINT MUTATIONS OF P53 AND DRUG RESISTANCE TO ARANOZA IN HUMAN MELANOMA CELL LINES

A.V. Ponomarev¹, A.A. Solodovnik¹, A.S. Mkrtychyan², Yu.P. Finashutina¹, A.A. Turba², V.A. Misyurin^{1,2},
A.V. Misyurin¹, M.A. Baryshnikova¹

¹N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia; 24 Kashirskoe Shosse, Moscow 115478, Russia;

²“GenoTechnology” LLC; 104 Profsoyuznaya St., Moscow 117485, Russia

Introduction. Aranoza, nitrozourea derivative is a DNA-methylating agent that has been approved for treatment of patients with disseminated melanoma. Aranoza effect is based on DNA damage and then as a result apoptosis mechanisms start launching. The important role in this process must be played by p53 protein, and its different dysfunctions can result in drug resistance.

Objective. The purpose is to study p53 mutational status in cell lines of human skin metastatic melanoma and to estimate its connection with cell lines resistance to aranoza.

Materials and methods. The research was conducted on 14 cell lines of human skin metastatic melanoma. Aranoza IC₅₀ for cell lines was determined by MTT-test. The 17p chromosome's condition was estimated by fluorescence *in situ* hybridization. The presence of point mutations in DNA-binding domain of human p53 was researched by Sanger sequencing.

Results. Skin metastatic melanoma cell lines had different sensitivity to aranoza. Almost all cell lines were heterogeneous in the condition of 17th chromosome. P53 point mutations were found in 2 cell lines. But one part of resistant cell lines almost didn't have any mutational disorders of p53, another part of resistant lines on the contrary had plenty of p53 mutational disorders.

Conclusion. The correlation of resistance and p53 mutations can be established for one part of human skin metastatic melanoma cell lines. But for another part of human skin metastatic melanoma cell lines resistance most likely are driven by other mechanisms.

Key words: aranoza, melanoma, p53, mutations, fluorescence *in situ* hybridization, sequencing

Введение

Как известно, образование и прогрессирование опухолей связаны с генетическими изменениями, происходящими в различных участках генома. В нашей работе был изучен мутационный статус белка p53 для метастатической меланомы — наиболее агрессивной опухоли кожи.

Белок p53 кодируется геном *TP53*, который расположен на коротком плече (p) хромосомы 17 и состоит из 11 экзонов. Ген *TP53* человека охватывает 20 кб и кодирует ядерный фосфопротеин (длина 393 аминокислоты). В качестве онкосупрессивного белка p53 действует как «страж генома». В норме «стрессорная» функция p53 неактивна до того момента, пока не произойдет ее активирование за счет повреждений ДНК или других геномных aberrаций. Белок p53 затем активирует свои нисходящие эффекторы для ареста клеточной пролиферации и ингибирования репликации поврежденной ДНК, чтобы провести процесс репарации. В случаях, если повреждение сложное, белок p53 может запускать программу апоптоза. Потеря функции «хранителя генома» позволяет продолжить репликацию клеток с поврежденной ДНК и, в свою очередь, приводит к накоплению генетических изменений, которые способствуют злокачественной прогрессии [1, 2].

В здоровых клетках часто не обнаруживается белок p53 из-за его быстрого убиквитинирования белком MDM2 и последующей протеасомной деградации [3]. Однако при повреждении ДНК и некоторых других стрессах, включая онкогенный стресс, количество p53 увеличивается вследствие его стабилизации [4]. Инактивация p53 является одной из значимых характеристик опухолевой клетки. Для p53 обнаружен широкий спектр различных мутаций, которые встречаются в ~ 50 % всех опухолей [5]. Еще одним механизмом ослабления реакции p53 на онкогенный стресс может быть повышенная экспрессия MDM2 [6, 7]. Хотя мутация гена-супрессора опухоли p53 является общей чертой для многих типов рака, мутационная инактивация p53 при меланоме встречается редко, а p53 дикого типа часто показывает высокие уровни экспрессии [8–11]. Кроме того, увеличение экспрессии p53 не является достаточным фактором для хорошего ответа на лечение меланомы [12]. Таким образом, можно предположить, что p53 дикого типа в меланоме по каким-то причинам не проявляет своих функций опухолевого супрессора [13].

Хромосомные изменения, в частности аллельные потери, практически на каждой хромосоме были описаны в первичной меланоме, а также в клеточных линиях, полученных из метастазов, демонстрируя множественные генетические изменения на разных участках генов и констатируя гетерогенную природу генетических изменений в меланоме [1, 14–16].

Мы исследовали участок на коротком плече хромосомы 17p, где находится ген *p53*, который подвергается делециям или мутациям при многих опухолях. Например, при В-клеточном хроническом лимфоцитарном лейкозе делеции 17p связаны с худшим клиническим прогнозом [17].

Исследование проводили на культурах клеток, полученных из метастатической меланомы кожи. Мы допускаем, что в процессе культивирования в них могли произойти вторичные генетические изменения. Делеции гена *p53* могли бы быть одной из причин утраты функции p53 в клетках без точечных мутаций.

В связи с тем, что p53 вызывает арест пролиферации или гибель клеток при повреждениях ДНК, мы решили исследовать чувствительность клеточных линий метастатической меланомы кожи к аранозе, являющейся метилирующим ДНК агентом.

Цель исследования — изучить мутационный статус белка p53 в клеточных линиях метастатической меланомы кожи человека и оценить его связь с резистентностью клеточных линий к аранозе.

Материалы и методы

Клеточные линии. Исследования проводили на 14 клеточных линиях метастатической меланомы кожи человека из банка клеточных культур лаборатории экспериментальной диагностики и биотерапии опухолей НИИ ЭДнТО ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России [18]. Были изучены клеточные линии mel Kor, mel Rac, mel Is, mel Si, mel Hn, mel R, mel Gi, mel H, mel Il, mel Ibr, mel Me, mel Mtp, mel Gus, mel Bgf. Клеточные линии культивировали в среде RPMI-1640, содержащей 10 % телячьей эмбриональной сыворотки, 10 мМ NEPES, 2 мМ L-глутамин, пенициллин (25 000 Ед), стрептомицин (25 000 мкг), пируват натрия, 0,1 % раствор аминокислот и 0,1 % раствор витаминов при 37 °С в атмосфере 5 % CO₂ (полная среда). Клетки поддерживали в логарифмической фазе роста постоянным пересевом культуры через 3–4 дня.

Противоопухолевые препараты. «Араноза, лиофилизат для приготовления раствора для инъекций 500 мг» (араноза) производства филиала «Научпрофи» ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России.

МТТ-тест. Клетки снимали раствором Версена, отмывали от него полной средой и рассаживали в 96-луночные плоскодонные планшеты (SPL, США) по 7 × 10³ клеток в 180 мкл полной среды RPMI-1640 на лунку. Далее клетки помещали в термостат при 37 °С в атмосфере 5 % CO₂. Через 24 ч в лунки с клетками добавляли исследуемый препарат в выбранных концентрациях. Клетки инкубировали с препаратом в течение 24 ч при 37 °С и 5 % CO₂. После инкубации

в каждую лунку вносили по 20 мкл раствора 3-[4,5-диметилтиазол-2-ил]-2,5-дифенилтетразолия бромида (1 мг/мл в фосфатно-солевом буфере с pH 7,4; Sigma Chemical Co., США) и оставляли еще на 4 ч при 37 °C и 5 % CO₂. По окончании инкубации планшеты центрифугировали, отбирали супернатант и вносили в лунки по 150 мкл диметилсульфоксида («ПанЭко», Россия) для растворения кристаллов формазана, после чего планшеты аккуратно встряхивали на шейкере для равномерного распределения раствора формазана. Оптическую плотность раствора формазана определяли на фотометрическом анализаторе иммуноферментных реакций MultiskanEX (ThermoLabsystems, США) при длине волны 540 нм. Величина поглощения прямо пропорциональна числу живых клеток. Цитотоксичность (*Ц*) оценивали в % по формуле

$$Ц = (1 - O_o/O_k) \times 100 \%,$$

где *O_к* — оптическая плотность в контрольных лунках; *O_о* — оптическая плотность в опытных лунках.

Для оценки цитотоксического эффекта определяли ИК₅₀ — концентрацию вещества, вызывающую гибель 50 % клеток.

Флуоресцентная гибридизация *in situ* (fluorescence *in situ* hybridization, FISH). Для постановки FISH использовался зонд ONp53 (17p13)/SE17 (Kreatech, Германия), исследование проводилось согласно рекомендациям производителя.

Секвенирование по Сэнгеру. Секвенирование проводили с использованием набора реактивов BigDye-Terminator 3.1vCycleSequencingKit (Applied Biosystems, США) с учетом рекомендаций производителя. Проводилось секвенирование последовательности, кодирующей ДНК-связывающий домен белка p53. Для данной последовательности характерно наибольшее количество мутаций, нарушающих функции белка p53 [19]. Для проведения секвенирующей реакции в прямом направлении использовали следующие праймеры:

- праймеры для секвенирования экзона 5 и 6 — 5-6F5'-TGTTCACTTGTCCTGACT-3' и 5-6R5'-GGAGGGCCACTGACAACCA-3';
- праймеры для секвенирования экзона 7 — 7F5'-ACTGGCCTCATCTTGGGCCT-3' и 7R5'-GTCA-GAGGCAAGCAGAGGCT-3';
- праймеры для секвенирования экзона 8 — 8F5'-TAAATGGGACAGGTAGGACC-3' и 8R5'-TCCA-CCGCTTCTGTCTCCTGC-3'.

После проведения секвенирующих реакций продукты полимеразной цепной реакции очищали с помощью набора BigDyeXTerminatorPurificationKit (Applied Biosystems). Продукты секвенирующей реакции разделяли и анализировали с использованием гене-

тического анализатора ABIPRISM 310 (Applied Biosystems, США).

Определение уровня экспрессии гена *TP53*. Протокол определения представлен в нашем исследовании: из клеток производилось выделение РНК, далее ее конверсия в комплементарную ДНК и количественная ПЦР в реальном времени для оценки уровня экспрессии *TP53* по отношению к гену домашнего хозяйства *ABL* [20]. Используемая система позволяла установить наличие всех типов матричной РНК, кодирующих все известные изоформы белка p53 [20].

Статистический анализ данных. Для определения наиболее значимого фактора, связанного с чувствительностью клеток меланомы к аранозе, применялся многофакторный регрессионный анализ. В качестве «входных» параметров были использованы следующие факторы: уровень экспрессии *TP53*; отсутствие аномалий хромосомы 17; наличие делеций или точечных мутаций гена *TP53*; количество клеток с трисомией хромосомы 17; количество клеток с тетрасомией хромосомы 17; количество клеток с гексасомией хромосомы 17 и общее количество клеток с аномалиями хромосомы 17. Для статистического анализа данных FISH-исследования использовались значения, превышающие 5 %, так как меньшие значения процента делеций могли быть ложноположительными. Анализ проводился в программе Statistica 10. Результаты принимались как значимые при *p* < 0,05.

Результаты

С помощью метода FISH изучили состояние хромосомы 17, кодирующей белок p53. Обнаружено, что практически все клеточные линии были неоднородны по своему составу (табл. 1). В пределах одной клеточной линии были как нормальные клетки, так и клетки с трисомией или тетрасомией хромосомы 17. Часто встречались более сложные нарушения. Ряд клеточных линий имели делеции *p53*. Также изучили наличие мутаций *p53* в клеточных линиях метастатической меланомы и обнаружили наличие мутаций только в 2 линиях из 9 исследованных, это mel Hn и mel Ibr (табл. 2). Полученные результаты согласуются с данными исследований, подтвердивших, что точечные мутации *p53* при меланоме встречаются редко [13].

С помощью МТТ-теста определили чувствительность клеточных линий метастатической меланомы к аранозе. Клеточные линии имели разную чувствительность к исследуемому препарату (табл. 3). Резистентными к аранозе считали линии, для которых значение ИК₅₀ составляло 1500 мкг/мл или выше.

Методом пошаговой селекции обнаружены наиболее значимые факторы, коррелирующие со значением ИК₅₀ аранозы. Большее значение ИК₅₀ наблюдалось при отсутствии аномалий хромосомы 17

Таблица 1. Мутационный статус *p53* в клеточных линиях метастатической меланомы

Клеточные линии	Мутационный статус <i>p53</i>
mel R	В 50 % клеток – трисомия хромосомы 17 с делецией гена <i>p53</i> на 1 хромосоме, в 25 % – тетрасомия хромосомы 17 с делецией гена <i>p53</i> на 2 хромосомах, 15 % нормальных клеток, в 6 % – гексасомия хромосомы 17 с делецией гена <i>p53</i> на 2 хромосомах, в 4 % – разное сочетание количественных изменений хромосомы 17 и делеций гена <i>p53</i>
mel Bgf	В 44 % клеток – тетрасомия хромосомы 17 с делецией гена <i>p53</i> на 2 хромосомах, в 21 % – трисомия хромосомы 17 с делецией гена <i>p53</i> на 1 хромосоме, 12 % нормальных клеток, в 8 % – гексасомия хромосомы 17 с делецией гена <i>p53</i> на 2 хромосомах, в 6 % – тетрасомия хромосомы 17, в 4 % – октасомия хромосомы 17 с делецией гена <i>p53</i> на 4 хромосомах; в 3 % – разное сочетание количественных изменений хромосомы 17 и делеций гена <i>p53</i>
mel Kor	В 60 % клеток – тетрасомия хромосомы 17, в 30 % – трисомия хромосомы 17
mel Hn	В 85 % клеток – трисомия хромосомы 17
mel Gi	В 80 % клеток – трисомия хромосомы 17
mel Gus	В 3 % клеток – делеция гена <i>p53</i> , в 2 % – трисомия хромосомы 17
mel Rac	В 90 % клеток – трисомия хромосомы 17, остальные клетки нормальные
mel Il	В 40 % – тетрасомия с делецией гена <i>p53</i> на 2 из 4 хромосом 17, в 40 % – трисомия с делецией гена <i>p53</i> на 1 хромосоме 17
mel Ibr	В 87 % клеток – тетрасомия хромосомы 17, в 9 % – трисомия хромосомы 17
mel Cher	В 65 % клеток – тетрасомия хромосомы 17, в 5 % – гексасомия хромосомы 17
mel H	В 60 % клеток – тетрасомия хромосомы 17 с делецией гена <i>p53</i> на 2 из 4 хромосом, в 37 % – трисомия хромосомы 17 с делецией гена <i>p53</i> на 1 хромосоме
mel Is	В 80 % клеток – тетрасомия, в 15 % – трисомия хромосомы 17
mel Me	В 70 % клеток – тетрасомия, в 15 % – трисомия, в 4 % – трисомия хромосомы 17 с делецией гена <i>p53</i> на 1 из 3 хромосом
mel Mtp	90 % нормальных клеток, в 7 % – трисомия, в 2 % – дисомия с делецией гена <i>p53</i> на 1 из 2 хромосом, в 1 % – тетрасомия
mel Si	В 65 % клеток – трисомия, 25 % – нормальные клетки, в 4 % – трисомия с делецией гена <i>p53</i> на 1 хромосоме, в 5 % – пентасомия, в 1 % – дисомия с делецией гена на 1 хромосоме

Таблица 2. Точечные мутации в гене *TP53* (указано количество мутантных аллелей в процентах от общего числа аллелей)

Клеточная линия	Наличие точечных мутаций в гене <i>TP53</i>
mel Hn	с.451C>T 47 % р.Пролин151Серин с.722C>T 38 % р.Серин240Фенилаланин
mel Ibr	с.512A>C 15 % р.Глутамин171Аланин
mel Rac	отсутствие
mel Kor	отсутствие
mel Gi	отсутствие
mel Is	отсутствие
mel Gus	отсутствие
mel Ch	отсутствие
mel Il	отсутствие

($p = 0,0028$), наличии множественных аномалий хромосомы 17 ($p = 0,0057$), отсутствии трисомии хромосомы 17 ($p = 0,032$) и наличии делеций хромосомы 17 или мутаций гена *TP53* ($p = 0,0395$).

Уровень экспрессии гена *TP53*, тетрасомия и гексасомия хромосомы 17 не были значимо связаны с величиной ИК₅₀ аранозы ($p > 0,05$).

Заключение

В исследовании был определен мутационный статус белка *p53* в клеточных линиях меланомы человека. Обнаружены количественные изменения хромосомы 17, делеции участка короткого плеча *p53* хромосомы 17 (ген *p53*) и точечные мутации в определенных линиях. В одном случае для клеточных линий с повышенной резистентностью к аранозе характерно наличие аномалий хромосомы 17, в другом – наблюдается отсутствие аномалий хромосомы 17. В результате было выявлено 2 состояния. Первое: клетка

Таблица 3. ИК₅₀ аранозы и экспрессия TP53 в клеточных линиях метастатической меланомы

Клеточные линии	ИК ₅₀ аранозы, мкг/мл	Уровень экспрессии TP53, относительно гена ABL, %	Наличие мутации ДНК-связывающего домена	% клеток с делециями локуса гена TP53 от общей популяции
mel Kor	500	не определено	—	0
mel Rac	1250	не определено	—	0
mel Is	1300	162	—	0
mel Si	1350	не определено	не определено	0
mel Hn	1500	246	+	85
mel R	1500	не определено	не определено	50
mel Gi	1550	не определено	—	0
mel H	1800	107	не определено	33
mel Il	1900	100	—	50
mel Ibr	2000	214	+	15
mel Me	2000	132	не определено	0
mel Mtp	2000	100	не определено	0
mel Gus	2000	62	—	0
mel Bgf	2000	2	не определено	50

резистентна к аранозе при наличии множества нарушений хромосомы 17. Второе: хромосома 17 сохранена. Уровень экспрессии TP53 оказался не связанным с устойчивостью к аранозе фактором. Мы можем объяснить наблюдаемый дуализм тем, что у одних больных меланома прогрессирует при наличии аномалий хромосомы 17 и отсутствии «стража генома».

Но существует такая группа больных, у которых прогрессия и резистентность меланомы оказались не связаны с аномалиями хромосомы 17. Прогрессия могла произойти только в том случае, если клетка с самого начала не имела возможности осуществить p53-зависимый апоптоз. Причины этого явления еще недостаточно изучены [6, 13].

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Bogdan I., Xin H., Burg G., Boni R. Heterogeneity of allelic deletions within melanoma metastases. *Melanoma Res* 2001;11(4):349–54. PMID: 11479423.
2. Копнин Б. П., Копнин П. Б., Хромова Н. В. и др. Многоликий p53: разнообразие форм, функций, опухолюсупрессирующих и онкогенных активностей. *Клиническая онкогематология* 2008;1(1):2–9.
3. Blagosklonny M. V. Loss of function and p53 protein stabilization. *Oncogene* 1997;15:1889–93. DOI: 10.1038/sj.onc.1201374. PMID: 9365234.
4. Lavin M. F., Gueven N. The complexity of p53 stabilization and activation. *Cell Death Differ* 2006;13(6):941–50. DOI: 10.1038/sj.cdd.4401925. PMID: 16601750.
5. Roemer K. Mutant p53: gain-of-function oncoproteins and wild-type p53 inactivators. *Biol Chem* 1999;380(7–8):879–87. DOI: 10.1515/BC.1999.108. PMID: 10494837.
6. Houben R., Hesbacher S., Schmid C. P. et al. High-level expression of wild-type p53 in melanoma cells is frequently associated with inactivity in p53 reporter gene assays. *PLoS One* 2011;6(7):e22096. DOI: 10.1371/journal.pone.0022096. PMID: 21760960.
7. Michael D., Oren M. The p53 and Mdm2 families in cancer. *Curr Opin Genet Dev* 2002;12(7):53–9. PMID: 11790555.
8. Soussi T., Beroud C. Assessing TP53 status in human tumours to evaluate clinical outcome. *Nat Rev Cancer* 2001;1(3):233–40. DOI: 10.1038/35106009. PMID: 11902578.
9. Gwosdz C., Scheckenbach K., Lieven O. et al. Comprehensive analysis of the p53 status in mucosal and cutaneous melanomas. *Int J Cancer* 2006;118(3):577–82. DOI: 10.1002/ijc.21366. PMID: 16094622.
10. Sparrow L. E., Soong R., Dawkins H. J. et al. p53 gene mutation and expression in naevi and melanomas. *Melanoma Res* 1995;5(2):93–100. PMID: 7620345.
11. Soto J. L., Cabrera C. M., Serrano S., López-Nevot M. A. Mutation analysis of genes that control the G1/S cell cycle in melanoma: TP53, CDKN1A, CDKN2A, and CDKN2B. *BMC Cancer* 2005;5:36.

- DOI: 10.1186/1471-2407-5-36.
PMID: 15819981.
12. Li W., Sanki A., Karim R.Z. et al. The role of cell cycle regulatory proteins in the pathogenesis of melanoma. *Pathology* 2006;38(4):287–301. DOI: 10.1080/00313020600817951. PMID: 16916716.
13. Avery-Kiejda K.A., Bowden N.A., Croft A.J. et al. P53 in human melanoma fails to regulate target genes associated with apoptosis and the cell cycle and may contribute to proliferation. *BMC Cancer* 2011;11:203. DOI: 10.1186/1471-2407-11-203. PMID: 21615965.
14. Healy E., Belgaid C.E., Takata M. et al. Allelotypes of primary cutaneous melanoma and benign melanocytic nevi. *Cancer Res* 1996;56(3):589–93.
15. Boni R., Matt D., Voetmeyer A. et al. Chromosomal allele loss in primary cutaneous melanoma is heterogeneous and correlates with proliferation. *J Invest Dermatol* 1998;110(3):215–7. DOI: 10.1046/j.1523-1747.1998.00109.x. PMID: 9506438.
16. Soto Martínez J.L., Cabrera Morales C.M., Serrano Ortega S., López-Nevot M.A. Mutation and homozygous deletion analyses of genes that control the G1/S transition of the cell cycle in skin melanoma: p53, p21, p16 and p15. *Clin Transl Oncol* 2005;7(4):156–64. PMID: 15960923.
17. Shahjahani M., Mohammadiasl J., Noroozi F. et al. Molecular basis of chronic lymphocytic leukemia diagnosis and prognosis. *Cell Oncol (Dordr)* 2015;38(2):93–109. DOI: 10.1007/s13402-014-0215-3. PMID: 25563586.
18. Михайлова И.Н., Лукашина М.И., Барышников А.Ю. и др. Клеточные линии меланомы — основа для создания противоопухолевых вакцин. *Вестник РАМН* 2005;7:37–40.
19. Olivier M., Hollstein M., Hainaut P. TP53 mutations in human cancers: origins, consequences, and clinical use. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2010;2(1):a001008. DOI: 10.1101/cshperspect.a001008. PMID: 20182602
20. Пономарев А.В., Мисюрин В.А., Рудакова А.А. и др. Изменение экспрессии мРНК MDM2 и NFκB1 в клеточных линиях меланомы человека при воздействии двух лекарственных форм аранозы. *Российский биотерапевтический журнал* 2017;16(3):52–8. DOI: 10.17650/1726-9784-2017-16-3-52-58.