

**НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ МОЛЕКУЛЯРНОЇ БІОЛОГІЇ І ГЕНЕТИКИ**

РУДЕНКО ЄВГЕНІЯ ЄВГЕНІЇВНА

УДК 577.218, 616.006.6

**ПОШУК ПОТЕНЦІЙНИХ ГЕНІВ-СУПРЕСОРІВ ПУХЛИННОГО
РОСТУ ДЛЯ СВІТЛОКЛІТИННОЇ КАРЦИНОМИ НИРКИ ЛЮДИНИ**

03.00.22– молекулярна генетика

АВТОРЕФЕРАТ
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Київ 2016

Дисертацією є рукопис.

Роботу виконано у відділі молекулярної онкогенетики Інституту молекулярної біології і генетики НАН України.

Науковий керівник: доктор біологічних наук, старший науковий співробітник
Кашуба Володимир Іванович
Інституту молекулярної біології і генетики
НАН України,
завідувач відділу молекулярної онкогенетики.

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук, професор
Сиволоб Андрій Володимирович,
ННЦ «Інститут біології та медицини» Київського
національного університету імені Тараса Шевченка,
професор кафедри загальної та молекулярної генетики;

кандидат біологічних наук, доцент
Подольська Світлана Володимирівна,
Національна медична академія післядипломної освіти
імені П.Л. Шупіка,
доцент кафедри медичної та лабораторної генетики.

Захист дисертації відбудеться «27» грудня 2016 року о 10³⁰ годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.237.01 Інституту молекулярної біології і генетики НАН України за адресою: 03680, м. Київ, вул. Академіка Заболотного, 150.

З дисертацією можна ознайомитися в бібліотеці Інституту молекулярної біології і генетики НАН України за адресою (03680, м. Київ, вул. Академіка Заболотного, 150).

Автореферат розіслано «25» листопада 2016 року.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради
кандидат біологічних наук, с.н.с.

І.В. Крупська

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Захворюваність пухлинами сечостатевої системи в світі становить понад 200 тис. випадків щорічно. Протягом 2011 року рак нирки був діагностований в 5622 пацієнтів в Україні. Для близько чверті цих пацієнтів період з моменту постановки діагнозу до смерті становить менше, ніж один рік (Бюлетень національного канцер-реєстру України, видання № 14). Тому діагностика і лікування світлоклітинної карциноми нирки (СККН) залишається складною проблемою в Україні і в світі.

Серед урологічних пухлин світлоклітинна карцинома нирки займає третє місце по частоті захворюваності після раку простати і раку сечового міхура. При цьому СККН займає перше місце по смертності і складає близько 85% всіх випадків раку нирки (Cheville et al., 2003). Це захворювання характеризується негативним прогнозом і, як правило, погано піддається хіміо- та радіотерапії (Tannir, 2014).

Таким чином, рак органів уrogenітальної системи залишається складною проблемою, і дослідження особливостей канцерогенезу на молекулярному рівні є важливими для виявлення нових специфічних онкомаркерів для зазначених форм злоякісних новоутворень. В перспективі це може сприяти ранній діагностиці, вибору оптимального лікування та подальшому контролю захворювання (Negm et al., 2002).

Фундаментальні дослідження клітинних і молекулярних механізмів онкогенезу виявили ряд генетичних і епігенетичних змін, які супроводжують процес пухлиноутворення (Pavlovich et al., 2003). Наприклад, делеції і гіперметилування промоторних ділянок генів-супресорів та ампліфікації онкогенів і їх транслокації в більш транскрипційно активні регіони. Такі зміни призводять до зниження або блокування експресії генів-супресорів пухлин і надекспресії протоонкогенів.

Вищевказані зміни часто спостерігаються на хромосомі 3 людини у випадку розвитку епітеліальних пухлин і, зокрема, при СККН. Так, при СККН частими є інактивації генів *VHL* (Velickovic et al., 2001) та *FHIT* (Fong et al., 1997). Також на 3-й хромосомі знаходяться кілька генів, для яких супресія пухлин показана тільки на клітинних лініях. Зокрема, на ділянці 3p21.3 був відкритий ген-супресор *RASSF1A* (Ras association domain family 1A). Реекспресія гена *RASSF1A* в лініях клітин раку легені інгібувала ріст пухлин у безтимусних мишей при інокуляції модифікованими сублініями (Dammann et al., 2000). Ген *NPRL2/G21* (nitrogen permease regulator - like 2) є негативним регулятором кіназної активності. Було показано інактивуючі мутації цього гена для ряду злоякісних пухлин, а також виявлено гомозиготні делеції на 3'-кінці у клітинах ліній карциноми нирки, легені і шийки матки. Супресію росту пухлин було показано *in vitro* (Li et al., 2004). Ген *hMLH1* (human mutL homolog 1) бере участь у репарації ДНК. Було показано, що для гена *hMLH1* спостерігається зниження експресії білка при недрібноклітинному раку легені (Wieland et al., 1996, Xinarianos et al., 2000, Kane et al., 1997). Ще один ген - *BAP1* (BRCA associated protein 1) показує часту втрату гетерозиготності і інтрагенні гомозиготні делеції

в клітинних лініях раку легені. Було висунуто припущення, що цей ген-супресор бере участь в сигнальних шляхах, які контролюються протеїном BRCA1 (Jensen et al., 1998). Нещодавно потенційним геном-супресором став ген *FUS1*, що містить внутрішні гомозиготні делеції в клітинах раку молочної залози і легені. Підвищена експресія даного гена призводила до зменшення кількості колоній на 60-80%, сформованих лінією клітин в тесті на формування колоній (Kondo et al., 2001).

Розуміння молекулярних механізмів онкосупресії дозволить створювати діагностичні панелі та отримувати лікарські препарати для стримування росту пухлин. В зв'язку з цим, дослідження відомих генів, що мають функції онкосупресорів, та пошук нових генів-супресорів росту пухлин є перспективним напрямком онкогенетики.

Зв'язок з науковими програмами, планами, темами. Роботу виконано в рамках наукових проектів відділу функціональної геноміки Інституту молекулярної біології та генетики НАН України «Ідентифікація генів-супресорів, картованих на 3-й хромосомі для створення маркерів – ключових для певних видів злоякісних пухлин епітеліального походження» (2007-2011 рр., номер державної реєстрації 0107U000337), та «Дослідження властивостей молекулярно-генетичних маркерів як основи для діагностики онкологічних патологій» (2007-2009 рр., номер державної реєстрації 0107U0004941), а також в рамках наукової теми відділу молекулярної онкогенетики «Вивчення генетичних та епігенетичних змін в злоякісних пухлинах епітеліального походження» (2010-2015 рр., номер державної реєстрації 0110U000691).

Мета та завдання дослідження. Метою роботи було виявити потенційні гени-супресори росту пухлин для світлоклітинної карциноми нирки людини та визначити вплив генетичних порушень і епігенетичних змін на їх експресію.

Для досягнення мети необхідно було вирішити такі завдання:

1. Виявити за допомогою методів широкомаштабного скрінгу потенційні гени-супресори для СККН.
2. Провести аналіз рівня експресії найбільш перспективних генів-супресорів у зразках СККН людини;
3. Встановити статус метилування промоторних ділянок генів зі зміненою експресією в зразках пухлин для з'ясування можливої причини змін рівня їхньої експресії у пухлинних тканинах порівняно з нормальними тканинами.
4. Перевірити наявність делецій в гомо- та гетерозиготному стані і змін кількості копій для відібраних генів у пухлинних тканинах.

Об'єкт дослідження – генетичний та епігенетичний контроль росту пухлин.

Предмет дослідження – потенційні гени-супресори пухлинного росту світлоклітинної карциноми нирки.

Методи дослідження – молекулярно-біологічні методи, що включають NotI-мікрочіпи (NMA), полімеразну ланцюгову реакцію в реальному часі (К-ПЛР), визначення втрати гетерозиготності в поліморфних локусах (ЛОН-аналіз),

метилспецифічну полімеразну ланцюгову реакцію (МС-ПЛР), аналіз кількості копій гена, а також біоінформатичні і статистичні методи.

Наукова новизна одержаних результатів. За допомогою нової технології NotI-мікрочіпів були виявлені зміни в генах/локусах 3-ї хромосоми людини, а також досліджений профіль експресії потенційних генів-супресорів пухлинного росту на рівні мРНК *NKIRAS1*, *PPM1M*, *PRICKLE2* в карциномах нирок. Вперше досліджено профіль експресії родини селеновмісних глутатіонпероксидаз (*GPX 1-4,6*) в карциномах нирок. Показано, що гени *GPX2* і *GPX6* не експресуються в пухлинах і нормальній тканині нирки. Вперше показано зміни кількості копій певних генів, а також відсутність взаємозв'язку між експресією генів на рівні мРНК та метилуванням їх промоторних ділянок. Так, зменшення кількості копій в зразках СККН було показано для генів *NKIRAS1*, *PPM1M*, *PRICLE2* та *GPX1*. Збільшення кількості копій було виявлено для гена *GPX3*, а кількість копій гена в зразках *GPX4* СККН залишалася незмінною.

Практичне значення одержаних результатів. Отримані нами результати підтверджують ефективність і перспективність нової технології NotI-мікрочіпів для масштабного скринінгу геному з метою виявлення потенційних пухлиносупресорних генів і наборів онкомаркерів для ранньої діагностики раку. Виявлені генетичні порушення в генах *NKIRAS1*, *PPM1M*, *PRICLE2* та *GPX1* в пухлинах хворих на СККН свідчать про можливість застосування цих генів як компонентів мультимаркерної панелі для ідентифікації даного типу карцином.

Особистий внесок здобувача. Усі дослідження проводилися за безпосередньої участі здобувача. Отримання геномної ДНК із зразків хірургічно видалених тканин епітеліальних пухлин та оточуючих тканин, а також аналіз отриманих результатів, були виконані автором особисто. Безпосередньо здобувачем виконано вивчення експресії генів та аналіз кількості копій генів у епітеліальних пухлинах нирки людини методом К-ПЛР (кількісна полімеразна ланцюгова реакція). Бісульфітна обробка геномної ДНК, виділення РНК зі зразків пухлин та МС-ПЛР проводилися спільно зі ст. н. с. Геращенко Г.В. та н. с. Кондратовим О.Г. Визначення кількості тринуклеотидних повторів виконано спільно з ст. н. с. Кравченко С.А. Цикл експериментів, які пов'язані з технологією NotI-мікрочіпів, виконано у співробітництві з Каролінським інститутом, Стокгольм, Швеція.

Апробація результатів дисертації. Результати досліджень були представлені на поточних наукових семінарах відділів молекулярної онкогенетики і функціональної геноміки ІМБіГ та на наукових конференціях: Біологічні дослідження молодих учених в Україні (Київ, 2012); Біотехнологія XXI століття (Київ, 2013); Шевченківська Весна (Київ, 2013). Молодь і поступ в біології (Львів, 2014).

Публікації: основні положення дисертаційної роботи опубліковано в 11 працях, з них 7 статей у фахових наукових журналах та тези 4 доповідей на наукових конференціях.

Структура та обсяг роботи. Дисертація складається із вступу, огляду літератури, експериментальної частини, узагальнення результатів, висновків, переліку використаних джерел. Загальний обсяг дисертації - 134 сторінки.

Робота містить 16 рисунків, 10 таблиць. Список використаної літератури охоплює 288 найменувань.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ

Матеріали та методи досліджень. В роботі були використані видалені хірургічним шляхом пухлини і оточуючі їх умовно нормальні тканини, що були отримані в Київському національному урологічному центрі (Київ, Україна). Зразки зберігали в рідкому азоті. Пухлини гістологічно класифікували відповідно до критеріїв ВООЗ по TNM класифікації. Всі зразки були зібрані відповідно до принципів, викладених в Гельсінкській декларації та згідно з інструкціями Етичного Комітету ІМБІГ. Для виділення ДНК використовували GeneJET Genomic DNA Purification Kit “Thermo Scientific”, а тотальної РНК - RNeasy Mini Kit “QIAGEN”, згідно з протоколом виробника.

Технологія NotI-мікрочипів. Сто вісімдесят NotI-зв’язуючих клонів з хромосоми 3 людини було нанесено на скляні слайди у шістьох повторях. У цих клонах були вставки до 15 тис п. о. Плазмідну ДНК для іммобілізації було виділено за допомогою набору HiPure Plasmid Midiprep kit (Invitrogen), друкування проводили на покриті силаном скельця при концентрації ДНК 0.25 мкг/мл за допомогою QarrayMini microarrayer (Genetix, United Kingdom). В якості негативного контролю використовували ДНК з *E. coli*. Для гібридизації використовували ДНК, мічені за допомогою ПЛР. Для ДНК з нормальних тканин використовували флуоресцентний барвник Cy3 (зелений), а для ДНК з пухлин – Cy5 (червоний), Amersham. Гібридизацію масивів проводили при 42°C протягом 15 годин на приладі Lucidea Base (Amersham Pharmacia Biotech), згідно з протоколом виробника. Сканували мікромасиви на приладі GenePix 4000A. Результати гібридизації аналізували за допомогою програми GenePix Pro 6.0 (Amersham Pharmacia Biotech).

Визначення відносної експресії генів. Перед початком процедури синтезу кДНК тотальну РНК попередньо обробляли ДНКазою (Thermo Scientific) з метою видалення домішок геномної ДНК. Для синтезу першого ланцюга кДНК використовували RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific) згідно з протоколом виробника.

Рівень відносної експресії генів визначали методом кількісної ПЛР в реальному часі на приладі Bio-Rad iQ5. Результати обраховували за формулою для відносної кількісної ПЛР в реальному часі ($\Delta\Delta C_t$ -метод). Для обчислення ефективності реакції створювали стандартну логарифмічну криву серії розведень для праймерів досліджуваних і референсних генів. Для цього виконували серію розведень матриці від 1 до 100нг. Кожний зразок аналізували у триплетах, для кожної пари праймерів робили негативний контроль.

Праймери були підібрані за допомогою онлайн-ресурсу Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>). В якості референсного гену, згідно з даними літератури, використовували ТВР. Реакції проводили, використовуючи реактиви

фірми «Thermo Scientific» 2x SYBR Green PCR Master Mix. Кожний зразок аналізували у триплетах, для кожної пари праймерів робили негативний контроль.

Бісульфітна модифікація геномної ДНК. Для бісульфітної модифікації використовували EZ DNA Methylation™ Kit (ZYMO RESEARCH). Модифікована ДНК (100 нг) була використана в якості матриці для ПЛР з праймерами, які були підібрані за допомогою онлайн-інструменту MethPrimer (<http://www.urogene.org/methprimer/>).

Аналіз алельного поліморфізму локусів D3S1287, D3S4182, A002C09, MARC_15661, RH76369, RH12810 З метою визначення інформативності аналізу даних локусів було проведено аналіз алельного поліморфізму вибірці умовно здорових індивідів з України (n=25). Ампліфікація (28 циклів) здійснювалась на приладі BIS Thermocycler, для реакції використовували праймери з бази даних NCBI: D3S1287, D3S4182, A002C09, MARC_15661, RH76369, RH12810 Аналіз отриманих продуктів ПЛР проводили в 6% поліакриламідному гелі.

Аналіз кількості копій гена. Аналіз кількості копій гена виконували методом кількісної ПЛР в реальному часі на приладі Bio-Rad iQ5. Праймери були підібрані за допомогою онлайн-ресурсу Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>). Для генів *NKIRAS1*, *PPM1M*, *PRICKLE2* в якості референсного гена використовували *TBP*. Для генів *GPX1*, 3, 4 використовували референсний ген *COL2A1*. Реакції виконували, використовуючи реактиви фірми «Thermo Scientific» 2x SYBR Green PCR Master Mix. Кожний зразок аналізували у триплетах. Згідно з гістологічним аналізом, забруднення пухлинного зразка тканинами строми і лімфоцитами може досягати 30–40%. Таким чином, якщо розраховане відношення числа копій гена у пухлині до нормальної тканини було нижче 0,35, вважали, що має місце гомозиготна делеція; як гетерозиготну делецію визначали зразки, що мали відповідне співвідношення у діапазоні 0,35–0,85. Відношення вище 1,5 вважалось ампліфікацією (Elenbaas et al., 2001). Зразки, що мали співвідношення 0,85–1,5 вважали такими, що не мають змін кількості копій гена.

Аналіз кількості тринуклеотидних повторів. Для аналізу кількості тринуклеотидних повторів GCG (аланінові повтори) проводили ампліфікацію ділянки, що містила поліморфний локус. На 5'-кінці прямого праймера містилася флуоресцентна мітка Cy5. Для встановлення точних розмірів продуктів ампліфікації, їх розділяли в 6% денатуруючому поліакриламідному гелі. Флуоресценцію фіксували за допомогою автоматичного лазерного секвенатора ALF-express. Електрофорез проводили при температурі 50°C, при 1000 V, 50 mA, 30 W протягом 90 хв. Після сканування ALF-гель аналізували за допомогою програми FM2.1 (Fragment Manager Software V2.1, Pharmacia, Швеція).

Статистичний аналіз. Непараметричний тест Вілкоксона використовували для порівняння відносного рівня експресії мРНК у зразках СККН і умовно нормальних тканин. Для обрахування похибки вимірювання рівня відносної експресії генів в триплетах використовували похибку середнього. Частоти алелей та теоретично очікуваний розподіл генотипів

розраховували за методом запропонованим Лі (Лі Ч., 1978). Показник достовірності P для відповідності рівновазі Харді-Вайнберга було розраховано із використанням методу ланцюгів Маркова за Guo та Thompson (Guo S.W., 1992).

Показники фактичної і теоретичної гетерозиготності та стандартну похибку розраховували за формулами, запропонованими Неєм (Nei M., 1978). Визначення дефіциту чи надлишку гетерозигот розраховували за методом, запропонованим Росе та Раймондом (Rousset F., 1995). Різницю між найбільшими та найменшими показниками гетерозиготності оцінювали за допомогою t -критерія Стьюдента (Лакін Г.Ф., 1980).

Статистична обробка результатів проводилась за допомогою загальнодоступних онлайн онлайн ресурсів <http://www.openepi.com>, а також програмного забезпечення Statistica v.10.0 та за допомогою власного програмного забезпечення ATG (Senchenko et al., 2011) і NIMAN (Dmitriev et al., 2012), а також програмного забезпечення фірми BioStat (Glantz et al., 2005). За критичний рівень достовірності при перевірці статистичних гіпотез приймали $P < 0,05$.

Результати та їх обговорення. Широкомаштабний аналіз змін експресії генів на рівні мРНК при СККН. Для пошуку потенційних генів-супресорів росту пухлин нирки ми використовували NotI-мікрочіпи (NMA) для хромосоми 3 людини. За допомогою технології NMA було проаналізовано 23 зразка раку нирки для виявлення метилування, делецій або ампліфікацій в NotI-сайтах хромосоми 3 людини.

Результати гібридизації 23 NotI-збагачених ДНК-зондів хромосоми 3 із парних проб тканини нирки норма/пухлина на мікрочіпах, що містять 180 NotI-зв'язуючих клонів, показали, що основними змінами в ДНК є метилування або делеції (M/D). Оскільки ампліфікації та/або деметилування було детектовано вкрай рідко, такі випадки було проігноровано в подальшому аналізі.

Аналіз виявив 19 NotI-сайтів, пов'язаних з 23 генами, для яких встановлено метилування або делеції у більш ніж 17% випадків (табл. 1).

Таблиця 1.

Список NotI-сайтів на хромосомі 3 з частотами метилування/делецій вище 17% у світлоклітинному раку нирки.

NotI-сайт	Назва гена	Локус	Частота метилування/делецій, %
NL1-CJ4R (C)	<i>NKIRAS1/RPL15</i>	3p24.2	57 (13/23)
NL6-FJ5R (C)	<i>LRRN1</i>	3p26.2	43 (10/23)
NL3-CA11RS	<i>LRRC3B</i>	3p24	43 (10/23)
NLJ-003RD	<i>RBSP3 (CTDSPL)</i>	3p21.3	35 (8/23)
NL3003R (U)	<i>GORASP1/TTC21A</i>	3p22-p21.33	35 (8/23)
NRLA404R (U)	<i>VHL</i>	3p25.3	30 (7/23)
NR1-XM13C	<i>IQSEC1</i>	3p25.2	26 (6/23)

Продовження таблиці 1

NL1-BA6R	<i>FOXP1</i>	3p14.1	26 (6/23)
NR1-AN24RS	<i>ABHD5/C3orf77</i>	3p21	22 (5/23)
NL3A006R (D)	<i>NBEAL2</i>	3p21.31	22 (5/23)
NL3A001R (D)	<i>GNAI2</i>	3p21.31	22 (5/23)
NR1-NC7RS	<i>PPM1M</i>	3p21.2	22 (5/23)
NR1-NJ9R (C)	<i>PRICKLE2</i>	3p14.1	22 (5/23)
HSJ4-AB7R (C)	<i>RPL32/IQSEC1</i>	3p25.2	17 (4/23)
NL4-DP2RS	<i>FGD5</i>	3p25.1	17 (4/23)
NL4-AP18R (C)	<i>PLCL2</i>	3p24.3	17 (4/23)
NL4-BC8R (C)	<i>ALDH1L1</i>	3q21.3	17 (4/23)
NL1A079R (D)	<i>EPHB1</i>	3q21-q23	17 (4/23)
NR1-PD1R	<i>ZIC4</i>	3q24	17 (4/23)

Згідно з даними літератури, 6 із цих генів асоційовані з різними типами карцином (*LRRN1*, *GORASP1*, *FOXP1*, *FGD5*, *PLCL2* і *ALDH1L1*). П'ять з 23 зразків (№ 8, 11, 16, 17, 22) показали одночасні зміни з високою частотою (в 9-16 NotI-сайтах із 19) (рис. 1).

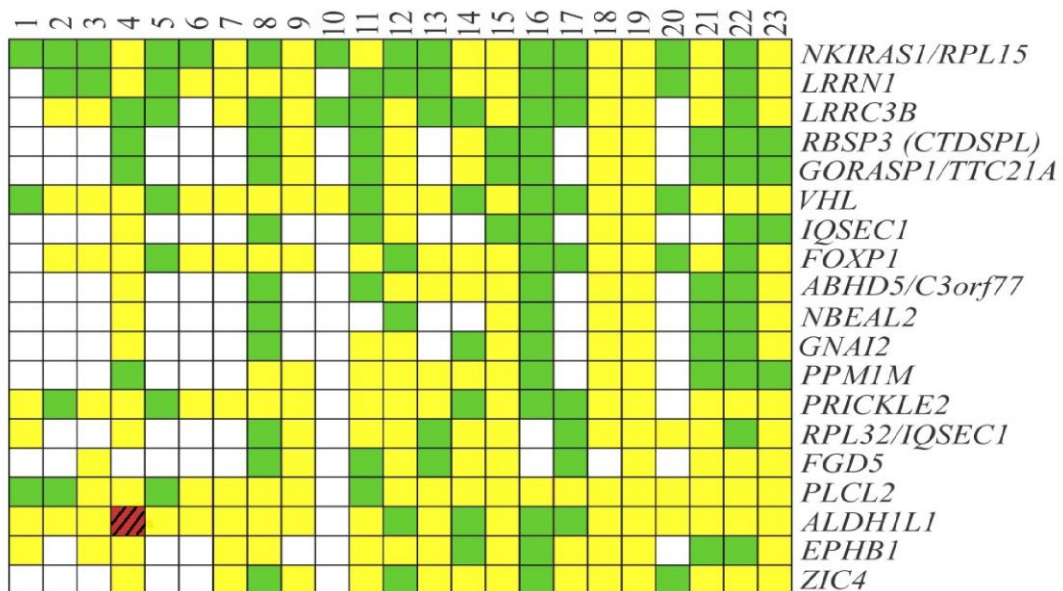


Рис. 1. Результати аналізу даних NotI-мікрочіпів для генів з високою частотою метилювання та/або делецій в СККН. Вертикаль: NotI-сайти, упорядковані по частоті змін, і у яких частота метилювання/делецій варіює від 57% до 17%. Горизонталь: 23 зразка СККН. Темно-сірі квадрати вказують метилювання та/або делеції ДНК; Світло-сірі – без змін, квадрат зі штриховкою - ампліфікацію/деметилювання, білий - не інформативні дані

Для більш детального вивчення були відібрані гени *NKIRAS1* та *PPM1M*, які задіяні у NF-кВ-сигнальному шляху, а також ген *PRICKLE2*, що бере участь у Wnt-сигнальному шляху. Обидва сигнальні шляхи є ключовими молекулярними шляхами при канцерогенезі. Решта генів, що показують зміни більше, ніж у 17%, були описані співробітниками нашого відділу раніше або немає даних про їх зв'язок з канцерогенезом.

Аналіз відкритих біоінформатичних баз даних. Одним з підходів для ідентифікації потенційних генів-супресорів росту пухлин є аналіз відкритих біоінформатичних баз даних. До них відносяться, наприклад, бази даних по експресії, встановленої за допомогою олігонуклеотидних мікрочіпів (гібридизація) або серійного аналізу експресії генів (SAGE). З метою ідентифікації генів, які беруть участь у розвитку раку нирки, було проаналізовано дані, отримані при гібридизації кДНК з олігонуклеотидами на мікрочіпах, для 84 зразків нормальної тканини та 83 зразків пухлин. Одночасно було проведено аналіз одного зразка пухлини нирки, а також двох зразків нормальної тканини, представлених в базі SAGE. В якості контролю для порівняння експресії використовували ген *TBP* (Jung et al., 2007).

Було ідентифіковано 12 генів, для яких дані по зниженню експресії на рівні мРНК, отримані в результаті гібридизації мікрочіпів, співпадали з даними аналізу бази SAGE.

Два гени - глутатіонпероксидази *GPX1* та *GPX3* – було обрано для вивчення генетичних і епігенетичних змін, враховуючи дані про їх участь у прогресії і метастазуванні пухлин. Ми припустили, що й інші гени цього сімейства можуть брати участь у розвитку СККН. Тому для подальшого аналізу також було взято гени *GPX2*, *GPX4* і *GPX6*.

Профіль метилування промоторних ділянок генів NKIRAS1, PPM1M, PRICKLE2 та сімейства GPX і втрата гетерозиготності в зразках тканин СККН. CpG-острівці в промоторних ділянках генів *NKIRAS1*, *PPM1M*, *PRICKLE2* та сімейства *GPXs* було визначено за допомогою онлайн-інструменту для пошуку CpG-острівців (<http://www.uscnorris.com/cpgislands2/cpg.aspx>). Ми виявили CpG-острівці в промоторних областях генів *NKIRAS1*, *PPM1M*, *GPX1*, *GPX3* і *GPX4*, але не у генів *PRICKLE2*, *GPX2* і *GPX6*. Було проаналізовано 25 зразків СККН і відповідних нормальних тканин, використовуючи метилспецифічну ПЛР і специфічні праймери для неметильованих і метильованих нуклеотидних послідовностей генів *NKIRAS1*, *PPM1M*, *GPX1*, *GPX3* і *GPX4*. Нами було встановлено, що промотори вказаних генів не метиловані ані в зразках пухлин, ані в умовно нормальних тканинах. За результатами аналізу алельного поліморфізму досліджуваних генів встановлено низький рівень гетерозиготності в дослідній групі, тому LOH-аналіз не проводився. Таким чином, представлені вище дані, отримані при гібридизації NotI-микрочипів, скоріше за все, свідчать про наявність делецій у регіонах цих генів.

Дослідження експресії та аналіз кількості копій генів NKIRAS1, PPM1M, PRICKLE2 та GPXs 1, 2, 3, 4, 6. Методом К-ПЛР показано зниження рівня експресії мРНК гена *NKIRAS1* в 75% зразків СККН у порівнянні з оточуючою

нормальною тканиною (рис. 2). Аналіз кількості копій гена підтвердив наявність делецій гена *NKIRAS1* у 78,6% зразків (табл. 2). Загалом, дані NotI-мікрочіпів, аналізу експресії та кількості копій гена добре узгоджуються. Отримані результати вказують на те, що, імовірно, причиною зниження експресії для гена *NKIRAS1* в СККН є делеції. Враховуючи функції продукта гена *NKIRAS1* та його інгібуючий вплив на один з центральних пухлинно-асоційованих молекулярних шляхів, цей ген може розглядатися як кандидат в гени-супресори росту пухлин.

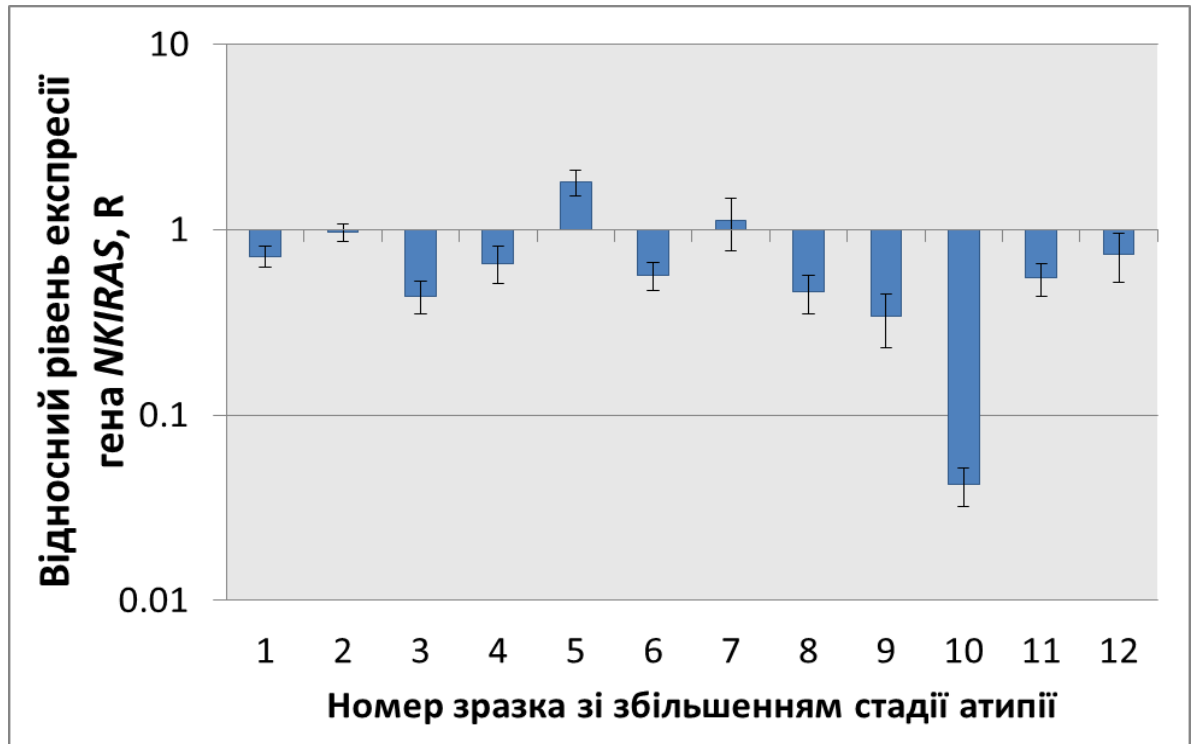


Рис. 2. Відносна експресія гена *NKIRAS1* (12 зразків) у світлоклітинних карциномах нирки. Зразки 1-7 стадії 1-2, 8-12 – стадії 3-4

Зміни у локусі гена *PPM1M* було виявлено у 22% зразків СККН за даними NotI-мікрочіпів. Зниження експресії гена *PPM1M* спостерігалось в 33% зразків СККН, однак, в 50% зразків експресія була підвищена (рис. 3). Втрат гетерозиготності (LOH) в поліморфних локусах і метилування промоторного регіону гена *PPM1M* не знайдено. Аналіз кількості копій гена показав наявність делецій у *PPM1M* в 50% зразків СККН, хоча також спостерігалися і дуплікації (у 17% зразків) (табл. 2).

Очевидно, для даного гена характерна складна регуляція активності. Проте, враховуючи можливу участь *PPM1M* в одному з ключових молекулярних шляхів канцерогенезу, а саме ІЛ1-індукованому шляху активації запалення через NF-κB, та високий відсоток змін як в експресії мРНК, так і в кількості копій гена в пухлинах, його можна віднести до пухлиноасоційованих. Механізми регуляції експресії та точні функції *PPM1M* в нормі і при СККН потребують подальшого вивчення.

Дані аналізу відносної експресії та кількості копій генів.

Назва гена	Зміни експресії, %	Результати аналізу кількості копій гена			
		Гомозиготні делеції з загального числа зразків	Гетерозиготні делеції з загального числа зразків	Зразки без змін з загального числа зразків	Дуплікації з загального числа зразків
<i>NKIRAS</i>	75%↓	2/14	9/14	3/14	0
<i>PPM1M</i>	33%↓, 50%↑	1/18	8/18	6/18	3/18
<i>PRICKLE2</i>	83%↓	0/18	8/18	9/18	1/18
<i>GPX1</i>	75%↓	1/12	10/12	1/12	0
<i>GPX2</i>	Слабка	-	-	-	-
<i>GPX3</i>	100%↓	0	0/12	6/12	6/12
<i>GPX4</i>	61%↓	0	0	12/12	0
<i>GPX6</i>	Не виявлено	-	-	-	-

Методом NotI-мікрочіпів у зразках СККН виявлено 22% змін у локусі гена *PRICKLE2*. Експресія гена *PRICKLE2* на рівні мРНК була знижена у 83% зразків СККН (рис. 4). Оскільки промоторна зона гена *PRICKLE2* не містить CpG-острівців, метилування промоторного регіону не є причиною зниження експресії *PRICKLE2*. Втрат гетерозиготності (LOH) у поліморфних локусах гена *PRICKLE2* також не знайдено. Визначення кількості копій гена виявило делеції у 44,4% зразків СККН. Імовірно, делеції є однією з причин зниження експресії *PRICKLE2* в клітинах СККН (табл. 2).

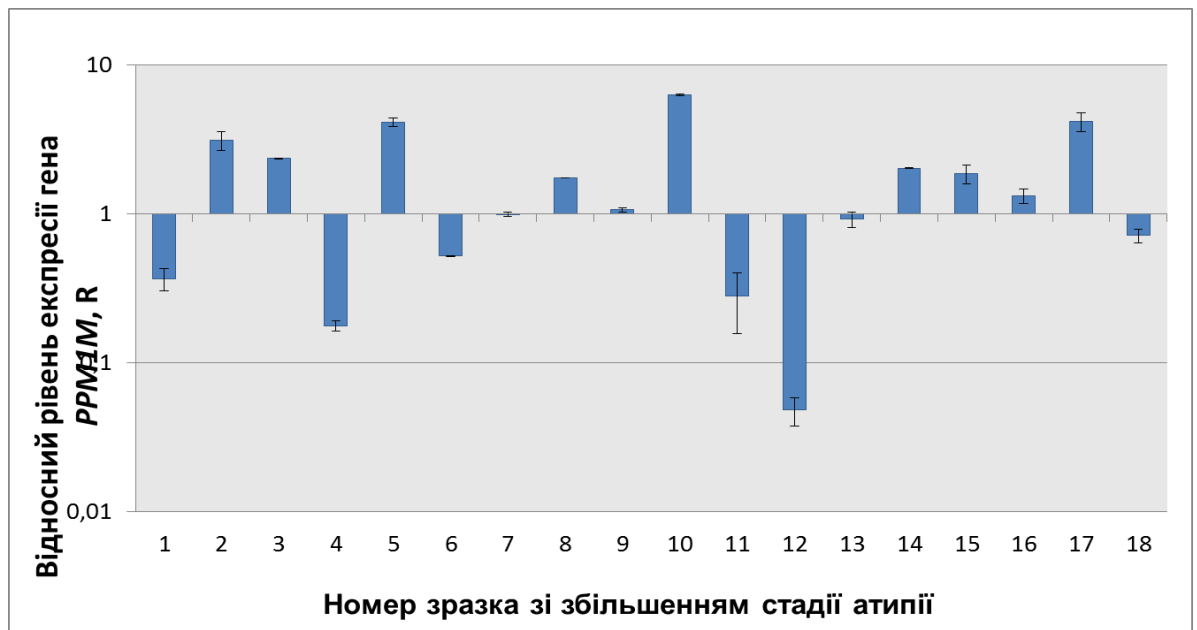


Рис. 3. Відносна експресія гена *PPM1M* (18 зразків) у світлоклітинних карциномах нирки. Зразки 1-14 стадія 1-2, 15-18 – стадії 3-4

Оскільки *PRICKLE2* приймає участь в Wnt-сигнальному шляху визначення площинної клітинної поляризації, інактивація цього гена може відображати процеси дедиференціації та втрати клітинами пухлин морфологічних ознак тканини, з якої вони походять. Отже, *PRICKLE2* є потенційним геном-супресором росту пухлин.

Дослідження експресії сімейства генів селеновмісних глутатіонпероксидаз методом К-ПЛР показало суттєве зниження експресії для генів *GPX1*, *GPX3* та *GPX4* на рівні мРНК. В той же час, гени *GPX2* і *GPX6* не експресувалися у СККН та в умовно нормальних тканинах (табл. 2).

Наші дані свідчать, що експресія гена *GPX1* була знижена у 75% зразків СККН, причому на пізніх стадіях захворювання зниження більш значне. Це добре погоджується з даними, що експресія *GPX1* знижується в умовах зниження рівня кисню, оскільки на пізніх стадіях канцерогенезу характерне наростання гіпоксії.

Метилювання промоторної ділянки гена *GPX1* не було виявлено, однак зменшення кількості копій гена (делеції) *GPX1* спостеігалися в 91,7% зразків СККН. Ми вважаємо, що делеції паралельно з білковою регуляцією, впливають на рівень експресії *GPX1* в СККН. Таким чином, ген *GPX1* є потенційним геном-супресором пухлин в СККН.

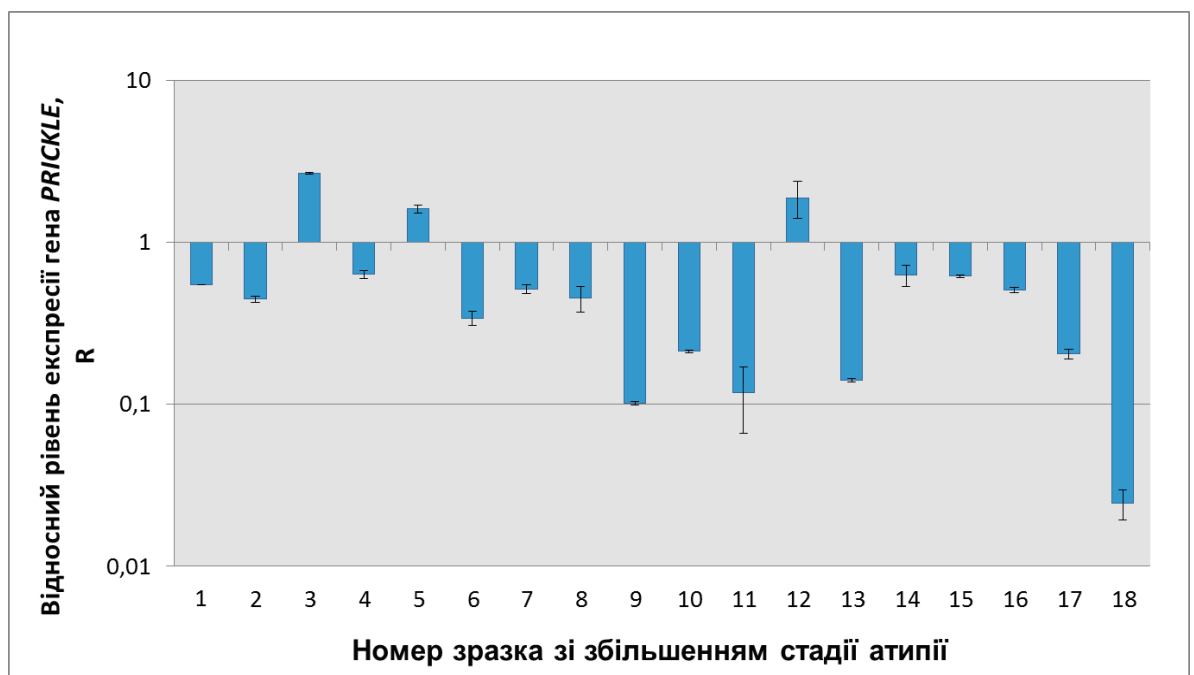


Рис. 4. Відносна експресія гена *PRICKLE2* (18 зразків) у світлоклітинних карциномах нирки. Зразки 1-14 стадія 1-2, 15-18 – стадії 3-4

Експресія гена *GPX3* була знижена у 100% зразків СККН порівняно з оточуючими тканинами. Отже, ген *GPX3* може бути кандидатом у гени-супресори пухлинного росту в СККН. Метилювання промоторної ділянки гена *GPX3* не було виявлено. Однак аналіз кількості копій гена виявив 50% дуплікацій гена у зразках СККН. Механізми регуляції експресії гена *GPX3* в СККН залишаються незрозумілими і потребують подальших досліджень.

Можливо, незважаючи на дуплікацію даного гена, його експресія пригнічується за рахунок білкової регуляції або мікроРНК.

За даними наших досліджень експресія *GPX4* була знижена у 61% зразків СККН, порівняно з оточуючими тканинами. Метилування промоторної ділянки гена *GPX4* не було виявлено, змін кількості копій гена *GPX4* не спостерігалось. Не зважаючи на те, що механізм зниження експресії *GPX4* залишається не яким і потребує подальших досліджень, цей ген може бути кандидатом в гени-супресори росту пухлин. В подальшому доцільно дослідити вплив білків і некодуючих РНК на експресію даного гена.

Аналіз поліморфізму тринуклеотидних повторів GPX1. Для глутатіонпероксидази 1 описано поліаланіновий поліморфізм в N-кінцевому регіоні, який включає три алеля з п'ятьма, шістьма або сімома аланінами (*Ala5*, *Ala6*, *Ala7*) в цій послідовності. Відповідно до цього, під час ПЛР-реакції для кожного зразка, що аналізується, утворюється по 1 продукту різної довжини для гомозиготних індивідів або 2 продукти у випадку гетерозигот (рис. 5.).

Оскільки досліджуваний локус містить поліморфні триклеотидні повтори, а їх алельні варіанти можуть відрізнятися один від одного лише на 1 повтор (3 п.н.), для встановлення точних розмірів продуктів ампліфікації конкретних алелів використовували аналіз за допомогою автоматичного лазерного флуориметра ALF express II (Amersham Biosciences, Швеція).

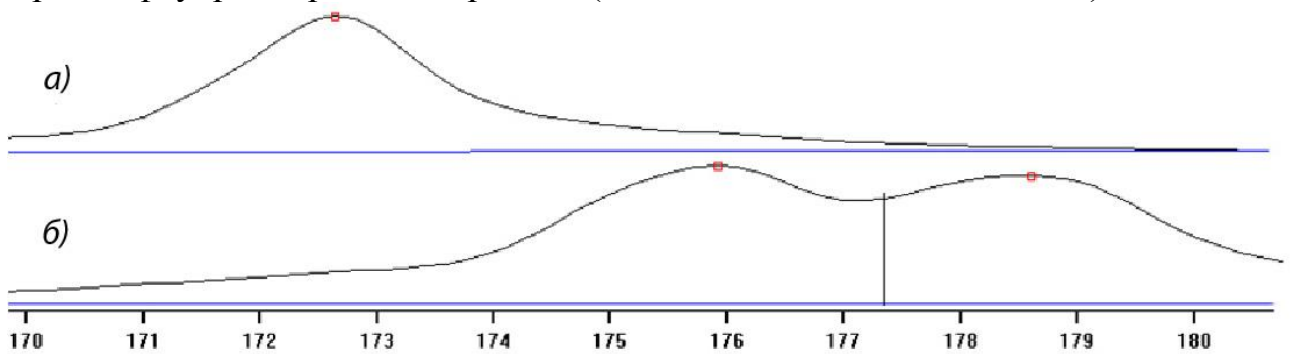


Рис. 5. Приклад електрофореграми флуоресцентно мічених продуктів ПЛР алельних варіантів поліаланінового поліморфізму гена *GPX1* за допомогою автоматичного лазерного флуориметру ALF-express II, отриманої з використанням програми Fragment Manager v 2.0. а) *Ala5/Ala5* (гомозигота), б) *Ala6/Ala7* (гетерозигота)

Алель *Ala5* для деяких видів раку пов'язаний з підвищеним ризиком виникнення онкологічних хвороб. Це може пояснюватися тим, що цей алель більш чутливий до індукції селеном (Zhuo, 2009). Однак, наявні дані для раку грудей і простати досить суперечливі (Knight, 2004; Kote-Jarai 2002). Тому в даній роботі проведено дослідження можливої асоціації алеля *Ala5* і генотипу *Ala5/Ala5* з ризиком виникнення СККН.

Щоб перевірити інформативність даного поліморфізму, було проведено аналіз даного алельного поліморфізму в 41 зразку плазми крові умовно здорових індивідів, старших за 60 років, без онкологічних захворювань в анамнезі, які проживали на території України.

Розподіл частот алелів та генотипів в цій групі суттєво не відрізнявся від даних для європейських популяцій (Makara, 2010). Фактична гетерозиготність 58,54% достовірно не відрізнялась від розрахованої за рівнянням Харді-Вайнберга – 63,62 (табл. 3).

Таблиця 3.

Розподіл частот алелів та генотипів поліаланінового поліморфізму гена *GPX1* в контрольній групі (n=41)

Алелі, %								Фактична частота	Очікувана частота
<i>Ala5</i>		<i>Ala6</i>		<i>Ala7</i>					
47,56		26,83		25,61					
Генотипи, %								Гетерозиготність	P
Частота	<i>Ala5/Ala5</i>	<i>Ala5/Ala6</i>	<i>Ala6/Ala6</i>	<i>Ala6/Ala7</i>	<i>Ala7/Ala7</i>	<i>Ala5/Ala7</i>			
Фактична	26,83	26,83	4,88	17,07	9,76	14,63	58,54	0,3593	
Очікувана	22,62	25,52	7,20	13,74	6,56	24,36	63,62		

Відсутність відхилення від рівноважного розподілу генотипів за рівнянням Харді-Вайнберга, свідчить про те, що окремі генотипи даного поліморфізму не знаходяться під впливом екзогенних факторів та внутрішньопопуляційних процесів в досліджуваній вибірці, а вибірка є репрезентативною. Отримані частоти алелів та генотипів та показник гетерозиготності, є достовірно значущими, тому даний поліморфізм може бути використаний в подальших дослідженнях.

Для дослідження асоціації певних алелів та генотипів поліморфного локусу гена *GPX1* з розвитком СККН використовувалась вибірка з 40 пар зразків пухлинних та відповідних їм умовно нормальних тканин. Зразки нормальних тканин пацієнтів були залучені до аналізу з метою виявлення можливої втрати гетерозиготності внаслідок гетерозиготних делецій в зразках пухлин. За результатами проведеного аналізу в парах пухлина-норма не виявлено втрати гетерозиготності, що свідчить на користь того, що делеції даного локусу не є частим явищем для даного типу пухлин. Розподіл частот генотипів в зразках пухлин 40 пацієнтів з СККН також не мав відхилень від очікуваних за законом Харді-Вайнберга (табл. 4.), що вказує на відсутність селективної переваги жодного генотипу в процесі розвитку цього типу пухлин.

Розподіл частот алелів та генотипів поліаланінового поліморфізму гена *GPX1* в групі пацієнтів з СККН (n=40)

Алелі, %							Гетерози- готність	P
Фактична частота	<i>Ala5</i>	<i>Ala6</i>	<i>Ala7</i>					
	48,75	30,00	21,25					
Генотипи, %							Гетерози- готність	P
Частота	<i>Ala5/Ala5</i>	<i>Ala5/Ala6</i>	<i>Ala6/Ala6</i>	<i>Ala6/Ala7</i>	<i>Ala7/Ala7</i>	<i>Ala5/Ala7</i>		
Фактична	25,00	25,00	10,00	15,00	2,50	22,50	62,50	0,8261
Очікувана	23,77	29,25	9,00	12,75	4,52	20,72	62,76	

Нами проведено порівняння частот алелів (рис. 6) за поліаланіновим поліморфізмом для пацієнтів із СККН та здорових донорів, старших 60 років. Алель з 5 аланіновими повторами як в групі з СККН, так і у здорових донорів є мажорним.

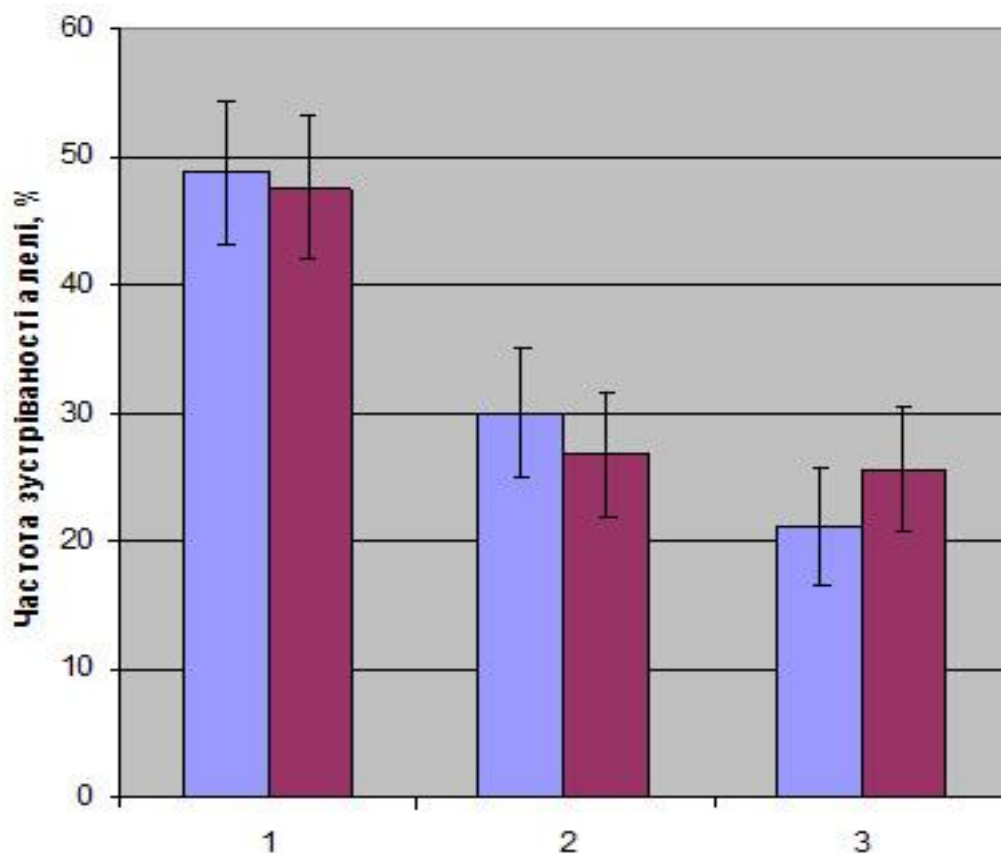


Рис.6. Розподіл алелів за поліаланіновим поліморфним локусом у хворих на СККН та осіб без онкологічних захворювань. 1. - *Ala5*. 2. - *Ala6*. 3. - *Ala7*. |■ СККН |■ Контроль |

Проте достовірних відмінностей між частотою алеля *Ala5* у хворих на СККН та осіб без онкологічних захворювань не виявлено ($p=0,44$). Згідно отриманих нами результатів, аланіновий поліморфізм гена *GPX1* не має прогностичного значення для СККН.

Гіпотетичні зміни у кількості копій генів, визначені за допомогою веб-ресурсу *sBioPortal*. Щоб підтвердити отримані результати, було проведено біоінформатичний аналіз даних, використовуючи веб-ресурс *sBioPortal* (Serami et al., 2012).

Використання *sBioPortal* (<http://cbioportal.org>) полегшує вивчення молекулярних механізмів канцерогенезу, оскільки на порталі зібрано дані по експресії генів, що були отримані за допомогою різних технологій, а також надано можливість проводити аналіз, порівнюючи гени, зразки різних пухлин і різні масиви даних. Дані аналізу геному на *sBioPortal* включають у себе соматичні мутації, зміни кількості копій ДНК (copy-number alterations, CNA), експресію мРНК і мікроРНК (міРНК), метилування ДНК, кількість білка, а також наявність фосфорильованих протеїнів.

Нами було проаналізовано генетичні зміни в 415 зразках СККН, використовуючи *sBioPortal*. Для генів *NKIRAS1*, *PPM1M*, *PRICKLE2* та *GPX1* найбільш характерними змінами є зменшення кількості копій гена (делеції), а для гена *GPX3* – дуплікації (рис. 7).

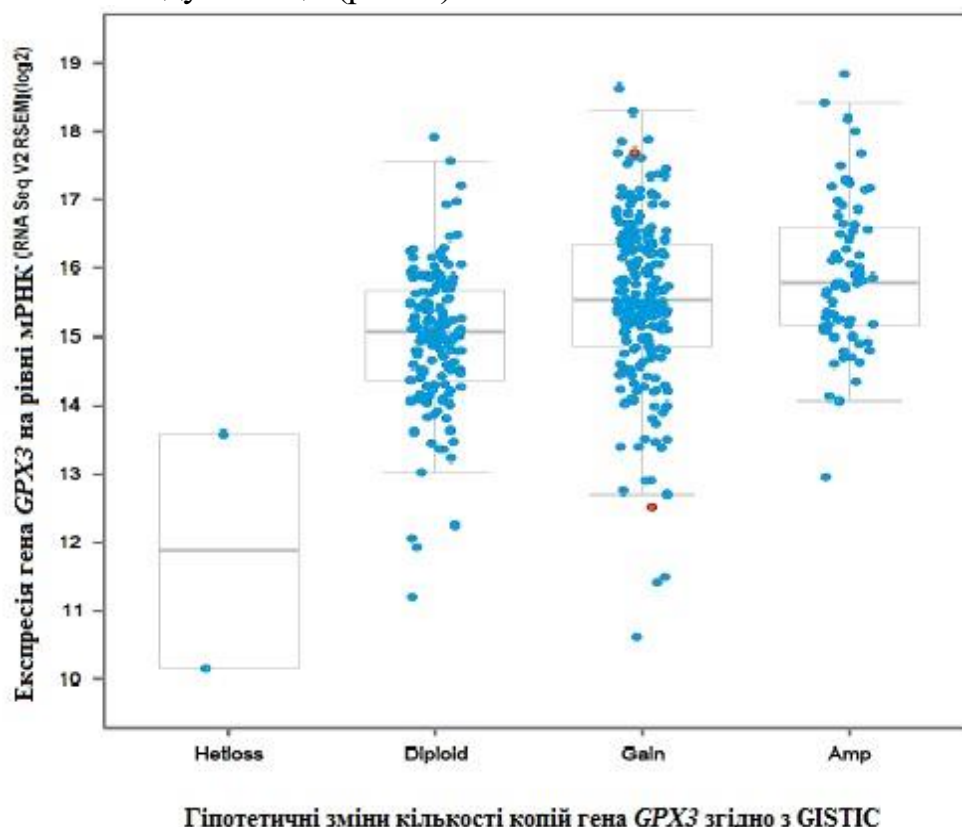


Рис. 7. Відносний рівень експресії в залежності від відносного числа копій гена *GPX3*. Homdel - гомозиготні делеції; Hetloss, - гетерозиготні делеції; Diploid - присутні обидва алелі; Gain - незначна ампліфікація гена; Amp – суттєва ампліфікація гена

Для гена *GPX4* суттєвих змін виявлено не було, як і в результаті експериментальних досліджень (рис. 8). Таким чином, біоінформатичний аналіз повністю підтвердив результати наших експериментальних досліджень.

Загальною ланкою у виникненні пухлин є онкоген, внесений в клітину вірусом, або трансформований з протоонкогена в результаті мутації чи виведений з-під контролю стримуючих генів хромосомної транслокацією. Група генів, що за своїми функціями протилежні дії онкогенів и пригнічують їх активність, отримала назву гени-супресори пухлин або антионкогени (Албертс, 1994).

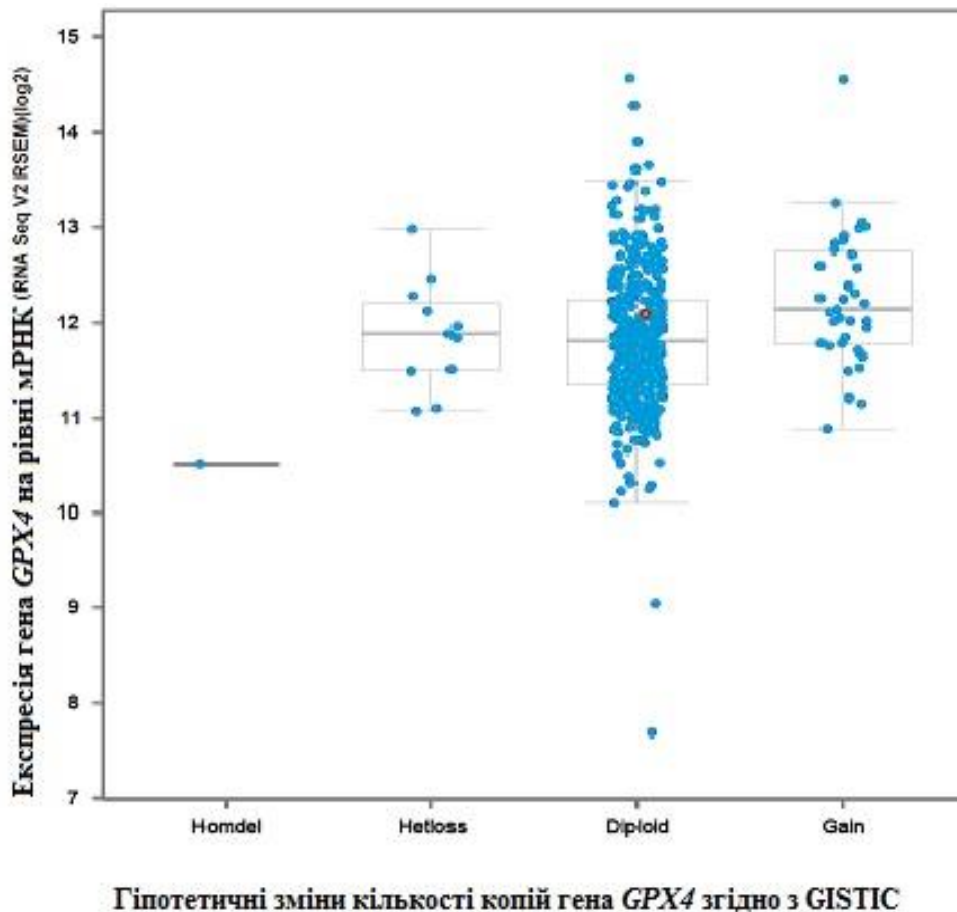


Рис. 8. Відносний рівень експресії в залежності від відносного числа копій гена *GPX4*. Homdel - гомозиготні делеції; Hetloss - гетерозиготні делеції; Diploid - присутні обидва алелі; Gain - незначна ампліфікація гена

Дефект цих генів призводить до прогресії, а відновлення функції - до істотного уповільнення проліферації або навіть реверсії розвитку пухлини. Таким чином, своєчасне виявлення осіб, що мають підвищений ризик захворювання може значно знизити кількість хворих, у яких злоякісні захворювання були діагностовані на пізніх стадіях. Особливо це важливо для неоплазій, що на ранніх стадіях не мають клінічних проявів – рак легень, нирок, підшлункової залози, простати. Виявлення неоплазії на 1-2 стадії значно підвищує шанси на успішне лікування.

Крім того, білки, що є продуктами генів-супресорів мають перспективу у таргетній протипухлинній терапії. Деякі гени-супресори можуть бути

використані в якості маркерів у діагностичних панелях для діагностики, прогнозу, перевірки ефективності лікування при підборі терапевтичних засобів та контролю стану здоров'я пацієнтів під час ремісії. Спостереження пацієнта після терапії для вчасного виявлення рецидиву раку - ще одна причина для використання онкомаркерів. Періодичні вимірювання можуть виявити рецидив часто на місяці раніше, ніж ультразвук, рентгенівське або фізичне обстеження

Маркери для прогностики, розробки індивідуального плану лікування, контролю захворювання після хірургічного втручання та перевірки ефективності призначених ліків для хворих на СККН знаходяться на стадії пошуку і клінічних випробувань. Також перспективними, але поки безуспішними є пошуки маркера для виявлення пухлин малого розміру і здешевлення моніторингу пацієнтів з високим онкологічним ризиком. Надзвичайно актуальним є пошук маркерів, що дозволили б відрізнити світлоклітинну карциному нирки від менш агресивного типу раку – хромофобної карциноми та доброякісної пухлини – онкоцитому. Це дало б можливість уникнути непотрібного хірургічного втручання і зберегти орган, за умови постійного моніторингу хворого (Winer, 2016). Наразі не відомо жодного маркера, що використовувався б в медичній практиці для пацієнтів з СККН (Garcia-Roig, 2014).

Загалом, перспективними кандидатами в гени-супресори є гени *NKIRAS1*, *PRICKLE2* та *GPX1,3*, оскільки їх експресія була знижена у переважній більшості зразків СККН, порівняно з оточуючими умовно нормальними тканинами. Гени *GPX3* і *GPX4* потребують додаткового дослідження молекулярних механізмів зниження експресії. Показано, що гени *GPX2* і *GPX6* не експресуються, або мають занадто низьку експресію в нормальних тканинах нирки та в СККН, і навряд чи мають суттєвий вплив на процес канцерогенезу. Також показано, що поліаланіновий поліморфізм гена *GPX1* не має прогностичного значення для формування груп ризику по СККН.

Ген *PPM1M* являє собою потенційно цікавий ген для подальшого дослідження його ролі в канцерогенезі. У подальшому доцільно дослідити його експресію на різних стадіях захворювання для можливого використання при уточненні діагнозу. В подальшому доцільно зосередити увагу на генах, що мають значні відміни в ДНК, оскільки діагностичні маркери, як правило, вимірюють в біологічних рідинах пацієнта. Для використання вибраних генів у таргетній терапії слід провести дослідження, що підтверджують пухлиносупресуючі властивості їх білкових продуктів. Можливо також в подальшому перейти від вимірювання ДНК в біологічних рідинах до вимірювання і порівняння рівня білкових продуктів.

Досліджений розподіл алелів гена *GPX1* за поліаланіновим поліморфізмом у пацієнтів із СККН і контрольній групі донорів, старших 60 років і без онкологічних хвороб в анамнезі. Підвищений ризик захворювання серед людей, що мають алель з 5 аланіновими повторами у випадку СККН не підтверджено. Таким чином, згідно з нашими дослідженнями, поліаланіновий поліморфізм не має прогностичного значення для СККН.

Відкриття генів-супресорів клітинного ділення і злоякісного росту - одне з найважливіших досягнень останніх років в області біології. Воно безумовно покликане внести помітний внесок у вирішення багатьох проблем, що стоять як перед медициною, так і перед фундаментальною наукою.

За результатами нашої роботи з вивчення генетичних та епігенетичних змін низки генів при СККН, проведених з використанням сучасних молекулярно-біологічних технологій, були виявлені нові потенційні гени-супресори росту досліджуваного типу пухлин. Ці результати в подальшому можуть стати основою для створення нових наборів для ранньої діагностики та таргетної персоналізованої терапії злоякісних новоутворень.

ВИСНОВКИ

Використовуючи технологію широкомаштабного скрінінгу за допомогою NotI-мікрочіпів та біоінформатичного пошуку у відкритих базах даних, було відібрано 8 генів (*NKIRAS1*, *PPM1M*, *PRICKLE2*, *GPXs 1, 2, 3, 4, 6*), що можуть бути задіяні в процесі виникнення СККН. Оцінка експресії генів *NKIRAS1*, *PRICKLE2*, *GPXs 1, 3, 4* в зразках СККН підтвердила їх можливу приналежність до потенційних генів-супресорів даного типу пухлин. Подальші дослідження виявили генетичні порушення, що можуть впливати на процес канцерогенезу.

1. Гени *NKIRAS1*, *PRICKLE2* та *GPXs 1* і *3* є кандидатами на роль супресорів для СККН, оскільки для них характерне зниження експресії в більшості досліджених зразків СККН у людини (*NKIRAS1* – 75%, *PRICKLE2* – 83%, *GPX 1* – 75% і *GPX3* – 100% зразків).
2. Ген *PPM1M* є онкоасоційованим геном, для якого спостерігалася як підвищена (50% зразків), так і знижена (33% зразків) експресія при СККН порівняно з умовно-нормальною тканиною.
3. Метилування цитозинів у CpG-острівцях промоторних регіонів не виявлено для жодного з досліджених генів, що вказує на наявність інших механізмів змін їх експресії.
4. Алель з 5 Ala-повторами гена *GPX1* є мажорним в контрольній групі (47,56%) та групі пацієнтів з СККН (48,75%). Частота цього алеля в досліджуваних групах достовірно не відрізнялась ($p = 0,44$). Не виявлено також достовірної різниці в частотах всіх алелей та генотипів даного поліморфізму між контрольною групою та групою пацієнтів з СККН. Таким чином, даний поліморфізм не має прогностичного значення для СККН.
5. Гени *NKIRAS1*, *PPM1M*, *PRICKLE2* та *GPX1* характеризуються високою частотою делецій в гомо- та гетерозиготному стані. Дуплікацію гена *GPX3* виявлено в 50% зразків пухлин, а змін кількості копій гена *GPX4* не спостерігалось. Отримані дані підтверджено за допомогою веб-ресурсу cBioPortal.
6. Для генів *NKIRAS1* та *GPX1* зафіксовано найбільший відсоток делецій (78,6% та 91,7% відповідно), що дозволяє розглядати їх як потенційні молекулярні маркери для СККН.

ПЕРЕЛІК НАУКОВИХ ПРАЦЬ, ВИКОНАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Genetic and epigenetic changes of *NKIRAS1* gene in human renal cell carcinomas / G.V. Gerashchenko, O.O. Bogatyrova, E. E. Rudenko, A.G. Kondratov // *Experimental Oncology* 2010, 71-75. *Особистий внесок здобувача: частково виконані К-ПЛР, участь у написанні статті, аналіз даних.*
2. *PPM1M* як потенційний ген супресор росту пухлин у світлоклітинних карциномах нирок людини / Руденко Є.Є., Г.В.Геращенко, В.В.Гордіюк, А.Г.Кондратов, В.І.Кашуба // *Фактори Експериментальної Еволюції Організмів*. Київ.2011.Збірник наукових праць. Т.11. С.522-526. *Особистий внесок здобувача: всі експериментальні дослідження були виконані автором самостійно.*
3. Genetic and epigenetic changes of *GPX1* and *GPX3* in human clear-cell renal cell carcinoma / E. E. Rudenko, G. V. Gerashchenko, Y. V. Lapska, O. O. Bogatyrova, S. O. Vozianov, Y. M. Zgonnyk, V. I. Kashuba // *Biopolymers and Cell* 2013, 395–401. *Особистий внесок здобувача: дослідження експресії генів були виконані автором самостійно.*
4. *PPM1M* and *PRICKLE2* are potential tumor suppressor genes in human clear-cell renal cell carcinoma / E. E. Rudenko, G. V. Gerashchenko, Y. V. Lapska, S. O. Vozianov, Y. M. Zgonnyk, V. I. Kashuba // *Biopolymers and Cell* 2014, 229–233. *Особистий внесок здобувача: дослідження експресії та аналіз кількості копій гена, аналіз даних, написання статті.*
5. Epigenetic Alterations of Chromosome 3 Revealed by NotI-Microarrays in Clear Cell Renal Cell Carcinoma / A. A. Dmitriev, E. E. Rudenko, A. V. Kudryavtseva, G. S. Krasnov, V. V. Gordiyuk, N. V. Melnikova, E. O. Stakhovsky, O. A. Kononenko, L. S. Pavlova, T. T. Kondratieva, B. Y. Alekseev, E.A. Braga, V. N. Senchenko, V. I. Kashuba // *BioMed Research International* 2014, Article ID 735292. *Особистий внесок здобувача: виділення геномної ДНК, створення бібліотеки зразків, участь у написанні статті.*
6. Heterozygous deletions are main cause of expression alterations of *PPM1M* and *PRICKLE2* genes in human clear cell renal cell carcinomas / E. E. Rudenko, Y. V. Lapska, G. V. Gerashchenko, E. O. Stakhovsky, M. V. Vikarchuk, V. I. Kashuba // *Biopolymers and Cell* 2015, 29–33. *Особистий внесок здобувача: всі експериментальні дослідження були виконані автором самостійно.*
7. Aberrant expression of selenium-containing glutathione peroxidases in clear cell renal cell carcinomas / E. E. Rudenko, O. Kondratov, G. Gerashchenko, Y. Lapska, S. Kravchenko, O. Koliada, S. Vozianov, Y. Zgonnyk, V. Kashuba // *Exp Oncol* 2015, 105–110. *Особистий внесок здобувача: дослідження експресії, аналіз кількості копій гена, підготовка проб для ALF гелі-електрофорезу.*
8. Аналіз рівня експресії гена *GPx1* у світлоклітинних карциномах нирок людини / Ю.В. Лапська, Руденко Є.Є. // «Біологічні дослідження молодих учених України» 2012, Київ, 30.
9. Поліморфізм гена *GPx-1* у світлоклітинних карциномах нирок / Ю.В. Лапська, Руденко Є.Є. // «Шевченківська весна» 2013, Київ, 66.

10. Аналіз поліморфних варіантів GPX1 у хворих на світлоклітинну карциному нирок / Ю.В. Лапська, Руденко Є.Є. // «Біотехнологія XXI століття» 2013, Київ 47-48.
11. Association between polyalanine sequence polymorphism of GPX1 gene and the risk of clear cell renal cell carcinoma / Ю.В. Лапська, Руденко Є.Є. // Молодь і поступ в біології» 2014, Львів, 100.

АНОТАЦІЯ

Руденко Є.Є. Пошук потенційних генів-супресорів пухлинного росту для світлоклітинної карциноми нирки людини. – Рукопис.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.22 – молекулярна генетика. – Інститут молекулярної біології та генетики НАН України, Київ, 2016.

Дисертація присвячена аналізу порушень потенційних генів-супресорів пухлин *NKIRAS1*, *PPM1M*, *PRICKLE2*, *GPXs1*, 2, 3, 4, 6 в світло клітинній карциномі нирки людини. Для генів *NKIRAS1*, *PPM1M*, *PRICKLE2*, *GPXs1*, 3, 4 було виконано дослідження експресії, аналіз метилування промоторних ділянок та аналіз кількості копій гена. Показано відсутність експресії генів *GPXs* 2 і 6 в нормальних і пухлинних тканинах нирки. Метилування промоторних ділянок не виявлено для жодного з досліджених генів. Виявлено генетичі зміни і зниження рівня експресії *NKIRAS1*, *PPM1M*, *PRICKLE2* та *GPX1* і 3. Для генів *PPM1M*, *GPX3* і *GPX4* механізми зміни експресії потребують подальшого дослідження. Наявність генетичних змін, таких як гетерозиготні делеції, гомозиготні делеції та ампліфікації для генів *NKIRAS1*, *PPM1M*, *PRICKLE2*, *GPXs* 1,3,4 підтверджено за допомогою веб-ресурсу cBioPortal.

Ключові слова: NotI-мікрочіпи, світлоклітинна карцинома нирки, гени-супресори пухлин, кількісна ПЛР, аналіз кількості копій гена.

АННОТАЦИЯ

Руденко Е.Е. Поиск потенциальных генов-супрессоров опухолевого роста для светлоклеточной карциномы почки человека. – Рукопись.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.22 - молекулярная генетика. - Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины, Киев, 2016.

Диссертация посвящена анализу нарушений потенциальных генов-супрессоров опухолей *NKIRAS1*, *PPM1M*, *PRICKLE2*, *GPXs1*, 2, 3, 4, 6 в светлоклеточных карциномах почки. Для генов *NKIRAS1*, *PPM1M*, *PRICKLE2*, *GPXs1*, 3, 4 было выполнено исследование экспрессии, анализ метилирования промоторных участков и анализ количества копий гена. Показано отсутствие экспрессии генов *GPXs* 2 и 6 в нормальных и опухолевых тканях почки. Метилирования промоторных участков не выявлено ни для одного из исследованных генов. Выявлены генетические изменения и снижение уровня экспрессии *NKIRAS1*, *PPM1M*, *PRICKLE2* и *GPX1* и 3. Для генов *PPM1M*, *GPX3* и *GPX4* механизмы изменения экспрессии требуют дальнейшего исследования. Наличие генетических изменений, таких как гетерозиготные делеции, гомозиготные делеции и амплификации для генов *NKIRAS1*, *PPM1M*, *PRICKLE2*, *GPXs* 1, 3, 4 подтверждено с помощью веб-ресурса cBioPortal.

Ключевые слова: NotI-микрочипы, светлоклеточная карцинома почки, гены-супрессоры опухолей, количественная ПЦР, анализ количества копий гена.

SUMMARY

Rudenko E.E. Search for potential tumor suppressor genes in human renal clear cell carcinoma. – Manuscript.

Thesis for a candidate's degree, specialty 03.00.22 – molecular genetics. – Institute of Molecular Biology and Genetics, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, 2016.

The thesis is devoted to an analysis of genetic and epigenetic changes of potential tumor suppressor genes in human renal clear cell carcinoma. Kidney carcinoma is associated with the worst prognosis and responding poorly to medical treatment, as a rule. The course of disease and treatment depends on the molecular profile of tumor.

On the basis of the results obtained by NotI-microarray analysis *NKIRAS1* was selected for further investigation as a gene with the highest number of genetic alterations in epithelial tumors. We have found that expression of *NKIRAS1* is decreased in malignant renal tumors; moreover, the copy number is also decreased in ccRCC. *NKIRAS1* expression was downregulated in 75% of ccRCC samples compared with surrounding normal tissue. No significant association was found between gene expression level and gender or age. Analysis of *NKIRAS1* gene copy number was performed in 14 tumor samples. Changes in the copy number were observed in 11 out of 14 ccRCC samples. In 9 samples there were heterozygous deletions and in 2 - homozygous deletions. 3 samples showed the normal copy number. No changes in methylation status of *NKIRAS1* were found in RCC.

We have validated the results of the NotI-microarray analysis for *NKIRAS1* gene in ccRCC: expression level of *NKIRAS1* is decreased significantly in cancerous cells, compared with normal tissues. The function of *NKIRAS1* protein in the renal cancer development should be elucidated further.

Expression of *PPM1M* and *PRICKLE2* genes was also analyzed in ccRCC by the Q-PCR method. We have found that the *PPM1M* expression is increased in 50% of the samples and decreased in 33% of the samples. The gene copy number was analyzed in 18 samples of ccRCC and corresponding normal tissues. The *PPM1M* gene was deleted in 50% of cases (8 cases of heterozygous deletions and 1 homozygous deletion). Amplification was observed in 3 samples, while in 6 samples expression was unchanged.

According to our data, the expression of *PRICKLE2* is altered in 83% of cases. Heterozygous deletions were found in 8 out of 18 samples. In 9 samples there were no changes in the copy number, while amplification was observed in 1 sample. Taking into consideration the functions of proteins, encoded by the *PPM1M* and *PRICKLE2* genes, we can suggest their involvement in the kidney carcinogenesis. Based on obtained results, the *PRICKLE2* gene might be a tumor suppressor candidate. Further studies are required to explain the mechanisms of the detected changes in the *PPM1M* expression.

Thus, we have shown that homo- and heterozygous deletions, revealed by the analysis of the gene copy number, is the possible reason of changes in gene expression. Our study confirmed the data of the microarray and SAGE analysis for the *GPX1* and *GPX3* genes. We have shown the essential decrease in the relative

expression level of *GPX1* and *GPX3* in ccRCC. We also found that the rarest allele trinucleotide polymorphism was the allele with 7 Ala repeats for the *GPX1*. All three genes, *GPX1*, *GPX3*, and *GPX4* showed decreased expression in tumors, compared with the normal tissues.

The *GPX2* and *GPX6* genes were not expressed in renal cell carcinomas nor in normal tissues. Investigation of the possible epigenetic mechanisms, contributing to the expression decline has shown that promoter methylation was not a key mechanism. So, lowered expression of *GPX* genes is not associated with promoter methylation. We have found heterozygous deletions of *GPX1* gene. *GPX3* gene, in contrast, showed amplification. No changes in copy number of *GPX4* gene were found. Despite the uncertainty what was a cause of decreased expression of genes (except *GPX1*), *GPXs* might be considered as candidate for tumor suppressor genes for ccRCC.

More work should be done with the aim to confirm tumor suppressor properties of proteins, encoded by the studied genes. Also, it is possible to go further by measuring of DNA in biological fluids, that can lead to validation of these proteins as biological markers and the development of the target therapy..

One of the most important achievements of recent years in the field of biology is an identification of the genes, suppressing cell division and cancer progression. Certainly, this contributes significantly into solution of many problems in the basic science and medicine. .

Keywords: NotI-microarray, clear cell renal cell carcinoma, tumor suppressor genes, quantitative PCR, copy number analysis.

Keywords: NotI-microarray, clear cell renal cell carcinoma, tumor suppressor genes quantitative PCR, copy number analysis.