

## Виявлення епігенетичних і генетичних порушень та зміни експресії генів 3-ї хромосоми людини при раку яєчників

В. В. Гордіюк<sup>1</sup>, Г. В. Геращенко<sup>1</sup>, І. Я. Скрипкіна<sup>1</sup>, О. В. Симончук<sup>2</sup>,  
Т. В. Павлова<sup>3</sup>, Д. Д. Угрин<sup>1</sup>, О. П. Манжура<sup>4</sup>, Г. О. Вакуленко<sup>5</sup>,  
Є. Р. Забаровський<sup>6</sup>, А. В. Риндич<sup>1</sup>, В. І. Кашуба<sup>1,6</sup>

<sup>1</sup>Інститут молекулярної біології і генетики НАН України  
Вул. Академіка Заболотного, 150, Київ 03680, Україна

<sup>2</sup>Київська медична академія післядипломної освіти ім. П. Л. Шупика  
Вул. Героїв Сталінграда, 16, Київ, 04210, Україна

<sup>3</sup>Інститут молекулярної біології ім. В. А. Енгельгардта РАН  
Вул. Вавилова, 32, Москва, 119991, Російська Федерація

<sup>4</sup>Київська міська онкологія  
Вул. Верховинна, 67, Київ, 03115, Україна

<sup>5</sup>Київський медичний університет ім. О. О. Богомольця  
Бул'єв. Тараса Шевченка, 13, Київ, 01004, Україна

<sup>6</sup>Department of Microbiology, Tumor and Cell Biology, Karolinska Institute  
Stockholm, Sweden

---

*Для вивчення генетичних та епігенетичних змін у пухлинах яєчників використано технологію ДНК-мікрочипів на основі NotI-зв'язувальних клонів. Аналізом зразків пухлин 22 пацієнтів виявлено метилювання, делеції або ампліфікації у 92 NotI-клонах з 181. Для 32 локусів генів подібні зміни зустрічаються більш ніж в 30 % випадків, що вказує на високу вірогідність залучення цих генів до процесу пухлиноутворення в яєчниках. Для двох генів, GORASP1 і GNAI2, підтверджено зниження експресії методом нозерн-блотингу. Для 16 генів і локусів 3-ї хромосоми вперше показано аберації при раку яєчників.*

*Ключові слова: NotI-мікрочипи, 3-тя хромосома людини, метилювання ДНК, експресія генів, пухлини яєчників.*

---

**Вступ.** Проблема раку яєчників є однією з найскладніших у сучасній онкології. Це пов'язано з особливостями етіології та патогенезу пухлин цього органу, що призводить до пізньої діагностики та низького виживання хворих. В Україні рак яєчників займає третє місце за розповсюдженістю

серед онкогінекологічних захворювань та перше місце – за смертністю [1].

Епітеліальні пухлини яєчників поділяються на доброякісні, перехідні та злоякісні. Серед останніх превалюючими за чисельністю є серозні (біля 80 %), за ними йдуть ендометриодні, муцинозні та світлоклітинні пухлини, які є найагресивнішими і мають найменший відсоток за показником виживання хворих.

В. В. ГОРДІЮК, Г. В. ГЕРАЩЕНКО, І. Я. СКРИПКІНА, О. В. СИМОНЧУК,  
Т. В. ПАВЛОВА, Д. Д. УГРИН, О. П. МАНЖУРА, Г. О. ВАКУЛЕНКО,  
Є. Р. ЗАБАРОВСЬКИЙ, А. В. РИНДИЧ, В. І. КАШУБА, 2008

Таблиця 1  
Послідовність праймерів для синтезу зондів ЗТ-ПЛР

| Ген            | Прямий праймер            | Зворотний праймер        | T <sub>m</sub> | Довжина продукту, п. н. |
|----------------|---------------------------|--------------------------|----------------|-------------------------|
| <i>LRRC3B</i>  | TGGACTCCAATCAGATCACATC    | AGGTTTCTGCTTTCTTCTGTC    | 60 °C          | 545                     |
| <i>NKIRAS1</i> | GTGGTTTGTGGATTGTTATCTGTGG | TGGGGTTGAGAAAGTTACTGGCTA | 64 °C          | 494                     |
| <i>ZIC4</i>    | TGAGACATTCCTGCTTGTCG      | CAGAGGTGGCTTTGAAGGAG     | 60 °C          | 523                     |
| <i>RARb</i>    | GAAACAGGCCTTCTCAGTGC      | GGTACTGACTGACCCCACT      | 60 °C          | 383                     |
| <i>UBE2E2</i>  | TGTTTCAGCAAGAACCAGAAAGA   | AAGAAGTGAGCAGATGGAGAGG   | 62 °C          | 415                     |
| <i>GNAI2</i>   | AACGACTCAGCTGCCTACTACC    | AGGGGACTGTGTGTGATCTTCT   | 60 °C          | 404                     |

Відомо, що при розвитку пухлини відбуваються генетичні та епігенетичні зміни по всьому геному, однак залишаються невідомими причинно-наслідкові зв'язки цих подій. Тому актуальним у цьому напрямку є системний підхід до вивчення генетичних та епігенетичних змін у генах конкретних хромосом, який також дає можливість виявити нові гени, що беруть участь у процесі розвитку пухлини, з подальшим визначенням їхніх функцій. Одним із таких методів є новітня технологія *NotI*-мікрочипів, яка має низку переваг перед іншими типами мікрочипів [2] і дає змогу визначити як генетичні (делеції, ампліфікації), так і епігенетичні (метилування промоторів генів) зміни генів та локусів за різних типів патологій.

Об'єктом дослідження слугували гени 3-ї хромосоми людини. Це пов'язано з тим, що зазначена хромосома схильна до найчастіших аберацій при багатьох видах раку. Показано, що на ній розташовано низку генів-супресорів, функціонування яких запобігає розвитку злоякісних новоутворень, а їхня втрата або інактивация супроводжується прогресією пухлин [3, 4].

**Матеріали і методи.** Для дослідження змін у генах 3-ї хромосоми людини в епітеліальних пухлинах яєчників методом *NotI*-мікрочипів використано 22 пари хірургічно видалених зразків ДНК пухлин та оточуючих їх тканин яєчників. З них 15 злоякісних пухлин: шість карцином (1–3-ї стадій), шість аденокарцином (1–3-ї стадій), три цистаденокарциноми (2–4-ї стадій); п'ять доброякісних пухлин і дві перехідні.

Для приготування мікрочипів використано 181 клон 3-ї хромосоми з бібліотеки *NotI*-зв'язувальних клонів геному людини. *NotI*-мікрочипи аналізували, як описано у нашій попередній роботі [5].

Геному ДНК з пухлин та припухлих тканин виділяли за методом Маніатіса [6] з модифікаціями [7].

Сумарну РНК одержували із заморожених у рідкому азоті пухлин або оточуючих пухлини тканин яєчників екстракцією кислим гуанідинтіоціанат-фенол-хлороформним розчином [8], нозерн-блотинг (Northern-blot-analysis) проводили, як у роботі [6]. Для контролю кількості РНК, нанесеної на агарозний гель, мембрани після експозиції відмивали і гібридизували повторно з <sup>32</sup>P-міченою кДНК гена *GAPDH* людини. Денситометричний аналіз гібридизаційних сигналів здійснювали за допомогою програми ImageJ. Статистичну обробку даних нозерн-блот гібридизацій виконували непараметричним методом за Манн-Уїтні (тест Вілкоксона) у програмі «Statgraphics».

кДНК, використані як зонди, отримували методом ЗТ-ПЛР з праймерами, наведеними у табл. 1, і клонували у плазмідному векторі *pGEM-T Easy* фірми «Promega» (США) згідно із стандартним протоколом.

**Результати і обговорення.** Нами проаналізовано геному ДНК з тканин хірургічно видалених пухлин яєчників методом *NotI*-мікрочипів. Співвідношення сигналів гібридизації ДНК із зразків пухлин до норми представлено на рис. 1. Коефіцієнти такого співвідношення згруповані в

| № клону | NotI-клон | Зразки пухли (1-22) |    |     |    |   | Ген/локус       |
|---------|-----------|---------------------|----|-----|----|---|-----------------|
|         |           | I                   | II | III | IV | V |                 |
| 1       | NL6 FJ5   | ■                   | ■  | ■   | ■  | ■ | MINT24          |
| 2       | NR1 DH18  |                     |    |     |    |   | CACNA2D3        |
| 3       | NR5 GP13  |                     |    |     |    |   | LMCD1           |
| 4       | NL2 001   |                     | ■  |     |    |   | AK128398        |
| 5       | NL1 BH17  |                     | ■  |     |    |   | LOC442074       |
| 6       | NR1 WA8   |                     |    | ■   |    |   | IL17RE          |
| 7       | NL1 106   |                     |    | ■   |    | ■ | IL17RC          |
| 8       | NRL 404   | ■                   | ■  | ■   | ■  | ■ | VHL             |
| 9       | NRL 98    |                     |    | ■   |    |   | IRAK-2          |
| 10      | NLM 188   |                     |    | ■   |    |   | SEN2L           |
| 11      | NR1 NK17  |                     | ■  |     |    |   | KIAA0667        |
| 12      | HSJ4 AB7  | ■                   |    | ■   | ■  | ■ | RPL32           |
| 13      | NLM 161   |                     |    | ■   |    |   | KIAA0763        |
| 14      | NR1 XM13  | ■                   | ■  | ■   | ■  | ■ | hmm57278        |
| 15      | NR1 KJ5   | ■                   | ■  | ■   | ■  | ■ | FBLN2           |
| 16      | NRL 062   |                     |    |     |    |   | Nucleoporin 210 |
| 19      | NL4 BK12  |                     | ■  | ■   | ■  | ■ | WNT7A           |
| 20      | NLM 199   |                     |    | ■   |    |   | LOC131973       |
| 21      | NL4 DP2   | ■                   | ■  | ■   | ■  | ■ | FGD5            |
| 22      | NL1 177   |                     |    | ■   |    |   | SH3BP5          |
| 23      | AP1 102   |                     |    | ■   |    | ■ | EAF1            |
| 24      | NR1 AB20  | ■                   | ■  | ■   | ■  | ■ | ANKRD28         |
| 26      | NL4 AP18  |                     | ■  | ■   | ■  | ■ | PLCL2           |
| 27      | NL1 GC10  |                     | ■  | ■   | ■  | ■ | HMG1L5          |
| 28      | NR1 WF18  | ■                   | ■  | ■   | ■  | ■ | UBE2E2          |
| 29      | NL1 CJ4   | ■                   | ■  | ■   | ■  | ■ | NKIRAS1         |
| 30      | NR1 KA8   | ■                   | ■  | ■   | ■  | ■ | THRB            |
| 31      | NL4 BB6   | ■                   | ■  | ■   | ■  | ■ | RARB            |
| 32      | NR1 NL9   |                     | ■  | ■   | ■  | ■ | RAB7L1          |
| 33      | NL3 CA11  | ■                   | ■  | ■   | ■  | ■ | LRRC3B          |
| 34      | NRL 082   |                     | ■  | ■   | ■  | ■ | SIMP            |
| 35      | NL1 024   | ■                   |    |     |    |   | OSBPL10         |
| 36      | NR5 FK11  |                     | ■  | ■   | ■  | ■ | CMTM8           |
| 37      | NRL 063   |                     | ■  | ■   | ■  | ■ | CKLFSF6         |
| 38      | NR1 EP7   |                     |    | ■   |    |   | CLASP2          |
| 39      | AP 40     |                     |    | ■   |    |   | LBA1            |
| 40      | NL1 401   | ■                   | ■  | ■   | ■  | ■ | ITGA9           |
| 41      | NLJ 003   | ■                   | ■  | ■   | ■  | ■ | RBSP3           |
| 42      | AP 20     |                     |    |     |    |   | SCN5A           |
| 43      | NL3 003   | ■                   | ■  | ■   | ■  | ■ | GORASP1         |
| 44      | NL1 308   |                     | ■  | ■   | ■  | ■ | MOBP            |
| 45      | NR1 NK20  |                     |    | ■   |    |   | GC20            |
| 46      | NR5 IB17  |                     |    | ■   |    |   | HIGD1A          |
| 47      | NR1 PA6   |                     |    | ■   |    | ■ | C3orf41         |
| 48      | NL3 009   |                     | ■  | ■   | ■  | ■ | SNF-1           |
| 49      | NL1 232   |                     |    | ■   |    |   | CG158           |
| 50      | NR1 AN24  | ■                   | ■  | ■   | ■  | ■ | hmm144092       |
| 51      | NL2 007   |                     |    |     |    |   | ZDHHC3          |
| 52      | NL1 320   |                     | ■  |     |    |   | KIAA0851        |
| 53      | NL3 010   |                     | ■  |     |    |   | XT3             |
| 54      | NLM 067   | ■                   | ■  | ■   | ■  | ■ | TESSP2          |
| 55      | NL3 006   | ■                   | ■  | ■   | ■  | ■ | NBEAL2          |
| 56      | NR1 NJ3   |                     | ■  | ■   | ■  | ■ | CSPG5           |
| 57      | NR1 KF21  |                     |    | ■   |    |   | MAP4            |
| 58      | NR1 PM22  | ■                   | ■  | ■   | ■  | ■ | SCOTIN          |

| № клону | NotI-клон | Зразки пухли (1-22) |    |     |    |   | Ген/локус |
|---------|-----------|---------------------|----|-----|----|---|-----------|
|         |           | I                   | II | III | IV | V |           |
| 59      | NR1 PJ14  |                     | ■  | ■   | ■  | ■ | USP19     |
| 60      | NL3 14    |                     | ■  | ■   | ■  | ■ | RHOA      |
| 61      | NRL 1 1   |                     |    |     |    |   | SEMA3F    |
| 62      | NL3 001   | ■                   | ■  | ■   | ■  | ■ | GNAI2     |
| 63      | NL1 210   |                     |    | ■   | ■  | ■ | MAPKAP3   |
| 64      | NL1 216   |                     |    | ■   | ■  | ■ | ARMET     |
| 65      | NRL 097   |                     |    | ■   | ■  | ■ | HUMAGCGB  |
| 66      | NR1 WH9   |                     |    | ■   | ■  | ■ | PARP3     |
| 67      | NRL 113   |                     | ■  | ■   | ■  | ■ | GPR62     |
| 68      | NL1 243   |                     |    | ■   | ■  | ■ | MGC15429  |
| 69      | NL1 245   |                     | ■  | ■   | ■  | ■ | ACY1      |
| 70      | NR1 NC7   | ■                   | ■  | ■   | ■  | ■ | FLJ32332  |
| 71      | NL2 008   |                     |    | ■   | ■  | ■ | PRO2730   |
| 72      | AP 32     |                     |    |     |    |   | PHF7      |
| 73      | NR 143    |                     | ■  | ■   | ■  | ■ | AD-017    |
| 74      | NR5 IH18  | ■                   | ■  | ■   | ■  | ■ | BHLHB2    |
| 75      | NRL 091   |                     |    | ■   | ■  | ■ | RAF140    |
| 76      | AP2 60    |                     |    | ■   |    | ■ | ARF4      |
| 77      | NLM 223   |                     |    | ■   |    |   | ABHD6     |
| 78      | NL1 358   |                     |    | ■   |    |   | ATXN7     |
| 79      | NR1 NJ9   | ■                   | ■  | ■   | ■  | ■ | hmm210782 |
| 80      | NR5 FL20  |                     |    | ■   | ■  | ■ | LRIG1     |
| 81      | NL1 ZP3   |                     | ■  | ■   | ■  | ■ | TA-KRP    |
| 82      | NL4 BN15  |                     | ■  | ■   | ■  | ■ | TAF4      |
| 84      | NL1 YL16  | ■                   | ■  | ■   | ■  | ■ | MITF      |
| 85      | NL1 BA6   | ■                   | ■  | ■   | ■  | ■ | FOXP1     |
| 86      | NL6 AF21  |                     |    | ■   | ■  | ■ | PDZRN3    |
| 87      | 924 O21   |                     |    | ■   | ■  | ■ | LOC285296 |
| 88      | NR5 GE23  |                     |    | ■   | ■  | ■ | ROBO2     |
| 89      | NL6 HG15  | ■                   | ■  | ■   | ■  | ■ | MRPS17P3  |
| 90      | NR1 WE11  | ■                   | ■  | ■   | ■  | ■ | p20-CGGBP |
| 91      | R5 FK16   | ■                   | ■  | ■   | ■  | ■ | MINA      |
| 92      | NL6 FO20  |                     | ■  | ■   | ■  | ■ | DCBLD2    |
| 93      | NLM 202   |                     |    | ■   | ■  | ■ | NIT2      |
| 94      | NL1 268   |                     |    | ■   | ■  | ■ | TMEM45A   |
| 95      | NL1 051   |                     |    | ■   | ■  | ■ | TFG       |
| 96      | NLM 134   |                     |    | ■   | ■  | ■ | BBX       |
| 97      | NL3 CI2   | ■                   | ■  | ■   | ■  | ■ | LOC285205 |
| 98      | NLM 187   |                     |    | ■   | ■  | ■ | BOC       |
| 99      | NL2 273   |                     |    | ■   | ■  | ■ | B4GALT4   |
| 100     | NR1 WD23  |                     |    | ■   | ■  | ■ | LRRCS58   |
| 101     | NR5 FG18  |                     |    | ■   | ■  | ■ | FSTL1     |
| 102     | NL2 092   | ■                   | ■  | ■   | ■  | ■ | SEMA5B    |
| 103     | NL1 GK21  | ■                   | ■  | ■   | ■  | ■ | ROPN1     |
| 104     | NR5 CD6   |                     |    | ■   | ■  | ■ | ITGB5     |
| 105     | NL4 BC8   | ■                   | ■  | ■   | ■  | ■ | ALDH1L1   |
| 106     | NL1 290   | ■                   | ■  | ■   | ■  | ■ | CHST13    |
| 107     | NL1 YJ5   | ■                   | ■  | ■   | ■  | ■ | hmm133095 |
| 108     | NR1 NK11  | ■                   | ■  | ■   | ■  | ■ | CHCHD6    |
| 109     | NL2 230   | ■                   | ■  | ■   | ■  | ■ | ABTB1     |
| 110     | NL1 DE18  | ■                   | ■  | ■   | ■  | ■ | GATA2     |
| 112     | NR5 IG11  |                     |    | ■   | ■  | ■ | hmm146433 |
| 113     | NL1 205   |                     |    | ■   | ■  | ■ | C3orf27   |
| 114     | AP 4      |                     |    | ■   | ■  | ■ | RPN1      |
| 115     | NRL 084   |                     |    | ■   | ■  | ■ | Hmm147837 |

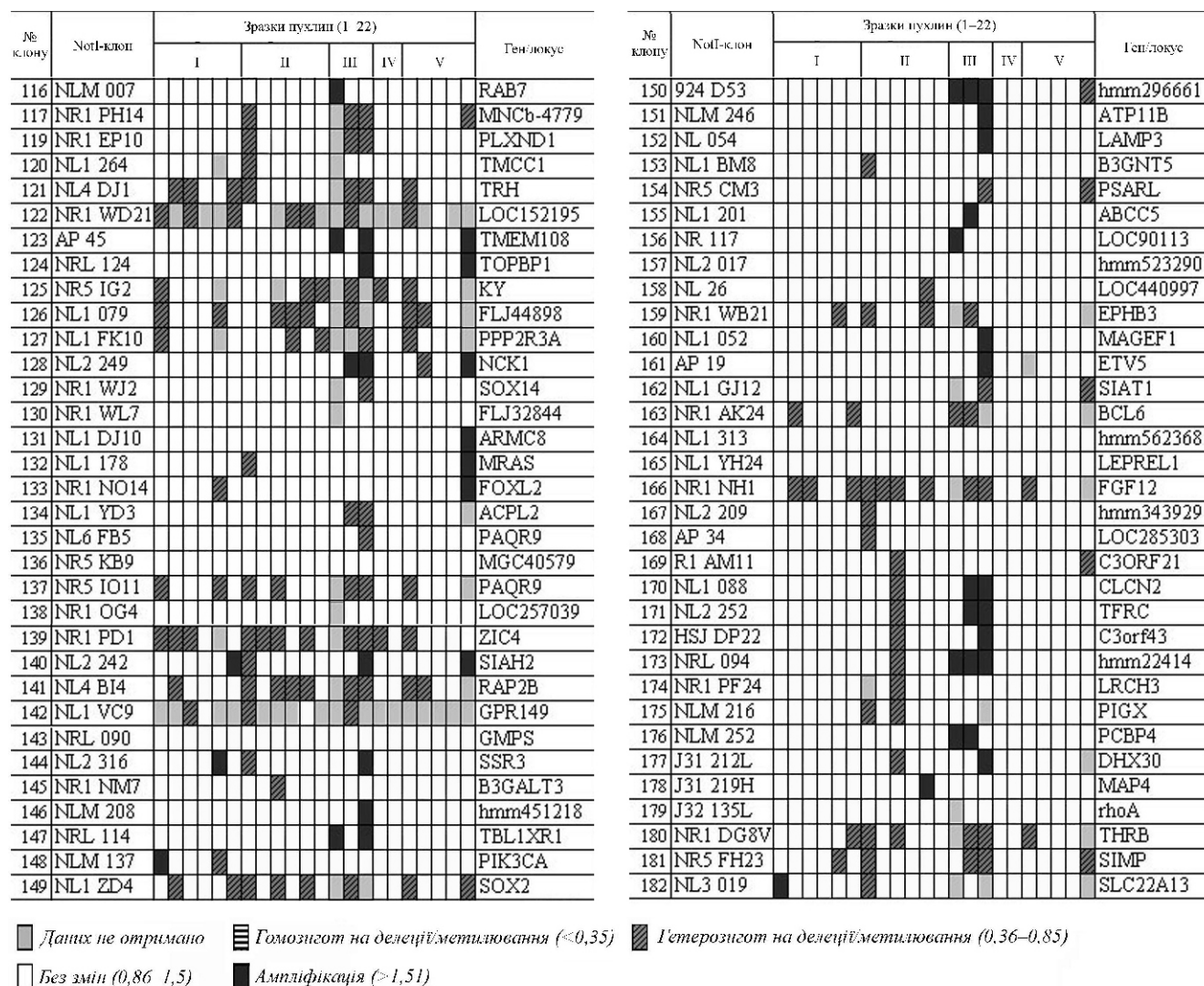


Рис. 1. Профіль гібридації хірургічно видалених зразків пухлин яєчників з *NotI*-клонами хромосоми 3 людини. Різними штриховими лініями показано співвідношення сигналу гібридації ДНК з пухлин до нормальної ДНК пацієнтів. Групи пухлин: I – карциноми різних стадій; II – аденокарциноми різних стадій; III – цистаденокарциноми різних стадій; IV – перехідні пухлини; V – доброякісні пухлини

інтервали: до 0,35 – гомозиготна делеція/метилування; від 0,35 до 0,85 – гетерозиготна делеція/метилування; вище 1,5 – ампліфікація.

Із 181 клону 3-ї хромосоми людини при раку яєчників відмічено зміни в 92 клонах. Найчастіше зустрічаються гетерозиготні делеції/метилування (561 випадок), менше – ампліфікації (101) і найменше – гомозиготні делеції/метилування (2).

Аналіз даних, отриманих за допомогою *NotI*-мікрочипів, показав, що гени та локуси можна умовно поділити на дві групи, у першій з яких спостерігається великий відсоток генетичних та епіге-

нетичних змін (делеція/метилування) тільки в злоякісних пухлинах (*FGF12*, *ZIC4*, *BHLHB2*, *THRB*, *MIFT*, *CHST13*, *TRH*, *LOC152195*, *PAQR9*), у другій – такі зміни присутні як у злоякісних, так і в доброякісних пухлинах (табл. 2). Останні є найчисленнішими. У зв'язку з невеликою кількістю перехідних пухлин в досліді можна лише відмітити, що гени *GATA2*, *NBEAL2* та *GORASP1* зазнали змін у досліджених зразках. Крім того, за кількістю змін у групі злоякісних пухлин усі гени та локуси також можна умовно розділити на групи: 1 – більше 60 % змін; 2 – від 45 до 60 %; 3 – від 30 до 45 %.

Таблиця 2  
Зміни (делеції/метилювання) генів та локусів 3-ї хромосоми в пухлинах яєчників

| Ген/локус                  | Відсоток змін від загальної кількості злоякісних пухлин | Відсоток змін від загальної кількості доброякісних пухлин |
|----------------------------|---|---|
| <i>LRRC3B</i>              | 73,3  | 60  |
| <i>hmm210782 (3p14)</i>    | 73,3  | 40  |
| <i>NKIRAS1</i>             | 66,7  | 80  |
| <i>RARB</i>                | 66,7  | 80  |
| <i>GATA2</i>               | 66,7  | 60  |
| <i>LOC285205 (3q13.12)</i> | 60  | 40  |
| <i>FGF12</i>               | 60  | 25  |
| <i>ZIC4</i>                | 60  | 25  |
| <i>VHL</i>                 | 53  | 40  |
| <i>UBE2E2</i>              | 53  | 40  |
| <i>hmm144092(3p21.32)</i>  | 53  | 80  |
| <i>NBEAL2</i>              | 53  | 80  |
| <i>BHLHB2</i>              | 53  | 25  |
| <i>p20-CGGBP (3p12)</i>    | 53  | 60  |
| <i>hmm57278 (3p25.2)</i>   | 46,7  | 25  |
| <i>GORASP1</i>             | 46,7  | 40  |
| <i>GNAI2</i>               | 46,7  | 60  |
| <i>FOXP1</i>               | 46,7  | 40  |
| <i>RAP2B</i>               | 46,7  | 40  |
| <i>MINT24</i>              | 40  | 60  |
| <i>THRB</i>                | 40  | 25  |
| <i>ITGA9</i>               | 40  | 40  |
| <i>MITF</i>                | 40  | 0   |
| <i>ROPN1</i>               | 40  | 40  |
| <i>CHST13</i>              | 40  | 25  |
| <i>TRH</i>                 | 40  | 25  |
| <i>LOC152195 (3q21.3)</i>  | 40  | 25  |
| <i>PAQR9</i>               | 40  | 25  |
| <i>SOX2</i>                | 40  | 40  |
| <i>MINA</i>                | 33,3  | 25  |
| <i>FGD5</i>                | 33,3  | 25  |

Серед цих генів та локусів *LRRC3B*, *hmm210782*, *NKIRAS1*, *RARB*, *GATA2*, *LOC285205*, *FGF12*, *ZIC4* мають найсуттєвіші зміни у групі злоякісних пухлин (більше 60 %).

*LRRC3B* (Leucine rich repeats containing 3B), за даними [9], – це ген, асоційований з рецидивом лейкемії (leukemia relaps-associated gene). Метилювання промотору цього гена та зниження його експресії спостерігаються при гострій лейкемії [10]. При інших типах пухлин зміни експресії та метилювання промотора гена не вивчено.

Для *NKIRAS1* (NF-kappaB inhibitor interacting Ras-like1) встановлено наявність гетерозиготної делеції/метилювання цього гена у 78 % зразків при раку нирок [7].

Варто зазначити, що метилювання/делеція у *RARB* (Retinoic acid receptor beta) притаманна карциномам яєчників усіх стадій. Гетерозиготні делеції/метилювання цього гена описані для раку шийки матки (43 %) [5]. Виявлено гіперметилювання промотору гена при мієлоїдній лейкемії [11], при раку печінки та стравоходу [5].

*GATA binding protein 2* – продукт гена *GATA2* – є транскрипційним фактором, який бере участь у гематопоезі [12]. Зміни експресії цього гена описано для різних форм лейкемій [13] та при аденомах гіпофізу [14].

Для *FGF12* (Fibroblast growth factor 12) відомо зниження експресії при карциномах щитовидної залози [15].

Змін гена *ZIC4* (zinc finger protein of the cerebellum 4) під час канцерогенезу раніше не виявлено.

Серед групи злоякісних пухлин гени *VHL*, *UBE2E2*, *NBEAL2*, *BHLHB2*, *GORASP1*, *GNAI2*, *FOXP1*, *RAP2B* мають гетерозиготні делеції/метилювання у 45–60 % зразків (табл. 2).

Інактивацію відомого гена-супресора *VHL* виявлено для цілої низки пухлин [5]. Високий відсоток змін цього гена у наших дослідженнях підтверджує дані літератури про причетність його до розвитку раку яєчників [16].

*UBE2E2* входить до родини убіквітин-кон'югуючих ферментів. Відомо, що убіквітинування відіграє важливу роль у канцерогенезі, але участь саме *UBE2E2* до сьогодні була не відомою.

Зв'язок гена *NBEAL2* (neurobeachin-like 2) з канцерогенезом також не доведено.

Для гена *BHLHB2* (basic helix-loop-helix domain containing class B 2) з'ясовано його участь у контролі клітинного диференціювання, а також у розвитку раку підшлункової залози. Гетерозиготні делеції/метилування цього гена описані для раку шийки матки (64 %) [5]. *BHLHB2* має 53 % делеції/метилування у групі злоякісних пухлин яєчників. Ці зміни спостерігаються у п'яти із шести аденокарцином різних стадій (рис. 1).

Білок, що кодується геном *GORASP1* (golgi reassembly stacking protein 1, 65 kDa), входить до складу апарату Гольджі і виконує функцію підтримки цілісності його структури. Прямих доказів участі у канцерогенезі поки не існує.

Раніше методом серійного аналізу генної експресії (SAGE) показано зміну експресії гена *GNAI2* (guanine nucleotide binding protein (G protein)) при раку яєчників. Гетерозиготні делеції/метилування цього гена описані для раку нирок (30 %) [7].

Експресія транскрипційного фактора FOXP1 (forkhead box P1) зменшується в різних злоякісних епітеліальних пухлинах. Гетерозиготні делеції/метилування цього гена знайдено при раку нирок (30 %) [7].

Продукт гена *RAP2B* (member of RAS oncogene family) є GTP-зв'язувальним білком (мала GTPаза), експресія якого підвищується при раку легень [17]. Ген *RAP2B* має зміни у чотирьох з шести аденокарцином та в двох з трьох цистаденокарцином яєчників.

Наступна група генів та локусів має від 30 до 46 % гетерозиготних делецій/метилування у пухлинах яєчників (табл. 2).

Відомо, що локус *MINT24* асоційований з раком прямої кишки. Гетерозиготні делеції/метилування цього гена описано для раку нирок (56 %) [7].

Зміну експресії гена *ITGA9* (integrin, alpha 9) відмічено при дрібноклітинному раку легень. Гетерозиготні делеції/метилування цього гена виявлено при раку шийки матки (46 %) [5].

Продукт гена *MITF* (microphthalmia-associated transcription factor) є транскрипційним фактором, який відіграє важливу роль у розвитку меланом

[18]. Треба відмітити, що, за нашими даними (табл. 2), ген *MITF* має високий відсоток змін тільки в групі злоякісних пухлин яєчників, у доброякісних пухлинах їх не спостерігали.

Білок, що кодується *TRH* (thyrotropin-releasing hormone), є аутокринним фактором росту для меланоми [19].

Продукт гена *SOX2* (SRY (sex determining region Y)-box 2) є транскрипційним фактором, який змінює експресію при раку шлунка [20] та дрібноклітинному раку легень [21].

Ген *MINA* (MYC induced nuclear antigen) кодує білок, який є мішенню онкогену *myc* та бере участь у процесах проліферації [22]. Відомо, що експресія цього гена змінюється при раку прямої кишки [23].

Встановлено, що зміни експресії рецептора тиреоїдних гормонів В *THRβ* (thyroid hormone receptor, beta) відбуваються у різних типах раку [24].

Описано порушення експресії *ROPNI* (rhopilin associated protein 1) при раку сім'яників [25].

Для генів *FGD5*, *THRβ*, *CHST13*, *PAQR9* (progesterin and adipoQ receptor family member IX) участі в онкогенезі не відмічено.

У гена *CHST13* (carbohydrate (chondroitin 4) sulfotransferase 13), за нашими даними, зміни спостерігаються в усіх цистаденокарциномах та аденокарциномах тільки третьої стадії.

Варто зазначити, що гени та локуси *FGF12*, *ZIC4*, *BHLHB2*, *hmm57278*, *CHST13* мають невеликий відсоток змін (0–25 %) у групі доброякісних пухлин. Це дає підставу для припущення, що генетичні й епігенетичні зміни в них відбуваються саме у злоякісних пухлинах.

Після встановлення генетичних/епігенетичних змін генів у пухлинах яєчників важливим є визначення рівня їхньої експресії.

Грунтуючись на вищевикладеному, вивчали експресію методом нозерн-блотингу таких генів (у яких зафіксовано більше 45 % змін за даними NotI-мікроареїв): *ITGA9*, *RARβ*, *GORASP1*, *LRR3B*, *NKIRAS1*, *GNAI2*, *ZIC4*.

Для порівняння обрано ген *GAPDH*, оскільки з літератури відомо, що в нього відбуваються незначні зміни в експресії порівняно з -актином, який частіше використовують для вивчення відносної експресії у нормальних тканинах, але він має

значні коливання експресії у пухлинах різного походження [26].

Отримані дані свідчать про те, що відносна експресія *GORASP1* значно знижується в аденокарциномах різних стадій у порівнянні з нормальними тканинами ( $p < 0,05$ ) (рис. 2, а, в). Вивчення методом нозерн-блотингу відносної експресії *GNAI2* вказує на зниження експресії в усіх досліджених злоякісних пухлинах порівняно з нормальними тканинами ( $p < 0,05$ ) (рис. 2, б, з). Ці результати корелюють з даними *NotI*-мікрочипів, які свідчать про значний відсоток (46,7) делеції/метилування *GNAI2* у злоякісних пухлинах та суттєву частку (66,6 %) делеції/метилування *GORASP1* в аденокарциномах яєчників різних стадій, що могло вплинути на рівень експресії.

Для інших досліджуваних генів (*NKIRAS1*, *ZIC4*, *RARB*, *UBE2E2*, *LRRC3B*) не вдалось отримати сигналів нозерн-блот-гібридацій, що, напевно, пов'язано з досить низькою експресією згаданих генів як у нормальних тканинах, так і в пухлинах. Це не залежало від ступеня чутливості експериментів з нозерн-блот-гібридацій, оскільки питома активність зондів у всіх гібридаціях була в межах  $5 \cdot 10^8$ – $5 \cdot 10^9$  імпхв<sup>-1</sup>мкг<sup>-1</sup>. Для отримання даних по експресії вищезгаданих генів необхідно проводити дослідження чутливішими методами, а саме – напівкількісною ПЛР або ПЛР у реальному часі.

Таким чином, у пухлинах яєчників з використанням *NotI*-мікрочипів нами виявлено 32 гени/локуси, зміни в яких (делеції/метилування) перевищують 30 % (табл. 1). За даними літератури та результатами наших досліджень, деякі гени/локуси зазнають аберацій чи змінюють рівень експресії в широкому спектрі епітеліальних пухлин і при лейкеміях.

Раніше інші автори відмічали відхилення рівня експресії/метилування від норми при різних типах раку і інших патологіях для 16 з цих генів/локусів, що свідчить про важливість для канцерогенезу досліджуваних ділянок 3-ї хромосоми. Однак нами вперше методом *NotI*-мікрочипів визначено низку генів/локусів, причетних до пухлиноутворення в яєчниках. Надалі ми прогнозуємо ідентифікувати характер виявлених з використанням *NotI*-мікро-

чипів змін (делеції або метилування) даних генів і локусів.

Функціональний спектр продуктів зазначених генів досить різноманітний, наприклад, це чинники транскрипції (*GATA2*, *MITF*, *SOX2*, *FOXP3*), рецептори гормонів і метаболітів (*RARB*, *THRB*, *PAQR9*), білки, що беруть участь в процесі убіквітинування (*UBE2E2*, *VHL*, *SLAH2*) та в різних сигнальних шляхах клітини. Відомо, зокрема, що *GATA2* взаємодіє з сигнальним шляхом ретиноїдної кислоти [27], до якого причетний *RARB* [28].

Результати наших досліджень свідчать про позитивну кореляцію змін згаданих генів при раку яєчників (наявність чи відсутність делеції/метилування у конкретному зразку пухлини), які збігаються на 72 %, що є підтвердженням даних літератури [27, 28].

Функції деяких генів/локусів (із змінами більше 30 %) поки ще не відомі (*ZIC4*, *hmm210782*, *LOC285205*, *hmm144092*). Варто зазначити, що лише для *GNAI2* відмічено зміну експресії при раку яєчників іншими методами, зокрема SAGE.

За допомогою *NotI*-мікрочипів раніше нами виявлено аналогічні абераційні гени/локуси із змінами в пухлинах яєчників, а також при раку шийки матки (*RARB*, *BHLHB2*, *ITGA9*) [5] і раку нирок (*NKIRAS1*, *GNAI2*, *FOXP3*, *MINT24*) [7].

**Висновки.** Таким чином, отримані нами на пухлинах яєчників результати з урахуванням даних відносно раку шийки матки і нирок підтверджують ефективність і перспективність нового методу – *NotI*-мікрочипів при масштабному аналізі геному для виявлення як потенційних генів – супресорів пухлин, так і наборів онкомаркерів у контексті ранньої діагностики. Знайдено 32 гени/локуси із змінами (делеції/метилування), що перевищують 30 %. Раніше тільки для 16 з виявлених нами генів відмічено зміни в епітеліальних типах раку і лейкемії. Для 16 генів і локусів 3-ї хромосоми вперше показано аберації при раку яєчників. Встановлено зниження експресії генів *GORASP1* в аденокарциномах та *GNAI2* – в усіх досліджених злоякісних пухлинах яєчників. Надалі передбачається провести оцінку аберації по групах і стадіях для кожної локалізації раку, що вивчається, і оцінити рівні їхньої експресії.

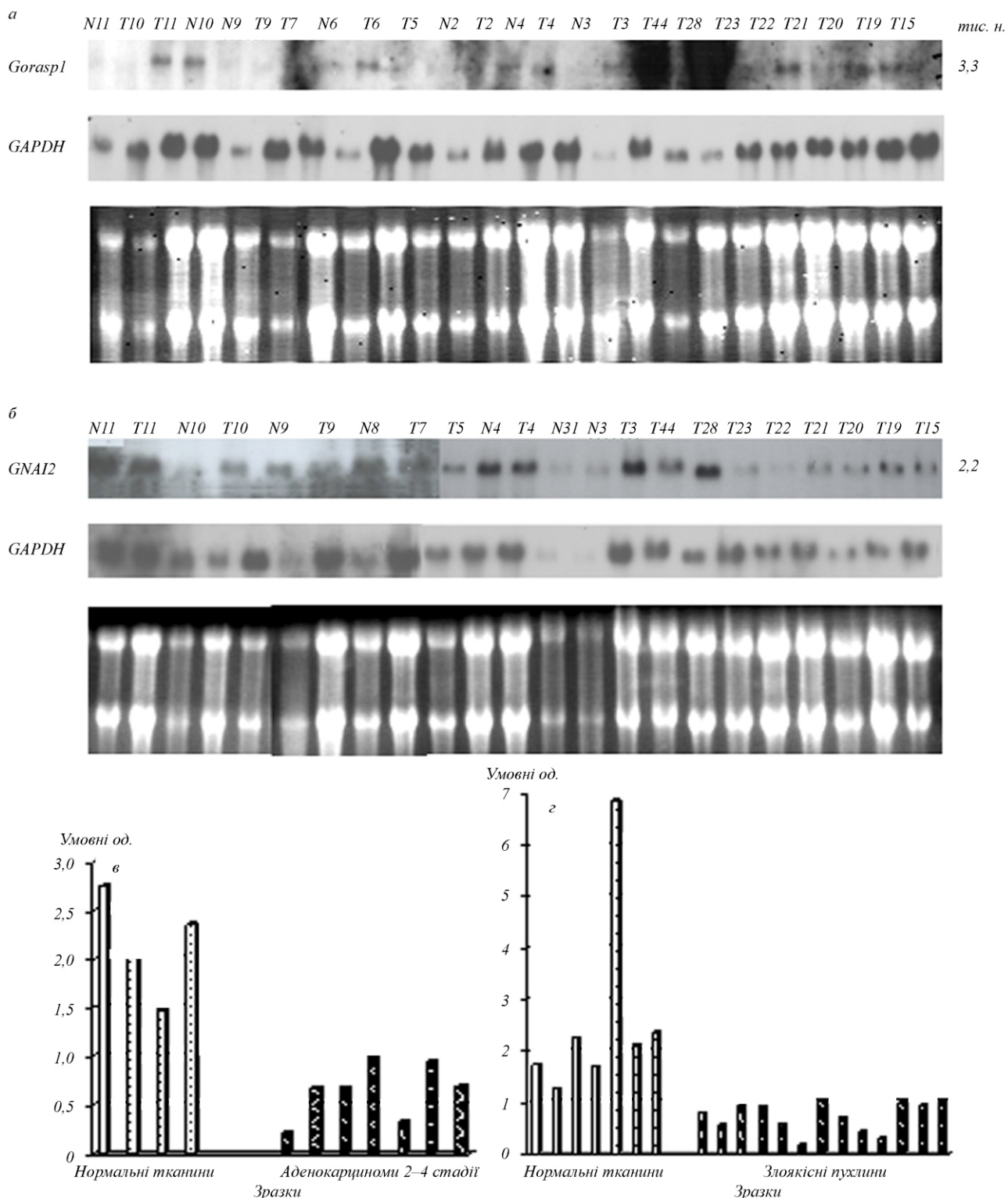


Рис. 2. Експресія *GORASP1* (а, в) та *GNAI2* (б, г) у нормальних (контрольних) тканинах та пухлинах яєчників: а, б – дані нозерн-гібридацій досліджуваних генів та референтного гена (*GAPDH*); в, г – дані відносної експресії *GORASP1* та *GNAI2*, виражені в умовних одиницях інтенсивності гібридаційних сигналів досліджуваних генів до референтного гена *GAPDH* на радіоавтографах



V. V. Gordiyuk, G. V. Gerashchenko, I. Ya. Skrypkin, O. V. Symonchuk, T. V. Pavlova, D. D. Ugryn, E. P. Manzhu, G. O. Vakulenko, E. R. Zabarovskiy, A. V. Rynditch, V. I. Kashuba

Identification of chromosome 3 epigenetic and genetic abnormalities and gene expression changes in ovarian cancer

#### Summary

DNA-microarray technology comprising NotI-linking clones has been used to check ovarian cancer cells for genetic and epigenetic changes. Analysis of samples from 22 patients revealed methylations, deletions and amplifications in 92 out of 181 NotI clones. For 32 gene loci these changes have been shown in more than 30% of tumor samples that specifies a high probability of these genes involvement in the ovarian cancer development. For two genes, GORASP1 and GNAI2, the decrease in their expression has been confirmed by Northern blot analysis. Aberrations of 16 genes and loci unknown previously to be involved in the development of ovarian cancer have been detected.

Keywords: NotI-microarrays, human chromosome 3, DNA methylation, gene expression, ovarian cancer.

B. B. Гордійук, А. В. Геращенко, И. Я. Скрипкина, Е. В. Симончук, Т. В. Павлова, Д. Д. Угрин, Е. П. Манжура, Г. А. Вакуленко, Е. Р. Забаровский, А. В. Рындич, В. И. Кашуба

Выявление эпигенетических и генетических нарушений и изменений экспрессии генов 3-ей хромосомы человека при раке яичников

#### Резюме

Для изучения генетических и эпигенетических изменений при опухолях яичников нами использована технология ДНК-микрочипов на основе Not I-связывающих клонов. Анализ образцов опухолей 22 пациенток выявил метилирование, делеции или амплификации в 92 NotI-клонах из 181. Для 32 локусов генов такие изменения встречаются более чем в 30% случаев, что указывает на высокую вероятность вовлечения этих генов в процесс опухолеобразования в яичниках. Для двух генов, GORASP1 и GNAI2, подтверждено снижение экспрессии методом нозерн-блот гибридизации. Для 16 генов и локусов 3-й хромосомы впервые показаны aberrации при раке яичников.

Ключевые слова: NotI-микрочипы, 3-я хромосома человека, метилирование ДНК, экспрессия генов, опухоли яичников.

#### PERELIK LITERATURY

1. Коханевич Е. В., Вакуленко Г. А., Клеветенко М. П., Симончук Е. В., Судомо И. А., Суменко В. В. Злокачественные опухоли яичников: проблемы диагностики // Здоровье женщины.—2004.—2, № 18.—С. 202–215.
2. Li J., Protopopov A., Wang F., Senchenko V., Petushkov V., Vorontsova O., Petrenko L., Zabarovska V., Muravenko O., Braga E., Kisselev L., Lerman M. I., Kashuba V., Klein G., Ernberg I., Wahlestedt C., Zabarovskiy E. R. NotI subtraction and NotI-specific microarrays to detect copy number and methylation changes in whole genomes // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—2002.—99.—P. 10724–10729.
3. Dreijerink K., Braga E., Kuzmin I., Geil L., Duh F. M., Angeloni D., Zbar B., Lerman M. I., Stanbridge E. J., Minna J. D., Protopopov A., Li J., Kashuba V., Klein G., Zabarovskiy

E. R. The candidate tumor suppressor gene, RASSF1A, from human chromosome 3p21.3 is involved in kidney tumorigenesis // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—2001.—98, N 13.—P. 7504–7509.

4. Kashuba V. I., Li J., Wang F., Senchenko V. N., Protopopov A., Malyukova A., Kutsenko A. S., Kadyrova E., Zabarovska V. I., Muravenko O. V., Zelenin A. V., Kisselev L. L., Kuzmin I., Minna J. D., Winberg G., Ernberg I., Braga E., Lerman M. I., Klein G., Zabarovskiy E. R. RBSP3 (HYA22) is a tumor suppressor gene implicated in major epithelial malignancies // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—2004.—101, N 14.—P. 4906–4611.
5. Кашуба В. И., Скрипкина И. Я., Сараев Д. В., Гордійук В. В., Винницкая А. Б., Цыба Л. А., Погребной П. В., Блинов В. М., Забаровский Е. Р., Рындич А. В. Использование NotI-микрочипов для идентификации изменений в локусах генов, потенциально участвующих в развитии рака шейки матки // Укр. біохім. журн.—2006.—78, № 2.—С. 113–120.
6. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Молекулярное клонирование / Пер. с англ.—М.: Мир, 1984.—479 с.
7. Скрипкина И. Я., Кашуба В. И., Гордійук В. В., Сараев Д. В., Зубко В. И., Згонник Ю. М., Цыба Л. А., Блинов В. М., Угрин Д. Д., Михайлик А. А., Яцула Б. А., Забаровский Е. Р., Рындич А. В., Возіанов О. Ф. Идентифікація змін у локусах генів, які потенційно задіяні в розвитку раку нирок, за допомогою нової технології NotI-микрочипів // Доп. НАН України.—2006.—№ 11.—С. 188–192.
8. Chomczynski P., Sacchi N. Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction // Anal. Biochem.—1987.—162.—P. 156–159.
9. Xu Z. M., Yu L., Lu X. C., Han W. D., Li X. J., Jing Y., Wang S. H., Jin H. J., Lon F. D. Cloning of the full length cDNA for a novel leukemia relapse-associated candidate gene LRP15 // Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi.—2003.—11, N 1.—P. 22–26.
10. Dou L. P., Wang C., Xu Z. M., Kang H. Y., Fan H., Lou F. D., Yu L. Methylation pattern of LRP15 gene in leukemia // Chin. Med. Sci. J.—2007.—22, N 3.—P. 187–191.
11. Fazi F., Zardo G., Gelmetti V., Travaglini L., Ciolfi A., Di Croce L., Rosa A., Bozzoni I., Grignani F., Lo-Coco F., Pelicci P. G., Nervi C. Heterochromatic gene repression of the retinoic acid pathway in acute myeloid leukemia // Blood.—2007.—109, N 10.—P. 4432–4440.
12. Pimanda J. E., Ottersbach K., Knezevic K., Kinston S., Chan W. Y., Wilson N. K., Landry J. R., Wood A. D., Kolb-Kococinski A., Green A. R., Tannahill D., Lacaud G., Kouskoff V., Gottgens B. Gata2, Fli1, and Scl form a recursively wired gene-regulatory circuit during early hematopoietic development // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—2007.—104, N 45.—P. 17692–17697.
13. Schneider E. M., Torlakovic E., Stuhler A., Diehl V., Tesch H., Giebel B. The early transcription factor GATA-2 is expressed in classical Hodgkin's lymphoma // J. Pathol.—2004.—204, N 5.—P. 538–545.
14. Umeoka K., Sanno N., Osamura R. Y., Teramoto A. Expression of GATA-2 in human pituitary adenomas // Mol. Pathol.—2002.—15, N 1.—P. 11–17.
15. Jeong H., Kim Y. R., Kim K. N., Choe J. G., Chung J. K., Kim M. K. Effect of all-trans retinoic acid on sodium/iodide symporter expression, radioiodine uptake and gene expression profiles in a human anaplastic thyroid carcinoma cell line // Nucl. Med. Biol.—2006.—33, 7.—P. 875–882.

16. Lee S., Garner E. I., Welch W. R., Berkowitz R. S., Mok S. C. Over-expression of hypoxia-inducible factor 1 alpha in ovarian clear cell carcinom // *Gynecol. Oncol.*—2007.— **106**, N 2.—P. 311–317.
17. Liu Y., Sun W., Zhang K., Zheng H., Ma Y., Lin D., Zhang X., Feng L., Lei W., Zhang Z., Guo S., Han N., Tong W., Feng X., Gao Y., Cheng S. Identification of genes differentially expressed in human primary lung squamous cell carcinoma // *Lung Cancer.*—2007.—**56**, N 3.—P. 307–317.
18. Lesiak K., Sztiller-Sikorska M., Czyz M. Transcription factors in the development and progression of melanoma // *Postepy Hig. Med. Dosw.*—2007.—**61**.—P. 576–595.
19. Ellerhorst J. A., Naderi A. A., Johnson M. K. Expression of thyrotropin-releasing hormone by human melanoma and nevi // *Clin. Cancer Res.*—2004.—**10**, N 1.—P. 5531–5536.
20. Li X. L., Eishi Y., Bai Y. Q. Expression of the SRY-related HMG box protein SOX2 in human gastric carcinoma // *Int. J. Oncol.*—2004.—**24**, N 2.—P. 257–263.
21. Gure A. O., Stockert E., Scanlan M. J., Keresztes R. S., Jager D., Altorki N. K., Old L. J., Chen Y. T. Serological identification of embryonic neural proteins as highly immunogenic tumor antigens in small cell lung cancer // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—2000.—**97**, N 8.—P. 4198–4203.
22. Tsuneoka M., Koda Y., Soejima M., Teye K., Kimura H. A novel myc target gene, mina53, that is involved in cell proliferation // *J. Biol. Chem.*—2002.—**277**, N 3.—P. 35450–35459.
23. Teye K., Tsuneoka M., Arima N. Increased expression of a Myc target gene Mina53 in human colon cancer // *Amer. J. Pathol.*—2004.—**164**, N 1.—P. 205–216.
24. Gonzalez-Sancho J. M., Garcia V., Bonilla F., MuZoz A. Thyroid hormone receptors/THR genes in human cancer // *Cancer Lett.*—2003.—**192**, N 2.—P. 121–132.
25. Li Z., Li W., Meklat F. A yeast two-hybrid system using Sp17 identified Ropporin as a novel cancer-testis antigen in hematologic malignancies // *Int. J. Cancer.*—2007.—**121**, N 7.—P. 1507–1511.
26. Barber R. D., Harmer D. W., Coleman R. A., Clark B. J. GAPDH as a housekeeping gene: analysis of GAPDH mRNA expression in a panel of 72 human tissues // *Physiol. Genomics.*—2005.—**21**, N 3.—P. 389–395.
27. Tsuzuki S., Kitajima K., Nakano T., Glasow A., Zelent A., Enver T. Cross talk between retinoic acid signaling and transcription factor GATA-2 // *Mol. Cell. Biol.*—2004.—**24**, N 15.—P. 6824–6836.
28. Ren M., Pozzi S., Bistulfi G., Somenzi G., Rossetti S., Sacchi N. Impaired retinoic acid (RA) signal leads to RARbeta2 epigenetic silencing and RA resistance // *Mol. Cell. Biol.*—2005.—**25**, N 23.—P. 10591–10603.

УДК 577.218+577.133.4  
Надійшла до редакції 06.02.08