

RESEARCH OF GENETIC AND EPIGENETIC CHANGES IN EPITHELIAL TUMORS USING MICROARRAY TECHNOLOGY

P. Bazurina

National University of Food Technologies

G. Gerashchenko

Institute of Molecular Biology and Genetics NAS of Ukraine

Key words:

DNA
RNA
Gene
Microarrays
Cancer
Tumour
Chromosome

ABSTRACT

The use of microarrays is a new direction of biological research, which focuses on the global study of genome expression at the RNA or protein level, as well as on changes that occur at the level of genomic DNA. NotI-microarray approach has significant technological advantages over the other approaches used for determination of genetic and epigenetic changes, namely, the possibility of their simultaneous detection in tumors.

Article history:

Received 20.04.2013
Received in revised form
19.05.2013
Accepted 23.05.2013

Corresponding author:

P. Bazurina
E-mail:
polinochka_2512@ukr.net

ДОСЛІДЖЕННЯ ГЕНЕТИЧНИХ ТА ЕПІГЕНЕТИЧНИХ ЗМІН В ЕПІТЕЛІАЛЬНИХ ПУХЛИНАХ З ВИКОРИСТАННЯМ ТЕХНОЛОГІЇ МІКРОЧИПІВ

П.В. Базуріна

Національний університет харчових технологій

Г.В. Геращенко

Інститут молекулярної біології і генетики НАН України

Використання мікрочипів є новим напрямом біологічних досліджень, орієнтованим на глобальне вивчення експресії геному на рівні РНК або білків, а також змін, які відбуваються на рівні геномної ДНК. NotI-мікрочипам властиві значні технологічні переваги порівняно з іншими підходами до визначення генетичних та епігенетичних змін: можливість їхньої одночасної детекції в пухлинах.

Ключові слова: ДНК, РНК, ген, мікрочипи, рак, онкомаркери, хромосома

Рак є однією з головних причин смертності у всьому світі. За даними ВООЗ, що року хворіють 10 млн осіб. Як стверджує ВООЗ, смертність від раку до 2030 року зросте на 45 %, в порівнянні з рівнем 2007 року. За розрахунками фахівців, до 2020 року кількість вперше захворілих на рак в Україні перевищить 200 тис [1].

Вчені всього світу працюють над пошуком нових технологій, які зможуть дозволити покращити діагностику та лікування раку, або взагалі запобігти появі цієї хвороби. Для цього

проводяться дослідження клітинних і молекулярних механізмів онкогенезу. В яких виявили ряд структурних генетичних і епігенетичних змін, які супроводжують процес утворення пухлин. Відповідні зміни відбуваються у різних хромосомах, але саме з абераціями на короткому плечі 3-ї хромосоми людини пов'язана значна кількість типів раку. Делеції на плечі 3p є одними з найчастіших змін у більшості епітеліальних пухлин. Епігенетичні зміни у даній ділянці також відіграють важливу роль у канцерогенезі, коли відбувається одночасне метилювання CpG-острівців промоторів тих генів, які неметильовані в нормальних тканинах [2].

Одним із напрямків сучасної діагностики онкологічних захворювань, який швидко розвивається, являється визначення онкомаркерів за допомогою лабораторних тестів. Онкомаркери — це речовини, наявність яких в організмі людини пов'язана з присутністю чи прогресуванням пухлини. Онкомаркери використовують як один із методів комплексної діагностики онкологічних захворювань [3].

Для подальшого дослідження епігенетичних та генетичних змін генів використовують сучасні технології, такі як мікрочіпи, наприклад *NotI*-мікрочіпи, та мікроарреї, SAGE технологію, пряме секвенування дає можливість широкомасштабного скринінгу змін експресії, генетичних та епігенетичних змін у пухлинах, порівняно з нормальними тканинами. Це дає змогу виявити, наприклад, інактивацію супресорних генів у пухлинах, що важливо для розуміння механізмів утворення пухлин, визначити специфічні геномні сигнатури досліджуваних новоутворень і сприяти вибору наборів потенційних онкомаркерів для ранньої діагностики раку.

Мета роботи: застосування методу порівняльної геномної гібридизації на мікрочіпах з іммобілізованими ДНК з відомими нуклеотидними послідовностями для порівняння числа копій гомологічних послідовностей в тестованій пухлинній геномній ДНК і в геномній ДНК з нормальної тканини.

Зазвичай при підготовці ДНК-проби сумарну геномну ДНК з нормальної і з належної тканини мітять двома флуоресцентними барвниками. Ці проби містять повторювані елементи геному. Використання такого способу приготування ДНК-проб призводить до зниження специфічності гібридизації та зменшенню співвідношення сигнал / фон [4]. Методика «блокування» цих повторів при гібридизації за допомогою *CotI*-ДНК істотно знижує силу сигналу. Все це значно погіршує роздільну здатність методу. Тому конструювання принципово нових ДНК-мікрочіпів, на яких іммобілізовані *NotI*-зв'язуючі клони (ділянки геномної ДНК, розташовані близько *NotI*-сайтів) є важливим для досліджень в генетиці та онкології, бо *NotI*-мікрочіпи — єдині ДНК-мікрочіпи, що дозволяють аналізувати одночасно як структурні, так і епігенетичні зміни в геномі пухлинних клітин [5].

Технологія мікрочіпів являє собою потужний інструмент, що дозволяє аналізувати десятки тисяч генів. Бурхливий розвиток технології дозволяє вивчати не тільки диференційну експресію, але і екзонно-інтронну структуру генів, здійснювати пошук нових генів, виявляти одонуклеотидні поліморфні сайти (SNP, Single Nucleotide Polymorphism) і проводити філогенетичний аналіз [6]. Мікрочіпи використовуються для ідентифікації пухлинних маркерів, вивчення механізмів дії протипухлинних засобів і в генодіагностиці ряду захворювань [7, 8]. Найбільш відомі ДНК-мікрочіпи з іммобілізованими на них олігонуклеотидами, а також з ДНК, отриманої в результаті використання P1-, PAC-, BAC-клонів (тобто штучних хромосом, які містять геномний фрагмент довжиною від 50000 до 1 млн.п.н.) або кДНК-клонів [3].

Як відомо, аналіз *NotI*-клонотеки генома людини дозволив відкрити гени, не виявлені раніше ні в кДНК-, ні в EST-клонотеці. *NotI*-мікрочіпи дозволяють знаходити зміни навіть у низкоекспресуючихся генах, які не представлені в кДНК-клонотеці нормальних тканин [5].

За допомогою *NotI*-мікрочіпів досліджено метилювання деяких нових генів — передбачуваних супресорів пухлинного росту — на ранніх стадіях канцерогенезу, що може стати революційним у діагностиці раку, так як дозволить істотно раніше виявляти і прогнозувати виникнення онкологічного захворювання.

Виявлено, що використання *NotI* — мікрочіпів має ряд переваг. По-перше в методі використовується рідкощіпляча рестриктаза *NotI*, сайт впізнавання якої включає два CpG — динуклеотида. Метилювання цитозина в них перешкоджає розщепленню рестриктазою цього сайту. Отже, в випадку гомо- або гемізіготного метилювання *NotI*-сайта в міченій пробі цей локус відсутній повністю або частково. По-друге, використання щіплячої рестриктази *Sau3AI* в

парі з NotI дозволяє отримати фрагменти міченої ДНК розміром від 100 до 2000 п.н., а біотинізований NotI-лінкер дає можливість позбавитися від фрагментів ДНК. В результаті в гібридизаційній пробі представлені в основному короткі NotI — Sau3A-фрагменти ДНК та лише незначна кількість повторів, які залишаються через неминучих методичних похибок. Таким чином, зразок збагачений нуклеотидними послідовностями, гомологічними ДНК із NotI-зв'язуючих клонів, іммобілізованих на мікрочипі.

Висновки

З'ясовано, що NotI-мікрочипи можуть з успіхом використовуватися для виявлення порушень в геномі пухлинних клітин і являють собою перший етап у шляху відбору найбільш перспективних генів, пов'язаних тим чи іншим чином з виникненням злоякісних клітин.

Створення нових ДНК — мікрочипів має велике значення, так як може надати інформацію не тільки о генетичних, але і епігенетичних змінах в геномі пухлинних клітин. NotI-мікрочипи — єдині ДНК-мікрочипи, які дозволяють аналізувати одночасно як структурні, так і епігенетичні зміни в геномі пухлинних клітин.

Література

1. Федоренко З.П., Гайсенко А.В., Гулак Л.О. Статистика рака в Украине // Бюлетень Национального канцер-реестру № 10 — «Рак в Україні, 2008 — 2009.
2. Якубовская Р.И. Современные подходы к биотерапии рака // Российский биотерапевтический журнал. — 2007. — 1, № 3 5 — 14.
3. Тюляндин С.А. Проблема рака в современном обществе // 3 ежегодная Русская онко-конференция (Санкт-Петербург 1999): Тез докл.: — К.: Наук. думка, 1980. — С. 200 — 201.
4. Pollack J.R., Perou C.M., Alizadeh A.A. 1999. Genome-wide analysis of DNA copy-number changes using cDNA microarrays. *Nat. Genet.* 23, 41 — 46.
5. Li J., Protopopov A., Wang F. 2002. NotI subtraction and NotI-specific microarrays to detect copy number and methylation changes in whole genomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 99, 10724 — 10729.
6. Trevino V., Falciani F., Barrera-Saldana H.A. 2007. DNA microarrays: a powerful genomic tool for biomedical and clinical research. *Mol. Med.* 13, 527 — 541.
7. Su A.I., Welsh J.B., Sapinoso L.M. 2001. Molecular classification of human carcinomas by use of gene expression signatures. *Cancer Res.* 61, 7388 — 7393.
8. Павлова Т.В., Кашиба В.И., Муравенко О.В. Технология анализа эпигенетических и структурных изменений хромосомы 3 человека // Молекулярная биология. — 2009. — 43, № 2 — С. 342 — 344.

ИССЛЕДОВАНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКИХ И ЭПИГЕНЕТИЧЕСКИХ ИЗМЕНЕНИЙ В ЭПИТЕЛИАЛЬНЫХ ОПУХОЛЯХ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ТЕХНОЛОГИИ МИКРОЧИПОВ

П.В. Базурина

Национальный университет пищевых технологий

Г.В. Геращенко

Институт молекулярной биологии генетики НАН Украины

Использование микрочипов является новым направлением биологических исследований, ориентированным на глобальное изучение экспрессии генома на уровне РНК или белков, а также изменений, которые происходят на уровне геномной ДНК. Технологии NotI-микрочипов свойственны значительные технологические преимущества по сравнению с другими подходами к определению генетических и эпигенетических изменений: возможность их одновременной детекции в опухолях.

Ключевые слова: ДНК, РНК, ген, микрочипы, рак, онкомаркеры, хромосома