

muticum. *Triticum aestivum*/*Amblyopyrum muticum* introgressive lines and their parental forms – common wheat cultivar *Aurora* and genome substitution amphidiploid *Aurotica* – were assessed for such root system characteristics as root number, maximum root length, and root system volume, which was determined as the volume of liquid supplanted by roots. Winter resistance of introgressive lines was assessed as their winter field survival. The results of introgressive lines' root system measurements and winter survival were compared with the previous SSR analysis of these introgressive lines for SSR loci specific to chromosomes of homeological group 5 (5A, 5B, and 5D), because it is known that the main loci controlling winter tolerance in wheat are localized on the chromosomes of this group. Correlation between the volume of liquid supplanted by roots and the productive work is twice bigger for *Aurotica* compared to *Aurora*. Introgressive lines characterized by winter resistance approaching *Aurotica* have *Aurotica* alleles at SSR loci specific to chromosome 5A. This can be the evidence for the presence of 5A/5T alien chromosome substitution or 5A/5T recombinant chromosomes in these lines. No correlation was found between winter resistance, root characteristics, and SSR alleles specific to chromosomes 5B and 5D.

Keywords: wheat introgressive lines, root system, winter resistance, *Amblyopyrum muticum*, microsatellite loci.

Матеріал надійшов 11.03.2016

УДК 57.052

Маньковська О. С., Асатрян О. Е., Вікарчук М. В.,
Кононенко О. А., Стаховський Е. О., Кашуба В. І.

ВИЗНАЧЕННЯ ЕКСПРЕСІЇ ГЕНІВ КІНАЗ *Aurora A*, *Aurora B*, *Aurora C*, *BRAF* і *EGFR* У СЕЧІ ПАЦІЄНТІВ, ХВОРИХ НА РАК ПЕРЕДМІХУРОВОЇ ЗАЛОЗИ

Кінази родини *Aurora* (*Aurora A*, *Aurora B* і *Aurora C*) є важливими для формування веретена поділу і правильної сегрегації хромосом і потенційно є пов'язаними через регуляторні механізми з білками MAP-кіназного каскаду, зокрема *BRAF* і *EGFR*. Порушення у експресії генів усіх перелічених білків було виявлено при канцерогенезі. У цій роботі ми мали на меті виявити й оцінити рівень експресії генів *Aurora A*, *Aurora B*, *Aurora C*, *BRAF* і *EGFR* у сечі пацієнтів, хворих на рак передміхурової залози. Було проаналізовано 22 зразки хворих і 6 умовно здорових осіб і показано, що експресія усіх перелічених генів дійсно ідентифікувалась у сечі як за діагностованого раку, так і у нормі. Серед генів кіназ родини *Aurora* експресія *Aurora B* і *Aurora C* була вищою за експресію *Aurora A*. Було виявлено кореляцію між рівнем експресії *Aurora C* і *BRAF*, що приводить до висновку про існування спільної і/або взаємної регуляції експресії цих генів.

Ключові слова: *Aurora A*, *Aurora B*, *Aurora C*, клітинний цикл, канцерогенез, рак передміхурової залози, MAPK.

Кінази родини *Aurora* кодуються відповідно генами *Aurora A*, *Aurora B* та *Aurora C*. Кінази цієї родини є важливими для нормального перебігу поділу клітини, а саме для формування веретена поділу і правильної сегрегації хромосом, їхні гени є еволюційно консервативними, з незначними варіаціями – їхні ортологи було виявлено

в організмах різного рівня організації [1, р. 585]. У ссавців на сьогодні відомо три члени родини кіназ *Aurora*: *Aurora A*, *Aurora B* і *Aurora C*, які були виокремлені у зв'язку з особливостями субклітинної локалізації під час мітозу, що також відображається на їхній функціональній активності [2, р. 1059].

Порушення клітинного циклу є типовим явищем для пухлинних клітин. Прямий зв'язок між подіями клітинного циклу і канцерогенезом був доведений, коли було показано ампліфікацію гена цикліну D1 у низці онкопатологій людини [3, р. 513]. Неконтрольована проліферація, нерозходження хромосом, хромосомні аберації, анеуплоїдія – результат змін у регуляції клітинного циклу, що можуть виникнути як у процесі розвитку пухлини, так і бути причиною її появи. Підвищений інтерес до кіназ родини *Aurora* як до учасників процесу злоякісної трансформації клітини виник, коли стало відомо, що мутації у генах білків цієї родини викликають серйозні порушення клітинного циклу. Зокрема, одна з мутацій в *Aurora-A* призводить до формування монополярного веретена поділу, і саме відкриття цього ефекту дало назву усій родині кіназ – *Aurora*, за аналогією з полярною зіркою [4, р. 100].

Ген *Aurora-A* (*AUR-A*) кодує кіназу *Aurora A*, також відому як AIK, ARK1, AURA, BAK, STK6, STK7, STK15, AURORA2 і MGC34538. Серед трьох кіназ родини *Aurora* *Aurora A* є найкраще вивченою. Як було зазначено вище, *Aurora A* – важлива регуляторна кіназа формування мітотичного веретена і є необхідною для правильного розходження хромосом. Первинна локалізація *Aurora A* міститься на центросомах, де вона регулює функцію центросом і формування веретена поділу, від початку дуплікації центросом до виходу з мітозу новоутворених дочірніх клітин. Ектопічна експресія *Aurora-A* трансформує клітини ліній Rat-1 і NIH3T3, що підтверджує онкогенний потенціал цієї кінази. Ампліфікація гена *Aurora-A* і/або його оверекспресія були виявлені у низці пухлин людини, серед яких рак молочної залози, колоректальний рак, рак сечового міхура, гепатоцелюлярна карцинома і рак передміхурової залози [5]. Кіназа *Aurora B* (*AURKB*) – мультифункціональний білок хромосомального пасажирського комплексу, локалізована у регіоні центромер у період від профазі до анафазі. Ген *Aurora B* експресується постійно під час G2-M фази клітинного циклу. Аналіз зразків тканин пацієнтів, хворих на рак передміхурової залози, виявив оверекспресію *Aurora B* у андроген-незалежних пухлинах порівняно з андроген-чутливими. Було показано, що трансфекція клітин *Aurora B* викликає хромосомну нестабільність, анеуплоїдію [6, р. 352]. Підвищену експресію *Aurora B* було виявлено різними авторами у клінічних зразках хворих на колоректальний рак, астроцитому, семіному [5], а також у деяких зразках раку передміхурової залози.

Aurora C, так само, як і *Aurora B* – білок хромосомального пасажирського комплексу. Прийнято вважати, що експресія його обмежена тканиною тестикулярних залоз. Високий рівень білка *Aurora C* був детектований у деяких клітинних лініях, таких як HepG2, HuH7 і HeLa, NB1RGB, MDZ-MB-453, у первинному колоректальному раку [7, р. 250].

Каталітичні домени білків родини *Aurora* (*A*, *B* і *C*) демонструють дуже невеликі відмінності в амінокислотній послідовності, в той час як їхні некаталітичні N-кінцеві домени сильно відрізняються. Найвірогідніше, цим зумовлене те, що *Aurora A*, *Aurora B* і *Aurora C* можуть взаємодіяти з різними білками і відрізняються за субклітинною локалізацією, іноді мають різні субстрасти [8, р. 217].

Під час вивчення кіназ родини *Aurora* було виявлено, що одним із можливих способів її впливу на події, які відбуваються у клітині, є взаємодія з білками сигнального каскаду мітоген-активованих протеїнкіназ.

Мітоген-активований протеїнкіназний (**M**itogen-**a**ctivated **p**rotein **k**inase, MAPK) сигнальний шлях об'єднує різні сигнальні каскади, серед яких Ras-Raf-Mek- ERK1/2, який є одним з ключових регуляторів проліферації, росту і виживаності клітин, і порушення в ньому часто спостерігається при онкологічних захворюваннях у людини. Білки родини Ras є важливими ГТФазами, які закорені на внутрішній стороні клітинної мембрани і, активуючись, запускають передачу сигналу всередину клітини кількома шляхами, включаючи RAF-MEK-ERK/MAPK каскад. Для регуляції активності Ras після отримання сигналу з тирозинкіназного рецептора, який розташований вище у сигнальному шляху, зокрема, рецептора епідермального фактора росту EGFR, необхідні кілька білків-адапторів і допоміжних білків для активації-деактивації Ras шляхом обміну ГДФ-ГТФ (nucleotide exchange factors (GEFs) і GTPase activating proteins (GAPs)) [9, р. 103–104]. Основна функція білка RasGAP у нормі полягає у негативній регуляції активності Ras. На N-кінці молекули RasGAP є функціональні SH2 і SH3 домени, через зв'язування з якими може відбуватись взаємодія з іншими білками. SH3 домен відіграє важливу роль у Ras-залежному онкогенезі – пригнічує апоптоз, було показано його залучення до регуляції клітинного циклу. Gigoux зі співавторами у 2002 р. опублікувала результати дослідження, які показують, що SH3 домен RasGAP зв'язується з C-кінцевими доменами кіназ *Aurora A* і *B* та сурвівіном і утворюється комплекс, який, за пропозицією авторів,

може бути залученим у регуляцію процесу поділу клітини [10].

BRAF – один з білків каскаду Ras, член родини RAF-кіназ (вона включає ARAF, BRAF і CRAF). RAF-кінази безпосередньо активуються фосфорильованим Ras і передають сигнал далі по MAP-кіназному шляху. Мутації у гені *BRAF* найчастіше зустрічаються при онкопатологіях (меланома 98–100 %, тиреоїдна карцинома – близько 40 %) і для деяких із них розглядаються як діагностичні або асоційовані з поганим прогнозом. Розуміння регуляції експресії й функціональної активності гена *BRAF* і його продукту ускладнена наявністю псевдогена цього гена на X-хромосомі, експресія якого впливає на активацію BRAF і рівень його активності [11]. Оскільки BRAF передає всередину клітини проліферативний сигнал, його надмірна експресія може бути пов'язана з канцерогенезом. Wen зі співавторами показали, що визначена імуногістохімічно експресія *BRAF* у 74 хворих на аденокарциному передміхурової залози корелювала зі стадією хвороби і запропонували виявлення її як діагностичного і прогностичного фактора для цього типу раку [12]. Вонет зі співавторами на моделі меланоми показала, що при зменшеній експресії *Aurora B* у клітинах, чутливих до вемурафенібу (таргетний препарат проти BRAF-кінази) вона відновлюється з виникненням резистентності до препарату. Було проведено низку експериментів, які показали, що з великою вірогідністю експресія *Aurora B* регулюється BRAF/ERK віссю опосередковано через FOXM1 [13].

Вже згаданий вище рецептор епідермального фактора росту EGFR часто пов'язують з канцерогенезом. Зокрема, його властивість активувати рецептори андрогенових гормонів, виявлена Pignon зі співавторами у сердовищі, бідному на андрогени, є одним із можливих механізмів андрогенрезистентності пухлин передміхурової залози і пов'язана з поганим прогнозом цього захворювання [14]. Оверекспресія *Aurora B* і *EGFR* було виявлено у нечутливому до андрогенів раку передміхурової залози [15].

Спираючись на сказане вище, можна дійти висновку, що на сучасному етапі цілком вірогідним є припущення, що білки родини Aurora і білки MAP-кіназного шляху залучені до розвитку пухлин передміхурової залози і що між ними існує взаємозв'язок, який полягає у взаємній регуляції цих білків.

Проте всі дослідження, за поодинокими винятками, які проводились з метою вивчення експресії генів Aurora-кіназ, були виконані на клітинних лініях або зразках тканин хворих та здорових

індивідів [16], що не дає розуміння того, чи можна використовувати отримані дані, наприклад, для моніторингу стану хворого, для прогнозу розвитку захворювання або для діагностичних задач.

Отже, у цій роботі ми мали на меті виявити рівень експресії генів кіназ родини Aurora і білків-учасників MAP-кіназного каскаду, серед яких ми виділили BRAF і EGFR як такі, що можуть бути залучені до розвитку пухлини передміхурової залози і можуть бути пов'язані з експресією генів Aurora-кіназ, у клітинах передміхурової залози, що потрапили у сечу пацієнтів, хворих на карциному простати.

Перед нами стояло завдання оцінити, чи можемо ми детектувати неінвазивним шляхом (у сечі пацієнтів) зміни експресії генів перелічених білків, а також виявити, чи існують певні закономірності у співвідношенні експресії всередині родини Aurora-кіназ і з генами білків зазначеного сигнального каскаду.

Матеріали і методи

Зразки сечі і тканин. У дослідження взяли вибірку пацієнтів із підтвердженим діагнозом «аденокарцинома передміхурової залози» ($n = 22$) відділення пластичної та реконструктивної онкоурології Національного інституту раку і третього урологічного відділення Інституту урології НАМН України і зразки умовно здорових людей ($n = 6$). У всіх хворих забір сечі проводили до операційного втручання. Сечу збирали у пластикові контейнери ємністю 50 мл, транспортували на холоді, центрифугували на низькій швидкості (до 1000XG) протягом 20 хвилин для того, щоб осадити клітини.

У дослідження було включено 5 зразків тканин аденокарциноми передміхурової залози, отримані нами в Інституті урології НАМН України. Тканини одразу після операції переміщували у розчин *RNAlater*[®] (Sigma-Aldrich[®]), транспортували на холоді і зберігали при температурі -20°C .

Виділення РНК і синтез κ ДНК. РНК виділяли за модифікованим методом Хомжинського [17]. Перед виділенням тканину звільняли від розчину *RNAlater*[®] і подрібнювали у ступці. Далі подрібнені тканини і клітини переносили у 1,5 мл пробірки і додавали розчин D згідно з протоколом. Модифікація методу полягала в тому, що РНК виділяли в один етап, не розчиняючи повторно осаджену ізопропіловим спиртом РНК у розчині D, а одразу промивали 70 % спиртом

Таблиця 1. Послідовності олігонуклеотидних праймерів

<i>Aurora-A</i>	Forward 5'-CTGCATTTCAGGACCTGTAAAGG-3'
	Reverse 5'-AACGCGCTGGGAAGAATT-3'
<i>Aurora-B</i>	Forward 5'-AACTCCTACCCCTGGCCCTA-3'
	Reverse 5'-ACAAGTGCAGATGGGGTGAC-3'
<i>Aurora-C</i>	Forward 5'-CGCATCCTCAAGGTAGATGTG-3'
	Reverse 5'-GAACACACAAAAGGGAACAGAG-3'
<i>BRAF</i>	Forward 5'-GTGGATTATGCTCCCCACC
	Reverse 5'-CTGCCATTCCGGAGGAG-3'
<i>EGFR</i>	Forward 5'-ATGCCCG-CATTAGCTCTTAG-3'
	Reverse 5'-GCAACTTCCCAAATGTGCC-3'
<i>beta-Actin</i>	Forward 5'-TGACGTGGACATCCGCAAAG-3'
	Reverse 5'-CTGGAAGGTGGACAGCGAGG-3'

і розчиняли у воді. Концентрацію і чистоту РНК оцінювали спектрофотометрично (NanoDrop™ 2000, Thermo Fisher Scientific, Inc.). кДНК синтезували з 1 мкг РНК з використанням набору для

проведення зворотної транскрипції RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific).

ПЛР у реальному часі. ПЛР проводили з використанням Maxima SYBR Green qPCR Master Mix (Thermo Scientific), на Real-Time ампліфікаторі CFX96 (Biorad).

Послідовності праймерів наведено у табл. 1. Умови: 95 °C – 10 хв; цикл: 95 °C – 15 с, 60 – 15 с, 72 °C – 15 с – 49 циклів; плавлення 65 °C – 0,05 с, 85 °C – 0,05 с.

Результати й обговорення

Результати дослідження показали, що експресія генів кіназ родини Аугога, *BRAF* і *EGFR* детектується обраною методикою у сечі хворих на карциному передміхурової залози, а також у сечі деяких умовно здорових осіб (табл. 2).

Таблиця 2. Відносна експресія генів кіназ родини Аугога, *BRAF* і *EGFR* у досліджуваній вибірці

	AurA	AurB	AurC	BRAF	EGFR
N1*	0,000236	2,04E-06	0,001619765	0,000488	0,069830446
N2	0	0	0,0238478	0	0,027204705
N3	4,63E-05	0,000605	0	0,00099	0,116629124
N4	0,000408	0	0,000690534	0,038473	0,271683716
N5	0	0	0	0,001381	1,536875181
N6	0	0	0	8192	147463,6657
P1**	0	0,050067	0,197510328	0,164938	0,38958229
P2	1,17E-05	0,009037	0,048361406	0,059129	0,167240944
P3	0	0,028557	0,26061644	0,049037	2,02791896
P4	1,38E-05	1,78E-05	3,09436E-05	3,63E-05	0,037162722
P5	0	0	0,069348092	0,145592	1,101905116
P6	2,24E-07	3,16E-05	0,002668047	0,004613	0,126744935
P7	0	0	0	0	0,073812041
P8	5,43E-06	6,87E-05	9,45822E-06	3,73E-05	0,068393356
P9	1,58E-05	3,05E-05	1,96097E-06	0,000109	0,075362989
P10	1,42E-07	1,75E-05	0,004910208	0,010746	0,181746565
P11	0	0,003129	4,88934E-05	0,00029	0,074325445
P12	4,59E-05	0,000102	0,000186311	1,84E-05	0,078563336
P13	0,00145	0,002152	0,002919627	0,009163	3,60500185
P14	3,81E-05	8,51E-05	0	0,000114	0,087171479
P15	1,22E-05	6,54E-05	2,60204E-05	5,98E-05	0,062934722
P16	0,103665	0	0	0,051474	1,028113827
P17	0,000269	0,019915	0	0,01278	0,07588718
P18	0	0,085378	0,121581868	0,00011	0,281264621
P19	0	0,010598	0,145591698	0,01176	0,059128603
P20	2,68E-05	0,004158	0,001018033	0,004809	0,158219574
P21	3082,745	2019,805	0	0	1964,572916
P22	0	0	0	0	0,00000232

*N – зразки умовно здорових осіб, **P – зразки хворих на рак передміхурової залози.

При порівнянні експресії кожного з генів інтересу у хворих осіб і в умовній нормі за критерієм Манна-Вітні жоден з результатів не потрапив у довірчий інтервал. Це зумовлено в першу чергу тим, що кількість умовно здорових осіб була значно меншою за кількість хворих у вибірці. Ще одним можливим поясненням може бути якість зразків, взятих у вибірку умовної норми, оскільки перед забором зразків не було проведено ретельного обстеження умовно здорових індивідів, і певні відхилення від нормального стану здоров'я у вибірці можна припустити. Загалом, у двох зразках умовно здорових людей не було детектовано експресії генів кінази родини Aurora. У одному було виявлено мРНК усіх трьох кіназ, а у двох зразках – дві у комбінаціях – *Aurora A* і *Aurora B* та *Aurora A* і *Aurora C*. Експресію *BRAF* було детектовано у 5 із 6 умовно здорових осіб, а *EGFR* – у 6 із 6. Експресія *BRAF* і *EGFR* однієї з норм (N6) значно перевищувала показники як в інших нормах, так і у хворих осіб, тому було вирішено не приймати цей зразок за норму за цими показниками.

Незважаючи на деякі суперечності у результатах, ми виявили, що у всіх зразках, отриманих із тканин, так само як і в тих, що були отримані з сечі, сумарна експресія *Aurora B* і *Aurora C* перевищувала експресію *Aurora A* – явище, протилежне тому, що було описане для нормальної тканини передміхурової залози. За даними літератури, у нормальної тканини передміхурової залози експресія гена *Aurora A* суттєво переважає експресію *Aurora B* і *Aurora C* і становить більше ніж 90 % від сумарної експресії кінази родини Aurora [5].

Серед усієї вибірки відносна експресія *Aurora B* і *Aurora C* достовірно відрізнялись за експресією від *Aurora A* (критерій Манна-Вітні, $p = 0,01$, $U_{\text{емп}} = 82$ і 79 відповідно). У зразку P21 експресія *Aurora A* у 1,5 разу перевищувала експресію *Aurora B*, при тому що експресія *Aurora C* не детектувалась і була у 7560236,841 разу вищою за найвищий показник норми. Проте лише в трьох зразках експресія *Aurora A* перевищувала показники, які були виявлені в сечі умовно здорових осіб, і тільки в P16 і P21 вона перевищувала 50 % від загальної експресії генів кінази цієї родини (рис. 1).

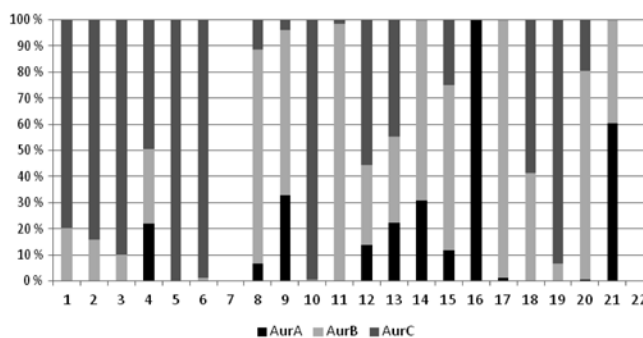


Рис. 1. Розподіл у відсотках експресії кінази родини Aurora у клінічних зразках

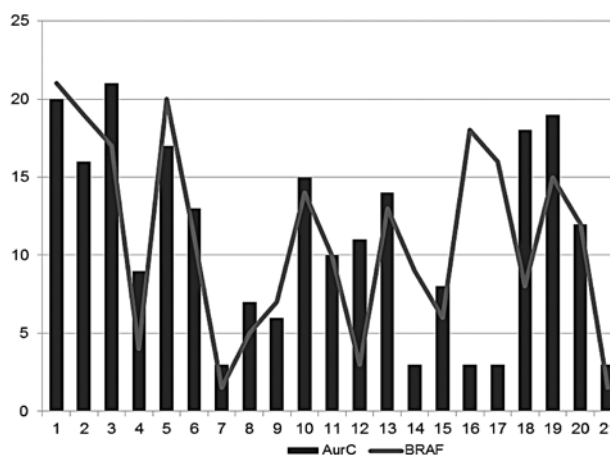


Рис. 2. Графічне зображення рангової кореляції Спірмена між експресією *Aurora C* і *BRAF*

У клінічних зразках сумарна експресія *Aurora B* + *Aurora C* перевищувала найвищий показник норми у зразках P1, P2, P3, P5, P6, P10, P11, P13, P17, P18, P19, P20, P21 – тобто у 13 із 22 зразків.

При пошуку кореляції між експресією досліджуваних генів ми виявили, що експресія *Aurora C* достовірно корелює з експресією гена *BRAF* у цій вибірці (коефіцієнт Спірмена $r_s = 0,548$, $p = 0,01$) (рис. 2). При цьому кореляції між *BRAF* і *Aurora B* або інших генів між собою виявлено не було.

Для перевірки гіпотези, що ми можемо достовірно оцінити експресію досліджуваних генів у пухлині пацієнта на зразках сечі цих пацієнтів, ми дослідили експресію усіх 5 генів у 5 парах сеча/тканина. Результати показали, що співвідношення експресії досліджуваних генів не збігалось у проаналізованих парах, проте у зразку P14, де експресії *Aurora C* не спостерігалось у тканині, її не було виявлено і в клітинах, виділених з сечі. Натомість у зразку P22 у сечі не детектувалась матрична РНК жодного з генів інтересу, а в тканині була наявна експресія усіх 5 генів (табл. 3).

Таблиця 3. Відносна експресія генів кіназ родини Ауорога, BRAF і EGFR у досліджуваній вибірці

		AurA	AurB	AurC	Braf	EGFR
P11	сеча	0	0,003129179	4,88934E-05	0,000290334	0,074325445
	тканина	0,000549345	0,00837323	0,000729907	0,004775939	1,021012126
P13	сеча	0,00144973	0,002152158	0,002919627	0,009162773	3,60500185
	тканина	0,000280444	0,000110781	0,000695337	0,002919627	0,426317446
P14	сеча	3,8096E-05	8,51284E-05	0	0,000113896	0,087171479
	тканина	0,001490488	0,029977004	0	0,002781348	3,706352248
P15	сеча	1,22234E-05	6,54159E-05	2,60204E-05	5,97791E-05	0,062934722
	тканина	0,000534323	0,000498541	0,002137292	0,015843117	1,892115293
P22	сеча	0	0	0	0	0
	тканина	0,00191293	0,025033434	0,004044004	0,05041511	1,72907446

Ці результати потребують подальшого дослідження і пояснення, проте можна припустити, що, враховуючи гетерогенність пухлини за представленістю клітинних популяцій [18; 19], існує вірогідність, що у сечу пацієнтів насамперед потрапляють клітини з певними властивостями, а саме з порушеною клітинною адгезією. Це означає, що перед тим, як потрапити у дослідження, відбувається добір клітин за певною ознакою, проконтролювати який ми не можемо. Також у самій пухлинній тканині у різних її ділянках (наприклад, центральних і маргінальних) можуть бути представлені різні популяції клітин у різному співвідношенні, що відрізняються одна від одної за профілем експресії. Відомо, що адгезивні властивості клітини впливають на її здатність до поділу, хоч характер цього взаємозв'язку може сильно відрізнитись у нормальних і пухлинних клітин. Оскільки усі з досліджуваних генів залучені до регуляції проліферації клітин у нормі й у патології, а кінази родини Ауорога є кіназами клітинного циклу, цілком можливо припустити, що між експресією цього набору генів і адгезією клітин може існувати взаємозв'язок. У літературі було наведено дані про те, що білок адгезії HGF1 активує кіназу Aurora A на центросомах [20]. Сьогодні ще мало відомо про наявність і характер подібних явищ у пухлинних клітинах.

Якщо ці припущення правильні, ми не можемо говорити про достовірну кількісну оцінку в жодному з розглянутих варіантів. Проте ми можемо оцінити якісно наявність чи відсутність експресії певного гена, оцінити сумарну експресію досліджуваних генів, виявити певні закономірні співвідношення.

З огляду на дані літератури, в яких було запропоновано регуляцію експресії Aurora B через

MAP-кіназний каскад, з участю BRAF-кінази, ми очікували побачити кореляцію між експресією відповідних генів. Натомість, як було зазначено вище, єдиною парою генів, для якої було показано наявність кореляційного взаємозв'язку, були BRAF і Aurora C, що спонукувало нас звернутись до даних про можливу функціональну і структурну подібність білків Ауорога B і Ауорога C, які могли б пояснити спостережуване явище з погляду взаємозамінності та/або подібності у шляхах регуляції цих двох кіназ. Так, на клітинних лініях було показано, що при сайленсингу гена Aurora B, Aurora C була здатна функціонально заміщувати її у мітозі [6, р. 250], що дає змогу припустити, що регуляція їхньої активності може мати певні спільні сигнальні шляхи. Подальші дослідження в цьому напрямі показали, що відомі раніше субстрати Ауорога B – центромерний білок CENP-A і бореалін – також виступають як субстрати для кінази Ауорога C [21], тобто здійснення цими білками їхніх функцій має спільний механізм. Для BRAF у деяких дослідженнях була показана здатність до взаємодії з низкою білків клітинного циклу, зокрема деяких циклін-залежних кіназ [22].

Тому кореляція між BRAF і Aurora C, виявлена у нашому дослідженні, може бути пояснена тим, що між кіназою BRAF і кіназою Ауорога C існує певна пряма чи опосередкована взаєморегуляція, характер і напрям якої ми плануємо дослідити у наступних роботах.

Висновки

Підсумовуючи отримані результати, можна сказати, що експресію досліджуваних генів Aurora A, Aurora B, Aurora C, Braf і EGFR можна детектувати у сечі хворих на рак передміхурової залози, причому в межах родини Ауорога експресія

Aurora B і *Aurora C* була вищою за експресію *Aurora A*, що не відповідає літературним даним про співвідношення експресії цих генів у нормальній тканині передміхурової залози і може свідчити про наявність злоякісного переродження у цій тканині.

Експресія *BRAF* і *Aurora C* у зразках пацієнтів, хворих на карциному передміхурової залози, корелювала у межах дослідженої вибірки хворих. Це приводить до висновку про існування спільної

і/або взаємної регуляції експресії цих генів, що відкриває плацдарм для подальших досліджень.

У цьому напрямі потрібно, крім збільшення вибірки клінічних зразків і умовно здорових людей, створити клітинну модель, на якій можна було б оцінити вплив експресії кожного гена і її відсутності на властивості клітин, насамперед на ті характеристики, які асоціюються з процесом канцерогенезу.

Список літератури

1. Aurora-A and an Interacting Activator, the LIM Protein Ajuba, Are Required for Mitotic Commitment in Human Cells / T. Hirota, N. Kunitoku, T. Sasayama, et al. // *Cell*. – 2003. – Vol. 114. – P. 585–598.
2. Aurora-A Kinase Is Essential for Bipolar Spindle Formation and Early Development / D. O. Cowley, J. A. Rivera-Pérez, M. Schliekelman, et al. // *Molecular and cellular biology*. – Feb. 2009. – Vol. 29, No. 4. – P. 1059–1071.
3. A novel cyclin encoded by a bcl1-linked candidate oncogene / T. Motokura, T. Bloom, H. G. Kim, et al. // *Nature*. – 1991. – Vol. 350. – P. 512–515.
4. Mutations in aurora Prevent Centrosome Separation Leading to the Formation of Monopolar Spindles / D. M. Glover, M. H. Leibowitz, D. A. McLean, et al. // *Cell*. – 1995. – Vol. 81. – P. 95–105.
5. Gene Expression Profiles of the Aurora Family Kinases / Y.-SH. Lin, L.-J. Su, Ch.-T. Rickyuu, et al. // *Gene Expression*. – 2006. – Vol. 13. – P. 15–26.
6. RNAi-mediated knockdown of AURKB and EGFR shows enhanced therapeutic efficacy in prostate tumor regression / M. K. Addepall, K. B. Ray, B. Kumar, et al. // *Gene Therapy*. – 2010. – Vol. 17. – P. 352–359.
7. Aurora-C Kinase Is a Novel Chromosomal Passenger Protein That Can Complement Aurora-B Kinase Function in Mitotic Cells / K. Sasai, H. Katayama, D. L. Stenoien, et al. // *Cell Motility and the Cytoskeleton*. – 2004. – Vol. 59. – P. 249–263.
8. Aurora A, Meiosis and Mitosis / R. Crane, B. Gadea, L. Littlepage, et al. // *Biology of the Cell*. – 2003. – Vol. 96. – P. 215–229.
9. Targeting the Mitogen-Activated Protein Kinase RAS-RAF Signaling Pathway in Cancer Therapy / L. Santarpia, S. L. Lippman and A. K. El-Naggar // *Expert Opin. Ther. Targets*. – 2012. – Vol. 16 (1). – P. 103–119.
10. Identification of Aurora kinases as RasGAP SH3 domain-binding proteins / V. Gigoux, S. L'Hoste, F. Raynaud, et al. // *J Biol Chem*. – 2002. – Vol. 28. – P. 23742–23746.
11. The BRAF pseudogene functions as a competitive endogenous RNA and induces lymphoma in vivo / F. A. Karreth, M. Reschke, A. Ruocco, et al. // *Cell*. – 2015. – Vol. 161 (2). – P. 319–332.
12. The expression and clinical significance of BRAF in prostate cancer / Z. Wen, X. Zou, G. Yang, et al. // *Chinese-German Journal of Clinical Oncology*. – 2011. – Vol. 10, No. 9. – P. 523–525.
13. Aurora B Is Regulated by the Mitogen-activated Protein Kinase / Extracellular Signal-regulated Kinase (MAPK/ERK) Signaling Pathway and Is a Valuable Potential Target in Melanoma Cells / C. Bonet, S. Giuliano, M. Ohanna, et al. // *J Biol Chem*. – 2012. – Vol. 287 (35). – P. 29887–29898.
14. Androgen Receptor Controls EGFR and ERBB2 Gene Expression at Different Levels in Prostate Cancer Cell Lines / J.-C. Pignon, B. Koopmansch, G. Nolens, et al. // *Cancer Research Application Note*. – 2012. – No. 4. – P. 232–241.
15. Enhanced Radiosensitivity of Androgen-Resistant Prostate Cancer: AZD1152-Mediated Aurora Kinase B Inhibition / K. J. Niermann, L. Moretti, N. J. Giacalone, et al. // *Radiation Research*. – 2011. – Vol. 175, No. 4. – P. 444–451.
16. The Present and Future of Prostate Cancer Urine Biomarkers. M. Rigau, M. Olivan, M. Garcia, et al. // *Int. J. Mol. Sci*. – 2013. – Vol. 14. – P. 12620–12649.
17. The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate–phenol–chloroform extraction: twenty-something years on / P. Chomczynski & N. Sacchi // *Nature Protocols*. – 2006. – Vol. 1, No. 1. – P. 581–585.
18. Prostate Cancer Stem Cells: Research Advances / D. Jaworska, W. Król, E. Szliszka // *Int. J. Mol. Sci*. – 2015. – Vol. 16. – P. 27433–27449.
19. The PSA- α Prostate Cancer Cell Population Harbors Self-Renewing Long-Term Tumor-Propagating Cells that Resist Castration / J. Qin, X. Liu, B. Laffin, et al. // *Cell Stem Cell*. – 2012. – Vol. 10, Issue 5. – P. 556–569.
20. The focal adhesion scaffolding protein HEF1 regulates activation of the Aurora-A and Nek2 kinases at the centrosome / E. N. Pugacheva, E. A. Golemis // *Nature Cell Biology*. – 2005. – Vol. 7. – P. 937–946.
21. Aurora-C and Aurora-B share phosphorylation and regulation of CENP-A and Borealin during mitosis / S. D. Slattery, R. V. Moore, B. R. Brinkley, et al. // *Cell Cycle*. – 2008. – Vol. 7 (6). – P. 787–795.
22. Adhesion control of cyclin D1 and p27Kip1 levels is deregulated in melanoma cells through BRAF-MEK-ERK signaling / K. V. Bhatt, L. S. Spofford, G. Aram // *Oncogene*. – 2005. – Vol. 24. – P. 3459–3471.

*O. Mankovska, O. Asatryan, M. Vikarchuk,
O. Kononenko, E. Stakhovsky, V. Kashuba*

IDENTIFICATION OF GENE EXPRESSION OF KINASES *AURORA A*, *AURORA B*, *AURORA C*, *BRAF* AND *EGFR* IN SAMPLES OF URINE FROM PATIENTS WITH PROSTATE CANCER

Serine-threonine kinases from Aurora family (Aurora A, Aurora B, and Aurora C) are important for mitotic spindle formation and normal chromosome segregation, and they potentially share some regulatory mechanisms with proteins of MAPK pathway, including BRAF and EGFR. Abnormalities in gene expression of all of these proteins were discovered during carcinogenesis. This study aimed to identify and evaluate the level of gene expression of Aurora A, Aurora B, Aurora C, BRAF and EGFR in the urine of patients with prostate cancer.

22 urine samples from patients with prostate cancer (PCa) were gathered after prostate massage before surgical invasion. We used urine samples from 6 healthy men as control. We obtained cells from each urine sample by centrifugation and isolated RNA using a standard approach with phenol and guanidine thiocyanate. cDNA was synthesized and taken to qPCR reactions. The data were statistically analysed.

The results demonstrated that the differential expression of all these genes can be identified in urine in samples from people both with diagnosed cancer and healthy individuals. Among gene expression inside Aurora kinase family, the expression level of Aurora B and Aurora C was significantly higher than the expression of Aurora A. The cumulative expression *AURB* and *AURC* was higher than expression of *AURA* in 13 samples out of 22 in the prostate cancer sample. Moreover, we observed positive correlation between expression of *AURC* and *BRAF* in prostate cancer samples ($r_s = 0,548$, $p = 0,01$), which leads to the conclusion that there is joint and / or mutual regulation of expression of these genes.

Keywords: Aurora A, Aurora B, Aurora C, cell cycle, carcinogenesis, prostate cancer, MAPK.

Матеріал надійшов 15.03.2016

УДК 57.052

Маньковська О. С., Скрипнікова О. С., Панасенко Г. В., Вікарчук М. В., Кононенко О. А., Стаховський Е. О., Кашуба В. І.

ВИЯВЛЕННЯ МЕТИЛЮВАННЯ ГЕНІВ *VIM*, *TMEFF2* І *GDF15* У СЕЧІ ПАЦІЄНТІВ, ХВОРИХ НА РАК СЕЧОВОГО МІХУРА, В УКРАЇНСЬКІЙ ПОПУЛЯЦІЇ

Рак сечового міхура є одним із найпоширеніших в Україні та світі, проблема його ранньої діагностики досі є нерозв'язаною. Використання епігенетичних маркерів, а саме виявлення метилювання генів-онкосупресорів, є перспективним засобом для оцінки ризиків цього захворювання і раннього його виявлення, проте має популяційні особливості. Метою цієї роботи було перевірити, чи виявляється метилювання генів *GDF15*, *TMEFF2* і *VIM* у сечі хворих на рак сечового міхура в українській популяції і чи можна застосовувати цю комбінацію метильованих генів як інформативну панель онкомаркерів. Ми виявили наявність метилювання усіх трьох генів серед досліджуваних хворих ($n = 42$), при цьому жоден не детектувався у нормі ($n = 5$). Чутливість цієї комбінації потенційних маркерів становила 69 %, специфічність – 100 %. Було зроблено висновок про необхідність розширення вибірки і перевірки диференціальної здатності *GDF15*, *TMEFF2* і *VIM* для раку сечового міхура порівняно з іншими онкоурологічними патологіями.

Ключові слова: метилювання, гени-онкосупресори, рак сечового міхура, рання діагностика, онкомаркери, *GDF15*, *TMEFF2*, *VIM*.

Вступ

Рак сечового міхура сьогодні є однією з найактуальніших проблем онкоурології. Це зумовлено значною частотою захворювання з тенденцією до її зростання, особливостями клініки і перебігу хвороби, відсутністю єдиних підходів до лікування залежно від стадії та ступеня диференцію-

вання пухлини. За даними світової статистики, рак сечового міхура посідає 6-те місце серед онкологічних захворювань загалом, 3-тє місце серед урологічної та 2-ге (відповідно 50–72 %) серед онкоурологічної патології. У світі щороку діагностують 380 тисяч нових випадків раку сечового міхура і близько 150 тисяч летальних випадків цього захворювання [1].