

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

Розенберг Євгенія Едуардівна

УДК 577.218, 616-006, 616.65

**ДИФЕРЕНЦІЙНО ЕКСПРЕСОВАНІ ГЕНИ ТА ГЕНЕТИЧНІ Й
ЕПІГЕНЕТИЧНІ ЗМІНИ У ПУХЛИНАХ ПРОСТАТИ ЛЮДИНИ**

03.00.03 – молекулярна біологія

АВТОРЕФЕРАТ
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Київ 2018

Дисертацією є рукопис.

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

Науковий керівник: доктор біологічних наук, професор
Кашуба Володимир Іванович
Інститут молекулярної біології і генетики
НАН України,
завідувач відділу молекулярної онкогенетики.

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук, с.н.с.
Бучинська Любов Георгіївна,
завідуюча лабораторією генетики раку,
Інститут онкології, експериментальної радіобіології
та патології ім. Р.Є. Кавецького НАН України,
заступник директора з наукової роботи;

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

Захист відбудеться «27» лютого 2018 р. 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. Ак.Заболотного, 150

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

Автореферат розісланий «26» січня 2018 року.

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

І.В. Крупська

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. За даними Всесвітньої організації охорони здоров'я рак передміхурової залози (РПЗ) займає друге місце по частоті захворюваності та п'яте місце по смертності серед чоловіків у світі станом на 2012 рік (Ferlay et al., 2012). Згідно даних канцер – реєстру Національного інституту раку України в 2015 році загальна кількість випадків захворювання на РПЗ становила 6898, загальна кількість померлих — 3149 випадків. РПЗ займає друге місце за частотою захворюваності та третє місце за частотою смертності в Україні (10,5% та 8,5% відповідно) (Федоренко та ін., 2017).

З одного боку, виникнення РПЗ так само, як і інших видів раку, супроводжується багатьма генетичними та епігенетичними змінами. Так, показано низку ділянок хромосом, зміни в яких найчастіше виникають при розвитку РПЗ та є асоційованими з ризиком виникнення цього захворювання (Aschelter et al., 2012). Однією з таких ділянок є 8q24, яка часто ампліфікується в пухлинах передміхурової залози. Вона містить онкоген *MYC*, ампліфікація якого корелює з прогресуванням та рецидивами пухлин передміхурової залози (Fromont et al., 2013). Гіпометилування ДНК було визначено як на ранніх (Cho et al., 2009), так і на пізніх стадіях розвитку РПЗ (Yegnasubramanian et al., 2008). В той же час, гіперметилування промоторів генів є однією з найбільш досліджених епігенетичних змін при РПЗ (Jerónimo et al., 2011).

З іншого боку, РПЗ характеризується високим рівнем як генетичної (Gerlinger et al., 2015), так і епігенетичної гетерогенності (Brocks et al., 2014), що створює проблему для ранньої діагностики пухлин передміхурової залози. Запропонована молекулярна класифікація підтипів РПЗ на основі досліджень генетичних, епігенетичних та транскриптомних змін наразі охоплює 74% випадків досліджених зразків РПЗ (The Cancer Genome Atlas Research Network, 2015).

В той же час, при прогресуванні РПЗ відбувається інгібування генів-супресорів пухлинного росту та активація протоонкогенів (Zhu et al., 2015). На сьогодні серед залучених до РПЗ протоонкогенів суттєве значення мають гени родини *ETS* у складі злитих генів *TMPRSS2:ETS* та ген *MYC* (Schrecengost et al., 2013), підвищені рівні експресії яких асоціюються з прогресуванням пухлинного процесу РПЗ (Gallucci et al., 2009, Hagglof et al., 2014). Серед виявлених генів-супресорів, пов'язаних з виникненням РПЗ, відзначено втрату гетерозиготності гена *PTEN* у первинних пухлинах передміхурової залози (Nodouzi et al., 2015), гена *RB* в метастазах та резистентному до кастрації РПЗ (Sharma et al., 2010).

Значний рівень гетерогенності РПЗ спричиняє певні труднощі в діагностиці цієї форми раку та персоніфікованому лікуванні хворих (Hodgson et al., 2012, Dani et al., 2017). Відомо, що від 10% (Fujimoto et al., 2017) до 30% (Climent et al., 2015) пухлин передміхурової залози здатні прогресувати до агресивного метастазуючого типу, який характеризується резистентністю до андрогенів (Aragon-Ching et al., 2007). Механізми набуття резистентності до андрогенів лишаються ще недостатньо охарактеризованими. До того ж, клінічна ефективність гормональної терапії, яка застосовується для лікування хворих з гормоночутливими пухлинами

передміхурової залози, є варіабельною серед пацієнтів із РПЗ (Fujimoto et al., 2017), а для гормонорезистентних пухлин терапії фактично не існує. Це ставить питання про необхідність подальшого дослідження, яке спрямоване на виявлення молекулярних підтипів пухлин передміхурової залози.

Незважаючи на достатньо широкий спектр досліджень РПЗ, що дозволило виявити певні фактори та механізми розвитку цього захворювання, залишається невирішеною низка питань, наприклад щодо переходу деяких пухлин до гормонорезистентного типу. Отже дослідження генетичних та епігенетичних змін, а також експресії генів в доброякісних та злоякісних пухлинах передміхурової залози надасть можливість розширити існуючі знання механізмів прогресування РПЗ. Також це допоможе виявити потенційно асоційовані із РПЗ гени, що можуть бути використані для виявлення і розрізнення доброякісних та злоякісних процесів передміхурової залози.

Зв'язок з науковими програмами, планами, темами, грантами. Роботу виконано в рамках наукових проектів відділу молекулярної онкогенетики Інституту молекулярної біології і генетики НАН України “Вивчення генетичних та епігенетичних змін в злоякісних пухлинах епітеліального походження” (державний реєстраційний номер № 0110U000691, 2011-2015 рр.), «Ідентифікація нових біомаркерів для діагностики злоякісних новоутворень та розробка підходів до генотерапії пухлин у модульних системах » (державний реєстраційний номер № 0115U003742, 2016-2020 рр.), цільової комплексної міждисциплінарної програми наукових досліджень НАН України «Фундаментальні основи молекулярних та клітинних біотехнологій», проекту «Ідентифікація молекулярно-генетичних маркерів для діагностики злоякісних новоутворень епітеліального походження» (державний реєстраційний номер №0110U000691, 2009-2014 рр. та № 41/146 2015 рр.), цільового тематичного конкурсу Ф46 ДФФД науково-навчального центру “Державна ключова лабораторія молекулярної та клітинної біології” - “Макромолекули та їх комплекси в реалізації генетичної інформації” (№ F46.1/011, 2011-2012 рр.) та за підтримки гранту Державного агентства з питань науки, інновацій та інформатизації № 0111U005988.

Мета та завдання дослідження. Метою роботи був пошук генів, які беруть участь у процесах виникнення та прогресування РПЗ.

Для досягнення цієї мети було поставлено наступні завдання:

1. Пошук диференційно експресованих генів у модельних клітинних лініях аденокарцином передміхурової залози для виявлення нових генів, асоційованих з пухлинами передміхурової залози.
2. Виявлення змін експресії генів, асоційованих з інвазивністю та метастазуванням пухлин, у модельних клітинних лініях аденокарцином передміхурової залози.
3. Визначення експресії генів, виявлених в модельних клітинних лініях аденокарцином, на клінічних зразках пухлин.
4. Виявлення генетичних та епігенетичних змін у доброякісних та злоякісних пухлинах передміхурової залози за допомогою NotI-мікрочипів.
5. Валідація виявлених за даними NotI-мікрочипів змін іншими молекулярно-

біологічними методами.

Об'єкт дослідження – розвиток пухлин передміхурової залози людини.

Предмет дослідження – генетичні та епігенетичні зміни, асоційовані з пухлинами передміхурової залози людини.

Методи дослідження: молекулярно-біологічні (культивування клітинних ліній, кількісна полімеразна ланцюгова реакція зі зворотною транскрипцією (к-ЗТ-ПЛР), гібридизація на NotI-мікрочипах, бісульфітне секвенування), біоінформаційні та статистичні методи.

Наукова новизна отриманих результатів. На модельних клітинних лініях аденокарцином передміхурової залози LNCaP, DU145, PC3 з різною чутливістю до андрогенів, відносно лінії умовно нормального епітелію PNT2, досліджено експресії 65 генів на рівні мРНК. Виявлено 14 диференційно експресованих генів між гормоночутливою лінією LNCaP та гормонорезистентними лініями DU145 та PC3. Вивчено на рівні мРНК експресії 84 генів, асоційованих з онкогенезом, між лінією PC3 та LNCaP. Визначено 36 генів зі змінами у лінії з високим потенціалом до інвазивності та метастазування (PC3) порівняно до лінії з низьким відповідним потенціалом (LNCaP). Вперше виявлено вплив експресії гена *GLCE* на експресію генів ангиогенезу та інвазивності і метастазування у клітинних лініях аденокарцином передміхурової залози. Вперше у вибірці зразків доброякісних гіперплазій передміхурової залози (ДГПЗ), аденокарцином та умовно-нормальних тканин (УНТ) передміхурової залози українських пацієнтів визначено експресії на рівні мРНК генів *EFNA5*, *TAGLN*, *EPDR1*, *FOS*, *PLAU*, *TGFBI*, *IL1B*. Вперше на вибірці клінічних зразків ДГПЗ та аденокарцином передміхурової залози з української популяції гібридизацією на NotI-мікрочипах виявлено делеції/метилювання 50 генів/локусів третьої хромосоми. Також вперше виявлено значущі різниці у частотах делецій/метилювання між зразками ДГПЗ та аденокарцином передміхурової залози із різними сумами за шкалою Глісона для 14 генів/локусів. Вперше показано наявність метилювання промоторних ділянок генів *FGF12*, *GATA2* та *LMCD1* у вибірці зразків аденокарцином передміхурової залози хворих з української популяції.

Практичне значення одержаних результатів.

Результати роботи підтверджують перспективність технології NotI-мікрочипів для скринінгу геному з метою пошуку потенційних пухлино-асоційованих генів для ранньої діагностики аденокарцином передміхурової залози. В даній роботі було виявлено низку генів, потенційно асоційованих з ДГПЗ та аденокарциномами передміхурової залози. Ці диференційно експресовані гени можуть бути використані для створення наборів маркерів для виявлення та розрізнення доброякісних та злоякісних процесів передміхурової залози.

Особистий внесок здобувача. Основний обсяг експериментальної роботи, обробка та аналіз отриманих результатів було проведено особисто здобувачем. Так, автором проведено виділення тотальної РНК з клітинних ліній карцином передміхурової залози LNCaP, DU145, PC3 та лінії нормальних клітин епітелію передміхурової залози людини PNT2, а також частини зразків ДГПЗ, аденокарцином та УНТ передміхурової залози. Крім того, виконано дизайн праймерів та визначення

рівнів відносної експресії пухлино-асоційованих генів методом к-ЗТ-ПЛР в клітинних лініях та клінічних зразках пухлин передміхурової залози та УНТ, статистичну обробку результатів. Виділення тотальної РНК з частини клінічних зразків пухлин було проведено спільно з с.н.с., к.б.н. Геращенко Г.В. Виділення геномної ДНК зі зразків біопсій передміхурової залози було проведено спільно з с.н.с., к.б.н. Гордіюком В.В. Підготовка зразків геномної ДНК до гібридизації, гібридизація на NotI-мікрочипі, сканування, а також бісульфітна обробка ДНК, клонування та секвенування проведено спільно з к.б.н. Кондратовим О.Г. Обробка отриманих результатів гібридизації проведена спільно з Дмитрієвим А.А. (Інститут молекулярної біології ім. В.О. Енгельгардта РАН, Москва, Росія). Планування дослідження, обговорення результатів та написання статей було здійснено під керівництвом завідувача відділом молекулярної онкогенетики Інституту молекулярної біології і генетики НАН України д.б.н., проф. Кашуби В.І., та с.н.с. відділу молекулярної онкогенетики к.б.н. Геращенко Г.В.

Здобувач висловлює подяку завідувачу відділу молекулярної онкогенетики д.б.н., проф. Кашубі В.І. та с.н.с. відділу молекулярної онкогенетики к.б.н. Геращенко Г.В. за корисні поради під час планування експериментів та обговорення результатів.

Апробація матеріалів дисертації. Результати досліджень було представлено на поточних семінарах відділу Молекулярної онкогенетики Інституту Молекулярної Біології і Генетики НАН України та міжнародних і вітчизняних конференціях: VII Conference of Young Scientists, Institute of Molecular Biology and Genetics NAS Ukraine (Kyiv, Ukraine, 2013), VIII Conference of Young Scientists, Institute of Molecular Biology and Genetics NAS Ukraine (Kyiv, Ukraine, 2014), X міжнародній науковій конференції студентів та аспірантів «Молодь і поступ біології» (Львів, Україна, 2014), XI міжнародній науковій конференції студентів та аспірантів «Молодь і поступ біології» (Львів, Україна, 2015), EACR Conference in Cancer Genomics (Cambridge, United Kingdom, 2015), XIII з'їзді онкологів та радіологів України (Київ, Україна, 2016), конференції «Інтегральні патогенетичні підходи в діагностиці та терапії раку» (Київ, Україна, 2016).

Публікації. За темою дисертації опубліковано 12 праць, з них п'ять статей у фахових наукових журналах, які входять до міжнародної бази даних SCOPUS, та тези семи доповідей у збірниках матеріалів з'їздів і конференцій.

Структура та обсяг роботи. Дисертація складається зі вступу, огляду літератури, матеріалів та методів досліджень, експериментальної частини, узагальнення одержаних результатів, висновків, списку використаних джерел, додатків. Загальний обсяг дисертації – 217 сторінок. Робота містить 19 рисунків, 17 таблиць. Список використаної літератури охоплює 404 найменування, з них кирилицею - 3, латиницею - 401.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ

Матеріали та методи дослідження. *Клітинні лінії та трансфекція.* В роботі було використано наступні культури клітин людини: аденокарцином передміхурової

залози LNCaP, DU145 і PC3, а також клітинну лінію нормального епітелію передміхурової залози PNT2. Клітини культивували згідно з рекомендаціями Американського банку клітин та тканин (ATCC). Трансфекцію клітин проводили за допомогою реагентів Lipofectamine та Plus Reagent (Invitrogen, США).

Біологічний матеріал. В роботі було використано зразки біопсій та хірургічно видаленого матеріалу пухлин передміхурової залози (аденокарциноми, ДГПЗ), а також УНТ передміхурової залози. Зразки було отримано з Інституту урології, НАМН України та Національного Інституту раку, МОЗ України. Для дослідження за допомогою NotI-мікрочипів було використано зразки біопсій: 15 зразків ДГПЗ, 18 зразків аденокарцином, чотири з яких були IV стадії за класифікацією TNM, а також чотири зразки УНТ передміхурової залози. Для дослідження за допомогою к-ЗТ-ПЛР було використано 16 зразків ДГПЗ, 37 зразків аденокарцином, з яких 29 мали парні УНТ. Для валідації результатів, виявлених гібридизацією на Not-I мікрочипах методом к-ЗТ-ПЛР було використано 11 зразків аденокарцином (сума за шкалою Глісона в діапазоні від п'яти до дев'яти) та 12 зразків аденокарцином передміхурової залози (сума за шкалою Глісона в діапазоні від чотирьох до дев'яти) для валідації методом бісульфитного секвенування. Зразки від пацієнтів було отримано згідно з принципами, викладеними в Гельсинській декларації та інструкціями Етичного Комітету Інституту молекулярної біології та генетики НАН України. Виділення ДНК проводили за протоколом, викладеним Маніатісом Т. з модифікаціями (Maniatis et al., 1982). Тотальну РНК з клітин та тканин виділяли за допомогою наборів RNeasy Mini kit (Qiagen, Німеччина) та TRI Reagent (Sigma-Aldrich, США) відповідно, згідно до інструкцій виробника.

Визначення відносної експресії генів. Тотальну РНК зразків, оброблену ДНКазою I (Thermo Scientific, США) використовували для синтезу першого ланцюга кДНК за допомогою First Strand cDNA Synthesis kit та оліго(dT)-праймерів (ThermoScientific, США) відповідно до протоколу виробника.

Праймери до 65 генів, досліджених методом к-ЗТ-ПЛР, а також генів *BHLHE40*, *BCL6*, *ITGA9* були підібрані з бази даних праймерів для кількісної ПЛР (<http://primerdepot.nci.nih.gov/>). Для нормалізації даних у досліді з визначенням відносної експресії генів у клітинних лініях аденокарцином порівняно до клітинної лінії нормального епітелію передміхурової залози було використано референсні гени *GAPDH* та *ACTB*. В експерименті з визначення рівнів відносної експресії генів за допомогою комерційного експресійного мікрочипу Cancer Path Finder RT2 Profiler PCR array («SABioscience», США) між клітинними лініями аденокарцином LNCaP, PC3 та GLCE-LNCaP, GLCE-PC3 в якості референсних генів використовували гени *B2M*, *HPRT1*, *RPL13A*, *GAPDH* та *ACTB*. В експериментах на клінічних зразках пухлин передміхурової залози для нормалізації використовували гени *TBP*, а також *B2M*, *GAPDH* та *ACTB*. З отриманих даних порогових циклів були розраховані зміни експресії за методом $2^{-\Delta\Delta C_t}$. Реакції проводили з використанням Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (ThermoScientific, США).

Імуноцитохімія. Клітини вирощували на покривних скельцях та фіксувалися в 4% формальдегіді. Для імунопреципітації використовували поліклональну анти-GLCE сироватку з кролика (GenScript Corporation, США). Візуалізацію фарбування

проводили за допомогою антитіл, кон'югованих з барвником Техаський червоний, проти IgGs кролика (Vector Laboratories, США). Далі клітини було пофарбовано контрастним барвником DAPI SlowFade Gold у середовищі DAPI (Invitrogen, США). Флюоресценцію вивчали з використанням мікроскопа Axio Imager (Carl Zeiss UK, Великобританія).

Технологія NotI-мікрочипів. Метод включає в себе підготовку проб ДНК, яка містить наступні етапи: обробку *NotI* рестриктазою, лігування з *NotI*-лінкером, обробку *Sau3AI* - рестриктазою, іммобілізацію на кульках, лігування з *Sau3AI* - лінкером, ампліфікацію та мічення ДНК за допомогою полімеразної ланцюгової реакції. Для *NotI* обробки брали 3 мкг геномної ДНК. При гібридизації використовували ДНК з УНТ, мічених зеленим флюоресцентним барвником (Cy3), а для ДНК з пухлин – червоним (Cy5) (Amersham, США). Гібридизацію надрукованих слайдів із міченою ДНК з пухлин і УНТ було виконано за допомогою приладу Lucidea slide processor (Amersham, США) згідно протоколу виробника. Сканування слайдів здійснювали за допомогою сканера GenePix 4000B (Axon instrument, США). Аналіз результатів гібридизації мікрочипів виконували за допомогою програми GenPixPro6.0 (Amersham, США).

Бісульфитне секвенування ДНК. Підготовка до секвенування складалася з бісульфитної обробки ДНК, яка проводилася з використанням набору EZ DNA Methylation Kit (Zymo Research, США), ампліфікації модифікованої ДНК у кількості 100 нг на реакцію з використанням полімерази DreamTaq DNA Polymerase (Thermo Scientific, США) згідно з інструкцією виробника. Трансформацію компетентних клітин *E.coli* штам JM107 проводили з використанням набору TransformAid Bacterial Transformation kit (Thermo Scientific, США). Після селекції трансформованих штамів проводили виділення плазмідної ДНК за допомогою набору GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Scientific, США). Клоновані ПЛР продукти були секвеновані на автоматичному секвенаторі ABI Prism 3100-Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США) з використанням набору для секвенування Big Dye Terminator v 3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, США) та прямого праймера до ПЛР продукту згідно з інструкцією виробника.

Статистичний аналіз. Статистичний аналіз проводили за допомогою програми STATISTICA 10.0 (StatSoft Inc, США), відкритого ресурсу Open Source Epidemiologic Statistics for Public Health (<http://www.openepi.com/>) та програми NIMAN, створеної співавторами (Dmitriev et al., 2012). За критичний рівень достовірності при перевірці статистичних гіпотез приймали значення $p < 0,05$.

Результати досліджень та їх обговорення.

На першому етапі дослідження проведено зіставлення рівнів експресії 65 генів, асоційованих з онкогенезом, у модельних клітинних лініях аденокарцином передміхурової залози LNCaP, DU145 та PC3 порівняно до клітинної лінії нормального епітелію передміхурової залози PNT2 для пошуку диференційно експресованих генів між агресивними гормонорезистентними лініями DU145 та PC3 та неагресивною гормоночутливою лінією LNCaP. Ці гени входять до різних

сигнальних шляхів та систем, зокрема: Wnt, NF-κB, p53, системи міжклітинного матриксу та адгезії клітин, сигнальної трансдукції та транскрипційних факторів, інвазивності та метастазування, ангиогенезу, контролю клітинного циклу та репарації ДНК, метаболізму триптофану. Гени були відібрані за результатами біоінформатичного аналізу бази даних NCBI Geo Datasets (Edgar et al., 2002.).

Виявлено ряд генів зі змінами експресії більше ніж в чотири рази порівняно до лінії PNT2: 29 генів у клітинній лінії LNCaP, 20 генів – у DU145 та 16 генів – у PC3. З яких 27 - знижують, 5 - підвищують та два - виявляють перемінний рівень експресії (таблиця 1).

Таблиця 1.

Рівні відносної експресії генів у клітинних лініях аденокарцином передміхурової залози

№	Сигнальні шляхи та системи	Гени	Клітинні лінії					
			LNCaP	DU145	PC3	LNCaP	DU145	PC3
			Підвищення експресії, к.р.			Зниження експресії, к.р.		
0	1	2	3	4	5	6	7	8
1	Wnt	<i>TCF7L2</i>	-	0	0	4,2	0	0
		<i>FAT1</i>	-	0	0	4,6	0	0
		<i>WNT7A*</i>	-	-	0	69,6*	44,6*	0
		<i>SUFU</i>	0	0	0	0	0	0
		<i>MYO1B</i>	-	0	-	51,4	0	15,5
2	NF-κB	<i>IL1B</i>	21,0	-	445,7	-	15,4*	-
		<i>TNFRSF11B*</i>	-	-	-	11489,3*	35,9*	15,8*
		<i>IL6</i>	0	0	-	0	0	44,8
		<i>IL1RL1*</i>	-	-	15,1	1016,2*	468,2*	-
		<i>IL33</i>	0	BE	0	0	BE	0
3	p53	<i>CCNB2</i>	-	0	0	107,7	0	0
		<i>CCNE1</i>	-	0	-	4,1	0	11,5
		<i>TSC2</i>	0	0	0	0	0	0
4	Адгезія між клітинами та міжклітинним матриксом	<i>CDH1*</i>	-	0	-	1530,7*	0	3145,3*
		<i>CDH2</i>	0	BE	0	0	BE	0
		<i>GLCE</i>	-	4,3	0	4,2	-	0
		<i>CSPG4*</i>	-	-	-	4,9	71,0*	6864,8*
		<i>EFNA5</i>	-	0	-	32,2	0	6,0
		<i>FYN</i>	-	-	0	18,8	6,4	0
		<i>MYO10</i>	0	0	0	0	0	0
		<i>CDK5</i>	-	0	0	27,0	0	0
		<i>SEMA3A*</i>	0	-	0	0	75,5*	0
		<i>PKM2</i>	0	0	0	0	0	0
		<i>RHOF</i>	0	0	0	0	0	0
		<i>AGTR1</i>	BE	BE	BE	BE	BE	BE

Продовження таблиці 1

0	1	2	3	4	5	6	7	8
		<i>MXRA5</i>	BE	BE	BE	BE	BE	BE
		<i>CAVI</i>	0	0	0	0	0	0
		<i>PLOD2</i>	0	0	0	0	0	0
		<i>TAGLN</i>	-	0	-	4,5	0	10,0
5	Сигналь-	<i>RASSF4</i>	0	-	-	12,8	5,3	0
	на транс-	<i>HOXA13</i>	-	0	7,4	0	0	0
	дукція та	<i>NR5A2</i> *	-	0	-	13,6	0	28,6*
	транс-	<i>SOX4</i>	-	0	0	5,2	0	0
	крипційні							
	фактори							
6	Інвазив-	<i>SERPINE1</i> *	-	-	0	7,7	373,3*	0
	ність та	<i>PLAU</i>	-	-	0	15,2	7,7	0
	метаста-	<i>SERPINE2b</i> *	-	-	BE	7,3	424,0*	BE
	зування	<i>S100A4</i>	23,6	17,8	0	0	0	0
		<i>SERPINE2a</i>	-	-	0	9,1	7,6	0
7	Ангіо-	<i>IL8</i>	0	4,8	5,8	0	-	-
	генез	<i>MME</i>	-	-	-	6,1	4179,2	18,0
		<i>CXCL1</i>	-	-	-	116,3	16,0	10,0
		<i>CXCL2</i>	0	4,5	0	0	-	0
		<i>CXCL6</i> *	-	-	0	142,0*	4,1*	0
8	Контроль	<i>PCNA</i>	-	0	0	4,7	0	0
	клітинно-	<i>MKI67</i>	0	0	0	0	0	0
	го циклу	<i>HBEGF</i> *	-	-	-	413,9*	28,1*	15,5*
	та	<i>P27</i>	0	0	0	0	0	0
	репарація	<i>P16</i>	0	4,3	0	0	-	0
		<i>RNASET2</i>	0	0	0	0	0	0

Примітки: 1. - жирним шрифтом виділено достовірні зміни рівнів відносної експресії генів. 2. «0» – зміни експресії менше ніж у чотири рази. 3. «*» – слабоекспресовані гени в досліджених клітинних лініях (LNCaP, DU145, PC3) ($St > 30$). 4. «BE» – відсутність експресії. 5. к.р. – кількість разів.

У класичному Wnt шляху з восьми генів, які вивчались, для чотирьох генів знайдено зниження рівнів відносної експресії (*WNT7A* – в LNCaP, DU145; *TCF7L2*, *FAT1* - в LNCaP; *MYO1B* – в LNCaP, PC3). Серед досліджуваних генів шляху NF-кВ два гени (*TNFRSF11B* — в усіх лініях, *IL6* - в LNCaP) виявляють знижений рівень експресії, два гени мають диференційні рівні експресії (*IL1RL1* – в LNCaP, DU145 має знижений рівень експресії, у PC3 — підвищений рівень; ген *IL1B* в LNCaP, PC3 – підвищений рівень, в DU145 — знижений рівень експресії). З досліджуваних нами генів шляху p53 виявлено зниження експресії двох генів (*CCNE1* — в LNCaP, PC3; *CCNB* - в LNCaP). Серед досліджуваних в нашій роботі генів клітинної адгезії сім генів з 20 виявляють знижені рівні експресії (*CDH1*, *EFNA5*, *TAGLN* - в LNCaP, PC3; *SEMA3A* - в DU145; *CSPG4* — в усіх лініях; *CDK5* — в LNCaP; *FYN* - в LNCaP,

DU145), один ген має диференційні рівні експресії (*GLCE* - в LNCaP знижений рівень експресії, в DU145 – підвищений рівень). З 12 генів системи сигнальної трансдукції клітин та транскрипційних факторів один ген має підвищений рівень експресії (*HOXA13* — в PC3), три гени мають знижений рівень експресії (*RASSF4* – в LNCaP, DU145; *NR5A2* - в LNCaP, PC3; *SOX4* - в LNCaP). Серед генів, що асоційовані з інвазивністю та метастазуванням, які вивчалися нами, для чотирьох генів відмічено знижений рівень експресії (*PLAU*, *SERPINE1*, *SERPINE2a* - в LNCaP, DU145; *SERPINE2b* – в усіх лініях), для одного гену — підвищений рівень експресії (*S100A4* — в LNCaP, DU145). З досліджуваних нами генів ангиогенезу у двох генів було знайдено підвищені рівні відносної експресії (*IL8* – в DU145, PC3; *CXCL2* – в DU145), для трьох генів — знижені рівні експресії (*MME*, *CXCL1* - в усіх лініях; *CXCL6* - в LNCaP, DU145). Серед досліджуваних нами генів системи контролю клітинного циклу та репарації для одного гену було показано підвищений рівень експресії (*P16* — в DU145), для двох генів — знижені рівні (*PCNA*- в LNCaP; *HBEGF* - в усіх лініях).

Отримані результати дають підставу зробити наступні припущення: у клітинній лінії LNCaP спостерігається інгібування класичного Wnt шляху, що проявляється у зниженні рівнів експресії генів *WNT7A* та *FAT1* (Kato et al., 2012). Зниження рівня експресії гена *SEMA3A* свідчить про активацію міграції (Blanc et al., 2011). У клітинних лініях аденокарцином передміхурової залози порівняно до лінії нормального епітелію спостерігаються підвищені рівні експресії генів *S100A4*, *IL8* та зниження експресії генів *SERPINE1*, *SERPINE2a* та *SERPINE2b*, що може вказувати на активізацію сигнальних шляхів інвазивності, метастазування та ангиогенезу (Hagelgans et al., 2013). До того ж відмічено знижені рівні експресії генів адгезії клітин (*CSPG4*, *EFNA5*, *FYN*, *TAGLN*) та епітеліального маркера *CDH1*, що вказують на порушення механізмів адгезії між клітинами аденокарцином передміхурової залози, показаних на клітинних лініях (Sørensen et al., 2004; Ozerdem et al. 2006).

Виявлено три гени (*GLCE*, *IL1RL1*, *IL1B*) з диференційними рівнями експресії між гормоночутливою та гормонорезистентними клітинними лініями із сигнальних шляхів адгезії та NF-κB, що можуть вказувати на їх різну регуляцію в різних типах аденокарцином (гормоночутливих та гормонорезистентних). Результати нашого дослідження доповнюють результати подібних досліджень із транскрипційного профайлінгу клітинних ліній (Singh et al., 2008; Li et. al., 2007) та розширюють уявлення про зміни рівнів експресії генів при розвитку пухлин передміхурової залози.

На підставі отриманих нами даних про рівні відносної експресії генів зі змінами у клітинних лініях LNCaP, DU145 та PC3, було відібрано 14 диференційно експресованих генів (таблиця 2), експресія яких в гормонорезистентних клітинних лініях з більш високим потенціалом до інвазивності та метастазування (DU145, PC3) відрізняється від експресії в гормоночутливій клітинній лінії з меншим потенціалом до метастазування (LNCaP). Тобто диференційно експресовані гени можуть бути одними з ключових генів які допоможуть диференціювати гормоночутливі пухлини передміхурової залози від гормонорезистентних. Тому відбір проводили з максимальним залученням генів з різних сигнальних шляхів, щоб отримати

комплексну інформацію про процеси, що відбуваються у пухлинах передміхурової залози. Ці гени входять до систем ангіогенезу (*IL8*, *MME*, *CXCL1*, *CXCL2*), інвазивності та метастазування (*SERPINE2b*), контролю клітинного циклу (*P16*, *CCNE1*), сигнальних шляхів: NF- κ B (*IL1B*, *IL6*, *IL8*, *IL1RL1*), адгезії (*EFNA5*, *GLCE*, *TAGLN*), а також групи транскрипційних факторів та молекул сигнальної трансдукції (*HOXA13*). Для цих генів була перевірена наявність секретованого протеїну у відкритих базах даних COMPARTMENTS (Binder et al., 2014) та NCBI Gene (NCBI Resource Coordinators, 2017) для перевірки можливості вивчення білкових продуктів цих генів у біологічних рідинах організму.

Таблиця 2.

Рівні відносної експресії та секреція протеїнів диференційно експресованих генів у клітинних лініях аденокарцином передміхурової залози

Гени	Клітинні лінії			Секреція протеїна
	LNCaP	DU145	PC3	
	Зміни рівня експресії, к.р.			
<i>IL8</i>	0	4,8↑	5,8↑	так
<i>CXCL2</i>	0	4,5↑	0	так
<i>P16</i>	0	4,3↑	0	ні
<i>HOXA13</i>	0	0	7,4↑	ні
<i>IL1RL1</i>	0	0	15,1↑	ні
<i>IL1B</i>	21,0↑	15,4*↓	445,7↑	так
<i>GLCE</i>	4,2↓	4,3↑	0	так
<i>MME*</i>	6,1	4179,2*	18,0	ні
<i>IL6</i>	0	0	44,8	так
<i>CXCL1</i>	116,3	16,0	10	так
<i>SERPINE2b*</i>	7,3	424,0*	0	так
<i>CCNE1</i>	4,1	0	11,5	ні
<i>TAGLN</i>	4,5	0	10,0	ні
<i>EFNA5</i>	32,2	0	6,0	ні

Примітки: 1. «*» – слабоекспресовані гени в досліджених клітинних лініях (LNCaP, DU145, PC3) ($Ct > 30$). 2. «0» – зміни експресії менше ніж у чотири рази. 3. к.р. – кількість разів. 4. ↑ - підвищення рівня відносної експресії. 5. ↓ - зниження рівня відносної експресії.

Наявність секреції протеїну була показана для генів, які кодують інтерлейкіни (*IL6*, *IL8*, *IL1B*), хемокіни (*CXCL1*, *CXCL2*), а також інгібітор плазміногенного активатора два *SERPINE2b* та D-глюкуроніл C5-епімераза (*GLCE*).

Відібрані гени можуть бути використані в подальших дослідженнях зі створення діагностичних панелей з експресією генів на рівні мРНК, а гени *IL6*, *IL8*, *IL1B*, *CXCL1*, *CXCL2*, *SERPINE2b*, *GLCE* – також і на рівні протеїну.

Ген *GLCE* було обрано для більш детального вивчення після аналізу даних літератури. Він є потенційним геном-супресором росту пухлин молочної залози та легень (Prudnikova et al., 2010). До того ж показано диференційні рівні метилювання промотора гена *GLCE* у клітинних лініях аденокарцином передміхурової залози з різною чутливістю до дії андрогенів (Prudnikova et al., 2013). З метою визначення сигнальних шляхів, які можуть бути залученими до регуляції експресії у різних типах пухлин передміхурової залози, було досліджено вплив ектопічної експресії гена *GLCE* на експресію генів у клітинних лініях аденокарцином передміхурової залози із різною чутливістю до андрогенів (LNCaP та PC3).

Для цього було проведено трансфекцію клітин LNCaP та PC3 плазмідним вектором, який містив послідовність гена *GLCE*. Перевірку експресії гена *GLCE* на рівні мРНК у трансфікованих та нативних клітинних лініях було проведено за допомогою мультиплексної ПЛР, а на рівні протеїну – за допомогою імуноцитохімії. Рівні експресії гена *GLCE* в трансфікованих клітинних лініях були вище ніж в нативних клітинних лініях LNCaP та PC3 (рис.1 а, б).

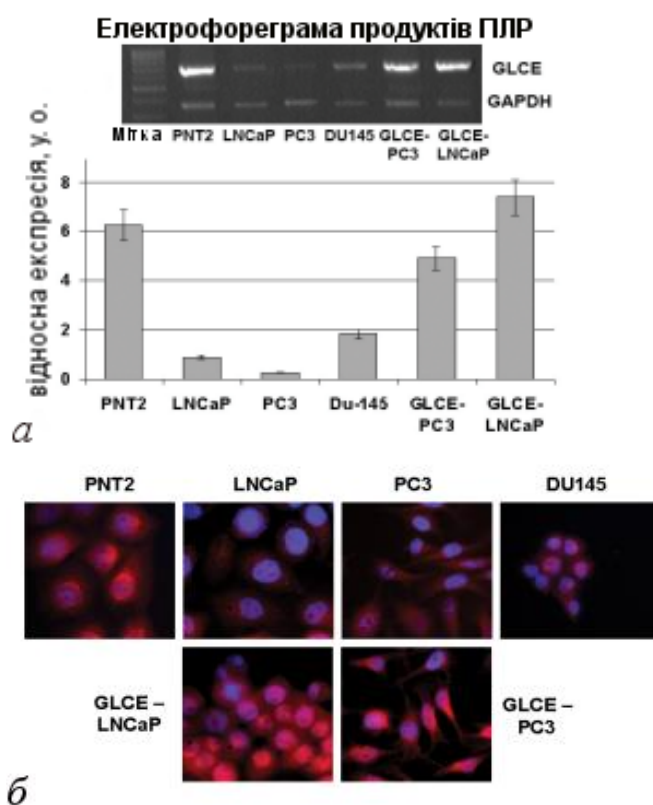


Рис. 1. Рівні експресії гена *GLCE* у клітинних лініях аденокарцином та нормального епітелію передміхурової залози: а - рівень відносної експресії на рівні мРНК по відношенню до референсного гена *GAPDH*; б - експресія на рівні протеїну. Інтенсивність флюоресценції протеїну *GLCE* нормована на флюоресценцію *GAPDH*. PNT2 – лінія нормального епітелію передміхурової залози людини; LNCaP, DU145, PC3 – клітинні лінії аденокарцином передміхурової залози людини; GLCE-LNCaP, GLCE-PC3 – трансфіковані клітинні лінії аденокарцином передміхурової залози людини

Для дослідження відносних рівнів експресії генів використано експресійний мікрочип Cancer Path Finder RT2 Profiler PCR array («SABiosciense», США), який містив праймери до генів з різних сигнальних шляхів та систем: 1) контроль клітинного циклу та репарація ДНК; 2) апоптоз та клітинне старіння; 3) сигнальна трансдукція та транскрипційні фактори; 4) адгезія; 5) ангіогенез; 6) інвазивність та метастазування.

В результаті вивчення рівнів відносної експресії 84 генів було виявлено 18 та 21 ген зі змінами рівнів відносної експресії більше двох разів у трансфікованих клітинних лініях GLCE-LNCaP та GLCE-PC3 відповідно, порівняно до нативних

клітинних ліній. Більшість генів зі змінами рівнів відносної експресії були з систем ангіогенезу (*ANGPT1, IGF1, PDGFB, TNF, IL8, TEK, IFNA1, IFNB1*) та інвазивності й метастазування (*MMP1, MMP2, MMP9, SERPINE1, PLAUR, PLAUR, SERPINB5, S100A4*). Ектопічна експресія гена *GLCE* по-різному вплинула на експресію генів, які регулюють інвазивність та метастазування, а також генів ангіогенезу в клітинних лініях *GLCE-LNCaP* та *GLCE-PC3*. Так, в гормоночутливій клітинній лінії *GLCE-LNCaP* спостерігається підвищення рівнів експресії генів *MMP1, MMP2, MMP9* та *TEK*, проте зниження рівня експресії гена *S100A4*. В гормонорезистентній клітинній лінії *GLCE-PC3* було виявлено зниження рівня експресії генів *MMP1, PLAUR* та *SERPINE1*, й підвищення рівнів експресії генів *IL8* та *TNF*.

Визначена різниця, можливо, відображає різні механізми регуляції процесів інвазивності та метастазування, які опосередковує ген *GLCE* у пухлинах передміхурової залози різної злоякісності. Отримані нами результати узгоджуються із даними Prudnikova T.Y. (Prudnikova et al., 2013).

Для пошуку потенційних генів, асоційованих із інвазивністю та метастазуванням раку передміхурової залози людини також було досліджено рівні відносної експресії 84 генів, пов'язаних з онкогенезом, у гормонорезистентній клітинній лінії *PC3* з високим потенціалом до інвазивності та метастазування порівняно до гормоночутливої лінії *LNCaP* з відповідним низьким потенціалом.

Виявлено зміни рівнів відносної експресії 36 генів в клітинній лінії *PC3* більш ніж у чотири рази. Серед яких десять генів мали підвищені рівні експресії та 26 — знижені рівні експресії (таблиця 3).

Таблиця 3.

Рівні експресії генів у клітинній лінії *PC3* порівняно з *LNCaP*

№	Сигнальні шляхи	Гени	Підвищення експресії (к.р.)	Зниження експресії (к.р.)
0	1	2	3	4
1	Контроль клітинного циклу та репарація ДНК	<i>ATM</i> <i>CDKN2A</i> <i>BRCA1</i> <i>CDC25A</i> <i>TP53</i>	8,6 7,0	4,9 4,3 13,4
2	Апоптоз та клітинне старіння	<i>BAX</i> <i>BCL2</i> <i>BCL2L1</i> <i>CASP8</i> <i>TNFRSF10B</i> <i>TNFRSF1A</i>	6,8 35,9 13,5 4,6 5,3 4,1	
3	Сигнальна трансдукція та транскрипційні фактори	<i>PIK3R1</i> <i>ETS2</i> <i>FOS</i> <i>NFKBIA</i> <i>SNCG</i>	12,7	4,8 68,9 5,3 11,6

Продовження таблиці 3

0	1	2	3	4
4	Адгезія	<i>ITGA1</i>	4,3	
		<i>ITGA3</i>	13,1	
		<i>ITGAV</i>	4,2	
		<i>MTSS1</i>	25,2	
		<i>ITGB1</i>	11,4	
		<i>MCAM</i>		14,1
		<i>EPDR1</i>	6,7	
5	Ангіогенез	<i>PDGFB</i>	4,5	
		<i>TGFBI</i>	11,5	
		<i>THBS1</i>	6,4	
		<i>VEGFA</i>	4,0	
6	Інвазивність	<i>MET</i>	9,7	
	та	<i>MMP1</i>	28,7	
	метастазування	<i>MTA2</i>	7,4	
		<i>NME4</i>	5,7	
		<i>PLAU</i>	28,3	
		<i>SERPINB5</i>	4,7	
		<i>SERPINE1</i>	6,0	
		<i>S100A4</i>		9,7
		<i>TWIST1</i>		4,7

Примітка. к.р. - кількість разів.

З-поміж 14 досліджених нами генів контролю клітинного циклу і репарації ДНК було знайдено два гени з підвищеним рівнем експресії (*ATM*, *CDKN2A*) та три гени зі знизеними рівнями експресії (*BRCA1*, *CDC25A*, *TP53*). Серед 14 проаналізованих в нашій роботі генів апоптозу та клітинного старіння для шести генів знайдено підвищення рівнів відносної експресії (*BAX*, *BCL2*, *BCL2L1*, *CASP8*, *TNFRSF10B*, *TNFRSF1A*). Серед 12 досліджених генів сигнальної трансдукції та транскрипційних факторів було знайдено підвищення рівня відносної експресії для одного гена (*PIK3R1*) та для чотирьох – знизені рівні експресії (*ETS2*, *FOS*, *NFKBIA*, *SNGG*). Серед досліджуваних в нашій роботі 13 генів адгезії було відмічено підвищення рівнів відносної експресії для шести генів (*ITGA1*, *ITGA3*, *ITGB1*, *ITGAV*, *EPDR1*, *MTSS1*) та для одного гена - знизення рівня експресії (*MCAM*). Серед 16 генів ангіогенезу, що досліджувалися нами, було знайдено чотири гени з підвищеними рівнями експресії (*PDGFB*, *TGFBI*, *THBS1*, *VEGFA*). Серед 16 досліджених нами генів, залучених до процесів інвазивності та метастазування, було знайдено сім генів з підвищеними рівнями експресії (*MET*, *MMP1*, *MTA2*, *NME4*, *PLAU*, *SERPINB5*, *SERPINE1*), два гени — зі знизеними рівнями (*S100A4*, *TWIST1*).

Аналіз генів зі змінами рівня експресії у гормонорезистентній клітинній лінії PC3 дозволив відзначити знизення рівнів експресії генів – супресорів росту пухлин (*TP53*, *BRCA1*, *FOS*, *NFKBIA*, *SNGG*). До того ж, серед генів, які відповідають за апоптоз та клітинне старіння, було виявлено підвищення експресії як анти-

апоптичних генів (*BCL2*, *BCL2L1*), так і про-апоптотичних генів (*BAX*, *CASP8*). Також відмічено порушення регуляції системи ангіогенеза: підвищення експресії як про-ангіогенних (*VEGFA*), так і анти-ангіогенних (*THBS1*) генів, а також генів, залучених до процесу інвазивності (*MET*, *MMP1*).

Вищезазначені дані, а також знайдене зниження рівнів експресії генів (*S100A4*, *TWIST1*), які опосередковують формування метастазів, відображають загальне розбалансування процесів в гормонорезистентних пухлинах передміхурової залози. Так, Balaji K. (Balaji K. et al., 2004) при порівнянні гормоночутливої клітинної лінії LNCaP з гормонорезистентною лінією C4-2 за допомогою кДНК мікрочипів також виявили 4480 генів зі змінами рівня експресії. Ці гени входять до різних сигнальних шляхів, зокрема контролю клітинного циклу, апоптозу, ангіогенезу та ін.

Агресивні гормонорезистентні пухлини відрізняються від гормоночутливих за ступенем інвазивності та метастазування. Серед 36 генів зі змінами рівнів відносної експресії, із досліджених 84 генів, у клітинній лінії PC3 було відібрано 14 генів (таблиця 4), які є перспективними для подальших досліджень з урахуванням результатів досліджень, представлених в базі даних PubMed (NCBI Resource Coordinators, 2017).

Таблиця 4.

Рівні експресії та секреція протеїну потенційних пухлино-асоційованих генів, пов'язаних з інвазивністю та метастазуванням у клітинній лінії PC3

Протеїн секретується		Протеїн не секретується	
Гени	Зміни експресії, к.р.	Гени	Зміни експресії, к.р.
<i>EPDR1</i>	6,7↑	<i>BCL2</i>	35,85↑
<i>MET</i>	9,67↑	<i>BCL2L1</i>	13,49↑
<i>MMP1</i>	28,72↑	<i>FOS</i>	68,88↓
<i>PLAU</i>	28,32↑	<i>MTA2</i>	7,43↑
<i>TGFB1</i>	11,5↑	<i>NME4</i>	5,71↑
<i>SERPINE1</i>	6,04↑	<i>PIK3R1</i>	12,68↑
<i>VEGFA</i>	4,04↑	<i>ITGA3</i>	13,12↑

Примітки: 1. ↑ - підвищення рівня експресії. 2. ↓ - зниження рівня експресії. 3. к.р. - кількість разів.

Для цих генів було перевірено наявність секретованого протеїну у відкритих базах даних COMPARTMENTS (Binder et al., 2014) та NCBI Gene (NCBI Resource Coordinators, 2017) для визначення можливості подальшого вивчення білкових продуктів цих генів у зразках біологічних рідин організму.

Наведені гени належать до наступних сигнальних шляхів та систем: апоптозу та клітинного старіння (*BCL2*, *BCL2L1*), сигнальної трансдукції та транскрипційних факторів (*PIK3R1*, *FOS*), адгезії (*ITGA3*, *EPDR1*), ангіогенезу (*TGFB1*, *VEGFA*) та інвазивності і метастазування (*MET*, *MMP1*, *MTA2*, *NME4*, *PLAU*, *SERPINE1*). Зазначені гени можуть розглядатися як потенційні пухлино-асоційовані маркери, пов'язані з інвазивністю та метастазуванням при РПЗ, та можуть бути використані в

подальших дослідженнях із пошуку маркерів метастазуючого РПЗ, в тому числі і на рівні протеїну (*EPDR1*, *MET*, *MMP1*, *PLAU*, *SERPINE1*, *TGFBI*, *VEGFA*).

Наступний етап досліджень полягав в визначенні експресії низки генів у хворих на РПЗ для оцінки можливості їх використання у клінічних зразках пухлин. Сім генів (*EFNA5*, *TAGLN*, *EPDR1*, *FOS*, *PLAU*, *TGFBI*, *IL1B*) було відібрано згідно їх функцій в онкогенезі. Гени були вибрані з різних шляхів для отримання комплексної інформації стосовно процесів, що відбуваються у пухлинах передміхурової залози. Так, гени *EFNA5*, *TAGLN*, *EPDR1* відіграють важливу роль в адгезії типів «клітина-клітина» та «клітина-міжклітинний матрикс», які зазнають змін при прогресуванні пухлин (Le Bras et al., 2012). В той час як гени *FOS*, *PLAU*, *TGFBI*, *IL1B* залучені до сигнальних шляхів, що беруть участь у проліферативних процесах (Barrett et al., 2017; Hildenbrand et al., 2008; Vela et al., 2002).

Після аналізу рівнів відносної експресії було знайдено статистично значущу різницю між групами ДГПЗ, аденокарцином та УНТ для генів *FOS* ($p=0,0001$), *EFNA5* ($p=0,0030$), *IL1B* ($p=0,0180$) та *TGFBI* ($p=0,0300$). Так, для генів *EFNA5* ($p=0,0047$), *FOS* ($p=0,0026$) та *IL1B* ($p=0,0180$) було відмічено підвищення рівня відносної експресії у групі аденокарцином порівняно з групою ДГПЗ. Для гена *TGFBI* виявлено зниження рівня відносної експресії у групі ДГПЗ порівняно до групи УНТ ($p=0,0082$). Знижені рівні експресії цього гена у групі ДГПЗ підтверджують його пухлиносупресорні властивості на ранніх стадіях онкогенезу (Massague et al., 2000). Для гена *PLAU* показано достовірне зниження ($p=0,0388$) рівня відносної експресії у групі аденокарцином порівняно до УНТ. Ці результати є неочікуваними, оскільки підвищені рівні експресії цього гена у пухлинах передміхурової залози сприяють підвищенню їх інвазивності (Dong et al., 2008). Втім, це може свідчити про відсутність експресії онкогену *ERG* в досліджуваній вибірці пухлин, який здатен активувати експресію гена *PLAU* (Mohamed et al., 2011).

Серед досліджених нами клінічних характеристик пацієнтів хворих на РПЗ за допомогою непараметричного регресійного аналізу було виявлено зв'язок між незначним підвищенням рівня простатоспецифічного антигену (ПСА) в сироватці крові (не більше 20,0 нг/мл) та підвищенням рівня експресії гена *IL1B* ($OR=2,1$; $p=0,0377$). Ген *IL1B* кодує один із прозапальних інтерлейкінів, рівень якого, зазвичай, підвищений у простатичних виділеннях хворих на хронічний простатит (Nadler et al., 2000). Можна припустити, що високі рівні експресії прозапальних інтерлейкінів важливі не тільки для ініціації РПЗ, але і при прогресуванні цього захворювання.

Відомо, що експресію генів регулюють як генетичні, так і епігенетичні фактори (Wang et al., 2006; Razin et al., 1991). Дослідження причин змін експресії генів є важливим для розуміння механізмів, які опосередковують процеси сигналіngu у клітинах.

Оскільки генетичні та епігенетичні зміни третьої хромосоми пов'язані з формуванням злоякісних пухлин різних локалізацій (Kok et al., 1997; Vonné et al., 2004) і, зокрема, пухлин передміхурової залози (Larson et al., 2005), тому для дослідження було обрано третю хромосому людини.

За допомогою методу гібридизації на Not-I мікрочипах на клінічних зразках

ДГПЗ, аденокарцином та УНТ передміхурової залози виявлено зміни у 88 генах/локусах третьої хромосоми людини для більше ніж 10% досліджуваних зразків. Вперше на вибірці клінічних зразків ДГПЗ та аденокарцином передміхурової залози хворих з української популяції показані делеції/метилування 50 генів/локусів третьої хромосоми (*HMGB1L5*, *LRRC58*, *DZIP1L*, *NUDT16*, *LOC285205*, *KY*, *VHLHE40*, *ROPNI/KALRN*, *BCL6*, *PLCL2*, *ITGA9*, *CTDSPL (RBSP3)*, *GORASP1/TTC21A*, *FSTL1*, *ABHD5/C3orf77*, *IQSEC1*, *CLASP2*, *GNAI2*, *NEK11*, *FBLN2*, *SOX2*, *MINA*, *CHCHD6*, *WNT7A*, *LOC285375*, *FGF12*, *NKIRAS1/RPL15*, *CGGBP1*, *PPP2R3A*, *SOX14*, *ZIC4*, *RAP2B*, *RPL32/IQSEC1*, *C3orf46/CHCHD6*, *RRP9/PARP3*, *PPM1M*, *KBTBD8*, *FGD5*, *CMTM8*, *NBEAL2*, *TMEM45A*, *LRRC3B*, *PDZRN3*, *USP19*, *EPHB1*, *FOXP1*, *MANF*, *GATA2*, *ALDH1L1*, *EPHB3*) у більше ніж 30% досліджуваних зразків.

Наші дані з наявності генетичних/епігенетичних змін у доброякісних та злоякісних пухлинах передміхурової залози підтверджують значення генів третьої хромосоми у розвитку РПЗ та співпадають з результатами, отриманими іншими дослідниками, представленими у базах даних cBioPortal (Cerami et al., 2012) та MethHC (Huang et al., 2015).

РПЗ найчастіше має мультифокальне походження та характеризується гетерогенним характером експресії генів, що ускладнює його діагностування та прогноз (Boutros et al., 2015). Тому важливим є пошук маркерів для детального типування пухлин передміхурової залози.

Аналіз частот делецій чи метилування, детектованих за допомогою Not-I мікрочипів, виявив дев'ять генів/локусів (*LOC440944/SETD5*, *OSBPL10/ZNF860*, *CLCN2*, *PRSS42/MYL3*, *VHL*, *BBX*, *LMCD1*, *CMTM6*, *FAM19A4*) зі статистично достовірною різницею у цих частотах між зразками хворих на аденокарциноми з високим ризиком прогресування (сума за шкалою Глісона більше семи) і групою зразків, що об'єднує аденокарциноми з низьким та середнім ризиком прогресування (сума за шкалою Глісона менше або дорівнює семи) та ДГПЗ (таблиця 5).

Таблиця 5.

Зіставлення частоти метилування/делецій у групі хворих на аденокарциноми з високим ризиком прогресування та хворих на ДГПЗ і аденокарциноми з низьким і середнім ризиком прогресування пухлинного процесу

Ген/локус	Частота метилування/делецій, %		р-значення
	Аденокарциноми з Гл.>7	Аденокарциноми з Гл.≤7 та ДГПЗ	
0	1	2	3
<i>LOC440944/SETD5</i>	100 (4/4)	10 (3/29)	< 0,001
<i>OSBPL10/ZNF860</i>	100 (4/4)	7 (2/29)	< 0,001
<i>CLCN2</i>	100 (4/4)	7 (2/29)	< 0,001
<i>PRSS42/MYL3</i>	100 (4/4)	0 (0/29)	< 0,001
<i>VHL</i>	75 (3/4)	0 (0/29)	< 0,001
<i>BBX</i>	100 (4/4)	17 (5/29)	0,003
<i>LMCD1</i>	100 (4/4)	21 (6/29)	0,005
<i>CMTM6</i>	100 (4/4)	21 (6/29)	0,005

Продовження таблиці 5

0	1	2	3
<i>FAM19A4</i>	100 (4/4)	21 (6/29)	0,005

Примітка: 1. ДГПЗ – доброякісні гіперплазії передміхурової залози. 2. Гл.- сума за шкалою Глісона.

Також було виявлено шість генів/локусів (*CAND2*, *GATA2*, *FAM19A4*, *KY*, *ALDH1L1*, *MAP4*) зі статистично достовірною різницею у частотах делецій/метилування між групою ДГПЗ та аденокарцином з низьким ризиком прогресування (сума за шкалою Глісона, яка дорівнює або менше семи) (таблиця 6).

Таблиця 6.

Зіставлення частоти метилування/делецій у хворих на ДГПЗ та аденокарциноми з низьким та середнім ризиком прогресування пухлинного процесу

Ген	Частота метилування/делецій, %		р-значення
	ДГПЗ	Аденокарциноми з Гл. ≤ 7	
<i>CAND2</i>	47 (7/15)	0 (0/14)	0,006
<i>GATA2</i>	20 (3/15)	71 (10/14)	0,009
<i>FAM19A4</i>	40 (6/15)	0 (0/14)	0,017
<i>KY</i>	60 (9/15)	14 (2/14)	0,021
<i>ALDH1L1</i>	33 (5/15)	79 (11/14)	0,025
<i>MAP4</i>	33 (5/15)	0 (0/14)	0,042

Примітка: 1. ДГПЗ – доброякісні гіперплазії передміхурової залози. 2. Гл.- сума за шкалою Глісона.

Всі ці гени/локуси можуть бути потенційними маркерами для визначення прогресування пухлин передміхурової залози.

Для валідації результатів гібридизації на Not-I мікрочипах було проведено к-ЗТ-ПЛР для ряду генів, що мають високий відсоток генетичних/епігенетичних змін: *BHLHE40*, *BCL6*, *ITGA9*. Виявлено зниження рівнів експресії усіх трьох досліджуваних генів в середньому до 3-х разів у переважній більшості зразків аденокарцином порівняно до УНТ передміхурової залози (рис. 2).

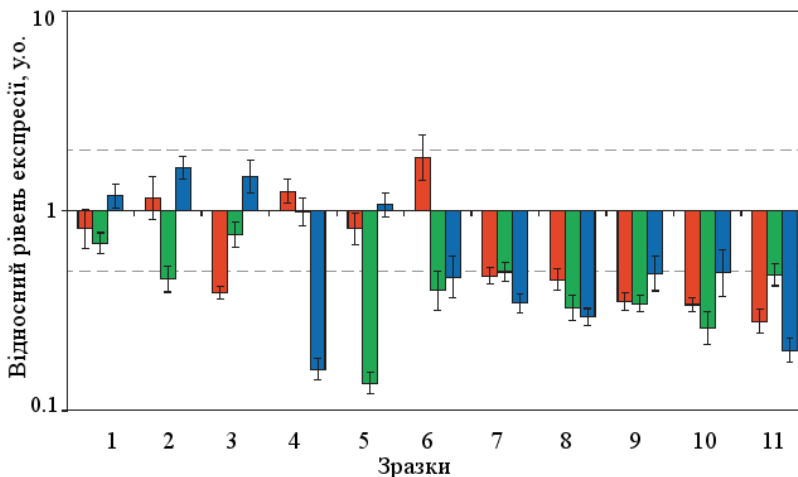


Рис. 2. Рівні відносної експресії генів *BHLHE40*, *BCL6*, *ITGA9* по відношенню до референсного гена *GAPDH*. Червоним кольором показані рівні відносної експресії гена *BHLHE40*, зеленим кольором – для гена *BCL6* та синім кольором – для гена *ITGA9*. Сірим штрих-пунктиром позначено інтервал змін експресії у два рази

Для перевірки виявленого гібридизацією на Not-I мікрочипах можливого метилювання було використано бісульфітне секвенування для низки генів *FGF12*, *GATA2*, *LMCD1*, *TESSP2*. На рис. 3 наведено результати бісульфітного секвенування гена *FGF12* у зразку аденокарциноми передміхурової залози з сумою за шкалою Глісона, що дорівнює дев'яти.

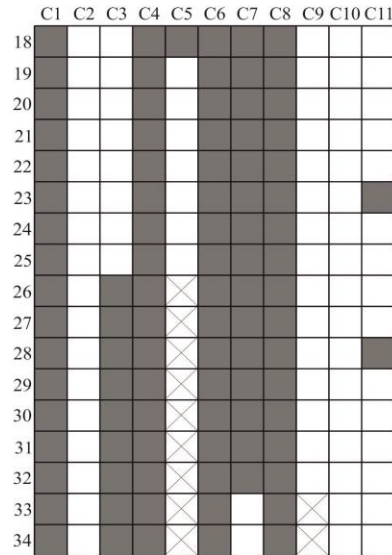
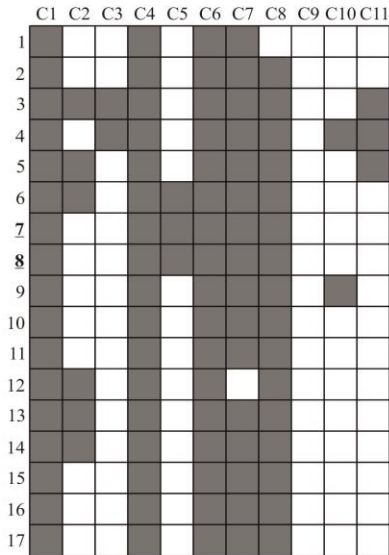


Рис. 3. Результати бісульфітного секвенування гена *FGF12*: сірим кольором позначено метильовані CG-динуклеотиди; білим — неметилювані CG-динуклеотиди; хрестиками позначено відсутність даних в 11 клонах. CG-динуклеотиди, в яких знаходиться сайт рестрикції NotI (сім та вісім) підкреслено та виділено жирним

Метилювання NotI-сайта гена *FGF12* було знайдено в шести з 11 досліджуваних клонів (55%) та асоційовано з переважним метилюванням секвенованого регіону. Інші 11 секвенованих зразків показали від 40 до 80% метилювання NotI-сайта. Високий ступінь метилювання зразків (30-70%) був знайдений також для генів *GATA2* та *LMCD1*. В той час як для гена *TESSP2*, який використовували в якості контролю, майже не було знайдено метилювання (менше 10%).

Отже, отримані результати з к-ЗТ-ПЛР та бісульфітного секвенування підтвердили дані гібридизації на Not-I мікрочипах, що вказує на перспективність використання цього метода для одночасного виявлення генетичних та епігенетичних змін.

Таким чином, наші дослідження продемонстрували генетичні, епігенетичні, а також зміни експресії генів у модельних клітинних лініях та клінічних зразках пухлин передміхурової залози. Встановлені зміни підтверджують високий ступінь гетерогенності пухлин передміхурової залози та складні механізми регуляції прогресування цих пухлин. Виявлені в нашій роботі пухлино-асоційовані гени можуть бути потенційними маркерами прогресування РПЗ.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі на модельних клітинних лініях аденокарцином передміхурової залози людини вивчено рівні відносної експресії 143 генів, пов'язаних з онкогенезом, серед яких 70 генів мають зміни експресії. Ці гени належать до таких сигнальних шляхів та систем як: адгезія, сигнальна трансдукція,

контроль клітинного циклу, ангіогенез, інвазивність та метастазування. Для п'яти генів *FOS*, *EFNA5*, *IL1B*, *TGFB1*, *PLAU* зміни рівня експресії було підтверджено на клінічних зразках пухлин передміхурової залози. У 30% хворих на РПЗ виявлено генетичні та епігенетичні зміни 50 генів/локусів третьої хромосоми зі 180 досліджених.

1. Виявлено 14 диференційно експресованих генів між гормоночутливою клітинною лінією LNCaP та гормонорезистентними лініями DU145 та PC3, відносно лінії умовно нормального епітелію PNT2, які є потенційними пухлино-асоційованими генами аденокарцином передміхурової залози. Вони входять до систем ангіогенезу (*IL8*, *MME*, *CXCL1*, *CXCL2*), інвазивності та метастазування (*SERPINE2b*), контролю клітинного циклу (*P16*, *CCNE1*), сигнальних шляхів: NF- κ B (*IL1B*, *IL6*, *IL1RL1*), адгезії (*TAGLN*, *EFNA5*, *GLCE*), а також групи транскрипційних факторів та молекул сигнальної трансдукції (*HOXA13*).

2. Детектовано 36 генів зі змінами рівня відносної експресії більше ніж в 4 рази в гормонорезистентній клітинній лінії PC3 у порівнянні з гормоночутливою клітинною лінією LNCaP, серед яких 14 генів, які належать до сигнальних шляхів: апоптозу та клітинного старіння (*BCL2*, *BCL2L1*), сигнальної трансдукції та транскрипційних факторів (*PIK3R1*, *FOS*), адгезії (*ITGA3*, *EPDR1*), ангіогенезу (*TGFB1*, *VEGFA*) та інвазивності та метастазування (*MET*, *MMP1*, *MTA2*, *NME4*, *PLAU*, *SERPINE1*) є асоційованими із інвазивністю та метастазуванням пухлин передміхурової залози.

3. Показано для п'яти генів (*FOS*, $p=0,0001$, *EFNA5*, $p=0,0030$, *IL1B*, $p=0,0180$, *TGFB1*, $p=0,0300$, *PLAU*, $p=0,0388$) різниці у рівнях відносної експресії між групами доброякісних гіперплазій, аденокарцином та умовно-нормальних тканин передміхурової залози.

4. Методом непараметричного регресійного аналізу виявлено, що у пацієнтів із незначним підвищенням рівня ПСА (не більше 20,0 нг/мл) спостерігається підвищення рівня експресії гена *IL1B* (OR=2,1; $p=0,0377$).

5. За допомогою гібридизації на NotI-мікрочипах виявлено 1163 випадки гетерозиготних та 461 випадки гомозиготних делецій/метилування, а також ампліфікації/деметилування (24 випадки), серед яких 50 генів/локусів із делеціями/метилуванням у більше ніж в 30% досліджуваних зразків.

6. Виявлено 14 генів/локусів зі статистично значущою різницею ($p<0,05$) у частоті метилування/делецій серед різних типів пухлин передміхурової залози (*LOC440944/SETD5*, *OSBPL10/ZNF860*, *CLCN2*, *PRSS42/MYL3*, *VHL*, *BBX*, *LMCD1*, *СМТМ6*, *FAM19A4*, *CAND2*, *GATA2*, *KY*, *ALDH1L1*, *MAP4*), які можуть бути використані для створення панелей діагностичних біомаркерів для розрізнення доброякісних та злоякісних пухлин, чи як мішені для терапії різних типів пухлин передміхурової залози.

7. Дані NotI-мікрочипів підтверджені методами к-3Т-ПЛР та бісульфітного секвенування: виявлено зниження рівнів експресії генів *BHLHE40*, *ITGA9*, *BCL6* у досліджуваних зразках аденокарцином, а також наявність метилування CG – динуклеотидів NotI-сайта у промоторі генів *FGF12*, *GATA2* та *LMCD1*.

ПЕРЕЛІК ОПУБЛІКОВАНИХ НАУКОВИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Пошук генів – потенційних маркерів агресивності і метастазування раку простати людини / Є.Е. Розенберг, Т. Ю. Прудникова, Г. В. Геращенко, Е. В. Григор'єва, В. І. Кашуба // *Biopolym. Cell.* – 2013. - № 29(6). – С. 499-505. *(Особистий внесок: дослідження рівнів експресії генів, обробка результатів та підготовка статті до друку)*
2. D-glucuronyl C5-epimerase cell type specifically affects angiogenesis pathway in different prostate cancer cells / E.E. Rosenberg, T.Y. Prudnikova, E.R. Zabarovsky, V.I. Kashuba, E.V. Grigorieva // *Tumour Biol.* – 2014. - Vol. 35 (4). – P. 3237-45. *(Особистий внесок: дослідження рівнів експресії генів, аналіз результатів)*
3. Порівняльний аналіз експресії генів в нормальній клітинній лінії та клітинних лініях раку простати людини / Є.Е. Розенберг, Г. В. Геращенко, В.І. Кашуба // *Ukr.Biochem.J.*- 2014. - № 86 (2). - P.119-128. *(Особистий внесок: дослідження рівнів експресії генів, обробка результатів та підготовка статті до друку)*
4. Identification of novel epigenetic markers of prostate cancer by NotI-microarray analysis / A.A. Dmitriev, E.E. Rosenberg, G.S. Krasnov, G.V. Gerashchenko, V.V. Gordiyuk, T.V. Pavlova, A.V. Kudryavtseva, A.D. Beniaminov, A.A. Belova, Y.N. Bondarenko, R.O. Danilets, A.I. Glukhov, A.G. Kondratov, A. Alexeyenko, B.Y. Alekseev, G. Klein, V.N. Senchenko, V.I. Kashuba // *Dis Markers.* – 2015. - Vol. 2015. – P. 241301. *(Особистий внесок: аналіз та узагальнення результатів та підготовка статті до друку)*
5. Relative expression of cancer-associated genes in prostate tumor samples / E.E. Rosenberg, G.V. Gerashchenko, N.V. Hryshchenko, L.V. Mevs, K.A. Nekrasov, R.A. Lytvynenko, Yu.V. Vitruk, O.P. Gryzodub, E.A. Stakhovsky, V.I. Kashuba // *Exp oncology.* – 2017. - № 39 (2). – P.1-8. *(Особистий внесок: виділення РНК зі зразків пухлин та умовно-нормальних тканин передміхурової залози, синтез кДНК, дослідження рівнів експресії генів, статистична обробка результатів та підготовка статті до друку)*
6. Transcriptional profiling of normal and cancer prostate cell lines / E.E. Rosenberg, G.V. Gerashchenko, V.I. Kashuba // *Biopolym. Cell.* – 2013, № 29, special issue, VII Conference of Young Scientists, Institute of Molecular Biology and Genetics NAS Ukraine, 28-29 May. - P.19.
7. Search for potential biomarkers of prostate cancer / E.E. Rosenberg, G.V. Gerashchenko, V.I. Kashuba // *Матеріали X міжнародної наукової конференції студентів та аспірантів «Молодь і поступ біології» 8-11 квітня 2014.* – Львів, Україна. – С. 230-231.
8. Genes with altered expression in prostate cancer as putative biomarkers of invasion and metastasis / E.E. Rosenberg, G.V. Gerashchenko, V.I. Kashuba // *Biopolym. Cell.* – 2014. – № 30, special issue, VIII Conference of Young Scientists, Institute of Molecular Biology and Genetics NAS Ukraine dedicated to 90th Anniversary of P. G. Kostyuk, 20-21 May 2014. - P.14.
9. Effect of D-glucuronyl C5-epimerase expression in prostate cancer cell lines/ E.E. Rosenberg, G.V. Gerashchenko, V.I. Kashuba // *Ukr. Biochem. J.* – 2014. –

- Vol. 86 (5), suppl. 2. Матеріали XI Українського біохімічного конгресу 6-10 жовтня 2014.– P.29.
10. Molecular subtyping of prostate tumors / E. Rosenberg, G. Gerashchenko, V. Gordiyuk, Yu. Bondarenko, R. Danilets, V. Kashuba // Матеріали XI міжнародної наукової конференції студентів та аспірантів «Молодь і поступ біології» 20-23 квітня 2015. – Львів, Україна. – С. 396.
 11. Genetic and epigenetic changes in prostate tumors / E. Rosenberg, G. Gerashchenko, V. Gordiyuk, Yu. Bondarenko, R. Danilets, V. Kashuba // EACR Conference Series, materials of Meeting in Cancer Genomics, 28 June- 1 July, 2015. – Cambridge, UK.
 12. Експресія пухлино-асоційованих генів при раку передміхурової залози / Є.Е Розенберг, Г.В. Геращенко, В.І. Кашуба, Р.А. Литвиненко, Ю.В. Вітрук, Е.О. Стаховський // Матеріали XIII З'їзду онкологів та радіологів України 26-28 травня 2016. – Київ, Україна. – С. 114-115.

АНОТАЦІЯ

Розенберг Є.Е. Дифференційно експресовані гени та генетичні й епігенетичні зміни у пухлинах простати людини. –Рукопис.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук (доктора філософії) за спеціальністю 03.00.03 «Молекулярна біологія». – Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, Київ, 2018.

Дисертація присвячена виявленню генетичних, епігенетичних та змін експресії генів у різних типах пухлин передміхурової залози. Досліджено рівні експресії 143 генів, пов'язаних з онкогенезом, у клітинних лініях аденокарцином передміхурової залози людини. Виявлено 70 генів зі змінами експресії між лініями LNCaP та DU145 та PC3, які є потенційно асоційованими з інвазивним та метастазуючим типом пухлин передміхурової залози. Показано вплив гена *GLCE* на експресію генів ангиогенезу та інвазивності і метастазування у клітинних лініях LNCaP та PC3. Визначено різниці у частотах делецій/метилування 14 генів/локусів між зразками доброякісних гіперплазій та різними стадіями аденокарцином передміхурової залози. Виявлені гени з генетичними/ епігенетичними та змінами рівнів експресії можуть бути використані для подальших досліджень зі створення панелей біомаркерів для виявлення та стратифікації різних типів пухлин передміхурової залози.

Ключові слова: аденокарциноми передміхурової залози, доброякісні гіперплазії передміхурової залози, відносна експресія генів, генетичні зміни, епігенетичні зміни.

АННОТАЦИЯ

Розенберг Е.Э. Дифференциально экспрессируемые гены и генетические и эпигенетические изменения в опухолях простаты человека. -Рукопись.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук (доктора философии) по специальности 03.00.03 «Молекулярная биология». - Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины, Киев, 2018.

Диссертация посвящена выявлению генетических, эпигенетических, а также изменений экспрессии генов в различных типах опухолей предстательной железы. Исследованы уровни экспрессии 143 генов, связанных с онкогенезом, в клеточных линиях аденокарцином предстательной железы человека. Выявлено 70 генов с изменениями экспрессии между линиями LNCaP и DU145, PC3, которые потенциально ассоциированы с инвазивным и метастазирующим типом опухолей предстательной железы. Показано влияние гена *GLCE* на экспрессию генов ангиогенеза и инвазивности и метастазирования в клеточных линиях LNCaP и PC3. Отмечено различия в частотах делеций / метилирования 14 генов/локусов между образцами доброкачественной гиперплазии и различными стадиями аденокарцином предстательной железы. Обнаруженные гены с генетическими / эпигенетическими и изменениями уровней экспрессии могут быть использованы для дальнейших исследований по созданию панелей биомаркеров для выявления и стратификации различных типов опухолей предстательной железы.

Ключевые слова: аденокарциномы предстательной железы, доброкачественные гиперплазии предстательной железы, экспрессия генов, генетические изменения, эпигенетические изменения.

SUMMARY

Rozenberg I.E. Differentially expressed genes and genetic and epigenetic changes in human prostate tumors. – Manuscript.

Thesis for Philosophy Doctor (PhD) degree in biology, specialty 03.00.03 – molecular biology. – Institute of Molecular Biology and Genetics, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, 2018.

The thesis is dedicated to the discovery of genetic, epigenetic and gene expression changes in various types of prostate tumors.

Prostate cancer is the most frequently diagnosed male cancer in Western countries, taking the third place in morbidity and the second place in mortality in Ukraine in 2014 year.

Investigation of genetic and epigenetic changes, as well as gene expression in different types of prostate tumors, will enable not only to expand existing knowledge of the mechanisms of development and progression of prostate cancer. It will also help to identify potential prostate cancer-associated genes, which may include both proto-oncogenes and tumor suppressor genes that could help with stratification of various types of prostate tumors.

The study of genetic and epigenetic changes was performed by hybridization on NotI-microarrays in 33 clinical specimens of prostate tumors, among which there were 15 prostate adenoma and 18 adenocarcinoma samples. Four samples of conventionally normal prostate gland tissue were used as controls. Genetic/epigenetic alterations were found in the 88 genes / loci of the human chromosome three from the 180 ones.

After statistical analysis we obtained a difference in the deletion / methylation frequencies between the prostate adenoma and the various stages of prostate adenocarcinoma samples for 14 genes / loci (*LOC440944 / SETD5, OSBPL10 / ZNF860, CLCN2, PRSS42 / MYL3, VHL, BBX, LMCD1, CMTM6, FAM19A4, CAND2, KY* ,

GATA2, ALDH1L1, MAP4).

Validation of genetic and epigenetic changes found on microarrays was performed for the selected genes / loci by quantitative polymerase chain reaction and bisulfite sequencing, respectively. For qPCR we selected *BHLHE40, BCL6, ITGA9* genes. Investigation was performed on 11 samples of prostate adenocarcinoma. It was found that the expression levels of all three genes were decreased by an average of 3 times in the vast majority of samples of adenocarcinoma compared to the CNT.

To verify the possible methylation detected by the Not-I hybridization we selected *FGF12, GATA2, LMCD1, TESSP2* genes. Experiment was conducted on 12 samples of the prostate adenocarcinoma. Methylation of the NotI site of *FGF12* gene was found in six out of 11 studied clones (55%) and was associated with methylation of the sequenced region. Other 11 sequenced samples showed from 40 to 80% of NotI site methylation. A high degree of methylation of samples (30-70%) was also found for *GATA2* and *LMCD1* genes. While for *TESSP2*, which was used as a control, almost no methylation (less than 10%) was found.

Next, we investigated levels of expression of 143 cancer-associated genes in the human prostate adenocarcinoma cell lines. Fifty differentially expressed genes were identified between the LNCaP and DU145 and PC3 cell lines, which are potentially associated with the invasive and metastatic type of prostate tumors. Among these genes we selected *GLCE* gene for detailed research due to the literature data. After transfection of the human prostate cancer cell lines LNCaP and PC3 with vector containing *GLCE* we have shown that expression of *GLCE* protein mostly effects on expression of the angiogenesis, invasiveness and metastasis genes in LNCaP and PC3 cell lines.

Due to the complexity of the signaling processes in cancer cells our data obtained on the cell lines requires testing on clinical samples. Therefore, seven genes (*EFNA5, TAGLN, EPDR1, FOS, PLAU, TGFB1, IL1B*) were selected for further validation. After analysis of the relative expression levels, a statistically significant difference was found between the groups of prostate adenoma, adenocarcinoma and conventionally normal tissues for *FOS, EFNA5, IL1B* and *TGFB1* genes. For *EFNA5, FOS* and *IL1B* genes, the relative expression level in the adenocarcinoma group was elevated in comparison with the prostate adenoma group. For the *TGFB1* gene, a decrease in the relative expression level in the prostate adenoma group was observed compared to the conventionally normal tissues group. In addition, for the *PLAU* gene, a significant reduction of the relative expression level in the adenocarcinoma group was shown compared with conventionally normal tissues.

Detected genes with genetic / epigenetic and altered expression levels could be used for further studies on the creation of biomarker panels for the detection and stratification of various types of prostate tumors.

Key words: prostate adenocarcinoma, benign prostatic hyperplasia, gene expression, genetic changes, epigenetic changes.