

**АКАДЕМИЯ НАУК РЕСПУБЛИКИ УЗБЕКИСТАН
ИНСТИТУТ БИОХИМИИ**

На правах рукописи
УДК: 577.217+577.218

МАМАТКУЛОВ ДОНИЁР АНВАРОВИЧ

**СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ И
ЗАКОНОМЕРНОСТИ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА ТИРЕОГЛОБУЛИНА
ПРИ ОПУХОЛЕОБРАЗОВАНИИ В КЛЕТКАХ ЩИТОВИДНОЙ
ЖЕЛЕЗЫ**

03.00.04-Биохимия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Ташкент – 2010

Работа выполнена в лаборатории биохимии гормонов Института биохимии Академии Наук Республики Узбекистан.

Научный руководитель: доктор биологических наук
КАДЫРОВА Дильбар Абдуллаевна

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, профессор
ДАЛИМОВА Сурайё Нугмановна
доктор биологических наук, профессор
ЗИЛЯЛИЕВА Марьям Валиевна

Ведущая организация: Институт биофизики и физиологии
Академии наук Республики Узбекистан.

Защита состоится « ____ » _____ 2010 года в _____ часов на заседании специализированного совета Д 015.16.01 по присуждению ученой степени доктора биологических наук при Институте биохимии АН РУз по адресу: 100143, Ташкент, ул. Х.Абдуллаева, 56. Телефон: (99871) 262-25-66, факс: (998) 262-24-41.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института биохимии АН РУз.

Автореферат разослан « ____ » _____ 2010 г.

Ученый секретарь
Специализированного совета
кандидат биологических наук

Г.У.Усманова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ.

Актуальность работы: Канцерогенез—сложный многоэтапный процесс, ведущий к глубокой опухолевой реорганизации нормальных клеток. Из всех теорий канцерогенеза мутационная теория заслуживает наибольшего внимания. Согласно этой теории, опухоли являются генетическими заболеваниями, патогенетическим субстратом которых является повреждение генетического материала клетки (точечные мутации, хромосомные aberrации, структурно-функциональные нарушения хроматина, изменение содержания индивидуальных полирибосом и т.п.). Повреждение специфических участков ДНК приводит к нарушению механизмов контроля за пролиферацией и дифференцировкой клеток и, в конце концов к возникновению опухоли .

Опухоли щитовидной железы занимают 0,5-3% в структуре заболеваемости всеми злокачественными новообразованиями. Проблема рака щитовидной железы остается актуальной в связи с тем, что узловой зоб встречается более чем у 4% населения и более чем в 90% случаев рак щитовидной железы при обследовании выявляется как аденома. Как известно, картина развития злокачественных опухолей щитовидной желез остается неполной, не определены факторы, влияющие на трансформацию этих клеток. Остается неясным, является связь рака щитовидной железы с доброкачественными узловыми образованиями и зобом реальной, как происходят процессы репликации, транскрипции и мутирования ДНК при злокачественном перерождении клеток, по каким критериям можно установить диагноз в ранние сроки развития опухолей щитовидной железы.

ТГ – основной белок, синтезируемый клетками щитовидной железы играющий ключевую роль в метаболизме тиреоидных гормонов. Одним из факторов образования опухолей щитовидной железы является резкое нарушение синтеза ТГ, раковые клетки не синтезируют ТГ, т.е. ТГ полностью отсутствует. Для изучения процессов опухолеобразования щитовидных желез необходимо иметь индивидуальные полирибосомы и выделенные из них нативные мРНК, поэтому исследование структуры, функции, содержания индивидуальных полирибосом и мРНК можно считать одним из механизмов опухолеобразования в клетках щитовидной железы.

Несмотря на то, что в настоящее время достаточно подробно изучены все этапы образования опухолей щитовидной железы, однако конкретные механизмы развития каждой отдельной опухоли щитовидной железы различны, и полную картину этих изменений сегодня дать невозможно. Полученная информация позволяет уже сейчас предупреждать развитие некоторых видов опухолей щитовидной железы. Однако эта информация недостаточна для ранней диагностики и развития методов эффективной терапии различных опухолей щитовидной железы. Профилактика, диагностика и лечение новообразований щитовидной железы представляют собой одну из самых актуальных проблем.

Данная проблема должна быть решена, особенно в условиях нашей Республики, где частота встречаемости различных опухолей щитовидной железы достаточно высока. Всестороннее изучение этих вопросов с применением высокоинформативных методов позволит создать основу для ранней дифференциальной диагностики с целью профилактики и лечения этих заболеваний.

Исследование нарушений регуляции экспрессии гена ТГ, структурной организации данного гена и его значимости для ранней диагностики является одной из наиболее важных задач.

Исходя из вышесказанного, изучение закономерностей экспрессии гена ТГ при различных опухолях щитовидной железы, создание теоретической базы для ранней диагностики этих заболеваний весьма актуально и своевременно.

Степень изученности проблемы: Для новообразований щитовидной железы характерны генетические изменения, встречающиеся только при данном заболевании. К ним относятся хромосомные транслокации, протоонкогены и опухолевые супрессоры, нарушение регуляции экспрессии гена ТГ, изменение содержания индивидуальных ТГ полирибосом, структурно-функциональные изменения хромосом. Специфичность таких изменений можно объяснить следующими причинами. Во-первых, в определенных типах клеток может быть повышена вероятность некоторых генетических перестроек. Во-вторых, тканеспецифическими могут быть экспрессия или действие определенных онкогенов или опухолевых супрессоров. И, в третьих, для приобретения злокачественного фенотипа разные клетки могут нуждаться в неодинаковых наборах биологических свойств. Генетические нарушения, которые наиболее часто встречаются в клетках щитовидной железы при различных опухолях – это нарушение регуляции экспрессии гена ТГ, структурно-функциональные изменения хроматина, изменение РНК-полимеразной активности, нарушение синтеза ТГ, снижение количества ТГ - синтезирующих полирибосом.

В различных опухолях щитовидной железы количество ТГ варьирует, возможно, это связано с низкоэффективным образованием йодтиронинов, что наиболее вероятно объясняется нарушением структурно-функциональных взаимосвязей процесса гормоногенеза и позволяет определять молекулярный базис генетических дефектов при опухолеобразовании щитовидной железы.

Связь диссертационной работы с тематическими планами НИР: Работа выполнена в рамках фундаментального проекта Ф-4.1.32 «Структурно-функциональная организация и закономерности экспрессии генов и генов-супрессоров, ответственных за опухолеобразование в клетках эндокринных желез и анализ для диагностики».

Цель исследования: Изучение молекулярно-генетического механизма образования опухолей щитовидной железы, изучение нарушений регуляции экспрессии гена ТГ.

Задачи исследования:

1. Определение размера популяции ТГ полирибосом в клетках щитовидной железы в норме и при различных опухолях,
2. Изучение структурно-функциональных свойств хроматина и различных модификаций ДНК при опухолеобразовании в клетках щитовидной железы,
3. Изучение регуляции экспрессии гена ТГ в клетках щитовидной железы при некоторых опухолях.

Объект и предмет исследования: Щитовидные железы больных, удаленные во время операции по поводу различных опухолей. Были использованы образцы ДНК, выделенные из крови больных с различными опухолями щитовидной железы (32 – папиллярная аденокарцинома, 24 – фолликулярная аденокарцинома), в качестве контроля использовали ДНК из крови 12 здоровых доноров.

Методы исследований: В работе были использованы современные методы биохимии и молекулярной биологии: выделение полирибосом магнитным методом, выделение суммарной РНК, выделение высокомолекулярной ДНК, рестрикционный анализ ДНК, электрофорез продуктов гидролиза ДНК рестриктазами в 0,8% агарозном геле, полимеразная цепная реакция (ПЦР).

Основные положения, выносимые на защиту:

1. При различных опухолях щитовидной железы происходит резкое уменьшение содержания ТГ – синтезирующих полирибосом, Процесс опухолеобразования сопровождается заметным снижением синтеза ТГ, что объясняется нарушением регуляции экспрессии гена ТГ на уровне транскрипции и трансляции.

2. При образовании различных опухолей щитовидной железы большое значение имеет выяснение структурной организации и функциональных свойств транскрипционно активных участков гена ТГ, выявление факторов, определяющих потенциально активное состояние гена ТГ и обеспечивающих транскрипцию данного гена.

3. При опухолеобразовании в клетках щитовидной железы выявляются мутационные изменения в молекуле ДНК, происходит нарушение регуляции экспрессии гена ТГ.

Научная новизна: В данной диссертации проведено изучение нарушений регуляции экспрессии гена ТГ на всех уровнях, а именно: на уровне трансляции, на уровне транскрипции, процессинга (созревание молекулы мРНК), на уровне выхода мРНК из ядра и вхождения мРНК в полирибосомы, на уровне метилирования молекулы ДНК. Впервые проведено изучение изменения содержания индивидуальных ТГ полирибосом при опухолеобразовании в клетках щитовидной железы.

Результаты, полученные при выполнении работы, имеют фундаментальное значение для выяснения структурной организации и функционирования генома человека, для изучения молекулярных механизмов реализации гене-

тической информации и общих механизмов образования различных опухолей эндокринных желез.

В настоящей работе дана молекулярно-генетическая характеристика различных опухолей щитовидной железы, проведено изучение дефектов регуляции активности гена ТГ, выявлены различные молекулярно-генетических факторы образования данного заболевания, одним из основных, среди которых, являются дефекты гена ТГ. Данное исследование представляет собой базу для дальнейшего развития молекулярно-генетических исследований опухолей щитовидной железы, связанных с нарушениями работы гена ТГ.

Научная и практическая значимость результатов исследования: Предложены новые подходы к ранней диагностике, профилактике и лечения различных опухолей щитовидной железы

Полученные экспериментальные данные об изменении размера популяции ТГ – синтезирующих полирибосом, нарушении регуляции экспрессии гена ТГ, изменении структурно-функциональных свойств хроматина, нарушении паттерна метилирования ДНК при опухолеобразовании в клетках щитовидной железы расширяют наши знания о патогенезе данного заболевания и могут быть включены в курс лекций по биохимии и молекулярной биологии.

Введение в практику молекулярно-генетических методов исследования различных опухолей щитовидной железы приведут к углубленному пониманию вопросов патогенеза опухолеобразования, что может послужить надежным критерием прогноза исхода заболевания.

Выявленные нарушения регуляции экспрессии гена ТГ могут быть использованы в качестве маркеров ранней доклинической диагностики различных опухолей щитовидной железы с целью профилактики и дальнейшего лечения данного заболевания.

Реализация результатов: Основные положения диссертации включены в курс лекций по биохимии и молекулярной биологии факультета естественных наук Ташкентского Государственного Педагогического Университета им. Низами.

Апробация работы: Основные положения диссертации докладывались на международных и республиканских съездах, конгрессах, симпозиумах, конференциях: «Третий Московский Международный конгресс» (Пушино, 2005), конференции молодых ученых Института Биохимии АН РУз (Ташкент, 2006), на конференциях «Современные проблемы биохимии и эндокринологии» с международным участием (Ташкент, 2006), «Современные проблемы физиологии и биофизики» (Ташкент, 2007), на IV съезде микробиологов Узбекистана (Ташкент, 2008), на 6-й Российской конференции по фундаментальной онкологии (Санкт-Петербург, 2010), на научном семинаре при Специализированном совете Д.015.16.01 при Институте биохимии АН РУз (Ташкент, 2010).

Опубликованность результатов: По теме диссертационной работы в различных изданиях Узбекистана и Российской Федерации опубликовано 5 журнальных статей, 8 тезисов.

Структура и объём диссертации: Диссертация изложена на 107 страницах компьютерного текста и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, глав с результатами собственного исследования, заключения, выводов, практических рекомендаций. Иллюстрации: 12 таблиц и 15 рисунков. Библиографический указатель включает 122 источника авторов стран СНГ и зарубежных авторов.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИИ.

Во введении раскрыты актуальность работы, сформулированы цель и задачи исследования, научная новизна, научная и практическая значимость, сформулированы положения, выносимые на защиту, обосновано практическое внедрение полученных результатов исследования.

В первой главе освещены молекулярно-генетические аспекты различных опухолей щитовидной железы. Проанализированы структурно-функциональная организация и строение гена ТГ, функциональная роль метилирования ДНК при опухолеобразовании.

Во второй главе даны материал и методы. ДНК выделяли из крови больных с различными опухолями щитовидной железы. В качестве контроля использовали ДНК из крови здоровых доноров. Полирибосомы и ДНК выделяли из клеток щитовидной железы человека, удаленных во время операции по поводу различных опухолей.

Суммарные полирибосомы из клеток щитовидной железы получали магниевым методом, с помощью которого удалось добиться оптимального выхода полирибосом (Лейтин В.Л., Лерман М.И., 1969г.).

Индивидуальные ТГ полирибосомы получали с помощью иммуносорбентов, представляющих собой ковалентно связанные комплексы белковых антигенов с нерастворимой основой и содержащих антитела к синтезируемому белку. В качестве нерастворимой основы «сэндвич» - сорбента брали коммерческий препарат ионообменника – парааминобензилцеллюлозы (ПАБЦ). ПАБЦ имеет первичные ароматические аминогруппы, которые могут диазотироваться и соединяться с белками, гистонами и антителами, образуя специфичные адсорбенты.

Суммарную РНК выделяли SDS-фенол-хлороформным методом.

Выделение высокомолекулярной ДНК из лейкоцитов крови проводили в соответствии с методом фенольной экстракции (Шипицина и соавт., 1980г.).

Выделение фракций ДНК проводили модифицированным фенольным методом, который позволяет выделить три фракции ДНК, благодаря применению различных условий депротенинизации.

Гибридизацию фракций ДНК с ³H ТГ кДНК проводили при 65⁰С в гибридных пробах объемом по 30 мкл, содержащих по 30 мкг одной из

фракций ДНК, 50 мкг ^3H ТГ кДНК (1000 имп/мин), 3 мМ NaCl, 0,01М трис-HCl, pH 7,5. Через определенные промежутки времени пробы охлаждали, разбавляя водой до 100 мкл, и наносили по 30 мкл на фильтры "Ruf" для подсчета общей радиоактивности. Гибридизацию нейлоновых фильтров "Bio-dan", содержащих фрагменты ДНК с ^{32}P -ТГ кДНК проводили в течение 15 часов при 65°C в 10 мл смеси, содержащей 4хССР, четырехкратный раствор Денхардта, 0,5мг/мл полиU, 0,1% додецилсульфата натрия, 10% декстран-сульфата (Pharmacia) и 10 имп/мин/мл меченой по фосфору ТГ кДНК.

ТГ комплементарную ДНК получали методом полимеразной цепной реакции (ПЦР).

Ядра из клеток щитовидной железы выделяли осаждением их в 0,25 М сахарозе, содержащей 5 мМ MgCl_2 1 мМ дитиотрейтола (ДТТ) 10 мМ трис-HCl pH 7.5 (буфер Б) и дальнейшей очисткой их путём наслоения на раствор 2 М сахарозы в буфере Б (24000 об/мин 1 час ротор SW-27, «Beckman»).

Третья глава посвящена изучению нарушений регуляции экспрессии гена ТГ при различных опухолях щитовидной железы

Синтез и физико-химическая характеристика кДНК для гена тиреоглобулина. Для того чтобы изучить нарушения, происходящие в гене ТГ, при различных опухолях щитовидной железы необходимо иметь ТГ кДНК, которая используется в качестве зонда в экспериментах по гибридизации для обнаружения мутационных изменений в гене ТГ. Синтез кДНК для гена ТГ проводили методом ПЦР. ТГ комплементарную ДНК синтезировали на 0,5 мкг суммарной РНК в присутствии обратной транскриптазы с применением праймеров, специфичных для гена ТГ:

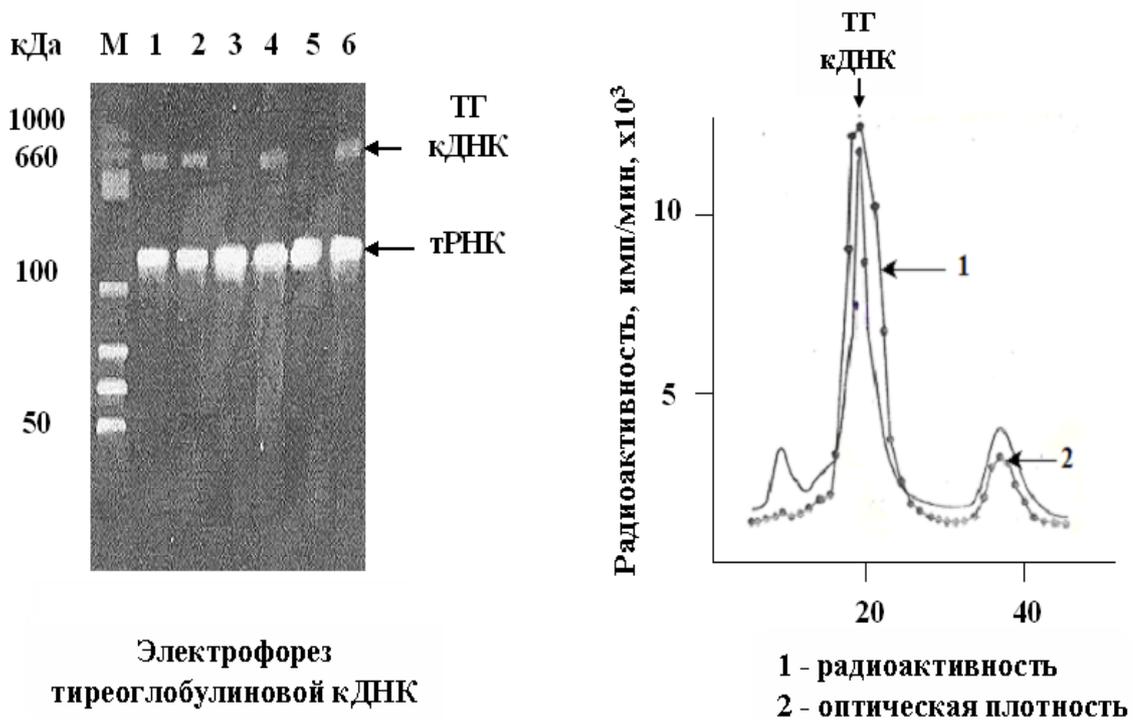
for 5' – AGGCTAGGAAAATGGCCCTGGTCC – 3';

rev 5' – TTGGATCCTTATGTGGGGGAATCTGCC – 3'.

ПЦР проводили в инкубационной среде: 50мкл содержали 60 мМ трис-HCl (pH 8,6), 6 мМ ЭДТА, 10 мМ β -меркаптоэтанол, 10 мкг/мл ВСА, 1 мМ каждого из 4-х нуклеотидов, 2 ед. обратной транскриптазы. ПЦР имела 35 циклов. Для синтеза кДНК для гена ТГ использовали как ДНК-полимеразу I, так и РНК-зависимую ДНК-полимеразу (ревертазу).

По окончании 35 циклов амплификации пробы в течение 10 мин выдерживали при 72°C для завершения элонгации, после чего проверяли степень амплификации электрофорезом аликвоты реакционной смеси (10 мкл) в 1% агарозе с бромистым этидием.

На рис. 1 представлены результаты амплификации, последующего электрофореза и ультрацентрифугирования кДНК для гена ТГ в 5-20% сахарозном градиенте. В качестве маркера брали цитоплазматическую РНК из печени мышей. Показано, что коэффициент седиментации кДНК для гена ТГ составляет 33S, что соответствует литературным данным и нашим собственным результатам.



Электрофорез
тиреоглобулиновой кДНК

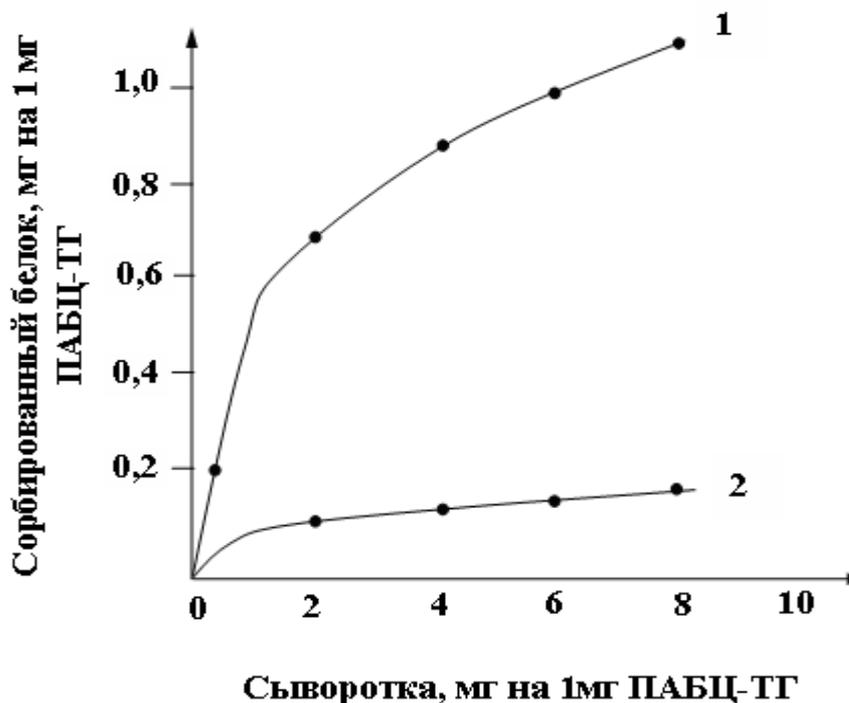
Рис. 1. Синтез тиреоглобулиновой кДНК и ультрацентрифугирование в градиенте плотности сахарозы

Таким образом, синтезированный препарат кДНК для гена ТГ, будет использоваться в экспериментах по изучению дефектов экспрессии этого гена в клетках щитовидной железы при различных опухолях.

Анализ процесса иммуносорбции индивидуальных полирибосом и определение емкости ПАБЦ-ТГ:аТГ. Для выделения индивидуальных ТГ полирибосом мы использовали иммуносорбенты типа “сэндвич”. В качестве нерастворимой основы “сэндвич”-сорбента был использован коммерческий препарат ионообменника ПАБЦ, имеющий первичные ароматические аминогруппы, которые могут диазотироваться и соединяться с белками, гистонами и антителами, образуя специфические адсорбенты.

Для того, чтобы измерить, какое количество аТГ связывается с ПАБЦ-ТГ при различных условиях, определить уровень неспецифической сорбции и выбрать оптимальные условия для приготовления “сэндвич» - сорбента, исследовали кривые связывания ПАБЦ-ТГ с нормальной и аТГ сывороткой (рис.2). При увеличении концентрации аТГ в инкубационной смеси повышается достигаемая емкость иммуносорбента. Однако, полученная емкость не является максимальной, о чем свидетельствует отсутствие плато на кривой связывания. Форма кривой указывает на наличие нескольких типов связывания, что, по-видимому, является отражением неэквивалентности аминокрупп ПАБЦ.

При приготовлении иммуносорбента ПАБЦ-ТГ:аТГ мы выбрали соотношение 1мл аТГ на 1 мг ПАБЦ-ТГ, потому, что при этих условиях обеспечивается достигаемая емкость ПАБЦ-ТГ по аТГ 0,6 мг аТГ/мг ПАБЦ-ТГ.



Кривая 1 - антитиреоглобулиновая сыворотка
 Кривая 2 - нормальная сыворотка

Рис. 2. Кривые связывания белков из нормальной и антитиреоглобулиновой сыворотки с ПАБЦ-ТГ:аТГ

При данных условиях инкубации с 1 мг ПАБЦ-ТГ связывается до 1мг аТГ (рис. 2, кривая 1). Уровень неспецифической сорбции белков из нормальной сыворотки не превышает 0,1мг/мг ПАБЦ, причем число мест неспецифического связывания с иммуносорбентом строго ограничено (рис.2, кривая 2).

Таким образом, нами получен иммуносорбент ПАБЦ-ТГ:аТГ, который характеризуется высокой емкостью и низкой неспецифической сорбцией.

Определение размера популяции индивидуальных тиреоглобулиновых полирибосом щитовидной железы при различных опухолях.

При ряде заболеваний щитовидной железы содержание ТГ в тиреоидной ткани сильно изменяется, отмечаются изменения и в структуре ТГ. При изучении механизма образования опухолей щитовидной железы, для разработки методов ранней диагностики особое место занимает вопрос о размере популяции индивидуальных полирибосом, поскольку именно количество транслируемых молекул мРНК и определяет скорость синтеза белка.

Для изучения процессов опухолеобразования щитовидных желез необходимо иметь индивидуальные полирибосомы и выделенные из них нативные мРНК, поэтому исследование структуры, функции и содержания индивидуальных полирибосом и мРНК можно считать одним из механизмов опухолеобразования в клетках щитовидной железы. Полирибосомы выделяли из ткани каждого случая опухоли магниевым методом, с помощью которого

удалось добиться оптимального выхода полисом. В таблице 1 представлены данные, позволяющие оценить спектральные свойства и выход полирибосом, полученных из ткани патологических желез и нормальной ткани. Из данных таблицы видно, что выделенные суммарные полирибосомы по физико-химическим свойствам могут быть использованы в исследованиях по определению размера популяции индивидуальных ТГ полирибосом в клетках щитовидной железы при различных опухолях. Нами было использовано 28 образцов ткани щитовидной железы, из них: папиллярная аденокарцинома (12 случаев), фолликулярная аденокарцинома (8 случаев), нормальная тиреоидная ткань (8случаев)

Таблица 1

**Некоторые физико-химические свойства полирибосом
полученные магниевым методом(t-критерий Стьюдента для независи-
мых выборок)**

№	Объект исследования	D ₂₆₀ / D ₂₃₅	D ₂₆₀ / D ₂₈₀	Содержание РНК мкг/г сырой ткани	Выход полисом	
					мкг/г сырой ткани	%
1	Нормальная тиреоидная ткань	1,47±0,8	1,81±0,18	390±21	500±34	80±1,5
2	Папиллярная карцинома	1,55±0,14	1,81±0,22	457±26**	572±42**	75±1,9
3	Фолликулярная карцинома	1,41±0.24	1,75±0,16	470±21**	520±29*	76±1,8

Примечание: Достоверное отличие **p<0,05 ,*p<0,01 по отношению к норме.

Для определения количества ТГ-синтезирующих полирибосом готовили серии инкубационных смесей, содержащих фиксированное количество полирибосом и разное количество “сэндвич”- сорбента ПАБЦ-ТГ:аТГ (табл. 2).

Таблица 2

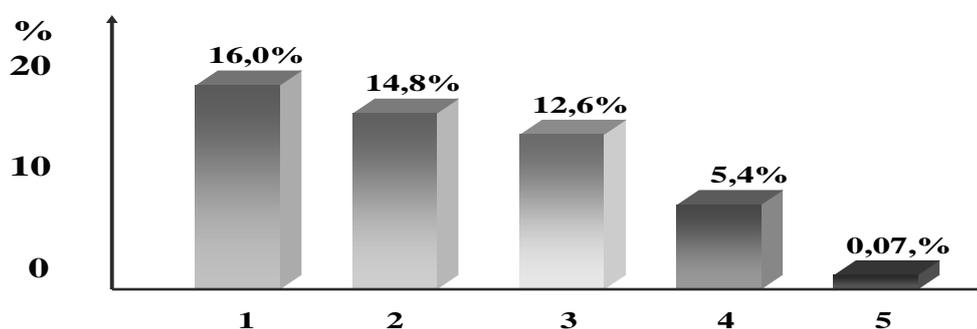
Состав инкубационных смесей

№	Полирибосомы мл*	ПАБЦ-ТГ:аТГ мл**	Буфер	Инкубационная смесь содержит:			
				Полирибосомы		ПАБЦ-ТГ:аТГ	
				мг	мг/мл	мг	мг/мл
1	0.12	0,012	0,0175	0,016	1,0	0,12 5	1,2
2	0,12	0,025	0,005	0,016	1,0	0,25	0,64
3	0,12	0,025	0,005	0,016	1,0	0, 5	0,32
4	0,12	0,05	--	0,016	1,0	1,0	0,16

*- концентрация полирибосом в исходном растворе 1,2 мг\мл

** - концентрация иммуносорбента 10 мг\мл в 1 и 2 точках, 20мг\мл в 3 и 4 точка

Нами было проведено определение содержания ТГ полирибосом при фолликулярной аденокарциноме. Размер популяции ТГ полирибосом при фолликулярной аденокарциноме составляет 5,4%. В следующей серии экспериментов было проведено определение содержания ТГ полирибосом при папиллярной аденокарциноме. Определению размера популяции ТГ полирибосом при папиллярной карциноме показало, что размер популяции ТГ полирибосом в клетках щитовидной железы при папиллярной карциноме составляет 0,07%. На рисунке 3 суммированы данные по определению размера популяции ТГ – синтезирующих полирибосом в клетках щитовидной железы.



1- нормальная тиреоидная ткань, 2- бычьи щитовидные железы, 3- узловой эутиреоидный зоб, 4- фолликулярная аденокарцинома, 5- папиллярная аденокарцинома.

Рис. 3. Размер популяции индивидуальных ТГ - полирибосом

Снижение размера популяции ТГ – синтезирующих полирибосом при опухолях щитовидной железы указывает на то, что при данных заболеваниях ТГ мРНК либо практически отсутствует, либо образуется, но не способна транслироваться.

Биосинтез тиреоглобулина в клетках щитовидной железы при различных опухолях. Процесс опухолеобразования обычно связан с дефектом синтеза ТГ. Нами было проведено исследование активности белоксинтезирующей системы из клеток щитовидной железы в норме и при различных опухолях щитовидной железы. Компоненты белоксинтезирующего аппарата (полирибосомы, белковые факторы трансляции, тРНК и аминокил-тРНК-синтетазы) вносили в систему в виде фракции, получаемой центрифугированием гомогената клеток при 3000 g в течение 10 мин (фракция S₃₀). Концентрация фракции S₃₀ в системе составляла 20 ед. Д₂₆₀ на 1 мл. Бесклеточную систему инкубировали при 37° в течение 1 часа. Результаты по включению С¹⁴- аминокислот в бесклеточную белоксинтезирующую систему представлены в таблице 3. Из данных таблицы видно, что белоксинтезирующая активность щитовидной железы при фолликулярной карциноме снижается на 77%, а при папиллярной карциноме на 98%. Полученные результаты указы-

вают на то, что при опухолях щитовидной железы происходит нарушение регуляции экспрессии гена ТГ на уровне трансляции.

Таблица 3

Включение C^{14} –аминокислот в бесклеточную белок-синтезирующую систему из клеток щитовидной железы

Вид патологии	Включение C^{14} – аминокислот (имп/мин на 20 ед. S_{30})
Диффузный токсический зоб n-10	1416±82
Фолликулярная карцинома n-8	320±21
Папиллярная карцинома n-12	15,6±1,9

Изучение транскрипционно-активной фракции ДНК в клетках щитовидной железы при опухолях. Для изучения особенностей структуры ДНК, функционально различных участков хроматина при различных опухолях щитовидной железы было проведено выделение фракций ДНК с различной транскрипционной активностью и с помощью ДНК-ДНК гибридизации исследовано содержание последовательностей гена ТГ в этих фракциях.

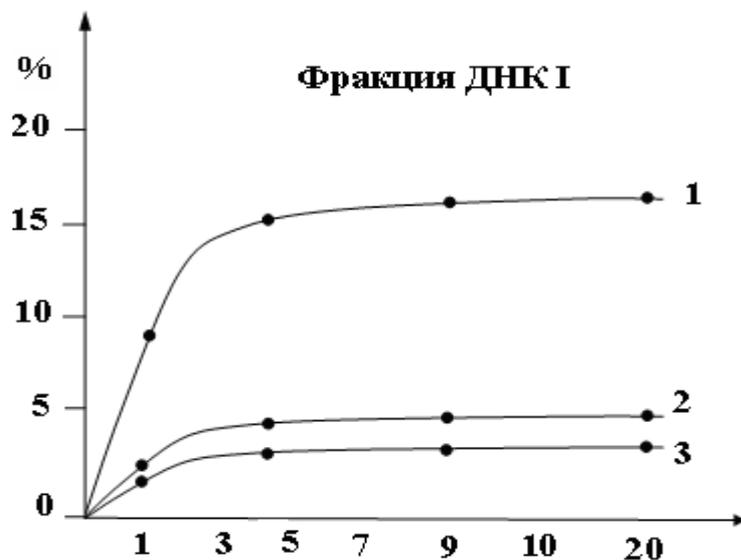
Из клеток щитовидной железы при папиллярной и фолликулярной аденокарциноме методом дифференциальной бездетергентной фенольно-солевой депротеинизации выделены три фракции ДНК I, ДНК II и ДНК III.

Фракция ДНК I охарактеризована как транскрипционно активная ДНК на основании высокого содержания в ней гибридной ДНК, обогащенной уникальными последовательностями. ДНК II представляет собой ДНК стабильно репрессированных участков генома. ДНК III является потенциально активной областью генома. Данный метод позволяет получить транскрипционно активную ДНК в высокомолекулярной форме, что открывает возможности для исследования ее структурных особенностей.

Прямые доказательства функциональных различий ДНК I, ДНК II и ДНК III были получены при изучении содержания последовательностей гена ТГ методом молекулярной гибридизации этих фракций с избытком 3H ТГ кДНК, содержащей 5' область гена ТГ. На рисунке 4 представлены кривые гибридизации фракции ДНК I из клеток щитовидной железы в норме и при патологии. Из данных рисунка видно, что кривая гибридизации фракции ДНК I при папиллярной аденокарциноме выходит на плато при 2,5%, кривая гибридизации фракции ДНК I при фолликулярной аденокарциноме – при 4,0%, тогда как в случае нормальной тиреоидной ткани плато достигается при 15%.

На рисунке 5 представлены кривые гибридизации фракции ДНК III из клеток щитовидной железы в норме, при папиллярной и фолликулярной аденокарциноме. Из данного рисунка видно, что кривая гибридизации фракции ДНК III при папиллярной аденокарциноме достигает плато при 8%, тогда как в случае фолликулярной аденокарциномы плато достигается при 10%. Повышенное содержание последовательностей гена ТГ во фракции ДНКIII в

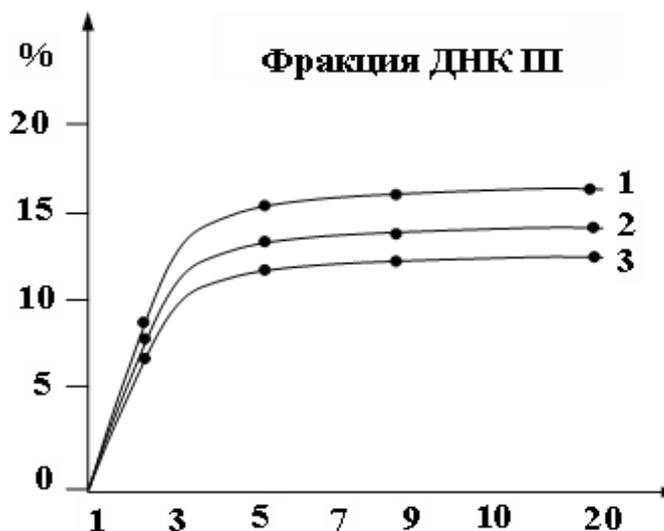
клетках щитовидной железы при папиллярной и фолликулярной аденокарциноме свидетельствует о том, что эта фракция более обогащена транскрибируемыми последовательностями генома, в отличие от фракции ДНК I.



1 – диффузный токсический зоб, 2 - фолликулярная аденокарцинома,
3 - папиллярная аденокарцинома

Рис. 4. Кривые гибридизации фракции ДНК I.

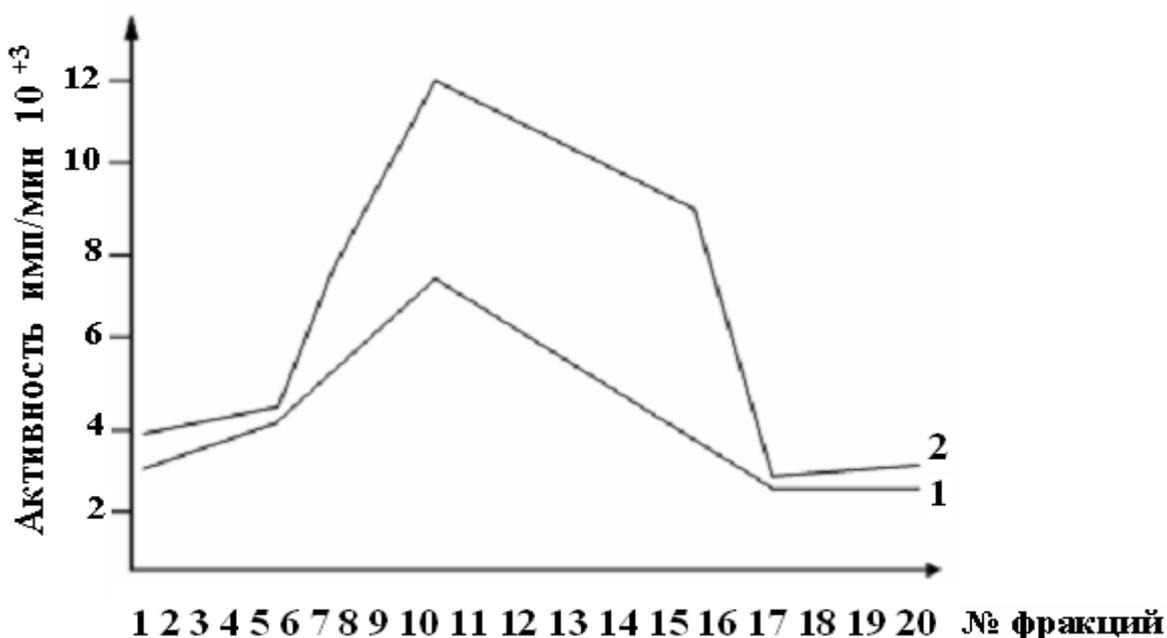
Таким образом, из полученных данных видно, что при фолликулярной и папиллярной аденокарциноме фракция ДНК I не является транскрипционно активной и последовательности гена ТГ при данной патологии находятся в потенциально активных районах генома. Это хорошо коррелирует с низкой транскрипционной активностью клеток щитовидной железы при папиллярной и фолликулярной аденокарциноме: ТГ мРНК при этих заболеваниях практически отсутствует.



1 – диффузный токсический зоб, 2 - фолликулярная аденокарцинома,
3 - папиллярная аденокарцинома

Рис. 5. Кривые гибридизации фракции ДНК III.

Изучение метилирования молекулы ДНК при опухолеобразовании в клетках щитовидной железы. Одним из молекулярно-генетических факторов образования различных опухолей щитовидной железы является изменение сайтов метилирования ДНК, при этом происходит избирательное локальное гиперметилирование цитозина в составе CpG – динуклеотидов (неметилированных в норме), т.е. наблюдается гиперметилирование молекулы ДНК. В опухолевых клетках происходит также общее деметилирование. Для того, чтобы понять причину одновременного гиперметилирования и гипометилирования ДНК в различных опухолях нами была изучена активность ДНК - метилтрансферазы в ДНК нормальных и опухолевых клеток. С этой целью из лейкоцитов крови практически здоровых людей и крови при папиллярной и фолликулярной аденокарциноме были выделены молекулы ДНК и обработаны ферментом ДНК - метилтрансферазой. Нами было показано изменение активности метилтрансферазы в опухолевых клетках щитовидной железы. На рис. 6 приведены кривые, отражающие изменение активности данного фермента, в зависимости от формы опухоли. Из данного рисунка видно, что при папиллярной аденокарциноме активность метилтрансферазы повышается в 1,76 раза, по сравнению с нормой.



1 – норма, 2 – папиллярная аденокарцинома

Рис. 6. Активность метилтрансферазы в клетках щитовидной железы при папиллярной аденокарциноме.

При изучении взаимосвязи между экспрессией гена ТГ и его метилированием показано, что чувствительные к метилированию сайты, расположенные в 5' –фланкирующей области гена ТГ, гиперметилируются при папил-

лярной аденокарциноме, в то время как в клетках нормальной тиреоидной ткани наблюдается неометилирование этих сайтов.

Рестрикционное картирование ДНК для определения мутационных изменений в гене тиреоглобулина. В клетках щитовидной железы при различных опухолях наблюдаются различные мутационные изменения в гене ТГ, которые нарушают его функционирование. Нарушение регуляции экспрессии гена ТГ приводит к различным наследственным заболеваниям, а также происходит образование опухолей в клетках щитовидной железы.

Из клеток щитовидной железы при папиллярной и фолликулярной аденокарциноме, а также из нормальной крови человека были выделены высокомолекулярные молекулы ДНК.

Обработку ДНК рестрикционными эндонуклеазами BamH1, HindIII, EcoRV, EcoRI, PstI проводили в буфере, содержащем 0,04М трис-HCl, pH 7,4, 0,01М MgCl₂, 0,05М NaCl, 0,01М дитиотрейтол. В качестве маркера использовали ДНК бактериофага λ обработанную теми же рестриктазами. После электрофореза фрагменты ДНК переносили на нейлоновые фильтры «Viduan» по методу Саузерна.

При обработке ДНК больного при папиллярной аденокарциноме эндонуклеазой EcoRI методом рестрикционного анализа было выявлено 3 фрагмента, а при фолликулярной аденокарциноме выявлено 4 фрагмента. В ДНК больных при папиллярной аденокарциноме отсутствует фрагмент ДНК размером 3,4 т.п.н. Из полученных данных видно, что при папиллярной аденокарциноме произошла делеция последовательностей ДНК, содержащих ген ТГ. В ДНК больных при фолликулярной аденокарциноме мутационных изменений в молекуле ДНК не обнаружено.

Из приведенных данных видно, что при папиллярной аденокарциноме происходит резкое уменьшение количества ТГ мРНК, подтверждением чего являются мутационные изменения в гене ТГ. Изменение уровня ТГ мРНК определяет состояние щитовидной железы при опухолеобразовании. Регуляция экспрессии гена ТГ на уровне транскрипции играет существенную роль при различных опухолях щитовидной железы.

Таким образом, в патогенезе тиреоидных новообразований нарушение регуляции экспрессии гена ТГ занимает важное место и является одним из факторов опухолеобразования в клетках щитовидной железы и может быть использован в качестве маркера ранней доклинической диагностики этих заболеваний.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ.

Результаты исследования позволили сформулировать выводы:

1. Получен иммуносорбент ПАБЦ-ТГ:аТГ, для определения размера популяции индивидуальных ТГ полирибосом, достигаемая емкость полученного иммуносорбента равна 0,14 мг/мг.

2. Определен размер популяции индивидуальных ТГ полирибосом в клетках щитовидной железы в норме и при различных опухолях щитовидной железы, установлено, что размер популяции ТГ полирибосом составляет: в клетках нормальной тиреоидной ткани–26%, при фолликулярной аденокарциноме–5,4%, при папиллярной аденокарциноме – 0,07%.

3. Показано, что белоксинтезирующая активность клеток щитовидной железы при фолликулярной аденокарциноме уменьшается на 77%, а при папиллярной аденокарциноме - на 98%.

4. Проведено изучение содержания последовательностей гена ТГ во фракциях ДНК I и ДНК III в клетках щитовидной железы при папиллярной и фолликулярной аденокарциноме. Показано, что при фолликулярной и папиллярной аденокарциноме фракция ДНК I не обогащена последовательностями гена ТГ и не является транскрипционно активной.

5. При папиллярной аденокарциноме выявлены хромосомные aberrации, что приводит к генетической нестабильности, частота хромосомных aberrаций составляет 2,8%.

6. Установлено, что при папиллярной аденокарциноме активность метилтрансферазы повышается в 1.76 раза, по сравнению, с нормой. При папиллярной аденокарциноме происходит гиперметилование регуляторной области ТГ гена.

7. При обработке ДНК рестриктазой EcoRI при папиллярной аденокарциноме происходит потеря гетерозиготности, что сопровождается появлением крупной делеции в гене ТГ, размером 3,4 т.п.н.

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ

1. Маматкулов Д., Абдугаффурова Д. Изменение содержания тиреоглобулиновых полирибосом в клетках щитовидной железы при различных опухолях// Матер. научно-практич. конф. «Современные проблемы биохимии и эндокринологии». – Ташкент, 2006.- С.47-48.

2. Кадырова Д.А., Ибрагимов А.А., Ибрагимова Э.А., Саидкаримов И.С., Маматкулов Д.А. Сравнительный анализ ДНК клеток крови и слюны при некоторых формах тиреоидной патологии// Проблемы биологии и медицины. – Самарканд, 2007. Т.50.- С. 27-30.

3. Кадырова Д.А., Маматкулов Д.А., Зиямухамедова С.А., Абдугаффурова Д.Г. Молекулярно-генетические факторы образования опухолей щитовидной железы, ранняя диагностика// Проблемы биологии и медицины. – Самарканд, 2007. № 4 (50).- С.34-37.

4. Ибрагимова Э.А., Кадырова Д.А., Маматкулов Д.А., Ялалова И.Р., Зиямухамедова С.А. Характеристика полирибосом щитовидной железы человека при различных опухолях// Современные проблемы физиологии и биофизики: Матер. респуб. науч. конф. 24-25 октябрь. – Ташкент, 2007.- С.44-45.

5. Маматкулов Д.А., Кадырова Д.А., Абдугаффурова Д.Г., Зиямухамедова С.А. Структурно-функциональные особенности и закономерности экс-

прессии гена тиреоглобулина при опухолях щитовидной железы// Современные проблемы физиологии и биофизики: Матер. респуб. науч. конф. 24-25 октябрь. – Ташкент, 2007.- С.74-75.

6. Кадырова Д.А., Маматкулов Д.А., Зиямухамедова С.А., Абдугаффурова Д.Г. Изменения структуры хроматина, связанные с экспрессией гена тиреоглобулина при различных опухолях щитовидной железы// ДАН РУз. – Ташкент, 2008.- № 4.- С.98-101.

7. Кадырова Д.А., Маматкулов Д.А., Абдугаффурова Д.Г., Алланазарова Б. Нарушение регуляции экспрессии гена тиреоглобулина в клетках щитовидной железы при различных опухолях// Матер. конф. «Фундаментальная и клиническая эндокринология, проблемы и перспективы». – Харьков, 2008.- С.65-66.

8. Кадырова Д.А., Абдугаффурова Д.А., Маматкулов Д.А. Активность метилтрансферазы при различных опухолях щитовидной железы и при клеточном старении// Матер. респуб. науч. конф. «Проблемы современной микробиологии и биотехнологии». – Ташкент, 2009.- С.115.

9. Кадырова Д.А., Маматкулов Д.А. Изучение статуса метилирования ДНК и экспрессии гена тиреоглобулина при различных опухолях щитовидной железы// Матер. 6-й Российской конф. по фундаментальной онкологии. – Санкт-Петербург, 2010.- С.23-24.

10. Кадырова Д.А., Маматкулов Д.А., Абдугаффурова Д.Г. Содержание тиреоглобулиновых полирибосом щитовидной железы в норме и при опухолеобразовании// Матер. 6-й Российской конф. по фундаментальной онкологии. – Санкт-Петербург, 2010.- С.24.

11. Кадырова Д.А., Маматкулов Д.А., Касымов О.Ш., Ибрагимов А.А. Значение процесса метилирования ДНК гена p53 при различных опухолях щитовидной железы// Матер. 6-й Российской конф. по фундаментальной онкологии. – Санкт-Петербург., 2010.- С.24-25.

12. Кадырова Д.А., Маматкулов Д.А. Нарушение регуляции экспрессии гена тиреоглобулина – один из маркеров диагностики опухолей щитовидной железы// Проблемы биологии и медицины. – Самарканд, 2010.- № 1(60).- С.139-143.

13. Кадырова Д.А., Маматкулов Д.А., Ялалова И.Р., Абдуллаева М.И. Содержание последовательностей гена тиреоглобулина во фракциях ДНК с различной транскрипционной активностью в клетках щитовидной железы при различных опухолях// Назарий ва клиник тиббиёт–Ташкент, 2010.-№4.- С.82-85.

Биология фанлари номзоди илмий даражасига талабгор Маматқулов Дониёр Анваровичнинг 03.00.04 - Биокимё ихтисослиги бўйича «Қалқонсимон без хужайраларидаги ўсма ҳосил бўлишида тиреоглобулин гени экспрессияси қонунлари ва структура-функционал тузилиши» мавзусидаги диссертациясининг

РЕЗЮМЕСИ

Таянч (энг муҳим) сўзлар: қалқонсимон без, тиреоглобулин, индивидуал ТГ полирибосомалар, имуносорбент, метилланиш, РНК, ДНК, экспрессия, папилляр аденокарцинома, фолликуляр аденокарцинома.

Тадқиқот объектлари: бемор ва соғлом донорлар қонидан олинган ДНК намуналари, турли ўсма ҳолатларида беморларда ўтказилган жарроҳлик амалиётида олинган қалқонсимон без намуналари.

Ишнинг мақсади: ишнинг асосий мақсади ҳар хил қалқонсимон без ўсмаларида ТГ гени экспрессияси қонуниятлари ва таркибий–функционал тузилишини, ўсмалар ҳосил бўлишининг молекуляр–генетик механизмларини ва ТГ гени экспрессияси регуляциясининг бузилишларини ўрганиш ва ушбу касалликларни эрта ташхислаш учун назарий асос яратиш.

Тадқиқот методлари: полирибосома ажратиб олишнинг магнийли усули, суммар РНК ажратиш, ПАБЦ-ТГ:аТГ имуносорбенти олиш, юқори молекуляр ДНК ажратиш, ДНК рестрикция таҳлили, рестриктазаланган ДНК гидролизи маҳсулотларининг 0,8% агароза гелида электрофорези, ДНК фрагментларини сақловчи “Biodan” нейлон фильтрида ³²P-нишонланган кДНК билан дурагайлаш, Полимераза занжир реакциялари.

Олинган натижалар ва уларнинг янгилиги: ПАБЦ-ТГ:аТГ имуносорбенти олинди. Индивидуал ТГ полирибосомалар миқдори аниқланди. Папилляр аденокарциномада индивидуал ТГ полирибосомалар миқдорининг камайиши кузатилди. Папилляр аденокарциномада генетик ўзгаришларга сабабчи хромосома абберрациялари ўрганилди, хромосома абберрацияларининг частотаси 2,8% ташкил этади. Папилляр аденокарциномада ТГ гени экспрессияси регуляциясидаги бузилишлар мРНК синтези даражасида, яъни транскрипция даражасида рўй беради.

Амалий аҳамияти: қалқонсимон без ўсмаларини тадқиқ қилишнинг молекуляр–генетик усулларини амалиётга жорий қилиш ўсма пайдо бўлиш механизмларини янада тўлиқ ва чуқур ўрганиш имконини беради, бу касаллик оқибатини эрта аниқлашнинг жиддий мезони саналади.

Татбиқ этиш даражаси ва иқтисодий самарадорлиги: тадқиқот натижаларидан қалқонсимон без ўсмаларини эрта ташхислашда, университетларнинг биология факультетларида молекуляр биология ва гормонлар биокимёси, тиббиёт институтларида эндокринология курсларини ўқитишда фойдаланиш мумкин.

Қўлланиш (фойдаланиш) соҳаси: биокимё, молекуляр биология, биотехнология, тиббиёт, эндокринология.

РЕЗЮМЕ

диссертации Маматкулова Дониёра Анваровича на тему: «**Структурно-функциональная организация и закономерности экспрессии гена тиреоглобулина при опухолеобразовании в клетках щитовидной железы**» на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.04-Биохимия

Ключевые слова: щитовидная железа, тиреоглобулин, ТГ полирибосомы, иммуносорбент, метилирование, РНК, ДНК, экспрессия, папиллярная аденокарцинома, фолликулярная аденокарцинома.

Объекты исследования: образцы ДНК, полученные из крови больных и здоровых доноров, щитовидные железы больных, удаленные во время операции по поводу различных опухолей.

Цель исследования: изучить структурно-функциональные особенности и закономерности экспрессии гена ТГ при различных опухолях щитовидной железы, молекулярно-генетические механизмы образования опухолей щитовидной железы, нарушение регуляции экспрессии гена ТГ и создание теоретической базы для ранней диагностики этих заболеваний.

Методы исследования: выделение полирибосом магниевым методом, выделение суммарной РНК, получение иммуносорбента ПАБЦ-ТГ:аТГ, выделение высокомолекулярной ДНК, обработка ДНК рестрикционными эндонуклеазами, электрофорез продуктов гидролиза ДНК рестрикционными эндонуклеазами. Гибридизация нейлоновых фильтров “Biodan”, содержащих фрагменты ДНК с ³²P-меченой кДНК, полимеразная цепная реакция.

Полученные результаты и их новизна: получен иммуносорбент ПАБЦ-ТГ:аТГ. Определен размер популяции индивидуальных ТГ полирибосом. Показано, что при папиллярной аденокарциноме наблюдается снижение содержания индивидуальных ТГ полирибосом.

При папиллярной аденокарциноме выявлены хромосомные аберрации, что приводит к генетической нестабильности, частота хромосомных аберраций составляет 2,8%. Показано, что при папиллярной аденокарциноме происходит нарушение регуляции экспрессии гена ТГ на уровне синтеза мРНК, т.е. на уровне транскрипции.

Практическая значимость: введение в практику молекулярно-генетических методов исследований опухолей щитовидной железы способствует более полному пониманию механизма опухолеобразования, что является существенным критерием прогноза исхода заболевания.

Степень внедрения и экономическая эффективность: результаты исследований могут быть использованы при разработке подходов для ранней диагностики опухолей щитовидной железы, а также при чтении курсов молекулярной биологии и биохимии на биологических факультетах Университетов и курсах эндокринологии медицинских институтов.

Область применения: биохимия, молекулярная биология, биотехнология, медицина, эндокринология.

THE RESUME

Thesis of Mamatkulov Donier Anvarovich on the scientific degree competition of the doctor of philosophy in biology on specialty 03.00.04-Biochemistry, subject: "**Structurally functional organization and laws expression of thyroglobulin gene at cancerogenesis in cells of the thyroid gland**"

Key words: a thyroid gland, thyroglobulin, TG polyribosomes, immunosorbent, methylation, RNA, DNA, expression, papillary adenocarcinome, follicular adenocarcinome.

Subjects of research: samples DNA received from blood of sick and healthy donors, the thyroid glands of patients removed during operation concerning various tumors.

Purpose of work: studying structurally - functional features and laws expression TG gene at various tumors of a thyroid gland, studying of the molecular-genetic mechanism of formation of tumors of a thyroid gland, studying of infringements of regulation expression TG gene and creation of theoretical base for early diagnostics of these diseases.

Methods of researches: allocation of polyribosomes by a magnesium method, allocation total RNA, reception of immunosorbent PABC-TG:aTG, allocation high-molecular DNA, processing DNA restriction endonucleases, electrophoresis products of hydrolysis DNA by restriction endonucleases, hybridization of the nylon filters " Biodan " containing fragments DNA with ³²P- marked cDNA, polymerase chain reaction.

The results obtained and their novelty: it is received immunosorbent PABC-TG:aTG. The size of a population individual TG polyribosomes is determined. It is shown, that at papillary adenocarcinome decrease of the maintenance individual TG polyribosomes is observed. At papillary adenocarcinome chromosomal aberrations that leads to genetic instability are revealed, frequency of chromosomal aberrations makes 2,8 %. It is shown, that at papillary adenocarcinome occur infringement of regulation expression TG gene at a level of synthesis mRNA, i.e. at a level of a transcription.

Practical value: Introduction in practice of molecular-genetic methods of researches of tumors of a thyroid gland stimulate more full understanding of the mechanism cancerogenesis, that is essential criterion of the forecast of an outcome of disease.

Degree of embed and economic effectivity: Results of researches can be used by development of approaches for early diagnostics of tumors of a thyroid gland, and also at reading rates of molecular biology and biochemistry of hormones at biological faculties of Universities, and rates endocrinology in medical institutes.

Field of application: biochemistry, molecular biology, biotechnology, medicine, endocrinology.