

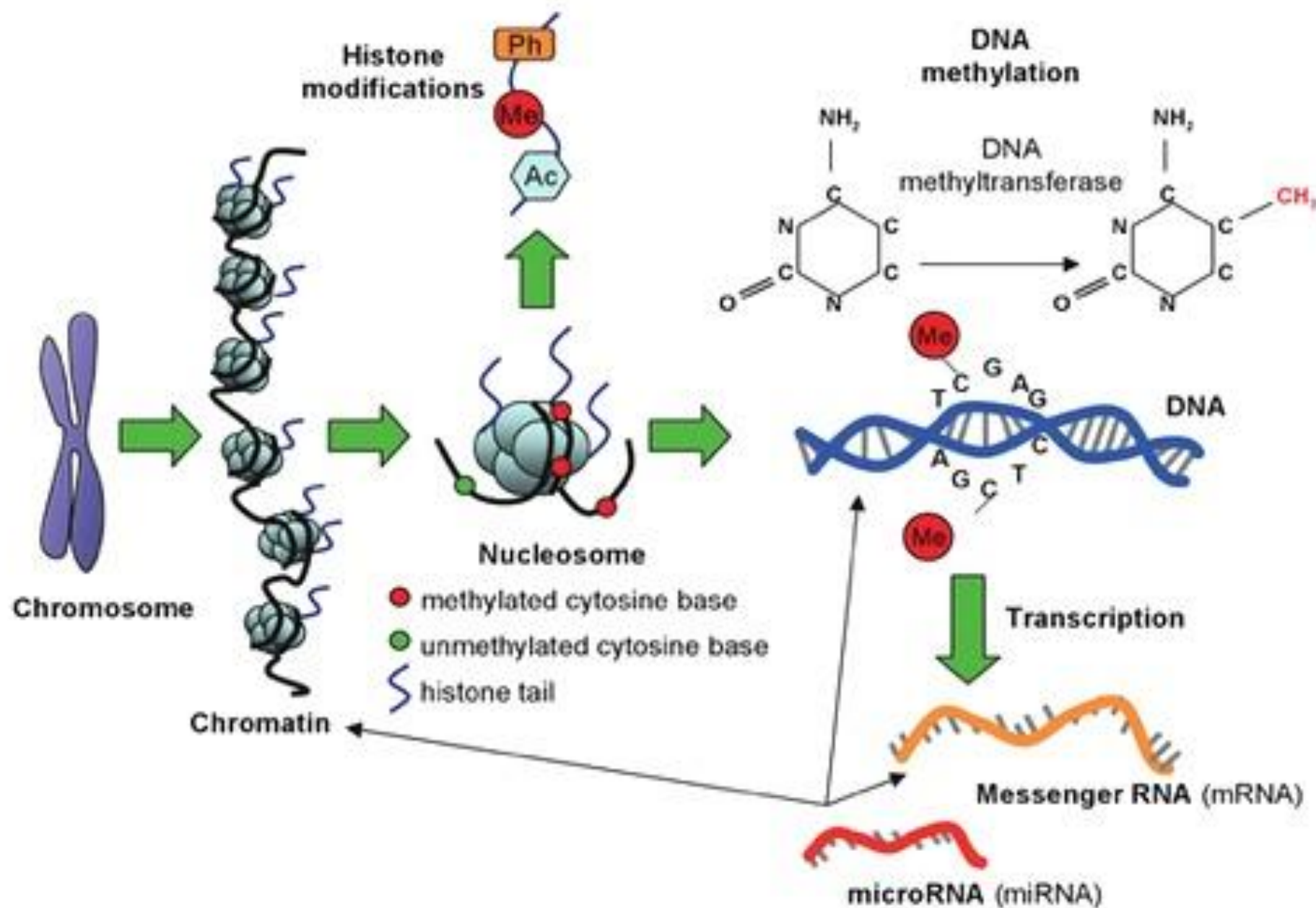
Эпигенетические механизмы регуляции в патогенезе опухолевой болезни

Что такое эпигенетика?

- **Эпигенетика – это раздел молекулярной и клеточной биологии, который изучает изменения экспрессии генов или фенотипа клетки, вызванных механизмами, не затрагивающими последовательности ДНК.**
- **Эпигенетические изменения сохраняются в ряде митотических делений соматических клеток, а также могут передаваться следующим поколениям.**
- **В эпигенетических исследованиях используется широкий спектр методов молекулярной биологии, в том числе — иммунопреципитация хроматина (ChIP), гибридизация *in situ*, чувствительные к метилированию рестриктазы, идентификации ДНК-аденин-метилтрансферазы (DamID), бисульфитное секвенирование. Кроме того, всё большую роль играет использование методов биоинформатики**

Виды эпигенетических модификаций

- Метилирование CpG-динуклеотидов в ДНК
- Посттрансляционные модификации гистонов (HPMTs):
 1. Ацетилирование/деацетилирование по остаткам Lys (K) и Arg (R)
 2. Фосфорилирование по остаткам Ser (S) и Thr (T)
 3. Метилирование по остаткам Lys (K) и Arg (R)
 4. Убиквитилирование и сумоилирование
 - АДФ-рибозилирование
 - Ремоделинг хроматина
 - микроРНК (miRNAs)



Посттрансляционные модификации гистонов (HPTMs)



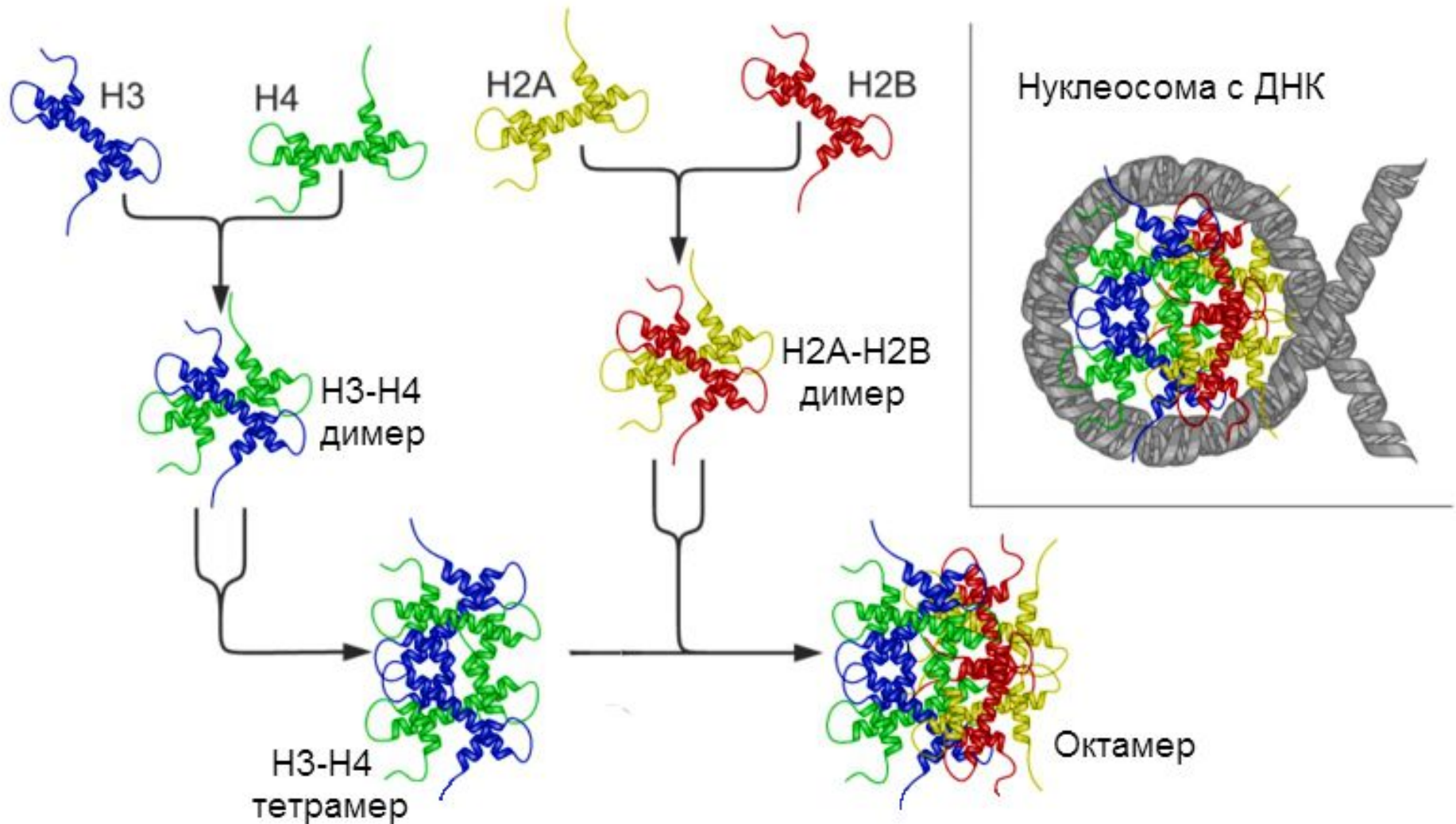
- Гистоны обнаружены в 1884 году немецким биохимиком Альбрехтом Косселем
- Нобелевская премия по физиологии и медицине 1910 г.

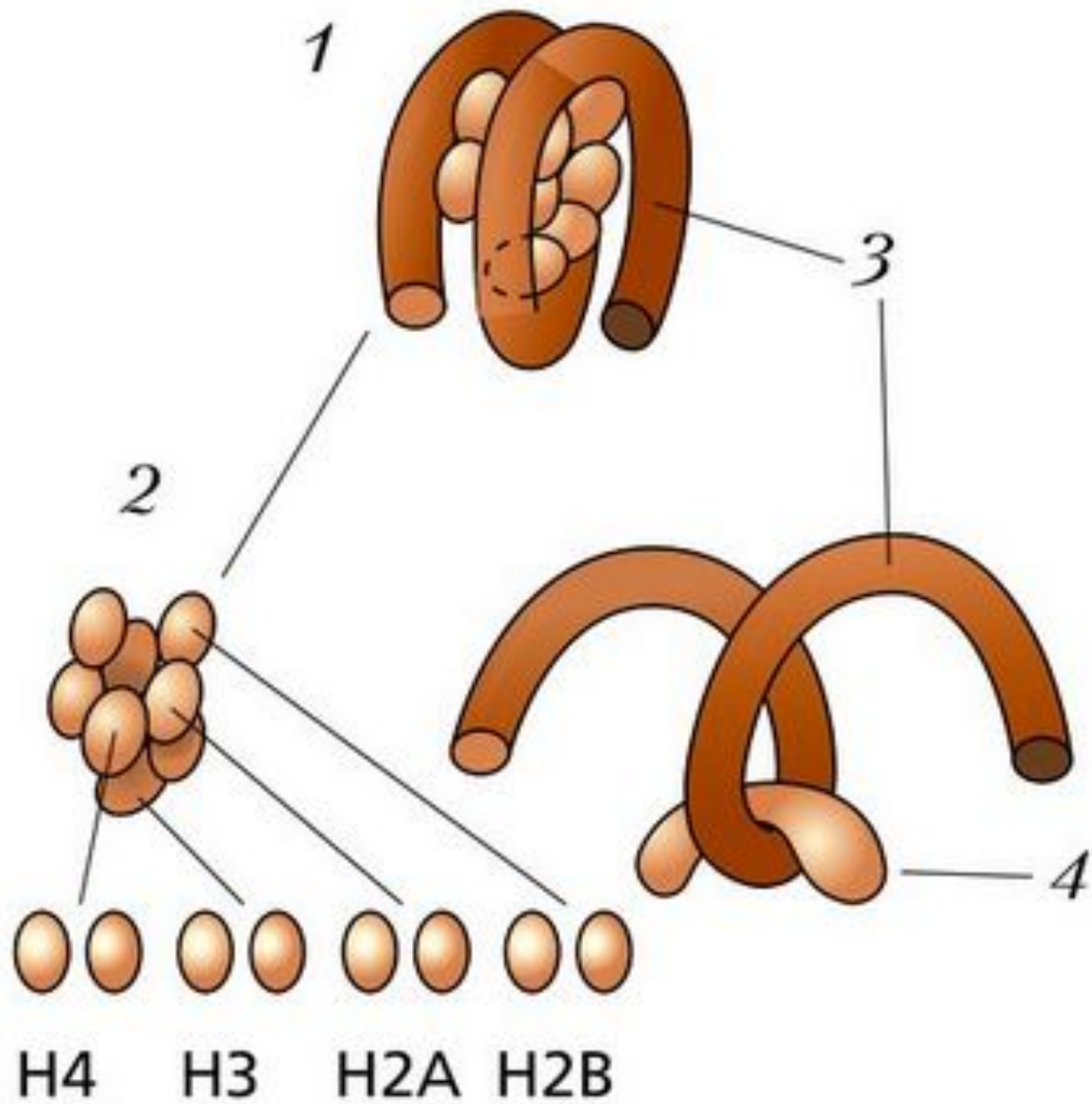
Гистоны

- **Гистоны** — обширный класс ядерных белков, выполняющих две основные функции: они участвуют в упаковке нитей ДНК в ядре и в эпигенетической регуляции таких ядерных процессов, как транскрипция, репликация и репарация.
- Существует пять различных типов гистонов H1/H5, H2A, H2B, H3, H4. Гистоны H2A, H2B, H3, H4, называемых *кóровыми* гистонами (от англ. core — сердцевина), формируют нуклеосому, представляющую собой белковую глобулу, вокруг которой накручена нить ДНК. Гистон H1/H5, называемый *линкерным* гистоном (от англ. link — связь), связывается с внешней стороной нуклеосомы, фиксируя на ней нить ДНК.

- По две молекулы каждого из гистонов H2A, H2B, H3 и H4 составляют октамер, обвитый сегментом ДНК длиной 146 пар оснований (п.о.), образующим 1,8 витка спирали поверх белковой структуры. Эта частица диаметром 7 нм называется нуклеосомой. Участок ДНК, соединяющий соседние нуклеосомы и непосредственно не контактирующий с гистоновым октамером, взаимодействует с линкерным гистоном H1. Длина фрагмента ДНК, приходящегося на одну нуклеосому, варьирует и составляет в среднем 200 п.о. При этом непосредственно с нуклеосомой связаны 146 п.о., а остальные несколько десятков соединяют две соседние нуклеосомы
- ДНК и нуклеосомные гистоны прочно соединены: в каждой нуклеосоме между ДНК и гистонами, входящими в её состав, образуется **142 водородные связи**. Почти половина этих связей возникает между основной цепью аминокислот гистонов и фосфодиэфирными группами сахарнофосфатного остова ДНК. Помимо водородных связей ДНК с белками нуклеосомы скрепляют многочисленные гидрофобные взаимодействия и солевые мостики. Например, положительные заряды аминокислот лизина и аргинина, которыми обогащены гистоны, могут эффективно нейтрализовать отрицательный заряд остова ДНК.

Структура нуклеосомы и гистоновых белков

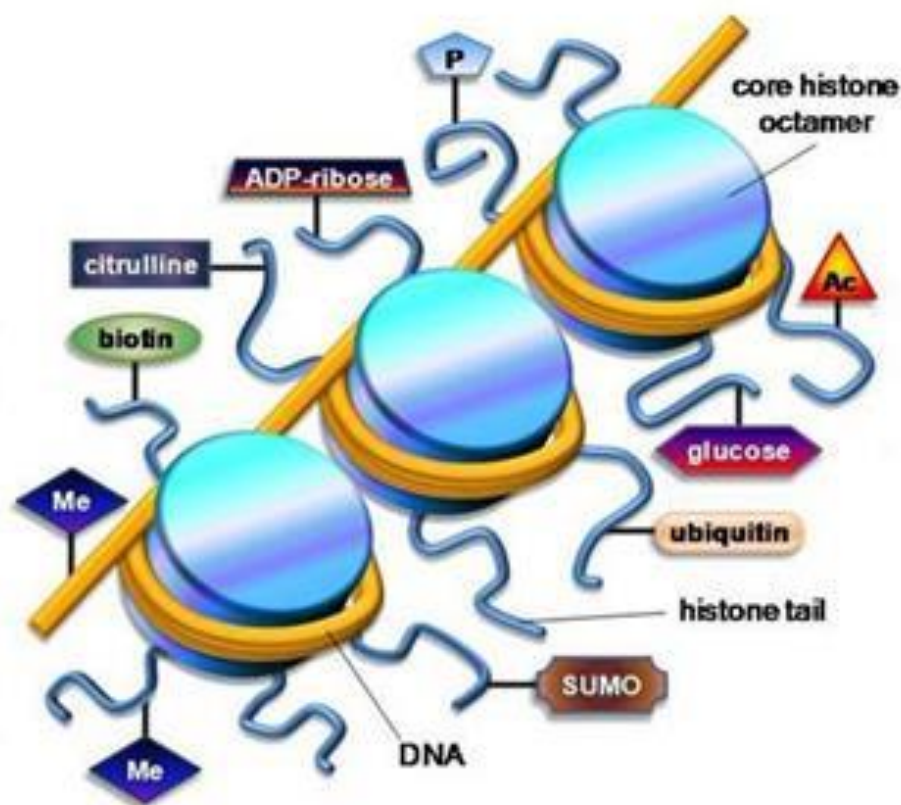




- В хроматине гистоны составляют 25-40 % сухого веса. Благодаря высокому содержанию Lys и Arg гистоны проявляют сильно основные свойства.
- Положительно заряженные аминокислоты сосредоточены в основном в аминных (N-) и карбоксильных (C-) концевых частях молекул коровых гистонов, называемых хвостами. Гистоновые хвосты длиной около 15 — 30 аминокислотных остатков не организованы в какие-либо выраженные вторичные структуры. Гистоновые хвосты, прежде всего N-хвост, играют ключевую роль в эпигенетических механизмах, в которых участвуют эти белки. В центральных, самых консервативных, участках полипептидной цепи коровых гистонов преобладают остатки гидрофобных аминокислот.
- Гистоны непосредственно контактируют с ДНК и способны нейтрализовать отрицательный заряд фосфатных групп ДНК за счёт положительных зарядов аминокислотных остатков.
- Последовательность аминокислот в этих белках является консервативной и практически не различается в организмах различных таксонов.
- Гистоны присутствуют в ядрах эукариотических клеток; у бактерий гистонов нет, но они выявлены у архей группы *Euryarchaea*

Модификации гистонов

Аминокислота	Модификация
Лизин (K)	Метилирование (Me) Ацетилирование (Ac) Убиквитинирование (Ub) Сумоимирование (Su) Рибозилирование (Rib)
Аргинин (R)	Метилирование (Me)
Серин (S) Треонин (T) Цистеин (C)	Фосфорилирование (P)



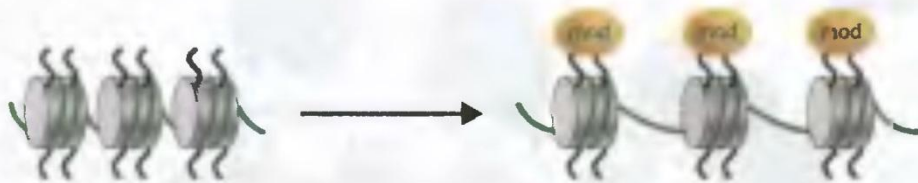
Влияние ковалентных посттрансляционных модификаций гистонов на уровень транскрипции

	Роль в транскрипции	Модифицируемые сайты гистона
ГРУППА 1		
Ацетилирование	Активация	H3 (K9,K14,K18,K56) H4 (K5,K8,K12,K16) H2A H2B (K6,K7,K16,K17)
Фосфорилирование	Активация	H3 (S10)
Метилирование	Активация	H3 (K4,K36,K79)
	Репрессия	H3 (K9,K27)
ГРУППА 2		H4 (K20)
Убиквитилирование	Активация	H2B (K123)
	Репрессия	H2A (K119)
Сумоилирование	Репрессия	H3 (?)
		H4 (K5, K8, K12, K16)
		H2A (K126)
		H2B (K6, K7, K16, K17)

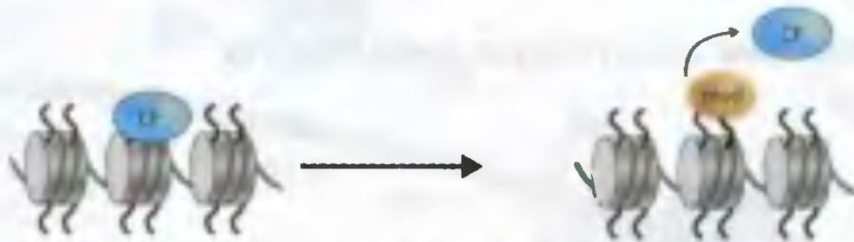
- НРТМs подразделяются на 2 группы:
1. Модификации малыми химическими группами
 2. Крупные химические модификации

Влияние НРТМs на хроматиновую матрицу

Модель 1: структурное изменение хроматина



Модель 2: ингибирование связывания негативно действующего фактора



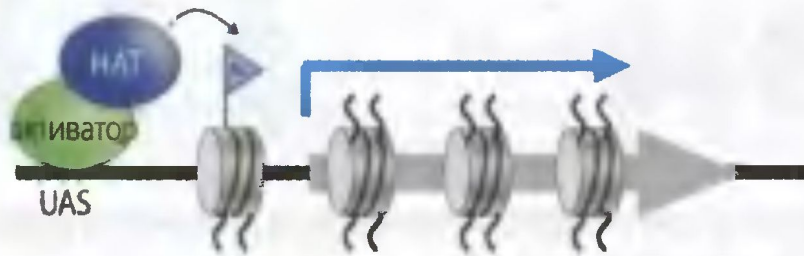
Модель 3: рекрутирование позитивно действующего фактора



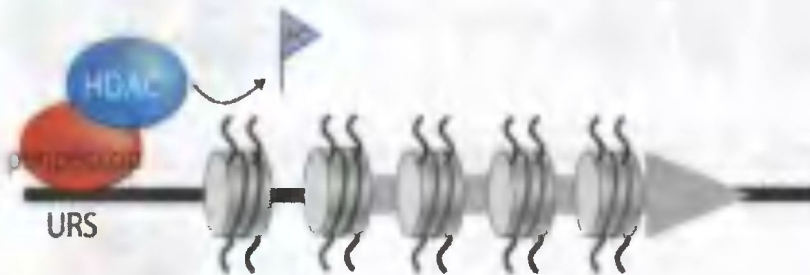
1. Модификация приводит к изменению в структуре хроматина
2. Модификация подавляет связывание фактора ассоциированного с хроматином (например фосфорилирование H3S10 блокирует связывание HP1 с метилированным H3K9)
3. Модификация обеспечивает специфичность связывания фактора ассоциированного с хроматином

Ацетилирование/деацетилирование (НАТ/HDAC)

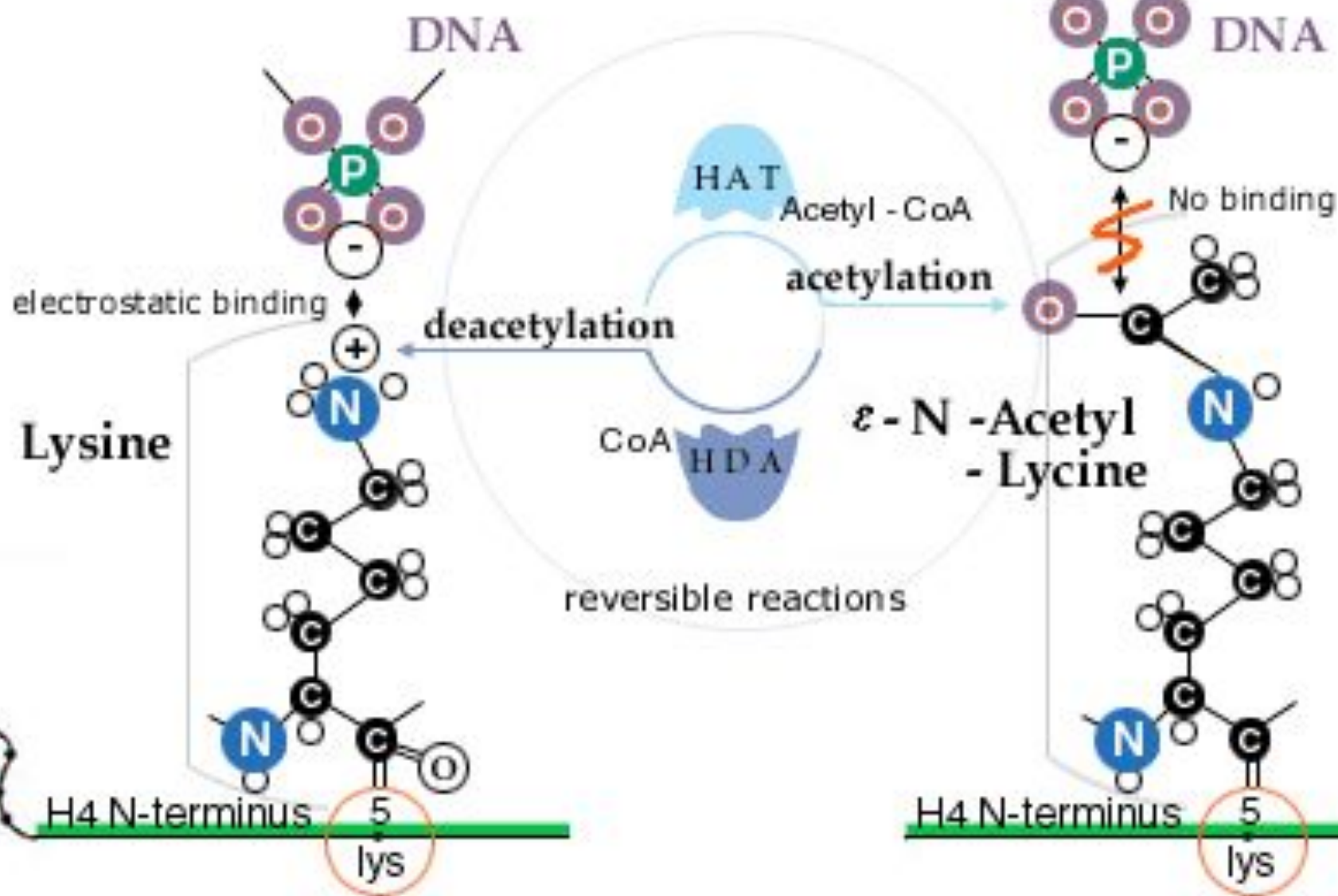
Активатор гена рекрутирует ацетилтрансферазу гистонов



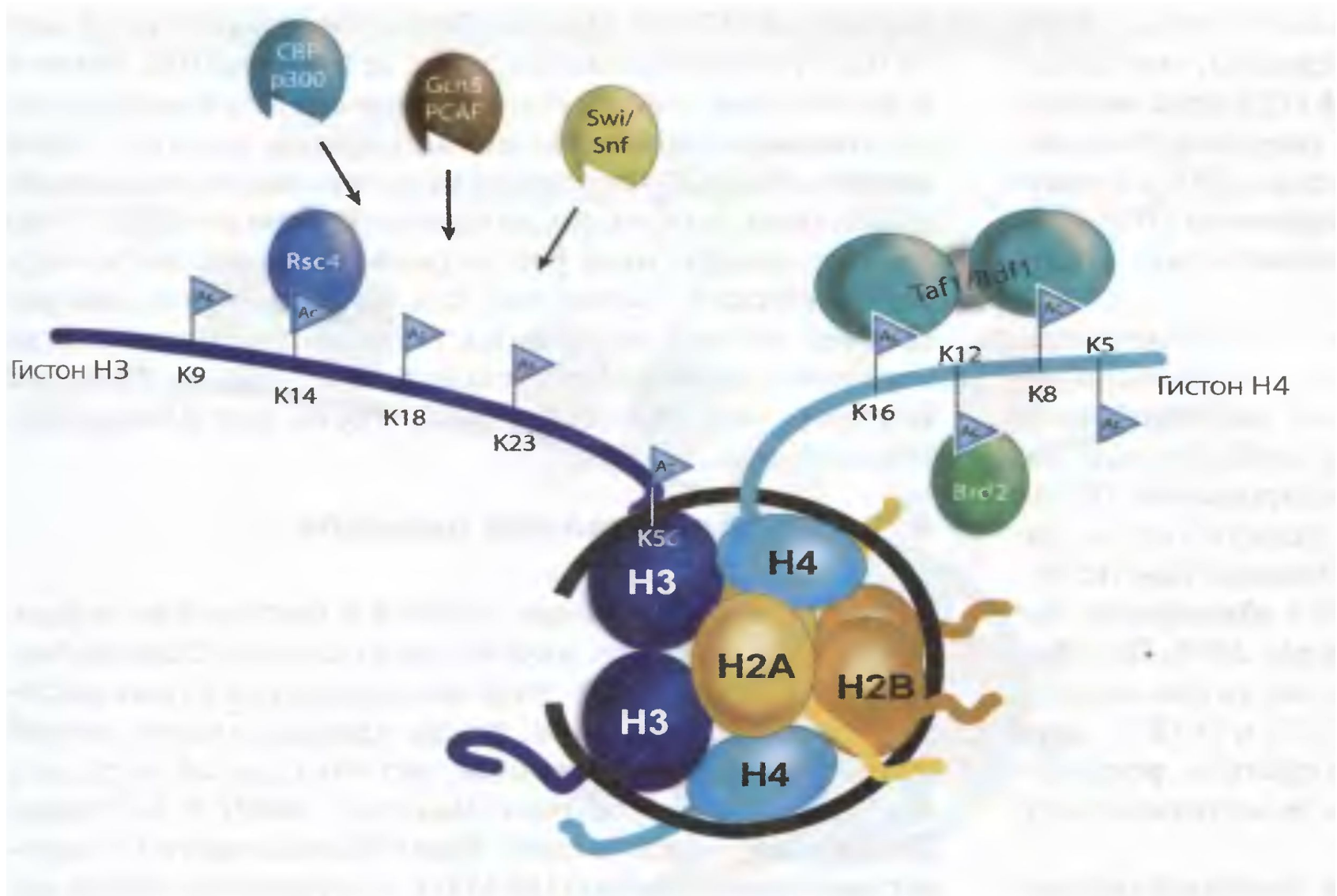
Репрессор гена рекрутирует деацетилазу гистонов

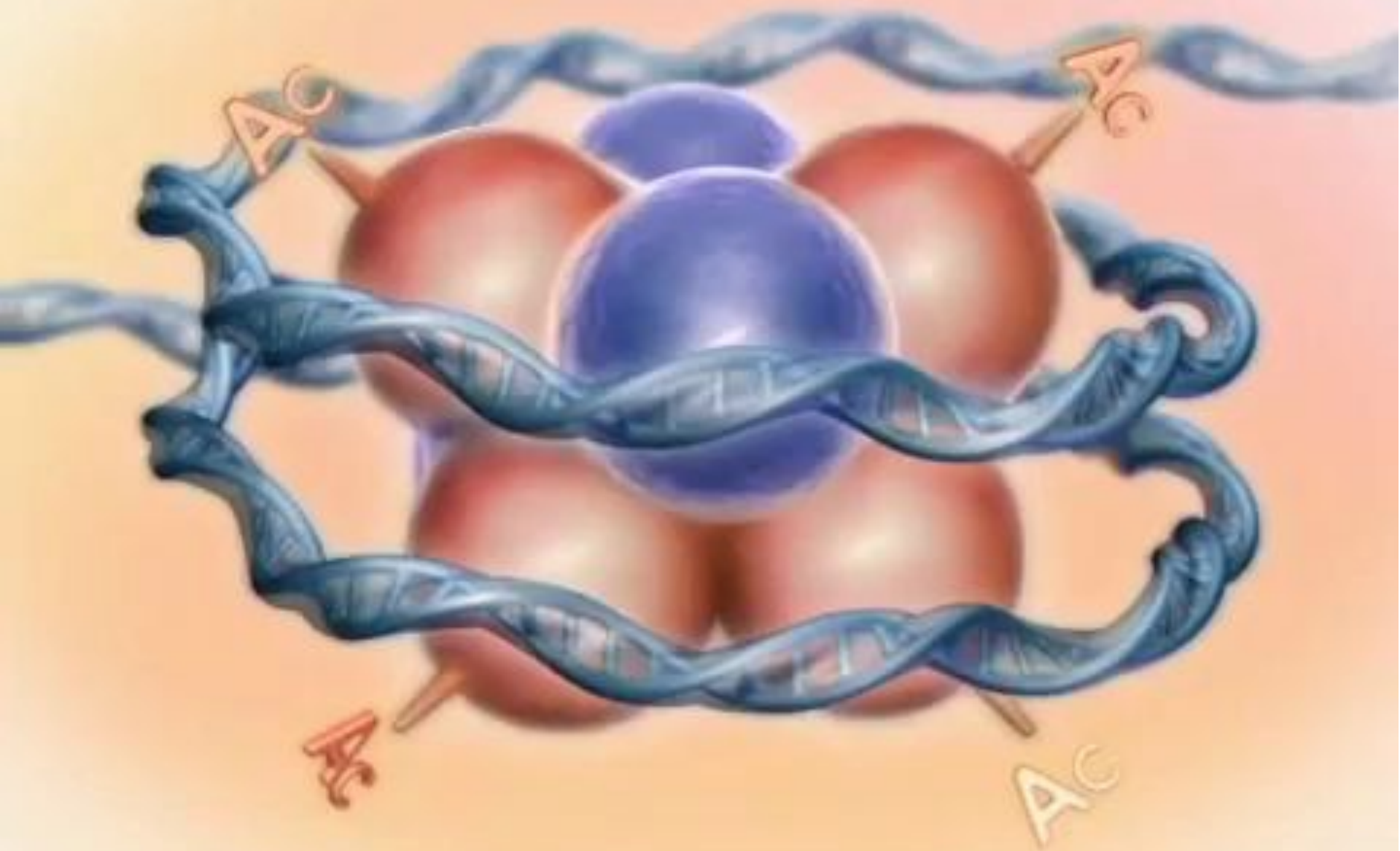


- Ацетилтрансферазы гистонов (НАТ) рекрутируются активаторами, которые связываются с активирующими последовательностями (UAS: upstream activating sequences)
- Деацетилазы гистонов активируются репрессорами транскрипции, которые связываются с URS: upstream repressing sequences

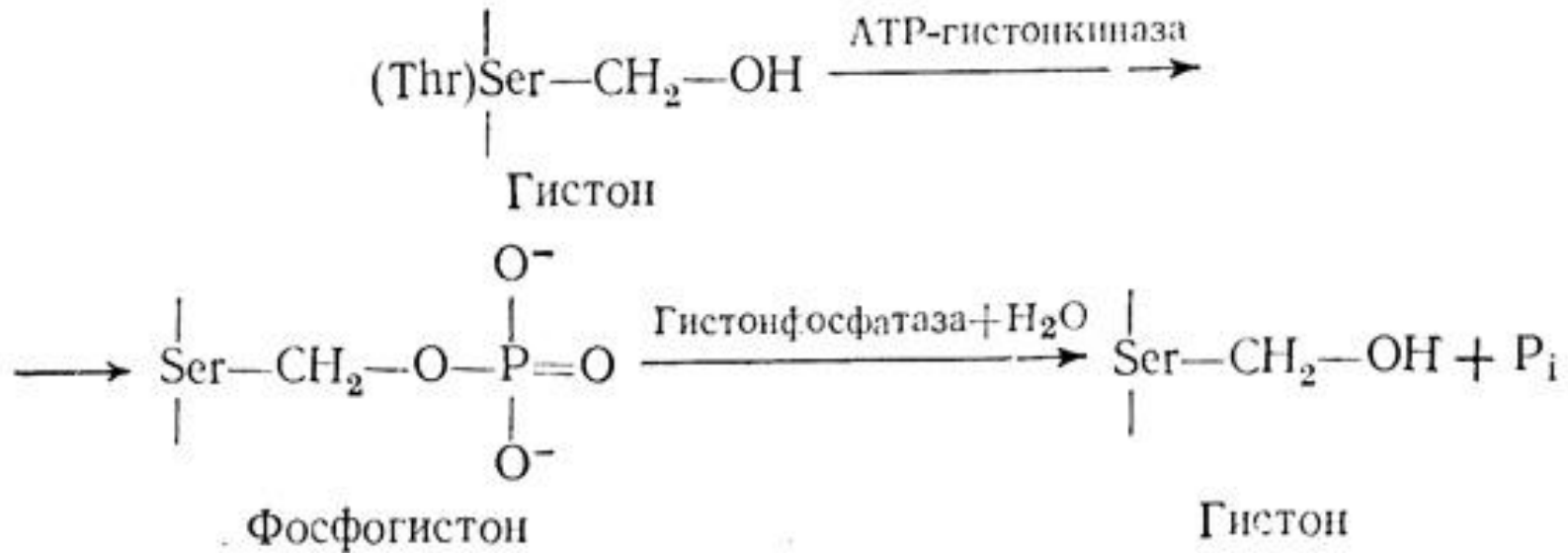


Сайты ацетилирования гистонов



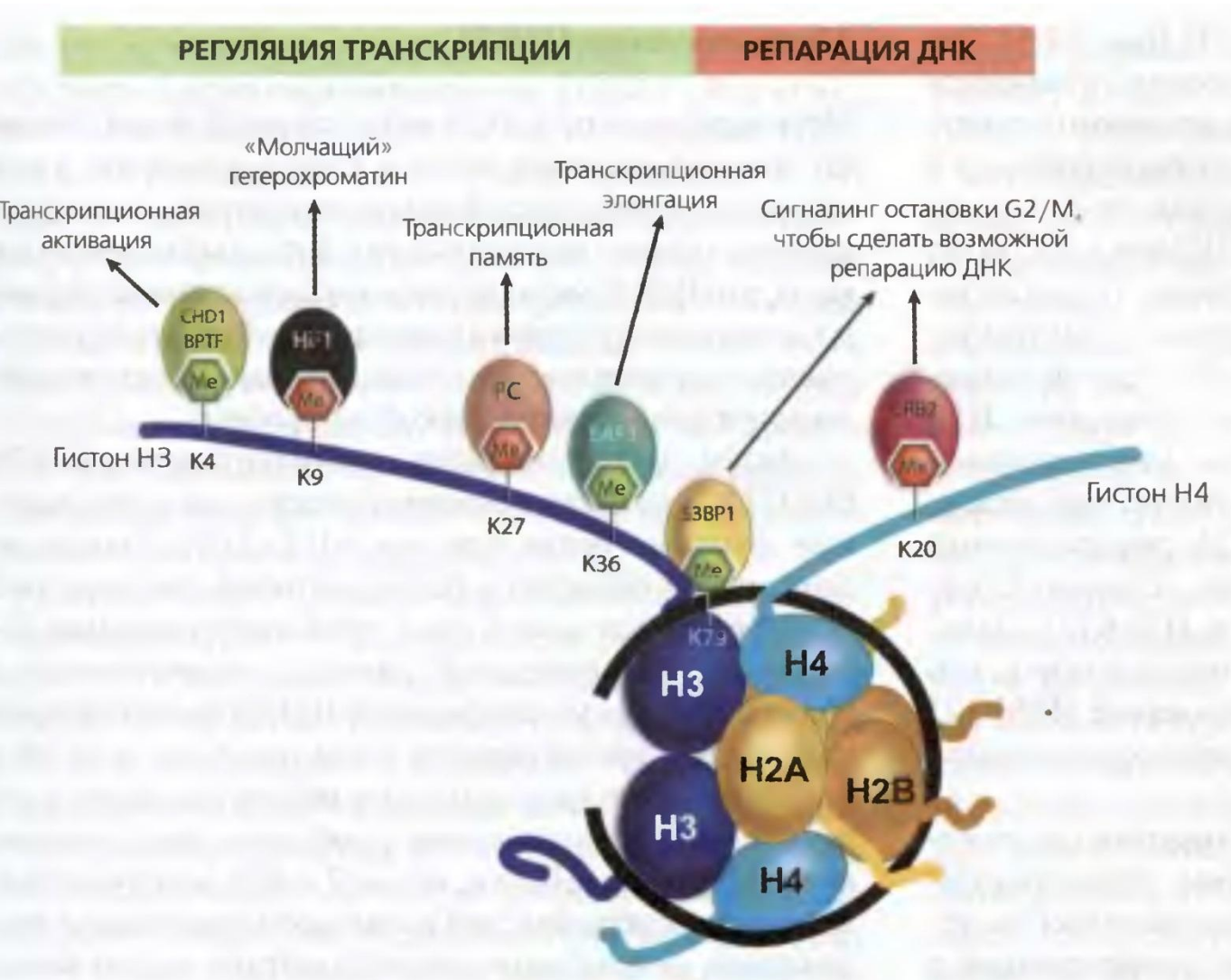


Фосфорилирование гистонов



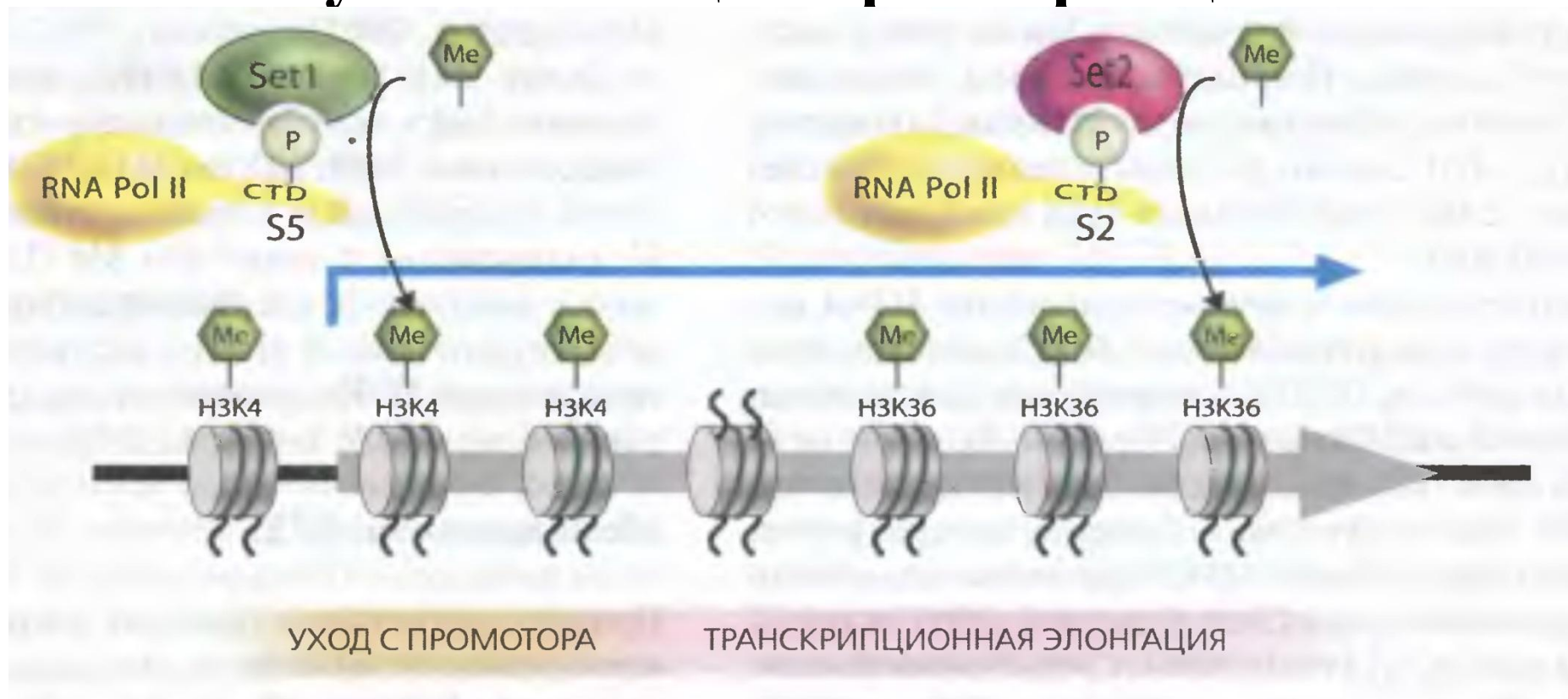
- Увеличение экспрессии генов коррелирует с фосфорилированием остатка Ser10 в гистоне H3 (H3S10)
- Этот сайт является мишенью для многих киназ: Msk1/2 у *Drosophila*, Rsk2 у млекопитающих и SNF-1 у *S. cerevisiae*

Метилирование H3 и H4 по остаткам Lys (HKMTs)



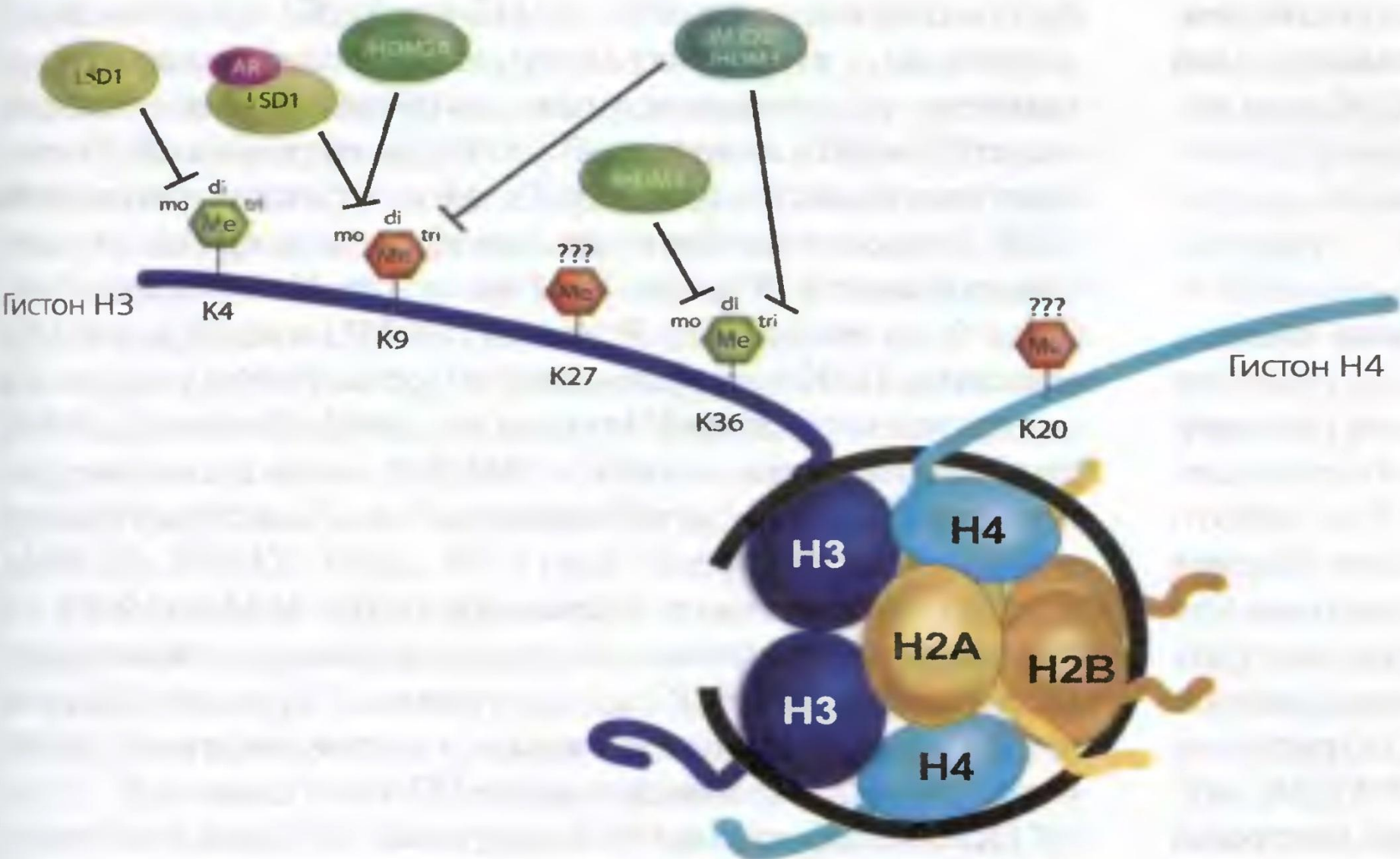
Красный –
репрессия
транскрипции
Зеленый –
активация
транскрипции

Роль метилирования гистонов по остаткам Lys в элонгации транскрипции



- RNA-pol II рекрутирует разные типы НКМТs в зависимости от состояния фосфорилирования её С-концевого домена (CTD). RNA-pol II активируется для инициации транскрипции поблизости от промотора, когда Ser5 фосфорилирован. При этом рекрутируется Set 1 НКМТ для метилирования H3K4. Фосфорилирование Ser2 происходит в ходе элонгации транскрипции. При этом рекрутируется Set 2 НКМТ для метилирования H3K36

Деметилирование гистонов



Метилирование гистонов по Arg (Protein arginine-methyltransferases: PRMTs)

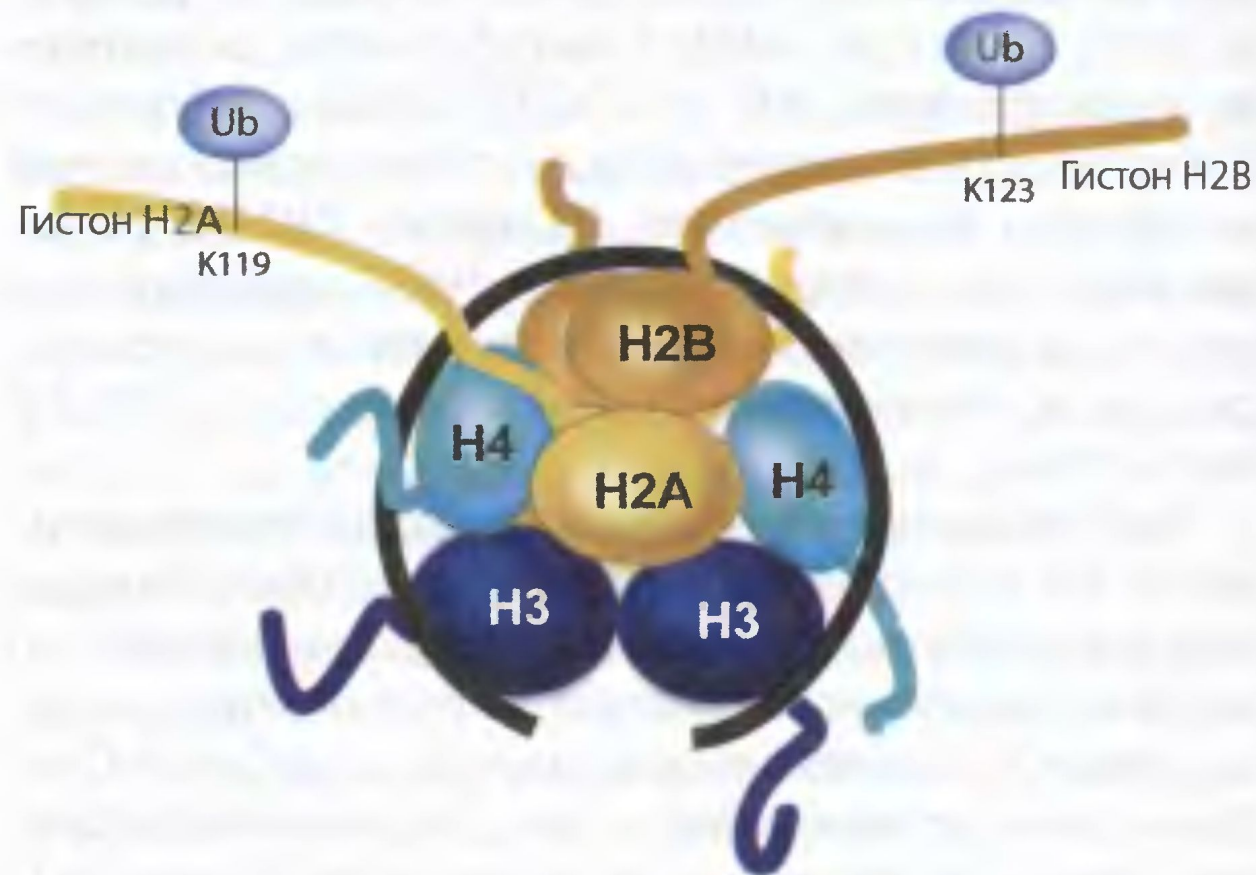
- Участвует как в позитивной, так и в негативной регуляции транскрипции:
- PRMT1 – H4R3 – upregulation
- PRMT4 – H3R2, H3R17, H3R26 – upregulation

Recruit p53, NFκB

- PRMT5 – H3R8, H4R3 – downregulation MYC

Убиквитирование/Деубиквитирование и сумоилирование гистонов

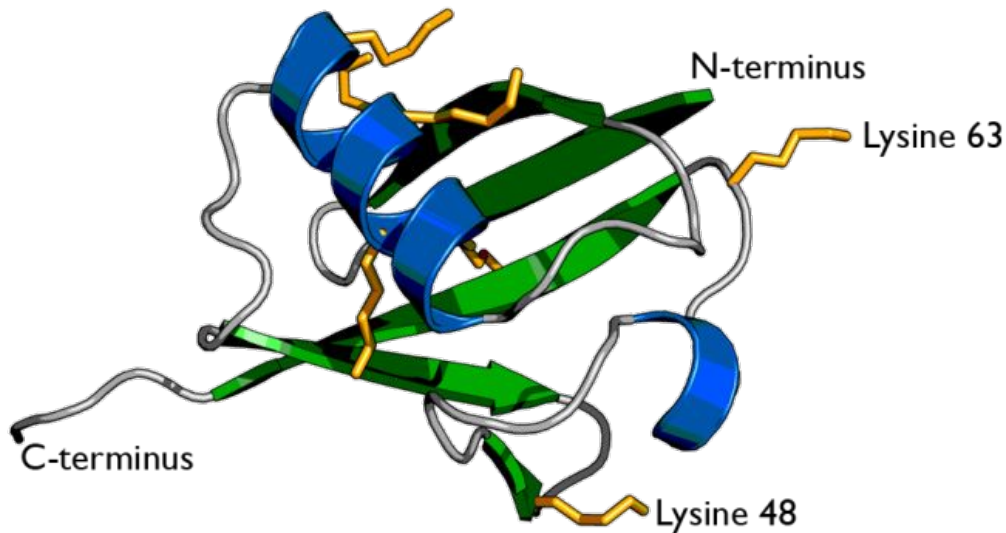
ТРАНСКРИПЦИОННАЯ
РЕПРЕССИЯ



- H2AK119ub – downregulation
- H2BK123ub - upregulation

Ub и SUMO - это крупные полипептиды, которые увеличивают размеры гистона приблизительно на две трети. Ub и SUMO на 18% идентичны по нуклеотидной последовательности и имеют общую трехмерную структуру, но различаются по поверхностному заряду.

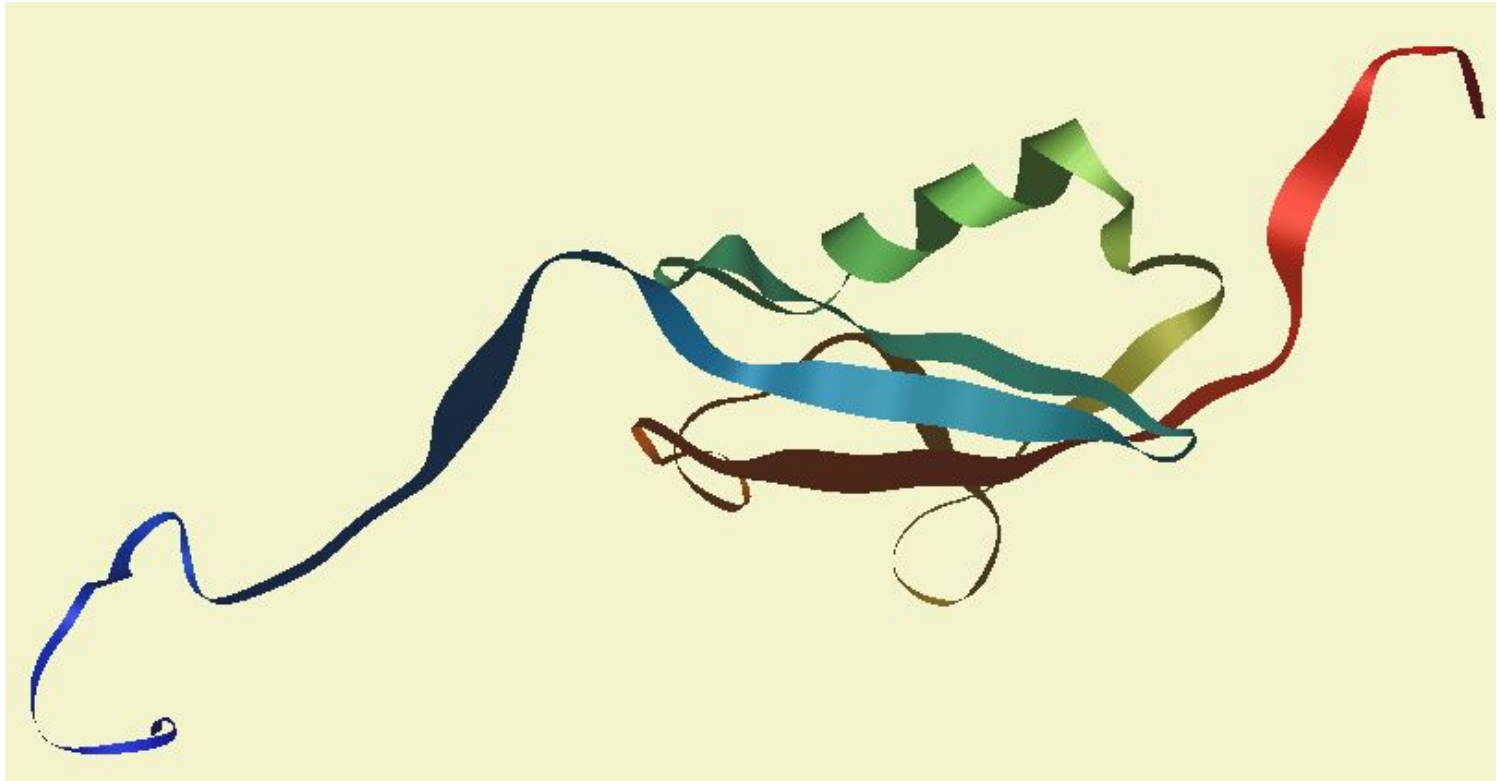
Трехмерная модель убиквитина



Убиквитин (от англ. ubiquitous — вездесущий) — небольшой (8.5 кДа) консервативный белок эукариот, участвующий в регуляции процессов внутриклеточной деградации других белков, а также их функций. Он присутствует почти во всех тканях многоклеточных эукариот, а также у одноклеточных эукариотических организмов.

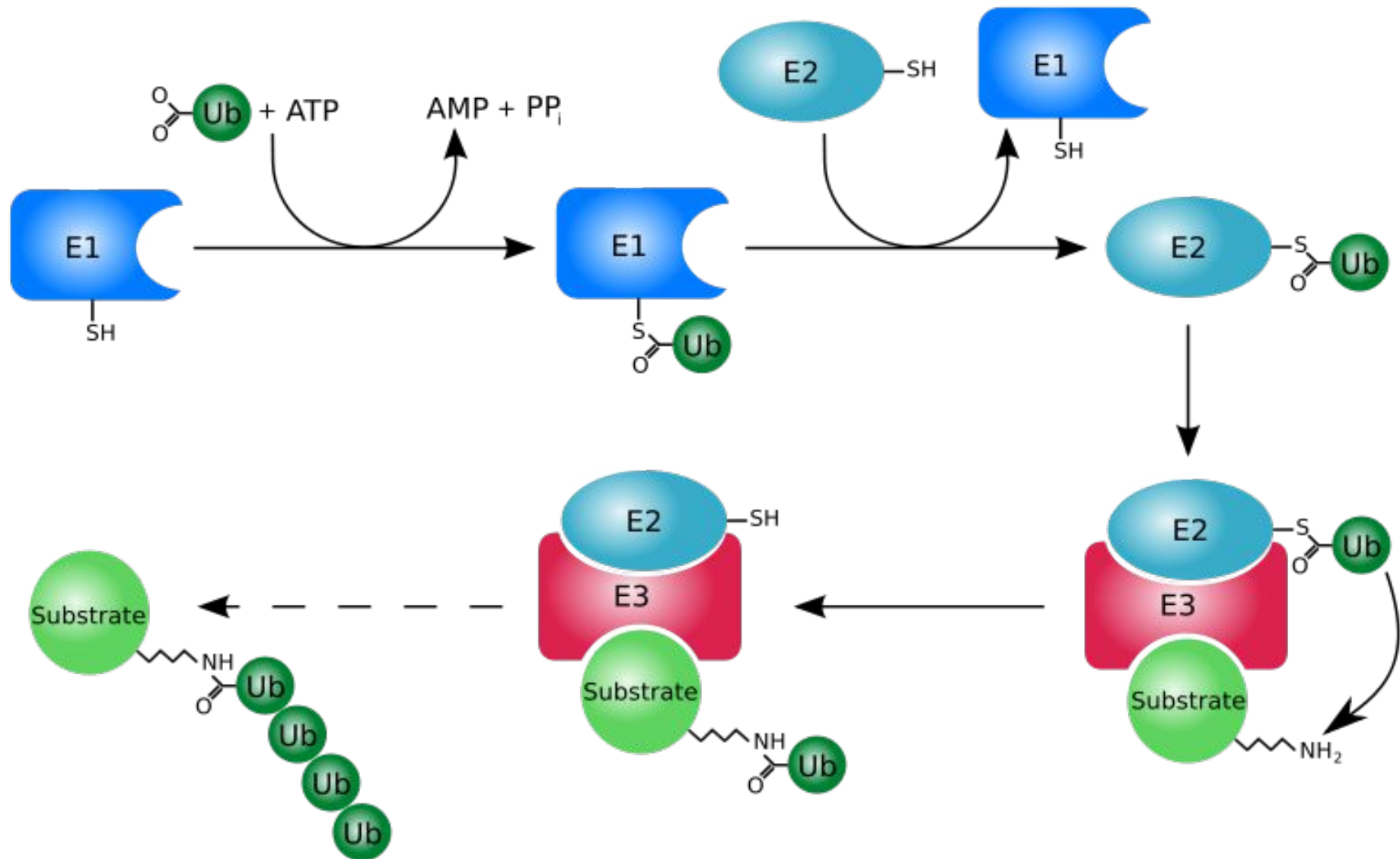
Убиквитин был открыт в 1975 году [Гидеоном Голдштейном](#) с соавторами и охарактеризован в 70—80-х годах XX века. В [геноме человека](#) есть четыре гена, кодирующих убиквитин: [UBB](#), [UBC](#), [UBA52](#) и [RPS27A](#).

Трехмерная модель SUMO



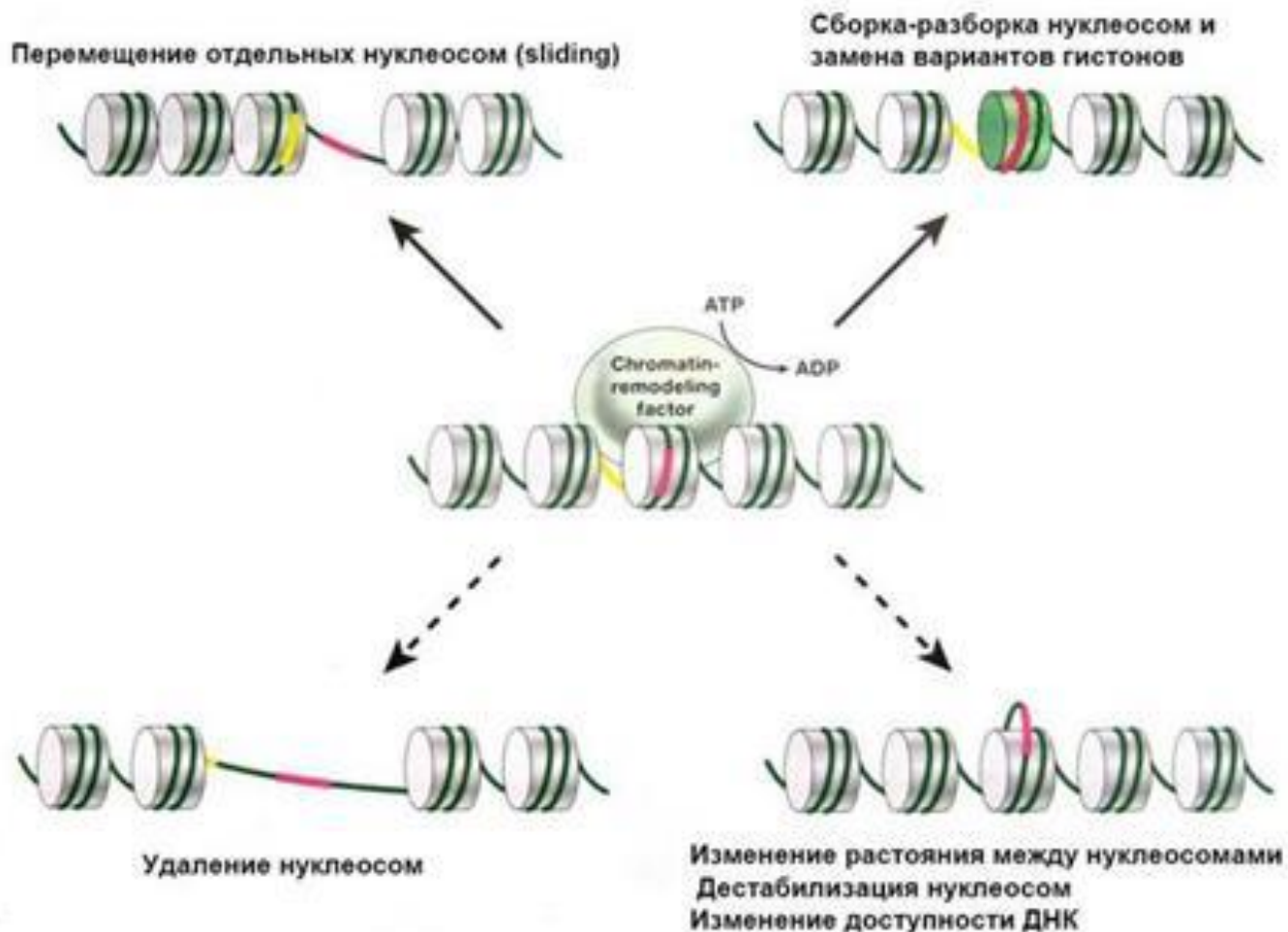
Белки **SUMO** (от англ. *Small Ubiquitin-related Modifier*) - семейство маленьких белков, ковалентно связываются и отделяются от других белков клетки, изменяя их функцию.

Убиквитинирующая ферментная система



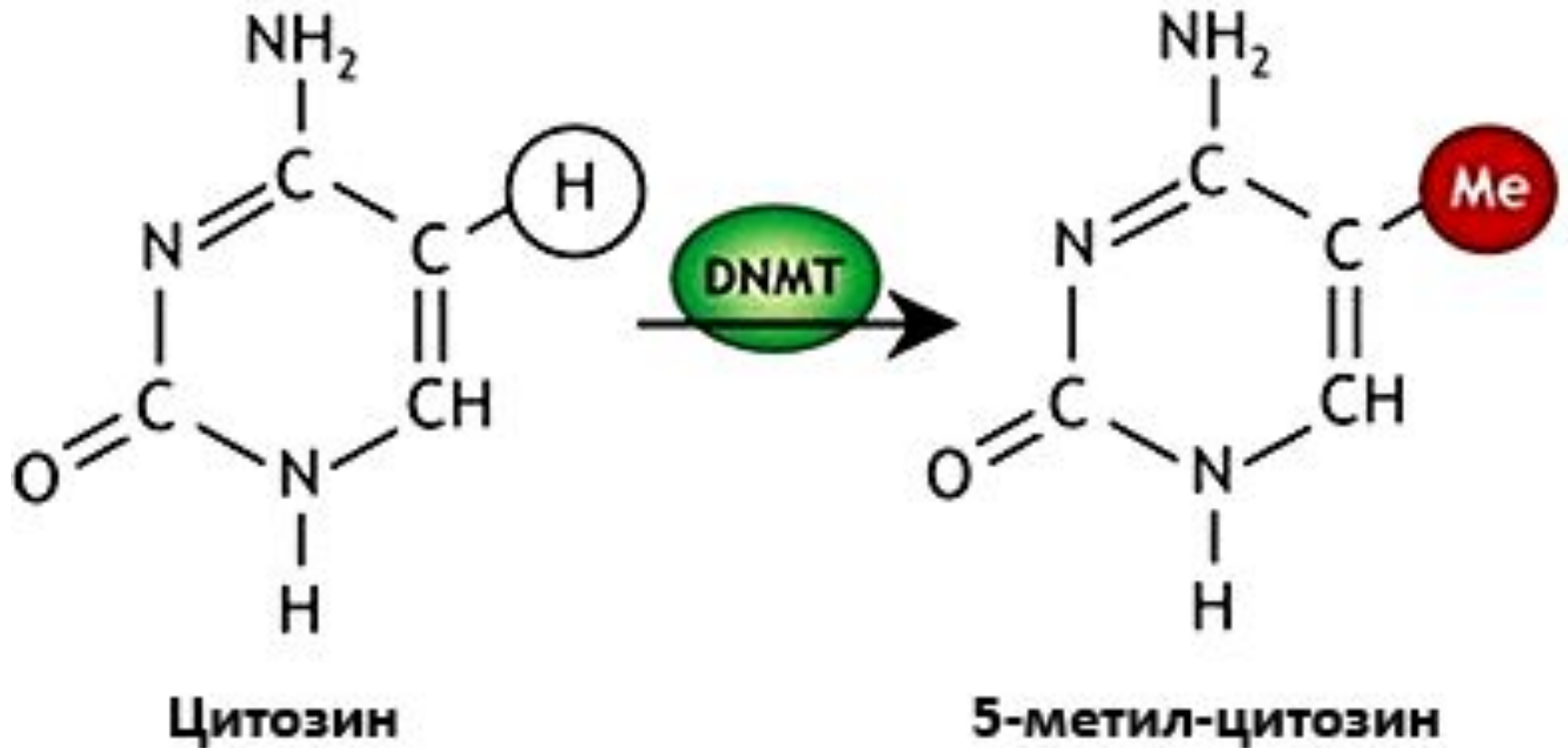
Ремоделирование хроматина

Ремоделинг - это изменение связывания ДНК с гистонами

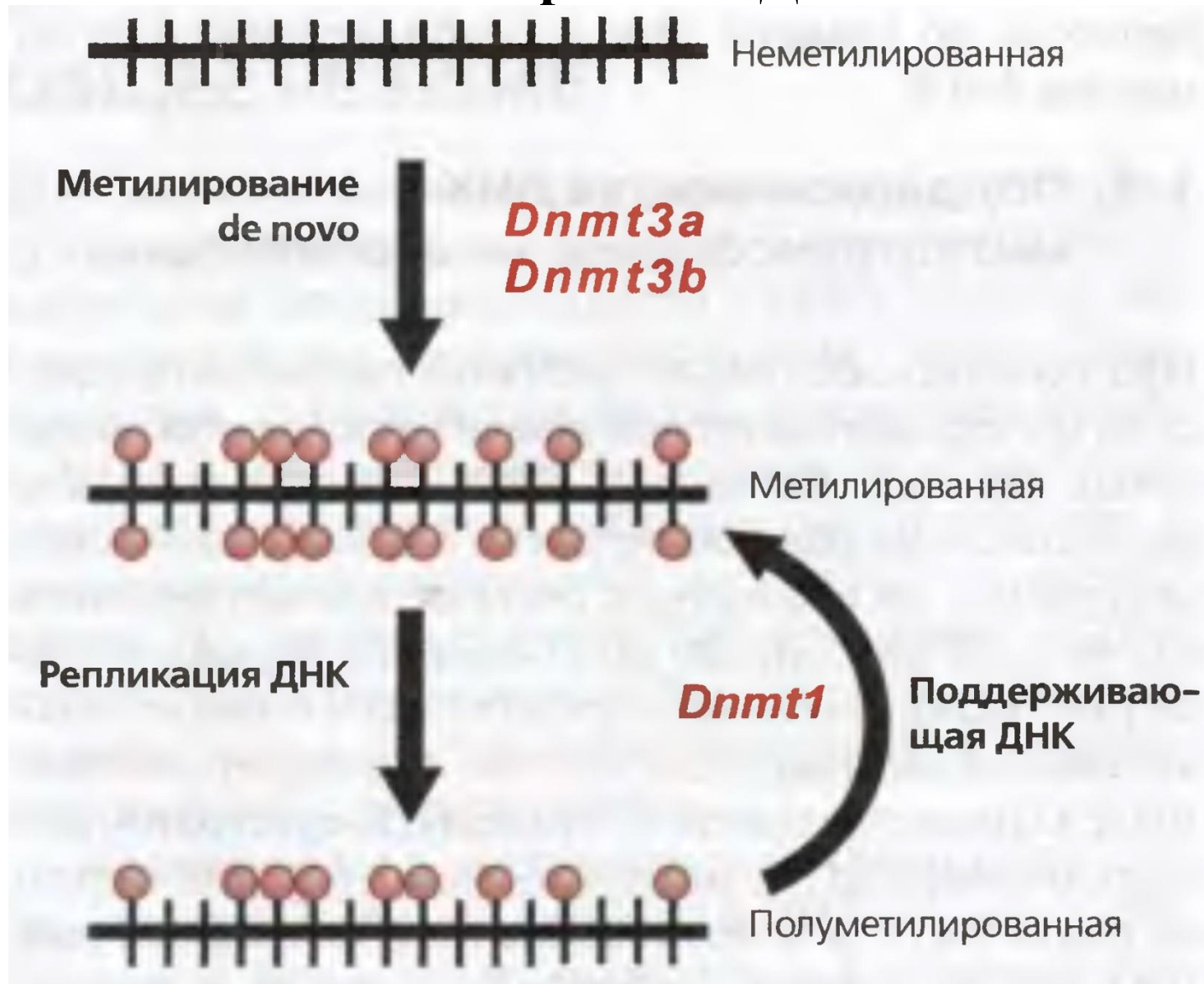


Метилирование ДНК

**ДНК позвоночных животных ковалентно
модифицируется метилированием цитозина в
динуклеотидной последовательности 5' CpG 3'**



Метилирование de novo и поддерживающее метилирование ДНК



Метилтрансферазы ДНК млекопитающих



- Каталитические домены Dnmt1, Dnmt2 и Dnmt3 – консервативны
- PCNA – домен, взаимодействующий с PCNA (Proliferating cell nuclear antigen)
- NLS – nuclear localization signal (сигнал ядерной локализации)
- RFT – replication focus targeting domain (домен, нацеливающий на фокусы репликации)
- CXXC – домен богатый остатками Cys; предположительно ответственен на связывание с CpG-содержащими последовательностями в ДНК
- BAN – bromo-adjacent homology. Участвует в белок-белковых взаимодействиях
- PWWP – домен, содержащий высококонсервативную последовательность Pro-Trp-Trp-Pro, участвующий в ассоциации с гетерохроматином
- ATRX – богат Cys, участвует в белок-белковых взаимодействиях

Картирование метилирования ДНК

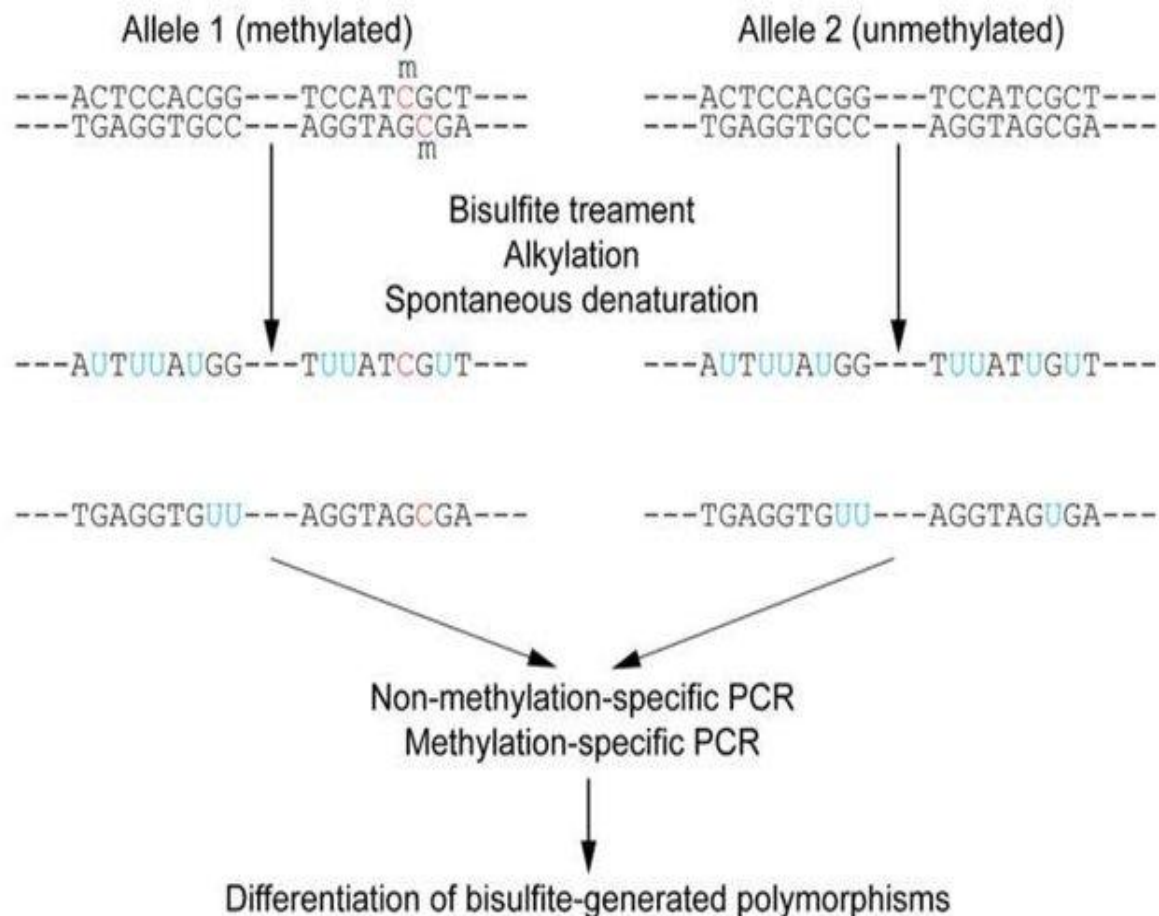
Чтобы понять функции метилирования ДНК, необходимо сначала выяснить, где оно происходит в геноме. Для этого существуют несколько методов, каждый из которых имеет свои преимущества и недостатки.

- Поскольку метилирование ограничено в основном последовательностями CpG, для картирования широко использовали расщепление рестрикционными ферментами, распознающими содержащие CpG нуклеотидные последовательности ДНК (Bird and Southern, 1978). Преимущество этого метода заключается в том, что можно протестировать большие участки генома, но он ограничен динуклеотидами CpG, которые обнаруживаются в сайтах рестрикционных ферментов.
- Надежный метод тестирования всех цитозинов в данном участке включает **бисульфитную модификацию** однонитевой ДНК (Frommer et al., 1992). Это приводит к дезаминированию немодифицированных цитозинов, но 5-метилцитозин остается защищенным. В результате цитозины, сохраняющиеся после обработки бисульфитом, идентифицируются как метилированные. Благодаря своей высокой разрешающей способности и позитивной идентификации метилированных цитозинов этот метод является предпочтительным для анализа паттернов метилирования ДНК, хотя детальный анализ больших участков занимает много времени.
- Несколько **методов, базирующихся на ПЦР**, которые зависят от предшествующей бисульфитной обработки, были разработаны для того, чтобы ускорить анализ интересующих исследователя районов (см., например, Herman et al., 1996). Эти методы очень удобны, но, фокусируясь на нескольких немногих сайтах CpG, они жертвуют детальной информацией, которая была бы получена при бисульфитном секвенировании.
- Недавно для картирования метилирования ДНК были использованы микрочипы (microarrays). Например, ДНК, устойчивая к деградации специфичной к 5-метилцитозину нуклеазой MspI, может быть использована как зонд для работы с последовательностями геномной ДНК методом tiled arrays, чтобы получить общую картину уровня метилирования в специфическом участке (Martienssen et al., 2005). Можно также провести иммунопреципитацию зондов для tiled arrays, используя специфичные к 5-метилцитозину антитела, что позволяет получить общую картину уровней метилирования ДНК (Weber et al., 2005).

Бисульфитное секвенирование

- Прямое секвенирование
- Пиросеквенирование
- Чувствительный к метилированию анализ одноцепочечных конформаций
- Методы высокочувствительного плавления
- Чувствительный к метилированию метод однонуклеотидного удлинения праймера
- Расщепление, специфичное к основанию
- Метилированно-специфичная ПЦР (MSP)
- Методы, основанные на микрочипах

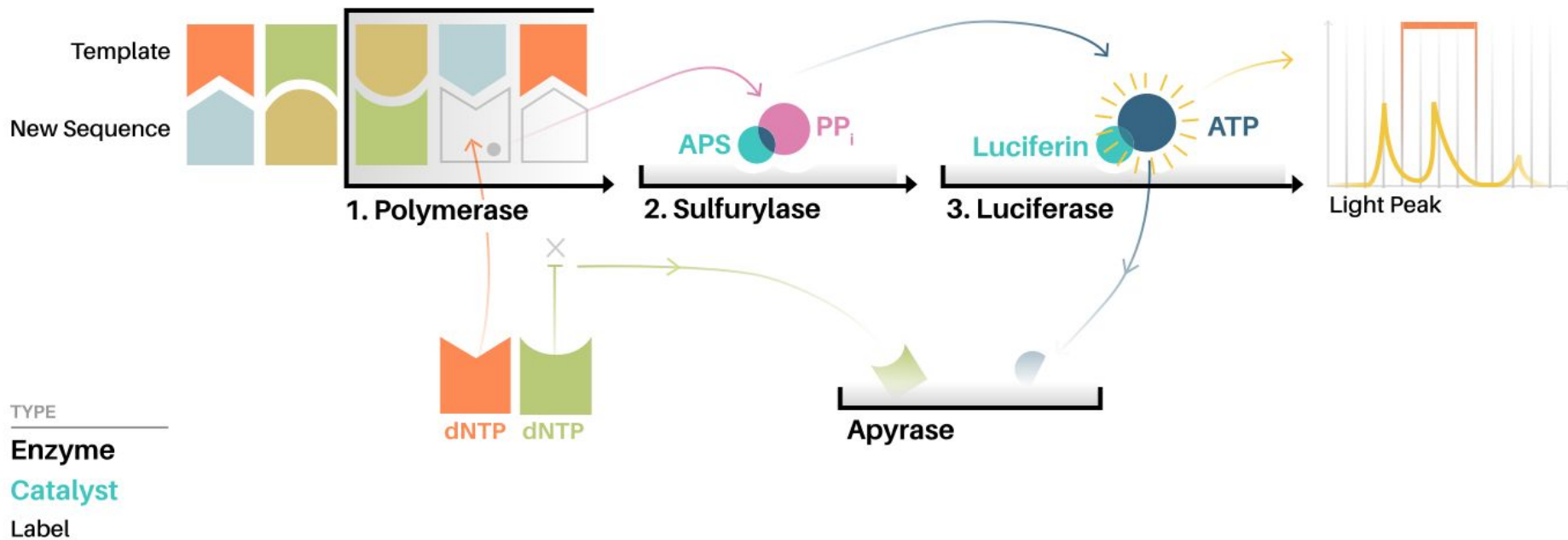
Бисульфитное секвенирование – определение метилированных CpG



Прямое секвенирование

Первый метод бисульфитного секвенирования описан в 1992 году. Для определения паттерна метилирования использовали ПЦР, [праймеры](#) для которой были специфичными как к изменённой, так и к неизменённой бисульфитом ДНК, то есть они не содержали цитозинов, входящих в [СpG-динуклеотиды](#). Для праймеров использовали участки, близкие к интересующему сайту метилирования, но не содержащие его. В случае, когда цитозин не был метилирован, в амплифицированной последовательности обнаруживался [урацил](#), а в [синтезированной комплементарной](#) последовательности — [аденин](#). Если цитозин был метилирован, то в амплифицированной последовательности он и остался, а в комплементарной синтезировался [гуанин](#). Такой метод очень трудозатратен, поскольку требует клонирования продуктов ПЦР для достижения необходимой чувствительности.

Пиросеквенирование



Пиросеквенирование — это метод секвенирования ДНК (определение последовательности нуклеотидов в молекуле ДНК), основанный на принципе «секвенирование путём синтеза». При включении нуклеотида происходит детекция высвобождающихся пирофосфатов. Технология была разработана [Полом Ниреном](#) и его студентом [Мустафой Ронаги](#) в [Королевском технологическом институте \(Стокгольм\)](#) в 1996 году

Идея пиросеквенирования заключается в регистрации пирофосфата, который образуется при присоединении очередного нуклеотида [ДНК-полимеразой](#). Детекция пирофосфата осуществляется за счёт каскада [химических реакций](#), который заканчивается выделением [кванта света](#).

Прежде всего создаётся иммобилизованная на твёрдой фазе клональная [библиотека](#) одноцепочечных фрагментов ДНК (например, при помощи мостиковой [полимеразной цепной реакции](#), ПЦР). Ко всем фрагментам ДНК присоединяется адаптер, с которым будет [комплементарно](#) связываться [праймер](#) — затравка для синтеза комплементарной цепи ДНК-полимеразой. Далее производится серия последовательных циклов, в процессе которых к закреплённой на твёрдой фазе ДНК по очереди добавляют dNTPs всех четырёх типов: А, Т, G, С. Если на секвенируемой цепи ДНК есть комплементарный к добавленному нуклеотид, то при образовании [фосфолиэфирной связи](#) побочным продуктом станет пирофосфат. Он активирует каскад химических реакций: пирофосфат вместе с аденозинсульфофосфатом (АСФ) при помощи [фермента АТФ-сульфорилазы](#) образуют [АТФ](#), который является источником энергии для проведения реакции окисления [люциферина](#) в оксильюциферин с выделением кванта света. Интенсивность выделяемого света пропорциональна числу включённых в цепь нуклеотидов (чем больше подряд одинаковых нуклеотидов, тем сильнее световой сигнал). Детекция света осуществляется ПЗС-матрицей и анализируется с помощью программного обеспечения, которое строит по пирограмме последовательность нуклеотидов. Нуклеотиды, не вовлечённые в синтез новой цепи, а также АТФ разрушаются ферментом [апиразой](#). После этого начинается следующий цикл, то есть добавляется нуклеотид другого типа

В пиросеквенировании используют ПЦР с праймерами, амплифицирующими как изменённую, так и не изменённую бисульфитом ДНК. Соотношение числа метилированных и неметилированных цитозинов в амплифицируемой последовательности определяется по соотношению количества [нуклеотидов А](#) и [Г](#) в синтезируемой комплементарной последовательности.

Чувствительный к метилированию анализ одноцепочечных конформаций (*single-strand conformation polymorphism analysis, SSCA*)

- Этот метод основан на методе анализа одноцепочечных конформационных полиморфизмов
- SSCA был разработан для выявления однонуклеотидных полиморфизмов (SNP). Фрагменты ДНК одинаковой длины, но разной нуклеотидной последовательности, с разной скоростью перемещаются в электрофорезе. SSCA недостаточно чувствителен для выявления единичной замены, но при достаточном количестве полиморфизмов неметилированных CpG-динуклеотидов в обработанной и необработанной бисульфитом ДНК будет достаточно много, чтобы чувствительности метода оказалось достаточно для определения доли метилированных цитозинов на рассматриваемом участке. Данный метод не позволяет исследовать метилирование в конкретном сайте, однако дает представление о метилировании на уровне некоторого участка или даже всего генома.

Методы высокочувствительного плавления

High Resolution Melt (HRM)

Метод высокочувствительного плавления (HRM) основан на ПЦР в реальном времени. Температуру повышают с 55 до 95 °C, в результате чего комплементарные связи между цепочками разрушаются. Скорость плавления регистрируют при помощи специальных флуоресцентных красителей, и, зная зависимость флуоресценции от нуклеотидной последовательности цепочек, можно различить однонуклеотидные полиморфизмы. Метод не дает информации о том, какие именно CpG-динуклеотиды были метилированы и потому не изменились в процессе бисульфитной обработки, однако дает достаточно точную информацию об их количестве на интересующем участке.

Чувствительный к метилированию метод однонуклеотидного удлинения праймера

Метод однонуклеотидного расширения праймера исходно был разработан для анализа SNP. Применительно к анализу метилирования его используют следующим образом. На обработанной бисульфитом одноцепочечной ДНК отжигают праймеры до пары оснований, непосредственно предшествующей интересующему сайту метилирования. Затем праймер удлиняется при помощи ДНК-полимеразы с использованием терминирующих её ddNTPs. Соотношение числа метилированных и неметилированных цитозинов в исходной последовательности определяется по соотношению количеств расширений праймеров нуклеотидами Г и А соответственно. Определить соотношение числа метилированных и неметилированных цитозинов в исходной последовательности можно разными способами.

Используют радиоактивные или флуоресцентные метки, а также пиросеквенирование.

Кроме того, это можно делать при помощи матрично-активированной лазерной десорбции/ионизации с последующим применением время-пролетного масс-анализатора (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-flight Mass Spectrometry: MALDI-TOF) или ион-парной обращенно-фазной высокоэффективной жидкостной хроматографии (IP-RP-HPLC).

Расщепление, специфичное к основанию

Метод основан на использовании специфического расщепления РНК. При добавлении к праймеру в ПЦР промотора РНК-полимеразы *in vitro* синтезируется РНК-транскрипт интересующего участка, после чего расщепляется рибонуклеазой А. Рибонуклеаза А расщепляет одноцепочечную РНК на местах расположения нуклеотидов Ц и У. Используя устойчивые к расщеплению нуклеозидтрифосфаты dUTP и dCTP, можно добиться специфического расщепления в местах расположения Ц или У. Фрагменты РНК затем анализируют при помощи MALDI-TOF. Данный метод даёт информацию о метилировании каждого из имеющихся CpG-динуклеотидов, а не только о доле метилированных нуклеотидов.

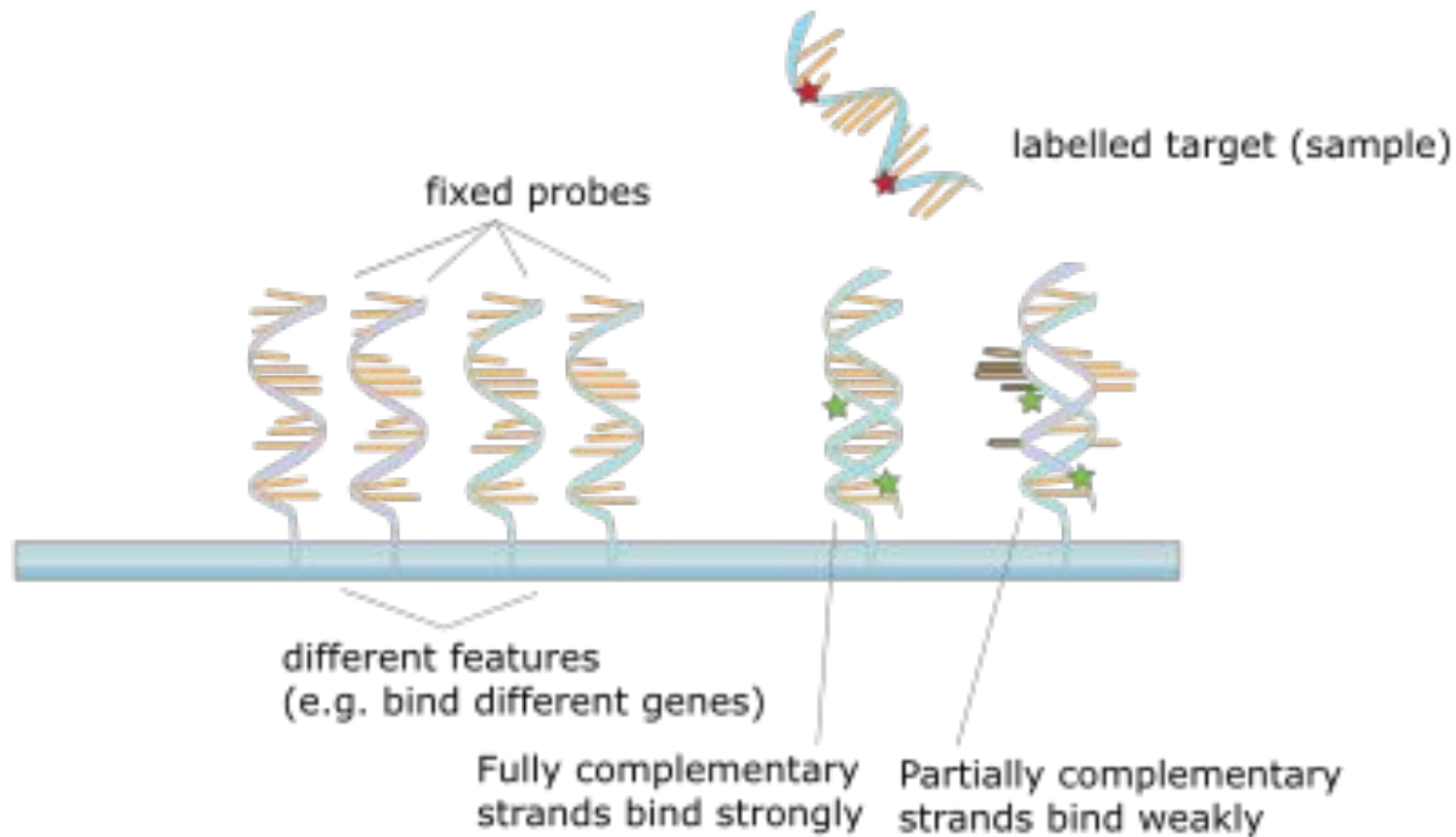
Метилированно-специфичная ПЦР (MSP)

- Этот метод использует праймеры, специфичные или только к преобразованной бисульфитом ДНК, или только к непреобразованной. Соответственно, к первым праймерам прикрепляются только участки, которые были метилированы, а ко вторым — те, которые не были, что избавляет от необходимости секвенировать участки после амплификации.
- Амплифицированную в MSP ДНК можно далее анализировать разными другими методами. Метод **MethyLight** использует MSP в реальном времени, основанную на флуоресценции. **Ms-MSP** использует анализ кривых плавления.
Высокочувствительный метод плавления использует и то, и другое, и потому обладает достаточной чувствительностью для определения метилирования низкого уровня

Методы, основанные на микрочипах (Microarray)

- Использование ДНК-микрочипов дает возможность расширить описанные выше методы для анализа метилированности на уровне всего генома. Олигонуклеотиды ДНК-микрочипа делают специфичными к метилированию и соответствующими интересующим CpG-сайтам. Одни комплементарны измененной бисульфитом последовательности (то есть той, в которой CpG-сайт не был метилирован), другие — к неизменной.

Принцип метода Microarray



Комплементарные ДНК образуют дуплекс, который получается значительно слабее при неполной комплементарности и может быть смыт с чипа. «Хороший» дуплекс будет давать сигнал, в данном случае в виде света

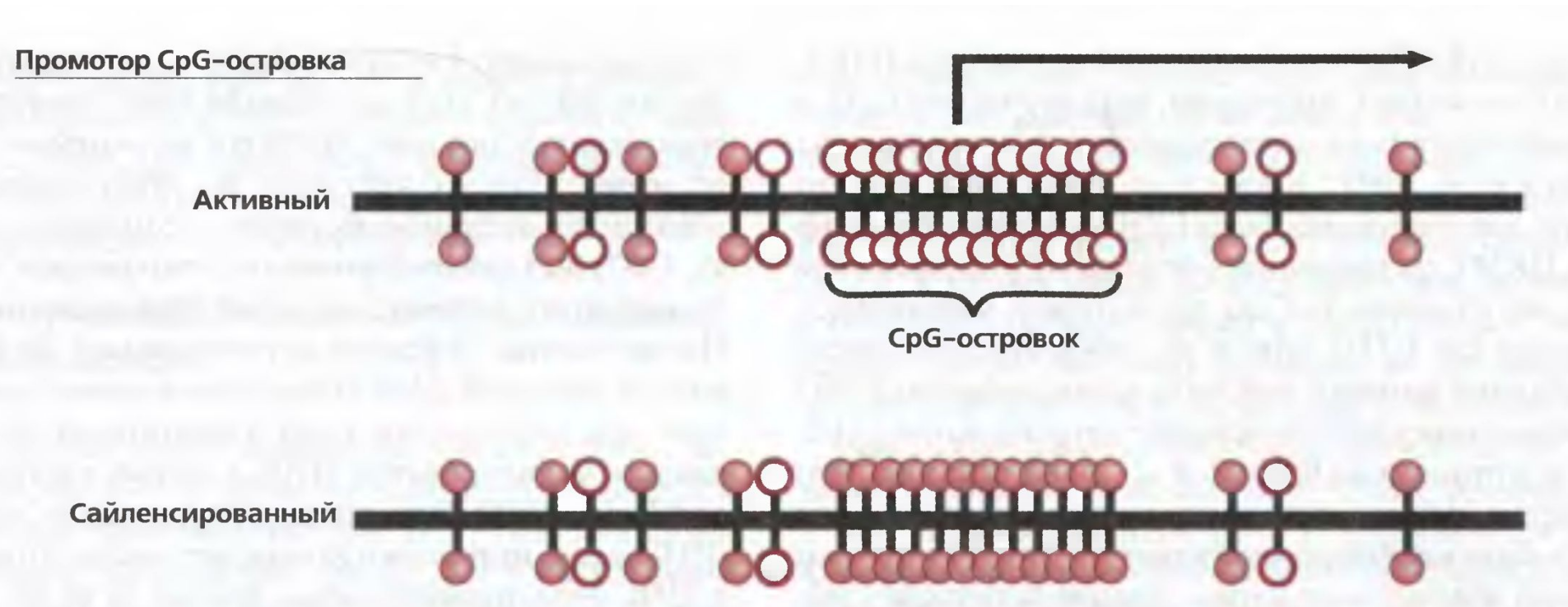
Сборка ДНК-микрочипов

Аmplицированные фрагменты ДНК при помощи микроманипулятора наносят на кремниевые или стеклянные пластины, ковалентно закрепляя зонды. В 1991—1993 годах был предложен другой подход, в основе которого лежала технология **фотолитографии**, используемая в полупроводниковой индустрии. Позже, в 1997 году, был запатентован ещё один метод — **«электрофокусирование»**.

«Печать» ДНК-чипа, выполняемая роботом

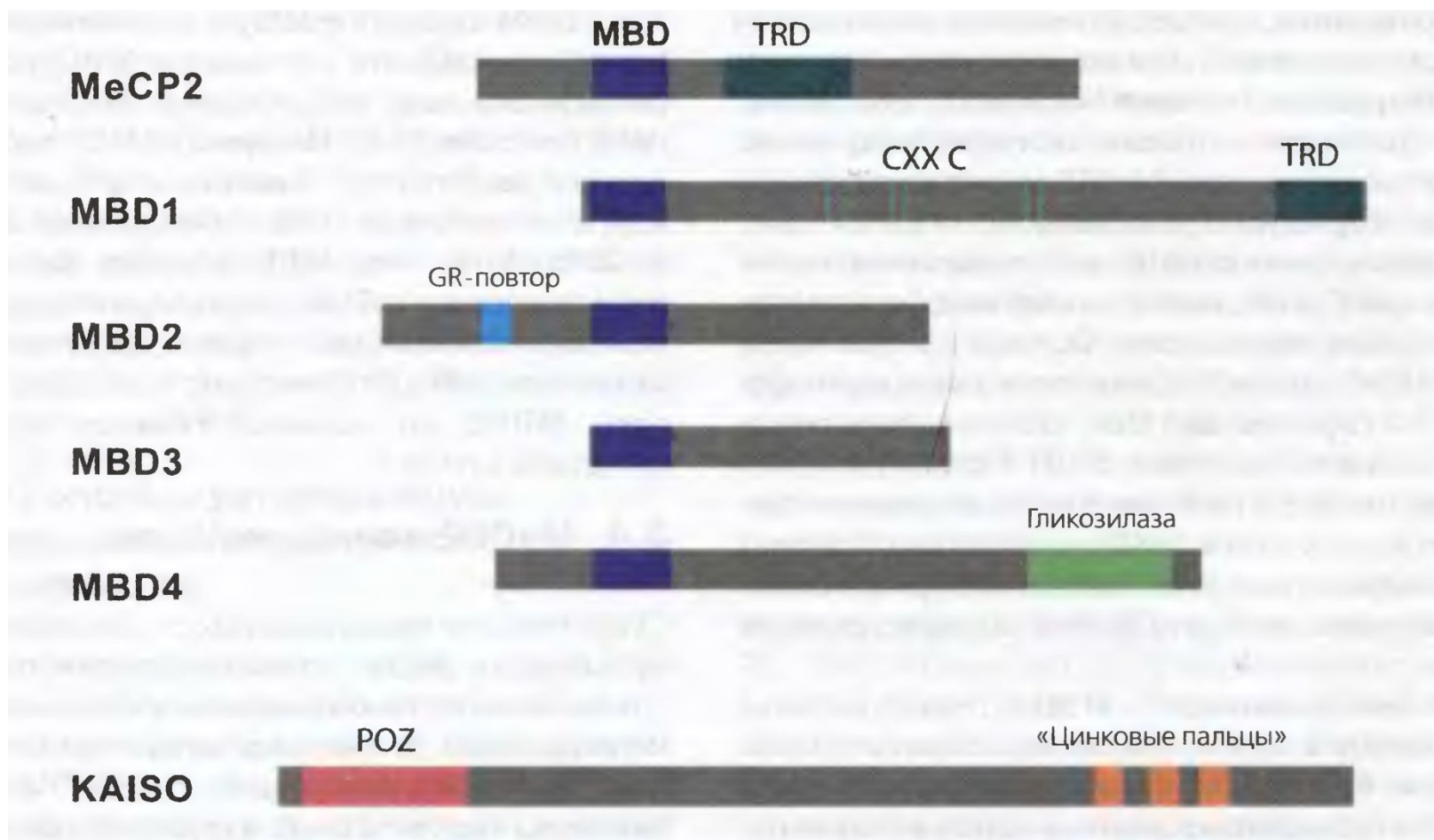


СрG-островки



Островки СрG – это участки высокой плотности СрG, лишенные метилирования и обнаруживаемые в промоторах большинства генов человека. Метилирование СрG-островков обеспечивает долговременный сайленсинг гена. Например, таким путем сайленсированны гены на неактивной X-хромосоме и некоторые импринтированные гены. Кроме того, некоторые гены в раковых клетках aberrантно сайленсированы метилированием СрG-островков.

Белки, связывающиеся с метил-CpG

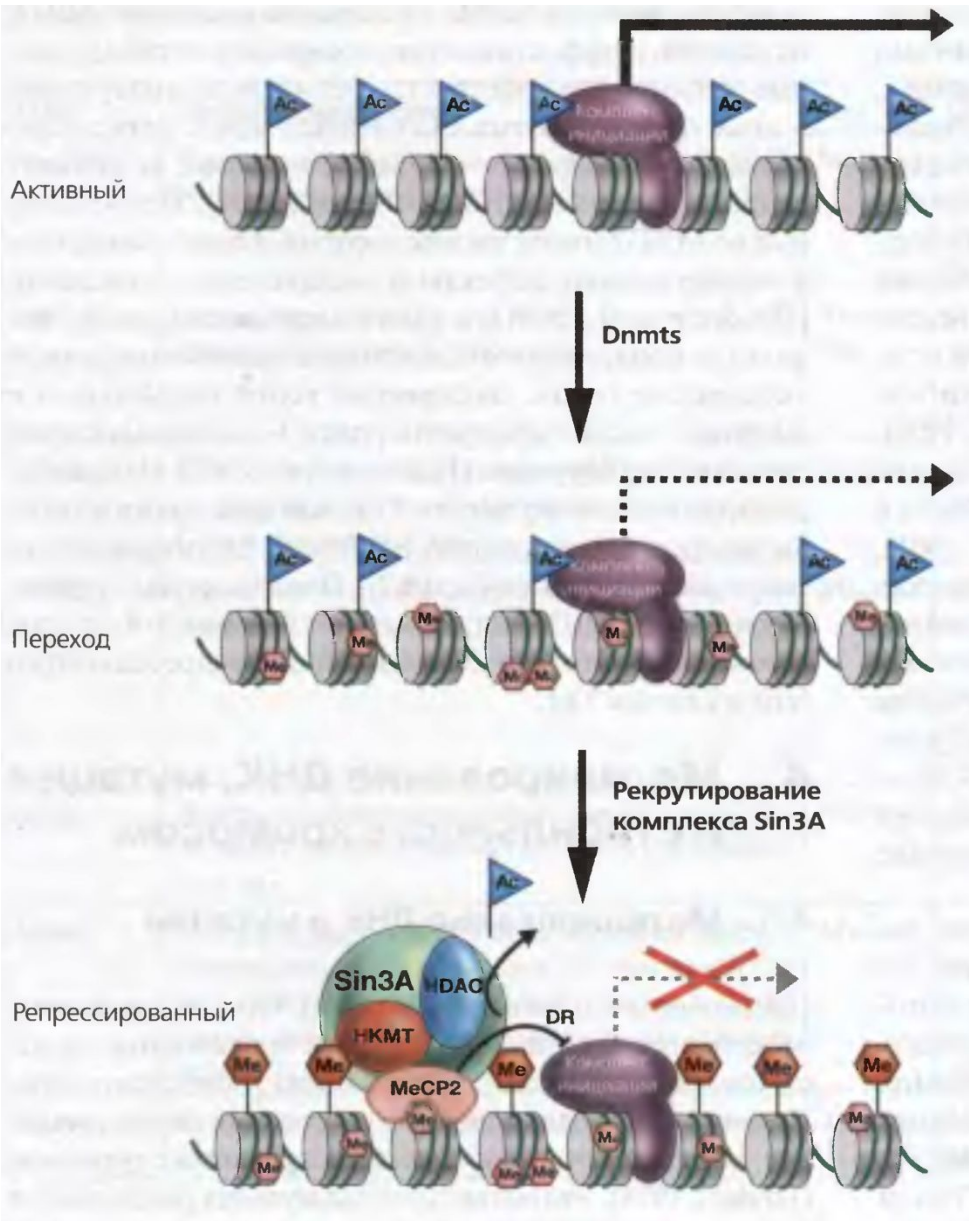


Пять членов белкового семейства MDB, выравненные по их MBD-доменам (*пурпурный цвет*). Обозначены и другие домены, в том числе домены репрессии транскрипции (TRD, transcriptional repression domains); домены CXXC, «цинковые пальцы» (предполагается участие некоторых из них в связывании неметилированных CpG); повторы GR с неизвестной функцией; гликозилазный домен с неправильным спариванием оснований T:G, участвующий в репарации дезаминирования 5-метилцитозина. Белок Kaiso не имеет домена MDB, но связывается с метилированной ДНК через «цинковые пальцы» (*оранжевый цвет*) и обладает доменом POB/VTB, общим с другими транскрипционными репрессорами

Функции белков, связывающих метил-CpG

MBP	Основная активность	Вид	Основные фенотипы мутантов с потерей функции
MeCP2	Связывает mCpG с соседней цепочкой А/Т; транскрипционный репрессор	Мышь	Задержанные нейрологические дефекты, в том числе инертность, hindlimb clasping, неритмичное дыхание и аномальная походка; продолжительность постнатальной жизни ~ 10 недель
MECP2	Связывает mCpG с соседней цепочкой АТ; транскрипционный репрессор	Человек	Гетерозиготы страдают синдромом Ретта — серьезным нейрологическим нарушением, характеризующимся апраксией, утратой целенаправленного использования рук, нарушениями дыхания и микроцефалией
Mbd1	Связывается с mCpG через MBD; основная сплайс-форма способна связываться также с CpG через домен CxxC	Мышь	Никаких явных фенотипов, но выявляются небольшие дефекты в нейрогенезе
Mbd2	Связывается с mCpG; транскрипционный репрессор	Мышь	Жизнеспособные и фертильные, но демонстрируют ослабленное поведение, связанное с материнским кормлением; дефектная регуляция генов при дифференцировке Т-хелперных клеток, приводящая к измененной реакции на инфекцию; высоко устойчивы к образованию опухолей кишечника
Mbd3	Коровый компонент корепрессорного комплекса NuRD; не обнаруживает сильного связывания с mCpG	Мышь	Ранняя эмбриональная леталь
Mbd4	Белок репарации ДНК, связывающийся с mCpG и неправильно спаренными основаниями Т:G в сайтах mCpG; гликозилаза тимина в ДНК, вырезающая Т из неправильно спаренных оснований Т:G	Мышь	Жизнеспособные и фертильные; 3-4-кратное увеличение частоты мутаций в сайтах CpG; повышенная чувствительность к раку кишечника коррелирует с транзициями С в Т в гене Arc; Mbd4 минимизирует мутабельность 5-метилцитозина
Kaiso	Связывается с mCGmCG и CTGCNA; транскрипционный репрессор	Мышь	Никаких явных фенотипов; небольшая, но достоверная задержка туморогенеза на фоне Min

Механизм действия MeCP2

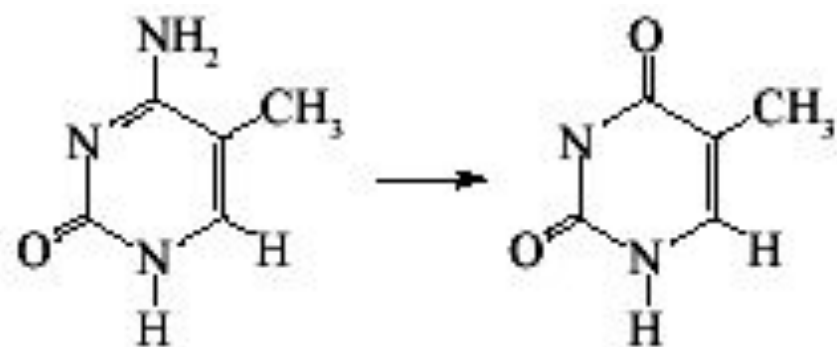


Гипотетический переход между активным неметилированным генным промотором и репрессированным промотором, «молчание» которого обусловлено метилированием ДНК, опосредованным MeCP2

Эта переходная фаза представляет собой промежуточный этап, во время которого транскрипция сайленсирована и происходит метилирование ДНК. MeCP2 рекрутирует комплекс HDAC Sin3A и HKMT к метилированным сайтам. Кроме того, имеются данные, что MeCP2 может прямо репрессировать транскрипцию путем контакта с комплексом инициации транскрипции DR. Другие связывающиеся с метил-CpG белки взаимодействуют с разными корепрессорами, включающими активность HKMT и/или HDAC и рекрутируют их.

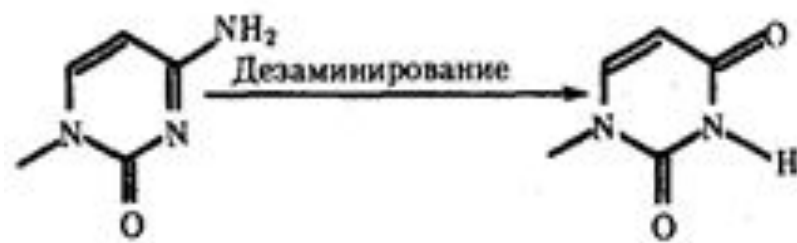
Метил-СpG-МеСР2-Sin3A-комплекс

HHMI



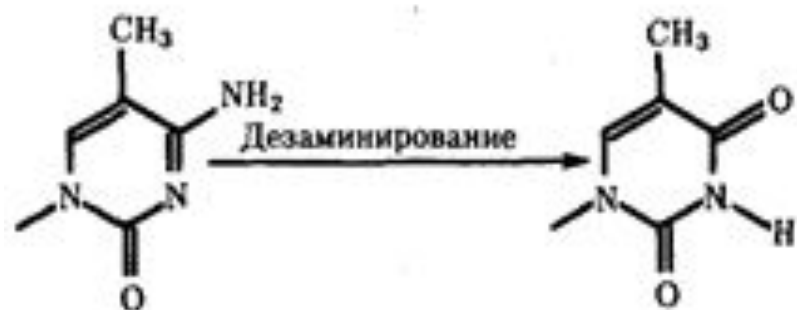
5-Метилцитозин (mC)

Тимин (T)



Цитозин

Урацил



5-Метилцитозин

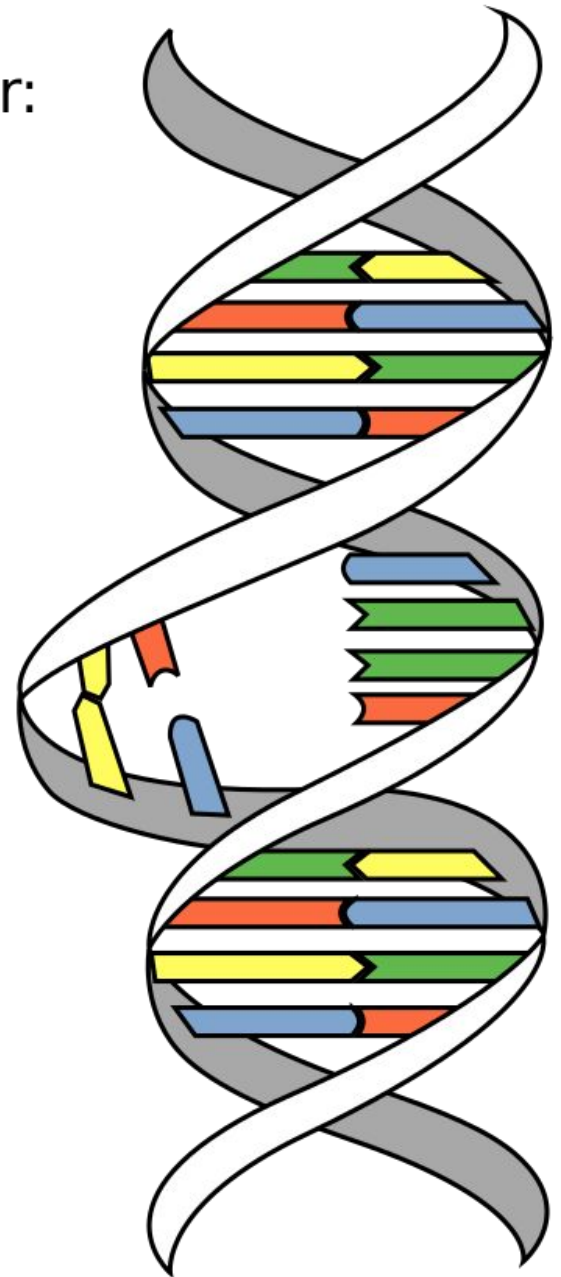
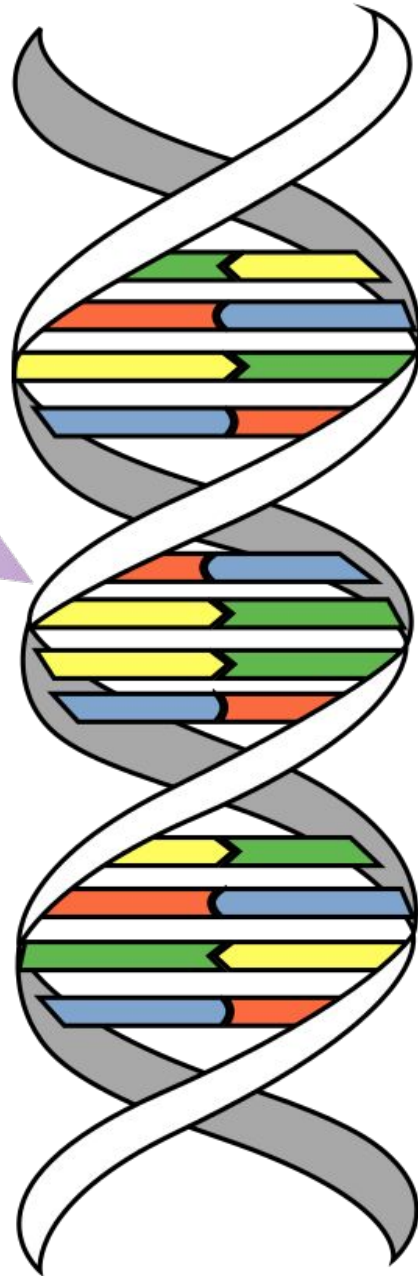
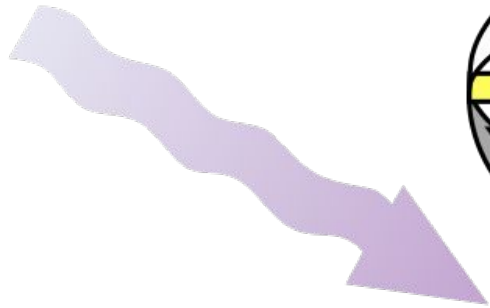
Тимин



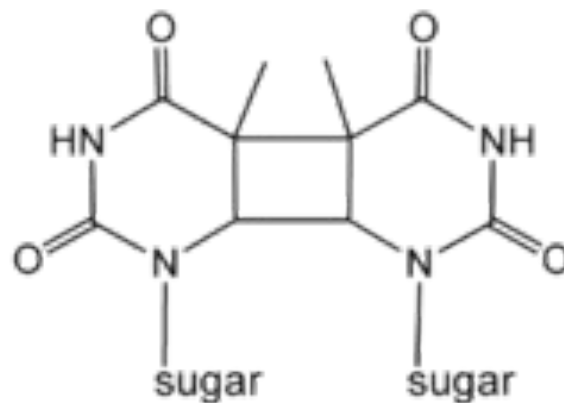
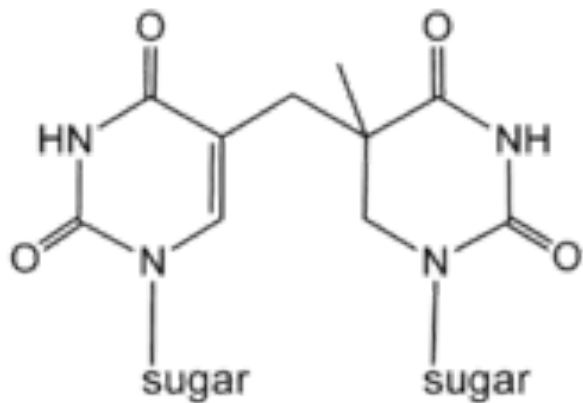
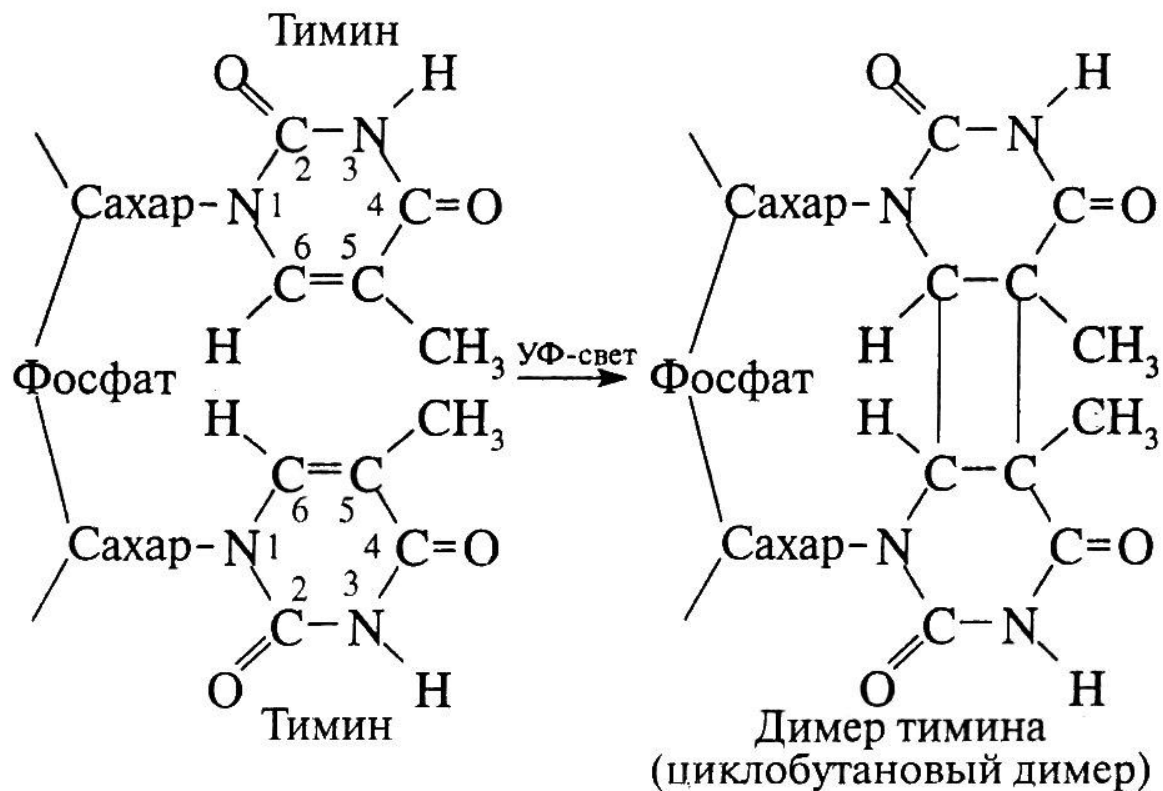
Before:

Incoming
UV photon

After:



Образование димеров Т=Т

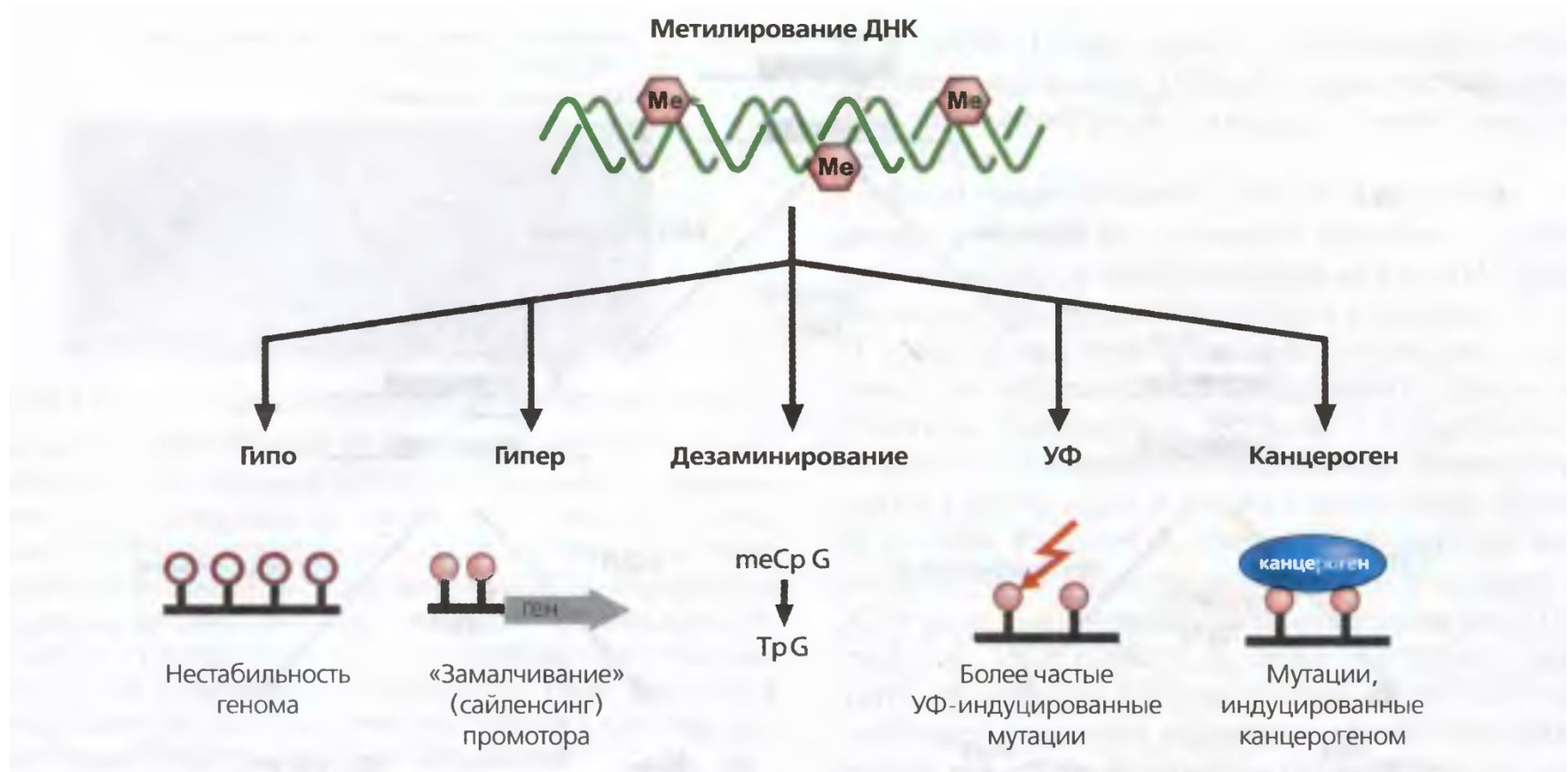


Биологическая основа раковых заболеваний

Ключевые клеточные пути, которые нарушаются генетическими и эпигенетическими механизмами при раковых заболеваниях

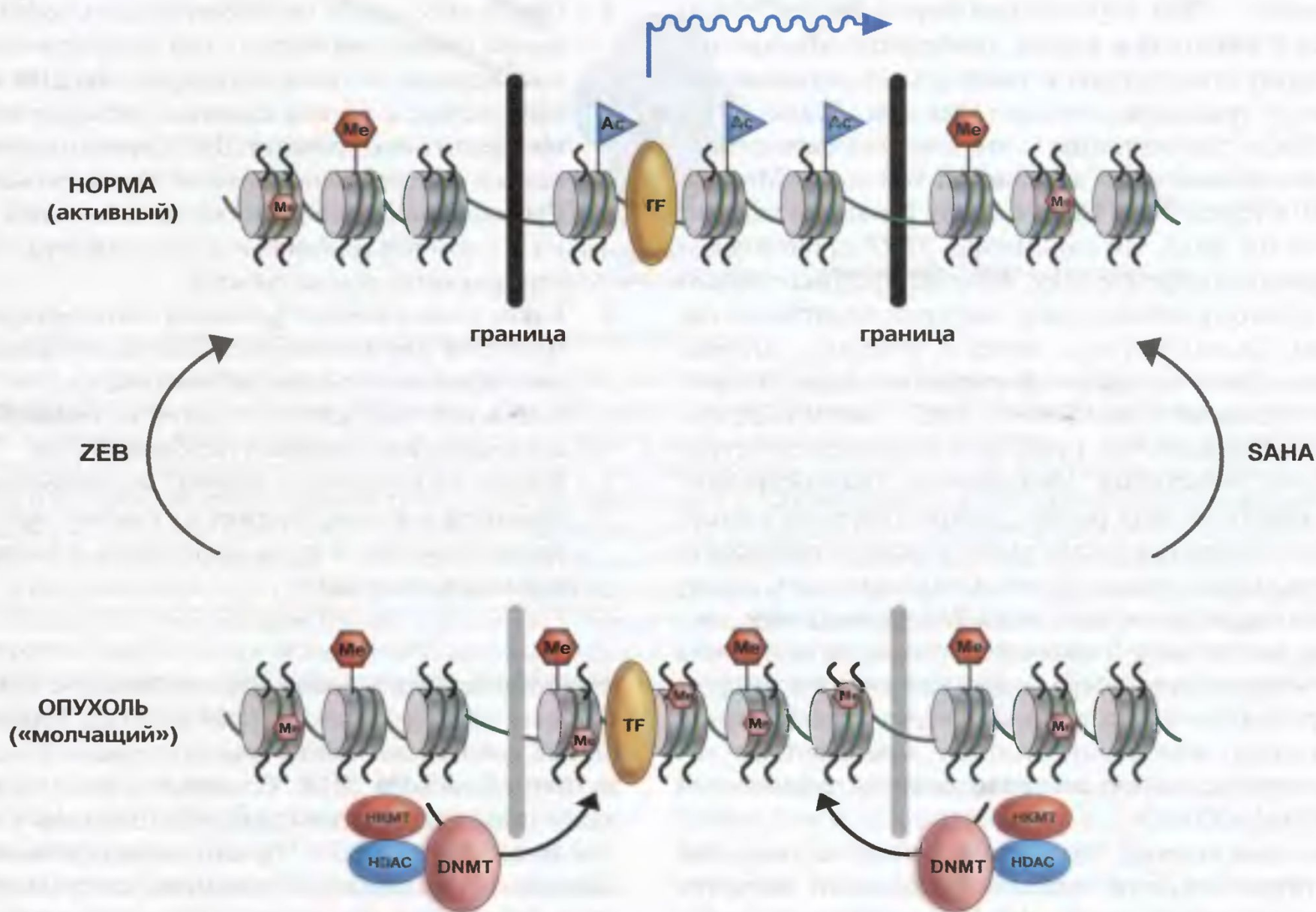
Путь	Пример генетической модификации	Пример эпигенетической модификации
Самообеспеченность ростовыми сигналами	Мутации в гене <i>RAS</i>	Метилирование гена <i>RASSF1A</i>
Нечувствительность к антиростовым сигналам	Мутация в генах <i>TGFβ</i> -рецептора	Даун-регуляция рецепторов <i>TGFβ</i>
Тканевая инвазия и метастазирование	Мутация в гене <i>E-Cadherin</i>	Метилирование промотора <i>E-Cadherin</i>
Неограниченный репликативный потенциал	Мутации в генах <i>p16</i> и <i>Rb</i>	Сайленсинг генов <i>p16</i> или <i>Rb</i> путем метилирования промотора
Поддерживаемый ангиогенез		Сайленсинг тромбоспондина-1
Уход от апоптоза	Мутация в <i>p53</i>	Метилирование <i>DAP</i> -киназы, <i>ASC/TMS1</i> и <i>HIC1</i>
Способность к репарации ДНК	Мутации в <i>MLH1</i> , <i>MSH2</i>	Метилирование <i>GST P1</i> , <i>O6-MGMT</i> , <i>MLH1</i>
Мониторинг геномной стабильности	Мутации в <i>Chfr</i>	Метилирование <i>Chfr</i>
Функции убиквитинирования белка	Мутации в <i>Chfr</i>	Метилирование <i>Chfr</i>

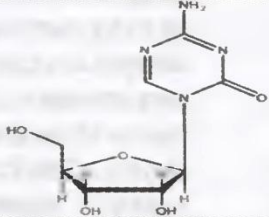
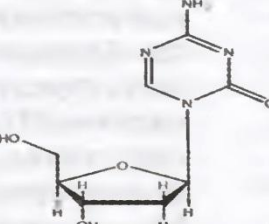
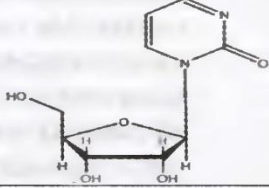
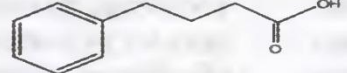
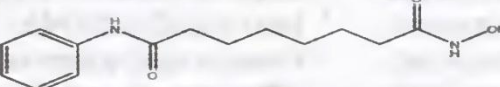
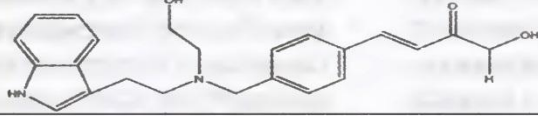
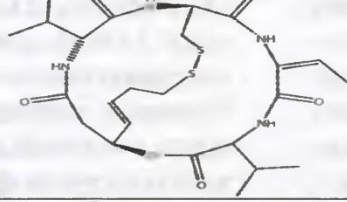
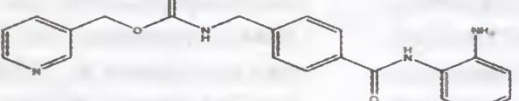
Изменения в паттернах метилирования ДНК может приводить к раковым заболеваниям



Утрата метилирования по цитозину в ДНК (гипо) приводит к нестабильности генома. Локальное гиперметилирование в промоторе гена (гипер) вызывает наследуемый сайленсинг и, следовательно, инактивацию генов-супрессоров опухоли. Кроме того, метилированные сайты CpG представляют собой горячие точки для мутаций типа транзиций C→T, вызванных спонтанным гидролитическим дезаминированием. Метилирование сайтов CpG также повышает связывание некоторых химических канцерогенов с ДНК и повышает частоту мутаций, индуцированных УФ-излучением

Метилирование ДНК и HPTMs в районе CpG-островка генного промотора в нормальных и опухолевых клетках



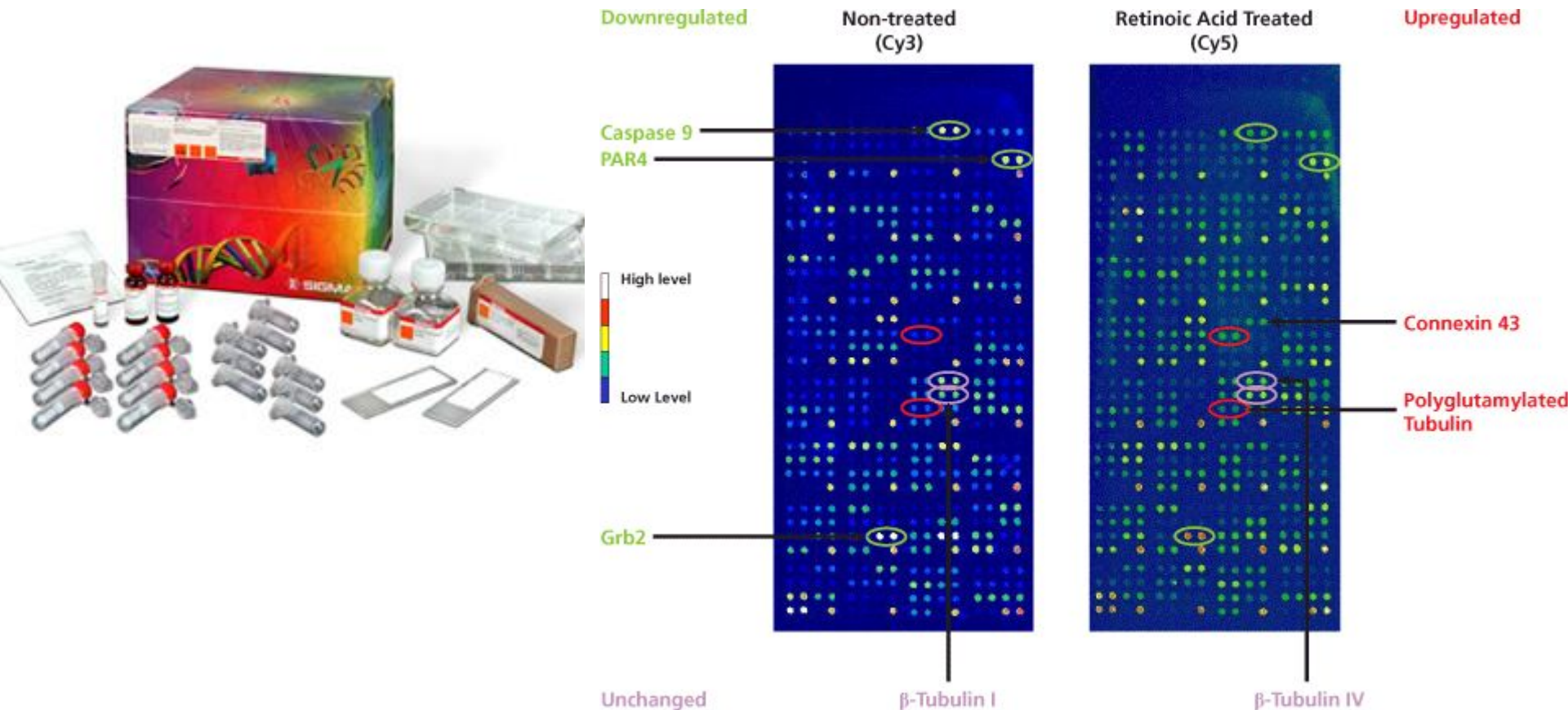
	Вещество	Структура	Тип рака	Клинические испытания
а	ИНГИБИТОРЫ МЕТИЛИРОВАНИЯ ДНК			
	5-азацитидин 5-аза-CR «Видаза»		MDS; злокачественные болезни крови	I, II, и III; одобрено FDA (food and drug administration) для MDS (МДС)
	5-аза-2'-дезоксцитидин 5-аза-CdR «Дакоген»		MDS; злокачественные болезни крови	I, II, и III
	«Зебуларин» 1-β-D-рибофуранозил-2(1H)-пиримидинон		N/A	Доклинические
6	ИНГИБИТОРЫ ГИСТОНОВЫХ ДЕАЦЕТИЛАЗ			
	4-фенилбутират (РВА)		Солидные опухоли	I
	Субероиланилидгидроксамовая кислота (САГА)		Солидные опухоли и злокачественные болезни крови	I, II
	NVP-LAQ824		N/A	I
	Депсипептид FK-228 FR901228		Развитые неоплазмы и Т-клеточные лимфомы	I, II
	MS-275		Компактные опухоли и лимфома	I, II

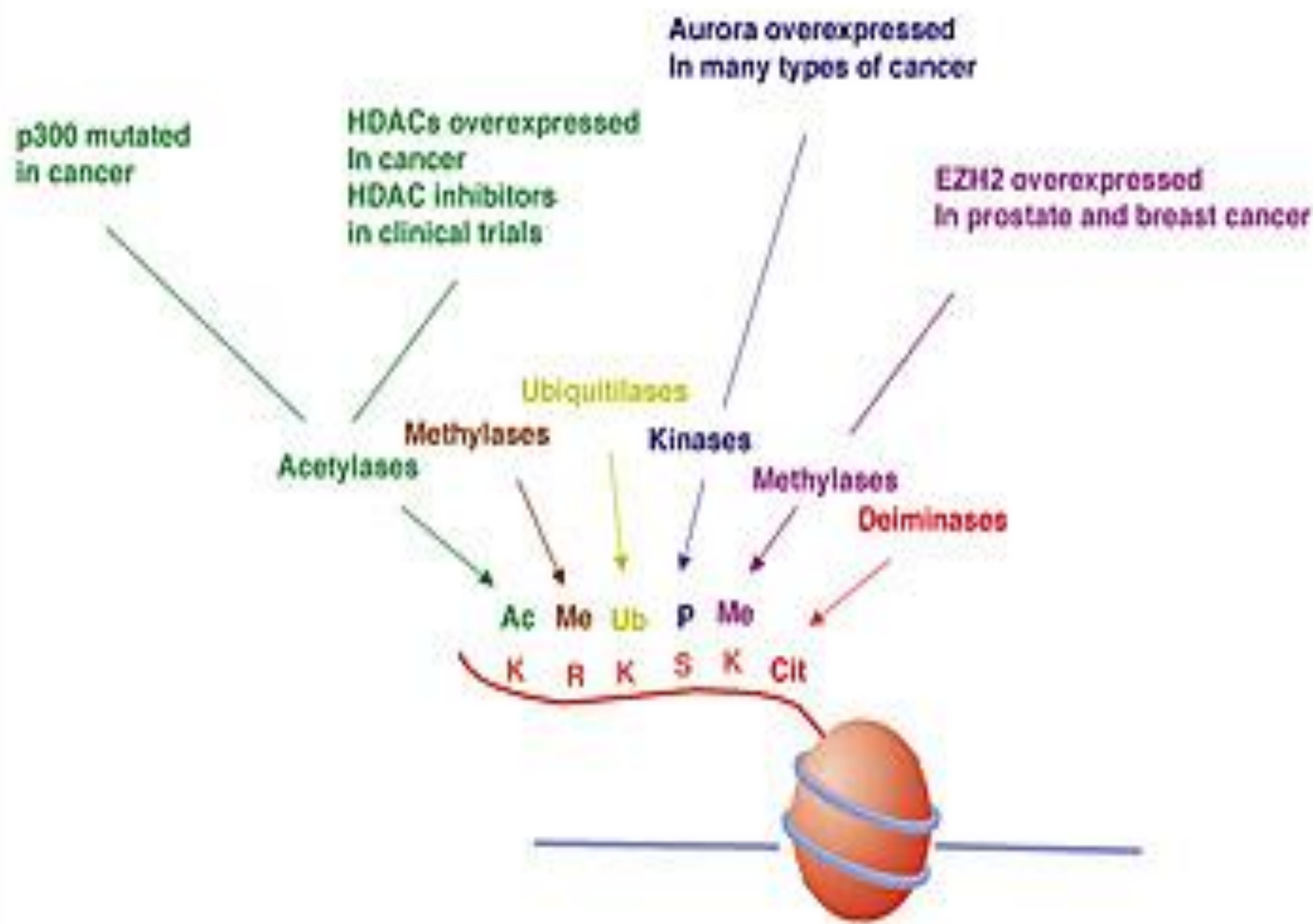
- [Tumour Biol.](#) 2014 Aug;35(8):8225-33. doi: 10.1007/s13277-014-2098-3. Epub 2014 May 22.
- **Expression of proteins involved in epigenetic regulation in human cutaneous melanoma and peritumoral skin.**
- [Uzdensky A¹](#), [Demyanenko S](#), [Bibov M](#), [Sharifulina S](#), [Kit O](#), [Przhedetski Y](#), [Pozdnyakova V](#).

- **Abstract**

Epigenetic processes play a critical role in melanoma development. However, little is known about proteins responsible for epigenetic transformations in melanoma cells. The processes in the peritumoral skin within the excision margin are almost unstudied. We studied the changes in expression of **112 proteins** involved in epigenetic regulation of gene expression in the human cutaneous melanoma and its peritumoral zone using "**The Proteomic Antibody Microarrays**" (**GRAA2, Sigma-Aldrich**). Dimethylated histone H3 at lysines 4 and 9 as well as proteins involved in the regulation of transcription (histone deacetylases HDAC-1 and HDAC-11, DNA methyl-binding protein Kaiso), cell cycle control (protein kinases Aurora-B and PKR, chromosome protein CENP-E, and phosphorylated and acetylated histone H3), DNA repair (phosphorylated histone H2AX), and nuclear protein import (importins $\alpha 3$ and $\alpha 5/7$) were over-expressed in the melanoma tissue as compared with normal skin. **At the same time, HDAC-10 and proliferating cell nuclear antigen PCNA were downregulated.** In the peritumoral skin, at the excision margin (1-2 cm from the melanoma edge), we observed similar changes in expression of these proteins and, additionally, **over-expression of arginine methyltransferases PRMT5 and NAD-dependent histone deacetylase SIR2. Histone methyltransferase G9a and metastasis-associated protein 2 were downregulated.** Therefore, epigenetic regulation that requires histone modifications and expression of some regulatory proteins is of importance for melanoma development and propagation. The observed changes in the peritumoral skin may indicate the epigenetic pre-tuning in this zone possibly involved in malignant transformation. These results can be potentially useful for melanoma diagnostics and targeted therapy.

Antibody microarray





Литература

- **Эпигенетика. Эллис С.Д., Дженювейн Т., Рейнберг Д. М.: 2010 - 496 с.**
- **Laird PW The power and the promise of DNA methylation markers. Nat Rev Cancer. 2003 Apr;3(4):253-66.**
- **Uzdensky A, Demyanenko S, Bibov M, Sharifulina S, Kit O, Przhedetski Y, Pozdnyakova V. Expression of proteins involved in epigenetic regulation in human cutaneous melanoma and peritumoral skin. Tumour Biol. 2014 Aug;35(8):8225-33. doi: 10.1007/s13277-014-2098-3. Epub 2014 May 22.**
- **Kostaki M, Manona AD, Stavraka I, Korkolopoulou P, Levidou G, Trigka EA, Christofidou E, Champsas G, Stratigos AJ, Katsambas A, Papadopoulos O, Piperi C, Papavassiliou AG. High-frequency p16(INK) (4A) promoter methylation is associated with histone methyltransferase SETDB1 expression in sporadic cutaneous melanoma. Exp Dermatol. 2014 May;23(5):332-8. doi: 10.1111/exd.12398.**