

ЭПИГЕНЕТИКА

Часть 3

ЭПИГЕНЕТИЧЕСКАЯ ПАТОЛОГИЯ В ПРОЦЕССАХ КАНЦЕРОГЕНЕЗА

Запросы клиники

- **Ранняя диагностика**
- **Классификация, дифференциальная диагностика**
- **Прогноз развития заболевания, в том числе выживаемости, метастазирования, рецидивов**
- **Тактика лечения, в том числе хирургического и медикаментозного, таргетная терапия**

Что является молекулярно-генетическим маркером опухоли?

Структурные и функциональные изменения в ДНК -последовательности генов в опухоли, приводящие к нарушению их экспрессии:

- мутации (активирующие и инактивирующие);
- делеции генов-супрессоров и больших хромосомных фрагментов (потеря гетерозиготности);
- транслокации, приводящие к появлению химерных генов;
- аномальное метилирование регуляторных областей генов-супрессоров;
- исчезновение нормального и появление аномального белкового продукта или РНК (химерные гены в результате межгенного сплайсинга, альтернативный сплайсинг);
- изменение профиля экспрессии микро РНК.

Чувствительности и специфичности одного опухолевого маркера недостаточно - НУЖНА СИСТЕМА МАРКЕРОВ.

ПРОТООНКОГЕНЫ

Позитивные регуляторы, способные индуцировать деление клетки

В нормальных тканях имеют фоновый уровень экспрессии

Действие проявляется в результате активации протоонкогена даже в гетерозиготном состоянии (достаточно активации одного аллеля)

Активация

- 1. Нарушение экспрессии:
- гиперэкспрессия,
- эктопическая экспрессия;**
- 2. Появление нового химерного белка с аномальной функцией;**
- 3. РНК-интерференция**

ГЕНЫ-СУПРЕССОРЫ

Негативные регуляторы, препятствующие делению клетки

В норме экспрессируются почти во всех тканях

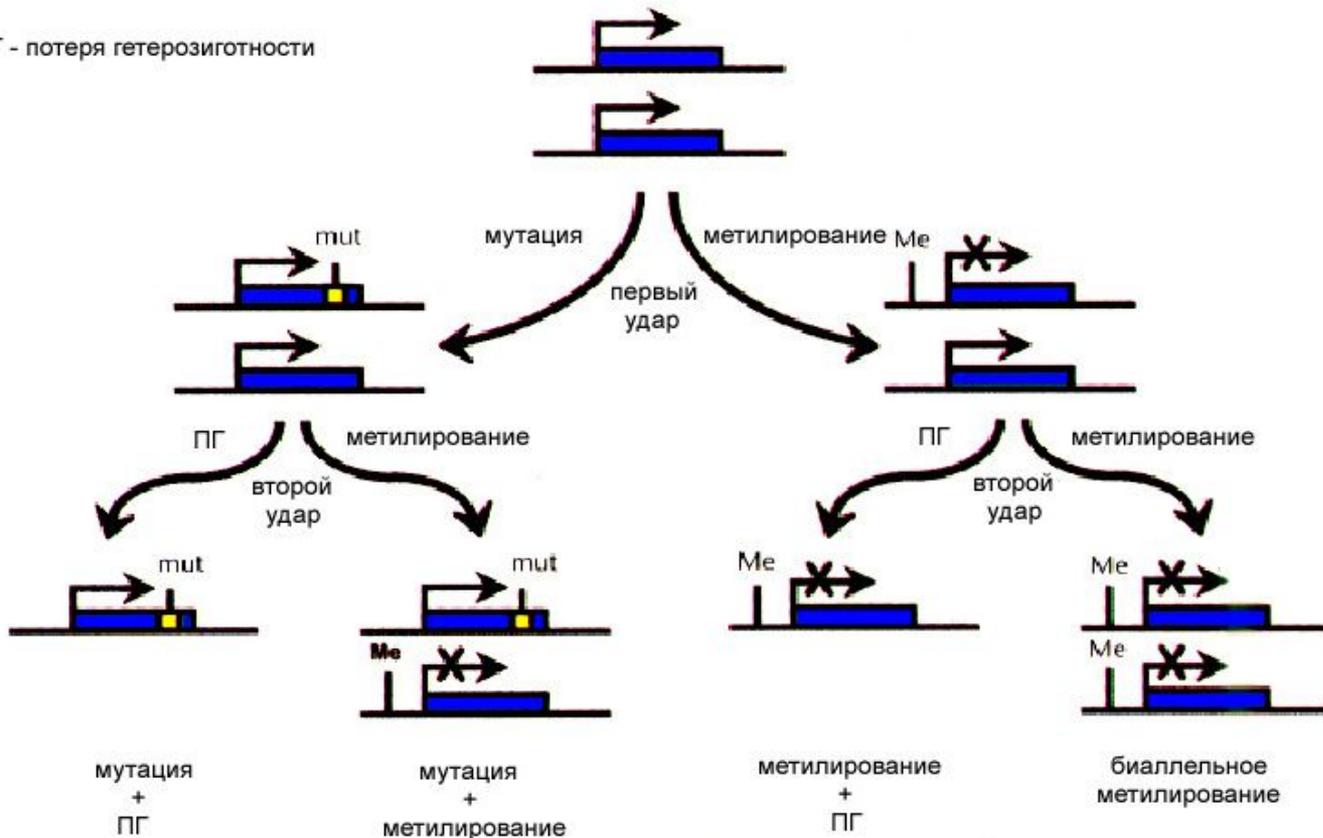
Действие проявляется только при наличии повреждения обоих аллелей (полная инактивация функции)

Инактивация

- 1. Мутации - гетерозиготы по мутантным аллелям генов-супрессоров имеют повышенную предрасположенность к опухолям;**
- 2. Потеря гетерозиготности в опухолевых тканях - делеции районов локализации генов-супрессоров;**
- 3. Метилирование регуляторных районов, приводящее к отсутствию экспрессии гена;**
- 4. РНК-интерференция**

Современная двухударная модель канцерогенеза

ПГ - потеря гетерозиготности

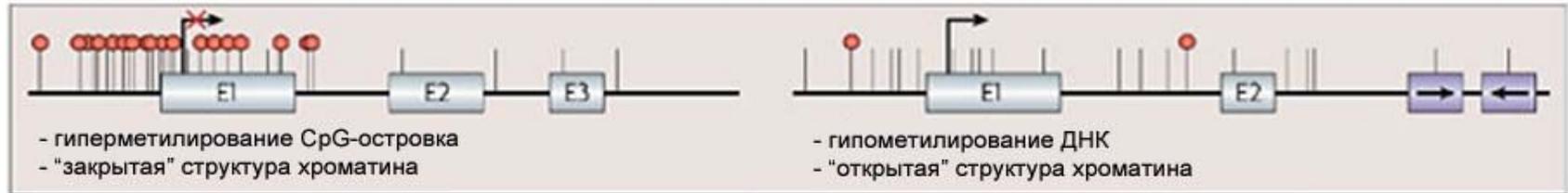


Изменение метилирования генома в процессе канцерогенеза

нормальная клетка



раковая клетка



канцерогенез

нemetилированный CpG метилированный CpG

Пути инактивации классических генов-супрессоров опухолевого роста

Механизмы инактивации генов.					Механизм двойного события.				
Гены	Тип опухоли	ПГ	Мутации	Метилирование	Гомозиг. делеция	Мутация + ПГ	Мутация + метил.	Метил. + ПГ	Биаллел. метилпр.
<i>RB1</i>	Ретинобластома	+	+	+	Редко	+	+	+	+
<i>P53</i>	Различные типы	+	+	-	Редко	+	+	-	-
<i>VHL</i>	Карцинома почек	+	+	+	Редко	+	+	+	?
<i>p16</i>	Меланома и другие	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>p15</i>	Лейкозы	+	-	+	+	?	+	+	+
<i>MLH1</i>	Колорект. раки	+	+	+	?	+	+	?	+
<i>APC</i>	Колорект. раки	+	+	+	?	+	?	?	?

По экспериментальным оценкам около 200 генов мутируют в злокачественных опухолях молочной железы и толстого кишечника, со средним показателем – 11 мутаций в каждой опухоли. Аномально метилированные промоторные районы (CpG-островки) составляют 100-400 в каждой опухоли.

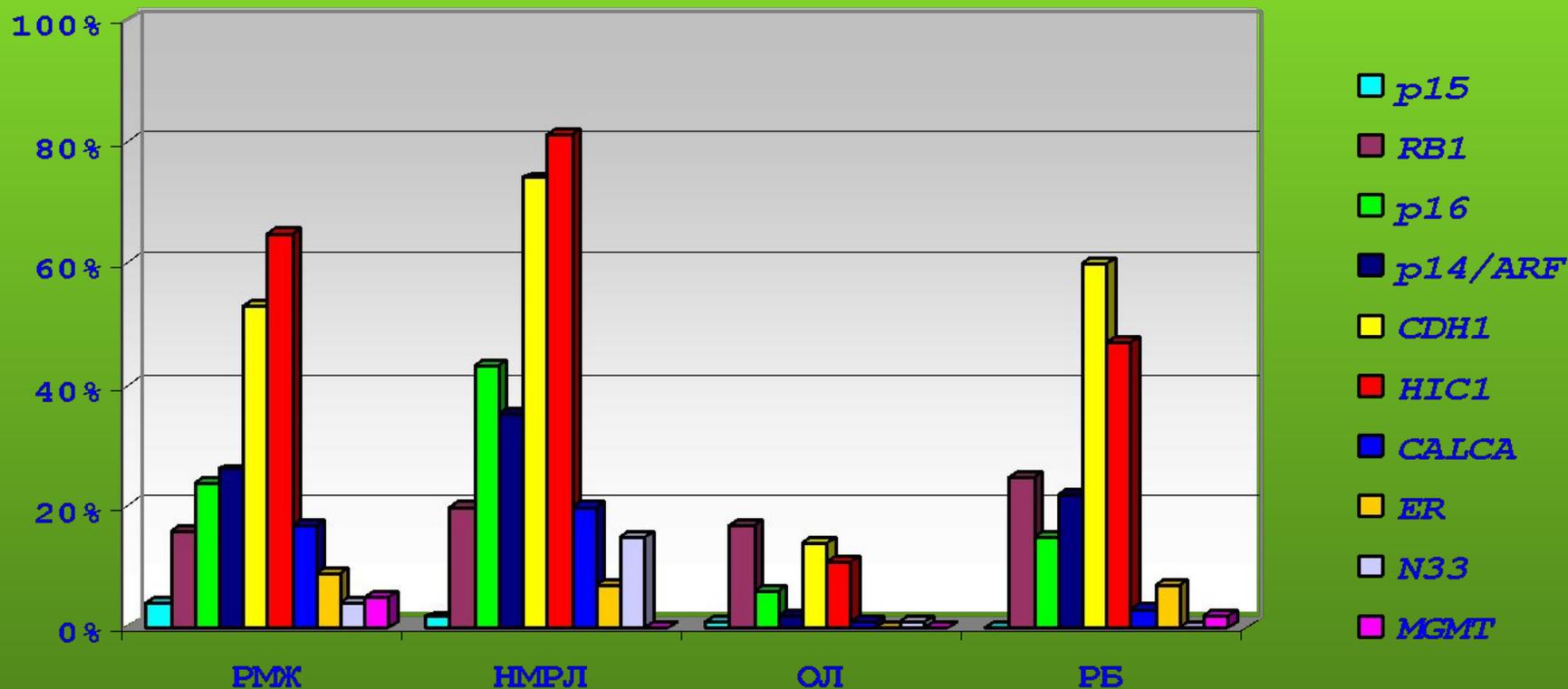
Примеры генов-супрессоров опухолевого роста, CpG-островки которых могут быть метилированы при различных злокачественных новообразованиях.

Ген	Локус	Функция белка	Опухоль.
<i>RB1</i>	13q14.1	Регуляция перехода G1→S фазы клеточного цикла	ретинобластома, меланома,
<i>VHL</i>	3p25	Подавление экспрессии генов, активируемых при гипоксии (VEGF).	опухоли почек.
<i>INK4A/p16</i>	9p21	Регуляция сигнального пути циклин D/Rb.	рак легких, толстого кишечника, лимфомы.
<i>INK4B/p15</i>	9p21	Регуляция сигнального пути циклин D/p53	острые лейкозы.
<i>CDH1 (E-катгерин)</i>	16q22.1	Участие в формировании межклеточных контактов.	опухоли молочной железы, желудка, печени, мочевого пузыря.
<i>APC</i>	5q21	Участие в образовании клеточных контактов	колоректальные раки
<i>BRCA1</i>	17q21	Участие в узнавании и/или репарации поврежденной ДНК	рак молочной железы.
<i>MLH1</i>	2p22	Репарация неспаренных участков ДНК.	опухоли желудка, эндометрия, толстого кишечника.

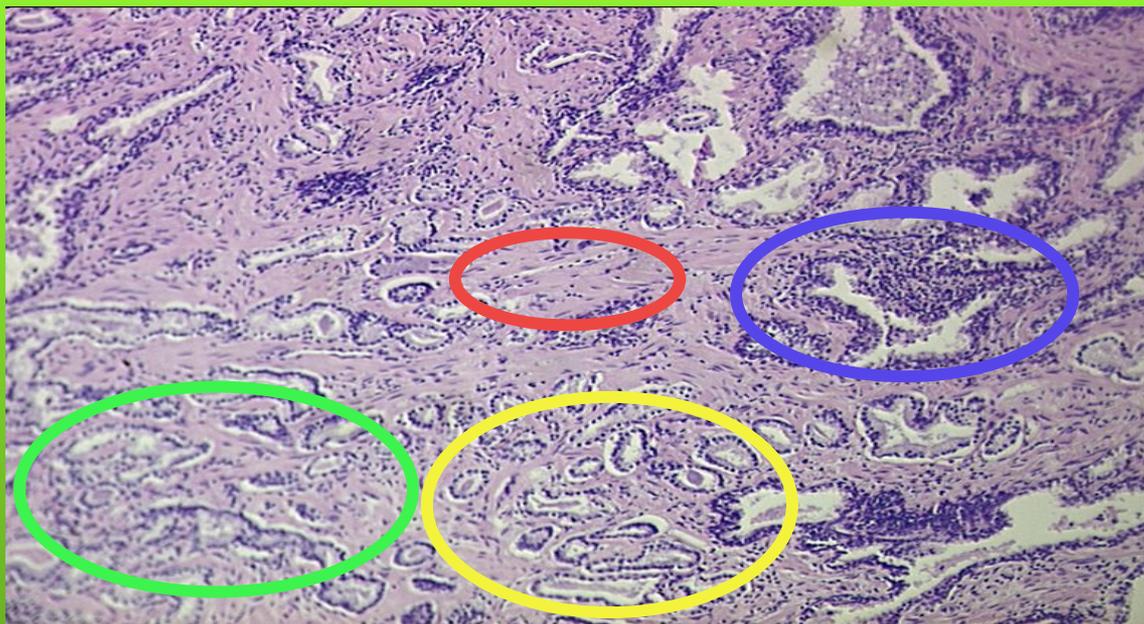
Примеры генов-супрессоров опухолевого роста, CpG-островки которых могут быть метилированы при различных злокачественных новообразованиях.

<i>ER</i>	6q25.1	Рецептор эстрогена.	рак толстой кишки, рак груди, острые лейкозы
<i>HIC1</i>	17p13.3	Транскрипционный фактор.	рак простаты, груди, толстой кишки, опухоли легких, почек.
<i>MDG1</i>	1p.35	Регулятор клеточного цикла	рак молочной железы.
<i>GSTP1</i>	11q13	Фермент, участвующий в детоксикации ксенобиотиков	рак простаты, печени, почек, груди, толстого кишечника.
<i>MGMT</i>	10q26	Метилгуанин метилтрансфераза	опухоли мозга, легких, груди.
<i>CALCA</i>	11p15	Кальцитонин	рак легких, толстого кишечника.
<i>THBS1</i>	15q15	Ингибитор ангиогенеза.	острые миелоидные лейкозы.

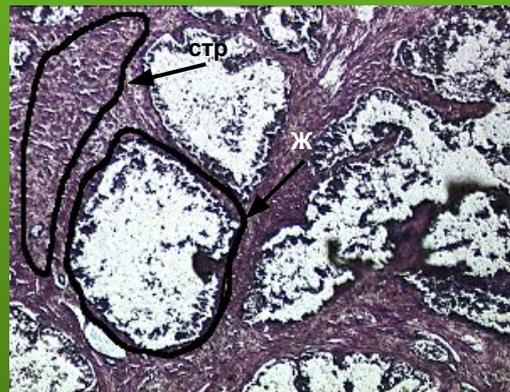
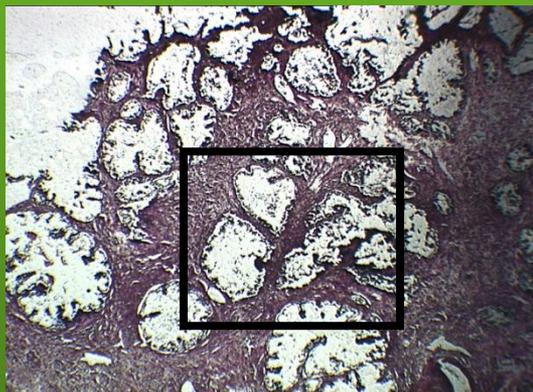
Профиль метилирования генов, вовлеченных в канцерогенез, при раке молочной железы, немелкоклеточном раке легких, остром лейкозе и ретинобластоме.



ГЕТЕРОГЕННОСТЬ РПЖ



аденокарцинома
аденокарцинома
строма
ПИН



Гиперплазия ПЖ. Стрелкой
указаны области
микродиссекции:
гиперплазированный ацинус
(ж) и смежная строма (стр).

Молекулярные маркеры рака предстательной железы

Эпигенетические маркеры

Гиперметиличрование

*Rassf1A, GSTP1,
HIC1, P16,
N33, APC, CDH1,
CD44, GPX3, Dlc1*

Гипометиличрование

CAGE, HPSE, PLAU

Модификация гистонов

CAR, CPA3, RARb, VDR

Генетические маркеры

Делеции

*8p22, 16q24
RB1, p53*

Мутации

*AR, KLF6, p53,
PTEN*

Хромосомные перестройки

Химерные онкогены
*TMPRSS2/ERG4,
TMPRSS2/ETV1,
TMPRSS2/ETV4*

Экспрессионные маркеры

*PSCA, KLK2, PSMA,
HER-2/neu, DD3*

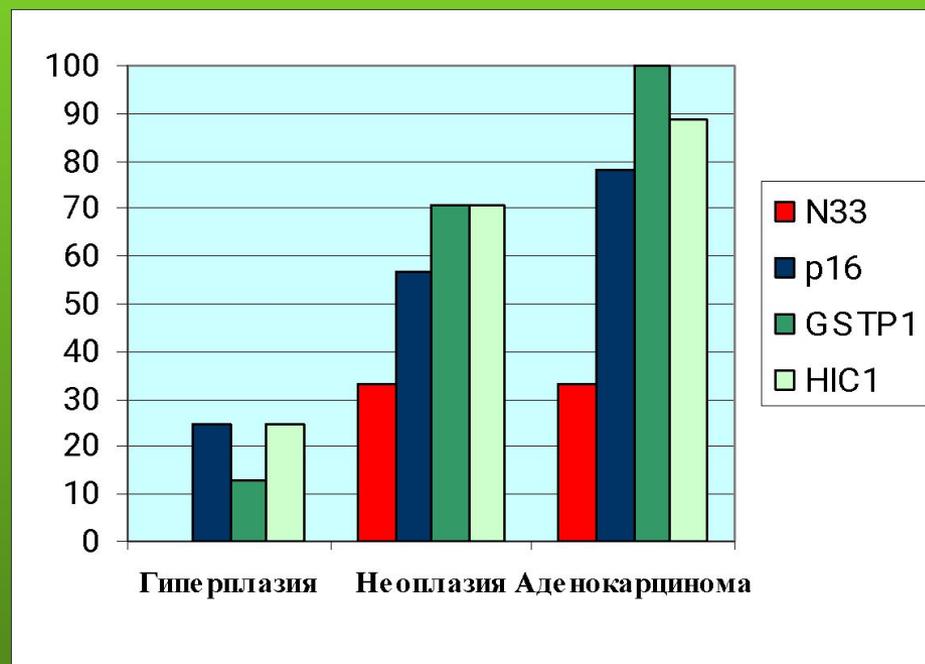
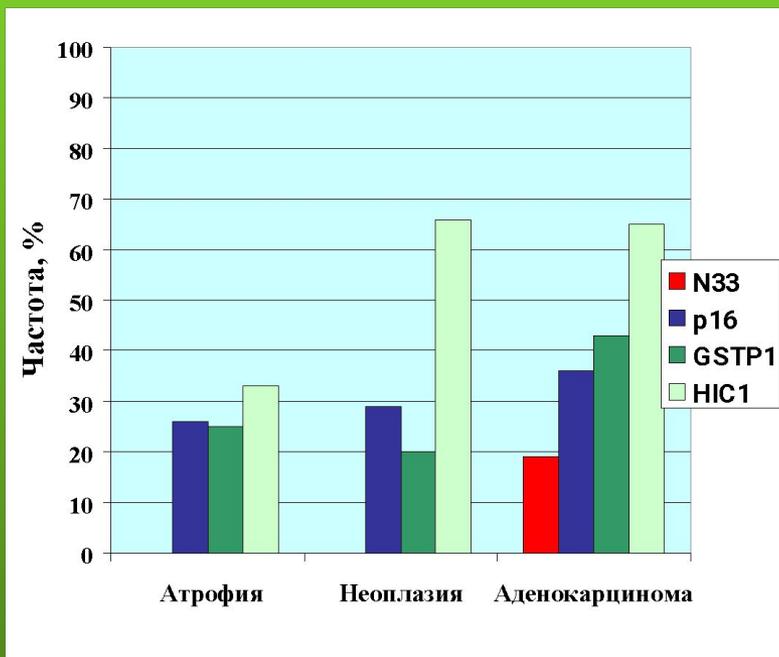
Частоты метилирования генов *HIC1*, *p16*, *N33* и *GSTP1* в микродиссекционных образцах предстательной железы

	<i>HIC1</i>	<i>p16</i>	<i>GSTP1</i>	<i>N33</i>
норма	0/2	0/2	0/2	0/2
смежная строма	0/2	0/2	0/2	0/2
гиперплазия (от пациентов с ДГПЖ)	0/5	0/5	0/5	0/5
смежная строма	0/5	0/5	0/5	0/5
гиперплазия (от пациентов с АК)	2/8 (25%)	2/8 (25%)	1/8 (13%)	0/8
смежная строма	1/6	0/6	1/6	1/6
ПИН (от пациентов с АК)	9/15 (60%)	8/15 (53%)	11/15(73%)	5/15(33%)
смежная строма	8/12 (66%)	7/12 (58%)	4/12 (33%)	0/12
аденокарцинома	23/30(77%)	15/30 (50%)	28/30 (93%)	8/30 (27%)
смежная строма	14/25 (56%)	9/25 (36%)	14/25 (56%)	2/25 (8%)

Сравнение частот аномального метилирования генов *P16*, *HIC1*, *N33* и *GSTP1* в биопсийных и микродиссекционных образцах РПЖ

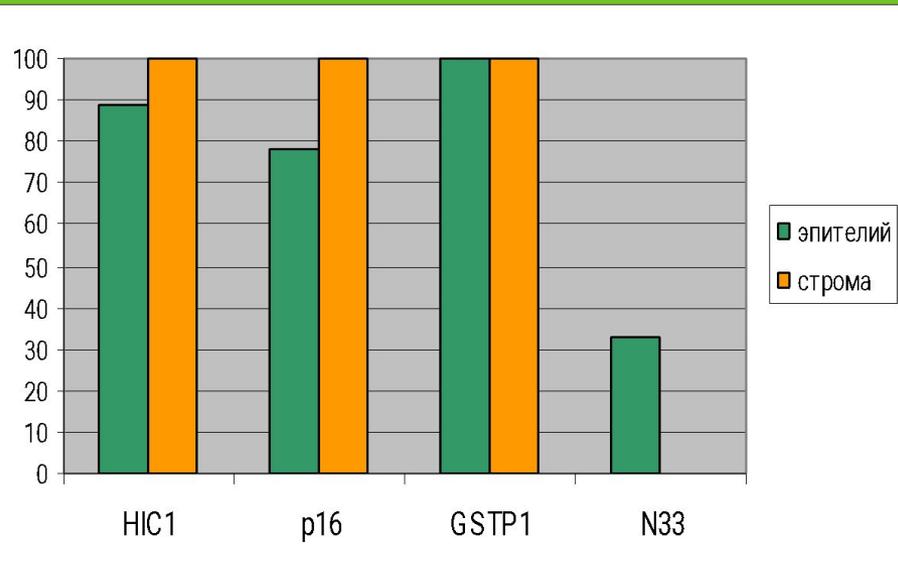
Биоптаты

Микродиссекционные образцы

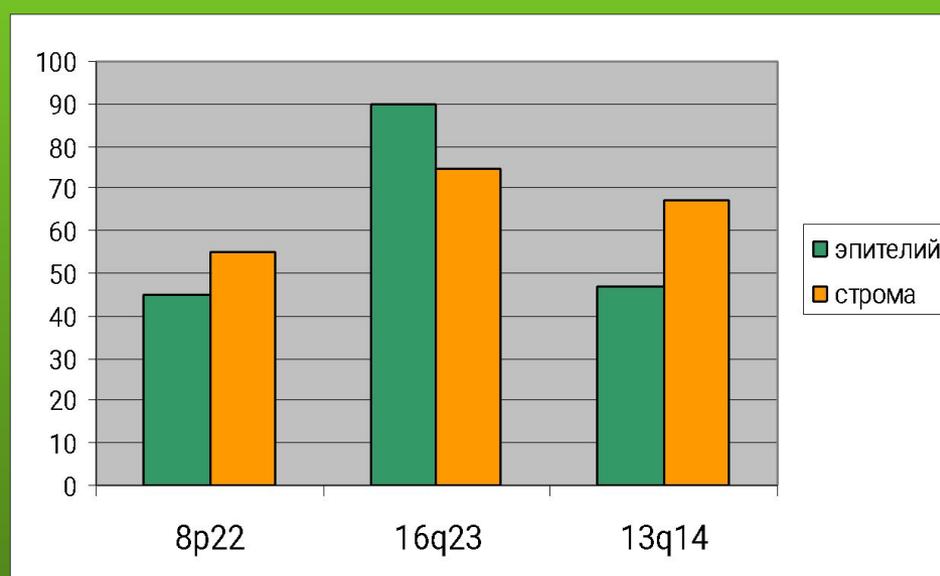


Сравнение молекулярно-генетических нарушений в опухолевом эпителии и смежной строме

Метилирование



Потеря гетерозиготности и нестабильность



Система маркеров аномального метилирования для ранней дифференциальной диагностики опухолей предстательной железы (частоты метилирования генов 50-90%):

ADCY4, ARHGEF10, CXCL14, CYBA, GFRA2, GPX7, GRASP, HAPLN3, HEMK1, HOXB5, HOXD9, KIFC2, KLK10, LOXL2, MOXD1, NEUROG3, RASSF5, SLC16A5, SOCS3, GSTP1, APC, PTGS2, RARB, RASSF1

Метилирование генов *HOXB5, RASSF5, ADCY4, SOCS3, RASSF1* характерно для ранних стадий рака предстательной железы и является лучшей комбинацией, чем все 24 маркера (чувствительность 100% и специфичность 97%)

Возможность обнаружения аномального метилирования за 4 года до появления опухоли

Аномальное метилирование генов *GRASP, HEMK1, RARB* и *SLC16A5* относится к более поздним событиям и выявляется в карциномах предстательной железы

ФОРМИРОВАНИЕ СИСТЕМ МАРКЕРОВ МЕТИЛИРОВАНИЯ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ РМЖ

Для диагностики рака молочной железы предложены две системы, оптимизированные по количеству маркеров:

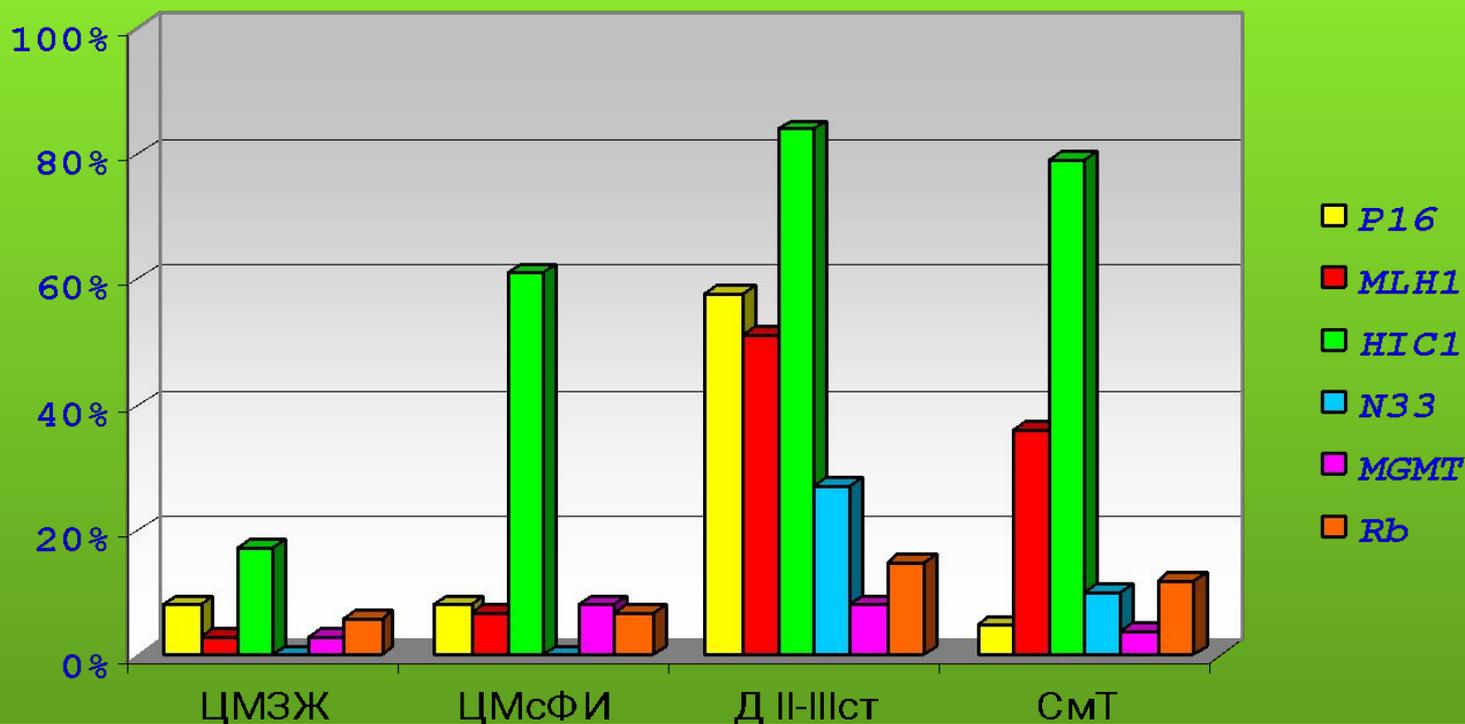
- первая включает 13 маркеров (*PPP2R5C*, *IQSEC2*, *RHF15*, *ATMIN*, *TMEM176A/TMEM176B*, *TAF4*, *RAI1*, *KCNH8*, *DOCK6*, *GPC2*, фрагменты межгенных хромосомных районов 12q13.13, 1p33, 5p15.33) и характеризуется чувствительностью 93,9% и специфичностью 93,9%.
- вторая состоит из 7 маркеров (*RAI1*, *KCNH8*, *DOCK6*, *TAF4*, *GPC2* и фрагментов межгенных хромосомных районов 1p33, 5p15.33), с чувствительностью 89,8% и специфичностью 100%.

При использовании любой из двух систем для постановки диагноза «рак молочной железы» достаточно выявления 4 маркеров в метилированном состоянии; метилирование 2–3 маркеров характерно для прилежащей к опухоли морфологически неизменной ткани.

Молекулярные маркеры, определяемые на ранних стадиях канцерогенеза.

Злокачественная опухоль	Молекулярные маркеры
Рак простаты	Метилирование <i>GSTP1</i>
Колоректальный рак	Метилирование <i>p16</i>, <i>MLH1</i>, <i>APC</i>, микросателлитная нестабильность
Рак желудка	Метилирование <i>p16</i>, <i>MLH1</i>
Рак пищевода	Метилирование <i>p16</i>, <i>APC</i>, наличие HPV 16, 18
Рак мочевого пузыря	Метилирование <i>p16</i>, <i>DAPK1</i>, <i>RAR-β</i>, <i>RASSF1A</i>
Рак печени	Метилирование <i>p16</i>, <i>p15</i>
Рак поджелудочной железы	Метилирование <i>p16</i>
Немелкоклеточный рак легкого	Метилирование <i>p16</i>, <i>MGMT</i>, <i>DAPK1</i>, мутации <i>KRAS</i>
Рак шейки матки	Метилирование <i>p16</i>, <i>MLH1</i>, <i>N33</i> наличие HPV 16, 18
Рак молочной железы	Метилирование <i>p16</i>, <i>CCND2</i>, <i>TWIST</i>, <i>RAR-β</i>, <i>RASSF1A</i>

Частоты метилирования генов *p16*, *MLH1*, *hIC1*, *N33*, *MGMT* и *Rb1* в образцах ткани шейки матки.

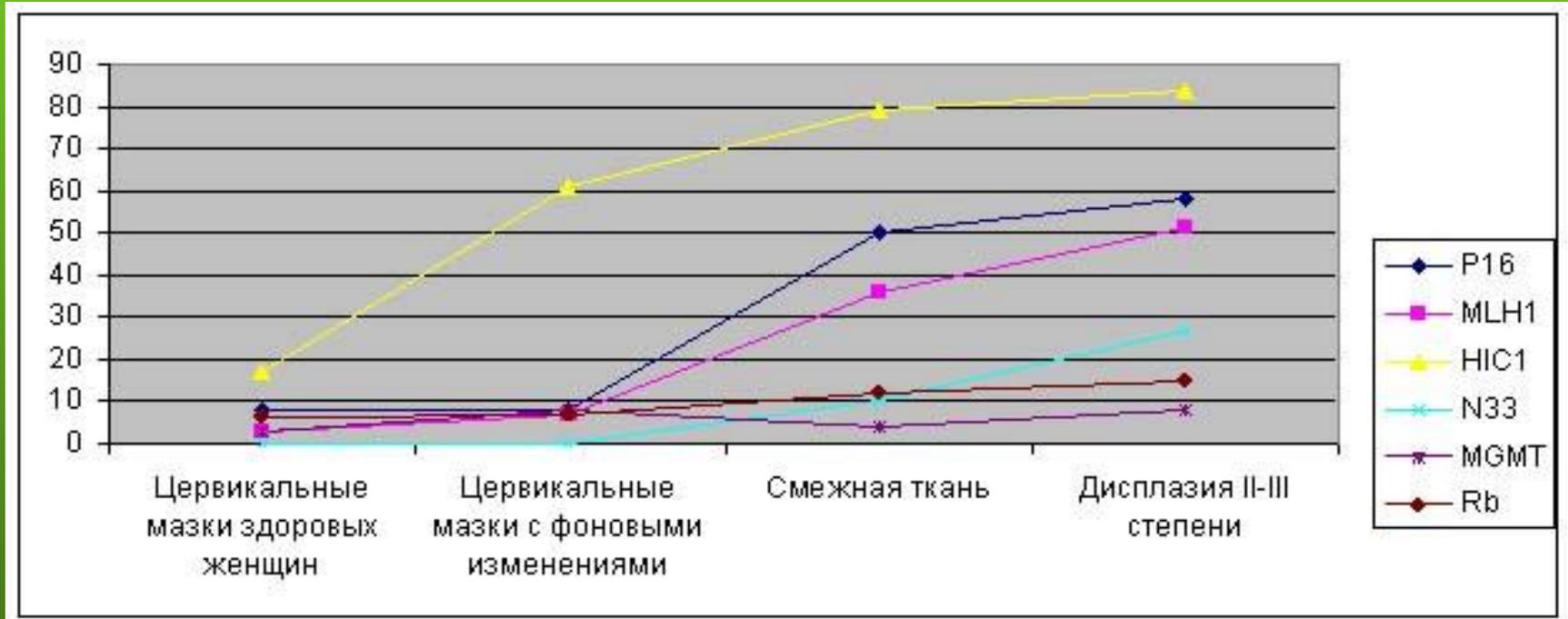


Тип образца	Число образцов	P16	MLH1	hIC1	N33	MGMT	Rb
Цервикальные мазки здоровых женщин	35	8%	3%	17%	0%	3%	6%
Цервикальные мазки с фоновыми изменениями	93	8%	7%	61%	0%	8%	7%
Дисплазия II-III степени	53	58%	51%	84%	27%	8%	15%
Смежная ткань	45	5%	36%	79%	10%	4%	12%

МАРКЕРЫ МЕТИЛИРОВАНИЯ В ПРОГНОЗИРОВАНИИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ ОПУХОЛЕЙ ЖЕНСКОЙ РЕПРОДУКТИВНОЙ СИСТЕМЫ

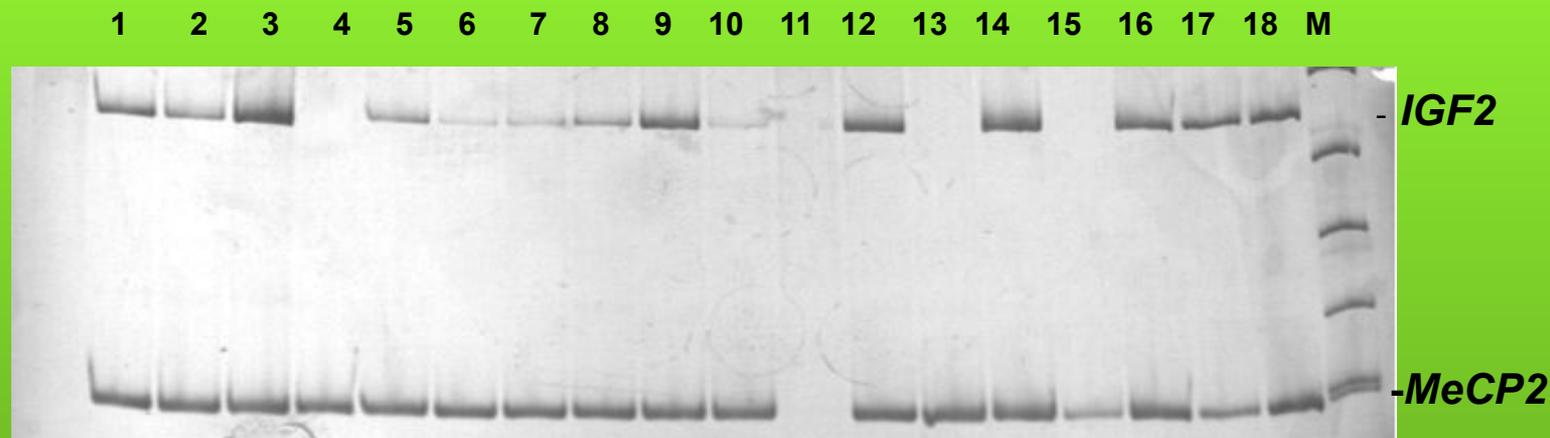
Частота аномального метилирования генов-супрессоров опухолевого роста (*RASSF1*, *MLH1*, *P16*, *RAR-b*, *GSTP1*, *CDX1*) возрастает в ряду: **хронический эндометрит**→**простая гиперплазия эндометрия без атипии**→**комплексная гиперплазия эндометрия без атипии**→**полип эндометрия**→**комплексная гиперплазия эндометрии с атипией**→**рак эндометрия**.

Частота аномального метилирования генов-супрессоров опухолевого роста (*MLH1*, *HIC1*, *RASSF1A*, *MGMT*, *N33* и *CDH1*) возрастает в ряду: **доброкачественные процессы шейки матки**→**CIN I**→**CIN II**→**CIN III**→**карцинома *in situ***.

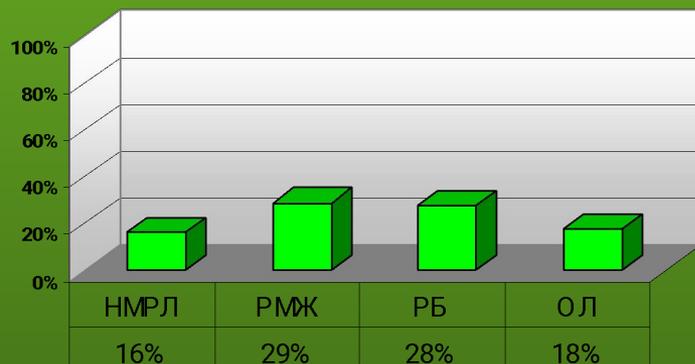


**Инактивация посредством гиперметилирования
ключевых генов-супрессоров сопровождается
гипометилированием и активацией целого ряда
онкогенов (*raf, c-fos, c-myc, c-Ha-ras, c-K-ras*),
факторов роста (*IGF2, TGF*) и мобильных
повторяющихся элементов, расположенных в
районах гетерохроматина.**

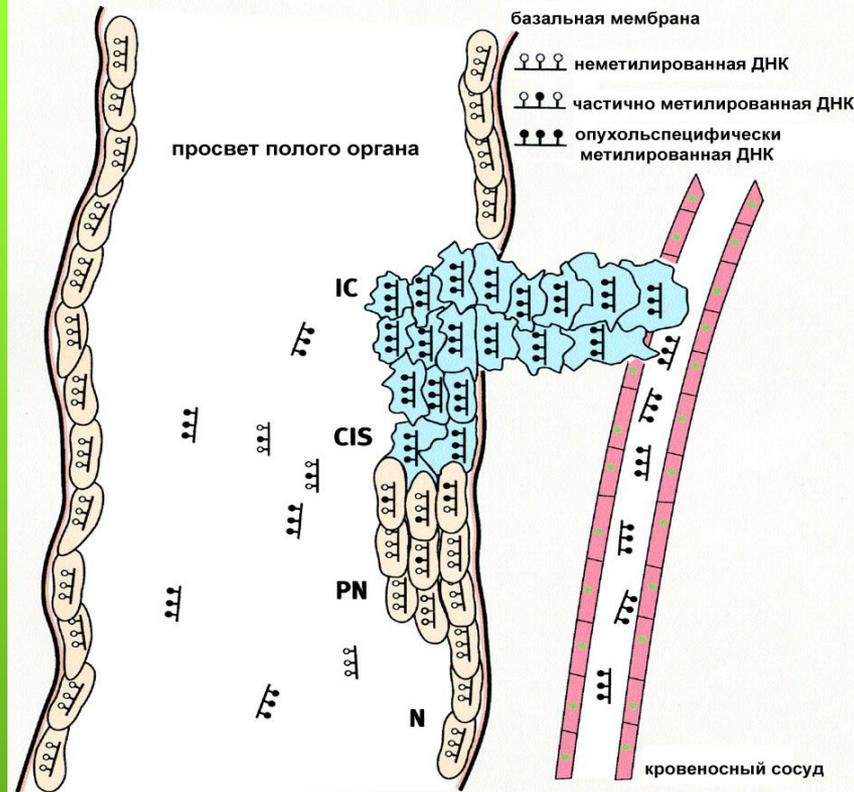
Аномальное деметилирование гена *IGF2* в образцах опухолей.



Дорожка 18 – положительный контроль (ДНК здорового донора); 11 – отрицательный контроль; 1-3, 9, 12, 14, 16, 17 – нормальное метилирование гена *IGF2* в опухолевых образцах; 5-8, 10 – гипометилирование гена *IGF2* в опухоли; 4, 13, 15 – отсутствие метилирование гена *IGF2* в образцах опухолей; М – маркер молекулярного веса.



Потеря метилирования гена *IGF2* в разных типах опухолей.



Определяется в:

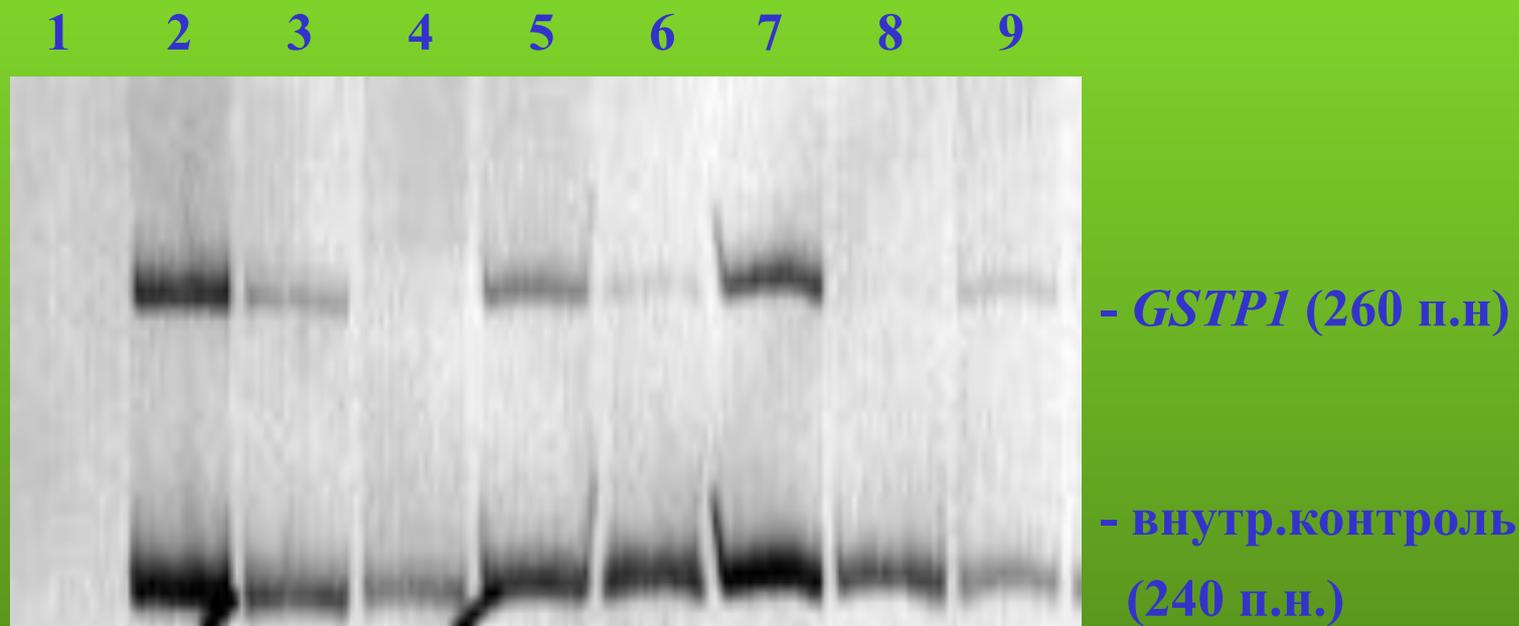
- мокроте
- кале
- моче
- семенной жидкости
- лаваже протоков

Определяется в:

- плазме крови
- сыворотке крови
- костном мозге

Свободная ДНК в периферической крови онкологического больного составляет около 200 нг/мл, в норме ее на порядок меньше. Фрагменты ДНК в сыворотке крови составляют около 150-200 п.н. Наборы для выделения ДНК и метил-специфического анализа рассчитаны на выделение фрагментов ДНК не менее 1000 п.н. Поэтому идет большая потеря малых фрагментов ДНК, что усложняет процесс анализа. Метил-чувствительный анализ, в связи с этим, имеет количественное преимущество.

Определение метилирования гена *GSTP1* в плазме крови больных раком предстательной железы.



1 – отрицательный контроль; 2 и 7 – положительный контроль (негидролизованная ДНК); 3, 5, 6 и 9 – метилирование гена *GSTP1* в плазме, 4 и 8 – отсутствие метилирования гена *GSTP1* в плазме.

Системы молекулярных маркеров метилирования

Гены	Чувствительность	Специфичность
<i>Рак шейки матки</i>		
<i>P16</i>	54%	93%
<i>MLH1</i>	45%	93%
<i>N33</i>	27%	100%
Панель из 3 маркеров	85%	85%
<i>Рак желудка (в сыворотке крови)</i>		
<i>CDH1</i>	57%	100%
<i>P16</i>	52%	100%
<i>P15</i>	56%	100%
<i>DAPK1</i>	48%	100%
<i>GSTP1</i>	15%	100%
Панель из 5 маркеров	83%	100%
<i>Рак мочевого пузыря (в моче)</i>		
<i>DAPK</i>	67%	100%
<i>RARβ2</i>	71%	100%
<i>CDH1</i>	49%	100%
<i>P16</i>	76%	100%
Панель из 4 маркеров	91%	100%

Метилирование ДНК является ценным биомаркером для диагностики рака.

- 1. Целый ряд генов, вовлеченных в канцерогенез, инактивируется посредством метилирования (*p16, p14, RB1, LKB, ER, RAR2 β , VHL, DAP, MGMT, CDI* и др.);**
- 2. Метилирование генов, вовлеченных в канцерогенез, не наблюдается в ДНК из нормальных тканей;**
- 3. Метилирование генов, вовлеченных в канцерогенез, может быть определено в сыворотке крови и соответствует профилю метилирования ДНК, выделенной из соответствующей опухоли;**
- 4. Лабораторные исследования подтверждают, что метилирование является одним из наиболее ранних событий в канцерогенезе;**
- 5. Многочисленные исследования показывают, что метилирование ДНК, как биомаркер, является высоко специфичным и чувствительным;**
- 6. Разработаны эффективные методы, позволяющие проводить качественный и количественный анализ метилирования ДНК.**

Метилирование позволяет прогнозировать течение заболевания и эффективность терапии.

Метилирование промоторных районов генов *RASSF* и *p16* достоверно чаще происходит в клетках уротелиальных карцином с инвазией в подслизистый слой (pT1) и может рассматриваться как маркер инвазивного роста опухоли. Аномальное метилирование промоторного района гена *p14* ассоциировано с полифокальным ростом опухоли.

Метилирование *CDH1* ассоциировано с прорастанием опухолью капсулы почки ($P = 0.024$) и наличием метастазов на момент постановки диагноза ($P = 0.001$). Метилирование *RASSF1* чаще встречается в умеренно-, чем в высокодифференцированных первичных опухолях ($P = 0.047$). Метилирование *RASSF1* и *CDH1* может рассматриваться в качестве неблагоприятного прогностического маркера на различных стадиях рака почки.

Метилирование *RASSF1A*, определенное в сыворотке крови пациентов с РМЖ во время терапии томоксифеном, свидетельствует о наличии метастазов, неэффективности лечения и крайне неблагоприятном прогнозе заболевания.

Метилирование *MGMT* коррелирует с успешным лечением глиом кармустином.

Метилирование генов *N33*, *CDH1*, *DAPK* при раке желудка определяется во всей слизистой желудка, что свидетельствует о ее вовлеченности в опухолевый процесс.

Метилирование ДНК, как диагностический маркер онкологического заболевания, имеет ряд преимуществ перед другими маркерами

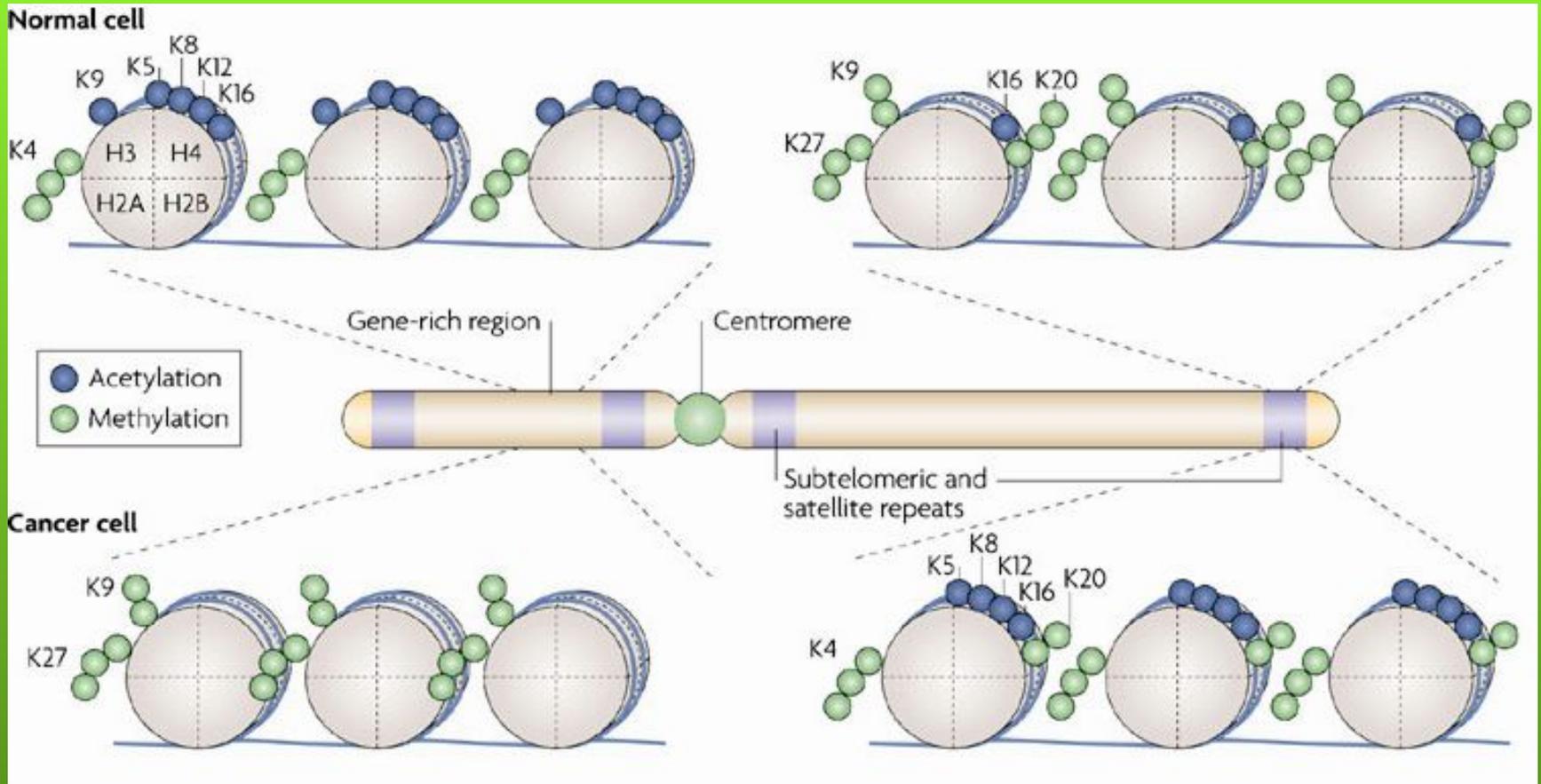
Мы определяем положительный сигнал – гиперметилирование ДНК в опухолевой клетке.

Потерю гетерозиготности или изменения в экспрессии гена в опухолевой клетке определить сложнее при наличии большого количества нормальной ДНК и РНК.

ДНК, содержащая метилированные районы, более стабильна, чем РНК и легко выделяется из большинства биологических жидкостей организма и фиксированных тканей.

Возникнув в опухоли однажды, метилирование поддерживается в течение жизни этой опухоли.

Модификация гистонов в нормальной и злокачественной клетках

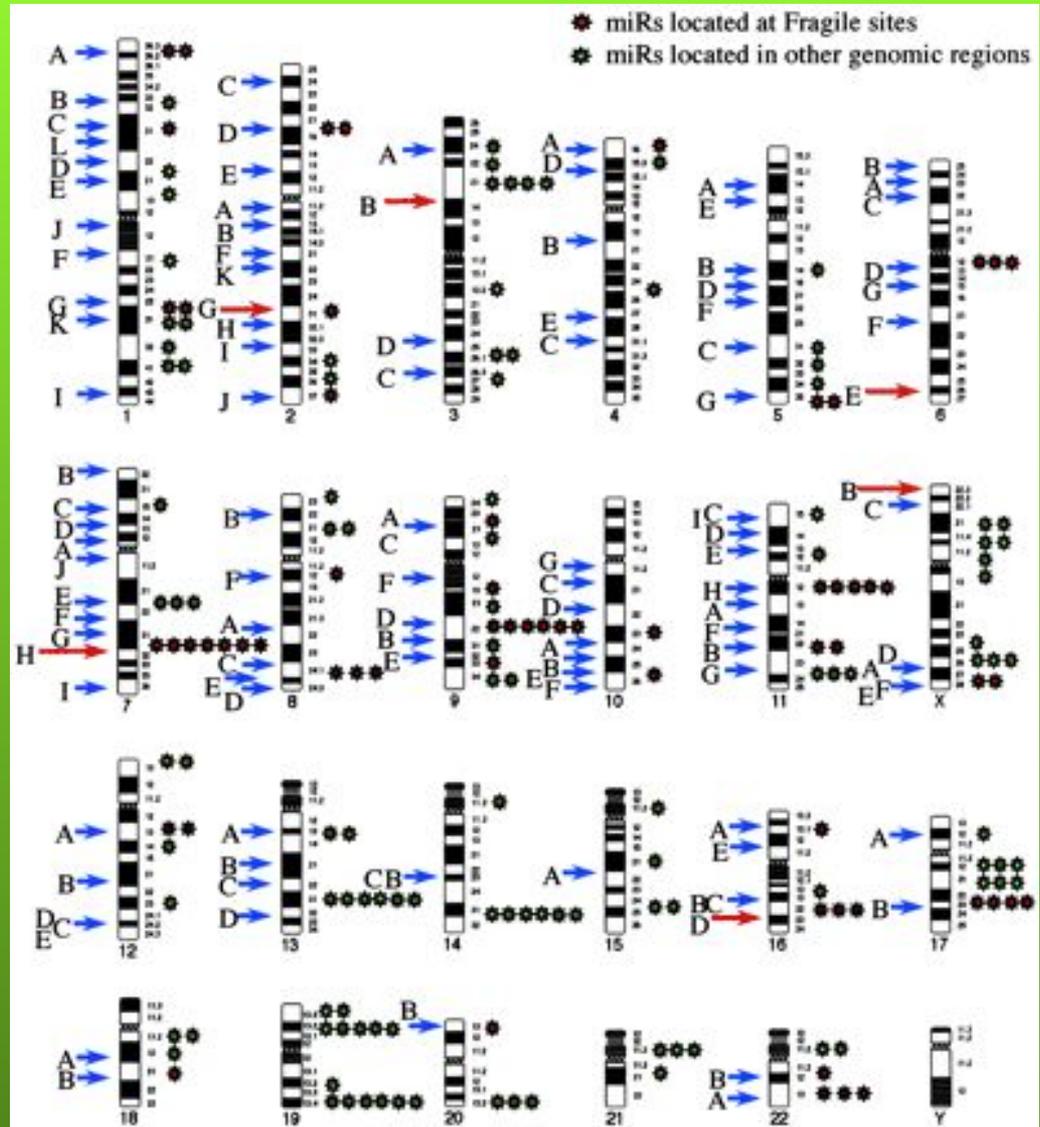


Деацетилирование гистонов, триметилирование лизина K27 и диметилирование лизина K9 гистона H3 в районах активного хроматина, а так же потеря триметилирования лизина K20 гистона H4 и триметилирование K27 гистона H3 в гетерохроматиновых районах являются таким же характерным признаком раковой клетки, как метилирование CpG-островков.

miРНК И КАНЦЕРОГЕНЕЗ

miРНК часто локализуются в районах хрупких участков, в минимальных районах перекрытия делеций при онкологических заболеваниях или в точках разрыва при распространенных хромосомных перестройках и в сайтах интеграции HPV.

Ломкие сайты и картированные miRNA



113 ломких сайтов и 186 miR. 61 miR локализованы в ломких сайтах. Красными стрелками указаны часто выявляемые ломкие участки.

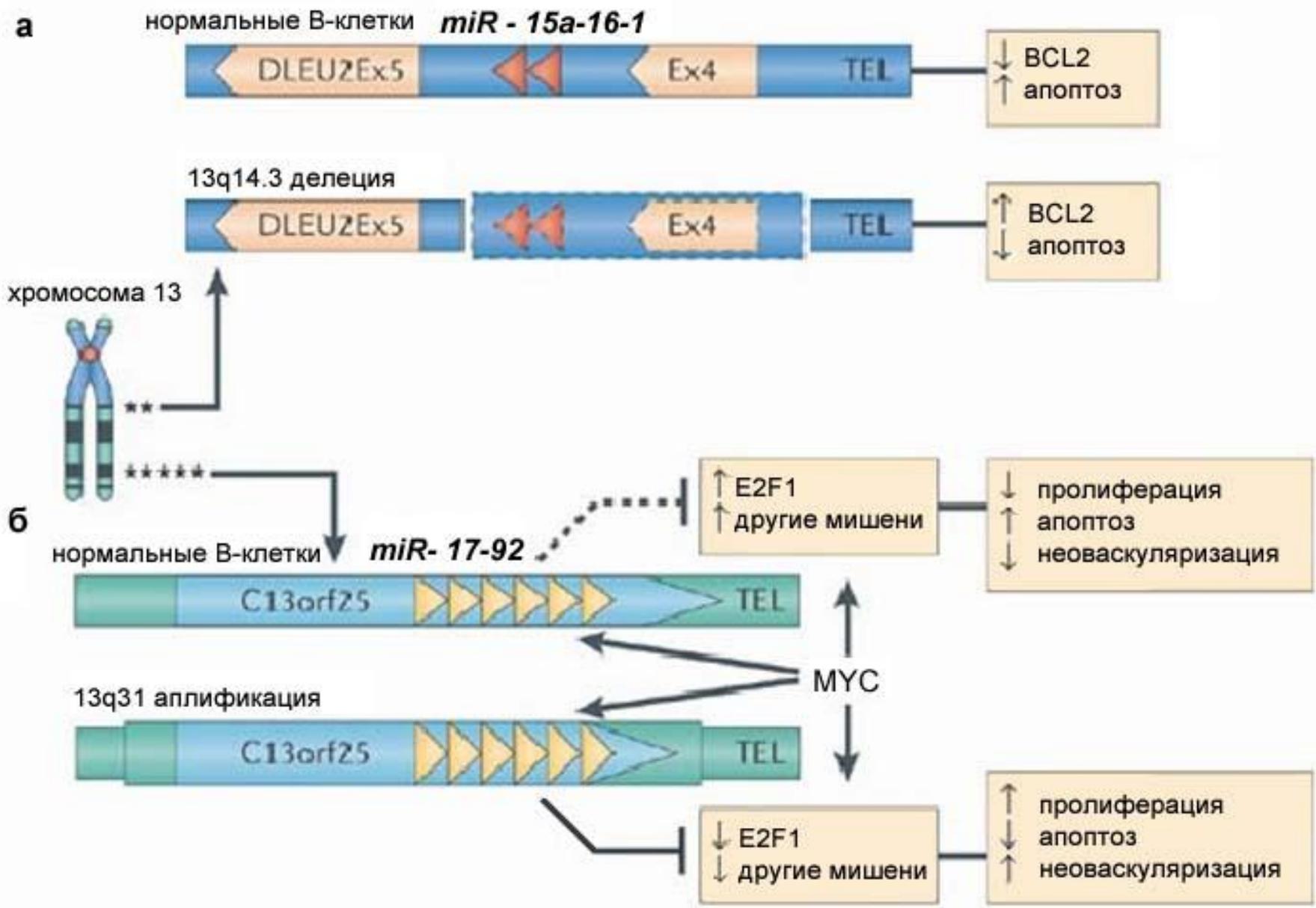
Локализация miRNA в районах делеций, амплификаций и транслокаций при раке

Chromosome	Location (defining markers)	Size, Mb	miR	Hystotype	Known OG/TS
3p21.1–21.2-D	ARP-DRR1	7	<i>let-7g/miR-135-1</i>	Lung, breast cancer	—
3p21.3(AP20)-D	GOLGA4-VILL	0.75	<i>miR-26a</i>	Epithelial cancer	—
3p23–21.31(MDR2)-D	D3S1768-D3S1767	12.32	<i>miR-26a; miR-138-1</i>	Nasopharyngeal cancer	—
5q32-D	ADRB2-ATX1	2.92	<i>miR-145/miR-143</i>	Myelodysplastic syndrome	—
9q22.3-D	D9S280-D9S1809	1.46	<i>miR-24-1/mir-27b/miR-23b; let-7a-1/let-7f-1/let-7d</i>	Urothelial cancer	PTC, FANCC
9q33-D	D9S1826-D9S158	0.4	<i>miR-123</i>	NSCLC	—
11q23-q24-D	D11S927-D11S1347	1.994	<i>miR-34a-1/miR-34a-2</i>	Breast, lung cancer	PPP2R1B
11q23-q24-D	D11S1345-D11S1328	1.725	<i>miR-125b-1/let-7a-2/miR-100</i>	Breast, lung, ovary, cervix cancer	—
13q14.3-D	D13S272-D13S25	0.54	<i>miR-15a/miR-16a</i>	B-CLL	—
13q32–33-A	stSG15303-stSG31624	7.15	<i>miR-17/miR-18/miR-19a/miR-20/ miR-19b-1/miR-92-1</i>	Follicular lymphoma	—
17p13.3-D	D17S1866-D17S1574	1.899	<i>miR-22; miR-132; miR-212</i>	HCC	—
17p13.3-D	ENO3-TP53	2.275	<i>miR-195</i>	Lung cancer	TP53
17q22-t(8;17)	<i>miR-142s/c-MYC</i>		<i>miR-142s; miR-142as</i>	Prolymphocytic leukemia	c-MYC
17q23-A	CLTC-PPM1D	0.97	<i>miR-21</i>	Neuroblastoma	—
20q13-A	FLJ33887-ZNF217	0.55	<i>miR-297-3</i>	Colon cancer	—
21q11.1-D	D21S1911-ANA	2.84	<i>miR-99a/let-7c/miR-125b</i>	Lung cancer	—

D, deleted region; A, amplified region; NSCLC, non-small-cell lung cancer; HCC, hepatocellular carcinoma; PTC, patched homolog (*Drosophila*); FANCC, Fanconi anemia, complementation group C; PPP2R1B, protein phosphatase 2, regulatory subunit A (PR 65), β isoform, miRNAs in a cluster are separated by a slash. For references, see Table 6.

Хронический В-клеточный лимфолейкоз – минимальный район перекрывания делеций (~65% случаев) расположен в интроне гена *LEU2*, где локализованы *miR15* и *miR16*. Делеции обнаружены в 50% лимфом мантийной зоны, 16-40% множественных миелом и в 60% рака простаты. Мишенью этих *miR* является антиапоптотический ген *BCL2*, чья гиперэкспрессия обнаружена в различных типах рака. В то же время, они гиперэкспрессируются в опухолях поджелудочной железы нейроэндокринного происхождения.

Выявлено увеличение копий *miR17*, индуцируемое *c-Myc*, при различных формах рака. Гиперэкспрессия *miR-17-5p* и *miR-20a* (кластер *miR-17-92*) приводит к инактивации транскрипционного фактора *E2F1* и коррелирует с гиперпролиферацией, неоангиогенезом, блокирует апоптоз.



Клеточные онкогены *K-RAS* и *MYC* имеют множественные сайты комплементации с *let-7*, расположенные в 3'- НТР. Гиперэкспрессия этой *miR* приводит к инактивации *K-RAS* и ингибирует опухолевую прогрессию. Кроме того, при раке легкого выявлены снижение экспрессии *miR-30a*, *-126*, *-143*, *-146*, *-188*, *-331* и гиперэкспрессия *miR-21*, *-189*, *-200b*.

Папиллярная карцинома щитовидной железы возникает в результате нарушения пути регуляции RET/PTC-RAS-BRAF. *miR-221*, *miR-222* и *miR-146* имеют повышенный уровень экспрессии (в 11-20 раз) в опухоли по сравнению с нормальной тканью, а экспрессии гена *KIT*, который имеет сайты комплементации для указанных *miR* резко снижена. По-видимому, гиперэкспрессия малых РНК и инактивация гена *KIT* каким-то образом участвуют в генезе папиллярного рака щитовидной железы.

miR-372 и *miR-373* гиперэкспрессируются и выполняют функцию онкогенов в опухолях тестикулярных половых клеток. Механизм заключается в нейтрализации р53-опосредованного ингибирования CDK в результате прямой инактивации гена-супрессора *LATS2*.

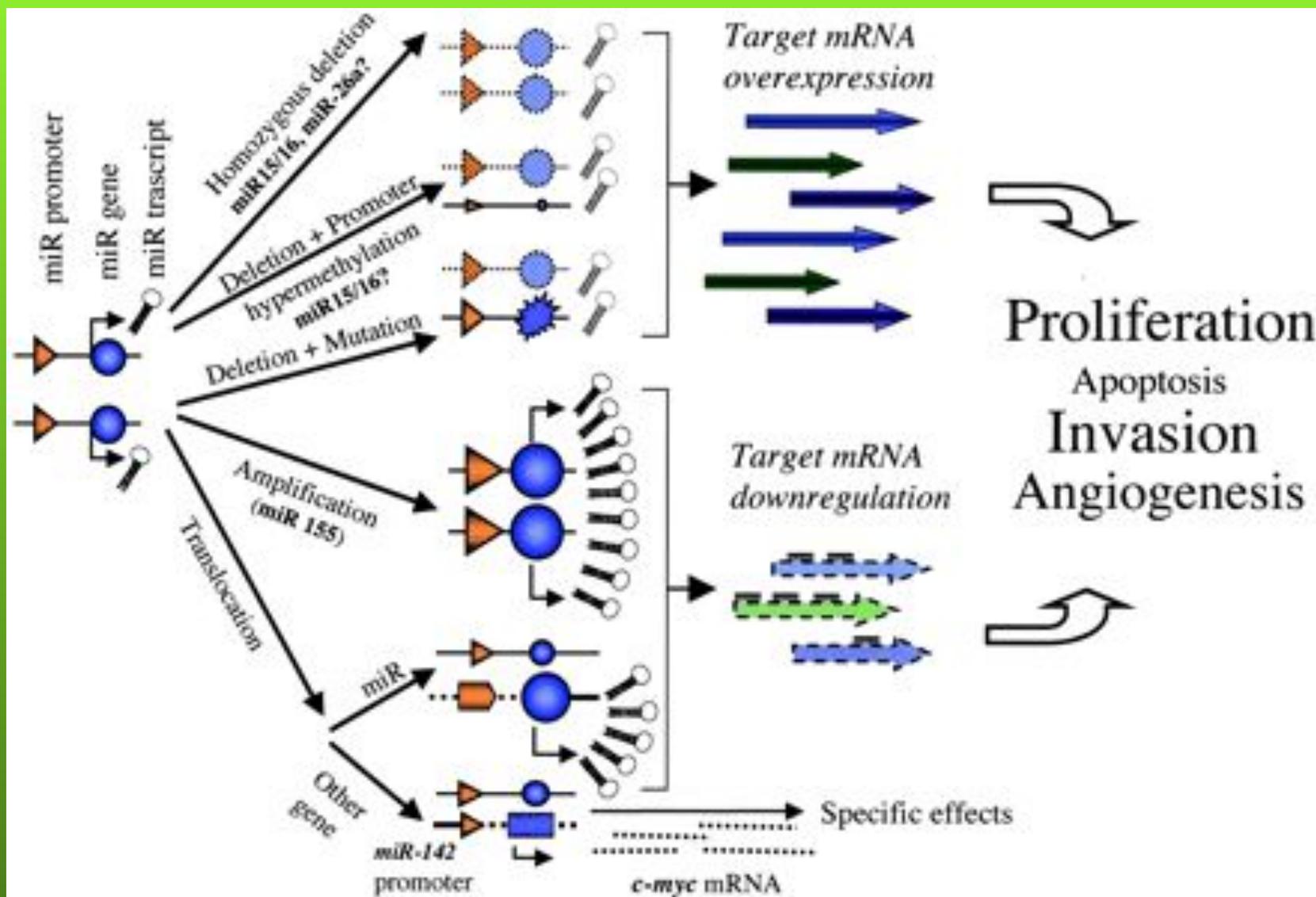
В лимфомах обнаружена гиперэкспрессия *miR-155* (в 10-60 раз) и гена *BIC*. *miR-155* расположена в консервативном районе этого гена и, возможно, активирует его. Мишенью *miR-155* является ген-супрессор *PU.1*, который необходим для регуляции последних стадий дифференцировки В-клеток. Профиль экспрессии *miR-21*, *miR-155* и *miR-221* позволяет дифференцировать два подтипа диффузной лимфомы: в подтипе ABC их экспрессия много выше, чем в подтипе GCB.

Тип рака	Экспрессия ↑/инактивация ↓ miРНК
Глиобластома	miR-21↑, miR-221↑, miR-12↓, miR-181a,b,c↓
Рак молочной железы	miR-21↑, miR-146↑, miR-155↑, miR-106↓, miR-17-5p↓, miR-125b↓, miR-145↓
Холангиокарцинома	miR-21↑, miR-141↑, miR-200b↑
Хронический лимфолейкоз	miR-16↓, miR-15↓
Колоректальный рак	miR-10a↑, miR-17-92↑, miR-20a↑, miR-31↑, miR-96↑, miR-183↑, miR-143↓, miR-145↓, let-7
Диффузная крупно В-клеточная лимфома	miR-21↑, miR-155↑, miR-221↑
Сквамозный рак головы и шеи	miR-21↑, miR-205↑
Гепатоклеточная карцинома	miR-18↑, miR-224↑, miR-199↓
Рак легкого	miR-17-92↑, let-7↓
Лимфомы	miR-155↑, miR-17-92↑,
Рак яичников	miR-200a,b,c↑, miR-141↑, miR-199a↓, miR-140↓, miR-145↓, miR-125b↓
Рак поджелудочной железы	miR-221↑, miR-181a↑, miR-21↑, miR-148a,b↓
Папиллярный рак щитовидной железы	miR-221↑, miR-222↑, miR-146↑, miR-181↑

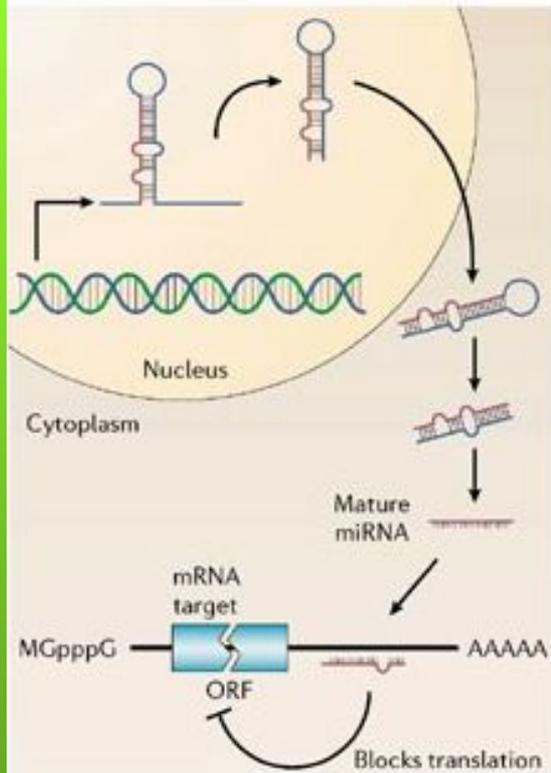
Аденомы гипофиза	miR-212↑, miR-026a↑, miR-150↑, miR-152↑, miR-191↑, miR-192↑, miR-024↓, miR-098↓, miR-15a↓, miR-16-1↓
Рак предстательной железы	miR-195↑, miR-203↑, let-7↑, miR-128↓
Рак желудка	miR-21↑, miR-103↑, miR-223↑, miR-218↓
Опухоли тестикулярных половых клеток	miR-372↑, miR-373↑

miРНК могут действовать как онкогены и гены-супрессоры. Причем профиль экспрессии miРНК в опухолях более точно отражает стадию и процесс канцерогенеза, чем профиль экспрессии мРНК.

Т.о. профиль экспрессии малых РНК в определенных типах опухолей может быть достаточно эффективным диагностическим маркером.



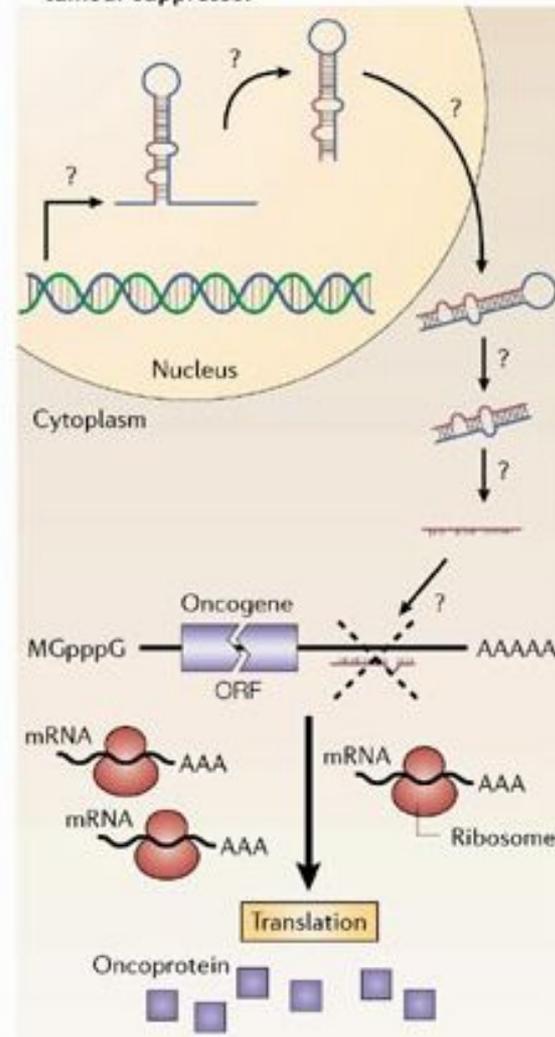
a Normal tissues



Result

Normal rate of growth, proliferation, differentiation and cell death

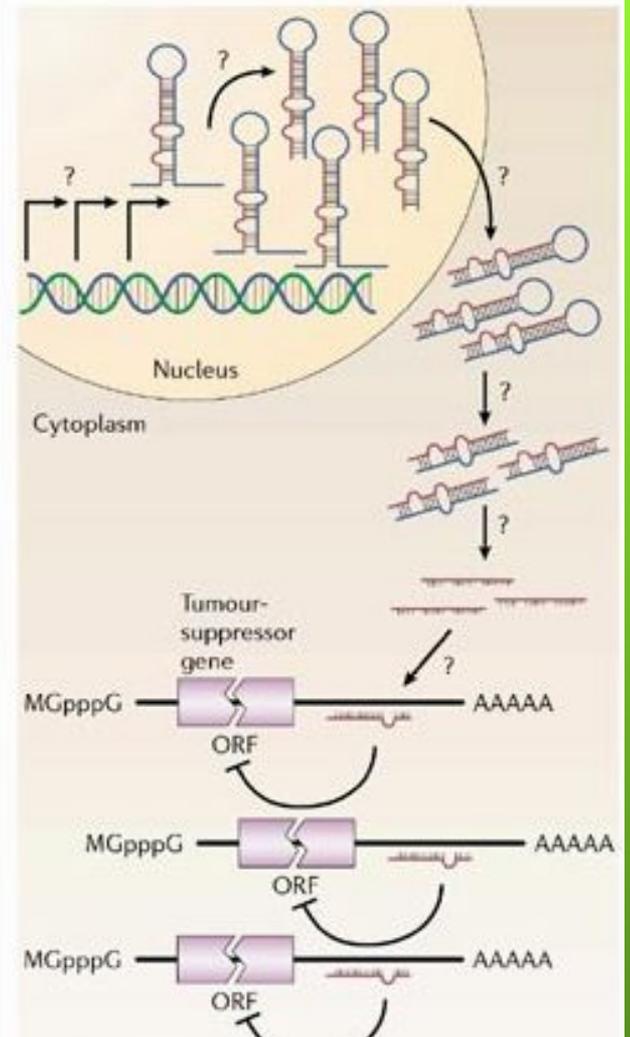
b MicroRNA functioning as a tumour suppressor



Result

Tumour formation
 ↑ Proliferation
 ↑ Invasion
 ↑ Angiogenesis
 ↓ Cell death

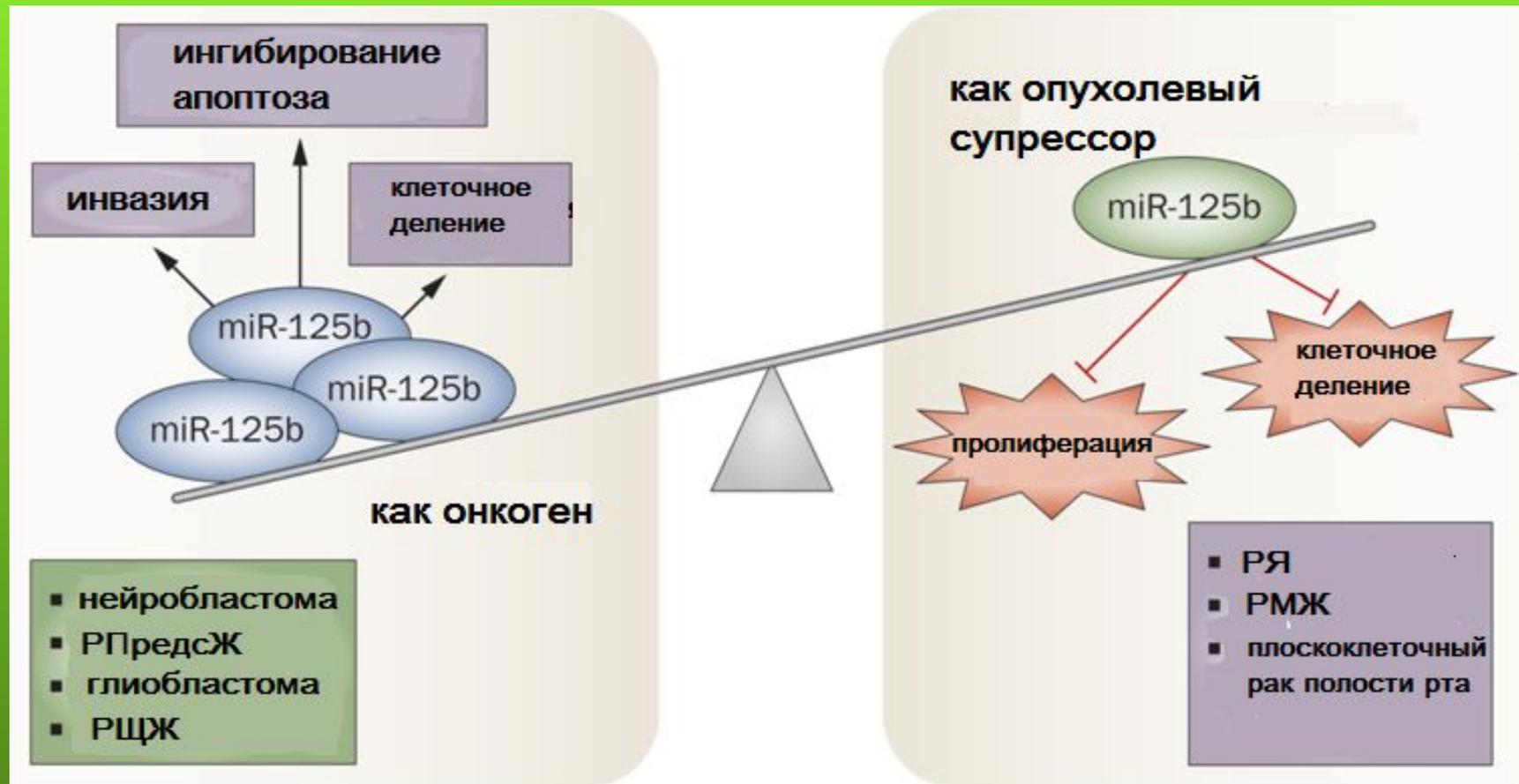
c MicroRNA functioning as an oncogene



Result

Tumour formation
 ↑ Proliferation
 ↑ Invasion
 ↑ Angiogenesis
 ↓ Cell death

Двойственная роль многих микроРНК – онкогенная и супрессорная



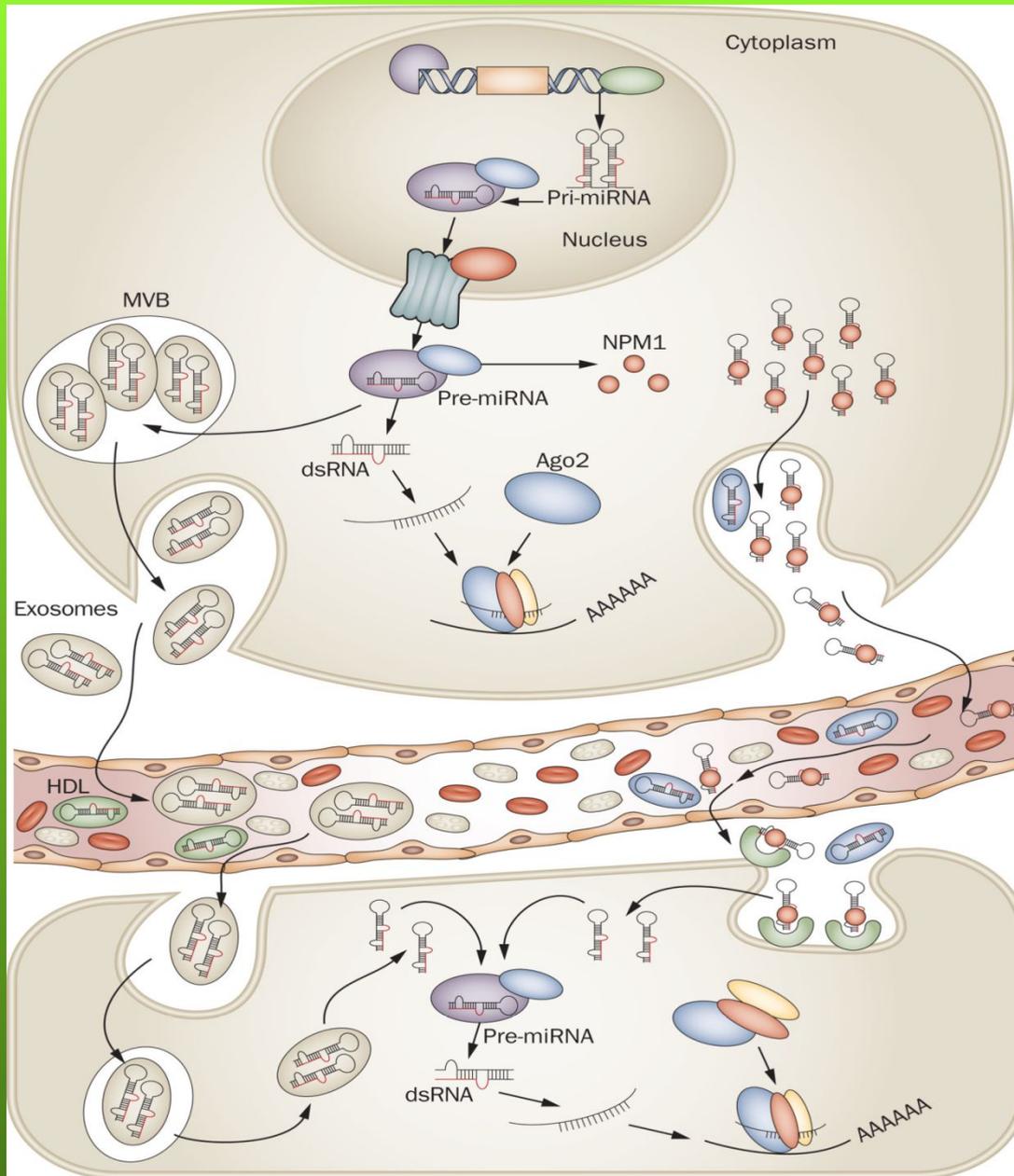
микроРНК – регуляторы различных процессов

микроРНК	изменение в опухоли	гены-мишени	процессы
miR-21	↑	BCL2, TPM1, PDCD4, PTEN, MASPIN, RHOV, MMP3	апоптоз, инвазия, метастазы
miR-155	↑	FOXO3A, SOCS1, RHOA	пролиферация, TGF- β signaling
miR-210	↑	MNT, RAD52	гипоксия
miR-145	↓	MUC1, ERA, RTKN	апоптоз, инвазия, пролиферация
miR-10b	↓↑	TIAM, HOXD10	миграция, инвазия, метастазы
miR-31	↓↑	ITGA5, RDX, RHOA	метастазы
miR-335	↓	SOX4	апоптоз, пролиферация

микроРНК – прогноз и лечение

- **Выживаемость – корреляция с экспрессией miR-21, miR-155, miR-210, miR-197**
- **Экспрессия miR-21 – чувствительность к трастузумабу**
- **Экспрессия miR-210 – чувствительность к трастузумабу**
- **Потеря miR-200с – устойчивость к таксанам**
- **Экспрессия miR-221/222 – устойчивость к тамоксифену, фулвестранту**

Внеклеточные микроРНК



В крови микроРНК циркулируют в составе экзосом или в комплексе с:

- Ago2, Argonaute2
- NPM1, nucleophosmin 1
- HDL, high-density lipoprotein

miR - стабильные молекулы

MVB – мультивезикулярные тельца

- **Одна микроРНК может регулировать сотни генов-мишеней. Аберрантная экспрессия микроРНК инициирует многие заболевания, в том числе рак.**
- **МикроРНК образуют уникальный экспрессионный профиль в опухоли и являются потенциальным биомаркёром в диагностике рака, прогнозе, выбора лекарственной терапии.**
- **Обнаружение микроРНК в биологических жидкостях создаёт возможность использования их как неинвазивного биомаркёра рака и предиктора ответа на химиотерапию.**

ХИМЕРНЫЕ ГЕНЫ

Типы химерных генов

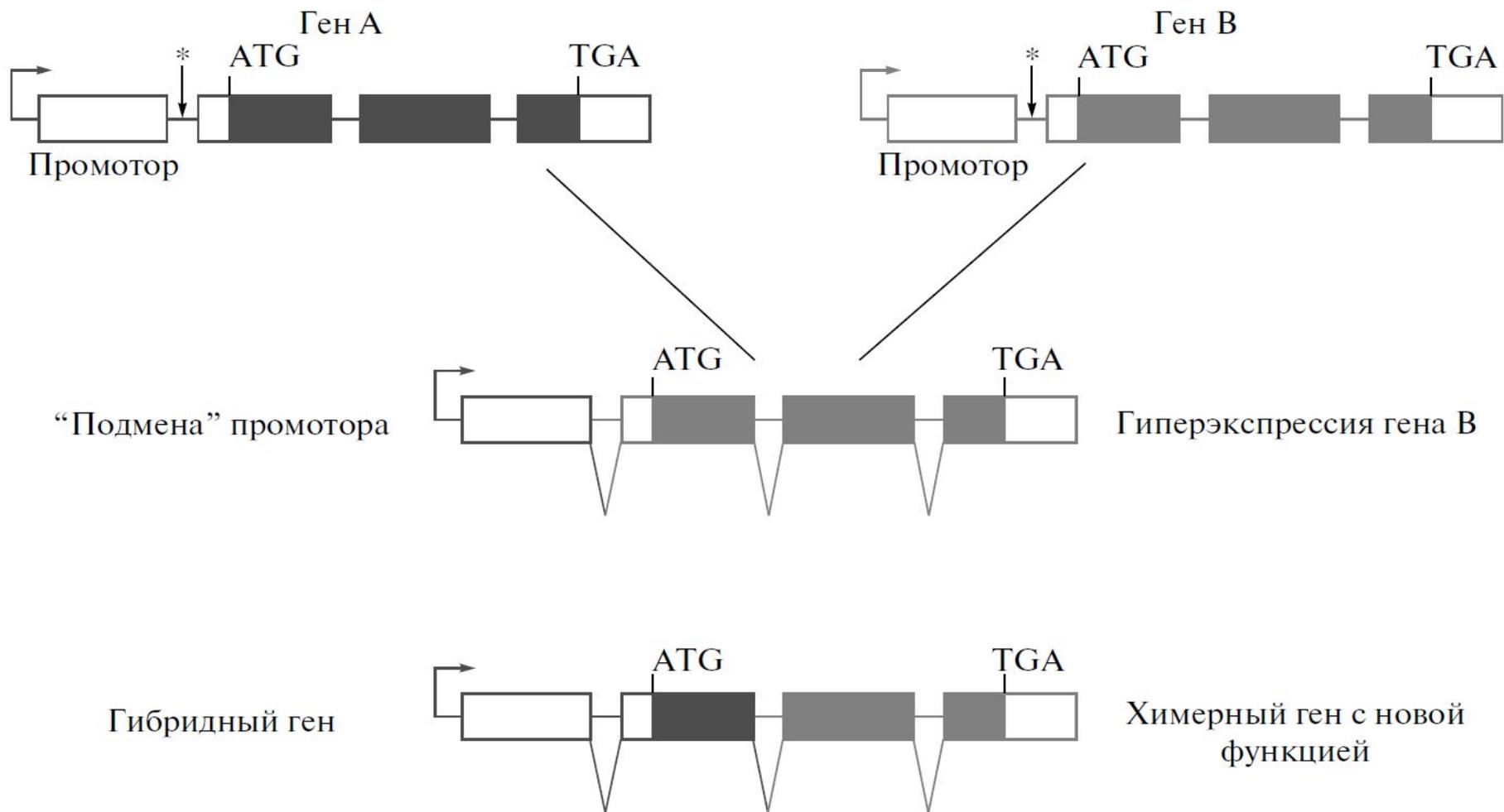
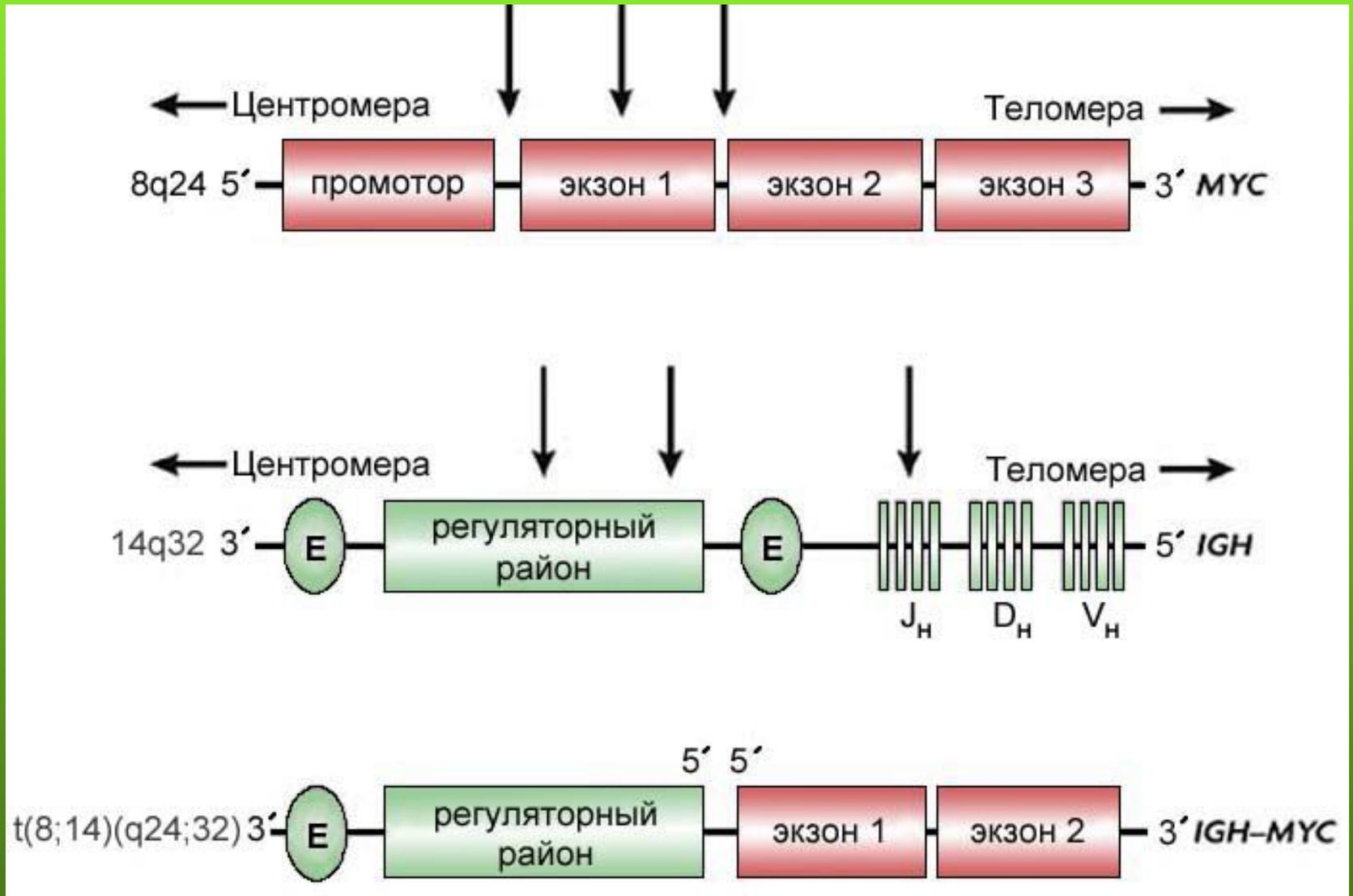
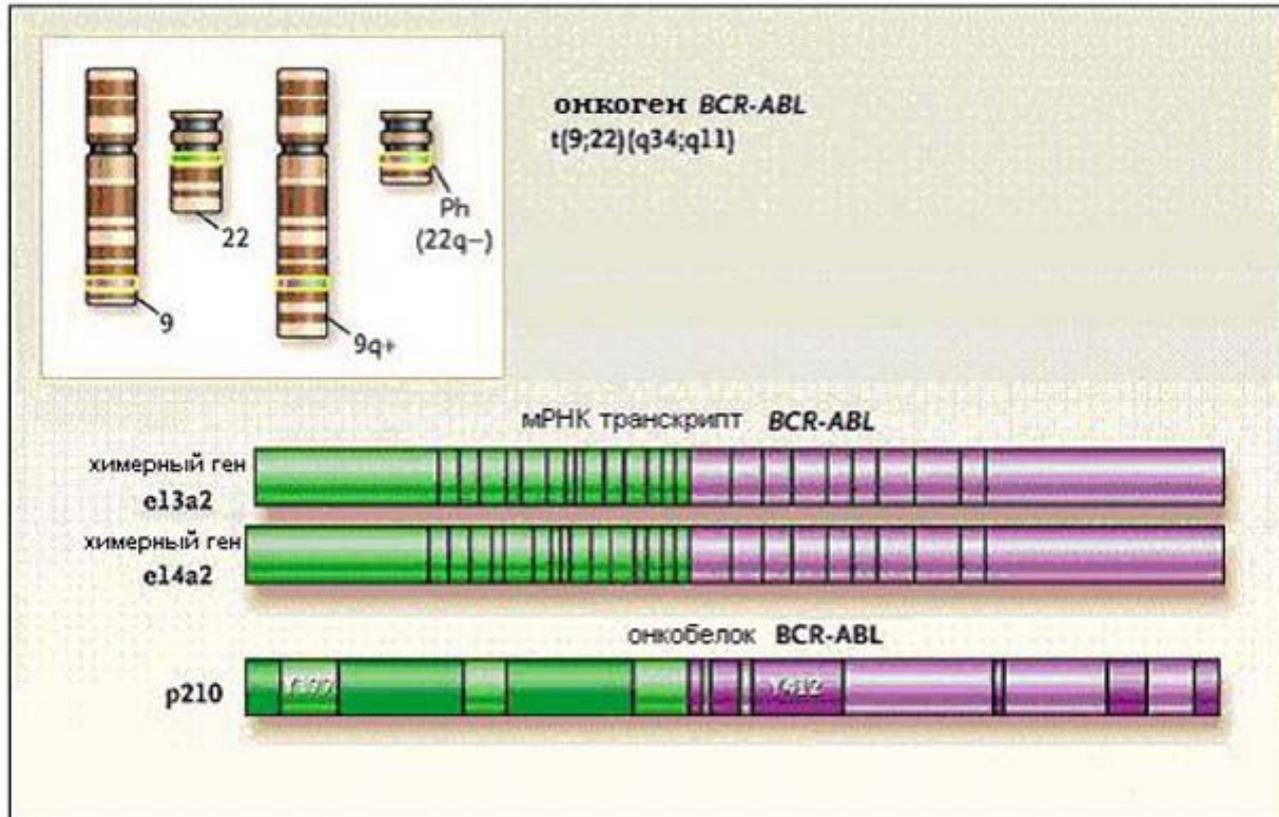


Схема транслокации хромосом 8 и 14, в результате которой возникает гиперэкспрессия протоонкогена *MYC*



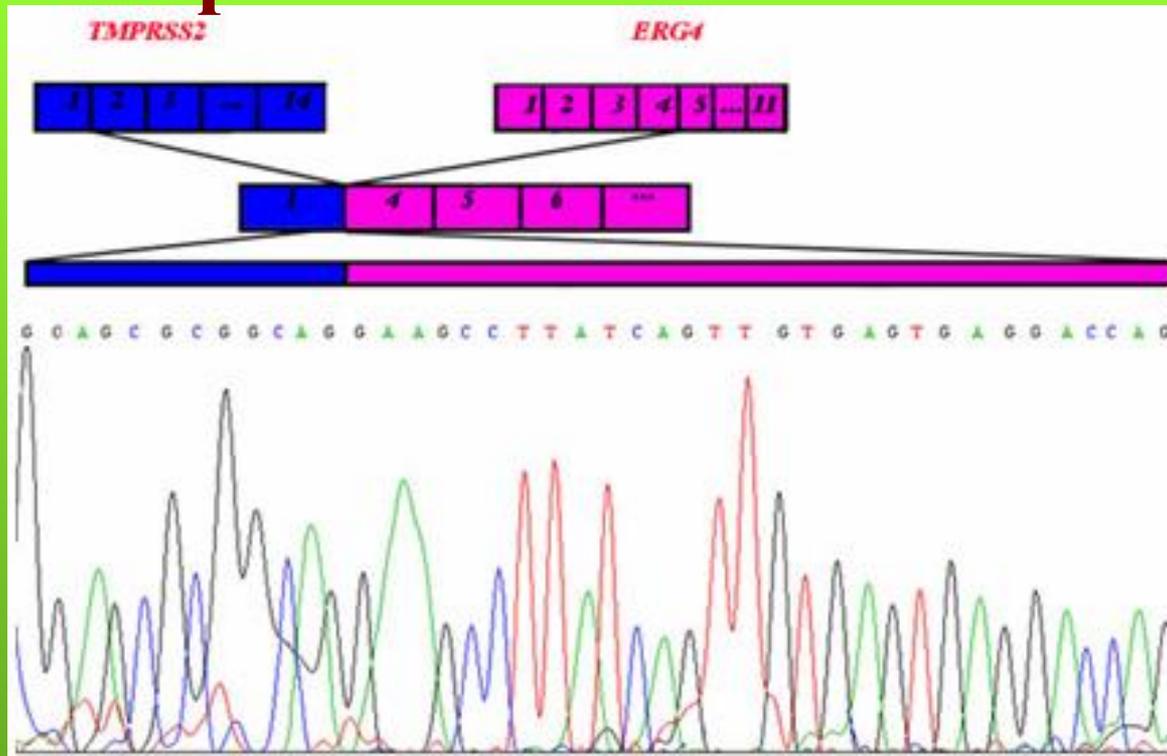
Транслокация хромосом 9 и 22 с образованием филадельфийской хромосомы и химерного онкогена BCR/ABL при хроническом миелоидном лейкозе



Возможны два варианта точек разрыва при транслокации с образованием двух транскриптов e13a2 и e14a2, которые транслируются в химерный белок p210, содержащий ряд функционально значимых доменов исходных белков. Тирозин 177 (Y177) и 412 (Y412) необходимы для связывания адаптерных белков и автофосфорилирования.

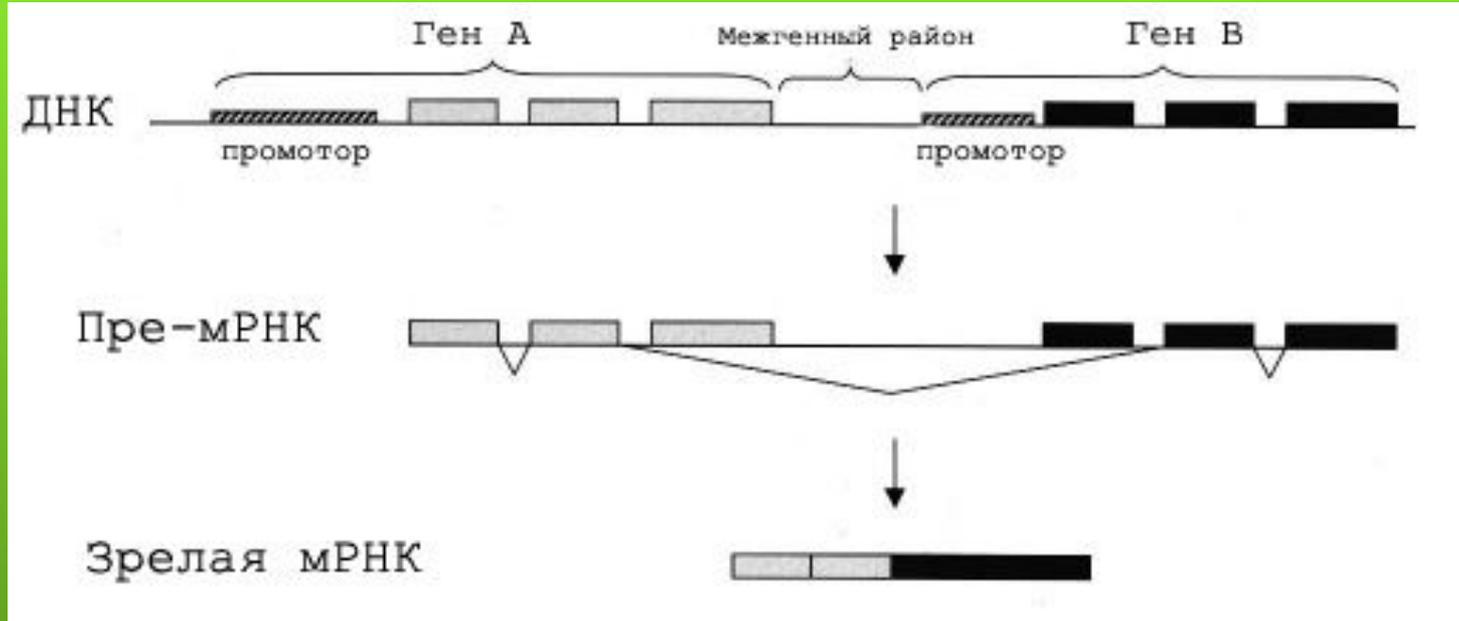
Опухоль	Хромосомная перестройка	Химерный ген
	inv(10)(q11.2q11.3)	<i>CCDC6/RET</i>
Папиллярный рак щитовидной железы	inv(10)(q11.2q21)	<i>NCOA4/RET</i>
	t(10;17)(q11;q23)	<i>PRKARIA/RET</i>
	inv (1)(q21q23)	<i>TPM3/NTRK1</i>
Фолликулярный рак щитовидной железы	t(2;3)(q13;p25)	<i>PAX8/PPARG1</i>
	t(3;7)(p25;q34)	<i>CREB3L2/PPARG1</i>
	t(3;8)(p21;q12)	<i>CTNNB1/PLAG1</i>
Рак предстательной железы	del(21)(q22.2q22.3)	<i>TMPRSS2/ERG</i>
	t(17;21)(q21;q22)	<i>TMPRSS2/ETV4</i>
Аденокарцинома легкого	inv(2)(p21p23)	<i>EML4/ALK</i>
Саркома Юинга/PNET	t(11;22)(q24;q12)	<i>FLI1/EWSR1</i>
	t(21;22)(q22;q12)	<i>ERG/EWSR1</i>
Миксоидная липосаркома	t(12;16)(q13;p11)	<i>FUS/CHOP</i>
	t(12;22)(q13;q12)	<i>EWS/CHOP</i>
		<i>SYT/SSX1</i>
Синовиальная саркома	t(X;18)(p11;q11)	<i>SYT/SSX2</i>
		<i>SYT/SSX4</i>
Альвеолярная рабдомиосаркома	t(2;13)(q35;q14)	<i>PAX3/FKHR</i>
	t(1;13)(p36;q14)	<i>PAX7/FKHR</i>
Альвеолярная саркома мягких тканей	t(X;17)(p11;q25)	<i>ASPL/TFE3</i>
Светлоклеточная саркома	t(12;22)(q13;q12)	<i>EWSR1/ATF1</i>
Ангиоматоидная фиброзная гистиоцитома	t(12;16)(q22;q13)	<i>FUS/ATF1</i>
Врожденная фибросаркома	t(12;15)(p13;q25)	<i>ETV/NTRK3</i>
Д	t(11;22)(q12;q12)	<i>EWS/ATF1</i>

Химерный ген *TMPRSS2/ERG4*

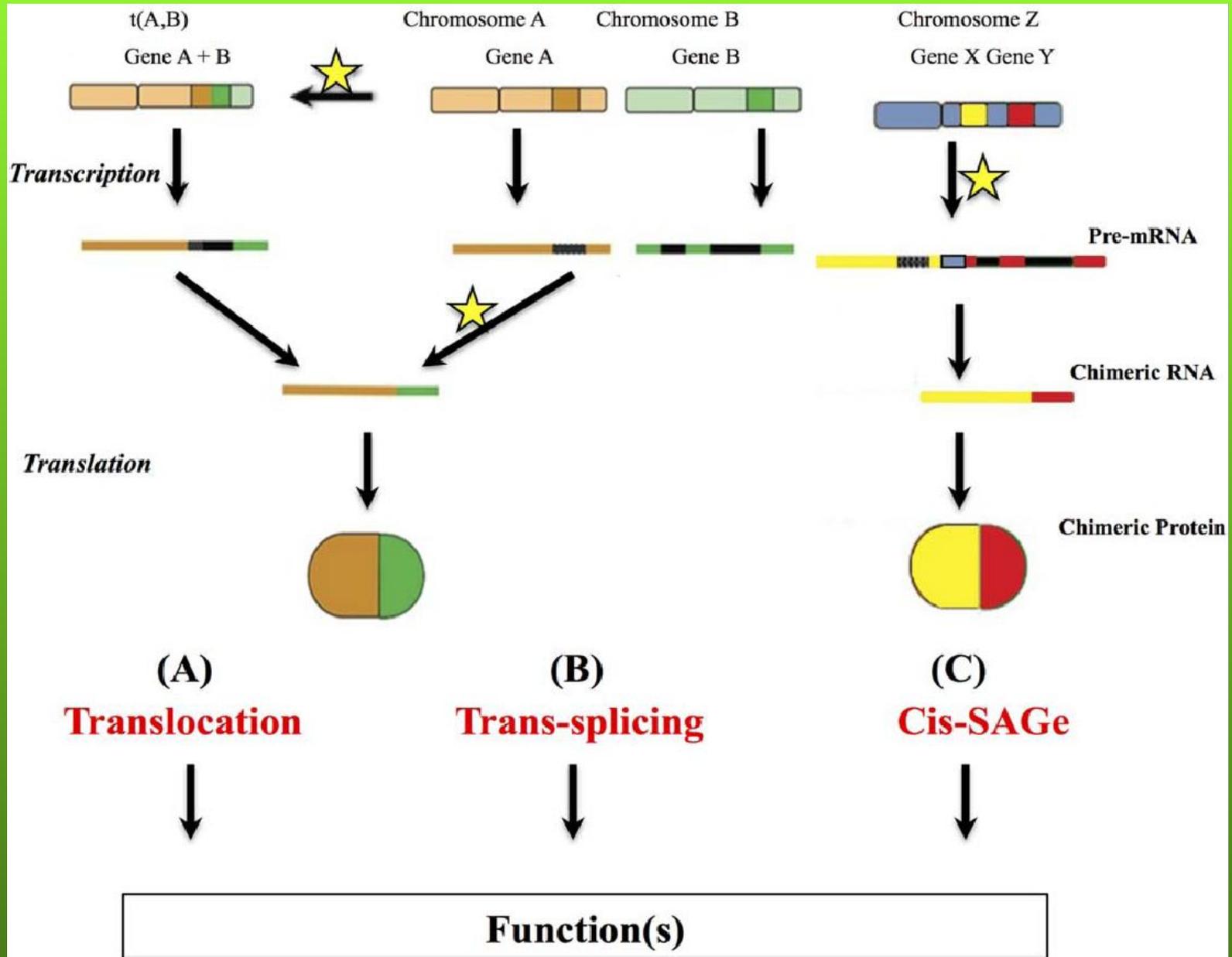


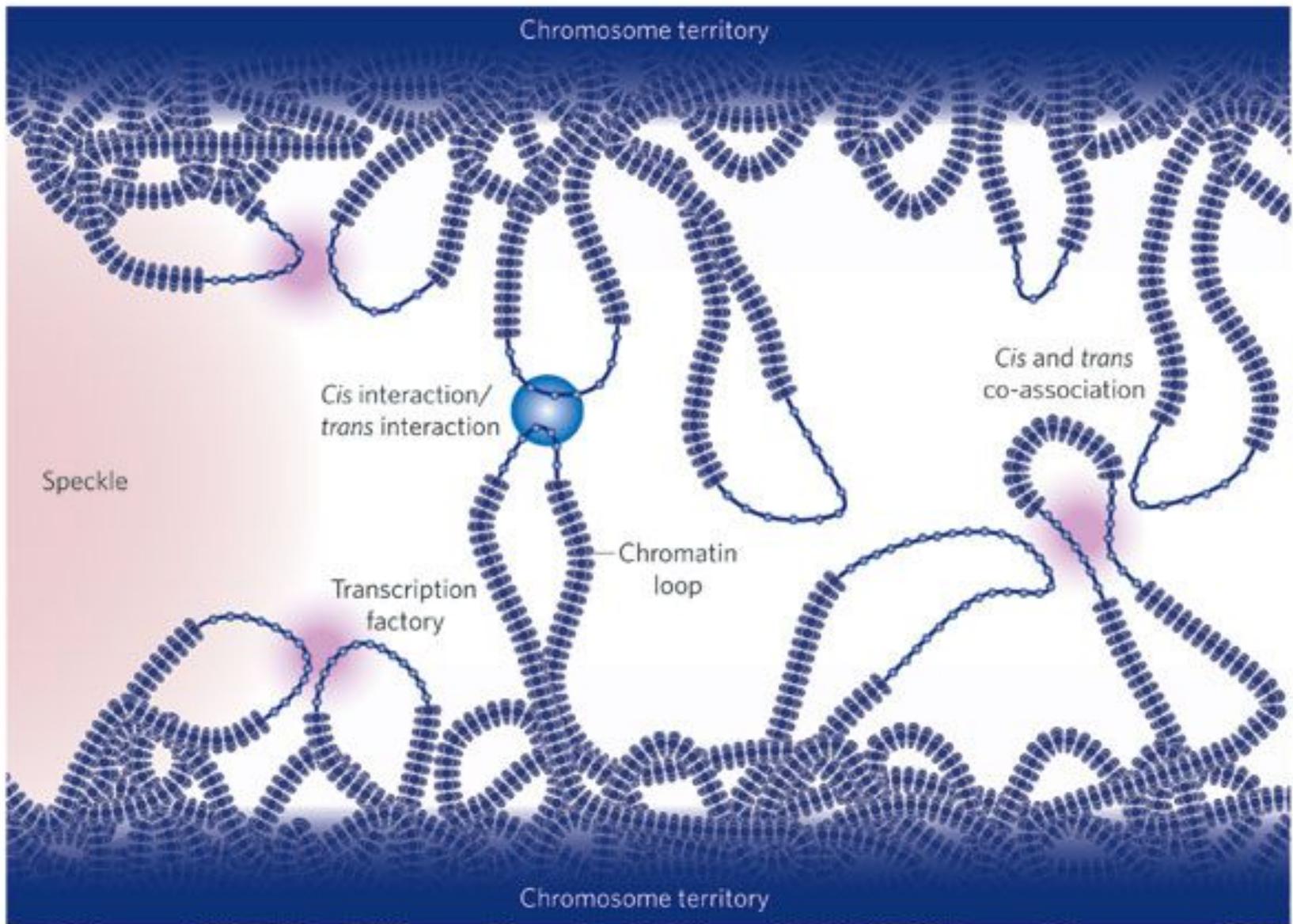
Особенностью канцерогенеза РПЖ является гиперэкспрессия факторов транскрипции семейства ETS вследствие хромосомных перестроек $\text{del}(21)(\text{q}22.2;\text{q}22.3)$, $\text{t}(7;21)(\text{p}21;\text{q}22)$ и $\text{t}(17;21)(\text{q}21;\text{q}22)$. Наиболее частый химерный ген (до 78%) образуется в результате слияния гена *TMPRSS2* (21q22) с расположенным рядом геном *ERG4*. Экспрессия трансмембранной сериновой протеиназы *TMPRSS2* является простатспецифической и андрогензависимой. Таким образом, активация факторов транскрипции ETS осуществляется при помощи андрогенчувствительных промоторных и энхансерных элементов. Химерный транскрипт *TMPRSS2/ERG4* ассоциирован с инвазией в семенные пузырьки, ранним рецидивом, агрессивным течением и метастазированием РПЖ.

Модель обусловленного транскрипцией химеризма (межгенного сплайсинга)



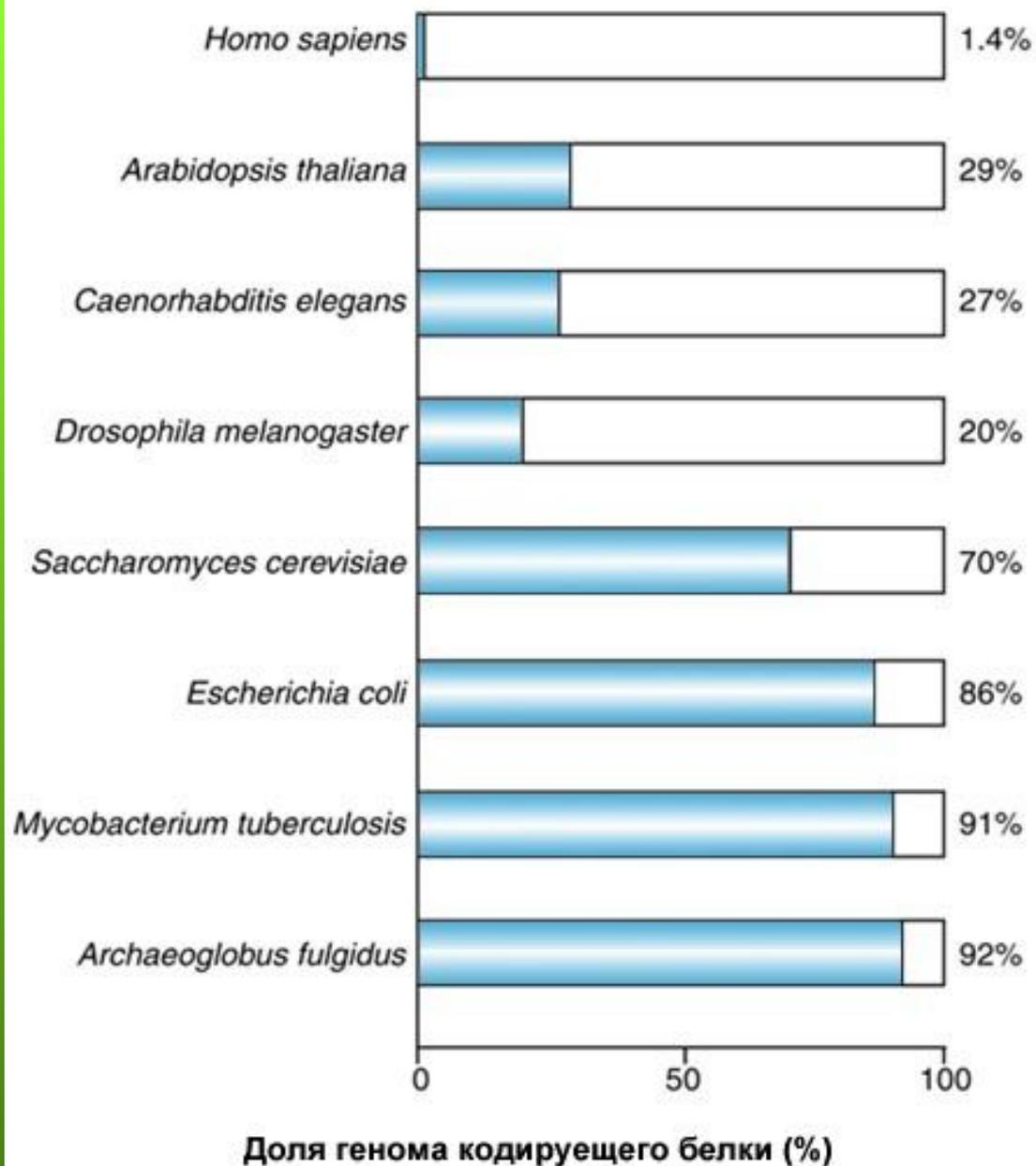
Транс-сплайсинг подразумевает две различные молекулы РНК генов, находящихся на разных хромосомах, цис-сплайсинг – результат слияния РНК двух близкорасположенных генов в одну объединенную молекулу мРНК. Предполагают, что в образовании химер могут участвовать более 400 генов





Подвижность генов – важный фактор их регуляции.
Кластеры активных генов - 150-200 т.п.н., расстояние между кластерами
~ 70 м.п.н. *in cis*

АЛЬТЕРНАТИВНЫЙ СПЛАЙСИНГ И ПАТОЛОГИЯ У ЧЕЛОВЕКА



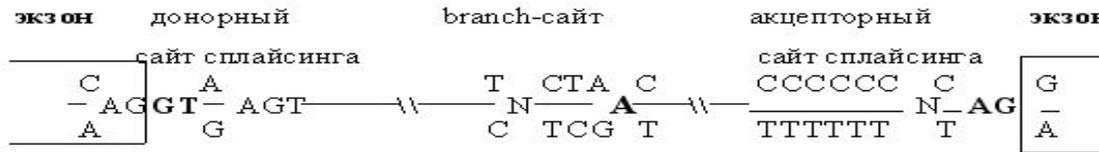
23341

13985

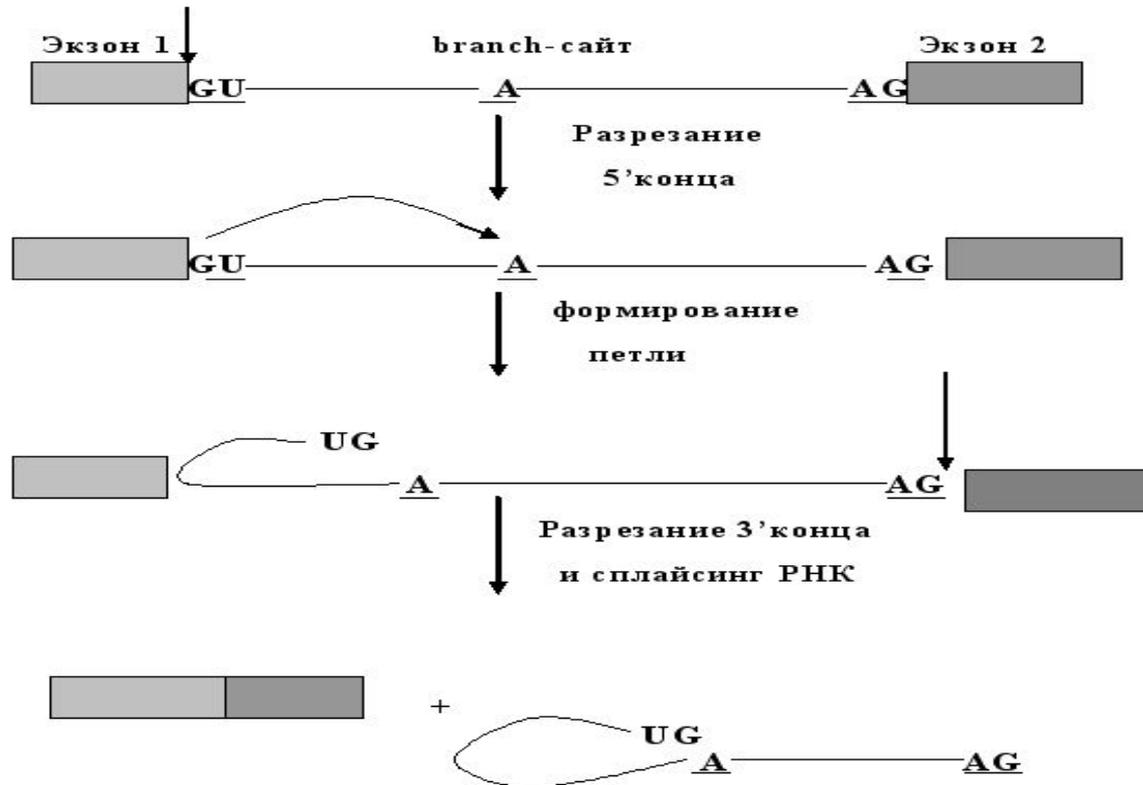
Около 70% генов человека могут подвергаться альтернативному сплайсингу, что вносит значительный вклад в разнообразие протеома и объясняет несоответствие между количеством генов (около 23341) и количеством белков человека (более 90000). Первичный транскрипт может иметь несколько районов альтернативного сплайсинга и в результате различных комбинаций ген может кодировать от десятков до сотен различных изоформ.

Анализ по реконструкции мРНК 22 хромосомы человека показал, что около 60% генов имеют два и более транскриптов. Выявлено около 10000 активных промоторов, значительная часть которых соответствует транскриптам с неизвестной функцией.

A.



B.

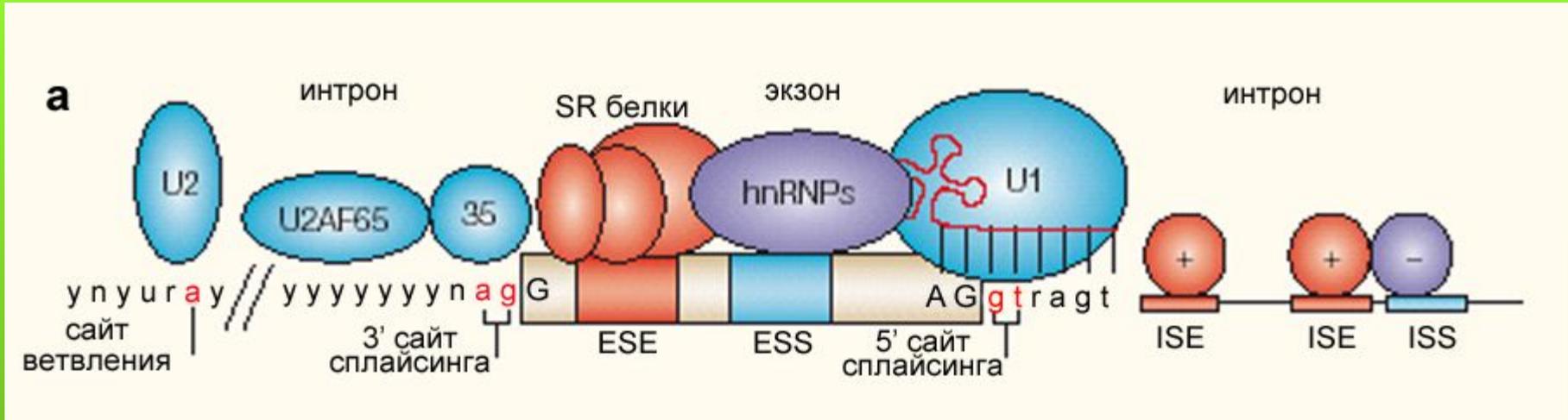


A. – консенсусные последовательности донорного сайта сплайсинга, акцепторного сайта сплайсинга и branch-сайта в интронах эукариот.

B. – механизм сплайсинга РНК с участием branch-сайта

Четыре коротких последовательности нуклеотидов позволяют определить интрон: экзон-интронные границы в 5' и 3' концах интрона, сайт ветвления, расположенный выше 3' сайта сплайсинга и полипиримидиновый тракт, расположенный между сайтом ветвления и 3' сайтом сплайсинга. Все типы сплайсинга пре-мРНК происходят в сплайсосоме – большом комплексе, состоящим из 5 малых ядерных РНК молекул (U1, U2, U4-6) и не менее 150 белков. Каждая из 5 мяРНК взаимодействует с белками для того, чтобы сформировать малые ядерные рибонуклеопротеиновые комплексы (мяРНП). Координированное связывание пяти мяРНП с сигналами сплайсинга пре-мРНК приводит к удалению интронов и воссоединению экзонов.

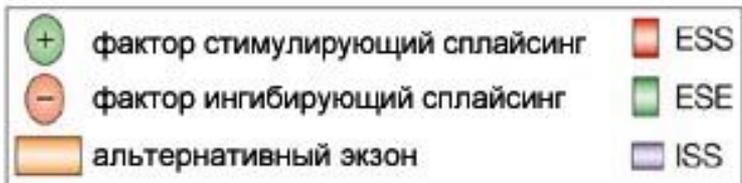
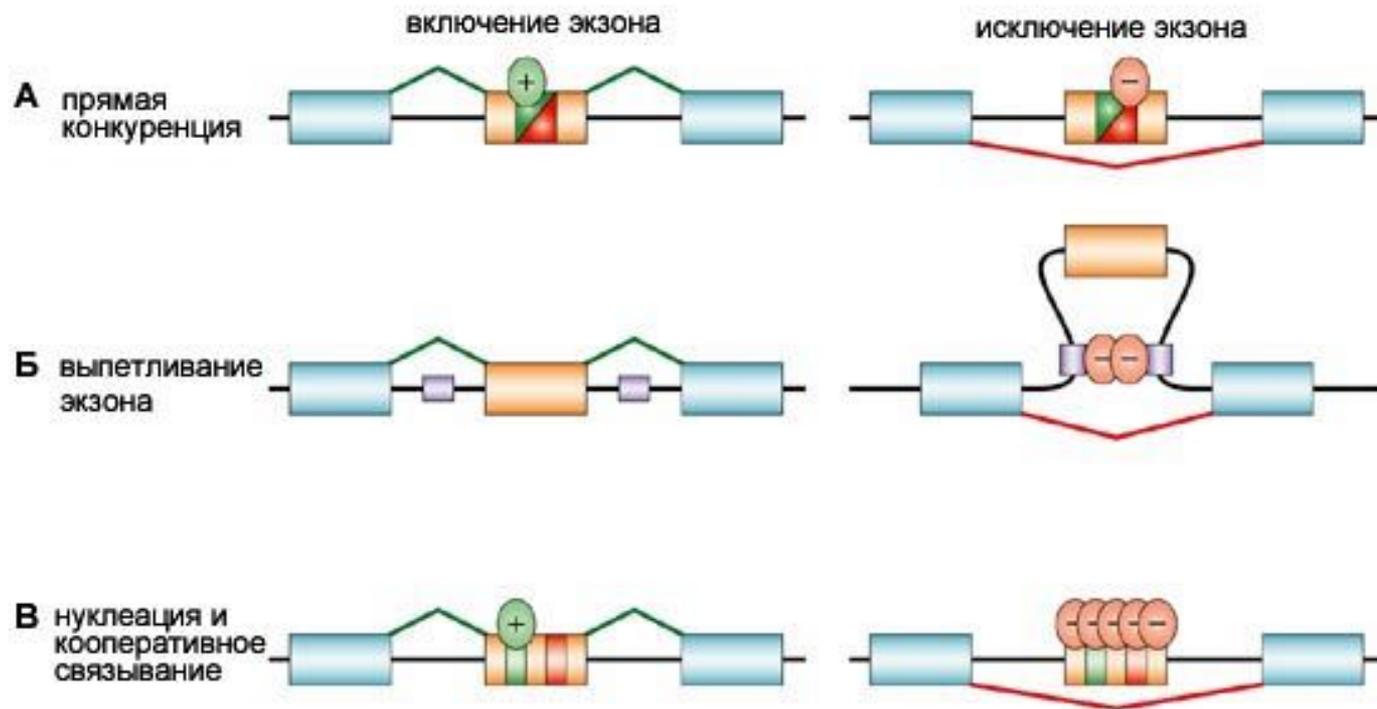
Регуляторные элементы сплайсинга в пре-мРНК

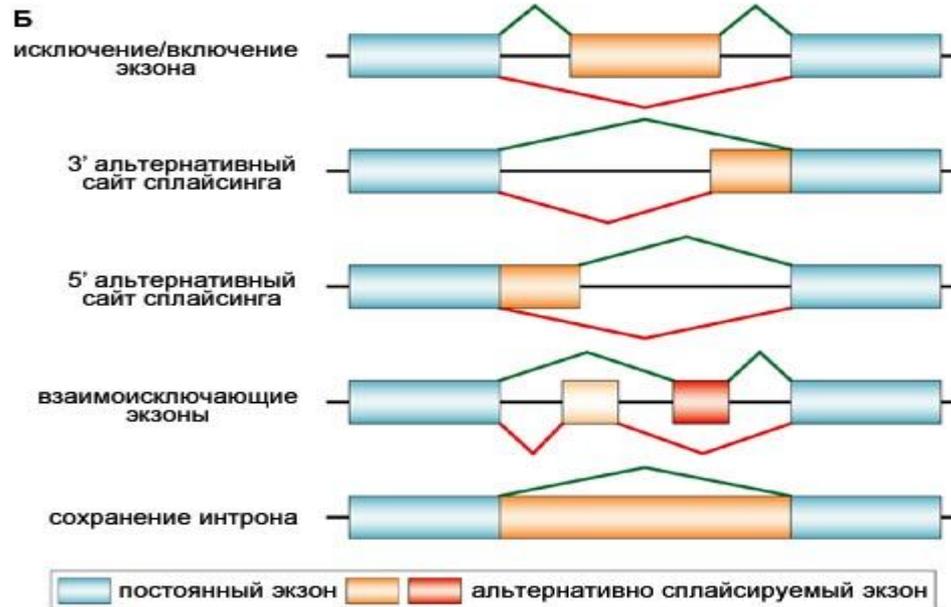
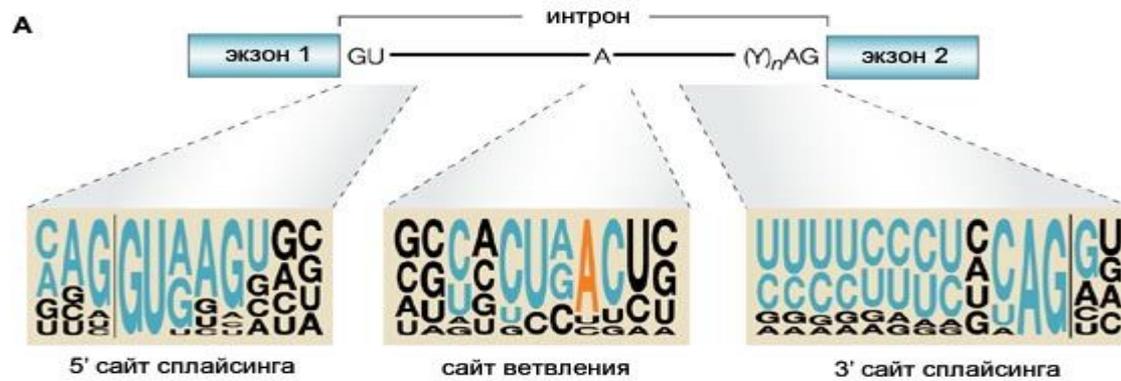


У –пиримидины (С/Т); ESE – экзонные энхансеры сплайсинга; ESS – экзонные сайленсеры сплайсинга; ISE - интронные энхансеры сплайсинга; ISS - интронные сайленсеры сплайсинга; U1 и U2 – малые ядерные рибонуклеопротеиновые частицы; SR – серин/аргинин богатые белки; hnRNP – гетерогенные ядерные рибонуклеопротеиновые частицы.

Экзонные энхансеры сплайсинга представляют собой сайты связывания обогащенных серином и аргинином белков (SR-белки). Эти белки являются высоко консервативными факторами сплайсинга, которые имеют 1-2 мотива распознавания и связывания РНК и обогащенный Arg/Ser дипептидами карбокситерминальный домен (RS-домен), участвующий в белок-белковых взаимодействиях.

Экзонные сайленсеры сплайсинга работают через взаимодействие с негативными регуляторами, которые относятся к семейству гетерогенных ядерных рибонуклеопротеинов (гяРНП). Это класс различных РНК-связывающих белков, ассоциированных с вновь синтезированной пре-мРНК.





Основные формы альтернативного сплайсинга: 1) пропускание экзона составляет около 38%; 2) альтернативные 3' и 5' сайты сплайсинга составляют 18% и 8%; 3) сохранение интрона - менее 3%; 4) взаимоисключение экзонов, альтернативные сайты старта транскрипции и множественные сайты полиаденилирования составляют 33%.

Ген	Тип опухоли	Кол-во сплайс-вариантов
CD44	Различные типы	20
WT1	Нефробластома	4
BRCA1/ BRCA2	Рак молочной железы, яичников, предстательной и поджелудочной желез	24
MDM2	Рак молочной железы и яичников, мочевого пузыря, саркомы	40
PCA	Рак предстательной и молочной желез	8
KLK2	Рак предстательной железы	3
KLK13	Рак яичка	5
FGFR1	Рак поджелудочной и предстательной желез	3
FGFR2	Рак мочевого пузыря и предстательной железы	2
FGFR3	Множественная миелома, колоректальный рак	2
FGFR4	Рак молочной железы, аденома гипофиза	2
RET	Феохромоцитомы, рак щитовидной железы	6
VEGF	Почечно-клеточный рак	6
WFDC2	Рак яичников	5

Сплайс-варианты *CD44*

CD44 - мультифункциональный рецептор, вовлеченный в межклеточные взаимодействия, перемещение клеток, метаболизм гиалуроновой кислоты, передачу сигналов для гематопоеза, апоптоза, роста клеток и др. Содержит 20 экзонов, из которых первые и последние 5 консервативны, а 10 внутренних экзонов подвергаются АС. *CD44* и его варианты экспрессируются во многих типах раковых клеток, но некоторые варианты специфичны для определенных типов клеток.

Вариант, содержащий экзоны 8-10 вариабельного района (*CD44v8-10*), преимущественно экспрессируется в эпителиальных клетках, а вариант, содержащий экзоны 3-10 (*CD44v3-10*) – в кератиноцитах. По экспрессии *CD44v10* можно дифференцировать метастатический и неметастатический рак поджелудочной железы. Экспрессия *CD44v6* коррелирует с более продвинутыми стадиями рака желудка, а пациенты имеют более низкую 3- и 5-летнюю выживаемость. Снижение экспрессии *CD44* и *CD44v6* и гиперэкспрессия варианта *CD44v7-9* при раке предстательной железы свидетельствует о большей злокачественности опухоли и плохом прогнозе. Экспрессия *CD44v5* коррелирует с агрессивностью эпителиальных опухолей тимуса, а так же с метастазированием остеосаркомы.

Т.о., варианты *CD44* могут быть полезными маркерами в диагностике и прогнозировании злокачественных опухолей.

миРНК могут регулировать альтернативный сплайсинг. Их возможное участие согласуется с данными о высокой консервативности последовательностей, примыкающих к альтернативным сайтам сплайсинга, у различных видов. Было показано, что расположение сайтов сплайсинга можно легко изменить, как в культуре клеток, так и *in vivo*, введением антисмысловых малых РНК, что оказалось многообещающим подходом к генотерапии миодистрофии и некоторых других наследственных болезней человека, вызванных мутациями сайтов сплайсинга. Предполагается, что малые РНК и в норме контролируют выбор сайтов сплайсинга.

Лекарственные средства для аномальных эпигенетических событий

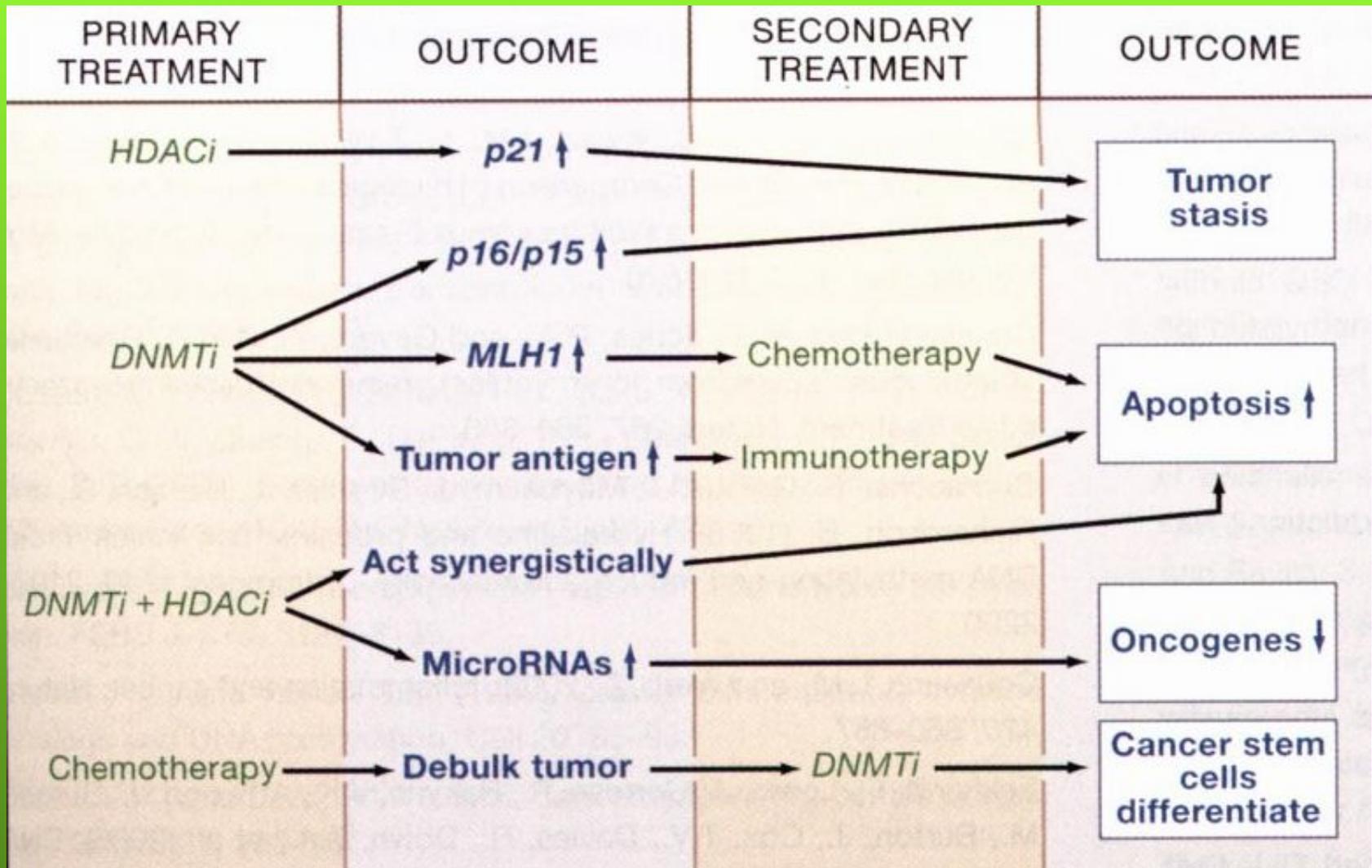
Ингибиторы ДНК-метилтрансфераз

5-Azacytidine	Vidaza	(лейкемия, МДС)
5-Aza-2'-deoxycytidine	Decitabine	(лейкемия, МДС)
Arabinosyl-5-azacytidine	Fazarabine	
5-6-Dihydro-5-azacytidine	DHAC	
5-Fluoro-2'-deoxycytidine	Gemcitabine	
Epigallocatechin-3-gallate	EGCG Green tea polyphenol	
Hydralazine	Cardiovascular drug	
MG98	DNMT1 antisense	
Procainamide	Cardiovascular drug	
Procaine	Anesthetic	

Ингибиторы гистондеацетилаз

Apicidin	Phenylbutyrate
Butyrates	CBHA
m-Carboxycinnamic acid bishydroxamide	
Cyclic hydroxamic-acid-containing peptide 1	
Depudecin Epoxide	
FK228 Depsipeptide	FR901228
MS-275 Benzamidine	
Oxamflatin	
Pyroxamide	
Suberic Bishydroxamic Acid	SBHA
Suberoylanilide Hydroxamic Acid	SAHA (кожная Т-клеточная лимфома)
Trichostatin A	TSA
Trapoxin A	
Valproic acid	

Стратегии эпигенетической терапии



Методы анализа метилирования

1. Метилчувствительная ПЦР (Not1, Eag1, SacII, HpaII, NhaI)

аналитическая чувствительность - 1: 2000

2. Метилспецифическая ПЦР

Трансформация цитозина в урацил бисульфитом Na

аналитическая чувствительность - 1: 1000

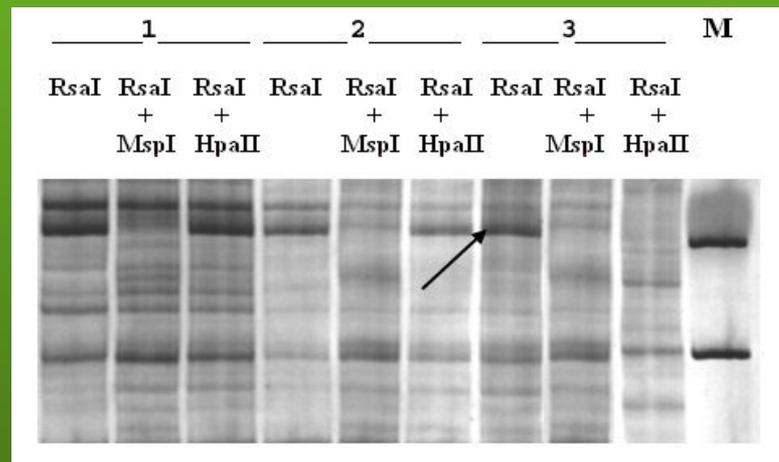
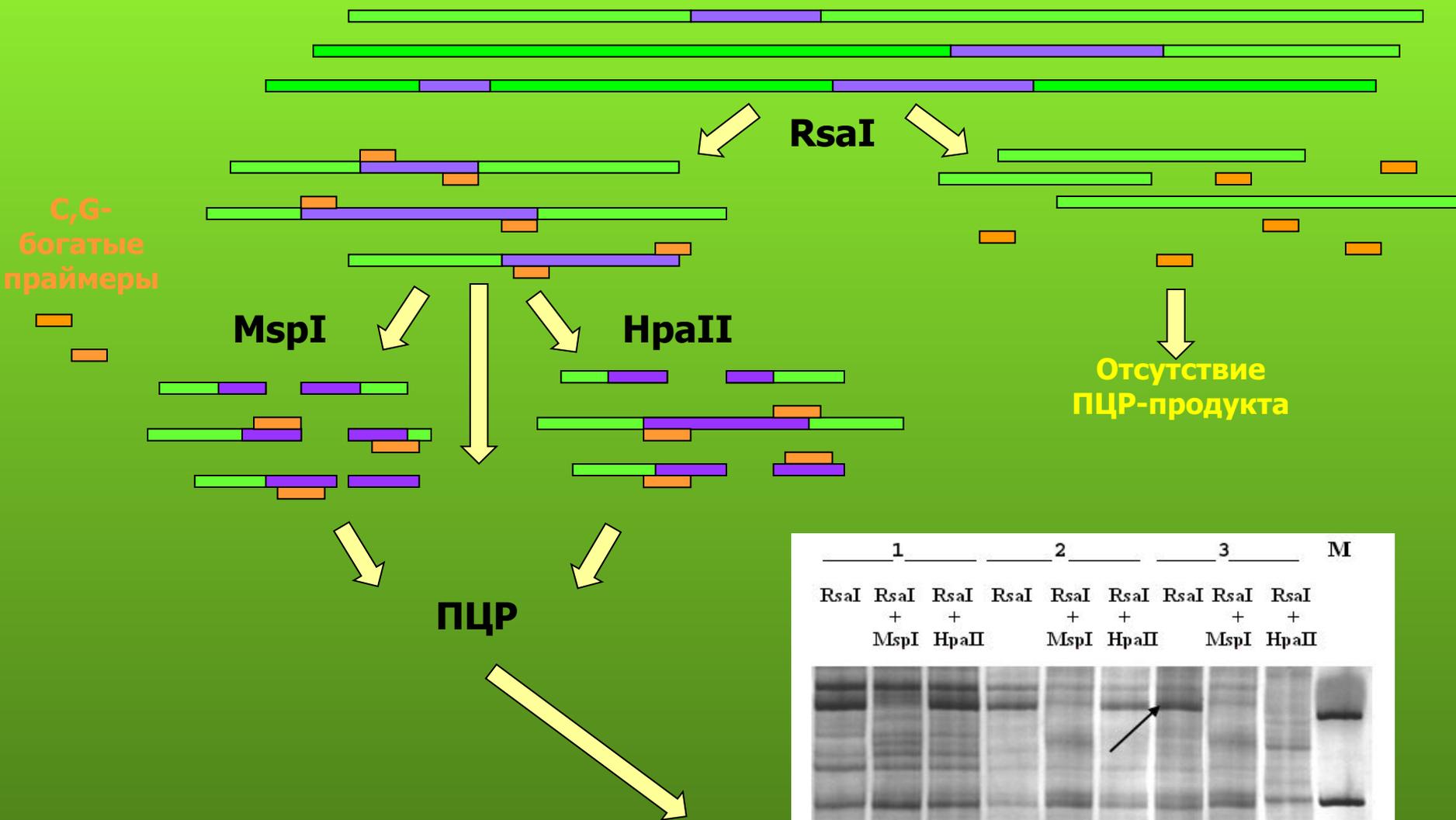
3. MethylLight – метилспецифическая ПЦР в реальном времени

аналитическая чувствительность - 1: 10000

4. Метилспецифическое секвенирование

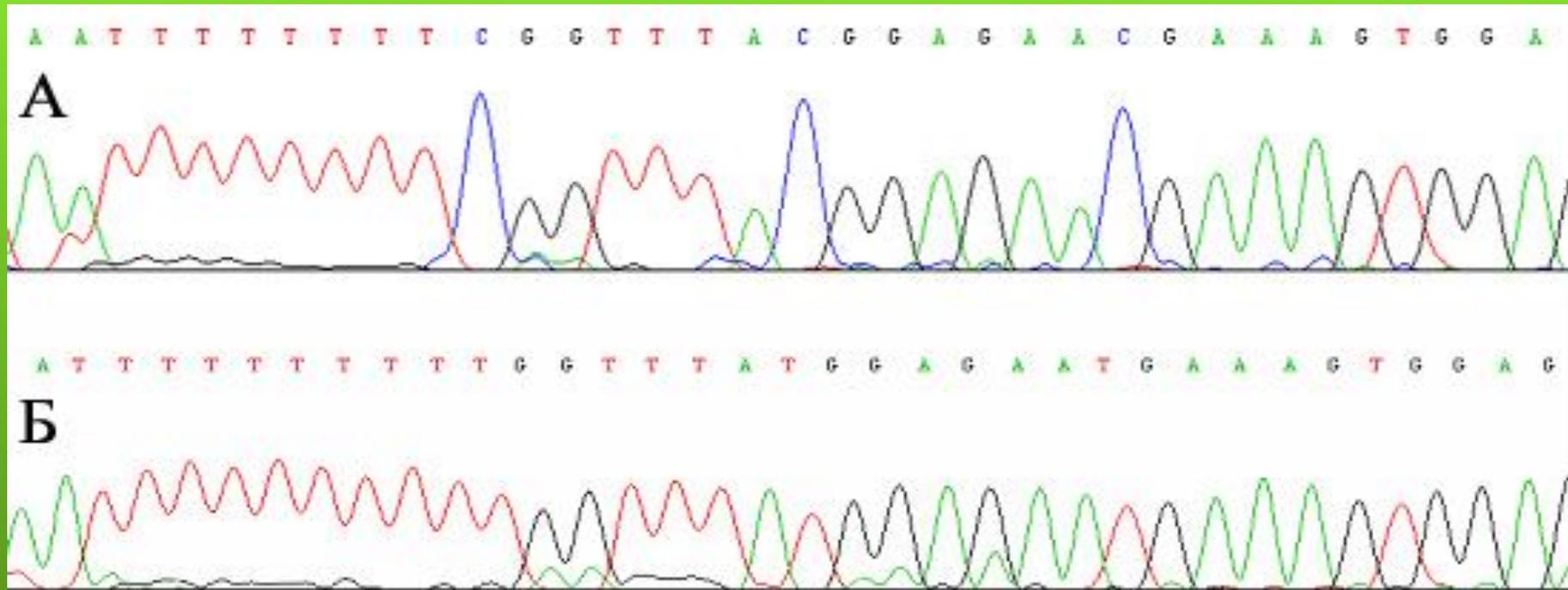
5. Биологические микрочипы

Принцип метода метилчувствительного фингерпринтинга



Молекулярная патология гена *VIN1* при РМЖ: метилирование

Метилспецифическое секвенирование

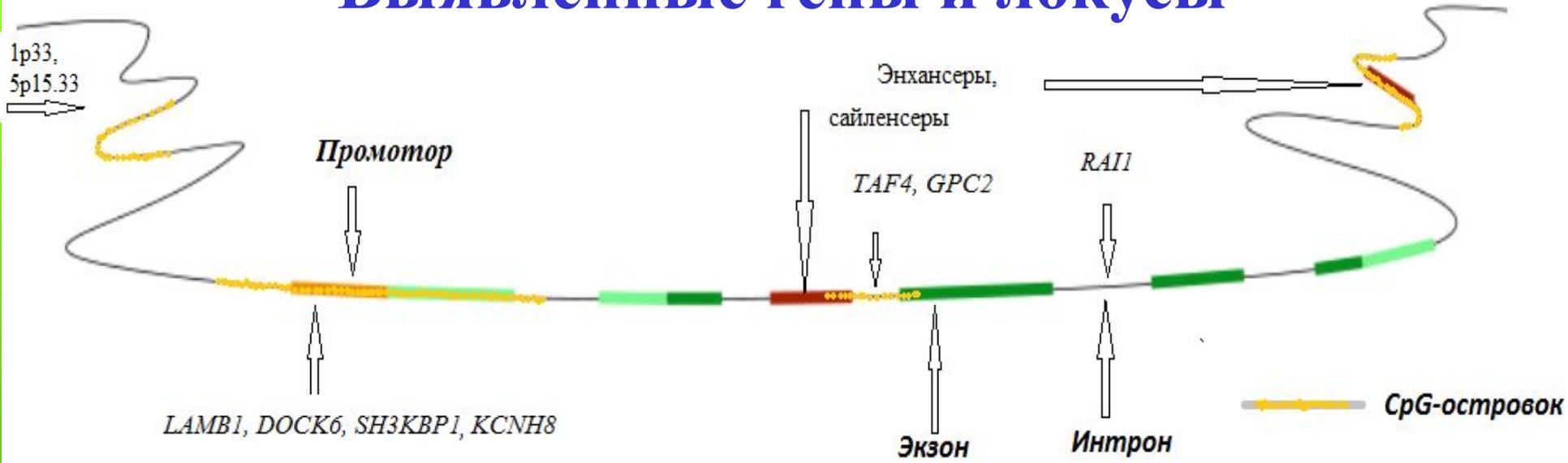


Результаты метилспецифического секвенирования фрагмента промоторного CpG-островка гена *VIN1*. А – метилированная последовательность, в качестве матрицы использована ДНК из клеточной линии MCF7; Б – неметилированная последовательность (ДНК из нормальной ткани молочной железы).

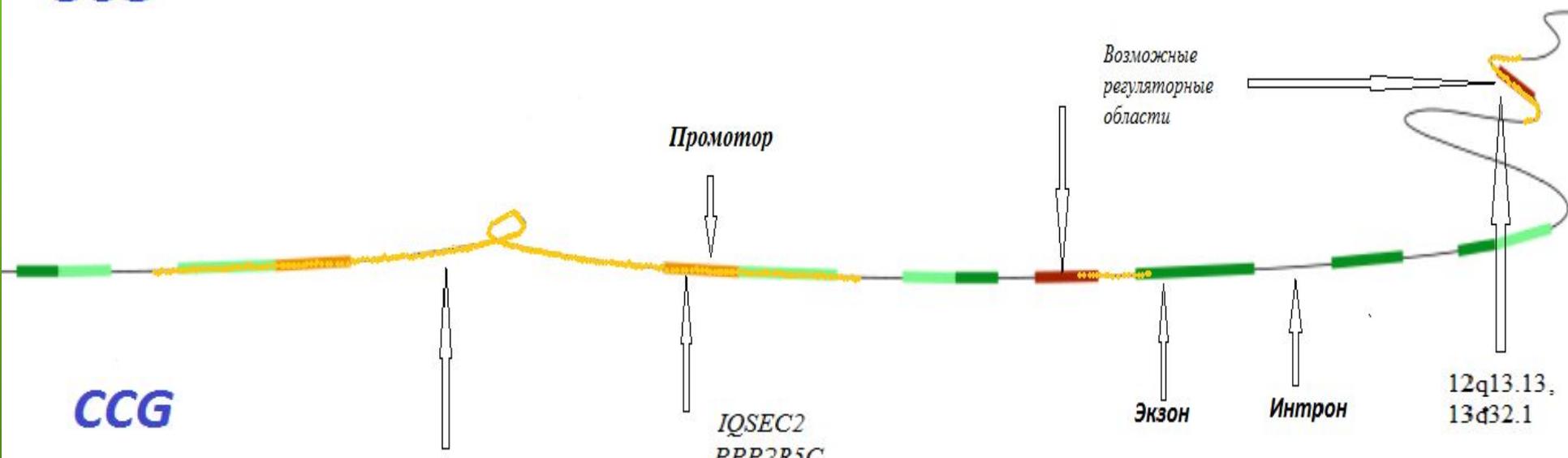
Промоторы достаточно большого числа генов имеют CpG-островки протяженностью свыше 1000 п.н., которые характеризуются гетерогенным статусом метилирования. Так, CpG-островок промотора гена *CDKN2A* захватывает промоторную область и первый экзон гена, но подавление транскрипции происходит лишь при метилировании области в 230 п.н., которая перекрывает сайт инициации транскрипции. Ген *RASSF1A* также содержит промоторный CpG-островок, распространяющийся на первый экзон, но метилирования области, перекрывающей минимальный промотор, необходимо и достаточно для потери экспрессии этого гена. Ген *MLH1* характеризуется наличием протяженного промоторного CpG-островка, который начинается приблизительно за 1000 п.н. проксимальнее гена и распространяется на первый экзон. Метилирование CpG-островка часто наблюдается и в 5'-области, но только метилирование участка в 280 п.н., перекрывающего сайт инициации транскрипции, коррелирует с подавлением экспрессии.

CpG-островок, локализованный в промоторной области *BIN1*, имеет протяженность 1650 п.н. и захватывает 5'-регион, первый экзон и фрагмент первого интрона, включая, таким образом, и промоторные и непромоторные последовательности. Структурный и функциональный анализ последовательности фрагмента 5'-области островка размером примерно 900 п.н., прилежащего к первому экзону, показал, что он содержит консенсусные сайты для ряда транскрипционных факторов и достаточен для базовой транскрипции *BIN1*. CpG-островок гена *BIN1*, подобно островкам генов *CDKN2A* и *RASSF1A*, состоит из двух функционально неравнозначных частей: 3'-область *BIN1* достаточно часто и интенсивно метилируется, тогда как 5'-область в опухолях неметилирована. Было показано, что метилирование 3'-области CpG-островка является опухольеспецифичным и может быть использовано при разработке панелей эпигенетических маркеров рака после оценки паттернов метилирования для различных типов опухолей.

Выявленные гены и локусы



GCG



CCG

*TMEM 176A/176B,
FOXM1/ HKMT1188,
AX746725/AK127124,*

*IQSEC2
PPP2R5C,
PHF15
ATMIN,
C2CD2,
KLAA1324L*

Спектр геномной локализации продуктов непредвзятого скрининга

Выявлено 26 новых локусов, аномально метилированных при РМЖ:

15% - межгенные (области 1p33, 5p15.33, 12q13.13 и 13q32.1)

19% – интронные (гены *VIN1*, *RAI1*, *GPC2*, *PPP2R5C*, *PHF1*)

8% расположены в первых экзонах (гены *ATMIN*, *IQSEC2*).

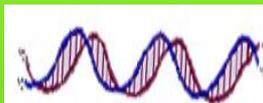
Лишь около половины, (**56%**, гены *LAMB1*, *KCNH8*, *DOCK6*, *SH3KBP1*, *C2CD2*, *KIAA1324L*, *AX746725/AK127124*, *TMEM176A/TMEM176B*, *FOXO1/HKMT1188*, *LAMC3*, *SEMA6B*, *VCIP135*, *KCNH2*, *SACNG4* и *PSMF1*) полученных фрагментов имеют локализацию, каноническую для дифференциального метилирования при канцерогенезе

УЧАСТИЕ В КАНЦЕРОГЕНЕЗЕ НЕКОТОРЫХ ИЗ ВЫЯВЛЕННЫХ ГЕНОВ

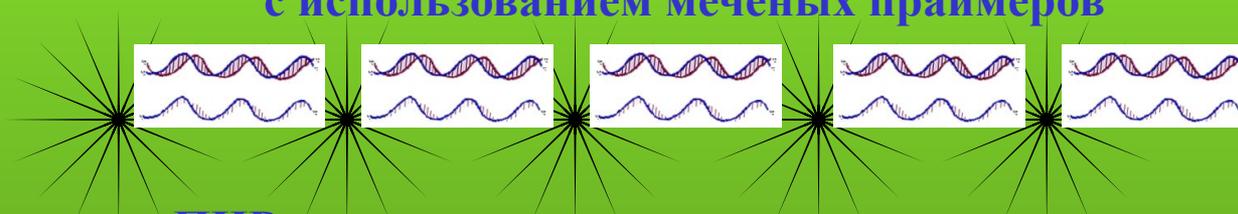
<i>Ген</i>	<i>Комментарии</i>
<i>LAMB1</i>	Влияет на миграционное поведение опухолевых клеток, инвазию, метастазирование
<i>ATMIN</i>	Нарушение в В-клеточных лимфомах АТМ-сигналинга, участвующего в активации Р53 и, следовательно, остановке клеточного цикла при двуцепочечных разрывах ДНК
<i>FOXM1/ НКМТ1188</i> (C12orf32)	<p>Нарушение пути активации киназы АТР, которая зондирует повреждения ДНК, что приводит к аресту клеточного цикла</p> <p>Супрессирует клеточный рост опосредованно, через РНК интерференцию, возможно, приводя к ингибированию G1/S транзиции и последующей клеточной смерти</p>
<i>SH3KBP1</i>	SH3KBP1 вызывает ингибирование эндоцитоза EGFR и, таким образом, усиливает EGFR-сигналинг, который может приводить к снижению чувствительности клеток опухоли к химиотерапевтическим препаратам

Схема анализа метилирования с использованием биологических микрочипов

Выделение ДНК



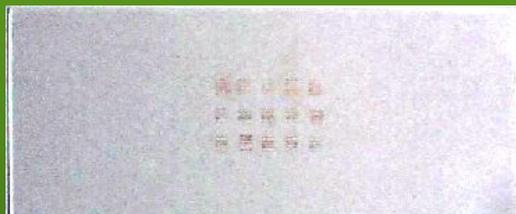
Ассиметричная мультипраймерная ПЦР с использованием меченых праймеров



Гибридизация ПЦР-продуктов с нанесенными на стекло олигонуклеотидами



Визуализация результатов гибридизации и анализ изображения



Частоты метилирования генов *MGMT*, *RASSF1A*, *GSTP1*, *RARβ*, *CDKN2A*, *ING* в различных опухолях

	<i>MGMT</i>	<i>RASSF1</i>	<i>GSTP1</i>	<i>RARβ</i>	<i>CDKN2A</i>	Совокупная расчетная частота	<i>ING</i>
Рак молочной железы	8	58	24	38	56	92	0
Рак предстательной железы	78	84	98	88	60	100	0
Немелкоклеточный рак легких	81	35	40	70	75	100	0
Мелкоклеточный рак легких	91	85	59	45	37	98	0
Рак мочевого пузыря	2	35	11	15	69	89	0
Рак желудка	25	46	0	52	43	85	0
Рак поджелудочной железы	40	75		25	27	≥98	0
Рак шейки матки	26	46	18	26	42	86	0

Определение метилирования генов, вовлеченных в канцерогенез, методом метилчувствительной ПЦР

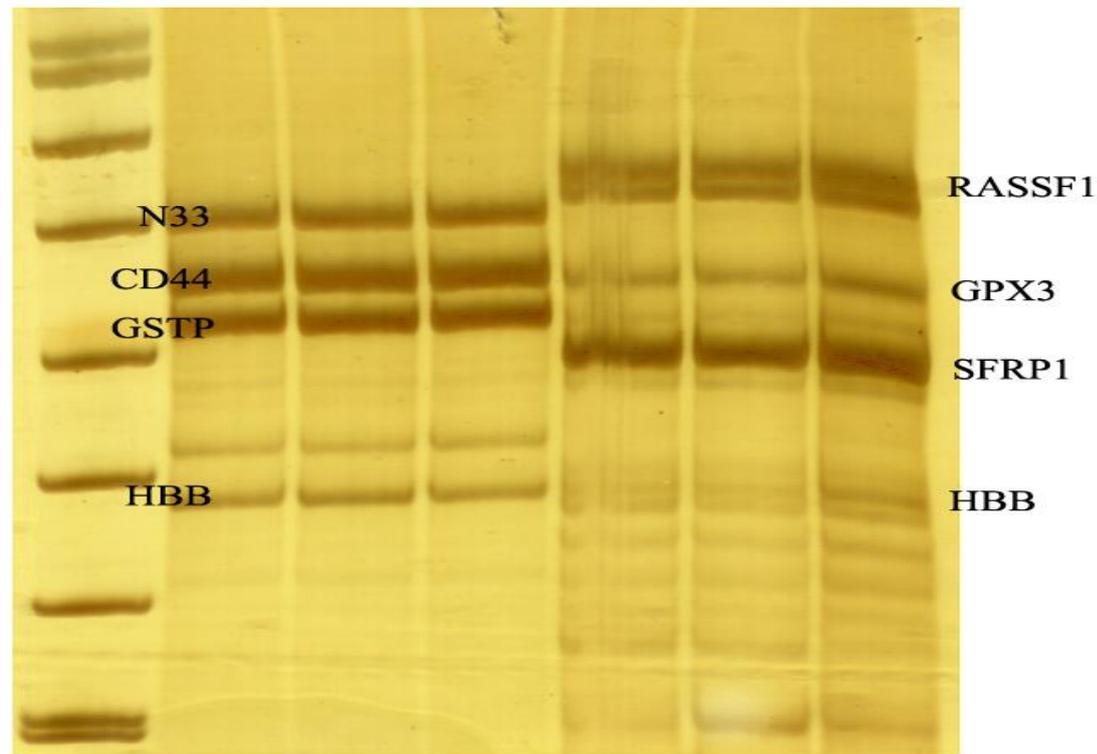
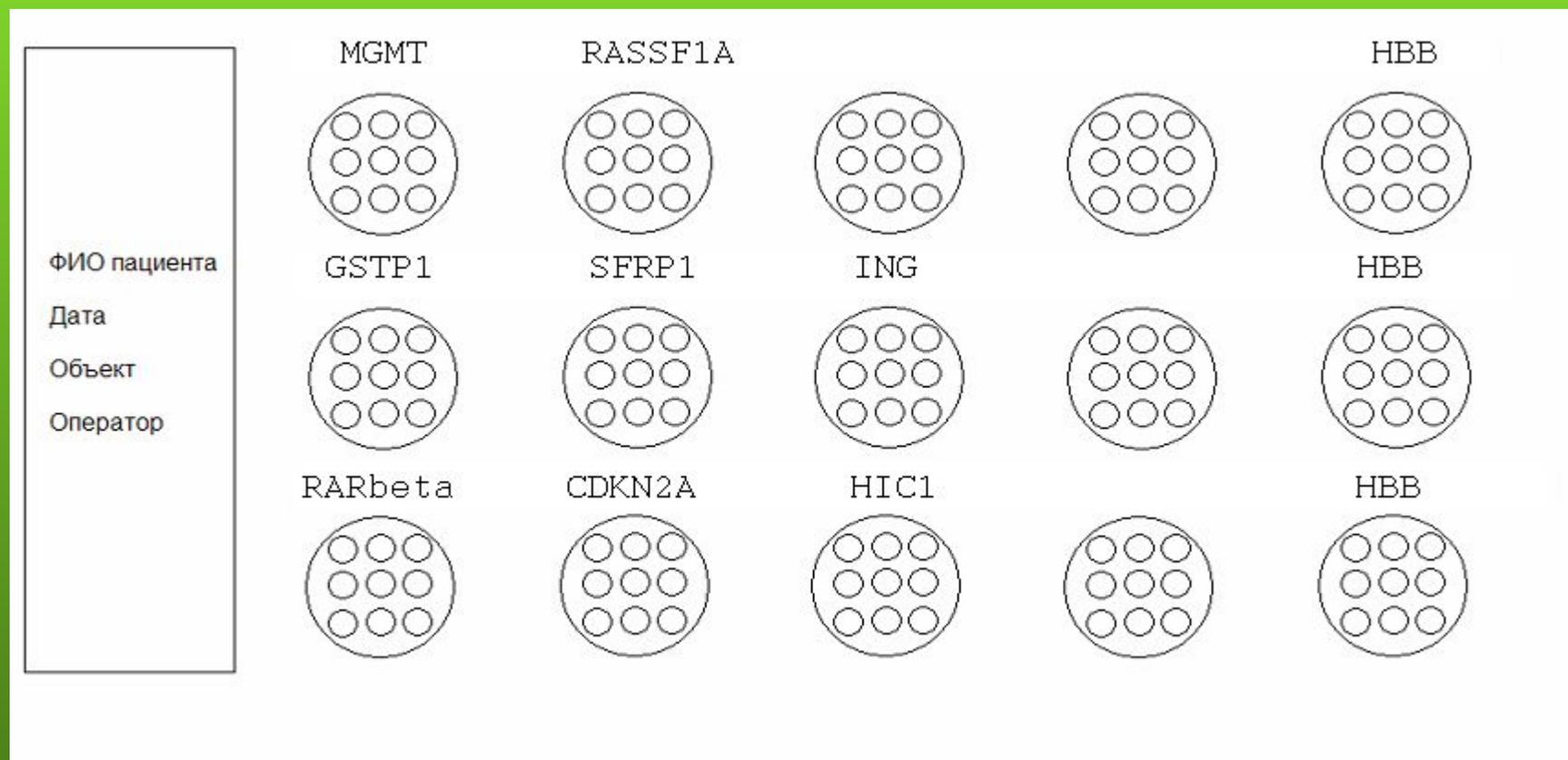
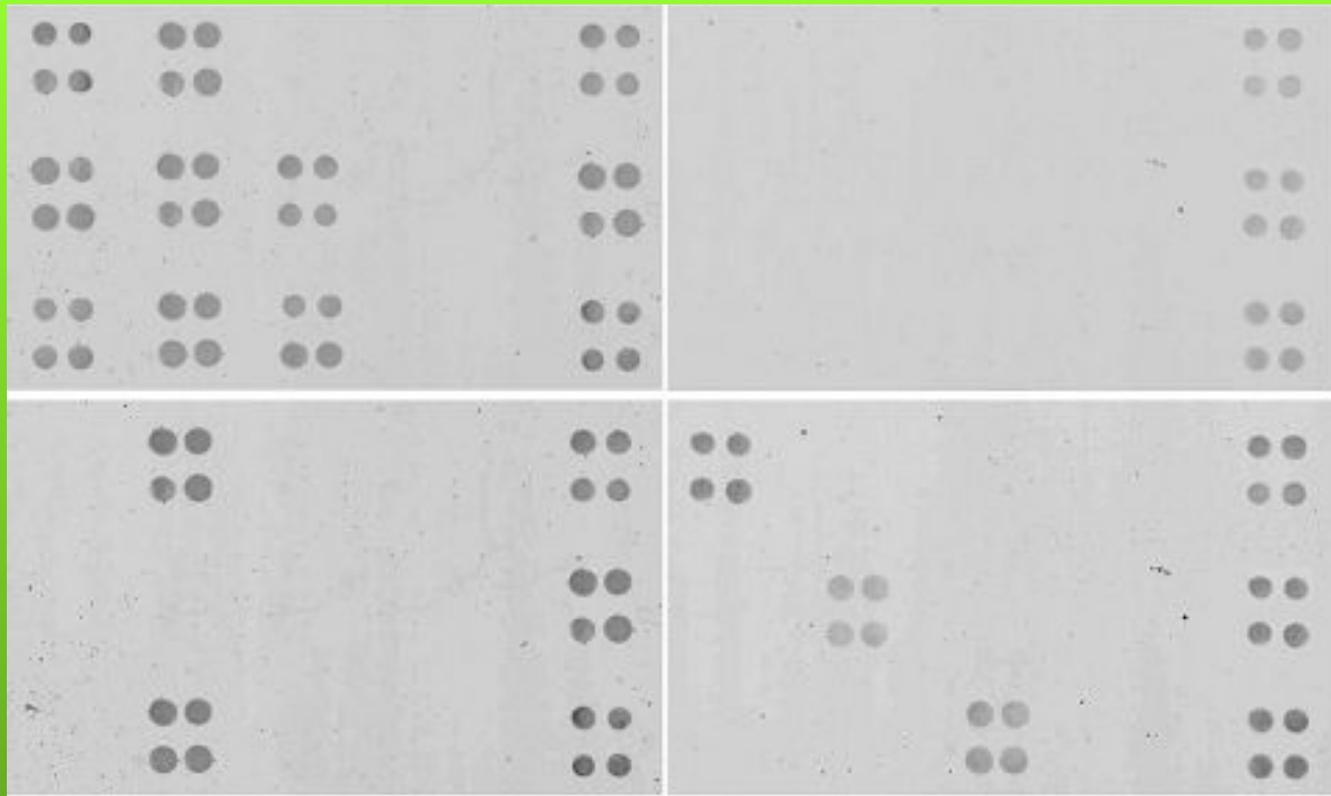


Схема чипа для определения метилирования генов, вовлеченных в канцерогенез

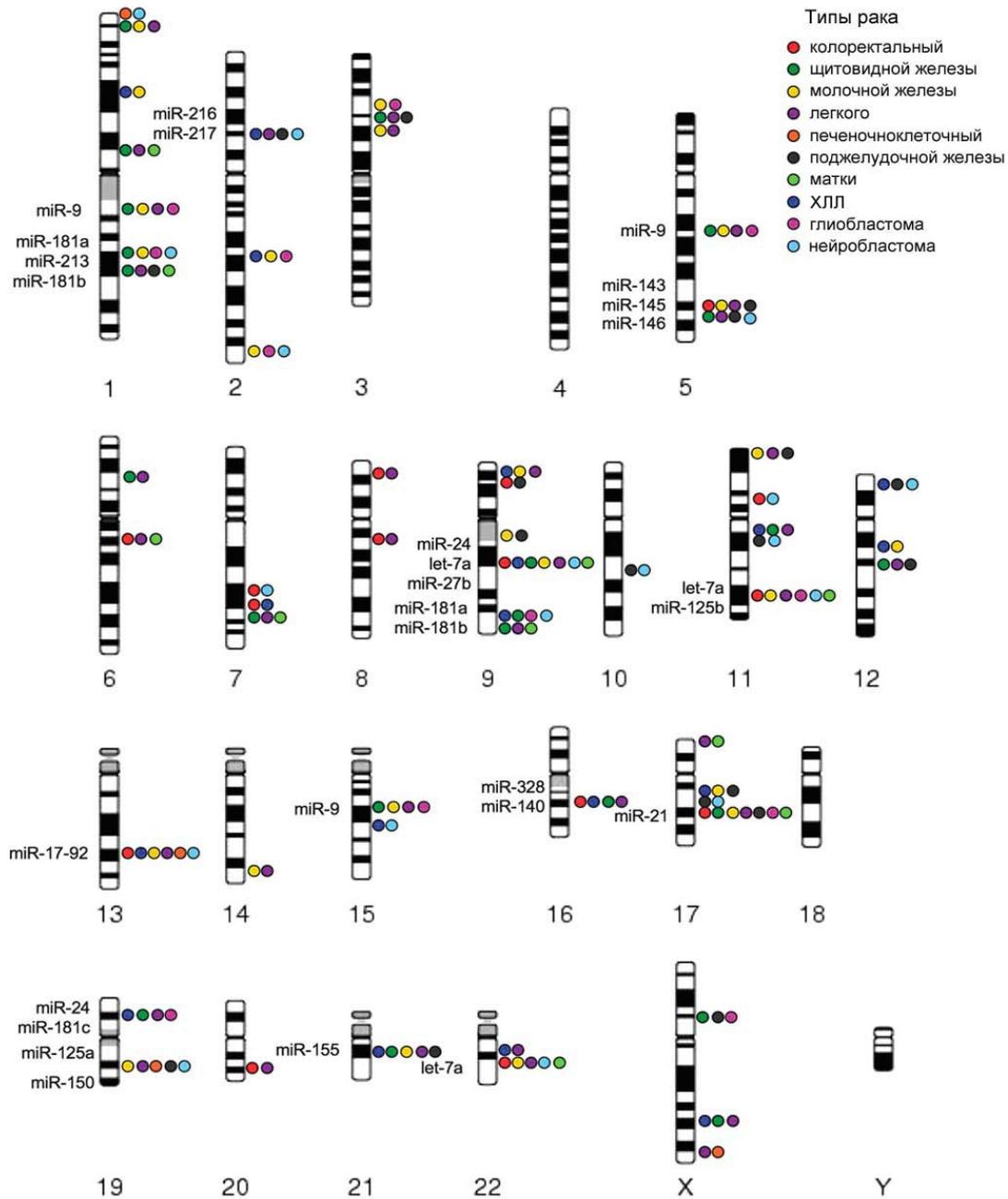




Примеры анализа образцов клинического материала с применением микрочипа низкой плотности для анализа метилирования. Вверху слева: гибридизация ПЦР-продуктов, полученных с интактной геномной ДНК (видны сигналы гибридизации во всех используемых позициях); вверху справа: гибридизация продуктов метилчувствительной ПЦР, полученных с геномной ДНК здорового человека (присутствуют только сигналы, соответствующие положительному контролю амплификации); внизу слева: метилирование генов *RASSF1* и *CDKN2A*; внизу справа: метилирование генов *MGMT*, *SFRP1* и *HIC1*.

Патология генов, вовлеченных в эпигенетическую регуляцию, и канцерогенез

Gene	Alteration	Tumour type
<i>DNA methyltransferases</i>		
DNMT1	Overexpression	Multiple types
DNMT3b	Overexpression	Multiple types
<i>Methyl-CpG-binding proteins</i>		
MeCP2	Overexpression, rare mutations	Multiple types
MBD1	Overexpression, rare mutations	Multiple types
MBD2	Overexpression, rare mutations	Multiple types
MBD3	Overexpression, rare mutations	Multiple types
MBD4	Inactivating mutations in MSI+	Colon, stomach, endometrium
<i>Histone acetyltransferases</i>		
p300	Mutations in MSI+	Colon, stomach, endometrium
CBP	Mutations, translocations, deletions	Colon, stomach, endometrium, lung, leukaemia
pCAF	Rare mutations	Colon
MOZ	Translocations	Haematological malignancies
MORF	Translocations	Haematological malignancies, leiomyomata
<i>Histone deacetylases</i>		
HDAC1	Aberrant expression	Multiple types
HDAC2	Aberrant expression, mutations in MSI+	Multiple types
<i>Histone methyltransferases</i>		
MLL1	Translocation	Haematological malignancies
MLL2	Gene amplification	Glioma, pancreas
MLL3	Deletion	Leukaemia
NSD1	Translocation	Leukaemia
EZH2	Gene amplification, overexpression	Multiple types
RIZ1	CpG-island hypermethylation	Multiple types
<i>Histone demethylase</i>		
GASC1	Gene amplification	Squamous cell carcinoma



Экзонные энхансеры сплайсинга представляют собой сайты связывания обогащенных серином и аргинином белков (SR-белки). Эти белки являются высоко консервативными факторами сплайсинга, которые имеют 1-2 мотива распознавания и связывания РНК (PPM) и обогащенный Arg/Ser дипептидами карбокситерминальный домен (SR-домен), участвующий в белок-белковых взаимодействиях.

Экзонные сайленсеры сплайсинга работают через взаимодействие с негативными регуляторами, которые относятся к семейству гетерогенных ядерных рибонуклеопротеинов (гяРНП). Это класс различных РНК-связывающих белков, ассоциированных с вновь синтезированной пре-мРНК.

микроРНК и рак

- oncomiR - онкогенные микроРНК, экспрессия в опухоли увеличена
- tumor-suppressor tsmiR – супрессорные микроРНК, экспрессия в опухоли снижена
- metastamiR – метастатические микроРНК



ПАТОЛОГИЯ ТИПА «ЭФФЕКТ ПОЛОЖЕНИЯ» У ЧЕЛОВЕКА

Эффект положения - нарушение или изменение уровня экспрессии гена в результате изменения его местоположения в структуре генома, но не сопровождающееся структурной патологией или мутацией. При этом ген сохраняется как транскрипционная единица с соответствующей промоторной областью и 3'-нетранслируемым районом, содержащим мотив полиаденилирования.

Мозаичный эффект положения - клоновый характер уровня экспрессии гена в результате изменения его местоположения в геноме.

ПРЕДПОЛАГАЕМЫЕ МЕХАНИЗМЫ ЭФФЕКТА ПОЛОЖЕНИЯ

Перемещение гена из района с определенной структурой хроматина в район с другой структурой хроматина:

- изменение времени репликации => отсутствие специфических транскрипционных факторов => снижение экспрессии;**
- чужеродная последовательность ДНК => метилирование => изменение конформации ДНК => отсутствие экспрессии;**

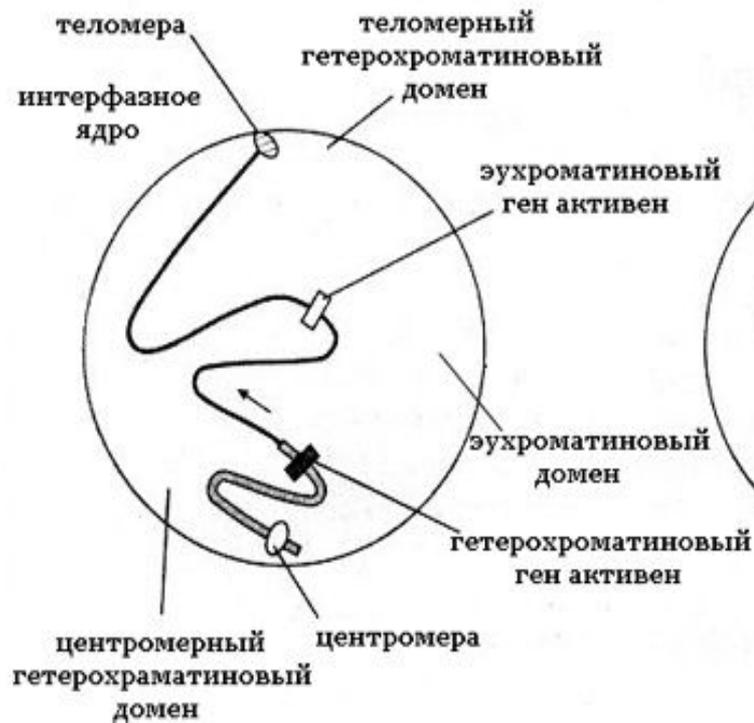
Структурная перестройка разделяет ген (транскрипционную единицу) и его регуляторные элементы:

- энхансер => снижение экспрессии;**
- сайленсер => увеличение экспрессии;**
- инсулятор => изменение структуры хроматина => снижение экспрессии.**

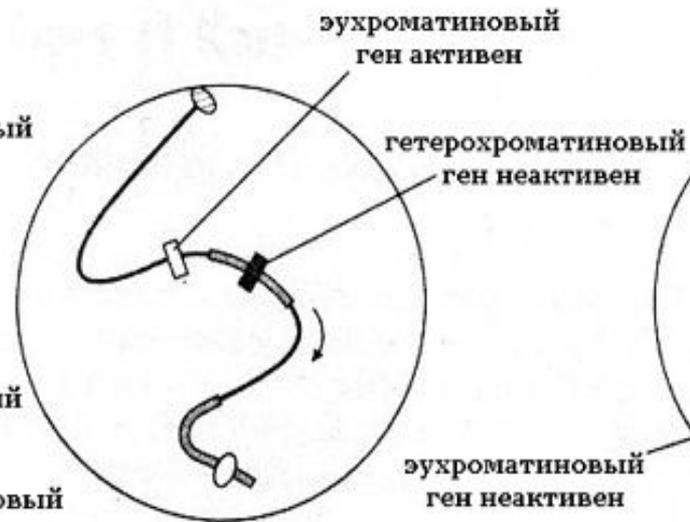
Конкуренция за регуляторный элемент между геном заболевания и геном в районе перестройки => снижение экспрессии.

Приобретение новых регуляторных элементов => снижение или увеличение экспрессии.

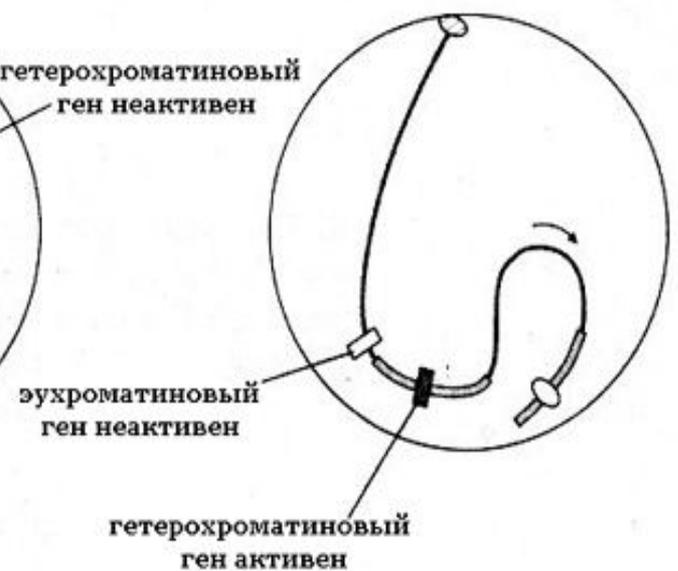
(а) нормальное положение хромосомы



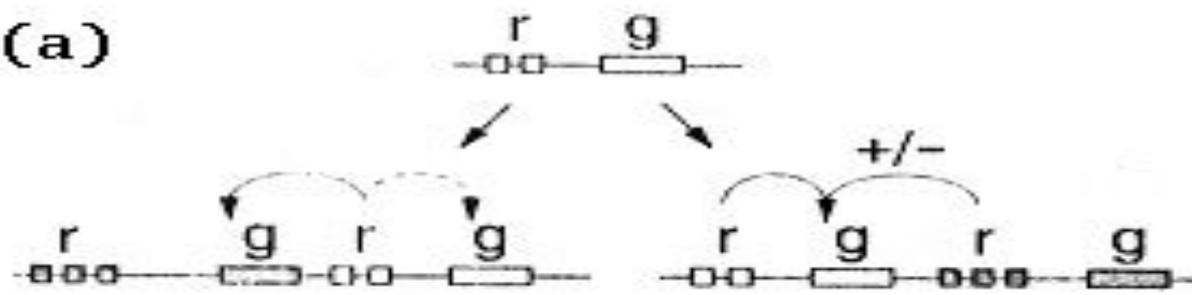
(б) ядро с генами в эухромативном домене



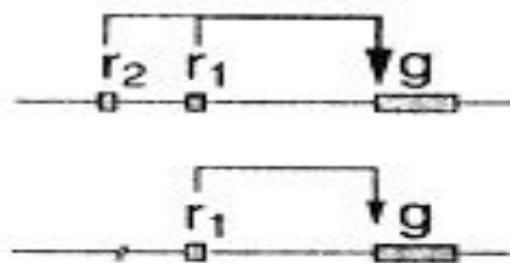
(в) ядро с генами в гетерохромативном домене



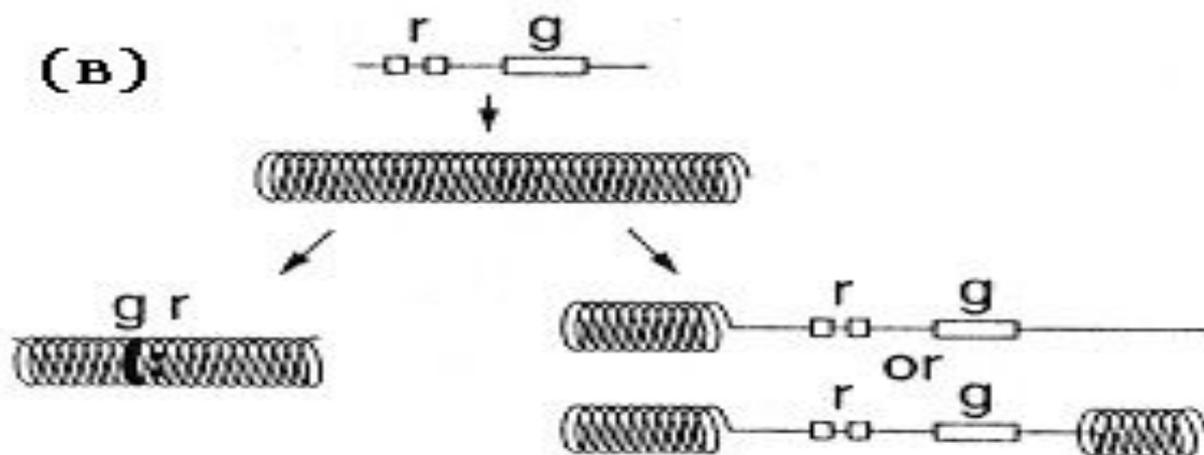
(a)

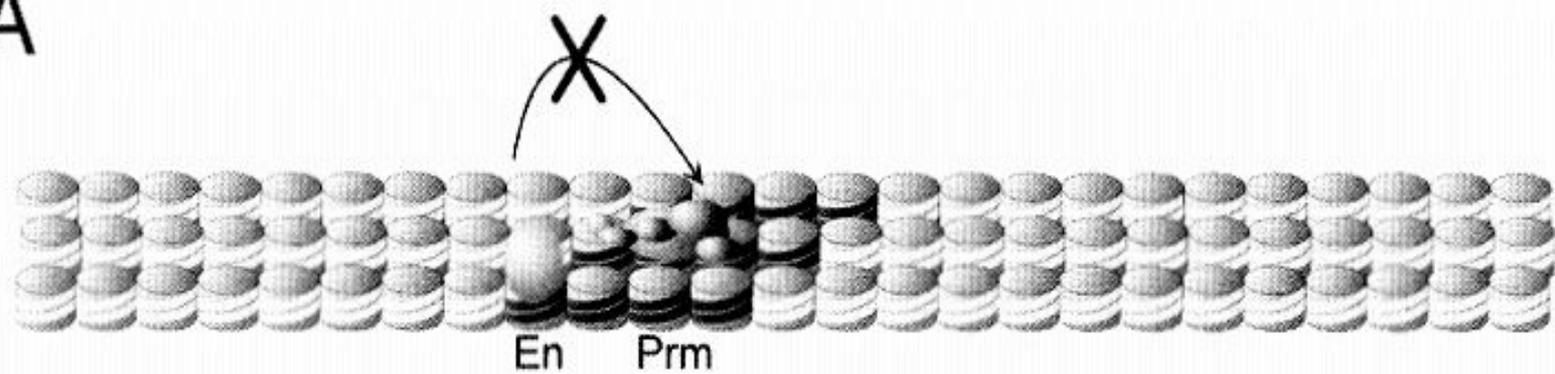
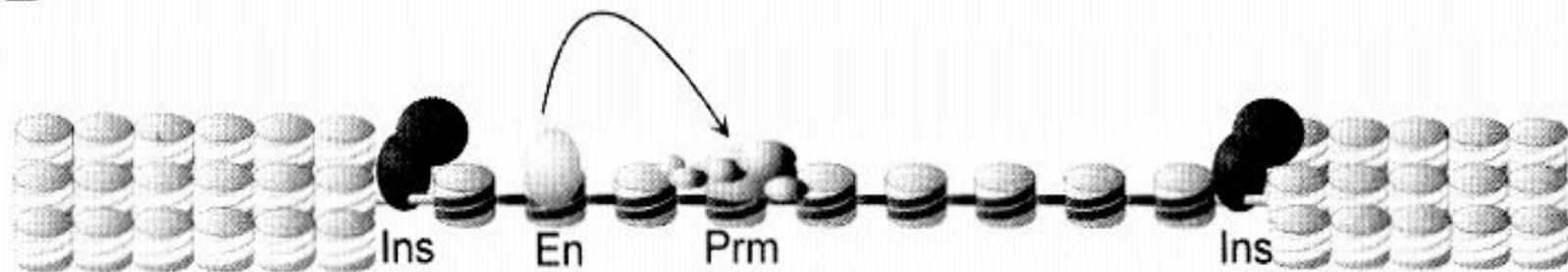


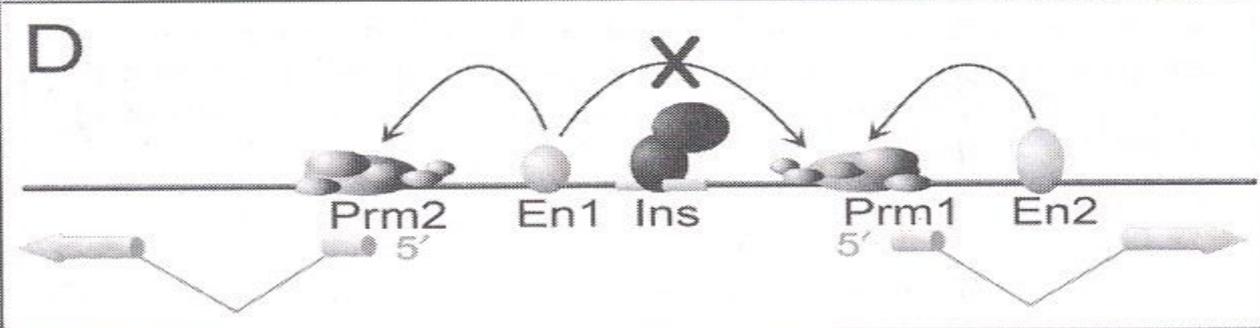
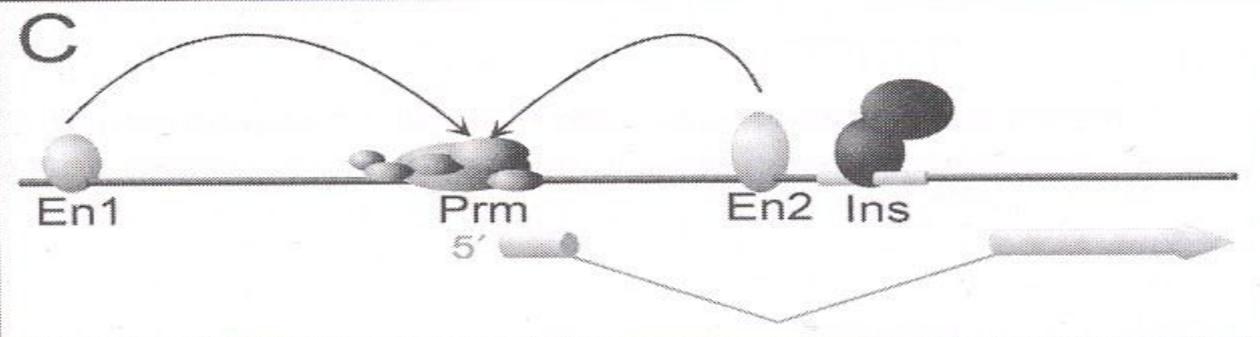
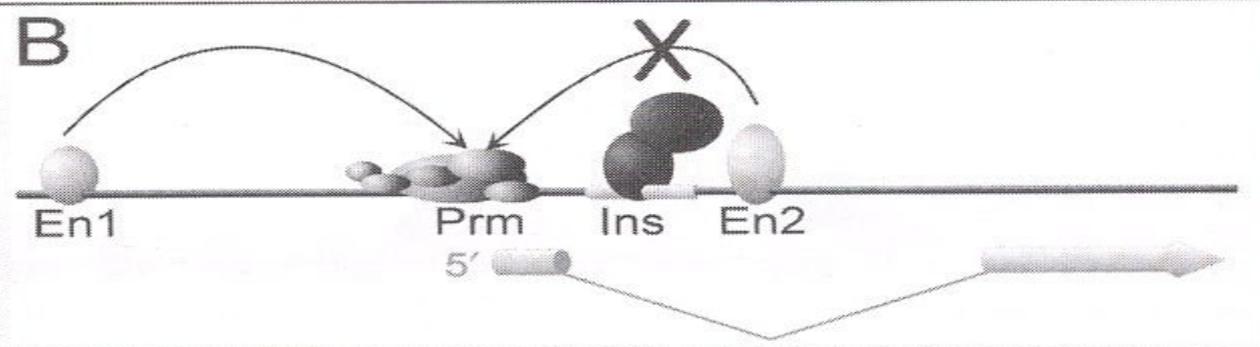
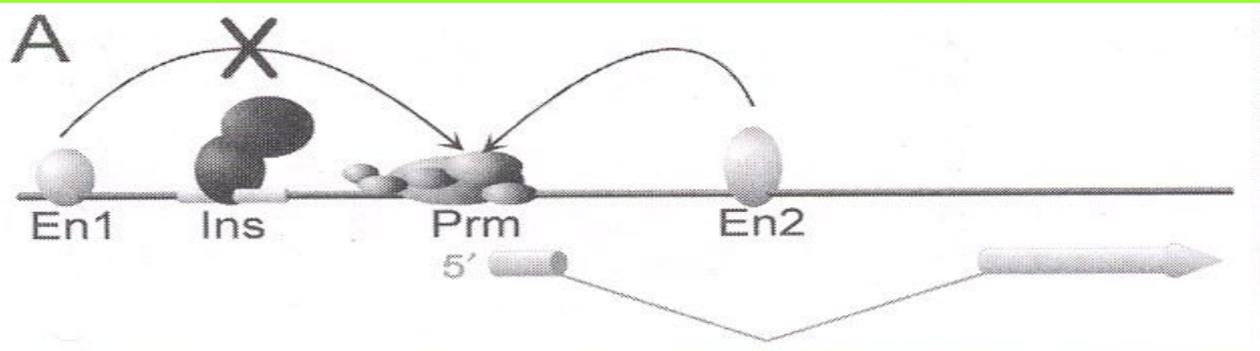
(б)



(B)



A**B**



Патология типа «эффект положения» у человека

Ген	Белок	Повреждение (расстояние)	Эффект	Патология
<i>Соматические мутации</i>				
<i>CCND1</i>	Циклин	Тр. (120 kb)	A	В-клеточная лимфома
<i>EVI1</i>	Протоонкоген	Тр. (13-330 kb) Инв. (10-400 kb)	A	Миелоидная лейкемия
<i>MYC</i>	Протоонкоген	Тр. (140-300 kb)	A	Лимфома Беркита
<i>Герминальные мутации</i>				
<i>HBA/HBB</i>	Глобин	Дел. (9,5-50 kb)	P	Талассемия
<i>HBB</i>	Глобин	Дел. (15-55 kb)	A	Персистенция фетального гемоглобина
<i>PAX6</i>	Тр. фактор	Инв, Тр. (100-125 kb) 3'	P	Аниридия
<i>GLI3</i>	Тр. фактор	Тр. (10 kb) 3'	P	Цефалополисиндактилия
<i>TWIST</i>	Тр. фактор	Тр. (5-250 kb) 3'	P	Акроцефалосиндактилия
<i>PITX2</i>	Тр. фактор	Тр. (5-90 kb)	P	с-м Ригера
<i>POU3F4</i>	Тр. фактор	Дел, Дупл. (15-900 kb)	P	Х-сцепленная глухота
<i>SOX9</i>	Тр. фактор	Тр. (50-850 kb)	P	Кампомиелическая дисплазия, аутосомная реверсия пола
<i>SH</i>		Тр. (15-315 kb)	P	Голопрозэнцефалия
<i>SRY</i>	Тр. фактор	Дел. (>17 kb) 5' Дел. (3 kb) 3'	P	Реверсия пола
<i>DSS1</i>		Тр.	P	Эктродактилия
<i>FRG1</i>		Дел. (100 kb)	P	Лице-плече-лопаточная дистрофия
<i>DAZ</i>		Дел. 5' и 3'	P	Азоо- и олигоспермия
<i>EXT1</i>	неизвестен	Дел. (50-70 kb) 3'	P	МЭХД

Доказанный эффект положения

Ген *PAX6* - транскрипционный фактор. Хромосома 11p13.

Аниридия - врожденная патология глаз, характеризующаяся значительной гипоплазией радужной оболочки глаз. В пяти случаях у больных выявлены транслокации, **точки разрыва при которых локализованы в 100-125 т.п.н. от 3' района гена.**

Ген *GLI3* - транскрипционный фактор. Хромосома 7p13. Вовлечен в эмбриональное развитие конечностей и черепа. Мутации приводят к с-му цефалополисиндактилии Грейга.

В одном случае заболевания выявлена транслокация с точкой разрыва, расположенной в **10 т.п.н. от последнего экзона гена.** Аналогичный вариант показан у мутантной линии мышей, где инсерция трансгена комбинирует с делецией в 80 т.п.н., произошедшей в 40 т.п.н. от 5' области гена.

Ген *TWIST* - транскрипционный фактор. Хромосома 7p21.

Акроцефалосиндактилия III типа характеризуется брахидактилией, синдактилией мягких тканей, птозом и лицевой асимметрией. В 5 случаях описаны транслокации, **точки разрыва при которых выявлены в 5- 250 т.п.н. от 3' конца гена.**

Ген *PITX2* - транскрипционный фактор. Хромосома 4(q26). Синдром Ригера - олигодонтия, аномалии глаз, аномалии развития. В трех случаях выявлены транслокации, **точки разрыва при которых локализованы в 5' районе гена на расстоянии 15-90 т.п.н.**

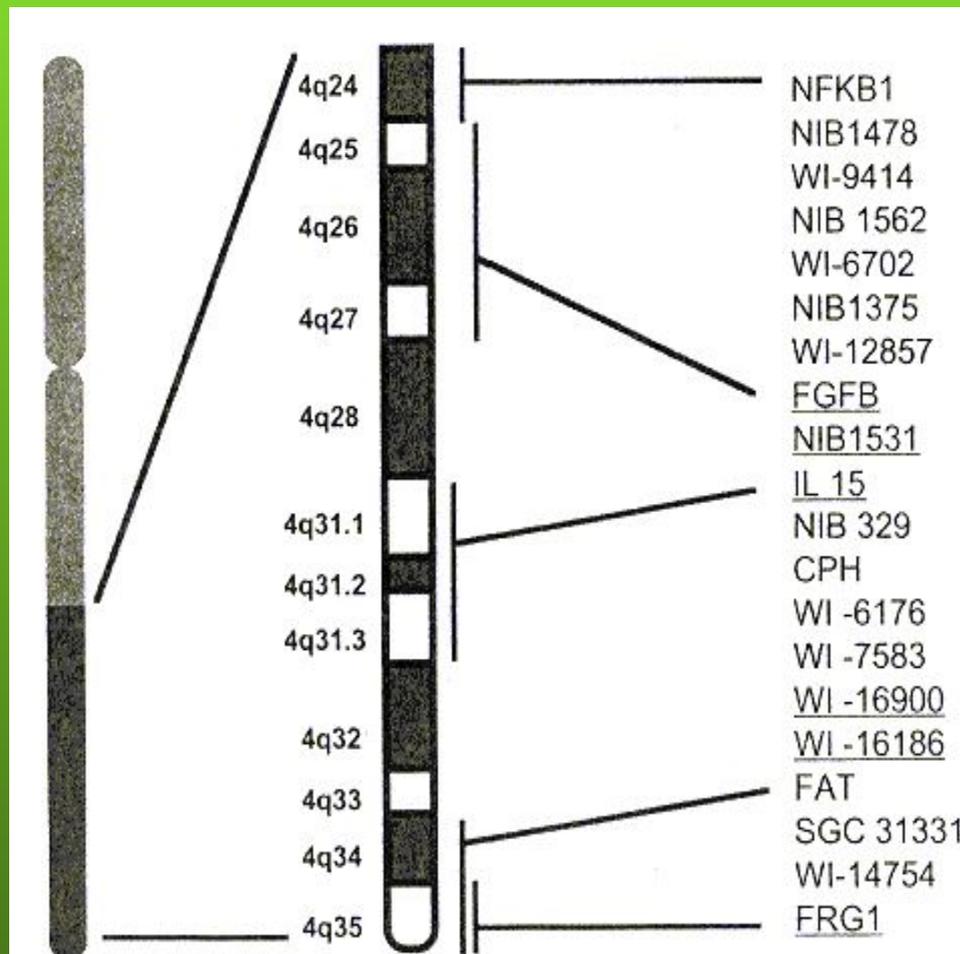
Ген *SOX9* - транскрипционный фактор. Хромосома 17(q25.1). Кампомелическая дисплазия - аномалии длинных костей и XY реверсия пола. В 8 случаях выявлены хромосомные перестройки с **точками разрыва в 5' области гена на расстоянии от 50 до 850 т.п.н.** Больные с патологией вне гена имели более легкие проявления заболевания.

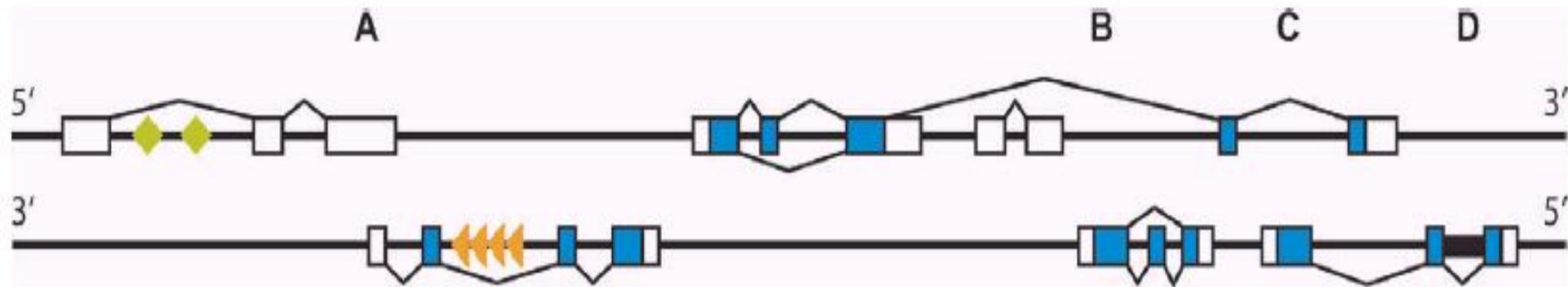
Ген *POU3F4*. Хромосома Xq21.1. X-сцепленная глухота - фиксация стремечка и нарушение проводимости слухового нерва. В 9 случаях обнаружены **микроделеции в районе 400-900 т.п.н. от 5' области гена.**

Ген *sonic hedgehog*. Хромосома 7q36. Голопрозэнцефалия. Транслокации с **точками разрыва, локализованными в 15-265 т.п.н. от 5' района гена** выявлены у 3 больных. Больные с транслокациями имели более легкие фенотипические проявления. Транслокация с точкой разрыва в 235 т.п.н. от гена в 3 случаях из 4 не сопровождалась патологией.

ОБЩИЕ ЧЕРТЫ РАЙОНОВ, ПОДВЕРЖЕННЫХ ИМПРИНТИНГУ И ЭФФЕКТУ ПОЛОЖЕНИЯ

1. Протяженность эффекта (4 м.п.о. и более);
2. Мозаичность экспрессии генов;
3. Клональный характер экспрессии тканеспецифического гена;
4. Наличие повторяющихся последовательностей.





Белые прямоугольники – некодирующие экзоны, синие – кодирующие, зеленые – snoРНК, треугольники – miРНК. А – антисмысловые транскрипты с перекрывающимися экзонами; В – внутренние транскрипты на обеих цепях; С – антисмысловые транскрипты с переплетенными экзонами; D – сохраненный интрон.

60-70% генома транскрибируется с одной или обеих цепей ДНК. 5880 транскрипционных кластеров генома человека формируют смысловые/антисмысловые пары транскриптов, причем антисмысловые, как правило являются некодирующими. 2,4 г.п.н. генома человека транскрибируются и, по крайней мере, 25% - с двух цепей.

Что называть геном?

«один ген – один фермент»

«белок-кодирующий район с определенными регуляторными последовательностями»

«транскрипционная единица» или «фрагмент ДНК, ответственный за синтез функционально значимого продукта»

«последовательность генетического материала, экспрессирующая, как РНК, так и/или белок (через мРНК), имеющие функциональное значение для клетки»

«локализованная геномная последовательность, соответствующая единице наследственности, которая содержит регуляторные районы, транскрибирующиеся районы и/или другие функционально значимые районы»

2006 г.

Система молекулярно-генетических маркеров для карцином желудка

Генетические
(структурные)

Эпигенетические

Делеции и МН

16q22.1 (*CDH1*)

17p13 (*TP53*)

1p36 (*RUNX3*)

Мутации

K-RAS

Метилирование

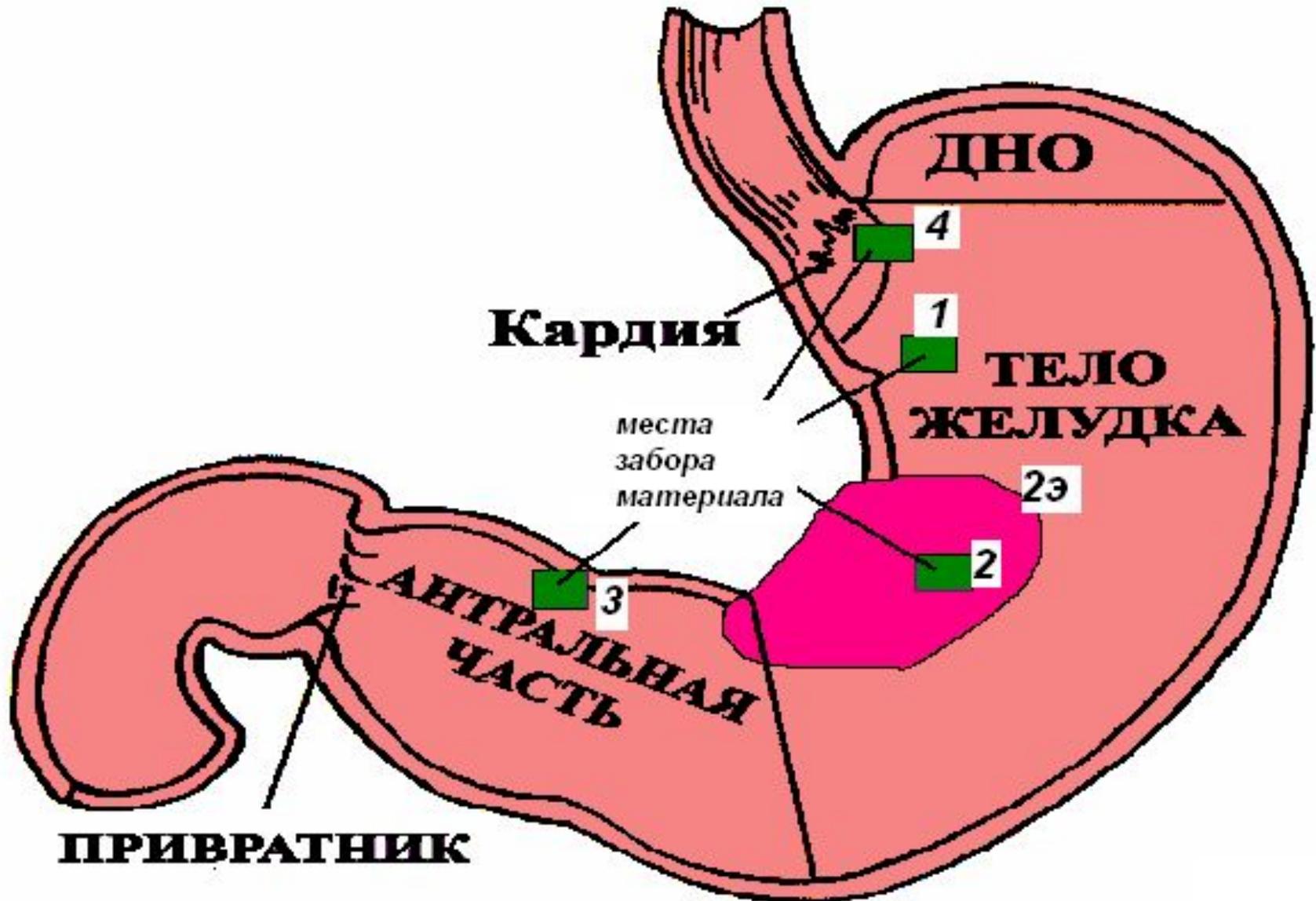
MLH1, RASSFA1,

CDH1, DAPK, N33,

RUNX3

	Аномальное метилирование					Структурные повреждения		
Кол-во	<i>N33</i>	<i>CDH1</i>	<i>DAPK</i>	<i>MLH1</i>	<i>RASSF</i>	ПГ <i>CDH1</i>	ПГ <i>p53</i>	МН
46 (100%)	31/46 (67%)	28/46 (60%)	21/46 (45%)	7/46 (15%)	8/46 (17%)	8/46 (17%)	19/46 (41%)	8/46 (17%)

Схема получения операционного материала РЖ



Маркеры метилирования при раке желудка

Различия в поведении молекулярных маркеров в клинических группах можно использовать в качестве прогностических показателей течения рака желудка:

- с увеличением размера опухоли до 2-4 см достоверно возрастает степень метилирования почти всех генов, кроме *DAPK*;
- аномальное метилирование генов *N33* и *CDH1* является маркером негативного прогноза для рака желудка, достоверно связано с генерализацией опухолевого процесса, по сравнению с ранним и местно-распространенным раком;
- наличие метилирования гена *DAPK* является маркером благоприятного прогноза - его частота снижена при развитии метастазов в лимфотические узлы;
- увеличение метилирования *CDH1* характерно для опухолей диффузного типа, по сравнению с интестинальным типом.

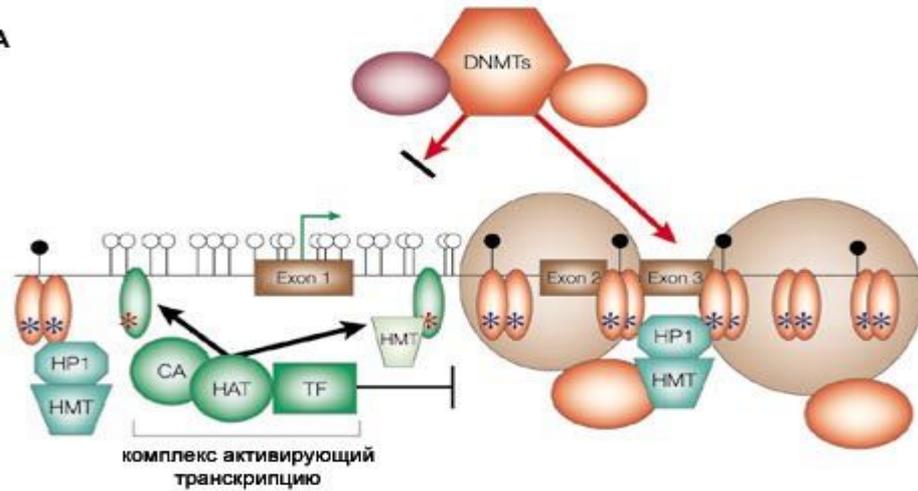
Что будет с больным после операции по удалению опухоли, если осталось метилирование в нормальной слизистой???

Рак желудка – заболевание всего эпителия ЖКТ?

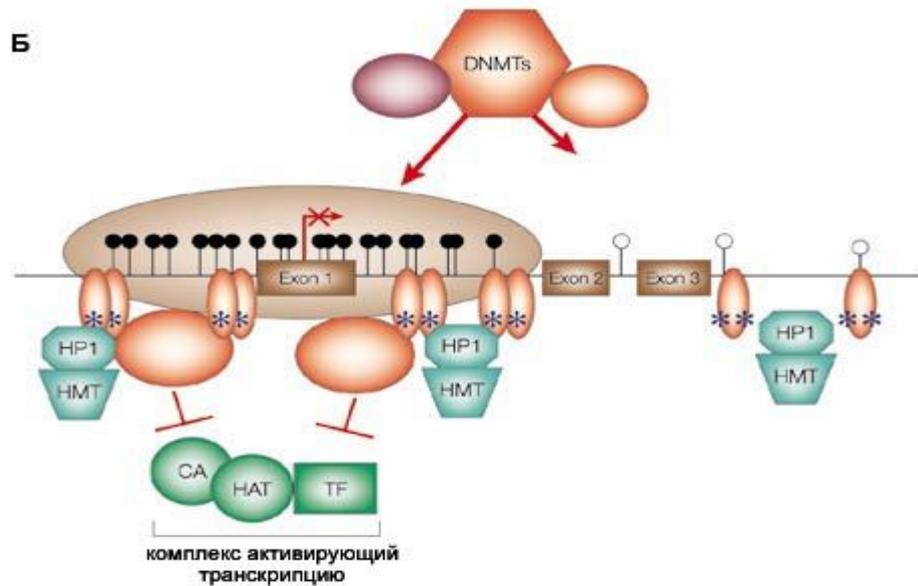
Методы поиска дифференциально метилированных CpG-островков

- Рестрикционно-ориентированное геномное сканирование
- Репрезентативно-дифференциальный анализ
- Микрочипы
- Метил-чувствительный фингерпринтинг
 - *наименьшая себестоимость и трудоемкость метода;*
 - *возможность тестирования большого количества образцов в одном эксперименте*

A



Б



- | | | |
|--------------------------------|-----------------------------|---|
| ● метилированные CpG | * метилированный Lys4 на H3 | ○ нуклеосома с деацетилованными гистонами |
| ○ неметилированные CpG | * метилированный Lys9 на H3 | ○ нуклеосома с ацетилованными гистонами |
| ● ДНК метилтрансферазы (DNMTs) | ● ко-репрессор | |
| | ● HDAC | |

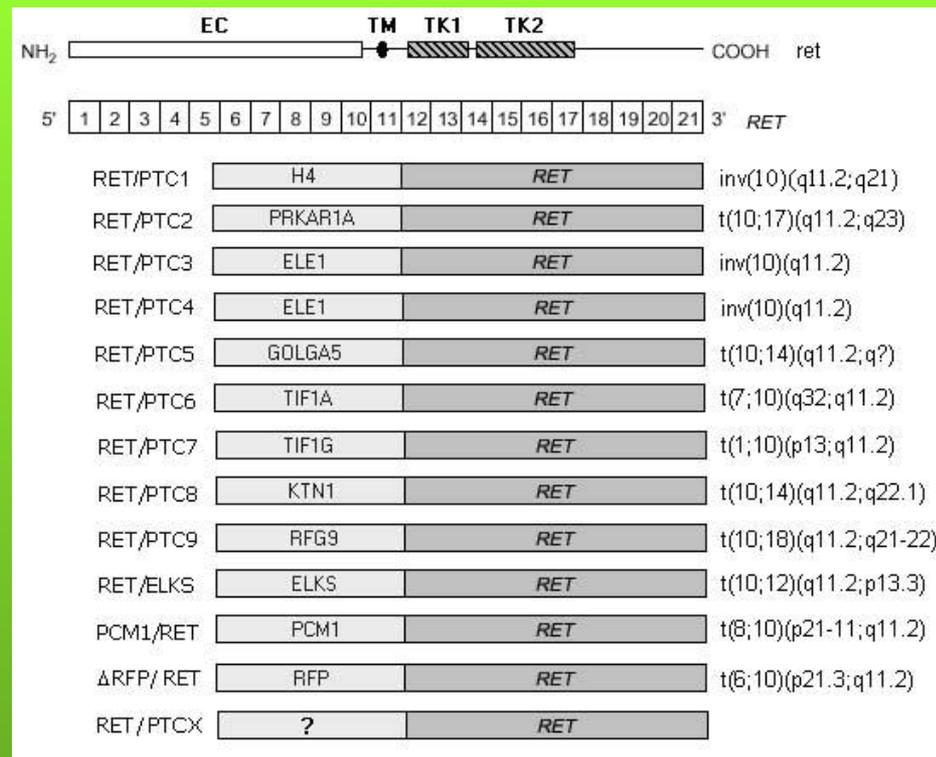
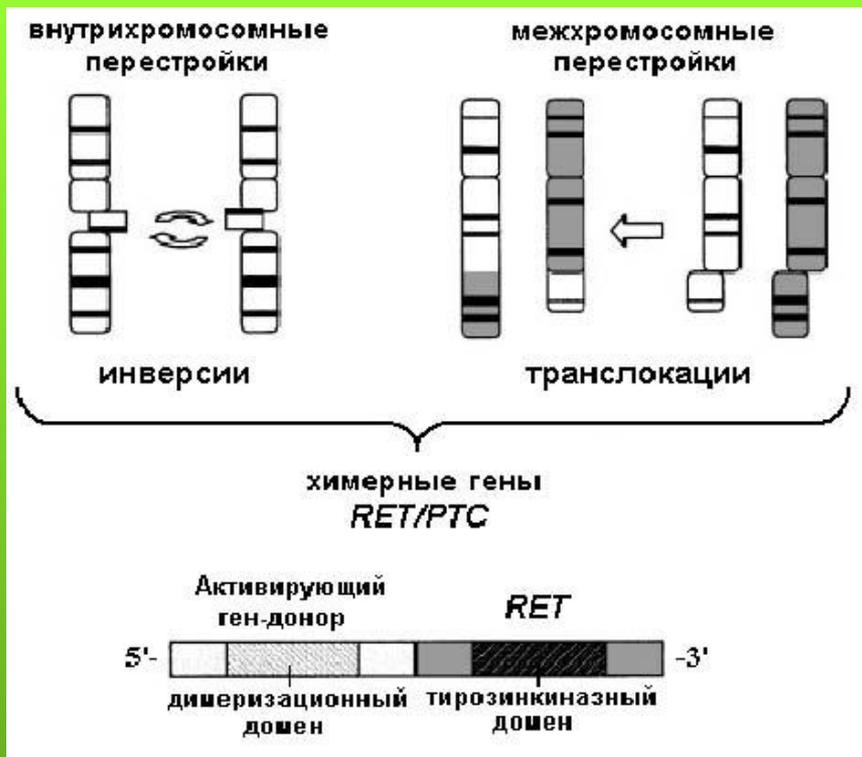


Схема образования химерных онкогенов *RET/PTC* в результате инверсий и транслокаций хромосомы 10.

Схематическая структура протоонкогена *RET*, белкового продукта RET и известных на сегодняшний день химерных онкогенов *RET/PTC*. В верхней части рисунка указано относительное расположение доменов нормального рецептора RET (EC-внеклеточный, TM-трансмембранный, TK1 и TK2 – тирозинкиназные внутриклеточные домены) и кодирующих экзонов гена *RET*. 3'-концевые последовательности онкогенов *RET/PTC* справа от точек разрыва (между 11 и 12 экзонами *RET*) представлены 12-21 экзонами *RET*. *RET/PTCX* - перестройки с неидентифицированными генами-партнерами.

Химерные гены при раке предстательной железы:

В результате структурных перестроек:

TMPRSS2-ERG, TMPRSS2-ETV1, TMPRSS2-ETV4, TMPRSS2-ETV5, HNRNPA2B1-ETV1, HERV-K-ETV1, C15ORF21-ETV1, SLC45A3-ETV1, SLC45A3-ETV5, KLK2-ETV4, CANT1-ETV4

В результате ТИС:

TMEM79-SMG5, SLC45A3-ELK4

В результате неизвестных событий:

VPS26B-NCAPD3, XPA-NCBP1, ANKRD39-ANKRD23, RASL12-OSTbeta, ELF3-RNPEP, TMEM79-SMG5, NARG1-NDUFC1, TSPAN1-POMGNT1, SLC44A4-EHMT2, FAM18B2-CDRT4, HARS2-ZMAT2, KRTCAP3-IFT172, MTG1-LOC619207, NOS1AP-C1orf226, C9orf163-SEC16A, DHCR24-C1orf177, NCAPD3-JAM3, SMG5-PAQR6, GPT-PPP1R16A, ASTN2-PAPPA, GOLM1-MAK10, ACTR8-IL17RB, HSP90B1-C12orf73, ZNF606-C19orf18, C12orf76-ANKRD13A, SLC16A8-BAIAP2L2, BC035340-MCF2L, BC160930-MC1R, TMEM165-CLOCK, RAPGEF3-SLC48A1 (30)

Химерные гены при карциноме почки у детей и молодых

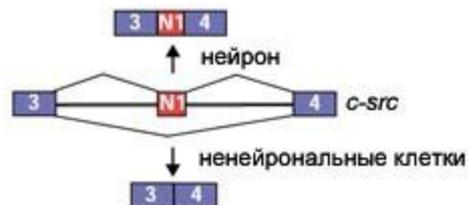
В результате структурных перестроек:

MALAT1-TFE3, ASPSCR1-TFE3, PRCC-TFE3, CLTC-TFE3, NONO-TFE3, SFPQ-TFE3

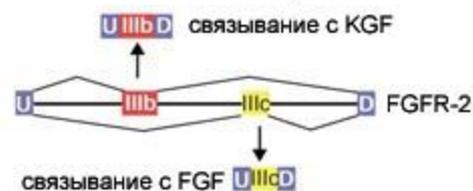
В результате ТИС:

BC039389-GATM, KLK4-KRSP1 (и еще 25 не охарактеризованных)

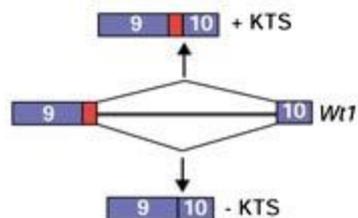
А кассетный экзон



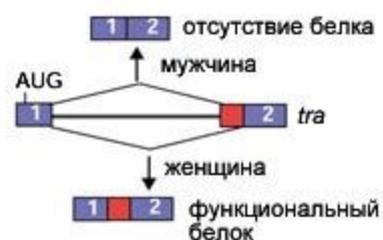
Б взаимоисключающие экзоны



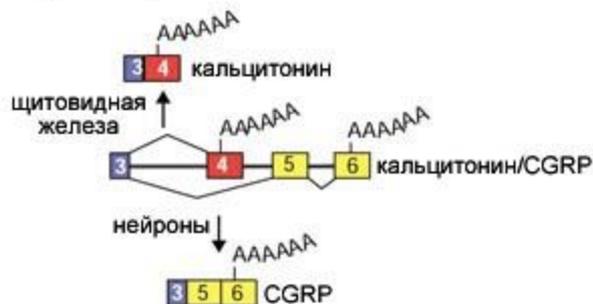
В 5'альтернативный сайт сплайсинга



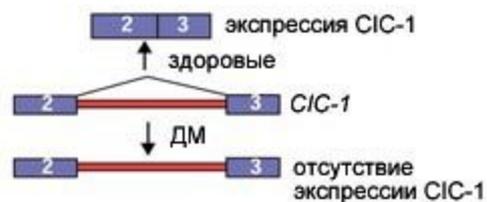
Г 3'альтернативный сайт сплайсинга



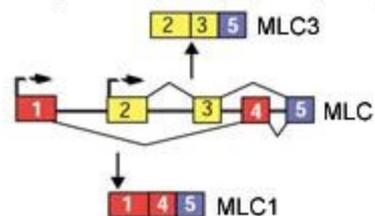
Д альтернативный терминальный экзон



Е сохранение интрона



Ж альтернативный промотор/первый экзон



Протоколы диагностики систем молекулярных маркеров в нейроонкологии

Материал опухоли (парафиновый блок)

Периферическая (венозная) кровь

Морфологическое исследование микросреза – оценка представленности опухолевого материала

Экстракция РНК, обратная транскрипция

Экстракция ДНК

Качественный анализ экспрессии аномальных форм сплайсинга

Полуколичественный анализ экспрессии нормальных транскриптов

ПЦР, прямое секвенирование

Анализ метилирования ДНК (МЧ-ПЦР)

Микросателлитный анализ

EGFRvIII - Аномальная сплайсоформа EGFR

Экспрессия гена PTEN

Мутации в гене EGFR (18-22 экзоны)

Статус метилирования гена MGMT

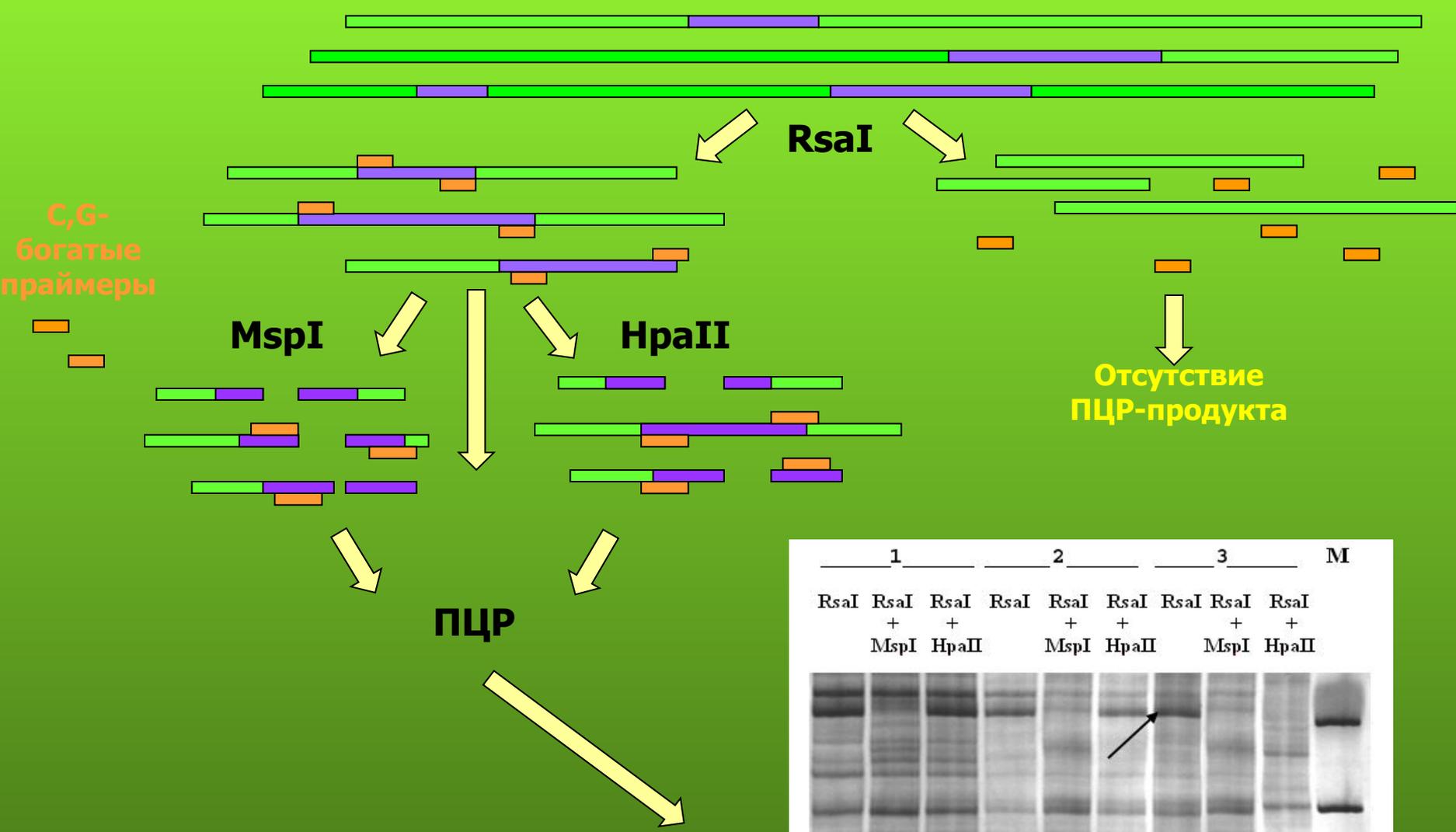
Делеции 1p\19q

Прогноз эффективности таргетной терапии ингибиторами EGFR (эрлотиниб, gefитиниб)

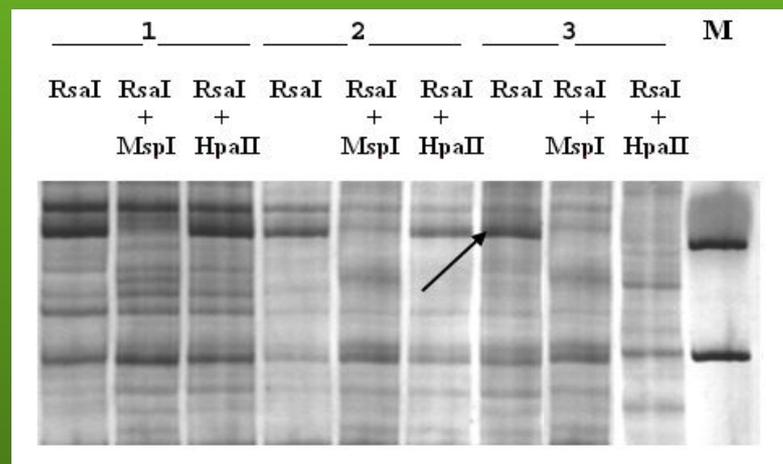
Прогноз эффективности терапии темозоломидом (Темодал)

Характеристика олигодендроглиом; оптимистичный прогноз с точки зрения выживаемости пациентов независимо от стадии заболевания

Принцип метода метилчувствительного фингерпринтинга



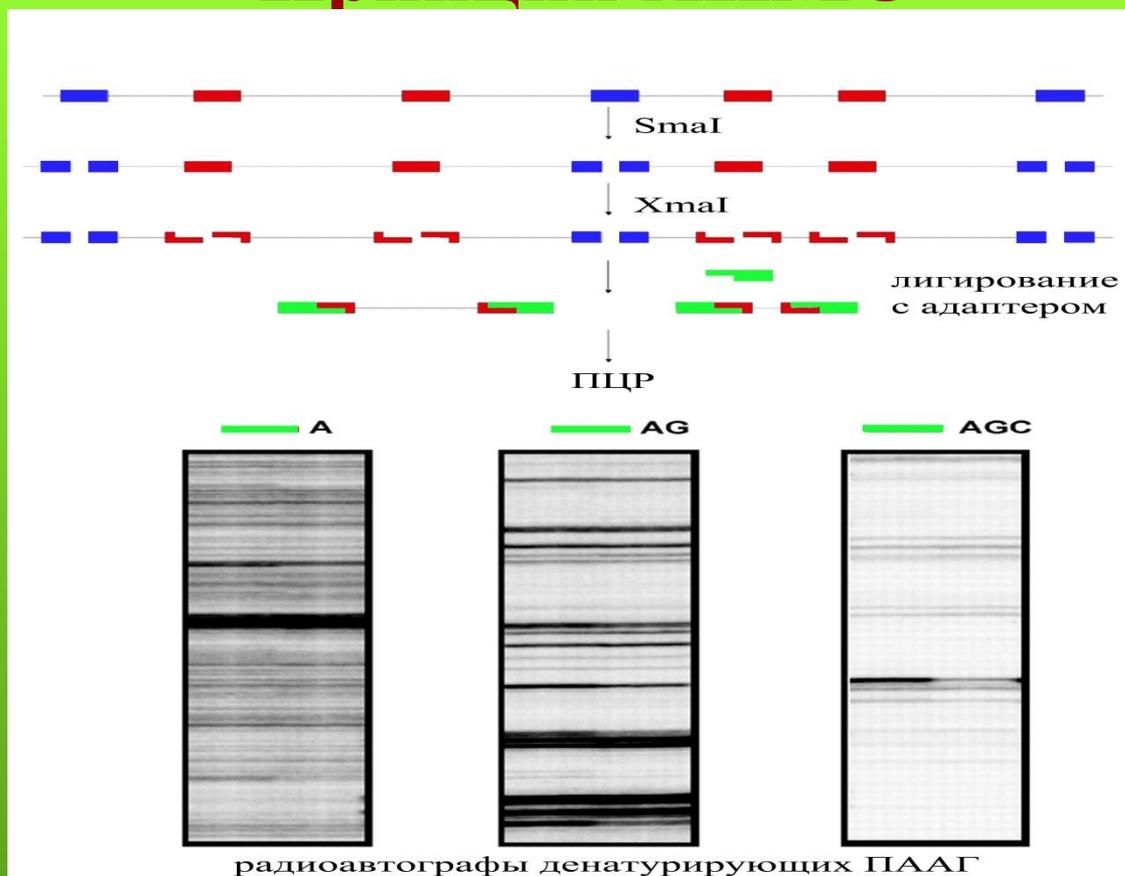
Отсутствие ПЦР-продукта



Гены, идентифицированные методом МЧФП

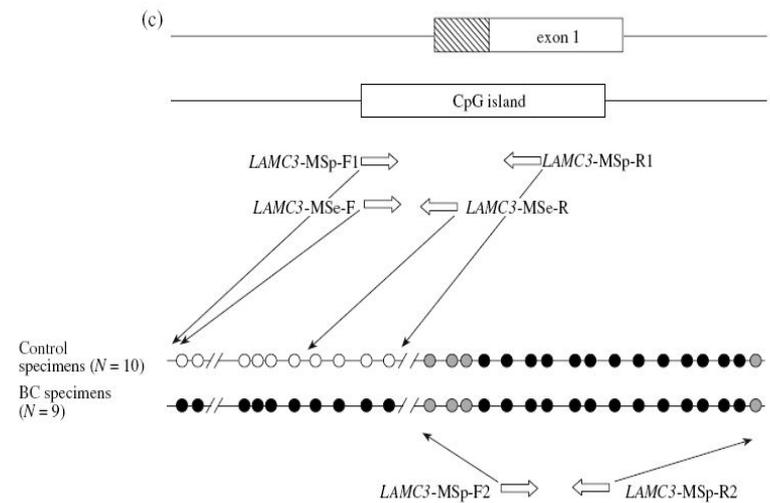
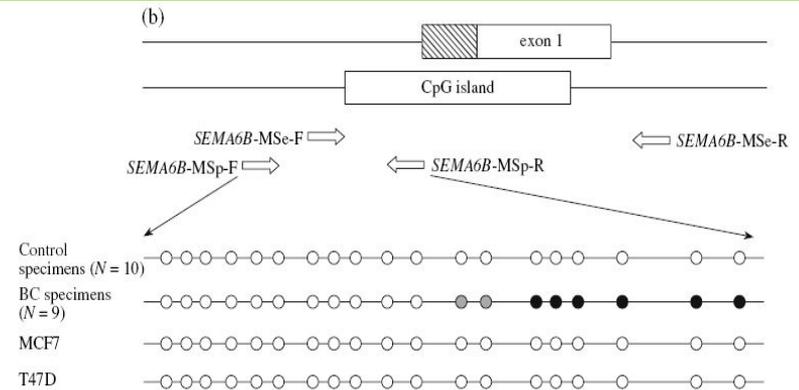
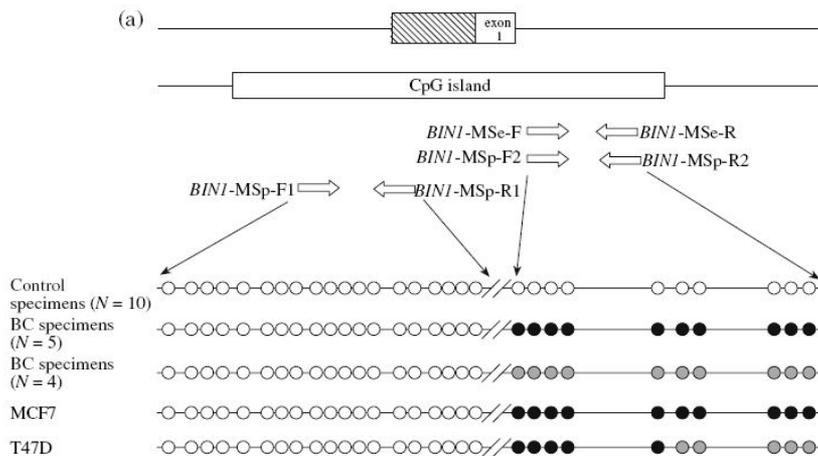
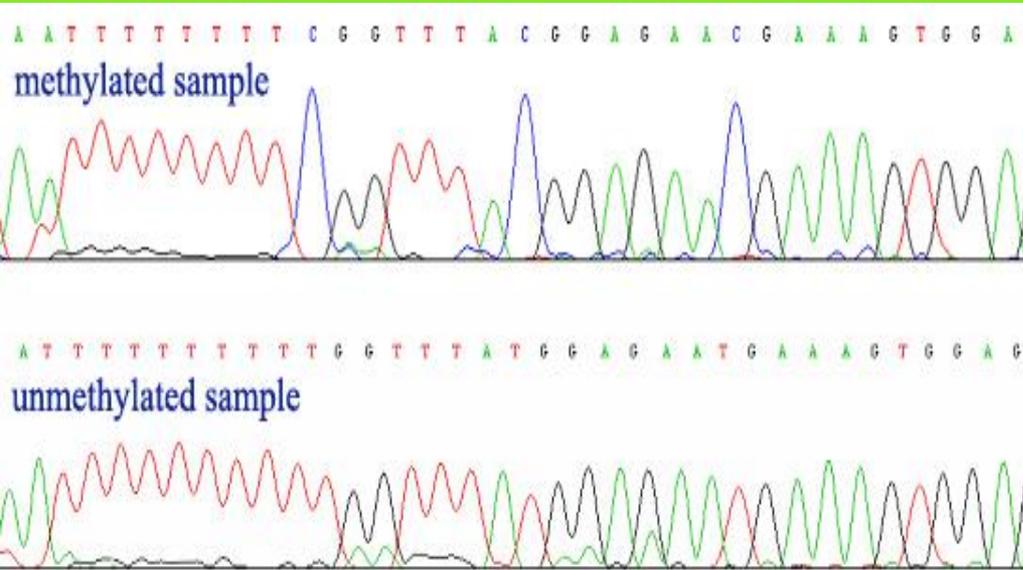
Ген	Локус	Белок	Метилирование
<i>SEMA6B</i>	19p13.3	Семафорин 6В	38%
<i>BIN1</i>	2q14.3	Адапторный протеин BIN 1	18%
<i>LAMC3</i>	9q34.13	Гамма –3-цепь ламинина	8%
<i>KCNH2</i>	7q36.1	Потенциал-зависимый калиевый канал, субсемейства H	7%
<i>VCIP135</i>	8q13.1	Белок VCIP135	4%
<i>CACNG4</i>	17q24.2	Потенциал-зависимый кальциевый канал, субъединица гамма 4	3%
<i>PSMF1</i>	20p13	Протеасомный ингибитор, субъединица 1 (P131)	3%

Принцип АИМС



Геномную ДНК обрабатывают метилчувствительной рестриктазой *Sma*I, которая формирует фрагменты с «тупыми» концами. Метилированные сайты узнавания, оставшиеся интактными, расщепляются нечувствительной к метилированию рестриктазой *Xma*I, формирующей фрагменты с «липкими» концами. Последние способны взаимодействовать в реакции лигирования с адаптерами и амплифицироваться в ходе ПЦР. ПЦР всей совокупности лигированных фрагментов проводят с радиоактивно мечеными праймерами, комплементарными адаптеру. В результате реакции нарабатывается значительное количество фрагментов ДНК различной длины, визуализацию которых проводят методом радиоавтографии

Высокоразрешающие карты метилирования CpG-островков генов *BIN1*, *SEMA6B* & *LAMC3*

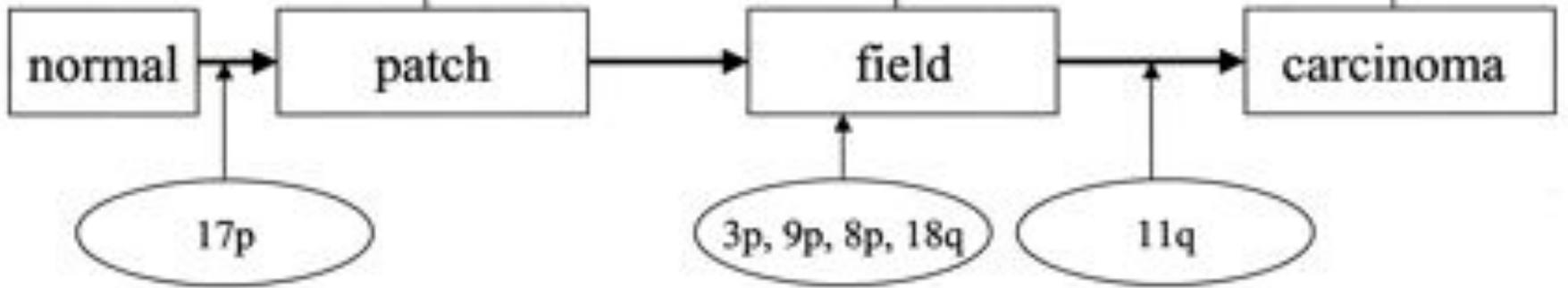


Карта метилирования CpG-островка гена *SEMA6B*



Anti-cancer RNAi targets tested in vivo

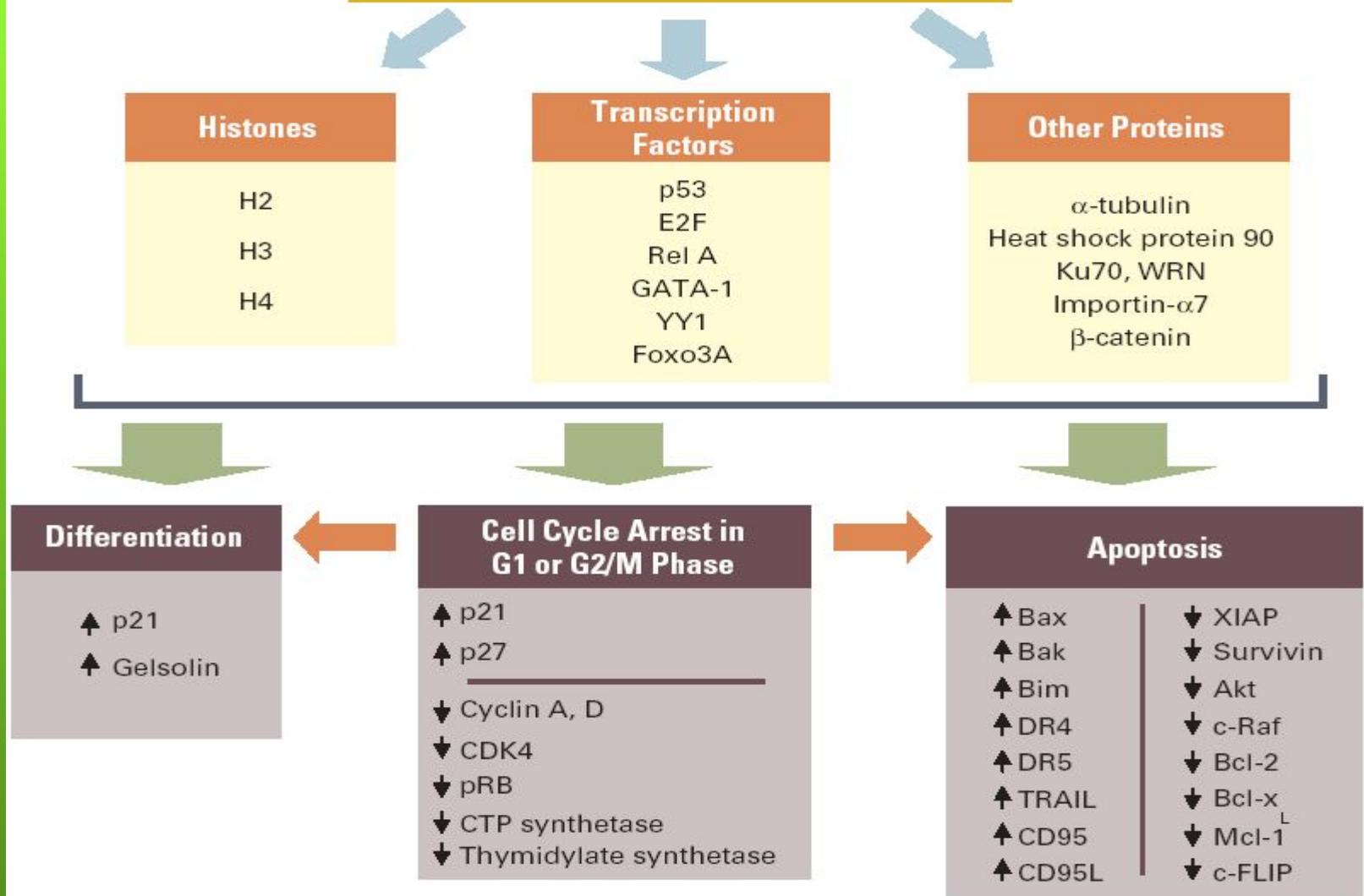
Target	Route	Vehicle
Bcl-2	i.v.	Liposome
Cxcr4	i.v.	None
Focal adhesion kinase	i.v.	None
EphA2	i.v.	None
Polo-like kinase 1	i.v.	ATA-treated
Colony-stimulating factor	i.t.	None
survivin	hd	DNA
CEACAM6	i.v.	None
EGFR	i.v.	Ligand-targeted
ErbB2/neu (HER2)R	i.p.	PEI-complex
Skp-2	i.t.	Adenovirus
Spingosine-1 phosphate-R	i.t.	Liposome
RhoA	i.t.	None
VEGF-R	i.v.	Ligand-targeted
VEGF	i.t./i.v.	Atelocollagen
FGF4	i.t.	Atelocollagen



Теория «полей канцеризации»



HDI-Induced Acetylation



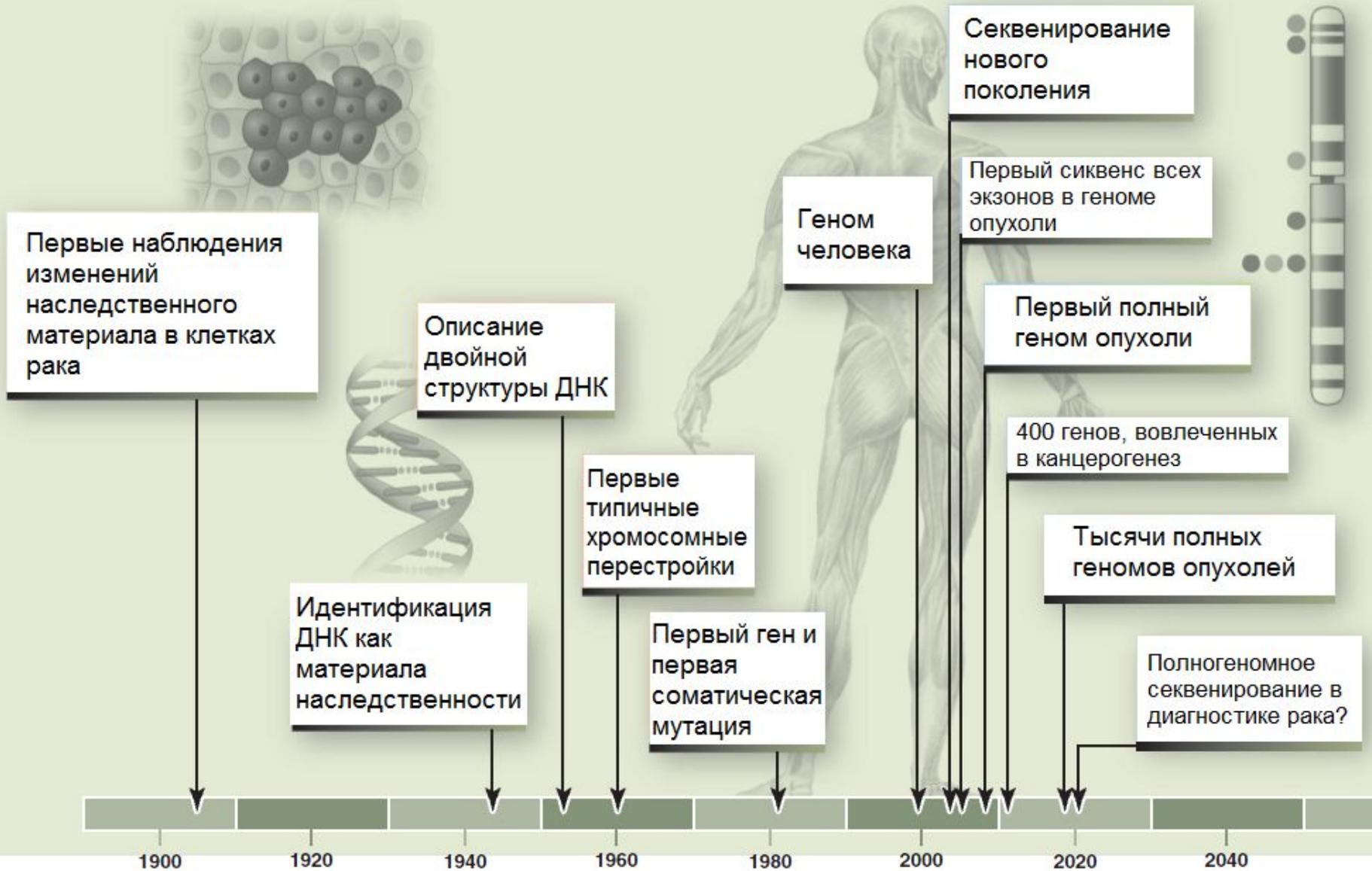
Лечение с использованием ингибиторов гистондеацетилаз индуцирует ацетилирование гистонов и негистоновых белков, которые модифицируют уровень экспрессии генов, влияющих на клеточный цикл, на дифференцировку и вступление в апоптоз клеток в опухоли.

Вопросы и методы науки

- **Сколько, какие, где, когда, почему в опухоли:**
 - гены несут мутации
 - локусы метилированы
 - транскрипты изменены
 - белки изменены
- Геномика
- Эпигеномика
- Транскриптомика
- Протеомика

Сколько и каких изменений достаточно для классификации и диагностики опухолей

Как найти «ген рака»?



Сколько и какие гены несут мутации в опухоли?

- До внедрения полногеномного секвенирования было известно около 400 генов, вовлеченных в канцерогенез (в которых обнаруживаются структурные нарушения)
- Вопрос о количестве соматических мутаций в отдельно взятой опухоли может быть решен только полногеномным секвенированием
- На основе полногеномных сиквенсов формируются каталоги соматических мутаций опухолевых геномов

Соматические мутации в опухоли: драйверные и пассажирские

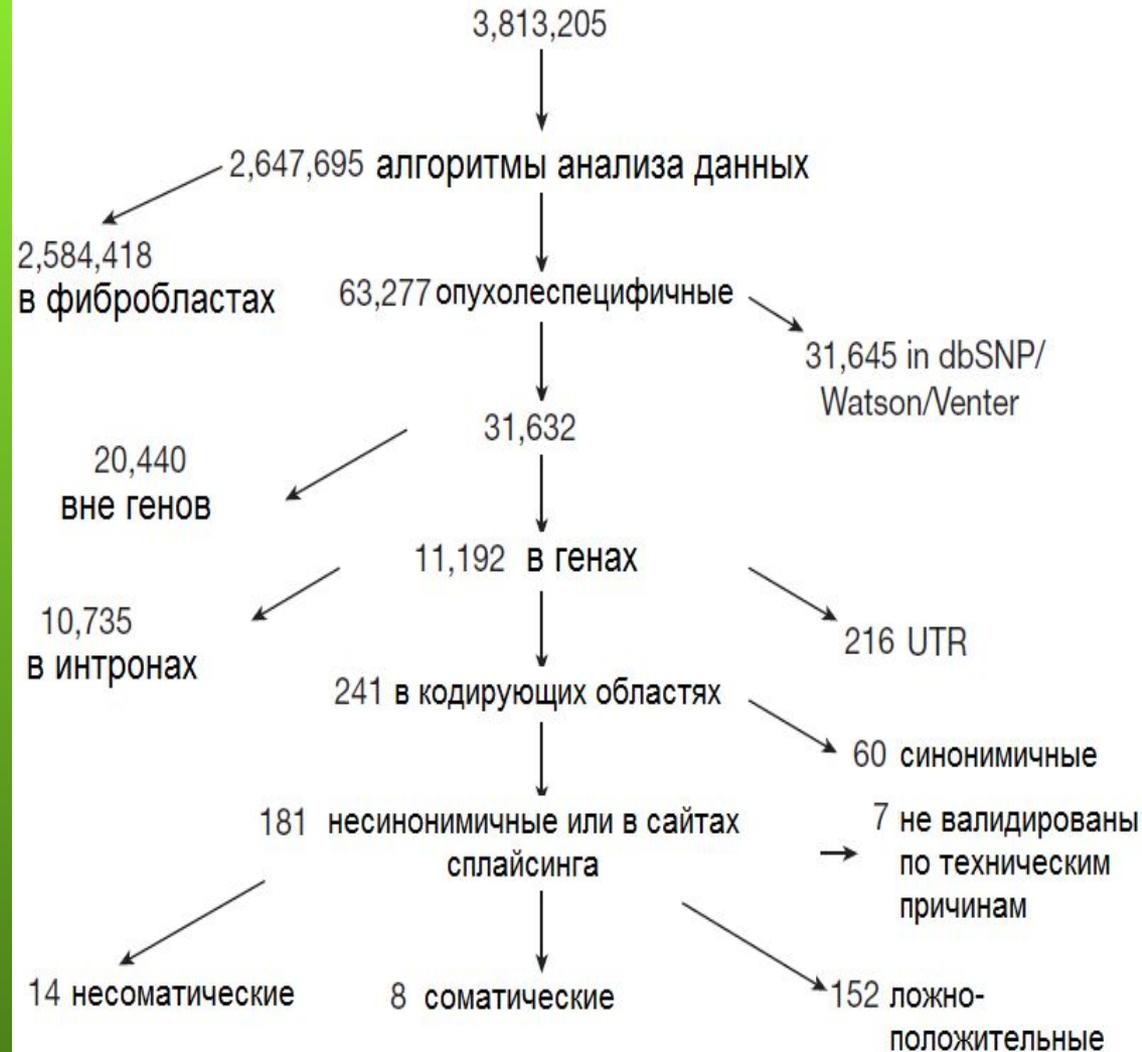
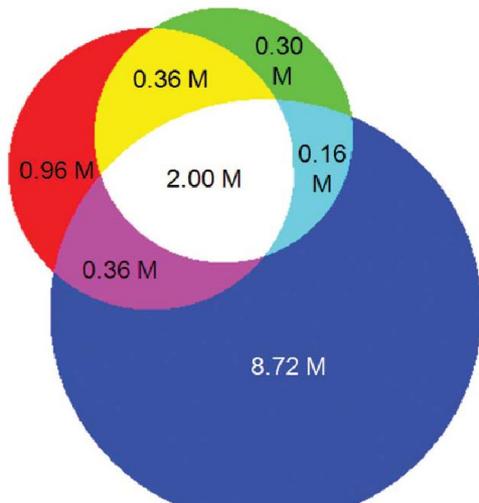
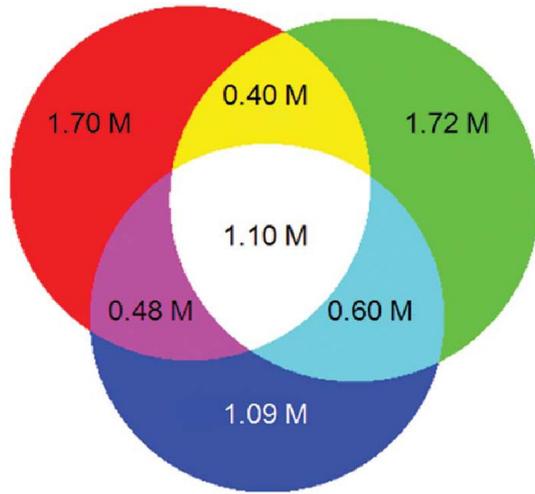
- **Драйверные мутации возникают в ключевых генах контроля пролиферации, дифференцировки, апоптоза, поддержания гомеостаза в тканевом микроокружении и нарушают соответствующие процессы**
- **По определению, драйверными являются мутации в генах, вовлеченных в канцерогенез (Hanahan, Weinberg, 2000)**

Соматические мутации в опухоли: драйверные и пассажирские

- Прочие соматические мутации, составляющие в геномах опухолей большинство, получили название пассажирских.
- По определению, пассажирские мутации не влияют на формирование фенотипа опухоли.
- Спектр пассажирских мутаций, тем не менее, отражает мутационные механизмы, действующие в опухолевом геноме, и, будучи невидимым для процессов отбора, представляет собой ценную информацию о молекулярных этиологии и патогенезе злокачественных новообразований (Pleasance et al., 2010)

Каталоги соматических мутаций Каталог 1

- ОМЛ: Ley 2008



Каталог 2 - ОМЛ: Mardis 2009

- Уровень ложноположительных результатов снижен с 96% до 47%
- 12 мутаций в кодирующих областях
- 52 мутации в регуляторных и высоко-консервативных областях
- 4 из 64 встречены хотя бы один раз при тестировании 188 образцов ОМЛ
- Вывод авторов: лишь незначительная доля вошедших в каталог мутаций может иметь патогенетическое значение

1860 – 1900х: «Ген – это дискретная единица наследственности» (Wilhelm Johannsen);
1910х: «Ген – это отдельный локус» (Thomas Hunt Morgan);
1940х: «Ген – это чертеж белка» (Beadle and Tatum);
1950х: «Ген – это физическая молекула» (Griffith);
1960х: «Ген – это транскрибируемый код» (Watson and Crick);
1970х-1980х: «Ген – это открытая рамка считывания (open reading frame – ORF) части последовательности» (Doolittle);
2000х: «Аннотированная структурная единица генома, зарегистрированная в одной из баз данных».

В программе «Геном человека» за ген принимали единицу транскрипции, которая может быть транслирована в одну или несколько аминокислотных последовательностей [69].

Современное определение гена формулируется так: «Ген – это совокупность геномных последовательностей, кодирующих сцепленный набор потенциально перекрывающихся функциональных продуктов». В нем не упоминаются сложные аспекты регуляции и транскрипции и утверждается, что с одним геном могут быть ассоциированы группы функциональных продуктов гена (а не промежуточные транскрипты).

Метилирование позволяет предсказать поведение опухоли (эффективность терапии, метастазирование):

- метилирование *WIT1* коррелирует с **хеморезистентностью** при ОМЛ;
- метилирование *DAP*-киназы свидетельствует о **благоприятном прогнозе**

при немелкоклеточном раке легкого;

- метилирование *APC* в плазме крови пациентов с аденокарциномами свидетельствует о **коротком сроке выживаемости**;

- метилирование генов-супрессоров, в том числе *PCDH9* и *BLU*, ассоциировано с **плохой выживаемостью** пациентов с нейробластомой, вне зависимости от амплификации *N-тус*.

