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:

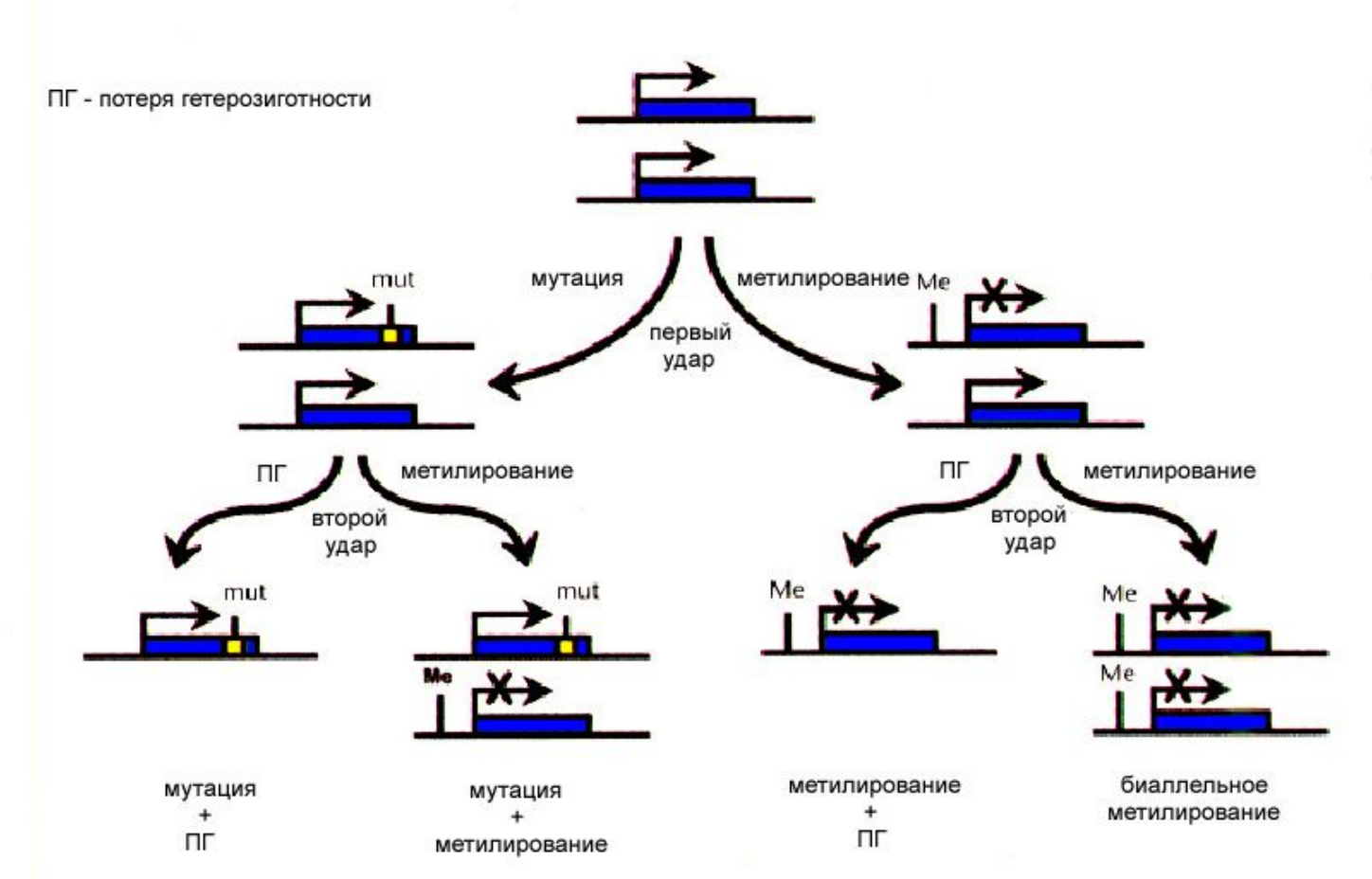
- **мутации (активирующие и инактивирующие);**
- **делеции генов-супрессоров и больших хромосомных фрагментов (потеря гетерозиготности);**
- **транслокации, приводящие к появлению химерных генов;**

- **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 некодирующих РНК.**

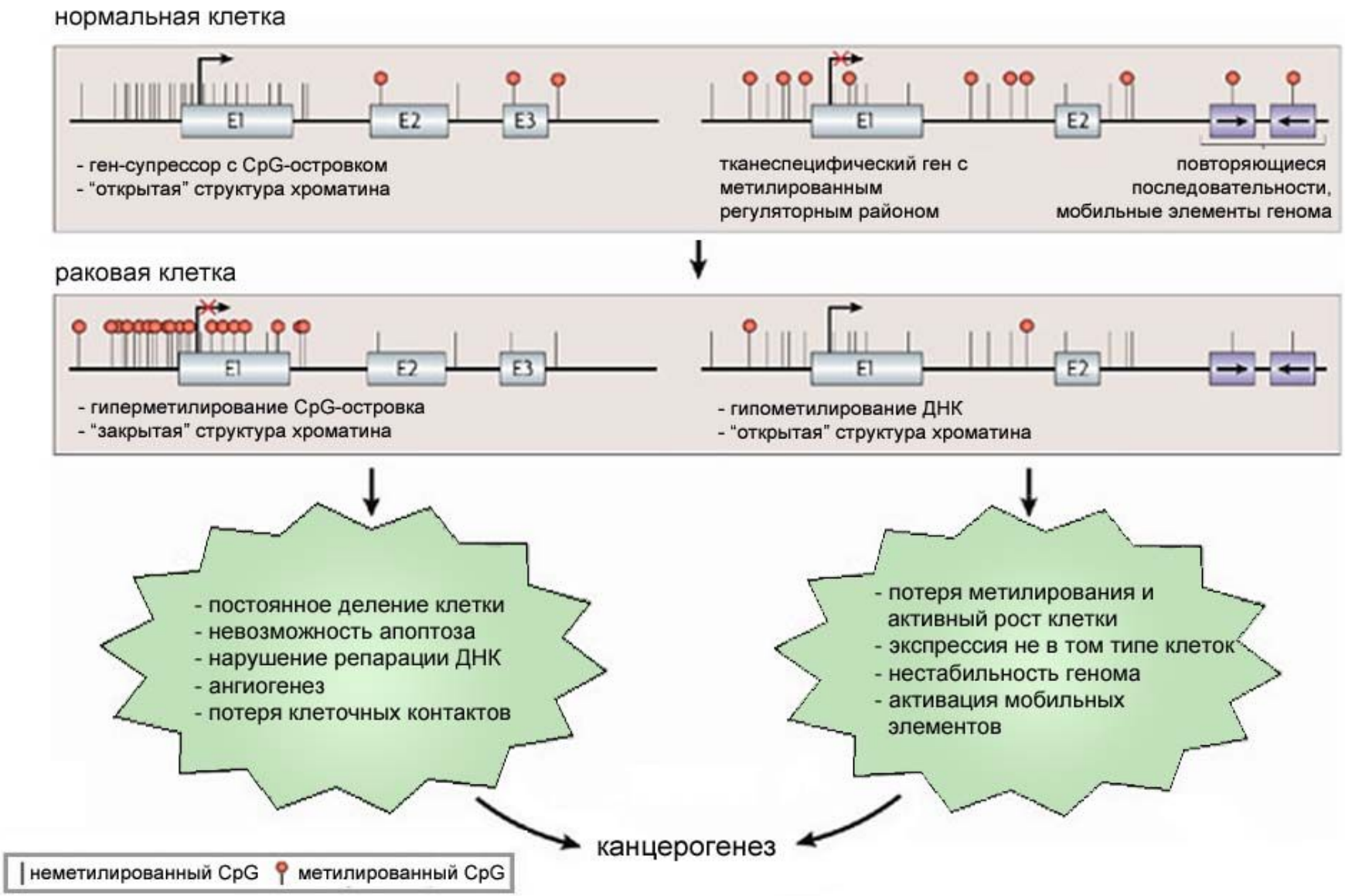
Чувствительности и специфичности одного опухолевого маркера недостаточно - НУЖНА СИСТЕМА МАРКЕРОВ.

ПРОТООНКОГЕНЫ	ГЕНЫ-СУПРЕССОРЫ
Позитивные регуляторы, способные индуцировать деление клетки	Негативные регуляторы, препятствующие делению клетки
В нормальных тканях имеют фоновый уровень экспрессии	В норме экспрессируются почти во всех тканях
Действие проявляется в результате активации протоонкогена даже в гетерозиготном состоянии (достаточно активации одного аллеля)	Действие проявляется только при наличии повреждения обоих аллелей (полная инактивация функции)
Активация 1. Нарушение экспрессии: - гиперэкспрессия, - эктопическая экспрессия; 2. Производство нового химерного белка с аномальной функцией; 3. РНК-интерференция (экспрессия онкогенных некодирующих РНК)	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 (инактивация некодирующих РНК – супрессоров ОР.

Современная двухударная модель канцерогенеза



Изменение метилирования генома в процессе канцерогенеза

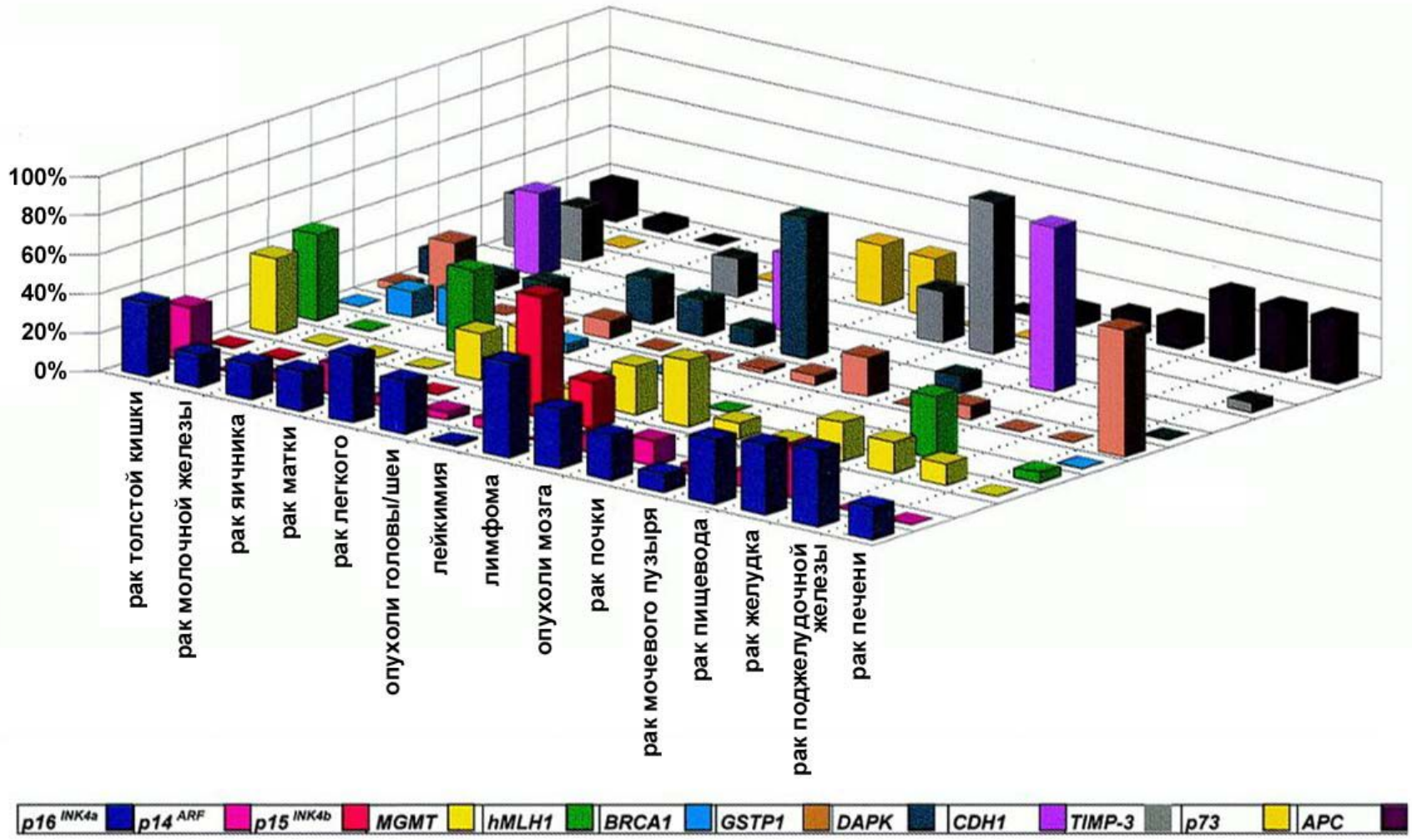


Пути инактивации классических генов-супрессоров опухолевого роста

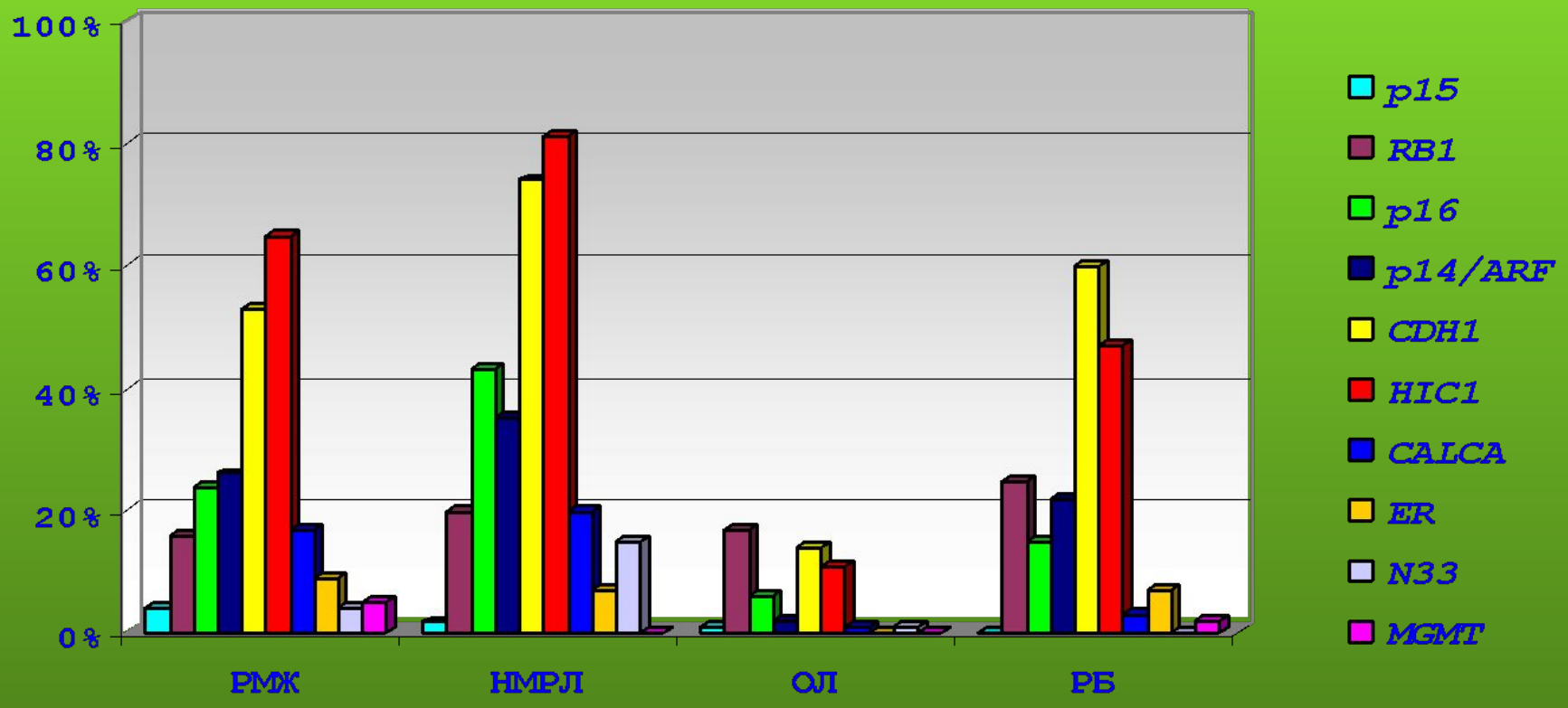
Механизмы инактивации генов.					Механизм двойного события.				
Гены	Тип опухоли	ПГ	Мутации	Метилиро-вание	Гомозиг. делеция	Мутация + ПГ	Мутация + метил.	Метил. + ПГ	Биаллел. метилир.
RB1	Ретинобластома	+	+	+	Редко	+	+	+	+
P53	Различные типы	+	+	-	Редко	+	+	-	-
VHL	Карцинома почек	+	+	+	Редко	+	+	+	?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

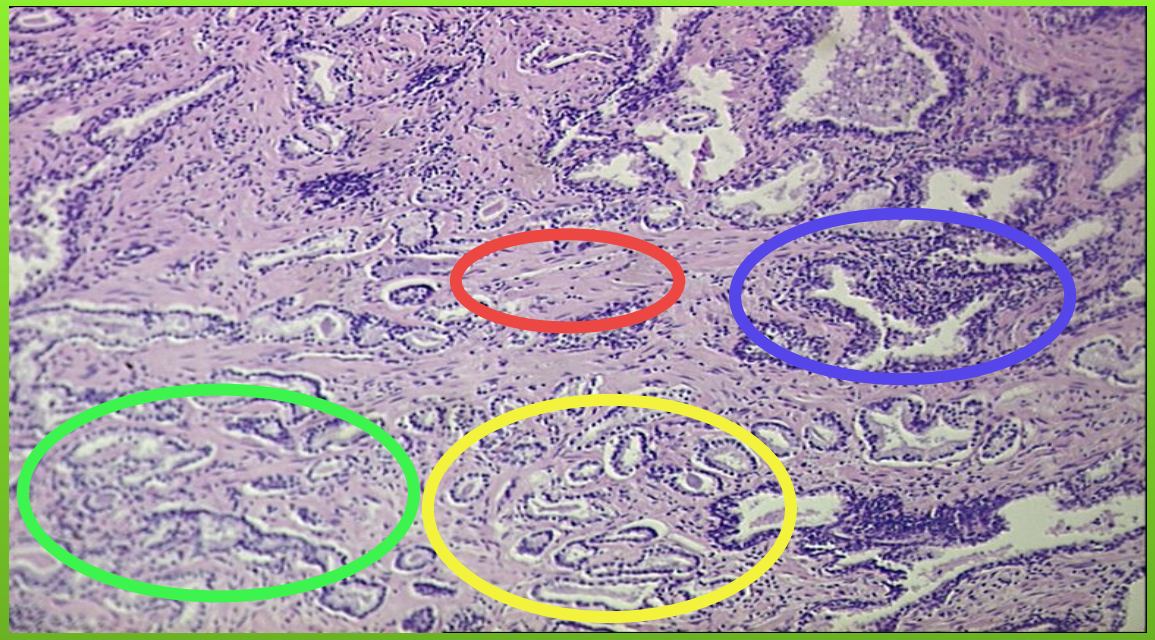
ПРОФИЛЬ МЕТИЛИРОВАНИЯ ГЕНОВ-СУПРЕССОРОВ В РАЗЛИЧНЫХ ТИПАХ ОПУХОЛЕЙ



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



ГЕТЕРОГЕННОСТЬ РПЖ

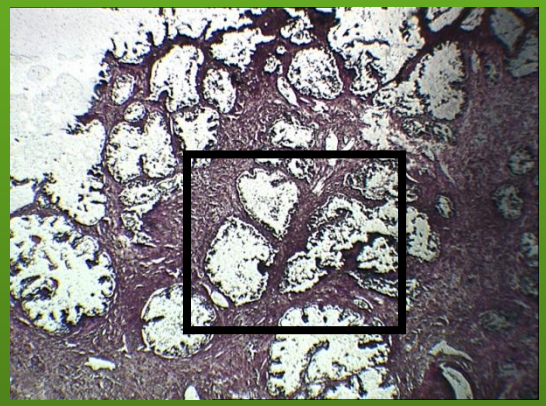


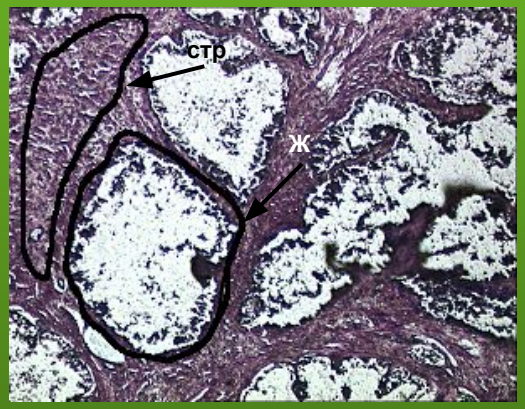
аденокарцинома

аденокарцинома

строма

ПИН





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

Молекулярные маркеры рака предстательной железы

Эпигенетические маркеры

Гиперметилирование

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

Модификация гистонов

CAR, CPA3, RARb, VDR

Гипометилирование

CAGE, HPSE, PLAU

Генетические маркеры

Делеции

8p22, 16q24

RB1, p53

Мутации

AR, KLF6, p53, PTEN

Хромосомные перестройки

Химерные онкогены

TMPRSS2/ERG4, TMPRSS2/ETV1, TMPRSS2/ETV4

Экспрессионные маркеры

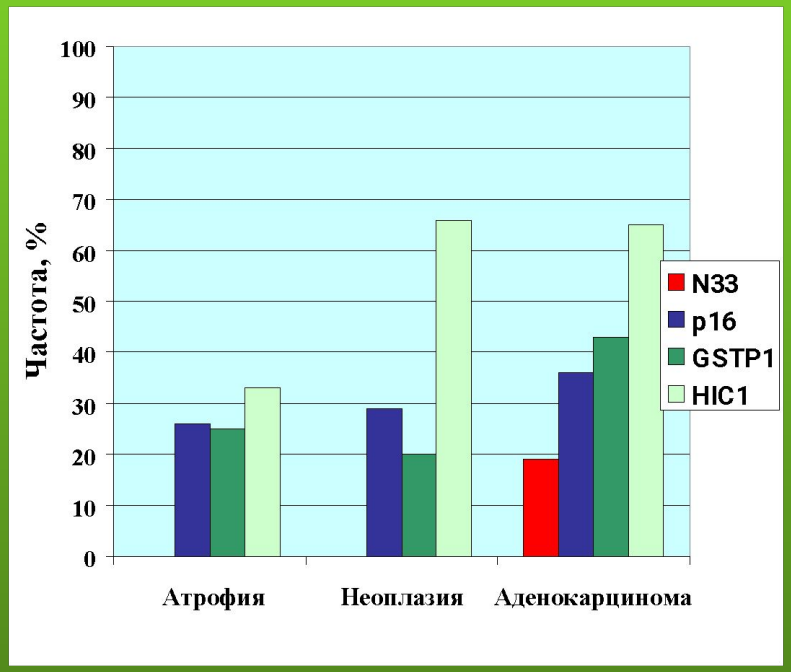
PSCA, KLK2, PSMA, HER-2/neu, DD3

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

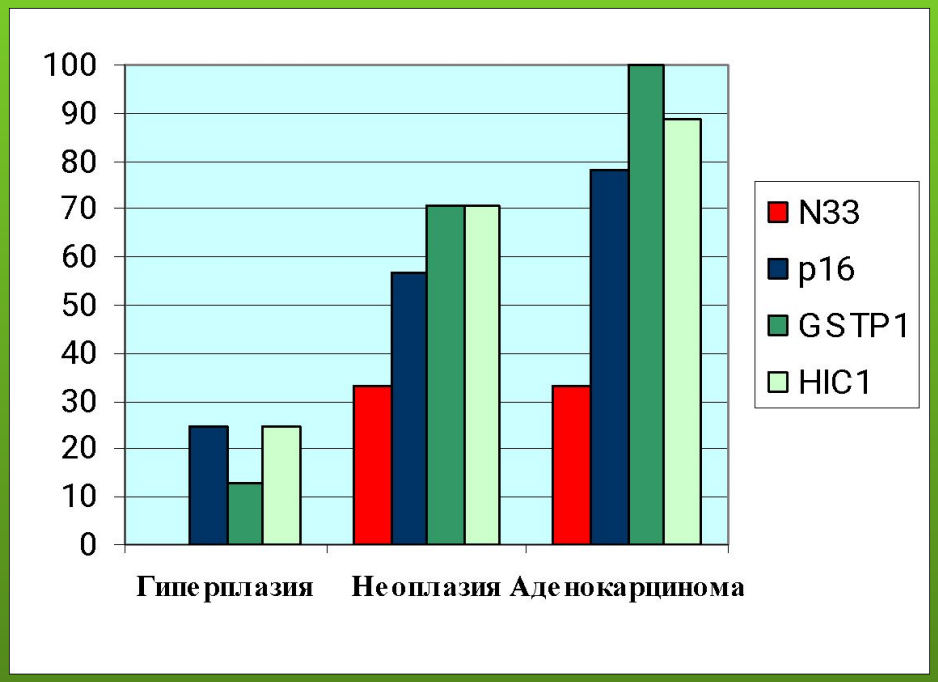
	HIC1	*p16*	*GSTP1*	*N33*
норма	0/2	0/2	0/2	0/2
смежная строма	0/2	0/2	0/2	0/2
гиперплазия (от пациентов с ДГПЖ)	0/5	0/5	0/5	0/5
смежная строма	0/5	0/5	0/5	0/5
гиперплазия (от пациентов с АК)	2/8 (25%)	2/8 (25%)	1/8 (13%)	0/8
смежная строма	1/6	0/6	1/6	1/6
ПИН (от пациентов с АК)	9/15 (60%)	8/15 (53%)	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

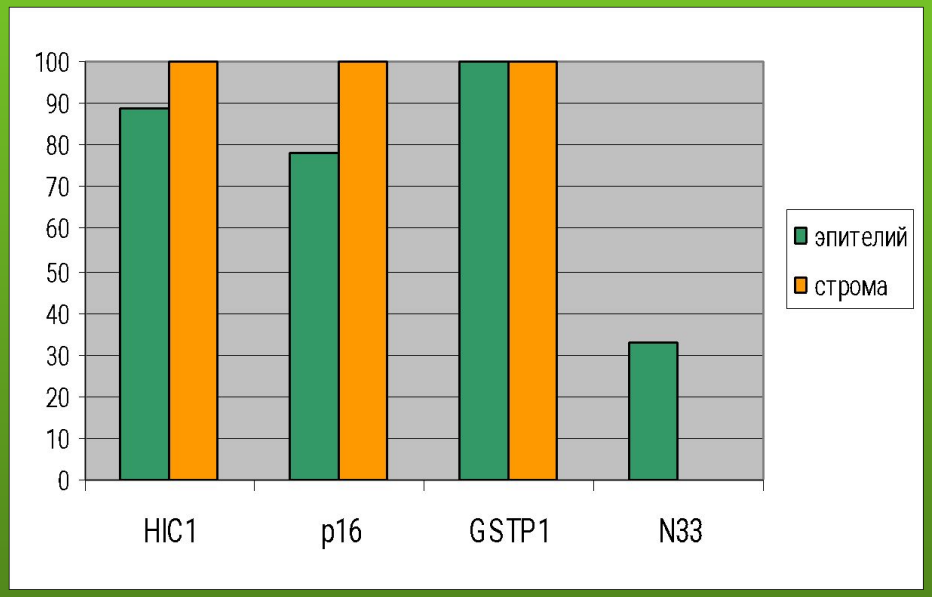


Микродиссекционные образцы

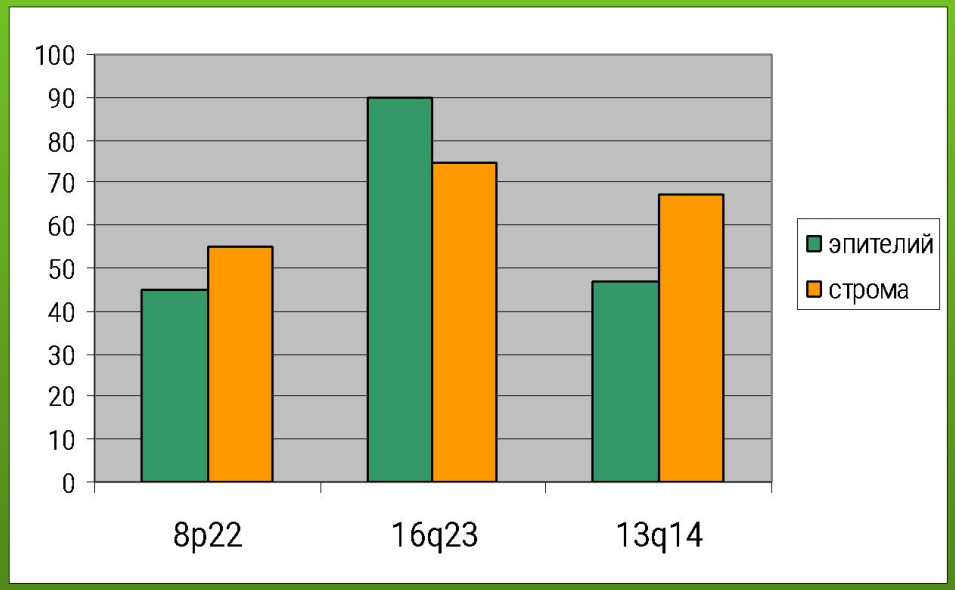


Сравнение молекулярно-генетических нарушений в опухолевом эпителии и смежной строме

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%)

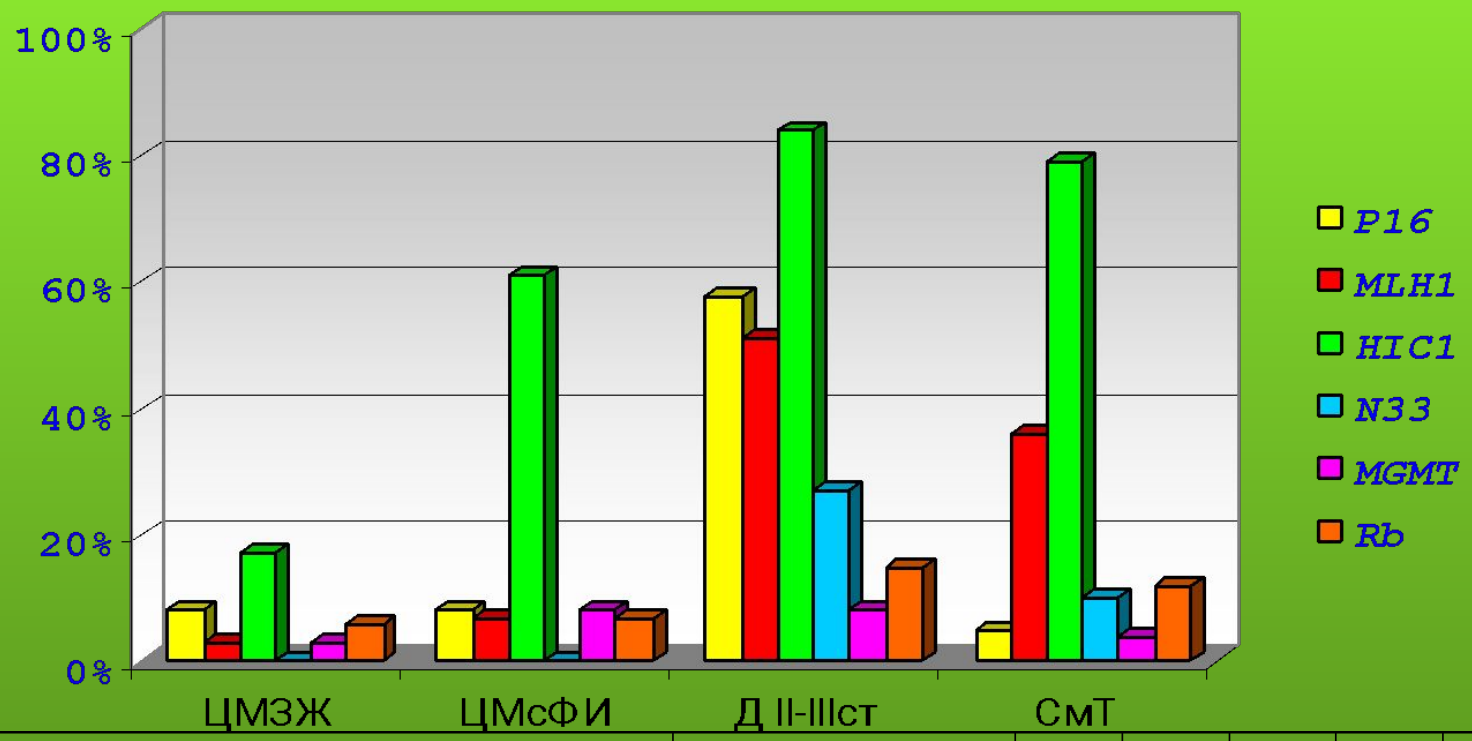
Возможность обнаружения аномального метилирования за 4 года до появления опухоли

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

Маркеры метилирования, определяемые на ранних стадиях канцерогенеза.

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

Частоты метилирования генов *p16, MLH1, HIC1, N33, MGMT* и *RB1* в образцах ткани шейки матки.

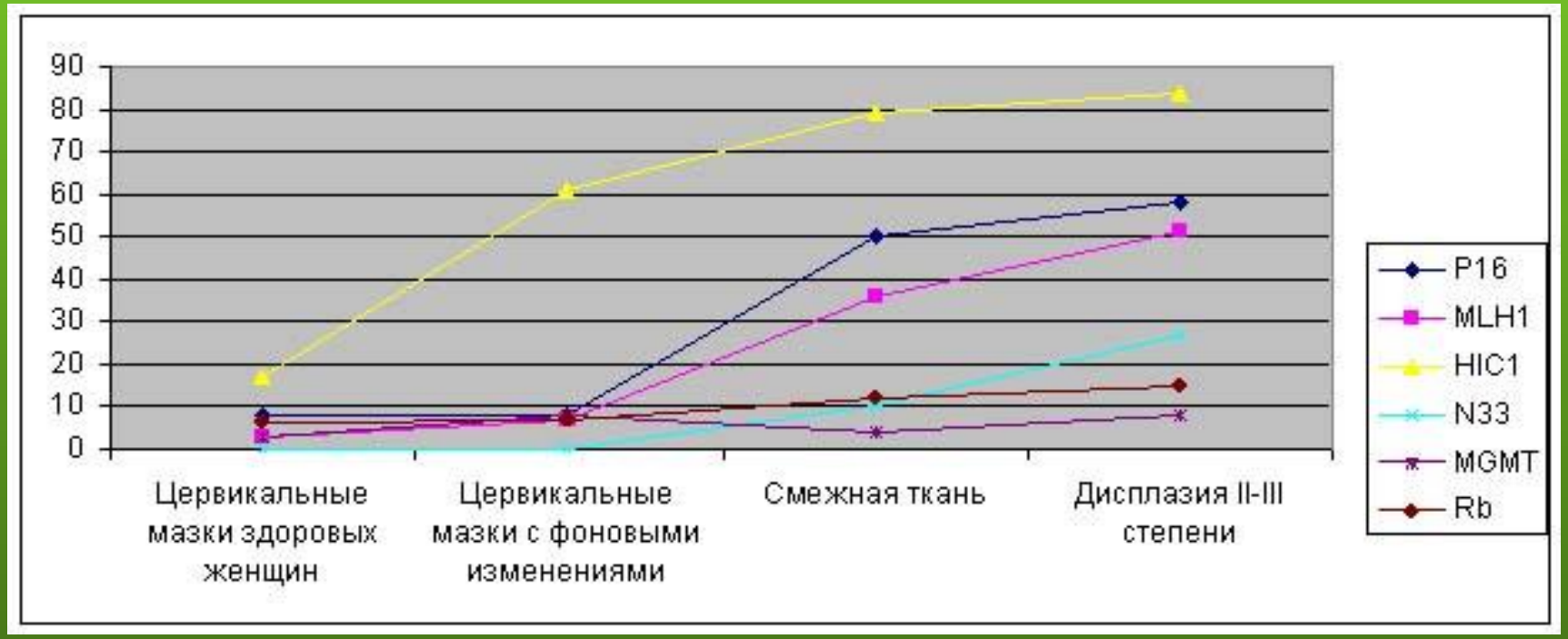


Тип образца	Число образцов	*P16*	*MLH1*	*HIC1*	N33	*MGMT*	*Rb*
Цервикальные мазки здоровых женщин	35	8%	3%	17%	0%	3%	6%
Цервикальные мазки с фоновыми изменениями	93	8%	7%	61%	0%	8%	7%
Дисплазия II-III степени	53	58%	51%	84%	27%	8%	15%
Смежная ткань	45	5%	36%	79%	10%	4%	12%

МАРКЕРЫ МЕТИЛИРОВАНИЯ В ПРОГНОЗИРОВАНИИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ ОПУХОЛЕЙ ЖЕНСКОЙ РЕПРОДУКТИВНОЙ СИСТЕМЫ

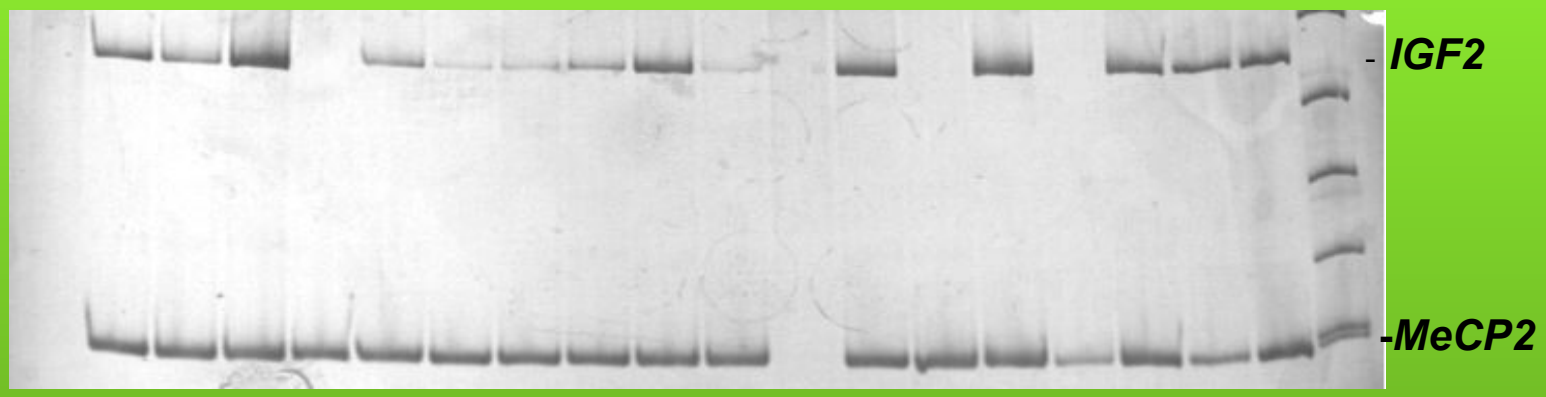
Частота аномального метилирования генов-супрессоров опухолевого роста (*RASSF1, MLH1, P16, RAR-b, GSTP1, CDH1*) возрастает в ряду: хронический эндометрит→простая гиперплазия эндометрия без атипии→комплексная гиперплазия эндометрия без атипии→ полип эндометрия→комплексная гиперплазия эндометрии с атипией→рак 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.*

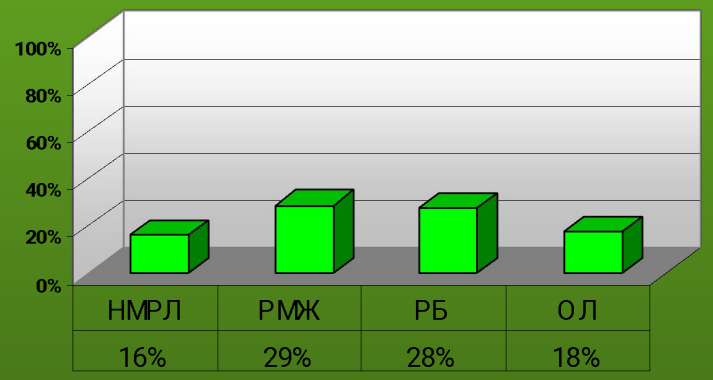


Инактивация посредством гиперметилирования ключевых генов-супрессоров сопровождается гипометилированием и активацией целого ряда онкогенов (*raf, c-fos, c-myc, c-Ha-ras, c-K-ras*), факторов роста (*IGF2, TGF*) и мобильных повторяющихся элементов, расположенных в районах гетерохроматина.

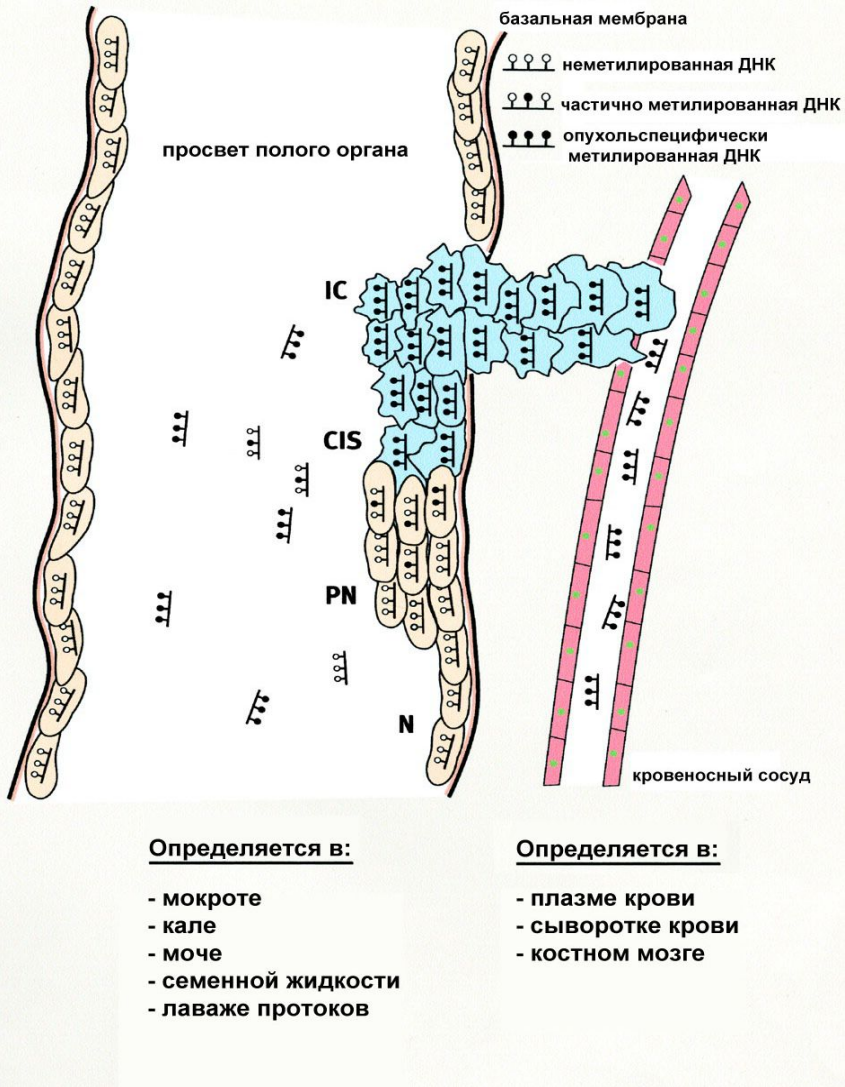
Аномальное деметилирование гена *IGF2* в образцах опухолей.



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.

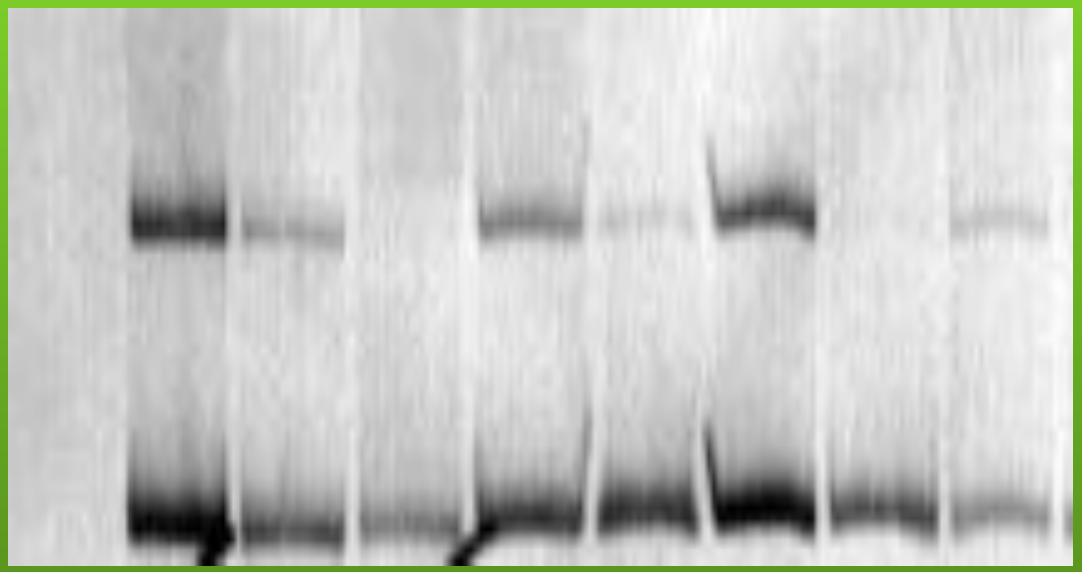


Частота потери метилирования гена *IGF2* в разных типах опухолей.



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.

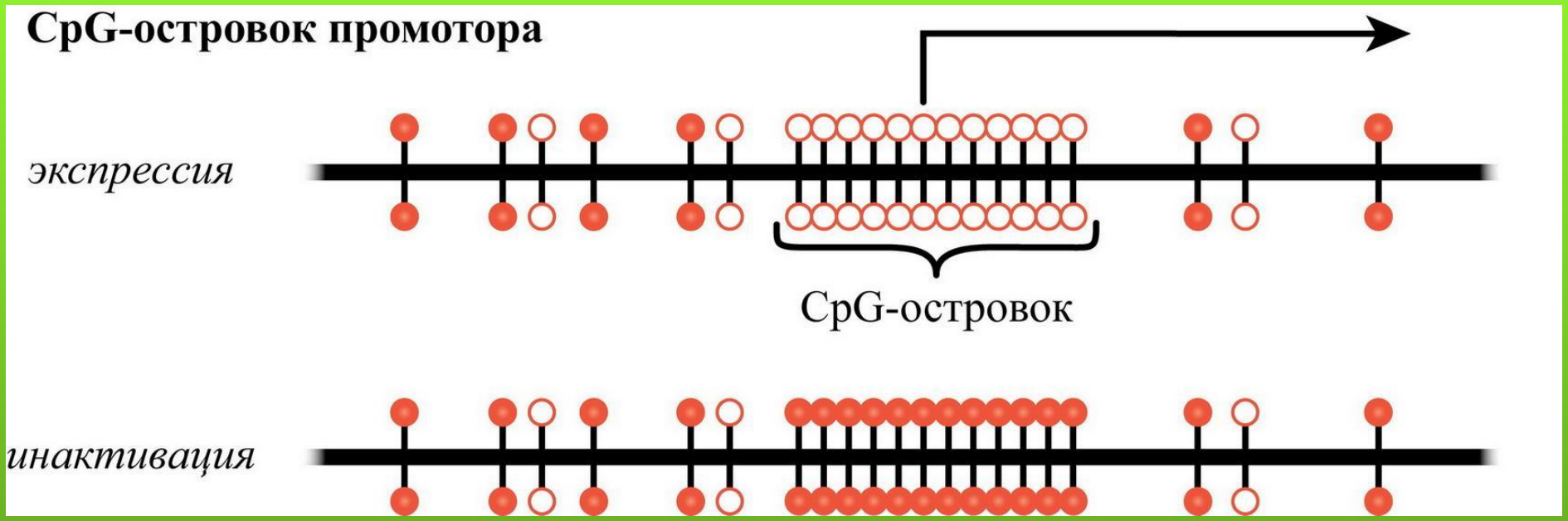
Определение метилирования гена *GSTP1* в плазме крови больных раком предстательной железы.



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



CpG-островки присутствуют в промоторных районах 60% генов, составляют от 0,5 до 1,5 т.п.н., содержание C + G превышает 60%, а соотношение CpG/GpC должно составлять не менее 0,6. За редким исключением (импринтированные гены) CpG-островки промоторных районов в нормальных тканях не метилированы, что свидетельствует о функционально нормальном состоянии гена.

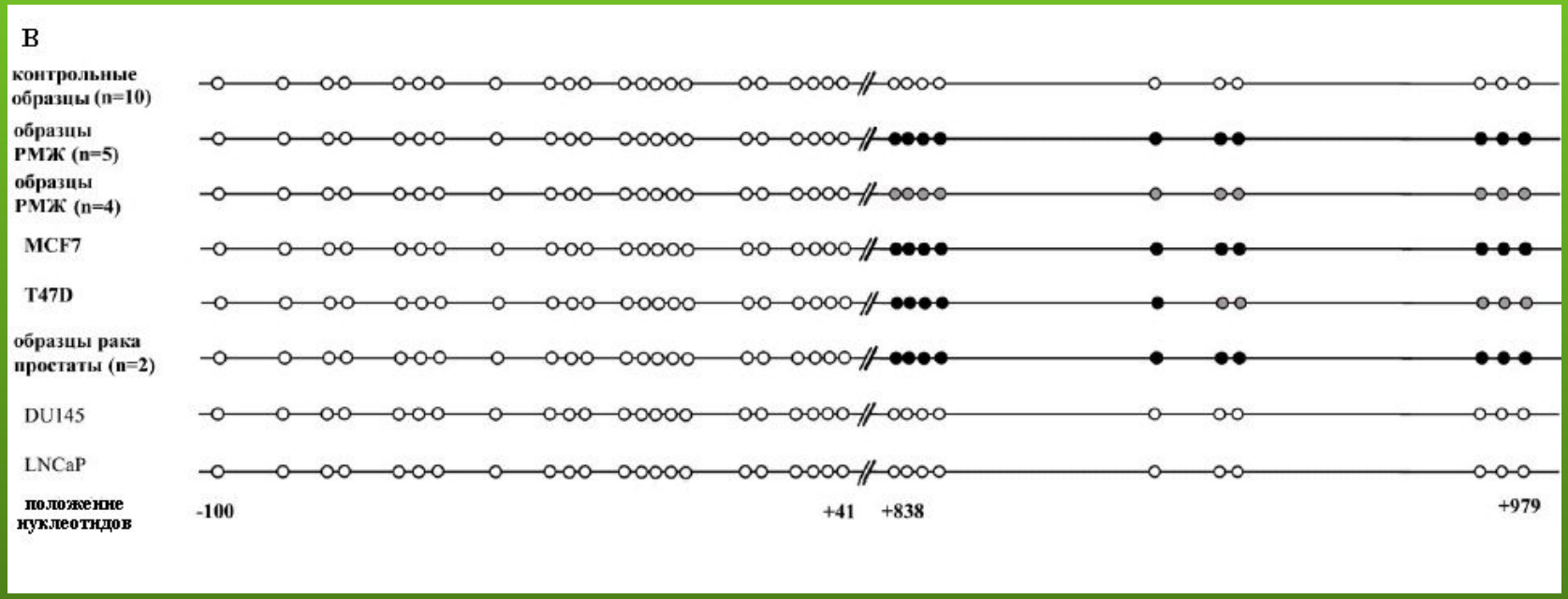
Карта метилирования CpG-островка гена *BIN1*

0,9 т.п.н. промотор

интрон 1

экзон 1

CpG-островок промотора



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 опухольспецифичным и может быть использовано при разработке панелей эпигенетических маркеров рака после оценки паттернов метилирования для различных типов опухолей.

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 *BIN1*, *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*, *FOXM1/HKMT1188*, *LAMC3*, *SEMA6B*, *VCIP135*, *KCNH2*, *CACNG4* и *PSMF1*) полученных фрагментов имеют локализацию, каноническую для дифференциального метилирования при канцерогенезе

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, PHF15, 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 неизмененной ткани.

Метилирование ДНК является ценным биомаркером для диагностики рака.

1. **Целый ряд генов, вовлеченных в канцерогенез, инактивируется посредством метилирования (*P16, P14, RB1, LKB, ER, RAR2β, 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 биологических жидкостях организма 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.

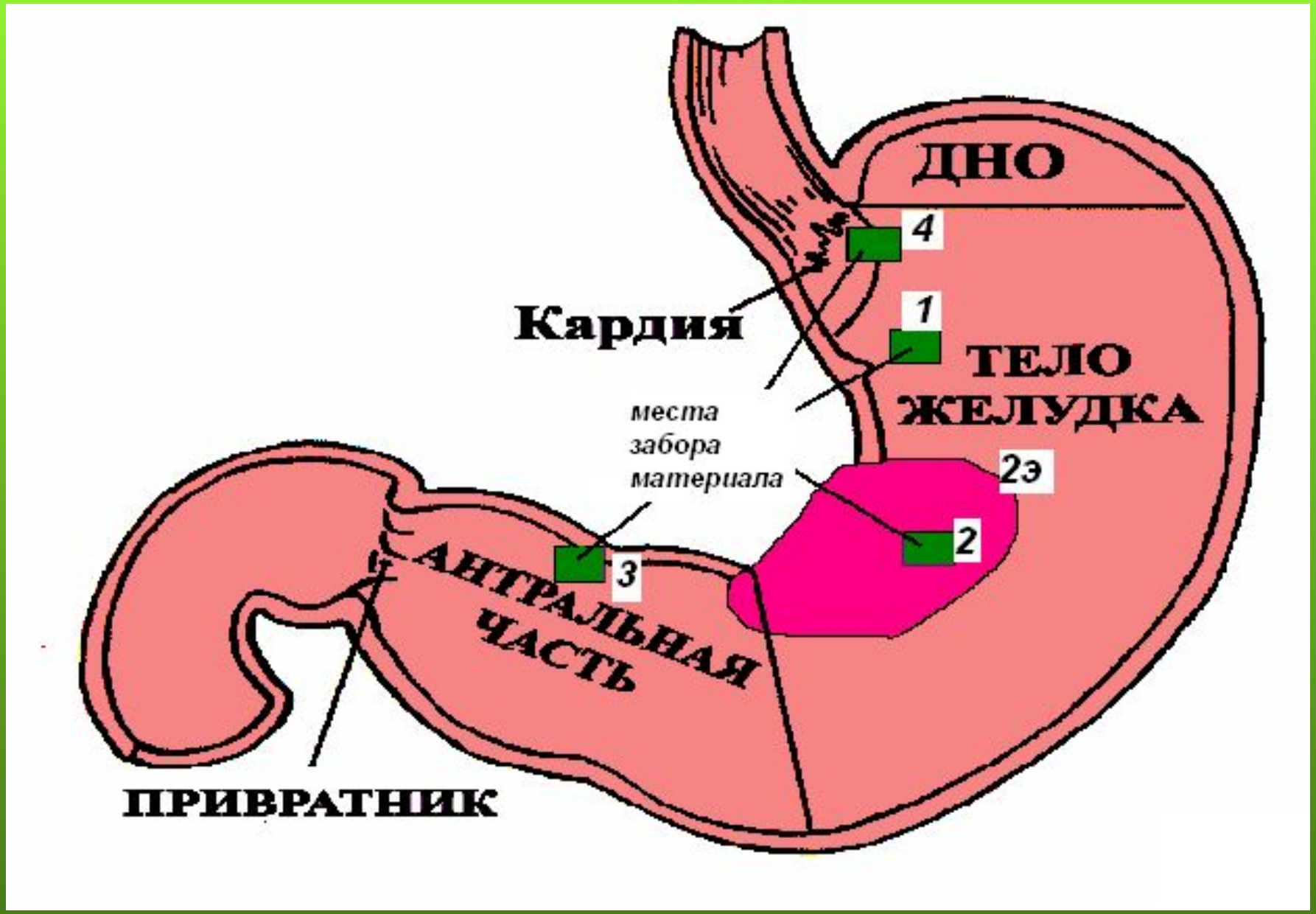
Метилирование *CDH1* ассоциировано с прорастанием опухолью капсулы почки (P = 0.024) и наличием метастазов на момент постановки диагноза (P = 0.001). Метилирование *RASSF1* чаще встречается в умеренно-, чем в высокодифференцированных первичных опухолях (P = 0.047). Метилирование *RASSF1* и *CDH1* может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

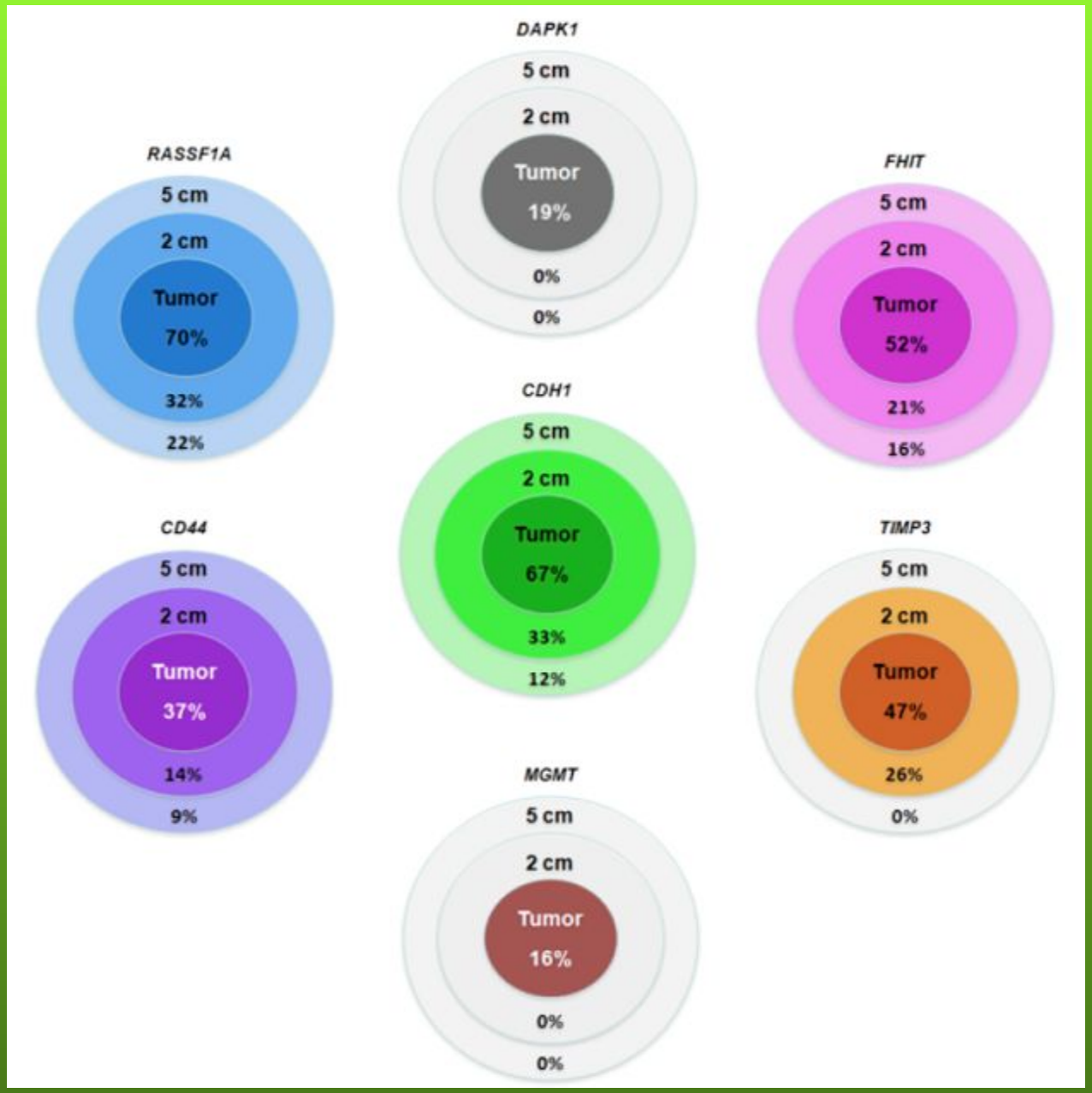
Метилирование *MGMT* коррелирует с успешным лечением глиом кармустином.

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

Схема получения операционного материала РЖ



Изменение частот аномального метилирования ряда генов в ряду опухоль (рак легкого) – нормальная ткань 2см. – нормальная ткань 5см.



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

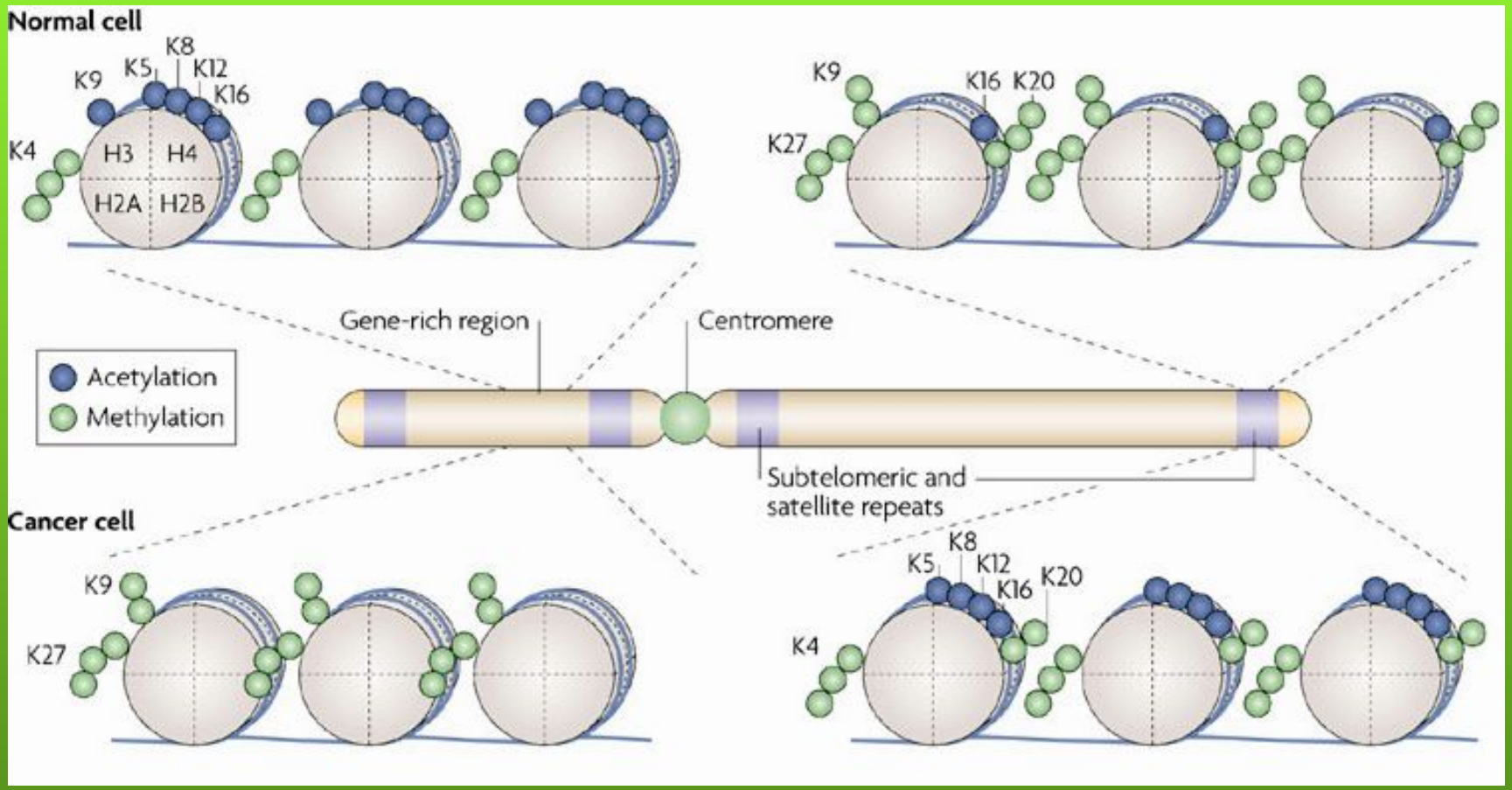
Мы определяем положительный сигнал – гиперметилирование ДНК в опухолевой клетке.

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 К27 и диметилирование лизина К9 гистона Н3 в районах активного хроматина, а так же потеря триметилирования лизина К20 гистона Н4 и триметилирование К27 гистона Н3 в гетерохроматиновых районах являются таким же характерным признаком раковой клетки, как метилирование CpG-островков.

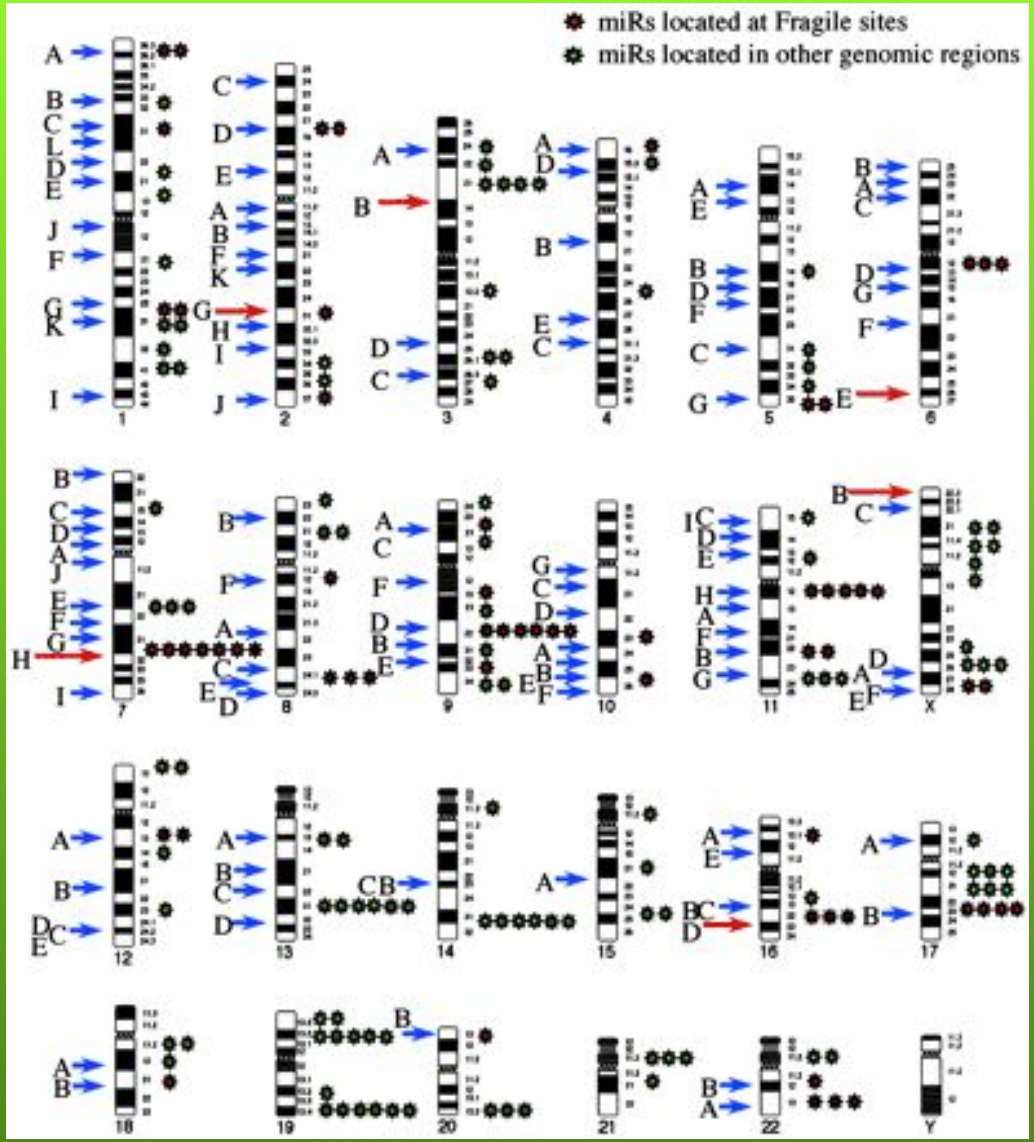
Патология генов, вовлеченных в эпигенетическую регуляцию, и канцерогенез

Gene	Alteration	Tumour type
DNA methyltransferases		
DNMT1	Overexpression	Multiple types
DNMT3b	Overexpression	Multiple types
Methyl-CpG-binding proteins		
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
Histone acetyltransferases		
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
Histone deacetylases		
HDAC1	Aberrant expression	Multiple types
HDAC2	Aberrant expression, mutations in MSI+	Multiple types
Histone methyltransferases		
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
Histone demethylase		
GASC1	Gene amplification	Squamous cell carcinoma

miРНК И КАНЦЕРОГЕНЕЗ

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

Ломкие сайты и картированные miРНК



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

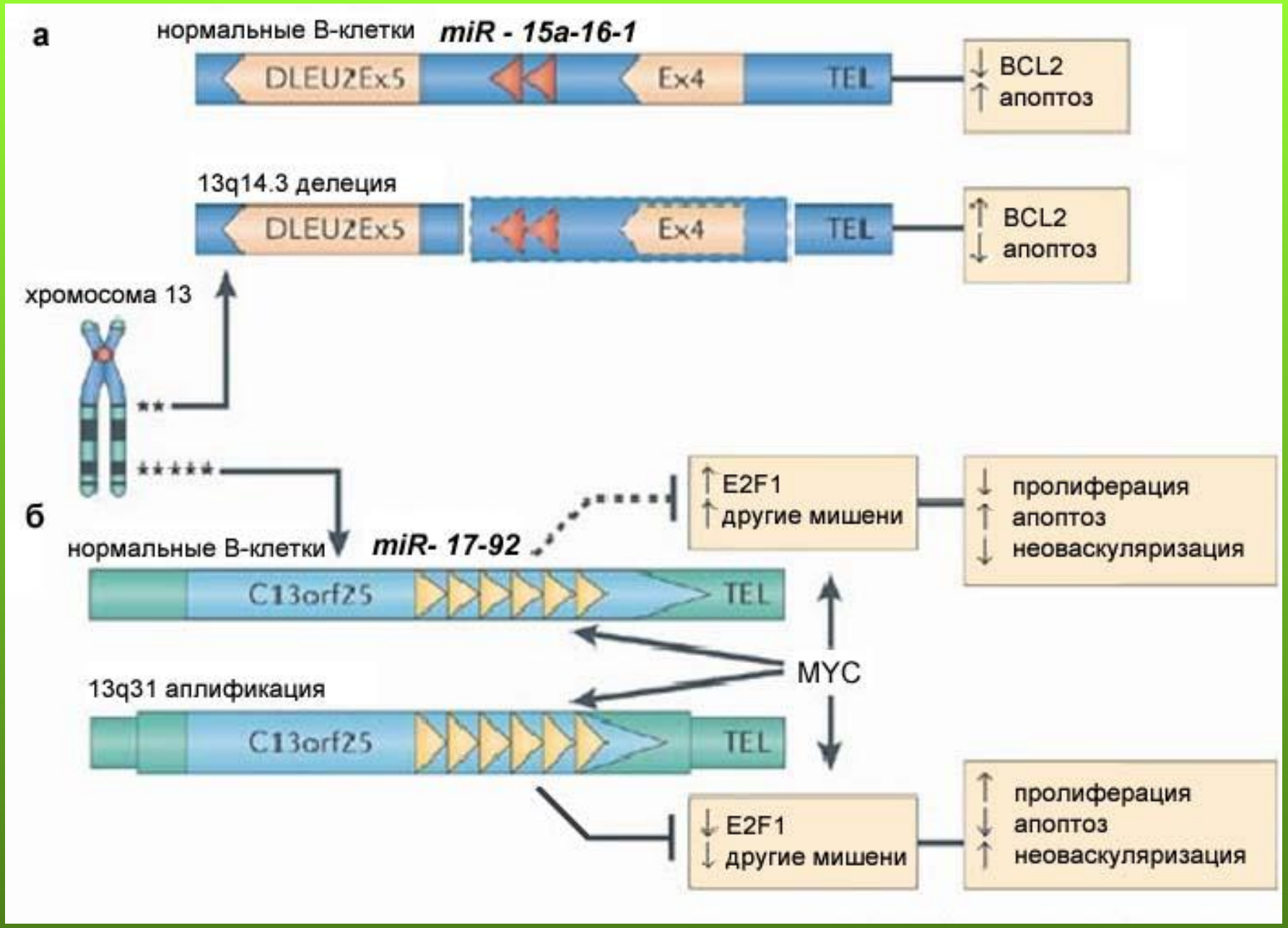
Локализация miРНК в районах делеций, амплификаций и транслокаций при раке

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


а
нормальные В-клетки
miR - 15a-16-1
DLEU2Ex5
Ex4
TEL
↓ BCL2
↑ апоптоз
13q14.3 делеция
DLEU2Ex5
Ex4
TEL
↑ BCL2
↓ апоптоз
хромосома 13
б
нормальные В-клетки
miR- 17-92
C13orf25
TEL
↑ E2F1
↑ другие мишени
↓ пролиферация
↑ апоптоз
↓ неоваскуляризация
MYC
13q31 аплификация
C13orf25
TEL
↓ E2F1
↓ другие мишени
↑ пролиферация
↓ апоптоз
↑ неоваскуляризация

Клеточные онкогены *K-RAS* и *MYC* имеют множественные сайты комплементации с *let-7*, расположенные в 3'- НТР. Гиперэкспресия 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 p53-опосредованного ингибирования CDK в результате прямой инактивации гена-супрессора *LATS2*.**

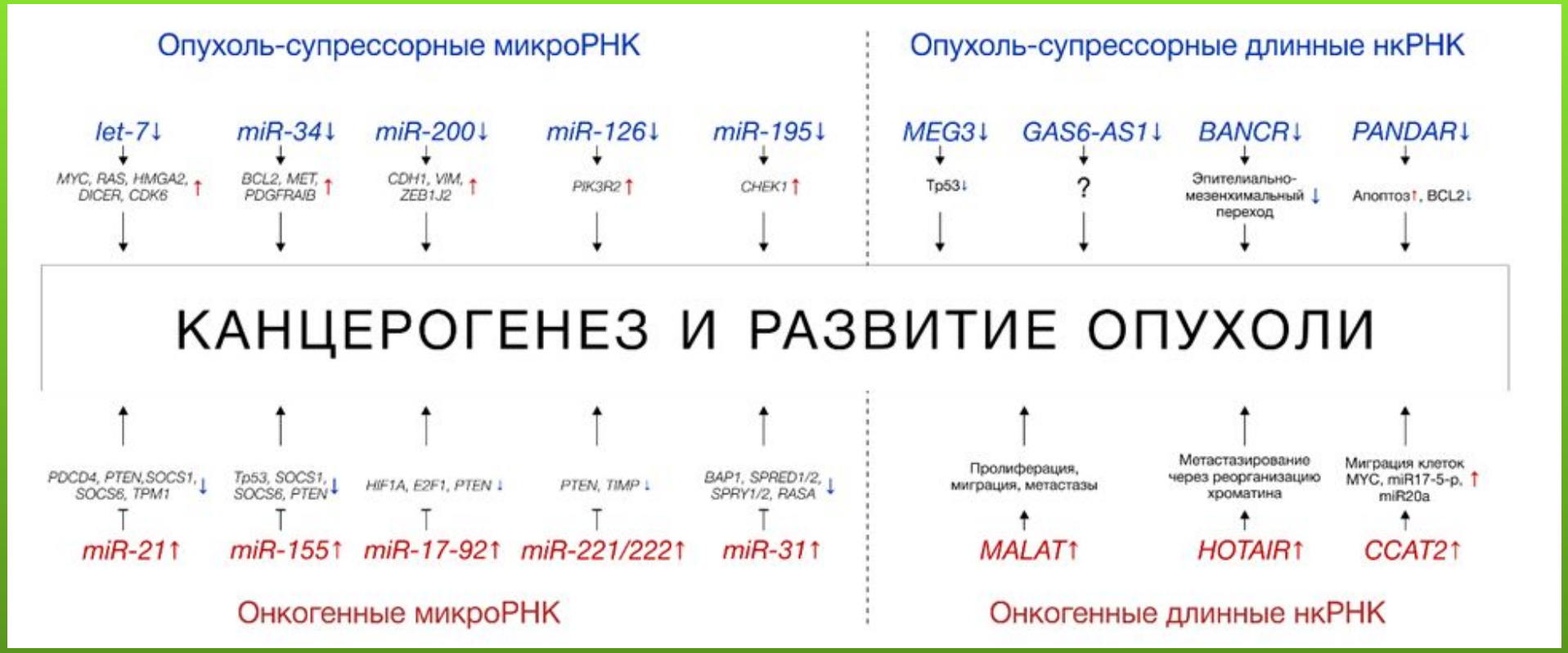
В лимфомах обнаружена гиперэкспрессия *miR-155 (*в 10-60 раз) и гена *BIC*. *miR-155* расположена в консервативном районе этого гена и, возможно, активирует его. Мишенью *miR-155* является ген-супрессор *PU.1*, который необходим для регуляции последних стадий дифференцировки В-клеток. Профиль экспрессии *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↑**

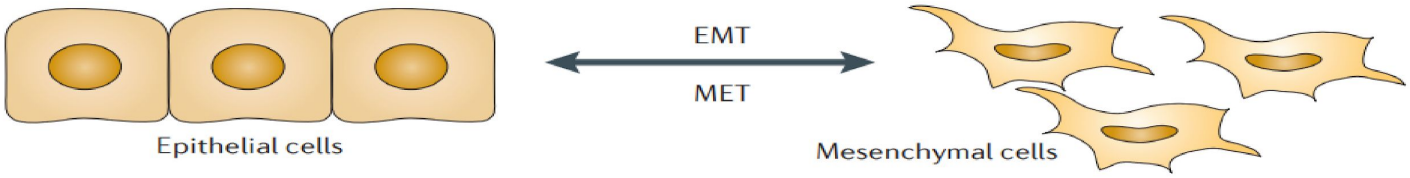
miРНК могут действовать как онкогены и гены-супрессоры. Причем профиль экспрессии miРНК в опухолях более точно отражает стадию и процесс канцерогенеза, чем профиль экспрессии мРНК.
Т.о. профиль экспрессии малых РНК в определенных типах опухолей может быть достаточно эффективным диагностическим маркером.

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ДЕЙСТВИЯ нкРНК ПРИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ ОПУХОЛЯХ

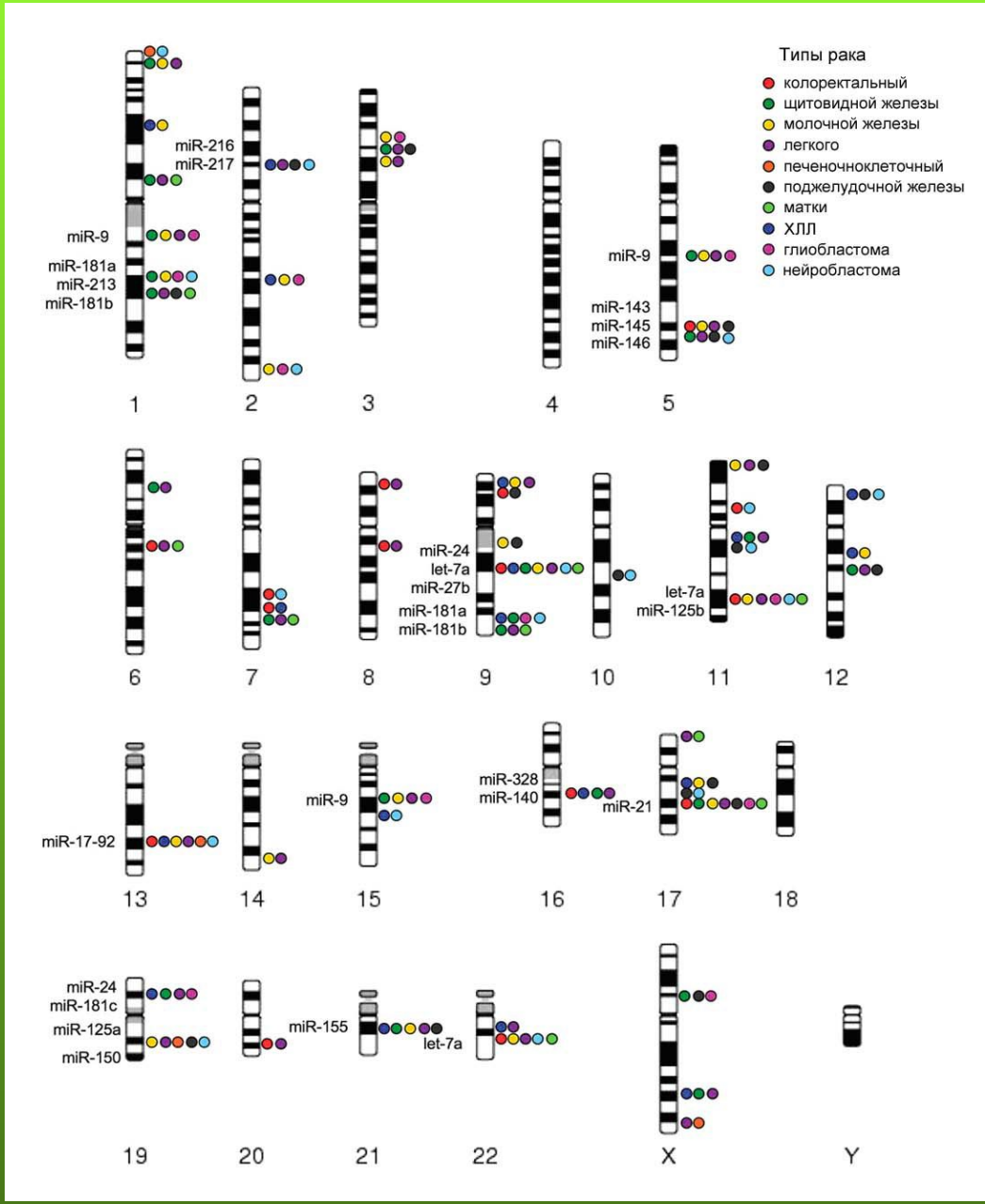


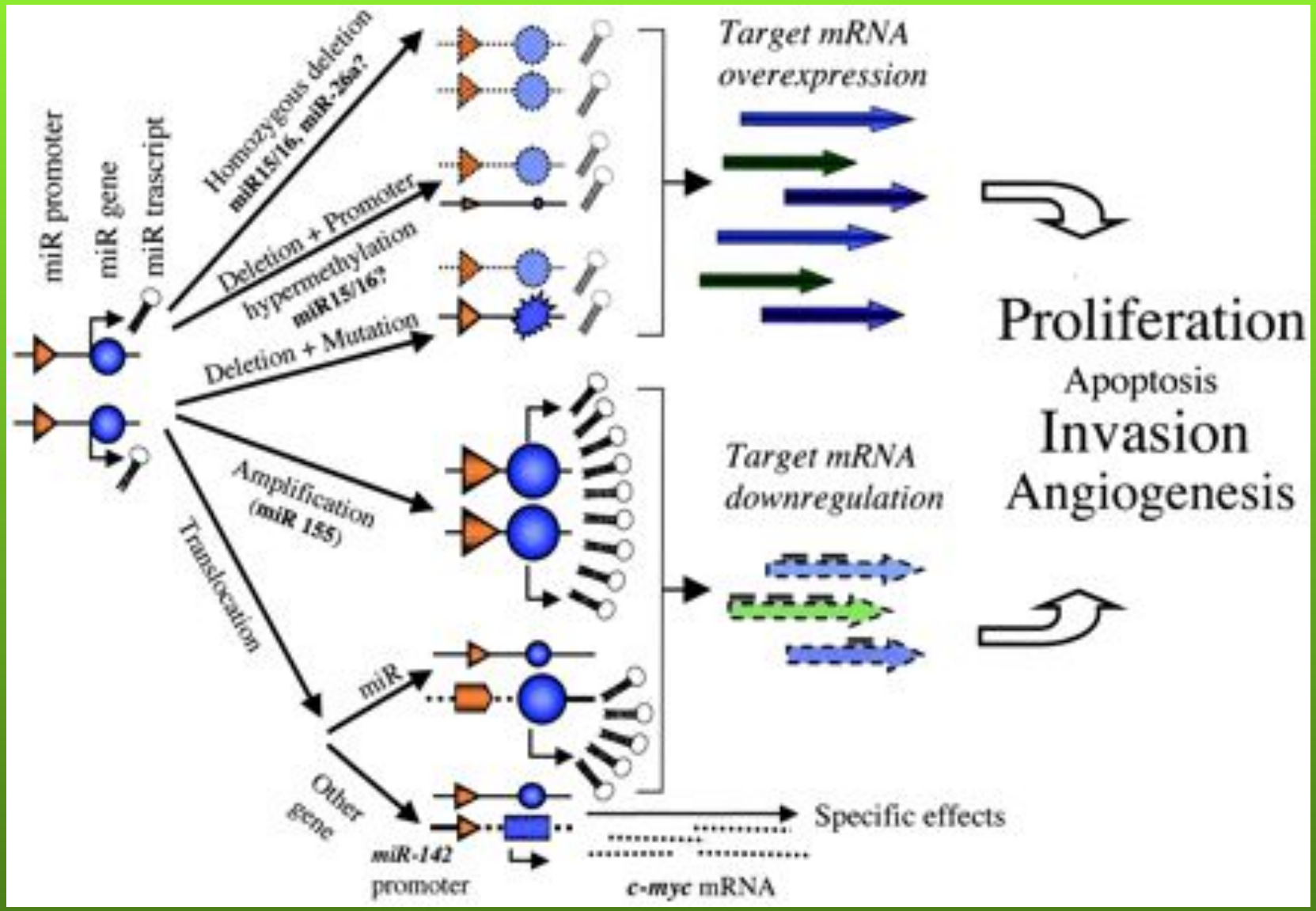
Роль некодирующих РНК в регуляции эпителиально-мезенхимального перехода

miR-128
miR-148a
RP11-789C1.1
miR-26a
EZH2
MMP3
MMP7
XIST
miR-101
ZFAS1
miR-5003-3p
TUG1
AFAP1-AS1
SLUG
SNHG-6
miR-101-3p
E-cadherin
EMT
Linc-ROR
miR-205
ZEB1/2
miR-200a
NEAT1
MALAT
SNAIL1/2
TWIST
C-MET
FRLnc1
Linc00978
TGFb1
miR-34a
HOTAIR
UCA1
miR-204



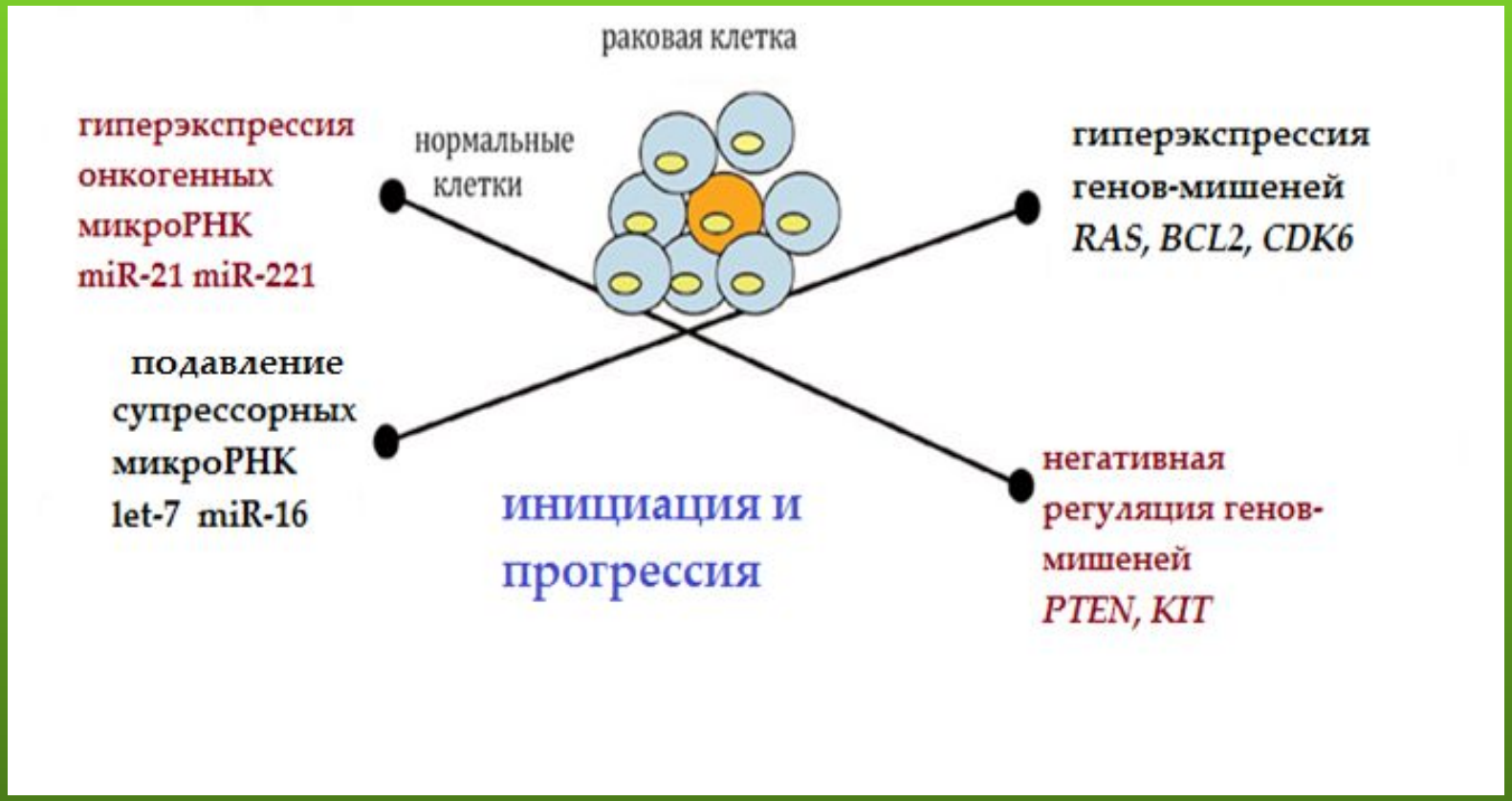
Локализация miРНК, вовлеченных в канцерогенез различных органов и рак

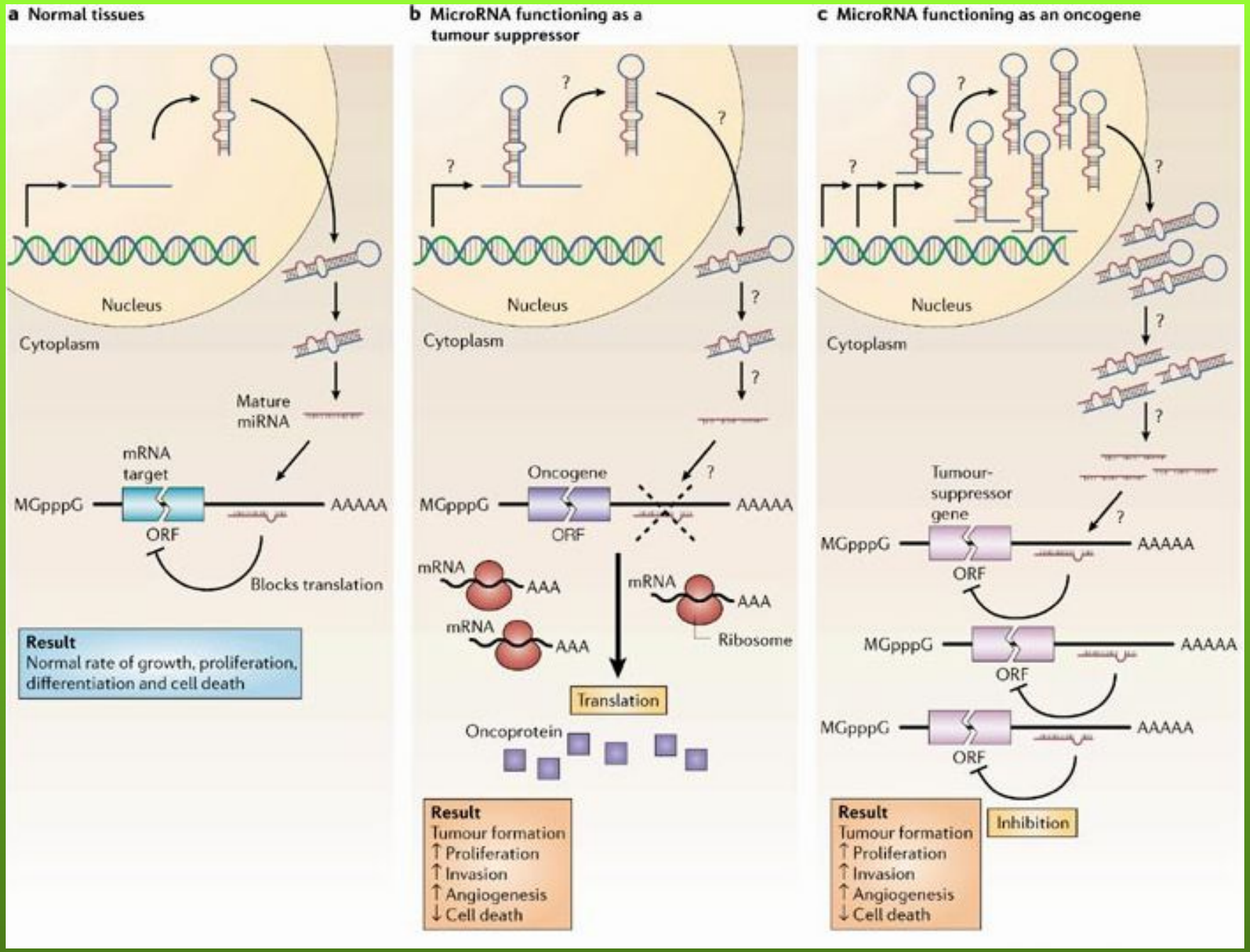



miR promoter
miR gene
miR trascript
Homozygous deletion
miR15/16, miR-26a?
Deletion + Promoter
hypermethylation
miR15/16?
Deletion + Mutation
Amplification
(miR 155)
Translocation
miR
Other
gene
miR-142
promoter
Target mRNA
overexpression
Target mRNA
downregulation
Proliferation
Apoptosis
Invasion
Angiogenesis
Specific effects
c-myc mRNA

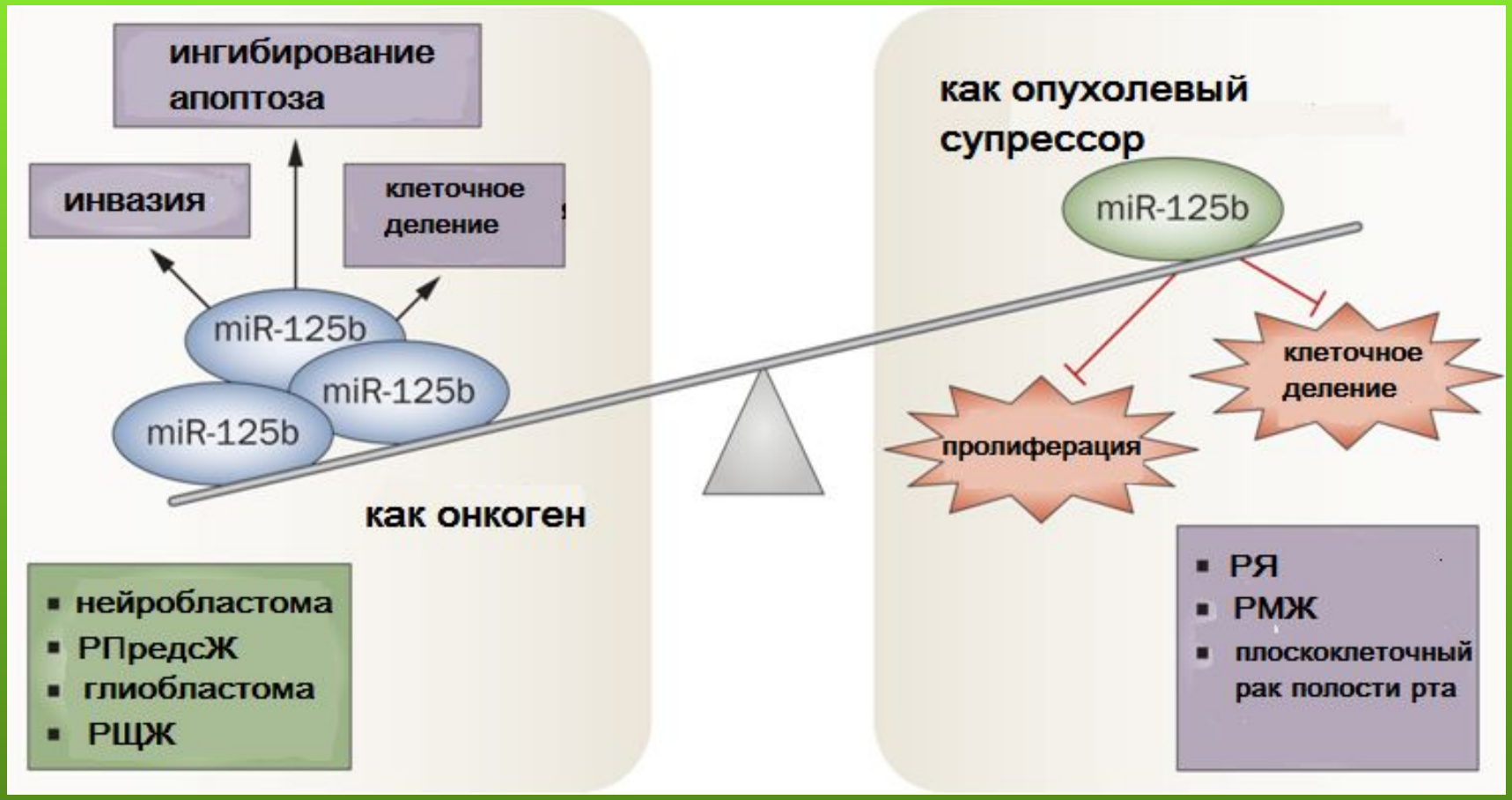
микроРНК и рак

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




a Normal tissues
Nucleus
Cytoplasm
Mature miRNA
mRNA target
MGpppG
AAAAA
ORF
Blocks translation
Result
Normal rate of growth, proliferation, differentiation and cell death
b MicroRNA functioning as a tumour suppressor
Nucleus
Cytoplasm
Oncogene
MGpppG
AAAAA
ORF
mRNA
AAA
mRNA
AAA
mRNA
AAA
Ribosome
Translation
Oncoprotein
Result
Tumour formation
↑ Proliferation
↑ Invasion
↑ Angiogenesis
↓ Cell death
c MicroRNA functioning as an oncogene
Nucleus
Cytoplasm
Tumour-suppressor gene
MGpppG
AAAAA
ORF
MGpppG
AAAAA
ORF
MGpppG
AAAAA
ORF
Inhibition
Result
Tumour formation
↑ Proliferation
↑ Invasion
↑ Angiogenesis
↓ Cell death

Двойственная роль многих микроРНК – онкогенная и супрессорная



микроРНК усиливают устойчивость к препаратам

Репарация ДНК:
miR-15b ⊣ Wip1
miR-210 → HIF-1

Апоптоз:
miR-197 ⊣ BMF, NOXA

Клеточный цикл:
miR-25 ⊣ Cyclin E2, CDK2

Ответ на препарат:
miR-21 (TRAIL)
miR-30c (TRAIL, gefitinib)
miR-100 (TRAIL)
miR-494 (TRAIL)
miR-31 (cisplatin)
miR-30b (gefitinib)
miR-221 (gefitinib)
miR-222 (gefitinib)
miR-214 (gefitinib)

опухолевые клетки

микроРНК усиливают восприимчивость к препаратам

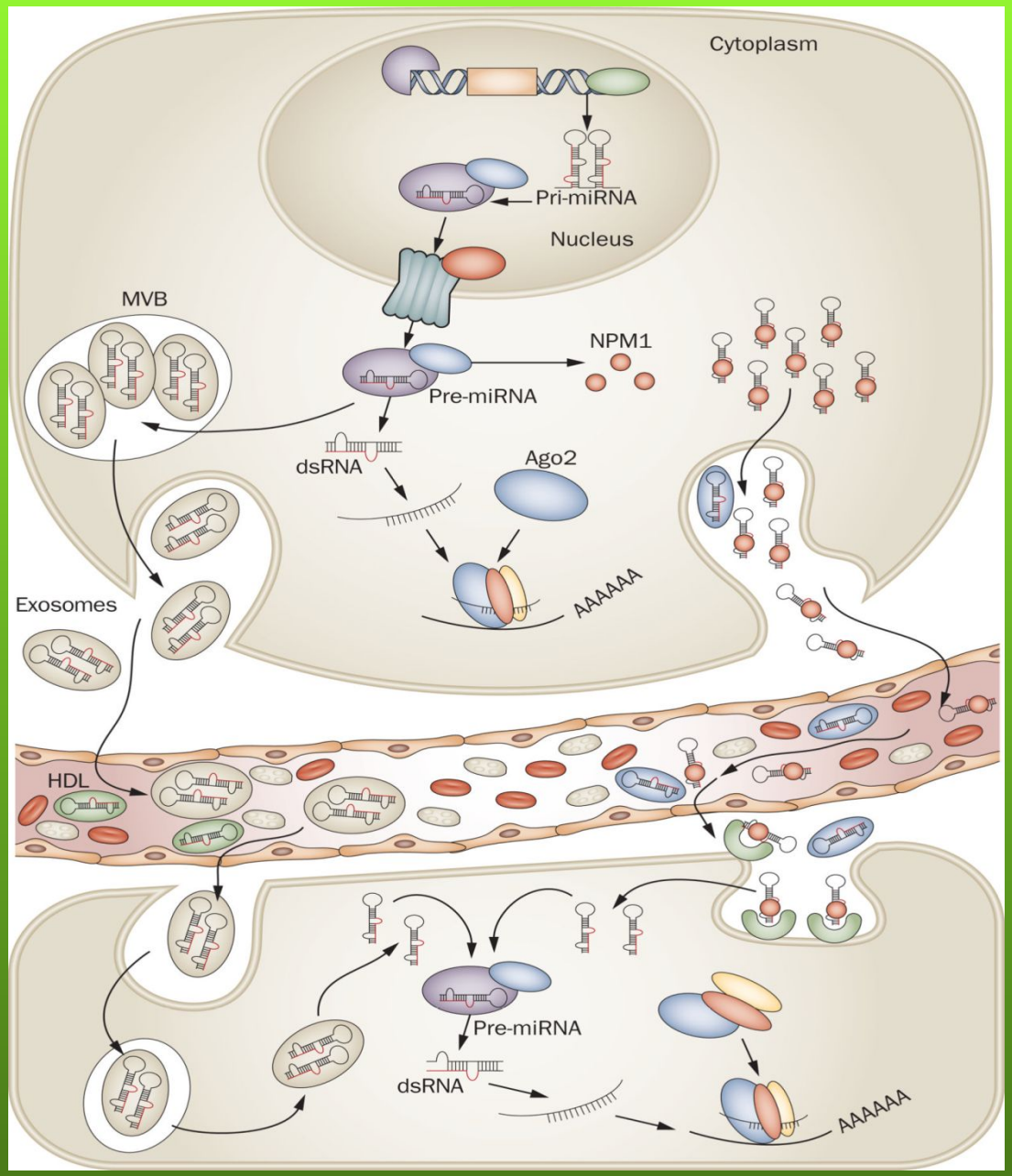
Репарация ДНК:
miR-18a ⊣ ATM
miR-101 ⊣ ATM, DNA-PKc

Апоптоз:
miR-608 ⊣ Bcl-2
miR-7 ⊣ Bcl-2
miR-203 ⊣ PKC-A
miR-143 ⊣ PKC-e
miR-451 ⊣ RAB14
miR-146a ⊣ EGFR

Клеточный цикл:
miR-15a-16-1 ⊣ Cyclin D1, D2, E1
let-7 ⊣ CDC25A, CDK6, Cyclin D2
miR-138 ⊣ Cyclin D3

Ответ на препарат:
miR-34a (TRAIL)
miR-148a (TRAIL)
miR-138a (cisplatin)
miR-451 (cisplatin)
miR-630 (cisplatin)
miR-133b (gefitinib, gemcitabine)
miR-101 (paclitaxel)
miR-100 (docetaxel)
miR-200bc-429 (multidrug)
miR-181b (multidrug)
let-7b ⊣ CYPYJ2 (drug metabolism)

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

Циркулирующие нкРНК как биомаркеры различных видов рака

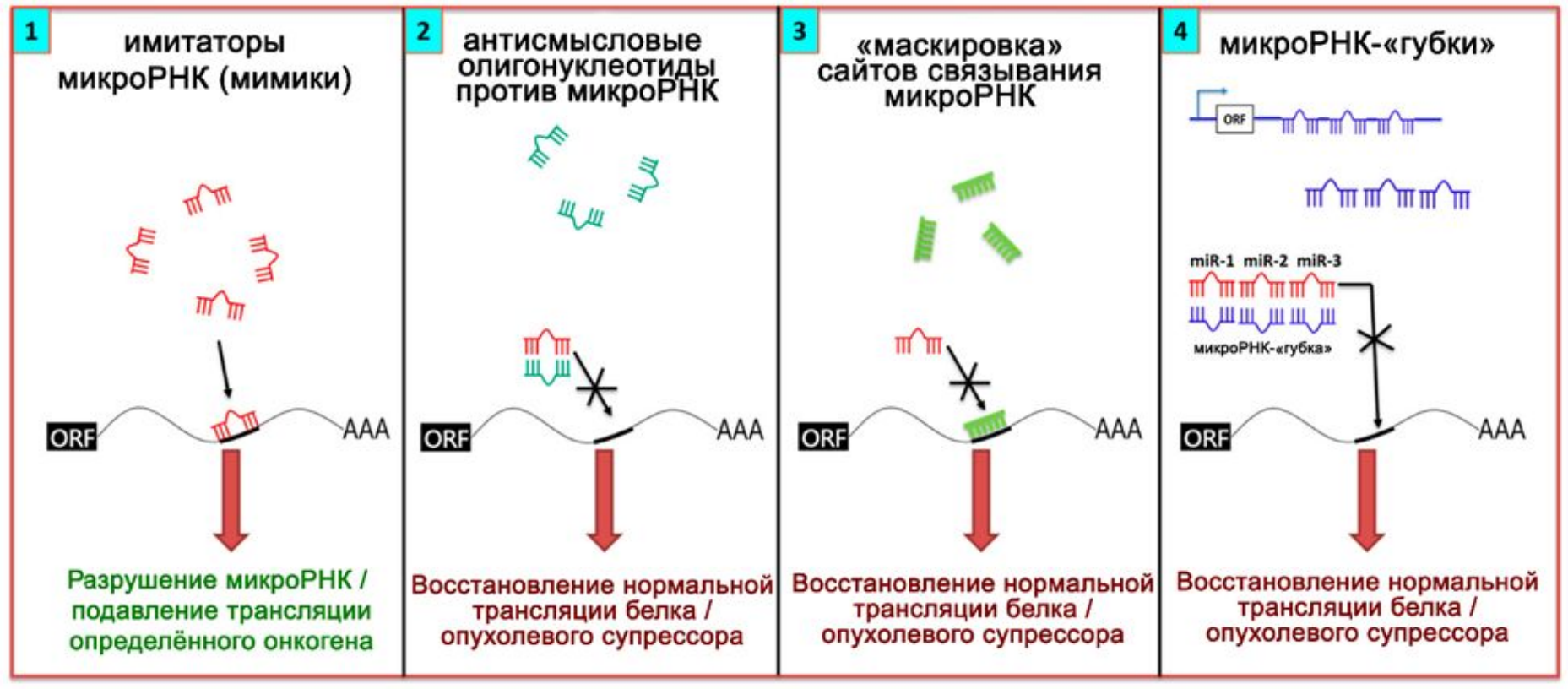
Тип рака	Тип нкРНК	Маркеры	Биологическая жидкость
Плоскоклеточная карцинома полости рта	МикроРНК	miR-184	Плазма
	МикроРНК	miR-125a, miR-200a	Слюна
	Длинная нкРНК	HOTAIR	Слюна
Немелкоклеточный рак лёгкого	МикроРНК	miR-21 miR-25, miR-223	Сыворотка
	Длинная нкРНК	XIST	Сыворотка
	Длинная нкРНК	MALAT1	Цельная кровь
Рак молочной железы	МикроРНК	miR-155, miR-126, miR-199a, miR-335	Сыворотка
	МикроРНК	let-7c, let-7d, miR-589, miR-425	Плазма
Рак желудка	МикроРНК	miR-106a, miR-106b, miR-21, let-7a, miR-17-5p	Плазма
	Длинная нкРНК	LINC00152, H19	Плазма
	Длинная нкРНК	LINC00152, PVT1	Желудочный сок
Рак поджелудочной железы	МикроРНК	miR-210	Плазма
	МикроРНК	miR-21, miR-155	Секрет поджелудочной железы
Рак толстой кишки	МикроРНК	miR-29a, miR-92a	Плазма
	Длинная нкРНК	HOTAIR	Цельная кровь
Рак мочевого пузыря	МикроРНК	miR-155, miR-192, miR-200, miR-205	Моча
	Длинные нкРНК	SncmtRNA, AsncmtRNA	Моча
Рак предстательной железы	МикроРНК	miR-21 miR-200b, miR-375, miR-516a	Сыворотка
	МикроРНК	miR-20a, miR-21, miR-145, miR-221	Плазма
	Длинная нкРНК	MALAT1	Плазма
	Длинные нкРНК	PCA3, MALAT1, XLOC_007697 и др.	Моча

- **Одна микроРНК может регулировать сотни генов-мишеней. Аберрантная экспрессия микроРНК инициирует многие заболевания, в том числе рак.**

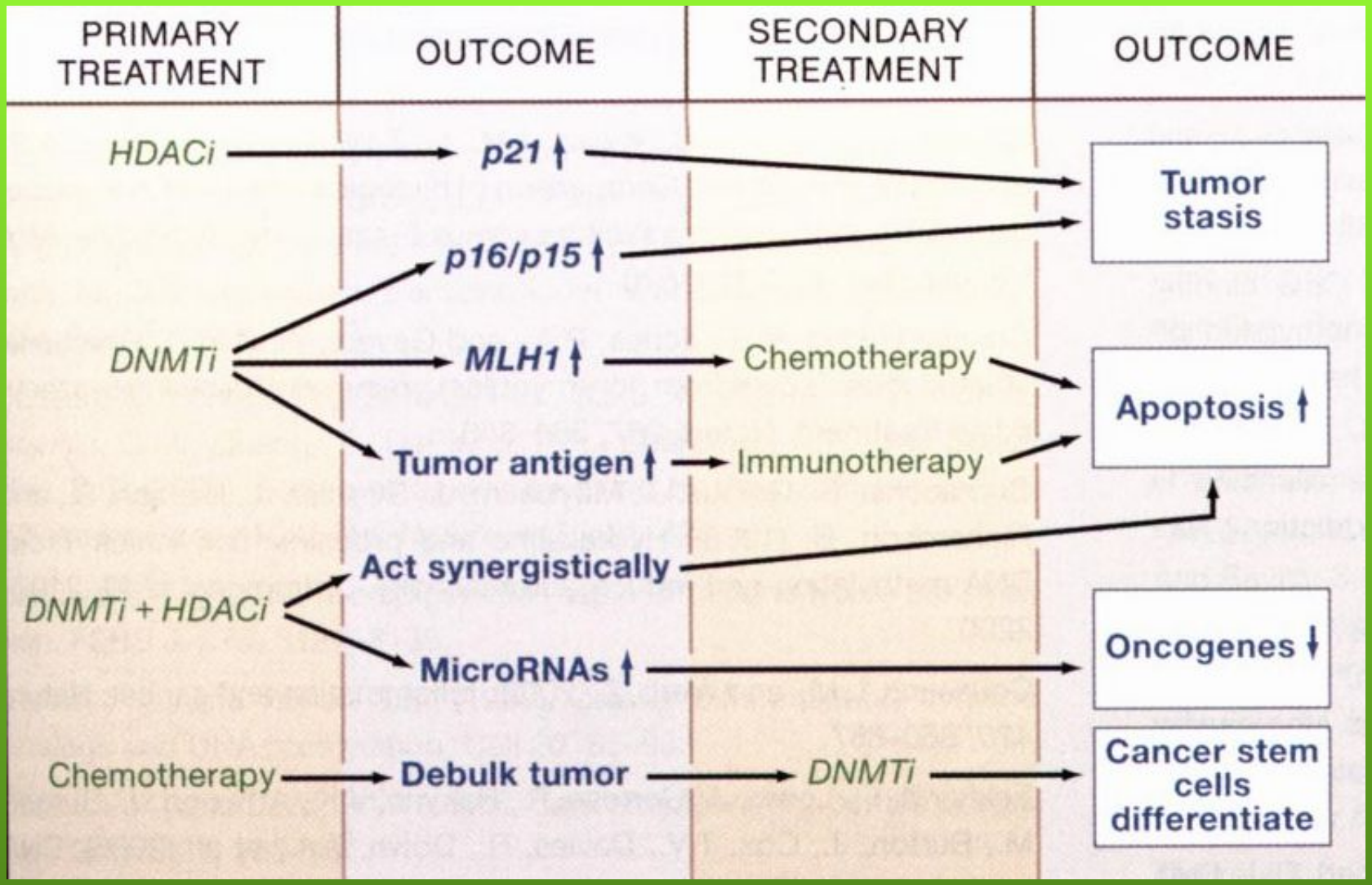
- **МикроРНК образуют уникальный экспрессионный профиль в опухоли и являются потенциальным биомаркёром в диагностике рака, прогнозе, выбора лекарственной терапии.**

- **Обнаружение микроРНК в биологических жидкостях создаёт возможность использования их как неинвазивного биомаркёра рака и предиктора ответа на химиотерапию.**

Возможности терапии с помощью нкРНК



Стратегии эпигенетической терапии



ХИМЕРНЫЕ ГЕНЫ

Типы химерных генов

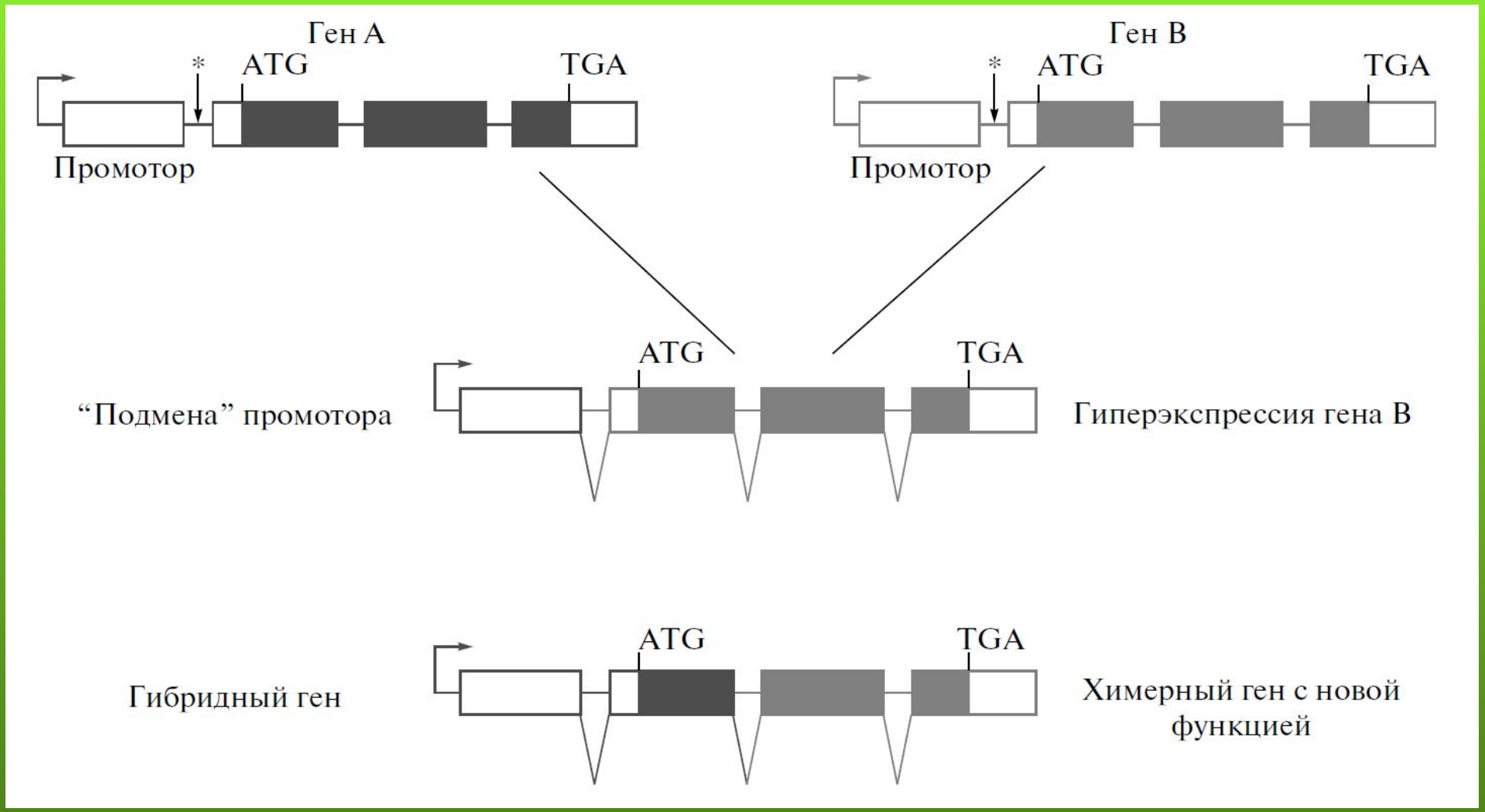
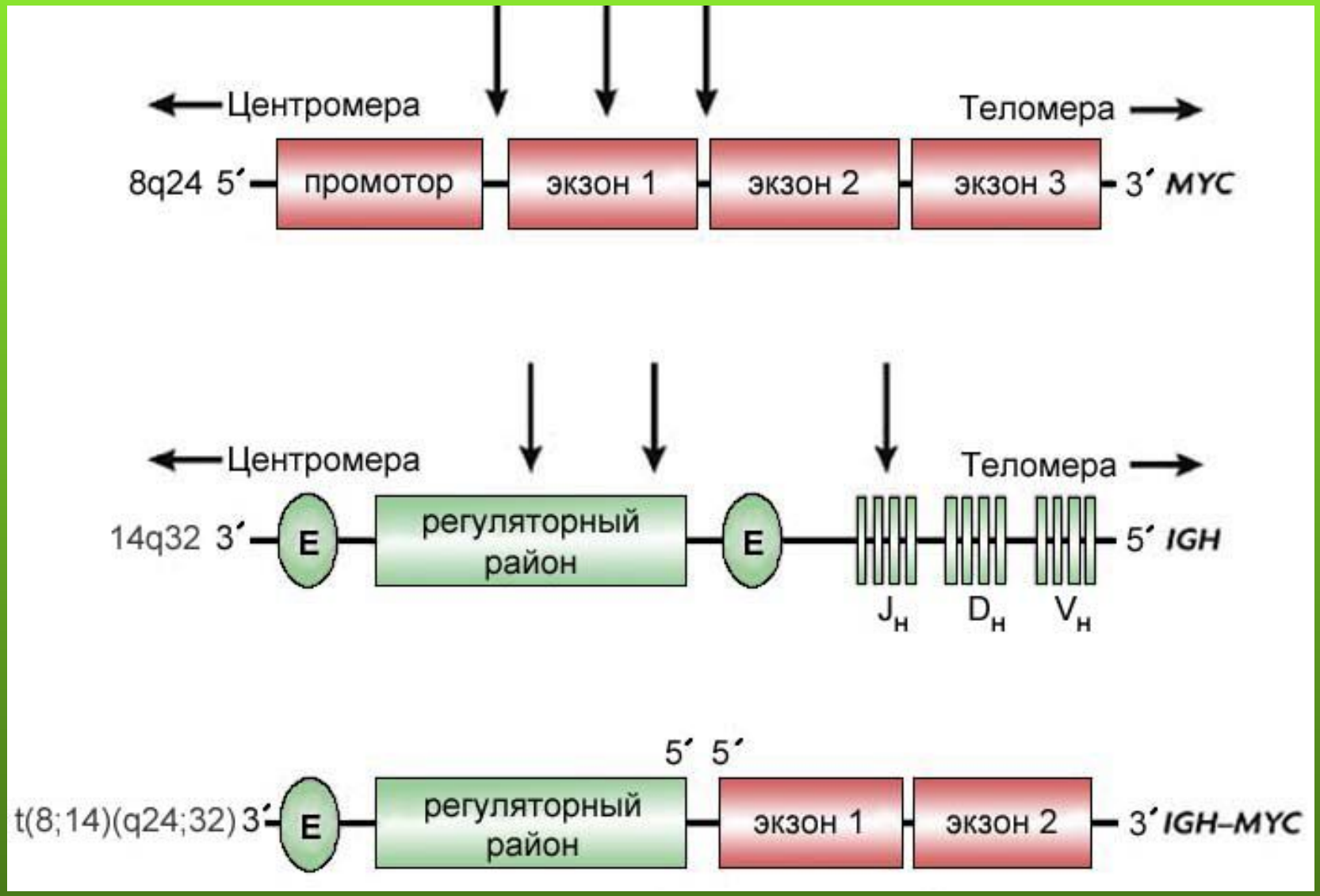
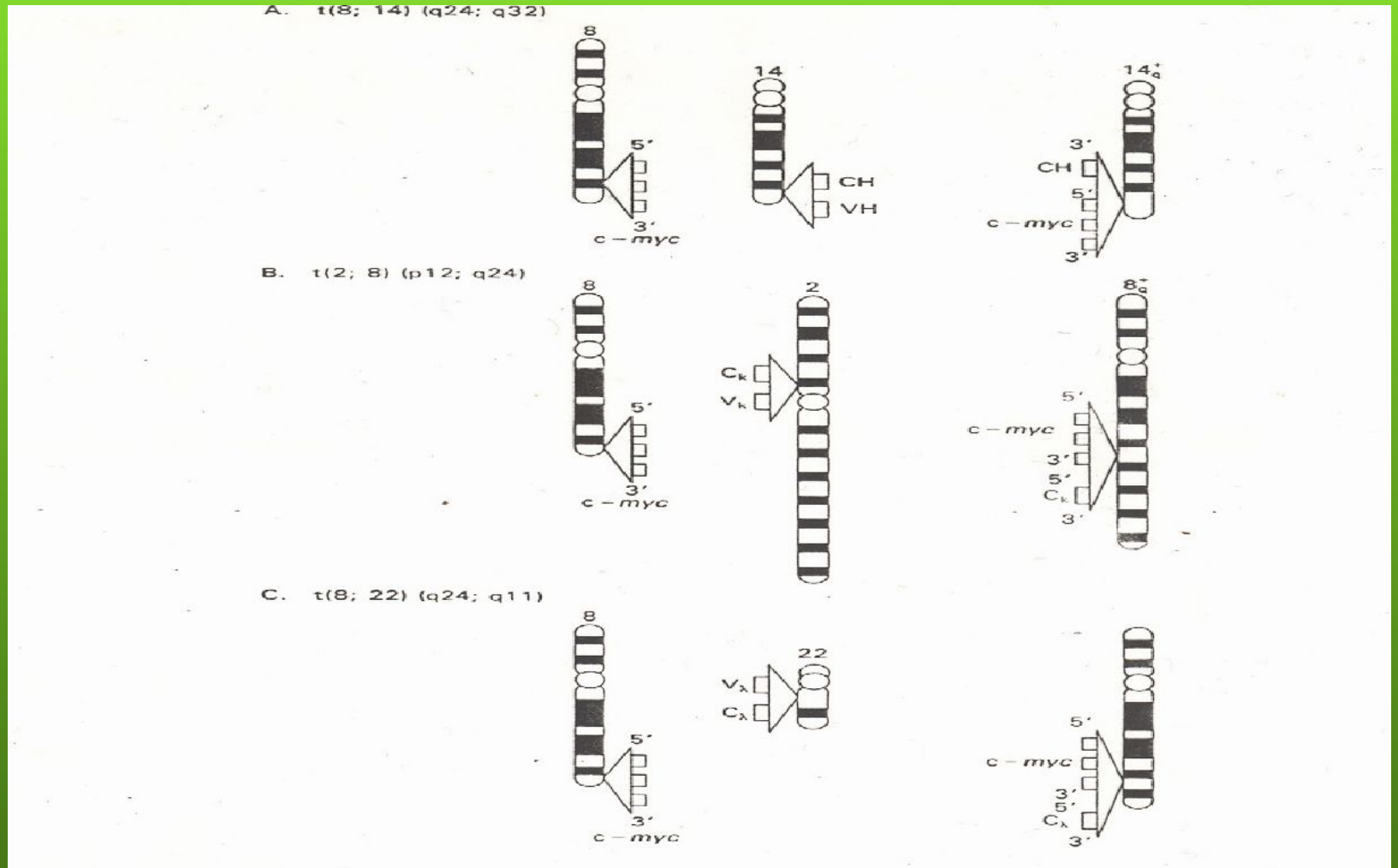


Схема транслокации хромосом 8 и 14, в результате которой возникает гиперэкспрессия протоонкогена *MYC*

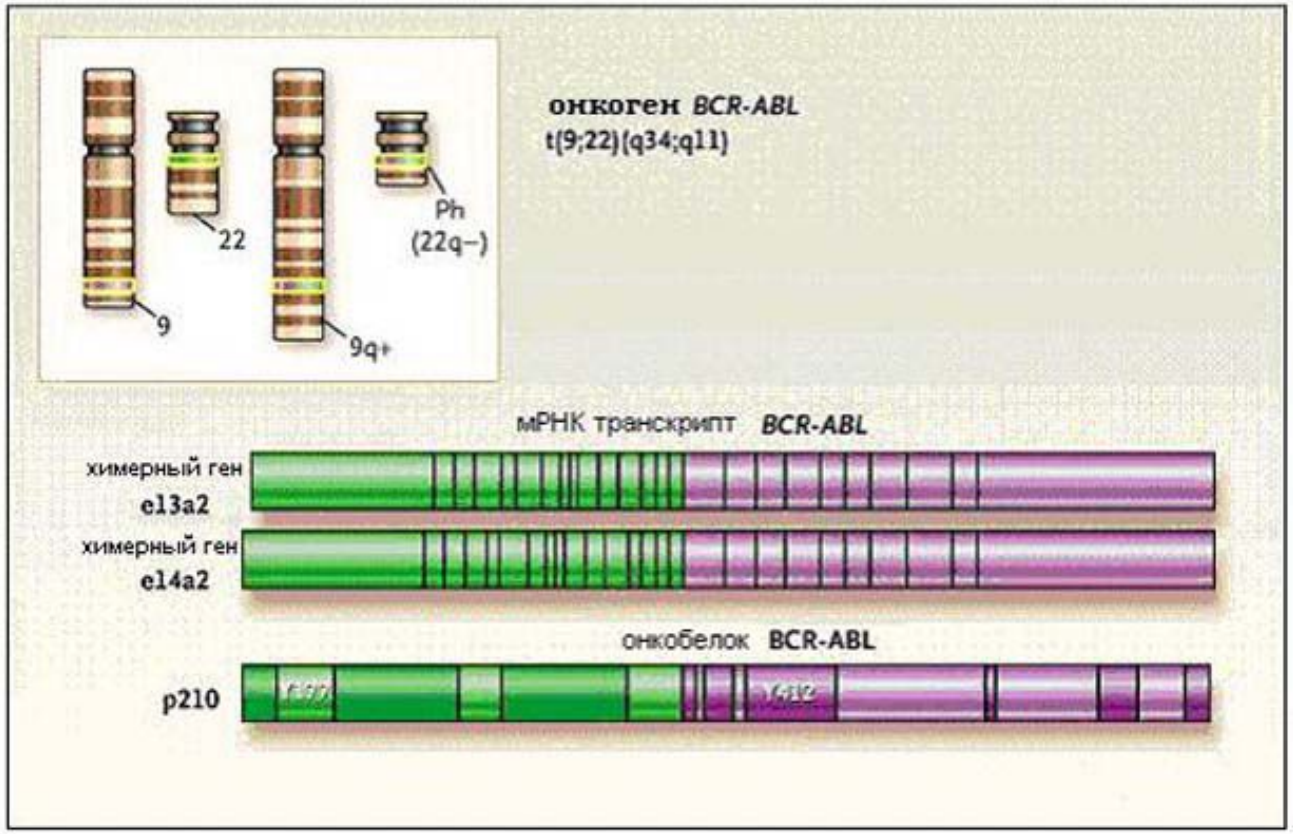


Структурные перестройки при лимфоме Беркита

Протоонкоген с-Мус в результате перестроек оказывается под влиянием сильных промоторов генов иммуноглобулинов

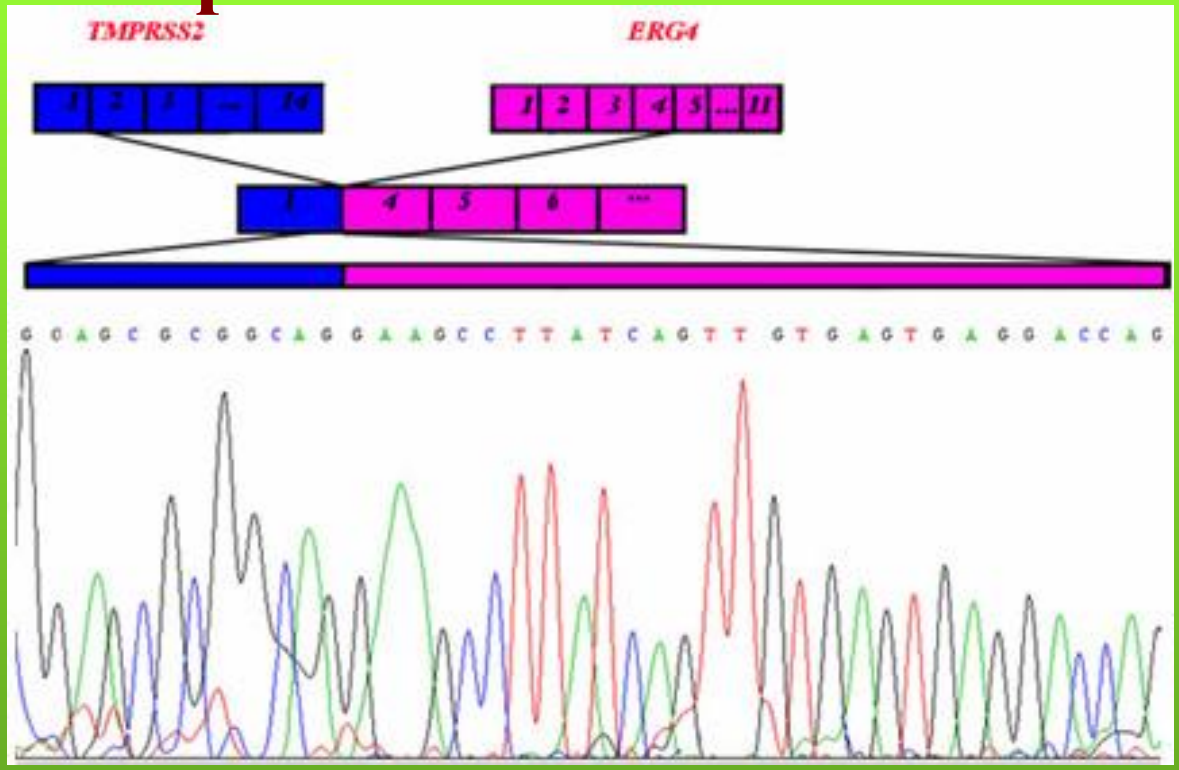


Транслокация хромосом 9 и 22 с образованием филадельфийской хромосомы и химерного онкогена BCR/ABL при хроническом миелоидном лейкозе



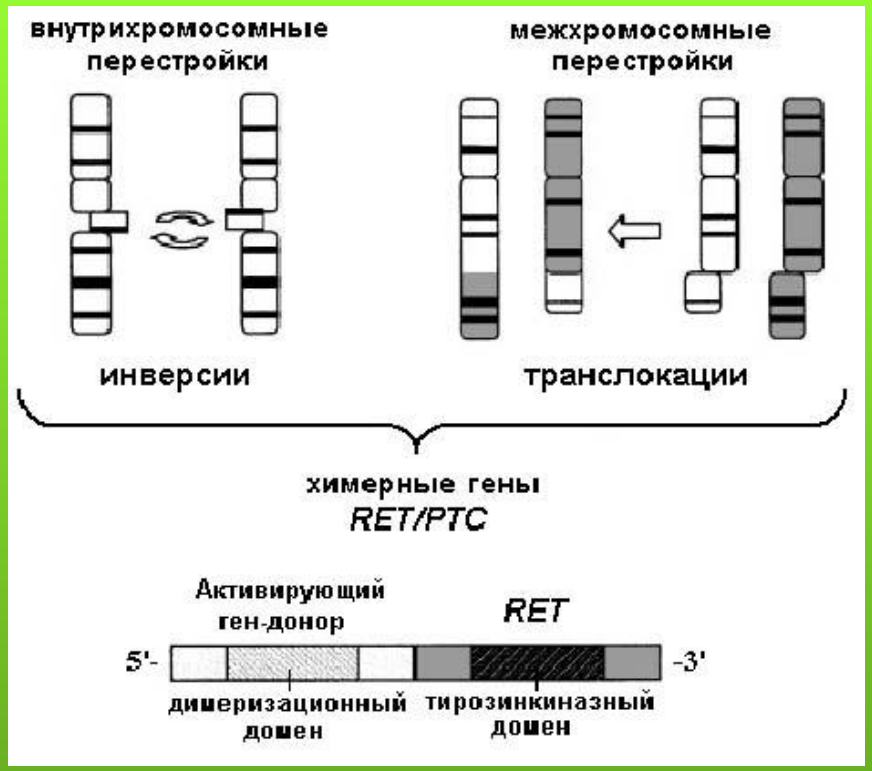
Возможны два варианта точек разрыва при транслокации с образованием двух транскриптов e13a2 и e14a2, которые транслируются в химерный белок p210, содержащий ряд функционально значимых доменов исходных белков. Тирозин 177 (Y177) и 412 (Y412) необходимы для связывания адаптерных белков и автофосфорилирования.

Химерный ген TMPRSS2/ERG



Особенностью канцерогенеза РПЖ является гиперэкспрессия факторов транскрипции семейства ETS вследствие хромосомных перестроек del(21)(q22.2;q22.3), t(7;21)(p21;q22) и t(17;21)(q21;q22). 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.

Опухоль	Хромосомная перестройка	Химерный ген
	inv(10)(q11.2q11.3)	*CCDC6/RET*
Папиллярный рак щитовидной железы	inv(10)(q11.2q21)	*NCOA4/RET*
	t(10;17)(q11;q23)	*PRKAR1A/RET*
	inv (1)(q21q23)	*TPM3/NTRK1*
Фолликулярный рак щитовидной железы	t(2;3)(q13;p25)	*PAX8/PPARG1*
	t(3;7)(p25;q34)	*CREB3L2/PPARG1*
	t(3;8)(p21;q12)	*CTNNB1/PLAG1*
Рак предстательной железы	del(21)(q22.2q22.3)	*TMPRSS2/ERG*
	t(17;21)(q21;q22)	*TMPRSS2/ETV4*
Аденокарцинома легкого	inv(2)(p21p23)	*EML4/ALK*
Саркома Юинга/PNET	t(11;22)(q24;q12)	*FLI1/EWSR1*
	t(21;22)(q22;q12)	*ERG/EWSR1*
Миксоидная липосаркома	t(12;16)(q13;p11)	*FUS/CHOP*
	t(12;22)(q13;q12)	*EWS/CHOP*
		SYT/SSX1
Синовиальная саркома	t(X;18)(p11;q11)	*SYT/SSX2*
		SYT/SSX4
Альвеолярная рабдомиосаркома	t(2;13)(q35;q14)	*PAX3/FKHR*
	t(1;13)(p36;q14)	*PAX7/FKHR*
Альвеолярная саркома мягких тканей	t(X;17)(p11;q25)	*ASPL/TFE3*
Светлоклеточная саркома	t(12;22)(q13;q12)	*EWSR1/ATF1*
Ангиоматоидная фиброзная гистиоцитома	t(12;16)(q22;q13)	*FUS/ATF1*
Врожденная фибросаркома	t(12;15)(p13;q25)	*ETV/NTRK3*



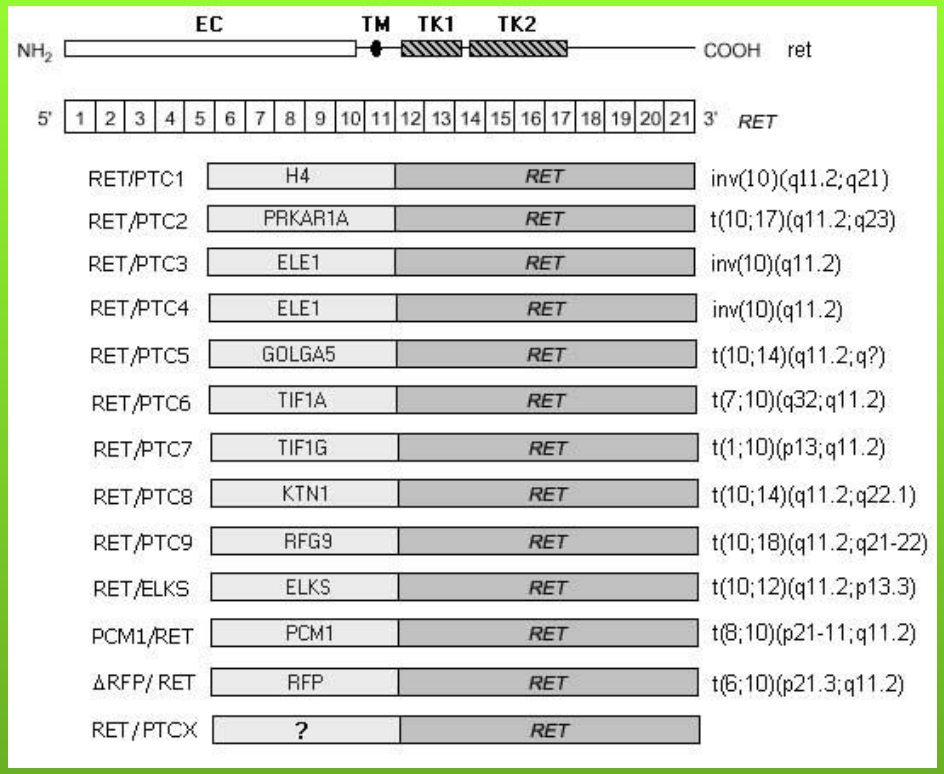
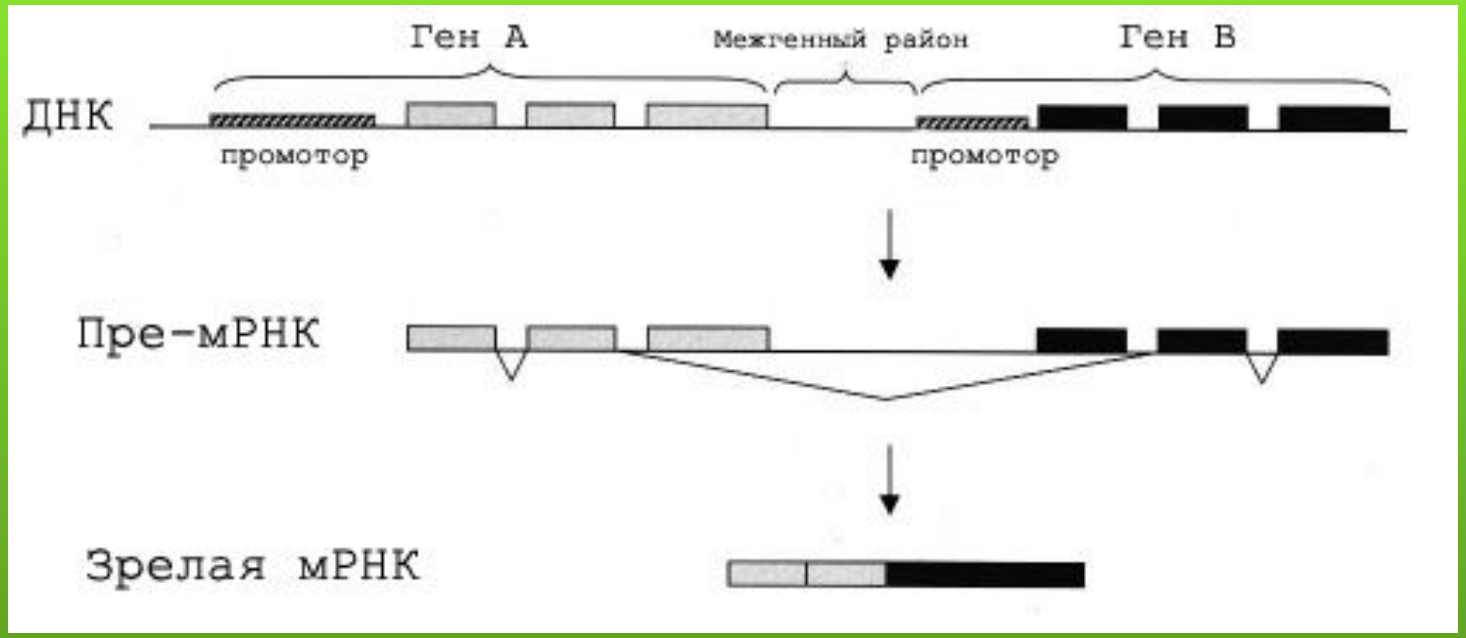


Схема образования химерных онкогенов *RET/PTC* в результате инверсий и транслокаций хромосомы 10.

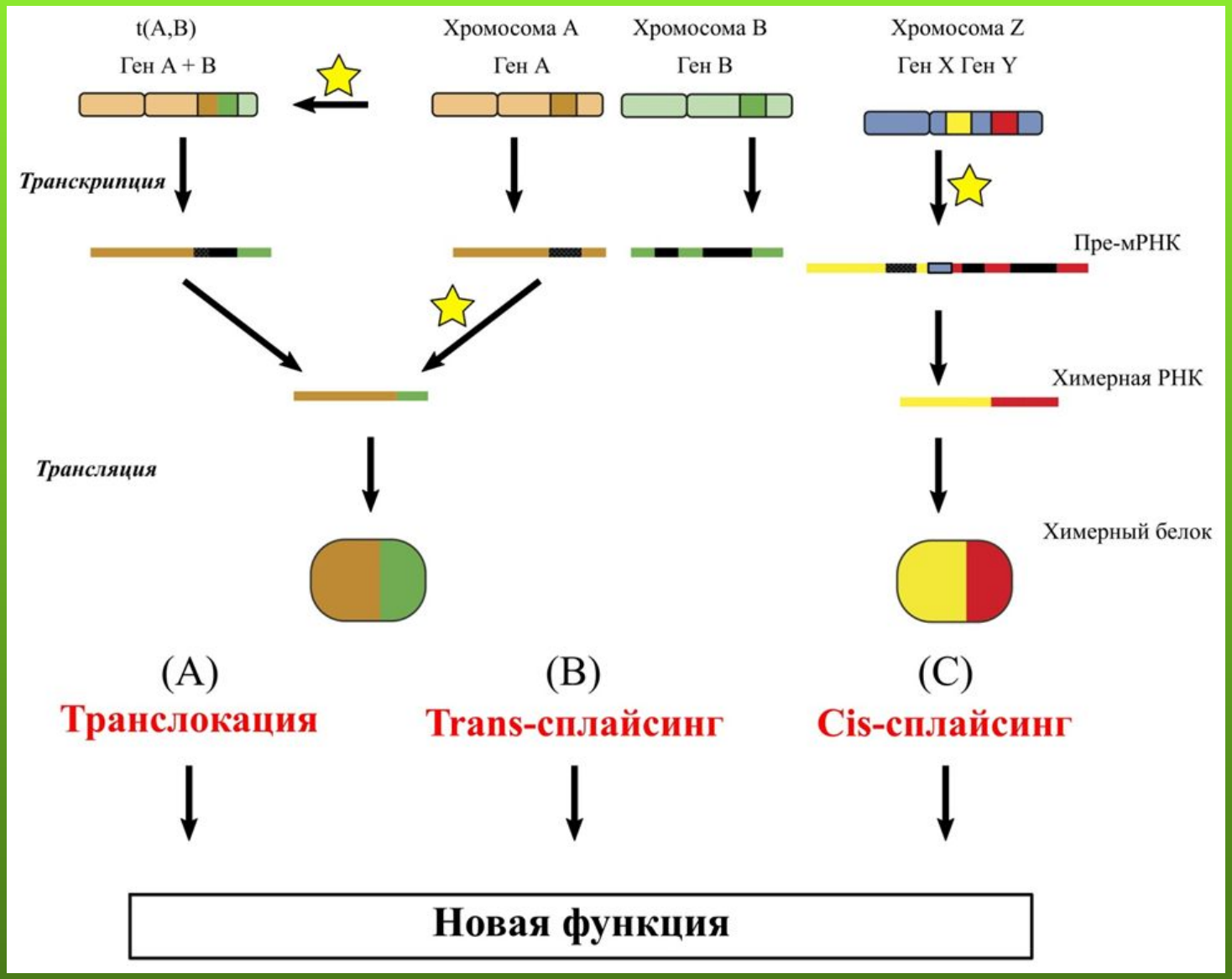
Схематическая структура протоонкогена *RET*, белкового продукта RET и известных на сегодняшний день химерных онкогенов *RET/PTC*. В верхней части рисунка указано относительное расположение доменов нормального рецептора RET (EC-внеклеточный, TM-трансмембранный, TK1 и TK2 – тирозинкиназные внутриклеточные 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.

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

Межгенный сплайсинг, обусловленный транскрипцией



От 2 до 5% всех генов может быть вовлечено в процесс межгенного сплайсинга.

Описано явление транс-сплайсинга на примере химерного транскрипта JAZF1/JJAZ1 в образцах нормальной ткани эндометрия. Описанные химерные РНК и белок идентичные тем, что образуются в результате транслокации. Результаты блот-гибридизации по Саузерну и FISH-анализа свидетельствуют об отсутствии в образцах соответствующей транслокации t(7;17)(p15;q21), которая и приводит к появлению химерного онкогена JAZF1/JJAZ1 при стромальной саркоме эндометрия. Можно предположить, что химера играет индуцирующую роль ростового фактора в нормальном развитии, а возникающая при патологии соответствующая транслокация вызывает необратимое изменение, приводящее к злокачественной трансформации.

ТІС более широко распространен в геноме человека, чем предполагалось ранее и формирует дополнительный уровень белковой вариабельности.

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 (11)

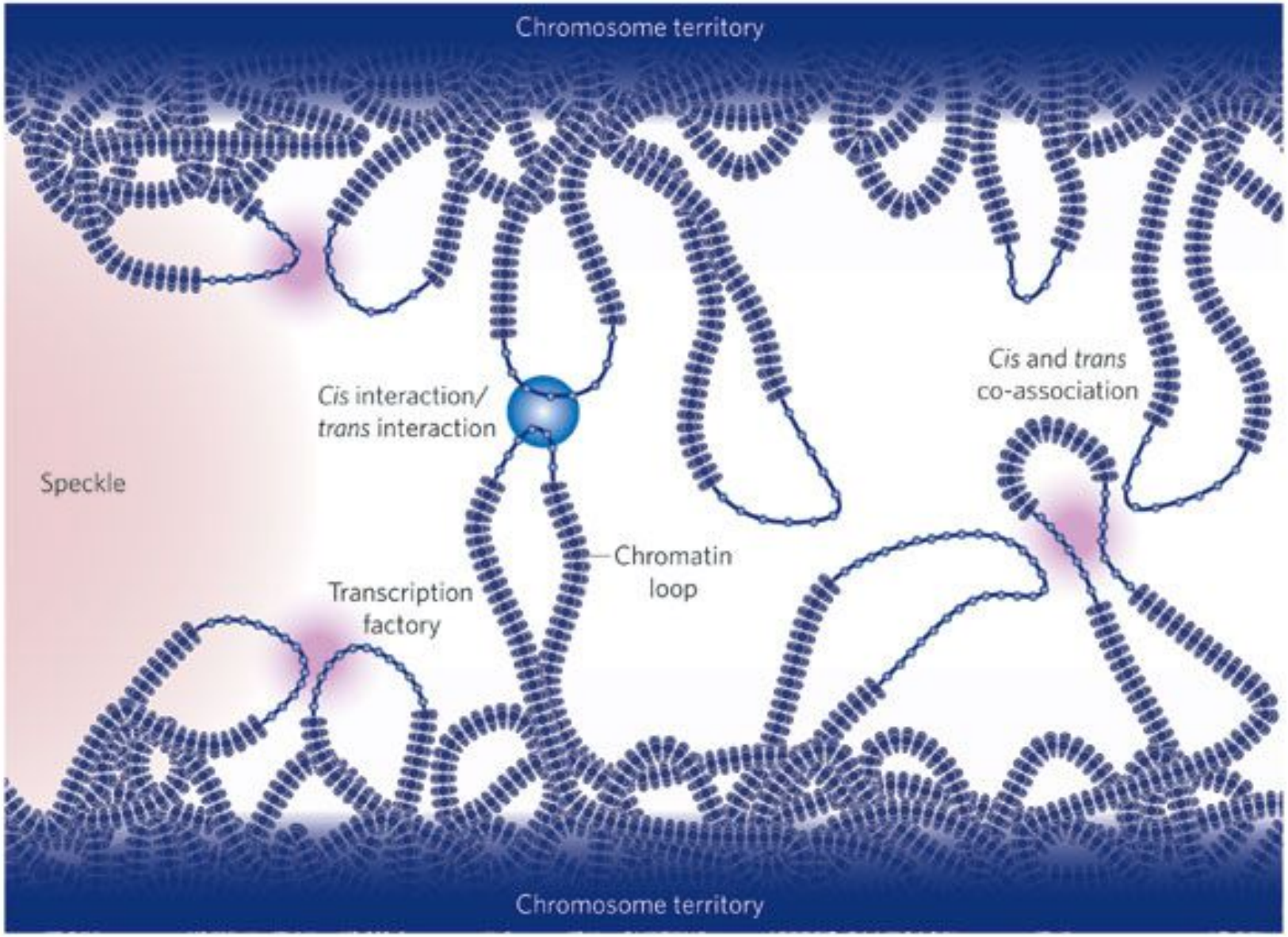
В результате TIC:
TMEM79-SMG5, SLC45A3-ELK4 (2)

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 ювенильной карциноме почки

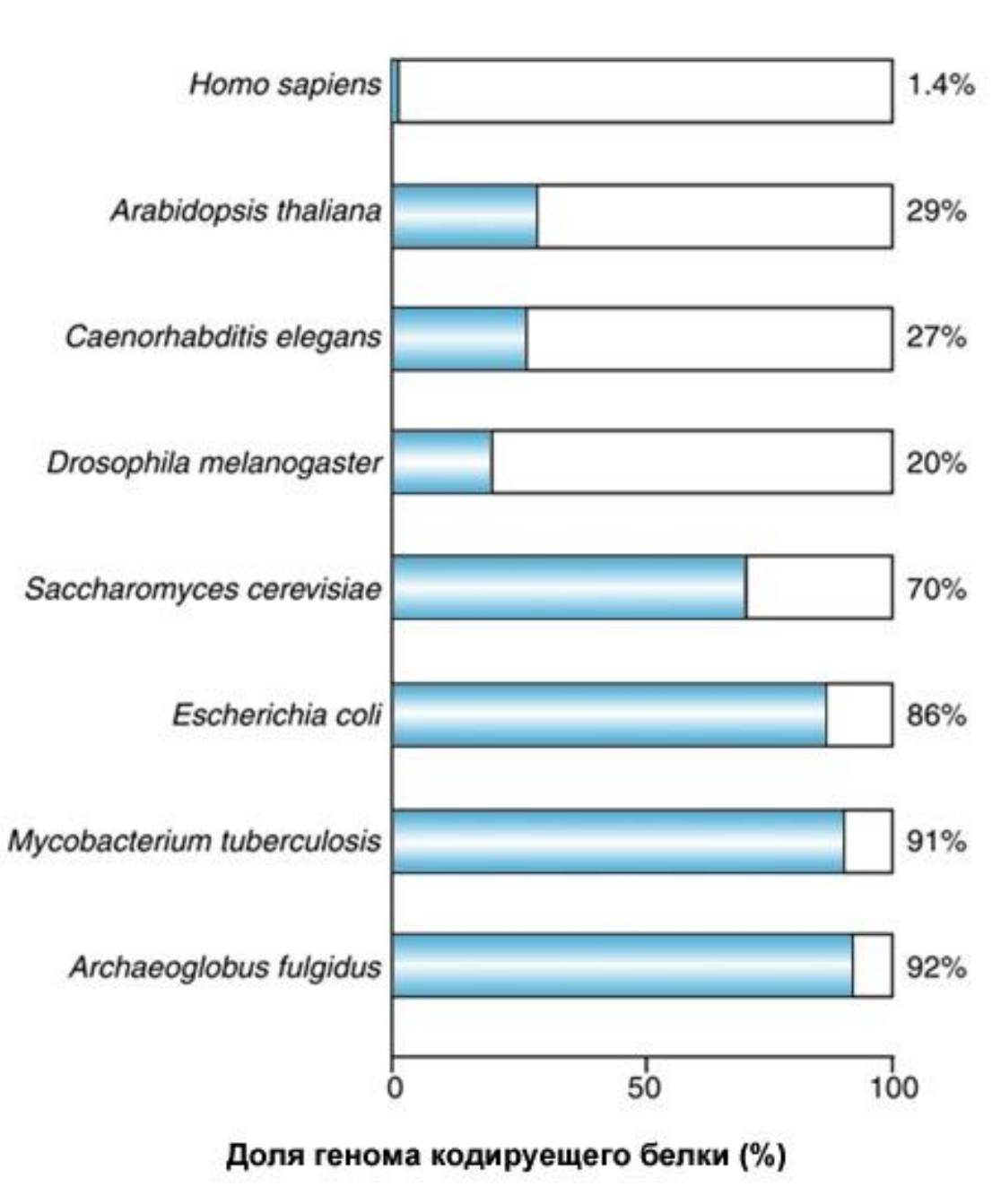
В результате структурных перестроек:
MALAT1-TFEB, ASPSCR1-TFE3, PRCC-TFE3, CLTC-TFE3, NONO-TFE3, SFPQ-TFE3 (6)

В результате TIC:
BC039389-GATM, KLK4-KRSP1 (и еще 25 не охарактеризованных)



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

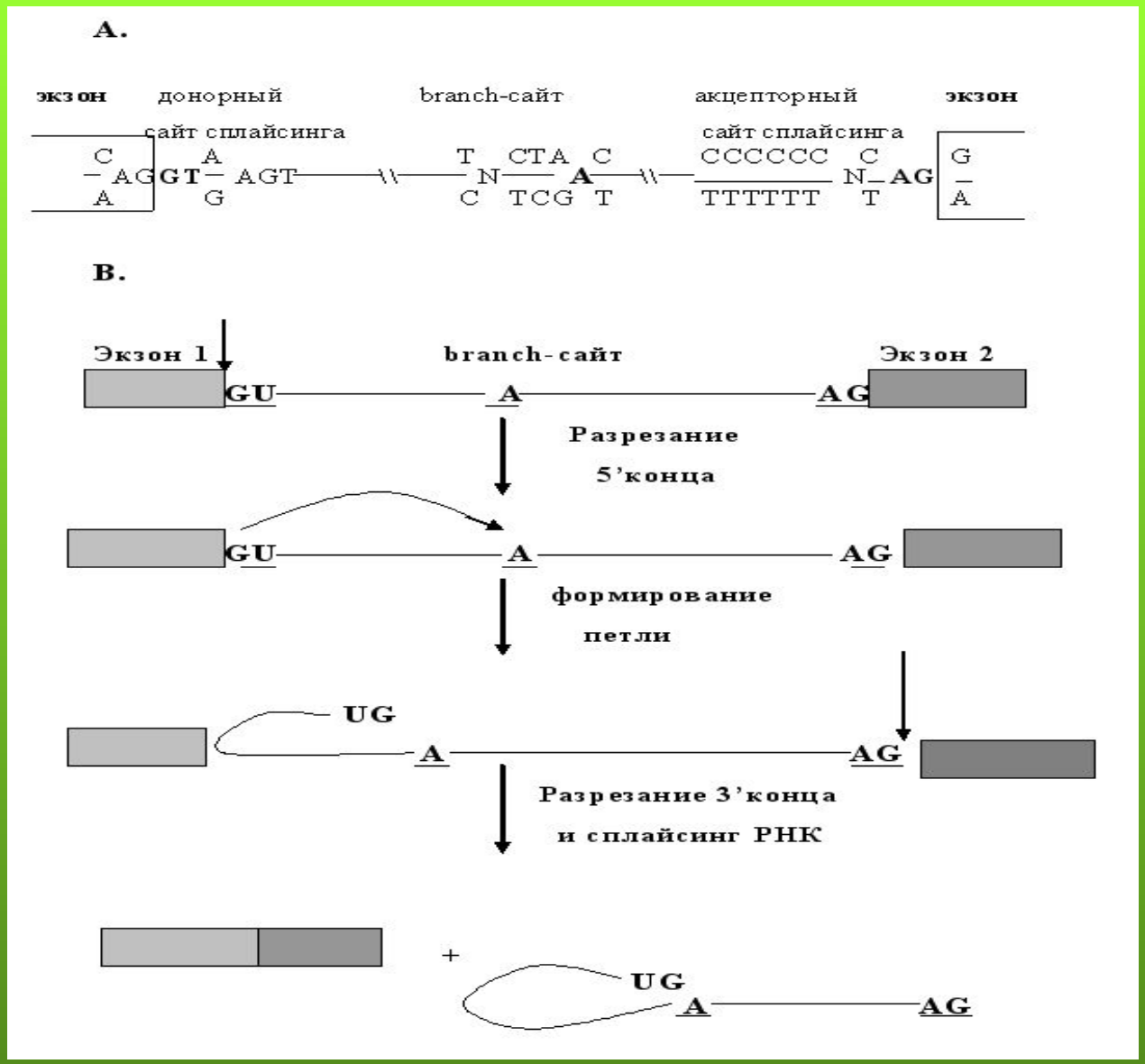

Homo sapiens
1.4%
Arabidopsis thaliana
29%
Caenorhabditis elegans
27%
Drosophila melanogaster
20%
Saccharomyces cerevisiae
70%
Escherichia coli
86%
Mycobacterium tuberculosis
91%
Archaeoglobus fulgidus
92%
0
50
100
Доля генома кодируещего белки (%)

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.

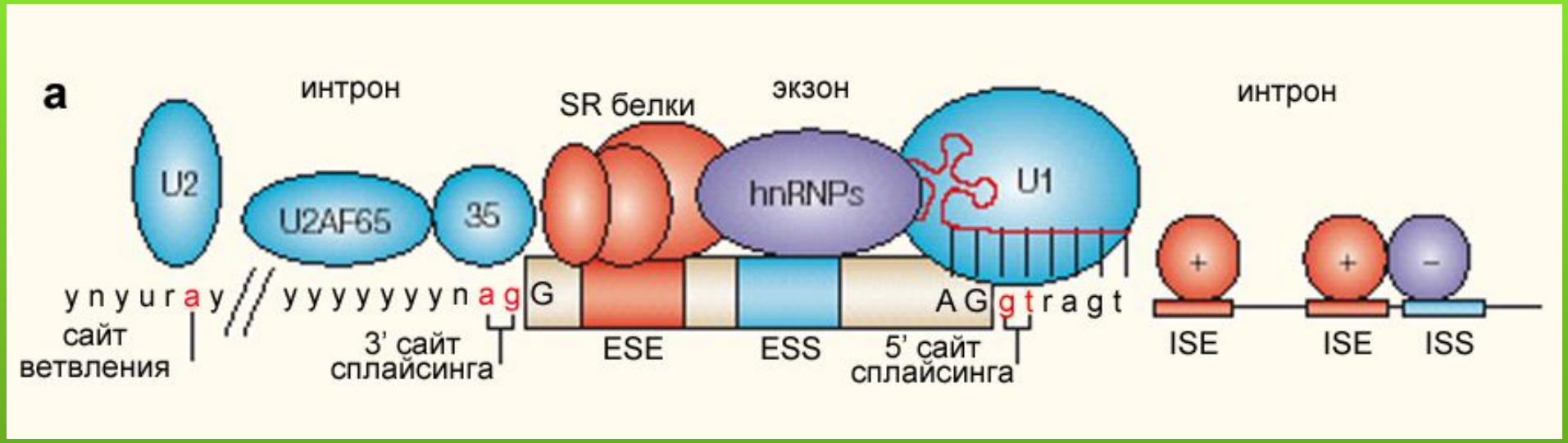
Анализ по реконструкции мРНК 22 хромосомы человека показал, что около 60% генов имеют два и более транскриптов. Выявлено около 10000 активных промоторов, значительная часть которых соответствует транскриптам с неизвестной функцией.



А. – консенсусные последовательности донорного сайта сплайсинга, акцепторного сайта сплайсинга и branch-сайта в интронах эукариот.
В. – 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 170 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.

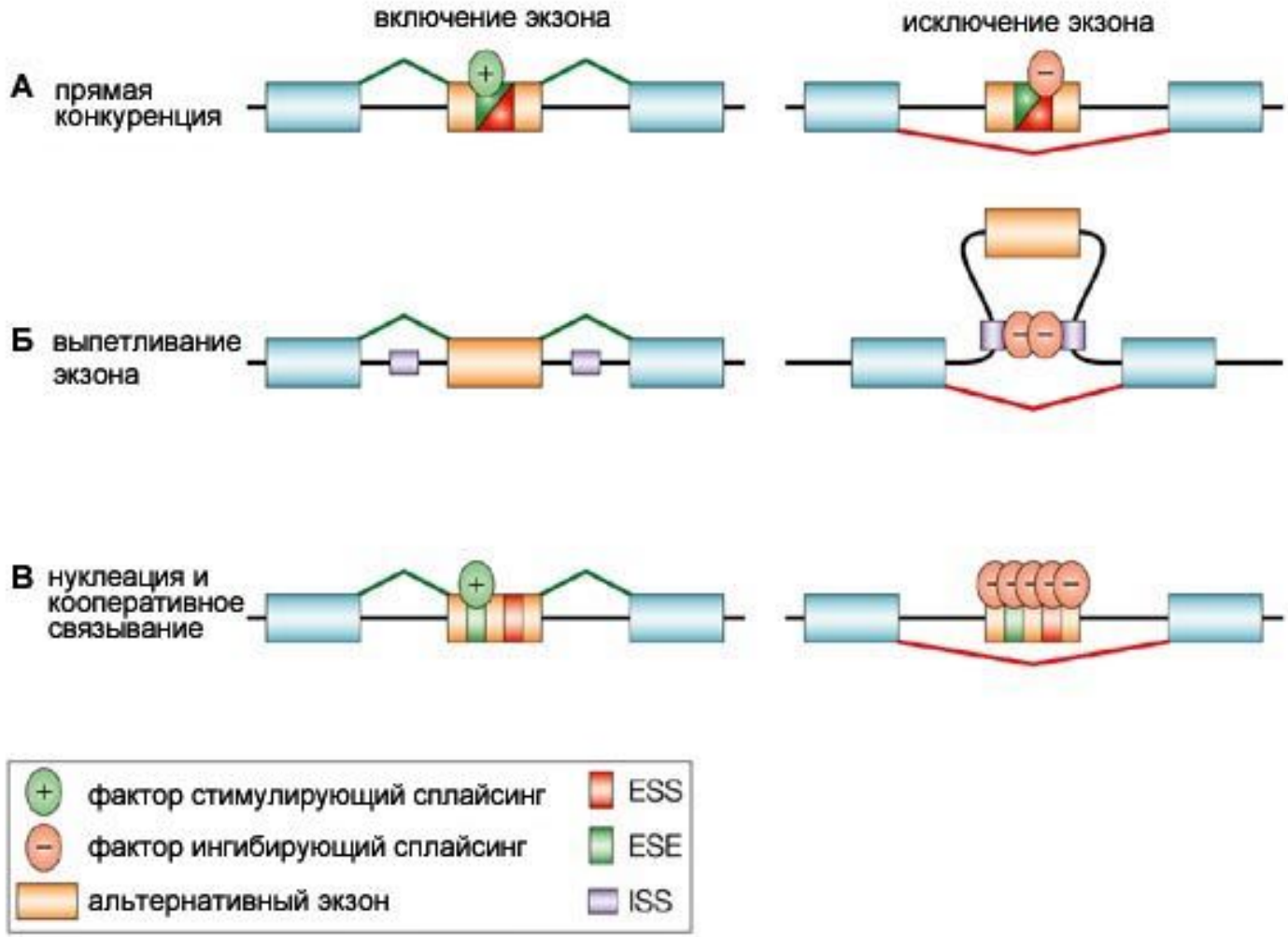
Регуляторные элементы сплайсинга в пре-мРНК

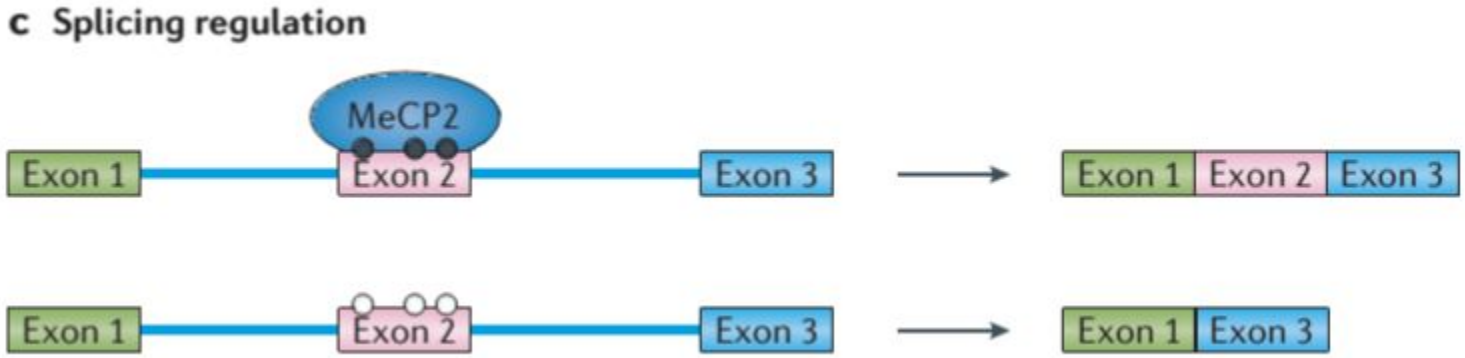


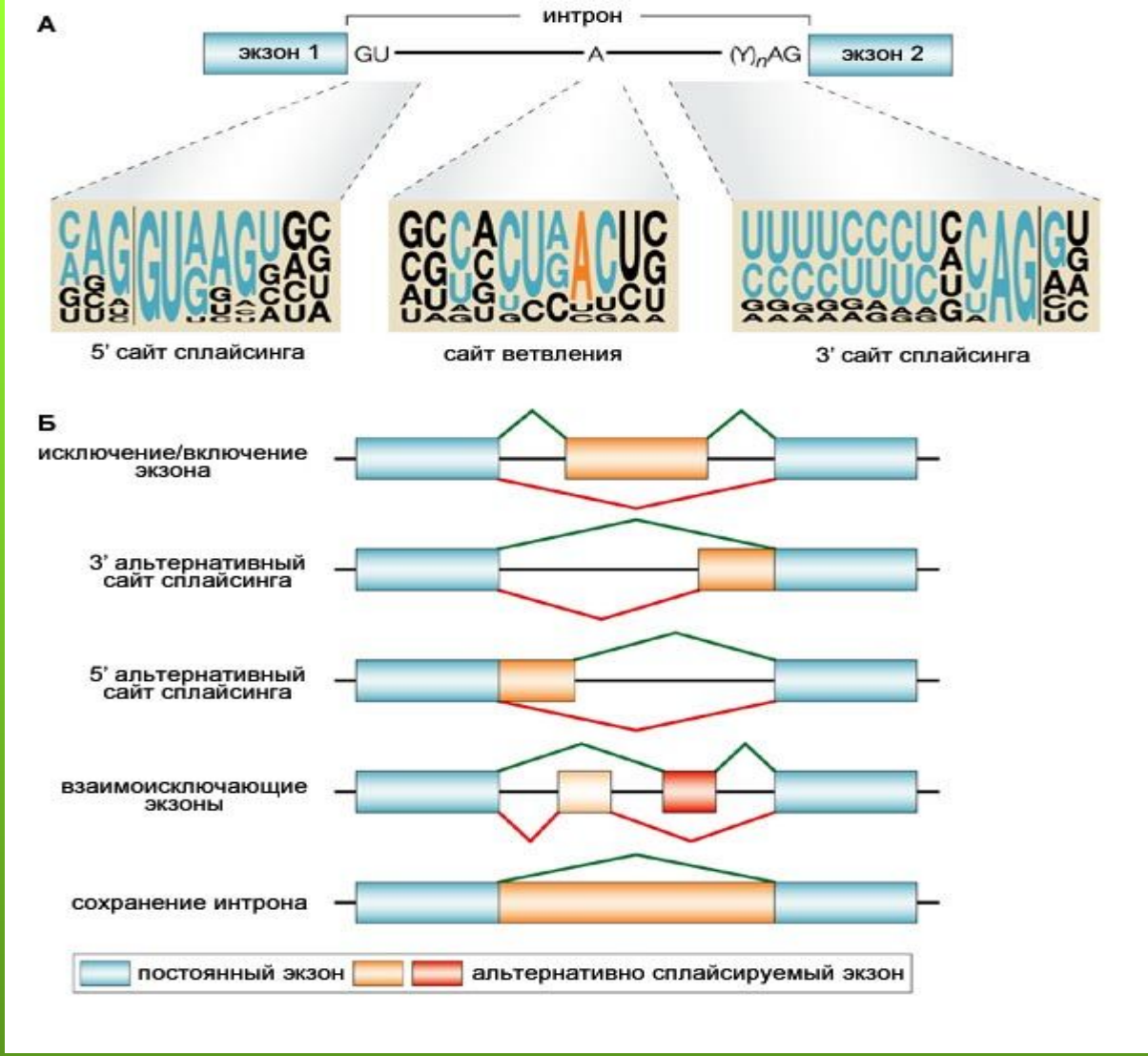
Y –пиримидины (C/T); ESE – экзонные энхансеры сплайсинга; ESS – экзонные сайленсеры сплайсинга; ISE - интронные энхансеры сплайсинга; ISS - интронные сайленсеры сплайсинга; U1 и U2 – малые ядерные рибонуклеопротеиновые частицы; SR – серин/аргинин богатые белки; hnRNP – гетерогенные ядерные рибонуклеопротеиновые 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 (РРМ) и обогащенный Arg/Ser дипептидами карбокситерминальный домен (RS-домен), участвующий в белок-белковых взаимодействиях.

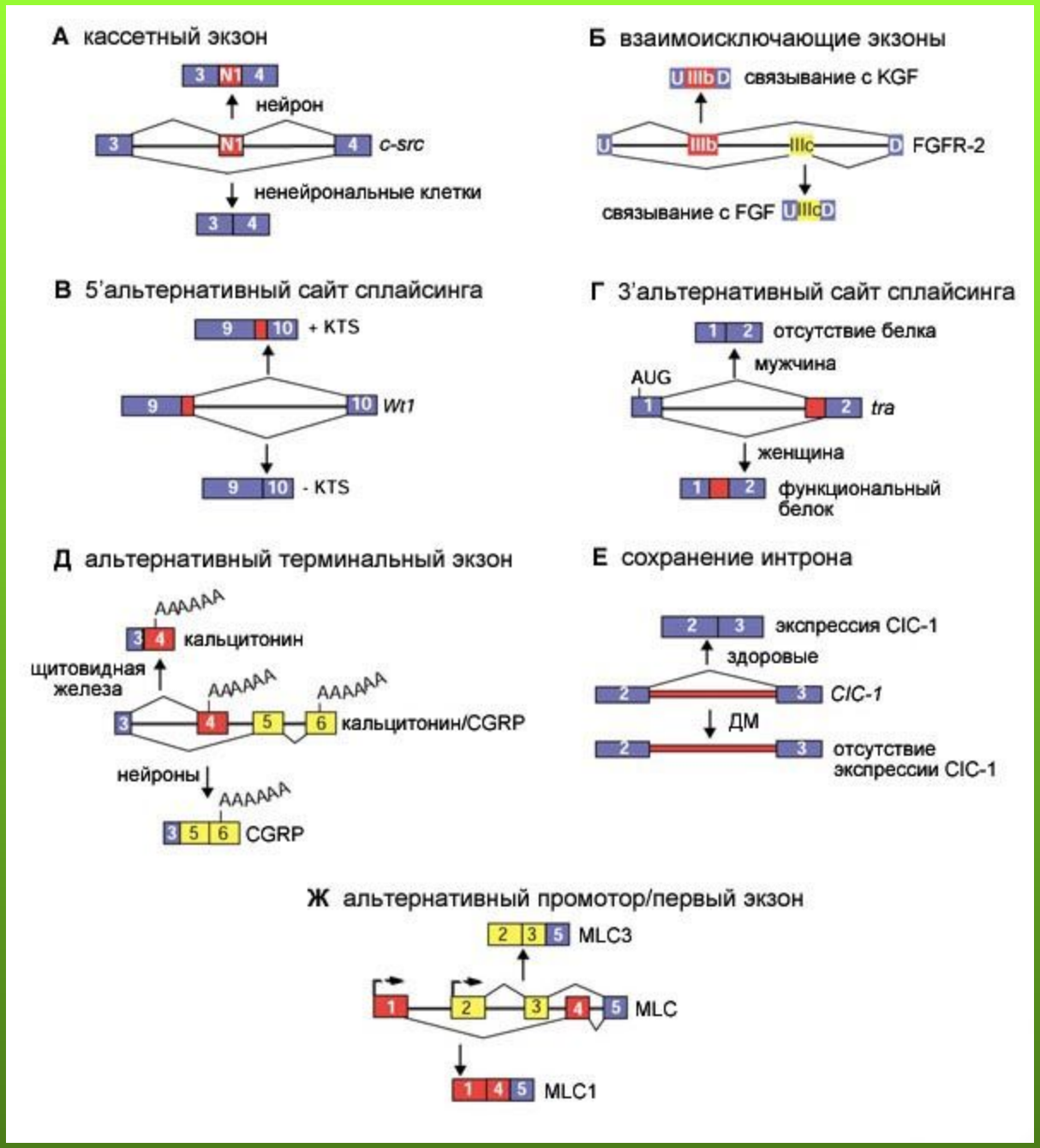
Экзонные сайленсеры сплайсинга работают через взаимодействие с негативными регуляторами, которые относятся к семейству гетерогенных ядерных рибонуклеопротеинов (гяРНП). Это класс различных РНК-связывающих белков, ассоциированных с вновь синтезированной пре-мРНК.


включение экзона
исключение экзона
А прямая конкуренция
Б выпетливание экзона
В нуклеация и кооперативное связывание
фактор стимулирующий сплайсинг
фактор ингибирующий сплайсинг
альтернативный экзон
ESS
ESE
ISS


c Splicing regulation
MeCP2
Exon 1
Exon 2
Exon 3
Exon 1
Exon 2
Exon 3
Exon 1
Exon 2
Exon 3
Exon 1
Exon 3



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%.


А кассетный экзон
3 N1 4
нейрон
3 N1 4 c-src
ненейрональные клетки
3 4
Б взаимоисключающие экзоны
U IIIb D связывание с KGF
U IIIb IIIc D FGFR-2
связывание с FGF U IIIc D
В 5'альтернативный сайт сплайсинга
9 10 + KTS
9 10 Wt1
9 10 - KTS
Г 3'альтернативный сайт сплайсинга
1 2 отсутствие белка
мужчина
AUG
1 2 tra
женщина
1 2 функциональный белок
Д альтернативный терминальный экзон
AAAAAA
3 4 кальцитонин
щитовидная железа
AAAAAA
AAAAAA
3 4 5 6 кальцитонин/CGRP
нейроны
AAAAAA
3 5 6 CGRP
Е сохранение интрона
2 3 экспрессия ClC-1
здоровые
2 3 ClC-1
ДМ
2 3 отсутствие экспрессии ClC-1
Ж альтернативный промотор/первый экзон
2 3 5 MLC3
1 2 3 4 5 MLC
1 4 5 MLC1

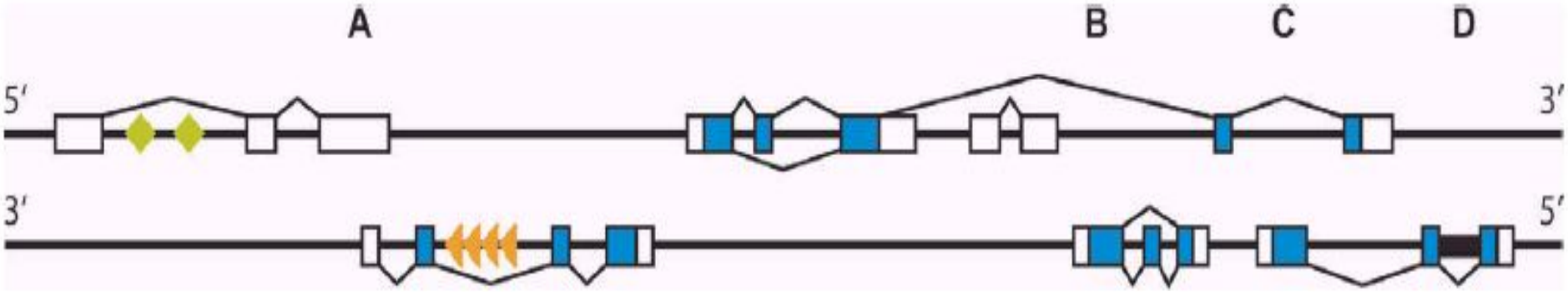
Ген	Тип опухоли	Кол-во сплайс-вариантов
CD44	Различные типы	20
WT1	Нефробластома	4
BRCA1/ BRCA2	Рак молочной железы, яичников, предстательной и поджелудочной желез	24
MDM2	Рак молочной железы и яичников, мочевого пузыря, саркомы	40
PCA	Рак предстательной и молочной желез	8
KLK2	Рак предстательной железы	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	Феохромацитома, 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 гематопоэза, 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.



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.

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:

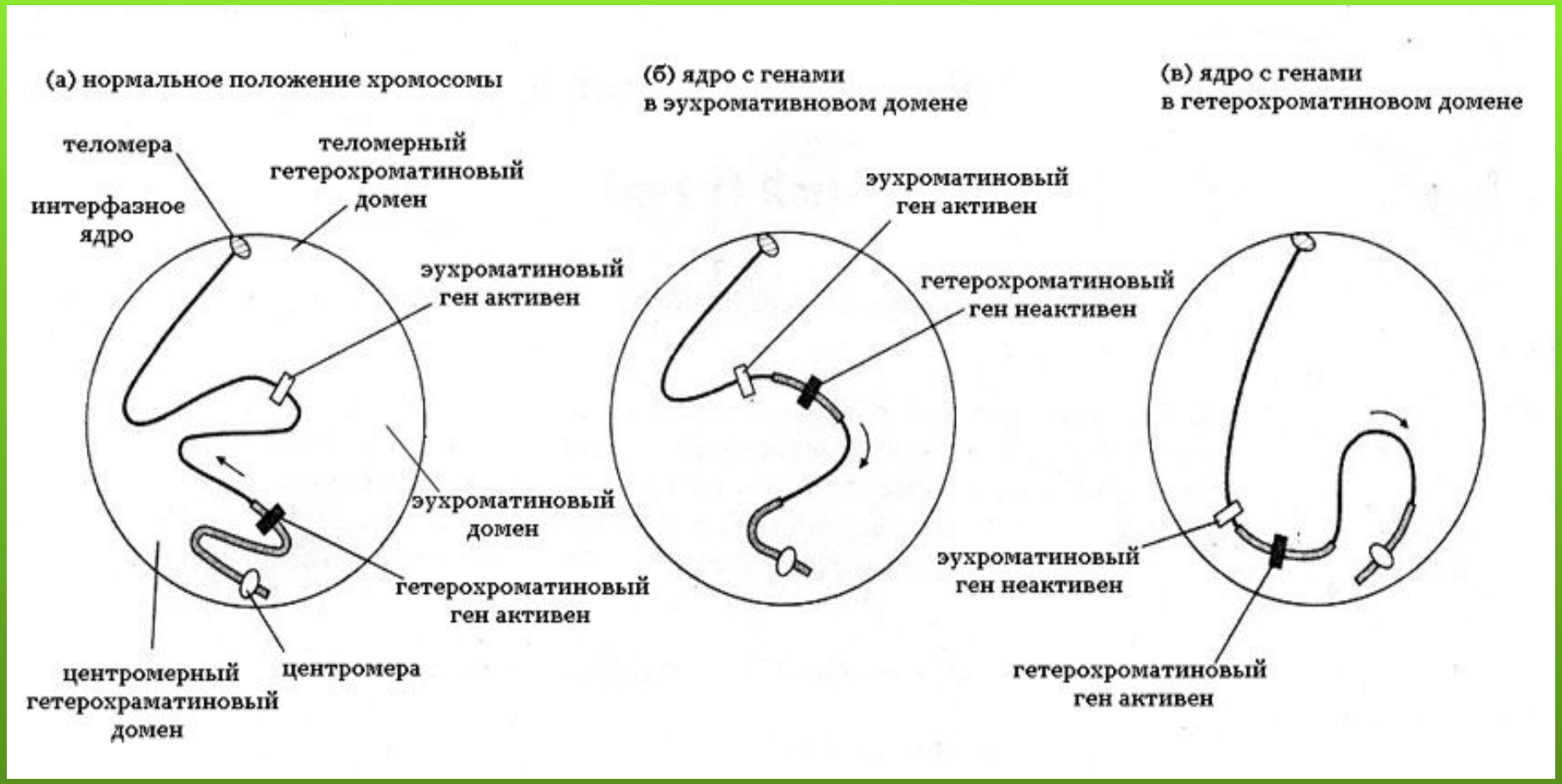
- энхансер => снижение экспрессии;

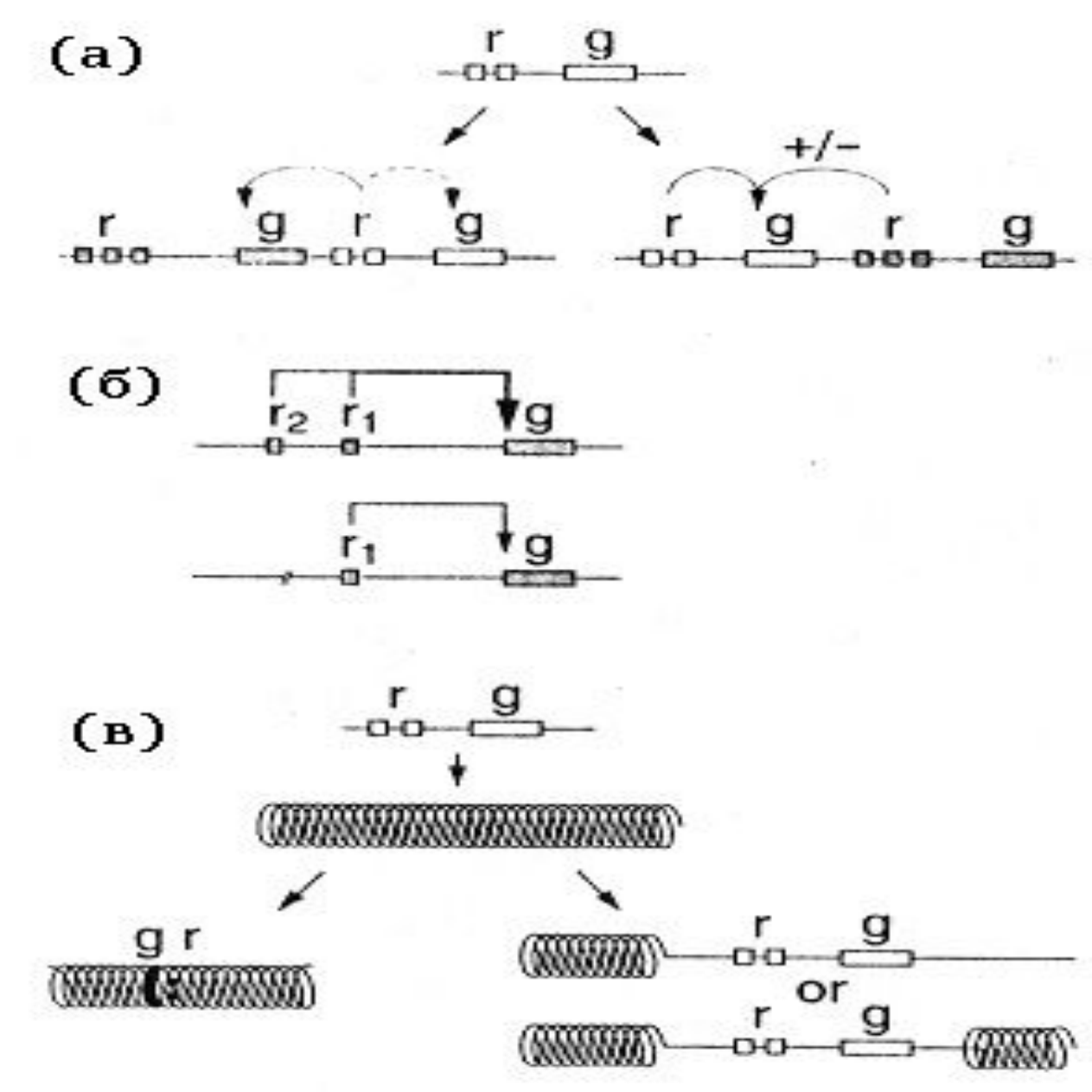
- сайленсер => увеличение экспрессии;

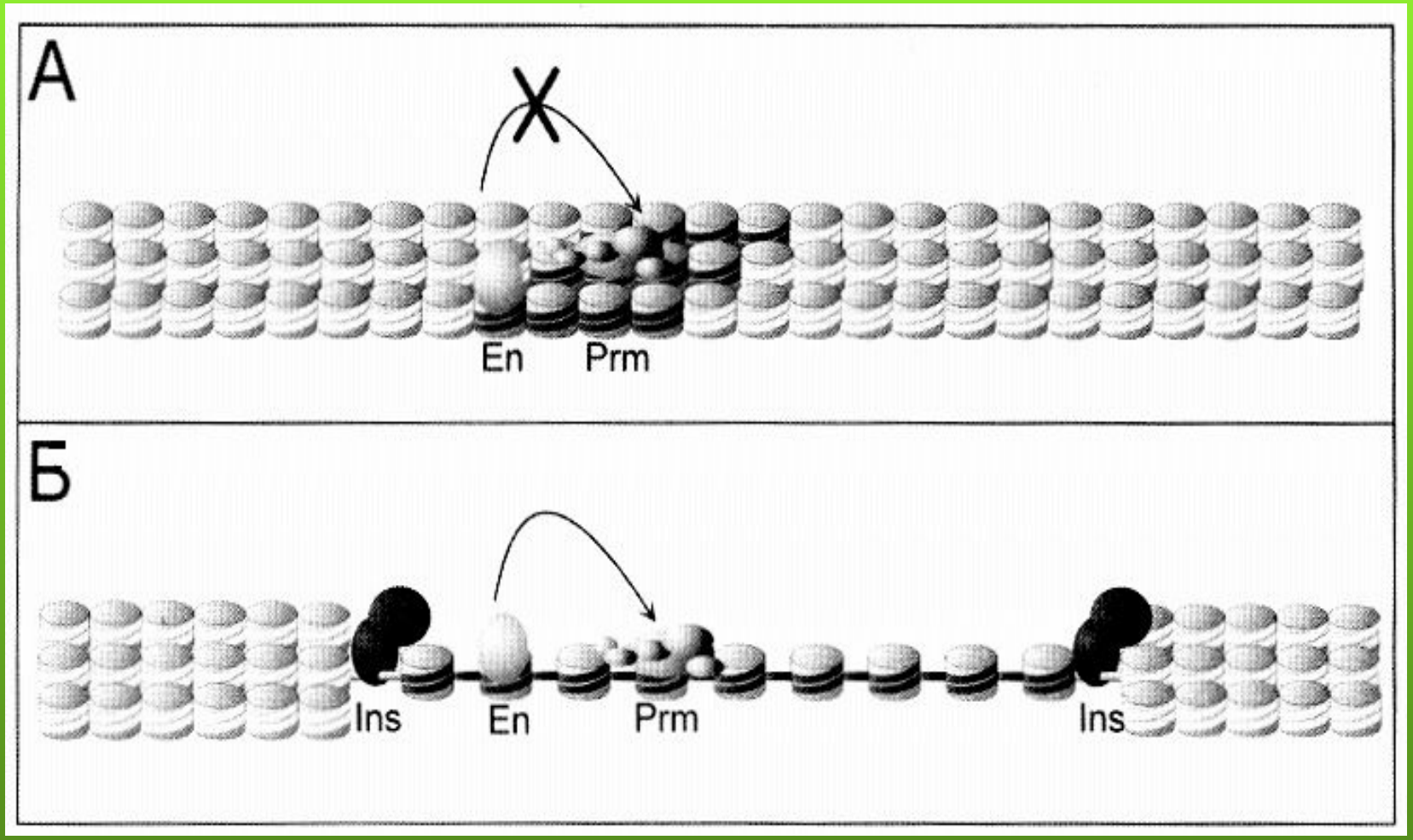
- инсулятор => изменение структуры хроматина => снижение экспресии.

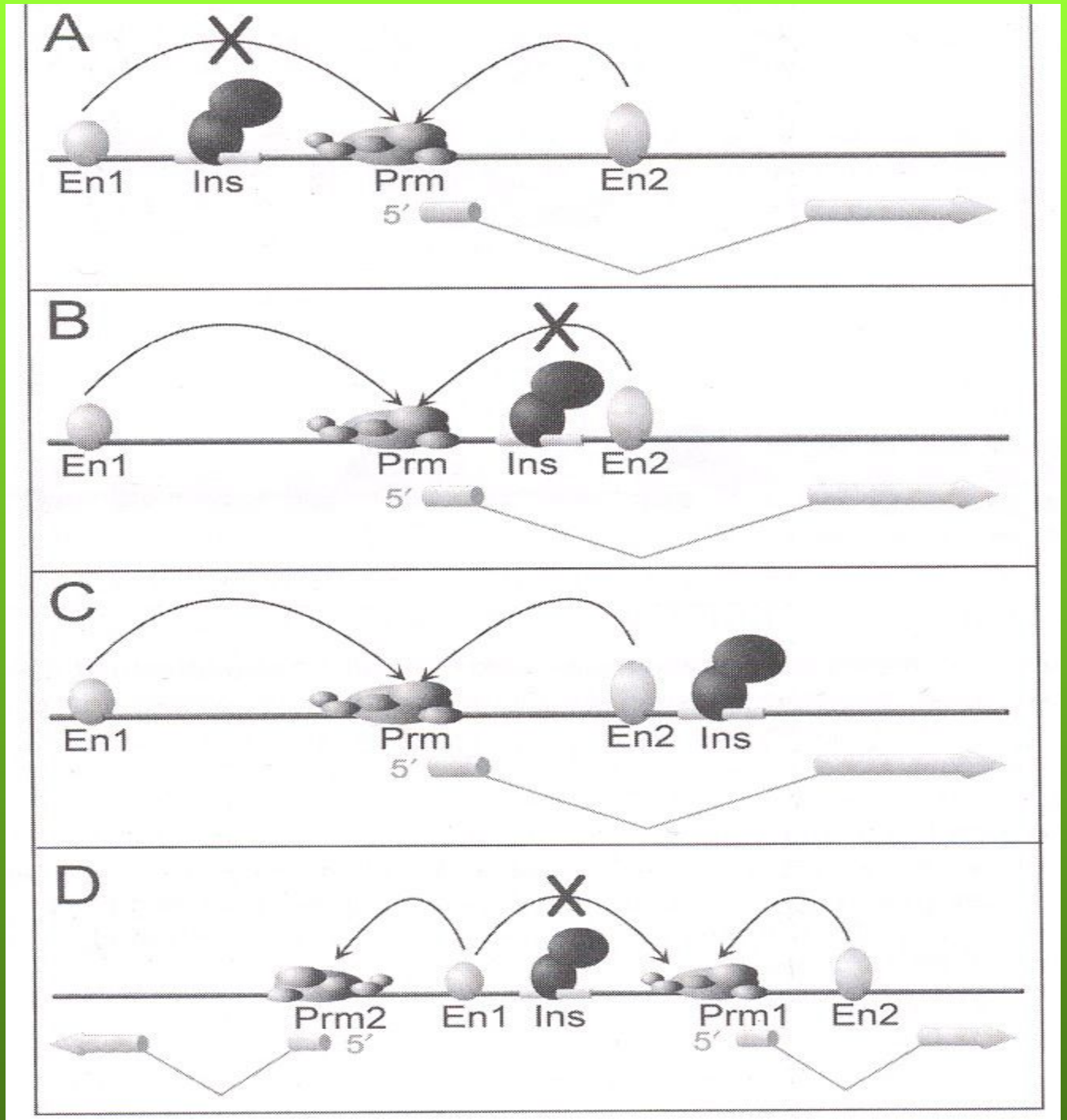
Конкуренция за регуляторный элемент между геном заболевания и геном в районе перестройки => снижение экспрессии.

Приобретение новых регуляторных элементов => снижение или увеличение экспрессии.


(а) нормальное положение хромосомы
теломера
теломерный гетерохроматиновый домен
интерфазное ядро
эухроматиновый ген активен
эухроматиновый домен
гетерохроматиновый ген активен
центромерный гетерохраматиновый домен
центромера
(б) ядро с генами в эухромативновом домене
эухроматиновый ген активен
гетерохроматиновый ген неактивен
(в) ядро с генами в гетерохроматиновом домене
эухроматиновый ген неактивен
гетерохроматиновый ген активен


(а)
r
g
+/−
r
g
r
g
r
g
r
g
(б)
r2
r1
g
r1
g
(в)
r
g
g r
r
g
or
r
g


А
X
En
Prm
Б
Ins
En
Prm
Ins


A
En1
Ins
Prm
En2
5′
B
En1
Prm
Ins
En2
5′
C
En1
Prm
En2
Ins
5′
D
Prm2
En1
Ins
Prm1
En2
5′
5′

Патология типа «эффект положения» у человека

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

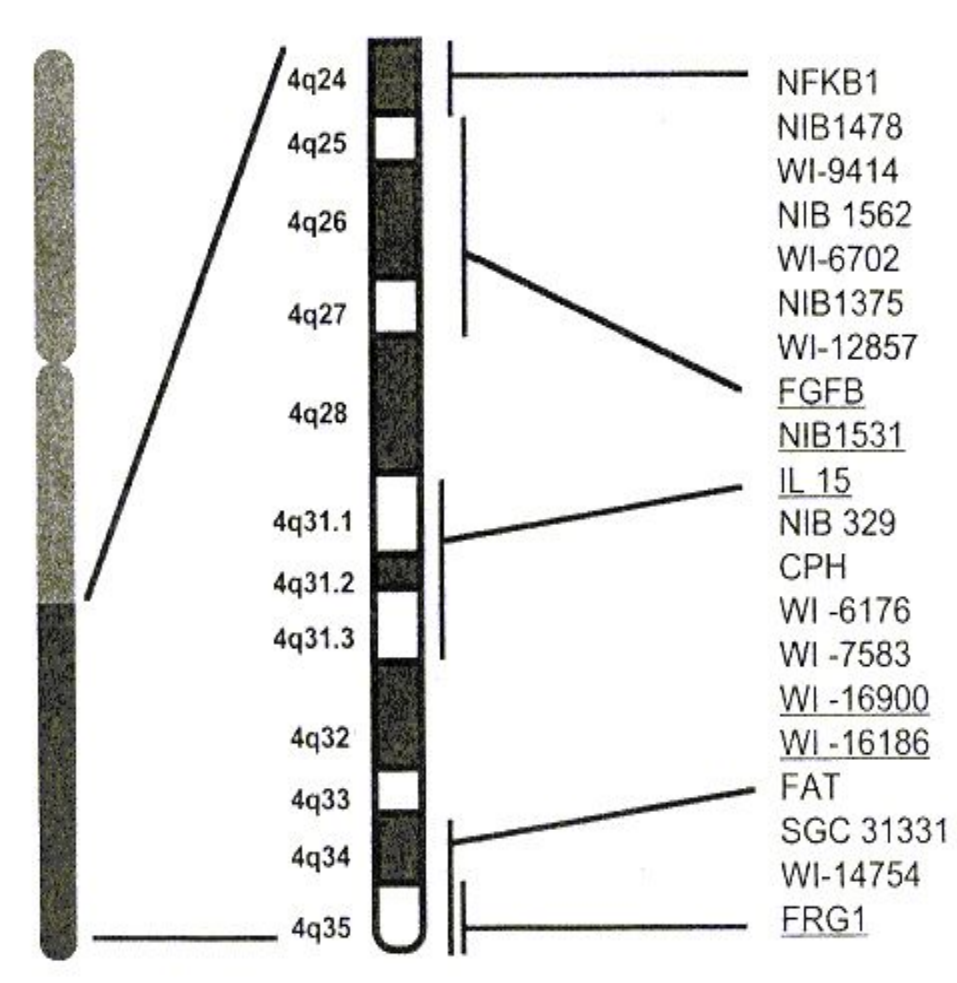
ОБЩИЕ ЧЕРТЫ РАЙОНОВ, ПОДВЕРЖЕННЫХ ИМПРИНТИНГУ И ЭФФЕКТУ ПОЛОЖЕНИЯ

1. Протяженность эффекта (4 м.п.о. и более);

2. Мозаичность экспрессии генов;

3. Клональный характер экспрессии тканеспецифического гена;

4. Наличие повторяющихся последовательностей.



Что называть геном?

«один ген – один фермент»

«белок-кодирующий район с определенными регуляторными последовательностями»

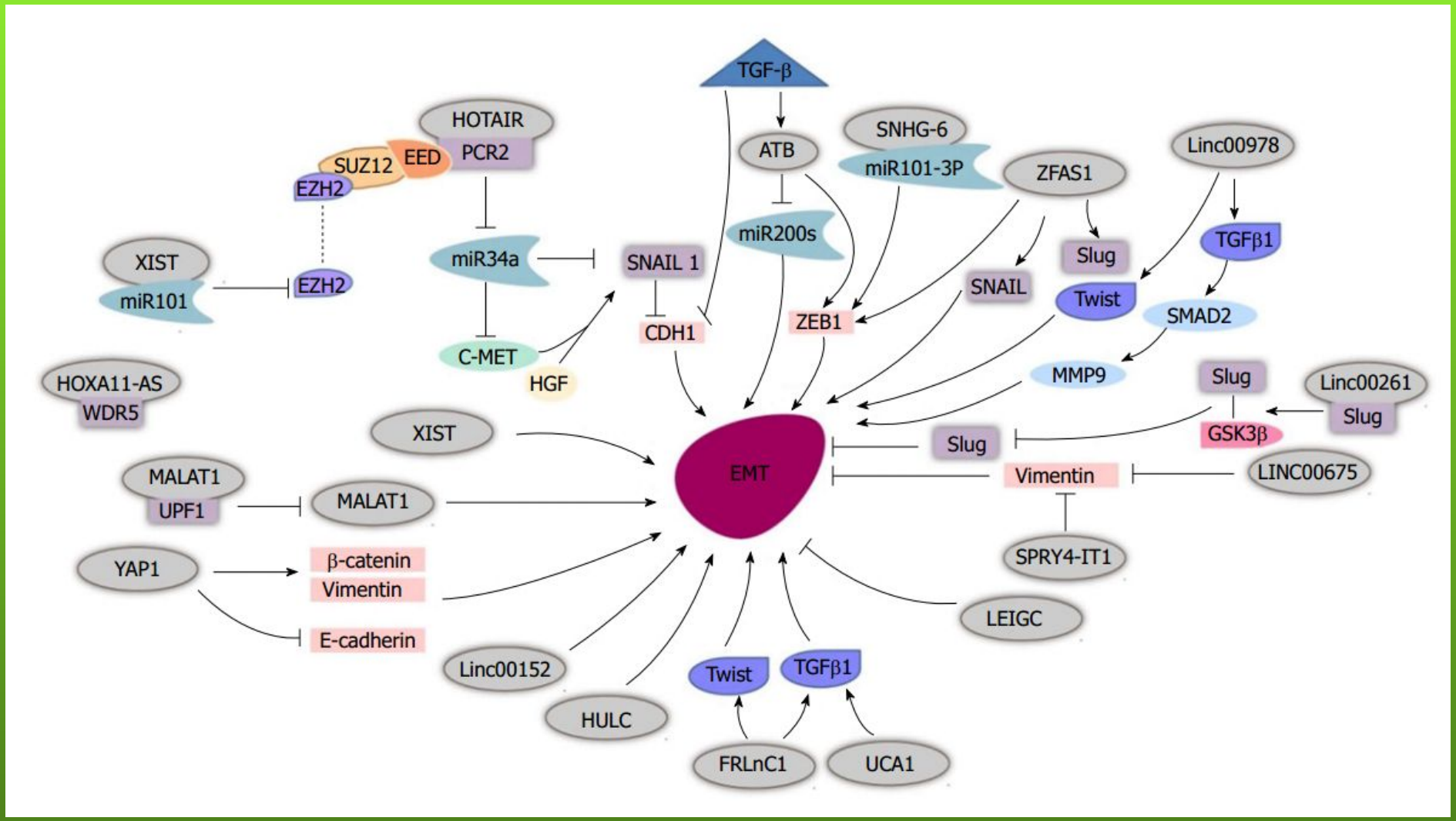
«транскрипционная единица» или «фрагмент ДНК, ответственный за синтез функционально значимого продукта»

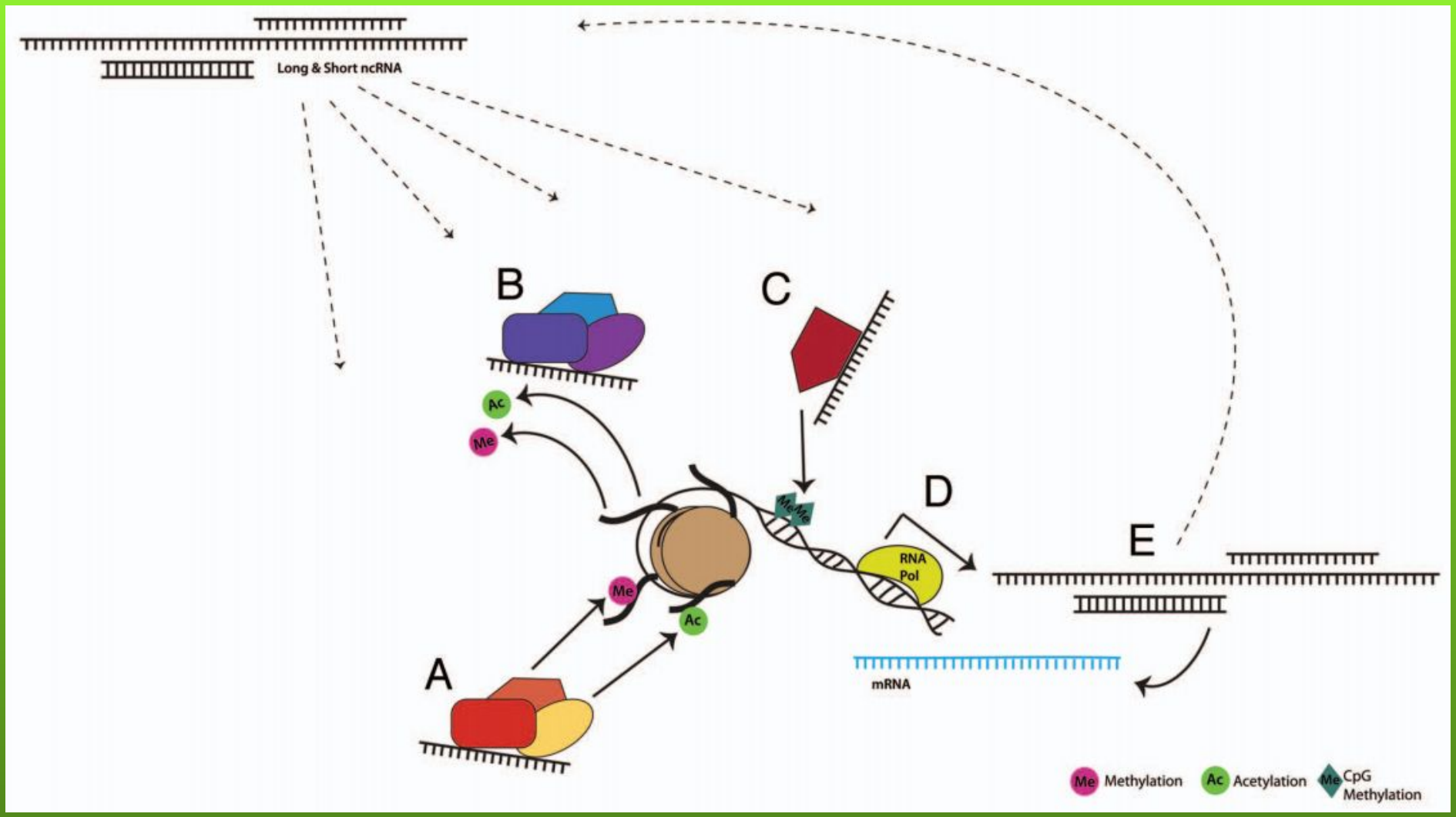
«последовательность генетического материала, экспрессирующая, как РНК, так и/или белок (через мРНК), имеющие функциональное значение для клетки»

«локализованная геномная последовательность, соответствующая единице наследственности, которая содержит регуляторные районы, транскрибирующиеся районы и/или другие функционально значимые районы» 2006 г.

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.
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).

Роль некодирующих РНК в регуляции эпителиально-мезенхимального перехода




Long & Short ncRNA
B
C
Ac
Me
Me
Me
Ac
D
RNA
Pol
E
A
mRNA
Me Methylation
Ac Acetylation
Me CpG
Methylation

Система молекулярно-генетических маркеров для карцином желудка

Генетические (структурные)

Делеции и МН
16q22.1 *(CDH1)*
17p13 *(TP53)*
1p36 *(RUNX3)*

Мутации
K-RAS

Эпигенетические

Метилирование
MLH1, RASSFA1, CDH1, DAPK, N33, RUNX3

	Аномальное метилирование					Структурные повреждения		
Кол-во	*N33*	*CDH1*	*DAPK*	*MLH1*	*RASSF*	*ПГCDH1*	*ПГp53*	*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%)

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?

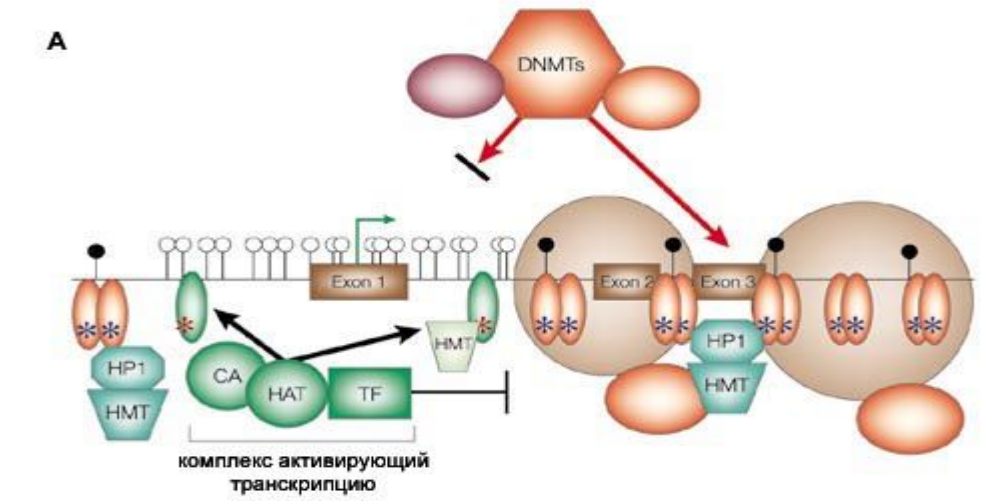
Методы поиска дифференциально метилированных CpG-островков

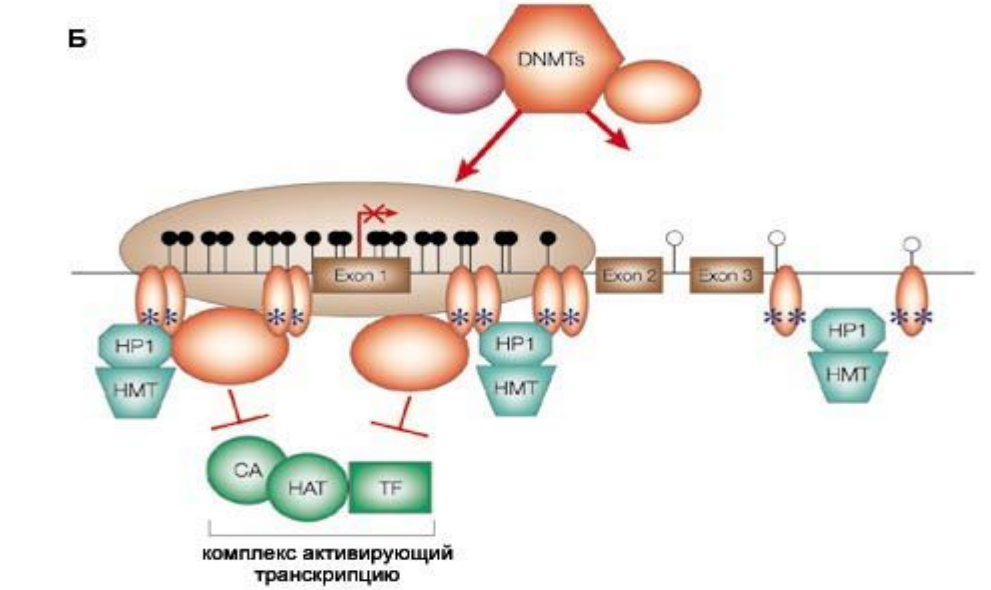
- Рестрикционно-ориентированное геномное сканирование
- Репрезентативно-дифференциальный анализ
- Микрочипы

- Метил-чувствительный фингерпринтинг

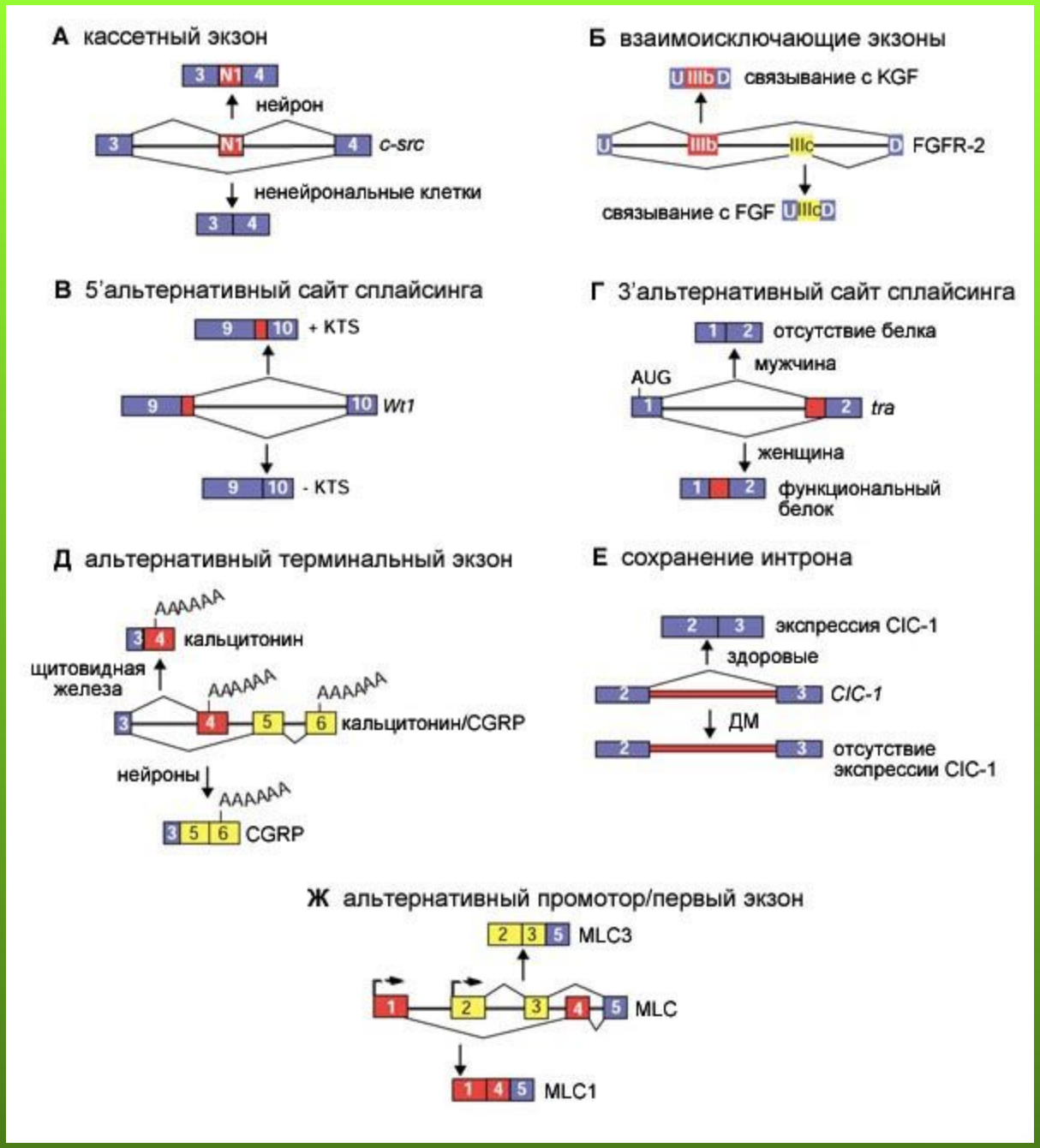
- наименьшая себестоимость и трудоемкость метода;

- возможность тестирования большого количества образцов в одном эксперименте


А
DNMTs
Exon 1
Exon 2
Exon 3
HP1
HMT
CA
HAT
TF
комплекс активирующий транскрипцию


Б
DNMTs
Exon 1
Exon 2
Exon 3
HP1
HMT
CA
HAT
TF
комплекс активирующий транскрипцию

метилированные CpG
неметилированные CpG
ДНК метилтрансферазы (DNMTs)
метилированный Lys4 на H3
метилированный Lys9 на H3
ко-репрессор
HDAC
MBP
нуклеосома с деацетилированными гистонами
нуклеосома с ацетилированными гистонами


А кассетный экзон
3 N1 4
нейрон
3 N1 4 c-src
ненейрональные клетки
3 4
Б взаимоисключающие экзоны
U IIIb D связывание с KGF
U IIIb IIIc D FGFR-2
связывание с FGF U IIIc D
В 5'альтернативный сайт сплайсинга
9 10 + KTS
9 10 Wt1
9 10 - KTS
Г 3'альтернативный сайт сплайсинга
1 2 отсутствие белка
мужчина
AUG
1 2 tra
женщина
1 2 функциональный белок
Д альтернативный терминальный экзон
AAAAAA
3 4 кальцитонин
щитовидная железа
AAAAAA
AAAAAA
3 4 5 6 кальцитонин/CGRP
нейроны
AAAAAA
3 5 6 CGRP
Е сохранение интрона
2 3 экспрессия ClC-1
здоровые
2 3 ClC-1
ДМ
2 3 отсутствие экспрессии ClC-1
Ж альтернативный промотор/первый экзон
2 3 5 MLC3
1 2 3 4 5 MLC
1 4 5 MLC1

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

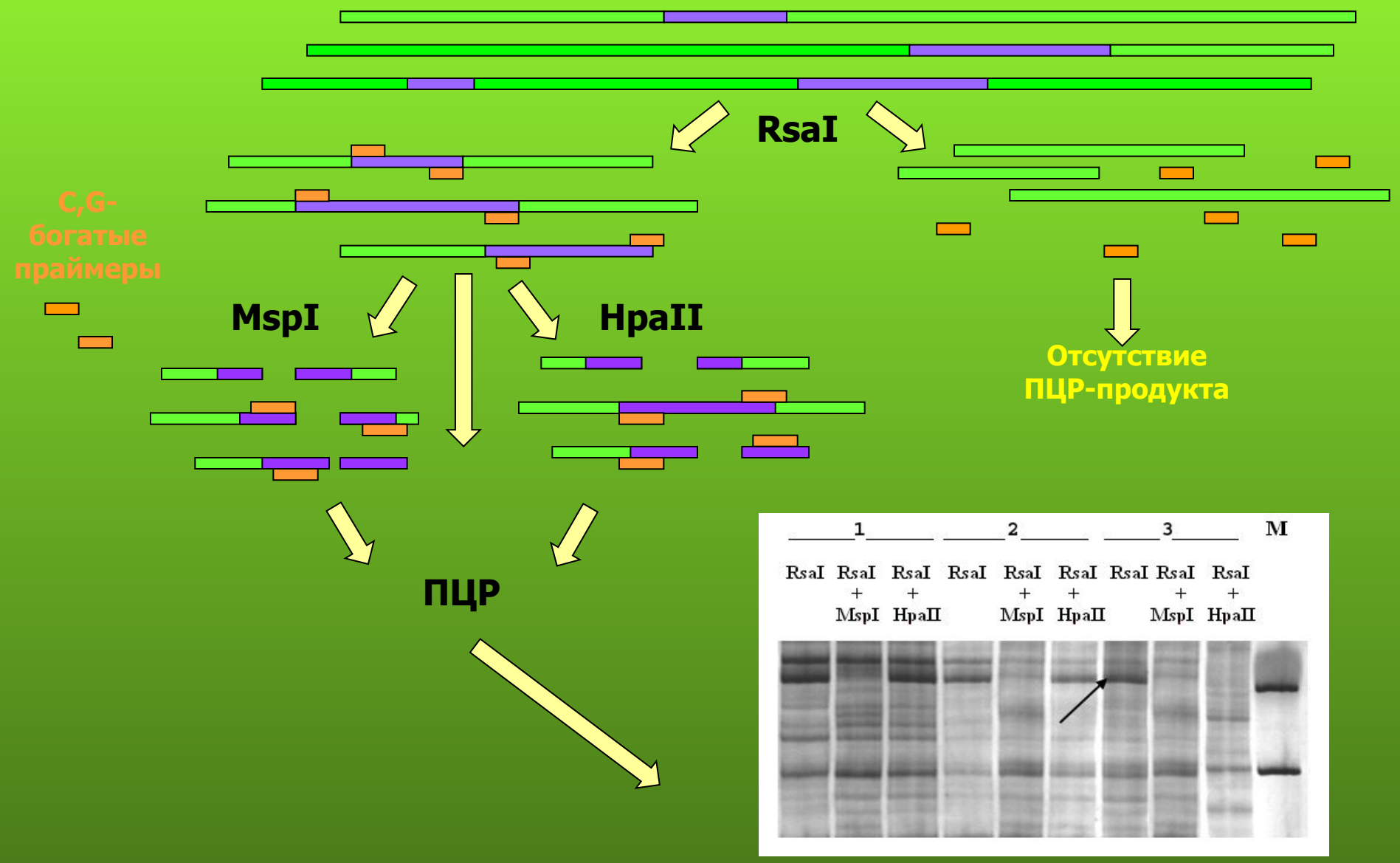
Делеции 1p\19q

Прогноз эффективности таргетной терапии ингибиторами EGFR (эрлотиниб, гефитиниб)

Прогноз эффективности терапии темозоламидом (Темодал)

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

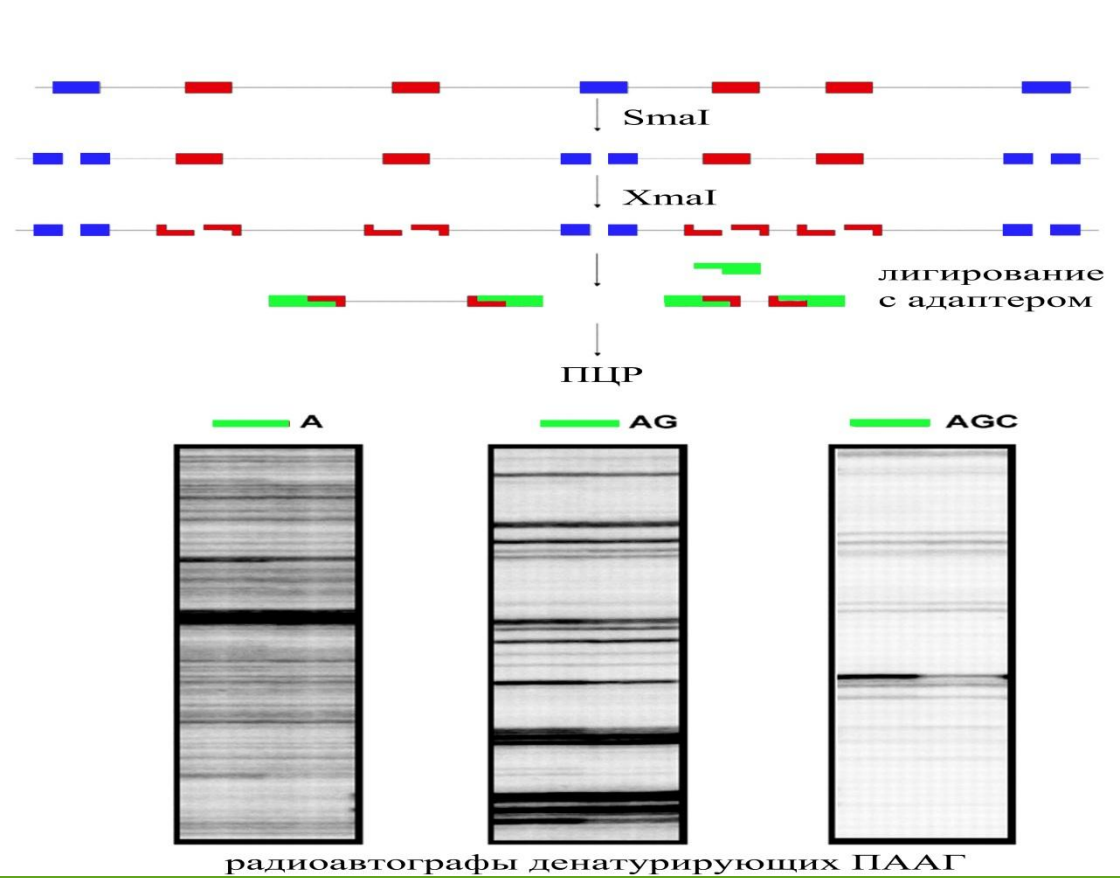
Принцип метода метилчувствительного фингерпринтинга



Гены, идентифицированные методом МЧФП

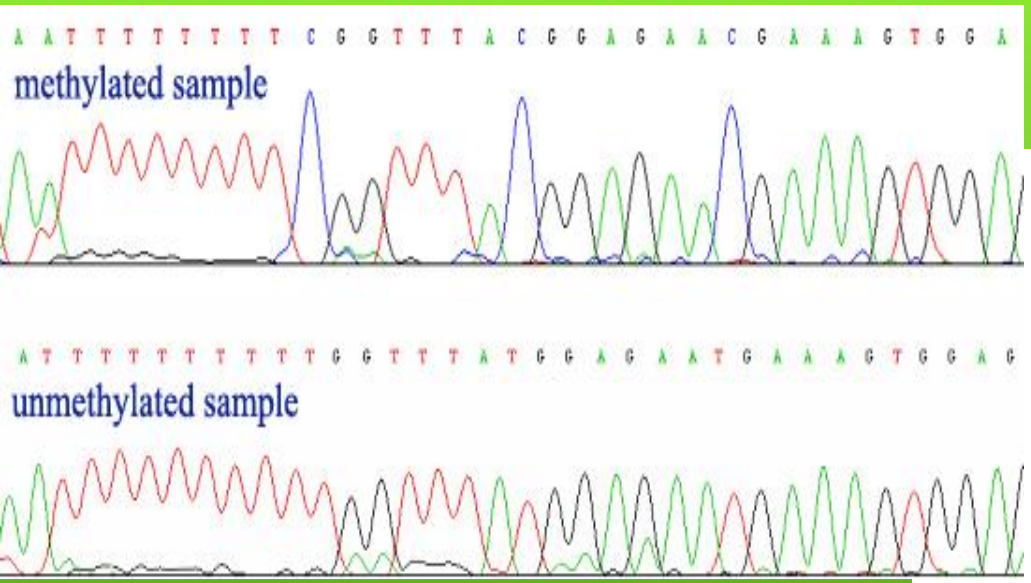
Ген	Локус	Белок	Метилирование
SEMA6B	19p13.3	Семафорин 6В	38%
BIN1	2q14.3	Адапторный протеин BIN 1	18%
LAMC3	9q34.13	Гамма –3-цепь ламинина	8%
KCNH2	7q36.1	Потенциал-зависимый калиевый канал, субсемейства Н	7%
VCIP135	8q13.1	Белок VCIP135	4%
CACNG4	17q24.2	Потенциал-зависимый кальциевый канал, субъединица гамма 4	3%
PSMF1	20p13	Протеосомный ингибитор, субъединица 1 (PI31)	3%

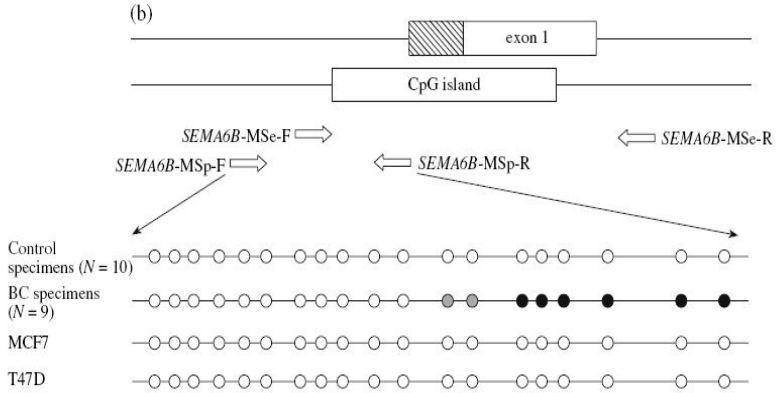
Принцип АИМС

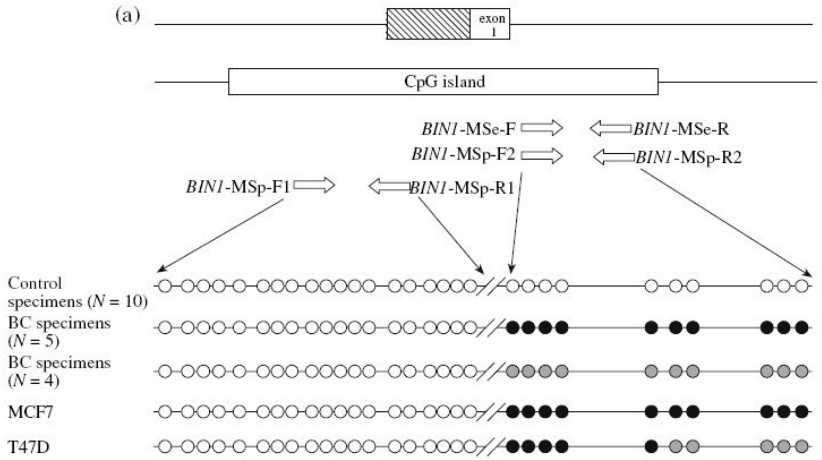


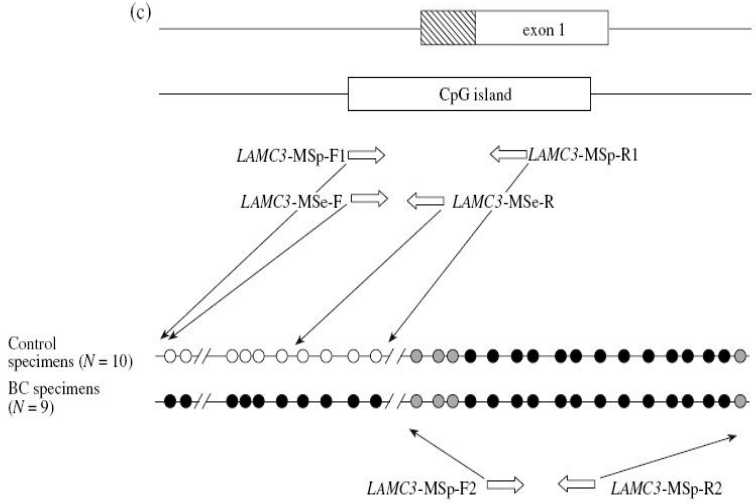
Геномную ДНК обрабатывают метилчувствительной рестриктазой SmaI, которая формирует фрагменты с «тупыми» концами. Метилированные сайты узнавания, оставшиеся интактными, расщепляются нечувствительной к метилированию рестриктазой XmaI, формирующей фрагменты с «липкими» концами. Последние способны взаимодействовать 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*

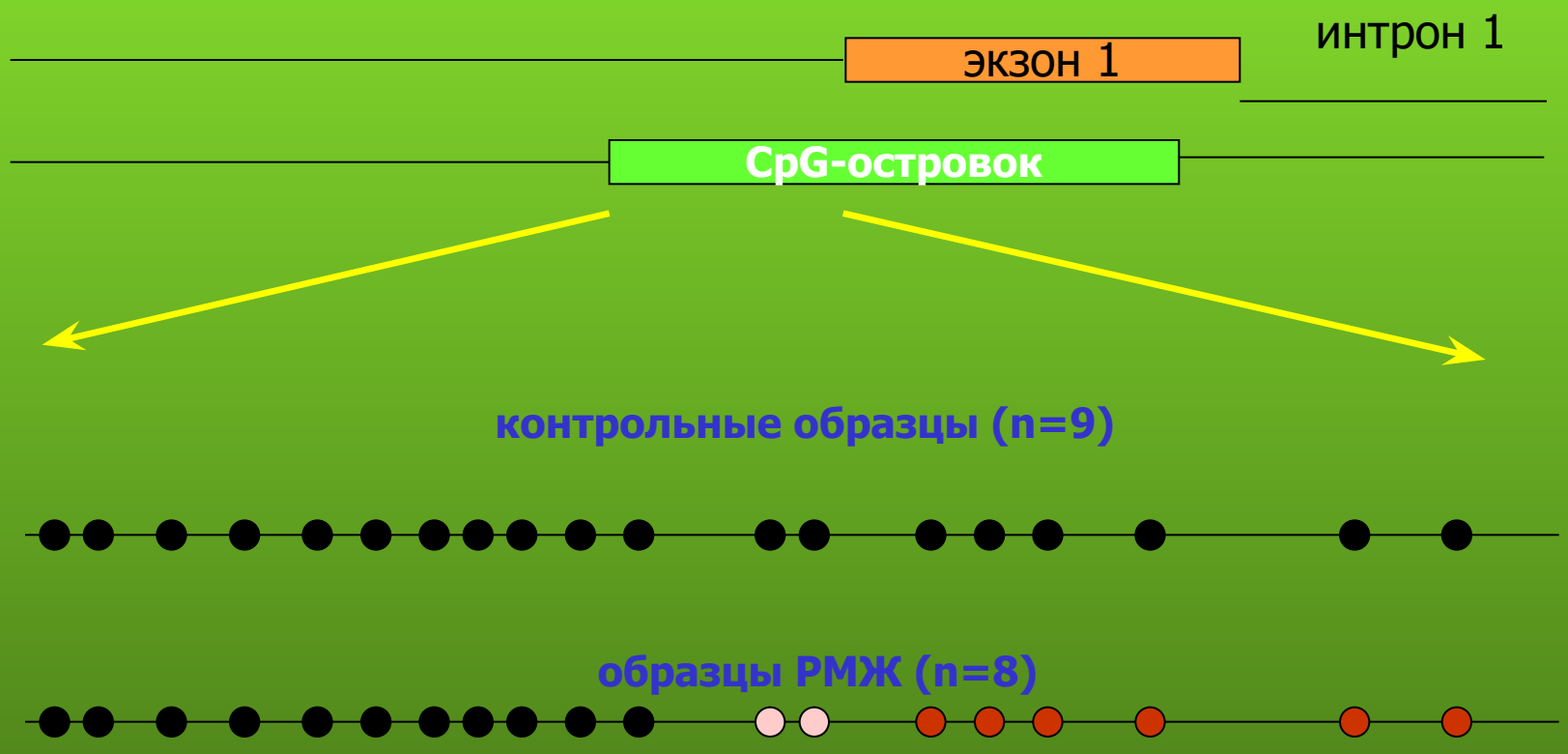






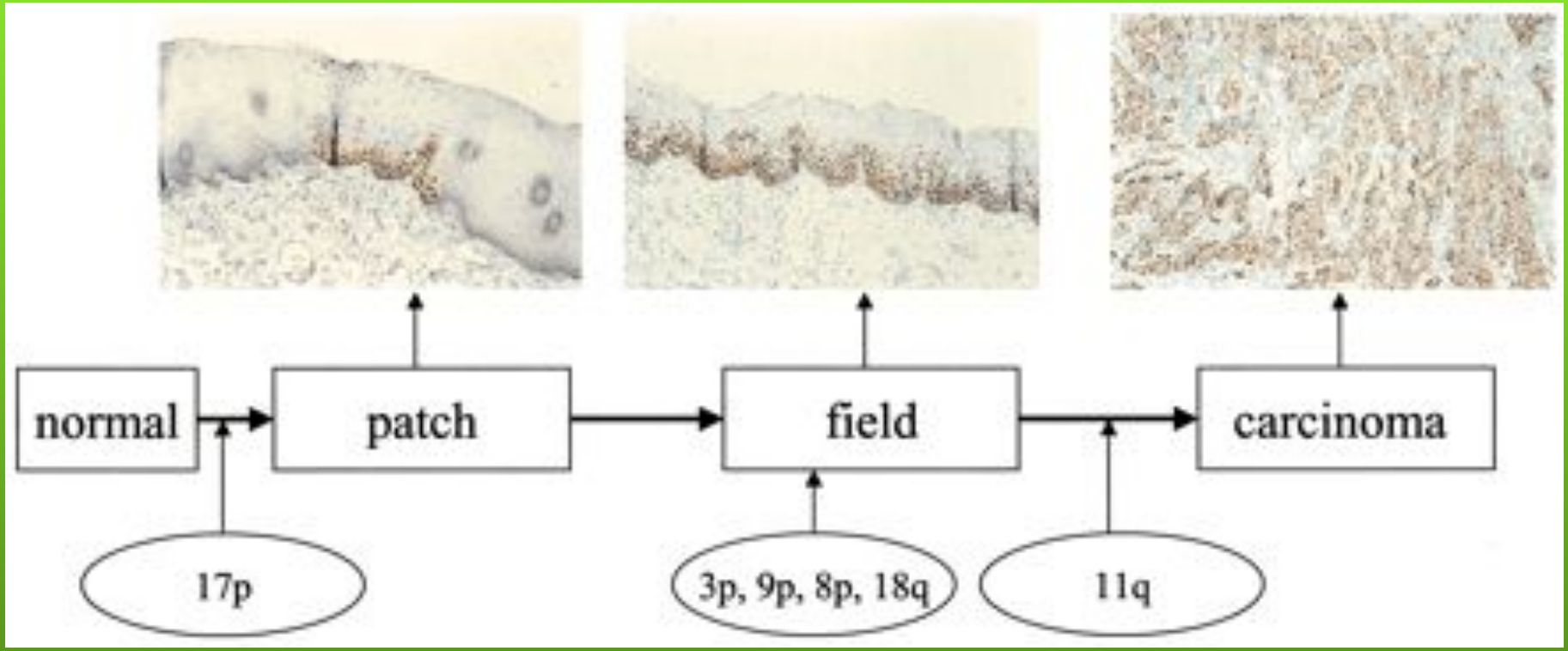


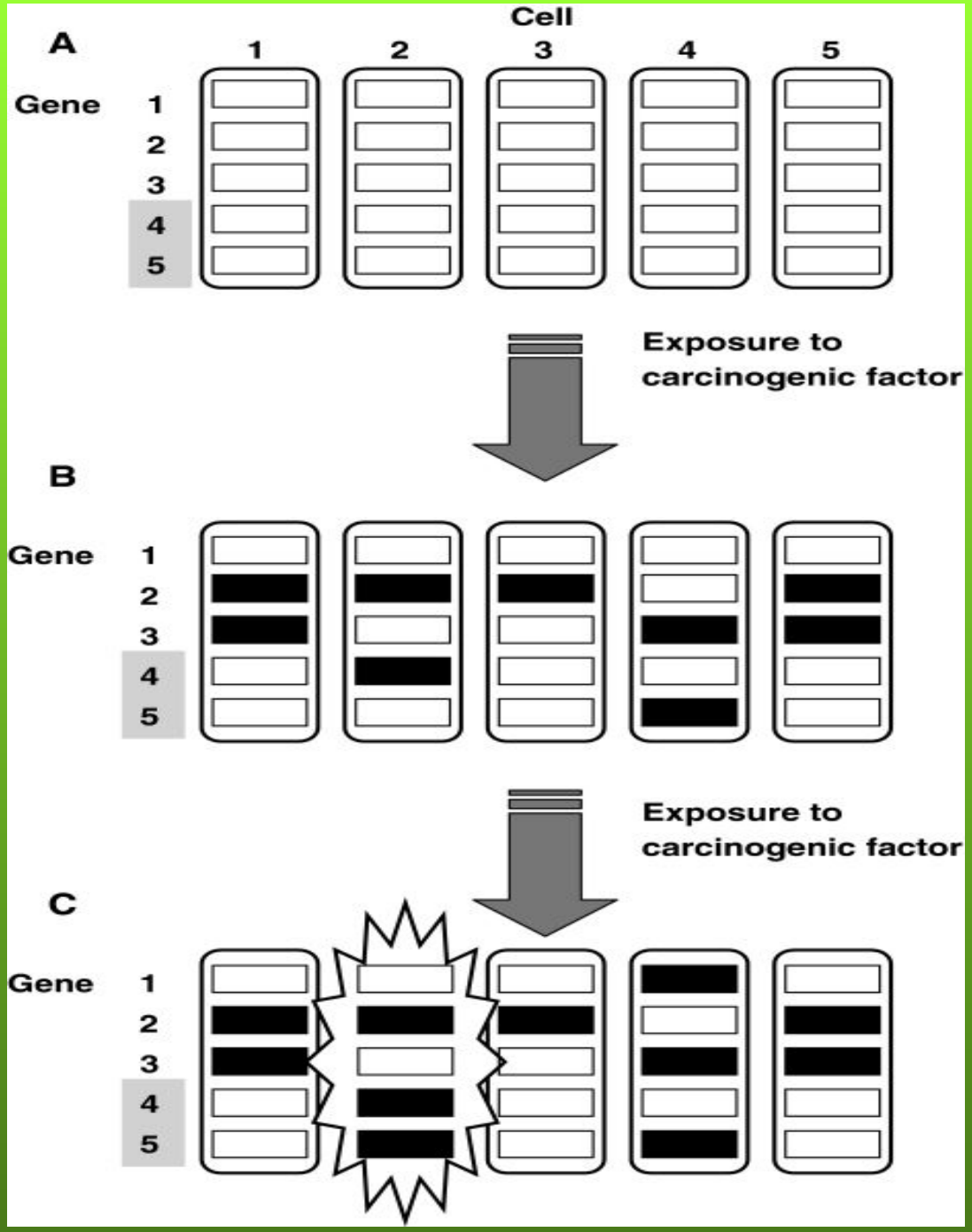
Карта метилирования CpG-островка гена *SEMA6B*



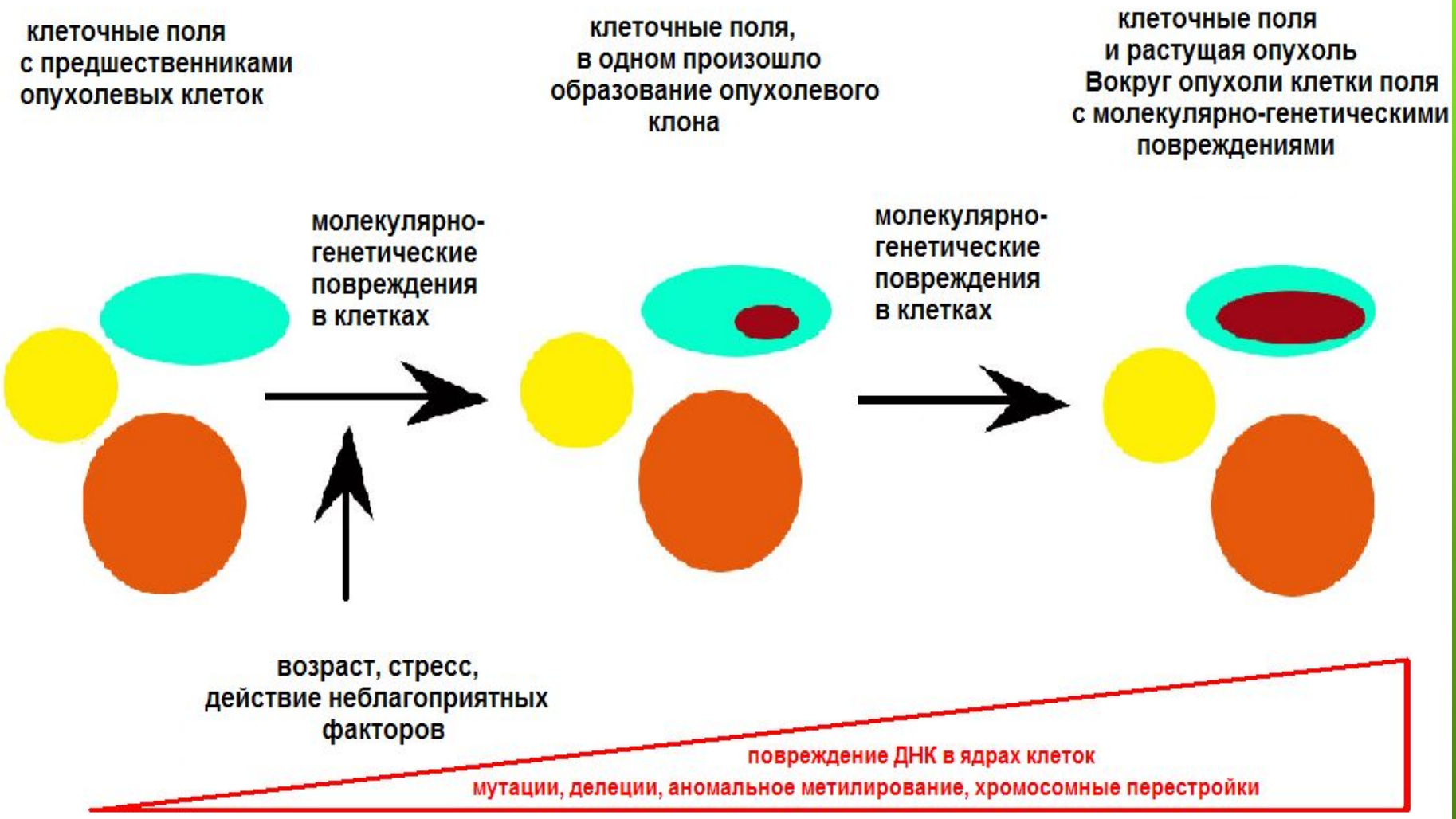
Anti-cancer RNAi targets tested in vivo

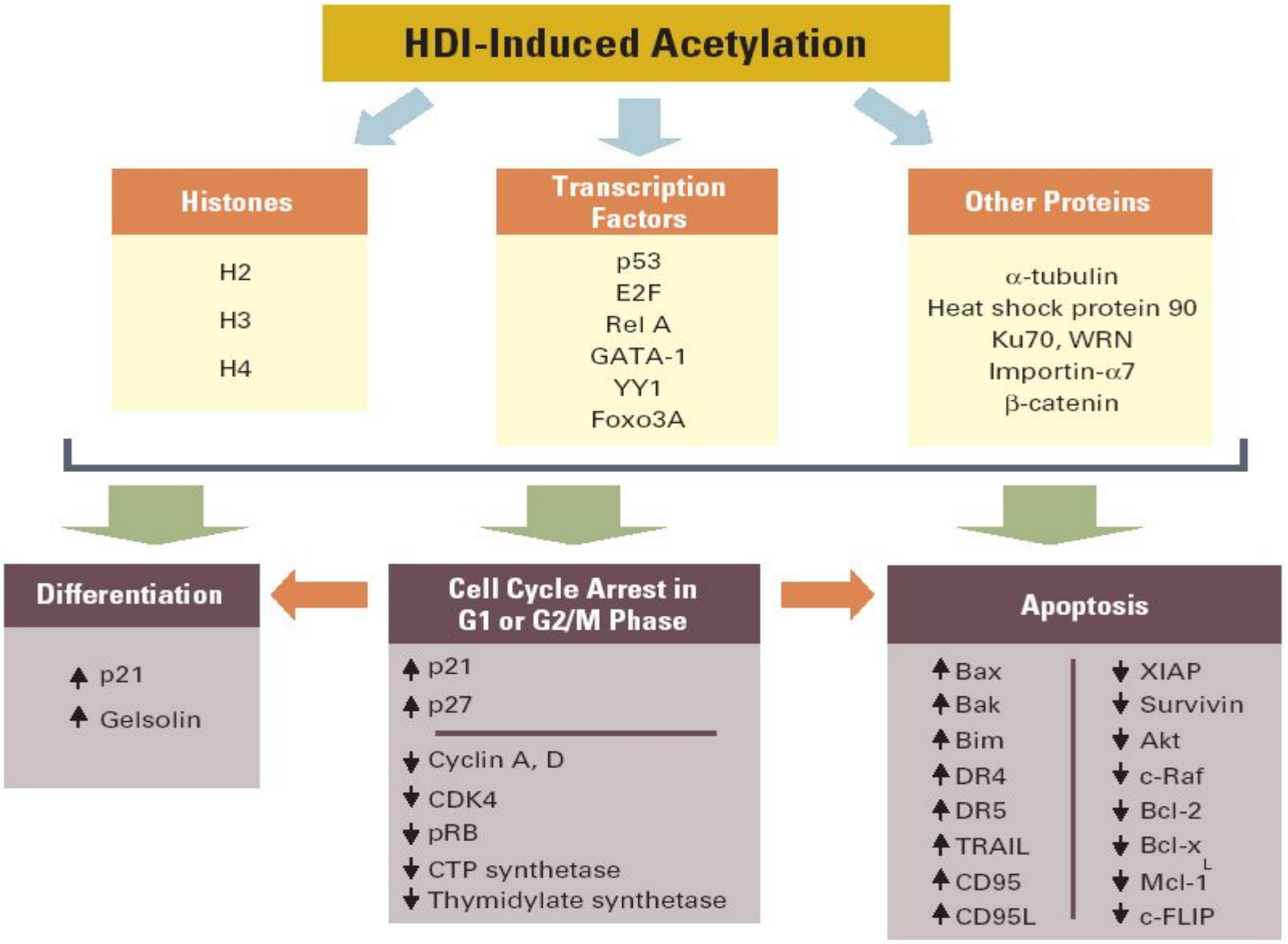
Target	Route	Vehicle
Bcl-2	i.v.	Liposome
Cxcr4	i.v.	None
Focal adhesion kinase	i.v.	None
EphA2	i.v.	None
Polo-like kinase 1	i.v.	ATA-treated
Colony-stimulating factor	i.t.	None
survivin	hd	DNA
CEACAM6	i.v.	None
EGFR	i.v.	Ligand-targeted
Erbb2/neu (HER2)R	i.p.	PEI-complex
Skp-2	i.t.	Adenovirus
Spingosine-1 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


normal
patch
field
carcinoma
17p
3p, 9p, 8p, 18q
11q


Cell
A
1
2
3
4
5
Gene
1
2
3
4
5
Exposure to carcinogenic factor
B
Gene
1
2
3
4
5
Exposure to carcinogenic factor
C
Gene
1
2
3
4
5

Теория «полей канцеризации»





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

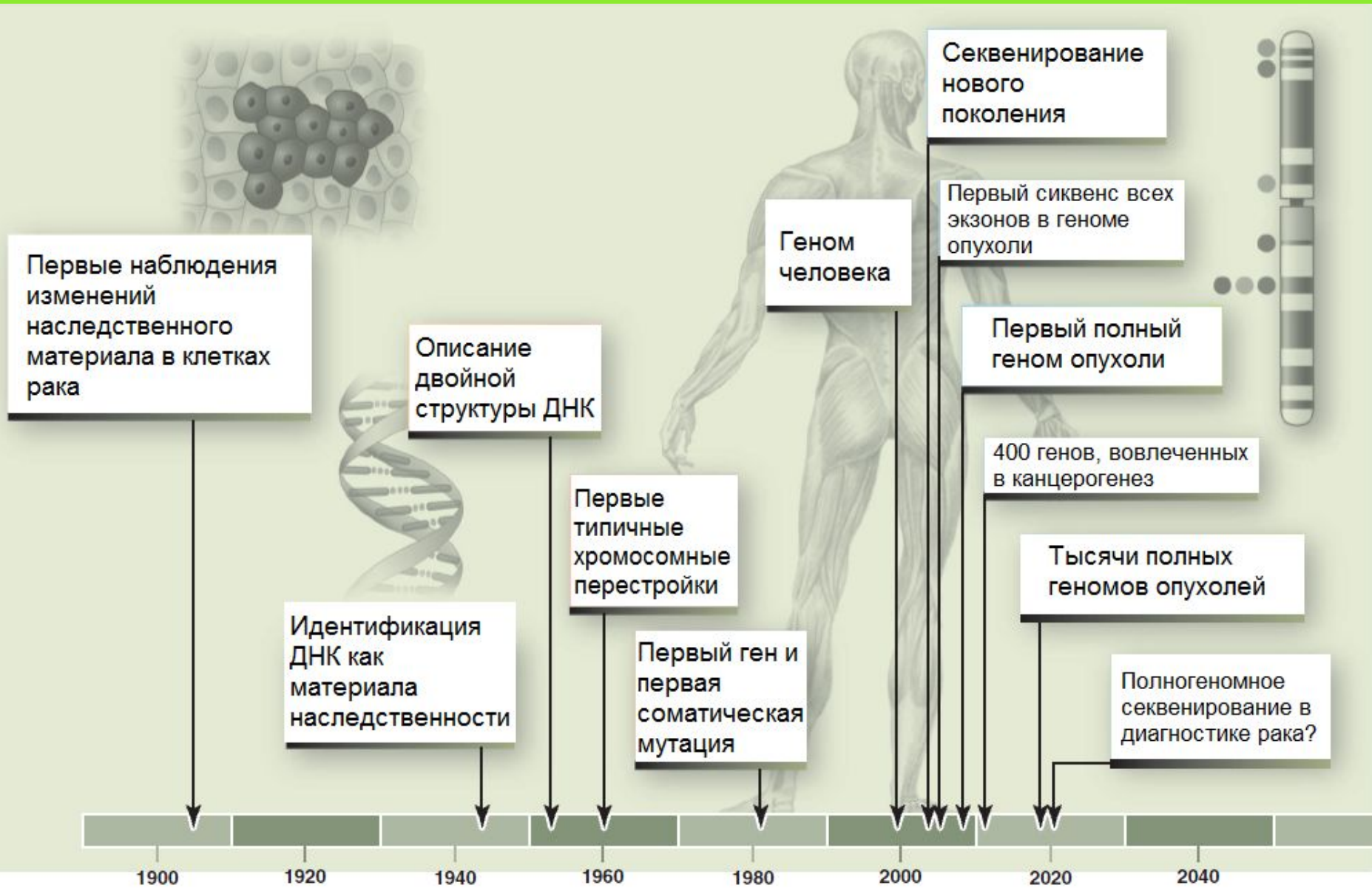
- Сколько, какие, где, когда, почему в опухоли:

- 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

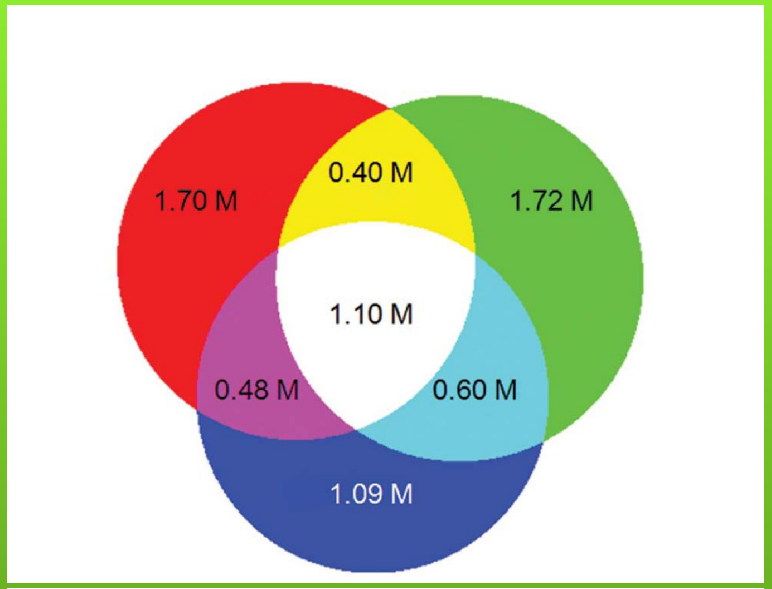
Соматические мутации в опухоли: драйверные и пассажирские

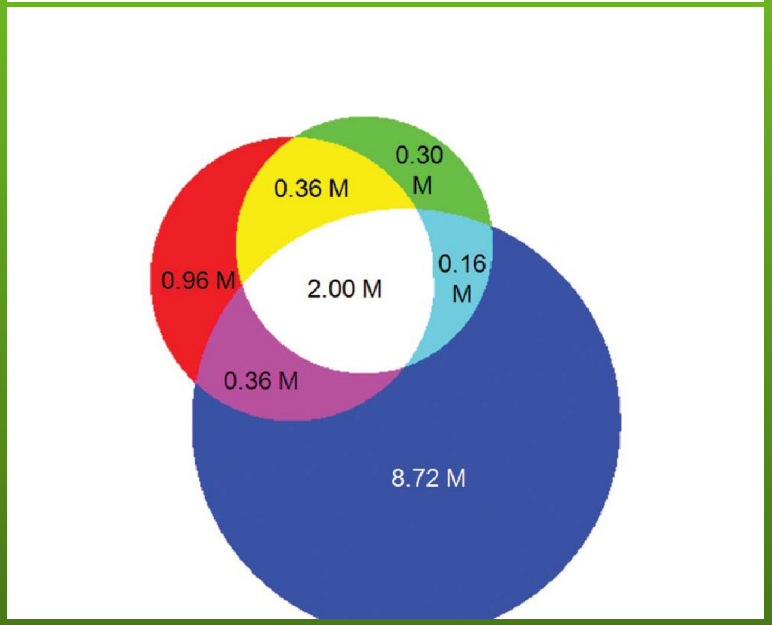
- Драйверные мутации возникают в ключевых генах контроля пролиферации, дифференцировки, апоптоза, поддержания гомеостаза в тканевом микроокружении и нарушают соответствующие процессы
- По определению, драйверными являются мутации в генах, вовлеченных в канцерогенез (Hanahan, Weinberg, 2000)

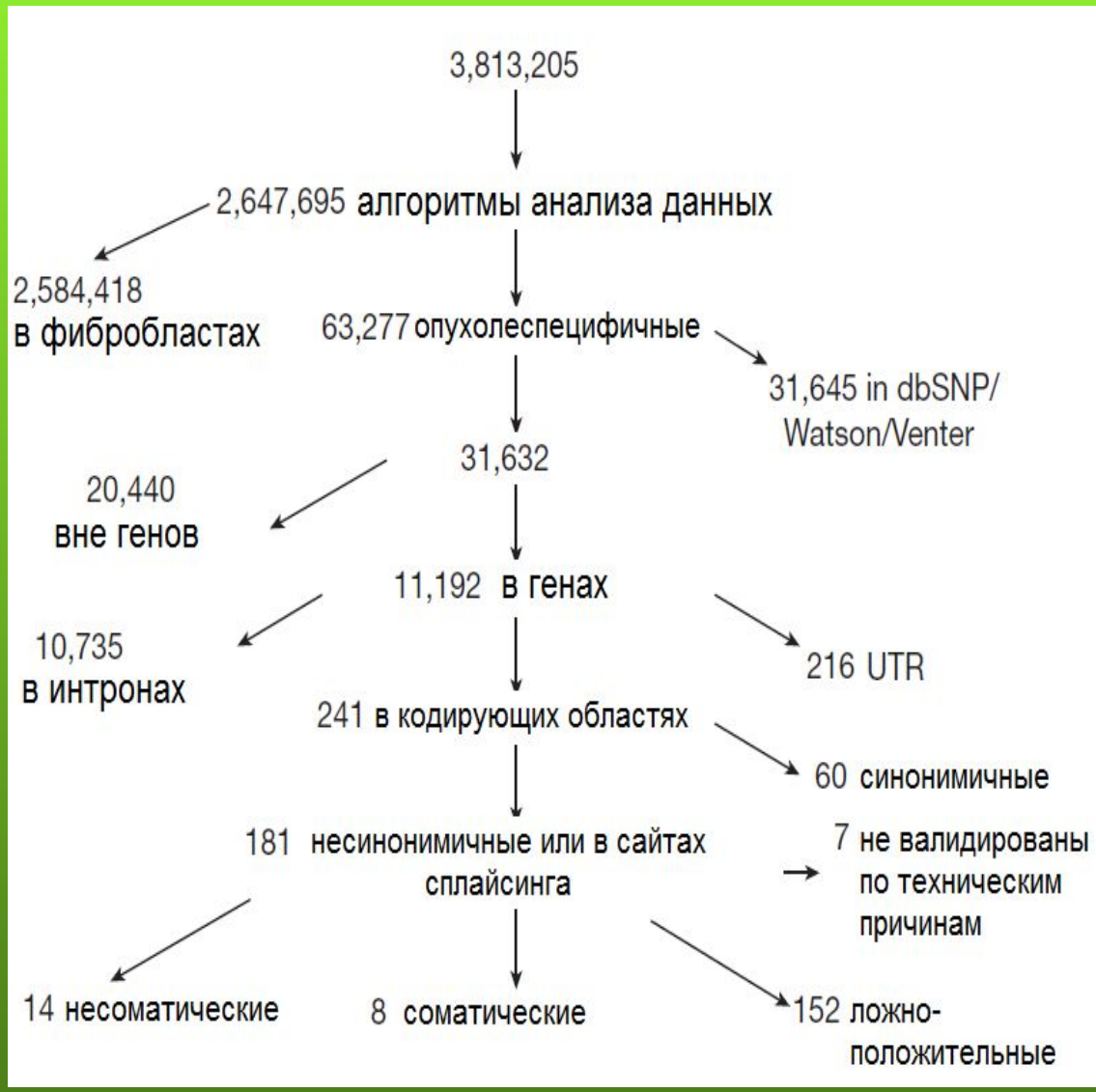
Соматические мутации в опухоли: драйверные и пассажирские

- 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

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-200c – устойчивость к таксанам**
- **Экспрессия miR-221/222 – устойчивость к тамоксифену, фулвестранту**

Методы анализа метилирования

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

   аналитическая чувствительность - 1: 2000

2. Метилспецифическая ПЦР

   Трансформация цитозина в урацил бисульфитом Na

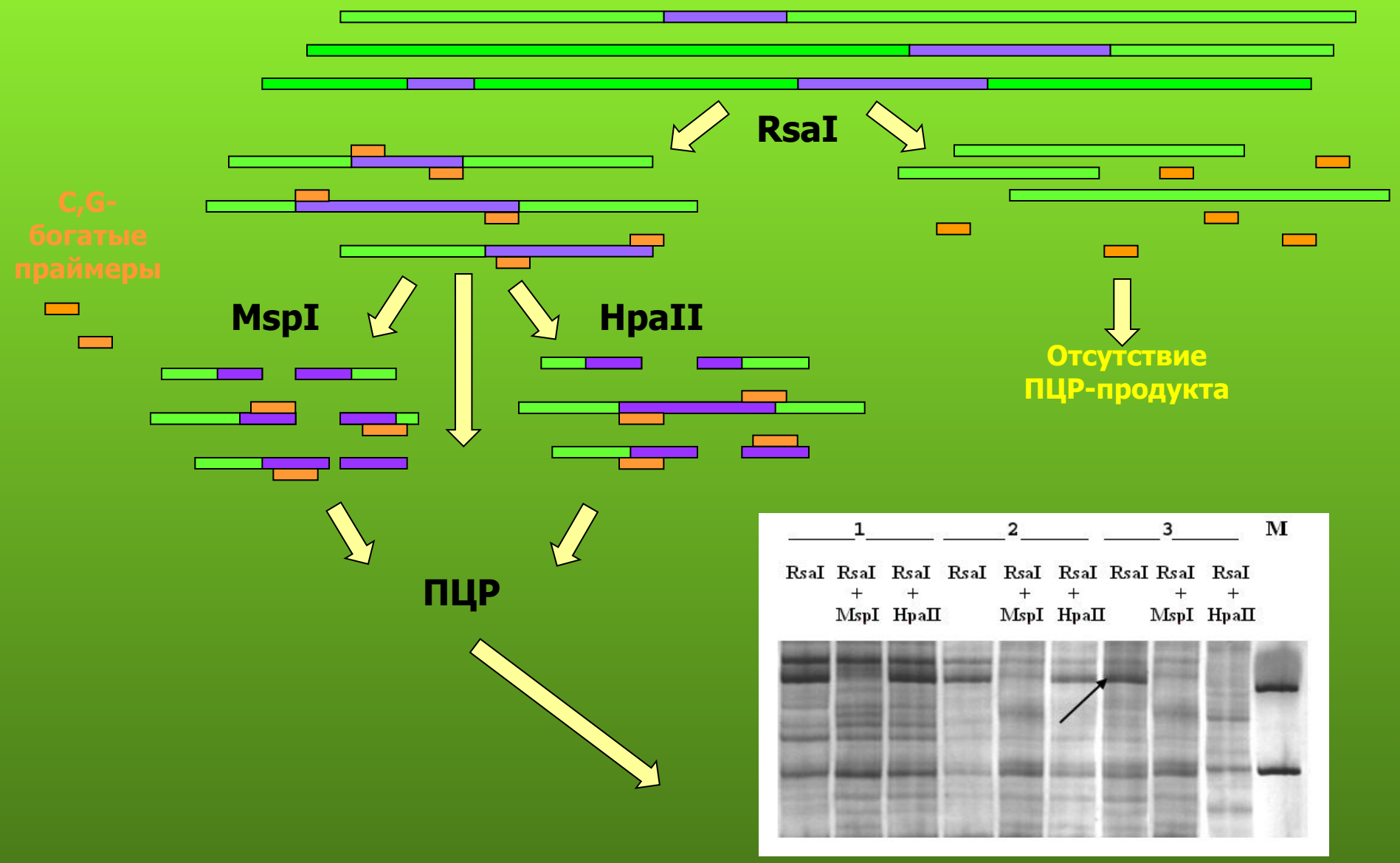
   аналитическая чувствительность - 1: 1000

3. MethylLight – метилспецифическая ПЦР в реальном времени

   аналитическая чувствительность - 1: 10000

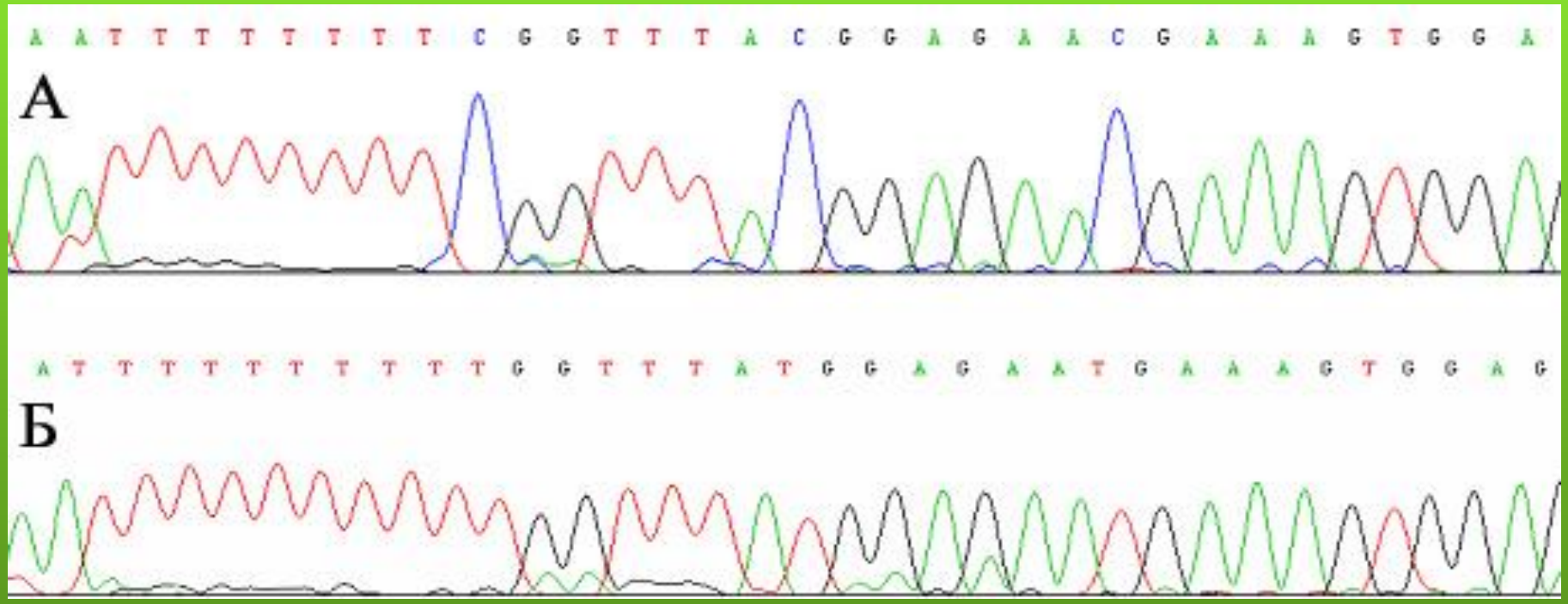
4. Метилспецифическое секвенирование
5. Биологические микрочипы

Принцип метода метилчувствительного фингерпринтинга



Молекулярная патология гена *BIN1* при РМЖ: метилирование

Метилспецифическое секвенирование



Результаты метилспецифического секвенирования фрагмента промоторного CpG-островка гена *BIN1*. А – метилированная последовательность, в качестве матрицы использована ДНК из клеточной линии MCF7; Б – неметилированная последовательность (ДНК из нормальной ткани молочной железы).

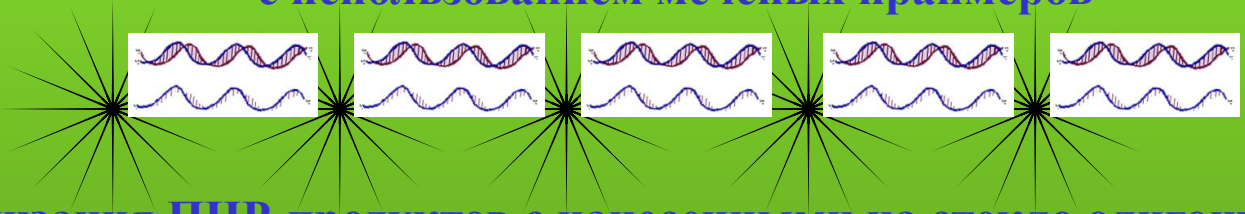
УЧАСТИЕ В КАНЦЕРОГЕНЕЗЕ НЕКОТОРЫХ ИЗ ВЫЯВЛЕННЫХ ГЕНОВ

Ген	*Комментарии*
LAMB1	**Влияет на миграционное поведение опухолевых клеток, инвазию, метастазирование**
ATMIN	**Нарушение в В-клеточных лимфомах ATM-сигналинга, участвующего в активации P53 и, следовательно, остановке клеточного цикла при двуцепочечных разрывах ДНК**
FOXM1/ HKMT1188 **(C12orf32)**	**Нарушение пути активации киназы ATR, которая зондирует повреждения ДНК, что приводит к аресту клеточного цикла**
	Супрессирует клеточный рост опосредованно, через РНК интерференцию, возможно, приводя к ингибированию G1/S транзиции и последующей клеточной смерти
SH3KBP1	**SH3KBP1 вызывает ингибирование эндоцитоза EGFR и, таким образом, усиливает EGFR-сигналлинг, который может приводить к снижению чувствительности клеток опухоли к химиотерапевтическим препаратам**

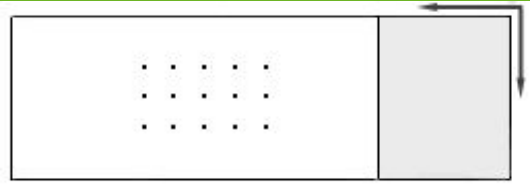
Схема анализа метилирования с использованием биологических микрочипов

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

	MGMT	*RASSF1*	*GSTP1*	*RARβ*	*CDKN2A*	Совокупная расчетная частота	*ING*
Рак молочной железы	8	58	24	38	56	92	0
Рак предстательной железы	78	84	98	88	60	100	0
Немелкоклеточ-ный 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

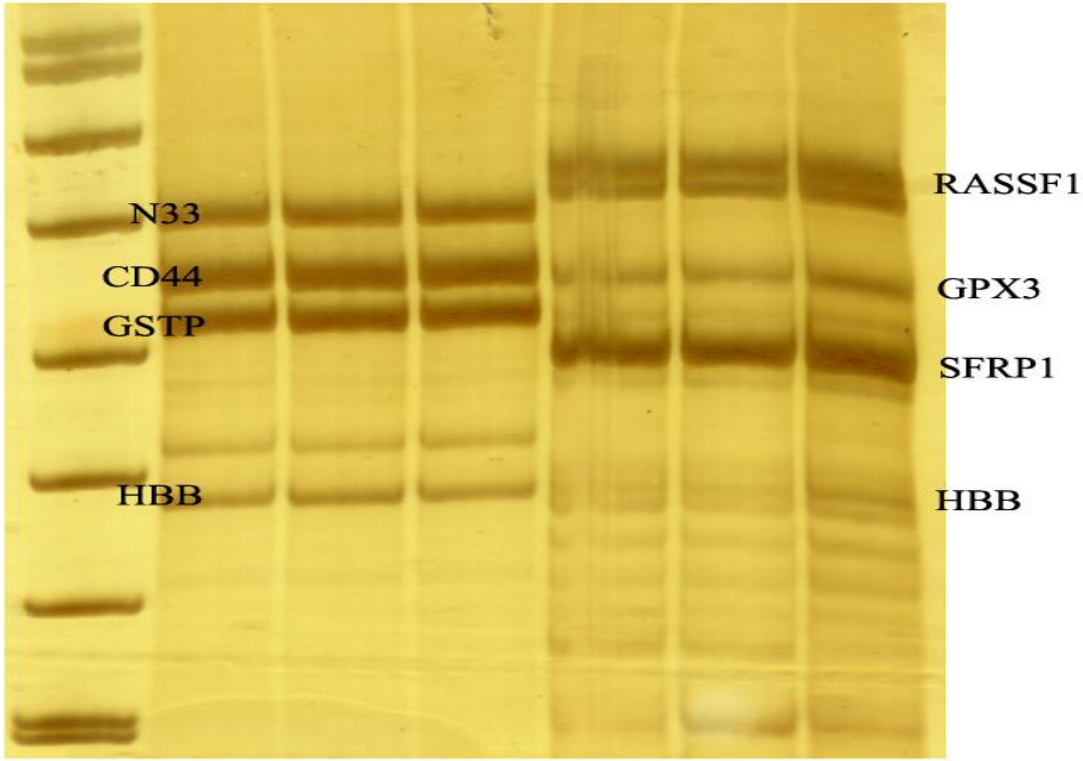
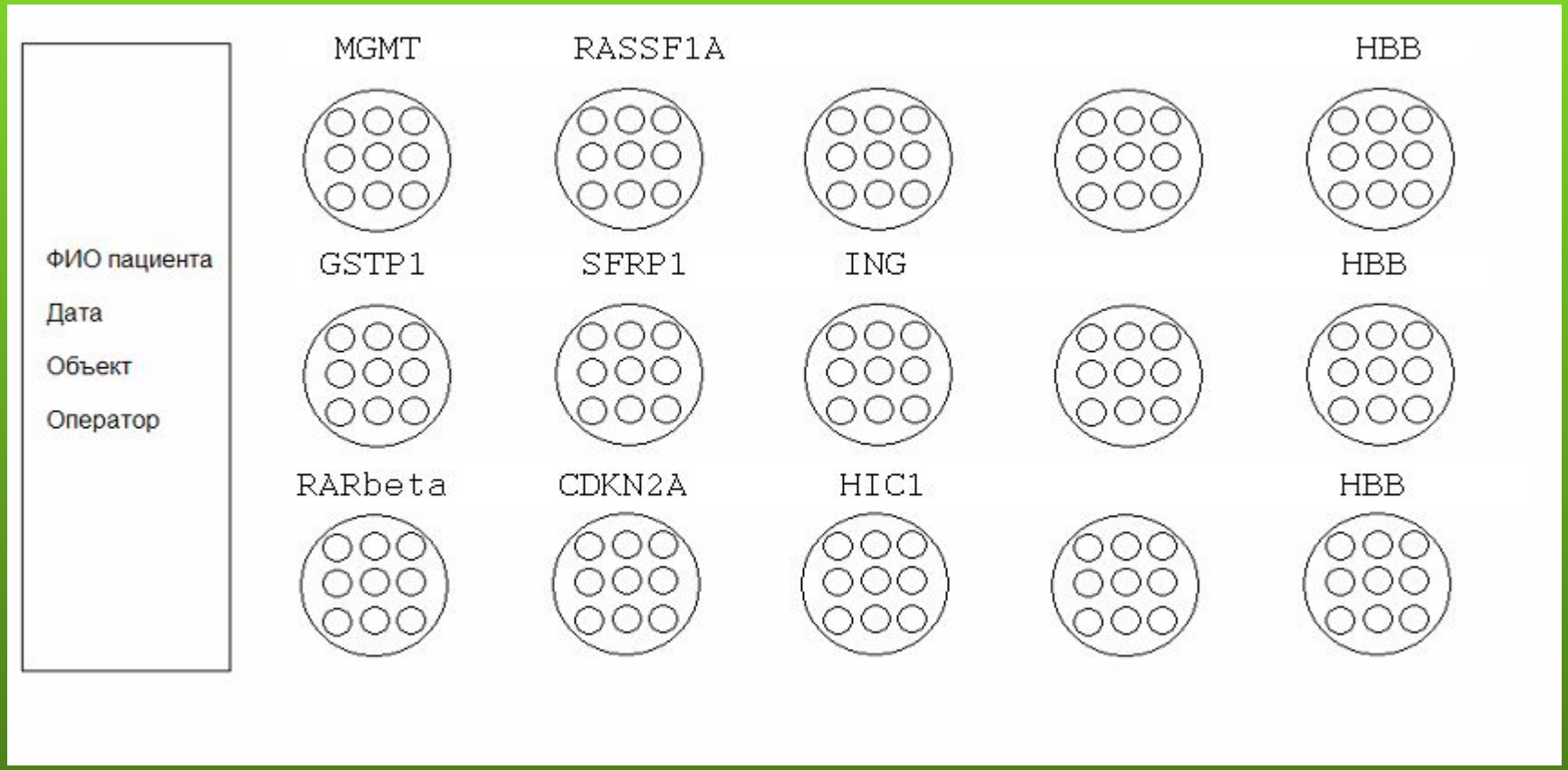
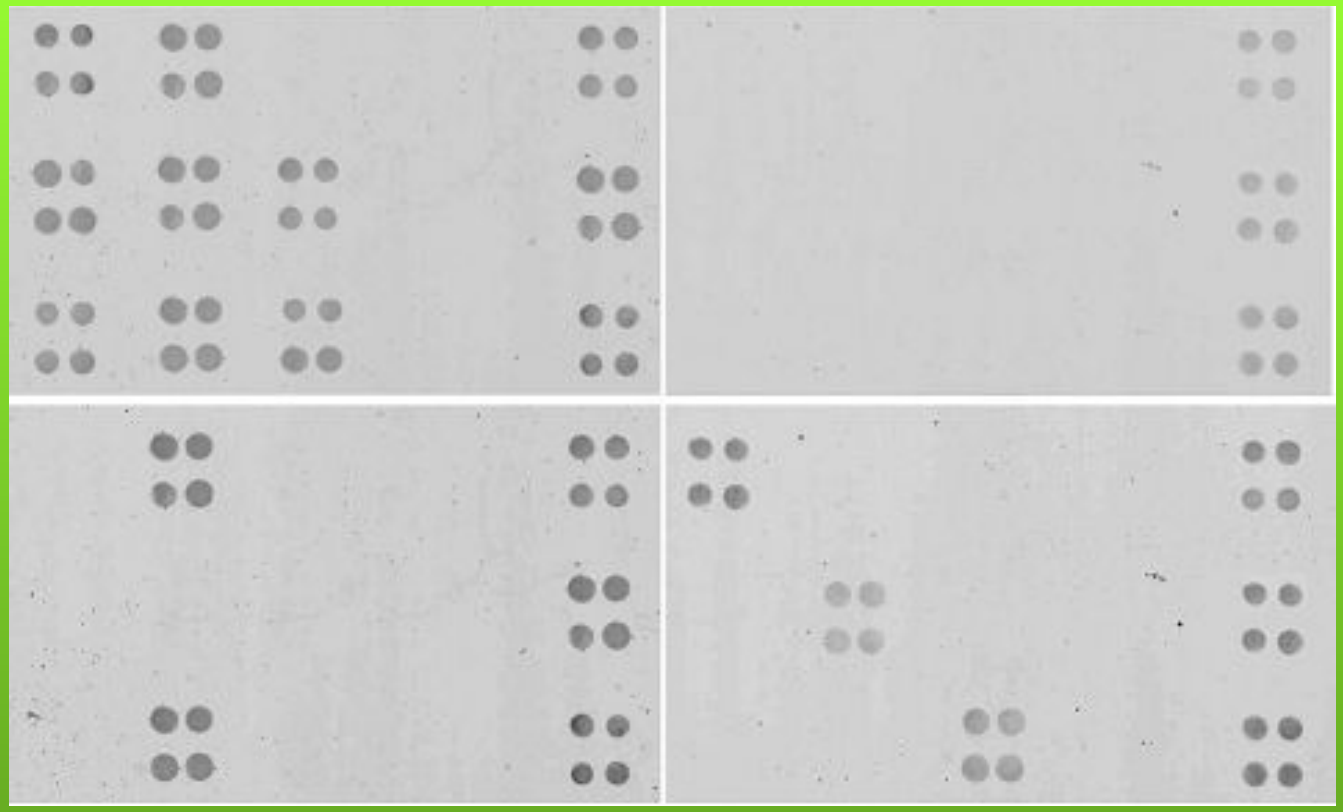
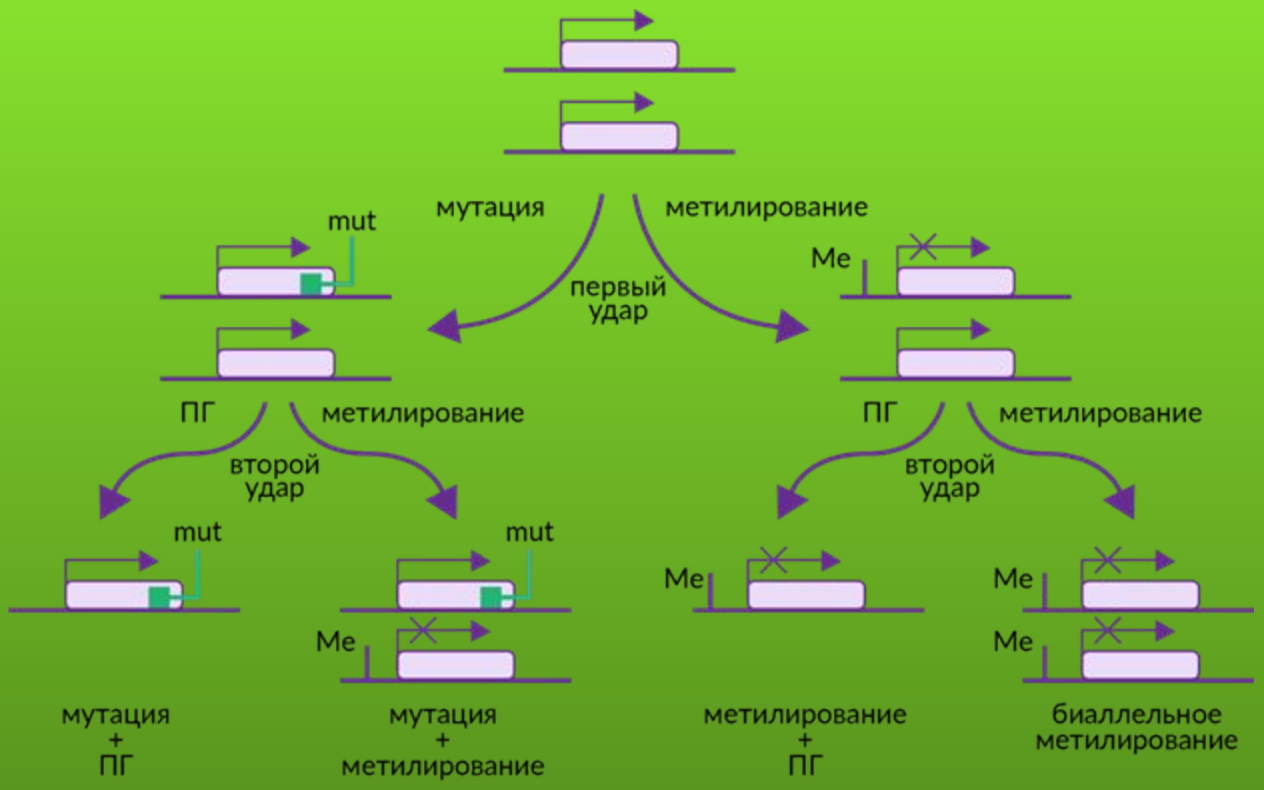


Схема чипа для определения метилирования генов, вовлеченных в канцерогенез

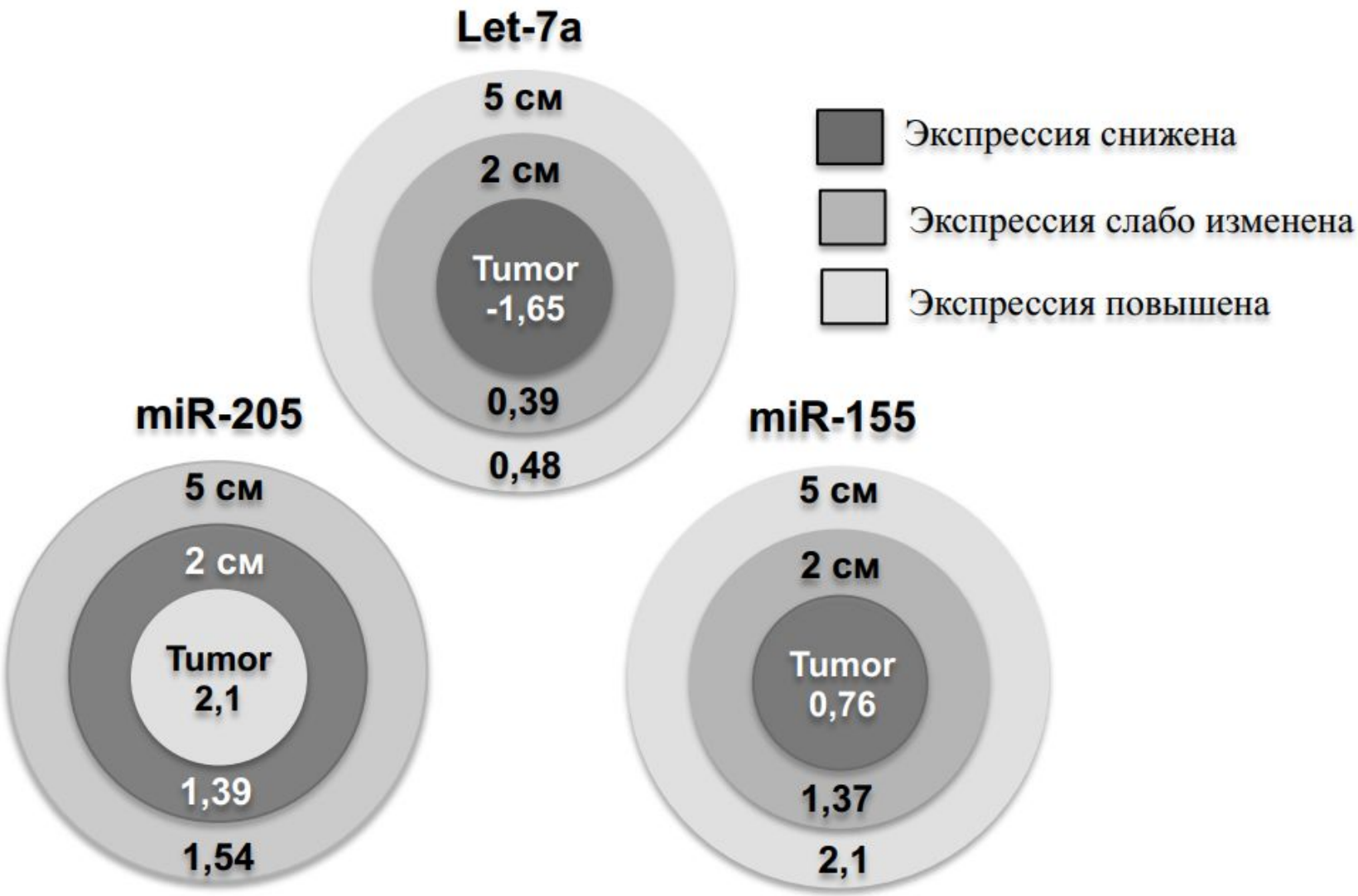




Примеры анализа образцов клинического материала с применением микрочипа низкой плотности для анализа метилирования. Вверху слева: гибридизация ПЦР-продуктов, полученных с интактной геномной ДНК (видны сигналы гибридизации во всех используемых позициях); вверху справа: гибридизация продуктов метилчувствительной 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*.


мутация
метилирование
первый удар
mut
Me
ПГ
метилирование
второй удар
ПГ
метилирование
второй удар
mut
mut
Me
Me
Me
мутация + ПГ
мутация + метилирование
метилирование + ПГ
биаллельное метилирование

Среднее значение экспрессии let-7a, miR-155, miR-205 в образцах рака легкого



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

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

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

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 *PCDHB* и *BLU*, ассоциировано с плохой выживаемостью пациентов с нейробластомой, вне зависимости от амплификации *N-myc*.

микроРНК – регуляторы различных процессов

микроРНК	изменение в опухоли	гены-мишени	процессы
miR-21	↑	BCL2, TPM1, PDCD4, PTEN, MASPIN, RHOB, MMP3	апоптоз, инвазия, метастазы
miR-155	↑	FOXO3A, SOCS1, RHOA	пролиферация, TGF-b 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

Лекарственные средства для аномальных эпигенетических событий

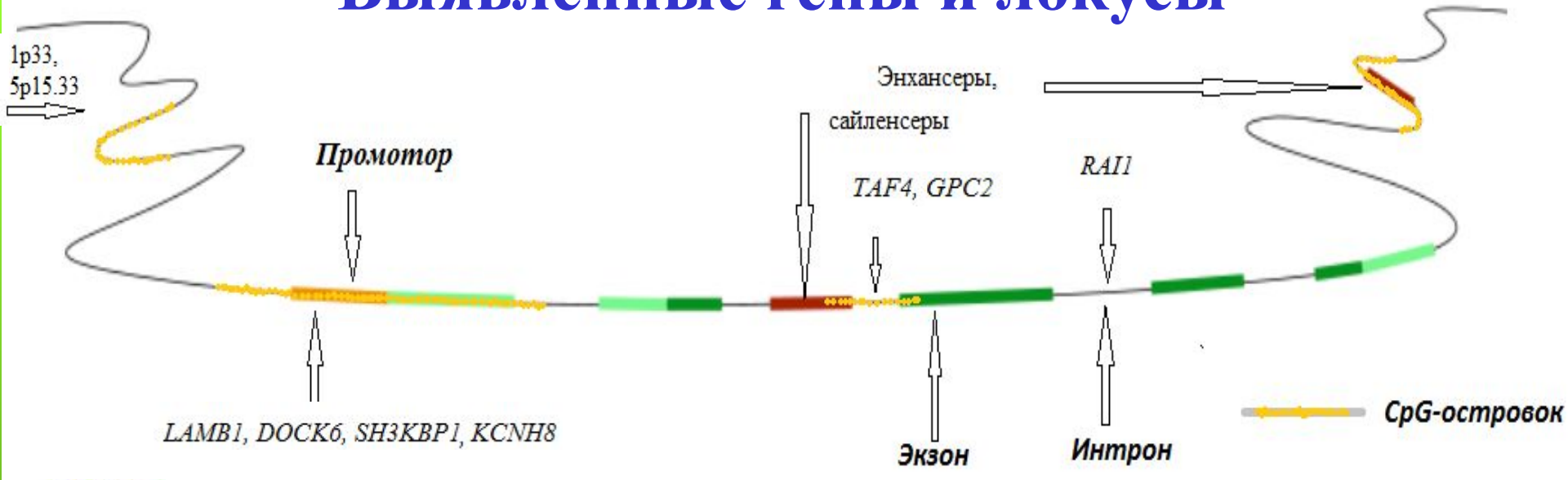
Ингибиторы ДНК-метилтрансфераз

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

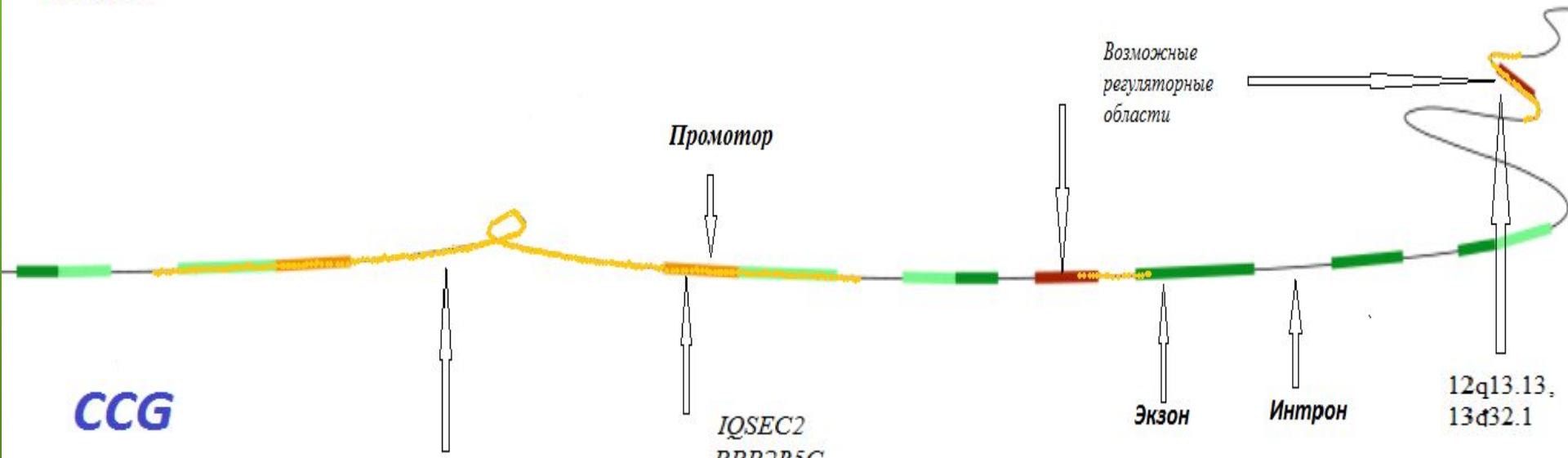
Ингибиторы гистондеацетилаз

Apicidin	
Butyrates	Phenylbutyrate
m-Carboxycinnamic acid bishydroxamide	CBHA
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	

Выявленные гены и локусы



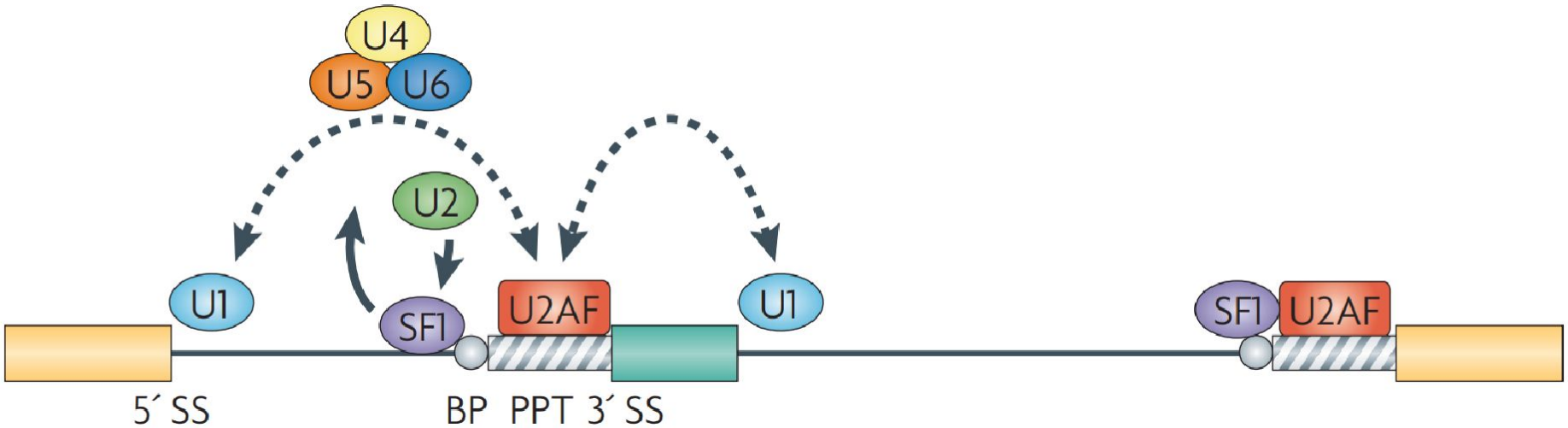
GCG

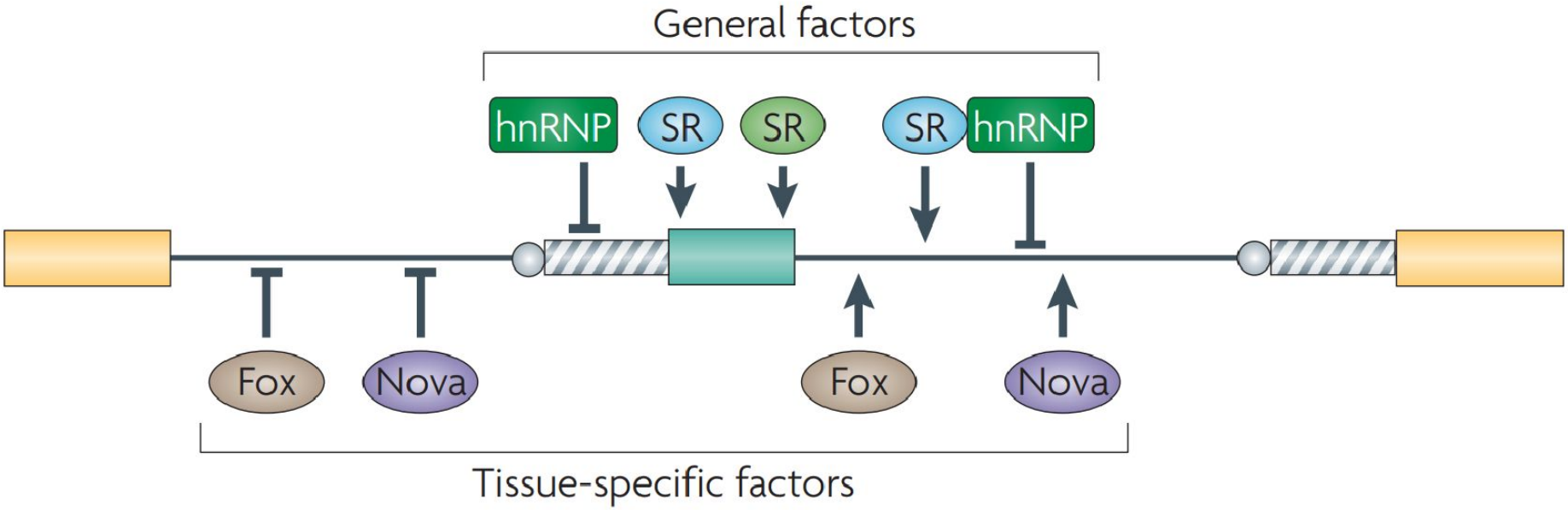


CCG

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

IQSEC2
PPP2R5C,
PHF15
ATMIN,
C2CD2,
KIAA1324L


U4
U5
U6
U2
U1
SF1
U2AF
U1
SF1
U2AF
5´ SS
BP
PPT
3´ SS


General factors
hnRNP
SR
SR
SR
hnRNP
Fox
Nova
Fox
Nova
Tissue-specific factors