

© Д. В. Залетаев,  
В. В. Стрельников, Т. В. Кекеева,  
В. В. Землякова, Е. Б. Кузнецова,  
Д. С. Михайленко

Медико-генетический научный  
центр РАМН, Москва

✿ В статье рассматриваются эпигенетические дефекты, происходящие в опухолевых клетках. Аномальное метилирование CpG-островков в промоторных и регуляторных районах генов приводит к их функциональной инактивации, подобно структурной делеции. Гены-супрессоры опухолевого роста инактивируются таким образом практически во всех типах злокачественных опухолей. Опухоли различаются по спектру генов и частотам метилирования. Аномальное метилирование генов-супрессоров появляется на самых ранних этапах канцерогенеза и позволяет осуществлять пресимптоматическую и неинвазивную диагностику злокачественных новообразований.

✿ **Ключевые слова:** гены-супрессоры; метилирование ДНК; рак молочной железы; рак предстательной железы; рак почки; интраэпителиальная неоплазия шейки матки.

Поступила в редакцию 15.09.2010.  
Принята к публикации 28.07.2011.

## АНОМАЛИИ МЕТИЛИРОВАНИЯ В ПРОЦЕССАХ КАНЦЕРОГЕНЕЗА: ПОИСК НОВЫХ ГЕНОВ, РАЗРАБОТКА МЕТОДОВ И СИСТЕМ ДНК-МАРКЕРОВ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ

### РОЛЬ МЕТИЛИРОВАНИЯ ДНК В КАНЦЕРОГЕНЕЗЕ

В настоящее время установлено, что не только генетические факторы могут определять развитие патологического процесса, но и, так называемые, эпигенетические факторы — наследственные и ненаследственные изменения в экспрессии конкретного гена без каких-либо соответствующих структурных изменений в его нуклеотидной последовательности. В качестве причин возникновения онкологических заболеваний большая роль отводится эпигенетической регуляции активности генов, основанной на аномальном метилировании/деметиловании (рис. 1). Во всех без исключения исследованных неопластических клетках был показан дисбаланс метилирования. Сочетанно с гипометилированием генома происходит аномальное метилирование CpG-островков в промоторных районах генов, участвующих в регуляции клеточного цикла, что приводит к их полной инактивации. Так же метилируются гены, участвующие в апоптозе, ангиогенезе, дифференцировке, репарации ДНК, метастазировании, передаче сигнала, детоксикации, лекарственной резистентности и др. Таким образом, при отсутствии каких-либо структурных изменений нуклеотидной последовательности гена, он полностью теряет свою активность (Залетаев и др., 2010).

Метилирование является обратимой ковалентной модификацией ДНК, когда цитозиновый остаток в CG-динуклеотиде метилируется в позиции N5 пиримидинового кольца. Метилирование осуществляется с помощью ферментов ДНК-метилтрансфераз, которые переносят метильную группу S-аденозилметионина. Такая модификация является единственно допустимой в физиологических условиях химической модификацией ДНК у позвоночных и стабильно поддерживается в ряду клеточных делений. CpG-островки промоторных районов в нормальных тканях не метилированы, что свидетельствует о функционально нормальном состоянии гена. Механизмы значительных изменений картины метилирования ДНК в опухолях только начинают исследовать. К сегодняшнему дню детально описана картина метилирования не более 0,1 % генома. Знание эпигенетических нарушений в опухолевых клетках исключительно важно с точки зрения понимания этиологии новообразований, а также, учитывая обратимость эпигенетических изменений, для разработки новых эпигенетических подходов к терапии опухолей.

Исследования эпигенетической регуляции экспрессии генов в онкологии сейчас приобрели особенно большой вес, причем, как научный, так и практический. Для некоторых генов показано, что именно метилирование как одного, так и обоих аллелей является причиной развития опухоли. Аномальное метилирование/деметилование может служить диагностическим и прогностическим маркером, а также позволяет дифференцировать определенные типы опухолей. Характеристика профиля метилирования генов в различных тканях и типах опухолей вносит существенный вклад в понимание процессов дифференцировки тканей и канцерогенеза. Существующие методические подходы (метил-чувствительная ПЦР (МЧ-ПЦР), метил-специфическая ПЦР (МС-ПЦР) и метил-специфическое секвенирование) позволяют проводить экспресс-анализ и в операционном материале опухоли, и в лимфоцитах

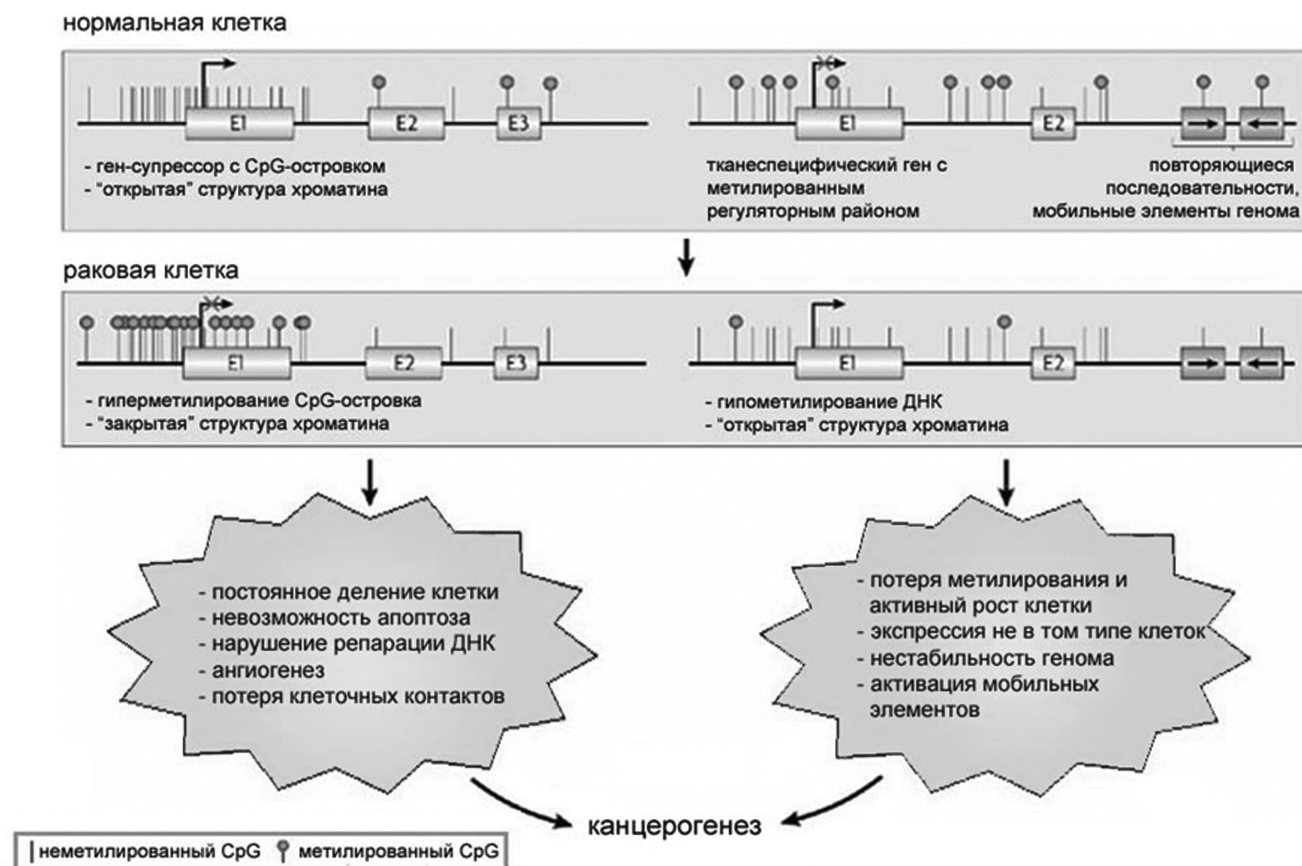


Рис. 1. Изменение метилирования генома в процессе канцерогенеза

крови, что имеет большое значение для выбора тактики лечения конкретного больного.

Анализ метилирования промоторных районов генов, вовлеченных в канцерогенез, посредством указанных подходов, имеет ряд преимуществ по сравнению с традиционными молекулярно-генетическими методами: однозначность и легкость интерпретации результатов, возможность поставить диагноз в течение 2–3 дней, технологическая эффективность и низкая себестоимость (Стрельников и др., 2009).

В связи с тем, что частота онкопатологии постоянно растет, а возраст манифестации заболевания уменьшается, большую актуальность приобретает проспективная диагностика онкопатологии (до явной манифестации) в рамках ежегодных диспансеризаций и в группах риска. Мониторинг молекулярных маркеров, которые обнаруживаются задолго до клинических признаков, позволяет вовремя начать более тщательную диагностику и превентивную терапию. В пользу того, что аномальное метилирование является одним из наиболее ранних событий в геноме трансформированной клетки, свидетельствует обнаружение метилирования гена *P16* в гиперплазированном эпителии бронхолегочной системы, а метилирование в мокроте может свидетельствовать о возникновении рака легких задолго до клинических проявлений

(3–5 лет). Проспективная неинвазивная диагностика основана на исследовании ДНК из биологических жидкостей организма. Наличие аномального метилирования генов-супрессоров опухолевого роста, микросателлитной нестабильности, потери гетерозиготности по определенным хромосомным районам и мутаций ряда онкогенов в плазме крови с высокой вероятностью свидетельствует о возникновении злокачественного процесса (Залетаев и др., 2009).

#### ПОИСК И ХАРАКТЕРИСТИКА НОВЫХ МАРКЕРОВ МЕТИЛИРОВАНИЯ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Проводится поиск новых генов, подверженных эпигенетической регуляции, в различных типах опухолей. Нами разработан метод поиска дифференциально метилированных районов генома — метилчувствительный фингерпринтинг. При использовании этого метода обнаружено 7 генов — *SEMA6B*, *BIN1*, *VCP1P1*, *LAMC3*, *KCNH2*, *CACNG4* и *PSMF1*, подвергающихся аномальной эпигенетической регуляции при раке молочной железы (РМЖ), что было показано впервые (Кузнецова и др., 2007). Определены частоты метилирования промоторных областей для каждого из выявленных генов. Зна-

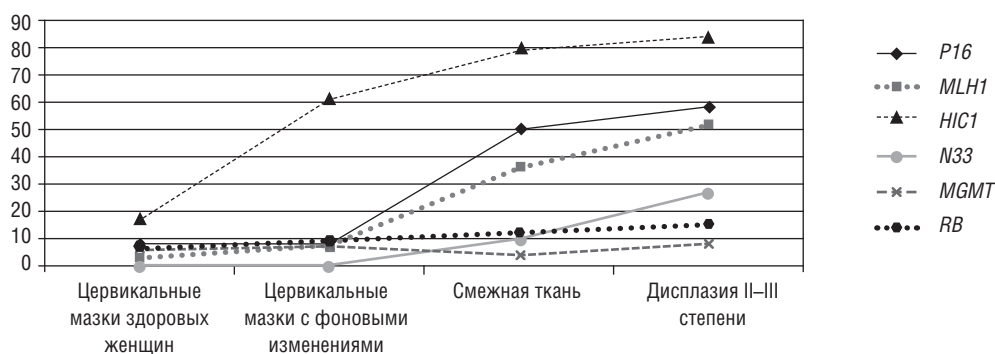


Рис. 2. Динамика изменения частот метилирования ряда генов от воспалительных до предраковых состояний шейки матки

чимые частоты аномального метилирования показаны для генов *SEMA6B*, *BIN1*, *LAMC3* (38 %, 18 % и 8 % соответственно). Функциональные нарушения генов *SEMA6B* и *LAMC3* выражены в наибольшей степени, что позволяет рекомендовать включение этих генов в системы диагностических маркеров канцерогенеза при РМЖ. Проведено тонкое картирование метилирования CpG-островков генов с наиболее высокими частотами метилирования, что создает фундаментальную базу для разработки эффективных тест-систем анализа метилирования указанных генов.

#### РАЗРАБОТКА СИСТЕМЫ ЭПИГЕНЕТИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ ДЛЯ РАННЕЙ ДИАГНОСТИКИ РАКА ШЕЙКИ МАТКИ

Нами исследовано метилирование генов *P16*, *MLH1*, *HIC1*, *MGMT*, *RB1* и *N33* в образцах дисплазий II–III степеней и смежных с ними морфологически неизменных тканей шейки матки (рис. 2). Так же было изучено метилирование этих генов в образцах цервикальных мазков, взятых у женщин с воспалительными изменениями шейки матки и в образцах цервикальных мазков женщин, не имеющих гинекологической патологии. При воспалительных изменениях шейки матки метилирование изучаемых генов не меняется по сравнению с образцами, полученными от женщин без гинекологической патологии.

Высокая частота гиперметилирования определена для генов *P16* (58 %), *MLH1* (51 %), *HIC1* (84 %) и *N33* (27 %) при диспластических процессах II–III степеней. В образцах ткани шейки матки, смежной с дисплазией, но морфологически не отличающейся от нормы, выявлены частоты метилирования, близкие к частотам диспластических образцов (*P16* — 50 %; *MLH1* — 36 %; *HIC1* — 79 %; *N33* — 10 %; *MGMT* — 4 %; *RB1* — 12 %). Достоверных различий между частотами метилирования этих генов при диспластических процессах и в морфологически неизменной ткани не

обнаружено. Высокий уровень метилирования в морфологически неизменной ткани указывает на то, что молекулярные методы являются более строгим контролем наличия или отсутствия злокачественных изменений в тканях, чем цитологический.

Для оценки диагностической значимости выбранных маркеров метилирования (генов *P16*, *MLH1* и *N33*) была рассчитана чувствительность и специфичность такой системы. Наибольшая чувствительность определена для гена *P16* — 54 %, а наибольшая специфичность — для гена *N33* — 100 %, его метилирование выявлено только в образцах дисплазии II–III степеней (27 %) и в смежной с ней ткани (10 %). Система маркеров из 3 генов имеет чувствительность и специфичность 85 % (Кекеева и др., 2006).

Результаты показывают, что исследование гиперметилирования генов-супрессоров вместе с цитологическим исследованием и тестированием вируса папилломы человека может служить основой для мониторинга женщин с высоким риском развития рака шейки матки.

#### КЛИНИЧЕСКИ ЗНАЧИМЫЕ МАРКЕРЫ МЕТИЛИРОВАНИЯ ПРИ РАКЕ ПРЕДСТАТЕЛЬНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Анализ метилирования промоторных областей генов *P16*, *HIC1*, *N33* и *GSTP1* проведен на опухолевом материале, полученном в результате лазерной микродиссекции, от пациентов с диагнозами: аденокарцинома, простатическая интраэпителиальная неоплазия (ПИН), доброкачественная гиперплазия предстательной железы (ДГПЖ) и аутопсийном материале нормальной железы. Высокие частоты метилирования были установлены для аденокарциномы: *HIC1* — 89 %; *P16* — 78 %, *GSTP1* — 100 %, *N33* — 33 %. Похожие частоты показаны для ПИН высокой степени: *HIC1* — 71 %; *P16* — 57 %, *GSTP1* — 71 %, *N33* — 33 %. В близлежащей строме практически во всех анализируемых образцах показано наличие метилирования, кроме гена *N33*. Для генов *N33*

и *GSTP1* показано статистически достоверное отличие между группами пациентов с ПИН и пациентов с аденокарциномами. Использование системы прогностических маркеров метилирования, в частности генов *N33* и *GSTP1*, как дополнительного метода к гистологическому исследованию, может помочь в диагностике и прогнозе РПЖ (Кекеева и др., 2007).

Для оценки возможности неинвазивной диагностики проведен анализ метилирования генов *P16*, *CD44*, *CADH*, *N33* и *GSTP* в образцах плазмы крови пациентов с РПЖ и пациентов с ДГПЖ. Метилирование гена *GSTP1* у пациентов с ДГПЖ не обнаружено, в то же время для пациентов с аденокарциномой частота метилирования гена *GSTP1* в плазме составила (28 %) ( $p = 0,05$ ). В плазме пациентов с ДГПЖ метилирование гена *P16* не выявлено, тогда как частота метилирования этого гена в плазме пациентов с аденокарциномой составила 19 %. Гиперметилирование генов *CD44* и *CADH* обнаружено в 32 % и 33 % образцов плазмы пациентов с РПЖ, схожая частота метилирования выявлена для гена *N33* (30 %). Для гена *GSTP1* обнаружены достоверные различия в плазме между пациентами с предраковыми состояниями и РПЖ, чувствительность маркера составляет 28 %.

#### ХАРАКТЕРИСТИКА ЭПИГЕНЕТИЧЕСКИХ НАРУШЕНИЙ ПРИ РАКЕ ПОЧКИ И РАЗРАБОТКА ПРОТОКОЛА МОЛЕКУЛЯРНОЙ ДИАГНОСТИКИ

Возникновение опухолей почки связано с инактивацией генов-супрессоров, в значительной доле случаев обусловленной аномальным метилированием. Нами исследовано метилирование генов *VHL*, *RASSF1*, *FHIT*, *CDH1* и *SFRP1* в образцах рака почки методами метилчувствительной ПЦР и бисульфитного секвенирования с целью поиска диагностических и прогностических критериев этого заболевания. Аномальное метилирование *VHL* было выявлено в 14,2 %, *RASSF1* — 52,8 %, *FHIT* — 54,3 %, *CDH1* — 41,7 % и *SFRP1* — 33,1 %. Метилирование *RASSF1* достоверно чаще присутствует при степени дифференцировки *G2*, чем при *G1* ( $P = 0,047$ ). Метилирование как минимум одного из исследованных генов обнаружено в 85,0 % исследованных образцов. Диагностическая чувствительность системы маркеров, состоящей из генов *VHL*, *RASSF1* и *FHIT*, в плазме крови составила 44 %, диагностическая специфичность — 85 %. Полученные результаты могут служить основой для выбора оптимальных диагностических маркеров метилирования при раке почки (Михайленко и др., 2010).

Разработан протокол анализа структурных и функциональных аномалий гена *VHL*, который может быть использован в клинической практике для оценки эффективности таргетной терапии заболевания Сорафенибом (Нексаваром).

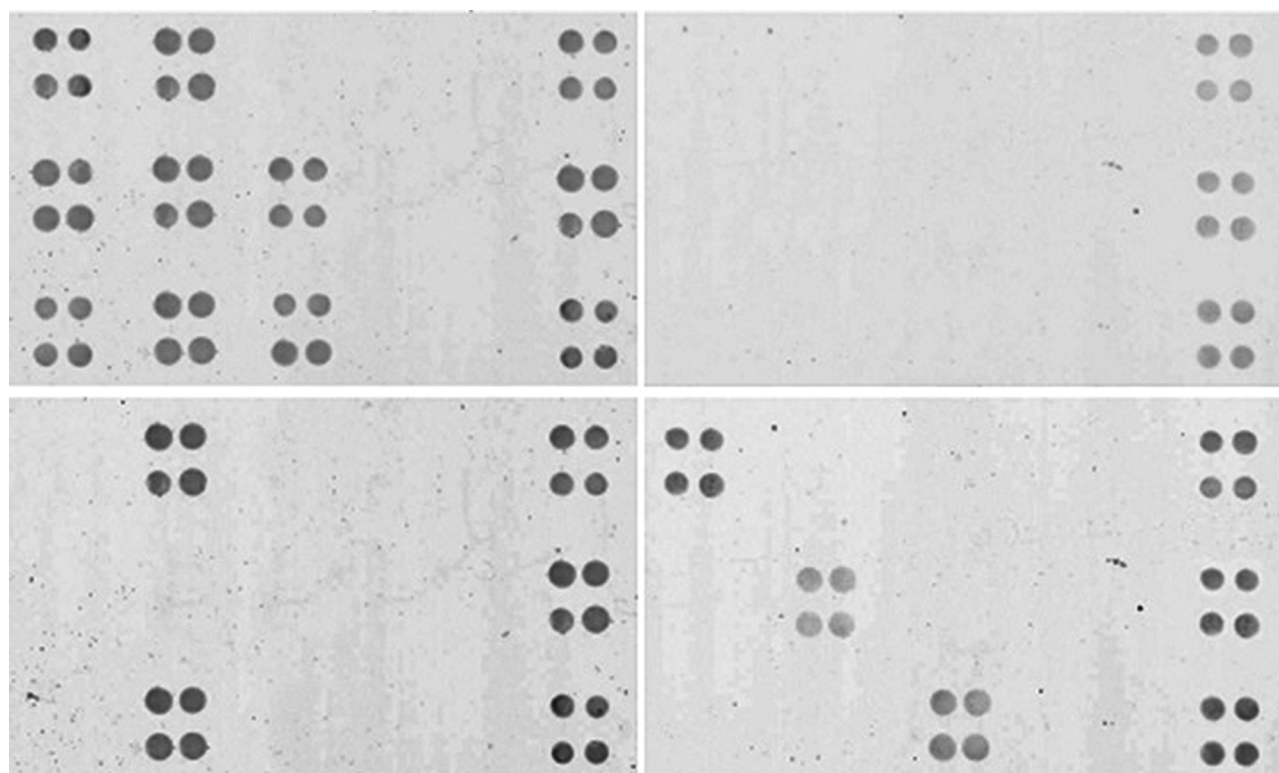
#### РАЗРАБОТКА БИОЛОГИЧЕСКИХ МИКРОЧИПОВ ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ АНОМАЛЬНОГО МЕТИЛИРОВАНИЯ ГЕНОВ В ПРОЦЕССАХ КАНЦЕРОГЕНЕЗА

Особую актуальность приобретает разработка новых методов крупномасштабного и высокопроизводительного анализа метилирования ДНК, с помощью которых можно одновременно анализировать характер метилирования множества генов в нескольких биологических образцах в ходе одного эксперимента. Нами разработана стратегия создания биологических микрочипов для диагностики аномального метилирования в опухолях. Микрочипы низкой плотности удовлетворяют практически всем требованиям, необходимым для использования в практической диагностике. Результаты, получаемые с помощью чипов низкой плотности, отличаются высокой степенью точности и достоверности. Высокая чувствительность при этом обеспечивается возможностью применения ПЦР для обогащения исследуемого материала таргетными фрагментами ДНК. Специфичность значительно повышается с уменьшением количества зондов, наносимых на микрочип, вследствие снижения количества высоко гомологичных фрагментов, склонных к перекрестной гибридизации. Воспроизводимость результатов достигается как значительным повышением чувствительности и специфичности, так и упрощенной процедурой выполнения анализов и детекции результатов. При этом в полной мере сохраняется возможность одновременного анализа множества параметров (по крайней мере, такого их количества, которое достаточно для проведения эффективной диагностики конкретного заболевания), а стоимость работ на всех этапах производственного цикла значительно снижается. Нами разработана система определения наиболее часто метилируемых в большинстве типов опухолей промоторов генов: *MGMT*, *RASSF1*, *GSTP1*, *RARβ*, *CDKN2A*, *SFRP1* и *HIC1* (рис. 3). Частоты метилирования указанных промоторов, определены по результатам собственных исследований (Стрельников и др. 2008).

#### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Метилирование ДНК является ценным биомаркером для диагностики рака, потому что: 1) значительное количество генов, вовлеченных в канцерогенез, инактивируется посредством метилирования; 2) метилирование генов, вовлеченных в канцерогенез, не наблюдается в ДНК из нормальных тканей; 3) метилирование генов может быть определено в сыворотке крови, в других биологических жидкостях организма и соответствует профилю метилирования ДНК, выделенной из соответствующей опухоли; 4) исследования подтверждают, что метилирование является одним из





**Рис. 3.** 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*

наиболее ранних событий в канцерогенезе; 5) исследования показывают, что метилирование ДНК, как биомаркер, является высоко специфичным и чувствительным; 6) разработаны эффективные методы, позволяющие проводить качественный и количественный анализ метилирования ДНК.

Исследование эпигенетической регуляции экспрессии генов в норме и при патологии является самостоятельным направлением в молекулярной генетике человека. Разработка стандартного набора ДНК-маркеров для наиболее часто встречающихся онкологических заболеваний позволит эффективно проводить скрининг и бороться с онкопатологией на самых ранних этапах ее возникновения, проводить мониторинг заболевания в периоды ремиссий, определять микрометастазы в период лечения и определять тактику лечения в случае инактивации определенных генов-рецепторов. Результаты дальнейших исследований позволят получить новую информацию о закономерностях функционирования генома человека. Это, в свою очередь, приведет к разработке новых эффективных диагностических подходов, новых лекарственных средств и методов терапии.

## Литература

1. Залетаев Д. В., Стрельников В. В., Немцова М. В., 2009. Системы генетических и эпигенетических маркеров в ДНК-диагностике злокачественных новообразований // Системы генетических и эпигенетических маркеров в диагностике онкологических заболеваний / под ред. М. А. Пальцева и Д. В. Залетаева. М.: Медицина. С. 7–75.
2. Залетаев Д. В., Стрельников В. В., Немцова М. В., Бабенко О. В., Кузнецова Е. Б., Землякова В. В., Кекеева Т. В., Михайленко Д. С., Шкарупо В. В., Танаас А. С., 2010. Маркеры метилирования в диагностике онкологических заболеваний // Медицинская генетика. Т. 9. № 1. С. 15–21.
3. Кекеева Т. В., Жевлова А. И., Подистов Ю. И., Соловьева Ю. В., Залетаев Д. В., Немцова М. В., 2006 // Аномальное метилирование генов-супрессоров опухолевого роста и микросателлитная нестабильность в предраковых состояний шейки матки // Молекулярная биология. № 2. С. 224–230.
4. Кекеева Т. В., Попова О. П., Шегай П. В., Алексеев Б. Я., Андреева Ю. Ю., Залетаев Д. В., Немцо-

- ва М. В., 2007 // Аномальное метилирование генов-супрессоров опухолевого роста *P16*, *h1C1*, *N33* и *GSTP1* в опухолевом эпителии и стромальных клетках предстательной железы // Молекулярная биология. Т. 41, № 1, С. 79–85.
5. Кузнецова Е. Б., Кекеева Т. В., Ларин С. С., Землякова В. В., Бабенко О. В., Немцова М. В., Залетаев Д. В., Стрельников В. В., 2007 // Новые маркеры метилирования и экспрессии генов // Молекулярная биология. Т. 41, № 4, С. 624–633.
6. Михайленко Д. С., Григорьева М. В., Землякова В. В., Шкарупо В. В., Яковлева Е. С., Носов Д. А., Любченко Л. Н., Курынин Р. В., А. М. Попов, Д. В. Залетаев, И. Г. Русаков., 2010. Молекулярно-генетические нарушения в гене *VHL* и метилирование некоторых генов-супрессоров в спорадических светлоклеточных карциномах почки // Онкоурология. № 2. С. 32–36.
7. Стрельников В. В., Землякова В. В., Белецкий И. П., Грановский И. Э., Пальцева Е. М., Залетаев Д. В., 2008. ДНК-микрочипы в диагностике онкологических заболеваний // Молекулярная медицина. № 4, С. 4–11.
8. Стрельников В. В., Кузнецова Е. Б., Залетаев Д. В., 2009. Поиск и характеристика новых маркеров метилирования и генов, вовлеченных в канцерогенез // Системы генетических и эпигенетических маркеров в диагностике онкологических заболеваний под ред. М. А. Пальцева и Д. В. Залетаева. Москва. Издательство Медицина. С. 76–113.

**METHYLATION ANOMALIES IN CANCEROGENESIS: SEARCH FOR NEW GENES, DEVELOPMENT OF METHODS AND DNA-MARKERS FOR DIAGNOSIS**

Zaletaev D. V., Strelnikov V. V., Kekeeva T. V., Zemlyakova V. V., Kuznetsova E. B., Mikhailenko D. S.

✿ **SUMMARY:** The report considers the epigenetic defects and their diagnostics in tumors. Aberrant methylation of the promoter or regulatory region of a gene results in its functional inactivation, which is phenotypically similar to structural deletion. Cancerogenesis-associated genes are often methylated in tumors. Tumors differ in methylation frequencies, allowing differential diagnostics. Aberrant methylation of tumor suppressor genes occurs in early cancerogenesis, and its detection may be employed in presymptomatic and noninvasive diagnostics of tumors.

✿ **KEY WORDS:** tumor suppressor genes; DNA-methylation; breast cancer; prostate cancer; clear cell kidney cancer; cervical intraepithelial neoplasia

✿ Информация об авторах

**Залетаев Дмитрий Владимирович** — д. б. н., проф., заведующий лабораторией эпигенетики. Медико-генетический научный центр РАМН. 115478, Москва, ул. Москворечье, д. 1. E-mail: zalnem@mail.ru.

**Стрельников Владимир Викторович** — к. б. н., в. н. с., лаборатории эпигенетики. Медико-генетический научный центр РАМН. 115478, Москва, ул. Москворечье, д. 1. E-mail: vstrel@list.ru.

**Кекеева Татьяна Владимировна** — к. м. н., н. с. лаборатории эпигенетики. Медико-генетический научный центр РАМН. 115478, Москва, ул. Москворечье, д. 1. E-mail: kekeeva@mail.ru.

**Землякова Валерия Владимировна** — к. б. н., с. н. с. лаборатории эпигенетики. Медико-генетический научный центр РАМН. 115478, Москва, ул. Москворечье, д. 1. E-mail: valzem@inbox.ru.

**Кузнецова Екатерина Борисовна** — к. б. н., с. н. с. лаборатории эпигенетики. Медико-генетический научный центр РАМН. 115478, Москва, ул. Москворечье, д. 1. E-mail: kuznetsova.k@bk.ru.

**Михайленко Дмитрий Сергеевич** — к. б. н., с. н. с. лаборатории эпигенетики. Медико-генетический научный центр РАМН. 115478, Москва, ул. Москворечье, д. 1. E-mail: dimserg@mail.ru.

**Zaletaev Dmitri V.** — DSci, prof., head of epigenetics lab. Research Centre for Medical Genetics. 115478, Moscow, Moskvoechest. 1. E-mail: zalnem@mail.ru.

**Strelnikov Vladimir V.** — leading scientist of epigenetics lab. Research Centre for Medical Genetics. 115478, Moscow, Moskvoechest. 1. E-mail: vstrel@list.ru.

**Kekeeva Tatiana V.** — Phd, scientist of epigenetics lab. Research Centre for Medical Genetics. 115478, Moscow, Moskvoechest. 1. E-mail: kekeeva@mail.ru.

**Zemliakova Valeria V.** — Phd, scientist of epigenetics lab. Research Centre for Medical Genetics. 115478, Moscow, Moskvoechest. 1. E-mail: valzem@inbox.ru.

**Kuznetsova Ekaterina B.** — Phd, scientist of epigenetics lab. Research Centre for Medical Genetics. 115478, Moscow, Moskvoechest. 1. E-mail: kuznetsova.k@bk.ru.

**Mikhailenko Dmitri S.** — Phd, scientist of epigenetics lab. Research Centre for Medical Genetics. 115478, Moscow, Moskvoechest. 1. E-mail: dimserg@mail.ru.