

На правах рукописи

ХОДЫРЕВ ДМИТРИЙ СЕРГЕЕВИЧ

**ИЗМЕНЕНИЕ МЕТИЛИРОВАНИЯ ПРОМОТОРНЫХ ОБЛАСТЕЙ
СЕМИ ГЕНОВ ХРОМОСОМЫ 3 ЧЕЛОВЕКА В ЭПИТЕЛИАЛЬНЫХ
ОПУХОЛЯХ**

03.00.03 - Молекулярная биология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2009

Работа выполнена в Лаборатории молекулярной диагностики и геномной дактилоскопии Государственного научно-исследовательского института генетики и селекции промышленных микроорганизмов (ФГУП «ГосНИИгенетика»).

Научный руководитель:

доктор биологических наук

Брага Элеонора Александровна

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук, профессор **Карпухин Александр Васильевич**
ГУ Медико-генетический научный центр

доктор биологических наук, профессор **Сломинский Петр Андреевич**
Институт молекулярной генетики РАН

Ведущая организация:

**Учреждение Российской академии наук
Институт молекулярной биологии им.
В.А.Энгельгардта РАН**

Защита состоится «10» ноября 2009г. в 14⁰⁰ часов на заседании Диссертационного совета Д.217.013.01 при Государственном научно-исследовательском институте генетики и селекции промышленных микроорганизмов по адресу: 117545, Москва, 1-й Дорожный проезд, 1.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГУП «ГосНИИгенетика».

Автореферат разослан «___» _____ 2009 г.

Ученый секретарь

Диссертационного совета

кандидат химических наук

Т.Л. Воюшина

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Проблема онкологических заболеваний остается приоритетной для современного общества. По прогнозам ВОЗ заболеваемость и смертность от онкологических заболеваний во всем мире неуклонно растет и за период с 1999 года по 2020 год увеличится в 2 раза: с 10 до 20 млн. новых случаев. Учитывая, что в развитых странах наблюдается тенденция к замедлению роста заболеваемости и снижению смертности от злокачественных опухолей (как за счет антираковых программ, профилактики онкологических заболеваний, так и за счет улучшения ранней диагностики и лечения), то основной прирост придется на развивающиеся страны, к которым сегодня следует отнести и Россию.

Исследование молекулярно-биологических причин возникновения рака представляет одну из наиболее актуальных проблем здравоохранения. Согласно современным представлениям, важную роль в процессе канцерогенеза играют как генетические, так и эпигенетические факторы. Значительный прогресс в понимании механизмов канцерогенеза связан с открытием сначала онкогенов (и протонкогенов), или факторов позитивного контроля деления клеток, а затем – антионкогенов или генов-супрессоров опухолевого роста (TSG), осуществляющих негативный контроль клеточного роста. Онкогены активируются в опухолях по доминантному механизму и стимулируют развитие опухоли. Напротив, TSG инактивируются в опухолях по рецессивному типу с повреждением обоих родительских аллелей. В случае сохранности некоторых критичных TSG (например, гена p53) в клетке, подверженной неопластическим изменениям, эти TSG могут вызвать остановку клеточного цикла или ее программируемую смерть (апоптоз), и таким образом, остановить или замедлить опухолевый рост. TSG могут участвовать в подавлении нео-ангиогенеза, инвазии и метастазирования, в регуляции теломеразной системы. Некоторые TSG прямо или опосредованно участвуют в репарации мутаций, например, p53 задерживает клеточный цикл до исправления нарушений с помощью белков системы репарации. Все большая роль в регуляции экспрессии генов, связанных с развитием злокачественных опухолей, отводится метилированию CpG-островков в промоторных районах, а число работ, опубликованных в последнее десятилетие, превысило 14 тысяч. Изменение профиля метилирования промоторных районов некоторых генов является характерной чертой опухолевых клеток, причем аномальное метилирование наблюдается уже на ранних этапах канцерогенеза. Данное исследование посвящено изучению метилирования промоторных областей семи генов в эпителиальных опухолях почки, молочной железы и немелкоклеточного рака легкого, а также

связи метилирования промоторных районов этих генов с прогрессией данных видов рака. В данной работе проведен подбор систем маркеров, оптимальных для выявления и мониторинга данных социально-опасных видов рака, что является важной задачей молекулярной медицины и практической онкологии.

Цель и задачи исследования. Данная работа направлена на изучение метилирования промоторных областей семи генов хромосомы 3 с целью поиска молекулярных маркеров, а также подбора информативных систем маркеров, необходимых для ранней диагностики и мониторинга рака легкого, молочной железы и почки. В соответствии с указанной целью нами были поставлены следующие задачи:

1. Определение профиля метилирования промоторных областей семи генов хромосомы 3 (*RASSF1A*, *SEMA3B*, *RAR-beta2*, *RHOA*, *USP4*, *GPX1*, *NKIRAS1*) в эпителиальных опухолях молочной железы, немелкоклеточного рака легкого и почечноклеточного рака.
2. Выявление возможных корреляций между уровнем метилирования этих генов и прогрессией опухоли, а также отбор молекулярных маркеров неблагоприятного прогноза онкозаболевания.
3. Подбор информативных систем маркеров, оптимальных для выявления и мониторинга данных видов опухолей.

Научная новизна работы. В данной работе впервые исследовано метилирование истинно промоторного CpG-островка гена *SEMA3B* и показано, что он метилирован в 1,5 раза чаще, чем известный ранее интронный CpG-островок при разных видах рака. Показана высокая частота метилирования промоторного района гена *RAR-beta2* при почечно-клеточном раке и ее связь с прогрессией данного вида опухоли. Впервые исследовано метилирование промоторных районов генов *RHOA*, *USP4*, *GPX1*, *NKIRAS1* в опухолях разных локализаций. Впервые установлено, что гены *RHOA*, *USP4*, *NKIRAS1* представляют интерес как диагностические маркеры, изменения в метилировании которых можно обнаружить уже на ранней, доклинической стадии опухолевого процесса. Установлена достоверная положительная корреляция частоты метилирования гена *RASSF1A* со стадией и степенью анаплазии при раке молочной железы, а также, получены статистически достоверные корреляции изменения метилирования промоторных областей генов *RHOA*, *USP4*, *GPX1*, *NKIRAS1* с различными клинико-гистологическими характеристиками, такими как стадия, степень анаплазии, размер опухоли и метастазирование в регионарные лимфатические узлы.

Практическая ценность работы. Показано, что изменение метилирования промоторных областей всех исследованных генов можно обнаружить уже на ранней стадии опухолевого процесса, что позволяет использовать данные маркеры для ранней диагностики рака. С другой стороны, достоверные корреляции между уровнем метилирования генов *RASSF1A*, *SEMA3B*, *RAR-beta2*, *RHOA*, *USP4*, *NKIRASI* и клинико-гистологическими показателями опухолей позволяют использовать их в качестве молекулярных маркеров неблагоприятного прогноза онкозаболевания. Подобраны информативные системы маркеров, позволяющие с высокой чувствительностью выявить рак легкого (в 89% случаев), рак молочной железы (в 80% случаев) и почечно-клеточный рак (в 68% случаев).

Апробация работы. Диссертационная работа была представлена на заседании Секции молекулярной биологии Ученого Совета ФГУП “ГосНИИ генетика” от 15 апреля 2009г. Результаты настоящей работы доложены автором диссертации на международной конференции “Генетика в России и мире” (Москва, 2006), конференции по фундаментальной онкологии “Петровские чтения” (Санкт-Петербург, 2008), V конференции молодых ученых России с международным участием “Фундаментальные науки и прогресс клинической медицины”(Москва, 2008), а также пятом съезде Вавиловского общества генетиков и селекционеров (Москва, 2009).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 7 статей, а также тезисы докладов и сообщений на отечественных и международных конференциях.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из следующих разделов: введения, обзора литературы, описания использованных материалов и методов, результатов и их обсуждения, выводов и списка литературы. Материалы диссертации изложены на 137 страницах машинописного текста и содержат 15 таблиц и 56 рисунков.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. Выборка образцов и методы исследований. Для исследования уровня метилирования промоторных районов генов *RASSF1A*, *RAR-beta2*, *SEMA3B*, *RHOA*, *USP4*, *GPX1*, *NKIRASI* была использована комбинация методов: 1) ПЦР-анализ образцов геномной ДНК, последовательно расщепленной с помощью набора метилчувствительных рестриктаз (МЧРА); 2) модификация геномной ДНК бисульфитом с последующей ПЦР, специфичной к метилированному аллелю гена (МС-ПЦР), или секвенированием ПЦР-продукта исследуемого фрагмента гена

(бисульфитное секвенирование). Основные статистические методы – критерий Фишера, ранговая корреляция Спирмана с использованием t-теста Стьюдента.

Исследования были проведены с использованием 231 пары образцов ДНК, выделенных из опухолевых (Т) и морфологически нормальных (N) тканей. Выборка включала 83 случая светлоклеточного почечноклеточного рака (ПКР), 38 случаев рака легкого (НМКРЛ, наиболее представлены плоскоклеточная карцинома и аденокарцинома), 110 случаев рака молочной железы (РМЖ, преимущественно представлены случаи с инфильтративно-протоковой гистологией). Все исследованные нами опухоли были классифицированы клинически по системе TNM принятой Международным противораковым союзом, UICC-2002 г., и гистологически в соответствии с ВОЗ в отделе патоморфологии опухолей НИИ клинической онкологии ГУ РОНЦ РАМН. При отборе материала проводили дополнительный гистопатологический анализ микросрезов (3-5 мкм), что обеспечило отбор образцов с содержанием опухолевых клеток не менее 70%. Были использованы образцы опухолей только тех пациентов, которые до операции не получали лучевую или химиотерапию. В качестве контролей использовали лейкоциты периферической крови от 15 здоровых доноров и образцы тканей легкого, почки и молочной железы от 6 человек, онкологически здоровых в анамнезе.

2. Определение профиля метилирования промоторных областей семи генов хромосомы 3 (*RASSF1A*, *SEMA3B*, *RAR-beta2*, *RHOA*, *USP4*, *GPX1*, *NKIRASI*) в различных эпителиальных опухолях.

2.1. Изменение профилей метилирования промоторных областей генов *RASSF1A* и *RAR-beta2* в эпителиальных опухолях.

Ген *RASSF1A* (Ras Association Domain Family 1A) локализован в районе 3p21.31 короткого плеча 3 хромосомы (3p). Этот ген протяженностью 7.6 т.п.н. содержит 5 экзонов и кодирует м-РНК длиной 2 т.н. Белковый продукт *RASSF1A* относится к цитоплазматическим белкам. Выявлено многообразие функций этого белка в клетке, например, задержка клеточного цикла (*Shivakumar et al., 2002*), участие в индукции апоптоза за счет взаимодействия с продуктом онкогена *ras* (*Vos et al., 2000*) или гена *MST1* (*Oh et al., 2006*), стабилизация микротрубочек (*Пфайфер и Дамманн., 2005*). Супрессорная активность гена *RASSF1A* подтверждена и с помощью нокаут-мутаций гена в клетках мыши (*Tommasi et al., 2005*).

Ген *RAR-beta2* локализован в районе 3p24 относится к суперсемейству ядерных рецепторов, которые служат лиганд-активирующими транскрипционными факторами (*Chambon et al., 1996*). Лигандами для рецепторов класса RAR являются

ретиноиды – витамин А и его биологически активные метаболиты. Известно, что ретиноиды способны ингибировать пролиферацию клеток и индуцировать клеточную дифференцировку. В связи с этим, их используют для профилактики и терапии различных опухолей (Hong et al., 1995). Во многих случаях метилирование промоторной области данного гена было обнаружено в предраковых новообразованиях, и частота метилирования возрастала с прогрессией заболевания и образованием карцином (Feng et al., 2007; Fendri et al., 2009; Garcia et al., 2009).

Физические карты промоторных районов генов *RASSF1A* и *RAR-beta2* представлены на рисунке 1а и 1б. На рис. 1 показаны CpG-динуклеотиды анализируемых фрагментов и позиции праймеров, использованных в данной работе. При анализе гена *RASSF1A* применяли метод МС-ПЦР, а *RAR-beta2* - метод МЧРА, с использованием 3-х метил-чувствительных рестриктаз - HpaII, Bsh1236I, AclI и бисульфитное секвенирование. Для *RASSF1A* исследованы 76 случаев ПКР, 110 случаев РМЖ и 32 случая НМКРЛ, для *RAR-beta2* – 61, 56 и 37, соответственно.

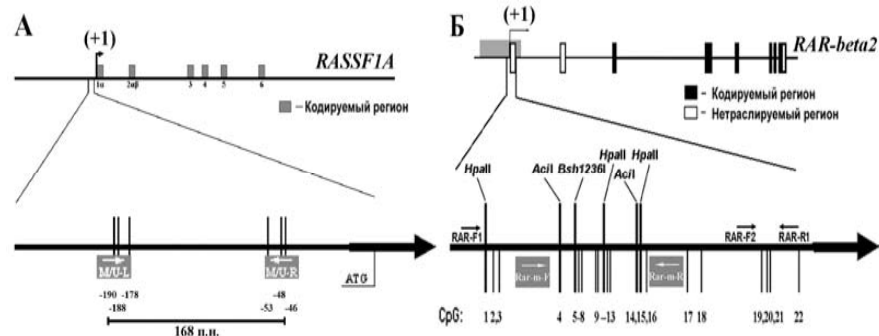


Рисунок 1. Физические карты промоторных районов генов *RASSF1A* (А) и *RAR-beta2* (Б). Показаны экзоны гена, начало 1-го экзона (+1). А. Праймеры для МС-ПЦР (M/U-L и M/U-R), показаны белым цветом на сером фоне. Б. Показаны праймеры использованные для бисульфитного секвенирования (Rar-m-F и Rar-m-R, белым цветом на темно-сером фоне), для МЧРА (RAR-F1 и RAR-R1) и для контроля сохранности препарата ДНК после рестрикции (RAR-F2 и RAR-R1); стрелками отмечены прямые (→) и обратные праймеры (←).

На рисунке 2 приведены примеры анализа метилирования CpG-островка гена *RASSF1A* (2а,2в) и гена *RAR-beta2* (2б).

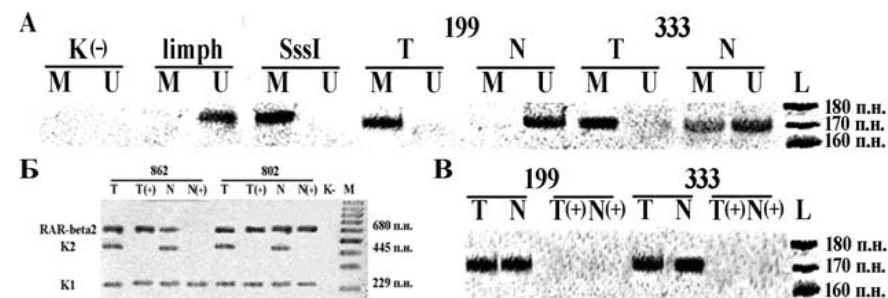


Рисунок 2.А. Примеры типичных результатов анализа метилирования промоторной области гена *RASSF1A* с применением метода МС-ПЦР в 2-х образцах ПКР 199 и 333. Электрофоретическое разделение в 10%-ном ПААГ продуктов МС-ПЦР, полученных для образцов ДНК ПКР. ПЦР проводили на ДНК, конвертированной бисульфитом. Исследован фрагмент гена *RASSF1A*, 168 п.н. Показаны продукты ПЦР, специфичной к метилированному (М) и неметилированному (U) аллелю. В качестве позитивного контроля 100%-ого метилирования ДНК, использовали ДНК плаценты (placental tissue DNA) после обработки метилтрансферазой SssI (SssI). ДНК из лимфоцитов крови использовали как контроль для неметилированных аллелей (limph). K(-) – отрицательный контроль (в отсутствии ДНК). L – маркер с шагом 10 п.н.

Б. Примеры применения МЧРА для гена *RAR-beta2*: Электрофоретическое разделение в 2% агарозном геле продуктов ПЦР для 2-х образцов ДНК ПКР, до(T/N) и после (T+/N+) гидролиза рестриктазой Bsh1236I. Исследуемый фрагмент гена *RAR-beta2* – 680 п.н.; Контроль на полноту рестрикции (K2) – фрагмент гена beta-3A-адаптина, 445 п.н.; контроль сохранности ДНК (K1) – фрагмент экзона 3 гена *RAR-beta2*, 229 п.н.; K(-) – отрицательный контроль (в отсутствии ДНК). M – маркер с шагом полос 100 п.н.; T – продукт амплификации ДНК из опухолевой ткани; N – продукт амплификации ДНК из нормальной ткани.

В. Проверка полноты бисульфитной конверсии с применением праймеров, гомологичных фрагменту гена в исходной ДНК, не модифицированной бисульфитом: электрофоретическое разделение в 10%-ном ПААГ продуктов ПЦР. Исследован фрагмент гена *RASSF1A*, 168 п.н. ПЦР проводили на исходных препаратах ДНК (T/N) и на образцах ДНК, конвертированных бисульфитом (T(+)/N(+)). L – маркер с шагом 10 п.н.

Пример результатов анализа метилирования промоторных областей 2-х генов схематически представлены на рисунке 3.

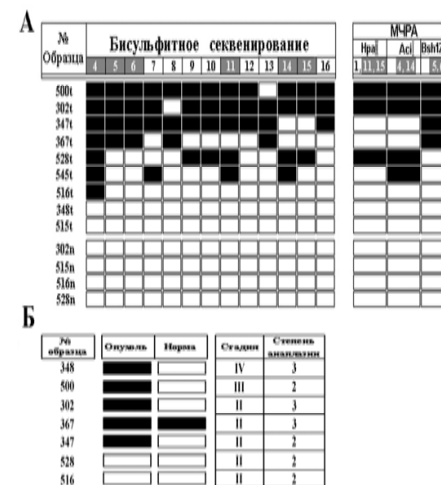


Рисунок 3. А. Применение бисульфитного секвенирования и МЧРА при анализе метилирования CpG-островка промоторной области гена *RAR-beta2*. Сверху даны позиции CpG-динуклеотидов; CpG- динуклеотиды 4, 5, 6, 11, 14 и 15, исследованные двумя методами, отмечены белым шрифтом на сером фоне; с левого края приведены номера образцов ПКР. Черный прямоугольник указывает на выявление метилирования, белый прямоугольник – метилирование не выявлено. Приведены данные анализа для 9-ти образцов ДНК первичных опухолей ПКР (т) и образцов ДНК условно-нормальной ткани почки от 4-х пациентов (n). **Б.** Применение метода МС-ПЦР при анализе метилирования CpG-островка гена *RASSF1A*. Справа показаны клинико-гистологические характеристики опухоли: стадия и степень анаплазии опухоли.

Метод МС-ПЦП позволяет тестировать только 6 CpG-динуклеотидов в промоторной области гена *RASSF1A*, входящих в состав праймеров (M/U-L, M/U-R) (рис.1а). Для гена *RAR-beta2* метод МЧРА позволил тестировать 8 CpG-динуклеотидов (рис.1б) в промоторном районе. Данные, полученные методом МЧРА, были подтверждены с помощью бисульфитного секвенирования. На рисунке 4 приведены примеры бисульфитного секвенирования этого фрагмента. Показан участок в 40 п.н., перекрывающий 6 CpG-динуклеотидов. Соответствие результатов бисульфитного секвенирования и МЧРА оценивали с использованием ранговой корреляции Спирмана. Результаты этих методов совпали в 44 из 78 CpG (22 с метилированием и 22 без метилирования). Корреляция результатов, полученных двумя независимыми методами для образцов ПКР, высоко достоверна: $R_s=0.98$, $t=15,8$, $v=11$, $P=6.52 \times 10^{-9}$.

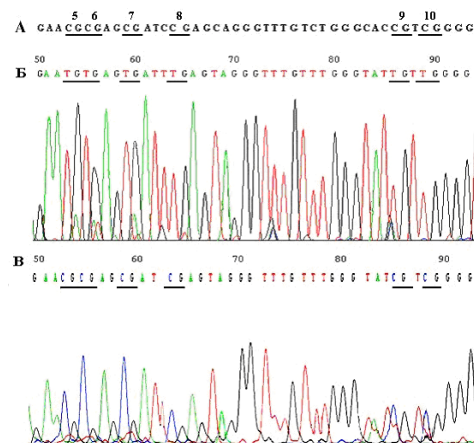


Рисунок 4. Примеры бисульфитного секвенирования фрагмента гена *RAR-beta2* (280 п.н.). Показан участок в 40 п.н. CpG-динуклеотиды подчеркнуты и пронумерованы в соответствии с рис 1б. (А) Исходный фрагмент до обработки бисульфитом (образец ПКР 500). (Б) Модифицированный неметилированный фрагмент (образец ПКР 703): все остатки цитозина дезаминированы и превращены в тимин. (В) Модифицированный метилированный фрагмент (образец ПКР 500): цитозин в CpG-динуклеотидах остался не измененным, остальные остатки цитозина конвертированы в тимин. Данные по частоте метилирования промоторных районов генов *RASSF1A* и *RAR-beta2* представлены в таблице 1.

Таблица 1. Частота метилирования промоторных районов генов *RASSF1A* и *RAR-beta2* в образцах ДНК ПКР, РМЖ и НМКРЛ и в образцах ДНК гистологически нормальной ткани.

Вид рака		ПКР	РМЖ	НМКРЛ
<i>P</i>		$2,15 \times 10^{-12}$	$1,19 \times 10^{-10}$	0,043
<i>RASSF1A</i>	T	48/76, 63%	34/110, 31%	9/32, 28%
	N	7/76, 9%	1/110, 1%	2/32, 6%
<i>P</i>		$9,18 \times 10^{-9}$	$1,09 \times 10^{-7}$	0,1
<i>RAR-beta2</i>	T	36/61, 59%	26/56, 46%	13/37, 35%
	N	4/51, 8%	2/56, 4%	6/37, 16%

*Под частотой метилирования подразумевали долю образцов, в которых данный ген метилирован.

Итак, в данной работе впервые показана высокая частота метилирования промоторного района гена *RAR-beta2* при ПКР, данные по частоте метилирования при РМЖ и НМКРЛ согласуются с данными литературы (Karray-Chouayekh et al., 2009; Onay. et al., 2009; De Jong et al., 2009). Результаты данной работы подтверждают высокую частоту метилирования промоторного района гена *RASSF1A* в этих эпителиальных опухолях и весьма близки с данными других авторов (Dammann et al., 2005; Karray-Chouayekh S. et al., 2009). В ДНК из крови 15-ти здоровых доноров, а также 6 человек, онкологически здоровых в анамнезе, не выявлено ни одного случая метилирования CpG-островка гена *RASSF1A* и *RAR-beta2*.

2.2. Изменение профилей метилирования 2-х CpG-островков гена *SEMA3B* в эпителиальных опухолях.

Ген *SEMA3B* локализован в области 3p21.31. Он состоит из 18-ти экзонов, (9533 п.н., NCBI, Build 36), кодирует мРНК длиной 3.4 т.н. и белок 750 а.е. (Lerman&Minna, 2000). Функции гена *SEMA3B* разнообразны и связаны с онкогенезом. Ген *SEMA3B* может подавлять рост клеточной линии рака легкого NCI-H1299 и образование опухолей в мышцах с иммунодефицитом (Tomizawa et al., 2001; Tse et al., 2002). Белок SEMA3B способен ингибировать активацию онкобелков MET и RON, индуцировать апоптоз и подавлять неоангиогенез в опухолях (Kuceliev u др., 2005). Во многих линиях клеток мелкоклеточного и немелкоклеточного рака легкого выявлено метилирование CpG-островка в 5' области гена (Tomizawa et al., 2001; Kuroki et al., 2003; Ito et al., 2005), которая, как выяснилось позднее, соответствовала области первого интрона гена (NCBI, Build 36). Мы обнаружили локализованный в промоторной области протяженный CpG-островок (дистальный)(рис.5) с более высокой плотностью CpG-динуклеотидов (22 CpG/772 п.н.) по сравнению с проксимальным (8 CpG/400 п.н.), способный к связыванию ряда факторов транскрипции, содержащих участки взаимодействия с CpG-динуклеотидами (NCBI Build 36). В связи с этим представлялось целесообразным изучить и сравнить частоту метилирования двух CpG-островков в различных видах рака.

На рисунке 5 показана структурная организация гена *SEMA3B*, включая расположение промоторного (1-го) и интронного (2-го) CpG-островков.

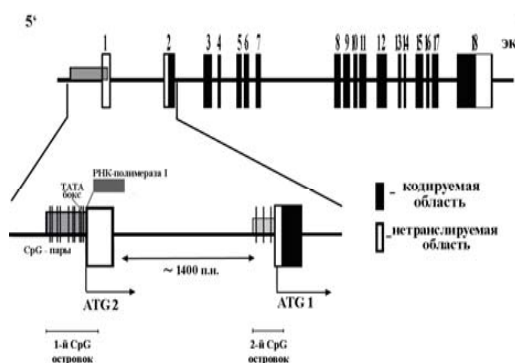


Рисунок 5. Структурная организация гена *SEMA3B*. Показаны 2 CpG-островка: проксимальный (2-й CpG-островок) – в области интрона между нетранслируемым экзонном 1 и транслируемым экзонном 2 (перед ATG1, по Tomizawa et al., 2001), и дистальный (1-й CpG-островок) – в промоторной области гена (перед ATG2 по базе данных NCBI, версия 36). 1-й CpG-островок содержит 22 CpG-динуклеотида на участке 772 п.н., а 2-й CpG-островок – восемь CpG на участке 400 п.н.

В данной работе исследованно 83 парных (T/N) образца почечноклеточного рака, 61 образец рака молочной железы и 38 образцов немелкоклеточного рака легкого. Методом МС-ПЦР определяли статус метилирования 6-ти CpG-динуклеотидов в дистальном CpG-островке и 3-х CpG-динуклеотидов - в интронном. Данные по частотам метилирования обоих CpG-островков представлены в таблице 2.

Таблица 2. Частота метилирования 2-х CpG-островков гена *SEMA3B* в опухолях почки (ПКР), молочной железы (РМЖ) и немелкоклеточного рака легкого (НМКРЛ).

Вид рака		ПКР	РМЖ	НМКРЛ
Частота Метилирования	<i>P</i>	$1,72 \times 10^{-12}$	$1,01 \times 10^{-5}$	$8,98 \times 10^{-7}$
	1-й CpG-островок			
	T	42/83, 52%	34/61, 53%	20/38, 53%
	N	3/83, 4%	10/61, 16%	1/38, 3%
	<i>P</i>	$2,19 \times 10^{-6}$	0,0009	0,0001
2-й CpG-островок				
	T	30/83, 36%	25/61, 40%	14/38, 37%
	N	5/83, 6%	8/61, 13%	0/38, 0%

В данной работе впервые проведено сравнение частоты метилирования промоторного и интронного CpG-островков гена *SEMA3B* в опухолях почки, молочной железы и немелкоклеточного рака легкого, показано, что частота метилирования промоторного островка выше в 1,5 раза во всех из представленных видов опухолей. Кроме того, получены данные для ПКР о понижении содержания мРНК гена *SEMA3B* при появлении метилирования в промоторном CpG-островке (Пронина и др., 2009), что позволяет предположить роль промоторного CpG-островка в инактивации гена-супрессора *SEMA3B* при почечноклеточном раке. По данным литературы метилирование интронного CpG-островка наблюдали ранее

при раке легкого (Tomizawa et al., 2001; Kuroki et al., 2003; Ito et al., 2005), а также при нейробластоме, раке печени и желчного пузыря (Tischhoff et al., 2005; Nair et al., 2007; Riquelme et al., 2007). Однако не было сообщений о метилировании промоторного CpG-островка этого гена в каких-либо видах эпителиальных опухолей.

2.3. Изменение профилей метилирования промоторных областей генов *RHOA/ARHA*, *USP4* и *GPXI* в эпителиальных опухолях.

Нами проведен предварительный анализ уровней мРНК ~30 генов из открытого нами нового «критичного» района между маркерами D3S2409 и D3S3667 (3p21.31, 600 т.п.н., Логинов и др., 2008) в эпителиальных опухолях. Использована информация, представленная в базах данных SAGE (серийный анализ экспрессии генов). В эпителиальных опухолях выявлены изменения уровня мРНК более 10-ти генов. Среди этих генов были отобраны три близко расположенных гена (*RHOA/ARHA*, *USP4* и *GPXI*), которые согласно данным литературы, связаны с важными функциями клетки и предположительно участвуют в процессах онкогенеза.

Ген *RHOA* кодирует белок суперсемейства Ras-гомологичных малых гуанозинтрифосфатаз (Sahai and Marshall, 2002). Играет роль в адгезии, в регуляции клеточного цикла и апоптоза, а также в сигнальных путях клетки (Vial et al., 2003; Liu et al., 2004). Вызывает онкогенную трансформацию клеток *in vitro* и *in vivo*; усиливает инвазию опухолей (Kamai et al., 2003, 2004).

Ген *USP4* кодирует убиквитин-специфическую протеазу 4-го типа (Unp), которая отщепляя убиквитин (76 а.о.), может на время останавливать процесс протеолитической деградации в протеасомах коротко-живущих белков, в том числе, регуляторных белков и компонентов сигнальных путей клетки, включая циклины А, В, Е, p27, p53 и pRb, транскрипционные факторы E2F, NF-κB, протоонкогены c-myc, c-jun, c-fos, а также Ser/Thr-киназа c-mos (DeSalle et al., 2001). Ген *USP4* на 90% идентичен мышинному протоонкогену Unp, кодирующему ядерную убиквитин-специфическую протеазу, увеличение экспрессии которой приводит к онкогенной трансформации NIH3T3 клеток (Gupta et al., 1994). В одной из работ показано повышение уровня мРНК *USP4* в опухолях легкого, а также онкогенная трансформация клеток NIH3T3 при введении кДНК этого гена (Gray et al., 1995). В другой работе, напротив, обнаружено снижение уровня Unp-белка в клеточных линиях МКРЛ и наличие двух изоформ в клеточных лизатах: 105 и 110 кД (Frederick et al., 1998).

Продукт гена *GPXI* (glutathione peroxidase 1) восстанавливает перекись водорода и ее производные и представляет наиболее распространенный член

семейства глутатионпероксидаз. Этот белок локализован в митохондриях, ядре и цитоплазме (Diwadkar-Navsariwala and Diamond, 2004). Как антиоксидантный селенопротеин он играет центральную роль в защите клеток от окислительного стресса и разрушения. Выявлено снижение белкового продукта гена *GPX1* в злокачественных опухолях легкого (плоскоклеточный рак и аденокарцинома, Korotkina et al., 2002) и снижение мРНК в опухолях щитовидной железы (Hasegawa et al., 2002), а также способность подавлять рост эндотелиальной линии клеток ECV304 (Faucher et al., 2003). Показана связь определенных полиморфных аллелей гена с развитием разных форм рака, например, рака молочной железы (Hu et al., 2003). Предполагается, что промоторная область гена *GPX1* связывает p53 (как транскрипционный фактор), что сопровождается повышением экспрессии *GPX1* и стимуляцией апоптоза (Hussain et al., 2004).

Анализ метилирования CpG-островков в промоторных областях генов *GPX1*, *RHOA* и *USP4* был выполнен методом МЧРА с применением 2-х метилчувствительных рестриктаз HpaII и HhaI. Исследование проведено на образцах ПКР от 39 пациентов, РМЖ от 54 пациентов и на образцах НМКРЛ от 37 пациентов. Структурная организация генов, рестрикционная карта исследованных фрагментов и позиции праймеров показаны на рисунке 6.

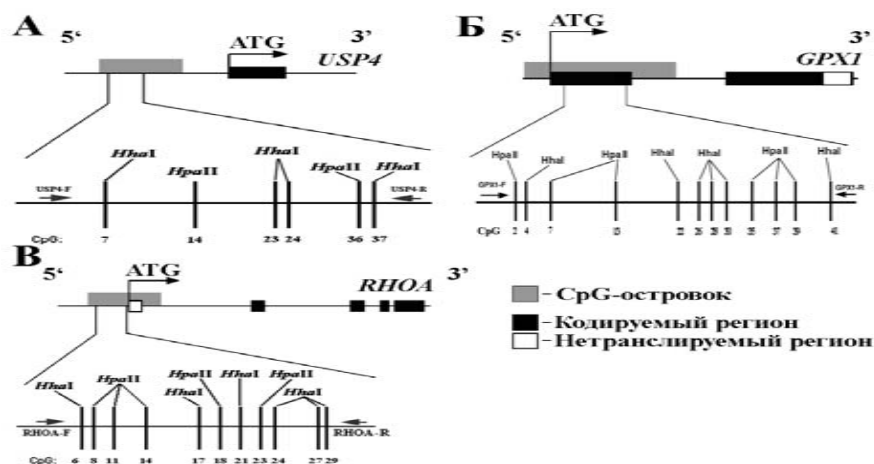


Рисунок 6. Структурная организация генов *USP4*(А), *GPX1*(Б) и *RHOA*(В). Показаны положение ATG кодонов и CpG-островков. Также показаны позиции праймеров, использованных при МЧРА для амплификации фрагмента *USP4* (USP4-F и USP4-R; 598 п.н.)(А), для фрагмента *GPX1* (GPX1-F и GPX1-R; 437 п.н.)(Б) и для фрагмента *RHOA* (RHOA-F, RHOA-R; 416 п.н.)(В). (→) – прямой праймер; (←) – обратный праймер.

Методом МЧРА определяли профиль метилирования 6 CpG-динуклеотидов в CpG-островке гена *USP4*, 12 CpG-динуклеотидов в CpG-островке гена *GPX1* и 11 CpG-динуклеотидов в CpG-островке гена *RHOA*. Данные по частотам

метилирования CpG-островков этих генов представлены в таблице 3. Для более полной картины был определен уровень метилирования каждого из генов, который рассчитывали как долю метилированных CpG-динуклеотидов в исследуемом фрагменте ДНК в данной выборке образцов(табл.3).

Таблица 3. Частоты и уровни метилирования CpG-островков генов *USP4*, *GPX1* и *RHOA* в образцах ДНК ПКР, РМЖ и НМКРЛ и в образцах ДНК гистологически нормальной ткани.

Вид опухоли	ПКР		РМЖ		НМКРЛ		
	Уровень метилирования *	Уровень метилирования *	Уровень метилирования *	Уровень метилирования *	Уровень метилирования *	Уровень метилирования *	
	Частота метилирования	Частота метилирования	Частота метилирования	Частота метилирования	Частота метилирования	Частота метилирования	
P	>0,05	>0,05	<u>0,01</u>	<u>0,0006</u>	<u>0,03</u>	<u>1,19 * 10⁻⁵</u>	
USP4	T	7/36, 19%	24/216, 11%	19/54, 35%	50/324, 15%	8/37, 22%	22/222, 10%
	N	11/36, 31%	32/216, 15%	7/54, 13%	22/324, 7%	18/37, 49%	58/222, 26%
P	0,1	<u>1,2 * 10⁻⁵</u>	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	
GPX1	T	9/39, 23%	54/468, 12%	16/47, 34%	102/564, 18%	7/37, 19%	48/444, 11%
	N	3/39, 8%	18/468, 4%	9/47, 19%	54/564, 10%	7/37, 19%	48/444, 11%
P	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	<u>0,04</u>	
RHOA	T	5/29, 17%	32/319, 10%	11/33, 33%	76/363, 21%	13/37, 35%	92/407, 23%
	N	5/29, 17%	36/319, 11%	10/33, 30%	70/363, 19%	20/37, 54%	119/407, 29%

* Под уровнем метилирования подразумевали долю метилированных CpG-динуклеотидов из суммарно исследованных для конкретного CpG-островка в расчете на все образцы данной выборки. За 100% принимали произведение количества CpG, исследованных в конкретном CpG-островке, на число случаев в соответствующей выборке. Уровень метилирования включает в себя как частоту встречаемости случаев метилирования, так и плотность метилирования (долю метилированных CpG в каждом случае).

При РМЖ выявлено достоверное повышение частоты метилирования гена *USP4*, а при ПКР уровни метилирования гена *GPX1*. Эти данные указывают на возможное участие этих генов в супрессии данных видов опухолей. При НМКРЛ, напротив, отмечено понижение частоты метилирования для гена *USP4* и уровня метилирования для гена *RHOA*. Эти данные указывают на возможное участие этих генов в роли протоонкогенов при НМКРЛ. Вызывает интерес ген *USP4*, для которого в случае ПКР и НМКРЛ наблюдается деметилирование CpG-островка промоторной области гена, в то время как при РМЖ наблюдается прямо противоположная картина. Это может быть связано с ткане-специфичным характером метилирования CpG-островка гена *USP4*. Полученные данные согласуются с приведенными выше данными литературы по функциям этих генов в опухолевой клетке. В литературе нет сообщений по характеристике метилирования генов *GPX1*, *RHOA* и *USP4* в опухолях. Таким образом, результаты по изменению метилирования этих генов при ПКР, РМЖ и НМКРЛ представлены нами впервые.

2.4. Изменение профиля метилирования трех участков протяженного CpG-островка гена *NKIRASI* в эпителиальных опухолях.

Ген *NKIRASI* – NFKB inhibitor interacting Ras-like 1, или гомолог онкогена Ras, взаимодействующий с фактором некроза NF-каппаВ. Его другие названия: KBRAS1 и каппаВ-Ras 1. Белковый продукт гена функционирует как G-белки, связанные с GTP/GDP и проявляющие GTP-азную активность. Показано, что белок *NKIRASI* участвует в регуляции деградации ИкаппаВ (*Fenwick et al., 2000*) и в комплексе с ИкаппаВ подавляет активность NF-каппаВ (*Chen et al., 2004*). Ген *NKIRASI* содержит протяженный CpG-островок (1800 п.н.), окружающий 1-ый нетранслируемый экзон (рис.7). В этом островке мы выбрали три фрагмента, доступные для анализа методом МЧРА. Метилирование каждого из трех фрагментов CpG-островка данного гена было исследовано в 26 случаях РМЖ и 30 случаях НМКРЛ. Структурная организация гена, рестрикционная карта и позиции праймеров, использованных в работе, показаны на рисунке 7.

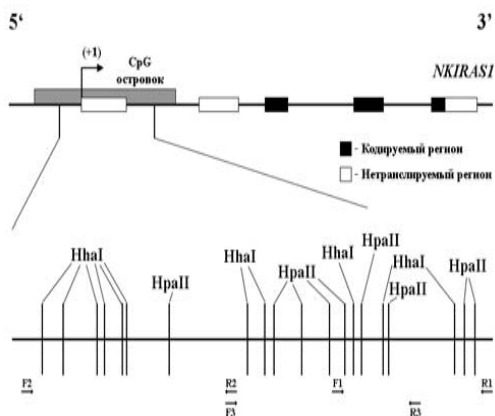


Рисунок 7. Структурная организация гена *NKIRASI*: Показаны экзоны гена, начало 1-го экзона (+1), положение CpG-островка и расположение участков узнавания двух метилчувствительных рестриктаз: HpaII (9 участков) и HhaI (11 участков) - в протяженном CpG-островке. Показаны также позиции праймеров, использованных при МЧРА, трех исследованных фрагментов: фрагмента №1 (F1 и R1, 423 п.н.), фрагмента №2 (F2 и R2, 522 п.н.) и фрагмента №3 (F3 и R3, 472 п.н.); (→) – прямой праймер; (←) – обратный праймер.

Метод МЧРА с использованием 2-х метилчувствительных рестриктаз – HpaII и HhaI позволил определить профиль метилирования 8 CpG-динуклеотидов в первом фрагменте, 7 во втором и 10-ти в третьем. А для более полной картины был определен уровень метилирования каждого из трех фрагментов гена *NKIRASI*. Данные по частоте и уровню метилирования 3-х фрагментов представлены в таблице 4.

Таблица 4. Частота и уровень метилирования 3-х фрагментов CpG-островка гена *NKIRASI* в образцах ДНК РМЖ и НМКРЛ и в образцах ДНК гистологически нормальной ткани.

		фрагмент №1		фрагмент №2		фрагмент №3	
		Уровень метилирования	Уровень метилирования	Уровень метилирования	Уровень метилирования	Частота метилирования	Частота метилирования
P		>0,05	<u>0,001</u>	>0,05	<u>0,04</u>	>0,05	>0,05
РМЖ	T	13/26, 50%	53/182,29%	12/26, 46%	17/182,9%	17/26, 65%	102/260,39%
	N	18/26, 69%	85/182,47%	14/26, 54%	31/182,17%	18/26, 69%	112/260,43%
P		>0,05	<u>0,054</u>	0,1	<u>3,1*10⁻⁸</u>	<u>0,006</u>	<u>5,9*10⁻¹⁰</u>
НМКРЛ	T	13/30, 43%	53/210,25%	21/30, 70%	43/210,20%	14/30, 47%	96/300,32%
	N	19/30, 63%	72/210,34%	27/30, 90%	97/210,46%	25/30, 83%	172/300,57%

Согласно данным МЧРА наблюдается деметилирование каждого из фрагментов гена *NKIRASI*, а т.к. данный ген имеет гомологию с онкогеном *RAS* и взаимодействует с фактором некроза опухолей NF-каппаВ (*Chen et al., 2004*) можно предположить онкогенные функции данного гена при РМЖ и НМКРЛ. Причем, при РМЖ фрагменты 1 и 2 показывают достоверные различия с учетом уровня метилирования, в то время как при НМКРЛ наиболее дистальные фрагменты показывают статистически достоверные различия как частоты, так и уровня метилирования CpG-динуклеотидов этих фрагментов. Данные о метилировании гена *NKIRASI* получены впервые.

Следует также сказать, что в случае генов *RASSF1A*, *SEMA3B*, *RAR-beta2*, *GPX1* не было выявлено методами МС-ПЦР и МЧРА ни одного случая метилирования в лейкоцитах периферической крови от 15 здоровых доноров и в образцах тканей легкого, почки и молочной железы от 6 человек, онкологически здоровых в анамнезе. Напротив, метилирование было выявлено во всех образцах контролей в случае генов *RHOA* и *NKIRASI*. В случае гена *USP4* ситуация неоднозначная, т.к. было выявлено, что изменение метилирования этого гена обладает тканеспецифичным и опухоль-специфичным характером. Ген *USP4* метилирован в ДНК лейкоцитов от 15 здоровых доноров. Представляет интерес выявление метилирования промоторных районов, данных генов в образцах ДНК из гистологически нормальной ткани онкологического пациента, что может указывать на возможность молекулярных изменений в эпителиальных тканях еще до

появления морфологически выраженной патологии. Для ряда генов (*RASSF1A*, *SEMA3B*, *RAR-beta2*, *RHOA*) в нашей лаборатории проведено исследование на наличие гомозиготных делеций в промоторных областях этих генов, гомозиготные делеции выявлены с частотой 5-10% (данные не представлены). Образцы с гомозиготными делециями были исключены из соответствующих выборок при исследовании метилирования.

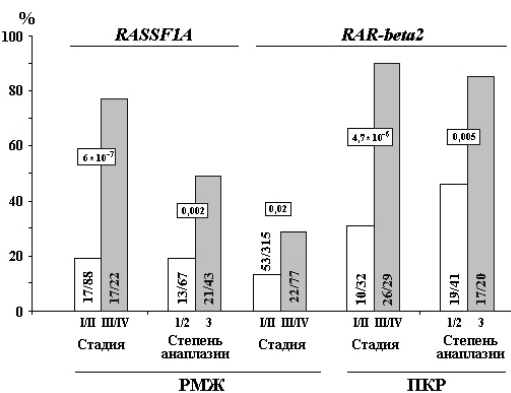
3. Анализ корреляций между изменением метилирования CpG-островков генов *RASSF1A*, *SEMA3B*, *RAR-beta2*, *GPX1*, *USP4*, *RHOA* и *NKIRAS1* и клинико-гистологическими характеристиками исследованных опухолей ПКР, РМЖ и НМКРЛ.

Во второй части работы на основе полученных результатов проводили выявление возможных корреляций частоты и уровня метилирования промоторных CpG-островков представленных генов с клинико-гистологическими характеристиками опухолей, такими как стадия, степень анаплазии и размер опухоли, а также метастазирование в регионарные лимфатические узлы.

3.1. Связь метилирования промоторных CpG-островков генов *RASSF1A* и *RAR-beta2* с прогрессией эпителиальных опухолей.

Для генов *RASSF1A* и *RAR-beta2* исследована корреляция частоты метилирования промоторных CpG-островков с клинической стадией, степенью анаплазии, метастазированием в регионарные лимфатические узлы и размером опухоли почки, молочной железы и немелкоклеточного рака легкого; результат представлен на рисунке 8.

Рисунок 8. Корреляция частоты метилирования гена *RAR-beta2* с прогрессией почечноклеточного рака (ПКР), уровня метилирования с прогрессией рака молочной железы; частоты метилирования гена *RASSF1A* с прогрессией рака молочной железы (РМЖ). Достоверность рассчитана с помощью теста Фишера.



Для гена *RASSF1A* связь между степенью метилирования и зависимостью от прогрессии наблюдали в нескольких видах рака: мочевого пузыря, головного мозга, предстательной железы, желудка и носоглотки, хотя всего анализировали

более 20 видов опухолей (*Dammann et al., 2005; Fendri et al., 2009*). Нами была установлена достоверная корреляция увеличения частоты метилирования промоторного района гена *RASSF1A* с увеличением стадии и степени анаплазии опухоли молочной железы, что согласуется с данными других авторов, установивших связь степени метилирования гена *RASSF1A* с плохим уровнем выживания пациентов при раке молочной железы (*Karray-Chouayekh et al., 2009*). Все это позволяет рассматривать ген *RASSF1A* как молекулярный маркер неблагоприятного прогноза РМЖ. В случае гена *RAR-beta2* нами была выявлена зависимость частоты метилирования с прогрессией почечноклеточного рака и рака молочной железы, позволяющая включить ген *RAR-beta2* в панель эпигенетических онкомаркеров для прогноза течения заболевания ПКР и РМЖ.

3.2. Связь метилирования 2-х CpG-островков гена *SEMA3B* с прогрессией эпителиальных опухолей.

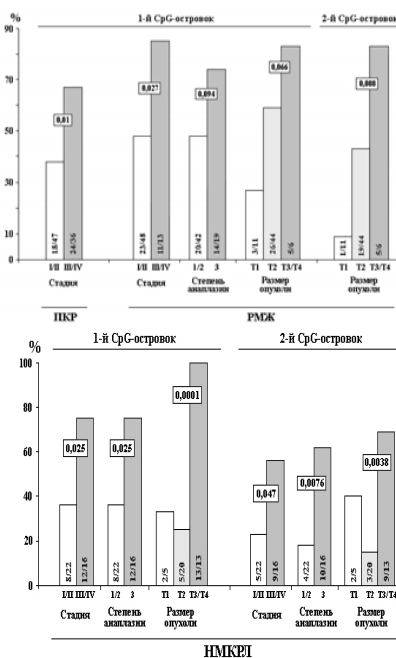


Рисунок 9. Корреляция частоты метилирования 2-х CpG-островков гена *SEMA3B* с прогрессией рака молочной железы (РМЖ), почечноклеточного рака (ПКР) и рака легкого (НМКРЛ). Достоверность рассчитана с помощью теста Фишера.

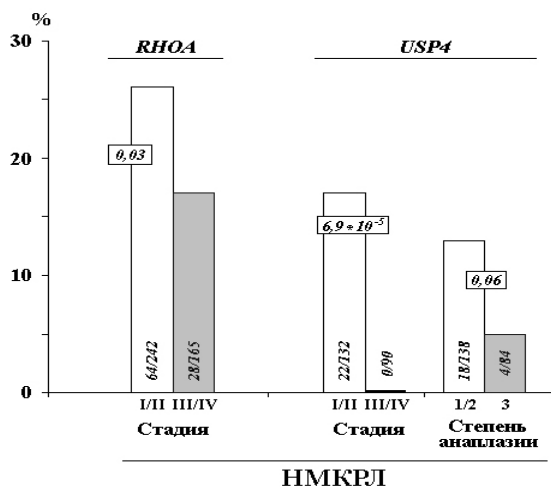
Для гена *SEMA3B* показано частое снижение уровня мРНК в опухолях за счет эпигенетического метилирования проксимального интронного CpG-островка гена (*Angeloni et al., 2007; Hesson et al., 2007*). Нами были исследованы корреляции частоты метилирования интронного и промоторного CpG-островков с прогрессией РМЖ, ПКР и НМКРЛ (рис.9). Установлено, что метилирование промоторного CpG-островка связано с развитием всех 3-х эпителиальных опухолей. С другой стороны, выявлены статистически достоверные корреляции частоты метилирования интронного CpG-островка с размером опухоли при раке молочной железы и прогрессией рака легкого (рис.9). Таким образом, метилирование дистального CpG-островка промоторной области гена *SEMA3B* может служить онкомаркером как для ранней диагностики опухолей, так и для прогноза и мониторинга течения ПКР, РМЖ и НМКРЛ, в то время как метилирование проксимального CpG-островка может

являться маркером неблагоприятного прогноза только для НМКРЛ.

3.3. Связь метилирования CpG-островков генов *RHOA*, *USP4* и *GPX1* с прогрессией эпителиальных опухолей.

При анализе профиля метилирования генов *RHOA* и *USP4* было выявлено деметилирование их промоторных районов при НМКРЛ, что указывает на онкогенный потенциал данных генов при этом виде рака. Выявленные корреляции уровня метилирования промоторных CpG-островков генов *RHOA* и *USP4* с клинической стадией и степенью анаплазии немелкоклеточного рака легкого подтвердили онкогенный потенциал данных генов при НМКРЛ (рис. 10).

Рисунок 10. Корреляция уровня метилирования промоторных CpG-островков генов *RHOA* и *USP4* с прогрессией рака легкого (НМКРЛ). Достоверность рассчитана с помощью теста Фишера.



В одной из работ показано повышение уровня мРНК *USP4* в опухолях МКРЛ и аденокарциномах легкого, а также онкогенная трансформация клеток NIH3T3 при введении кДНК этого гена (Gray et al., 1995).

Полученные нами данные по связи изменения метилирования генов *USP4* и *RHOA* согласуются с данными литературы об онкогенных функциях этих генов в опухолевой клетке, а связь изменения метилирования промоторных районов данных генов с прогрессией НМКРЛ, позволяют включить их в панель эпигенетических онкомаркеров для прогноза течения заболевания НМКРЛ. В случае гена *GPX1* связи изменения метилирования с прогрессией опухолей, обнаружено не было.

3.4. Связь метилирования 3-х фрагментов CpG-островка гена *NKIRASI* с прогрессией эпителиальных опухолей.

Исходя из наших данных все три фрагмента CpG-островка гена *NKIRASI* деметилируются в опухолях молочной железы и немелкоклеточного рака легкого. Однако в случае РМЖ статистически достоверных корреляций частоты метилирования фрагментов CpG-островка с прогрессией данного вида опухоли не было обнаружено ни для одного из фрагментов.

В то время как для НМКРЛ такие корреляции были выявлены для первого и второго фрагментов (рис. 11). Для первого фрагмента установлена статистически маргинально-значимая корреляция уменьшения уровня метилирования с увеличением степени анаплазии. Для третьего фрагмента выявлена корреляция уменьшения уровня метилирования с клинической стадией, степенью анаплазии и размером опухоли, а также выявлено достоверное уменьшение метилирования третьего фрагмента с увеличением метастазирования в регионарные лимфатические узлы (рис.11), что позволяет использовать данный тест для диагностики и прогноза этого социально-опасного вида рака. Данные литературы по метилированию промоторной области данного гена отсутствуют.

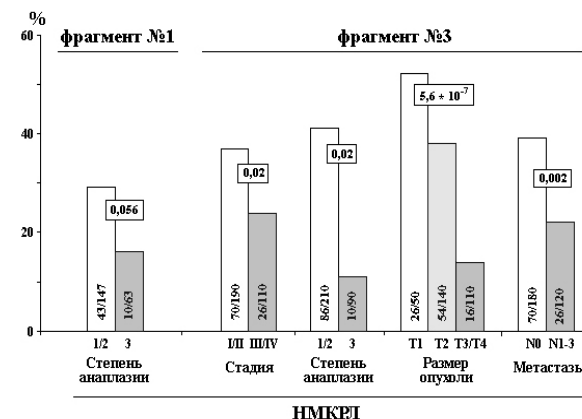


Рисунок 11. Корреляция уровня метилирования 2-х фрагментов CpG-островка гена *NKIRASI* с прогрессией рака легкого (НМКРЛ). Достоверность рассчитана с помощью теста Фишера.

4. Предпосылки для разработки новых диагностических и прогностических онкомаркеров.

Одной из важных задач молекулярной медицины и практической онкологии является подбор системы из нескольких маркеров, оптимальных для диагностики и прогнозирования социально-опасных форм рака. К таким заболеваниям относятся рак легкого, который отличает высокая частота смертности, широко-распространенный рак молочной железы и почечно-клеточный рак, который часто не подлежит операбельному вмешательству. На основании полученных данных были выбраны гены наиболее полезные для диагностики, а именно, изменяющие статус метилирования при данном виде рака преимущественно в одну сторону, например, появление гиперметилирования, что характерно для генов-супрессоров, или наоборот, снятие метилирования (деметилирование), что характерно для онкогенов.

При ПКР применение 4-х генов-маркеров *GPX1*, *RASSF1A*, *SEMA3B* и *RAR-beta2* позволяет выявить метилирование хотя бы одного из этих маркеров в 13 из 19

случаев (рис. 12). Таким образом, можно говорить, что панель этих маркеров позволяет выявить опухоль в 68% случаев ПКР.

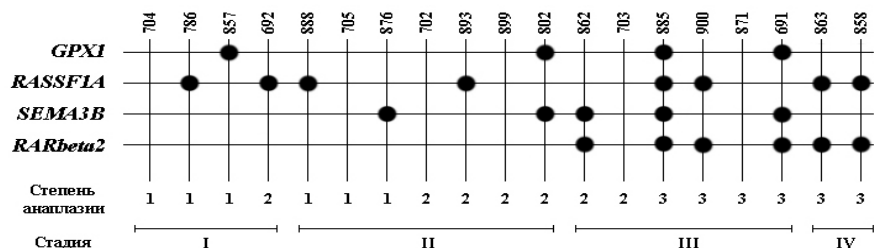


Рисунок 12. Схематическое изображение метилирования 4-х маркеров в 19 образцах ПКР. Черный кружок – CpG-динуклеотиды промоторной области гена метилированы в образце опухоли и не метилированы в соответствующей гистологически-нормальной ткани. Во всех остальных случаях не выявлено изменения статуса метилирования. Сверху показаны номера образцов, исследованных на изменение метилирования промоторных районов всех представленных слева генов. Для гена *SEMA3B* приведены данные для 2-х CpG-островков. Снизу показаны основные клинико-гистологические характеристики: стадия и степень анаплазии опухоли.

При РМЖ для 4-х генов получены репрезентативные данные для общей выборки из 45 образцов. Метилирование хотя бы в одном из этих 4-х маркеров (*RASSF1A*, *SEMA3B*, *RAR-beta2* и *USP4*) выявлено в 36 из 45 случаев (рис.13), то есть этот набор маркеров позволяет выявить опухоль молочной железы в 80% случаев.

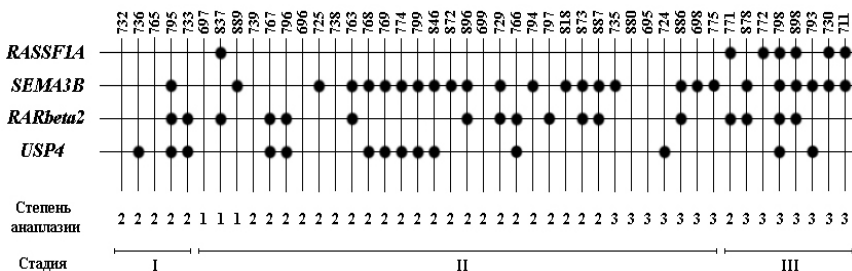


Рисунок 13. Схематическое изображение метилирования 4-х маркеров в 45 образцах РМЖ. Основные обозначения как на рисунке 12.

Анализ 5-ти генов при НМКРЛ: выявление гиперметилирования генов-супрессоров *RASSF1A*, *SEMA3B* и деметилирование предполагаемых потенциальных онкогенов *RHOA*, *USP4* и *NKIRAS1* в общей выборке образцов показал, что аномальное метилирование хотя бы одного из этих 5-ти маркеров выявляется в 25 из 29 случаев (рис. 14) т.е. в 89% случаев НМКРЛ. Таким образом, выбрана система маркеров (рис. 14) для диагностики НМКРЛ с частотой выявления 89%.

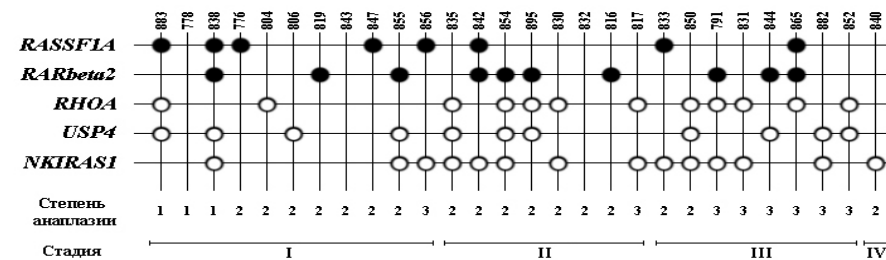


Рисунок 14. Схематическое изображение метилирования 5-ти маркеров в 28 образцах НМКРЛ. Белый кружок - CpG-динуклеотиды промоторной области гена метилированы в образце гистологически-нормальной ткани и не метилированы в образце опухоли. Основные обозначения как на рисунке 12.

К настоящему времени подобраны эпигенетические маркеры: – *RASSF1A*, *HIN-1*, *RAR-beta2*, *Cyclin D2*, *Twist*, *BRCA1*, которые позволяют в 100% случаев выявить метилирование хотя бы в одном из этих генов, и тем самым установить наличие опухоли (*Fackler et al., 2003, 2009; Karray-Chouayekh et al., 2009; Feng et al., 2009; Radpour et al., 2009*). Несколько более сложная ситуация с диагностикой и прогнозированием опухоли почки. При данном виде рака показана ассоциация с возникновением и прогнозом опухоли для гена *UCHL1* (*Kagara et al., 2008*), а также прогностическое значение гена *PTEN* (*Ljungberg, 2007*). Подобранная нами панель маркеров позволяет выявить ПКР с достаточно высокой частотой (68%), однако она нуждается в доработке. Для гена *RASSF1A* выявлено метилирование промоторной области на ранней стадии заболевания ПКР, что согласуется с нашими данными (*Peters et al., 2007*). При НМКРЛ на ранней стадии заболевания происходит метилирование генов *RASSF1A*, *APC*, *ESR1*, *ABC1* и *HOXC9* (*Lin et al., 2009*). Также описаны и другие панели маркеров для НМКРЛ – *APC*, *CDKN2A/p16* и *RASSF1A* с чувствительностью обнаружения метилирования 53% и высокой спецификой (99%) (*Schmiemann et al., 2005*). Для панелей онкомаркеров НМКРЛ используют также гены *HS3ST2(3OST2)*, *MLH1*, *RARβ2*, *FHIT* и *HYAL2*, которые по данным разных авторов имеют чувствительность определения метилирования из слюны до 76% и специфику до 86% (*Wang et al., 2003; Belinsky et al., 2006; Shivapurkar et al 2007; Li et al., 2007*).

В данной работе нами показаны высокие частоты изменения профиля метилирования ряда генов, приводящих к опухолевой трансформации клетки и прогрессии рака. Эти результаты могут быть использованы в целях диагностики, прогноза и мониторинга течения этих онкологических заболеваний. Подобранная система маркеров, позволяющие с высокой чувствительностью выявлять РМЖ, ПКР и НМКРЛ – в 80%, 68% и 89% случаев, соответственно.

ВЫВОДЫ

1. Впервые обнаружено метилирование не исследованного ранее дистального промоторного CpG-островка гена *SEMA3B* в опухолях почки, легкого и молочной железы. Показано, что частота метилирования промоторного CpG-островка в 1,5 раза выше, чем интронного в опухолях разных локализаций. Выявлены корреляции частоты метилирования промоторного CpG-островка гена *SEMA3B* с прогрессией 3-х видов опухолей, а интронного с прогрессией РМЖ и НМКРЛ.
2. Впервые показана высокая частота метилирования промоторного района гена *RAR-beta2* при ПКП (59%), а также установлена достоверная корреляция частоты метилирования этого гена с прогрессией ПКП и РМЖ.
3. Выявлена корреляция частоты метилирования промоторного района гена *RASSF1A* с клинической стадией и степенью анаплазии опухоли молочной железы.
4. Впервые исследованно метилирование промоторных районов генов *RHOA*, *USP4*, *GPX1*, *NKIRASI* в опухолях разных локализаций. Обнаружено частое деметилирование гена *RHOA* при НМКРЛ и гена *NKIRASI* при РМЖ и НМКРЛ. Показан опухоль-специфичный характер изменения профиля метилирования промоторной области гена *USP4*. Выявлены корреляции уровня метилирования промоторных CpG-островков генов *RHOA* и *USP4* с клинической стадией и степенью анаплазии немелкоклеточного рака легкого. Установлена корреляция уровня метилирования CpG-островка гена *NKIRASI* с прогрессией немелкоклеточного рака легкого: с клинической стадией, степенью анаплазии и размером опухоли, а также с метастазированием в регионарные лимфатические узлы.
5. Составлены панели информативных маркеров, позволяющие с высокой чувствительностью выявлять опухоль молочной железы (в 80% случаев), опухоль почки (в 68% случаев) и немелкоклеточный рак легкого (в 89% случаев).

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ.

1. Логинов В.И., Малюкова А.В., Серегин Ю.А., Ходырев Д.С., Казубская Т.П., Ермилова В.Д., Гарькавцева Р.Ф., Киселев Л.Л., Забаровский Е.Р., Брага Э.А. Уровень метилирования гена *RASSF1A* в эпителиальных опухолях почки, молочной железы и яичников. *Молекулярная Биология*, 2004 Т. 38 С. 654-667.
2. Малюкова А.В., Логинов В.И., Ходырев Д.С., Кадырова Е.Л., Пронина И.В., Иванова Т.А., Киселев Ф.Л., Забаровский Е.Р., Киселева Н.П., Брага Э.А. Метилирование предполагаемого гена-супрессора *RASSF1A* в опухолях шейки матки. *Молекулярная Биология*, 2004.Т.38С.1005-1013.
3. Э.А. Брага, В.И. Логинов, Е.А. Климов, Г. Килосанидзе, Д.С. Ходырев, Н.Л. Каганова, Т.П. Казубская, В.Д. Ермилова, Р.Ф. Гарькавцева, И.В. Пронина, О.И. Рудько, Е.Р. Забаровский, Г.Е. Сулимова, Л.Л. Киселев. Умножение копий гена и деметилирование промоторного района – факторы активации транскрипции онкогена *RHOA* в эпителиальных опухолях. *Молекулярная биология*, 2006,Т.40С.865-877.
4. Ходырев Д.С., Логинов В.И., Пронина И.В., Казубская Т.П., Гарькавцева Р.Ф., Брага Э.А. Метилирование промоторной области гена *RAR-beta2* в опухолях почки, молочной железы и яичников. *Генетика*. 2008. Т. 44 С. 1126-1132.
5. Логинов В.И., Базов В.И., Ходырев Д.С., Пронина И.В., Казубская Т.П., Ермилова В.Д., Гарькавцева Р.Ф., Забаровский Е.Р., Брага Э.А. Районы потенциальных генов-супрессоров эпителиальных опухолей почки, молочной железы и яичников на хромосоме 3 человека. *Генетика*. 2008. Т. 44 С. 250-256.
6. Логинов В.И., Ходырев Д.С., Пронина И.В., Казубская Т.П., Ермилова В.Д., Гарькавцева Р.Ф., Брага Э.А. Метилирование промоторной области гена *RASSF1A* и частота аллельных дисбалансов в критичных районах хромосомы 3 коррелируют с прогрессией светлоклеточного рака почки. *Молекулярная биология*.2009.43:436-445.
7. Логинов В.И., Ходырев Д.С., Пронина И.В., Малюкова А.В., Казубская Т.П., Ермилова В.Д., Гарькавцева Р.Ф., Забаровский Е.Р., Брага Э.А. Два CpG-островка гена *SEMA3B*: метилирование при светлоклеточном раке почки.

8. **Ходырев Д.С.**, Логинов В.И., Пронина И.В., Губина О.Г., Гарькавцева Р.Ф., Брага Э.А. Анализ метилирования промоторных областей генов *RARbeta2* и *SEMA3B* для диагностики и прогноза эпителиальных опухолей почки, молочной железы и яичников. Материалы V Конференции молодых ученых России с международным участием «Фундаментальные науки и прогресс клинической медицины», Москва, 2008г.
9. **Ходырев Д.С.**, Логинов В.И., Пронина И.В., Губина О.Г., Казубская Т.П., Гарькавцева Р.Ф., Брага Э.А. Метилирование промоторной области гена *RAR-beta2* в опухолях почки, молочной железы и яичников. Материалы 4-й Российской конференции по фундаментальной онкологии “Петровские чтения”, Санкт-Петербург, 2008г.
10. **Ходырев Д.С.**, Логинов В.И., Пронина И.В., Брага Э.А. Метилирование двух CpG-островков гена *SEMA3B* в эпителиальных опухолях разных локализаций. Материалы V Съезда Вавиловского общества генетиков и селекционеров, Москва, 2009г.