## Роль метилирования ДНК в канцерогенезе.

**Введение.**

**Метилирование ДНК** - это процесс ковалентного присоединения *in vivo* метильной группы к основаниям в составе ДНК.

5-метилцитозин (5-МеС) был первым обнаруженным модифицированным основанием (*Hotchkiss R.D., 1948*). Метилирование цитозиновых остатков геномной ДНК имеет место у бактерий, растений, животных, в том числе и млекопитающих (включая человека), но отсутствует у дрожжей и нематод (*Caenorhabditis elegans*). Помимо 5-МеС ДНК прокариот содержит модифицированное основание N6-метиладенин, тогда как ДНК высших эукариот - только 5-МеС (Bird A.P., 1995). Поскольку нуклеотидная последовательность при этом не изменяется, то по своей сути метилирование - событие эпигенетическое (*Baylin S.B., et al, 1998*).

Наиболее сложные функции метилирование ДНК выполняет в клетках млекопитающих. Оно вовлечено в такие фундаментальные процессы жизнедеятельности клетки, как регуляция экспрессии генов и поддержание стабильности генома. В первом случае - это стабильная репрессия транскрипции определенных генов (гены инактивированной Х-хромосомы у самок, импринтированные гены, часть тканеспецифичных генов), во втором - регуляция процессов рекомбинации и защита генома от инвазии и распространения чужеродной информации. Очевидно, что многообразие функций метилирования и важность процессов, в которых оно участвует, предполагает наличие достаточно жесткой регуляции. В исследованиях на экспериментальных моделях было показано, что нарушение регуляции метилирования в эмбриогенезе может приводить к гибели организма. Изменение степени метилирования в соматических клетках взрослого организма наблюдается при некоторых патологических состояниях у человека, в том числе и злокачественных новообразованиях. Далее будут рассмотрены современные представления о метилировании ДНК в клетках млекопитающих и его роли в канцерогенезе.

**Метилирование ДНК в нормальных клетках.**

Для понимания роли метилирования при канцерогенезе необходимо знание закономерностей протекания этого процесса в нормальном организме.

Клетки млекопитающих обладают способностью эпигенетически модифицировать свой геном путем энзиматического по пятому положению метилирования остатков цитозина в составе 5/-CpG динуклеотидов. Цитозиновый остаток в составе 5/-GpC или любых других динуклеотидов не метилируется. Приблизительно 70-80% CpG динуклеотидов в геномах млекопитающих метилированы (*Baylin S.B., et al, 1998*). Одновременно, их распределение в ДНК является не случайным, и, в целом, геномы обеднены по отношению к CpG динуклеотидам (*Antequera F. & Bird A., 1993*). Предполагается, что именно метилирование сыграло в этом критическую роль. 5-МеС в составе CpG динуклеотидов гипермутабилен, поскольку аминогруппа в шестом положении цитозинового кольца крайне нестабильна. 5-МеС может легко подвергаться спонтанному дезаминированию с образованием тимина. Это обстоятельство вело в процессе эволюции к многочисленным заменам пар G-C на А-Т, в результате чего динуклеотидов CpG в составе ДНК приблизительно в 5 раз меньше (~1 CpG на 80 динуклеотидов), чем следовало бы (1 на 16) (*Gardiner-Garden V. & Frommer M., 1987*).

Существуют два вида распределения CpG динуклеотидов в составе ДНК млекопитающих. Первое - это рассеянные CpG (их ~80% от общего количества). Они рассредоточены по всему геному в виде одиночных динуклеотидов, причем особой закономерности в их распределении выявить невозможно. Чаще всего они встречаются в интронах и намного реже в транскрибируемых областях. Значительная часть тканеспецифичных генов имеют в своих промоторах одиночные CpG. Степень их метилирования может быть различной в разных клетках и тканях (*Лихтенштейн А.В. & Киселева Н.П., 2001*).

Второй вид распределения заключается в следующем. В геномах млекопитающих существуют короткие (от 500 до 5000 пар нуклеотидов) последовательности, где CpG динуклеотиды распределены кластерами. Плотность их близка к расчетной (1 на 16), а содержание G + C превышает 60%. Такие последовательности получили название CpG-островков. Характерным свойством этих структур является их частая локализация в 5/-регуляторных районах генов, но они также встречаются и в интронах, а также на 3/- концах генов. Свыше половины генов, составляющих функционирующий геном человека, содержат CpG-островки. К их числу относятся, по-видимому, все гены домашнего хозяйства, около 40% тканеспецифичных генов, многие протоонкогены и гены супрессоры опухолевого роста. CpG-островки, ассоциированные с регуляторными областями генов, неметилированы во всех тканях эмбриона и взрослого организма (включая и гаметы), независимо от того, экспрессируются в них гены или нет. Исключение составляют только гены, расположенные на инактивированной Х-хромосоме у самок, а также импринтированные гены, которые экспрессируются только с одного из двух аллелей, материнского или отцовского. У этих генов в нормальных клетках CpG-островки метилированы (*Baylin S.B., et al, 1998; Лихтенштейн А.В. & Киселева Н.П., 2001*). Кроме того, большую часть генома млекопитающих (~95%) составляет генетический балласт или junk ДНК, участки которой, подвергаются интенсивному метилированию. Например, к числу последовательностей, обогащенных CpG динуклеотидами, относятся транспозоны (~25% генома человека) и сателлитные повторы (~10% генома человека). Эти паразитические элементы метилированы во всех изученных сайтах генома нормального взрослого организма (*Selker E.U., 1999*). Подобным же образом в нормальных клетках грызунов и человека интегрированные вирусные последовательности подвергаются метилированию и обусловленному им стабильному блоку транскрипции (*Walsh C.P., et al, 1998*).

Паттерн метилирования конкретных генов и генома в целом устанавливается в процессе эмбриогенеза и стабильно сохраняется в популяциях соматических клеток взрослого организма. Так, вскоре после оплодотворения, на стадии 1-2 клеточных делений, происходит тотальное деметилирование генома, устраняющее паттерн исходных половых клеток. Деметилированное состояние ДНК сохраняется до стадии имплантации бластоцисты (*Razin A. & Shemer R., 1995*). На постимплантационной стадии начинается процесс метилирования *de novo*, когда большинство CpG-сайтов вновь метилируется, за исключением тех, что находятся в составе CpG-островков (*Tuker M.S., 1999*). Механизм, позволяющий CpG-островкам избегать метилирования *de novo* в эмбриогенезе, пока неизвестен. Предполагают, что защитную роль в этом процессе играют специфические *цис*-действующие генетические элементы. В настоящее время такая функция доказана для последовательности, являющейся одновременно сайтом узнавания транскрипционного фактора Sp1 (*Tuker M.S., 1999*). Позднее, в процессе дифференцировки происходит локальное деметилирование индивидуальных генов. В результате этих последовательных событий 70-80% CpG-сайтов в геноме человека и мыши оказывается метилированными. Сформированный профиль метилирования затем сохраняется в ряду клеточных поколений. Поддерживающее метилирование осуществляется только в тех сайтах вновь синтезированной цепи ДНК, где в исходной цепи уже содержались CpG динуклеотиды с метилированным остатком цитозина (*Лихтенштейн А.В. & Киселева Н.П., 2001*).

В настоящее время у млекопитающих, включая человека, известны четыре фермента, осуществляющие метилирование геномной ДНК. Это ДНК-метилтрансферазы: Dnmt1, Dnmt2, Dnmt 3a и 3b (*Лихтенштейн А.В. & Киселева Н.П., 2001; Robertson K.D. & Jones P.A., 2000*). Dnmt1 - наиболее изученный на сегодня фермент системы метилирования ДНК у позвоночных. Гомозиготная делеция dnmt1 у мышей приводит к летальному исходу на стадии эмбриона (*Li E., et al, 1993*). Именно это наблюдение явилось доказательством необходимости метилирования ДНК у высших эукариот. В структуре Dnmt1 были выявлены два домена: каталитический и регуляторный. Каталитический домен локализован в С-концевой области белка и структурно близок к бактериальным цитозиновым метилтрансферазам. В свою очередь, регуляторный домен расположен в N-концевой части Dnmt1 и содержит специальную сигнальную последовательность, направляющую фермент в активные репликативные комплексы делящихся клеток (*Bestor T.H. & Verdin G.L., 1994*). Активность фермента резко возрастает с началом синтеза ДНК и в первые минуты после репликации профиль метилирования дочерней нити воссоздается по образцу материнской. Dnmt 3a и 3b, как оказалось, необходимы для метилирования *de novo* (*Okano M., et al, 1998a*). Инактивация соответствующих генов несовместима с развитием зародыша у мыши. Ферменты экспрессируются на высоком уровне в эмбрионах и на очень низком в соматических клетках взрослого организма. Эти ферменты различаются по своим функциям, так как только Dnmt3b небходима для метилирования центромерных минисателлитных повторов (*Okano M., et al, 1999*). Функции Dnmt2 остаются пока неясными (*Okano M., et al, 1998b*).

В настоящее время ничего не известно и о том, как происходит тотальное деметилирование генома в эмбриогенезе. Только совсем недавно была открыта ДНК-деметилаза, которая по своим свойствам является весьма вероятным кандидатом на роль фермента, осуществляющего тотальное деметилирование. ДНК-деметилаза способна узнавать метилированные CpG динуклеотиды и трансформировать 5-МеС в цитозин, не нарушая целостности ДНК (*Bhatacharya S.K., et al, 1999*). Что касается механизма локального деметилирования, то для нескольких тканеспецифичных генов установлено, что этот процесс контролируется определенными *цис*-действующими генетическими элементами, которые узнаются специфическими *транс*-действующими белковыми факторами (*Лихтенштейн А.В. & Киселева Н.П., 2001*).

Метилирование подавляет экспрессию на уровне транскрипции. Существует, по крайней мере, два механизма, с помощью которых метилирование может препятствовать транскрипции. Один из них заключается в прямом ингибировании связывания специфических транскрипционных факторов (c-Myc/Myn, AP-2, E2F и ATF/CREB-подобные белки), чьи сайты узнавания содержат одиночные метилированные CpG динуклеотиды (*Robertson K.D. & Jones P.A., 2000*). Второй механизм репрессии опосредуется через метил-CpG связывающие белки, такие как MeCP1 и MeCP2, известные также как MBD-семейство (*Boyes J. & BirdA., 1992*). Они не проявляют специфичности к последовательности немодифицированных нуклеотидов, но обладают высокой степенью родства к метилированной ДНК. Наиболее изученный из них, MeCP2 локализуется в ядре в гетерохроматине (неактивен, конденсирован, реплицируется в поздней S-фазе). Структура белка включает 2 домена: один связывает метилированные CpG, второй обеспечивает функции репрессора транскрипции. Взаимодействуя с метилированными основаниями, MeCP2 рекрутирует корепрессорный комплекс mSin3a/HDAC (гистондеацетилаза), который осуществляет деацетилирование N-концевых аминогрупп гистонов. В результате гистоны приобретают дополнительный положительный заряд и способность прочно взаимодействовать с витками нуклеосомной ДНК. Нуклеосомы компактизуются и теряют способность взаимодействовать с факторами транскрипции. Напротив, рекрутирование в комплекс с транскрипционными факторами белков с гистонацетилазной активностью (НАТ) способно снимать репрессирующее действие метилирования, приводя к образованию эухроматина (деконденсирован, потенциально активен, реплицируется в ранней S-фазе) (*Лихтенштейн А.В. & Киселева Н.П., 2001; Spencer T.E., et al, 1997*).

Таким образом, наряду с формированием репрессивных комплексов на основе обычных белков - репрессоров, узнающих специфические последовательности, высшие эукариоты с усложненным геномом обладают дополнительным уникальным эпигенетическим механизмом регуляции транскрипции, который наследуется дочерними клетками при делении.

**Нарушения метилирования ДНК при канцерегенезе.**

За последние 15-20 лет было установлено, что паттерн метилирования в неопластических клетках значительно изменяется по сравнению с нормальными клетками, причем тотальное деметилирование генома сопровождается увеличением активности метилтрансферазы и локальным гиперметилированием CpG-островков. Во всех, без исключения, исследованных неоплазиях наблюдается подобный дисбаланс метилирования. В свете описанных выше функций метилирования в нормальных клетках, очевидно, что эти нарушения могут изменять структуру хроматина и функции ДНК, внося тем самым значительный вклад в создание генетической и фенотипической нестабильности опухолевой клетки.

**1.      Тотальное гипометилирование генома.**

Было обнаружено, что одним из первичных нарушений метилирования ДНК в неопластических клетках, является тотальное гипометилирование генома. Уменьшение количества метильных групп является одним из ранних, зачастую еще до появления сформированной опухоли, событием в клеточной трансформации. Напрямую роль гипометилирования ДНК в процессе клеточной трансформации была доказана на основании данных о том, что содержание грызунов на безметиониновой диете, ведущей к дефициту доноров метильных групп, вызывает гипометилирование ДНК и образование опухолей печени (*Pogribny I.P., et al, 1995*). Несмотря на явную ассоциацию гипометилирования ДНК с процессом образования опухолей, причины и конкретные механизмы, обуславливающие его канцерогенный эффект, до сих пор остаются неясными. Есть данные, что гипометилирование может затрагивать определенные онкогены, такие как К-ras при раке легкого и кишечника у человека. Эти локальные ген-специфические изменения возникают на ранних стадиях канцерогенеза и обнаружены, в частности, в доброкачественных полипах, которые являются предшественниками карциномы кишечника (*Baylin S.B., et al, 1998; Лихтенштейн А.В. & Киселева Н.П., 2001*). Тем не менее, спектр генов, активируемых в опухолях в результате гипометилирования генома, ограничен. Вероятно, это объясняется тем, что гипометилирование затрагивает рассеянные CpG динуклеотиды. CpG-островки не могут быть объектами деметилирования. Исключение составляют импринтированные гены и гены на инактивированной Х-хромосоме у самок. Таким образом, деметилирование может затрагивать группы тканеспецифичных генов, содержащих в регуляторных областях одиночные CpG динуклеотиды.

Нарушение импринтинга в результате деметилирования и его роль в канцерогенезе были доказаны при изучении опухоли Вильмса (*Jirtl R.L., 1999*). Опухоль этого типа развивается у детей в раннем возрасте из метанефрических бластных клеток. Существуют спорадическая и наследственная формы заболевания (*RyanG., et al , 1995*). Было обнаружено, что в 70% случаев в опухолях Вильмса имеет место аберрантное деметилирование материнского аллеля и биаллельная экспрессия гена инсулинподобного фактора роста IGF2. Как известно, при сверхэкспрессии IGF2 проявляет свойства онкогена. Биаллельная экспрессия IGF2 часто наблюдается в фенотипически нормальных тканях окружающих опухоль, т.е. является ранним событием при возникновении опухоли Вильмса. Нарушение импринтинга IGF2 наблюдается более чем в 20 различных типах опухолей (*Jirtl R.L. , 1999*).

Как уже упоминалось выше, тотальное гипометилирование генома может, изменяя структуру хроматина и переводя его в активное состояние, косвенно влиять на экспрессию генов. Так, было показано, что деметилирование генома нормальных клеток под воздействием 5-азацитидина ведет к трансформации некоторых клеточных культур и нарушению процесса расхождения хромосом во время митоза (*Baylin S.B., et al, 1998; Лихтенштейн А.В. & Киселева Н.П., 2001*).

Еще одним следствием тотального гипометилирования и, возможно, наиболее вероятным, является возникающая в результате нарушения паттерна метилирования общая нестабильность генома. Так гипометилирование ДНК в эмбриональных клетках мыши, нокаутированных по гену dnmt1, увеличивало частоту реарранжировок эндогенных ретровирусов и паразитических последовательностей, частоту образования делеций и транслокаций некоторых уникальных генов, т.е. являлось причиной хромосомных аномалий и последующего летального исхода (*Chen R.Z., et al, 1998*). Однако, для опухолевых клеток пока отсутствуют данные, которые подтвердили бы, что перечисленные нарушения, всегда присутствующие в них, являются прямым следствием тотального гипометилирования.

**2.      Локальное гиперметилирование.**

Локальное гиперметилирование распространяется на небольшую часть CpG динуклеотидов (~20%), которые входят в состав CpG-островков. CpG-островки, за известными исключениями, всегда неметилированы в нормальных клетках. Аберрантное гиперметилирование CpG-островков является особенностью иммортализованных и трансформированных клеток и связано с инактивацией определенных генов супрессоров опухолевого роста y человека (*Toyota V. & Issa J.-P.J., 1999*).

Механизм локального гиперметилирования не вполне ясен. По-видимому, важную роль в этом процессе играет повышение метилтрансферазной активности, тем более что оно является характерным свойством опухолевых клеток (*Robertson K.D., et al, 1999*). При исследовании некоторых клеточных культур было показано, что повышение ДНК-метилтрансферазной активности зачастую предшествует злокачественной трансформации. Так, трансфекция клонированного гена человеческой Dnmt1 в иммортализованные фибробласты человека приводит к аберрантному метилированию CpG-островков в промоторных зонах ряда генов, в том числе генов E-cad (*E-cadherin*) и HIC1 (*hypermethylated in cancer*). В тоже время, CpG-островки, ассоциированные с другими генами (например, с геном-супрессором p16INK4A), не меняют статус метилирования, несмотря на постоянную экспрессию Dnmt1 (*Vertino P.M., et al, 1996*). Таким образом, очевидно, что повышение активности Dnmt1 играет определенную роль в аберрантном метилировании CpG-островков. Однако простым повышением уровня экспрессии нельзя объяснить появление у фермента способности к метилированию *de novo*. По-видимому, в трансформированных и опухолевых клетках нарушен механизм защиты CpG-островков от метилирования. Кроме того, недавно было показано, что Dnmt1 является мишенью действия онкобелков Ras и Fos, то есть активность фермента регулируется внутриклеточными путями, передающими митогенные сигналы (*Лихтенштейн А.В. & Киселева Н.П., 2001*).

Гиперметилирование CpG-островков приводит к стабильной инактивации прилежащего гена, то есть феномену MAGI (methylation-associated gene inactivation). Это происходит в результате возникновения стерических препятствий к связыванию транскрипционных факторов или гетерохроматинизации, опосредованной метилцитозин-связывающими белками MBD (*Robertson K.D. & Jones P.A., 2000*). Если прилежащим геном окажется ген домашнего хозяйства, то его инактивация будет летальна для клетки, но не будет иметь особых последствий для организма. Подавление экспрессии какого-либо из тканеспецифических генов нанесет определенный ущерб дифференциальному фенотипу клетки, не оказывая влияния на общую жизнеспособность. В то же время, инактивация гена супрессора опухолевого роста или гена репарации может создать условия для неконтролируемой пролиферации (*Baylin S.B., et al, 1998; Лихтенштейн А.В. & Киселева Н.П., 2001*). Аберрантное метилирование CpG-островков является ранним событием в процессе возникновения опухоли. Например, гиперметилирование промоторного региона гена супрессора опухолевого роста p16INK4A при плоскоклеточном раке легкого было обнаружено уже в гиперплазии (*Baylin S.B., et al, 1998*).

Ген ретинобластомы (Rb1) - первый классический ген супрессор опухолевого роста, в отношении которого был установлен феномен MAGI. Важность этого гена определяется тем, что, как полагают, все (или почти все) антипролиферативные сигналы реализуются в клетке опосредованно, через белок Rb или родственные белки (*Hanahan D. & Weinberg R.A., 2000*). Белок Rb синтезируется на протяжении всего клеточного цикла и почти все время присутствует в неполностью фосфорилированном виде. Такая форма белка способна связывать факторы, отвечающие за переход клетки из фазы G1 в фазу S, т.е. принимает участие в негативной регуляции клеточного цикла (*Kouzarides T., 1995*). Когда белок Rb фосфорилируется с помощью специфичных для клеточного цикла киназ (например, циклином D1/CDK4), связанные с ним эффекторы высвобождаются и запускают переход в S-фазу.

Сама по себе, ретинобластома представляет собой опухоль, развивающуюся из эмбриональной сетчатки и наследуемую в большинстве случаев по аутосомно-доминантному типу с 90%-ной пенетрантностью. Кроме семейных случаев возникновения ретинобластомы описаны и спорадические случаи (*Киселев Ф.Л., 1998*). Гиперметилирование CpG-островка промотора гена Rb1 имеет место только при спорадической (унилатеральной) ретинобластоме в 10-15% случаев (*Hanahan D. & Weinberg R.A., 2000*). К настоящему времени известно значительное число генов супрессоров опухолевого роста, инактивированных в различных опухолях путем гипеметилирования CpG-островков, локализованных в их регуляторных областях. Среди них: гены Rb1, р53, VHL, BRCA1, MLH1 и другие (*Baylin S.B., et al, 1998; Лихтенштейн А.В. & Киселева Н.П., 2001; Robertson K.D. & Jones P.A., 2000; Hanahan D. & Weinberg R.A., 2000; Киселев Ф.Л., 1998*).

**3.      5-МеС как эндогенный мутаген.**

5-МеС может подвергаться спонтанному дезаминированию даже при обычных условиях тепловых флуктуаций, что делает CpG сайты "горячими точками" для возникновения мутаций. CpG динуклеотиды, расположенные в кодирующих регионах генов супрессоров опухолевого роста могут спровоцировать мутации, приводящие к возникновению опухоли (*Rideout W.M.I., et al, 1990*). О серьезности этого феномена свидетельствует то обстоятельство, что из 300 мутаций гена р53, главного хранителя целостности генома, зарегистрированных в опухолях человека различной локализации, 25-30% относятся к мутациям этого типа или эпимутациям (*Greenblatt M.S., et al, 1994*).

Увеличение мутабельности 5-МеС может быть обусловлено тремя факторами: различной эффективностью репарации, скоростью спонтанного дезаминирования и скоростью деления клеток (*Robertson K.D. & Jones P.A., 2000*). Дезаминирование 5-МеС приводит к образованию тимина, такого же естественного основания ДНК, как и другие, и поэтому возможны ошибки системы репарации. Серьезность проблемы состоит в том, что замены нуклеотидов возникают довольно часто. Согласно расчетам, за сутки в каждой клетке происходит ~100 реакций дезаминирования, из которых многие приводят к мутациям (*Лихтенштейн А.В. & Киселева Н.П., 2001*). Что касается третьего фактора, то оказалось, что связанные с CpG мутации быстрее происходят в поврежденных тканях в процессе восстановления (*Greenblatt M.S., et al, 1994*).

**Заключение.**

Характерной чертой опухолевых и трансформированных in vitro клеток млекопитающих является дисбаланс метилирования геномной ДНК, который вносит значительный вклад в создание генетической и фенотипической нестабильности. В тоже время, нестабильность 5-МеС в составе CpG динуклеотидов, приводящая к эпимутациям, может иметь тот же конечный результат. Таким образом, метилирование, являясь эпигенетической модификацией ДНК, может в случае нарушения приводить к генетическим изменениям, делая очевидной взаимосвязь между генетическими и эпигенетическими процессами при возникновении и развитии опухоли.

Нарушение паттерна метилирования проявляется на ранних стадиях злокачественной трансформации клеток млекопитающих. С медицинской точки зрения это открывает возможности для ранней диагностики и лечения заболевания. Тем более, что в отличие от мутаций, которые принципиально необратимы, модификации ДНК, хотя и весьма стабильны, но принципиально обратимы.

Литература

Antequera F., Bird A. (1993) Proc.Natl.Acad.Sci. USA, 90, 11995-11999;
Baylin S.B., Herman J.G., Graff J.R. et al (1998) Adv.Cancer Res., 72, 141-196;
Bestor T.H., Verdin G.L. (1994) Carr.Opin. Cell Biol., 259, 946-951;
Bhatacharya S.K., Ramchandani S., Cervoni N., Szyf M. (1999) Nature, 397, 579-583;
Bird A.P. (1995) Trends Genet., 11, 94-100;
Boyes J., BirdA. (1992) EMBO J., 11, 327-333;
Chen R.Z. et al (1998) Nature, 395, 89-92;
Gardiner-Garden V., Frommer M. (1987) J.Mol.Biol., 196, 261-268;
Greenblatt M.S., Bennett W.P., Нollstein M., Harris C.C. (1994) Cancer Res., 54, 4855-4878;
Hanahan D., Weinberg R.A. (2000) Cell, 100, 57-70;
Hotchkiss R.D. (1948) J.Biol.Chem., 168, 315-322 ;
Jirtl R.L. (1999) Exp. Cell Res., 248, 18-24 ;
Киселев Ф.Л. (1998) Молекулярная Биология, 32, 197-205;
Kouzarides T. (1995) Sem.Canser Biol., 6, 91-98 ;
Лихтенштейн А.В., Киселева Н.П. (2001), Биохимия, 66, 293-317;