

Асинхронная репликация у онкологических больных

Г.Ф. Михайлова, В.В. Цепенко, Т.Г. Шкаврова, Е.В. Голуб

Медицинский радиологический научный центр им А.Ф. Цыба – филиал ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Минздрава России; Россия, 249036 Обнинск, ул. Королева, 4

Контакты: Галина Федоровна Михайлова tais1260@mail.ru

Эпигенетика — наука об обратимых наследственных изменениях функционирования гена, которые происходят без изменений в нуклеотидной последовательности ДНК. Один из важнейших маркеров нарушений эпигенетической регуляции генома клетки — асинхронность репликации ДНК биаллельно экспрессирующихся генов. Удобным методом оценки нарушения синхронности репликации (асинхронной репликации) в культивированных лимфоцитах периферической крови человека, как правило, является интерфазная флуоресцентная *in situ* гибридизация (I-FISH). В обзоре проведен анализ работ, направленных на изучение асинхронной репликации биаллельно экспрессирующихся генов в лимфоцитах периферической крови онкологических больных. Этот анализ показал, что асинхронная репликация — неспецифический маркер злокачественных новообразований и наблюдается как у онкогематологических больных, так и у пациентов с солидными опухолями, причем не только в клетках опухоли, но и в лимфоцитах периферической крови. Проведенный анализ продемонстрировал, что встречаемость лимфоцитов с асинхронной репликацией изученных генов у онкологических больных достоверно повышена по сравнению со здоровыми лицами и увеличивается в процессе малигнизации (злокачественного перерождения) заболеваний. Это дает потенциальную возможность использовать асинхронную репликацию как молекулярно-генетический маркер для раннего выявления лиц с онкологическими заболеваниями.

Ключевые слова: асинхронная репликация, флуоресцентная *in situ* гибридизация, лимфоциты периферической крови, онкологический биомаркер

Для цитирования: Михайлова Г.Ф., Цепенко В.В., Шкаврова Т.Г., Голуб Е.В. Асинхронная репликация у онкологических больных. Успехи молекулярной онкологии 2018;5(1):26–34.

DOI: 10.17650/2313-805X-2018-5-1-26-34

Asynchronous replication in oncological patients

G.F. Mikhailova, V.V. Tsepenco, T.G. Shkavrova, E.V. Goloub

A.F. Tsyb Medical Radiological Research Center — branch of the National Medical Research Center of Radiology, Ministry of Health of Russia; 4 Korolyova St., Obninsk 249036, Russia

Epigenetics is a science studying mechanisms of heritable changes in gene function that occur without a change in the DNA sequence. One of the most important marks of epigenetic misbalance of cell genome is an replication asynchrony of genes with biallelic expression. Interphase fluorescence *in situ* hybridization (I-FISH) in phytohaemagglutinin-stimulated lymphocytes of peripheral blood is a proper method of estimation of aberrant DNA replication time e. g. DNA replication asynchrony. In this review we analyzed reports referring to asynchronous DNA replication of biallelically expressed genes in lymphocytes of peripheral blood of cancer patients. Analysis shows the DNA replication asynchrony is a nonspecific tumor marker observing both in tumor cells and lymphocytes of peripheral blood in oncohematological patients and patients with solid tumors. It's stated the frequency of lymphocytes with asynchronous DNA replication of studied genes in cancer patients is increased significantly compares with healthy donors and is enhanced during malignance process. It gives the opportunity of potential using asynchronous replication as molecular genetic marker for cancer patients early revealing.

Key words: asynchronous replication, fluorescence *in situ* hybridization, peripheral blood lymphocyte, cancer biomarker

For citation: Mikhailova G.F., Tsepenco V.V., Shkavrova T.G., Goloub E.V. Asynchronous replication in oncological patients. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology* 2018;5(1):26–34.

Введение

В настоящее время все большую актуальность приобретает диагностика онкологических заболеваний на основе биологических маркеров на уровне клеток, субклеточных структур и генома. Злокачественная трансформация является многоступенчатым процессом, включающим накопление структурных и функ-

циональных изменений в геноме клетки. К структурным (генетическим) маркерам относят все нарушения, которые изменяют структуру ДНК: делеции хромосомных участков, содержащих гены-супрессоры опухолевого роста, амплификации участков хромосом, содержащих протоонкогены, транслокации и инверсии хромосомного материала, в результате которых могут

образовываться химерные гены, имеющие онкогенные функции, а также различные типы мутаций, которые могут активировать протоонкогены или инактивировать гены-супрессоры, и др. К функциональным (эпигенетическим) маркерам относят все нарушения, которые не связаны с изменениями структуры ДНК, но приводят к изменениям в уровне экспрессии генов, участвующих в процессах канцерогенеза. Для многих видов онкологических патологий существующие на данный момент молекулярно-генетические маркеры или их сочетание позволяют определить начальные стадии, прогноз развития заболевания, подобрать оптимальную тактику лечения и разработать таргетные терапевтические средства [1–6]. Тем не менее, несмотря на то, что для многих типов онкологических патологий выявлены характерные генетические и эпигенетические нарушения, постоянно проводятся исследования по созданию и внедрению в клиническую практику новых молекулярно-генетических и биохимических маркеров, что дает мощный импульс для развития диагностики, позволяющей прогнозировать риски развития заболеваний, их обнаружения на ранних стадиях, течение болезни, тактику лечения и осуществлять мониторинг рецидивирования.

На сегодняшний день совершенно очевидно, что в возникновении онкологических заболеваний играют роль как генетические, так и эпигенетические факторы. И если генетические нарушения изучались на протяжении достаточно долгого времени, то исследования роли эпигенетических нарушений в развитии злокачественных новообразований находятся в начале пути. В настоящем обзоре проведен анализ научной литературы с точки зрения возможности применения асинхронной репликации в качестве молекулярно-генетического маркера у онкологических больных и определения области его применения.

Роль времени репликации при канцерогенезе

В организме существуют мощные регуляторные системы как для генома в целом, так и для отдельных клеток, которые контролируют работу генов. Набор эпигенетических механизмов в клетке разнообразен, и сегодня они подразделяются на несколько групп — метилирование и деметилирование ДНК, транскрипционное и трансляционное замалчивание генов малыми РНК, позиционирование элементов хроматина, энзиматическая модификация гистонов — ацетилирование, метилирование, убиквитинирование, фосфорилирование и др. [7]. Многие из этих процессов взаимозависимы. Именно это обеспечивает надежность эпигенетического контроля над избирательным функционированием генов.

При нормальном клеточном делении необходимо, чтобы геном реплицировался правильно, гарантируя, что геномная информация в неизменном виде перешла из одного клеточного поколения в другое. При каждом клеточном цикле ДНК-репликация иници-

руется из тысяч точек начала репликации (ориджинов), распределенных по всему геному. Этот процесс происходит одновременно, занимает короткий промежуток времени и остается практически синхронным во всех последующих клеточных циклах [8–10]. Если ДНК-репликация может инициироваться из любого активного ориджина внутри конкретной фазы S, то время инициации различных ориджинов значительно меняется. Точки начала репликации, расположенные рядом друг с другом, имеют тенденцию инициировать ее в одно и то же время, что в конечном итоге приводит к обширному синхронному реплицированию хромосомных доменов [8, 11, 12]. Некоторые домены начинают репликацию в начале фазы S, другие вступают позднее: в середине или в конце фазы S. Такая временная иерархия процесса называется программой времени репликации [8]. Она устанавливается сразу после митоза в точке фазы G₁, предшествующей точке выбора ориджина, которая определяется случайным образом в результате глобальной реорганизации хроматина в специфических регионах внутри ядра [9, 13, 14]. Программа репликации наследуема, митотически стабильна и является устойчивой эпигенетической характеристикой всех эукариотических хромосом [8, 11].

Контроль времени ДНК-репликации связан с множеством базовых клеточных процессов, которые регулируются во время клеточного цикла и роста. В некоторых модельных системах дефекты времени репликации ассоциируются с дефектами при конденсации хромосом, сцеплении сестринских хроматид и геномной стабильностью [15, 16]. В частности, специфические хромосомные транслокации возникают в результате обширной хромосомной задержки во времени репликации, которая, в свою очередь, запускает высокую частоту добавочных транслокаций [17, 18]. Поздно реплицирующиеся регионы генома имеют более высокую скорость спонтанного мутагенеза по сравнению с рано реплицирующимися. Более того, показано, что искусственная задержка инициации ДНК-репликации увеличивает частоту мутагенных явлений [19, 20]. Интересен тот факт, что в образцах опухолей геномные делеции имеют тенденцию накапливаться в поздно реплицирующихся регионах, в то время как амплификации — в рано реплицирующихся [21, 22]. Пространственная близость между регионами с похожим временем репликации может влиять на транслокации и сайты перестройки в геноме [21, 23]. Это подтверждается тем, что во многих злокачественных клетках регионы, которые компонуются в ядре рядом друг с другом, более подвержены транслокациям, чем более удаленные друг от друга регионы. Поэтому многие повторяющиеся и онкогенные транслокации возникают между регионами с близким временем репликации и местоположением в ядре [24, 25]. Кроме того, сайты повышенной ломкости хромосом являются типичными точками хромосомных разрывов в опухолях, и их нестабильность часто наблюдается на ранних стадиях

канцерогенеза [26]. Поскольку часть генов, ассоциируемых с канцерогенезом, расположена внутри сайтов повышенной ломкости, их нестабильность может напрямую дерегулировать некоторые онкоген/опухоль-супрессорные функции [26]. Следовательно, время ДНК-репликации не только оказывает влияние на скорость мутагенеза, но также может смещать положение точек разрыва перестроек.

Таким образом, ДНК-репликация – жестко регулируемый процесс. Для большей части генома гомологичные локусы реплицируются в фазе S одновременно и четко скоординированно. Исключения из этого правила – локусы, которые имеют моноаллельную экспрессию генов. Аллельные копии моноаллельно экспрессирующихся генов реплицируются асинхронно, причем активная копия реплицируется раньше, чем инактивированная. Это свойство установлено для всех известных моноаллельно экспрессирующихся генов: импринтинговые гены, примером которых является ген *SNRPN*, локализованный в импринтинговом регионе при синдроме Прадера–Вилли/Ангельмана [27–29]; гены, находящиеся на инактивированной X-хромосоме [30–32]; гены, подвергшиеся аллельному выключению [33–38]. Эта модель репликации очень стабильна в нормальных клетках и независима от транскрипции.

Результаты многочисленных исследований указывают на то, что нарушения во времени репликации часто сопровождают развитие злокачественных новообразований [14, 22, 39–41]. Хотя степень, с которой они влияют на процесс трансформации, все еще не определена, наличие этих изменений при различных типах опухолей свидетельствует о том, что нарушения во времени репликации являются важным компонентом в развитии опухоли и ранним эпигенетическим событием при канцерогенезе [41, 42].

Асинхронная репликация у здоровых лиц и онкологических больных

В 1992 г. S. Selig и соавт. предложили использовать метод интерфазной флуоресцентной *in situ* гибридизации (I-FISH) для оценки нарушения синхронности репликации гомологичных генов (асинхронности репликации) в культивированных лимфоцитах периферической крови человека [43]. Анализируемые флуоресцентные сигналы в клетках подразделяются на 2 категории: «S» – единичный сигнал, представляющий собой участок еще не реплицированной ДНК, и «D» – двойной сигнал от реплицированного участка ДНК. Таким образом, часть клеток отражает одинаковый статус репликации: клетки с нереплицированными (SS-клетки) и реплицированными (DD-клетки) аллелями; другая часть клеток отражает асинхронную репликацию, когда в клетке виден один сигнал одинарный, а другой – двойной (SD-клетки).

Сравнительные результаты встречаемости клеток с асинхронной репликацией разных генов, локусов

и центромерных участков хромосом в исследованных группах больных и клинически здоровых лиц с представлением уровня значимости (*p*) найденных различий представлены в таблице.

Работа А. Amiel и соавт. (1997) по изучению асинхронной репликации генов методом I-FISH у онкологических больных была одной из первых. Она выполнена на лимфоцитах периферической крови больных хроническим лимфоцитарным лейкозом и здоровых лиц [44]. Для исследования встречаемости клеток с асинхронной репликацией авторы выбрали ген *TP53*, участвующий в клеточной регуляции, и локус 21q22, который не участвует в клеточной регуляции и не мутирует в клетках больных хроническим лимфоцитарным лейкозом. Результаты проведенного исследования показали, что содержание лимфоцитов с асинхронной репликацией (ЛАР) у здоровых лиц не превышало 14 % как для гена *TP53*, так и для локуса 21q22, тогда как в группе больных этот показатель был в 2 раза больше (см. таблицу). Работа [45] была направлена на изучение клеток с асинхронной репликацией генов *TP53*, *HER2/neu*, *C-MYC* и локуса 21q22 у здоровых лиц, больных хроническим миелоидным лейкозом и больных лимфомами. Авторы провели исследование на клетках костного мозга (озлокачествление большей части которых характерно для хронического миелоидного лейкоза), лимфатических узлов (озлокачествление большей части которых характерно для лимфом) и лимфоцитах периферической крови. Полученные результаты показали, что доля клеток с асинхронной репликацией в группе здоровых лиц для всех изученных генов и локуса как в клетках костного мозга, так и в лимфоцитах в среднем не превышает 12 %. Встречаемость клеток с асинхронной репликацией у больных хроническим миелоидным лейкозом в костном мозге и у больных лимфомами в клетках лимфатических узлов для всех исследованных генов и локуса практически не отличалась и составила около 41 %. Аналогичные результаты получены для больных с солидными опухолями. В 2000 г. Z.A. Dotan и соавт. показали, что в группе больных почечно-клеточными карциномами содержание ЛАР гена *TP53* и локуса 21q22 составило 36 и 44 % соответственно [46]. В контрольной группе этот показатель был 12 и 14 %. В дальнейшем проведены исследования для других генов как у здоровых лиц, так и у онкологических больных. В работах [47, 48] исследовалась встречаемость ЛАР генов *TP53*, *RBI*, *AML1* и *C-MYC* у здоровых лиц, которая не превышала для всех генов 20 %. Для этих же генов показано, что доля ЛАР у больных раком предстательной железы составила около 31 % [49]. Аналогичные данные получены для гена *HER2/neu* у больных раком молочной железы и здоровых лиц – 35 и 14 % соответственно [50]. Таким образом, можно заключить, что встречаемость ЛАР биаллельно экспрессирующихся генов у онкологических больных достоверно повышена по сравнению со здоровыми лицами.

Сравнение встречаемости лимфоцитов с асинхронной репликацией в разных группах с представлением уровня значимости найденных различий
 Comparison of the frequency of lymphocytes with asynchronous replication in various groups and significance level of the differences

Группа сравнения Comparison group	Ген, локус Gene, locus	Лимфоциты с асинхронной репликацией, % Lymphocytes with asynchronous replication, %	p	Ссылка Reference
Больные хроническим лимфоцитарным лейкозом/контроль (л.) Patients with chronic lymphocytic leukemia/control (l.)	<i>TP53</i> , 21q22	28 vs 13 23 vs 10	<0,02	[44]
Больные хроническим миелоидным лейкозом (к. м.), лимфомой (л. у.) /хроническим миелоидным лейкозом (л.), лимфомой (к. м.) /контроль (к. м., л.) Patients with chronic myeloid leukemia (b. m.), lymphoma (l. n.) /chronic myeloid leukemia (l.), lymphoma (b. m.) /control (b. m., l.)	<i>HER2/neu</i> , 21q22, <i>TP53</i> , <i>C-MYC</i>	41 vs 27 vs 12	<0,001	[45]
Больные почечной карциномой/контроль (л.) Patients with renal carcinoma/control (l.)	<i>TP53</i> , 21q22	36 vs 12 44 vs 14	<0,01	[46]
Больные нейрофиброматозом 1-го типа/контроль (л.) Patients with neurofibromatosis type 1/control (l.)	<i>RBI</i> , <i>AML1</i> , <i>C-MYC</i>	33 vs 17 34 vs 17 31 vs 17	<0,001	[47]
Онкогематологические больные/контроль (л.) Oncohematological patients/control (l.)	<i>TP53</i> , <i>AML1</i> , cen17	39 vs 20 42 vs 20 39 vs 20	<0,001	[48]
Больные до аллогенной трансплантации костного мозга/после трансплантации костного мозга (л.) Patients prior to allogenic bone marrow transplantation/after bone marrow transplantation (l.)		36 vs 21 39 vs 20 37 vs 21		
Больные раком предстательной железы/пациенты с гиперплазией предстательной железы (л.) Patients with prostate cancer/patients with prostate hyperplasia (l.)	<i>TP53</i> , <i>AML1</i> , <i>C-MYC</i> , <i>RBI</i> , cen15	33 vs 13 31 vs 13 29 vs 12 32 vs 13 35 vs 14	<0,01	[49]
Культивирование с AZA: рак предстательной железы/гиперплазия предстательной железы (л.) Culture with AZA: prostate cancer/prostate hyperplasia (l.)		18 vs 14 16 vs 14 14 vs 13 10 vs 14 12 vs 14	>0,50	
Больные раком молочной железы/контроль (л.) Patients with breast cancer/control (l.)	<i>HER2/neu</i> , cen17	35 vs 14 25 vs 13	<0,01	[50]
Больные раком яичников/контроль (л.) Patients with ovarian cancer/control (l.)	cen 10, cen 11, cen 17	44 vs 19 39 vs 17 37 vs 19	<0,001	[51]
Онкогематологические больные/контроль (л.) Oncohematological patients/control (l.)	<i>TP53</i> , <i>AML1</i> , <i>RBI</i> , cen15, cen17	40 vs 18 41 vs 19 39 vs 21 45 vs 18 38 vs 21	<0,01	[52]
Культивирование с AZA: больные/контроль (л.) Culture with AZA: patients/control (l.)		22 vs 20 25 vs 22 22 vs 22 22 vs 21 23 vs 21	>0,50	
Больные раком предстательной железы/с гиперплазией предстательной железы (л.) Patients with prostate cancer/with prostate hyperplasia (l.)	<i>RBI</i> , cen15	36 vs 23 38 vs 21	<0,01	[53]
Культивирование с AZA: рак предстательной железы/гиперплазия предстательной железы (л.) Culture with AZA: prostate cancer/prostate hyperplasia (l.)		23 vs 23 24 vs 22	>0,50	

Окончание таблицы
End of table

Группа сравнения Comparison group	Ген, локус Gene, locus	Лимфоциты с асинхронной репликацией, % Lymphocytes with asynchronous replication, %	<i>p</i>	Ссылка Reference
Больные раком печени/циррозом печени/контроль (л.) Patients with liver cancer/liver cirrhosis/control (l.)	cen17	35 vs 19 vs 14	<0,01	[54]
Больные множественной миеломой/моноклональной гаммапатией/контроль (л.) Patients with multiple myeloma/monoclonal gammopathy/control (l.)	<i>TP53</i> , <i>RB1</i> , 21q22	36 vs 20 vs 12 34 vs 20 vs 12 35 vs 20 vs 12	<0,05	[55]
Контроль/больные хроническим гепатитом С без криоглобулинемии/хронический гепатит С с криоглобулинемией/лимфома (л.) Control/patients with chronic hepatitis C without cryoglobulinemia/chronic hepatitis C with cryoglobulinemia/lymphoma (l.)	<i>TP53</i> , <i>RB1</i> , 21q22	11 vs 15 vs 24 vs 39 10 vs 16 vs 26 vs 42 10 vs 16 vs 25 vs 36	<0,01	[56]
Больные раком предстательной железы/с гиперплазией предстательной железы (л.) Patients with prostate cancer/with prostate hyperplasia (l.)	<i>RB1</i> , <i>AML1</i>	32 vs 20 32 vs 18	<10 ⁻⁷	[57]
Больные полицитемией и эссенциальной тромбоцитемией (без лечения)/полицитемией и эссенциальной тромбоцитемией (с лечением)/контроль (л.) Patients with polycythemia and essential thrombocythemia (without treatment)/polycythemia and essential thrombocythemia (with treatment)/control (l.)	<i>HER2/neu</i> , <i>RB1</i> , <i>C-MYC</i>	20 vs 16 vs 11 21 vs 15 vs 8 22 vs 21 vs 13	<0,05	[58]

Примечание. л. — лимфоциты периферической крови; к. м. — костный мозг; л. у. — лимфоциты, полученные из лимфатических узлов; AZA — 5-азацитидин.

Note. l. — peripheral lymphocytes; b. m. — bone marrow; l. n. — lymphocytes isolated from the lymph nodes; AZA — 5-azacitidine.

В ряде исследований обнаружено, что у онкологических больных α -сателлитные хромосомспецифические участки — центромеры, которые в норме реплицируются синхронно, также реплицируются асинхронно. Встречаемость ЛАР центромерных участков хромосом 10, 11 и 17 у больных раком яичника составила в среднем для каждой хромосомы 41 % против 19 % у здоровых лиц [51]. Аналогичные данные получены для центромерных участков хромосом 15 и 17 у гематологических больных [52] и для центромеры 15 у больных раком предстательной железы [49, 53] и пациентов с гепатоцеллюлярной карциномой [54]. Авторы отмечают, что нарушение порядка репликации центромерных участков вызывает нарушение расхождения хромосом в митозе, в результате чего увеличивается частота клеток с анеупloidией, что взаимосвязано с процессом малигнизации клеток.

Асинхронная репликация у лиц с предраковыми и раковыми заболеваниями

Большой интерес представляют работы, направленные на сравнительное изучение встречаемости ЛАР биаллельно экспрессирующихся генов, а также центромерных участков хромосом у лиц с предраковыми и раковыми заболеваниями. А. Amiel и соавт. [55] исследовали встречаемость ЛАР в 3 подгруппах: здоровые лица, пациенты с моноклональной гаммапатией (предраковое заболевание, предшествующее множественной миеломе) и больные множественной миеломой. Уста-

новлено, что в пределах ошибки содержание ЛАР для генов *TP53*, *RB1* и локуса 21q22 было практически одинаковым и в изученных подгруппах составило в среднем 12, 20 и 35 % соответственно. При дальнейших исследованиях показано, что в группах здоровых лиц, пациентов с хроническим заболеванием печени, инфицированных вирусом гепатита С, пациентов с хроническим заболеванием печени, инфицированных вирусом гепатита С, с ассоциированной эссенциальной криоглобулинемией (предраковое состояние) и пациентов с фолликулярной лимфомой встречаемость ЛАР генов *TP53*, *RB1* и локуса 21q22 была также практически одинаковой и составила в среднем 10, 16, 25 и 39 % соответственно [56]. О. Reish и соавт. обнаружили, что у больных нейрофиброматозом 1-го типа, имеющих доброкачественные опухоли (нейрофиброма, глиома зрительного нерва и др.) и находящихся в группе риска развития злокачественных опухолей, встречаемость ЛАР генов *RB1*, *AML1* и *C-MYC* оказалась практически одинаковой и составила приблизительно 32 % [47]. В работе [54] показано, что встречаемость ЛАР центромерных участков хромосомы 17 у больных гепатоцеллюлярной карциномой, циррозом печени, имеющих высокий риск развития карциномы, и здоровых лиц составила 35, 19 и 14 % соответственно. Для больных раком предстательной железы, с начальной гиперплазией предстательной железы и хроническим воспалением предстательной железы при исследовании частоты ЛАР гена *AML1* и центромерного участка хромосомы 15 получены ана-

логичные результаты [49]. S. Cytron и соавт. предложили использовать частоту встречаемости ЛАР генов *RB1* и *AML1* как потенциальный неинвазивный маркер, в дополнение к уровню простатического специфического антигена, для ранней диагностики рака предстательной железы, поскольку проведенное сравнительное с результатами биопсии исследование показало 100 % чувствительность и 82 % специфичность теста асинхронной репликации для выявления больных раком предстательной железы [57].

Таким образом, в представленных работах показано, что встречаемость ЛАР генов увеличивается по мере озлокачествления заболеваний. Эта закономерность также обнаружена при исследовании асинхронной репликации гена *TP53* в 3 клеточных линиях молочной железы: нормальной MCF10A, предраковой MCF10AT1 и злокачественной MCF10CA1a [59].

Обратимость асинхронной репликации

Потеря синхронности репликации у онкологических больных — обратимый эпигенетический феномен, связанный в том числе с аномальным метилированием. Первоначально это показано в экспериментах *in vitro*: при культивировании лимфоцитов в присутствии ингибитора метилирования 5-азациитидина (5-azacytidine, AZA) нарушенная программа времени репликации возвращалась к нормальной. В группе онкологических больных исследовалась встречаемость ЛАР генов *TP53*, *RB1* и *AML1* в культурах лимфоцитов периферической крови в присутствии AZA и в качестве контроля без данного ингибитора [52]. Обнаружено, что в культурах лимфоцитов от здоровых лиц присутствие AZA практически не изменяло процентное содержание ЛАР данных генов, которое колебалось в пределах 18–21 %. В культурах клеток от онкологических больных встречаемость ЛАР генов *TP53*, *RB1* и *AML1* без ингибитора варьировала в пределах 39–41 %, а в культурах с AZA — 22–25 %. Аналогичные результаты получены в работе [48]. Тот же эффект установлен для больных раком предстательной железы [49, 53]. На данный момент всего в 2 работах [48, 58] показано снижение доли ЛАР у больных после лечения. А. Amiel и соавт. изучили встречаемость ЛАР генов *RB1*, *HER2/neu* и *C-MYC* у больных миелопролиферативными заболеваниями (полицитемией и эссенциальной тромбоцитемией) до лечения гидроксикарбамидом, тормозящим синтез ДНК, и после него. Установлено, что процентное содержание ЛАР исследованных генов в группе здоровых лиц составляло в среднем 10 %, а в группе больных до лечения и после него — 21 и 16 % соответственно, за исключением гена *C-MYC*, статус репликации которого до лечения и после него оставался на одном уровне [58]. А. Nagler и соавт. изучали встречаемость ЛАР генов *TP53* и *AML1* у здоровых лиц и в группах больных острой миелоидной лейкоемией, хронической миелоидной лейкоемией, острой лимфобластной лейкоемией и неходжкинской лимфомой

до аллогенной трансплантации костного мозга и после нее. Установлено, что у здоровых лиц она составила 20 %, у онкогематологических больных до трансплантации и после нее — 38 и 21 % соответственно [48]. Авторы этой работы сделали заключение, что aberrантная репликация у онкогематологических больных полностью восстанавливается до уровня здоровых лиц после проведенной терапии (аллогенной трансплантации), и данный тест может быть потенциальным эпигенетическим маркером успешности трансплантации.

Заключение

В представленных выше исследованиях изучались отдельные гены и локусы у онкологических больных, поэтому они не давали представления, насколько широко по геному распространена асинхронная репликация. Полногеномное исследование процесса синхронности репликации на клетках костного мозга больных острым лимфобластным лейкозом проведено в работе [42]. Нарушения синхронности репликации в гомологичных аллелях обнаружены во всех хромосомах. Локусы, в которых наблюдались нарушения, были равномерно распределены по геному и типичны для всех исследованных образцов. Это позволило авторам предположить, что нарушение времени репликации в специфических местах является ранним эпигенетическим событием при канцерогенезе. В одной из последних работ, вызвавшей большой интерес и дискуссии в научных кругах, С. Tomasetti и соавт., используя полногеномное секвенирование и биомоделирование, показали, что 2/3 мутаций, связанных с развитием рака, возникают в результате нарушений репликации ДНК [41]. Несмотря на то, что природа феномена нарушения синхронности репликации до конца не известна, большинство авторов исследований, представленных в данном обзоре, связывают это явление с геномной нестабильностью, последующим мутагенезом и канцерогенезом.

Таким образом, рассмотренные работы, направленные на изучение репликации биаллельно экспрессирующихся генов в лимфоцитах периферической крови онкологических больных, демонстрируют, что асинхронная репликация является неспецифическим опухолевым маркером. Она наблюдается как у онкогематологических больных, так и у больных с солидными опухолями, причем не только в клетках опухоли, но и в лимфоцитах периферической крови, что дает потенциальную возможность использовать асинхронную репликацию как молекулярно-генетический маркер для раннего выявления лиц с онкологическими заболеваниями [52]. Кроме того, широкое распространение эпигенетических aberrаций в клетках организма в совокупности с их обратимой природой не только открывает новые терапевтические возможности для разработки противоопухолевых препаратов, способных восстанавливать эпигенетические нарушения, но и может найти применение в качестве одного из индикаторов полного биологического излечения.

Л И Т Е Р А Т У Р А / R E F E R E N C E S

- Cancer Biomarkers. Minimal and noninvasive early diagnosis and prognosis. Eds. D. Barh, A. Carpi, M. Verma, M.L. Gunduz. N.-Y.: CRC Press, 2014. P. 929. DOI: 10.1201/b16389.
- Holdenrieder S., Pagliaro L., Morgenstern D., Dayyani F. Clinically meaningful use of blood tumor markers in oncology. *Biomed Res Int* 2016;2016: 9795269. DOI: 10.1155/2016/9795269. PMID: 28042579.
- Duffy M.J., O'Donovan N., McDermott E., Crown J. Validated biomarkers: the key to precision treatment in patients with breast cancer. *Breast* 2016;29:192–201. DOI: 10.1016/j.breast.2016.07.009. PMID: 27521224.
- Залетаев Д.В., Стрельников В.В., Немцова М.В. и др. Структурно-функциональный анализ опухолевых геномов и разработка тест-систем для ранней диагностики, прогноза течения и оптимизации терапии злокачественных новообразований. *Вестник РАМН* 2013;9:7–14. [Zaletaev D.V., Strelnikov V.V., Nemtsov M.V. et al. Structural and functional analysis of tumor genomes and the development of test systems for early diagnosis, prognosis and cancer therapy optimization. *Vestnik RAMN = Annals of the Russian Academy of Medical Sciences* 2013;9:7–14. (In Russ.)].
- Kamel H.F.M., Al-Amadi H.S.A.B. Exploitation of gene expression and cancer biomarkers in paving the path to era of personalized medicine. *Genomics Proteomics Bioinformatics* 2017;15(4):220–35. DOI: 10.1016/j.gpb.2016.11.005. PMID: 28813639.
- Cree I.A., Charlton P. Molecular chess? Hallmarks of anti-cancer drug resistance. *BMC Cancer* 2017;17(1):10. DOI: 10.1186/s12885-016-2999-1. PMID: 28056859.
- Эпигенетика. Под ред. С.Д. Элліса, Т. Дженювейна, Д. Рейнберга, М.Л. Капаррос. М.: Техносфера, 2010. С. 495. [Epigenetics. Eds. C.D. Allis, T. Jenuwein, D. Reinberg, M.L. Caparros. Moscow: Tekhnosfera, 2010. P. 495. (In Russ.)].
- Колесникова Т.Д. Механизмы пространственно-временной регуляции репликации. *Молекулярная биология* 2013;47(1):12–37. [Kolesnikova T.D. Regulation of DNA replication timing. *Molekulyarnaya biologiya = Molecular Biology* 2013;47(1):12–37. (In Russ.)]. DOI: 10.7868/S0026898412060110.
- Dimitrova D.S., Gilbert D.M. The spatial position and replication timing of chromosomal domains are both established in early G1 phase. *Mol Cell* 1999;4(6):983–93. DOI: 10.1016/S1097-2765(00)80227-0. PMID: 10635323.
- Sadoni N., Cardoso M.C., Stelzer E.H. et al. Stable chromosomal units determine the spatial and temporal organization of DNA replication. *J Cell Sci* 2004;117 (Pt 22):5353–65. DOI: 10.1242/jcs.01412. PMID: 15466893.
- Hiratani I., Gilbert D.M. Replication timing as an epigenetic mark. *Epigenetics* 2009;4(2):93–7. DOI: 10.4161/epi.4.2.7772. PMID: 19242104.
- Pope B.D., Gilbert D.M. The replication domain model: regulating replicon firing in the context of large-scale chromosome architecture. *J Mol Biol* 2013;425(23): 4690–5. DOI: 10.1016/j.jmb.2013.04.014. PMID: 23603017.
- Gilbert D.M. Cell fate transitions and the replication timing decision point. *J Cell Biol* 2010;191(5):899–903. DOI: 10.1083/jcb.201007125. PMID: 21115801.
- Reddy K.L., Feinberg A.P. Higher order chromatin organization in cancer. *Semin Cancer Biol* 2013;23(2):109–15. DOI: 10.1016/j.semcancer.2012.12.001. PMID: 23266653.
- Loupart M., Krause S., Heck M.S. Aberrant replication timing induces defective chromosome condensation in *Drosophila* ORC2 mutants. *Curr Biol* 2000;10(24):1547–56. DOI: 10.1016/S0960-9822(00)00844-7. PMID: 11137005.
- Pflumm M.F., Botchan M.R. Orc mutants arrest in metaphase with abnormally condensed chromosomes. *Development* 2001;128(9):1697–707. PMID: 11290306.
- Breger K.S., Smith L., Thayer M.J. Engineering translocations with delayed replication: evidence for cis control of chromosome replication timing. *Hum Mol Genet* 2005;14(19):2813–27. DOI: 10.1093/hmg/ddi314. PMID: 16115817.
- Chang B.H., Smith L., Huang J., Thayer M.J. Chromosomes with delayed replication timing lead to checkpoint activation, delayed recruitment of Aurora B and chromosome instability. *Oncogene* 2007;26(13):1852–61. DOI: 10.1038/sj.onc.1209995. PMID: 17001311.
- Lang G.I., Murray A.W. Mutation rates across budding yeast chromosome VI are correlated with replication timing. *Genome Biol Evol* 2011;3:799–811. DOI: 10.1093/gbe/evr054. PMID: 21666225.
- Donley N., Stoffregen E.P., Smith L. et al. Asynchronous replication, mono-allelic expression, and long range Cis-effects of ASAR6. *PLoS Genet* 2013;9(4):e1003423. DOI: 10.1371/journal.pgen.1003423. PMID: 23593023.
- De S., Michor F. DNA replication timing and long-range DNA interactions predict mutational landscapes of cancer genomes. *Nat Biotechnol* 2011;29(11):1103–8. DOI: 10.1038/nbt.2030. PMID: 22101487.
- Woo Y.H., Li W.H. DNA replication timing and selection shape the landscape of nucleotide variation in cancer genomes. *Nat Commun* 2012;3:1004. DOI: 10.1038/ncomms1982. PMID: 22893128.
- Soutoglou E., Misteli T. On the contribution of spatial genome organization to cancerous chromosome translocations. *J Natl Cancer Inst Monogr* 2008;(39):16–9. DOI: 10.1093/jncimonographs/IGN017. PMID: 18647996.
- Engreitz J.M., Agarwala V., Mirny L.A. Three-dimensional genome architecture influences partner selection for chromosomal translocations in human disease. *PLoS One* 2012;7(9):e44196. DOI: 10.1371/journal.pone.0044196. PMID: 23028501.
- Meaburn K.J., Misteli T., Soutoglou E. Spatial genome organization in the formation of chromosomal translocations. *Semin Cancer Biol* 2007;17(1):80–90. DOI: 10.1016/j.semcancer.2006.10.008. PMID: 17137790.
- Ozeri-Galai E., Bester A.C., Kerem B. The complex basis underlying common fragile site instability in cancer. *Trends Genet* 2012;28(6):295–302. DOI: 10.1016/j.tig.2012.02.006. PMID: 22465609.
- Simon I., Tenzen T., Reubinoff B.E. et al. Asynchronous replication of imprinted genes is established in the gametes and maintained during development. *Nature* 1999;401(6756):929–32. DOI: 10.1038/44866. PMID: 10553911.
- Gunaratne P.H., Nakao M., Ledbetter D.H. et al. Tissue-specific and allele-specific replication timing control in the imprinted human Prader-Willi syndrome region. *Genes Dev* 1995;9(7):808–20. DOI: 10.1101/gad.9.7.808. PMID: 7705658.
- LaSalle J.M., Lalande M. Domain organization of allele-specific replication within the GABRB3 gene cluster requires a biparental 15q11–13 contribution. *Nat Genet* 1995;9(4):386–94. DOI: 10.1038/ng0495-386. PMID: 7795644.
- Torchia B.S., Call L.M., Migeon B.R. DNA replication analysis of FMR1, XIST, and factor 8C loci by FISH shows nontranscribed X-linked genes replicate late. *Am J Hum Genet* 1994;55(1):96–104. PMID: 8023856.
- Yeshaya J., Shalgi R., Shohat M., Avivi L. FISH-detected delay in replication timing

- of mutated FMR1 alleles on both active and inactive X-chromosomes. *Hum Genet* 1999;105(1–2):86–97. DOI: 10.1007/s004399900081. PMID: 10480360.
32. Koren A., McCarroll S.A. Random replication of the inactive X chromosome. *Genome Res* 2014;24(1):64–9. DOI: 10.1101/gr.161828.113. PMID: 24065775.
33. Goldmit M., Bergman Y. Monoallelic gene expression: a repertoire of recurrent themes. *Immun Rev* 2004;200(1):197–214. DOI: 10.1111/j.0105-2896.2004.00158.x. PMID: 15242406.
34. Chess A., Simon L., Cedar H., Axel R. Allelic inactivation regulates olfactory receptor gene expression. *Cell* 1994;78(5):823–34. DOI: 10.1016/S0092-8674(94)90562-2. PMID: 8087849.
35. Mostoslavsky R., Singh N., Tenzen T. et al. Asynchronous replication and allelic exclusion in the immune system. *Nature* 2001;414(6860):221–5. DOI: 10.1038/35102606. PMID: 11700561.
36. Ensminger A.W., Chess A. Coordinated replication timing of monoallelically expressed genes along human autosomes. *Hum Mol Genet* 2004;13(6):651–8. DOI: 10.1093/hmg/ddh062. PMID: 14734625.
37. Gribnau J., Hochedlinger K., Hata K. et al. Asynchronous replication timing of imprinted loci is independent of DNA methylation, but consistent with differential subnuclear localization. *Genes Dev* 2003;17(6):759–3. DOI: 10.1101/gad.1059603. PMID: 12651894.
38. Bergman Y., Cedar H. A stepwise epigenetic process controls immunoglobulin allelic exclusion. *Nat Rev Immun* 2004;4(10):754–61. DOI: 10.1038/nri1458. PMID: 15459667.
39. Donley N., Thayer M.J. DNA replication timing, genome stability and cancer: late and/or delayed DNA replication timing is associated with increased genomic instability. *Semin Cancer Biol* 2013;23(2):80–9. DOI: 10.1016/j.semcancer.2013.01.001. PMID: 23327985.
40. Liu L., De S., Michor F. DNA replication timing and higher-order nuclear organization determine single-nucleotide substitution patterns in cancer genomes. *Nat Commun* 2013;4:1502. DOI: 10.1038/ncomms2502. PMID: 23422670.
41. Tomasetti C., Li L., Vogelstein B. Stem cell divisions, somatic mutations, cancer etiology, and cancer prevention. *Science* 2017;355(6331):1330–4. DOI: 10.1126/science.aaf9011. PMID: 28336671.
42. Ryba T., Battaglia D., Chang B.H. et al. Abnormal developmental control of replication-timing domains in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Genome Res* 2012;22(10):1833–44. DOI: 10.1101/gr.138511.112. PMID: 22628462.
43. Selig S., Okumura K., Ward D.C., Cedar H. Delineation of DNA replication time zones by fluorescence *in situ* hybridization. *EMBO J* 1992;11(3):1217–25. DOI: 10.1016/0962-8924(92)90032-I. PMID: 1547781.
44. Amiel A., Litmanovitch T., Gaber E. et al. Asynchronous replication of p53 and 21q22 loci in chronic lymphocytic leukemia. *Hum Genet* 1997;101(2):219–22. DOI: 10.1007/s004390050619. PMID: 9402974.
45. Amiel A., Litmanovitch T., Lishner M. et al. Temporal differences in replication timing of homologous loci in malignant cells derived from CML and lymphoma patients. *Genes Chromosomes Cancer* 1998;22(3):225–31. DOI: 10.1002/(SICI)1098-2264(199807)22:3<225::AID-GCC8>3.0.CO;2-Y. PMID: 9624534.
46. Dotan Z.A., Dotan A., Litmanovitch T. et al. Modification in the inherent mode of allelic replication in lymphocytes of patients suffering from renal cell carcinoma: a novel genetic alteration associated with malignancy. *Genes Chromosomes Cancer* 2000;27(3):270–7. DOI: 10.1002/(SICI)1098-2264(200003)27:3<270::AID-GCC7>3.0.CO;2-7. PMID: 10679916.
47. Reish O., Orlovski A., Mashevich M. et al. Modified allelic replication in lymphocytes of patients with neurofibromatosis type I. *Cancer Genet Cytogenet* 2003;143(2):133–9. DOI: 10.1016/S0165-4608(02)00858-0. PMID: 12781447.
48. Nagler A., Cytron S., Mashevich M. et al. The aberrant asynchronous replication – characterizing lymphocytes of cancer patients – is erased following stem cell transplantation. *BMC Cancer* 2010;10(1):230. DOI: 10.1186/1471-2407-10-230. PMID: 20497575.
49. Dotan Z.A., Dotan A., Ramon J., Avivi L. Altered mode of allelic replication accompanied by aneuploidy in peripheral blood lymphocytes of prostate cancer patients. *Int J Cancer* 2004;111(1):60–6. DOI: 10.1002/ijc.20237. PMID: 15185343.
50. Grinberg-Rashi H., Cytron S., Gelman-Kohan Z. et al. Replication timing aberrations and aneuploidy in peripheral blood lymphocytes of breast cancer patients. *Neoplasia* 2010;12(8):668–74. DOI: 10.1593/neo.10568. PMID: 20689761.
51. Litmanovitch T., Altaras M.M., Dotan A., Avivi L. Asynchronous replication of homologous alpha-satellite DNA loci in man is associated with nondisjunction. *Cytogenet Cell Genet* 1998;81(1):26–35. DOI: 10.1159/000015003. PMID: 9691171.
52. Korenstein-Ilan A., Amiel A., Lalezari S. et al. Allele-specific replication associated with aneuploidy in blood cells of patients with hematologic malignancies. *Cancer Genet Cytogenet* 2002;139(2):97–103. DOI: 10.1016/S0165-4608(02)00610-6. PMID: 12550768.
53. Dotan Z.A., Dotan A., Ramon J., Avivi L. Aberrant allele-specific replication, independent of parental origin, in blood cells of cancer patients. *BMC Cancer* 2008;8(1):390. DOI: 10.1186/1471-2407-8-390. PMID: 19109880.
54. Hanna M.O., Zayed N.A., Darwish H., Girgis S.I. Asynchronous DNA replication and aneuploidy in lymphocytes of hepatocellular carcinoma patients. *Cancer Genet* 2012;205(12):636–43. DOI: 10.1016/j.cancergen.2012.10.006. PMID: 23182962.
55. Amiel A., Kirgner I., Gaber E. et al. Replication pattern in cancer: asynchronous replication in multiple myeloma and in monoclonal gammopathy. *Cancer Genet Cytogenet* 1999;108(1):32–7. DOI: 10.1016/S0165-4608(98)00107-1. PMID: 9973921.
56. Amiel A., Kitay-Cohen Y., Fejgin M.D., Lishner M. Replication status as a marker for predisposition for lymphoma in patients with chronic hepatitis C with and without cryoglobulinemia. *Exp Hematol* 2000;28(2):156–60. DOI: 10.1016/S0301-472X(99)00140-X. PMID: 10706071.
57. Cytron S., Stepnov E., Bounkin I. et al. Epigenetic analyses in blood cells of men suspected of prostate cancer predict the outcome of biopsy better than serum PSA levels. *Clin Epigenetics* 2011;2(2):383–8. DOI: 10.1007/s13148-011-0029-3. PMID: 21949550.
58. Amiel A., Elis A., Maimon O. et al. Replication status in leukocytes of treated and untreated patients with polycythemia vera and essential thrombocytosis. *Cancer Genet Cytogenet* 2002;133(1):34–8. DOI: 10.1016/S0165-4608(01)00560-X. PMID: 11890987.
59. Fritz A., Sinha S., Marella N., Berezney R. Alterations in replication timing of cancer-related genes in malignant human breast cancer cells. *J Cell Biochem* 2013;114(5):1074–83. DOI: 10.1002/jcb.24447. PMID: 23161755.

Вклад авторов

Г.Ф. Михайлова: разработка дизайна исследования, написание текста рукописи;
В.В. Цепенко, Т.Г. Шкаврова, Е.В. Голуб: обзор публикаций по теме статьи, анализ данных; каждый соавтор готовил материалы по определенному разделу статьи.

Authors' contributions

G.F. Mikhailova: developing the research design, article writing;
V.V. Tsepenko, T.G. Shkavrova, E.V. Goloub: reviewing of publications of the article's theme, analysis of the obtained data; each co-author prepared materials on a certain section of the article.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Финансирование. Исследование проведено без спонсорской поддержки.

Financing. The study was performed without external funding.

Статья поступила: 10.01.2018. **Принята к публикации:** 28.02.2018.

Article received: 10.01.2018. **Accepted for publication:** 28.02.2018.