

УДК 577.2:616.006

ХИМЕРНЫЕ ГЕНЫ И ТРАНСКРИПТЫ В ОНКОЛОГИИ

© 2011 г. Т. В. Кекеева^{1, 2*}, Л. Э. Завалишина¹, Г. А. Франк¹, Д. В. Залетаев²

¹Московский научно-исследовательский онкологический институт им. П.А. Герцена
Министерства здравоохранения и социального развития РФ, Москва, 125284

²Научно-исследовательский институт молекулярной медицины при Московской медицинской академии
им. И.М. Сеченова Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации,
Москва, 119992

Поступила в редакцию 30.11.2010 г.

Принята к печати 09.02.2011 г.

Хромосомные перестройки и образующиеся в результате них химерные гены — частое событие в канцерогенезе. В настоящий момент известно более 440 химерных генов, описанных как для злокачественных, так и для доброкачественных новообразований. Химерные транскрипты, встречающиеся в норме, возникают в результате межгенного сплайсинга, или химеризма, обусловленного транскрипцией (ТИС). Ответ на вопрос, какую роль играет ТИС в канцерогенезе, остается пока нерешенным. Химерные белки представляют собой идеальные маркеры, специфичные для опухолевой нозологии, и одновременно потенциальные мишени терапии, так как в большинстве своем это пусковые элементы канцерогенеза. Результатом образования химерных транскриптов могут быть новые белки с новыми функциями или изменение регуляции уже существующих белков. Вновь возникшие химерные белки могут быть или пусковыми элементами канцерогенеза, или фоновыми изменениями для опухолевой клетки, либо придавать опухоли характерный фенотип. В обзоре приведены химерные гены, известные в различных областях онкологии: гематологии, опухолях мягких тканей и эпителиальных опухолях.

Ключевые слова: хромосомные перестройки, химерные гены, онкологические заболевания.

FUSION GENES AND TRANSCRIPTS IN NEOPLASIA, by T. V. Kekeeva^{1, 2*}, L. E. Zavalishina¹, G. A. Frank¹, D. V. Zaltaev² (¹Herzen Moscow Oncological Research Institute, Moscow, 125284 Russia, *e-mail: kekeeva@mail.ru; ²Institute of Molecular Medicine, Sechenov Moscow Medical Academy, Moscow, 119992 Russia). Chromosomal rearrangements resulting in the formation of fusion genes are common events in carcinogenesis. There are more than 440 known fusion genes found in both malignant and benign tumors. The mechanism of transcription induced chimerism (TIC) contributes to fusion transcripts in normal human tissues. However, there is no clarity about the role of TIC in carcinogenesis. Hybrid proteins resulting from chimeric genes regarded as ideal markers which are specific for disease entities can be potential targets for the treatment due to their key roles in malignant transformation. In some tumors fusion genes may play primary role, and in the others may represent an additional mechanism during subclonal selection. The aim is to briefly review and discuss the occurrence and biologic relevance of chimeric genes in hematologic malignant diseases, sarcomas and epithelial neoplasms.

Keywords: chromosomal arrangements, fusion genes, oncological diseases.

ВВЕДЕНИЕ

Хромосомные перестройки и образующиеся в результате химерные гены — частое событие в канцерогенезе. В настоящий момент известно более 440 химерных генов, описанных как для злокачественных, так и для доброкачественных новообразований. Химерные белки представляют собой идеальные маркеры, специфичные для опухолевой нозологии, одновременно выступая

потенциальными мишенями для терапии вследствие того, что в большинстве своем это пусковые элементы канцерогенеза. В течение 25 лет считали, что химерные гены характерны для канцерогенеза только гематологических опухолей и опухолей мягких тканей. Возможность присутствия химерных генов в эпителиальных опухолях, таких как рак молочной железы, рак легкого, рак предстательной железы (РПЖ), фактически игнори-

Принятые сокращения: FISH — флуоресцентная гибридизация *in situ*; ТИС — химеризм, обусловленный транскрипцией (transcription induced chimerism); ОМЛ — острый миелобластный лейкоз; РПЖ — рак предстательной железы; СС — синовиальная саркома.

* Эл. почта: kekeeva@online.ru

ровали. Область поиска специфичных опухолевых изменений ДНК в случае эпителиальных опухолей была сфокусирована на изучении точечных мутаций, амплификаций, делеций, потери гетерозиготности, а также метилирования в генах-супрессорах опухолевого роста. В то же время изучение лейкозов, лимфом и сарком было почти полностью сосредоточено на поиске хромосомных перестроек, приводящих к образованию химерных генов. Такое неоправданное разделение в области молекулярно-генетических исследований онкологических заболеваний, в основном, связано с методологическими аспектами. В настоящее время достижения цитогенетических технологий позволяют с высокой эффективностью выявлять ранее не видимые транслокации и другие сложные aberrации хромосомных районов в большинстве тканей. Помимо этого, развитие молекулярно-генетических методов позволяет выявлять химерные транскрипты на уровне их экспрессии, т.е. не зависимо от детектирования хромосомной перестройки.

МЕТОДЫ ВЫЯВЛЕНИЯ ХИМЕРНЫХ ГЕНОВ

Химерные гены могут образоваться в результате различного рода перестроек: сбалансированных транслокаций, несбалансированных транслокаций, делеций, инверсий, инсерций, tandemных дупликаций, а химерные транскрипты – еще и в результате так называемого *цис-* и *транс-*транскрипционного сплайсинга.

Различные методы, используемые для выявления химерных генов, позволяют детектировать только определенные типы хромосомных aberrаций. Для детекции химерных генов используются, в основном, ОТ-ПЦР и флуоресцентная гибридизация *in situ* (FISH). С их помощью можно определять химеры в любом материале, взятом для исследования: свежем, замороженном, фиксированном в формалине и залитом в парафин, включая тонкоигольные биопсии. Кроме того, метод FISH, в отличие от ОТ-ПЦР, позволяет проводить диагностику на фиксированных формалином парафиновых блоках, которые, как правило, представляют единственный возможный материал для исследования. Однако в каждом из этих методов есть слабое звено. С одной стороны, вследствие нестабильности РНК анализ экспрессии химерного транскрипта методом ОТ-ПЦР в парафиновых блоках становится сложной задачей, которую, однако, необходимо решать для того, чтобы идентифицировать и охарактеризовать химерный ген. С другой стороны, иногда, при неадекватной предварительной обработке материала, достаточно сложно интерпретировать результаты FISH-анализа. Вот почему в клинической диагностике крайне желательным представляется

использование обоих методов детекции химерного гена.

Еще несколько лет назад подходов к системному поиску новых химерных транскриптов не было. Так, химеры в эпителиальных опухолях обнаруживали непрямыми методами, используемыми только для данных конкретных случаев. Например, химерные гены, специфичные для РПЖ, обнаружили с помощью компьютерного анализа экспрессии генов в опухолевых образцах; химеры рака легкого – методами трансфекции. В настоящее время практикуется два системных подхода к поиску химерных генов, которые разработаны практически одновременно. Первый подход, на основе цитогенетических методов, позволяет оценить изменения на хромосомном уровне (модификации методов FISH и сравнительной геномной гибридизации – SKY и M-FISH), второй подход основан на использовании новых технологий секвенирования полного генома [1–3].

ХИМЕРНЫЕ ТРАНСКРИПТЫ В НОРМЕ

Явление межгенного сплайсинга, или химеризма, обусловленного транскрипцией (transcription induced chimerism – TIC), описано менее 5 лет назад [4]. Выделяют два вида сплайсинга: *транс-*сплайсинг подразумевает слияние двух различных молекул РНК генов, находящихся на разных хромосомах и *цис-*сплайсинг – результат слияния РНК двух близкорасположенных генов в одну объединенную молекулу мРНК (рис. 1).

Предполагают, что в образовании химер могут участвовать более 400 генов [5, 6]. Так, в работе Акива (Akiva) [5] описано 212 вариантов химерного сплайсинга. По всей видимости, эта цифра будет стремительно увеличиваться: некоторые исследователи предполагают, что от 2 до 5% всех генов вовлечено в процесс межгенного сплайсинга.

В работе Ли (Li) и соавт. [7] описано явление *транс-*сплайсинга на примере химерного транскрипта *JAZF1/JJAZ1* в образцах нормальной ткани эндометрия. Описанные химерные РНК и белок идентичны тем, которые образуются в результате транслокации. Результаты блот-гибридизации по Саузерну и FISH-анализа свидетельствовали об отсутствии в этих образцах соответствующей транслокации t(7;17)(p15;q21), которая приводит к появлению химерного онкогена *JAZF1/JJAZ1* при стромальной саркоме эндометрия. Можно предположить, что химера играет роль ростового фактора в нормальном развитии, а возникающая при патологии соответствующая транслокация вызывает необратимое изменение, приводящее к злокачественной трансформации. С одной стороны, есть мнение, что процесс транскрипционного сплайсинга химерных РНК может способствовать сближению хромосомных районов и, таким образом, иницииро-

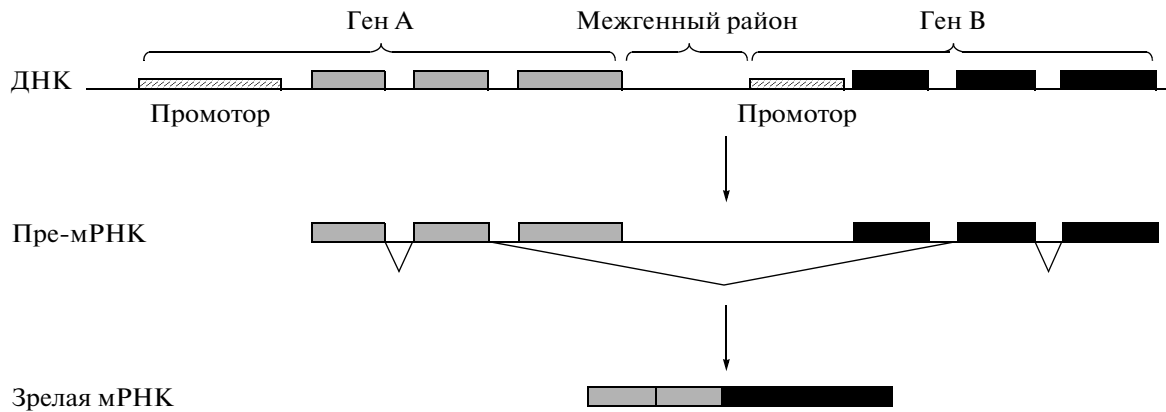


Рис. 1. Модель обусловленного транскрипцией химеризма (ТГС) (по Р. Akiva с соавт. [5]). Прямоугольниками схематически изображены экзоны; линиями – некодирующие участки и/или интроны.

вать хромосомные транслокации. С другой стороны, показано, что сближение хромосомных районов нельзя считать основным механизмом, запускающим перестройку. Безусловно, чтобы сделать правильные выводы, необходимо провести исследование механизмов образования различных сплайсинговых химерных транскриптов.

В качестве примера *цис*-сплайсинга можно привести еще один, довольно хорошо охарактеризованный, химерный транскрипт. Он состоит из двух членов семейства TNF-лигандов: *TNFSF12* (17p13) и *TNFSF13* (17p13), соответствующих трансмембранному и секретирующемуся белкам. Доказано, что химерный белок представляет собой биологически активный лиганд, экспрессирующийся на поверхности Т-клеток и монокитов [8].

Ответ на вопрос, что представляет собой ТГС, остается пока нерешенным. Высказываются два противоположных мнения. Одни исследователи считают, что это физиологический процесс, поддерживающий эволюционные механизмы в нормальных тканях. Другие склоняются к тому, что межгенный сплайсинг – патологический механизм, лежащий в основе некоторых нервно-мышечных, гематологических или онкологических заболеваний, которым можно управлять посредством антисмысловых РНК. К настоящему моменту понятно, что ТГС формирует дополнительный уровень белковой вариабельности и распространен в геноме человека гораздо шире, чем предполагалось ранее. Дальнейшее изучение роли межгенного сплайсинга позволит ответить на вопрос, какую роль этот процесс играет в образовании химерных онкобелков и канцерогенезе.

ТИПЫ ХИМЕРНЫХ ГЕНОВ

В результате образования химерных транскриптов либо появляются новые белки с новыми

функциями, либо происходит гиперэкспрессия уже существующих белков. Наиболее простое событие – это слияние регуляторного промоторного элемента одного гена с 5'-областью другого гена, что в результате приводит к эктопической экспрессии неизмененного полноразмерного генного продукта, – так называемая “подмена” промотора (рис. 2). Вторым вариантом событий может быть образование нового белка, обладающего новой функцией. Накоплено много данных, свидетельствующих о том, что такие химерные гибридные гены играют важную роль в инициации канцерогенеза. На экспериментальных моделях животных показано, что у трансгенных по химерным генам животных формируются опухоли, схожие с теми, которые наблюдаются у человека при соответствующих злокачественных новообразованиях. Так, например, в экспериментах *in vivo* исследована трансформирующая активность химерного гена синовиальной саркомы (СС) *SYT/SSX2*: при имплантации мышам клеточной культуры фибробластов формировалась опухоль, напоминающая СС. В свою очередь, ингибирование *in vitro* химерных транскриптов посредством малых интерферирующих РНК (siРНК – small interfering RNA) приводит к снижению пролиферативной активности опухолевых клеток и восстановлению их дифференцировки [10].

Гибридные химерные гены составляют примерно 75% всех известных химерных генов и идентифицированы в различных гематологических и солидных опухолях, локализованных в эпителиальных, стволовых, эмбриональных, нервных, жировых, фибробластных, мышечных, сосудистых, хрящевых и костных тканях. По функциональным особенностям можно выделить две основные группы генов-участников: транскрипционные факторы и тирозинкиназные рецепторы,

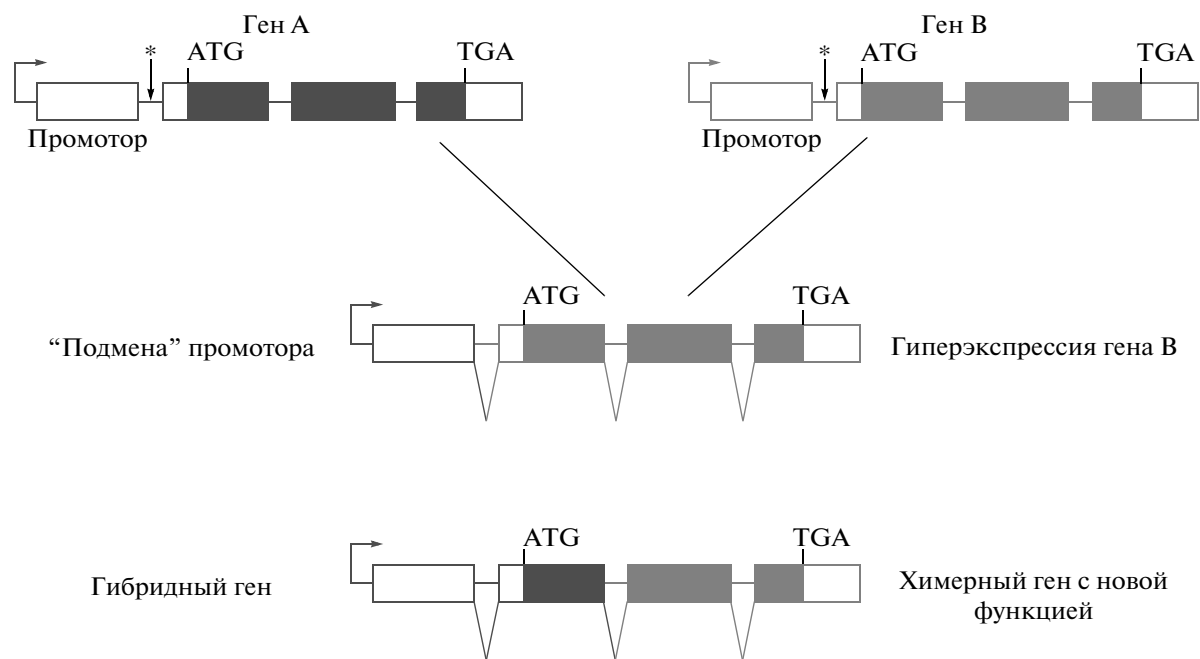


Рис. 2. Типы химерных генов (по Ф. Кауе [9]). Прямоугольниками схематически изображены экзоны; линиями — интроны.

на которые приходится до 50% всех вовлекаемых генов.

В большинстве случаев химерные гены высокоспецифичны для соответствующего им типа опухоли. Однако существует ряд исключений. Так, транслокация $t(12;15)(p13;q25)$, приводящая к слиянию гена *ETV6* с геном тирозинкиназного рецептора *NTRK3*, обнаружена в совершенно гистогенетически различных опухолях, таких как острый миелобластный лейкоз (ОМЛ), мезобластная нефрома, мягкотканная фибросаркома и секреторный рак молочной железы [11]. Другой пример — мукоэпидермоидная карцинома и светлоклеточная гидраденома: для обоих типов опухолей обнаружены транслокации $t(11;19)(q21;p13)$ и $t(6;22)(p21;q12)$ с образованием химерных генов *MECT1/MAML2* и *EWSR1/POU5F1* соответственно [12]. Транслокация $t(2;3)((q13;p25)$, приводящая к образованию химеры *PAX8/PPARG1*, описана для фолликулярного варианта папиллярного рака щитовидной железы и фолликулярного рака щитовидной железы [13]. Приведенные примеры свидетельствуют о том, что указанные перестройки могут представлять собой лишь фоновые процессы, общие для всех клеток опухолевых изменений, как в случае с транслокацией $t(12;15)(p13;q25)$. Как один из вариантов событий, происходящих при трансформации, может быть следующий: некоторые опухоли развиваются из одних и тех же клеток-предшественников, которые на настоящий момент еще не идентифицированы. В соответствующем органном микроокружении они формируют раз-

ные фенотипы (мукоэпидермоидной карциномы и светлоклеточной гидраденомы), но несут в своем генотипе первичные транслокации. Еще одним вариантом объяснения подобного феномена может быть морфологическая классификация опухолей, основанная на ошибочных признаках, не являющихся ключевыми моментами гистогенеза; например, в случае фолликулярного варианта папиллярного рака щитовидной железы и фолликулярного рака щитовидной железы. В этой связи постепенно осознается необходимость в пересмотре сложившейся классификации опухолей на основании их патогенетических изменений, причем при тесном взаимодействии специалистов различных областей: онкологов, патологоанатомов, молекулярных биологов. Новая классификация уже принята для некоторых гематологических опухолей, и подобное предложение высказывается относительно ряда сарком. Возможно, классификация некоторых эпителиальных опухолей также в скором времени подвергнется пересмотру.

ХИМЕРНЫЕ ОНКОГЕНЫ В ГЕМАТОЛОГИИ

На сегодняшний день для гематологических заболеваний описано 264 химерных гена, вовлекающих 238 различных генов (табл. 1). Это составляет 75% всех известных в онкологии химер. В настоящее время классификация ВОЗ для ряда гематологических нозологий основана исключи-

Таблица 1. Хромосомные перестройки и соответствующие химерные гены в гематологических опухолях

Опухоль	Хромосомная перестройка	Химерный ген
Острый мегакариобластный лейкоз	t(1;22)(p13;q13)	<i>RBM15/MKL1</i>
Анапластическая Т-крупноклеточная лимфома	t(2;5)(p23;q35)	<i>NPM1/ALK</i>
Лимфома Беркитта	t(8;14)(q24;q32)	<i>IGH/MYC</i>
Острый миелоидный лейкоз с t(8;21)(q22;q22)	t(8;21)(q22;q22)	<i>RUNX1/RUNX1T1</i>
Острый миелоидный лейкоз с inv(16)(p13.1q22) или t(16;16)(p13.1;q22)	inv(16)(p13.1q22) или t(16;16)(p13.1;q22)	<i>CBFB/MYH11</i>
Острый миелоидный лейкоз с t(9;11)(p22;q23)	t(9;11)(p22;q23)	<i>MLLT3/MLL</i>
Острый миелоидный лейкоз с t(6;9)(p23;q34)	t(6;9)(p23;q34)	<i>NUP214/DEK</i>
Хронический миелоидный лейкоз	t(9;22)(q34;q11)	<i>BCR/ABL1</i>
В-клеточный острый лимфобластный лейкоз	t(12;21)(p13;q22)	<i>ETV6/RUNX1</i>
Множественная миелома	t(14;16)(q32;q23)	<i>IGH/MAF</i>
Фоликулярная лимфома	t(14;18)(q32;q21)	гиперэкспрессия <i>BCL2</i>
Лимфома из клеток мантийной зоны	t(11;14)(q13;q32)	<i>CCND1/IGHG1</i>
В-лимфобластный лейкоз с t(1;19)(q23;p13)	t(1;19)(q23;p13)	<i>PBX1/E2A</i>
Т-лимфобластная лимфома/лейкоз из клеток-предшественников	t(11;14)(p15;q11)	гиперэкспрессия <i>TTG1</i>
MALT-лимфома	t(11;18)(q21;q21)	<i>API2/MLT</i>
Т-клеточный пролимфоцитарный лейкоз	t(14;14)(q11;q32)	<i>TCR/TCL1</i>
Острый промиелоцитарный лейкоз	t(15;17)(q22;q21)	<i>PML/RARA</i>
Острый миелоидный лейкоз с inv(3)(q21q26) или t(3;3)(q21;q26)	inv(3)(q21q26) или t(3;3)(q21;q26)	<i>RPN1/EVI1</i>
Острый лейкоз со смешанным фенотипом с t(9;22)(q34;q11)	t(9;22)(q34;q11)	<i>BCR/ABL1</i>
Острый лейкоз смешанного фенотипа с t(v;11q23)	t(v;11q23)	перестройка <i>MLL</i>
В-лимфобластный лейкоз с t(5;14)(q31;q32)	t(5;14)(q31;q32)	<i>IL3/IGH</i>

тельно на наличии или отсутствии специфической транслокации и химерного гена [14].

Механизм образования разнообразного пула антител в В-клетках включает в себя разрывы и рекомбинацию ДНК генов, кодирующих иммуноглобулины. В результате вероятность aberrантной рекомбинации между генами иммуноглобулинов (Ig) и другими локусами резко увеличивается; и такие патологии, как В-клеточные лимфомы, лейкозы и опухоли плазматических клеток, часто характеризуются наличием транслокаций между генами тяжелых цепей иммуноглобулинов (*IgH*) или генами легких цепей (*IgK* или *IgL*) и онкогенами *c-myc* или членами семейства *bcl*. Так, лимфома из клеток мантийной зоны несет транслокацию, приводящую к слиянию генов *IgH* и *CCND1*; для диффузной В-крупноклеточной лимфомы характерны перестройки между *IgH*, *Igk* или *Igl* и *bcl-2*, *bcl-6* или *c-myc*; в лимфоме Беркита обнаруживают химеру *IgH/c-myc*.

Классическим примером транслокации, приводящей к возникновению химерного гена, считается t(9;22)(q34;q11) – встречается более чем в 90% случаев хронического миелоидного лейкоза. В результате этой транслокации объединяются

5'-область гена *BCR* и 3'-область гена *ABL1*, что приводит к увеличению тирозинкиназной активности [15].

Маркером лимфомы из клеток мантийной зоны считается транслокация t(11;14)(q13;q32), выявляемая с высокой частотой – вплоть до 100%. При этой транслокации происходит перестройка локусов протоонкогена *CCND1(BCL1)* и генов *IgH*, приводящая к гиперэкспрессии циклина D1, что, как полагают, становится пусковым моментом канцерогенеза этой лимфомы [16].

Основным диагностическим критерием лимфомы Беркита считается транслокация с перестройкой гена *c-myc*. В 80% случаев обнаружена транслокация t(8;14)(q24;q32) с перемещением *c-myc* в локус *IgH*, в 20% случаев встречаются транслокации t(8;2)(q24;p12) и t(8;22)(q24;q11) с перемещением в локусы легких цепей иммуноглобулинов. Следствие транслокации – нарушение регуляции гена *c-myc*, что приводит к увеличению пролиферации опухолевых клеток [17].

Острый миелоидный лейкоз, или острый промиелоцитарный лейкоз, несет транслокацию t(15;17)(q22;q12), в результате которой происходит слияние гена рецептора ретиноевой кислоты

Таблица 2. Хромосомные перестройки и соответствующие химерные гены в опухолях мягких тканей

Опухоль	Хромосомная перестройка	Химерный ген
Саркома Юинга/PNET	t(11;22)(q24;q12)	<i>FLI1/EWSR1</i>
	t(21;22)(q22;q12)	<i>ERG/EWSR1</i>
	t(7;22)(p22;q12)	<i>ATV1/EWSR1</i>
Миксоидная липосаркома	t(12;16)(q13;p11)	<i>FUS/CHOP</i>
	t(12;22)(q13;q12)	<i>EWS/CHOP</i>
Синовиальная саркома	t(X;18)(p11;q11)	<i>SYT/SSX1</i>
		<i>SYT/SSX2</i>
		<i>SYT/SSX4</i>
Альвеолярная рабдомиосаркома	t(2;13)(q35;q14)	<i>PAX3/FKHR</i>
	t(1;13)(p36;q14)	<i>PAX7/FKHR</i>
Альвеолярная саркома мягких тканей	t(X;17)(p11;q25)	<i>ASPL/TFE3</i>
Светлоклеточная саркома	t(12;22)(q13;q12)	<i>EWSR1/ATF1</i>
Ангиоматоидная фиброзная гистиоцитома	t(12;16)(q22;q13)	<i>FUS/ATF1</i>
Врожденная фибросаркома	t(12;15)(p13;q25)	<i>ETV/NTRK3</i>
Десмопластическая круглоклеточная опухоль	t(11;22)(p13;q12)	<i>EWS/WT1</i>
Гигантоклеточная фибробластома	t(17;22)(q22;q13)	<i>COL1A1/PDGFβ</i>
Эндометриальная стромальная саркома	t(7;17)(p15;q21)	<i>JAZF1/JJAZ1</i>
	t(9;22)(q22;q12)	<i>NR4A3/EWSR1</i>
Экстраскелетная миксоидная хондросаркома	t(9;17)(q22;q11)	<i>NR4A3/RBP56</i>
	t(9;15)(q22;q21)	<i>NR4A3/TCF12</i>
Фибромиксоидная саркома	t(7;16)(q33;p11)	<i>FUS/CREB3L2</i>
Воспалительная миофибробластическая опухоль	t(1;2)(q22;p23)	<i>TPM3/ALK</i>
	t(2;19)(p23;p13)	<i>TPM4/ALK</i>
Рабдоидная опухоль	t(1;22)(q36;q11)	<i>SNFS/INI1</i>

(*RARA*) и гена регуляторного фактора *PML*. В редких случаях встречаются другие вариантные перестройки, вовлекающие ген *RARA*: t(11;17)(q23;q12) и t(5;17)(q35;q12); в таких случаях диагноз звучит как ОМЛ с вариантной транслокацией гена *RARA* [18].

Для фолликулярной лимфомы диагностической считается транслокация t(14;18)(q32;q21), реже встречаются варианты t(2;18)(p12;q21) и t(18;12)(q21;q11) – перестройки локуса гена *BCL2* (18q21) и локусов генов тяжелых и легких цепей иммуноглобулинов. Результат транслокации – гиперэкспрессия белка-ингибитора апоптоза *bcl2* [16].

В целом, около 15–30% острых лимфобластных лейкозов и зрелых В- и Т-опухолей характеризуются наличием химерных генов; для ходжкинских лимфом, миелодиспластических синдромов и хронических миелопролиферативных заболеваний идентифицировано менее 1% химерных генов. Таким образом, мнение, что для большинства гематологических заболеваний характерны химерные гены, не совсем обосновано. Однако в случаях, когда специфические транслокации известны, их определение становится неотъемлемой частью стандартизированной диа-

гностической процедуры верификации гематологической нозологии.

ХИМЕРНЫЕ ОНКОГЕНЫ ОПУХОЛЕЙ МЯГКИХ ТКАНЕЙ

Саркомы – чрезвычайно гетерогенная группа опухолей мезенхимального и нейроэктодермального происхождения (табл. 2). Приблизительно для одной трети всех сарком показано наличие специфической перестройки с соответствующим химерным геном. На сегодняшний день для этой группы опухолей известно более 40 химерных генов. Большинство опухолей мягких тканей диагностировать, опираясь только на гистологические и клинические критерии, сложно. В части случаев только совместное проведение ультраструктурных, иммуногистохимических и генетических исследований дает возможность определить тип саркомы. В последние годы классификация сарком, основанная только на клинических и гистологических параметрах, подвергается пересмотру. Так, на основании идентичных хромосомных перестроек в одну группу опухолей включены саркома Юинга и семейство примитивных нейроэктодермальных опухолей (PNET), миксоидная и

круглоклеточная липосаркомы; а в отдельные нозологические группы выделены ангиоматоидная фиброзная гистиоцитома и злокачественная фиброзная гистиоцитома. Таким образом, молекулярная диагностика прочно входит в список основных методов идентификации некоторых типов сарком. Вот несколько примеров.

СС – злокачественная опухоль мягких тканей, встречающаяся с частотой 5–10% среди всех сарком. Преимущественно СС локализуется на конечностях, около крупных суставов, сухожилий, синовиальных сумок, реже – в области головы, шеи, на стенке живота и практически в любом внутреннем органе. В настоящее время принято считать, что СС происходит из мультипотентных стволовых клеток, которые способны дифференцироваться как в эпителиальном, так и в мезенхимальном направлении. Дифференциальную диагностику СС проводят наряду с фибросаркомой, лейомиосаркомой, злокачественной опухолью оболочек периферических нервов, злокачественной фиброзной гистиоцитомой. В настоящий момент единственной однозначной характеристикой СС считается хромосомная транслокация $t(X;18)(p11;q11)$, определяемая с частотой $\leq 98\%$. В результате транслокации происходит слияние гена *SYT* с одним из генов-членов семейства *SSX*: *SSX1*, *SSX2* или *SSX4* – с образованием нового химерного онкогена *SYT/SSX*. Белковый продукт *SYT/SSX* играет важную роль в формировании опухолевого фенотипа СС [19].

Миксоидная липосаркома составляет более трети липосарком; дифференциальный диагноз этого типа опухоли включает в себя липобластому, высокодифференцированную липосаркому с большими очагами миксоидных изменений, миксоидную злокачественную фиброзную гистиоцитому и миксоидную хондросаркому, а также, в некоторых случаях, другие круглоклеточные саркомы. Специфических иммуногистохимических маркеров для миксоидной липосаркомы не существует, а основным признаком этого варианта считается транслокация $t(12;16)(q13;p11)$ [20]. Цитогенетический анализ выявляет эту, специфическую для миксоидной липосаркомы, транслокацию в 85–95% случаев. В процесс перестройки вовлекаются гены *FUS* и *CHOP*, что приводит к образованию нового химерного гена *FUS/CHOP*. Другой тип транслокации $t(12;22)(q13;q12)$ встречается крайне редко и приводит к образованию химерного гена *EWS/CHOP* (рис. 3). Ген *CHOP* (12q13) кодирует белок – член семейства транскрипционных факторов “лейциновая молния”, который участвует в дифференцировке адипоцитов и аресте клеточного роста. Считают, что *FUS/CHOP* функционирует как абберантный транскрипционный регулятор, влияющий на дифференцировку адипоцитов. *FUS* (16p11.2) и *EWS* (22q12) принадлежат одному семейству

РНК-связывающих белков; их высокая гомология на уровне как аминокислотных, так и нуклеотидных последовательностей позволяет предположить происхождение от общего гена-предка. Таким образом, два разных транслокационных партнера *CHOP* приводят к единому конечному результату – фенотипическому проявлению миксоидной липосаркомы, что подтверждает их функциональную гомологию.

Семейство опухолей Юинга включает в себя саркому Юинга, примитивные нейроэктодермальные опухоли, опухоль Аскина и нейроэпителиому. Для этого семейства характерны транслокации $t(11;22)(q22;q12)$, приводящая к образованию химерного гена *EWS1/FLI1* (80–85%) (рис. 4), и транслокация $t(21;22)(q22;q12)$ с химерным геном *EWS1/ERG* (10%) [21]. Редкие варианты химер образованы посредством слияния гена *EWS1* с другими факторами семейства ETS. Ген *EWS1* принадлежит к семейству генов, которые кодируют белки, участвующие в процессинге РНК. Считают, что химерный ген *EWS1/FLI1* – транскрипционный фактор, причем более мощный, чем *FLI1*.

Рабдомиосаркома относится к опухолям мягких тканей, происходящих из скелетной мускулатуры. На основании гистологических параметров выделяют альвеолярную и эмбриональную рабдомиосаркому. Цитогенетический анализ выявляет хромосомные транслокации $t(2;13)(q35;q14)$ и $t(1;13)(p36;q14)$ в альвеолярном типе саркомы, но не в эмбриональном [22]. В результате перестроек образуется два химерных гена с вовлечением транскрипционного фактора *FKHR*: *PAX3/FKHR* (55%) и *PAX7/FKHR* (27%) (рис. 5). Наличие химерного гена *PAX7/FKHR* свидетельствует о более благоприятном течении рабдомиосаркомы, чем при перестройке *PAX3/FKHR*.

Опухоли мягких тканей остаются одним из труднейших разделов онкоморфологии. Это связано с большим числом нозологических форм и их вариантов, обусловленных многообразием гисто- и морфогенеза, сложностями дифференциального диагноза при наличии весьма близкой структурной и клеточной характеристики опухоли, разнообразием клинического течения и прогноза. В последние годы традиционные диагностические подходы дополнены молекулярными методами, позволяющими детектировать опухоль-специфические химерные гены, что существенно облегчает диагностику ряда сарком и позволяет разрабатывать новые подходы терапевтического лечения.

ХИМЕРНЫЕ ОНКОГЕНЫ ЭПИТЕЛИАЛЬНЫХ ОПУХОЛЕЙ

Хромосомные перестройки с образованием химерных генов изначально были описаны для

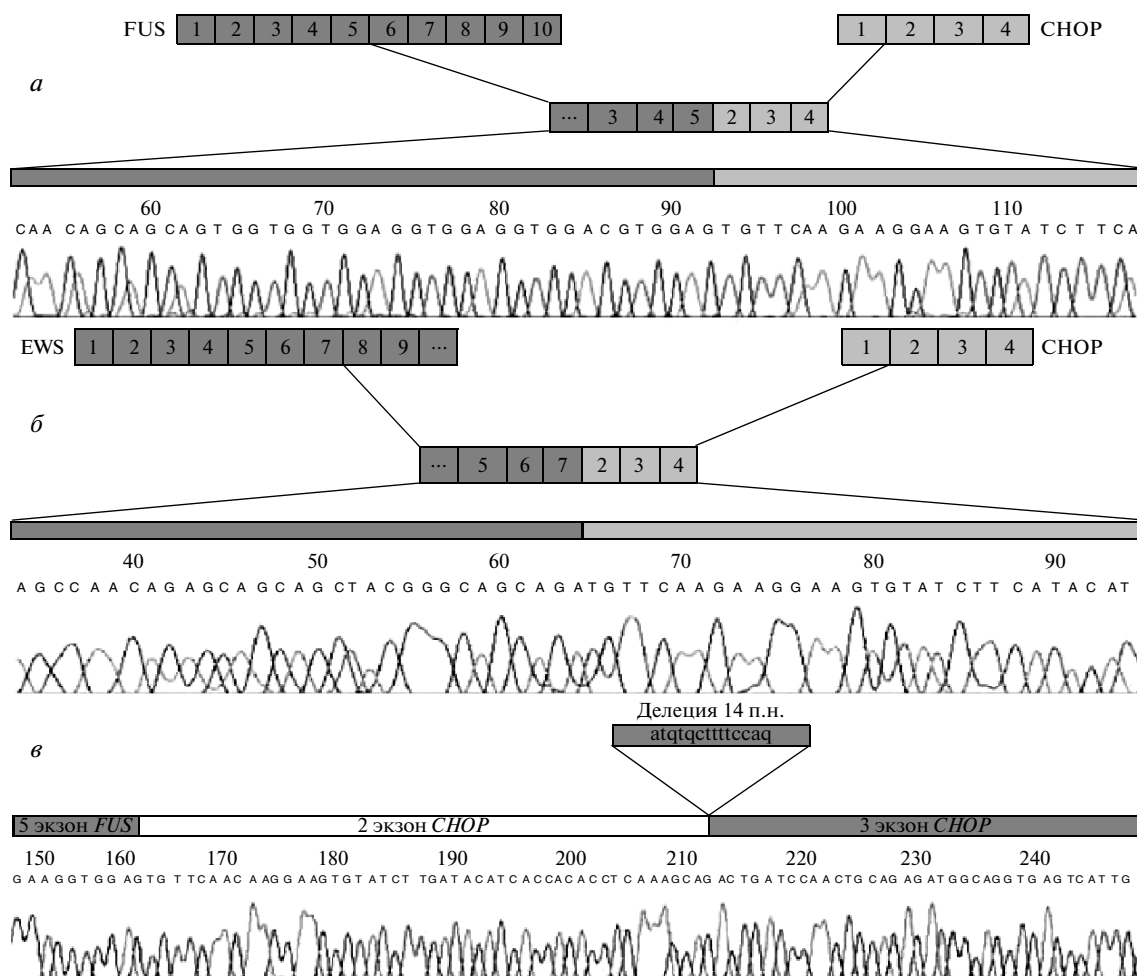


Рис. 3. Схематическое изображение и нуклеотидная последовательность кДНК химерных генов, характерных для миксоидной липосаркомы, в месте слияния. *а* – Химерный ген *FUS/CHOP*; *б* – химерный ген *EWS/CHOP*; *в* – химерный ген *FUS/CHOP* с делецией в третьем экзоне *CHOP*. Цифрами обозначены номера экзонов генов-участников транслокации.

гематологических опухолей, позднее – для сарком и лишь недавно обнаружены в эпителиальных опухолях. В соответствии с этими данными считалось, что молекулярные механизмы канцерогенеза мезенхимальных опухолей фундаментально отличаются от эпителиальных. Ситуация изменилась в 2005 году, когда показали, что самым высокочувствительным и высокоспецифичным изменением РПЖ следует считать появление химерных генов *TMPRSS2/ERG* – их выявляют в предстательной железе с частотой $\leq 79\%$. Начавшиеся вскоре интенсивные поиски химерных генов в других эпителиальных опухолях уже привели к положительному результату – для рака легкого и рака молочной железы (табл. 3). Интересно, что и для РПЖ, и рака щитовидной железы, и рака легкого механизм возникновения химерных генов не связан с транслокациями, а заключается в появлении небольших делеций или инверсий внутри хромосомы. Возможно, в этом и кроется

причина того, почему эти химерные гены не обнаружили ранее цитогенетическими методами.

Первые химерные гены, описанные для карциномы, – перестройки гена *RET* в папиллярном раке щитовидной железы. Ген *RET* расположен в локусе 10q11 и вовлечен в перестройки с несколькими партнерами, наиболее часто с генами *CCDC6* и *NCOA4*, также расположенными в районе 10q [23]. Таким образом, оба химерных гена, *CCDC6/RET* (ранее известного как *RET/PTC1*) и *NCOA4/RET* (*RET/PTC3*), образуются в результате парацентрической хромосомной инверсии. Описано более 10 редких химерных перестроек с частотой встречаемости менее 1%, но все они имеют схожую структуру и функцию: второй ген способствует димеризации доменов, что обеспечивает постоянную активность киназного домена *RET*. В среднем в 35% случаев папиллярного рака щитовидной железы детектируют перестройки *RET*.

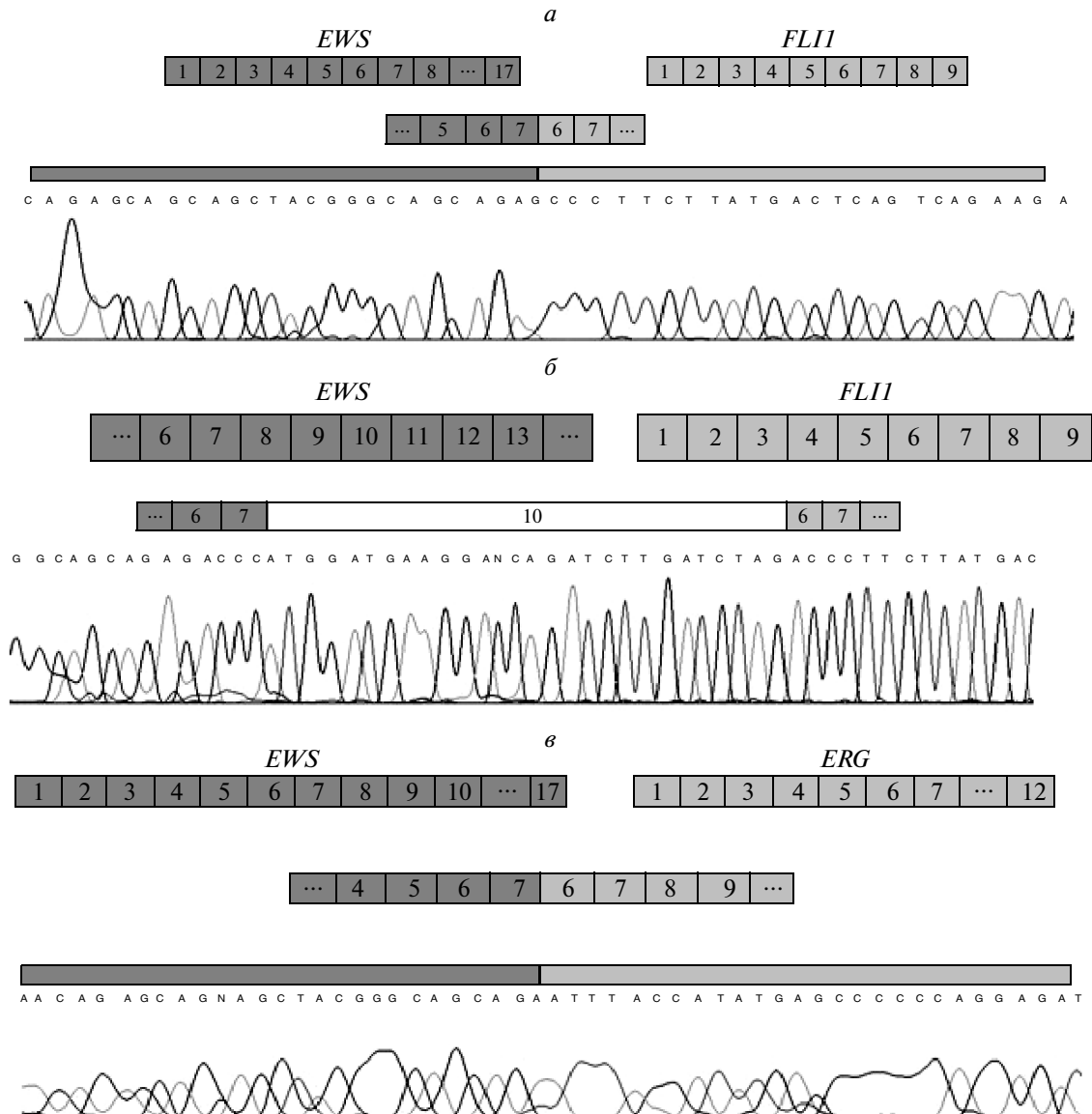


Рис. 4. Схематическое изображение и нуклеотидная последовательность кДНК химерного гена *EWS/FLI1*, характерного для опухолей семейства Юинга, в месте слияния. *а* – Химерный ген *EWS/FLI1*; *б* – химерный ген *EWS/FLI1* с инсерцией 10-го экзона гена *EWS* между экзонем 7 гена *EWS* и экзонем 6 гена *FLI1*; *в* – химерный ген *EWS/ERG*. Цифрами обозначены номера экзонов генов-участников транслокации.

Фолликулярный рак щитовидной железы характеризуется хромосомной транслокацией $t(2;3)(q13;p25)$, которая приводит к слиянию гена тиреоидспецифического транскрипционного фактора *PAX8* с геном ядерного рецептора *PPARG1* [24]. Химерный ген *PAX8/PPARG1* кодирует химерный транскрипционный фактор, предполагаемый механизм действия которого заключается в отрицательной регуляции *PPARG1* дикого типа. В зависимости от способов детекции, по разным источникам, частота встречаемости *PAX8/PPARG1* варьирует от 10 до 60%.

Особенностью канцерогенеза РПЖ считается гиперэкспрессия факторов транскрипции семейства ETS вследствие хромосомных перестроек

$del(21)(q22.2q22.3)$, $t(7;21)(p21;q22)$ и $t(17;21)(q21;q22)$ [25]. Наиболее часто образуется химерный ген (до 78%) – результат слияния гена *TMPRSS2* (21q22) с расположенным рядом геном *ERG4* (рис. 6). Варианты химерных генов *TMPRSS2/ETV1* и *TMPRSS2/ETV4* встречаются намного реже – с частотой не выше 2%. Экспрессия трансмембранной сериновой протеиназы *TMPRSS2* – это протатспецифический и андрогензависимый процесс. Таким образом, активация факторов транскрипции ETS осуществляется при помощи андрогенчувствительных промоторных и энхансерных элементов. Этот химерный транскрипт хорошо охарактеризован и встречается чаще всех

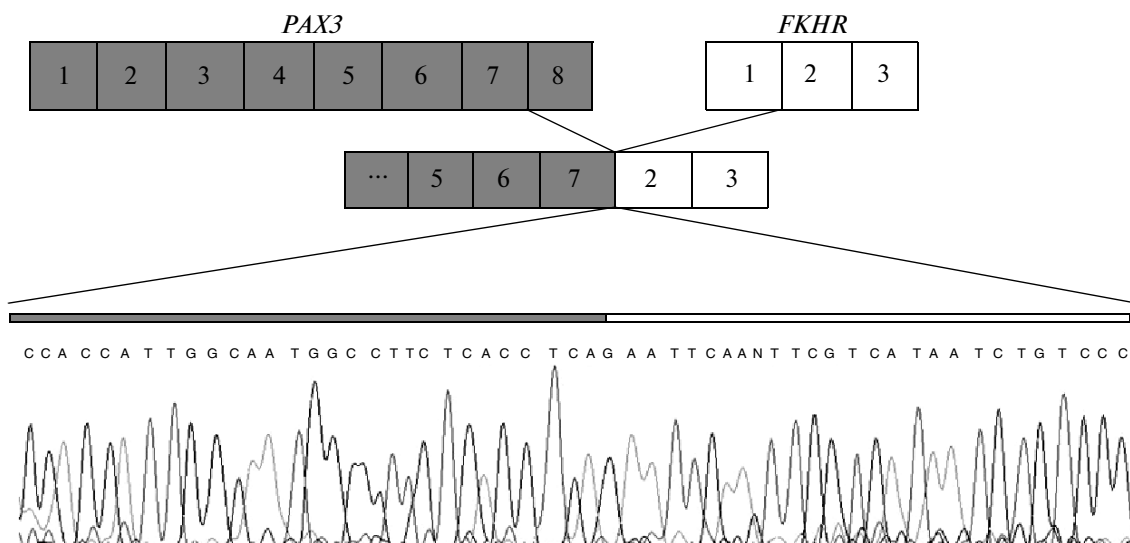


Рис. 5. Схематическое изображение и нуклеотидная последовательность кДНК химерного гена *PAX3/FKHR*, характерного для альвеолярной рабдомиосаркомы, в месте слияния. Цифрами обозначены номера экзонов генов-участников транслокации.

известных для эпителиальной опухоли. Показано, что химерный транскрипт *TMPRSS2/ERG4* ассоциирован с инвазией в семенные пузырьки, ранним рецидивом, агрессивным течением и метастазированием.

Плеоморфная аденома — доброкачественная бифазная опухоль с признаками эпителиальной и мезенхимальной дифференцировки. Приблизительно 40% плеоморфных аденом имеют перестройки локуса 8q21 с вовлечением транскрипционного фактора, содержащего мотив цинковых пальцев, *PLAG1* [26]. Чаще всего ген *PLAG1* вовлечен в транслокацию $t(3;8)(p21;q12)$, в результате которой происходит его слияние с геном бета-катенина *CTNBN1*. Описаны также более редкие варианты. Конечный результат такой перестройки —

гиперэкспрессия *PLAG1*. Однако избыточная экспрессия белка *PLAG1* наблюдается более чем в 75% плеоморфных аденом, что предполагает помимо перестроек 8q21 существование альтернативных механизмов гиперэкспрессии этого гена.

В качестве интересного примера эпителиальной опухоли со специфической транслокацией рассмотрим случай срединной карциномы. Это высоко агрессивная карцинома, располагающаяся преимущественно вдоль средней линии головы и шеи, причем встречается у людей молодого возраста. Хромосомные транслокации $t(15;19)(q13;p13)$ и $t(9;15)(q34;q13)$ приводят к формированию соответствующих химерных генов *BRD4/NUT* и *BRD3/NUT* [26]. *BRD4* кодирует хроматин-связывающийся ядерный белок, который, как предполагают, участвует в сохранении клеточной памяти во время митоза. *NUT* кодирует ядерный белок с неизвестной функцией, экспрессируется преимущественно в яичках. С момента обнаружения данной транслокации в 2001 году и выделения соответствующей отдельной нозологии на основании этого критерия показано, что срединная карцинома *NUT* распространена шире, чем полагали ранее, и встречается также в старших возрастных группах.

Несколько лет назад в отдельную нозологию выделили почечно-клеточную карциному, для которой характерно наличие перестроек локуса Xp11.2 [27]. Эта опухоль поражает преимущественно детей и подростков. В перестройку Xp11.2 вовлечен ген *TFE3*, кодирующий транскрипционный фактор семейства MITF/TFE; результат химеризации *TFE3* — его гиперэкспрессия. Среди пяти описанных химерных генов наиболее распространены *ASPL/TFE3* и *PRCC/TFE3*. Интересно, что химерный ген *ASPL/TFE3* харак-

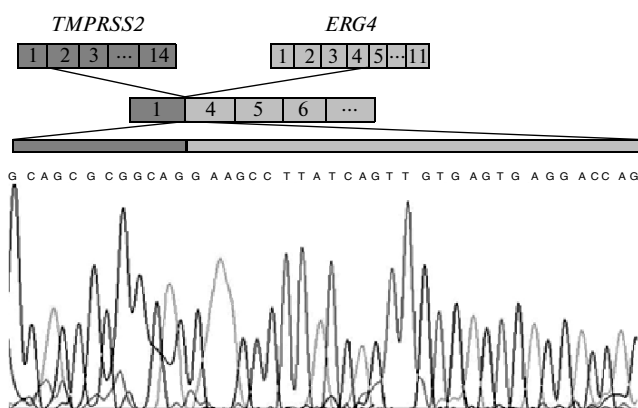


Рис. 6. Схематическое изображение и нуклеотидная последовательность кДНК химерного гена *TMPRSS2/ERG*, характерного для РПЖ, в месте слияния. Цифрами обозначены номера экзонов генов-участников транслокации.

Таблица 3. Хромосомные перестройки и соответствующие химерные гены в эпителиальных опухолях

Опухоль	Хромосомная перестройка	Химерный ген
Папиллярный рак щитовидной железы	inv(10)(q11.2q11.3)	<i>CCDC6/RET</i>
	inv(10)(q11.2q21)	<i>NCOA4/RET</i>
	t(10;17)(q11;q23)	<i>PRKARIA/RET</i>
	inv(1)(q21q23)	<i>TPM3/NTRK1</i>
Фолликулярный вариант папиллярного рака щитовидной железы	t(2;3)(q13;p25)	<i>PAX8/PPARG1</i>
	t(2;3)(q13;p25)	<i>PAX8/PPARG1</i>
Фолликулярный рак щитовидной железы	t(3;7)(p25;q34)	<i>CREB3L2/PPARG1</i>
	t(3;8)(p21;q12)	<i>CTNNB1/PLAG1</i>
	t(5;8)(p13;q12)	<i>LIFR/PLAG1</i>
	inv(8)(q12q12)	<i>CHCHD7/PLAG1</i>
Плеоморфная аденома	t(11;19)(q21;p13)	<i>MECT/MAML2</i>
	t(6;22)(p21;q12)	<i>EWSR1/POU5F1</i>
	t(11;15)(q21;q26)	<i>CRTC3/MAML2</i>
Мукоэпидермоидная карцинома	t(11;19)(q21;p13)	<i>MECT/MAML2</i>
	t(6;22)(p21;q12)	<i>EWSR1/POU5F1</i>
Гидраденома	t(11;15)(q21;q26)	<i>CRTC3/MAML2</i>
	t(15;19)(q13;p13)	<i>BRD4/NUT</i>
Срединная карцинома NUT	t(X;17)(p11;q25)	<i>ASPL/TFE3</i>
	t(X;1)(p11;q21)	<i>PRCC/TFE3</i>
Почечноклеточная карцинома	t(X;1)(p11;p34)	<i>SFPQ/TFE3</i>
	t(X;17)(p11;q23)	<i>CLTC/TFE3</i>
Секреторный рак молочной железы	t(12;15)(p13;q25)	<i>ETV6/NTRK3</i>
	del(21)(q22.2q22.3)	<i>TMPRSS2/ERG</i>
Рак предстательной железы	t(7;21)(p21;q22)	<i>TMPRSS2/ETV1</i>
	t(17;21)(q21;q22)	<i>TMPRSS2/ETV4</i>
Аденокарцинома легкого	inv(2)(p21p23)	<i>EML4/ALK</i>

терен также для альвеолярной мягкотканой саркомы, которая имеет цитологические характеристики схожие с *ASPL/TFE3*-положительной почечно-клеточной карциномой.

В 2007 году исследования немелкоклеточного рака легкого привели к открытию нового химерного гена *EML4/ALK*, встречающегося при аденокарциноме легкого с частотой до 16% [28]. Этот химерный ген образуется в результате небольшой инверсии короткого плеча хромосомы 2p. Описаны также два альтернативных партнера *ALK*: *TFG* и *KIF5B*. Следует отметить, что при раке легкого среди химерных генов, вовлекающих *ALK*, не обнаружено генов, характерных для гематологических опухолей, таких как *NPM/ALK*, *TPM3/ALK* или *CLTC/ALK*. В результате перестройки происходит конституционная активация тирозинкиназы, и последние достижения в области “таргетной” (от “target” – мишень, т.е. действующей на определенную мишень) терапии позволяют надеяться на эффективность действия разрабатываемых ингибиторов *ALK*-киназы в соответствующей группе пациентов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Мы привели ряд примеров, свидетельствующих о разнообразии генов, участвующих в создании химер. Вновь возникшие химерные белки могут быть пусковыми элементами канцерогенеза или придавать опухоли характерный фенотип, или быть фоновыми изменениями для опухолевой клетки. Стремительный рост современных технологий, приведший к идентификации большого количества новых химерных генов, ставит перед исследователями новые вопросы: какую роль (из вышеперечисленных) играют эти химерные транскрипты в этиологии соответствующего злокачественного новообразования и являются ли химерные гены конститутивной формой соответствующих химерных транскриптов в норме. Хотя некоторые химерные онкогены уже эффективно используются в диагностике опухолей, очевидно, что большинство идентифицированных и еще не идентифицированных перестроек требуют интенсивного изучения специалистами из различных областей онкологии.

С момента открытия химерного гена *TMPRSS2/ERG* при РПЖ, когда господствовало мнение, что химеры не характерны для эпителиальных опухолей, прошло всего несколько лет. И сейчас исследователи столкнулись с тем, что не знают, как интерпретировать и классифицировать то огромное количество новых химерных генов, информация о которых поступает практически каждый день. Надеемся, что их открытие поможет поднять на новый уровень диагностические и терапевтические возможности клинической онкологии.

Авторы благодарят д-ра П. Акива (P. Akiva) и его руководителя д-ра Р. Сорека (R. Sorek) и д-ра Ф. Кайе (F. Kaye) за разрешение на воспроизведение в этом обзоре рисунков из статей [5] и [9].

Работа выполнена при финансовой поддержке Государственного контракта Министерства науки и образования Российской Федерации № 02.740.11.0089 от 15 июня 2009 г.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Heim S., Mitelman F. 2008. Molecular screening for new fusion genes in cancer. *Nat. Genet.* **40**, 685–686.
2. Howarth K., Blood K., Ng B., et al. 2008. Array painting reveals a high frequency of balanced translocations in breast cancer cell lines that break in cancer-relevant genes. *Oncogene*. **27**, 3345–3359.
3. Maher C., Palanisamy N., Brenner J., et al. 2009. Chimeric transcript discovery by paired-end transcriptome sequencing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **106**, 12353–12358.
4. Tolvanen M., Ojala P., Toronen P., et al., 2009. Interspersed transcription chimeras: Neglected pathological mechanism infiltrating gene accession queries? *J. Biomed. Inform.* **42**, 382–389.
5. Akiva P., Toporik A., Edelheit S., et al. 2006. Transcription-mediated gene fusion in the human genome. *Genome Res.* **16**, 30–36.
6. Parra G., Raymond A., Dabbouseh N., et al. 2006. Tandem chimerism as a means to increase protein complexity in the human genome. *Genome Res.* **16**, 37–44.
7. Li H., Wang J., Mor G., Sklar J. 2008. A neoplastic gene fusion mimics trans-splicing of RNAs in normal human cells. *Science*. **321**, 1357–1361.
8. Pradet-Balade B., Medema J., Lopez-Fraga M., et al. 2002. An endogenous hybrid mRNA encodes TWEAK-PRIL, a functional cell surface TWEAK-APRIL fusion protein. *EMBO J.* **21**, 5711–5720.
9. Kaye F. 2009. Mutation-associated fusion cancer genes in solid tumors. *Mol. Cancer Ther.* **8**, 1399–408.
10. Nagai M., Tanaka S., Tsuda M., et al. 2001. Analysis of transforming activity of human synovial sarcoma associated chimeric protein SYT-SSX1 bound to chromatin remodeling factor hBRM/hSNF2 alpha. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **98**, 3843–3848.
11. Lannon C.L., Sorensen P.H. 2005. ETV6-NTRK3: a chimeric protein tyrosine kinase with transformation activity in multiple cell lineages. *Semin. Cancer Biol.* **15**, 215–223.
12. Behboudi A., Winnes M., Gorunova L., et al. 2005. Clear cell hidradenoma of the skin—a third tumor type with a t(11;19)—associated TORC1-MAML2 gene fusion. *Genes Chromosomes Cancer*. **43**, 202–205.
13. Salajegheh A., Petcu E., Smith R., Lam A. 2008. Follicular variant of papillary thyroid carcinoma: a diagnostic challenge for clinicians and pathologists. *Postgrad. Med. J.* **84**, 78–82.
14. WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. 2008. Eds Swerdlow S., Campo E., Harris N., et al. Lyon, International agency for research on cancer.
15. Virgili A., Nacheva E. 2010. Genomic amplification of BCR/ABL1 and a region downstream of ABL1 in chronic myeloid leukaemia: a FISH mapping study of CML patients and cell lines. *Mol. Cytogenet.* **1**, 3–15.
16. Bernicot I., Douet-Guilbert N., Le Bris M., et al. 2007. Molecular cytogenetics of IGH rearrangements in non-Hodgkin B-cell lymphoma. *Cytogenet. Genome Res.* **118**, 345–352.
17. Boerma E., Siebert R., Kluin P., Baudis M. 2009. Translocations involving 8q24 in Burkitt lymphoma and other malignant lymphomas: a historical review of cytogenetics in the light of today's knowledge. *Leukemia*. **23**, 225–34.
18. Wrede J., Sundram U., Kohler S. 2005. Fluorescence in situ hybridization investigation of cutaneous lesions in acute promyelocytic leukemia. *Mod. Pathol.* **18**, 1569–1576.
19. Santos N., Bruijn D., Kessel G. 2001. Molecular mechanisms underlying human synovial sarcoma development. *Genes Chromosomes Cancer*. **30**, 1–14.
20. Riggi N., Cironi L., Provero P., et al. 2006. Expression of the FUS-CHOP fusion protein in primary mesenchymal progenitor cells gives rise to a model of myxoid liposarcoma. *Cancer Res.* **66**, 7016–7023.
21. Yamaguchi U., Hasegawa T., Morimoto Y., et al. 2005. A practical approach to the clinical diagnosis of Ewing's sarcoma/primitive neuroectodermal tumour and other small round cell tumours sharing EWS rearrangement using new fluorescence *in situ* hybridisation probes for EWSR1 on formalin fixed, paraffin wax embedded tissue. *J. Clin. Pathol.* **58**, 1051–1056.
22. Melcon G., Toledo S., Codina J., et al. 2007. Molecular biology of rhabdomyosarcoma. *Clin. Transl. Oncol.* **9**, 415–419.
23. Васильев Е., Румянцев П., Саенко В., Ильин А., Полякова Е., Немцова М., Залетаев Д. 2004. Молекулярный анализ структурных нарушений генома папиллярных карцином щитовидной железы. *Молекуляр. биология*. **38**, 642–653.
24. Caria P., Vanni R. 2010. Cytogenetic and molecular events in adenoma and well-differentiated thyroid follicular-cell neoplasia. *Cancer Genet. Cytogenet.* **203**, 21–29.
25. Tomlins S., Rhodes D., Perner S., et al. 2005. Recurrent fusion of *TMPRSS2* and *ETS* transcription factor genes in prostate cancer. *Science*. **310**, 644–648.
26. Zhang H., Oliveira A. 2010. Fusion genes in epithelial neoplasia. *J. Clin. Pathol.* **63**, 4–11.
27. Ross H., Argani P. 2010. Xp11 translocation renal cell carcinoma. *Pathology*. **42**, 369–373.
28. Sakairi Y., Nakajima T., Yasufuku K., et al. 2010. EML4-ALK fusion gene assessment using metastatic lymph node samples obtained by endobronchial ultrasound-guided transbronchial needle aspiration. *Clin. Cancer Res.* **16**, 4938–4945.