

some cases reaching 100%. The molecular structure of the antibiotic resistance plasmids of ancient bacteria was investigated and its comparative analysis with the plasmids of modern bacterial strains was carried out. A wide distribution among the modern bacteria of small plasmids, closely related to the ancient *Acinetobacter* plasmid, carrying an autonomous streptomycin/ spectinomycin resistance gene *aadA27*, has been revealed. The structure of the «ancient» integron satisfying the description of the hypothetical precursor of the subgroup *aadA2* integrons is described. On the examples of the Tn3 family transposons (Tn5393 and Tn21 subgroups) various mechanisms of the formation of antibiotic resistance complex transposons are considered. In particular, the important role of integrons in the formation of complex transposons is demonstrated by a presentation of the numerous cases of independent insertion of integrons containing various cassette resistance genes into various Tn3 family base transposons. Separately, the origin of complex Tn21 related transposons is considered in connection with the detection in the permafrost of simple mobile elements, their possible precursors. Together, these data are considered as convincing evidence of the origin of both the antibiotic resistance genes of clinical bacteria and the mobile elements carrying them from the resistance determinants of bacteria inhabiting natural ecosystems.

**К е у w o r d s :** *review; permafrost, antibiotic resistance; plasmids, transposons, integrons*

**For citation:** Mindlin S.Z., Petrova M.A. On the origin and distribution of antibiotic resistance: the permafrost bacteria studies. *Molekulyarnaya Genetika, Mikrobiologiya i Virusologiya (Molecular Genetics, Microbiology and Virology)* 2017; 35(4): 123–132 (Russian). DOI 10.18821/0208-0613-2017-35-4-123–132.

**For correspondence:** Sofia Z.Mindlin, Dr. Sci. Biol., lead researcher of the department of molecular genetics; Institute of Molecular Genetics, Russian Academy of Sciences, Moscow 123182, Russia. E-mail: mindlin@img.ras.ru

**Acknowledgments.** The authors are grateful to A.V. Kulbachinskiy and T.S. Ilyina for helpful comments and suggestions and for critical reading of the manuscript.

This work was partially supported by the Russian Foundation for Basic Research (grants 05-04-49372, 08-04-00263, 11-04-01217 and 14-04-01917) and by the Russian Academy of Sciences Presidium Program «Molecular and Cellular Biology» (grant to A.V. Kulbachinskiy).

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

Received 10.05.17

Accepted 10.07.17

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2017

УДК 616.831-006.484:577.21.00

*Кут О.И., Водолажский Д.И., Росторгуев Э.Е., Франциянц Е.М., Панина С.Б.*

## МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ ГЛИОМ

ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» Минздрава России, 344037 Ростов-на-Дону, 14-я Линия, 63

**Резюме.** Глиомы — инвазивные опухоли мозга, характеризующиеся высокими уровнями рецидивирования и смертности. Морфологически глиомы подразделяют на астроцитомы, олигодендроглиомы и смешанные олиго-астроцитомы. Согласно классификации ВОЗ, по степени злокачественности (I—IV) глиомы дифференцируют на следующие группы: I (пилоцитарные астроцитомы), II (глиомы низкой степени злокачественности), III (глиомы высокой степени), IV (глиобластомы). Мутации в генах *IDH1/2*, *TP53*, метилирование гена *MGMT* наиболее часто обсуждаются как прогностические маркеры глиом. Цель настоящего обзора — анализ исследований и экспериментальных результатов (базы данных Scopus, Web of Science, Pubmed), касающихся характерных для различных морфологических групп и стадий глиом соматических мутаций, aberrантной регуляции экспрессии генов сигнальных путей, а также диагностических и прогностических маркеров прогрессирования глиом. Отдельно рассмотрены молекулярно-генетические особенности медуллобластом и эпендимом.

**Ключевые слова:** *глиомы, молекулярные маркеры, онкогенные мутации, эпигенетические изменения, обзор.*

**Для цитирования:** *Кут О.И., Водолажский Д.И., Росторгуев Э.Е., Франциянц Е.М., Панина С.Б.* Молекулярно-генетические маркеры глиом. Молекулярная генетика, микробиология и вирусология 2017; 35(4): 132–140. DOI 10.18821/0208-0613-2017-35-4-132–140.

Глиомы — наиболее распространенные инвазивные первичные опухоли мозга у взрослых, характеризующиеся высокими уровнями смертности и рецидивирования после хирургического удаления, с частотой встречаемости около 5 пациентов в год на 100,000 человек в мире. Глиомы поражают головной и спинной мозг и возникают в результате онко-трансформации глиальных клеток [1]. Приблизительно 70% всех глиом относятся к злокачественным; 5-летний рубеж выживаемости

преодолевают лишь 20% пациентов с данным заболеванием [2]. Морфологически все глиомы подразделяют на астроцитомы, олигодендроглиомы и смешанные олиго-астроцитомы. Наиболее распространенным и опасным типом глиом является мультиформная глиобластома (GBM, IV степень злокачественности по классификации ВОЗ), медиана выживаемости пациентов с GBM составляет приблизительно 14 мес с момента постановки диагноза, что на 4 мес больше относительно выживаемости 5 лет назад [3–5].

В настоящее время стандарты лечения глиом включают хирургическую резекцию с последующей адьювантной лучевой и химиотерапией, при этом объем резекции является независимым фактором риска при выживании пациента [6]. В течение десятилетий ключевым подходом в лечении глиом являлась лучевая терапия; при этом применение такого цитостатического алкилирующего агента как темозоломид (Temozolomidum) одновременно или после лучевой терапии значительно увеличило среднюю выживаемость пациентов. Уже на пути обширного внедрения в клиническую практику таргетная терапия агрессивных глиобластом, например, бевацизумаб, рекомбинантные гиперхимерные моноклональные антитела к фактору роста эндотелия сосудов VEGF [5].

Кроме величины резекции глиомы, к прогностическим факторам относятся возраст на момент постановки диагноза, общее состояние больного по шкале Карновского, а также определенные генетические факторы риска [7]. Низкая эффективность при лечении глиом объясняется, прежде всего, высокой гетерогенностью клеток опухоли и инвазивностью, а также часто встречающейся на практике поздней постановкой диагноза, когда появляются явно выраженные симптомы заболевания. В подавляющем большинстве случаев данные опухоли неизлечимы: глиомы низкой степени злокачественности прогрессируют в глиомы высокой степени злокачественности; даже глиомы низкой степени злокачественности часто диагно-

**Для корреспонденции:** *Панина Светлана Борисовна*, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории молекулярной онкологии РНИОИ, e-mail: tailana703@gmail.com

стируют тогда, когда процесс распространился за пределы возможности эффективной хирургической резекции. Вследствие этого, проблема ранней диагностики глиом и скрининга молекулярных мишеней с целью терапии является весьма актуальной [8].

Исследования молекулярно-генетических особенностей первичных опухолей мозга идентифицировали определенные общие патологические изменения и сигнальные пути, свойственные нескольким типам глиом. Так, при глиомах наблюдаются изменения в таких сигнальных путях, как тирозинкиназные рецепторы ростовых факторов и связанные с ними фосфатидилинозитол-3 киназа (PI3K) или MAP-киназные каскады; регуляции апоптоза через p53 сигналинг; а также регуляция клеточного цикла через циклин-зависимые киназы и ангиогенез путем VEGF сигналинга [3]. GWAS-исследования (Genome-Wide Association Studies) идентифицировали несколько наследственных генетических вариантов, ассоциированных с повышенным риском развития глиом; среди них: SNP генов субъединицы обратной транскриптазы теломеразы (*TERT*, rs2736100), рецептора эпидермального фактора роста (*EGFR*, rs2252586), ингибитора 2В циклин-зависимой киназы (*CDKN2B*, rs4977756), белка p53 (*TP53*, rs78378222) и др. [9, 10]. Полиморфная замена rs2736100 в гене *TERT* значимо ассоциирована с высоким риском развития глиомы, что доказано мета-исследованиями. При этом аллель риска чаще встречается у пациентов с диагнозом, поставленным в более позднем возрасте, что свидетельствует о том, что теломеразо-зависимый путь может являться отдельным механизмом глиомогенеза [11].

Тем не менее, дополнительно к общим путям патогенеза, для отдельных видов глиом были идентифицированы специфические изменения, некоторые из которых имеют терапевтическое значение. Разделение глиом на астроцитомы и олигодендроглиомы базируется на данных гистологического исследования, однако тестирование молекулярных и цитогенетических особенностей помогает в классификации и предоставляет дополнительную информацию пациентам и лечащим врачам [7].

### Олигодендроглиомы

Для олигодендроглиом характерны соматические мутации в генах изоцитратдегидрогеназы 1 (*IDH1*) и/или 2 (*IDH2*), которые наиболее часто (90%) происходят в кодоне p.132 гена *IDH1* (наиболее распространена мутация p.R132H); что является одним из самых ранних событий в возникновении опухоли и часто сопровождается ко-делецией плеч хромосом 1p и 19q. Одним из используемых методов детекции 1p/19q в клинике служит флуоресцентная гибридизация *in situ*, не требующая использования контрольных образцов [9].

Ко-делеция 1p/19q приводит к потере гетерозиготности и изменению функций генов транскрипционного репрессора *CIC* (*Capicua*), расположенного на хромосоме 19q13.2 и FUSE-связывающего белка (*Far upstream element-binding protein 1*, *FUBP1*). При этом, как правило, не наблюдается мутаций *TP53* [7, 12, 13]. Тем не менее, достоверно не определено, к гипо- или гиперфункции белка *CIC* приводят гемизиготные соматические мутации гена *CIC* при олигодендроглиомах. Следует отметить, что мутации *CIC* были обнаружены практически только при олигодендроглиомах с ко-делецией 1p/19q и мутацией *IDH1* [13]. FUBP был обнаружен как ДНК-связывающий белок, ассоциированный с FUSE протоонкогеном *c-myc*. Показано, что высокий уровень экспрессии *FUBP1* положительно коррелирует со стадией глиом, а сайленсинг гена *FUBP1* в культуре клеток при-

водил к ингибированию пролиферации клеток глиомы, снижал экспрессию гена *c-myc* и значительно индуцировал апоптоз [14]. С другой стороны, согласно результатам NGS, на развитие олигодендроглиомы с ко-делецией 1p/19q не влияют мутации *CIC* или *FUBP1*, а наиболее значимым предиктивным фактором, способствующим выживанию и благоприятному ответу на химиотерапию (прокарбазин/ломустин/винкристин, PCV) оказался статус метилирования промотора гена *MGMT*, (*O*<sup>6</sup>-метилгуанин-метилтрансфераза) [15]. Кроме того, при олигодендроглиомах идентифицированы соматические мутации в промоторе гена *TERT*, ассоциированные с его гиперэкспрессией — C228T и C250T [12]. Для глиом при олигодендроглиомах характерен процесс гипометилирования и высокие уровни экспрессии гистоновых деацетилаз, например, HDAC3 [16].

Олигодендроглиомы являются хемочувствительными опухолями, прогрессируют медленно, а ко-делеция 1p/19q ассоциирована с целой группой положительных прогностических маркеров, включая метилирование промотора гена *MGMT* и мутации *IDH1* [13]. Согласно результатам одного из GWAS-анализов, полиморфный локус rs498872 гена *PHLDB1* (Pleckstrin Homology Like Domain Family B Member 1), находящегося на хромосоме 11q23, ассоциирован с повышенным риском развития глиом низкой степени злокачественности с мутацией в гене изоцитратдегидрогеназы (*IDH*). *T*-аллель локуса rs498872 *PHLDB1* увеличивает вероятность развития *IDH*-мутированных глиом, независимо от стадии, но не глиом *IDH*-дикого типа [17, 18].

Мутации изоформ *IDH* — *IDH1* и *IDH2* — могут привести к развитию т.н. «псевдогипоксии», т.е. активации сигнальных путей гипоксии при нормоксии следующим образом. Среди эффектов мутаций *IDH* — истощение пула  $\alpha$ -кетоглутарата, необходимого для функционирования пролилгидроксилаз, и NADPH, важного кофактора поддержания нормального уровня антиоксиданта глутатиона GSH, а также накопление онкометаболита 2-гидроксиглутарата, который образуется из  $\alpha$ -кетоглутарата мутантной формой *IDH*. Ингибирование пролилгидроксилаз приводит к нарушению гидроксиглирования и деградации гипоксия-индуцибельного фактора HIF-1 $\alpha$ , что, в свою очередь, приводит к индукции HIF-1 $\alpha$ -таргетных генов, которые влияют на процессы ангиогенеза, роста и дифференциации, апоптоза и аутофагии [19, 20].

### Пилоцитарные астроцитомы (ПА)

Астроцитомы I степени (пилоцитарные астроцитомы, ПА) являются не-инфильтрирующими, относительно доброкачественными опухолями (I степень по классификации ВОЗ), чаще всего поражающими детей и подростков. Хотя клетки ПА, как правило, не имеют мутаций, которые наблюдаются при диффузных (инфильтрирующих) глиомах, но практически все опухоли такого типа имеют активирующие мутации в гене *BRAF* [4, 21]. Этот ген кодирует Ser/Thr протеинкиназу, которая участвует в MAPK/ERK сигнальном пути и играет важнейшую роль в патогенезе различных видов рака и патологий развития, т.н. *RASopathies* [22]. Точечные мутации, сплайсинговые или нонсенс-мутации (врожденные), а также потеря гетерозиготности и эпигенетические изменения — все эти явления имеют место при пилоцитарных астроцитомах [23]. Полногеномный сиквенс совместно с РНК-сиквенсом показали, что количество соматических мутаций при данном виде патологии в среднем невелико; практически все клинические случаи имели соматические мутации в генах MAP-киназного пути [24].

Известно, что митоген-активируемые протеинкиназы (МАРК) — основной ключевой сигнальный путь в развитии пилоцитарных астроцитом; активации МАРК в том числе способствуют fusion- и точечные мутации, связанные с геном *BRAF* [23, 25]. Наиболее часто встречающимся генетическим изменением при ПА (>70%) является соматическая fusion-мутация — генов *KIAA1549-BRAF*, — которая обычно происходит в результате 2 Мб тандемной дупликации на хромосоме 7q34 и иногда сопровождает другую мутацию — приобретение полной хромосомы 7, WC7, что ассоциировано с повышенной вероятностью рецидивов опухоли [26]. В результате такой тандемной дупликации N-терминальный конец гена *KIAA1549* заменяет N-терминальный регуляторный регион *BRAF*, при этом оставшийся киназный домен *BRAF* становится конститутивно активируемым. Идентификация fusion-мутации *KIAA1549-BRAF* используется как диагностический маркер ПА, с помощью метода FISH. Следует отметить, что мутация *KIAA1549-BRAF* очень распространена при опухоли в мозжечке (>90%), и менее распространена при супратенториальных новообразованиях [24].

Менее часто встречающимися fusion-мутациями при пилоцитарной астроцитоме являются *SRGAP3-RAF1*, *FAM131B-BRAF*, *BRAF-RAF1*; а также точечная соматическая мутация V600E в гене *BRAF*, приводящие к устойчивой активации *BRAF* [22, 23]. Кроме *BRAF*, при этом виде опухоли идентифицированы точечные соматические мутации гена *FGFR1* (fibroblast growth factor receptor 1), особенно в тирозинкиназном регионе (p.N546K, p.K656E), а также мутации в генах семейства *NTRK* (neurotrophic tyrosine kinase receptor), преимущественно в виде fusion-мутаций, и генов *PTPN11*, *KRAS*, *NF1* [24, 25]. Мутации в гене *FGFR1* редки, но они ассоциированы с худшим прогнозом заболевания [23]. Изменения в гене *FGFR1* в основном ограничены срединными структурами мозга, в то время, как мутации V600E в гене *BRAF* и fusion-мутации генов семейства *NTRK* относительно чаще встречаются при супратенториальных ПА [24]. Однако, fusion-мутации генов *NTRK* очень часто характерны и для других видов глиом, например, глиобластом (около 30—50% от всех случаев) [27].

Таким образом, обнаружение fusion-мутации *KIAA1549-BRAF* и отсутствие других изменений, наряду с соответствующими морфологическими особенностями, дают основание диагностировать ПА. У взрослых отсутствие мутаций *IDH1/2*, ко-делеции 1p/19q и/или наличие изменений статуса гена *BRAF* очень помогают в дифференцировании пилоцитарной астроцитомы от диффузной глиомы, что сложно применить к детям, у которых мутации *IDH1/2*, 1p/19q отсутствуют [24].

### Диффузные глиомы

Диффузные глиомы разделяют на следующие категории в зависимости от стадии развития: низкой степени злокачественности (II стадия), анапластические глиомы (III стадия), мультиформные глиобластомы (GBM, IV стадия).

### Диффузные астроцитомы

Диффузные астроцитомы характеризуются инвазивным ростом и могут прогрессировать в глиобластомы по механизму приобретения дополнительных мутаций. Диффузный характер опухоли часто не позволяет проводить хирургическую резекцию. Новообразование классифицируется в категорию инфильтрирующих астроцитом, если наблюдаются соматические мутации в генах *IDH*, но не ко-делеция 1p/19q. Соматические мутации в

генах *ATRX* ( $\alpha$ -thalassemia/mental-retardation-syndrome-X-linked gene) или *TP53* часто встречаются совместно с *IDH*-мутациями при астроцитоме [7]. Наличие точечных замен в гене *TP53* при диффузных астроцитомах низкой степени злокачественности и вторичных GBM дает основание считать, что они играют важнейшую роль в астроцитарной дифференциации. Изменения гена *ATRX* (миссенс-мутации, делеции), участвующего в модификациях хроматина, встречаются часто и, согласно последним данным, ассоциированы с астроцитомами, имеющими дополнительные мутации *IDH1/2* и *TP53* [28]. Потеря *ATRX*, обнаруженная методом ИГХ, была характерна для астроцитом II-III степени и глиобластомы (IV степень), но не для пилоцитарных астроцитом, и тесно коррелировала с мутациями *IDH1/2* и гистона *H3F3A* — G34R или K27M в кодонах 34 и 27. Сохранение *ATRX* в *IDH1/2*-мутантных опухолях было связано с ко-делецией 1p/19q и олигодендроглиомной гистологией. Исход заболевания более благоприятен в случае опухолей с утратой *ATRX* [29]. В целом, потеря *ATRX* рассматривается как специфический маркер астроцитарных опухолей, включая диффузные и анапластические астроцитомы, а также смешанные олигоастроцитомы [30].

### Анапластические астроцитомы

Анапластические астроцитомы, в отличие от астроцитом низкой степени злокачественности, характеризуются ускоренной клеточной пролиферацией и поэтому содержат больше клеток. Среди генетических изменений, ассоциированных с переходом глиомы низкой степени злокачественности в анапластическую астроцитому — утрата плеч хромосом 9p, 11p, 13q, 19q, а также мутации в гене ретинобластомы (*Rb*), расположенного на хромосоме 13q14, наблюдаемые в 40% случаев [31]. При анапластических астроцитомах достаточно часто обнаруживаются делеции, в т.ч. биаллельные, гена ингибитора циклин-зависимой киназы 2A *CDKN2A* (9p21), кодирующего два белка — p16<sup>INK4a</sup> и p14<sup>ARF</sup>, и/или моносомия хромосомы 10. Делеция *CDKN2A* связана с худшим прогнозом вследствие специфической роли этого гена в регуляции клеточного цикла [32]. Врожденные мутации гена *CDKN2A* связаны также с плохим прогнозом выживаемости пациентов с глиобластомой. Так, пациенты-носители мутантного аллеля *500G* полиморфного локуса *C500G* (rs11515) в 3'-UTR гена *CDKN2A* характеризовались меньшей выживаемостью независимо от возраста, объема хирургического вмешательства или терапии [33]. При глиобластоме, в клетках которой поддержание длины теломер не связано с активностью теломеразы или ALT (альтернативное удлинение теломер), частота встречаемости этого минорного аллеля *500G* увеличена относительно случаев GBM с активной теломеразой или ALT-позитивных GBM. Аллель *500G* гена *CDKN2A* может служить информативным биомаркером, указывая на худший прогноз, именно для пациентов с глиобластомами, при которых механизм удлинения теломер не определен. Замена *C500G* может изменять стабильность транскриптов p16<sup>INK4a</sup> и p14<sup>ARF</sup>, вероятно, способствуя инактивации путем последующей делеции. Для ALT-позитивных глиобластом маркером благоприятного прогноза являются мутации *IDH1* [33].

### Медуллобластомы

Отдельно стоящей в классификации опухолей мозга является группа метастазирующих медуллобластом, примитивных нейроэпителиальных опухолей мозжечка, поражающей преимущественно детей или подростков. Одно специфическое изменение в кариотипе является

Таблица 1

## Наиболее характерные молекулярно-генетические маркеры различных видов глиом

Маркеры/мутации генов	Пилоцитарные астроцитомы	Олигодендроглиомы/олигоастроцитомы	Диффузные астроцитомы	Анапластические олиго/олигоастроцитомы	Анапластические астроцитомы	Первичные глиобластомы
<i>IDH1/2</i> p.R132H	—	+	+	+/-	+/-	—
Ко-делеция 1p/19q ( <i>CIC, FUBP1</i> )	—	+	—	+	—	—
<i>TERT</i>	—	+	—	+	—	+/-
Потеря <i>ATRX</i>	—	—	+	+/-	+	—
<i>TP53</i>	—	—	+	+	+	+/-
<i>CDKN2A</i>	—	—	—	—	+	+
Метилирование MGMT	—	+	+/-	+	+/-	+/-
Мутации гистонов (характерны для детских опухолей)	—	—	—	—	+	+
Фенотип G-CIMP	—	+	+	+	—	—
<i>BRAF</i> fusion	+	—	—	—	—	—

Примечание. +: характерно; +/-: характерно в меньшей степени; —: мало характерно.

типичным для всех медуллобластом — наличие изохромосомы 17q в 50% случаев, с точкой разрыва 17p11.2 [34]. Исследования выделили две подгруппы медуллобластом: 1) ассоциированные с мутациями сигнального пути Sonic Hedgehog (SHH); 2) ассоциированные с измененным Wnt-сигналингом; кроме этого, были идентифицированы амплификации генов *MYC* (*MYC, MYCN*, в меньшей степени, *MYCL1*) и транскрипционного фактора *OTX2*, мутации *TP53* [35]. Сигнальный путь SHH играет важную роль в развитии нервной ткани, формировании мозжечка, его основными компонентами являются: трансмембранный рецептор белка SHH, т.н. patched (PTC, PTCH), ассоциированная с ним эффекторная молекула smoothed (smo), а также активатор транскрипции *gli1*. Связывание SHH с его рецептором приводит к снятию ингибирования smo и транскрипционной активации ряда генов [34]. Развитие медуллобластом связывают с некоторыми врожденными мутациями при таких наследственных синдромах, как синдром Горлина (делеция и мутации гена *PTCH1* SHH-пути) и синдром Туркота (ген *APC*, участвующий в Wnt-сигналинге). Следует отметить, что белок APC, снижающий уровень свободного  $\beta$ -катенина в цитоплазме, является опухолевым супрессором, поскольку  $\beta$ -катенин способен, взаимодействуя с транскрипционными факторами TCF, активировать экспрессию ряда генов, индуцирующих деление клетки [34, 35].

NGS-исследование генетического ландшафта медуллобластом выявило также наличие соматических инактивирующих мутаций в генах лизинового N-метилтрансфераз гистонов (*MLL2, MLL3*), характерных для глиобластомы, в 16% случаев медуллобластом [35]. Интересно, что  $\beta$ -катенин способен стимулировать H3K4-триметилирование гистонов, например, гена *c-Myc*, с помощью MLL-комплексов [36].

### Эпендимомы

Описаны также некоторые маркеры группы эпендимом — опухолей специфической локализации, которые развиваются из клеток эпендимы желудочков мозга и центрального канала спинного мозга. По статистике, эпендимомы занимают приблизительно 3—9% от всех

нейроэпителиальных опухолей и разделяются на эпендимомы II стадии по классификации ВОЗ и анапластические эпендимомы III стадии. Около 40% от всех случаев эпендимом не имеют детектируемых генетических изменений [37].

Для супратенториальных эпендимом (70—75% от общего числа) характерны fusion генов *C11orf95-RELA*. Для агрессивных опухолей подтипа posterior fossa (локализуются в задней черепной ямке) группы А более характерна латеральная локализация опухолей, инвазивный рост, вовлечение классических сигнальных путей, связанных с канцерогенезом (ангиогенез, MAP-, EGFR-, TGF $\beta$ -сигналинг) и CIMP-фенотип. Для опухолей posterior fossa группы В — преимущественно центральная локализация опухолей, CIMP-фенотип не характерен, но часто встречаются соматические

абберации хромосом, например, делеции (1, 2, 3, 6, 8, 10, 14q, 17q и 22q) или вставки (4, 5q, 7, 9, 11, 12, 15q, 18, 20 и 21q) хромосом или их плеч [9, 38]. Из генетических изменений для пациентов с эпендимомы подтипа posterior fossa группы А характерны только вставки плеча хромосомы 1q, что ассоциировано с худшим прогнозом течения заболевания [38].

### Роль метилирования и других эпигенетических изменений в патогенезе глиом

#### Метилирование ДНК

Как показывают результаты глобального проекта The Cancer Genome Atlas (TCGA), глиомы относятся к опухолям с CpG-островковым метилированным фенотипом (G-CIMP), и мутация *IDH1* приводит к формированию CIMP путем ремоделирования метилома: 2-гидроксиглутарат конкурентно ингибирует активность гистоновых деметилаз (например, UTX H3K27, JARID1C H3K4) и TET-белков, конвертирующих 5-метилцитозин в 5-гидроксиметилцитозин [16, 39, 40]. Глобальное метилирование промоторов генов при участии механизма активации метилазы *DNMT1* и сайленсинг путем активации гистоновой деацетилазы *HDAC3* затрагивает также гены опухолевых супрессоров [16, 41]. При глиомах гиперметилирование промоторных участков характерно для генов тромбоспондина 1 (*THBD1*), транспортера возбуждающих аминокислот-нейротрансмиттеров (excitatory amino-acid transporter 2, *EAAT2*), эпителиального мембранного белка 3 (*EMP3*) и O<sup>6</sup>-метилгуанин-метилтрансферазы (*MGMT*) [42]. Эпигенетический сайленсинг гена *EAAT2* и репрессия трансляции белка, характерные для глиом, приводят к ингибированию процесса удаления эксайтотоксичного глутамата из синаптической щели, в результате чего он накапливается и способствует более быстрому росту опухоли, вероятно, за счет гибели нейронов в периферической зоне, тем самым освобождая место для роста глиомы [42]. Тем не менее, по сравнению с глиобластомами, фенотип G-CIMP примерно в 10 раз чаще встречается при астроцитомах низкой степени злокачественности (45%) и олигодендроглиомах (93%), и является прогностическим фактором при астроцитомах [43]. Ги-

перметилированный фенотип свидетельствует о более благоприятном прогнозе при глиомах низкой степени злокачественности [44].

Наоборот, в случае первичных глиобластом чаще встречается явление глобального гипометилирования промоторов генов; например, в качестве нового эпигенетического прогностического биомаркера глиом обсуждается гипометилирование промотора гена *POTEN* (POTE ankyrin domain family, member H); экспрессия *POTEN* возрастает с увеличением стадии заболевания и является неблагоприятным прогностическим фактором [45]. Прогрессирование глиомы может сопровождаться снижением частоты метилированных CpG-сайтов; особенно неблагоприятный прогностический фенотип для опухолей, рецидивирующих с потерей G-CIMP- фенотипа [46].

Кроме гена *MGMT*, одновременное гиперметилирование промотора и гипометилирование структурной части характерно для генов *AJAP1* и *PTPRN2* [47]. Эти уникальные паттерны ДНК-метилирования характерны также для GBM-ксенографтных опухолей, а не только для культуры клеток. Исследование группы [47] идентифицировало кандидатные гены опухолевых супрессоров (*SPINT2*, *NEFM* и *PENK*), зачастую гипорегулированные при GBM.

Известно, что глиомы с мутированными изоформами *IDH1/2* являются менее агрессивными и имеют лучший прогноз по сравнению с глиомами *IDH*-дикого типа; эти мутации, определяемые сейчас методами иммуногистохимического исследования и магнитно-резонансной спектроскопии, могут являться факторами, связанными с предикцией ответа на лучевую терапию или терапию алкилирующими препаратами [20]. В целом, мутации *IDH1/2* — раннее явление в патогенезе не только олигодендроглиом, но и астроцитом II—III стадии, смешанных олигоастроцитом, а также вторичных глиобластом (GBM); в развитии GBM *de novo* участие таких мутаций не отмечено [39].

Недавние исследования показали, что уровень метилирования промотора гена *MGMT* (O<sup>6</sup>-метилгуанин-метилтрансфераза) является предиктивным фактором ответа на лучевую терапию и применение темозоломида в терапии пациентов с глиобластомой. При этом сочетанная оценка мутационного статуса гена *IDH1* и уровня метилирования промоторного участка гена *MGMT* дает лучшие прогностические результаты по критерию выживаемости пациентов [48, 49]. *MGMT* участвует в ДНК-репарации, удаляет продукты алкилирования в положении O<sup>6</sup>-гуанидинового кольца, тем самым препятствуя канцерогенезу нормальных клеток, но также способствуя устойчивости опухолевых клеток к химиотерапевтическим алкилирующим препаратам, например, темозоломиду [39, 50]. Последствия транскрипционного сайленсинга гена *MGMT* путем гиперметилирования его промоторного участка изначально представляют собой существенный источник мутаций, поскольку аддукты O<sup>6</sup>-метилгуанина не удаляются и способствуют образованию транзиций G → C и A → T: показано, что ген *TP53* имеет такие транзиции, особенно за пределами CpG-островков, в т.ч. при глиомах [50, 51].

Показана тесная связь наличия мутаций в генах *IDH1/2* с усилением метилирования промоторного участка гена *MGMT*. Подобный механизм возникновения мутаций ассоциирован с повышенной чувствительностью клеток к воздействию алкилирующих агентов, что непосредственно влияет на уровень терапевтического ответа при использовании в клинике препаратов алкилирующего типа воздействия [52]. Статус метилирования промотора *MGMT* используется как важный

клинический маркер в нейроонкологии: носители метилированного промотора *MGMT* отвечают на терапию темозоломидом лучше по сравнению с пациентами, имеющими неметилированный промотор [39]. В настоящее время информация о статусе метилирования промотора *MGMT*, экспрессии этого гена, а также мутационном статусе *TP53* и 1p/19q-статусе может быть получена из 1 мм<sup>3</sup> тканевого биоптата, полученного в результате стереотаксической биопсии глиомы [53]. Обычно метилирование промотора *MGMT* остается стабильным в течение заболевания, однако опухоли с метилированным промотором *MGMT* способны приобретать вторичную устойчивость к темозоломиду вследствие появления дополнительных мутаций, связанных с рецидивами глиом. Например, мутации в генах, участвующих в ДНК-репарации ошибочно спаренных нуклеотидов, могут вызывать появление генотипа с большим количеством мутаций [54]. Профиль метилирования, определяемый с помощью ДНК-микрочипов, является ценной информацией для диагностики, поскольку этот профиль различен при анапластических глиомах, глиобластомах, эпендимоммах. Более того, изменения числа копий генов на всех хромосомах и статус метилирования промотора гена *MGMT* могут быть оценены параллельно с профилем ДНК-метилирования с помощью различных биоинформатических алгоритмов анализа микрочиповых данных [54].

Y. Yuan и соавт. показали, что различные молекулярные фенотипы связаны со специфическими регионами мозга и имеют выраженный прогностический характер. Так, гипометилирование промотора гена *MGMT* указывает на плохой прогноз глиомы высокой степени злокачественности, локализуемой в правой лобной доле. С плохим прогнозом связано также наличие мутаций *TP53*, гиперэкспрессия *EGFR* и дикий тип *IDH* в случае опухоли в белом веществе перивентрикулярной области левого полушария [55]. В глиобластомах с диким типом гена *IDH*, одной из драйверных мутаций, запускающих эпигенетическое ремоделирование, провоцирующее опухолевый рост, является делеция-*fusion EGFRvIII*. Мутантная изоформа *EGFRvIII* относительно устойчива к ингибиторам сигналинга *EGFR* [56].

#### Модификации гистонов

Ремоделирование и модификация хроматина — динамический процесс, приводящий к трехмерным изменениям, влияющим на экспрессию генов путем регулирования доступа к РНК-полимеразам и транскрипционным факторам. N-терминальные концы гистонов содержат остатки лизина (K) и аргинина (R), которые могут претерпевать различные посттрансляционные модификации, включая ацетилирование, метилирование, убиквитинирование, а также остатки серина, которые могут быть фосфорилированы [57].

Секвенирование глиом, характерных для детей и подростков, выявило некоторые дополнительные подтипы, уникальные именно в этой группе пациентов [44]. Некоторые глиомы детей имеют мутации в белках гистонов 3.1 и 3.3, которые кодируются генами *HIST1H3B* и *H3F3A*, соответственно. Соматические мутации *H3F3A* особенно характерны при центральной локализации опухоли, а именно в таламусе, мосте, спинном мозге или крайне агрессивной глиоме ствола мозга (DIPG, *diffuse intrinsic pontine glioma*) [44, 58]. Мутация K27M *H3F3A* (замена лизина на метионин в позиции 27 аминокислотной последовательности гистона H3F3A) предотвращает посттрансляционное метилирование и K27-ацетилирование гистона, связанные с активацией промотора или энхансером [59]. Несмотря на то, что пост-

трансляционные модификации H3G34 неизвестны, было показано, что точечная замена G34V влияет на баланс этих модификаций, например, активирует метилирование находящегося рядом лизина K36, что вовлечено в элонгацию транскрипции [60]. Мутации K27M и G34R/V являются взаимоисключающими [61]. Полноэкзомное секвенирование 60 глиом высокой степени злокачественности у детей при сравнении их с контрольными образцами показало, что сниженный уровень метилирования H3K36 происходит вследствие мутаций H3K36-метилтрансферазы SETD2 и коррелирует с активацией экспрессии генов [62]. *IDH1* косвенно влияет на метилирование гистона H3 (H3K27, H3K36) вследствие влияния онкометаболита 2-гидроксиглутарата, ингибирующего гистоновые деметилазы, увеличивающего метилирование H3K27 и H3K36 и ассоциированного с фенотипом G-CIMP [63].

Интересно, что данные мутации (K27M, G34R, G34V) гистона H3F3A являются строго специфичными для детских диффузных астроцитом высокой степени злокачественности, поскольку не обнаруживаются в других тестируемых опухолях, включая глиомы взрослых, другие детские опухоли мозга, глиомы низкой степени злокачественности и др. [64]. Мутация K27M *H3F3A* имеет прогностическую значимость при DIPG и ассоциирована с худшим прогнозом относительно подобных глиом с диким типом *H3F3A*, которые включают мутации *HIST1H3B* [65].

Опухоли как с G34R, так и с K27M-мутациями в целом имеют ДНК-гипометилированный фенотип. K27M ингибирует субъединицу EZH2 (enhancer of zeste homologue 2) комплекса PRC2 (Polycomb repressive complex 2), выполняющую роль метилтрансферазы, что приводит к глобальной потере и перераспределению H3K27me3, в результате последнего хроматин способен перейти в бивалентное состояние с H3K4me3, аналогично эмбриональным стволовым клеткам, что является началом канцерогенеза.

PRC2 регулирует гены, участвующие в развитии ткани, индуцирует компактизацию хроматина, поддерживает стволовое состояние эмбриональных стволовых клеток. В стволоподобных клетках глиобластомы PRC2 гипер-активирован, и практически 40% гиперметилированных сайтов CpG являются мишенями PRC2 [66]. Среди гипер-метилированных генов сигнальных путей, регуляторная сеть транскрипции, характерная для эмбриональных стволовых клеток, была наиболее значимой [66].

Обе мутации — G34R и K27M — связаны с развитием фенотипа альтернативного удлинения теломер (ALT). При этом опухоли с мутацией H3K27M характеризуются гиперактивацией транскрипционного фактора *OLIG2* (oligodendrocyte lineage transcription factor 2), в то время, как опухоли с мутацией G34R/V характеризуются активацией *FOXG1* (forkhead box G1) [67]. Альтернативное удлинение теломер встречается лишь в 5% случаев всех видов рака, это характерно для глиобластом и основано на явлении гомологической рекомбинации [68]. Мутации G34R/V, характерные для глиом высокой степени злокачественности у детей, зачастую сопровождаются мутациями гена *TP53*, *ATRX*, *DAXX*, в отличие от K27M-мутированных глиом [61].

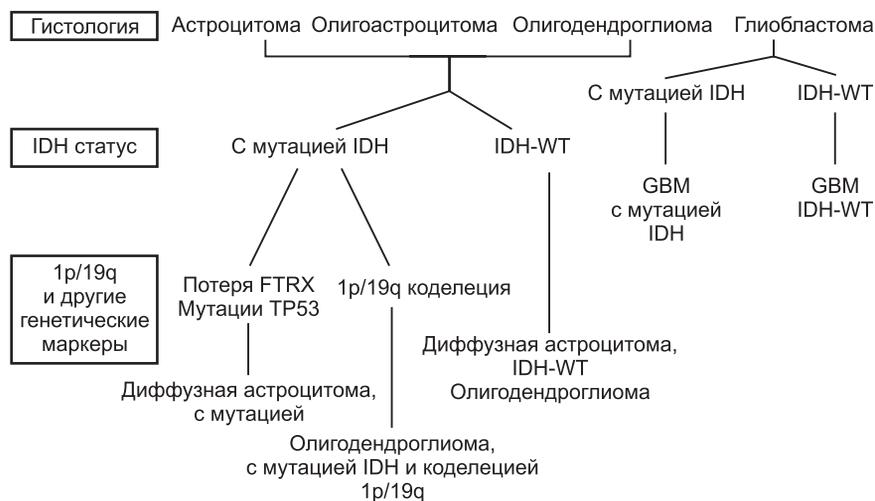


Рис. 1. Алгоритм современной классификации диффузных глиом на основе гистологических и генетических особенностей (CNS WHO 2016). Обозначения: GBM — глиобластома, IDH — изоцитратдегидрогеназа, WT — дикий тип, ATRX —  $\alpha$ -thalassaemia/mental-retardation-syndrome-X-linked gene, TP53 — ген p53.

Интересно, что субъединицу EZH2 гистоновой метилтрансферазы блокирует также miR-101, которая гипо-активирована при GBM, что способствует прогрессии опухоли, и ингибирование EZH2 может быть потенциальной терапевтической стратегией, нацеленной на пролиферацию, миграцию и ангиогенез при GBM [69]. Более того, miR-101 подавляет экспрессию ключевого фактора контроля трансляции мРНК CPEB1 (cytoplasmic polyadenylation element-binding protein) путем обращения статуса метилирования промотора *CPEB1*, а именно гистоновых меток H3K4me2, H3K27me3, H3K9me3, H4K20me3. CPEB1 вносит вклад в p53-опосредованное старение глиальных клеток, а при глиоме его ген гипометилирован и гиперэкспрессирован. Эпигенетическая регуляция меток H3K27me3, H3K4me2 опосредуется, в том числе, и EZH2 [70]. M. Boustani и соавт. показали повышенную экспрессию не только *CPEB1*, но и *CPEB4*, в ткани глиом по сравнению с нормальными тканями, при этом экспрессия *CPEB4* была ассоциирована с прогрессированием глиомы и меньшей продолжительностью жизни пациентов [71].

Ацетилирование гистонов — другая эпигенетическая метка, влияющая на экспрессию генов; показано, что глобальные изменения гистонов при глиомах могут происходить вследствие мутаций регуляторных генов, например, генов гистоновых деацетилаз (*HDAC2,9*), гистоновых деметилаз (*JMJD1A, JMJD1B*), гистоновых метилтрансфераз (*SET7, SETD7, MLL3, MLL4*) [72]. Следует отметить, что паттерн ацетилирования гистонов связан с выживаемостью пациентов: более низкая экспрессия H3K9Ac и более высокая H3K18Ac в клетках опухоли связаны с плохой выживаемостью пациентов. Наиболее маленькой безрецидивной и общей выживаемостью характеризовались пациенты с глиобластомами с низким уровнем экспрессии H3K20triMe [73]. Терапия, комбинирующая ингибиторы DNMT и HDAC, может быть эффективной стратегией в борьбе с GBM [72].

#### Новая классификация глиом

Новая классификация инфильтрующих глиом (CNS WHO, 2016) включает молекулярно-генетические подтипы глиом, вместо устаревших гистологических типов (астроцитомы, олигодендроглиомы и др.); новые диагностические критерии включают тестирование на наличие мутации *IDH*, делеции 1p/19q, мутаций гистонов [44,74]

(рис. 1). Так, все астроцитомы и глиобластомы подразделяются на *IDH*-мутированные и *WT-IDH*. Кроме этого, как установлено путем анализа данных TCGA, глиобластомы дифференцируются на следующие молекулярные субтипы в зависимости от особенностей их экспрессионного профиля: классические, пронейрональные, нейрональные и мезенхимальные GBM [75]. Метилирование ДНК также может использоваться в качестве «молекулярного классификатора» глиобластом и глиом низкой степени злокачественности, более широким, чем генетические изменения или экспрессионный профиль [44, 76]. Так, методом кластеризации паттернов глобального ДНК-метилирования, было идентифицировано 6 основных биологических подгрупп глиобластом у детей и взрослых: IDH-тип (ассоциирован с мутацией *IDH*), K27 (ассоциирован с мутацией гистона 3.3 K27), G34 (ассоциирован с мутацией гистона 3.3 G34), RTK 1 «*PDGFRA*» (ассоциирован с повышенной частотой амплификации гена *PDGFRA*), мезенхимальный подтип, RTK 2 «classic» (ассоциирован с высокой частотой амплификации *EGFR*, вставок хромосомы 7, потери хромосомы 10) [76]. Мультиплатформный анализ TCGA-данных позволил идентифицировать мезенхимальный и классический подтипы глиобластом, а также подтипы глиом низкой степени злокачественности [46].

#### Заключение

За последние несколько лет количество публикаций, касающихся молекулярных/геномных биомаркеров, нацеленных на выявление и идентификацию класса и подкласса глиом, более или менее пригодных в использовании в ежедневной нейрохирургической практике, увеличилось лавинообразно. Их роль двояка: с одной стороны, кроме классификации большого разнообразия глиальных опухолей, молекулярные маркеры вносят вклад в наше понимание патофизиологии опухоли и злокачественного процесса. С другой стороны, что очень важно, они могут быть использованы для молекулярно-направленной персонализированной терапии.

Мутации в генах *IDH1/2*, *TP53*, а также статус метилирования гена *MGMT* наиболее часто обсуждаются как прогностические маркеры глиом. Ранними событиями в процессе глиомогенеза являются мутации гена *IDH1* (особенно R132H), которые приводят к накоплению онкометаболита 2-гидроксиглутарата, а также активируют процесс гиперметилирования при глиомах. Метилированный статус промотора гена *MGMT* ассоциирован с более благоприятным ответом на терапию темозоломидом, а мутация *IDH1* — с лучшей выживаемостью пациентов. Эффективность применяемых лекарств и их безопасность могут быть значительно улучшены путем дальнейших исследований в области фармакогеномики, для идентификации генетических маркеров, дифференцирующих пациентов, отвечающих на терапию, от других пациентов; а также пациентов с повышенным риском развития побочных эффектов [77]. В настоящее время молекулярно-генетический анализ глиальной опухоли для ее точной диагностики встает на первый план: согласно новой классификации инфильтрирующих глиом (CNS WHO, 2016), устаревшие гистологические подтипы (астроцитомы, олигодендроглиомы и др.) дополняются новыми диагностическими маркерами, включающими тестирование на наличие мутаций *IDH*, *TERT*, *TP53*, делеции 1p/19q, мутаций гистонов [74].

Гетерогенность клеток глиом/глиобластом приводит к их высокой устойчивости против стандартных типов терапии, таких как хирургическое вмешательство, радиация, комбинированное лечение. Вследствие этого, необходимы новые стратегии лечения GBM. Кроме темозоломида, пер-

спективными противоопухолевыми агентами в терапии глиом являются бевацизумаб (антитела против эндотелиального ростового фактора VEGF), эрлотиниб/гефитиниб (мишенью является EGFR), риндопепимут (антитела против мутантной формы рецептора EGFRvIII), ломустин/прокарбазин/кармустин, темзиролимус (мишень — mTOR), ДНК-алкилирующие агенты, которые могут проникать через гемато-энцефалический барьер и др. [78, 79]. К настоящему времени были протестированы на клеточных линиях синтетические препараты против глиомы, например, синтетические каннабиноиды и NF115, блокирующие пролиферацию клеток глиомы, тетрагидроизохинолины, блокирующие гистоновую деацетилазу HDAC [78]. Однако, несмотря на последние успехи в понимании молекулярной гетерогенности заболевания, прогностических и предиктивных маркеров ее развития, персонализированная терапия GBM не всегда возможна [79]. Обязательным является поиск новых терапевтических агентов и более удачных клинических испытаний.

**Финансирование.** Финансирования не было.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Mamelak A.N., Jacoby D.B. Targeted delivery of antitumoral therapy to glioma and other malignancies with synthetic chlorotoxin (TM-601). *Expert Opin. Drug Deliv.* 2007; 4: 175—86.
- Wen P.Y., Kesari S. Malignant gliomas in adults. *N. Engl. J. Med.* 2008; 359: 492—507.
- Cohen A.L., Colman H. Glioma biology and molecular markers. *Cancer Treat. Res.* 2015; 163: 15—30. doi: 10.1007/978-3-319-12048-5\_2.
- Hess K.R., Broglio K.R., Bondy M.L. Adult glioma incidence trends in the United States, 1977—2000. *Cancer.* 2004; 101: 2293—9.
- Van Meir E.G., Hadjipanayis C.G., Norden A.D., Shu H.-K., Wen P.Y., Olson J.J. Exciting new advances in neuro-oncology: the avenue to a cure for malignant glioma. *CA-Cancer J. Clin.* 2010; 60: 166—93.
- Laws E.R., Parney I.F., Huang W., Anderson F., Morris A.M., Asher A. et al. Survival following surgery and prognostic factors for recently diagnosed malignant glioma: data from the Glioma Outcomes Project. *J. Neurosurg.* 2003; 99: 467—73.
- Neill S.G., Fisher K.E. Section III: Molecular diagnostics in neuro-oncology. *Curr. Probl. Cancer.* 2014; 38: 175—9.
- Kelly P.J. Gliomas: Survival, origin and early detection. *Surg. Neurol. Int.* 2010; 1: 96.
- Olar A., Sulman E.P. Molecular markers in low-grade glioma — toward tumor reclassification. *Semin. Radiat. Oncol.* 2015; 25: 155—63.
- Walsh K.M., Anderson E., Hansen H.M., Decker P.A., Kosel M.L., Kollmeier T. et al. Analysis of 60 reported glioma risk SNPs replicates published GWAS findings but fails to replicate associations from published candidate-gene studies. *Genet. Epidemiol.* 2013; 37: 222—8.
- Peng Z., Tian D., Chen Q., Zhang S., Liu B., Ji B. Telomerase reverse transcriptase (TERT) rs2736100 polymorphism contributes to increased risk of glioma: evidence from a meta-analysis. *Int. J. Clin. Exp. Med.* 2015; 8: 422—30.
- Cahill D.P., Louis D.N., Cairncross J.G. Molecular background of oligodendroglioma: 1p/19q, IDH, TERT, CIC and FUBP1. *CNS Oncol.* 2015; 4: 287—94.
- Yip S., Butterfield Y.S., Morozova O., Chittaranjan S., Blough M.D., An J. et al. Concurrent CIC mutations, IDH mutations and 1p/19q loss distinguish oligodendrogliomas from other cancers. *J. Pathol.* 2012; 226: 7—16.
- Ding Z., Liu X., Liu Y., Zhang J., Huang X., Yang X. et al. Expression of far upstream element (FUSE) binding protein 1 in human glioma is correlated with c-Myc and cell proliferation. *Mol. Carcinog.* 2015; 54: 405—15.
- Dubbink H.J., Atmodimedjo P.N., Kros J.M., French P.J., Sanson M., Idhah A. et al. Molecular classification of anaplastic oligodendroglioma using next-generation sequencing: a report of the prospective randomized EORTC Brain Tumor Group 26951 phase III trial. *Neuro Oncol.* 2016; 18: 388—400.
- Moyon S., Liang J., Casaccia P. Epigenetics in NG2 glia cells. *Brain Res.* 2016; 1638: 183—98.
- Rice T., Zheng S., Decker P.A., Walsh K.M., Bracci P., Xiao Y. et al. Inherited variant on chromosome 11q23 increases susceptibility to *IDH*-mutated but not *IDH*-normal gliomas regardless of grade or histology. *Neuro Oncol.* 2013; 15: 535—41.

18. Gao X., Mi Y., Yan A., Sha B., Guo N., Hu Z. et al. The PHLDB1 rs498872 (11q23.3) polymorphism and glioma risk: a meta-analysis. *Asia Pac. J. Clin. Oncol.* 2015; 11: e13—21.
19. Fu Y., Zheng S., Zheng Y., Huang R., An N., Liang A., Hu C. Glioma derived isocitrate dehydrogenase-2 mutations induced up-regulation of HIF-1 $\alpha$  and beta-catenin signaling: Possible impact on glioma cell metastasis and chemo-resistance. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2012; 44: 770—5.
20. Cohen A., Holmen S., Colman H. IDH1 and IDH2 mutations in glioma. *Curr. Neurol. Neurosci. Rep.* 2013; 13: 345.
21. Appin C.L., Brat D.J. Biomarker-driven diagnosis of diffuse gliomas. *Mol. Aspects Med.* 2015; 45: 87—96.
22. Hussain M.R.M., Baig M., Mohamoud H.S.A., Ulhaq Z., Hoessli D.C., Khogeer G.S. et al. BRAF gene: From human cancers to developmental syndromes. *Saudi J. Biol. Sci.* 2015; 22: 359—73.
23. Becker A.P., Scapulatempo-Neto C., Carloni A.C., Paulino A., Sheren J., Aisner D.L. et al. KIAA1549:BRAF gene fusion and FGFR1 hotspot mutations are prognostic factors in pilocytic astrocytomas. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 2015; 74: 743—54.
24. Collins V.P., Jones D.T.W., Giannini C. Pilocytic astrocytoma: pathology, molecular mechanisms and markers. *Acta Neuropathol.* 2015; 129: 775—88.
25. Jones D.T.W., Hutter B., Jager N., Korshunov A., Kool M., Warnatz H.-J. et al. Recurrent somatic alterations of FGFR1 and NTRK2 in pilocytic astrocytoma. *Nat. Genet.* 2013; 45: 927—32.
26. Roth J.J., Fierst T.M., Waanders A.J., Yimei L., Biegel J.A., Santi M. Whole chromosome 7 gain predicts higher risk of recurrence in pediatric pilocytic astrocytomas independently from KIAA1549-BRAF fusion status. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 2016; 75: 306—15.
27. Amatu A., Sartore-Bianchi A., Siena S. NTRK gene fusions as novel targets of cancer therapy across multiple tumour types. *ESMO Open.* 2016; 1: e000023.
28. Liu X.Y., Gerges N., Korshunov A., Sabha N., Khuong-Quang D.A., Fontebasso A.M. et al. Frequent ATRX mutations and loss of expression in adult diffuse astrocytic tumors carrying IDH1/IDH2 and TP53 mutations. *Acta Neuropathol.* 2012; 124: 615—25.
29. Ebrahimi A., Skardelly M., Bonzheim I., Ott I., Muhleisen H., Eckert F. et al. ATRX immunostaining predicts IDH and H3F3A status in gliomas. *Acta Neuropathol. Commun.* 2016; 4: 60.
30. Siegal T. Clinical impact of molecular biomarkers in gliomas. *J. Clin. Neurosci.* 2015; 22: 437—44.
31. Zhu Y., Parada L.F. The molecular and genetic basis of neurological tumours. *Nat. Rev. Cancer.* 2002; 2: 616—26.
32. Kramar F., Zemanova Z., Michalova K., Babicka L., Ransdorfova S., Hrabal P., Kozler P. Cytogenetic analyses in 81 patients with brain gliomas: correlation with clinical outcome and morphological data. *J. Neurooncol.* 2007; 84: 201—11.
33. Royds J.A., Nadaf S.A., Wiles A.K., Chen Y.-J., Ahn A., Shaw A. et al. The CDKN2A G500 allele is more frequent in GBM patients with no defined telomere maintenance mechanism tumors and is associated with poorer survival. *PLoS One.* 2011; 6: e26737.
34. Raffel C. Medulloblastoma: molecular genetics and animal models. *Neoplasia.* 2004; 6: 310—22.
35. Parsons D.W., Li M., Zhang X., Jones S., Leary R.J., Lin J.C.-H. et al. The genetic landscape of the childhood cancer medulloblastoma. *Science.* 2011; 331: 435—9.
36. Sierra J., Yoshida T., Joazeiro C.A., Jones K.A. The APC tumor suppressor counteracts beta-catenin activation and H3K4 methylation at Wnt target genes. *Genes Dev.* 2006; 20: 586—600.
37. Rivera A.L., Pelloski C.E., Sulman E., Aldape K. Prognostic and predictive markers in glioma and other neuroepithelial tumors. *Curr. Probl. Cancer.* 2008; 32: 97—123.
38. Witt H., Mack S.C., Ryzhova M., Bender S., Sill M., Isserlin R. et al. Delineation of two clinically and molecularly distinct subgroups of posterior fossa ependymoma. *Cancer Cell.* 2011; 20: 143—57.
39. Kreth S., Thon N., Kreth F.W. Epigenetics in human gliomas. *Cancer Lett.* 2014; 342: 185—92.
40. Turcan S., Rohle D., Goenka A., Walsh L.A., Fang F., Yilmaz E. et al. IDH1 mutation is sufficient to establish the glioma hypermethylator phenotype. *Nature.* 2012; 483: 479—83.
41. Morokoff A., Ng W., Gogos A., Kaye A.H. Molecular subtypes, stem cells and heterogeneity: Implications for personalised therapy in glioma. *J. Clin. Neurosci.* 2015; 22: 1219—26.
42. Watkins S., Sontheimer H. Unique biology of gliomas: challenges and opportunities. *Trends Neurosci.* 2012; 35: 546—56.
43. Noushmehr H., Weisenberger D.J., Diefes K., Phillips H.S., Pujara K., Berman B.P. et al. Identification of a CpG island methylator phenotype that defines a distinct subgroup of glioma. *Cancer Cell.* 2010; 17: 510—22.
44. Chen R., Smith-Cohn M., Cohen A.L., Colman H. Glioma subclassifications and their clinical significance. *Neurotherapeutics.* 2017; 14(2): 284—97. doi: 10.1007/s13311-017-0519-x.
45. Liu X., Tang H., Zhang Z., Li G. POTEH hypomethylation, a new epigenetic biomarker for glioma prognosis. *Brain Res.* 2011; 1391: 125—31.
46. Ceccarelli M., Barthel F.P., Malta T.M., Sabetot T.S., Salama S.R., Murray B.A. et al. Molecular profiling reveals biologically discrete subsets and pathways of progression in diffuse glioma. *Cell.* 2016; 164: 550—63.
47. Lee E.J., Rath P., Liu J., Ryu D., Pei L., Noonpalle S.K. et al. Identification of global DNA methylation signatures in glioblastoma-derived cancer stem cells. *J. Genet. Genomics.* 2015; 42(7): 355—71.
48. Malenaar R.J., Verbaan D., Lamba S., Zanon C., Jeuken J.W.M., Boots-Sprenger S.H.E. et al. The combination of IDH1 mutations and MGMT methylation status predicts survival in glioblastoma better than either IDH1 or MGMT alone. *Neuro Oncol.* 2014; 16: 1263—73.
49. Hegi M.E., Diserens A.C., Gorlia T., Hamou M.F., de Tribolet N., Weller M. et al. MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N. Engl. J. Med.* 2005; 352: 997—1003.
50. Jacinto F.V., Esteller M. MGMT hypermethylation: a prognostic foe, a predictive friend. *DNA Repair.* 2007; 6: 1155—60.
51. Nakamura M., Watanabe T., Yonekawa Y., Kleihues P., Ohgaki H. Promoter methylation of the DNA repair gene MGMT in astrocytomas is frequently associated with G:C to >A:T mutations of the TP53 tumor suppressor gene. *Carcinogenesis.* 2001; 22: 1715—9.
52. Christensen B.C., Smith A.A., Zheng S., Koestler D.C., Houseman E.A., Marsit C.J. DNA methylation, isocitrate dehydrogenase mutation, and survival in glioma. *J. Natl. Cancer Inst.* 2011; 103: 143—53.
53. Thon N., Eigenbrod S., Grason-Frodl E.M., Ruiter M., Mehrkens J.H., Kreth S. et al. Novel molecular stereotactic biopsy procedures reveal intratumoral homogeneity of loss of heterozygosity of 1p/19q and TP53 mutations in World Health Organization grade II gliomas. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 2009; 68: 1219—28.
54. Reifenberger G., Wirsching H.G., Knobbe-Thomsen C.B., Weller M. Advances in the molecular genetics of gliomas — implications for classification and therapy. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 2017; 14(7): 434—52. doi: 10.1038/nrclinonc.2016.204.
55. Yuan Y., Yunhe M., Xiang W., Yanhui L., Ruofei L., Jiewen L., Qing M. Mapping genetic factors in high-grade glioma patients. *Clin. Neurol. Neurosurg.* 2016; 150: 159—63.
56. Liu F., Hon G.C., Villa G.R., Turner K.M., Ikegami S., Yang H. et al. EGFR mutation promotes glioblastoma through epigenome and transcription factor network remodeling. *Mol. Cell.* 2015; 60: 307—18.
57. Berger S.L. The complex language of chromatin regulation during transcription. *Nature.* 2007; 447(7143): 407—12.
58. Nicolaidis S. Biomarkers of glioblastoma multiforme. *Metabolism.* 2015; 64(3, Suppl. 1): S22—7.
59. Gielen G.H., Gessi M., Hammes J., Kramm C.M., Waha A., Pietsch T. H3F3A K27M mutation in pediatric CNS tumors. *Am. J. Clin. Pathol.* 2013; 139: 345—9.
60. Waldmann T., Schneider R. Targeting histone modifications — epigenetics in cancer. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2013; 25(2): 184—9.
61. Williams M.J., Singleton W.G.B., Lowis S.P., Malik K., Kurian K.M. Therapeutic targeting of histone modifications in adult and pediatric high-grade glioma. *Front. Oncol.* 2017; 7: 45.
62. Fontebasso A.M., Schwartzentruber J., Khuong-Quang D.A., Liu X.Y., Sturm D., Korshunov A. et al. Mutations in SETD2 and genes affecting histone H3K36 methylation target hemispheric high-grade gliomas. *Acta Neuropathol.* 2013; 125(5): 659—69.
63. Dang L., White D.W., Gross S., Bennett B.D., Bittinger M.A., Driggers E.M. et al. Cancer-associated IDH1 mutations produce 2-hydroxyglutarate. *Nature.* 2009; 462(7274): 739—44.
64. Wu G., Broniscer A., McEachron T.A., Lu C., Paugh B.S., Beckwith J. et al. Somatic histone H3 alterations in pediatric diffuse intrinsic pontine gliomas and non-brainstem glioblastomas. *Nat. Genet.* 2012; 44: 251—3.
65. Khuong-Quang D.A., Buczkowicz P., Rakopoulos P., Liu X.Y., Fontebasso A.M., Bouffet E. et al. K27M mutation in histone H3.3 defines clinically and biologically distinct subgroups of pediatric diffuse intrinsic pontine gliomas. *Acta Neuropathol.* 2012; 124: 439—47.
66. Lai R.K., Chen Y., Guan X., Noursome D., Sharma C., Canoll P. et al. Genome-wide methylation analyses in glioblastoma multiforme. *PLoS One.* 2014; 9(2): e89376.
67. Plass C., Pfister S.M., Lindroth A.M., Bogatyrova O., Claus R., Lichter P. Mutations in regulators of the epigenome and their connections to global chromatin patterns in cancer. *Nat. Rev. Genet.* 2013; 14: 765—80.
68. Flynn R.L., Cox K.E., Jeitany M., Wakimoto H., Bryll A.R., Ganem N.J. et al. Alternative lengthening of telomeres renders cancer cells hypersensitive to ATR inhibitors. *Science.* 2015; 347: 273—7.
69. Smits M., Nilsson J., Mir S.E., van der Stoop P.M., Hulleman E., Niers J.M. et al. miR-101 is down-regulated in glioblastoma result-

- ing in EZH2-induced proliferation, migration, and angiogenesis. *Oncotarget*. 2010; 1(8): 710–20.
70. Xiaoping L., Zhibin Y., Wenjuan L., Zeyou W., Gang X., Zhaohui L. et al. CPEB1, a histone-modified hypomethylated gene, is regulated by miR-101 and involved in cell senescence in glioma. *Cell Death Dis.* 2013; 4: e675.
  71. Boustani M.R., Mehrabi F., Yahaghi E., Khoshnood R.J., Shahmohammadi M., Darian E.K., Goudarzi P.K. Somatic CPEB4 and CPEB1 mutations spectrum on the prognostic predictive accuracy in patients with high-grade glioma and their clinical significance. *J. Neurol. Sci.* 2016; 363: 80–3.
  72. Kim Y.Z. Altered histone modifications in gliomas. *Brain Tumor Res. Treat.* 2014; 2(1): 7–21.
  73. Liu B.L., Cheng J.X., Zhang X., Wang R., Zhang W., Lin H. et al. Global histone modification patterns as prognostic markers to classify glioma patients. Hotspot mutations in H3F3A and IDH1 define distinct epigenetic and biological subgroups of glioblastoma. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 2010; 19(11): 2888–96.
  74. Louis D.N., Perry A., Reifenberger G., von Deimling A., Figarella-Branger D., Cavenee W.K. et al. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathol.* 2016; 131(6): 803–20.
  75. Verhaak R.G.W., Hoadley K.A., Purdom E., Wang V., Qi Y., Wilkerson M.D. et al. An integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR and NF1. *Cancer Cell.* 2010; 17(1): 98.
  76. Sturm D., Witt H., Hovestadt V., Khuong-Quang D.A., Jones D.T., Konermann C. et al. Hotspot mutations in H3F3A and IDH1 define distinct epigenetic and biological subgroups of glioblastoma. *Cancer Cell.* 2012; 22(4): 425–37.
  77. Shai R.M., Reichardt J.K., Chen T.C. Pharmacogenomics of brain cancer and personalized medicine in malignant gliomas. *Future Oncol.* 2008; 4(4): 525–34.
  78. Anjum K., Shagufta B.I., Abbas S.Q., Patel S., Khan I., Shah S.A.A. et al. Current status and future therapeutic perspectives of glioblastoma multiforme (GBM) therapy: A review. *Biomed. Pharmacother.* 2017; 92: 681–9.
  79. Mrugala M.M. Advances and challenges in the treatment of glioblastoma: a clinician's perspective. *Discov. Med.* 2013; 15(83): 221–30.

Kit O.I., Vodolazhsky D.I., Rostorguev E.E., Frantsiyants E.M., Panina S.B.

## MOLECULAR GENETIC MARKERS OF GLIOMAS

Rostov Research Institute of Oncology, 344037 Rostov-on-Don, Russia, e-mail: tailana703@gmail.com

Gliomas are invasive recurrent brain tumors with high lethality. Gliomas have been morphologically divided into astrocytomas, oligodendrogliomas and mixed oligoastrocytomas. The gliomas are graded according to World Health Organization (WHO) criteria as grade I (pilocytic astrocytomas), grade II (low-grade gliomas), grade III (high-grade gliomas), grade IV (glioblastoma). The mutations of *IDH1*, *TP53* genes, *MGMT* methylation have been described as the prognostic markers of glioma. The aim of the present review is to analyze research and experimental results (Scopus, Web of Science, Pubmed) concerning somatic mutations, aberrant regulation of gene expression of signal pathways, diagnostic and prognostic markers of glioma progression, characterizing various morphological types and grades of glioma. Particularly, the specificities of medulloblastomas and ependimomas have been considered in the present review.

**Key words:** gliomas, molecular markers, oncogenic mutations, epigenetic alterations, review.

**For citation:** Kit O.I., Vodolazhsky D.I., Rostorguev E.E., Frantsiyants E.M., Panina S.B. Molecular Genetic Markers of Gliomas. *Molekulyarnaya Genetika, Mikrobiologiya i Virusologiya (Molecular Genetics, Microbiology and Virology)* 2017; 35(4): 132–140 (Russian). DOI 10.18821/0208-0613-2017-35-4-132-140.

**For correspondence:** Panina Svetlana B. Dr Rostov Research Institute of Oncology, 344037 Rostov-on-Don, Russia, e-mail: tailana703@gmail.com

**Acknowledgments.** The study had no sponsorship.

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

Received 06.03.17  
Accepted 02.11.17

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2017

УДК 579.842.23:579.253(479)

**Кисличкина А.А.<sup>1</sup>, Соломенцев В.И.<sup>1</sup>, Благодатских С.А.<sup>1</sup>, Кадникова Л.А.<sup>1</sup>, Платонов М.Е.<sup>1</sup>, Майская Н.В.<sup>1</sup>, Дубянский В.М.<sup>2</sup>, Богун А.Г.<sup>1</sup>, Куличенко А.Н.<sup>2</sup>, Анисимов А.П.<sup>1</sup>**

### В ПОЛЕВОЧЬИХ ПРИРОДНЫХ ОЧАГАХ ЧУМЫ НА КАВКАЗЕ ЦИРКУЛИРУЮТ ТРИ ГЕНЕТИЧЕСКИ РАЗЛИЧНЫЕ ЛИНИИ ШТАММОВ *YERSINIA PESTIS* SUBSP. *MICROTUS* BV. *CAUCASICA* (0.PE2)

<sup>1</sup> Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии Роспотребнадзора, 142279, Московская обл., Серпуховский р-н, п. Оболенск

<sup>2</sup> Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора, 355035, Ставрополь

Грамотрицательные бактерии *Y. pestis* subsp. *pestis* SNP-типов 0.ANT-4.ANT, 1.ORI и 2.MED — причина многочисленных эпидемических вспышек, эпидемий и трех пандемий чумы, унесших сотни миллионов человеческих жизней. В то же время, циркулирующие в популяциях различных видов полевых (*Microtus* spp.) штаммы подвида *microtus*, относящиеся к SNP-типам 0.PE, способны вызывать у людей лишь крайне редкие не передающиеся от человека к человеку заболевания чумой. Высказано предположение, что клиническая форма инфекции может развиваться лишь у лиц с нарушениями иммунного статуса. Штаммы *Y. pestis* bv. *caucasica* (0.PE2), одной из наиболее редких филогенетических групп subsp. *microtus*, выделяют на территории при-

родных очагов: Закавказского высокогорного (включающего мезоочаги Лениканский горный (04), Присеванский горный (05) и Зангезуро-Карабахский горный (06)) и Восточно-Кавказского высокогорного (39). Кроме перечисленных районов, аналогичные штаммы *Y. pestis* выделяют на территориях Приараксинского низкогогорного очага песчаночного типа (07), граничащих с Закавказским высокогорным. Ранее, мы показали, что паспортные данные о фенотипических отличиях штаммов биовара *caucasica*, выделенных из разных очагов, соответствовали их MLVA25-, CRISPR- и DFR-генотипам.

В настоящей работе на 21 штамме *Y. pestis* subsp. *microtus* bv. *caucasica* (0.PE2) проведен сравнительный анализ кластеризующей способности методов MLVA25- и CRISPR-типирования с «золотым стандартом» филогенетических исследований — SNP-типированием. Анализ полученных результатов подтверждает существование трех клональных кластеров штаммов, соответ-

Для корреспонденции: Кисличкина Ангелина Александровна, e-mail: angelinakislichkina@yandex.ru, kislichkina@obolensk.org