

Роль эпигенетических факторов в патогенезе нейрофиброматоза 1-го типа

Р.Н. Мустафин¹, Э.К. Хуснутдинова^{1,2}

¹ФГБОУ ВО «Башкирский государственный университет»; Россия, Республика Башкортостан, 450076 Уфа, ул. Заки Валиди, 32;

²ФГБУН Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН;

Россия, Республика Башкортостан, 450054 Уфа, проспект Октября, 71

Контакты: Эльза Камилевна Хуснутдинова elzakh@mail.ru

В обзорной статье описана роль эпигенетических факторов в туморогенезе нейрофиброматоза 1-го типа (НФ1). Клиническая картина НФ1 характеризуется выраженным полиморфизмом — от стертых форм с единичными нейрофибромами до тяжелых проявлений с тысячами опухолей и злокачественными осложнениями. Несмотря на выявление более 1400 типов мутаций в гене NF1, большинством исследователей не обнаружено генофенотипических корреляций. Второе генетическое событие в гене NF1, выявляемое в шванноцитах большинства нейрофибром, может быть результатом общих нарушений стабильности генома и регуляции клеточного цикла. Вероятность тканеспецифической инактивации второго аллеля чрезвычайно мала и не может объяснить образование опухолей у большинства больных НФ1. В то же время роль эпигенетических факторов в блокировании онкосупрессоров доказана и может иметь значение в развитии данного заболевания, в пользу чего говорит закономерное начало образования нейрофибром в пубертатном периоде, утяжеление клиники при наследовании болезни от матери. Представлены исследования роли определенных микроРНК и особенностей метилирования промоторной области NF1 в туморогенезе при НФ1, а также роли мутаций в гене NF1 в развитии спорадических злокачественных новообразований. В связи с возможностью фармакологической коррекции активности микроРНК с использованием антисмысловых последовательностей изучение эпигенетических процессов при НФ1 перспективно для диагностики и лечения не только данной болезни, но и спорадических злокачественных новообразований.

Ключевые слова: нейрофиброматоз 1-го типа, нейрофибромин, туморогенез, импринтинг, микроРНК, метилирование, CpG-островки

DOI: 10.17650/2313-805X-2017-4-3-35-49

The role of epigenetic factors in the pathogenesis of neurofibromatosis type 1

R.N. Mustafin¹, E.K. Khusnutdinova^{1,2}

¹Bashkir State University; 32 Zaki Validi St., Ufa 450076, Republic of Bashkortostan, Russia;

²Institute of Biochemistry and Genetics, Ufa Science Center, Russian Academy of Sciences;

71 Prospekt Oktyabrya, Ufa 450054, Republic of Bashkortostan, Russia

The article describes the role of epigenetic processes in the tumorigenesis of neurofibromatosis type 1. The clinical manifestations of neurofibromatosis type 1 is characterized by a pronounced polymorphism erased from with single neurofibromas to severe forms with thousands of tumors and complications even in patients with the same mutations. More than 1400 mutations in the NF1 gene have been reported, but have not yet identified genotype-phenotype correlations. Detected in the majority of neurofibromas mutation of the second allele of the gene NF1 and loss of heterozygosity may result from common disorders of genome stability and cell cycle regulation. Chance of tissue-specific inactivation of the second allele is extremely low and can not prove the detection of neurofibromas in most patients with neurofibromatosis type 1. At the same time, the role of epigenetic factors for blocking of oncosuppressors has been proven and can be applied to the development of malignant tumors and neurofibromas. This assumption is proved by the fact that the majority of neurofibromas are formed in puberty, while inheriting the disease from mother to clinical manifestations more severe. This review presents the research on the role of miRNAs and specific methylation in the promoter region of NF1 tumorigenesis in neurofibromatosis type 1. Mutations in the NF1 gene are of great importance in the development of many malignancies. Due to the possibility of pharmacological correction of activity of microRNAs using antisense sequences, the study of epigenetic processes in neurofibromatosis type 1 promising to diagnose and treat not only the disease but also sporadic malignancies.

Key words: neurofibromatosis type 1, neurofibromin, tumorigenesis, imprinting, microRNA, methylation, CpG-islands

Введение

Нейрофиброматоз 1-го типа (НФ1) — распространенное аутосомно-доминантное заболевание с опухолевым синдромом, встречающееся в мире в среднем с частотой 1:3,0—3,5 тыс. населения [1–4]. Характерной

клинической чертой болезни являются множественные доброкачественные новообразования — нейрофибромы, гамартумы радужной оболочки глаза и пигментные пятна на коже цвета «кофе с молоком». Плексиформные нейрофибромы, отличающиеся инфильтративным

ростом и склонностью к озлокачествлению, встречаются у 30 % больных НФ1. Риск развития глиом зрительного нерва составляет до 20 %, злокачественных опухолей из оболочек периферических нервов (malignant peripheral nerve sheath tumor, MPNST) 5–10 % [2, 3, 5]. Все развивающиеся опухоли устойчивы к химиотерапии, хирургическое иссечение опухолей часто провоцирует образование новых нейрофибром [6].

MPNST – наиболее характерные для НФ1 злокачественные опухоли. Другие распространенные опухоли при НФ1 представлены в табл. 1.

Ген *NFI* картирован на 17q11.2 и кодирует белок нейрофибромин, содержащий высококонсервативный ГТФаз-активирующий домен, превращающий активные RAS-ГТФ путем отсоединения остатка фосфорной кислоты в RAS-ГДФ, которая неактивна (рис. 1). Потеря экспрессии нейрофибромина приводит к актива-

ции RAS-сигнальных путей и способствует образованию опухолей [8]. Помимо ингибирования RAS, нейтрофибромин положительно регулирует аденилатциклазу, RAS независимо влияет на апоптоз, регулирует адгезию и подвижность клеток [9].

В целях нахождения причин патологии поиск мутаций в гене *NFI* у больных НФ1 проводится по всему миру. В России молекулярно-генетическое исследование с описанием клинической картины больных с выявленными мутациями проведено в работах О.В. Дрозд и соавт. [11], Р.Н. Мустафина и соавт. [12]. В базе данных генных мутаций человека (The Human Gene Mutation Database, 2015) зарегистрировано более 1400 различных мутаций в гене *NFI*, расположенных практически во всех экзонах [13]. У 5 % больных НФ1 с идентифицированными мутациями выявляются микроделеции *NFI*, затрагивающие соседние гены [3, 14]. Несмотря

Таблица 1. Сравнение частоты развития злокачественных опухолей при нейрофиброматозе 1-го типа и в общей популяции

Вид опухоли	Частота развития при нейрофиброматозе 1-го типа, %	Частота развития в популяции, %
Злокачественные опухоли из оболочек периферических нервов	5,0—10,0	0,001
Гастроинтестинальные стромальные опухоли	3,9—25,0	0,0001
Рак молочной железы	18,5	9
Рабдомиосаркома	1,4—6,0	0,000003
Лейкоз	2,0	0,01
Карциноидные опухоли	1,0	0,00003
Феохромоцитома	0,1—5,7	0,00008

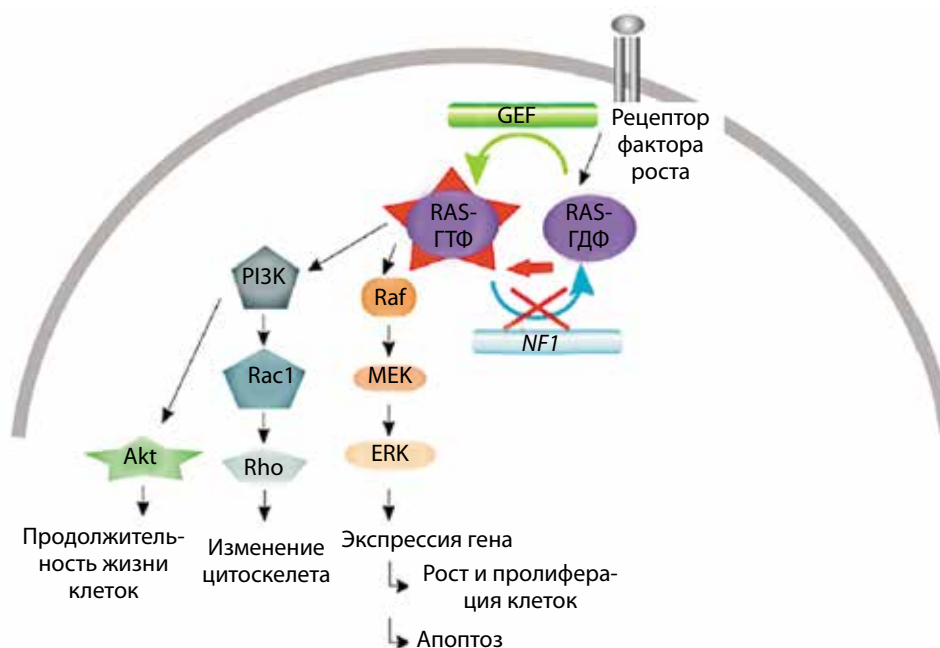


Рис. 1. Схема онкосупрессивного действия нейрофибромину (адаптировано из [10])

на огромный генетический банк данных, исследователями не обнаружено генофенотипических корреляций [13], что дает возможность использования полученных данных лишь для ранней пренатальной диагностики. Однако это не является решением проблемы и вызывает множество спорных биоэтических вопросов (в связи с необходимостью прерывания беременности), поэтому оправдан поиск новых путей патогенеза болезни для возможной коррекции опухолевого синдрома.

Основная идея механизма туморогенеза при НФ1 объясняется двухударной моделью, согласно которой опухоли образуются в результате 2-го генетического события гена опухолевой супрессии [15]. Обоснованием данной идеи являются факты обнаружения биаллельной инактивации гена *NF1* в нейрофибромах при НФ1 [16], причем только в шванноцитах, не выявляемые в других клетках микроокружения [17, 18]. Также в экспериментальных работах при трансплантации мышам химерных *NF1*—/— клеток у мышей развивались опухоли, напоминающие нейрофибромы у людей [19]. У мышей со специфической инактивацией гена *NF1* в центральной нервной системе формировались глиомы зрительных нервов как результат пролиферации глиальных клеток-предшественников. У эмбрионов мышей с *NF1*—/— спинальным гребнем формировалось повышенное количество клеток-предшественников олигодендроцитов [20].

Помимо мутаций, на экспрессию нейрофибромина могут воздействовать и другие механизмы (табл. 2): процессинг, стабилизация и транспорт матричной РНК (мРНК) гена *NF1*. Имеет значение неравноценная экспрессия гена *NF1*, обнаруженная в фибробластах, лимфоцитах, кератиноцитах и меланоцитах [8]. Соответственно, для данных клеток неравноценная экспрессия может вызвать эффект, подобный потере гетерозиготности (loss of heterozygosity, LOH), по следующему механизму: у больных НФ1 один из аллелей инактивирован в результате мутации, выработка нейрофибромина поддерживается за счет оставшегося второго аллеля. Однако при подавлении экспрессии данного аллеля гена эпигенетическими механизмами выработка нейрофибромина полностью прекращается — LOH-подобный эффект (полностью прекращается выработка продукта гена). В результате эпигенетической инактивации второго аллеля гена *NF1*, являющегося геном опухолевой супрессии, потеря его

экспрессии приводит к гиперпролиферации клеток и туморогенезу.

Высококонсервативная среди разных видов 3'-нетранслируемая область *NF1* связывается с опухолевым антигеном HuR и содержит 4 потенциальных белоксвязывающих домена, которые могут представлять дополнительные механизмы контролирования мРНК стабильности, внутриклеточной локализации и эффективности трансляции [8].

Транскрипционный контроль гена *NF1* осуществляется посредством эпидермального фактора роста (EGF), тромбоцитарного фактора роста (PDGF) и основного фактора роста фибробластов (bFGF) [21]. Большое значение в подавлении функции *NF1* имеют микроРНК: путем репрессии трансляции, воздействия на расщепление и деградацию мРНК [22].

Особенности функционирования гена *NF1*

Для определения возможных причин отсутствия корреляции клинических проявлений с типом мутаций в гене *NF1* необходим поиск новых молекулярно-генетических механизмов формирования болезни. Ген *NF1* размером 280 кб картирован в прицентромержной области длинного плеча хромосомы 17 и состоит из 57 экзонов. Известны 4 нормальные внутрирамочные изоформы альтернативного сплайсинга продукта гена *NF1*, экспрессирующиеся во всех тканях в разных концентрациях: экзон 9bг (добавочные 30 пар нуклеотидов (п.н.) между экзонами 9 и 10a), экзон 10a-2 (45 п.н. между экзонами 10a и 10b), экзон 23a (63 п.н. между экзонами 23 и 24), экзон 48a (54 п.н. в направлении 3'-конца гена). Выявлены несколько дополнительных вариантов сплайсинга, экспрессирующихся в низких концентрациях — альтернативные транскрипты ex29-, ex30-, ex29/30-, N-изоформы, отличающиеся различной степенью активности в тканях [23]. Включение экзона 23a происходит под влиянием белков TIA-1/TIAR, а под действием Hu-белка угнетается [24].

В геноме человека содержатся 11 последовательностей, родственных *NF1*, 9 из которых расположены в центромержных областях 7 различных хромосом. Псевдогены *NF1* расположены на хромосомах 2, 12, 14, 15, 18, 21 и 22 [10].

Темп мутирования гена *NF1* на 2 порядка выше, чем в других локусах — до 1 на 10 тыс. гамет [4, 25]. Однако с учетом частоты встречаемости болезни 1:3,0—

Таблица 2. Механизмы изменения экспрессии нейрофибромина

Мишень воздействия	Причина инактивации
Экзоны <i>NF1</i>	Мутации гена <i>NF1</i>
Промоторная область гена <i>NF1</i>	Метилирование
Процессируемая матричная РНК гена <i>NF1</i>	Расширение рамки считывания экзона <i>NF1</i> при процессинге, образование стоп-кодона
3'-нетранслируемая область матричной РНК	микроРНК

3,5 тыс. населения, а также, в среднем, половины спорадических случаев НФ1, темп мутирования гена должен быть не менее 1 на 6–7 тыс. гамет. До 50 % точковых мутаций обнаруживаются в сайтах сплайсинга, в то время как существуют 4 нормальные сплайсинговые изоформы [26], а также, как упомянуто выше, выявляются дополнительные варианты сплайсинга, экспрессирующиеся в низких концентрациях [23]. Ген *NF1* регулирует пролиферацию клеток, при этом сплайсинговые изоформы обладают разной активностью и преимущественно экспрессируются в определенных тканях. Например в нервных клетках преимущественная экспрессия сплайсинговых изоформ нейрофибромина, обладающих низкой активностью, может поддерживать низкий пролиферативный потенциал. Поскольку ген *NF1* является онкосупрессором, опосредованно (влиянием на RAS-систему) регулируя пролиферацию клеток, экспрессия сплайсинговых изоформ в различных тканях может влиять на возрастзависимую тканеспецифическую дифференцировку клеток в связи с различной активностью данных изоформ, преимущественная экспрессия специфических изоформ в различных тканях в разные периоды онтогенеза — на скорость клеточных делений. Высокая частота сплайсинговых мутаций иногда связана со сложными взаимодействиями гена *NF1* и продуктов его экспрессии с другими факторами, которые могут влиять на темп мутирования в сайтах сплайсинга, 11 родственных *NF1*-последовательностей могут влиять на данные процессы совместно.

Согласно исследованиям К. Wimmer и соавт. ген *NF1* содержит «горячие точки» для инсерции L1-элементов. Выявлены 3 специфических интеграционных сайта для независимых событий транспозиции в гене *NF1*, каждый из которых используется дважды: с. 1642–1_1642 в интроне 14, с. 2835_2836 в экзоне 21, с. 4319_4320 в экзоне 33. Поскольку по данным недавних исследований в онтогенезе происходит перемещение ретроэлементов, а ген *NF1* является предпочтительным сайтом их интеграции, данный процесс может иметь значение в инактивации второго аллеля гена в патогенезе формирования нейрофибром при НФ1 [26]. Существование «горячих точек» мутагенеза в гене *NF1* может в некоторой степени объяснить наличие большого количества псевдогенов и повышенной мутабельности гена. Наличие L1-элементов в гене приводит к усилению мутагенеза и образованию псевдогенов в связи с тем, что ретроэлемент транспозирует в новый локус, оставляя исходную последовательность на прежнем месте. В результате возможны структурные преобразования генома, в том числе формирование псевдогенов [27]. Псевдогены — неактивные копии исходных генов, измененных мутациями; некоторые из их разновидностей представлены процессированными псевдогенами, в которых отсутствуют интроны гена-предшественника (образованные путем встраивания комплементарной ДНК с помощью

генов автономных ретротранспозонов). Многие псевдогены эукариот высоко консервативны и активно транскрибируются, а часть может быть активирована мутациями [28].

С учетом того, что в общебиологическом плане феномен метилирования является элементом системы распознавания, выполняя защитную функцию, направленную на предохранение организма от чужеродной ДНК и избытка эндогенных повторов [29], логично предположить следующий механизм инактивации одного из аллелей *NF1* в определенных тканях с возрастом. Известно, что в онтогенезе могут активироваться определенные ретроэлементы, влияя на дифференцировку клеток с возрастом. Ген *NF1* регулирует цитологическую дифференцировку. Поскольку в гене имеются «горячие точки» инсерции для L1-транспозонов, характер метилирования гена может играть защитную роль, препятствуя тем самым внедрению транспозонов.

Промотор гена расположен в CpG-богатой области [30]. Согласно данным литературы промоторная область *NF1* вблизи стартового сайта транскрипции полностью деметилирована в клетках многих нормальных тканей [31]. Данная особенность может свидетельствовать в пользу возможного влияния метилирования на патогенез опухолевого синдрома.

Около 50 % случаев НФ1 обусловлены мутациями *de novo*, при этом 90 % из них определяются в отцовских хромосомах [25]. Возможные причины данного феномена — влияние микроРНК и геномный импринтинг в связи с тем, что при наличии мутаций *de novo* материнского происхождения эпигенетическое подавление экспрессии аллеля гена *NF1* отцовского происхождения может быть несовместимым с жизнью (инактивация обоих аллелей на ранних этапах эмбрионального развития приводит к летальным порокам развития). В случае семейных форм при наследовании от матери наблюдается утяжеление клиники, однако нелетальное благодаря эпигенетическим механизмам перестройки генома в яйцеклетках.

В интроне 27b расположены 3 небольших гена, транскрибирующиеся в обратной ориентации к *NF1*: *OMGP*, *EVI2A*, *EVI2B*. Функция данных генов направлена на регуляцию пролиферации клеток, при этом интрон расположен между экзонами, кодирующими функционально активный Sec14p-домен [10].

Продукт экспрессии гена *NF1* содержит несколько функционально-активных доменов, 3 из которых наиболее важны для его функции (рис. 2). ГТФаз-активирующий домен взаимодействует со всеми 3 изоформами RAS-белков. Цистеин-серин-богатый домен (CSRD) взаимодействует с циклической аденозинмонофосфатзависимой протеинкиназой A, регулирует взаимодействие с микротубулами. Sec14p-домен регулирует расположение нейрофибромина на эндомембранах, облегчает взаимодействие с глицерофосфолипидами для селективной регуляции RAS [10]. Идентифицирован также плекстрингомолгич-

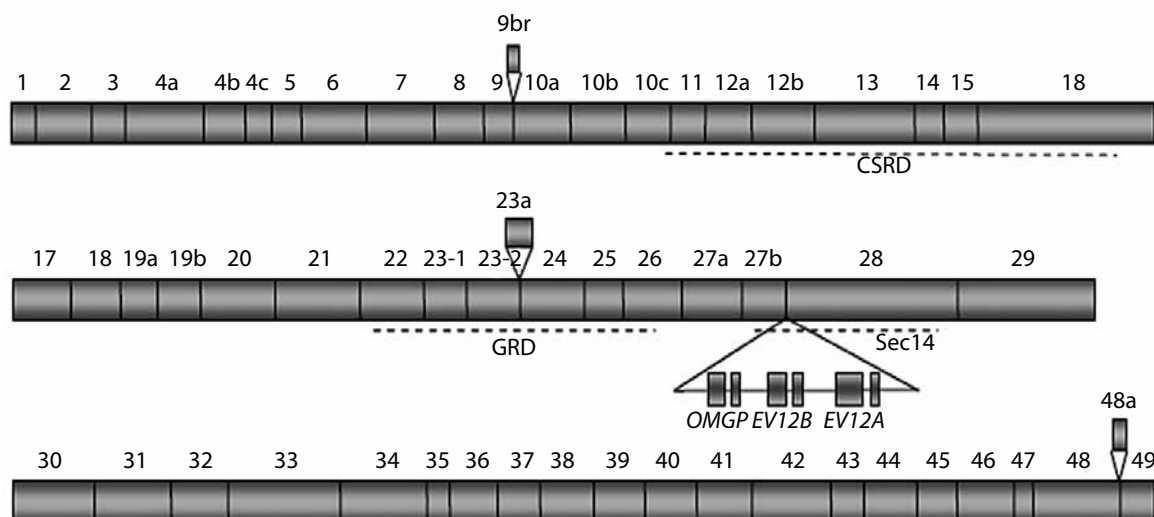


Рис. 2. Схема гена *NF1* с основными доменами (адаптировано из [10]). CSRD — цистеин-серин-богатый домен; GRD — связанный с ГТФаз-активирующим белком домен (GAP (GTPase-activating protein) — related domain)

ный (PH) домен, совместно с Sec14-доменом модулирующий актиновый цитоскелет [13].

На сегодняшний день известны не менее 7 доменов нейрофибромина, посредством которых он взаимодействует с большим количеством белков, участвуя в разнообразных внутриклеточных процессах (рис. 3) [13]. Он реагирует с белком SPRED1, также влияющим на RAS-систему. Нейрофибромин является основным GAP-белком для RAS в дендритах нейронов, где посредством лейцинбогатого домена он взаимодействует с молекуляр-

ным проводником (шапероном) — валозинсодержащим белком (VCP). При взаимодействии с убиквитинлигазами продукт экспрессии *NF1* подвергается деградации путем убиквитинирования, что повышает активность RAS. Так, убиквитинлигаза SAG посредством подобных взаимодействий стимулирует развитие сосудов, а убиквитинлигаза куллин 3 в клетках спорадических глиобластом разрушает нормальный нейрофибромин. Таким образом, изменения активности белков, взаимодействующих с продуктом экспрессии *NF1*, могут приводить

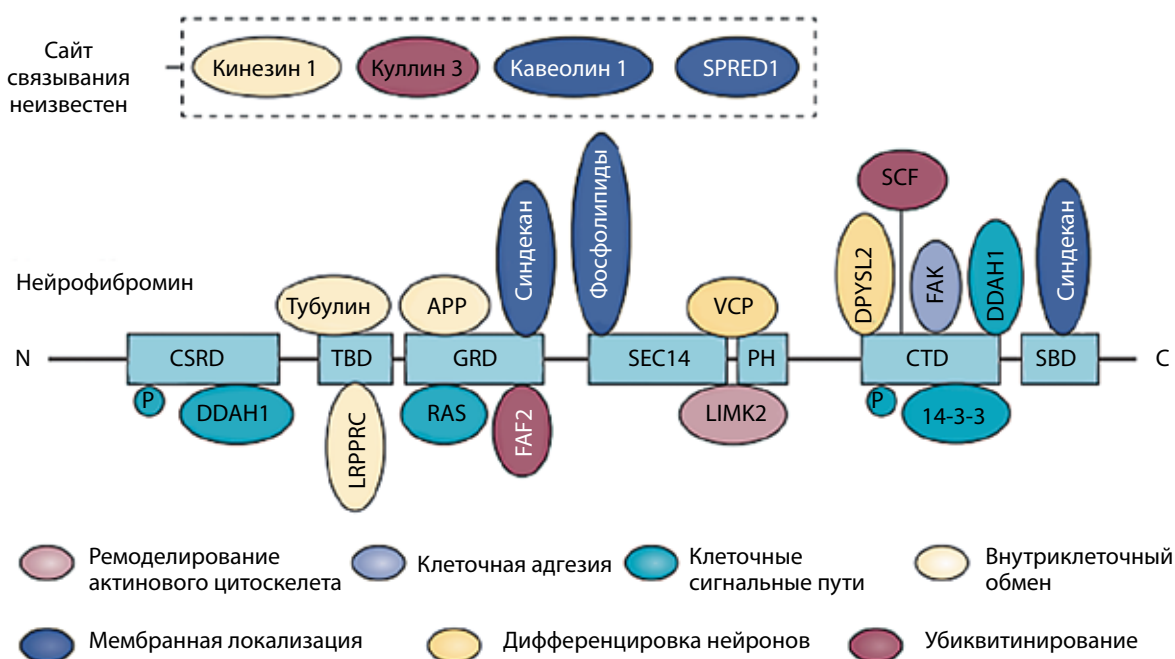


Рис. 3. Схема взаимодействия нейрофибромина с биомолекулами. Домены белка: CSRD — цистеин-серин-богатый домен, TBD — тубулинсвязывающий домен, GRD — связанный с ГТФаз-активирующим белком домен (GAP (GTPase-activating protein) — related domain), Sec14-домен, PH — плекстрингомологичный домен, CTD — карбокситерминальный домен, SBD — синдекансвязывающий домен (адаптировано из [13])

к его инактивации и являться одной из причин иницирования туморогенеза [13].

Патогенез опухолевого синдрома при нейрофиброматозе 1-го типа

В настоящее время механизмом туморогенеза при НФ1 принято считать двухударную модель 2-го генетического события онкосупрессорного гена. Действительно, в злокачественных опухолях и нейрофибромах часто выявляется биаллельная инактивация *NF1*, в том числе ЛОН. Предполагается, что один из механизмов инактивации второго аллеля *NF1* происходит во время репарации ДНК, особенно при гомологичной рекомбинации [32]. Механизмы, ведущие к биаллельной инактивации включают потерю хромосомы с редупликацией, митотическую рекомбинацию, хромосомные микроделеции, а также соматические внутригенные мутации [21]. Однако мутации во втором аллеле, по данным многочисленных исследований, не совпадают с первичной мутацией гена, вызвавшей заболевание [15, 33]. Среди соматических мутаций второго аллеля наиболее распространенными оказались мутации со сдвигом рамки считывания, из них наиболее часто встречающиеся — делеция не менее 4 п.н. Частота выявления ЛОН составляет 20 % [21]. В исследованиях D.R. Stewart и соавт. при изучении клеточной линии, выделенной из гломусных опухолей при НФ1, обнаружена митотическая рекомбинация в 22 % клеток. Однако исследование проводили в клеточных линиях опухолей, редко (лишь у 5 %) встречающихся при НФ1, выделенных лишь из 4 образцов опухолей, что дает статистически малодостоверный результат [34]. Более того, даже при применении полученных данных в качестве объяснения туморогенеза при НФ1 рекомбинация лишь в 22 % случаев не может объяснить образование опухолей у всех больных НФ1.

Высокий темп (до 1 на 10 тыс. гамет) мутирования гена *NF1* [4] также не может объяснить образование нейрофибром у 95 % пораженных. Характерна также взаимосвязь образования опухолей и возраста — в большинстве случаев нейрофибромы начинают формироваться в пубертате — в период, когда в организме происходят серьезные физиологические сдвиги под действием эпигенетических процессов. В связи с вышеизложенным становится понятным, что выявленные мутации второго аллеля гена *NF1* являются, скорее, не иницирующими, а результатом общих нарушений стабильности генома и регуляции клеточного цикла. Промотор гена расположен в CpG-богатой области [30], в связи с чем обоснованно проведение сравнительного анализа паттернов метилирования CpG-динуклеотидов промоторной области гена *NF1* у больных НФ1, а также общего гипометилирования генома. При отличии метилирования геномной ДНК из тканей опухолей по сравнению с ДНК лейкоцитов крови можно утверждать, что мутации во втором аллеле гена *NF1* могут быть следствием общих дестабилизирующих

изменений в геноме или (под действием микроРНК) в области геномной нестабильности [22]. В подтверждение можно привести пример обнаружения мутаций *NF1* более чем в 10 % образцов рака легких, появляющихся на поздних стадиях туморогенеза, тогда как при НФ1 нет выраженной предрасположенности к данному виду рака, сравнимой с другими злокачественными новообразованиями [13].

Уровни экспрессии продукта гена *NF1* отличаются в различных тканях и на разных этапах онтогенетического развития [10], что указывает на роль эпигенетических факторов в регуляции гена. Нарушение регуляции с помощью микроРНК или изменения метилирования у здорового человека компенсируется функцией второго аллеля, в то время как при НФ1 данные нарушения ведут к потере функции нейрофибромину и образованию опухолей.

В патогенезе опухолевого синдрома большое значение имеют иммунологические нарушения. В крови больных НФ1 обнаружено повышенное количество активированных моноцитов крупных размеров с CD16-экспрессией, а также высокие уровни цитокинов IL-1 β и IL-6 [23]. Выявлена корреляция уровней иммуноглобулина E в сыворотке больных НФ1 с количеством нейрофибром, а также с размерами плексиформных нейрофибром [35], что подтверждается эффективностью длительного применения кетотифена в лечении болезни. Нейрофибромы густо инфильтрированы мастоцитами, которые принимают активное участие в инициации и прогрессировании опухолевого процесса за счет дегрануляции и высвобождения медиаторов, повреждающих внеклеточный матрикс, усиливая пролиферацию фибробластов и синтез коллагена. Мастоциты выделяют также белок, ремоделирующий клеточные ассоциации и иницирующий неоангиогенез, а также факторы роста нервных и эндотелиальных клеток. В то же время *NF1*-мутантные шванноциты секретируют Kit-лиганд, стимулирующий миграцию мастоцитов [36]. Таким образом, формируется своеобразный замкнутый патофизиологический процесс (рис. 4), который подвергается влиянию других факторов (в противном случае происходила бы тотальная безостановочная генерализация, приводящая, в конце концов, к летальному исходу). В действительности характер туморогенеза при НФ1 в каждом случае индивидуален, часто встречается стертая клиника с единичными опухолями, при генерализованных формах туморогенез в определенные моменты значительно стихает, достигая своего максимума в пубертатном периоде. Наиболее вероятной причиной являются особенности онтогенетического регулирования эпигенетическими факторами в разном возрасте [37]. Одновременно данные обстоятельства говорят о выраженной дисфункции иммунной системы, с патологической гиперактивацией и пролиферацией мастоцитов. В связи с этим важно проводить эпигенетические

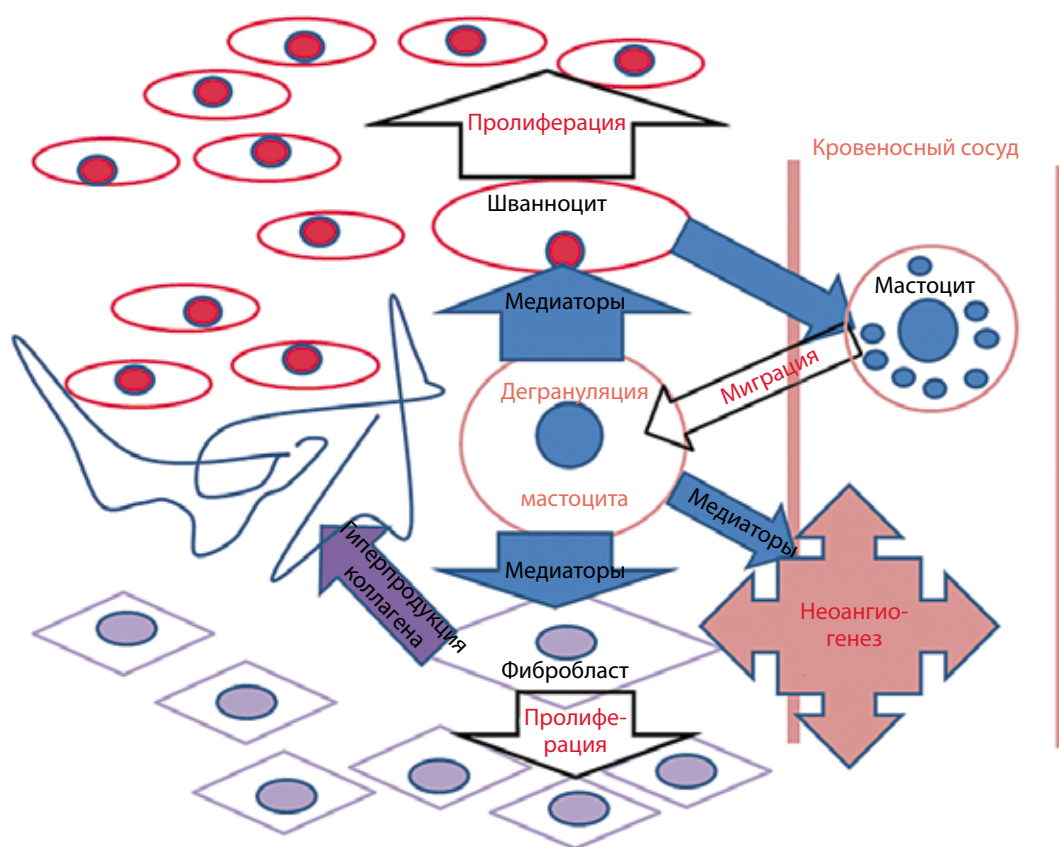


Рис. 4. Схема механизма прогрессирования нейрофибромы

исследования не только опухолей, но и клеток периферической крови больных НФ1.

Дегрануляция мастоцитов в тканях опухоли вызывает выброс медиаторов, способствующих пролиферации шванноцитов и фибробластов. Пролiferирующие фибробласты продуцируют повышенное количество коллагена, что приводит к образованию стромы опухоли. Пролiferирующие шванноциты вырабатывают Kit-лиганд, способствующий миграции мастоцитов (которые далее активно дегранулируют и приводят к прогрессированию опухолевого процесса).

Роль гена *NF1* в спорадическом канцерогенезе

Комплексное исследование с анализом соматических мутаций в моделях более 1500 связанных с раком генов в крупной панели опухолей легких, молочной железы, яичников, поджелудочной железы и предстательной железы выявило, что *NF1* — один из 10 наиболее часто мутатирующих генов при данных типах опухолей (частота мутаций >5 %) [13]. Частота обнаружения мутаций в гене *NF1* у больных с ювенильной миеломоноцитарной лейкемией достигает 30 %. В то же время лишь 10–14 % детей с данным типом лейкоза страдают НФ1. Данное обстоятельство говорит о роли мутаций *NF1* в генезе спорадических форм миелолейкоза [25].

В различных исследованиях выявляются соматические мутации *NF1* при раке, не ассоциированном с НФ1: глиобластомы, аденокарциномы легких, рак молочной железы, лейкозы, серозные карциномы яичников, нейробластомы. Некоторые изменения в гене *NF1* в данных опухолях определяются относительно часто и могут быть использованы в качестве специфических прогностических и диагностических маркеров. Например, *NF1* инактивирован в 23 % случаев спорадических глиобластом, что позволяет выделить данный мезенхимальный молекулярный подкласс. В 22 % серозных карцином яичников определяются мутации *NF1*, из них в 70 % случаев инактивация *NF1* биаллельна [6].

При меланом 3-го класса (ассоциированных с возрастом) в 30 % случаев обнаруживают делеционные мутации *NF1*. Мутации *NF1* при кожных меланомах встречаются в 14 %, при раке легкого — в 12 %, при колоректальной карциноме — в 5 %, при раке молочной железы — в 3 % случаев; при остром миелолейкозе взрослых полная потеря экспрессии *NF1* выявлена у 7 % больных. Встречаемость мутаций при других видах рака представлена в табл. 3. Предполагается, что инактивация *NF1* при некоторых видах опухолей является причиной резистентности к терапии и неблагоприятных исходов [9]. Так, в работе М.Н. Nissan и соавт. при исследовании клеточной линии меланомы

Таблица 3. Частота обнаружения мутаций в гене *NF1* при спорадическом раке

Вид злокачественной опухоли	Частота обнаружения мутаций <i>NF1</i> , %
Эмбриональная рабдомиосаркома	35
Спорадические феохромоцитомы	26–41
Глиобластомы	23
Серозные карциномы яичников	22
Кожные меланомы	14
Рак легкого	12
Миксофибросаркома	10
Плеоморфная липосаркома	8
Острый миелолейкоз взрослых	7
Нейробластомы	6
Колоректальная карцинома	5

по мутации в гене *BRAF* (*V600E*) показано, что потеря *NF1* дает клеткам селективные преимущества и устойчивость к *RAF*-ингибиторам [38]. В исследованиях М. Holzel и соавт. доказано, что *NF1* контролирует ответ на ретиноевую кислоту через *RAS*-*MEK*-сигнальный каскад путем ингибирования экспрессии *RAR/RXR* коактиватора *ZNF423*. Клеточные линии нейробластомы с *NF1*-нокаутом проявляли устойчивость к ретиноевой кислоте. При этом мутации *NF1* выявляются в 6 % спорадических нейробластом [39].

Исследование метилирования промоторной области гена *NF1* при нейрофиброматозе 1-го типа

Важнейшая эпигенетическая модификация, статус которой в организме достоверно меняется с течением жизни — метилирование ДНК [40] — механизм геномного импринтинга и регуляции всей программы развития. У эукариот метилирование видо- и тканеспецифично, контролируется гормонами, изменяется с возрастом и является одним из механизмов клеточной и половой дифференцировки. Профиль метилирования изменяется при канцерогенезе, служит надежным диагностическим признаком разных форм рака [41].

В норме в организме человека метилировано до 70 % CpG-динуклеотидов, или 3–6 % всех цитозинов [40]. Распространенным механизмом инактивации генов-онкосупрессоров при туморогенезе является гиперметилирование промотора — данная «эпимутация» считается функциональным эквивалентом ЛОН [42]. Локальное гиперметилирование при этом распространяется на относительно небольшую часть (20 %) динуклеотидов CpG, образующих соответствующие островки [29]. Подавление продукции нейрофибромина в результате метилирования *NF1* наблюдается

в раковых клетках [13]. Логично предположить, что и при НФ1 инициирующим для образования опухолевых клеток может служить физиологическое гиперметилирование одного из аллелей. Физиологическое — значит, что для генома человека описаны возрастные характеристики процесса метилирования ДНК, имеющие ткане- и возрастспецифический характер. Различна также роль ДНК метилтрансфераз в клетках на различной стадии дифференцировки [29]. В пубертате происходят серьезные физиологические перестройки в организме под действием гормонов, в том числе для регуляции функций определенных тканей необходимо регулирование функции генов. В данном возрасте характерно образование большинства нейрофибром при НФ1. Основной причиной этого может служить гиперметилирование промоторной области *NF1* — гена, регулирующего пролиферативную активность клеток — соответственно, инактивация одного из его аллелей для резких физиологических переходов оправдана.

Перерождение плексиформных нейрофибром в MPNST при НФ1 — распространенный процесс. Особенности метилирования могут быть вовлечены в развитие различных типов нейрофибром и злокачественную трансформацию. В работе А. Harder и соавт. при исследовании паттерна метилирования промотора *NF1* бисульфитным геномным секвенированием НФ1-ассоциированных 9 кожных и 7 плексиформных нейрофибром, 5 MPNST и 20 контрольных образцов ДНК из лейкоцитов периферической крови было выявлено специфическое метилирование сайтов связывания транскрипционных факторов для SP1, CRE (-10), AP-2; гиперметилирование промотора в НФ1-ассоциированных опухолях не обнаружено [43]. Однако М.Р. Hogan и соавт. при исследовании нейрофибром и лимфоцитов периферической крови больных НФ1 и в группе контроля обнаружили опухолеспецифическое метилирование в 6 отдельных CpG-сайтах в позициях -609, -429, -406, -383, -331, -315 по отношению к сайту начала транскрипции [42]. В работе L. Fishbein и соавт. проведен анализ метилирования промотора *NF1* в нормальных шванноцитах и образцах плексиформных нейрофибром от больных НФ1, в которых соматические мутации второго аллеля не были выявлены. Однако в позиции -451 по отношению к сайту начала транскрипции определено специфическое метилирование в 12 из 18 анализируемых опухолей [31].

Д.Н. Gutmann и соавт. при сравнительном исследовании паттерна метилирования *NF1* низкодифференцированных глиом обнаружили значительные различия с данными по спорадическим опухолям, что дало основание считать метилирование *NF1* в качестве возможной причины биаллельной инактивации гена [44].

У животных, как и у человека, существует тканевая (клеточная), субклеточная и возрастная разнокачественность (специфичность) метилирования ДНК.

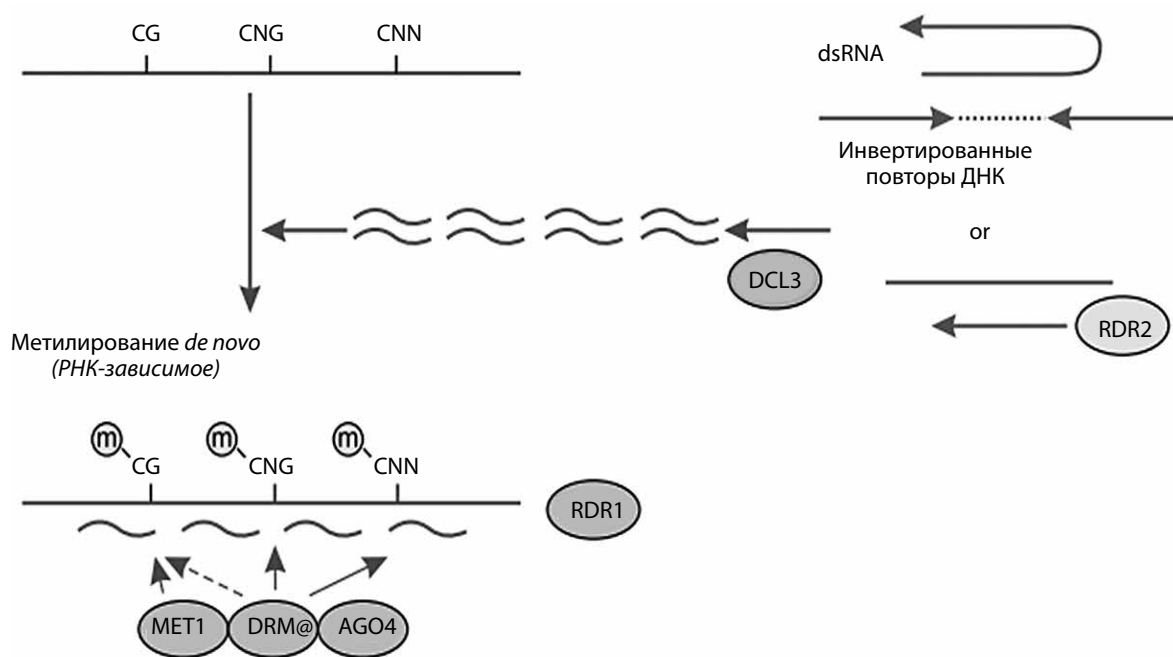


Рис. 5. Подавление экспрессии генов малыми интерферирующими РНК (siRNA). Из инвертированных повторов ДНК образуются двуцепочечные РНК. RDR2 (RNA-dependent RNA polymerase 2) – РНК-зависимая ДНК-полимераза 2; DCL3 (dicer-like 3) – Dicer-подобный фермент-2, который разрезает длинные молекулы двуцепочечной РНК (dsRNA) на короткие фрагменты порядка 21–25 нуклеотидов, называемых siРНК, вызывающие сайтспецифическое *de novo* метилирование нуклеотидов молекулы ДНК с помощью ферментов метилтрансфераз (метилтрансферазы 1 (MET1), метилтрансферазы перегруппировки доменов 2 (domains rearranged methyltransferase, DRM2) и белка-аргонаута (AGO4) (адаптировано из [41])

Общебиологическое явление программированного метилирования определяется гормональным контролем. При этом глобальные перестройки происходят в период полового созревания [41]. С учетом иницирования опухолевого процесса при НФ1 главным образом в пубертатный период роль метилирования в данном отношении наиболее очевидна. Перспективы исследования характера метилирования промотора *NF1* при НФ1 и его роли в патогенезе заболевания связаны с возможностью специфического деметилирования и, таким образом, ингибирования опухолевой трансформации. Метилирование ДНК может существенно модулироваться различными биологическими (вирусами, бактериями, грибами, паразитическими растениями) и абиотическими (стрессами) факторами. Так, ингибитор метилирования ДНК 5-азациитидин уже используется для лечения рака кожи [41]. Поэтому программа по возможному нахождению терапевтических моделей регуляции метилирования вполне осуществима. Однако перспективно использование молекул, максимально специфично взаимодействующих с промоторной областью конкретного гена, так как описаны случаи, когда химиотерапия с применением гипометилирующих агентов (азациитидина и децитабина) приводила к развитию тяжелого миокардита [40].

У животных и растений существует связь между метилированием ДНК и деацетилизацией гистонов. Например, ген гистоновой деацетилазы необходим для метилирования ДНК, индуцированной малыми РНК (dsRNA). Большой интерес привлекает изучение

механизмов и биологической роли метилирования ДНК, направляемой малыми РНК, которые осуществляют специфическое выключение генов (сайленсинг). Сайтспецифичные ДНК-метилтрансферазы в присутствии малых сигнальных РНК осуществляют *de novo* метилирование ДНК по CNG и другим сайтам нуклеотидной последовательности ДНК, узнаваемой малой РНК (рис. 5). Метилирование ДНК играет решающую роль в подавлении экспрессии генов малыми РНК [41].

Исследование микроРНК в патогенезе нейрофиброматоза 1-го типа

МикроРНК имеют важное значение в регуляции канцерогенеза. Различные типы образований и опухоли на разных стадиях показывают уникальные профили микроРНК [22]. Одним из первых сообщений об ассоциации микроРНК с канцерогенезом человека стала публикация G.A. Calin и соавт. (2002) о *hsa-miR-15a* и *hsa-miR-16-1*, делетированных в 70 % опухолевых клеток у больных с В-клеточным хроническим лимфолейкозом. Трансгенная экспрессия *hsa-miR-15a* и *hsa-miR-16-1* приводила к снижению уровней белка В-клеточного лейкоза и индукции апоптоза в лейкоэмических клеточных линиях [22, 45]. С момента открытия микроРНК около 24 лет назад обнаружена их важная роль в развитии рака, в том числе НФ1-ассоциированных опухолей. С момента открытия микроРНК, им посвящено более 60 000 научных публикаций, около половины которых о роли микроРНК в онкогенезе. У человека открыто около 2000 уникальных микроРНК,

Таблица 4. МикроРНК, ингибирующие экспрессию гена *NF1*

Источник	МикроРНК	Объект исследования
[47]	miR-21, miR-29c, miR-34a, miR-204	Злокачественные опухоли из оболочек периферических нервов
[8, 21, 47]	miR-10b	Злокачественные опухоли из оболочек периферических нервов, нейрофибромы
[48]	miR-370	Лейкоциты при остром миелолейкозе
[9]	miR-193b	Плоскоклеточный рак головы и шеи
[50]	miR-514a	Меланома
[49]	miR-128, miR-137	Клетки головного мозга здорового человека
[49]	miR-103	Любые клетки здорового человека

и число их растет. Изменение уровней специфических микроРНК выявлено почти во всех типах злокачественных новообразований, включая рак легкого, толстой кишки, поджелудочной и молочной железы и лейкоз [46]. Сейчас очевидно, что микроРНК регулируют экспрессию не менее 30 % всех белоккодирующих генов в геномах млекопитающих. Потенциальная роль микроРНК в патологии изучена не только при определении их однонуклеотидных полиморфизмов (SNP), но и по вариациям числа их копий (CNV). МикроРНК играют ключевую роль в развитии рака влиянием на гены-онкосупрессоры. Более 50 % микроРНК локализованы в ассоциированных с раком областях или ломких участках хромосом [47].

Специфические микроРНК могут служить альтернативой LOH гена *NF1* в регуляции туморогенеза при НФ1 [8]. Несколько исследовательских групп изучили роль микроРНК в возникновении НФ1-ассоциированных злокачественных заболеваний. Из них напрямую вовлечены в туморогенез злокачественного перерождения при НФ1: miR-10b, miR-21, miR-29c, miR-34a, miR-204 [47]. В исследованиях G. Chai были определены профили микроРНК для *NF1* в опухолевых тканях и клеточных линиях. Выявлена усиленная регуляция miR-10b в шванноцитах MPNST, а также нейрофибром при НФ1 [8, 21].

Функциональный анализ показал, что ген *NF1* является непосредственной мишенью miR-370, гиперэкспрессия которого дает аналогичные с *NF1*-инактивацией эффекты, усиливая пролиферацию и образование колонии клеток острого миелолейкоза [48]. На уровень экспрессии нейрофибромина оказывают влияние miR-103, miR-128 и miR-137 путем специфического связывания с 3'-концом белка. При этом miR-103 экспрессируется во всех тканях организма, тогда как miR-128 и miR-137 — только в головном мозге. Экспрессия данных трех микроРНК на самом высоком уровне регистрируется в нейронах, на самом низком — в шванноцитах. Избыточная экспрессия этих микроРНК значительно снижает уровень эндогенного нейрофибромина, тогда

как антисмысловое ингибирование данных микроРНК усиливает его трансляцию [49].

Обнаружено подавление *NF1* посредством miR-193b, гиперэкспрессия которого наблюдается при спорадическом плоскоклеточном раке головы и шеи, приводящее к активизации ERK и прогрессии опухоли [9]. В исследованиях M.S. Stark и соавт. подтверждено, что *NF1* является непосредственной мишенью miR-514a. Гиперэкспрессия miR-514a в клеточной линии меланомы ингибирует экспрессию *NF1* [50].

Изучение влияния микроРНК на ген *NF1* в туморогенезе при НФ1, а также при спорадических злокачественных опухолях имеет большое значение. Так, в исследованиях G. Chai и соавт. показана возможность использования антисмыслового ингибирования miR-10b для восстановления экспрессии нейрофибромина клеточной линии саркомы SK-ES-1 и подавления зависимой от нейрофибромина RAS-активности в клетках MPNST при НФ1 [8]. В апреле 2013 г. начаты клинические испытания противоопухолевой терапии микроРНК-препарата MRX34 — липосомсвязанной мимичной miR-34 для лечения больных гепатоцеллюлярной карциномой [51].

В табл. 4 представлены накопленные данные об ингибирующем влиянии микроРНК на экспрессию *NF1*. Эти микроРНК могут служить альтернативой LOH для гена *NF1* в регуляции туморогенеза при НФ1.

Сегодня возлагаются большие надежды на использование специфических микроРНК в терапии рака и других болезней. Это преимущественно связывают с направленным ингибированием активности генов, отвечающих за раковую трансформацию клеток и метастазирование [41]. Поскольку *NF1* играет значительную роль в опухолевой трансформации как при НФ1-ассоциированных, так и при спорадических злокачественных новообразованиях, исследование роли микроРНК в патогенезе данных процессов является перспективной и социально значимой задачей.

Кроме того, выявлена значительная роль длинных некодирующих РНК (long non-coding RNA, lncРНК) для активации критических регуляторов в развитии

опухолей при НФ1. В качестве гена-модификатора *NF1* может служить ген лнсРНК *ANRIL*, оказывающий существенное влияние на формирование плексиформных нейрофибром при НФ1. В работе Е. Pasmant и соавт. обнаружена статистически значимая ассоциация однонуклеотидного полиморфизма *rs2151280*, расположенного в *ANRIL*, с количеством плексиформных нейрофибром у больных НФ1 [52]. Однако в исследовании Т. Mubotter и соавт. у больных НФ1 с микроделециями *NF1* не выявлено ассоциации плексиформных нейрофибром с *rs2151280*. ЛнсРНК *ANRIL* напрямую связывается с белком *SUZ12*, важным участником многокомпонентного репрессивного комплекса-2, и необходим для использования *SUZ12* генами-онкосупрессорами *CDKN2A/CDKN2B*, а также для их эпигенетического подавления. Т-аллель *rs2151280*, коррелирующий с редуцированной экспрессией *ANRIL*, ассоциирован с большим количеством плексиформных нейрофибром [53]. ЛнсРНК *ANRIL* идентифицирована в качестве онкогена, вовлеченного в развитие ряда опухолей, таких как рак желудка, легкого, гепатоцеллюлярная карцинома и плоскоклеточный рак пищевода. Ингибирование *ANRIL* подавляет пролиферацию, миграцию и инвазию раковых клеток [54]. Предполагается, что исследование роли лнсРНК имеет важное значение в фармакокоррекции опухолевого синдрома при НФ1, в частности путем модуляции экспрессии *ANRIL* [50]. Кроме того, *ANRIL* может выступать в качестве диагностического и прогностического биомаркера некоторых опухолей [52] и быть использован для прогнозирования течения опухолевого синдрома при НФ1.

Заключение

НФ1 — одно из самых распространенных наследственных заболеваний с частотой встречаемости 1:3,0–3,5 тыс. населения в мире [1–4]. Причиной возникновения НФ1 являются мутации в онкосупрессорном гене *NF1*, отличающиеся чрезвычайно высокой мутабельностью — доля спорадических случаев составляет 50 %, в связи с чем с учетом сохраненной способности к деторождению больных, распространенность НФ1 в мире

неуклонно возрастает. В настоящее время не существует эффективных способов лечения опухолевого синдрома при НФ1, нередко иссечение опухолей провоцирует диссеминацию опухолевого процесса и развитие рецидивов. Возникающие злокачественные новообразования при НФ1 проявляют высокую стойкость к химиотерапии [6]. Кроме того, мутации в гене *NF1* играют важную патогенетическую роль в спорадическом канцерогенезе [6, 9, 38, 39]. Предполагается, что в инактивации второго аллеля гена *NF1* в опухолях при НФ1 и в инактивации обоих аллелей *NF1* в спорадических неоплазмах большое значение имеют эпигенетические факторы. На роль эпигенетических факторов в патогенезе НФ1 указывает отсутствие в большинстве опубликованных исследований гено-фенотипических корреляций даже у членов одной семьи с идентичной мутацией [13], а также особенности гена *NF1* (большие размеры гена — 280 кб, 57 экзонов; наличие нескольких функционирующих альтернативных сплайсинговых транскриптов [23]; наличие 11 псевдогенов *NF1* [10], высокий темп мутирования гена *NF1* [4, 25]; наличие в гене *NF1* «горячих точек» для инсерции L1-элементов [26]; развитие большинства нейрофибром в пубертатном периоде, расположение промотора гена в CpG-богатой области [30], разные уровни экспрессии *NF1* в различных тканях и на различных этапах и в разном возрасте [10]). Исследование роли эпигенетических факторов в патогенезе НФ1 позволило выявить специфическое изменение характера метилирования промоторной области гена *NF1* в НФ1-ассоциированных опухолях [31, 42–44], а также обнаружить вовлечение в канцерогенез злокачественных новообразований микроРНК *miR-10b*, *miR-21*, *miR-29c*, *miR-34a*, *miR-204* [8, 21, 47], *miR-370* [48] при НФ1 и в спорадических случаях *miR-193b* [9], *miR-514a* [50]. Перспективы изучения роли эпигенетических факторов в патогенезе НФ1 позволяют надеяться на возможности таргетной терапии опухолевого синдрома при данном заболевании, а также при спорадических злокачественных новообразованиях. В эксперименте успешно применено антисмысловое ингибирование *miR-10b* в клеточных линиях злокачественных опухолей при НФ1 [8].

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Duong T., Sbidian E., Valeyrie-Allanore L. et al. Mortality associated with neurofibromatosis 1: a cohort study of 1895 patients in 1980–2006 in France. *Orphanet J Rare Dis* 2011;6:18–26.
2. Gregorian C., Nakashima J., Dry S. et al. PTEN dosage is essential for neurofibroma development and malignant transformation. *PNAS* 2009;106(46):19479–84.
3. Melean G., Hernandez A.M., Valero M.C. et al. Monozygotic twins with neurofibromatosis type 1, concordant phenotype and synchronous development of MPNST and metastasis. *BMC Cancer* 2010;10:407–12.
4. Ponti G., Losi L., Martotana D. et al. Clinico-pathological and biomolecular findings in Italian patients with multiple cutaneous neurofibromas. *Hered Cancer in Clin Pract* 2011;9:6–15.
5. Brinkman J., Bron J., Wuisman P. et al. The correlation between clinical, nuclear and histologic findings in a patient with Von Recklinghausen's disease. *World J Surg Oncol* 2007;5:130–7.
6. Laycock-van Spyk S., Thomas N., Cooper D., Upadhyaya M. Neurofibromatosis type 1-associated tumours: their somatic mutational spectrum and pathogenesis. *Hum Genomics* 2011;5(6): 623–90.
7. Patil S., Chamberlain R.S. Neoplasms associated with germline and somatic *NF1* gene mutations. *Oncologist* 2012;17(1):101–16.
8. Chai G., Liu N., Ma J. et al. MicroRNA-10b regulated tumorigenesis in neurofibromatosis type 1. *Cancer Sci* 2010;101(9):1997–2004.
9. Yap Y.S., McPherson J.R., Ong C. et al. The NF1 gene revisited — from bench to bedside. *Oncotarget* 2014;5(15): 5873–92.

10. Vandenbrucke I. Identification and characterization of neurofibromatosis type 1 splice variants. 2004.
11. Дрозд О.В., Бабенко О.В., Семьячкина А.Н. и др. Разработка подходов к ДНК-диагностике нейрофиброматоза 1-го типа в России. Медицинская генетика 2005;4(7):322–6. [Droz O.V., Babenko O.V., Semyachkina A.N. et al. Development of approaches to DNA diagnostics of type 1 neurofibromatosis in Russia. Meditsinskaya genetika = Medical Genetics 2005;4(7):322–6. (In Russ.)].
12. Мустафин Р.Н., Бермишева М.А., Хуснутдинова Э.К. Особенности нейрофиброматоза 1-го типа в Республике Башкортостан. Медицинская генетика 2015;14(6):29–35. [Mustafin R.N., Bermisheva M.A., Khusnutdinova E.K. Features of type 1 neurofibromatosis in the Republic of Bashkortostan. Meditsinskaya genetika = Medical Genetics 2015;14(6):29–35. (In Russ.)].
13. Ratner N., Miller S.J. A RASopathy gene commonly mutated in cancer: the neurofibromatosis type 1 tumour suppressor. Nat Rev Cancer 2015;15(5):290–301.
14. Sabbagh A., Pasmant E., Laurendeau I. et al. Unravelling the genetic basis of variable clinical expression in neurofibromatosis 1. Hum Mol Gen 2009;18(18):2768–78.
15. Eisenbarth I., Beyer K., Krone W., Assum G. Toward a survey of somatic mutation of the NF1 gene in benign neurofibromas of patients with neurofibromatosis type 1. Am J Hum Genet 2000;66(2):393–401.
16. Stevenson D.A., Zhou H., Ashrafi S. et al. Double inactivation of NF1 in tibial pseudarthrosis. Am J Hum Genet 2006;79(1):143–8.
17. Boyd K.P., Korf B.R., Theos A. Neurofibromatosis type 1. J Am Acad Dermatol 2009;61(1):1–16.
18. McGillicuddy L.T., Fromm J.A., Hollstein P.E. Proteasomal and genetic inactivation of the NF1 tumor suppressor in gliomagenesis. Cancer Cell 2009;16(1):44–54.
19. Gutmann D.H., Giovannini M. Mouse models of neurofibromatosis 1 and 2. Neoplasia 2002;4(4):279–90.
20. Hawes J.J., Tuskan R.G., Reilly K.M. Nf1 expression is dependent on strain background: implications for tumor suppressor haploinsufficiency studies. Neurogenetics 2007;8(2):121–30.
21. Jouhilahti E.M., Peltonen S., Heape A.M., Peltonen J. The pathoetiology of neurofibromatosis 1. Am J Pathol 2011;178(5):1932–9.
22. Huppi K., Volfovsky N., Mackiewicz M. et al. MicroRNAs and genomic instability. Semin Cancer Biol 2007;17(1):65–73.
23. Bottillo I., Luca A., Schirinz A. et al. Functional analysis of splicing mutations in exon 7 of NF1 gene. BMC Med Genet 2007;8:4–13.
24. Zhou H., Hinman M., Barron V. et al. Hu proteins regulate alternative splicing by inducing localized histone hyperacetylation in an RNA-dependent manner. PNAS 2007;108(36):627–35.
25. Горбунова В.Н., Имянитов Е.Н., Ледашева Т.А. и др. Молекулярная неврология. Часть III. Опухоли головного мозга, онкогены и антионкогены. Под ред. А.А. Скоромца. СПб.: Интермедика, 2004. С. 219–232. [Gorbunova V.N., Imyanitov E.N., Ledasheva T.A. et al. Molecular neurology. Part III. Tumors of the brain, oncogenes and anti-oncogenes. Ed. A.A. Skoromets. Saint Petersburg: Intermedika, 2004. Pp. 219–232. (In Russ.)].
26. Wimmer K., Callens T., Wernstedt A., Messiaen L. The NF1 gene contains hotspots for L1 endonuclease-dependent *de novo* insertion. PLoS Genet 2011;7(11):e1002371.
27. Ayarpadikannan S., Lee H.E., Han K., Kim H.S. Transposable element-driven transcript diversification and its relevance to genetic disorders. Gene 2015;558(2):187–94.
28. Патрушев Л.И., Минкевич И.Г. Проблема размера геномов эукариот. Успехи биологической химии 2007;47:293–370. [Patrushev L.I., Minkevich I.G. The problem of the size of the genomes of eukaryotes. Uspekhi biologicheskoy khimii = Advances in Biological Chemistry 2007;47:293–370. (In Russ.)].
29. Козлов В.А. Метилирование ДНК клетки и патология организма. Медицинская иммунология 2008;10(4):307–18. [Kozlov V.A. Methylation of cell DNA and pathology of the body. Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology 2008;10(4):307–18. (In Russ.)].
30. Jeong S.Y., Park S.J., Kim H.J. The spectrum of NF1 mutations in Korean patients with neurofibromatosis type 1. J Korean Med Sci 2006;21(1):107–12.
31. Fishbein L., Eady B., Sanek N. et al. Analysis of somatic NF1 promoter methylation plexiform neurofibromas and Schwann cells. Cancer Genet Cytogenet 2005;157(2):181–6.
32. Garcia-Linares C., Fernandez-Rodriguez J., Terribas E. et al. Dissecting loss of heterozygosity (LOH) in neurofibromatosis type 1-associated neurofibromas: importance of copy neutral LOH. Hum Mutat 2011;32(1):78–90.
33. De Raedt T.D., Maertens O., Chmara M. et al. Somatic loss of wild type NF1 allele in neurofibromas: comparison of NF1 microdeletion and non-microdeletion patients. Genes Chromosomes Cancer 2006;45(10):893–904.
34. Stewart D.R., Pemov A., van Loo P. et al. Mitotic recombination of chromosome arm 17q as a cause of loss of heterozygosity of NF1 in neurofibromatosis type 1-associated glomus tumors. Genes Chromosomes Cancer 2012;51(5):429–37.
35. Geller M., Ribeiro M.G., Araújo A.P. et al. Serum IgE levels in neurofibromatosis 1. Int J Immunogenet 2006;33(2):111–5.
36. Chen S., Burgin S., McDaniel A. et al. NF1–/– schwann cell-conditioned medium modulates mast cell degranulation by c-Kit-mediated hyperactivation of phosphatidylinositol 3-kinase. Am J Pathol 2010;177(6):3125–32.
37. Horvath S. DNA methylation age of human tissues and cell types. Genome 2013;14(10):115.
38. Nissan M.H., Pratilas C.A., Jones A.M. Loss of NF1 in cutaneous melanoma is associated with RAS activation and MEK dependence. Cancer Res 2014;74(8):2340–50.
39. Holzel M., Huang S., Koster J. et al. NF1 is a tumor suppressor in neuroblastoma that determines retinoic acid response and disease outcome. Cell 2010;142(2):218–29.
40. Рунов А.Л., Вонский М.С., Михельсон В.М. Уровень метилирования ДНК и длина теломер как основа для построения модели биологических часов старения. Цитология 2015;57(3):192–6. [Runov A.L., Vonskiy M.S., Mikhel'son V.M. The level of DNA methylation and the length of telomeres as a basis for constructing a model of biological aging hours. Tsitologiya = Cytology 2015;57(3):192–6. (In Russ.)].
41. Ванюшин Б.Ф. Эпигенетика сегодня и завтра. Вавиловский журнал генетики и селекции 2013;17(4/2):805–32. [Vanyushin B.F. Epigenetics today and tomorrow. Vavilovskiy zhurnal genetiki i selektsii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding 2013;17(4/2):805–32. (In Russ.)].
42. Horan M.P., Cooper D.N., Upadhyaya M. Hypermethylation of the neurofibromatosis type 1 (NF1) gene promoter is not a common event in the inactivation of the NF1 gene in NF1-specific tumours. Hum Genet 2000;107(1):33–9.
43. Harder A., Rosche M., Reuss D.E. et al. Methylation analysis of the neurofibromatosis type 1 (NF1) promoter in peripheral nerve sheath tumors. Eur J Cancer 2004;40(18):2820–8.
44. Gutmann D.H., McLellan M.D., Hussain I. et al. Somatic neurofibromatosis type 1 (NF1) inactivation characterizes NF1-associated pilocytic astrocytoma. Genome Res 2013;23(3):431–9.
45. Calin G.A., Dumitru C.D., Shimizu M. et al. Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. Proc Natl Acad Sci U S A 2002;99(24):15524–9.
46. Gozuacik D., Akkoc Y., Ozturk D.G., Kocak M. Autophagy-regulating microRNAs and cancer. Front Oncol 2017;7:65.

47. Sedani A., Cooper D.N., Upadhyaya M. An emerging role for microRNAs in NF1 tumorigenesis. *Human Genomics* 2012;6:23–32.
48. Garcia-Orti L., Cristobal I., Cirauqui C. et al. Integration of SNP and mRNA arrays with microRNA profiling reveals that miR-370 is upregulated and targets NF1 in acute myeloid leukemia. *PLoS One* 2012;7(10):e47717.
49. Paschou M., Doxakis E. Neurofibromin 1 is a miRNA target in neurons. *PLoS One* 2012;7(10):e46773.
50. Stark M.S., Bonazzi V.F., Boyle G.M. et al. MiR-514a regulates the tumour suppressor NF1 and modulates BRAFi sensitivity in melanoma. *Oncotarget* 2015;6(19):17753–63.
51. Ling H., Fabbri M., Calin G.A. Micro-RNAs and other non-coding RNAs as targets for anticancer drug development. *Nat Rev Drug Discov* 2013;12(11):847–65.
52. Pasmant E., Sabbagh A., Masliah-Planchon J. et al. Role of noncoding RNA ANRIL in genesis of plexiform neurofibromas in neurofibromatosis type 1. *J Natl Cancer Inst* 2011;103(22):1713–22.
53. Mubotter T., Kluwe L., Hogel J. et al. Non-coding RNA ANRIL and the number of plexiform neurofibromas in patients with NF1 microdeletions. *BMC Med Genet* 2012;13:98.
54. Li Z., Yu X., Shen J. ANRIL: a pivotal tumor suppressor long non-coding RNA in human cancers. *Tumour Biol* 2016;37(5):5657–61.