БИОЛОГИЯ

УДК 621.383: 539.231

НОВОЕ В ПОНИМАНИИ МЕХАНИЗМОВ КАНЦЕРОГЕНЕЗА

© 2013 г. Член-корреспондент РАН Д.Г. Матишов[1], В.А. Тарасов[1]

Рассмотрены изменения в системе представлений о механизмах внутриклеточных процессов в норме и при развитии патологий, произошедшие уже в текущем столетии, в так называемую постгеномную эпоху в биологии. Эти изменения обусловлены рядом открытий, сделанных в конце прошлого века, но их общебиологическое значение осознано только в первом десятилетии XXI столетия. Открытие явления микроРНК-зависимого замолкания генов и микроРНК, способности метилированных сайтов ДНК реплицироваться и передаваться по наследству, ключевой роли микроРНК в регуляции этих процессов привели нас к пониманию определяющего значения эпигенетических изменений генома в процессах индивидуального развития организма, адаптации клеток к стрессовым воздействиям, а также прогрессии и, возможно, инициации канцерогенеза. Принципиальным отличием эпимутации от канонических мутаций является их обратимость. И это открывает захватывающие перспективы создания принципиально новых методов диагностики и лечения заболеваний, которые в настоящее время представляются неизлечимыми.

Ключевые слова: эпигенетические изменения генома, микроРНК, канцерогенез.

ПОСТГЕНОМНАЯ ЭРА В БИОЛОГИИ

Биологический мир уже примерно 10 лет живет в постгеномную эпоху. Условно она началась в 2001 г., когда одновременно в журналах “Nature” и “Science” [1, 2] были опубликованы первые результаты по определению нуклеотидной последовательности генома человека, обозначившие окончание технологического этапа в молекулярной генетике, когда центральную роль играли исследования, направленные на определение нуклеотидной последовательности генов и всего генома в целом. Эта задача была реализована немногим более чем за 10 лет в рамках международного проекта “Геном человека”. Одним из главных его инициаторов был Джеймс Уотсон, который вместе с Френсисом Криком совершил одно из ключевых открытий XX в., установив, что молекула ДНК имеет структуру двойной спирали. Именно с этого начинается отсчет существования молекулярной генетики как науки.

Продвигая многомиллиардный проект “Геном человека”, его инициаторы опирались на достижения молекулярной генетики в 1970-е годы: возможность клонирования определенных фрагментов ДНК и отдельных генов в бактериальных плазмидных векторах, а также развитые Ф. Сенджером и В. Гильбертом методы секвенирования клонированных последовательностей ДНК [3, 4], работы которых указывали на техническую реальность предлагаемого проекта. Однако основной аргумент в пользу его социальной значимости заключался в возможности понять молекулярную природу возникновения и развития злокачественных опухолей человека. В процессе выполнения проекта были разработаны технологии оперативного и экономичного секвенирования ДНК, и в настоящее время определена полная нуклеотидная последовательность многих сотен видов как эукариот, так и прокариот, а само определение нуклеотидной последовательности превратилось в рутинную процедуру. Это обстоятельство (а также внедрение компьютерных методов анализа) принципиально изменило технологию получения новых знаний и практически сняло все ограничения в отношении объектов и явлений, у которых возможно проведение экспериментального анализа на молекулярном уровне. Это касается таких фундаментальных явлений, как деление клеток и апоптоз, репликация генома, его стабильность, механизмы межклеточных взаимодействий в пределах многоклеточного организма, дифференцировка клеток в онтогенезе, систематика видов, эволюционная теория и так далее. Существенно, что появилась реальная возможность экспериментально исследовать и понять молекулярную природу самых различных патологий человека и создать на этой основе принципиально новые методы их диагностики и лечения. К числу этих болезней относятся и такие социально значимые за-

[1]Институт аридных зон Южного научного центра РАН, 344006, Ростов-на-Дону, пр. Чехова. 41; e-mail: dmatishov@mail.ru

болевания, какими являются сердечно-сосудистые, нейродегенеративные и, конечно, онкологические патологии.

КАНОНИЧЕСКАЯ ТЕОРИЯ КАНЦЕРОГЕНЕЗА (ЧТО ТАКОЕ РАК С ТОЧКИ ЗРЕНИЯ ГЕНЕТИКИ)

В течение многих десятилетий усилия медиков, цитологов, морфологов, физиологов, генетиков в сотнях лабораторий мира направлены на решение проблемы канцерогенеза, однако природа этого явления до конца не понята и сегодня. Развитие опухоли непосредственно связано с протеканием таких внутриклеточных и организменных фундаментальных процессов, какими являются деление клеток и апоптоз, поддержание целостности генома и его нестабильность, ограничение числа делений клеток и снятие этих ограничений, процессы дифференцировки и дедифференцировки клеток, взаимоотношение клеток с иммунными системами организма и другие. В последней четверти прошлого века сложилась теория, которая в настоящее время принята большинством исследователей как каноническая и в основе которой лежат представления о том, что прогрессия опухоли определяется последовательными мутациями в специфическом наборе генов, который может полностью или частично меняться при переходе от одного типа опухоли к другому [5, 6].

Эти наборы генов включают в себя онкогены и гены-супрессоры опухоли. Доказательства существования онкогенов в геноме нормальных клеток впервые получены в конце 1970-х гг. Джоном Бишопом и Харолдом Вармусом [7], которые за это открытие в 1989 г. получили Нобелевскую премию. Ещё ранее, в начале 1970-х гг., при исследовании наследственного заболевания ретинобластомы, приводящего к возникновению опухоли сетчатки глаза у детей, было показано существование в геноме человека другого типа генов – генов-супрессоров опухоли [8]. События, связанные с прогрессией опухоли, в рамках этих представлений обусловлены мутациями, приводящими к активации функции онкогенов и, напротив, потере функции в случае генов-супрессоров опухоли. По своей сути развитие опухоли представляет собой эволюционный процесс клеточных клонов, возникших в результате деления одной первично инициированной клетки. В связи с тем, что процесс возникновения мутаций является стохастическим, не существует двух абсолютно одинаковых опухолей, которые возникли независимо друг от друга. Однако во всех случаях из одной полностью или частично дифференцированной клетки, находящейся под контролем своего окружения и организма, возникают самодостаточные злокачественные клетки, способные к бесконечному росту.

После расшифровки нуклеотидной последовательности генома человека и даже несколько ранее, когда он был секвенирован, но не полностью, начались интенсивные исследования генов-супрессоров опухоли и протоонкогенов, мутации которых определяют предрасположенность к возникновению злокачественных опухолей человека либо участвуют в их прогрессии. У евреев ашкенази в двух генах – BRCA1 и BRCA2 – были обнаружены мутации, у носителей которых с высокой частотой, доходящей до 90%, развивается рак молочной железы [9].

Аналогичные мутации в этих генах обнаружены и в других этнических популяциях [10].

Существование таких “патогенных” мутаций показано и для рака толстой кишки. Однако в этом случае речь идет о других генах – гене APC, участвующем в контроле фосфорилирования белков, и генах, контролирующих протекание репарации неправильно спаренных оснований ДНК, соответственно для полипозного и неполипозного варианта этой патологии. Все эти случаи относятся к фамильным, наследуемым формам рака, предрасположенность к которому встречается среди кровных родственников. Подавляющее большинство случаев онкологических заболеваний является спорадическими, у которых не прослеживается родственная связь. В этом случае можно было бы ожидать, что риск развития спорадических форм злокачественных опухолей сцеплен с определенными ассоциациями полиморфных сайтов генов, прямо или косвенно участвующих в контроле протекания развития опухоли. Однако, по крайней мере в большинстве случаев, такие устойчивые ассоциации не обнаружены. Успехи, достигнутые в самые последние годы в анализе механизмов эпигенетических нарушений генома (которые в отличие от традиционных мутаций являются обратимыми) и их роли в процессах малигнизации, заставили пересмотреть наши представления о вкладе необратимых мутаций в канцерогенезе.

РНК-ЗАВИСИМОЕ ЗАМОЛКАНИЕ ГЕНОВ И ЭПИГЕНЕТИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ ГЕНОМА

В середине 1990-х гг. были сделаны два открытия, которые, как казалось сначала, не связаны между собой; фундаментальное значение их было осознано научным сообществом уже в нашем веке. Это относится, во-первых, к открытию так называемой косупрессии, когда экзогенная активно функционирующая копия гена, введенная в геном, не только не приводит к её функциональному выра-

жению в фенотипически регистрируемый признак, но и подавляет активность своего эндогенного гомолога [11–13]. Выяснение механизма, лежащего в основе косупрессии генов, привело к открытию процесса интерференции РНК, за открытие которой Эндрю Файеру и Крейгу Мелло в 2006 г. была присуждена Нобелевская премия [14]. Оказалось, что в клетках существует сложный многоэтапный механизм трансформации двунитевой экзогенной РНК в короткие, размером порядка 20 с небольшим нуклеотидных пар, однонитевые последовательности. Эти последовательности ассоциируются с полибелковым комплексом, получившим название RISC (RNA-induced silencing complex), и с использованием свойства комплементарности связываются с информационной РНК отдельных генов, нуклеотидная последовательность которых имеет комплементарные районы. И это в конечном счете приводит к деградации информационной РНК либо к подавлению её трансляции. Первоначально предполагалось, что роль РНК-интерференции связана с защитой клеток от РНК-содержащих вирусов и стабилизацией генома за счет подавления неконтролируемого перемещения мобильных элементов, имеющих концевые инвертированные и прямые повторы.

Второе открытие связано с обнаружением в клетках функционально значимых микроРНК у нематоды *Caenorhabditis elegans* [15]. Их размеры полностью соответствуют размерам молекул РНК, формирующихся при протекании РНК-интерференции на базе двунитевых протяженных последовательностей экзогенных РНК. Проведенный уже в 2000-е годы скрининг показал существование многочисленных микроРНК в клетках растений, насекомых, млекопитающих, включая клетки человека [16]. В настоящее время идентифицировано около 2000 микроРНК, имеющих одинаковые размеры, но различающихся нуклеотидной последовательностью в клетках человека [17]. Уже сейчас экспериментально установлено, что под их контролем находится не менее 60% генов. Стало ясно, что микроРНК играют ключевую роль в регуляции практически всех клеточных процессов, включая деление клеток, апоптоз, репликацию, рекомбинацию, репарацию ДНК, сигнальную трансдукцию, дифференцировку клеток, ответ клеток на стрессовое воздействие.

Этот интерес обусловлен существованием, наряду с посттранскрипционным, теперь уже каноническим РНК-зависимым замолканием генов, так называемого процесса микроРНК-зависимого транскрипционного замолкания генов. При протекании последнего микроРНК связывается с другим полибелковым комплексом, получившим название RITS (RNA-induced transcriptional silencing). В результате функционирования этого полибелкового комплекса, связанного с микроРНК, происходит направленное метилирование промоторных участков генов-мишеней для каждой конкретной микроРНК. Непосредственную функцию метилирования ДНК обеспечивают три метилтрансферазы, получившие название ДНК-метилтрансферазы (DNMT) 1, 3a и 3b. При этом если DNMT3a и 3b ответственны за инициирующее метилирование, то DNMT1 обеспечивает протекание так называемого поддерживающего метилирования, когда метилируются цитозиновые основания во вновь синтезированной нити ДНК лишь в том случае, если родительская нить ДНК, напротив, в оппозитном сайте, уже содержит метилированный цитозин. Другими словами, происходит репликация метилированного сайта ДНК, который наследуется по крайней мере при делении соматических клеток, то есть возникают эпигенетические изменения генома. В свою очередь установлено, что активность ДНК-метилтрансфераз также зависит от активности микроРНК.

В результате этих открытий стало понятно, что существует ещё один ранее неизвестный уровень регуляции активности генов, связанный с существованием некодирующих, но регуляторных РНК. Эта регуляция активности генов осуществляется как на посттранскрипционном, так и на транскрипционном уровнях. Последнее представляет особый интерес, поскольку в данном случае речь идёт о наследуемых изменениях генома, которые, однако, в отличие от мутаций, являются обратимыми. Процесс дифференцировки клеток связан не с возникновением мутаций, а с наследуемыми, но обратимыми эпигенетическими изменениями. Экспериментальные доказательства этого вывода даны в работах Джона Гёрдона и Синъя Яманака (см. [18]), за которые совсем недавно, в 2012 г., они получили Нобелевскую премию. Однако процессы дифференцировки клеток протекают не только в нормальном онтогенезе, но и при развитии злокачественных опухолей, в результате чего и формируются те изменения структуры и функции опухолевых клеток, которые отличают их от клеток нормальной ткани. В многочисленных работах преимущественно последних четырех-пяти лет идентифицированы десятки микроРНК, аберрантная экспрессия которых отражает изменения метаболизма при переходе от одной стадии развития опухоли к другой, включая стадию метастазирования. Более того, для ряда микроРНК, например микроРНК-21 [19], показано, что их аберрантная экспрессия не только отражает, но и обусловливает эти изменения метаболизма клеток.

Действительно, нормализация уровня экспрессии этих микроРНК приводит к существенному подавлению скорости развития опухоли. Это открывает принципиальную возможность разработки новых методов при практическом лечении злокачественных опухолей. В последние два-три года появились сотни публикаций, свидетельствующих о том, что работы по реализации этой возможности интенсивно проводятся во многих лабораториях и научных центрах разных стран мира. Однако более реальные и более быстро реализуемые перспективы, на наш взгляд, связаны с использованием микроРНК и эпигенетических изменений в качестве ранней диагностики онкологических заболеваний, пригодных для массового использования. И в этом плане уже достигнуты первые успехи. Для многих типов опухолей, таких как рак простаты, рак молочной железы, рак толстой кишки, рак поджелудочной железы, рак легких, идентифицированы микроРНК с увеличенным (онкогенные микроРНК) или уменьшенным (супрессорные микроРНК) уровнем экспрессии в клетках злокачественной опухоли [20–22]. К числу наиболее известных онкогенных микроРНК относится микроРНК-21, микроРНК-125b, микроРНК-372/373 и другие. В аналогичный список супрессорных микроРНК входят микроРНК-34a, семейство микроРНК let-7, микроРНК-221/222 и другие. Особый, в первую очередь практический, интерес представляют собой результаты, полученные буквально в течение последних двух-трех лет, в которых показано, что специфическое изменение уровня экспрессии микроРНК происходит не только в клетках опухоли. Оказалось, что существует связь между наличием злокачественной опухоли и концентрацией определенных микроРНК в циркулирующих в организме жидкостях, в первую очередь речь идет о плазме крови. В случае рака простаты впервые это явление было продемонстрировано П.С. Митчелом и др. в 2008 г. [23]. В этой работе при анализе более 300 различных miRNA было показано, что микроРНК-141 является специфическим маркером рака простаты. В дальнейшем, в течение двух-трех последних лет, были опубликованы результаты, указывающие на перспективность использования при диагностике рака простаты не только микроРНК-141, но и других микроРНК [23–26]. К числу этих перспективных в отношении диагностики рака простаты, кроме микроРНК-141, относятся также микроРНК-21, микроРНК-200b и микроРНК-375.

Чрезвычайно интересные данные опубликованы в мае 2012 г. в работе «Intragenic ATM Methylation in Peripheral Blood DNA as a Biomarker of Breast Cancer Risk” [27], в которой продемонстрирована связь метилирования ДНК гена ATM, который является одним из ключевых генов, контролирующих ответ клетки на радиационное воздействие с предрасположенностью развития рака молочной железы. У пациенток с повышенным метилированием этого гена через несколько лет с высокой вероятностью развивался рак молочной железы. Полученные в этой работе результаты являются еще одним свидетельством в пользу того, что эпигенетические изменения генома могут лежать в основе предракового состояния клеток и создавать высокий риск опухолевой трансформации клеток нормальной ткани.

НЕСКОЛЬКО ЗАКЛЮЧИТЕЛЬНЫХ ЗАМЕЧАНИЙ

Характеризуя XXI век как постгеномную эру в биологии, мы вполне обоснованно можем говорить о наступившем столетии как о веке эпигенетики. Основные проблемы молекулярной генетики и биологии XX века были связаны с исследованием структурно функциональной организации генома, механизмов его устойчивого функционирования при передаче информации от ДНК генов к белковым продуктам.

Природа наследуемой изменчивости в рамках этих представлений наряду с проблемой гена рассматривалась в качестве центральной до 1953 г. – момента рождения молекулярной генетики.

Проблема наследуемой изменчивости генома в рамках молекулярной генетики перестала существовать. Казалось очевидным, что единственной причиной наследуемой изменчивости являются изменения нуклеотидной последовательности ДНК генов и их регуляторных детерминант или нуклеотидной последовательности генома в целом, если речь идёт о его структурной изменчивости. Эти изменения генома по своей природе необратимы. Уже в нашем веке на первый план выступили проблемы механизмов пластичности генома, его изменчивости в онтогенезе, координации работы ансамбля генов в динамичных процессах индивидуального развития организмов, адаптации клеток к действию экзогенных факторов самой разной природы. Ряд открытий, сделанных в конце XX века (общебиологическое значение которых осознано лишь в первом десятилетии XXI столетия), привели к пониманию определяющей роли эпигенетических нарушений генома, связанных с метилированием ДНК и модификацией гистонов, в изменении функции генома при протекании онтогенеза, адаптации клеток к стрессовым воздействиям и развитии патологий, в первую очередь касающихся инициации и развития злокачественных опухолей животных и человека.

Принципиальным отличием эпимутации от канонических мутаций является их обратимость.

И это открывает захватывающие перспективы создания принципиально новых методов лечения заболеваний, которые в настоящее время представляются неизлечимыми.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Lander E.S., Linton L.M., Birren B., Venter J.C. et al.* Initial sequencing and analysis of the human genome // Nature. 2001. Vol. 409. Iss. 6822. P. 860–921.
2. *Venter J.C., Adams M.D., Myers E.W. et al.* The sequence of the human genome // Science. 2001. Vol. 291. Iss. 5507. P. 1304–1351.
3. *Sanger F., Air G.M., Barrell E.G. et al.* Nucleotide sequence of bacteriophage φX174 DNA // Nature. 1977. Vol. 265. Iss. 5596. P. 687–695.
4. *Maxam A., Gilbert W.* A new method for sequencing DNA // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1977. Vol. 74. Iss. (2). P. 560–564.
5. *Vogelstein B., Kinzler K.W.* The multistep nature of cancer // Trends in Genetics. 1993. Vol. 9. Iss. 4. P. 138–141.
6. *Wolff M.S., Weston A.* Breast cancer risk and environmental exposures // Environ. Health Perspect. 1997. Vol. 105. P. 891–896.
7. *Stehelin D., Vannus H.E., Bishop J.M., Vogt P.K.* DNA related to the transforming gene(s) of avian sarcoma viruses is present in normal avian DNA // Nature. 1976. Vol. 260. Iss. 5547. P. 170–173.
8. *Knudson A.G.* Mutation and Cancer: Statistical Study of Retinoblastoma // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1971. Vol. 68. Iss. 4. P. 820–823.
9. *Struewing J.P., Hartge P., Wacholder S. et al.* The risk of cancer associated with specific mutations of BRCA1 and BRCA2 among Ashkenazi Jews // N. Engl. J. Med. 1997. Vol. 336. P. 1401–1408.
10. *Nagy R., Sweet K., Eng C.* Highly penetrant hereditary cancer syndromes // Qncogene. 2004. Vol. 23. P. 6445–6470.
11. *Ecker J.R., Davis R.W.* Inhibition of gene expression in plant cells by expression of antisense RNA // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1986. Vol. 83. Iss. 15. P. 5372–5376.
12. *Napoli C., Lemieux C., Jorgensen R.* Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into Petunia Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans // Plant Cell. 1990. Vol. 2. Iss. 4. P. 279–289.
13. *Romano N., Macino G.* Quelling: transient inactivation of gene expression in Neurospora crassa by transformation with homologous sequences // Mol. Microbiol. 1992. Vol. 6. Iss. 22. P. 3343–3353.
14. *Fire A., Xu S., Montgomery M. et al.* Potent and specific genetic interference by double-slranded RNA in Caenorhabditis elegans // Nature. 1998. Vol. 391. Iss. 6669. P. 806–811.
15. *Lee R.C., Feinbaum R.L., Ambros V.* The C. elegans heterochronic genelin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14 // Cell. 1993. Vol. 75. Iss. (5). P. 843–854.
16. *Lagos-Quintana M., Rauhut R., Lendeckel W., Tuschl T.* Identification of novel genes coding for small expressed RNAs // Science. 2001. Vol. 294. Iss. 5543. P. 853–858.
17. miRBase: the microRNA database. URL: http://www.inirbase.org/
18. Сайт Нобелевского комитета; URL: http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/tnedicine/laureates/2012/
19. *Kulda V., Pesta M., Topolcan O. et al.* Relevance of miR-21 and miR-143 expression in tissue samples of colorectal carcinoma and its liver metastases // Cancer Genet. Cytogenet. 2010. Vol. 200. Iss. 2. P. 154–160.
20. *kaftnesmo K.O., Prestegarden L., Micklem D.R., Lorens J.B.* MicroRNAs in tumorigenesis // Curr. Pharm. Biotechnol. 2007. Vol. 8. Iss. 6. P. 320–325.
21. *Folini M., Gandellini P., Longoni N. et al.* miR-21: an oncomir on strike in prostate cancer // Mol. Cancer. 2010. Vol. 21. Iss. 9. P. 1–12.
22. *Zhang W., Dahlberg J.E., Tarn W.* MicroRNAs in tumorigenesis: a primer // Am. J. Pathol. 2007. Vol. 171. Iss. 3. P. 728–738.
23. *Mitchel P.S., Parkin R.K., Kroh E.M. et al.* Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2008. № 105. P. 10513–10518.
24. *Zhang H.L, Yang L.F., Zhu Y. et al.* Serum *miRNA*-21: elevated levels in patients with metastatic hormone-refractory prostate cancer and potential predictive factor for the efficacy of docetaxel-based chemotherapy // Prostate. 2010a. № 71. P. 326–331.
25. *Moltzath F., Olshen A.B., Baehner L. et al.* Microfluidic-based multiplex qRT-PCR identifies diagnostic and prognostic microRNA signatures in the sera of prostate cancer patients //Cancer Research. 2011. № 71. P. 550–560.
26. *Bryan R.J., Pawlowski T., Catto J.W. et al.* Changes in circulating microRNA levels associated with prostate cancer // British Journal of Cancer. 2012. № 106. P. 768–774.
27. *Brennan K., Garcia-Closas M., Orr N. et al.* Intragenic ATM methylation in peripheral blood DNA as a biomarker of breast cancer risk // Cancer Res. 2012. Vol. 72. Iss. 9. P. 2304–2313.

NOVEL IN THE UNDERSTANDING OF THE CARCINOGENESIS MECHANISMS

Corresponding Member RAS D.G. Matishov, V.A. Tarasov

The paper considers the changes in our understanding of the mechanisms of intracellular processes, ensuring they function in normal and pathological development, which have already taken place in this century in the so-called post-genomic era in biology. These changes are due to a number of discoveries made at the end of the last century, the biological significance of which was appreciated only in the first decade of the 21st century. The discovery of microRNA-dependent silencing of genes and miRNAs, the ability of DNA methylation sites to replicate and inherit, the key role of microRNAs in the regulation of these processes, have led us to the understanding of decisive importance of epigenetic changes in the genome in the process of individual development of an organism, cell adaptation to stresses and progression, and, possibly, initiation of carcinogenesis. The principal difference between the epimutation and canonical mutations is in their reversibility. This gives floor to the exciting prospects of developing basically novel methods of diagnosis and treatment of diseases which are currently considered incurable.

Key words: epigenetic changes in the genome, miRNA, carcinogenesis.

REFERENCES

1. Lander E.S., Linton L.M., Birren B., Venter J. C. [et al.] 2001. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*. 409(6822): 860–921.
2. Venter J.C., Adams M.D., Myers E.W. [et al.] 2001. The sequence of the human genome. *Science*. 291(5507): 1304–1351.
3. Sanger F., Air G.M., Barrell B.G. [et al.] 1977. Nucleotide sequence of bacteriophage φX174 DNA. *Nature*. 265(5596): 687–695.
4. Maxam A., Gilbert W. 1977. A new method for sequencing DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 74(2): 560–564.
5. Vogelstein B., Kinzler K.W. 1993. The multistep nature of cancer. *Trends in Genetics.* 9(4): 138–141.
6. Wolff M.S., Weston A. 1997. Breast cancer risk and environmental exposures. *Environ Health Perspect.* 105: 891–896.
7. Stehelin D., Varmus H.E., Bishop J.M., Vogt P.K. 1976. DNA related to the transforming gene(s) of avian sarcoma viruses is present in normal avian DNA. *Nature*. 260(5547): 170–173.
8. Knudson A.G. 1971. Mutation and Cancer: Statistical Study of Retinoblastoma. *Proc. Natl. Acad. of Sci.* 68(4): 820–823.
9. Struewing J.P., Hartge P., Wacholder S. [et al.] 1997. The risk of cancer associated with specific mutations of BRCA1 and BRCA2 among Ashkenazi Jews. *N. Engl. J. Med.* 336: 1401–1408.
10. Nagy R., Sweet K., Eng C. 2004. Highly penetrant hereditary cancer syndromes. *Oncogene*. 23: 6445–6470.
11. Ecker J.R., Davis R.W. 1986. Inhibition of gene expression in plant cells by expression of antisense RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 83(15): 5372–5376.
12. Napoli C., Lemieux C., Jorgensen R. 1990. Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into Petunia Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans. *Plant Cell*. 2(4): 279–289.
13. Romano N., Macino G. 1992. Quelling: transient inactivation of gene expression in Neurospora crassa by transformation with homologous sequences. *Mol. Microbiol.* 6(22): 3343–3353.
14. Fire A., Xu S., Montgomery M. [et al.] 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in Caenorhabditis elegans. *Nature.* 391(6669): 806–811.
15. Lee R.C., Feinbaum R.L., Ambros V. 1993. The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14. *Cell*. 75(5): 843–854.
16. Lagos-Quintana M., Rauhut R., Lendeckel W., Tuschl T. 2001. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science*. 294(5543): 853–858.
17. miRBase: the microRNA database, http://www.m irbase.org/
18. Nobelprize.org. The Official web site of the Nobelprize. Available at: http://www.nobelprize.org/ nobel_prizes/medicine/laureates/2012/
19. Kulda V., Pesta M., Topolcan O. [et al.] 2010. Relevance of miR-21 and miR-143 expression in tissue samples of colorectal carcinoma and its liver metastases. *Cancer Genet. Cytogenet*. 200(2): 154–160.
20. Skaftnesmo K.O., Prestegarden L., Micklem D.R., Lorens J.B. 2007. MicroRNAs in tumorigenesis. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 8(6): 320–325.
21. Folini M., Gandellini P., Longoni N. [et al.] 2010. miR-21: an oncomir on strike in prostate cancer. *Mol. Cancer.* 21(9): 1–12.
22. Zhang W., Dahlberg J.E., Tam W. 2007. MicroRNAs in tumorigenesis: a primer. *Am. J. Pathol*. 171(3): 728–738.
23. Mitchel P.S., Parkin R.K., Kroh E.M. et al. 2008. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *PNAS*. 105: 10513–10518.

24. Zhang H.L., Yang L.F., Zhu Y. [et al.] 2010. Serum *miRNA*-21: elevated levels in patients with metastatic hormone-refractory prostate cancer and potential predictive factor for the efficacy of docetaxel-based chemotherapy. *Prostate*. 71: 326–331.

25. Moltzath F., Olshen A.B., Baehner L. et al. 2011. Microfluidic-based multiplex qRT-PCR identifies diagnostic and prognostic microRNA signatures in the sera of prostate cancer patients. *Cancer Research*. 71: 550–560.

26. Bryan R.J., Pawlowski T., Catto J.W. et al. 2012. Changes in circulating microRNA levels associated with prostate cancer. *British Journal of Cancer*. 106: 768–774.

27. Brennan K., Garcia-Closas M., Orr N. [et al.] 2012. Intragenic ATM methylation in peripheral blood DNA as a biomarker of breast cancer risk. *Cancer Res.* 72(9): 2304–2313.