

УДК 576.316.24

Регуляция теломеразы в онкогенезе

Д. А. Скворцов¹, М. П. Рубцова¹, М. Э. Зверева¹, Ф. Л. Киселев², О. А. Донцова^{1#}

¹ Химический факультет МГУ имени М. В. Ломоносова, 119992, Москва.

² ГУ РОНЦ имени Н. Н. Блохина РАМН, 115478, Москва.

e-mail: dontsova@genebee.msu.su

РЕФЕРАТ

Теломераза – сложный рибонуклеопротеид, достраивающий в клетках эукариот теломерные концы хромосом, укорачивающиеся из-за недорепликации ДНК. Коровый фермент состоит из белковой каталитической субъединицы (теломеразная обратная транскриптаза, TERT – Telomerase Reverse Transcriptase) и теломеразной РНК (TR – Telomerase RNA), небольшой определенный участок которой служит матрицей для синтеза теломерных повторов. Активность теломеразы не проявляется в соматических клетках и тканях человека за редким исключением. Активация теломеразы в раковых клетках достоверно показана в 80-90 % случаев.

Понимание того, как работает теломераза, и регулирующих ее работу механизмов может быть использовано в онкодиагностике. Сама теломераза и ее регуляторы могут быть важными мишенями антираковой терапии. На активность теломеразы влияют белки, имеющие множество функций в клетке, соответственно, их воздействие не обязательно специфично. Также встречаются случаи, когда регуляторы теломеразы действуют совместно либо несколько регуляторов объединены в каскад.

Целью данного обзора является обобщение и систематизация данных о регуляции теломеразы при онкогенезе.

Ключевые слова: теломераза, теломеразная обратная транскриптаза, теломеразная РНК, регуляция, рак.

Принятые сокращения: 5azadC – 5-аза-2'-дезокситидин, АВ – аденовирусы, HBV – вирус гепатита В, ВПЧ – вирус папилломы человека, ВЭБ – вирус Эпштейна-Барра, нп – нуклеотидная пара, ОВ-мотив – олигонуклеотид/олигосахарид связывающий мотив, ОТ – обратная транскрипция, ПЦР – полимеразная цепная реакция, РНКазы – рибонуклеаза, TERT – белок теломеразной обратной транскриптазы, hTERT – TERT человека, mTERT – TERT мыши, DN-hTERT – доминантно-негативный мутированный hTERT, ERβ – рецептор эстрогена β, HTLV-I – человеческий лимфотрофический вирус 1-го типа, TR – теломеразная РНК, TRAP – протокол амплификации теломерных повторов, ФГА – фитогемагглютинин, HRE – участок ответа на гипоксию, NES – сигнал транспорта из ядра.

ВВЕДЕНИЕ

В 1961 г. Хайфлик и Мурхиад показали, что культура соматических клеток имеет ограниченный период жизни [1]. В 1973 г. Оловников предположил, что укорочение концов хромосом (теломер) определяет возможное число делений клетки [2]. Теломеры защищают геном клетки от дегенерации, участвуют в мейотическом спаривании хромосом и в регуляции транскрипции генов прителомерной области [3]. В клетках, способных размножаться бесконечно (бессмертных), должен существовать механизм, компенсирующий укорочение теломер. В 1985 г. Блекберн и Грейберг открыли фермент, удлиняющий теломеры, – теломеразу [4].

Теломераза – рибонуклеопротеиновый комплекс, состоящий из абсолютно необходимых для активности компонентов: молекулы РНК – TR и теломеразной обратной транскриптазы – TERT [5]; также в состав теломеразы может входить ряд ассоциированных с ними белков. TR является матрицей для TERT при удлинении теломер с помощью теломеразы. Теломераза в клетках человека существует в виде

димера и содержит две субъединицы обратной транскриптазы и две молекулы РНК [6]. В теломеразе человека с hTERT связываются: p23/p90 – шаперон, отвечающий за сборку/конформацию комплекса; 14-3-3, обеспечивающий ядерную локализацию; TP1 с неизвестной функцией. С hTR связываются белки hGAR1, Dyskerin/NAP57, hNHP2, C1/C2, отвечающие за стабильность, созревание и локализацию РНК; La, hStau, вероятно, отвечающие за присоединение к теломерам; L22, участвующий в процессинге ядерной локализации; hNOP10, A1/UP1, TP1 с неизвестными функциями [7], TCAB1, отвечающий за локализацию hTR в тельцах Кахаля и связывание с теломерами [8]. Ферментативная активность теломеразы человека в лизате ретикулоцитов кролика детектируется при добавлении hTR и hTERT [9, 10]. Заметим, что выполнение теломеразой своих функций *in vivo* не всегда совпадает с наличием теломеразной активности, измененной *in vitro*. Например, добавление геммагглютининового эпитопа на С-конец hTERT при сохранении теломеразной активности препятствует удлинению теломер [11].

Детектируемая *in vitro* теломеразная активность появляется в лейкоцитах в G1-фазе (рис. 1) [12]. С другой стороны, *in vivo* теломеры реплицируются во время S-фазы (рис. 1) [13, 14]. В течение большей части клеточного цикла hTR накапливается в тельцах Кахаля при помощи TCAB1 [8], в S-фазе совмещаясь с теломерами в клетках. hTERT также в S-фазе клеточного цикла перемещается на теломеры [15, 16]. Это свидетельствует о существовании регуляции на уровне пространственной локализации активной теломеразы (фермента) и теломеры (субстрата). Не всегда наблюдается корреляция активности теломеразы и длины теломер. Например, при лейкемии зависимость между длиной теломер и активностью теломеразы отсутствует [17].

Активность теломеразы в зависимости от числа делений



Рис. 1. Схема клеточного цикла. Появление активности теломеразы *in vitro* происходит в G1-фазе, а работает она в S-фазе



Рис. 2. Зависимость длины теломер от числа делений в различных типах клеток: эмбриональных клеточных линиях, соматических клетках, трансфицированных hTERT клетках. а – достижение клетками предела Хайфлика, б – кризис, сопровождающийся гибелью клеток и перерождением уцелевших в раковые, в – трансфекция клеток геном hTERT

хорошо описывается двухшаговой гипотезой клеточного старения и обретения бессмертия (иммортализации) – теорией M1/M2 (рис. 2). В эмбриональных клеточных линиях теломераза активна, и длина теломер поддерживается на постоянном уровне. В стволовых клетках активность теломеразы ниже и позволяет лишь частично компенсировать укорочение теломер. В соматических клетках активность теломеразы отсутствует. Укорочение теломер приводит в момент M1 – достижение предела Хайфлика (точка А на рис. 2) – к переходу клеток в состояние сенесценса (старения), которое может быть преодолено инактивацией (удалением) pRB/p16 или p53. Клетки, преодолевшие M1, продолжают делиться и входят в состояние кризиса M2 (точка Б на рис. 2), сопровождающееся массовой клеточной смертью. Уцелевшие клетки перерождаются в раковые. Раковые клетки способны к неограниченному делению и поддержанию длины теломер (как правило, с помощью теломеразы). Если экспрессирующие hTERT соматические клетки трансфицируют геном hTERT (точка В на рис. 2) до момента M2, в них, как и в раковых, происходит удлинение и стабилизация теломер [7].

Активность теломеразы не проявляется в соматических клетках и тканях человека за редким исключением. Показано ее наличие в репродуктивных тканях, а также в быстро обновляющихся тканях, например, в некоторых клетках крови, кишечном эпителии и базальном слое клеток кожи [18], при этом в соматических клетках с активной теломеразой уровень ее активности ниже, чем в раковых [19].

ЧАСТОТА ДЕТЕКЦИИ ТЕЛОМЕРАЗНОЙ АКТИВНОСТИ В РАЗЛИЧНЫХ ОПУХОЛЯХ

В большинстве опухолевых клеток (80–90 %) теломераза активна (табл. 1) и является основным инструментом поддержания длины теломер. Доброкачественные опухоли и другие предраковые поражения представлены как опухолями, в которых теломеразная активность проявляется почти в 100 % случаев, так и опухолями, в которых активность теломеразы не определяется [19-21]. Опухолевые клетки некоторых типов могут использовать альтернативный механизм поддержания длины теломер, основанный на рекомбинации [22]. Хотя при трансфекции геном hTERT клеток с альтернативным механизмом поддержания теломер работают оба механизма, при объединении клеточных линий с разными механизмами в гибридах присутствует теломераза, а признаки альтернативного механизма удлинения теломер пропадают [23]. Следует отметить, что сама по себе теломераза не является онкогеном. Клеточные линии, трансфицированные геном hTERT, долгое время не показывают признаков злокачественной трансформации [24, 25].

Активность теломеразы может появляться вследствие отбора клонов при критическом укорочении теломер [26] (рис. 2, точка Б). Сначала клетки начинают усиленно делиться, при этом у них укорачиваются теломеры, затем выживают те из них, у которых активируется теломераза. В этом случае теломеразная активность может быть маркером опухолевой прогрессии и отрицательного прогноза. Так, при лимфогранулематозе основное увеличение активности теломеразы происходит при переходе от первой

Табл. 1. Частота встречаемости теломеразной активности в различных типах опухолей

Вид опухоли	Частота встречаемости теломеразной активности, %	Число исследованных образцов	[ссылка]
ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫЕ ОПУХОЛИ:			
Мелкоклеточный рак легкого	100	15	[21]
	90	10	[30]
Немелкоклеточный рак легкого	78	125	[21]
	83	68	[31]
	84	32	[30]
Мокрота при раке легкого	67.6	34	[30]
Рак желудка	72	85	[21]
Рак ободочной и прямой кишки	89	138	[21]
Рак поджелудочной железы	95	43	[21]
Рак печени	86	173	[21]
	79	24	[32]
Рак молочной железы	88	339	[21]
	59	44	[33]
Рак шейки матки	100	16	[21]
Рак яичников	91	23	[21]
Рак простаты	90	58	[21]
Рак мочевого пузыря	92	185	[21]
Рак почек	83	115	[21]
Рак Вильяма	100	6	[21]
	95.7	164	[34]
Ретинобластома	50	34	[21]
Нейроэпителиальные опухоли	62	107	[35]
Глиобластома	75	60	[21]
	72	47	[35]
	28	25	[36]
	26	38	[37]
Астроцитомы II стадии	20	15	[35]
Олигодендроглиомы	100	19	[21]
	100	4	[35]
Олигодендроглиома II стадии	14	14	[37]
Анапластическая олигодендроглиома	43	7	[37]
Анапластическая астроцитомы	10	20	[21]
	40	15	[35]
	23	13	[37]
Нейробластома	94	100	[38]
Меланома	86	7	[21]
Плоскоклеточная карцинома	83	18	[21]
Базалиома	95	77	[21]
ГЕМОБЛАСТОЗЫ:			
Лимфома низкой злокачественности	86	14	[21]
Лимфома высокой злокачественности	100	16	[21]
Злокачественная лимфома ЦНС	83	12	[39]
Миелодиспластический синдром	67	6	[21]
Хронический миелолейкоз	71	42	[21]
Хронический миелолейкоз в фазе ускорения	100	21	[21]
Хронический лимфолейкоз ранняя фаза	14	14	[21]
Хронический лимфолейкоз поздняя фаза	57	7	[21]
Острый миелобластный лейкоз	73	64	[21]
Острый лимфобластный лейкоз	80	5	[21]
Лимфогранулематоз (лимфоидное преобладание)	63.6	33	[40]
Лимфогранулематоз (нодулярный склероз)	89.7	39	[40]
Лимфогранулематоз (смешанно-клеточный вариант)	96.1	26	[40]
Лимфогранулематоз (лимфоидное истощение)	100	7	[40]
ДОБРОКАЧЕСТВЕННЫЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ:			
Аденома ободочной и прямой кишки	45	44	[21]
Гепатит/цирроз печени	29	148	[21]
(активность слабее, чем в случае рака печени)	8/24	24/34	[32]
	25/45.9	80/37	[41]
Фиброаденома молочной железы	75	12	[21]
Лейомиома	0	14	[21]
Менингиома	0	25	[36]
Доброкачественное поражение лимфатических узлов	33	15	[21]
Доброкачественное поражение миндалевидной железы	100	23	[21]

ко второй стадии [27]. При другом варианте развития событий теломеразная активность появляется одновременно с другими ведущими к раку нарушениями метаболизма вследствие исходного клеточного поражения. В этом случае активность теломеразы появляется в самом начале заболевания и служит маркером начала онкологических процессов. Например, при раке шейки матки нет зависимости активности теломеразы от стадии рака – теломераза активна уже на первой стадии, а ее активация происходит во время предопухолевых заболеваний [28]. Теломераза может быть исходно активна в исследуемом типе клеток, и эта активность лишь усиливается при переходе к раку, например, при гемобластозе [26]. Также теломераза может быть исходно активна в случае перерождения стволовой клетки [29]. В этом случае теломеразная активность будет обнаруживаться при начале роста опухоли, поскольку метод ее детекции не позволяет увидеть активность из одной клетки на фоне окружающей ткани, но уже небольшой пул теломеразоположительных клеток будет заметен.

К сожалению, в большинстве исследований можно найти информацию лишь о наличии теломеразной активности в определенном типе рака. Механизмы активации теломеразы изучают, как правило, на клеточных линиях, и редко можно сказать, какой механизм и с какой частотой встречается в исследуемом типе рака *in vivo*.

АМПЛИФИКАЦИЯ ГЕНОВ hTR И hTERT

Ген, кодирующий hTR, представлен одной копией, находящейся на хромосоме 3 в положении 3q26.3. Этот участок хромосомы 3 часто амплифицируется, например, в раках шейки матки, легкого и плоскоклеточной карциноме головы и шеи. Число копий гена hTR возрастает в опухолевых клетках по сравнению с нормальными, и, в соответствии с этим, усиливается и экспрессия hTR в раках шейки матки и плоскоклеточной карциноме головы и шеи [42].

Ген hTERT, расположен на хромосоме 5 в положении 5q15.33, в регионе, который тоже часто амплифицируется в ряде раков [42]. Поскольку амплификация теломеразных генов происходит в процессе амплификации хромосом, содержащих эти гены, а не во время специфической амплификации локусов, можно сделать вывод о неспецифичности этого процесса. В случае плоскоклеточных карцином шейки матки активация экспрессии hTERT не связана с амплификацией гена hTERT [43]. С другой стороны, эта амплификация может происходить в результате хромосомной нестабильности и анеуплоидии, возникающих при критическом укорочении теломер.

РЕГУЛЯЦИЯ ТРАНСКРИПЦИИ TERT

Транскриптов hTERT мало или они вовсе не детектируются в большинстве тканей человека, но часто наблюдаются в этих же тканях после неопластической трансформации [44].

СТРУКТУРА ПРОМОТОРА ОБРАТНОЙ ТРАНСКРИПТАЗЫ ТЕЛОМЕРАЗЫ

Промотор hTERT не содержит блоков ТАТА и СААТ, характерных для посадки РНК-полимеразы II, и является GC-богатым. Существуют разные данные о местоположении участка инициации транскрипции. Здесь и далее нумерация нуклеотидов в промоторе будет от А (точка +1 нп (нуклеотидная пара)) в триplete ATG, с которого начинается трансляция. В работе [45] с помощью метода защиты от РНКазы обнаружено несколько защищаемых участков в разных hTERT положительных клеточных линиях, что говорит о возможности наличия нескольких сайтов инициации транскрипции (в области -40-100 нп). Наиболее общим является защищенный участок, которому соответствует положение участка инициации транскрипции в положении -55 нп от начала трансляции. В работе [46], анализируя кэпированную мРНК клеточной линии HeLa, обнаружили сайт старта транскрипции в положении -77 нп. В настоящее время в большинстве работ именно это положение принимается за основное.

Сайты, отвечающие за регуляцию транскрипции hTERT, сосредоточены на участке в 2000 нуклеотидных пар до сайтов инициации трансляции и транскрипции [47, 48]. Наиболее важным для активации является участок от 250-300 нп перед ATG до нескольких десятков нп после [46]. Кроме того, GC-богатый участок промотора формирует CpG-островки рядом с ATG, указывая на возможность участия метилирования в регуляции экспрессии hTERT [7].

Активность промотора связана с расположением на нем различных участков связывания регуляторных

белков, которые не только взаимодействуют с промотором, но и являются посредниками действия других регуляторов. На рис. 3 приведена схема влияния различных эффекторов на промотор hTERT, которые дальше рассмотрены более подробно.

МЕТИЛИРОВАНИЕ ПРОМОТОРА hTERT

В опухолевых клетках профиль метилирования отличается от профиля нормальных клеток. Анализ промотора теломеразы выявил два CpG-островка, один из которых находится в положении -900 нп от стартового кодона ATG [49].

В случае раковых клеточных линий и тканей рака кишечника оказалось, что в них экспрессируется hTERT, и CpG-островки промотора hTERT полностью или частично метилированы [50]. При длительной обработке деметилирующим агентом 5-аза-2'-дезоксцитидином (5azadC) клеточных линий Lan-1, HeLa, Col15, в которых теломераза активна, а промотор hTERT гиперметилирован, показано снижение уровня метилирования промотора hTERT на 95 % и уменьшение уровня экспрессии мРНК hTERT. Активность теломеразы сильно падает после 2-4 пересевов клеток в присутствии 5azadC [51].

Маркеры активного хроматина и экспрессия теломеразы детектируются, когда участок промотора hTERT -73-+227 нп вокруг сайта транскрипции не метилирован [52]. В нормальных клетках гиперметилирование промотора hTERT угнетает активность теломеразы и экспрессию мРНК hTERT, и при их обработке 5azadC теломераза активируется [53]. Анализ метилирования промотора hTERT у пациентов с хроническими В-клеточными лимфоидными лейкозами показал, что при высокой теломеразной активности заметно снижен уровень метилирования [49]. Нет зависимости активности теломеразы от статуса метилирования промотора hTERT для клеточных линий остеосаркомы, образцов тканей раков яичника, шейки матки и нормальных тканей [54, 55].

Такой разброс данных говорит о том, что метилирование ДНК не является критическим фактором регулирования экспрессии теломеразы при раке. Оно происходит одновременно с другими нарушениями системы регуляции промотора hTERT. Кроме того, как метилирование, так и деметилирование могут влиять на трансрегуляторы теломеразы, а не на сам промотор.

МЕТИЛИРОВАНИЕ ГИСТОНОВ ПРОМОТОРА hTERT

Метилирование гистонов, проводимое метилтрансферазами и деметилазами гистонов, играет важную роль в регуляции структуры хроматина и транскрипции. Метилтрансфераза SMYD3, участвующая в онкогенезе, специфично активирует ген теломеразной обратной транскриптазы. Эта метилтрансфераза занимает свой участок связывания на промоторе hTERT и триметилирует гистон H3-K4. Подавление SMYD3 в раковых клетках упраздняет триметилирование H3-K4, ослабляет связывание с промотором транс-активаторов Sp1 и с-Мус и приводит к пониженному ацетилированию гистона H3 в промоторе hTERT, что приводит к сокращению количества мРНК hTERT и снижению теломеразной активности [56].

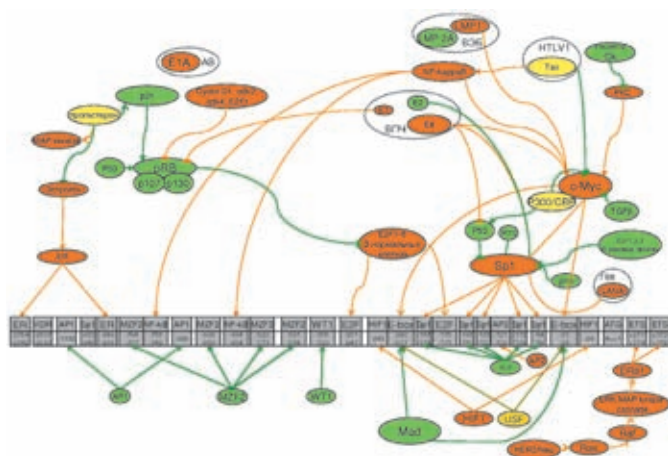


Рис. 3. Схема влияния трансрегуляторов промотора hTERT. Зеленым обозначены ингибиторы промотора hTERT, оранжевым – активаторы, желтым – эффекторы двойного действия. Стрелкой → обозначена активация следующего участника каскада, стрелкой ⊥ – ингибирование следующего участника каскада, без стрелки – совместное действие

АЦЕТИЛИРОВАНИЕ И ДЕАЦЕТИЛИРОВАНИЕ ГИСТОНОВ ПРОМОТОРА hTERT

Ацетилтрансферазы GCN5 и Tip60 ацетилируют гистоны H3 и H4, что приводит к активации транскрипции hTERT. Эти же ацетилтрансферазы ацетилируют Мус, что приводит к уменьшению его деградации [57], и другие белки, участвующие в транскрипции генов, что может опосредованно регулировать промотор hTERT. Ацетилтрансфераза p300 и сопутствующий СВР – транскрипционные коактиваторы, которые взаимодействуют с большим количеством сиквенс-специфических транскрипционных факторов, в т.ч. являются коактиваторами онкосупрессора p53 [58]. p300 является коактиватором транскрипции hTERT, который приносится на промотор белком с-Мус. Хотя p300 и СВР могут стабилизировать Мус независимо от ацетилирования, проводимое p300 ацетилирование при этом снижает уровень связывания Мус с промотором. Таким образом, p300 может участвовать и в активации, и в ингибировании промотора hTERT. Комплекс Мус/Мах по-разному ацетируется p300 и GCN5 и не ацетируется Tip60 *in vitro*, что говорит о различных механизмах действия этих ацетилтрансфераз [59].

Деацетилирование гистонов приводит к снижению экспрессии hTERT [60, 61]. Суперэкспрессия деацетилаз гистонов (HDAC1) приводит к подавлению активности промотора hTERT. HDAC1 связывается с промотором теломеразы, угнетает теломеразную активность и взаимодействует с Sp1 [62]. Деацетилазы гистонов могут взаимодействовать с промотором hTERT с помощью белка Mad1, связывающегося с E-блоками [60, 62, 63]. Ингибирование деацетилирования гистонов Трихостатином А (TSA) приводит к активации экспрессии hTERT, этот эффект зависит от Sp1, но не от с-Мус. При суперэкспрессии Sp1 эффект TSA возрастает, а при мутациях в участках связывания Sp1 (но не с-Мус) аннулируется [63]. Ингибирование деацетилирования гистонов приводит к увеличению экспрессии и активности теломеразы в нормальных, но не в раковых клетках (клеточные линии рака легкого) с уже активной теломеразой [63, 64]. Можно предположить, что в случае рака деацетилирование гистонов уже выключено.

КАСКАД МАРК

Сигнальный каскад митоген-активируемой протеинкиназы МАРК, эффектора внеклеточных сигналов роста и сигналов стресса, может регулировать транскрипционную активность многих промоторов за счет прямого фосфорилирования Sp1 или по иным механизмам. Сигнальный путь МАРК важен для регуляции транскрипции hTERT через ряд эффекторов, связывающихся с участками в его основном промоторе, включая транскрипционные факторы с-Мус, AP-1 и Ets [42]. Подавление каскада МАРК приводит к ослаблению фосфорилирования рецептора эстрогена β (ER β) и уменьшению связывания ER β с промотором hTERT с соответствующим снижением уровня экспрессии hTERT [65].

ОНКОГЕН МУС И ЕГО АНТИПОД МАД

В положениях -242 и -34 нп гена hTERT находятся E-блоки, с которыми взаимодействует онкопротеин с-Мус, являющийся одним из основных активаторов транскрипции

hTERT [48, 66]. Этот белок является также транскрипционным активатором целого ряда промоторов других генов и ингибитором транскрипции генов, участвующих в остановке роста клеток [67].

Наблюдение воздействия антисенс-олигонуклеотидов с-Мус, подавляющих его экспрессию, на 3 клеточные линии лейкемии выявило падение в этом случае и теломеразной активности [68]. с-Мус индуцирует транскрипцию hTERT и теломеразную активность в нормальных клетках эпителия молочных желез и первичных фибробластах человека [69]. Высокий уровень с-Мус приводит к активации промотора hTERT, а при удалении E-блоков этот эффект теряется [66, 67, 70]. Нарушение связывания с-Мус имеет разный эффект в различных клеточных линиях. Так, введение мутаций в E-блок, находящийся в положении -242 нп, в клетках линий С33А и ME180 приводит к падению активности промотора hTERT на 70 %, а в клетках линии SiHa такие мутации имеют незначительный эффект. При введении мутаций в E-блок, находящийся в положении -34 нп, происходит снижение активности промотора hTERT на 60 % в клетках ME180, тогда как в клетках С33А и SiHa активность промотора hTERT меняется незначительно [71]. Индуцируемая с-Мус активация промотора hTERT происходит быстро и независимо от клеточной пролиферации и белкового синтеза [67, 70]. Гетеродимеры с-Мус/Мах взаимодействуют непосредственно с промотором hTERT [61, 66].

Возможно, что другим активатором теломеразы является белок N-Мус. Амплификация этого гена в нейробластоме наблюдается одновременно с активацией промотора hTERT [44]. Показано связывание N-Мус с промотором hTERT [72].

Белок Mad является антиподом с-Мус и ослабляет активность промотора hTERT, связываясь с E-блоками в виде гетеродимера Mad/Мах. Угнетение промотора hTERT белком Mad требует наличия активных деацетилаз гистонов. При этом ингибирование деацетилаз гистонов с помощью TSA не зависит от наличия E-блоков в промоторе hTERT [60].

ТРАНСКРИПЦИОННЫЕ ФАКТОРЫ SP1 И SP3

Белок Sp1 регулирует ряд специфических промоторов, инициирующих транскрипцию у позвоночных РНК-полимеразой II. Sp1 связывается с последовательностью GGGGCGGGGC и сходными с ней последовательностями, называемыми GC-боксами. Он регулирует промоторы как hTERT, так и hTR.

В промоторе hTERT находится серия участков связывания Sp1 необходимых для активности промотора [46-48, 71, 73]. Подобные кластеры часто встречаются и в других, не содержащих ТАТА-боксов, промоторах и необходимы для их полной активации [74]. Известно 5 участков связывания Sp1 в основном промоторе между E-блоками [46]. 2 участка связывания Sp1 совпадают у человека и мыши [67]. В регуляции, судя по активным участкам промотора, наверняка принимают участие сайты Sp1, находящиеся между E-блоками, внесение мутаций в которые приводит к падению активности промотора в различной степени, в зависимости от мутируемого сайта и клеточной линии [71]. В случае выключения всех 5 участков связывания про-

исходит снижение активности промотора hTERT на 90 %, т.е. Sp1 абсолютно необходим для его активности [60, 71]. Интересно, что если при наличии участков связывания Sp1 введение с-Мус активирует промотор hTERT, то когда их нет, активация промотора hTERT белком с-Мус незначительна [71]. Вероятно, в регуляции участвуют два мало исследованных участка связывания Sp1, находящиеся в районе -320-350 нп от сайта трансляции [47, 48] и, возможно, два предполагаемых участка в районе -800-1000 нп [47]. Маловероятно, чтобы расположенные далее от сайта начала транскрипции участки связывания Sp1 [47] принимали участие в регуляции транскрипции hTERT.

Другим повсеместно экспрессируемым белком семейства Sp является белок Sp3, который часто выступает конкурентным ингибитором Sp1 [75]. Изменение соотношения этих двух белков в пользу Sp3 приводит к ингибированию транскрипции hTERT [76].

И Sp1 и Sp3 также требуются для репрессии промотора hTERT деацетилазами гистонов, вероятно, связывая их с промотором hTERT [77]. Кроме вышеизложенного, Sp1 является посредником целого ряда как активаторов, так и ингибиторов транскрипции hTERT (рис. 3).

ЯДЕРНЫЙ ФАКТОР NF-kB

NF-kB контролирует экспрессию и функции ряда генов, участвующих в развитии рака [78], в т.ч. с-Мус, являющегося трансактиватором теломеразы. Когда белок Tax человеческого лимфотрофического вируса 1-го типа (HTLV-I, Human T-lymphotropic virus I) активирует NF-kB, происходит последовательное повышение активности промоторов с-Мус и hTERT [79]. Иммунопреципитация хроматина показала усиление связывания с-Мус и Sp1 с промотором hTERT при его активации NF-kB [80].

Экспрессия генов NF-kB и hTERT происходит одновременно и увеличивается на ранних стадиях появления рака желудка [81]. Одновременный синтез с hTERT и наличие потенциальных сайтов связывания NF-kB в промоторе hTERT (участки -758-749 нп, -664-654 нп) позволяют предположить, что NF-kB участвует в активации теломеразы [82]. Активация промотора hTERT в результате связывания с ним NF-kB показана у мышей [82].

NF-kB (p65 субъединица) может взаимодействовать с деацетилазами гистонов (HDAC1), за счет этого участвуя в отрицательной регуляции экспрессии генов [83]. Деацетилазы гистонов ингибируют промотор hTERT, связываясь с ним с помощью Sp1. NF-kB в случае его связывания с промотором может использоваться для связывания HDAC1.

ТРАНСКРИПЦИОННЫЕ ФАКТОРЫ AP1 И AP2

Транскрипционный фактор AP1 (activator protein 1) участвует в процессах клеточной пролиферации, дифференцировки, канцерогенеза и апоптоза и экспрессируется как в раковых, так и в нормальных клетках. Он является гетеродимером Jun (с-Jun, JunB или JunD) и Fos (с-Fos, FosB, Fra-1 или Fra2) [84].

Суперэкспрессия AP-1 приводит к подавлению транскрипции hTERT в клеточной линии HeLa. Комбинация с-Fos и с-Jun или с-Fos и JunD уменьшает активность промотора hTERT на 80 % в опытах с кратковременной экспрессией. Участок промотора hTERT между нуклео-

тидами -2077 и -455 нп принимает в этом участие. JunD и с-Jun связываются с обоими предполагаемыми участками связывания AP-1 в положениях -1732 и -795 нп. Внесение мутаций в участки связывания AP-1 на промоторе hTERT нивелирует вызываемое AP-1 ингибирование [84]. При амелобластоме обнаружена корреляция между экспрессией с-Fos, одной из субъединиц AP-1, и экспрессией мРНК hTERT [85].

Промотор hTERT также содержит потенциальный участок связывания AP-2 [48, 86]. AP-2 связывается с участком -121-129 промотора hTERT. В клетках линии рабдомиосаркомы мутация в участке связывания AP-2 приводит к уменьшению активности промотора. При этом суперэкспрессия AP-2 не приводит к увеличению активности промотора hTERT [86].

ОНКОСУПРЕССОРЫ P53 И P73

Белок p53 регулирует множество генов, участвующих в контроле клеточного цикла и онкогенезе (p21, MDM-2, Вах, с-Fos/Jun, pRB, 14-3-3σ, Bcl2 и ряд других) [87-89]. p53 противодействует онкогенезу, включая механизмы ареста клеточного цикла и апоптоза в ответ на различные поражения клетки [87]. Этот белок неактивен более чем в половине типов человеческих опухолей [90]. Восстановление функционального p53 в раке шейки матки, лимфоме Беркитта, раках молочной и поджелудочной желез приводит к ингибированию теломеразной активности за счет подавления экспрессии hTERT [91-94]. Этот эффект проявляется в течение нескольких часов после индукции p53, до того как происходит нарушение клеточного цикла и начинается апоптоз.

Мутации в доменах p53, ответственных за связывание деацетилаз гистонов и корепрессора Sin3A, не влияют

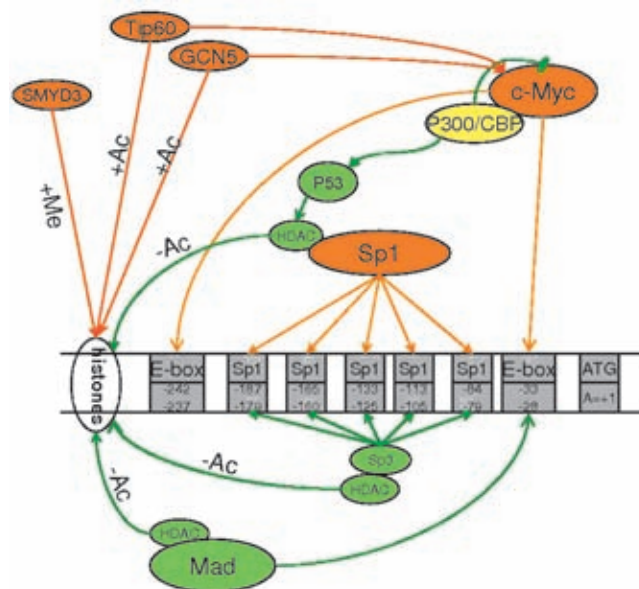


Рис. 4. Метилирование (+Me), ацетилирование (+Ac) и деацетилирование (-Ac) гистонов промотора hTERT. Зеленым обозначены ингибиторы промотора hTERT, оранжевым – активаторы, желтым – эффекторы двойного действия. Стрелкой → обозначена активация следующего участника каскада, стрелкой ⊣ – ингибирование следующего участника каскада

на угнетение hTERT, хотя деацетилазы участвуют в ингибировании транскрипции hTERT белком p53. Мутации p53 в домене связывания с ДНК, домене олигомеризации или домене активации транскрипции приводит к деактивации p53 по отношению к теломеразе. При этом p53 не связывается *in vivo* с промотором hTERT, т.е. его действие на промотор не прямое. p53 может использовать в качестве посредников белки p21, E2F и белки группы pRB [95].

Для проявления ингибирования p53 необходим Sp1 [92, 94]. Мутации в участках связывания Sp1 ликвидируют подавление активности промотора hTERT с помощью p53 [92]. Эксперименты в клетках *Drosophila* Schneider SL2 показали, что активация промотора hTERT, зависящая от эктопической экспрессии Sp1, аннулируется p53 дикого типа. p53 взаимодействует с Sp1 и предотвращает его связывание с промотором hTERT *in vitro* [94]. p53, возможно, использует в качестве посредника белок p21 [95], хотя в аналогичных более ранних экспериментах обнаружено, что p21 не является посредником в действии p53 на теломеразу [94].

Белок p73 проявляет онкосупрессорные функции, подобно p53. Изучение не вырабатывающих p53 клеток показало, что суперэкспрессия С-концевых изоформ p73 (α, β, γ, δ) приводит к уменьшению активности промотора hTERT. Угнетение экспрессии hTERT происходит при посредничестве эндогенного p73 после активации E2F1 в клетках. Мутации в участках связывания Sp1 в основной части промотора hTERT нивелируют репрессию промотора hTERT с помощью p73, свидетельствуя об участии Sp1 в этом процессе в качестве посредника. Кроме того, p73 связывается с Sp1, что подтверждает участие Sp1 в p73-зависимом угнетении экспрессии hTERT [96].

БЕЛКИ pRB, E2F, p21 И p16

Белки E2F могут как угнетать, так и активировать онкотрансформацию на модельных системах [97]. Суперэкспрессия E2F-3 коррелирует с худшим прогнозом в раках простаты, яичников, немелкоклеточного рака легкого, высокий уровень E2F-1 – в раках легкого, молочной и поджелудочной желез. При этом пониженная экспрессия E2F-1 наблюдается при более агрессивном течении болезни в раках прямой кишки и мочевого пузыря. Также E2F-1, E2F-2 и E2F-3 регулируются белком pRB, тогда как E2F-4 и E2F-5 в основном регулируются белками p107 и p130. E2F-1, E2F-2 и E2F-3 могут связывать Sp1, а ни E2F-4, ни E2F-5 с ним не взаимодействуют [98].

Белок E2F-1 связывается с промотором теломеразы в двух специфичных участках (в районах -251 и -175 нп). Кроме того, на участке -67-61 нп присутствует неклассический участок связывания E2F-1 [99]. E2F-1 снижает экспрессию мРНК hTERT и активность теломеразы в клетках линий плоскоклеточной карциномы [99, 100]. Эктопическая экспрессия E2F-1, E2F-2 и E2F-3 уменьшает активность промотора теломеразной обратной транскриптазы в клетках линий HeLa, U2OS, 273 при посредничестве Sp1, а E2F-4 и E2F-5 не угнетают теломеразу. В то же время в нетрансформированных hTERT клетках активация эндогенной теломеразы наблюдается при воздействии E2F-1, 2, 3, 4, 5 факторов [98].

Иные результаты получены в работе [101] на клетках линии плоскоклеточной карциномы. Обнаружено, что ак-

тивность промотора hTERT и активность теломеразы снижает только суперэкспрессия pRB, а суперэкспрессия E2F-1 восстанавливает активность промотора hTERT. При исследовании глиобластомы обнаружена корреляция в экспрессии E2F1 и hTERT, пациенты с низким уровнем экспрессии E2F-1 имели гораздо более благоприятный прогноз [102]. Эктопическая экспрессия экзогенного E2F-1 увеличивает активность промотора hTERT в клеточных линиях Saos-2, HeLa и U-251 MG [102]. Разброс данных может быть связан с гетерогенностью клеточных линий (та же линия HeLa, десятилетиями культивируемая в различных лабораториях, может значительно различаться в разных источниках). Второй причиной может быть не только критичность для активации или ингибирования промотора hTERT белками E2F их наличия, но и их посттрансляционные модификации и модификации pRB, участвующего в этом каскаде.

E2F-1, вероятно, является одним из посредников p53. Мутации неканонического участка связывания E2F-1 и суперэкспрессия мутанта E2F-1, способного связываться с ДНК, но с отсутствующими доменами трансактивации и связывания pRB, приводят к полному нивелированию влияния p53. Такой же эффект при угнетении белков pRB, p107 и p130 [95].

Суперэкспрессия p21 и pRB полностью подавляет экспрессию hTERT и останавливает клеточный цикл в клетках линии U-251 MG [102]. Появление в клетках белка p21, ингибитора циклин-зависимых киназ, приводит к накоплению гиперфосфорилированной активной формы pRB, p130, p107. Эти белки связываются с белками семейства E2F, переводя их из активаторов транскрипции в репрессоры [103]. Восстановление экспрессии pRB в pRB- и p53-негативных раковых клетках приводит к угнетению теломеразной активности и остановке клеточного цикла [104]. Для восстановления подавленной pRB теломеразной активности достаточно суперэкспрессии циклин-зависимых киназ cdk2 или cdk4, или циклина D1, или E2F-1. Для функционирования pRB как ингибитора промотора hTERT критично фосфорилирование pRB [101]. Ингибирующее действие pRB может объясняться связыванием с E2F-1 и дальнейшим связыванием с промотором hTERT [101], в т.ч. с привнесением дополнительных ингибиторов, например, деацетилаз гистонов. Также pRB может нарушать связывание E2F-1 с промотором hTERT. pRB и E2F-1 могут регулировать экспрессию и независимо друг от друга.

Белок-онкосупрессор p16 участвует в регуляции системы pRB/E2F. Его экспрессия заметно снижает уровень теломеразной активности в клеточных линиях глиомы. p16 ингибирует связывание Sp1 с его участками связывания в промоторе [105]. В работе [100] p16 ингибирует теломеразу в клетках линий плоскоклеточного рака головы и шеи незначительно, а в работе [101] активность теломеразы в клетках линии SSC25, трансфицированных экспрессирующим p16 вектором, пропадает практически полностью.

Bcl2

Bcl2 – один из факторов апоптоза [106]. Суперэкспрессия Bcl2 в человеческих раковых клеточных линиях с низким эндогенным уровнем экспрессии этого белка сопровождается

ся возрастанием уровня теломеразной активности. При выключении экспрессии Bcl2 и ее последующей активации в линии CTLL-2 активность теломеразы, соответственно, обратимо понижается и повышается [107]. При исследовании серии образцов рака молочной железы не обнаружено корреляции между экспрессией Bcl2 и теломеразной активностью [108]. Также при подавлении экспрессии Bcl2 в клеточной линии лейкемии HL-60 не наблюдали изменений в экспрессии мРНК hTERT [109].

Вероятно, регуляция экспрессии hTERT белком Bcl2 не используется или используется редко при развитии природных онкогенных процессов, а найденная активация экспрессии hTERT белком Bcl2 является не прямой. Другое объяснение – этот процесс тканеспецифичен.

ОНКОСУПРЕССОР WT1

В подавлении теломеразной активности участвует онко-супрессор WT1 [110]. В промоторе hTERT в положении 352 нп находится участок связывания WT1, мутации которого могут увеличивать активность промотора hTERT (увеличивают в клеточной линии 293, но не в клеточной линии HeLa). Суперэкспрессия WT1 подавляет экспрессию мРНК hTERT и теломеразную активность в клетках 293 [110]. Поскольку ген WT1 экспрессируется в определенных типах клеток при дифференцировке (почки, половые железы, селезенка) [111], роль WT1 в подавлении теломеразы, вероятно, тканеспецифична.

МИЕЛОИДНЫЙ КЛЕТОЧНО-СПЕЦИФИЧНЫЙ БЕЛОК MZF-2

В промоторе hTERT находится 4 участка вероятного связывания транскрипционного фактора MZF-2 в положениях -687, -619, -543 и -514. Они отвечают за угнетение активности промотора hTERT, и MZF-2 специфически связывается с этими участками. Суперэкспрессия MZF-2 подавляет активность промотора hTERT [112].

MZF-2 экспрессируется в раковых теломераза-положительных клеточных линиях, так что, скорее всего, он играет не основную роль в ингибировании теломеразы [112].

РЕГУЛЯТОРНЫЕ БЕЛКИ ГРУППЫ USF

Промотор hTERT содержит E-блоки, с которыми могут связываться не только димеры Мус/Мах и Mad/Мах, но и регуляторные факторы USF.

В модельной системе с использованием репортерной конструкции экспрессия USF1 или USF2 ингибирует активность промотора. Эти белки не взаимодействуют с с-Мус или Mad и не влияют на их количество в клетке, а связываются напрямую с E-блоками в промоторе hTERT. Анализ клинических препаратов нормальных и раковых образцов ротовой полости показал, что уровни экспрессии USF1 и USF2 ниже в раковых образцах, а экспрессия hTERT и теломеразная активность в них повышены [113].

По другим данным, USF1 и USF2 в виде гетеродимера взаимодействуют с обоими участками связывания в промоторе hTERT и не влияют или подавляют транскрипцию hTERT в hTERT-негативных соматических клетках. В клетках, экспрессирующих hTERT, эти белки активируют транскрипцию, участвуя в появлении и поддержании клеточного бессмертия [114].

ТРАНСКРИПЦИОННЫЕ ФАКТОРЫ ETS

Белки ETS – это семейство транскрипционных факторов, в состав которых входит консервативный ДНК-связывающий домен, специфически взаимодействующий с последовательностями GGA(A/T).

MAP-киназы могут фосфорилировать белки ETS1 и ETS2 после активации фактором роста эпидермиса (EGF) и его гомологом HER2/Neu. Фосфорилированная форма ETS активна в транскрипции. Культивирование раковых клеток A-431, ME180 и MCF-7 с EGF приводит к усилению промотора hTERT. Влияние EGF нивелируется при добавлении ингибитора MAP-киназ или удалении двух предполагаемых смежных участков связывания факторов ETS с промотором в районе от -22 до -14 нп. EGF может приводить к фосфорилированию с-Мус, в результате чего последний активирует транскрипцию, но мутации участков связывания с-Мус в промоторе hTERT не влияют на способность EGF активировать транскрипцию [115]. ETS взаимодействует с промотором hTERT ДНК в положении -36 нп, активируя, а в -293 нп – ингибируя экспрессию hTERT, образуя комплекс Ets-Id2-ДНК (Id – семейство белков-регуляторов клеточного роста и ингибиторов дифференцировки) [116]. Суперэкспрессия ETS1 и ETS2 приводит к уменьшению, а суперэкспрессия Id2 – к возрастанию теломеразной активности в клетках линии K562 [117].

Онкопротеин HER2/Neu активирует транскрипцию hTERT, используя в качестве посредника транскрипционный фактор ER81 из семейства ETS. Экспрессия только ER81 или HER2/Neu в клеточной линии VJ не стимулирует экспрессию мРНК hTERT. Одновременная экспрессия этих генов индуцирует транскрипцию мРНК hTERT и активность теломеразы. В модельной системе экспрессия ER81 и HER2/Neu увеличивает активность промотора в 3 и 9 раз соответственно, а их совместная экспрессия – в 37 раз (в клеточной линии 293T). Найдено 5 возможных участков связывания, и для двух из них (в положениях +211-+214 нп и +313-+316 нп) доказана возможность связывания с ER81. Мутации только этих двух участков приводят к кооперативному уменьшению активации промотора hTERT с помощью ER81 и HER2/Neu [118]. ERK MAP киназы являются посредниками между HER2/Neu и ER81. Также показано, что Ras и Raf, являющиеся регуляторами ERK MAP киназ, стимулируют транскрипцию hTERT [118].

Два других белка группы ETS того же подсемейства, что и ER81 – PEA3 и ERM – также синергично с HER2/Neu активируют промотор hTERT, хотя и в меньшей степени, чем ER81. Напротив, 4 транскрипционных фактора группы ETS, принадлежащие к другим подсемействам (Elk1, Sap1a, Elf1 и ER71), практически не активируют промотор hTERT [118].

СИГНАЛЬНЫЙ ПУТЬ РЕЦЕПТОРА СК

Нарушение сигнального пути специфичного к холестерину рецептора Ск обнаружено у больных лейкемией, в клеточных линиях лейкемии и в раках центральной нервной системы.

Активированный рецептор Ск понижает экспрессию мРНК hTERT, ингибируя протеинкиназу С. Протеинкиназа С активирует транскрипцию PPAR γ (peroxisome proliferated receptor γ), который ингибирует экспрессию с-Мус

и hTERT, снижая активность теломеразы. Также PPAR γ может взаимодействовать с транскрипционным фактором Sp1, являющимся активатором транскрипции hTERT. Кроме того, PPAR γ является антагонистом NF-kB, также являющегося активатором транскрипции hTERT [119].

СТЕРОИДНЫЕ ГОРМОНЫ

Во многих случаях вероятность онкогенеза повышается в результате нарушений регуляции экспрессии генов с участием гормонов. Ряд гормонов, участвующих в онкогенезе, может влиять на экспрессию hTERT.

ЭСТРОГЕН

Эстроген (17 β -эстрадиол) активирует транскрипцию hTERT в гормон-чувствительных тканях. При обработке клеток рака молочной железы или нормальных клеток эпителия яичников эстрогеном уже через несколько часов в них увеличивается уровень мРНК hTERT и активность теломеразы [120, 121]. Анализ промотора hTERT выявил 2 участка связывания рецепторов эстрогена [122]. Участок связывания рецептора эстрогена в положении 2754 нп под действием гормона усиливает активность промотора в 5 раз. При удалении этого участка активация промотора hTERT эстрогеном уменьшается на 70 %. Второй участок, в положении 949 нп, возможно, работает в кооперации с Sp1 сайтом, который примыкает к нему [123]. С помощью футпринтинга показана защита участка -949 нп в присутствии эстрогена. Мутации этого участка сильно снижают активацию промотора hTERT эстрогеном в репортерной конструкции [121]. В другой работе найдено связывание рецептора эстрогена только с участком -2754 нп, но не с -949 нп и обнаружено, что удаление участка -949 нп из промотора hTERT не влияет на активность промотора [120]. С промотором hTERT связываются рецепторы эстрогена α и β . Низкая теломеразная активность в раке молочной железы коррелирует с отсутствием рецептора эстрогена β [33]. Активация промотора hTERT в клеточной линии NIH $_3$ T $_3$ зависит от наличия α рецептора эстрогена, но не β [121].

При регуляции эстрогеном реализуется схема многоуровневой активации теломеразы. Эстроген активирует теломеразу не только как непосредственный регулятор, но и за счет индукции другого активатора промотора hTERT – с-Мус [120].

Эстроген также активирует экспрессию hTERT через каскад PI3K/Akt/NF-kB. Эстроген также индуцирует фосфорилирование hTERT, связывание белков 14-3-3 и NF-kB с hTERT и накопление hTERT в ядре при посредничестве Akt-киназы [124].

АНДРОГЕНЫ

Нормальные ткани простаты и клеточные линии эпителия, как правило, не обладают теломеразной активностью в присутствии андрогенов, а их отсутствие вызывает активацию теломеразы в нормальных тканях простаты у крыс и не дает заметных изменений активности теломеразы в тканях сердца, почек, печени, легких [125]. В то же время большинство раков простаты имеют явно выраженную теломеразную активность при нормальном уровне андрогенов. Теломеразная активность в клеточных линиях рака простаты угнетается, когда андрогены отсутствуют [126].

Окрашивание антителами показало значительное угнетение экспрессии теломеразы в серии клинических образцов рака простаты без андрогенов [127].

В клеточных линиях раков молочной железы и матки прогестерон увеличивает количество мРНК теломеразной обратной транскриптазы уже через 3 ч после начала инкубации. Через 12 ч ее количество достигает пика и начинает уменьшаться, а через 48 ч прогестерон противодействует эстрогену и ингибирует эстроген-индуцированную экспрессию мРНК hTERT. Активирующий эффект прогестерона осуществляется через каскад MAP киназы, а ингибирование при участии p21 [128]. Комбинация эстрогена и прогестерона (моделирование понижения риска рака молочной железы при беременности) вызывает некоторое угнетение активности теломеразы и увеличение экспрессии ее ингибиторов p53 и p21 в клеточной линии эпителия молочной железы 76N TERT [129].

При росте нормальных и андроген-независимых клеточных линий рака простаты в присутствии дигидротестостерона нет изменения теломеразной активности. В случае клеток андроген-зависимой раковой клеточной линии простаты LNCaP отсутствие андрогена в среде снижает теломеразную активность. Дигидротестостерон активирует теломеразную активность в G1-фазе клеточного цикла. В то же время не происходит усиление активности промотора в опытах с репортерными конструкциями [130, 131]. Действие андрогена – не прямое, что подтверждается отсутствием элементов ответа на андроген в промоторе hTERT [126].

ВИРУСНАЯ РЕГУЛЯЦИЯ ЭКСПРЕССИИ hTERT

ВИРУС ПАПИЛЛОМЫ ЧЕЛОВЕКА

Вирусы папилломы человека (ВПЧ) делят на 3 группы (неонкогенные, низкого и высокого риска) по вероятности неопластической трансформации зараженных клеток. Белки E6 и E7 ВПЧ группы высокого риска участвуют в онкогенезе, инактивируя раковые супрессоры p53 (E6 совместно с E6AP убиквитин белковой лигазой), pRB и ассоциированные с pRB белки p130 и p107 (E7) и еще ряд белков [132].

При трансфекции теломеразы-негативных клеток (первичных кератиноцитов) генами E6 и E7 теломеразу активирует только E6, но не E7 [133, 134]. В случае трансфекции клеток обоими генами (E6 + E7) данные противоречивы: активность теломеразы может быть как при трансфекции только геном E6 [134], несколько ниже [133] или несколько выше [73]. В клеточной линии рака шейки матки C33A (с активной теломеразой, но без ВПЧ) экспрессия E6 активирует экспрессию hTERT в 3 раза, E7 в 1.5 раза [73]. В линии клеток эпителия молочной железы E6 активирует теломеразу практически сразу, а E7 ускоряет процесс появления в популяции теломеразной активности постепенно (через 20–25 пересевов при экспрессии E7 обнаруживается высокая активность теломеразы) [135]. В целом, E6 является прямым активатором теломеразы, а возможная активация теломеразы белком E7 – опосредованный и слабый эффект.

E6 активирует транскрипцию теломеразы, используя участок промотора от -260 нп до сайта инициации трансляции (-15–266 нп [134], -258 нп [73]), на котором расположены

2 участка связывания с-Мус, при удалении каждого из которых происходит падение активности на 60 % [134]. Е6 соосаждается с с-Мус при иммунопреципитации [136]. Изменение уровня экспрессии с-Мус при трансфекции клеток геном Е6 не обнаружено. При суперэкспрессии гена, кодирующего Мах (белок-антагонист, конкурирующий с Мус), происходит подавление экспрессии hTERT, вызванное Е6 [134]. По данным других авторов, введение мутаций в оба участка связывания с-Мус дает лишь незначительное уменьшение активности промотора. В то же время мутации в сайтах связывания Sp1 приводят к снижению индуцируемой Е6 активности промотора до 50 %. Мутации же участков связывания с-Мус и Sp1 одновременно приводят к практически полному исчезновению активации транскрипции теломеразы белком Е6 [73].

В кератиноцитах и клетках эпителия молочной железы сильным активирующим теломеразу действием обладает Е6 у ВПЧ группы высокого онкологического риска (ВПЧ 16, ВПЧ 18, ВПЧ 31 и ВПЧ 54), а в случае ВПЧ группы низкого риска (ВПЧ 11, ВПЧ 6) активация транскрипции hTERT невелика [73]. Белок Е6 вирусов папилломы только группы высокого риска связывается с минимальным промотором hTERT (-300/+1 нп) [136]. Активация теломеразы белком Е6 является специфичной к типу клеток. Трансфекция клеток геном Е6, приводящая в случае клеток эпителия шейки матки к активации теломеразы, при использовании фибробластов крайней плотности [137] или клеток IMR90 [69] не дает аналогичного эффекта.

Белок Е2 ВПЧ способен угнетать промотор hTERT. Этот белок может связываться с промотором hTERT. Для ингибирования промотора важно его взаимодействие с Sp1, участки связывания которого находятся между Е-блоками. Е2 способен ингибировать рост ВПЧ-инфицированных клеток и приводить к апоптозу клетки HeLa [138].

ВИРУС ГЕПАТИТА В

Белок Х вируса гепатита В (HBV) – транс-активатор, мишенями которого являются гены с-Мус, AP1, AP2, NF-kB [19], в свою очередь являющиеся активаторами теломеразы.

Частота встречаемости теломеразной активности увеличивается при переходе от нормальной ткани к раку: в 79 % раков, 24 % цирроза и 8 % хронического гепатита [32]; в 85.2 % раков, 45.9 % цирроза печени, 25 % хронического гепатита и 15.7 % нормальных тканей [41].

При трансфекции клеточных линий геном белка Х HBV происходит увеличение количества мРНК hTERT (клеточные линии гепатокарциномы и холангиокарциномы) [139]. С помощью Вестерн-блот-анализа обнаружено, что количество теломеразной обратной транскриптазы возрастает в клеточной линии гепатомы при суперэкспрессии белка Х HBV [140].

Одновременно с hTERT обнаружено небольшое возрастание количества с-Мус при суперэкспрессии белка Х в клеточной линии гепатомы [140]. Поскольку с-Мус активируется белком Х и активирует экспрессию hTERT, возможно, он является одним из посредников в активации теломеразы при заражении HBV. С другой стороны, связи экспрессии мРНК hTERT с уровнем с-Мус не обнаружено в клинических образцах рака печени методом гибридизации *in situ*.

В участках связывания с-Мус с промотором hTERT в клинических образцах гепатоклеточной карциномы встречаются мутации [141].

Участки возможного связывания ядерных гепатоцеллюлярных факторов HNF-3b и HNF-5 найдены в промоторах TERT как у человека, так и у мыши. Хотя они консервативны, их функциональная значимость остается неопределенной [67].

ГЕРПЕСВИРУСЫ (ВИРУСЫ ЭПШТЕЙНА-БАРР, САРКОМЫ КАПОШИ)

Оба герпесвируса, являющиеся онкогенными для человека, могут участвовать в регуляции транскрипции hTERT.

Вирус Эпштейна-Барра (ВЭБ) является возбудителем инфекционного мононуклеоза и связан с образованием раков, например, с лимфомой Беркитта [19, 142]. Латентный мембранный белок 1 (LMP1) ВЭБ индуцирует специфическое связывание hTERT с р65 субъединицей NF-kB и перенос обоих белков из цитоплазмы в ядро [143]. Другой механизм активации экспрессии hTERT белком LMP1 осуществляется путем трансактивации им с-Мус [144]. Латентный мембранный белок ВЭБ LMP 2A угнетает транскрипционную активность гена hTERT [145].

Герпесвирус типа 8 идентифицирован как возбудитель множественной пигментированной саркомы кожи (Капоши) [19]. Ядерный антиген LANA этого вируса, является активатором транскрипции hTERT. Этот белок может связываться с Sp1, и активация промотора теломеразы, вероятно, осуществляется в результате этого взаимодействия [146].

T-ЛИМФОТРОПНЫЕ ВИРУСЫ

T-лимфотропные вирусы первого и второго типов (HTLV-I и HTLV-II) активируют теломеразу [80, 147].

У всех взрослых пациентов с острой или хронической формой T-клеточной лейкемии обнаружена высокая активность теломеразы, в то время как у бессимптомных носителей HTLV-I активность теломеразы определяется лишь в 29 % случаев. У двух из семи пациентов с активной теломеразой произошел переход в острую форму в течение месяца [148]. Однако отсутствие достаточного количества данных (было проанализировано всего 24 пациента) не позволяет сделать строгий вывод об однозначной связи увеличения активности теломеразы и прогрессии заболевания. Теломеразная активность высока как в трансформированных HTLV-I клетках, так и в лимфоцитах, полученных от больных лейкемией/лимфомой, по сравнению с нетрансформированными или нормальными клетками [149].

В регуляции транскрипции hTERT участвует белок Tax вируса HTLV-I, который, несмотря на то, что является онкогеном, может угнетать экспрессию гена hTERT [80, 150] при стимуляции деления клеток фитогемагглютинином (ФГА) в два раза за 3 сут. В отсутствие же ФГА и при наличии Tax происходит увеличение теломеразной активности на 25 % за то же время. При этом происходит активация экспрессии NF-kB, который, в свою очередь, активирует промотор hTERT [80]. Угнетение активности промотора hTERT осуществляется в результате конкуренции Tax с с-Мус за канонический участок связывания с-Мус в промоторе hTERT [150].

SV 40 И АДЕНОВИРУСЫ

Ни SV 40, ни аденовирусы (АВ) не имеют отношения к этиологии естественных опухолей человека, но на модельных системах они могут участвовать в трансформации.

Для человека АВ не являются онкогенными, и на их основе даже пытаются делать средства доставки генетического материала для генотерапии. При этом экспрессии аденовирусного белка Е1А достаточно для иммортализации первичных клеток грызунов, а в присутствии второго онкогена Е2А или *ras* возможна их трансформация. Белок Е1А 243R и, в частности, второй экзон Е1А активируют промоторы hTERT и hTR. Эта активация может подавляться репрессором CtBP (C terminal binding protein), который сам по себе не влияет на базовый уровень экспрессии hTERT. Активация hTERT белком Е1А, вероятно, происходит через участки связывания Sp1 [151]. Эти данные говорят о необходимости предельно внимательного отношения к АВ и их неонкогенности/безвредности при использовании в терапии человека.

Вирус SV 40, бывший долгое время под подозрением как онкоген, для человека в настоящее время таковым не считается [152]. В человеческих клеточных линиях большой и малый раковые антигены SV40 могут приводить к трансформации [153]. Есть данные, что вирус SV40Т ускоряет появление теломеразной активности в клетках эпителия молочной железы человека. Но активность зависит от числа пересевов, т.е. активация теломеразы, вероятно, происходит опосредованно в результате учащения некоего случайного события, происходящего в результате нарушения клеточного метаболизма [135].

ВЛИЯНИЕ ГИПОКСИИ НА ЭКСПРЕССИЮ hTERT

Области гипоксии (кислородного голодания) раков характеризуются устойчивостью к терапии, генетической нестабильностью и усилением злокачественной прогрессии. Гипоксия может приводить к усилению теломеразной активности, например, в клеточных линиях рака шейки матки [154]. Промотор hTERT содержит в своей основной части 2 участка HRE (hypoxia responsible element) – связывания гипоксия-индуцируемого фактора 1 (hypoxia-inducible factor-1, HIF-1) в областях -242 и -26 нп. Обнаружено, что эти участки действительно необходимы для активации hTERT с помощью HIF-1 [155]. Инкубация раковых клеточных линий в условиях недостатка кислорода приводит к сборке транскрипционного комплекса, включающего в себя HIF-1, p300/CBP, РНК-полимеразу II и TFIIIB на промоторе hTERT в районе HRE участков. Суперэкспрессия HIF-1 в клеточной линии яичников приводит к более чем двукратному росту активности промотора hTERT. При росте раковой клеточной линии в условиях гипоксии без суперэкспрессии HIF-1 происходит перераспределение сплайс-форм мРНК hTERT (подробнее рассмотрено в главе «Регуляция сплайсинга hTERT») при очень незначительном увеличении количества суммарной мРНК hTERT [156].

ПОСТТРАНСКРИПЦИОННАЯ РЕГУЛЯЦИЯ hTERT

Необходимым для раков является поддержание длины теломера, и активность поддерживающей их теломеразы может не коррелировать с транскрипцией hTR и/или мРНК hTERT [32].

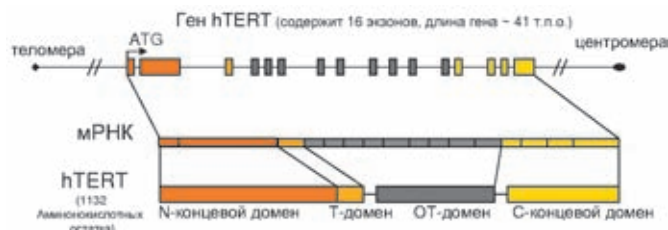


Рис. 5. Ген теломеразной обратной транскриптазы. Выделяют участки, кодирующие N- и C-концевые, обратнотранскриптазный (OT) и характерный для теломераз (T) домены [48]

РЕГУЛЯЦИЯ СПЛАЙСИНГА ГЕНА hTERT

Ген теломеразной обратной транскриптазы состоит из 16 экзонов, при этом он занимает ~37 тыс. пар оснований геномной ДНК, из которых ~33 тыс. пар оснований приходится на интроны и ~4 тыс. соответствуют транскрипту [48] (рис. 5).

ПРИРОДНЫЙ СПЛАЙСИНГ мРНК hTERT

Только полноразмерная мРНК hTERT обеспечивает активность теломеразы. Известно 13 альтернативных вариантов сплайсинга мРНК hTERT [48, 157-159]. Изоформа с т.н. α -делецией (делеция 36 нуклеотидов в обратнотранскриптазном домене) при суперэкспрессии является доминантным ингибитором теломеразной активности [160, 161]. Этот вариант мРНК hTERT транслируется, и получающийся белок может включаться в теломеразный комплекс, существующий в виде димера (рис. 6).

Делеции β или $\alpha + \beta$ не приводят к образованию активной теломеразы, но и не ингибируют ее [161]. В то же время при обработке бессмертной клеточной линии фактором TGF β 1 (transforming growth factor β 1) образуется β -вариант мРНК hTERT в результате альтернативного сплайсинга, и активность теломеразы падает [162]. Обратная ситуация может складываться в областях гипоксии раков: происходит перераспределение от β -варианта сплайсинга к активному транскрипту [156] (рис. 6).

Теломеразная активность в клетках линий остеосаркомы, экспрессирующих только полноразмерную мРНК, выше, чем в случае клеток с набором различных сплайсформ мРНК hTERT [54]. В ткани аденокарциномы желудка теломеразная активность возрастает, общее количество мРНК hTERT увеличивается по сравнению с окружающей нормальной тканью, а соотношение количеств α , β и $\alpha + \beta$ форм в них одинаково, что указывает на отсутствие регуляции сплайсинга hTERT [163].

Вариант с делецией γ экспрессируется мало и не оказывает заметного эффекта на теломеразную активность в клеточных линиях, полученных из рака печени [159]. Делеции $\alpha + \beta$, β и 4 вставки INS 1-4 [48, 157] вызывают преждевременную терминацию трансляции hTERT [161], как и варианты с делециями $\beta + \gamma$, $\alpha + \beta + \gamma$ [159]. Часть транскриптов, найденная недавно [158], пока не описана с точки зрения их влияния на активность теломеразы.

Вероятно, регуляция теломеразы с помощью сплайсинга является тканеспецифичной. При исследовании образцов тканей зародыша оказалось, что в сердце и пече-

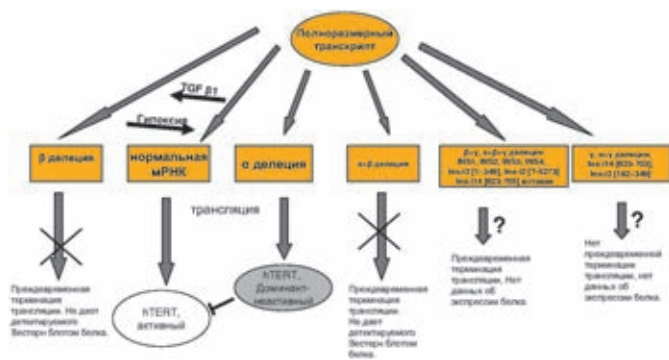


Рис. 6. Различные варианты сплайсинга мРНК hTERT

ни теломеразная активность коррелирует с экспрессией гена hTERT, в почках она исчезает на 15 неделе развития, а транскрипты hTERT обнаруживаются на 21 неделе [164].

ИСКУССТВЕННЫЙ СПЛАЙСИНГ

Интрон первой группы из *Tetrahymena* может индуцировать новую РНК, которая заменяет с высокой точностью и специфичностью мРНК hTERT в результате транс-сплайсинга [165]. В клеточной линии рака простаты 2'-О-метил-РНК фосфотиоат олигонуклеотиды, подобранные к участку сплайсинга между 5 интроном и 6 экзоном в hTERT пре-мРНК, уменьшают количество полномерного транскрипта и одновременно увеличивают количество альтернативно-сплайсированного транскрипта, что приводит к снижению теломеразной активности. При этом уменьшается скорость роста, и через два дня обработки клетки начинают входить в состояние апоптоза [166].

КЛЕТОЧНАЯ ЛОКАЛИЗАЦИЯ

In vitro высокая активность теломеразы наблюдается в цитоплазматическом экстракте, а не в ядерном, хотя для работы теломеразы в клетке она должна быть локализована вместе с теломерами в ядре [167]. При этом *in vivo* GFP-содержащая теломераза локализуется в ядре [168].

При связывании NF-kB (p65 субъединица) с белком hTERT фактор некроза опухолей α (tumor necrosis factor α, он же TNF α) индуцирует перенос из цитоплазмы в ядро hTERT, связанный с NF-kB [169].

Белок 14-3-3, отвечающий за ядерную локализацию, связывается с теломеразой. Доминант-негативный 14-3-3 направляет в цитоплазму hTERT, в норме локализованный в ядре. Мутантный hTERT, не способный связываться с 14-3-3, локализуется в цитоплазме. 14-3-3 мешает связываться белку CRM1 с NES-мотивом (nuclear export signal, сигнал экспорта из ядра). Ингибирование CRM1/экспортин1 пути ядерного экспорта, как и нарушение NES-мотива, приводит к уменьшению локализации hTERT в цитоплазме [170].

hTERT большую часть клеточного цикла не локализуется в нуклеолях, тельца Кахаля или на теломерах. В S-фазе клеточного цикла hTERT перемещается в нуклеоли, затем в тельца Кахаля и затем на теломеры [15, 16].

ФОСФОРИЛИРОВАНИЕ И ДЕФОСФОРИЛИРОВАНИЕ hTERT

Фосфорилирование теломеразной обратной транскриптазы протеинкиназой Cα (PKCα) требуется для активности теломеразы в клетках рака молочной железы [171]. Другая протеиназа этой группы, протеинкиназа Cz (PKC zeta), контролирует теломеразную активность в клетках рака носоглотки без влияния на экспрессию hTERT. Выключение активатора PKC zeta Cdc42/Rac1 приводит к уменьшению теломеразной активности [172] (рис. 6).

Фосфатаза PP2A ингибирует теломеразную активность в клетках рака молочной железы [173] (рис. 7).

Киназа Akt увеличивает активность теломеразы, фосфорилируя hTERT, в клетках линии меланомы [174]. Доминант-негативная мутантная Akt-киназа значительно снижает уровень теломеразной активности в клетках эндотелия. Также подавляет теломеразную активность ингибирование киназы PI3K (phosphoinositol 3-kinase), фосфорилирующей и активирующей Akt-киназу [175] (рис. 7).

Фосфорилирование влияет не только непосредственно на активность hTERT, но и на транскрипцию этого гена. Обработка клеток ингибитором PI3K или экспрессия в них доминант-негативной Akt-киназы ослабляет транскрипционную активацию промотора hTERT эстрогеном в клеточных линиях рака яичника человека [124].

Тирозин-киназа c-Abl, активируемая двухцепочечными разрывами ДНК, связывается с hTERT и фосфорилирует его, ингибируя активность. Облучение клеток ионизирующим излучением индуцирует фосфорилирование hTERT по c-Abl-зависимому механизму [176].

При окислительном стрессе hTERT экспортируется из ядра с помощью ГТФазы Ran. Для этого экспорта необходимо фосфорилирование hTERT киназой Src [177]. Этот механизм экспорта hTERT блокируется суперэкспрессией фосфатазы Shp-2 [178].

РЕГУЛЯЦИЯ ТЕЛОМЕРАЗНОЙ РНК

В тканях взрослых людей высокий уровень экспрессии теломеразной РНК обнаружен в первичных сперматоцитах и клетках Сертоли, средний уровень экспрессии – в лимфатических фолликулах, слабый уровень экспрессии – в эпителии, а в клетках нервной системы и тканях, происходящих из мезенхимы, экспрессия hTR отсутствует [179]. Заметный уровень экспрессии обнаружен в тонком кишечнике, яичниках, селезенке, тимусе, почках и простате. Низкий уровень экспрессии hTR наблюдается в мозге, печени, желудке, поджелудочной железе, легких и сердце [180].

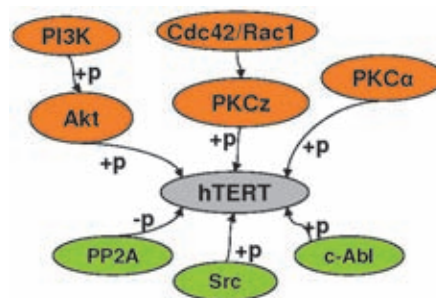


Рис. 7. Регуляция активности белка hTERT с помощью фосфорилирования/дефосфорилирования. Активаторы показаны оранжевым, ингибиторы зеленым. «+p» – фосфорилирование, «-p» – дефосфорилирование

В теломераза-положительных образцах опухолевых тканей наблюдали сильную экспрессию hTR, а в теломераза-негативных саркомах мягких тканей только половина экспрессировала hTR в различной степени. В теломераза-негативных опухолях нет связи между экспрессией hTR и пролиферативным статусом, длиной теломера и экспрессией hTERT [181]. Повышенная экспрессия hTR не связана с теломеразной активностью, например, в раке легких [30].

Методом *in situ* гибридизации определено, что в случае пищевода Баррета и дисплазии пищевода ранней стадии hTR отсутствует или экспрессируется со средней эффективностью, а на поздних стадиях развития дисплазии или рака эффективность экспрессии hTR велика [182]. В образцах рака легких в случае применения ОТ-ПЦР (обратной транскрипции и ПЦР) hTR выявляется в 90-100 % случаев образцов как раковых, так и нормальных тканей [30, 183]. При определении в раке легких методом гибридизации *in situ* hTR обнаруживался всего в 26 % раковых тканей, определенных гистологическим анализом, для некоторых образцов хорошо определяется разница между раковыми и нормальными тканями. Этим же методом определена экспрессия hTR в 41 % плоскоклеточной карциномы, 13 % и 17 % аденокарцином молочной железы и яичников, 43 % рака и 40 % предраковых поражений шейки матки [34]. К сожалению, неизвестна дальнейшая судьба пациентов с предраковыми поражениями, поэтому невозможно говорить об экспрессии hTR как о маркере развития онкогенного процесса. Для использования экспрессии hTR в качестве ракового маркера необходимо проводить точный количественный анализ в отличие от экспрессии hTERT или определения теломеразной активности.

При анализе нейроblastом в 9 из 12 образцах раков средних стадий и только в 2 из 8 образцов раков ранних стадий обнаружен высокий или средний уровень экспрессии hTR. Заболевание не прогрессировало у пациентов с низким уровнем экспрессии hTR или без нее. В случае 8 образцов рака (от 7 пациентов) со средним или высоким уровнем экспрессии hTR развитие болезни было неблагоприятным. Следует отметить, что в случае поздней стадии болезни с обширными метастазами (4 образца) экспрессия hTR была слабой. Экспрессия hTR в ганглионейробластомах и ганглионейромах ограничена только нервными клетками, в лимфоцитах она отсутствует. Таким образом, в неметастазирующих нейроblastомах экспрессия hTR оказалась хорошим прогностическим фактором [184].

Для рака Вильямса именно экспрессия hTR, но не hTERT, является предсказательным фактором дальнейшего развития. У 30 % пациентов с наибольшей экспрессией hTR (количественную оценку проводили ОТ-ПЦР в реальном времени) вероятность рецидива вдвое выше по сравнению с пациентами с наименьшим уровнем экспрессии hTR [185]. Также высокий уровень экспрессии hTR коррелирует с плохим прогнозом у пациентов с липосаркомой [42].

Повышение экспрессии hTR не всегда совпадает с повышением теломеразной активности [30]. hTR ингибирует протеинкиназу контрольных точек АTR. Подавление уровня экспрессии hTR приводит к остановке клеточного цикла в G1- и G2-фазах в результате активации белка p53

и протеинкиназы контрольных точек СНК1. Этот эффект не зависит от теломеразной активности. Возрастание экспрессии hTR в ответ на ультрафиолетовое облучение предотвращает активацию p53 и СНК1 в результате ингибирования активности АTR, тем самым ослабляя клеточный ответ на повреждение ДНК и позволяя клеткам проходить контрольную точку G2/М. Взаимодействия между hTR и АTR не обнаружено, так что механизм этого ингибирования остается неизвестным [186].

РЕГУЛЯЦИЯ ТРАНСКРИПЦИИ ТЕЛОМЕРАЗНОЙ РНК

Промотор hTR содержит ССААТ- и ТАТА-блоки рядом с участком старта транскрипции и ряд участков связывания: рецепторов глюкокортикоидов, прогестерона и андрогена; транскрипционных факторов AP1 и ETS [187]. Минимальный участок промотора теломеразной РНК человека -272-42 нп до участка старта транскрипции. Активность промотора максимальна при использовании участка до -463 нп, при использовании большего участка промотора происходит уменьшение транскрипции [187].

При проверке статуса метилирования промотора hTR 3 из 8 теломераза-положительных клеточных линий и обе теломераза-негативных оказались гиперметилированы, при этом в образцах операционных материалов метилирование промотора hTR не наблюдалось ни в раковых, ни в нормальных тканях. Таким образом, метилирование промотора скорее всего не связано с регулированием экспрессии hTR [181].

Промотор hTR содержит 4 участка связывания белков Sp1/Sp3 (рис. 8). Связывание Sp1 активирует промотор, а Sp3 ингибирует его [188]. Мутационный анализ показал, что участок до ССААТ-блока нужен для активации промотора hTR, а 3 участка после ССААТ отвечают за ингибирование промотора. Участок, находящийся сразу после ССААТ, имеет наибольший ингибирующий эффект, хотя и наименьшее родство к Sp1. Это можно объяснить его близостью к участку связывания транскрипционного фактора NF- κ B. Два участка, находящиеся после старта транс-

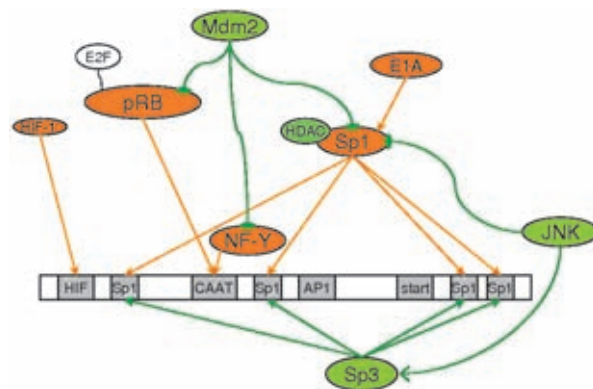


Рис. 8. Схема влияния трансаактиваторов промотора hTR. Зеленым обозначены ингибиторы промотора hTR, оранжевым – активаторы, без цвета – кофакторы. Стрелкой → обозначена активация следующего участника каскада, стрелкой ⊥ – ингибирование следующего участника каскада, без стрелки – совместное действие

крипции, подвергаются сложной регуляции, поскольку внесение мутаций в оба участка дает сильный активирующий эффект, не равный сумме эффектов мутаций участков по отдельности [189]. С другой стороны, по результатам работы [151] одновременное внесение мутаций в 4 участка связывания Sp1 не влияет на базовый уровень активности промотора hTR, хотя и нарушает его трансрегулирование.

Транскрипционный фактор NF- κ B, способный рекрутировать на промотор ряд компонентов комплекса РНК-полимеразы II [190], является основным активатором промотора теломеразной hTR. NF- κ B связывается с участком ССААТ промотора hTR, и при нарушении этого связывания активность промотора практически пропадает [189].

Активатором промотора hTR также является pRB. Для его действия необходим участок ССААТ. Активирование промотора hTR белком pRB снижается при использовании мутантных pRB, не способных связывать E2F, и пропадает при использовании мутанта Δ 657, не способного связывать E2F и активировать транскрипцию генов [188].

Митоген-активируемая протеинкиназа киназы 1 – (MEKK1)/c-Jun-NH(2)-kinase (JNK) подавляет экспрессию hTR. Трансфекция постоянно активного киназного домена MEKK1, основного MAP3K в пути JNK, вызывает сильное ингибирование промотора hTR в ряде раковых клеточных линий. Угнетение промотора hTR киназой MEKK1 можно блокировать с помощью SP600125 – ингибитора JNK. Эффект ингибирования промотора hTR киназой MEKK1 может быть усилен коэкспрессией JNK дикого типа, но не коэкспрессией мутантной формы JNK, не способной фосфорилироваться. Котрансфекция Sp3 и MEKK1 дает аддитивный эффект ингибирования hTR. Обработка клеток SP600125 приводит к изменению соотношения количеств Sp1/Sp3 на промоторе в пользу Sp1, согласно иммунопреципитации. Таким образом, эта киназа способствует смещению баланса Sp1/Sp3, связанных с промотором, в пользу Sp3 без изменения в уровне экспрессии Sp1 и Sp3 и ингибированию промотора hTR [191].

Убиквитинлигаза Mdm2 уменьшает стабильность p53 и регулирует комплекс pRb/E2F [192]. Mdm2 взаимодействует с Sp1 *in vitro* и *in vivo* и ингибирует трансактивацию Sp1-активируемых промоторов. Mdm2 взаимодействует с промотором hTR *in vivo* и ингибирует его, причем участки

связывания Sp1 не принимают в этом участия. Mdm2 подавляет активацию, вызываемую pRb, NF- κ B и Sp1. Mdm2 и pRb, как и NF- κ B, могут взаимодействовать с аппаратом РНК-полимеразы II и в результате этого влиять на экспрессию hTR [190].

Ген теломеразной РНК содержит участок HRE, с которым связывается HIF-1. Суперэкспрессия в раковых клетках фактора HIF-1 приводит к почти двукратному росту активности промотора hTR через 6 ч после инкубации в условиях гипоксии и затем падению до нормального уровня в течение 4 ч. На промоторе hTR в раковой клеточной линии в условиях гипоксии собирается транскрипционный комплекс, включающий в себя HIF-1, p300, РНК-полимеразу II и TFIIIB [156].

Аденовирусный белок E1A увеличивает экспрессию репортерной конструкции под контролем промотора hTR в 2.5 раза. Эта активация скорее всего осуществляется через участки связывания Sp1, поскольку их мутации приводят к исчезновению эффекта E1A. Активация промотора hTR белком E1A также ингибируется белком CtBP, но он не оказывает влияния на базовый уровень экспрессии hTR [151]

ПОСТТРАНСКРИПЦИОННАЯ РЕГУЛЯЦИЯ ТЕЛОМЕРАЗНОЙ РНК

TR накапливается в тельцах Кахаля в клетках раковых линий, но не в клетках нормальных линий. Накопление hTR в тельцах Кахаля можно вызвать, экспрессируя в клетках hTERT [193]. Именно hTERT является ключевым фактором локализации hTR как в тельцах Кахаля, так и на теломерах [194]. Для накопления в тельцах Кахаля также необходим предшествующий процессинг 3'-конца hTR [195].

При онкогенезе может возрастать стабильность теломеразной РНК в клетках. При экспрессии hTERT в hTERT-негативных клетках период полураспада hTR возрастает в 1.6 раза. Вероятно, это происходит за счет связывания и стабилизации TR каталитической субъединицей [196].

КОНТРОЛЬ ДОСТУПА ТЕЛОМЕРАЗЫ НА ТЕЛОМЕРЫ

Теломеры имеют выступающий 3'-конец, который, возможно, образует несколько структур: Т-петлю [197], G-квадруплексы [198, 199] (рис. 9). В Т-петле выступающий 3'-конец спарен с внутренней областью теломеры и стабилизирован белками [197]. G-квадруплексы образуются выступающим 3'-концом за счет Хугстейновских пар [198, 199]. У человека 6 белков (TRF1, TRF2, hRap1, TIN2, TPP1 и POT1) формируют так называемый шелтериновый комплекс, который является постоянным компонентом человеческого теломер [200].

Изменение уровня экспрессии белков шелтеринового комплекса резко отражается на длине теломер. Так, ингибирование TRF1 приводит к удлинению теломер в человеческих раковых клетках, а его суперэкспрессия приводит к укорочению теломер без изменения теломеразной активности *in vitro*. Уменьшение количества белка TIN2 или суперэкспрессия его мутантных аллелей, которые нарушают связывание TIN2 с TRF1 и TRF2, приводит к удлинению теломер. Суперэкспрессия TRF2 вызывает укорочение теломер, происходящее не только за счет *in vivo* ингибирования теломеразы, но и за счет увеличения скорости укорочения. Подавление TPP1 с помощью интерфери-

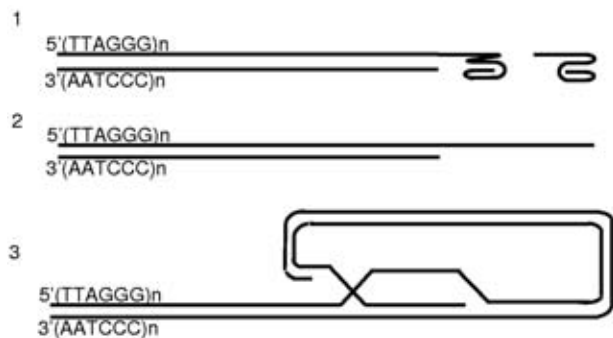


Рис. 9. Возможная организация концов теломер: 1 – примеры G-квадруплексов, 2 – выступающий 3'-конец (субстрат для теломеразы), 3 – Т-петля

рующей РНК или нарушение связывания TRP1–POT1 также приводит к удлинению теломер, сопровождающемуся потерей теломерами белка POT1 [200]. По данным других авторов, TRP1 и POT1 образуют комплекс с теломерной ДНК, который увеличивает активность и процессивность человеческой теломеразы. Существует предположение, что TRP1–POT1 переключается от ингибирования доступа теломеразы к теломере как компонент шелтерина на работу как фактор процессивности теломеразы во время удлинения теломер [201].

POT1 связывает одноцепочечную теломерную ДНК с высокой специфичностью, используя 2 ОВ-мотива (oligonucleotide/oligosaccharide-binding folds). Суперэкспрессия POT1 без первого ОВ-мотива приводит к быстрому удлинению теломер [200]. Уменьшение экспрессии hPOT1 также может приводить к удлинению теломер [202]. У другой группы исследователей экспрессия полноразмерного белка приводит к удлинению теломер [203]. Связывание рекомбинантного POT1 с теломерным олигонуклеотидом ингибирует связывание теломеразы. С другой стороны, POT1 *in vitro* способен разрушать квадруплексные структуры, которые образуются за счет Хугстеновского спаривания нуклеотидов в теломерной ДНК. Это может объяснять, как POT1 вносит положительный вклад в теломераза-зависимое удлинение теломер, поскольку G-квадруплексы представляются очень плохим субстратом для теломеразы. Разрушение G-квадруплексов также могут осуществлять хеликазы WRN или BLM семейства RecQ, которые взаимодействуют с POT1 [200]. У человека мутации в генах, кодирующих хеликазы WRN или BLM, приводят к развитию синдромов Блума и Вернера соответственно, характеризующихся геномной нестабильностью [204].

Более длинные теломеры содержат больше шелтеринового комплекса, который может являться датчиком длины теломер. Связывание белка POT1 с шелтеринем может влиять на посадку POT1 на одноцепочечный участок теломерной ДНК. Также шелтерин может ингибировать теломеразу, облегчая образование T-петли, в которой 3'-конец недоступен [200].

Количество мРНК POT1 в случае рака желудка на начальных стадиях чаще уменьшается, а на поздних стадиях возрастает. Уровень экспрессии POT1 уменьшается в соответствии с укорочением теломер. Кроме того, ингибирование POT1 в клеточных линиях рака желудка с помощью антисмысловых олигонуклеотидов приводит к укорочению теломер, так же как и ингибирование теломеразной активности [205].

Посадка теломеразы на теломеры может регулироваться за счет образования/разрушения G-квадруплексов. Связывающий одноцепочечную ДНК белок RPA способен расплетать теломерные G-квадруплексы в модельных системах [206]. С другой стороны, RPA способен ингибировать теломеразную активность в модельных системах за счет связывания с теломер-имитирующим олигонуклеотидом [207]. Ингибирование теломеразы *in vitro* происходит и при удалении из смеси RPA, и при его большом избытке [208].

К сожалению, методы анализа теломеразной активности используют модельные системы с искусственным субстратом, без учета доступа на теломеры.

РЕГУЛЯЦИЯ В ХОДЕ ОТВЕТА НА ИОНИЗИРУЮЩИЕ ИЗЛУЧЕНИЯ

При изучении процессов, происходящих при онкогенезе, нельзя обойти вниманием последствия воздействия на клетки различных видов излучений. С одной стороны, они способны провоцировать онкогенные процессы (УФ-облучение является провокаторм рака кожи, проникающие ионизирующие излучения могут вызывать различные типы раков и т.д.), а с другой стороны, различные типы облучения применяются для борьбы с раком (β -частицы, нейтроны, γ - и рентгеновское облучение и т.д.). Поскольку активность теломеразы ассоциирована с большим числом раков, логичен вопрос, что же происходит с этой активностью при облучении. Также представляется интересным, может ли облучение вызывать активность теломеразы.

При изучении воздействия ионизирующего излучения на клеточную линию HeLa обнаружено, что теломеразная активность и количество мРНК hTERT возрастают в первые 24 ч, вплоть до двукратного превышения по сравнению с необлученными образцами, а потом за 72 ч возвращаются к исходному значению [209].

При воздействии на клетки гемопозитической клеточной линии γ - и нейтрон/ γ -излучения наблюдается увеличение теломеразной активности и количества мРНК hTERT, зависящее от дозы и интенсивности облучения. В случае нейтрон/ γ -излучения сначала происходит уменьшение, а затем увеличение теломеразной активности. Влияние излучений разной энергии различается по величине и кинетике, но одинаково по механизму воздействия на клетки. Изменения в теломеразной активности не связаны ни с изменением клеточного цикла, ни с индукцией клеточной смерти, а являются последствиями специфических регуляторных ответов на ионизирующие излучения [210].

Клетки HeLa с укороченными теломерами после трансфекции DN-hTERT (доминантно-негативный мутантный hTERT) становятся более восприимчивыми к воздействию ряда химиотерапевтических агентов и облучению. Клетки, трансфицированные hTERT дикого типа, с более длинными теломерами проявляют большую устойчивость к химиотерапевтическим агентам и облучению [211].

УФ-облучение провоцирует теломеразную активность в различных типах клеток, включая клетки кожи. Кроме кожи, УФ-воздействию постоянно подвергаются глаза. Оказалось, что уровень теломеразной активности и количество мРНК hTERT и hTR возрастают только при получении хрусталиком определенной энергии УФ-излучения [212].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Знания о системе регуляции теломеразы позволят более эффективно разрабатывать методики и препараты для подавления теломеразной активности в раковых клетках. К сожалению, многие механизмы регуляции теломеразы тканеспецифичны. Выявление взаимосвязи системы регуляции теломеразы с другими онкогенами может помочь в разработке комплексной диагностики рака, позволяющей выявлять заболевание и определять тактику борьбы с ним на наименее агрессивной стадии.

Теломеразная активность является маркером активно делящихся клеток и одним из наиболее универсальных маркеров рака. ●

Список литературы

- Hayflick L., Moorhead P.S. *Exp Cell Res.* 1961. 25. P. 585-621.
- Olovnikov A.M. *J Theor Biol.* 1973. 41(1). P. 181-190.
- Pandita T.K., Hunt C.R., Sharma G.G., Yang Q. *Cell Mol Life Sci.* 2007. 64(2). P. 131-138.
- Greider C.W., Blackburn E.H. *Cell.* 1985. 43(2 Pt 1). P. 405-413.
- Harrington L., McPhail T., Mar V., Zhou W., Oulton R., Bass M.B., Arruda I., Robinson M.O. *Science.* 1997. 275(5302). P. 973-977.
- Beattie T.L., Zhou W., Robinson M.O., Harrington L. *Mol Cell Biol.* 2001. 21(18). P. 6151-6160.
- Cong Y.S., Wright W.E., Shay J.W. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2002. 66(3). P. 407-425.
- Venteicher A.S., Abreu E.B., Meng Z., McCann K.E., Terns R.M., Veenstra T.D., Terns M.P., S.E. Artandi S.E. *Science.* 2009. 323(5914). P. 644-648.
- Beattie T.L., Zhou W., Robinson M.O., Harrington L. *Curr Biol.* 1998. 8(3). P. 177-180.
- Weinrich S.L., Pruzan R., Ma L., Ouellette M., Tesmer V.M., Holt S.E., Bodnar A.G., Lichtsteiner S., Kim N.W., Trager J.B., Taylor R.D., Carlos R., Andrews W.H., Wright W.E., Shay J.W., Harley C.B., Morin G.B. *Nat Genet.* 1997. 17(4). P. 498-502.
- Counter C.M., Hahn W.C., Wei W., Caddle S.D., Beijersbergen R.L., Lansdorp P.M., Sedivy J.M., Weinberg R.A. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998. 95(25). P. 14723-14728.
- Buchkovich K.J., Greider C.W. (1996) *Mol Biol Cell.* 1996. 7(9). P. 1443-1454.
- Ten Hagen K.G., Gilbert D.M., Willard H.F., Cohen S.N. *Mol Cell Biol.* 1990. 10(12). P. 6348-6355.
- Wright W.E., Tesmer V.M., Liao M.L., Shay J.W. *Exp Cell Res.* 1999. 251(2). P. 492-499.
- Tomlinson R.L., Ziegler T.D., Supakorndej T., Terns R.M., Terns M.P. *Mol Biol Cell.* 2006. 17(2). P. 955-965.
- Jady B.E., Richard P., Bertrand E., Kiss T. *Mol Biol Cell.* 2006. 17(2). P. 944-954.
- Januszkiewicz D., Wysoki J., Lewandowski K., Pernak M., Nowicka K., Rembowska J., Nowak J. *Int J Mol Med.* 2003. 12(6). P. 935-938.
- Harle-Bachor C., Boukamp P. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996. 93(13). P. 6476-6481.
- Заридзе Д.Г., *Канцерогенез, Медицина: Москва.* 2004. С. 179-191.
- Kim N.W., Piatyszek M.A., Prowse K.R., Harley C.B., West M.D., Ho P.L., Coviello G.M., Wright W.E., Weinrich S.L., Shay J.W. *Science.* 1994. 266(5193). P. 2011-2015.
- Shay J.W., Bacchetti S. *Eur J Cancer.* 1997. 33(5). P. 787-791.
- Henson J.D., Neumann A.A., Yeager T.R., Reddel R.R. *Oncogene.* 2002. 21(4). P. 598-610.
- Perrem K., Colgin L.M., Neumann A.A., Yeager T.R., Reddel R.R. *Mol Cell Biol.* 2001. 21(12). P. 3862-3875.
- Rambhatla L., Chiu C.P., Glickman R.D., Rowe-Rendleman C. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2002. 43(5). P. 1622-1630.
- Condon J., Yin S., Mayhew B., Word R.A., Wright W.E., Shay J.W., Rainey W.E. *Biol Reprod.* 2002. 67(2). P. 506-514.
- Norrback K.F., Roos G. *Eur J Cancer.* 1997. 33(5). P. 774-780.
- Резван В.В., Бокарев И.Н. *Российские медицинские вести.* 2001. № 2. С. 4-7.
- Скорцов Д.А., Гаспарьян Н.М., Рубцова М.П., Зверева М.Э., Федорова М.Д., Павлова Л.С., Богданов А.А., Донцова О.А., Киселев Ф.Л. *ДАН.* 2006. Т. 408. № 4. С. 556-559.
- Dick J.E. *Blood.* 2008. 112(13). P. 4793-4807.
- Pasirja T., Srinivasan R., Behera D., Majumdar S. *Eur J Cancer.* 2007. 43(9). P. 1476-1482.
- Chen K.Y., Lee L.N., Yu C.J., Lee Y.C., Kuo S.H., Yang P.C. *Cancer Lett.* 2006. 240(1). P. 148-156.
- Park Y.M., Choi J.Y., Byun B.H., Cho C.H., Kim H.S., Kim B.S. *Exp Mol Med.* 1998. 30(1). P. 35-40.
- Murillo-Ortiz B., Astudillo-De la Vega H., Castillo-Medina S., Malacara J.M., Benitez-Bribiesca L. *BMC Cancer.* 2006. 6. P. 206.
- Soder A.I., Going J.J., Kaye S.B., Keith W.N. *Oncogene.* 1998. 16(8). P. 979-983.
- Hiraga S., Ohnishi T., Izumoto S., Miyahara E., Kanemura Y., Matsumura H., Arita N. *Cancer Res.* 1998. 58(10). P. 2117-2125.
- Carroll T., Maltby E., Brock I., Royds J., Timperley W., Jellinek D. *J Pathol.* 1999. 188(4). P. 395-399.
- Chong E.Y., Lam P.Y., Poon W.S., Ng H.K. *Hum Pathol.* 1998. 29(6). P. 599-603.
- Hiyama E., Hiyama K., Yokoyama T., Matsuura Y., Piatyszek M.A., Shay J.W. *Nat Med.* 1995. 1(3). P. 249-255.
- Harada K., Kurisu K., Arita K., Sadamoto T., Tahara H., Tahara E., Ide T., Uozumi T. *Cancer.* 1999. 86(6). P. 1050-1055.
- Резван В.В., Б.И.Н. *Российские медицинские вести.* № 2. С. 4-7.
- Yao D.F., Wu W., Yao M., Qiu L.W., Wu X.H., Su X.Q., Zou L., Yao D.B., Meng X.Y. *World J Gastroenterol.* 2006. 12(31). P. 4966-4972.
- Cairney C.J., Keith W.N. *Biochimie.* 2008. 90(1). P. 13-23.
- Anedchenko E., Oparina N., Dmitriev A., Krasnov G., Pavlova L., Alexandrova N., Kisselov F., Senchenko V. *Oncol Rep.* 2008. 20(2). P. 469-474.
- Meyerson M., Counter C.M., Eaton E.N., Ellisen L.W., Steiner P., Caddle S.D., Ziaugra L., Beijersbergen R.L., Davidoff M.J., Liu Q., Bacchetti S., Haber D.A., Weinberg R.A. *Cell.* 1997. 90(4). P. 785-795.
- Horikawa I., Cable P.L., Afshari C., Barrett J.C. *Cancer Res.* 1999. 59(4). P. 826-830.
- Takakura M., Kyo S., Kanaya T., Hirano H., Takeda J., Yutsudo M., Inoue M. *Cancer Res.* 1999. 59(3). P. 551-557.
- Pericuesta E., Ramirez M.A., Villa-Diaz A., Relano-Gines A., Torres J.M., Nieto M., Pintado B., Gutierrez-Adan A. *Reprod Biol Endocrinol.* 2006. 4. P. 5.
- Wick M., Zubov D., Hagen G. *Gene.* 1999. 232(1). P. 97-106.
- Bechter O.E., Eisterer W., Dlaska M., Kuhr T., Thaler J. *Exp Hematol.* 2002. 30(1). P. 26-33.
- Nomoto K., Maekawa M., Sugano K., Ushiyama M., Fukayama N., Fujita S., Kakizoe T. *Jpn J Clin Oncol.* 2002. 32(1). P. 3-8.
- Guilleret I., Benhattar J. *Exp Cell Res.* 2003. 289(2). P. 326-334.
- Zinn R.L., Pruitt K., Eguchi S., Baylin S.B., Herman J.G. *Cancer Res.* 2007. 67(1). P. 194-201.
- Shin K.H., Kang M.K., Dicterow E., Park N.H. *Br J Cancer.* 2003. 89(8). P. 1473-1478.
- Fujiwara-Akita H., Maesawa C., Honda T., Kobayashi S., Masuda T. *Int J Oncol.* 2005. 26(4). P. 1009-1016.
- Widschwendter A., Muller H.M., Hubalek M.M., Wiedemair A., Fiegl H., Goebel G., Mueller-Holzner E., Marth C., Widschwendter M. *Gynecol Oncol.* 2004. 93(2). P. 407-416.
- Liu C., Fang X., Ge Z., Jalink M., Kyo S., Bjorkholm M., Gruber A., Sjoberg J., Xu D. *Cancer Res.* 2007. 67(6). P. 2626-2631.
- Patel J.H., Du Y., Ard P.G., Phillips C., Carella B., Chen C.J., Rakowski C., Chatterjee C., Lieberman P.M., Lane W.S., Blobel G.A., McMahon S.B. *Mol Cell Biol.* 2004. 24(24). P. 10826-10834.
- Coutts A.S., La Thangue N.B. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005. 331(3). P. 778-785.
- Faiola F., Liu X., Lo S., Pan S., Zhang K., Lymar E., Farina A., Martinez E. *Mol Cell Biol.* 2005. 25(23). P. 10220-10234.
- Cong Y.S., Bacchetti S. *J Biol Chem.* 2000. 275(46). P. 35665-35668.
- Xu D., Popov N., Hou M., Wang Q., Bjorkholm M., Gruber A., Menkel A.R., Henriksson M. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001. 98(7). P. 3826-3831.
- Hou M., Wang X., Popov N., Zhang A., Zhao X., Zhou R., Zetterberg A., Bjorkholm M., Henriksson M., Gruber A., Xu D. *Exp Cell Res.* 2002. 274(1). P. 25-34.
- Takakura M., Kyo S., Sowa Y., Wang Z., Yatabe N., Maida Y., Tanaka M., Inoue M. *Nucleic Acids Res.* 2001. 29(14). P. 3006-3011.
- Mukhopadhyay N.K., Gordon G.J., Maulik G., Doerre G., Liu B.C., Bueno R., Sugarbaker D.J., Jaklitsch M.T. *J Cell Mol Med.* 2005. 9(3). P. 662-669.
- Kondoh K., Tsuji N., Asanuma K., Kobayashi D., Watanabe N. *Exp Cell Res.* 2007. 313(16). P. 3486-3496.
- Wu K.J., Grandori C., Amacker M., Simon-Vermot N., Polack A., Lingner J., Dalla-Favera R. *Nat Genet.* 1999. 21(2). P. 220-224.
- Greenberg R.A., O'Hagan R.C., Deng H., Xiao Q., Hann S.R., Adams R.R., Lichtsteiner S., Chin L., Morin G.B., DePinho R.A. *Oncogene.* 1999. 18(5). P. 1219-1226.
- Fujimoto K., Takahashi M. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997. 241(3). P. 775-781.
- Wang J., Xie L.Y., Allan S., Beach D., Hannon G.J. (1998) *Genes Dev.* 12(12). P. 1769-1774.
- Oh S., Y.H. Song, U.J. Kim, J. Yim, T.K. Kim *Biochem Biophys Res Commun.* 1998. 263(2). P. 361-365.
- Kyo S., Takakura M., Taira T., Kanaya T., Itoh H., Yutsudo M., Ariga H., Inoue M. *Nucleic Acids Res.* 2000. 28(3). P. 669-677.
- Mac S.M., D'Cunha C.A., Farnham P.J. *Mol Carcinog.* 2000. 29(2). P. 76-86.
- Oh S.T., Kyo S., Laimins L.A. *J Virol.* 2001. 75(12). P. 5559-5566.
- Boisclair Y.R., Brown A.L., Casola S., Rechler M.M. *J Biol Chem.* 1993. 268(33). P. 24892-24901.
- Hagen G., Muller S., Beato M., Suske G. *EMBO J.* 1994. 13(16). P. 3843-3851.
- Wooten L.G., Ogretmen B. *J Biol Chem.* 2005. 280(32). P. 28867-28876.
- Won J., Yim J., Kim T.K. *J Biol Chem.* 2002. 277(41). P. 38230-38238.
- Pacifico F., Leonardi A. *Biochem Pharmacol.* 2006. 72(9). P. 1142-1152.
- Duyao M.P., Kessler D.J., Spicer D.B., Bartholomew C., Cleveland J.L., Siekevitz M., Sonnenshein G.E. *J Biol Chem.* 1992. 267(23). P. 16288-16291.
- Sinha-Datta U., Horikawa I., Michishita E., Datta A., Sigler-Nicot J.C., Brown M., Kazanji M., Barrett J.C., Nicot C. *Blood.* 2004. 104(8). P. 2523-2531.
- Simickova M., Nekulova M., Pecen L., Cernoch M., Vagundova M., Pacovsky Z. *Neoplasma.* 2001. 48(4). P. 267-273.
- Yin L., Hubbard A.K., Giardina C. *J Biol Chem.* 2000. 275(47). P. 36671-36675.
- Ashburner B.P., Westerheide S.D., Baldwin A.S., Jr. *Mol Cell Biol.* 2001. 21(20). P. 7065-7077.
- Takakura M., Kyo S., Inoue M., Wright W.E., Shay J.W. *Mol Cell Biol.* 2005. 25(18). P. 8037-8043.
- Zhong M., Liu J.D., Wang J., Liu J., Li L., Hou L., Zhang B. *Shanghai Kou Qiang Yi Xue.* 2006. 15(5). P. 461-465.
- Ma H., Urquidí V., Wong J., Kleeman J., Goodison S. *Mol Cancer Res.* 2003. 1(10). P. 739-746.
- Ko L.J., Prives C. *Genes Dev.* 1996. 10(9). P. 1054-1072.
- el-Deiry W.S. *Semin Cancer Biol.* 1998. 8(5). P. 345-357.
- Sax J.K., el-Deiry W.S. *Cell Death Differ.* 2003. 10(4). P. 413-417.
- Asker C., Wiman K.G., Selivanova G. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999. 265(1). P. 1-6.
- Kusumoto M., Ogawa T., Mizumoto K., Ueno H., Niiyama H., Sato N., Nakamura M., Tanaka M. *Clin Cancer Res.* 1999. 5(8). P. 2140-2147.
- Kanaya T., Kyo S., Hamada K., Takakura M., Kitagawa Y., Harada H., Inoue M. *Clin Cancer Res.* 2000. 6(4). P. 1239-1247.
- Roos G., Nilsson P., Cajander S., Nielsen N.H., Arnerlov C., Landberg G. *Int J Cancer.* 1998. 79(4). P. 343-348.
- Xu D., Wang Q., Gruber A., Bjorkholm M., Chen Z., Zaid A., Selivanova G., Peterson C., Wiman K.G., Piza P. *Oncogene.* 2000. 19(45). P. 5123-5133.
- Shats I., Milyavsky M., Tang X., Stambolsky P., Erez N., Brosh R., Kogan I., Braunstein I., Tzukerman M., Ginsberg D., Rotter V. *J Biol Chem.* 2004. 279(49). P. 50976-50985.
- Racek T., Mise N., Li Z., Stoll A., Putzer B.M. *J Biol Chem.* 2005. 280(49). P. 40402-40405.
- Ge Z., Liu C., Bjorkholm M., Gruber A., Xu D. (2006) *Mol Cell Biol.* 2006. 26(1). P. 230-237.
- Won J., Yim J., Kim T.K. *FASEB J.* 2002. 16(14). P. 1943-1945.
- Crowe D.L., Nguyen D.C., Tsang K.J., Kyo S. *Nucleic Acids Res.* 2001. 29(13). P. 2789-2794.
- Henderson Y.C., Breau R.L., Liu T.J., Clayman G.L. (2000) *Head Neck.* 2000. 22(4). P. 347-354.
- Crowe D.L., Nguyen D.C. *Biochim Biophys Acta.* 2001. 1518(1-2). P. 1-6.
- Alonso M.M., Fueyo J., Shay J.W., Aldape K.D., Jiang H., Lee O.H., Johnson D.G., Xu J., Kondo Y., Kanawo T., Kyo S., Bekele B.N., Zhou X., Nigro J., McDonald J.M., Yung W.K., Gomez-Manzano C. *J Natl Cancer Inst.* 2005. 97(21). P. 1589-1600.
- Bartek J., Lukas J. *FEBS Lett.* 2001. 490(3). P. 117-122.
- Xu H.J., Zhou Y., Ji W., Perng G.S., Krugelock R., Kong C.T., Bast R.C., Mills G.B., Li J., Hu S.X. *Oncogene.* 1997. 15(21). P. 2589-2596.
- Saito M., Nakagawa K., Hamada K., Hirose S., Harada H., Kohno S., Nagato S., Ohnishi T. *Int J Oncol.* 2004. 24(5). P. 1213-1220.
- Thomadaki H., Scorilas A. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 2006. 43(1). P. 1-67.
- Mandal M., Kumar R. *J Biol Chem.* 1997. 272(22). P. 14183-14187.
- Elkai A.E., Kirkpatrick K., Mears L., Wells C., Ghilchik M., Newbold R., Mokbel K.

- Eur J Surg Oncol. 2002. 28(1). P. 14-18.
109. Jiang J.F., Liu W.J., Ding J. Acta Pharmacol Sin. 2000. 21(8). P. 759-764.
110. Oh S., Song Y., Yim J., Kim T.K. J Biol Chem. 1999. 274(52). P. 37473-37478.
111. Englert C. Trends Biochem Sci. 1998. 23(10). P. 389-393.
112. Fujimoto K., Kyo S., Takakura M., Kanaya T., Kitagawa Y., Itoh H., Takahashi M., Inoue M. Nucleic Acids Res. 2000. 28(13). P. 2557-2562.
113. Chang J.T., Yang H.T., Wang T.C., Cheng A.J. Mol Carcinog. 2005. 44(3). P. 183-192.
114. Goueli B.S., Janknecht R. Oncogene. 2003. 22(39). P. 8042-8047.
115. Maida Y., Kyo S., Kanaya T., Wang Z., Yatabe N., Tanaka M., Nakamura M., Ohmichi M., Gotoh N., Murakami S., Inoue M. Oncogene. 2002. 21(26). P. 4071-4079.
116. Xiao X., Phogat S.K., Sidorov I.A., Yang J., Horikawa I., Prieto D., Adelesberger J., Lempicki R., Barrett J.C., Dimitrov D.S. Leukemia. 2002. 16(9). P. 1877-1880.
117. Xiao X., Athanasiou M., Sidorov I.A., Horikawa I., Cremona G., Blair D., Barret J.C., Dimitrov D.S. Exp Mol Pathol. 2003. 75(3). P. 238-247.
118. Goueli B.S., Janknecht R. Mol Cell Biol. 2004. 24(1). P. 25-35.
119. Sikand K., Kaul D., Varma N. BMC Cell Biol. 2006. 7. P. 2.
120. Kyo S., Takakura M., Kanaya T., Zhuo W., Fujimoto K., Nishio Y., Orimo A., Inoue M. Cancer Res. 1999. 59(23). P. 5917-5921.
121. Misiti S., Nanni S., Fontemaggi G., Cong Y.S., Wen J., Hirte H.W., Piaggio G., Sacchi A., Pontecorvi A., Bacchetti S., Farsetti A. Mol Cell Biol. 2000. 20(11). P. 3764-3771.
122. Tanaka M., Kyo S., Takakura M., Kanaya T., Sagawa T., Yamashita K., Okada Y., Hiyama E., Inoue M. Am J Pathol. 1998. 153(6). P. 1985-1991.
123. Poole J.C., Andrews L.G., Tollesbol T.O. Gene. 2001. 269(1-2). P. 1-12.
124. Kimura A., Ohmichi M., Kawagoe J., Kyo S., Mabuchi S., Takahashi T., Ohshima C., Arimoto-Ishida E., Nishio Y., Inoue M., Kurachi H., Tasaka K., Murata Y. Oncogene. 2004. 23(26). P. 4505-4515.
125. Meeker A.K., Sommerfeld H.J., Coffey D.S. (1996) Endocrinology. 1996. 137(12). P. 5743-5746.
126. Meeker A.K. Urol Oncol. 2006. 24(2). P. 122-130.
127. Iczkowski K.A., Huang W., Mazzucchelli R., Pantazis C.G., Stevens G.R., Montironi R. Cancer. 2004. 100(2). P. 294-299.
128. Wang Z., Kyo S., Takakura M., Tanaka M., Yatabe N., Maida Y., Fujiwara M., Hayakawa J., Ohmichi M., Koike K., Inoue M. Cancer Res. 2000. 60(19). P. 5376-5381.
129. Zhang J., Tu Y., Smith-Schneider S. Cancer Cell Int. 2005. 5(1). P. 6.
130. Soda H., Raymond E., Sharma S., Lawrence R., Davidson K., Oka M., Kohno S., Izibicka E., Von Hoff D.D. Prostate. 2000. 43(3). P. 161-168.
131. Guo C., Armbruster B.N., Price D.T., Counter C.M. J Urol. 2003. 170(2 Pt 1). P. 615-618.
132. Kelley M.L., Keiger K.E., Lee C.J., Huibregtse J.M. J Virol. 2005. 79(6). P. 3737-3747.
133. Gewin L., Galloway D.A. J Virol. 2001. 75(15). P. 7198-7201.
134. Veldman T., Horikawa I., Barrett J.C., Schlegel R. J Virol. 2001. 75(9). P. 4467-4472.
135. Garbe J., Wong M., Wigington D., Yaswen P., Stampfer M.R. Oncogene. 1999. 18(13). P. 2169-2180.
136. Veldman T., Liu X., Yuan H., Schlegel R. Proc Natl Acad Sci U S A. 2003. 100(14). P. 8211-8216.
137. Klingelhutz A.J., Foster S.A., McDougall J.K. (1996) Nature. 1996. 380(6569). P. 79-82.
138. Lee D., Kim H.Z., Jeong K.W., Shim Y.S., Horikawa I., Barrett J.C., Choe J. J Biol Chem. 2002. 277(31). P. 27748-27756.
139. Qu Z.L., Zou S.Q., Cui N.Q., Wu X.Z., Qin M.F., Kong D., Zhou Z.L. World J Gastroenterol. 2005. 11(36). P. 5627-5632.
140. Zhang X., Dong N., Zhang H., You J., Wang H., Ye L. J Lab Clin Med. 2005. 145(2). P. 98-104.
141. Liu Y.C., Chen C.J., Wu H.S., Chan D.C., Yu J.C., Yang A.H., Cheng Y.L., Lee S.C., Harn H.J. Eur J Surg Oncol. 2004. 30(4). P. 384-390.
142. Sugimoto M., Tahara H., Ide T., Furuichi Y. Cancer Res. 2004. 64(10). P. 3361-3364.
143. Ding L., Li L.L., Yang J., Tao Y.G., Ye M., Shi Y., Tang M., Yi W., Li X.L., Gong J.P., Cao Y. Int J Biochem Cell Biol. 2005. 37(9). P. 1881-1889.
144. Yang J., Deng X., Deng L., Gu H., Fan W., Cao Y. J Exp Clin Cancer Res. 2004. 23(3). P. 495-506.
145. Chen F., Liu C., Lindvall C., Xu D., Ernberg I. Int J Cancer. 2005. 113(2). P. 284-289.
146. Verma S.C., Borah S., Robertson E.S. J Virol. 2004. 78(19). P. 10348-10359.
147. Re M.C., Monari P., Gibellini D., Ciancinaini P., Dall'Aglio P.P., Vignoli M., Furlini G., Ramazzotti E., Bertazzoni U., Casoli C. J Hematother Stem Cell Res. 2000. 9(4). P. 481-487.
148. Uchida N., Otsuka T., Arima F., Shigematsu H., Fukuyama T., Maeda M., Sugio Y., Itoh Y., Niho Y. Leuk Res. 1999. 23(3). P. 311-316.
149. Bellon M., Nicot C. J Natl Cancer Inst. 2008. 100(2). P. 98-108.
150. Gabet A.S., Mortreux F., Charneau P., Riou P., Duc-Dodon M., Wu Y., Jeang K.T., Wattel E. Oncogene. 2003. 22(24). P. 3734-3741.
151. Glasspool R.M., Burns S., Hoare S.F., Svensson C., Keith W.N. Neoplasia. 2005. 7(6). P. 614-622.
152. Shah K.V. Int J Cancer. 2007. 120(2). P. 215-223.
153. Moreno C.S., Ramachandran S., Ashby D.G., Laycock N., Plattner C.A., Chen W., Hahn W.C., Pallas D.C. Cancer Res. 2004. 64(19). P. 6978-6988.
154. Yatabe N., Kyo S., Maida Y., Nishi H., Nakamura M., Kanaya T., Tanaka M., Isaka K., Ogawa S., Inoue M. Oncogene. 2004. 23(20). P. 3708-3715.
155. Nishi H., Nakada T., Kyo S., Inoue M., Shay J.W., Isaka K. Mol Cell Biol. 2004. 24(13). P. 6076-6083.
156. Anderson C.J., Hoare S.F., Ashcroft M., Bilisland A.E., Keith W.N. Oncogene. 2006. 25(1). P. 61-69.
157. Kilian A., Bowtell D.D., Abud H.E., Hime G.R., Venter D.J., Keese P.K., Duncan E.L., Reddel R.R., Jefferson R.A. Hum Mol Genet. 1997. 6(12). P. 2011-2019.
158. Saeboe-Larssen S., Fossberg E., Gaudernack G. BMC Mol Biol. 2006. 7. P. 26.
159. Hisatomi H., Ohyashiki K., Ohyashiki J.H., Nagao K., Kanamaru T., Hirata H., Hibi N., Tsukada Y. Neoplasia. 2003. 5(3). P. 193-197.
160. Colgin L.M., Wilkinson C., Englezou A., Kilian A., Robinson M.O., Reddel R.R. Neoplasia. 2000. 2(5). P. 426-432.
161. Yi X., White D.M., Aisner D.L., Baur J.A., Wright W.E., J.W. Shay J.W. Neoplasia. 2000. 2(5). P. 433-440.
162. Cerezo A., Kalthoff H., Schuermann M., Schafer B., Boukamp P. J Cell Sci. 2002. 115(Pt 6). P. 1305-1312.
163. Barclay J.Y., Morris A.G., Nwokolo C.U. Dig Dis Sci. 2005. 50(7). P. 1299-1303.
164. Ulaner G.A., Hu J.F., Vu T.H., Giudice L.C., Hoffman A.R. Cancer Res. 1998. 58(18). P. 4168-4172.
165. Song M.S., Lee S.W. FEBS Lett. 2006. 580(21). P. 5033-5043.
166. Brambilla C., Folini M., Gandellini P., Daprai L., Daidone M.G., Zaffaroni N. Cell Mol Life Sci. 2004. 61(14). P. 1764-1774.
167. Morin G.B. Cell. 1989. 59(3). P. 521-529.
168. Wong J.M., Kusdra L., Collins K. Nat Cell Biol. 2002. 4(9). P. 731-736.
169. Akiyama M., Hideshima T., Hayashi T., Tai Y.T., Mitsiades C.S., Mitsiades N., Chauhan D., Richardson P., Munshi N.C., Anderson K.C. Cancer Res. 2003. 63(1). P. 18-21.
170. Seimiya H., Sawada H., Muramatsu Y., Shimizu M., Ohko K., Yamane K., Tsuruo T. EMBO J. 2000. 19(11). P. 2652-2661.
171. Li H., Zhao L., Yang Z., Funder J.W., Liu J.P. J Biol Chem. 1998. 273(50). P. 33436-33442.
172. Yeh Y.M., Pan Y.T., Wang T.C. Cancer Lett. 2005. 218(2). P. 207-213.
173. Li H., Zhao L.L., Funder J.W., Liu J.P. J Biol Chem. 1997. 272(27). P. 16729-16732.
174. Kang S.S., Kwon T., Kwon D.Y., Do S.I. J Biol Chem. 1999. 274(19). P. 13085-13090.
175. Breitschopf K., Zeiher A.M., Dimmeler S. FEBS Lett. 2001. 493(1). P. 21-25.
176. Kharbanda S., Kumar V., Dhar S., Pandey P., Chen C., Majumder P., Yuan Z.M., Whang Y., Strauss W., Pandita T.K., Weaver D., Kufe D. Curr Biol. 2000. 10(10). P. 568-575.
177. Haendeler J., Hoffmann J., Brandes R.P., Zeiher A.M., Dimmeler S. Mol Cell Biol. 2003. 23(13). P. 4598-4610.
178. Jakob S., Schroeder P., Lukosz M., Buchner N., Spyridopoulos I., Altschmied J., Haendeler J. J Biol Chem. 2008. 283(48). P. 33155-33161.
179. Yashima K., Maitra A., Rogers B.B., Timmons C.F., Rathi A., Pinar H., Wright W.E., Shay J.W., Gazdar A.F. (1998) Cell Growth Differ. 1998. 9(9). P. 805-813.
180. Feng J., Funk W.D., Wang S.S., Weinrich S.L., Avilion A.A., Chiu C.P., Adams R.R., Chang E., Allsopp R.C., Yu J., et al. Science. 1995. 269(5228). P. 1236-1241.
181. Guilleret I., Yan P., Guillou L., Braunschweig R., Coindre J.M., Benhattar J. Carcinogenesis. 2002. 23(12). P. 2025-2030.
182. Morales C.P., Lee E.L., Shay J.W. Cancer. 1998. 83(4). P. 652-659.
183. Nishio Y., Nakanishi K., Ozeki Y., Jiang S.X., Kameya T., Hebisawa A., Mukai M., Travis W.D., Franks T.J., Kawai T. Jpn J Clin Oncol. 2007. 37(1). P. 16-22.
184. Maitra A., Yashima K., Rathi A., Timmons C.F., Rogers B.B., Shay J.W., Gazdar A.F. Cancer. 1999. 85(3). P. 741-749.
185. Dome J.S., Bockhold C.A., Li S.M., Baker S.D., Green D.M., Perlman E.J., Hill D.A., Breslow N.E. J Clin Oncol. 2005. 23(36). P. 9138-9145.
186. Kedde M., le Sage C., Duursma A., Zlotorynski E., van Leeuwen B., Nijkamp W., Beijersbergen R., Agami R. J Biol Chem. 2006. 281(52). P. 40503-40514.
187. Zhao J.Q., Hoare S.F., McFarlane R., Muir S., Parkinson E.K., Black D.M., Keith W.N. Oncogene. 1998. 16(10). P. 1345-1350.
188. Zhao J.Q., Glasspool R.M., Hoare S.F., Bilisland A., Sztamari I., W.N. Keith W.N. Neoplasia. 2000. 2(6). P. 531-539.
189. Zhao J., Bilisland A., Hoare S.F., Keith W.N. FEBS Lett. 2003. 536(1-3). P. 111-119.
190. Zhao J., Bilisland A., Jackson K., Keith W.N. BMC Cancer. 2005. 5. P. 6.
191. Bilisland A.E., Stevenson K., Atkinson S., Kolch W., Keith W.N. Cancer Res. 2006. 66(3). P. 1363-1370.
192. Levav-Cohen Y., Haupt S., Haupt Y. Growth Factors. 2005. 23(3). P. 183-192.
193. Zhu Y., Tomlinson R.L., Lukowiak A.A., Terns R.M., Terns M.P. Mol Biol Cell. 2004. 15(1). P. 81-90.
194. Tomlinson R.L., Abreu E.B., Ziegler T., Ly H., Counter C.M., Terns R.M., Terns M.P. Mol Biol Cell. 2008. 19(9). P. 3793-3800.
195. Theimer C.A., Jady B.E., Chim N., Richard P., Breece K.E., Kiss T., Feigon J. Mol Cell. 2007. 27(6). P. 869-881.
196. Yi X., Tesmer V.M., Savre-Train I., Shay J.W., Wright W.E. Mol Cell Biol. 1999. 19(6). P. 3989-3997.
197. Griffith J.D., Comeau L., Rosenfield S., Stansel R.M., Bianchi A., Moss H., de Lange T. (1999) Cell. 1999. 97(4). P. 503-514.
198. Paeschke K., Juranek S., Simonsson T., Hempel A., Rhodes D., Lipps H.J. Nat Struct Mol Biol. 2008. 15(6). P. 598-604.
199. Tang J., Kan Z.Y., Yao Y., Wang Q., Hao Y.H., Tan Z. Nucleic Acids Res. 2008. 36(4). P. 1200-1208.
200. Hug N., Lingner J. Chromosoma. 2006. 115(6). P. 413-425.
201. Wang F., Podell E.R., Zaig A.J., Yang Y., Baciu P., Cech T.R., Lei M. Nature. 2007. 445(7127). P. 506-510.
202. Ye J.Z., Hockemeyer D., Krutchinsky A.N., Loayza D., Hooper S.M., Chait B.T., de Lange T. Genes Dev. 2004. 18(14). P. 1649-1654.
203. Armbruster B.N., Linardic C.M., Veldman T., Bansal N.P., Downie D.L., Counter C.M. Mol Cell Biol. 2004. 24(8). P. 3552-3561.
204. van Brabant A.J., Stan R., Ellis N.A. Annu Rev Genomics Hum Genet. 2000. 1. P. 409-459.
205. Kondo T., Oue N., Yoshida K., Mitani Y., Naka K., Nakayama H., Yasui W. Cancer Res. 2004. 64(2). P. 523-529.
206. Salas T.R., Petrusseva I., Lavrik O., Bourdoncle A., Mergny J.L., Favre A., Saintome C. Nucleic Acids Res. 2006. 34(17). P. 4857-4865.
207. Cohen S., Jacob E., Manor H. Biochim Biophys Acta. 2004. 1679(2). P. 129-140.
208. Рубцова М.П., Скворцов Д.А., Петрусева И.О., Лаврик О.И., Спирин П.В., Прасолов В.С., Киселев Ф.Л., Донцова О.А. Биохимия. 2009. 174(1). P. 117-123.
209. Satra M., Tsougou I., Papanikolaou V., Theodorou K., Kappas C., Tsezou A. Int J Radiat Biol. 2006. 82(6). P. 401-409.
210. Perez Mdel R., Dubner D., Michelin S., Leteurtre F., Carosella E.D., Gisone P.A. Int J Radiat Biol. 2002. 78(12). P. 1175-1183.
211. Xi L., Chen G., Zhou J., Xu G., Wang S., Wu P., Zhu T., Zhang A., Yang W., Xu Q., Lu Y., Ma D. (2006) Apoptosis. 2006. 11(5). P. 789-798.
212. Colitz C.M., Barden C.A., Lu P., Chandler H.L. Vet Ophthalmol. 2006. 9(5). P. 379-385.