

УДК 577.21

# Новый гибридный промотор ARE-hTERT для генной терапии рака

С. В. Калининко<sup>1#</sup>, М. В. Шепелев<sup>1#\*</sup>, П. Н. Вихрева<sup>1,2</sup>, И. В. Коробко<sup>1</sup><sup>1</sup>Институт биологии гена РАН, 119334, Москва, ул. Вавилова 34/5, Россия<sup>2</sup>MRC Toxicology Unit, University of Leicester, Leicester, UK

#Эти авторы внесли равный вклад в выполнение работы.

\*E-mail: mshepelev@mail.ru

Поступила в редакцию 09.07.2017

Принята к печати 30.10.2017

**РЕФЕРАТ** Сконструирован новый гибридный опухолеспецифический промотор ARE-hTERT, состоящий из промотора гена *TERT* человека (hTERT) и генетических элементов антиоксидантного ответа (ARE) из промотора гена *GCLM* человека. Показано, что транскрипционная активность гибридного промотора повышена в опухолевых клетках с аномально активным фактором транскрипции Nrf2 и при индукции окислительного стресса, но при этом сохраняет опухолеспецифичность базального промотора hTERT. В *in vitro* схеме генной терапии фермент-пролекарство с применением химерного белка цитозиндезаминаза : урацилфосфорибозилтрансфераза и 5-фторцитозина гибридный промотор ARE-hTERT вызывал более выраженную гибель обработанных/необработанных химиотерапевтическими препаратами опухолевых клеток, чем промотор hTERT. Созданный нами гибридный промотор можно рассматривать в качестве лучшей альтернативы промотору hTERT в схемах генной терапии рака.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** промотор hTERT, ARE-элементы, окислительный стресс, гибридный промотор, генная терапия рака, опухолеспецифический промотор.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** ARE (antioxidant response element) – элементы антиоксидантного ответа; CMV (cytomegalovirus) – цитомегаловирус; GCLM (glutamate-cysteine ligase modifier subunit) – регуляторная субъединица глутамат-цистеин-лигазы; TERT (telomerase reverse transcriptase) – теломеразная обратная транскриптаза; tBHQ – (tert-butylhydroquinone) – *терт*-бутилгидрохинон; АФК – активные формы кислорода; ОЕЛ – относительные единицы люминесценции; СО – стандартное отклонение; ЦД : УФРТ – химерный белок дрожжевая цитозиндезаминаза : урацилфосфорибозилтрансфераза; 5ФЦ – 5-фторцитозин.

## ВВЕДЕНИЕ

Генная терапия является динамически развивающимся подходом, применяемым при онкологических заболеваниях. В настоящее время получено разрешение на клиническое использование нескольких генно-терапевтических препаратов. Большое число препаратов находится на разных стадиях клинических исследований, и еще больше разрабатывается в лабораториях. Предложены различные подходы к обеспечению специфичности генно-терапевтических средств в опухолевых клетках, включая посттранскрипционную регуляцию уровня экспрессии трансгена за счет селективной стабилизации транскрипта в опухолевых клетках [1] или дестабилизации транскрипта в нормальных клетках [2]. При этом одной из наиболее используемых стратегий обеспечения специфичности генной терапии рака остается активация экспрессии трансгена преимущественно в опухолевых клетках за счет опухолеспецифических промоторов [3].

Использование опухолеспецифических промоторов, успешно применяемых во многих случаях, связано с рядом проблем, включая неабсолютную специфичность и низкую активность, что влияет на уровень экспрессии трансгена и соответственно на терапевтический эффект. В частности, один из наиболее охарактеризованных опухолеспецифических промоторов – промотор гена теломеразы человека (hTERT), активен в различных опухолях, что обеспечивает возможность воздействия на опухолевые клетки различного происхождения [3–7]. Тем не менее, промотор hTERT является достаточно слабым, что может влиять на эффективность проводимой терапии. Поэтому было предпринято несколько попыток повышения активности промотора hTERT. Показано, что слияние промотора hTERT с синтетическим ТАТА-боксом (нативный hTERT промотор не содержит ТАТА-боксы) или с минимальным ранним/предранним промотором цитомегаловируса (CMV) увеличивает активность промотора hTERT [8,

9]. Однако активность hTERT-промотора сильно зависит от используемых опухолевых клеточных линий, что снижает преимущество его универсальности [10]. Учитывая эти данные, можно констатировать, что необходимы новые подходы к усилению активности промотора hTERT в опухолевых клетках с сохранением его опухолеспецифичности.

Такие промоторы, как hTERT, проявляют опухолеспецифичность в результате их реактивации в опухолевых клетках, поэтому специфичность экспрессии трансгена можно повысить за счет использования генетических регуляторных элементов, которые либо отвечают на измененное микроокружение опухоли, либо аномально активны из-за соматических мутаций в опухолевых клетках. В качестве примера этой стратегии можно привести *cis*-действующие регуляторные элементы, определяющие транскрипционный ответ на окислительный стресс или гипоксию, характерные для многих опухолей. В частности, элементы антиоксидантного ответа (ARE), с которыми связывается фактор транскрипции Nrf2, основной активатор ответа на окислительный стресс, способны обеспечивать опухолеспецифическую экспрессию трансгена при соединении с базальным промотором [11]. В такой системе транскрипция поддерживается за счет аномальной активации Nrf2 в ответ на окислительный стресс или вследствие соматических мутаций, вызывающих конститутивную активацию Nrf2.

В данной работе показано, что комбинация ARE и опухолеспецифического промотора hTERT приводит к увеличению активности гибридного промотора ARE-hTERT в опухолевых клетках по сравнению с промотором hTERT. В то же время эта модификация не влияет на активность промотора в неопухолевых клетках, в которых Nrf2 в нормальных условиях не активен. Данный подход можно использовать для увеличения уровня экспрессии трансгенов и активности терапевтических белков в опухолевых клетках без снижения их специфичности.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### Культивирование клеточных линий

Клеточные линии рака легкого человека Calu-1 (эпидермоидная карцинома, ECACC #93120818), NCI-H1299 (немелкоклеточный рак, ATCC #CRL-5803), A549 (немелкоклеточный рак, ATCC #CRL-185) и NCI-H358 (немелкоклеточная бронхоальвеолярная карцинома, ATCC #CRL-5807) культивировали в среде DMEM/F12 (1 : 1) (HyClone, США), содержащей 10% фетальную бычью сыворотку (HyClone), пенициллин (100 ЕД/мл) и стрептомицин (100 мкг/мл) (Gibco, Великобритания). Клетки

бронхиального эпителия человека HBEpC (ECACC #502-05) культивировали в среде Bronchial Epithelial Growth Medium (Lonza, Швейцария). Для проведения экспериментов по оценке жизнеспособности клеток или измерению активности люциферазного репортерного гена клетки рассеивали в лунки 24-луночного планшета: NCI-H1299 – 20000 клеток на лунку; A549 – 30000; Calu-1 – 40000; NCI-H358 – 150000; HBEpC – 80000. На следующий день клетки трансфицировали с помощью реагента для трансфекции Unifectin-56 (Rusbiolink, Россия) в соответствии с протоколом производителя.

### Плазмиды

Плаزمида pH-TERT-Luc, несущая кДНК люциферазы светлячка под контролем промотора hTERT (-206...+37 н.), описана ранее [10]. Плаزمида pARE-hTERT-Luc, несущая кДНК люциферазы светлячка под контролем гибридного промотора ARE-hTERT, получена путем клонирования 56 п.н. ARE-элемента (TGAGTAACGGTTACGAAGCACTT-TCTCGGCTACGATTTCTGCTTAGTCATTGTCTT) из промотора гена *GCLM* человека в 5'-область промотора hTERT в плазмиду pH-TERT-Luc [12]. Плазмиды pH-TERT-CD : UPRT и pARE-hTERT-CD : UPRT для продукции химерного белка дрожжевая цитозиндезаминаза : урацилфосфорибозилтрансфераза (ЦД : УФРТ) под контролем промоторов hTERT или ARE-hTERT соответственно созданы на основе вектора pBluescriptII SK<sup>-</sup> (Stratagene, США) [13]. Сигнал терминации транскрипции и полиаденилирования вируса SV40 из плазмиды pBK-CMV (Stratagene) клонировали в 3'-область кДНК ЦД : УФРТ.

### Химические вещества

Использовали *tert*-бутилгидрохинон (tBHQ), доксорубин, цисплатин, этопозид и 5ФЦ производства Sigma-Aldrich, США.

### Измерение активности репортерного гена люциферазы

Смесью репортерной плазмиды, несущей кДНК люциферазы светлячка (pH-TERT-Luc, pARE-hTERT-Luc или pGL3-Basic (плаزمида без промотора, Promega, США)) и плазмиды pRL-CMV (Promega), несущей кДНК люциферазы *Renilla* под контролем предраннего энхансера/промотора CMV, трансфицировали по три лунки для каждой экспериментальной точки. До определения активности люциферазы клетки, если указано специально, обрабатывали 100 мкМ tBHQ в течение 24 ч. Активность люциферазы измеряли через 2 дня после трансфекции с использованием набора реагентов Dual-Luciferase<sup>®</sup> Reporter

Assay System (Promega) в соответствии с протоколом производителя. Активность люциферазы светлячка нормировали на активность люциферазы *Renilla* и вычисляли среднее значение относительных единиц люминесценции (ОЕЛ) и стандартное отклонение (СО).

### Измерение жизнеспособности клеток

Клетки трансфицировали плазмидами, кодирующими ЦД : УФРТ, или пустым вектором рВК-СМV и рассеивали в лунки 96-луночного планшета через 24 ч после трансфекции (2000 клеток линий NCI-H1299, A549 и Calu-1 на лунку; 5000 – клеток линии NCI-H358). 5ФЦ и/или этопозид, цисплатин или доксорубин добавляли к клеткам через 24 ч после посева. Культуральную среду, содержащую 5ФЦ и/или химиотерапевтические препараты, меняли на свежую через 24 и 96 ч инкубации. Культуральная среда клеток, инкубируемых в течение 24–96 ч, если указано, содержала tBHQ в концентрации 100 мкМ. Количество живых клеток оценивали после 120 ч инкубации с использованием набора реагентов CellTiter96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega) в соответствии с протоколом производителя. Каждую экспериментальную точку анализировали в трех повторах. Количество живых клеток нормировали на принятое за 100% количество живых клеток, инкубированных в отсутствие 5ФЦ и химиотерапевтических препаратов.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

### Дизайн гибридного промотора ARE-hTERT

Способность различных ARE из генов, регулируемых транскрипционным фактором Nrf2, обеспечивать экспрессию трансгена в условиях окислительного стресса была проанализирована ранее. Показано, что наивысший уровень экспрессии трансгена обеспечивал ARE *GCLM* [12]. На основании этих данных мы поместили элемент ARE из промотора гена *GCLM* человека в 5'-область относительно фрагмента -206...+37 н. промотора hTERT, содержащего сайт начала транскрипции и способного обеспечивать опухолевую специфическую экспрессию трансгена [5].

### Активность гибридного промотора ARE-hTERT в опухолевых и нормальных клетках

Активность промоторов hTERT и ARE-hTERT в нормальных и опухолевых клетках сравнивали с помощью двойного люциферазного теста. В трех из четырех клеточных линий рака легкого человека (NCI-H1299, Calu-1 и A549) активность промотора ARE-hTERT была в 2–3 раза выше активности промотора hTERT, тогда как в клетках линии NCI-H358

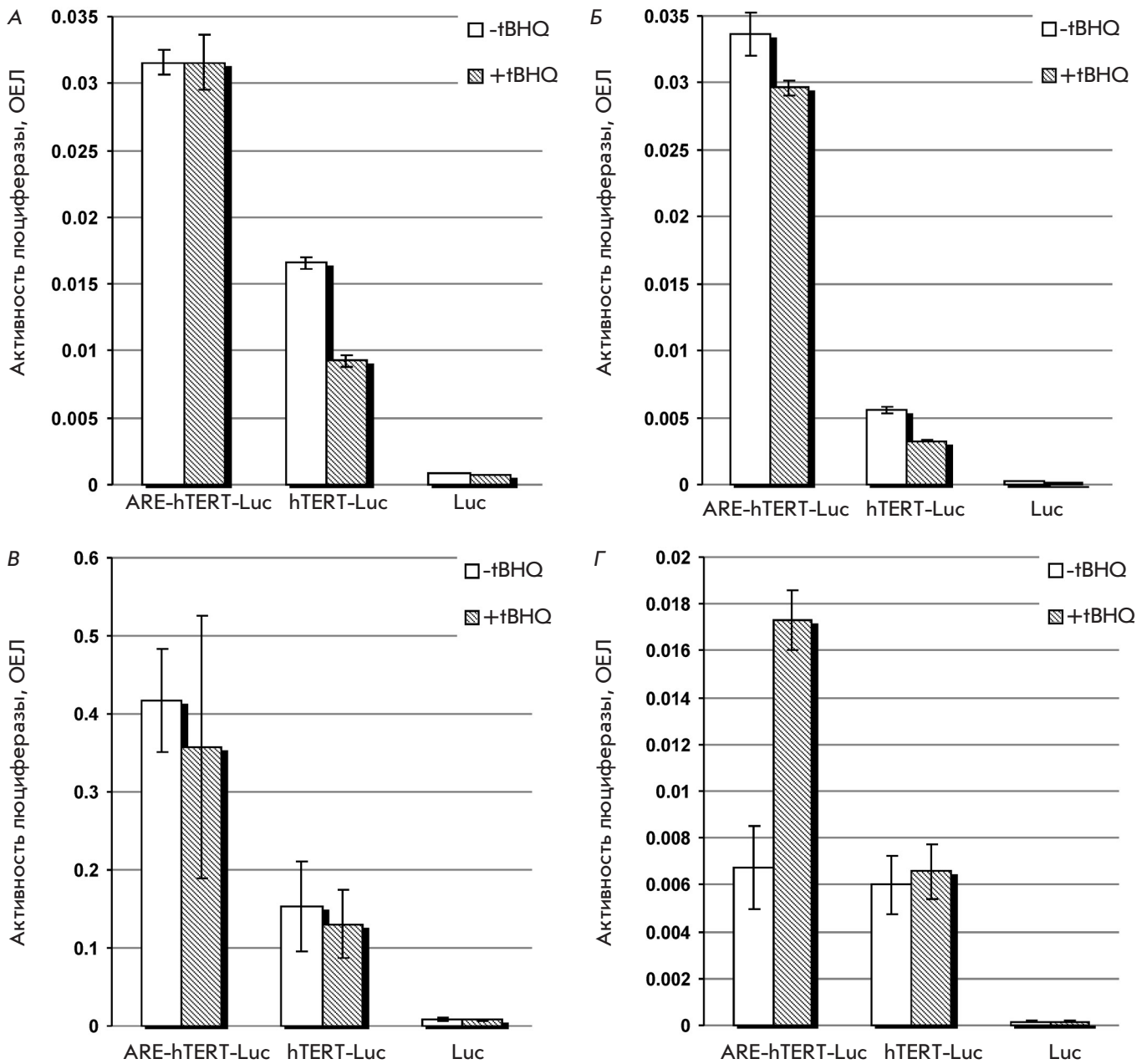
присутствие ARE не влияло на активность промотора (рис. 1, образцы «-tBHQ»). Важно отметить, что не выявлено влияния ARE на активность гибридного промотора в неопухолевых клетках HBePC: относительная активность люциферазы в клетках, трансфицированных плазмидами pARE-hTERT-Luc и rhTERT-Luc, составляла  $1.41 \pm 0.45$  и  $1.00 \pm 0.214$  ( $P = 0.2272$ , двунаправленный *t*-критерий Стьюдента) соответственно. Следовательно, в трех из четырех клеточных линий рака легкого человека промотор ARE-hTERT был более активен, чем промотор hTERT, при этом модификация не влияла на его активность в нормальных клетках.

### Индукция окислительного стресса стимулирует активность гибридного промотора

Мы изучали возможность увеличения активности промотора ARE-hTERT в опухолевых клетках под действием окислительного стресса. Обработка клеток линии NCI-H358 веществом tBHQ приводила к ~2.5-кратному увеличению активности репортерного гена люциферазы под контролем промотора ARE-hTERT, но не влияла на активность промотора hTERT (рис. 1, образцы «+tBHQ»), что согласуется с данными о влиянии внешнего окислительного стресса на активность ARE гена *GCLM* [12]. Добавление tBHQ не влияло на активность промотора ARE-hTERT в клетках Calu-1, A549 и NCI-H1299, в которых активность промотора ARE-hTERT была существенно выше активности hTERT-промотора в отсутствие индукции окислительного стресса (рис. 1, образцы «+tBHQ»). Таким образом, в опухолевых клетках в базальных условиях гибридный промотор ARE-hTERT проявляет более высокую активность, чем промотор hTERT. Это может быть следствием часто наблюдаемой в опухолевых клетках аномальной активации транскрипционного фактора Nrf2, обусловленной соматическими мутациями, либо повышенным уровнем активных форм кислорода (АФК) [14–19]. Транскрипционную активность промотора ARE-hTERT в клетках с ее низким базальным уровнем можно увеличить путем обработки клеток индукторами окислительного стресса, такими, как tBHQ.

### Гибридный промотор ARE-hTERT повышает эффективность суицидальной генной терапии рака *in vitro* при использовании схемы фермент-пролекарство

Повышенная активность гибридного промотора ARE-hTERT в клетках NCI-H1299, Calu-1 и A549, наблюдаемая в люциферазном тесте, указывает на то, что введение ARE может улучшить свойства векторов для генной терапии рака. Чтобы получить прямой



**Рис. 1.** Влияние модификации промотора hTERT с помощью последовательности ARE на активность репортерного гена люциферазы в клеточных линиях рака легкого. Активность репортерного гена люциферазы измеряли в клеточных линиях NCI-H1299 (А), Calu-1 (Б), A549 (B) и NCI-H358 (Г), трансфицированных плазмидами rhTERT-Luc (*hTERT-Luc*), pARE-hTERT-Luc (*ARE-hTERT-Luc*) и плазмидой без промотора pGL3-Basic (*Luc*) вместе с плазмидой pRL-CMV для нормирования. Если указано (заштрихованные столбцы), клетки обрабатывали tBHQ в концентрации 100 мкМ в течение 24 ч. Данные показаны как средние значения OEЛ ± CO

ответ на этот вопрос, сравнили гибель опухолевых клеток, экспрессирующих терапевтический трансген под контролем промотора hTERT или ARE-hTERT, в схеме суицидальной генной терапии фермент-пролекарство ЦД : УФРТ–5ФЦ [20]. Как и ожидалось, экспрессия ЦД : УФРТ под контролем промотора

ARE-hTERT приводила к более выраженной гибели клеток Calu-1, A549 и NCI-H1299 в присутствии 5ФЦ в той же концентрации по сравнению с экспрессией под контролем промотора hTERT (рис. 2А–В). При этом в клетках NCI-H358 экспрессия ЦД : УФРТ под контролем ARE-hTERT лишь



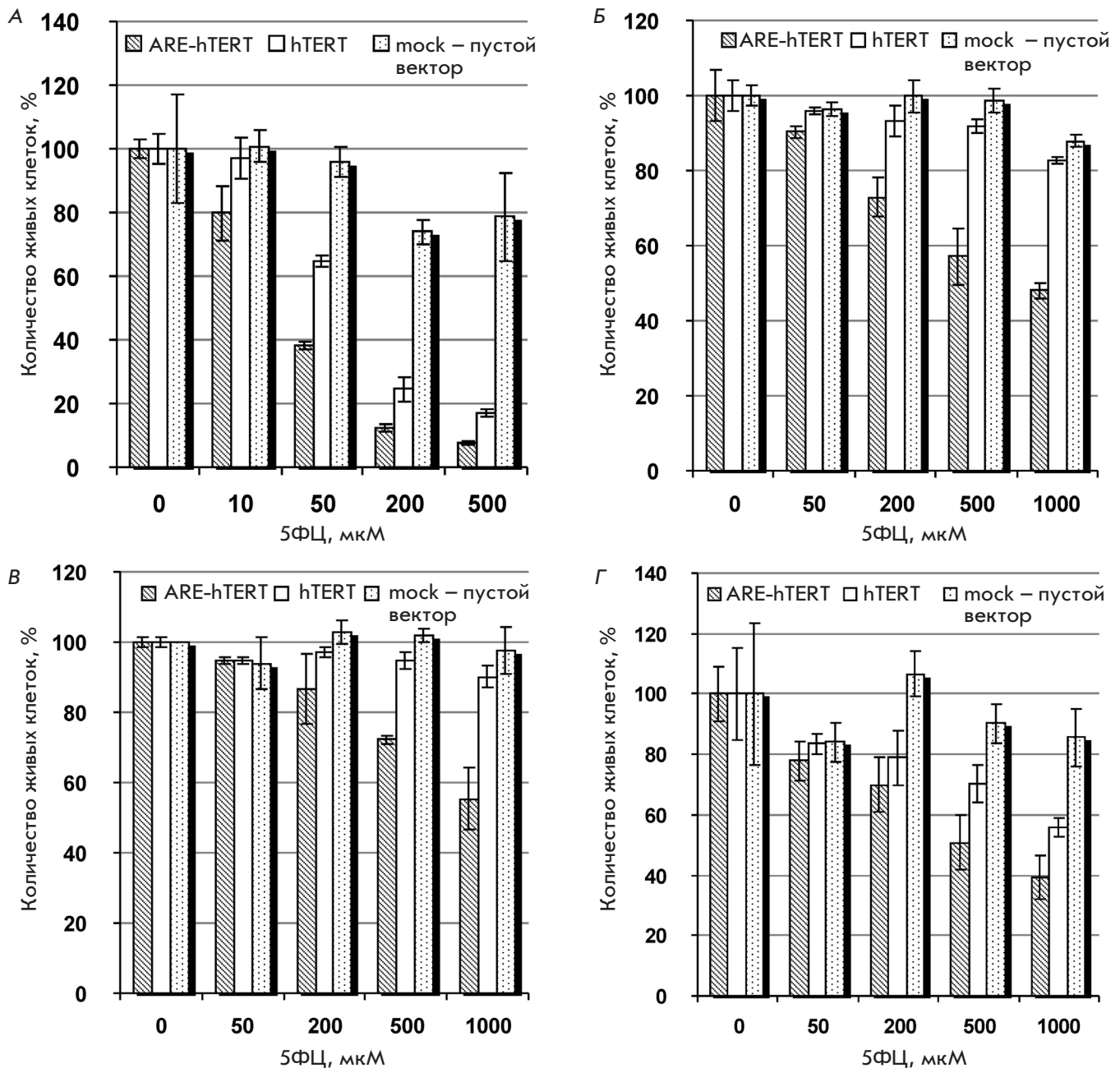


Рис. 2. Сравнение цитотоксического эффекта экспрессии ЦД : УФРТ под контролем промоторов hTERT и ARE-hTERT в присутствии 5ФЦ в клеточных линиях рака легкого. Показано относительное количество живых клеток NCI-H1299 (А), Calu-1 (Б), А549 (В) и NCI-H358 (Г), трансфицированных плазмидами рARE-hTERT-CD : UPRT (заштрихованные столбцы), рhTERT-CD : UPRT (пустые столбцы) и пустым вектором рВК-СМV (mock, столбцы с точками), после инкубации с 5ФЦ в указанных концентрациях. Данные показаны как среднее значение ( $\pm$  CO) количества живых клеток относительно количества живых клеток, трансфицированных теми же плазмидами, но инкубированных без 5ФЦ

незначительно влияла на уровень цитотоксичности по сравнению с экспрессией под контролем промотора hTERT (рис. 2Г), что согласуется с результатами люциферазного теста. Обработка клеток NCI-H358 индуктором окислительного стресса tBHQ суще-

ственно усиливала цитотоксический эффект лишь при использовании промотора ARE-hTERT (рис. 3). Обработка клеток NCI-H1299, Calu-1 и А549 индуктором tBHQ не приводила к усилению цитотоксичности в случае использования промотора ARE-hTERT

(данные не показаны), более активного в базальных условиях по сравнению с промотором hTERT (рис. 1).

**Экспрессия терапевтического трансгена под контролем промотора ARE-hTERT в схеме суицидальной генной терапии рака фермент-пролекарство более эффективно сенсibiliзирует опухолевые клетки к действию химиотерапевтических препаратов**

Сообщалось о том, что суицидальная генная терапия рака по схеме фермент-пролекарство под контролем ARE увеличивает чувствительность опухолевых клеток к химиотерапевтическим препаратам, в частности, к доксорубину [11]. Поэтому мы исследовали влияние промотора ARE-hTERT на цитотоксичность при суицидальной генной терапии комбинацией фермент-пролекарство ЦД : УФРТ-5ФЦ при одновременном использовании химиотерапевтических препаратов. Как видно из рис. 4А, экспрессия ЦД : УФРТ под контролем hTERT не вызывала гибель клеток NCI-H1299 в присутствии 10 мкМ 5ФЦ. Обработка 0.1 мкМ доксорубина приводила лишь к незначительной гибели клеток NCI-H1299. Важно отметить, что в тех же условиях использование промотора ARE-hTERT приводило к значительной гибели клеток (~40%), которая существенно потенцировалась при одновременной обработке доксорубином (рис. 4А). Сходные данные получены для клеток A549 и Calu-1, обработанных доксорубином, этопозином или цисплатином (рис. 4Б и данные не показаны). Важно отметить, что в использованных нами условиях генная терапия с применением промотора hTERT не оказывала эффекта, и не потенцировала действие химиотерапевтических препаратов. Тогда как модификация промотора с помощью ARE позволяла индуцировать выраженный цитотоксический эффект как в случае монотерапии, так и при комбинации с химиотерапевтическими препаратами.

**ОБСУЖДЕНИЕ**

В данной работе мы проверили гипотезу о том, что введение ARE в опухолеспецифический промотор, используемый для экспрессии трансгена в злокачественных клетках, может усилить активность промотора без существенного снижения опухолеспецифичности. Действительно, ранее было показано, что комбинация ARE и неселективного минимального промотора способна обеспечивать опухолеспецифическую экспрессию трансгена благодаря aberrантно активированному транскрипционному фактору Nrf2 [14-19] или вследствие присущего опухолевым клеткам высокого уровня АФК [11, 12]. Нами показано, что активность гибридного промотора, включающего промотор гена TERT человека и ARE из промотора

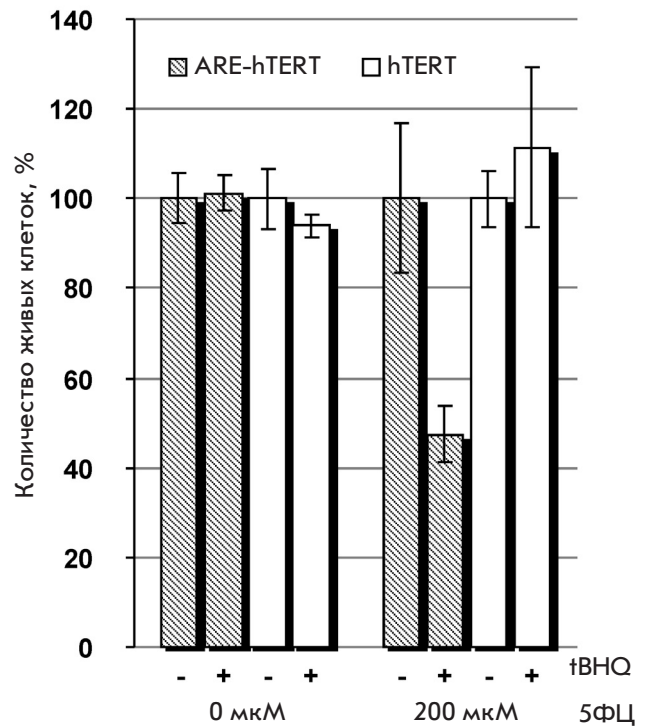


Рис. 3. В клетках NCI-H358 цитотоксический эффект от экспрессии ЦД : УФРТ под контролем промотора ARE-hTERT в присутствии 5ФЦ усиливается индуктором окислительного стресса. Клетки NCI-H358 трансфицировали плазмидами pARE-hTERT-CD : UPRT (заштрихованные столбцы) и rhTERT-CD : UPRT (пустые столбцы) и определяли количество живых клеток после инкубации в отсутствие или в присутствии 200 мкМ 5ФЦ и/или 100 мкМ tBHQ, как указано. Данные показаны как среднее значение (± CO) количества живых клеток относительно количества живых клеток в образцах, обработанных сходным образом, но инкубированных в отсутствие 5ФЦ

гена GCLM человека, была выше в трех из четырех клеточных линий рака легкого человека как при измерении активности репортерного гена люциферазы, так и в схеме суицидальной генной терапии фермент-пролекарство ЦД : УФРТ-5ФЦ *in vitro*. Модификация промотора hTERT с помощью ARE не влияла на его активность в клетках NCI-H358, что указывает на отсутствие аномальной регуляции Nrf2. Однако активность гибридного промотора в клетках NCI-H358 может стимулироваться индукторами окислительного стресса, такими, как tBHQ.

Важно отметить, что активность гибридного промотора ARE-hTERT не повышалась в первичных клетках эпителия бронхов человека HBEpC, что указывает на отсутствие влияния ARE на опухолеспецифичность транскрипции.

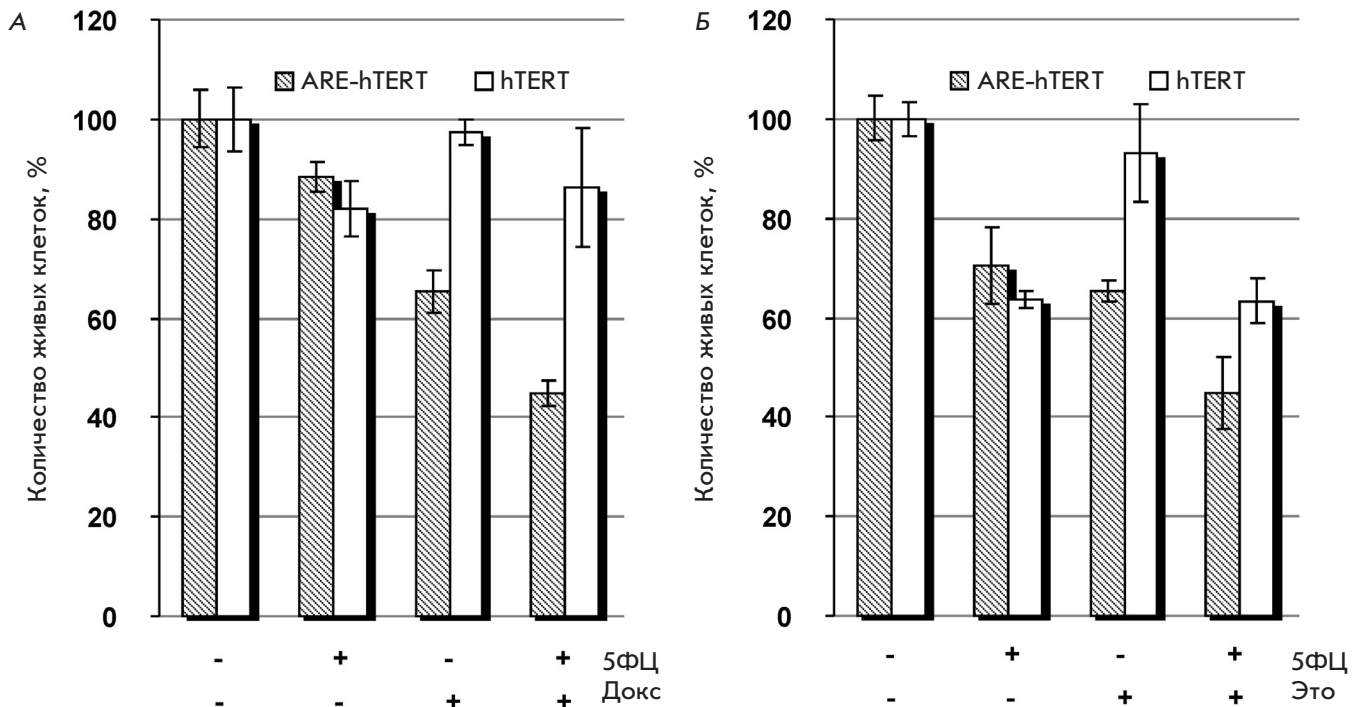


Рис. 4. Сравнение цитотоксического эффекта экспрессии ЦД : УФРТ под контролем промоторов hTERT и ARE-hTERT в присутствии комбинации 5ФЦ и химиотерапевтических препаратов в клеточных линиях рака легкого. Клетки NCI-H1299 (А) и А549 (Б) трансфицировали плазмидами рARE-hTERT-CD : UPRT (заштрихованные столбцы) и рhTERT-CD : UPRT (пустые столбцы) и инкубировали в отсутствие или в присутствии 10 мкМ 5ФЦ и 0.1 мкМ доксорубина (Докс) (А) или 500 мкМ 5ФЦ и 2 мкМ этопозиды (Это) (Б). Данные показаны как среднее значение ( $\pm$  СО) количества живых клеток относительно количества живых клеток в образцах, обработанных сходным образом, но инкубированных в отсутствие 5ФЦ и химиотерапевтических препаратов

Наши результаты показывают, что в существенной доле опухолей с активацией Nrf2 вследствие соматических мутаций гибридный промотор будет более активен, нежели обычный hTERT-промотор, при этом будет сохраняться высокая опухолеспецифичность экспрессии. Кроме того, опухолевые клетки в целом характеризуются повышенным уровнем АФК как *in vitro*, так и *in vivo*, что вызвано рядом факторов, таких, как изменение метаболизма и недостаточное кровоснабжение [21]. При этом многие химиотерапевтические препараты вызывают окислительный стресс, поэтому комбинация генной терапии с использованием промотора ARE-hTERT и химиотерапевтических препаратов *in vivo* способна еще больше увеличивать общую эффективность лечения за счет усиления экспрессии терапевтического трансгена.

Эффективность генной терапии рака определяется, прежде всего, уровнем экспрессии терапевтического трансгена, который должен быть достаточен для достижения требуемого эффекта. В данной рабо-

те мы использовали подход, основанный на системе фермент-пролекарство ЦД : УФРТ-5ФЦ, в котором общая эффективность терапии определяется эффективностью доставки плазмид в опухолевые клетки, активностью промотора и чувствительностью клеток к цитотоксическому веществу, которое образуется после конверсии пролекарства. Очевидно, эти параметры будут варьировать в различных типах клеток, потенциально приводя к снижению эффективности лечения. Действительно, схема генной терапии с экспрессией трансгена под контролем промотора hTERT не приводила к существенной гибели опухолевых клеток, и не наблюдалось потенцирования действия химиотерапевтических препаратов (рис. 4). Однако в тех же самых условиях генная терапия под контролем промотора ARE-hTERT вызывала цитотоксический эффект и существенно потенцировала цитотоксический эффект химиотерапевтических препаратов. Эти результаты показывают явные преимущества нового гибридного промотора ARE-hTERT в схемах генной терапии перед промотором hTERT.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Нами создан новый гибридный промотор, который сохраняет опухолеспецифичность базального промотора hTERT, но характеризуется повышенной транскрипционной активностью в опухолевых клетках, обусловленной или аномальной активацией транскрипционного фактора Nrf2, или повышением уровня АФК. Эти свойства позволяют рассматривать гибридный промотор ARE-hTERT как лучшую альтернативу промотору hTERT при использовании

в схемах генной терапии. Кроме того, комбинацию ARE-элементов с другими опухоле- или тканеспецифичными промоторами, используемыми для создания генно-терапевтических векторов, можно рассматривать как способ усиления их действия без существенной потери опухолеспецифичности. ●

*Работа выполнена при поддержке гранта  
РФФИ № 13-04-40173.*

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Shepelev M.V., Korobko E.V., Georgiev G.P., Sverdlov E.D., Korobko I.V. // *Cancer Gene Ther.* 2011. V. 18. № 9. P. 682–684.
2. Korobko I.V. // *Curr. Cancer Ther. Rev.* 2014. V. 10. № 3. P. 271–276.
3. Gu J., Fang B. // *Cancer Biol. Ther.* 2003. V. 2. № 4. Suppl. 1. P. S64–70.
4. Horikawa I., Cable P.L., Afshari C., Barret J.C. // *Cancer Res.* 1999. V. 59. № 4. P. 826–830.
5. Takakura M., Kyo S., Kanaya N., Hirano H., Takeda J., Yutsudo M., Inoue M. // *Cancer Res.* 1999. V. 59. № 3. P. 551–557.
6. Horikawa I., Barrett J.C. // *Carcinogenesis.* 2003. V. 24. № 7. P. 1167–1176.
7. Poole J.C., Andrews L.G., Tollefsbol T.O. // *Gene.* 2001. V. 269. № 1–2. P. 1–12.
8. Wirth T., Zender L., Schulte B., Mundt B., Plentz R., Rudolph K.L., Manns M., Kubicka S., Kühnel F. // *Cancer Res.* 2003. V. 63. № 12. P. 3181–3188.
9. Davis J.J., Wang L., Dong F., Zhang L., Guo W., Teraishi F., Xu K., Ji L., Fang B. // *Cancer Gene Ther.* 2006. V. 13. № 7. P. 720–723.
10. Shepelev M.V., Kopantzev E.P., Vinogradova T.V., Sverdlov E.D., Korobko I.V. // *Oncol. Lett.* 2016. V. 12. № 2. P. 1204–1210.
11. Leinonen H.M., Ruotsalainen A.K., Määttä A.M., Laitinen H.M., Kuosmanen S.M., Kansanen E., Pikkarainen J.T., Lappalainen J.P., Samaranayake H., Lesch H.P., et al. // *Cancer Res.* 2012. V. 72. № 3. P. 6227–6235.
12. Hurttila H., Koponen J.K., Kansanen E., Jyrkkänen H.K., Kivelä A., Kylätie R., Ylä-Herttua S., Levonen A.L. // *Gene Ther.* 2008. V. 15. № 18. P. 1271–1279.
13. Kuzmin D.V., Vinogradova T.V., Kopantzev E.P., Sverdlov E.D. // *Open Gene Ther. J.* 2010. V. 3. P. 31–39.
14. Hayes J.D., McMahon M. // *Trends Biochem. Sci.* 2009. V. 34. № 4. P. 176–188.
15. Kim Y.R., Oh J.E., Kim M.S., Kang M.R., Park S.W., Han J.Y., Eom H.S., Yoo N.J., Lee S.H. // *J. Pathol.* 2010. V. 220. № 4. P. 446–451.
16. Konstantinopoulos P.A., Spentzos D., Fountzilas E., Francoeur N., Sanisetty S., Grammatikos A.P., Hecht J.L., Cannistra S.A. // *Cancer Res.* 2011. V. 71. № 15. P. 5081–5089.
17. Seng S., Avraham H.K., Birrane G., Jiang S., Li H., Katz G., Bass C.E., Zagazdzon R., Avraham S. // *Oncogene.* 2009. V. 28. № 3. P. 378–389.
18. Zhang P., Singh A., Yegnasubramanian S., Esopi D., Kombairaju P., Bodas M., Wu H., Bova S.G., Biswal S. // *Mol. Cancer Ther.* 2010. V. 9. № 2. P. 336–346.
19. Cairns R.A., Harris I.S., Mak T.W. // *Nat. Rev. Cancer.* 2011. V. 11. № 2. P. 85–95.
20. Adachi Y., Tamiya T., Ichikawa T., Terada K., Ono Y., Matsu-moto K., Furuta T., Hamada H., Ohmoto T. // *Hum. Gene Ther.* 2000. V. 11. № 1. P. 77–89.
21. Brown N.S., Bicknell R. // *Breast Cancer Res.* 2001. V. 3. № 5. P. 323–327.