

УДК 577.214

Суперэнхансеры в регуляции транскрипции генов: общебиологические аспекты и мишени противоопухолевой терапии

А. В. Брутер^{1,2*}, М. Д. Родионова³, Е. А. Варламова^{1,2}, А. А. Штиль^{1,2}¹Институт биологии гена РАН, Москва, 119334 Россия²Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина, Москва, 115478 Россия³Университет ИТМО, Санкт-Петербург, 197101 Россия

*E-mail: aleabruter@gmail.com

Поступила в редакцию 30.06.2020

Принята к печати 07.09.2020

DOI: 10.32607/actanaturae.11067

РЕФЕРАТ Суперэнхансеры – элементы генома, активирующие транскрипцию генов, – представляют собой участки ДНК с повышенной концентрацией транскрипционных комплексов. В таких мультибелковых структурах особая роль принадлежит транскрипционным протеинкиназам, главным образом, циклинза-висимым киназам 8 и 19. Эти уникальные белки рассматриваются как новые мишени противоопухолевых соединений.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА транскрипция, суперэнхансеры, транскрипционные протеинкиназы, мишень-направленная терапия, опухоли.

ВВЕДЕНИЕ

Матричный синтез молекул, в частности, транскрипция генов – важнейший процесс в живой природе. Этот эволюционно консервативный механизм встречается во всех без исключения организмах – от вирусов до высших млекопитающих. Его биологическая роль – передача и закрепление в потомстве генетической информации от макромолекулы-матрицы. Краеугольное значение транскрипции не ограничено «нормальными» процессами – онто- и филогенезом, видообразованием, обеспечением биологического многообразия, контролем наследственности и др. Углубление представлений о молекулярных механизмах транскрипции позволяет раскрыть ее фундаментальное значение для патологических процессов. Сегодня невозможно интерпретировать этиологию и патогенез заболеваний без анализа регуляции экспрессии генов в патологическом очаге. Правомерно утверждать, что именно дифференциальная экспрессия генов – изменения набора функционирующих генов, активности (интенсивности) и временной регуляции экспрессии по сравнению с физиологической ситуацией – определяет сущность болезни как «транскрипционный дисбаланс».

На этой основе формируется современный подход к терапии – мишень-направленное (таргетное)

воздействие на конкретные механизмы транскрипции. Эти механизмы в клетках млекопитающих необычайно многообразны, взаимозаменяемы и недостаточно изучены; к тому же ряд этих механизмов не поддается фармакологической регуляции (undruggable targets). Поэтому таргетная «транскрипционная терапия» делает лишь первые шаги.

На какие структурно-функциональные элементы транскрипционного аппарата можно воздействовать для регуляции генной экспрессии? Какие именно механизмы регулировать и как эта проблема решается в аспекте пространственной организации транскрипции? Требуются исследования регуляторных областей генов – промоторов и энхансеров: их функции состоят в обеспечении правильной локализации мультибелковых транскрипционных комплексов, старта транскрипции и регуляции ее скорости. Поскольку протеинкиназы – едва ли не наиболее распространенные мишени в современном дизайне лекарств, не случайно среди разнообразия механизмов регуляции экспрессии генов транскрипционные киназы – отдельный класс серин-треониновых фосфотрансфераз – становятся объектом исследования как возможные мишени лекарственных воздействий.

В настоящем обзоре анализируются элементы генома, в которых особенно велико присутствие

транскрипционных «машин»: суперэнхансеры и ассоциированные с ними белки – транскрипционные факторы, кофакторы и протеинкиназы. Мы рассматриваем эти элементы как структурно-функциональные единицы транскрипционного аппарата и терапевтические мишени в опухолевых клетках.

СУПЕРЭНХАНСЕРЫ: ОСОБЕННЫЕ ЭНХАНСЕРЫ!

Определение понятия

Концепция суперэнхансеров впервые сформулирована при изучении регуляции экспрессии генов в эмбриональных стволовых клетках. Whyte и соавт. [1] обнаружили особенности регуляторных областей генов, активная экспрессия которых связана с поддержанием недифференцированного плюрипотентного состояния (*Oct4*, *Sox2*, *Nanog*, *Klf4*, *Esrrb*, микроРНК miR-290-295 и т.д.). Эти участки генома отличались от обычных энхансеров по протяженности и расстоянию от регулируемого гена, а также по количеству и набору связанных с ними транскрипционных факторов. Среди транскрипционных факторов преобладали *Oct4*, *Sox2*, *Nanog*, *Klf4* и *Esrrb* (присутствие двух последних в обычных энхансерах особенно отличается от присутствия в суперэнхансерах) – ключевые транскрипционные факторы, поддерживающие и даже способные индуцировать плюрипотентное состояние эмбриональных клеток, а также *Med1* – компонент комплекса Mediator. Выявленные области были названы суперэнхансерами. Уже в первом исследовании обнаружили важную особенность суперэнхансеров – при изменении уровня транскрипционных факторов в клетке, например, при частичном снижении количества *Oct4* или комплекса Mediator транскрипция соответствующих генов прекращалась, в то время как транскрипция генов, регулируемых обычными энхансерами, изменялась незначительно [1].

Попытка дать обобщенное определение понятию «суперэнхансер» приводит к необходимости провести границу между этими участками генома и обычными энхансерами. Эта граница оказывается условной (см. ниже). Определение суперэнхансеров носит эмпирический характер и опирается на два критерия. К суперэнхансерам относят участки генома со следующими особенностями: 1) участки, содержащие протяженные (до 12.5 т.п.н.) группы энхансеров, 2) участки с аномально высоким связыванием определенного набора транскрипционных факторов (как правило, транскрипционные факторы, существенные для физиологии клеток данного типа: *Oct4*, *Sox2* и *Nanog* в эмбриональных стволовых клетках, *MyoD* – важнейший тканеспецифичный транскрипционный фактор в мышечных клетках [2] и т.д.)

и кофакторов. На практике эти два структурных критерия коррелируют с двумя функциональными критериями: высоким уровнем экспрессии регулируемых суперэнхансерами генов и резким изменением уровня экспрессии в ответ на небольшие изменения концентрации транскрипционных факторов [1, 3].

Хотя несколько тысяч энхансеров регулируют экспрессию тысяч генов, лишь несколько сотен суперэнхансеров регулируют экспрессию генов, продукты которых особенно важны для клеток данного типа [1, 4–6]. Кроме того, некоторые суперэнхансеры функционируют по механизму положительной обратной связи: суперэнхансерами регулируется экспрессия генов, кодирующих транскрипционные факторы, активирующие гены, регулируемые суперэнхансерами. К таким генам относятся *Oct4*, *Sox2*, *Nanog*, *Klf4*, *Esrrb*, *Prdm14* [6].

Примечательно, что в ходе эволюции суперэнхансерами «обзавелись» многие гены, играющие ключевую роль в биологии клетки, но не так называемые гены «домашнего хозяйства», характеризующиеся только стабильно высоким уровнем экспрессии. Суперэнхансеры чаще обычных энхансеров оказываются финальной мишенью основных сигнальных каскадов. Кроме повышенного связывания с транскрипционными факторами (*Oct4*, *Sox2*, *Nanog* и т.д.), регулирующими поддержание недифференцированного состояния эмбриональных стволовых клеток, обнаружено повышенное связывание суперэнхансеров с транскрипционными факторами, замыкающими важные сигнальные каскады: TCF3 (каскад WNT), SMAD3 (каскад TGF- β), STAT1 (JAK-STAT) и STAT3 (LIF) [7, 8].

Идентификация суперэнхансеров в геноме

Наиболее распространенный метод идентификации активных суперэнхансеров основан на характерном эпигенетическом состоянии, присущем активным энхансерам: монометилировании вместо триметилирования лизина в положении 4 гистона 3 (H3K4me1; позволяет отграничить энхансеры от активных промоторов) и ацетилировании лизина в положении 27 гистона 3 (H3K27ac; «маркирует» активные энхансеры в отличие от неактивных регуляторных элементов) [1, 3, 9]. На первом, экспериментальном, этапе проводят иммунопреципитацию H3K27ac участков хроматина с последующим секвенированием связанных с ними фрагментов ДНК. Полученные данные обрабатывают биоинформатическими методами (см. [1, 4]). Обнаруженные при секвенировании последовательности ДНК сравнивают с соответствующим геномом и выявляют многократно обнаруженные участки (так называемые пики). Пики, отстоящие друг от друга менее чем на 12.5 т.п.н., объединяют

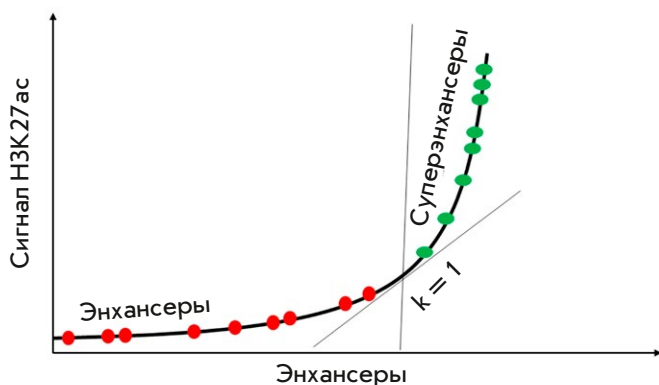


Рис. 1. Схема разделения регуляторных элементов на обычные энхансеры и суперэнхансеры. Показано распределение энхансеров по количеству связанных с ними молекул H3K27ac. Адаптировано из [3, 10]

в единые протяженные энхансеры. Затем нормируют плотность H3K27ac в обогащенных местах на среднюю плотность H3K27ac для данного участка генома и располагают энхансеры по возрастанию обогащения. Полученная кривая характеризуется резким ростом в области высокого обогащения гистонами 3 с ацетилированным лизином-27. Содержащиеся в этой области энхансеры и относят к суперэнхансерам; критерий – нахождение энхансера на графике (рис. 1) справа от точки, в которой производная кривой обогащения равна 1 [10].

Наряду с обогащением гистоновыми «метками», для выявления суперэнхансеров могут использоваться и другие молекулярные критерии активной транскрипции: чувствительность к ДНКазе I, увеличенное связывание транскрипционных факторов (Oct4, Sox2, Nanog и др.), присутствие активаторов Med1 и p300 [1, 3, 6]. В базе данных SEdb [11] представлено более 300 000 суперэнхансеров из 542 образцов, полученных из линий клеток человека. Указаны различия в количестве суперэнхансеров между отдельными линиями неопухолевых и опухолевых клеток. Эта база данных позволяет детально анализировать нуклеотидные последовательности суперэнхансеров, выявлять сайты связывания транскрипционных факторов, полиморфизм и др.

Определенные тем или иным методом суперэнхансеры часто состоят всего из нескольких одиночных энхансеров, а около 15% суперэнхансеров – только из одного [12]. Столь нечеткое эмпирическое определение, основанное к тому же на условном выборе границы между обычными энхансерами и суперэнхансерами, позволяет поставить вопрос: действительно ли суперэнхансеры – отдельный класс регуляторных элементов или это особенно эффективная разновидность энхансеров?

ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ СУПЕРЭНХАНСЕРОВ

Различие между обычными энхансерами и суперэнхансерами ярко проявляется в характере зависимости активности транскрипции, обеспечиваемой регуляторным элементом и количеством связанных с ним транскрипционных факторов и кофакторов. У обычных энхансеров эта зависимость линейная, а для суперэнхансеров она имеет вид «все или ничего» [1, 13], напоминающий зависимости, описывающие фазовые переходы в рамках статистической термодинамики. На практике это выражается в высокой чувствительности суперэнхансеров к изменениям условий. Делеция небольшого участка или снижение концентрации одного из кофакторов (BRD4, CDK7) может полностью инактивировать суперэнхансер [4, 6, 14, 15]. Подробный анализ этих механизмов приведен ниже.

Для объяснения закономерностей функционирования суперэнхансеров предложена модель фазовой сепарации [13]. Высокая концентрация интенсивно взаимодействующих молекул приводит к формированию своего рода безмембранной органеллы, фазово отделенной от остального содержимого ядра. Модель учитывает два численных показателя: количество молекул в заданном объеме (ДНК, гистоны, транскрипционные факторы и кофакторы) (принято, что в среднем оно равно 10 для обычного энхансера и 50 для суперэнхансера) и «валентность» этих молекул – число, описывающее количество взаимодействий, доступных молекуле. Транскрипционная активность в этой модели определяется по доле молекул, взаимодействующих между собой в данный момент (рис. 2, 3). Состояние фазовой сепарации наступает, когда взаимодействуют почти все молекулы, т.е. доля взаимодействующих молекул приближается к 1. Транскрипционная активность при этом увеличивается до максимума. Валентность молекул в системе может расти, например, при ремоделировании и активации хроматина в районе энхансера или суперэнхансера. Математическое моделирование показало, что транскрипционная активность обычного энхансера зависит от валентности системы линейно, а в случае суперэнхансера при относительно небольших значениях валентности происходят фазовая сепарация и резкое увеличение транскрипционной активности практически до максимума.

Согласно этой модели, при ингибировании кофактора или делеции сайта связывания валентность снижается. В случае суперэнхансера это приводит к резкому падению транскрипционной активности от максимального значения до минимального.

Кроме молекул ДНК и белков, в состав комплекса входят и энхансерные РНК (эРНК) – некодирующие РНК, транскрибирующиеся с энхансеров.

Среди них присутствуют короткоживущие короткие РНК без поли(А)-участков, способные транскрибироваться в обоих направлениях, и более длинные с поли(А)-участками (транскрибируются только в 5'→3'-направлении). эРНК участвуют в организации взаимодействия промоторов с энхансерами: увеличивают прочность связывания транскрипци-

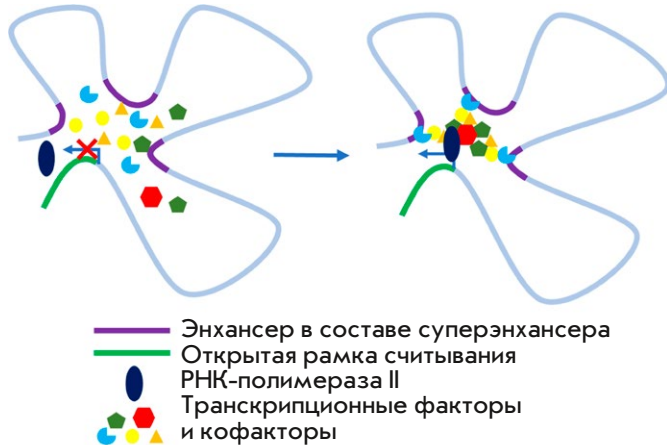


Рис. 2. Суперэнхансеры в модели фазовой сепарации. Транскрипционные факторы и коактиваторы взаимодействуют с разными участками суперэнхансера и друг с другом. Высокая интенсивность их взаимодействия приводит к фазовой сепарации ДНК-белкового транскрипционного комплекса и резкому росту активности транскрипции. Слева отражена ситуация до начала взаимодействия и сепарации. Синтез мРНК РНК-полимеразой II не происходит. Справа – ситуация после сепарации и активации транскрипции. Адаптировано из [13]

онных факторов с ДНК, привлекают и активируют кофакторы, сокращают транскрипционную паузу. Суперэнхансеры экспрессируют эРНК на более высоком уровне, чем обычные энхансеры; кроме того, эРНК чаще экспрессируются с суперэнхансеров, чем с обычных энхансеров [10]. эРНК могут участвовать в активации экспрессии соответствующего гена, но могут активировать и другие гены, в том числе расположенные на других хромосомах, распространяя таким образом действие энхансера (дистантная регуляция генома) [16].

СУПЕРЭНХАНСЕРЫ В РЕГУЛЯЦИИ НОРМАЛЬНЫХ И ПАТОЛОГИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ

Суперэнхансеры значительно чаще, чем обычные энхансеры, оказываются регуляторами ключевых процессов в нормальных клетках и при патологических процессах [6]. Суперэнхансер *IgH 3'RR*, расположенный в 3'-регуляторной области локуса *IgH* на 14-й хромосоме в геноме человека, регулирует рекомбинацию в В-клетках, в частности, VDJ-рекомбинацию в В1-клетках [17] и переключение изотипа в зависимости от внешнего сигнала в В2-клетках [18]. Другой элемент, важный для этого процесса – суперэнхансер локуса *Aicda*. Ферменты семейства ТЕТ, обеспечивающие деметилирование этого суперэнхансера, необходимы для переключения изотипа [19]. Конверсия адипоцитов из бурого жира в белый сопровождается активацией суперэнхансера, связанного с геном ядерного рецептора PPAR γ [20]. Также за счет активации суперэнхансера происходит индукция синтеза ренина клетками почек, в обычных условиях не синтезирующими ренин. Активация

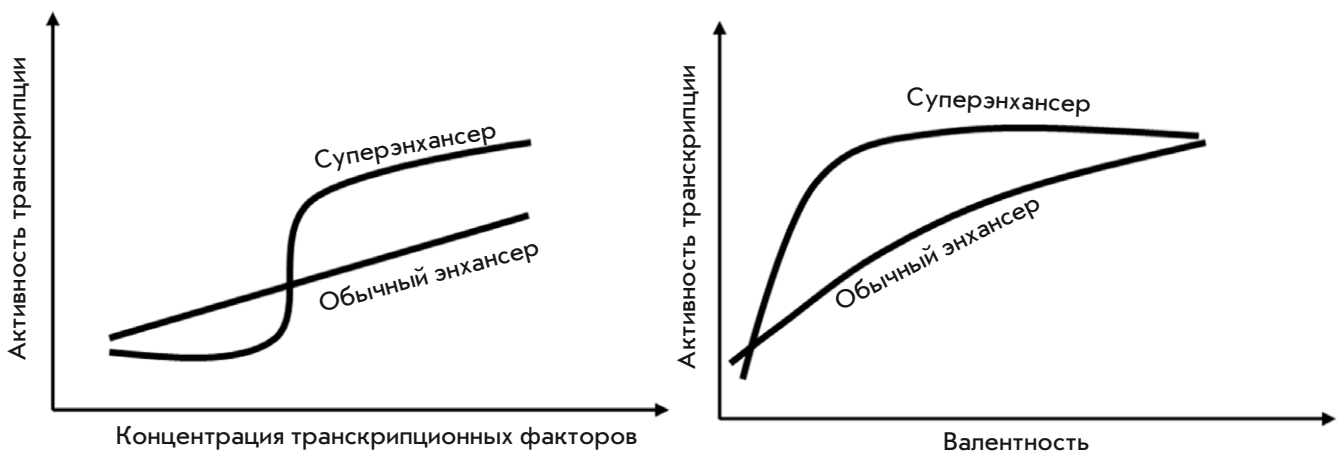


Рис. 3. А – обобщенная зависимость активности транскрипции, регулируемой энхансером и суперэнхансером, от концентрации транскрипционных факторов. Б – зависимость активности экспрессии энхансера и суперэнхансера от валентности – количества доступных межмолекулярных взаимодействий в рамках теории фазовой сепарации. Обычный энхансер моделирован системой, состоящей из 10 молекул, а суперэнхансер – из 50. Адаптировано из [13]

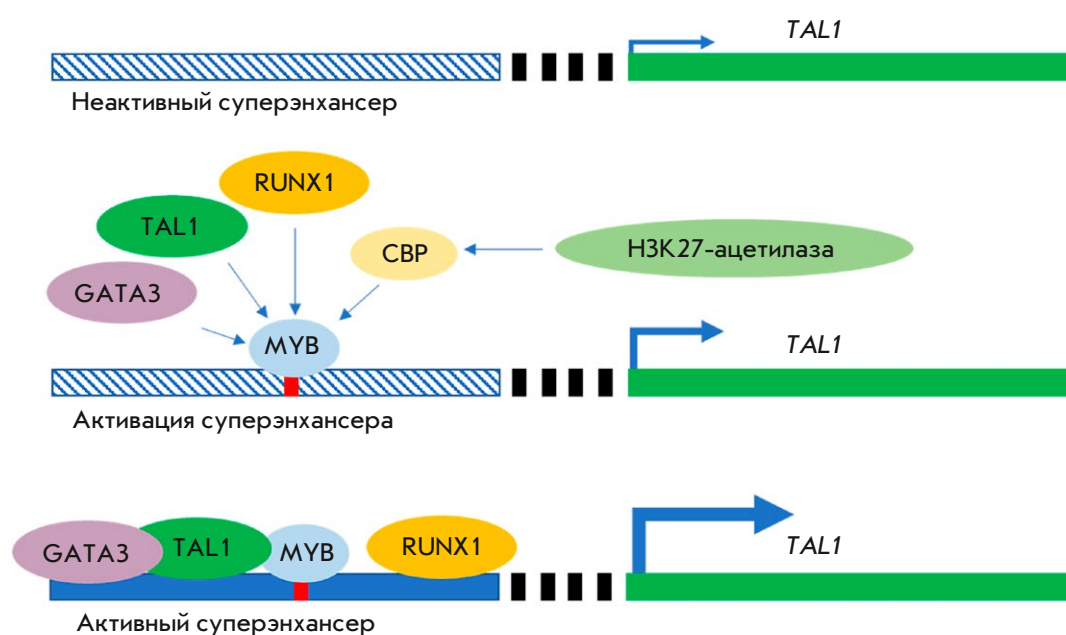


Рис. 4. Инсерция сайта связывания транскрипционного фактора Муб активирует суперэнхансер, регулирующий экспрессию онкогена *TAL1*. Связанный с ДНК Муб привлекает белок СВР (cyclic AMP response element binding protein) и его партнера – гистонацетилазу H3K27, активирующую хроматин в районе суперэнхансера, а также дополнительные транскрипционные факторы

суперэнхансера происходит только в потомках эмбриональных ренинпродуцирующих клеток [21]. Регулируемая суперэнхансером циркРНК (circNfix), специфичная для зрелых кардиомиоцитов [22], не позволяет делиться зрелым кардиомиоцитам, а ее подавление улучшает регенерацию тканей после экспериментального инфаркта миокарда у мышей.

Точечные мутации в некодирующих областях генома составляют около 90% от всех мутаций, связанных с болезнями (согласно GWAS, genome wide association studies). Такие мутации чаще встречаются в суперэнхансерах, чем в обычных энхансерах. Этот вывод подтвержден и при сравнении суперэнхансеров в разных типах клеток одного пациента: в патологическом очаге и вне его. Мутации (single nucleotide polymorphism, SNP) в суперэнхансерах связаны с болезнью Альцгеймера, системной красной волчанкой, сахарным диабетом типа 1 и др. Так, несколько SNP обнаружены в суперэнхансере гена *BIN1*, повышенная экспрессия которого связана с риском развития болезни Альцгеймера. В случае диабета типа 1 повышенное содержание мутаций обнаружено в суперэнхансерах Т-хелперов. Полиморфизмы, связанные с системной красной волчанкой, оказались сконцентрированы в суперэнхансерах генов, ключевых для В-клеток [6].

Суперэнхансеры также могут эпигенетически активироваться в ответ на внешние стимулы. Например, при воспалении активация транскрипционного фактора NF-κB в эндотелиальных клетках может приводить к формированию активных суперэнхансеров и поддержанию высокой экспрес-

сии генов, продукты которых способствуют адгезии лейкоцитов (*SELE*, *VCAM1*), а также хемокина *CCL2*. Активация суперэнхансеров происходила за счет связывания ацетилированной формы NF-κB с BRD4. При ингибировании BRD4 активации суперэнхансеров не наблюдалось [23].

Суперэнхансеры в опухолевых клетках

Высокий уровень экспрессии онкогенов в злокачественных клетках может быть обусловлен появлением нового суперэнхансера. Ускоренная пролиферация злокачественных клеток регулируется сигнальными каскадами. Интенсивность пролиферации клеток аденокарциномы толстой кишки (линия HCT116) зависит от активации сигнального пути Wnt; в этой линии активирован суперэнхансер в локусе *c-MYC*. Наряду с этим обнаружено повышенное связывание с суперэнхансером транскрипционного фактора TCF4 – эффектора Wnt-каскада. Аналогичный механизм регуляции обнаружен в клетках эстрогензависимого рака молочной железы [7].

Возникновение суперэнхансеров в опухолевых клетках происходит по тем же механизмам, как и любые изменения экспрессии генов. В злокачественной трансформации клеток могут участвовать как генетические механизмы: хромосомные транслокации [6], амплификация [24–27], делеции, инсерции [28] и точечные мутации, так и эпигенетические – активация экспрессии онкогенов [4, 6, 11, 29–31] или снижение экспрессии антионкогенов [8, 31–33]. В первом варианте возможно возникновение новых и исчезновение ранее существовавших супер-

энхансеров, а также перемещение потенциальных онкогенов под контроль несвойственных им активных суперэнхансеров. Эпигенетическая регуляция представлена активацией или инактивацией соответствующих суперэнхансеров.

Локус *c-Myc* особенно часто приобретает суперэнхансеры в процессе канцерогенеза. В клетках множественной миеломы суперэнхансер, регулирующий экспрессию генов локуса *igH*, оказывается в локусе *c-Myc* путем транслокации [6]. У отдельных пациентов с острым Т-клеточным лейкозом обнаружены редупликации в некодирующей области, соответствующей суперэнхансеру, регулирующему ген *c-Myc*. Амплифицированный фрагмент обеспечивает Notch-зависимое функционирование суперэнхансера [25]. С амплифицированным участком оказались связаны белки комплекса SWI/SNF, ремоделирующего хроматин и важного для пролиферации опухолевых клеток [34]. Фокальные амплификации (копирование небольшого участка генома с последующим переносом копий в произвольные места генома) суперэнхансеров в 3'-регуляторную область гена *c-Myc* обнаружены в опухолях легкого и эндометрия [26]. Аналогичным образом фокальная амплификация суперэнхансера в 3'-регуляторную область гена *KLF4* и увеличение его экспрессии обнаружены при плоскоклеточном раке головы и шеи [27]. При Т-клеточных лейкозах небольшая (2–12 п.н.) инсерция, образующая сайт связывания транскрипционного фактора Myb, опосредует формирование активного суперэнхансера размером 8 т.п.н., привлекая дополнительные транскрипционные факторы [28] (рис. 4).

Важный генетический механизм злокачественной трансформации клеток представлен нарушением границ топологически ассоциированных доменов (ТАД) – участков хромосом длиной около 1 млн п.н., фактически изолированных друг от друга. Фрагменты одного ТАД взаимодействуют между собой гораздо чаще, чем фрагменты разных ТАД. Разделение на эти домены эволюционно консервативно и, вероятно, возникло для предотвращения взаимодействия далеко расположенных энхансеров и суперэнхансеров с «чужими» промоторами. Границы между ТАД представляют собой сайты связывания репрессора транскрипции CTCF (CCGCGNGGNGGCAG) и ассоциированные с ними белковые комплексы CTCF–когезин. Мутации в генах, кодирующих когезин и CTCF, и в сайтах их связывания с ДНК часто обнаруживаются в трансформированных клетках [9]. В линии клеток Jurkat (CD4⁺8⁺ тимоциты) на границах ТАД обнаружены небольшие делеции. Воспроизведя эти делеции в эпителиоцитах (линия HEK293) с помощью системы

CRISPR/Cas9, выявили зависимость от суперэнхансера активацию онкогенов *TAL1* и *LMO1* [35].

Изменения в нуклеотидных последовательностях суперэнхансеров могут не только влиять на их связывание с белками, но и приводить к изменениям в последовательностях и количестве молекул эРНК. Определенные эРНК, связанные с «онкогенными» суперэнхансерами, обладают онкогенными свойствами сами по себе. Эти эРНК принимают участие в регуляции ключевых процессов: пролиферации, апоптоза, аутофагии, эпителиально-мезенхимального перехода и ангиогенеза [16].

В эпигенетической регуляции активности суперэнхансеров большую роль играет белок BRD4 (от bromodomain), связывающийся с ацетилированными остатками лизина в гистонах (т.е. с активным хроматином). При исследовании диффузных крупноклеточных В-клеточных лимфом показано, что 1/3 молекул BRD4 в клетке сосредоточены в суперэнхансерах. Экспрессия соответствующих генов оказалась очень чувствительной к фармакологическому ингибированию BRD4 [14]. Низкомолекулярный ингибитор BRD4 – соединение JQ1 – вызывал снижение экспрессии суперэнхансер-зависимых генов, в частности, онкогена *c-Myc* в клетках миеломы [4]. Высокий уровень экспрессии *c-Myc* в клетках рака толстой кишки (линии HCT116 и DLD1) также поддерживается суперэнхансером. Нокдаун генов *BRD4*, *MED12* и *MED13/13L* снижал зависимость от суперэнхансеров экспрессию генов и ингибировал пролиферацию клеток колоректального рака [29].

Неожиданный вариант эпигенетической активации суперэнхансеров обнаружен при изучении инфекции В-клеток вирусом Эпштейна–Барр. В зараженных клетках этот вирус синтезирует собственные транскрипционные факторы EBNA2, 3A, 3C и EBNA-LP и активирует некоторые клеточные (RelA, RelB). Эти транскрипционные факторы формируют активные суперэнхансеры, регулирующие ключевые для выживания клеток гены *c-Myc*, *MIR155*, *IKZF3* и *Bcl-2*. Активация суперэнхансеров чувствительна к ингибированию BRD4 – ее отменяло соединение JQ1 [36].

Суперэнхансеры также регулируют статус дифференцировки опухолевых стволовых клеток, что может быть использовано в терапевтических стратегиях. Для поддержания плюрипотентного состояния стволовых клеток глиомы важен белок ELOVL2 (elongation of very long chain fatty acids protein 2), экспрессия которого в этих клетках особенно высока и запускается эпигенетической активацией соответствующего суперэнхансера. ELOVL2 играет ключевую роль в синтезе полиненасыщенных жирных кислот – компонентов плазматической

мембраны, а также участвует в передаче сигналов от рецептора эпидермального фактора роста (EGFR). Селективная инактивация суперэнхансера ELOVL2 методом dCas9-KRAB приводит к посттранскрипционному снижению уровня EGFR [30]. Потеря функциональной активности В-клеточным регулятором транскрипции Ikaros ассоциирована с негативным прогнозом при В-клеточном остром лимфобластном лейкозе. Это объясняется тем, что Ikaros необходим для терминальной дифференцировки быстро пролиферирующих предшественников В-клеток. Интересна «двуликость» Ikaros: он поддерживает неактивное состояние хроматина в областях суперэнхансеров генов, экспрессия которых обуславливает недифференцированное состояние В-клеток, но также поддерживает и активный хроматин в суперэнхансерах генов, продукты которых важны для дифференцировки [31].

Приведенный пример иллюстрирует ситуацию, при которой злокачественный потенциал клетки обеспечивается не высокой экспрессией онкогенов, обусловленной суперэнхансерами, а инактивацией зависимой от суперэнхансеров экспрессии антионкогенов. В этой связи обоснованными представляются лечебные стратегии, направленные на реактивацию суперэнхансеров антионкогенов. Ниже проанализирована возможность реализации такой стратегии.

СУПЕРЭНХАНСЕРЫ КАК СРЕДОТОЧИЕ ТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ МИШЕНЕЙ

Как указано выше, суперэнхансеры обуславливают возможность принципиальным образом изменять транскрипционную программу даже в ответ на относительно слабое воздействие. Злокачественная трансформация нередко связана с возникновением (формированием) или активацией имевшегося, но не функционировавшего, суперэнхансера. Поэтому суперэнхансеры и ассоциированные с ними белки приобретают интерес как мишени для разработки противоопухолевых препаратов. Можно надеяться, что терапевтический эффект будет достигаться при относительно низких концентрациях таких препаратов (см. ниже).

В качестве терапевтических мишеней рассматривают два класса белков, связанных с суперэнхансерами: белки, имеющие бромодомен (в первую очередь, BRD4), и циклинзависимые протеинкиназы CDK4/6, CDK7, CDK8 и CDK12/13.

Белки, содержащие бромодомен

Белки, несущие консервативную лизинсвязывающую аминокислотную последовательность – бромодомен, обеспечивают функционирование суперэнхансеров, поддерживая активное состояние

хроматина благодаря взаимодействию с ацетилированными остатками лизина в белках хроматина. В результате этого взаимодействия к суперэнхансерам рекрутируются транскрипционные факторы и РНК-полимераза II. Ингибирование белков, несущих бромодомен, может приводить к инактивации хроматина.

Ингибиторы BRD4 – низкомолекулярные соединения JQ1 и I-BET151 – показали обнадеживающие результаты в доклинических моделях острого миелоидного лейкоза и множественной миеломы. Наблюдалось замедление роста опухолей, подавление экспрессии *Myc* и нижележащих транскрипционных программ [9]. Отдельные соединения, ингибирующие BRD2/3/4/T путем конкурентного связывания, проходят клинические испытания [37]. Тестирование ингибитора ABBV-075 (Mivebresib) проведено у 10 пациентов с устойчивыми к стандартной терапии и/или рецидивирующими формами острого миелоидного лейкоза, у одного из них достигнута полная ремиссия, количество бластных клеток в костном мозге у четверых сократилось минимум вдвое при хорошей переносимости лечения. Перспективным направлением является также комбинированная терапия [38].

Циклинзависимые протеинкиназы

Циклинзависимые киназы CDK4 и CDK6 играют ключевую роль в смене фаз клеточного цикла G1-S. Ингибиторы CDK4/6 палбоциклиб, рибоциклиб и абемациклиб включены в протоколы лечения гормончувствительного HER2-негативного рака молочной железы в качестве препаратов для монотерапии. В составе комбинированной терапии ингибиторы CDK4/6 проходят клинические испытания и при других вариантах рака молочной железы [39]. Селективные ингибиторы CDK4/6 оказывают цитостатическое действие и вызывают гибель клеток саркомы Юинга в культуре и *in vivo*, а также снижают экспрессию ряда генов, зависимых от суперэнхансеров, в частности циклина D1 [40].

Особая группа циклинзависимых протеинкиназ не участвует в регуляции фаз клеточного цикла, а функционирует как структурно-функциональный компонент транскрипционного аппарата. К таким «транскрипционным» протеинкиназам относятся, в частности, CDK7, CDK8 и ее паралог CDK19 (CDK8/19), а также CDK9 и -12/13 [41]. CDK7 – компонент иницирующего транскрипцию комплекса TFIIH, опосредует фосфорилирование С-концевого домена РНК-полимеразы II и старт транскрипции. CDK9 в составе комплекса р-TEFb также путем фосфорилирования С-концевого домена РНК-полимеразы II регулирует переход к элонгации [41].

Непосредственно элонгацию и процессинг мРНК активируют CDK12 и -13 [42].

THZ1, ингибитор CDK7 (и, в некоторой степени, CDK9 и CDK12) [43, 44], снижает транскрипцию в клетках разного тканевого происхождения; трансформированные клетки оказались чувствительными к низким концентрациям THZ1. Это соединение подавляло ассоциированные с суперэнхансерами онкогены, в частности в локусе *c-Myc* [45]. В 2020 г. начаты клинические испытания более селективного ингибитора CDK7 – соединения SY5609 [46].

Под действием THZ531 – ингибитора CDK12 – снижается зависимость от суперэнхансеров экспрессия онкогенов *RUNX1*, *MYB*, *TAL1* и *GATA3* в клетках Jurkat [47]. Поскольку первые специфические ингибиторы CDK12 синтезированы недавно, их клинические испытания пока не начались. В культурах клеток и на моделях опухолей у мышей показано, что ингибирование CDK12 оказывает выраженный эффект при остеосаркоме, опухолях печени, молочной железы и яичников, а также нейробластоме [48].

Особенная роль в регуляции транскрипции принадлежит CDK8. Эта серин-треониновая протеинкиназа в кооперации с циклином C (CCNC), белками MED12 и MED13 формирует регуляторный CDK-модуль важнейшего транскрипционного комплекса – Mediator. Компоненты этого комплекса консервативны у всех эукариот. Важно, что CDK8/19, в отличие от других CDK, не регулируют смену фаз клеточного цикла [49]. Основной (не единственной) функцией CDK8/19 является регуляция фосфорилирования C-концевого домена РНК-полимеразы II по остаткам серина-2 и -5 гептапептидного повтора, составляющего указанный домен. Такое фосфорилирование показано в бесклеточной системе; в клетках это событие необходимо на разных этапах транскрипции – инициации, выхода из паузы, элонгации первичного транскрипта, однако роль CDK8/19 в указанном фосфорилировании нуждается в прямом экспериментальном доказательстве. В отличие от CDK7 и CDK9, функционирующих на всех промоторах, CDK8/19 участвует только в регуляции активности РНК-полимеразы II на активно транскрибируемых генах – индуцибельных, а также функционирующих в развитии организма [50–53]. Селективность активации экспрессии указывает на то, что CDK8/19 – один из ключевых механизмов транскрипционного перепрограммирования. Эта уникальная функция стала предметом детального исследования в последние годы.

Транскрипционное перепрограммирование не является жизненно важным для взрослого организма в гомеостатических условиях; длительное ингибирование CDK8/19 не имеет фенотипических проявлений.

Не имеет значительных проявлений и генетический (опосредованный системой Cre/Lox) нокаут гена *cdk8* у взрослых мышей [54]. Однако перепрограммирование транскрипции необходимо для развития организма: нокаут *cdk8* у мышей летален на стадии предимплантационного эмбриона [55], а нуль-мутации в генах, кодирующих белки *cdk8* или *ccnc* у *Drosophila melanogaster*, приводят к гибели на стадиях поздней личинки третьего возраста и предкуколки [56, 57].

Важно, что нокаут гена CDK8 и фармакологическое ингибирование киназной активности по-разному влияют на общие паттерны экспрессии генов, что указывает на два принципиально разных механизма действия CDK8/19 – зависимость и независимость от киназной функции.

Существует ли связь между CDK8/19 и суперэнхансерами? В экспериментах по иммунопреципитации выявлено повышенное присутствие CDK8 в областях отдельных суперэнхансеров. По данным РНК-секвенирования, 2/3 генов, на экспрессию которых влияет ингибирование CDK8, – это гены, регулируемые суперэнхансерами. Среди суперэнхансеров, связь которых с CDK8 установлена в обеих упомянутых экспериментальных системах, оказались суперэнхансеры генов, кодирующих транскрипционные факторы *Nanog*, *Oct3/4* и *SOX2*, а также значительное число суперэнхансеров генов, регулируемых сигнальным каскадом Wnt [32].

СУПЕРЭНХАНСЕРЫ И CDK8/19 – ОБЪЕКТЫ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ ВОЗДЕЙСТВИЙ

Транскрипционное перепрограммирование принципиально важно для развития многих патологических процессов, особенно опухолевых. Дерегуляция CDK8/19 часто обнаруживается в опухолях, в которых CDK8 участвует в активации важных сигнальных путей, опосредованных Wnt/ β -катенином [58], NF- κ B [51], TGF- β [59], HIF1 α [51], рецептором эстрогенов [41], а также регулирует ответ на изменения концентрации сыворотки [50]. CDK8 идентифицирован как онкобелок, связанный с развитием колоректального рака [47], опухолей поджелудочной [60] и молочной [52, 61–63] желез, меланомы [64]. CDK8 участвует в формировании фенотипа опухолевых стволовых клеток [65].

Поскольку ингибирование CDK8/19 практически безопасно для взрослого организма, использование CDK8/19 в качестве терапевтических мишеней перспективно [41, 66, 67]. Интенсивно развивается изучение соединений различных химических классов, на основе которых предложены фармакологические блокаторы киназной активности CDK8/19 и так называемые соединения-degraders для полной элими-

нации этих белков (преодоление киназонезависимой функции) [68, 69]. Вопросы селективности ингибиторов рассмотрены в обзорах и оригинальных исследованиях [53, 70–73].

Кортикостатин А – относительно селективный ингибитор киназной активности CDK8/19. Ингибирование этих протеинкиназ кортикостатином А в клетках острого миелоидного лейкоза (линия MOLM-14) усиливало экспрессию «противоопухолевых» генов, контролируемую суперэнхансерами (*CEBPA*, *IRF8*, *IRF1* и *ETV6*), что приводило к замедлению пролиферации клеток. При этом увеличилась экспрессия 20% генов, связанных с суперэнхансерами, и только 3% генов, имеющих обычные энхансеры. Оказалось, что CDK8 связана с суперэнхансерами всех активированных генов (в сравнении с 67% активированных генов, имеющих обычные энхансеры). Ингибированных генов, регулируемых суперэнхансерами, оказалось всего три (1% всех генов, регулируемых суперэнхансерами). Эти соотношения позволяют [33] сделать вывод о том, что именно белки, ассоциированные с суперэнхансерами, – непосредственные мишени кортикостатина А в клетках MOLM-14.

Обработка указанных клеток соединением I-BET151 – ингибитором BRD4 – снижала экспрессию генов, регулируемых суперэнхансерами, хотя результат – противоопухолевый эффект – был таким же, как при действии кортикостатина А. Вероятно, пролиферация опухолевых клеток зависит от «дозировки» экспрессии генов, определяемой суперэнхансерами. Примечательно, что эффекты не суммировались при совместном применении I-BET151 и кортикостатина А, а изменения профиля экспрессии генов полностью совпадали с изменениями, вызванными одним I-BET151. Вероятно, BRD4 необходим для активации транскрипции в ответ на кортикостатин А [33].

Клетки острого миелоидного лейкоза характеризуются конститутивной активацией сигнального пути JAK-STAT. Одна из основных мишеней киназной активности CDK8 – транскрипционный фактор STAT1. Содержание фосфорилированной (транскрипционно компетентной) формы pSTAT1S727 повышено в областях суперэнхансеров [8]. Оказалось, что CDK8-зависимое фосфорилирование STAT1 необходимо для быстрой пролиферации лейкозных клеток. При действии кортикостатина А наблюдались замедление пролиферации и активация зависимой от суперэнхансеров экспрессии транскрипционных факторов GATA1, GATA2 и ID2, опосредующих замедление или прекращение пролиферации, а также активация факторов PLEK, CFLAR и UBASH3B, специфичных для мегакариоцитов. В результате наблюдали переход клеток от стволового состояния

к дифференцированному и торможение пролиферации [8].

Ингибиторы CDK8/19 на основе модифицированных пиридинов замедляли пролиферацию клеток колоректального рака [32]. Паттерны экспрессии генов изменялись так же, как при активации некоторых суперэнхансеров. Под действием ингибиторов CDK8/19 опухолевые клетки переходили из стволового фенотипа в дифференцированное состояние. Этот процесс, как упоминалось, связан с активацией суперэнхансеров. С концепцией роста зависимой от суперэнхансеров экспрессии при ингибировании CDK8 согласуется и активация онкогена *c-Myc*, также регулируемого суперэнхансером. Однако интегральный эффект ингибиторов, несмотря на активацию *c-Myc*, оказался противоопухолевым, хотя и умеренным [32].

Kuuluvainen и соавт. [29] попытались найти способ селективной инактивации суперэнхансеров, обеспечивающих высокую экспрессию онкогенов в клетках колоректального рака. Уменьшение уровня CDK8 с помощью РНК-интерференции приводило к интегральному снижению экспрессии генов, регулируемых суперэнхансерами, но селективного снижения экспрессии онкогенов, регулируемых суперэнхансерами, не наблюдалось. К такому снижению приводил нокаун генов *MED12* и *MED13/13L* [29].

В рассмотренных выше примерах ингибирование CDK8/19 не влияло на активированные энхансеры онкогенов, но приводило к активации суперэнхансеров антионкогенов [8, 32, 33]. Противоопухолевый эффект объясняется восстановлением дифференцированного фенотипа и замедлением пролиферации клеток. Таким образом, применение ингибиторов CDK8/19 в терапии отдельных видов опухолей следует рассматривать как опосредованное суперэнхансерами восстановление нормальной экспрессии генов в злокачественных клетках. Вместе с тем, патологический процесс не сводится к нарушениям транскрипции: отдельная роль принадлежит посттранскрипционным и посттрансляционным событиям.

Клинические испытания ингибиторов CDK8/19 находятся на начальных этапах. Соединение SEL120 испытывают в качестве кандидата в препараты против острого миелоидного лейкоза, BCD-115 – при раке молочной железы с экспрессией рецептора эстрогенов, но HER2-негативном. Идентификаторы испытаний, а также анализ причин токсичности ингибиторов CDK8/19 приведены в работе [71].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ. СУПЕРЭНХАНСЕРЫ КАК ТЕРАПЕВТИЧЕСКИ ЗНАЧИМЫЕ ЭЛЕМЕНТЫ ГЕНОМА

Детальные исследования структурно-функциональных особенностей организации генома позволили

сформулировать представление о суперэнхансерах как районах с повышенным содержанием транскрипционных комплексов. Не удивительно, что эти участки важны в патогенезе: молекулярные механизмы заболеваний так или иначе связаны с дисрегуляцией транскрипции генов. Особую роль суперэнхансеры приобретают в биологии опухолей: неконтролируемая пролиферация трансформированных клеток, их «ускользание» от терапевтических воздействий (химио- и лучевая терапия) обусловлены не просто активацией транскрипции, но адаптивным изменением профиля экспрессии генов. Следовательно, суперэнхансеры – участки ДНК, несущие мультибелковые транскрипционные «машины», становятся мишенями противоопухолевых воздействий.

Особенно важен вопрос перспективности низкомолекулярных химических модуляторов транскрипционных CDK в терапии опухолей. Эффективность первых ингибиторов CDK оказалась недостаточной, а общерезорбтивная токсичность высокой. В дальнейшем были получены более селективные ингибиторы отдельных транскрипционных протеинкиназ: THZ1 для CDK7, THZ531 для CDK12/13, палбоциклиб и рибоциклиб для CDK4/6. Эти соединения оказывают выраженное противоопухолевое действие в клинических ситуациях и становятся компонентами лечебных режимов [74, 75].

CDK8/19 представляют интерес как уникальная мишень: особая избирательность перепрограммирования транскрипции предоставляет шанс заменить применяемые сегодня токсичные препараты хорошо переносимыми ингибиторами этого механизма. Острый миелоидный лейкоз встречается во всех возрастных группах, но особенно часто у пациентов старше 60 лет. Применяемые в настоящее время лечебные схемы с трудом переносятся из-за кардио-

и миелотоксичности; высока вероятность ранних рецидивов (в течение первого года) [76, 77]. В наших экспериментах селективный ингибитор CDK8/19 сенексин В вызывал гибель клеток острого миелоидного лейкоза (линия MV-4-11) в значительно более низких концентрациях, чем цитозар – один из основных химиопрепаратов, применяемых при этом заболевании. Сенексин В вызывал указанный эффект в концентрациях, нетоксичных для неопухолевых клеток. В культуре клеток хронического миелоидного лейкоза сенексин В повышал противоопухолевое действие таргетных ингибиторов химерной тирозинкиназы Vcr-ABL [78], что расширяет возможности блокирования CDK8/19 в терапии опухолей системы крови. Неудовлетворительными остаются и результаты химиотерапии колоректального рака, особенно метастатической болезни [79, 80], поэтому перспективными представляются результаты изучения этой опухоли, в которых показана эффективность инактивации компонентов комплекса Mediator [29, 32, 81].

Если с общебиологических позиций интерпретация суперэнхансеров как особых «самостоятельных» регуляторных элементов генома может быть затруднительна, несомненной представляется их практическая важность как «аккумуляторов» транскрипционных комплексов для изучения патогенеза и разработки персонализированной терапии. Эта стратегия предусматривает выявление роли конкретного механизма транскрипции у пациента (транскрипционный «портрет») и мишень-направленное воздействие на установленный механизм. ●

*Работа поддержана грантом
Минобрнауки Российской Федерации
(соглашение № 14.W03.31.0020 с Институтом
биологии гена РАН).*

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Whyte W., Orlando D., Hnisz D., Abraham B., Lin C., Kagey M., Rahl P., Lee T., Young R. // Cell. 2013. V. 153. № 2. P. 307–319.
- Peng X., So K., He L., Zhao Y., Zhou J., Li Y., Yao M., Xu B., Zhang S., Yao H., et al. // Nucl. Acids Res. 2017. V. 45. № 15. P. 8785–8805.
- Tang F., Yang Z., Tan Y., Li Y. // NPJ Precis. Oncol. 2020. V. 4. № 1. P. 2.
- Lovén J., Hoke H., Lin C., Lau A., Orlando D., Vakoc C., Bradner J., Lee T., Young R. // Cell. 2013. V. 153. № 2. P. 320–334.
- Parker S., Stitzel M., Taylor D., Orozco J., Erdos M., Akiyama J., Bueren K., Chines P., Narisu N., Black B., et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2013. V. 110. № 44. P. 17921–17926.
- Hnisz D., Abraham B., Lee T., Lau A., Saint-André V., Sigova A., Hoke A., Young R. // Cell. 2013. V. 155. № 4. P. 934–947.
- Hnisz D., Schuijers J., Lin C.Y., Weintraub A., Abraham B., Lee T., Bradner J., Young R. // Mol. Cell. 2015. V. 58. № 2. P. 362–370.
- Nitulescu I., Meyer S., Wen Q., Crispino D., Lemieux M., Levinee R., Pelish H., Shair M. // EBioMedicine. 2017. V. 26. P. 112–125.
- Thandapani P. // Pharmacol. Ther. 2019. V. 199. P. 129–138.
- Peng Y., Zhang Y. // Animal Model Exp. Med. 2018. V. 1. № 3. P. 169–179.
- The comprehensive human Super-Enhancer database (<http://www.licpathway.net/sedb>) // Date of the application: 05.08.2020.
- Pott S., Lieb J. // Nat. Genet. 2014. V. 47. № 1. P. 8–12.
- Hnisz D., Shrinivas K., Young R., Chakraborty A., Sharp P. // Cell. 2017. V. 169. № 1. P. 13–23.
- Chapuy B., McKeown M., Lin C., Monti S., Roemer M., Qi J., Rahl P., Sun H., Yeda K., Doench J., et al. // Cancer Cell. 2013. V. 24. № 6. P. 777–790.
- Ball B., Abdel-Wahab O. // Trends Pharmacol. Sci. 2018. V. 39. № 12. P. 1002–1004.
- Tan Y., Li Y., Tang F. // Mol. Cancer. 2020. V. 19. № 1. P. 74.
- Ghazzaoui N., Issaoui H., Saintamand A., Oblet C., Carrion C.,

- Denizot Y. // *Blood Adv.* 2018. V. 2. № 3. P. 252–262.
18. Santos J., Braikia F., Oudinet C., Joana M., Dauba A., Khamlichi A. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2019. V. 116. № 29. P. 14708–14713.
 19. Lio C., Shukla V., Samaniego-Castruita D., González-Avalos E., Chakraborty A., Yue X., Schatz D., Rao A. // *Sci. Immunol.* 2019. V. 4. № 34. P. eaau7523.
 20. Loft A., Forss I., Siersbæk M., Schmidt S., Larsen A., Madsen J., Pisani D., Nielsen R., Aagaard M., Mathison A., et al. // *Genes Dev.* 2014. V. 29. № 1. P. 7–22.
 21. Martinez M., Medrano S., Brown E., Tufan T., Shang S., Bertocello N., Guessoum O., Adli M., Belyea B., Sequeira-Lopez M., Gomez R. // *J. Clin. Invest.* 2018. V. 128. № 11. P. 4787–4803.
 22. Huang S., Li X., Zheng H., Si X., Li B., Wei G., Li C., Chen Y., Chen Y., Liao W., et al. // *Circulation.* 2019. V. 139. № 25. P. 2857–2876.
 23. Brown J., Lin C., Duan Q., Griffin G., Federation A., Paranal R., Bair S., Newton G., Lichtman A., Kung A., et al. // *Mol. Cell.* 2014. V. 56. № 2. P. 219–231.
 24. Iwakawa R., Takenaka M., Kohno T., Shimada Y., Totoki Y., Shibata T., Tsuta T., Nishikawa R., Noguchi M., Sato-Otsubo A., et al. // *Genes Chromosomes Cancer.* 2013. V. 52. № 9. P. 802–816.
 25. Herranz D., Ambesi-Impiombato A., Palomero T., Schnell S., Belver L., Wendorff A., Xu L., Castillo-Martin M., Llobet-Navás D., Cordon-Cardo C., et al. // *Nat. Med.* 2014. V. 20. № 10. P. 1130–1137.
 26. Zhang X., Choi P., Francis J., Imielinski M., Watanabe H., Cherniack A., Meyerson M. // *Nat. Genet.* 2015. V. 48. № 2. P. 176–182.
 27. Zhang X., Choi P., Francis J., Gao G., Campbell J., Ramachandran A., Mitsuishi Y., Ha G., Shih J., Vazquez F., et al. // *Cancer Discov.* 2018. V. 8. № 1. P. 108–125.
 28. Mansour M., Abraham B., Anders L., Berezovskaya A., Gutierrez A., Durbin A., Etchin J., Lawton L., Sallan S., Silverman L., et al. // *Science.* 2014. V. 346. № 6215. P. 1373–1377.
 29. Kuuluvainen E., Domènech-Moreno E., Niemelä E., Mäkelä T. // *Mol. Cell Biol.* 2018. V. 38. № 11. P. e00573–17.
 30. Gimple R., Kidwell R., Kim L., Sun T., Gromovsky A., Wu Q., Wolf M., Lv D., Bhargava S., Jiang L., et al. // *Cancer Discov.* 2019. V. 9. № 9. P. 1248–1267.
 31. Hu Y., Zhang Z., Kashiwagi M., Yoshida T., Joshi I., Jena N., Somasundaram R., Emmanuel A., Sigvardsson M., Fitamant J., et al. // *Genes Dev.* 2016. V. 30. № 17. P. 1971–1990.
 32. Clarke P., Ortiz-Ruiz M., TePoele R., Adeniji-Popoola O., Box G., Court W., Czasch S., Bawab S., Eudar C., Ewan K., et al. // *eLife.* 2016. V. 5. P. e20722.
 33. Pelish H., Liau B., Nitulescu I., Tangpeerachaikul A., Poss Z., Da Silva D., Caruso B., Arefolov A., Fadeyi O., Christie A., et al. // *Nature.* 2015. V. 526. № 7572. P. 273–276.
 34. Shi J., Whyte W., Zepeda-Mendoza C., Milazzo J., Shen C., Roe J., Minder J., Mercan F., Wang E., Eckersley-Maslin M., et al. // *Genes Dev.* 2013. V. 27. № 24. P. 2648–2662.
 35. Hnisz D., Weintraub A., Day D., Valton A., Bak R., Li C., Goldmann J., Lajoie B., Fan Z., Sigova A., et al. // *Science.* 2016. V. 351. № 6280. P. 1454–1458.
 36. Zhou H., Schmidt S., Jiang S., Willox B., Bernhardt K., Liang J., Johannsen E., Kharchenko P., Gewurz B., Kieff E., et al. // *Cell Host Microbe.* 2015. V. 17. № 2. P. 205–216.
 37. Alqahtani A., Choucair K., Ashraf M., Hammouda D., Alloghbi A., Khan T., Senzer N., Nemunaitis J. // *Future Sci. OA.* 2019. V. 5. № 3. FSO372.
 38. Borthakur G., Wolff J., Aldoss I., Hu B., Dinh M., Torres A., Chen X., Rizzieri D., Sood A., Odenike O., et al. // *J. Clin. Oncol.* 2018. V. 36. № 5. P. 7019.
 39. Sobhani N., D'Angelo A., Pittacolo M., Roviello Z., Miccoli A., Corona S., Bernocchi O., Generali D., Otto T. // *Cells.* 2019. V. 8. № 4. P. 321.
 40. Kennedy A., Vallurupalli M., Chen L., Crompton B., Cowley G., Vazquez F., Weir A., Tsherniak A., Parasuraman S., Kim S., et al. // *Oncotarget.* 2015. V. 6. P. 30178–30193.
 41. Chou J., Quigley D., Robinson T., Feng F., Ashworth A. // *Cancer Discov.* 2020. V. 10. № 3. P. 351–370.
 42. Greenleaf A. // *Transcription.* 2019. V. 10. № 2. P. 91–110.
 43. Kwiatkowski N., Zhang T., Rahl P., Abraham B., Reddy J., Ficarro S., Dastur A., Amzallag A., Ramaswamy S., Tesar B., et al. // *Nature.* 2014. V. 511. № 7511. P. 616–620.
 44. Rix U., Superti-Furga G. // *Nat. Chem. Biol.* 2009. V. 5. № 9. P. 616–624.
 45. Chipumuro E., Marco E., Christensen C., Kwiatkowski N., Zhang T., Hatheway C., Abraham B., Sharma B., Yeung C., Altabef A., et al. // *Cell.* 2014. V. 159. № 5. P. 1126–1139.
 46. A Study of SY 5609, a Selective CDK7 Inhibitor, in Advanced Solid Tumors (<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04247126>) // Date of the application: 05.08.2020.
 47. Zhang T., Kwiatkowski N., Olson C., Dixon-Clarke S., Abraham B., Greifenberg A., Ficarro S., Elkins J., Liang Y., Hannett N., et al. // *Nat. Chem. Biol.* 2016. V. 12. P. 876–884.
 48. Liang S., Hu L., Wu Z., Chen Z., Liu S., Xu X., Qian A. // *Cells.* 2020. V. 9. № 6. P. 1483.
 49. Galbraith M., Donner A., Espinosa J. // *Transcription.* 2010. V. 1. P. 4–12.
 50. Donner A., Ebmeier C., Taatjes D., Espinosa J. // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2010. V. 17. P. 194–201.
 51. Galbraith M., Allen M., Bensard C., Wang X., Schwinn M., Qin B., Long H., Daniels D., Hahn W., Dowell R., et al. // *Cell.* 2013. V. 153. P. 1327–1339.
 52. McDermott M., Chumanevich A., Lim C., Liang J., Chen M., Altilla S., Oliver D., Rae J., Shtutman M., Kiaris H., et al. // *Oncotarget.* 2017. V. 8. P. 12558–12575.
 53. Chen M., Liang J., Ji H., Yang Z., Altilla S., Hu B., Schronce A., McDermott M.S.J., Schools G.P., Zik C.U., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2017. V. 114. P. 10208–10213.
 54. McCleland M., Soukup T., Liu S., Esensten J., de Sousa E Melo, Yaylaoglu M., Warming S., Roose-Girma M., Firestein R. // *J. Pathol.* 2015. V. 237. P. 508–519.
 55. Westerling T., Kuuluvainen E., Makela T. // *Mol. Cell Biol.* 2007. V. 27. P. 6177–6182.
 56. Loncle N., Boube M., Joulia L., Boschiero C., Werner M., Cribbs D., Bourbon H. // *EMBO J.* 2007. V. 26. P. 1045–1054.
 57. Xie X., Hsu F., Gao X., Xu W., Ni J., Xing Y., Huang L., Hsiao H., Zheng H., Wang C., et al. // *PLoS Biol.* 2015. V. 13. № 7. P. e1002207.
 58. Firestein R., Bass A., Kim S., Dunn I., Silver S., Guney I., Freed E., Ligon A., Vena N., Ogino S., et al. // *Nature.* 2008. V. 455. P. 547–551.
 59. Alarcon C., Zaromytidou A., Xi Q., Gao S., Yu J., Fujisawa S., Barlas A., Miller A., Manova-Todorova K., Macias M., et al. // *Cell.* 2009. V. 139. P. 757–769.
 60. Xu W., Wang Z., Zhang W., Qian K., Li H., Kong D., Li Y., Tang Y. // *Cancer Lett.* 2015. V. 356. P. 613–627.
 61. Porter D., Farmaki E., Altilla S., Schools G., West D., Chen M., Chang B., Puzyrev A., Lim C., Rokow-Kittell R., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2012. V. 109. P. 13799–13804.
 62. Broude E., Gyorffy B., Chumanevich A., Chen M., McDermott M., Shtutman M., Catroppo J., Roninson I. // *Curr. Cancer Drug Targets.* 2015. V. 15. P. 739–749.
 63. Xu D., Li C., Zhang X., Gong Z., Chan C., Lee S., Jin G., Rezaeian A., Han F., Wang J., et al. // *Nat. Commun.* 2015. V. 6. P. 6641.

64. Kapoor A., Goldberg M., Cumberland L., Ratnakumar K., Segura M., Emanuel P., Menendez S., Vardabasso C., Leroy G., Vidal C., et al. // *Nature*. 2010. V. 468. P. 1105–1109.
65. Adler A., McClelland M., Truong T., Lau S., Modrusan Z., Soukup T., Roose-Girma M., Blackwood E., Firestein R. // *Cancer Res*. 2012. V. 72. P. 2129–2139.
66. Menzl I., Witalisz-Siepracka A., Sexl V. // *Pharmaceuticals (Basel)*. 2019. V. 12. № 2. P. 92.
67. Xi M., Chen T., Wu C., Gao X., Wu Y., Luo X., Du K., Yu L., Cai T., Shen R., Sun H., et al. // *Eur. J. Med. Chem*. 2019. V. 164. P. 77–91.
68. Solum E., Hansen T., Aesoy R., Herfindal L. // *Bioorg. Med. Chem*. 2020. V. 28. № 10. P. 115461.
69. Hatcher J., Wang E., Johannessen L., Kwiatkowski N., Sim T., Gray N. // *ACS Med. Chem. Lett*. 2018. V. 9. № 6. P. 540–545.
70. Philip S., Kumarasiri M., Teo T., Yu M., Wang S. // *J. Med. Chem*. 2018. V. 61. № 12. P. 5073–5092.
71. Chen M., Li J., Liang J., Thompson Z., Kathrein K., Broude E., Roninson I. // *Cells*. 2019. V. 8. № 11. P. 1413.
72. Chen W., Ren X., Chang C. // *ChemMedChem*. 2019. V. 14. № 1. P. 107–118.
73. He L., Zhu Y., Fan Q., Miao D., Zhang S., Liu X., Zhang C. // *Bioorg. Med. Chem. Lett*. 2019. V. 29. № 4. P. 549–555.
74. Jia Q., Chen S., Tan Y., Li Y., Tang F. // *Exp. Mol. Med*. 2020. V. 52. № 5. P. 713–723.
75. Sengupta S., George R. // *Trends Cancer*. 2017. V. 3. № 4. P. 269–281.
76. Brinda B., Khan I., Parkin B., Konig H. // *J. Cell. Mol. Med*. 2018. V. 22. № 3. P. 1411–1427.
77. Tan Y., Wu Q., Zhou F. // *Crit. Rev. Oncol. Hematol*. 2020. V. 152. P. 102993.
78. Khamidullina A., Tatarskiy V., Yastrebova M., Nuzhina J., Ivanova E., Lim C.-U., Chen M., Broude E., Roninson I., Shtil A. // *Proc. EACR conference «A Matter of Life and Death: Mechanisms, Models and Therapeutic Opportunities»*. Italy, 2020. P. 60.
79. Feng S., Yan P., Zhang Q., Li Z., Li C., Geng Y., Wang L., Zhao X., Yang Z., Cai H., Wang X. // *Int. J. Colorectal Dis*. 2020. V. 35. P. 1355–1369.
80. Kotani D., Kuboki Y., Horasawa S., Kaneko A., Nakamura Y., Kawazoe A., Bando H., Taniguchi H., Shitara K., Kojima T., et al. // *BMC Cancer*. 2019. V. 19. № 1. P. 1253.
81. Liang J., Chen M., Hughes D., Chumanevich A., Altilia S., Kaza V., Lim C., Kiaris H., Mythreye K., Pena M., et al. // *Cancer Res*. 2018. V. 78. № 3. P. 6594–6606.