

Dolomatov S.I., Ageeva E.S., Zukow W. Molecular biology of the cell. Journal of Education, Health and Sport. 2022;12(8):730-926. eISSN 2391-8306. DOI <http://dx.doi.org/10.12775/JEHS.2022.12.08.074>
<https://apcz.umk.pl/JEHS/article/view/JEHS.2022.12.08.074>
<https://zenodo.org/record/7016176>

The journal has had 40 points in Ministry of Education and Science of Poland parametric evaluation. Annex to the announcement of the Minister of Education and Science of December 21, 2021. No. 32343. Has a Journal's Unique Identifier: 201159. Scientific disciplines assigned: Physical Culture Sciences (Field of Medical sciences and health sciences); Health Sciences (Field of Medical Sciences and Health Sciences).

Punkty Ministerialne z 2019 - aktualny rok 40 punktów. Załącznik do komunikatu Ministra Edukacji i Nauki z dnia 21 grudnia 2021 r. Lp. 32343. Posiada Unikatowy Identyfikator Czasopisma: 201159. Przynależność dyscypliny naukowej: Nauki o kulturze fizycznej (Dziedzina nauk medycznych i nauk o zdrowiu); Nauki o zdrowiu (Dziedzina nauk medycznych i nauk o zdrowiu).

© The Authors 2022;

This article is published with open access at Licensee Open Journal Systems of Nicolaus Copernicus University in Torun, Poland
Open Access. This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Noncommercial License which permits any noncommercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author (s) and source are credited. This is an open access article licensed under the terms of the Creative Commons Attribution Non commercial license Share alike. (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>) which permits unrestricted, non commercial use, distribution and reproduction in any medium, provided the work is properly cited.
The authors declare that there is no conflict of interests regarding the publication of this paper.

Received: 12.07.2022. Revised: 07.08.2022. Accepted: 23.08.2022.

MOLECULAR BIOLOGY OF THE CELL

Dolomatov S.I., Ageeva E.S., Zukow W.

The book is intended for students studying medical and biological specialties.

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ КЛЕТКИ

Доломатов С.И., Агеева Е.С., Жуков В.А.

Книга предназначена для студентов, обучающихся по медицинским и биологическим специальностям.

Information about authors:

Dolomatov Sergey Igorevich, Candidate of Biological Sciences, Associate Professor, Crimean Federal University

Ageeva Elizaveta Sergeevna, Doctor of Biological Sciences, Professor, Crimean Federal University

Zukow Walery, Doctor of Medical Sciences, Nicolaus Copernicus University in Toruń

Key words: molecular biology, cell, epigenetics, transcription factors, cell signaling pathways, tumor molecular biology.

Сведения об авторах:

Доломатов Сергей Игоревич, кандидат биологических наук, доцент,
Крымский Федеральный университет

Агеева Елизавета Сергеевна, доктор биологических наук, профессор,
Крымский Федеральный университет

Жуков Валерий Анатольевич, доктор медицинских наук, Университет
Миколая Коперника в Торуню

Key words: molecular biology, cell, epigenetics, transcription factors, cell signaling pathways, tumor molecular biology.

Ключевые слова: молекулярная биология, клетка, эпигенетика, факторы транскрипции, сигнальные пути клетки, молекулярная биология опухоли.

СОДЕРЖАНИЕ
ГЛАВА I. ЭПИГЕНЕТИКА.
ВВЕДЕНИЕ
1.1. КОВАЛЕНТНАЯ МОДИФИКАЦИЯ ГИСТОНОВ
1.1.1. Ацетилирование и деацетилирование гистонов.
1.1.2. Метилирование и деметилирование гистонов.
1.1.3. Фосфорилирование гистонов.
1.1.4. Другие пути ковалентной модификации гистонов нуклеосомы
1.2. РОЛЬ КОВАЛЕНТНОЙ МОДИФИКАЦИИ ГИСТОНОВ В РЕГУЛЯЦИИ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ.
1.2. МЕТИЛИРОВАНИЕ ДНК
1.4. УЧАСТИЕ НЕКОДИРУЮЩИХ РНК В ЭПИГЕНЕТИЧЕСКИХ МЕХАНИЗМАХ
1.4.1. МикоРНК
1.4.2. Длинные некодирующие РНК
ЛИТЕРАТУРА К ГЛАВЕ ЭПИГЕНЕТИКА
ГЛАВА II. ФАКТОРЫ ТРАНСКРИПЦИИ
ВВЕДЕНИЕ
2.1. ОБЩИЕ ФАКТОРЫ ТРАНСКРИПЦИИ
2.1.1. Общий фактор транскрипции TFIID
2.1.2. Общий фактор транскрипции TFIIB
2.1.3. Общий фактор транскрипции TFIIF
2.1.4. Общий фактор транскрипции TFIIN
2.1.5. Общий фактор транскрипции TFIIH
2.2. УЧАСТИЕ ОБЩИХ ФАКТОРОВ ТРАНСКРИПЦИИ В ИНИЦИАЦИИ ПРОЦЕССОВ ТРАНСКРИПЦИИ
2.3. МЕДИАТОР
2.4. ЭНХАНСЕРЫ
2.5. СПЕЦИФИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ ТРАНСКРИПЦИИ
ЛИТЕРАТУРА К ГЛАВЕ ФАКТОРЫ ТРАНСКРИПЦИИ
ГЛАВА III. СИГНАЛЬНЫЕ ПУТИ КЛЕТКИ
ВВЕДЕНИЕ
3.1. Wnt СИГНАЛЬНЫЙ ПУТЬ

3.2. СИГНАЛЬНЫЙ ПУТЬ, ОПОСРЕДУЕМЫЙ РЕЦЕПТОРАМИ СОПРЯЖЕННЫМИ С G-БЕЛКАМИ (GPCR).
3.3. RIZK/АКТ-СИГНАЛЬНЫЙ ПУТЬ
3.4. Трансформирующий фактор роста бета/SMAD (transforming growth factor beta, TGFb) сигнальный путь
3.5. JAK/STAT-СИГНАЛЬНЫЙ ПУТЬ
3.6. Notch-СИГНАЛЬНЫЙ ПУТЬ.
ЛИТЕРАТУРА К ГЛАВЕ СИГНАЛЬНЫЕ ПУТИ
ГЛАВА IV. МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ ОПУХОЛИ: МЕХАНИЗМЫ ИНИЦИАЦИИ, ПРОМОЦИИ И ПРОГРЕССИИ
ВВЕДЕНИЕ
4.1. Типы опухоли. Классификация
4.2. Стадии канцерогенеза
4.3. Молекулярно-генетическая характеристика канцерогенеза
ЛИТЕРАТУРА К ГЛАВЕ МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ ОПУХОЛИ

ГЛАВА I. ЭПИГЕНЕТИКА

ВВЕДЕНИЕ

Наука эпигенетика рассматривает механизмы молекулярных модификаций гистонов и ДНК, которые могут регулировать активность генов, не затрагивая последовательности нуклеотидов в молекуле ДНК. Признанными эпигенетическими регуляторами являются метилирование ДНК, посттрансляционные модификации гистонов и некодирующие РНК (нкРНК). Одним из важнейших отличий эукариотических клеток от прокариот является наличие у эукариот сложного нуклео-протеинового комплекса хроматина. Именно в такой форме молекула ДНК хранится в наших клетках. С одной стороны, сложная структурная организация хроматина обеспечивает компактное расположение ДНК в ядре клетки. С другой стороны, хроматин непосредственно участвует в процессе регуляции экспрессии генов. При этом, изображенная на рис.1 нуклеосома (структурно-функциональная единица хроматина) рассматривается в качестве ключевого компонента в процессах регуляции экспрессии генов

Строение нуклеосомы - 8 молекул гистонов четырех видов (H2A, H2B, H3 и H4) составляют нуклеосомный кор (ядро), на который наматывается ДНК, образуя примерно два витка

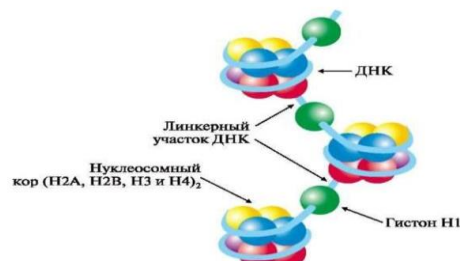


Рисунок 1.1. Строение нуклеосомы. Цитировано по данным ресурса http://vmede.org/sait/?id=Biohimija_severin_2011&menu=Biohimija_severin_2011&page=6

Ядром нуклеосомы являются 8 белков гистонов (октамер). В состав ядра нуклеосомы входят по две копии каждого из гистоновых белков H2A, H2B, H3 и H4. Цепь ДНК, включающая 147 нуклеотидов сворачивается в 1,65 раза вокруг октамера гистонов. Нуклеосомы расположены в виде линейного массива вдоль молекулы ДНК в виде "бусин на нитке". Соединяющий сопредельные нуклеосомы линкерный участок ДНК (транскрипционно неактивный) уплотнен H1-гистоновым белком. Протяженность линкерного участка составляет 30 нм. Причем, сайт начала транскрипции обычно находится внутри нуклеосомы. Следовательно, нуклеосома служит репрессором генов, предотвращая инициацию транскрипции. Т.е., хроматин обеспечивает тотальную репрессию генов. Напротив, транскрипция становится возможной в результате ремоделирования хроматина факторами, которые обеспечивают «демонтаж» нуклеосом или иным образом изменяют их структуру и организацию. Таким образом, репрессия (инактивация) генов начинается с обертывания молекулы ДНК вокруг гистонов в нуклеосоме, а освобождение генов от репрессии (активация) включает в себя освобождение ДНК от связи с белками гистонами и разворачивание ДНК факторами, ремоделирующими хроматин (Lorch Y., Kornberg R.D., 2017). Благодаря такому механизму возможна избирательная экспрессия только тех генов, которые необходимы в данный момент времени клетки или ткани. Следует подчеркнуть, что репрессия нуклеосомами распространяется не только на транскрипцию, но и на большинство других биологических процессов, связанных с молекулой ДНК, таких как репликация, митотическое деление, восстановление двухцепочечных разрывов и поддержание теломер. Таким образом, эпигенетические механизмы управляют различными физиологическими и патологическими процессами посредством регуляции экспрессии соответствующих генов путем изменения доступности эпигенетических систем контроля к хроматину.

Сфера применения эпигенетических методов исследования стремительно расширяется. В настоящее время мы наблюдаем активное внедрение эпигенетических подходов в области практической медицины, направленных на диагностику и лечение опасных заболеваний человека.

CHAPTER I. EPIGENETICS

INTRODUCTION

The science of epigenetics looks at the mechanisms of molecular modifications of histones and DNA that can regulate gene activity without affecting the nucleotide sequences in the DNA molecule. Recognized epigenetic regulators are DNA methylation, post-translational modifications of histones, and non-coding RNAs (ncRNAs). One of the most important differences between eukaryotic cells and prokaryotes is the presence of a complex nucleo-protein chromatin complex in eukaryotes. It is in this form that the DNA molecule is stored in our cells. On the one hand, the complex structural organization of chromatin provides a compact arrangement of DNA in the cell nucleus. On the other hand, chromatin is directly involved in the process of regulating gene expression. At the same time, the nucleosome depicted in Fig. 1 (a structural and functional unit of chromatin) is considered as a key component in the processes of regulating gene expression.

The nucleus of the nucleosome is 8 histone proteins (octamers). The nucleus of the nucleosome consists of two copies of each of the histone proteins H2A, H2B, H3 and H4. The DNA chain, which includes 147 nucleotides, folds 1.65 times around the octamer of histones. The nucleosomes are arranged as a linear array along the DNA molecule in the form of "beads on a string". The linker section of DNA connecting adjacent nucleosomes (transcriptionally inactive) is sealed with H1-histone protein. The length of the linker section is 30 nm. Moreover, the site of the beginning of transcription is usually located inside the nucleosome. Consequently, the nucleosome serves as a gene repressor, preventing the initiation of transcription. That is, chromatin provides a total repression of

genes. In contrast, transcription becomes possible as a result of chromatin remodeling factors that enable the "dismantling" of nucleosomes or otherwise alter their structure and organization. Thus, the repression (inactivation) of genes begins with wrapping the DNA molecule around the histones in the nucleosome, and the liberation of genes from repression (activation) involves freeing DNA from binding to histone proteins and unfolding DNA by chromatin remodeling factors (Lorch Y., Kornberg R. D., 2017). Thanks to this mechanism, selective expression of only those genes that are needed at a given time by the cell or tissue is possible. It should be emphasized that nucleosome repression extends not only to transcription, but also to most other biological processes associated with the DNA molecule, such as replication, mitotic division, repair of double-strand breaks, and maintenance of telomeres. Thus, epigenetic mechanisms control various physiological and pathological processes by regulating the expression of the corresponding genes by changing the availability of epigenetic control systems to chromatin.

The scope of application of epigenetic research methods is rapidly expanding. Currently, we are witnessing the active introduction of epigenetic approaches in the field of practical medicine aimed at diagnosing and treating dangerous human diseases.

1.1. КОВАЛЕНТНАЯ МОДИФИКАЦИЯ ГИСТОНОВ

Хроматин - это не инертная структура, а скорее, специфический каркас ДНК, обладающий способностью воспринимать и реагировать на внешние сигналы, тем самым регулируя участие молекулы ДНК в различных обменных процессах. При этом, одним из центральных механизмов, который демонстрирует такую реакцию хроматина на внешние воздействия, является ковалентная модификация белков-гистонов нуклеосомы. В настоящее время известно, что амино (N)-концевые хвосты гистонов могут выступать за пределы нуклеосомы и вступать в контакт с соседними нуклеосомами. Поэтому модификация этих хвостов оказывает влияние на межнуклеосомные взаимодействия и, таким образом, влияет на общую структуру хроматина. Известно, что ковалентная модификация гистонов нуклеосомы путем ацетилирования и фосфорилирования (пояснения ниже) способствуют снижению величины положительного заряда белков гистонов и ослабляет силу электростатического взаимодействия между гистонами и ДНК. Этот процесс формирует менее компактную структуру нуклеосомы, облегчая доступ белковых факторов транскрипции к молекуле ДНК. Установлено множество сайтов ацетилирования гистонов, в том числе связанных с некодирующими участками ДНК, в частности, с промоторами генов. Расположение ацетилированных меток в этих участках гистонов облегчают доступ факторам транскрипции.

Фосфорилирование гистонов также высоко специфично, однако затрагивает меньше сайтов фосфорилирования гистонов по сравнению с ацетилированными сайтами. Модификации гистонов в процессе фосфорилирования могут индуцировать глубокие структурные изменения хроматина, причем, эти изменения не всегда повышают доступность ДНК

для факторов транскрипции. Например, фосфорилирование специфического сайта в H3 гистоне во время митоза происходит по всему геному и способствует усилению конденсации хроматина.

Локализация ковалентных модификаций гистоновых белков также необходима для распознавания их специфическими белками (или белковыми комплексами), принимающих участие в регуляции функциональной активности хроматина. В частности, модификации белков-гистонов вовлекают высокомолекулярные комплексы ферментов ремоделирования нуклеосом, которые используют энергию гидролиза АТФ, для изменения структуры нуклеосом (Patel A.V. et al., 2019). Установлено, что белки, входящие в состав комплексов ремоделирования нуклеосом обладают высокой степенью консервативности в ряду эукариот.

1.1.1. Ацетилирование и деацетилирование гистонов.

Как уже отмечалось, посттрансляционная модификация гистонов может оказывать влияние на транскрипцию, репарацию и репликацию. Известно, что ацетилирование аминокислотных остатков лизина в составе белков гистонов является одним из основных путей такой модификации. По данным литературы, процесс ацетилирования лизинов гистонов является очень динамичным и регулируется противоположным действием двух семейств ферментов, гистоновых ацетилтрансфераз (НАТ) и гистоновых деацетилаз (HDAC) (Bannister A.J., Kouzarides T., 2011). Ферменты НАТ используют ацетил CoA в качестве субстрата и катализируют перенос ацетильной группы на ε-аминогруппу боковых цепей остатков аминокислоты лизина в составе гистонов (Su X. et al., 2016). Процесс ацетилирования способствует нейтрализации положительного заряд лизина, ослабляя силу электростатического взаимодействия между гистонами и ДНК, тем самым увеличивая доступность хроматина для РНК-полимеразы

и факторов транскрипции. Однако ацетилирование гистонов связано не только с активацией экспрессии генов, но и с репликацией и репарацией ДНК. Напротив, деацетилирование гистонов – удаление ацетильных групп гистон-деацетилазами HDAC приводит к подавлению экспрессии гена.

Синтез гистонов в основном происходит во время S-фазы митотического цикла параллельно с репликацией ДНК, и вновь синтезированные гистоны быстро модифицируются в цитоплазме перед их сборкой в нуклеосому. В частности, стабильные димеры гистона H3/H4 импортируются в ядро после ацетилирования вновь синтезированного в цитоплазме гистона H4 в положениях остатков лизина Lys5 и Lys12. Два гетеродимера H2A/H2B входят в ядро как часть другого комплекса гистонов-шаперонов, но остаются неацетилированными и только затем ассоциируются с тетрамерами H3/H4. Когда коровый октамер гистонов нуклеосомы полностью сформирован, метки ацетилирования гистонов удаляются с H3 и H4 с помощью HDACs (Poziello A. et al., 2021).

Существует **два основных класса НАТ: тип А и тип В**. Тип-В НАТ преимущественно локализованы в цитоплазме, подвергая ацетилированию молекулы гистонов, свободные от ацетилирования, не вошедшие в состав хроматина. Привлекает внимание тот факт, что у всех эукариот (простейших, насекомых и человека) ацетилирование гистона H4 в положениях Лизин-5 (K-5) и Лизин-12 (K-12) является основной модификацией гистонов (Sobel R.E. et al., 1995). Класс ферментов ацетилтрансфераз гистонов - НАТ является высококонсервативным, и все НАТ типа В имеют общую гомологию последовательности с scNat1, белком-основателем этого семейства изоферментов НАТ. Ферменты НАТ типа В ацетируют вновь синтезированный гистон H4 в K5 и K12 позициях (в данном случае, K5 и K12 – указание на расположение присоединенной ацетильной группы к аминокислоте лизин в 5 и 12 положении, это положение указывается, например, как H4K5 – т.е. в гистоне-4 лизин в 5

положении), а также в определенных участках гистона H3. Указанная модель ацетилирования важна для укладки гистонов в нуклеосому, после чего метки удаляются. Трансферазы НАТ типа А представляют собой более разнообразное семейство ферментов, чем тип В. Тем не менее, их можно разделить, по меньшей мере, на три отдельные группы в зависимости от гомологии аминокислотных последовательностей и конформационной структуры: семейства GNAT, MYST и CBP/p300. Ферменты НАТ типа А обладают способностью модифицировать несколько участков в N-концевых хвостах гистонов. Способность НАТ типа А нейтрализовать положительные заряды, тем самым нарушая стабилизирующее влияние электростатических взаимодействий (между гистоновыми белками, а также между гистонами и ДНК) положительно коррелирует с их способностью регулировать процессы транскрипции. Поскольку в регуляции экспрессии генов участвуют не только хвосты гистонов, но и дополнительные участки ацетилирования, присутствующие в коровых гистонах (гистонах, формирующих ядро (кор) нуклеосомы) таких, как H3K56, который ацетируется у людей hGCN5. Ацетилирование в положении H3K56 непосредственно влияет на взаимодействие гистонов с ДНК. Как и многие гистон-модифицирующие ферменты, НАТ типа А обнаруживаются в составе крупных мультипротеиновых комплексов. Белки, входящие в состав этих комплексов, играют важную роль в контроле набора ферментов, их активности и специфичности к субстрату. Например, очищенный scGCN5 ацетирует свободные белки-гистоны, но не оказывает влияния на гистоны, включенные в состав нуклеосомы.

Ферменты-деацетилазы гистонов (HDAC), напротив противодействуют эффектам ацетилаз гистонов (НАТ) и обеспечивают удаление ацетильных групп с остатков лизина, тем самым восстанавливая положительный заряд лизина. В свою очередь, это способствует стабилизации хроматина и подавляет процесс транскрипции. Выявлено

четыре класса HDAC: Классы I и II включают в себя ферменты, которые гомологичны HDAC дрожжевых клеток *scRpd3* и *scHda1*. Класс IV содержит только один фермент HDAC11. Между тем, в состав класса III (называемый sirtuins - сиртуины) входят HDAC, гомологичные дрожжевому *scSir2*. Ферменты класса III, в отличие от трех других классов, для реализации своей энзиматической активности, нуждаются в присутствии специфического кофактора NAD⁺. Необходимо отметить, что HDAC характеризуются достаточно низкой субстратной специфичностью, поскольку один фермент способен деацетилировать несколько ацетилированных сайтов в белках-гистонах. Кроме того, ферменты обычно присутствуют в составе многочисленных белковых комплексов, зачастую совместно с другими членами семейства HDAC. В частности, HDAC в основном ассоциированы со стабильными мультипротеиновыми комплексами, в которые входят HDAC1/2 и гистон-связывающий белок (Verdone L. et al., 2006). В результате чего, трудно определить, какая активность (конкретный фермент HDAC и/или комплекс) отвечает за наблюдаемый эффект. Тем не менее, в некоторых случаях можно, по крайней мере, определить, какой фермент требуется для данного процесса. Например, было показано, что HDAC1, но не HDAC2, контролирует дифференцировку эмбриональных стволовых клеток.

1.1.2. Метилирование и деметилирование гистонов.

Метилирование гистонов в основном происходит на боковых цепях лизинов и аргининов. Метильные метки на молекулах гистонов воссоздаются после каждого цикла репликации ДНК. Гистоны нуклеосом вновь синтезированной ДНК будут содержать новое ацетилирование, но не будут иметь других специфичных для хроматина эпигенетических меток, таких как метилирование. Чтобы восстановить исходные эпигенетические

метки, новые гистоны должны подвергнуться деацетилированию, позволяя восстановить ландшафт эпигенетических меток, существовавших до репликации. Хотя основные области октамера гистонов остаются внутри нуклеосомы, N-концевые хвосты открыты и, таким образом, подвержены таким модификациям, как метилирование, ацетилирование, фосфорилирование и др. (Estève P.O. et al., 2006). В настоящее время установлены, по меньшей мере, пять остатков аргинина (H3R2, H3R8, H3R17, H3R26 и H4R3) и шесть остатков лизина (H3K4, H3K9, H3K27, H3K36, H3K79 и H4K20) на гистонах H3 и H4, которые могут подвергаться метилированию (Wu S.C., Zhang Y., 2009). Однако, в отличие от ацетилирования, метилирование гистонов не изменяет заряд гистонового белка. Тем не менее, метилированные метки гистонов могут служить сайтом связывания регуляторных белков, определяющих доступность ДНК для факторов транскрипции. В частности, метилированный H3K9 служит связующей платформой для белка гетерохроматина 1 (HP1). В свою очередь, HP1 ассоциируется с множеством других факторов, включая гистондеацетилазы (HDAC), репрессоры транскрипции и ферменты ремоделирования хроматина. Таким образом, белок HP1 обладает возможностью связывать специфические эухроматиновые локусы у млекопитающих, подавляя экспрессию генов (Smallwood A. et al., 2007). Кроме того, необходимо дополнительно учитывать уровень интенсивности метилирования; лизины могут подвергаться присоединению 1, 2 или 3 метил-радикалов, следовательно быть моно-, ди- или триметилированными. Тогда как аргинины могут быть монометилированными, а также симметрично или асимметрично диметилированными.

Рассмотрим механизмы **метилирования остатков лизина в белках-гистонах**. Все **гистоновые лизин-метилтрансферазы (HKMT)** катализируют перенос метильной группы из S-аденозилметионина (SAM) в ε-аминогруппу лизина. Первой идентифицированной **гистоновой лизин-**

метилтрансферазой (НКМТ), была SUV39H1, предназначенная для метилирования лизина H3K9 (т.е. в составе белка гистон-3, 9 остатка лизина). Установлено, что все НКМТ, которые метилируют N-концевые лизины, содержат так называемый домен SET, который обеспечивает ферментативную активность метилтрансферазы. Исключением является фермент Dot1, который метилирует остаток лизина в положении H3K79 внутри кора (ядра нуклеосомы) гистонов и не содержит SET-домена. Для **гистоновых лизин-метилтрансфераз (НКМТ) характерно проявление специфичности, во-первых**, по отношению к субстрату (например, DIM5 специфически метилирует H3K9, тогда как объектом метилирования SET7/9 является H3K4). **Во-вторых**, специфичность ферментов НКМТ проявляется в способности изменять степень метилирования лизина (т.е. трансформировать лизин в моно-, ди- и/или триметильное состояние). Например, DIM5 может триметилировать H3K9, но SET7/9 может только монометилировать H3K4.

Метилирование аргинина осуществляют два класса аргинин-метилтрансфераз. Оба типа аргининметилтрансфераз образуют относительно большое семейство белков (11 ферментов), члены которого называются protein arginine methyltransferase (PRMTs). Все эти ферменты переносят метильную группу из S-аденозилметионина (SAM) в ω -гуанидиногруппу аргинина в различных субстратах. Что касается метилирования гистонов аргинина, наиболее важными ферментами являются PRMT1, 4, 5 и 6.

Деметилирование гистонов. В течение многих лет полагали, что метки, созданные метилтрансферазами гистонов являются стабильной, статической модификацией гистоновых белков. Сейчас известно, что метилирование гистонов может быть устранено группой специфических ферментов - гистоновыми деметилазами, которые включают PAD14 (пептидиларгининдейминазу, тип 4), LSD1 (лизинспецифическую

деметилазу 1) и белки, содержащие JmjC (Jumonji C)-домен. В 2002 году было показано, что механизмы метилирования и деметилирования лизина и аргинина достаточно динамичная система и был предложен ряд различных механизмов посттрансляционного процессинга гистонов, подтвержденных экспериментально (Bannister A.J. et al., 2002). Было показано, что белок jumonji JMJD6 способен проводить реакцию деметилирования остатков аргинина гистонов H3R2 и H4R3 (Chang B. et al., 2007). В данном случае буквой R обозначен остаток аргинина, следовательно, запись H3R2 следует читать так – в H3 гистоновом белке во втором положении находится остаток аргинина. В 2004 году была идентифицирована первая **лизиндеметилаза**. Было обнаружено, что данный фермент использует FAD в качестве кофактора и получил название лизинспецифической деметилазы 1 (LSD1) (Shi Y et al., 2004). Однако, данная реакция деметилирования применима только к моно- и диметилированным субстратам лизина. В условиях *in vitro* очищенный LSD1 катализирует удаление метильных групп из H3K4me1/2, но очищенный фермент не может деметилировать тот же сайт гистона, когда белок-гистон включен в состав нуклеосомы. С другой стороны, когда LSD1 образует комплекс с репрессорным комплексом Co-REST, он приобретает способность деметилировать нуклеосомные гистоны. Таким образом, дополнительные белки комплекса обеспечивают распознавание ферментом LSD1 гистонов нуклеосомы. Кроме того, образование комплекса LSD1 со специфическими белками определяет, какой лизин должен быть деметилирован. Помимо катализа метилтрования гистонов, некоторые ферменты данной группы могут непосредственно участвовать в регуляции экспрессии генов. Сообщается, что деметилаза лизина гистонов LSD1 (KDM1A) функционирует, как компонент корепрессорного комплекса C-концевого связывающего белка 1 (CtBP1). Было обнаружено, что LSD1 (KDM1A) ассоциирован с другими подобными комплексами-

корепрессорами, что позволяет предположить, что этот белок осуществляет репрессию генов (Black J.C. et al., 2012).

Первым ферментом, идентифицированным как триметиллизиндеметилаза, был белок JMJD2, который деметилюет H3K9me3 и H3K36me3 (Whetstine J.R. et al., 2006). В настоящее время известно много деметилаз лизина гистонов. За исключением LSD1, все ферменты данной группы обладают каталитическим доменом jumonji. Этот класс ферментов использует домен JmjC для катализа деметилирования путем окисления метильных групп. Белки, содержащие домен JmjC используют α -кетоглутарат, молекулярный кислород и Fe(II) в качестве кофакторов деметилирования (Black J.C. et al., 2012). Как и лизин-метилтрансферазы, деметилазы обладают высоким уровнем субстратной специфичности по отношению к их целевому лизину. Они также чувствительны к степени метилирования лизина; например, некоторые из ферментов способны деметилировать только моно- и диметильные субстраты, тогда как другие могут деметилировать все три состояния метилированного лизина.

1.1.3. Фосфорилирование гистонов.

Фосфорилирование гистонов также характеризуется высокой степенью пластичности. Процесс ковалентной модификации в данном случае контролируется киназами и фосфатазами, которые соответственно присоединяют и удаляют фосфатные группы. Фосфорилированию подвергаются остатки аминокислот серина, треонина и тирозина, преимущественно, в области N-концевых хвостов гистонов. Все идентифицированные гистоновые киназы переносят фосфатную группу из АТФ в гидроксильную группу боковой цепи целевой аминокислоты. При этом модификация добавляет значительный отрицательный заряд гистону,

что, в свою очередь, ослабляет силу электростатического взаимодействия между ДНК и гистонами. Большинство сайтов фосфорилирования гистонов находятся в пределах N-концевых хвостов. Однако сайты фосфорилирования в пределах коровых участков гистонов также существуют. Одним из таких примеров является фосфорилирование H3Y41 (тирозин в 41 положении), который регулируется тирозинкиназой JAK2. Учитывая чрезвычайно высокую пластичность процесса фосфорилирования гистонов, в ядре клетки должна быть высокая активность фосфатаз. Мы знаем, например, что фосфатаза PP1 работает антагонистически по отношению к Aurora B-киназе, которая формирует метки H3S10ph и H3S28ph в процессе регуляции митотического цикла клетки.

1.1.4. Другие пути ковалентной модификации гистонов нуклеосомы

Убиквитинирование.

Это присоединение ферментами убиквитинлигазами одного или нескольких мономеров убиквитина (высококонсервативного белка, принимающего участие в регуляции метаболизма белковых молекул) с помощью ковалентной связи к боковым аминокетильным группам белка-мишени.

β -N-ацетилглюкозаминирование

Многие белки регулируются посредством модификации их сериновых и треониновых боковых цепей одиночными остатками сахара β -N-ацетилглюкозамина (O-GlcNAc). Недавно гистоны были добавлены к длинному списку белков, модифицированных O-GlcNAc.

Дезаминирование

Эта реакция включает превращение аргинина в цитруллин. В клетках млекопитающих эта реакция на гистонах катализируется пептидилдеаминазой PADI4, которая превращает аргинин в цитруллин.

Удаление «хвостового» конца гистонов

Возможно, наиболее радикальным способом ковалентной модификаций гистонов является удаление N-концевого хвоста гистонов – процесс «отсечения» хвоста. В настоящее время известно, что этот тип модификации существует у дрожжей и млекопитающих, где удаляются первые 21 аминокислота H3-гистона. В клетках мыши фермент, выполняющий эту функцию, был идентифицирован, как Катепсин L, который расщепляет N-конец H3-гистона в процессе дифференцировки клеток. Также установлено, что процесс «отсечения» хвостовых фрагментов гистонов принимает участие в регуляции транскрипции (Santos-Rosa H. et al., 2009).

1.2 РОЛЬ КОВАЛЕНТНОЙ МОДИФИКАЦИИ ГИСТОНОВ В РЕГУЛЯЦИИ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ.

В целом, локализация и интенсивность ацетилированных и метилированных сайтов гистонов играет важнейшую роль в регуляции экспрессии генов. Сообщается, что пермиссивные области (доступные для транскрипции) демонстрируют открытую структуру хроматина, отмеченную гиперацетилированием гистонов H3 и H4 и ди- и триметилированием гистона H3 по лизину 4 (H3K4me_{2/3}). Напротив, репрессированные области (в которых транскрипция подавлена) демонстрируют компактную структуру хроматина, в которой отсутствует ацетилирование H3/H4 и метилирование H3K4, но, данные участки обогащены “репрессивными” модификациями, ди- и триметилированием H3K9 (H3K9me_{2/3}), триметилированием H3K27 (H3K27me₃) и триметилированием H4K20 (H4K20me₃) (McCabe M.T. et al., 2009). Например, установлено, что триметилирование гистона H3 остатков Лизина в 9 положении (H3K9) активирует белок HP1, связывающий хроматин, который является маркером конденсации в гетерохроматин с последующей репрессией генов (Lehnertz V. et al., 2003). Действительно, в то время как метилирование в H3K9 позволяет связывать белок гетерохроматина 1 (HP1), подавляющий транскрипцию, метилирование в H3K4, напротив, способствует стимуляции транскрипции через блокирование связывания репрессора транскрипции, ремоделирование нуклеосом и угнетение деацетилаз. Кроме расположения метильной группы, имеет значение интенсивность метилирования остатков лизина. Показано, что триметилированный остаток лизина H4K20 связан с транскрипционно неактивным гетерохроматином, тогда как монометилированный и диметилированный H4K20 связаны с областями эухроматина (Xiao B. et al.,

2005). С другой стороны, распределение метилированных меток гистонов может отличаться по своему положению в нуклеосоме относительно различных функциональных участков ДНК и таким образом оказывать влияние на экспрессию генов. Например, одним из основных признаков промотора (сайта старта транскрипции - TSS) является присутствие H3K4me3. Область промотра обогащена метками H3K4me3. Метки H3K4me3 могут быть обнаружены, как в неактивных, так и в активных промоторах; таким образом, он маркирует не только транскрибируемый/активный ген, но и гены, которые могут стать активными. Например, указанная закономерность относится к генам, которые угнетены в G0 фазу митотического цикла, но активны в пресинтетический период (Black J.C. et al., 2012). В тоже время, расположение метки H3K27me3 в области транскрибируемого участка гена, в отличие от H3K36me3, коррелирует с репрессией транскрипции. Это ингибирование может быть устранено путем деметилирования. В целом, данные факты позволяют предположить, что антагонизм между H3K27me3 и H3K36me3 может быть важным регулятором транскрипции.

Расположение ацетилированных и метилированных меток гистонов при онкологических заболеваниях может претерпевать, как геноспецифические, так и широко распространенные изменения. Раковые клетки демонстрируют глобальное снижение уровней H4K20me2/3, H3K9me2 и ацетилирования H4, особенно в H4K16. Деацетилирование сайта H4K16Ac и деметилирование лизина в положениях H4K20me2/3 происходит при предраковых состояниях и нарастает во время прогрессирования опухоли. Деметилирование сайтов H3K9me2 и H4K20me3 может свидетельствовать о глобальном нарушении регуляции транскрипционной репрессии в раковых клетках.

У млекопитающих важным фактором контроля баланса процессов ацетилирования и деацетилирования гистонов является рацион питания.

Например, ограничение калорийности пищи или диета с высоким содержанием жиров могут влиять на ацетилирование гистонов через уровни образования NAD^+ . При этом ограничение калорий способствует повышению уровня $NAD^+/NADH$, усиливая процессы деацетилирования. Диета с высоким содержанием жиров, напротив, снижая активность NAD^+ приводит к подавлению активности деацетилазы сиртуина (Su X. et al., 2016). Авторы цитируемого обзора высказывают мнение о том, что показатель соотношения в тканях $NAD^+/NADH$ может оказывать прямое влияние на активность деацетилаз sirtuin. В частности, у мышей с сахарным диабетом, вызванным диетой с высоким содержанием жиров, активность никотинамид-фосфорибозилтрансферазы (NAMPT), ключевого фермента в синтезе NAD^+ у млекопитающих, сильно снижается. Тогда, как введение никотинамид-моноклеотида или рибозида восстанавливает NAD^+ , активирует деацетилазы SirT1 и SirT3 и повышает чувствительность тканей к инсулину. С другой стороны, NAD^+ -содержащий фермент никотинамид N-метилтрансфераза (NNMT) активируется в экспериментальных моделях ожирения и резистентности к инсулину и сверхэкспрессируется во многих опухолях. Этот фермент обладает двойным эпигенетическим действием, одновременно истощая ресурсы S-аденозилметионина и NAD^+ и тем самым нарушая процессы метилирования и деацетилирования.

Еще одним важным фактором среды является гипоксия, которая может быть вызвана интенсивными физическими нагрузками, восхождением в горы, авиаперелетами на большой высоте, а также рядом патологий – онкология и заболевания сердечно-сосудистой системы. Следовательно, вызванное гипоксией повышение уровня $NADH$ также может подавлять активность деацетилазы сиртуина.

Гормоны системного действия также являются важным специфическим фактором контроля эпигенетической системы регуляции экспрессии генов в организме млекопитающих (Wu S.C., Zhang Y., 2009).

Авторы цитируемого обзора сообщают, что ядерные рецепторы гормонов могут прямо или косвенно вовлекать модифицирующие хроматин ферменты, такие как метил-трансферазы (НМТ) и деметилазы белков гистонов в процессы регуляции экспрессии различных генов-мишеней. Например, ассоциированная с коактиватором аргининметилтрансфераза 1 (фермент CARM1, также известный, как PRMT4) является одним из наиболее хорошо охарактеризованных примеров НМТ, который играет важную роль в опосредовании функции ядерных рецепторов эстрогенов. Данный фермент осуществляет метилирование остатков аргинина в положении 2, 17 и 26 гистона H3 и опосредует активацию транскрипции генов-мишеней. С другой стороны, физиологически активная форма гормонов щитовидной железы - трийодтиронин (Т3), взаимодействуя с собственным ядерным рецептором, способствует активации гистоновых метилтрансфераз CARM1, тем самым увеличивает метилирование остатков аргинина, стимулируя транскрипцию. Напротив, подавление транскрипции, опосредованной рецепторами Т3 в отсутствие гормона объясняется метилированием H3K9 с помощью SUV39H1.

1.3. МЕТИЛИРОВАНИЕ ДНК

Метилирование ДНК является одним из наиболее важных эпигенетических механизмов. Метилированию подвергается цитозин, стоящий в паре с гуанином в одной полинуклеотидной нити ДНК - CpG-сайты. Современные данные литературы свидетельствуют о том, что у млекопитающих метилировано 60-80% CpG, которые распределены закономерно в повторяющихся последовательностях, транскрибируемых участках генов и межгенных областях. Предполагается, что метилирование CpG сайтов может играть важную роль в ограничении доступности хроматина и к подавлению транскрипции (Li Y. et al., 2021). В то время, как CpG является основной мишенью метилирования ДНК, присоединение метиловой группы может происходить на сайте CpNpG, где N может быть представлен А, Т или С (Stoll S. et al., 2018). Известно несколько вариантов метилирования ДНК, такие как 5-метилцитозин (5 mC), N6-метиладенин (6mA) и 4-метилцитозин (4 mC), где цифрами обозначено положение метильной (CH₃) группы в азотистом основании нуклеотида (Chen K et al., 2016). При этом, варианты метилирования 6mA и 4mC могут встречаться в геноме прокариот, тогда, как вариант метилирования 5mC широко распространенный тип метилирования ДНК эукариот. Результаты наиболее ранних исследований позволили установить роль 5mC-модификации цитозина в процессах митотического деления клетки. Но только в 1983 году первая ДНК-метилтрансфераза (Dnmt1) была очищена группой Ингрэма (Bestor и Ingram, 1983). Было показано, что Dnmt1 предпочтительно метилирует ДНК в сайтах CpG, тогда, как отсутствие активного фермента Dnmt1 в эмбриональных стволовых клетках мыши приводит к истощению метилирования CpG во всем геноме, что указывает на роль Dnmt1 в поддержании метилирования во время репликации ДНК. Сейчас

установлено, что сложная закономерная топология метилированных участков ДНК формируется при участии ДНК-метилтрансфераз (DNMT), включая DNMT1, DNMT3A и DNMT3B, а также ферментов, осуществляющих деметилирование ДНК, включая семейство ТЕТ метилцитозиндиоксигеназ. При этом, ДНК-метилтрансферазы DNMT3A и DNMT3B катализируют метилирование CpG в ранее неметилированных CpG. Тогда, как ДНК-метилтрансфераза DNMT1 обеспечивает воспроизведение с высокой точностью ранее существовавших сайтах метилирования CpG во вновь синтезированной дочерней цепи ДНК, обеспечивая сохранность ранее метилированных сайтов CpG во время деления клетки (Li Y. et al., 2021).

Основным биологическим эффектом метилирования ДНК обычно является подавление экспрессии генов. Результаты исследования с использованием линии мышей, у которых отсутствовал фермент Dnmt1, показали, что утрата способности к метилированию ДНК привела к экспрессии некоторых генов, которые в норме находятся в неактивном состоянии. Обнаружены также специфические белки, способные распознавать 5mC-метку на молекуле ДНК и выполняют последующие действия, т.е. эффекторы или считыватели 5mC. Выявлено четыре белка-считывателя 5mC, включающие семейство метил-CpG-связывающих доменов (MBD), включая MeCP2, MBD1, MBD2 и MBD4 (Chen K et al., 2016). Установлено, что белок катенина (p120) является специфическим считывателем 5mC и функционирует как репрессор генов, зависимый от метилирования ДНК. Последующий анализ белков-считывателей 5mC привел к более полному объяснению роли метилирования ДНК в регуляции экспрессии генов. Было выяснено, что специфическое связывание считывающих белков с метилированным CpG приводит к подавлению экспрессии генов и представляет собой фундаментальный эпигенетический механизм, имеющий особое значение у высших организмов. Таким образом,

метилирование ДНК непосредственно участвует в процессах регуляции экспрессии генов. Наряду с модифицированием гистонов метилирование ДНК модулирует структуру хроматина и влияет на экспрессию генов, определяя их активность в разных типах клеток. Тем не менее, согласно современным представлениям, подавление экспрессии генов метилированием ДНК может происходить напрямую или опосредовано. Например, присутствие метил-группировок в промоторной области гена **напрямую** связано с подавлением транскрипции, за счет прямого подавления связывания факторов транскрипции с промотором гена. Либо **опосредованным** путем, через рекрутирование белков репрессоров транскрипции, (например белок Kaiso). Белки-репрессоры предотвращают доступ транскрипционных факторов к промоторной области. Данные белки содержат метил-СрG-связывающий домен (MDB) и обладают способностью специфически связываться с метилированной ДНК. MBD-содержащие белки обеспечивают репрессию транскрипции. Данная группа белков модифицируют структуру хроматина, иницируя активность гистондеацетилазы (HDAC) к метилированной ДНК, что приводит к репрессии генов (Schubeler D. et al., 2000).

Однако, в литературе имеются данные о том, что у позвоночных значительная часть СрG сайтов в зоне промотора не чувствительны к действию ДНК-метилтрансфераз, образуя СрG-островки, свободные от метилирования (Hughes A.L. et al., 2020). В данном случае доступность транскрипции определяется эпигенетическими метками белков-гистонов. Например, триметилирование остатка лизина в гистоне H3 (H3K4me3) в геномах позвоночных тесно коррелирует с расположением СрG-островков, ассоциированных с промотором. Приводятся данные о том, что метилирование ДНК связано с отсутствием метилирования H3K4 и наличием метилирования H3K9 (Cheng X., Blumenthal R.M., 2010). Напротив, метилирование ДНК в области транскрибируемого участка гена

может оказывать положительное влияние на экспрессию гена. Метилирование ДНК транскрибируемого участка гена может оказывать влияние на течение элонгации РНК во время транскрипции, регулировать сплайсинг РНК и изменять расположение нуклеосом, что в совокупности поясняет разнообразие роли метилирования ДНК в процессах регуляции экспрессии генов (Stoll S. et al., 2018).

Важно отметить, что в системе контроля транскрипции различные формы метилирования ДНК могут координировать свои эффекты с различными гистоновыми метками, поскольку метилтрансферазы, деметилазы и белки-считыватели метилирования ДНК взаимодействуют с различными гистоновыми метками или ферментами модификации гистонов. Поскольку динамика ковалентных модификаций ДНК и белков-гистонов строго регулируется и координируется между собой, то уместно говорить о наличии эпигенетического кода, главное назначение которого управление экспрессией генов (Hashimoto H. et al., 2010). Например, деметилирование ДНК положительно коррелирует с активностью деметилаз остатков лизина в гистонах (Allis C.D., Jenuwein T., 2016). Затрагивая тему взаимодействия механизмов метилирования ДНК и гистонов, следует отметить, что метилирование CpG сайтов ДНК положительно коррелирует с метилированием остатков лизина гистонов H3K9 и негативно коррелирует с метилированием H3K4 (Meissner A. et al, 2008). Показано, что ДНК-метилтрансфераза Dnmt3L обладает способностью специфически взаимодействовать с амино-концом гистона H3 только тогда, когда H3K4 не подвергался метилированию (Hashimoto H. et al., 2010). Поэтому, когда метилирование H3K4 отсутствует, Dnmt3L индуцирует метилирование ДНК de novo путем присоединения Dnmt3a к нуклеосоме в положении H3K4, что позволяет говорить о согласованном функционировании сложного комплекса гистонов–Dnmt3L–Dnmt3a–ДНК. В современных публикациях высказывается мнение о том, что

метилирование цитозина в CpG-динуклеотидах ДНК и остатков гистонового лизина и аргинина представляет собой модификацию хроматина, которая критически важна для сохранения целостности наследственного материала, а также для регуляции репликации транскрипции (Li Y. et al., 2021). Поэтому представленную выше информацию уместно дополнить данными о взаимодействии ДНК-метилтрансфераз и метилтрансфераз остатков аргинина в белках гистонах. Было показано, что симметричное метилирование гистона H4 аргинин 3 (H4R3me2s) белком аргининметилтрансферазой PRMT5 требуется для последующего метилирования ДНК. H4R3me2s служит прямой связывающей мишенью для ДНК-метилтрансферазы DNMT3A, подавляющей экспрессию генов. Напротив, утрата метки H4R3me2s в результате подавления аргининметилтрансферазы PRMT5 приводит к снижению связывания DNMT3A, потере метилирования ДНК и активации генов (Zhao Q. et al., 2009).

Метилирование ДНК, также, как и ковалентная модификация гистонов обладает высокой пластичностью, в частности, именно регуляторные участки гена могут подвергаться наиболее динамичному метилированию и деметилированию. Возможно, активное деметилирование, связанное с присутствием метилированных производных цитозина, может играть решающую роль в цитодифференцировке и поддержании популяций стволовых клеток. Установлена связь между активным деметилированием ДНК и эмбриональным развитием. ДНК прокариотических клеток также содержат метилированные метки. Имеются данные о том, что N6-метиладенин (6mA или m6dA), присутствует в ДНК прокариот и играет решающую роль в репликации и репарации ДНК, защите бактериальных клеток от вирусной инвазии благодаря тому, что 6mA метка может быть распознана соответствующими эндонуклеазами рестрикции в

качестве маркера, предотвращающего рестрикцию генома хозяина и дальнейшей деградации неметилированной вирусной ДНК.

Между тем, ядерная ДНК эукариот также содержит достаточно высокий уровень 6mA-меток. Возможно, присутствие 6mA модификаций аденина в ядерной ДНК эукариот допустимо рассматривать в качестве еще одной потенциальной эпигенетической метки в дополнение к 5-метилцитозину. Обнаружено, что в ядерной ДНК эукариот 6mA-метки могут располагаться в сайтах старта транскрипции (TSS), в транскрибируемых областях генов, а также области ДНК-линкера между сопредельными нуклеосомами.

Механизмы метилирования ДНК критически важны для процессов роста и развития многоклеточных организмов, как животных, так и растений. Показано, что у мышей нокаутирующие мутации (исключающие возможность экспрессии гена) любого из трех генов, кодирующих ДНК-метилтрансферазы (Dnmt1, Dnmt3a и Dnmt3b) являются летальными (Zilberman D, Henikoff S., 2007). Используя метод сопоставления комплексов метилированных локусов клеток различных тканей или разных индивидуумов возможно сформировать представление о полиморфизме метилирования ДНК, что в свою очередь делает возможным создание наборов маркеров метилирования, способных отличать, например эпигенетический ландшафт раковых клеток и нормальной ткани.

Важно отметить, что нарушение интенсивности и топологии метилированных меток ДНК рассматривают, как одну из причин заболеваний человека. Установлено, что малигнизированные клетки проявляют гиперметилирование в промоторных областях многих генов-супрессоров опухолей, такие как ген ретинобластомы (Rb1), глутатион S-трансфераза (GSTP1) и E-кадгерин (CDH1), что приводит к подавлению экспрессии данных генов (McCabe M.T. et al., 2009). По мнению авторов, показатели метилирования ДНК значительно влияют на состояние

экспрессии генов раковых клеток в еще большей степени, чем мутации кодирующей области генов. Напротив, гипометилирование промотора гена *Atgr1a*, кодирующего белок рецептора к Ангиотензину-II (AT1aR), приводит к повышению кровяного давления и усиливает чувствительность к потреблению соли (Stoll S. et al., 2018).

Как уже отмечалось, существует тесная взаимосвязь процессов метилирования ДНК и ковалентной модификации гистонов (метилирование и ацетилирование). Кроме того, гены, кодирующие ДНК-метилтрансферазы могут мутировать, способствуя патологическим изменениям в клетках. Сообщается, что мутации в гене DNMT3L не только глобально подавляли метилирование ДНК, но и ингибировали способность Dnmt3L связываться с неметилированным лизином гистона H3K4me0 (Hashimoto H. et al., 2010). Поэтому механизмы, с помощью которых участки CpG остаются неметилированными в нормальных клетках или приобретают метилирование ДНК в раковых клетках, могут быть тесно связаны с интенсивностью модификации гистонов, поскольку неметилированные CpG-островки активных генов обогащены ацетилированными H3 и H4, а также H3K4me2. С другой стороны, появление в раковых клетках дополнительных, нехарактерных для нормальных клеток, сайтов метилирования ДНК, сочетается с преобладанием метилированием лизина в участках H3K9me2/3 и/или H3K27me3, что в свою очередь может приводить к устойчивой конденсации хроматина в гетерохроматин. Но и в нормальных клетках также метилирование лизина H3K9 и метилирование ДНК тесно связаны в гетерохроматиновых и транскрипционно-репрессированных эухроматических областях. Данный тандем метилтрансфераз гистонов и ДНК критически важен для регуляции экспрессии генов в течении гисто- и органогенеза.

1.4. УЧАСТИЕ НЕКОДИРУЮЩИХ РНК В ЭПИГЕНЕТИЧЕСКИХ МЕХАНИЗМАХ

Некодирующие РНК (нкРНК, non-coding RNAs - ncRNAs) наряду с метилированием ДНК и ковалентной модификацией гистонов являются одним из ключевых факторов формирования эпигенетического кода. Некодирующие РНК представляют собой группу молекул РНК, которые, в отличие от матричной РНК, не несут информацию о первичной структуре белка. К группе нкРНК можно отнести рибосомную и транспортную РНК. Однако, в современной литературе термином нкРНК принято обозначать группу РНК, выполняющих функцию эпигенетических регуляторов, которые активно участвуют во многих физиологических и патологических процессах. В настоящее время хорошо изучены несколько групп регуляторных нкРНК, обладающих способностью контролировать экспрессию генов на этапе транскрипции и посттранскрипционном уровне. К нкРНК относят микроРНК (miRNA), длинную нкРНК (lncRNA), малую интерферирующую РНК (siRNA), piwi-взаимодействующую РНК (piRNA) и т.д. При этом, miRNA, siRNA и piRNA получили название малые нкРНК, поскольку длина данных РНК обычно менее 200 нуклеотидов, тогда как длина lncRNA превышает 200 нуклеотидов.

Согласно современным данным литературы (Li Y., 2021), роль нкРНК в эпигенетической системе контроля экспрессии генов лучше всего понятна на примере микроРНК. Данная группа нкРНК представлена нуклеотидными цепочками длиной около 20 нуклеотидов. Известно, что микроРНК, являясь одной из наиболее важных нкРНК, реализуют свои эффекты, регулируя посттранскрипционный этап экспрессии генов в широком диапазоне нормальных физиологических процессов, таких как развитие организма, гисто- и органогенез. С другой стороны, микроРНК играют ключевую роль

в патогенезе целого ряда опаснейших заболеваний, таких как рак. Нарушение регуляции профилей экспрессии микроРНК тесно коррелирует с инициацией и развитием рака у человека, где эти aberrантные транскрипты обычно сопровождаются эпигенетическими нарушениями. Малая интерферирующая РНК (siRNA) представляют собой класс двухцепочечных молекул РНК. Подобно микроРНК, siRNA опосредуют посттранскрипционное подавление посредством процессов РНК-интерференции (RNAi), связываясь с мРНК. В свою очередь, piRNA представляют собой группу небольших нкРНК длиной примерно 21-35 нуклеотидов. Известно, что piRNA связывается с белками PIWI, приводя к подавлению транскрипции генов посредством деградации матричной РНК. Рассмотрим роль некодирующих РНК в эпигенетических механизмах на примере наиболее хорошо изученных представителей некодирующих РНК - микроРНК и длинных некодирующих РНК.

1.4.1. МикроРНК

Согласно классическим представлениям ген miRNA сначала транскрибируется РНК-полимеразой II или РНК-полимеразой III в первичный транскрипт miRNA (pri-miRNA). Затем при-микроРНК расщепляется на микроРНК-предшественницу (пре-микроРНК; 60-80 нуклеотидов) ядерным белковым комплексом, образованным Drosha и DGCR8. Пре-микроРНК транспортируется из ядра специфическим ядерным транспортным рецептором Экспортин-5 в цитоплазму, где она далее расщепляется на двухцепочечную микроРНК/микроРНК дуплекс с помощью Dicer, рибонуклеазы из семейства РНКазы III (RNase III), который разрезает двуцепочечные молекулы РНК и пре-микроРНК (pre-miRNA) с получением коротких двуцепочечных РНК-фрагментов. Дуплекс микроРНК связывается с белками Argonaute с помощью РНК-

индуцирующего комплекса сайленсинга (RISC), включающего Dicer, РНК-связывающий белок ответа на трансактивацию (TRBP) и Argonaute. В результате одна из нитей дуплекса (зрелая микроРНК) при участии белков семейства Argonaute включается в механизмы подавления трансляции.

Согласно классическим представлениям микроРНК выполняют свою роль только в цитоплазме, где они распознают свои целевые белок-кодирующие мРНК и приводят к подавлению трансляции и деградации целевой мРНК. При этом, основной регуляторный эффект микроРНК обусловлен их способностью связываться с мРНК-мишенями в 3'-нетранслируемой области (3' UTR). Однако элементы, реагирующие на микроРНК, также располагаются и в кодирующих областях мРНК-мишени. МикроРНК реализуют свой эффект в комплексе с белками семейства Argonaute, поскольку данные белки являются эффективной платформой, на которой микроРНК могут связываться с мРНК-мишенями. Кроме того, если соединение оснований miRNA-mRNA произойдет корректно представитель семейства Argonaute, белок AGO2 может проявлять эндонуклеазную активность, расщепляя мРНК-мишень. Таким образом микроРНК подавляют экспрессию генов, точнее служат посттранскрипционными регуляторами генов. По мнению ряда авторов именно этот классический путь регуляции позволяет микроРНК принимать участие в важнейших процессах жизнедеятельности клеток, таких как дифференцировка клеток, апоптоз, пролиферация клеток и органогенез (Wang S. et al., 2021). В тоже время, нарушение экспрессии микроРНК может быть причиной многих опасных заболеваний человека. Также подчеркивается, что остаются мало изученными механизмы экспрессии генов микроРНК и инициация транскрипции микроРНК в различных типах клеток и тканей в норме и при патологии.

Однако, дальнейшие исследования показали, что зрелые микроРНК могут транспортироваться из цитоплазмы в ядро, где микроРНК могут

функционировать в качестве регуляторов генов в ядре посредством механизма, отличного от классической посттранскрипционной репрессии включаясь в системы регуляции биогенеза и функционирования некодирующих РНК (включая микроРНК и длинные нкРНК) (Liang H. et al., 2013). Некоторые зрелые микроРНК не только могут повторно проникать в ядро, но в некоторых случаях их даже больше в ядре, чем в цитоплазме. Сообщается, что присутствие зрелых микроРНК в ядре - общее явление в клетках млекопитающих. Результаты исследований показали, что зрелые микроРНК первоначально накапливаются в цитоплазме, а в дальнейшем происходит транспорт цитоплазматической микроРНК в ядро клетки (Foldes-Papp Z. et al., 2009). Показано, что представители одного и того же семейства микроРНК могут по-разному распределяться в цитоплазме или в ядре (Hwang H.W. et al., 2007). По данным авторов, транспортировке микроРНК в ядро способствует присутствие в молекуле микроРНК специфического гексануклеотидный 3'-концевого мотива (набора нуклеотидов - AGUGUU) определяющего импорт микроРНК в ядро. Результаты дальнейших исследований показали, что около 75% микроРНК присутствуют как в ядре, так и в цитоплазме (Gagnon K.T. et al., 2014). Наряду с этим было подтверждено, что в ядрах клеток человека присутствуют специфические белки семейства Argonaute (Ago2), наличие которых критически важно для поддержания стабильности, в том числе, и микроРНК (Hansen T.B. et al., 2011; Zisoulis D.G. et al., 2012). Также выявлено присутствие в ядрах клеток рибонуклеазы Dicer (Catalanotto C. et al., 2016). Предполагается, что транспортный белок ядерной мембраны Экспортин-1 может обеспечивать транслокацию, как микроРНК, так и белков Argonaute из цитоплазмы в ядро (Zisoulis D.G. et al., 2012). Сообщается, что комплекс AGO-микроРНК может импортироваться в ядро при участии транспортного белка импортин-8 (IPO8), поскольку подавление синтеза IPO8 резко снижает содержание AGO2 в ядре (Catalanotto C. et al.,

2016). Тем не менее, состав РНК-индуцирующего рибонуклеопротеинового комплекса сайленсинга (RISC) в ядре и цитоплазме отличается. Таким образом, присутствие в ядре микроРНК и белков семейства Argonaute (в частности, белка Ago2, обладающего нуклеазной активностью) может свидетельствовать о том, что микроРНК функционируют, как регуляторы генов в ядре посредством механизма, отличного от классической посттранскрипционной репрессии. Экспериментально данный тезис был подтвержден анализом процессов связывания некоторых микроРНК с первичным транскриптом (pri-miR) и блокировки процессинга pri-miR в предшественник pre-miR с последующим подавлением созревания микроРНК (Tang R. et al., 2012; Catalanotto C. et al., 2016). По мнению авторов, приведенный факт допускает возможность того, что, во-первых, одна молекула микроРНК способна непосредственно в ядре воздействовать на первичные транскрипты других микроРНК и контролировать их синтез. Во-вторых, можно предположить наличие сложной иерархической структуры в ряду микроРНК, в которой определенные микроРНК могут иметь приоритет над другими микроРНК. Помимо этого, в литературе представлены сведения о том, что комплексы AGO-miRNA могут воздействовать по принципу комплементарности на специфические последовательности в длинных некодирующих РНК, влияя на их стабильность и функцию (Chiyomaru T. et al., 2014). Наряду с этим, была показана возможность микроРНК регулировать экспрессию генов длинных некодирующих РНК через управление активностью фермента ДНК-метилтрансферазы (DNMT) (Braconi C. et al., 2011). Привлекает внимание тот факт, что в области ядрышка наблюдается высокое содержание микроРНК. Возможно, тесная связь микроРНК с ядрышками может указывать на то, что такая локализация микроРНК необходима для посттранскрипционного контроля мРНК в цитоплазме. Таким образом, динамическое перемещение микроРНК в ядрышко и из него является

частью программы регуляции мРНК (Politz J.C. et al., 2009; Catalanotto C. et al., 2016). В частности, совместная локализация некоторых микроРНК и рибосомной РНК (рРНК), как в ядрышке, так и в цитоплазме в клетках млекопитающих, дает основание предполагать, что микроРНК может ассоциироваться с субъединицами рибосом на ранней стадии биогенеза рибосом (Politz J.C. et al., 2006). Также в литературе обсуждается возможное участие комплекса микроРНК-Ago2 в системе регуляции сплайсинга и альтернативного сплайсинга первичного транскрипта мРНК, благодаря которому микроРНК изменяют доступность сплайсосом к сайтам сплайсинга, не влияя на уровни и стабильность транскрипции про-мРНК (Ameyar-Zazoua M. et al., 2012; Liu J. et al., 2012; Alló M. et al., 2014).

Однако, механизмы регуляции экспрессии генов молекулами микроРНК не ограничиваются перечисленными выше примерами. Имеются экспериментальные доказательства комплементарного взаимодействия некоторых микроРНК с промоторами структурных генов, что в свою очередь, подтверждает прямое участие микроРНК в регуляции транскрипции ряда белков (Place R.F. et al., 2008). Последующие исследования подтвердили существование нового и широко распространенного механизма регуляции экспрессии генов, управляемой микроРНК через комплементарное взаимодействие с промоторами структурных генов, а также выявили актуальность данного механизма в изучении патогенеза смертельно опасных заболеваний человека (Majid S. et al., 2010; Huang V. et al., 2012; Zhang Y. et al., 2014).

Еще одним важным современным направлением исследований микроРНК является анализ механизмов их транскрипции. В связи с этим высказывается мнение о необходимости создания базы данных, содержащей информацию о механизмах регуляции транскрипции микроРНК человека (TRmir). Предполагается, что эта база данных должна быть ориентирована на предоставление множества доступных ресурсов, касающихся

транскрипционных регуляторных областей микроРНК и аннотирования их потенциальных ролей в регуляции микроРНК (Gao Y. et al., 2022). Необходимость в создании такой базы данных обусловлена не только широким доступом к сведениям о регуляторных областях транскрипции микроРНК, но также получением информации о связанных с микроРНК однонуклеотидных полиморфизмах (SNP) и факторах транскрипции (TFs), способных оказывать существенное влияние на биологические процессы человека в норме и при патологии.

1.4.2. Длинные некодирующие РНК

Данная группа нкРНК (lncRNA) представлена нуклеотидными цепочками длиной свыше 200 нуклеотидов. В зависимости от их положения относительно кодирующих генов lncRNA можно разделить на две основные группы: межгенные lncRNA и внутригенные lncRNA. Межгенные, локализованные по определению в неаннотированных областях генома, обычно называют lincRNA. Источником образования внутригенных lncRNA, например, могут являться интроны структурных генов (Rinn J.L., Chang H.Y., 2012). Установлено, что lncRNA транскрибируются РНК-полимеразой II, демонстрируют специфическую для типа клеток экспрессию и реагируют на различные стимулы (Wang K.C., Chang H.Y., 2011). По данным литературы, основной функцией lncRNA является регуляция экспрессии структурных генов, которая может осуществляться cis- и trans-эффектами (Kopp F., Mendell J.T., 2018). **Под cis-эффектами lncRNA** следует понимать влияние на экспрессию близлежащих, сопредельных генов, во-первых, за счет регуляторного влияния транскрипта lncRNA на экспрессию соседних генов. Во-вторых, когда сами процессы транскрипции или сплайсинга lncRNA могут инициировать экспрессию соседних генов. В-третьих, экспрессия сопредельных генов зависит

исключительно от элементов ДНК в промоторе локуса lncRNA и полностью независима от кодируемой РНК или ее продукции. В то время, как **транскрипция молекулами lncRNA может осуществляться**: 1).lncRNA, контролирующими состояние хроматина и экспрессию генов в областях, удаленных от их сайта транскрипции; 2).lncRNA, которые взаимодействуют и регулируют эффекты белков или других молекул РНК.

Обсуждая **пути реализации эффектов lncRNA** на процессы транскрипции, необходимо отметить, что lncRNA обладает способностью связывать факторы транскрипции и индуцировать ковалентную модификацию гистонов, подавляя экспрессию генов (Wilusz J.E. et al., 2009). Сообщается, что lncRNA могут модулировать активность или количества белков или РНК, с которыми они непосредственно связываются, как в ядре, так и в цитоплазме (Kopp F., Mendell J.T., 2018). Эффекты некоторых lncRNA связаны с образованием гетерохроматина, ярким примером данного механизма есть инактивация второй X-хромосомы в соматических клетках женщин и некоторые другие примеры аллельного исключения. Некоторые lncRNA, взаимодействуя непосредственно с ДНК или со специфическими белками, способными модифицировать хроматин, могут оказывать влияние на структуру хроматина, подавляя экспрессию множества генов (Wang K.C., Chang H.Y., 2011; Kopp F., Mendell J.T., 2018). Было установлено, что lncRNA влияют на экспрессию сопредельных генов, взаимодействуя с их энхансерами, но для активации энхансера гена важен не процесс транскрипции, а сама lncRNA (Rinn J.L., Chang H.Y., 2012).

Следует, однако отметить, что многие авторы из общего семейства lncRNA выделяют в самостоятельную группу межгенные длинные некодирующие РНК-lincRNA. Межгенные lincRNA наиболее хорошо изучены, при этом многие гены lincRNA имеют сайт инициации транскрипции, подобно структурному гену, причем транскрипция находится на противоположной цепи (дивергентная транскрипция)

(Бейлерли О.А., Гареев И.Ф., 2020). Гены длинной межгенной некодирующей РНК (lincRNA) обладают разнообразными особенностями, которые отличают их от генов, кодирующих мРНК, и выполняют такие функции, как ремоделирование хроматина и архитектуры генома, стабилизация РНК и регуляция транскрипции (Ransohoff J.D. et al., 2018). Некоторые гены, которые в настоящее время аннотируются как кодирующие lincRNAs, включают небольшие открытые рамки считывания (smORFs) и кодируют функциональные пептиды и, таким образом, могут быть более правильно классифицированы как кодирующие РНК. В целом, lincRNAs могут служить для точной настройки экспрессии соседних генов с выраженной тканевой специфичностью экспрессии. Следует подчеркнуть, что для lincRNA, в сравнении с мРНК, наблюдается более выраженная тканевая специфичность экспрессии, что позволяет им эффективно контролировать экспрессию генов-мишеней тканеспецифичным образом (Cabili M.N. et al., 2011). Тканевая специфичность экспрессии lincRNA может способствовать процессам гистогенеза и что функции lincRNA могут быть тесно связаны с функциями мРНК или других некодирующих РНК, экспрессируемых в той же ткани (Ransohoff J.D. et al., 2018).

В настоящее время аннотировано 13 255 транскриптов lincRNA, кодируемых 8598 генами. lincRNA отличаются от мРНК по их обилию, геномной локализации и субклеточной локализации, эпигенетической регуляцией и тканевой специфичности экспрессии. По сравнению с мРНК транскрипты lincRNA имеют меньше экзонов, линейные размеры lincRNA существенно меньше, а также значительно ниже интенсивность их экспрессии (Melé M. et al., 2017). Кроме того экспрессия lincRNA характеризуется резко выраженной тканеспецифичностью, что согласуется с тем, что lincRNA играют тканеопределяющую роль. Если мРНК в основном транспортируются в цитоплазму для участия в трансляции, то lincRNA чаще обнаруживаются в ядре, чем в цитоплазме. Установлено, что

концентрационные индексы уровней содержания lincRNA в ядрах и в цитоплазме различных типов клеток, в целом имеют сходные соотношения (Derrien T. et al., 2012). Экспрессия генов, кодирующих lincRNA, как и генов, кодирующих белок могут регулировать эпигенетическими механизмами. В частности, метки гистонов H3K4me3 локализованы в участках начала транскрипции активно экспрессируемых генов lincRNA, тогда как метки H3K36me3 располагаются вдоль тела гена (Derrien T. et al., 2012).

В ряде обзорных публикаций (Spitale R.C. et al., 2011; Popadin K. et al., 2013; Ransohoff J.D. et al., 2018) выделены основные эффекты lincRNA, обуславливающие реализацию их функций:

- ремоделирование хроматина, направленное на активацию или подавление транскрипции;

- специфическое взаимодействие с нуклеиновыми кислотами, а также с белками, участие в агрегации белковых комплексов. В частности, в цитоплазме lincRNA могут оказывать влияние на мРНК-мишени, изменяя их стабильность, регулируя деградацию и состояние трансляции;

- роль фактора, ограничивающего взаимодействие белков и нуклеиновых кислот. Например, изолируют микроРНК от взаимодействия с их мРНК-мишенями, или изолируют микроРНК от связывания с белками в функционально активный комплекс RISC, или ограничивают взаимодействие факторов транскрипции с промоторами генов;

- преобладание цис-эффектов в локальной регуляции транскрипции в сопредельных структурных генах. Однако, из данного правила имеются исключения. Например, lincRNA HOTAIR. Ген данной lincRNA расположен между HOXC11 и HOXC12 на хромосоме 12 и влияет на транскрипцию генов заднего кластера HOXD, расположенных на хромосоме 2. Это был первый пример lincRNA, которая осуществляет транс-регуляцию генов, т.е. на расстоянии;

-приводятся данные о том, что lincRNA могут действовать как прямые регуляторы ферментативной активности, связываясь с ферментом, чтобы либо активировать, либо подавлять его активность;

- установлено, что локусы lincRNA могут быть расположены ближе к сайтам запуска транскрипции (TSS) структурных генов;

-кодирование функционально активных олигопептидов. Как уже отмечалось, многие lincRNA могут кодировать небольшие молекулы пептидов, обладающих физиологической функцией в клетке. В частности у млекопитающих данная группа пептидов могут участвовать в регуляции мышечного сокращения и регенерации мышечной ткани.

ЛИТЕРАТУРА К ГЛАВЕ ЭПИГЕНЕТИКА

Beylerli O.A., Gareev I.F. Long non-coding RNAs: what are the prospects?//Preventive Medicine 2020, Vol. 23, No. 2, pp. 124-128
<https://doi.org/10.17116/profmed202023021124>

Allis C.D., Jenuwein T. The molecular hallmarks of epigenetic control\\Nat. Rev. Genet.-2016.-Т.17.-С.487–500
doi: 10.1038/nrg.2016.59

Alló M., Agirre E., Bessonov S. et al. Argonaute-1 binds transcriptional enhancers and controls constitutive and alternative splicing in human cells//Proc Natl Acad Sci U S A.-2014 .-Т.111,№44.-С.15622-15629
doi: 10.1073/pnas.1416858111

Ameyar-Zazoua M., Rachez C., Souidi M. et al. Argonaute proteins couple chromatin silencing to alternative splicing//Nat Struct Mol Biol.-2012.-Т.19,№10.-С.998-1004
doi: 10.1038/nsmb.2373

Bannister A.J, Schneider R., Kouzarides T. Histone methylation: dynamic or static?//Cell.-2002.-Т.109.-С.801-806
doi: 10.1016/s0092-8674(02)00798-5

Bannister A.J., Kouzarides T. Regulation of chromatin by histone modifications//Cell Research.-2011.-T.21.-C.381-395
doi:10.1038/cr.2011.22

Black J.C., Van Rechem C., Whetstine J.R. Histone Lysine Methylation Dynamics: Establishment, Regulation, and Biological Impact//Mol Cell.-2012.-T.48,№4.-C.491-507
doi:10.1016/j.molcel.2012.11.006

Braconi C., Kogure T., Valeri N et al. (2011). microRNA-29 can regulate expression of the long non-coding RNA gene MEG3 in hepatocellular cancer//Oncogene.-2011.-T.30.-C.4750–4756
doi: 10.1038/onc.2011.193

Cabili M.N., Trapnell C., Goff L. et al. Integrative annotation of human large intergenic noncoding RNAs reveals global properties and specific subclasses//Genes Dev.-2011.-T.25,№18.-C.1915-1927
doi: 10.1101/gad.17446611

Catalanotto C., Cogoni C., Zardo G. MicroRNA in Control of Gene Expression: An Overview of Nuclear Functions//Int J Mol Sci.-2016.-T.17,№10.-C.1712
doi: 10.3390/ijms17101712

Chang B, Chen Y, Zhao Y, Bruick RK. JMJD6 is a histonearginine demethylase// Science.-2007.-T.318.-C.444-447
doi: 10.1126/science.1145801

Chen K, Zhao BS, He C, Nucleic Acid Modifications in Regulation of Gene Expression//Cell Chem Biol.-2016.-T.23,№1.-C.74–85
doi: 10.1016/j.chembiol.2015.11.007

Cheng X., Blumenthal R.M. Coordinated Chromatin Control: Structural and Functional Linkage of DNA and Histone Methylation//Biochemistry.-2010.-T.49,№14.-C.2999–3008
doi:10.1021/bi100213t

Chiyomaru T., Fukuhara S., Saini S. et al. Long non-coding RNA HOTAIR is targeted and regulated by miR-141 in human cancer cells//J Biol Chem.-2014.-T.289,№18.-C.12550-12565
doi: 10.1074/jbc.M113.488593

Derrien T, Johnson R., Bussotti G. et al. The GENCODE v7 catalog of human long noncoding RNAs: analysis of their gene structure, evolution, and expression//Genome Res.-2012.-T.22,№9.-C.1775-1789
doi: 10.1101/gr.132159.111

Estève P.O., Chin H.G., Smallwood A. et al. Direct interaction between DNMT1 and G9a coordinates DNA and histone methylation during replication//Genes Dev.-2006.-T.20,№22.-C.3089-3103
doi: 10.1101/gad.1463706

Foldes-Papp Z., König K., Studier H. et al. Trafficking of mature miRNA-122 into the nucleus of live liver cells//Curr Pharm Biotechnol.-2009.-T.10.-C.569–578
doi: 10.2174/138920109789069332

Gagnon K.T., Li L., Chu Y. et al. RNAi factors are present and active in human cell nuclei. Cell Rep.-2014.-T.6,№1.-C.211-221
doi: 10.1016/j.celrep.2013.12.013

Gao Y., Feng C., Zhang Y. et al. TRmir: A Comprehensive Resource for Human Transcriptional Regulatory Information of MiRNAs//Front. Genet.-2022.-T.13.-C.808950
doi: 10.3389/fgene.2022.808950

Hansen T.B., Wiklund E.D., Bramsen, J.B. et al. miRNA-dependent gene silencing involving Ago2-mediated cleavage of a circular antisense RNA//EMBO J.-2011.-T.30.-C.4414–4422
doi: 10.1038/emboj.2011.359

Hashimoto H., Vertino P.M., Cheng X. Molecular coupling of DNA methylation and histone methylation//Epigenomics.-2010.-T.2,№5.-C.657–669
doi: 10.2217/epi.10.44

Huang V., Place R.F., Portnoy V. et al. Upregulation of cyclin B1 by miRNA and its implications in cancer//Nucleic Acids Res.-2012.-T.40,№4.-C.1695-1707
doi: 10.1093/nar/gkr93

Hughes A.L., Kelley J.R., Klose R.J. Understanding the interplay between CpG island-associated gene promoters and H3K4 methylation// Biochim Biophys Acta Gene Regul Mech.-2020.-T.1863,№8.-C.194567
doi: 10.1016/j.bbagr.2020.194567

Hwang H.W., Wentzel E.A., Mendell J.T A hexanucleotide element directs microRNA nuclear import//*Science*.-2007.-T.315.-C.97–100
doi: 10.1126/science.1136235

Kopp F., Mendell J.T. Functional classification and experimental dissection of long noncoding RNAs//*Cell*.-2018.-T.172,№3.-C.393–407
doi:10.1016/j.cell.2018.01.011

Lehnertz B., Ueda Y., Derijck A.A. et al. Suv39h-mediated histone H3 lysine 9 methylation directs DNA methylation to major satellite repeats at pericentric heterochromatin//*Curr. Biol*.-2003.-T.13.-C.1192–1200
doi: 10.1016/s0960-9822(03)00432-9

Li Y. Modern Epigenetics Methods in Biological Research//*Methods*.-2021.-T.187.-C.104–113
doi:10.1016/j.ymeth.2020.06.022

Li Y., Chen X., Lu C. The interplay between DNA and histone methylation: molecular mechanisms and disease implications//*EMBO Reports*.-2021.-T.22.-C.e51803
doi 10.15252/embr.202051803

Liang H., Zhang J., Zen K. et al. Nuclear microRNAs and their unconventional role in regulating non-coding RNAs//*Protein Cell*.-2013.-T.4,№5.-C.325–330
doi 10.1007/s13238-013-3001-5

Liu J., Hu J., Corey D.R. Expanding the action of duplex RNAs into the nucleus: Redirecting alternative splicing *Nucleic Acids Res*//2012.-T.40,№3.-C.1240-1250
doi: 10.1093/nar/gkr780

Liu J., Hu J., Hicks J.A. et al. Modulation of splicing by single-stranded silencing RNAs//*Nucleic Acid Ther*.-2015.-T.25,№3.-C.113-120
doi: 10.1089/nat.2014.0527

Lorch Y., Kornberg R.D. Chromatin-remodeling for transcription//*Quarterly Reviews of Biophysics*.-2017.-T.50.-C.e5
doi:10.1017/S003358351700004X

Majid S., Dar A.A., Saini S. et al. MicroRNA-205-directed transcriptional activation of tumor suppressor genes in prostate cancer//*Cancer*.-2010.-T.116,№24.-C.5637-5649
doi: 10.1002/cncr.25488

McCabe M.T., Brandes J.C., Vertino P.M. Cancer DNA Methylation: Molecular Mechanisms and Clinical Implications//Clin Cancer Res.-2009.-T.15,№12.-C.3927–3937

doi:10.1158/1078-0432.CCR-08-2784

Meissner A., Mikkelsen T.S., Gu H. et al Genome-scale DNA methylation maps of pluripotent and differentiated cells//Nature.-2008.-T.454.-C.766 – 770

doi: 10.1038/nature07107

Melé M., Mattioli K., Mallard W. et al. Chromatin environment, transcriptional regulation, and splicing distinguish lincRNAs and mRNAs//Genome Res.-2017.-T.27,№1.-C.27-37

doi: 10.1101/gr.214205.116

Patel A.B., Moore C.M., Greber B.J. et al. Architecture of the chromatin remodeler

RSC and insights into its nucleosome engagement//eLife.-2019.-T.8.-C.e54449

doi: <https://doi.org/10.7554/eLife.54449>

Place R.F., Li L.C., Pookot D. et al. MicroRNA-373 induces expression of genes with complementary promoter sequences//Proc Natl Acad Sci U S A.-2008.-T.105,№5.-C.1608-1613

doi: 10.1073/pnas.0707594105

Politz J.C., Zhang F., Pederson T. MicroRNA-206 colocalizes with ribosome-rich regions in both the nucleolus and cytoplasm of rat myogenic cells//Proc Natl Acad Sci U S A.-2006.-T.103,№50.-C.18957-18962

doi: 10.1073/pnas.0609466103

Politz J.C., Hogan E.M., Pederson T. MicroRNAs with a nucleolar location//RNA.-2009.-T.15,№9.-C.1705-1715

doi: 10.1261/rna.1470409

Popadin K., Gutierrez-Arcelus M., Dermitzakis E.T., Antonarakis S.E. Genetic and Epigenetic Regulation of Human lincRNA Gene Expression//Am J Hum Genet.-2013.-T.93,№6.-C.1015-1026

doi: 10.1016/j.ajhg.2013.10.022

Poziello A., Nebbioso A., Stunnenberg H.G. et al. Recent insights into *Histone Acetyltransferase-1*: biological function and involvement in pathogenesis//EPIGENETICS.-2021.-T.16,№8.-C.838–850

<https://doi.org/10.1080/15592294.2020.1827723>

Ransohoff J.D., Wei Y., Khavari P.A. The functions and unique features of long intergenic non-coding RNA//*Nat Rev Mol Cell Biol.*-2018.-T.19,№3.-C.143–157
doi:10.1038/nrm.2017.104

Rinn J.L., Chang H.Y. Genome regulation by long noncoding RNAs//*Annu Rev Biochem.*-2012.-T.81.-C.145-166
doi: 10.1146/annurev-biochem-051410-09290

Santos-Rosa H, Kirmizis A, Nelson C, et al. Histone H3 tail clipping regulates gene expression//*Nat Struct Mol Biol.*-2009.-T.16.-C.17-22
doi: 10.1038/nsmb.1534

Schubeler D., Lorincz M.C., Cimborá D.M. et al. Genomic Targeting of Methylated DNA: Influence of Methylation on Transcription, Replication, Chromatin Structure, and Histone Acetylation//*Molecular and cellular biology.*-2000.-T.20,№24.-C.9103–9112
doi:https://doi.org/10.1128/MCB.20.24.9103-9112.2000

Shi Y, Lan F, Matson C, et al. Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1//*Cell.*-2004.-T.119.-C.941-953
doi: 10.1016/j.cell.2004.12.012

Smallwood A., Estève P.-O., Pradhan S., Carey M. Functional cooperation between HP1 and DNMT1 mediates gene silencing//*Genes & Dev.*-2007.-T.21.-C.1169-1178
doi/10.1101/gad.1536807

Sobel R.E., Cook R.G., Perry C.A. et al. Conservation of deposition-related acetylation sites in newly synthesized histones H3 and H4//*Proc Natl Acad Sci.*-1995.-T.92.-C.1237–1241
doi: 10.1073/pnas.92.4.1237

Spitale R.C., Tsai M.-C., Chang H.Y. RNA templating the epigenome Long noncoding RNAs as molecular scaffolds//*Epigenetics.*-2011.-T.6,№5.-C.539-543
doi: 10.4161/epi.6.5.15221

Stoll S., Wang C., Qiu H. DNA Methylation and Histone Modification in Hypertension//*Int. J. Mol. Sci.*-2018.-T.19.-C.1174
doi:10.3390/ijms19041174

Su X., Wellen K.E., Rabinowitz J.D. Metabolic control of methylation and acetylation//*Curr Opin Chem Biol.*-2016-T.30.-C.52–60

doi:10.1016/j.cbpa.2015.10.030

Tang R., Li L., Zhu D. et al. Mouse miRNA-709 directly regulates miRNA-15a/16-1 biogenesis at the posttranscriptional level in the nucleus: evidence for a microRNA hierarchy system//Cell Res.-2012.-T.22.-C.504–515
doi: 10.1038/cr.2011.137

Verdone L., Agricola E., Caserta M., Di Mauro E. Histone acetylation in gene regulation//Brief Funct Genomic Proteomic.-2006.-T.5,№3.-C.209-221
doi: 10.1093/bfpg/ell028

Wang K.C., Chang H.Y. Molecular mechanisms of long noncoding RNAs//Mol Cell.-. 2011.-T.43,№6.-C.904-914
doi: 10.1016/j.molcel.2011.08.01

Wang S., Talukder A., Cha M. et al. Computational annotation of miRNA transcription start sites//Briefings in Bioinformatics.-2021.-T.22,№1.-C.2021, 380–392
doi: 10.1093/bib/bbz178

Whetstine JR, Nottke A, Lan F, et al. Reversal of histone lysine trimethylation by the JMJD2 family of histone demethylases//Cell.-2006.-T.125.-C.467-481
doi: 10.1016/j.cell.2006.03.028

Wilusz J.E., Sunwoo H., Spector D.L. Long noncoding RNAs: functional surprises from the RNA world//Genes Dev.-2009.-T.23,№13.-C.1494-1504
doi: 10.1101/gad.1800909

Wu S.C., Zhang Y. Role of Protein Methylation and Demethylation in Nuclear Hormone Signaling//Mol Endocrinol.-2009.-T.23,№9.-C.1323–1334
doi: 10.1210/me.2009-0131

Xiao B., Jing C., Kelly G. et al. Specificity and mechanism of the histone methyltransferase Pr-Set7//Genes and Development.-2005.-T.19.-C.1444–1454
doi/10.1101/gad.1315905

Zhang Y., Fan M., Geng G. et al. A novel HIV-1-encoded microRNA enhances its viral replication by targeting the TATA box region//Retrovirology.-2014.-T.11.-C.23.
doi: 10.1186/1742-4690-11-23

Zhao Q., Rank G., Tan Y.T. et al. PRMT5-mediated methylation of histone H4R3 recruits DNMT3A, coupling histone and DNA methylation in gene silencing//*Nat Struct Mol Biol.*-2009.-T.16,№3.-C.304–311
doi:10.1038/nsmb.1568

Zilberman D, Henikoff S. Genome-wide analysis of DNA methylation patterns//*Development*-2007.-T.134.-C.3959–3965
doi.org/10.1242/dev.001131

Zisoulis D.G., Kai Z.S., Chang R.K., Pasquinelli A.E. Autoregulation of microRNA biogenesis by let-7 and Argonaute//*Nature*.-2012.-T.486.-C.541–544
doi: 10.1038/nature11134

ГЛАВА II. ФАКТОРЫ ТРАНСКРИПЦИИ

ВВЕДЕНИЕ

Впервые существование факторов транскрипции было выявлено на основании открытия, позволившего установить, что *in vitro* очищенная РНК-полимераза-II может инициировать транскрипцию на матрице ДНК в присутствии клеточного экстракта (Weil P. A. et al., 1979). Дальнейшие исследования, направленные на фракционирование и идентификацию общих факторов транскрипции (general transcription factors – GTF), необходимых для инициации транскрипции *in vitro*, позволили определить аналогичные факторы у крыс, дрозофил и дрожжей и обосновать предположение, что GTF действительно являются “общими” факторами, необходимыми для экспрессии генов, транскрибируемых РНК полимеразой II. Таким образом, процесс инициации транскрипции РНК-полимеразы II является высоко консервативным в ряду эукариотических организмов (Matsui T. et al., 1980). Мы упоминаем только РНК-полимеразу II, поскольку только данный тип фермента обладает способностью синтезировать мРНК. Тогда, как РНК-полимераза I отвечает за синтез про-рРНК, а РНК-полимераза III за синтез тРНК и других некодирующих РНК клетки.

Между тем, регуляция транскрипции у эукариот организована достаточно сложно, поскольку зависима от комплексов ремоделирования хроматина (Burns L.G., Peterson C.L., 1997) и ковалентной модификации белков гистонов (Natsume-Kitatani Y., Mamitsuka H., 2016). В инициации транскрипции непосредственной мишенью GTF является строго определенная зона промотра структурного гена. В структуре промотра эукариот можно выделить основные элементы и регуляторные элементы. К **основным элементам промотра (коровый промотор, см. Рис.2.1)** можно отнести сайт для сборки комплекса преинициации транскрипции (PIC),

включающий последовательность ТАТА, расположенную выше от сайта старта транскрипции (TSS), и иницирующую последовательность (Inr), охватывающую сайт старта. Промоторы могут включать в себя блок ТАТА, последовательность «инициатор» (Inr) или оба этих управляющих элемента (Hampey M., 1998). Третий основной элемент, нижестоящий элемент корового промотора (downstream promoter element - DPE), был первоначально описан у дрозофилы и расположен примерно на 30 п.н. ниже от TSS. Элемент промотора DPE, по-видимому, функционирует в сочетании с элементом Inr в качестве сайта связывания фактора транскрипции TFIID на промоторах, не содержащих ТАТА.

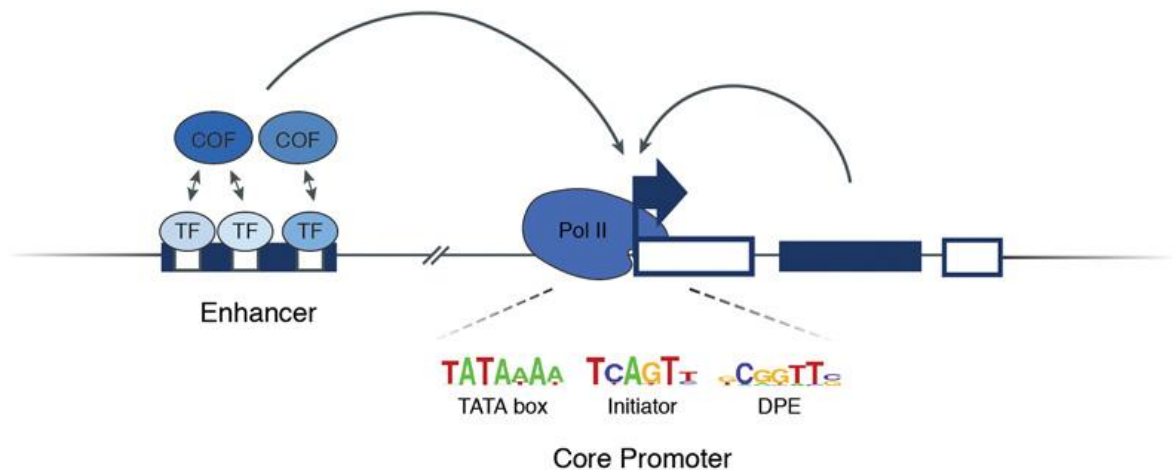


Рисунок 2.1. Структура корового промотора. Цитировано по Zabidi M.A., Stark A., 2016

По данным современных исследований коровые (основные) промоторы многоклеточных организмов, контролирующие инициацию транскрипции РНК-полимеразой II, могут содержать короткие последовательности нуклеотидов, называемые элементами (мотивами) корового промотора (например, блок ТАТА, инициатор (Inr) и нижестоящий элемент корового промотора (DPE)), которые рекрутируют РНК-полимеразу II через общий механизм инициации транскрипции (Dreos R. et al., 2021). Авторы сообщают, что классы промоторов Inr+DPE не только присутствуют в геноме дрозофилы и человека и по своей структуре похожи

друг на друга, но также могут быть общими для различных видов многоклеточных организмов.

Наиболее изученным элементом корового промотора является ТАТА box, однако ТАТА box обнаруживается только примерно в 10-20% коровых промоторов многоклеточных. Поэтому, наряду с ТАТА последовательностью необходимо назвать и другие возможные ключевые последовательности ДНК известные, как коровые промоторные элементы, которые включают в себя: BRE, MTE, TCT и DPE последовательности. Два мотива BRE (TFIIIB recognition element) расположены либо выше (BREu), либо ниже (BREd) элементов ТАТА box. Следует подчеркнуть, что TBP, ТАТА box, и BRE демонстрируют высокий уровень консервативности в ряду от археобактерий до человека (Kadonaga J.T., 2012). При этом BREu, а также BREd оказывают как положительное, так и отрицательное влияние на активность транскрипции. Элемент DPE (downstream core promoter element) был обнаружен при анализе промоторов генов без ТАТА у дрозофилы. Элемент MTE (motif ten element), который расположен непосредственно перед DPE, был идентифицирован как чрезмерно представленная последовательность корового промотора, называемая “мотив 10”, а затем обнаружено, что это функциональный элемент корового промотора. Мотивы MTE и DPE демонстрируют высокую консервативность в ряду от дрозофилы до человека, и оба мотива, по-видимому, непосредственно распознаются субъединицами основного фактора транскрипции TFIIID - ТАФ-белками, которые напоминают по своей структуре белки-гистоны. В свою очередь TCT последовательность регулирует транскрипцию генов рибосомных белков у дрозофилы и человека. Несмотря на то, что не существует универсальных коровых промоторных элементов, которые присутствуют во всех промоторах, тем не менее, понятие корового промотора ядерной РНК-полимеразы II можно определить, как минимальный участок ДНК, которая достаточна для точной инициации

транскрипции РНК-полимеразой II (Kadonaga J.T., 2012; Haberle V., Stark A., 2018). Следует отметить, что результаты современных исследований постоянно дополняют список все новых компонентов корового промотора, например DNA-replicated related element (DRE), Ohler 1,6 и 7 мотивы (Danino Y.M. et al., 2015; Haberle V., Stark A., 2018). По мнению авторов коровый промотор, возможно, трансформируется в ходе эволюции. Благодаря этому уровни экспрессии генов могут модулироваться композицией элементов корового промотора. Такая модуляция непосредственно достигается за счет возникновения комбинаций новых элементов корового промотора, в результате чего реализуется дополнительный уровень регуляции транскрипции.

Суммируя приведенные выше факты, отметим, что транскрипция обычно инициируется в определенной позиции - сайте начала транскрипции (TSS), на 5'-конце гена. Сайт TSS встроен в коровый промотор, который представляет собой короткую последовательность, охватывающую 50 пар оснований выше и на 50 ниже относительно TSS. Коровый промотор служит в качестве платформы связывания компонентов, необходимых для инициации транскрипции, включая РНК полимеразу II и связанных с ней общих факторов транскрипции (GTF).

Регуляторные элементы. Коровый промотор достаточен для инициации транскрипции, но такая транскрипция обладает низкой базальной активностью, которая может быть дополнительно активирована, как правило, более дистально расположенными регуляторными элементами, называемыми энхансерами (рассмотрены ниже). Энхансеры связывают регуляторные белки, известные как факторы транскрипции, рекрутируют кофакторы транскрипции и могут дополнительно усиливать транскрипцию.

CHAPTER II. TRANSCRIPTION FACTORS

INTRODUCTION

For the first time, the existence of transcription factors was revealed on the basis of a discovery that made it possible to establish in vitro purified RNA polymerase-II can initiate transcription on the DNA template in the presence of a cell extract (Weil P. A. et al., 1979). Further research aimed at the fractionation and identification of the general transcription factors (GTF) required to initiate transcription in vitro has identified similar factors in rats, *Drosophila*, and yeast and substantiated the assumption that GTFs are indeed "common" factors necessary for the expression of genes transcribed by RNA polymerase II. is highly conserved in a number of eukaryotic organisms (Matsui T. et al., 1980). We only mention RNA polymerase II because only this type of enzyme has the ability to synthesize mRNA. Whereas RNA polymerase I is responsible for the synthesis of pro-rRNA, and RNA polymerase III is responsible for the synthesis of tRNA and other non-coding cell RNAs.

Meanwhile, the regulation of transcription in eukaryotes is quite complex, since it depends on chromatin remodeling complexes (Burns L. G., Peterson C. L., 1997) and covalent modification of histone proteins (Natsume-Kitatani Y., Mamitsuka H., 2016). In transcription initiation, the immediate target of GTF is a well-defined promo zone of a structural gene. In the structure of the promotra of eukaryotes, the main elements and regulatory elements can be distinguished. The **main elements of the promotra (bark promoter, see Fig. 2.1)** can be attributed to the site for assembling the transcription initiation complex (PIC), including the TATA sequence located above from the transcription start site (TSS), and an initiating sequence (Inr) covering the start site. Promoters may include a TATA unit, an initiator sequence (Inr), or both (Hampsey M., 1998). A third major

element, the downstream promoter element (DPE), was originally described in *Drosophila* and is located about 30 p.p. below TSS. The DPE promoter element appears to function in conjunction with the Inr element as a binding site for the transcription factor TFIID on non-TATA promoters.

According to current research, the cellular (main) promoters of multicellular organisms that control the initiation of transcription by RNA polymerase II may contain short sequences of nucleotides called cow promoter elements (motifs) (e.g., the TATA block, the initiator (Inr), and the lower element of the cow promoter (DPE)) that recruit RNA polymerase II through a common transcription initiation mechanism (Dreos R. et al., 2021). The authors report that the classes of Promoters of Inr+DPE are not only present in the genome of *Drosophila* and humans and are structurally similar to each other, but may also be common to different species of multicellular organisms.

The most studied element of the cow promoter is the TATA box, but the TATA box is found only in about 10-20% of multicellular cortical promoters. Therefore, along with the TATA sequence, it is necessary to name other possible key DNA sequences known as cortical promoter elements, which include: BRE, MTE, TST and DPE sequences. The two BRE (TFIIB recognition element) motifs are located either above (BREu) or below (BREd) elements of the TATA box. It should be emphasized that TBP, TATA box, and BRE demonstrate high levels of conservatism in the range from archaeobacteria to humans (Kadonaga J. T., 2012). In doing so, BREu as well as BREd have both positive and negative effects on transcription activity. The downstream core promoter element (DPE) was detected in the analysis of non-TATA gene promoters in *Drosophila*. The MTE element (motif ten element), which is located directly in front of the DPE, was identified as an overrepresented sequence of a cow promoter called "motif 10" and then discovered, that it is a functional element of a cow promoter. The MTE

and DPE motifs exhibit high conservatism in the range from *Drosophila* to humans, and both motifs appear to be directly recognized by the subunits of the main transcription factor TFIID, TAF proteins that resemble histone proteins in structure. In turn, the TCT sequence regulates the transcription of ribosomal protein genes in *Drosophila* and humans. Although there are no universal cortical promoter elements that are present in all promoters, the concept of a core promoter of nuclear RNA polymerase II can be defined as a minimum stretch of DNA that is sufficient to accurately initiate transcription by RNA polymerase II (Kadonaga J. T., 2012; Haberle V., Stark A., 2018). It should be noted that the results of modern research will constantly supplement the list of all new components of the core promoter, for example, DNA-replication-related element (DRE), Ohler 1,6 and 7 motifs (Danino Y. M. et al., 2015; Haberle V., Stark A., 2018). According to the authors, the core promoter may be transformed in the course of evolution. Due to this, gene expression levels can be modulated by the composition of core promoter elements. Such modulation is directly achieved through the emergence of combinations of new elements of the core promoter, as a result of which an additional level of transcription regulation is realized.

To summarize the above facts, transcription is usually initiated at a specific position, the Transcription Initiation Site (TSS), at the 5' end of the gene. The TSS site is embedded in a core promoter, which is a short sequence spanning 50 base pairs above and 50 below TSS. The core promoter serves as a binding platform for the components required to initiate transcription, including RNA polymerase II and related common transcription factors (GTFs).

Regulatory elements. The core promoter is sufficient to initiate transcription, but such transcription has low basal activity, which can be further activated, generally by more distally arranged regulatory elements called enhancers (discussed below). Enhancers bind regulatory proteins known as transcription factors, recruit transcription cofactors, and can further enhance transcription.

2.1. ОБЩИЕ ФАКТОРЫ ТРАНСКРИПЦИИ

Любой белок, который необходим для инициации транскрипции, но не является частью РНК-полимеразы, определяется как фактор транскрипции. Многие факторы транскрипции действуют путем распознавания специфических сайтов в ДНК. Однако связывание с ДНК не единственная функция фактора транскрипции. Фактор может распознавать другой фактор, распознавать РНК-полимеразу или включаться в иницирующий комплекс только в присутствии нескольких других белков. Следовательно, о принадлежности белка к аппарату транскрипции можно судить на основании того, насколько данный белок необходим для инициации транскрипции.

Наряду с этим, выделяют группу общих факторов транскрипции (general transcription factors – GTF), в которую входят TFIIA (читается, как фактор транскрипции РНК-полимеразы II - А), TFIIB, TFIID, TFIIЕ, TFIIF и TFIIH. Главной особенностью общих факторов транскрипции является их способность формировать на коровом промоторе специфический белковый комплекс – комплекс преинициации транскрипции (PIC). Формирование PIC возможно только в присутствии необходимого набора общих факторов транскрипции, это их основная задача. Общие факторы транскрипции были идентифицированы в клетках дрожжей, мух, крыс, человека и других многоклеточных организмов, что позволяет предположить, что общие факторы транскрипции являются универсальными факторами инициации транскрипции РНК полимеразой II и что механизм, с помощью которого РНК полимеразой II распознает промоторную ДНК и иницирует транскрипцию, сохраняется среди эукариотических организмов.

2.1.1. Общий фактор транскрипции TFIID

Данный фактор является ключевым в старте сборки РИС. В действительности TFIIID млекопитающих представляет из себя сложный белковый комплекс, в состав которого входит набор белков: ТАТА-бокс связывающий протеин (ТВР) и 13 высоко консервативных в ряду эукариот белков - ТВР-ассоциированные факторы (ТАFs). Согласно данным литературы TFIIID является трехлопастной структурой, в которой доли А и С соединены белками ТАF1 и ТАF6. Лепесток А обладает структурной гибкостью и высокой степенью мобильности, в результате чего он также может ассоциироваться с лепестком В (Рис. 2.2) (Patel A.V. et al., 2019).

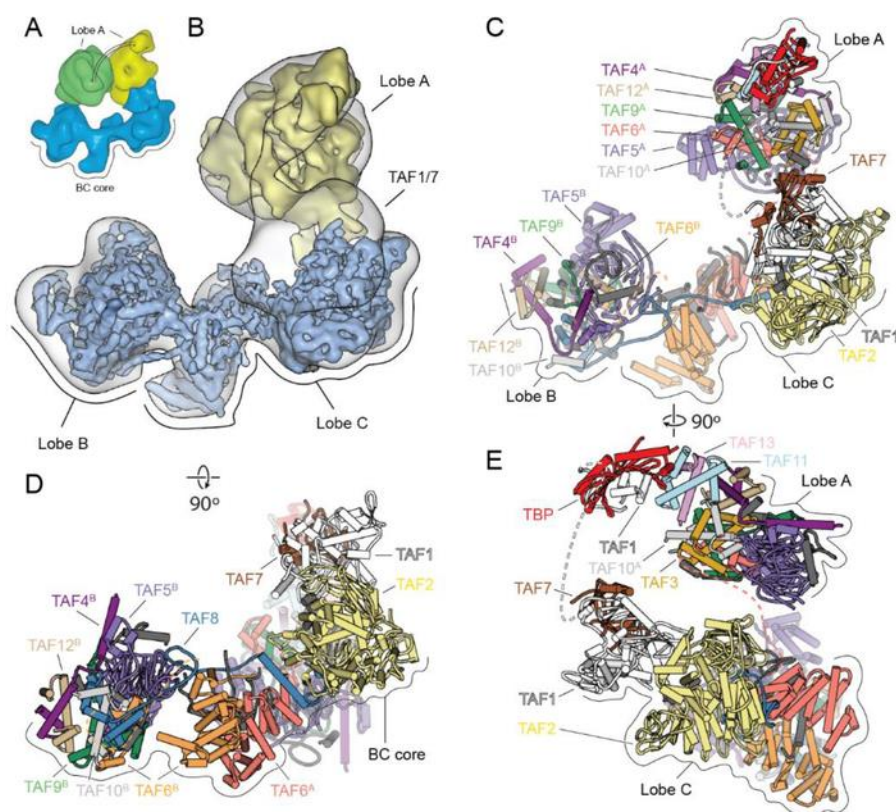


Рисунок 2.2. Структура TFIIID по данным криоэмиссионной реконструкции. Ядро ВС (синий цвет), лепесток А (желтый - исходное состояние; зеленый - расширенное состояние). Цитировано по Avinash V Patel et al., 2019

При этом, ТАТА-бокс связывающий протеин (ТВР) входит также в состав факторов транскрипции, инициирующих активность РНК-полимеразы I и III (Bhuiyan T., Timmers H.Th.M., 2019). Входящие в состав TFIIID белки ТАFs взаимодействуют между собой, образуют

специфическую укладку, представленную на Рис.2.3, получившую название гистоновый складчатый домен (HFD), т.к. белки TAFs напоминают по структуре гистоны, формируя в комплексе TFIID пять групп гетеродимеров TAF3-TAF10, TAF8-TAF10, TAF6-TAF9, TAF11-TAF13 и TAF4-TAF12 (Leurent C. et al., 2002). TAF-субъединицы TFIID первоначально были определены как коактиваторы, опосредующие взаимодействие между геноспецифическими активаторами транскрипции и РНК полимеразой II. Выяснилось также, что некоторые TAF обладают способностью ацетилировать белки гистоны (TAF1) или связываться с комплексами, подобными SAGA, которые могут подвергать модификации гистоны.

Установлено, что TFIID человека включает эволюционно консервативные последовательности всех TAF и TBP и, что такая укладка важна для цитоплазматической стабильности и ядерного импорта белков TAFs (Soutoglou E. et al., 2005).

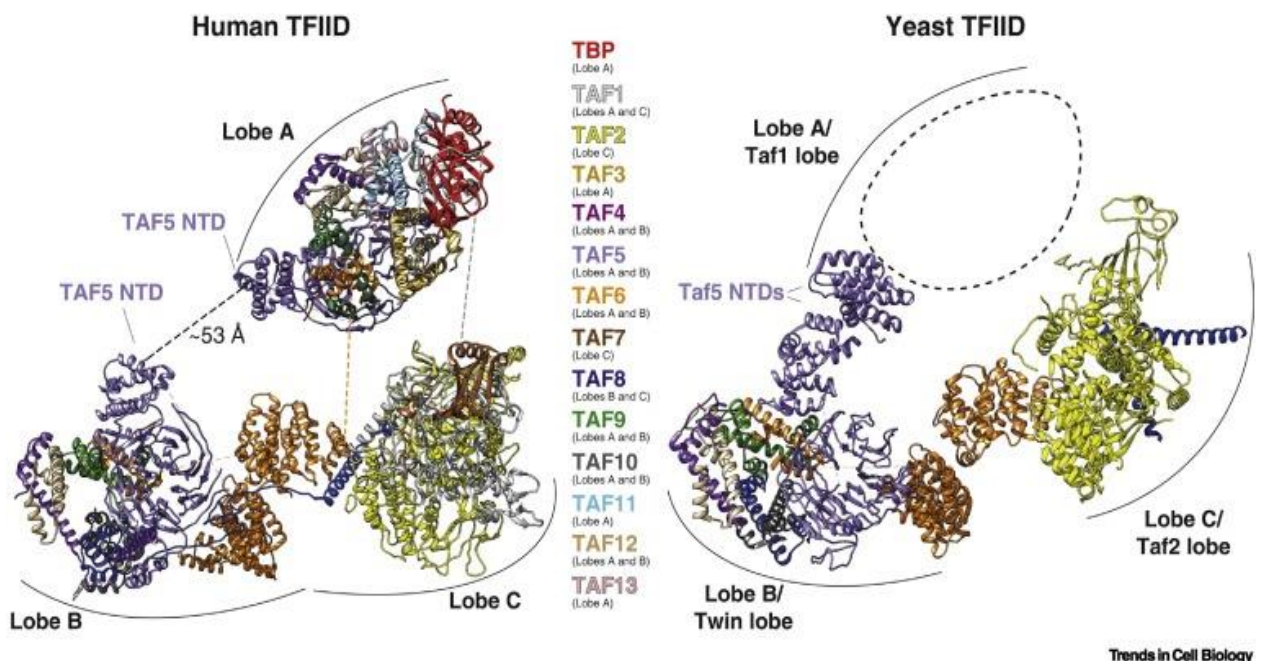


Рисунок 2.3. Результаты криоэлектронной микроскопии TFIID человека и дрожжей. Цитировано по Bhuiyan T., Timmers H.Th.M., 2019.

Наличие в комплексе TFIID TATA-box связывающего протеина (TBP), как одного из ключевых факторов взаимодействия с коровым промотором, выглядит несколько парадоксально, потому что только около

5% коровых промоторов человека содержат ТАТА-box. Тем не менее, связывание TFIIID с промоторами не содержащими ТАТА-последовательности может регулироваться при участии TAFs, способных распознавать другие основные элементы промотора. Например, Inr-связывание происходит с помощью гетеродимера TAF1-2, DCE-связывание с помощью TAF1, DPE-связывание с помощью TAF6-9, тогда, как гетеродимер TAF4-12 может осуществлять неспецифические взаимодействия с молекулой ДНК (Bhuiyan T., Timmers H.Th.M., 2019). Вогнутая поверхность ТВР является гидрофобной по своей природе и взаимодействует с малой бороздкой ДНК путем вставки двух пар остатков фенилаланинов между первым и последним динуклеотидами последовательности ТАТААААG.

В литературе имеются данные о том, что на процессы связывания TFIIID с промотором могут оказывать существенное влияние эпигенетические метки коровых гистонов, расположенных в зоне промотора. Высказывается мнение о многофакторном характере процесса связывания TFIIID с коровыми промоторами и возможных механизмах регуляции данного взаимодействия посредством контроля ацетилирования гистонов, триметилирования и, возможно, других модификаций гистонов (Farrelly, L.A. et al., 2019).

2.1.2. Общий фактор транскрипции TFIIВ

Общий фактор транскрипции TFIIВ представлен одной субъединицей и является важным компонентом PIC. Фактор TFIIВ присутствуют во всех трех системах РНК-полимеразы эукариот и демонстрирует высокий уровень консервативности в ряду архей и эукариот. TFIIВ имеет функциональное сходство с сигма-фактором инициации транскрипции бактерий, однако их первичная и третичная структуры отличаются. TFIIВ участвует в инициации

транскрипции, а также в выборе места начала транскрипции. Общий фактор транскрипции TFIIB играет центральную роль в сборке комплекса PIC, обеспечивая связь между TFIID, связанным с промотором, и РНК-полимеразой II. TFIIB поддерживает тесный контакт с коровым (основным) промотором через два независимых модуля распознавания ДНК. В дополнение к взаимодействию с другими общими факторами транскрипции, TFIIB непосредственно модулирует каталитический центр РНК-полимеразы II в транскрипционном комплексе. Более того, TFIIB был предложен в качестве мишени для белков-активаторов транскрипции, которые стимулируют сборку комплекса PIC. TFIIB играет решающую роль в формировании PIC на всех промоторах, рекрутирующих РНК-полимеразу II. Человеческий TFIIB представляет собой одиночный пептид 33 кДа, состоящий из цинковой ленты на N-конце и C-концевого домена ядра, состоящего из α -спиралей. TFIIB связывается с промоторной областью после рекрутирования TFIID, взаимодействуя как с элементами ДНК, так и с другими белками, облегчая транскрипцию. Современные представления о роли TFIIB в инициации транскрипции изложены в ряде обзорных публикаций (Deng W., Roberts S.G., 2007; Wang Y., Roberts S., 2010; Luse D.S., 2012; 2014; Adachi N. et al., 2016; O'Brien M.J., Ansari A., 2022). В процессе инициации транскрипции TFIIB взаимодействует с промотором, ТАТА-связывающим белком (ТВР) в составе TFIID, фактором транскрипции TFIIF и с каталитическим центром РНК-полимеразы II. TFIIB связывается с белком ТВР, в состав которого входит элемент распознавания TFIIB. Затем, образовавшийся комплекс ТВР-TFIIB в промоторной области рекрутирует РНК полимеразу II и другие общие факторы транскрипции TFIIF, TFIIE и TFIIH. Фактор TFIIB, фактически выполняет функцию мостика между TFIID, связанным с ДНК, и РНК-полимеразой II. Считается, что TFIIB взаимодействует с активным центром РНК полимеразы II, играя также определенную роль в прерывании транскрипции и покидании РНК

полимеразой II промотора. Высказывается мнение, что TFIIВ может иметь активную (открытую) конформацию или неактивную (закрытую) конформацию, поэтому взаимодействие с активаторами транскрипции стабилизирует активную (открытую) форму TFIIВ и, таким образом, стимулирует инициацию транскрипции (O'Brien M.J., Ansari A., 2022).

2.1.3. Общий фактор транскрипции TFIIФ

Роль фактора TFIIФ у млекопитающих в инициации транскрипции анализировалась в экспериментах с использованием экспериментальной модели образования транскрипционного пузыря (начального эта плавления области промотора). В условиях такой модели транскрипция поддерживалась при участии только ТВР и TFIIВ, но синтез мРНК резко усиливался при добавлении TFIIФ (Luse D.S., 2012). TFIIФ первоначально был идентифицирован как фактор с очень высоким сродством к РНК-полимеразе II. Факторы TFIIФ и TFIIВ структурно и функционально совместно интегрированы в составе PIC и связаны с одной из субъединиц РНК полимеразы II. Присутствие TFIIФ необходимо для удержания TFIIВ в составе PIC в соответствии с архитектурой промотора. Возможно, удержание TFIIВ в составе PIC является основной функцией TFIIФ. Благодаря этому свойству TFIIФ может влиять на выбор сайта старта транскрипции посредством взаимодействия с TFIIВ (Luse D.S., 2014). Кроме того, у человека TFIIФ регулирует пространственное положение РНК полимеразы II в комплексах с Медиатором (структура и функция Медиатора рассмотрены ниже). У многоклеточных организмов TFIIФ обладает свойством, которое можно считать уникальным для общих факторов транскрипции - стимулировать элонгацию транскрипта. Обращает на себя внимание тот факт, что в ядрах млекопитающих TFIIФ может подвергаться интенсивному фосфорилированию, скорее всего ферментом казеинкиназой-

2 (СК2). Это согласуется с тем фактом, что среди общих факторов транскрипции, TFIIIF *in vitro* является предпочтительным субстратом СК2. При этом, фосфорилированный и нефосфорилированный белок TFIIIF одинаково эффективно связываются с РИС и РНК полимеразой II, однако, фосфорилированная форма TFIIIF утрачивает способность стимулировать элонгацию транскрипта.

2.1.4. Общий фактор транскрипции TFIIH

TFIIH представляет собой комплекс из 10 субъединиц с общей массой 500 кДа, который обладает несколькими ферментативными активностями, включая две АТФ-зависимые ДНК-геликазы с полярностью 3 → 5 или 5 → 3 и киназную активность (у млекопитающих представлена CDK7-циклин-зависимой киназой, активируемой циклином H). Комплекс TFIIH может быть разделен на два подкомплекса, ядро TFIIH и комплекс циклинзависимая-киназа. Кроме важной роли в механизмах инициации транскрипции, TFIIH функционирует как важный компонент в процессах репарации и принимает участие в системе контроля клеточного цикла млекопитающих. TFIIH выполняет важнейшие роли при инициации транскрипции и переходу к элонгации путем фосфорилирования CDK7 остатка серина С-концевого домена РНК-полимеразы II (Krishnamurthy S., Hampsey M., 2009; Luse D.S., 2014; Bhuiyan T., Timmers H.Th.M., 2019; Roeder R.G.). При инициации транскрипции, TFIIH отвечает за плавление промотора (локальную деспирализацию ДНК и разрыв водородных связей между нитями ДНК в области промотора). Кроме того, TFIIH регулирует переход от инициации к элонгации благодаря своей киназной активности путем фосфорилирования остатка Ser5 в составе РНК полимеразы II.

2.1.5. Общий фактор транскрипции TFIIЕ

Фактор TFIIIE состоит из двух субъединиц с молекулярной массой 56 кДа (TFIIIEальфа) и 34 кДа (TFIIIEбета). Сообщается, что TFIIIE входит в PIC после РНК полимеразы II и взаимодействует непосредственно с нефосфорилированной формой РНК полимеразы II, с TFIIIV и с обеими субъединицами TFIIIF. Альфа-субъединица TFIIIE необходима для специфического взаимодействия с TFIIIN. Центральная область ядра бета-субъединицы связывается с молекулой ДНК и необходима для инициации транскрипции (Jawhari A. et al., 2006). У эукариот общие факторы транскрипции TFIIIE и TFIIIN собираются в области сайта старта транскрипции (TSS), при этом субъединицы TFIIIEальфа и TFIIIEбета стабилизируют модуль киназы TFIIIN в комплексе PIC. Однако, по мере того, как происходит фосфорилирование РНК-полимеразы II и плавление ДНК, TFIIIEальфа высвобождается из промотора (Compe E. et al., 2019). Следовательно, TFIIIE представляет собой общий фактор транскрипции, который функционирует на более поздней стадии инициации транскрипции - этапах плавления промотора и покидания промотора РНК-полимеразой II. В то же время, РНК-полимераза II дрожжей может поддерживать транскрипцию без участия TFIIIE. Возможно, основное участие TFIIIE в формировании PIC заключается в рекрутировании TFIIIN (Kang S.W. et al., 2000; Luse D.S., 2014; Nogales E. . et al., 2017; Bhuiyan T., Timmers H.Th.M., 2019). Вместе с тем, сообщается, что TFIIIE участвует в регуляции транскрипции рРНК РНК-полимеразой I и различные мутации в TFIIIE у человека приводят к дегенеративному расстройству трихотиодистрофии (Phan T. et al., 2021).

2.2. УЧАСТИЕ ОБЩИХ ФАКТОРОВ ТРАНСКРИПЦИИ В ИНИЦИАЦИИ ПРОЦЕССОВ ТРАНСКРИПЦИИ

Избирательная регуляция экспрессии генов эукариот имеет решающее значение для различных биологических процессов, включая эмбриональное развитие, дифференцировку клеток, течение клеточного цикла, регенерация и апоптоз. Клеточные сигналы, регулирующие экспрессию генов, определяются множеством различных факторов и корегуляторов, но окончательное решение о том, инициировать транскрипцию или нет, принимается коровым промотором при участии общих факторов транскрипции. Коровый промотор, который лежит в основе транскрипции, обычно определяется как минимальная область, которая иницирует транскрипцию РНК-полимеразой II. В данном случае мы обсуждаем инициацию транскрипции только РНК-полимеразой II, поскольку, во-первых, только РНК-полимераза II отвечает за синтез мРНК. Во-вторых, механизмы инициации транскрипции РНК-полимеразами I и III осуществляется механизмами, которые существенно отличаются от обсуждаемого нами порядка событий (Roeder R.G., 2019). Транскрипция генов ферментом РНК-полимеразой II иницируется в геномной области, называемой коровым промотором. Коровый промотор представляет собой регуляторную область, которая может содержать различные относительно короткие последовательности нуклеотидов ДНК, придающие данному участку ДНК специфические свойства.

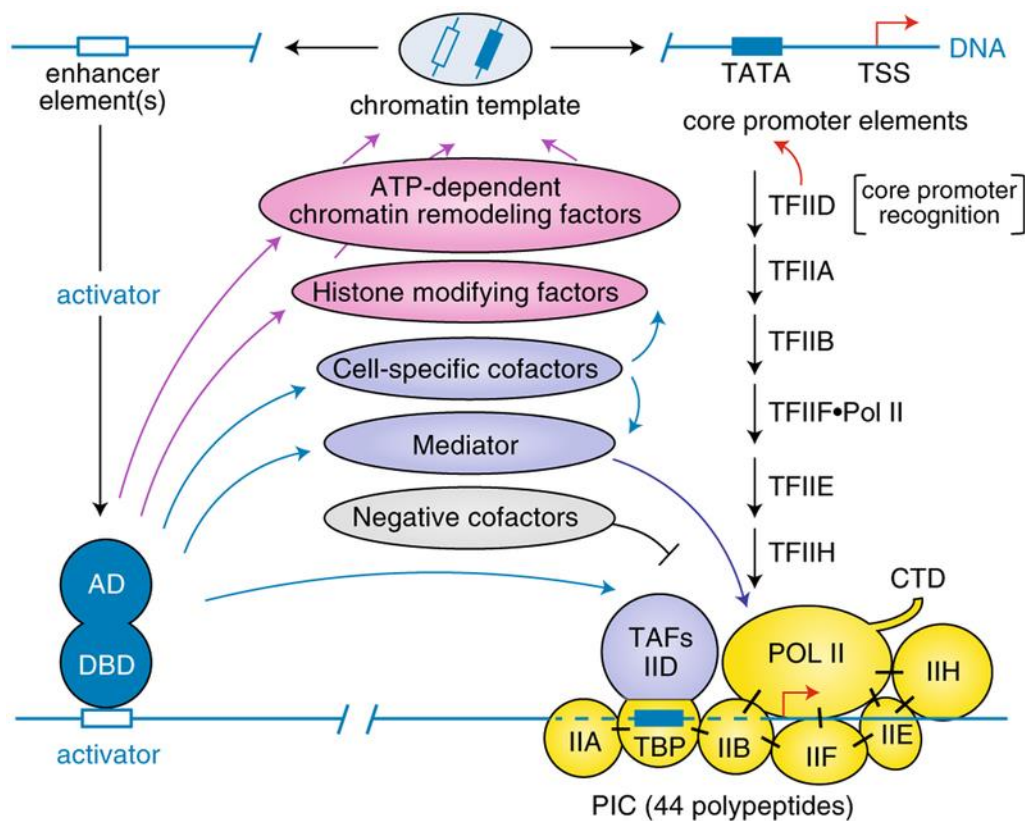


Рисунок 2.4. Порядок сборки основных факторов транскрипции на коровом промоторе. Цитировано по Robert G. Roeder, 2019.

РНК-полимераза II представляет собой мультисубъединичный фермент, который может синтезировать мРНК на матрице ДНК, но очищенная полимераза неспособна распознать основной промотор. Этот процесс требует дополнительных общих факторов транскрипции (“общие факторы транскрипции” или “GTF”), хотя они не действуют универсально на всех коровых промоторах. Напомним, что группа общих факторов транскрипции включает факторы: TFIIA, TFIIB, TFIID, TFII E, TFIIF и TFII H. Поэтому точная инициация синтеза мРНК в эукариотических клетках требует сборки РНК-полимеразы II и общих факторов транскрипции в нуклеопротеиновый комплекс преинициации транскрипции (preinitiation complex, PIC) на коровом промоторе (Malecova V. et al., 2007). Предполагается, что сборка PIC может происходить поэтапно. На первом этапе строящийся комплекс представлен матрицей, в состав которой входят

только TFIIID (TBP), TFIIA, TFIIB и РНК-полимераза II (комплекс А). Дальнейшая сборка осуществляется добавлением фактора TFIIIF (комплекс В), фактора TFIIIE (комплекс С) и, наконец, TFIIN (комплекс D). Предполагается, что описанная последовательность является “обычным” порядком сборки PIC для РНК полимеразы II (Luse D.S., 2012;2014).

Первым основным фактором транскрипции, который связывается с коровым промотором, рекрутирует РНК-полимеразу II и другие основные факторы, фактически делает возможным сборку комплекса преинициации РНК-полимераза II (PIC) - является TFIIID (Bhuiyan T., Timmers H.Th.M., 2019; Dreos R. et al., 2021). При этом мутации в участках корового промотора TATA box, Inr, MTE и DPE значительно снижают связывание TFIIID и уровень транскрипции. Распознавание нуклеотидной последовательности корового промотора выполняется TFIIID, субъединицами которого являются TATA-бок связывающий протеин (TBP) и TBP-ассоциированные факторы (TAFs). Таким образом, в области корового промотора формируется крупный белковый комплекс (preinitiation complex, PIC), включающий в себя общие факторы транскрипции и РНК-полимеразу II. Первый этап активации промотора, содержащего TATA-бокс, в открытом (доступном для транскрипции) хроматине инициируется, когда субъединица TBP, входящая в состав общего фактора транскрипции TFIIID, связывается с TATA-боксом. Эта связь может быть усилена вышестоящими элементами, действующими через коактиватор. TFIIID также распознает последовательность Inr в начальной точке, DPE и, возможно, другие элементы промотора. Еще один общий транскрипционный фактор TFIIB связывается ниже от TATA box, рядом с TBP в области, называемой элементом распознавания В (B-recognition element, BRE). Этот этап является определяющим в установлении полярности промотора, задавая последующий вектор работы РНК-полимеразы и выбор одной из цепей ДНК в качестве матричной. TFIIB также играет важную роль в рекрутировании

РНК полимеразы II в комплекс ДНК TFIID/TFIIA/промотор, помогая также выбору сайта начала транскрипции (transcription start site, TSS). При этом С-концевой домен TFIIВ взаимодействует с РНК-полимеразой и с TFIID для инициации начального плавления промотора. Он также определяет вектор транскрипции на матрице ДНК, контактируя с выстроенными вдоль промотора общими факторами транскрипции TFIIЕ, TFIIF и TFIIH (Dergai O., Hernandez N., 2019). Фактор TFIIF представляет собой гетеротетрамер, состоящий из двух типов субъединиц, и необходим для сборки PIC (комплекса преинициации транскрипции). Более крупная субъединица (RAP74) обладает АТФ-зависимой активностью ДНК-геликазы, которая может принимать участие в плавлении ДНК при инициации. Меньшая субъединица (RAP38) плотно связывается с РНК-полимеразой II. TFIIF способствует привлечению РНК-полимеразы II к комплексу сборки транскрипции и требуется, наряду с TFIIВ, для выбора сайта начала транскрипции. Потребность в общих факторах транскрипции сохраняется, даже если в промоторе ТАТА-бокс отсутствует. В этом случае необходимы те же общие факторы транскрипции, включая TFIID. В этом случае, элемент Inr обеспечивает позиционирование - TFIID связывается с ним благодаря способности одного или нескольких TAFs распознавать Inr напрямую. Другие TAFs в TFIID также распознают элемент DPE ниже от начальной точки транскрипции. Помимо присоединения РНК-полимеразы к промотору, общие факторы транскрипции TFIIВ, TFIIЕ и TFIIH необходимы для плавления ДНК, чтобы обеспечить движение РНК-полимеразы. Плавление промотора (деспирализация ДНК и разрыв водородных связей между нитями ДНК с образованием «открытого» промоторного комплекса) необходимо для начала процесса транскрипции. TFIIH требуется для образования открытого комплекса в сочетании с гидролизом АТФ, чтобы обеспечить напряжение кручения молекулы ДНК для ее деспирализации. Таким образом, последними общими факторами,

которые присоединяются к комплексу преинициации транскрипции, являются TFIIЕ и TFIIН. Они действуют на более поздних стадиях инициации деспирализуя ДНК. Связывание TFIIЕ приводит к тому, что граница области транскрипции молекулы ДНК расширяется еще на один виток спирали. TFIIН является единственным общим фактором транскрипции, который обладает множеством независимых ферментативных активностей, включают АТФазную активность, функции геликазы и активность киназы, фосфорилируя РНК-полимеразу II. Поэтому присоединение общих факторов транскрипции TFIIЕ и TFIIН необходимо для плавления ДНК и начала движения РНК-полимеразы II. TFIIН также может принимать участие в элонгации транскрипта.

Общие факторы транскрипции, главным образом, необходимы для связывания РНК-полимеразы с промотором и подготовки ДНК к транскрипции. Вместе с тем, некоторые факторы транскрипции продолжают свое действие и после связывания РНК-полимеразы с промотором. Например, факторы транскрипции, связывающие энхансеры, которые обычно не контактируют непосредственно с элементами промотора, а связываются с коактиватором, который взаимодействует с элементами промотора. Комплекс Медиатор-коактиватор является одним из наиболее распространенных коактиваторов. Это очень крупный белковый комплекс и у многоклеточных эукариот он может содержать более 30 субъединиц. Многие клеточные и геноспецифичные формы медиатора содержат общее ядро субъединиц, обладающее высокой консервативностью в ряду от дрожжей до человека, которые интегрируют сигналы от многих регуляторных факторов.

2.3. МЕДИАТОР

Медиатор был впервые идентифицирован в клетках дрожжей, также была показана его способность непосредственно взаимодействовать с РНК полимеразой II (Flanagan P.M. et al., 1991; Thompson C.M. et al., 1993). Медиатор из клеток человека был впервые очищен в виде комплекса белка, связанного с рецептором гормона щитовидной железы (Fondell J.D. et al., 1996). В результате этих исследований было показано, что Медиатор служит связующим звеном для облегчения взаимодействий между активаторами транскрипции, связанными с энхансером, и общим механизмом регуляции транскрипции (главным образом РНК полимеразой II) в коровом промоторе.

Хотя общие факторы транскрипции и РНК полимеразы II достаточны для точной инициации транскрипции *in vitro*, сами по себе эти компоненты не реагируют на белки-активаторы, связанные с энхансером или вышестоящими активационными последовательностями. Медиатор необходим для транскрипции на большинстве промоторов РНК полимеразы II, фактически являясь общим фактором транскрипции, хотя и необязателен для распознавания промотора. Значение Медиатора для инициации транскрипции у эукариот настолько велико, что высказываются мнения о причислении Медиатора к ряду GTF - общих факторов транскрипции. Функция Медиатора, как GTF непосредственно подтверждается исследованиями *in vitro* в клетках дрожжей и млекопитающих, которые выявили потребность в медиаторе для базальной (независимой от активатора) транскрипции (Malik S., Roeder R.G., 2010). Медиатор принимает участие в тканеспецифической регуляции экспрессии генов, например, кодирующих рибосомные белки или гликолитические ферменты. Медиатор также может осуществлять репрессию транскрипции. Медиатор

демонстрирует достаточно высокую эволюционно консервативную роль у эукариот в регуляции транскрипции РНК полимеразы II. Однако аналоги Медиатора не были обнаружены в бактериальных клетках.

Еще одним важным аспектом, связанным с участием Медиатора в регуляции транскрипции – его роль в пространственном совмещении энхансера и промотора. Такое пространственное совмещение промотора и энхансера осуществляется за счет образования петли молекулы ДНК («выпетливания»), если промотор и энхансер расположены в одной и той же хромосоме. Медиатор выполняет важную функцию в этом процессе. Медиатор представляет собой большой комплекс (человеческий медиатор: 26 субъединиц, 1,4 МДа), который может одновременно взаимодействовать с факторами транскрипции и ферментом РНК полимеразой II. В клетках млекопитающих Медиатор также взаимодействует с белком когезином, который может образовывать петли хроматина, облегчающие пространственное совмещение энхансера и промотора (Poss Z.S. et al., 2013). По данным авторов цитируемого обзора, роль Медиатора в формировании «выпетливания» ДНК анализировалась по результатам исследований связи энхансер-промотор во время активации в ответ на ядерные рецепторы. Поскольку субъединица Медиатора MED1 является общей мишенью для ядерных рецепторов, было продемонстрировано, что нокдаун MED1 отрицательно регулирует индуцируемую ядерными рецепторами активацию генов. В данном случае потеря экспрессии генов совпала с утратой петли, соединяющей энхансер и промоторы индуцируемых генов. Высказывается мнение о том, что Медиатор и белок когезин работают совместно, образуя петли энхансер-промотор и эта функция важна для поддержания экспрессии генов. Кроме того, на эмбриональных клетках мыши было показано, что CpG-ДНК-связывающий белок FBXL19 принимает участие в связывании энхансера и комплекса CDK-Медиатор с CpG-островками промотора (Dimitrova E. et al., 2018). Поскольку CDK-

модуль Медиатора блокирует взаимодействия Медиатор-РНК полимеразы II, эта связь не сразу активирует транскрипцию. Скорее всего, петли энхансер-промотор, образованные с помощью FBXL19 и комплекса CDK-Медиатор, пространственно совмещают гены для последующей в дальнейшем активации транскрипции. Установлено, что в клетках человека CDK-медиаторный комплекс, в частности, компонент киназного модуля Медиатора MED12 важен для образования петель энхансер-промотор. При этом петлевые взаимодействия могут быть частично опосредованы присутствием энхансерной РНК eRNA (Lai F. et al., 2013). Показано, что метилирование MED12 JMJD6-зависимой метилтрансферазой CARM1, которая метилирует MED12 по нескольким остаткам аргинина (Gao W.-W. et al., 2018), также, как и стабилизация субъединицей MED12 связывания ацетилтрансферазы p300 с энхансерами (отвечающей за ацетилирование остатков лизина H3K27) принимают участие в формировании петли энхансер-промотор для обеспечения надежных транскрипционных ответов на целый ряд сигнальных каскадов (Aranda-Orgilles B. et al., 2016) .

Возможно, Медиатор функционирует как элемент контроля инициации транскрипции, воспринимая регуляторные сигналы иногда от нескольких белков-активаторов, связанных с энхансером, и передает эту информацию на РНК-полимеразу II и общие факторы транскрипции. Более десяти белковых субъединиц Медиатора кодируются генами, которые были идентифицированы ранее на основе дефектов в активации или репрессии транскрипции. Медиатор связывается с гипофосфорилированной формой РНК-полимеразы II и стимулирует киназную активность фактора TFIIN в отношении С-концевого домена (CTD) РНК-полимеразы II. В литературе высказывается мнение о том, что Медиатор служит связующим звеном между факторами транскрипции (связанных с промотором и энхансером) и РНК полимеразой II. Медиатор также контролирует сборку и активность других факторов PIC, включая TFIIN и саму РНК полимеразу II и, что

медиатор стимулирует TFIIH-зависимое фосфорилирование С-концевого домена РНК полимеразы II, что необходимо для активации транскрипции (Knuesel M.T. et al., 2009). Наряду с этим имеются данные о том, что эти функции нарушаются при связывании медиатора с киназным модулем, поскольку киназный модуль Медиатора блокирует сборку РНК полимеразы II в PIC. То есть связывание киназного модуля с Медиатором исключает взаимодействие с РНК полимеразой II. Анализ формирования PIC в клетках человека также показал, что связывание киназного модуля с Медиатором исключает связывание Медиатора с TFIIH, поэтому комплекс киназный-модуль-Медиатор может блокировать сборку PIC, предотвращая инициацию транскрипции (Luyties O., Taatjes D.J., 2022). Поскольку медиатор обычно требуется для экспрессии генов, кодирующих белок, описанный выше принцип подавления сборки PIC может отражать общий механизм, с помощью которого ингибируется транскрипция мРНК в клетках человека.

Медиатор представляет собой комплекс в форме полумесяца, состоящий из головного, среднего, хвостового и киназного модулей. Медиатор, содержащий головной, средний и хвостовой модули (основной Медиатор), связывается с РНК полимеразой II. Кроме того, головной и средний модули отвечают за взаимодействие с общими факторами транскрипции на промоторе, в то время, как киназный модуль существует в переменной ассоциации с основным Медиатором. Центральную роль в организации всей структуры Медиатора выполняют субъединица MED14, которая соединяет головной, средний и хвостовой модули, и MED17, которая формирует наибольшее количество контактов с другими субъединицами Медиатора (Путляев Е.В. и соавт., 2018). Это физическое разделение медиатора согласуется с генетическими и биохимическими данными, указывающими на то, что головной комплекс (в клетках человека представлен субъединицами MED6, MED8, MED11, MED17, MED18,

MED19, MED20, MED22, MED27, MED28, MED29, MED30) взаимодействует непосредственно с РНК полимеразой II и играет общую роль в регуляции транскрипции. Средний комплекс (в клетках человека представлен субъединицами MED1, MED4, MED7, MED9, MED10, MED19, MED21, MED31, MED26) ассоциируется с С-концевым доменом (CTD) РНК-полимеразы II. Хвостовой комплекс (в клетках человека представлен субъединицами MED14, MED15, MED16, MED23, MED24, MED25) распознает и связывает ко-активаторы и имеет решающее значение для функции медиатора. С Медиатором может быть ассоциирован киназный модуль - комплекс из четырех субъединиц. Киназный модуль состоит из циклин-зависимой киназы CDK8-Циклин С, а также MED12/MED12L и MED13/MED13L. У млекопитающих и некоторых других позвоночных существуют паралоги субъединиц киназного модуля CDK8, MED12 и MED13, которые получили обозначения CDK19, MED12L и MED13L соответственно (Conaway R.C., Conaway J.W., 2011; Tsai K.L. et al., 2014). Авторы сообщают, что в Медиаторе высших эукариот присутствуют субъединицы MED23-30. При этом, возможно, что MED24, MED27 и MED29 являются родственными ортологами медиаторных субъединиц *S. cerevisiae* MED5, MED3 и MED2 соответственно. Хвост медиатора, возможно, является наименее эволюционно консервативным модулем всего комплекса. Причина эволюционных отличий данного участка медиатора, скорее всего, связана с его участием во взаимодействии с ДНК-связывающими трансаактиваторами, которые значительно различаются по структуре и функциям у дрожжей и человека.

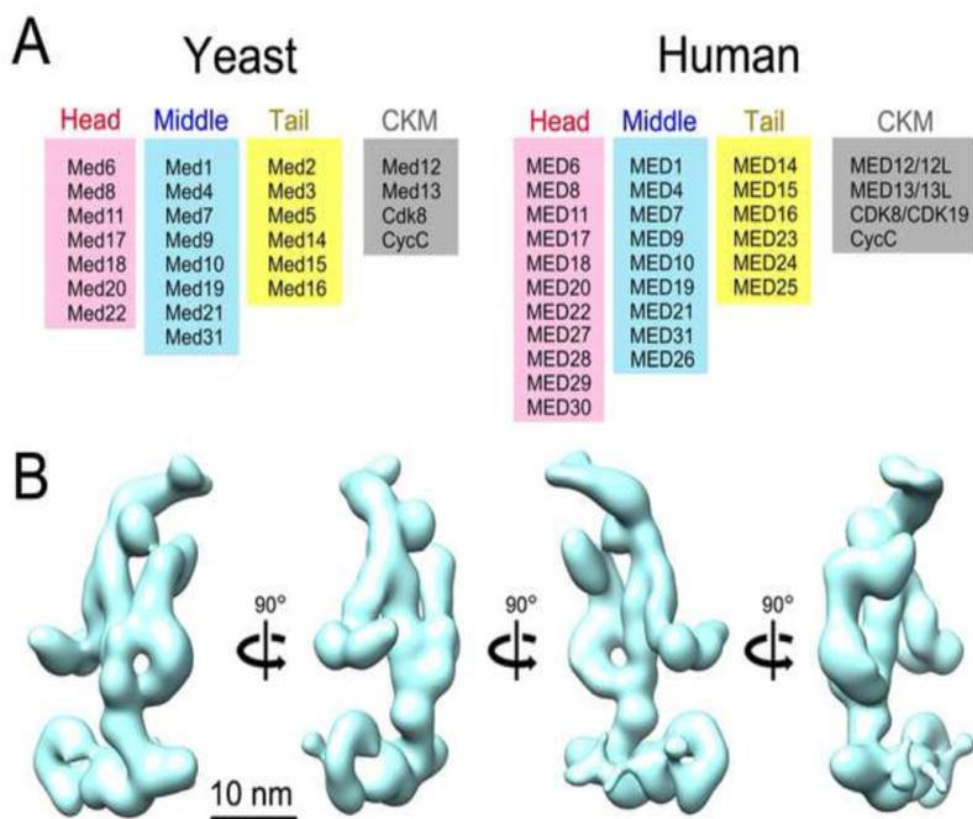


Рисунок 2.5. Структура и состав Медиатора клеток дрожжей и человека. Цитировано по Kuang-Lei Tsai et al. 2014.

В дополнение к консервативным субъединицам MED15 и MED16, медиаторные хвостовые субъединицы высших эукариот включают три дополнительные субъединицы, MED23, MED24 и MED25. MED23 и MED25 которые уникальны для высших эукариот. Потеря либо MED23, либо MED24 приводит к разрушению хвостового модуля и выходу MED16, MED23 и MED24 из медиаторного комплекса. MED28 первоначально был идентифицирован как белок, который взаимодействует с цитоскелетным белком-супрессором опухоли при нейрофиброматозе, который экспрессируется в эндотелиальных клетках. Повышение экспрессии MED28 наблюдается при некоторых видах рака у человека, а также приводит к усилению пролиферации клеток в некоторых линиях клеток человека. MED28 действует совместно с несколькими другими медиаторными субъединицами в качестве негативного регулятора дифференцировки

гладкомышечных клеток. MED26 играет уникальную роль в функциях Медиатора у высших эукариот. MED26 принимает участие в активации транскрипции РНК полимеразы II. MED26 входит в состав Медиатора человека, свободного от киназного модуля и, по-видимому, играет ключевую роль в активации транскрипции. Медиатор, содержащий MED26, способен поддерживать активацию транскрипции РНК полимеразы II *in vitro*, тогда как медиатор, лишенный MED26, но содержащий киназный модуль, не поддерживает транскрипцию. Из сказанного выше можно сделать вывод, что различные субъединицы медиатора в определенной степени участвуют в регуляции различных наборов генов.

Возможно, пластичность взаимосвязи между субъединицами Медиатора и регулируемым набором генов, по меньшей мере, частично можно объяснить тем, что существует избирательное взаимодействие факторов транскрипции с соответствующими им субъединицами Медиатора. Например, у млекопитающих субъединица MED1 является общей мишенью для ядерных рецепторов, а MED23 поддерживает активацию ELK-1 (ETS Like-1 протеин Elk-1) фактора транскрипции (Poss Z.S. et al., 2013).

Основной мишенью Медиаторного комплекса на промоторе является С-концевой домен РНК полимеразы II. Этот домен является сборной площадкой для многих факторов, участвующих в транскрипции, и служит для координации всего процесса. Помимо этого, Медиатор также регулирует привлечение и активность других компонентов РИС – общих факторов транскрипции TFIIA, B, D, E, F, стимулирует привлечение и ферментативную активность TFIIH (Allen B.L., Taatjes D.J., 2015; Путляев Е.В. и соавт., 2018). После завершения сборки РИС и образования открытого комплекса РНК полимеразы II, она прекращает взаимодействие с Медиатором и РИС, покидает промотор и переходит к элонгации. Фосфорилирование С-концевого домена (CTD) РНК полимеразы II играет

ключевую роль в нарушении взаимодействия Медиатор–РНК полимеразы II. CTD РНК полимеразы II фосфорилируется TFIIH (через его субъединицу CDK7-киназы), и это сопровождается инициацией РНК полимеразы II (делает возможной транскрипцию). С другой стороны, способность TFIIH фосфорилировать CTD РНК полимеразы II зависит от Медиатора (Allen B.L., Taatjes D.J., 2015). В литературе имеются данные о том, что Медиатор принимает участие в процессе транскрипции и на этапе элонгации. Было показано, что специфическая для многоклеточных организмов субъединица медиатора MED26 взаимодействует с SEC (комплекс суперэлонгации - общий регулятор элонгации РНК полимеразы II, включающий в себя факторы P-TEFb, AFF4 и ELL), способствуя элонгации. Область MED26, с которой связывается SEC, также связывает TFIID (Takahashi H. et al., 2011). Авторы предполагают, что MED26 действует как переключатель, возможно, первоначально связывая TFIID для содействия сборке PIC, а затем, в ответ на активирующий сигнал, связывая SEC для контроля элонгации.

Наличие большого количества белковых субъединиц в составе Медиатора предопределяет его восприимчивость к широкому спектру транскрипционных факторов. Например, в высокодифференцированных клетках Медиатор включает в себя сокращенный комплекс субъединиц, что способствует поддержанию экспрессии ограниченного набора генов и выполнению специализированных функций. Напротив, активно пролиферирующие клетки (раковые или стволовые клетки), как правило, экспрессируют все 26 основных медиаторных субъединиц в дополнение к субъединицам модуля CDK8 (Allen B.L., Taatjes D.J., 2015).

Необходимо отметить, что циклин-зависимые киназы (CDK) – особая группа ферментов, которые активируются в комплексе со специфическими белками-циклинами и фосфорилируют соответствующие аминокислотные остатки в белках. CDK играют центральную роль в регуляции клеточного цикла и транскрипции. Например, пара CDK7/циклин-Н находится в составе

общего фактора транскрипции TFIID, а пара CDK8/циклин-С (или Srb10/Srb11) была обнаружена в клетках дрожжей и человека. CDK8/циклин-С ассоциируется с MED12 (Srb8) и MED13 (Srb9), формируя киназный модуль Медиатора (Hoeppner S. et al., 2005; Osman S. et al., 2021). Авторы подчеркивают важную роль киназного модуля Медиатора в регуляции транскрипции, приводя примеры его участия в репрессии и активации транскрипции. Киназный модуль Медиатора обратимо связывается с Медиатором (образуя CDK-Медиатор) и регулирует функцию Медиатора. Приводятся данные о том, что MED12 может выполнять ключевую роль в сборке киназного комплекса благодаря взаимодействию с димером CDK8-Cnc2 и MED13 (Luyties O., Taatjes D.J., 2022). В клетках дрожжей и человека киназный модуль Медиатора состоит из четырех субъединиц: киназы CDK8, циклин-С, MED12 и MED13. Однако в процессе эволюции у позвоночных животных возникли паралоги субъединиц CDK8, MED12 и MED13, получившие соответственно название CDK19, MED12L и MED13L, которые способствовали расширению функциональных возможностей киназного модуля (Luyties O., Taatjes D.J., 2022). Установлено участие белка MED12 в патогенезе многих X-сцепленных наследственных заболеваний (ген MED12 локализован в X-хромосоме), тогда как ген MED12L находится в хромосоме 3 и с указанной группой наследственных заболеваний не связан.

Приводятся сведения о том, что MED13 непосредственно участвует в связывании модуля CDK8 с Медиатором, как у дрожжей, так и у человека (Allen B.L., Taatjes D.J., 2015). Сообщается, что киназная активность CDK8 была необходима для взаимодействия, как циклином-С, так и MED12. Циклин-зависимые киназы (CDK) представляют собой серин/треониновые протеинкиназы, которые служат ключевыми регуляторами, как клеточного цикла, так и транскрипции. Для проявления энзиматической активности CDK требуют связывания циклина и подразделяются на две

функциональные подгруппы: CDK-регуляторы клеточного цикла и CDK-регуляторы транскрипции. К CDK-регуляторам транскрипции относятся CDK7, CDK8 и CDK9. Уникальность CDK8 основана на его способности точно настраивать транскрипцию не только путем фосфорилирования самого фермента РНК полимеразы II, но и связанных с нею факторов транскрипции. Для этого CDK8 обратимо взаимодействует с Медиатором (Dannappel M.V. et al., 2019).

Способность Медиатора регулировать активность РНК-полимеразы II, основана на обширных белок-белковых взаимодействиях между Медиатором, РНК-полимеразой II и другими общими и специфичными для генов регуляторных факторах транскрипции (Allen B.L., Taatjes D.J., 2015). Такая сложная сеть межбелковых взаимодействий позволяет Медиатору реализовать свою основную функцию, которая заключается в передаче регуляторных сигналов от ДНК-связанных (в области промотора и энхансера) факторов транскрипции непосредственно ферменту РНК-полимеразе II. Связывание факторов транскрипции с Медиатором необходимо для активации целевого гена, потеря специфической субъединицы медиатора может в разной степени препятствовать экспрессии генов, регулируемых данным фактором транскрипции (Poss Z.S. et al., 2013).

Потребность регуляторных механизмов транскрипции у млекопитающих в различных ко-активаторах определила комплексы субъединиц Медиатора различного состава, в зависимости от конкретного активатора, предполагая, что Медиатор представляет собой динамический комплекс, который позволяет комбинировать подкомплексы в ответ на воздействие различных активаторов или репрессоров (Roeder R.G., 2019). Медиатор - общегеномный регулятор транскрипции РНК-полимеразы II, с другой стороны, сам медиатор подвергается воздействию множества факторов, которые регулируют его функцию. В данной системе координат мы рассматриваем киназный модуль, как одну из ключевых составляющих

структуры Медиатора. Киназный модуль Медиатора в ответ на клеточные сигнальные каскады обеспечивает транскрипционные ответы, трансформируя экспрессию генов в соответствии с изменяющимися условиями. Важность компонентов киназного модуля, в частности, для биологии развития млекопитающих проиллюстрирована рядом исследований, согласно которым инактивация CDK8 и MED13 в зиготе мышей путем введением коротких РНК, образующих шпильки (short hairpin RNA (shRNA)) приводила к гибели эмбриональных клеток на ранних стадиях дробления. Аналогичный результат был получен и при инактивации гена циклина-С (Dannappel M.V. et al., 2019). При подавлении выработки циклина-С в эмбриональных фибробластах мыши киназа CDK8 утрачивала активность и теряла способность взаимодействовать с MED12 и MED13, демонстрируя, что циклин-С критически важен для формирования модуля CDK8. Важно отметить, что MED13L частично компенсировал потерю MED13, но не компенсировал эмбриональное развитие на последующих после имплантации этапах развития, показывая, что MED13 и MED13L контролируют четко определенные программы эмбриогенеза (Miao et al., 2018). Кроме того, MED13 и MED13L играют важную роль в процессах дифференцировки нейронов. Мутации гена, кодирующего белок MED13 были выявлены у людей с умственной отсталостью, задержками развития и врожденными нарушениями речи. Кроме того, мутации MED13 связаны с развитием аутизма и аномалиями зрительного нерва (Dannappel M.V. et al., 2019). По данным авторов цитируемого обзора, в составе Медиатора MED12 связывается с CDK8 через циклин-С и имеет решающее значение для активности киназы CDK8. Недостаток белка MED12 приводит к внутриутробной гибели плода из-за дефектов развития нервной трубки, пороков развития сердца, дефектного сомитогенеза и других грубых нарушений морфогенеза плода. При этом подчеркивается, что на этапе эмбрионального развития участие CDK8 в процессах морфогенеза

реализуется в кооперации с сигнальными путями Notch и Wnt (Dannappel M.V. et al., 2019).

В отличие от механизмов регуляции эмбрионального развития белками CDK8-комплекса, их участие в контроле гомеостаза у взрослых млекопитающих изучено менее подробно. Тем не менее, известно, что в кардиомиоцитах MED13 контролирует транскрипцию при взаимодействии ядерными рецепторами гормонов. Сверхэкспрессия MED13 в кардиомиоцитах защищала мышечную ткань от ожирения, вызванного диетой с высоким содержанием жиров, и улучшала толерантность к глюкозе и чувствительность к инсулину. Напротив, тканеспецифичная для миокарда делеция MED13 увеличивает ожирение при диете с высоким содержанием жиров и усиливает симптомы метаболического синдрома (Grueter C.E. et al., 2012). Также сообщается, что MED12 необходим для поддержания гомеостаза гемопоэтических стволовых клеток, поскольку индуцированная делеция MED12 в гемопоэтических стволовых клетках и клетках-предшественниках (HSPCs) вызывает аплазию костного мозга, приводящую к летальному исходу (Aranda-Orgilles B. et al., 2016). Привлекает внимание тот факт, что эта функция MED12 не зависит от модуля Медиатор-киназы, поскольку делеция или нокадаун CDK8, циклина-С или MED13 не влияли на колониобразующую способность исследуемых популяций клеток. Современные данные литературы свидетельствуют о том, что снижение активности киназы CDK8 (CDK19), вызванное мутациями MED12, может рассматриваться в качестве причины многих онкологических заболеваний человека (Luyties O., Taatjes D.J., 2022).

Для исследований роли киназы CDK8/19 *in vivo* у взрослых особей млекопитающих были разработаны и протестированы два структурно различных ингибитора CDK8/19. Установлено, что ингибиторы CDK8/19, вводимые крысам и собакам, приводили к выраженным эффектам во многих тканях, включая нарушения морфогенеза кости, апоптотические поражения

в поджелудочной железе, кишечном эпителии, мужском репродуктивном тракте, волосяных фолликулах, сердце и лимфатических тканях у крыс. Напротив, пролиферативные поражения наблюдались в легких, печени, тимусе, сердце, молочной железе и мужской репродуктивной системе (Clarke et al., 2016). Полученные данные подчеркивают сложность функций киназной активности Медиатора *in vivo* и подразумевают, что физиологические роли CDK8 и CDK19 должны быть тщательно изучены в соответствующем контексте экспериментальной модели.

В тоже время, в литературе отражена работа по обобщению клинического материала, связанного с белками киназного модуля Медиатора. В частности, по мнению некоторых авторов, Мутации в субъединицах модуля медиатор-киназы вызывают заболевания, которые в целом можно разделить на несколько групп: онкологические заболевания, неврологические нарушения, аномалии развития (Srivastava S., Kulshreshtha R., 2021).

2.4. ЭНХАНСЕРЫ

Точная регуляция генов в сложных многоклеточных организмах достигается за счет интеграции сигналов окружающей среды с внутренними транскрипционными программами клетки. Отдельные клетки реагируют на эти сигналы с помощью регуляторных сетей, состоящих из некодирующих регуляторных последовательностей, их генов-мишеней и специфичных белков-факторов транскрипции, способных связывать определенные последовательности ДНК. Энхансеры представляют собой регуляторные последовательности, которые усиливают транскрипцию целевого гена. Отдельные энхансеры содержат множество коротких сайтов связывания факторов транскрипции (Tobias I.C. et al., 2021). В литературе высказывается мнение о том, что энхансеры регулируют частоту всплесков активации транскрипции. Причем сильные энхансеры производят больше всплесков активности генов, чем слабые энхансеры (Ibragimov A.N. et al., 2020). Авторы высказывают мнение, что регуляция частоты вспышек энхансером является ключевым параметром контроля генов. Возможно, характерный для эукариот, пульсирующий режим транскрипции мРНК (когда за короткими интенсивными всплесками транскрипционной активности генов следуют периоды молчания генов) способствует более эффективному контролю синтеза конкретного белка, необходимого данной популяции клеток в данных условиях.

По данным литературы (Разин С.В. и соавт., 2015; Luyties O., Taatjes D.J., 2022) энхансеры являются одним из наиболее важных регуляторов транскрипции РНК полимеразы II в клетках млекопитающих. Деятельность энхансера зависит от связывания с факторами транскрипции, которые опосредуют свои биологические функции в значительной степени через энхансеры. Энхансеры представляют собой последовательности геномной

ДНК, которые содержат сайты связывания факторов транскрипции и могут контролировать транскрипцию РНК полимеразой II в промоторных областях. При том, что промотор и энхансер могут отстоять друг от друга на десятки тысяч оснований (или более) геномной ДНК, более того, энхансер и регулируемый им промотор могут располагаться в разных хромосомах (Ong C.-T., Corces V.G., 2011). Однако, энхансеры могут находиться и внутри структурного гена. В этом случае внутригенные энхансеры ведут себя как альтернативные промоторы и могут функционально заменять промоторы для управления транскрипцией мРНК или длинной некодирующей РНК (Sartorelli V., Lauberth S.M., 2020). Пространственное совмещение энхансера и промотора осуществляется за счет образования петли в молекуле ДНК (Рис.6). Механизмы взаимодействия энхансера и промотора подробно рассмотрены в обзорах (Krivega I., Dean A., 2012; Ibragimov A.N. et al., 2020). При этом указывается, что конкретные сценарии, определяющие роль энхансеров в процессах контроля транскрипции (инициации или элонгации) могут зависеть от функции, выполняемой репортерным геном. Например, ген «домашнего хозяйства» или ген, вовлеченный в реализацию сигнальных путей могут по-разному взаимодействовать с энхансером (Ibragimov A.N. et al., 2020). Приводятся данные о том, что комплексы белка когезина могут быть, по крайней мере, частично ответственны за эту задачу. Известно, что когезины опосредуют сцепление сестринских хроматид, необходимое для правильной сегрегации хромосом и репарации ДНК.

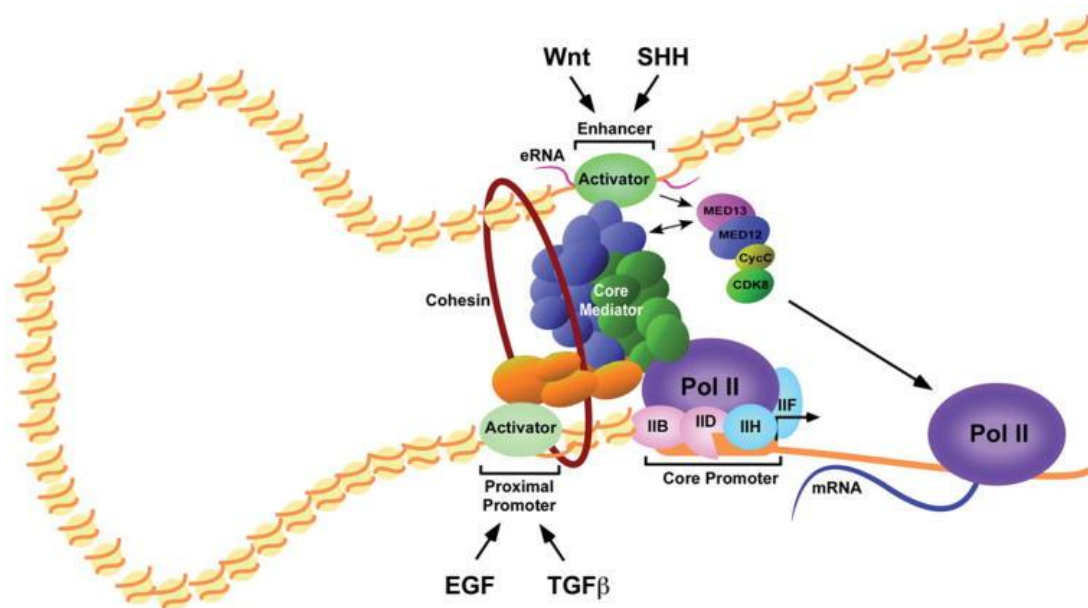


Рисунок 2.6. Схема пространственного совмещения энхансера и промотора. Цитировано по Alison D. Clark et al. 2015

Однако механизм, лежащий в основе их участия в регуляции транскрипции, показал, что когезин взаимодействует с СССТС-связывающим фактором (СТСФ). Приводятся данные о том, что когезин является важным фактором формирования контакта между энхансером и промотором (Ong C.-T., Corces V.G., 2011; El Khattabi L. et al., 2019). Взаимодействие энхансера и РС в области промотора может происходить главным образом через связывание факторов транскрипции и Медиатора с РС. Энхансеры представляют собой площадки для связывания транскрипционных факторов. Стадией, определяющей скорость транскрипции (эффективность работы промотора), логично считать не сборку комплекса РС, а этап освобождения промотора (переход к элонгации). Возможно, именно эта стадия транскрипционного цикла регулируется энхансерами. Помимо обычных энхансеров существуют кластеры энхансеров, к числу которых можно отнести области контроля локуса (Locus Control Region, LCR) и так называемые суперэнхансеры. Суперэнхансеры большим размером (охватывающим от нескольких до, возможно, нескольких десятков тысяч пар нуклеотидов) и высоким уровнем

присутствия факторов транскрипции, медиатора, РНК полимеразы II и других факторов (Whyte W.A. et al., 2013).

В литературе имеется много данных о том, что Медиатор обеспечивает непосредственный контакт между энхансером и промотором в процессах регуляции транскрипции. Наряду с этим высказываются предположения о том, что структурная пластичность медиатора позволяет ему интегрировать и передавать регуляторные сигналы РНК полимеразе, действуя, скорее, как функциональный мост между промоторами и энхансерами, а физический контакт между энхансером и промотором не являются существенными для активации транскрипции (Ibragimov A.N. et al., 2020; El Khattabi L. et al., 2019).

Активные энхансеры связаны с факторами транскрипции и обычно двунаправленно транскрибируются РНК полимеразой II. Эти двунаправленные транскрипты, называемые энхансерными РНК (eRNA). Установлено, что уровни eRNA, транскрибируемых на энхансерах, коррелируют с показателями транскрипции мРНК в генах-мишенях. Этот факт позволяет предположить, что транскрипция eRNA может быть необходима для регуляции активности генов (Krivega I., Dean A., 2012). Назначение и функции eРНК остаются мало изученными, до настоящего времени нет четких критериев, позволяющих разграничить между собой eРНК и lнРНК. Однако в настоящее время eРНК принято подразделять на 2 группы: 1. короткие, двунаправленные, неполиаденилированные, не подвергающиеся сплайсингу и нестабильные, 2. однонаправленно транскрибируемые, подвергающиеся сплайсингу, полиаденилированные и стабильные (Sartorelli V., Lauberth S.M., 2020). Авторы обзора также указывают, что для функциональной активности энхансера, скорее всего, важен не только его продукт (eРНК), но и сам процесс транскрипции. Поскольку транскрипция энхансеров важна для поддержания открытого состояния хроматина, доступного для транскрипционных факторов и ко-

факторов. Ссылаясь на тот факт, что ингибирование элонгации на энхансерах влияет на состояние эпигенетических меток H3K4me1 и H3K4me2, которые не зависели от синтезируемой eРНК. В обзоре приводятся данные и об эффектах собственно eРНК. Например, указывается, что eРНК могут способствовать стабильности комплекса энхансер-промотор, также выступают, как эпигенетический регулятор, способствуя усилению ацетилирование гистонов в энхансерах, взаимодействуя с гистон-ацетилтрансферазой СВР. Указывается, что eРНК имеют важное медицинское значение, поскольку принимают участие в патогенезе ряда опасных заболеваний человека, включая онкологические (Sartorelli V., Lauberth S.M., 2020; Wang R., Tang Q., 2021).

С другой стороны, активность энхансера динамична и может быть ограничена определенными типами клеток или тканей, а также сигналами окружающей среды. В частности, известно о том, что маркерами активных энхансеров являются эпигенетические факторы (ядерные трансферазы и некодирующие РНК), способствующие ремоделированию хроматина (Ong C.-T., Corces V.G., 2011; Krivega I., Dean A., 2012; Wang R., Tang Q., 2021). Поэтому набор маркеров, характерных для активного функционирующего энхансера включает в себя несколько общих характеристик: - открытое состояние хроматина, чувствительного к ДНКазе (в этих участках ДНК отсутствуют нуклеосомы); - связывание факторов транскрипции и кофакторов, включая фермент гистонацетилтрансферазу p300 и родственной ему белок, связывающий элементы ответа цАМФ (СВР); - одновременное монометилирование лизина 4 гистона H3 (H3K4me1), высокие уровни триметилирования лизина 4 гистона H3 (H3K4me3) и ацетилирование лизина 27 гистона H3 (H3K27ac). Кроме того, показатели транскрипции eRNA могут оказаться наиболее надежным маркером активности энхансера (Agrawal P. et al., 2018; Sartorelli V., Lauberth S.M., 2020; Wang R., Tang Q., 2021).

2.5. СПЕЦИФИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ ТРАНСКРИПЦИИ

Благодаря ряду исследований, проведенным на рубеже 20 и 21 веков, стало известно, что, сборка PIC на коровом промоторе достаточна для только низких уровней инициированной транскрипции *in vitro*, обычно называемой базальной транскрипцией. Транскрипционная активность в значительной степени стимулируется вторым классом факторов, называемых активаторами. Активаторы представляют собой специфичные для последовательности ДНК-связывающие белки, сайты распознавания которых обычно присутствуют в последовательностях выше корового промотора. На основании этих исследований была выдвинута гипотеза ко-активатора, согласно которой ко-активаторы (или адаптеры) необходимы для передачи информации, передаваемой активаторами, связанными с ДНК, к механизмам регуляции активности РНК полимеразы II (Lemon B., Tjian R., 2000). Наряду с этим, ранние исследования транскрипции *in vitro* с использованием ДНК-матрицы и очищенных общих факторов транскрипции выявили потребность в дополнительных факторах, которые входили в состав комплекса белков Медиатора и TAFs (TBP-ассоциированных факторов, компонентов TFIID). Таким образом, было установлено, что экспрессия генов регулируется большим количеством факторов транскрипции, оказывающих действие на специфические участки ДНК. С позиции современных взглядов факторы транскрипции в самом широком смысле можно классифицировать как базальные (общие) или специфичные. Общие факторы транскрипции распознают коровый промотор и непосредственно участвуют в рекрутировании РНК-полимеразы и инициации транскрипции. Центральную роль в этом процессе выполняет TFIID. Напротив, специфичные факторы транскрипции регулируют транскрипцию на специфических промоторах путем идентификации точных

мотивов ДНК (специфических последовательностей нуклеотидов), расположенных в энхансерах (Torres-Machorro, A.L., 2021). Если главной задачей общих факторов транскрипции является формирование PIC, обеспечение точной посадки РНК-полимеразы на участки ДНК, прилежащие к сайтам стартам транскрипции. То вторая группа факторов транскрипции отвечает за состояние синтеза мРНК каждого конкретного гена в соответствии с типом ткани, стадией развития и реакцией на изменения среды. В свою очередь, передача сигналов между факторами транскрипции (специфичными для данной нуклеотидной последовательности энхансера) и основным механизмом контроля транскрипции опосредуется сложной системой ко-активаторов и ко-репрессоров (Lemon V., Tjian R., 2000). Специфические факторы транскрипции (далее – факторы транскрипции) обычно регулируют экспрессию генов путем связывания энхансерных элементов и привлечения ко-активаторов и РНК-полимеразы II к генам-мишеням. Факторы транскрипции обычно связывают кофакторы, которые представляют собой белковые комплексы, способствующие активации (ко-активаторы) и репрессии (ко-репрессоры), но не обладающие собственными ДНК-связывающими свойствами (Lee T.I., Young R.A., 2013). При этом авторы обзора подчеркивают важность Медиатора в интеграции информации от активаторов транскрипции, репрессоров, сигнальных путей и других регуляторов во время инициации транскрипции и во время перехода к элонгации. По мнению авторов, наличие столь сложной системы контроля экспрессии генов у высших эукариот обеспечивает ситуацию, при которой строго определенный набор факторов транскрипции, которые экспрессируются в данном конкретном типе клеток (в организме млекопитающих – сотни типов клеток), могут избирательно контролировать транскрипцию точного набора генов с помощью РНК-полимеразы II, тем самым создавая программу экспрессии генов клетки. Привлекает внимание

тот факт, что гены, кодирующие белки-факторы транскрипции составляют от 0,5 до 8% от содержания генов в геномах эукариот, причем как абсолютное количество таких генов, так и их удельный вес в геноме, примерно, пропорциональны сложности организма (Weirauch M.T., Hughes T.R., 2011).

Среди наиболее известных факторов транскрипции человека можно также назвать антионкоген p53, фактор индуцируемый гипоксией HIF-1 альфа, семейство транскрипционных факторов ядерного фактора-кВ (NF-кВ)-универсальный фактор транскрипции, контролирующий экспрессию генов иммунного ответа, апоптоза и клеточного цикла, семейство белков СТАТ, которые являются белками-посредниками, обеспечивающие ответ клетки на сигналы, поступающие через рецепторы интерлейкинов, факторов роста и т.д. (Dannappel M.V. et al., 2019). Сигнальные пути могут влиять на состояние обменных процессов в клетке, как непосредственно, контролируя активность ферментов-регуляторов метаболизма (например, посредством фосфорилирования), так и модулируя интенсивность обмена через изменения экспрессии генов.

В частности, в геноме человека установлено 1639 факторов транскрипции, классифицированных примерно на 100 типов на основе их ДНК-связывающих доменов (DBD). Эти DBD в значительной степени определяют нуклеотидные последовательности в ДНК, предпочтительно связанные с каждым фактором транскрипции, и, следовательно, способность влиять на экспрессию генов-мишеней. Таким образом, сложная и динамичная регуляторная сеть в данной клетке контролируется взаимодействием транскрипционных факторов с их генами-мишенями (Weirauch M.T., Hughes T.R., 2011; de Martin X. et al., 2021). В подавляющем большинстве хорошо изученных случаев эти взаимодействия опосредуются ДНК-связывающими доменами (DBD), и семейства факторов транскрипции формируются на основе сходства последовательностей их DBD.

Эукариотические DBD демонстрируют широкий спектр структурных форм, охватывающих разнообразный набор белковых структур, каждая из которых предназначена для распознавания специфической последовательности ДНК. В большинстве случаев взаимодействие факторов транскрипции с ДНК осуществляется в области большой бороздки спирали ДНК, хотя часто встречаются взаимодействия с малой бороздкой и/или фосфатной и углеводной компонентами нуклеотидов. Каталог факторов транскрипции эукариот, представленный Weirauch M.T. и Hughes T.R. (2011) в соответствии со структурными особенностями DBD предусматривает наличие следующих основных групп (суперсемейств) факторов транскрипции у многоклеточных организмов:

-Суперсемейство – факторы транскрипции с основными ДНК-связывающими доменами (Basic Superfamily Transcription Factors):

Данное суперсемейство, включает в себя классы лейциновых застежек (leucine zipper, bZIP) и спираль-петля-спираль цепей (helix-loop-helix, bHLH), в которые входят факторы транскрипции, образующие димеры и связывают ДНК ножничным захватом. Белки этого суперсемейства состоят из основной α -спиральной области, контактирующей с ДНК. В результате димеризации белков этой группы, при связывании ДНК большинство представителей этого суперсемейства распознают палиндромные связывающие последовательности. Классы bZIP и bHLH являются одними из самых крупных среди позвоночных, в геноме человека присутствуют 53 и 110 представителей соответственно.

- Суперсемейство - факторы транскрипции, содержащие цинк-координирующие ДНК-связывающие домены (Zinc-Coordinating Transcription Factors).

Структура цинк-координирующих факторов транскрипции стабилизирована тетраэдрической координацией атома цинка (Zn^{++}) и остатками гистидина и цистеина. Это суперсемейство включает в себя

широкий спектр классов факторов транскрипции, включая цинковые пальцы C2H2, ядерные рецепторы (цинковые пальцы C4) и семейство цинковых кластеров. Цинковые пальцы C2H2 представляют собой самое большое семейство эукариотических факторов транскрипции, в геномах многоклеточных содержится более 600 представителей этого семейства. Семейство ядерных рецепторов специфично для многоклеточных. Данное семейство факторов контролирует широкий спектр физиологических процессов. В частности, ядерные рецепторы действуют как гормональные и экологические сенсоры, реагируя на липофильные молекулы, такие как жирные кислоты, витамины и стероидные гормоны. Представители семейства GATA, которые содержат два цинковых пальца и получили название благодаря способности распознавать последовательность WGATAR (где W-A/T, а R — A/G). Сайты связывания факторов GATA были детально изучены в регуляторных областях кластера генов β -глобина человека. Члены семейства GATA играют важную роль в регуляции гемопоэза, а также в процессе эмбрионального развития. Мутации белков GATA связывают с такими заболеваниями человека, как онкология, врожденные пороки сердца и др.

-Суперсемейство - факторы транскрипции Спираль-Поворот-Спираль (Helix-Turn-Helix Transcription Factors)

ДНК-связывающий домен этих факторов состоит из 61 остатка аминокислот, и образует структуру спираль-поворот-спираль (НТН-структура), в которой три альфа-спирали связаны короткими петлевыми участками. У эукариот данное суперсемейство представляют собой самую большую группу факторов транскрипции, которые связывают ДНК в области большой бороздки, используя НТН-структуру. В его состав входят десятки подсемейств, в том числе Нох-белки и белки POU. В дополнение к основному трехспиральному ДНК-связывающему домену у факторов данного суперсемейства появилось множество модификаций, например

мотив с крылатой спиралью (wHTH). Крылатый спираль-поворот-спираль. wHTH домен (winged helix-turn-helix) — вариант, имеющий в своём составе 3 альфа-спирали и 3-4 бета-листа. Семейства факторов, которые используют мотив wHTH для связывания ДНК, включают Forkhead box (Fox), Ets, IRF, RFX, фактор теплового шока (HSF) и E2F. Fox факторы широко распространены у млекопитающих и играют важную роль в процессах органогенеза и развития речи. Мутации в генах Fox также были вовлечены в широкий спектр заболеваний человека, включая рак, глаукому и различные расстройства речи.

-Суперсемейство – факторы которые связывают ДНК с использованием β -скэффолда (каркасоподобной) структуры (β -Scaffold Transcription Factors)

Факторы, у которых поверхность, контактирующая с ДНК, представлена в виде сложным образом организованного скэффолда из бета-нитей. Контакты с ДНК в этом случае осуществляются в области малой бороздки. В состав семейства входит супрессор опухолей p53, который называют “хранителем генома” из-за его важной роли в предотвращении мутаций в геномах эукариот. p53 активируется повреждением ДНК или гипоксией и контролирует гены, участвующие в остановке клеточного цикла, репарации ДНК и регуляции апоптоза. Мутация или инактивация p53 способствует развитию рака, а также приводит к нарушению клеточного цикла и апоптоза. p53 связывает ДНК 200 аминокислотным DBD, состоящим из цинк-координируемого β -сэндвича. p53 структурно связан с несколькими основными семействами эукариотических факторов транскрипции, включая семейство Rel Homology Region (RHR), в которое входят фактор NFkB, и семейство STAT. ДНК-связывающий домен холодного шока (CSD) обнаружен у всех эукариот и, таким образом, считается, что он представляет одно из самых древних семейств факторов транскрипции. В дополнение к роли в регуляции транскрипции, которую

играют CSD Y-бок факторы, такие как YB1 и FRGY2, CSD-содержащие белки участвуют в широком спектре процессов, включая инициацию трансляции, деградацию РНК и сплайсинг пре-мРНК.

-Другие факторы транскрипции многоклеточных

ССААТ-связывающий фактор CBF (также называемый NFY) - это гетеродимерный фактор транскрипции, который специфически связывается с последовательностью ССААТ, присутствующей во многих генах эукариот. CBF/NF-Y связывает ДНК в виде комплекса, который состоит из трех субъединиц: CBF-A (NFY-B/HAP3), CBF-B (NFY-A/HAP2) и CBF-C (NF-YC/HAP5). Образовавшийся комплекс распознает блок ССААТ, который расположен в пределах 100 оснований от сайта начала транскрипции примерно в 30% эукариотических промоторов. Субъединицы, входящие в состав комплекса CBF/NF-Y являются объектом различных систем регуляторного контроля транскрипции, а также посттранскрипционного и посттрансляционного процессинга. Факторы транскрипции семейства Sox, возможно, сыграли определенную роль в эволюции многоклеточных эукариот из-за их важности в контроле генов, участвующих в метаболизме внеклеточного матрикса, клеточной адгезии и передаче сигналов. Геном млекопитающих содержит около 20 факторов семейства Sox, каждый из которых участвует во многих процессах развития.

При этом, важной мишенью данной группы транскрипционных факторов является Медиатор. Например, в клетках мыши и человека киназный модуль Медиатора CDK8 фосфорилирует факторы транскрипции, которые образуются в сигнальных путях SREBP, Notch ICD, SMAD1/3 и STAT1/3/5a. Эти транскрипционные факторы являются конечными точками для сигнальных каскадов инсулина, WNT/ β -катенина, TGF β и интерферона соответственно. Важно отметить, что CDK8-зависимое фосфорилирование изменяло стабильность или активность этих транскрипционных факторов. Таким образом, киназа Медиатора непосредственно регулирует

нижестоящие транскрипционные ответы на сигнальные каскады (Luyties O., Taatjes D.J., 2022). По данным литературы, различные факторы транскрипции активируют транскрипцию, взаимодействуя с различными субъединицами Медиатора, которые способны преобразовывать биологические сигналы (например, сигналы развития) в конкретные результаты транскрипции. В соответствии с этими взглядами Медиатор был описан как конечная точка клеточных сигнальных путей, поскольку он является конечной мишенью для транскрипционных факторов (Allen B.L., Taatjes D.J., 2015). Приводятся данные о том, что Медиатор может выполнять ключевую функцию в реализации эффектов факторов транскрипции TGF β –SMAD сигнального пути (Huang S. et al., 2012; Zhao M. et al., 2013), Wnt– β -катенин сигнального пути (Carrera I. et al., 2008; Rocha P.P. et al., 2010) и Ras–ERK–MAPK сигнального пути (Balamotis M.A. et al., 2009).

Медиатор также принимает участие в регуляции транскрипционных сигналов, реализуемых через систему ядерных рецепторов. Уникальным свойством ядерных рецепторов, является их способность напрямую взаимодействовать с геномной ДНК и регулировать экспрессию генов. В частности, субъединица медиатора MED1 является мишенью связанного с лигандом рецептора гормона щитовидной железы, множества разнообразных рецепторов, которые включают (но не ограничиваются ими) рецептор витамина D, рецептор- γ , активируемый пероксисомными пролифераторами (PPAR γ), ядерный фактор 4 α гепатоцитов (HNF4 α), глюкокортикоидный рецептор и рецептор эстрогена (Malik S., Roeder R.G., 2010; Poss Z.C. et al., 2013).

Анализ литературы показывает, что киназный модуль Медиатора может оказывать влияние на функцию энхансера через фосфорилирование факторов транскрипции. Действительно, факторы транскрипции - основная категория белков, модифицируемая киназами Медиатора в клетках

человека, что позволяет предположить, что CDK8/CDK19 эволюционировали в направлении расширения возможностей модуляции активности факторов транскрипции (Luyties O., Taatjes D.J., 2022).

ЛИТЕРАТУРА К ГЛАВЕ ФАКТОРЫ ТРАНСКРИПЦИИ

Путляев Е.В., Ибрагимов А.Н., Лебедева Л.А. и соавт. Структура и функции комплекса медиатор//Биохимия.-2018.-Т.83,вып. 4.-С.577 – 591

Разин С.В., Гаврилов А.А., Ульянов С.В. Регуляторные элементы эукариотического генома, контролирующие транскрипцию//Молекулярная биология.-2015.-Т.49, № 2.-С.212–223
doi: 10.7868/S0026898415020123

Adachi N, Senda T, Horikoshi M (2016) Uncovering ancient transcription systems with a novel evolutionary indicator//Sci Rep.-2016.-Т.6,№1.-С.1–12
doi: 10.1038/srep27922

Agrawal P., Heimbruch K.E., Rao S. Genome-Wide Maps of Transcription Regulatory Elements and Transcription Enhancers in Development and Disease//Compr Physiol.-2018.-Т.9,№1.-С.439-455
doi: 10.1002/cphy.c180028

Allen B.L., Taatjes D.J. The Mediator complex: a central integrator of transcription//Nat Rev Mol Cell Biol.-2015.-Т.16,№3.-С.155–166
doi:10.1038/nrm3951

Aranda-Orgilles B., Saldaña-Meyer R., Wang E. et al. MED12 regulates HSC-specific enhancers independently of mediator kinase activity to control hematopoiesis//Cell Stem Cell.-2016.-Т.19.-С.784–799
doi: 10.1016/j.stem.2016.08.004

Balamotis M.A., Pennella M.A., Stevens J.L. et al. Complexity in transcription control at the activation domain-mediator interface//Sci Signal.-2009.-Т.2.-С.ra20
doi: 10.1126/scisignal.1164302

Bhuiyan T., Timmers H.Th.M. Promoter Recognition: Putting TFIID on the Spot// Trends in Cell Biology.-2019.-Т.29,№9.-С.752-763
<https://doi.org/10.1016/j.tcb.2019.06.004>

Burns L. G., Peterson C. L. 1997. Protein complexes for remodeling chromatin//*Biochim. Biophys. Acta.*-1997.-T.1350,№2.-C.159–168
doi: 10.1016/s0167-4781(96)00162-5

Carrera I., Janody F., Leeds N. et al. Pygopus activates Wingless target gene transcription through the mediator complex subunits Med12 and Med13//*Proc Natl Acad Sci U S A.*-2008.-T.105,№18.-C.6644-6649
doi: 10.1073/pnas.0709749105

Clarke P.A., Ortiz-Ruiz M.J., TePoele R. et al. (2016). Assessing the mechanism and therapeutic potential of modulators of the human mediator complex-associated protein kinases//*eLife.*-2016.-T.5.-C.e20722
doi: 10.7554/eLife.20722

Compe E., Genes C.M., Braun C. et al. TFIIE orchestrates the recruitment of the TFIIF kinase module at promoter before release during transcription// *Nat. Commun.*-2019.-T.10.-C.2084
doi: 10.1038/s41467-019-10131-1

Conaway R.C., Conaway J.W. Origins and Activity of the Mediator Complex// *Semin Cell Dev Biol.*-2011.-T.22,№7.-C.729–734
doi: 10.1016/j.semcdb.2011.07.021

Danino Y.M., Even D., Ideses D., Juven-Gershon T. The core promoter: At the heart of gene expression//*Biochim Biophys Acta.*-2015.-T.1849,№8.-C.1116-1131
doi: 10.1016/j.bbagr.2015.04.003

Dannappel M.V., Sooraj D., Loh J.J., Firestein R. Molecular and in vivo Functions of the CDK8 and CDK19 Kinase Modules//*Front. Cell Dev. Biol.*-2019.-T6.-C.171
doi: 10.3389/fcell.2018.00171

de Martin X., Sodaei R., Santpere G. Mechanisms of Binding Specificity among bHLH Transcription Factors//*Int J Mol Sci.*-2021.-T.22,№17.-C.9150
doi: 10.3390/ijms22179150

Deng W., Roberts S.G. TFIIB and the regulation of transcription by RNA polymerase II//*Chromosoma.*-2007.-T.116.-C.417–429
doi: 10.1007/s00412-007-0113-9

Dergai O., Hernandez N. How to Recruit the Correct RNA Polymerase? Lessons from snRNA Genes//*Trends Genet.*-2019.-T.35,№6.-C.457-469

doi: 10.1016/j.tig.2019.04.001

Dimitrova E., Kondo T., Feldmann A. et al. FBXL19 recruits CDK-Mediator to CpG islands of developmental genes priming them for activation during lineage commitment//*Elife*.-2018.-T.7.-C.e37084
doi: 10.7554/eLife.37084

Dreos R., Sloutskin A., Malachi N. et al. (2021) Computational identification and experimental characterization of preferred downstream positions in human core promoters//*PLoS Comput Biol*.-2021.-T.17,№8.-C.e1009256
<https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1009256>

El Khattabi L., Zhao H., Kalchschmidt J. et al. A pliable Mediator acts as a functional rather than an architectural bridge between promoters and enhancers//*Cell*.-2019.-T.178,№5.-C.1145–1158.e20.
doi:10.1016/j.cell.2019.07.011

Farrelly, L.A., Thompson R.E., Zhao S. et al. (2019) Histone serotonylation is a permissive modification that enhances TFIID binding to H3K4me3//*Nature*.-2019.-T.567,№7749.-C. 535–539
doi: 10.1038/s41586-019-1024-7

Flanagan P.M., Kelleher R.J., Sayre M.H. et al. A mediator required for activation of RNA polymerase II transcription in vitro//*Nature*.-1991.-T.350,№6317.-C.436-438
doi: 10.1038/350436a0

Fondell J.D., Ge H., Roeder R.G. Ligand induction of a transcriptionally active thyroid hormone receptor coactivator complex//*Proc Natl Acad Sci U S A*.-1996.-T.93,№16.-C.8329-8333
doi: 10.1073/pnas.93.16.8329

Gao W.-W., Xiao R.-Q., Zhang W.-J. et al. JMJD6 Licenses ER α -Dependent Enhancer and Coding Gene Activation by Modulating the Recruitment of the CARM1/MED12 Co-activator Complex//*Mol Cell*.-2018.-T.70,№2.-C.340-357
doi: 10.1016/j.molcel.2018.03.006

Grueter C.E., van Rooij E., Johnson B.A. et al. A cardiac microRNA governs systemic energy homeostasis by regulation of MED13//*Cell*.-2012.-T.149.-C.671–683
doi: 10.1016/j.cell.2012.03.029

Haberle V., Stark A. Eukaryotic core promoters and the functional basis of transcription initiation//*Nat Rev Mol Cell Biol.*-2018.-T.19,№10.-C.621–637
doi:10.1038/s41580-018-0028-8

Hampsey M. Molecular Genetics of the RNA Polymerase II General Transcriptional Machinery//*Microbiology and molecular biology reviews.*-1998.-T.62,№2.-C.465–503
doi: 10.1128/membr.62.2.465-503.1998

Hoepfner S., Baumli S., Cramer P. Structure of the Mediator Subunit Cyclin C and its Implications for CDK8 Function//*J. Mol. Biol.*-2005.-T.350.-C.833–842
doi:10.1016/j.jmb.2005.05.041

Huang S., Hölzel M., Knijnenburg T. et al. MED12 controls the response to multiple cancer drugs through regulation of TGF- β receptor signaling//*Cell.*-2012.-T.151,№5.-C.937-950
doi: 10.1016/j.cell.2012.10.035

Ibragimov A.N., Bylino O.V., Shidlovskii Y.V. Molecular Basis of the Function of Transcriptional Enhancers//*Cells.*-2020.-T.9,№7.-C.1620
doi: 10.3390/cells9071620

Jawhari A., Uhring M., De Carlo S. et al. Structure and oligomeric state of human transcription factor TFIIE//*EMBO Rep.*-2006.-T.7,№5.-C.500-505
doi: 10.1038/sj.embor.7400663

Kadonaga J.T. Perspectives on the RNA Polymerase II Core Promoter//*Wiley Interdiscip Rev Dev Biol.*-2012.-T.1,№1.-C.40–51
doi:10.1002/wdev.21

Kang S.W., Kuzuhara T., Horikoshi M. Functional interaction of general transcription initiation factor TFIIE with general chromatin factor SPT16/CDC68//*Genes Cells.*-2000.-T.5,№4.-C.251-263
doi: 10.1046/j.1365-2443.2000.00323.x

Knuesel M.T., Meyer K.D., Bernecky C., Taatjes D.J. The human CDK8 subcomplex is a molecular switch that controls Mediator coactivator function//*Genes Dev.*- 2009.-T.23,№4.-C.439-451
doi: 10.1101/gad.1767009

Krishnamurthy S., Hampsey M. Eukaryotic transcription initiation//Curr Biol.-2009.-T.19,№4.-C.R153-R156
doi: 10.1016/j.cub.2008.11.052

Krivega I., Dean A. Enhancer and promoter interactions — long distance calls//Curr Opin Genet Dev.-2012.-T.22,№2.-C.79–85
doi: 10.1016/j.gde.2011.11.001

Lai F., Orom U.A., Cesaroni M. et al. Activating RNAs associate with Mediator to enhance chromatin architecture and transcription//Nature.-2013.-T.494,№7438.-C.497-501
doi: 10.1038/nature11884

Larroux C., Luke G.N., Koopman P. et al. Genesis and Expansion of Metazoan Transcription Factor Gene Classes//Mol. Biol. Evol.-2008.-T.25,№5.-C.980–996
doi:10.1093/molbev/msn047

Lee T.I., Young RA. Transcriptional Regulation and its Misregulation in Disease//Cell. 2013.-T.152,№6.-C.1237–1251
doi:10.1016/j.cell.2013.02.014

Lemon B., Tjian R. Orchestrated response: a symphony of transcription factors for gene control//Genes Dev.-2000.-T.14,№20.-C.2551-2569
doi: 10.1101/gad.831000

Leurent C., Sanders S., Ruhlmann C. et al. Mapping histone fold TAFs within yeast TFIID//EMBO Journal.-2002.-T.21,№13.-C.3424-3433
doi: 10.1093/emboj/cdf342

Luse D.S. Rethinking the role of TFIIF in transcript initiation by RNA polymerase II//Transcription.-2012.-T.3,№4.-C.156-159
doi: 10.4161/trns.20725

Luse D.S. The RNA polymerase II preinitiation complex. Through what pathway is the complex assembled?//Transcription.-2014.-T.5,№1.-C.e27050
doi: 10.4161/trns.27050

Luyties O., Taatjes D.J. The Mediator kinase module: an interface between cell signaling and transcription//Trends Biochem Sci.-2022.-T.47,№4.-C.314–327
doi:10.1016/j.tibs.2022.01.002

Malecova B., Gross P., Boyer-Guittaut M. et al. The Initiator Core Promoter Element Antagonizes Repression of TATA-directed Transcription by Negative

Cofactor NC2//Journal of biological chemistry.-2007.-T.282,№34.-C.24767–24776

doi: 10.1074/jbc.M702776200

Malik S., Roeder R.G. The metazoan Mediator co-activator complex as an integrative hub for transcriptional regulation//Nat Rev Genet.-2010.-T.11,№11.-C.761–772

doi:10.1038/nrg2901

Matsui T., Segall J., Weil P. A., Roeder R. G. Multiple factors required for accurate initiation of transcription by purified RNA polymerase II//J. Biol. Chem.-1980.-T.255.-C.11992–11996

PMID: 7440580

Miao Y.L., Gambini A., Zhang Y. et al. Mediator complex component MED13 regulates zygotic genome activation and is required for postimplantation development in the mouse//Biol. Reprod.-2018.-T.98.-C.449–464

doi: 10.1093/biolre/iy004

Natsume-Kitatani Y., Mamitsuka H. Classification of Promoters Based on the Combination of Core Promoter Elements Exhibits Different Histone Modification Patterns//PLoS ONE.-2016.-T.11,№3.-C. e0151917

doi:10.1371/journal.pone.0151917

Nogales E., Louder R.K., He Y. Structural Insights into the Eukaryotic Transcription Initiation Machinery//Annu Rev Biophys.-2017.-T.46.-C.59-83

doi: 10.1146/annurev-biophys-070816-033751

O'Brien M.J., Ansari A. Beyond the canonical role of TFIIB in eukaryotic transcription//Current Genetics.-2022.-T.68.-C.61–67

<https://doi.org/10.1007/s00294-021-01223-x>

Ong C.-T., Corces V.G. Enhancer function: new insights into the regulation of tissuespecific gene expression//Nat Rev Genet.-2011.-T.12,№4.-C.283–293

doi:10.1038/nrg2957

Osman S., Mohammad E., Lidschreiber M. et al. The Cdk8 kinase module regulates interaction of the mediator complex with RNA polymerase II//J. Biol. Chem.-2021.-T.296.-C.100734

<https://doi.org/10.1016/j.jbc.2021.100734>

Patel A.B., Louder R.K., Greber B.J. et al. Structure of human TFIID and mechanism of TBP loading onto promoter DNA//*Science*.-2018.-T.362,№6421.-C.eaau8872

doi: 10.1126/science.aau8872

Phan T., Maity P., Ludwig C. et al. Nucleolar TFIIE plays a role in ribosomal biogenesis and performance//*Nucleic Acids Res*.-2021 Nov 8;49(19):11197-11210.

doi: 10.1093/nar/gkab866

Poss Z.S., Ebmeier C.C., Taatjes D.J. The Mediator complex and transcription regulation//*Crit Rev Biochem Mol Biol*.-2013.-T.48,№6.-C.575–608

doi: 10.3109/10409238.2013.840259

Rocha P.P., Scholze M., Bleiss W., Schrewe H. Med12 is essential for early mouse development and for canonical Wnt and Wnt/PCP signaling//*Development*.-2010.-T.137,№16.-C.2723-2731

doi: 10.1242/dev.053660

Roeder R.G. 50+ years of eukaryotic transcription: an expanding universe of factors and mechanisms//*Nat Struct Mol Biol*.-2019.-T.26,№9.-C.783–791

doi:10.1038/s41594-019-0287-x

Sartorelli V., Lauberth S.M. Enhancer RNAs are an important regulatory layer of the epigenome//*Nat Struct Mol Biol*.-2020.-T.27,№6.-C.521–528

doi:10.1038/s41594-020-0446-0

Soutoglou E., Demény M.A., Scheer E. et al. The nuclear import of TAF10 is regulated by one of its three histone fold domain-containing interaction partners//*Mol Cell Biol*.-2005.-T.25,№10.-C.4092-4104

doi: 10.1128/MCB.25.10.4092-4104.2005

Srivastava S., Kulshreshtha R. Insights into the regulatory role and clinical relevance of mediator subunit, MED12, in human diseases//*J Cell Physiol*.-2021.-T.236,№5.-C.3163-3177

doi: 10.1002/jcp.30099

Struhl K. Yeast transcriptional regulatory mechanisms//*Annu. Rev.Genetics*.-1995.-T.29.-C.651-674

Takahashi H., Parmely T.J., Sato S. et al. Human mediator subunit MED26 functions as a docking site for transcription elongation factors//*Cell*.-2011.-T.146,№1.-C.92-104

doi: 10.1016/j.cell.2011.06.005

Thompson C.M., Koleske A.J., Chao D.M., Young R.A. A multisubunit complex associated with the RNA polymerase II CTD and TATA-binding protein in yeast//Cell.-1993.-T.73,№7.-C.1361-1375

doi: 10.1016/0092-8674(93)90362-t

Tobias I.C., Abatti L.E., Moorthy S.D. et al. Transcriptional enhancers: from prediction to functional assessment on a genome-wide scale//Genome.-2021.-T.64,№4.-C.426-448

doi: 10.1139/gen-2020-0104

Torres-Machorro, A.L. Homodimeric and Heterodimeric Interactions among Vertebrate Basic Helix–Loop–Helix Transcription Factors//Int. J. Mol. Sci.-2021.-T.22.-C.12855

<https://doi.org/10.3390/ijms222312855>

Tsai K.L., Tomomori-Sato C., Sato S. et al. Subunit architecture and functional modular rearrangements of the transcriptional Mediator complex//Cell.-2014.-T.157,№6.-C.1430–1444

doi: 10.1016/j.cell.2014.05.015

Wang R., Tang Q. Current Advances on the Important Roles of Enhancer RNAs in Molecular Pathways of Cancer// Int. J. Mol. Sci.-2021.-T.22.-C.5640

<https://doi.org/10.3390/ijms22115640>

Wang Y., Roberts S. New insights into the role of TFIIB in transcription initiation//Transcription.-2010.-T.1,№3.-C.126–129

doi: 10.4161/trns.1.3.12900

Weil P. A., Luse D. S., Segall J., Roeder R. G. Selective and accurate initiation of transcription at the Ad2 major late promoter in a soluble system dependent on purified RNA polymerase II and DNA//Cell.-1979.-T.18.-C.469–484

doi: 10.1016/0092-8674(79)90065-5

Weirauch M.T., Hughes T.R. A catalogue of eukaryotic transcription factor types, their evolutionary origin, and species distribution//Subcell Biochem.-2011.-T.52.-C.25-73.

doi: 10.1007/978-90-481-9069-0_3

Whyte W.A., Orlando D.A., Hnisz D. et al. Master Transcription Factors and Mediator Establish SuperEnhancers at Key Cell Identity Genes//Cell.-2013.-T.153,№2.-C.307–319

doi:10.1016/j.cell.2013.03.035

Zhao M., Yang X., Fu Y. et al. Mediator MED15 modulates transforming growth factor beta (TGF β)/Smad signaling and breast cancer cell metastasis//J Mol Cell Biol.-2013.-T.5,№1.-C.57-60

doi: 10.1093/jmcb/mjs054

ГЛАВА III. СИГНАЛЬНЫЕ ПУТИ КЛЕТКИ

ВВЕДЕНИЕ

В многоклеточном организме работа каждой клетки регулируется большим количеством сигналов. Эти сигналы могут формироваться, как в самом организме, отражая конкретные потребности живого организма (состояние обмена веществ, этапы развития, дифференциация, размножение), так и в форме реакции на воздействие внешней среды. Реализация каждого из этих сигналов охватывает все биологические и биохимические процессы, которые приводят от восприятия сигнала клеткой до реакции клетки. Сигнал для клетки - это то, что распознается конкретным рецептором, который в свою очередь может инициировать ответ на этот сигнал.

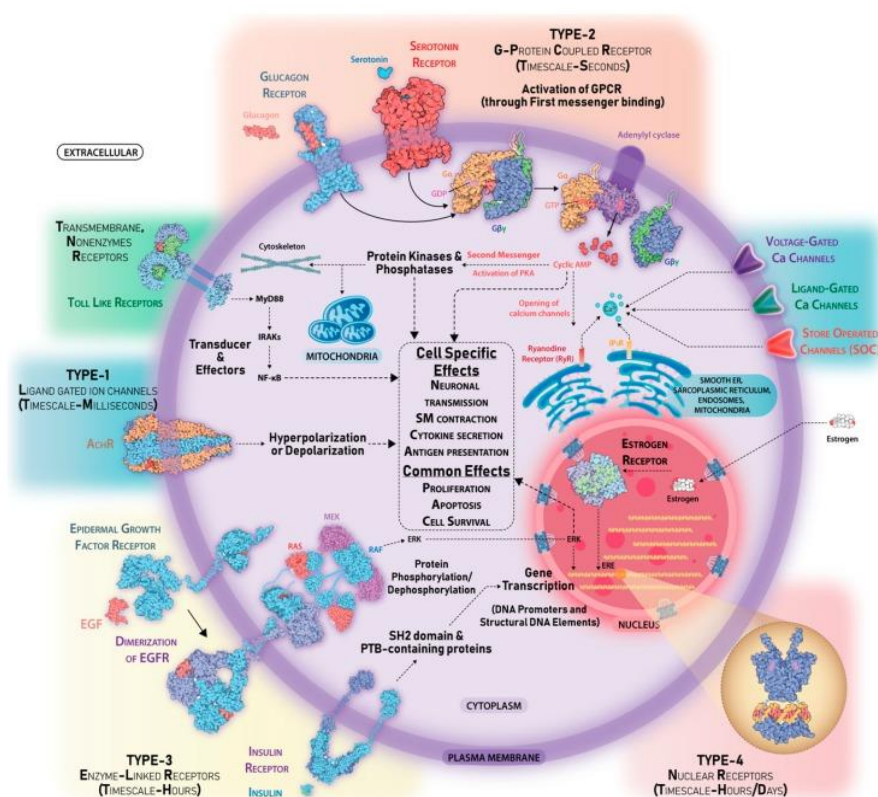


Рисунок 3.1. Пути передачи сигналов в клетку. Цитировано по Arathi Nair и соавторы, 2019

Рецептор - это структура, которая распознает сигнал, интерпретирует специфичность сигнала и транслирует его в клетку в форме внутриклеточных сигнальных молекул, каскада фосфорилирования белков и другими путями. Таким образом, передача сигналов в клетку начинается, как только сигнальная молекула (лиганд) связывается со своим рецептором — белком с комплементарной структурой на трансмембранном белке или внутри клетки. В качестве лиганда, связывающегося с рецептором, могут выступать факторы роста, гормоны, цитокины, нейротрансмиттеры, компоненты внеклеточного матрикса и т.д. Химическая природа лигандов разнообразна, включая малые молекулы, такие, как липиды (простагландины, стероидные гормоны), белки (например, пептидные гормоны, цитокины и хемокины, факторы роста), сложные полимеры сахаров (например, β -глюкан и зимозан) и их комбинации (например, протеогликаны), нуклеиновые кислоты и т.д. Связывание лиганда индуцирует конформационные изменения в рецепторе и затем транслируется в клетку с помощью активации каскадов вторичных мессенджеров (киназы, фосфатазы, ГТФазы, ионы и малые молекулы, такие как цАМФ, цГМФ, диацилглицерин и т.д.). Таким образом, сообщение передается от мембраны к ядру, где запускаются процессы экспрессии генов, последующие трансляции и нацеливание белка на клеточную мембрану и другие органеллы.

Существует два основных типа рецепторов – мембранные (трансмембранные) рецепторы клеток и внутриклеточные рецепторы. Мембранные рецепторы расположены на плазматической мембране и имеют отдельный внеклеточный домен, связывающий лиганд, трансмембранный домен, который является гидрофобным по своей природе, и цитоплазматический домен. Рецепторы клеточной поверхности можно разделить на рецепторы, связанные с G-белком, рецепторные

связанные с тирозинкиназой и ионотропные рецепторы. При связывании лиганда плазматические рецепторы претерпевают конформационные изменения в своем внеклеточном домене и активируют связанные с цитоплазматическим доменом ферментативные механизмы, обычно киназы, фосфатазы и белки-адаптеры. Эти белки могут быть ковалентно связаны с рецептором и способны продуцировать вторичные мессенджеры для последующей передачи сигнала. Внутриклеточные рецепторы могут быть ядерными рецепторами (рецептор эстрогена, глюкокортикоидный рецептор, рецептор прогестерона, рецептор ретиноевой кислоты, рецептор гормонов щитовидной железы и т.д.), цитоплазматическими рецепторами или рецепторами, расположенными на мембранах органелл (митохондрии, эндоплазматический ретикулум и аппарат Гольджи).

Таким образом, информация (лиганд), полученная на поверхности клетки (например, через мембранный рецептор), трансформируется специфическими ферментными системами, ассоциированными с рецептором плазматической мембраны и передается в форме вторичных мессенджеров внутриклеточным мишеням. Все перечисленные компоненты формируют путь передачи сигнала в клетку. Однако, определенный набор эффекторных белков, ферментов и субстратов, которые реализуют клеточные сигналы, формируют данный сигнальный путь (каскад передачи сигнала).

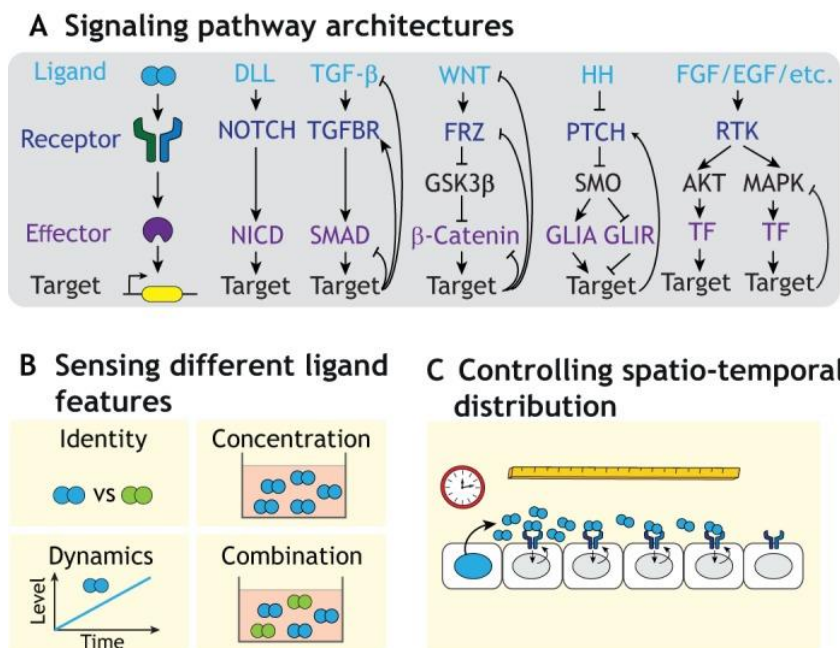


Рисунок 3.2.Общий принцип передачи сигнала в клетку. Цитировано по Pulin Li и Michael V. Elowitz, 2019.

Однако в последнее время появляется все больше свидетельств в пользу того, что чрезвычайно важную роль в регуляции передачи клеточных сигналов играют не только сами сигнальные белки, но и так называемые скаффолд-белки («белки-платформы», адапторные белки), которые координируют сборку многокомпонентных белковых комплексов. Скаффолд-белки могут связывать в единый комплекс несколько элементов одного сигнального пути, тем самым модулируя эффективность передачи соответствующего сигнала. Связывая и сближая два или более сигнальных белка, эти белки-платформы направляют поток информации в клетке, активируя, координируя и регулируя сигнальные события в регуляторных сетях (Сковородникова П.А. и соавт., 2017).

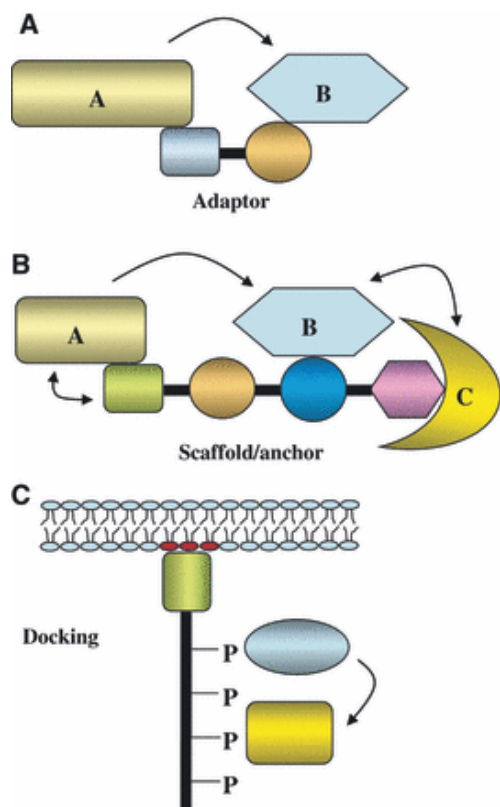


Рисунок 3.3. Классы скаффолд-белков. Цитировано по Buday L., Tompa P, 2010.

По данным литературы, описано несколько типов скаффолд-белков, которые охватывают широкий спектр функций. Данную группу белков принято подразделять на три основные категории (Рис.1): простые белки, связывающие два функционально зависимых белка (adaptors), более крупные многодоменные белки, предназначенные для связывания большого количества белков и регулирующие их активность сложными механизмами (scaffold/anchoring proteins) и белки, специализированные для инициирования сигнальных каскадов путем локализации определенных белков-компонентов сигнальных путей на клеточной мембране (docking proteins) (Buday L., Tompa P, 2010). Наличие таких белковых платформ повышает эффективность и избирательность сигнального пути, а также позволяет формировать обратную связь регуляции.

Конечной мишенью сигнальных путей клетки являются факторы транскрипции, которые регулируют экспрессию генов и в конечном итоге позволяют преобразовать полученный сигнал в изменение клеточной

активности (Brivanlou A.H., Darnell J.E., 2002). Большинство сигнальных путей инициируют каскад из нескольких внутриклеточных сигнальных молекул, которые в конечном итоге образуют белки-активаторы или репрессоры транскрипции, предназначенные для связывания с определенной последовательностью ДНК. Факторы транскрипции эукариот, как и другие белки, транскрибируются в ядре, но затем их трансляция протекает в цитоплазме.

Передача сигнала в клетку - многофакторная система, в основе которой узловые комплексы специальных белков сигнальных каскадов. Тем не менее, ни один из сигнальных путей в клетках не работает изолированно. Взаимодействие сигнальных механизмов неизбежно в сложных комплексах, когда система воспринимает комбинацию стимулов (гормоны, цитокины, факторы роста и патогенные лиганды), но одновременно сохраняет точность передачи сигналов (Saini N., Sarin A., 2021).

Хорошо известно, что относительно небольшое количество сигнальных путей контролирует развитие всех типов клеток в организме млекопитающих (Brivanlou A.H., Darnell J.E., 2002). Комбинации и время действия основных сигнальных путей определяют решения о судьбе клетки, включая такие события, как дифференцировка клеток в процессе онтогенеза (Li P., Elowitz M.B., 2019; de Roo J.J.D., Staal F.J.T., 2020) и малигнизация клетки (Dreesen O., Brivanlou A.H., 2007; Сковородникова П.А. и соавт., 2017). Рассмотрим некоторые из сигнальных путей клетки, имеющих наиболее важное медицинское значение.

CHAPTER III. CELL SIGNALING PATHWAYS

INTRODUCTION

In a multicellular organism, the work of each cell is regulated by a large number of signals. These signals can be formed both in the organism itself, reflecting the specific needs of a living organism (metabolic state, stages of development, differentiation, reproduction), and in the form of a reaction to the effects of the external environment. The implementation of each of these signals encompasses all the biological and biochemical processes that lead from the cell's perception of the signal to the cell's response. A signal to a cell is something that is recognized by a specific receptor, which in turn can initiate a response to that signal.

A receptor is a structure that recognizes a signal, interprets the specificity of a signal, and translates it into the cell in the form of intracellular signaling molecules, a cascade of protein phosphorylation, and other pathways. Thus, signaling to the cell begins as soon as the signaling molecule (ligand) binds to its receptor – a protein with a complementary structure on the transmembrane protein or inside the cell. Growth factors, hormones, cytokines, neurotransmitters, components of the extracellular matrix, etc. The chemical nature of the ligands is diverse, including small molecules such as lipids (prostaglandins, steroid hormones), proteins (for example, peptide hormones, cytokines and chemokines, growth factors), complex polymers of sugars (for example, β -glucan and zymosan) and their combinations (for example, proteoglycans), nucleic acids, etc. Binding of the ligand induces conformational changes in the receptor and is then translated into the cell by activating cascades of secondary messengers (kinases, phosphatases, GTPases, ions and small molecules such as cAMP, cGMP, diacylglycerol, etc.). Thus, the message is transmitted from the membrane to the

nucleus, where the processes of gene expression, subsequent translation and targeting of the protein to the cell membrane and other organelles are triggered.

There are two main types of receptors – membrane (transmembrane) cell receptors and intracellular receptors. Membrane receptors are located on the plasma membrane and have a separate extracellular domain binding ligand, a transmembrane domain that is hydrophobic in nature, and a cytoplasmic domain. Cell surface receptors can be divided into G-protein-bound receptors, tyrosine kinase-bound receptors, and ionotropic receptors. When the ligand binds, plasma receptors undergo conformational changes in their extracellular domain and activate enzymatic mechanisms associated with the cytoplasmic domain, usually kinases, phosphatases and adapter proteins. These proteins can be covalently bound to the receptor and are capable of producing secondary messengers for subsequent signal transmission. Intracellular receptors can be nuclear receptors (estrogen receptor, glucocorticoid receptor, progesterone receptor, retinoic acid receptor, thyroid hormone receptor, etc.), cytoplasmic receptors or receptors located on the membranes of organelles (mitochondria, endoplasmic reticulum and Golgi apparatus).

Thus, information (ligand) received on the cell surface (e.g., through a membrane receptor) is transformed by specific enzyme systems associated with the plasma membrane receptor and transmitted in the form of secondary messengers to intracellular targets. All of these components form the path of signal transmission to the cell. However, a certain set of effector proteins, enzymes and substrates that implement cellular signals form this signaling pathway (signaling cascade).

Recently, however, there has been growing evidence that not only the signaling proteins themselves play an extremely important role in the regulation of cellular signaling, but also the so-called scaffold proteins ("platform proteins", adaptor proteins), which

coordinate the assembly of multicomponent protein complexes. Scaffold proteins can bind several elements of one signaling pathway into a single complex, thereby modulating the efficiency of transmission of the corresponding signal. Binding and by bringing two or more signaling proteins closer together, these platform proteins direct the flow of information in the cell, activating, coordinating and regulating signaling events in regulatory networks (Skovorodnikova P.A. et al., 2017).

According to the literature, several types of scaffold proteins have been described, which cover a wide range of functions. This group of proteins is usually divided into three main categories (Fig. 1): simple proteins that bind two functionally dependent proteins (adaptors), larger multi-domain proteins designed to bind a large number of proteins and regulate their activity by complex mechanisms (scaffold/anchoring proteins) and proteins specialized for initiating signaling cascades by localizing certain proteins-components of signaling pathways on the cell membrane (docking proteins) (Buday L., Tompa P, 2010) The presence of such protein platforms increases the efficiency and selectivity of the signaling pathway, and also allows the formation of regulatory feedback.

The ultimate target of cell signaling pathways are transcription factors that regulate gene expression and ultimately allow the resulting signal to be converted into a change in cellular activity (Brivanlou A. H., Darnell J. E., 2002). Most signaling pathways initiate a cascade of several intracellular signaling molecules that eventually form activation proteins or transcription repressors designed to bind to a specific DNA sequence. Eukaryotic transcription factors, like other proteins, are transcribed in the nucleus, but then their translation takes place in the cytoplasm.

Signal transmission to the cell is a multifactorial system, which is based on nodular complexes of special proteins of signaling cascades. However, none of the signaling pathways in the cells work in isolation. The interaction of signaling

mechanisms is inevitable in complex complexes, when the system perceives a combination of stimuli (hormones, cytokines, growth factors and pathogenic ligands), but at the same time preserves the accuracy of signal transmission (Saini N., Sarin A., 2021).

It is well known that a relatively small number of signaling pathways control the development of all cell types in mammals (Brivanlou A. H., Darnell J. E., 2002). Combinations and time of action of the main signaling pathways determine decisions about the fate of the cell, including events such as cell differentiation in the process of ontogenesis (Li R., Elowitz M.V., 2019; de Roo J. J. D., Staal F. J. T., 2020) and cell malignancy (Dreesen O., Brivanlou A.N., 2007; Skovorodnikova P.A. et al., 2017). Consider some of the cell signaling pathways that are most important medically important.

3.1. Wnt СИГНАЛЬНЫЙ ПУТЬ

Данная тема подробно рассмотрена в ряде фундаментальных обзоров литературы (Brivanlou A.H., Darnell J.E., 2002; Logan C.Y., Nusse R., 2004; Dreesen O., Brivanlou A.H., 2007; MacDonald B.T. et al., 2009; Катанаев В.Л., 2010; Домнинский Д.А., 2011; Willert K., Nusse R., 2012; Куликова К.В. и соавт., 2012; Dijksterhuis J.P. et al., 2014; de Roo J.J.D., Staal F.J.T., 2020)

Лигандом данного сигнального пути являются липогликопротеины Wnt (в организме человека и мыши синтезируется 19 изоформ белка Wnt). Wnt-сигнальный путь - один из фундаментальных механизмов, которые контролируют пролиферацию клеток, формируют полярность клеток и определяют судьбу клеток во время эмбрионального развития и тканевого гомеостаза.

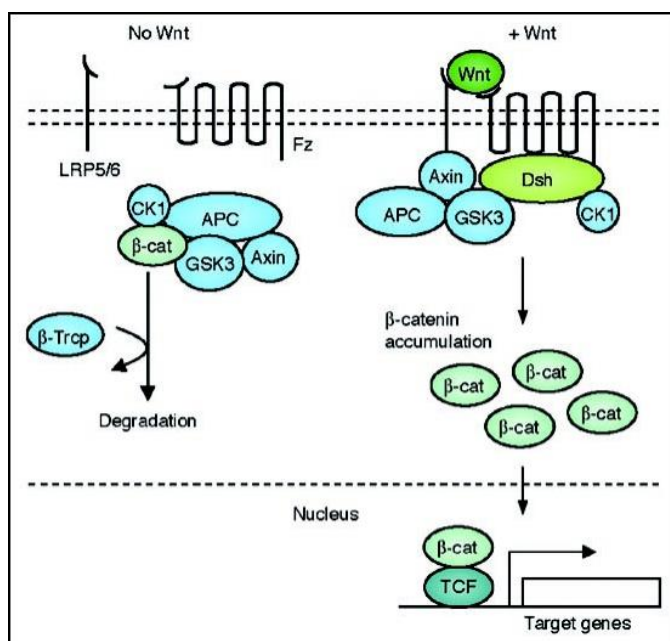


Рисунок 3.4. Классическая передача сигнала по Wnt/ β -катенин-сигнальному пути. Цитировано по Yuko Komiyu и Raymond Habas, 2008.

Нерастворимость в водной среде белков Wnt объясняется тем, что эти белки пальмитоилированы (ковалентно присоединяется ацильная группа — пальмолеиновая жирная кислота). Пальмитоилирование обнаружено на

консервативном цистеине и эта форма посттрансляционной модификации белка необходима для функционирования белка. Обработка белков Wnt ферментом ацил-протеин тиоэстеразой приводит к образованию формы протеина, которая больше не является гидрофобной при этом, утрачивая активность лиганда, что является дополнительным доказательством того, что пальмитат имеет решающее значение для передачи сигналов. Жирная кислота в составе белка необходима для того, чтобы Wnt мог взаимодействовать с транспортными и с мембранными белками. Кроме того, ацильная часть Wnt также имеет решающее значение для опосредования их взаимодействия с рецепторами для инициирования передачи сигналов. Во внеклеточном пространстве инактивация лигандов Wnt может происходить путем отщепления ацильной группы деацетилазой Notum. И наоборот, ингибирование деацетилазы Notum приводит к сверхактивации передачи сигналов Wnt.

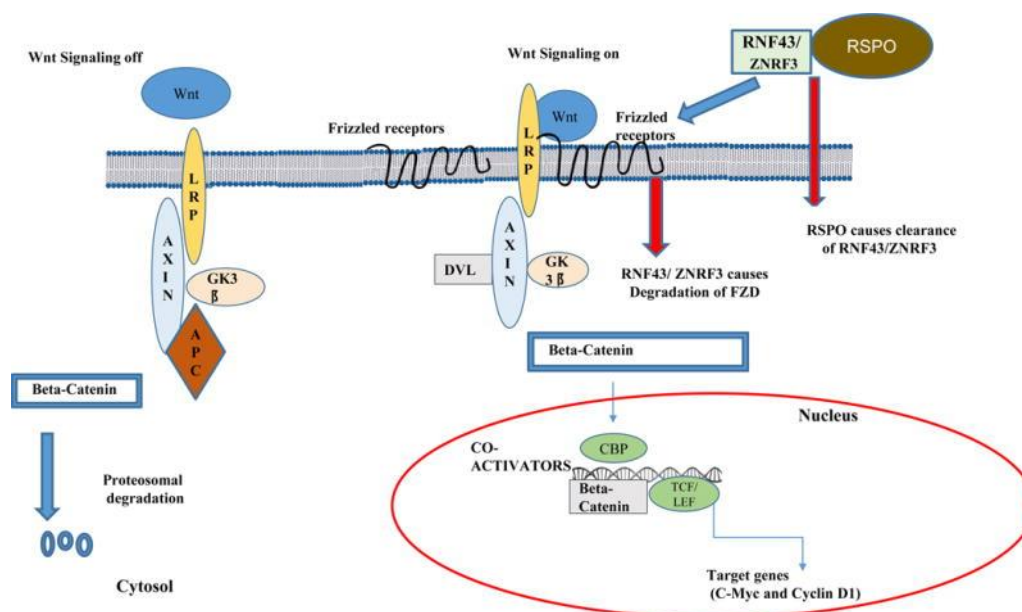


Рисунок 3.5. Взаимодействие FZD-рецепторов и LRP5/6-коррецепторов с Wnt-лигандом на плазматической мембране. Цитировано по Nithya Krishnamurthy и Razelle Kurzrock, 2018.

Рецепторы Wnt. Frizzleds (FZD)-рецепторы Wnt представляют собой семидоменный трансмембранный (7TM) протеин, змееобразно

пронизывающий 7 раз плазматическую мембрану. Связывание лиганда Wnt Fz-рецептором и его корецептором - односпиральным трансмембранным LRP5/6 (родственный рецептору липопротеинов низкой плотности) приводит к реорганизации Axin-зависимого комплекса и активации WNT/ β -катенин канонического сигнального пути. Кроме того, функцию корецептора FZD может выполнять трансмембранная рецепторная протеинтирозинкиназа ROR1/2 при инициации неканонического Wnt/Ca²⁺ сигнального пути. Чтобы иницировать передачу сигналов, белки Wnt связываются с рецепторами Frizzled (FZD) на клеточной поверхности тем самым активируя такие нижестоящие пути, как канонический Wnt/ β -катенин, и неканонические Wnt/планарная клеточная полярность и Wnt/Ca²⁺. Вероятно, решающее значение для взаимодействия белка Wnt с FZD-рецептором имеет внеклеточный богатым цистеином доменом FZD и ацильный участок Wnt. Рецепторы Frizzled относятся к суперсемейству рецепторов, сопряженных с G-белками (GPCR). Клетки млекопитающих содержат 10 рецепторов FZD, которые сгруппированы в четыре подсемейства на основе гомологии их аминокислотных последовательностей: FZD1/2/7, FZD5/8, FZD3/6 и FZD4/9/10.

Наиболее изученным (**каноническим**) путем реализации сигнала Wnt является передача сигналов, которая функционирует путем регулирования количества транскрипционного коактиватора β -катенина, (Wnt/ β -катенин-зависимый сигнальный путь) контролирующего ключевые программы экспрессии генов развития. В отсутствие белков Wnt, белок β -катенина постоянно разрушается в цитоплазме под действием деструкционного комплекса, состоящего из скаффолд-белка Axin, супрессора опухоли продукта гена adenomatous polyposis coli (APC), caspase kinase alpha (СК1-альфа) и киназы гликогенсинтазы 3-бета (GSK3-бета). Отметим, что белок Axin выполняет функцию «платформы» на которой размещены активные факторы деструкции β -катенина: APC, СК1-альфа и GSK3-бета. Благодаря

этому происходит последовательное фосфорилирование аминоконцевой области β -катенина киназами CK1-альфа и GSK3-бета, что приводит к убиквитинированию (присоединение ферментами убиквитин-лигазами одного или нескольких мономеров убиквитина с помощью ковалентной связи к боковым аминокетильным группам белка-мишени) β -катенина и его протеолизу. Фактор APC способствует фосфорилированию с последующей протеасомной деградацией β -катенина. Кроме того, APC усиливает экспорт β -катенина из ядра, что уменьшает количество β -катенина в ядре, не допуская образования активирующего транскрипцию комплекса β -катенина и TCF/LEF (T-cell factor/lymphoid enhancer-binding factor). Таким образом, белок Axin - ключевой цитоплазматический супрессор Wnt/ β -катенин зависимой передачи сигнала. Непрерывная элиминация β -катенина в цитоплазме предотвращает проникновение β -катенина в ядро, препятствуя экспрессии генов-мишеней Wnt. Напротив, сигнальный путь Wnt/ β -катенин активируется, когда лиганд Wnt связывается с трансмембранным рецептором Frizzled (Fz) и односпиральным трансмембранным белком корцептора LRP6 (рецептор липопротеинов низкой плотности - LRP6) или родственным ему белком LRP5. Образование комплекса Wnt-Fz-LRP5/6 вместе с рекрутированием скаффолд-белка Dishevelled (Dvl) приводит к реорганизации Axin-комплекса. Белок Dvl связывает Axin и инактивирует GSK3-бета. Эти события ингибируют фосфорилирование и убиквитинирование β -катенина, опосредованного Axin-комплексом и приводят к стабилизации уровня β -катенина в цитоплазме. В результате - β -катенин накапливается в цитоплазме и импортируется в ядро, где активирует транскрипцию при участии транскрипционного фактора TCF/LEF, и совместно с коактиваторами транскрипции, в частности с гистонацетилтрансферазами CBP/p300 (CREB-связывающий белок) активируют ацетилирование гистонов, стимулируя экспрессию генов-мишеней Wnt. Напротив, при низком уровне содержания β -катенина в

цитозоле и ядре клетки (на фоне активного Axin-комплекса) транскрипционный фактор TCF/LEF выступает в роли репрессора транскрипции, способствует активации гистондеацетилаз и конденсации хроматина. Наиболее изученными лигандами для канонического пути являются WNT1, WNT3A и WNT7a, которые используют для передачи сигнала рецепторы FZD1, FZD4 и FZD9.

Неканонический (β -катенин-независимый путь) включает Wnt/Ca²⁺ и путь планарной полярности клеток (planar cell polarity-PCP) Wnt/PCP.

Wnt/Ca²⁺-сигнальный путь активируется белками Wnt и связан с освобождением ионов Ca²⁺ из внутриклеточного депо. Ко-рецепторами основного рецептора FZD являются ROR1/2 (трансмембранные рецепторные протеинтирозинкиназы 1 и 2), RYK (рецептор-подобной тирозиновой киназой) и др. Это способствует рекрутированию белка DVL в комплексе с G-белком. Узнавание рецептора Fz лигандом Wnt приводит к диссоциации гетеротримерного G-белка на две субъединицы G α и G β/γ . Субъединица G β/γ активирует фосфолипазу C (PLC), которая перемещается к мембране и гидролизует фосфотидилинозитол(4,5)-бифосфаты (PIP₂) до инозитол(1,4,5)-трифосфатов (IP₃) и диацилглицерола (DAG). В свою очередь DAG активирует протеинкиназу C (PKC), а IP₃ индуцирует освобождение ионов Ca²⁺ из внутриклеточных депо. Повышение уровня цитоплазматического Ca²⁺ стимулирует Ca²⁺-зависимые эффекторные молекулы - Ca²⁺/кальмодулин-зависимая киназа II (CaMKII), ядерный фактор, ассоциированный с T-клетками (NFAT), и кальцинейрин. Обе киназы CaMKII и PKC активируют регуляторные белки NF- κ B и CREB (цАМФ-связывающий белок), которые являются факторами транскрипции.

Wnt/PCP-сигнальный путь стимулируется лигандами Wnt7a и Wnt11 с рецепторами FZD. Wnt/PCP-сигнальный путь контролирует активность малых ГТФ-аз Rac и Rho. Rho-зависимая ветвь сигнального каскада связана с активацией миозина и Rho-ассоциированной киназы

ROCK (Rho-associated kinase). Активация происходит в результате формирования комплекса Dvl-Daam-1. Белок Daam-1 опосредует формирование комплекса Dvl с RhoA. Ras-зависимый сигнальный каскад связан с индукцией киназной активности JNK. В отличие от Rho-зависимого он не требует участия Daam-1, поскольку малая ГТФ-аза Ras способна напрямую взаимодействовать с Dvl. Wnt/PCP-сигнальный путь вовлечен в регуляцию процесса модификации актинового цитоскелета, оказывает значительное влияние на поляризацию и подвижность клеток.

Патологии, вызванные нарушением Wnt-пути.

Wnt-сигнальный каскад тесно связан с различными биологическими процессами, такими как эмбриональное развитие, самообновление, пролиферация и дифференцировка стволовых клеток тканей взрослого организма. Максимальная интенсивность Wnt-каскада наблюдается в период активно протекающих процессов гисто- и органогенеза. Но и в зрелом возрасте его активность сохраняется в активно пролиферирующих клетках, контролируя процессы регенерации тканей. Например, в красном костном мозге и стволовых клетках кишечника. По данным литературы, 90% случаев рака толстой кишки вызваны мутациями белка APC, который при нормальных обстоятельствах нацелен на деградацию β -катенина. Однако, в результате мутации напротив приводит к стабилизации концентрации β -катенина и инициации транскрипционной программы TCF/LEF (Dreesen O., Brivanlou A.H., 2007). По данным авторов цитируемого обзора, мутации в белках APC или β -катенине, часто обнаруживаются при аденокарциномах тонкой кишки, полипах желудка и лейкомиах. Сообщается, что гиперактивация Wnt/ β -катенин каскада наблюдается при гепатоцеллюлярной карциноме и связана с генетическими мутациями, приводящих к аномалиям белков: β -катенин в 37% случаев, Axin в 10% случаев и APC - менее 2% случаев (Chan K.K., Lo R.C., 2018).

Приводятся данные о том, что устойчивая активация Wnt/ β -катенин каскада, вызванная мутациями генов ключевых белков сигнального пути является мощным индуктором канцерогенеза, а также способствует метастазированию и поддержанию роста опухолей за счет стимуляции ангиогенеза (Исаева А.В. и соавт., 2015). Имеются указания, что стимуляция Wnt/ β -катенин каскада при онкологических заболеваниях, вызванная мутациями и эпигенетическими факторами, сопровождается повышением устойчивости клеток опухоли к лучевой и химиотерапии (Василец Ю.Д. и соавт., 2018).

3.2. СИГНАЛЬНЫЙ ПУТЬ, ОПОСРЕДУЕМЫЙ РЕЦЕПТОРАМИ СОПРЯЖЕННЫМИ С G-БЕЛКАМИ (GPCR).

Сигналы, распознаваемые рецепторами GPCR включает широкий спектр воздействий: фотоны света (родопсин тоже относится к этому классу рецепторов), гормоны, пептиды, липиды и белки. Механизмы активации, передачи сигналов и регуляции GPCR обладают высокой степенью консервативности.

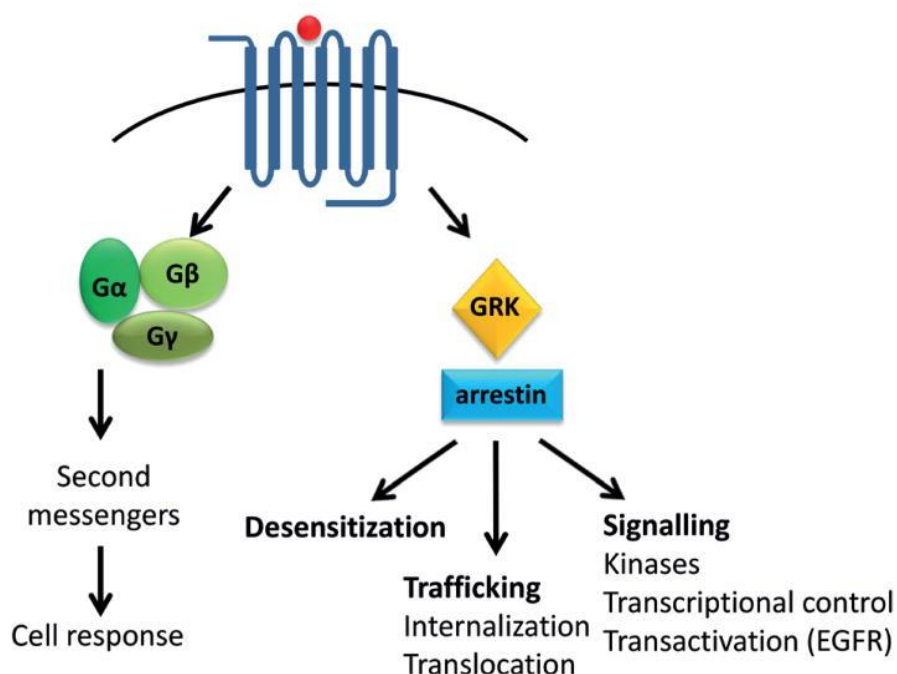


Рисунок 3.6. Принцип передачи сигнала GPCR-рецепторами в клетку. Цитировано по Dorota Latek и соавторы, 2012.

Рецепторы GPCR - крупнейшее суперсемейство рецепторов в животном царстве. В состав этого семейства входят и рассмотренные выше Frizzleds (FZD)-рецепторы Wnt-сигнального пути. Особенностью GPCR в том, что они связываются с G-белками (название связано с тем, что эти белки активируются ГТФ - GTP) для активации нижестоящих сигнальных путей. Полное название данного класса рецепторов - G-белоксопращенные рецепторы (от англ. G-protein-coupled receptors, GPCR) Цитоплазматический домен рецепторов ассоциирован с «заякоренными» на

мембране G-белками (Рис.6). G-белки включают в себя два класса, а именно гетеротримерных G-белков и мономерных G-белков. Гетеротримерные G-белки представляют собой внутриклеточный комплекс, содержащий три субъединицы: Гальфа, Гбета и Ггамма. Связывание рецептора с лигандом индуцирует конформационное изменение GPCR, которое впоследствии рекрутирует G-белки, связанные с гуанозиндифосфатом (ГДФ). G-белок активируется путем обмена ГДФ на гуанозинтрифосфат (ГТФ). Активация G-белков зависит от действия белков GEFs (guanine nucleotide-exchange factors), которые катализируют превращение ГДФ в ГТФ, а дезактивация — от действия белков GAPs (GTPase activating proteins), активирующих ГТФазную активность G-белков, т. е. ускоряющих их переход в неактивную конформацию. G-белки диссоциируют от рецептора, при этом Гальфа-субъединица, связанная с ГТФ, диссоциируется от комплекса $G\beta\gamma$ и активирует дальнейшую передачу сигнала (Latek D. et al., 2012; Seyedabadi M. et al., 2019). В каноническом сигнальном каскаде связывание лиганда индуцирует структурную перестройку в рецепторе, усиливая его взаимодействие с родственным гетеротримерным G-белком. Это взаимодействие вызывает реорганизацию доменов G-белка и обмен GDP/GTP в альфа-субъединице. Установлено около 20 изобелков субъединицы Гальфа можно разделить на 4 основных семейства Ga (Gs, Gi/o, Gq/11 и G12/13), способных регулировать ключевые ферменты-эффекторы (аденилилциклазу, фосфолипазу C и т.д.) и образование вторичных мессенджеров (цАМФ, Ca^{2+} , инозитол 1,4,5-трифосфат и т.д.), которые запускают различные сигнальные каскады. Соответственно, для каждой из указанных семейств альфа-субъединиц выявлены собственные каталитические свойства: а).белок Gs (стимулирующий) - активирует аденилатциклазу, который отвечает за превращение аденозин-5-трифосфата (АТФ) в 3'-5'-циклический аденозинмонофосфат (цАМФ); б).белок Gi (ингибирующий) инактивирует

аденилатциклазу, уменьшая синтез 3-5-цАМФ; в). белок Gq активирует фосфолипазу C (PLC), который гидролизует фосфатидилинозитол-4,5-бисфосфат (PIP2) в инозитол-1,4,5-три-4,5-фосфат (IP3) и диацилглицерин (DAG); г). Белки G12/13 активируют белок Rho (гомологичный Ras), принадлежащий к небольшому семейству белков Ras (малые G-белки) (Oldham W.M., Hamm H.E., 2008; Latek D. et al., 2012).

Хотя β - и γ -субъединицы синтезируются отдельно, они образуют биологически неразделимый комплекс G $\beta\gamma$. Через ацетильную и пренильную группы он закрепляется в клеточной мембране и может регулировать активность ионных каналов, фосфолипазы C (PLC) и многих других медиаторов. Субъединицы G $\beta\gamma$ выполняют как регуляторные, так и сигнальные функции, служат скаффолд-белками для рецепторных киназ и модуляторами ионных каналов (Wooten D. et al., 2018). Цикл завершается гидролизом связанного с G α -субъединицей ГТФ до ГДФ и его повторной ассоциацией с G $\beta\gamma$ -белками для отключения сигнала.

Кроме того, фосфорилирование активированных рецепторов GPCR-киназами (киназы рецепторов, связанных с G-белками, или **GRK-киназы** - семейство протеинкиназ, фосфорилирующих внутриклеточные домены рецепторов GPCR), позволяет GPCR связываться с многофункциональными скаффолд-белками, называемыми β -аррестинами. Было обнаружено, что рецепторные киназы, связанные с G-белком (GRK) и аррестины, опосредуют десенсibilизацию рецептора. Десенсibilизация рецептора защищает клетку от постоянной передачи сигнала и предотвращает неконтролируемую стимуляцию рецептора. Киназы GRK фосфорилируют цитоплазматический хвост рецепторов, занятых агонистами. Фосфорилированные GPCR обладают высоким сродством к аррестинам, которые существуют в виде четырех изоформ: две экспрессируются в основном в фоторецепторах (“зрительные или визуальные” аррестины, аррестин-1 и аррестин-4), а также два

«невизуальных» аррестина (β -аррестин-1 и β -аррестин-2), которые присутствуют повсеместно. β -Аррестин конкурирует с G-белками за сайты связывания с рецепторами, приводя к десенсibilизации GPCR (Hodavance S.Y. et al., 2016). Связанные с рецептором β -аррестины также могут индуцировать механизмы эндоцитоза, опосредованные клатрином, способствуя интернализации (поглощение клеткой) GPCR-рецепторов. Наряду с этим β -аррестины также могут самостоятельно, независимо от G-белков, передавать сигналы, регулирующие активацию митоген-активируемых протеинкиназ, которые регулируют цитоскелет, синтез белка, миграцию клеток и апоптоз. Следовательно, соединение GPCR с β -аррестинами, которое, как когда-то считалось, прекращает передачу сигнала рецептора, в действительности, может инициировать новый набор сигнальных путей (Peterson Y.K., Luttrell L.M., 2017; Seyedabadi M. et al., 2019). Явление смещения сигналов GPCR либо в сторону G-белков, либо в сторону аррестинов, а также способность отдельных лигандов, действующих на один и тот же рецептор, инициировать различные реакции клетки имеет важное медицинское значение и связан с разработкой новых фармакологических агонистов к GPCR (Gurevich V.V., Gurevich E.V., 2020).

С учетом столь широкого разнообразия рецепторов данного суперсемейства была проведена работа по их классификации. В настоящее время существует несколько классификаций. Одна из них получила наиболее широкое распространение и основана на результатах функциональных и филогенетических исследованиях GPCR. Согласно этой системе, называемой “GRAFS”, рецепторы GPCR человека были подразделены пять основных семейств: глутамат (G), родопсин (R), адгезия (A), frizzled/taste (F) и секретин (S) (Ghosh E. et al., 2015; Odoemelam C.S. et al., 2020).

Сигнальные пути, опосредуемые GPCR, участвуют в регуляции многих физиологических функций организма, таких как зрение, обоняние,

вкус, когнитивные функции и поведение, регуляция кровяного давления и иммунные реакции. Нарушение процесса передачи сигналов рецепторами GPCR лежит в основе патогенеза многих заболеваний: гипертония, диабет, сепсис, ожирение и рак. **Рецепторы GPCR являются мишенями около 40% выпускаемых фармакологических препаратов, включающие блокаторы гистаминовых рецепторов, агонисты опиоидов, бета-блокаторы и блокаторы рецепторов ангиотензина.**

GPCR - это самое большое семейство мембранных белков в геноме человека они представлены, примерно 5% от общего количества белок-кодирующих генов. Генетические вариации в рецепторах, связанных с G-белком (GPCR), приводят к нарушению функции GPCR и к различным генетическим заболеваниям человека. Мутации в генах GPCR могут влиять на функцию рецепторов на разных уровнях. Класс 1 - Мутации обусловлены частичной или полной делецией гена или возникла мутация в области промоторе гена. Класс 2 - Мутации негативно влияют на стабильность мРНК, трансляцию, посттрансляционные модификации и нарушают транспорт белка из эндоплазматического ретикулума. Класс 3 - мутации, которые вызывают изменения в структуре рецептора и влияют на корректную укладку белка в аппарате Гольджи. Трансформированный белок подлежит протеолизу. Класс 4. Искажения передачи сигналов рецептора в результате изменений в лигандсвязывающем домене (Schöneberg T. et al., 2004; Zalewska M. et al., 2014). В настоящее время выявлено более 60 могогенных наследственных заболеваний человека, вызванных мутациями белков GPCR (Schöneberg T., Liebscher I., 2004; 2021). Мутации в гене рецептора могут приводить, к полной инактивации рецептора, к повышению его активности и конститутивной форме активности рецептора, когда рецептор осуществляет передачу сигнала в отсутствие агониста. При этом различные заболевания могут быть результатом мутации одного гена GPCR, в зависимости от того

инактивирует и усиливает данная мутация способности рецептора к передаче сигнала. Например, и гипотиреоз и гипертиреоз вызваны мутациями в рецепторе ТТГ (TSHR) (Schöneberg T., Liebscher I., 2004; 2021). В отличие от рецессивной мутации, приводящей к потере рецептором своей функции, мутации с усилением функции рецептора являются доминантными, поскольку совершенно нормальный второй аллель не может подавлять чрезмерную передачу сигналов мутантом белком (Gurevich V.V., Gurevich E.V., 2019). Мутации часто затрагивают такие этапы передачи сигнала, как связывание рецептором лиганда, связывание рецептором G-белков, десенсибилизацию рецептора и рециркуляцию рецептора (Thompson M.D. et al., 2008; Schöneberg T., Liebscher I., 2021). Мутации в генах GPCR могут изменять активность промотора, оказывать влияние на процессы сплайсинга, а также приводить к дупликации или перегруппировке генов, однако преобладающей формой мутаций генов GPCR является точечная миссенс-мутация (68% мутаций), переключающая кодон на кодирование другой аминокислоты (Schöneberg T., Liebscher I., 2021). По данным литературы широкий спектр наследственных заболеваний вызван мутацией, ведущей к потере функции аномального рецептора (Thompson M.D. et al., 2008; 2014; Ulloa-Aguirre A. et al., 2021).

Мутации в кодирующей области родопсина (относящегося к GPCR), одно из первых выявленных наследственных заболеваний данной группы, представляет собой наследственную форму пигментного ретинита, заболевания, характеризующегося дегенерацией фоторецепторов (Schöneberg T., Liebscher I., 2021). Мутации в системе GPCR также являются причиной: X-сцепленного нефрогенного несахарного диабета (аномальная пространственная укладка в плазматической мембране белка рецептора-2 аргинина-васопресина человека; V2R), заболевания щитовидной железы (рецептор тиреотропного гормона; TSHR), семейной гипокальциурической гиперкальциемии (чувствительный к кальцию

рецептор; CaSR), ожирения (рецепторы меланокортина-3 и -4; MC3R и MC4R соответственно) и семейного дефицита глюкокортикоидов (рецептор меланокортина-2, MC2R или рецептор адренокортикотропина, ACTHR) и т.д.. Ряд мутаций могут быть причиной патологий репродуктивной функции, обусловленных аномальными рецепторами GPCR, например, мутации в рецепторе гонадотропин-рилизинг-гормона человека, в рецепторе нейрокина-3 (NK3R), в рецепторе лютеинизирующего гормона/хорионического гонадотропина; (LHCGR) и в рецепторе фолликулостимулирующего гормона (FSHR) (Schöneberg T. et al., 2004; Tao Y.-X., 2006; Thompson M.D. et al., 2008; 2014; Schöneberg T., Liebscher I., 2021; Ulloa-Aguirre A. et al., 2021).

Анализ мутаций в генах невизуальных аррестинов человека (аррестин-2 и аррестин-3), выявил существенное количество однонуклеотидных полиморфизмов (Single Nucleotide Polymorphism, SNP) в промоторных, некодирующих и экзонных участках гена. При этом в области экзонов все выявленные SNP были синонимичными, не приводили к замене аминокислоты в белке (Gurevich V.V., Gurevich E.V., 2019). Авторы цитируемого обзора делают вывод о том, что выявленные мутации в невизуальных аррестинах не были связаны с каким-либо заболеванием, хотя полиморфизмы в некодирующих областях и синонимичные замены оснований в экзонах связаны с реакцией на лечение нескольких неврологических расстройств. Между тем, в литературе имеются данные о том, что мутации белков GPCR-сигнального пути могут быть причиной многих онкологических заболеваний человека (Bar-Shavit R. et al., 2016).

3.3. PI3K/АКТ-СИГНАЛЬНЫЙ ПУТЬ

При подготовке данного раздела были использованы материалы обзоров литературы авторов Manning B.D. и Toker A. (2017), Aoki M., Fujishita T. (2017), Porta C. И соавторы (2014), Faes S., Dormond O. (2015), Huang X. И соавторов (2018), Zhang Z. и соавторы (2018), Thapa N. И соавторы (2019), Xie Y. И соавторы (2019), He Y. и соавторы (2021). Лиганды, включая факторы роста, цитокины и гормоны, активируют рецепторные тирозинкиназы (RTK - growth factor receptor tyrosine kinases) и рецепторы связанные с G-белком (GPCR), активируя одну или несколько изоформ семейства PI3K класса I (phosphoinositide 3-kinase (PI3K), семейство липидных киназ фосфорилирующих 3'-гидроксильную группу фосфоинозитидов). RTK рекрутируют PI3K класса I к плазматической мембране. PI3-киназы класса IA состоят из каталитической субъединицы p110 и регуляторной субъединицы p85.

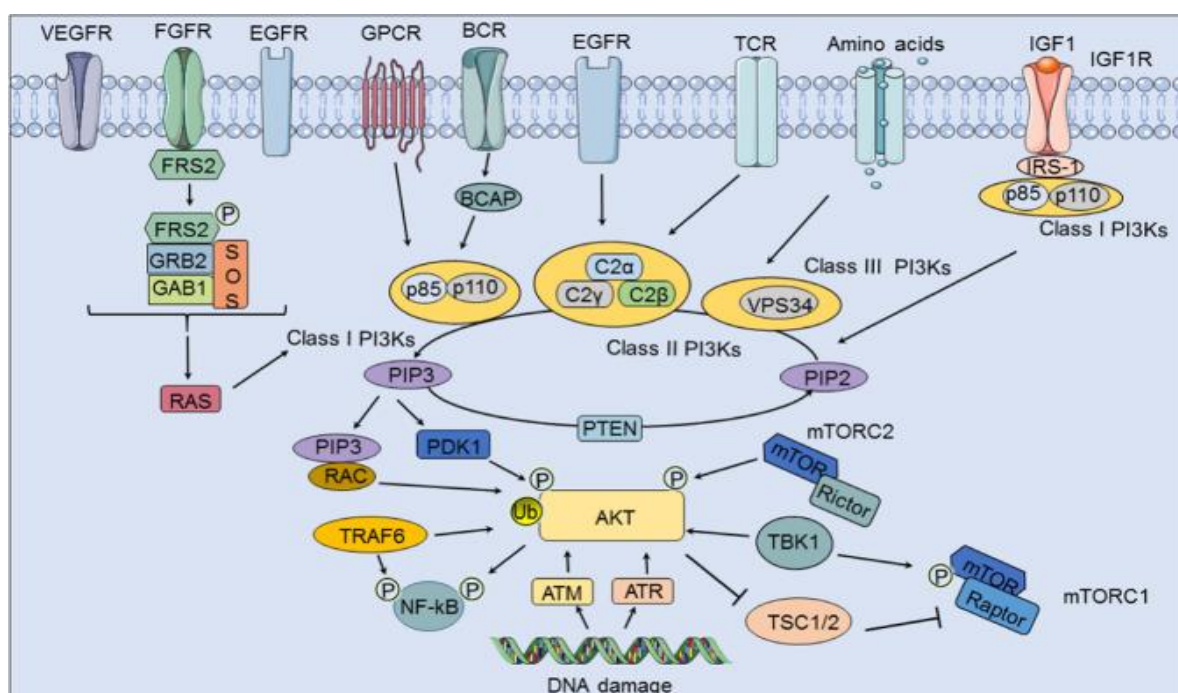


Рисунок 3.7. Лиганды PI3K/АКТ-сигнального пути. Цитировано по Yan He и соавт., 2021.

Взаимодействие PI3K с рецепторными протеинкиназами приводит к подавлению инактивирующей функции p85 и активации каталитической субъединицы p110. GPCR напрямую взаимодействуют с PI3K через субъединицы Гальфа или Gбета-гамма. Между тем, RTK и GPCRs также активируют Ras, который также активирует PI3K. Активированный фермент PI3K класса I фосфорилирует 3'-гидроксил инозитольной головной группы фосфоинозитидов, что приводит к образованию липидных вторичных мессенджеров PtdIns-3,4-P2 (PI3,4P2) и PtdIns-3,4,5-P3 (PIP3) в мембране, впоследствии рекрутируя сигнальные белки, например, киназу АКТ. Далее АКТ связывается с мембраной PH-доменом в сайтах накопления PI3,4P2 или PIP3. Присутствие в мембране PIP3 и PI3,4P2 непосредственно способствуют активации АКТ. Первоначально предполагалось, что PIP3 локализуется исключительно на плазматической мембране, однако, в дальнейшем было выявлено наличие эндомембранных сайтов (на мембранах органелл) PIP3 и PI3,4P2, которые непосредственно способствуют активации АКТ.

Figure 1A

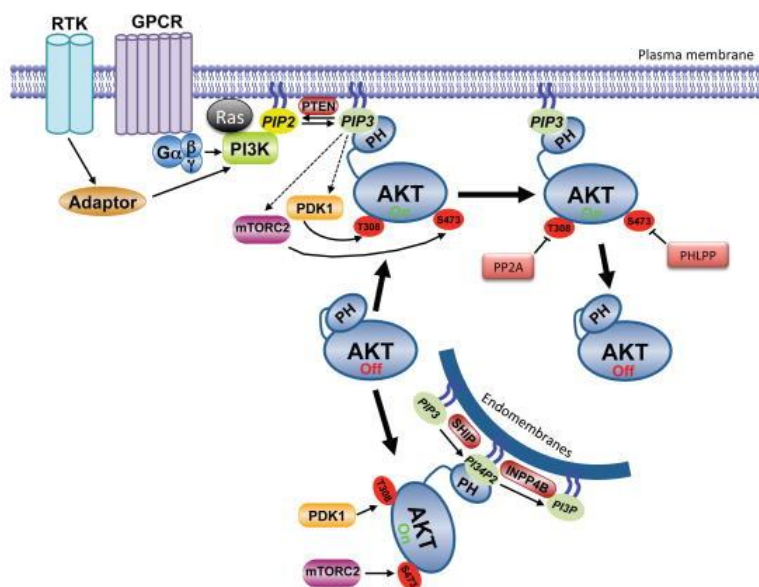


Рисунок 3.8. Принцип работы PI3K/АКТ-сигнального пути. Цитировано по Brendan D. Manning и Alex Toker, 2017.

Ограничение активности АКТ мембранами, в которых присутствуют липидные продукты PI3K, может служить для обеспечения специфичности и точности выбора субстрата, а также может рассматриваться в качестве механизма пространственной целевой ориентации внутриклеточного сигнала.

Возможно, активации АКТ непосредственно зависит от способности киназы PI3K связываться с рецептором GPCR. Активация PI3K внеклеточными стимулами приводит к активации АКТ практически во всех клетках и тканях и киназа PI3K критически необходима для активации АКТ. В свою очередь, АКТ - первая эффекторная для PI3K молекула белка в клетках.

Напротив, гомолог фосфатазы и тензина (Phosphatase and tensin homologue, PTEN, еще называют опухолевый супрессор PTEN), основной отрицательный регулятор PI3K, дефосфорилирует PIP3 с образованием PIP2. Фосфатаза PTEN катализирует отщепление фосфатной группы в положении 3D инозитольного кольца фосфатидинозитол-3-фосфатов, тормозя передачу сигнала по PI3K/АКТ/mTOR-сигнальному пути.

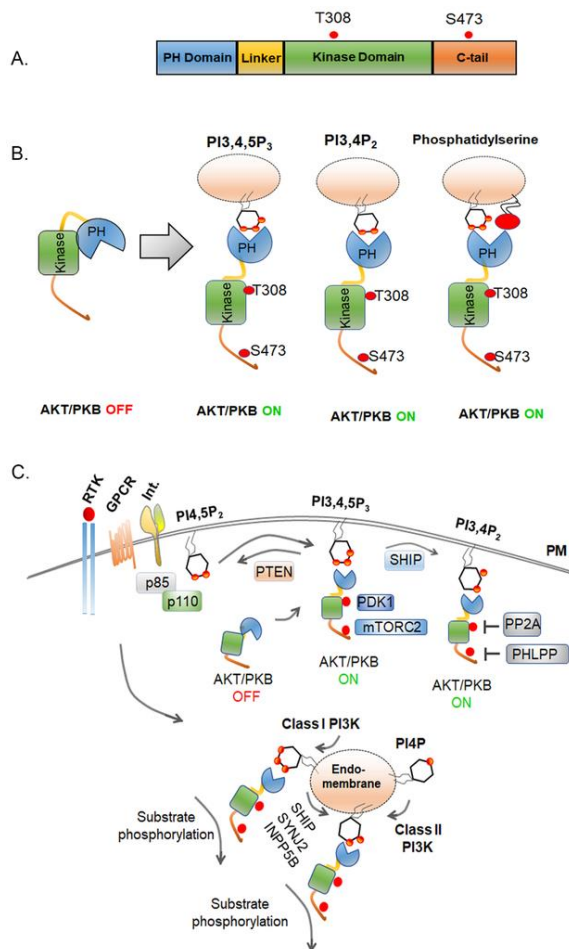


Рисунок 3.9. Структура АКТ-киназы (А), схемы ее активации (В) и функций (С). Цитировано по Narendra Thara и соавт., 2019.

Киназа АКТ (Ser/Thr киназа), также известная, как протеинкиназа В (РКВ), содержит три домена: гомологию плекстрина (pleckstrin homology, PH) PH-домен, который регулирует транслокацию АКТ к мембране и может связываться с липидными вторичными мессенджерами $PI3$ и $PI3,4P_2$ (в неактивной конформации АКТ домен PH является ингибирующим), консервативный киназный домен и гибкий С-концевой регуляторный домен. В нестимулированных условиях тесное взаимодействие между PH-доменом и киназным доменом удерживает АКТ/РКВ в закрытой и неактивной конформации, которая находится в цитозоле. Киназа АКТ присутствует в организме человека в трех изоформах (АКТ1 или РКВальфа, АКТ2 или РКВбета, а также АКТ3 или РКВгамма).

Изоформа АКТ1 экспрессируется во всех тканях, АКТ2 в основном экспрессируется в тканях, чувствительных к инсулину, таких как скелетные мышцы, жировая ткань и печень, а АКТ3 экспрессируется в семенниках и головном мозге.

Киназа АКТ активируется посредством двух последовательных этапов фосфорилирования. Аналогичные события фосфорилирования наблюдаются в соответствующих остатках аминокислот в АКТ2 (в положениях T309 и S474) и АКТ3 (в положениях T305 и S472). Перемещение как АКТ, так и киназы PDK1 (phosphoinositide-dependent protein kinase-1, PDK1) к мембранным сайтам накопления PIP3 или PI3,4P2 индуцирует конформационные изменения белка, обеспечивающие доступ фосфоинозитидзависимой протеинкиназе 1 PDK1 к АКТ для инициации процесса активации фосфорилированием в киназном домене в положении T308. Последующее фосфорилирование серина происходит в С-концевом регуляторном домене в положении 473 (АКТ1) через комплекс mTOR 2 (mammalian target of rapamycin 2, mTORC2), полностью активирующий АКТ. Протеинкиназная активность mTORC2 стимулируется факторами роста PI3K-зависимым образом, при этом PH-домен в компоненте SIN1 mTORC2 служит для связывания с PIP3, что приводит к ослаблению аутоингибирования активности киназы mTOR. Следовательно, вторичный мессенджер PIP3 может выполнять двойную функцию, как транслокацию mTORC2 к мембране, где рекрутируется АКТ, так и снятие конформационного ингибирования mTOR, позволяя фосфорилировать АКТ.

Данный этап активации сигнального пути также имеет собственную отрицательную регуляцию. В частности, сначала протеинфосфатаза 2A (PP2A), а затем домен PH фосфатазы повторов белка, богатых лейцином 1 и 2 (PH domain leucine-rich repeat protein phosphatases, PHLPP1 и PHLPP2),

последовательно дефосфорилируют АКТ в положениях T308 и S473, что приводит к инактивации АКТ.

Нарушения регуляторной функции АКТ приводят к различным патологиям человека, включая аномалии развития, онкологические заболевания, сердечно-сосудистые заболевания, развитие резистентности к инсулину и диабет 2 типа, воспалительные и аутоиммунные расстройства и неврологические расстройства.

Нижестоящие эффекторные молекулы белков, включая факторы транскрипции, белковые и липидные киназы, регуляторы малых G-белков и транспорта везикул, метаболические ферменты, убиквитинлигазы E3, регуляторы клеточного цикла и многие другие эффекторные белки, регулируются посредством фосфорилирования серина и/или треонина с помощью АКТ. Эти эффекторные белки имеют общий мотив минимальной последовательности, Arg-Xaa-Arg-Yaa-Zaa-Ser-Hyd. Открытие оптимального консенсусного мотива фосфорилирования АКТ способствовало выявлению более сотни субстратов АКТ, связанных с физиологией клеток и заболеваниями. Благодаря этим эффекторным белкам АКТ играет важную роль во многих клеточных процессах, таких как апоптоз, выживание клеток, регуляция клеточного цикла и метаболизма клетки.

Одной из ключевых мишеней активированной АКТ является Киназа 3 гликогенсинтазы (GSK3), присутствующая в двух изоформах GSK3альфа и бета, при этом специфические для изоформ функции были идентифицированы в конкретных тканях. Киназа GSK3 - один из ключевых регуляторов Wnt/ β -catenin-сигнального пути, кроме того субстратами GSK3 являются широкий спектр белковых молекул (факторы транскрипции и ключевые ферменты, контролирующие обменные процессы) большинство из которых ингибируются или разрушаются при фосфорилировании, опосредованном GSK3. Поэтому, передача сигналов

фактора роста через АКТ, сопровождающаяся инактивацией GSK3, положительно регулирует эти белки-мишени GSK3.

Важной мишенью АКТ являются белки-факторы транскрипции семейства Forkhead Box O (FoxO). Факторы транскрипции FoxO (FoxO1,3,4 и 6) оказывают влияние на экспрессию генов, регулирующих апоптоз, клеточный цикл и устойчивость к окислительному стрессу, принимают участие в метаболизме глюкозы, клеточной дифференциации, атрофии мышц, и регуляции энергетического гомеостаза. Передача сигналов по PI3K-АКТ-пути и активация АКТ приводит к транслокации белков FoxO из ядра в цитоплазму, что, в свою очередь, подавляет транскрипционную программу этих факторов. Таким образом, передача сигналов АКТ подавляет экспрессию генов-мишеней FoxO-факторов. АКТ контролирует эти факторы прямым фосфорилированием трех консервативных остатков на этих белках.

Комплекс туберозного склероза 2 (TSC2) и Комплекс mammalian target of rapamycin 1 (mTORC1). Сигнальный путь PI3K/АКТ выполняет важную роль в системе контроля роста клеток, тканей и организмов, опосредовано АКТ-зависимой активации протеинкиназного комплекса mTORC1, который стимулирует биосинтетические механизмы, определяющие процессы роста. Активация mTORC1 осуществляется АКТ опосредовано через G-белки (малые ГТФазы Rheb и Rag). В отсутствие факторов роста, при неактивном PI3K/АКТ-сигнальном пути, комплекс туберозного склероза (TSC) связывается с Rheb на лизосоме, удерживая его в связанном с ГДФ состоянии, неспособном активировать mTORC1. Активированная АКТ фосфорилирует TSC, высвобождая комплекс TSC и позволяет Rheb связаться с ГТФ (перейти в активное состояние) и локально активировать mTORC1, рекрутируемый белками комплекса Regulator-Rag – компонентом системы лизосомальной передачи сигналов и транспорта в эукариотических клетках.

3.4. Трансформирующий фактор роста бета/SMAD (transforming growth factor beta, TGFb)-сигнальный путь

Данная проблема подробно рассмотрена в современных обзорах литературы (Verrecchia F, Mauviel A., 2002; Massagué J. et al., 2005; Morikawa M. et al., 2016; Hata A., Chen Y.-G., 2016; Budi E.H. et al., 2017; Zhang Y.E., 2018; Hu H.-H. et al., 2018; Derynck R., Budi E.H., 2019; Goebel E.J. et al., 2019). Лиганды TGFb-сигнального пути включают в себя три класса цитокинов: TGFb, в честь которых названо семейство; костные морфогенетические белки (bone morphogenetic proteins, BMP-белки), названные в связи с их участием в развитии костей; и активины, которые играют важную роль в развитии мышечной ткани.

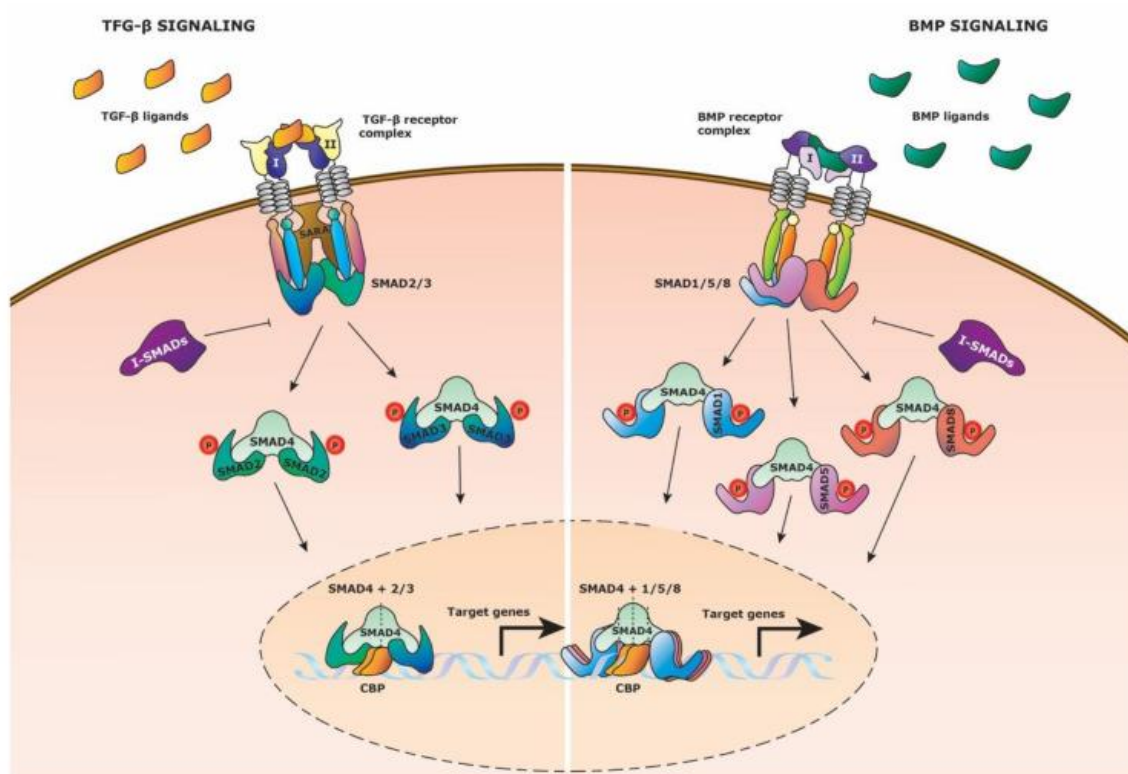


Рисунок 3.10. TGF-β/SMAD-сигнальный путь. Цитировано по Jolanda. J.D. de Roo и Frank. J.T. Staal, 2020.

Все белки семейства TGF- β синтезируются в виде предшественников с N-концевым сигнальным пептидом, за которым следует большой продомен, содержащий сайт расщепления фурипротеазой и C-концевой зрелый полипептид. Протеолитическое отщепление сигнального пептида и продомена фуриновыми протеазами превращает TGF- β в зрелый пептид. Продомен способствует корректному фолдингу молекул лигандов, кроме того, после протеолиза препропротеина продомен остается нековалентно связанным с TGF- β .

Все белки семейства содержат централизованный цистеиновый узел, отличительный признак других факторов роста, включая фактор роста нервов, фактор роста тромбоцитов и фактор роста эндотелия сосудов. Этот узел вносит значительный вклад в обеспечение фолдинга белка и его стабильности. Узел образован дисульфидными связями между остатками цистеина в положении 77 образует единственный межмолекулярный дисульфидный мостик, который приводит к образованию димера TGF- β . Таким образом, зрелый полипептид превращается в дисульфидно-связанный димер, который действует как лиганд для рецепторов клеточной поверхности и активирует передачу сигналов семейства TGF- β .

Однако, нековалентное связывание продоменов (продомен получили название «ассоциированный с латентностью пептид», LAP), с тремя зрелыми димерами TGF- β приводит к формированию латентных комплексов TGF- β , то есть предотвращает связывание TGF- β с рецепторами. Поэтому необходима активация латентных комплексов для высвобождения TGF- β -лиганда и связывания его с TGF- β -рецепторами. Формирование латентных комплексов не наблюдается у BMP и активинов. Латентный комплекс, образованный LAP и TGF- β получил название малый латентный комплекс LAP-TGF- β (SLC) продуцируется некоторыми клеточными линиями. Между тем TGF- β чаще всего откладывается в окружающем внеклеточном матриксе в виде большого латентного

комплекса (LLC), который состоит из SLC в комплексе с латентным TGF- β -связывающим белком (LTBR), дисульфидно связанным с двумя LAP. Существуют четыре фибриллин-подобных LTBR, которые кодируются разными генами. Три из них связываются в определенных комбинациях с SLC TGF- β , действуют как шапероны во время транспорта и секреции латентных комплексов TGF- β и способствуют отложению комплексов во внеклеточном матриксе. Большой латентный комплекс LLC остается во внеклеточном матриксе до тех пор, пока он не будет дополнительно активирован для высвобождения TGF- β . Например, большие латентные комплексы (LTBR) могут взаимодействовать с альфа ν бета6 интегрином, который может за счет энергии натяжения в латентном комплексе инициировать высвобождение лиганда для передачи сигналов. В тоже время, у некоторых других представителей данного семейства цитокинов, активация латентных комплексов возможна при участии металлопротеаз. Описанный механизм образования латентных комплексов TGF- β имеет важное практическое значение и его принцип взят за основу перспективных методов иммунотерапии онкологических заболеваний. Для данных сигнальных молекул важное значение имеет заряд. Например, лиганды BMP заряжены положительно, что обуславливает их способность напрямую взаимодействовать с гепарином или гепарансульфатом протеогликанов. Связывание с гепарином ограничивает их подвижность, заставляя их передавать сигналы по паракринному или аутокринному пути.

Кроме образования малых и больших комплексов, физиологическая активность лигандов семейства TGF β также может регулироваться широким спектром разнообразных внеклеточных белковых антагонистов. Большинство белков-антагонистов могут блокировать, как оба сайта связывания рецепторов типа I, так и двух сайтов связывания рецепторов типа II для предотвращения сборки рецептора и передачи сигналов.

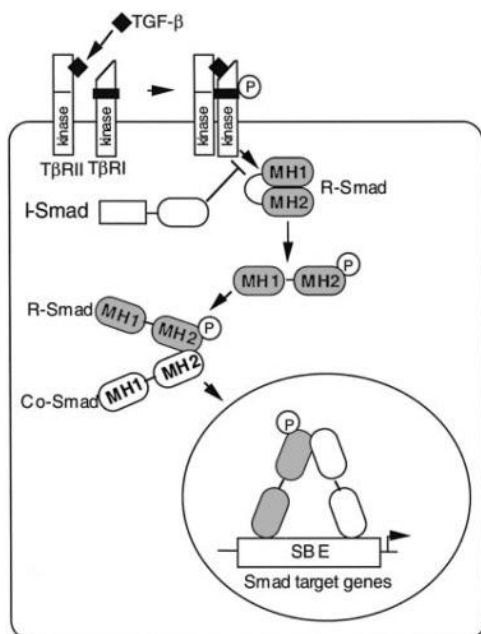


Рисунок 3.11. Взаимодействие лиганда TGF- β с рецепторами I и II типа на плазматической мембране. Цитировано по Franck Verrecchia 2002.

Рецепторы семейства TGF- β представляют собой трансмембранные гликопротеины. Рецепторы T β RII и T β RI имеют, соответственно, три и один сайт гликозилирования в своих внеклеточных доменах (эктодомен). Физиологически активные лиганды связывают и собирают два сигнальных рецептора (рецепторы I и II типа – Рис.11). Рецепторы как типа I, так и типа II имеют один эктодомен и внутриклеточный киназный домен. Передача сигналов инициируется, когда TGF- β связывается с рецепторами T β RII. В отсутствие TGF- β , T β RI и T β RII могут быть обнаружены на поверхности клетки в виде мономеров, гомодимеров, и гетеродимеры. Связывание лиганда стабилизирует тетрамерное взаимодействие двух молекул T β RII с двумя T β RI. TGF- β 1 и TGF- β 3 могут связывать T β RII независимо от рецептора типа I. Рецептор T β RI обладает более низким сродством к TGF- β 1 и TGF- β 3 и требуется T β RII для связывания с ними. Напротив, для связывания TGF- β 2 требуются, как T β RII, так и T β RI. Подобно TGF- β 1 и TGF- β 3, активины взаимодействуют главным образом со своими рецепторами типа II, и это связывание требуется для взаимодействия

активина с рецепторами типа I. Белки BMP имеют более высокое сродство к связыванию с рецептором типа I. Однако, предварительно сформировавшийся комплекс рецепторов типа II и типа I обеспечивает более эффективное связывание BMP. Для взаимодействия с большим количеством лигандов данного семейства имеется пять различных рецепторов типа II (TbRII, ActRIIa, ActRIIB, BMPRII и AMHRII) и семь рецепторов типа I (Alk1-7), где комбинация рецепторов типа I и типа II зависит от лиганда. В процессе эволюции разнообразие лигандов увеличивалось быстрее, чем разнообразие рецепторы. Поэтому существует гораздо большее количество лигандов, чем рецепторов типа I и типа II в результате чего рецепторы обладают относительно низкой селективностью и могут взаимодействовать с множеством лигандов. Из пяти рецепторов типа II - BMPRII, ActRIIa и ActRIIB взаимодействуют с несколькими лигандами, тогда как TbRII и AMHRII более ограничены в возможности связывания лигандов. В частности, TbRII высокоспецифичен для связывания с лигандами TGF β (TGF β 1-3), в то время как AMHRII обладает высокой избирательностью к анти-мюллеровому гормону (AMH). Рецепторы типа II, ActRIIa и ActRIIB взаимодействуют с активина и BMP. Рецептор BMPRII, как правило, взаимодействует с BMP, но в некоторых тканях может связывать активин.

Два типа рецепторов TGF- β структурно схожи, оба содержат гликозилированный и богатый дисульфидными связями эктодомен (на наружной поверхности плазматической мембраны), один трансмембранный сегмент и цитоплазматический киназный домен (на внутренней стороне плазматической мембраны). Киназные домены рецепторов TGF β не только обладают серин/треонинкиназной активностью, но также способны индуцировать фосфорилирование тирозина. Рецепторы типа I отличаются от рецепторов типа II наличием N-концевого домена, богатого глицин-серином (GS-домен), который регулирует активность киназы и связывание

белков Smad. После взаимодействия лиганда с рецепторами и сборки рецепторов конститутивно активная рецепторная киназа II типа фосфорилирует рецепторную киназу I типа, инициируя нисходящий сигнальный каскад фосфорилированием SMAD-белков. Несколько фосфатаз контролируют фосфорилирование рецепторов, в частности протеинфосфатазы PP1c и PP2A могут дефосфорилировать рецептор T β RI, в то время как не было выявлено фосфатаз, которые дефосфорилируют рецептор T β RII. Внутриклеточная передача сигнала лигандами TGF β и активинами осуществляется белками Smad2/3. В то время, как лиганды BMP используют для трансдукции белки Smad1/5/8. Передача сигналов белками Smad приводит к прямой активации или репрессии генов-мишеней. Наряду с этим связывание лигандов с рецепторами могут приводить к ответам клетки, не связанными со Smad-белками. Например, связывание лиганда может приводить к активации ряда киназ: extracellular signal-regulated kinase - Erk, p38 и C-Jun N-концевой киназы (JNK) mitogen-activated protein kinase - MAPK, активации малых ГТФаз. Возможно, внутриклеточная передача сигналов, зависящая или нет от участия Smad-белков, может определяться типом клетки и физиологическими условиями.

Только пять Smad-протеинов присутствуют у млекопитающих - Smad1, Smad2, Smad3, Smad5 и Smad8, которые являются субстратами рецепторов TGF β и активина. Обычно эти белки называют Smad, регулируемые рецепторами или RSmad. Группа белков Smads 1, 5 и 8 служат, главным образом, для внутриклеточной передачи сигналов BMP, а Smads 2 и 3 - для TGF β и активина. Белок Smad4 (иногда называют Co-Smad) служит общим для взаимодействия со всеми RSmad. Белки Smad6 и Smad7 являются ингибирующими Smad, которые препятствуют взаимодействиям Smad-рецептор или Smad-Smad. Активация рецепторов типа I сопровождается фосфорилированием и активированием рецепторспецифичных белков Smad или RSmad. Фосфорилирование RSmad активированным комплексом

рецепторов TGF β является ключевым событием в инициации передачи сигнала TGF β . При фосфорилировании белки R-Smad образуют гетеромерные комплексы с общим для всего семейства Smad-протеинов белком Smad4. Активированные R-Smads вместе со Smad4 накапливаются в ядре для регуляции экспрессии целевого гена. Активированный Smad3, либо в виде гомодимера, либо в комбинации с Smad2, может объединяться со Smad4 для воздействия на гены-мишени TGF- β /SMAD-пути. Только небольшое количество генов-мишеней TGF- β -сигнального пути реагируют на Smad2 без участия Smad3. Белки Smad состоят из двух глобулярных доменов, называемых Mad homology 1 (MH1) и MH2. Эти два домена удерживаются вместе с помощью линкера, богатого пролином. N-концевой домен MH1 служит ДНК-связывающим доменом, предназначенным для связывания с ДНК. В то время, как домен MH2 служит сайтом связывания для рецепторов типа I, для взаимодействия с компонентами комплекса ядерных пор (нуклеопоринами). Кроме того, домен MH2 участвует во взаимодействии с другими белками Smad, кофакторами, коактиваторами и корепрессорами этого сигнального пути. Комплекс RSmad–Smad4, образующийся при рецептор-опосредованном фосфорилировании RSmad, действует как ядро многих различных мультипротеиновых комплексов, которые нацелены на различные гены для активации или репрессии. Белки Smad в этом комплексе через свой домен MH1 могут связываться с ДНК, однако Smad-белки взаимодействуют с другими ДНК-связывающими факторами транскрипции и белками-кофакторами для обеспечения высокого сродства и селективности в отношении определенных генов-мишеней. Гены-мишени TGF- β /Smad имеют регуляторные последовательности ДНК (чаще всего последовательность AGAC или GTCT), которые рекрутируют комплексы Smad. В тандеме эти последовательности эффективно активируют транскрипцию, индуцированную TGF- β . Несколько генов, таких как ген SMAD7,

кодирующий ингибирующий Smad7, ген SERPINE1, кодирующий ингибитор 1 активатора плазминогена, или ген CDKN1A, кодирующий ингибитор циклин-зависимой киназы были установлены в качестве прямых генов-мишеней Smad, которые быстро индуцируются под воздействием TGF- β во многих типах клеток. В дополнение к генам, кодирующим белки, TGF- β также регулирует экспрессию некодирующих РНК, такие как микроРНК (miRNA) и длинные некодирующие РНК (lncRNA). В частности, семейство микроРНК-200 (miR-200a, -200b, -200c, -141 и -429) и miR-205 заметно подавляются в клетках, которые подверглись эпителиально-мезенхимальному переходу (EMT) в ответ на TGF- β .

Мутации генов, которые приводят к нарушению образования латентных комплексов TGF- β и повышают высвобождение активного TGF- β , были вовлечены в патогенез заболеваний соединительной ткани и заболеваний скелета. Болезнь Камурати–Энгельмана (Camurati–Engelmann disease, CED) характеризуется прогрессирующей диафизарной дисплазией с гиперостозом и склерозом диафизов длинных костей. Большинство людей в семьях CED имеют мутацию в области локуса гена TGF β 1, который кодирует LAP, что негативно влияет на димеризацию LAP, истощает запасы латентных форм TGF- β вне клетки и приводит к гиперактивации передачи сигналов TGF- β , тогда как в домене, кодирующем зрелый пептид TGF- β 1, мутаций не обнаружено.

Мутации в гене, кодирующем фибриллин-1, связаны с синдромом Марфана, что подчеркивает важную роль TGF-бета в патогенезе синдрома Марфана и подобных заболеваний соединительной ткани. Фибриллины, которые образуют внеклеточные микрофибриллы, связываются с LTBP-1 (семейство латентных TGF-бета-связывающих белков), который взаимодействует с LAP в LLC, следовательно, связывая этот комплекс с эластичными микрофибриллами.

Аневризма аорты при синдроме Лойса-Дитца, семейной аневризме грудной аорты также вызвана усиленной передачей сигналов TGF- β .

3.5. JAK/STAT-СИГНАЛЬНЫЙ ПУТЬ

Молекулярные механизмы JAK/STAT-сигнального пути и его медицинские аспекты рассмотрены в ряде современных обзоров литературы (Dreesen O., Brivanlou A.H., 2007; Li W.X., 2008; Vera J. et al., 2011; Pencik J. et al., 2016; Morris R. et al., 2018; Puigdevall L. et al., 2022). Цитокины, секретируемые в организме человека, можно подразделить на пять групп: (А) TNF-альфа и родственные цитокины, (Б) члены семейства IL-1, (В) TGF-Бета, (Г) факторы, которые сигнализируют через рецепторные тирозинкиназы, такие как M-CSF, (Д) хемокины, а также (Е) цитокины, которые сигнализируют через путь JAK/STAT. Т.е., последняя группа цитокинов и является лигандами JAK/STAT-сигнального пути (Рис.12). К данной группе цитокинов относятся гемопоэтические факторы (например, эритропоэтин), иммуномодулирующие цитокины (например, ИЛ-2) и воспалительные цитокины (например, гамма-интерферон). В этом сигнальном каскаде цитокин реализует внутриклеточный сигнал при участии только трех компонентов рецептора, фермента киназы и фактора транскрипции. Согласно классической схеме передачи сигналов JAK/STAT-пути инициируется связыванием пептидного лиганда (цитокина) с трансмембранными рецепторами. Это приводит к димеризации рецептора, тем самым вызывая активацию ассоциированных с рецептором киназ JAK путем фосфорилирования тирозина.

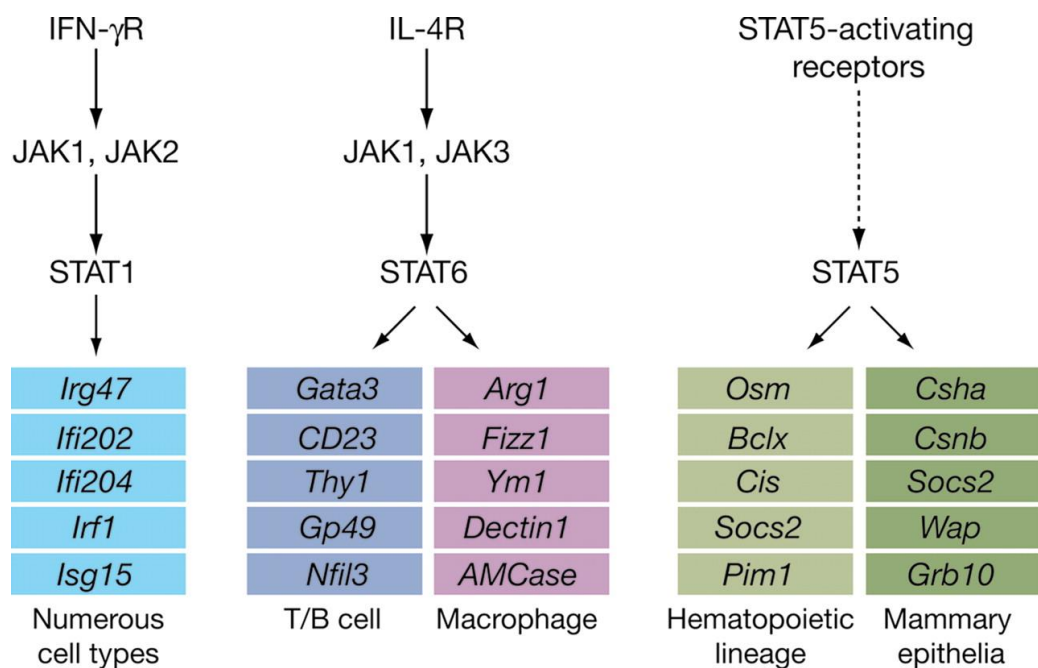


Рисунок 3.12. Лиганды JAK/STAT-сигнального пути. Цитировано по Peter J. Murray, 2007

Рецепторы содержат внутриклеточные домены, которые конститутивно связаны с JAK (Janus Kinase), ферментами семейства тирозинкиназ. У всех позвоночных есть четыре представителя семейства JAK: JAK1, JAK2, JAK3 и TYK2. Каждая из указанных киназ содержит около 1000 аминокислотных остатков. Молекула киназы подразделяется на четыре отдельных домена: N-концевого домена (FERM), за которым следует домен SH2 (Src-homology-2 (SH2)-domain) и два домена киназы. Первый из доменов киназы каталитически неактивен, является псевдокиназным доменом (JH2-домен). С-концевой киназный домен является каталитическим доменом в каждом JAK (JH1-домен). Киназы JAK неактивны до момента взаимодействия цитокинов с рецептором. Связывание цитокина с рецептором индуцирует их автоактивацию путем фосфорилирования. У млекопитающих существует четыре белка JAK и семь белков STAT. Каждый рецептор цитокинов активирует характерный набор индивидуальных белков JAK и STAT, который определяется структурой внутриклеточных доменов рецепторных цепей (рис.12).

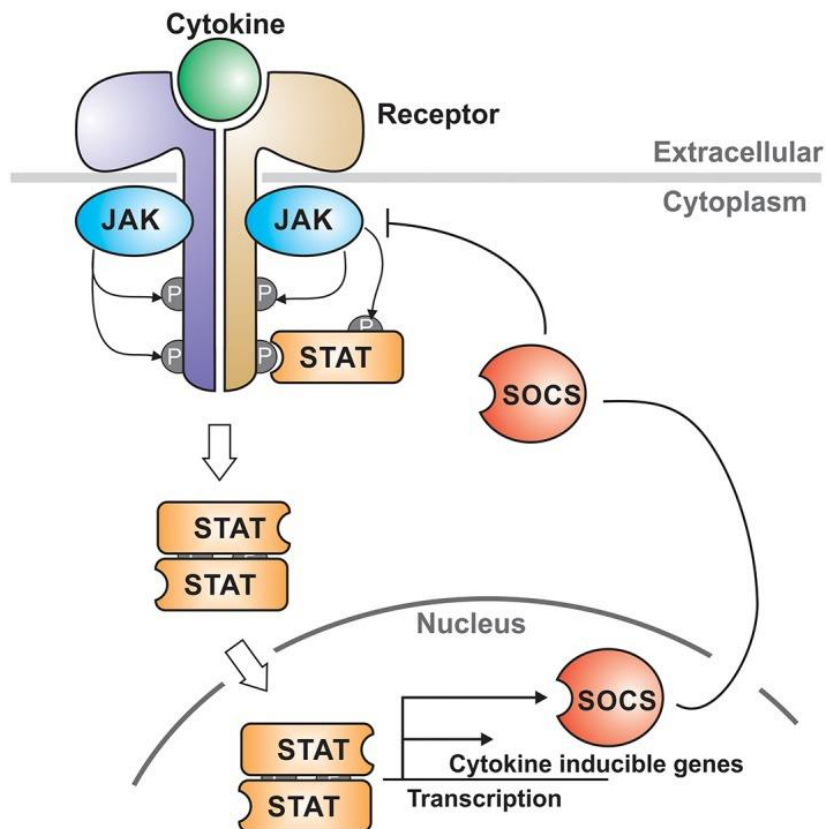


Рисунок 3.13. Путь передачи сигнала JAK/STAT-сигнального пути. Цитировано по Rhiannon Morris и соавторы, 2018.

При активации JAK фосфорилируют внутриклеточные хвосты рецепторов в специфических положениях остатков тирозина. Эти фосфотирозиновые остатки функционируют в качестве docking sites (сайты стыковки) для пока еще неактивных цитоплазматических белков STAT (Signal transducers and activators of transcription) - членов семейства факторов транскрипции. Белки STAT находятся в цитоплазме до момента связывания с рецептора цитокинами. У млекопитающих семейство STAT включает в себя семь белков: STAT-1, STAT-2, STAT-3, STAT-4, STAT-5a, STAT-5b и STAT-6. Белки STAT, в свою очередь, фосфорилируются JAK. Фосфорилированные белки STAT димеризуются, взаимодействуя фосфотирозинами в области SH2-домена (Src-homology-2(SH2)-domain) и импортируются в ядро, где они функционируют как активаторы транскрипции, индуцируя экспрессию генов-мишеней. Только в форме

димеров STAT приобретают способность перемещаться в ядро при участии белков импортинов. В ядре димеры связываются со специфическими последовательностями ДНК в промоторных областях, регулируя транскрипцию соответствующих генов-мишеней, поскольку белки STAT содержат ДНК связывающий домен. Димеры STAT образуют ножницеобразную структуру вокруг ДНК (стабилизированную взаимными взаимодействиями между SH2-доменами каждого из мономеров). При этом процессу транскрипции способствует дополнительное рекрутирование транскрипционных коактиваторов, например гистон-ацетилтрансферазы СВР/Р300. После диссоциации от ДНК STAT-факторы дефосфорилируются и могут быть экспортированы из ядра обратно в цитоплазму, поэтому доступны для следующего цикла фосфорилирования.

У млекопитающих, гены, регулируемые через JAK/STAT-сигнальный путь, могут принимать участие в механизмах положительной и отрицательной регуляции пути трансдукции. Было идентифицировано несколько негативных регуляторов пути, которые, как полагают, ответственны за "выключение" передачи сигналов JAK/STAT после активации. В этих процессах принимают участие специфические белки, экспрессия которых индуцируется после стимуляции цитокинами. К числу белков отрицательной регуляции JAK/STAT-пути относятся белковый ингибитор активированного STAT (PIAS), супрессор цитокиновой сигнализации (SOSC) и белковые тирозинфосфатазы (PTP). Ингибирующие белки взаимодействуют с фосфотирозиновыми участками рецепторов через домены SH2 (конкурируя с белками STAT), поэтому они рекрутируются только после фосфорилирования рецепторов. Например, белки SOCS содержат домены SH2, и связываются со специфическими участками рецептора для подавления передачи сигналов, конкурируя со STAT за ассоциацию с рецептором. Кроме того, белки SOCS связываются непосредственно с киназами JAK, препятствуя распознаванию субстрата, а

также способствуя убиквитинированию и последующей протеасомной деградации JAK. Тирозиновые фосфатазы, которые могут дефосфорилировать компоненты JAK/STAT-пути. Некоторые из фосфатаз содержат в своей структуре SH2-домена и могут присоединяться к любому фосфорилированному рецептору или фосфорилированной JAK-киназе и способствовать их инактивации за счет дефосфорилирования. В свою очередь, белковые ингибиторы активированного STAT (PIAS) связывают димеры STAT, а также ингибируют связь STAT-ДНК или рекрутирование факторов транскрипции. Кроме этого, белки PIAS могут инактивировать STAT, стимулируя его сумоилирование (ковалентное присоединение небольших белков SUMO - малый убиквитин-родственный модификатор). В данном случае PIAS-белок функционирует, как SUMO-лигаза.

Мутации или усиление сигнальных компонентов JAK/STAT, например рецептора эпидермального фактора роста (EGFR), актуальны при опухолях молочной железы, головного мозга и желудка, поскольку могут вызывать повышение чувствительности к митогенным сигналам и способствовать пролиферации. Кроме того, STAT3 конститутивно активируется в нескольких карциномах человека и при некоторых онкогематологических заболеваниях. Белок STAT3 устойчиво активен в более чем в 50% опухолей легких и молочной железы и более чем в 95% случаев рака головы и шеи.

Возможно, одной из важных причин онкологических заболеваний, вызванных нарушениями JAK/STAT-пути, являются мутации белков-компонентов сигнального пути. В частности, мутации, вызывающие устойчивую активность киназы JAK2, могут быть причиной онкогематологических заболеваний. При этом, конститутивная (независимая от лиганда) активация JAK может способствовать онкогенезу за счет устойчивой активации факторов транскрипции семейства STAT. Белки STAT нельзя считать типичными онкопротеинами, поскольку нет

сведений о мутациях STAT при онкологических заболеваниях. Например, STAT1 рассматривается как, супрессор опухолей, что, возможно, объясняется его ключевой ролью в передаче сигналов интерферонов, которые являются мощными ингибиторами клеточной пролиферации и промоторами апоптоза. Тем не менее, повышенный уровень активированного STAT3 часто наблюдается при злокачественных новообразованиях крови, а так же при онкологических заболеваниях молочной железы, легких и поджелудочной железы. Белок STAT3 рассматривается в качестве ключевого медиатора хронических воспалительных реакций, которые связаны со значительным повышением риска развития онкологических заболеваний. Возможно, в условиях постоянной активации JAK/STAT-пути онкогенные эффекты STAT3 могут быть связаны с подавлением апоптоза и стимуляцией клеточной пролиферации.

3.6. Notch-СИГНАЛЬНЫЙ ПУТЬ.

При подготовке данного раздела были использованы данные обзоров литературы D'souza B. и соавторы (2008; 2010), Gordon W.R. и соавторы (2008), Kopan R. и Pagan M. (2009), Wang M.M. (2011), Louvi A. и Artavanis-Tsakonas S. (2012), South A.P. и соавторы (2012), Bray S.J. (2016), Salazar J.L. и Yamamoto S. (2018), Katoh M. и Katoh M. (2020), Tyagi A. и соавторы (2020), D'Assoro A.B. и соавторы (2022), Zhou B. И соавторы (2022). Эволюционно консервативный сигнальный путь Notch функционирует как посредник межклеточной коммуникации. Данный сигнальный путь играет очень важную роль в процессах гистогенеза и органогенеза, поэтому аномальное усиление или потеря сигнальных компонентов Notch напрямую связаны с многочисленными заболеваниями человека. К этим заболеваниям относятся аномалии развития (тетрада Фалло, синдактилия, спондилококостальный дизостоз, наследственные нарушения аортального клапана), а также заболевания, проявляющиеся в зрелом возрасте (онкологические заболевания, болезнь Альцгеймера). Основные компоненты Notch-пути представлены рецепторами Notch, которые представляют собой крупные однопроходные (пересекают плазматическую мембрану один раз) трансмембранные белки I Типа, а также лигандами DSL (у млекопитающих представлены набором лигандов Jagged1-2 и Delta-like 1,3,4), которые ответственны за большинство эффектов передачи сигналов Notch. У млекопитающих имеется четыре типа рецепторов Notch. Внеклеточный домен всех белков Notch-рецепторов (Рис.14) содержит 29-36 тандемных повторов, подобных эпидермальному фактору роста (EGF), некоторые из которых опосредуют взаимодействия с лигандом. Многие повторы EGF связывают кальций, который играет важную роль в определении структуры и сродства Notch к его лигандам.

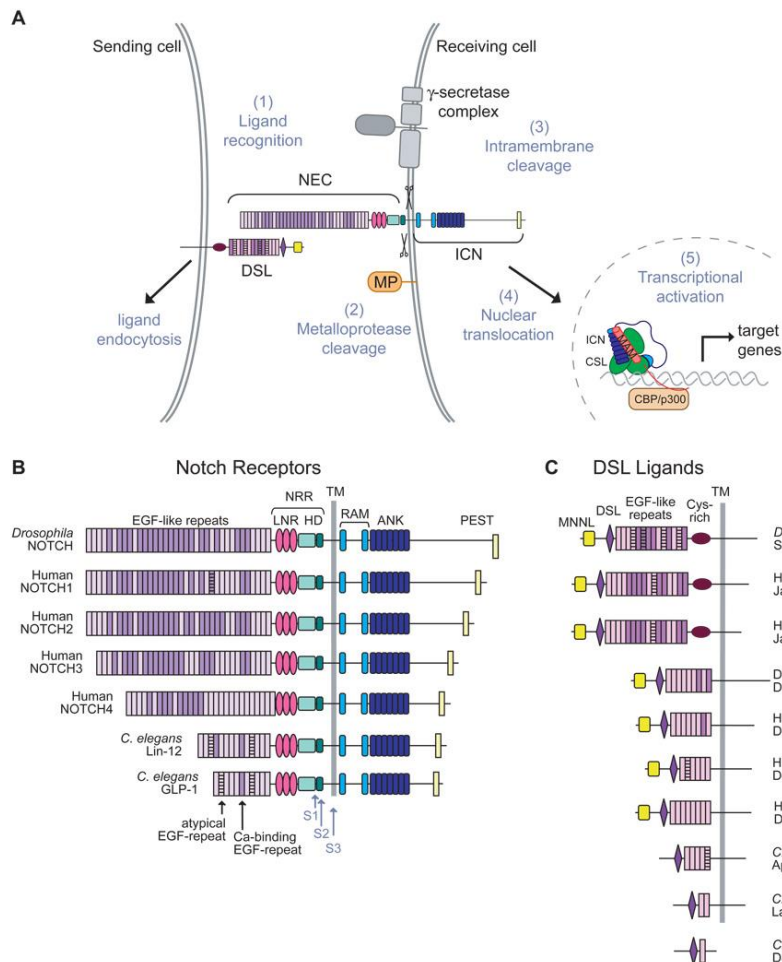


Рисунок 3.14. Сравнение белков-рецепторов Notch у человека, дрозофилы и нематод – основных объектов исследования для данного сигнального пути. Цитировано по Wendy R. Gordon и соавторы, 2008.

Классические лиганды, которые связывают и активируют рецепторы Notch, являются также, как и рецепторы интегральными белками клеточной мембраны. Таким образом, **активация передачи сигналов Notch-пути зависит от прямых межклеточных взаимодействий**. Поэтому, классическая схема передача сигналов Notch рассматривает передачу сигналов на короткие расстояния между двумя соседними клетками: **принимающая** сигнал клетка, экспрессирующая рецептор Notch на поверхности мембраны, и **передающая** сигнал клетка, экспрессирующая лиганд. Трансмембранная природа лигандов Notch между соседними

клетками служит для ограничения передачи сигналов локальными клеточными взаимодействиями (рис.15).

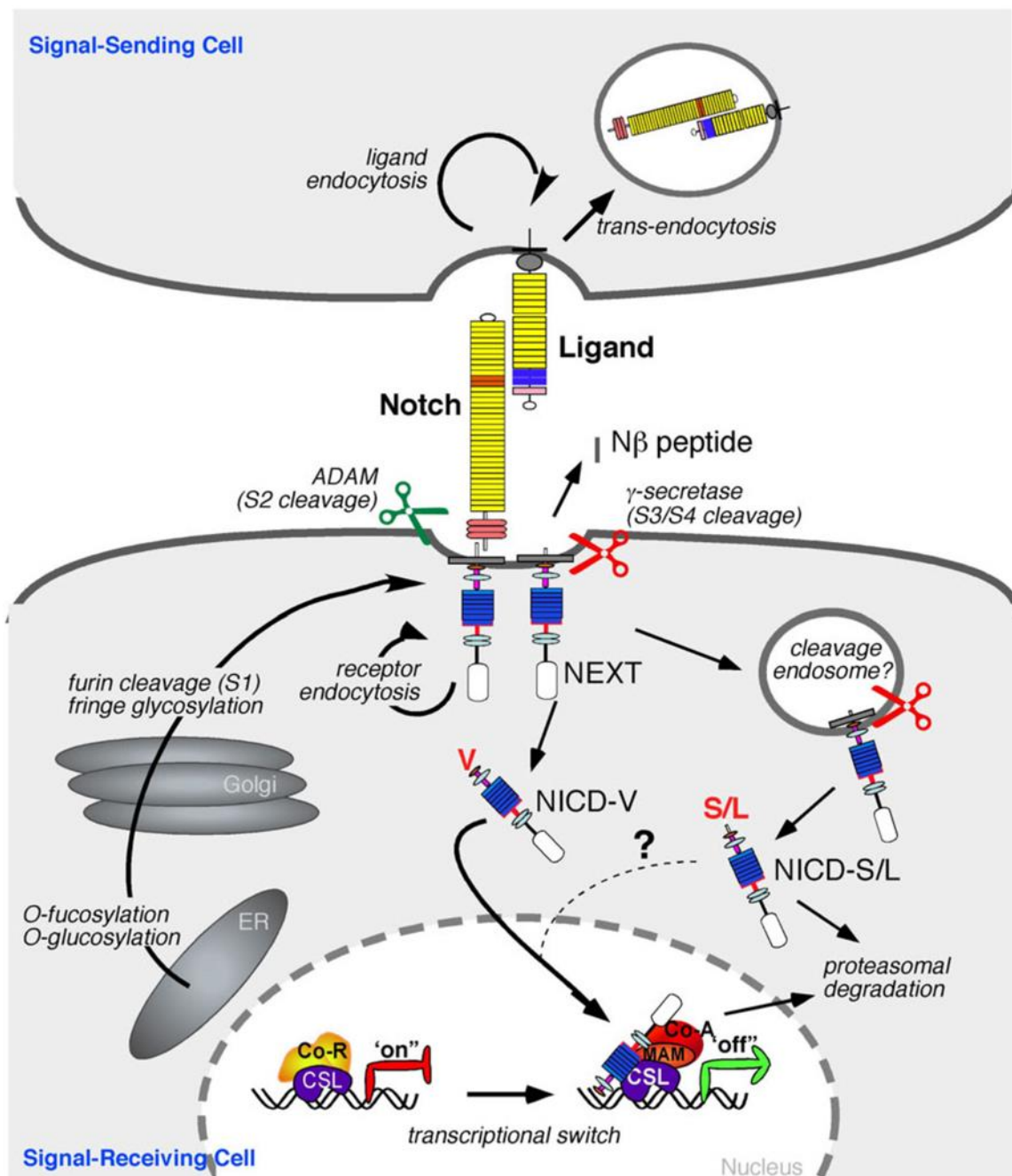


Рисунок 3.15. Принцип работы Notch-сигнального пути. Цитировано по Raphael Kopan и Maria Xenia G Ilagan, 2010.

В данном случае, механизм передача сигнала от одной клетке к другой осуществляет транс-регуляцию. В отличие от транс-взаимодействий (между клеткой, экспрессирующей лиганд Notch и клеткой, экспрессирующей

рецептор Notch), взаимодействия между лигандами Notch и рецепторами могут происходить в одной и той же клетке, которая одновременно и передает и принимает сигнал – цис-регуляция. Цис-регуляция, в отличие от транс-регуляции приводит к ингибированию передачи сигналов. Цис-ингибирование является важным механизмом для установления и поддержания полярности (однонаправленности) передачи сигналов, т.е. последовательном однонаправленном распространении сигнала от одной клетке к другой. В процессе дифференцировки клеток такая полярность необходима для определения специфической Notch-зависимого направления развития клеток. Возможно, некоторые лиганды Notch-сигнального пути специализированы для цис-передачи сигнала. Привлекает интерес, что у млекопитающих лиганд Dll3 функционирует только в цис-ингибирующем режиме и не обладает способностью активировать транс-передачу сигналов.

Классическими лигандами Notch-сигнального пути являются DSL(Delta-Serrate-Lag-2)-белки, которые, как и рецепторы Notch, содержат многочисленные тандемные повторы эпидермального фактора роста (EGF) в своих внеклеточных доменах. Лиганды DSL имеют общую модульную структуру своих внеклеточных участков, включающую N-концевой (NT) домен, за которым следует домен DSL и множество тандемно расположенных повторов, подобных эпидермальному фактору роста (EGF) (как кальцийсвязывающих, так и не связывающих кальций). В молекуле DSL первые два повтора EGF вместе с боковым N-концевым (NT) доменом и необходимы для связывания лигандов с Notch. Домен DSL представляет собой вырожденный EGF-подобный повтор, который необходим, но недостаточен для взаимодействия с рецептором Notch. В частности, мутации в домене DSL связаны с потерей передачи сигналов Notch как у позвоночных, так и у беспозвоночных. Внутриклеточные участки лигандов DSL содержат большое количество остатков лизина, которые являются

потенциальными сайтами для модификации различными убиквитинлигазами E3. Убиквитинирование имеет решающее значение для активации лигандами передачи сигналов Notch. Основываясь на структурной гомологии с двумя лигандами дрозофилы, Дельта и Serrate, канонические лиганды млекопитающих обозначаются либо, как Дельта-подобные (Dll1, Dll3 и Dll4), либо, как Serrate -подобные, к которым относятся два специфичных Jagged-лиганда, известных как Jagged1 и Jagged2 (Jag1 и Jag2). Особенность Jagged-лигандов в том, что они содержат почти в два раза больше повторов EGF, чем дельта-подобные лиганды, функция которых мало изучена. Предполагают, что Dll1 управляет дифференцировкой клеток и межклеточной коммуникацией, Dll3 подавляет рост клеток, индуцируя апоптоз, Dll4 активирует передачу сигналов фактора транскрипции NF-κB в усилении секреции сосудистого эндотелиального фактора (VEGF) и метастазирования опухоли, Jag1 усиливает ангиогенез, а Jag2 способствует выживанию и пролиферации клеток. Наличие нескольких белков-лигандов и рецепторов может оказывать существенное влияние на результаты передачи сигналов. Об этом свидетельствует тот факт, что у людей мутации разных типов рецепторов демонстрируют разные фенотипические проявления. Например, только мутации в рецепторе Notch3 вызывают CADASIL - церебральную аутосомно-доминантную артериопатию с подкорковыми инфарктами и лейкоэнцефалопатией. Тогда, как мутации в генах Notch1 и Notch2 вызывают соответственно синдром Адамса-Оливера и синдром Алагилла. Кроме того, рецепторы Notch1 и Notch2 оказывают противоположное влияние на рост одного и того же типа опухолевых клеток. Наряду с этим, Dll1 способствует миогенезу через временную активацию Notch1, тогда как Dll4 ингибирует миогенез через активацию Notch1. Следовательно, профиль экспрессии лигандов и рецепторов Notch влияет на взаимодействия

рецептор-лиганд и модулирует направление и интенсивность сигнальных каскадов Notch.

Во время посттрансляционного процессинга в аппарате Гольджи белок рецептора Notch подвергается гликозилированию гликозилтрансферазами семейства Fringe. Гликозилирование белка Notch жизненно важно для его стабильности и функционирования. Нарушение процессов гликозилирования ингибирует активность Notch-трансдукции. Далее, в аппарате Гольджи происходит еще один этап посттрансляционного процессинга гликозилированного предшественника рецептора, обусловленный воздействием фуриноподобной протеазы с образованием гетеродимера, который облегчает протеолитическую активацию зрелого рецептора Notch лигандом.

Передача сигналов, индуцируемая рецептором Notch после взаимодействия с лигандами, включает серию протеолитических расщеплений в рецепторе Notch, необходимых для высвобождения внутриклеточного домена, который функционирует непосредственно как биологически активный преобразователь сигнала. Взаимодействие с клетками-лигандами приводит к внеклеточному расщеплению Notch, катализируемому металлопротеазой семейства ADAM. Эта лиганд-зависимая стадия протеолиза образует форму рецептора, чувствительную к последующему внутримембранному расщеплению мультипротеиновым ферментативным комплексом гамма-секретазы. Внутримембранное расщепление гамма-секретазой приводит к высвобождению внутриклеточного домена Notch (Notch intracellular domain, NICD) из мембраны. Образовавшийся NICD, либо подвергается протеолизу в цитоплазме, либо импортируется в ядро, где он непосредственно участвует в передаче сигнала посредством образования комплекса с ДНК-связывающим белком CSL (С-промотор-связывающий фактор) и транскрипционными коактиваторами для включения экспрессии генов-

мишеней Notch. Белок CSL, (также называемый recombination signal binding protein-J, RBPJ) является повсеместным фактором транскрипции, который рекрутирует другие ко-факторы транскрипции для регуляции экспрессии генов. В отсутствие NICD белок CSL выступает в роли репрессора транскрипции, рекрутируя белки-корепрессоры и нейтрализуя деацетилазы гистонов. Присоединение NICD к белку CSL может приводить к изменению конформации CSL-репрессирующего комплекса, что сопровождается удалением ко-репрессоров и рекрутированием ко-активаторов для стимулирования транскрипции генов-мишеней. Гены-мишени передачи сигналов NOTCH в значительной степени определяются мотивом Su(H) в белке CSL, который отвечает за связывание ДНК. Классическими семействами генов-мишеней NOTCH являются Hairy/Enhancer of Split (HES), связанные с мотивом YRPW (HEY). Основные компоненты комплекса активации транскрипции, индуцированной NICD включают ДНК-связывающий транскрипционный фактор CSL, ICN и белок-коактиватор семейства Mastermind-like (MAML). Транскрипционный коактиватор Mastermind-подобный белок (MAML) является одним из основных ко-активаторов транскрипции, который может распознавать комплекс NICD-CSL и рекрутировать другие ко-активаторы. Активация транскрипции в сайтах связывания NICD/CSL также, по-видимому, зависит от рекрутирования дополнительных коактиваторов, таких как гистонацетилтрансферазы p300 и комплекс ремоделирования хроматина Brahma SWI/SNF. NICD/CSL-зависимую транскрипцию генов-мишеней Notch принято считать классическим путем передачи сигнального каскада Notch. Однако существуют и другие механизмы регуляции транскрипции, также зависящие от NICD. Поэтому, CSL-независимые пути передачи внутриклеточного сигнала Notch, такие как NICD-зависимая активация nuclear factor κ B (NF- κ B), а также NICD-зависимое ингибирование серин-протеинкиназы ATM (ATM-киназа фосфорилирует

несколько ключевых белков, которые инициируют остановку клеточного цикла, запускают репарацию ДНК или апоптоз) и Notch transmembrane domain (NTMd)-зависимая активация Ras-связанного субстрата 1 ботулинического токсина С3 (RAC1), определяются как неканонические сигнальные каскады Notch.

Уникальным аспектом роли DSL-лигандов в активации Notch является их строгое требование к эндоцитозу. **Т.е., лиганд на поверхности клетки, передающей сигнал, должен быть интернализован в клетках, передающих сигнал для активации Notch-рецептора клеткой, принимающей сигнал.** Кроме того, возможно эндоцитоз лигандов DSL играет решающую роль в усилении их сигнальной активности. В результате эндоцитоза лигандов запускается процесс моноубиквитинирования лигандов убиквитиновыми лигазами E3, специфически распознающими лиганды Дельта-типа, или лиганды Jagged. В результате, эндоцитоз способствует образованию более активных форм лиганда. В отсутствие эндоцитоза лиганды DSL накапливаются на поверхности клетки, где они неспособны активировать Notch. Возможно, роль эндоцитоза лиганда в активации передачи сигналов сопряжена с механическим усилием для отделения (Notch extracellular domain) NECD от интактного (стабильного, неактивного) рецептора Notch. Считается, что сила, создаваемая эндоцитозом лиганда в клетке, которая экспрессирует лиганд (передает сигнал), индуцирует конформационные изменения в клетке, которая экспрессирует рецептор (принимает сигнал). Предполагается, что эндоцитоз лигандов способствует конформационным изменениям Notch, необходимым для осуществления активирующего протеолиза рецептора, поскольку само по себе связывание с лигандом не могло бы вызвать его активацию. Протеолитическая активация передачи сигналов Notch включает специфическое поглощение внеклеточного домена Notch (NECD) клеткой-лигандом. Действительно, клетки-лиганды, с нарушениями

процессов эндоцитоза, связывают и кластеризуют Notch, они не интернализируют NICD и не активируют передача сигналов.

В отличие от других сигнальных систем, классическая активация Notch не приводит к существенному усилению сигнала, поскольку рецептор необратимо расщепляется, диссоциируется и разрушается во время трансдукции. Каждая молекула рецептора Notch подвергается протеолизу для генерации сигнала, следовательно, может осуществлять передачу сигнала только один раз. Поэтому, регулирование доступности лиганда или рецептора на поверхности клетки является ключевым для контроля активации Notch.

Унаследованные или соматические *de novo* мутации в генах человека, которые кодируют основные компоненты Notch-пути (рецепторы, лиганды и факторы транскрипции) могут вызывать различные наследственные болезни. Мутации рецепторов Notch могут оказывать влияние на их чувствительность к лиганду или стимулировать передачу сигнала в отсутствие лиганда. Наиболее распространенные мутации рецепторов Notch включают в себя точечные замены нуклеотидов или небольших делеции, вставки или дупликаций во внеклеточной области рецептора или трансмембранного домена, которые могут приводить к независимому от лиганда протеолизу и активации. Кроме того, имеет место нонсенс мутаций или мутаций со сдвигом рамки, которые приводят к удалению C-концевого домена (домен PEST) внутриклеточного сегмента рецептора. Домен PEST содержат сигналы деградации и имеют решающее значение для стабильности внутриклеточного домена NOTCH (NICD). Поэтому, мутации в домене PEST не влияют на активацию рецептора лигандом, но пролонгируют стимулирующую активность отщепленного NICD домена рецептора Notch. Активирующие мутации во внеклеточной области рецептора Notch1 наблюдаются более чем в 50% случаев рака. Передача сигналов Notch активируется при T-ALL (Т-лимфобластном лейкозе),

хроническом лимфоцитарном лейкозе, диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфоме, лимфоме клеток мантийной зоны, раке молочной железы и немелкоклеточном раке. Напротив, передача сигналов Notch инактивируется при плоскоклеточном раке кожи, плоскоклеточном раке головы и шеи (HNSCC) и плоскоклеточном раке пищевода.

Мутации лигандов также возможны и имеют важное медицинское значение. В частности, мутаций в гене лиганда Dll3 могут быть причиной семейного врожденного сколиоза, вызванного дисплазией позвоночника на этапе эмбрионального развития. Мутации в гене Jagged1 могут рассматриваться в качестве одной из причин развития синдрома Алагилла - аутосомно-доминантного заболевания, затрагивают многие ткани и органы, включая печень, скелет, почки, сердце.

ЛИТЕРАТУРА К ГЛАВЕ СИГНАЛЬНЫЕ ПУТИ

Василец Ю.Д., Арноцкая Н.Е., Кудрявцев И.А., Шевченко В.Е. Wnt-сигнальный каскад в патогенезе мультиформной глиобластомы//Успехи молекулярной онкологии.-2018.-Т.5,№4.-С.94–103
doi: 10.17650/2313-805X-2018-5-4-94-103

Домнинский Д.А. Механизмы реализации сигнальной трансдукции//Онкогематология.-2011.-Т.6,№1.-С.76-84
<https://doi.org/10.17650/1818-8346-2011-6-1-76-84>

Исаева А.В., Зима А.П., Шабалова И.П и соавт. β -Катенин: структура, функции и роль в опухолевой трансформации эпителиальных клеток//Вестник РАМН.-2015.-Т.70,№4.-С.475–483
doi: 10.15690/vramn.v70.i4.1415

Куликова К.В., Кибардин А.В., Гнучев Н.В. и соавт. Сигнальный путь wnt и его значение для развития меланомы//Современные технологии в медицине.-2012.-№3.-С.107-112

Катанаев В.Л. Внутриклеточная передача сигнала от wnt-лигандов и сопряженных с g-белками frizzled-рецепторов//Биохимия.-2010.-Т.75,вып.12.-С.1642 – 1650

Сковородникова П.А. и соавт. Скаффолд-белки семейства IQGAP – мультифункциональные регуляторы внутриклеточной сигнализации и опухолевой трансформации//Успехи молекулярной онкологии.-2017.-Т.4,№2.-С.35-45

doi: 10.17650/2313-805X-2017-4-2-36-45

Aoki M., Fujishita T. Oncogenic Roles of the PI3K/AKT/mTOR Axis//Curr Top Microbiol Immunol.-2017.-Т.407.-С.153-189

doi: 10.1007/82_2017_6

Bar-Shavit R., Maoz M., Kancharla A. et al. G Protein-Coupled Receptors in Cancer//Int J Mol Sci.-2016.-Т.17,№8.-С.1320

doi: 10.3390/ijms17081320

Bray S.J. Notch Signalling in context//Nat Rev Mol Cell Biol.-2016.-Т.17,№11.-С.722-735

doi: 10.1038/nrm.2016.94

Brivanlou A.H., Darnell J.E. Signal transduction and the control of gene expression//Science.-2002.-Т.295,№5556.-С.813-818

doi: 10.1126/science.1066355

Buday L., Tompa P. Functional classification of scaffold proteins and related molecules//FEBS J.-2010.-Т.277,№21.-С.4348-4355

doi: 10.1111/j.1742-4658.2010.07864.x

Budi E.H., Duan D., Derynck R. Transforming Growth Factor- β Receptors and Smads: Regulatory Complexity and Functional Versatility//Trends Cell Biol.-2017.-Т.27,№9.-С.658-672

doi: 10.1016/j.tcb.2017.04.005

Chan K.K., Lo R.C. Deregulation of Frizzled Receptors in Hepatocellular Carcinoma//Int J Mol Sci.-2018.-Т.19,№1.-С.313

doi: 10.3390/ijms19010313

D'Assoro A.B., Leon-Ferre R., Braune E.-B., Lendahl, U. Roles of Notch Signaling in the Tumor Microenvironment//Int. J. Mol. Sci.-2022.-Т.23.-С.6241
<https://doi.org/10.3390/ijms2311624>

de Roo J.J.D., Staal F.J.T. Cell Signaling Pathway Reporters in Adult Hematopoietic Stem Cells//Cells.-2020.-Т.9,№10.-С.2264

doi: 10.3390/cells9102264

Derynck R., Budi E.H. Specificity, versatility and control of TGF- β family signaling// *Sci Signal.*-2019.-T.12,№570.-C.eaav5183

doi: 10.1126/scisignal.aav5183

Dijksterhuis J.P., Petersen J., Schulte G. WNT/Frizzled signalling: receptor–ligand selectivity with focus on FZD-G protein signalling and its physiological relevance: *IUPHAR Review 3//British Journal of Pharmacology.*-2014.-T.171.-C.1195–1209

<http://dx.doi.org/10.1111/bph.2014.171.issue-5>

Dreesen O., Brivanlou A.H. Signaling Pathways in Cancer and Embryonic Stem Cells//*Stem Cell Rev.*-2007.-T.3,№1.-C.7-17

doi: 10.1007/s12015-007-0004-8

D'souza B., Miyamoto A., Weinmaster G. The many facets of Notch ligands//*Oncogene.*-2008.-T.27,№38.-C.5148–5167

doi:10.1038/onc.2008.229

D'souza B., Meloty-Kapella L., Weinmaster G. Canonical and non-canonical Notch ligands//*Curr Top Dev Biol.*-2010.-T.92.-C.73–129

doi:10.1016/S0070-2153(10)92003-6

Faes S., Dormond O. PI3K and AKT: Unfaithful Partners in Cancer//*Int. J. Mol. Sci.*-2015.-T.16.-C.21138-21152

doi:10.3390/ijms160921138

Goebel E.J., Hart K.N., McCoy J.C., Thompson T.B. Structural biology of the TGF β family//*Experimental Biology and Medicine.*-2019.-T.244.-C.1530–1546

doi: 10.1177/1535370219880894

Ghosh E., Kumari P., Jaiman D., Shukla A.K. Methodological advances: the unsung heroes of the GPCR structural revolution//*Nat Rev Mol Cell Biol.*-2015.-T.16,№2.-C.69-81

doi: 10.1038/nrm3933

Gordon W.R., Arnett K.L., Blacklow S.C. The molecular logic of Notch signaling: a structural and biochemical perspective//*J Cell Sci.*-2008.-T.121(Pt 19).-C.3109–3119

doi:10.1242/jcs.035683

Gurevich V.V., Gurevich E.V. Arrestin mutations: Some cause diseases, others promise cure//Prog Mol Biol Transl Sci.-2019.-T.161.-C.29–45
doi:10.1016/bs.pmbts.2018.09.004

Gurevich V.V., Gurevich E.V. Biased GPCR signaling: possible mechanisms and inherent limitations//Pharmacol Ther.-2020.-T.211.-C.107540
doi:10.1016/j.pharmthera.2020.107540

Hata A., Chen Y.-G. TGF- β Signaling from Receptors to Smads//Cold Spring Harb Perspect Biol.-2016.-T.8,№9.-C.a022061
doi: 10.1101/cshperspect.a022061

He Y., Sun M.M., Zhang G.G. et al. Targeting PI3K/Akt signal transduction for cancer therapy//Signal Transduct Target Ther.-2021.-T.6,№1.-C.425
doi: 10.1038/s41392-021-00828-5

Hodavance S.Y., Gareri C., Torok R.D. et al. G Protein-Coupled Receptor Biased Agonism//J Cardiovasc Pharmacol.-2016.-T.67,№3.-C.193–202
doi:10.1097/FJC.0000000000000356

Hu H.-H., Chen D.-Q., Wang Y.-N. et al. New insights into TGF- β /Smad signaling in tissue fibrosis//Chem Biol Interact.-2018.-T.292.-C.76-83
doi: 10.1016/j.cbi.2018.07.008

Huang X., Liu G., Guo J., Su Z. The PI3K/AKT pathway in obesity and type 2 diabetes//Int J Biol Sci.-2018.-T.14,№11.-C.1483-1496
doi: 10.7150/ijbs.27173

Katoh M., Katoh M. Precision medicine for human cancers with Notch signaling dysregulation (Review)//International journal of molecular medicine.-2020.-T.45.-C.279-297
doi: 10.3892/ijmm.2019.4418

Kopan R., Ilagan M.X.G. The Canonical Notch Signaling Pathway: Unfolding the Activation Mechanism//Cell.-2009.-T.137,№2.-C.216–233
doi:10.1016/j.cell.2009.03.045

Latek D., Modzelewska A., Trzaskowski B. et al. G protein-coupled receptors — recent advances//Acta Biochim Pol.-2012.-T.59,№4.-C.515–529

Li P., Elowitz M.B. Communication codes in developmental signaling pathways//Development.-2019.-T.146,№12.-C.dev170977
doi: 10.1242/dev.170977

Li W.X. Canonical and non-canonical JAK–STAT signaling//Trends Cell Biol.-2008.-T.18,№11.-C.545–551
doi:10.1016/j.tcb.2008.08.008

Logan C.Y., Nusse R. The wnt signaling pathway in development and disease//Annu Rev Cell Dev Biol.-2004.-T.20.-C.781-810
doi: 10.1146/annurev.cellbio.20.010403.113126

Louvi A., Artavanis-Tsakonas S. Notch and disease: A growing field//Semin Cell Dev Biol.-2012.-T.23,№4.-C.473–480
doi:10.1016/j.semcdb.2012.02.005

MacDonald B.T., Tamai K., He X. Wnt/ β -catenin signaling: components, mechanisms, and diseases//Dev Cell.-2009.-T.17,№1.-C.9–26
doi:10.1016/j.devcel.2009.06.016

Manning B.D., Toker A. AKT/PKB Signaling: Navigating the Network//Cell.-2017.-T.169,№3.-C.381–405
doi:10.1016/j.cell.2017.04.001

Massagué J., Seoane J., Wotton D. Smad transcription factors//Genes Dev.-2005.-T.19,№23.-C.2783-2810
doi: 10.1101/gad.1350705

Morikawa M., Derynck R., Miyazono K. TGF- β and the TGF- β Family: Context-Dependent Roles in Cell and Tissue Physiology//Cold Spring Harb Perspect Biol.-2016.-T.8,№5.-C.a021873
doi: 10.1101/cshperspect.a021873

Morris R., Kershaw N.J., Babon J.J. The molecular details of cytokine signaling via the JAK/STAT pathway//Protein Sci.-2018.-T.27,№12.-C.1984-2009
doi: 10.1002/pro.3519

Odoemelam C.S., Percival B., Wallis H. et al. G-Protein coupled receptors: structure and function in drug discovery//RSC Adv.-2020.-T.10.-C.36337-36348
doi: 10.1039/d0ra08003a

Oldham W.M., Hamm H.E. Heterotrimeric G protein activation by G-protein-coupled receptors//Nat Rev Mol Cell Biol.-2008.-T.9,№1.-C.60-71
doi: 10.1038/nrm2299

Pencik J., Pham H.T., Schmoellerl J. et al. JAK-STAT signaling in cancer: From cytokines to non-coding genome//Cytokine.-2016.-T.87.-C.26-36
doi: 10.1016/j.cyto.2016.06.017

Peterson Y.K., Luttrell L.M. The Diverse Roles of Arrestin Scaffolds in G Protein–Coupled Receptor Signaling//Pharmacol Rev.-2017.-T.69,№3.-C.256–297
doi: 10.1124/pr.116.013367

Porta C., Paglino C., Mosca A. Targeting PI3K/Akt/mTOR signaling in cancer//Front Oncol.-2014.-T.4.-C.64
doi: 10.3389/fonc.2014.00064

Puigdevall L., Michiels C., Stewardson C., Dumoutier L. JAK/STAT: Why choose a classical or an alternative pathway when you can have both?//J Cell Mol Med.-2022.-T.26,№7.-C.1865-1875
doi: 10.1111/jcmm.17168

Saini N., Sarin A. Spatial regulation and generation of diversity in signaling pathways//J Biosci.-2021.-T.46.-C.30
doi: 10.1007/s12038-021-00150-w

Salazar J.L., Yamamoto S. Integration of *Drosophila* and Human Genetics to understand Notch signaling related diseases//Adv Exp Med Biol.-2018.-T.1066.-C.141–185
doi:10.1007/978-3-319-89512-3_8

Schöneberg T., Schulz A., Biebermann H. et al. Mutant G-protein-coupled receptors as a cause of human diseases\\ Pharmacol Ther.-2004.-T.104,№3.-C.173-206
doi: 10.1016/j.pharmthera.2004.08.008

Schöneberg T., Liebscher I. Mutations in G Protein–Coupled Receptors: Mechanisms, Pathophysiology and Potential Therapeutic Approachess//Pharmacol Rev.-2021.-T.73.-C.89–119
<https://doi.org/10.1124/pharmrev.120.000011>

Seyedabadi M., Ghahremani M.H., Albert P.R. Biased signaling of G protein coupled receptors (GPCRs): Molecular determinants of GPCR/transducer selectivity and therapeutic potential//Pharmacol Ther.-2019.-T.200.-C.148-178
doi: 10.1016/j.pharmthera.2019.05.006

South A.P., Cho R.J., Aster J.C. The Double-Edged Sword of Notch Signaling in Cancer//Semin Cell Dev Biol.-2012.-T.23,№4.-C.458–464
doi:10.1016/j.semcdb.2012.01.017

Tao Y.-X. Inactivating mutations of G protein-coupled receptors and diseases: Structure-function insights and therapeutic implications//Pharmacol Ther.-2006.-T.111,№3.-C.949-73
doi: 10.1016/j.pharmthera.2006.02.008

Thapa N., Horn H. T., Anderson R.A. Phosphoinositide Spatially Free AKT/PKB Activation to all Membrane Compartments//Adv Biol Regul.-2019.-T.72.-C.1-6
doi:10.1016/j.jbior.2019.04.002

Thompson M.D., Percy M.E., Burnham W.M., Cole D.E. G Protein-Coupled Receptors Disrupted in Human Genetic Disease//Methods Mol Biol.-2008.-T.448.-C.109-137
doi: 10.1007/978-1-59745-205-2_7

Thompson M.D., Hendy G.N., Percy M.E. et al. G Protein-Coupled Receptor Mutations and Human Genetic Disease//Methods Mol Biol.-2014.-T.1175.-C.153-87
doi: 10.1007/978-1-4939-0956-8_8

Tyagi A., Sharma A.K., Damodaran C. A Review on Notch Signaling and Colorectal Cancer//Cells.-2020.-T.9,№6.-C.1549
doi: 10.3390/cells9061549

Ulloa-Aguirre A., Zariñán T., Jardón-Valadez E. Misfolded G Protein-Coupled Receptors and Endocrine Disease. Molecular Mechanisms and Therapeutic Prospects//Int. J. Mol. Sci.-2021.-T.22.-C.12329
<https://doi.org/10.3390/ijms222212329>

Vera J., Rateitschak K., Lange F. et al. Systems biology of JAK-STAT signalling in human malignancies//Prog Biophys Mol Biol.-2011.-T.106,№2.-C.426-34
doi: 10.1016/j.pbiomolbio.2011.06.013

Verrecchia F, Mauviel A. Transforming Growth Factor- β Signaling Through the Smad Pathway: Role in Extracellular Matrix Gene Expression and Regulation//J Invest Dermatol.-2002.-T.118,№2.-C.211-215
doi: 10.1046/j.1523-1747.2002.01641.x

Wang M.M. Notch signaling and Notch signaling modifiers//Int J Biochem Cell Biol.-2011.-T.43,№11.-C.1550–1562

doi:10.1016/j.biocel.2011.08.005

Willert K., Nusse R. Wnt Proteins//Cold Spring Harb Perspect Biol.-2012.-T.4,№9.-C.a007864

doi: 10.1101/cshperspect.a007864

Wootten D., Christopoulos A., Marti-Solano M. et al. Mechanisms of signalling and biased agonism in G protein-coupled receptors//Nat Rev Mol Cell Biol.-2018.-T.19,№10.-C.638-653

doi: 10.1038/s41580-018-0049-3

Xie Y., Shi X., Sheng K. et al. PI3K/Akt signaling transduction pathway, erythropoiesis and glycolysis in hypoxia (Review)//Molecular medicine reports.-2019.-T.19.-C.783-791

doi: 10.3892/mmr.2018.9713

Zalewska M., Siara M., Sajewicz W. G Protein-coupled receptors: abnormalities in signal transmission, disease states and pharmacotherapy//Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research.-2014.-T.71,№2.-C.229-243

Zhang Y.E. Mechanistic insight into contextual TGF- β signaling//Curr Opin Cell Biol.-2018.-T.51.-C.1-7

doi:10.1016/j.ceb.2017.10.001

Zhang Z., Yao L., Yang J. et al. PI3K/Akt and HIF-1 signaling pathway in hypoxia-ischemia (Review)//Molecular medicine reports.-2018.-T.18.-C.3547-3554

doi: 10.3892/mmr.2018.9375

Zhou B., Lin W., Long Y. et al. Notch signaling pathway: architecture, disease, and therapeutics//Signal Transduct Target Ther.-2022.-T.7,№1.-C.95

doi: 10.1038/s41392-022-00934-y

ГЛАВА IV. МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ ОПУХОЛИ: МЕХАНИЗМЫ ИНИЦИАЦИИ, ПРОМОЦИИ И ПРОГРЕССИИ

ВВЕДЕНИЕ

Опухолевые заболевания занимают ведущее место, как по уровню заболеваемости, так и по показателям смертности. Однако несмотря на успехи в изучении молекулярно-генетических закономерностей остается много нерешенных вопросов. С одной стороны, спектр молекулярных маркеров дает возможность диагностировать, прогнозировать течение, степень злокачественности, скорость прогрессирования опухоли и предсказывать возможный ответ на проводимую терапию. С другой стороны, те процессы, которые происходят на молекулярном уровне не характеризуются стабильностью, они динамичны и связаны с изменением генетического профиля – появлением множества клонов опухолевых клеток с разным набором свойств. Гетерогенность опухолевых заболеваний одновременно усложняет стратегию ведения таких пациентов, создавая предпосылки для дальнейшего изучения молекулярно-генетических характеристик опухолевых клеток.

CHAPTER IV. MOLECULAR BIOLOGY OF THE TUMOR: MECHANISMS OF INITIATION, PROMOTION AND PROGRESSION

INTRODUCTION

Tumor diseases occupy a leading place, both in terms of morbidity and mortality. However, despite the advances in the study of molecular genetic patterns, many unresolved questions remain. On the one hand, the spectrum of molecular markers makes it possible to diagnose, predict the course, degree of malignancy, rate of tumor progression and predict a possible response to the therapy. On the other hand, those processes that occur at the molecular level are not characterized by stability, they are dynamic and are associated with a change in the genetic profile - the appearance of many clones of tumor cells with a different set of properties. The heterogeneity of tumor diseases simultaneously complicates the strategy of managing such patients, creating the prerequisites for further study of the molecular genetic characteristics of tumor cells.

4.1. Типы опухоли. Классификация

Рак представляет собой группу заболеваний, характеризующуюся неконтролируемым ростом и распространением соматических или зародышевых клеток с дестабилизацией взаимодействия протоонкогенов, генов-супрессоров и генов репарации ДНК.

Нарушение процесса клеточной регуляции может инициироваться организмом вследствие различных мутационных событий, имеющих случайный либо наследственный характер. В связи с чем, все раки условно подразделяют на спорадические, наследственные и семейные.

Спорадический рак – самая частая форма (75-80% случаев) – встречается у пациентов с точечными мутациями в соматических клетках. Генетическая предрасположенность к спорадическому раку является мультифакторной. Установлены ассоциации полиморфизмов в генах, которые могут влиять на канцерогенез, включая гены, которые метаболизируют ксенобиотические агенты (цитохром P450, N-ацетилтрансферазы и глутатион-S-трансферазы), онкогены (гомолог вирусного онкогена саркомы крысы Харви), и гены, влияющие на метилирование ДНК (метилентетрагидрофолатредуктаза – MTHFR). Для некоторых из этих генов наблюдаются примерно 1,5-кратные различия в относительном риске между индивидуумами, которые несут восприимчивые и нечувствительные аллели.

Семейный рак (15-20%) определяется как онкопроцесс, встречающийся в семьях с относительно высокой частотой и в низком диагностическом возрасте по сравнению с населением в целом. Семейная группировка рака часто вызывается наследственными факторами с сильными последствиями. Например, у пациентов, страдающих семейным

аденоматозным полипозом (FAP), в кишечнике развиваются сотни полипов, поскольку они несут один связанный с раком аллель гена-супрессора опухолей аденоматозного полипа (APC) в своей зародышевой линии. Проникновение таких аллелей APC к раку толстой кишки очень высоко, приближаясь к 100%. Следовательно, восприимчивость к раку толстой кишки в семьях FAP наследуется по менделевскому типу как моногенная черта, и полиморфизмы в гене APC, которые вызывают FAP, могут быть идентифицированы с использованием прямого генетического подхода. Локус APC был картирован в хромосоме человека 5q21 с помощью анализа сцепления, после чего процедуры позиционного клонирования показали, что изменения зародышевой линии в гене APC были ответственны за фенотип FAP. Позже было доказано, что ген-супрессор опухолей APC также критичен для развития спорадического рака толстой кишки.

Наследственный опухолевый синдром (1-2%) – группа заболеваний с передачей предрасположенности к развитию рака по поколениям. Вызваны наследственными мутациями в генах, отвечающих за стабильность генома и регуляцию клеточного цикла. Аналитическая диагностика основана на возникновении опухолей в раннем возрасте, выявлении первично-множественных, синхронных/билатеральных опухолей, наличия нескольких пораженных членов семьи, редких типов рака (рак молочной железы у мужчин и др.).

Примерами наследственных форм рака являются синдром Линча (наследственный колоректальный рак без полипоза – мутации MSH2, MLH1, MSH6, PMS2), наследственный рак молочной железы и яичников (молочная железа, яичники, простата – ассоциируется с мутациями BRCA1 и BRCA2), синдром Ли-Фраумени (широкий спектр опухолей, среди которых рак молочной железы, лейкемия, опухоли головного мозга – мутация TP53), МЭН 2 типа (медуллярный рак щитовидной железы,

феохромоцитомы – мутация гена RET), синдром Гиппеля-Ландау (светлоклеточный рак почки – мутация APC) и др.

Многообразие форм злокачественных новообразований, их агрессивность независимо от наследственности связано с уникальностью раковой клетки обусловленной шестью основными изменениями клеточной физиологии, которые приводят к устойчивой злокачественной пролиферации: поддержание передачи сигналов пролиферативной активности, уклонение от ингибиторов факторов роста, блокирование механизма клеточного апоптоза, индукция ангиогенеза, неконтролируемая клеточная репликация, а также активация инвазии и метастазирования (Hanahan and Weinberg 2011).

Традиционная модель канцерогенеза представляет трансформацию «нормальной клетки» в «атипичную или диспластическую» с последующим прогрессированием в инвазивную злокачественную клетку. Это модель, которая предполагает стохастическую генерацию клеток, способных к поведению метастазирования и прогрессирования клеточной гетерогенности рака. Усиленная и устойчивая пролиферация клеток является наиболее фундаментальным признаком раковых клеток и одним из наиболее важных признаков рака, который может быть идентифицирован с помощью ряда гистологических, биохимических и проточных цитометрических методов.

Морфологическая диагностика неоплазии построена на локализации первичного очага, верификации признаков тканевой и цитологической атипии, а также иммунофенотипировании опухолевого роста.

Существует более 10000 различных видов опухолей, характеристики которых постоянно систематизируются и реклассифицируются, в том числе с учетом молекулярной патологии неоплазии.

Согласно Международной классификации онкологических болезней выделяют 6 основных видов злокачественных новообразований по гистогенезу:

1. Карцинома – характеризуется эпителиальным происхождением. В зависимости от типа эпителия подразделяется на плоскоклеточную, железистую (аденокарцинома) и нейроэндокринную;

2. Саркома – мезенхимальные злокачественные опухоли мягких тканей: соединительной, мышечной, жировой, сосудов и т.д.;

3. Карциносаркома – новообразование с морфологией эпителиального и мезенхимального злокачественных компонентов;

4. Меланома – меланоцитарные опухоли пигментные и беспигментные;

5. Опухоли лимфоидной (лимфома) и гемопоэтической тканей (лейкоз, миелома);

6. Бластома – дизэмбриогенетические опухоли из клеток-предшественников.

Важным диагностическим и прогностическим критерием при оценке опухолевого роста является степень клеточной анаплазии, определяющая степень агрессивности клинического течения. С точки зрения биологии клетки дифференцировка – комплекс процессов, посредством которых клетки-предшественники становятся полноценными в функциональном отношении. Хорошо дифференцированные раковые клетки похожи на нормальные клетки и имеют тенденцию расти и распространяться медленнее. При этом, плохо дифференцированные или недифференцированные клетки эволюционно приближены к стволовым, не имеют функциональной спецификации, не связаны межклеточными взаимодействиями, что обеспечивает максимальную скорость роста и метастазирования.

В зависимости от степени клеточной анаплазии опухоли подразделяют на:

1. Высокодифференцированные (G1) низкой степени злокачественности – морфология опухоли напоминает нормальные структуры ткани;

2. Умереннодифференцированные (G2) – умеренной степени злокачественности – наличие как характерных структур, так и солидного компонента, в котором клетки утрачивают способность к специфической тканевой организации;

3. Низкодифференцированные (G3), высокой степени злокачественности – преобладает солидный компонент, однако возможна морфологическая верификация раковой клетки с позиции ее тканевой принадлежности (эпителиальная, лимфоидная и т.д.);

4. Недифференцированные (анапластические, G4), высокой степени злокачественности – тканевая принадлежность не может быть установлена рутинными методами, т.к. клетки выглядят как стволовые

4.2. Стадии канцерогенеза

Канцерогенез — это многофакторный, многостадийный процесс, связанный с рядом изменений генетического материала клетки: генетических и эпигенетических повреждений клетки. В мутационный процесс вовлечены различные функциональные системы [Аничков Н.М., 2001].

Обычно клетки подвергаются нескольким уровням регуляции: экстраклеточным (например, TGF- β), внутриклеточным (сигнальная трансдукция) и межклеточным взаимодействиям (анионно-ионные щелевые контакты).

В опухолевых клетках изменяются регуляторные механизмы, а межклеточные взаимодействия отсутствуют. Основными свойствами опухолевых клеток является бессмертность, потеря контроля роста и/или его ингибирование, невозможность терминальной дифференцировки, способность к инвазии, сепарации клеток и ангиогенезу. Не менее важным в регуляции, контроле численности клеточных популяций и своевременной элиминации измененных «своих» клеток является индукция апоптоза. При канцерогенезе роль апоптоза определяется несостоятельностью механизмов элиминации предопухолевых клеток.

Апоптоз — высокорегулируемый (модифицируемый) процесс, сила и направленность которого зависит от соотношения в клетке уровня экспрессии про- и антиапоптотических факторов. Процесс модифицируется цитокинами (IL-1 β , TNF- α и др.), активными формами кислорода (оксид азота), патогенами в результате их адаптации внутри организма (например, CagA, VacA *H. pylori*). Канцерогенез ассоциирован с гипоксией,

воспалением, иммунными реакциями. В результате на опухолевые клетки в избытке воздействуют апоптоз-модулирующие агенты. Здесь необходимо учитывать причины мутационного процесса со спецификой патогенного воздействия (химические, физические, вирусные и бактериальные канцерогены).

По мере накопления знаний о генетике опухоли этиопатогенетические представления также эволюционировали. Современная теория канцерогенеза основана на **интегративном понимании вклада всех существующих ранее теорий происхождения опухоли** (Yoshioka K.-i., 2019 Высоцкая И.В. , 2019) Согласно этой теории выделяют следующие дефиниции. Клетки-мишени, в которых происходит первоначальная мутация – стволовые клетки. Гены-мишени – это специфические онкогены и опухолевые супрессоры – протоонкогены. Факторы повреждения – мутации и эпигенетические изменения в клетках-мишенях и генах-мишенях. Механизм опухолевого развития – клональная экспансия (опухолевая промоция) и геномная нестабильность (опухолевая прогрессия), которая реализуется в результате накопления соответствующих повреждений (Yoshioka K.-i., 2019 Fidler, I.J. 2016, Lee, J.K.; 2016).

В механизме развития опухолевых заболеваний выделяют сменяющие друг друга стадии канцерогенеза: инициация, промоция, прогрессия и метастазирование.

На этапе инициации действует специфический раздражитель (канцероген) вызывающий мутации в протоонкогенах. В результате мутаций протоонкогены становятся онкогенами (таблица 1). Антионкогены, наоборот, супрессируются и также становятся онкогенами (Лыжко Н.А. 2017). Клетка пока еще с неизменным фенотипом - предрак (Высоцкая И.В. , 2019) Характерно нарушение контроля функций, важных для

жизнедеятельности клетки: клеточного роста, деления и дифференцировки. Период времени от первого воздействия канцерогена на ткань до появления видимой глазом опухоли называется латентным.

Таблица 4.1

Биологическая функция протоонкогенов и антионкогенов

Гены	Функция	Роль в канцерогенезе	Примеры
Протоонкогены	<ul style="list-style-type: none"> - транскрипция - MYC, - рост – SIS, PDGF, Neu, EDF-R - клеточный цикл - Rb, - передача сигналов – RAS, G-белок 	<p>Активируются при мутации (амплификации). Начинается гиперэкспрессия. Расцениваются как доминантные мутации</p>	<p>ERB2 экспрессируется при раке молочной железы</p>
Антионкогены (супрессоры)	<ul style="list-style-type: none"> - ростовые ингибиторы – TGFβ, глюкокортикоиды - рецепторы ростовых ингибиторов - ингибиторы белковых сигналов - транскрипционные факторы ростовых ингибиторов 	<p>Деактивация. По функциональному значению являются рецессивными мутациями. Потеря контроля пролиферации.</p>	<p>При раке молочной железы, ретинобластома, остеосаркома – BRCA-1/BRCA-2</p> <p>P53</p>

Гены, мутации которых являются ключевыми на этапе инициации: **регуляторы клеточной пролиферации, транскрипционные факторы, клеточного цикла, репарационной системы.**

– **RAS** (Rat sarcoma — саркома крысы). известно, что более 30 % всех форм опухолевых заболеваний сопровождаются мутациями в одном из трех канонических генов этого семейства (H-ras, N-ras и K-ras). Ras представляют собой ГДФ/ГТФ-связывающие белки. Связываются с поверхностными

клеточными рецепторами различных гормонов и факторов роста. Регулируют процессы клеточной пролиферации, роста и дифференцировки. Мутации Ras приводят к повышенной выработке белковых рецепторов гуанозин трифосфатов, что также отражается на пролиферативных способностях опухолевых клеток (например, гиперэкспрессия H-ras при раке желудка)(Высоцкая И.В. , 2019) [Лихтенштейн А.В. 2014, Кушлинский Н.Е., 2014. Aguirre-Ghiso JA. 2007 Egeblad M, 2010. Аничков Н.М. 2003 Fernandez A 2010].

– **Семейство MYC.** Белок p57 MYC взаимодействует с 2-х спиральной ДНК клетки и действует как транскрипционный фактор ряда генов – в том числе протоонкогенов.

- Благодаря «правильному» функционированию p53, а также таких антионкогенов, как Rb (retinoblastoma) и APC (adenomatous polyposis coli), происходит регуляция процесса ухода клетки в апоптоз или репарацию (Высоцкая И.В. , 2019). Кроме того, отменяется запрет на пролиферацию клеток с различными аномалиями. Такие белки называются сторожами генома (gatekeepers). (Лыжко Н.А. 2017) Нарушение функций белков, которые контролируют апоптоз и/или клеточный цикл вызывается мутациями супрессорных генов **p53, MCC, APC** (регистрируется у 30-65% больных раком желудка, обычно при кишечной форме).

Системы репарации и распознавания ДНК-повреждений называются смотрителями (caretakers), например, PARP — поли(АДФ-рибоза)-полимеразы (Лыжко Н.А. 2017) У человека идентифицировано более 150 генов и более 400 ферментов, участвующих в различных вариантах репарации (Высоцкая И.В. , 2019). **Репарационные системы, которые причастны к канцерогенезу:** (1) система репарации 2-х нитевых разрывов ДНК; (2) система репарации неспаренных оснований (mismatch repair); (3) система эксцизионной репарации. (Лыжко Н.А. 2017). 80–90 % опухолей

имеют дефекты в генах системы репарации. (Высоцкая И.В. , 2019) [Junttila MR, 2009, Плешкан В.В., 2011 Ковалева О.В., 2014 Berger АН,2011, Jones RG, 2009. Berdasco M, 2010].

Такой механизм способствует появлению клеточных клонов, содержащих все больше и больше вновь возникающих мутаций.

Стадия промоции характеризуется клональной экспансией в инициаторных клетках. Причиной этого этапа могут быть канцерогены и/или различные неспецифические раздражители (промоторы), различные по своей природе. Промотор вызывает усиление пролиферации «дремлющих» опухолевых клеток — незрелых клеток исходной ткани. На этом этапе инициированные клетки приобретают опухолевый фенотип (Высоцкая И.В. , 2019). Стимуляция роста в предопухолевых клетках происходит под действием митогенных ростовых факторов, гормонов, или как результат компенсаторной гиперплазии в очагах некроза клеток.

Клетки опухоли являются самодостаточными в реализации механизмов клеточной пролиферации, для них характерно снижение потребности в ростовых сигналах. (Лыжко Н.А. 2017) Опухолевые клетки секретируют необходимые ростовые факторы, селективно увеличивается количество рецепторов для них. Это создает условия для реализации каскада пролиферативных реакций даже в отсутствии ростовых факторов. Например, при кишечной форме раке желудка гиперэкспрессированы онкогены эпидермальных факторов роста EGF, Erb-B2, Erb-B3.

Характерным для опухолевых клеток является уменьшение чувствительности к ростиингибирующим сигналам (например, цитокинам, инактивация чекпойнтов, дисфункция опухолевых супрессоров, например SKI). (Лыжко Н.А. 2017)

Еще один механизм – способность опухолевой клетки генерировать сигналы к размножению внутри себя (активация протоонкогенов *cdk4* и *cdk2*).

Характерным явлением для опухолевых клеток принято считать иммортализацию. Если для неизмененных клеток такое явление невозможно за счет ограничительного процесса – уменьшения длины теломер (число Хйфлика или репликационное старение), то у раковых клеток теломераза активна (Лыжко Н.А.. 2017).

Следующая стадия канцерогенеза – **прогрессия**. Генотипически и фенотипически измененные клетки неограниченно делятся, образуя опухоль. Механизмы, которые способствуют этому – мутационные или эпигенетические повреждения генетической информации (на уровне генов и/или хромосом). Способствующими факторами мутагенеза могут быть: (1) факторы окружающей среды (например, курение, алкоголь, действие каких-либо генотоксических веществ), (2) ошибки репарации, (3) ошибки репликации. (Лыжко Н.А. 2017)

Процессы деструкции, некроза, воспаления в самой опухоли приводят к тому, что появляются клетки с разными мутациями. Генотип опухоли в моноклональную стадию разительно отличается от такового в поликлоновую стадию. В эту стадию в опухоли присутствует множество генотипических вариантов клеток, что осложняет терапевтические возможности.

Важным процессом опухолевой прогрессии является **неоангиогенез**. Клетки опухоли стимулируют пролиферацию и миграцию эндотелиальных клеток. Реализация этого феномена достигается за счет генетической нестабильности, которая происходит постоянно. Быстро размножающиеся клетки опухоли находятся в постоянной борьбе за выживание – конкуренция за питательные вещества (ловушка глюкозы, аминокислот и

др.), доступность кислорода, инициация воспаления и цитопатического воздействия на собственные клетки и окружающие ткани, взаимодействие с иммунной системой. В результате такой борьбы остаются только наиболее приспособленные клеточные клоны.

Кроме того, клетки опухоли реализуют несколько механизмов «ухода от иммунологического надзора». Это достигается за счет выброса иммуносупрессивных цитокинов (TGF- β) и создания противоопухолевого микроокружения, снижение антигенной нагрузки и уровня экспрессии генов МНС класса I, отсутствие костимулирующих молекул, защищающих опухолевые клетки от распознавания иммунной системой (Лыжко Н.А. 2017). Клетки опухоли характеризуются примитивностью антигенных детерминант и постоянным антигенным дрейфом. Таким образом, клетка остается «невидимой» для Т-лимфоцитов.

Взаимодействие с киллерными лигандами опухолевых клеток запускает механизм апоптотического разрушения лимфоцитов. Наличие собственной антигенности особенно в поликлоновую стадию ослабляет механизмы иммунной защиты (Тешелова В.Т. 2003 Bindea G, 2010 Grivennikov S, 2010. Высоцкая И.В. , 2019)

Метастазирование. Изменения цитоскелета и адгезионные взаимодействия (ухудшение прикрепления клеток к внеклеточному матриксу), дезорганизация системы актиновых микрофиламентов (изменение активности псевдоподий и подвижности клеток) - механизмы, обеспечивающие инвазию и метастазирование. (Лыжко Н.А. 2017 Pastushenko, I.; 2019).

Потеря экспрессии CDH1 (E-cadherin), молекул межклеточной адгезии, является ключевым фактором эпителиально-мезенхимального перехода, патогенного события, связанного с повышенным инвазивным и метастатическим потенциалом Petrova, Y.I.; 2016 Например, при раке

желудка обнаружены мутации E-кадгерина (E-cadherin). В норме этот ген экспрессирует кадгерины – кальций-содержащие белковые молекулы, выполняющие важную роль в межклеточных сцеплениях. При мутации этого гена и инактивации кадгеринов облегчаются механизмы миграции и отрыва клеток из первичного очага. Мутация E-кадгерина чаще фиксируется при недифференцированном диффузном раке желудка.

4.3. Молекулярно-генетическая характеристика канцерогенеза

Известно, что для возникновения трансформированного клеточного клона требуется 5–9 мутаций в разных протоонкогенах и антионкогенах. Многие виды рака демонстрируют высокую степень генетической гетерогенности.

Канцерогены, чье действие не затрагивает генетический материал клетки и которые выступают в роли промоторов, называют эпигенетическими канцерогенами. К ним относятся цитотоксические эффекты, хроническое травмирование тканей, эндокринопатии, приводящие к иммунодефициту и другим расстройствам функциональных систем.

Патогенез рака характеризуется широким спектром генетических изменений – генных (малые, например, единичные нуклеотидные изменения, вставки или делеции; и большие, например, амплификации/делеции генов) (Vishwakarma R., 2020), геномных (изменение числа хромосом, или анеуплоидия) и хромосомных мутаций (изменение структуры хромосом), а также эпигеномного ремоделирования хромосом (метилование ДНК, модификация гистонов, изменение микроРНК-профиля). Мутации ведут к нарушению регуляции важнейших сигнальных путей клетки, изменению ответной реакции организма на воздействие факторов окружающей среды. В свою очередь происходит нарушение клеточного цикла, дифференцировки клеток, процессов репарации ДНК и апоптоза.

По отношению к канцерогенезу все мутации можно разделить на пассажирские и драйверные. Именно драйверные запускают механизмы,

приводящие к дисфункции генов онкогенов.

К причинам, вызывающим мутации, относится ряд факторов экзогенной и эндогенной природы. В том числе, хроническое бактериальное, вирусное и паразитарное воспаление, в результате которого инициируются механизмы канцерогенеза (на пример каскад Коррея, когда инфекция *H. pylori* (канцероген 1 порядка) последовательно приводит к изменениям слизистой оболочки желудка – атрофии, метаплазии, неоплазии и раку (Маев И.В., 2006 Correa M.,2012). Другими примерами вирусов с доказанными онкогенными свойствами являются вирус гепатита С, вирус Эпштейн-Барр, вирус папилломы человека. Мутации также накапливаются с возрастом (например, в пищеводе, крови, коже) (Tomasetti, C.; 2017 Martincorena, I.; 2018, Yokoyama, A.; 2019 Yokoyama, A.; 2019 Martincorena, I.; 2015 Matsuno, Y.; 2019).

Кроме мутаций, к возникновению опухолевых клеток приводят эпигенетические механизмы. В данном случае происходит повреждение генетического материала на уровне генной экспрессии: транскрипция (метилирование ДНК или ацетиляция ядерных белков), трансляция (альтернативный сплайсинг мРНК) и посттрансляционная модификация белка (модификация белков путем фосфорилирования или нитролиза).

Молекулярные механизмы развития рака рассматривают с позиции нескольких молекулярных фенотипов – генетическая нестабильность, хромосомная нестабильность, эпигенетическая (микросателлитная) нестабильность и потери гетерозиготности. (Yoshioka K.-i., 2019). (Matsuno, Y.; 2019).

Генетическая нестабильность Основными ее причинами являются ошибки при репликации ДНК из-за уменьшения точности воспроизведения генетической информации. Неправильная работа системы репарации

приводит к появлению низкоточных ДНК-полимераз β , ϵ (экспрессия онкогенов BCR/ALB RAS) (Biron-Shental, T.; 2015. Nicholson, J.M.; 2015, Zhu, J.; 2018). В результате в течение длительного времени в геноме накапливаются двойные разрывы ДНК, которые в дальнейшем ассоциированы с клональной экспансией. (Matsuno, Y.; 2019). (Лыжко Н.А. 2017).

Другой причиной генетической нестабильности будут механизмы, связанные с ослаблением индукции апоптоза, что дает возможность выживания клеток с нарушенным геномом (например, потеря экспрессии клетки рецепторов к TNF α , инактивация опухолевых супрессоров p53 и PTEN, изменение экспрессии белков семейства bcl-2; потеря экспрессии ARAF-1 активации протоонкогенов RAS, PKB/Akt или инактивация опухолевого супрессора PTEN). ((Лыжко Н.А. 2017) .

Хромосомная нестабильность может возникать в результате появления 2-х центромерных хромосом, что в свою очередь формирует многополярные митозы - сегрегация хромосом при митозе и анеуплоидные клетки (за увеличение числа хромосом отвечает активация онкогена RAS и инактивация опухолевых супрессоров p53 APC BRCA1). Тем не менее, при генетических и хромосомных мутациях клетка продолжает делиться, этому способствует нарушение регуляции клеточного цикла, реализации программы клеточной гибели, а также дифференцировки (например, ослабление функции чекпойнтов клеточного цикла, нечувствительность к действию ростиингибирующих цитокинов и индукторов дифференцировки - TGF β). (Лыжко Н.А. 2017)

Микросателлитная нестабильность. Мутации или эпигенетические изменения гена MMR (mismatch repair), включая hMLH1 и hMSH2, ответственны за снижение экспрессии белка hMLH1 или hMSH2, что является результатом инактивации гена вследствие гиперметилирования

промотора [Simpson A.J., 2001.]. (панель Bethesda) встречается от 5 до 50 % всех карцином желудка со значительными различиями в разных этнических группах. В случаях карцином желудка с высоким уровнем микросателлитной нестабильности задействованы гены, регулирующие клеточный цикл и апоптотические сигналы, такие как TGF β RII, IGFIIR, TCF4, RIZ, BAX, CASPASE5, FAS, BCL10 и APAF1 [Iacopetta B.J., 1999.].

При РЖ с микросателлитной стабильностью или низким уровнем микросателлитной нестабильности преобладают мутации в гене p53 [Iacopetta B.J., 1999.]. Гены hMSH6, hMSH3, MED1, RAD50, BLM, ATR и MRE11 чаще мутируют в клетках антрального отдела желудка. Такие опухоли относятся к интестинальному типу рака, характеризуются редким метастазированием в лимфатические узлы и лучшим прогнозом в плане выживаемости в сравнении с карциномами с высоким уровнем микросателлитной нестабильности [Corso G., 2009.].

Потеря гетерозиготности. Потеря гетерозиготности часто наблюдается в тех же самых плечах хромосом, включая 1p, 3p, 4p, 4q, 5q, 6q, 7p, 8p, 8q, 9p, 10q, 12p, 13q, 16q, 17p, 18q, 20q и 22q [Buffart T.E., 2009.]. Некоторые хромосомные сегменты включают в себя гены, вовлеченные в канцерогенез, такие как ген p53 на 17 хромосоме, гены DCC, DPC4 и SMAD2 на 18 хромосоме и гены APC и MCC на 5 хромосоме. Опухоли с потерей гетерозиготности с локализацией на хромосомах 5q, 18q или 17p имеют худший прогноз [Bamias A.T., 2003.]. Процесс, при котором происходит превращение нормальной клетки, но с повышенным риском трансформации, в раковую сформулирован в называемую двухударную теорию канцерогенеза. В данном случае высокий риск трансформации клетки в раковую связан с наличием онкогенной мутации в виде рецессивного аллеля. В дальнейшем в результате мутационного события происходит потеря здорового доминантного аллеля. Клетка начинает

безостановочно делиться, что приводит к возникновению злокачественной опухоли.

Метилирование CpG островков. Гены, имеющие отношение к развитию опухоли, такие как APC, CDH1, MHL1, CDKN2A, CDKN2B и RUNX3, часто подвергаются метилированию. Причиной инактивации генов CDKN2A, CDH1 и MLH1 в большинстве случаев является именно метилирование промотора, а не мутации [Ushijima T., 2004.]. Например, метилирование генов имеет отношение к прогнозу при РЖ. Метилирование генов-супрессоров опухолей CDH1, DKK3, PTEN, MGMT, а также генов-супрессоров опухолей TFPI2 и SASCNA2D3 и других генов, имеющих отношение к опухолям, таким как PCDH10 [Yu J., 2009.] и SOX2 [Otsubo T., 2008.], ассоциировано с низкой продолжительностью выживания. Пациенты с комбинацией нескольких маркеров метилирования (APC и CDH1) относятся в группу с неудовлетворительным прогнозом [Leung W.K., 2005.]. В некоторых случаях метилирование единичных генов APC, M1 региона MA1 промотора и циклооксигеназы-2 (COX2) ассоциировано с длительной выживаемостью [Buffart T.E., 2008.].

Таким образом, мутации (реактивная форма канцерогена), ассоциированные с канцерогенезом воздействуют на потенциально онкогенные гены, которые в свою очередь делятся на протоонкогены, антионкогены и гены-модуляторы (их более 50). Экспрессия измененного генома клетки, содержащего онкогены и инактивированные гены-супрессоры опухолей, патологически меняет клеточный фенотип.

ЛИТЕРАТУРА К ГЛАВЕ МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ ОПУХОЛИ

1. Tomasetti, C.; Li, L.; Vogelstein, B. Stem cell divisions, somatic mutations, cancer etiology, and cancer prevention. *Science* 2017, 355, 1330–1334
2. Martincorena, I.; Fowler, J.C.; Wabik, A.; Lawson, A.R.J.; Abascal, F.; Hall, M.W.J.; Cagan, A.; Murai, K.; Mahbubani, K.; Stratton, M.R.; et al. Somatic mutant clones colonize the human esophagus with age. *Science* 2018, 362, 911–917.
3. Yokoyama, A.; Kakiuchi, N.; Yoshizato, T.; Nannya, Y.; Suzuki, H.; Takeuchi, Y.; Shiozawa, Y.; Sato, Y.; Aoki, K.; Kim, S.K.; et al. Age-related remodelling of oesophageal epithelia by mutated cancer drivers. *Nature* 2019, 565, 312–317.
4. Martincorena, I.; Roshan, A.; Gerstung, M.; Ellis, P.; Van Loo, P.; McLaren, S.; Wedge, D.C.; Fullam, A.; Alexandrov, L.B.; Tubio, J.M.; et al. High burden and pervasive positive selection of somatic mutations in normal human skin. *Science* 2015, 348, 880–886.
5. Matsuno, Y.; Atsumi, Y.; Shimizu, A.; Katayama, K.; Fujimori, H.; Hyodo, M.; Minakawa, Y.; Nakatsu, Y.; Kaneko, S.; Hamamoto, R.; et al. Replication stress triggers microsatellite destabilization and hypermutation leading to clonal expansion in vitro. *Nat. Commun.* 2019, 10, 3925.
6. Vishwakarma R., McManus K.J. Chromosome Instability; Implications in Cancer Development, Progression, and Clinical Outcomes *Cancers* 2020, 12, 824; doi:10.3390/cancers12040824
7. Fidler, I.J. Commentary on “Tumor Heterogeneity and the Biology of Cancer Invasion and Metastasis”. *Cancer Res.* 2016, 76, 3441–3442.
8. Lee, J.K.; Choi, Y.L.; Kwon, M.; Park, P.J. Mechanisms and Consequences of Cancer Genome Instability: Lessons from Genome Sequencing Studies. *Annu. Rev. Pathol.* 2016, 11, 283–312.
9. Petrova, Y.I.; Schecterson, L.; Gumbiner, B.M. Roles for E-cadherin cell surface regulation in cancer. *Mol. Biol. Cell* 2016, 27, 3233–3244.

10. Pastushenko, I.; Blanpain, C. EMT Transition States during Tumor Progression and Metastasis. *Trends Cell Biol.* 2019, 29, 212–226.
11. Biron-Shental, T.; Liberman, M.; Sharvit, M.; Sukenik-Halevy, R.; Amiel, A. Amniocytes from aneuploidy embryos have enhanced random aneuploidy and signs of senescence-can these findings be related to medical problems? *Gene* 2015, 562, 232–235.
12. Nicholson, J.M.; Macedo, J.C.; Mattingly, A.J.; Wangsa, D.; Camps, J.; Lima, V.; Gomes, A.M.; Doria, S.; Ried, T.; Logarinho, E.; et al. Chromosome mis-segregation and cytokinesis failure in trisomic human cells. *Elife* 2015, 4
13. Zhu, J.; Tsai, H.J.; Gordon, M.R.; Li, R. Cellular Stress Associated with Aneuploidy. *Dev. Cell* 2018, 44, 420–431.
14. Yoshioka K.-i., Matsuno Y., Hyodo M., Fujimori H. Genomic-Destabilization-Associated Mutagenesis and Clonal Evolution of Cells with Mutations in Tumor-Suppressor Genes *Cancers* 2019, 11, 1643; doi:10.3390/cancers11111643
15. Высоцкая И.В. , Летягин В.П. , Шабанов М.А. , Кирсанов В.Ю. , Ким Е.А. , Левкина Н.В. Актуальные вопросы канцерогенеза *Клиническая онкогематология.* 2019;12(1):101–6
16. Аничков Н.М., Плотникова Н.А. О морфологии и классификации опухолеподобных и раковых поражений предстательной железы. *Архив патологии.* 2001;63(5):44–50. [Anichkov NM, Plotnikova NA. On the morphology and classification of prostate tumors and cancerous lesions. *Arkhiv patologii.* 2001;63(5):44–50. (In Russ)]
17. Исследования рака: бег с препятствиями. *Биохимия.* 2014;79(5):493–500. [Likhtenshtein AV. Cancer research: a hurdle race. *Biokhimiya.* 2014;79(5):493– 500. (In Russ)]
18. Кушлинский Н.Е., Немцова М.В. Молекулярно-биологические характеристики злокачественных новообразований. *Вестник РАМН.* 2014;69(1–2):5–15. doi: 10.15690/vramn.v69i1-2.934. [Kushlinskii NE,

Nemtsova MV. Molecular biological characteristics of cancer. *Annals of the Russian academy of medical sciences*. 2014;69(1–2):5–15. doi: 10.15690/vramn.v69i1-2.934 . (In Russ)]

19. Aguirre-Ghiso JA. Models, mechanisms and clinical evidence for cancer dormancy. *Nat Rev Cancer*. 2007;7(11):834–46. doi: 10.1038/nrc2256. 22. Coghlin C, Murray GI. Current and emerging concepts in tumour metastasis. *J Pathol*. 2010;222(1):1–15. doi: 10.1002/path.2727.

20. Egeblad M, Nakasone ES, Werb Z. Tumors as organs: complex tissues that interface with the entire organism. *Dev Cell*. 2010;18(6):884–901. doi: 10.1016/j.devcel.2010.05.012.

21. Аничков Н.М. Биологические и клиничко-морфологические аспекты учения о метастазировании злокачественных опухолей. *Медицинский академический журнал*. 2003;1:3–13. [Anichkov NM. Biological and morphological aspects of the doctrine of metastasis of malignant tumors. *Meditinskii akademicheskii zhurnal*. 2003;1:3–13. (In Russ)]

22. Fernandez A, Esteller M. Viral epigenomes in human tumorigenesis. *Oncogene*. 2010;29(10):1405–20. doi: 10.1038/onc.2009.517

23. Junttila MR, Evan GL. p53 – a Jack of all trades but master of none. *Nat Rev Cancer*. 2009;9(11):821–9. doi: 10.1038/nrc2728.

24. Плешкан В.В., Алексеенко И.В., Зиновьева М.В. и др. Промоторы со специфической активностью в раковых клетках при генной терапии меланомы. *Acta Naturae*. 2011;3(2):14–23. [Pleshkan VV, Alekseenko IV, Zinov'eva MV. Promoters with cancer cell-specific activity for melanoma gene therapy. *Acta Naturae*. 2011;3(2):14–23. (In Russ)]

25. Ковалева О.В., Назарова О.Р., Матвеев В.Б., Грачев А.Н. Молекулярные особенности почечно-клеточного рака: ранняя диагностика и перспективы терапии. *Успехи молекулярной онкологии*. 2014;1(2):36–43. [Kovaleva OV, Nazarova OR, Matveev VB, Grachev AN.

Molecular features of renal cell carcinoma: early diagnosis and perspectives for therapy. *Uspekhi molekulyarnoi onkologii*. 2014;1(2):36–43. (In Russ)]

26. Berger AH, Knudson AG, Pandolfi PP. A continuum model for tumour suppression. *Nature*. 2011;476(7359):163–9. doi: 10.1038/nature10275.

27. Jones RG, Thompson CB. Tumor suppressors and cell metabolism: a recipe for cancer growth. *Genes Dev*. 2009;23(5):537–48. doi: 10.1101/gad.1756509.

28. Berdasco M, Esteller M. Aberrant epigenetic landscape in cancer: how cellular identity goes awry. *Dev Cell*. 2010;19(5):698–711. doi: 10.1016/j.devcel.2010.10.005

29. Маев И.В., Зайратьянц О.В., Кучерявый Ю.А. Кишечная метаплазия слизистой оболочки желудка в практике гастроэнтеролога: современный взгляд на проблему. *Росс. журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии*. 2006; 4: 38—47.

30. Correa M., Piazuelo B. The gastric precancerous cascade. *J. Dig. Dis*. 2012; 13(1): 2—9

31. Hanahan D, Weinberg RA. *Hallmarks of cancer: the next generation*. *Cell* 2011 Mar 4;144(5):646-74 Abstract available at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21376230>.

32. Yoshioka K.-i., Matsuno Y., Hyodo M., Fujimori H. Genomic-Destabilization-Associated Mutagenesis and Clonal Evolution of Cells with Mutations in Tumor-Suppressor Genes *Cancers* 2019, 11, 1643; doi:10.3390/cancers11111643

33. Лыжко Н.А. Молекулярно-генетические механизмы инициации, промоции и прогрессии опухолей *Российский биотерапевтический журнал* 4'2017 Том 16 . 7-17

34. Тешелова В.Т. Канцерогенез и активация периферических лимфоцитов. *Успехи современной биологии*. 2003;123(5):495–505. [Teshelova

VT. Carcinogenesis and activation of peripheral lymphocytes. *Uspekhi sovremennoi biologii*. 2003;123(5):495–505. (In Russ)]

35. Bindea G, Mlecnik B, Fridman WH. Natural immunity to cancer in humans. *Curr Opin Immunol*. 2010;22(2):215–22. doi: 10.1016/j.coi.2010.02.006.

36. Grivennikov S, Greten FR, Karin M. Immunity, inflammation and cancer. *Cell*. 2010;140(6):883–99. doi: 10.1016/j.cell.2010.01.025. 45. Mougiakakos D, Choudhury A, Lladser A, et al. Regulatory T cells in cancer. *Adv Cancer Res*. 2010;107:57–117. doi: 10.1016/S0065-230X(10)07003-X

37. Chao Ma et.al. Ma C., Vio J.W., Kuang A.R., Huang K. Tang G.S. [The effects of Antisense Oligonucleotides bcl-2/bcl-x1 and bcl-2 on proliferation and Apoptosis of Breast Cancer Cells]. *Sishuan Da Xue Xue Bio Yi Xue Ban.*:2009 40(5):780-783.

38. Chopra A. [99mTc]Human telomerase reverse-transcriptase antisense mRNA oligonucleotide. *Molecular Imaging and Contrast Agent Database (MICAD)*: National Center for Biotechnology Information (US); 2008

39. Kurreck J. Antisense technologies. Improvement through novel chemical modifications. *European Journal of Biochemistry*. 2003;270(8):1628-1644..

40. Juliano RL. The delivery of therapeutic oligonucleotides. *Nucleic Acids Research*. 2016;44(14):6518-48.

41. Linnane E, Davey P, Zhang P, et al. Differential uptake, kinetics and mechanisms of intracellular trafficking of next-generation antisense oligonucleotides across human cancer cell lines. *Nucleic Acids Research*. 2019;47(9):4375-4392.

42. Zhou T, Jia X, Li H. et al Neptumar- targeted nano sigol delivery carrier for oligonucleotides; ofaracteristies in vitro and in vivo. *International journal of Nanonadicine*. 2011;6;1527-1534

43. Ou X, Tan T, Hel, Li Y, Li S, Kuang A. Antitumor effects of radioiodinated antisense oligonucleotide mediated by VIP receptor. *Cancer Gene Ther.* 2005; 12(3):313-320.
44. Olie RA, Hafner C, Küttel R, et al. Bcl-2 and bcl-xL antisense oligonucleotides induce apoptosis in melanoma cells of different clinical stages. *The Journal of Investigative Dermatology.* 2002;118(3):505-512.
45. Xiu B, Chi Y, Liu L, et al. LINC02273 drives breast cancer metastasis by epigenetically increasing AGR2 transcription. *Molecular Cancer.* 2019;18(1):187.
46. Nagini S. Breast Cancer: Current Molecular Therapeutic Targets and New Players. *Anti-cancer Agents in Medicinal Chemistry.* 2017;17(2):152-163.
47. Kashyap AS, Thelemann T, Klar R, et al. Antisense oligonucleotide targeting CD39 improves anti-tumor T cell immunity. *Journal of Immunotherapy Cancer.* 2019;7(1):67.
48. Sun, Y., Yan, L., Guo, J. et al. Inhibition of SRSF3 by antisense oligonucleotides increases the sensitivity of squamous cell carcinoma of the oral cavity and breast cancer cells to treatment with paclitaxel. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2019;84: 1133–1143.
49. Смирнова О.В., Борисов В.И. Иммуноterapia в лекарственном лечении больных с метастатическим тройным негативным раком молочной железы. *Онкология. Журнал им. П.А. Герцена.* 2018;7(6):60-66.
50. Velcheti V, Schalper K. Basic Overview of Current Immunotherapy Approaches in Cancer. *American Society of Clinical Oncology Educational Book.* 2016;35:298-308.
51. Hudler P. Genetic Aspects of Gastric Cancer Instability [Электронный ресурс] // *The Scientific World Journal.* – 2012. – Vol. 2012. URL: <http://www.hindawi.com/journals/tswj/2012/761909/> (дата обращения 31.01.2015)].

52. Buffart T.E., van Grieken N.C., Tijssen M., Coffa J., Ylstra B., Grabsch H.I., van de Velde C.J., Carvalho B., Meijer G.A. High resolution analysis of DNA copy-number aberrations of chromosomes 8, 13, and 20 in gastric cancers // *Virchows Arch.* 2009. Vol. 455. P. 213–223. doi: 10.1007/s00428-009-0814-y
53. Bamias A.T., Bai M.C., Agnantis N.J., Michael M.C., Alamanos Y.P., Stefanaki S.V., Razi E.D., Skarlos D.V., Kappas A.M., Pavlidis N.A. Prognostic significance of the deleted in colorectal cancer gene protein expression in high-risk resected gastric carcinoma // *Cancer Invest.* 2003. Vol. 21. P. 333–340
54. Simpson A.J., Caballero O.L., Pena S.D. Microsatellite instability as a tool for the classification of gastric cancer // *Trends Mol. Med.* 2001. Vol. 7. P. 76–80
55. Iacopetta B.J., Soong R., House A.K., Hamelin R. Gastric carcinomas with microsatellite instability: clinical features and mutations to the TGF-beta type II receptor, IGFII receptor, and BAX genes // *J. Pathol.* 1999. Vol. 187. P. 428–432].
56. Corso G., Pedrazzani C., Marrelli D., Pascale V., Pinto E., Roviello F. Correlation of microsatellite instability at multiple loci with long-term survival in advanced gastric carcinoma // *Arch. Surg.* 2009. Vol. 144. P. 722–727. doi: 10.1001/archsurg.2009.42
57. Ushijima T., Sasako M. Focus on gastric cancer // *Cancer Cell.* 2004. Vol. 5. P. 121–125
58. Yu J., Cheng Y.Y., Tao Q., Lam C.N., Geng H., Tian L.W., Wong Y.P., Tong J.H., Ying J.M., Jin H., To K.F., Chan F.K., Sung J.J. Methylation of protocadherin 10, a novel tumor suppressor, is associated with poor prognosis in patients with gastric cancer // *Gastroenterology.* 2009. Vol. 136. P. 640–651. doi: 10.1053/j.gastro.2008.10.050

59. Otsubo T., Akiyama Y., Yanagihara K., Yuasa Y. SOX2 is frequently downregulated in gastric cancers and inhibits cell growth through cellcycle arrest and apoptosis // *Br. J. Cancer.* 2008. Vol. 98. P. 824–831. doi: 10.1038/sj.bjc.6604193
60. Leung W.K., To K.F., Chu E.S., Chan M.W., Bai A.H., Ng E.K., Chan F.K., Sung J.J. Potential diagnostic and prognostic values of detecting promoter hypermethylation in the serum of patients with gastric cancer // *Br. J. Cancer.* 2005. Vol. 92. P. 2190–2194
61. Buffart T.E., Overmeer R.M., Steenbergen R.D., Tijssen M., van Grieken N.C., Snijders P.J., Grabsch H.I., van de Velde C.J., Carvalho B., Meijer G.A. MAL promoter hypermethylation as a novel prognostic marker in gastric cancer // *Br. J. Cancer.* 2008. Vol. 99. P. 1802–1807. doi: 10.1038/sj.bjc.6604777