

АКТИВИРОВАННЫЕ ЛЕЙКОЗНЫЕ ОНКОГЕНЫ AML1-ETO И C-KIT: РОЛЬ В РАЗВИТИИ ОСТРОГО МИЕЛОИДНОГО ЛЕЙКОЗА И СОВРЕМЕННЫЕ ПОДХОДЫ К ИХ ИНГИБИРОВАНИЮ

©2010 г.

А. В. РУЛИНА,

П. В. СПИРИН, В. С. ПРАСОЛОВ

*Институт молекулярной биологии им. В.А.Энгельгардта РАН,
Москва*

I. Введение. II. Острый миелоидный лейкоз. III. Активированные лейкозные онкогены: а) AML1-ETO. б) Рецепторная тирозинкиназа KIT. IV. Интерференция. V. Заключение.

I. ВВЕДЕНИЕ

Согласно прогнозам Всемирной Организации Здравоохранения (ВОЗ) онкологические заболевания в обозримом будущем могут выйти на первое место, обогнав заболевания сердечно-сосудистой системы. В настоящее время известно более 5000 видов онкологических заболеваний, вызываемых структурно-функциональными нарушениями различных генов, в том числе, активацией протоонкогенов, приводящей к злокачественному перерождению клеток. Ситуация еще больше осложняется тем, что в каждом отдельном случае в развитии злокачественного заболевания участвуют разные гены. Это затрудняет выбор генов-мишеней и их белковых продуктов для направленной терапии опухолей.

Принятые сокращения: МДС – миелодиспластический синдром; МПЗ – миелопролиферативные заболевания; ОМЛ – острый миелоидный лейкоз; ПТСГ – посттранскрипционный сайленсинг генов; дцРНК – двухцепочечная РНК; мРНК – матричная РНК; *cas*РНК – *cis*-acting siRNAs, *cis*-действующие siРНК, характерные для растений; *mi*РНК – микроРНК; *pi*РНК – РНК, взаимодействующие с белками PIWI; *gasi*РНК – малые интерферирующие РНК, ассоциированные с повторами; *sh*РНК – малая шпилечная РНК; *si*РНК – малая интерферирующая РНК; *AML1* – Ген *Acute Myeloid Leukemia 1* (острая миелоидная лейкемия 1), кодирующий белок – регулятор гематопоза; *AML1-ETO* – химерный ген *Acute Myeloid Leukemia 1 – Eight-Twenty One* (ОМЛ1-восемь-двадцать один); Akt – семейство белков, у млекопитающих играющих важную роль в передаче сигналов внутри клеток; CBF – гетеродимерный транскрипционный комплекс, Core Binding Factor; CBF ОМЛ – ОМЛ, ассоциированный с нарушением функции

Окончание см. на сл. стр.

К числу распространенных онкологических заболеваний относятся лейкозы, для которых характерно повышенное содержание морфологически незрелых – бластных – клеток крови, которые, с одной стороны, не выполняют нормальные функции зрелых клеток, а с другой – за счет активной пролиферации вытесняют нормальные клетки-предшественники.

Значительную долю лейкозов составляют острые миелоидные лейкозы (ОМЛ). В опухолевых клетках таких больных очень часто обнаруживают мутантные формы определенных онкогенов, что позволяет считать мутации в этих генах ответственными за злокачественное перерождение клеток кроветворной системы.

Показано, что у 20% больных ОМЛ лейкозные клетки несут транслокацию между 21 и 8 хромосомами, приводящую к образованию химерного онкогена *AML1-ETO*, продуктом которого является слитный белок AML1-ETO, обладающий активностью транскрипционного фактора. Наряду с геном *AML1-ETO*, у 70% таких больных наблюдается гиперэкспрессия рецепторной тирозинкиназы KIT. Мутации этого фермента при ОМЛ встречаются довольно редко (около 5% больных), но при наличии транслокации t(8;21) частота мутаций

CBF; Cbl – убиквитин E3 лигаза; ERK – киназа, участвующая в передаче сигналов (extracellular-signal-regulated kinase); ETO – ген *Eight-Twenty One* (восемь-двадцать один); FAB – French-American-British classification of AML (Франко-Американо-Британская классификация ОМЛ); FLT-3 – fms-подобная рецепторная тирозинкиназа-3; GIST – рак желудочно-кишечного тракта; HDAC – деацетилаза гистонов; HZ4-FeSV – вирус саркомы кошек; IL – интерлейкин; JAK – Janus тирозинкиназа; JM-домен – юкстамембранный домен рецепторной тирозинкиназы KIT; M-CSF – колоние-стимулирующий фактор макрофагов; N-CoR – ядерный корепрессор транскрипции; NHR – область, гомологичная белку Nrvy; PDGF – фактор роста тромбоцитов; PI3K – фосфатидилинозитол-3-киназа; PIWI – белки, семейства Ago (P-element Induced WImpy testis); PLZF-Pro-myelocytic Leukemia Zinc Finger – репрессор транскрипции; Ras – семейство малых ГТФ-аз, участвующих в передаче сигнала в клетке; RdRP – РНК-зависимая-РНК-полимераза; RHD – домен гомологичный белку Runt; RISC – RNA-induced silencing complex; RLC – погрузочный комплекс RISC; SFK – семейство киназ Src; SCF – фактор стволовых клеток; SH2 – домен 2 гомологии белков Src; SHP-2 и SHP-3 – тирозинфосфатазы 2 и 3, содержащие домен, гомологичный белкам Src; SFK – семейство киназ Src; Sin3 – корепрессор транскрипции; STAT – Signal Transducers and Activator of Transcription; VEGFR – рецептор фактора роста эндотелия; VSV-G – белок G вируса везикулярного стоматита.

Адрес для корреспонденции: rulinaura@mail.ru

Работа выполнена при финансовой поддержке программ фундаментальных исследований Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология» и «Основы фундаментальных исследований нанотехнологий и наноматериалов», ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009–2013 годы (ГК 02.740.11.0706), а также РФФИ (08-04-00547).

повышается до 30%. Связь между этими двумя онкогенами была замечена давно. Было высказано предположение, что наличие в клетках пары активированных онкогенов (например, транскрипционного фактора *AML1-ETO* и тирозинкиназы *c-kit*) запускает процесс их злокачественного перерождения. Впрочем, недавно были получены результаты, позволяющие предположить, что в исключительных случаях даже один активированный онкоген может вызвать появление лейкозных клеток [27].

Основными методами лечения лейкозов на сегодняшний день остаются пересадка костного мозга, лучевая терапия и химиотерапия. Каждый из этих методов имеет ряд существенных недостатков, включая подавление иммунитета, тяжелые лучевые отравления и возникновение вторичных опухолей, значительно более устойчивых ко всем видам лечения. В настоящее время во многих лабораториях активно ведется разработка инновационных подходов для борьбы с лейкозами. Одним из перспективных подходов, который, повидимому, скоро получит широкое распространение, является подавление экспрессии активированных лейкозных онкогенов на основе принципа РНК-интерференции.

Целью данного обзора была систематизация имеющихся на данный момент знаний о двух основных лейкозных онкогенах, имеющихся лекарственных средствах, а также о наиболее современном методе подавления активности генов – РНК-интерференции. Структура и функции белка AML1-ETO, а также его участие в процессе онкогенеза были подробно рассмотрены в обзоре Баскарана Д. [146], поэтому в данном обзоре мы ограничились более кратким описанием.

II. ОСТРЫЙ МИЕЛОИДНЫЙ ЛЕЙКОЗ

Лейкоз — клональное злокачественное (неопластическое) заболевание кроветворной системы, к которым относится обширная группа заболеваний, различных по своей этиологии. Характерной особенностью лейкозов является быстрая диссеминация опухолевых клеток по всей системе кроветворения. Согласно статистическим данным, ежегодно собираемым в США, среди опухолей лейкозы являются самой частой причиной смерти молодого населения страны (т.е. людей моложе 40 лет) [1].

По клиническому течению выделяют:

1. Острые лейкозы (лейкемии) – начинаются остро, быстро прогрессируют и при отсутствии лечения в течение нескольких месяцев приводят к смерти. В крови таких больных обычно определяется большое количество бластных клеток.

2. Хронические лейкозы (лейкемии) начинаются постепенно и медленно прогрессируют – даже при отсутствии лечения больные могут прожить несколько лет. В крови выявляются обычно незрелые, но с тенденцией к созреванию клетки.

Необходимо отметить, что термины «острый» и «хронический» лейкоз используются только для удобства – они никогда не переходят друг в друга. Значение этих терминов в гематологии отличается от значения в других медицинских дисциплинах.

Острые лейкозы представляют собой гетерогенную группу злокачественных заболеваний системы крови с характерным поражением костного мозга бластными клетками. В дальнейшем (или с самого начала) может происходить инфильтрация бластными клетками различных тканей и органов. Поскольку опухолевая трансформация при остром лейкозе происходит на стадиях дифференцировки прародительских кроветворных клеток, их принято разделять на основании этого признака. Выделяют лимфобластные, то есть относящиеся к клеткам-предшественникам лимфопоэза и составляющие 15% всех острых лейкозов, и миелоидные, относящиеся к клеткам-предшественникам миелопоэза и составляющие основную массу острых лейкозов у взрослых [2].

Острый миелоидный лейкоз (ОМЛ) – злокачественное заболевание крови, возникающее в результате раковой трансформации и нарушения дифференцировки гемопоэтических клеток на уровне миелоидных клеток-предшественниц [3]. Острый миелоидный лейкоз сложно вылечить и на его долю приходится около 1.6% смертей от рака в США [1]. Несмотря на то, что после химиотерапии у 65% больных наблюдается полная ремиссия, в 70% случаев в течение 5 лет наблюдается рецидив [4].

КЛИНИЧЕСКАЯ И ГЕМАТОЛОГИЧЕСКАЯ КАРТИНА

Начальная стадия возникновения и развития лейкозов протекает, как правило, бессимптомно: больные чувствуют себя здоровыми вплоть до повсеместного расселения опухолевых клеток по кроветворной системе. Диагноз острого лейкоза может быть установлен только морфологически – по обнаружению бластных опухолевых клеток в крови или в костном мозге. У пациентов наблюдается снижение количества форменных элементов из-за вытеснения нормальных ростков кроветворения неопластическими клетками. В результате возникают анемия, тромбоцитопения (снижение количества тромбоцитов) и нейтропения (снижение числа нейтрофильных лейкоцитов), которая проявляется в виде частых инфекционных заболеваний и изъязвлений на слизистых оболочках [2].

В периферической крови определяется лейкоцитоз (увеличение количества лейкоцитов) с наличием бластов, а также наблюдается «лейкемический провал», то есть резкое увеличение числа бластных клеток и наличие единичных зрелых элементов на фоне отсутствия переходных созревающих форм. Иногда количество лейкоцитов не увеличено, но бласты обязательно присутствуют. Если бластные клетки не приобрели еще способность к выходу из костного мозга, то там их достаточно много [2]. Одним из основных критериев для постановки диагноза ОМЛ является наличие в костном мозге более 30% миелобластов [3].

КЛАССИФИКАЦИЯ ОМЛ

В настоящее время существует две основных классификации ОМЛ: первоначальная FAB-классификация и более современная классификация ВОЗ.

В 1976 г. гематологами Франции, Америки и Британии (FAB) была разработана классификация острых лейкозов, основанная на морфологических и цитохимических признаках клеток [2, 5]. FAB-классификация подразделяет ОМЛ на 8 подклассов, M0–M7. В зависимости от типа больные имеют разный прогноз и получают различное лечение. [5] На сегодняшний день классификация выглядит следующим образом (табл. 1)

Таблица 1.
Классификация острых миелоидных лейкозов по FAB [5]

Тип	Описание
M0	Острая недифференцируемая лейкемия – незрелые бластные клетки с минимальной дифференцировкой
M1	Острая миелобластная лейкемия без созревания - незрелые бластные клетки без признаков миелоидного дифференцирования
M2	Острая миелобластная лейкемия с гранулоцитарным созреванием
M3	Промиелоцитарная или острая промиелоцитарная лейкемия (APL)
M4	Острая миеломоноцитарная лейкемия
M4эо	Миеломоноцитарная лейкемия с эозинофилией костного мозга
M5	M5a – острая моноцитарная лейкемия, без созревания M5b – то же, с частичным созреванием
M6	Острый эритромиелоз
M7	Острая мегакариобластная лейкемия

Система классификации острого миелоидного лейкоза ВОЗ разработана с учётом системы ФАБ, но она удобнее для клинического применения, поскольку учитывает наиболее прогностически значимые признаки заболевания (табл. 2). Мутации, описанные для первой группы, находятся в генах, высокочувствительных к повреждениям, вызываемым некоторыми химиопрепаратами, поэтому могут быть вовлечены в возникновение ОМЛ третьей группы [6].

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ГЕНЕТИКА ОСТРОГО ЛЕЙКОЗА

ОМЛ возникает в результате отдельных кооперирующихся мутаций различных генов, которые увеличивают пролиферативную способность и выживаемость, нарушают нормальную дифференцировку и апоптоз клеток-предшественников миелоидного, эритроидного, мегакариоцитного и моноцитного рядов. Все острые лейкозы клональны, то есть возникают из одной мутировавшей кроветворной клетки, которая может относиться как к очень ранним, так и к уже частично дифференцированным (коммитированным) в сторону различных линий кроветворения клеткам-предшественницам. Принадлежность бластных клеток к той или иной линии кроветворения и степень их дифференцировки в какой-то мере определяет клиническое течение острого лейкоза, программу терапии, ее эффективность. По основным мутациям и прогнозу течения заболевания больных ОМЛ можно разделить на три группы (табл. 3) [7]

При ОМЛ выделяют два класса мутаций. Мутации класса II затрагивают гены транскрипционных факторов, приводя к изменению их функции или активности, и влияют на дифференцировку клеток. Самыми частыми мутациями класса II при ОМЛ являются транслокация $t(8;21)(q22;q22)$ и инверсия $inv(16)(p13q22)$. На молеку-

Таблица 3.
**Выделяемые группы риска среди больных ОМЛ
в зависимости от основных хромосомных аберраций [7].**

Группа риска	Хромосомная аномалия	5-летняя выживаемость	Вероятность рецидива
Благоприятный	$t(8;21)$, $t(15;17)$, $inv(16)$	70%	33%
Промежуточный	Нормальная цитогенетика, +8, +21, +22, $del(7q)$, $del(9q)$, атипичная 11q23 и т.д.	48%	50%
Неблагоприятный	-5, -7, $del(5q)$, атипичная 3q, сложная цитогенетика	15%	78%

Таблица 2.
Подвиды острых миелоидных лейкозов по классификации ВОЗ [6]

Группа	Подвид	Описание
ОМЛ с характерными генетическими изменениями	<ul style="list-style-type: none"> – ОМЛ с транслокацией t(8;21)(q22;q22), (AML1/ETO) – ОМЛ с эозинофилией костного мозга и инверсиями [inv(16)(p13q22) или t(16;16)(p13;q22); SVFV/MYH11 RARα] – ОМЛ с транслокациями [t(15;17)(q22;q12) (PML/RARα)] – ОМЛ с мутацией 11q23 (MLL) 	<p>У больных обычно высок уровень ремиссий, они хорошо реагируют на терапию. Прогноз лучше по сравнению с ОМЛ других типов. Обычно наблюдается у детей и молодых людей до 20 лет. Подвиды достаточно легко идентифицировать морфологически.</p>
ОМЛ с дисплазией нескольких ростков	<ul style="list-style-type: none"> – развивается из МДС или МДС/МПЗ – нет предшествующих МДС или МДС/МПЗ, но наблюдается дисплазия более 50% клеток 2 или более миелоидных ростков 	<p>Эта группа отличается неблагоприятным прогнозом, вероятность его возникновения увеличивается с возрастом.</p>
ОМЛ и МДС, связанные с предыдущим лечением	<ul style="list-style-type: none"> – алкилирующие агенты/радиация (возникает через 4–7 лет после воздействия агента, характерны мутации, затрагивающие хромосомы 5 и 7) – ингибитор топоизомеразы II (возникает через 2–3 года после воздействия агента, характерны мутации: 11q23, 21q22, inv(16)(p13q22), t(15;17)(q22;q12) 	<p>Этот вид ОМЛ включает больных, получавших химиотерапию и/или лучевое лечение, после которых возник ОМЛ или МПЗ. При этих лейкозах могут быть характерные изменения в хромосомах, при которых прогноз заболевания часто бывает хуже</p>
ОМЛ не подпадающие под признаки перечисленных подвидов	<ul style="list-style-type: none"> – ОМЛ без созревания – ОМЛ с минимальной дифференцировкой – ОМЛ с созреванием – острая миелоцитарная лейкемия – острая моноцитарная лейкемия – острая эритроидная лейкемия – острая мегакариобластная лейкемия – острая базофильная лейкемия – острый панмиелоз (гиперплазия всех ростков костного мозга) с миелофиброзом – остеобластосаркома 	<p>Включает подвиды ОМЛ, не входящие в перечисленные выше, либо для которых невозможно получить генетический анализ.</p>

лярном уровне транслокация t(8;21) и инверсия inv(16) приводят к возникновению слитных белков AML1-ETO и CBF β /MYH11, являющихся транскрипционными факторами [8]. Подобные мутации необходимы, но недостаточны для опухолевой трансформации. Для приобретения опухолевого фенотипа нужны вторичные генетические перестройки, называемые мутациями класса I. Мутации класса I происходят в генах тирозинкиназ, ведут к их постоянной активации и влияют на пролиферацию и выживание клеток. При ОМЛ чаще всего мутируют гены тирозинкиназ KIT и FLT3. [9]

III. АКТИВИРОВАННЫЕ ЛЕЙКОЗНЫЕ ОНКОГЕНЫ

III А. AML1-ETO

УЧАСТИЕ CBF В ВОЗНИКНОВЕНИИ И РАЗВИТИИ ОСТРЫХ МИЕЛОИДНЫХ ЛЕЙКОЗОВ

CBF – это гетеродимерный транскрипционный фактор, состоящий из субъединиц CBF α (AML1) и CBF β . CBF регулирует экспрессию ряда генов, участвующих в гематопоезе [10]. В группу CBF ОЛМ входят лейкозы, характеризующиеся мутациями в генах, кодирующих субъединицы этого комплекса. Эти мутации включают вышеупомянутые транслокацию между 8ой и 21ой хромосомами [t(8;21)(q22;q22)] и перичентрическую инверсию в хромосоме 16 [inv(16)(p13q22)]. У взрослых с *de novo* развившимся ОМЛ транслокация t(8;21) встречается в 7% случаев, а инверсия inv(16) – в 8% случаев [8]. Химерные гены, образующиеся в результате цитогенетических аномалий, участвуют в развитии ОМЛ [11]

Транслокация [t(8;21)(q22;q22)] затрагивает ген *AML1* (или *RUNX1*, *CBF α*) на 21-ой хромосоме и ген *ETO* (или *MTG8*) на 8-ой хромосоме. Эта транслокация приводит к образованию химерного гена, который кодирует слитный белок AML1-ETO (рис. 1).

ТРАНСКРИПЦИОННЫЙ ФАКТОР AML1

AML1 как компонент CBF комплекса

Ген *AML1* кодирует ДНК-связывающую альфа-субъединицу транскрипционного комплекса CBF. Консервативный Runt-домен (RHD – Runt Homology Domain), локализованный на N-конце белка AML1, необходим для связывания с ДНК и кофактором CBF β . [12] С-конец белка AML1 содержит трансактивационные и репрессорные домены. Гетеродимерный комплекс AML1-CBF β связывается с

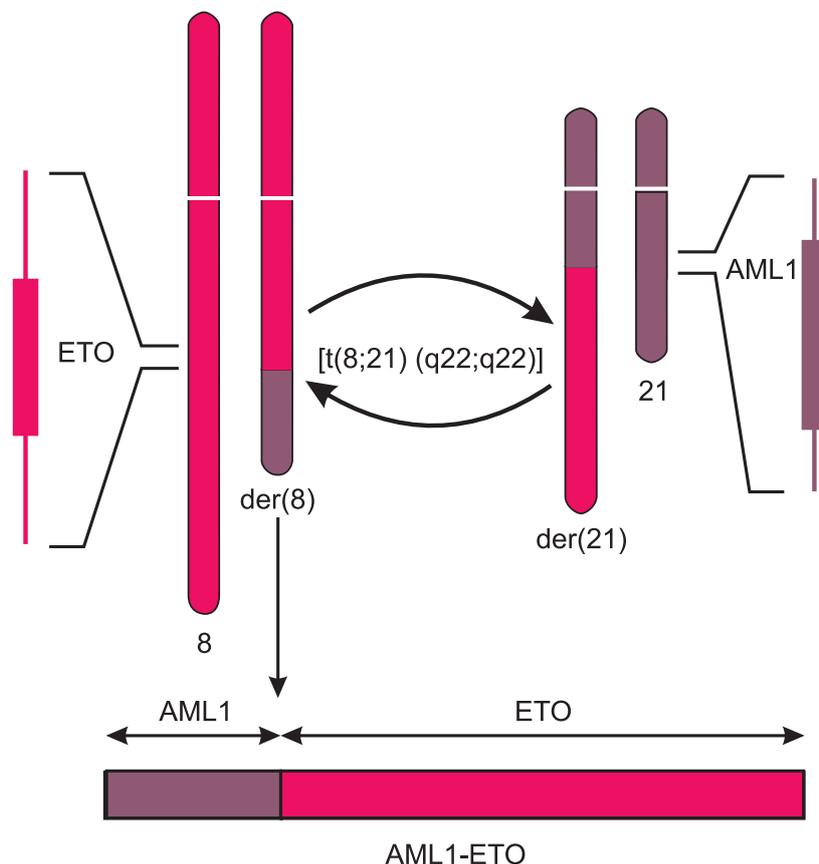


Рис. 1. Схема транслокации $t(8;21)(q22;q22)$, приводящей к образованию слитного гена AML1-ETO.

Одна копия аллелей генов остается нетронутой, что необходимо учитывать при изучении функции и механизма действия белка AML1-ETO.

ДНК в определенном сайте с консенсусной последовательностью $PuGPuGGTPu$ (где Pu – пиримидиновое основание, цитозин или тимин). Белок CBF β усиливает связывание AML1 с ДНК, а также стабилизирует AML1, защищая его от убиквитин-зависимого протеолиза [13]. CBF регулирует транскрипцию многих генов, необходимых для дифференцировки клеток миелоидного и лимфоидного ряда, путем связывания с другими факторами транскрипции в зависимости от контекста промотора [12].

Взаимодействия AML1 с другими белками

AML1 как транскрипционный активатор.

Большинство активируемых генов связано с гематопоезом: гены Т-клеточных и В-клеточных рецепторов, *IL-3* (интерлейкин-3), *M-CSFR* (рецептор колониестимулирующего фактора макрофагов), гены эластазы нейтрофилов, миелопероксидазы и гранзима В. В активации транскрипции с помощью СВФ-комплекса ключевую роль играют белок-белковые взаимодействия, в которые вовлечен С-конец полноразмерного белка AML1. СВФ является «скаффолдинг»-белком – он обеспечивает сборку транскрипционных факторов в промоторных областях генов, хотя сам по себе активировать транскрипцию не может. Для его работы необходима помощь других транскрипционных факторов, таких как AP-1, Myb, C/EBP β и/или белков семейства Ets [14]. Собранный на СВФ комплекс факторов транскрипции привлекает дополнительные кофакторы – например, p300, CREB-связывающий белок и «yes»-ассоциированный белок-1 (*yap1*), за связывание с которыми также отвечает AML1. Эти кофакторы, в свою очередь, ацетилируют гистоны и «разматывают» конденсированную ДНК, делая промоторные области генов доступными для РНК-полимеразы, которая теперь может эффективно инициировать транскрипцию. [15]

Белок AML1 как транскрипционный репрессор.

Белок AML1 является контекст-зависимым транскрипционным репрессором. В частности, он подавляет транскрипцию генов *CD4*, *p21WAF-1*, *HERF1*, *MRP14*, *Pim-2*, Стефин-3, ген уридин-фосфорилазы и сиалопротеина кости [16]. Самым известным случаем функционирования AML1 как транскрипционного репрессора является подавление экспрессии гена *CD4* в CD4⁺CD8⁺-тимocyтах в ходе дифференцировки Т-клеток. Связываясь с сайленсерным участком гена *CD4*, белок AML1 привлекает к данному локусу хроматин-ремодулирующий комплекс BAF [17]. В других случаях репрессорный эффект AML1 объясняется связыванием с транскрипционными корепрессорами, которые образуют комплексы с деацетилазами гистонов (HDAC). Эти ферменты подавляют экспрессию генов за счет деацетилирования гистонов, что обеспечивает конденсацию хроматина. Некоторые белки HDAC могут напрямую взаимодействовать с белком AML1 и, таким образом, обеспечивать транскрипционную репрессию [14].

Белок AML1 в эпигенетическом сайленсинге.

У дрозофилы и мышей белок AML1 также участвует в эпигенетическом сайленсинге генов [16]. Белок SUV39H1 является специфичной метилтрансферазой лизина 9 гистона H3. Метилирование

лизина 9 гистона H3 представляет собой посттрансляционную модификацию, которая позволяет гистону H3 связываться с белком HP1 и обеспечивает сайленсинг гена. Коиммунопреципитация в клеточных линиях Cos7 показала ассоциацию белков AML1 и SUV39H1 [18].

СЕМЕЙСТВО ТРАНСКРИПЦИОННЫХ ФАКТОРОВ ETO

Структура белка

К семейству белков ETO (Eight-Twenty One) принадлежат: 1) ETO (MTG8), 2) ETO2 (MTG16, MTGR2), 3) MTGR1. Все представители семейства ETO, также как и AML, участвуют в активации транскрипции и являются «скаффолдинг»-белками [19]. Характерной чертой этих белков является наличие четырех эволюционно консервативных доменов NHR 1–4 (Nervy Homology Region) [29]. Домен NHR1 отвечает за белок-белковые взаимодействия и гомологичен ТАТА-боксу дрожозифилы. В домене NHR2 находятся гептадные повторы гидрофобных аминокислот и он необходим для гомо- и гетеродимеризации белков семейства ETO. Домен NHR3 имеет структуру двойной спирали («coiled coil») и, скорее всего, совместно с NHR4 участвует во взаимодействии с некоторыми корепрессорами. В домене NHR4 присутствуют два мотива цинковых пальцев на С-конце (СххССххС и СххСНххС), участвующие в белок-белковых взаимодействиях. Недавно было установлено, что неконсервативные (не входящие в NHR) участки белка ETO также участвуют в его взаимодействиях с транскрипционными корепрессорами [21].

ОСНОВНЫЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ETO С ДРУГИМИ БЕЛКАМИ

Деацетилазы гистонов.

Деацетилирование гистонов оказывает влияние на их взаимодействие с ключевыми регуляторами транскрипции. Следовательно, белки HDAC могут регулировать экспрессию гена и устанавливать так называемый «гистоновый код».

ETO рекрутирует белки HDAC непосредственно взаимодействуя с ними (в основном за счет NHR2 и NHR4-доменов), или связываясь с компонентами комплексов, в которые входят HDAC. Белки HDAC являются компонентом мультисубъединичных комплексов, таких как N-CoR, SMRT или Sin3. Установлено, что N-CoR и SMRT способны локально деацетилировать гистоны, «отмеченные» ДНК-связывающими транскрипционными регуляторами. Sin3, по-видимому, участвует в глобальном геномном деацетилировании. HDAC является ферментативным компонентом комплекса, а другие белки, скорее всего, регулируют или направляют белки HDAC [21].

Транскрипционные репрессоры PLZF и Gfi-1.

Согласно корепрессорной модели, белок ETO взаимодействует с репрессорами транскрипции, специфичными к нуклеотидной последовательности. На данный момент обнаружено два таких репрессора – PLZF и Gfi-1. Показано, что ETO взаимодействует с PLZF напрямую [22]. PLZF обнаружен в гематопозитических клетках, где он функционирует как супрессор роста, и его экспрессия снижается во время миелоидного дифференцирования [23].

В опытах *in vivo* и *in vitro* было показано взаимодействие между белком ETO и транскрипционным репрессором Gfi-1, который также экспрессируется в гематопозитических клетках. Предполагается, что Gfi-1 регулирует гематопоз и влияет на жизнеспособность кроветворных клеток [24].

ETO-ETO взаимодействия.

Белки семейства ETO при взаимодействии друг с другом могут образовывать высокомолекулярные олигомеры. Олигомеризация ETO усиливает его сродство к белкам N-CoR, SMRT и другим корепрессорам. Гомоолигомеризация, повидимому, является необходимым условием для функционирования слитного онкобелка AML1-ETO [25].

СЛИТЫЙ БЕЛОК AML1-ETO

Химерный ген *AML1-ETO* образуется вследствие транслокации t(8;21), которая приводит к слиянию гена *AML1* на хромосоме 21q22 с геном *ETO* на хромосоме 8q22. Точки разрыва в этой молекулярной перестройке постоянны и затрагивают экзон 5 гена *AML1* и экзон 2 гена *ETO*. [11] Ген *AML1-ETO* кодирует слитный белок, который является транскрипционным фактором. Белок AML1-ETO содержит N-концевую часть белка AML1, включая RHD-домен (ДНК- и СВФβ-связывающий), в то время как C-концевая часть принадлежит белку ETO, включая все его четыре домена NHR [26].

Роль белка AML1-ETO в развитии лейкоза обусловлена доминантно-негативным влиянием на транскрипционную активность белка AML1. Фенотип «knock in» мышей, экспрессирующих слитный ген *AML1-ETO*, идентичен фенотипу мышей с гомозиготным нокаутом гена AML1 (у которых нарушен гематопоз) [26]. Показано, что слитный белок AML1-ETO блокирует дифференцировку клеток миелоидного и эритроидного рядов [27].

AML1-ETO как репрессор транскрипции

AML1 функционирует как активатор транскрипции, способствуя дифференцировке гранулоцитов за счет трансактивации линиеспецифичных генов-мишеней. Образование слитного белка AML1-ETO приводит к замене активационных доменов AML1 на репрессорные домены ETO). Слитный белок AML1-ETO связывается с ДНК через RHD-домен, принадлежащий AML1-части. Далее слитный белок за счет NHR-доменов ETO эффективно рекрутирует корепрессоры, которые, в свою очередь, рекрутируют HDAC. За счет действия белков HDAC подавляется транскрипция генов. В результате вместо того, чтобы активировать гены-мишени AML1, слитный белок подавляет их экспрессию [19].

Белок AML1-ETO как активатор транскрипции

Исследования выявили 24 гена-мишени AML1-ETO, только 10 из которых были генами-мишенями AML1 [28]. Это означает, что белок AML1-ETO может влиять на экспрессию генов, которые в нормальных условиях не находятся под контролем белка AML1. Впоследствии оказалось, что AML1-ETO активирует экспрессию приблизительно того же числа генов, что и репрессирует. Примерами трансактивированных генов-мишеней являются: 1) *Jagged1* – Notch-лиганд, ответственный за пролиферацию стволовых клеток; 2) *Плакоглобин* – служит посредником Wnt-сигнального пути; 3) *β-катенин* – также участвует в Wnt-сигналинге; 4) рецептор ростового фактора нервов RKA в человеческих CD34+ гематопозитических клетках-предшественниках; 5) *Bcl-2* – антиапоптотический ген; 6) *C/EBPε* – ген, продукт которого трансактивирует экспрессию гена *G-CSFR* путем взаимодействия с сайтом связывания C/EBP в регуляторных областях ДНК [19, 27]. Все гены-мишени в регуляторных областях имеют сайты связывания с AML1. Многие гены, экспрессия которых активируется белком AML1-ETO, участвуют в самообновлении стволовых клеток. За счет трансактивации подобных генов слитный белок AML1-ETO обеспечивает экспансию мультипотентных клеток-предшественников.

Белок AML1-ETO – блокатор дифференцировки клеток

Недавно была выдвинута гипотеза, согласно которой развитие острых лейкозов обусловлено потерей функции линиеспецифических транскрипционных факторов. При полной потере функции клетки погибают, но частичная потеря приводит к нарушению гомеостаза гематопозитических стволовых клеток, достаточному для развития лейкозов [29]. В частности, дефекты в линиеспецифической детерминации гематопозитических стволовых клеток вызывают экспансию компартмента самообновляющихся клеток-предшественниц, которые могут стать опухолевыми при возникновении дополнительных мутаций. Слитный белок AML1-ETO посредством прямых белок-белковых взаимодействий (через RHD- или ETO-домены) может репрессировать факторы транскрипции (E белки, PU.1, C/EBP α , GATA-1), играющие ключевую роль при дифференцировке клеток гематопозитического ряда [19]. Показано также, что AML1-ETO подавляет экспрессию генов, участвующих в эксцизионной репарации ДНК, и тем самым, возможно, увеличивает генетическую нестабильность в популяции клеток. Подавление дифференцировки гематопозитических стволовых клеток белком AML1-ETO, скорее всего, не абсолютно, но непрекращающаяся экспансия клеток-предшественниц на фоне генетической нестабильности служит основой дополнительных вторичных мутаций [30].

Функции белка AML1-ETO

Изучение функций слитных белков, содержащих часть белка AML1 или CBF β , позволили заключить, что эти мутантные белки участвуют в возникновении прелейкозных клеточных популяций, о чем свидетельствует накопление ранних клеток-предшественниц с пониженной способностью к дифференцировке, но без явной лейкемии. Исследования на мышах подтвердили гипотезу о том, что мутации в гене *AML1* являются иницирующими событиями в развитии острых лейкозов, хотя для их прогрессии необходимы вторичные мутации.[12, 31]

Слитный белок AML1-ETO – мультифункциональный белок, играющий важную роль в регулировании множества клеточных программ, таких как дифференцировка, пролиферация, апоптоз и самообновление в моделях *in vitro* и *in vivo*. Этот белок регулирует как гены-мишени AML1, так и другие гены-мишени, поскольку он взаимодействует с различными транскрипционными регуляторами. Кроме того, для развития ОМЛ необходимы дополнительные мута-

ции. Вопрос, на который пока еще нет ответа, состоит в том, какие гены являются критическими мишенями слитного белка, и какие молекулярные пути совместно с AML1-ETO участвуют в неопластической трансформации гематopoэтических клеток. Огромное количество новой информации о геноме человека и мыши, а также новые технологии должны существенно облегчить исследования этих интересных вопросов и проблем [27].

III Б. РЕЦЕПТОРНАЯ ТИРОЗИНКИНАЗА KIT

АЛЛЕЛИЗМ SCF С SL И C-KIT С W-ЛОКУСОМ

Много лет назад было отмечено, что мутации в W-локусе (dominant white spotting locus) на пятой хромосоме мыши или в Sl (Steel) локусе на десятой хромосоме внешне проявляются одинаково – мыши характеризуются дефектами в окраске шерсти, макроцитарной анемией и стерильностью. Сходные фенотипические проявления мутаций в разных локусах привели к выводу, что продукты, кодируемые этими участками хромосом, в клетке должны совместно выполнять общие функции [32]. Позднее эта гипотеза подтвердилась. В 1986 году был открыт вирусный остротрансформирующий онкоген *v-kit*, который экспрессируется вирусом саркомы кошек (Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma virus) [33]. Спустя год нашли его клеточный гомолог *c-kit*, который кодирует белок KIT, являющийся рецепторной тирозинкиназой. В 1988 г. обнаружили, что *c-kit* аллелен W локусу мышей, а затем был найден лиганд KIT – SCF (stem cell factor), кодируемый Sl локусом [34]. Этими пионерными исследованиями были доказано влияние системы SCF/KIT на меланогенез, гаметогенез и гематopoэз [33].

KIT КАК РЕЦЕПТОРНАЯ ТИРОЗИНКИНАЗА III ТИПА

Ген *c-kit* кодирует белок KIT (или CD117, с молекулярной массой 145 кДа), который является рецептором цитокинов и экспрессируется на поверхности гематopoэтических стволовых клеток, а также на поверхности многих других типов клеток. KIT – это рецепторная тирозинкиназа III типа, которая относится к семейству мономерных рецепторов. В эту же группу входят также рецептор фактора роста тромбоцитов (PDGF-R), рецептор колоний-стимулирующего фактора макрофагов (M-CSF-R), а также *fms*-подобная тирозинкиназа-3/эмбриональная киназа-2 печени (Flt-3/Flt-2). Этот класс киназ (называемый также PDGF-R семейством) играет ключевую роль в регуляции гематopoэза и эмбрионального развития [33]. Тирозинкиназы

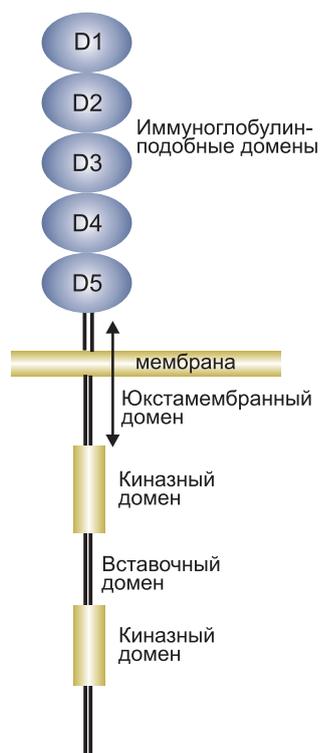


Рис. 2. Схема расположения доменов белка КИТ.

III класса характеризуется наличием пяти экстрацеллюлярных иммуноглобулин-подобных доменов, отвечающих за связывание с лигандом (рис. 2). Они отличаются от других типов тирозинкиназ наличием вставки из 70–100 аминокислот в киназном домене (80 в случае КИТ). Вставочный домен может фосфорилироваться и служить сайтом связывания для некоторых важных сигнальных молекул [35].

СТРУКТУРА ГЕНА C-KIT

Ген *c-kit* расположен в локусе q11-q12 четвертой хромосомы человека [36]. У мышей он был картирован в W-локусе пятой хромосомы [37]. Ген состоит из 21 экзона и 20 интронов. Экзоны малы по размеру – около 100 п.н., за исключением экзона 21, размер которого составляет 2407 п.н. В итоге из мРНК, содержащей более 89 тыс.п.н., кодирующими белок являются не более 6% последовательности [38]. Первый экзон содержит 5'-нетранслируемую область (5'-НТО), сайт инициации трансляции и сигнал транслокации через

мембрану. Экстрацеллюлярный домен закодирован в экзонах 2–9 и 5'-конце экзона 10. Трансмембранный домен находится в экзоне 10. Цитоплазматический домен закодирован в 3'-конце экзона 10 и в 11–20 экзонах. В них и находятся киназные домены, разделенные вставочным доменом, который затрагивает 3'-конец экзона 14, экзон 15 и 5'-конец экзона 16. Экзон 12 содержит АТФ-связывающий сайт (Gly-X-Gly-X-X-Gly). Экзон 21 содержит сайт терминации трансляции и 3'-UTR [39].

Промоторная область гена *c-kit* не содержит типичный TATA-бокс, характерный для многих эукариотических промоторов, и имеет около 70% G/C-состава, как и у промоторов генов домашнего хозяйства, а также генов некоторых тирозинкиназ, таких как *EGFR*, *c-fms* и рецептора инсулина [40]. Промоторные области мыши и человека имеют высокую гомологию (75% последовательности). Сайты связывания транскрипционных факторов также консервативны [41].

ИЗВЕСТНЫЕ ФОРМЫ KIT И АЛЬТЕРНАТИВНЫЙ СПЛАЙСИНГ

У человека существует четыре изоформы белка, образующиеся за счет альтернативного сплайсинга. Две из них различаются по наличию (или отсутствию) тетрапептида GNNK в экстрацеллюлярной части юкстамембранного домена. Еще две формы отличаются наличием или отсутствием единственного серинового остатка во вставочном домене белка KIT. В зародышевых клетках семенников мышей с криптического промотора экспрессируется укороченная форма *c-kit* (tr-kit, truncated *c-kit*) [42]. Такой усеченный вариант KIT не способен фосфорилировать белки, но может передавать сигнал. Микроинъекции tr-kit в мышинные яйцеклетки запускают в них переход от метафазы к анафазе [43].

Была найдена также растворимая форма KIT, которая, скорее всего, образуется в результате протеолиза, хотя сама протеаза, участвующая в отщеплении экстрацеллюлярного домена, еще обнаружена. Косвенными методами было показано участие в этом процессе протеинкиназы C [44], TACE (tumor necrosis factor α -converting enzyme) [45] и матриксной металлопротеиназы-9 (ММР-9) [45]. Растворимая форма рецептора, также как и мембраносвязанная, гликозилирована и связывается с SCF [47, 48], вследствие чего конкурирует с мембраносвязанным KIT. Это приводит к подавлению SCF-зависимого роста, и, возможно, к мобилизации колоние-образующих клеток крови и их выходу из костного мозга [46, 49].

ПЕРЕДАЧА СИГНАЛА С УЧАСТИЕМ KIT

Взаимодействия между фактором стволовых клеток SCF и рецепторной тирозинкиназой KIT

В связывании с SCF участвуют три внеклеточных домена KIT – D1, D2 и D3, расположение которых в пространстве напоминает букву «Г». Эта структура жесткая, со строго определенными углами, которые поддерживаются обширными междоменными взаимодействиями. Аминокислотные остатки, участвующие в этих взаимодействиях, у млекопитающих консервативны, вследствие чего пространственная структура доменов и их взаимная ориентация также остаются консервативными. В результате закрепляется пространственная ориентация петли C' домена D1, участвующей во взаимодействии с SCF [33].

Область взаимодействия SCF и KIT включает 3 участка (D1/SCF, D2/SCF и D3/SCF), которые поддерживаются большим количеством солевых мостиков и водородных связей. Эти взаимодействия обеспечивают образование димера SCF·KIT. При этом SCF претерпевает значительные конформационные изменения – неструкту-

рированные или слабо структурированные участки становятся хорошо видимыми. Затем образуются димеры димеров – тетрамерные комплексы 2·(SCF·KIT). В образовании тетрамеров участвует только SCF – молекулы объединяются по принципу «голова к голове» [33].

Димеризация рецептора вызывает активацию его ферментативной активности. В результате автофосфорилирования происходит модификация некоторых остатков тирозина (в первую очередь Tyr568 и Tyr570), которые находятся вне киназных доменов и служат как сайты связывания для передающих сигнал молекул, содержащих SH2 (Src homology 2 domain) или PTB (phosphotyrosine binding) домены [50].

Регуляция активности KIT и остановка сигнала

После фосфорилирования рецептор может подвергаться убиквитинированию при участии убиквитин E3 лигаз, среди которых наибольшее значение имеет белок Cbl. Этот белок связывается с активированным KIT при помощи адаптерных белков и фосфорилируется SFK. Видимо, именно SFK-зависимое фосфорилирование Cbl и последующее убиквитинирование KIT приводит к интернализации рецептора и его деградации в лизосомах [34].

Основными тирозинфосфатазами, регулирующими активность KIT, являются SHP-1 и SHP-2. В инактивации KIT участвует SHP-1, а SHP-2 стимулирует передачу сигнала. В регуляции активности KIT участвуют также другие фосфатазы, но их роль пока еще не выяснена [34].

Юкстамембранный домен (JM) выполняет функцию внутримолекулярного ингибитора. Этот домен KIT имеет стабильную вторичную структуру и прочно связан с АТР-связывающей областью рецептора. В таком виде KIT ингибирован и не может фосфорилировать белки. Фосфорилирование JM-домена изменяет его конформацию и снимает ингибирование рецептора [51].

Сигнальные пути, запускаемые KIT

Активация PI3K при участии KIT связана с делением клеток, дифференцировкой, адгезией, секрецией, выживанием и реорганизацией цитоскелета. KIT стимулирует выживание клеток путем PI3K-зависимой активации Akt и фосфорилирования Bad, являющегося проапоптотическим белком. При стимуляции SCF повышается уровень антиапоптотических белков Bcl-2 и Bcl-xL, и при этом снижается количество проапоптотического фактора Bax. [52] Физиологическая роль KIT-зависимой активации PI3K была показана в двух независимых исследованиях на трансгенных мышцах, экспрессирующих мутантный

c-kit. Потеря PI3K-киназной активности оказалась критической для гаметогенеза – мыши были стерильными [34].

Лиганд-зависимая активация КИТ приводит к быстрой активации киназ SFK (Src family kinase). В клетке данное семейство киназ отвечает за выживание клеток, хемотаксис, адгезию, пролиферацию и миграцию. Основным сайтом связывания SFR с КИТ является тирозин Y568. В 2004 г. были проведены опыты, в которых использовались мыши, экспрессирующие КИТ с заменой тирозина в положении 568 на фенилаланин (Y568F). У этих мышей наблюдался блок дифференцировки Т- и В-клеток. Можно было бы предположить, что SFK участвует в развитии лимфоцитов, если бы не тот факт, что Y568 является также сайтом связывания для других сигнальных молекул [34].

Показано, что при стимуляции SCF активируется сигнальный каскад Ras/Erk, играющий важную роль в клеточном делении, выживании и опухолевой трансформации. КИТ запускает также и другие сигнальные пути: например, JAK/STAT путь, активирует фосфолипазу C-γ, а также взаимодействует с различными адаптерными белками [34].

КИТ взаимодействует с тирозинфосфатазами белков SHP1 и SHP2. Активация SHP-2 необходима для полноценной активации Ras/Erk-пути. Установлена роль SHP-2 в дифференцировке эмбриональных клеток и гематопоезе. Также было отмечено, что КИТ взаимодействует с факторами транскрипции – Mitf и Slug [34, 54, 55].

ЭКСПРЕССИЯ И РОЛЬ С-КИТ В НОРМАЛЬНОМ ГЕМАТОПОЭЗЕ

Система КИТ/SCF участвует в гематопоезе. КИТ экспрессируется в костном мозге взрослых людей (около 8% всех клеток костного мозга) в гематопоетических стволовых клетках, и в периферической крови (0,1% клеток) [56, 57]. Экспрессия *c-kit* отмечена также и в более коммитированных предшественниках: эритроидных и миелоидных, а также предшественников мегакариоцитов [58], тучных клеток [59] и натуральных киллеров. Кроме того, КИТ участвует в раннем развитии Т- и В-лимфоцитов [60, 61].

Исследования *in vitro* показали, что SCF поддерживает жизнеспособность стволовых клеток, но для пролиферации требуются дополнительные факторы. Совместно с другими цитокинами, такими как Epo (эритропоэтин), IL-1, IL-3, IL-6, IL-7, GM-CSF, G-CSF и др., SCF способствует амплификации коммитированных клеток-предшественниц. Видимо, дифференцировка клеток-предшественниц в определенную линию клеток зависит не только от SCF, но и от дополнительных факторов. Например, SCF вместе с Epo приводит к росту популяции эритроидных предшественников, а совместно с IL-7 или GM-CSF – к экспансии миелоидных предшественников [62].

С-KIT и ОМЛ

Экспрессия и мутации c-kit в опухолевых клетках

KIT участвует в таких важных для опухолевой прогрессии процессах, как стимуляция пролиферации клеток, снижение чувствительности к апоптотическим сигналам, их миграции и адгезии. Гиперэкспрессия или мутации KIT стабильно наблюдаются у большинства больных ОМЛ, МДС/МПЗ, GIST и мастоцитозом. Следует учитывать, что снижение чувствительности к апоптозу способствует возникновению лекарственной резистентности [63].

Роль KIT в онкогенезе двойственна. С одной стороны, во множестве опухолей наблюдается конститутивная активация KIT [64], а с другой, когда KIT теряет свою функцию, развивается рак щитовидной железы. [65]

Конститутивная активация рецептора может быть достигнута различными путями, такими как активирующие мутации, аутокринная петля или паракринная активация. Аутокринная петля подразумевает экспрессию клетками одновременно KIT и SCF. Подобного рода мутации были найдены при мелкоклеточном раке легкого [66] и GIST [67].

Активирующие мутации KIT в опухолях могут быть в юкстамембранном (JM) и киназных доменах. Как упоминалось выше, JM-домен в KIT дикого типа ингибирует рецептор за счет взаимодействия с АТР-связывающей областью. Было показано, что мутации в JM-домене KIT приводят к сокращению времени, требуемого для активации KIT. При этом сохраняется субстратная специфичность рецептора и константа связывания с АТР [23]. Мутации в JM-домене KIT наблюдаются при различных опухолевых заболеваниях, таких как ОМЛ и GIST [68, 69].

Используя молекулярное моделирование удалось показать, что мутации в киназном домене KIT и Flt-3 (родственная по структуре RTK) не ведут непосредственно к стабилизации активной конформации фермента. Сдвиг равновесия в сторону активированной формы фосфотрансферазного домена происходит за счет значительной дестабилизации неактивной конформации киназы [70]. Мутации подобного рода были показаны для мастоцитоза [68, 71, 72], ОМЛ [68, 72] и GIST [68, 69].

Экспрессия c-kit в ОМЛ

В норме KIT экспрессируется только в недифференцированных или слабо-дифференцированных гематопозитических клетках. Однако было отмечено, что у больных острой миелоидной лейкемией продукт гена *c-kit* экспрессируется на поверхности полностью диффе-

ренцированных клеток [73]. Исследования *in vitro* на различных клеточных линиях ОМЛ показали наличие в них продуктов гена *c-kit*. В этих клетках степень фосфорилированности рецептора коррелирует с уровнем пролиферации [74, 75]. Внесение гена *c-kit* в клетки усиливает их пролиферативный потенциал [76]. Все эти данные позволяют думать, что активация КИТ в опухолевых клетках играет определенную роль в избыточной пролиферации и нарушении дифференцировки клеток крови при развитии ОМЛ.

В 63–85% случаев зрелые клетки крови людей, больных ОМЛ являются КИТ-позитивными [68, 77–83]. Наиболее часто экспрессия *c-kit* наблюдается в клетках больных ОМЛ, относящихся к типам М0, М1 и М2. Для типов М5 и М7 экспрессия КИТ менее свойственна [77–79, 81, 82]. Пациенты, в опухолевых клетках которых отмечалась экспрессия КИТ, имеют более высокий уровень смертности [8, 84].

Мутации гена c-kit при остром миелоидном лейкозе

Повышенная пролиферация клеток при раковом перерождении возникает как в результате мутаций гена *c-kit*, ведущих к конститутивной активации рецептора, так и при гиперэкспрессии рецептора. Мутации гена *c-kit* сравнительно редки у больных острым миелоидным лейкозом (до 6% всех больных ОМЛ) [85, 86], и главным образом ассоциированы с ОМЛ, при которых найдены t(8,21) или inv(16) (до 30% больных СВФ-ОМЛ) [11, 87].

Наиболее часто встречающейся мутацией является замена аспарагиновой кислоты в положении 816 киназного домена КИТ (экзон 17), среди которых найдены D816V, D816I, D816P, D816N, D816Y и D816H [8, 88, 89]. Мутация этой аминокислоты приводит к конститутивной активации рецептора [49]. Недавно была обнаружена еще одна активирующая мутация в экзоне 17 – N822K [74, 51]. Также часто выявляются мутации, приводящие к делециям и вставкам в 8 экзоне гена *c-kit* [87]. Мутации 8 экзона затрагивают иммуноглобулиновые домены рецептора. Они выражаются в гиперактивации рецептора в ответ на действие фактора стволовых клеток (SCF) [90]. Мутацией, ведущей к конститутивной активации КИТ, также являются тандемные повторы в экзонах 11 и 12 (юкстамембранный домен рецептора) [91].

Препараты, использующиеся для подавления КИТ в ОМЛ

Белок КИТ участвует в таких важных для опухолевой прогрессии процессах, как пролиферация клеток, утрата чувствительности к апоптотическим сигналам, миграция и адгезия. Гиперэкспрессия или мутации КИТ стабильно наблюдаются у большинства больных ОМЛ,

МДС/МПЗ, раком желудочно-кишечного тракта (GIST) и мастоцитозом. Следует учитывать, что снижение чувствительности к апоптозу способствует возникновению лекарственной резистентности [66]. Все эти факты послужили стимулами для разработки различных химиотерапевтических препаратов для ингибирования его активности.

Гливек (Gleevec®, STI571) является ингибитором тирозинкиназ, специфичным в отношении BCR-ABL, PDGFR и KIT. [92] Исследования на модельных линиях клеток свидетельствовали о значительном снижении пролиферации и подавлении антиапоптотического эффекта, вызванного активацией KIT. На свежих образцах клеток крови, полученных от больных, эти эффекты были выражены заметно слабее [93, 94]. Проведенные клинические испытания не выявили заметного терапевтического эффекта STI571 в отношении KIT⁺-больных ОМЛ [95–99].

Исследование кристаллической структуры рецептора и ингибитора показало, что STI571 не является идеальным ингибитором KIT. Он работает как конкурентный ингибитор – соединяется с АТФ-связывающим сайтом и не дает рецептору активироваться. Однако молекула STI571 слишком велика и разрушает в рецепторе связи, обеспечивающие инактивированную конформацию [50].

SU6668 и *SU5416* – низкомолекулярные ингибиторы тирозинкиназ VEGFR-1, VEGFR-2 (KDR), VEGFR-3, KIT, FLT3 [100–102]. Исследование, проведенное на модельной линии, а также на клетках крови больных ОМЛ, показало эффективность этих ингибиторов – снижалась пролиферация, повышалась чувствительность к апоптозу [103]. В опытах на мышах было показано, что SU5416 и SU6668 ингибируют метастазирование, формирование микрососудов и пролиферацию клеток [104]. Клинические испытания также были успешными [105, 106], однако вопрос о том, являются ли эти положительные результаты следствием подавления именно KIT, или все дело в ингибировании рецептора фактора роста эндотелия (VEGFR), остается открытым.

Дазатиниб (*Dasatinib*, BMS-354825) – специфический ингибитор киназ Src и BCR/ABL, показавший хорошие результаты в клинических испытаниях на больных хроническим миелоидным лейкозом [107]. На примере клеточных линий было показано, что дазатиниб ингибирует лиганд-зависимое фосфорилирование KIT и пролиферацию клеток [108, 109]. В проведенных клинических испытаниях на четырех пациентах с KIT⁺ ОМЛ Дазатиниб также показал неплохие результаты – у всех пациентов наблюдалось значительное улучшение картины крови; с помощью дополнительных препаратов у одного из пациентов удалось добиться полной ремиссии [110].

Сорафениб (Sorafenib) – изначально разрабатывался как ингибитор тирозинкиназ C-RAF и B-RAF, однако позже выяснилось, что он ингибирует и другие тирозинкиназы, в том числе KIT, FLT3, PDGFR, VEGFR. На примере клеточных линий было показано, что Сорафениб ингибирует лиганд-зависимое фосфорилирование KIT и пролиферацию клеток [111]. В настоящее время этот препарат используется для лечения рака почек и печени; также хорошие результаты были получены при лечении рака щитовидной железы [112].

Сунитиниб (Sunitinib, SU11248) – низкомолекулярный ингибитор тирозинкиназ, в том числе FLT3, VEGFR и PDGFR [113]. На примере клеточных линий было показано, что SU11248 ингибирует лиганд-зависимое фосфорилирование KIT и пролиферацию клеток [111]; у больных ОМЛ сунитиниб вызывает кратковременную ремиссию [113, 114].

В настоящее время ведутся преклинические испытания и других ингибиторов тирозинкиназ, влияющих, в том числе, и на KIT, таких как Ki11502, PD180970 и MLN518, PKC412, АВТ-869 [115-118].

Перспективным современным подходом к лечению опухолей могла бы стать РНК-интерференция, основанная на подавлении экспрессии генов на посттранскрипционном уровне с использованием коротких олигорибонуклеотидов.

На сегодняшний день РНК-интерференция является наиболее популярным методом нокдауна генов – он прост в исполнении, недорог, малотоксичен и высокоспецифичен. Технология siРНК уже несколько лет с успехом применяется в геномике для изучения функций генов и их взаимодействий, а также с целью поиска новых лечебных препаратов. Считается, что РНК-интерференция может стать основой новых биомедицинских подходов, направленных на борьбу с заболеваниями различной природы, в том числе и с онкологическими. Основным препятствием использования интерферирующих РНК в терапевтических целях является несовершенство методов их доставки в клетки-мишени. В настоящее время большое распространение получили системы переноса и экспрессии генов в клетках высших животных и человека *in vitro* и *in vivo* с помощью лентивирусных векторов. В качестве целевого гена такие векторы несут предшественник малых интерферирующих РНК (shРНК), который под действием внутренних клеточных механизмов превращается в siРНК.

IV. ИНТЕРФЕРЕНЦИЯ

ИСТОРИЯ ВОПРОСА

Явление РНК-интерференции было открыто в 1990 г. при попытке создания нового сорта петунии с более яркими цветками. Ученые ввели в клетки петунии конструкцию, кодирующую ген *chs*. Продукт этого гена, фермент халкосинтаза, отвечает за синтез фиолетового пигмента. Однако вместо желаемого усиления яркости цветки трансгенных растений были либо полностью белыми, либо содержали белые вкрапления или секторы. В клетках таких растений было отмечено снижение концентрации мРНК как для эндогенного, так и для экзогенного генов *chs*. Это явление получило название ко-супрессии [119]. В 1994 году другой группой ученых на примере экспрессии гена *chs* петунии было показано, что, несмотря на то, что в цитоплазме таких растений отсутствует мРНК, соответствующая гену *chs*, в ядре транскрипция гена сохраняется на прежнем уровне [120]. Отсюда следовал вывод, что ко-супрессия происходит на посттранскрипционном уровне. После обнаружения большого числа случаев посттранскрипционной деградации РНК у растений в результате введения растительных, бактериальных и вирусных трансгенов явление ко-супрессии переименовали в посттранскрипционный сайленсинг генов (ПТСГ).

Участие малых РНК в ПТСГ было установлено в 1999 г.: в клетках растений, у которых ПТСГ индуцировали введением дцРНК, образовывались короткие молекулы РНК (длиной около 25 нт.) смысловой и антисмысловой полярности, чего не наблюдалось у растений контрольной группы [121]. Затем образование подобных молекул обнаружили у дрозофилы при инициации ПТСГ длинными дцРНК [122]. Такие малые РНК, участвующие в ПТСГ, получили название «малые интерферирующие РНК» – siРНК.

Открытие феномена интерференции вызвало огромный интерес и простимулировало интенсивные исследования в этой области. Довольно скоро выяснилось, что явление сайленсинга характерно не только для растений, но и для грибов и животных [123, 124]. За последние годы был исследован молекулярный механизм РНК-интерференции, которая оказалась фундаментальным и эволюционно консервативным механизмом регуляции экспрессии генов и стала активно использоваться в молекулярной биологии как инструмент для анализа функций генов.

МЕХАНИЗМ ИНТЕРФЕРЕНЦИИ РНК

Сигналом для инициации интерференции РНК служит появление в клетке экзогенной или эндогенной дцРНК. Эффективность интерфе-

ренции коррелирует с длиной дцРНК – чем она длиннее, тем больше образуется siРНК, и тем большее число сайтов-мишеней на молекуле мРНК будет распознано. Минимальный размер дцРНК, достаточный для индукции интерференции, – 26 п.н. Скорее всего, такое ограничение защищает от деградации собственную клеточную мРНК с короткими внутримолекулярными самокомплементарными структурами [125].

Распознается и нарезается дцРНК ферментом Dicer, относящимся к семейству РНКаз типа III [126]. Этот белок консервативен у простейших, растений, грибов и животных; Dicer нарезает длинные дцРНК с обоих концов [127]. В результате образуются короткие дцРНК длиной 21–28 нт. (видоспецифический признак) [128]. Эти фрагменты содержат на 3'-концах по два выступающих неспаренных нуклеотида. 3'-Концы несут гидроксильную группу, а 5'-концы – фосфатную. Именно такая структура фрагмента необходима для участия в последующих этапах процесса, приводящего к сайленсингу РНК [129].

Следующий этап – образование погрузочного комплекса – RLC (RISC-loading complex). Для этого к ферменту Dicer, содержащему фрагмент дцРНК, присоединяется специальный белок (TRBP – у человека, R2D2 – у *Drosophila*). RLC участвует в двух важнейших процессах – в выборе цепи, которая будет участвовать в дальнейших событиях, а также в передаче этой цепи на комплекс RISC.

В комплексе RLC РНК располагается особым образом – Dicer связывает конец дцРНК, имеющий меньшую температуру плавления, а R2D2 – противоположный конец. Позиционирование фрагмента РНК в RLC определяет, повидимому, то, как она будет расположена в белке Argonaut, и то, какая цепь станет направляющей (guide), а какая разрушится, и не будет принимать участие в дальнейших событиях (пассажирская цепь, passenger). Направляющей цепью становится та, у которой ниже температура плавления 5'-конца [130].

RLC передает эти двухцепочечные siRNA на один из белков семейства Argonaut (Ago), который является основным белком комплекса RISC (рис. 3). Один из доменов белка Ago режет пассажирскую цепь между 9 и 10 нт считая от 5'-конца направляющей цепи, после чего пассажирская цепь выходит из комплекса, а направляющая остается в составе функционально активного комплекса RISC [131].

ВИДЫ МАЛЫХ РНК

Биохимически и функционально эти молекулы практически неразличимы, и принцип их классификации основан на природе предшественников.

siРНК – малые интерферирующие РНК длиной 21 нт образуются из длинных двухцепочечных молекул РНК (дцРНК).

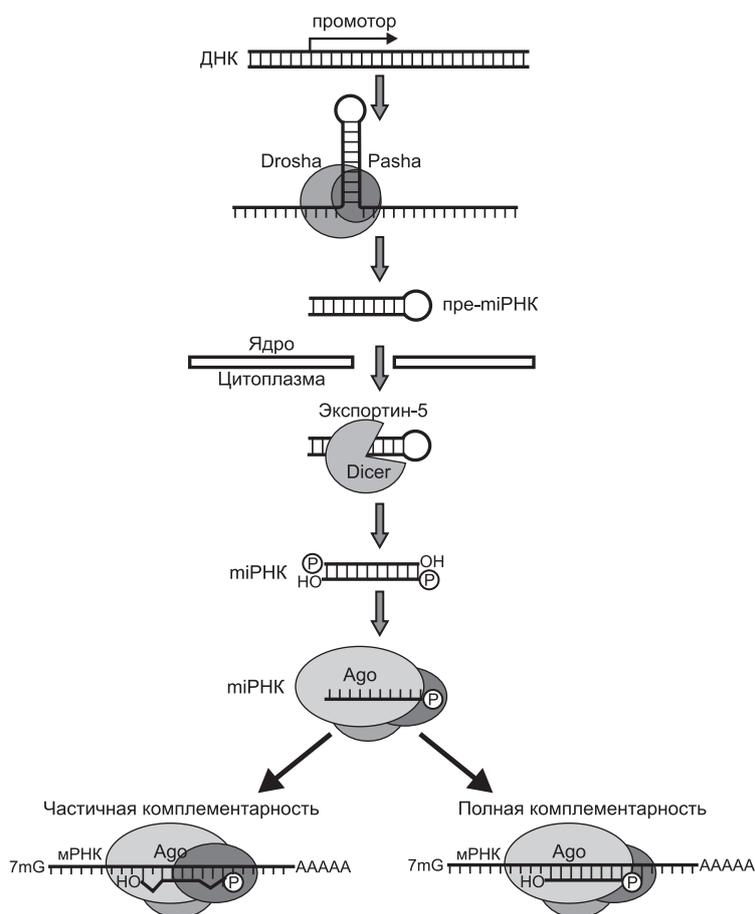


Рис. 3. Биогенез и механизм действия miRNA [132].

Первый этап процессинга miRNA происходит в ядре. В результате транскрипции генов образуются первичные транскрипты, которые содержат самокомплементарные участки, формирующие шпильки. Эти транскрипты разрезаются микропроцессорным комплексом (белки Pasha и Drosha) с образованием пре-miРНК длиной ~70 нт. Далее пре-miРНК при помощи Экспортин-5 переносится в цитоплазму клетки, где происходит их процессинг с участием ферментов Dicer (отрезает петлю шпильки) и Ago. В результате образуется зрелый комплекс RISC, содержащий одну из цепей miРНК. Дальнейшее развитие событий зависит от степени гомологии между miРНК и мРНК-мишенью. Для большинства изученных miРНК животных не характерно полное соответствие последовательности нуклеотидов мРНК-мишени; обычно они связываются с 3'-UTR мРНК и действуют как ингибиторы трансляции. У растений miРНК обычно обладают большей степенью гомологии к мРНК, поэтому они чаще действуют через индукцию ПТСТГ.

miРНК – малые интерферирующие РНК, длиной около 22 нт, образуются из внутримолекулярных двухцепочечных структур (шпильки) РНК-предшественниц [132, 133].

рiРНК – малые одноцепочечные РНК длиной 24–31 нт, характерные для половых клеток; для их образования не нужен Dicer [133].

miРНК

miРНК обнаружены как в царстве растений, так и в царстве животных. Гены miРНК обычно собраны в кластеры и транскрибируются как единые полицистронные единицы (TU), хотя существуют исключения, когда ген miРНК имеет собственный промотор [134]. Биогенез этих молекул наиболее полно изучен у животных (рис. 3). Первый этап процессинга miRNA происходит в ядре. В результате транскрипции генов образуются первичные транскрипты, которые содержат самокомплементарные участки, формирующие шпильки. Эти транскрипты, не выходя из ядра, разрезаются микропроцессорным комплексом с образованием пре-miРНК длиной ~70 нт.

Микропроцессорный комплекс включает два белка: 1) *Drosha*, который, как и Dicer, является представителем семейства РНКаз III типа [135]. Именно он разрезает первичный транскрипт. 2) *Pasha* (для *D. Melanogaster* и *C. Elegans*; человеческий аналог – DGCR8), содержащий два дцРНК-связывающих домена. DGCR8 связывается с транскриптами у основания шпильки и помогает ферменту *Drosha* разрезать стебель на расстоянии 11 п.н. от основания. В результате образуются пре-miРНК (рис. 3). Нарезание, скорее всего, происходит ко-транскрипционно и сопряжено со сплайсингом. Кроме классических miРНК выделяют так называемые «миртроны» – маленькие интроны, формирующие шпильки, которые вырезаются в результате сплайсинга; они по сути уже являются пре-miРНК и не требуют нарезания ферментом *Drosha* [134].

Далее пре-miРНК при помощи Экспортин-5 переносятся в цитоплазму клетки, где происходит их процессинг с участием ферментов Dicer (отрезает петлю шпильки) и Ago по описанному выше механизму. В результате образуется зрелый комплекс RISC, содержащий одну из цепей miРНК (рис. 3) [136]. Следует помнить, что большинство miРНК-дуплексов содержат некомплементарные нуклеотиды, в силу чего они не могут нарезаться ферментом Ago. Считается, что в этом случае пассажирская цепь удаляется РНК-хеликазой [134].

Дальнейшее развитие событий зависит от степени гомологии между miРНК и мРНК-мишенью. Для большинства изученных miРНК животных не характерно полное соответствие последовательности

нуклеотидов мРНК-мишени; обычно они связываются с 3'-UTR мРНК и действуют как ингибиторы трансляции [133, 137]. У растений miРНК обычно обладают большей степенью гомологии к мРНК, поэтому они чаще действуют через индукцию ПТСГ [138].

siРНК

Эндогенные siРНК чаще всего образуются из комплементарных пар транскриптов, кодирующихся транспозонами, повторяющимся элементами генома, или при наличии неполной комплементарности между транскриптами мРНК разных белков. Другой тип предшественников siРНК – это одноцепочечные самокомплементарные транскрипты, образующие длинные шпильчатые структуры (для miРНК длина стебля шпильки заметно меньше). Все вышеперечисленные двухцепочечные предшественники малых РНК образуются в ядре, после выхода из которого они претерпевают процессинг с участием белков Dicer и Ago, после чего остаются в комплексе RISC, где выполняют свои функции в ПТСГ [133].

У растений найдено большое число различных типов siРНК и белков, участвующих в их образовании. Например, у *Arabidopsis thaliana* найдено 4 DCL-белка (Dicer-like) и 10 белков семейства Argonaute, каждый из которых выполняет уникальные функции. Скорее всего, такое разнообразие связано с необходимостью для прикрепленных организмов бороться с биотическими и абиотическими стрессами. Другой особенностью siРНК растений является метилирование 3'-конца ферментом HEN1. Кроме того, в образовании эндогенных siRNA растений участвует РНК-зависимая-РНК-полимераза (RdRP). Среди растительных siРНК выделяют:

1) *casiРНК* – образуются из транспозонов и tandemных повторов; участвуют в реорганизации хроматина.

2) *tasiРНК* – их образование связано с процессингом miРНК.

3) *natsiРНК* – синтезируются в ответ на стресс. Они образуются из пары частично комплементарных транскриптов; причем обычно один из транскриптов экспрессируется конститутивно, а другой только при стрессах.

4) *lsiРНК* (“long” siRNAs) – также, как и *natsiРНК*, образуются из комплементарных пар транскриптов и синтез их вызывается стрессом, но они заметно длиннее – 30–40 нт [139]

Геном млекопитающих и дрозофил не кодирует РНК-зависимых-РНК-полимераз (RdRP), поэтому открытие у них эндогенных siРНК стало неожиданным. Первые открытые siРНК млекопитающих были направлены против одного из мобильных элементов генома LINE1. Он имеет промоторы для смысловой и антисмысловой цепей; комп-

лементарные транскрипты образуют дцРНК, которая инициирует РНК-интерференцию. Позже у нематоды *Caenorhabditis elegans* и дрозофил также были найдены siРНК, участвующие в сайленсинге транспозонов [139].

siRNA, образующиеся при вирусной инфекции. У растений и грибов РНК-интерференция участвует в борьбе с вирусами при помощи siРНК, образующихся из дцРНК, которая появляется при репликации вирусов. Эти siРНК полностью комплементарны вирусной РНК и в составе комплекса RISC способствуют ее разрушению или подавлению трансляции [140].

Млекопитающие и *C. elegans* имеют по одному виду ферментов Dicer, в то время как у *Drosophila* найдено два вида: Dcr-1 – для образования miРНК, и Dcr-2 – для siРНК. Дело в том, что *Drosophila* активно использует РНК-интерференцию как для регуляции своих генов, так и для защиты от вирусов, и за счет специализации Dicer снижается конкуренция за фермент между пре-miРНК и вирусными дцРНК. Интересно, что гены Dcr-2 и Ago-2 являются одними из самых быстро эволюционирующих, что может отражать давление эволюции на ПТСГ со стороны вирусов. Для млекопитающих сайленсинг вирусных генов не столь актуален, поскольку в ходе эволюции они приобрели эффективную основанную на белках иммунную систему [140].

piРНК

piРНК (24–29 нт) экспрессируются преимущественно в половых клетках. В своем образовании они зависят от белков PIWI (подсемейство белков Ago), характерных также для половых клеток. Большинство piРНК кодируются повторяющимися межгенными элементами ДНК, в том числе и мобильными элементами [141]. В отличие от всех других малых РНК, образование piРНК не зависит от Dicer, поскольку они никогда не образуют стабильных дуплексов [142].

ТЕХНОЛОГИЯ РНК-ИНТЕРФЕРЕНЦИИ

Со времени открытия РНК-интерференции ученые предсказывали большое практическое значение этого феномена. В последние годы невероятно быстрыми темпами шла разработка методик регуляции экспрессии генов, базирующихся на свойствах малых РНК. На сегодняшний день РНК-интерференция является наиболее популярным методом нокдауна (избирательной инактивации экспрессии) генов – он прост в исполнении, недорог, малотоксичен и высокоспецифичен. Технология siРНК уже несколько лет с успехом применяется в геномике для изучения функций генов и их взаимодействий, а также с целью поиска новых лекарственных средств. Возможно в будущем

эта методика найдет применение и в медицине, например, при борьбе против вирусных заболеваний и паразитарных инфекций, при лечении рака и т.п. Ниже описаны методические аспекты технологии siРНК, а также некоторые проблемы, возникающие при ее использовании.

Синтез siRNA in vitro

Для исследования функций генов у растений, червей и *Drosophila* обычно используют длинные молекулы dsРНК. Однако их применение для этих же целей у млекопитающих невозможно, поскольку в их организме dsРНК длиной более 30 п.н. вызывает активацию интерфероновой системы. При этом происходит инициация экспрессии более 100 различных клеточных генов, в том числе и гена dsРНК-связывающей протеинкиназы R, которая обеспечивает неспецифическое подавление трансляции и деградацию РНК [143]. Поэтому для индукции РНК-интерференции в клетках млекопитающих используют синтетические двуцепочечные молекулы siРНК длиной 21–22 п.н. [144].

Существенно, что синтезированная *in vitro* siРНК должна быть полностью комплементарна мРНК-мишени, поскольку различие даже в одном нуклеotide может полностью лишить эту молекулу siРНК активности. На эффективность подавления экспрессии гена во многом влияет выбор участка-мишени на молекуле мРНК, с которым должна образовывать дуплекс комплементарная ему siРНК – вторичная структура мРНК-мишени или связанные с ней белки могут затруднять доступ к ней siРНК. Не рекомендуется использовать в качестве сайтов-мишеней первые 75–100 нуклеотидов мРНК, поскольку они с большой долей вероятности могут содержать регуляторные связывающие белки последовательности. И все же, в каждом конкретном случае выбор последовательности-мишени для siРНК индивидуален и осуществляется методом проб и ошибок. Обычно синтезируют 3–4 различных siРНК, комплементарных различным участкам молекулы мРНК, из которых экспериментальным путем выбирают наиболее эффективную [145].

Считается, что последовательность из 21 нуклеотида – оптимальная длина области-мишени и, соответственно, siРНК. Кроме того, последовательность-мишень должна начинаться с двух остатков аденина. Наибольший эффект РНК-интерференции достигается, если синтетическая двуцепочечная siРНК имеет 19 спаренных оснований и по два выступающих уридина на 3'-концах каждой из цепей. Иногда неспаренные остатки уридина заменяют остатками дезокситимидина, что придает молекуле большую устойчивость в клетке. Фосфорилирование 5'-концов – необходимое условие для функ-

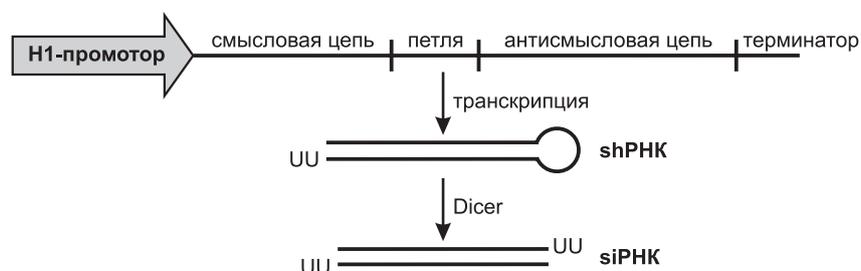


Рис. 4. Экспрессия shRNA.

Для экспрессии малых РНК внутри клетки используют ДНК-конструкты, в которых последовательности, кодирующие смысловую и антисмысловую цепи siРНК, разделенные спейсером, расположены между промотором и терминатором РНК-полимеразы III (pol III). Транскрипция такой матрицы приводит к образованию РНК-шпилек (shРНК), аналогичных пре-miРНК. После транскрипции петля, соединяющая две комплементарные последовательности shРНК, вырезается при участии фермента Dicer, в результате чего образуются siРНК.

ционирования siРНК, однако оно не является значимым фактором для дизайна молекулы, поскольку может происходить непосредственно в клетке [132].

Доставку синтезированной *in vitro* siРНК в клетки обычно осуществляют за счет трансфекции с использованием липофильных агентов или методом электропорации. В случае выбора последнего необходимо принимать во внимание значительную (более 50%) гибель клеток в ходе процедуры. Эффект РНК-интерференции развивается не сразу после трансфекции клеток, поскольку siРНК обеспечивает деградацию только мРНК, но не белка. Обычно время развития эффекта составляет около 18 часов, однако в случае стабильных белков этот период может увеличиваться. Главный недостаток метода состоит в том, что действие siРНК непродолжительно, и сохраняется лишь в течение 3–5 клеточных делений. Поэтому в случае стабильных белков, или если для проявления фенотипа клеток нужно значительное время, делают либо дополнительные трансфекции, либо используют конструкции, позволяющие экспрессировать siРНК непосредственно в клетках [132].

Экспрессия малых РНК внутри клетки

Для достижения длительного эффекта РНК-интерференции используют ДНК-конструкты, в которых последовательности, кодирующие смысловую и антисмысловую цепи siРНК, разделенные спейсером, расположены между промотором и терминатором РНК-полимеразы III (pol III) (рис. 4). Использование именно pol III очень удобно,

поскольку в этом случае сигналом, терминирующим транскрипцию, является последовательность из четырех тимидинов, что позволяет продуцировать короткие РНК с 1-4 уридинами на 3'-конце. Транскрипция такой матрицы приводит к образованию РНК-шпиклек (shРНК), аналогичных пре-miРНК. Оптимальная экспрессия такого транскрипта достигается при длине спейсера, равной девяти основаниям. Установлено, что после транскрипции петля, соединяющая две комплементарные последовательности shРНК, вырезается при участии фермента Dicer, в результате чего образуются siРНК. Эффективность РНК-интерференции значительно повышается при использовании вместо случайного спейсера последовательности, кодирующей петлю pre-miРНК человека [132].

Вначале для экспрессии shРНК в клетках использовали плазмиды, в которые был также встроен селективный маркер. Позже стали использовать более удобные вирусные векторы, из которых самыми популярными являются ретровирусные.

V. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Острый миелоидный лейкоз (ОМЛ) – злокачественное заболевание крови, возникающее в результате различных мутаций, которые увеличивают пролиферативную способность и выживаемость клеток крови, нарушают процессы их дифференцировки и апоптоза. В каждом отдельном случае в развитии злокачественного заболевания участвуют разные гены. Это затрудняет выбор генов-мишеней и их белковых продуктов для направленной терапии опухолей. Ситуация еще больше осложняется тем, что в развитии опухолей участвуют, как правило, не один, а несколько генов. Было высказано предположение, что наличие в клетках пары активированных онкогенов (в частности, транскрипционного фактора и тирозинкиназы) запускает процесс их злокачественного перерождения. Наиболее часто встречается пара онкогенов *AML1-ETO* и *c-kit*. Существующие методы лечения онкологических заболеваний (пересадка костного мозга, лучевая терапия и химиотерапия) имеют ряд существенных недостатков, включая подавление иммунитета, тяжелые лучевые отравления, возникновение вторичных опухолей, значительно более устойчивых ко всем видам лечения. В настоящее время во многих лабораториях активно ведется разработка новых перспективных подходов для борьбы с лейкозами. Одним из них можно считать подавление экспрессии активированных лейкозных онкогенов на основе принципа РНК-интерференции.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Jemal, A., Siegel, R., Ward, E., Hao, Y., Xu, J., Thun, M.J.* (2009) *C.A. Cancer J. Clin.*, **59**, 225–249.
2. *Воробьев А.И.* Москва. (2002) Ньюдиамед. В 2 томах. Т.1, 448 стр.
3. *Rubnitz, J.E., Gibson, B., Smith, F.O.* (2008) *Pediatr. Clin. North. Am.*, **55**, 21–51.
4. *Advani, A.S.* (2006) *Curr. Hematol. Malig. Rep.*, **1**, 101–107.
5. *Bennett, J.M., Catovsky, D., Daniel, M.T., Flandrin, G., Galton, D.A., Gralnick, H.R., Sultan, C.* (1976) *Br. J. Haematol.*, **33**, 451–458.
6. *Vardiman, J.W., Harris, N.L., Brunning, R.D.* (2002) *Blood*, **100**, 2292–2302.
7. *Grimwade, D., Walker, H., Oliver, F., Wheatley, K., Harrison, C., Harrison, G., Rees, J., Hann, I., Stevens, R., Burnett, A., Goldstone, A.* (1998) *Blood*, **92**, 2322–2333.
8. *Lasa, A., Carricondo, M.T., Carnicer, M.J., Perea, G., Aventin, A., Nomdedeu, J.F.* (2006) *Haematologica*, **91**, 1283–1284
9. *Kelly, L.M., Gilliland, D.G.* (2002) *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.*, **3**, 179–198.
10. *Gilliland, D.G.* (1998) *Leukemia*, **12** Suppl. 1: S7–12.
11. *Paschka, P., Marcucci, G., Ruppert, A.S., Mrózek, K., Chen, H., Kittles, R.A., Vukosavljevic, T., Perrotti, D., Vardiman, J.W., Carroll, A.J., Kolitz, J.E., Larson, R.A., Bloomfield, C.D.* (2006) *J. Clin. Oncol.*, **24**, 3904–3911.
12. *Niebuhr, B., Fischer, M., Tager, M., Cammenga, J., Stocking, C.* (2008) *Blood Cells Mol. Dis.*, **40**, 211–218.
13. *Huang, G., Shigesada, K., Ito, K., Wee, H.J., Yokomizo, T., Ito, Y.* (2001) *EMBO J.*, **20**, 723–733.
14. *Perryab, C., Eldorb, A., Sorega, H.* (2002) *Leuk. Res.*, **26**, 221–228.
15. *Kitabayashi, I., Yokoyama, A., Shimizu, K., Ohki, M.* (1998) *EMBO J.*, **17**, 2994–3004.
16. *Durst, K.L., Hiebert, S.W.* (2004) *Oncogene*, **23**, 4220–4224.
17. *Taniuchi, I., Osato, M., Egawa, T., Sunshine, M.J., Bae, S.C., Komori, T., Ito, Y., Littman, D.R.* (2002) *Cell*, **111**, 621–633.
18. *Durst, K.L., Lutterbach, B., Kummalue, T., Friedman, A.D., Hiebert, S.W.* (2003) *Mol. Cell. Biol.*, **23**, 607–619.
19. *Elagib, K.E., Goldfarb, A.N.* (2007) *Cancer Lett.*, **251**, 179–186.
20. *Feinstein, P.G., Kornfeld, K., Hogness, D.S., Mann, R.S.* (1995) *Genetics*, **140**, 573–586.
21. *Hug, B.A., Lazar, M.A.* (2004) *Oncogene*, **23**, 4270–4274.
22. *Costoya, J.A., Pandolfi, P.P.* (2001) *Curr. Opin. Hematol.*, **8**, 212–217.
23. *Melnick, A.M., Westendorf, J.J., Polinger, A., Carlile, G.W., Arai, S., Ball, H.J., Lutterbach, B., Hiebert, S.W., Licht, J.D.* (2000) *Mol. Cell. Biol.*, **20**, 2075–2086.
24. *McGhee, L., Bryan, J., Elliott, L., Grimes, H.L., Kazanjian, A., Davis, J.N., Meyers, S.* (2003) *J. Cell Biochem.*, **89**, 1005–1018.
25. *Minucci, S., Maccarana, M., Ciocce, M., De Luca, P., Gelmetti, V., Segalla, S., Di Croce, L., Giavara, S., Matteucci, C., Gobbi, A., Bianchini, A., Colombo, E., Schiavoni, I., Badaracco, G., Hu, X., Lazar, M.A., Landsberger, N., Nervi, C., Pelicci, P.G.* (2000) *Mol. Cell.*, **5**, 811–820.
26. *Downing, J.R.* (2003) *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **13**, 48–54.
27. *Peterson, L.F., Zhang, D.E.* (2004) *Oncogene*, **23**, 4255–4262.
28. *Shimada, H., Ichikawa, H., Nakamura, S., Katsu, R., Iwasa, M., Kitabayashi, I., Ohki, M.* (2000) *Blood*, **96**, 655–663.

29. Rosenbauer, F., Koschmieder, S., Steidl, U., Tenen, D.G. (2005) *Blood*, **106**, 1519–1524.
30. Frosina, G. (2000) *Eur. J. Biochem*, **267**, 2135–2149.
31. Bausecke, J., Schwieger, M., Griesinger, F., Schiedlmeier, B., Wulf, G., Trumper, L., Stocking, C. (2005) *Leuk. Lymphoma*, **46**, 265–272.
32. Russell, E. S. (1979) *Adv. Gen.*, **20**, 357–459.
33. Liu, H., Chen, X., Focia, P., He, X. (2007) *EMBO J.*, **26**, 891–901.
34. Lennartsson, J., Voytyuk, O., Heiss, E., Sundberg, C., Sun, J., Ronnstrand, L. (2005) *Cancer Ther.*, **3**, 5–28.
35. Roskoski, R. Jr. (2005) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **338**, 1307–1315.
36. d'Auriol, L., Mattei, M.G., Andre, C., Galibert, F. (1998) *Hum. Genet.*, **78**, 374–376.
37. Geissler, E.N., Cheng, S.V., Gusella, J.F., Housman, D.E. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 9635–9639.
38. Vandenbark, G.R., Chen, Y., Friday, E., Pavlik, K., Anthony, B., deCastro, C., Kaufman, R.E. (1996) *Cell. Growth. Differ.*, **7**, 1383–1392.
39. Vandenbark, G.R., deCastro, C.M., Taylor, H., Dew-Knight, S., Kaufman, R.E. (1992) *Oncogene*, **7**, 1259–1266.
40. Yamamoto, K., Tojo, A., Aoki, N., Shibuya, M. (1993) *Jpn. J. Cancer Res.*, **84**, 1136–1144.
41. Yasuda, H., Galli, S.J., Geissler, E.N. (1993) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **191**, 893–901.
42. Albanesi, C., Geremia, R., Giorgio, M., Dolci, S., Sette, C., Rossi, P. (1996) *Development*, **122**, 1291–1302.
43. Paronetto, M.P., Farini, D., Sammarco, I., Maturo, G., Vespasiani, G., Geremia, R., Rossi, P., and Sette, C. (2004) *Am. J. Pathol.*, **164**, 1243–1251.
44. Yee, N.S., Langen, H., Besmer, P. (1993) *J. Biol. Chem.*, **268**, 14189–14201.
45. Cruz, A.C., Frank, B.T., Edwards, S.T., Dazin, P.F., Peschon, J.J. Fang, K.C. (2004) *J. Biol. Chem.*, **279**, 5612–5620.
46. Heissig, B., Hattori, K., Dias, S., Friedrich, M., Ferris, B., Hackett, N.R., Crystal, R.G., Besmer, P., Lyden, D., Moore, M.A.S., Werb, Z., Rafii, S. (2002) *Cell*, **109**, 625–637.
47. Wypych, J., Bennett, L.G., Schwartz, M.G., Clogston, C.L., Lu, H.S., Broudy, V.C., Bartley, T.D., Parker, V.P., Langley, K.E. (1995) *Blood*, **85**, 66–73.
48. Turner, A.M., Bennett, L.G., Lin, N.L., Wypych, J., Bartley, T.D., Hunt, R.W., Atkins, H.L., Langley, K.E., Parker, V., Martin, F. (1995) *Blood*, **85**, 2052–2058.
49. Nakamura, Y., Tajima, F., Ishiga, K., Yamazaki, H., Oshimura, M., Shiota, G., Murawaki, Y. (2004) *Exp. Hematol.*;32(4):390–396.
50. Mol, C.D., Dougan, D.R., Schneider, T.R., Skene, R.J., Kraus, M.L., Scheibe, D.N., Snell, G.P., Zou, H., Sang, B.C., Wilson, K.P. (2004) *J. Biol. Chem.*, **279**, 31655–31663.
51. Chan, P.M., Ilangumaran, S., La Rose, J., Chakrabarty, A., Rottapel, R. (2003) *Mol. Cell. Biol.*, **23**, 3067–3078.
52. Wandzioch, E., Edling, C., Pulmer, R., Carisson, L., and Hallberg, B. (2004) *Blood*, **104**, 51–57.
53. Смирнов А.Н. (2006) Москва. Издательская группа «ГОЭТАР-Медиа», 352 стр.
54. Perez-Losada, J., Sanchez-Martin, M., Perez-Caro, M., Perez-Mancera, P., Sanchez-Garcia, I. (2003) *Oncogene*, **22**, 4205–4211.
55. Perez-Losada, J., Sanchez-Martin, M., Rodriguez-Garcia, A., Sanchez, M., Orfao, A., Flores, T., Sanchez-Garcia, I. (2002) *Blood*, **100**, 1274–1286.

56. Hassan, H.T., EL-Sheemy, M. (2004) *J. Roy. Soc. Med.*, **97**, 465–471.
57. Ogawa, M., Matsuzaki, Y., Nishikawa, S., Hayashi, S., Kunisada, T., Sudo, T., Kina, T., Nakauchi, H., Nishikawa, S. (1991) *J. Exp. Med.*, **174**, 63–71
58. André, C., d'Auriol, L., Lacombe, C., Gisselbrecht, S., Galibert, F. (1989) *Oncogene*, **4**, 1047–1049.
59. Galli, M.C., Giardina, P.J., Migliaccio, A.R., Migliaccio, G. (1993) *Int. J. Clin. Lab. Res.*, **23**, 70–77.
60. deCastro, C.M., Denning, S.M., Langdon, S., Vandenbark, G.R., Kurtzberg, J., Searce, R., Haynes, B.F., Kaufman, R.E. (1994) *Exp. Hematol.*, **22**, 1025–1033
61. Lennartsson, J., Voytyuk, O., Heiss, E., Sundberg, C., Sun, J., Ronnstrand, L. (2005) *Cancer Ther.*, **3**, 5–28
62. Galli, S.J., Tsai, M., Wershil, B.K. (1993) *Am. J. Pathol.*, **142**, 965–974.
63. Hassan, H.T., Zander, A. (1996) *Acta Haematol.*, **95**, 257–262.
64. Ulivi, P., Zoli, W., Medri, L., Amadori, D., Saragoni, L., Barbanti, F., Calistri, D., Silvestrini, R. (2004) *Breast Cancer Res. Treat.*, **83**, 33–42.
65. Tanaka, T., Umeki, K., Yamamoto, I., Kotani, T., Sakamoto, F., Noguchi, S., Ohtaki, S. (1995) *Endocr. J.*, **42**, 723–728.
66. Krystal, G.W., Hines, S.J., Organ, C.P. (1996) *Cancer Res.*, **56**, 370–376.
67. Théou-Anton, N., Tabone, S., Brouty-Boyé, D., Saffroy, R., Ronnstrand, L., Lemoine, A., Emile, J.F. (2006) *Br. J. Cancer*, **94**, 1180–1185.
68. Kitayama, H., Kanakura, Y., Furitsu, T., Tsujimura, T., Oritani, K., Ikeda, H., Sugahara, H., Mitsui, H., Kanayama, Y., Kitamura, Y. (1995) *Blood*, **85**, 790–798.
69. Feng, F., Liu, X.H., Xie, Q., Liu, W.Q., Bai, C.G., Ma, D.L. (2003) *World J. Gastroenterol.*, **9**, 2548–2551.
70. Torrent, M., Rickert, K., Pan, B.S., Sepp-Lorenzino, L. (2004) *J. Mol. Graph. Model.*, **23**, 153–165.
71. Longley, B.J., Reguera, M.J., Ma, Y. (2001) *Leuk. Res.*, **25**, 571–576.
72. Boissan, M., Feger, F., Guillosso, J.J., Arock, M. (2000) *J. Leukoc. Biol.*, **67**, 135–148
73. Ikeda, H., Kanakura, Y., Tamaki, T., Kuriu, A., Kitayama, H., Ishikawa, J., Kanayama, Y., Yonezawa, T., Tarui, S., Griffin, J.D. (1991) *Blood*, **78**, 2962–2968.
74. Kuriu, A., Ikeda, H., Kanakura, Y., Griffin, J.D., Druker, B., Yagura, H., Kitayama, H., Ishikawa, J., Nishiura, T., Kanayama, Y. (1991) *Blood*, **78**, 2834–2840.
75. Beghini, A., Magnani, I., Ripamonti, C.B., Larizza, L. (2002) *Hematol. J.*, **3**, 157–163.
76. Hu, Q., Trevisan, M., Xu, Y., Dong, W., Berger, S.A., Lyman, S.D., Minden, M.D. (1995) *J. Clin. Invest.*, **95**, 2530–2538.
77. Bene, M.C., Bernier, M., Casasnovas, R.O., Castoldi, G., Knapp, W., Lanza, F., Ludwig, W.D., Matutes, E., Orfao, A., Sperling, C., van't Veer, M.B. (1998) *Blood*, **92**, 596–599.
78. Cascavilla, N., Musto, P., D'Arena, G., Melillo, L., Carella, A.M., Petrilli, M.P., Sanpaolo, G., Carotenuto, M. (1998) *Haematol. J.*, **83**, 392–397.
79. Hans, C.P., Finn, W.G., Singleton, T.P., Schnitzer, B., Ross, C.W. (2002) *Am. J. Clin. Pathol.*, **117**, 301–305.
80. Omar, S., Abdel-Kader, M., Matar, M., Meabed, M. (2001) *J. Egypt. Nat. Cancer Inst.*, **13**, 191–201
81. Schwartz, S., Heinecke, A., Zimmermann, M., Creutzig, U., Schoch, C., Harbott, J., Fonatsch, C., Lffler, H., Bchner, T., Ludwig, W. D., Thiel, E. (1999) *Leuk. Lymph.*, **34**, 85–94
82. Tsao, A.S., Kantarjian, H., Thomas, D., Giles, F., Cortes, J., Garcia-Manero, G., Huh, Y., Yang, Y., Shen,

- Y., Albitar, M., Estey, E. (2004) *Leuk. Res.* **28**, 373–378.
83. Valverde, L.R., Matutes, E., Farahat, N., Heffernan, A., Owusu-Ankomah, K., Morilla, R., Catovsky, D. (1996) *Ann. Hematol.*, **72**, 11–15.
84. Ashman, L.K., Roberts, M.M., Gadd, S.J., Cooper, S.J., Juttner, C.A. (1988) *Leuk. Res.*, **12**, 923–928.
85. Longley, B. J. Jr., Metcalfe, D.D., Tharp, M., Wang, X., Tyrrell, L., Lu, S.-Z., Heitjan, D., Ma, Y. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 1609–1614.
86. Zaker, F., Mohammadzadeh, M., Mohammadi, M. (2012) *Arch. Iran. Med.*, **13**, 21–25.
87. Gari, M., Goodeve, A., Wilson, G., Winship, P., Langabeer, S., Linch, D., Vandenberghe, E., Peake, I., Reilly, J. (1999) *Br. J. Haematol.*, **105**, 894–900.
88. Bacher, U., Haferlach, T., Kern, W., Haferlach, C., Schnittger, S. (2007) *Haematol. J.*, **92**, 744–752.
89. Sun, J., Pedersen, M., Ronnstrand, L. (2009) *J. Biol. Chem.*, **284**, 11039–11047.
90. Kohl, T.M., Schnittger, S., Ellwart, J.W., Hiddemann, W., Spiekermann, K. (2005) *Blood*, **105**, 3319–3321.
91. Corbacioglu, S., Kilic, M., Westhoff, M.A., Reinhardt, D., Fulda, S., Debatin, K.M. (2006) *Blood*, **108**, 3504–3513.
92. Kindler, T., Breitenbuecher, F., Marx, A., Hess, G., Gschaidmeier, H., Gamm, H., Kirkpatrick, C.J., Huber, C., Fischer, T. (2003) *Blood*, **101**, 2960–2962.
93. Heinrich, M.C., Griffith, D.J., Druker, B.J., Wait, C.L., Ott, K.A., Ziegler, A.J. (2000) *Blood*, **96**, 925–932.
94. Scappini, B., Onida, F., Kantarjian, H.M., Dong, L., Verstovsek, S., Keating, M.J., Beran, M. (2001) *Clin. Cancer Res.*, **7**, 3884–3893.
95. Kindler, T., Breitenbuecher, F., Marx, A., Beck, J., Hess, G., Weinkauff, B., Duyster, J., Peschel, C., Kirkpatrick, C.J., Theobald, M., Gschaidmeier, H., Huber, C., Fischer, T. (2004) *Blood*, **103**, 3644–3654.
96. Cortes, J., Giles, F., O'Brien, S., Thomas, D., Albitar, M., Rios, M.B., Talpaz, M., Garcia-Manero, G., Faderl, S., Letvak, L., Salvado, A., Kantarjian, H. (2003) *Cancer*, **97**, 2760–2766.
97. Cairoli, R., Beghini, A., Morello, E., Grillo, G., Montillo, M., Larizza, L., Morra, E. (2005) *Leuk. Res.*, **29**, 397–400.
98. Heidel, F., Cortes, J., Rucker, F.G., Aulitzky, W., Letvak, L., Kindler, T., Huber, C., Duhner, H., Kantarjian, H., Fischer, T. (2007) *Cancer*, **109**, 907–914.
99. Piccaluga, P.P., Malagola, M., Rondoni, M., Arpinati, M., Paolini, S., Candoni, A., Fanin, R., Messa, E., Pirrotta, M.T., Lauria, F., Visani, G., Alberti, D., Rancati, F., Vinaccia, V., Russo, D., Saglio, G., Baccarani, M., Martinelli, G. (2007) *Haematol. J.*, **92**, 1721–1722.
100. Fong, T.A., Shawver, L.K., Sun, L., Tang, C., App, H., Powell, T.J., Kim, Y.H., Schreck, R., Wang, X., Risau, W., Ullrich, A., Hirth, K.P., McMahon, G. (1999) *Cancer Res.*, **59**, 99–106.
101. O'Farrell, A., Yuen, H., Smolich, B., Hannah, A., Louie, S., Hong, W., Stopeck, A., Silverman, L., Lancet, J., Karp, J. (2004) *Leuk. Res.*, **8**, 679–689.
102. Loges, S., Tinnefeld, H., Metzner, A., Jucker, M., Butzal, M., Bruweleit, M., Fischer, U., Draab, E., Schuch, G., O'Farrell, A.M., Hossfeld, D.K., Bokemeyer, C., Fiedler, W. (2005) *Blood (ASH Annual Meeting Abstracts)*, **106**, Abstract 2793.

103. Smolich, B.D., Yuen, H.A., West, K.A., Giles, F.J., Albitar, M., Cherrington, J.M. (2001) *Blood*, **97**, 1413–1421.
104. Shaheen, R.M., Davis, D.W., Liu, W., Zebrowski, B.K., Wilson, M.R., Bucana, C.D., McConkey, D.J., McMahon, G., Ellis, L.M. (1999) *Cancer Res.*, **59**, 5412–5416.
105. Giles, F.J., Stopeck, A.T., Silverman, L.R., Lancet, J.E., Cooper, M.A., Hannah, A.L., Cherrington, J.M., O'Farrell, A.M., Yuen, H.A., Louie, S.G., Hong, W., Cortes, J.E., Verstovsek, S., Albitar, M., O'Brien, S.M., Kantarjian, H.M., Karp, J.E. (2003) *Blood*, **102**, 795–801.
106. Fiedler, W., Serve, H., Dohner, H., Schwittay, M., Ottmann, O.G., O'Farrell, A.M., Bello, C.L., Allred, R., Manning, W.C., Cherrington, J.M., Louie, S.G., Hong, W., Brega, N.M., Massimini, G., Scigalla, P., Berdel, W.E., Hossfeld, D.K. (2005) *Blood*, **105**, 986–993.
107. Talpaz, M., Shah, N.P., Kantarjian, H., Donato, N., Nicoll, J., Paquette, R., Cortes, J., O'Brien, S., Nicaise, C., Bleickardt, E., Blackwood-Chirchir, M.A., Iyer, V., Chen, T.T., Huang, F., Decillis, A.P., Sawyers, C.L. (2006) *N. Engl. J. Med.*, **354**, 2531–2541.
108. Schittenhelm, M.M., Shiraga, S., Schroeder, A., Corbin, A.S., Griffith, D., Lee, F.Y., Bokemeyer, C., Deininger, M., Druker, B.J., Heinrich, M.C. (2006) *Cancer Res.*, **66**, 473–481.
109. Kolb, E.A., Gorlick, R., Houghton, P.J., Morton, C.L., Lock, R.B., Tajbakhsh, M., Reynolds, C.P., Maris, J.M., Keir, S.T., Billups, C.A., Smith, M.A. (2008) *Pediatr. Blood Cancer*, **50**, 1198–1206.
110. Cioch, M., Dmoszynska, A., Wach, M. (2008) *Haematol. J.*, **93**, 480 Abs.1236.
111. Hu, S., Niu, H., Minkin, P., Orwick, S., Shimada, A., Inaba, H., Dahl, G.V., Rubnitz, J., Baker, S.D. (2008) *Mol. Cancer Ther.*, **7**, 1110–1120.
112. Hasskarl, J. (2010) *Recent Results Cancer Res.*, **184**, 61–70.
113. Fiedler, W., Serve, H., Döhner, H., Schwittay, M., Ottmann, O.G., O'Farrell, A.M., Bello, C.L., Allred, R., Manning, W.C., Cherrington, J.M., Louie, S.G., Hong, W., Brega, N.M., Massimini, G., Scigalla, P., Berdel, W.E., Hossfeld, D.K. (2005) *Blood*, **105**, 986–993.
114. Ikezoe, T., Nishioka, C., Tasaka, T., Yang, Y., Komatsu, N., Togitani, K., Koeffler, H.P., Taguchi, H. (2006) *Mol. Cancer Ther.*, **5**, 2522–30.
115. Corbin, A.S., Griswold, I.J., La Rosùe, P., Yee, K.W., Heinrich, M.C., Reimer, C.L., Druker, B.J., Deininger, M.W. (2004) *Blood*, **104**, 3754–7.
116. Growney, J.D., Clark, J.J., Adelsperger, J., Stone, R., Fabbro, D., Griffin, J.D., Gilliland, D.G. (2005) *Blood*, **106**, 721–4.
117. Shankar, D.B., Chang, J.C., Parcels, B., Sandoval, S., Li, J., Wei, R.-Q., Tapang, P., Davidsen, S.K., Albert, D.H., Glaser, K.B., Moore, T.B., Sakamoto, K.M. (2005) *Blood* (ASH Annual Meeting Abstracts), **106**, Abstract 616.
118. Nishioka, C., Ikezoe, T., Yang, J., Miwa, A., Tasaka, T., Kuwayama, Y., Togitani, K., Koeffler, H.P., Yokoyama, A. (2008) *Blood*, **111**, 5086–5092.
119. Napoli, C., Lemieux, C., Jorgensen, R. (1990) *Plant Cell*, **2**, 279–289.
120. Van Blokland, R., Van der Geest, N., Mol, J.N.M., Kooter, J.M. (1994) *Plant J.*, **6**, 861–877.
121. Hamilton, A.J., Baulcombe, D.C. (1999) *Science*, **286**, 950–952.

122. Tuschl T., Zamore, P.D., Lehmann, R., Bartel, D.P., Sharp, P.A. (1999) *Genes Dev.*, **13**, 3191–3197.
123. Cogoni, C., Macino, G. (1997) *Trends in Plant Science*, **2**, 438–443
124. Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E., Mello, C.C. (1998) *Nature*, **391**, 806–811.
125. Elbashir, S.M., Harborth, J., Weber, K., Tuschl, T. (2002) *Methods*, **26**, 199–213.
126. Bernstein, E., Caudy, A.A., Hammond, S.M., Hannon, G.J. (2001) *Nature*, **409**, 363–366.
127. Lima, W.F., Murray, H., Nichols, J.G., Wu, H., Sun, H., Prakash, T.P., Berdeja, A.R., Gaus, H.J., Crooke, S.T. (2009) *J. Biol. Chem.*, **284**, 2535–2548.
128. Chiu, Y.L., Rana, T.M. (2002) *Mol. Cell.*, **10**, 549–561.
129. Tomari, Y., Matranga, C., Haley, B., Martinez, N., Zamore, P.D. (2004) *Science*, **306**, 1377–1380.
130. Song, J.J., Smith, S.K., Hannon, G.J., Joshua-Tor, L. (2004) *Science*, **305**, 1434–1437.
131. Leuschner, P., Ameres, S.L., Kueng, S., Martinez, J. (2006) *EMBO Rep.*, **7**, 314–320.
132. Вильгельм А.Э., Чумаков С.П., Прасолов В.С. (2006) *Мол. Биол.*, **40**, 387–403.
133. Kim, V.N., Han, J., Siomi, M.C. (2009) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **10**, 126–139.
134. Borchert, G.M., Lanier, W., Davidson, B.L. (2006) *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **13**, 1097–1101.
135. Khvorova, A., Reynolds, A., Jayasena, S.D. (2003) *Cell*, **115**, 209–216.
136. Grosshans, H., Slack, F.J. (2002) *J. Cell Biol.*, **156**, 17–21.
137. Llave, C., Kasschau, K.D., Rector, M.A., Carrington, J.C. (2002) *Plant Cell*, **14**, 1605–1619.
138. Leung, A.K., Sharp, P.A. (2007) *Cell*, **130**, 581–585.
139. Haasnoot, J., Westerhout, E.M., Berkhout, B. (2007) *Nature Biotech.*, **25**, 1435–1443.
140. Siomi, M.C., Mannen, T., Siomi, H. (2010) *Genes Dev.*, **24**, 636–646.
141. Li, C., Vagin, V.V., Lee, S., Xu, J., Ma, S., Xi, H., Seitz, H., Horwich, M.D., Syrzycka, M., Honda, B.M., Kittler, E.L., Zapp, M.L., Klattenhoff, C., Schulz, N., Theurkauf, W.E., Wenig, Z., Zamore, P.D. (2009) *Cell*, **137**, 509–521.
142. Gunawardane, L.S., Saito, K., Nishida, K.M., Miyoshi, K., Kawamura, Y., Nagami, T., Siomi, H., Siomi, M.C. (2007) *Science*, **315**, 1587–1590.
143. Tuschl, T., Borkhardt, A. (2002) *Mol. Interv.*, **2**, 158–167.
144. Kim, V.N. (2003) *J. Korean Med. Sci.*, **18**, 309–318.
145. Hu, W.S., Pathak, V.K. (2000) *Pharmacol. Rev.*, **52**, 493–511.
146. Баскаран Д., Спириин П.В., Прасолов В.С. (2010) *Мол. биол.*, **44**, 1–13.