

## МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ПРОГРЕССИИ ОПУХОЛЕЙ ПЕЧЕНИ

© 2004 г.

Н. Л. ЛАЗАРЕВИЧ

*НИИ канцерогенеза Российского онкологического научного центра  
им. Н.Н.Блохина РАМН, Москва*

I. Введение. II. Эпидемиология и патологические свойства гепатокарцином. III. Генетические механизмы гепатоканцерогенеза. IV. Гепатоцитарные ядерные факторы и их роль в регуляции генов печени. V. Закономерности экспрессии гепато-специфических генов при прогрессии опухолей печени. VI. Заключение.

### I. ВВЕДЕНИЕ

Гепатоцеллюлярная карцинома (ГК) – самая частая опухоль печени и одна из наиболее распространенных форм рака в мире. Основными факторами риска для развития ГК являются хронические инфекции вирусами гепатита В (HBV) или С (HCV) и длительное воздействие химических гепатоканцерогенов [30]. Анализ генетических нарушений и изменений в экспрессии генов позволил выявить ряд факторов, вовлеченных в процесс гепатоканцерогенеза. Он вклю-

---

*Принятые сокращения:*  $\alpha$ 1-АТ – альфа1-антитрипсин, АФП – альфа-фетопротеин, ВКМ – внеклеточный матрикс, ГК – гепатоцеллюлярная карцинома, бГК – быстрорастущая гепатокарцинома, мГК – медленно растущая гепатокарцинома, ГЯФ (HNF) – гепатоцитарные ядерные факторы, ММП – матриксные металлопротеиназы, ЭМП – эпителиально-мезенхимальный переход, С/ЕВР – СААТ/энхансер связывающий белок, CDK – циклин-зависимая киназа, Сх32 – коннексин 32, EGF – эпидермальный фактор роста, FGF – фактор роста фибробластов, FTF – фактор транскрипции фетопротейна, HBV – вирус гепатита В, HCV – вирус гепатита С, HGF – фактор роста гепатоцитов, IGF – инсулин-подобный ростовой фактор, IL – интерлейкин, PTF1 – транскрипционный фактор поджелудочной железы, TGF – трансформирующий фактор роста, TNF – фактор некроза опухолей, VEGF – фактор роста эндотелия сосудов.

*Адрес для корреспонденции:* lazarevich@crc.umos.ru

Экспериментальные данные, использованные в этом обзоре, получены в рамках проектов Американского фонда гражданских исследований и развития для независимых государств бывшего Советского Союза (АФГИР) № RB1-2033, ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития науки и техники» (контракт № 43.073.1.1.2507), РФФИ № 04-04-49189 и грантом поддержки ведущих научных школ НШ 1494.2003.4.

чает гены, кодирующие факторы роста (трансформирующие ростовые факторы (TGF)  $\alpha$  и  $\beta$ , фактор роста гепатоцитов (HGF) и их рецепторы), опухолевые супрессоры (Rb, p53), компоненты Wnt-сигнального пути, молекулы межклеточных контактов и адгезионные белки [35].

Развитие опухолевого фенотипа представляет собой многостадийный процесс, обусловленный накоплением генетических нарушений. Следствием таких нарушений является постепенное приобретение опухолью все более злокачественного фенотипа. Этот процесс, получивший название опухолевой прогрессии, является важным свойством злокачественных новообразований различного происхождения, но всегда определяется свойствами исходной ткани, давшей начало опухоли.

Прогрессия ГК сопровождается снижением уровня дифференцировки, подавлением экспрессии ткане-специфических генов, увеличением скорости пролиферации клеток, утратой эпителиальной морфологии, приобретением инвазивности и способности к метастазированию. Прогрессия ГК связана с утратой опухолью дифференцированного фенотипа, в то же время карциномы часто сохраняют способность к ре-дифференцировке [2]. В настоящее время описано множество сигнальных путей, важных для контроля функций печени и пролиферации, однако молекулярные основы прогрессии ГК остаются недостаточно изученными.

## II. ЭПИДЕМИОЛОГИЯ И ПАТОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ГК

ГК – наиболее часто встречающаяся форма злокачественных опухолей печени, возникающая из основных клеток печени, гепатоцитов. Она является пятой по распространенности и третьей по уровню смертности опухолью в мире. В 2000 г. новые случаи ГК были зарегистрированы у 316 000 мужчин и 121 000 женщин, что составило примерно 7,4% (для мужчин) и 3,2% (для женщин) всех злокачественных новообразований (кроме раков кожи) [76]. Частота возникновения ГК варьирует географически и составляет менее 3,6 на 100 000 в Северной и Южной Америке, Центральной и Северной Азии, северной Европе, Австралии и Новой Зеландии и более чем 20,1 на 100 000 в Сахаре, Северной Африке, Восточной Азии и Меланезии [76]. За последние годы частота встречаемости ГК в странах с традиционно низким уровнем заболеваемости ГК стала возрастать, прежде всего в результате распространения HCV. В зонах высокого риска ГК обычно возникают у населения среднего возраста (20–34 лет), в

то время как в странах с низким уровнем заболеваемости ГК страдают в основном пациенты старшего возраста (55–59 лет).

ГК чаще всего возникают на фоне хронических заболеваний печени, прежде всего при циррозе. В таких случаях возникновению ГК обычно предшествует образование гепатоцеллюлярных аденом, которые могут давать начало злокачественным ГК. Нередко в наиболее поврежденных участках печени наблюдается несколько очагов опухолевого роста. От 50 до 80% ГК могут метастазировать в другие органы, прежде всего в легкие, семенники, костный мозг, желудочно-кишечный тракт, мочевой пузырь и поджелудочную железу [97]. Основными признаками, позволяющими отличить низкодифференцированные ГК от печеночных метастазов негепатоцитарного происхождения, считаются продукция желчи, экспрессия альфа-фетопротеина (АФП), сывороточного альбумина, антигена HerPар 1, окраска желчных капилляров поликлональными антителами на раково-эмбриональный антиген и CD 10 [144].

#### СТАДИИ ГЕПАТОКАНЦЕРОГЕНЕЗА

В 1940-х годах И. Беренблум [26] на модели рака кожи мышей была разработана теория многостадийного канцерогенеза, согласно которой возникновение опухоли происходит в результате ряда последовательных событий. Позже эта теория была подтверждена и для других типов опухолей, в том числе для опухолей печени [135]. Выделяют три основных стадии канцерогенеза: инициацию, промоцию и прогрессию.

*Инициация* происходит при воздействии канцерогена или спонтанных изменениях в клетке, в дальнейшем приводящих к образованию опухоли. Инициация необратима, на этой стадии происходят изменения последовательности ДНК, приводящие к мутациям отдельных генов. Наличие в клетке других мутаций, например, нарушение системы репарации, усиливает эффективность инициации.

Иницирующим называется агент, который способен непосредственно и необратимо изменять исходную последовательность ДНК клетки. Классическими инициаторами гепатоканцерогенеза являются афлатоксины, о-аминоазотолуен, диэтилнитрозамин, 2-ацетиламинофлуорен, вирусы HBV и HCV [8].

Иницированные клетки можно обнаружить в нормальной ткани по ускорению роста, они, как правило, не экспрессируют специфических маркеров. Группы таких клеток получили название пренеопластических фокусов или узелков. Для этих клеток характерны пониженная чувствительность к антипролиферативному действию ксенобиотиков и токсинов и повышенная чувствительность к митогенам или сигналам регенерации.

Промежуток времени, необходимый для клинического проявления опухоли, получил название *промоции*. В этот период в клетке происходят существенные изменения метаболизма и активности генов, способствующие трансформации. Эта стадия обратима, при отмене промотора возможна регрессия. Промоторное действие оказывают вещества, изменяющие характер экспрессии генов и способные индуцировать пролиферацию. Главным эффектом промоторов является сокращение времени, необходимого для проявления опухоли, и увеличение эффективности канцерогенеза. Некоторые инициаторы также обладают промоторными свойствами.

Клетки, находящиеся на этой стадии канцерогенеза, можно отличить по изменению спектра экспрессии генов, появлению белков, нехарактерных для данной ткани или стадии дифференцировки, а также по изменению спектра ферментативной активности. Для гепатоцитов на стадии промоции характерны снижение активности ферментов синтеза гликогена, накопление рибосом и изменение реакции цитоплазмы от ацидофильной к базофильной, рост активности эмбриональной изоформы  $\gamma$ -глутамилтранспептидазы, увеличение синтеза глутатион-S-трансферазы, появление специфических маркеров (АФП), увеличение скорости синтеза ДНК и числа митозов.

Стадия промоции сопровождается морфологическими изменениями: значительное усиление роста приводит к обособлению гиперпластических узелков. Клетки в таких фокусах характеризуются деконденсацией хроматина, разрушением межклеточных контактов и отделением клеток друг от друга. Стадия промоции завершается либо полным исчезновением гиперплазии, либо образованием опухоли, дальнейшее развитие которой происходит за счет прогрессии.

*Прогрессией* называется процесс постепенного приобретения опухолью все более автономного и агрессивного характера роста. Эта стадия необратима, так как для нее характерна растущая нестабильность генома, приводящая к анеуплоидиям и другим хромосомным aberrациям. В клетках отбираются и накапливаются изменения, приводящие к ускорению пролиферации, появлению инвазивности, а на последних стадиях и способности к метастазированию. На этой стадии показана транскрипционная или мутационная активация многих протоонкогенов [134] и изменение активности ряда ферментов. Несмотря на существование разнообразных экспериментальных моделей, ключевые механизмы прогрессии пока изучены недостаточно.

#### ФАКТОРЫ РИСКА ПРИ ГЕПАТОКАНЦЕРОГЕНЕЗЕ

На возникновение ГК в разной мере оказывают влияние факторы окружающей среды, инфекции, питание, метаболические и эндокринные нарушения, пол и возраст пациента. Основные факторы

Таблица 1  
**Факторы риска, влияющие на развитие ГК**

| Тип факторов                    | Факторы риска*   |
|---------------------------------|--|
| Инфекционные агенты             | <u>HBV</u><br><u>HCV</u>   |
| Патологические состояния печени | <u>Хроническая болезнь печени (цирроз)</u><br>Гепатит новорожденных  |
| Загрязнение окружающей среды    | <u>Винил хлорид</u><br>Неорганические арсениты<br>Курение<br>Пестициды   |
| Питание                         | <u>Потребление афлатоксина В1</u><br>Избыток железа<br>Низкое потребление овощей<br>Хронический алкоголизм   |
| Гормоны                         | Оральные контрацептивы<br>Анаболики<br>Высокий уровень тестостерона  |
| Генетические нарушения          | <u>Наследственная тирозинемия</u><br><u>Дефицит <math>\alpha</math>1-антитрипсина (<math>\alpha</math>1-АТ)</u><br><u>Идиопатический гемохроматоз</u><br>Болезнь Вильсона<br>Генетический полиморфизм ферментов детоксикации (P450 2E1, 2D6, ариламин ацетилтрансферазы 2) |
| Другое                          | Повышенный уровень TGF $\alpha$<br>Пол (м)<br>Возраст (>50)  |

\* – факторы, для которых четко показана связь с гепатоканцерогенезом, подчеркнуты.

риска представлены в табл. 1. Важнейшие из них будут подробно рассмотрены ниже. Важно отметить, что сочетание факторов риска у одного пациента существенно повышает риск возникновения ГК.

#### *Хронический вирусный гепатит*

Хронический гепатит, вызываемый вирусами HBV и HCV, ассоциирован с некрозом клеток печени, воспалением, повышением синтеза цитокинов и фиброзом. Воспаление при вирусном гепатите связано с действием на гепатоциты цитотоксических Т и мононуклеарных клеток. Во время воспаления гепатоциты подвергаются воздействию генотоксических агентов (свободные радикалы, перфорин, гранзим), секретируемых цитотоксическими клетками, которое приводит к повреждениям ДНК. Гибель печеночных клеток ведет к акти-

вазии пролиферативных сигналов, по-видимому, аналогичных тем, которые запускают регенерацию в нормальной печени [118], кроме того, в этом процессе могут участвовать цитокины (интерлейкин (IL) 6, фактор некроза опухолей (TNF) $\alpha$ ), синтезируемые макрофагами в ответ на воспаление [59].

Большинство гепатоцитов нормальной взрослой печени находятся в покоем состоянии. Постоянная индукция вхождения в клеточный цикл ведет к подавлению механизмов репарации ДНК, что может стать причиной мутаций и хромосомных перестроек. Дополнительным механизмом развития злокачественного фенотипа в таких клетках является подавление про-апоптотических механизмов.

В то же время, обширный фиброз печени приводит к нарушению ее нормальной дольчатой структуры, и, как следствие, к изменению межклеточных взаимодействий, взаимодействий клеток с внеклеточным матриксом (ВКМ) и к снижению контроля клеточного роста. В этих условиях клетки, которым благодаря генетическим нарушениям удалось избежать апоптоза и/или иммунного ответа, претерпевают трансформацию и могут дать начало ГК [33]. Показано, что даже в отсутствие цирроза нарушение нормальной регенерации гепатоцитов существенно для возникновения ГК [181].

Цирроз, являющийся крайним гистологическим проявлением хронического воспаления и фиброза, характеризуется значительным повышением уровня синтеза ДНК. В то же время цирроз не является обязательным условием гепатоканцерогенеза. У сурков и земляных белок, хронически инфицированных вирусами гепатита, при полном отсутствии цирроза ГК развиваются практически у всех животных [138]. У человека также описаны случаи возникновения ГК в отсутствие цирротических изменений печени [144].

#### *Вирус гепатита В*

Хроническая инфекция HBV и вызываемый ею цирроз печени являются важнейшим фактором риска для развития ГК. Интеграция вирусной ДНК в геном клетки-хозяина и хронический гепатит часто являются маркерами HBV-зависимого канцерогенеза. Интеграция HBV в культуре гепатомы ПерG2 и в трансгенных мышах вызывает хромосомную нестабильность, это согласуется со значительным повышением частоты хромосомных нарушений у носителей HBV по сравнению с вирус-негативными пациентами [105]. У пациентов с хронической инфекцией HBV риск возникновения ГК повышен 70 раз.

HBV относится к гепаднавирусам, самым небольшим ДНК-содержащим вирусам. Его частично двуцепочечный геном составляет примерно 3200 пар нуклеотидов. В трех рамках считывания он содер-

жит гены, кодирующие вирусную полимеразу, коровый белок, белки оболочки и HBx [81].

На ранних стадиях инфекции и репликации HBV встраивания вирусной ДНК в геном клетки-хозяина обычно не происходит. Однако в большинстве ГК человека и животных выявляются интегрированные последовательности ДНК HBV, с которых экспрессируются вирусные белки. Встраивание ДНК обычно происходит в случайные участки генома, оно сопровождается перестройкой вирусной ДНК и утратой некоторых ее частей, что приводит к невозможности репликации вируса. Чаще всего происходит нарушение открытых рамок считывания, с которых транскрибируются коровый белок и вирусная полимераза [81]. Интеграция происходит обычно на стадии хронической инфекции, во время клеточной пролиферации, вызванной некрозом или апоптозом смежных гепатоцитов, и может индуцировать хромосомные перестройки. В геноме HBV не содержится онкогенов, действие этого вируса определяется транс-активацией или транс-репрессией клеточных генов белками вируса.

Ген X, кодирующий белок HBx, чаще всего интегрирует в геном клетки-хозяина. Полноразмерный HBx состоит из 154 аминокислотных остатков и представляет собой короткоживущий транс-активационный белок [146], роль которого в жизненном цикле вируса пока четко не определена. У некоторых линий трансгенных мышей, экспрессирующих HBx, наблюдается образование ГК [96]. У других линий HBx повышает чувствительность к химическим канцерогенам или ускоряет развитие с-тум индуцированных опухолей. По-видимому, HBx может действовать как промотор гепатоканцерогенеза, однако его влияние на жизненный цикл клетки существенно зависит от экспериментальных условий. На ранних этапах инфекции HBx индуцирует арест в G1 фазе клеточного цикла и последующий апоптоз. Так как репликация HBV зависит от стадии клеточного цикла и дифференцировочного статуса клетки, задержка в G1 фазе вероятно способствует экспрессии факторов, необходимых для дополнительных раундов репликации вируса [33]. Интегрированные варианты HBx, изолированные из клинических образцов ГК, обычно укорочены на С-конце. В то время как полноразмерный HBx ингибирует клеточную пролиферацию и стимулирует апоптоз [154], укороченная форма за счет изменения транс-активационных свойств способствует пролиферации и трансформации клеток в культуре [180]. Возможно, про- или антиапоптотические свойства HBx могут определяться уровнем его экспрессии в клетке: для стадии острой инфекции характерна его гиперэкспрессия, а в опухолевых образцах уровень его экспрессии очень низок.

НВх в основном действует в ядре, хотя его значительная часть локализована в цитоплазме. Этот белок может регулировать различные клеточные и вирусные гены, контролирующие пролиферацию и апоптоз (*c-myc*, *c-jun*, *c-fos*, *IL-6*, *iNOS*), активировать сайты AP-1, AP-2, NF-κB и CRE, а также регуляторные элементы некоторых вирусов [138]. В клетках, экспрессирующих НВх, описана функциональная инактивация опухолевого супрессора Rb вследствие гиперфосфорилирования, приводящая к активации E2F и инициации клеточного цикла [154]. Показана способность НВх индуцировать ядерную транслокацию NF-κB, секвестрировать в цитоплазме p53, стимулировать транскрипцию генов *TNFα*, *TGFβ*, инсулин-подобного рогового фактора (*IGF*)<sub>2</sub> и рецептора *IGF*, а также активировать в цитозоле *gas/raf/MAPK*, *Src*, *Jak1-STAT* и, возможно, PKC сигнальные каскады [см. обзор 33]. Так как непосредственного связывания НВх с ДНК выявить не удалось, предполагается, что этот белок регулирует транскрипцию за счет взаимодействия с транскрипционными факторами и изменения их активационных свойств. Большинство описанных изменений происходит в неопухолевых клетках печени, таким образом, инактивация перечисленных путей может быть необходима на самых ранних этапах гепатоканцерогенеза [60].

Помимо НВх, трансформирующие свойства описаны для укороченных по С-концу форм среднего белка оболочки, которые образуются при интеграции вируса и выявляются в 25% клинических образцов ГК [33]. Эти формы являются функциональными транс-активаторами клеточных генов *c-myc* и *c-fos* и кооперативно с с-На-*gas* могут вызывать клеточную трансформацию. Этот эффект, вероятно, прямой, так как укороченные формы локализуются исключительно на мембране эндоплазматического ретикула и вероятно вовлечены в образование свободных радикалов.

#### *Вирус гепатита С*

HCV – одноцепочечный позитивный РНК вирус размером примерно 9500 нуклеотидов, принадлежащий к семейству флавиавирусов и не имеющий обратной транскриптазной активности. Пока не получено данных об интеграции этого вируса в геном пациентов с ГК. Хронический гепатит, сам по себе являющийся важным фактором риска образования ГК, наблюдается в 60–80 % случаев инфекции HCV и менее чем в 10 % случаев инфекции HBV. ГК развиваются примерно у 20 % носителей HCV и 5 % носителей HBV [48] (рис. 1), таким образом, бессимптомная инфекция HCV представляется существенно более опасным фактором риска для возникновения ГК.



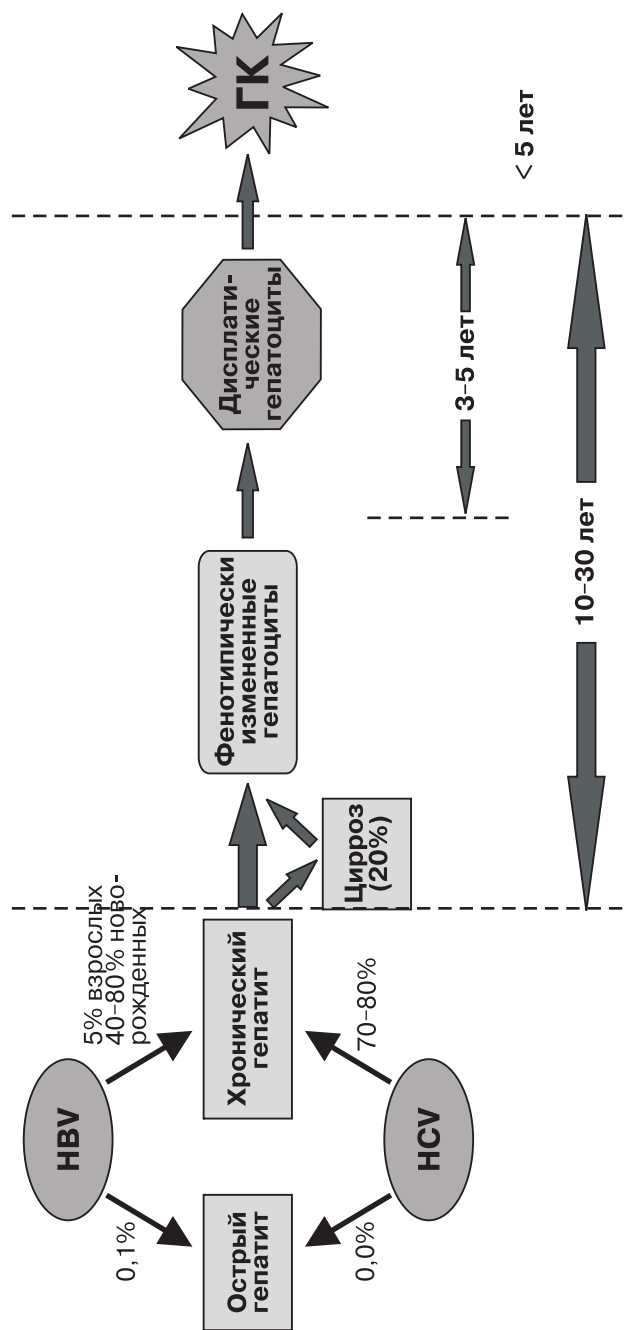


Рис. 1. Хронологическая последовательность событий, приводящих к развитию ГК человека.

Механизмы возможного участия HCV в процессе гепатоканцерогенеза пока недостаточно исследованы. Как уже отмечалось, воспаление при вирусном гепатите часто приводит к повреждениям ДНК и может стать причиной гепатоканцерогенеза. Этот эффект является непрямой и неспецифическим. Прямое влияние на развитие ГК могут оказывать вирусные белки, регулирующие пролиферацию и клеточную смерть. Единственная открытая рамка считывания HCV кодирует белок размером 3000 аминокислотных остатков [142]. Этот предшественник расщепляется вирусными и хозяйскими протеазами на ряд структурных и неструктурных белков. В той или иной степени трансформирующие свойства описаны для корового белка HCV [141] и неструктурных белков NS5A, NS4B и NS3 [67].

Участие этих белков в гепатоканцерогенезе осуществляется, скорее всего, за счет связывания с клеточными белками и/или трансактивационных свойств. Вирусные белки могут взаимодействовать с целым рядом клеточных белков: 14–3–3, аполипопротеином A2, рецепторами TNF и  $\beta$ -лимфотоксина, DEAD-доменом РНК-хеликазы, ядерным рибонуклеопротеином К (коровый белок), интерферон-индуцибельной протеин киназой PKR (белок оболочки E2 и фосфобелок NS5A), p53 (протеаза и хеликаза NS3, NS5A и, возможно, коровый белок), SNARE-подобным белком (NS5A) [142, 152].

Коровый белок – центральный компонент вириона, необходимый для формирования нуклеокапсида. Он может вызывать антиапоптотический эффект через активацию NF- $\kappa$ B [152]. Апоптоз при хроническом гепатите индуцируется экспрессирующими Fas-лиганд цитотоксическими Т клетками, которые связывают Fas на поверхности гепатоцитов и индуцируют клеточную смерть. Гепатоциты, экспрессирующие коровый белок, обладают повышенной устойчивостью к Fas-индуцированному апоптозу. Коровый белок способен также оказывать про-апоптотическое действие за счет связывания рецепторов TNF $\alpha$  и  $\beta$ -лимфотоксина [142, 152]. Он может регулировать активность генов или белков, контролирующих клеточный цикл, пролиферацию, дифференцировку и апоптоз: c-myc, циклина E, p21, Rb, TGF $\beta$ , FADD, IGF2, Elk и ряда других [142]. Есть данные, что этот белок способен супрессировать активность промотора p53 [143] а также активировать MAPK/ERK путь передачи сигнала [79].

Таким образом, за счет экспрессии вирусных белков и/или индукции хромосомных нарушений HBV и HCV могут влиять на процессы пролиферации, дифференцировки и выживания клеток печени, нарушение которых может привести к инициации трансформации некоторых гепатоцитов и их клональной экспансии. Необходимо отметить, что хроническая инфекция не обязательно ведет к развитию

ГК, более того, среднее время возникновения опухолей у носителей вируса составляет 10–30 лет. Дальнейшее развитие ГК в таком случае определяется действием ко-факторов, способных вызвать дальнейшее развитие опухолевого фенотипа.

Несмотря на различия механизмов, нетрудно выделить общие закономерности действия HBV и HCV на регуляторную систему гепатоцита: подавление транскрипции или функциональной активности p53 и его мишени p21, гиперэкспрессия *c-myc*, активация *ras/raf/MAPK* и *NF-κB* сигнальных путей, подавление *Fas*- и *TNFα*-зависимого апоптоза. Если эти изменения регуляторных каскадов лежат в основе нарушений, приводящих к возникновению опухолей печени, можно предполагать, что по крайней мере часть из них должна реализовываться и при вирус-независимом гепатоканцерогенезе.

#### *Химические канцерогены*

Гепатоканцерогены можно разделить на два основных класса – генотоксические и негенотоксические. Представители первого класса способны непосредственно взаимодействовать с ДНК, образуя ковалентные соединения и индуцируя генетические изменения при репликации. Негенотоксические вещества стимулируют образование опухолей, изменяя кинетику клеточной пролиферации, апоптоза и дифференцировки за счет эпигенетических механизмов [194].

Большинство гепатоканцерогенов являются генотоксическими и нуждаются в активации, осуществляемой цитохромами P450, семейством специфических для печени белков, локализованных в эндоплазматическом ретикулуме. Повреждения ДНК и канцерогенность различных веществ модулируется также белками острой фазы второго класса – глутатион-S трансферазами, глюкуронозилтрансферазами и NAD(P)H:хинон-редуктазами [194]. Исследования последних лет выявили изменения уровней экспрессии некоторых из этих генов при гепатоканцерогенезе, а индукция синтеза белков острой фазы рассматривается как одна из перспектив усиления защиты печени и некоторых других тканей от химического канцерогенеза [194]. Гепатоканцерогены часто представляют собой вещества природного происхождения, загрязняющие воду (токсины цианобактерий) или пищу (афлатоксины грибкового происхождения, возникающие при неправильном хранении зерна и орехов), медицинские препараты (тамоксифен), пищевые добавки или соединения, возникающие при приготовлении пищи. Эти соединения вызывают генотоксический эффект при долговременном потреблении в определенных дозах.

Классическим примером генотоксического гепатоканцерогена служит афлатоксин В1 – продукт метаболизма грибов, парази-

рующих на зерне и орехах арахиса. Высокое содержание в пище этого соединения характерно для некоторых районов Африки и Азии. Афлатоксин В1 относится к числу важнейших факторов риска для возникновения ГК и является непосредственной причиной мутации р53 (замена G на T в третьем основании 249 кодона), специфичной для опухолей печени. Афлатоксин В1 трансформируется в 8,9 эпопозид, который связывается с ДНК. Такие ДНК-аддукты часто приводят к мутациям в 249 кодоне р53 [14]. Употребление пищи, зараженной афлатоксином В1, существенно повышает риск развития ГК у хронических носителей вирусов гепатита [27].

Примером негенотоксических гепатоканцерогенов могут служить пероксисомные пролифераторы. Эта группа включает антижировые препараты, органические растворители (хлороформ), некоторые гербициды и гормоны, стимулирующие пролиферацию пероксисом. Их действие сопровождается гипертрофией и гиперплазией печени, увеличением количества пероксисом на клетку и активацией ядерного рецептора PPAR $\alpha$ , вовлеченного в регуляцию экспрессии генов.

Канцерогенные свойства тех или иных соединений видоспецифичны. Так, повышенное употребление алкоголя, по эпидемиологическим данным включенное в число факторов риска для возникновения ГК человека, не является канцерогенным для мышей и крыс [194].

#### *Наследственные генетические нарушения*

Хотя гепатоканцерогенез является многостадийным процессом, случаи заболевания у детей [40] предполагают возможность существования факторов генетической предрасположенности к возникновению ГК. Для целого ряда наследственных генетических заболеваний высокая вероятность возникновения ГК, по всей видимости, связана с мутагенными эффектами токсических метаболитов, накапливающихся в печени и вызывающих цирроз.

Это четко показано для *наследственной тирозинемии 1 типа* — нарушения метаболизма, вызываемого дефицитом фумарилацетат-гидролазы, последнего фермента катаболизма тирозина, что приводит к накоплению в клетках сукцинил-ацетона [162], образующего стабильные соединения с белками и аминокислотами. Избыток сукцинил-ацетона приводит к падению активности ДНК-лигазы и нарушению процессов репликации и репарации ДНК [137]. Кроме того, при наследственной тирозинемии отмечаются цирротические изменения печени, существенно повышающие риск возникновения ГК.

*Болезнь Вильсона и гемохроматоз* (описано 5 типов заболевания, вызываемых мутациями разных генов) — наследственные заболевания, характеризующиеся накоплением в печени меди или железа,

соответственно. Эти нарушения ведут к возникновению окислительного стресса и увеличивают риск возникновения опухолей печени. В печени пациентов, страдающих этими заболеваниями, повышена частота мутаций p53 в 249 и 250 кодонах, что может быть свидетельством повреждения ДНК под действием кислородных радикалов [85]. 60% случаев болезни Вильсона и 28% гемохроматоза сопровождаются индукцией в печени NO синтазы.

В некоторых случаях генетические заболевания не связаны с накоплением токсичных продуктов метаболизма.

Возникновение ГК у больных с дефицитом альфа1-антитрипсина ( $\alpha$ 1-АТ) может происходить при отсутствии цирротических изменений в печени и, вероятно, не связано с отсутствием антипротеазной активности [205]. Снижение уровня  $\alpha$ 1-АТ, ассоциированное с повышением частоты возникновения ГК, связано, по всей видимости, не столько с мутациями этого гена, сколько с нарушением регуляции его транскрипции. Показано, что активация кластера серпиновых генов, к которым относится  $\alpha$ 1-АТ, осуществляется в основном за счет кооперативного действия гепато-специфических факторов HNF4 $\alpha$  и HNF1 [145] (см. IV). По нашему мнению, дефицит  $\alpha$ 1-АТ в таких случаях может определяться изменением нормального уровня экспрессии или активационных свойств его транскрипционных регуляторов HNF4 $\alpha$  и HNF1. К сожалению, данные об экспрессии этих факторов у больных с наследственным дефицитом  $\alpha$ 1-АТ в литературе отсутствуют.

#### ОСНОВНЫЕ ЭТАПЫ ТРАНСФОРМАЦИИ ГЕПАТОЦИТОВ

В последние годы сформулирован ряд общих свойств, определяющих злокачественную трансформацию клеток [4, 74, 77]. Как показывает анализ литературы, эти свойства характерны и для гепатоканцерогенеза. Ниже будут коротко освещены основные изменения, определяющие развитие злокачественного фенотипа клеток печени, и генетические механизмы их реализации.

#### *Независимость от ростовых сигналов*

Нормальные клетки нуждаются в ростовых сигналах, которые передаются посредством каскада тирозиновых киназ. Такими сигналами могут служить растворимые ростовые факторы, компоненты ВКМ и молекулы межклеточных контактов. Ростовые факторы чаще всего продуцируются клетками одного типа для стимуляции пролиферации другого. В нормальной печени значительные количества ростовых факторов откладываются в ВКМ и играют ключевую роль в активации пролиферации при регенерации, сопровождающейся

деградацией матрикса. При канцерогенезе аналогичный эффект может быть достигнут при активации матриксных металлопротеаз (ММП). В других случаях опухолевая клетка сама приобретает способность синтезировать необходимый фактор, аутокринно стимулируя свою пролиферацию. Еще одним способом обеспечения митотической стимуляции является гиперэкспрессия рецепторов ростовых факторов или их структурная перестройка, делающие клетку более чувствительной к пролиферативным сигналам. Все эти механизмы реализуются для HGF, продуцируемого эндотелием печени. Клинические исследования показали, что у многих пациентов с ГК значительно повышен уровень экспрессии HGF или его рецептора c-Met [153]. Экспрессия конститутивно активной формы рецептора c-met достаточна для иммортализации первичных гепатоцитов мыши [15]. К другим гепатоцитарным митогенам, вовлеченным в опухолевую трансформацию, относят TGF $\alpha$ , эпидермальный фактор роста (EGF) и IGF2. Мишенью активирующих мутаций в ГК часто становится ген передающей пролиферативный сигнал киназы Ras.

#### *Нечувствительность к сигналам, запрещающим рост*

Нормальная клетка постоянно получает сигналы, которые удерживают ее либо в стадии покоя G<sub>0</sub>, либо в пост-митотической стадии. Такие сигналы определяются цитокинами, компонентами ВКМ и межклеточными взаимодействиями и посредством трансмембранных рецепторов активируют внутриклеточные антипролиферативные механизмы. Трансформированная клетка должна обладать способностью преодолевать сигналы, препятствующие ее росту.

Одним из ключевых регуляторов клеточного цикла является белок Rb, регулирующий активность транскрипционного фактора E2F. В гипофосфорилированном состоянии pRb связывает E2F, который необходим для экспрессии генов, контролирующих переход из G<sub>1</sub> в S-фазу [74]. Нарушения pRb сигнального пути (мутации самого гена, нарушения TGF $\beta$ -зависимого пути передачи сигнала, инактивация pRb вирусными онкогенами, мутации p15<sup>INK4B</sup>, Smad4 или циклин-зависимой киназы (CDK) 4) делают клетку нечувствительной к антипролиферативным сигналам, которые определяют остановку клеточного цикла в G<sub>1</sub> фазе.

Потеря клетками чувствительности к тормозящим пролиферацию сигналам ВКМ может происходить за счет изменения в спектре экспрессии интегринов.

Еще один характерный для ГК путь утраты чувствительности к запрещающим рост сигналам — активация Wnt сигнального пути за счет нарушения адгезионных контактов, стабилизации  $\beta$ -катенина

и его транслокации в ядро, где в комплексе с факторами Tcf/LEF этот белок может активировать транскрипцию генов *c-тус*, *циклина D1*, *ММП* и *фибронектина*. Этот механизм чаще всего реализуется за счет мутаций гена  $\beta$ -катенина [см. обзор 35].

#### *Уклонение от программы апоптоза*

Преодоление апоптоза, который может индуцироваться внешними сигналами либо внутриклеточными повреждениями, является важным фактором успешного развития опухоли. Уклонение от программы апоптоза может осуществляться за счет двух основных механизмов – нарушения сенсорной системы, определяющей состояние клетки и необходимость ее элиминации, либо повреждения механизмов, непосредственно осуществляющих разрушение поврежденных клеток.

Наиболее универсальным молекулярным изменением в различных новообразованиях человека является инактивация опухолевого супрессора p53 [9]. Мутации этого гена обнаружены примерно в трети случаев ГК. Кроме того, инактивация p53 на ранних стадиях гепатоканцерогенеза может определяться его связыванием с вирусными белками HBV или HCV. Функциональная инактивация p53 нарушает механизм активации каспаз в ответ на повреждения ДНК или гипоксию. Мутации p53 ассоциированы с развитием инвазивного фенотипа ГК и рассматриваются как неблагоприятный прогностический признак. Подавление p53-зависимого апоптоза резко увеличивает жизнеспособность опухолевых клеток при попадании их в кровотоки, что ведет к значительному повышению вероятности метастазирования.

К числу других важнейших механизмов «выживания», реализуемых при гепатоканцерогенезе, можно отнести падение уровня экспрессии рецептора смерти FAS при прогрессии ГК, активацию антиапоптотического гена Bcl-XL, гиперэкспрессию IGF2 и мутации антионкогена PTEN [60].

#### *Неограниченный репликативный потенциал*

Даже приобретя способность к неограниченному росту и независимость от ростовых сигналов, трансформированные клетки не могут создать опухоль значительной массы, пока их репликативный потенциал ограничен пределом Хайфлика, связанным с физическим укорачиванием теломер при делении. Однако репликативный потенциал трансформированных клеток может стать практически неограниченным благодаря активности теломеразы, сложного комплекса с обратной-транскриптазной активностью, достраивающего концы

хромосом с РНК-матрицы. Такой же механизм обеспечивает способность эмбриональных тканей к пролиферации. Ткань печени в этом смысле находится в особом положении, так как она способна к практически неограниченной регенерации. В печени грызунов теломераза конститутивно активна, при регенерации ее активность существенно повышается [200]. Возможно, в таких случаях активация теломеразы не является критическим этапом для опухолевой трансформации, однако может отражать изменения в находящихся выше механизмах транскрипционной регуляции. Повышение теломеразной активности описано для разных типов опухолей, в том числе для 85% ГК [166].

Активность теломеразы в значительной степени определяется уровнем транскрипции гена *TERT*, который кодирует каталитическую субъединицу, обладающую РНК-зависимой ДНК-полимеразной активностью [29, 111]. Регуляция экспрессии гена *TERT* может непосредственно активироваться прото-онкогеном *c-Myc* [186], который часто гиперэкспрессируется в различных типах опухолей, в том числе в ГК. Гиперэкспрессия *c-Myc* при гепатоканцерогенезе может достигаться за счет амплификации самого гена, либо при активации Wnt сигнального пути.

#### *Способность к ангиогенезу*

Растущей опухоли так же, как и нормальной ткани, необходимо поступление питательных веществ и кислорода. Ангиогенез регулируют иницирующие (фактор роста эндотелия сосудов (VEGF), факторы роста фибробластов (FGF) -1 и -2) и блокирующие (тромбоспондин-1) факторы. При этом в печени осуществляется положительная обратная связь между эндотелием сосудов и гепатоцитами: эндотелий продуцирует HGF, являющийся сильным митогеном для гепатоцитов, а нормальные гепатоциты на низком уровне продуцируют VEGF, активирующий рост сосудов [201]. При росте опухоли спектр продуцируемых регуляторов сосудистого роста смещается в пользу факторов, индуцирующих ангиогенез. Задача облегчается, если мутирован или подавлен p53, который активирует экспрессию тромбоспондина-1, или если активирован Ras, являющийся активатором VEGF. Кроме того, ангиогенезу может способствовать  $\beta$ -катенин-зависимая активация металлопротеиназ, разрушающих ВКМ, из которого освобождается значительный запас ростовых факторов.

#### *Генетическая нестабильность*

Генетическая нестабильность является фактором, обеспечивающим возникновение и накопление генетических изменений, которые в ходе постоянного отбора приводят к возникновению все более злокачественного фенотипа опухоли. Нарушение систем репликации



и репарации приводит к повышению числа ошибок при воспроизведении генетической информации, подавление индукции апоптоза повышает вероятность выживания клеток с повреждениями ДНК, но наиболее эффективным представляется нарушение системы контроля клеточного цикла, предотвращающей пролиферацию клеток с поврежденным геномом. Дисфункция опухолевых супрессоров p53 и pRb, а также протоонкогенов MYC и RAS, часто наблюдаемая в ГК, приводит именно к таким последствиям [4].

#### *Способность к инвазии и метастазированию*

Удаленные метастазы являются причиной смерти 90% онкологических больных. Способность к инвазии и метастазированию позволяет злокачественным клеткам выходить за пределы первичной опухоли и заселять новые пространства с пока не ограниченным количеством места и питательных веществ. Для приобретения этой способности клетка должна выйти из-под контроля нормального микроокружения, а также приобрести дополнительную подвижность. Молекулы межклеточной адгезии, белки щелевых контактов (коннексины) и рецепторы ВКМ (интегрины) являются самыми частыми мишенями для изменений при трансформации и прогрессии.

Изменение морфологических свойств и повышение миграционной способности трансформированных гепатоцитов выражается в потере ими эпителиальной морфологии и может быть квалифицировано как эпителиально-мезенхимальный переход (ЭМП). ЭМП впервые был описан как морфологическая перестройка участков эмбрионального эпителия, приводящая к появлению отдельных мигрирующих клеток. Это один из фундаментальных процессов раннего онтогенеза многоклеточных организмов, определяющий некоторые ключевые стадии обособления и формирования эмбриональных тканей [149, 170]. Кроме того, ЭМП играет важную роль в прогрессии эпителиальных опухолей, карцином, в сторону де-дифференцированного и более злокачественного фенотипа *in vivo* [см. обзоры 7, 149, 170].

Основными критериями ЭМП являются утрата эпителиальной полярности, разделение на отдельные клетки и дисперсия при приобретении клеточной подвижности. При этом происходит разрушение плотных и адгезионных контактов, десмосом и реорганизация комплексов, обеспечивающих прикрепление клетки к субстрату. Утрата полярности клеток ведет к изменению цитоскелета, одним из маркеров ЭМП является переход от цитокератиновых промежуточных филаментов к виментиновым. ЭМП сопровождается изменением профилей транскрипции генов, в том числе компонентов цитоскелета и ВКМ. ЭМП индуцируется сигналами, поступающими извне клетки (растворимые ростовые факторы и компоненты матрикса), которые

интегрируются на мембране за счет взаимодействия со специфическими рецепторами и определяют активацию малых ГТФ-связывающих белков Ras, Rho и Rac [149]. Основными механизмами внутриклеточной передачи сигнала для ЭМП являются MAP-киназный и PI3-киназный каскады, а также Src-зависимый сигнальный путь, определяющий фосфорилирование белков, связанных с цитоскелетом [31].

Мигрирующая клетка встречает новые для себя компоненты ВКМ, и изменения в спектре экспрессии интегринов позволяют ей более успешно взаимодействовать с ними. Так, в низкодифференцированных ГК активируется синтез рецепторов к ламинину, что дает клеткам преимущества при миграции, инвазии и метастазировании [185]. Активация внеклеточных протеаз позволяет физически разрушить ограничивающий движение матрикс [77].

Взаимосвязь клеток в эпителиальном пласте во многом обеспечивают щелевые контакты, для гепатоцитов основным компонентом таких контактов является коннексин 32 (Cx32). В ГК экспрессия Cx32 часто бывает утрачена [98] несмотря на отсутствие значительных делеций или мутаций этого гена. Вероятно, подавление экспрессии этого гена является результатом нарушения регуляторных путей, определяющих его транскрипцию.

Наиболее общим нарушением, сопровождающим прогрессию эпителиальных раков, является нарушение функции E-кадгерина. Этот трансмембранный гликопротеин — один из ключевых кадхеринов, обеспечивающих гомотипическую адгезию в эпителиальных тканях. Его внутриклеточный домен связывается с рядом белков, прежде всего с  $\beta$ -катенином, который, в свою очередь, взаимодействует с актиновыми микрофиламентами [22]. Снижение уровня E-кадгерина может приводить к освобождению  $\beta$ -катенина из зоны контакта и индукции его транскрипционной активности. Однако гиперэкспрессия  $\beta$ -катенина сама по себе не приводит к ЭМП, по-видимому, ключевым событием в этом случае является снижение уровня E-кадгерина [170]. Подавление экспрессии E-кадгерина описано в ГК на поздних стадиях развития опухоли, при инвазии и неблагоприятном прогнозе. В некоторых случаях нарушение нормального уровня экспрессии гена E-кадгерина может быть связано с активацией прото-онкогена *c-myc* [24] или с репрессорным действием родственных транскрипционных факторов Snail и Slug [23, 37]. Snail-зависимая репрессия транскрипции гена E-кадгерина индуцирует ЭМП в опухолях эпителиального происхождения. Обратная корреляция уровней экспрессии этих генов описана в гепатоцитах мышей и ГК человека [160, 164]. В регуляцию экспрессии генов семейства *Snail* при ЭМП вовлечены различные сигнальные каскады (TGF $\beta$ , FGF и Wnt) [124].

### *Снижение уровня дифференцировки*

Нарушение функций исходной ткани и утрата тканевой специфичности экспрессии генов являются характерным признаком большинства опухолей. Этот процесс происходит постепенно по мере развития злокачественного фенотипа и включает в себя как инактивацию белков, отсутствие которых придает клеткам селективные преимущества, так и утрату специализированных функций, не требующихся опухоли для поддержания своей жизнедеятельности (антигенное упрощение опухолей) [1].

Спектр экспрессии ткане-специфических генов практически полностью сохраняется в высокодифференцированных ГК и большей частью утрачивается в низкодифференцированных опухолях. Однако полной утраты ткане-специфических антигенов никогда не происходит – при де-дифференцировке ГК сохраняют по крайней мере часть признаков исходной ткани [11, 95].

Кроме того, при де-дифференцировке может происходить возобновление синтеза эмбрио-специфических белков, характерных для незрелых клеток определенного типа. Первым и классическим примером этого явления является активация экспрессии характерного для эмбриональной печени белка АФП, наблюдаемая в большинстве случаев ГК и широко используемая в диагностике этого типа опухолей [12, 13].

Важно отметить, что ГК обычно сохраняют способность к редифференцировке даже при внешней утрате ее признаков [2]. Это свойство предполагает возможность повышения эффективности терапии опухолей за счет реверсии злокачественного фенотипа. Поэтому изучение механизмов, регулирующих гепато-специфическую дифференцировку в норме и при патологии, представляется важной и перспективной задачей.

### **III. ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ ГЕПАТОКАНЦЕРОГЕНЕЗА**

Итак, развитие ГК – многостадийный процесс, связанный с изменениями экспрессии генов, некоторые из которых коррелируют с возникновением и прогрессией опухолей. Пренеопластические изменения в экспрессии генов могут быть вызваны изменениями уровней метилирования ДНК, действием вирусных белков, точечными мутациями или потерей гетерозиготности. Прогрессия опухолей характеризуется потерей гетерозиготности генов опухолевых супрессоров или амплификацией некоторых онкогенов. По-видимому, существуют множественные взаимодублирующие пути нега-

тивной регуляции клеточного роста, защищающие клетку от трансформации. Это подтверждает значительное количество данных о генетических изменениях, сопровождающих возникновение и прогрессию ГК, однако ключевые механизмы, определяющие ход злокачественной трансформации клеток печени, изучены пока недостаточно полно.

#### РАННИЕ ИЗМЕНЕНИЯ ПРИ ГЕПАТОКАНЦЕРОГЕНЕЗЕ

Описано несколько молекулярных изменений, часто встречающихся в цирротической ткани и небольших опухолевых узелках, которые, вероятно, отражают ранние этапы развития опухоли. Так, при хронической инфекции HBV происходит связывание HBx с опухолевым супрессором p53, приводящее к секвестрированию в цитоплазме и функциональной инактивации последнего, подавление экспрессии p21, функциональная инактивация Rb и гиперэкспрессия IGF2 [60].

К числу ранних событий гепатоканцерогенеза относятся активация MAPK сигнального пути и генов, связанных с регуляцией клеточного цикла [127, 197], а также мутации  $\beta$ -катенина, вовлеченного в процессы межклеточной адгезии и Wnt–зависимый сигнальный каскад [73].

В нормальных эпителиальных клетках  $\beta$ -катенин ассоциирован с E-кадхерином и участвует в поддержании адгезионных контактов [73]. Он взаимодействует с GSK3 $\beta$ , аксином и APC, фосфорилируется по N-концевым серин-треониновым остаткам и подвергается деградации в убиквитин-протеасомной системе. В трансформированной клетке при активации Wnt сигнального пути или мутациях генов APC и аксина  $\beta$ -катенин стабилизируется, перемещается в ядро и может активировать транскрипцию респонсивных генов [43]. Наличие среди мишеней  $\beta$ -катенина ММП и компонентов ВКМ, а также его роль в поддержании клеточной адгезии указывают на то, что нарушение нормальной функции этого белка существенно влияет на взаимоотношения опухолевой клетки с микроокружением. Клинические исследования показали, что ген  $\beta$ -катенина мутирован в 18–41% случаев ГК, благодаря чему его стабильность не регулируется APC и аксином [35, 83]. Мутаций APC в образцах ГК практически не выявляется, а мутации аксина обычно происходят на поздних стадиях гепатоканцерогенеза.

Внутриклеточное накопление  $\beta$ -катенина или мутации соответствующего гена выявляются в гепатоцеллюлярных аденомах, что позволяет отнести активацию  $\beta$ -катенина к ранним событиям гепатоканцерогенеза [51]. В то же время, мутации  $\beta$ -катенина не связаны со способностью ГК к метастазированию [115]. В опухолях с мута-

циями  $\beta$ -катенина существенно реже встречаются другие хромосомные перестройки, особенно на плечах 1p, 4q и 16p [35], что указывает на существование альтернативных путей, определяющих гепатоканцерогенез. Такие опухоли менее агрессивны [83, 115] и рассматриваются в настоящее время как наиболее перспективная мишень для генной терапии [173].

Рост ГК зависит от способности опухоли к инвазии в соседние участки ткани. Этот процесс связан с повышением экспрессии ММП1 и 7 [129], разрушающих целостность ВКМ. Гиперэкспрессия ММП1 и 7 обычно наблюдается в ранних, дифференцированных ГК, но снижается на поздних стадиях гепатоканцерогенеза, что, вероятно, связано с дедифференцировкой быстро пролиферирующих опухолей.

В пренеопластической печени или небольших дифференцированных опухолях нередко регистрируется утрата гетерозиготности на 1p, 4q, 6q и 8p хромосомах [173]. Вероятно, в этих участках находятся гены других опухолевых супрессоров, инактивируемых в ходе гепатоканцерогенеза.

#### ПОЗДНИЕ СОБЫТИЯ ГЕПАТОКАНЦЕРОГЕНЕЗА

Генетическая нестабильность в ГК выражается в увеличении количества хромосомных перестроек при прогрессии опухолей. В крупных, де-дифференцированных опухолях чаще всего наблюдается потеря гетерозиготности в локусах 1p, 4q, 6q, 8p, 13q, 16q, и 17p [60]. Эти изменения ассоциируются с неблагоприятным прогнозом и повышенным риском повторного возникновения опухолей.

Ген p53 является, по-видимому, наиболее общей молекулярной мишенью в человеческих опухолях различного происхождения. p53 активируется в ответ на повреждения ДНК, индуцируя арест клеточного цикла, во время которого клетка может репарировать поврежденную ДНК или уйти в апоптоз [109]. Онкогенный потенциал аномалий p53 прежде всего связан с потерей контроля над размножением измененных клеток, в том числе тех, в которых произошла активация онкогенов, а также с возникновением генетической нестабильности, резко увеличивающей вероятность появления других онкогенных мутаций, и подавлением p53-зависимого апоптоза. Утрата функции p53 на поздних стадиях гепатоканцерогенеза происходит обычно за счет аллельных делеций хромосомного локуса 17p13, где расположен этот ген, или мутаций в четырех высоко консервативных участках ДНК-связывающего домена. Эти мутации приводят к потере ДНК-связывающей активности p53, а также связаны с увеличением времени полужизни этого белка, который накапливается в ядре и приобретает новые функции [109]. В ГК человека потеря гетерозиготности

в локусе 17p13 описана в 25-60% опухолей [35, 64]. Некоторые данные позволяют предположить существование другого гена опухолевого супрессора по соседству с p53 [35].

В 1991 г. примерно в половине случаев ГК в Северной Африке (Мозамбик, Сенегал) и в некоторых провинциях Китая была обнаружена мутация G:C на T:A, приводящая к замене аргинина на серин в 249 кодоне p53 [34, 84]. Мутации в 249 кодоне не обнаружены ни в одном другом типе опухолей и распространены именно в районах с максимальной частотой хронических инфекций HBV и высоким уровнем афлатоксина В1 в пище.

Эпидемиологические исследования показали, что именно канцерогенное действие афлатоксина В1 является основной причиной специфической мутации в 249 кодоне p53. Хотя большинство таких мутаций зарегистрировано у пациентов, инфицированных HBV, они были обнаружены только у больных из районов, загрязненных афлатоксином В1 [182]. Синергизм инфекции HBV и отравления афлатоксином при возникновении ГК позволяют предполагать, что HBV вовлечен в селекцию мутаций p53. К числу других этиологических факторов, связанных с мутагенезом p53 при гепатоканцерогенезе, относят гемохроматоз, ассоциированный с мутациями в 220 кодоне [184].

Таким образом, как и в других опухолях человека, при гепатоканцерогенезе мутации p53 являются поздним событием многостадийного процесса. Вероятно, низкая частота мутаций гена p53 на ранних стадиях развития опухоли при вирусном гепатоканцерогенезе связана с возможностью инактивации p53 дикого типа вирусными белками. Мутации p53 коррелируют с большим размером опухоли, ее поздней стадией и/или де-дифференцировкой [35] и рассматриваются как неблагоприятный прогностический фактор, ассоциированный с низким уровнем выживаемости после удаления опухоли [82].

Частые аллельные делеции при гепатоканцерогенезе выявлены в локусе 13q, на котором картированы гены Rb и BRCA2. Опухоли с делециями в 13q13-14 обычно характеризуются низким уровнем дифференцировки [101]. Потеря гетерозиготности в локусе Rb выявлена в 25-48 % случаев [35, 64, 121], а значительное снижение экспрессии отмечено в 30-50% случаев, в строгой корреляции с генетическими поломками гена p53 [204]. Инактивация pRb может быть вызвана как мутациями самого гена, так и потерей чувствительности к TGFβ, инактивацией p16<sup>INK4A</sup>, p15<sup>INK4B</sup> или CDK4 [77]. Гены TGFβRII, Smad2, Smad4 мутированы в ГК очень редко – TGFβ путь передачи сигнала нарушен примерно с 10% случаев [94, 198].

Второй возможный опухолевый супрессор, расположенный на 13q хромосоме, BRCA2, довольно редко мутирован в ГК, и в боль-

шинстве случаев такая мутация происходит еще на эмбриональных стадиях развития, поэтому такие нарушения скорее определяют предрасположенность к образованию опухолей печени, чем являются их причиной [93].

В 17–27% случаев в ГК наблюдается потеря одной из аллелей 10q, на которой картирован опухолевый супрессор PTEN (10q23) [101], который блокирует сигналы, обеспечивающие рост и выживание клеток. Соматические мутации гена PTEN выявлены в 4% случаев ГК [202].

Частые аллельные делеции при гепатоканцерогенезе обнаружены в районе 6q26-27, содержащем манноза-6-фосфат/IGFII рецептор, ген, рассматриваемый как опухолевый супрессор благодаря его способности активировать TGF $\beta$ -зависимый путь передачи сигнала и индуцировать деградацию IGF2, потенциального митогена клеток печени. Частота мутаций этого гена в ГК составляет примерно 25% [49].

Потеря гетерозиготности отмечена также для каждого плеча 16 хромосомы. На 16p картирован ген аксина, определяющего зависимое от фосфорилирования убиквитинирование и деградацию  $\beta$ -катенина [122]. Инактивация аксина ведет к накоплению  $\beta$ -катенина в ядре, где последний выполняет функцию транскрипционного фактора. Действительно, в некоторых ГК показана ядерная локализация  $\beta$ -катенина при мутациях аксина в отсутствие повреждений самого  $\beta$ -катенина, а экспрессия эндогенного аксина в культуре клеток ГК восстанавливает цитоплазматическую локализацию  $\beta$ -катенина, блокирует клеточную пролиферацию и индуцирует апоптоз [148].

Аллельные делеции на 16q обычно ассоциированы с опухолевой прогрессией и метастазированием [63]. На этом плече расположен ген E-кадгерина (16q22.1) и еще несколько генов, потенциально кодирующих опухолевые супрессоры [132]. E-кадгерин-зависимая адгезия определяет поддержание структуры и гомеостаза в эпителиальных тканях. Кроме того, его утрата может привести к освобождению  $\beta$ -катенина из зоны контакта, накоплению его в цитоплазме и транслокации в ядро [22]. Подавление экспрессии E-кадгерина или нарушение его клеточной локализации ассоциируются с де-дифференцировкой, инвазивностью и возникновением отдаленных метастазов при злокачественных заболеваниях человека, в том числе ГК [32]. Нарушение функции E-кадгерина критично и для появления внутривисцеральных метастазов [128]. Делеции этого гена часто встречаются в HBV-позитивных ГК. Кроме того, подавление транскрипции гена E-кадгерина может определяться гиперметилированием его промоторного района.

Гиперметилирование CpG островков в регуляторных районах генов является одним из альтернативных механизмов подавления

транскрипции генов опухолевых супрессоров при канцерогенезе. Помимо метилирования промотора E-кадгерина, во многих человеческих опухолях описано гиперметилирование регуляторного района гена CDKN2A, расположенного на 9p21. Продукты этого гена p16<sup>INK4A</sup> – ингибитор CDK 4 и 6, который блокирует клеточный цикл в G1 фазе через дефосфорилирование Rb и репрессию E2F, и p14<sup>ARF</sup>, участвующий в регуляции p53 через ингибирование mdm2 [151]. Потеря гетерозиготности в 9p наблюдается примерно в 20% случаев ГК, соматические мутации достаточно редки, но в то же время примерно половина опухолей не содержит p16<sup>INK4A</sup> вследствие метилирования *de novo* промотора CDKN2A [117]. Существование альтернативных механизмов подавления транскрипции E-кадгерина и компонентов Rb пути является дополнительным подтверждением важности инактивации этих генов для гепатоканцерогенеза.

За последние годы методом сравнительной геномной гибридизации было выявлено несколько локусов, с высокой частотой амплифицированных в ГК. Они расположены на 1q, 6p, 8q и 17q хромосомах (табл. 2) [35, 173]. Эти районы, потенциально содержащие доминантные онкогены, бывают амплифицированы и в других типах опухолей. Амплификация локуса 8q24.12-q24.13, содержащего ген *c-Myc*, коррелирует с повышением уровня этого белка в опухолях печени. Такая амплификация обычно наблюдается в дифференцированных ГК, что позволяет предположить, что амплификация гена *c-Myc* определяет ранние этапы гепатоканцерогенеза, а не прогрессию ГК [101].

Амплификация на 1q, 8q и 17q, а также на 11q и 20q отмечена при анализе образцов ГК пациентов, инфицированных HBV и HCV, при этом перестройки в локусе 11q13 наблюдаются в основном у носителей HBV и характеризуют злокачественные де-дифференцированные опухоли [101]. Возможные онкогены, расположенные в перечисленных локусах, пока не идентифицированы.

Накопленная к настоящему времени информация о хромосомных перестройках при гепатоканцерогенезе позволяет отнести к наиболее важным событиям, определяющим ход этого процесса, нарушения Rb, p53 и Wnt сигнальных путей. В то же время, можно предполагать, что районы 1p, 4q и 8p содержат еще неидентифицированные гены, повреждение которых оказывает существенное влияние на процесс злокачественной трансформации гепатоцитов. Потенциальные онкогены расположены на 1q, 6p, и 17q хромосомах.

Описанные закономерности генной экспрессии отражают основные изменения сигнальных путей, реализующиеся в процессе возникновения и развития злокачественного фенотипа гепатоцитов. Эти результаты открывают новые возможности для развития методов диагностики ГК и для поиска мишеней терапевтического воздейст-



Таблица 2.  
**Частота аллельных делеций и мутаций в ГК и  
их предполагаемые мишени**

(обобщенные результаты сравнительной геномной гибридизации, по [35, 173])

| Плечо хромосомы     | Частота нарушения | Кандидат             |
|---------------------|-------------------|----------------------|
| <b>ДЕЛЕЦИИ</b>      |                   |                      |
| 1p                  | 30–42             |                      |
| 4q                  | 15–70             |                      |
| 5q                  | 35                |                      |
| 6q                  | 23–37             | IGFII рецептор       |
| 8p                  | 15–65             |                      |
| 9p                  | 26–27             | p16 <sup>INK4A</sup> |
| 10q                 | 17–27             | PTEN                 |
| 13q                 | 20–44             | Rb/BRCA2?            |
| 16p                 | 35                | E-кадхерин           |
| 16q                 | 30–58             | аксин                |
| 17p                 | 20–51             | p53?                 |
| <b>АМПЛИФИКАЦИИ</b> |                   |                      |
| 1q                  | 20–78             |                      |
| 6p                  | 20–38             |                      |
| 8q                  | 31–66             | c-мус                |
| 11q                 | 15                |                      |
| 17q                 | 18–47             |                      |
| 20q                 | 37                |                      |

вия на этот тип опухолей. В то же время необходимо отметить крайнюю недостаточность сведений о возможных взаимодействиях опухолевой клетки ГК с микроокружением и о механизмах, определяющих уровень дифференцировки гепатоцитов на разных стадиях гепатоанцирогенеза.

#### **IV. ГЕПАТОЦИТАРНЫЕ ЯДЕРНЫЕ ФАКТОРЫ И ИХ РОЛЬ В РЕГУЛЯЦИИ ГЕНОВ ПЕЧЕНИ**

В печени происходят процессы глюконеогенеза, синтеза липидов и многих белков крови, осуществляется регуляция уровня сахара в крови, а также процессы, связанные с железо-гемоглобиновым обменом. Большинство белков, обеспечивающих эти функции, синтезируется почти полностью или исключительно в гепатоцитах.

Регуляция экспрессии генов печени — крайне сложный многоступенчатый процесс. Это связано с необходимостью постоянного изменения и координации экспрессии огромного количества структурных, секреторных, транспортных белков и ферментов. Решающую роль в такой регуляции, которая происходит в основном на транс-

крипционном уровне, играют гепатоцитарные ядерные факторы (ГЯФ), краткому обзору которых будет посвящена эта глава.

В настоящее время к ГЯФ относят несколько семейств регуляторных белков (HNF1, C/EBP, HNF3, HNF4 и HNF6), сайты связывания которых обнаружены в регуляторных элементах многих генов, специфичных для печени (табл. 3). Хотя экспрессия этих факторов не ограничивается клетками печени, именно в этом органе выявляются максимальные количества ГЯФ. Тканевая специфичность экспрессии любого из печеночных генов достигается, по-видимому, одновременным участием нескольких гепатоцитарных факторов транскрипции в регуляции этого процесса. Кроме того, заметную роль в регуляции печеночных генов, особенно на ранних стадиях онтогенеза, могут играть ранние энтодермальные факторы семейства GATA и ядерные рецепторы FTF и COUP-TF.

В табл. 3 приведены сведения об основных гепато-специфических транскрипционных факторах. Краткая характеристика пяти семейств ГЯФ приведена ниже, подробнее структура и функции транскрипционных факторов печени рассмотрены в обзорах [6, 112].

#### СЕМЕЙСТВО HNF1

Члены этого семейства HNF1 и vHNF1 по структуре ДНК-связывающего домена относятся к суперсемейству гомеобелков [178]. Белки семейства HNF1 являются, по-видимому, наиболее распространенными регуляторами экспрессии печень-специфических генов. Они узнают одну и ту же последовательность и взаимодействуют с ДНК в виде гомо- или гетеродимеров. Сайты связывания HNF1 выявлены в промоторах более ста гепато-специфических генов [179].

В процессе эмбрионального развития vHNF1 появляется раньше, чем HNF1 – его мРНК выявляется в висцеральной энтодерме желточного мешка мышей уже на 4,5 день развития [21]. На более поздних стадиях развития vHNF1 синтезируется в печени, почках и легких. В этих же органах на 10,5 день развития появляется HNF1 [39], однако уровень его экспрессии существенно ниже. После рождения оба гена экспрессируются в эпителиальных клетках печени, почек, кишечника и поджелудочной железы, причем везде, кроме почек, преобладает HNF1 [178].

Инактивация гена HNF1 не летальна для мышинных эмбрионов, но после рождения вызывает замедление роста и прогрессирующее истощение из-за нарушения функций печени, почек и поджелудочной железы. У HNF1-/- мышей повреждена система секреции инсулина, наблюдается фенилкетонурия (заболевание, вызываемое отсутствием фермента фенилаланин-гидроксилазы) и нарушения метаболизма из-за дефекта реабсорбции в почках [136].

Таблица 3  
Гепато-специфические регуляторы транскрипции

| Ген (синонимы)                                   | Специфичность экспрессии   | Экспрессия в онтогенезе (д. р.) | Гены-мишени  | Регуляция   |
|--|--|---------------------------------|--|---|
| <b>HNF1</b><br>(HNF1 $\alpha$ , LFB1, TCF1)      | Печень, кишечник, почки, поджелудочная железа  | 10.5                            | АФП, СА,   | HNF4, HNF3, AP1, HNF1 (-)   |
| <b>vHNF1</b><br>(HNF1 $\beta$ , LFB3, TCF2)      | Печень, почки, легкие, кишечник, пищевод, поджелудочная и щитовидная железы                        | 4.5                             | $\alpha$ 1-АТ, РЕПСК, ТТР, Аро А2, В, альдолаза В                                  | COUP-TF1 и II, HNF3 $\gamma$ , HNF6 (эмбр)                                |
| <b>HNF3<math>\alpha</math></b><br>(FoxA1, TCF3A) | Печень, кишечник, легкие, желудок, поджелудочная железа  | 7.5                             |  | HNF3 $\beta$  |
| <b>HNF3<math>\beta</math></b><br>(FoxA2, TCF3B)  | Печень, кишечник, легкие, желудок, поджелудочная железа, яичники                                   | 6.5                             | СА, ТТР, $\alpha$ 1-АТ, Аро В, HNF1, HNF3 $\alpha$ и HNF3 $\beta$                  | HNF3, C/EBP, HNF6, FTF, инсулин, GATA6                                    |
| <b>HNF3<math>\gamma</math></b><br>(FoxA3, TCF3G) | Печень, кишечник, легкие, желудок, яичники, семенники  | 8.5                             |  | HNF1/vHNF1  |
| <b>C/EBP<math>\alpha</math></b>                  | Печень, жировая ткань, кишечник, легкие, скелетные мышцы, плацента, лейкоциты периферической крови | 13                              | АФП, СА, РЕПСК, Аро А1, А2, В, ТФН, гликогенсинтетаза                              | C/EBP, NF1, тус/тах, NF-kB, Sp1, AP2, USF, посттрансляционные модификации |
| <b>C/EBP<math>\beta</math></b><br>(LAP, NF-IL6)  | Большинство тканей, преобладает в печени и легких  | 12                              | РЕПСК, Egr-1, IL-6, HGF, МКР-1, циклины В и Е, коллаген I типа, ММП                | IL-6, IL-1, сАМФ, дексаметазон, посттрансляционные модификации            |
| <b>HNF4<math>\alpha</math></b><br>(NR2A1)        | Печень, кишечник, поджелудочная железа, почки  | 4.5                             | HNF1, ТФН, L-ПК, ТТР, $\alpha$ 1-АТ, Аро А1, А2, В, С2, С3, РЕПСК, СА, альдолаза В | HNF1, HNF3, C/EBP, HNF6, GATA6 (эмбр), посттрансляционные модификации     |
| <b>HNF6</b><br>(Onecut1)                         | Печень, селезенка, поджелудочная железа, мозг, семенники   | 9                               | vHNF1, HNF3 $\beta$ , HNF4 $\alpha$ , ТТР, $\alpha$ 1-АТ, глюкокиназа              | STAT5, HNF4 $\alpha$ , гормон роста, C/EBP $\alpha$ (-)                   |
| <b>FTF</b> (NR5A2 LRH-1)                         | Печень, поджелудочная железа, яичник, семенники  | 7                               | HNF1, HNF3 $\beta$ , HNF4 $\alpha$ , АФП, Сур7А, HBV                               | HNF4 $\alpha$ , GATA, nkx-2.5   |

(-) - негативная регуляция, (эмбр) - регуляция только во время эмбрионального развития, д. р. - день развития мышиноного эмбриона, СА - сывороточный альбумин, РЕПСК - фосфоенолпируват-карбоксикиназа, ТТР - транстиретин, Аро - аполипопротеины, ТФН - трансферрин, L-ПК - пируват киназа L, Сур7А - холестерол 7-альфа-гидроксилаза.

Инактивация гена  $\nu$ HNF1 ведет к смерти мышинных эмбрионов на восьмые сутки развития за счет нарушения гастрюляции и дифференцировки висцеральной энтодермы [47]. Кондиционный нокаут  $\nu$ HNF1 в печени мышей вызывает задержку роста и острое разлитие желчи из-за повреждений желчного пузыря и внутрипеченочных желчных протоков [46].

По-видимому,  $\nu$ HNF1 критичен для дифференцировки висцеральной энтодермы и закладки печени и почек, а HNF1 необходим для поддержания дифференцированного состояния этих органов [38].

#### СЕМЕЙСТВО C/EBP

Открытие первого представителя этого семейства, C/EBP $\alpha$  [104], позволило охарактеризовать новый класс транскрипционных факторов. Они содержат основной ДНК-связывающий домен bZIP, N-концевой транс-активационный домен и спиральную структуру типа «лейциновой застезки», обеспечивающую димеризацию. Белки семейства C/EBP имеют сходную структуру, образуют гомо- и гетеродимеры и связываются с общей последовательностью ДНК. В гепатоцитах экспрессируются C/EBP $\alpha$ , C/EBP $\beta$  и C/EBP $\delta$  [167].

Два белка семейства – позитивный регулятор C/EBP $\beta$  и доминантно-негативный ингибитор транскрипции LIP – продукты одного и того же гена, их соотношение в клетке регулируется на уровне трансляции [50], либо за счет C/EBP $\alpha$ -зависимого протеолитического расщепления C/EBP $\beta$  [193]. Гетеродимеры других белков-активаторов семейства C/EBP с укороченным белком LIP, у которого отсутствует N-концевой транс-активационный домен, подавляют транскрипцию генов-мишеней.

Уровни экспрессии C/EBP $\alpha$  и  $\beta$  связаны с пролиферативным статусом клетки. В клетках нормальной взрослой печени соотношение этих факторов примерно одинаково, однако при повреждениях, сопровождающихся регенерацией, уровень C/EBP $\alpha$  быстро падает, а уровень C/EBP $\beta$  заметно возрастает, при этом общее количество C/EBP в клетке остается неизменным [71, 139]. Эти наблюдения согласуются с данными о том, что у мышей с инактивированным C/EBP $\beta$  пролиферация во время регенерации существенно замедлена [72], а у C/EBP $\alpha$ -/- мышей наблюдается гиперплазия печени [62]. Взаимосвязь скорости пролиферации с соотношением уровней C/EBP $\alpha/\beta$ , по-видимому, определяется способностью C/EBP $\alpha$  (но не у C/EBP $\beta$ ) связывать Rb-подобные факторы, препятствуя образованию их комплекса с E2F, необходимого для перехода в S-фазу [175].

Мыши с инактивированным геном C/EBP $\alpha$  умирают через несколько часов после рождения из-за нарушения системы синтеза и

хранения гликогена. У таких мышей заметно гипертрофирована печень, снижены уровни экспрессии некоторых метаболических генов и гиперэкспрессированы гены *c-myc* и *c-jun* [62, 187]. Первичные культуры гепатоцитов, полученные от таких животных, сохраняют эпителиальные свойства, но характеризуются значительным ускорением пролиферации и увеличением частоты трансформации по сравнению с культурами нормальных гепатоцитов новорожденных мышей [157]. Таким образом, C/EBP $\alpha$ , вероятно, является важным переключателем процессов, связанных с поддержанием дифференцировки, контролем пролиферации и поддержанием нетрансформированного фенотипа.

При инактивации C/EBP $\beta$  эмбриональное развитие мышинных эмбрионов не нарушается, но после рождения примерно половина животных погибает от гипогликемии. У C/EBP $\beta$ - мышей замедлен пролиферативный ответ печени на повреждения и снижена экспрессия ранних генов, контролирующих рост клеток: транскрипционного фактора Egr-1, MAPK тирозин фосфатазы MKP-1, циклинов B и E [72].

Фактор C/EBP $\beta$  может индуцировать гепато-специфическую транс-дифференцировку панкреатической клеточной линии AR42J-B13. Экзогенная экспрессия C/EBP $\beta$  вызывает подавление экспрессии амилазы, основного маркера клеток поджелудочной железы, активацию целого ряда гепатоцитарных генов и транслокацию HNF4 $\alpha$  из цитоплазмы в ядро [150]. Функциональная активность факторов C/EBP может регулироваться на пост-трансляционном уровне за счет фосфорилирования, изменения стабильности белка или гетеродимеризации форм с различными свойствами.

#### СЕМЕЙСТВО HNF3

Белки семейства HNF3 содержат ДНК-связывающий домен типа «крылатая спираль», гомологичный соответствующему району белка *fork head* дрозофилы и состоящий из участка спираль-поворот-спираль и двух «крыльев», участвующих во взаимодействии с ДНК [42, 191]. По третичной структуре ДНК-связывающий домен HNF3 имеет большое структурное сходство с ДНК-пакующими гистонами H1 и H5. Это позволяет предположить, что факторы HNF3 не только непосредственно влияют на экспрессию генов путем связывания со специфическими сайтами ДНК, но и участвуют в изменении нуклеосомной организации хроматина, делая его таким образом доступным для других транс-активаторов [203].

Члены семейства, белки HNF3 $\alpha$ ,  $\beta$  и  $\gamma$ , узнают одинаковые последовательности ДНК, взаимодействуя с ними в виде мономеров [42]. HNF3 $\beta$  появляется в мышинном эмбрионе на 6,5 день развития [18],

чуть позже начинают экспрессироваться HNF3 $\alpha$  и  $\gamma$ . Во взрослом организме белки семейства преимущественно экспрессируются в печени, кишечнике, легких и желудке [196]. Инактивация HNF3 $\alpha$  существенно снижает скорость роста мышей после рождения и вызывает смерть, связанную с нарушением гомеостаза глюкозы за счет падения экспрессии проглюкагона в поджелудочной железе, в первую неделю жизни [91]. Вероятно, HNF3 $\alpha$  является слабым активатором транскрипции, конкурирующим с HNF3 $\beta$  за общие сайты связывания. Мыши, у которых инактивирован HNF3 $\gamma$ , не имеют видимых нарушений в развитии и отличаются от нормальных животных изменением уровня транскрипции нескольких гепато-специфических генов [90].

Инактивация гена HNF3 $\beta$  приводит к гибели мышечных эмбрионов на девятые сутки развития за счет нарушения образования кишечной трубки и отделения зародыша от желточного мешка [17, 192]. Экспрессия HNF3 $\beta$  критична для правильного функционирования висцеральной энтодермы и необходима для формирования гензеновского узелка, клетки которого участвуют в образовании ното хорды, первичной кишки и нервной трубки. Кондиционная инактивация гена HNF3 $\beta$  во взрослой печени не влияет на уровни экспрессии других ГЯФ и гепато-специфических генов [165], что указывает на существенное различие регуляторных взаимосвязей между транскрипционными факторами в эмбриональной и взрослой печени.

#### СЕМЕЙСТВО HNF4

К настоящему времени идентифицировано несколько представителей семейства HNF4, из которых в печени млекопитающих экспрессируется HNF4 $\alpha$  [156]. По структуре факторы HNF4 относятся к суперсемейству ядерных рецепторов и наиболее родственны рецепторам X ретиноевой кислоты. Как и другие белки этого типа, они содержат два ДНК-связывающих домена типа «цинковые пальцы» и обширный С-концевой район, обеспечивающий димеризацию и возможное связывание лиганда. Лиганд, способный достоверно активировать HNF4 $\alpha$  *in vivo*, пока не идентифицирован.

HNF4 $\alpha$  непосредственно регулирует экспрессию широкого спектра гепато-специфических генов. Кроме того, он является основным активатором экспрессии гена HNF1, который, в свою очередь, регулирует значительное количество гепатоцитарных генов [100, 174]. Как и большинство ядерных рецепторов, чтобы связаться с ДНК, HNF4 $\alpha$  должен образовать гомодимер [155]. Другие ядерные рецепторы не димеризуются с HNF4 $\alpha$  [88], однако могут участвовать в регуляции контролируемых им генов, конкурируя за общие сайты связывания.

вания. Транскрипционная активность HNF4 $\alpha$  зависит от пост-трансляционных модификаций – ацетилирования [158] и фосфорилирования [99]. Как и другие ядерные рецепторы, HNF4 $\alpha$  взаимодействует с кофакторами (CBP, p300, p/CAF и белки семейства NcoA) [159], способными модулировать его транс-активационные свойства. Описано также p53-зависимое подавление транскрипционной активности HNF4 $\alpha$ : p53 способен взаимодействовать с лиганд-связывающим доменом HNF4 $\alpha$  и восстанавливать гистон-деацетилазную активность [114].

Описано 8 изоформ HNF4 $\alpha$ , образующихся в результате альтернативного сплайсинга и имеющих разные активационные свойства [155]. Изоформы  $\alpha$ 1- $\alpha$ 6, транскрибирующиеся с основного промотора P1, преобладают во взрослой печени и дифференцированных гепатомах [123, 177]. Изоформы  $\alpha$ 7 и  $\alpha$ 8 отличаются от других вариантов N-концевой последовательностью, их транскрипция регулируется альтернативным промотором P2. Эти формы экспрессируются в стволовых клетках, эмбриональной печени,  $\beta$ -клетках поджелудочной железы и де-дифференцированных культурах гепатом [123, 171, 177]. «Взрослые» ( $\alpha$ 1- $\alpha$ 6) и «эмбриональные» ( $\alpha$ 7 и  $\alpha$ 8) изоформы имеют разный спектр генов-мишеней –  $\alpha$ 7 форма эффективнее активирует промоторы ранних гепатоцитарных генов (например, АФП), а  $\alpha$ 1 – гены основных дифференцировочных маркеров печени.

HNF4 $\alpha$  – один из самых ранних маркеров первичной энтодермы. В мышинном эмбрионе мРНК HNF4 $\alpha$  впервые выявляется на 4,5 день развития в слое клеток, выстилающих бластоцель [54]. Во взрослом организме HNF4 $\alpha$  экспрессируется в печени, почках, кишечнике и поджелудочной железе [156, 169, 196]. В де-дифференцированных гепатомных клеточных линиях утрата гепатоцитарного фенотипа может сопровождаться падением экспрессии HNF4 $\alpha$  [36, 57]. Экспрессия экзогенного HNF4 $\alpha$  в де-дифференцированной гепатоме H5 ведет не только к ре-экспрессии ряда генов, специфических для печени, но также к частичному восстановлению эпителиальной морфологии и приобретению клетками способности реагировать на дифференцировочные стимулы [161]. Таким образом, HNF4 $\alpha$  – единственный из ГЯФ, для которого *in vitro* показана морфогенная активность.

Инактивация гена HNF4 $\alpha$  приводит к смерти гомозиготных мышинных эмбрионов на 10,5 день развития за счет аномальной гастрюляции, связанной с нарушением развития висцеральной энтодермы [55]. При дополнении HNF4 $\alpha$ -/- эмбрионов HNF4 $\alpha$ +/+ внеэмбриональными тканями эмбрионы успешно проходят гастрюляцию [55], однако в печени таких животных существенно подавлена экспрессия многих генов, характерных для дифференцированной печени [110].

Таким образом, HNF4 $\alpha$  не влияет на образование зачатка печени, но необходим для дифференцировки гепатоцитов в процессе развития. При кондиционной инактивации HNF4 $\alpha$  во взрослой печени трансгенные животные ограниченно жизнеспособны – более 70% из них умирает к возрасту 8 недель от нарушения метаболических функций, связанных с транспортом и метаболизмом липидов и с гомеостазом мочевины [80].

#### СЕМЕЙСТВО HNF6

С сайтом связывания HNF3 в промоторе некоторых гепато-специфических генов может связываться еще один фактор, HNF6 [108]. Этот ядерный белок, взаимодействующий с ДНК в виде мономера, стал первым охарактеризованным представителем нового класса транскрипционных регуляторов ONECUT, содержащих гомеобокс и один ДНК-связывающий домен типа CUT.

HNF6 впервые выявляется на 9 день развития мышиноного эмбриона в зачатке печени и в нервной системе [103]. Во взрослом организме он экспрессируется в печени, поджелудочной железе, селезенке, мозге и семенниках. В печени HNF6 экспрессируется не только в гепатоцитах, но и в холангиоцитах – эпителиальных клетках, выстилающих просвет внутри- и вне-печеночных желчных протоков и желчного пузыря – с первых стадий их дифференцировки [44]. Инактивация гена HNF6 у мышей нарушает дифференцировку экзокринных клеток поджелудочной железы и приводит к развитию диабета за счет подавления экспрессии глюкокиназы [87]. Кроме того, у таких животных не образуется желчный пузырь, нарушено развитие внутри- и внепеченочных желчных протоков [44]. К настоящему времени HNF6 представляется наиболее вероятным регулятором дифференцировки гепатобластов в холангиоциты, образующие желчные протоки.

#### FTF

Транскрипционный фактор FTF был идентифицирован как ядерный рецептор, участвующий в активации гена АФП в эмбриональной печени [28]. Этот фактор относится к семейству *Drosophila fushi tarazu* и содержит Ftz-F1 бокс [65]. В отличие от классических ядерных рецепторов, FTF связывается с ДНК в виде мономера и не нуждается в лиганде. FTF экспрессируется в эмбриональной и взрослой печени, в поджелудочной железе, яичнике и семенниках, а также в АФП-продуцирующих гепатомах [28, 65]. Сведения о наличии функциональных сайтов связывания FTF в промоторах HNF3 $\beta$ , HNF4 $\alpha$  и HNF1 [65] и регуляторных элементах HBV [69] позволяют рассматривать этот фактор не только как специфический активатор



промотора гена АФП, но и как одно из важных звеньев в пути передачи сигналов дифференцировки энтодермы и регуляции экспрессии генов, определяющих гепатоцитарный фенотип. По-видимому, FTF занимает промежуточное положение в транскрипционном каскаде между ранними маркерами энтодермы (GATA) и транс-факторами, определяющими формирование печени (HNF4 $\alpha$ , HNF1 и HNF3 $\beta$ ). Влияние FTF на экспрессию второй группы генов ограничивается ранними стадиями развития. В зрелых неделящихся гепатоцитах с сайтами связывания FTF взаимодействуют другие ядерные рецепторы, характерные для взрослой печени [130]. Вероятно, FTF необходим для ранних этапов дифференцировки печени, а во взрослом организме действуют механизмы, отменяющие его действие.

#### СЕМЕЙСТВО COUP-TF

Факторы семейства COUP-TF (Chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factors) относятся к суперсемейству ядерных рецепторов, лиганд этих факторов не идентифицирован. Димеры белков COUP-TFI и COUP-TFII узнают прямые повторы DR1, с которыми связываются многие типы ядерных рецепторов, в том числе HNF4 $\alpha$  [54, 156]. В гепатоцитах COUP-TF чаще всего выполняют функцию негативных регуляторов транскрипции, действуя как антагонисты HNF4 $\alpha$  [102]. Как и другие рецепторы, не имеющие лиганда, факторы COUP-TF взаимодействуют с ко-репрессорами.

#### ГЯФ И ОСНОВНЫЕ ЭТАПЫ ФОРМИРОВАНИЯ ПЕЧЕНИ

Печень закладывается как вырост вентральной части энтодермы первичной кишки. Гепатогенез условно разделяют на четыре стадии, которые взаимосвязаны и частично перекрываются: 1) компетентность энтодермы, 2) получение сигнала к развитию печени, 3) дифференцировка и 4) морфогенез [52].

*Сигнал к развитию печени.* В работе ЛеДурена [107] показано, что прекардиальная мезодерма цыпленка может индуцировать в вентральной энтодерме передней кишки *in vitro* формирование печени-подобного фенотипа. Воздействие FGF1 или -2 может заменить сигнал от прекардиальной мезодермы [89]. Таким образом, сигнальный путь FGF играет ключевую роль в индукции гепатоцитарного пути дифференцировки.

*Компетентность* к принятию индуцирующего сигнала обеспечивает гепато-специфический фактор HNF3 $\beta$  [18]. Благодаря структурному сходству с гистонами он обеспечивает разворачивание конденсированного хроматина и облегчает связывание с регуляторными районами гепатоцитарных генов энтодермального фактора GATA4

[41]. Факторы HNF3 $\beta$  и GATA4 в онтогенезе кооперативно регулируют свойства энтодермы таким образом, чтобы она была способна к развитию по гепатоцитарному пути. При инактивации HNF3 $\beta$  или GATA4 трансгенные мыши погибают к 8,5 дню эмбрионального развития из-за нарушения формирования передней кишки. Кроме этих двух факторов, на формирование печеночного зачатка влияет гомеобелок H $\alpha$ x, один из самых ранних маркеров передней части эмбриональной энтодермы. У H $\alpha$ x-/- эмбрионов печень не формируется [172].

*Дифференцировка печеночного зачатка.* Получив сигнал к формированию печени, клетки первичной кишки начинают интенсивно делиться и мигрируют в глубь мезодермы. На 9,5 день развития мыши образуется печеночный зачаток, состоящий из пре-гепатоцитов, или гепатобластов. Для превращения в зрелые гепатоциты, гепатобласты должны пройти процесс дифференцировки, который включает в себя приобретение эпителиального фенотипа и активацию экспрессии генов, обеспечивающих метаболизм, детоксикацию и синтез сывороточных белков. Ключевая роль в этом процессе отводится гепатоцитарному ядерному фактору HNF4 $\alpha$  [53]. Это доказывают результаты инактивации гена HNF4 $\alpha$  в эмбрионах мышей, в зародышевых тканях эмбрионов и в эмбриональных стволовых клетках [55, 110].

*Морфогенез печени.* Морфогенез печени заключается в формировании печеночных балок, синусоидов, желчных протоков и всего комплекса кровоснабжения; морфологическое усложнение печени происходит параллельно с увеличением ее размера. В этом процессе задействовано много общераспространенных регуляторов. Показано, что инактивация генов *c-jun*, *HGF*, его рецептора *c-met*, гомеобоксного фактора H $\alpha$ x, экспрессируемого мезенхимой развивающейся печени Xbp-1 (X-box binding protein 1), приводит к гипоплазии печени [52].

#### СПЕКТРЫ ЭКСПРЕССИИ ГЯФ В ДРУГИХ ОРГАНАХ

Как уже упоминалось ранее, ГЯФ экспрессируются не только в печени, но и в некоторых органах близкого происхождения – в поджелудочной железе и тонком кишечнике. Именно в этих органах спектр экспрессии ГЯФ ближе всего к гепатоцитарному, особенно в ходе эмбрионального развития. Тканевая специфичность экспрессии в этих органах формируется кооперативным действием ГЯФ и других ткане-специфических регуляторов.

ГЯФ необходимы для нормального функционирования поджелудочной железы и тонкого кишечника. Например, экспрессия гена пируваткиназы L во взрослой печени, тонком кишечнике и в эмбриональных экзокринных клетках поджелудочной железы контролируется

факторами HNF1, vHNF1 и HNF4 $\alpha$  [119]. HNF4 $\alpha$  и HNF1 регулируют экспрессию гена инсулина в  $\beta$ -клетках поджелудочной железы [199], а HNF3 $\alpha$  и - $\beta$  вместе с транскрипционным фактором поджелудочной железы (PTF1) определяют активность панкреатической  $\alpha$ -амилазы [45].

Ключевым фактором, определяющим формирование поджелудочной железы, считается специфичный для этого органа гомеобоксный фактор Pdx1, транскрипция которого регулируется HNF3 $\beta$  [195]. Кроме того, важную роль в установлении и поддержании панкреатического фенотипа играют PTF1, определяющий образование экзокринных клеток, и  $\beta$ 2, необходимый для формирования поджелудочных островков [112]. В отличие от кишечника и печени, в поджелудочной железе не экспрессируются факторы HNF3 $\gamma$ , C/EBP $\alpha$ ,  $\beta$  и «взрослые» изоформы HNF4 $\alpha$  [112]. Как обсуждалось ранее, фактор C/EBP $\beta$  по крайней мере частично определяет транс-дифференцировку панкреатических клеток в сторону гепатоцитарного фенотипа *in vitro* [150].

Эпителий тонкого кишечника экспрессирует гомеобоксные факторы Cdx1 и HoxC11, которые вместе с ГЯФ определяют экспрессию генов, специфичных именно для этой ткани [112].

Таким образом, и в тонком кишечнике, и в поджелудочной железе ранние стадии развития определяются факторами, специфическими только для этого типа ткани. Хотя к настоящему времени выявлено несколько ключевых факторов раннего развития печени (GATA4, HNF3 $\beta$ ), ни один из них не является уникальным для этого органа [112], что позволяет предполагать существование дополнительных механизмов индукции гепато-специфической дифференцировки в онтогенезе.

#### РЕГУЛЯЦИОННАЯ ИЕРАРХИЯ ГЯФ

Между ГЯФ существует регуляционная иерархия, которая позволяет четко контролировать выполнение и координацию всего многообразия печеночных функций на разных стадиях развития. Данные о взаимной регуляции печеночных транс-факторов иногда противоречивы и отражают скорее возможности регуляции, чем полную картину иерархических связей, реализуемых в конкретном клеточном контексте. Результаты исследований взаимосвязей различных групп ГЯФ суммированы на рис. 2. Для примера рассмотрим основные закономерности, определяющие регуляцию экспрессии гена HNF4 $\alpha$ .

Транскрипция эмбриональных и взрослых форм HNF4 $\alpha$  может происходить с двух независимых промоторов, P2 и P1, соответственно [123].

В P1 промоторе выявлены эволюционно консервативные сайты связывания семейств HNF1, HNF3, HNF6 и GATA6 [78, 168].

Активация P1 осуществляется, вероятно, двумя способами: кооперативным действием факторов  $\nu$ HNF1 и GATA6 (в висцеральной энтодерме на ранних стадиях развития) или синергичной активацией HNF1 и HNF6 (во взрослой печени или дифференцированных гепатомах) [78]. Для максимальной экспрессии HNF4 $\alpha$  1 в печени необходим энхансер, в котором картированы сайты связывания C/EBP, HNF4, HNF3, HNF1 и сайты чувствительности к глюкокортикоидам [20]. Возможно, значительная активация транскрипции HNF4 $\alpha$  после рождения связана с действием C/EBP $\alpha$  и глюкокортикоидных рецепторов, активирующихся на этой стадии развития.

Альтернативный промотор P2 гена, определяющий экспрессию эмбриональных форм HNF4 $\alpha$ , регулируется факторами HNF1,  $\nu$ HNF1 и регулятором дифференцировки панкреатических  $\beta$ -клеток Pdx1 [171].

К сожалению, вопрос о взаимодействии каскада ГЯФ с ткане-специфическими регуляторными путями, обеспечивающими контроль клеточной пролиферации и дифференцировки, пока недостаточно изучен. Представляется, что ключевую роль в интеграции общих и ткане-специфических путей передачи сигнала мог бы играть HNF4 $\alpha$ , который не только контролирует гепато-специфическую экспрессию генов, но и определяет эпителиальный морфогенез [161].

Итак, несколько семейств ГЯФ контролируют экспрессию большинства известных генов, специфичных для печени. Внутри одного семейства факторы узнают одну и ту же последовательность ДНК и часто способны образовывать гетеродимеры, модулирующие их индивидуальные свойства. Кроме того, в клетке может экспрессироваться несколько форм одного и того же белка с разными активационными свойствами, и от того, какая форма будет успешнее связываться, зависит эффективность активации транскрипции. Факторы, относящиеся к различным семействам, также модифицируют действие друг друга, действуя синергично, либо конкурируя за перекрывающиеся сайты связывания.

Судя по всему, в настоящее время описана существенная часть гепато-специфических регуляторов транскрипции. Почти все они охарактеризованы как активаторы экспрессии генов, что, однако, не исключает возможности существования негативных механизмов регуляции, которая может осуществляться за счет действия репрессорных факторов и форм с пониженной транскрипционной активностью.

#### ГЯФ В ГЕНЕТИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ ЧЕЛОВЕКА

Исследования последних лет показали, что нарушения регуляторной сети ГЯФ связаны с развитием целого ряда заболеваний человека.

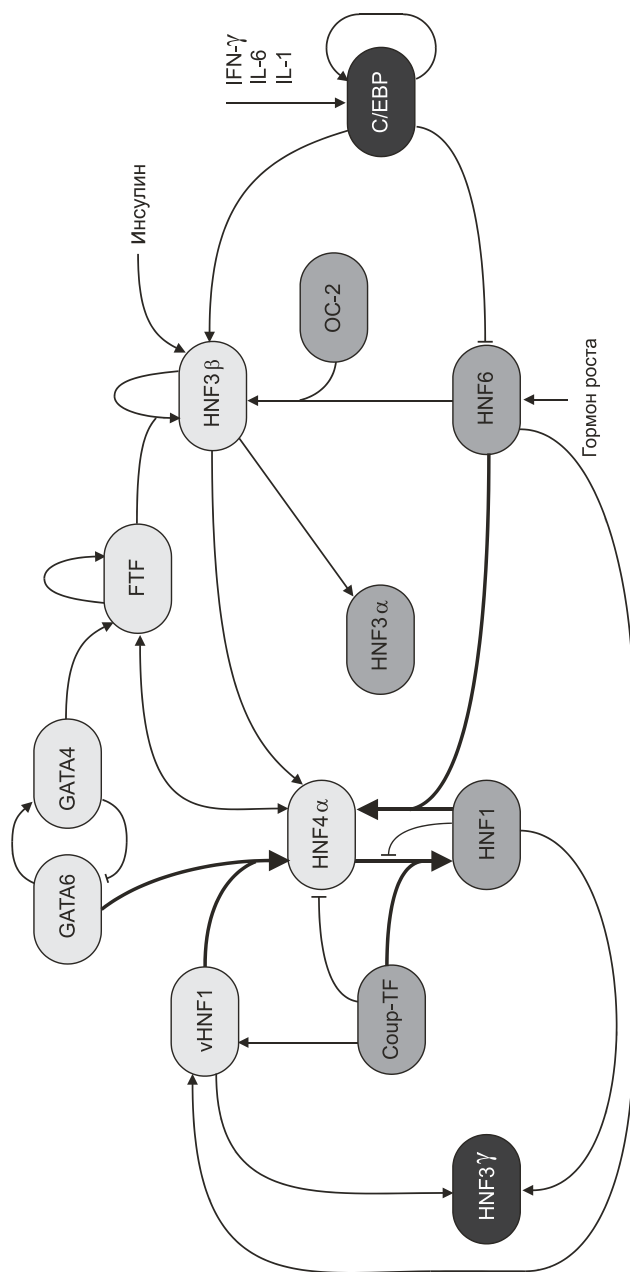


Рис. 2. Схема регуляторных взаимосвязей гепатоцитарных ядерных факторов.

Мутации в сайтах связывания ГЯФ в регуляторных районах ткане-специфических генов приводят к таким патологиям, как хронические заболевания дыхательных путей и печени (дефицит  $\alpha$ 1-АТ) [120], фенилкетонурия (отсутствие фенилаланин-гидроксилазы) [136], гемофилия В (фактор IX) [75], предрасположенность к алкогольным поражениям печени (цитохромы P450) [86].

Мутации в генах, кодирующих ГЯФ, приводят к тяжелым заболеваниям почек и к диабетам молодых MODY (Maturity Onset Diabetes of the Young). MODY – генетически гетерогенный подтип инсулин-независимого диабета (NIDDM), для которого характерна гипергликемия, вызванная нарушениями в секреции и действии инсулина. HNF1 и HNF4 $\alpha$  играют критическую роль в нормальном функционировании взрослых гепатоцитов и  $\beta$ -клеток поджелудочной железы и являются основными факторами, поддерживающими нормальный гомеостаз глюкозы. Мутации в генах HNF4 $\alpha$ , HNF1 и vHNF1 являются непосредственной причиной развития форм MODY1, MODY3 и MODY5, соответственно, которые характеризуются нарушением глюкозо-стимулирующей секреции инсулина, рано начинающейся болезнью и аутосомной доминантной наследственностью [147]. Мутации гена глюкокиназы, регулируемого ГЯФ, приводят к возникновению MODY2.

#### ГЯФ ПРИ ВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЯХ

ГЯФ вовлечены в регуляцию экспрессии вирус-специфических белков вирусов гепатита В и С, которые избирательно поражают клетки печени. Для экспрессии своих белков HBV использует активность факторов HNF1 [189], HNF3 [140], С/ЕВР [19], FTF [69] и HNF4 $\alpha$  [66]. По-видимому, наибольшее значение для экспрессии вирусных генов имеет HNF4 $\alpha$ , влияющий на уровень транскрипционной активности промоторов нуклеокапсида, большого поверхностного антигена и энхансера гена I/X. Вероятно, именно необходимость ГЯФ для репликации HBV определяет его гепато-специфичность. Репликация HBV в клетках негепатоцитарного происхождения может быть индуцирована ко-экспрессией HNF4 $\alpha$ , рецептора X ретиноевой кислоты и PPAR [168].

В свою очередь, развитие вирусной инфекции влияет на активность гепато-специфической регуляторной сети. Белок HBx может непосредственно связываться со специфическими и базальными факторами транскрипции (HNF1, С/ЕВР $\alpha$ , ТВР, TFIIH), изменяя их активационные свойства. В ГК человека HBx способен секвестрировать в цитоплазме р53, блокируя его функциональную активность. Предполагается, что это препятствует р53 модулировать

опосредованную ГЯФ регуляцию гепато-специфических генов и является одной из возможных причин ре-экспрессии гена АФП в опухолях [126].

#### ГЯФ ПРИ КАНЦЕРОГЕНЕЗЕ

К сожалению, пока очень мало сведений об изменениях уровней экспрессии ГЯФ в ходе гепатоканцерогенеза. Из-за различия биологических свойств исследованных экспериментальных систем и неоднозначности классификации клинических образцов ГК человека эти данные часто носят довольно противоречивый характер [61, 92, 163, 197]. Большая часть сведений о регуляции ГЯФ в опухолях получена при изучении культур гепатомных клеток.

В дифференцированных гепатомных клеточных линиях выявляются значительные количества HNF4 $\alpha$  и HNF1 (но не vHNF1). Дедифференцировка таких гепатом обычно сопровождается подавлением экспрессии генов HNF4 $\alpha$  и HNF1 и увеличением количества vHNF1 [25, 36, 174]. Исследования образцов ГК человека подтверждают изменение соотношения уровней экспрессии HNF1/vHNF1 в опухолях печени в пользу vHNF1 [125, 188]. Способность HNF4 $\alpha$  к прямой активации дифференцировочных процессов *in vitro* была продемонстрирована при стабильной трансфекции кДНК HNF4 $\alpha$  в линию клеток крысиной гепатомы H5 [161].

Снижение уровня транскрипции гена C/EBP $\alpha$  описано в образцах ГК крысы и человека [61, 197]. Экзогенная экспрессия C/EBP $\alpha$  снижает уровень пролиферации и туморогенность гепатомных линий HepG2 и Hep3B [190].

Подавление активности HNF1 и HNF4 $\alpha$  описано у пациентов с опухолями почек (80% случаев) [16]. Это может свидетельствовать о том, что инактивация этих гепатоцитарных факторов – важный шаг в малигнизации других типов клеток.

Изучение роли ГЯФ в злокачественной трансформации клеток печени существенно осложняется из-за отсутствия адекватных модельных систем гепатоканцерогенеза *in vivo*. Создание новой экспериментальной модели одноступенчатой прогрессии ГК мышей позволило нам исследовать некоторые механизмы прогрессии злокачественного фенотипа опухолей печени.

## У. ЗАКОНОМЕРНОСТИ ЭКСПРЕССИИ ГЕПАТО-СПЕЦИФИЧЕСКИХ ГЕНОВ ПРИ ПРОГРЕССИИ ОПУХОЛЕЙ ПЕЧЕНИ

### МОДЕЛЬ ОДНОСТУПЕНЧАТОЙ ПРОГРЕССИИ ГК МЫШИ *IN VIVO*

Для исследования полного спектра экспрессии гепато-специфических транскрипционных факторов была использована коллекция перевиваемых ГК мышей, полученная в НИИ Канцерогенеза РОНЦ РАМН по стандартной методике химического гепатоканцерогенеза: инициация (диэтилнитрозамин) – промоция (фенобарбитал). При подкожной перевивке одна из медленно растущих дифференцированных опухолей (мГК) в одном из животных резко увеличила скорость роста, дав начало быстрорастущему де-дифференцированному варианту (бГК) [10]. В то время как для мГК интервал между пассажами *in vivo* составлял 5-7 месяцев, бГК требовала перевивки каждые 2 недели. По гистологической характеристике мГК – дифференцированная опухоль, состоящая из крупных, в основном октаплоидных клеток. бГК – низкодифференцированная анапластическая опухоль, потерявшая балочную структуру и состоящая из беспорядочно расположенных преимущественно диплоидных клеток [10].

мГК имеет типичную для ее дольчатой структуры базальную мембрану, состоящую из коллагенов I и IV типа, ламинина, энтактина и фибронектина [5]. В мГК все клетки взаимодействуют с ВКМ. Хотя в бГК синтезируются те же компоненты матрикса, клеточная адгезия значительно нарушена и большая часть клеток не образует контактов с ВКМ. Нарушение мембранной локализации белка плотных контактов ZO-1, E-кадгерина и перераспределение других домен-специфических маркеров свидетельствует о нарушении межклеточных контактов и утрате бГК клеточной полярности [5, 10]. В отличие от мГК, клетки которой не способны расти *in vitro*, из бГК была получена клеточная культура [5]. Множественные морфологические изменения, произошедшие при прогрессии от мГК к бГК – утрата клеточной полярности, ослабление межклеточных контактов и связи с ВКМ – позволяют квалифицировать наблюдаемое явление как ЭМП.

Утрата эпителиальной морфологии сопровождалась изменениями в экспрессии некоторых генов, кодирующих компоненты межклеточных контактов и адгезионные молекулы. Так, в ходе прогрессии в бГК произошла активация транскрипции гена  $\alpha 3$  субъединицы интегрина [3], которая характерна для незрелых и трансформированных гепатоцитов и в комплексе с  $\beta 1$  определяет дифференцировочный ответ клеток на ВКМ [113].



Примечательно, что в мГК, характеризующейся усилением межклеточных и матриксных контактов, наблюдается гиперэкспрессия генов E-кадгерина и b-катенина по сравнению с нормальной печенью. В бГК экспрессия основного компонента щелевых контактов печени Sx32 и E-кадгерина существенно подавлена, при этом произошел переход от мембранной локализации b-катенина в мГК к цитоплазматической в бГК. Значительное подавление уровня E-кадгерина в бГК происходит параллельно с индукцией экспрессии гена *Snai1*, кодирующего один из ключевых регуляторов ЭМП в некоторых типах клеток и способного репрессировать промотор E-кадгерина [37].

Одновременно с утратой эпителиальных признаков при прогрессии в бГК наблюдается координированное подавление экспрессии целого ряда гепато-специфических генов (альбумин, АФП, транскретин,  $\alpha$ 1-АТ, многие аполипопротеины, альдолаза В, пируваткиназа L и другие) [106], соответствующее типичному для карцином антигенному упрощению опухолей [11]. В то же время де-дифференцированный вариант несет отпечаток гепатоцитарного происхождения, сохраняя экспрессию ряда генов, специфичных для печени (трансферрин и некоторые аполипопротеины).

Наряду с увеличением скорости пролиферации и снижением уровня дифференцировки, прогрессия от мГК к бГК сопровождалась активацией теломеразы, важного маркера злокачественной трансформации, и гиперэкспрессией онкогена *c-myc*, способного активировать промотор гена каталитической субъединицы теломеразы.

Таким образом, наблюдаемая прогрессия затрагивает фундаментальные свойства клеток печеночного происхождения, такие как морфологические, ростовые и функциональные характеристики. Так как опухолевая прогрессия в описанной системе одновременно привела к множественным изменениям гепатоцитарного фенотипа, она, вероятнее всего, стала следствием нарушения работы одного (или нескольких) мастер-генов, ответственных за дифференцировку гепатоцитов.

#### ГЕПАТОЦИТАРНЫЕ ЯДЕРНЫЕ ФАКТОРЫ ПРИ ПРОГРЕССИИ ГК

Координированное подавление активности целого ряда гепатоцитарных генов позволило предположить, что изменения, наблюдаемые при прогрессии ГК, могут быть вызваны нарушениями в экспрессии ключевых регуляторов транскрипции генов печени, которыми являются гепатоцитарные ядерные факторы. Действительно, оказалось, что при прогрессии от мГК к бГК происходит координированное падение уровней экспрессии целого блока транскрипци-

онных факторов, влияющих на установление и поддержание гепатоцитарного фенотипа – HNF4 $\alpha$ , HNF1,  $\nu$ HNF1, HNF3 $\gamma$ , HNF6, C/EBP $\alpha$ , FTF, и гиперэкспрессия COUP-TF1. Таким образом, развитие злокачественного фенотипа в описываемой системе связано с нарушением контроля дифференцировки, которое было вызвано утратой гепатоцитарных факторов транскрипции с взаимосвязанной регуляцией [3, 106].

Мы предположили, что причиной по крайней мере некоторых фенотипических изменений в ходе прогрессии, могло стать нарушение нормальной функции ядерного рецептора HNF4 $\alpha$  [156], являющегося важным регулятором морфогенеза [55, 131] и дифференцировки [110] эмбриональной печени. Как отмечалось выше, в де-дифференцированных гепатомных клеточных линиях утрата гепатоцитарного фенотипа обычно сопровождается падением транскрипции гена *HNF4 $\alpha$* . Кроме того, именно HNF4 $\alpha$  является возможным морфогеном и способен индуцировать сдвиг в сторону эпителиального фенотипа *in vitro* [161].

Возможная роль HNF4 $\alpha$  в контроле дифференцировочного статуса опухолей печени была исследована путем трансфекции HNF4 $\alpha$ -экспрессирующих векторов в культуру клеток бГК. Восстановление экспрессии HNF4 $\alpha$  в бГК привело к значительным изменениям клеточной морфологии – образованию эпителиальных островков с плотными контактами. Восстановление эпителиального фенотипа при ре-экспрессии HNF4 $\alpha$  сопровождается нормализацией контактов клеток с ВКМ. В эпителиальных островках HNF4 $\alpha$ -трансфицированных клонов восстанавливается характерная для культур эпителиальных клеток локализация компонентов матрикса. Фибриллы энтактина, фибронектина, ламинина и коллагена IV типа расположены вдоль межклеточных контактов. Таким образом, клетки, экспрессирующие HNF4 $\alpha$ , образуют более сформированную базальную мембрану, чем клетки исходной культуры [106]. Ре-экспрессия HNF4 $\alpha$  в культуре клеток бГК вызывает индукцию ряда гепато-специфических генов, кодирующих транскрипционные факторы, метаболические ферменты и молекулы межклеточной адгезии. В частности, выявлена четкая Hnf4 $\alpha$ -зависимая активация гепато-специфических регуляторов HNF1, FTF, HNF6, HNF4 $\alpha$ 7 и HNF3 $\gamma$ , и подавление транскрипции COUP-TF1. Полученные нами данные о HNF4 $\alpha$ -зависимой активации перечисленных генов не исключают возможности существования взаимной регуляции между ними, однако возможность ре-экспрессии этих факторов в бГК четко указывает на то, что регуляторные и кодирующие последовательности этих генов не были существенно повреждены при прогрессии. Следовательно,

мутация любого из этих генов не может рассматриваться как первичная причина прогрессии ГК.

HNF4 $\alpha$ -зависимая активация экспрессии гена *Cx32*, кодирующего основной компонент щелевых контактов печени, является, по всей видимости, следствием недавно описанной активации промотора этого гена фактором HNF1 [133]. Регуляторный каскад HNF4 $\alpha$   $\rightarrow$  HNF1  $\rightarrow$  *Cx32* представляется возможным механизмом восстановления межклеточных контактов в HNF4 $\alpha$  – трансфицированных клонах бГК.

Итак, ре-экспрессия HNF4 $\alpha$  в культуре клеток бГК вызывает сдвиг в сторону эпителиальной морфологии и восстановление экспрессии ряда транскрипционных факторов и функциональных генов печени. Эти наблюдения прямо указывают на возможность частичной реверсии опухолевого фенотипа ГК при ре-экспрессии HNF4 $\alpha$ . Чтобы проверить, насколько общий характер носят описанные закономерности, была использована коллекция независимо индуцированных диэтилнитрозамином и фенобарбиталом перевиваемых ГК мышей. Из этой коллекции было отобрано 12 опухолей, которые составили две группы: медленно растущие высокодифференцированные и быстро растущие низкодифференцированные ГК. Анализ уровней экспрессии печень-специфических генов и некоторых других вероятных эффекторов гепатоканцерогенеза в образцах ГК и нормальной печени взрослой мыши позволил выделить три группы генов.

Оказалось, что HNF4 $\alpha$  экспрессируется только в печени и во всех высокодифференцированных опухолях, то есть уровень дифференцировки ГК четко коррелирует с уровнем экспрессии гена HNF4 $\alpha$ . Аналогичный профиль экспрессии выявлен для транскрипционных факторов HNF1,  $\nu$ HNF1, HNF3 $\gamma$ , C/EBP $\alpha$  и FTF. Вероятно, именно репрессия генов, входящих в эту группу, может играть наиболее существенную роль в процессе де-дифференцировки при гепатоканцерогенезе. Полное совпадение профилей экспрессии этой группы генов в ГК предполагает возможность кооперативной регуляции их транскрипции. Важно отметить, что большинство генов этой группы являются прямыми или опосредованными мишенями HNF4 $\alpha$ .

Гены, кодирующие возможные эффекторы ЭМП – *Cx32*,  $\alpha$ 3 *интегрин*, *Snai1* и *E-кадгерин* – попали в группу последовательностей, транскрипция которых нестрого связана с дифференцировочным статусом ГК (не более трех несовпадений в 12 образцах). В эту же группу попал ген онко-эмбрионального маркера *AФП*. Отсутствие экспрессии *AФП* в некоторых де-дифференцированных ГК вероятно стало следствием репрессии транс-факторов, регулирующих транскрипцию этого гена, и свидетельствует об их наибольшей злокачест-

венности по сравнению с другими опухолями. По-видимому, гены этой группы могут быть вовлечены в развитие злокачественного фенотипа ГК, но не являются определяющими для этого процесса, а регуляция их экспрессии напрямую не связана с активностью HNF4 $\alpha$ .

В группу генов, экспрессирующихся независимо от HNF4 $\alpha$  и не связанных с прогрессией ГК, попали *c-myc* и  *$\beta$ -катенин* – их гиперэкспрессия является ранним событием гепатоканцерогенеза и, видимо, не является непосредственной причиной де-дифференцировки опухолей. Экспрессия HNF3 $\alpha$  и HNF3 $\beta$ , играющих важную роль в органогенезе печени, сохраняется в части недифференцированных ГК, но, по-видимому, не является достаточной для сохранения гепато-специфического спектра экспрессии генов и поддержания эпителиальной морфологии.

Итак, исследования на коллекции химически индуцированных ГК мышей независимого происхождения с различным уровнем дифференцировки подтвердили основные закономерности ткане-специфической регуляции генов, выявленные на модели одноступенчатой прогрессии ГК. Эти данные указывают на существование зависимости между дифференцировочным статусом опухоли, ее эпителиальными характеристиками, скоростью роста и экспрессией HNF4 $\alpha$  и ряда других ГЯФ. Полученные результаты подтверждают важную роль ядерного рецептора HNF4 $\alpha$  в поддержании дифференцировочного статуса опухолей печени.

При трансфекции культуры клеток бГК конструкцией, содержащей ген люциферазы под контролем 5' регуляторного района HNF4 $\alpha$ 1, активность репортерного гена не выявляется. Следовательно, снижение экспрессии HNF4 $\alpha$  в бГК определяется на транскрипционном уровне и не связано с мутацией или другим повреждением промотора или кодирующей части гена HNF4 $\alpha$ . Репрессия гена HNF4 $\alpha$  в бГК вызвана, вероятно, изменением уровня его транскрипционных регуляторов.

Как отмечалось выше, при прогрессии от мГК к бГК изменяется уровень экспрессии целого ряда регуляторов гепатоцитарной дифференцировки, которые могут влиять на уровень транскрипции гена *HNF4 $\alpha$*  в некоторых экспериментальных системах. Однако возможность восстановления эндогенной экспрессии всех этих факторов доказывает, что ни один из них не может считаться первичной причиной прогрессии ГК на исследуемой модели. Эти результаты предполагают существование неизвестного пока регуляторного механизма, определяющего подавление транскрипции гена *HNF4 $\alpha$*  в процессе гепатоканцерогенеза. Можно ожидать, что идентификация механизмов, определяющих репрессию гена *HNF4 $\alpha$*  в бГК, позволит выявить ключевые изменения сигнальных путей, ставшие причиной прогрессии ГК в исследуемой модели.

При сравнении профилей экспрессии генов в мГК и бГК методом гибридизации с кДНК микрочипами было установлено, что свыше половины наиболее репрессированных в ходе прогрессии генов кодирует сывороточные белки, специфичные для печени. Существенную часть из них составляют ингибиторы протеиназ. Возможно, именно активация протеиназ в отсутствие их ингибиторов приводит к нарушению морфологии и повышению инвазивности быстрорастущей опухоли.

Гены, экспрессия которых заметно повышается при прогрессии ГК, кодируют транскрипционные факторы; белки, участвующие в передаче сигнала или контролирующие пролиферацию; метаболические ферменты; транспортные и адгезионные молекулы. Существенная часть генов с максимальным уровнем активации оказались TGF $\beta$ -индуцируемыми, что указывает на вовлеченность сигнального пути, регулируемого факторами этого семейства, в прогрессию опухолей печени. Несколько последовательностей из этого списка в геноме человека картированы в хромосомных локусах, чаще всего амплифицированных в ГК, в которых предполагается наличие пока неидентифицированных онкогенов. Один из них — упоминавшийся ранее ген  $\alpha 3$  субъединицы интегрина, расположенный в локусе 17q21. Субстратная специфичность  $\alpha 3$  субъединицы направлена преимущественно на взаимодействие с деградированными компонентами ВКМ, которые могут образовываться благодаря описанной выше инактивации ингибиторов протеиназ. Экспрессия  $\alpha 3$  субъединицы интегрина в гепатомных клетках может быть индуцирована TGF $\beta$  и сопровождается развитием инвазивного и метастатического фенотипа [68].

Цитокины семейства TGF $\beta$  играют исключительно важную роль регуляции пролиферации, апоптоза и морфогенеза эпителиальных клеток [116]. На первый взгляд роль TGF $\beta$  в развитии печени и при гепатоканцерогенезе достаточно противоречива. С одной стороны, TGF $\beta$  блокирует пролиферацию, подавляет трансформацию и индуцирует апоптоз гепатоцитов [58]. Вероятно, именно этот фактор определяет своевременную остановку деления гепатоцитов при регенерации печени [118]. С другой стороны, в человеческих ГК синтез и секреция TGF $\beta$  существенно повышены, трансформированные клетки нередко приобретают устойчивость к этому фактору, а конститутивная экспрессия TGF $\beta$  в печени ускоряет гепатоканцерогенез у трансгенных мышей [56].

Недавно было показано, что TGF $\beta$  индуцирует ЭМП в Ha-Ras-трансформированных гепатоцитах [70]. Этот переход сопровождается утратой полярности, разрушением межклеточных контактов, дедифференцировкой и повышением инвазивности при росте *in vivo*.

Важно отметить, что развитие инвазивного фенотипа сопровождается секрецией в среду значительных количеств TGF $\beta$ , что обеспечивает аутокринную регуляцию сигнала. Сходные результаты получены при изучении влияния TGF $\beta$  на рост и дифференцировку эмбриональных гепатоцитов крысы в культуре [183]. В то время как основная часть эмбриональных гепатоцитов при воздействии TGF $\beta$  погибает, выжившие клетки претерпевают ЭМП и приобретают устойчивость к TGF $\beta$ . Эти события сопровождаются подавлением экспрессии ряда дифференцировочных маркеров, снижением уровней HNF4 $\alpha$  и HNF1, индукцией транскрипции фибронектина и транскрипционного регулятора Snai1. Обнаружена также способность TGF $\beta$  блокировать дифференцировку *c-met* иммортализованных мышечных гепатоцитов в культуре от фибробласто-подобных к эпителиальным клеткам [160]. Этот фактор стабилизирует фибробласто-подобный фенотип гепатоцитов в культуре параллельно с репрессией HNF4 $\alpha$  и HNF1 и активацией транскрипции гена Snai1.

Нетрудно заметить значительное сходство изменений, выявленных при исследовании прогрессии ГК мышечей, с описанными выше последствиями активации TGF $\beta$  сигнального пути в других экспериментальных системах. Наши предварительные результаты [Овчинников и др., неопубл. данные] указывают на то, что в ходе прогрессии ГК *in vivo* происходит активация TGF $\beta$ -зависимых сигнальных путей, играющих, по-видимому, важную роль в процессе развития злокачественного фенотипа опухолей печени.

Значительное падение уровня экспрессии HNF4 $\alpha$ , зарегистрированное нами и в клинических образцах ГК [7], указывает на вовлеченность HNF4 $\alpha$  в процесс гепатоканцерогенеза у человека. Более того, наблюдавшееся в одном из случаев полное подавление экспрессии HNF4 $\alpha$  коррелировало с утратой печеночной архитектуры и приобретением способности к метастазированию. Вероятно, репрессия HNF4 $\alpha$  может оказаться неблагоприятным прогностическим фактором для опухолей печени. Эти данные могут иметь важное практическое значение, поскольку на модели прогрессии ГК мышечей продемонстрирована возможность частичной реверсии злокачественного фенотипа при восстановлении экспрессии HNF4 $\alpha$ .

Важно отметить, что HNF4 $\alpha$  участвует в регуляции генов, ответственных за детоксикацию и метаболизм лекарственных веществ, и, прежде всего цитохромов P450 [176]. Поэтому его утрата при прогрессии ГК может иметь дополнительные последствия – можно ожидать, что HNF4 $\alpha$ -негативные опухоли хуже реагируют на лекарственную терапию. Следовательно, восстановление экспрессии HNF4 $\alpha$  представляется действенным способом повышения чувствительности ГК к терапевтическим воздействиям.

## VI. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Изучение молекулярных механизмов гепатоканцерогенеза показало, что оно сопровождается глубокими изменениями в дифференцировочном статусе клетки и затрагивает многие биохимические процессы. Эти изменения происходят одновременно с нарушением регуляции целого блока гепато-специфических транскрипционных регуляторов и частично определяются ядерным рецептором HNF4 $\alpha$ .

Совершенно очевидно, что прекращение экспрессии HNF4 $\alpha$  способствует прогрессии ГК. Оно затрагивает целый ряд ткане-специфических и общих путей передачи сигнала и влияет на множество клеточных характеристик. Так как репрессия HNF4 $\alpha$  является причиной, по крайней мере, некоторых изменений, происходящих в ходе прогрессии, можно предполагать, что именно нарушение механизмов, прямо или опосредованно влияющих на экспрессию HNF4 $\alpha$ , приводит к возникновению более злокачественных опухолей.

Полученные результаты свидетельствуют о ключевой роли HNF4 $\alpha$  в интеграции гепато-специфических регуляторных путей и базовых механизмов контроля клеточной пролиферации и дифференцировки. Однако остаются нерешенными два фундаментальных вопроса:

— Посредством каких механизмов осуществляется влияние фактора HNF4 $\alpha$  на функциональные, морфологические и ростовые характеристики ГК?

— Какие регуляторы экспрессии HNF4 $\alpha$  определяют прогрессию опухолей?

Дальнейшее изучение регуляции транскрипции при гепатоканцерогенезе и проверка выявленных закономерностей в клинике будут полезны для решения проблемы прогнозирования и генной терапии опухолей.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абелев Г.И. (1979) Опухолевый рост как проблема биологии развития. / Ред. Гельштейн В.И., М: Наука, 148–173.
2. Абелев Г.И. (2003) Мол. Биол., **37**, 1–8.
3. Варга Е.В., Черемнова О.А., Овчинников Д.А., Шапигузов А.Ю., Кудрявцева Е.И., Морозова О.В., Энгельгардт Н.В., Лазаревич Н.Л. (2001) Генетика, **37**, 803–810.
4. Копнин Б.П. (2000). Биохимия, **65**, 5–33.
5. Кудрявцева Е.И., Морозова О.В., Рудинская Т.Д., Энгельгардт Н.В. (2001) Арх. Патол., **4**, 33–37.
6. Лазаревич Н.Л. (2000) Биохимия, **65**, 139–158.
7. Лазаревич Н.Л. (2003) Изменения спектров экспрессии генов при гепатоканцерогенезе и прогрессии опухолей печени. Дисс. д-ра биол. наук. М., МГУ, с. 245.
8. Турусов В.С. (1985) Эксп. Онкол., **7**, 5–12.

9. Чумаков П.М. (2000) Биохимия, **65**, 34–47.
10. Энгельгардт Н.В., Кудрявцева Е.И., Морозова О.В., Рудинская Т.Д., Турусов В.С. (2000) Арх. патол., **62**, 24–29.
11. Abelev G.I. (1965) Progr. Exp. Tumor Res., **7**, 104–157.
12. Abelev G.I. (1993) Sov. Sci. Rev. D. Physicochem. Biol., **11**, 85–109.
13. Abelev G.I., Perova S.D., Khramkova N.I., Postnikova Z.A., Irlin I.S. (1963) Transplantation, **1**, 174–180.
14. Aguilar F., Hussain S.P., Cerutti P. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **90**, 8586–8590.
15. Amicone L., Spagnoli F.M., Spath G., Giordano S., Tommasini C., Bernardini S., De Luca V., Della Rocca C., Weiss M.C., Comoglio P.M., Tripodi M. (1997) EMBO J **16**, 495–503.
16. Anastasiadis A.G., Lemm I., Radzewitz A., Lingott A., Ebert T., Ackermann R., Ryffel G.U., Schulz W.A. (1999) Anticancer Res., **19**, 2105–2110.
17. Ang S.L., Rossant J. (1994) Cell, **78**, 561–574.
18. Ang S.L., Wierda A., Wong D., Stevens K.A., Cascio S., Rossant J., Zaret K.S. (1993) Development, **119**, 1301–1315.
19. Aragona E., Burk R.D., Ott M., Shafritz D.A., Gupta S. (1996) J. Pathol. **180**, 441–449.
20. Bailly A., Torres-Padilla M.E., Tinel A.P., Weiss M.C. (2001) Nucl. Acids Res., **29**, 3495–3505.
21. Barbacci E., Reber M., Ott M.O., Breilhat C., Huetz F., Cereghini S. (1999) Development, **126**, 4795–4805.
22. Barth A.I., Nathke I.S., Nelson W.J. (1997) Curr. Opin. Cell Biol., **9**, 683–690.
23. Battle E., Sancho E., Franci C., Dominguez D., Monfar M., Baulida J., Garcia De Herreros A. (2000) Nat. Cell Biol., **2**, 84–89.
24. Batsche E., Muchardt C., Behrens J., Hurst H.C., Cremisi C. (1998) Mol. Cell. Biol., **18**, 3647–3658.
25. Baumheuter S., Courtois G., Crabtree G.P. (1988) EMBO J., **7**, 2485–2493.
26. Berenblum I. (1941) Cancer Res., **1**, 44–50.
27. Bergsland E.K., Venook A.P. (2000) Curr. Opin. Oncol., **12**, 357–361.
28. Bernier D., Thomassin H., Allard D., Guertin M., Hamel D., Blagiere M., Beauchemin M., La Rue H., Estable-Puig M., Belanger L. (1993) Mol. Cell. Biol., **13**, 1619–1633.
29. Bodnar A.G., Ouellette M., Frolkis M., Holt S.E., Chiu C.P., Morin G.B., Harley C.B., Shay J.W., Lichtsteiner S., Wright W.E. (1998) Science, **279**, 349–352.
30. Bosch F.X., Ribes J., Borrás J. (1999) Semin. Liver Dis., **19**, 271–285.
31. Boyer B., Valles A.M., Edme N. (2000) Biochem. Pharmacol. **60**, 1091–1099.
32. Bracke M.E., Van Roy F.M., Mareel M.M. (1996) Curr. Top. Microbiol. Immunol., **213**, 123–161.
33. Brechot C., Gozuacik D., Murakami Y., Paterlini-Brechot P. (2000) Sem. Cancer Biol., **10**, 211–231.
34. Bressac B., Kew M., Wands J., Ozturk M. (1991) Nature, **350**, 429–431.
35. Buendia M.A. (2000) Semin. Cancer Biol., **10**, 185–200.
36. Bulla G.A., Fournier R.E.K. (1994) Mol. Cell. Biol., **14**, 7086–7094.
37. Cano A., Perez-Moreno M.A., Rodrigo I., Locascio A., Blanco M.J., del Barrio M.G., Portillo F., Nieto M.A. (2000) Nat. Cell Biol., **2**, 76–83.
38. Cereghini S. (1996) FASEB J., **10**, 267–282.
39. Cereghini S., Ott M.O., Power S., Maury M. (1992) Development, **116**, 783–797.
40. Chang M.H., Chen D.S., Hsu H.C., Hsu H.Y., Lee C.Y. (1989) Cancer, **64**, 2377–2380.
41. Cirillo L., Zaret K. (1999) Mol. Cell, **4**, 961–969.
42. Clark K.L., Halay E.D., Lai E., Burley S.K. (1993) Nature, **364**, 412–420.



43. Clevers H., van de Wetering M. (1997) Trends Genet., **13**, 485–489.
44. Clotman F., Lannoy V.J., Reber M., Cereghini S., Cassiman D., Jacquemin P., Roskams T., Rousseau G.G., Lemaigre F.P. (2002) Development, **129**, 1819–1828.
45. Cockell M., Stolarczyk D., Frutinger S., Hughes G.J., Wellauer P.K. (1995) Mol. Cell. Biol., **15**, 1933–1941.
46. Coffinier C., Gresh L., Fiette L., Tronche F., Schutz G., Babinet C., Pontoglio M., Yaniv M., Barra J. (2002) Development, **129**, 1829–1838.
47. Coffinier C., Thepot D., Babinet C., Yaniv M., Barra J. (1999) Development, **126**, 4785–4794.
48. Colombo M. (1999) Semin. Liver Dis., **19**, 263–269.
49. De Souza A.T., Hankins G.R., Washington M.K., Orton T.C., Jirtle R.L. (1995) Nat. Genet., **11**, 447–449.
50. Descombes P., Schibler U. (1991) Cell, **67**, 569–579.
51. Devereux T.R., Anna C.H., Foley J.F., White C.M., Sills R.C., Barrett J.C. (1999) Oncogene, **18**, 4726–4733.
52. Duncan S.A. (2000) Dev. Dynamics, **219**, 131–142.
53. Duncan S.A. (2003) Mech Dev., **120**, 19–33.
54. Duncan S.A., Manova K., Chen W.S., Hoodless P., Weinstein D.C., Bachvarova R.F., Darnell J.E., Jr (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **91**, 7598–7602.
55. Duncan S.A., Nagy A., Chan W. (1997) Development, **124**, 279–287.
56. Factor V.M., Kao C.Y., Santoni-Rugiu E., Woitach J.T., Jensen M.R., Thorgeirsson S.S. (1997) Cancer Res., **57**, 2089–2095.
57. Faust D.M., Boshart M., Imaizumi S.T., Schutz G., Weiss M.C. (1994) Cell Growth Differ., **5**, 47–53.
58. Fausto N. (2000) J. Hepatol., **32**, 19–31.
59. Fausto N., Webber E.M. (1993) Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr., **3**, 117–135.
60. Feitelson M., Sun B., Tufan N.L.S., Liu J., Pan J., Lian Z. (2002) Oncogene, **21**, 2593–2604.
61. Flodby P., Liao DZ, Blanck A, Xanthopoulos KG, Hallstrom IP. (1995) Mol. Carcinog., **12**, 103–109.
62. Flodby P., Barlow C., Kylejford H., Ahrlund-Richter L., Xanthopoulos K.G. (1996) J. Biol. Chem., **271**, 24753–24760.
63. Fujimori M., Tokino T., Hino O., Kitagawa T., Imamura T., Okamoto E., Mitsunobu M., Ishikawa T., Nakagama H., Harada H. (1991) Cancer Res., **51**, 89–93.
64. Fujimoto Y., Hampton L.L., Wirth P.J., Wang N.J., Xie J.P., Thorgeirsson S.S. (1994) Cancer Res., **54**, 281–285.
65. Galarneau L., Pare J.-F., Allard D., Hamel D., Levesque L., Tugwood J.D., Green S., Belanger L. (1996) Mol. Cell. Biol., **16**, 3853–3865.
66. Garcia A.D., Ostapchuk P., Hearing P. (1993) J. Virol., **67**, 3940–3950.
67. Ghosh A.K., Steele R., Meyer K., Ray R., Ray R.B. (1999) J. Gen. Virol., **80**, 1179–1183.
68. Giannelli G., Fransvea E., Marinocci F., Bergamini C., Colucci S., Schiraldi O., Antonaci S. (2002) Am. J. Pathol., **161**, 183–193.
69. Gilbert S., Galarneau L., Lamontagne A., Roy S., Belanger L. (2000) J. Virol., **74**, 5032–5039.
70. Gotzmann J., Huber H., Thallinger C., Wolschek M., Jansen B., Schulte-Hermann R., Beug H., Mikulits W. (2002) J. Cell. Sci., **115**, 1189–1202.
71. Greenbaum L.E., Cressman D.E., Haber B.A., Taub R. (1995) Clin. Invest., **96**, 1351–1365.
72. Greenbaum L.E., Li W., Cressman D.E., Peng Y., Ciliberto G., Poli V., Taub R. (1998) J. Clin. Invest., **102**, 996–1007.
73. Gumbiner B.M. (1995) Curr. Opin. Cell Biol., **7**, 634–640.
74. Hahn W.C., Weinberg R.A. (2002) Nat. Rev. Cancer, **2**, 331–341.

75. Hall A.J., Chuansumrit A., Peake I.R., Winship P.R. (1994) *Thromb. Haemost.*, **72**, 799–803.
76. Hamilton S.R., Aaltonen L.A. Pathology and genetics of tumours of the digestive system. (2000) Lyon: IARC Press.
77. Hanahan D., Weinberg R.A. (2000) *Cell*, **100**, 57–70.
78. Hatzis P., Talianidis I. (2001) *Mol. Cell. Biol.*, **21**, 7320–7330.
79. Hayashi J., Aoki H., Kajino K., Moriyama M., Arakawa Y., Hino O. (2000) *Hepatology*, **32**, 958–961.
80. Hayhurst G.P., Lee Y.H., Lambert G., Ward J.M., Gonzalez F.J. (2001) *Mol. Cell. Biol.*, **21**, 1393–1403.
81. Hildt E., Hofschneider P.H., Urban S. (1996) *Sem. Virology*, **7**, 333–347.
82. Honda K., Sbisà E., Tullo A., Papeo P.A., Saccone C., Poole S., Pignatelli M., Mitry R.R., Ding S., Isla A., Davies A., Habib N.A. (1998) *Br. J. Cancer*, **77**, 776–782.
83. Hsu H.C., Jeng Y.M., Mao T.L., Chu J.S., Lai P.L., Peng S.Y. (2000) *Am. J. Pathol.*, **157**, 763–770.
84. Hsu I.C., Metcalf R.A., Sun T., Welsh J.A., Wang N.J., Harris C.C. (1991) *Nature*, **350**, 427–428.
85. Hussain S.P., Harris C.C. (2000) *Mutat. Res.*, **462**, 311–322.
86. Ingelman-Sundberg M., Johansson I., Persson I., Oscarson M., Hu Y., Bertilsson L., Dahl M.L., Sjoqvist F. (1994) *EXS*, **71**, 197–207.
87. Jacquemin P., Durvieux S.M., Jensen J., Godfraind C., Gradwohl G., Guillemot F., Madsen O.D., Carmeliet P., Dewerchin M., Collen D., Rousseau G.G., Lemaigre F.P. (2000) *Mol. Cell. Biol.*, **20**, 4445–4454.
88. Jiang G., Sladek F.M. (1997) *J. Biol. Chem.*, **272**, 1218–1225.
89. Jung J., Zheng M., Goldfarb M., Zaret K.S. (1999) *Science*, **284**, 1998–2003.
90. Kaestner K.H., Hiemisch H., Schutz G. (1998) *Mol. Cell. Biol.*, **18**, 4245–4251.
91. Kaestner K.H., Katz J., Liu Y., Drucker D.J., Schutz G. (1999) *Genes Dev.*, **13**, 495–504.
92. Kalkuhl A., Kaestner K., Buchmann A., Schwarz M. (1996) *Carcinogenesis*, **17**, 609–612.
93. Katagiri T., Nakamura Y., Miki Y. (1996) *Cancer Res.*, **56**, 4575–4577.
94. Kawate S., Takenoshita S., Ohwada S., Mogi A., Fukusato T., Makita F., Kuwano H., Morishita Y. (1999) *Int. J. Oncol.*, **14**, 127–131.
95. Khramkova N.I., Postnikova Z.A., Abelev G.I. (1963) *Neoplasma*, **10**, 127–131.
96. Kim C.M., Koike K., Saito I., Miyamura T., Jay G. (1991) *Nature*, **351**, 317–320.
97. Kojiro M. (1997) *Liver Cancer*. /Ed. Okuda K., Tabor E. New York: Churchill Livingstone, 165–187.
98. Krutovskikh V.A., Oyamada M., Yamasaki H. (1991) *Carcinogenesis*, **12**, 1701–1706.
99. Ktistaki E. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 9876–9880.
100. Kuo C.J., Conley P.B., Chen L., Sladek F.M., Darnell J.E., Jr., Crabtree G.R. (1992) *Nature*, **355**, 457–461.
101. Kusano N., Shiraishi K., Kubo K., Oga A., Okita K., Sasaki K. (1999) *Hepatology*, **29**, 1858–1862.
102. Ladias J.A., Karathanasis S.K. (1991) *Science*, **251**, 561–565.
103. Landry C., Clotman F., Hioki T., Oda H., Picard J.J., Lemaigre F.P., Rousseau G.G. (1997) *Dev. Biol.*, **192**, 247–257.
104. Landschulz W.H., Johnson P.F., and McKnight S.L. (1988) *Science*, **240**, 1754–1764.
105. Laurent-Puig P., Legoix P., Bluteau O., Belghiti J., Franco D., Binot F., Monges G., Thomas G., Bioulac-Sage P., Zucman-Rossi J. (2001) *Gastroenterology*, **120**, 1763–1773.
106. Lazarevich N.L., Cheremnova O.A., Varga E.V., Ovchinnikov D.A., Kudrjavtseva E.I., Morozova O.V., Fleish-

- man D.I., Engelhardt N.V., Duncan S.A.* (2004) *Hepatology*, **39**, в печати.
107. *LeDouarin N.M.* (1975) *Med. Biol.* **53**, 427–455.
108. *Lemaigre F.P., Durviaux S.M., Truong O., Lannoy V.J., Hsuan J.J., Rousseau G.G.* (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 9460–9464.
109. *Levine A.J.* (1997) *Cell*, **88**, 323–331.
110. *Li J., Ning G., Duncan S.A.* (2000) *Genes Dev.*, **14**, 464–474.
111. *Lingner J., Hughes T.R., Shevchenko A., Mann M., Lundblad V., Cech T.R.* (1997) *Science*, **276**, 561–567.
112. *Locker J.* (2001) *Transcription factors.*/Ed. J. Locker. Oxford: BIOS Scientific Publishers, 237–262.
113. *Lora J.M., Rowader K.E., Soares L., Giancotti F., Zaret K.S.* (1998) *Hepatology*, **28**, 1095–1104.
114. *Maeda Y., Seidel S.D., Wei G., Liu X., Sladek F.M.* (2002) *Mol. Endocrinol.*, **16**, 402–410.
115. *Mao T.L., Chu J.S., Jeng Y.M., Lai P.L., Hsu H.C.* (2001) *J. Pathol.*, **193**, 95–101.
116. *Massague J., Chen Y.G.* (2000) *Genes Dev.*, **14**, 627–644.
117. *Matsuda Y., Ichida T., Matsuzawa J., Sugimura K., Asakura H.* (1999) *Gastroenterology*, **116**, 394–400.
118. *Michalopoulos G.K., DeFrances M.C.* (1997) *Science*, **276**, 60–66.
119. *Miquerol L., Lopez S., Cartier N., Tulliez M., Raymondjean M., Kahn A.* (1994) *J. Biol. Chem.*, **269**, 8944–8951.
120. *Morgan K., Scobie G., Marsters P., Kalsheker N.A.* (1997) *Biochim. Biophys. Acta*, **1362**, 67–76.
121. *Murakami Y., Hayashi K., Hirohashi S., Sekiya T.* (1991) *Cancer Res.*, **51**, 5520–5525.
122. *Nakamura T., Hamada F., Ishidate T., Anai K., Kawahara K., Toyoshima K., Akiyama T.* (1998) *Genes Cells*, **3**, 395–403.
123. *Nakhei H., Lingott A., Lemm I., Ryffel G.U.* (1998) *Nucl. Acids Res.*, **26**, 497–504.
124. *Nieto M.A.* (2002) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **3**, 155–166.
125. *Ninomiya T., Hayashi Y., Saijoh K., Ohta K., Yoon S., Nakabayashi H., Tamaoki T., Kasuga M., Itoh H.* (1996) *J. Hepatol.* **25**, 445–453.
126. *Ogden S.K., Lee K.C., Barton M.C.* (2000) *J. Biol. Chem.*, **275**, 27806–27814.
127. *Okabe H., Satoh S., Kato T., Kitahara O., Yanagawa R., Yamaoka Y., Tsunoda T., Furukawa Y., Nakamura Y.* (2001) *Cancer Res.*, **61**, 2129–2137.
128. *Osada T., Sakamoto M., Ino Y., Iwamatsu A., Matsuno Y., Muto T., Hirohashi S.* (1996) *Hepatology*, **24**, 1460–1467.
129. *Ozaki I., Mizuta T., Zhao G., Yotsu-moto H., Hara T., Kajihara S., Hisatomi A., Sakai T., Yamamoto K.* (2000) *Cancer Res.*, **60**, 6519–6525.
130. *Pare J.F., Roy S., Galarneau L., Belanger L.* (2001) *J. Biol. Chem.*, **276**, 13136–13144.
131. *Parviz F., Matullo C., Garrison W.D., Savatski L., Adamson J.W., Ning G., Kaestner K.H., Zaret K.S., Duncan S.A.* (2003) *Nat. Genet.*, **34**, 292–296.
132. *Piao Z., Park C., Kim J.J., Kim H.* (1999) *Br. J. Cancer*, **80**, 850–854.
133. *Piechocki M.P., Toti R.M., Fernstrom M.J., Burk R.D., Ruch R.J.* (2000) *Biochim. Biophys. Acta*, **1491**, 107–122.
134. *Pitot H., Dragan Y.* (1991) *FASEB J.*, **5**, 2280–2286.
135. *Pitot H., Sirica A.* (1980) *Biochim. Biophys. Acta*, **605**, 191–215.
136. *Pontoglio M., Barra J., Hadchouel M., Doyen A., Babinet C., Yaniv M.* (1996) *Cell*, **84**, 575–585.
137. *Prieto-Alamo M.J., Laval F.* (1998) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **95**, 12614–12618.
138. *Rabe C., Cheng B., Caselmann W.H.* (2001) *Dig. Dis.*, **19**, 279–287.

139. Rana B., Xie Y., Mischoulon D., Bucher N.L., Farmer S.R. (1995) *J. Biol. Chem.*, **270**, 18123–18132.
140. Raney A.K., Zhang P., McLachlan A. (1995) *J. Virol.*, **69**, 3265–3272.
141. Ray R.B., Meyer K., Ray R. (1996) *Virology*, **226**, 176–182.
142. Ray R.B., Ray R. (2001) *FEMS Microbiol. Lett.*, **202**, 149–156.
143. Ray R.B., Steele R., Meyer K., Ray R. (1997) *J. Biol. Chem.*, **272**, 10983–10986.
144. Rucken C., Carl-McGrath S. (2001) *Dig. Dis.*, **19**, 269–278.
145. Rollini P., Xu L., Fournier R.E. (1999) *Somat. Cell. Mol. Genet.*, **25**, 207–221.
146. Rossner M.T. (1992) *J. Med. Virol.*, **36**, 101–117.
147. Ryffel G.U. (2001) *J. Mol. Endocrinol.*, **27**, 11–29.
148. Satoh S., Daigo Y., Furukawa Y., Kato T., Miwa N., Nishiwaki T., Kawasoe T., Ishiguro H., Fujita M., Tokino T., Sasaki Y., Imaoka S., Murata M., Shimano T., Yamaoka Y., Nakamura Y. (2000) *Nat. Genet.*, **24**, 245–250.
149. Savagner P. (2001) *BioEssays*, **23**, 912–923.
150. Shen C.N., Slack J.M., Tosh D. (2000) *Nat. Cell. Biol.*, **2**, 879–887.
151. Sherr C.J. (1996) *Science*, **274**, 1672–1677.
152. Shimotohno K. (2000) *Semin. Cancer Biol.*, **10**, 233–240.
153. Shiota G., Okano J., Kawasaki H., Kawamoto T., Nakamura T. (1995) *Hepatology*, **21**, 106–112.
154. Sirma H., Giannini C., Poussin K., Paterlini P., Kremsdorf D., Brechot C. (1999) *FALK Workshop.* / Ed. Fleig W.E. Norwell: Kluwer Academic Publishers, 171–186.
155. Sladek F.M., Ruse M.D., Jr., Nepomuceno L., Huang S.M., Stallcup M.R. (1999) *Mol. Cell. Biol.*, **19**, 6509–6522.
156. Sladek F.M., Zhong W., Lai E., Darnell J.E., Jr. (1990) *Genes Dev.*, **4**, 2353–2364.
157. Soriano H.E., Kang D.C., Finegold M.J., Hicks M.J., Wang N.D., Harrison W., Darlington G.J. (1998) *Hepatology*, **27**, 392–401.
158. Soutoglou E., Ktrakili N., Talianidis L. (2000) *Mol. Cell*, **5**, 745–751.
159. Soutoglou E., Papafiotou G., Kartakili N., Talianidis I. (2000) *J. Biol. Chem.*, **275**, 12515–12520.
160. Spagnoli F.M., Cicchini C., Tripodi M., Weiss M.C. (2000) *J. Cell. Sci.*, **113**, 3639–3647.
161. Spath G.F., Weiss M.C. (1998) *J. Cell. Biol.*, **140**, 935–946.
162. St-Louis M., Tanguay R.M. (1997) *Hum. Mutat.*, **9**, 291–299.
163. Stumpf H., Senkel S., Rabes H.M., Ryffel G.U. (1995) *Carcinogenesis*, **16**, 143–145.
164. Sugimachi K., Tanaka S., Kameyama T., Taguchi K., Aishima S., Shimada M., Sugimachi K., Tsuneyoshi M. (2003) *Clin. Cancer Res.*, **9**, 2657–2664.
165. Sund N.J., Ang S.L., Sackett S.D., Shen W., Daigle N., Magnuson M.A., Kaestner K.H. (2000) *Mol. Cell. Biol.*, **20**, 5175–5183.
166. Tahara H., Kuniyasu H., Yokozaki H., Yasui W., Shay J.W., Ide T., Tahara E. (1995) *Clin. Cancer Res.*, **1**, 1245–1251.
167. Takiguchi M. (1998) *Int. J. Exp. Pathol.*, **79**, 369–391.
168. Tang H., McLachlan A. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 1841–1846.
169. Taraviras S., Monaghan A.P., Schutz G., Kelsey G. (1994) *Mech. Dev.*, **48**, 67–79.
170. Thiery J.P. (2002) *Nat. Rev. Cancer*, **2**, 442–454.
171. Thomas H., Jaschkowitz K., Bulman M., Frayling T.M., Mitchell S.M., Roosen S., Lingott-Frieg A., Tack C.J., Ellard S., Ryffel G.U., Hattersley A.T. (2001) *Hum. Mol. Genet.*, **10**, 2089–2097.

172. Thomas P., Brown A., Beddington R. (1998) *Development*, **125**, 85–94.
173. Thorgeirsson S.S., Grisham J.W. (2002) *Nat. Genet.*, **31**, 339–346.
174. Tian J.M., Schibler U. (1991) *Genes Dev.*, **5**, 2225–2234.
175. Timchenko N.A., Wilde M., Darlington G.J. (1999) *Mol. Cell. Biol.*, **19**, 2936–2945.
176. Tirona R.G., Lee W., Leake B.F., Lubin H., Brimer C., Lamba V., Parviz F., Duncan S.A., Inoue Y., Gonzalez F.J., Schuetz E.G., Kim R.B. (2003) *Nat. Med.*, **9**, 220–224.
177. Torres-Padilla M.E., Fougere-Deschattrette C., Weiss M.C. (2001) *Mech. Dev.*, **109**, 183–193.
178. Tronche F., Yaniv M. (1992) *BioEssays*, **14**, 579–587.
179. Tronche F., Ringeisen F., Blumenfeld M., Yaniv M., Pontoglio M. (1997) *J. Mol. Biol.*, **266**, 231–245.
180. Tu H., Bonura C., Giannini C., Mouly H., Soussan P., Kew M., Paterlini-Brechot P., Brechot C., Kremsdorf D. (2001) *Cancer Res.*, **61**, 7803–7810.
181. Ueno Y., Moriyama M., Uchida T., Arakawa Y. (2001) *Hepatology*, **33**, 357–362.
182. Unsal H., Yakicier C., Marçais C., Kew M., Volkmann M., Zentgraf H., Isselbacher K.J., Ozturk M. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 822–826.
183. Valdes F., Alvarez A.M., Locascio A., Vega S., Herrera B., Fernandez M., Benito M., Nieto M.A., Fabregat I. (2002) *Mol Cancer Res.*, **1**, 68–78.
184. Vautier G., Bomford A.B., Portmann B.C., Metivier E., Williams R., Ryder S.D. (1999) *Gastroenterology*, **117**, 154–160.
185. Volpes R., van den Oord J.J., Desmet V.J. (1993) *Am. J. Pathol.*, **142**, 1483–1492.
186. Wang J., Xie L.Y., Allan S., Beach D., Hannon G.J. (1998) *Genes Dev.*, **12**, 1769–1774.
187. Wang N.D., Finegold M.J., Bradley A., Ou C.N., Abdelsayed S.V., Wilde M.D., Taylor L.R., Wilson D.R., Darlington G.J. (1995) *Science*, **269**, 1108–1112.
188. Wang W., Hayashi Y., Ninomiya T., Ohta K., Nakabayashi H., Tamaoki T., Itoh H. (1998) *J. Pathol.*, **184**, 272–278.
189. Wang W.X., Li M., Wu X., Wang Y., Li Z.P. (1998) *Res. Virol.*, **149**, 99–108.
190. Watkins P.J., Condreay J.P., Huber B.E., Jacobs S.J., Adams D.J. (1996) *Cancer Res.*, **56**, 1063–1067.
191. Weigel D., Jackle H. (1990) *Cell*, **63**, 455–456.
192. Weinstein D.C., Ruiz i Altaba A., Chen W.S., Hoodless P., Prezioso V.R., Jessell T.M., Darnell J.E., Jr. (1994) *Cell*, **78**, 575–588.
193. Welm A.L., Timchenko N.A., Darlington G.J. (1999) *Mol. Cell. Biol.*, **19**, 1695–1704.
194. Wogan G.N. (2000) *Sem. Cancer Biol.*, **10**, 201–210.
195. Wu K.L., Gannon M., Peshavaria M. (1997) *Mol. Cell. Biol.*, **17**, 6002–6013.
196. Xanthopoulos K.G., Mirkovitch J. (1993) *Eur. J. Biochem.*, **216**, 353–360.
197. Xu L., Hui L., Wang S., Gong J., Jin Y., Wang Y., Ji Y., Wu X., Han Z., Hu G. (2001) *Cancer Res.*, **61**, 3176–3181.
198. Yakicier M.C., Irmak M.B., Romano A., Kew M., Ozturk M. (1999) *Oncogene*, **18**, 4879–4883.
199. Yamagata K., Furuta H., Oda N., Kaisaki P.J., Menzel S., Cox N.J., Fajans S.S., Signorini S., Stoffel M., Bell G.I. (1996) *Nature*, **384**, 458–460.
200. Yamaguchi Y., Nozawa K., Savoysky E., Hayakawa N., Nimura Y., Yoshida S. (1998) *Exp. Cell Res.*, **242**, 120–127.
201. Yamane A., Seetharam L., Yamaguchi, S., Gotoh N., Takahashi T., Neufeld G., Shibuya M. (1994) *Oncogene*, **9**, 2683–2690.

- 
202. Yao Y.J., Ping X.L., Zhang H., Chen F.F., Lee P.K., Ahsan H., Chen C.J., Lee P.H., Peacocke M., Santella R.M., Tsou H.C. (1999) *Oncogene*, **18**, 3181–3185.
203. Zaret K.S. (1994) *The Liver, Biology and Pathobiology*. Third Edition. / Eds. Arias I.M., Boyer J.L. et al. New York: Raven Press.
204. Zhang X., Xu H.J., Murakami Y., Sachse R., Yashima K., Hirohashi S., Hu S.X., Benedict W.F., Sekiya T. (1994) *Cancer Res.*, **54**, 4177–4182.
205. Zhou C., Tsai S.Y., Tsai M.-J. (2000) *Biochim. Bioph. Acta*, **1470**, M63–M68.