

Гены раннего ответа в патогенезе рака шейки матки: обзор

О.В. Курмышкина¹, Т.О. Волкова¹, П.И. Ковчур¹, И.Е. Бахлаев¹, Н.Н. Немова^{1,2}

¹Петрозаводский государственный университет; ²Институт биологии КарНЦ РАН, Петрозаводск, Карелия

Контакты: Татьяна Олеговна Волкова VolkovaTO@yandex.ru

Гены раннего ответа — это группа протоонкогенов, в числе первых активирующихся при стимуляции клетки различными ростовыми факторами и участвующих в регуляции клеточной пролиферации и дифференцировки. Накоплен большой объем данных, подтверждающих, что изменение экспрессии данных генов является одним из центральных и наиболее ранних событий канцерогенеза. В связи с этим представляется перспективным использование генов раннего ответа в качестве диагностических и прогностических маркеров для выявления и комплексной терапии рака шейки матки — одного из наиболее распространенных онкогинекологических заболеваний, характеризующихся высоким показателем смертности и сложностью ранней диагностики. Теоретическую основу данных перспектив составляют обнаруженные механизмы взаимодействия генов раннего ответа с геномом вируса папилломы человека — главной причиной развития рака шейки матки.

Ключевые слова: гены раннего ответа, рак шейки матки, вирус папилломы человека, диагностические маркеры

Early response genes in the pathogenesis of cancer of the cervix uteri: a review

O.V. Kurmyshkina¹, T.O. Volkova¹, P.I. Kovchur¹, I.E. Bakhlayev¹, N.N. Nemova^{1,2}

¹Petrozavodsk State University; ²Institute of Biology, Karelian Research Center, Russian Academy of Sciences, Petrozavodsk, Karelia

Early response genes are a group of proto-oncogenes that are the first to be activated in cell stimulation with different growth factors and to be involved in the regulation of cell proliferation and differentiation. Large amount of information supporting that altered expression of these genes is one of the central and earliest events of carcinogenesis has been accumulated. In this connection, it is promising to use early response genes as diagnostic and prognostic markers for the detection and combination therapy of cancer of the cervix uteri, one of the most common gynecological malignancies characterized by high mortality rates and difficulties in early diagnosis. The theoretical basis for these promises is the found mechanisms for the interaction of early response genes with human papillomavirus genome, the main cause of cervix uteri cancer.

Key words: early response genes, cancer of the cervix uteri, human papillomavirus, diagnostic markers

Введение

Одним из наиболее распространенных у женщин онкологических заболеваний, характеризующихся высокой смертностью, является рак шейки матки (РШМ). Более 99% случаев данного заболевания ассоциировано с инфицированием вирусом папилломы человека (ВПЧ) [1]. Несмотря на высокую степень изученности молекулярных механизмов ВПЧ-индуцированного злокачественного роста, актуальными остаются проблемы поиска диагностических маркеров наиболее ранних стадий онкогенеза, идентификации прогностических факторов, а также выявления молекулярных мишеней для комплексной терапии РШМ. С этой позиции перспективными маркерами и мишенями представляются транскрипционные факторы c-Myc, c-Fos и c-Jun, которые являются продуктами экс-

прессии определенной группы генов, входящих в состав генома человека — генов раннего ответа. Именно эта группа генов в первую очередь активируется при стимуляции покоящихся клеток ростовыми факторами и участвует в регуляции процессов клеточной пролиферации и дифференцировки [2]. Гены *c-myc*, *c-fos* и *c-jun* рассматривают как протоонкогены, так как доказано, что изменение их экспрессии является одним из центральных событий канцерогенеза.

Известно, что гены раннего ответа и геном ВПЧ влияют друг на друга в процессе злокачественной трансформации клеток цервикального эпителия. Кроме того, накапливаются данные о диагностической значимости и прогностической ценности уровня экспрессии генов *c-myc*, *c-fos* и *c-jun* при дисплазии и РШМ. Тем не менее остается ряд про-

тиворечий в результатах исследований, направленных на установление связи между активностью генов раннего ответа и клинико-патологическими характеристиками РШМ.

Цель данной обзорной статьи состояла в суммировании и систематизации опубликованных экспериментальных материалов о молекулярных механизмах развития ВПЧ-ассоциированного РШМ и участия генов раннего ответа в прогрессии данного заболевания. Анализ данных литературы позволил бы сделать выводы о перспективности определения экспрессии генов *c-myc*, *c-fos* и *c-jun* в качестве одного из звеньев комплексной терапии РШМ.

Структура генома ВПЧ. Механизм стимулирования пролиферации эпителиальных клеток и индукции неопластической трансформации

Семейство папилломавирусов насчитывает более 100 представителей, или ВПЧ-генотипов. Наиболее часто в клетках РШМ выявляют вирусы типов 16 и 18 (ВПЧ 16 и 18), которые относят к категории вирусов высокого риска [1]. Генетический материал ВПЧ представлен кольцевой двуцепочечной молекулой ДНК. В геноме вируса выделяют 2 кодирующие области, содержащие 8 открытых рамок считывания, и 1 некодирующую, или регуляторную, область (рис. 1). Кодирующие области, обозначаемые символами E и L, содержат соответ-

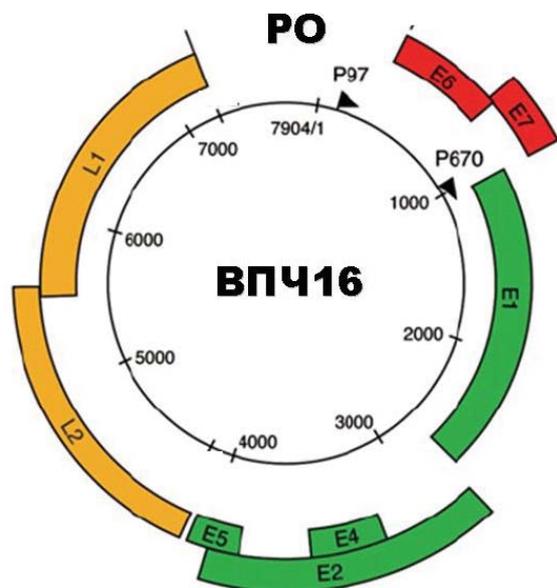


Рис. 1. Организация генома ВПЧ. Геном ВПЧ 16 (7904 п.н.) содержит ранний (p97) и поздний (p670) промоторы (выделены стрелками), с которых транскрибируются 6 ранних генов (E1–E6, выделены зеленым и красным цветом). Поздние транскрипты L1 и L2 (выделены желтым) образуются в результате альтернативного сплайсинга РНК, считываемой с промотора p670. Регуляторная область (PO), занимающая в геноме положение 7156–7184 п.н., содержит участки связывания различных транскрипционных факторов [1]

ственно ранние и поздние гены. Шесть E-белков (E1, E2, E4, E5, E6, E7) отвечают за репликацию вируса, транскрипцию его генома и трансформацию клетки, причем белки E6 и E7 являются вирусными протоонкогенами. Два L-белка (L1, L2) формируют капсид икосаэдрической формы [3].

ВПЧ обладает строгой специфичностью в отношении типа клеток. Вирус обычно инфицирует активно пролиферирующие клетки базального слоя эпителия шейки матки вблизи зоны трансформации, где чаще всего и развивается неоплазия. При продуктивном жизненном цикле ВПЧ существует в форме эписомы (10–200 копий на клетку). Для размножения ВПЧ использует синтетический аппарат клетки хозяина, при этом вспомогательную функцию выполняют вирусные репликативные белки E1 и E2 [1]. Кроме того, белок E2 является транскрипционным фактором, регулирующим активность ранних промоторов вируса. E2 может выступать в качестве как активатора, так и репрессора экспрессии вирусных онкогенов [4].

В базальных клетках эпителия шейки матки вирус реплицируется вместе с клеточной ДНК во время S-фазы митоза. В результате постоянного деления клетки базального слоя смещаются в супрабазальный слой, где они в норме выходят из клеточного цикла и начинают процесс терминальной дифференцировки. Однако ВПЧ использует ряд механизмов стимулирования пролиферации клеток в супрабазальном слое для того, чтобы максимально увеличить число инфицированных клеток, способных продуцировать вирионы. Центральную роль в этом процессе играют онкогены E6 и E7 [1].

В норме процесс пролиферации базальных клеток эпителия находится под контролем ростовых факторов (рис. 2). Связывание молекулы фактора роста с соответствующим клеточным рецептором приводит, с одной стороны, к каскадной активации белков, контролирующих протекание S-фазы, и, с другой стороны, к индукции экспрессии ингибиторов клеточного цикла. В результате по завершении митотического цикла на него накладывается арест, и базальная клетка включается в процесс дифференцировки. Однако в инфицированном вирусом эпителии прохождение клеточного цикла не зависит от внешних ростовых факторов, а стимулируется белками E6 и E7 (рис. 3). Главными мишенями их действия являются такие важные супрессоры опухолевого роста, как белок p53 и ретинобластомный белок Rb. Связывание E6 и E7 с данными белковыми факторами приводит к повышенной деградации последних по протеасомному механизму [1].

Блокирование стадии G1/S чекпойнта, опосредуемого p53, способствует накоплению соматических мутаций, что, по-видимому, играет критиче-

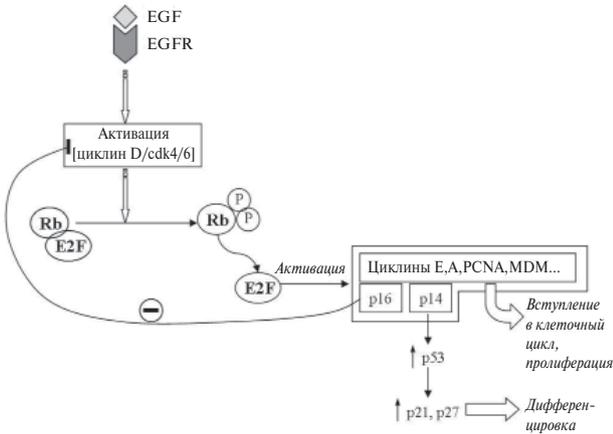


Рис. 2. Схема регуляции пролиферации и дифференцировки клеток базального слоя эпителия шейки матки.

При связывании молекулы эпидермального фактора роста EGF с соответствующим рецептором (EGFR) на поверхности покоящейся клетки происходит активация комплекса [циклин D / циклин-зависимая киназа cdk 4/6], что приводит к фосфорилированию ретинобластомного белка Rb и высвобождению связанного с ним транскрипционного фактора E2F. E2F активирует экспрессию белков, вовлеченных в прогрессию S-фазы митотического цикла (циклины E и A, PCNA, MDM и др.), а также белков-ингибиторов клеточного цикла — p16INK4A и p14ARF. Ингибитор циклинзависимых киназ 4/6 p16INK4A препятствует их ассоциации с циклином D и образованию активного комплекса и тем самым обуславливает существование отрицательной регуляторной «петли» (обозначена символом «-»). p14ARF подавляет активность MDM-убиквитин-лигазы, которая стимулирует деградацию p53. Таким образом, p14ARF стабилизирует p53 и способствует повышению его уровня в клетке. В свою очередь, p53 активирует экспрессию ингибиторов [циклин/cdk]-комплексов p21CIP/WAF1 и p27KIP1, в результате чего клетка выходит из клеточного цикла и включается в процесс дифференцировки [1]

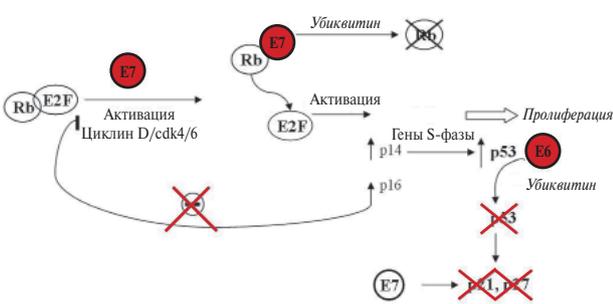


Рис. 3. Схема механизма стимуляции ВПЧ-пролиферации клеток базального слоя цервикального эпителия.

Онкопротеин E7 связывается с Rb, вытесняя из комплекса E2F, в результате чего E2F становится способным активировать клеточные белки S-фазы в обход циклинзависимого пути. Одновременно происходит индукция экспрессии ингибиторов клеточного цикла p14, p16 и p53. Однако вирусный белок E6 взаимодействует с p53 и стимулирует его деградацию. Это приводит к подавлению экспрессии белков p21 и p27 соответственно к торможению клеточной дифференцировки

скую роль при злокачественной трансформации [4]. Особенность E6 и E7 ВПЧ высокого риска состоит в том, что они с большим сродством связываются с p53 и Rb и приводят к их более интенсивной деградации. Кроме того, E7 ВПЧ высокого риска индуцирует centrosomal нарушения в клетке и та-

ким образом увеличивает вероятность возникновения генетических ошибок в ходе деления клетки. E6 ВПЧ высокого риска связывает ряд клеточных белков, вовлеченных в регуляцию адгезии, что приводит к потере межклеточных контактов и полярности клеток, а также способствует инвазивному росту [1]. Эти механизмы объясняют вклад генотипа вируса в риск развития злокачественной патологии.

Однако при нормальном жизненном цикле способность онкогена E7 стимулировать пролиферацию кератиноцитов определяется уровнями p21 и p27, которые, несмотря на ингибирующее влияние E7, возрастают по мере дифференцировки клеток (см. рис. 2). E7, связанный с p21, образует неактивный комплекс с циклином E, что способствует выходу клетки из митотического цикла. Таким образом осуществляются жесткая временная и пространственная регуляция экспрессии вирусных онкогенов и пролиферации инфицированных клеток (рис. 4), обуславливающие возможность длительной персистенции вируса без индукции злокачественного роста [1].

Функции белков E4 и E5 менее понятны. E4 экспрессируется на более поздних стадиях жизненного цикла вируса (см. рис. 4) и, вероятно, играет определенную роль в созревании вирусных частиц [5]. E5 способен встраиваться в мембраны внутриклеточных везикул и замедлять процесс эндосомальной деградации рецепторов факторов роста, что усиливает их пролиферативный эффект [1, 5].

Переломным моментом в развитии ВПЧ-инфекции является интеграция вирусного генома в геном хозяина [6]. Поскольку, в отличие от ретровирусов, ВПЧ не кодирует собственной интегразы, интеграция не играет никакой роли в нормальном жизненном цикле вируса и может считаться случайным, побочным его результатом [7, 8]. Стимулировать интеграцию могут любые события, увеличивающие частоту возникновения двуцепочечных разрывов в ДНК вируса и/или хозяина. Каких-либо специфических нуклеотидных последовательностей для включения вирусного генома выявлено

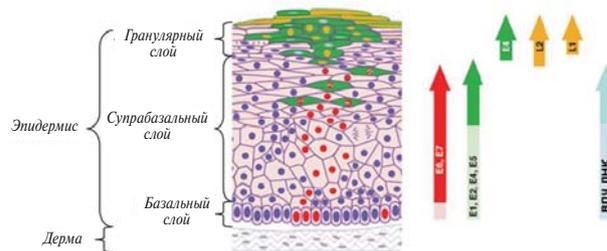


Рис. 4. Общая схема распределения экспрессии вирусных белков и репликации вирусной ДНК вдоль слоев многослойного эпителия шейки матки [1]

не было, однако появляется все больше сообщений о том, что с высокой частотой интеграция вируса происходит в консервативные участки генома человека, называемые в англоязычной литературе common fragile sites — «хрупкие» участки с высокой частотой двуцепочечных разрывов [7]. Что касается генома ВПЧ, интеграция, как правило, происходит по гену E2, в результате чего он становится нефункциональным. Это в свою очередь приводит к утрате контроля над экспрессией вирусных онкогенов (E6 и E7), активной их транскрипции и прогрессии цервикальной интраэпителиальной неоплазии (ЦИН) [4]. По мере развития ЦИН баланс между репликацией вирусного генома и дифференцировкой эпителиоцитов, с одной стороны, и сверхэкспрессией вирусных онкогенов и пролиферацией клеток — с другой, смещается в сторону пролиферации и экспрессии E6 и E7. Амплификация вируса сдвигается к поверхности эпителия, экспрессия капсидных белков и в целом жизненный цикл ВПЧ подавляются. При РШМ происходит полное прекращение сборки вирусных частиц [9].

Общепризнанным является тот факт, что канцерогенез — это многостадийный процесс, мультигенное заболевание с повторяющимися циклами соматических мутаций и клональной селекции, приводящими к приобретению агрессивных ростовых свойств [10]. Кроме того, накапливается все больше данных, свидетельствующих о том, что ВПЧ-инфицирование, интеграция вирусного генома и экспрессия онкогенов ВПЧ — необходимые, но недостаточные условия для развития РШМ [11]. Известные механизмы с участием E6 и E7 не объясняют в полной мере онкогенный потенциал вируса [12]. Современные теоретические модели ВПЧ-индуцированного онкогенеза предполагают участие различных клеточных протоонкогенов и генов-супрессоров (таких как p16^{INK4A}, p53, cIAP1, Ras, PTEN) [13]. На данный момент получены доказательства взаимного влияния генома ВПЧ и генов раннего ответа на экспрессию друг друга, однако механизм и физиологическое значение этого взаимодействия требуют дальнейшего изучения.

Особенности функционирования транскрипционных факторов c-Myc, c-Fos и c-Jun

Гены *c-myc*, *c-fos* и *c-jun* являются человеческими гомологами соответствующих генов, входящих в состав генома трансформирующих ретровирусов. Кодлируемые ими белки принадлежат семейству транскрипционных факторов HLH-bZip и состоят из ДНК-связывающего и активирующего (трансактивационного) доменов [2]. Кроме того, данные белковые факторы функционально активны только в форме димеров, например, c-Fos и c-Jun взаимодействуют друг с другом с об-

разованием AP-1-фактора, способного связываться со специфической последовательностью ДНК, называемой AP-1-сайтом. Идентифицированы также другие представители семейств Fos и Jun, формирующие стабильные гетеродимеры AP-1: JunB, JunD; FosB, Fra-1, Fra-2; JDP1, JDP2; ATF2, ATF3, B-ATF. Все они различаются по активирующему потенциалу, специфичности и экспрессируются в ответ на различные стимулы, что является одним из механизмов регуляции активности AP-1. Так, например, c-Jun и c-Fos служат активаторами транскрипции генов-мишеней, а JunB, JunD, Fra-1 и -2 — репрессорами транскрипции и соответственно антагонистами белков c-Jun и c-Fos [14].

Белок c-Myc после димеризации с подходящим белком-партнером (например, Max) также способен специфически связываться с консенсусной последовательностью ДНК, называемой E-боксом. В связанном с ДНК состоянии c-Myc взаимодействует с базальным аппаратом транскрипции и с комплексами ремоделинга и модификации хроматина, активируя транскрипцию генов-мишеней [15]. По аналогичному механизму осуществляется функционирование фактора AP-1.

Индукторами экспрессии генов раннего ответа могут являться различные ростовые и дифференцировочные факторы, провоспалительные цитокины, вирусные онкогены, гормоны, химические агенты, ультрафиолетовое излучение [14]. Гены раннего ответа служат «точками пересечения» многочисленных сигнальных путей и молекулярных каскадов.

С другой стороны, мишенями действия транскрипционных факторов c-Myc, c-Fos и c-Jun являются гены, участвующие в регуляции клеточного цикла, процессов репарации и репликации ДНК, ремоделинга хроматина, биосинтеза белка, метаболизма, межклеточной адгезии [15, 16]. В зависимости от конкретного молекулярного контекста факторы раннего ответа могут быть как активаторами, так и ингибиторами экспрессии данных генов. Кроме того, спектр генов-мишеней может зависеть от типа исследуемых клеток [17].

Получены многочисленные экспериментальные подтверждения того, что сверхэкспрессия генов раннего ответа приводит к иммортализации клеток, их злокачественной трансформации и индуцирует инвазивный рост [18]. Онкогенный эффект факторов раннего ответа зависит от типа клеток, что обусловлено их взаимодействием с тканеспецифичными коактиваторами/корепрессорами.

Следует отметить, что в ходе канцерогенеза гены раннего ответа, в отличие от других клеточных онкогенов (например, Ras, ErbB, p53), как правило, не подвергаются мутациям, не участвуют в хромосомных транслокациях, не амплифицируются, но

находятся в конце сигнальных каскадов, в которых участвуют трансформирующие онкогены [18].

Зависимость экспрессии генома ВПЧ от клеточных факторов c-Myc, c-Fos и c-Jun

Транскрипция генов ВПЧ не может происходить без участия транскрипционных факторов хозяина. Более того, экспрессия генома ВПЧ строго специфична в отношении типа клеток — вирусные гены могут транскрибироваться только в кератиноцитах или клетках карциномы шейки матки [19]. Механизм кератиносцифичности ВПЧ полностью не установлен. Вероятнее всего причина заключается в особом сочетании транскрипционных факторов, способных активировать регуляторную область генома ВПЧ (например, AP-1, GRE, NF1, YY1, Oct-1, C/EBP, TEF-1, TEF-2, KRF-1) [19, 20]. Предположительно AP-1 играет центральную роль в формировании тканеспецифичности вируса [19].

Установлено, что c-Fos, c-Jun и, в меньшей степени, c-Myc увеличивают активность вирусного промотора/энхансера p97 (см. рис. 1) [21]. Такой стимулирующий эффект обусловлен тем, что регуляторные участки вирусного генома содержат AP-1-сайты [22]. Посредством связывания с ДНК ВПЧ AP-1-фактор взаимодействует с множеством других транскрипционных факторов, что сопровождается формированием энхансомы и специфичным активированием транскрипции вирусных генов [19]. В то же время сайтов связывания c-Myc не было выявлено, возможно, он усиливает активность промотора вируса опосредованно [21].

На основании данных о структуре регуляторных участков генома ВПЧ логично предположить, что нарушение регуляции экспрессии клеточных протоонкогенов (в сторону увеличения их уровня) должно способствовать развитию сверхэкспрессии онкогенных белков вируса Е6 и Е7. Это может являться основанием для того, чтобы считать гены раннего ответа перспективными мишенями противораковой и противовирусной терапии [23]: блокирование экспрессии генов раннего ответа делает невозможным транскрипцию генов ВПЧ.

В подтверждение сказанному выше можно привести данные [20], согласно которым паттерн экспрессии AP-1 в многослойном эпителии шейки матки совпадает с паттерном экспрессии белков Е6 и Е7: если в нормальной эпителии и на начальных этапах неоплазии экспрессия AP-1, Е6 и Е7 ограничена низшими слоями эпителия, причем уровень экспрессии этих белков уменьшается по мере дифференцировки клеток, то при ЦИН III степени и карциноме их выявляют во всех слоях. В связи с этим в данном случае возможным является существование взаимостимулирующей регуляторной связи между AP-1 и Е6/Е7 [12].

Рядом исследовательских групп была установлена зависимость экспрессии ВПЧ-генома от состава AP-1-фактора. Так, например, в статье F. Rösl et al. [24] сообщается о подавлении экспрессии вирусных генов на уровне транскрипции после обработки ВПЧ-иммортиализованных кератиноцитов пирролидин-дитиокарбаматом. Анализ показал, что если в необработанных кератиноцитах AP-1-комплекс представлен в основном Jun-гомомерами, то после обработки данным химическим агентом AP-1 состоял преимущественно из c-Jun/Fra-1- и c-Jun/JunB-гетеродимеров. Как известно, эти комплексы ингибируют c-Jun/c-Fos-опосредованную трансактивацию AP1-зависимых генов, в том числе генов ВПЧ.

Воздействие онкогенов вируса на экспрессию генов раннего ответа

Изменение экспрессии генов раннего ответа при инфицировании ВПЧ изучали различными методами, как на уровне белка (трансляции), так и на уровне мРНК (транскрипции) с использованием разнообразных клеточных линий и опухолевых клеток пациентов с различными стадиями заболевания.

J. de Wilde et al. [25] определяли уровень мРНК c-Jun, JunB, junD, c-Fos, FosB, Fra-1, Fra-2 методом количественной полимеразной цепной реакции в первичных кератиноцитах, неопухолевых ВПЧ-иммортиализованных кератиноцитах и клетках линии РШМ. Также оценивали экспрессию перечисленных генов на уровне белка и определяли состав AP-1-комплекса. На стадии иммортализации было зарегистрировано увеличение уровня мРНК c-Fos, Fra-2 и JunB наряду с уменьшением содержания мРНК Fra-1 и c-Jun. С другой стороны, изменение состава AP-1-комплекса (от Fra-1/c-Jun-к преобладанию c-Fos/c-Jun-комплексов) наблюдалось только в опухолевых клетках. Таким образом, исследователи сделали вывод о том, что ВПЧ-индуцируемая онкотрансформация ассоциирована с изменением экспрессии различных членов AP-1-семейства. К аналогичному выводу пришли В.К. Prusty и В.С. Das [26], отметившие повышение экспрессии c-Fos и JunB и уменьшение Fra-1 по мере прогрессии заболевания. Однако исследователи указывают на преобладание димеров c-Fos/JunB и умеренную экспрессию c-Jun как в нормальной, так и в предраковой и опухолевой тканях. Результаты [21] лишь частично согласуются с приведенными выше: в образцах ткани РШМ методом гибридизации была выявлена интенсивная экспрессия как c-Fos мРНК, так и c-Jun мРНК. В целом исследователи наблюдали крайне низкий уровень AP-1-факторов в нормальной ткани и ткани на предраковой стадии и очень высокий — в опухолевой ткани.

Исследование А. Morosov et al. [27] подтверждает факт ВПЧ-индуцированного усиления экспрессии *c-fos* и на основе анализа серии мутантов по промотору данного гена объясняет, каким образом это может осуществляться. Установлено, что индукция экспрессии Е6 или Е7 в экспериментальных условиях приводит к увеличению уровня мРНК *c-Fos*, но в аналогичных условиях не влияет на содержание мРНК *c-Jun*. Был идентифицирован CRE-сайт в зоне промотера *c-fos*, критичный для активации факторами Е6 и Е7; кроме того, методом мутагенеза были выявлены участки в молекулах белков Е6 и Е7, необходимые для осуществления этой активации.

В исследовании М.А. Nead et al. [28] описан другой механизм, согласно которому белок вируса Е7 может оказывать влияние на активность и экспрессию *c-Jun*. Он основан на способности белковых молекул Rb, *c-Jun* и Е7 взаимодействовать друг с другом. В кератиноцитах, проходящих терминальные этапы дифференцировки, белок Rb активирует *c-Jun*, образуя с ним комплексы. В то же время вирусный белок Е7 при связывании с Rb препятствует активации *c-Jun*. В связи с тем что регуляция экспрессии *c-Jun* осуществляется в том числе и по принципу положительной обратной связи, это приводит к снижению уровня *c-Jun* и подавлению дифференцировки эпителиальных клеток. Известно, что AP-1-фактор играет важную роль в процессе дифференцировки кератиноцитов [29], в частности в регуляции экспрессии генов кератина, лорикрина, инволюкрина и интегринов. Установлено, что определенные члены AP-1-семейства, а именно *c-Jun*, JunB, JunD и Fra-1, активны в ходе дифференцировки кератиноцитов [30]. В Е7-экспрессирующих кератиноцитах ДНК-связывающая активность именно этих 4 факторов снижена по сравнению с нормальными клетками [28].

Кроме *c-Jun*, Е7 способен образовывать комплексы с JunB, JunD и *c-Fos*, что может приводить к изменению активности данных факторов и к ингибированию дифференцировки кератиноцитов, необходимому для размножения вируса [31].

Вирусный онкоген Е5, в экспериментальных условиях инициирующий трансформацию клеток, субстратнезависимый рост и образование очагов опухоли, также может активировать экспрессию *c-jun*. Более того, Е5-трансфицированные кератиноциты в ответ на стимуляцию EGF экспрессировали более высокий уровень *c-Jun* мРНК, чем клетки родительской линии, видимо, потому, что Е5 способен задерживать интернализацию и деградацию EGFR, передающего активирующий сигнал на *c-jun* [32].

Изменение экспрессии компонентов AP-1-фактора может иметь важный биологический

смысл при прогрессии неоплазии цервикального эпителия. Например, состав AP-1-комплекса влияет на восприимчивость клеток к такому важному регулятору клеточной пролиферации, как фактор некроза опухолей- α (ФНО- α) [11]. При неопластической трансформации ВПЧ 18-позитивных клеток параллельно с изменениями в составе AP-1-комплекса (от неактивных Fra-1/*c-Jun*-комплексов к практически полному преобладанию *c-Fos/c-Jun*-комплексов) происходит потеря чувствительности вирусной транскрипции к действию ФНО- α . Выявлено, что в нетрансформированных ВПЧ-позитивных клетках экспрессия Fra-1 может быть индуцирована ФНО- α , что в свою очередь приводит к подавлению экспрессии вирусного генома. Однако хромосомный участок, в котором локализован ген *fra-1*, при цервикальном раке может подвергаться делеции или перестройкам [11].

Более изученным является вопрос о механизме влияния ВПЧ на экспрессию гена *c-myc*. Обнаружено, что сайты интеграции ДНК-вируса в геном человека не являются случайными. Ряд исследований посвящен идентификации хромосомных локусов, содержащих участки интеграции ВПЧ, и генетических aberrаций, вызванных встраиванием вирусной ДНК. Так, в работе М. Peter et al. [33] был поставлен вопрос о том, может ли интеграция ВПЧ приводить к дерегуляции генов, вовлеченных в онкогенез. Для ответа на него были проанализированы сайты интеграции вирусного генома в 9 клеточных линиях, полученных из первичных карцином шейки матки. В клетках 5 из 9 линий последовательности ВПЧ 16 или 18 были найдены в локусе 8q24 на расстоянии 58–500 кб от гена *c-myc* или в пределах самого гена *c-myc*. В 3 клеточных линиях, а также в первичных опухолях вирусная и *c-myc*-последовательности амплифицировались совместно. Важным фактом является то, что сверхэкспрессия *c-Myc* на уровне мРНК и белка наблюдалась именно в тех 5 линиях, в которых ВПЧ-ДНК была вставлена вблизи локуса *c-myc*, но не в тех линиях, где инсерция происходила в другие сайты. Таким образом, активация гена *c-myc* может быть результатом встраивания вируса и являться одним из этапов онкотрансформации [7, 34]. Тем не менее связь между амплификацией гена *c-myc* и уровнем соответствующего транскрипта неоднозначна, поскольку амплификация в ряде случаев может происходить лишь частично и сопровождаться хромосомными перестройками. Так, в исследовании J. Couturier et al. [35] увеличение уровня *c-myc*-транскриптов было отмечено только в 1 из 3 случаев, когда последовательности ВПЧ были картированы в области 8q24; в тех случаях, когда ген *c-myc* подвергался перестройкам и амплификации, повышения уровня *c-Myc* мРНК не выявлено.

Некоторые исследования позволили выяснить функциональное значение усиления экспрессии *c-Myc* в процессе трансформации клеток эпителия шейки матки. Например, котрансфекция первичных эпителиальных ВМК-клеток ВПЧ 16 и плазмидой, конститутивно экспрессирующей *c-Myc*, приводила к образованию быстро делящихся колоний клеток, не нуждающихся в присутствии форболмиристил-ацетата или стероидных гормонов, чего не наблюдалось при трансфекции только ВПЧ 16 [36]. При трансплантации мышам двойные трансфектанты формировали очаги опухоли. Трансфекция *c-myc* клеточных линий, трансформированных ВПЧ 16 и онкогеном *v-fos*, обуславливала увеличение скорости роста и плотности насыщения в несколько раз, что способствовало росту клеток в среде с низким содержанием сыворотки и в отсутствие глюкокортикоидов или прогестеронов. На основании этих данных исследователи выдвигают предположение о том, что в естественной системе экспрессия *c-myc* вносит вклад в злокачественность опухоли [36].

Известен также один из механизмов регуляции ВПЧ высокого риска пролиферации кератиноцитов с участием *c-Myc*. С помощью метода иммунопреципитации выявлено, что белки Е6 и *c-Myc* образуют комплекс, способный специфически активировать промотор гена обратной транскриптазы hTERT — регуляторной субъединицы теломеразы [37]. По аналогичному механизму может осуществляться стимуляция других генов-мишеней *c-Myc*, участвующих в пролиферации инфицированных клеток.

С другой стороны, существуют данные о том, что экспрессия Е6 ВПЧ 16 может стимулировать деградацию *c-Myc* по убиквитинзависимому пути, что приводит к снижению его содержания в клетке. Возможно, таким образом вирус предотвращает нежелательный запуск *Myc*-индуцированного апоптоза инфицированных клеток [38].

Прогностическое и диагностическое значение экспрессии генов раннего ответа при РШМ

Использование технологии кДНК-микрочипов позволяет провести масштабный количественный анализ профилей экспрессии генов в опухолевых клетках пациенток, выявить взаимосвязь с клинико-патологическими факторами и таким образом более достоверно идентифицировать диагностические и прогностические маркеры, т. е. гены, экспрессия которых существенно изменяется при течении заболевания, тесно связана со стадией, злокачественностью, другими свойствами опухоли, прогнозом и т.п. Однако данный метод не дает однозначных результатов в отношении экспрессии генов раннего ответа при различных стадиях дисплазии и РШМ. Так, в исследовании M. Manavi et al.

[39] сообщается о группах генов, экспрессия которых существенно изменяется в клетках цервикальной карциномы по сравнению с нормальной тканью, однако *c-jun*, *c-fos* и *c-myc* в числе этих генов не указаны. Другая исследовательская группа [40] также приводит спектр генов, экспрессия которых наиболее сильно увеличивается при карциноме IB—IIA стадий. Этот спектр практически не перекрывается с тем, который описан в предыдущей работе [39], но он также не включает *c-jun*, *c-fos* и *c-myc*.

Биологическое поведение цервикальных клеток на предраковой стадии и на ранних стадиях карциномы предсказать сложно. В связи с этим большое значение имеет идентификация новых маркеров, позволяющих точно предсказать эволюцию заболевания. Кроме того, непростыми задачами являются определение стадии заболевания, дифференциальная диагностика доброкачественных и злокачественных нарушений [41]. Существует комплекс исследований, цель которых — поиск диагностических и прогностических маркеров РШМ. В число таких маркеров входят p16 [42, 43], p53 [44, 45], сосудистый эпителиальный фактор роста, p27 и LRIG1 [46], COX-2 [44, 46], *c-erbB2*, H-ras [47], кератины 10 и 17 [48], Cdc6 и Mcm5 [49], Ki-67 [46, 50], EGFR [44], раковоэмбриональный антиген [50] и др. Большинство ученых акцентируют внимание на том, что ни один ген самостоятельно не может служить надежным маркером для диагностики стадии заболевания или предсказания его прогрессии. Только использование комплекса маркеров, отражающих как процессы клеточной пролиферации, роста опухоли, ангиогенеза, так и процессы супрессии опухоли, апоптоза, воспаления, межклеточной адгезии и другие, способствует проведению надежного анализа [44].

Дискуссия относительно возможности использования генов раннего ответа в качестве маркеров онкогенеза шейки матки остается пока незавершенной. В некоторых исследовательских работах отмечено отсутствие диагностической и прогностической ценности генов раннего ответа, в частности гена *c-myc* [45, 51]. В исследовании R.P. Symonds et al. [52] также сообщается об отсутствии статистически значимой связи между экспрессией онкогенов *c-myc* и *c-jun* и периодом развития локального рецидива или метастазов, а также общей продолжительностью жизни. С другой стороны, L.T. Soh et al. [47] приводят данные о том, что экспрессия *c-myc* связана с риском возврата заболевания. Низкая экспрессия *c-myc* в сочетании с низкой экспрессией COX-2 и нормальной экспрессией немутантного p53 в значительной степени коррелировала с высокой выживаемостью больных (на протяжении 10-летнего периода) [44]. *c-Myc* также может служить диагно-

стическим маркером предраковой стадии заболевания: иммуногистохимическим методом было выявлено существенное повышение уровня с-Мус в кератиноцитах пациенток с тяжелой дисплазией, в то время как различий в экспрессии с-Мус между контрольной группой и больными с начальной степенью дисплазии не обнаружено [41]. Интересным представляется тот факт, что столь же существенные различия в экспрессии с-Мус между указанными группами пациенток зарегистрированы в отношении клеток стромы (фибробласты, фиброциты, некоторые эндотелиальные клетки, лимфоциты), окружающих опухолевые клетки. Автор статьи ставит вопрос: способствует ли повышение экспрессии с-Мус в стромальных клетках на предраковой стадии созданию микроокружения, благоприятствующего развитию опухоли?

В некотором противоречии с результатами, полученными в упомянутой выше работе [41], находятся данные исследования S. Rughooputh et al. [51], в котором была изучена экспрессия на уровне мРНК широкого спектра генов, вовлеченных в G1/S-переход клеточного цикла. Авторы отнесли ген *c-myc* к группе опухоль-ассоциированных генов, так как усиление его транскрипционной активности наблюдалось только в образцах карциномы и отсутствовало при дисплазии.

В статье S.V. Petrov et al. [54] сделан акцент на том, что для дифференциальной диагностики необходимо не только оценивать уровень экспрессии протоонкогенов, но и выявлять их внутриклеточную локализацию, которая может изменяться в ходе прогрессии заболевания. Так, иммуногистохимически белок с-Мус обнаруживается в клеточной цитоплазме при интраэпителиальной дисплазии и в ядре клеток карциномы. Авторы также приводят данные о повышении экспрессии *c-myc* и *c-fos* по мере прогрессии от дисплазии к карциноме по сравнению со здоровой тканью.

В литературе обсуждается еще один вопрос в рамках проблемы выбора маркеров РШМ — вопрос зависимости профиля генетической экспрессии клеток от гистологического варианта [46]. При изучении профилей экспрессии генов в образцах ткани пациенток со стадиями РШМ IB, II, IIIA–IVa методом кДНК-микрочипа существенных различий между стадиями заболевания не выявлено. Однако при сравнении образцов по признаку гистологического происхождения (аденокарцинома или плоскоклеточный рак) обнаружено 45 различно экспрессирующихся генов [55]. Согласно данным A.K. Lindström et al. [56], существенно более высокая экспрессия p53, EGFR, стратифина и ряда других опухолевых маркеров наблюдалась в клетках плоскоклеточного рака, в то время как для клеток

аденокарциномы характерна более высокая экспрессия *c-myc*. Однако если экспрессия p53, *cox-2* и *c-myc* для больных плоскоклеточным раком была достоверно связана с прогнозом, то для пациенток с аденокарциномой ни один из этих маркеров не имел прогностической значимости. Таким образом, не только спектр маркеров, но и прогностическая ценность каждого индивидуального маркера зависит от гистологического варианта РШМ [56].

Существует ряд подтверждений того, что гены раннего ответа могут служить терапевтическими мишенями, поскольку отвечают изменением экспрессии на противоопухолевую терапию. В работе Y.H. Ruan et al. [43] отмечено, что у больных РШМ экспрессия *c-myc* была более выраженной, чем у пациенток, имеющих предраковую стадию дисплазии или входящих в группу контроля, однако после проведения химиотерапии зафиксировано снижение уровня экспрессии *c-myc* в клетках опухоли. В исследовании E.K. Yim et al. [57] был проведен протеомный анализ клеток линии РШМ HeLa, обработанных цисплатином, с целью изучения механизма индукции апоптоза цервикальных клеток данным препаратом. После обработки цисплатином отмечено изменение экспрессии 21 белка, в частности уменьшение экспрессии *c-myc*. Схожие данные были получены при сравнительном изучении профилей генетической экспрессии, проведенном с помощью кДНК-микрочипа, у пациенток до и после прохождения ими курса радио- и химиотерапии (наблюдение осуществляли на протяжении 2001–2004 гг.) [55]. После проведения химиорadioтерапии зарегистрировано существенное повышение экспрессии 91 гена и снижение — 251 (в частности, *c-myc*) гена.

Заключение

Данные, представленные в настоящем обзоре, свидетельствуют об актуальности и необходимости проведения дальнейших, более детальных и глубоких исследований в области изучения экспрессии генов раннего ответа при РШМ, возможности применения их в качестве диагностических и прогностических маркеров данного заболевания (в комплексе с другими маркерами). При разработке терапевтических подходов необходимо учитывать, что продукты экспрессии генов раннего ответа являются мультифункциональными белками, участвующими в сложной сети регуляторных взаимодействий и способными оказывать как пролиферативное, так и проапоптотическое действие. В настоящее время проводятся разработки молекулярных антагонистов с-Мус, с-Fos, с-Jun, однако эффективность использования их в качестве противоопухолевых агентов еще предстоит исследовать [58, 59].

ЛИТЕРАТУРА

1. Doorbar J. Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Clin Sci* 2006;110:525–41.
2. Sassone-Corsi P. Goals for signal transduction pathways: linking up with transcriptional regulation. *EMBO J* 1994;13(20):4717–28.
3. Dueñas-González A., Lizano M., Candelaria M. et al. Epigenetics of cervical cancer. An overview and therapeutic perspectives. *Mol Cancer* 2005;4:38.
4. Jayshree R.S., Sreenivas A., Tessa M. et al. Cell intrinsic and extrinsic factors in cervical carcinogenesis. *Indian J Med Res* 2009;130:286–95.
5. Motoyama S., Ladines-Llave C.A., Villanueva S.L. et al. The role of human papilloma virus in the molecular biology of cervical carcinogenesis. *Kobe J Med Sci* 2004;50(1):9–19.
6. Wang S.S., Hildesheim A. Viral and host factors in human papillomavirus persistence and progression. *J Natl Cancer Inst Monograph* 2003;31:35–40.
7. Pett M., Coleman N. Integration of high-risk human papillomavirus: a key event in cervical carcinogenesis? *J Pathol* 2007;212:356–67.
8. Kanodia S., Fahey L.M., Kast W.M. Mechanisms used by human papillomaviruses to escape the host immune response. *Curr Cancer Drug Target* 2007;7:79–89.
9. Jastreboff A.M., Cymet T. Role of the human papilloma virus in the development of cervical intraepithelial neoplasia and malignancy. *Postgrad Med J* 2002;78:225–8.
10. Lazo P.A. The molecular genetics of cervical carcinoma. *Br J Cancer* 1999;80(12):2008–18.
11. Soto U., Das B.C., Lengert M. et al. Conversion of HPV 18 positive non-tumorigenic HeLa-fibroblast hybrids to invasive growth involves loss of TNF- α mediated repression of viral transcription and modification of the AP-1 transcription complex. *Oncogene* 1999;18:3187–98.
12. Fogel S., Riou G. The early HPV 16 proteins can regulate mRNA levels of cell cycle genes in human cervical carcinoma cells by p53-independent mechanisms. *Virology* 1998;244 (1):97–107.
13. Narisawa-Saito M., Yoshimatsu Y., Ohno S. An in vitro multistep carcinogenesis model for human cervical cancer. *Cancer Res* 2008;68(14).
14. Shaulian E., Karin M. AP-1 in cell proliferation and survival. *Oncogene* 2001;20:2390–400.
15. Levens D. Disentangling the MYC web. *PNAS* 2002;99(9):5757–9.
16. Hess J., Angel P., Schorpp-Kistner M. AP-1 subunits: quarrel and harmony among siblings. *J Cell Sci* 2004;117:5965–73.
17. Eilers M., Eisenman R.N. Myc's broad reach. *Gen Develop* 2008;22:2755–66.
18. Vogt P.K. Jun, the oncoprotein. *Oncogene* 2001;20:2365–77.
19. Thierry F. Transcriptional regulation of the papillomavirus oncogenes by cellular and viral transcription factors in cervical carcinoma. *Virology* 2009;384:375–9.
20. Kyo S., Klumpp D.J., Inoue M. et al. Expression of AP1 during cellular differentiation determines human papillomavirus E6/E7 expression in stratified epithelial cells. *J Gener Virol* 1997;78:401–11.
21. Nirmberg W., Artuc M., Vorbrueggen G. et al. Nuclear proto-oncogene products transactivate the human papillomavirus type 16 promoter. *Br J Cancer* 1995;71:1018–24.
22. Velazquez T.A., Gariglio V.P. Possible role of transcription factor AP1 in the tissue-specific regulation of human papillomavirus. *Rev Invest Clin* 2002;54(3):23–42.
23. Young M.R., Farrell L., Lambert P. et al. Protection against human papillomavirus type 16-E7 oncogene-induced tumorigenesis by in vivo expression of dominant-negative c-jun. *Mol Carcinog* 2002;34(2):72–7.
24. Rösl F., Das B.C., Lengert M. et al. Antioxidant-induced changes of the AP-1 transcription complex are paralleled by a selective suppression of human papillomavirus transcription. *J Virol* 1997;71(1):362–70.
25. de Wilde J., De-Castro A.J., Snijders P.J. et al. Alterations in AP-1 and AP-1 regulatory genes during HPV-induced carcinogenesis. *Cell Oncol* 2008;30(1):77–87.
26. Prusty B.K., Das B.C. Constitutive activation of transcription factor AP-1 in cervical cancer and suppression of human papillomavirus (HPV) transcription and AP-1 activity in HeLa cells by curcumin. *Int J Cancer* 2005;113:951–60.
27. Morosov A., Phelps W.C., Raychaudhuri P. Activation of the c-fos gene by the HPV 16 upon the CAMP-response element at -60. *JBC* 1994;269(28):18434–40.
28. Nead M.A., Baglia L.A., Antinore M.J. et al. Rb binds c-Jun and activates transcription. *EMBO J* 1998;17(8):2342–52.
29. Gandarillas A., Watt F.M. Changes in expression of members of the fos and jun families and myc network during terminal differentiation of human keratinocytes. *Oncogene* 1995;11(7):1403–7.
30. Welter J.F., Eckert R.L. Differential expression of the fos and jun family members c-fos, fosB, Fra-1, Fra-2, c-jun, junB and junD during human epidermal keratinocyte differentiation. *Oncogene* 1995;11:2681–7.
31. Antinore M.J., Birrer M.J., Patel D. et al. The human papillomavirus type 16 E7 gene product interacts with and trans-activates the AP1 family of transcription factors. *EMBO J* 1996;15(8):1950–60.
32. Leechanachai P., Banks L., Moreau F. et al. The E5 gene from human papillomavirus type 16 is an oncogene which enhances growth factor-mediated signal transduction to the nucleus. *Oncogene* 1992;7(1):19–25.
33. Peter M., Rosty C., Couturier J. et al. MYC activation associated with the integration of HPV DNA at the MYC locus in genital tumors. *Oncogene* 2006;25(44):5985–93.
34. Ferber M.J., Eilers P., Schuurin E. et al. Positioning of cervical carcinoma and Burkitt lymphoma translocation breakpoints with respect to the human papillomavirus integration cluster in FRA8C at 8q24.13. *Cancer Genet Cytogenet* 2004;154(1):1–9.
35. Couturier J., Sastre-Garau X., Schneider-Maunoury S. et al. Integration of papillomavirus DNA near myc genes in genital carcinomas and its consequences for proto-oncogene expression. *J Virol* 1991;65(8):4534–8.
36. Crook T., Almond N., Murray A. et al. Constitutive expression of c-myc oncogene confers hormone independence and enhanced growth-factor responsiveness on cells transformed by human papilloma virus type 16. *PNAS* 1989;86:5713–17.
37. Veldman T., Liu X., Yuan H. et al. Human papillomavirus E6 and Myc proteins associate in vivo and bind to and cooperatively activate the telomerase reverse transcriptase promoter. *PNAS* 2003;100(14):8211–6.
38. Gross-Mesilaty S., Reinstein E., Bercovich B. et al. Basal and human papillomavirus E6 oncoprotein-induced degradation of Myc proteins by the ubiquitin pathway. *PNAS* 1998;95(14):8058–63.
39. Manavi M., Hudelist G., Fink-Retter A. et al. Gene profiling in Pap-cell smears of high-risk human papillomavirus-positive squamous cervical carcinoma. *Gynecol Oncol* 2007;105(2):418–26.
40. Santin A.D., Zhan F., Bignotti E. et al. Gene expression profiles of primary HPV 16- and HPV 18-infected early stage cervical cancers and normal cervical epithelium: identification of novel candidate molecular markers for cervical cancer diagnosis and therapy. *Virology* 2005;331(2):269–91.
41. Brychtová S., Brychta T., Sedláková E. et al. Proto-oncogene c-myc in uterine cervix carcinogenesis. *Neoplasma* 2004;51(2):84–9.
42. Klaes R., Friedrich T., Spitkovsky D. et al. Overexpression of p16(INK4A) as a specific marker for dysplastic and neoplastic epithelial cells of the cervix uteri. *Int J Cancer* 2001;92(2):276–84.
43. Ruan Y.H., Wei W.L., Zhang H.X. et al. Comparison and analysis of expression of c-myc and p16 in cervical carcinoma. *Ai Zheng* 2003;22(6):602–6.

44. Lindström A.K., Stendahl U., Tot T. et al. Predicting the outcome of squamous cell carcinoma of the uterine cervix using combinations of individual tumor marker expressions. *Anticancer Res* 2007;27(3):1609–15.
45. Gasparian N.A., Pozharisskii K.M., Zharinov G.M. et al. Immunohistochemical study of the predictive value of oncoproteins p53, Her-2 and c-myc during radiotherapy for squamous cell carcinoma of the cervix. *Vopr Onkol* 2007;53(4):439–44.
46. Hellberg D., Tot T., Stendahl U. Pitfalls in immunohistochemical validation of tumor marker expression — exemplified in invasive cancer of the uterine cervix. *Gynecol Oncol* 2009;112(1):235–40.
47. Soh L.T., Heng D., Lee I.W. et al. The relevance of oncogenes as prognostic markers in cervical cancer. *Int J Gynecol Cancer* 2002;12(5):465–74.
48. Maddox P., Sasieni P., Szarewski A. et al. Differential expression of keratins 10, 17, and 19 in normal cervical epithelium, cervical intraepithelial neoplasia, and cervical carcinoma. *J Clin Pathol* 1999;52(1):41–6.
49. Williams G.H., Romanovski P., Morris L. et al. Improved cervical smear assessment using antibodies against proteins that regulate DNA replication. *PNAS* 1998;95:14932–47.
50. Park K.J., Soslow R.A. Current concepts in cervical pathology. *Arch Pathol Lab Med* 2009;133:729–38.
51. Rughooputh S., Manraj S., Eddoo R. et al. Expression of the c-myc oncogene and the presence of HPV 18: possible surrogate markers for cervical cancer? *Br J Biomed Sci* 2009;66(2):74–8.
52. Symonds R.P., Habeshaw T., Paul J. et al. No correlation between ras, c-myc and c-jun proto-oncogene expression and prognosis in advanced carcinoma of cervix. *Eur J Cancer* 1992;28(10):1615–7.
53. Arvanitis D.A., Spandidos D.A. Deregulation of the G1/S phase transition in cancer and squamous intraepithelial lesions of the uterine cervix: A case control study. *Oncol Rep* 2008;20:751–60.
54. Petrov S.V., Mazurenko N.N., Sukhova N.M. et al. Cell oncogene expression in normal, metaplastic, dysplastic epithelium and squamous cell carcinoma of the uterine cervix. *Arkh Patol* 1994;56(4):22–31.
55. Zempolich K., Fuhrman C., Milash B. et al. Changes in gene expression induced by chemoradiation in advanced cervical carcinoma: a microarray study of RTOG C-0128. *Gynecol Oncol* 2008;109(2):275–9.
56. Lindström A.K., Tot T., Stendahl U. et al. Discrepancies in expression and prognostic value of tumor markers in adenocarcinoma and squamous cell carcinoma in cervical cancer. *Anticancer Res* 2009;29(7):2577–8.
57. Yim E.K., Lee K.H., Kim C.J. et al. Analysis of differential protein expression by cisplatin treatment in cervical carcinoma cells. *Int J Gynecol Cancer* 2006;16(2):690–7.
58. Mason J.M. Electrostatic contacts in the activator protein-1 coiled coil enhance stability predominantly by decreasing the unfolding rate. *FEBS J* 2009;276(24):7305–18.
59. Gustafson W.C., Weiss W.A. Myc proteins as therapeutic targets. *Oncogene* 2010;29:1249–59.