

61:03 - 3/277 - 9

на правах рукописи

ЧЕРЕМНОВА ОКСАНА АЛЕКСАНДРОВНА

**РЕГУЛЯЦИЯ ЭКСПРЕССИИ СПЕЦИФИЧЕСКИХ БЕЛКОВ
ПЕЧЕНИ И ТРАНСКРИПЦИОННЫХ ФАКТОРОВ В
ГЕПАТОКАРЦИНОМАХ МЫШЕЙ**

специальность 03.00.06 - вирусология

**Диссертация
на соискание ученой степени
кандидата биологических наук**

**Научные руководители:
доктор биологических наук Г.И. Абелев
кандидат биологических наук Н.Л. Лазаревич**

**МОСКВА
2002**

СОДЕРЖАНИЕ

Список сокращений	4
Введение	6
Глава 1. Обзор литературы	10
Краткий обзор семейств гепатоцитарных ядерных факторов.	10
Семейство C/EBP.	10
Семейство HNF1	14
Семейство HNF3	17
Семейство HNF6	20
Семейство HNF4	21
Супер-семейство ядерных рецепторов	29
Развитие печени	31
Семейство GATA	32
Развитие поджелудочной железы	33
Обобщение сведений о локализации и влиянии ГЯФ на гепато-специфическую экспрессию.	35
Обеспечение гепатоцитарного фенотипа – взаимная регуляция ГЯФ.	38
HNF4 – один из важнейших ГЯФ	42
Роль ГЯФ при регенерации и вирусной инфекции	45
Нарушения экспрессии ГЯФ	46
Гепатоцеллюлярные карциномы	47
ГЯФ при канцерогенезе	58
Заключение	59
Экспериментальная часть	61
Глава 2. Материалы и методы	61
Список использованных растворов и сред.	61
Линии перевиваемых гепатокарцином	62
Клеточные линии.	62
Бактериальные штаммы и плазмидные векторы.	62
Трансформация клеток E. Coli.	63

Выделение нуклеиновых кислот	63
Электрофорез нуклеиновых кислот	64
Метод “Обратная Транскрипция – Полимеразная Цепная Реакция” (OT-ПЦР)	64
Метод TRAP (Telomerase Repeated Amplification Protocol)	69
Авторадиография	70
Иммунохимическое выявление белков	70
Сканирование и компьютерная обработка результатов.	71
Глава 3. Результаты исследований	72
Описание исследуемой модели гепатокарцином мышей	72
Восстановление экспрессии гена HNF4α в культуре клеток Н33	84
Анализ коллекции перевиваемых гепатокарцином мышей	92
Глава 4. Обсуждение полученных результатов	97
Экспрессия HNF4α коррелирует с уровнем дифференцировки гепатокарцином.	97
Изменение экспрессии ГЯФ и некоторых транскрипционных факторов при прогрессии ГК мышей.	98
Снижение уровня дифференцировки при прогрессии ГК мышей.	105
Утрата эпителиальных свойств при прогрессии ГК мышей	106
Индукция активности гена с-тус и активация теломеразного комплекса.	107
Восстановление экспрессии гена HNF4α	108
Восстановление некоторых эпителиальных свойств.	109
Восстановление экспрессии гепато-специфических транскрипционных регуляторов.	110
Выводы	116
Список литературы	117

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- АФП – альфа-фетопротеин
α1-АТ – α1-антитрипсин
ДСД – ДНК-связывающий домен
ГК – гепатоцеллюлярная карцинома
БГК – быстрорастущая ГК
БнГК – быстрорастущая низко-дифференцированная ГК
МГК – медленнорастущая ГК
МвГК – медленнорастущая высоко-дифференцированная ГК
ГЯФ (HNF) – гепатоцитарные ядерные факторы
ЛСД – лиганд-связывающий домен
СА – сывороточный альбумин
ТТР – транстиреин
ТФН – трансферрин
ФБ – фибриноген
Аро – аполипопротеин
СВР – цАМФ-респонсивный связывающий белок
COUP-TF – chick ovalbumin upstream transcription factor
ER – эстрогеновые рецепторы
FGF – фактор роста фибробластов
FTF – транскрипционный фактор альфа-фетопротеина
GR – глюкокортикоидные рецепторы
HBV – вирус гепатита В
HCV – вирус гепатита С
HGF - фактор роста гепатоцитов
L-PK – L-пируват киназа
MR – минералокортикоидные рецепторы
ODC – орнитин декарбоксилаза
PEPCK – фосфоенолпируват-карбоксикиназа
RAR – рецепторы транс-ретиноевой кислоты
RXR – рецепторы 9-цис-ретиноевой кислоты
ТАТ – тирозин-аминотрансфераза
TERT – обратная транскриптаза теломеразы
TGF – фактор роста опухоли
TNF – фактор некрозов опухоли

TR – тиреоидные рецепторы

VDR – receptor витамина D

а.о. – аминокислотные остатки

д.р. – день развития

п.н. – пара нуклеотидов

т.н. – тысяча нуклеотидов

т.п.н. – тысяча пар нуклеотидов

ВВЕДЕНИЕ.

Актуальность исследования.

Злокачественный рост клеток основан на автономной и неограниченной пролиферации клеточного клона, выходящего за пределы собственной ткани и способного к росту в негомологичных тканях. При этом опухоль представляет собой популяцию генетически нестабильных клеток, в которых происходит постоянное накопление мутаций, ведущих к эволюции опухоли в сторону более агрессивного фенотипа. Это явление, получившее название опухолевой прогрессии, является фундаментальным свойством опухолей различного происхождения, но всегда определяется свойствами исходной ткани, давшей начало опухоли.

Гепатокарцинома (ГК) – один из самых часто встречающихся раков в мире, лечение которого осложняется тем, что опухоли обычно образуются на базе хронических заболеваний печени. По эпидемиологическим данным, хронические инфекции вирусами HBV и HCV являются причиной до 80% ГК в мире.

Вирусные инфекции вызывают хронические воспаления печени, при которых в ткани высок уровень клеточной смерти и пролиферации. Это пренеопластическая стадия; при стимуляции, например, оксидативным стрессом или воспалительными цитокинами, происходит злокачественная трансформация клеток (Buendia, 2000).

Прогрессия ГК сопровождается снижением уровня дифференцировки, сопряженным с подавлением экспрессии ткане-специфических генов, увеличением скорости пролиферации клеток, утратой эпителиальной морфологии, приобретением инвазивности и способности к метастазированию. Однако карциномы часто сохраняют способность к ре-дифференцировке.

Возможность реверсии низко-дифференцированных гепатом к более дифференцированным была показана *in vitro* (Spath and Weiss, 1998) при экзогенной экспрессии гена гепатоцитарного ядерного фактора (HNF) 4 α - специфичного для печени регулятора транскрипции.

Определяющую роль в регуляции экспрессии большинства генов, специфичных для печени, и в поддержании дифференцировочного статуса клеток играет соотношение в клетке уровней так называемых гепатоцитарных ядерных факторов (ГЯФ), к которым относят несколько семейств регуляторных белков: HNF1, C/EBP, HNF3, HNF4 и HNF6. Тканевая специфичность экспрессии печень-специфических генов достигается, по-видимому, одновременным участием нескольких гепатоцитарных факторов в регуляции их транскрипции. Между экспрессией ГЯФ существуют тесные связи, однако,

иерархические отношения между представителями различных семейств факторов пока исследованы недостаточно полно.

В настоящей работе роль ГЯФ в прогрессии ГК исследована на созданной в НИИ Канцерогенеза РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН коллекции перевиваемых ГК мыши, полученных из химически индуцированных первичных опухолей. В эту коллекцию входят также две ГК единого происхождения, резко различающиеся по скорости роста и уровню дифференцировки: медленно-растущая дифференцированная ГК мыши (мГК) и одномоментно выщепившийся из нее на раннем пассаже, по-видимому, в результате инактивации одного или немногих ключевых генов, быстро-растущий де-дифференцированный вариант (бГК).

Мы предположили, что сравнение свойств мГК и бГК позволит идентифицировать генетические пути, определяющие основные свойства прогрессии ГК, и приступить к разработке новых подходов к нормализации злокачественного фенотипа, а также к диагностике ГК.

Цели и задачи исследования.

Целью настоящей работы была идентификация генов и выявление молекулярных механизмов, которые лежат в основе прогрессии и де-дифференцировки опухолей печени.

В рамках этой проблемы основное внимание было сосредоточено на определении роли гепатоцитарных транскрипционных факторов и неткане-специфических регуляторов, экспрессия которых изменяется в ходе прогрессии опухолей, и поиске путей реверсии злокачественного фенотипа.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие экспериментальные задачи:

- Провести сравнительную характеристику медленной и быстрой ГК мышей с целью идентификации генов, в экспрессии которых при скачкообразной прогрессии от мГК к бГК произошли существенные изменения.
- Охарактеризовать гены, экспрессия которых прямо или обратно коррелирует с уровнем дифференцировки при прогрессии.
- Проанализировать роль HNF4 α в поддержании уровня дифференцировки, установлении эпителиального фенотипа и регуляции экспрессии гепато-специфических генов в ГК мышей *in vitro*.

Научная новизна и практическая ценность работы

Новизна исследования в первую очередь связана с использованием имеющихся в нашем распоряжении уникальных моделей: коллекции химически индуцированных ГК с различной скоростью роста и уровнем дифференцировки и системы ГК мышей единого происхождения (мГК и бГК), резко отличающихся по скорости роста, дифференцировочному статусу и морфологическим характеристикам, а также культуры клеток бГК (H33).

Это позволило методом полуколичественного ОТ-ПЦР впервые провести полный анализ спектров экспрессии ГЯФ, определяющих фенотип печени, при прогрессии ГК.

Наши результаты показали, что уровень транскрипции HNF4 α , одного из ключевых гепато-специфических регуляторов, коррелирует с уровнем экспрессии маркеров дифференцировки и общим дифференцировочным статусом химически индуцированных ГК, о котором мы можем судить по морфологическим признакам. Ранее подобные исследования опухолей печени *in vivo* не проводились.

В работе впервые показано, что по сравнению с нормальной печенью, в ГК, сохраняющих высокий уровень дифференцировки, параллельно с ре-экспрессией онко-эмбрионального маркера α -фетопротеина (АФП) происходит активация транскрипции эмбриональной изоформы HNF4 α 7.

Нами показано, что при прогрессии произошли резкие изменения в экспрессии целого блока ГЯФ и других транскриptionных регуляторов. Значительно снижена экспрессия HNF1, vHNF1, C/EBP α , HNF4 α , HNF3 γ и HNF6, ядерного рецептора FTF и энтодермального фактора GATA4 и активируется транскрипция ядерного рецептора COUP-TFI. Изменений в экспрессии ряда других транскрипционных факторов: C/EBP β , HNF3 α , HNF3 β , ядерного рецептора COUP-TFII, энтодермального фактора GATA 6 не произошло. Основные закономерности экспрессии ГЯФ, выявленные на этой модели, подтверждены на коллекции химически индуцированных ГК с различным уровнем дифференцировки.

Нами показано, что наряду со снижением уровня дифференцировки прогрессия от мГК к бГК сопровождается активацией онкогена с-myc и теломеразного комплекса.

При прогрессии ГК активируется экспрессия транскрипционного регулятора *Snail* - индуктора эпителиально-мезенхимального перехода.

При экзогенной экспрессии HNF4 α в культуре клеток H33 мы наблюдали частичное восстановление экспрессии гепато-специфических генов.

Впервые получены свидетельства того, что фактор HNF4 α прямо или косвенно способен активировать экспрессию генов ГЯФ HNF6 и HNF4 α 7 и транскрипцию ядерного

рецептора FTF. Таким образом, под воздействием экзогенной экспрессии HNF4α в культуре Н33 произошел сдвиг в сторону приобретения более дифференцированного гепато-специфического фенотипа.

Изучение возможностей реверсии опухолевого фенотипа и идентификация генов, участвующих в этом процессе, а также определение механизмов регуляции генов опухолевых маркеров относится к фундаментальным исследованиям природы опухолевого роста и имеет прямое отношение к разработке методов диагностики и биотерапии злокачественных опухолей. Повышение уровня дифференцировки в ГК может увеличить чувствительность опухоли к терапии.

Апробация работы

Диссертация была апробирована на совместном заседании кафедры Вирусологии МГУ им. М.В. Ломоносова и лаборатории Иммунохимии НИИ Канцерогенеза РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН 7 апреля 2001 года. Доклад по теме диссертации ("Экспрессия печень-специфических генов в новой модели быстро- и медленно-растущих гепатокарцином мышей") был признан лучшим на VI Международной конференции студентов и аспирантов по фундаментальным наукам "Ломоносов-99", секция "Биология", подсекция "Вирусология". Материалы исследований, представленных в работе, докладывались на международных конференциях: XXIX International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine (ISOBM) Meeting and VIII International Symposium "Biology and Clinical Usefulness of Tumor Markers", 2001; Rodolphe Brupbacher Foundation Fifth Scientific Symposium "Clinical and Basic Oncology: New Developments", 2001.

Публикации

По теме диссертации опубликовано 8 печатных работ.

Структура и объем работы

Диссертация изложена на 135 страницах машинописного текста (12 шрифт, полуторный интервал), содержит 14 рисунков, 3 таблицы. Состоит из глав: «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты исследования», «Обсуждение результатов», «Выводы» и «Список литературы». Список литературы содержит 244 источников, в том числе 9 в отечественных рецензируемых изданиях.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.

Определяющую роль в регуляции экспрессии большинства генов, специфичных для печени, и в поддержании дифференцировочного статуса гепатоцитов играет соотношение в клетке уровней так называемых гепатоцитарных ядерных факторов (ГЯФ), к которым относят несколько семейств регуляторных белков: HNF1, C/EBP, HNF3, HNF4 и HNF6. Тканевая специфичность экспрессии печень-специфических генов достигается одновременным участием нескольких гепатоцитарных факторов в регуляции их транскрипции. Между экспрессией различных ГЯФ существуют тесные связи, однако, иерархические отношения между представителями различных семейств факторов пока исследованы недостаточно полно (Tronche and Yaniv, 1992).

Данный обзор посвящен характеристике гепатоцитарных ядерных факторов, особое внимание удалено важнейшему, на наш взгляд, из ГЯФ - HNF4α.

1.1. Краткий обзор семейств гепатоцитарных ядерных факторов.

В настоящее время выявлено и охарактеризовано пять семейств гепатоцитарных ядерных факторов. Можно выделить ряд особенностей, объединяющих все пять семейств:

1. Представители всех этих семейств обязательно экспрессируются в печени, кроме того, они могут экспрессироваться и в других органах, хотя и в меньших количествах.
2. Регулируя активность печень-специфических генов, гепатоцитарные ядерные факторы связываются с сайтами в промоторах и/или в энхансерах генов.

1.1.1. Семейство C/EBP.

1.1.1.1. Особенности.

C/EBP - группа транскрипционных факторов (CCAAT/ enhancer binding protein), характерной особенностью которой является наличие “лейциновой застежки” (“b-ZIP”), что обеспечивает способность белков этого семейства образовывать димеры за счет взаимодействия негидрофобных поверхностей “лейциновой застежки” (Landschultz et al., 1988). Белки этого семейства имеют сходную структуру.

Белки семейства C/EBP регулируют экспрессию многих метаболических и сывороточных генов. C/EBP α и β критичны для экспрессии белков, участвующих в глюконеогенезе (Wang et al., 1995; Flodby et al., 1996).

Эти факторы регулируют экспрессию генов, влияющих на пролиферацию и рост в непаренхимных клетках печени (Michalopoulos and DeFrances, 1997; Diehl et al., 1998).

1.1.1.2. Представители.

Описано несколько представителей семейства С/ЕВР. Ниже будут рассмотрены факторы, экспрессирующиеся в печени.

С/ЕВР α был открыт как белок, способный связываться с ССААТ - последовательностью в регуляторном районе, усиливая при этом экспрессию сывороточного альбумина (СА) и транстиретина (TTR) (Friedman et al., 1989).

Белок LAP (С/ЕВР β) - второй представитель этого семейства транскрипционных факторов, способен образовывать димеры с С/ЕВР α .

Белок С/ЕВР δ , также относящийся к этому семейству, способен к гетеродимеризации как с С/ЕВР α , так и с LAP-белком.

Кроме того, среди белков этого семейства есть белок - ингибитор транскрипции - LIP (liver-enriched inhibitory protein). LIP синтезируется с мРНК С/ЕВР β , но трансляция инициируется с внутреннего ATG-кодона. Вследствие этого LIP не имеет N-концевого транс-активаторного домена (см. ниже) и, гетеродимеризуясь, действует как доминантный ингибитор транскрипции (Descombes and Schibler, 1991). С/ЕВР α , LAP и LIP способны образовывать между собой гетеродимеры.

За счет того, что все белки этого семейства узнают одинаковые последовательности в регуляторных районах генов и способны к образованию гетеродимеров, имеющих различные транс-активационные свойства, создается большое разнообразие вариантов регуляции активности генов (Tronche and Yaniv, 1992; DeSimone et al., 1991).

Соотношение в клетке транскрипционных факторов – положительного регулятора С/ЕВР β и ингибитора LIP динамически регулируется. В основе этого лежат два механизма: регуляция на уровне трансляции (Schibler et al., 1990) и регуляция посредством протеолитического С/ЕВР α -зависимого расщепления С/ЕВР β (Welm et al., 1999).

1.1.1.3. Влияние на пролиферативный статус клетки

Важным свойством С/ЕВР α и β является их связь с пролиферационным статусом клетки. В клетках здоровой взрослой печени соотношение этих факторов примерно одинаковое, однако при повреждениях, сопровождающихся регенерацией, уровень С/ЕВР α быстро падает, а уровень С/ЕВР β заметно возрастает, при этом общий уровень С/ЕВР в клетке остается неизменным (Greenbaum et al., 1995; Rana et al., 1995). Эти наблюдения согласуются с тем, что у мышей с инактивированным С/ЕВР β пролиферация во время регенерации сильно снижена (Greenbaum et al., 1998). У мышей с инактивированным С/ЕВР α наблюдается гиперплазия печени (Flodby et al., 1996).

Механизм такой регуляции пролиферации, по-видимому, состоит в следующем: у белков C/EBP α и β рядом с N-концом есть участок, связывающий гипофосфорилированный pRb (Chen et al., 1996). У C/EBP α (но не у C/EBP β) этот участок может также связывать Rb-подобные факторы p107 и p130. Показано, что связанный p107 не может образовать необходимый для перехода в S-фазу комплекс с фактором E2F. Вероятно, таким образом может осуществляться прямой селективный антипролиферативный эффект C/EBP α в гепатоцитах (Timchenko et al., 1999). C/EBP α может связывать и стабилизировать p21 (Timchenko et al., 1997).

1.1.1.4. Структура.

У белков семейства C/EBP выделяют N-концевой участок, отвечающий за трансактивацию, ДНК-узнавающий основной домен (basic region) и спиральную структуру, называемую "лейциновая застежка", которая состоит из лейциновых гептадных повторов и обеспечивает димеризацию.

Несмотря на ограниченный консерватизм структуры вне bZIP-домена, C/EBP α и β имеют общий механизм транскрипционной активности. В C/EBP β три активационных домена расположены на N-конце. Соответствующий N-концевой район C/EBP α консервативен (Williams et al., 1995). Однако, в отличие от C/EBP β , C/EBP α может непосредственно взаимодействовать с основными транскрипционными факторами TBP и TFIIB (Nerlov and Ziff, 1995). Кроме того, C/EBP α имеет внутренний активационный домен, не найденный в β , который предположительно и определяет различную форму взаимодействия (Nerlov and Ziff, 1994). Высокий консерватизм структуры "лейциновой застежки" также связан с необходимостью обеспечения взаимодействия с транскрипционными регуляторами – Tif1 β (Chang et al., 1998), субъединицами NF-кВ и глюкокортикоидными рецепторами (Takiguchi, 1998).

1.1.1.5. Пост-трансляционные модификации C/EBP.

Активность факторов C/EBP в значительной мере регулируется на посттрансляционном уровне и довольно оперативно, так как факторы семейства C/EBP участвуют в управлении клеточным циклом гепатоцитов (см. выше).

Изменения транскрипционной активности белка C/EBP β могут быть связаны с процессом фосфорилирования (Wegner et al., 1992). Такое фосфорилирование осуществляется белком CaMKII – протеин-киназой, найденной во многих тканях. Известно, что на уровень фосфорилирования C/EBP β влияют ростовые факторы TNF- β и HGF (Diehl et al., 1998).

1.1.1.6. PAR-белки. Представители.

Другое подсемейство bZIP-факторов, PAR-белки, также регулирует транскрипцию генов печени. PAR-белки узнают ту же последовательность ДНК, что и C/EBP (Falvey et al., 1996). Три представителя подсемейства PAR-белков экспрессируются в печени: DBP (D-сайт связывающий белок), HLF (фактор лейкемии) и TEF/VBP (транскрипционный энхансерный фактор/белок, связывающий промотор гена вителлогенина). Эти факторы способны образовывать как гомо-, так и гетеродимеры друг с другом, но не с C/EBP-факторами (Falvey et al., 1996; Inaba et al., 1994; Mueller et al., 1990). DBP был обнаружен как фактор, связывающийся с сайтом D в промоторе альбумина (это сайт сильного связывания C/EBP). DBP синтезируется во многих тканях, но его наибольшие количества находят в печени (Mueller et al., 1990). Экспрессия PAR-белков подчиняется циркадному ритму и, соответственно, суточный ритм функционирования печени во многом определяют именно эти факторы.

1.1.1.7. Спектр экспрессии.

a. В эмбрионе:

C/EBP α выявляют в формирующейся печени эмбриона мыши, начиная с 13 дня развития (д.р.) (Kuo et al., 1990). Начиная с 20 д.р. эмбриона крысы мРНК кроме печени выявляют и в кишечнике (Van den Hoff et al., 1994). Продукции белка, по-видимому, до рождения не происходит (Lincoln et al., 1998).

Методом гибридизации *in situ* транскрипты гена C/EBP β выявляют в сердце и печени на 14 д.р. эмбриона крысы (примерно 12 д.р. мыши). К 20 д.р. крысы мРНК C/EBP β появляется в почках и кишечнике (Van den Hoff et al., 1994).

б. Во взрослом организме:

В печени мыши постоянно наблюдается высокий уровень факторов C/EBP α и β , и низкий уровень C/EBP δ (Takiguchi et al., 1998). C/EBP α и β во взрослом организме присутствуют в жировой ткани, а также в кишечнике, легких, надпочечниках, плаценте, яичниках и мононуклеарных клетках периферической крови (Xanthopoulos et al., 1993; Lekstrom-Himes et al., 1998).

1.1.1.8. Инактивация генов семейства C/EBP.

При инактивации C/EBP α у мышей смерть наступает через несколько часов после рождения от гипогликемии. У C/EBP α -/- мышей гипертрофирована печень, снижены уровни экспрессии некоторых метаболических генов: альбумина, гликоген синтетазы и др. (Wang et al., 1995). При кондиционном "нокауте" гена C/EBP α во взрослой печени у трансгенных мышей обнаруживают сниженную экспрессию генов, вовлеченных в глюконеогенез (Lee et al., 1997).

При инактивации C/EBP β эмбриональное развитие трансгенных мышей нормальное, большая часть животных жизнеспособна. У C/EBP β -/- мышей отсутствует пролиферативный ответ печени на повреждения (Greenbaum et al., 1998).

При инактивации гена DBP трансгенные мыши рождаются жизнеспособными, но имеют такие дефекты печени, как потеря циркадной экспрессии некоторых генов, например, стероид 15 а-гидроксилазы и кумарин 7-гидроксилазы (Lopez-Molina et al., 1997; Lavery et al., 1999).

1.1.2. Семейство HNF1.

1.1.2.1. Особенности.

Белки семейства HNF1 являются наиболее распространенными регуляторами экспрессии множества печень-специфических генов (их потенциальные сайты связывания выявлены в промоторах более чем ста генов) (Tronche et al., 1992).

HNF1 описан как специфический ДНК-связывающий белок в печени крысы, который способен активировать промоторы многих печень-специфических генов, таких как CA (Cereghini et al., 1988), а- и β -фибриноген (ФБ) (Baumhueter et al., 1988), а-фетопротеин (АФП) (Bois-Joyeux and Danan, 1994), а₁-антитрипсин (а₁-AT) (Bulla and Fournier, 1992).

1.1.2.2. Представители.

Представителей семейства HNF1 относят к группе гомеобоксных факторов, они содержат последовательности, характерные для транскрипционных активаторов семейства POU (Frain et al., 1989; Baumhueter et al., 1990).

На данный момент открыты два представителя описываемого семейства - HNF1 (HNF1 α /LFB1/TCFI) и vHNF1 (HNF1 β /LFB3). Будучи представителями одного семейства, HNF1 и vHNF1 узнают одни и те же последовательности.

In vitro и *in vivo* эти белки связываются с молекулой ДНК в виде гомо- или гетеродимера (Nicosia et al., 1991; Rey-Campos et al., 1991; De Simone et al., 1991). Описан небольшой белок DCsH, который взаимодействует с димерами белков семейства HNF1, стабилизируя их (Mendel et al., 1991). Связываясь с димером HNF1, две молекулы DCsH образуют тетramer, являющийся более стабильным, таким образом, обеспечивая оптимальный транс-активационный эффект.

1.1.2.3. Структура.

Структура факторов семейства HNF1 очень консервативна у всех млекопитающих (94% гомологии в строении белка у крысы и человека) (Bach et al., 1990). Ген состоит из 8 инtronов и 9 экзонов. В отличие от классических гомеобоксных генов, у HNF1 гомеобоксный домен приходится на два экзона (Bach et al., 1992).

Белок HNF1 крысы состоит из 628 а.о. N-концевой домен А (две α -спирали с поворотом между ними) отвечает за димеризацию, затем следует последовательность, обеспечивающая специфическое связывание с ДНК – домен В, который родственен POU-домену, и нетипичный гомеобоксный домен С (Tronche and Yaniv, 1990). Этот домен впервые идентифицирован в белках, кодируемых гомеозисными генами у *Drosophila* (Bach et al., 1991). Димеризационный домен А является необходимым и достаточным для димеризации (структура его уникальна).

vHNF1, кодирующийся отдельным геном (Cereghini et al., 1990), характеризуется высокой степенью гомологии с HNF1, особенно в ДНК-узнавающей области (93%) (Rey-Campos et al., 1991).

Механизмы транскрипционной активности HNF1 до конца не определены, но активационные функции выполняют три С-концевых домена. Активационный домен ADI (серин-обогащенный), ADII (пролин-обогащенный) и ADIII (глутамин-обогащенный) (Cereghini et al., 1992; Toniatti et al., 1993). Активационные свойства vHNF1 несколько иные, так как наблюдается отличие С-концевой структуры (Cereghini et al., 1992).

1.1.2.4. Изоформы.

Для HNF1 и vHNF1 человека показано существование нескольких транскрипционных форм (A, B и C формы), характеризующихся разными трансактивационными способностями, причем C-форма vHNF1 ингибирует транскрипцию генов-мишеней семейства HNF1 (Bach et al., 1993).

Показано, что белки HNF1 и vHNF1 обладают различными трансактивационными свойствами и по-разному представлены в разных тканях (Cereghini, 1996).

1.1.2.5. Спектр экспрессии.

a. В эмбрионе:

vHNF1 впервые обнаруживается на 4.5 д.р. в висцеральной энтодерме эмбриона мыши. С 8.5 д.р. vHNF1 выявляют в нервной трубке, эпителии передней кишки и формирующемся засветке печени. На 10.5 д.р. vHNF1 можно обнаружить в стенке целомической полости, в формирующемся метанефросе. К 14.5 д.р. vHNF1 активно транскрибируется в почках, легких и в печени (Coffinier et al., 1999).

HNF1 впервые появляется в засветке печени на 10.5 д.р., далее в процессе развития (на 11.5 д.р.) HNF1 обнаруживают в желточном мешке, в развивающихся печени и в кишечнике (Blumenfeld et al., 1991). Таким образом, появление HNF1 задерживается по сравнению с vHNF1.

По-видимому, vHNF1 необходим для дифференцировки формирующихся печени и почек, в то время как HNF1 нужен для поддержания дифференциированного состояния этих органов после рождения (Cereghini et al., 1992).

Экспрессия белков семейства HNF1 не ограничивается только гепатоцитами, они также экспрессируются и в эпителиальных клетках некоторых развивающихся органов, и, кроме того, в мезодерме развивающихся почечных канальцев (vHNF1) (Ott et al., 1991).

6. Во взрослом организме:

В отличие от эмбрионального периода, во взрослом организме наблюдается ситуация, при которой снижается «общий» уровень и сужается спектр экспрессии vHNF1 по сравнению с HNF1. HNF1 экспрессируется в больших количествах в печени, а также в почках, кишечнике и поджелудочной железе (в меньших количествах). Экспрессию vHNF1 обнаруживают в почках, в меньших количествах в печени, кишечнике, желудке, тимусе, половых железах и поджелудочной железе (De Simone et al., 1991; Rey-Campos et al., 1991).

1.1.2.6. Инактивация генов семейства HNF1:

Мыши с инактивированным HNF1 умирают вскоре после рождения от синдрома прогрессирующего истощения вследствие множественных поражений внутренних органов. У таких животных нарушена система секреции инсулина (симптом MODY3). Происходят необратимые явления: замедление роста, нарушение работы органов. Наблюдаются дисфункция печени, фенилкетонурия и потеря метаболических веществ из-за дефекта реабсорбции в почках (Pontoglio et al., 1997; Pontoglio et al., 1998).

Инактивация гена vHNF1 приводит к эмбриональной летальности. До 6.5 д.р. трансгенные гомозиготные эмбрионы неотличимы от контроля. К 7.5 д.р. vHNF1/- эмбрионы сильно отстают в развитии, гаструляции не происходит, отсутствуют признаки дифференцировки висцеральной энтодермы. К 8.5 д.р. можно обнаружить только остаточные ткани (Coffinier et al., 1999).

Эмбриоидные тельца - суспензии эмбриональных стволовых клеток, способных дифференцироваться и проходить подобие ранних стадий эмбрионального развития. В нормальных эмбриоидных тельцах за 12-14 дней в культуре образуется подобие висцеральной энтодермы желточного мешка, окружающей ткани разного уровня дифференцировки. Ткани нормальных эмбриоидных телец экспрессируют эмбриональные маркеры, соответствующие данной стадии развития. Культивирование ЭС клеток с инактивированным регуляторным геном позволяет оценить значение этого гена для самых ранних стадий развития (Keller et al., 1995).

В таких эмбриоидных тельцах показано снижение уровней экспрессии GATA4 и GATA6 – ранних энтодермальных факторов, не удалось обнаружить экспрессию ГЯФ (HNF4 α , HNF1), АФП, ТТР. Уровни экспрессии генов HNF3 α , β и γ остались на прежнем уровне.

При дополнении vHNF1 $^{-/-}$ эмбрионов vHNF1 $^{+/+}$ тетраплоидной внеэмбриональной тканью происходит нормальное формирование висцеральной энтодермы. Эмбрионы проходят гаструляцию, до 8.5 д.р., не отличаясь по размеру от контрольных. Однако зародыши неправильно сориентированы. Обнаружены нарушения при формировании передней кишки и нервной трубы (Coffinier et al., 1999). Таким образом, vHNF1 необходим в процессе морфогенеза при формировании нервной трубы и передней кишки.

1.1.3. Семейство HNF3.

1.1.3.1. Особенности.

Семейство HNF3 – класс белков, гомологичных по своей структуре белкам *fork head*, которые необходимы для правильного формирования передней и задней кишки у *Drosophila* (Weigel et al., 1990).

Белки семейства HNF3 взаимодействуют с регуляторными элементами, важными для экспрессии генов TTP, $\alpha 1$ -AT (Costa et al., 1989), CA, HNF1 (Kuo et al., 1992).

Факторы HNF3 являются важными регуляторами метаболических и гормональных процессов в печени (контроль уровня глюкозы в крови, глюконеогенеза). Экспрессия ферментов глюконеогенеза и синтеза гликогена регулируется как гепатоспецифическими факторами, так и гормонами (Philippe et al., 1994). Вклад факторов HNF3 в регуляцию выражается либо в прямой активации генов, кодирующих гормоны (ген проглюкагона, регулируемого HNF3 α) либо в облегчении взаимодействия глюкокортикоидных гормон-рецепторных комплексов с их сайтами связывания. Часто сайты связывания для HNF3 располагаются в непосредственной близи от сайтов глюкокортикоидных рецепторов (Kaestner et al., 2000).

1.1.3.2. Сходство с гистонами H1 и H5.

Конденсированный хроматин транскрипционно неактивен, так как факторы транскрипции не могут достигнуть своих сайтов связывания (Ayeg, 1999). Механизмом, при помощи которого происходит разворачивание конденсированного хроматина, является ацетилирование гистонов.

Данные рентгеноструктурного анализа указывают на то, что ДНК-связывающий домен HNF3 имеет структурное сходство с гистонами H1 и H5 (Clark et al., 1993). Это свойство позволяет факторам HNF3 влиять на экспрессию генов не только на уровне активации транскрипции непосредственно, но и разворачивая сконденсированный

хроматин и делая его, таким образом, доступным для других транс-активаторов (Zaret et al., 1999).

Показано, что связывание HNF3 с упакованной ДНК более стабильно, чем со свободной (Cirillo et al., 1999).

1.1.3.3. Представители.

HNF3 α , β и γ - наиболее изученные представители семейства HNF3, экспрессирующиеся в печени (Costa et al., 1989). Белки HNF3 α , β и γ узнают одинаковые участки ДНК и взаимодействуют с ними в виде мономеров.

1.1.3.4. Структура.

Структура этих трех небольших родственных факторов сходна. Гены семейства HNF3 небольшие, в состав HNF3 α и β входят два экзона, а в HNF3 γ - три, из которых первый кодирует нетранслируемый участок (Pani et al., 1992a; Kaestner et al., 1994). Представители этого семейства очень консервативны у млекопитающих.

Белки семейства HNF3 имеют размер около 220 а.о. и содержат ДНК-связывающий домен типа «крылатая спираль» и четыре транс-активационных домена (Pani et al., 1992a, Clark et al., 1993). ДНК-связывающий домен размером 100 а.о. состоит из трех α -спиралей и двух характерных больших петель, или «крыльев» между ними (взаимодействие с ДНК обеспечивает α -спиральная N-концевая структура белка) (Clark et al., 1993).

Каждый фактор HNF3 имеет по два сигнальных участка ядерной локализации, располагающихся в середине аминокислотной цепи, и два сайта фосфорилирования (Qian et al., 1995).

Показано существование пяти районов, необходимых для функциональной активности. Район I (участок «крылатая спираль» ДНК-связывающего домена), районы IV и V – на N-концевом участке и районы II и III, небольшие сегменты, расположенные вблизи C-конца (Pani et al., 1992b, Quan et al., 1995). Районы II, III и IV высоко консервативны, в то время как участок V частично консервативен у HNF3 β , предполагается, что α и β активируют транскрипцию одинаковым способом. Эти районы менее консервативны у HNF3 γ .

Продемонстрировано, что именно связывание членов семейства с энхансером гена CA в передней кишке ведет к активации его транскрипции на ранних этапах развития (Bossard and Zaret, 1998).

1.1.3.5. Пост-трансляционная модификация HNF3 – фосфорилирование.

Как упоминалось ранее, факторы HNF3 имеют два сайта фосфорилирования, узнаваемых казеин-киназой I. При направленных мутациях сайтов казеин-киназы I не

отмечалось никакого влияния на транс-активационные способности HNF3, хотя фосфорилирование по сериновым остаткам было продемонстрировано *in vivo* (Qian et al., 1995). Возможно, фосфорилирование HNF3 влияет на стабильность белка.

1.1.3.6. Спектр экспрессии.

а. В эмбрионе:

Представители описываемого семейства экспрессируются в процессе развития печени, различно лишь время их появления. HNF3 β в мышном эмбрионе начинает экспрессироваться первым из трех представителей семейства уже на стадии ранней гаструллы на 6.5 д.р. (в первичной полоске и в первичном узелке) (Chen et al., 1994). На стадии поздней гаструллы (7.5 д.р.) начинает экспрессироваться фактор HNF3 α , правда, на более низком уровне, чем HNF3 β . Третий представитель семейства, HNF3 γ , появляется только на стадии формирования задней кишки, на 8.5 д.р. (Kaestner et al., 1998; Weinstein et al., 1994).

б. Во взрослом организме:

В организме мыши после рождения мРНК HNF3 α , β и γ методом гибридизации *in situ* обнаруживаются в печени, кишечнике, легких и желудке. Кроме того, HNF3 α и β выявляется в поджелудочной железе, HNF3 β и γ локализуются в яичниках, а HNF3 γ - в семенниках (Xanthopoulos and Mirkovich, 1993). Повышение уровня HNF3 α наблюдается в первичных культурах гепатоцитов, культивируемых на внеклеточном матриксе. По-видимому, HNF3 α участвует в передаче внеклеточных сигналов, определяющих дифференцировку гепатоцитов (Cascio and Zaret, 1991).

1.1.3.7. Инактивация генов семейства HNF3:

Инактивация гена HNF3 α , не оказывая существенного влияния на процесс эмбриогенеза, значительно снижает скорость роста мышей после рождения и приводит к смерти в первые дни жизни из-за нарушения гомеостаза глюкозы. Фактор HNF3 α критичен для экспрессии глюкагона. Экспрессия генов сывороточных белков (СА, ТФН, ТТР) при инактивации гена HNF3 α не изменяется. Факторы HNF1, vHNF1, HNF3 β и γ , HNF4 и HNF6 транскрибируются на том же уровне, что и у контрольных мышей (Kaestner et al., 1999).

Инактивация гена HNF3 γ имеет более мягкий эффект. У таких мышей нет видимых изменений в развитии, кроме того, что происходит повышение уровней экспрессии генов HNF3 α и β (что, по-видимому, компенсирует отсутствие экспрессии гена HNF3 γ) и, параллельно, снижение уровня транскрипции некоторых печень-специфических генов (Kaestner et al., 1998).

Инактивация гена HNF3 β приводит к смерти мышного эмбриона до формирования передней кишки, на 10 д.р. из-за нарушения формирования кишечной трубы (Weinstein et al., 1994). Таким образом, HNF3 β критичен для правильного функционирования висцеральной энтодермы и необходим для формирования гензеновского узелка, клетки которого участвуют в образовании нотохорда, первичной кишки и нервной трубы.

При анализе эмбриоидных телец с инактивированным HNF3 β показано катастрофическое снижение уровней экспрессии печень-специфических генов СА, ТТР, снижение количества мРНК HNF4 и HNF1, отсутствие HNF3 α (Duncan et al., 1998).

1.1.4. Семейство HNF6.

1.1.4.1. Особенности:

Сравнительно недавно идентифицирован транскрипционный фактор, необходимый для активации промотора гена HNF3 β и связывающийся с сайтом HNF3 в промоторе гена ТТР в виде мономера. Этот фактор получил название HNF6. Возможные сайты связывания HNF6 обнаружены также в промоторах генов АФП, HNF4, α 1-AT (Samadani et al., 1996).

HNF6 активирует некоторые гепатоспецифические гены, в том числе гены глюкозного обмена и белков крови (Lemaigre et al., 1996; Lannoy et al., 1998).

1.1.4.2. Структура:

HNF6 содержит два ДНК-связывающих домена, один из которых является гомеобоксом, второй представляет собой гомолог *cut*-домена у *Drosophila*. Транскрипционный фактор HNF6 блокирует глюкокортикоид-индуцированную стимуляцию двух генов, кодирующих ферменты метаболизма глюкозы в печени: 6-fosфофрукто-2-киназы и фосфоенол-пируват карбоксилазы. Связывание HNF6 с ДНК, необходимое для подавления активности глюкокортикоидного рецептора, происходит с участием N-концевого домена HNF6 и ДНК-связывающего домена рецептора (Pietteux et al., 1999).

Наличие в структуре транскрипционного фактора HNF6 *cut*-домена делает его прототипом нового класса транскрипционных факторов гомеобелков ONECUT (Lannoy et al., 1998).

К суперсемейству транскрипционных факторов ONECUT относится белок OC2. Ген OC2 расположен на 18 хромосоме человека. мРНК OC2 представлена только в некоторых тканях человека; довольно высокий уровень экспрессии мРНК OC2 обнаруживается в печени и коже. OC2 содержит участки, имеющие высокую степень

гомологии с HNF6. Как и HNF6, OC2 является транскрипционным активатором и стимулирует транскрипцию HNF3 β и TTP (Jacquemin et al., 1999).

1.1.4.3. Изоформы.

Изолированы и охарактеризованы две изоформы HNF6: α (465 а.о.) и β (491 а.о.), отличающиеся длиной спайсеров между ДНК-связывающими доменами (Lannoy et al., 1998). Обе изоформы являются активаторами транскрипции.

1.1.4.4. Регуляция уровня экспрессии гена HNF6 гормоном роста.

Неизвестно, что является основным регулятором гена HNF6. Есть данные о том, что уровень экспрессии гена HNF6 зависит от гормонов роста и, следовательно, полового диморфизма. Ген экспрессируется на низком, изменяющемся уровне у самцов и на постоянно высоком уровне у самок (Lahuna et al., 1997).

Продемонстрировано, что регуляция гена HNF6 посредством гормонов роста осуществляется при участии STAT5 и HNF4 (Lahuna et al., 2000). Это первые сведения о гормональной регуляции гомеобоксных генов.

1.1.4.5. Спектр экспрессии

a. В эмбрионе:

Методом гибридизации *in situ* мРНК HNF6 выявляют в зачатке печени и в нервной системе с момента образования, на 9 д.р. эмбриона мыши. В эмбриональной печени транскрипты пропадают на период с 12.5 до 15 д.р., но обнаруживаются в экзокринных клетках поджелудочной железы начиная с 10.5 д.р. (Landry et al., 1997).

б. Во взрослом организме:

Представители описываемого семейства, помимо печени, экспрессируются в поджелудочной железе и некоторых участках нервной системы (Landry et al., 1997).

1.1.5. Семейство HNF4.

1.1.5.1. Особенности.

HNF4 относится к супер-семейству ядерных рецепторов 2A (Nuclear Receptors Nomenclature Committee, 1999), представитель которого HNF4 α (NR2A1) был изолирован как фактор, который связывается со специфическими сайтами в промоторах генов TTP и аполипопroteина (Apo) CIII (Evans, 1988; Sladek et al., 1990).

HNF4 α активирует транскрипцию многих гепатоспецифических генов, в их числе сывороточные белки (ТФН, ТТР, АпоСIII), метаболические ферменты (РЕРСК, пируват киназа) и транспортные белки (Costa et al., 1989; Schaeffer et al., 1993; Harnish et al., 1996; Hall et al., 1995; Stoffel and Duncan, 1997). HNF4 α регулирует гены липидного обмена и транспорта желчи, инактивация гена HNF4 α во взрослой печени оказывается критичной для экспрессии этих генов (Hayhurst et al., 2001).

1.1.5.2. Представители.

Семейство HNF4 включает факторы HNF4 α , HNF4 β (только у *Xenopus laevis*) и HNF4 γ .

HNF4 α экспрессируется в печени, почках и пищеварительном тракте. У человека его ген картирован на 20 хромосоме (Chevre et al., 1998). Ген HNF4 γ локализован на хромосоме 8 человека и экспрессируется в почках, поджелудочной железе, яичниках и кишечнике. HNF4 γ обнаружен сравнительно недавно, так как этот ген не экспрессируется в печени (Drewes et al., 1996).

HNF4 чрезвычайно консервативен, представители семейства идентифицированы у человека, крысы, мыши, *Xenopus* и *Drosophila*. Ген HNF4 α крысы имеет 99% гомологию с геном мыши (Taraviras et al., 1994).

1.1.5.3. HNF4 β как материнский фактор в *Xenopus laevis*.

У *Xenopus* HNF4 β является материнским фактором, распределенным по анимально-вегетальному концентрационному градиенту. Предполагается, что этот градиент сопряжен с вегетальной локализацией эмбрионального фактора активина A, который активирует экспрессию HNF1 (Holewa et al., 1996a).

HNF4 β у *Xenopus* запускает каскад реакций с участием других транскрипционных факторов, который приводит к закладке энтодермы.

Изучена динамика экспрессии мРНК HNF4 β на разных стадиях развития *Xenopus*. мРНК HNF4 β впервые обнаруживаются на стадии ранней гаструлы, примерно со стадии хвостовой почки. Методом гибридизации *in situ* удалось установить локализацию мРНК HNF4 β в вылупившейся личинке в пронефросе, печени и кишке (Holewa et al., 1996b).

1.1.5.4. Структура.

Наличие структуры «цинковые пальцы» в ДНК-связывающем (ДСД) и лиганд-связывающем (ЛСД) доменах определяет принадлежность белков семейства HNF4 к «сиrotским» ядерным рецепторам.

Ген HNF4 α мыши содержит десять экзонов и девять инtronов. В отличие от генов других ядерных рецепторов, два «цинковых пальца» ДСД HNF4 кодируются двумя экзонами: второй экзон кодирует участок, содержащий первый “цинковый палец” и первый цистеин второго “цинкового пальца”, а оставшуюся часть второго “цинкового пальца” кодирует третий экзон. Положение интрана после карбокси-терминального пальца, наличие которого характерно для представителей этого семейства, консервативно. Четвертый экзон кодирует неконсервативную аминокислотную последовательность, которая содержит петлевой район между ДСД и лиганд-связывающим доменом. ЛСД кодируется экзонами от четвертого до восьмого. Димеризационный домен кодируется

седьмым и восьмым экзонами. Экзоны девять и десять кодируют С-концевой, богатый пролином, район и 3'-нетранслируемую область (Tarakiras et al., 1994).

HNF4 α содержит два транс-активационных домена: AF-1 и AF-2 (Рис. 1). AF-1 состоит из N-концевого района длиной в 24 а.о. и функционирует как постоянный автономный активатор транскрипции. Этот короткий транс-активатор относится к классу кислых активаторов и представляет собой амфипатическую α -спиральную структуру. Область 128-366 а.о. HNF4 α – это транс-активатор AF-2. AF-2 состоит из ЛСД и спирального участка между ДСД и ЛСД. Участок 360-366 а.о. HNF4 α высококонсервативен среди ядерных рецепторов, активирующих транскрипцию (Hadzopoulou-Cladaras et al., 1996).

Получена доминантно-негативная форма мышного белка HNF4 α с дефектным ДСД. В отличие от нормального, такой белок не способен связываться с промотором человеческого гена ApoCIII (Taylor et al., 1996).

Методом направленного мутагенеза выяснено, что AF-1 домен имеет общий структурный мотив, связывающийся с последовательностью ДНК, гомологичной сайтам связывания опухолевых супрессоров: p53 и NF-кB-(p56). Кроме того, AF-1 домен специфически взаимодействует с многочисленными факторами базальной транскрипции, включая ТВР, транскриptionные факторы ПВ, ПН-p63 и другие (Ladias, 1994).

1.1.5.5. Лиганд HNF4 α .

Существуют данные о том, что жирные ацил-СоА тиоэфиры *in vitro* связываются с HNF4 α в лиганд-связывающем домене и способны непосредственно модулировать его транскрипционную активность.

Показано, что присоединение короткоцепочечных (C13-C16) кислот активирует фактор HNF4 α , в то время как присоединение длинноцепочечных (C18 и более) ингибирует его активность (Hertz et al., 1998). Однако при добавлении лиганда изменений в конформации и во взаимодействии HNF4 α с ко-активаторами не происходит (Sladek et al., 1999). Таким образом, лиганд, способный активировать HNF4 α *in vivo* пока достоверно не обнаружен.

1.1.5.6. Варианты альтернативного сплайсинга HNF4 α :

При транскрипции гена HNF4 α существует несколько вариантов сплайсинга, в результате которых образуются белки с разными свойствами (Nakhei et al., 1998). В настоящее время у человека и мышей известно восемь вариантов (Рисунок 1), из которых HNF4 α 1 – первый обнаруженный и наиболее распространенный в печени человека и мыши.

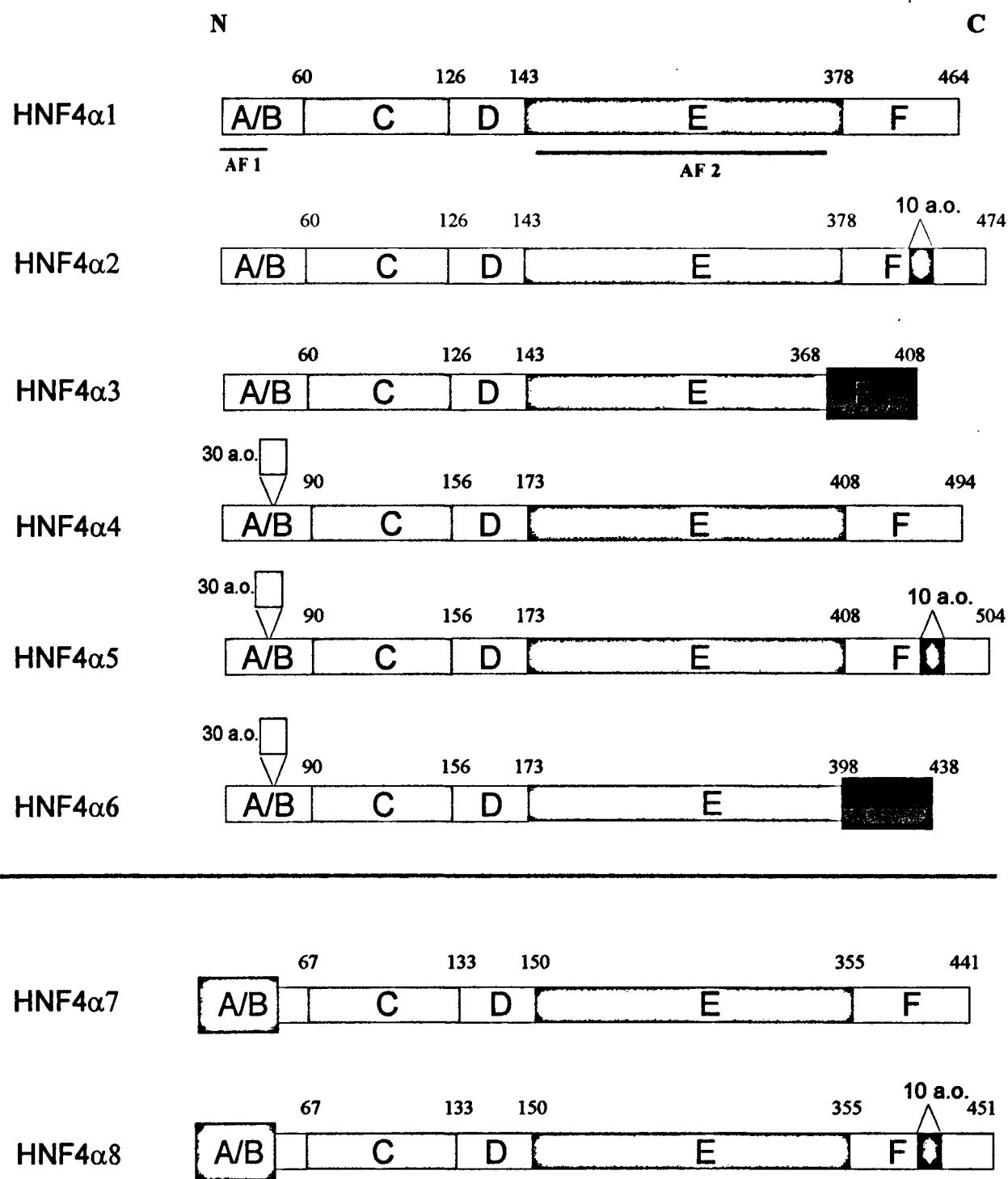


Рисунок 1. Варианты альтернативного сплайсинга HNF4 α .

Пояснения в тексте.

HNF4 α 2, форма сплайсинга, обнаруженная у человека (Chartier et al., 1994), крысы и мыши (Hata et al., 1995) имеет вставку в 9-м инtronе (10 дополнительных а.о. на С-конце).

В печени человека обнаружена кДНК третьей формы сплайсинга – HNF4 α 3, которая характеризуется укороченным по сравнению с С-концом HNF4 α 1 (Kritis et al., 1996).

Вариант HNF4 α 4, обнаруженный в почках и печени человека, содержит два дополнительных экзона 1B и 1C на N-конце.

Пятый вариант сплайсинга HNF4 α 5 содержит экзоны 1B и 1C, обнаруженные в HNF4 α 4, вместе с увеличенным экзоном 9 (как форма HNF4 α 2).

В HNF4 α 6 комбинируются экзоны 1B и 1C с укороченным С-концом, как у варианта HNF4 α 3. Транс-активационные способности форм сплайсинга HNF4 α 4, α 5 и α 6 снижены по сравнению с HNF4 α 2.

Необходимо отметить, что вышеперечисленные формы обнаружены в качестве мРНК, существование соответствующих форм белков пока не доказано.

Описана изоформа HNF4 α 7, которая транскрибируется с альтернативного промотора (P2) и имеет другой первый инtron. Фактор HNF4 α 7 экспрессируется в дедифференцированных линиях гепатом, в эмбриональных тканях и в β -клетках поджелудочной железы (Drewes et al., 1996; Sladek et al., 1999).

Восьмая изоформа HNF4 α 8 по структуре является результатом комбинации С-конца формы HNF4 α 7 (другой первый инtron) и N-концевого участка варианта сплайсинга HNF4 α 2, то есть дополнительной вставкой в 10 а.о. Характерный спектр экспрессии для HNF4 α 8 – эмбриональная печень и линии дедифференцированных гепатом (Torres-Padilla et al., 2001).

Во всех сплайс-вариантах HNF4 α ДНК-связывающий домен остается неизменным (Viollet et al., 1997; Nakhei et al., 1998).

Сведения о структурных особенностях всех изоформ HNF4 α приведены на рисунке 1.

1.1.5.7. Пост-трансляционные модификации белка HNF4

a. Обратимое ацетилирование

Ацетилирование – ключевая пост-трансляционная модификация, влияющая на функциональную активность транскрипционных факторов (Soutoglou et al., 2000a).

Экспрессирующиеся гены обычно локализованы в хроматине с высокой степенью ацетилирования. Статус ацетилирования нуклеосом регулируется двумя группами ферментов, гистоновых ацетилтрансфераз и гистоновых деацетилаз. Обе группы

ферментов представлены многочисленными членами, которые высоко консервативны (Workman and Kingston, 1998).

Продемонстрировано, что СВР (цАМФ-респонсивный связывающий белок) способен ацетилировать HNF4 α по лизиновым остаткам. СВР-опосредованное ацетилирование критично для удержания белка HNF4 α внутри ядра, в противном случае он транспортируется в цитоплазму. Ацетилирование увеличивает ДНК-связывающую активность HNF4 α и повышает его аффинность к СВР, что необходимо для активации генов-мишеней (Soutoglou et al., 2000).

6. Регуляция активности HNF4 за счет фосфорилирования

Фосфорилирование остатков тирозина является важным фактором, влияющим на ДНК-связывающую активность HNF4 α и, как следствие, на его транс-активационный потенциал, как в бесклеточных системах, так и в культурах клеток, что продемонстрировано *in vivo*, *ex vivo* и *in vitro*. Немутантный HNF4 α концентрируется в ядре. Фосфорилирование тирозина не влияет на обратный транспорт HNF4 α из цитоплазмы в ядро, но оказывается на его внутриядерной локализации. С помощью иммунофлюоресценции и электронной микроскопии показано, что HNF4 α накапливается в определенных ядерных компартментах. Эффективность компартментализации HNF4 α снижается, когда ингибитируется фосфорилирование тирозина (Ktistaki, 1995).

ДНК-связывающая активность HNF4 α *in vivo* снижается при накоплении внутриклеточного цАМФ. Фосфорилирование осуществляется протеин-киназой А (РКА). Сайт фосфорилирования расположен в А-боксе ДНК-связывающего домена.

В мутантах HNF4 α , в которых два потенциально фосфорилируемых серина удалены и заменены на другие аминокислотные остатки, способность связывать ДНК *in vitro* по сравнению с белком HNF4 α дикого типа практически не изменяется. Однако фосфорилирование РКА сильно снижает ДНК-связывающую способность фактора HNF4 α дикого типа, но не белков с мутацией (Viollet et al., 1997).

1.1.5.8. Спектр экспрессии.

а. В эмбриогенезе:

мРНК HNF4 α (видимо, мРНК HNF4 α 7) впервые можно обнаружить на 4.5 д.р. в слое клеток, выстилающих бластоцель. Таким образом, HNF4 α является одним из самых ранних маркеров энтодермы. До 8 д.р. экспрессия HNF4 α ограничивается висцеральной внеэмбриональной энтодермой (Duncan et al., 1994). В эмбриональной энтодерме мРНК HNF4 α обнаруживают с 9 д.р. в печеночном зародыше. На более поздних стадиях развития (11.5 - 16 день) мРНК HNF4 α обнаруживается на периферии печени (будущие гепатоциты) и не выявляется в центре. В эмбрионе мРНК HNF4 α локализуется и в почках,

а именно в мезонефрических канальцах (10.5 д.р.), затем метанефрических канальцах (начиная с 12.5 д.р.) (Taraviras et al., 1994).

6. Во взрослом организме:

Во взрослом организме HNF4 экспрессируется в больших количествах в печени, и в меньших количествах – в кишечнике, поджелудочной железе и почках (Sladek et al., 1990; Xanthopoulos et al., 1993).

1.1.5.9. HNF4 α как морфоген.

Помимо того, что экспрессия HNF4 α активирует транскрипцию множества генов, специфических для печени, возобновление активности HNF4 α оказывает существенное влияние на морфологию гепатоцитов.

При трансфекции дедифференцированной линии гепатомы H5 вектором, содержащим кДНК HNF4 α , клетки приобретают полигональную форму и образуют колонии, тогда как исходная линия состоит из клеток, по структуре напоминающих фибробласты. Эти изменения сочетаются с восстановлением экспрессии цитокератинов, ответственных за форму клетки, с образованием плотных контактов, а также с активацией экспрессии Е-кадхерина (Spath and Weiss, 1997).

Изменение морфологии эпителия в описанной системе происходит в две стадии. Во-первых, экспрессия HNF4 α вызывает реэкспрессию цитокератинов и частично восстанавливает продукцию Е-кадхерина. Только трансфицированные клетки способны отвечать на воздействие дексаметазоном (DEX), синтетическим аналогом глюкокортикоидных гормонов, который индуцирует вторую стадию морфогенеза, заключающуюся в формировании межклеточных контактов и в значительной поляризации клеток. Предполагается, что роль HNF4 α в дифференцировке эпителиальных клеток в конечном итоге заключается в реэкспрессии Е-кадхерина. HNF4 α действует как регулятор морфогенеза в гепатомных клетках и участвует в восстановлении способности клеток реагировать на дифференцировочные стимулы, в том числе на глюкокортикоидные гормоны (Spath and Weiss, 1998).

Таким образом, HNF4 α может влиять на генетическую программу экспрессии печень-специфических генов и эпителиальный морфогенез.

1.1.5.10. Инактивация HNF4 α .

Как обсуждалось ранее, транскрипционный фактор HNF4 α важен для закладки энтодермы.

В процессе гаструляции экспрессия гена HNF4 α выявляется в висцеральной энтодерме мышного эмбриона. “Нокаут” гена HNF4 α нарушает экспрессию всех форм HNF4 α и приводит к смерти гомозиготного мышного эмбриона (Chen et al., 1994).

Первые наблюдаемые клеточные аномалии в HNF4 α -/- эмбрионах заключаются в увеличении частоты клеточной смерти в эмбриональной эктодерме на 6,5 день, тогда как в норме в это время начинается процесс обособления мезодермы из эктодермы. На 7,5 д.р. в эмбрионах наблюдается аномальная гастроуляция, связанная с замедлением роста. В эмбриональной энтодерме возрастает частота клеточного апоптоза. Эмбрионы, характеризующиеся гомозиготной мутацией по HNF4 α (HNF4 $^{+/+}$) погибают на 10,5 д.р. При гетерозиготной мутации по HNF4 α (HNF4 $^{+/-}$) экспрессия генов, специфических для печени, не отличается от случая с нормальным HNF4 α (Duncan et al., 1997).

В HNF4 α -/- эмбриоидных тельцах обнаружено подавление экспрессии как генов ранних маркеров энтодермы, так и генов, появляющихся на более поздних стадиях (АФП, ТТР, ТФН). Таким образом, HNF4 α необходим для полной дифференцировки висцеральной энтодермы (Duncan et al., 1997).

Созданы химерные трансгенные мыши, у которых HNF4 α -/- эмбрионы были дополнены тетраплоидными HNF4 α +/ $+$ внеэмбриональными тканями. В этих условиях эмбрионы успешно проходили гастроуляцию и на стадии 8,5 д.р. были неотличимы от эмбрионов дикого типа (Duncan et al., 1997). В этом случае инактивация HNF4 α не влияет на образование печеночного зачатка и на его развитие в эмбриональную печень. Однако оказалось, что печень трансгенных животных практически не экспрессирует многие гены, характерные для дифференцированной печени: Apo AI, AI, B, CII, CIII, альдолазу B, фенилаланин гидроксилазу, трансферрин, эритропоэтин и другие. Экспрессия транскрипционных факторов HNF3 α , - β , и - γ , vHNF1, GATA4, HNF6, C/EBP β , C/EBP γ , рецепторов ретиноевой кислоты RAR- α , - β , и - γ , RXR- α , и COUP-TFII была такой же, как в контроле. Подавленной оказалась транскрипция двух факторов - HNF1 и PXR (pregnane-X-receptor). Таким образом, HNF4 α необходим для дифференцировки гепатобластов в гепатоциты (Li et al., 2000).

При инактивации HNF4 α во взрослой печени трансгенные животные ограниченно жизнеспособны. У таких мышей заметно увеличена печень (7,6 % от массы тела, в норме – 4,2 %), ее морфология изменена. При биохимическом анализе крови трансгенных мышей оказалось, что уровень СА у них нормальный, сильно повышен уровень желчных кислот (15-20 раз) и в 1,5 раза снижен уровень глюкозы. К возрасту 8 недель более 70% животных умирает от нарушений метаболических функций (Hayhurst et al., 2001).

1.2. Супер-семейство ядерных рецепторов.

Фактор HNF4 α связывается с прямым двойным повтором - DR1. С той же последовательностью могут связываться еще несколько ядерных рецепторов (Duncan et al., 1994; Sladek et al., 1990).

Ядерные рецепторы – лиганд-зависимые транскрипционные факторы, специфическим образом регулирующие уровень экспрессии генов-мишеней, вовлеченных в процессы метаболизма, развития и репродукции.

По филогенетическим признакам выделено несколько под-семейств ядерных рецепторов (ниже рассмотрены только те семейства, представители которых экспрессируются в печени):

- тип I («классический» или «стериоидный»), к которому относятся эстрогеновые рецепторы (ER), глюкокортикоидные рецепторы (GR), минералокортикоидные рецепторы (MR) и другие;
- тип II включает рецепторы тиреоидных гормонов (TR), транс-ретиноевой кислоты (RAR), 9-цис-ретиноевой кислоты (RXR) и рецепторы витамина D₃ (VDR);
- тип III содержит «сиротские рецепторы», для которых лиганд пока не обнаружен (HNF4, COUP-TFI и II, FTF) (Qiu et al., 1996).

Для представителей всех трех под-семейств ядерных рецепторов показано сходство структурной организации, однако, наблюдаются некоторые отличия функциональной активности ядерных рецепторов разных типов (Tsai et al., 1997).

Установлено, что активированные рецепторы взаимодействуют не только с базальными факторами транскрипции (Conneely et al., 1989).

В гепатомных линиях ретиноиды RXR влияют на уровень экспрессии HNF1 и HNF4 α (Magee et al., 1998). RXR могут формировать гетеродимеры с COUP-TF.

Если димеры RXR чаще всего активируют транскрипцию, то факторы COUP-TFI и COUP-TFII (chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor), как правило, подавляют.

1.2.1. Ко-регуляторы ядерных рецепторов.

Ко-факторы ядерных рецепторов подразделяют на ко-активаторы и ко-репрессоры. Ко-активаторы определяют как молекулы, которые взаимодействуют с ядерными рецепторами и усиливают их транс-активационное действие, тогда как ко-репрессоры, связываясь с ядерными рецепторами, снижают их транс-активационный потенциал. Существует несколько форм действия ко-регуляторов.

1. Непосредственное взаимодействие с факторами базальной транскрипции.

2. Ковалентная модификация гистонов и других белков.
3. Образование прекомплекса с ядерными рецепторами для последующего связывания со специфическими сайтами в промоторах генов-мишеней.
4. Ко-факторы могут действовать как «молекулярные ворота», необходимые для передачи сигналов от ядерных рецепторов к промоторам генов, уровень экспрессии которых регулируется.

В настоящее время идентифицировано множество ко-активаторов HNF4: CBP, p300, p/CAF и другие (Kamei et al., 1996; Torchia et al., 1997; Rachez et al., 2000; Soutoglou et al., 2000). Эти факторы представляют собой белки с молекулярным весом около 160 кДа и проявляют свойства гистоновых ацетилаз (Chen et al., 1997; Imhof et al., 1997).

Кроме того, семейство ко-активаторов ядерных рецепторов (NcoA) включает гомологичные факторы SRC-1 (NcoA-1), SRC-2 (NcoA-2) и SRC-3 (NcoA-3) (Torchia et al., 1997, Rachez et al., 2000). Представители семейства NcoA содержат консервативный N-концевой bHLH домен, A-домен (серин/тимидин-обогащенный район) и C-концевой глутамин-обогащенный домен (Torchia et al., 1997).

Ко-активаторы – очень консервативные белки, изменения в их структуре связаны с нарушениями во взаимодействии с транскрипционными факторами, что приводит к снижению транс-активационного потенциала. Гиперэкспрессия SRC-1 в клетках гепатобластомы HepG2 ведет к повышению экспрессии гена HNF1, этот эффект зависит от присутствия HNF4-связывающего сайта в промоторе гена HNF1 (Wang et al., 1998).

a. Факторы COUP-TFI и COUP -TFII.

Факторы COUP-TFI и COUP-TFII на низком уровне экспрессируются в печени (Tsai et al., 1997).

Как и другие рецепторы, не имеющие лиганда, факторы COUP-TF взаимодействуют с ко-репрессорами (Bailey et al., 1998).

Факторы COUP-TF в основном действуют как негативные транскрипционные регуляторы за счет активации модуляционного эффекта, оказываемого факторами HNF4, RXR. Экспрессия факторов COUP-TF значительно усиливается ретиноидами, что, возможно, представляет собой вторичный механизм для ограничения транскрипционных стимулирующих эффектов, оказываемых этими агентами (Yu et al., 2001).

Таким образом, влияние HNF4 α на экспрессию генов может модулироваться ядерными рецепторами, которые могут связываться с сайтами связывания HNF4 α и либо активировать транскрипцию, но на другом уровне (димеры RXR-RXR, RXR-PPAR), либо подавлять (димеры PPAR-COUP, RXR-COUP, COUP-COUP) (Locker, 2001).

Ядерные рецепторы COUP-TFI и COUP-TFII могут действовать как ко-факторы HNF4 α , и усиливать его действие, ориентируя активационные свойства HNF4 α (Ktistaki, 1995).

6. Фактор FTF.

FTF (транскрипционный фактор фетопротеина) является сиротским ядерным рецептором, который активирует ген АФП в процессе эмбриогенеза в печени. FTF связывает промоторную последовательность (-166-155 п.н.) гена АФП (Bernier et al., 1993). В промоторах других генов, специфичных для печени, например, HNF3 β , HNF4 α и HNF1 выявлены двойные сайты связывания FTF (Galarneau et al., 1996). В результате сплайсинга образуется большое многообразие изоформ FTF, которые связываются с ДНК в виде мономеров и не нуждаются в присутствии лиганда. Показано, что транскрипция гена FTF, в свою очередь, активируется HNF4 α , факторами GATA, FTF и bHLH-факторами (Pare et al., 2001). Таким образом, участие фактора FTF в регуляции ГЯФ обеспечивает функционирование авторегуляторных механизмов.

1.3. Развитие печени.

Развитие печени из вентральной части энтодермы первичной кишки – многоступенчатый процесс.

Первичный печеночный вырост появляется примерно на 8.5-9 д.р. мышного эмбриона в вентральной энтодерме передней кишки, рядом с прекардиальной мезодермой, которая, по-видимому, является источником сигнала к началу формирования печени, так как не прекардиальная мезодерма не способна индуцировать подобную дифференцировку (LeDouarin, 1975; Fukuda-Taira, 1981).

Показано, что воздействие факторами роста фибробластов (FGF) 1 или 2 может заменить собой инструктивный сигнал от прекардиальной мезодермы. Таким образом, сигнальный путь FGF играет ключевую роль в индукции дифференцировки гепатоцитарной линии (Jung et al., 1999).

Дорзальная энтодерма первичной кишки *in vitro* в отсутствие мезодермы способна экспрессировать некоторые гены, характерные для гепатоцитов, таким образом, сигнал не является строго специфичным (Gualdi et al., 1996).

Возможно, HNF3 β , экспрессирующийся в зародышевой энтодерме приблизительно к 8 д.р., обеспечивает компетентность энтодермы передней кишки (Ang et al., 1993; Sasaki and Hogan, 1993). Анализ регуляторного района гена-мишени HNF3 CA показал, что HNF3 β активен во всех тканях, компетентных к принятию сигнала для образования печеночного зачатка (Cascio and Zaret, 1991). Как отмечалось ранее, белки семейства

HNF3 обладают структурным сходством с гистонами. Механизмом, при помощи которого происходит развертывание конденсированного хроматина, является ацетилирование гистонов, при этом часто бывают необходимы белки-ко-активаторы гистоновой ацетилазы (Gregory and Horz, 1998). HNF3 β является таким ко-активатором (Zaret, 1998), более того, было показано, что HNF3 β может возобновлять экспрессию АФП (Crowe et al., 1999). Связавшись с энхансером гена CA, HNF3 β способен изменять нуклеосомную организацию (McPherson et al., 1993; Cirillo and Zaret, 1999). При этом, по-видимому, происходит облегчение связывания энтодермального фактора GATA4 с энхансером гена CA (Cirillo and Zaret, 1999).

В онтгенезе факторы HNF3 β и GATA4 совместно регулируют свойства энтодермы таким образом, чтобы она приобрела способность к формированию гепатоцитарного фенотипа. При инактивации генов HNF3 β и GATA4 трансгенные мыши погибают к 8.5 д.р. эмбриона из-за нарушения формирования передней кишки.

1.3.1. Семейство GATA.

Факторы семейства GATA не относятся к ГЯФ, а являются ранними энтодермальными факторами. Факторы GATA на ранних стадиях развития вовлечены в регуляцию ГЯФ, нам представляется целесообразным подробно рассмотреть это семейство.

1.3.1.1. Особенности.

Факторы семейства GATA относятся к семейству транскрипционных регуляторных белков, содержащих высококонсервативный ДНК-связывающий домен типа “цинковые пальцы”, который взаимодействует с последовательностью WGATAR или родственными *чис*-элементами. Это семейство получило свое название благодаря тому, что сайт связывания факторов GATA обязательно имеет последовательность GATA в середине. Описано шесть представителей этого семейства с различной тканевой специфичностью и временным профилем экспрессии (Morrisey et al., 1998).

Факторы семейства GATA подразделяют на два подсемейства: GATA1/GATA2/GATA3 и GATA4/GATA5/GATA6, для рассмотрения механизмов дифференцировки печени и регуляции ГЯФ представляют интерес GATA4 и 6, так как эти факторы экспрессируются во многих тканях энтодермального происхождения, в том числе, в печени, и их сайты связывания находят в регуляторных районах генов CA, вителлогенина II и гомеобоксного фактора Hex (Molkentin, 2000).

Факторы GATA очень консервативны, их гомологи необходимы для развития энтодермы у *Drosophila* и *Caenorhabditis elegans*.

1.3.1.2. Спектр экспрессии.

GATA – самые ранние из изученных маркеров эмбриональной и внеэмбриональной энтодермы. В эмбриональных тканях человека GATA6 на довольно высоком уровне экспрессируется в сердце и в легких. Во взрослом организме значительное количество GATA6 выявляется в сердце, яичниках, легких и поджелудочной железе. Низкий уровень экспрессии обнаружен в печени и в селезенке. Возможно, GATA6 является мишенью для тканеспецифической и митоген-зависимой регуляции (Kuo et al., 1997).

Только представители подсемейства GATA4/GATA5/GATA6 экспрессируются в процессе раннего развития, начиная с 5.5 д.р. В мышном эмбрионе GATA4 и GATA6 экспрессируются в висцеральной и париентальной энтодерме, GATA4, GATA5 и GATA6 – в эмбриональном сердце и в развивающемся эпителии толстого кишечника, и только GATA6 экспрессируется в энтодермальном эпителии бронхов (Morrisey et al., 1998).

Предполагается, что GATA4 может оказывать супрессорное влияние на экспрессию GATA6 в некоторых эмбриональных тканях (Kuo et al., 1997).

1.3.1.3. Инактивация GATA.

Мышь с инактивированным GATA6 (GATA6^{-/-}) умирают на 6.5-7.5 д.р. С помощью Нозерн-блот гибридизации показано, что в GATA6^{-/-}-мышах снижается уровень экспрессии ранних и поздних маркеров энтодермы (HNF4, GATA4, АФП, HNF3 β), что приводит к нарушению формирования висцеральной энтодермы. Нокаут гена GATA6 приводит к нарушениям в развитии, аналогичным тем, которые возникают при инактивации гена HNF4.

При инактивации GATA4 у трансгенных эмбрионов обнаруживаются дефекты в вентральном морфогенезе и в формировании сердца. Желочный мешок не затрагивается, в нем так же, как и у нормальных эмбрионов, экспрессируются энтодермальные маркеры HNF4 и HNF3 β , а фактор GATA6 экспрессируется на более высоком уровне (Kuo et al., 1997; Molkentin et al., 1997).

Печень образуется как вырост переднего отдела первичной кишки. Эта же эмбриональная структура дает начало поджелудочной железе и развивается в тонкий кишечник.

1.4. Развитие поджелудочной железы.

В печени, поджелудочной железе и тонком кишечнике экспрессируется много общих транскрипционных факторов и тканеспецифических генов. Факторы vHNF1, HNF1,

HNF3 β и γ находят во всех трех органах, HNF4 α 1 – в печени, HNF4 α 7 – в клетках поджелудочной железы (Locker, 2001).

HNF3 α и факторы C/EBP экспрессируются в кишечнике и печени, но не экспрессируются в поджелудочной железе, причем показано, что экспрессия C/EBP β критична для полностью дифференцированного состояния гепатоцита (Dabeva et al., 1995).

При обработке дексаметазоном панкреатической клеточной линии AR42J-B13 клетки приобретают гепатоцитарный фенотип. Эти преобразования сопровождаются индукцией C/EBP β и ряда гепатоцитарных генов (TTP, TФН) и транслокацией HNF4 α из цитоплазмы в ядро. При экзогенной экспрессии доминантно негативной формы LIP такого преобразования не происходит. Таким образом, фактор C/EBP β является кандидатом на роль фактора, который, по крайней мере, частично определяет гепато-специфическую дифференцировку, возможно, за счет изменения транскрипционной активности HNF4 α (Shen et al., 2000).

Достоверно показана необходимость печень-специфических факторов для нормального функционирования поджелудочной железы и тонкого кишечника. Например, ген L-PK экспрессируется во взрослой печени, тонком кишечнике и в эмбриональных эндокринных клетках поджелудочной железы, где регуляция его экспрессии осуществляется транскрипционными факторами HNF1, vHNF1 и HNF4 α (Miquerol et al., 1994). Факторы HNF4 α и HNF1 являются важными регуляторами экспрессии гена инсулина в β -клетках поджелудочной железы (Yamagata et al., 1996). Факторы семейства HNF3 регулируют активность панкреатической α -амилазы вместе с транскрипционным фактором поджелудочной железы (PTF1) (Cockell et al., 1995). Уровень C/EBP β в островках Лангерганса увеличивается при хронически высоком уровне глюкозы и действует как негативный регулятор активности гена инсулина.

Существует ряд факторов, специфичных для поджелудочной железы, которые играют важную роль в установлении и поддержании панкреатического фенотипа (Edlund et al., 1998), например, PTF1 экспрессируется в эндокринных клетках, β 2 – в островках поджелудочной железы (Mutoh et al., 1998).

Формирование панкреатического фенотипа и экспрессия генов регулируется специализированными гомеобоксными факторами. Для экспрессии специфических для поджелудочной железы генов необходим специфичный фактор IPF1 (он же Pdx1), регулятор на ранних стадиях развития поджелудочной железы (Locker, 2001). Фактор HNF3 β регулирует транскрипцию гена IPF1 (Wu et al., 1997).

Эпителий тонкого кишечника экспрессирует гомеобоксные факторы Cdx1 и Hoxc11, которые вместе с ГЯФ определяют экспрессию генов, специфичных именно для этой ткани (Locker, 2001).

Для формирования печени в раннем эмбриогенезе важны энтодермальные факторы семейства GATA и гепатоцитарные ядерные факторы vHNF1, HNF3 β и HNF4 α . Инактивация любого из этих генов приводит к эмбриональной летальности на ранних стадиях: инактивация генов GATA6 и vHNF1 подавляет экспрессию гена HNF4 α (Morrisey et al., 1998). Таким образом, на стадии раннего эмбрионального развития факторы GATA6 и vHNF1 находятся на иерархической лестнице выше, чем HNF4 α .

Инактивация vHNF1 не затрагивает экспрессию HNF3 α (Coffinier et al., 1999), а инактивация GATA6 подавляет экспрессию HNF3 α не полностью (Morrisey et al., 1998). Инактивация HNF3 β приводит к тому, что в эмбриоидных тельцах снижена экспрессия HNF4 α и HNF1, а мРНК HNF3 α отсутствует (Duncan et al., 1998).

1.5. Обобщение сведений о локализации и влиянии ГЯФ на гепато-специфическую экспрессию.

В таблице 1 приведены сведения о некоторых наиболее полно охарактеризованных печень-специфических генах и факторах, осуществляющих регуляцию их экспрессии.

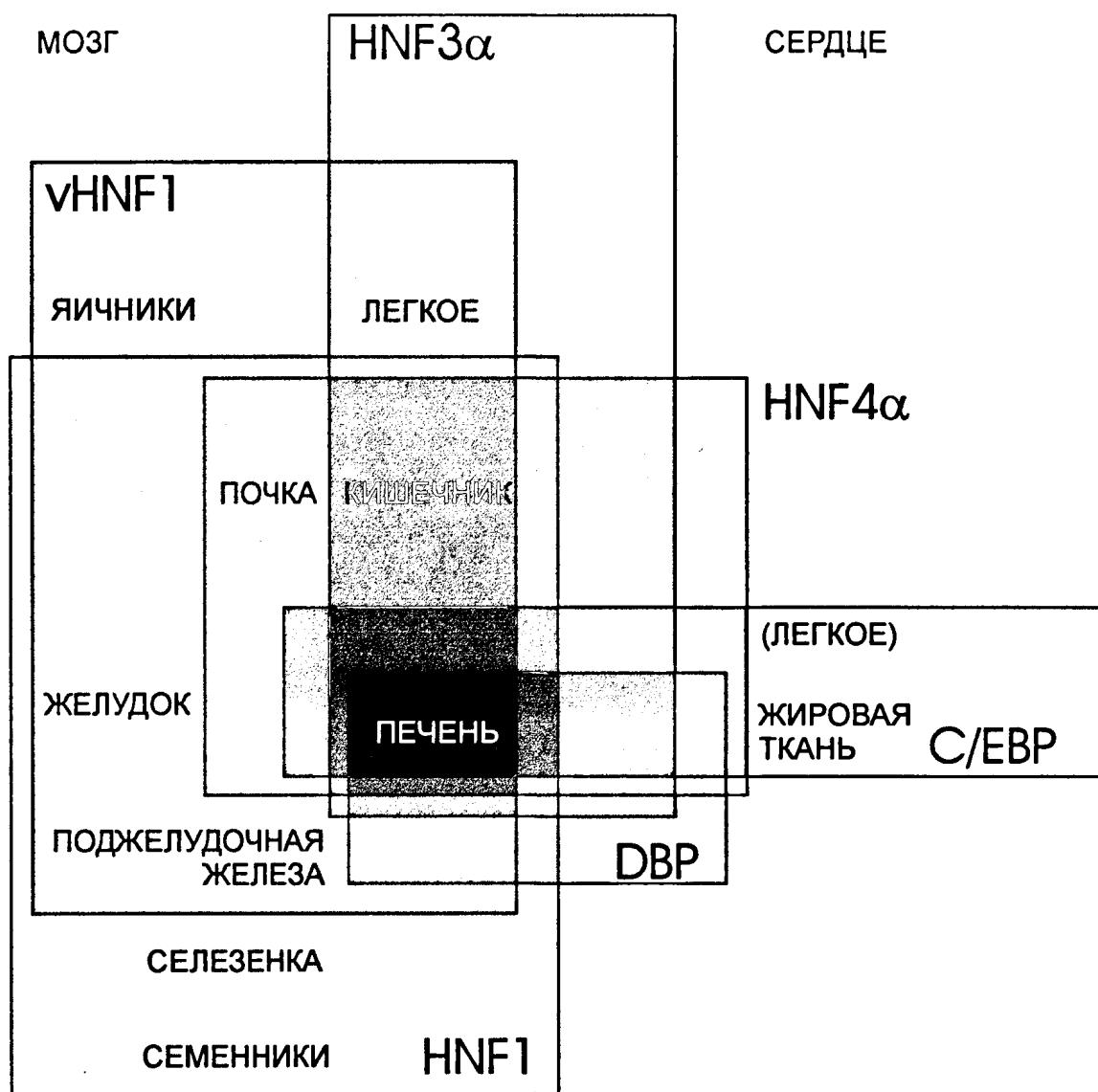
В таблице представлены гены сывороточных белков СА, АФП, ТТР и Аров. Высокий уровень транскрипции этих генов в основном постоянный и регулируется комбинаторным действием промоторов и энхансеров. В печени синтезируется множество ферментов – регуляторов метаболизма (Lemaigre and Rousseau, 1994). Глюкагон, инсулин и другие гормоны регулируют уровень транскрипции фосфоенолпириват карбоксилазы (РЕРСК).

Из приведенной таблицы видно, что регуляторные элементы печень-специфических генов содержат большое число сайтов связывания для ГЯФ.

На рисунке 2 приведены общие сведения о локализации ГЯФ в организме мыши. Видно, что ГЯФ экспрессируются в разных органах и тканях, но необходимо четко отметить, что только в печени можно наблюдать экспрессию всех известных ГЯФ. Направление и уровень дифференцировки печени однозначным образом формируется совокупным действием ГЯФ. Экспрессия ГЯФ в печени взаиморегулируется, однако, связи чрезвычайно сложны.

Ген	Функция	Специфичность экспрессии	Транскрипционные регуляторы	
			Печень-специфические	Общие
CA	Сывороточный белок	Экспрессируется только в печени, снижается при регенерации.	HNF1, C/EBP, DBP, HNF3	NFY, NF1 GATA4
АФП	Сывороточный белок	Высокий уровень в эмбриональной печени, стволовых клетках, примитивной энодерме, репрессия во взрослом организме, ре-экспрессируется при опухолях печени и регенерации	HNF1, HNF3, C/EBP, HNF6	NF1 FTF, nkx2.8
TTR	Сывороточный белок	Высокий уровень экспрессии в эмбриональной и взрослой печени, на низком уровне экспрессия в развивающейся кишке	HNF4, HNF3, HNF1, HNF6, C/EBP	AP1
Apo B	Сывороточный белок	Высокий уровень экспрессии в печени, кишке и плаценте	HNF3, HNF4, C/EBP, HNF1	COUP-TF, RXR
HBVx	Вирусный белок	Экспрессируется только в печени	C/EBP, HNF3, HNF4, PPAR	NF1, AP1, RXR, COUP-TF, p53 NF1, USF, COUP-TF
L-PK	Метаболический фермент	Экспрессируется в печени, почках, поджелудочной железе (экспрессия происходит параллельно с экспрессией HNF4 в этих тканях)	HNF1, HNF4	CREB (cAMP) NF1, USF, COUP-TF
PEPCK	Метаболический фермент	Экспрессируется в печени, почках и адипоцитах, ключевой фермент ингибитируется инсулином, сильно и быстро индуцируется GR и TR.	C/EBP, HNF1, HNF4, HNF3, PPAR	TR, RAR, GR, CREB (cAMP), AF2
TAT	Метаболический фермент	Индуктируется GR в печени.	HNF1, C/EBP, HNF3	NFY, NF1 GR
C/EBP α	Транскрипционный фактор	Экспрессируется в печени, в жировой ткани, а также в кишечнике, легких, надпочечниках, плаценте, яичниках и мононуклеарных клетках периферической крови.	C/EBP	NF1, myc/max, NF-kB, Sp1, AP2, USF
HNF4 α	Транскрипционный фактор	Экспрессируется в больших количествах в печени, и в меньших количествах – в кишечнике, поджелудочной железе и почках.	HNF1, HNF3, HNF6	NF1, AP1
HNF1	Транскрипционный фактор	Экспрессируется в больших количествах в печени, а также в почках, кишечнике и поджелудочной железе.	HNF4, HNF3	AP1

Таблица 1. Регуляция экспрессии гепато-специфических генов.



**Рисунок 2. Спектры экспрессии ГЯФ в организме мыши после рождения
(по (Tronche and Yaniv, 1992)).**

1.6. Обеспечение гепатоцитарного фенотипа – взаимная регуляция ГЯФ.

1.6.1. Регуляция уровня экспрессии гена HNF4.

1.6.1.1. Промоторы P1 и P2 гена HNF4α.

Транскрипция гена HNF4α может происходить с двух независимых промоторов. таким образом, существуют два альтернативных экзона с одного из которых начинается транскрипция форм HNF4α1 и других вариантов сплайсинга, экспрессирующихся в эмбриональной и взрослой печени, а с другого – форма HNF4α7, которая экспрессируется преимущественно в висцеральной энтодерме, эмбриональных стволовых клетках и клетках поджелудочной железы (Nakhei et al., 1998).

Попытка определения минимального участка регуляторного района промотора P1 гена HNF4α, способного обеспечивать ткане-специфическую активацию, привела к выявлению эволюционно консервативных сайтов связывания факторов семейств HNF1 и HNF3 (Zhong et al., 1994).

Формы HNF4α7/α8 транскрибируются с альтернативного промотора (P2), который находится на расстоянии ~ 45.6 т.п.н. от описанного ранее промотора P1 и экзона 1A. Транскрипт HNF4α, клонированный из поджелудочной железы, содержит экзон 1D, включающий два возможных варианта комбинаций 3' конца (Sladek et al., 1999).

В промоторе P1 гена HNF4α были выявлены эволюционно консервативные сайты связывания факторов семейств HNF1, HNF3, HNF6 и GATA6 (Tarakiras et al., 1994; Zhong et al., 1994; Landry et al., 1997; Hatzis and Talianidis, 2001). С P2 промотором гена HNF4α способны связываться факторы HNF1, vHNF1 (Thomas et al., 2001).

Наличие альтернативного промотора гена HNF4α (P2) со своими специфическими сайтами связывания определяет регуляцию уровня экспрессии изоформ HNF4α7-α8, и, следовательно, влияет на общий уровень экспрессии гена HNF4α и соотношение двух групп изоформ, обладающих разной способностью активировать гены-мишени HNF4α. Таким образом, дифференциальная регуляция P1 и P2 промоторов может оказывать существенное влияние на поддержание гепато-специфической экспрессии.

1.6.1.2. Удаленный энхансер гена HNF4α.

Для полной экспрессии формы HNF4α1 в линиях высокодифференцированных гепатом и в печени необходимый (Bailly et al., 2001). В составе этого энхансера выявлены сайты связывания факторов C/EBP, HNF4, HNF3, HNF1 и сайты чувствительности к глюкокортикоидам. Мутации в сайте C/EBP приводят к 6-кратному снижению активности гена в культуре дифференцированной гепатомы FGC4, а в сайте HNF1 – к 2-кратному. Мутации в сайтах HNF4 и HNF3 вызывают гораздо более мягкие последствия. На

основании этих данных была предложена модель регуляции гена HNF4α, согласно которой низкий эмбриональный уровень экспрессии обеспечивается действием факторов семейств HNF1 и HNF3 и формы HNF4α7, а после рождения к ним добавляется действие C/EBPβ и глюкокортикоидных рецепторов, которые и обеспечивают гораздо более высокий уровень экспрессии.

1.6.1.3. Факторы HNF1 и HNF3.

Важнейшим активатором экспрессии HNF4α7 является vHNF1, возможно, опосредованно, поскольку его «нокаут» ведет к полной репрессии гена HNF4α на ранних стадиях развития (Coffinier et al., 1999).

Возможность регуляции уровней экспрессии HNF4α/HNF1 белками HNF3α и HNF3β была исследована на эмбриоидных тельцах, в которых один или оба аллеля HNF3α или HNF3β были инактивированы.

Опыты по инактивации гена HNF3β показали, что в HNF3β-/ эмбриоидных тельцах транскрипция HNF4α заметно снижена. Инактивация фактора HNF3α, повышает уровень транскрипции HNF4α (Duncan et al., 1998).

Это указывает на то, что, по крайней мере, на ранних стадиях развития HNF3β является активатором экспрессии HNF4α/HNF1α и регулируемых ими генов.

Во взрослой печени инактивация HNF3β не влияет на экспрессию генов HNF4α и HNF1 (Sund et al., 2000).

В противоположность этому, HNF3α действует как негативный регулятор экспрессии HNF4α /HNF1α, то есть HNF3α и HNF3β действуют *in vivo* как антагонисты. HNF3α проявляет негативный эффект за счет конкуренции с более эффективным активатором HNF3β за HNF3-связывающие сайты. Соотношение HNF3α/HNF3β зависит от присутствия в среде инсулина. При увеличении концентрации инсулина в среде, в которой инкубируются эмбриоидные тельца, снижается экспрессия HNF3α и увеличивается экспрессия HNF3β (Duncan et al., 1998).

При трансфекции вектора, экспрессирующего HNF1, в клетки линии H5 может возобновиться транскрипция HNF4α, подавленная ранее (Bulla and Fournier, 1994), но такой эффект наблюдается не во всех клеточных линиях.

1.6.1.4. Факторы семейства GATA.

Экзогенная экспрессия фактора GATA6 активирует регуляторный район гена HNF4α в клетках неэнтодермального происхождения. Инактивация GATA6 ведет к образованию фенотипа, сходного с HNF4α-/, и полной репрессии HNF4α в трансгенных эмбрионах (Morrisey et al., 1996). Таким образом, можно предполагать, что GATA6 является регулятором, общим для HNF4α1 и HNF4α7. Другой фактор того же семейства,

GATA4, по-видимому, не влияет непосредственно на транскрипцию HNF4α, однако, может действовать опосредованно, через GATA6 (Kuo et al., 1997).

1.6.1.5. Фактор HNF6.

В опытах по трансфекционному анализу HNF6 активировал регуляторные районы генов HNF4α и HNF3β (Landry et al., 1997). Кроме того, участки, считавшиеся ранее сайтами связывания для HNF3, на самом деле регулируются как факторами семейства HNF3, так и факторами HNF6 (Hatzis and Talianidis, 2001).

1.6.1.6. Авторегуляторная петля с участием FTF.

При трансфекционном анализе было показано, что FTF может активировать гены HNF4α, HNF1 и HNF3α. Этот фактор экспрессируется преимущественно в печени и регулирует транскрипцию некоторых гепатоспецифических белков, например, АФП. Транскрипция гена FTF, в свою очередь, активируется HNF4α и факторами GATA (Pare et al., 2001). Таким образом, вероятно, в регуляции экспрессии HNF4α присутствует авторегуляторная петля.

1.6.2. Регуляция уровня экспрессии генов семейства HNF1

1.6.2.1. Регуляция HNF1 факторами HNF4α, HNF3, FTF.

HNF4α является основным активатором экспрессии гена HNF1. В промоторе гена HNF1 выявлены сайты связывания HNF4, HNF3, FTF и AP1 (Tian et al., 1991; Pare et al., 2001). Мутации в сайте связывания HNF4 влечут за собой падение уровня экспрессии на 95%, а повреждение сайтов для HNF3 - на 33%.

Предполагается существование авторегуляторного механизма, при котором HNF1 может снижать скорость транскрипции своего собственного гена. Так как было показано, что HNF1 не связывается со своим промотором, есть вероятность того, что HNF1 может блокировать транс-активационный эффект, оказываемый фактором HNF4α (Kritis et al., 1993).

1.6.2.2. Регуляция vHNF1 факторами семейства COUP-TF.

На расстоянии 260 п.н. от точки начала транскрипции гена vHNF1 обнаружен сайт связывания DR1. С этим сайтом в промоторе гена vHNF1 могут взаимодействовать три представителя под-семейства «сиротских» ядерных рецепторов: HNF4, COUP-TFI и COUP-TFII. Показано, что в отличие от фактора HNF4, который либо оказывает незначительный эффект, либо не активирует вовсе, факторы семейства COUP-TF транс-активируют транскрипцию гена vHNF1 (Power and Cereghini, 1996).

У мышей с фенотипом HNF6-/– наблюдало отсутствие желчного пузыря, нарушения в строении желчевыводящих протоков. Показано, что в таких HNF6-/– мышах

происходит подавление экспрессии гена vHNF1. Таким образом, фактор HNF6 может регулировать транскрипцию гена vHNF1 (Clotman et al., 2002).

1.6.2.3. Фактор HNF3 γ .

На модели регенерирующей печени крыс после отравления ССl₄ были получены данные о том, что трансфекция HNF3 γ может активировать транскрипцию гена vHNF1 (Nakamura et al., 1999).

1.6.3. Регуляция уровня экспрессии генов семейства HNF3.

1.6.3.1. Влияние факторов HNF3, C/EBP β , HNF6, FTF на экспрессию гена HNF3 β .

Для полной тканеспецифической экспрессии HNF3 β в линиях гепатом необходим промоторный участок, включающий сайты связывания четырех факторов: HNF3 (Pani et al., 1992a), C/EBP β (Samadani et al., 1995), HNF6 (Samadani et al., 1996) и FTF (Pare et al., 2001). Из экспериментов по инактивации HNF3 α следует, что этот фактор подавляет экспрессию HNF3 β (Kaestner et al., 1998). HNF3 β начинает экспрессироваться раньше всех вышеперечисленных, следовательно, «включать» экспрессию HNF3 β в онтогенезе должен ранний энтодермальный фактор. У эмбрионов с инактивированным GATA6 уровень мРНК HNF3 β снижается, но не полностью (Morrisey et al., 1998). Инактивация vHNF1 не затрагивает экспрессию этого фактора (Coffinier et al., 1999).

1.6.3.2. Факторы HNF3 β и HNF3 γ влияют на экспрессию гена HNF3 α .

Основным известным активатором гена HNF3 α является HNF3 β (Duncan et al., 1998). HNF3 γ , по-видимому, подавляет экспрессию HNF3 α (Kaestner et al., 1998). В онтогенезе мыши HNF3 α появляется примерно на день позже HNF3 β , то есть, по-видимому, существует еще фактор или факторы, необходимые для активации гена HNF3 α , отсутствие которых обуславливает задержку запуска экспрессии HNF3 α на день.

Существуют данные о том, что транскрипционный фактор HNF3 γ способен активировать транскрипцию генов HNF3 α и β , таким образом, образуется авторегуляторная петля (Costa et al., 1989).

1.6.3.3. Факторы HNF1 и vHNF1.

В литературе нет данных о том, что активирует экспрессию гена HNF3 γ . На эмбриоидных тельцах показано, что ни инактивация HNF3 α , ни инактивация HNF3 β не влияют на экспрессию этого гена (Duncan et al., 1998). В энхансере гена HNF3 γ , функциональная необходимость которого показана *in vitro*, обнаружены сайты связывания HNF1 α и vHNF1 (Heimisch et al., 1997).

1.6.4. Регуляция уровня экспрессии гена C/EBP α .

На транскрипционном уровне существенным для экспрессии гена C/EBP α является сайт связывания белков семейства C/EBP (Legraverend et al., 1993). Экспрессия C/EBP α заметно активируется при воздействии интерлейкинами 1 и 6, дексаметазоном и глюкагоном, что свидетельствует в пользу того, что этот фактор является медиатором воспалительного ответа (Lekstrom-Himes and Xanthopoulos, 1998).

1.6.5. Регуляция уровня экспрессии гена HNF6.

Показано, что транскрипционный фактор C/EBP β связывается с регуляторным элементом гена HNF6 и подавляет его экспрессию. Репрессия осуществляется за счет взаимодействия N-концевого домена белка C/EBP β с двумя сайтами в промоторе гена HNF6 (Pierreux et al., 1999).

В настоящее время описано пять семейств гепатоцитарных ядерных факторов: HNF4, HNF1, HNF3, C/EBP и HNF6, которые способны контролировать экспрессию многих генов, специфичных для печени. Представители внутри этих семейств очень консервативны и узнают одинаковые последовательности в регуляторных элементах. Вследствие этого создается большое разнообразие путей регуляции.

Кроме того, взаимодействуя, ГЯФ могут модифицировать действие друг друга: оказывать либо координированное воздействие на регулируемые им гены, либо конкурировать за сайты связывания.

Общая схема предполагаемых взаимодействий представителей семейств ГЯФ и других близких транскрипционных факторов представлена на рисунке 3.

Однако связи с основными процессами, происходящими в клетке, изучены пока не достаточно.

1.7. HNF4 α – один из важнейших ГЯФ.

HNF4 α является фундаментальным регулятором гепатоцитарного фенотипа (Kuo et al., 1992; Tian and Schibler, 1991). В результате взаимодействия всех известных семейств ГЯФ создается “микроклимат” для экспрессии генов, специфических для гепатоцитов. Показано, что HNF4 α и HNF1 играют основную роль в гепато-специфической дифференцировке. Возможно, существуют какие-либо факторы, регулирующие активность HNF4 α , так как при делеции седьмой хромосомы у мышей, не затрагивающей гены HNF4 α и HNF1, происходит подавление экспрессии их мРНК (Tonjes et al., 1992).

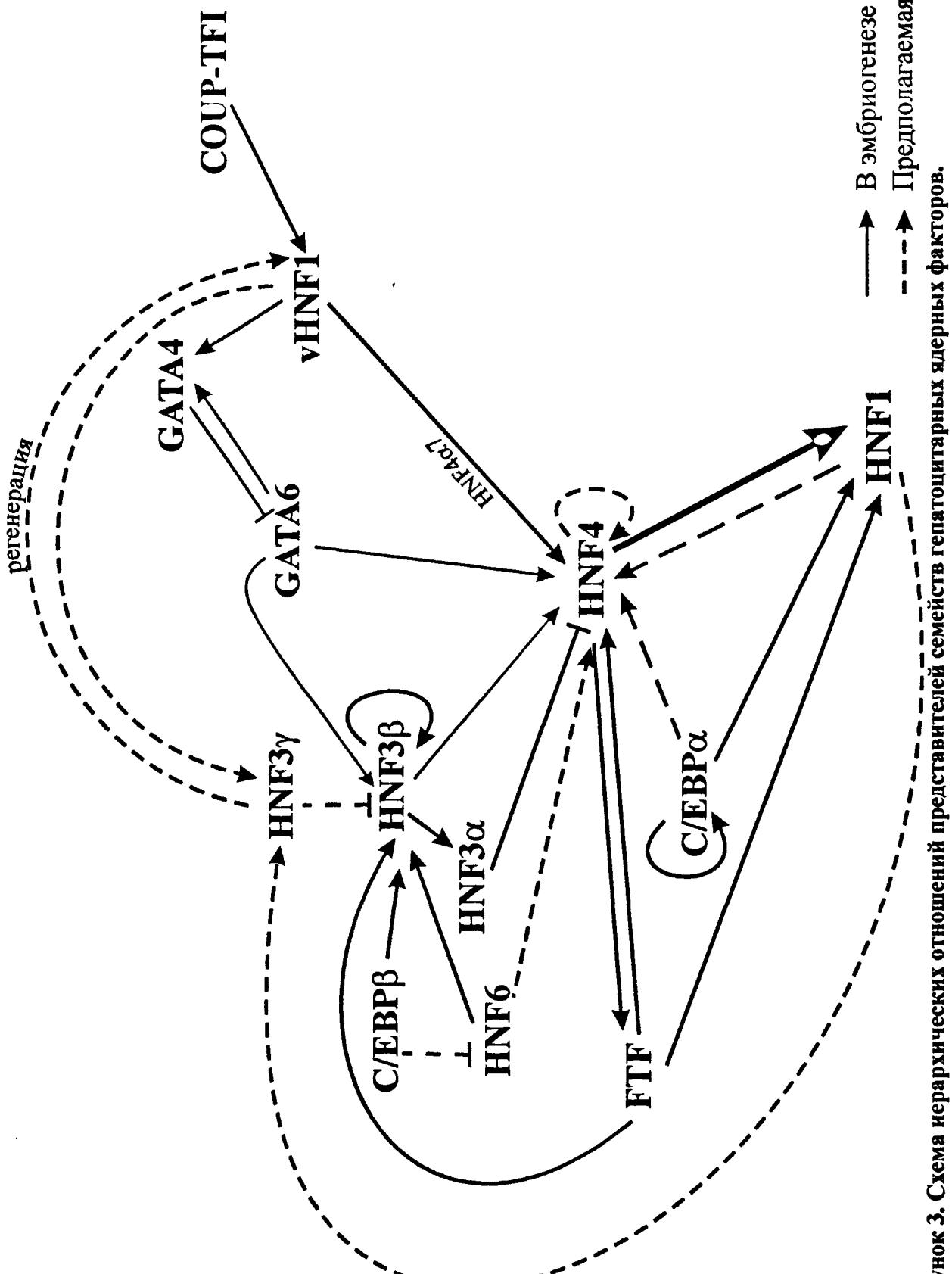


Рисунок 3. Схема иерархических отношений представителей семейств гепатоцитарных ядерных факторов.

Пояснения в тексте.

HNF4 α является, по-видимому, одним из ключевых факторов в дифференцировке гепатоцитов свидетельствуют следующие факты:

- **Роль материнского фактора в *Xenopus laevis*.** Белки HNF4 чрезвычайно консервативны, представители семейства идентифицированы у человека, крысы, мыши, *Xenopus* и *Drosophila*. У *Xenopus* HNF4 β является материнским фактором, распределенным по анимально-вегетальному концентрационному градиенту. HNF4 β у *Xenopus* запускает каскад реакций с участием других транскрипционных факторов, который приводит к закладке энтодермы (Ryffel, 1996).
- **Раннее появление в эмбриогенезе.** Еще до образования зародыша печени экспрессия этого фактора обнаруживается во внеэмбриональной висцеральной энтодерме. Впервые HNF4 α появляется на 4.5 д.р. в слое клеток, выстилающих бластоцель, то есть HNF4 α является одним из самых ранних маркеров первичной энтодермы (Duncan et al., 1994).
- **Необходимость HNF4 α в эмбриогенезе.** HNF4 α необходим для полной дифференцировки и функционирования висцеральной энтодермы желточного мешка и для нормального развития печени и почек (Duncan et al., 1994; Duncan et al., 1997).
- **Катастрофические последствия инактивации.** Нокаут гена HNF4 α практически полностью отменяет гастроуляцию и приводит к смерти зародыша уже на 10 д.р. (Duncan et al., 1994; Chen et al., 1994; Duncan et al., 1997).
- **Гепато-специфическая экспрессия.** мРНК HNF4 α экспрессируется в больших количествах в печени, кроме того, незначительные количества мРНК HNF4 α обнаруживаются в почке, тонкой кишке, желудке и в поджелудочной железе, так как все эти органы – единого происхождения (Sladek et al., 1990; Xanthopoulos and Mirkovitch, 1993; Taraviras et al., 1994).
- **Регуляция экспрессии HNF1.** HNF4 α является одним из основных регуляторов экспрессии наиболее распространенного гепатоцитарного фактора HNF1, возможные сайты связывания которого выявлены в регуляторных районах более ста генов печени (Tronche et al., 1997). Однако инактивация HNF1 не является летальной для мышного эмбриона, но после рождения происходят необратимые явления, что в большинстве случаев приводит к смерти гомозиготных животных вскоре после рождения (Pontoglio et al., 1997).
- **Отсутствие экспрессии в дедифференцированных гепатомах.** Большинство дедифференцированных гепатомных линий не экспрессируют HNF4 α (Bulla and

Fournier, 1992), либо экспрессируют его эмбриональную α 7 форму (Drewes et al., 1996).

- **Влияние на эпителиальный статус.** Экспрессия эндогенного гена HNF4 α в клетках дедифференцированной гепатомы приводит к приобретению последней эпителиальной морфологии (Spath and Weiss, 1998).

1.8. Роль ГЯФ при регенерации и вирусных инфекциях.

1.8.1. Регенерация.

Ткань печени обладает способностью к практически неограниченной регенерации. При удалении до 70% печени у мышей и крыс орган полностью восстанавливается примерно за 15 дней (Michalopoulos and DeFrances, 1997). При этом до 90% гепатоцитов могут быть вовлечены в пролиферацию (Урываева и др., 1972, 1975).

При регенерации для обеспечения резкого изменения функций уже сформировавшейся печени необходима координированная экспрессия множества печень-специфических генов. Как говорилось выше, уровень экспрессии большинства генов печени находится под контролем гепатоцитарных ядерных факторов. В то же время нельзя исключить существование определенных факторов или сигналов, способных активировать экспрессию гепатоцитарных ядерных факторов, которые в свою очередь, влияют на экспрессию генов печени (Corrales et al., 2002).

О роли ГЯФ, в частности HNF4 α , и динамике их экспрессии при регенерации известно немного. Существуют данные о том, что в процессе регенерации HNF4 α способствует дифференцировке овальных клеток в гепатоциты (Nagy, et al., 1994).

Известно, что при повреждениях, сопровождающихся регенерацией, уровень C/EBP β быстро падает, а уровень C/EBP α заметно возрастает (Greenbaum et al., 1995; Rana et al., 1995).

1.8.2. ГЯФ при вирусных инфекциях.

ГЯФ задействованы и в развитии вирусных инфекций, принимая участие в механизмах активации экспрессии вирус-специфических белков таких вирусов, как вирус иммунодефицита человека 1 (Ladias, 1994) и гепатита B (Garsia et al., 1993).

Для реализации своей программы вирус иммунодефицита человека использует факторы C/EBP (Henderson and Calame, 1997), в LTR вируса обнаружены сайты связывания HNF4 (Ladias, 1994).

Вирус гепатита B (HBV) избирательно поражает клетки печени. Показано, что для экспрессии своих генов этот вирус использует активность факторов HNF1 (Wang et al., 1998), HNF3 (Raney et al., 1995) и HNF4 (Chen and Ou, 1995).

С помощью трансфекционного анализа линии гепатобластомы человека HepG2 была исследована способность HNF4 α модулировать уровень транскрипционной активности четырех промоторов HBV. Промоторы генов белков нуклеокапсида и большого поверхностного антигена (LSA) транс-активируются в присутствии HNF4 α . кроме того, энхансер гена I/X, нуклеокапсидный и LSA промоторы транс-активируются в присутствии RXR и PPAR. HNF4 α связывается с регуляторным районом в промоторе гена белка нуклеокапсида HBV. Таким образом, HNF4 α может регулировать уровень транскрипции генов HBV и, следовательно, контролировать репликацию вируса при инфекции (Raney et al., 1995).

Интеграция вирусной ДНК в геном “хозяина” может привести к следующим последствиям:

- при интеграции вирусных промоторов может происходить активация и/или появление мутаций генов “хозяина”;
- при интеграции вирусной ДНК, кодирующей ген белка транс-активатора X вириуса HBV (HBx), усиливается экспрессия гена белка HBx и последующее взаимодействие с клеточными генами и регуляторными белками.

Белок HBx связывается с клеточными транскрипционными активаторами и базальными факторами транскрипции (C/EBP α , TBP, TFIIH), что усиливает активацию генов. С другой стороны, в человеческих гепатомах HBx связывает белок p53, блокируя функциональную активность p53, что приводит к невозможности p53-опосредованной активации транскрипции генов (Ogden et al., 2000).

Вероятно, необходимость ГЯФ для репликации вируса объясняет его гепатоспецифичность.

1.9. Нарушения экспрессии ГЯФ.

Нарушения экспрессии ГЯФ приводят к катастрофическим последствиям для всего организма в целом.

1.9.1. MODY.

Мутации в генах ГЯФ приводят к тяжелым заболеваниям почек и к так называемым диабетам молодых MODY (Maturity Onset Diabetes of the Young).

MODY - генетически гетерогенный подтипа инсулин-независимого диабета (NIDDM), для которого характерна гипергликемия, являющаяся результатом дефектов в секреции и действии инсулина. Белки, кодируемые генами HNF1 α и HNF4 α , играют критическую роль в нормальном функционировании печени и β -клеток поджелудочной железы и являются основными факторами, поддерживающими нормальный гомеостаз

глюкозы. Мутации в генах HNF4 α , HNF1 и vHNF1 являются причиной форм MODY1, MODY3 и MODY5 соответственно, которые характеризуются нарушением глюкозостимулирующей секреции инсулина, рано начинающейся болезнью и аутосомной доминантной наследственностью (Ryffel, 2001). Мутации гена глюкокиназы приводят к возникновению MODY2 (Vaisse et al., 1997).

1.9.2. Мутации в сайтах связывания ГЯФ.

Показано, что мутации в сайтах связывания ГЯФ в регуляторных районах тканеспецифичных генов приводят к таким патологиям, как хронические заболевания дыхательных путей (α 1-AT) (Morgan et al., 1997), гемофилия В (фактор IX) (Hall et al., 1994), предрасположенность к алкогольным поражениям печени (цитохром Р450) (Ingelman-Sundberg et al., 1994).

1.10. Гепатоцеллюлярные карциномы (ГК).

ГК – один из самых часто встречаемых раков в мире, лечение которого осложняется тем, что опухоли образуются на базе хронических заболеваний печени.

1.10.1. Причины возникновения ГК. Основные факторы риска:

1. ГК могут возникать в результате воздействия химических канцерогенов: афлатоксина B1 (AFB1 - соединение, вырабатываемое плесневыми грибками, контактирующими зерно и еду в некоторых районах Африки и Азии) (Wogan, 2000), а также химических соединений, используемых в промышленности (винил хлорид и некоторые лекарственные средства).
2. Значительный риск возникновения первичных опухолей печени существует среди людей с алкогольной зависимостью и ярко выраженной привычкой к табакокурению (Tang and Meydani, 2001).
3. По эпидемиологическим данным, хронические инфекции вирусами HBV и HCV являются причиной до 80% ГК в мире. Латентный период возникновения опухоли - в среднем от одного до трех десятилетий после начала хронической инфекции. Эпидемиологические данные свидетельствуют о том, что в последнее время частота возникновения ГК возрастает.

Сочетание факторов риска возникновения первичных опухолей печени значительно повышает вероятность озлокачествления (Bergsland and Venook, 2000).

Вирусная инфекция или химическая интоксикация вызывают хронические воспаления печени, при которых в ткани высок уровень клеточной смерти и пролиферации. Это пренеопластическая стадия; при стимуляции, например,

оксидативным стрессом или воспалительными цитокинами, происходит злокачественная трансформация клеток (Buendia, 2000).

1.10.2. Свойства опухолевой клетки

Сформулирован ряд свойств, наличие которых характерно для клетки, претерпевшей злокачественную трансформацию. Как показывает анализ литературы, все эти общие свойства характерны и для типичной клетки гепатоцеллюлярных карцином. На рисунке 4 представлены свойства клетки, приобретаемые ей при трансформации.

1.10.2.1. Неограниченный рост

Нормальная клетка постоянно получает сигналы, которые удерживают ее либо в стадии покоя G_0 , либо в пост-митотической стадии. Трансформированная клетка должна обладать способностью преодолевать сигналы, препятствующие росту.

Фактор pRb, регулирующий активность транскрипционного фактора E2F, является одним из ключевых регуляторов клеточного цикла. В гипофосфорилированном состоянии pRb связывает E2F, который необходим для экспрессии генов, контролирующих переход из G_1 в S-фазу (Weinberg, 2002). Для ГК характерна потеря гетерозиготности в локусе Rb (до 48% случаев) и подавление экспрессии этого гена (30-50% случаев), а также нарушения TGF- β зависимого пути передачи сигнала (Buendia, 2000).

В одном из сигнальных путей, определяющих неограниченный рост клетки задействован β -катенин (характерный для ГК путь утраты клеткой чувствительности к сигналам, запрещающим рост). В нормальной клетке этот белок участвует в образовании межклеточных контактов в комплексе с Е-кадхерином. Однако, в трансформированной клетке β -катенин может стабилизироваться, перемещаться в ядро и в комплексе с факторами Tcf/LEF активировать транскрипцию ряда генов, в том числе с-мус, CD1, матриксных металлопротеаз и фибронектина. Показано, что ген β -катенина мутирован в 20-40% случаев ГК (Buendia, 2000).

1.10.2.2. Автономность.

Нормальные клетки нуждаются в ростовых сигналах. Эти сигналы передаются посредством каскада тирозиновых киназ. Сигналами могут служить растворимые ростовые факторы, компоненты внеклеточного матрикса и молекулы межклеточных взаимодействий. Автономность трансформированной клетки достигается какой-либо «подменой» сигнала. Важным для пролиферации гепатоцитов является фактор роста гепатоцитов, HGF (фактор роста гепатоцитов), продуцируемый эндотелием печени. Клинические исследования показали, что у многих пациентов с ГК значительно повышен уровень экспрессии HGF (Shiota et al., 1995; Huang et al., 1999). Часто

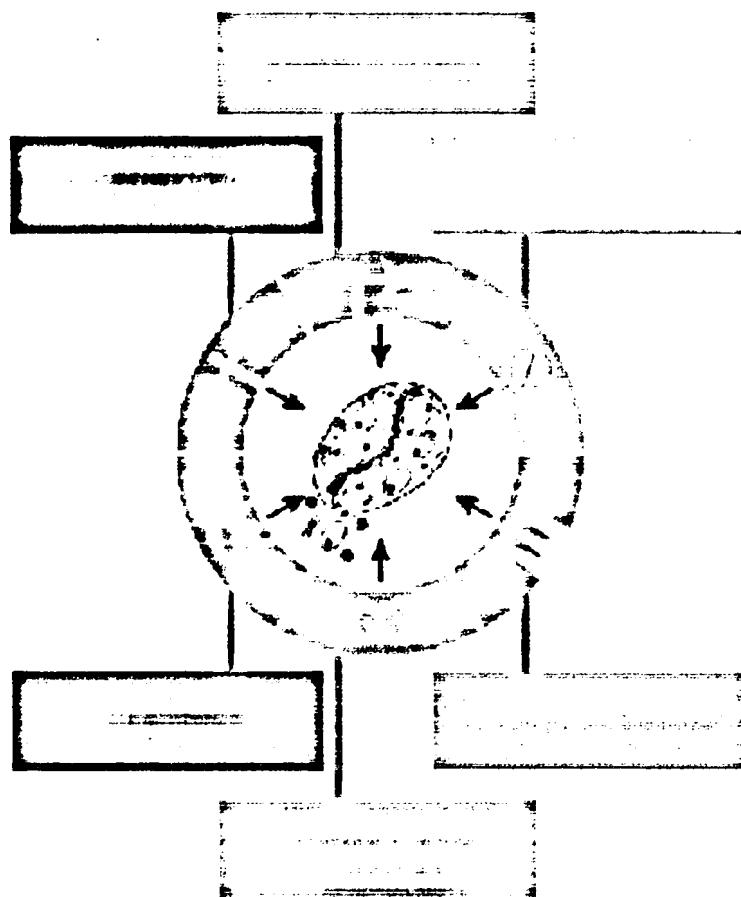


Рисунок 4. Основные свойства клетки, претерпевшей злокачественную трансформацию. (по (Hanahan and Weinberg, 2000)).

мишенью активирующих мутаций в ГК является ген передающей пролиферативный сигнал киназы N-ras (Adjei, 2001).

1.10.2.3. Уклонение от программы апоптоза.

Преодоление апоптоза необходимо для успешного развития опухоли.

Наиболее универсальным молекулярным изменением в различных новообразованиях человека является инактивация функции белка p53. Более чем в половине всех опухолей человека (50-60% новообразований более чем 50 различных типов) обнаружаются мутации гена p53, мутации этого гена обнаруживаются в трети случаев ГК.

Мутации обнаружаются в разных участках молекулы p53, но чаще всего в его эволюционно консервативном ДНК-связывающем домене. Действие гепатоканцерогена АТВ1 связывают с вызываемой им точечной мутацией в 249 кодоне гена p53, затрагивающей область, ответственную за специфическое ДНК-связывание. Интересно, что воздействие афлатоксина В1 является гепатоспецифическим (Buendia, 2000).

Предполагается, что 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.

Подавление p53-зависимого апоптоза резко увеличивает жизнеспособность опухолевых клеток при попадании их в кровоток, что ведет к значительному повышению вероятности возникновения из них метастазов.

a. p53 ингибирует активность некоторых ГЯФ (С/ЕВР, HNF4 α и HNF3).

p53 известен как ингибитор активности некоторых транскрипционных факторов (Chawla et al., 2000). Известно несколько механизмов ингибирования трансактивационного действия факторов. Один из этих механизмов состоит в связывании p53 с ДСД С/ЕВР, что приводит к невозможности связывания с ДНК. Таким способом ингибируется активность С/ЕВР и, как следствие, нарушается активация транскрипции гена СА.

Показано, что p53 влияет на HNF4 α 1, подавляя его активность *in vivo*. Это ингибирующее действие осуществляется не за счет связывания с ДНК-связывающим доменом HNF4 α 1, а за счет ингибирования функций ЛСД. Эндогенный p53 взаимодействует с ЛСД HNF4 α 1 (Nagao et al., 1995).

Как известно, печень-специфические факторы HNF4 α 1 и С/ЕВР α являются критичными для нормального функционирования печени и для процессов развития (Hayhurst et al., 2001; Lee et al., 1997). Таким образом, снижение активности этих

факторов при участии p53 может объяснить, почему гиперэкспрессия p53 кореллирует с утратой дифференцировки опухолей печени (Nagao et al., 1995; Itoh et al., 2000).

Высказано предположение, что p53 может репрессировать транскрипцию гена АФП, специфическим образом связываясь с ДНК и, таким образом, конкурируя с фактором HNF3 α . Факторы HNF3 α и p53 имеют общие сайты связывания в репрессорном районе гена АФП (Ogden et al., 2001), но нокаут гена p53 не влияет на экспрессию гена АФП, следовательно, такой механизм не является универсальным.

1.10.2.4. Неограниченный репликативный потенциал.

Репликативный потенциал клетки ограничен так называемым пределом Хайфлика. Даже трансформированные клетки, приобретая способность к неограниченному росту и автономность от ростовых сигналов, не могут создать опухоль значительной массы.

Однако, репликативный потенциал трансформированных клеток может стать практически неограниченным благодаря активности теломеразы. Такой же механизм обеспечивает способность к пролиферации эмбриональных тканей.

a. Теломеразный комплекс: структура и функциональная активность.

- *Теломеры и теломер-связывающие белки.*

На концах ДНК всех хромосом расположены характерные участки, представляющие собой повторяющиеся шестичленные нуклеотидные последовательности типа (TTAGGG) n . Общий размер этих последовательностей, названных теломерами, составляет 12-15 т.п.н. Теломерные последовательности обнаружены у дрожжей, простейших, грызунов и человека и весьма сходны по нуклеотидному составу. Обнаружены белки, непосредственно связанные с теломерами, защищающие их от различного рода воздействий.

Теломеры необходимы клетке для хромосомной сегрегации в течение мейоза и митоза (Greider and Blackburn, 1985).

- *Теломераза – ферментный комплекс для поддержания структуры теломер.*

Теломераза представляет собой комплекс из трех компонентов, кодируемых тремя различными генами: ген TR1 кодирует низкомолекулярную РНК (445 п.н.), выполняющую функцию затравки, которая связывается с теломерными повторами и необходима для ферментативного функционирования теломеразы (Greider and Blackburn, 1985, 1989); ген TERT кодирует каталитическую субъединицу этого фермента, обладающую РНК-зависимой ДНК-полимеразной (обратно-транскриптазной) активностью; ген TER1, функции которого остаются неясными. По-видимому, продукт этого гена способствует связыванию каталитической субъединицы с РНК-затравкой и теломерными повторами в ДНК.

Активность всего комплекса теломеразы в значительной степени определяется активностью TERT (Bodnar et al., 1998; Counter et al., 1998).

- *Теломераза и опухолевая прогрессия.*

Активность теломеразы не проявляется в подавляющем большинстве нормальных клеток человека за редким исключением. Так, она выявлена в стволовых клетках крови, в репродуктивных тканях, в некоторых популяциях нормальных кроветворных клеток (что можно объяснить присутствием в них стволовых клеток), а также в некоторых быстро обновляющихся тканях типа кишечного эпителия.

Следует подчеркнуть, что в тех случаях, когда теломеразная активность выявляется в нормальных клетках, ее уровень существенно ниже, чем в опухолевых. На пике заболевания лейкозом уровень теломеразной активности достаточно высок, при ремиссии существенно снижается, а затем перед обострением заболевания резко возрастает (Buchkovich and Greider, 1996).

Наличие теломеразной активности показано для различных типов опухолей (Kim et al., 1994). В 75% исследованных карцином ротовой полости (Kannan et al., 1997), 80% опухолей легких (Niyama et al., 1995), 84% опухолей простаты, 85% опухолей печени (Tahara et al., 1995), 93% раков молочной железы (Niyama et al., 1995), 95% колоректальных раков (Tahara et al., 1995). Таким образом, теломеразная активность характерна именно для злокачественных опухолей, в доброкачественных опухолях активность этого фермента не выявляется.

Клеточные линии, иммортилизированные либо спонтанно, либо после трансформации онкогенными вирусами (SV-40, HPV-16, 18), обычно теломеразопозитивны (Kim et al., 1994; Counter et al., 1998). Однако, надо заметить, что теломеразная активность не всегда детектируется в иммортилизованных клеточных линиях (Bryant et al., 1995).

Существует предположение, что нормальные клетки содержат ингибитор теломеразы, возможно на хромосоме 3 (Buchkovich and Greider, 1996), делеция в районе которого или его инактивация необходима для иммортилизации или опухолевой трансформации.

По-видимому, с большой долей вероятности можно говорить о теломеразе как об уникальном диагностическом маркере и, что особенно важно, как о маркере ранних стадий злокачественного опухолевого процесса. Хотя уже найдены и будут, вероятно, выявлены дополнительные исключения из этого правила, значение теломеразы как молекулярно-диагностического маркера вряд ли вызывает сомнение.

Очевидно также то, что теломераза является регулируемым белком и, по-видимому, активируется под воздействием различных факторов, в том числе, возможно, вирусных онкогенов или различных мутагенов.

Наиболее серьезные и прямые доказательства участия теломеразы в канцерогенезе были получены в последнее время, когда удалось трансформировать первичные эпителиальные и фибробластные клетки путем котрансфекции двух онкогенов (T-антителен вируса SV 40 или онкогенный вариант гена *Ha-ras*) и гена каталитической субъединицы теломеразы (hTERT). В отсутствие гена hTERT трансформации клеток не происходило.

1.10.2.5. Способность к ангиогенезу.

Растущей опухоли так же, как и нормальной ткани, необходимо поступление питательных веществ и кислорода. Ангиогенез (процесс образования сосудов) регулируют инициирующие (VEGF, FGF1/2) 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 (Yamane et al., 1994). 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, действие комплекса β-катенина с трансфакторами Tcf/LEF активирует синтез металлопротеиназ, разрушающих внеклеточный матрикс, из которого освобождается значительный запас ростовых факторов (Taipale et al., 1997).

1.10.2.6. Генетическая нестабильность.

Генетическая нестабильность является фактором, обеспечивающим для опухолевых клеток преимущества по сравнению с нормальными. Подавление индукции апоптоза повышает выживаемость клеток с повреждениями ДНК, но более эффективным является нарушение системы контроля клеточного цикла, предотвращающей пролиферацию клеток с поврежденным геном. В некоторых типах клеток TGF-β подавляет экспрессию с-myc (Moses et al., 1990). Дисфункция опухолевых супрессоров p53 и pRb иprotoонкогенов Myc и Ras приводит именно к таким последствиям (нарушение системы контроля клеточного цикла) (Копнин, 2000).

a. Семейство с-myc

- Особенности:

с-мус –proto-онкоген, кодирующий транскрипционный фактор, вовлеченный в контроль клеточной пролиферации и дифференцировки (Henriksson and Luscher, 1996).

- *Структура белка*

Продукт, кодируемый proto-онкогеном с-мус, является транскрипционным фактором. С-конец белка с-мус содержит домены, наличие которых характерно для транскрипционных факторов, - “лейциновая застежка” (bZIP), мотив «спираль-поворот-спираль» (HLH) и домен, обогащенный основными аминокислотными остатками. bZIP и HLH домены обеспечивают белок – белковые взаимодействия, тогда как «основной» регион участвует во взаимодействии с ДНК (Blackwell et al., 1990). На N-конце обнаружен транс-активационный домен (TAD). Как bHLHZip, так и TAD домены необходимы для транскрипционной активации, пролиферации и трансформации (Henriksson and Luscher, 1996).

Ген с-мус кодирует две формы белка с-мус1 (р67) и с-мус2 (р64), отличающихся друг от друга N-концевой последовательностью. Эти две формы экспрессируются во всех образцах, исследованных на предмет экспрессии с-мус.

При нормальных ростовых условиях синтез белков с-мус регулируется определенным образом. Показано, что форма с-мус2 синтезируется в растущих клетках, в то время как уровень с-мус1 при этом снижается. В высокодифференцированных клетках уровень с-мус2 оказывается намного выше уровня с-мус1 (Hann et al., 1992).

- *Способность к димеризации.*

с-мус действует как транскрипционный регулятор, являющийся частью сети взаимодействий множества факторов (Ayer et al., 1999). Белок с-мус не способен к образованию гомодимеров (Henriksson and Luscher, 1996). Постоянным партнером фактора с-мус по гетеродимеризации является Max, белок bHLHZip. Установлено, что Max является необходимым фактором для с-мус – зависимой транс-активации генов, трансформации, прогрессии клеточного цикла и апоптоза (Amati and Land, 1994).

- *Гены-мишени.*

Орнитин декарбоксилаза (ODC) – фермент, участвующий в биосинтезе полиаминов. Он необходим для входления и прохождения через клеточный цикл. ODC является классической транскрипционной мишенью для protoонкогена с-мус и отражает его транскрипционную активность (Bello-Fernandez et al., 1993). Белок ODC способен к кооперации с с-H-ras при клеточной трансформации (Hibshoosh et al., 1991).

Исследования Bacchetti и сотрудников показали, что промотор гена hTERT инактивирован в нормальных человеческих соматических клетках, но активируется в процессе иммортализации (Cong et al., 1999). Анализ последовательности промотора гена

hTERT показал, что в промоторе имеются сайты связывания для нескольких транскрипционных факторов, предполагается, что экспрессия гена hTERT является объектом многоуровневого контроля и регулируется разными факторами в различных клеточных контекстах (Wick et al., 1999).

c-myc непосредственно регулирует активность теломеразы посредством индукции экспрессии гена каталитической субъединицы теломеразы (TERT) (Lingner et al., 1997, Nakamura et al., 1997). TERT и c-myc экспрессируются в нормальных и трансформированных пролиферирующих клетках, уровень их экспрессии снижается в терминально дифференцированных клетках и может восстанавливаться при иммортализации (Bouchard et al., 1998, Bodnar et al., 1998, Counter et al., 1998).

c-myc – индуцированная активация экспрессии гена TERT происходит быстро и не зависит от пролиферативного статуса клетки и синтеза других белков. Это указывает на то, что TERT является прямой мишенью для c-myc (Wu et al., 1997).

1.10.2.7. 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 клеточного и матриксного окружения. CAM, молекулы межклеточной адгезии, белки щелевых контактов, коннексины, а также интегрины, рецепторы внеклеточного матрикса, являются самыми частыми мишениями для изменений при трансформации и прогрессии.

Мигрирующая клетка встречает новые для себя компоненты матрикса, поэтому изменение в спектре экспрессии интегринов позволяет ей более успешно передвигаться. Показано, что в низкодифференцированных ГК возобновляется синтез рецепторов к ламинину, что дает клеткам преимущества при миграции, инвазии и метастазировании (Volpes et al., 1993). Активация внеклеточных протеаз позволяет физически разрушить ограничивающий движение матрикс (Hanahan and Weinberg, 2000).

Взаимосвязь клеток в эпителиальном пласте во многом обеспечивают щелевые контакты, для гепатоцитов самым существенным белком таких контактов является коннексин 32 (Cx32). В ГК экспрессия гена Cx32 часто бывает утрачена (Krutovskikh et al., 1991).

E-кадхерин обеспечивает гомотипическую адгезию в эпителиальных тканях и одновременно передает сигналы, блокирующие рост, через путь β-катенин/Tcf/LEF.

В этой реактивации задействован β -катенин. В нормальной клетке этот белок участвует в межклеточных контактах в комплексе с Е-кадхерином, если β -катенин не задействован в контакте, то он попадает в цитоплазму и быстро убиквитинируется при помощи нескольких факторов, в том числе APC и аксина. Однако, в трансформированной клетке может активироваться сигнальный путь Wnt или происходить мутации генов APC и аксина, и тогда β -катенин стабилизируется, перемещается в ядро и в комплексе с факторами Tcf/LEF может активировать транскрипцию ряда генов, в том числе с-мус, циклина D1, матричных металлопротеаз и фибронектина. Клинические исследования показали, что ген β -катенина мутирован в 20-40% случаев ГК, благодаря чему его стабильность не регулируется APC и аксином (Buendia, 2000).

Функции Е-кадхерина нарушены в большинстве опухолей эпителиального происхождения (Hanahan and Weinberg, 2000).

a. Е-кадхерин

Е-кадхерин - представитель семейства трансмембранных гликопротеинов, один из ключевых кадхеринов, осуществляющий адгезионные межклеточные контакты типа «зона слипания» (*zona adhaerence*). Его внутриклеточный домен связывается с рядом белков, например, с β -катенином, который в свою очередь взаимодействует с актиновыми микрофиламентами. Нарушения экспрессии и клеточной локализации гена Е-кадхерина ассоциируется с дедифференцировкой, инвазиями и отдаленными метастазами при злокачественных заболеваниях человека, включая ГК (Bracke et al., 1996). Е-кадхерин критичен и для появления внутрипеченочных метастазов (Osada et al., 1996).

Показано, что прото-онкоген с-мус специфическим образом регулирует транскрипционную активность Е-кадхерина посредством связывания транскрипционного фактора AP-2 с промотором гена Е-кадхерина (Batsche et al., 1998).

б. Факторы семейства Snail.

Факторы этого семейства действуют как транскрипционные репрессоры. Гены семейства *Snail* кодируют белки, характерной особенностью которых является наличие структуры типа «цинковые пальцы» (цистеин/гистидин-обогащенные) для обеспечения связывания с ДНК (с последовательностью CAGGTG).

Представители этого семейства очень консервативны у человека, других позвоночных и беспозвоночных.

Семейство *Snail* можно разделить на две группы родственных, но независимых друг от друга факторов: *Snail* и *Scratch*. Продемонстрирована консервативность функций генов этих групп в процессе формирования мезодермы.

В индукцию генов этого семейства при ЕМТ (эпителиально-мезенхимальный переход) вовлечены различные сигнальные каскады (TGF- β , BMP, FGF и Wnt) (Nieto, 2002).

В (*Sna*-/-) эмбрионах происходит как формирование мезодермы, так и регистрируется индукция генов – маркеров мезодермы, но такая мезодерма морфологически ненормальна (Carver et al., 2001).

Транскрипционный регулятор *Snail* в эпителиальных клетках индуцирует эпителиально-мезенхимальный переход (Hemavathy et al., 2000). Процессы ЕМТ происходят при малигнизации опухолей эпителиального происхождения. *Snail* описан как репрессор E-кадхерина (Giroldi et al., 1997).

Показана четкая корреляция между экспрессией гена *Snail* и геном E-кадхерина при изучении панели, состоящей из множества ГК мышей различного происхождения (Battile et al., 2000, Cano et al., 2000, Yokoyama et al., 2001). Такая корреляция обнаружена и для ГК человека. Экспрессия гена *Snail* обратно коррелирует с экспрессией E-кадхерина в клетках ГК *in vitro* также четко, как и *in vivo* (Kitajima et al., 2002).

1.10.2.8. Снижение уровня дифференцировки.

Утрата тканевой специфичности является характерным признаком карцином. У опухолей больше сходства между собой, чем с нормальными тканями, из которых они возникли. Это представление имеет множество исключений.

Однако при анализе серии перевиваемых и первичных ГК мышей полной утраты ткане-специфических антигенов никогда не наблюдалось и сохранялись признаки исходной ткани (Khramkova et al., 1963; Abelev, 1965; Куприна и др., 1965).

Набор ткане-специфических антигенов может либо полностью сохраняться в высокодифференцированных гепатомах, либо утрачивается в низкодифференцированных опухолях. Более того, в значительном проценте (70-80% случаев) низко- и умеренно-дифференцированных ГК наблюдалось возобновление экспрессии АФП. Таким образом, АФП является важным маркером для дифференциальной диагностики опухолей (Abelev et al., 1963; Abelev, 1993).

АФП – основной компонент эмбриональной сыворотки крови млекопитающих, который синтезируется висцеральной энтодермой желточного мешка (на 6-7 д.р. у мышей) и клетками эмбриональной печени, являясь на этой стадии доминирующим сывороточным белком. В конце эмбрионального развития происходит резкое падение уровня АФП в крови, а вскоре после рождения концентрация АФП в сыворотке снижается в 10^4 раз (Tilghman and Belayew, 1982). Повышение уровня АФП выявляется во взрослой печени при регенерации (Abelev et al., 1963), в тератобластомах (Abelev et al., 1993).

Таким образом, гепатокарциномы обладают двумя особенностями: снижением проявлений дифференцировки по мере развития опухоли и сохранением способности к дифференцировке даже при внешней утрате ее признаков (Абелев, 2000). Это открывает перспективы повышения эффективности терапии опухолей, связанные с реверсией злокачественного фенотипа.

1.11. ГЯФ при канцерогенезе.

Канцерогенез - многоступенчатый процесс накопления мутаций и других генетических изменений, приводящих к нарушениям регуляции клеточного цикла, апоптоза, морфогенетических реакций и дифференцировки клеток. Только совокупность таких изменений может обеспечить развитие злокачественного новообразования. Было бы логично предположить, что потеря дифференцировки ГК, по крайней мере частично, может быть связана со злокачественной трансформацией нормального гепатоцита.

К сожалению, сведений о роли ГЯФ в канцерогенезе пока очень мало. Большинство сведений получено в опытах на культурах клеток. Известно, что при злокачественной трансформации гепатоцитов спектр экспрессии ГЯФ меняется.

- Показано, что в большинстве ГК (60-78%) подавлена активность C/EBP α (Hayashi et al., 1999; Xu et al., 2001).
- Исследования подтверждают факт сдвига баланса между HNF1 и vHNF1 в ГК в пользу vHNF1 в значительном числе случаев ГК (Ninomiya et al., 1996; Wang et al., 1998), то есть воспроизводится ситуация характерная для эмбриональной печени.
- Существует много данных о том, что экспрессия HNF4 α и HNF1 подавлена в клеточных линиях низкодифференцированных гепатом (Baumhueter et al., 1988; Cereghini et al., 1988; Herbst et al., 1991; Tian et al., 1991; Spath and Weiss, 1997).
- В дедифференцированной гепатомной клеточной линии H5 и межклеточных гибридах утрата гепатоцитарного фенотипа сопровождается значительным снижением уровня экспрессии HNF4 α и HNF1. Способность транскрипционного фактора HNF4 α к прямой активации дифференцировочных процессов в дедифференцированных клетах крысиной гепатомы была исследована с помощью стабильной трансфекции кДНК HNF4 α в линию клеток крысиной гепатомы H5. Оказалось, что экспрессия экзогенного HNF4 α в дедифференцированной клеточной линии H5 активирует “молчавший” ранее ген HNF1. Кроме того, экспрессия HNF4 α в клеточной линии H5 активирует транскрипцию генов α_1 -АТ, α -ФБ, которые характерны для гепатоцитов и для

хорошо дифференцированных клеток H4II, из которой был выделен дедифференцированный вариант H5 (Chaya et al., 1997).

- Происходит подавление активности HNF1 и HNF4 α (в 80% случаев) у пациентов с опухолями почек, что свидетельствует о том, что потеря этих факторов – важный шаг в малигнизации (Sel et al., 1996; Anastasiadis et al., 1999).

Полученные данные указывают на то, что ГЯФ играют существенную роль в канцерогенезе.

1.12. Заключение.

Действие представителей пяти семейств гепатоцитарных ядерных факторов: HNF1, C/EBP, HNF3, HNF4 и HNF6, образующих сложную сеть взаимодействий, приводит к образованию и поддержанию фенотипа гепатоцитов и печени в целом. Имеющиеся к настоящему времени данные по взаимосвязи различных групп ГЯФ суммированы в данном обзоре. Решающее значение для тонкой регуляции уровней экспрессии огромного количества генов печени на разных стадиях развития имеет, по-видимому, как наличие определенного набора гепатоцитарных и универсальных факторов транскрипции, так и соотношение их концентраций.

К сожалению, пока немного известно о взаимодействии ГЯФ с нетканеспецифическими регуляторными путями, обеспечивающими контроль клеточной пролиферации и дифференцировки. Представляется, что ключевую роль в интеграции общих и тканеспецифических путей передачи сигнала может играть HNF4 α , который не только контролирует печень-специфическую экспрессию генов, но и определяет эпителиальный морфогенез, возможно, через активацию E-кадхерина (Spath and Weiss, 1998).

Остаются невыясненными многие фундаментальные вопросы. Процесс антигенного упрощения в ГК описан достаточно полно, в то время как молекулярные механизмы, лежащие в его основе, изучены гораздо хуже, так же как и механизмы, обеспечивающие способность карцином к ре-дифференцировке. Между тем, такие исследования важны как в фундаментальном, так и в прикладном аспектах. Повышение уровня дифференцировки в карциномах (ГК) может увеличить чувствительность опухоли к терапии.

Настоящая работа посвящена исследованию молекулярных механизмов, определяющих снижение дифференцировки при прогрессии гепатоцеллюлярных карцином.

В НИИ Канцерогенеза РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН была получена система перевиваемых ГК мыши общего происхождения (медленнорастущая высокодифференцированная ГК и быстрорастущая низкодифференцированная ГК), отличающихся целым рядом ключевых биологических свойств. Это позволило приступить к поиску генов и регуляторных путей, определяющих прогрессию ГК.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Список использованных растворов и сред.

TE буфер: 10 мМ трис-HCl, pH 8.0, 1 мМ ЭДТА ("Sigma");

1ХТВЕ, трис-боратный буфер: 90 мМ трис-борат, 90 мМ борная кислота.

1Х PBS, забуференный физиологический раствор: 1.37 М NaCl, 270 мМ KCl, 130 мМ Na₂HPO₄, 150 мМ KH₂PO₄.

Среда LB: 20 г среды на 1 л H₂O ("Gibco").

Агар LB: 32 г агара на 1 л H₂O ("Gibco").

Раствор №1 для выделения плазмид: 50 мМ глюкозы, 25 мМ трис-HCl, pH 8.0, 10 мМ ЭДТА.

Раствор №2 для выделения плазмид: 200 мМ NaOH, 1% SDS.

Раствор №3 для выделения плазмид: ацетат калия (3М K⁺, 5 М ацетат), pH 4.5.

Набор для очистки плазмид ("Plasmid Maxi Kit", "Qiagen").

Буферы для рестрикции ("Amersham").

Ферменты рестрикции ("Amersham"; "Fermentas", Латвия).

Дезоксирибонуклеаза, очищенная от рибонуклеаз, ("Boehringer Mannheim").

Ингибитор рибонуклеаз ("Amersham").

Буффер для дезоксирибонуклеазы (X10): 400 мМ Трис-HCl pH 7.9, 100 мМ NaCl, 60 мМ MgCl₂, 1 мМ CaCl₂.

Стоковый раствор акриламида (40%): 38% ариламида, 2% бис-акриламид ("Sigma").

Акриламидный гель: стоковый раствор акриламида до 5%, персульфат аммония 10% ("Sigma"), на 0.5ХТВЕ, 0.1% TEMED ("Хеликон") непосредственно перед заливкой.

5Х краска для нанесения ДНК на гель: 30% глицерин, 1 мМ ЭДТА, 0.25% бромфеноловый синий, 0.25% ксилен-цианол в H₂O.

Раствор ГТЦ для выделения РНК: 4 М гуанидин-тиоцианат ("Sigma"), 25 мМ цитрат натрия, pH 7.0, 0.5% лаурилсарказил ("Sigma"), 5 мМ β-меркалтоэтанол ("Serva").

5Х краска для нанесения РНК на гель: 1 мМ ЭДТА, 0.25% бромфеноловый синий, 0.25% ксилен-цианол, 50% глицерин ("Sigma") в H₂O.

РНК-носитель: дрожжевая t-RНК ("BRL").

TRAP-буфер: 10 мМ Трис HCl pH 7.5, 1 мМ MgCl₂, 1 мМ EGTA, 0.1 мМ PMSF, 5 мМ β-меркалтоэтанола, 0.5 мМ CHAPS, 10% глицерина.

5Х буфер для нанесения в неденатурирующий гель: 30% фикол, 0.25% бромфеноловый синий, 0.25% ксилен-цианол, 0.2 М ЭДТА pH 8.0, на 10Х ТВЕ

Проявляющий раствор: 0.5 мг/мл 3,3'-диаминбензидин-тетрахлорида (ДАБ) ("Sigma"), 0.03% H₂O₂ на 1X PBS, готовили непосредственно перед употреблением.

2.2. Линии перевиваемых гепатокарцином.

Первичные ГК были индуцированы у гибридов F1 линий C57Bl и DBA по стандартной методике химического гепатоканцерогенеза: однократной инъекцией диэтилнитрозамина (90 мг/кг веса внутрибрюшинно) (инициация) с последующей промоцией фенобарбиталом (0.5 % в питьевой воде в течение 14 месяцев).

Полученные опухоли перевивали подкожно суспензией опухолевой ткани в ростовой среде.

Образцы опухолей, размером приблизительно 30 мг, вырезали у свежезабитых мышей и замораживали в жидкому азоту, параллельно замораживали образцы для гистологического и иммунохимического анализа. До выделения РНК образцы хранили при температуре -70°C или в жидкому азоте.

2.3. Клеточные линии.

Культура клеток быстрорастущей низкодифференцированной ГК, Н33, была получена и любезно предоставлена Е.И. Кудрявцевой (Энгельгардт и др., 2000). Трансфицированная вектором pLEN4S-HNF4 культура Н33-H4 была получена, клонирована и любезно предоставлена Н.Л. Лазаревич (Варга и др., 2001). Клоны, трансфицированные вектором pCMV-HNF4-Flag, были также получены и любезно предоставлены Н.Л.Лазаревич. Все клеточные линии культивировали в среде DMEM с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки глютамина (300 мкг/мл) и антибиотика ципрофлоксацина (10 мкг/мл) в атмосфере 5% CO₂ при температуре 37°C. Приблизительно раз в 7 дней клетки обрабатывали трипсином и пересевали.

2.4. Бактериальные штаммы и плазмидные векторы.

Экспрессирующий вектор pLEN4S-HNF4, содержащий кДНК гена HNF4α под контролем металлотионеинового промотора, был любезно предоставлен проф. J.E.Darnell, Jr.

Экспрессирующий вектор pCMV-HNF4-Flag, в котором под контролем промотора цитомегаловируса находится кДНК HNF4α1, несущая на С-конце пептидную метку FLAG (такая метка не влияет на биологические свойства HNF4α1), был любезно предоставлен проф. S.A.Duncan (Stoffel et al., 1997).

Для получения клонов, несущих селективный маркер, использовали:

для первой трансфекции – ретровирусный вектор pBabePuro, несущий ген устойчивости к пуромицину, любезно предоставленный Др. П.М.Чумаковым;
для второй трансфекции – вектор pCB6-neo, содержащий ген устойчивости к неомицину, любезно предоставленный Др. S. Cereghini.

Для наращивания плазмид использовали штамм *E.coli* XL1-Blue, устойчивый к тетрациклину.

2.5. Трансформация клеток *E. Coli*.

В работе использовались замороженные компетентные клетки *E.coli*, приготовленные по методике Симаниса с использованием CaCl₂ и RbCl (Sambrook et al., 1989). Клетки размораживали на льду, добавляли к ним 20-50 нг плазмидной ДНК и оставляли на льду на 40 минут. Затем клетки подвергали тепловому шоку при 42°C 90 секунд и быстро охлаждали на льду. Добавляли 4 объема среды LB и инкубировали клетки при 37°C в течение одного часа. Затем клетки высаживали на чашки Петри с LB агаром, содержащим соответствующий антибиотик, и инкубировали в течение ночи при 37°C. Бактериальные клоны отбирали и тестировали на наличие плазмиды методом рестрикционного анализа.

2.6. Выделение нуклеиновых кислот.

2.6.1. Выделение препаративных количеств плазмидной ДНК.

Для получения препаративных количеств плазмидной ДНК клетки *E.Coli*, трансформированные соответствующими плазмидами, выращивали из отдельной колонии в 250 мл среды LB с добавлением ампицилина и тетрациклина (до концентрации 50 и 12.5 мкг/мл соответственно) в течение ночи при интенсивном встряхивании и 37°C. Затем бактерии осаждали центрифугированием при 4000 об/мин, 15 мин, 4°C. Клеточный осадок ресуспендировали в 6 мл раствора для выделения плазмид №1, инкубировали при 4°C 20 мин. Затем осторожно добавляли 12 мл раствора №2 и инкубировали при 4°C 10 мин, после чего вносили 7.5 мл раствора №3 и инкубировали на льду 20 мин. Лизат центрифугировали в течение 40 мин при 15000 об/мин, 4°C на центрифуге K-24. Супернатант, содержащий плазмидную ДНК очищали с помощью колонок из набора для очистки плазмид ("Plasmid Maxi Kit", "Qiagen") в соответствии с рекомендациями фирмы-изготовителя.

2.6.2. Выделение суммарной клеточной РНК с помощью гуанидин-тиоцианата.

Для выделения РНК из ГК замороженные образцы тканей измельчали в парах жидкого азота предварительно охлажденным гомогенизатором Поттера. Затем к

полученному порошку прибавляли 1.5 мл раствора ГТЦ, тщательно перемешивали и переносили в три 1.5 мл пробирки Эппendorф.

При выделении РНК из культур 10^6 клеток лизировали в 0.5 мл раствора ГТЦ для выделения РНК и переносили в 1.5 мл пробирку Эппendorф.

К 0.5 мл лизата клеток в ГТЦ добавляли 30 мкл 3.3 М ацетата натрия (рН 5.0), 0.5 мл насыщенного водой фенола и 0.1 мл хлороформа. Смесь встряхивали после внесения каждого раствора. Конечную смесь энергично встряхивали в течение 10 секунд и инкубировали на льду 15 минут. После центрифугирования при температуре 4^0C 20 минут, 14 тыс.об/мин водную фракцию переносили в чистую пробирку, добавляли 0.5 мл изопропанола и инкубировали смесь при -20^0C 1 час для преципитации РНК. После центрифугирования при 14 тыс. об/мин 20 минут осадок РНК перерастворяли в 0.15 мл раствора ГТЦ, после добавления 0.15 мл изопропанола смесь выдерживали 1 час при -20^0C . После центрифугирования осадок РНК тщательно промывали 70% этианолом. Выделенную РНК хранили в 70% этианоле при температуре -20^0C , перед использованием РНК осаждали и растворяли в 50 мл H_2O . Концентрацию РНК определяли по оптической плотности раствора, измеренной на спектрофотометре фирмы "LKB" при длине волн 260 нм. Качество очистки РНК контролировали измерением оптической плотности при длинах волн 230 нм и 280 нм и визуальной оценкой в агарозном геле.

Эксперименты повторяли с РНК, выделенной из нескольких образцов одной и той же ГК, полученных от разных мышей. В случае культур клеток также использовали несколько независимых выделений РНК.

2.7. Электрофорез нуклеиновых кислот в неденатурирующих агарозных гелях.

Электрофорез РНК и нерадиоактивных продуктов ОТ-ПЦР проводили на горизонтальных пластинах 1.0% агарозного геля, приготовленного на буфере для электрофореза РНК с добавлением бромистого этидия. Осадок РНК растворяли в воде, добавляли 1/4 объема краски для нанесения на форез. Электрофорез РНК проводили в течение 3-5 минут в поле с напряженностью 2-5 В/см.

2.8. Метод "Обратная Транскрипция – Полимеразная Цепная Реакция" (ОТ-ПЦР)

2.8.1. Поиск и синтез праймеров

Для поиска праймеров использовали последовательности из генного банка NCBI:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi>

Подбор праймеров проводили при помощи программы Primer3:

Steve Rozen, Helen J. Skaletsky (1998) Primer3. http://www-genome.wi.mit.edu/genome_software/other/primer3.html.

Синтез праймеров осуществляла фирма «Синтол», Москва.

2.8.2. Очистка препаратов от тотальной клеточной РНК от следов ДНК

На 10 мкг тотальной РНК брали: 10 ед. дезоксирибонуклеазы без рибонуклеаз ("Boehringer Mannheim") в соответствующем буфере с добавлением 1 mM дитиотритола ("Sigma") и 2-3 ед. ингибитора рибонуклеаз ("Amersham"). Реакцию проводили при 37⁰C в течение 30 мин, после этого депротеинизировали при помощи кислого фенола и хлороформа и переосаждали с добавлением 1 M ацетата аммония и трехкратного объема спирта. Количество РНК повторно измеряли.

2.8.3. Обратная транскрипция (OT).

10 мкг РНК смешивали с 0.1 мкг случайных гексамерных олигонуклеотидов ("Boehringer Mannheim"), денатурировали при 65⁰C и охлаждали на льду. В OT-смесь входили: 2 ед. обратной транскриптазы MMLV ("Promega"), соответствующий буфер, 2 mM дитиотритола, 0.5 ед. ингибитора рибонуклеаз и смесь дезоксинуклотид-трифосфатов, по 0.5 mM каждого. Для контроля использовали смесь, не содержащую MMLV. Реакцию проводили при 42⁰ С в течение 30 мин, затем останавливали реакцию инактивацией ревертазы при 94⁰C в течение 5 минут, добавляли 80 мкл H₂O и использовали аликвоты для проведения ПЦР со специфическими праймерами.

2.8.4. Использованные праймеры и размеры продуктов ПЦР

В работе использовали праймеры, последовательности которых и размеры получаемых продуктов приведены ниже (указаны в порядке: смысловой, антисмысловой в направлении 5'-3').

HPRT - agcgcaagttaatctgc, agcgacaatctaccagag (по (Duncan et al., 1997)), размер продукта 219 п.н.;

β-actin – atggatgacgatatcgctg, atttcatgaggtagtctgtcagg, (по (Spagnoli et al., 2000)), размер продукта 574 п.н.;

vHNF1 – gaaagcaacggagatcctccgac, cttccactaaggcctccctctttcc (по (Duncan et al., 1998)), размер продукта 279 п.н.;

HNF1 - ttctaagctgagccagctcagacg, gctgagggtctccggctttcaga (по (Duncan et al., 1997)), размер продукта 274 п.н.;

C/EBPα - agccgagataagccaaaca, aaaccatcctctgggtctcc, размер продукта 243 п.н.;

C/EBPβ - cgccccgcgaccacgact, gaggcggcggcgggaagc (по (Li et al., 2000)), размер продукта 240 п.н.;

HNF3 α – gcctactcctctgtccctgtca, atgccagccacagcacccgggactc (по (Duncan et al., 1997)), размер продукта 183 п.н.;

HNF3 β – actggaggcagctactacg, cccacataggatgacatg (по (Duncan et al., 1997)), размер продукта 169 п.н.;

HNF3 γ – tcaagctggaggagaaggcaaaga, ctgggctcagatggcgtagg (по (Duncan et al., 1997)). размер продукта 149 п.н.;

HNF4 α - cttccttcttcatgccag, acacgtccccatctgaag (по (Duncan et al., 1997)), размер продукта 271 п.н.;

HNF4 α 1 – cagcgctgccctggacccagcctacacc, ggggaacgtcggcagtgtgcgagct (по (Duncan et al., 1997)), размер продукта 200 п.н.;

HNF4 α 7 – ccggtgccccccttgctgtg, cgcccaggctgtggatgaattgaggtt, размер продукта 175 п.н.;

HNF6 – aactcccaaggacttccccact, ccatctgccctgaattacttccattgc (по (Li et al., 2000)), размер продукта 295 п.н.;

ТФН - tggcacaggaacactttg, tcctgctgattccgaatg (по (Duncan et al., 1997)), размер продукта 179 п.н.;

TPP - ctcaccacagatgagaag, ggctgagtcctcaattc (по (Duncan et al., 1997)), размер продукта 227 п.н.;

GATA4 – ctaagctgtccccacaaggctatgca, cagagctccacctggaaagggtttg (по (Li et al., 2000)), размер продукта 326 п.н.;

GATA6 – atggcgtagaaaatgctgagg, tgaggtggtcgcgttgttag; размер продукта 256 п.н.;

CA – cttaaaccgatggcgatctcaact, ccccactagcctctggcaaaat, размер продукта 240п.н.;

АФП – tcgtattccaccaggagg, aggctttgcttcaccag, размер продукта 180 п.н.;

FTF – cagaagaaagccctattcg, cccgatttaggaaagtgcacca; размер продукта 256 п.н.;

COUP-TFI – aaactgccgcctcaagaag, atcgagaacatctgcgagct (по (Li et al., 2000)), размер продукта 250 п.н.;

COUP-TFII – cccgcccagcacgccggccca, tacagctccgtctcatgccc (по (Li et al., 2000)), размер продукта 307 п.н.;

Е-кадхерин – tcccagtccctcacgcaaga, gagcgcacatggcatgtct, размер продукта 245 п.н.;

β -катенин – gggagacaggctggctgaaa, gtctgcacatggctggctgaga, размер продукта 342 п.н.;

Snail – gtctgcacgacactgtggaaa, gacttctggtgcttgagg (по (Snagnoli et al., 2000)), размер продукта 230 п.н.;

c-myc – caaatcctgtacctgtc, tagttgtgctggtagtg, размер продукта 309 п.н.;

mTERT – caatatgtcagatctctcag, tcaagctggaggagaaggcaaaga, размер продукта 440 п.н.;

ODC – gccattggacaggattga, tccaagagaagcctgttgt, размер продукта 302 п.н.;

Рабочие растворы содержали смысловой и анти-смысловой праймеры к в концентрации 10 мкг/мл каждый.

Для проведения ОТ-ПЦР использовали прибор фирмы «ДНК-технология».

2.8.5. Полимеразная цепная реакция (ПЦР)

а. Состав реакционной смеси для полимеразной цепной реакции с использованием меченного нуклеотида дезоксиаденозин-5'(α - 32 P) трифосфата:

1/10 – 1/20 объема реакции обратной транскрипции,

1 мкл рабочего раствора праймеров,

0.5 мкл смеси dNTP, по 5 мМ каждого,

2.5 мкл 10X Tag-буфер с MgCl₂,

2.5 ед. Tag-полимеразы (Биомастер, 10000 ед/мл),

0.05 – 0.1 мКю/мкл дезоксиаденозин-5'(α - 32 P) трифосфата (Обнинск),

H₂O до конечного объема 25 мкл.

На поверхность реакционной смеси насылаивали 25 мкл минерального масла, чтобы предотвратить испарение смеси в ходе ОТ-ПЦР.

б. Состав реакционной смеси для полимеразной цепной реакции без использования P³²:

1 мкл рабочего раствора праймеров,

2.5 ед. Tag-полимеразы (Биомастер, 10000 ед/мкл),

2.5 мкл 10X Tag-буфер без MgCl₂ (Биомастер),

2.5 мМ MgCl₂,

250 мкг/мкл каждого dNTP,

5 мкл смеси после ОТ,

H₂O до конечного объема 25 мкл.

На поверхность реакционной смеси насылаивали 25 мкл минерального масла, чтобы предотвратить испарение смеси в ходе ОТ-ПЦР.

Выравнивание количества взятой в ОТ-ПЦР РНК производили по проводимому ОТ-ПЦР анализу со специфическими праймерами к HPRT и β -актину.

В работе были использованы следующие оптимальные температурные параметры:

Для HPRT, vHNF1, HNF1, HNF3 α , HNF3 β , HNF6, TTP, ТФН, GATA4, GATA6, COUP-TFI, Е-кадхерина и β -актина :

1. 94⁰ C - 3 мин. – первичная полная денатурация.

2. 28 циклов: 94⁰ C - 50 сек – денатурация;

65⁰C - 1 мин – отжиг праймеров;

72⁰ C - 1 мин – элонгация;

3. 72^0C - 10 мин – полное достраивание продукта;

4. $6-8^0\text{C}$ – хранение.

Для HNF4 α , HNF4 $\alpha 1$ и HNF4 $\alpha 7$:

аналогичные условия, число циклов – 30.

Для β -катенина, АФП, СА, Snail:

аналогичные условия, число циклов – 25.

Для HNF3 α и COUP-TFII:

температура отжига праймеров – 69^0C , число циклов – 28.

Для С/ЕВР α , С/ЕВР β и FTF:

температура отжига праймеров – 60^0C , число циклов – 28.

Для с-мус:

температура отжига праймеров – 59^0C , число циклов – 30.

Для mTERT:

температура отжига праймеров – 51^0C , число циклов – 35.

Для ODC:

температура отжига праймеров – 63^0C , число циклов – 25.

2.8.6. Электрофорез продуктов ОТ-ПЦР в акриламидных гелях.

Радиоактивно меченные продукты ОТ-ПЦР разделяли в вертикальных пластинах неденатурирующего акриламидного геля. Перед нанесением в гель к раствору ДНК добавляли 1/5 объема краски для нанесения. Разделение проводили в течение 40-50 минут в поле с напряженностью 5-6 В/см. По окончании электрофореза гели высушивали на листе ватмана при 80^0C при помощи вакуумной сушилки для гелей (“Hoefer”) и охлаждаемой конденсационной ловушки (“Savant”).

Нерадиоактивные продукты ОТ-ПЦР разделяли в 2% неденатурирующем агарозном геле (см. п.2.7).

2.8.7. Контроль результатов экспериментов.

Все эксперименты повторяли не менее трех раз с РНК из разных выделений. ОТ-ПЦР анализ считали успешным, если выявлялась одна полоса ожидаемого размера и если специфичность экспрессии подтверждалась в реакции с РНК из нормальной печени. О размере продукта ОТ-ПЦР судили по сопоставлению с подвижностью маркерных фрагментов ДНК известного размера (“Fermentas”).

2.9. Метод TRAP (Telomerase Repeating Amplification Protocol).

2.9.1. Получение TRAP-экстрактов

Для получения TRAP-экстрактов из ГК замороженные образцы тканей измельчали на жидком азоте предварительно охлажденным гомогенизатором Поттера. Затем к полученному порошку прибавляли 2 мл раствора 1XPBS, тщательно перемешивали, центрифугировали в течение 1-2 минуты 10 тыс. об/мин при 4⁰C, процедуру повторяли 2 раза. К осадку добавляли TRAP-буфер из расчета 20 мкл на 30 мг образца и тщательно ре-суспенсировали.

При выделении из культур 10⁶ клеток промывали в 2 мл раствора 1XPBS, центрифугировали 1-2 минуты на 10 тыс.об/мин при 4⁰C (2 раза). К осадку прибавляли 20 мкл TRAP-буфера и тщательно ре-суспенсировали.

Полученный экстракт инкубировали 30 минут на льду и подвергали центрифугированию 25-30 минут на 14 тыс.об/мин при температуре 4⁰C. Супернатант переносили в новую пробирку фирмы Эппendorф. Хранили образцы при температуре -70⁰C.

Образцы размораживали строго на льду, центрифугировали 10 минут на 14 тыс. об/мин при 4⁰C. Концентрацию TRAP-экстракта определяли, используя метод Лоури для определения концентрации белка, измеренной на спектрофотометре фирмы "LKB" при длине волны 260 нм.

2.9.2. TRAP-реакция.

Состав реакционной смеси для TRAP-реакции:

1/3 объема TRAP-экстракта,

1.5 мкл праймера ТС,

3 мкл смеси dNTP, по 250 мМ каждого,

3 мкл 5X Tag-буфер с MgCl₂,

5 ед. Tag-полимеразы (Биомастер, 10000 ед/мл),

0.05-0.1 мКю/мкл дезоксиаденозина-5'(α -³²P) трифосфата (Обнинск),

H₂O до конечного объема 15 мкл.

Праймер АСХ (0.7 мкл/реакцию) добавляли отдельно после первой стадии реакции

Праймеры, использованные в работе:

ТС – aatccgtcgagcaggtt,

АСХ – gcgcggttacccttacccttaccctaacc, (Kim and Wu, 1997).

На поверхность реакционной смеси насылаивали 20 мкл минерального масла, чтобы предотвратить испарение смеси в ходе реакции, возникающее вследствие перепада температур.

В работе были использованы следующие оптимальные температурные параметры:

1. 30^0C - 10 мин., ледяная баня, затем добавляли праймер АСХ (0.7 мкл/реакцию)
2. 20 циклов: 94^0C - 30 сек – денатурация;
 60^0C - 30 сек – отжиг праймеров;
3. $4-8^0\text{C}$ – хранение.

Для получения инактивированного контроля перед запуском программы соответствующий образец нагревали при температуре 75^0C в течение 10 минут.

2.9.3. Электрофорез продуктов TRAP-реакции в акриламидных гелях.

Радиоактивно меченные продукты TRAP-реакции разделяли в вертикальных пластинах 12% неденатурирующих акриламидных гелей. Перед нанесением в гель к раствору образца добавляли 1/5 объема краски для нанесения. Разделение проводили в течение 40-50 мин в поле с напряженностью 8 В/см. По окончании электрофореза гели фиксировали в 0.1 Н растворе NaOH и высушивали на стекле при 120^0C .

2.9.4. Контроль результатов экспериментов.

Все эксперименты повторяли не менее трех раз с TRAP-экстрактами разных выделений.

2.10. Авторадиография.

Высушенные акриламидные гели с радиоактивными продуктами TRAP-реакции экспонировали с рентгеновской пленкой “X-ray RETINA” (“Fotochemische Werke”) в течение 1-3 часов при комнатной температуре (в зависимости от силы сигнала).

Высушенные акриламидные гели с радиоактивными продуктами ОТ-ПЦР экспонировали с рентгеновской пленкой “X-ray RETINA” в кассете с усиливающим экраном при -70^0C в течение 0.5 – 8 часов (в зависимости от силы сигнала). Далее пленку обрабатывали согласно инструкции фирмы-изготовителя.

2.11. Иммунохимическое выявление белков.

Для выявления в препаратах белка ZO-1, ассоциированного с клеточными контактами, использовали иммунопероксидазный метод окраски *in situ* с применением ДАБ-комплекса. Клетки, растущие на чашке Петри, фиксировали метанолом при -20^0C в течение 20 минут, затем отмывали PBS в течение ночи при температуре 4^0C .

Для выявления ZO-1 использовали:

- 1) антитела к ZO-1 ("Chemicon") (далее антитела I) в разведении 1:200.
- 2) ослиные моноклональные антитела к гамма-глобулину кролика, конъюгированные с пероксидазой хрена "CalBiochem" (далее - антитела II) в разведении 1:200.

Процедура определения

- 1) препараты обрабатывали антителами I в течение 30 минут, затем дважды отмывали PBS в течение 10 минут;
- 2) инкубировали с антителами II в течение 30 минут, затем дважды отмывали PBS в течение 10 минут. Для контроля окрашивания использовали препараты, обработанные только антителами II.
- 3) инкубировали в проявляющем растворе до появления характерного окрашивания;
- 4) окрашенные препараты отмывали от проявляющего раствора, заключали в глицерин и хранили в темноте при комнатной температуре.

2.12. Сканирование и компьютерная обработка результатов.

Для обработки результатов использовали сканер ScanMaker X6 "Microtek" и программное обеспечение ScanSuite ScanWizard ("Microtek") и Adobe Photoshop 6.0.

3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

3.1. Описание исследуемой модели гепатокарцином мышей.

Настоящая работа проведена на коллекции перевиваемых гепатоцеллюлярных карцином мышей, полученной в лаборатории Канцерогенных веществ НИИ Канцерогенеза РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН О.В. Морозовой. Первичные гепатокарциномы были индуцированы у мышей F1(C57B1/DBA) по протоколу инициация (дипэтилнитрозамин) – промоция (фенобарбитал). Гепатомы (**мвГК** и **бнГК**) перевивали мышам F1(C57B1/DBA) подкожно супензией опухолевой ткани в культуральной среде. Медленнорастущие ГК (**мвГК**) перевивали с интервалами между пассажами 5-7 месяцев, быстрорастущие гепатокарциномы (**бнГК**) - с интервалом между пассажами 2 недели.

На третьем пассаже из медленнорастущей дифференцированной гепатокарциномы (**мГК**) у одного из животных возникла быстрорастущая дедифференцированная линия **бГК** (Энгельгардт и др., 2000) (Рисунок 5).

мГК – высокодифференцированная, частично трабекулярная, частично солидная опухоль, состоит из крупных, в основном октапloidных клеток.

бГК – низкодифференцированная мелкоклеточная анатомическая опухоль, потерявшая балочную структуру, состоящая в основном из беспорядочно расположенных диплоидных клеток.

Благодаря ослаблению матриксных и межклеточных взаимодействий, **бГК** в отличие от **мГК** была легко переведена *in vitro* в культуру (H33), характеризующуюся слабой адгезией к субстрату и склонностью к трехмерному росту. Супензию клеток из **мГК** стандартным двуступенчатым методом получить не удалось.

бГК отличается от **мГК** полной потерей клеточной полярности и резким ослаблением межклеточной и матричной адгезии. Клетки **мГК**, имеющей характерную для своей ацинарной природы базальную мемрану, секрецируют коллаген IV типа, ламинин, энтактин и фибронектин, взаимодействуя с матриксом своими базальными доменами. В **бГК** экспрессируются те же компоненты матрикса, но клеточная адгезия сильно нарушена. В отличие от **мГК**, большая часть клеток не образует контактов с матриксом (Кудрявцева и др., 2001).

Прогрессия ГК сопровождается множественными фенотипическими изменениями.

Новые свойства бГК:

- увеличение скорости роста *in vivo*;
- способность расти *in vitro*;
- полная потеря полярности клеток;

мГК

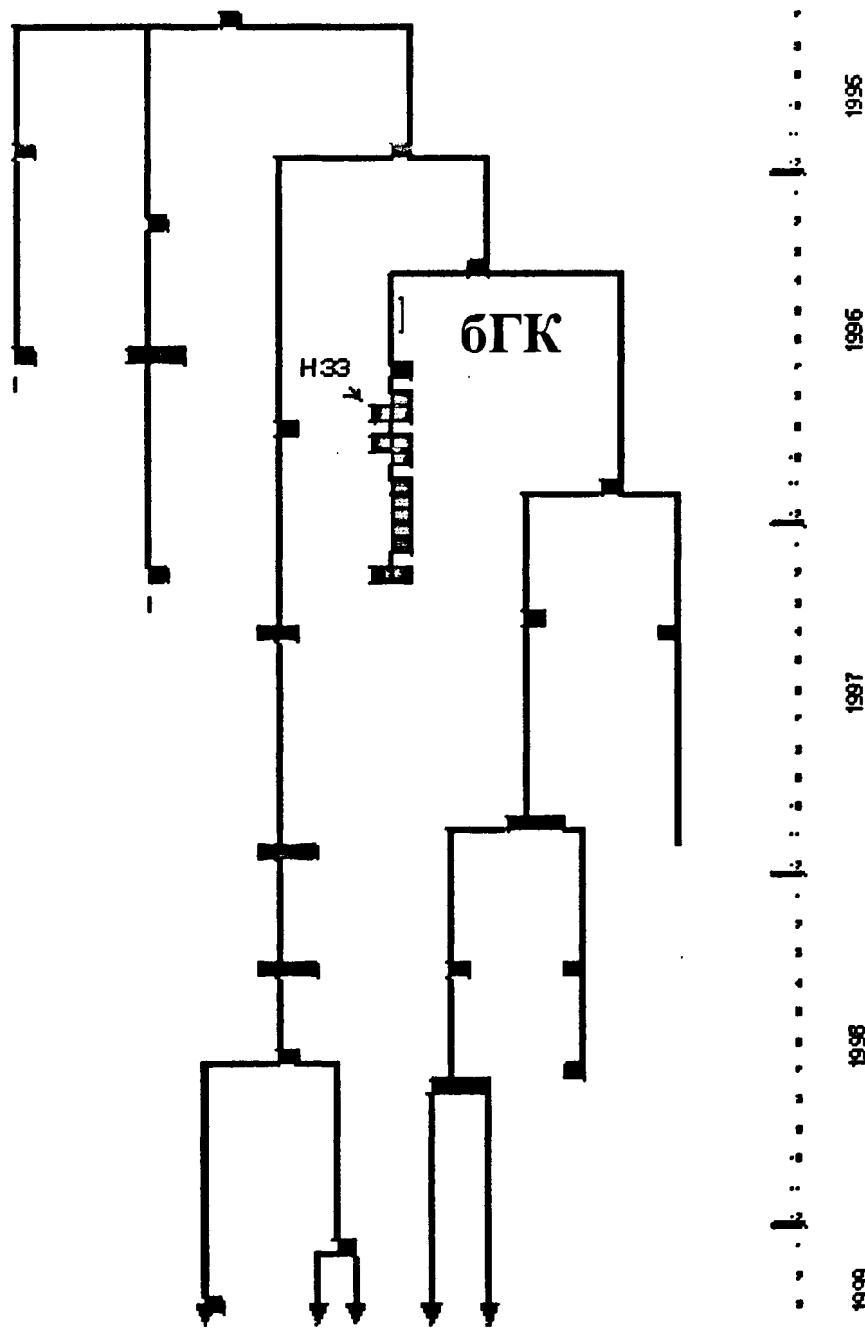


Рисунок 5. Древо ГК. Схема скачкообразного выщепления бГК из мГК.
(мГК – медленнорастущая дифференцированная ГК, бГК – быстрорастущий де-
дифференцированный вариант, Н33 – культура клеток бГК).

- резкое ослабление межклеточных контактов и связи с внеклеточным матриксом;
- повышение частоты апоптоза;
- падение пloidности.

3.1.1. Изучение спектров экспрессии гепато-специфических маркеров дифференцировки и маркеров трансформации клеток.

Снижение уровня дифференцировки наряду с сохранением способности к редифференцировке представляет собой одну из особенностей прогрессии гепатокарцином. Для определения дифференцировочного статуса в мГК и бГК мы исследовали уровни экспрессии генов СА, ТТР, ТФН – маркеров гепато-специфической дифференцировки, а также уровень экспрессии АФП методом ОТ-ПЦР, используя в качестве контроля образец РНК из нормальной печени взрослой мыши.

Ранее Е.В. Варгой с помощью Нозерн-блот гибридизация тотальной клеточной РНК из разных ГК и культуры Н33 с зондом к СА показано, что этот ген транскрибуируется на значительном уровне в мГК и в нормальной печени взрослой мыши, а в бГК и Н33 сигнал не выявлен. Выявить сигнал в пробах из бГК и ее культуры не удавалось даже при долговременном экспонировании блота с рентгеновской пленкой (Варга, 2002).

В этой работе методом ОТ-ПЦР мы показали, что уровни экспрессии СА и ТТР в мГК действительно сопоставимы с уровнем транскрипции этих генов в нормальной печени при полном отсутствии экспрессии этих генов в образцах, полученных из бГК и культуры клеток Н33 (Рисунок 6А).

Экспрессия гена ТФН выявлена в образцах нормальной печени мыши и мГК, меньшее количество мРНК гена ТФН было выявлено в бГК, в Н33 сигнала не было (Рисунок 6А). Сохранение экспрессии гена ТФН в бГК является важным подтверждением гепатоцитарного происхождения бГК.

В большом проценте (70-80%) опухолей гепатоцитарного происхождения наблюдается восстановление экспрессии гена АФП - важного диагностического маркера ГК (Abelev et al., 1963, Abelev, 1993).

Мы показали, что по сравнению с нормальной печенью взрослой мыши в мГК происходит возобновление экспрессии гена АФП, в бГК и Н33 транскрипция гена АФП подавлена (Рисунок 6А).

Таким образом, в мГК экспрессируются гены дифференцированных маркеров (СА, ТТР, ТФН), возобновляется (по сравнению с нормальной печенью взрослой мыши) экспрессия АФП. В результате прогрессии в бГК полностью исчезает экспрессия гепато-специфических маркеров дифференцировки СА, ТТР, АФП, уровень экспрессии гена ТФН

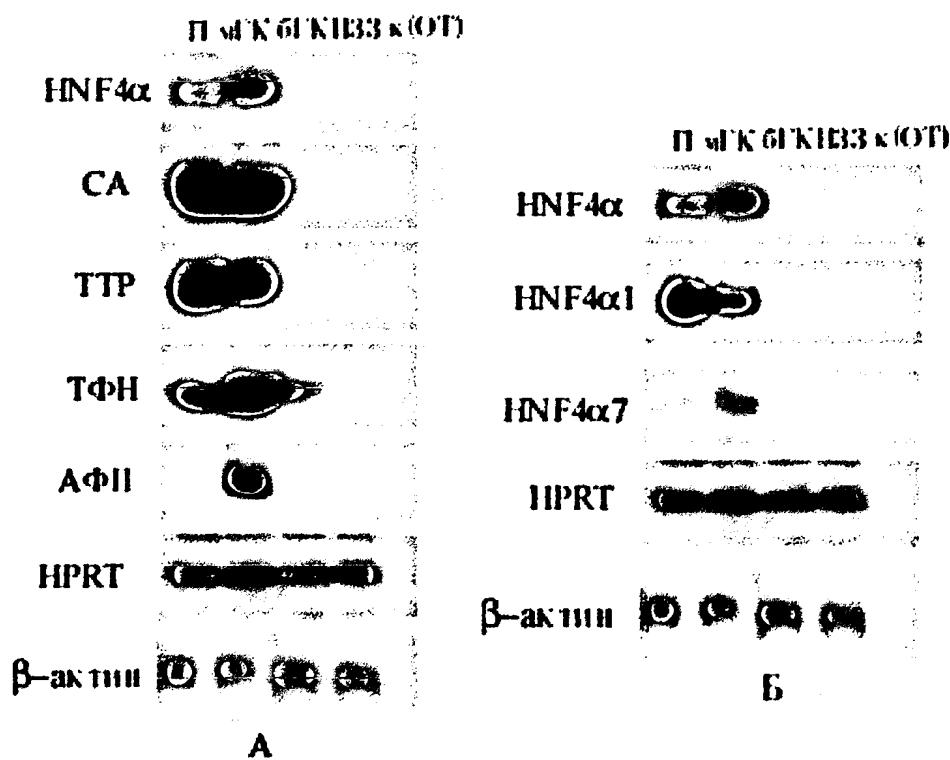


Рисунок 6. Падение экспрессии HNF4 α и дифференцировочных маркеров печени при прогрессии ГК. А) Результаты ОТ-ПЦР анализа со специфическими праймерами к СА, ТТР, ТФН АФП и HNF4 α . Б) Результаты ОТ-ПЦР анализа со специфическими праймерами к HNF4 α , HNF4 α 1 и HNF4 α 7. Для контроля количества РНК, взятой в реакцию, приведен ОТ-ПЦР с праймерами к HPRT и β -актину. Здесь и далее, П – нормальная печень взрослой мыши, мГК – медленная ГК, бГК – быстрая ГК, Н33 – культура клеток бГК, к (ОТ) – контроль ОТ-ПЦР без добавления обратной транскриптазы.

значительно снижается, но не исчезает полностью. Другими словами, при прогрессии в бГК происходит снижение уровня дифференцировки и потеря ткане-специфических свойств.

3.1.2. Изучение уровня экспрессии гена HNF4 α

Наблюдаемое при прогрессии координированное падение экспрессии ткане-специфических генов может быть вызвано нарушением экспрессии ГЯФ. факторов, ответственных за их регуляцию. При прогрессии ГК происходит как утрата эпителиальной морфологии, так и подавление экспрессии гепато-специфических генов.

Фактор HNF4 α является единственным из ГЯФ, для которого показана способность индуцировать ре-экспрессию некоторых гепато-специфических генов и частичное восстановление эпителиального фенотипа *in vitro* (Spath and Weiss, 1998), что указывает на то, что посредством HNF4 α может осуществляться координация процессов ткане-специфической экспрессии генов и эпителиального морфогенеза. Роль HNF4 α в опухолевой прогрессии, и, в частности, при химическом гепатоканцерогенезе, остается пока невыясненной.

Мы исследовали образцы РНК из печени, мГК, бГК и НЗЗ методом ОТ-ПЦР с праймерами, специальными для всех изоформ гена HNF4 α (далее в тексте - HNF4 α). Экспрессия HNF4 α обнаружена только в мГК и в печени взрослой мыши. Таким образом, прогрессия ГК помимо снижения уровня дифференцировки сопровождается падением уровня экспрессии гена HNF4 α в бГК по сравнению с мГК.

При транскрипции гена HNF4 α существует несколько вариантов сплайсинга, в результате которых образуются белки с разными свойствами. В настоящее время известно восемь вариантов, из которых формы HNF4 α 1- α 6 транскрибируются с промотора P1 (они содержат экзон 1A), а формы HNF4 α 7- α 8 – с альтернативного промотора P2, который находится на расстоянии - 45.6 т.п.н. от основного промотора P1 и экзона 1A, они содержат полностью отличающийся экзон 1D (Nakhei et al., 1998).

Экспрессия форм HNF4 α 1- α 6 характерна для клеточных линий высокодифференцированных гепатом и для печени (Bailly et al., 2001), в то время как для стволовых клеток, висцеральной энтодермы и дедифференцированных гепатом характерны HNF4 α 7- α 8 формы (Nakhei et al., 1998).

Так как экспрессия гена HNF4 α с промоторов P1 и P2 регулируется независимо и, возможно, отражает уровень дифференцировки клеток, мы отдельно изучили уровни экспрессии изоформ HNF4 α , транскрибирующихся с промоторов P1 и P2.

Праймеры, обозначенные в данных экспериментах HNF4 α 1, являются, по существу, праймерами к экзону 1A. ОТ-ПЦР с этими праймерами характеризуют уровень

экспрессии всех форм HNF4 α 1- α 6 (далее в тексте для упрощения – уровень экспрессии HNF4 α 1). Праймеры, обозначенные как HNF4 α 7, являются праймерами к экзону 1D, наличие которого характерно для форм, транскрибуемых с промотора P2 - HNF4 α 7- α 8 (далее в тексте как экспрессия HNF4 α 7).

Мы провели сравнение уровня экспрессии HNF4 α 1 в мГК и бГК. Обнаружено подавление уровня экспрессии в бГК и Н33 по сравнению с мГК и печенью нормальной взрослой мыши.

Профиль экспрессии HNF4 α 7 отличается и от экспрессии форм, транскрибирующихся с промотора P1, и от общего уровня экспрессии гена HNF4 α . В нормальной печени взрослой мыши мы обнаружили низкий уровень мРНК HNF4 α 7, выявляемый при проведении дополнительных раундов ОТ-ПЦР. В мГК показано существенное усиление экспрессии HNF4 α 7 по сравнению с нормальной печенью. В бГК и культуре клеток Н33 происходит падение экспрессии изоформ, транскрибирующихся с промотора P2 (Рисунок 6Б).

3.1.3. Исследование уровней экспрессии гепатоцитарных ядерных факторов при прогрессии ГК.

Для печени важнейшими регуляторами экспрессии ткане-специфических генов являются пять семейств гепатоцитарных ядерных факторов, которые способны контролировать экспрессию многих генов, специфичных для печени, кроме того, взаимодействуя, ГЯФ могут модифицировать действие друг друга: оказывать либо координированное воздействие на регулируемые им гены, либо конкурировать за сайты связывания. Важную роль в установлении и поддержании печеночного фенотипа играет взаимная регуляция транскрипции между различными семействами ГЯФ.

In vitro дедифференцировка опухолей гепатоцитарного происхождения часто сопровождается подавлением экспрессии некоторых ГЯФ (Cereghini et al., 1988; Anastasiadis et al., 1999; Xu et al., 2001). Однако, систематические исследования полного спектра ГЯФ в опухолях печени *in vivo* ранее не проводились.

Для изучения динамики экспрессии ГЯФ при прогрессии методом полуколичественного ОТ-ПЦР нами проанализированы уровни экспрессии этих белков в нормальной печени взрослой мыши, мГК, бГК и культуре клеток Н33.

3.1.3.1. HNF1

HNF4 α является основным активатором экспрессии фактора HNF1 α - наиболее распространенного регулятора экспрессии множества печень-специфических генов (Tronche et al., 1997).

Экспрессия HNF1 обнаружена в образцах мГК и печени, в бГК и культуре Н33 мРНК гена HNF1 в стандартных условиях не выявляется (Рисунок 7А).

Экспрессия vHNF1, преобладающего в эмбриональной печени и дедифференцированных гепатомах (Cereghini et al., 1996), в мГК выявлена на более высоком уровне, чем в печени. В бГК и Н33 транскрипция гена vHNF1 снижена (Рисунок 7Б).

3.1.3.2. C/EBP

Нами проведено сравнение количества мРНК гена С/ЕВР α , экспрессия которого характерна для дифференцированных неделяющихся гепатоцитов (Rana et al., 1995). Уровень транскрипции этого гена в мГК сравним с уровнем в нормальной печени мыши, в бГК и Н33 экспрессия С/ЕВР α значительно снижена (Рисунок 7А).

Во всех образцах из мГК, бГК, печени нормальной мыши и в Н33 выявлены сравнимые уровни транскрипции гена С/ЕВР β , активирующегося при пролиферации гепатоцитов (Greenbaum et al., 1995) (Рисунок 7Б).

3.1.3.3. HNF3

Экспрессия гепатоцитарного ядерного фактора HNF3 β критична для раннего эмбрионального развития, при его инактивации нарушается формирование передней кишки и снижается экспрессия гена HNF4 α (Duncan et al., 1998). На рисунке 7Б представлены данные проведенного ОТ-ПЦР анализа со специфическими праймерами к HNF3 α и β : уровни транскрипции гена HNF3 β сходны в мГК, бГК, Н33 и в нормальной печени взрослой мыши. Регулируемый HNF3 β ген HNF3 α (Duncan et al., 1998) также экспрессируется примерно в равных количествах во всех проанализированных образцах (Рисунок 7Б).

Уровень транскрипции гена HNF3 γ полностью коррелирует с экспрессией факторов HNF1 и HNF4 α : значительные количества мРНК этого гена выявлены в мГК и нормальной печени, в бГК, Н33 экспрессия HNF3 γ подавлена (Рисунок 7А).

3.1.3.4. HNF6

Гепатоцитарный ядерный фактор HNF6 в некоторых системах *in vitro* может активировать транскрипцию генов HNF4 α и HNF3 β (Samadani et al., 1996). Экспрессия гена HNF6 выявлена в образцах РНК, полученных из печени мыши и мГК; в бГК и Н33 экспрессия этого гена подавлена (Рисунок 7А). 3.1.4. Изменение уровней экспрессии ранних энтодермальных факторов и ткане-специфических ядерных рецепторов при прогрессии ГК.

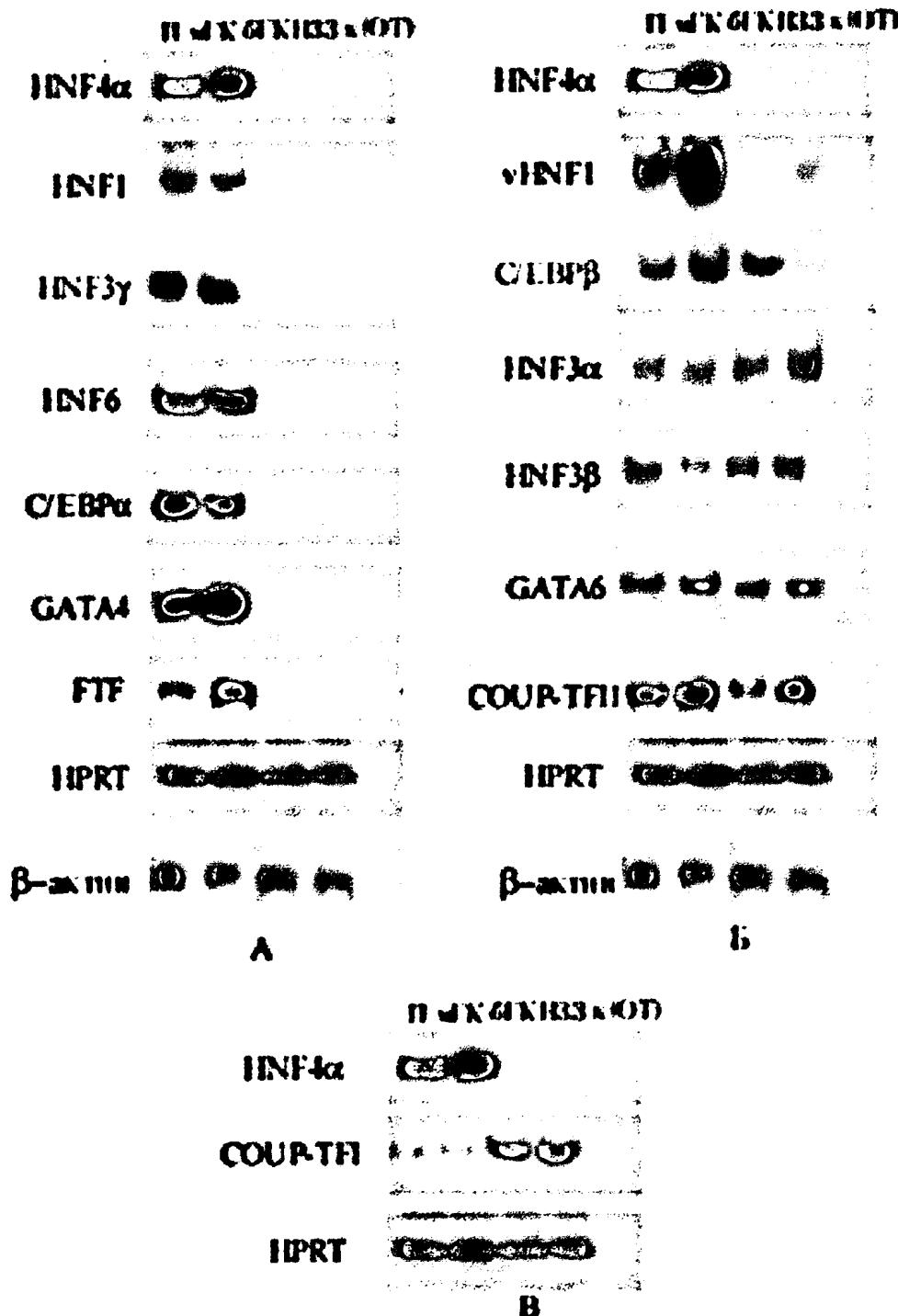


Рисунок 7. Экспрессия транскрипционных регуляторов в нормальной печени, мГК, бГК и Н33. А) Результаты ОТ-ПЦР со специфическими праймерами к генам, экспрессия которых коррелирует с экспрессией HNF4 α : HNF1, vHNF1, HNF3 γ , HNF6, C/EBP α , GATA4, COUP-TFI, FTF. Б) ОТ-ПЦР со специфическими праймерами к генам, не связанных с экспрессией гена HNF4 α : C/EBP β , HNF3 α , HNF3 β , GATA6, COUP-TFII. В) Результаты ОТ-ПЦР со специфическими праймерами к COUP-TFI, экспрессия которого обратно коррелирует с экспрессией HNF4 α . В качестве контроля количества РНК, взятой в реакцию, приведен ОТ-ПЦР с праймерами к HPRT и β -актину.

Методом ОТ-ПЦР нами произведено сравнение уровней экспрессии ранних энтодермальных факторов и ядерных рецепторов, участвующих в регуляции гепато-специфических генов, в мГК и бГК.

3.1.3.5. GATA

Ранние энтодермальные факторы семейства GATA не относятся к ГЯФ, однако, данные о том, что GATA регулируют экспрессию ГЯФ, заставляют обратить особое внимание на эти транс-активаторы.

Нами показано, что фактор GATA₆ транскрибируется на сходном уровне в мГК, бГК, Н33 и в нормальной печени взрослой мыши (Рисунок 7Б).

Уровень мРНК фактора GATA4, экспрессия которого зависит от GATA₆, в мГК сравним с уровнем его экспрессии в нормальной печени. В бГК и в культуре клеток Н33 экспрессия этого фактора подавлена (Рисунок 7А).

3.1.3.6. FTF

FTF – «сиротский» ядерный рецептор, который активирует ген АФП в процессе эмбриогенеза в развивающейся печени (Bernier et al., 1993). Транскрипция гена FTF активируется HNF4 α , факторами GATA и FTF (Pare et al., 2001). В промоторах генов HNF3 β , HNF4 α 1 и HNF1 α выявлены двойные сайты связывания FTF (Galarneau et al., 1996).

Высокий уровень мРНК гена FTF выявлен в образце из мГК и в нормальной печени мыши. В бГК и культуре Н33 экспрессия гена FTF полностью подавлена. Таким образом, экспрессия FTF четко коррелирует с экспрессией HNF4 α (Рисунок 7А).

3.1.3.7. COUP-TF

Как и HNF4 α , COUP-TF являются представителями под-семейства «сиротских» ядерных рецепторов. Факторы этого семейства в основном действуют как негативные транскрипционные регуляторы. Методом ОТ-ПЦР установлено, что уровни мРНК COUP-TFI в образцах, полученных из мГК, бГК и Н33, и в нормальной печени, различаются незначительно (Рисунок 7Б).

Транскрипция гена COUP-TFI значительно активирована в бГК и Н33 по сравнению с мГК и нормальной печенью (Рисунок 7В).

Таким образом, при прогрессии ГК в исследуемой системе произошло изменение уровней экспрессии ряда транскрипционных факторов, оказывающих определенное влияние на установление и поддержание гепатоцитарного фенотипа:

полностью подавлена экспрессия:

HNF4 α , HNF1, HNF6, C/EBP α , HNF3 γ , FTF, GATA4

снижена экспрессия:

vHNF1

не изменилась экспрессия:

HNF3 α , HNF3 β , C/EBP β , COUP-TFII, GATA6

усилилась экспрессия:

COUP-TFI

3.1.5. Экспрессия генов Е-кадхерина и его ингибитора *Snail* при прогрессии гепатокарцином мышей.

Способность к инвазии и метастазированию позволяет злокачественным клеткам выходить за пределы первичной опухоли. Для того, чтобы приобрести эту способность, клетка должна выйти из-под контроля нормального клеточного и матриксного окружения. Межклеточную адгезию обеспечивают кадхерины, для печени самым существенным из них является Е-кадхерин, обладающий морфогенными свойствами. Нарушение функций Е-кадхерина характерно для большинства опухолей эпителиального происхождения (Hanahan and Weinberg, 2000).

При прогрессии от мГК к бГК помимо подавления экспрессии ряда гепатоспецифических факторов произошла утрата некоторых эпителиальных признаков: была полностью потеряна клеточная полярность, произошло резкое ослабление межклеточной и матричной адгезии.

Мы обнаружили, что уровень транскрипции гена Е-кадхерина в мГК сравним с таковым в образце РНК, полученном из нормальной печени. В бГК и культуре Н33 транскрипция этого гена существенно снижена (Рисунок 8).

Результаты ОТ-ПЦР указывают на то, что хотя экспрессия партнера по контакту, Е-кадхерина, в бГК подавлена, транскрипция β -катенина остается на прежнем уровне как в бГК, так и в Н33 (Рисунок 8).

Транскрипционный регулятор *Snail* в эпителиальных клетках индуцирует эпителиально-мезенхимальный переход (Hemavathy et al., 2000). *Snail* описан как репрессор экспрессии гена Е-кадхерина (Giroldi et al., 1997).

В образцах, полученных из бГК и Н33, выявлено увеличение уровня экспрессии гена *Snail* по сравнению с мГК (Рисунок 8), что обратно коррелирует с изменением уровня Е-кадхерина при прогрессии гепатокарцином.

3.1.6. Активация теломеразы при прогрессии гепатокарцином.

Наличие теломеразной активности показано для различных типов опухолей (Kim et al., 1994). Теломераза является маркером злокачественного опухолевого процесса.

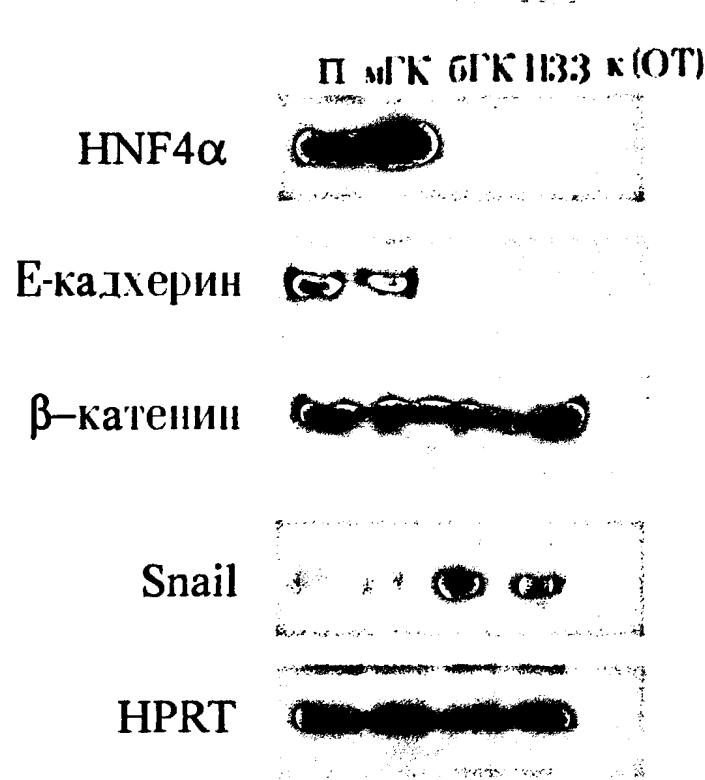


Рисунок 8. Транскрипция генов, влияющих на эпителиальные свойства гепатоцитов, при прогрессии ГК. Результаты ОТ-ПЦР со специфическими праймерами к HNF4 α , Snail, Е-кадхерину и β -катенину. В качестве контроля количества РНК, взятой в реакцию, приведен ОТ-ПЦР с праймерами к HPRT.

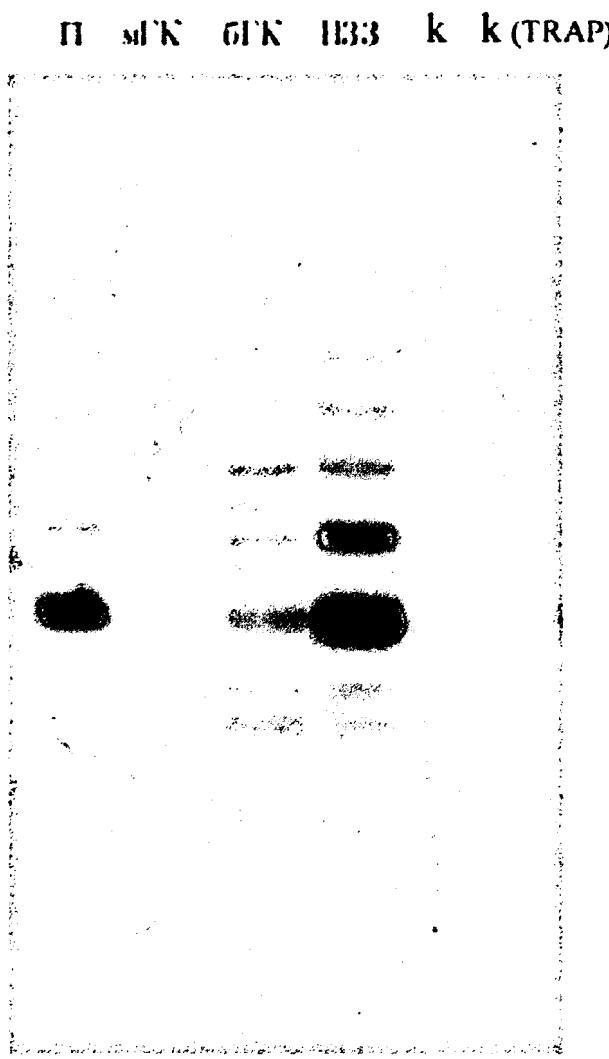


Рисунок 9. Изменение активности при прогрессии ГК. Результаты TRAP-анализа экстрактов из нормальной печени, мГК, бГК и культуры клеток Н33. Перед проведением TRAP-анализа экстракти выровнены по количеству белка. (П – нормальная печень взрослой мыши, мГК – медленнорастущая ГК, бГК – быстрорастущая ГК, Н33 – культура клеток бГК, k – инактивированный контроль, k (TRAP) – контроль проведения TRAP-реакции, без содержания белка).

Уровень активности теломеразы был исследован с помощью TRAP-анализа в экстрактах, полученных из печени, мГК, бГК и культуре клеток бГК. Активность теломеразы выявляется в образцах бГК и культуре клеток Н33 на уровне, существенно превышающем уровень активности теломеразы в печени. В экстракте из мГК активность теломеразы описанным методом не регистрируется (Рисунок 9).

3.1.7. Изменение уровней экспрессии генов *mTERT*, *c-myc* и *ODC* при прогрессии гепатокарцином мышей.

Активность теломеразного комплекса в значительной степени определяется активностью его субъединицы TERT, выполняющей функции РНК-зависимой ДНК-полимеразы (Bodnar et al., 1998; Counter et al., 1998).

Транскрипт гена TERT обнаружен нами в бГК и культуре клеток Н33, в мГК и нормальной печени мыши экспрессию гена TERT выявить не удалось. Таким образом, данные ОТ-ПЦР согласуются с результатами TRAP-анализа (Рисунок 10) и указывают на то, что активация теломеразы при прогрессии бГК происходит за счет усиления экспрессии гена TERT.

Онкоген *c-myc* может регулировать активность теломеразы посредством индукции экспрессии гена TERT (Lingner et al., 1997; Nakamura et al., 1999).

c-myc-индуцированная активация экспрессии гена TERT происходит быстро и не зависит от пролиферативного статуса клетки и синтеза других белков. Это указывает на то, что TERT является прямой мишенью белка *c-myc* (Wu et al., 1999), гиперэкспрессия которого характерна для опухолей различного происхождения.

Нами показано наличие экспрессии гена *c-myc* в образцах бГК и Н33, и отсутствие транскрипта в мГК и в нормальной печени мыши. Таким образом, профили экспрессии генов *c-myc* и TERT при прогрессии ГК сходны (Рисунок 10). Этот результат на то, что именно активация *c-myc* послужила причиной повышения теломеразной активности при прогрессии.

Классической транскрипционной мишенью дляprotoонкогена *c-myc* является ODC (Bello-Fernandez et al., 1993; Warner et al., 1993).

Мы наблюдали экспрессию гена ODC в бГК и культуре Н33 при отсутствии его мРНК в мГК. В печени выявлен низкий уровень экспрессии (Рисунок 10).

3.2. Восстановление экспрессии гена *HNF4a* в культуре клеток Н33.

Прогрессия от мГК к бГК сопровождается подавлением многих тканеспецифических функций и утерей эпителиальных черт. Поскольку прогрессия произошла скачкообразно, причиной ее могло стать изменение в экспрессии одного или немногих

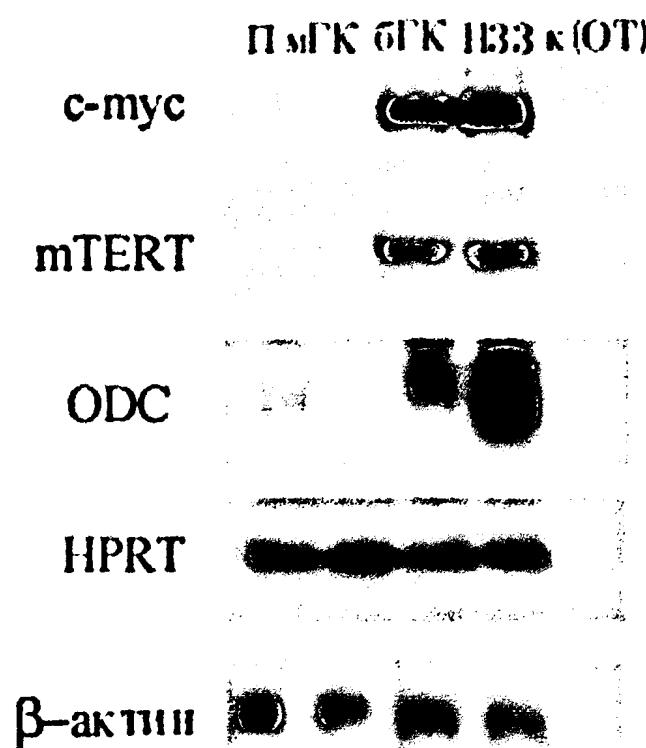


Рисунок 10. Изменение транскрипции генов *mTERT*, *c-myc* и *ODC* при прогрессии ГК. Результаты ОТ-ПЦР со специфическими праймерами к *mTERT*, *c-myc* и *ODC*. В качестве контроля количества РНК, взятой в реакцию, приведен ОТ-ПЦР с праймерами к *HPRT* и β -актину. (П – нормальная печень взрослой мыши, мГК – медленная ГК, бГК – быстрая ГК, Н33 – культура клеток бГК, к (ОТ) – контроль ОТ-ПЦР без добавления обратной транскриптазы).

ключевых генов, регулирующих гепато-специфическую экспрессию. Поэтому мы предположили, что ключевой ген является ткане-специфическим регулятором. Так как произошедшие изменения были очень существенны, маловероятно, что они были вызваны количественным изменением в экспрессии некого ключевого гена; скорее, изменение должно было произойти на качественном уровне. Среди регуляторов, качественно изменивших уровень экспрессии при прогрессии, оказались гепатоцитарные ядерные факторы HNF1, C/EBP α , HNF3 γ , HNF4 α и HNF6, энтодермальный фактор GATA4 и ядерные рецепторы FTF и COUP-TFI. Из всех этих регуляторов только для HNF4 α показана способность индуцировать эпителиальный морфогенез *in vitro*.

Для проверки предположения о том, что подавление экспрессии HNF4 α сыграло ключевую роль в дедифференцировке бГК по сравнению с мГК, было проведено две серии опытов по восстановлению экспрессии HNF4 α в культуре клеток Н33.

3.2.1. Трансфекция культуры клеток Н33 экспрессирующим вектором pLEN4S-HNF4.

В первой серии экспериментов был использован экспрессирующий вектор pLEN4S-HNF4, содержащий кДНК HNF4 α под контролем металлотионеинового промотора. Культура клеток Н33 была котрансфицирована векторами pLEN4S-HNF4 и pBabePuro, кодирующим устойчивость к пуромицину. Контролем для дальнейших исследований служила культура клеток Н33, трансфицированная только вектором pBabePuro (H33-Puro). После селекции на устойчивость к пуромицину было отобрано 10 индивидуальных клонов и смешанная культура клеток, из которых, судя по результатам Саузерн-блот анализа, семь интегрировали различное число копий трансгена (H33-H4-2, 3, 7, 8, 9, 12, 13) (клоны получены и любезно предоставлены Н.Л. Лазаревич).

3.2.1.1. Восстановление экспрессии HNF4 α

Уровни экспрессии экзогенного HNF4 α определяли методом ОТ-ПЦР с использованием специфических праймеров к HNF4 α . Во всех проверенных клонах первой трансфекции, успешно включивших вектор pLEN4S-HNF4, произошло восстановление транскрипции гена HNF4 α . В контрольной культуре H33-Puro экспрессия гена HNF4 α не выявлена. Уровень экспрессии трансгена в экспериментах по трансфекции оказался существенно ниже, чем в мГК.

Максимальный уровень экспрессии HNF4 α был выявлен в клоне H33-H4-2. Анализируя эффекты ре-экспрессии HNF4 α в бГК, мы обнаружили значительное снижение уровня HNF4 α в процессе культивирования стабильно трансфицированных клонов, такое снижение происходило и при культивировании клонов в присутствии пуромицина. При анализе транскрипции гена HNF4 α в клоне H33-HNF4-2 после трех

месяцев культивирования (14 пассаж) было выявлено значительное снижение уровня экспрессии по сравнению с клетками ранних пассажей (Рисунок 11). Это наблюдение указывает на существование *in vitro* отбора в пользу клеток со сниженной экспрессией HNF4α.

Отсутствие восстановления каких-либо факторов можно объяснить либо тем, что экзогенная экспрессия HNF4α не может восстановить транскрипцию данного фактора или для восстановления транскрипции данного фактора необходимы не только экспрессия трансгена, либо для восстановления транскрипции данного фактора необходим более высокий и стабильный уровень экспрессии трансгена.

3.2.1.2. Эффекты экспрессии экзогенного HNF4α.

a. Восстановление ткане-специфических свойств

В клоне H33-HNF4-2 и некоторых других на ранних пассажах было выявлено восстановление уровней транскрипции генов HNF1, ТФН, регулируемых HNF4α (представлены результаты по клону H33-HNF4-2 на 6 и 14 пассаже). В контрольной культуре H33-Puro экспрессия гена HNF4α не выявлена.

На рисунке 11 представлены результаты ОТ-ПЦР анализа со специфическими праймерами к HNF1. Экспрессия гена HNF1 в клоне H33-HNF4-2 сравнима с таковой в образце мГК. Таким образом, можно говорить о восстановлении функциональной активности HNF4α (активация экспрессии эндогенного HNF1).

По сравнению с бГК и исходной культурой H33, уровень транскрипции гена ТФН в клоне H33-HNF4-2 повысился до уровня, сравнимого с таковым в мГК. Индукции гена ТТР после трансфекции не происходит (Рисунок 11).

б. Восстановление эпителиальных свойств

В процессе культивирования в трех из семи исследованных клонов (H33-HNF4-2, 9 и 12) возникали островки с эпителиальной морфологией. Эти островки состояли из уплощенных полигональных клеток, которые контактировали друг с другом и росли в один слой, чего никогда не наблюдалось при культивировании или клонировании исходной клеточной культуры H33.

Эти островки характеризовались восстановлением плотных контактов между клетками (как это видно по окраске антител к белку ZO-1, ассоциированному с плотными контактами). В клонах с неизменившейся морфологией, как и в исходной культуре H33, такого восстановления не наблюдалось (Рисунок 12). Таким образом, экспрессия экзогенного HNF4α восстанавливает некоторые эпителиальные свойства.

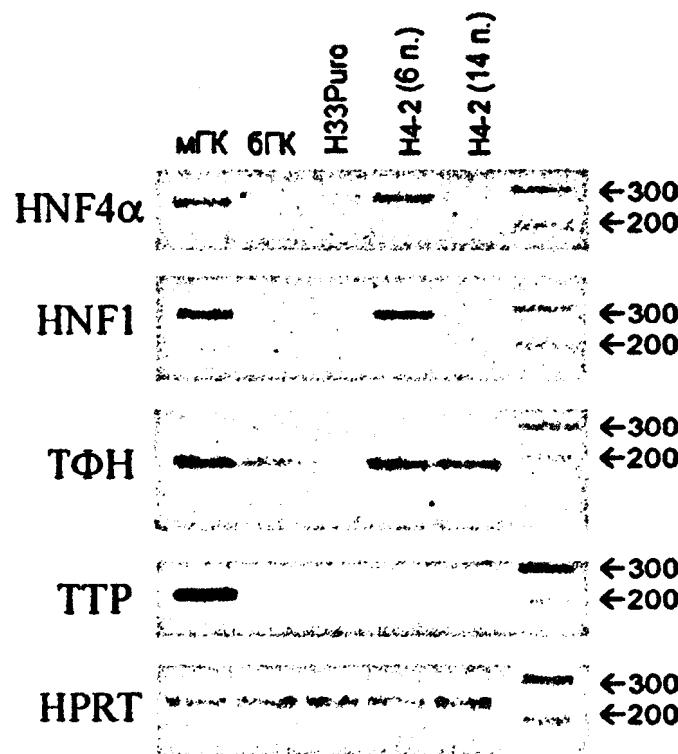


Рисунок 11. Частичное восстановление транскрипции гепато-специфичных генов при экзогенной экспрессии HNF4 (первая трансфекция). Результаты ОТ-ПЦР с праймерами к HNF4 α , HNF1, ТФН и TTP. Для контроля количества РНК, взятой в реакцию, приведен ОТ-ПЦР с праймерами к HPRT. (мГК – медленорастущая ГК, 6ГК – быстрорастущая ГК, Н33Puro – контрольная культура, трансфицированная вектором pBabePuro, H4-2 (6 п. и 14 п.) - клеточный клон, трансфицированный вектором с кДНК HNF4 α на 6 и 14 пассажах, соответственно. Справа указаны размеры фрагментов для контроля результатов ОТ-ПЦР(в п.н.)

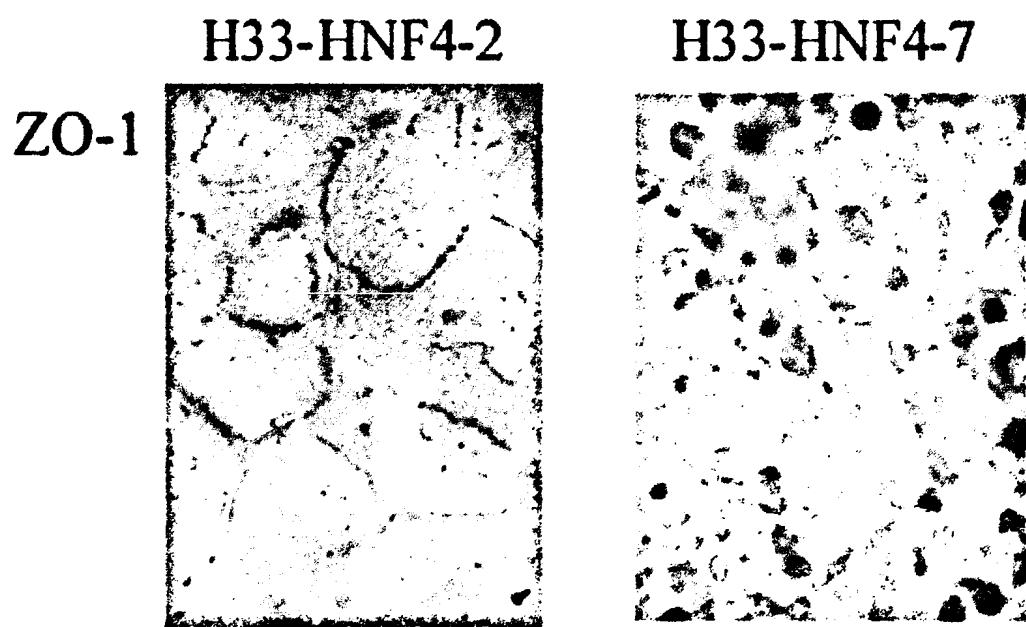


Рисунок 12. Восстановление эпителиальной морфологии при экзогенной экспрессии HNF4 α (первая трансфекция). Показано методом имунохимического окрашивания клеток антителами к белку ZO-1. (H33-HNF4-2 и H33-HNF4-7 – клонсы, трансфицированные вектором с кДНК HNF4 α).

3.2.2. Трансфекция культуры клеток H33 плазмидой pCMV-HNF4-Flag.

Поскольку металлотионеиновый промотор, под контролем которого находится экзогенный HNF4 α , определял низкий уровень экспрессии трансгена, была проведена вторая серия опытов по стабильной трансфекции культуры H33.

Для этого была использована плазмида pCMV-HNF4-Flag, в которой под контролем более сильного промотора цитомегаловируса находилась кДНК изоформы HNF4 α 1, несущая на С-конце пептидную метку FLAG. Такая метка не влияет на биологические свойства HNF4 α (Stoffel et al., 1997), но, благодаря ей, экспрессию химерного белка можно с высокой эффективностью обнаружить при помощи моноклональных антител к Flag-эпипотопу. Совместно с плазмидой pCMV-HNF4-Flag трансфицировали вектор pCB6-neo, содержащий ген устойчивости к неомицину под контролем промотора цитомегаловируса. В качестве контроля использовали культуру (k-Fl), трансфицированную только вектором pCB6-neo. После селекции было отобрано 6 клонов, из которых в трех (H4-Fl1, H4-Fl3, H4-Fl5) было обнаружено максимальное количество трансгена и при иммунохимическом анализе с Flag-антителами наблюдали наиболее яркое ядерное окрашивание (данные не представлены). Поскольку при предыдущей трансфекции со временем происходило снижение уровня экспрессии трансгена, HNF4-Flag клоны анализировали на 2-3 пассаже (вторая серия экспериментов по трансфекции проведена и любезно предоставлена Н.Л. Лазаревич).

3.2.2.1. Восстановление экспрессии HNF4 α после проведения экспериментов по трансфекции вектором pCMV-HNF4-Flag.

При анализе результатов второй трансфекции методом ОТ-ПЦР с праймерами к HNF4 α , мРНК гена HNF4 α была выявлена в трех проанализированных HNF4-Flag клонах. Экспрессия HNF4 α не обнаружена в контрольной культуре k-Fl (Рисунок 13А).

Необходимо отметить, что уровень экспрессии гена HNF4 α в трансфицированных HNF4-Flag клонах все равно оказался ниже, чем в образце из мГК (данные не представлены), возможно, вследствие описанной выше селекции в пользу клеток с пониженной экспрессией HNF4 α .

На рисунке 13А представлены результаты анализа уровней транскриптов вариантов сплайсинга HNF4 α 1 и HNF4 α 7. Нами обнаружено восстановление экспрессии генов HNF4 α 1 и HNF4 α 7 во всех трех клонах (H4-Fl1, H4-Fl3, H4-Fl5), Экспрессия HNF4 α 1 и HNF4 α 7 в контроле k-Fl отсутствует (Рисунок 13А).

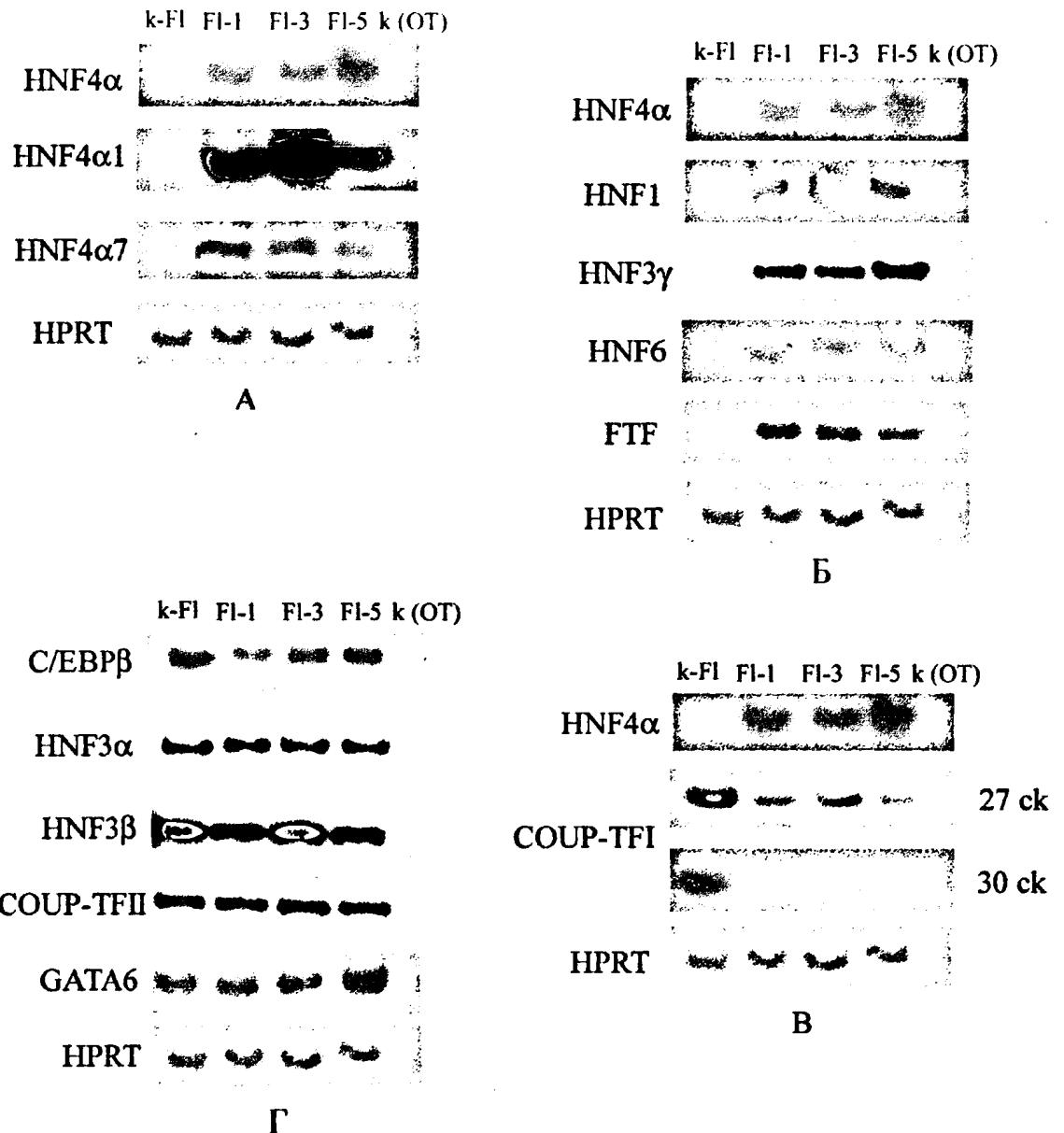


Рисунок 13. Восстановление экспрессии генов при экзогенной экспрессии HNF4 α (вторая трансфекция). k-Fl – контрольная культура, Fl-1, Fl-3, Fl-5 – трансфицированные клонсы, k (OT) – контроль ОТ-ПЦР без добавления обратной транскриптазы. А) ОТ-ПЦР с праймерами к HNF4 α , HNF4 α 1 и HNF4 α 7. Б) Результаты ОТ-ПЦР со специфическими праймерами к HNF1, HNF3 γ , HNF6, FTF. В) Результаты ОТ-ПЦР со специфическими праймерами к COUP-TFI (27 и 30 циклов раундов ОТ-ПЦР). Г) ОТ-ПЦР с праймерами к C/EBP β , HNF3 α , HNF3 β , COUP-TFII, GATA6. Для контроля количества РНК, взятой в реакцию, приведен ОТ-ПЦР с праймерами к HPRT и β -актину.

3.2.2.2. Эффекты восстановления экспрессии гена HNF4.

а. Восстановление экспрессии некоторых ГЯФ: HNF1, HNF3 γ и HNF6.

В трансфицированных клонах H4-FI1, H4-FI3, H4-FI5 произошла индукция гена HNF1, что свидетельствует о том, что экзогенный HNF4 α является транскрипционно активным. В k-FI экспрессия гена HNF1 подавлена (Рисунок 13Б).

Нами показано, что в H4-FI1, H4-FI3, H4-FI5 – клонах произошло восстановление экспрессии генов HNF3 γ и HNF6. В контрольных клетках k-FI не обнаружено мРНК HNF3 γ и HNF6 (Рисунок 13Б).

б. Восстановление экспрессии ядерного рецептора FTF.

В образцах, полученных из клонов H4-FI1, H4-FI3, H4-FI5 выявлена индукция экспрессии гена FTF по сравнению с контрольной культурой k-FI (Рисунок 13Б).

в. Подавление экспрессии гена COUP-TFI

При анализе уровня транскрипции фактора COUP-TFI, который активируется в бГК и Н33 по сравнению с мГК и печенью, мы обнаружили, что под воздействием экзогенной экспрессии HNF4 α в клонах H4-FI1, H4-FI3 и H4-FI5 происходит снижение транскрипции гена COUP-TFI по сравнению с контролем уровнем в k-FI (Рисунок 13В). При проведении дополнительных раундов ПЦР в клонах клонов H4-FI1, H4-FI3 и H4-FI5 выявляется некоторое количество COUP-TFI, но на существенно более низком уровне (Рисунок 13В).

г. Гены, экспрессия которых не изменилась после проведения трансфекции.

После проведения трансфекции вектором pCMV-HNF4-Flag нами не выявлено существенных изменений в уровнях экспрессии генов ГЯФ: C/EBP β , vHNF1, HNF3 α , HNF3 β ; ранних энтодермальных факторов GATA4 и GATA6; и ядерного рецептора COUP-TFII (Рисунок 13Г). Мы показали, что уровни мРНК вышеперечисленных генов сравнимы в культуре Н33 и трансфицированных клетках.

3.3. Анализ коллекции перевиваемых гепатокарцином мышей.

При прогрессии от мГК к бГК большое количество регуляторов дифференцировки печени изменило свой уровень экспрессии. Прогрессия произошла скачкообразно на раннем пассаже, что дает нам основание предполагать, что причиной ее явилось изменение в функционировании одного или немногих генов. Сведений о проанализированных факторах пока недостаточно для того, чтобы утверждать, что изменение в экспрессии определенного фактора является причиной всех остальных изменений. Однако претендентами на эту роль в первую очередь являются регуляторы, полностью подавленные в бГК и Н33, и не возобновившие экспрессии после действия

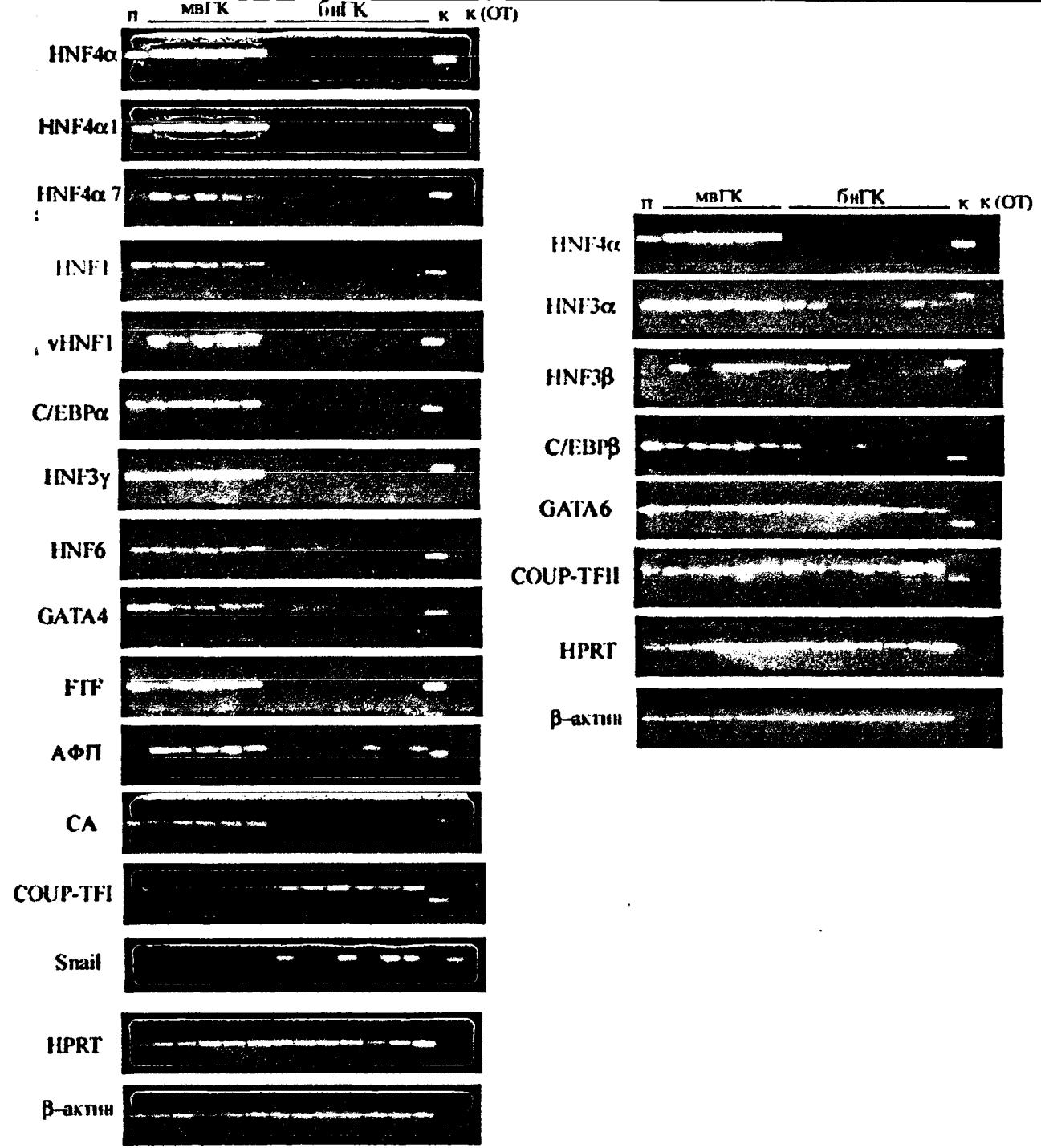


Рисунок 14. Анализ закономерностей, выявленных при прогрессии ГК. Результаты ОТ-ПЦР со специфическими праймерами к СА, АФП, HNF1, vHNF1, C/EBP α , C/EBP β , HNF3 α , HNF3 β , HNF3 γ , HNF6, HNF4 α (α 1 и α 7), GATA4, GATA6, FTF, COUP-TFI, COUP-TFII, *Snail*. Для контроля количества РНК, взятой в реакцию, приведен ОТ-ПЦР с праймерами к HPRT и β -актину. (П – нормальная печень взрослой мыши, мвГК – медленнорастущие высокодифференцированные ГК, бнГК – быстрорастущие низкодифференцированные ГК, к (ОТ) – контроль ОТ-ПЦР без добавления обратной транскриптазы.

экзогенного HNF4 α : ткане-специфические факторы C/EBP α , GATA4 и транскрипционные регуляторы Snail, c-myc.

На следующем этапе работы нами была использована коллекция перевиваемых гепатокарцином мышей, которые можно условно разделить на две группы по скорости роста и уровню дифференцировки.

Две группы ГК: мвГК (медленнорастущие высокодифференцированные ГК) и бнГК (быстрорастущие низкодифференцированные ГК) были проанализированы методом полуколичественного ОТ-ПЦР для проверки закономерностей, выявленных нами при исследовании прогрессии ГК (в качестве контроля использовали нормальную печень взрослой мыши). Следует обратить внимание, что бнГК и мвГК являются:

1. опухолями, индуцированными по стандартной методике химического канцерогенеза (см. пункт 2.2.);
2. гепатокарциномами, полученными независимо.

Было необходимо решить следующие вопросы:

- Действительно ли экспрессия HNF4 α коррелирует с уровнем дифференцировки химически индуцированных ГК мышей?
- Изменяются ли уровни экспрессии ГЯФ и других транскрипционных факторов в зависимости от дифференцировочного статуса таких опухолей?

В первую очередь нами было проведено сравнение уровня транскрипции гена HNF4 α в образцах, полученных из мвГК и бнГК и нормальной печени. Нами показано наличие экспрессии гена HNF4 α во всех мвГК и отсутствие таковой в бнГК. Таким образом, уровень дифференцировки четко коррелирует с уровнем экспрессии гена HNF4 α .

Аналогичным образом экспрессируются сплайс-формы гена – HNF4 α 1- α 6. Изоформы гена HNF4 α 7- α 8, транскрибирующиеся с промотора P2, экспрессируются только в мвГК, транскрипция этих изоформ не выявляется во взрослой печени мыши и в бнГК.

Показано, что ген CA, являющийся маркером дифференцировки, экспрессируется в образцах мвГК и печени, в бнГК мРНК этого гена не обнаружена (Рисунок 14).

В ходе исследования мы сравнили уровни экспрессии гепато-специфичных и общераспространенных регуляторных генов в мвГК и бнГК (Рисунок 14).

Оказалось, что все результаты ОТ-ПЦР можно подразделить на группы (для удобства восприятия результаты ОТ-ПЦР помещены в таблицу 2):

- Среди генов HNF1, vHNF1, C/EBP α , HNF3 γ , FTF, GATA4, COUP-TFI, GATA4, CA (в таблице 2 - выделены красным цветом) мы наблюдаем четкую

Пояснения к таблице 2.

+ ген экспрессируется
отсутствие экспрессии гена
норма экспрессии гена
(нормальная печень)

Образцы	Гены	м6ГК												+ ген экспрессируется
		печень	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	<i>HNF-4α</i>	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	
	<i>HNF-4αI</i>	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	
	<i>HNF-4α7</i>	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	
	<i>HNF1</i>	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	
	<i>vHNF1</i>	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	
	<i>C/EBPα</i>	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	
	<i>C/EBPβ</i>	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	
	<i>HNF3α</i>	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	
	<i>HNF3β</i>	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	
	<i>HNF3γ</i>	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	
	<i>HNF6</i>	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	
	<i>FTF</i>	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	
	<i>COUP-TFI</i>	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	
	<i>COUP-TFI</i>	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	
	<i>GATA4</i>	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	
	<i>GATA6</i>	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	
	<i>SmaII</i>	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	
	<i>AФП</i>	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	
	<i>CA</i>	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	
	<i>HPRT</i>	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	
	<i>β-актин</i>	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	

Таблица 2. Экспрессия генов ГЯФ и транскрипционных факторов в опухолях коллекции перевиваемых гепатокарцином мышей. м6ГК – медленнорастущие высокодифференцированные ГК, бнГК – быстрорастущие низкодифференцированные ГК, печень – нормальная печень взрослой мыши (представлены результаты ОТ-ПЦР).

корреляцию (в случае с COUP-TFI – обратную корреляцию) с уровнем дифференцировки и изменением экспрессии гена HNF4 α

- Спектры экспрессии генов HNF3 α , HNF3 β , HNF6, *Snail* и АФП (в таблице 2 эти гены обозначены синим цветом) в основном коррелируют с уровнем дифференцировки.
- Уровни экспрессии генов C/EBP β , GATA6 и COUP-TFII остаются неизменными. Таким образом, в эту группу входят гены, уровень экспрессии которых не связан с уровнем дифференцировки.

Вероятно, именно гены, входящие в первую группу, наиболее существенны при гепатоканцерогенезе. Об этом свидетельствует жесткая корреляция их экспрессии с уровнем дифференцировки и экспрессией гена HNF4 α .

Таким образом, в проанализированной нами коллекции гепатокарцином существует прямая корреляция между морфологическими признаками дифференцировки, экспрессией гепато-специфических маркеров дифференцировки и статусом гепатоцитарного регулятора HNF4 α .

5. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ.

Работа посвящена исследованию механизмов одноступенчатой прогрессии гепатоцеллюлярной карциномы мыши от высокодифференцированного (мГК) к низкодифференцированному варианту (бГК) и анализу роли гепатоцитарных ядерных факторов в этом процессе.

5.1. Экспрессия HNF4 α коррелирует с уровнем дифференцировки гепатокарцином.

HNF4 α является фундаментальным регулятором гепатоцитарного фенотипа (Kuo et al., 1992; Tian and Schibler, 1991) и, по-видимому, одним из ключевых факторов дифференцировки. HNF4 α чрезвычайно консервативен, впервые его обнаруживают уже на 4.5 д.р. мыши в слое клеток, выстилающих бластоцель, то есть HNF4 α не только раньше других ГЯФ появляется в онтогенезе, но и является одним из самых ранних маркеров первичной энтодермы (Duncan et al., 1994). Нокаут гена HNF4 α практически полностью отменяет гастроуляцию и приводит к смерти зародыша уже на 10 д.р. (Duncan et al., 1994; Chen et al., 1994; Duncan et al., 1997).

В настоящей работе впервые исследованы уровни экспрессии гепатоцитарного ядерного фактора HNF4 α в химически индуцированных гепатоцеллюлярных карциномах мышей. Наши результаты показали, что уровень транскрипции HNF4 α коррелирует с уровнем экспрессии маркеров дифференцировки (СА, ТТР, ТФН) и общим дифференцировочным статусом химически индуцированных гепатокарцином при прогрессии, о котором мы можем судить по морфологическим признакам. Эти результаты согласуются с данными, полученными *in vitro* на культурах клеток гепатом (Tian et al., 1991; Kuo et al., 1992). Ранее подобные исследования опухолей *in vivo* не проводились.

Получение экспериментальной модели перевиваемых мышиных ГК, различающихся по экспрессии гена HNF4 α , дает возможность выяснить роль этого фактора в прогрессии опухолей печени и в регуляции экспрессии опухолевых маркеров, а также идентифицировать гены и регуляторные каскады, задействованные в прогрессии ГК.

По-видимому, падение экспрессии гена HNF4 α является важным событием при прогрессии от мГК к бГК.

5.2. Изменение экспрессии ГЯФ и некоторых транскрипционных факторов при прогрессии ГК мышей.

Прогрессия ГК, наблюдаемая на данной модели, затрагивает фундаментальные свойства клеток печеночного происхождения, таких как морфологические, ростовые и функциональные характеристики.

Мы предположили, что причиной прогрессии могут являться изменения в спектре экспрессии ткане-специфических генов. Для проверки этого предположения мы провели сравнение уровней экспрессии таких регуляторов в мГК и бГК.

Наши результаты показали, что при прогрессии произошли резкие изменения в спектре экспрессии ГЯФ и некоторых других транскрипционных регуляторов (Таблица 3).

- В бГК и Н33 значительно снижена экспрессия ГЯФ HNF1, C/EBP α , HNF4 α , HNF3 γ и HNF6, энтодермального фактора GATA4 и транскрипционного регулятора FTF,
- экспрессия фактора vHNF1 подавлена в бГК, но обнаружена в Н33,
- в бГК и Н33 активируется транскрипционный регулятор COUP-TFI,
- в бГК и Н33 не изменились уровни экспрессии: C/EBP β , HNF3 α , HNF3 β , и ядерного рецептора COUP-TFII, энтодермального фактора GATA 6.

5.2.1. HNF4 α

Репортерный вектор люциферазы под контролем регуляторного района гена HNF4 α в клетках Н33 неактивен (Н.Л.Лазаревич, неопубликованные данные), что свидетельствует о том, что причиной отсутствия мРНК HNF4 α является подавление транскрипции гена, а не мутации в кодирующей области или в регуляторном районе гена. Таким образом, по-видимому, именно изменения («поломка» гена – позитивного регулятора или, наоборот, активация репрессора) экспрессии гена, находящегося в пути передачи сигнала выше HNF4 α и прямо или косвенно регулирующего его транскрипцию, явились причиной прогрессии ГК.

Взаимная регуляция ткане-специфических факторов в печени чрезвычайно сложна, данные о взаимосвязях, полученные на различных экспериментальных моделях, часто неоднозначны. Многие из данных получены при изучении ранних стадий развития. Значение факторов, играющих в процессе эмбриогенеза основную роль, может утрачиваться с течением времени, и во взрослом организме после рождения складывается другая картина иерархических отношений между транскрипционными факторами. Среди ГЯФ есть кандидаты на роль генов – ключевых причин прогрессии ГК.

Существование двух независимых промоторов усложняет картину регуляции транскрипции гена HNF4 α .

С промотора P1 происходит экспрессия изоформ HNF4 α 1- α 6, экспрессирующихся в эмбриональной и взрослой печени, промотор P2 определяет транскрипцию изоформ HNF4 α 7- α 8, которые преимущественно экспрессируются в висцеральной энтодерме, эмбриональных стволовых клетках, дедифференцированных гепатомах и в клетках поджелудочной железы (Nakhei et al., 1998).

В мГК экспрессируются изоформы HNF4 α , транскрибирующиеся с обоих промоторов (P1 и P2). В печени мы обнаружили экспрессию изоформ HNF4 α 1- α 6, формы сплайсинга HNF4 α 7- α 8 выявляются на низком уровне, в бГК и Н33 ни одна из известных сплайс-форм гена HNF4 α не экспрессируется.

В промоторе P1 гена HNF4 α были выявлены эволюционно консервативные сайты связывания факторов семейств HNF1, HNF3, HNF6, GATA6 и FTF (Landry et al., 1997; Taraviras et al., 1994; Zhong et al., 1994).

Наличие альтернативного промотора гена HNF4 α (P2) со своими специфическими сайтами связывания определяет регуляцию уровня экспрессии изоформ HNF4 α 7- α 8, и, следовательно, влияет на общий уровень экспрессии гена HNF4 α и соотношение двух групп изоформ, обладающих разной способностью активировать гены-мишени HNF4 α . Таким образом, дифференциальная регуляция P1 и P2 промоторов может оказывать существенное влияние на поддержание гепато-специфической экспрессии. P2 промотор гена HNF4 α способны активировать факторы HNF1, vHNF1 (Thomas et al., 2001).

Возможно существование авторегуляторного механизма, при котором HNF1 может снижать скорость транскрипции своего собственного гена. Так как было показано, что HNF1 не связывается со своим промотором, есть вероятность того, что HNF1 может блокировать транс-активационный эффект, оказываемый фактором HNF4 α (Kritis, et al., 1993). При трансфекции экспрессирующего вектора HNF1 может возобновится транскрипция HNF4, подавленная ранее (Bulla, et al., 1994), но такой эффект наблюдается не во всех клеточных линиях.

По-видимому, на данной системе ГК мышей, если эта связь и работает, то на уровне модуляции уровня экспрессии HNF4 α .

Вероятно, vHNF1 способен влиять на уровень экспрессии гена HNF4 α , так как инактивация гена vHNF1 приводит к нарушению формирования энтодермы у трансгенных эмбрионов и к полной репрессии гена HNF4 α (Coffinier et al., 1999). В мГК уровень транскрипции гена vHNF1 заметно выше, чем в печени, в бГК его экспрессия полностью подавлена, а в Н33 мРНК vHNF1 выявляется при отсутствии транскрипции гена HNF4 α .

Возможно, снижение уровня экспрессии vHNF1 в бГК и Н33 может привести к частичному подавлению транскрипции гена HNF4 α , но, так как наблюдаемая в Н33

экспрессия vHNF1 оказывается недостаточной для активации транскрипции HNF4α. По-видимому, vHNF1 не является фактором, обуславливающим полное подавление экспрессии HNF4α в бГК.

HNF3β - один из важнейших регуляторов раннего эмбрионального развития, необходимый для закладки печени, инактивация которого приводит к нарушениям формирования передней кишки. В эмбриоидных тельцах HNF3β^{-/-} заметно снижена экспрессия HNF4α и HNF1, а транскрипция HNF3α полностью подавлена (Duncan et al., 1998). Во взрослой печени инактивация HNF3β не влияет на экспрессию генов HNF4α и HNF1 (Sund et al., 2000). В проанализированных ГК уровни транскрипции гена HNF3β примерно равны.

Тот факт, что в бГК и культуре клеток H33 сохраняется экспрессия HNF3α (ген, являющийся непосредственной мишенью HNF3β), указывает на сохранение в бГК и H33 транскрипционной активности HNF3β.

Таким образом, снижение уровня экспрессии HNF4α при переходе мГК – бГК не может определяться снижением уровня экспрессии HNF3α и HNF3β.

В линии гепатомы человека HepG2 транскрипцию HNF4α может активировать фактор HNF6 (Samadani et al., 1996). Можно предполагать, что отсутствие HNF6 в бГК и H33 вносит свой вклад в репрессию HNF4α.

Инактивация гена GATA6 приводит к летальному фенотипу, сходному с фенотипом HNF4^{-/-} мышей, и к полной репрессии гена HNF4α в трансгенных эмбрионах и эмбриональных стволовых клетках, а экзогенная экспрессия GATA6 активирует транскрипцию гена HNF4α в фибробластной линии NIH-3T3 [Morrisey, 1998]. Эти данные указывают на то, что GATA6 необходим и, в некоторых случаях, достаточен для транскрипции HNF4α.

Экспрессия гена GATA6 при прогрессии ГК и подавлении экспрессии гена HNF4α не изменяется, что указывает на то, что активационный потенциал GATA6 не является определяющим в данной системе.

Ядерный рецептор FTF является одним из возможных регуляторов гена HNF4α (Pare et al., 2001). При прогрессии ГК подавление экспрессии HNF4α в бГК и H33 может быть обусловлено снижением уровня транскрипции гена FTF.

Между промоторами P1 и P2 гена HNF4α описан энхансер, активирующий транскрипцию HNF4α1 (Bailly et al., 2001), в котором выявлены сайты связывания факторов C/EBP, HNF4α, HNF3, HNF1 и сайты чувствительности к глюкокортикоидам. Мутации в сайте C/EBP приводят к 6-кратному снижению активности гена в культуре

дифференцированной гепатомы FGC4, а в сайте HNF1 – к 2-кратному. Мутации в сайтах HNF4 и HNF3 вызывают гораздо более мягкие последствия.

На основании этих данных была предложена модель регуляции гена HNF4 α , согласно которой низкий эмбриональный уровень экспрессии обеспечивается действием факторов семейств HNF1 и HNF3 и формы HNF4 α 7, а после рождения к ним добавляется действие C/EBP β и глюкокортикоидных рецепторов, которые и обеспечивают гораздо более высокий уровень экспрессии.

По литературным данным экспрессия генов HNF4 α (2 хромосома, 94.0 cM) и HNF1 (5 хромосома, 65.0 cM) существенно снижена у мышей с делецией локуса hsdr-1 на седьмой хромосоме (Tonjes et al., 1992). Это указывает на существование на этой хромосоме генов, способных осуществлять регуляцию транскрипции гена HNF4 α . Мы провели анализ и выяснили, что на седьмой хромосоме расположены гены HNF3 γ (7 хромосома, 6.5 cM) и COUP-TFII (7 хромосома, 33.0 cM), все остальные изучаемые нами гены расположены на других хромосомах. Этот факт свидетельствует о возможности регуляции экспрессии гена HNF4 α факторами HNF3 γ и COUP-TFII. Однако экспрессия COUP-TFII при гепатоканцерогенезе не изменяется, то есть уровни мРНК гена COUP-TFII примерно равны в печени мыши, мГК, бГК и Н33. Экспрессия гена HNF3 γ восстанавливается при экзогенной экспрессии гена HNF4 α в трансфицированных клонах, чего не могло бы произойти при делеции локуса гена HNF3 γ .

Таким образом, подавление транскрипции HNF4 α при прогрессии ГК не может быть объяснено делецией генов HNF3 γ и COUP-TFII и, вероятно, на 7 хромосоме мыши расположен дополнительный ген, способный влиять на экспрессию фактора HNF4 α .

5.2.2. HNF1

Факторы HNF4 α и HNF1 играют ключевую роль в гепато-специфической дифференцировке. Корреляция между уровнями экспрессии HNF4 α и генов, специфичных для печени, четко описана в литературе. HNF4 α является основным регулятором экспрессии гена HNF1 (Kuo et al., 1992).

Сайты связывания факторов семейства HNF1 обнаружены в регуляторных районах очень многих гепато-специфических генов. Делеция таких сайтов приводит к подавлению экспрессии этих генов (Tronche et al., 1990; Zhang et al., 1991; Song et al., 1998).

При прогрессии ГК происходит подавление транскрипции гена HNF1. Это подавление осуществляется за счет падения экспрессии гена HNF4 α в бГК и культуре клеток Н33. При восстановлении экспрессии гена HNF4 α происходит восстановление транскрипции гена HNF1. Таким образом, именно экспрессия гена HNF4 α определяет уровень транскрипции гена HNF1.

В мГК уровень транскрипции гена vHNF1 заметно выше, чем в печени, в бГК экспрессия этого гена полностью подавлена, а в Н33 мРНК vHNF1 выявляется при отсутствии транскрипции гена HNF4α.

“Нокаут” гена HNF4α не оказывает существенного влияния на транскрипцию гена vHNF1, однако, факторы семейства COUP-TF, узнающие ту же последовательность ДНК в промоторе гена vHNF1 (сайт DR1), что и фактор HNF4α, могут влиять на уровень экспрессии гена vHNF1 (Power and Cereghini, 1996).

Однако, уровни мРНК COUP-TFII в анализировавшихся опухолях и Н33 различаются незначительно, а уровень мРНК COUP-TFI в бГК и Н33 заметно индуцирован по сравнению с мГК и печенью. Кроме того, в бГК и Н33 уровни транскрипции генов COUP-TF не различаются, тогда как в бГК мРНК vHNF1 не выявляется, а в Н33 ген vHNF1 транскрибируется. Таким образом, маловероятно, что изменение уровня экспрессии факторов COUP-TF является причиной подавления vHNF1.

На модели регенерации печени крыс после отравления ССl₄ были получены данные о том, что трансфекция HNF3γ может повысить транскрипцию гена vHNF1 (Nakamura et al., 1999).

Возможно, подавление HNF3γ в бГК и Н33 повлияло на уровень экспрессии vHNF1.

У мышей с фенотипом HNF6-/− наблюдалась отсутствие желчного пузыря, нарушения в строении желчевыводящих протоков. Показано, что в таких HNF6-/− мышах происходит подавление экспрессии гена vHNF1. Таким образом, фактор HNF6 может регулировать транскрипцию гена vHNF1 (Clotman et al., 2002).

5.2.3. COUP-TF

При прогрессии ГК наблюдается обратная корреляция между экспрессией HNF4α и уровнем транскрипции ядерного рецептора COUP-TFI. Уровень мРНК COUP-TFI в бГК и Н33 заметно повышен по сравнению с мГК и нормальной печенью, а уровни мРНК COUP-TFII в анализировавшихся опухолях и Н33 различаются незначительно.

При восстановлении экспрессии гена HNF4α в трансфицированных клонах культуры Н33 экспрессия гена COUP-TFI значительно снижается. Таким образом, впервые показана способность фактора HNF4α оказывать репрессорное влияние на транскрипцию гена COUP-TFI на модели перевиваемых гепатокарцином мышей.

Уровни мРНК COUP-TFII в анализировавшихся опухолях и Н33 различаются незначительно и, вероятно, влияния на экспрессию других факторов в изучаемой системе ГК не оказывают.

5.2.4. HNF3

Инактивация гена HNF3 β приводит к нарушениям при формировании передней кишки, в эмбриоидных тельцах заметно снижена экспрессия HNF4 α и HNF1, а транскрипция HNF3 α полностью подавлена (Ang et al., 1994; Duncan et al., 1998).

В бГК и Н33 сохраняется транскрипционная активность HNF3 β , так как сохраняется и экспрессия гена HNF3 α – гена –мишени HNF3 β .

Сохранение экспрессии гепатоцитарных регуляторов HNF3 β , HNF3 α , vHNF1 (в культуре Н33), C/EBP β , энтодермального фактора GATA6 однозначно свидетельствует в пользу того, что бГК и ее культура Н33 имеют гепатоцитарное происхождение.

В бГК и культуре клеток Н33 подавлена транскрипция гена HNF3 γ . Мы показали, что при восстановлении экспрессии гена HNF4 α происходит восстановление экспрессии гена HNF3 γ . По-видимому, в данной системе именно экспрессия гена HNF4 α влияет на уровень транскрипции гена HNF3 γ .

Ядерный рецептор FTF является одним из возможных регуляторов экспрессии гена HNF3 β (показано *in vitro*) (Pare et al., 2001).

При прогрессии ГК подавление экспрессии HNF4 α и HNF1 в бГК и Н33 коррелирует со снижением уровня FTF, тогда как мы уровень транскрипции гена HNF3 β не изменяется. Таким образом, экспрессия фактора FTF не является определяющей для экспрессии гена HNF3 β на данной модели ГК.

5.2.5. HNF6

Регуляция гена HNF6 изучена недостаточно. Известно, что фактор HNF4 α может активировать, а C/EBP α подавляет транскрипцию гена HNF6 в клетках гепатомы человека HepG2 *in vitro* (Lahuna et al., 2000). Экспрессия генов HNF6 и C/EBP α кореллируют с изменением уровня экспрессии гена HNF4 α и, соответственно, со снижением уровня дифференцировки. Однако при восстановлении экспрессии гена HNF4 α происходит восстановление экспрессии HNF6. Вероятно, влияние HNF4 α на активность гена HNF6 в изучаемой системе существеннее, чем влияние C/EBP α .

Фактор HNF6 помимо регуляции транскрипции гена HNF4 α (см. п.5.2.1.), обладает способностью влиять на экспрессию гена HNF3 β (Samadani et al., 1996). Разницы в уровнях мРНК HNF3 β при прогрессии ГК не выявлено, таким образом, в данной системе ГК утрата фактора HNF6 не оказывает влияния на уровень транскрипции гена HNF3 β .

5.2.6. FTF

Ядерный рецептор FTF является одним из возможных регуляторов экспрессии генов HNF4 α , HNF1 и HNF3 β , а экспрессия FTF, в свою очередь, активируется факторами HNF4 α и GATA (Pare et al., 2001).

Помимо HNF4 α , мишенью факторов GATA является ядерный рецептор FTF, который, в свою очередь, может активировать транскрипцию HNF4 α (Pare et al., 2001). Возможно, падение экспрессии фактора GATA4 связано с подавлением транскрипции гена FTF, что может влиять на падение уровня экспрессии гена HNF4 α в бГК и культуре клеток Н33.

FTF – фактор, регулирующий активность АФП. При прогрессии существует корреляция экспрессии гена FTF и АФП, за исключением печени взрослой мыши, где АФП не выявляется, но наблюдается невысокий уровень экспрессии FTF. Это указывает на то, что FTF – не единственный фактор, осуществляющий регуляцию АФП.

5.2.7. GATA

Помимо гепатоцитарных ядерных факторов, в формировании фенотипа печени участвуют ранние энтодермальные факторы GATA6 и GATA4.

Инактивация GATA6 у мышей приводит к фенотипу, сходному с фенотипом HNF4 α -/- мышей, и к полной репрессии гена HNF4 α в трансгенных эмбрионах и эмбриональных стволовых клетках. Экзогенная экспрессия GATA6 активирует *de novo* транскрипцию гена HNF4 α в фибробластной линии NIH-3T3 (Morrisey et al., 1998). Эти данные указывают на то, что фактор GATA6 необходим для транскрипции HNF4 α . Поэтому нас заинтересовал уровень экспрессии этого гена в нашей системе.

Фактор GATA6, необходимый для экспрессии HNF4 α в эмбрионе (Morrisey et al., 1998), транскрибируется во взрослой печени, мГК, бГК и культуре клеток Н33, уровни экспрессии гена GATA6 сопоставимы и практически не отличаются.

При инактивации GATA6 транскрипция гена GATA4 в трансгенных эмбрионах мышей полностью подавлена (Morrisey et al., 1998). Уровень транскрипции гена GATA4, гена-мишени GATA6, четко коррелирует с уровнем мРНК гена HNF4 α при прогрессии ГК.

При инактивации GATA4 транскрипция гена HNF4 оказывается не затронутой, а транскрипцию GATA6 выявляют на уровне, повышенном по сравнению с нормальными эмбрионами (Kuo et al., 1997). Таким образом, на стадии раннего онтогенеза GATA4 действует как негативный регулятор экспрессии GATA6. Механизм подавления транскрипции GATA6 не исследован, по-видимому, на данной системе ГК эти взаимосвязи не работают.

Поскольку произошедшая прогрессия была скачкообразной, а изменения, сопровождавшие ее, были чрезвычайно резкими, скорее всего, причиной прогрессии послужило качественное изменение в экспрессии некоторых ключевых регуляторов.

5.3. Снижение уровня дифференцировки при прогрессии ГК мышей.

При прогрессии произошло значительное снижение уровня экспрессии классических маркеров гепато-специфической дифференцировки - СА, ТФН, ТТР. Эти результаты согласуются с данными по иммунохимическому выявлению СА, ТФН в мГК и отсутствию окраски на СА, а также снижению числа ТФН-содержащих клеток в бГК (Энгельгардт и др., 2000), что указывает на то, что изменения в уровне синеза этих белков произошли на транскрипционном уровне. Экспрессия этих генов в основном регулируются совместным действием гепатоцитарных ядерных факторов.

Утрата экспрессии HNF4 α в бГК и Н33 сопровождается либо снижением (ТФН), либо подавлением экспрессии (ТТР и СА). В клонах, трансфицированных HNF4 α , мы наблюдали индукцию гена ТФН, восстановления экспрессии генов СА и ТТР не происходило. Это может быть связано с тем, что помимо сайтов HNF1 и HNF4 α для экспрессии гена ТТР важны сайты связывания факторов HNF3 и С/ЕВР, а для СА – еще сайт GATA4 (Cereghini et al., 1996; Locker, 2001).

Уровни транскрипции генов HNF3 α , HNF3 β , С/ЕВР β примерно равны в мГК, бГК и Н33 и во взрослой печени мыши. Экспрессия гена HNF3 γ подавлена в бГК и Н33, но восстанавливается при экзогенной экспрессии HNF4 α . Видимо, репрессию гена ТТР определяет падение экспрессии генов С/ЕВР α , а СА - GATA4 и С/ЕВР α в бГК и Н33.

Регуляцию экспрессии гена ТФН осуществляет белок HNF4 α наряду с другими транс-активаторами С/ЕВР α , HNF3 и HNF1 (Sladek et al., 1990). Снижение уровня экспрессии ТФН в бГК и его восстановление после трансфекции HNF4 α указывает на то, что экспрессия гена ТФН зависит от HNF4 α , но может происходить и в его отсутствие, видимо, за счет активации другими транскрипционными факторами, возможно HNF3 β и членами семейства С/ЕВР.

Сниженная, но достоверная экспрессия гена ТФН в бГК может служить одним из доказательств того, что быстрорастущий вариант ГК является опухолью гепатоцитарного происхождения.

При гепатоканцерогенезе происходит активация экспрессии гена АФП (Абелев, 1999). Действительно, мы наблюдали, что в мГК по сравнению с нормальной печенью взрослой мыши возобновляется экспрессия АФП. Это является показателем того, что в клетках мГК произошли неопластические изменения.

Профиль экспрессии, сходный с АФП, имеет изоформа HNF4 α 7, что вместе с фактом существования сайтов связывания HNF4 α в промоторе гена АФП указывает на возможность регуляции транскрипции гена АФП путем изменения соотношения а1/а7 изоформ в клетке.

В регуляторном районе гена АФП есть сайты связывания факторов vHNF1, HNF1, С/ЕВРа и ядерных рецепторов. По наблюдениям группы M. Weiss, HNF4 α 7 является более эффективным активатором транскрипции гена АФП. Несмотря на то, что сайт связывания HNF4 в регуляторном районе АФП является общим для всех изоформ α 1- α 8, спектр экспрессии гена АФП коррелирует с экспрессией изоформы HNF4 α 7.

Таким образом, в мГК возобновляется экспрессия АФП и HNF4 α 7 по сравнению с нормальной печенью, а в бГК и Н33 исчезает как экспрессия HNF4 α 7, так и АФП.

5.4. Утрата эпителиальных свойств при прогрессии ГК мышей.

бГК отличается от мГК полной потерей клеточной полярности и резким ослаблением межклеточной и матричной адгезии. Клетки мГК, имеющей характерную для своей ацинарной природы базальную мемрану, секретируют коллаген IV типа, ламинин, энтактин и фибронектин, взаимодействуя с матриксом своими базальными доменами. В бГК экспрессируются те же компоненты матрикса, но клеточная адгезия сильно нарушена. В отличие от мГК, в бГК большая часть клеток не образует контактов с матриксом, что привело к приобретению бГК способности расти *in vitro*. Это позволило получить из бГК культуру клеток Н33 (Энгельгардт и др., 1999).

Экспрессия экзогенного гена HNF4 α в клетках дедифференцированной гепатомы приводит к приобретению последней эпителиальной морфологии *in vitro* (Spath et al., 1998), таким образом, фактор HNF4 α - единственный из ГЯФ, для которого описаны морфогенные свойства. Возможно, посредством HNF4 α может осуществляться координация процессов ткане-специфической экспрессии генов и эпителиального морфогенеза.

Произошедшие изменения морфологических свойств при прогрессии можно определить как эпителиально-мезенхимальный переход (EMT). Процессы EMT происходят при малигнизации опухолей эпителиального происхождения. Одним из индукторов EMT является транскриptionный регулятор *Snail* (Hemavathy et al., 2000).

Нами показано, что прогрессия ГК сопровождается активацией гена *Snail*. Уровень транскрипции гена Е-кадхерина катастрофически снижается при прогрессии бГК из мГК. Таким образом экспрессия гена *Snail*, который является репрессором гена Е-кадхерина, обратно коррелирует с его экспрессией при прогрессии в ГК. В клетке Е-кадхерин обеспечивает адгезию и латеральную полярность. бГК характеризуется утратой полярности клетки и ослаблением межклеточных контактов, что может являться следствием утраты Е-кадхерина при прогрессии ГК.

Уровень экспрессии β -катенина при прогрессии ГК не изменяется. Показано, что если β -катенин стабилизируется в цитоплазме и транслоцируется в ядро в комплексе с факторами TCF/LEF, то этот белок может действовать как транскрипционный фактор, активирующий экспрессию генов, задействованных в пролиферации (Gumbiner et al., 1995; Huber et al., 1996). В бГК и Н33 этого не происходит, так как при имунохимическом окрашивании антителами к β -катенину Е.И.Кудрявцевой ядерного окрашивания в бГК и Н33 не выявлено. Таким образом, несмотря на то, что нарушение пути передачи сигнала, связанного с β -катенином, является довольно частым событием при гепатоканцерогенезе, в рассмотренной прогрессии ГК этот ген видимо не участвует.

Таким образом, при прогрессии происходит одновременное падение уровня транскрипции гена HNF4 α и индукция гена *Snail*. В дальнейшем мы планируем выяснить вопрос о существовании взаимосвязи экспрессии фактора HNF4 α и транскрипционного регулятора *Snail*. Для этого необходимо выяснить, изменяется ли уровень мРНК гена *Snail* после восстановления экспрессии гена HNF4 α в культуре Н33.

5.5. Индукция активности гена *c-myc* и активация теломеразного комплекса.

Активность теломеразы является маркером уровня пролиферации клеток. Репликативный потенциал опухолевых клеток практически неограничен благодаря активности теломеразы, сложного комплекса с обратно-транскриптазной активностью, достраивающего концы хромосом. Такой же механизм обеспечивает способность эмбриональных тканей к пролиферации.

В подавляющем большинстве нормальных клеток человека за редким исключением активность теломеразы не проявляется. Основные клетки печени – гепатоциты обладают способностью к неограниченной пролиферации. Мы показали низкий уровень активности теломеразного комплекса в печени. Следует подчеркнуть, что в тех случаях, когда теломеразная активность выявляется в нормальных клетках, ее уровень существенно ниже, чем в опухолевых (Buchkovich and Greider, 1996).

В ГК человека активность теломеразы заметно повышена в 85-90% случаев (Tahara et al., 1995).

При характеристике мГК и бГК нами показано, что прогрессия сопровождается снижением уровня дифференцировки наряду с увеличением скорости пролиферации. В бГК и культуре клеток Н33 теломераза активна.

c-myc – онкоген, вовлеченный в контроль клеточной пролиферации и дифференцировки, часто активированный в опухолях различного происхождения (Henriksson and Luscher, 1996).

с-мус непосредственно регулирует активность теломеразы посредством индукции экспрессии гена каталитической субъединицы теломеразы (TERT) (Lingner et al., 1997, Nakamura et al., 1997).

Анализ последовательности промотора гена hTERT показал, что в промоторе имеются сайты связывания для нескольких транскрипционных факторов, предполагается, что экспрессия гена hTERT является объектом многоуровневого контроля (Wick et al., 1999). При прогрессии происходит активация гена с-мус. В бГК и Н33 активирована транскрипция как гена mTERT, так и ODC. Так как эти гены являются непосредственными мишениями фактора с-мус, можно говорить о том, что индуцированный в бГК с-мус является функционально активным. Не исключено, что именно активизация онкогена с-мус явилась причиной прогрессии ГК.

Существует корреляция между активностью с-мус и экспрессией Е-кадхерина (Batsche et al., 1998). Одним из свойств произошедшей прогрессии является утрата эпителиальных свойств, и как одна из характеристик этого – падение экспрессии Е-кадхерина в бГК и культуре клеток Н33. Возможно, фактор с-мус вносит вклад в репрессию гена Е-кадхерина.

Таким образом, прогрессия от мГК к бГК сопровождается:

- утратой морфологических признаков дифференцировки, а также подавлением экспрессии генов, обеспечивающих гепато-специфическую дифференцировку;
- снижением уровня экспрессии HNF4 α ;
- снижением уровня экспрессии генов HNF1, C/EBP α , HNF3 γ , HNF6, GATA4, FTF;
- активацией экспрессии ядерного рецептора COUP-TFI, генов с-мус, mTERT и транскрипционного регулятора *Snail*.
- утратой эпителиального фенотипа, одной из характерных особенностей которого является падение экспрессии Е-кадхерина.

5.6. Восстановление экспрессии гена HNF4 α .

Таким образом, прогрессия ГК, наблюдаемая на данной модели, затрагивает фундаментальные свойства клеток гепатоцитарного происхождения.

Для проверки гипотезы о том, что именно снижение уровня экспрессии HNF4 α стало причиной значительных фенотипических изменений, наблюдавшихся в описываемой модели прогрессии ГК, мы поставили цель проанализировать последствия восстановления экспрессии гена HNF4 α в культуре клеток бГК. Для восстановления экспрессии гена HNF4 α в бГК мы использовали два типа экспрессирующих векторов.

Экспрессия HNF4 α в стабильно трансфицированных вектором pLEN4S-HNF4 клонах была подтверждена с помощью ОТ-ПЦР, однако она была значительно ниже, чем в мГК. При утрате экспрессии HNF4 α в бГК и Н33 происходит подавление экспрессии генов-мишеней HNF4 α : HNF1, ТФН, ТТР. Как обсуждалось выше, в клонах, трансфицированных HNF4 α , мы наблюдали индукцию генов ТФН и HNF1, что свидетельствует о восстановлении не только экспрессии, но и транскрипционной активности фактора HNF4 α .

Таким образом, при восстановлении экспрессии HNF4 α происходит частичное восстановление экспрессии маркеров дифференцировки.

5.7. Восстановление некоторых эпителиальных свойств.

Большинство дедифференцированных гепатомных линий не экспрессируют HNF4 α . Показано, что при восстановлении экспрессии HNF4 α культура клеток дедифференцированной гепатомы Н5 приобретает эпителиальную морфологию. На первом этапе происходит частичное восстановление эпителиальной морфологии, также возобновляется экспрессия HNF1, но не наблюдается полного восстановления спектра экспрессии сывороточных белков. При добавлении дифференцирующих агентов только в клетках, трансфицированных HNF4 α , наблюдается восстановление межклеточных контактов и поляризация клеток, приводящие к приобретению эпителиального фенотипа. Происходит возобновление экспрессии ряда печень-специфических белков. По-видимому, именно ре-экспрессия HNF4 α в клетках дедифференцированной гепатомы приводит к приобретению последней эпителиальной морфологии (Spath and Weiss, 1998).

В 3 из 7 клонов, трансфицированных вектором, содержащим кДНК HNF4 α , мы наблюдали приобретение клетками морфологии, подобной эпителиальной, и установление полярности. Иммунохимический анализ показал восстановление экспрессии ZO-1 в клетках трансфицированных клонов. Этот белок ассоциирован с плотными клеточными контактами и действует как барьер для латеральной диффузии мембранных белков. Кроме того, ZO-1 индуцирует установление в клетке апикальной и базолатеральной полярности (Stevenson et al., 1989). Иными словами, ZO-1 может служить одним из критериев установления эпителиального фенотипа. Пока остается невыясненной связь между уровнем экспрессии HNF4 α и экспрессией различных белков, наличие которых характерно для клеток с эпитеиальной морфологией (Е-кадхерина, ZO-1 и другими).

В модели, которую изучала M. Weiss с сотрудниками, иммунохимически выявить белок ZO-1 удавалось только после воздействия на клоны, трансфицированные вектором с кДНК HNF4 α , дифференцировочного агента – дексаметазона.

В исследуемой нами модели белок ZO-1, ассоциированный с плотными контактами, выявляется в клетках трансформированных клонов, культивируемых без добавления дифференцировочных агентов. Этот факт можно объяснить следующим: клеточная линия Н5 культивируется давно и за время ведения в ней могли произойти множественные “поломки” генов, отвечающих за дифференцировку, тогда как в исследуемой нами модели бГК выщепилась из мГК на раннем пассаже, и произошло это одномоментно в результате “поломки” одного или небольшого числа генов.

Подробный анализ этого восстановления является темой отдельного исследования.

Анализируя последствия восстановления экспрессии HNF4 α в ГК, мы наблюдали значительное снижение уровня HNF4 α во время длительного культивирования трансформированных клонов. Это наблюдение говорит о существовании *in vitro* селекции клеток с пониженным уровнем экспрессии HNF4 α и необходимости использовать только ранние пассажи клеток для изучения роли HNF4 α в прогрессии ГК.

Такая селекция и исходно невысокий уровень экспрессии трансгена под несильным металлотионеиновым промотором не позволили провести полный анализ спектра экспрессии гепато-специфических генов на этой системе.

5.8. Восстановление экспрессии гепато-специфических транскрипционных регуляторов.

Трансфекция конструкцией pCMV-HNF4Flag под сильным цитомегаловирусным промотором позволила исследовать HNF4 α -зависимую индукцию некоторых печень-специфических генов.

К сожалению, уровень экспрессии трансгена в экспериментах по трансфекции оказался существенно ниже, чем в мГК. При иммунохимическом окрашивании антителами к Flag-эпигенотипу на 2-3 пассаже только 20-30% трансформированных клеток оказались Flag-положительными (Н.Л. Лазаревич, неопубликованные данные). Вероятно, причиной этого послужила уже описанная выше селекция в пользу клеток со сниженным уровнем экспрессии HNF4 α , которая при использовании конструкции с более сильным промотором происходит быстрее.

Отсутствие активации каких-либо генов можно объяснить либо тем, что экзогенная экспрессия HNF4 α не влияет на транскрипцию данного фактора или недостаточна для этого, либо для индукции транскрипции данного фактора необходим более высокий и стабильный уровень экспрессии трансгена. Вероятно, чувствительность метода ОТ-ПЦР недостаточна для определения полного спектра генов-мишеней HNF4 α на этой системе.

Приведенные ниже данные соответствуют только однозначным результатам, которые удалось получить методом ОТ-ПЦР.

Под воздействием трансгена помимо восстановления экспрессии некоторых генов-мишеней фактора HNF4 α мы наблюдали:

- восстановление экспрессии ГЯФ HNF1 α , HNF4 α 7, HNF3 γ , HNF6. Мы впервые получили свидетельства того, что HNF4 α прямо или косвенно регулирует экспрессию генов HNF3 γ , HNF6 и HNF4 α 7;
- активацию транскрипции ядерного рецептора FTF;
- в нашей системе экспрессия HNF4 α подавляет транскрипцию гена COUP-TFI. Это первое свидетельство того, что HNF4 α может прямо или опосредованно регулировать активность COUP-TFI. COUP-TFI является функциональным антагонистом HNF4 α . Показано, что этот фактор может связываться с сайтом DR1, и таким образом подавлять транскрипцию некоторых генов (Duncan et al., 1994; Sladek et al., 1990).

Таким образом, под воздействием экзогенной экспрессии HNF4 α в культуре Н33 произошел сдвиг в сторону приобретения более дифференцированного гепато-специфического фенотипа.

Внимания заслуживает тот факт, трансфекцию осуществляли вектором, экспрессирующим форму HNF4 α 1. При этом мы наблюдали восстановление экспрессии изоформы HNF4 α 7. Это первое указание на то, что транскрипция эмбриональных форм α 7- α 8 может активироваться взрослыми формами α 1- α 6.

Полученные результаты подтверждают гипотезу о том, что HNF4 является ключевым регулятором как экспрессии генов, специфичных для печени, так и поддержания эпителиального фенотипа, и может играть важную роль в интеграции ткане-специфических и общераспространенных сигнальных путей, обеспечивающих контроль клеточного деления и дифференцировки. В то же время, эти данные свидетельствуют в пользу предположения, что факторы, регулирующие экспрессию гена HNF4, могут быть ответственны за прогрессию опухолей.

Для анализа универсальности закономерностей, выявленных в ходе исследования одноступенчатой прогрессии, мы воспользовались коллекцией перевиваемых мышиных ГК.

Нами была выбрана коллекция перевиваемых гепатокарцином мышей, которые можно условно разделить на две группы по скорости роста и уровню дифференцировки: медленнорастущие дифференцированные гепатокарциномы (мвГК) и быстрорастущие низкодифференцированные гепатокарциномы (бнГК).

В качестве дополнительного маркера дифференцировки был использован СА. Действительно, оказалось, что экспрессия гена СА коррелирует с уровнем дифференцировки ГК. Мы показали, что в отличие от мвГК и печени взрослой мыши, во всех бнГК экспрессия этого гена отсутствует.

Необходимо отметить четкую взаимосвязь экспрессии гена HNF4 α и уровня дифференцировки ГК: в исследованных мвГК мы наблюдали экспрессию HNF4 α на уровне, сравнимом с уровнем экспрессии гена HNF4 α в печени. Все исследованные бнГК утрачивают экспрессию HNF4 α вместе со снижением уровня дифференцировки и увеличением скорости роста. Четкая корреляция экспрессии гена HNF4 α и уровня дифференцировки верна для изоформ HNF4 α 1- α 6. Экспрессия изоформ HNF4 α 7- α 8 возобновляется во всех исследованных мвГК по сравнению с нормальной печенью взрослой мыши и исчезает в бнГК. Таким образом, необходимо отметить, что HNF4 α 7 может являться маркером гепатоканцерогенеза.

При сравнении уровней экспрессии генов в мвГК и бнГК мы подтвердили следующие факты, выявленные при исследовании прогрессии ГК (Таблица3):

- экспрессия генов HNF4 α 7 и АФП появляется в мвГК по сравнению с печенью и полностью подавлена в бнГК;
- экспрессия гепатоцитарных ядерных факторов: HNF1, vHNF1, C/EBP α , HNF4 α 1 и HNF3 γ ; энтодермального фактора GATA4, ядерного рецептора FTF и СА – маркера дифференцировки сохраняется в мвГК по сравнению с нормальной печенью и полностью подавлена в бнГК;
- экспрессия HNF6 и энтодермального фактора GATA4 сохраняется в мвГК по сравнению с нормальной печенью и частично подавлена в бнГК;
- экспрессия транскрипционного регулятора COUP-TFI во всех бнГК активируется;
- в некоторых бнГК по сравнению с мвГК активируется ген *Snail*;
- уровни мРНК ГЯФ С/EBP β , HNF3 α , HNF3 β , раннего энтодермального фактора GATA6, а также ядерного рецептора COUP-TFII не изменились (либо изменения эти незначительны).

По-видимому, репрессия ряда генов в бнГК, потенциально может являться причиной произошедшей прогрессии в данной системе перевиваемых ГК мышей. По крайней мере, целая группа генов регулируется координированно.

В то же время, гены, экспрессия которых практически не изменяется, имеют HNF4 α -независимые пути регуляции и, по-видимому, их участие в прогрессии маловероятно.

MAPK/ERK1/2 MAPK/ERK1/2 MAPK/ERK1/2	TTF-1 TTF-1 TTF-1	TTF+ TФН+ CA+	TTF+ TФН+ CA+	TTF- TФН+ CA-	TTF- TФН+ CA-	TTF- TФН+ CA-
MAPK/ERK1/2 MAPK/ERK1/2 MAPK/ERK1/2	AФП- ГСТ+	▲ AФП+ ГСТ+	▼ ▼	AФП- ГСТ-	AФП- ГСТ-	?
MAPK/ERK1/2 MAPK/ERK1/2 MAPK/ERK1/2	E-кадхерин+ β-катенин+	E-кадхерин+ β-катенин+	▼	E-кадхерин+ β-катенин+	E-кадхерин+ β-катенин+	?
MAPK/ERK1/2 MAPK/ERK1/2 MAPK/ERK1/2	GATA4+ FTF+ COUP-TFI- Snail- c-myc- mTERT-	GATA4+ FTF+ COUP-TFI- Snail- c-myc- mTERT-	▼ ▼ ◀ ◀ ◀ ◀	GATA4- FTF- COUP-TFI+ Snail+ c-myc+ mTERT+	GATA4- FTF- COUP-TFI+ Snail+ c-myc+ mTERT+	▲ ▼ ?
MAPK/ERK1/2 MAPK/ERK1/2 MAPK/ERK1/2	HNF4α1+ HNF4α7- HNF1+ vHNF1+ C/EBPα+ HNF3γ+ HNF6+	HNF4α1+ ▲ HNF4α7+ HNF1+ vHNF1+ C/EBPα+ HNF3γ+ HNF6+	▼ ▼ ▼ ▼ ▼ ▼ ▼	HNF4α1- HNF4α7- HNF1- vHNF1- C/EBPα- HNF3γ- HNF6-	HNF4α1- HNF4α7- HNF1- ▲ vHNF1+ C/EBPα- HNF3γ- HNF6-	▲ ▲ ▲ ?
MAPK/ERK1/2 MAPK/ERK1/2 MAPK/ERK1/2	ПЕЧЕНЬ КАНИЦЕРОГЕНES3	ВЫСОКОДИФФЕРЕНЦИРОВАННАЯ МЕДЛЕННОРАСТУЩАЯ ГК (МК)	НИЗКОДИФФЕРЕНЦИРОВАННАЯ БЫСТРОРАСТУЩАЯ ГК (БГК)	ПРОГРЕССИЯ	КУЛЬТУРА КЛЕТОК БГК (Н33)	Н33 ПОСЛЕ ТРАНСФЕКЦИИ РЕЭКСПРЕССИЯ HNF4α

Таблица 3. Общая схема событий, произошедших при прогрессии, а затем при трансфекции.

Показана способность фактора HNF4 α осуществлять негативную регуляцию экспрессии фактора COUP-TFI. Можно взглянуть на этот факт с другой точки зрения. Возможно, мы наблюдали обратную корреляцию между уровнем дифференцировки и экспрессией фактора COUP-TFI.

Фактор COUP-TFI в нормальной печени экспрессируется на низком уровне. Возможно, потеря гепато-специфических свойств при снижении уровня дифференцировки может происходить не только за счет подавления экспрессии гепато-специфических факторов, но и за счет активации генов, не специфичных для печени. Такие факторы за счет репрессорных или конкурентных механизмов вносят свой вклад в утрату тканевой специфичности экспрессии.

Необходимо отметить, что исследуемая в этой работе прогрессия произошла в одной из мГК, которая является частью системы перевиваемых опухолей.

Таким образом, значимость модели, состоящей из мГК и выщепившегося из нее в результате скачкообразной прогрессии варианта бГК, возрастает.

Помимо корреляции с уровнем дифференцировки, падение экспрессии HNF4 α в этом случае сопровождается прогрессией, «озлокачествлением» фенотипа ГК.

Мы провели исследование молекулярных механизмов, которые отвечают за поддержание дифференцировочного статуса опухолей печени. Нарушение процессов дифференцировки - ее блокировка или искажение - является характерной особенностью опухолевого роста. ГК обладают двумя особенностями: снижением проявлений дифференцировки по мере развития опухоли и сохранением способности к ре-дифференцировке даже при внешней утрате признаков дифференцировки (Абелев, 2000).

Данная система, состоящая из перевиваемых мышиных гепатокарцином, представляет собой удобную модель как для изучения роли HNF4 α в регуляции уровней экспрессии печень-специфических генов, так и для анализа роли других и ткане-специфических, и неспецифических регуляторов в гепатоканцерогенезе и при прогрессии.

Выяснено, что бГК и мГК отличаются по уровню экспрессии гена HNF4 α . Причиной репрессии HNF4 в бГК, вероятно, является изменение в экспрессии неидентифицированных регуляторов транскрипции гена HNF4 α . Мы сравнили уровни экспрессии транскрипционных факторов, вероятно участвующих в контроле экспрессии HNF4 α в мГК и бГК. Оказалось, что прогрессия ГК и исчезновение HNF4 α коррелируют с утратой дифференцировки и эпителиального фенотипа, подавлением экспрессии некоторых транскрипционных факторов, участвующих в формировании печени у млекопитающих: HNF1, vHNF1, HNF3 γ , HNF6, C/EBP α , FTF и ранних энтодермальных

транскрипционных факторов GATA4 и GATA6. Так как, при восстановлении экспрессии HNF4 α в бГК не происходит полного восстановления свойств, утраченных мГК при прогрессии (Таблица 3), можно сделать следующие предположения:

- либо в регуляции HNF4 α задействован некий активатор, репрессия которого произошла при прогрессии ГК, в результате чего из мГК выщепилась бГК, где подавлена экспрессия всех изоформ HNF4 α , транскрибирующихся с обоих промоторов (P1 и P2);
- либо существует неизвестный пока репрессор гена HNF4 α , индукция которого происходит в ходе прогрессии ГК.

Новые данные о иерархии отношений гепато-специфических факторов при канцерогенезе могут открыть новые пути для создания подходов к реверсии опухолевого фенотипа.

ВЫВОДЫ

1. Впервые показано, что экспрессия HNF4α четко коррелирует с уровнем дифференцировки химически индуцированных гепатокарцином мышей.
2. Впервые описана активация эмбриональных изоформ HNF4α в ГК, сохранивших ткане-специфические свойства. При прогрессии ГК и утрате гепато-специфической экспрессии транскрипция этих изоформ подавляется.
3. Исследованы свойства скачкообразной прогрессии от медленнорастущей высокодифференцированной гепатомы (мГК) к быстрорастущему дедифференцированному варианту (бГК).

При прогрессии происходит:

- подавление экспрессии генов маркеров дифференцировки СА, ТТР, ТФН и онко-эмбрионального маркера АФП,
 - подавление экспрессии ГЯФ: HNF1, C/EBP α , HNF3 γ HNF4α и HNF6, ранних энтодермальных факторов GATA4 и ядерного рецептора FTF;
 - индукция экспрессии ткане-специфического регулятора COUP-TFI;
 - активация транскрипционного регулятора *Snail*;
 - активация теломеразного комплекса;
 - индукция экспрессии генов с-тус и его гена-мишени ODC;
 - утрата эпителиальной морфологии, коррелирующая с подавлением экспрессии гена Е-кадхерина.
4. Выявленные закономерности подтверждены при исследовании коллекции мышиных гепатокарцином.
 5. Экзогенная экспрессия HNF4α в культуре H33 быстрорастущей дедифференцированной гепатомы восстанавливает:
 - некоторые эпителиальные свойства;
 - экспрессию некоторых гепато-специфических генов: HNF6, HNF3 γ , HNF4α7, ядерного рецептора FTF и подавляет транскрипцию гена COUP-TFI.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Абелев, Г.И. (2000). Механизмы дифференцировки и опухолевый рост. Биохимия 65(1): 127-138.
- Варга, Е.В. (2002). ГЯФ и опухолевые маркеры при прогрессии гепатокарцином. Дисс. на соискание ученой степени канд. биол. наук., М.
- Варга, Е.В., Черемнова, О.А., Овчинников, Д.А., Шапигузов, А., Кудрявцева, Е.И., Морозова, О.В., Энгельгардт, Н.В., Лазаревич, Н.Л. (2001). Экспрессия тканеспецифических генов при прогрессии гепатокарцином мыши. Генетика 37(6): 803-10.
- Копнин, Б.П. (2000). Мишени действия онкогенов и опухолевых супрессоров: ключ к пониманию базовых механизмов канцерогенеза. Биохимия 65(1): 5-33.
- Кудрявцева, Е.И., Морозова, О.В., Рудинская, Т.Д., Энгельгардт, Н.В. (2001). Нарушение межклеточных контактов и взаимодействия клеток с внеклеточным матриксом в быстрорастущей гепатокарциноме мышей. Архив Патологии 4: 33-37.
- Куприна, Н.И. (1965). Органоспецифические антигены в печени и экспериментальных гепатомах. Дисс. на соискание ученой степени канд. биол. наук. М.
- Урываева, И.В., Бродский, В. (1972). Особенности репродукции гепатоцитов при регенерации печени мыши. Цитология 14(10): 1219-28.
- Урываева, И.В., Фактор, В.М. (1975). Фракция роста печени, ее состав по пloidности клеток и изменение при старении. Онтогенез 6(5): 458-465.
- Энгельгардт, Н.В., Кудрявцева, Е.И., Морозова, О.В., Рудинская, Т.Д. (2000). Скачкообразная прогрессия перевиваемой гепатокарциномы мышей, сопряженная с утратой полярности клеток. Архив Патологии 62(3): 24-29
- Abelev, G.I. (1965). Antigenic structure of chemically-induced hepatomas. Prog Exp Tumor Res 7: 104-57.
- Abelev, G.I. (1993). Alpha-fetoprotein biology. Sov. Sci. Rev. D. Physicochem. Biol. 11: 85-109.
- Abelev, G.I., Perova, S., Khramkova, N.I., Postnikova, Z.A., Irlin, I. (1963). Production of embrional alpha-globulin by the transplantable mouse hepatomas. Transplant. Bull 1: 174-180.
- Adjei, A.A. (2001). Blocking oncogenic Ras signaling for cancer therapy. J Natl Cancer Inst 93(14): 1062-74.
- Amati, S., Land, Ph. (1994). Myc-Max-Mad: a transcription factor network controlling cell cycle progression, differentiation and death. Curr Opin Genet Dev. 4(1):102-8.

- Anastasiadis, A.G., Lemm, I., Radzewitz, A., Lingott, A., Ebert, T., Ackermann, R., Ryffel, G.U., Schulz, W.A. (1999). Loss of function of the tissue specific transcription factor HNF1 alpha in renal cell carcinoma and clinical prognosis. *Anticancer Res* 19(3A): 2105-10.
- Ang, S.L., Wierda, A., Wong, D., Stevens, K.A., Cascio, S., Rossant, J., Zaret, K.S. (1993). The formation and maintenance of the definitive endoderm lineage in the mouse: involvement of HNF3/forkhead proteins. *Development* 119(4): 1301-15.
- Ayer, D. (1999). Histone deacetylases: transcriptional repression with SINers and NuRDs. *Trends Cell Biol* 9: 193-198.
- Bach, I., Galcheva-Gargova, Z., Mattei, M.G., Simon-Chazottes, D., Guenet, J.L., Cereghini, S., Yaniv M. (1990). Cloning of human hepatic nuclear factor 1 (HNF1) and chromosomal localization of its gene in man and mouse. *Genomics* 8(1): 155-64.
- Bach, I., Mattei, M.G., Cereghini, S., Yaniv M. (1991). Two members of an HNF1 homeoprotein family are expressed in human liver. *Nucleic Acids Res* 19(13): 3553-9.
- Bach, I., Pontoglio, M., Yaniv M. (1992). Structure of the gene encoding hepatocyte nuclear factor 1 (HNF1). *Nucleic Acids Res* 20(16): 4199-204.
- Bach, I., Yaniv M. (1993). More potent transcriptional activators or a transdominant inhibitor of the HNF1 homeoprotein family are generated by alternative RNA processing. *EMBO J* 12(11): 4229-42.
- Bailly, A., Torres-Padilla, M.E., Tinell, A.P., Weiss, M.C. (2001). An enhancer element 6 kb upstream of the mouse HNF4alpha1 promoter is activated by glucocorticoids and liver-enriched transcription factors. *Nucleic Acids Res* 29(17): 3495-505.
- Batsche, E., Muchardt, C., Behrens, J., Hurst, H.C., Cremisi, C. (1998). RB and c-Myc activate expression of the E-cadherin gene in epithelial cells through interaction with transcription factor AP-2. *Mol Cell Biol*, 18(7):3647-58.
- Baumhueter, S., Courtois, G., Crabtree G.R. (1988). A variant nuclear protein in dedifferentiated hepatoma cells binds to the same functional sequences in the beta fibrinogen gene promoter as HNF-1. *EMBO J* 7(8): 2485-93.
- Baumhueter, S., Mendel, D.B., Conley, P.B., Kuo, C.J., Turk, C., Graves, M.K., Edwards, C.A., Courtois, G., Crabtree G.R. (1990). HNF-1 shares three sequence motifs with the POU domain proteins and is identical to LF-B1 and APF. *Genes Dev* 4(3): 372-9.
- Bello-Fernandez C., Packham G., Cleveland JL. (1993). The ornithine decarboxylase gene is a transcriptional target of c-Myc. *Proc Natl Acad Sci USA*, 90(16): 7804-8.
- Bergsland, E.K., Venook, A.P. (2000). Hepatocellular carcinoma. *Curr Opin Oncol* 12(4): 357-61.

Bernier, D., Thomassin, H., Allard, D., Guertin, M., Hamel, D., Blaquiere, M., Beauchemin, M., LaRue, H., Estable-Puig, M., Belanger, L. (1993). Functional analysis of developmentally regulated chromatin-hypersensitive domains carrying the alpha 1-fetoprotein gene promoter and the albumin/alpha 1-fetoprotein intergenic enhancer. *Mol Cell Biol*, **13**(3):1619-33

Blumenfeld, M., Maury, M., Chouard, T., Yaniv, M., Condamine, H. (1991). Hepatic nuclear factor 1 (HNF1) shows a wider distribution than products of its known target genes in developing mouse. *Development* **113**: 589-599.

Bodnar, P.M., Kononenko, L.O. (1998). Glucobay in the therapy of patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Lik Sprava*, **3**: 111-4.

Bois-Joyeux, B., Danan, J. L. (1994). Members of the CCAAT/enhancer-binding protein, hepatocyte nuclear factor-1 and nuclear factor-1 families can differentially modulate the activities of the rat α -fetoprotein promoter and enhancer. *Biochem. J.* **301**: 49-55.

Boj, S.F., Parrizas, M., Maestro, M.A., Ferrer, J. (2001). A transcription factor regulatory circuit in differentiated pancreatic cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**(25):14481-6.

Bossard, P., Zaret, K. (1998). GATA transcription factors as potentiators of gut endoderm differentiation. *Development* **125**: 4909-17.

Bracke, M.E., Van Roy, F.M., Mareel, M.M. (1996). The E-cadherin/catenin complex in invasion and metastasis. *Curr Top Microbiol Immunol*, **213** (1): 123-61.

Buchkovich, K.J., Greider, C.W. (1996). Telomerase regulation during entry into the cell cycle in normal human T cells. *Mol Biol Cell*, **7**(9): 1443-54.

Buendia, M.A. (2000). Genetics of hepatocellular carcinoma. *Semin Cancer Biol* **10**(3): 185-200.

Bulla, G.A., Fournier, R.E.K., (1992). Selection of hepatoma cell variants deficient in alpha 1-antitrypsin gene expression. *Somat. Cell. Mol. Genet.*, **18**: 361- 370.

Bulla, G.A., Fournier, R.E. (1994). Genetic analysis of a transcriptional activation pathway by using hepatoma cell variants. *Mol Cell Biol* **14**(11): 7086-94.

Carver, E.A., Jiang, R., Lan, Y., Oram, K.F., Gridley, T. (2001). The mouse snail gene encodes a key regulator of the epithelial-mesenchymal transition. *Mol Cell Biol*, **21**(23): 8184-8.

Cascio, S., Zaret, K. (1991). Hepatocyte differentiation initiates during endodermal-mesenchymal interactions prior to liver formation. *Development* **113**: 217-215.

Cereghini, S. (1996). Liver-enriched transcription factors and hepatocyte differentiation. *FASEB J* **10**(2): 267-82.

Cereghini, S., Blumenfeld, M., Yaniv M. (1988). A liver-specific factor essential for albumin transcription differs between differentiated and dedifferentiated rat hepatoma cells. *Genes Dev* 2(8): 957-74.

Cereghini, S., Ott, M.O., Power, S., Maury M. (1992). Expression patterns of vHNF1 and HNF1 homeoproteins in early postimplantation embryos suggest distinct and sequential developmental roles. *Development* 116(3): 783-97.

Chang, C.J., Chen, Y.L., Lee, S.C. (1998). Coactivator TIF1 β interacts with transcription factor C/EBP β and glucocorticoid receptor to induce α 1-acid glycoprotein gene expression. *Mol Cell Biol* 18: 5880-87.

Chaya, D., Fougere-Deschattrette, C., Weiss, M.C. (1997). Liver-enriched transcription factors uncoupled from expression of hepatic functions in hepatoma cell lines. *Mol Cell Biol*, 17 (11): 6311-20.

Chen, M., Ou, J.H. (1995). Cell type-dependent regulation of the activity of the negative regulatory element of the hepatitis B virus core promoter. *Virology* 214(1): 198-206.

Chen, H.L., Wu, X.Z., Tong, H., Qureshi, I.A. (1997). Correlation between the Dynamic Changes of Lipids and Phospholipases during Induced Hepatocarcinogenesis. *Sheng Wu Hua Xue Yu Sheng Wu Wu Li Xue Bao (Shanghai)*, 29(5):489-94.

Chen, P.L., Riley, D.J., Chen, Y., Lee, W.H. (1996). Retinoblastoma protein positively regulates terminal adipocyte differentiation through direct interaction with C/EBPs. *Genes Dev.* 10: 2794-2804.

Chen, W.S., Manova, K., Weinstein, D.C., Duncan, S.A., Plump, A.S., Prezioso, V.R., Bachvarova, R.F., Jr. Darnell, J.E. (1994). Disruption of the HNF4 gene, expressed in visceral endoderm, leads to cell death in embryonic ectoderm and impaired gastrulation of mouse embryos. *Genes Dev.*, 8: 2466-2477.

Chevre, J.C., Hani, E.H., Boutin, P., Vaxillaire, M., Blanche, H., Vionnet, N., Pardini, V.C., Timsit, J., Larger, E., Charpentier, G., Beckers, D., Maes, M., Bellanne-Chantelot, C., Velho, G., Froguel, P. (1998). Mutation screening in 18 Caucasian families suggest the existence of other MODY genes. *Diabetologia*, 41(9):1017-23.

Cirillo, L., Zaret, K. (1999). An early developmental transcription factor complex that is more stable on nucleosome core particles than on free DNA. *Mol Cell* 4: 961-969.

Clark, K.L., Halay, E.D., Lai, E., Burley S.K. (1993). Co-crystal structure of the HNF-3/fork head DNA-recognition motif resembles histone H5. *Nature* 364(6436): 412-20.

Clotman, F., Lannoy, V.J., Reber, M., Cereghini, S., Cassiman, D., Jacquemin, P., Roskams, T., Rousseau, G.G., Lemaigre, F.P. (2002). The onecut transcription factor HNF6 is required for normal development of the biliary tract. *Development*, **129**(8): 1819-28.

Cockell, M., Stolarszyk, D., Frutinger, S., Hughes, G.J., Wellauer, P.K. (1995). Binding site HNF3- beta and gamma and pancreas transcription factor 1 are required for expression of the gene encoding pancreatic alfa-amylase. *Mol Cell Biol*, **15**: 1933-41/

Coffinier, C., Thepot, D., Babinet, C., Yaniv, M., Barra J. (1999). Essential role for the homeoprotein vHNF1/HNF1beta in visceral endoderm differentiation. *Development* **126**(21): 4785-94.

Coffinier, C., Varra, J., Babinet, C., Yaniv, M. (1999a). Expression of the vHNF1/HNF1beta homeoprotein gene during mouse organogenesis. *Mech Dev* **89**(1-2): 211-13.

Cong, Y.S., Wen, J., Bacchetti, S. (1999). The human telomerase catalytic subunit hTERT: organization of the gene and characterization of the promoter. *Hum Mol Genet*, **8**(1): 137-42.

Conneely, O.M., Kettelberger, D.M., Tsai, M.J., Schrader, W.T., O'Malley, B.W. (1989). The chicken progesterone receptor A and B isoforms are products of an alternate translation initiation event. *J Biol Chem*, **264**(24): 14062-4.

Corrales, F.J., Perez-Mato, I., Sanchez Del Pino, M.M., Ruiz, F., Castro, C., Garcia-Trevijano, E.R., Latasa, U., Martinez-Chantar, M.L., Martinez-Cruz, A., Avila, M.A., Mato, J.M. (2002). Regulation of mammalian liver methionine adenosyltransferase. *J Nutr*, **132** (8): 2377S-81S

Costa, R.H., Grayson, D.R., Jr. Darnell JE (1989). Multiple hepatocyte-enriched nuclear factors function in the regulation of transthyretin and alpha 1-antitrypsin genes. *Mol Cell Biol* **9**(4): 1415-25.

Costa A, Pulido F, Rubio R, Cepeda C, Torralba M, Costa JR. (2002). Lipid changes in HIV-infected patients who started rescue therapy with an amprenavir/ritonavir-based highly active antiretroviral therapy. *AIDS*, **16**(14): 1983-4.

Crowe, A.J., Sang, L., Li, K., Lee, K., Spear, B., Barton, M.C. (1999). Hepatocyte nuclear factor 3 relieves chromatin-mediated repression of the alpha-fetoprotein gene. *J Biol Chem* **274**: 25113-25120.

Dabeva, M.D., Hurston, E., Sharitz, D.A. (1995). Transcription factor and liver-specific mRNA expression in facultative epithelial progenitor cells of liver and pancreas. *Am J Pathol*, **147**(6):1633-48.

DeSimone, V., L. De Magistris, D. Lazzaro, J. Gerstner, P. Monaci, A. Nicosia, R. Cortese (1991). LFB3, a heterodimer-forming homeoprotein of the LFB1 family, is expressed in specialized epithelia. *Embo J* 10(6): 1435-43.

Descombes, P., U. Schibler (1991). A liver-enriched transcriptional activator protein, LAP, and a transcriptional inhibitory protein, LIP, are translated from the same mRNA. *Cell* 67(3): 569-79.

Diehl, A.M. (1998). Roles of CCAAT/enhancer-binding proteins in regulation of liver regenerative growth. *Journal Of Biological Chemistry* 273(47): 30843-6.

Drewes, T., Senkel, S., Holewa, B., Ryffel G.U. (1996). Human hepatocyte nuclear factor 4 isoforms are encoded by distinct and differentially expressed genes. *Mol Cell Biol* 16(3): 925-31.

Duncan, S.A., Manova, K., Chen, W.S., Hoodless, P., Weinstein, D.C., Bachvarova, R.F., Jr. Darnell JE (1994). Expression of transcription factor HNF-4 in the extraembryonic endoderm, gut, and nephrogenic tissue of the developing mouse embryo: HNF-4 is a marker for primary endoderm in the implanting blastocyst. *Proc Natl Acad Sci USA* 91(16): 7598-602.

Duncan, S.A., Nagy, A., Chan, W. (1997). Murine gastrulation requires HNF-4 regulated gene expression in the visceral endoderm: tetraploid rescue of Hnf-4(-/-) embryos. *Development* 124(2): 279-87.

Duncan, S.A., Navas, M.A., Dufort, D., Rossant, J., Stoffel M. (1998). Regulation of a transcription factor network required for differentiation and metabolism. *Science* 281(5377): 692-5.

Edlund, M., Wikstrom, K., Toomik, R., Ek, P., Obrink, B. (1998). Characterization of protein kinase C-mediated phosphorylation of the short cytoplasmic domain isoform of C-CAM. *FEBS*, 425(1):166-70.

Evans, R.M. (1988). The steroid and thyroid hormon receptor superfamily. *Science*, 240: 889-895.

Falvey, E., Marcacci, L., Schibler U. (1996). DNA-binding specificity of PAR and C/EBP leucine zipper proteins: a single amino acid substitution in the C/EBP DNA-binding domain confers PAR-like specificity to C/EBP. *Biol Chem* 377(12): 797-809.

Flodby, P., C. Barlow, H. Kylefjord, L. Ahrlund-Richter, K.G. Xanthopoulos (1996). Increased hepatic cell proliferation and lung abnormalities in mice deficient in CCAAT/enhancer binding protein alpha. *J Biol Chem* 271(40): 24753-60.

Frain, M., Swart, G., Monaci, P., Nicosia, A., Stampfli, S., Frank, R., Cortese R. (1989). The liver-specific transcription factor LF-B1 contains a highly diverged homeobox DNA binding domain. *Cell* **59**(1): 145-57.

Friedman, A.D., Landshulz, W.H., McKnight, S.L. (1989). CCAAT/enhancer-binding protein activates the promoter of the serum albumin gene in cultured hepatoma cells. *Genes Dev.*, **3**: 1314-1322.

Fukuda-Taira, S. (1981). Hepatic induction in the avian embryo: specificity of reactive endoderm and inductive mesoderm. *J Embryol Exp Morphol* **63**: 111-125.

Galarneau, L., Pare, J.F., Allard, D., Hamel, D., Levesque, L., Tugwood, J.D., Green, S., Belanger, L. (1996). The alpha1-fetoprotein locus is activated by a nuclear receptor of the *Drosophila* FTZ-F1 family. *Mol Cell Biol*, **16**(7):3853-65.

Garcia, A.D., Ostapchuk, P., and Hearing, P. (1993). Functional interaction of nuclear factors EF-C, HNF-4, and RXR alpha with hepatitis B virus enhancer I. *J. Virol.*, **67**: 3940-50.

Giroldi, L.A., Bringuier, P.P., de Weijert, M., Jansen, C., van Bokhoven, A., Schalken, J.A. (1997). Role of E boxes in the repression of E-cadherin expression. *Biochem Biophys Res Commun*, **241**(2):453-8.

Greenbaum, L.E., D.E. Cressman, B.A. Haber, R. Taub (1995). Coexistence of C/EBP alpha, beta, growth-induced proteins and DNA synthesis in hepatocytes during liver regeneration. Implications for maintenance of the differentiated state during liver growth. *J Clin Invest* **96**(3): 1351-65.

Greenbaum, L.E., Li, W., Cressman, D.E., Peng, Y., Ciliberto, G., Poli, V., Taub R. (1998). CCAAT enhancer- binding protein beta is required for normal hepatocyte proliferation in mice after partial hepatectomy. *J Clin Invest* **102**(5): 996-1007.

Greider, C.W., Blackburn, E.H. (1985). Identification of a specific telomere terminal transferase activity in *Tetrahymena* extracts. *Cell*, **43**(21):405-13

Greider, C.W., Blackburn, E.H. (1989). A telomeric sequence in the RNA of *Tetrahymena* telomerase required for telomere repeat synthesis. *Nature*, **337**(6205):331-7

Gregory, P., Horz, W. (1998). Life with nucleosomes: chromatin remodeling in gene regulation. *Curr Opin Cell Biol* **10**: 339-345.

Guaita, S., Puig, I., Franci, C., Garrido, M., Dominguez, D., Batlle, E., Sancho, E., Dedhar, S., Garcia De Herreros, A., Baulida, J. (2002). Snail induction of epithelial-to-mesenchymal transition in tumor cells is accompanied by MUC-1 repression and ZEB1 expression. *J Biol Chem* (epub ahead of print).

Gualdi, R., Bossard, P., Zheng, M., Hamada, Y., Coleman, J.R., Zaret, K.S. (1996). Hepatic specification of the gut endoderm in vitro: cell signaling and transcriptional control. *Gene Dev* **10**: 1670-1682.

Hadzopoulou-Cladaras, M., Kistanova, E., Evangelopoulou, C., Zeng, S., Cladaras, C., Ladias, J.A. (1996). Functional domain of the HNF4. *J. Biol. Chem.* **272**(1): 539-550.

Hall, A.J., Chuansumrit, A., Peake, I.R., Winship, P.R. (1994). A single base pair deletion in the promoter region of the factor IX gene is associated with haemophilia B. *Thromb Haemost* **72**(6): 799-803.

Hall, R.K., Sladek, F.M., Granner D.K. (1995). The orphan receptors COUP-TF and HNF-4 serve as accessory factors required for induction of phosphoenolpyruvate carboxykinase gene transcription by glucocorticoids. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(2): 412-6.

Hann, H.W., Stahlhut, M.W., Rubin, R., Maddrey, W.C. (1992). Antitumor effect of deferoxamine on human hepatocellular carcinoma growing in athymic nude mice. *Cancer*, **70**(8):2051-6.

Hanahan, D., Weinberg, R.A., (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* **100**(1): 57-70.

Harnish, D.C., Malik, S., Kilbourne, E., Costa, R., Karathanasis S.K. (1996). Control of apolipoprotein AI gene expression through synergistic interactions between hepatocyte nuclear factors 3 and 4. *J Biol Chem* **271**(23): 13621-8.

Hata, K. (1995). On the right track. The integrated IEC campaign succeeds in recruiting many acceptors in a fishing commune. *Integration*, **45**:14-6.

Hatzis, P., Talianidis, I. (2001). Regulatory mechanisms controlling human hepatocyte nuclear factor 4alpha gene expression. *Mol Cell Biol*, **21**(21): 7320-30.

Hayashi, Y., Wang, W., Ninomiya, T., Nagano, H., Ohta, K., Itoh H. (1999). Liver enriched transcription factors and differentiation of hepatocellular carcinoma. *Mol Pathol* **52**(1): 19-24.

Hayhurst, G.P., Lee, Y.H., Lambert, G., Ward, J.M., Gonzalez F.J. (2001). Hepatocyte nuclear factor 4alpha (nuclear receptor 2A1) is essential for maintenance of hepatic gene expression and lipid homeostasis. *Mol Cell Biol* **21**(4): 1393-403.

Hemavathy, K., Ashraf, S.I., Ip, Y.T. (2000). Snail/slug family of repressors: slowly going into the fast lane of development and cancer. *Gene*, **257**(1):1-12.

Henderson, A.J., Calame, K.L. (1997). CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP) sites are required for HIV-1 replication in primary macrophages but not CD4(+) T cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**(16): 8714-9.

Henriksson, M., Luscher, B. (1996). Proteins of the Myc network: essential regulators of cell growth and differentiation. *Adv Cancer Res*, **68**:109-82

Herbst, R.S., Nielsch, U., Sladek, F., Lai, E., Babiss, L.E., Jr. Darnell J.E. (1991). Differential regulation of hepatocyte-enriched transcription factors explains changes in albumin and transthyretin gene expression among hepatoma cells. *New Biol* **3**(3): 289-96.

Hertz, R., Magenheim, J., Berman, I., Bar-Tana J. (1998). Fatty acyl-CoA thioesters are ligands of hepatic nuclear factor-4alpha. *Nature* **392**(6675): 512-6.

Hibshoosh, H., Johnson, M., Weinstein, I.B. (1991). Effects of overexpression of ornithine decarboxylase (ODC) on growth control and oncogene-induced cell transformation. *Oncogene*, **6**(5):739-43

Holewa, B., Strandmann, E.P., Zapp, D., Lorenz, P., Ryffel, G.U. (1996a). Transcriptional hierarchy in Xenopus embryogenesis: HNF4 a maternal factor involved in the developmental activation of the gene encoding the tissue specific transcription factor HNF1 alpha (LFB1). *Mech Dev*, **54**(1):45-57.

Holewa, B., Pogge, E. (1996b). Transcriptional hierarchy in Xenopus embryogenesis: HNF4 is maternal factor involved in the developmental activation of the gene encoding the tissue specific transcription factor LFB1. *Mech. Dev.* **54**: 45-57.

Huang, G.T., Lee, H.S., Chen, C.H., Chiou, L.L., Lee, C.Z., Chen, D.S., Hsu, H.C., Sheu, J.C. (1999). Tissue hepatocyte growth factor and proliferating cell nuclear antigen in hepatocellular carcinoma. *J Formos Med Assoc* **98**(2): 92-6.

Imhof, A., Yang, X.J., Ogryzko, V.V., Nakatani, Y., Wolffe, A.P., Ge, H. (1997). Acetylation of general transcription factors by histone acetyltransferases. *Curr Biol* **7**(9): 689-92.

Inaba, T., Shapiro, L.H., Funabiki, T. (1994). DNA-binding specificity and trans-activating potential of the leukemia-associated E2A-hepatocyte factor protein. *Mol Cell Biol* **14**: 3403-14.

Ingelman-Sundberg, M., Johansson, I., Persson, I., Oscarson, M., Hu, Y., Bertilsson, L., Dahl, M.L., Sjoqvist, F. (1994). Genetic polymorphism of cytochrome P450. Functional consequences and possible relationship to disease and alcohol toxicity. *EXS* **71**: 197-207.

Jung, J., Zheng, M., Goldfarb, M., Zaret, K.S. (1999). Initiation of mammalian liver development from endoderm by fibroblast growth factors. *Science* **284**: 1998-2003.

Kaestner, K.H., Hiemisch, H., Luckow, B., Schutz G. (1994). The HNF-3 gene family of transcription factors in mice: gene structure, cDNA sequence, and mRNA distribution. *Genomics* 20(3): 377-85.

Kaestner, K.H., Hiemisch, H., Schutz G. (1998). Targeted disruption of the gene encoding hepatocyte nuclear factor 3gamma results in reduced transcription of hepatocyte-specific genes. *Mol Cell Biol* 18(7): 4245-51.

Kaestner, K.H., Katz, J., Liu, Y., Drucker, D.J., Schutz G. (1999). Inactivation of the winged helix transcription factor HNF3alpha affects glucose homeostasis and islet glucagon gene expression in vivo. *Genes Dev* 13(4): 495-504.

Kaestner, K.H., Knochel, W., Martinez D.E. (2000). Unified nomenclature for the winged helix/forkhead transcription factors. *Genes Dev* 14(2): 142-6.

Khramkova, N.I., Postnikova, Z.A., Abelev, G.I. (1963). Antigenic structure of mouse hepatomas III. A study of organospecific liver antigens in the hepatomas with the aid of specific antibodies. *Neoplasma* 10(2): 127-131.

Kritis, A.A., Ktistaki, E., Barda, D., Zannis, V.I., Talianidis, I. (1993). An indirect negative autoregulatory mechanism involved in hepatocyte nuclear factor-1 gene expression. *Nucleic Acids Res* 21(25): 5882-9.

Ktistaki, E. (1995). Recruitment of hepatocyte nuclear factor 4 into specific intranuclear compartments depends on tyrosin phosphorylation that affects its DNA-binding and transactivation potencial. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92: 9876-80.

Krutowskikh, V.A., Oyamada, M., Yamasaki, H. (1991). Sequential changes of gap-junctional intercellular communications during multistage rat liver carcinogenesis: direct measurement of communication in vivo. *Carcinogenesis* 12(9): 1701-6.

Kuo, C.F., Xanthopoulos, K.G., Jr. Darnell J.E. (1990). Fetal and adult localization of C/EBP: evidence for combinatorial action of transcription factors in cell-specific gene expression. *Development* 109(2): 473-81.

Kuo, C.J., Conley, P.B., Chen, L., Sladek, F.M., Jr. Darnell JE, Crabtree G.R. (1992). A transcriptional hierarchy involved in mammalian cell-type specification. *Nature* 355(6359): 457-61.

Kuo, C.T., Morrisey, E.E., Anandappa, R., Sigrist, K., Lu, M.M., Parmacek, M.S., Soudais, C., Leiden, J.M. (1997). GATA4 transcription factor is required for ventral morphogenesis and heart tube formation. *Genes Dev* 11(8): 1048-60.

Ladias, J.A. (1994). Convergence of multiple nuclear receptor signaling pathways onto the long terminal repeat of human immunodeficiency virus-1. *J Biol Chem* 269(8): 5944-51.

- Lahuna, O., Fernandez, L., Karlsson, H., Maiter, D., Lemaigre, F.P., Rousseau, G.G., Gustafsson, J., Mode, A. (1997). Expression of hepatocyte nuclear factor 6 in rat liver is sex-dependent and regulated by growth hormone. *Proc Natl Acad Sci USA* 94(23): 12309-13.
- Lahuna, O., Rastegar, M., Maiter, D., Thissen, J.P., Lemaigre, F.P., Rousseau, G.G. (2000). Involvement of STAT5 (signal transducer and activator of transcription 5) and HNF-4 (hepatocyte nuclear factor 4) in the transcriptional control of the hnf6 gene by growth hormone. *Mol Endocrinol* 14(2): 285-94.
- Landry, C., Clotman, F., Hioki, T., Oda, H., Picard, J.J., Lemaigre, F.P., Rousseau G.G. (1997). HNF-6 is expressed in endoderm derivatives and nervous system of the mouse embryo and participates to the cross-regulatory network of liver- enriched transcription factors. *Dev Biol* 192(2): 247-57.
- Landschulz, W.H., Johnson, P.F., McKnight, S.L. (1988). The leucine zipper: a hypothetical structure common to a new class of DNA binding proteins. *Science*, 240: 1754-1764.
- Lannoy, V.J., Burglin, T.R., Rousseau, G.G., Lemaigre F.P. (1998). Isoforms of hepatocyte nuclear factor-6 differ in DNA-binding properties, contain a bifunctional homeodomain, and define the new ONECUT class of homeodomain proteins. *J Biol Chem* 273(22): 13552-62.
- Lavery, D.J., Lopez-Molina, L., Margueron, R., Fleury-Olela, F., Conquet, F., Schibler, U., Bonfils C. (1999). Circadian expression of the steroid 15 α -hydroxylase (Cyp2a4) and coumarin 7-hydroxylase (Cyp2a5) genes in mouse liver is regulated by the PAR leucine zipper transcription factor DBP. *Mol Cell Biol* 19(10): 6488-99.
- LeDouarin, N.M. (1975). An experimental analysis of liver development. *Med Biol* 53: 427-55.
- Lee, Y.H., Sauer, B., Johnson, P.F., Gonzalez F.J. (1997). Disruption of the c/ebp alpha gene in adult mouse liver. *Mol Cell Biol* 17(10): 6014-22.
- Legraverend, C., Antonson, P., Flodby, P., Xanthopoulos, K.G. (1993). High level activity of the mouse CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP alpha) gene promoter involves autoregulation and several ubiquitous transcription factors. *Nucleic Acids Res* 21(8): 1735-42.
- Lekstrom-Himes, J., Xanthopoulos K.G. (1998). Biological role of the CCAAT/enhancer-binding protein family of transcription factors. *J Biol Chem* 273(44): 28545-8.
- Lemaigre, F.P., Rousseau, G.G., (1994). Transcriptional control of genes that regulate glycolysis and gluconeogenesis in adult liver. *Biochem*, 303 (1): 1-14.

Lemaigre, F.P., Durviaux, S.M., Truong, O., Lannoy, V.J., Hsuan, J.J., Rousseau G.G. (1996). Hepatocyte nuclear factor 6, a transcription factor that contains a novel type of homeodomain and a single cut domain. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**(18): 9460-4.

Li, J., Ning, G., Duncan, S.A. (2000). Mammalian hepatocyte differentiation requires the transcription factor HNF-4alpha. *Genes Dev* **14**(4): 464-74.

Lincoln, A.J., Monczak, Y., Williams, S.C., Johnson P.F. (1998). Inhibition of CCAAT/enhancer-binding protein alpha and beta translation by upstream open reading frames. *J Biol Chem* **273**(16): 9552-60.

Lingner, J., Hughes, T.R., Shevchenko, A., Mann, M., Lundblad, V., Cech, T.R. (1997). Reverse transcriptase motifs in the catalytic subunit of telomerase. *Science*, **276** (5312): 561-7.

Locker, J. (2001). Tissue-specific regulation by transcription factors. *Transcription factors*. J. Locker. Oxford, BIOS Scientific Publishers Ltd. **1**: 237-262.

Lopez-Molina, L., Conquet, F., Dubois-Dauphin, M., Schibler U. (1997). The DBP gene is expressed according to a circadian rhythm in the suprachiasmatic nucleus and influences circadian behavior. *Embo J* **16**(22): 6762-71.

Magee, T.R., Cai, Y., El-Houseini, M.E., Locker, J., Wan, Y.J. (1998). Retinoic acid mediates down-regulation of the alpha-fetoprotein gene through decreased expression of hepatocyte nuclear factors. *J Biol Chem* **273**(45): 30024-32.

McPherson, C.E., Shim, E.Y., Friedman, D.S., Zaret, K.S. (1993). An active tissue-specific enhancer and bound transcription factors existing in a precisely positioned nucleosomal array. *Cell* **75**(2): 387-98.

Mendel, D.B., Hansen, L.P., Graves, M.K., Conley, P.B., Crabtree G.R. (1991). HNF-1 alpha and HNF-1 beta (vHNF-1) share dimerization and homeo domains, but not activation domains, and form heterodimers in vitro. *Genes Dev* **5**(6): 1042-56.

Michalopoulos, G.K., DeFrances, M.C. (1997). Liver regeneration. *Science* **276**(5309): 60-6.

Miquerol, L., Lopez, S., Cartier, N., Tulliez, M., Raymondjean, M., Kahn, A. (1994). Expression of the L-type pyruvate kinase gene and the hepatocyte nuclear factor 4 transcription factor in exocrine and endocrine pancreas. *J Biol Chem*, **269**(12): 8944-51.

Molkentin, J., Lin, Q., Duncan, S., Olson, E. (1997). Requirement of the transcription factor GATA4 for heart tube formation and ventral morphogenesis. *Genes Dev*. **11**: 1061-72.

Molkentin, J.D. (2000). The zinc finger-containing transcription factors GATA-4, -5, and -6. Ubiquitously expressed regulators of tissue-specific gene expression. *J Biol Chem* **275**(50): 38949-52.

Moses, H.L., Yang, E.Y., Pietenpol, J.A. (1990). TGF-beta stimulation and inhibition of cell proliferation: new mechanistic insights. *Cell*, **63**(2):245.

Morgan, K., Scobie, G., Marsters, P., Kalsheker, N.A. (1997). Mutation in an alpha1-antitrypsin enhancer results in an interleukin-6 deficient acute-phase response due to loss of cooperativity between transcription factors. *Biochim Biophys Acta* **1362**(1): 67-76.

Morrisey, E.E., Ip, H.S., Lu, M.M., Parmacek, M.S. (1996). GATA-6: a zinc finger transcription factor that is expressed in multiple cell lineages derived from lateral mesoderm. *Dev Biol* **177**(1): 309-22.

Morrisey, E.E., Tang, Z., Sigrist, K., Lu, M.M., Jiang, F., Ip, H.S., Parmacek, M.S. (1998). GATA6 regulates HNF4 and is required for differentiation of visceral endoderm in the mouse embryo. *Genes Dev* **12**(22): 3579-90.

Mueller, C.R., Maire, P., Schibler U. (1990). DBP, a liver-enriched transcriptional activator, is expressed late in ontogeny and its tissue specificity is determined posttranscriptionally *Cell* **61**(2): 279-91.

Mutoh, K., Wakuri, H., Liu, B., Seno, M., Taniguchi, K. (1998). Electron microscopic study of intercalated duct cells in the chicken pancreatic islet and effects of tolbutamide administration. *Okajimas Folia Anat Jpn*, **75**(5): 231-7.

Nagao, T., Ishida, Y., Yamazaki, K., Kondo, Y. (1995). Nucleolar organizer regions in hepatocellular carcinoma related to the cell cycle, cell proliferation and histologic grade. *Pathol Res Pract*, **191**(10): 967-72.

Nagy, P., Bisgaard, H.C., Thorgeisson, S.S. (1994). Expression of hepatic transcription factor during liver development and oval cell differentiation. *J. Cell. Biol.* **126**: 223-233.

Nakamura, T., Akiyoshi, H., Shiota, G., Isono, M., Nakamura, K., Moriyama, M., Sato, K. (1999). Hepatoprotective action of adenovirus-transferred HNF-3gamma gene in acute liver injury caused by CCl₄. *FEBS Lett* **459**(1): 1-4.

Nakhei, H., Lingott, A., Lemm, I., Ryffel G.U. (1998). An alternative splice variant of the tissue specific transcription factor HNF4alpha predominates in undifferentiated murine cell types. *Nucleic Acids Res* **26**(2): 497-504.

Nerlov, C., Ziff, E.B (1994). Three levels of functional interaction determine the activity of CCAAT/enhancer binding protein- α on the serum albumin promoter. *Genes Dev* **8**(3): 350-62.

Nerlov, C., Ziff, E.B (1995). CCAAT/enhancer binding protein- α amino acid motifs with dual TBP and TFIIB binding ability co-operate to activate transcription in both yeast and mammalian cells. *EMBO J* **14**: 4318-28.

Nicosia, A., Monaci, P., Tomei, L., De Francesco, R., Nuzzo, M., Stunnenberg, H., Cortese R. (1991). A myosin-like dimerization helix and an extra-large homeodomain are essential elements of the tripartite DNA binding structure of LFB1. *Cell* 61(7): 1225-36.

Nieto, M.A. (2002). The snail superfamily of zinc-finger transcription factors. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 3(3): 155-66.

Ninomiya, T., Hayashi, Y., Saijoh, K., Ohta, K., Yoon, S., Nakabayashi, H., Tamaoki, T., Kasuga, M., Itoh, H. (1996). Expression ratio of hepatocyte nuclear factor-1 to variant hepatocyte nuclear factor-1 in differentiation of hepatocellular carcinoma and hepatoblastoma. *J Hepatol* 25(4): 445-53.

Nuclear Receptors Nomenclature Committee (1999). A unified nomenclature systems for the nuclear receptor superfamily. *Cell* 97: 161-3.

Ogden, S.K., Lee, K.C., Barton, M.C. (2000). Hepatitis B viral transactivator HBx alleviates p53-mediated repression of alpha-fetoprotein gene expression. *J Biol Chem*, 275(36): 27806-14.

Ogden, S.K., Lee, K.C., Wernke-Dollries, K., Stratton, S.A., Aronow, B., Barton, M.C. (2001). p53 targets chromatin structure alteration to repress alpha-fetoprotein gene expression. *J Biol Chem*, 276(45): 42057-62.

Ott, M.O., Rey-Campos, J., Cereghini, S., Yaniv M. (1991). vHNF1 is expressed in epithelial cells of distinct embryonic origin during development and precedes HNF1 expression. *Mech Dev* 36(1-2): 47-58.

Osada, T., Sakamoto, M., Ino, Y., Iwamatsu, A., Matsuno, Y., Muto, T., Hirohashi, S. (1996). E-cadherin is involved in the intrahepatic metastasis of hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, 24(6): 1460-7.

Pani, L., Overdier, D.G., Porcella, A., Qian, X., Lai, E., Costa R.H. (1992a). Hepatocyte nuclear factor 3 beta contains two transcriptional activation domains, one of which is novel and conserved with the *Drosophila* fork head protein. *Mol Cell Biol* 12(9): 3723-32.

Pani, L., Quian, X.B., Clevidence, D., Costa R.H. (1992b). The restricted promoter activity of the liver transcription factor hepatocyte nuclear factor 3 beta involves a cell-specific factor and positive autoactivation. *Mol Cell Biol* 12(2): 552-62.

Pare, J.F., Roy, S., Galarneau, L., Belanger, L. (2001). The mouse fetoprotein transcription factor (FTF) gene promoter is regulated by three GATA elements with tandem E box and Nkx motifs, and FTF in turn activates the Hnf3beta, Hnf4alpha, and Hnf1alpha gene promoters. *J Biol Chem* 276(16): 13136-44.

Philippe, J., Morel, C., Prezioso V.R. (1994). Glucagon gene expression is negatively regulated by hepatocyte nuclear factor 3 beta. *Mol Cell Biol* 14(5): 3514-23.

Pierreux, C.E., Stafford, J., Demonte, D., Scott, D.K., Vandenhoute, J., O'Brien, R.M., Granner, D.K., Rousseau, G.G., Lemaigre, F.P. (1999). Antiglucocorticoid activity of hepatocyte nuclear factor-6. *Proc Natl Acad Sci USA*, 96(16): 8961-6.

Pontoglio, M., Faust, D.M., Doyen, A., Yaniv, M., Weiss M.C. (1997). Hepatocyte nuclear factor 1alpha gene inactivation impairs chromatin remodeling and demethylation of the phenylalanine hydroxylase gene. *Mol Cell Biol* 17(9): 4948-56.

Pontoglio, M., Sreenan, S., Roe, M., Pugh, W., Ostrega, D., Doyen, A., Pick, A.J., Baldwin, A., Velho, G., Froguel, P., Levisetti, M., Bonner-Weir, S., Bell, G.I., Yaniv, M., Polonsky K.S. (1998). Defective insulin secretion in hepatocyte nuclear factor 1alpha-deficient mice. *J Clin Invest* 101(10): 2215-22.

Power, S.C., Cereghini, S. (1996). Positive regulation of the vHNF1 promoter by the orphan receptors COUP-TF1/Ear3 and COUP-TFII/Arp1. *Mol Cell Biol* 16(3): 778-91.

Qian, X., Costa R.H. (1995). Analysis of hepatocyte nuclear factor-3 beta protein domains required for transcriptional activation and nuclear targeting. *Nucleic Acids Res* 23(7): 1184-91.

Qiu, Y., Krishnan, V., Pereira, F.A., Tsai, S.Y., Tsai, M.J. (1996). Chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factors and their regulation. *J Steroid Biochem Mol Biol* 56(1-6 Spec No): 81-5.

Rachez, C., Gamble, M., Chang, C.P., Atkins, G.B., Lazar, M.A., Freedman, L.P. (2000). The DRIP complex and SRC-1/p160 coactivators share similar nuclear receptor binding determinants but constitute functionally distinct complexes. *Mol Cell Biol*, 20(8): 2718-26.

Rana, B., Y. Xie, D. Mischoulon, N.L. Bucher, S.R. Farmer (1995). The DNA binding activity of C/EBP transcription factor is regulated in the G1 phase of the hepatocyte cell cycle. *J Biol Chem* 270(30): 18123-32.

Raney, A.K., Zhang, P., McLachlan, A. (1995). Regulation of transcription from the hepatitis B virus large surface antigen promoter by hepatocyte nuclear factor 3. *J Virol* 69(6): 3265-72.

Rey-Campos, J., Chouard, T., Yaniv, M., Cereghini S. (1991). vHNF1 is a homeoprotein that activates transcription and forms heterodimers with HNF1. *EMBO J* 10(6): 1445-57.

Ryffel B. (1996). Gene knockout mice as investigative tools in pathophysiology. *Int J Exp Pathol*, 77(4): 125-41.

Ryffel, G.U. (2001). Mutations in the human genes encoding the transcription factors of the hepatocyte nuclear factor (HNF)1 and HNF4 families: functional and pathological consequences. *J Mol Endocrinol* 27(1): 11-29.

Samadani, U., Costa R.H. (1996). The transcriptional activator hepatocyte nuclear factor 6 regulates liver gene expression. *Mol Cell Biol* 16(11): 6273-84.

Samadani, U., Porcella, A., Pani, L., Johnson, P.F., Burch, J.B., Pine, R., Costa, R.H. (1995). Cytokine regulation of the liver transcription factor hepatocyte nuclear factor-3 beta is mediated by the C/EBP family and interferon regulatory factor 1. *Cell Growth Differ* 6(7): 879-90.

Sambrook, J., Fritsch, E., Maniatis, T. (1989). Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor, NY., Cold Spring Harbor laboratory.

Sasaki, H., Hogan, B.L. (1993). Differential expression of multiple fork head related genes during gastrulation and axial pattern formation in the mouse embryo. *Development* 118(1): 47-59.

Schaeffer, E., Guillou, F., Part, D., Zakin M.M. (1993). A different combination of transcription factors modulates the expression of the human transferrin promoter in liver and Sertoli cells. *J Biol Chem* 268(31): 23399-408.

Sel, S., Ebert, T., Ryffel, G.U., Drewes, T. (1996). Human renal cell carcinogenesis is accompanied by a coordinate loss of the tissue specific transcription factors HNF4 alpha and HNF1 alpha. *Cancer Lett* 101(2): 205-10.

Shen, C.N., Slack, J.M., Tosh, D. (2000). Molecular basis of transdifferentiation of pancreas to liver. *Nat Cell Biol* 2(12): 879-87.

Shiota, G., Okano, J., Kawasaki, H., Kawamoto, T., Nakamura, T. (1995). Serum hepatocyte growth factor levels in liver diseases: clinical implications. *Hepatology* 21(1): 106-12.

Sladek, F.M., Ruse, Jr, M.D., Nepomuceno, L., Huang, S.M., Stallcup M.R. (1999). Modulation of transcriptional activation and coactivator interaction by a splicing variation in the F domain of nuclear receptor hepatocyte nuclear factor 4alpha1. *Mol Cell Biol* 19(10): 6509-22.

Sladek, F.M., Zhong, W.M., Lai, E., Jr. Darnell JE (1990). Liver-enriched transcription factor HNF-4 is a novel member of the steroid hormone receptor superfamily. *Genes Dev* 4(12B): 2353-65.

Soutoglou, E., Papafotiou, G., Katrakili, N., Talianidis, I. (2000). Transcriptional activation by hepatocyte nuclear factor-1 requires synergism between multiple coactivator proteins. *J Biol Chem*, 275(17):12515-20.

Spath, G.F., Weiss, M.C. (1997). Hepatocyte nuclear factor 4 expression overcomes repression of the hepatic phenotype in dedifferentiated hepatoma cells. *Mol Cell Biol* 17(4): 1913-22.

Spath, G.F., Weiss, M.C. (1998). Hepatocyte nuclear factor 4 provokes expression of epithelial marker genes, acting as a morphogen in dedifferentiated hepatoma cells. *J Cell Biol* 140(4): 935-46.

Stoffel, M., Duncan S.A. (1997). The maturity-onset diabetes of the young (MODY1) transcription factor HNF4alpha regulates expression of genes required for glucose transport and metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(24): 13209-14.

Sund, N.J., Ang, S.L., Sackett, S.D., Shen, W., Daigle, N., Magnuson, M.A., Kaestner, K.H. (2000). Hepatocyte nuclear factor 3beta (Foxa2) is dispensable for maintaining the differentiated state of the adult hepatocyte. *Mol Cell Biol* 20(14): 5175-83.

Taipale, J., Keski-Oja, J. (1997). Growth factors in the extracellular matrix. *FASEB J* 11(1): 51-9.

Tahara, H., Kuniyasu, H., Yokozaki, H., Yasui, W., Shay, J.W., Ide, T., Tahara, E. (1995). Telomerase activity in preneoplastic and neoplastic gastric and colorectal lesions. *Clin Cancer Res*, 1(11): 1245-51.

Takiguchi, M. (1998). The C/EBP family of transcription factors in the liver and other organs. *Int J Exp Pathol* 79: 369-391.

Tang, F.Y., Meydani, M. (2001). Green tea catechins and vitamin E inhibit angiogenesis of human microvascular endothelial cells through suppression of IL-8 production. *Nutr Cancer*, 41(1-2): 119-25.

Taraviras, S., Monaghan, A.P., Schutz, G., Kelsey G. (1994). Characterization of the mouse HNF-4 gene and its expression during mouse embryogenesis. *Mech Dev* 48(2): 67-79.

Taylor, D.G., Haubbenwallner, S., Leff, T. (1996). Characterization of a DN-HNF4. *Nucleic Acids Res*. 24: 2930- 2935.

Tian, J.M., Schibler U. (1991). Tissue-specific expression of the gene encoding hepatocyte nuclear factor 1 may involve hepatocyte nuclear factor 4. *Genes Dev* 5(12A): 2225-34.

Tilghman, S.M., Belayew, A. (1982). Transcriptional control of the murine albumin/alpha-fetoprotein locus during development. *Proc Natl Acad Sci USA*, 79(17): 5254-7.

Timchenko, N.A., M. Wilde, G.J. Darlington (1999). C/EBP α regulates formation of S-phase-specific E2F-p107 complexes in livers of newborn mice. *Mol Cell Biol* 19(4): 2936-45.

Timchenko, N.A., Harris, T.E., Wilde, M (1997). CCAAT/enhancer binding protein α regulates p21 protein and hepatocyte proliferation in newborn mice. *Mol Cell Biol* 17: 7252-61.

Toniatti, C., Monaci, P., Nicosia, A., Cortese, R., Ciliberto G. (1993). A bipartite activation domain is responsible for the activity of transcription factor HNF1/LFB1 in cells of hepatic and nonhepatic origin. *DNA Cell Biol* 12(3): 199-208.

Tonjes, R.R., Xanthopoulos, K.G., Darnell, J.E., Jr. Paul D. (1992). Transcriptional control in hepatocytes of normal and c14CoS albino deletion mice. *EMBO J.*, 11: 127-33.

Torchia, J., Rose, D.W., Inostroza, J., Kamei, Y., Westin, S., Glass, C.K., Rosenfeld, M.G. (1997). The transcriptional co-activator p/CIP binds CBP and mediates nuclear-receptor function. *Nature*, 387(6634): 677-84.

Torres-Padilla, M.E., Fougere-Deschัtrette, C., Weiss, M.C. (2001). Expression of HNF4alpha isoforms in mouse liver development is regulated by sequential promoter usage and constitutive 3' end splicing. *Mech Dev*, 109(2): 183-93.

Tronche, F., Rollier, A., Herbomel, P., Bach, I., Cereghini, S., Weiss, M., Yaniv M. (1990). Anatomy of the rat albumin promoter. *Mol Biol Med* 7(2): 173-85.

Tronche, F., and Yaniv, M. (1992). HNF-1, a homeoprotein member of the hepatic transcription regulatory network. *BioEssays*, 14: 579-587.

Tsai, L.C., Hung, M.W., Yuan, C.C., Chao, P.L., Jiang, S.Y., Chang, G.G., Chang, T.C. (1997). Effects of tamoxifen and retinoic acid on cell growth and c-myc gene expression in human breast and cervical cancer cells. *Anticancer Res*, 17(6D): 4557-62.

Van den Hoff, M.J., Vermeulen, J.L., De Boer, P.A., Lamers, W.H., Moorman A.F. (1994). Developmental changes in the expression of the liver-enriched transcription factors LF-B1, C/EBP, DBP and LAP/LIP in relation to the expression of albumin, alpha-fetoprotein, carbamoylphosphate synthase and lactase mRNA. *Histochem J* 26(1): 20-31.

Vaisse, C., Kim, J., Espinosa, R. 3rd, Le Beau, M.M., Stoffel, M. (1997). Pancreatic islet expression studies and polymorphic DNA markers in the genes encoding hepatocyte nuclear factor-3alpha, -3beta, -3gamma, -4gamma, and -6. *Diabetes*, 46(8): 1364-7.

Viollet, B., Kahn, A. and Raymondejean, M. (1997). Protein kinase A-dependent phosphorylation modulates DNA-binding activity of HNF4. *Mol. Cell. Biol.* 17: 4208-19.

Volpes, R., van den Oord, J.J., Desmet, V.J. (1993). Integrins as differential cell lineage markers of primary liver tumors. *Am J Pathol* 142(5): 1483-92.

Wang, B., Cai, S.R., Gao, C., Sladek, F.M., Ponder, K.P. (2001). Lipopolysaccharide results in a marked decrease in hepatocyte nuclear factor 4 alpha in rat liver. *Hepatology*, 34(5): 979-89.

Wang, N.D., M.J. Finegold, A. Bradley, C.N. Ou, S.V. Abdelsayed, M.D. Wilde, L.R. Taylor, D.R. Wilson, G.J. Darlington (1995). Impaired energy homeostasis in C/EBP alpha knockout mice. *Science* **269**(5227): 1108-12.

Wang, W., Hayashi, Y., Ninomiya, T., Ohta, K., Nakabayashi, H., Tamaoki, T., Itoh, H. (1998). Expression of HNF-1 alpha and HNF-1 beta in various histological differentiations of hepatocellular carcinoma. *J Pathol* **184**(3): 272-8.

Wang, W.X., Li, M., Wu, X., Wang, Y., Li, Z.P. (1998). HNF1 is critical for the liver-specific function of HBV enhancer II. *Res Virol* **149**(2): 99-108.

Wang, X.Z., Lawson, B., Brewer, J.W., Zinszner, H., Sanjay, A., Mi, L.J., Boorstein, R., Kreibich, G., Hendershot, L.M., Ron, D. (1996). Signals from the stressed endoplasmic reticulum induce C/EBP-homologous protein (CHOP/GADD153). *Mol Cell Biol* **16**(8): 4273-80.

Wegner, M., Cao, Z., Rosenfeld M.G. (1992). Calcium-regulated phosphorylation within the leucine zipper of C/EBP β . *Science* **256**(5055): 370-3.

Weigel, D., Jurgens, G., Kuttner, F., Seifert, E., Jackle H. (1990). The homeotic gene fork head encodes a nuclear protein and is expressed in the terminal regions of the Drosophila embryo. *Cell* **57**(4): 645-58.

Weinberg, R.A. (2002). Cancer Biology and Therapy: the road ahead. *Cancer Biol Ther*, **1**(1): 3.

Weinstein, D.C., Ruiz i Altaba, A., Chen, W.S., Hoodless, P., Prezioso, V.R., Jessell, T.M., Jr. Darnell JE. (1994). The winged-helix transcription factor HNF-3 beta is required for notochord development in the mouse embryo. *Cell* **78**(4): 575-88.

Welm, A.L., Timchenko, N.A., Darlington, G.J. (1999). C/EBP α regulates generation of C/EBP β isoforms through activation of specific proteolytic cleavage. *Mol Cell Biol* **19**: 1695-1704.

Wick, M., Zubov, D., Hagen, G. (1999). Genomic organization and promoter characterization of the gene encoding the human telomerase reverse transcriptase (hTERT). *Gene*, **232**(1): 97-106.

Williams, S.C., Baer, M., Dillner, A.J., Johnson, P.F. (1995). CRP2 (C/EBP β) contains a bipartite regulatory domain that controls transcriptional activation, DNA binding and cell specificity. *EMBO J* **14**: 3170-83.

Wogan, G.N. (2000). Impacts of chemicals on liver cancer risk. *Semin Cancer Biol* **10**(3): 201-10.

Workman, J.L., Kingston, R.E., (1998). Alteration of nucleosome structure as a mechanism of transcriptional regulation. *Annu Rev Biochem*, **67**: 545-79.

Wu, K.L., Gannon, M., Peshavaria, M. (1997). HNF3 β is involved in pancreatic β -cell-specific transcription of the pdx-1 gene. *Mol Cell Biol* **17**: 6002-13.

Xanthopoulos, K.G., Mirkovitch J. (1993). Gene regulation in rodent hepatocytes during development, differentiation and disease. *Eur J Biochem* **216**(2): 353-60.

Xu, L., Hui, L., Wang, S., Gong, J., Jin, Y., Wang, Y., Ji, Y., Wu, X., Han, Z., Hu, G. (2001). Expression profiling suggested a regulatory role of liver-enriched transcription factors in human hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* **61**(7): 3176-81.

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). Mutations in the hepatocyte nuclear factor-4alpha gene in maturity-onset diabetes of the young (MODY1). *Nature*, **384**(6608): 458-60.

Yamane, A., Seetharam, L., Yamaguchi, S., Gotoh, N., Takahashi, T., Neufeld, G., Shibuya, M. (1994). A new communication system between hepatocytes and sinusoidal endothelial cells in liver through vascular endothelial growth factor and Flt tyrosine kinase receptor family (Flt-1 and KDR/Flk-1). *Oncogene* **9**(9): 2683-90.

Yu, X., Mertz, J.E. (2001). Differential regulation of the pre-C and pregenomic promoters of human hepatitis B virus by members of the nuclear receptor superfamily. *J Virol* **71**(12): 9366-74.

Zaret, K. (1998). Early liver differentiation: genetic potentiation and multilevel growth control. *Curr Opin Genet Dev* **8**(5): 526-31.

Zaret, K. (1999). Developmental competence of the gut endoderm: genetic potentiation by GATA and HNF3/fork head proteins. *Dev Biol* **209**: 1-10.

Zhong, W., Mirkovitch, J., Jr. Darnell JE. (1994). Tissue-specific regulation of mouse hepatocyte nuclear factor 4 expression. *Mol Cell Biol* **14**(11): 7276-84.