

Молекулярные механизмы регуляции экспрессии гена альфа-фетопротейна (АФП)

И. Кустова



Инна Кустова (Поддубная) 13-й выпуск (Кроссастеры), школа № 520 (1991 г.), закончила кафедру вирусологии Биофака МГУ, к.б.н., научный сотрудник в НИИ канцерогенеза Российского онкологического научного центра им. Н.Н. Блохина*, inna_kustova@yahoo.com

Альфа-фетопротейн (АФП) — основной белок эмбриональной сыворотки крови млекопитающих. Сразу после рождения его синтез почти полностью прекращается и АФП замещается родственным ему белком и функциональным аналогом — сывороточным альбумином (СА). АФП вновь появляется в сыворотке при возникновении опухолей печени и тератобластом, а также при механических или химических повреждениях печени, вызывающих регенерацию.

Последние несколько десятилетий АФП используют в клинической онкологии для дифференциальной диагностики гепатоклеточной карциномы (ГКК), гепатобластом (ГБ) и тератоканцином (ТК). Эти виды рака, особенно ГКК, широко распространены в человеческой популяции. Кроме этого, повышенный уровень АФП в амниотической жидкости и сыворотке крови беременных женщин является признаком врожденной невропатии или дефектов развития мозга. Практикуется также систематическое обследование на АФП пациентов, относящихся к группе риска по ГКК, — больных циррозом печени и хронических носителей вирусов гепатита В и С.

В свете изложенных выше фактов изучение молекулярных и клеточных механизмов, опреде-

ляющих регуляцию синтеза онко-эмбрионального маркера АФП, представляется важной проблемой современной биологии.

Структура и функции АФП

Впервые этот белок был обнаружен в 1957 г. в человеческой сыворотке новорожденных (Bergstrand, Czar, 1957). В нормальной сыворотке взрослых людей этого белка не оказалось.

В 1960 г. Г.И. Абелевым и сотрудниками в мышинной гепатоме был обнаружен α -глобулин, отсутствующий в печени, крови и других тканях взрослых нормальных мышей. Оказалось, что этот белок является одним из основных компонентов мышинной эмбриональной сыворотки и, кроме того, выявляется во взрослой печени во время регенерации (Абелев и др., 1963). Позже эмбрио-специфический α -глобулин был обнаружен в сыворотке больных с ГКК (Татаринов, 1965) и ТК (Abelev *et al.*, 1967). В последующие годы стало ясно, что этот белок, получивший название АФП, является важным маркером для диагностики опухолей.

АФП представляет собой полипептидную цепь из 600 аминокислот с молекулярным весом около 69 кДа. АФП характерен для всех млекопитающих, его аналоги были описаны также у птиц, рептилий, амфибий и акул. По физико-химическим свойствам и структуре АФП очень близок СА.

Основное свойство АФП — высокое сродство к ненасыщенным жирным кислотам. АФП способен связывать полиненасыщенные жирные кислоты на 5 порядков эффективнее, чем СА. Поскольку синтез ненасыщенных жирных кислот в эмбрионе не происходит, видимо, основная функция АФП в эмбриональный период заключается в транспорте этих веществ через плаценту. Во многих эмбриональных тканях были обнаружены рецепторы к АФП, которые, возможно, участвуют в транспорте ненасыщенных жирных кислот внутрь клетки. Есть данные, что АФП способен также связывать и транспортировать такие вещества, как билиру-

* В настоящее время Инна с семьей находится в загранкомандировке и работает учителем химии и биологии в школе при Посольстве РФ.

бин, стероиды, флавоноиды, диоксин, тяжелые металлы и различные лекарства.

В отличие от СА, АФП крыс и мышей способен связывать эстрогены. Возможно, циркулирующий или локализованный на поверхности клеток АФП может нейтрализовать эстрогены матери в развивающемся плоде.

Структура гена АФП

В геноме млекопитающих содержится единственная копия гена АФП. Ген АФП входит в семейство альбуминовых генов наряду с генами СА, витамин D-связывающим белком (ДСБ) и геном α -альбумина (α -АЛБ), который в геноме человека называют афамином. Эти белки и их гены обладают значительной степенью сходства первичной структуры (Belanger *et al.*, 1994).

Все гены этого семейства расположены на одной хромосоме. Для генома человека это длинное плечо 4-й хромосомы, у мышей эти гены локализованы на 5-й хромосоме, в геноме крыс — на 14-й хромосоме (рисунок 1).

Ген АФП крысы имеет размер 19 т.п.н. (тысяч пар нуклеотидов).

Данные о близком расположении и эволюции генов семейства альбумина, динамика их синтеза в онтогенезе и канцерогенезе, а также структура их регуляторных районов, которая будет рассмотрена ниже, позволяют предположить, что экспрессия этих генов взаимосвязана и имеет общие принципы регуляции.

Синтез АФП в норме и при патологии

АФП составляет около 50% общего количества белка в эмбриональной сыворотке млекопитающих. Структуры, продуцирующие АФП в эмбриогенезе, висцеральная энтодерма желточного мешка и печень, непосредственно участвуют в процессах органогенеза и эмбрионального кроветворения.

Висцеральная энтодерма желточного мешка

Висцеральная энтодерма желточного мешка — одна из первых структур, появляющихся при дифференцировке тканей. На ранних стадиях эмбриогенеза, когда эмбриональная печень еще не сформировалась, состав сывороточных белков определяется активностью именно этой ткани. Впервые АФП выявляется здесь на 6–7-е сутки развития мышинового эмбриона. В процессе развития состав сыворотки изменяется, и к моменту рождения уровень СА начинает преобладать над уровнем АФП.

Уже на ранней стадии развития синтез АФП зависит от межклеточных взаимодействий и взаимодействий клеток с внеклеточным матриксом. Так, при контакте висцеральной энтодермы *in vivo* и *in vitro* с внезародышевой эктодермой синтез АФП обратимо блокируется.

Висцеральная энтодерма желточного мешка дает начало клеткам первичной кишки, в которых уровень синтеза АФП и экспрессия его мРНК снижается примерно в 100 раз.

Эмбриональная печень

Формирование зачатка печени происходит путем вытягивания головного участка первичной кишки. Эмбриональная печень представляет собой плотное скопление эпителиальных и кроветворных клеток. В это время во всех гепатоцитарных клетках органа, гепатобластах, происходит синтез АФП наряду с СА и другими белками. В клетках эмбриональной печени уровень синтеза АФП по сравнению с висцеральной энтодермой значительно повышен.

Дифференцировка печени — процесс сложный и многостадийный. На ранних стадиях клетки-предшественники могут дифференцироваться как в гепатоциты, так и в холангиоциты (клетки желчных протоков). Далее линии дифференцировки расходятся и закладываются печеночные балки и желчные протоки. Гепатобласты продолжают синтезировать АФП и другие белки сыворотки, специфичные для печени, тогда как клетки желчных протоков теряют эту

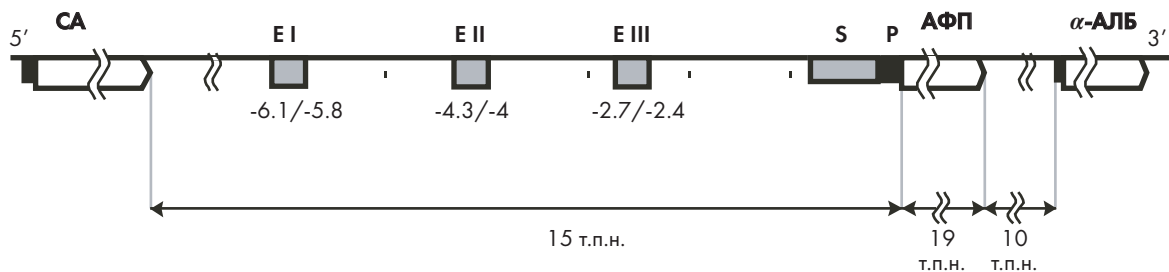


Рисунок 1. Структура регуляторного района гена АФП. Тандемное расположение генов семейства альбумина. АФП — альфа-фетопротейн, СА — сывороточный альбумин, α -АЛБ — альфа-альбумин (афамин); P — промотор; S — репрессор (сайленсер); EI — EIII — энхансеры гена АФП.

способность. С 14,5 недели развития уровень синтеза АФП в клетках эмбриональной печени человека начинает снижаться.

Постэмбриональная печень

Незадолго до рождения и сразу после него у крыс и мышей одновременно с морфологической перестройкой печени происходит быстрое падение уровня АФП в крови и сокращение числа АФП-продуцирующих клеток. Вскоре после рождения концентрация АФП в крови снижается на пять порядков.

АФП-продуцирующие клетки исчезают в первую очередь вокруг портальных трактов и в последнюю — около центральных вен. Таким образом, пространственная динамика исчезновения АФП-продуцирующих клеток совпадает с направлением формирования балок — от аорты к центральной вене. Наряду с этим, в крови повышается уровень СА — т.е. происходит замещение эмбрионального сывороточного белка на взрослый (Belanger *et al.*, 1983).

Экспрессия генов α -АЛБ и ДСБ начинается сразу после рождения (Belanger *et al.*, 1994). Возможно, экспрессия генов, расположенных в одном локусе, координируется общими регуляторными элементами, расположенными в межгенном пространстве.

Взрослая печень

Во взрослой печени ген АФП обратимо подавлен (супрессирован). Синтез АФП может возобновляться при регенерации печени. Моделями для изучения процесса регенерации являются частичная гепатэктомия — хирургическое удаление 2/3 органа, или отравление CCl_4 , вызывающее некроз гепатоцитов, расположенных вокруг центральных вен. Одновременно с увеличением синтеза АФП происходит падение синтеза СА. Наиболее сильно этот эффект выражен у мышей. Клетки, синтезирующие АФП при отравлении парами CCl_4 , локализованы в зоне вокруг некроза; в случае частичной гепатэктомии клетки располагаются хаотично.

Таким образом, наблюдается зависимость между появлением АФП и нарушением структуры взрослой печени. Определяющим фактором, регулирующим активность синтеза АФП на клеточном уровне, является положение гепатоцита в печеночной балке или вне ее (Abelev, 1978).

Синтез АФП в опухолях

Повышение уровня АФП в крови наблюдается при первичных опухолях печени — ГКК, ТК, реже — при опухолях кишечника, а также в случае циррозов и при вирусных гепатитах. В эмбриональных карциномах, ТК, ГКК, опухолях

желточного мешка и ГБ человека повышение уровня АФП наблюдается в 80–90% случаев и является важным диагностическим признаком.

Опухолевые клетки различаются по степени трансформации. Известно, что в опухолях с высоким уровнем синтеза АФП клетки имеют морфологию, характерную для раннего постэмбрионального периода. Клетки опухолей с низким уровнем синтеза АФП высокодифференцированы, и распределение белков-маркеров в них характерно для взрослой ткани.

Синтез АФП *in vitro*

В клеточной и молекулярной биологии широко используются первичные культуры клеток. Такие клетки выделяют непосредственно из организма донора и пересаживают в питательную среду. В культуре клетки, как правило, теряют дифференцировку и делятся чаще, чем *in vivo*. Когда такая культура достигает до монослоя, требуется ее субкультивирование на другую культуральную чашку с питательной средой. Первичные культуры не способны длительное время существовать *in vitro* и после нескольких пассажей (пересевов) гибнут. Кроме этого, с каждым новым пересевом клетки теряют свою специфичность, т.е. становятся все менее похожи на исходную ткань. Другой тип клеточных культур может стабильно существовать *in vitro* неограниченное время. Это перевиваемые культуры. Такими являются, например, культуры опухолевых клеток.

В первичных культурах гепатоцитов одновременно с утратой полярности, нарушением межклеточных взаимодействий и взаимодействий типа клетка-матрикс, наблюдается дедифференцировка клеток, они перестают синтезировать печень-специфические белки. В первичных культурах и большинстве гепатом возобновляется синтез эмбрионального белка АФП. В первичной культуре гепатоцитов взрослых мышей АФП появляется на 3–4-й день. Одновременно с накоплением АФП происходит падение синтеза СА.

Синтез АФП в перевиваемых культурах гепатоцитов зависит от плотности клеток в монослое. АФП-положительные клетки образуют четкое кольцо вокруг АФП-отрицательных клеток, расположенных в центре. Существует зависимость между формированием межклеточных контактов в монослойных культурах и подавлением синтеза АФП. Первичные гепатоциты, растущие в трехмерном геле, сохраняют поляризацию и балочную структуру. В таких культурах синтез АФП не возобновляется.

Морфологические изменения, обнаруженные *in vitro* при возобновлении синтеза АФП,

сходны с наблюдаемыми *in vivo* при некрозах печени: перераспределение актина, исчезновение белков, характерных для балочной структуры печени, потеря белков межклеточных контактов — коннексинов.

Таким образом, на основании изучения регуляции синтеза АФП на клеточном уровне можно сделать следующие выводы:

— подавление синтеза АФП во взрослых гепатоцитах обратимо;

— взаимодействия типа клетка-клетка и клетка-внеклеточный матрикс являются важным фактором и могут участвовать в подавлении синтеза АФП во взрослых гепатоцитах как *in vivo*, так и *in vitro* (Abelev, 1993).

Механизмы регуляции экспрессии гена АФП

Регуляция экспрессии любого гена может осуществляться на нескольких уровнях. Выше были описаны некоторые аспекты влияния клеточного микроокружения на экспрессию гена АФП. Наибольший интерес вызывают молекулярные механизмы регуляции экспрессии.

Основные события регуляции экспрессии гена АФП происходят на транскрипционном уровне. Однако есть данные о том, что регуляция экспрессии АФП мышей может осуществляться и на посттранскрипционном уровне.

Одним из возможных механизмов регуляции экспрессии генов является метилирование ДНК (присоединение метильных групп к азотистым основаниям). Метилироваться может сам ген, тогда транскрипция блокируется. Большое значение имеет метилирование промоторных районов генов, влияющее на связывание с транскрипционными факторами и, следовательно, на транскрипцию. Для гена АФП было установлено, что метилирование не является механизмом регуляции экспрессии АФП, но отражает состояние активности гена и может стабилизировать его неактивное состояние.

Структура регуляторного района гена АФП.

Цис-элементы

Большинство генов эукариот имеют регуляторные последовательности на 5'-конце. Они могут усиливать или ослаблять экспрессию гена. Такие последовательности называют *цис*-элементами, к ним относятся промоторы, репрессорные элементы и энхансеры. Для гена АФП такие элементы идентифицированы в районе от -7.6 т.п.н. до точки начала транскрипции (Widen, Papaconstantinou, 1986). Регуляторными районами гена АФП мыши, крысы

и человека очень сходны между собой. Регуляторный район гена АФП включает в себя промотор, репрессор и три энхансера.

Промотор

Промотор гена АФП расположен в районе $-200/+1$ н.п. относительно точки начала транскрипции. Промотор содержит последовательности (сайты), узнаваемые транскрипционными факторами, которые будут описаны ниже.

Энхансерные элементы

У мышей и крыс локализовано три независимых тканеспецифических энхансера, способных активировать промотор АФП — EI, EII и EIII (рисунок 1). Активность каждого энхансера определяют небольшие последовательности размером 200–300 п.н., которые содержат множественные перекрывающиеся сайты связывания транскрипционных факторов.

Сравнение энхансеров гена АФП показали, что все три энхансера активны, но в разной степени в тканях, обычно экспрессирующих АФП, а также во взрослой печени и кишке, где экспрессии АФП не наблюдается.

В регуляторной области гена АФП человека было обнаружено два энхансерных элемента.

Известно, что энхансеры АФП способны активировать промотор гена СА. Возможно, регуляция промоторов родственных генов СА и АФП общими межгенными энхансерами осуществляется на определенных стадиях развития и в гепатомах, если неактивен собственный энхансер СА. При этом между промоторами родственных генов не происходит конкуренции, т.е. каждый из промоторов двух генов не ограничивает экспрессии другого гена.

Однако ни промотор, ни энхансеры не достаточны для подавления экспрессии гена АФП в постэмбриональный период.

Репрессор

У всех изучаемых видов в регуляторном районе гена АФП обнаружены элементы, подавляющие транскрипцию гена, — репрессоры. Роль этих элементов в регуляции экспрессии гена АФП, по всей видимости, очень важна, поскольку активность энхансеров в постэмбриональный период сохраняется, а уровень экспрессии гена падает. В регуляторном районе гена АФП человека были описаны две репрессорные последовательности, локализованные между энхансером и промотором гена АФП. Они подавляют инициацию транскрипции гена АФП, ослабляя действие энхансеров. В регуляторных районах АФП крыс и мышей репрессоры расположены также рядом с промотором. Вероятно, существуют белки, способные связываться с этими регуляторными элементами. Однако, к настоящему времени такие белки не обнаружены.

Таким образом, структура регуляторного района гена АФП у изучаемых видов сходна. Он содержит промотор, три энхансера и репрессор, которые узнаются транскрипционными факторами, специфическими для печени или общими для многих тканей. Так что же является определяющим для характера экспрессии гена АФП на транскрипционном уровне? Общий эффект действия промотора и энхансеров регуляторного района на экспрессию гена зависит от комбинации транскрипционных факторов, представленных в ядре клетки на определенной стадии развития организма. Рассмотрим далее транскрипционные факторы, распространенные в печени и оказывающие наиболее сильное влияние на экспрессию белков, специфических для этого органа.

Транскрипционные факторы, определяющие экспрессию печень-специфических генов

Специфические свойства отдельных тканей живого организма формируются в результате экспрессии определенного спектра генов в клетках этих тканей. Каждый тип клеток синтезирует специфические для данной ткани белки, имеет определенную скорость роста, реагирует на внеклеточные сигналы. На экспрессию генов оказывает влияние множество факторов транскрипции, часть из которых являются общими для всех типов клеток, а часть — тканеспецифичными, специализированными для конкретного типа ткани. Транскрипционные факторы (*транс-факторы*) связываются с *цис*-элементами на ДНК, образуя энхансеосому — регуляторный модуль, от которого зависит экспрессия гена. Механизмы действия такого модуля полностью не выяснены, однако понятно, что его активность определяется двумя параметрами. Во-первых, это наличие на ДНК сайтов (участков) связывания с *транс*-факторами. С одним и тем же сайтом на молекуле ДНК могут связываться белки разных семейств, которые оказывают на транскрипцию генов различные эффекты. Связываясь с *цис*-элементом, каждый белок вносит свой вклад в изменение программы экспрессии гена. Такая динамичная регуляция *транс*-факторами модулирует фенотип клетки в соответствии с сигналами клеточного роста, гомеостаза, суточных ритмов, тканевыми повреждениями. Второй параметр регуляции отражает стадию развития. Транскрипционные факторы появляются в онтогенезе последовательно, что ведет к такой же постепенной и последовательной активации генов и, в итоге, к формированию взрослого фенотипа (Locker, 2001).

Поскольку именно в печени происходит синтез многих важных функциональных белков,

регуляция экспрессии которых изучалась давно и активно, печень-специфические *транс*-факторы и регуляторные модули, которые они образуют, были описаны наиболее подробно. Наиболее важными регуляторами экспрессии печень-специфических белков оказались гепатоцитарные ядерные факторы — ГЯФ (HNF), к которым относят 5 семейств — HNF1, HNF3, HNF4, HNF6 и C/EBP. Белки этих семейств начинают синтезироваться на ранних стадиях эмбрионального развития и продолжают экспрессироваться во взрослом организме. Эти факторы обнаруживаются не только в клетках печени, но именно в этом органе синтезируются их наибольшие количества. Сайты связывания ГЯФ находятся в регуляторных районах большинства известных гепатоспецифических генов.

При исследовании роли *транс*-факторов, участвующих в дифференцировке, успешно используют метод создания трансгенных мышей с нокаутными генами. У таких мышей в геноме отсутствует изучаемый ген. Эффект, к которому приводит такой нокаут, позволяет сделать выводы о значении исследуемого белка в онтогенезе. Были получены трансгенные мыши с нокаутами практически всех ГЯФ. Благодаря этой методике в последнее время достигнут значительный прогресс в понимании механизмов, определяющих и поддерживающих дифференцировку печени.

Все результаты нокаутов ГЯФ можно условно разбить на две группы: 1) последствия критичны для формирования эмбриона, животные гибнут на различных стадиях эмбрионального развития; 2) последствия мало критичны для внутриутробного развития, трансгенные животные чаще всего рождаются, в постнатальном периоде страдают от нарушения функций внутренних органов, но все-таки некоторое время жизнеспособны. Такие разные результаты могут касаться одного и того же гена, инактивированного (выключенного) на разных стадиях развития организма. По всей видимости, переломный момент — это формирование собственно зародышевой части эмбриона. Было показано, что экспрессия факторов HNF1 β , HNF3 β и HNF4 α совершенно необходима для раннего эмбрионального развития, а экспрессия остальных ГЯФ важна для правильного функционирования печени.

Взаимная регуляция ГЯФ

Если до момента формирования зародыша (примерно 7-й день развития) из ГЯФ экспрессируются только HNF1 β , HNF3 β и HNF4 α , то позже к ним добавляются HNF1 α , HNF3 α и γ , HNF6 и факторы семейства C/EBP. Таким обра-

факторы, также участвующие в дифференцировке тканей и регулирующие основные жизненные функции клеток: рост, деление, апоптоз.

Например, к таким факторам относятся белок *p53* — специфический активатор гена АФП. Этот белок обнаруживается только в клетках, экспрессирующих АФП.

Промотор гена АФП также несет сайты, узнаваемые ядерными рецепторами. Ядерные рецепторы — это большое семейство нетканеспецифических *транс*-факторов, которые участвуют в регуляции экспрессии генов, связываясь с небольшими молекулами — лигандами. Лигандами ядерных рецепторов часто являются гормоны. К этим факторам относятся рецепторы стероидных гормонов (глюкокортикоидов (ГКГ) и эстрогенов), рецепторы к тиреоидным гормонам и ретиноевой кислоте (РК) и многие другие. Эффект воздействия ядерных рецепторов на регуляцию экспрессии генов-мишеней может быть различным. Ядерные рецепторы в комплексе с лигандом в виде гомо- или гетеродимеров узнают сайт связывания на молекуле ДНК и активируют экспрессию генов. Некоторые гетеродимеры, связываясь с ДНК в отсутствие лиганда, способны подавлять экспрессию. Ядерные рецепторы могут усиливать или ослаблять экспрессию генов путем образования белок-белковых взаимодействий с другими *транс*-факторами (Glass, Rosenfeld, 2000).

Ретиноевая кислота (РК) является мощным регулятором процессов клеточного деления и дифференцировки. Ткани энтодермального происхождения, такие как печень и почки, имеют рецепторы к РК. РК вызывает дифференцировку клеток мышины тератокарциномы (эмбриональная опухоль) в висцеральную энтодерму, при этом наблюдается активация экспрессии АФП. В клетках гепатом крысы РК также активирует экспрессию гена АФП. В клетках гепатом человека, напротив, наблюдается подавление экспрессии генов АФП и СА под воздействием РК.

Последовательность нуклеотидов в промоторе гена АФП, узнаваемая ядерными рецепторами, частично перекрывается с сайтом, связывающим онкобелки Jun и Fos, которые тоже могут оказывать влияние на экспрессию АФП.

На различных клеточных линиях было показано, что онкобелки Jun и Fos активируют промотор АФП. С другой стороны, комплекс глюкокортикоидного гормона и рецептора (ГРК) активирует промотор гена АФП, в отсутствие белков Jun и Fos. Однако совместная экспрессия этих факторов приводит к подавлению активности промотора АФП.

Таким образом, в области сайтов, связывающих ядерные рецепторы и онкобелки, между

онкобелками Jun/Fos и ГРК происходит белок-белковое взаимодействие. В результате этого, ядерный рецептор не может связаться с ДНК и не происходит активации промотора.

Регуляторный район гена АФП в области репрессора содержит сайт связывания с белком *p53*. *p53* — полифункциональный белок, активация которого происходит в ответ на различные стрессовые ситуации. Основную функцию *p53* выполняет как фактор транскрипции. Белок *p53* способен оказывать комплексное воздействие на транскрипцию генов, активируя экспрессию одних и подавляя другие. Транскрипционными мишенями *p53* являются гены, активация которых ведет к остановке клеточного цикла, гены, участвующие в *p53*-зависимом апоптозе, а также множество генов с невыясненными функциями. Другими функциями *p53* являются репрессия транскрипции, подавление трансляции некоторых мРНК, и участие в репарационных процессах (Чумаков, 2000).

Вероятно, *p53* подавляет активацию промотора, конкурируя за связывание с сайтом ДНК с другими *транс*-факторами. Активность промотора восстанавливается в присутствии белка НВх вируса гепатита В. Вирусный белок взаимодействует с *p53*, в результате чего ген АФП может быть активирован. АФП часто экспрессируется в клетках инфицированных вирусом гепатита В. Возможно, этот механизм активации экспрессии АФП является первым шагом в трансформации (перерождение нормальных клеток в опухолевые) нормальных гепатоцитов в ГРК.

По-видимому, репрессия гена АФП белком *p53* имеет место на некоторых этапах развития, однако этот механизм не является универсальным, поскольку в первичной культуре мышинных гепатоцитов возобновление экспрессии АФП не связано с изменением активности *p53*. Нокаут гена *p53* не приводит к существенным изменениям в экспрессии АФП.

Возможная модель регуляции экспрессии гена АФП

Современные представления о механизмах регуляции экспрессии генов основываются на некоторых общих положениях, утверждающих:

- каждый тип клеток на определенной стадии развития содержит определенный набор факторов транскрипции, экспрессия которых строго регулируется;
- факторы могут конкурировать друг с другом за сайты связывания с ДНК;
- за счет белок-белковых взаимодействий транскрипционные факторы могут образовывать комплексы. Это изменяет их транс-активационные свойства.

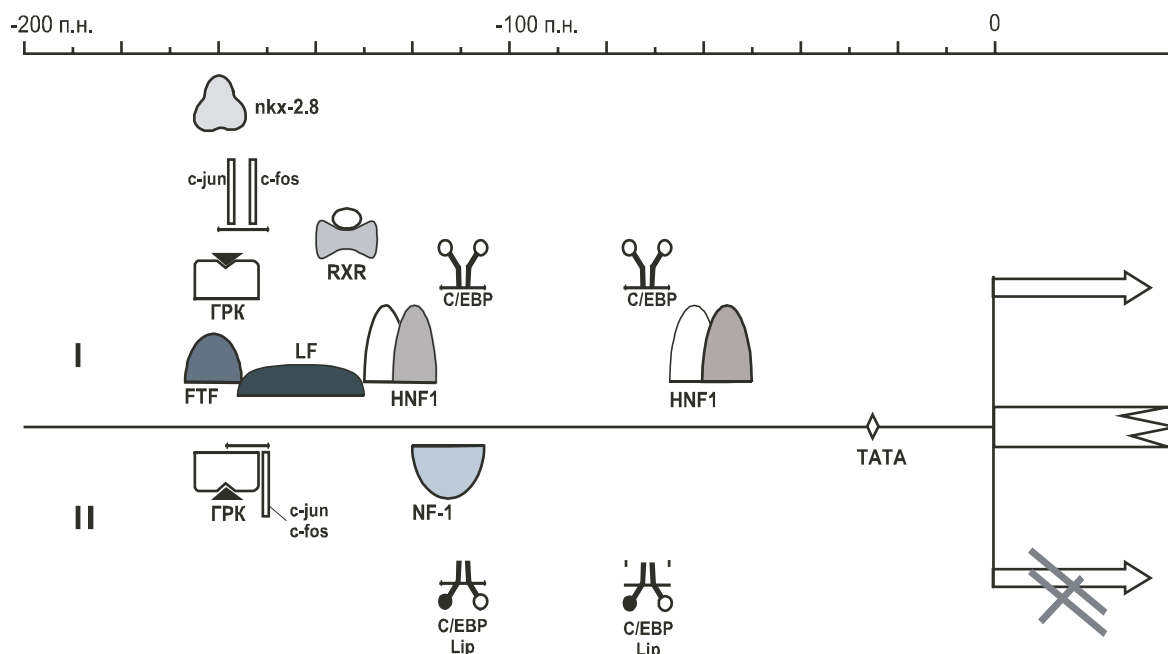


Рисунок 3. Модель регуляции активности промотора гена АФП (Bernier *et al.*, 1993): I — активация промотора; II — супрессия промотора.

Таким образом, регуляторный эффект, который фактор оказывает на транскрипцию, зависит от общего набора *транс*-факторов в клетке в данный момент развития и их влияния друг на друга.

Как можно заметить, наиболее изученными являются *транс*-факторы, активирующие промотор гена АФП. Существование и влияние репрессорных факторов экспериментально определить сложнее, в связи с чем о них практически ничего не известно.

В 1993 г. Bernier и соавторами была предложена модель регуляции экспрессии гена АФП, которая на данный момент является общепринятой. В этой гипотезе основная роль в активации промотора АФП отводится комплексу транскрипционных факторов HNF1/FTF, сайты связывания которых расположены в промоторе АФП (рисунок 3; Bernier *et al.*, 1993).

Комплекс HNF1/FTF может конкурировать за перекрывающиеся сайты связывания с факторами, репрессирующими промотор, — ГПК или NF-1.

NF-1 — тканенеспецифичный транскрипционный фактор. В низких концентрациях NF-1 слабо стимулирует промотор АФП, а в высоких — подавляет его активность. Согласно гипотезе Bernier, активность промотора зависит от количественного соотношения факторов HNF1 и NF-1.

Другие *транс*-факторы влияют на экспрессию АФП в зависимости от присутствия других

транс-факторов в клетке. Между этими белками происходит конкуренция за связывание с ДНК или белок-белковые взаимодействия, что может приводить к подавлению активности промотора (рисунок 3).

Наряду с HNF1 главным претендентом на роль основного активатора гена АФП является белок nkx-2.8, который обнаруживается только в тканях, синтезирующих АФП.

По-видимому, данная модель регуляции не объясняет высокую специфичность репрессии гена АФП после рождения. Единственным известным фактором, однозначно подавляющим активность промотора АФП, является NF-1. Однако, он не специфичен для печени, и маловероятно, что это — единственный репрессор, осуществляющий переключение активности промотора гена АФП. Это касается и белка р53. Вероятно, репрессия АФП белком р53 является частью общего механизма, подавляющего экспрессию тканеспецифических генов в опухолевых клетках.

Недостаточно полно изучена и роль репрессора гена АФП. По литературным данным известен район гена АФП, связывание которого с репрессором определяет полное подавление АФП экспрессии после рождения. Мы полагаем, что подавление активности промотора АФП осуществляется негативным печень-специфическим транскрипционным фактором, экспрессия которого наблюдается в клетках, не синтезирующих АФП.

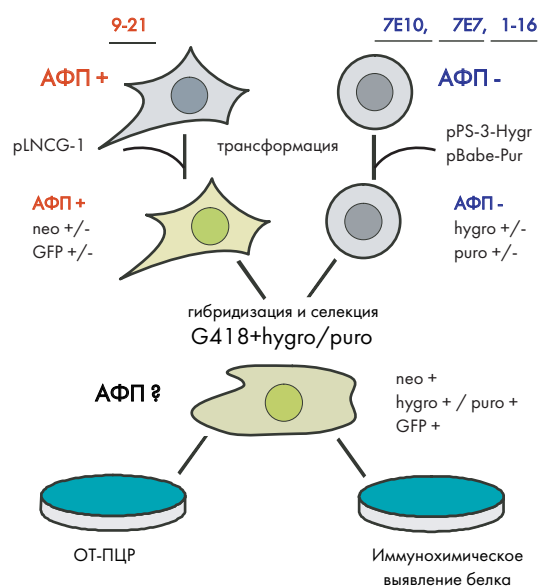


Рисунок 4. Схема соматической гибридизации.

Изучение механизмов негативной регуляции экспрессии гена АФП путем создания соматических гибридов

Одним из методов, позволяющих подойти к проблеме изучения механизмов подавления экспрессии генов, является создание соматических гибридов, которых получают слиянием эукариотических клеток с различными фенотипами. Этот метод был разработан в 1960-х гг. и в то время был одним из немногих, позволявших изучать закономерности экспрессии тканеспецифических генов (Sorieul, Ephrussi, 1961; Gershon, Sachs, 1963). При слиянии клеток, различающихся по какому-либо фенотипическому признаку, происходит объединение ядер и соответственно геномов этих клеток. В то же время объединяются и наборы транскрипционных факторов, которые присутствуют в исходных клеточных линиях. Изучая фенотип, наследуемый гибридами, можно предполагать, какой механизм регуляции экспрессии преобладает в данной системе.

В случае, когда в гибридных клетках продолжается экспрессия изучаемого гена, вероятнее позитивная регуляция экспрессии. При исчезновении в соматических гибридах признака, по которому различаются исходные линии клеток, можно считать, что в системе преобладает негативная регуляция, т.е. в исходных клетках, не продуцирующих исследуемый белок, существует механизм, подавляющий его экспрессию. В дальнейшем, используя другие методы молекулярной биологии, можно описать данный механизм.

Клеточные линии—предшественники соматических гибридов различаются в зависимости от целей эксперимента. Слияния могут быть межвидовыми или проводиться между клетками разных типов тканей; получают гибриды опухолевых и нормальных клеток или опухолевых линий клеток, различающихся способностью к метастазированию, степенью дифференцировки или экспрессией изучаемых генов.

Мы использовали метод соматической гибридизации для анализа механизмов регуляции экспрессии гена АФП. В качестве модели нами была выбрана коллекция клонов крысиной гепатомы, различающихся по уровню синтеза АФП примерно в 1000 раз (Эрайзер, Абелев, 1984). Мы использовали наиболее стабильные клоны, устойчиво сохраняющие АФП-фенотип в ряду поколений. Схема эксперимента представлена на рисунке 4. В результате слияния было получено шесть соматических гибридов. Три из них образованы АФП⁺- и АФП⁻- клонами.

Полученные гибридные клетки использовали для иммунохимического анализа и обратной транскрипции-ПЦР (ОТ-ПЦР) анализа.

Иммуногистохимическое окрашивание антителами к белку АФП показало, что во всех гибридных культурах АФП не синтезируется. Важно отметить, что в АФП⁺ × АФП⁻ гибридных клонах выявляется флуоресцирующий белок GFP, которым был маркирован АФП⁺-клон. Это является доказательством того, что полученные гибриды содержат ДНК из АФП⁺-клонов (рисунок 5).

Результаты, полученные иммуногистохимическим анализом, подтверждаются и при исследовании экспрессии мРНК АФП в гибридных клетках методом ОТ-ПЦР. Этот метод с большой чувствительностью позволяет определить наличие мРНК исследуемых генов. При этом мРНК *транс*-факторов представлены в ядрах в очень низких концентрациях и другими методами выявляются плохо. Реакция ОТ-ПЦР происходит в два этапа: 1) обратная транскрипция — с помощью вирусного фермента обратной транскриптазы с мРНК определенного гена синтезируется соответствующая ДНК; 2) полимеразная цепная реакция — происходит копирование вновь синтезированной ДНК. При проведении ПЦР используют меченые нуклеотиды, что помогает выявлению ДНК в ходе последующего электрофореза.

Было показано, что мРНК АФП обнаруживается только в АФП⁺-клоне и не выявляется в АФП⁻-клонах и во всех соматических гибридах. То есть результаты наших исследований говорят о том, что соматические гибриды имеют АФП⁻-

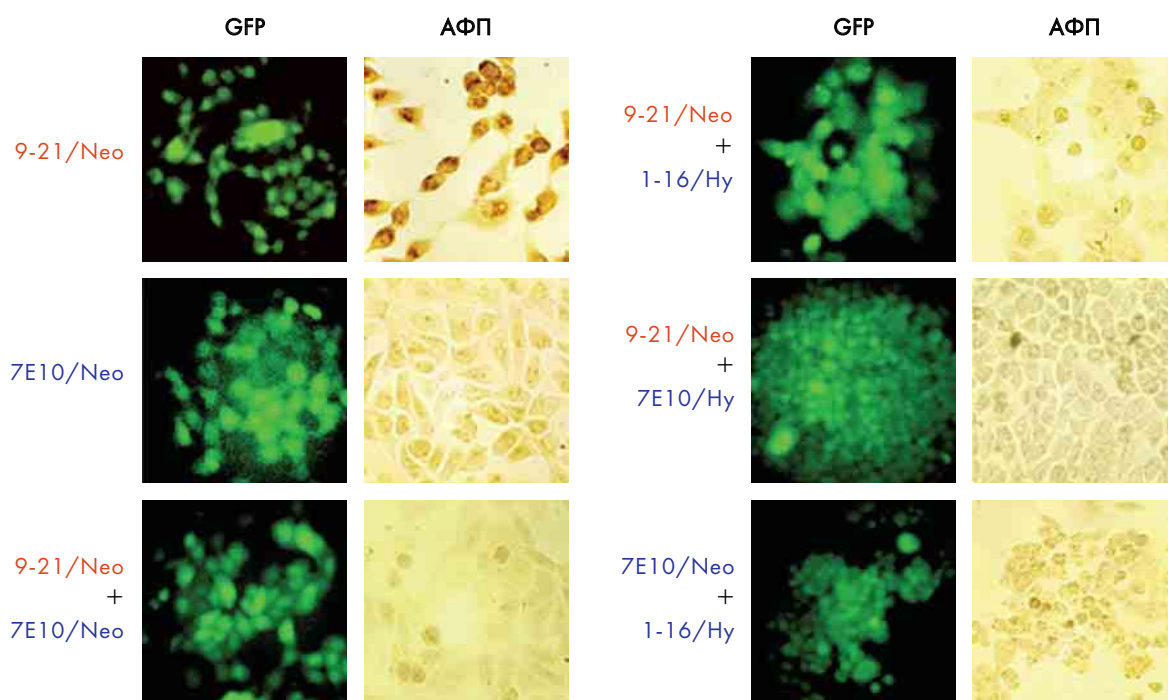


Рисунок 5. Подавление синтеза АФП в соматических гибридах.

Колонка «GFP» — флуоресценция белка GFP в клонах, трансфицированных ретровирусным вектором pLNCG-1; колонка «АФП» — непрямая иммунопероксидазная окраска исходных клонов гепатомы и соматических гибридов антителами к АФП крысы.

фенотип (рисунок 6). Вероятно, подавление экспрессии гена АФП в соматических гибридах происходит за счет наличия в АФП⁻-клонах негативного транскрипционного фактора, который связывается с репрессорным элементом АФП или подавляет экспрессию основного активатора гена АФП.

Так же был проведен ОТ-ПЦР анализ экспрессии большинства транскрипционных факторов в исходных клонах и соматических гибридах.

Оказалось, что экспрессия основных активаторов АФП-транскрипции HNF1 и FTF, является в АФП⁺- и одном из АФП⁻-клонов, а также и в некоторых соматических гибридах. Таким образом, присутствия этих факторов не достаточно для экспрессии гена АФП в АФП⁻-клонах и гибридах.

Анализ экспрессии остальных *транс*-факторов в клонах гепатомы и соматических гибридах не выявил связи между появлением какого-либо из факторов с репрессией гена АФП.

Итак, отсутствие ГЯФ в соматических гибридах могло бы объяснить подавление экспрессии АФП, однако результаты соматической гибридизации свидетельствуют о том, что факторов, активирующих промотор АФП, оказывается недостаточно для экспрессии этого гена в АФП⁻-клонах. Это согласуется с нашим

предположением о существовании негативного фактора, подавляющего транскрипцию АФП независимо от активационных факторов.

Изучение профилей экспрессии генов в ГКК

В последние годы в связи с расшифровкой генома и развитием высокотехнологичных методов исследования стало возможным исследование широкого спектра экспрессии генов.

Во многих странах создаются биологические микрочипы (microarray) — системы, позволяющие проводить множественный одновременный анализ микрообразцов ДНК. Микрочип — это маленькая (от пары миллиметров) пластинка из стекла, пластика или кремния, вмещающая до нескольких десятков тысяч ячеек с нанесенными (прикрепленными) в них фрагментами ДНК или белков. Вкупе с прибором-анализатором это мини-лаборатория, позволяющая быстро получать самые точные результаты.

ДНК-микрочипы способны анализировать линейные молекулы — ДНК и РНК — к примеру, находить мутации в генах, сравнивая «больные» и «здоровые» ДНК, или отлавливать вирусные и бактериальные ДНК. Для анализа к микрочипу добавляют меченный флуоресцентными краси-

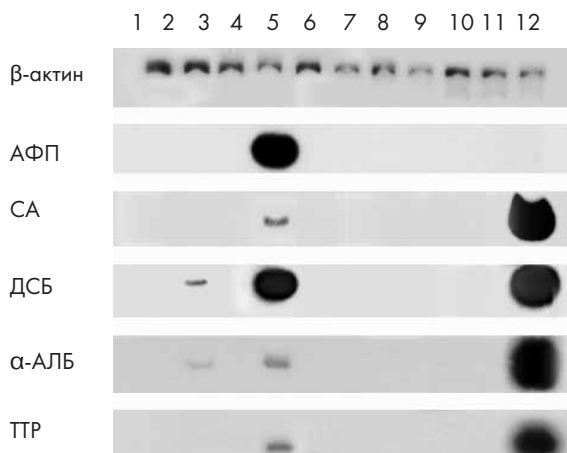


Рисунок 6. Экспрессия гепатоспецифических генов в клонах крысиной гепатомы и в соматических гибридах.

ОТ-ПЦР с праймерами к АФП, альбумину (СА), витамин-D связывающему белку (ДСБ), α-альбумину (α-АЛБ) и транскрипции без добавления фермента; 2–4 — АФП-клоны; 5 — АФП-клон; 6–11 — соматические гибриды; 12 — нормальная печень взрослой крысы.

Гибридизация с β-актином выполнена для контроля за качеством используемых образцов (мРНК этого гена равномерно распределена во всех клетках организма).

телями образец ДНК или мРНК исследуемого пациента или изучаемой ткани, клеточной линии. Принцип действия ячейки ДНК биочипа основан на комплементарных взаимодействиях азотистых оснований в двух нитях ДНК. Если последовательность оснований в одной нити ДНК (нанесенной в ячейку чипа) полностью комплементарна последовательности другой нити (ДНК пациента), то образуется стабильная совершенная двухнитчатая спираль — дуплекс. Однако присутствие даже одной неправильной пары предотвращает образование дуплекса. Положительная реакция (образование дуплекса), свидетельствует о наличии в исследуемом образце определенного фрагмента ДНК и фиксируется в виде светящегося квадрата (анализ проводится автоматически, рисунок 7).

Белковые чипы появились сравнительно недавно, с их помощью анализируют более сложные по форме, чем ДНК, белковые молекулы — антитела, антигены, гормоны, аллергены и др.

Метод ДНК-микрочипов позволяет изучить и сравнить спектры экспрессии нескольких тысяч генов в различных тканях или клеточных линиях. При сравнении нормальных и опухолевых тканей можно выявить группу онкомаркеров, характерную для данного типа опухолей, что имеет неоценимое значение для клинической диагностики. Также микрочипы начинают широко применяться в фармакологии для скрининга лекарственных веществ и токсинов.

При сравнении спектров экспрессии генов различных гепатом человека и нормальной печени было вновь показано, что возобновление экспрессии АФП является одним из событий наиболее четко маркирующих гепатоканцерогенез. При гибридизации с микрочипом на 9000 генов во всех рассматриваемых гепатомах АФП оказался геном, экспрессия которого максимально отличается в ГКК и нормальной печени. Сравнение профилей экспрессии генов в различных клеточных линиях гепатом, а также опухолей негепатоцитарного происхождения методом гибридизации с микрочипами более чем к тысячи генов позволило выявить 18 генов-маркеров этих опухолей, которые в ближайшем будущем могут быть применены в клинической практике. Возможно, использование ДНК-микрочипов позволит идентифицировать негативный фактор, подавляющий транскрипцию АФП.

Использование регуляторных элементов АФП в генной терапии

В последние годы активно разрабатывается технология генной терапии опухолей, в частности ГКК. Принцип лечения основан на введении в опухолевые клетки вирусных или плазмидных векторов, несущих гены, которые способствуют гибели опухолевых клеток, например р53 или тимидинкиназы. Наиболее успешно используют векторы на основе аденовирусов и ретрови-



Рисунок 7. Схема образования двойной спирали ДНК на биочипе.

Олигонуклеотид фиксирован на одном из элементов биочипа и избирательно связывает из многих флуоресцентно меченных фрагментов ДНК только комплементарный. В результате только этот элемент начинает светиться. Это происходит благодаря высокоспецифичным взаимодействиям комплементарных пар нуклеотидов А с Т и Г с С. Присутствие некомплементарной пары, например G–G, предотвращает взаимодействие и оставляет элемент микрочипа темным (иллюстрация взята с сайта http://www.bio.su/dig_008_002.htm).

русов, а также вирусов герпеса. Необходимые для лечения гены в таких вирусных векторах экспрессируют под контролем тканеспецифического регуляторного элемента, который должен быть активен именно в опухолевых клетках. Поиск подходящего регуляторного элемента является определяющим этапом в разработке стратегии для генной терапии. Для ГКК наиболее специфическим элементом, безусловно, является регуляторный район гена АФП. Промотор и энхансеры АФП успешно используют в вирусных и плазмидных векторах: при генной терапии на экспериментальных моделях происходит гибель высокого процента опухолевых клеток и существенно ингибируется рост ГКК. Однако этот метод имеет свои ограничения: в зависимости от степени дифференцировки опухоли определенная часть клеток может не продуцировать АФП, регуляторный элемент АФП в таких клетках не активен, и они оказываются нечувствительными к генной терапии. Возможно, такие опухоли можно лечить с использованием векторов под контролем регуляторных элементов СА или регуляторных элементов *транс*-фактора, подавляющего экспрессию гена АФП. Поэтому изучение механизмов, определяющих экспрессию АФП и тандемную регуляцию локуса СА/АФП, представляет значительный интерес для генной терапии.

Еще одним направлением лечения таких патологий печени, как цирроз или моногенные заболевания, является терапия, которая направлена на регенерацию нормальных гепатоцитов и постепенное замещение пораженных клеток на здоровые. Молекулярные механизмы экспрессии АФП при регенерации еще не достаточно хорошо изучены, это направление исследований представляется достаточно перспективным.

Заключение

Со времени открытия онкоэмбрионального маркера АФП и до настоящего времени не прекращаются исследования механизмов регуляции его экспрессии. Подробно описан 5'-регуляторный район гена, включающий в себя промотор, три энхансера и репрессор, определяющий падение экспрессии гена АФП во взрослой печени. Обнаружены общераспространенные и тканеспецифические транскрипционные факторы, участвующие в регуляции экспрессии большинства генов печени. Однако механизмы, определяющие падение синтеза АФП в онтогенезе, пока не ясны.

Могут возникнуть вопросы: что можно узнать нового о белке, изучением которого

занимаются более тридцати лет? Стоит ли заниматься этими проблемами?

Начнем с того, что очень мало известно о функциях АФП. Хорошо изучена лишь транспортная функция этого белка, которая считается основной. Другие функции белка, такие, как связывание эстрогенов и подавление иммунного ответа, по-видимому, отличают АФП от других белков семейства, но изучены недостаточно и описаны не для всех изучаемых видов.

Структура регуляторного района гена АФП описана подробно, тем не менее, роль каждого из цис-элементов в регуляции транскрипции АФП выяснена не до конца. Наиболее полно механизм регуляции описан для промотора гена АФП. Роль репрессора в регуляции, факторы способные с ним связываться, к настоящему времени не изучены. Возможно, дальнейшее изучение этих структур изменит наши представления о регуляции транскрипции этого гена.

Гены семейства альбумина расположены в одном участке хромосомы, непосредственно примыкают друг к другу. Вероятно, такая локализация генов не случайна и необходима для координированной регуляции их экспрессии. На данный момент известны лишь отдельные сведения совместной регуляции АФП и СА тем или иным транскрипционным фактором. Эти сведения не дают представления о полной картине координированной регуляции этих генов.

Наконец, практически ничего не известно о механизмах, подавляющих экспрессию гена АФП после рождения, и причинах восстановления экспрессии при регенерации и в гепатоканцерогенезе.

Каждая из рассмотренных выше проблем представляется нам важной и перспективной. АФП является маркером ГКК и ТК, и механизмы регуляции его экспрессии тесно связаны с опухолевой трансформацией. АФП и СА характеризуют дифференцированные гепатомы с эмбриональным и взрослым типами экспрессии генов. Механизмы канцерогенеза в разных типах ГКК могут иметь свои особенности. Для диагностики ГКК и разработки новых методов лечения важно понимать эти различия. Для применения регуляторных элементов АФП в генной терапии необходимо обладать полной информацией о возможностях регуляции этого гена.

Список используемых сокращений:

АФП — альфа-фетопротейн,
СА — сывороточный альбумин,
α-АЛБ — альфа-альбумин (афамин),
ДСБ — витамин-D-связывающий белок,

ГЯФ (HNF) — гепатоцитарные ядерные факторы,
 ГКК — гепатоклеточная карцинома,
 ГБ — гепатобластома,
 ТК — тератокарцинома,
 ГКГ — глюкокортикоидный гормон,
 ГРК — комплекс глюкокортикоидный гормон – рецептор,
 РК — ретиновая кислота,
 ТТР — транстретин,
 ТТФ — трансферрин,
 АФП⁺-клон — АФП-продуцирующий клон,
 АФП⁻-клон — АФП-непродуцирующий клон,
 п.н. — пара нуклеотидов,
 т.н. — тысяча нуклеотидов,
 т.п.н. — тысяча пар нуклеотидов.

Литература

- Абелев Г.И., Перова С.Д., Храмова Н.И., Постникова З.А., Ирилин И.С.** 1963. Эмбриональный сывороточный α -глобулин и его синтез перевиваемыми гепатомами мышей // Биохимия, 28 (4): 625–634.
- Татаринев Ю.С.** 1965. Содержание эмбриоспецифического α -глобулина в сыворотке плода, новорожденного и взрослого человека в случаях первичного рака печени // Вопр. мед. химии, 2: 584–589.
- Чумаков П.М.** 2000. Функция гена p53: выбор между жизнью и смертью // Биохимия, 65 (1): 34–47.
- Эрайзер Т.Л., Абелев Г.И.** 1984. Подходы к изучению клональной структуры первичных гепатом // Иммунологические аспекты биологии развития. — М.: Наука, 138–141.
- Abelev G.I., Assekritova I.V., Kraevsky I.A., Perova S.D., Perevodchicova N.I.** 1967. Embryonal serum α -globulin in cancer patients: diagnostic value // Int. J. Cancer, 2: 551–558.
- Abelev G.I.** 1978. Experimental study of alpha-fetoprotein reexpression in liver regeneration and hepatocellular carcinomas // Cell Differentiation and Neoplasia. G.G. Saunders (ed.). — New-York: Raven Press: 257–269.
- Abelev G.I.** 1993. Alpha-fetoprotein biology // Sov. Sci. Rev. D. Physicochem. Biol., 11: 85–109.
- Belanger L., Baril P., Guertin M., Gingras M.C., Gourdeau H., Anderson A., Hamel D., Boucher J.M.** 1983. Oncodevelopmental and hormonal regulation of the AFP gene expression // Adv. Enzyme Regul., 23: 73–99.
- Belanger L., Sylvie R., Allard D.** 1994. New albumin gene 3' adjacent to the α -fetoprotein locus // J. Biol. Chem., 269: 5481–5484.
- Bernier D., Thomassin H., Allard D., Guertin M., Hamel D., Blagiere M., et al.** 1993. Functional analysis of developmentally regulated chromatin-hypersensitive domains carrying the α -fetoprotein intergenic enhancer // Mol. Cell. Biol., 13: 1619–1633.
- Bergstrand C.G., Czar B.** 1956. Demonstration of a new protein fraction in serum from the human fetus // Scand. J. Clin. Lab. Invest., 8: 174–179.
- Gershon D., Sachs L.** 1963. Properties of a somatic hybrid between mouse cell with different genotypes // Nature, 198: 912–913.
- Glass C.K., Rosenfeld M.G.** 2000. The coregulator exchange in transcriptional functions of nuclear receptors // Genes Dev., 14: 121–141.
- Locker J.** 2001. Tissue-specific regulation by transcription factors // Transcription factors. J. Locker (ed.). Oxford: BIOS Scientific Publishers Ltd. 1: 237–262.
- Shen C.N., Slack J.M., Tosh D.** 2000. Molecular basis of transdifferentiation of pancreas to liver // Nat. Cell Biol., 2 (12): 879–887.
- Sorieul S., Ephrussi B.** 1961. Karyological demonstration of hybridization of mammalian cell *in vitro* // Nature, 190: 653–654.
- Widen S.G., Papaconstantinou J.** 1987. Extinction of α -fetoprotein gene expression in somatic cell hybrids involves *cis*-acting DNA elements // Mol. Cell. Biol., 7: 2606–2609.