

Усова Е.В.¹, Копанцева М.Р.¹, Егоров В.И.², Копанцев Е.П.³, Свердлов Е.Д.³

Белки *SNAI1* и *SNAI2* — транскрипционные мастер-регуляторы эпителиально-мезенхимального перехода

¹ — Федеральное государственное бюджетное учреждение «Институт хирургии им. А.В.Вишневского» Минздрава России, 115093, Москва, ул. Большая Серпуховская, д. 27

² — Государственное бюджетное учреждение здравоохранения городская клиническая больница №5 Департамента здравоохранения г.Москвы, 107076, Москва, ул. Стромынка, д. 7

³ — Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, 117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 16/10

*Эпителиально-мезенхимальный переход является результатом клеточного эпигенетического перепрограммирования, в ходе которого дифференцированные эпителиальные клетки теряют маркеры эпителиальной принадлежности и начинают проявлять свойства низкодифференцированных мезенхимальных клеток, способных к локальной инвазии и обладающих повышенной устойчивостью к апоптозу. Несмотря на очевидную широкую биологическую и медицинскую значимость многие аспекты эпителиально-мезенхимального перехода, в особенности, касающиеся его генетической регуляции, остаются малоизученными. В данном обзоре мы рассматриваем молекулярную организацию и механизмы регуляции активности двух близкородственных транскрипционных факторов *SNAI1* и *SNAI2*, которые играют центральную роль в индукции и прогрессии эпителиально-мезенхимального перехода в нормальном развитии и канцерогенезе. Особое внимание уделяется роли факторов *SNAI1* и *SNAI2*, а также взаимодействующих с ними корепрессоров в инициации процесса эпигенетической репрессии генов эпителиальной дифференцировки.*

Ключевые слова: эпителиально-мезенхимальный переход, канцерогенез, трансформация, дифференцировка, транскрипция, эпигенетика

Usova E.V.¹, Kopantseva M.R.¹, Egorov V.I.², Kopantzev E.P.³, Sverdlov E.D.³

***SNAI1* and *SNAI2* — transcriptional master-regulators of epithelial-mesenchymal transition**

¹ — A.V. Vishnevsky Institute of Surgery, Russian Federation, Moscow, 115093, Ul. Bolshaya Serpuhovskaya, 27

² — City Clinical Hospital №5 Moscow Health Department, Russian Federation, Moscow, 107014, Ul. Stromynka, 7

³ — Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry of the Russian Academy of Sciences, Russian Federation, Moscow, 117997, GSP-7, Ul. Miklukho-Maklaya, 16/10

*Epithelial-mesenchymal transition is a result of cellular epigenetic reprogramming. During this process differentiated epithelial cells lose specific markers of epithelial phenotype and gradually start displaying qualities of poorly differentiated mesenchymal cells, resistant to apoptosis and capable of local invasion. Despite their obvious importance for biology and medicine, many aspects of epithelial-mesenchymal transition, especially those related to its genetic regulation, remain poorly characterized. In this review we analyze molecular structure and mechanisms of regulation of two closely-related transcription factors *SNAI1* and *SNAI2*, which play an important role in induction and progression of epithelial-mesenchymal transition during both normal development and carcinogenesis. Special attention is paid to the role of *SNAI1* and *SNAI2* and their active co-repressors in initiation of epigenetic repression of epithelial differentiation marker genes.*

Key words: epithelial-mesenchymal transition, carcinogenesis, transformation, differentiation, transcription, epigenetics

В последние годы широкое внимание исследователей привлекает фенотипическая пластичность клеток при эмбриональном развитии, получившая название эпителиально-мезенхимального перехода (ЭМП). Этот процесс играет также чрезвычайную роль при

канцерогенезе особенно на стадиях метастазирования. Эпителиально-мезенхимальный переход (epithelial-mesenchymal transition, ЭМП) — биологический процесс обратимой фенотипической трансформации эпителиальных клеток, в результате которого они теряют свойства организованных в слои поляризованных клеток, снижают экспрессию специфических для эпителия белков межклеточных контактов и приобретают характерную для мезенхимальных клеток мор-

Для корреспонденции: Копанцев Евгений Павлович, к.биол.н., ст. науч. сотр. лаб. структуры и функции генов человека, ФГБУН ИБХ РАН, e-mail: kopantzev@ibch.ru

фологию и повышенную подвижность [1—3]. ЭМП является результатом клеточного эпигенетического перепрограммирования, в ходе которого дифференцированные эпителиальные клетки теряют маркеры эпителиальной принадлежности и начинают проявлять свойства низкодифференцированных мезенхимальных клеток, способных к локальной инвазии, направленной миграции, обладающих повышенной устойчивостью к апоптозу и синтезирующих белки внеклеточного матрикса характерные для клеток мезенхимального происхождения [3]. Многие аспекты ЭМП, в особенности, касающиеся его генетической регуляции, остаются малоизученными. В данном обзоре мы рассмотрим механизмы регуляции активности двух близкородственных транскрипционных факторов *SNAI1* (Snail) и *SNAI2* (Slug), которые играют центральную роль в индукции и прогрессии ЭМП в нормальном развитии и канцерогенезе.

Общая характеристика ЭМП

ЭМП впервые был описан как эмбриональный процесс имеющий место на стадии имплантации эмбриона, гастрюляции и формирования подвижных клеток нервного гребня. Сейчас эти процессы, происходящие в ходе эмбрионального ЭМП, принято определять как ЭМП первого типа. На стадии гастрюляции ЭМП первого типа четко ограничен временными рамками эмбрионального развития и связан с фундаментальным процессом формирования первичной мезенхимы трехслойного зародыша [4]. На более поздних стадиях эмбриогенеза ЭМП также является ключевым процессом во многих гистогенных процессах, особенно у позвоночных, поскольку сердце, скелетно-мышечная система, большая часть черепно-лицевых структур и периферическая нервная система формируются благодаря этому механизму [5]. В частности, при развитии эмбриональной поджелудочной железы также наблюдается этот тип ЭМП — панкреатические эндокринные зародышевые клетки отсоединяются от эпителия и деламинированные клетки мигрируют через окружающую мезенхиму, после чего подвергаются обратному процессу мезенхимально-эпителиального перехода (mesenchymal-epithelial transition, МЭП), необходимому для формирования функциональных островков Лангерганса [6—7]. Для формирования некоторых органов структур, таких, как, например, сердечные клапаны, необходимо несколько последовательных ЭМП — МЭП циклов [8]. Процесс ЭМП, связанный с заживлением ран и регенерацией тканей, принято относить ко второму типу [2]. ЭМП второго типа, происходит как часть нормального процесса, связанного с заживлением и регенерацией поврежденной эпителиальной ткани —

адаптивным процессом, который обычно активирует фибробласты и родственные клетки для восстановления необходимой целостности тканей после травм и повреждения эпителиальных слоев. Хронический воспалительный процесс, приводящий к патологическому фиброзу органов, таких как почки, печень и легкие, часто сопровождается ЭМП второго типа, который часто приводит к формированию клеточных элементов и экстраклеточного матрикса фиброзной ткани [9—10]. Так, на мышинных моделях почечного фиброза показано, что около 30% фибробластов фиброзной ткани происходит из прошедших ЭМП тубулярных эпителиальных клеток [11]. Как правило, ЭМП второго типа в поврежденных тканях прекращается по мере снижения интенсивности локального воспаления и завершения репарационного процесса. В отличие от первых двух типов ЭМП, которые происходят с генетически нормальными клетками, ЭМП третьего типа связан с генетически и эпигенетически измененными неопластическими клетками [2]. Мутантные клетки многих эпителиальных опухолей (карцином) на определенных стадиях развития опухолевого процесса в результате неконтролируемого ЭМП приобретают способность к инфильтрации в окружающую нормальную ткань и иницируют процесс непрерывного метастазирования опухолевых клеток тем самым, создавая наиболее серьезные угрозы для жизни больных с онкологическими заболеваниями.

Фенотипическая трансформация эпителиальных клеток карцином в результате ЭМП приводит к значительным изменениям в морфологии, клеточной архитектуре, адгезивности, и в способности клеток к миграции.

Генетические и эпигенетические характеристики ЭМП

Активирование ЭМП программы в раковых клетках изменяет экспрессию сотен генов [12—15], приводит к глобальному ремоделированию хроматина и перепрофилированию паттерна ДНК метилирования многих генов [16, 17]. Такой фундаментальный сдвиг клеточного фенотипа иницируются изменениями в уровнях экспрессии, стабильности и внутриклеточной локализации нескольких принципиальных белков — транскрипционных регуляторов ЭМП.

Важнейшим событием, сопровождающим процесс ЭМП всех трех типов, является прогрессирующее снижение уровня экспрессии гена *CDH1*, кодирующего белок Ca^{2+} -зависимых межклеточных контактов эпителиальных клеток E-кадгерин. Экспрессия гена *CDH1* критически связана с поддержанием клетками неинвазивного эпителиального фенотипа

[18—20]. Поэтому не удивительно, что транскрипционные репрессоры, связывающиеся с E-боксом (CANNTG) последовательностями ДНК внутри промоторной области гена *CDH1*, составляют большую часть группы белков транскрипционных мастер-регуляторов ЭМП [21]. К этим транскрипционным факторам, репрессирующим транскрипционную активность гена *CDH1* относятся такие белки, как TWIST1, TCF3 (E47), TCF4 (E2-2), ZEB1 (δ EF2) и ZEB2 (SlP1) [22, 23]. Центральную роль в индукции и прогрессии всех трех типов ЭМП играют два родственных E-боксов связывающих белка SNAI1 (Snail) и SNAI2 (Slug) регуляции, активности которых посвящен наш обзор.

Структура белков SNAI1 и SNAI2 и регуляция их активности

Эволюционно родственные белки SNAI1 и SNAI2 относятся к Snail суперсемейству транскрипционных факторов [24] с ДНК связывающими доменами, содержащими аминокислотные мотивы типа цинковые пальцы (Zinc-Finger motif, ZF-мотив). Описанный впервые в генетических экспериментах на дрозофиле ген *snail* (гомолог гена SNAI1 человека) оказался геном существенным для формирования мезодермы в раннем эмбриогенезе *Drosophila melanogaster* [25, 26]. Впоследствии гомологи гена *snail* были определены у всех исследованных позвоночных и беспозвоночных животных [27]. ДНК (E-боксов) связывающий домен белка SNAI1 человека (рис. 1) состоит из кластера четырех C_2H_2 ZF-мотивов (ZF1-ZF4) и локализован на C-конце белка (154—259 аминокислота). C_2H_2 ZF-участки белков SNAI1 и SNAI2 представляют классическую $\beta\beta\alpha$ -пространственную структуру с α -спиралью взаимодействующей с большой бороздкой ДНК [28]. Репрессорная активность Snail белков зависит от короткого расположенного на N-конце белков SNAI1 и SNAI2 (1—9 аминокислота) консервативного участка SNAG (Snail/Gfi) домена, который был впервые описан как репрессорный домен для Gfi1 белка [29] и обеспечивает связывание белков корепрессоров. Интересно, что SNAG домен отсутствует в гомологичных SNAI1 белках у *Drosophila melanogaster* и *Caenorhabditis elegans* (белки snail и ces1 соответственно) [27]. Аминокислотные последовательности центральной части SNAI1 и SNAI2 между SNAG-доменом и ДНК связывающим участками менее консервативны. Между SNAG-доменом и ZF-кластером белок SNAI1 содержит центральный серин-пролин богатый участок (S-P rich domain, SPR домен), лейцин богатый домен с сигналом ядерного экспорта (Nuclear Export Signal, NES-домен) и

домен дестабилизации (Destruction Box, DB-домен), находящийся внутри SPR участка. Сериновые остатки внутри SPR домена (90—120 аминокислота) SNAI1 важны для стабильности и внутриклеточной локализации белка, поскольку их замена с помощью мутагенеза на соответствующие аланины приводила к цитоплазматическому накоплению SNAI1 и его дисфункции как транскрипционного фактора [30]. Последовательность NES-домена обеспечивает распознавание SNAI1 транспортером CRM1 и после соответствующих посттрансляционных модификаций белка его эффективную транслокацию из клеточного ядра в цитоплазму [30—31]. Последовательность аминокислот DB-домена SNAI1 содержит важные для его функционирования остатки серина (S96 и S100), консервативна для нескольких регуляторных белков таких как IKK β , ATF4, CDC25A и β -катенин [20] и определяет короткий период полужизни белка SNAI1 [31]. Данные о расположении внутри белка SNAI1 сигнала ядерной локализации (Nuclear Localization Signal, NLS) противоречивы. Так, в работе Ko et al. [32] NLS мотив был локализован в два разделенных участка последовательности SNAI1 (8—16 и 151—152 аминокислота). Мутационная инактивация этого предполагаемого NLS приводила к уменьшению количества ядерного SNAI1 и снижению его репрессорной активности [32]. Однако в работе других авторов было продемонстрировано, что главный NLS белка SNAI1 находится на C-концевой половине молекулы и может быть диспергирован по ДНК связывающей области SNAI1 и что основные аминокислотные остатки, составляющие NLS локализованы, по меньшей мере, в трех ZF-доменах белка [33]. NLS обнаруженный в C-концевой области белка SNAI1 связывается с несколькими ядерными белковыми транспортерами (импортином- β KPNB1), импортином 7 (IPO7) и транспортинном) и обеспечивал транслокацию в ядро репортерного GFP конструкта [33, 34]. Этот диспергированный NLS мотив белка SNAI1, описанный Mingot et al [33], эволюционно консервативен и был выявлен в ZF-доменах у других членов семейства Snail белков (SNAI2, SNAI3 и Snail-like). Интересно отметить, что остатки основных аминокислот входящие в NLS белка SNAI1 (K161/K170, K187/R191 и K220/R224) не только обеспечивают взаимодействие с ядерными транспортерами, но и, по-видимому, принимают участие в связывании с ДНК последовательности E-боксов промоторной области гена *CDH1* [33].

Несколько различных клеточных протеинкиназ фосфорилируют многочисленные сериновые остатки внутри SPR домена (S92, S96, S100, S104, S107, S111, S115 и S119) белка SNAI1 [30, 35]. Сериновые остатки вне SPR домена SNAI1 (S11, S82, S203 и

S246) также могут подвергаться фосфорилированию [36, 35]. Эти модификации белка могут приводить к разнонаправленным изменениям его стабильности и внутриклеточной локализации. Серин/треониновая протеинкиназа GSK-3β была описана как важнейший негативный регулятор стабильности многих внутриклеточных белков, в том числе и ядерного SNAI1 [31, 37]. Предложены две отличающиеся в деталях модели GSK-3β регулируемой дестабилизации SNAI1. Согласно одной модели в эпителиальных клетках сериновые остатки (S107, S111 S115 и S119) NES фосфорилируются ядерной GSK-3β, что приводит к экспорту фосфорилированного SNAI1 из ядра клетки. Последующее фосфорилирование S96 и S100 внутри DB-домена белка цитоплазматической GSK-3β приводит к β-Tcr-опосредованному распознаванию SNAI1 E3 убиквитин лигазным SCF комплексом, полиубиквитинированию белка и его протеасомной деградации [31]. Согласно другой модели, GSK-3β фосфорилирует первоначально S104 и S107 и лишь затем критические остатки DB-домена S96 и S100 [37]. Известно, что для эффективного фосфорилирования сериновых и треониновых остатков

внутри DB-мотива β-катенина для GSK-3β необходимо праймирующее фосфорилирование прилежащего серинового остатка в положении +4, которое обычно осуществляется кезин киназой 1 (CK1) [38]. Для активирования DB-мотива белка SNAI1 был также экспериментально продемонстрирован схожий эффект праймирующего фосфорилирования остатка S104 киназой CK1ε, но не CK1α [39]. Интересно отметить, что для эффективного фосфорилирования остатка S104 киназой CK1ε необходимо присутствие в белке SNAI1 ДНК связывающего участка. Также авторами было показано, что остаток S104 является крайне неэффективным субстратом для GSK-3β и подавление экспрессии CK1ε приводит к стабилизации функционального SNAI1 и репрессии активности гена *CDH1* [39]. Ингибирование активности GSK-3β в частности при активировании PI3K/Акт сигнального каскада может приводить к ядерной стабилизации SNAI1 и способствовать запуску процесса ЭМТ. Wnt сигнальный путь также может приводить к увеличению количества ядерного SNAI1 путем Axin-2 контролируемого экспорта GSK-3β из ядра

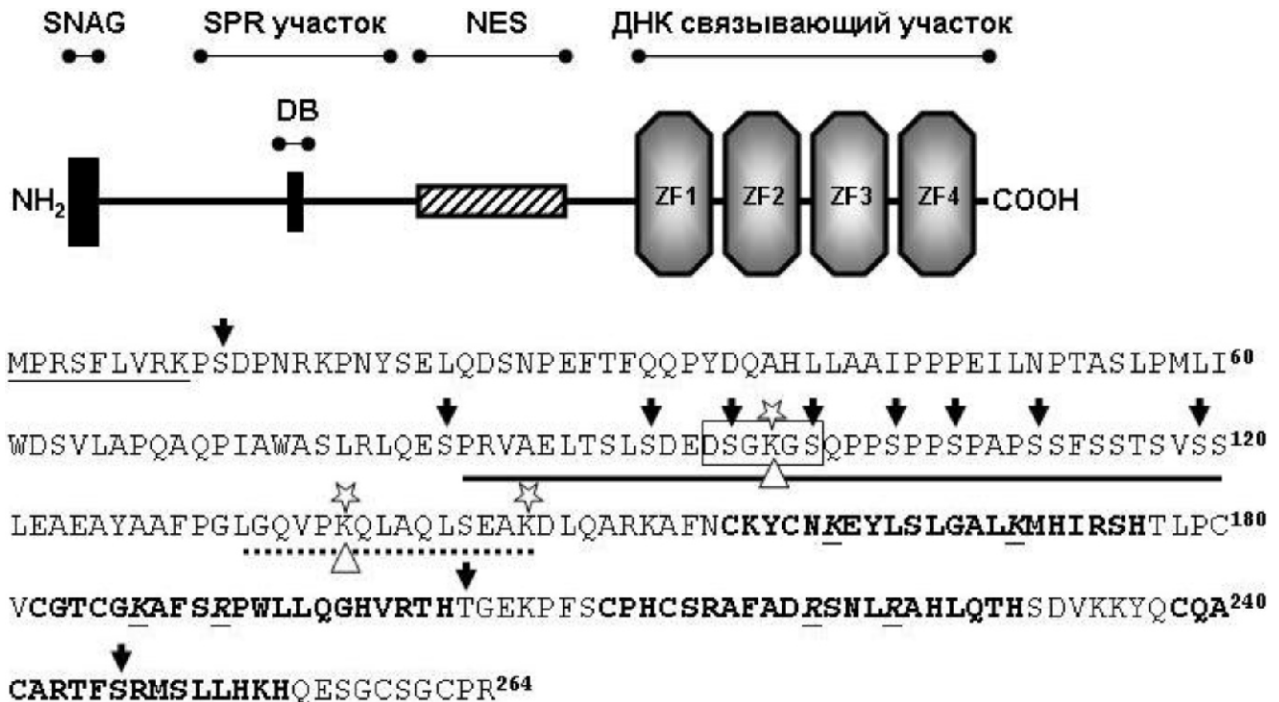


Рис. 1. Принципиальная модульная организация транскрипционного фактора SNAI1 и аминокислотная последовательность с указанием расположения функциональных участков и модифицируемых аминокислотных остатков. Жирным шрифтом указаны аминокислотные последовательности четырех C₂H₂ ZF-мотивов (ZF1-ZF4). Подчеркнутым жирным курсивом отмечены аминокислоты входящие в последовательность сигнала ядерной локализации (NLS). Тонкой сплошной линией подчеркнута аминокислотная последовательность SNAG домена белка SNAI1. Пунктирной линией подчеркнуты аминокислоты входящие в домен ядерного экспорта (NES участок). Жирной сплошной линией подчеркнута аминокислотная последовательность SPR (S-P rich domain) участка внутри, которого прямоугольником выделен домен дестабилизации (Destruction Box, DB-домен). Черными стрелками указаны аминокислоты, по которым происходит фосфорилирование белка SNAI1. Верхними звездочками и нижними треугольниками обозначены аминокислотные остатки лизинов белка SNAI1, по которым происходит убиквитинирование и окислительное деаминирование соответственно.

в цитоплазму [40]. Кроме того, было показано, что Wnt стимуляция клеток приводит к передислокации ядерной CK1 ϵ на цитоплазматическую мембрану [41], что дополнительно может стабилизировать белок SNAI1. Показано, что фармакологическое ингибирование активности GSK-3 низкомолекулярным агентом SB415286 приводит не только к внутриклеточному накоплению белка SNAI1, но и к повышению активности промотора и уровня экспрессии гена SNAI1. Последнее обстоятельство авторы объясняют активацией NF κ B сигнального пути в клетках с ингибированным GSK-3 ферментом [42]. Таким образом, усиление или снижение фосфорилирующей активности CK1 и GSK-3 β влияет на стабильность белка SNAI1 и в целом на процесс ЭМП. Также имеются указания на то, что в свою очередь белковые фосфатазы могут принимать участие в дополнительном регулировании стабильности ядерного SNAI1 и модуляции процесса EMT. Так был описан фермент SCP (small C-terminal domain phosphatase), который дефосфорилирует фосфорилированные GSK-3 β остатки серина (S96, S100, S107, S111 S15 и S119) и тем самым ингибирует GSK-3 β -зависимую деградацию SNAI1 и усиливает эффект ЭМП [43].

В дополнении к CK1 и GSK-3 β было показано, что несколько других серин/треониновых киназ фосфорилируют SNAI1. Так, казеин киназа CK2 фосфорилирует остаток S92, который является важным для взаимодействия SNAI1 и mSin3A корепрессора [35]. Мутация S92A усиливает стабильность SNAI1 и значительно ослабляет репрессорную активность мутантного белка по отношению промотора гена *CDH1*. Расположенный непосредственно рядом со SNAG доменом остаток S11 фосфорилируется цАМФ-активируемой PKA, что позволяет предполагать, что эта модификация влияет на взаимодействия SNAI1 и белков корепрессоров. Также как и замена S92A мутация S11A усиливает стабильность SNAI1 и снижает репрессорную активность мутантного белка по отношению промотора гена *CDH1* и гена *CLDN1* [35]. Стоит отметить, что S11 находится внутри разделенного на две части (бипартитного) предполагаемого N-концевого NLS аминокислотного мотива описанного Ko et al. [32] для белка SNAI1, поэтому фосфорилирование S11 может влиять на транслокацию SNAI1 в ядро. В отличие от негативного эффекта на стабильность SNAI1 как в случае с GSK-3 β другие киназы могут стабилизировать SNAI1 и усиливать его репрессорную активность по отношению к промотору *CDH1* и промоторам других эпителиальных генов. Так активируемая малыми ГТФ-азами Rac1 и Cdc42 серин/треониновая киназа Pak1 (известная как p21-активируемая киназа) фосфорилирует S246 расположенный в четвертом

ZF мотиве белка SNAI1 [36]. В клетках рака молочной железы фосфорилирование остатка S246 SNAI1 киназой Pak1 приводит к ядерной аккумуляции белка и индукции ЭМП процесса. Какой эффект на связывание SNAI1 с ДНК вызывает фосфорилирование остатка S246 к настоящему времени неизвестно. Повышенная активность Pak1, но не PKB (Akt1), наблюдается в протоковых карциномах молочной железы и коррелирует с инвазивным и низкодифференцированным фенотипом раковых клеток в опухоли [44]. При RNAi скрининге киназ, влияющих на стабильность биолюминесцентного репортерного Snail-CBG (Clc Beetle Green) белка в клетках HEK293, была идентифицирована серин/треониновая киназа Lats2, которая участвует в Hippo сигнальном пути и является продуктом активности гена предполагаемого опухолевого супрессора *LATS2* [45]. Lats2 фосфорилирует белок SNAI1 по остатку треонина (T203) находящемуся в линкерной аминокислотной последовательности между ZF2 и ZF3 мотивами ДНК связывающего домена SNAI1. Фосфорилирование T203 остатка приводит к ядерной стабилизации SNAI1 и усилению ЭМП процесса [45]. Это несколько противоречит с данными других работ, в которых было показано, что Lats2 ослабляет ЭМП путем ингибирующего фосфорилирования транскрипционных коактиваторов TAZ и YAP [46, 47]. Однако, как справедливо было замечено, эффект на ЭМП может зависеть от внутриклеточной локализации активированной Lats2. Так, в ядре Lats2 киназа может усиливать ЭМП, фосфорилируя и стабилизируя SNAI1, а в цитоплазме ослабляет ЭМП, фосфорилируя свои цитоплазматические мишени TAZ и YAP [45].

Помимо регулирующего фосфорилирования, белок SNAI1 подвергается другим посттрансляционным модификациям. Так, при поиске белков взаимодействующих со SNAI1 было показано, что лизиновые остатки K98 и K137 белка SNAI1 важны для стабильности белка и взаимодействия с белками членами LOX семейства медь-содержащих ферментов лизил-оксидаз [48, 49]. LOX ферменты осуществляют окислительное деаминирование ϵ -аминогрупп лизина в ряде определенных вне- и внутриклеточных белков [50]. Оверэкспрессия LOXL2 и LOXL3, но не LOXL4, в клетках MDCK индуцирует ЭМП процесс, связанный с приобретением трансфицированными клетками мезенхимального фенотипа и сниженной экспрессией гена *CDH1* [49]. Было предположено также, что LOXL2 может регулировать взаимодействие SNAI1 и GSK-3 β и таким образом активно защищать SNAI1 от GSK-3 β -индуцируемой деградации. К сожалению, в указанной работе авторы не показали присутствия действительно модифицированных лизиновых остатков в белке SNAI1. Однако если

подобные модификации имеют место, то они могут приводить к существенным изменениям в конформационной структуре, включая внутримолекулярные сшивки K98/K137, и в функции белка SNAI1 [48, 49]. Кроме того остатки K98 и K137 являются сайтами убиквитинилирования SNAI1 и их модификация LOXL2 и LOXL3 может изменять процесс деградации этого транскрипционного фактора. Как уже было сказано, деградация белка SNAI1 определяется GSK-3 β -зависимым фосфорилированием DB мотива и осуществляется β -Тгср опосредованным полиубиквитинилированием фосфорилированного белка [31]. Также был описан механизм GSK-3 β -независимого полиубиквитинилирования SNAI1 в условиях гипоксии и подавления ферментативной активности GSK-3 β с помощью LiCl [51]. Авторы показали, что при этих условиях основным механизмом деградации SNAI1 является его взаимодействие с FBXL14 E3 убиквитин лигазой. Характерной особенностью гена *FBXL14* является его HIF1 α /TWIST1-зависимая репрессия в условиях гипоксии, что приводит к увеличению количества SNAI1 и индукции ЭМП в участках опухолей со сниженным содержанием кислорода [51]. Недавно было экспериментально продемонстрировано, что SNAI1 может быть субстратом для поли(АДФ-рибоза) полимеразы-1 (PARP-1), особенно в опухолевых клетках подвергнутых действию

ДНК-повреждающих препаратов типа доксорубицин [52]. ПолиАДФ-рибозилирование SNAI1 увеличивает время жизни белка в клетках, а ингибирование активности PARP-1 фармакологическим препаратом KU0058948 ослабляет индуцированный ЭМП процесс, усиливает экспрессию гена *CDH1* и снижает инвазивность раковых клеток [52]. Необходимо также упомянуть работу [53], в которой было показано, что при культивировании клеток в гипергликемических условиях (25mM глюкозы) белок SNAI1 может подвергаться специфической модификации связанной с образованием O-связанного β -N-ацетилглюкозамина (O-GlcNAc). Авторы показали, что остаток S112 локализованный в внутри регуляторного SPR участка является единственным сайтом O-GlcNAc модификации белка SNAI1, которая приводит при гипергликемии к супрессии GSK-3 β -зависимой деградации SNAI1 и усилению его репрессорной активности по отношению к промотору гена *CDH1* [53]. Интересно отметить, что схожий по структуре и функции SNAI1 белок SNAI2, как было показано, не подвергается подобной модификации [54].

Ближайшим родственным геном *SNAI1* в геноме человека является ген *SNAI2* возникший, по-видимому, в результате полногеномной дупликации у эволюционного предшественника позвоночных животных [55]. Принципиально модульная организация транс-

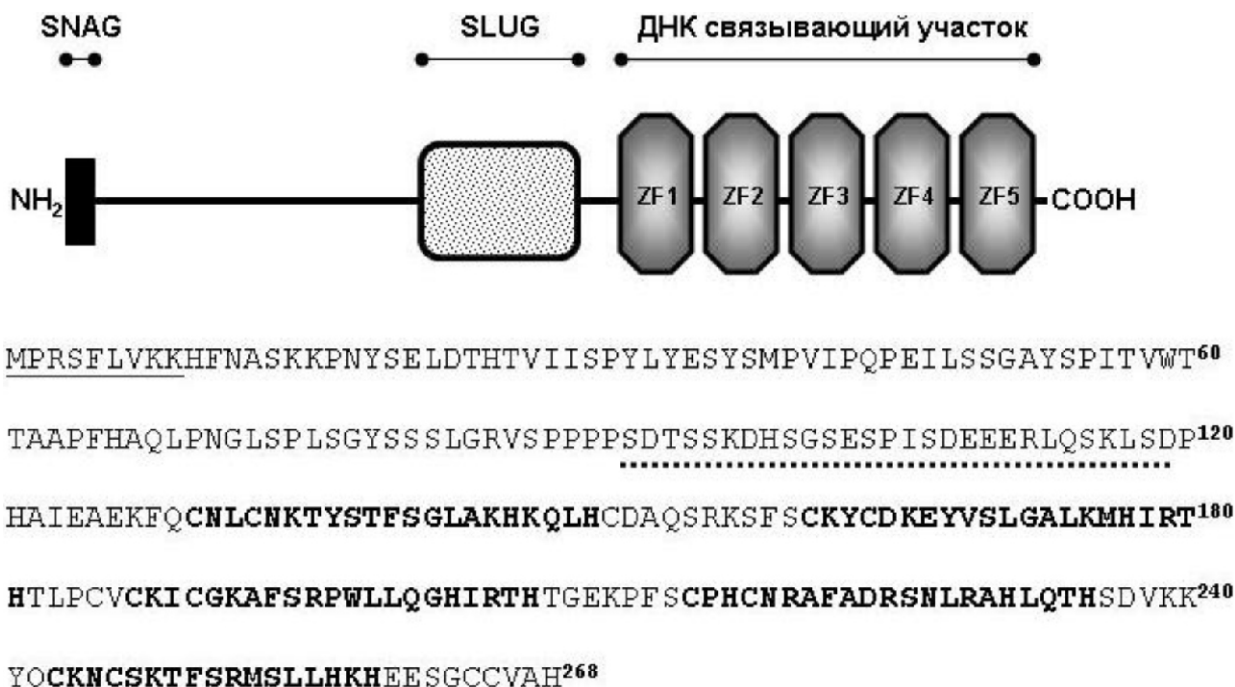


Рис. 2. Принципиальная модульная организация транскрипционного фактора SNAI2 и аминокислотная последовательность с указанием расположения функциональных участков. Жирным шрифтом указаны аминокислотные последовательности пяти C₂H₂ ZF-мотивов (ZF1-ZF5). Пунктирной линией подчеркнуты аминокислоты входящие в специфический для SNAI2 белка SLUG домен. Тонкой сплошной линией подчеркнута аминокислотная последовательность SNAG домена.

крипционного репрессора белка SNAI2 (Slug) сходна со структурой белка SNAI1 [24] (рис. 2), однако эти белки могут регулировать активности различающихся наборов генов-мишеней в эпителиальных клетках [14]. Так же как и SNAI1, белок SNAI2 может быть условно разделен на две части — N-концевую регуляторную часть и C-концевую ДНК связывающую. На N-конце белка SNAI2 (1—9 аминокислота) находится консервативный репрессорный домен SNAG, отличающийся от гомологичной последовательности SNAI1 единственной аминокислотной заменой в положении 8 (RyK). Делеция этого небольшого участка в белке приводит к полной потере репрессорной активности SNAI2 по отношению к промотору гена E-кадгерина мыши [56]. Гомологичный белку SNAI1 ДНК связывающий участок SNAI2 расположен в C-концевой области (128—264 аминокислота) и состоит из пяти C₂H₂ ZF-мотивов (ZF1-ZF5). Первый ZF-мотив (ZF1) SNAI2 является, по-видимому, нефункциональным [57] и его инактивирующие мутации не приводят к снижению репрессорной активности SNAI2 по отношению к промоторам гена E-кадгерина человека (*CDH1*) и гена клаудин-1 (*CLDN1*) [58]. ДНК связывающая активность SNAI2 по отношению E-боксу элементу (E-pal) промотора гена E-кадгерина мыши существенно ниже связывающей активности белка SNAI1 [59], тем не менее, оверэкспрессия SNAI2 в эпителиальных клетках линии MDCK вызывает полный ЭМП сопровождающийся выраженной репрессией гена E-кадгерина [14]. Между SNAG доменом и ДНК связывающим доменом SNAI2 расположена протяженная аминокислотная последовательность, содержащая серин-пролин богатый SPR участок и специфический SLUG домен, отсутствующий у других представителей Snail суперсемейства. Предполагается, что этот SPR участок SNAI2 также содержит высокодегенерированные сайты так называемых CtBP-связывающих доменов (C-terminal binding protein interacting domains, CID домены), описанных впервые для белка Snail (dSnail) *Drosophila melanogaster* [27, 60, 61]. Для белка SNAI2 не описано NES-домена и домена дестабилизации (DB-домена), которые в родственном белке SNAI1 во многом определяют стабильность и внутриклеточную локализацию. По аналогии со SNAI1 было предположено присутствие диспергированного по ZF-участкам сигнала ядерной локализации SNAI2 [33].

Имеется относительно немного экспериментальных данных о посттрансляционных модификациях белка SNAI2 регулирующих его биологическую активность. Так, в *in vitro* экспериментах с очищенными фрагментами SNAI2 было показано, что большинство сайтов фосфорилирования белка SNAI2 ре-

комбинантной киназой GSK-3 β находится в интервале между 63 и 130 аминокислотными остатками белка SNAI2 [62]. Использование мутантных рекомбинантных фрагментов SNAI2 содержащих замены остатков серина на аланин (S/A) показало, что сайтами для *in vitro* фосфорилирования белка киназой GSK-3 β являются аминокислотные остатки S96, S100 и S104. В экспериментах по трансфекции ДНК конструкций с мутантным SNAI2 было показано также, что остатки S96, S100 и S104, по видимому, являются сайтами дестабилизирующего фосфорилирования так как их замена на соответствующие аланины приводила существенно к увеличению времени полужизни мутантного белка SNAI2 [62]. Авторы показали также, что, как и в случае с фосфорилированным GSK-3 β белком SNAI1, фосфорилированный SNAI2 распознается β -Trcp1 E3 убиквитин лигазным комплексом и подвергается полиубиквитинированию с последующим протеасомным расщеплением [62]. В работе других авторов было показано, что фосфорилированный GSK-3 β белок SNAI2 может распознаваться U-бокс E3 убиквитин лигазой CHIP (carboxyl terminus of Hcs70-interacting protein) с последующим полиубиквитинированием [63]. Помимо дестабилизирующего фосфорилирования в SPR участке белок SNAI2 может подвергаться фосфорилированию усиливающему его репрессорную активность. Так было показано, что замена остатка S4, локализованного в N-концевом SNAG домене, на остаток аспарагиновой кислоты, которая имитирует фосфорилирование серина, может приводить к существенному усилению репрессорной активности мутантного SNAI2 [56].

Роль SNAI1 и SNAI2 в регуляции эпигенетических процессов, ведущих к ЭМП

Согласно современному представлению о транскрипционной регуляции ЭМП репрессия генов определяющих эпителиальный фенотип клеток не заключается в простом репрессирующем эффекте связывания факторов типа SNAI1 и SNAI2 с соответствующими участками промоторной области регулируемого гена [17]. Вероятнее всего первоначальное связывание с E-боксом элементами инициирует образование на промоторах регулируемых генов макромолекулярных репрессорных комплексов обеспечивающих репрессивную эпигенетическую модификацию, как белков хроматина, так и ДНК. Белок-связывающие SNAG домены SNAI1 и SNAI2 взаимодействуют с различными ядерными факторами, которые в клетке обеспечивают регуляцию дифференциальной активности генов.

Ацетилирование остатков лизина в молекулах гистонов, таких, как H3K9 и H3K14, обычно ассоциировано с транскрипционной активностью гена и удаление этих активирующих модификаций (гистон деацетилирование) как правило, приводит к конденсации хроматина промоторной области гена и ослаблению транскрипции. Было показано, что связанный с промоторной областью мышинного гена *Cdh1* белок mSnail рекрутирует на промотор *Cdh1* репрессорный комплекс Sin3 содержащий гистон деацетилазу I класса HDAC1/2 и белок mSin3A [64]. Также белок SNAI1 рекрутирует на промоторы репрессируемых генов лизин-специфическую гистон деметилазу LSD1 (FAD-зависимая моноамин оксигеназа, KDM1A), которая является субъединицей другого репрессорного комплекса, включающего белки CoREST и HDAC 1/2 [65]. Аминоксидазный домен LSD1 связывается со SNAG доменом SNAI1, который имеет частичное сходство по аминокислотной последовательности с N-терминальным участком гистона H3 [66]. Образование комплекса SNAI1/CoREST/LSD1 на промоторных участках генов и в частности на промоторе гена *CDH1* приводит к деацетилированию гистонов H3K9/14ac и деметилированию активирующих транскрипцию модифицированных гистонов H3K4me3 и H3K4me2, что ведет к существенному ослаблению транскрипции. Однако важно отметить, что LSD1 также, кроме деметилирования H3K4me3, может частично деметилировать сильные репрессирующие модификации H3K9me3, превращая его в более слабые репрессирующие варианты, частично активирующие транскрипцию H3K9me2 и H3K9me1 [67]. Таким образом, формирование комплекса LSD1/SNAI1 на промоторах регулируемых SNAI1 генов может приводить как к репрессии регулируемого промотора, так и к его частичной активации, что позволяет LSD1 тонко регулировать активность генов мишеней транскрипционного фактора SNAI1. Помимо LSD1 деметилазы белок SNAI1 также связывается с ферментом LOXL2, который катализирует окислительное деаминирование определенных ε-аминогрупп лизина в ряде белков [49]. Недавно было показано, что связанный со SNAI1 фермент LOXL2 способен осуществлять деаминирование триметилированного гистона H3K4me3, тем самым удалять активирующие транскрипцию модификации гистона H3 [68].

Белки группы Поликомб (Polycomb group proteins, PcG) относятся к фундаментальным эпигенетическим регуляторам, которые контролируют такие процессы как раннее развитие, выбор направления дифференцировки и поддержание пула стволовых клеток взрослого организма [69]. Эти белки функционируют как транскрипционные репрессоры и входят в состав

двух макромолекулярных комплексов (PRC1 и PRC2). Показана тесная связь этих комплексов с транскрипционными факторами, регулирующими ЕМП третьего типа. Так, в раковых клетках поджелудочной железы и толстой кишки связанный с промоторной областью гена *CDH1* белок SNAI1 способен образовывать комплекс, по крайней мере, с двумя субъединицами PRC2 комплекса SUZ12 и EZH2, что приводит к репрессорному триметилированию лизинового остатка K27 гистона H3 (H3K27me3) прилежащего хроматина [70]. В сочетании с сохранением H3K4me3 формы гистона H3 это приводит к созданию квазистабильного локально бивалентного состояния хроматина, имеющего как репрессивные, так и активирующие гистоновые модификации. Бивалентное состояние хроматина характерно для промоторов ряда генов в эмбриональных клетках и практически отсутствует в нормальных дифференцированных тканях [71]. Предполагается, что подобное бивалентное состояние хроматина промотора гена *CDH1* и других важных для канцерогенеза генов может иметь место и в раковых стволовых клетках [17]. Формирование варианта H3K27me3, в свою очередь, создает возможности связывания с хроматином промоторной области гена хромодомен-содержащих субъединиц комплекса PRC1, таких, как CBX2, CBX4 и CBX8 [72]. Связывание комплекса PRC1 рекрутирует на промоторы белки SUV39H1 (гистон-лизин метилтрансфераза) и RING1 (PRC1 ассоциированную E3 убиквитин лигазу), что приводит к дальнейшему репрессированию транскрипционной активности гена за счет образования сильной репрессивной гистоновой модификации H3K9me3 и образованию моноубиквитинированного гистона H2AK119ub соответственно. Белок SNAI1 взаимодействует с SUV39H1 при TGF-β индуцированной репрессии гена *CDH1* в раковых клетках молочной железы, что свидетельствует о необходимости постоянного присутствия связанного с промотором SNAI1 для PRC1/PRC2 опосредованной репрессии *CDH1* [73]. Необходимо отметить, что SNAI1 способен формировать активный комплекс с другой гистон-лизин метилтрансферазой G9a [74]. Эухроматин-ассоциированная метилтрансфераза G9a метилирует и диметилирует гистон H3, что приводит к образованию репрессорных модификаций H3K9me и H3K9me2, которые, в свою очередь, являются субстратами для белка SUV39H1 [75]. Рекрутированная SNAI1 метилтрансфераза G9a формирует H3K9me2-обогащенный хроматин промоторного участка, который затем дополнительно эпигенетически репрессируется за счет метилирования ДНК [74]. Таким образом, ЕМП фактор SNAI1 является частью многокомпонентной эпигенетической молекулярной машины осуществляющей репрессию генов

эпителиальной дифференцировки, которая критически важна для нормального развития и при патологических процессах вовлечена в формирование инвазивного фенотипа опухолевых клеток [76].

Помимо формирования репрессивного состояния хроматина за счет модификации нуклеосомальных гистонов стабильная инактивация генов эпителиальной дифференцировки в раковых клетках, в частности, гена *CDH1*, обычно сопровождается метилированием С-5 положения цитозина в CpG динуклеотидах, расположенных внутри и вблизи промоторных участков репрессируемых генов [76]. Метилирование цитозина в CpG приводит к формированию закрытой формы хроматина и наследуемой в ходе клеточных делений транскрипционной репрессии гена *CDH1* [76, 77]. Минимальный промотор гена *CDH1* человека содержит 29 CpG динуклеотидов 98% цитозинов, которых могут быть метилированы в некоторых клеточных линиях [78]. Основным ферментом, обеспечивающим CpG метилирование в соматических клетках человека является ДНК метилтрансфераза DNMT1 [79]. Белок SNAI1 способен образовывать комплексы с DNMT1 путем прямого взаимодействия либо за счет других ассоциированных с ним белков [77, 74]. Так, было показано, что в клетках карциномы толстой кишки HCT116 белок SNAI1 способен образовывать ядерный комплекс с DNMT1. Взаимодействие осуществляется через N-концевой SNAG домен SNAI1 и N-концевую часть DNMT1, содержащую DMAP-1 и PCNA- связывающие домены. Способность DNMT1 образовывать комплекс с SNAI1 не зависела от каталитического домена ДНК метилтрансферазы [77]. Интересно, что экспрессия белка DNMT1 с гипоморфного аллеля *DNMT1^{delE3-6}* приводила в клетках HCT116 к выраженному ЕМП и неспособностью N-делетированного DNMT1 связываться SNAI1. В работе Dong et al [74] было обнаружено образование устойчивого тройного комплекса SNAI1/G9a/DNMT1 в клетках рака молочной железы, причем авторы показали, что белок G9a выполняет роль своеобразного «мостика» соединяющего белки SNAI1 и DNMT1. Ингибирование G9a приводило к разрушению комплекса SNAI1/G9a/DNMT1 и индуцированному деметилированию промоторной области гена E-кадгерина [74].

Заключение

В настоящее время факторы семейства Snail рассматривают как принципиальные транскрипционные репрессоры генов, определяющих эпителиальный фенотип клеток. Кроме *CDH1*, к эпителиальным генам, которые репрессируются SNAI1 и SNAI2 относятся

гены нескольких цитокератинов CK8, CK17/18 [12] и CK19, ген *Crumbs3* [80], окклюдин, клаудины 1, 3, 4 [81] и 7 [82], муцин *MUC1* [83] и гены *HNF4α* и *HNF1β* [84]. SNAI1 и SNAI2 опосредованная репрессия этих генов осуществляется через прямое связывание белкового репрессора с E-бокс последовательностями ДНК внутри промоторной области регулируемых генов. Как осуществляется процесс многостадийной репрессии активности этих генов и насколько он схож с инактивацией промотора *CDH1* гена в настоящее время известно очень мало. Необходимо также отметить, что помимо репрессии активности эпителиальных генов в ходе ЭМП также происходит активация экспрессии многих генов мезенхимальной дифференцировки, среди которых виментин, различные коллагены, фибронектин, *LEF1* и *ZEB1* [83]. Участие белков SNAI1 и SNAI2 в активации транскрипции генов, по-видимому, опосредованное [83] поскольку к текущему моменту немного данных о генах, чьи промоторные области активируются напрямую этими транскрипционными факторами [85, 86]. Дальнейший полногеномный анализ взаимодействий SNAI1 и SNAI2 и их функциональных комплексов с цис-регуляторными участками генома, а также изменений профилей этих взаимодействий при канцерогенезе и, в особенности, при метастазировании поможет лучше понять механизмы ЭМП и возможно откроет новые более эффективные варианты активного воздействия на этот важнейший биологический феномен в медицинских целях.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект №14-50-00131).

References

1. Hay E.D. An overview of epithelio-mesenchymal transformation. *Acta Anat.* 1995; 154(1):8-20.
2. Kalluri R., Weinberg R.A. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest.* 2009; 119(6):1420-8.
3. Nieto M.A. The ins and outs of the epithelial to mesenchymal transition in health and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2011; 27:347-76.
4. Thiery J.P., Sleeman J.P. Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transition. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2006; 7(2):131-42.
5. Hay E.D. The mesenchymal cell, its role in the embryo, and the remarkable signaling mechanisms that create it. *Dev Dyn.* 2005; 233(3):706-20.
6. Gittes G.K. Developmental biology of the pancreas: a comprehensive review. *Dev Biol.* 2009; 326(1):4-35.
7. Nakaya Y., Sheng G. EMT in developing morphogenesis. *Cancer Lett.* 2013; 341(1):9-15.
8. Thiery J.P., Acloque H., Huang R.Y., Nieto M.A. Epithelial-mesenchymal transition in development and disease. *Cell.* 2009; 139(5):871-90.

9. Kim K.K., Kugler M.C., Wolters P.J., Robillard L., Galvez M.G., Brumwell A.N. et al. Alveolar epithelial cell mesenchymal transition develops in vivo during pulmonary fibrosis and is regulated by the extracellular matrix. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006; 103(35):13180-5.
10. Zeisberg M., Yang C., Martino M., Duncan M.B., Rieder F., Tanjore H., Kalluri R. Fibroblasts derive from hepatocytes in liver fibrosis via epithelial to mesenchymal transition. *J Biol Chem*. 2007; 282(32):23337-47.
11. Kalluri R., Nielson E.G. Epithelial-mesenchymal transition and its implication for fibrosis. *J Clin Invest*. 2003; 112(12):1776-84.
12. De Craene B., Gilbert B., Stove C., Bruyneel E., van Roy F., Berx G. The transcription factor Snail induces tumor cell invasion through modulation of the epithelial cell differentiation program. *Cancer Res*. 2005; 65(14):6237-6244.
13. Bermejo-Rodriguez C., Perez-Caro M., Perez-Manquera P.A., Sanchez-Beato M., Piris M.A., Sanchez-Garcia I. Mouse cDNA microarray analysis uncovers Slug targets in mouse embryonic fibroblasts. *Genomics*. 2006; 87(1):113-8.
14. Moreno-Bueno G., Cubillo E., Sarrío D., Peinado H., Rodriguez-Pinilla S.M., Villa S. et al. Genetic profiling of epithelial cells expressing E-cadherin repressors reveals a distinct role for Snail, Slug, and E47 factors in epithelial-mesenchymal transition. *Cancer Res*. 2006; 66(19):9543-56.
15. Hussey G.S., Link L.A., Brown A.S., Howley B.V., Chaudhury A., Howe P.H. Establishment of a TGF β -induced post-transcriptional EMT gene signature. *PLoS One*. 2012; 7(12):e52624.
16. Malouf G.G., Taube J.H., Lu Y., Roysarkar T., Panjarian S., Estecio M.R. et al. Architecture of epigenetic reprogramming following Twist1-mediated epithelial-mesenchymal transition. *Genome Biol*. 2013; 14(12):R144.
17. Tam W.L., Weinberg R.A. The epigenetics of epithelial-mesenchymal plasticity in cancer. *Nat Med*. 2013; 19(11):1438-49.
18. Birchmeier W., Behrens J. Cadherin expression in carcinomas: role in the formation of cell junctions and the prevention of invasiveness. *Biochim Biophys Acta*. 1994; 1198(1):11-26.
19. Thiery J.P. Epithelial-mesenchymal transition in tumor progression. *Nat Rev Cancer*. 2002; 2(6):442-54.
20. Nelson W.J., Nusse R. Convergence of Wnt, beta-catenin, and cadherin pathways. *Science*. 2004; 303(5663):1483-7.
21. Peinado H., Portillo F., Cano A. Transcriptional regulation of cadherins during development and carcinogenesis. *Int J Dev Biol*. 2004; 48(5-6):365-75.
22. Peinado H., Olmeda D., Cano A. Snail, ZEB and bHLH factors in tumor progression: an alliance against the epithelial phenotype? *Nat Rev Cancer*. 2007; 7(6):415-28.
23. De Craene B., Berx G. Regulatory networks defining EMT during cancer initiation and progression. *Nat Rev Cancer*. 2013; 13(2):97-110.
24. Manzanares M., Locascio A., Nieto M.A. The increasing complexity of the Snail gene superfamily in metazoan evolution. *Trends Genet*. 2001; 17(4):178-81.
25. Grau Y., Carteret C., Simpson P. Mutations and chromosomal rearrangements affecting the expression of snail, a gene involved in embryonic patterning in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*. 1984; 108(2):347-60.
26. Alberga A., Boulay J.L., Kempe E., Dennefeld C., Haenlin M. The snail gene required for mesoderm formation in *Drosophila* is expressed dynamically in derivatives of all three germ layers. *Development*. 1991; 111(4):983-92.
27. Nieto M.A. The Snail superfamily of zinc-finger transcription factors. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2002; 3(3):155-66.
28. Pabo C., Peisach E., Grant R.A. Design and selection of novel Cys₂His₂ zinc finger proteins. *Annu Rev Biochem*. 2001; 70:313-40.
29. Grimes H.L., Chan T.O., Zweidler-McKay P.A., Tong B., Tschlis P.N. The Gfi-1 proto-oncogene contains a novel transcriptional repressor domain, SNAG, and inhibits G1 arrest induced by interleukin-2 withdrawal. *Mol Cell Biol*. 1996; 16(11):6263-72.
30. Dominguez D., Montserrat-Sentis B., Virgos-Soler A., Guaita S., Grueso J., Porta M. et al. Phosphorylation regulates the subcellular location and activity of the snail transcriptional repressor. *Mol Cell Biol*. 2003; 23(14):5078-89.
31. Zhou B.P., Deng J., Xia W., Xu J., Li Y.M., Gunduz M., Hung M.C. Dual regulation of Snail by GSK-3 β -mediated phosphorylation in control of epithelial-mesenchymal transition. *Nat Cell Biol*. 2004; 6(10):931-40.
32. Ko H., Kim H.S., Kim N.H., Lee S.H., Kim K.H., Hong S.H., Yook J.I. Nuclear localization signals of the E-cadherin transcriptional repressor Snail. *Cells Tissues Organs*. 2007; 185(1-3):62-7.
33. Mingot J-M., Vega S., Maestro B., Sanz J.M., Nieto M.A. Characterization of Snail nuclear import pathways as representatives of C₂H₂ zinc finger transcription factors. *J Cell Sci*. 2009; 122(9):1452-60.
34. Yamasaki H., Sekimoto T., Ohkudo T., Douchi T., Nagata Y., Ozawa M., Yoneda Y. Zinc finger domain of Snail function as a nuclear localization signal for importin beta-mediated nuclear import pathway. *Genes Cells*. 2005; 10(5):455-64.
35. MacPherson M.R., Molina P., Souchelnytskyi S., Wernstedt C., Martin-Perez J., Portillo F., Cano A. Phosphorylation of serine 11 and serine 92 as new positive regulator of human Snail1 function: potential involvement of casein kinase-2 and the cAMP-activated kinase protein kinase A. *Mol Biol Cell*. 2010; 21(2):244-53.
36. Yang Z., Rayala S., Nguyen D., Vadlamudi R.K., Chen S., Kumar R. Pak1 phosphorylation of snail, a master regulator of epithelial-to mesenchyme transition, modulates snail's subcellular localization and functions. *Cancer Res*. 2005; 65(8):3179-84.
37. Yook J.I., Li X.Y., Ota I., Fearon E.R., Weiss S.J. Wnt-dependent regulation of the E-cadherin repressor snail. *J Biol Chem*. 2005; 280(12):11740-8.
38. Liu C., Li Y., Semenov M., Han C., Baeg G.H., Tan Y. et al. Control of beta-catenin phosphorylation/degradation by dual-kinase mechanism. *Cell*. 2002; 108(6):837-847.
39. Xu H., Lee S-H., Kim H.S., Kim N.H., Piao S., Park S.-H. et al. Role of CK1 in GSK3 β -mediated phosphorylation and degradation of Snail. *Oncogene*. 2010; 29(21):3124-33.
40. Yook J.I., Li X.Y., Ota I., Hu C., Kim H.S., Kim N.H. et al. A Wnt-Axin2-GSK3 β cascade regulates Snail activity in breast cancer cells. *Nat Cell Biol*. 2006; 8(12):1398-06.
41. Kishida M., Hino S., Michiue T., Yamamoto H., Kishida S., Fukui A. et al. Synergistic activation of the Wnt signaling pathway by Dvl and casein kinase I ϵ . *J Biol Chem*. 2001; 276(35):33147-55.

42. Bachelder R.E., Yoon S.-O., Franci C., Garcia de Herreros A., Mercurio A.M. Glycogen synthase kinase-3 is an endogenous inhibitor of Snail transcription: implication for the epithelial-mesenchymal transition. *J Cell Biol.* 2005; 166(1):29-33.
43. Wu Y., Evers B.M., Zhou B.P. Small C-terminal domain phosphatase enhance Snail activity through dephosphorylation. *J Biol Chem.* 2009; 284(1):640-8.
44. Salh B., Marotta A., Wagey R., Sayed M., Pelech S. Dysregulation of phosphatidylinositol 3-kinase and downstream effectors in human breast cancer. *Int J Cancer.* 2000; 98(1):148-54.
45. Zhang K., Rodriguez-Aznar E., Yabuta N., Owen R.J., Mingot J.M., Nojima H. et al. Lats2 kinase potentiates Snail1 activity by promoting nuclear retention upon phosphorylation. *EMBO J.* 2012; 31(1):29-43.
46. Zeng Q, Hong W. The emerging role of the hippo pathway in cell contact inhibition, organ size control, and cancer development in mammals. *Cancer Cell.* 2008; 13(3):188-192.
47. Varelas X., Samavarchi-Tehrani P., Narimatsu M., Weiss A., Cockburn K., Larsen B.G. et al. The Crumbs complex couples cell density sensing to Hippo-dependent control of the TGF-beta-SMAD pathway. *Dev Cell.* 2010; 19(6):831-84.
48. Peinado H., Portillo F., Cano A. Switching on-off Snail: LOXL2 versus GSK3 β . *Cell Cycle.* 2005; 4(12):1479-82.
49. Peinado H., Iglesias-de la Cruz M.C., Olmeda D., Csiszar K., Fong K.S., Vega S. et al. A molecular role for lysyl oxidase-like 2 enzyme in snail regulation and tumor progression. *EMBO J.* 2005 24(19):3446-58.
50. Barker H.E., Cox T.R., Emler J.T. The rationale for targeting the LOX family in cancer. *Nat Rev Cancer.* 2012; 12(8):540-52.
51. Vinas-Castells R., Beltran M., Valls G., Gymez I., Garcia J.M., Montserrat-Senths B. et al. The hypoxia-controlled FBXL14 ubiquitin ligase targets SNAIL1 for proteasome degradation. *J Biol Chem.* 2010; 285(6):3794-805.
52. Rodriguez M.I., Gonzalez-Flores A., Dantzer F., Collard J., Garcia de Herreros A., Oliver F.J. Poly (ADP-ribose)-dependent regulation of Snail1 protein stability. *Oncogene.* 2011; 30(42):4365-72.
53. Park S.Y., Kim H.S., Kim N.H., Ji S., Cha S.Y., Kang J.G. et al. Snail is stabilized by O-GlcNAc modification in hyperglycaemic condition. *EMBO J.* 2010; 29(22):3787-96.
54. Kim J.Y., Kim Y.M., Yang C.H., Cho S.K., Lee J.W., Cho M. Functional regulation of Slug/Snail2 is dependent on GSK-3 β -mediated phosphorylation. *FEBS Journal.* 2012; 279(16):2929-39.
55. Holland P.W.H., Garcia-Fernandez J., Williams N.A., Sidow A. Gene duplication at the origin of vertebrate development. *Development.* (Suppl). 1994; 120:125-33.
56. Molina-Ortiz P., Villarejo A., MacPherson M., Santos V., Montes A., Souchelnyskiy S. et al. Characterization of the SNAG and SLUG domains of Snail2 in the repression of E-cadherin and EMT induction: modulation by serine 4 phosphorylation. *PLoS One.* 2012; 7(5):e36132.
57. Pavletich N.P., Pabo C.O. Crystal structure of a five finger GLI-DNA complex: new perspectives on zinc fingers. *Science.* 1993; 261(5129):1701-7.
58. Villarejo A., Cortes-Cabrera A., Molina-Ortiz P., Portillo F., Cano A. Differential role of Snail1 and Snail2 zinc fingers in E-cadherin repression and epithelial to mesenchymal transition. *J Biol Chem.* 2014; 289(2):930-41.
59. Bolos V., Peinado H., Perez-Moreno M.A., Fra-gua M.F, Esteller M., Cano A. The transcriptional factor Slug represses E-cadherin expression and induces epithelial to mesenchymal transitions: a comparison with Snail and E47 repressors. *J Cell Sci.* 2003; 116(3):499-511.
60. Hemavathy K., Guru S.C., Harris J., Cheng J.D., Ip Y.T. Human Slug is a repressor that localizes to sites of active transcription. *Mol Cell Biol.* 2000; 20(14):5087-95.
61. Coboleda C., Perez-Caro M., Vicente-Duenas C., Sanchez-Garcia I. Function of the zinc-finger transcription factor SNAIL2 in cancer and development. *Annu Rev Genet.* 2007; 41:41-61.
62. Wu Z-Q., Li X-Y., Hu C.Y., Ford M., Kleer C.G., Weiss S.J. Canonical Wnt signaling regulates Slug activity and links epithelial-mesenchymal transition with epigenetic Breast Cancer 1, Early Onset (BRCA1) repression. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2012; 109(41):16654-9.
63. Kao S.H., Wang W.L., Chen C.Y., Chang Y.L., Wu Y.Y., Wang Y.T. et al. GSK3 β controls epithelial-mesenchymal transition and tumor metastasis by CHIP-mediated degradation of Slug. *Oncogene.* 2013; doi:10.1038/onc.2013.279 [Epub ahead of print].
64. Peinado H., Ballestar E., Esteller M., Cano A. Snail mediates E-cadherin repression by the recruitment of the Sin3A/Histone deacetylase 1(HDAC1)/ HDAC2 complex. *Mol Cell Biol.* 2004; 24(1):306-19.
65. Lin T., Ponn A., Hu X., Law B.K., Lu J. Requirement of the histone demethylase LSD1 in Snail1-mediated transcriptional repression during epithelial-mesenchymal transition. *Oncogene.* 2010; 29(35):4896-904.
66. Lin Y., Wu Y., Li J., Dong C., Ye X., Chi Y.I. et al. The SNAG domain of Snail1 functions as a molecular hook for recruiting lysine-specific demethylase 1. *EMBO J.* 2010; 29(11):1803-16.
67. Metzger E., Wissmann M., Yin N., Muller J.M., Schneider R., Peters A.H. et al. LSD1 demethylates repressive histone marks to promote androgen-receptor-dependent transcription. *Nature.* 2005; 437(7057):436-9.
68. Herranz N., Dave N., Millanes-Romero A., Morrey L., Diaz V.M., Lorenz-Fonfria V. et al. Lysyl oxidase-like 2 deaminates lysine 4 in histone H3. *Molecular Cell.* 2012; 46(3):369-76.
69. Sparmann A., van Lohuisen M. Polycomb silencers control cell fate, development and cancer. *Nat Rev Cancer.* 2006; 6(11):846-56.
70. Herranz N., Pasini D., Diaz V.M., Franci C., Gutierrez A., Dave N. et al. Polycomb complex 2 is required for E-cadherin repression by the Snail1 transcription factor. *Mol Cell Biol.* 2008; 28(15):4772-81.
71. Voigt P., Tee W.W., Reinberg D. A double take on bivalent promoters. *Genes Dev.* 2013; 27(12):1318-38.
72. Mills A.A. Throwing the cancer switch: reciprocal roles of polycomb and trithorax proteins. *Nat Rev Cancer.* 2010; 10(10):669-82.
73. Dong C., Wu Y., Wang Y., Wang C., Kang T., Rychahou P.G. et al. Interaction with Suv39H1 is critical for Snail-mediated E-cadherin repression in breast cancer. *Oncogene.* 2013; 32(11):1351-62.
74. Dong C., Wu Y., Yao J., Wang Y., Yu Y., Rychahou P.G. et al. G9a interact with Snail and is critical for Snail-mediated E-cadherin repression in human breast cancer. *J Clin Invest.* 2012; 122(4):1469-86.

75. Collins R., Cheng X. A case study in cross-talk: the histone lysine methyltransferases G9a and GLP. *Nucleic Acids Res.* 2010; 38(11):3503-11.
76. Baylin S.B., Jones P.A. A decade of exploring the cancer epigenome — biological and translational implications. *Nat Rev Cancer.* 2011; 11(10):726-34.
77. Espada J., Peinado H., Lopez-Serra L., Setien F., Lopez-Serra P., Portela A. et al. Regulation of SNAIL1 and E-cadherin function by DNMT1 in a DNA methylation-independent context. *Nucleic Acids Res.* 2011; 39(21):9194-205.
78. Reinhold W.C., Reimers M.A., Lorenzi P., Ho J., Shankavaram U.T., Ziegler M.S. et al. Multifactorial regulation of E-cadherin expression: an integrative study. *Mol Cancer Ther.* 2010; 9(1):1-16.
79. Chen T., Li E. Structure and functions of eukaryotic DNA methyltransferases. *Curr Top Dev Biol.* 2004; 60(1):55-89.
80. Whiteman E.L., Liu C.J., Fearon E.R., Margolis B. The transcriptional factor snail represses Crumbs3 expression and disrupts apico-basal polarity complexes. *Oncogene.* 2008; 27(27):3875-89.
81. Ikenouchi J., Matsuda M., Furuse M., Tsukita S. Regulation of tight junctions during the epithelium — mesenchyme transition: direct repression of the gene expression of claudins/occludin by Snail. *J Cell Sci.* 2003; 116(Pt 10):1959-67.
82. Martinez-Estrada O.M., Culleres A., Soriano F.X., Peinado H., Bolos V., Martinez F.O. et al. The transcription factors Slug and Snail act as repressors of Claudin-1 expression in epithelial cells. *Biochem.J.* 2006; 394(2):449-57.
83. Guaita S., Puig I., Fanci C., Garrido M., Dominguez D., Batlle E. et al. Snail induction of epithelial to mesenchymal transition in tumor cells is accompanied by MUC1 repression and ZEB1 expression. *J Biol Chem.* 2002; 277(42):39209-16.
84. Cicchini C., Filippini D., Coen S., Marchetti A., Cavallari C., Laudadio I. et al. Snail controls differentiation of hepatocytes by repressing HNF4 α expression. *J Cell Physiol.* 2006; 209(1):230-8.
85. Jorda M., Olmeda D., Vinyals A., Valero E., Cubillo E., Llorens A. et al. Upregulation of MMP-9 in MDCK epithelial cell line in response to expression of the Snail transcription factor. *J Cell Sci.* 2005; 118(Pt 15):3371-85.
86. Hu C-T., Chang T-Y., Cheng C-C., Liu C-S., Wu J-R., Li M-C, Wu W-S. Snail associates with EGR-1 and SP-1 to upregulate transcriptional activation of p15^{INK4B}. *FEBS Journal.* 2010; 277(5):1202-18.

Received 01.04.15

Сведения об авторах:

Усова Евгения Витальевна, мл. науч. сотр. лаб. молекулярной медицины, ФГБУ «Институт хирургии им. А.В. Вишневского» Минздрава России, e-mail: eugenia125@mail.ru

Копанцева Марина Робертовна, к.биол.н., ст. науч. сотр. лаб. молекулярной медицины, ФГБУ «Институт хирургии им. А.В. Вишневского» Минздрава России, e-mail: Korantseva@ixv.ru

Егоров Вячеслав Иванович, д.м.н., гл. онколог, Городская клиническая больница №5 Департамента здравоохранения г.Москвы (ГБУЗ «ГКБ №5 ДЗМ»), e-mail: egorov12333@gmail.com

Свердлов Евгений Давидович, акад. РАН, зав. лаб. структуры и функции генов человека, ФГБУН ИБХ РАН, e-mail: edsverd@gmail.com