

Перевод на английский язык <https://vavilov.elpub.ru/jour>

## Компьютерный анализ особенностей регуляции гиперметилированных маркерных генов гепатокарциномы вирусными белками гепатита С

Е.А. Антропова<sup>1</sup>✉, Т.М. Хлебодарова<sup>1, 2</sup>, П.С. Деменков<sup>1, 2</sup>, А.С. Вензель<sup>1, 2</sup>, Н.В. Иванисенко<sup>1, 2</sup>, А.Д. Гавриленко<sup>1, 3</sup>, Т.В. Иванисенко<sup>1, 2</sup>, А.В. Адамовская<sup>2, 3</sup>, П.М. Ревва<sup>2, 3</sup>, И.Н. Лаврик<sup>4</sup>, В.А. Иванисенко<sup>1, 2, 3</sup>

<sup>1</sup> Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

<sup>2</sup> Курчатовский геномный центр ИЦиГ СО РАН, Новосибирск, Россия

<sup>3</sup> Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия

<sup>4</sup> Магдебургский университет им. Отто фон Герике, медицинский факультет, Магдебург, Германия

✉ nzhenia@bionet.nsc.ru

**Аннотация.** Вирус гепатита С (ВГС) считается фактором риска для возникновения гепатоцеллюлярной карциномы (ГЦК). Известно, что большую роль в молекулярно-генетических механизмах вирус-индуцированного онкогенеза играют эпигенетические изменения. Аберрантное метилирование ДНК служит медиатором эпигенетических изменений, которые тесно связаны с патогенезом ГЦК, и признано биомаркером для его ранней диагностики. С помощью ANDSystem проведены реконструкция и оценка статистической значимости путей потенциальной регуляции вирусными белками ВГС 32 генов человека, гиперметилированных при ГЦК. Среди исследованных генов были как онкосупрессоры, так и проопухолевые гены, идентифицированных по данным полногеномного анализа метилирования ДНК. Реконструированы регуляторные пути, включающие белок-белковые взаимодействия, регуляцию экспрессии генов, регуляцию активности, стабильности и транспорта белков. Среди статистически значимых оказались пути регуляции экспрессии. Показано, что восемь из десяти белков ВГС являются участниками данных путей. Белок ВГС NS3 был вовлечен в наибольшее число регуляторных путей. NS3 связан с регуляцией пяти генов-онкосупрессоров, что может свидетельствовать о его центральной роли в патогенезе ГЦК. Анализ реконструированных путей показал, что при ингибировании транскрипционных факторов в результате связывания с вирусными белками, экспрессия ряда онкосупрессоров (*WT1*, *MGMT*, *SOCST1*, *P53*) подавлялась, тогда как экспрессия других (*RASF1*, *RUNX3*, *WIF1*, *DAPK1*) активировалась. Таким образом, с помощью реконструкции генных сетей показано, что вирусные белки гепатита С способны влиять не только на статус метилирования генов-онкосупрессоров, но и на их транскрипционную регуляцию. Полученные результаты могут быть использованы при поиске фармакологических мишеней для разработки новых средств против ГЦК, индуцированной ВГС.

Ключевые слова: гепатоцеллюлярная карцинома; вирус гепатита С; регуляция экспрессии; гиперметилирование; регуляторные пути; генные сети; биоинформатика.

**Для цитирования:** Антропова Е.А., Хлебодарова Т.М., Деменков П.С., Вензель А.С., Иванисенко Н.В., Гавриленко А.Д., Иванисенко Т.В., Адамовская А.В., Ревва П.М., Лаврик И.Н., Иванисенко В.А. Компьютерный анализ особенностей регуляции гиперметилированных маркерных генов гепатокарциномы вирусными белками гепатита С. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2022;26(8):733-742. DOI 10.18699/VJGB-22-89

## Computer analysis of regulation of hepatocarcinoma marker genes hypermethylated by HCV proteins

Е.А. Antropova<sup>1</sup>✉, T.M. Khlebodarova<sup>1, 2</sup>, P.S. Demenkov<sup>1, 2</sup>, A.S. Venzel<sup>1, 2</sup>, N.V. Ivanisenko<sup>1, 2</sup>, A.D. Gavrilenko<sup>1, 3</sup>, T.V. Ivanisenko<sup>1, 2</sup>, A.V. Adamovskaya<sup>2, 3</sup>, P.M. Revva<sup>2, 3</sup>, I.N. Lavrik<sup>4</sup>, V.A. Ivanisenko<sup>1, 2, 3</sup>

<sup>1</sup> Institute of Cytology and Genetics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

<sup>2</sup> Kurchatov Genomic Center of ICG SB RAS, Novosibirsk, Russia

<sup>3</sup> Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

<sup>4</sup> Translational Inflammation Research, Medical Faculty, Otto von Guericke University Magdeburg, Magdeburg, Germany

✉ nzhenia@bionet.nsc.ru

**Abstract.** Hepatitis C virus (HCV) is a risk factor that leads to hepatocellular carcinoma (HCC) development. Epigenetic changes are known to play an important role in the molecular genetic mechanisms of virus-induced oncogenesis. Aberrant DNA methylation is a mediator of epigenetic changes that are closely associated with the HCC pathogenesis and considered a biomarker for its early diagnosis. The ANDSystem software package was used to reconstruct and evaluate the statistical significance of the pathways HCV could potentially use to regulate 32 hypermethylated genes in HCC, including both oncosuppressor and protumorigenic ones identified by genome-wide analysis of DNA methyla-

tion. The reconstructed pathways included those affecting protein-protein interactions (PPI), gene expression, protein activity, stability, and transport regulations, the expression regulation pathways being statistically significant. It has been shown that 8 out of 10 HCV proteins were involved in these pathways, the HCV NS3 protein being implicated in the largest number of regulatory pathways. NS3 was associated with the regulation of 5 tumor-suppressor genes, which may be the evidence of its central role in HCC pathogenesis. Analysis of the reconstructed pathways has demonstrated that following the transcription factor inhibition caused by binding to viral proteins, the expression of a number of oncosuppressors (*WT1*, *MGMT*, *SOCS1*, *P53*) was suppressed, while the expression of others (*RAS1*, *RUNX3*, *WIF1*, *DAPK1*) was activated. Thus, the performed gene-network reconstruction has shown that HCV proteins can influence not only the methylation status of oncosuppressor genes, but also their transcriptional regulation. The results obtained can be used in the search for pharmacological targets to develop new drugs against HCV-induced HCC.

Key words: hepatocellular carcinoma; hepatitis C virus; expression regulation; methylation; regulatory pathways; gene networks; bioinformatics.

**For citation:** Antropova E.A., Khlebodarova T.M., Demenkov P.S., Venzel A.S., Ivanisenko N.V., Gavrilenko A.D., Ivanisenko T.V., Adamovskaya A.V., Revva P.M., Lavrik I.N., Ivanisenko V.A. Computer analysis of regulation of hepatocarcinoma marker genes hypermethylated by HCV proteins. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2022;26(8):733-742. DOI 10.18699/VJGB-22-89

## Введение

По статистике за 2020 г. рак печени признан третьей по значимости причиной смерти от рака в мире. За этот же год в мире было зарегистрировано более 900 тыс. новых случаев этой патологии (International Agency for Research on Cancer, <https://gco.iarc.fr/today/home>). Доминирующим типом первичного рака печени (~90 % случаев) является гепатоцеллюлярная карцинома (ГЦК) (Llovet et al., 2016). Развитие ГЦК может быть вызвано действием факторов риска, таких как воздействие афлатоксина, употребление алкоголя, заражение вирусами гепатита В или С (ВГС), цирроз печени, неалкогольная жировая болезнь печени, неалкогольный стеатогепатит, метаболический синдром, ожирение, диабет II типа и генетическая предрасположенность (McGlynn et al., 2021).

В настоящее время накоплено множество данных по ассоциации ВГС с нарушениями функций печени, развитием цирроза и ГЦК (Rabaan et al., 2020). Проникая в организм, ВГС стремится осуществлять контроль над биологическими процессами, протекающими в клетках хозяина, с целью повышения своей выживаемости и эффективности репликации. Более чем у 70 % первично инфицированных заболевание принимает хроническое течение, при котором у больных наблюдается прогрессирующий фиброз и цирроз печени на фоне ее длительного воспаления (Jaroszewicz et al., 2015). Используя различные механизмы для кооптации инфицированных клеток, вирус может непреднамеренно привести к развитию ГЦК (D'souza et al., 2020). Однако молекулярно-генетические механизмы вирус-индуцированного канцерогенеза до сих пор плохо изучены.

Кроме того, патогенез ГЦК связан с эпигенетическими модификациями, а aberrантное метилирование ДНК является медиатором эпигенетических изменений (Fernández-Barrena et al., 2020) и может служить биомаркером для ранней диагностики ГЦК (Zhang C. et al., 2016; Xu et al., 2017).

Для установления функциональных связей между генами и выяснения молекулярных механизмов биологических процессов широкое применение нашли методы реконструкции генных сетей. Ранее нами была разработана программно-информационная система ANDSystem, пред-

назначенная для реконструкции генных сетей на основе знаний, экстрагированных из фактографических баз данных и извлеченных с помощью методов текст-майнинга из научных публикаций (Ivanisenko V.A. et al., 2015, 2019; Ivanisenko T.V. et al., 2020). С применением ANDSystem были реконструированы молекулярные механизмы ряда патологий: преэклампсия (Glotov et al., 2015), туберкулез (Bragina et al., 2016), коморбидные состояния астмы и гипертонии (Saik et al., 2018), COVID-19 (Ivanisenko N.V. et al., 2020), жизненный цикл ВГС (Saik et al., 2016) и др.

В настоящей работе с использованием ANDSystem проведена реконструкция регуляторных путей, описывающих потенциальные механизмы модуляции гиперметилированных при ГЦК генов белками ВГС. В анализе были рассмотрены 32 гена, известных как гиперметилированные маркеры ГЦК. Среди семи типов реконструированных регуляторных путей, включающих белок-белковые взаимодействия, регуляцию экспрессии генов, регуляцию активности, стабильности и транспорта белков, статистически значимыми оказались пути регуляции экспрессии генов. Выявлено девять генов-маркеров, которые потенциально могут быть подвержены регуляции со стороны белков ВГС. Среди них три гена-супрессора ГЦК (*MGMT*, *SOCS1* и *TP53*) могут быть подвержены негативной регуляции, а ген-супрессор апоптоза (*TERT*) – положительной регуляции.

## Материалы и методы

**Гены, гиперметилированные при ГЦК.** Информация о генах, находящихся в гиперметилированном состоянии при ГЦК, была взята из опубликованных статей (табл. 1). Рассматривались только те гены, гиперметилирование которых ассоциировано с ГЦК, что было показано с помощью анализа и метаанализа в опубликованных работах. Схематичное описание алгоритма обработки данных представлено на рис. 1.

**Реконструкция регуляторных путей** проводилась с помощью программно-информационной системы ANDSystem (Ivanisenko V.A. et al., 2019). Данная система была разработана для реконструкции генных сетей на основе автоматического анализа текстов научных публикаций и фактографических баз данных. ANDSystem

**Таблица 1.** Список гиперметилированных генов, использованных в анализе

Ген	Кодируемый белок	Литературный источник
<i>APC</i>	Adenomatous polyposis coli	Zhang C. et al., 2016
<i>COL7A1</i>	Collagen alpha-1(VII) chain	Schulze et al., 2015
<i>COL16A1</i>	Collagen alpha-1(XVI) chain	»
<i>DAPK1</i>	Death-associated protein kinase 1	Zhang C. et al., 2016
<i>DSE</i>	Dermatan-sulfate epimerase	Cheng et al., 2018
<i>FAM55C</i>	NXPE family member 3	»
<i>FAT4</i>	Protocadherin Fat 4	Schulze et al., 2015
<i>GALNT3</i>	Polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 3	Cheng et al., 2018
<i>GSTP1</i>	Glutathione S-transferase P	Zhang C. et al., 2016
<i>IGFALS</i>	Insulin-like growth-factor-binding protein, acid labile subunit	Neumann et al., 2012
<i>KCNA3</i>	Potassium voltage-gated channel subfamily A member 3	Hernandez-Meza et al., 2021
<i>LDHB</i>	L-lactate dehydrogenase B chain	»
<i>MGMT</i>	O6-methylguanine-DNA methyltransferase	Zhang C. et al., 2016
<i>NEBL</i>	Nebulette	Cheng et al., 2018
<i>NEFH</i>	Neurofilament heavy polypeptide	Revill et al., 2013
<i>OPCML</i>	Opioid binding protein/cell adhesion molecule-like	Zhang C. et al., 2016
<i>TP53</i>	Cellular tumor antigen p53	»
<i>PER3</i>	Period circadian protein homolog 3	Neumann et al., 2012
<i>PRDM2</i>	PR domain containing 2	Zhang C. et al., 2016
<i>PROZ</i>	Vitamin K-dependent protein Z	Neumann et al., 2012
<i>RARβ</i>	Retinoic acid receptor beta	Zhang C. et al., 2016
<i>RASSF1A</i>	Ras association domain-containing protein 1	»
<i>RUNX3</i>	Runt-related transcription factor 3	»
<i>SFRP1</i>	Secreted frizzled-related protein 1	»
<i>SMPD3</i>	Sphingomyelin phosphodiesterase 3	Revill et al., 2013
<i>SOCS1</i>	Suppressor of the cytokine signalling 1	Zhang C. et al., 2016
<i>SPINT2</i>	Serine peptidase inhibitor, Kunitz type, 2	Zhang C. et al., 2016; Hernandez-Meza et al., 2021
<i>TERT</i>	Telomerase reverse transcriptase	Zhang H. et al., 2015
<i>TSPYL5</i>	Testis-specific Y-encoded-like protein 5	Hernandez-Meza et al., 2021
<i>TTC36</i>	Tetratricopeptide repeat protein 36	Jing et al., 2022
<i>WIF1</i>	WNT inhibitory factor 1	Zhang C. et al., 2016
<i>WT1</i>	Wilms tumor 1	»

включает в себя базу знаний, содержащую более 40 млн фактов о молекулярно-генетических взаимодействиях, включая физические межмолекулярные взаимодействия, регуляцию экспрессии генов, регуляцию активности, стабильности и транспорта белков. Работа над реконструкцией и анализом генных сетей в ANDSystem осуществляется в программе ANDVisio. Для реконструкции регуляторных путей использовалась функция Pathway Wizard, реализованная в ANDVisio, которая по заданному шаблону выполняет поисковые обращения к базе знаний. Схематическое описание шаблонов приведено в табл. 2.

Например, шаблон P4 означает поиск всех возможных молекулярно-генетических путей в базе знаний ANDSystem, удовлетворяющих следующему требованию: первым

участником пути является вирусный белок (Vp); вторым участником – белок человека (Hr); третьим – ген человека из списка генов-мишеней (Tg); последним – белок (Tr), кодируемый Tg. Далее по тексту в качестве генов-мишеней будут рассматриваться гены-маркеры ГЦК. Взаимодействия между участниками пути представлены следующими типами: Vp и Hr связаны белок-белковыми взаимодействиями (PPI); Hr и Tg – взаимодействием по типу «регуляция экспрессии» (*Exp reg*), где Hr – регулятор экспрессии гена Tg; Tg и Tr – взаимодействием по типу «экспрессия» (*Exp*), т. е. белок Tr является продуктом экспрессии гена Tg. Примеры реконструкции регуляторных путей в ANDSystem с использованием шаблонов представлены в предыдущей работе (Ivanisenko V.A. et al., 2022).

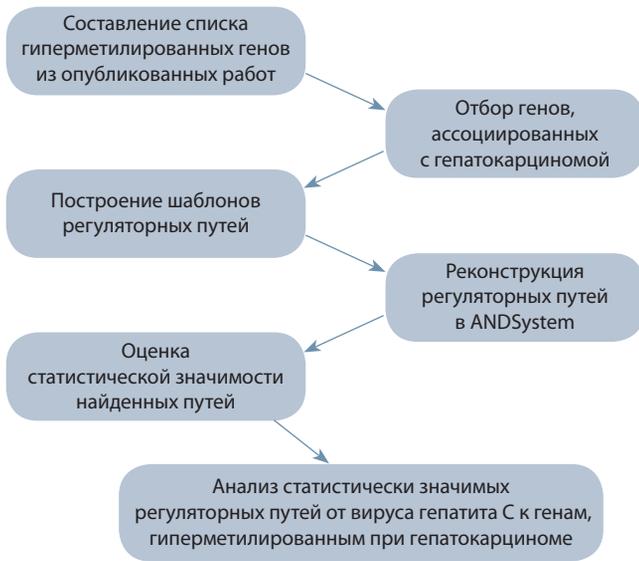


Рис. 1. Схематичное описание алгоритма обработки данных.

**Оценка статистической значимости регуляторных путей.** С помощью шаблонов из табл. 2 рассчитывалось число генов-маркеров  $K$ , являющихся участниками регуляторных путей, а также число таких участников из выборки контрольных генов. Вероятность наблюдения по случайным причинам числа  $K$  оценивалась с помощью стандартного гипергеометрического распределения с использованием функции `hypergeom` из пакета SciPy 1.8.0 (<https://scipy.org>). Для статистической обработки в качестве контроля была взята группа генов, предложенная в работе (Hoshida et al., 2008) для предсказания исхода заболевания ГЦК по уровню их экспрессии.

## Результаты

### Реконструкция потенциальных регуляторных путей влияния белков ВГС на гены-маркеры ГЦК

На начальном этапе исследования была собрана группа гиперметилированных генов-маркеров ГЦК (см. табл. 1). Список был сформирован на основе опубликованных данных полногеномного анализа метилирования ДНК и включал 30 генов, экспрессия которых по данным проведенных исследований была снижена при гепатоцеллюлярной карциноме, и два гена (*WT1* и *TERT*) с повышенной экспрессией.

Для реконструкции регуляторных путей использовалась программно-информационная система ANDSystem. Поиск запросы к базе знаний ANDSystem основывались на шаблонах регуляторных путей, представленных в табл. 2. Шаблоны описывают различные типы регуляторных путей, определяемые разными комбинациями молекулярно-генетических взаимодействий, включая белок-белковые взаимодействия, регуляцию экспрессии генов, регуляцию активности, стабильности и транспорта белков.

Анализ статистической значимости регуляторных путей, автоматически реконструированных ANDSystem по заданным шаблонам, показал, что среди семи проанализи-

Таблица 2. Шаблоны для поиска регуляторных путей, описывающих модуляцию вирусными белками генов-маркеров ГЦК

N шаблона	Схема шаблона
P1	$Vp \xrightarrow{PPI} Tr$
P2	$Vp \xrightarrow{PPI} Hr \xrightarrow{PPI} Tr$
P3	$Vp \xrightarrow{PPI} Hr \xrightarrow{Act/Stab/Pr/PPM/Tr} Tr$
P4	$Vp \xrightarrow{PPI} Hr \xrightarrow{Exp\ reg} Tg \xrightarrow{Exp} Tr$
P5	$Vp \xrightarrow{PPI} Hr \xrightarrow{Exp\ reg} Hg \xrightarrow{Exp} Hr \xrightarrow{Exp\ reg} Tg \xrightarrow{Exp} Tr$
P6	$Vp \xrightarrow{PPI} Hr \xrightarrow{Exp\ reg} Hg \xrightarrow{Exp} Hr \xrightarrow{Act/Stab/Pr/PPM/Tr} Tr$
P7	$Vp \xrightarrow{PPI} Hr \xrightarrow{Exp\ reg} Hg \xrightarrow{Exp} Hr \xrightarrow{PPI} Tr$

Примечание. Vp – белки вируса гепатита С; Hr – любые белки человека, участвующие во взаимодействиях; Hg – любые гены человека, участвующие во взаимодействиях; Tg – гены-мишени (гены-маркеры гепатокарциномы); Tr – белки-мишени (кодируемые Tg); PPI – белок-белковые взаимодействия; Act/Stab/Pr/PPM/Tr – регуляция активности или стабильности, или протеолиз, или посттрансляционные модификации, или транспорт; Exp reg – регуляция экспрессии генов; Exp – экспрессия генов (наработка белков).

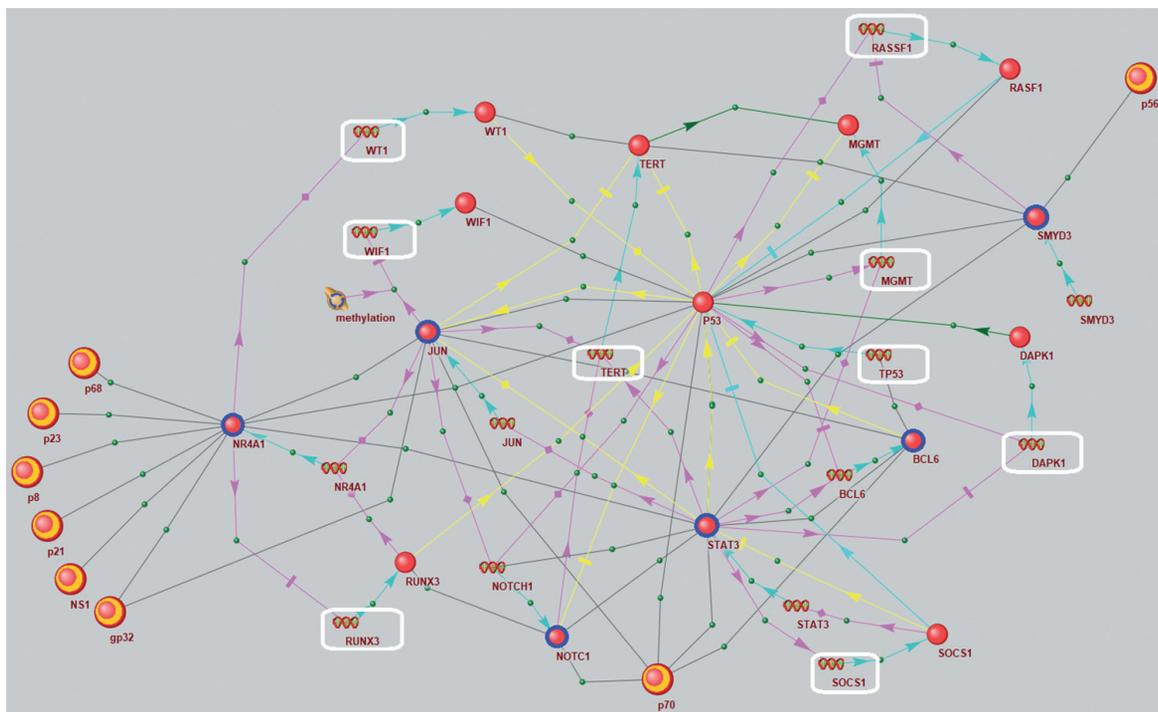
Таблица 3. Результаты оценки значимости регуляторных путей, описываемых разными шаблонами

Шаблон регуляторного пути	Количество генов-маркеров, участников регуляторного пути	P-val	FDR
P1	0	–	–
P2	15	0.52	0.62
P3	5	0.17	0.34
P4	9	<b>0.0054</b>	<b>0.032</b>
P5	21	0.047	0.14
P6	10	0.39	0.58
P7	23	0.83	0.83

Примечание. P-val – уровень статистической значимости; FDR – уровень статистической значимости с учетом множественного сравнения по методу False discovery rate (ожидаемая доля ложных отклонений).

зированных типов значимыми оказались пути регуляции экспрессии (шаблон P4 в табл. 3). Данный шаблон описывает регуляторные пути, включающие четыре участника: 1) вирусные белки; 2) транскрипционные факторы человека, вовлеченные в белок-белковые взаимодействия с вирусными белками; 3) гены-маркеры, представленные в табл. 1, экспрессия которых регулируется транскрипционными факторами-участниками под номером 2; 4) белки-продукты генов-маркеров.

Генная сеть, описывающая пути регуляции генов-маркеров ГЦК белками ВГС, включает восемь белков вируса гепатита С, семь промежуточных белков-посредников из числа белков хозяина, участвующих в белок-белковых взаимодействиях с белками ВГС, и девять генов (*DAPK1*, *SOC3*, *MGMT*, *RASSF1*, *RUNX3*, *TP53*, *WIF1*, *WT1*, *TERT*), aberrantная экспрессия которых коррелирует с прогрессией ГЦК (рис. 2).



**Рис. 2.** Генная сеть, включающая статистически значимые регуляторные пути влияния вирусных белков на экспрессию генов-маркеров ГЦК, реконструированная с помощью ANDSysystem по шаблону P4.

Белки вируса гепатита С (желто-красные большие шарики) – p8 (Non-structural protein 4A, NS4A), p21 (Core, Capsid protein C), p23 (Protease NS2-3), gp32 (Envelope glycoprotein E1), NS1 (Envelope glycoprotein E2), p56 (NS5A), p68 (NS5B), p70 (Hepacivirin, NS3); промежуточные посредники (сине-красные шарики): BCL6 (B-cell lymphoma 6 protein), NOTC1 (neurogenic locus notch homolog protein 1), NR4A1 (Nuclear receptor subfamily 4 group A member 1), JUN (c-Jun/activator protein 1), SMYD3 (lysine methyltransferase SET and MYND domain containing protein 3), STAT3 (Signal transducer and activator of transcription 3); гиперметилированные гены (выделены белыми рамками) и их белковые продукты: DAPK1 (Death associated protein kinase 1), MGMT (Methylated-DNA-protein-cysteine methyltransferase), RASSF1 (Ras association domain family member 1), RUNX3 (Runt-related transcription factor 3), SOCS1 (Suppressor of cytokine signaling 1), TERT (telomerase reverse transcriptase), TP53 (Tumor protein p53), WIF1 (Wnt inhibitory factor 1), WT1 (Wilms tumor protein).

### Анализ регуляторных путей влияния белков ВГС на гены-маркеры ГЦК

В регуляторных путях оказались задействованы восемь из десяти белков ВГС и шесть генов человека, являющихся промежуточными участниками, с которыми вирусные белки могут образовывать белковые гетерокомплексы. Среди последних транскрипционные факторы: STAT3 (Signal transducer and activator of transcription 3), NR4A1 (Nuclear receptor subfamily 4 group A member 1), JUN (c-Jun/activator protein 1), BCL6 (B-cell lymphoma 6 protein), а также трансмембранный рецептор NOTC1 (neurogenic locus notch homolog protein 1) и гистонметилтрансферазы SMYD3 (lysine methyltransferase SET and MYND domain containing protein 3).

Наибольшее число вирусных белков было связано с регуляцией *RUNX3* и *WT1*. Шесть вирусных белков (NS4A, Core, p23, gp32, NS1 и NS5B) взаимодействовали с NR4A1, который является общим регулятором экспрессии этих двух генов-маркеров ГЦК.

Если анализировать взаимодействия вирусных белков с клеточными регуляторами экспрессии, то можно увидеть, что белок NS3 (p70) потенциально может регулировать экспрессию пяти генов-супрессоров опухоли и TERT.

Рассмотрим возможности реализации этих регуляторных путей более подробно.

### p8, p21, p68, gp32, p23, NS1/NR4A1/RUNX3, WT1.

Данный регуляторный путь предполагает возможность влияния шести вирусных белков (p8, p21, p68, gp32, p23, NS1) ВГС на развитие гепатокарциномы через контроль активности генов *RUNX3* и *WT1* транскрипционным фактором NR4A1. Действительно, транскрипционный фактор NR4A1 напрямую взаимодействует с промоторами генов *RUNX3* и *WT1*, супрессируя активность *RUNX3* и активируя *WT1* (Nowyhed et al., 2015; Zong et al., 2017). Оба фактора участвуют в регуляции апоптоза. Так, *RUNX3* способствует активации внешнего, TRAIL-индуцированного пути апоптоза (Kim et al., 2019), а *WT1* контролирует митохондриальный (внутренний) путь апоптоза через регуляцию гена антиапоптотического белка *Bcl-2*, причем в зависимости от типа клеток оказывает на экспрессию гена *Bcl-2* как позитивное, так и негативное действие (Maуо et al., 1999; Loeb, 2006). Показано, что при ГЦК наблюдается повышенная экспрессия гена *WT1*, которая обусловлена гиперметилированием его промотора и коррелирует с плохим прогнозом заболевания (Sera et al., 2008; Mžik et al., 2016). Эти данные позволяют предположить, что роль *WT1* в прогрессии ГЦК связана с блокированием апоптоза.

Экспериментально показано, что коровый белок вируса гепатита С ингибирует экспрессию генов *NR4A1* и

*RUNX3* в инфицированных клетках (Tan, Li, 2015), способствуя подавлению внешнего пути апоптоза. С помощью Y2H теста (two hybrid test) выявлена возможность взаимодействия белка NR4A1 с вирусными белками CORE, E1, E2, NS2, NS4A и NS5B (de Chasseay et al., 2008), однако, за исключением CORE, эффекты других белков ВГС на активность ТФ не исследованы.

**E1, NS3, Core, p23, NS1, p68/JUN, NOTC1, STAT3/TERT.** Абберрантная экспрессия гена *TERT*, связанная в том числе с гиперметилованием его промотора, является прогностическим маркером ГЦК (Zhang H. et al., 2015; Zucman-Rossi et al., 2015; Oversoe et al., 2020). *TERT* влияет на прогрессию заболевания через стимуляцию клеточной пролиферации благодаря реактивации экспрессии его гена в клетках карциномы (Nault et al., 2019; In der Stroth et al., 2020). Показано, что в клетках, инфицированных ВГС, активность *TERT* тоже повышена, частично через прямое взаимодействие корового белка с ферментом (Zhu et al., 2010, 2017), однако в целом механизмы влияния белков вируса гепатита С на активность *TERT* не ясны. Данный регуляторный путь предполагает возможность действия белков NS3, Core, E1, p23, NS1 и NS5B вируса гепатита С на экспрессию гена *TERT* через взаимодействие с белками JUN (AP-1), STAT3, NOTC1.

Действительно, экспериментально показано, что существует возможность влияния на экспрессию *TERT* через транскрипционные факторы AP-1 и STAT3, поскольку они являются его прямыми регуляторами (Konnikova et al., 2005; Takakura et al., 2005), а также через NOTC1 сигнальный путь (Sawangarun et al., 2018). Более того, белок NS3 вируса гепатита С влияет на активность NOTC1 через транскрипционный фактор SRCAP (Iwai et al., 2011), а также на экспрессию AP1- и STAT3-регулируемых генов (Hassan et al., 2005, 2007; Machida et al., 2006; Li et al., 2010), однако конкретные механизмы реализации этих влияний в инфицированных клетках гепатоцитов практически не изучены.

**gp32, p70/JUN/WIF1.** Этот регуляторный путь описывает влияние белков NS3 и E1 вируса гепатита С на экспрессию гена *WIF1* (Wnt inhibitory factor 1) через взаимодействие с ТФ c-Jun/AP-1. *WIF1* является онкосупрессором, способствует снижению роста клеток при ГЦК (Deng et al., 2010), и уровень экспрессии его гена может быть прогностическим признаком течения заболевания (Huang et al., 2011).

Экспериментально показано, что существует как возможность прямого действия белков NS3 и E1 вируса гепатита С на активность c-Jun/AP-1 (de Chasseay et al., 2008), так и действие последнего на экспрессию гена *WIF1* через взаимодействие с DNMT1 метилтрансферазой (DNA methyltransferase 1), которое ведет к супрессии *WIF1* в раковых клетках желчного пузыря (Lin et al., 2018). Однако какие механизмы супрессии гена *WIF1* реализуются в клетках гепатокарциномы, инфицированных ВГС, неизвестно.

**p70/STAT3/MGMT, DAPK1, SOCS1.** Этот регуляторный путь инициируется неструктурным белком NS3 (p70) ВГС, влияющим на активность генов *MGMT*, *SOCS* и *DAPK1* через взаимодействие с ТФ STAT3. Белки DAPK1 (Death-associated protein kinase 1), *MGMT* (Methylated-

DNA-protein-cysteine methyltransferase) и *SOCS1* (Suppressor of cytokine signaling 1) считаются супрессорами опухолей, их низкая экспрессия в карциномах коррелирует с прогрессией заболевания (Gui et al., 2011; Jiang et al., 2019; Chen J. et al., 2020; Chen P. et al., 2020; Song et al., 2020).

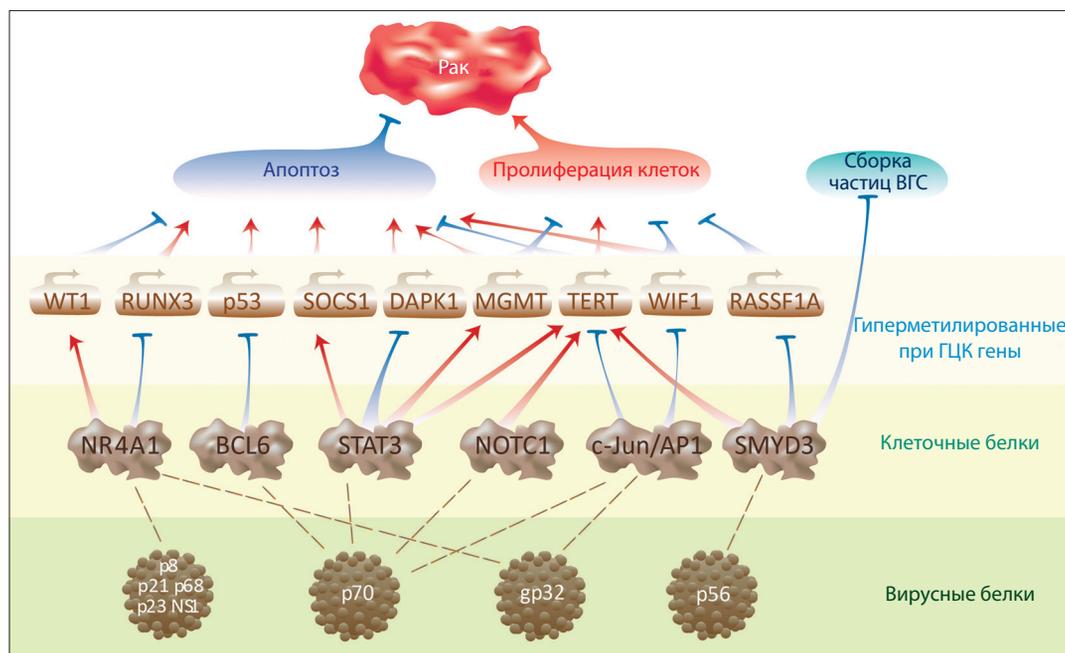
Экспериментально показано, что NS3 может напрямую взаимодействовать с ТФ STAT3 (de Chasseay et al., 2008), который участвует в регуляции экспрессии *MGMT*, *SOCS* и *DAPK1* (Kohsaka et al., 2012; Benderska, Schneider-Stock, 2014; Yang C. et al., 2015), однако влияние транскрипционного фактора STAT3 на экспрессию данных генов неоднозначно и может быть связано с клеточной специализацией. Что касается механизмов регуляции экспрессии этих генов в клетках гепатокарциномы, инфицированных ВГС, то они не исследованы.

**p70/BCL6/TP53.** *TP53* – ключевой активатор внутреннего пути апоптоза. Вирусный белок NS3 (p70) оказывает влияние на *TP53* через взаимодействие с транскрипционным фактором BCL6 (B-cell lymphoma 6 protein). *TP53* признан маркером ГЦК, его низкая экспрессия коррелирует с плохим прогнозом заболевания (Liu et al., 2012; Ye et al., 2017). Транскрипционный фактор BCL6 является репрессором гена *TP53* в клетках лимфоидного ряда. Его конститутивная экспрессия защищает В-лимфоциты от апоптоза, вызванного повреждением ДНК (Phan, Dallafavera, 2004; Jardin et al., 2007). Данные о влиянии вируса гепатита С на экспрессию и индукцию мутаций в генах *TP53* и *BCL6* в этих клетках противоречивы (Machida et al., 2004; Tucci et al., 2013). Взаимодействие NS3 белка ВГС с транскрипционным фактором BCL6 обсуждается в работе (Han et al., 2016), но конкретные механизмы влияния NS3 на активность транскрипционного фактора не исследованы.

## Обсуждение

Исследуемый набор гиперметилованных при ГЦК генов-маркеров этого заболевания (см. табл. 1) включал 30 генов с пониженной экспрессией и два гена с повышенной экспрессией. С использованием ANDSystem были реконструированы регуляторные пути, посредством которых белки ВГС способны влиять на экспрессию этих генов-маркеров. Схема взаимосвязи вирусных и клеточных белков, гиперметилованных генов и ключевых биологических процессов, ассоциированных с ГЦК, показана на рис. 3. Согласно данным литературы, гены *WT1*, *RUNX3*, *TP53* и *SOCS1* тесно связаны с апоптозом (Mayo et al., 1999; Loeb, 2006; Kim et al., 2019), а гены *MGMT*, *TERT*, *RASSF1A* и *WIF1* – как с апоптозом, так и с клеточной пролиферацией (He et al., 2005; Sarin et al., 2005; Choi et al., 2008; Feng et al., 2014; Chen J. et al., 2020; Ni et al., 2020).

Проведенный анализ показал потенциальную возможность реализации выявленных регуляторных путей влияния белков вируса гепатита С на активность генов-маркеров ГЦК, однако эффекты, которые оказывают белки ВГС на функцию регуляторных белков человека при образовании белок-белковых комплексов с ними, в настоящее время плохо изучены. К сожалению, это не позволяет однозначно интерпретировать реконструированные регуляторные пути. От того, останется ли способность регули-



**Рис. 3.** Связь реконструированных регуляторных путей с ключевыми биологическими процессами, ассоциированными с ГЦК.

ровать экспрессию генов у регуляторного белка организма хозяина после взаимодействия с вирусным белком или нет, зависит, будет ли регуляторный путь функционировать как активатор или как супрессор экспрессии целевого гена. Изучение этих эффектов требует проведения дальнейших экспериментальных исследований и компьютерного молекулярного моделирования.

В литературе описываются эффекты, которые могут оказывать вирусные белки на функцию хозяйских белков в результате взаимодействия с ними. В частности, белок NS5A связывается с SMYD3 в цитоплазме и ингибирует транслокацию SMYD3 в ядро (Chen M. et al., 2016). Если предположить, что регуляторные белки организма хозяина теряют способность осуществлять регуляцию экспрессии генов вследствие образования комплексов с вирусными белками, то можно ожидать следующих эффектов. При рассмотрении путей регуляции экспрессии онкосупрессоров из семи путей четыре (обеспечивающие ингибирование *RASFI*, *RUNX3*, *WIF1* и *DAPK1*) будут подавлены, что может привести к их активации белками ВГС, что, в свою очередь, будет препятствовать канцерогенезу. В оставшихся трех путях будет подавлена активация *MGMT*, *SOCS1* и *TP53*, что, вероятно, может оказать проопухольный эффект. В представленных путях (см. рис. 2) *WT1*, *MGMT*, *SOCS1* и *TP53* активируются соответствующими факторами (Phan et al., 2004; Kohsaka et al., 2012; Yang S. et al., 2015; Zong et al., 2017), а экспрессия генов *RASFI*, *RUNX3*, *WIF1* и *DAPK1* контролируется негативно (Guo et al., 2011; Benderska, Schneider-Stock, 2014; Nowyhed et al., 2015; Lin et al., 2018).

В случае *TERT* и *WT1*, которые относятся к генам с проопухольной активностью, можно ожидать подавления гена *WT1*, что приведет к негативному эффекту для канцерогенеза. Что касается *TERT*, который участвует в подавлении

апоптоза и стимулирует клеточную пролиферацию (Nault et al., 2019; In der Stroth et al., 2020), то, согласно нашим результатам (см. рис. 2), он оказался под управлением трех разных регуляторных путей. Экспрессия *TERT* активировалась двумя путями с участием хозяйских STAT3 и NOTC1 (Konnikova et al., 2005; Sawangarun et al., 2018). Один путь вел к подавлению экспрессии с участием c-JUN/AP-1 (Takakura et al., 2005). Взаимодействие вирусных белков с белками STAT3, NOTC1 и c-JUN/AP-1 способно привести к блокировке данных регуляторных путей. Особый интерес представляет путь c-JUN/AP-1, поскольку ингибирование этого транскрипционного фактора вирусными белками (gp32 и NS3) потенциально способствует активации *TERT*. Сделанные предположения хорошо согласуются с данными по дифференциальной экспрессии генов при острой инфекции гепатитом С, согласно которым в инфицированных клетках наблюдалась повышенная экспрессия гена *TERT* (Paric et al., 2012). Описанный путь представляет собой перспективную фармакологическую мишень.

Таким образом, в рамках рассмотренных предположений наблюдается разнонаправленная регуляция экспрессии генов маркеров ГЦК. Это может свидетельствовать в пользу того, что не все регуляторные пути, контролируемые вирусными белками, могут быть отнесены к факторам риска ГЦК. Однако регуляторные пути, обеспечивающие проопухольную активность вирусных белков, несомненно, заслуживают дополнительного изучения для понимания механизмов вирус-индуцированного канцерогенеза ГЦК. В частности, подавление вирусными белками экспрессии ген-супрессоров опухолей способно усиливать эффект их метилирования при ГЦК или имитировать этот эффект в случае, когда эти гены не метилированы, и спровоцировать возникновение ГЦК или осложнить его течение.

## Заклучение

С использованием компьютерных методов реконструкции генных сетей, представленных в программе ANDSystem, установлены статистически значимые пути генетической регуляции маркеров ГЦК белками ВГС. Полученные результаты описывают потенциальные механизмы участия белков ВГС в патогенезе ГЦК и могут быть полезны при планировании экспериментальных исследований для поиска новых мишеней для создания лекарств и профилактических средств, снижающих риск развития ГЦК при заражении ВГС.

## Список литературы / References

- Benderska N., Schneider-Stock R. Transcription control of DAPK. *Apoptosis*. 2014;19(2):298-305. DOI 10.1007/s10495-013-0931-6.
- Bragina E.Y., Tiys E.S., Rudko A.A., Ivanisenko V.A., Freidin M.B. Novel tuberculosis susceptibility candidate genes revealed by the reconstruction and analysis of associative networks. *Infect. Genet. Evol.* 2016;46:118-123. DOI 10.1016/j.meegid.2016.10.030.
- Chen J., Li Z., Chen J., Du Y., Song W., Xuan Z., Zhao L., Song G., Song P., Zheng S. Downregulation of MGMT promotes proliferation of intrahepatic cholangiocarcinoma by regulating p21. *Clin. Transl. Oncol.* 2020;22(3):392-400. DOI 10.1007/s12094-019-02140-9.
- Chen M., Gan X., Yoshino K., Kitakawa M., Shoji I., Deng L., Hotta H. Hepatitis C virus NS5A protein interacts with lysine methyltransferase SET and MYND domain-containing 3 and induces activator protein 1 activation. *Microbiol. Immunol.* 2016;60:407-417. DOI 10.1111/1348-0421.12383.
- Chen P., Meng C., Wang Q., Yang X., Huang Z., Xing X., Lin Y., Liu X., Peng J., Lin Y. Death-associated protein kinase 1 suppresses hepatocellular carcinoma cell migration and invasion by upregulation of DEAD-box helicase 20. *Cancer Sci.* 2020;111(8):2803-2813. DOI 10.1111/cas.14499.
- Cheng J., Wei D., Ji Y., Chen L., Yang L., Li G., Wu L., Hou T., Xie L., Ding G., Li H., Li Y. Integrative analysis of DNA methylation and gene expression reveals hepatocellular carcinoma-specific diagnostic biomarkers. *Genome Med.* 2018;10(1):42. DOI 10.1186/s13073-018-0548-z.
- Choi J., Southworth L.K., Sarin K.Y., Venteicher A.S., Ma W., Chang W., Cheung P., Jun S., Artandi M.K., Shah N., Kim S.K., Artandi S.E. TERT promotes epithelial proliferation through transcriptional control of a Myc- and Wnt-related developmental program. *PLoS Genet.* 2008;4(1):e10. DOI 10.1371/journal.pgen.0040010.
- de Chasse B., Navratil V., Tafforeau L., Hiet M.S., Aublin-Gex A., Agaogú S., Meiffren G., Pradezynski F., Faria B.F., Chantier T., Le Breton M., Pellet J., Davoust N., Mangeot P.E., Chaboud A., Penin F., Jacob Y., Vidalain P.O., Vidal M., André P., Rabourdin-Combe C., Lotteau V. Hepatitis C virus infection protein network. *Mol. Syst. Biol.* 2008;4:230. DOI 10.1038/msb.2008.66.
- Deng Y., Yu B., Cheng Q., Jin J., You H., Ke R., Tang N., Shen Q., Shu H., Yao G., Zhang Z., Qin W. Epigenetic silencing of WIF-1 in hepatocellular carcinomas. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 2010;136(8):1161-1167. DOI 10.1007/s00432-010-0763-5.
- D'souza S., Lau K.C., Coffin C.S., Patel T.R. Molecular mechanisms of viral hepatitis induced hepatocellular carcinoma. *World J. Gastroenterol.* 2020;26(38):5759-5783. DOI 10.3748/wjg.v26.i38.5759.
- Feng L., Li J., Yan L.D., Tang J. RASSF1A suppresses proliferation of cervical cancer cells. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* 2014;15(14):5917-5920. DOI 10.7314/apjcp.2014.15.14.5917.
- Fernández-Barrera M.G., Arechederra M., Colyn L., Berasain C., Avila M.A. Epigenetics in hepatocellular carcinoma development and therapy: the tip of the iceberg. *JHEP Rep.* 2020;2(6):100167. DOI 10.1016/j.jhepr.2020.100167.
- Glotov A.S., Tiys E.S., Vashukova E.S., Pakin V.S., Demenkov P.S., Saik O.V., Ivanisenko T.V., Arzhanova O.N., Mozgovaya E.V., Zainulina M.S., Kolchanov N.A., Baranov V.S., Ivanisenko V.A. Molecular association of pathogenetic contributors to pre-eclampsia (pre-eclampsia associome). *BMC Syst. Biol.* 2015;9(Suppl.2):S4. DOI 10.1186/1752-0509-9-S2-S4.
- Gui Y., Yeganeh M., Ramanathan S., Leblanc C., Pomerleau V., Ferbeyre G., Saucier C., Ilangumaran S. SOCS1 controls liver regeneration by regulating HGF signaling in hepatocytes. *J. Hepatol.* 2011;55(6):1300-1308. DOI 10.1016/j.jhep.2011.03.027.
- Guo N., Chen R., Li Z., Liu Y., Cheng D., Zhou Q., Zhou J., Lin Q. Hepatitis C virus core upregulates the methylation status of the RASSF1A promoter through regulation of SMYD3 in hilar cholangiocarcinoma cells. *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)*. 2011;43(5):354-361. DOI 10.1093/abbs/gmr021.
- Han Y., Niu J., Wang D., Li Y. Hepatitis C virus protein interaction network analysis based on hepatocellular carcinoma. *PLoS One*. 2016;11(4):e0153882. DOI 10.1371/journal.pone.0153882.
- Hassan M., Ghozlan H., Abdel-Kader O. Activation of c-Jun NH2-terminal kinase (JNK) signaling pathway is essential for the stimulation of hepatitis C virus (HCV) non-structural protein 3 (NS3)-mediated cell growth. *Virology*. 2005;333(2):324-336. DOI 10.1016/j.virol.2005.01.008.
- Hassan M., Selimovic D., Ghozlan H., Abdel-Kader O. Induction of high-molecular-weight (HMW) tumor necrosis factor (TNF) alpha by hepatitis C virus (HCV) non-structural protein 3 (NS3) in liver cells is AP-1 and NF-κB-dependent activation. *Cell. Signal.* 2007;19(2):301-311. DOI 10.1016/j.cellsig.2006.07.002.
- He B., Reguart N., You L., Mazieres J., Xu Z., Lee A.Y., Mikami I., McCormick F., Jablons D.M. Blockade of Wnt-1 signaling induces apoptosis in human colorectal cancer cells containing downstream mutations. *Oncogene*. 2005;24(18):3054-3058. DOI 10.1038/sj.onc.1208511.
- Hernandez-Meza G., von Felden J., Gonzalez-Kozlova E.E., Garcia-Lezana T., Peix J., Portela A., Craig A.J., Sayols S., Schwartz M., Losic B., Mazzaferro V., Esteller M., Llovet J.M., Villanueva A. DNA methylation profiling of human hepatocarcinogenesis. *Hepatology*. 2021;74(1):183-199. DOI 10.1002/hep.31659.
- Hoshida Y., Villanueva A., Kobayashi M., Peix J., Chiang D.Y., Camargo A., Gupta S., Moore J., Wrobel M.J., Lerner J., Reich M., Chan J.A., Glickman J.N., Ikeda K., Hashimoto M., Watanabe G., Daidone M.G., Roayaie S., Schwartz M., Thung S., Salvesen H.B., Gabriel S., Mazzaferro V., Bruix J., Friedman S.L., Kumada H., Llovet J.M., Golub T.R. Gene expression in fixed tissues and outcome in hepatocellular carcinoma. *N. Engl. J. Med.* 2008;359(19):1995-2004. DOI 10.1056/NEJMoa0804525.
- Huang L., Li M.X., Wang L., Li B.K., Chen G.H., He L.R., Xu L., Yuan Y.F. Prognostic value of Wnt inhibitory factor-1 expression in hepatocellular carcinoma that is independent of gene methylation. *Tumour Biol.* 2011;32(1):233-240. DOI 10.1007/s13277-010-0117-6.
- In der Stroth L., Tharehalli U., Günes C., Lechel A. Telomeres and telomerase in the development of liver cancer. *Cancers (Basel)*. 2020;12(8):2048. DOI 10.3390/cancers12082048.
- Ivanisenko N.V., Seyrek K., Kolchanov N.A., Ivanisenko V.A., Lavrik I.N. The role of death domain proteins in host response upon SARS-CoV-2 infection: modulation of programmed cell death and translational applications. *Cell Death Discov.* 2020;6:101. DOI 10.1038/s41420-020-00331-w.
- Ivanisenko T.V., Saik O.V., Demenkov P.S., Ivanisenko N.V., Savostianov A.N., Ivanisenko V.A. ANDDigest: a new web-based module of ANDSystem for the search of knowledge in the scientific literature. *BMC Bioinformatics*. 2020;21(Suppl.11):228. DOI 10.1186/s12859-020-03557-8.
- Ivanisenko V.A., Demenkov P.S., Ivanisenko T.V., Mishchenko E.L., Saik O.V. A new version of the ANDSystem tool for automatic extraction of knowledge from scientific publications with expanded functionality for reconstruction of associative gene networks by considering tissue-specific gene expression. *BMC Bioinformatics*. 2019;20(Suppl.1):34. DOI 10.1186/s12859-018-2567-6.
- Ivanisenko V.A., Gaisler E.V., Basov N.V., Rogachev A.D., Cherezis S.V., Ivanisenko T.V., Demenkov P.S., Mishchenko E.L., Khrip-

- ko O.P., Khripko Yu.I., Voevoda S.M., Karpenko T.N., Velichko A.J., Voevoda M.I., Kolchanov N.A., Pokrovsky A.G. Plasma metabolomics and gene regulatory networks analysis reveal the role of non-structural SARS-CoV-2 viral proteins in metabolic dysregulation in COVID-19 patients. *Sci. Rep.* 2022;12:19977. DOI 10.1038/s41598-022-24170-0.
- Ivanisenko V.A., Saik O.V., Ivanisenko N.V., Tiys E.S., Ivanisenko T.V., Demenkov P.S., Kolchanov N.A. ANDSystem: an Associative Network Discovery System for automated literature mining in the field of biology. *BMC Syst. Biol.* 2015;9(Suppl.2):S2. DOI 10.1186/1752-0509-9-S2-S2.
- Iwai A., Takegami T., Shiozaki T., Miyazaki T. Hepatitis C virus NS3 protein can activate the Notch-signaling pathway through binding to a transcription factor, SRCAP. *PLoS One.* 2011;6(6):e20718. DOI 10.1371/journal.pone.0020718.
- Jardin F., Ruminy P., Bastard C., Tilly H. The BCL6 proto-oncogene: a leading role during germinal center development and lymphomagenesis. *Pathol. Biol. (Paris).* 2007;55(1):73-83. DOI 10.1016/j.patbio.2006.04.001.
- Jaroszewicz J., Flisiak-Jackiewicz M., Lebensztejn D., Flisiak R. Current drugs in early development for treating hepatitis C virus-related hepatic fibrosis. *Expert Opin. Investig. Drugs.* 2015;24(9):1229-1239. DOI 10.1517/13543784.2015.1057568.
- Jiang L.H., Hao Y.L., Zhu J.W. Expression and prognostic value of HER-2/neu, STAT3 and SOCS3 in hepatocellular carcinoma. *Clin. Res. Hepatol. Gastroenterol.* 2019;43(3):282-291. DOI 10.1016/j.clinre.2018.09.011.
- Jing W., Peng R., Li X., Lv S., Duan Y., Jiang S. Study on the prognostic values of TTC36 correlated with immune infiltrates and its methylation in hepatocellular carcinoma. *J. Immunol. Res.* 2022;2022:7267131. DOI 10.1155/2022/7267131.
- Kim B.R., Park S.H., Jeong Y.A., Na Y.J., Kim J.L., Jo M.J., Jeong S., Yun H.K., Oh S.C., Lee D.H. RUNX3 enhances TRAIL-induced apoptosis by upregulating DR5 in colorectal cancer. *Oncogene.* 2019;38:3903-3918. DOI 10.1038/s41388-019-0693-x.
- Kohsaka S., Wang L., Yachi K., Mahabir R., Narita T., Itoh T., Tani-no M., Kimura T., Nishihara H., Tanaka S. STAT3 inhibition overcomes temozolomide resistance in glioblastoma by downregulating MGMT expression. *Mol. Cancer Ther.* 2012;11(6):1289-1299. DOI 10.1158/1535-7163.MCT-11-0801.
- Konnikova L., Simeone M.C., Kruger M.M., Kotecki M., Cochran B.H. Signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) regulates human telomerase reverse transcriptase (hTERT) expression in human cancer and primary cells. *Cancer Res.* 2005;65(15):6516-6520. DOI 10.1158/0008-5472.CAN-05-0924.
- Li B., Li X., Li Y., Guo H., Sun S.Y., He Q.Q., Wang Y., Luo J., Wen J.F., Zheng H., Feng D.Y. The effects of hepatitis C virus non-structural protein 3 on cell growth mediated by extracellular signal-related kinase cascades in human hepatocytes in vitro. *Int. J. Mol. Med.* 2010;26(2):273-279. DOI 10.3892/ijmm\_00000462.
- Lin B., Hong H., Jiang X., Li C., Zhu S., Tang N., Wang X., She F., Chen Y. c-Jun suppresses the expression of WNT inhibitory factor 1 through transcriptional regulation and interaction with DNA methyltransferase 1 in gallbladder cancer. *Mol. Med. Rep.* 2018;17(6):8180-8188. DOI 10.3892/mmr.2018.8890.
- Liu J., Ma Q., Zhang M., Wang X., Zhang D., Li W., Wang F., Wu E. Alterations of TP53 are associated with a poor out-come for patients with hepatocellular carcinoma: evidence from a systematic review and meta-analysis. *Eur. J. Cancer.* 2012;48(15):2328-2338. DOI 10.1016/j.ejca.2012.03.001.
- Llovet J.M., Zucman-Rossi J., Pikarsky E., Sangro B., Schwartz M., Sherman M., Gores G. Hepatocellular carcinoma. *Nat. Rev. Dis. Primers.* 2016;2:16018. DOI 10.1038/nrdp.2016.18.
- Loeb D.M. WT1 influences apoptosis through transcriptional regulation of Bcl-2 family members. *Cell Cycle.* 2006;5(12):1249-1253. DOI 10.4161/cc.5.12.2807.
- Machida K., Cheng K.T., Lai C.K., Jeng K.S., Sung V.M., Lai M.M. Hepatitis C virus triggers mitochondrial permeability transition with production of reactive oxygen species, leading to DNA damage and STAT3 activation. *J. Virol.* 2006;80(14):7199-7207. DOI 10.1128/JVI.00321-06.
- Machida K., Cheng K.T., Sung V.M., Shimodaira S., Lindsay K.L., Levine A.M., Lai M.Y., Lai M.M. Hepatitis C virus induces a mutator phenotype: enhanced mutations of immunoglobulin and proto-oncogenes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2004;101(12):4262-4267. DOI 10.1073/pnas.0303971101.
- Mayo M.W., Wang C.Y., Drouin S.S., Madrid L.V., Marshall A.F., Reed J.C., Weissman B.E., Baldwin A.S. WT1 modulates apoptosis by transcriptionally upregulating the *bcl-2* proto-oncogene. *EMBO J.* 1999;18(14):3990-4003. DOI 10.1093/emboj/18.14.3990.
- McGlynn K.A., Petrick J.L., El-Serag H.B. Epidemiology of hepatocellular carcinoma. *Hepatology.* 2021;73(Suppl.1):4-13. DOI 10.1002/hep.31288.
- Mžik M., Chmelařová M., John S., Laco J., Slabý O., Kiss I., Bohovicová L., Palička V., Nekvindová J. Aberrant methylation of tumour suppressor genes *WT1*, *GATA5* and *PAX5* in hepatocellular carcinoma. *Clin. Chem. Lab. Med.* 2016;54(12):1971-1980. DOI 10.1515/cclm-2015-1198.
- Nault J.C., Ningarhari M., Rebouissou S., Zucman-Rossi J. The role of telomeres and telomerase in cirrhosis and liver cancer. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 2019;16(9):544-558. DOI 10.1038/s41575-019-0165-3.
- Neumann O., Kesselmeier M., Geffers R., Pellegrino R., Radlwimmer B., Hoffmann K., Ehemann V., Schemmer P., Schirmacher P., Lorenzo Bermejo J., Longerich T. Methylation analysis and integrative profiling of human HCCs identify novel protumorigenic factors. *Hepatology.* 2012;56(5):1817-1827. DOI 10.1002/hep.25870.
- Ni Y., Gu J., Wu J., Xu L., Rui Y. MGMT-mediated neuron apoptosis in injured rat spinal cord. *Tissue Cell.* 2020;62:101311. DOI 10.1016/j.tice.2019.101311.
- Nowyhed H.N., Huynh T.R., Blatchley A., Wu R., Thomas G.D., Hedrick C.C. The nuclear receptor Nr4a1 controls CD8 T cell development through transcriptional suppression of Runx3. *Sci. Rep.* 2015;5:9059. DOI 10.1038/srep09059.
- Oversoe S.K., Clement M.S., Pedersen M.H., Weber B., Aagaard N.K., Villadsen G.E., Grønbaek H., Hamilton-Dutoit S.J., Sorensen B.S., Kelsen J. TERT promoter mutated circulating tumor DNA as a biomarker for prognosis in hepatocellular carcinoma. *Scand. J. Gastroenterol.* 2020;55(12):1433-1440. DOI 10.1080/00365521.2020.1837928.
- Papic N., Maxwell C.I., Delker D.A., Liu S., Heale B.S., Hagedorn C.H. RNA-sequencing analysis of 5' capped RNAs identifies many new differentially expressed genes in acute hepatitis C virus infection. *Viruses.* 2012;4:581-612. DOI 10.3390/v4040581.
- Phan R.T., Dalla-Favera R. The BCL6 proto-oncogene suppresses p53 expression in germinal-centre B cells. *Nature.* 2004;432(7017):635-639. DOI 10.1038/nature03147.
- Rabaan A.A., Al-Ahmed S.H., Bazzi A.M., Alfouzan W.A., Alsuliman S.A., Aldrazi F.A., Haque S. Overview of hepatitis C infection, molecular biology, and new treatment. *J. Infect. Public Health.* 2020;13(5):773-783. DOI 10.1016/j.jiph.2019.11.015.
- Revoll K., Wang T., Lachenmayer A., Kojima K., Harrington A., Li J., Hoshida Y., Llovet J.M., Powers S. Genome-wide methylation analysis and epigenetic unmasking identify tumor suppressor genes in hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology.* 2013;145(6):1424-1435.e1-25. DOI 10.1053/j.gastro.2013.08.055.
- Saik O.V., Demenkov P.S., Ivanisenko T.V., Bragina E.Y., Freidin M.B., Goncharova I.A., Dosenko V.E., Zolotareva O.I., Hofstaedt R., Lavrik I.N., Rogaev E.I., Ivanisenko V.A. Novel candidate genes important for asthma and hypertension comorbidity revealed from associative gene networks. *BMC Med. Genomics.* 2018;11(Suppl.1):15. DOI 10.1186/s12920-018-0331-4.
- Saik O.V., Ivanisenko T.V., Demenkov P.S., Ivanisenko V.A. Interaction of the hepatitis C virus: literature mining with ANDSystem. *Virus Res.* 2016;218:40-48. DOI 10.1016/j.virusres.2015.12.003.

- Sarin K.Y., Cheung P., Gilson D., Lee E., Tennen R.I., Wang E., Artandi M.K., Oro A.E., Artandi S.E. Conditional telomerase induction causes proliferation of hair follicle stem cells. *Nature*. 2005; 436(7053):1048-1052. DOI 10.1038/nature03836.
- Sawangarun W., Mandasari M., Aida J., Morita K.I., Kayamori K., Ikeda T., Sakamoto K. Loss of Notch1 predisposes oro-esophageal epithelium to tumorigenesis. *Exp. Cell Res.* 2018;372(2):129-140. DOI 10.1016/j.yexcr.2018.09.019.
- Schulze K., Imbeaud S., Letouzé E., Alexandrov L.B., Calderaro J., Rebouissou S., Couchy G., Meiller C., Shinde J., Soysouvanh F., Calatayud A.L., Pinyol R., Pelletier L., Balabaud C., Laurent A., Blanc J.F., Mazzaferro V., Calvo F., Villanueva A., Nault J.C., Bioulac-Sage P., Stratton M.R., Llovet J.M., Zucman-Rossi J. Exome sequencing of hepatocellular carcinomas identifies new mutational signatures and potential therapeutic targets. *Nat. Genet.* 2015;47(5): 505-511. DOI 10.1038/ng.3252.
- Sera T., Hiasa Y., Mashiba T., Tokumoto Y., Hirooka M., Konishi I., Matsuura B., Michitaka K., Udaka K., Onji M. Wilms' tumour 1 gene expression is increased in hepatocellular carcinoma and associated with poor prognosis. *Eur. J. Cancer*. 2008;44(4):600-608. DOI 10.1016/j.ejca.2008.01.008.
- Song Z., Li Z., Han W., Zhu C., Lou N., Li X., Luo G., Peng S., Li G., Zhao Y., Guo Y. Low DAPK1 expression correlates with poor prognosis and sunitinib resistance in clear cell renal cell carcinoma. *Aging (Albany NY)*. 2020;13(2):1842-1858. DOI 10.18632/aging.103638.
- Takakura M., Kyo S., Inoue M., Wright W.E., Shay J.W. Function of AP-1 in transcription of the telomerase reverse transcriptase gene (*TERT*) in human and mouse cells. *Mol. Cell Biol.* 2005;25(18): 8037-8043. DOI 10.1128/MCB.25.18.8037-8043.2005.
- Tan Y., Li Y. HCV core protein promotes hepatocyte proliferation and chemoresistance by inhibiting NR4A1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2015;466(3):592-598. DOI 10.1016/j.bbrc.2015.09.091.
- Tucci F.A., Broering R., Johansson P., Schlaak J.F., Küppers R. B cells in chronically hepatitis C virus-infected individuals lack a virus-induced mutation signature in the *TP53*, *CTNNB1*, and *BCL6* genes. *J. Virol.* 2013;87(5):2956-2962. DOI 10.1128/JVI.03081-12.
- Xu R.H., Wei W., Krawczyk M., Wang W., Luo H., Flagg K., Yi S., Shi W., Quan Q., Li K., Zheng L., Zhang H., Caughey B.A., Zhao Q., Hou J., Zhang R., Xu Y., Cai H., Li G., Hou R., Zhong Z., Lin D., Fu X., Zhu J., Duan Y., Yu M., Ying B., Zhang W., Wang J., Zhang E., Zhang C., Li O., Guo R., Carter H., Zhu J.K., Hao X., Zhang K. Circulating tumour DNA methylation markers for diagnosis and prognosis of hepatocellular carcinoma. *Nat. Mater.* 2017; 16(11):1155-1161. DOI 10.1038/nmat4997.
- Yang C., Zhang Y., Wang J., Li L., Wang L., Hu M., Xu M., Long Y., Rong R., Zhu T. A novel cyclic helix B peptide inhibits dendritic cell maturation during amelioration of acute kidney graft rejection through Jak-2/STAT3/SOCS1. *Cell Death Dis.* 2015;6(11):e1993. DOI 10.1038/cddis.2015.338.
- Ye S., Zhao X.Y., Hu X.G., Li T., Xu Q.R., Yang H.M., Huang D.S., Yang L. TP53 and RET may serve as biomarkers of prognostic evaluation and targeted therapy in hepatocellular carcinoma. *Oncol. Rep.* 2017;37(4):2215-2226. DOI 10.3892/or.2017.5494.
- Zhang C., Li J., Huang T., Duan S., Dai D., Jiang D., Sui X., Li D., Chen Y., Ding F., Huang C., Chen G., Wang K. Meta-analysis of DNA methylation biomarkers in hepatocellular carcinoma. *Oncotarget*. 2016;7(49):81255-81267. DOI 10.18632/oncotarget.13221.
- Zhang H., Weng X., Ye J., He L., Zhou D., Liu Y. Promoter hypermethylation of *TERT* is associated with hepatocellular carcinoma in the Han Chinese population. *Clin. Res. Hepatol. Gastroenterol.* 2015;39(5):600-609. DOI 10.1016/j.clinre.2015.01.002.
- Zhu Z., Tran H., Mathahs M.M., Moninger T.O., Schmidt W.N. HCV induces telomerase reverse transcriptase, increases its catalytic activity, and promotes caspase degradation in infected human hepatocytes. *PLoS One*. 2017;12(1):e0166853. DOI 10.1371/journal.pone.0166853.
- Zhu Z., Wilson A.T., Gopalakrishna K., Brown K.E., Luxon B.A., Schmidt W.N. Hepatitis C virus core protein enhances Telomerase activity in Huh7 cells. *J. Med. Virol.* 2010;82(2):239-248. DOI 10.1002/jmv.21644.
- Zong C., Qin D., Yu C., Gao P., Chen J., Lu S., Zhang Y., Liu Y., Yang Y., Pu Z., Li X., Fu Y., Guan Q., Wang X. The stress-response molecule NR4A1 resists ROS-induced pancreatic  $\beta$ -cells apoptosis via WT1. *Cell Signal*. 2017;35:129-139. DOI 10.1016/j.cellsig.2017.03.012.
- Zucman-Rossi J., Villanueva A., Nault J.C., Llovet J.M. Genetic landscape and biomarkers of hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*. 2015;149(5):1226-1239.e4. DOI 10.1053/j.gastro.2015.05.061.

#### ORCID ID

E.A. Antropova orcid.org/0000-0003-2158-3252  
P.S. Demenkov orcid.org/0000-0001-9433-8341

**Благодарности.** Исследование выполнено при финансовой поддержке проекта № 075-15-2021-944 Министерства науки и высшего образования РФ в рамках ERA-NET «Идентификация мишеней и разработка лекарственных средств при раке печени (TAIGA)».

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 15.11.2022. После доработки 22.11.2022. Принята к публикации 22.11.2022.