

Глава 20. Основы онкогенетики

<i>20.1. Характеристика опухолеобразования</i>	2
<i>20.2. Причины возникновения опухолей</i>	5
<i>20.3. Онкогены</i>	6
<i>20.4. Антионкогены или супрессоры опухолей</i>	9
<i>20.5. Генетический контроль метастазирования</i>	12
<i>20.6. Многоступенчатость формирования опухоли</i>	13

20. Основы онкогенетики

По статистике в мире ежегодно выявляют более 6 млн. случаев заболеваний раком пяти основных органов (легких, желудка, груди, прямой кишки, шейки матки). Около половины заболевших погибает (Из: Alberts et al., 1994, p. 1256). В конечном счете каждый пятый житель развитых стран умирает от онкологических заболеваний (от “онкос” - греч. - опухоль): Это само по себе говорит об исключительной важности онкологических исследований даже в чисто прикладных целях. Исследования изменений в функционировании клеток, возникающих при злокачественном перерождении, имеют фундаментальное теоретическое значение.

20.1. Характеристика опухолиобразования

(Абелев, 1997)

Число клеток в каждой ткани, также как и объем ткани, занимаемый ею в теле, более или менее постоянны. Естественная убыль клеток пополняется из молодых

отделов ткани, содержащих низкоспециализированные делящиеся клетки. Темп восполнения утраченных клеток контролируется ростовыми факторами, выработка которых каким-то образом определяется потребностями данной ткани в пополнении. Если баланс убыль-пополнение по каким-либо причинам нарушается в пользу пополнения, возникает избыточная масса клеток и в месте нарушения баланса образуется опухоль. Она может возникнуть, может длительное время увеличиваться, а может и постепенно исчезнуть. Опухоль может быть доброкачественной и злокачественной. Доброкачественной опухоль называется, если она не выходит за пределы своей ткани и не внедряется в подлежащие или соседние ткани (Рис. 20.1.).

Хирургическое удаление доброкачественной опухоли вместе с молодыми клетками, пополняющими ее, прекращает существование этой опухоли. Как правило, она более не возобновляется.

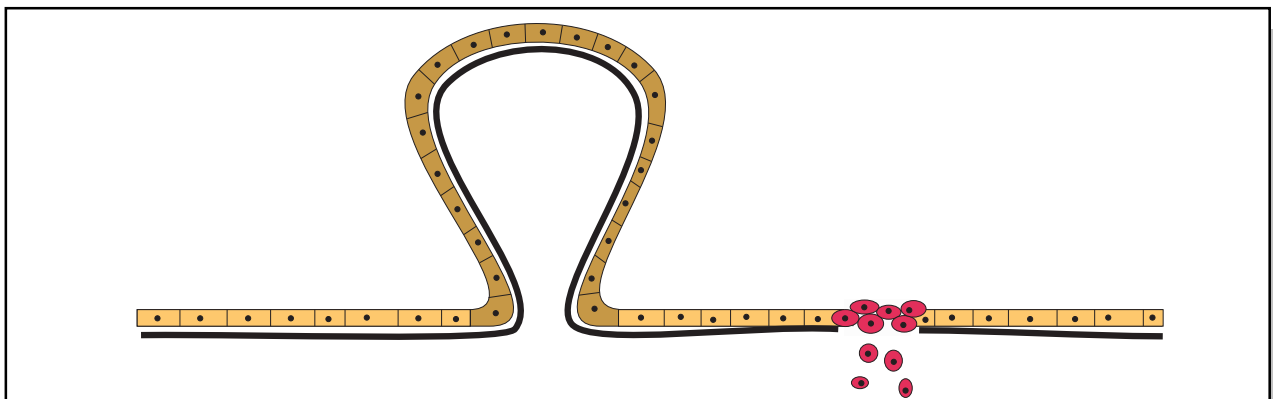


Рис. 20.1. Два опухолевых клона среди клеток нормального эпителия. Нормальные клетки светлорозовые. Клетки клона, образующего доброкачественную опухоль-полип (темно-коричневый цвет), дают избыточный прирост и образуют выпячивание над поверхностью слоя клеток, но не проникают в соединительную ткань под эпителием. Клетки злокачественного (ракового) клона (показаны красным цветом) проникают под базальную мембрану в соединительную ткань (Из: Васильев: 1997б)

Главным признаком злокачественной опухоли является ее выход за пределы территории, предназначенной для данной ткани. Если опухоль вырастает в подлежащую ткань, происходит инвазия (внедрение) опухолевых клеток. Инвазия - первый признак злокачественной опухоли. Если опухолевые клетки отрываются от основного очага, разносятся лимфой или кровью по организму, оседают в других, отдаленных органах (чаще всего в лимфатических узлах, печени, легких), и образуют там вторичные очаги опухолевого роста, происходит метастазирование, т.е. распространение опухолевого процесса по организму (Рис. 20.2).

Особенно опасны микрометастазы - мельчайшие очажки опухолевого роста, которые зачастую нельзя ни увидеть, ни удалить хирургически. Когда опухоль становится обнаружимой, она уже достаточно велика и содержит около миллиарда клеток: при числе клеток в опухоли 10^8 она становится видимой в результате рентгеновского обследования, при числе 10^9 - она пальпируется. Смерть пациента наступает, когда опухоль состоит примерно из 10^{12} клеток.

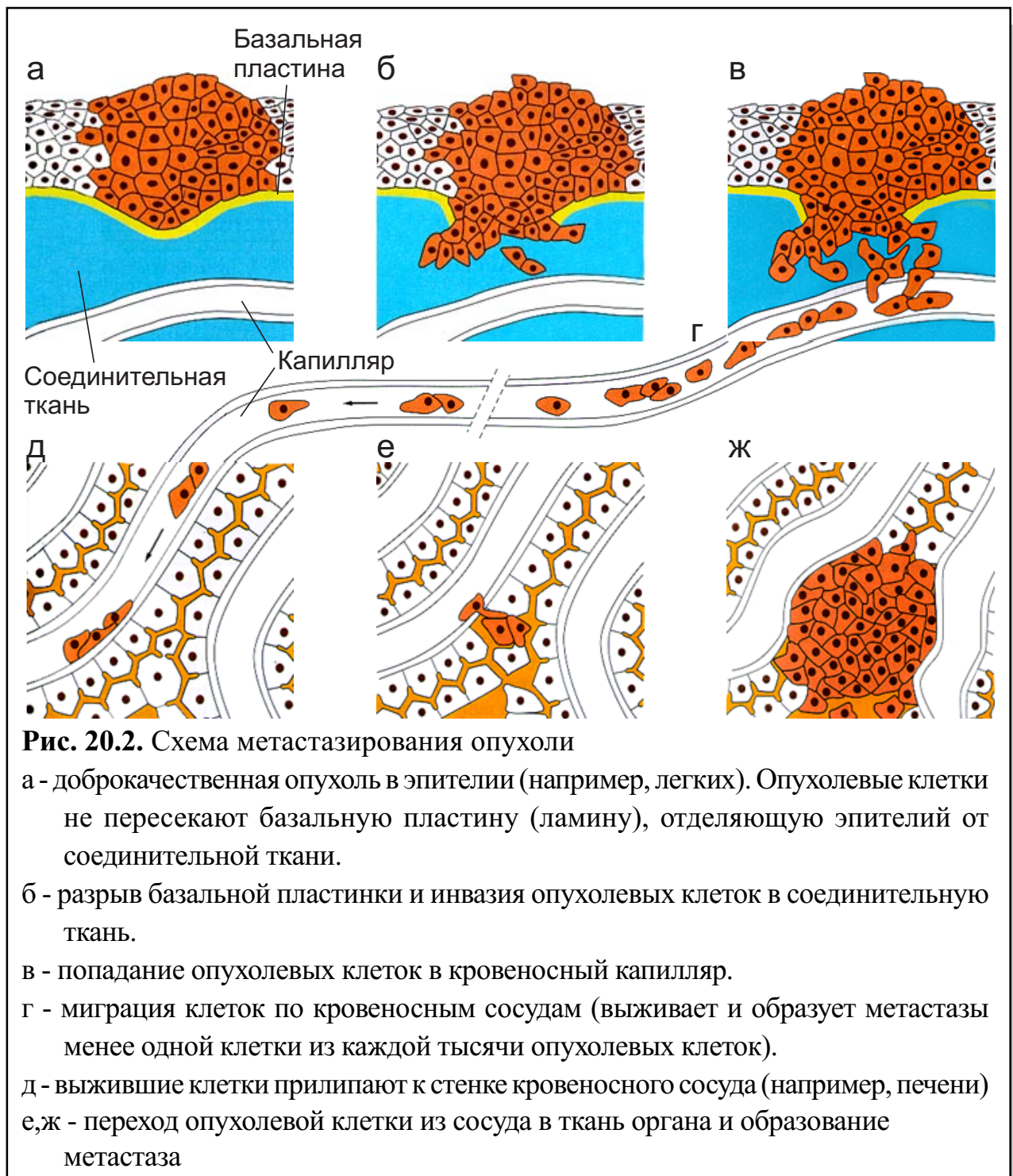
Если растущая опухоль уже не помещается в животном, ее можно пересадить другому животному и получить перевиваемую опухоль, которая будет неограниченно расти столько, сколько ее будут перевивать. Само существование перевиваемых опухолей, говорит о том, что опухоль развивается автономно, что причина ее роста в ней самой, так как перенос в нормальный организм здорового животного не останавливает ее роста.

Автономность опухоли проявляется также в независимости от окружающих тканей. Обычно соседствующие ткани влияют друг на друга и взаимно не выходят

за границы своих территорий. Злокачественные опухоли не чувствуют этих влияний. Они внедряются на чужие территории (инвазия) и способны расти в чуждом окружении. Способность к метастазированию - это не столько способность к отрыву и распространению, сколько именно к росту на чужих территориях и в чуждом микроокружении.

Следующим неотъемлемым свойством злокачественной опухоли является бессмертие ее клеток. Нормальные клетки смертны, их жизненный цикл включает запрограммированную смерть - апоптоз. Будучи высаженными в культуру, они погибают, пройдя несколько циклов деления. Клетки опухоли не знают предела для размножения ни в организме, ни вне его.

Очень важным и обязательным признаком злокачественной опухоли является ее моноклональность. Злокачественная опухоль развивается из одной генетически измененной клетки. В этом смысле она представляет собой клон, т.е. потомство генетически однородных клеток, возникших из одной клетки. Одно из доказательств моноклональности получено в результате анализа ДНК. Почти у всех пациентов, страдающих от хронической миелогенной лейкемии, лейкоцитарные белые кровяные клетки отличаются от нормальных клеток специфической хромосомной перестройкой так называемой Филадельфийской хромосомой - транслокацией между длинными плечами хромосом 9 и 22 (см. Рис. 20.6.). Когда была клонирована и секвенирована ДНК в участке транслокации, обнаружили, что участок разрыва и объединения транслоцированных фрагментов



идентичен во всех лейкоэмических клетках каждого больного индивидуума, но больные между собой несколько отличаются в том смысле, что точки разрыва-воссоединения ДНК хромосом могут различаться на несколько сот или тысяч пар нуклеотидов.

В дальнейшем, в череде генераций в опухоли возникают мутации, которые

порождают новые, вторичные клоны, создающие генетическую разнородность внутри опухоли, но это уже вторичная разнородность (см. ниже).

В процессе развития опухоли постепенно стираются признаки исходной ткани, т.к. они зачастую являются мишенью для контроля опухоли со стороны организма или соседних тканей. Однако

признаки ткани, из которой развилась опухоль, до конца все же никогда не исчезают полностью. Это важная особенность опухоли, позволяющая точно определить, где и из чего она возникла и к какому лечению будет чувствительна.

20.2. Причины возникновения опухолей

Хорошо известны несколько типов воздействий, с помощью которых можно индуцировать опухоли. Это канцерогенные вещества, опухолеродные вирусы, облучение. Однако, значительная, если не основная часть опухолей возникает спонтанно, т.е. без видимой связи с индуцирующими агентами.

1. Канцерогенные вещества весьма разнообразны - от таких простых, как четыреххлористый углерод (CCl_4) до весьма сложных полициклических гетероциклических соединений как метихолантрен или бензантрацен. Чаще всего они вызывают сходные биологические эффекты - стимулируют размножение клеток-предшественниц опухоли.

К канцерогенным веществам примыкают вещества, способствующие росту возникших одиночных опухолевых клеток - это так называемые промоторы канцерогенеза. Эти вещества являются чрезвычайно важным компонентом химического канцерогенеза, т.к. одиночные опухолевые клетки, находясь в окружении нормальной ткани, как правило, не в состоянии преодолеть ее сдерживающего влияния и годами способны сохраняться в латентном состоянии, не проявляясь в виде опухоли. Промоторы снимают это влияние, что внешне выглядит как сильный канцерогенный эффект.

Канцерогенные вещества (включая промоторы) являются причиной многих опухолей человека, например, каменноугольный деготь вызывает так называемый “рак трубочистов”, анилин вызывает у работников анилиновой промышленности рак мочевого пузыря, курение - рак легких.

2. Опухолеродные вирусы. Это могут быть крупные ДНК-содержащие вирусы или РНК-содержащие ретровирусы. Все они обладают уникальной способностью к интеграции с геномом клетки-хозяина. Эта удивительная особенность опухолевых вирусов была предсказана замечательным российским вирусологом Львом Александровичем Зильбером (1894-1966).

Первый опухолеродный вирус был открыт в 1910 году Ф.П. Раусом у кур. Инфекции им вызывали саркому, поэтому его назвали вирусом саркомы Рауса. Это РНК-содержащий ретровирус, т.е. на наследственной молекуле РНК синтезируется ДНК с помощью обратной транскриптазы, которая встраивается в геном клетки-хозяина.

3. Лучевой канцерогенез. Это одна из форм канцерогенеза, сопровождавшего первых радиологов, работавших с радием и лучами Рентгена без какой-либо защиты от облучения. Обычно это были раки кожи. Наиболее частыми при общем облучении организма являются лейкозы, т.е. различные формы опухолей кроветворной системы.

4. Роль генотипа. Еще одна важная причина рака - генетическая. У мышей путем отбора получены чистые линии со 100% вероятностью возникновения определенных форм опухолей - лейкозов, рака молочных желез и рака легких. В первых двух случаях имеет место сочетание генотипа животных и вируса, а

в случае наследственного рака легких речь идет о сочетании канцерогенного воздействия и генома животного. У человека чисто генетически обусловлено формирование детской опухоли сетчатки глаза (ретинобластомы), возникающей у ребенка, если соответствующие мутации имеются у отца и матери или даже только у одного из родителей.

20.3. Онкогены

В пользу генетической природы злокачественности свидетельствовали два факта:

1. Корреляции между существованием наследуемых опухолей и наличием специфических хромосомных транслокаций в клетках опухоли.

2. Стабильность злокачественных свойств в трансформированных клетках и их передача из одного клеточного поколения в другое также свидетельствуют в пользу генетической природы наследственности. Наиболее прямые

доказательства генетического контроля образования злокачественных опухолей были получены при изучении температурочувствительных мутаций у вирусов. В начале 1970-х годов были получены температурочувствительные мутанты вируса саркомы, которые трансформировали нормальные клетки в раковые только при определенной температуре. Это значит, что при этой температуре экспрессируется мутация только одного гена, и этого достаточно для того, чтобы вызвать опухолевую трансформацию и поддерживать ее. Инактивация этой мутации при другой температуре возвращала клетку в нормальное состояние. Таким образом в вирусе саркомы содержится один ген, вызывающий и поддерживающий злокачественность. Он был назван онкогеном. В конце 1970-х годов был выделен первый онкоген из вируса саркомы курицы и был назван *src* (Рис. 20.3, Рис.20.4).

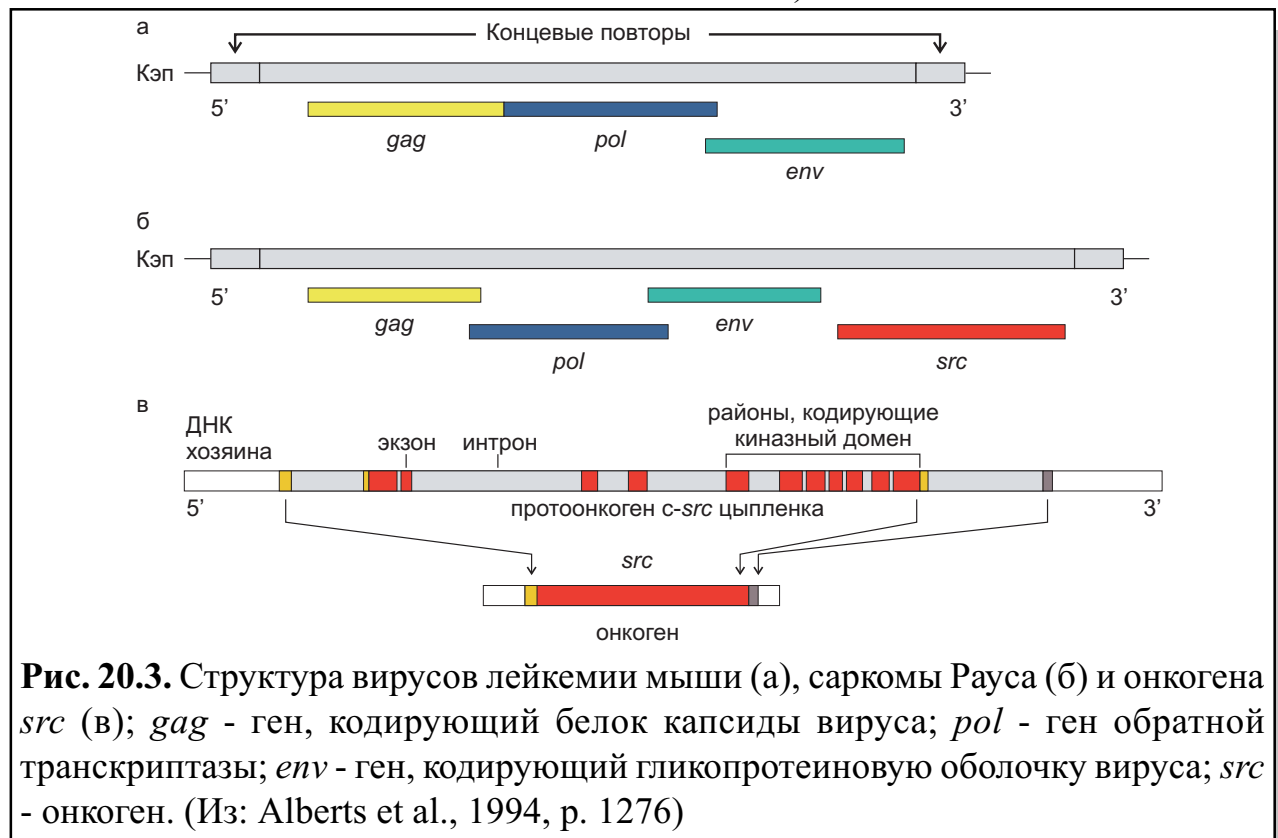
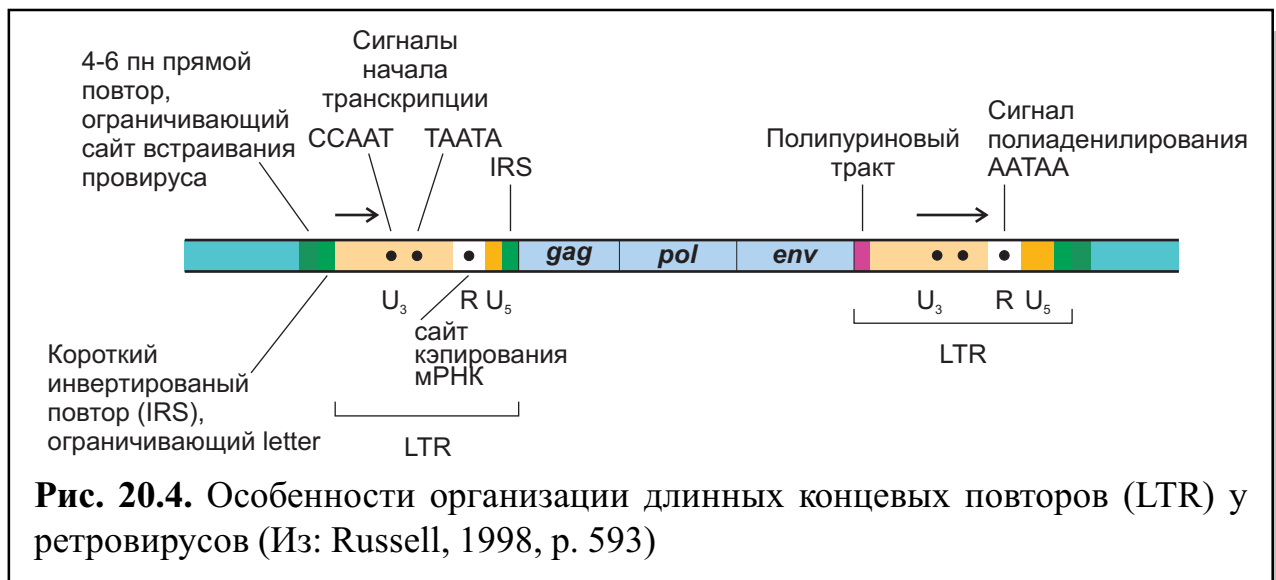


Рис. 20.3. Структура вирусов лейкемии мыши (а), саркомы Рауса (б) и онкогена *src* (в); *gag* - ген, кодирующий белок капсиды вируса; *pol* - ген обратной транскриптазы; *env* - ген, кодирующий гликопротеиновую оболочку вируса; *src* - онкоген. (Из: Alberts et al., 1994, p. 1276)



LTR вирусов содержат многие из регуляторных сигналов транскрипции: сайты инициации транскрипции, полиадеенилирования (Рис. 20.4.).

Вскоре было показано, что искусственное введение гена *src* в генетический аппарат клетки трансформирует ее и без вируса.

После этого были открыты и другие вирусные онкогены: *myc*, *ras*, *abl* и многие другие. Стало ясно, что опухолевые вирусы вызывают опухоли не сами по себе, а потому, что вносят онкоген в генетический аппарат клетки и закрепляют его там. Если удалить онкоген из генетического аппарата вируса, то он, не лишаясь способности размножаться и интегрироваться в геном клетки, утратит возможность вызывать формирование злокачественных опухолей.

Геномы нормальных клеток позвоночных содержат последовательности, которые похожи, но не полностью идентичны гену *src*, входящему в состав вируса саркомы Рауса. Поэтому их называют несколько по-разному: *v-src* вирусный (онкоген), *c-src* - клеточный (протоонкоген). На Рис. 20.3. показана схема организации онкогена *src* и протоонкогена *c-src*.

Позднее было установлено, что во всех нормальных клетках есть гены, очень близкие по структуре к известным вирусным онкогенам. Их известно уже около 100. Характеристики некоторых вирусных онкогенов и соответствующих им протоонкогенов представлены в Табл. 20.1.

Эти гены регулируют нормальное поведение клетки - ее ответы на ростовые факторы, на гормоны, нормальный темп и "расписание" ее делений. Протоонкогены находятся под контролем других генов. Мутации протоонкогенов выводят их из-под воздействия контролирующих генов и в результате чего они становятся автономными (Рис. 20.5.). Как правило, опухолеродное действие различных канцерогенных факторов приводит к постоянной активности протоонкогена. Так, хромосомные транслокации могут перенести протоонкоген в новое положение - под контроль постоянно активного промотора (Рис. 20.6.).

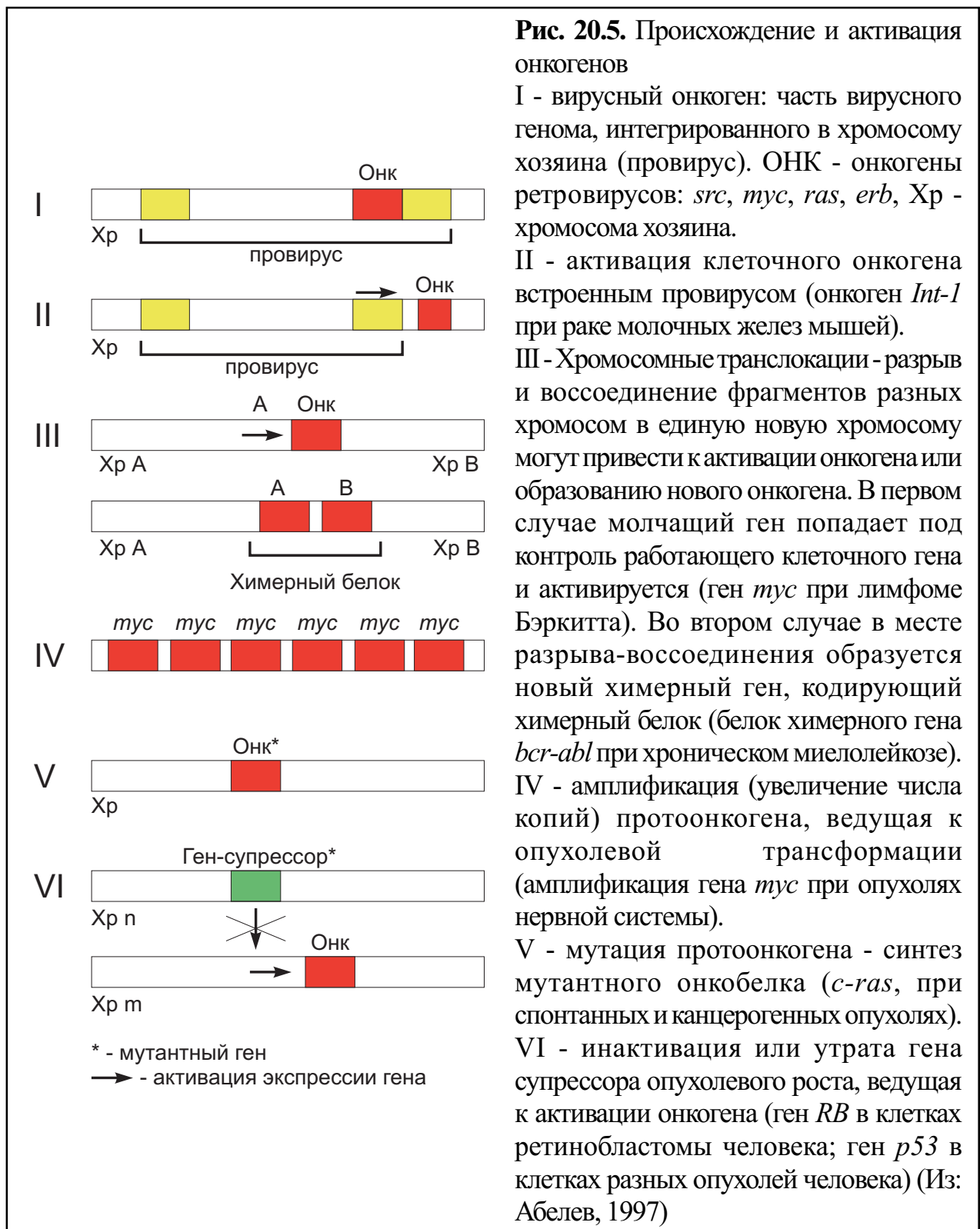
В результате этого переноса протоонкоген начинает работать непрерывно, не давая клетке выйти из цикла делений (*myc*), или посылая непрерывные сигналы с мембраны в ядро (*ras*), или приводя к синтезу ростовых

Табл. 20.1. Характеристики некоторых онкогенов и протоонкогенов
(Из: Alberts et al., 1994, p. 1276)

Онкоген	Функции протоонкогена	Источник вируса	Опухоль, индуцируемая данным вирусом
<i>abl</i>	протенкиназа (тирозин)	мышь, кошка	лейкемия, саркома
<i>erb-B</i>	протенкиназа (тирозин): рецептор эпидермального фактора роста. Мутантный рецептор фактора роста непрерывно пересылает сигналы к пролиферации	курица	эритролейкемия, фибросаркома
<i>fes</i>	протенкиназа (тирозин)	кошка, курица	саркома
<i>fms</i>	протенкиназа (тирозин): рецептор фактора, стимулирующего колонии (M-CSF)	кошка	саркома
<i>fos, jun</i>	ассоциирующиеся продукты, образующие ген, регулирующий белок AP1	мышь, курица	остеосаркома, фибросаркома
<i>kit</i>	протенкиназа (тирозин)	кошка	саркома
<i>raf</i>	протенкиназа (серин/ треонин), активируемая белком RAS	курица/мышь	саркома
<i>myc</i>	ген, регулирующий белок из семейства HLH. Ядерный фактор, активность которого ведет к непрерывному делению клеток	курица	саркома, миелоцитомы, карцинома, лейкоз птиц и многие опухоли человека и животных
<i>H-ras</i>	GTP-связывающий белок, цитоплазматический активированный передатчик сигналов в клетку, ведущий к ее пролиферации	крыса	саркома, эритролейкемия
<i>K-ras</i>	-	-	-
<i>rel</i>	ген, регулирующий белок, связанный с NF κ B	индюшка	ретикулоэндомиелоз
<i>sis</i>	ростовой фактор тромбоцитов - PDGF	мартышка	саркома
<i>src</i>	протенкиназа (тирозин), активированный передатчик сигналов в клетку, ведущий к ее пролиферации	курица	саркома птиц и млекопитающих

факторов. Некоторые опухолевые вирусы сами по себе не содержат онкогена, но, встраиваясь в хромосому рядом с протоонкогеном, активируют его, вызывая непрерывную активность (“вставочный” канцерогенез) (Рис. 20.7.).

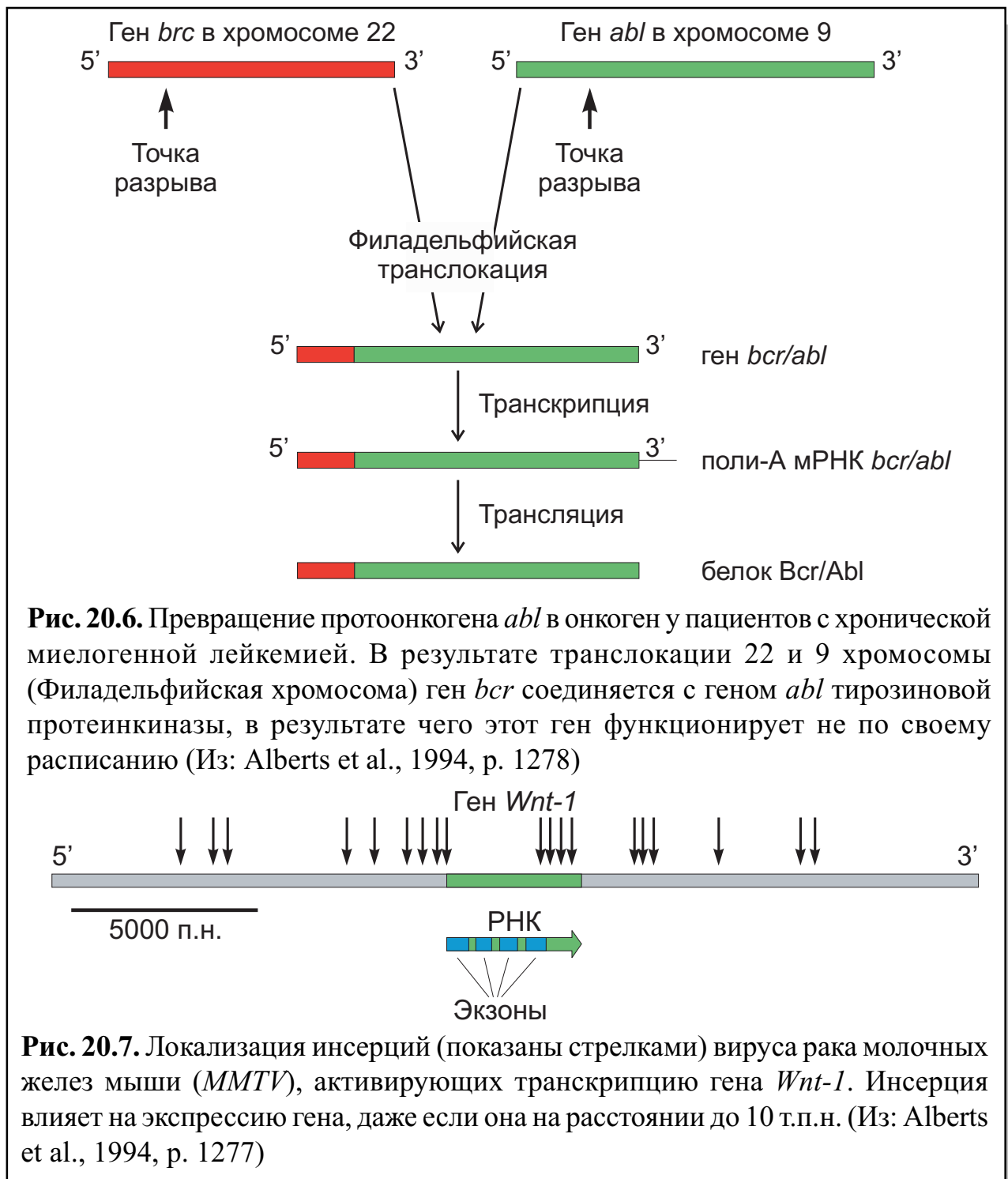
Канцерогенные вещества и облучение обладают высокой мутагенной активностью, вызывая мутации в различных генах, в том числе и в протоонкогенах. Эти мутации могут вести либо к нарушению регуляции



протоонкогена, и тогда он выходит из-под контроля, либо к изменению свойств белка, кодируемого этим онкогеном.

20.4. Антионкогены или супрессоры опухолей

Примерно один из каждых 20 тыс. детей имеет предрасположение к ретинобластоме - опухоли, возникающей в детстве из предшественников клеток



сетчатки глаза. Известны две формы заболевания - наследственное и ненаследственное. В случае наследственной формы множественные опухоли обычно возникают независимо в обоих глазах. При ненаследственной форме, только одна опухоль возникает только в одном глазу.

Предположили, что у особей с наследственной формой утрачена активность гена-супрессора опухолеобразования. Поэтому гетерозиготы по мутации данного гена являются генетически предрасположенными к опухолеобразованию. Первая же соматическая мутация этого локуса, делает данную клетку гомозиготой по мутации, из

которой и начинает развиваться опухоль. Таким образом, ретинобластома возникает по двухударному механизму: одна мутация наследственная, другая - соматическая. Этот ген у человека, отсутствие активности которого является критическим обстоятельством в развитии ретинобластомы, называется *Rb*. У детей-гомозигот по нормальному аллелю гена *Rb*, опухоль возникает очень редко, вследствие случайного возникновения мутаций гена *Rb* в обеих хромосомах одной клетки.

В более поздних исследованиях было установлено, что потеря активности гена *Rb* вызывает разнообразные формы опухолей, не только ретинобластома.

Ген *Rb* был клонирован, он занимает 180 т.п.н. ДНК и кодирует белок с молекулярной массой 110 кДа. Ген активно функционирует в большинстве нормальных клеток тела, и его продукт действует как один из главных "тормозов" в клеточных делениях. В каждом цикле белок *Rb* может быть в фосфорилированном или нефосфорилированном состоянии. Когда он не фосфорилирован, то связывается с факторами транскрипции DP1/E2F, предотвращая таким образом действие этих факторов в процессе репликации ДНК (Рис. 20.8.) и соответственно в переходе от стадии G1 к S. До тех пор, пока этот статус сохраняется, клетки пребывают в стадии G1.

В случае если белок pRb фосфорилируется, он больше не связывается с комплексом DP1/E2F. Освобожденная молекула E2F связывается с регуляторными участками генов, связывающих этот фактор транскрипции, и включаются гены, чья активность требуется для перехода в S-фазу.

Если оба гена в клетке находятся в мутантном состоянии, белок Rb нефункционален. Он не связывается с комплексом DP1/E2F, который постоянно активирует гены, ответственные за переход в S-фазу. В результате деление клеток идет значительно чаще, чем это запланировано (Рис. 20.8б.).

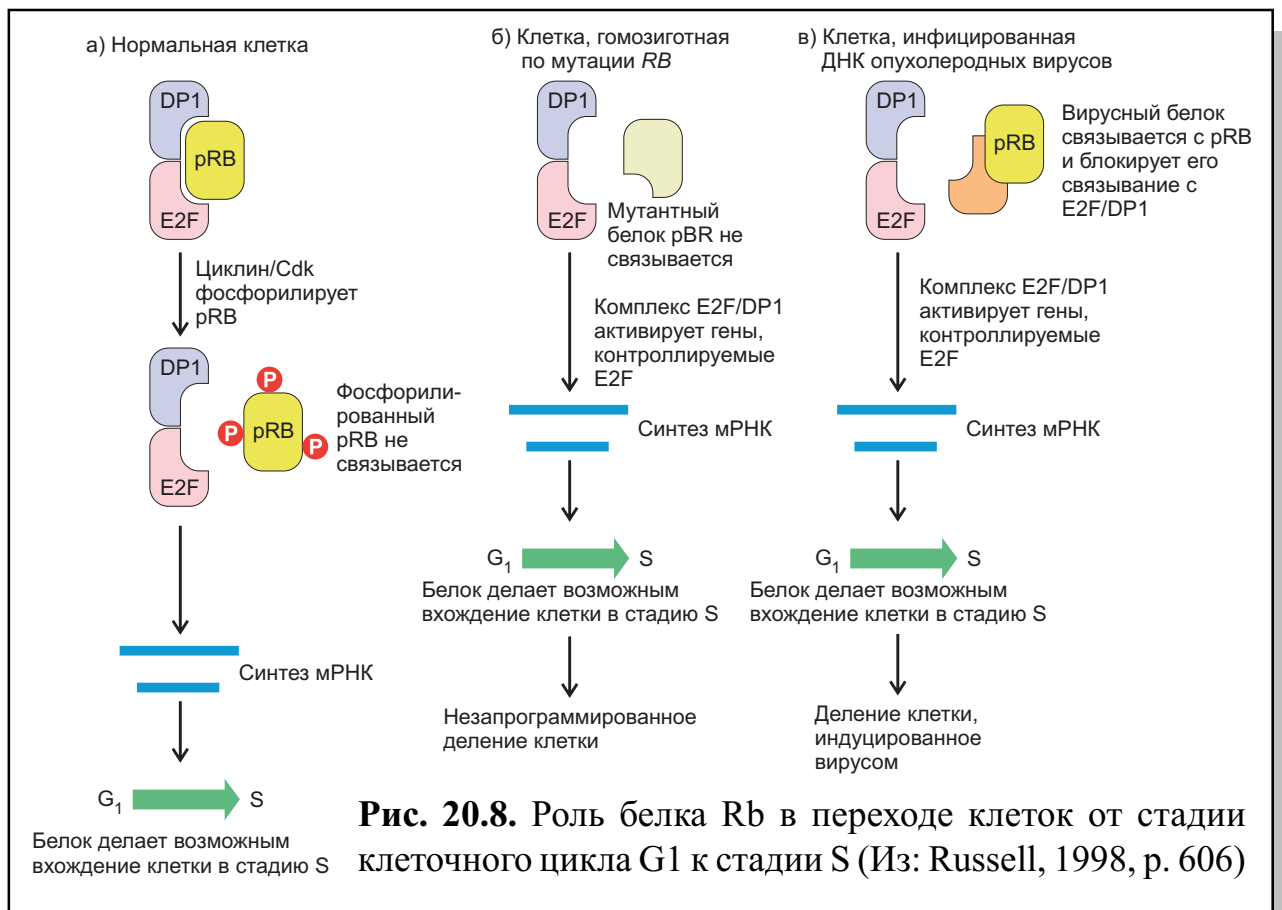
Некоторые онкогенные вирусы (например, аденовирусы, вирус SV40) осуществляют онкогенное действие из-за того, что их онкогены кодируют белки, образующие комплексы с Rb-белком, что также предотвращает его связывание с фактором транскрипции E2F (Рис. 20.8в.).

Другой ген-супрессор опухолеобразования называется p53 (p-protein, 53-53кДа). Действие мутантных аллелей этого гена вовлечено в развитие примерно 50% всех типов опухолей у человека.

Так же как и в случае гена *Rb*, для онкогенного действия клетка должна быть гомозиготной по мутантным аллелям гена p53. К настоящему времени выделено свыше 3400 мутаций гена p53.

Белок, синтезируемый геном p53, способен связываться с ДНК и действует как фактор транскрипции (Рис. 20.9.).

Белок P21 связывается с белками cyclin (сус) и cyclin/cyclin dependent kinase (Cdk), что блокирует киназную активность, необходимую для перехода из G1 в S - фазу (Из: Russell, 1998, p. 607). Как уже показано, промоторы нескольких генов связывают белок p53, один из которых - WAF1 - специфически активируется нормальным белком p53. В свою очередь, продукт гена *WAF1* это белок с молекулярной массой 21кДа, называемый p21. Когда белок P21 синтезируется в избытке, это блокирует переход клетки из фазы G1 в S. Задержка возникает из-за того, что p21 связывается



с комплексом Cdk/сус (см. Рис. 20.9.), который блокирует киназную активность, необходимую для активирования генов, необходимых для перевода клетки из фазы G₁ в фазу S.

В нормальной клетке самым простым способом вызвать каскад генной активности, ведущий к остановке в G₁, является индукция повреждений в молекуле ДНК, например облучением клетки. В результате этого по непонятным причинам повреждения ДНК приводят к стабилизации белка p53 и начинается каскад событий, изображенный на Рис. 20.9.

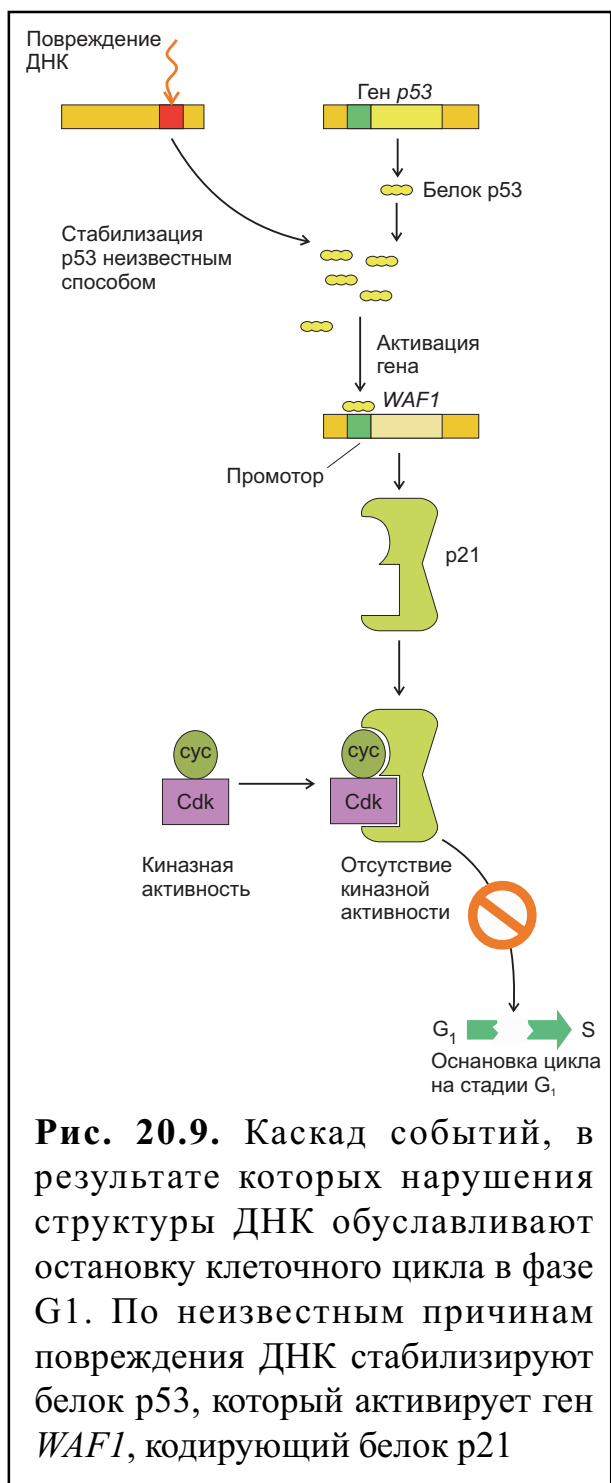
Задержка клетки в G₁ дает клетке время индуцировать систему репарации ДНК. Если размеры повреждений ДНК слишком велики и не могут быть восстановлены, клеточный цикл не восстанавливается, а клетка переходит на режим апоптоза (запрограммированной

гибели клетки - см. раздел 14). Индукция апоптоза является важнейшей функцией гена p53.

У клеток-гомозигот по мутации гена p53, не активируется ген WAF1 и нет белка p21, чтобы блокировать активность Cdk, в результате клетка не задерживается в фазе G₁, и апоптоз у них не происходит. Клетка ускоренно вступает в S-фазу, да к тому же и отягощенная генетическими повреждениями. Все это усиливает возможность возникновения рака.

20.5. Генетический контроль метастазирования

Главная проблема современной онкологии - это природа метастазирования: что позволяет клетке поселиться и давать вторичные очаги опухоли на чужой территории, каким образом у опухолевой клетки возникает способность взаимодействовать с чужеродным



матриксом, то есть внеклеточным веществом, выделяемым клетками соединительной ткани? В 1984 году был клонирован ген *mts1*. В результате сравнения двух линий опухолевых клеток у мышей CSML-100 и CSML-0 оказалось, что вторая сублиния не давала метастазов. В линии CSML-100 была обнаружена мРНК размером 0,55 т.п.н., которая отсутствовала

в линии CSML-0. Эта мРНК была обнаружена во многих опухолях, способных давать метастазы (Из: Georgiev et al., 1997).

20.6. Многоступенчатость формирования опухоли

(Из: Russell, 1998).

Для большинства типов раков шанс заболеть резко увеличивается с возрастом: например, если в возрасте 40 лет выявляемость первого заболевания раком составляет 8 случаев на 100000 человек (данные для женщин Англии и Уэльса), в 60 лет - уже около 60, а в 70 - 120.

Формирование многих опухолей является многоступенчатым процессом, включающим аккумуляцию мутаций по ряду генов. Статистика возникновения опухолей у человека показывает, что необходимо накопление в клетке 6-7 мутаций в течение последних десятилетий жизни для того, чтобы рак развился. Например, чтобы развился рак толстой кишки происходят следующие события: утрата гена-супрессора *APC* (adenomatous polyposis coli) и возникновение небольшой опухоли. В сочетании с гипометилированием ДНК может развиваться аденома I класса (небольшой полип из эпителия толстого кишечника или прямой кишки). Далее, если вследствие мутации протоонкоген *ras* превращается в онкоген, размер опухоли увеличивается (аденома класса II). Если затем происходит гомозиготизация мутации опухолевого супрессора *DCC* опухоль снова увеличивается в размерах (аденома III класса).

Утрата обеих копий гена p53 превращает доброкачественную аденому в злокачественную карциному. Потеря каких-то других генов вызывает метастазы этой опухоли.

Литература

- Абелев Г.И. Что такое опухоль. Сорос. образов. журн. N 10, с. 85-90, 1997.
- Васильев Ю.М. Социальное поведение нормальных клеток и антисоциальное поведение опухолевых клеток. I. Сигнальные молекулы, вызывающие размножение и гибель клеток. Сорос. образов.журн. N 4, 1с. 7-22, 1997а.
- Васильев Ю.М. Социальное поведение нормальных клеток и антисоциальное поведение опухолевых клеток. II. Клетки строят ткань. Сорос. образов. журн. N 5, с. 20-25, 1997б.
- Зильбер Л.А. Вирусно-генетическая теория возникновения опухолей. Москва, Наука, 1-273, 1968.
- Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K., Watson J.D. Molecular biology of the cell. Third edition. Garland Publishing, Inc., New York & London, 1994, pp. 1255-1294.
- Grigorian M.S., Tulchinsky E.M., Zain S., Ebralidze A.K., Kramerov D.A., Kriajevska M.V., Georgiev G.P., Lukanidin E.M. The *mts1* gene and control of tumor metastasis. Gene 135, p. 229-238, 1993.
- Georgiev G.P., Kiselev S.L., Lukanidin E.M. Tumor progression and metastasis. In: Genome structure and function (C. Nicolini, ed.) p. 217-237, Kluwer Acad.Publ., Netherlands, 1997.
- Russell P.J. Genetics. Fifth edition. Addison Wesley Longman, Menlo Park, California, 585-614, 1998.