

Национальный медико-хирургический центр
им. Н.И. Пирогова Минздрава России



А.А. Новик, Т.А. Камилова, В.Н. Цыган

ВВЕДЕНИЕ В МОЛЕКУЛЯРНУЮ БИОЛОГИЮ КАНЦЕРОГЕНЕЗА

Под редакцией акад. РАМН Ю.Л. Шевченко

Рекомендовано УМО по медицинскому и фармацевтическому
образованию вузов России в качестве учебного пособия
для студентов медицинских вузов и слушателей системы
послевузовской подготовки специалистов



Москва

Издательский дом «ГЭОТАР-МЕД»

2004

УДК 576.385.5.616-006 (075.8)

ББК 28.05+55.6я73

Н73

Рецензенты

Директор Московского научно-исследовательского онкологического института им. П.А. Герцена докт. мед. наук, проф., акад. РАМН *В.И. Чиссов*

Вице-президент РАМН, зав. кафедрой генетики Московской медицинской академии им. И.М. Сеченова докт. мед. наук, проф., акад. РАМН *Н.П. Бочков*

Новик А.А.

Н73 Введение в молекулярную биологию канцерогенеза: Уч. пос. / А.А. Новик, Т.А. Камилова, В.Н. Цыган; Под ред. Ю.Л. Шевченко. — М.: ГЭОТАР-МЕД, 2004. — 224 с.

ISBN 5-9231-0364-8

В книге изложены представления о молекулярно-генетических основах канцерогенеза, необходимые для понимания современных принципов диагностики злокачественных опухолей и новых подходов к терапии онкологических заболеваний, включая методы генной терапии.

Учебное пособие рассчитано на студентов медицинских вузов и слушателей системы последиplomного образования. Материалы, изложенные в учебном пособии, также представляют интерес для врачей общей практики, терапевтов, хирургов, онкологов, гематологов.

УДК 576.385.5.616-006 (075.8)

ББК 28.05+55.6я73

Права на данное издание принадлежат издательскому дому «ГЭОТАР-МЕД». Воспроизведение и распространение в каком бы то ни было виде части или целого издания не могут быть осуществлены без письменного разрешения издательского дома.

Научно-практическое издание

Новик Андрей Аркадьевич, Камилова Татьяна Аскарровна, Цыган Василий Николаевич

Введение в молекулярную биологию канцерогенеза

Под редакцией Ю.Л. Шевченко

Зав. редакцией

О.В. Кириллова

Редактор-координатор

А.В. Одноровова

Дизайн обложки

А.Н. Якушев

Техническая группа

З.С. Люманова,

О.А. Ильина

ISBN 5-9231-0364-8

© Новик А.А., Камилова Т.А., Цыган В.Н., 2004

© Издательский дом «ГЭОТАР-МЕД», 2004

Предисловие

XXI век ознаменовался бурным прогрессом в познании природы злокачественных новообразований и впечатляющими успехами в лечении различных форм рака благодаря достижениям в изучении молекулярных основ канцерогенеза. В клиническую практику входят высокотехнологичные методы диагностики и лечения злокачественных опухолей. Среди них можно упомянуть высокодозную химиотерапию с трансплантацией стволовых клеток, использование цитокинов, моноклональных антител и вакцин, рекомбинантных ДНК и белков, полученных методами генной инженерии.

Научный прогресс на определенном этапе накопления фактов, в том числе в смежных дисциплинах, требует осмысления и систематизации. Такая потребность особенно актуальна в онкологии, где каждый год на основе достижений молекулярной биологии появляются новые методы диагностики и лечения. Итогом прогресса в этой области стала возможность создания средств, способных повысить качество жизни и сделать жизнь человека более здоровой и счастливой. Неудивительно, что высшая награда в области науки — Нобелевская премия по физиологии и медицине в последние годы присуждалась за работы в области молекулярной биологии.

Частота онкологических заболеваний неуклонно растет. Молекулярно-генетические исследования в онкологии являются самостоятельным направлением и составляют на сегодняшний день часть фундаментальной науки, от успехов которой зависит клиническая практика. Определение молекулярно-генетических маркеров неблагоприятного прогноза позволяет оптимизировать стратегию и тактику терапии. Формирование групп риска и мониторинг результа-

тов лечения открывают возможности более точного управления процессами опухолевой прогрессии.

Эта книга позволяет по-новому оценить молекулярные механизмы канцерогенеза и определить пути разработки принципиально новых противоопухолевых препаратов, поможет студентам и врачам войти в круг научно-практических проблем современной онкологии. Независимо от избранной специальности познание роли молекулярно-генетических механизмов онкогенеза поможет читателю сформировать клиническое мышление, опирающееся на глубокое понимание природы злокачественной опухоли, и использовать эти знания в принятии обоснованных решений по профилактике, диагностике и выбору наиболее эффективного пути лечения больного.

Президент

Национального медико-хирургического центра
имени Н.И. Пирогова Минздрава России
академик РАМН Ю.Л. Шевченко

Список сокращений

- BC3 – высокая степень злокачественности
ГДФ – гуанозиндифосфат
ГН – генетическая нестабильность
ГТФ – гуанозинтрифосфат
ММ – множественная миелома
ММР – матриксная металлопротеиназа
МН – микросателлитная нестабильность
НСЗ – низкая степень злокачественности
НХЛ – неходжкинские лимфомы
ОЛЛ – острый лимфобластный лейкоз
ОМЛ – острый миелобластный лейкоз
ОПМЛ – острый промиелоцитарный лейкоз
ПХТ – полихимиотерапия
РТК – протеинтирозинкиназы
СТ – сигнальная трансдукция
ХМЛ – хронический миелолейкоз
цАМ(Д,Т)Ф – циклический аденозинмоно(ди,три)фосфат
цГМ(Д,Т)Ф – циклический гуанозинмоно(ди,три)фосфат
ЭКМ – экстраклеточный матрикс
- AP-1 – activator protein 1
aFGF – acid fibroblast growth factor
bFGF – basic fibroblast growth factor
CAK – Cdk activating kinase
Cdk – cyclin depending kinase
CRABP – cytoplasmic (или cellular) RA-binding protein

CREB – cAMP responsive element binding protein
 DAG – diacylglycerol
 DD – death domain
 DED – death effector domain
 DR – death receptor
 E-CAM – endothelial cell adhesion molecule
 EGF – epidermal (или epithelial) growth factor
 ERK – extracellular regulated kinase или extracellular receptor-activated kinase
 FAK – focal adhesion kinase
 GAP – GTPase activating protein
 GM-CSF – granulocyte/macrophage-colony stimulating factor
 Grb – growth factor bound protein
 HGF – hepatocyte growth factor
 HRE – hormone responsive element
 HSP – heat shock protein
 IAP – inhibitor of apoptosis proteins
 ICAM – intercellular cell adhesion molecule
 IGF – insulin-like growth factor
 IFN– interferon
 IFNGR – рецептор IFN- γ
 IL – interleukin
 IPI – international prognostic index
 IRF – interferon regulatory factor
 ISGF – IFN-stimulated gene factor
 ISRE – IFN-stimulated response element
 JAK – Janus kinase или just another kinase
 JNK – Jun N-terminal kinase
 LEF/TCF – leucocyte enhancer factor / T cell factor
 LFA – lymphocyte function associated antigen
 LIF – leukemia inhibition factor
 MAP – mitogen activated protein
 MAPK – MAP-kinase
 MEK – MAP-kinase/ERK-kinase
 MMP – matrix metalloproteinase
 NGF – neural growth factor
 PCNA – proliferating cell nuclear antigen
 PDGF – platelet derived growth factor
 PE-CAM – platelet-endothelial cell adhesion molecule
 PAI – plasminogen activator inhibitor
 PET – p53 early transcripts
 PIG – p53-induced gene

PI3K – phosphatidylinositol-3-kinase
 PKA – protein-serine kinase A
 PKC – protein-serine kinase C
 PTB – P.Tyr-binding (домен протеинкиназы)
 PTEN/MMAC1 – phosphatase and tensin homologue deleted / mutated in multiple advanced cancers I
 PTK – protein tyrosine kinase
 PTP – protein tyrosine phosphatase
 RA – retinoic acid
 RAR – retinoid acid receptor
 RER – replication errors
 ROS – reactive oxygen species
 RXR – retinoid X receptor
 SAPK – stress-activated protein kinase
 SCF – stem cell factor
 SH2 – Src homology 2
 SH3 – Src homology 3
 STAT – signal transducer and activator of transcription
 TGF α – tumor growth factor α
 TGF β – transforming growth factor β
 TIMP – tissue inhibitors of metalloproteinases
 TNF – tumor necrosis factor
 TNM – tumor-node-metastasis
 TRAIL – TNF-related apoptosis-inducing ligand
 uPA – urokinase-type plasminogen activator
 VCAM – vascular cell adhesion molecule
 VEGF – vascular endothelial growth factor
 Wt – wild type

Введение

В настоящее время достоверно установлено, что рак — это генетическое заболевание или, как его называют некоторые авторы, болезнь генома. Хотя эта болезнь и является полиэтиологичной, этиологические агенты злокачественной трансформации, будь то радиация, химические канцерогены, вирусы, эндогенные факторы организма, воздействуют на генетический аппарат клетки и изменяют его.

В геноме человека, как и других высших эукариот, имеется большое количество регуляторных генов, которые контролируют фундаментальные процессы развития и жизнедеятельности организма, протекающие на клеточном и молекулярном уровнях, такие как клеточный цикл, дифференцировка, межклеточные взаимодействия и апоптоз. Эти гены кодируют разнообразные в структурном и функциональном отношении белки, в том числе:

- ✓ эндогенные митогены (цитокины, гормоны, ростовые факторы) и их рецепторы;
- ✓ транскрипционные факторы;
- ✓ внутриклеточные белки, передающие митогенные сигналы (белки сигнальной трансдукции);
- ✓ белки клеточного цикла (циклины, циклинзависимые киназы, ингибиторы циклинзависимых киназ);
- ✓ белки экстраклеточного матрикса и молекулы клеточной адгезии;
- ✓ каспазы, про- и антиапоптозные факторы.

Многие из перечисленных молекул полифункциональны и способны участвовать в различных, иногда даже противоположно на-

правленных процессах в зависимости от конкретной физиологической ситуации, определяемой моментом клеточного цикла, стадией дифференцировки, стадией индивидуального развития и воздействием внешних факторов (голодание, гипоксия, стресс и т.д.).

Изменение или утрата экспрессии регуляторного гена вследствие мутации ведет к неконтролируемой пролиферации и/или иммортализации клеточного клона, что является предпосылкой его злокачественной трансформации, а накопление таких нарушений в одной клетке становится причиной ее полного озлокачествления. Любой регуляторный ген, таким образом, имеет онкогенный потенциал, которому он обязан наименованием «онкоген». Гены с онкогенным потенциалом подразделяются на два больших класса — протоонкогены и гены-супрессоры опухолей в зависимости от функций, которые они выполняют в своем нормальном, немутантном состоянии. Эти термины получают конкретное содержание и будут многократно использоваться в следующих главах.

Картирование и секвенирование генома сделали доступными для исследования молекулярных участников процессов канцерогенеза, что будет способствовать лучшему пониманию сигнальной специфичности и перекрестной активации сигнальных путей. Уже известны десятки онкогенов, принимающих участие в процессе злокачественной трансформации клетки. Что эти знания дают клинической практике? Почему злокачественные опухоли одного и того же органа столь многообразны? Почему опухоли одного и того же гистологического типа по-разному ведут себя у разных пациентов? Почему возникает резистентность к терапии? Ответы на эти вопросы определяются генетической уникальностью каждой опухоли. Понимание механизмов канцерогенеза и опухолевой супрессии даст молекулярные мишени для мультимодальной противораковой терапии, включая химио-, иммуно- и генотерапию.

Глава 1

ФЕНОТИП ЗЛОКАЧЕСТВЕННОЙ КЛЕТКИ

1.1. ГЕНЕТИЧЕСКАЯ НЕСТАБИЛЬНОСТЬ

Опухолевые клетки отличаются от своих нормальных аналогов не только морфологическими, иммунофенотипическими и цитохимическими особенностями, но и наличием генетических аномалий. Кроме множественных мутаций, идентифицируемых цитогенетически как хромосомные aberrации, анализ генома на уровне генов и нуклеотидов выявляет тысячи мутаций в каждой опухолевой клетке. Такое количество мутаций не может быть объяснено спонтанной мутабельностью нормальной клетки, а представляет собой проявление генетической нестабильности (ГН), свойственной раковым опухолям. Открытие роли нестабильности ДНК — одно из важнейших событий в истории исследования природы рака, так как состояние ГН является универсальной характеристикой всех видов злокачественных опухолей и причиной развития опухолевого фенотипа. Оказалось, что ДНК — не статичная, а высокодинамичная структура. Эта нестабильность является основой эволюции, нормального индивидуального развития и одновременно злокачественной трансформации. У каждого организма свой собственный видовой и индивидуальный уровень общей и тканевой ГН и соответственно наследственной предрасположенности к раку, который в свою очередь не является константным, а изменяется с возрастом и под влиянием среды. Впервые существование ГН постулировал Р.С. Nowell (1976): селективный пресс приводит к возникновению агрессивных и злокачественных субклонов. ГН отражает уровень мутабельности.

На хромосомном уровне ГН проявляется анеуплоидией, транслокациями, делециями, инверсиями, рекомбинацией сестринских хроматид, ломкостью хромосом, появлением двойных мини-хромосом, а на уровне ДНК — точечными мутациями, микроделециями и микроинверсиями, генной амплификацией, микросателлитной нестабильностью, дефектами системы репарации повреждений ДНК.

Мутаторный фенотип. Большинство множественных мутаций в опухолевых клетках человека идентифицировано цитогенетически как хромосомные aberrации, вовлекающие миллионы нуклеотидов. На самом деле это лишь верхушка айсберга. Анализ хромосом на молекулярном уровне выявляет тысячи мутаций в каждой опухолевой клетке. Для злокачественной трансформации требуется несколько генетических изменений, а частота спонтанных мутаций в нормальных соматических клетках чрезвычайно низка. Встречаемость рака у человека значительно выше теоретически ожидаемой, если при расчетах исходить из предположения о независимом и случайном возникновении мутаций в опухолевой клетке. Для объяснения этого противоречия предложена модель, согласно которой ранним событием канцерогенеза является такое изменение нормальной клетки, которое приводит к резкому повышению частоты мутаций — возникновению мутаторного фенотипа. Концепция мутаторного фенотипа предполагает существование большого числа генов, необходимых для поддержания целостности генома, и подразумевает, что мутации любого из этих генов генетической стабильности могут служить причиной появления мутаторного фенотипа. Поддержание геномной целостности — комплексный многосторонний процесс. Рассмотрим, каким образом нарушение нормальных клеточных процессов может способствовать развитию ГН.

Репликация. Нуклеотидная последовательность всего генома должна быть точно и безошибочно передана от одной генерации к другой, от одной соматической клетки к следующей. Формированию мутаторного фенотипа способствует нарушение полимеразной избирательности в процессе синтеза ДНК. В норме ДНК-полимераза эффективнее включает в строящуюся цепь правильные нуклеотиды, чем неправильные, и делает одну ошибку на 10^4 – 10^6 встроенных нуклеотидов. Удлинение синтезируемой цепи путем присоединения следующего нуклеотида к неправильному нуклеотиду происходит намного медленнее, чем к правильному, что создает благоприятную возможность для исправления ошибки 3'-5'-экзонуклеазой, т.е. баланс между скоростью эксцизии и скоростью синтеза определяет эффективность коррекции.

Мутации гена ДНК-полимеразы могут увеличивать мутабельность до 10^5 раз, а некоторые даже летальны, т.е. уровень мутабельности превышает допустимый для клетки предел. 6 миллиардов нуклеотидов в геноме человека реплицируют ДНК-полимеразы и вспомогательные белки полимеразного комплекса. Вспомогательные белки придают высокую технологичность каталитической субъединице, и в их отсутствие полимеразы приобретает склонность к ошибкам.

В экспериментальной бесклеточной системе показано, что экстракты из лейкозных и лимфомных клеток чаще включают некомплементарные нуклеотиды, чем экстракты из нормальных лимфоцитов. Секвенирование гена ДНК-полимеразы выявило специфические мутации, изменяющие точность синтеза при раке толстой кишки, предстательной и молочной желез.

Репарация. Ошибки репликации подлежат исправлению системой пострепликативной репарации (рис. 1.1, см. вклейку). Высокая точность репликации ДНК поддерживается сложной системой контроля точности репликации — ферментативными системами репарации, которые корректируют возникающие ошибки. Сохранение геномной последовательности требует участия множества генов, каждый из которых может мутировать и тем самым способствовать развитию мутаторного фенотипа. Одновременное присутствие в клетке многих мутантных генов геномной стабильности способно резко понизить правильность репликации, эффективность репарации и точность сегрегации хромосом и привести к накоплению мутаций и злокачественной трансформации (рис. 1.2, см. вклейку).

У человека известны 8 генов пострепликативной репарации (генов стабильности): *hMSH2*, *hMSH3*, *hMSH4*, *hMSH5*, *hMLH1*, *PMS1*, *PMS2*, *GTBP* (*hMSH6*). Клетки с дефектом системы пострепликативной репарации характеризуются повышением частоты спонтанных мутаций. Степень мутаторного эффекта варьирует от 2-кратного до 60-кратного повышения мутабельности.

Мутации в генах стабильности — раннее событие канцерогенеза, генерирующее серию вторичных мутаций в различных генах и особый вид нестабильности структуры ДНК в форме высокой вариабельности структуры нуклеотидных микросателлитов, так называемой микросателлитной нестабильности (МН) (рис. 1.3, см. вклейку). Микросателлиты представляют собой тандемные повторы от нескольких до тысяч 1-6-нуклеотидных мономеров (средняя длина микросателлитных повторов 25–60 оснований). Существуют различия по длине повторов между опухолевой и нормальной тканью

одного и того же пациента. Как результат нарушения метаболизма ДНК, ее репликации и репарации, МН служит индикатором мутаторного фенотипа и диагностическим признаком дефекта пострепликативной репарации, что используется для деления опухолей и линий опухолевых клеток на RER⁺ и RER⁻ (RER — аббревиатура слов replication errors, которая подчеркивает, что МН — это результат нерепарированных ошибок репликации). Клетки опухолей с фенотипом RER⁺ в большинстве случаев диплоидны, и в них не выявляются хромосомные aberrации, распространенные при других формах рака. По предложению немецкой группы по исследованию колоректального рака, МН диагностируется тогда, когда ее проявляют более 20% исследованных локусов. С этой строгой дефиницией МН становится реальным инструментом оценки молекулярного статуса опухоли для рекомендации терапевтической стратегии.

МН может влиять на уникальные последовательности генома. Хотя большинство микросателлитных повторов находится в некодирующих областях и, следовательно, не может прямо приводить к канцерогенезу, МН может дестабилизировать ДНК как внутри, так и за пределами микросателлитов и привести клетку в состояние гипермутабильности.

МН в основном не характерна для лейкозов и лимфом, хотя описана при фолликулярной centroцитарной лимфоме. При RER⁺-фенотипе распространены мутации в гене TGFβ в опухолях толстой кишки и желудка, но редки в опухолях эндометрия с МН. TGFβ ингибирует рост некоторых опухолей. Мутации TGFβ или его рецептора могут вывести клетку из-под контроля роста со стороны TGFβ. Пролиферативное преимущество имеют также клетки с МН, ассоциированной с гиперэкспрессией других генов, кодирующих ростовые факторы и их рецепторы, например, erbB2 при карцинне желудка.

Сведения о возможной связи МН со степенью дифференцированности опухоли противоречивы. Низкодифференцированные карциномы желудка, эндометрия, молочной железы, толстой кишки имеют преимущественно RER⁺-фенотип, хотя корреляция между МН и стадией дифференцировки колоректальных опухолей не обнаружена. Видимо, наличие или отсутствие корреляции такого рода зависит от конкретных генов, затронутых МН.

ГН, изначально присущая клетке, претерпевающей злокачественную трансформацию, является причиной развития специфических особенностей опухолевого фенотипа.

1.2. ПРИЗНАКИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННОГО ФЕНОТИПА

Сопоставление феноменологии канцерогенеза с данными молекулярно-генетических исследований привело к выводу, что формирование опухоли представляет собой многоступенчатый процесс, этапы которого отражают генетические изменения, управляющие прогрессирующей трансформацией нормальных клеток в высокозлокачественные производные. Клетки опухолей, встречающихся в популяции человека с частотой, зависящей от возраста, несут минимум 4–7 стохастических онкогенных генетических событий. Все эти наблюдения приобретают конкретность благодаря большому массиву данных о том, что опухолевые клетки необратимо изменены во множестве сайтов, несущих поломки от таких тонких, как точечные мутации, до таких явных, как хромосомные aberrации. Ряд исследователей высказывают мысль о том, что опухолевая прогрессия формально напоминает дарвиновскую эволюцию, в которой имеет место последовательность генетических изменений, каждое из которых придает клеточному клону то или иное пролиферативное преимущество.

В настоящее время известно более 100 различных типов и подтипов опухолей человека. Это многообразие и сложность порождают ряд вопросов:

- ✓ может ли большая коллекция ассоциированных с канцерогенезом генов функционировать в небольшой группе регуляторных механизмов?
- ✓ какие из этих механизмов действуют в клетке автономно и какие связаны с экстраклеточными сигналами, поступающими из тканевого микроокружения?
- ✓ как много различных регуляторных механизмов в каждом типе клеток-мишеней должно быть разрушено, чтобы такая клетка стала злокачественной?
- ✓ одни ли и те же регуляторные механизмы подвергаются разрушению в опухолях различного происхождения?

Комплексность злокачественной болезни станет более понятной, если описывать ее в терминах небольшого числа основополагающих принципов, управляющих трансформацией нормальных клеток в злокачественную опухоль. Основываясь на том, что все клетки организма обладают сходными молекулярными механизмами пролиферации, дифференцировки и смерти, D. Hanahan и R.A. Weinberg (2000) постулировали существование небольшого числа общих для всех типов опухолей человека молекулярных, биохимических и клеточ-

ных особенностей. Согласно данному постулату, огромный каталог опухолевых генотипов является проявлением 6 принципиальных изменений клеточной физиологии, которые в совокупности при-
нуждают клетку к злокачественному росту:

- ✓ самодостаточность в отношении ростовых сигналов;
- ✓ нечувствительность к рост-ингибиторным сигналам;
- ✓ уклонение от запрограммированной клеточной смерти (апоптоза);
- ✓ неограниченность репликативного потенциала;
- ✓ ангиогенез;
- ✓ тканевая инвазия и метастазирование.

Каждое из этих физиологических изменений, приобретенных во время развития опухоли, представляет собой успешный прорыв одного из механизмов антираковой защиты. Эти 6 свойств являются общими для всех или почти всех типов опухолей человека. Такая множественность механизмов защиты объясняет, почему рак развивается относительно редко. Ниже мы описываем эти свойства, иллюстрируя примерами и указывая пути их приобретения раковыми клетками.

1. *Самодостаточность в отношении ростовых сигналов.* Нормальные клетки нуждаются в митогенных (ростовых) сигналах для того, чтобы перейти из покоящегося состояния в состояние активной пролиферации. Эти сигналы передаются в клетку трансмембранными рецепторами, которые связывают различные классы лигандов: цитокины, гормоны и другие ростовые факторы, компоненты экстраклеточного матрикса, адгезионные и другие молекулы межклеточных взаимодействий. Насколько известно, ни один тип нормальных клеток не может пролиферировать в отсутствие подобных молекулярных сигналов. Опухолевая клетка сама генерирует такие сигналы, их роль тем или иным способом исполняют клеточные онкогены.

Зависимость от ростовых сигналов особенно четко проявляется при культивировании клеток в искусственной среде, где они пролиферируют только при наличии соответствующих митогенных факторов и подходящего субстрата для их интегринов. Такое поведение резко контрастирует с тем, как ведут себя опухолевые клетки, которые постоянно генерируют собственные ростовые сигналы и поэтому не зависят от экзогенной ростовой стимуляции. Эта свобода от влияния тканевой микросреды является результатом разрушения важного гомеостатического механизма (механизмов), который в норме обеспечивает сбалансированное сосуществование и

взаимодействие различных типов клеток в ткани. Если в нормальной ткани митогенные ростовые факторы синтезируются одним типом клеток, чтобы стимулировать пролиферацию другого, то раковые клетки приобретают способность синтезировать ростовые факторы, на которые они сами отвечают, создавая петлю позитивной обратной связи, часто называемой аутокринной регуляцией. Продукция факторов PDGF (platelet-derived growth factor) и TGF α (tumor growth factor α) клетками глиобластомы и саркомы соответственно иллюстрирует автономность опухолевых клеток.

Рецепторы клеточной поверхности, передающие ростовые сигналы внутрь клетки, сами являются объектом дерегуляции в ходе канцерогенеза. Гиперэкспрессия рецепторов делает раковую клетку чувствительной к таким уровням ростового фактора, которые в норме не могут запустить пролиферацию. Лиганд-независимая пролиферация может также достигаться структурным изменением рецепторов, например, усеченная версия рецептора EGF (epidermal growth factor), лишенная большей части цитоплазматического домена, конститутивно активна (рис. 1.4, см. вклейку).

В раковой клетке может происходить переключение типов интегринов, выполняющих функцию рецепторов белков экстраклеточного матрикса (ЭКМ). Эти бифункциональные гетеродимерные структуры физически прикрепляют клетку к суперструктурам ЭКМ, передают в цитоплазму специфические ЭКМ-сигналы, которые влияют на поведение клетки, выводят ее из покоящегося состояния, регулируют пролиферацию и апоптоз. Разрушение этих экстраклеточных связей придаст клетке подвижность.

Наиболее сложные механизмы приобретения пролиферативной автономии заключаются в изменениях компонентов цитоплазматических путей сигнальной трансдукции (СТ), которые получают и процессируют сигналы, передаваемые лиганд-активированными рецепторами ростовых факторов и интегринами.

2. Нечувствительность к рост-ингибиторным сигналам. В нормальной ткани действует множество антипролиферативных сигналов, поддерживающих покоящееся состояние клеток и тканевого гомеостаз, включая как растворимые, так и иммобилизованные в ЭКМ и на клеточной поверхности ингибиторы роста. Эти рост-ингибиторные сигналы, подобно позитивным регуляторам роста, принимаются трансмембранными клеточно-поверхностными рецепторами, связанными с внутриклеточными путями СТ.

Антиростовые сигналы могут блокировать пролиферацию двумя различными механизмами: 1) клетка может быть принудительно

выведена из активного клеточного цикла в покоящееся состояние (фаза G0), из которого она может возвратиться при поступлении экстраклеточного пролиферативного сигнала; и 2) клетка может быть принуждена к полному отказу от своего пролиферативного потенциала, будучи индуцирована к вхождению в постмитотическое состояние, обычно ассоциированное с приобретением специфических признаков дифференцировки.

Большинство механизмов, которые позволяют нормальным клеткам отвечать на антипролиферативные сигналы, ассоциировано с клеточным циклом, со структурами, управляющими прохождением клеткой фазы G1. Клетка мониторирует окружающую среду в течение этого периода и на основании улавливаемых сигналов решает, продолжать ли ей пролиферацию, перейти в фазу G0 или в постмитотическое состояние. На молекулярном уровне многие (возможно, все) антипролиферативные сигналы канализируются через белок pRb и два родственных ему белка p107 и p130. В гипофосфорилированном состоянии pRb блокирует пролиферацию, выключая функцию фактора E2F, контролирующего экспрессию банка генов, существенных для прогрессии клеточного цикла из фазы G1 в S-фазу. Этот механизм приводится в действие TGFβ (transforming growth factor β) и другими экстраклеточными факторами, его разрушение освобождает E2F и, следовательно, позволяет клеточную пролиферацию, делая клетку нечувствительной к антиростовым факторам, что наблюдается в опухолях человека многих типов.

Дисфункция рецептора TGFβ в результате изменения микросателлитной последовательности гена обнаружена в злокачественных опухолях. Причиной нечувствительности может быть нарушение любого звена путей, трансдуцирующих TGFβ-сигнал к циклиновым комплексам, фосфорилирующим Rb, а также структуры самого Rb — конечной мишени этих путей.

3. *Уклонение от апоптоза.* Рост популяции опухолевых клеток предопределяется скоростью не только пролиферации, но и клеточного истощения, основной причиной которого является апоптоз. Приобретенная резистентность к апоптозу является признаком большинства, если не всех опухолевых клонов. Апоптозная программа присутствует в латентной форме во всех клетках организма. Приводимая в действие множеством физиологических сигналов, эта программа разворачивается в серию этапов, длящихся в совокупности 30–120 минут: клеточная мембрана разрывается, цитоплазматический и ядерный скелеты разрушаются, цитозоль выдавливается, хромосомы деградируют, ядро фрагментируется. Сморщенная

клетка поглощается соседними клетками и исчезает обычно в течение 24 часов.

Компоненты апоптозного механизма подразделяются на сенсоры и эффекторы. Сенсоры ответственны за отслеживание отклонений от нормы внутри- и внеклеточной среды, определяющих дальнейшую судьбу клетки: жить ей или умереть. Эти сигналы регулируют второй класс компонентов, функционирующих как эффекторы апоптозной смерти. Класс сенсоров включает рецепторы клеточной поверхности, которые связывают сигналы выживания или смерти. Примером лиганд-рецепторных пар, передающих сигналы выживания, служат факторы IGF-1/IGF-2 и их рецепторы, IL-3 и его рецептор IL-3R. Сигналы смерти передаются связыванием FAS-лиганда (FASL) с его рецептором (FAS) и фактора некроза опухоли TNF с его рецептором TNF-R1.

Внутриклеточные сенсоры активируют апоптозный путь при выявлении аномалий, таких как повреждение ДНК, сигнальный дисбаланс, провоцируемый гиперэкспрессией онкогенов, нехватка факторов выживания и гипоксия. Кроме того, жизнь большинства клеточных типов отчасти поддерживается сигналами выживания, основанными на межклеточном взаимодействии и взаимодействии между клеткой и ЭКМ, отмена которых вызывает апоптоз. И растворимые, и иммобилизованные апоптозные регуляторные сигналы отражают потребности тканей в поддержании составляющих их клеток в надлежащей архитектурной конфигурации.

Многие проапоптозные сигналы воздействуют на митохондрии, которые отвечают на них высвобождением цитохрома C, потенциального катализатора апоптоза. Члены семейства белков Bcl2 с проапоптозной (Bax, Bak, Bid, Bim) и антиапоптозной (Bcl2, Bcl-X_L, Bcl-W) функцией управляют апоптозом отчасти через высвобождение цитохрома C.

Апоптоз является основным барьером для развития раковой опухоли. Опухолевые клетки приобретают резистентность к апоптозу различными путями. Большинство распространенных вариантов потери проапоптозных регуляторов — это мутации опухолевого супрессора гена p53, которые обнаруживаются более чем в 50% опухолей и приводят к функциональной инактивации ключевого сенсора повреждений ДНК и индуктора апоптозного эффекторного каскада. Сигналы, вызываемые другими аномалиями, включая гипоксию и гиперэкспрессию онкогенов, также канализируются через p53, они также оказываются неспособными вызвать апоптоз в отсутствие функционально активного p53. Потеря функции гена

p53 позволяет клеткам преждевременно входить в S-фазу, и следствием этого становится появление клеток с аномальными карิโอ-типом и плоидностью.

Множество регуляторных и эффекторных компонентов апоптозного механизма представляется избыточным. Эта избыточность создает возможность развития новых типов противоопухолевой терапии, так как в опухолевых клетках, утративших какой-либо проапоптозный элемент, еще остаются интактными другие, подобные ему. Ожидается, что новые технологии смогут выявить оставшиеся интактными параллельные апоптозные пути, а новые лекарства восстановят утраченные связи между ними.

4. *Безграничный репликативный потенциал.* Дерегуляция клеточной пролиферативной программы создает принципиальную возможность генерации огромных клеточных популяций, из которых состоит опухолевая масса. В действительности же разобщение клетки с ее микросредой не обеспечивает опухолевой экспансии. Клетки млекопитающих содержат собственную автономную программу, ограничивающую их мультипликацию. Эта программа не зависит от меж- и внутриклеточных сигнальных путей. Она также должна быть повреждена для того, чтобы клеточный клон мог разрастись до размеров угрожающей жизни опухоли.

Работы по культивированию показали, что в норме соматические клетки имеют ограниченные репликативные возможности (mortal phenotype). После определенного числа (60–70) делений рост культуры останавливается, и клетки входят в жизнеспособное постмитотическое состояние старения (senescence). Это дополнительная критическая точка, которую злокачественные клетки должны преодолевать, приобретая способность к неограниченной пролиферации. Состояние старения может быть индуцировано *in vitro* в некоторых клетках высокой экспрессией онкогенов, таких как Ras. Нарушение функций генов-супрессоров Rb и p53 предоставляет клеткам возможность и в состоянии старости продолжать размножаться до тех пор, пока они не войдут в состояние, называемое кризисным. Для кризисного состояния характерны нарушение карิโอтипического порядка, ассоциированное со слиянием концов хромосом, массивная клеточная гибель и случайное появление вариантов (10^{-7}) со способностью к неограниченному размножению (immortal phenotype). Большинство типов опухолевых клеточных линий имеет иммортализованный фенотип, следовательно, неограниченный репликативный потенциал приобретается *in vivo* во вре-

мя злокачественной трансформации и является существенным для опухолевого роста.

«Счетное приспособление» для клеточных поколений оказалось скрыто в теломерах (концах хромосом), состоящих из нескольких тысяч повторов коротких 6-нуклеотидных элементов. Каждое деление сопровождается потерей 50–100 нуклеотидных последовательностей на конце каждой хромосомы. Причина этого прогрессирующего укорочения в неспособности ДНК-полимеразы полностью реплицировать 3'-концы хромосом. Эрозия теломер лишает их способности защищать хромосомную ДНК от слияния концов хромосом и приводит к кариотипическому беспорядку, ассоциированному с кризисным состоянием, в норме почти неминуемо переходящим в апоптоз.

Поддержание теломер имеет место практически во всех типах опухолевых клеток, в 85–90% случаев оно достигается благодаря нерегулируемой экспрессии фермента теломеразы, которая добавляет гексануклеотидные повторы к концам теломерной ДНК, а в остальных случаях – благодаря рекомбинационному механизму межхромосомного обмена последовательностями. Тем или иным механизмом длина теломер не допускается до критического уровня, что в свою очередь предоставляет возможность неограниченного роста клеточного клона. Оба механизма строго репрессированы в большинстве нормальных клеток. Роль теломеразы в иммортализации клеток очень хорошо продемонстрирована экспериментально. Мыши, гомозиготные по дефектному гену-супрессору опухолей $p16^{INK4A}$ (гену ингибитора клеточного цикла), склонны к заболеванию раком, причем возникающие опухоли характеризуются повышенной теломеразной активностью. У таких же мышей, но лишенных теломеразной функции, опухоли развивались значительно реже.

Таким образом, старение, подобно апоптозу, отражает механизм, активируемый укорочением теломер или противоречивыми ростовыми сигналами, который принуждает аберрантную клетку войти в необратимое G0-подобное состояние и лишает ее возможности продолжать пролиферацию. Предполагается, что, приобретая иммортализованный фенотип, клетка должна «обмануть» механизм старения, что является важным этапом процесса озлокачествления. Следует помнить, что пока все доказательства этого феномена получены *in vitro* и, возможно, это не более чем артефакт клеточной культуры, не соответствующий клеточному фенотипу в живой ткани.

5. *Опухолевый ангиогенез.* Кислород и нутриенты, доставляемые капиллярной сетью, настолько необходимы для клеточных функций

p53 позволяет клеткам преждевременно входить в S-фазу, и следствием этого становится появление клеток с аномальными кариотипом и плоидностью.

Множество регуляторных и эффекторных компонентов апоптозного механизма представляется избыточным. Эта избыточность создает возможность развития новых типов противоопухолевой терапии, так как в опухолевых клетках, утративших какой-либо проапоптозный элемент, еще остаются интактными другие, подобные ему. Ожидается, что новые технологии смогут выявить оставшиеся интактными параллельные апоптозные пути, а новые лекарства восстановят утраченные связи между ними.

4. *Безграничный репликативный потенциал.* Дерегуляция клеточной пролиферативной программы создает принципиальную возможность генерации огромных клеточных популяций, из которых состоит опухолевая масса. В действительности же разобшение клетки с ее микросредой не обеспечивает опухолевой экспансии. Клетки млекопитающих содержат собственную автономную программу, ограничивающую их мультипликацию. Эта программа не зависит от меж- и внутриклеточных сигнальных путей. Она также должна быть повреждена для того, чтобы клеточный клон мог разрастись до размеров угрожающей жизни опухоли.

Работы по культивированию показали, что в норме соматические клетки имеют ограниченные репликативные возможности (mortal phenotype). После определенного числа (60–70) делений рост культуры останавливается, и клетки входят в жизнеспособное постмитотическое состояние старения (senescence). Это дополнительная критическая точка, которую злокачественные клетки должны преодолевать, приобретая способность к неограниченной пролиферации. Состояние старения может быть индуцировано *in vitro* в некоторых клетках высокой экспрессией онкогенов, таких как Ras. Нарушение функций генов-супрессоров Rb и p53 предоставляет клеткам возможность и в состоянии старости продолжать размножаться до тех пор, пока они не войдут в состояние, называемое кризисным. Для кризисного состояния характерны нарушение кариотипического порядка, ассоциированное со слиянием концов хромосом, массивная клеточная гибель и случайное появление вариантов (10^{-7}) со способностью к неограниченному размножению (immortal phenotype). Большинство типов опухолевых клеточных линий имеет иммортализованный фенотип, следовательно, неограниченный репликативный потенциал приобретается *in vivo* во вре-

мя злокачественной трансформации и является существенным для опухолевого роста.

«Счетное приспособление» для клеточных поколений оказалось скрыто в теломерах (концах хромосом), состоящих из нескольких тысяч повторов коротких 6-нуклеотидных элементов. Каждое деление сопровождается потерей 50–100 нуклеотидных последовательностей на конце каждой хромосомы. Причина этого прогрессирующего укорочения в неспособности ДНК-полимеразы полностью реплицировать 3'-концы хромосом. Эрозия теломер лишает их способности защищать хромосомную ДНК от слияния концов хромосом и приводит к кариотипическому беспорядку, ассоциированному с кризисным состоянием, в норме почти неминуемо переходящим в апоптоз.

Поддержание теломер имеет место практически во всех типах опухолевых клеток, в 85–90% случаев оно достигается благодаря нерегулируемой экспрессии фермента теломеразы, которая добавляет гексануклеотидные повторы к концам теломерной ДНК, а в остальных случаях — благодаря рекомбинационному механизму межхромосомного обмена последовательностями. Тем или иным механизмом длина теломер не допускается до критического уровня, что в свою очередь предоставляет возможность неограниченного роста клеточного клона. Оба механизма строго репрессированы в большинстве нормальных клеток. Роль теломеразы в иммортализации клеток очень хорошо продемонстрирована экспериментально. Мыши, гомозиготные по дефектному гену-супрессору опухолей $p16^{INK4A}$ (гену ингибитора клеточного цикла), склонны к заболеванию раком, причем возникающие опухоли характеризуются повышенной теломеразной активностью. У таких же мышей, но лишенных теломеразной функции, опухоли развивались значительно реже.

Таким образом, старение, подобно апоптозу, отражает механизм, активируемый укорочением теломер или противоречивыми ростовыми сигналами, который принуждает аберрантную клетку войти в необратимое G0-подобное состояние и лишает ее возможности продолжать пролиферацию. Предполагается, что, приобретая иммортализованный фенотип, клетка должна «обмануть» механизм старения, что является важным этапом процесса озлокачествления. Следует помнить, что пока все доказательства этого феномена получены *in vitro* и, возможно, это не более чем артефакт клеточной культуры, не соответствующий клеточному фенотипу в живой ткани.

5. *Опухолевый ангиогенез.* Кислород и нутриенты, доставляемые капиллярной сетью, настолько необходимы для клеточных функций

и выживания, что практически все клетки в ткани находятся на расстоянии не более 100 мкм от какого-либо кровеносного сосуда. В ходе органогенеза эта близость обеспечена координированным ростом сосудов и паренхимы. В формирующейся ткани рост новых кровеносных сосудов — процесс ангиогенеза — тщательно регулируется. Проллиферирующие клетки в нормальной ткани способны стимулировать его в отличие от клеток тканевого поражения с аберрантной пролиферацией, изначально лишенных ангиогенной способности, что ограничивает их экспансию. Чтобы дорасти до крупных размеров, начинающиеся неоплазии должны развить способность к ангиогенезу. Противоположно направленные позитивные и негативные сигналы стимулируют или блокируют ангиогенез. Первые передаются растворимыми факторами и их рецепторами, представленными на поверхности эндотелиальных клеток. Интегрины и молекулы клеточной адгезии также играют важную роль в этом процессе.

Типичный ингибитор ангиогенеза тромбоспондин-1 связывается с CD36, трансмембранным рецептором на эндотелиальных клетках, соединенным с внутриклеточной Src-подобной протенинкиназой. В настоящее время известно несколько десятков эндогенных индукторов и ингибиторов ангиогенеза.

Интегриновые сигналы также участвуют в поддержании регуляторного баланса. Растущие капилляры экспрессируют другие классы интегринов, нежели неподвижные. Препятствование прохождению сигналов через интегрины растущих капилляров ингибирует ангиогенез, подчеркивая важный вклад клеточной адгезии в ангиогенную программу. Экстраклеточные протеазы физически и функционально связаны с проангиогенными интегринными, что создает предпосылки к появлению инвазивных свойств ангиогенных эндотелиальных клеток.

Значение ангиогенеза для роста опухоли подтверждено экспериментально способностью многочисленных антиангиогенных веществ подавлять рост опухолевых клеток, введенных подкожно мышам, и опухолей, возникающих у трансгенных мышей с наследственной предрасположенностью к раку.

Способность индуцировать и поддерживать ангиогенез приобретает на определенном этапе (этапах) развития опухоли через «ангиогенное переключение» из состояния сосудистой неподвижности (рис. 5.5). Эта проблема была проанализирована на трех трансгенных мышиных моделях на всем протяжении мультиэтапного канцерогенеза, и во всех случаях активация ангиогенеза происходила до завершения процесса полного озлокачивания опухоли. У человека признаки

ангиогенеза можно отметить в предзлокачественных поражениях молочной железы, шейки матки и кожи. Все эти наблюдения в совокупности с эффектами ингибиторов ангиогенеза показывают, что неоваскуляризация является предпосылкой быстрой клональной экспансии и формирования макроскопической опухоли.

Во многих опухолях ангиогенное переключение осуществляется путем усиления транскрипции генов, кодирующих индукторы ангиогенеза (такие как VEGF и/или FGF), и, следовательно, сдвига равновесия индукторов/ингибиторов ангиогенеза в пользу первых. В других опухолях обнаружено подавление экспрессии эндогенных ингибиторов (тромбоспондина 1 или интерферона- β). Наконец, в некоторых опухолях встречаются изменения обоих типов.

Механизмы поддержания баланса между регуляторами ангиогенеза во многом недостаточно изучены. В клетках некоторых типов обнаружена позитивная регуляция тромбоспондина-1 опухолесупрессирующим белком p53. Следовательно, потеря функции p53 может быть причиной падения уровня тромбоспондина-1 и освобождения эндотелиальных клеток от его ингибиторного действия. Активация онкогена Ras или потеря гена-супрессора опухолей VHL обуславливает в некоторых клеточных типах усиление экспрессии фактора VEGF.

Другой механизм регуляции возникает в форме протеаз, которые контролируют биодоступность ангиогенных активаторов и ингибиторов. Координированная экспрессия про- и антиангиогенных сигнальных молекул и ее протеолитическая модуляция обеспечивают комплексную гомеостатическую регуляцию ангиогенеза нормальных тканей и сосудистой целостности. Многие протеазы высвобождают bFGF из его депо в ЭКМ, а плазмин, проангиогенный компонент свертывающей системы, может саморасщепляться с образованием ингибитора ангиогенеза ангиостатина.

Опухолевый ангиогенез присущ солидным опухолям всех типов и в связи с этим представляет собой привлекательную мишень для разработки новых терапевтических стратегий. В течение предстоящего десятилетия по мере установления специфических функций, молекулярных механизмов действия и регуляции их экспрессии и активности будет создан каталог регуляторных молекул ангиогенеза, экспрессируемых опухолями различных типов и во многих случаях предзлокачественными поражениями. Поскольку опухолевые клетки различных типов используют различные молекулярные пути ангиогенного переключения, предстоит найти ответ на вопрос, возможен ли единый терапевтический антиангиогенный подход или опухоли

каждого типа соответствует собственная программа ангиогенеза, которая будет отвечать на специфические антиангиогенные воздействия.

6. *Тканевая инвазия и метастазирование.* Рано или поздно в ходе развития большинства злокачественных опухолей в первичной опухолевой массе возникают клетки-первопроходцы, которые прокладывают себе путь, проникая в смежные ткани. Отсюда они путешествуют к отдаленным областям организма и колонизируют их. Эти отдаленные колонии опухолевых клеток — вторичные опухоли или метастазы являются причиной приблизительно 90% случаев смерти от рака. Способность к инвазии и метастазированию позволяет опухолевым клеткам покидать первичную опухоль и колонизировать новые территории, где по крайней мере сначала нутриенты и пространство для роста не ограничены. Вновь сформированные метастазы появляются как сплав опухолевых и поддерживающих клеток, призванных из нормальных тканей. Подобно формированию первичной опухолевой массы, успешная инвазия и метастазирование зависят от первых 5 характерных особенностей рака. Однако что представляют собой дополнительные клеточные изменения, присущие финальному этапу канцерогенеза?

Инвазия и метастазирование — чрезвычайно сложные процессы и их генетические и биохимические детерминанты еще не полностью изучены. На механическом уровне они тесно связаны между собой, что оправдывает их объединение в единое свойство опухолевых клеток. Белки нескольких классов вовлечены в привязывание клеток к их тканевому окружению и изменяются в клетках, приобретающих инвазивные или метастатические свойства. К ним относятся молекулы адгезии, в том числе из семейств иммуноглобулинов и кальций-зависимых кадеринов, участвующие в межклеточных взаимодействиях, и интегрины, привязывающие клетку к ЭКМ. Особенно стоит отметить, что все эти «привязывающие» взаимодействия передают регуляторные сигналы в клетку. Большинство широко распространенных при раке изменений взаимодействия клетки со средой затрагивает Е-кадгерин — молекулу межклеточного взаимодействия, повсеместно экспрессирующуюся на эпителиальных клетках. Связывание соседних клеток посредством Е-кадериновых мостиков проявляется в трансмиссии антиростовых и других сигналов через плазматические контакты с β -катенином во внутриклеточную сигнальную мишень с транскрипционным фактором *Lef/Tcf*. Функция Е-кадерины как опухоль-супрессирующего фактора утрачена в большинстве эпителиальных опухолей. Утрата может произойти в результате мутационной инактивации генов Е-кадери-

на или β -катенина, транскрипционной репрессии или протеолиза экстраклеточного домена кадгерина. Повышенная экспрессия в культивируемых раковых клетках и трансгенных моделях канцерогенеза ослабляет инвазивный и метастатический фенотип, а блокирование функции E-кадгерина усиливает оба свойства. Таким образом, E-кадгерин является супрессором инвазии и метастазирования эпителиальных раков, и его функциональная элиминация представляет собой ключевой этап приобретения этой способности.

Изменение экспрессии молекул адгезии из суперсемейства иммуноглобулинов также играет критическую роль в процессах инвазии и метастазирования. В наиболее ясном случае молекула N-CAM претерпевает переключение экспрессии высокоадгезивной формы в слабоадгезивную (или даже отталкивающую) форму в опухолях Вилмса, нейробластоме и мелкоклеточном раке легкого и редукцию общего уровня экспрессии в инвазивных опухолях поджелудочной железы и толстой кишки. Эксперименты на трансгенных мышцах подтверждают функциональную роль нормальной адгезивной формы N-CAM в супрессии метастазирования.

Изменения интегринов также доказаны в инвазивных и метастатических клетках. Такие клетки испытывают во время своего путешествия воздействие измененной тканевой микросреды, которая может содержать новые, нетипичные для нормальных условий компоненты. Соответственно успешная колонизация ими нового местоположения (как близкого, так и отдаленного от первичной опухоли) требует адаптации, которая достигается путем переключения спектра интегриновых α - и β -субъединиц, что и наблюдается в мигрирующих клетках. В результате возникают новые субтипы интегриновых молекул с новыми субстратными предпочтениями. Клетки карциномы, таким образом, облегчают себе инвазию, экспрессируя вместо интегринов, соответствующих ЭКМ нормального эпителия, интегрины, связывающие преимущественно деградированные стромальные компоненты ($\alpha_3\beta_1$ и $\alpha_v\beta_3$). Усиленная экспрессия различных интегриновых субъединиц в опухолевых клетках может индуцировать или ингибировать инвазивное и метастатическое поведение в зависимости от их роли в этих процессах.

Попытки объяснить биологические эффекты интегринов в механистических терминах затрудняются существованием большого числа генов интегриновых субъединиц и еще большего числа гетеродимерных рецепторов, возникающего в результате комбинированной экспрессии различных α - и β -субъединиц и соответственно сложных сигналов, испускаемых цитоплазматическими доменами

этих рецепторов. Тем не менее нет сомнений, что эти рецепторы играют важную роль в способности опухолевых клеток к тканевой инвазии и метастазированию.

Второй важнейший фактор инвазивности и метастазирования — экстраклеточные протеазы. Матрикс-деградирующие протеазы ассоциированы с клеточной поверхностью в соединении со специфическими рецепторами или интегринами. Протеазные гены активируются, гены ингибиторов протеаз подавляются, неактивные зимогенные формы протеаз превращаются в активные формы. Появление активных протеаз на клеточной поверхности облегчает инвазию опухолевых клеток в строму, через стенки кровеносных сосудов и сквозь слои нормальных эпителиальных клеток. В карциномах многих типов матрикс-деградирующие протеазы продуцируются не эпителиальными раковыми клетками, а стромальными и воспалительными клетками, привлеченными в опухоль. Экскретированные этими клетками протеазы управляют клетками карциномы. Например, некоторые раковые клетки индуцируют экспрессию урокиназы (uPA) в ко-культивируемых стромальных клетках, которая затем связывается с урокиназным рецептором (uPAR), экспрессируемым на раковых клетках.

Активация экстраклеточных протеаз и изменение специфичности связывания кадеринов, молекул адгезии и интегринов — основные моменты приобретения инвазивности и способности к метастазированию. Молекулярные механизмы, регулирующие эти события, различаются в различных тканевых средах. Этот аспект канцерогенеза — один из наиболее сложных, запутанных и наименее изученных. Слишком мало информации, чтобы восстановить во всей полноте профиль экспрессии и функциональной активности всех этих молекул во всем многообразии типов раковых опухолей до и после приобретения инвазивности и способности к метастазированию.

Пока описание вновь диагностированных опухолей в терминах генетических повреждений остается отдаленной перспективой, но возможности анализировать индивидуальные опухоли на генетическом и биохимическом уровне будут стремительно расти, через 10–20 лет диагноз соматических повреждений, имеющих в геноме опухолевых клеток, и определение профиля генной экспрессии по всему их геному станут рутинной процедурой. Благодаря всей этой информации станет возможным проверить утверждение о том, что развитие опухолей человека всех типов определяется общим для всех них набором «правил», подразумевающих приобретение описанных здесь признаков злокачественности.

Глава 2

СИГНАЛЬНАЯ ТРАНСДУКЦИЯ

2.1. ПОНЯТИЕ О СИГНАЛЬНОЙ ТРАНСДУКЦИИ

Наиболее сложные механизмы приобретения клеткой пролиферативной автономии заключаются в изменениях компонентов цитоплазматических путей СТ, которые получают и процессируют сигналы, испускаемые лиганд-активированными рецепторами ростовых факторов и интегринами. Изменение состояния клетки в ответ на внешние сигналы управляется генетическим аппаратом, находящимся в ядре. Внутриклеточный барьер в виде ядерной мембраны защищает ДНК от нуклеаз и мутагенов, но в то же время ограничивает возможности ядерных генов непосредственно улавливать изменения вне- и внутриклеточной среды и реагировать на них. В ходе эволюции эукариотической клетки возникла система биохимических коммуникационных сетей, преодолевающая это ограничение и обеспечивающая ядро информацией о состоянии среды. Средовые сигналы в форме цитокинов, низкомолекулярных гормонов, ростовых факторов и других протеинов попадают в клетку с помощью двух основных механизмов. Некоторые средовые агенты передают в клетку специфический сигнал, непосредственно мигрируя через плазматическую мембрану в цитоплазму и связываясь там со своими белками-мишенями или рецепторными молекулами. Затем такие лиганд-рецепторные комплексы транслоцируют свои лиганды прямо в ядро. Но чаще передача сигнала (сигнальная трансдукция) происходит по альтернативному механизму. Специфические клеточно-поверхностные рецепторы на клеточной мембране избирательно связываются со своими лигандами (соответствующи-

ми гормонами и цитокинами) и передают (трансдуцируют) сигнал путем конформационного изменения молекулы со своих экстраклеточных лиганд-связывающих доменов через мембрану на внутриклеточные (цитоплазматические) домены.

Регуляция трансдукции поверхностными рецепторами. Связывание лиганда с рецепторами вызывает клеточный ответ в виде генной экспрессии. Ростовые факторы индуцируют экспрессию *de novo* специфических групп генов через трансцитоплазматические сигнальные пути, регулирующие транскрипцию. Первый и простейший механизм передачи сигнала через цитоплазму в ядро — система PKA/CREB. В этом сигнальном пути цАМФ, чей уровень повышается в ответ на рецепторную стимуляцию, активирует протеинсеринкиназу PKA (тетрамер, состоящий из двух регуляторных R- и двух каталитических C-субъединиц), локализованную в цитоплазме, связываясь с ее регуляторными субъединицами и тем самым высвобождая каталитические субъединицы, которые перемещаются в ядро. C-субъединица входит в ядро и фосфорилирует транскрипционный фактор CREB (cAMP responsive element binding protein), который является ядерной мишенью PKA (protein kinase A). Фосфорилирование обуславливает связывание CREB с ко-активатором CBP/p300 и транскрипцию цАМФ-зависимых индуцибельных генов. Многие транскрипционные факторы известны теперь как непосредственно регулируемые фосфорилированием через позитивный или негативный контроль ядерного экспорта или импорта, связывание с ДНК или трансактивацию.

Молекулярные механизмы всех процессов СТ сводятся к специфическим межпротеиновым взаимодействиям, которые осуществляются путем гомо- или гетеродимеризации белков и образования протеиновых комплексов. Путь СТ представляет собой каскад белков-трансммиттеров, которые, как эстафету, передают сигнал от предыдущего (upstream) члена пути к следующему (downstream). Биохимические последствия СТ заключаются в изменении состояния ГТФ-связывающих белков и/или последовательной ферментативной активации каскада протеинкиназ. Передача сигнала осуществляется чаще всего фосфорилированием белка-мишени по тирозину, серину или треонину. Конечная цель всех путей СТ — достичь ядра, модифицировать генную транскрипцию и специфическим образом изменить поведение клетки. Выбор пути СТ зависит от внутри- и внеклеточной ситуации: совокупности действующих факторов, стадии дифференцировки, момента клеточного цикла, электролитного баланса и доступности метаболитов. В онкологическом

контексте стоит акцентировать внимание на описании молекулярных механизмов, ответственных за передачу митогенных сигналов, регулирующих клеточный цикл и пролиферацию.

Поливариантность СТ обеспечивается возможностью перекрестной передачи сигнала с одного пути на другой и существованием родственных высокомолекулярных белков (от 2–3 до нескольких десятков в семействе) с модульной (доменной) структурой, которые могут отличаться друг от друга по структуре наличием/отсутствием функциональных доменов.

Для передачи регуляторных сигналов в геноме человека закодировано более 650 протеинкиназ, около 20% этого количества составляют протеинтирозинкиназы (РТК). Сравнительный анализ протеинкиназ и фосфатаз из разных видов показал, что настоящие РТК отсутствуют у одноклеточных эукариот (в частности, у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*), но появляются у простейших многоклеточных эукариот, т.е. эволюционируют рука об руку с многоклеточностью, судя по всему, в ответ на потребность в межклеточных коммуникациях. Это подтверждается тем, что большинство РТК играют роль в трансмембранном сигналинге в ответ на воздействие лигандов, которые связываются с поверхностными клеточными рецепторами. Роль экстраклеточных лигандов в индукции и регуляции клеточных метаболических ответов играют гормоны, цитокины и другие ростовые факторы.

К механизмам регуляции протеинкиназной активности относятся:

- ✓ взаимодействие с вторичными мессенджерами (небелковыми регуляторами), к которым относятся цАМФ, цГМФ, DAG, полиамины, двуцепочечные РНК, двуцепочечные ДНК, IP_6 ;
- ✓ фосфорилирование определенных аминокислотных остатков;
- ✓ интраклеточная ингибция через псевдосубстратные последовательности;
- ✓ связывание с регуляторными субъединицами, ингибиторными белками или белками межклеточной адгезии, димеризация;
- ✓ изменение субклеточной локализации.

Внутриклеточные белковые ингибиторы протеинкиназ обычно высокоспецифичны к индивидуальным протеинкиназам, как и следует ожидать, исходя из принципа межбелкового взаимодействия, например, PKI (protein kinase cAMP-dependent catalytic inhibitor) для PKA, p21 и p16 для циклинзависимых протеинкиназ.

Протеинфосфатазная активность может регулироваться:

- ✓ соединением с лигандами (рецептороподобные фосфотирозинфосфатазы);

- ✓ вторичными мессенджерами;
- ✓ объединением в комплекс с ингибиторными белками;
- ✓ посттрансляционными модификациями (фосфорилирование и метилирование).

Активность регуляторных белков также регулируется фосфорилированием и субклеточной локализацией. Существует большое семейство рецептороподобных протеинфосфатаз, активность которых регулируется взаимодействием с лигандами. В некоторых случаях они негативно ингибируются димеризацией (например, RPTPα и CD45), что является зеркальным отражением активации димеризацией самих рецепторных РТК. Лиганды, регулирующие димеризацию фосфотирозинфосфатаз, еще не идентифицированы.

Примерно в середине 1950-х годов была открыта возможность обратимого изменения активности ферментов путем фосфорилирования в результате комбинированного действия протеинкиназ и протеинфосфатаз и примерно тогда же было показано, что гормоны адреналин и глюкагон повышают уровень внутриклеточного цАМФ. Так был впервые установлен факт участия вторичных мессенджеров в регуляторных процессах. Позднее цАМФ-зависимая протеинсеринкиназа PKA была изолирована как субстрат цАМФ, и при изучении ее плеiotропной субстратной специфичности было показано, что она ответственна за многие эффекты цАМФ. Эти открытия послужили предпосылками рождения концепции сигнальной трансдукции. В последующие десятилетия было обнаружено, что эукариотические сигнальные пути имеют высоко-консервативную природу, их дефекты являются краеугольной причиной развития рака и ряда других заболеваний. Громадный прогресс достигнут с тех пор благодаря структурному и генетическому анализу, развитию аналитических методов и созданию реагентов, в том числе фармакологических модуляторов сигналинга.

Анализ рецепторной активации сигнальных путей показал, что сигналинг может быть инициирован и распространяться по принципу индуцированного молекулярного совмещения. Связывание лиганда с рецепторной РТК инициирует сигналинг, вызывая димеризацию, которая облегчает трансфосфорилирование. Привлечение белков с фосфотирозин-связывающими доменами к активированным трансмембранным рецепторам повышает локальную концентрацию белков на мембране, увеличивая этим количество сигнальных комплексов. Наличие в молекуле определенных последовательностей (SH2-доменов) резко повышает аффинность этих белков как субстратов фосфорилирования активированными рецепторными РТК.

Индуктированное совмещение белков используется для активации сигнальных путей многими рецепторными системами, особенно цитокиновыми и рецепторами смерти (см. главу «Апоптоз»), где начальные события сигналинга принципиально зависят от олигомеризации белков. Группа рецепторов семейства TNF, которые промотируют клеточную смерть, использует гомотипные взаимодействия между доменами смерти, эффекторными доменами и CARD-доменами, чтобы запустить внутриклеточный сигнальный каскад последовательной протеолитической активации серии проферментов (семейства каспазных протеаз). В индуцированной рецепторами смерти активации каспазного каскада совмещение молекул используется, чтобы повысить низкий базальный уровень каталитической активности прокаспаз, что приведет к эффективному аутопроцессингу в контексте олигомера.

Хотя достоверно установлено, что лиганд-индуцированная димеризация необходима для активации рецепторных РТК, недавно показано, что димеризации *per se* может быть недостаточно для активации и что может существовать дополнительная потребность в относительной ориентации двух субъединиц димера так, чтобы каталитические домены корректно соприкасались. Рецепторные димеры могут существовать и в отсутствие лиганда, но лиганд-индуцированная конформационная реконструкция рецепторных димеров является принципиально важным моментом активации каталитических доменов.

2.2. ФОСФОРИЛИРОВАНИЕ В СИГНАЛЬНОЙ ТРАНСДУКЦИИ

Основные принципы СТ установлены в 1980–1990-х годах. Открытие протенинкиназ v-Src и v-Abl (вирусных трансформирующих белков, которые фосфорилируют тирозиновые остатки в сигнальных молекулах инфицированной клетки-хозяина) послужило прямым доказательством того, что фосфорилирование тирозина играет роль в контроле роста. Как теперь известно, тирозинфосфорилирование — основной механизм трансмембранной и внутриклеточной передачи ростового сигнала. Открытие EGF-стимулированного фосфорилирования рецептора EGF по тирозину привело к идентификации большого семейства лиганд-стимулируемых рецепторных протеинтирозинкиназ, которые обладают внутриклеточной каталитической активностью, активируемой связыванием с лигандом.

Рецепторы бывают разных типов: 1) рецепторные тирозинкиназы с цитоплазматическим доменом, обладающим каталитической активностью, который активируется связыванием экстраклеточного домена с лигандом; 2) рецепторы, лишенные цитоплазматического протеинкиназного домена, которые нековалентно связываются с цитоплазматическим доменом другой рецепторной субъединицы и формируют бинарные рецепторы (например, цитокиновые рецепторы связываются для передачи сигнала с тирозинкиназами JAK-семейства); 3) трансмембранные протеинсеринкиназы — рецепторы цитокинов семейства TGF β также передают сигнал в клетку посредством лиганд-индуцированного внутриклеточного фосфорилирования.

Активация цитоплазматического каталитического домена рецепторной РТК и поверхностных рецепторов других типов происходит вследствие лиганд-индуцированной ди- или олигомеризации, в результате которой каждый каталитический домен трансфосфорилирует тирозин в активационной петле другого каталитического домена. Затем происходит аутофосфорилирование тирозина вне каталитического домена, которое является ключом к дальнейшей передаче сигнала.

Цитокиновые рецепторы без внутриклеточной киназной активности, такие как рецепторы IL-3, GM-CSF и интерферонов, передают свои регуляторные сигналы в первую очередь через JAK-семейство рецептор-ассоциированных тирозинкиназ. JAK-киназы (Janus kinase) получили свое название в честь божества римской мифологии двуликого Януса, так как содержат два киназных домена, хотя только С-терминальный проявляет тирозинкиназную активность. JAK-киназы опосредуют сигнальную трансдукцию практически всех цитокинов. Они активируют транскрипционные факторы STAT, которые затем трансдуцируют эти сигналы в ядро и модулируют генную экспрессию (рис. 2.1).

Цитокиновые рецепторы с цитоплазматической киназной активностью, такие как c-kit, первоначально представлялись как передающие свои сигналы независимо от серин/треонинкиназных каскадов. Теперь известно, что оба типа рецепторных сигнальных путей взаимодействуют с серин/треонинкиназными каскадами, так как максимальная активация тирозинкиназно активируемых каскадов вовлекает серин/треонин-фосфорилирование, модулируемое, например, MAP-киназами. На пересечении двух различных направлений исследований — изучения активации протеинкиназ рецепторными РТК и фосфорилирования транскрипционных факторов

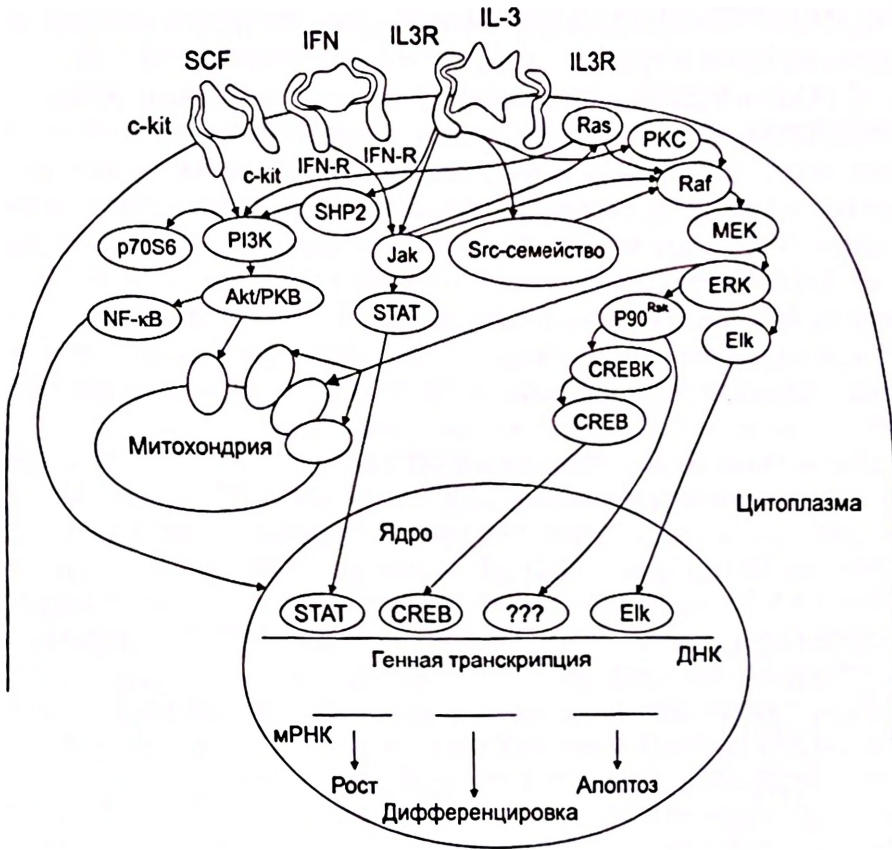


Рис. 2.1. Цитокин-индуцированная сигнальная трансдукция.
Не обозначенные трансмембранные структуры митохондрий – белки семейства Bcl2.

было установлено, что MAP-киназный сигнальный путь является основным механизмом контроля транскрипции у эукариот. MAP-киназа была первоначально открыта как инсулин-активируемая протеинсеринкиназа. Генетический и биохимический анализ показал, что этот механизм представляет собой каскад из трех протеинкиназ: MAPKKK (MAP kinase kinase kinase) фосфорилирует MAPKK (MAP kinase kinase) по сериновым остаткам в ее активационной петле, а MAPKK затем фосфорилирует MAPK (MAP kinase) по треонину и тирозину. Активированная MAPK, конечное звено этого каскада, мигрирует в ядро и там фосфорилирует и активирует транскрипционные факторы.

Активация общего сигнального пути, инициируемого цитокиновыми рецепторами, протеинкиназного каскада Ras/Raf/MEK/

ERK(MAPK), проявляется в фосфорилировании и активации дополнительных киназ и транскрипционных факторов (p90^{Rsk}, CREB, ELK, Erg-1). Серин/треонин-фосфорилирование вовлечено в регуляцию контролирующего апоптоз белка Bcl2 и в этиологию некоторых опухолей человека. Активность белков STAT-1 и -3, регулируемая ERK-киназным каскадом, значительно усиливается фосфорилированием по серину. Конститутивное фосфорилирование серина в молекулах STAT-1 и -3 наблюдается при хроническом лимфоцитарном лейкозе и может быть ингибировано флударабином. Оно играет роль в развитии иммунодефицитов и может быть важной мишенью некоторых химиотерапевтических лекарств, распознающих активированные белки.

Цитокиновая стимуляция соответствующих клеток-мишеней приводит к быстрой активации киназы PI3K (phosphatidylinositol-3-kinase), которая катализирует фосфорилирование фосфатидилинозитолов: $\text{PtdIns} \rightarrow \text{PtdIns}(3)\text{P}$, $\text{PtdIns}(4)\text{P} \rightarrow \text{PtdIns}(3,4)\text{P}_2$, $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2 \rightarrow \text{PtdIns}(3,4,5)\text{P}_3$. Липидные продукты PI3K служат для локализации и активации добавочных сигнальных молекул Ras и PKB (protein kinase B, известной еще и как Akt) вблизи мембраны.

PI3K — гетеродимерный белок, состоящий из регуляторной субъединицы p85 (которая содержит домены SH2 и SH3) и каталитической субъединицы p110. Как только p85 фосфорилирована, активируется p110 и активирует в свою очередь киназу PKB/Akt и транскрипционный фактор NF-κB. ИЛ-3 индуцирует ассоциацию тирозинфосфатазы SHP2 с адапторным белком, который прикрепляет PI3K к клеточной мембране, богатой липидными субстратами. Итак, основными мишенями PI3K являются PKB/Akt и NF-κB, а также p70S6K (p70 ribosomal S6 kinase).

Фосфорилирование проапоптозного белка Bad по серину-112 и серину-136 проявляется в его ассоциации с цитозольным шаперонным белком 14-3-3 и вытеснении из комплекса с Bcl-XL в митохондрии. Фосфорилирование по серину-136 осуществляют протеинкиназы PI3K и PKB и тем самым предотвращают апоптоз. Фосфорилирование по серину-112 происходит MEK-зависимым путем, и именно оно главным образом регулирует ассоциацию Bad с Bcl-XL. Фосфорилирование по серину-112 может происходить и PI3K-зависимым путем в тех случаях, когда PI3K способствовала активации MAP-киназного пути. Многие цитокины способны активировать PI3K-путь, но результат этой активации, особенно фосфорилирование Bad, зависит от клеточного контекста. Фосфорилирование транскрипционных факторов — сложная область, так как

некоторые из этих событий активируют, а другие ингибируют соответствующий белок.

Отмена цитокиновой зависимости часто связана с опухолевой трансформацией и ассоциирована с аутокринной экспрессией ростовых факторов. Например, клетки, трансформированные к цитокин-независимости онкобелком Raf, экспрессируют ростовой фактор GM-CSF на высоком уровне, достаточном для их собственной пролиферации. Raf — семейство серин/треонинкиназ, которые являются мишенью активации многими цитокиновыми рецепторами. Они проводят сигналы от Ras, Src-подобных тирозинкиназ, PKC, KSR (kinase suppressor of Ras) к MEK1-киназе с двойной, тирозин- и серин/треонинкиназной, специфичностью. A-Raf — самый слабый сигнальный трансдуктор и слабый индуктор белка-ингибитора клеточного цикла p21^{CIP1} оказался самым эффективным в отмене цитокиновой зависимости. Существует сложный запутанный баланс между промоцией роста и промоцией остановки клеточного цикла белками Raf.

Дерегулированное серин/треонинфосфорилирование молекул STAT (signal transducer and activator of transcription) вовлечено в патогенез ХЛЛ, наиболее распространенной в США формы лейкоза, при которой у пациентов белки STAT1 и STAT3 конститутивно фосфорилированы по серину-727. Это наблюдение имеет клиническое значение, так как лечение пациентов с ХЛЛ флударабином приводит к специфической потере активности STAT1. Пуриновый аналог флударабин — на сегодня самый эффективный химиотерапевтический препарат против ХЛЛ. 80–90% пациентов отвечают на лечение флударабином, но ответ непродолжителен, а кроме того, сопровождается тяжелым иммунодефицитом. Идентификация киназ, фосфорилирующих STAT1, и его мишеней поможет улучшить лечение ХЛЛ и других болезней.

Цитоплазматические протеинкиназы и протеинфосфатазы могут быть классифицированы на основе их субстратной специфичности. Практически все они воздействуют либо на тирозиновые, либо на серин/треониновые остатки в молекулах своих белковых субстратов. Идентифицированы также киназы и фосфатазы с двойной, тирозин- и серин/треониновой, специфичностью. Фосфорилирование (протеинкиназами) и дефосфорилирование (протеинфосфатазами) тирозиновых, сериновых и треониновых остатков играют решающую роль в сигнальных межпротеиновых взаимодействиях и катализе.

2.3. БЕЛКОВЫЕ СИГНАЛЬНЫЕ МОЛЕКУЛЫ

Межпротейновые взаимодействия, которые играют важную роль в сборке и функционировании мультикомпонентных комплексов сигнальной трансдукции, осуществляются посредством нескольких структурных мотивов, часто встречающихся в молекулах сигнальных протеинкиназ, а также адапторных (стыковочных) белков, не имеющих каталитической функции. К наиболее распространенным мотивам сигнальных белков относятся домены SH1, SH2 и SH3 (Src homology). Белки, лишенные каталитической активности (киназного домена SH1), но содержащие интактные домены SH2 и SH3, обладают трансформирующей способностью. Домены SH2 взаимодействуют с последовательностями, содержащими фосфотирозиновые остатки. Функциональные последствия этой ассоциации заключаются в прямой или опосредованной активации специфического фермент-субстратного взаимодействия. Специфичность протеин-протеинового связывания определяется коротким (из 4–6 аминокислот), С-терминальным по отношению к фосфотирозinovому остатку фрагментом молекулы-субстрата и поддерживается высокой эволюционной консервативностью первичных последовательностей фосфотирозинсодержащих пептидов. SH2-домены связывают субстрат последовательность-специфичным образом, распознавая один аминокислотный остаток или более в позиции 1–6 с С-терминальной стороны от фосфотирозина.

Лиганды для доменов SH3 содержат полипролиновые последовательности, которые принимают спиралевидную конфигурацию при связывании с SH3-доменами. Функциональные последствия связывания с SH3-доменами те же, что описаны для SH2-доменов, т.е. привлечение и активация адапторных белков и протеинкиназ, а также определение их клеточной локализации. Многие адапторные белки содержат несколько SH2- и SH3-доменов, благодаря которым они могут участвовать в сборке мультивалентных сигнальных комплексов в ответ на активацию рецепторов, ассоциированных с тирозинкиназной активностью.

Домен SH2 – наиболее распространенный инструмент распознавания специфических фосфорилированных тирозинов в молекулах активированных рецепторных протеинтирозинкиназ (РТК) и их мишенях (рис. 2.2, см. вклейку). Его открытие (впервые в молекуле Src-киназы, а затем и в других тирозинкиназах) было прорывом в понимании того, как активированные РТК распространяют сигнал – как ассоциация двух белков может быть индуцирована

фосфорилированием. Позднее были обнаружены другие типы фосфотирозинсвязывающих доменов (PTB, P.Tyr-binding), но преобладающим типом фосфотирозинсвязывающих доменов, участвующих в сигналинге, является SH2.

SH2- и PTB-взаимодействия используются как средство привлечения белков-мишеней к активированным РТК и для их транслокации к плазматической мембране, где находятся субстраты многих эффекторных белков, активированных рецепторными РТК (такие как фосфолипаза $C\gamma$ и PI3K). SH2/PTB-домены присутствуют не только в белках с ферментативной активностью, регулируемой тирозинфосфорилированием, но и в так называемых адапторных белках (например, GRB2), которые связывают и доставляют эффекторные белки (белки-мишени в сигнальном каскаде) к плазматической мембране. Рецептор-индуцированное привлечение белков к плазматической мембране как механизм активации сигнальных путей является ключевым моментом сигнальной трансдукции.

После идентификации SH2-домена было установлено, что большинство индуцибельных и конститутивных межпротениновых взаимодействий, вовлеченных в сигнальную трансдукцию, обеспечивается модульной природой белков. В сигналинге, индуцированном рецепторными РТК и другими протенинкиназами, участвуют различные домены размером 40–150 аминокислотных остатков. Среди них домены SH2, PTB, SH3, WW, FHA, SAM, LIM, PX, EH, EVH1 и PDZ. Домены в белковой молекуле располагаются в линейной последовательности и своими amino- и карбокситерминальными концами соединяются с другими доменами, подобно бусинам на нитке. Как и домен SH2, большинство этих доменов распознают короткие линейные последовательности из 4–10 аминокислотных остатков. Фосфорилирование специфических сериновых, треониновых или тирозиновых остатков в распознаваемых последовательностях этих доменов обеспечивает индуцибельную ассоциацию белковых молекул.

Домен PH (или PHD, pleckstrin homology domain) обнаружен как в сигнальных, так и в цитоскелетных белках. Хотя гомология первичных последовательностей доменов PH из разных источников значительно ниже, чем у доменов SH2 и SH3, высокой консервативностью отличается их трехмерная структура.

Домены, вовлеченные в мембранный сигналинг, могут распознавать не только белковые молекулы. Например, домены PH распознают специфические фосфолипиды и участвуют в индуцибельной мембранной ассоциации, зависящей от вторичных липидных мессенджеров. Домен PH протенинкиназ PDK1 и Akt/PKB распоз-

нает и связывает белок PIP3, и это промотирует их привлечение к мембране в ответ на фосфатидилинозитол-3-киназную активацию и приводит к активации киназы Akt/PKB киназой PDK1. Изменение уровня ионов кальция может регулировать мембранную ассоциацию белков через кальций-зависимое взаимодействие доменов C2/CalB с фосфолипидами.

Идентифицированы фосфосеринсвязывающие домены, которые также играют роль в распространении сигнала, облегчая зависящие от фосфорилирования белковые взаимодействия, например, связывание ко-активаторного белка CBP с транскрипционным фактором CREB после фосфорилирования последнего по серину-133.

Домены SH2, SH3 и PH характерны для цитоплазматических межпротениновых взаимодействий, тогда как ядерные транскрипционные факторы содержат другие аминокислотные мотивы, например, полилейциновые «молнии» (leucine zippers).

Структурный анализ сигнальных белков. Анализ линейной и трехмерной структуры сигнальных белков обнаружил новые и неожиданные принципы регуляции. Например, в некоторых протеинкиназах так называемая активационная петля действует как негативный регулятор активности, блокируя связывание АТФ и/или субстрата, и вращение С-спирали в аминотерминальной области молекулы используется как регуляторный механизм.

Пример 1. В ингибированном (фосфорилированном по тирозину-527) состоянии тирозинкиназы c-Src ее SH2- и SH3-домены, расположенные в стороне от каталитического домена, связываются с фосфотирозином и линкерной последовательностью соответственно вместо того, чтобы блокировать доступ субстрата к каталитическому центру, как ожидалось. Активность Src-киназы ингибируется в результате конформационного изменения, которое приводит к вращению С-спирали и искажению активного сайта.

Пример 2. Димерная структура белка RPTP α (receptor protein-tyrosine phosphatase- α) является причиной того, что активность данной рецепторной фосфотирозинфосфатазы может негативно регулироваться через взаимодействие симметричных димеров, в котором НТН(helix-turn-helix)-мотив одного мономера блокирует доступ к активному (каталитическому) центру другого.

Пример 3. Аминотерминальный домен SH2 тирозинфосфатазы Shp2 связывается с ее же каталитическим центром и блокирует доступ субстрата к нему. При связывании протеинфосфатазы с доменом SH2 фосфотирозинсодержащего белкового лиганда происходит открывание активного сайта в молекуле Shp2.

Пример 4. Структура Ras и других G-белков, связывающих ГДФ и ГТФ, такова, что гидролиз ГТФ проявляется в конформационном блокировании связывания с эффекторными белками.

Структурный анализ протеинкиназ и фосфатаз является теперь рутинным этапом в создании лекарств, ингибирующих каталитическую активность или блокирующих молекулярные взаимодействия, для лечения болезней deregулированного сигналинга, преимущественно злокачественных. Структура протеинкиназ, связывающихся с белковыми (p16, p21 и др.) и низкомолекулярными синтетическими химическими ингибиторами, определяет механизмы, которыми осуществляется ингибирование и достигается избирательность взаимодействий.

Точечная мутация в субстрат-связывающих доменах (например, в домене WW, связывающем фосфосерины в фосфосеринпролиновых мотивах) рецепторной протеинкиназы может изменить ее лиганд-специфичность. Это предвещает возможность существования уникальных сигнальных путей с необычными сигнальными компонентами. Функциональное различие фосфорилированных и нефосфорилированных форм протеинкиназ обусловлено тем, что добавление фосфата может индуцировать локальное конформационное изменение, повышающее сродство к субстрату (например, гликогенфосфорилаза) или блокирующее связывание с субстратом (изоцитратдегидрогеназа).

Пространственные аспекты СТ. Замечено, что протеинкиназы, фосфатазы и их субстраты дискретно локализуются в клетке и это определяет специфичность фосфорилирования. Сигнальные компоненты сложно организованы на плазматической мембране, в цитоплазме и ядре в дискретные сигнальные комплексы. Традиционное представление, что СТ вовлекает свободно диффундирующие структуры, оказалось справедливым только для вторичных мессенджеров типа цАМФ, тогда как численно преобладающие протеиновые компоненты передают сигнал в полужидком состоянии с минимальной свободной диффузией. Возможен направленный транспорт сигнальных белков посредством филаментоподобных или везикулярных транспортных структур. Сигналы канализируются специфическими путями от мембраны к ядру и другим клеточным мишеням, и за трансляцию сигнала ответственны специальные клеточные компартменты. Этим обеспечиваются эффективность и специфичность СТ. Для локализации и прикрепления протеинкиназ и фосфатаз к их субстратам в особых местах клетки часто используются так называемые якорные (прикрепляющие и поддерживающие) структурные

белки. Это усиливает эффективность и специфичность фосфорилирования субстрата и координирует действия протеинкиназ и фосфатаз. Наиболее изучены якорные белки AKAP, которые используются для фиксации PKA-киназы к специальным местам в клетке. Например, белок AKAP18, локализованный на мембране, связывается с PKA и ее мишенью — кальциевым каналом L-типа.

Якорные белки известны и для TGF β RI, например, белок SARA используется для привлечения белков Smad-семейства и фиксации сигнального комплекса к дискретным мембранным областям. Несомненно, множество других якорных белков предстоит открыть в будущем.

Существуют различные способы доставки сигнальных компонентов через формирование мультипротеиновых комплексов, которые обустраиваются и поддерживаются специальными структурными белками для последовательного соединения компонентов сигнальных путей. Примером может служить строительно-вспомогательный белок Ste5, который взаимодействует с протеинкиназами Ste7, Ste11 и Fus3p/Kss1p в феромоновом сигнальном MAPK-пути. Важным свойством многих строительно-вспомогательных белков является способность к димеризации, которая делает возможной трансфосфорилирование между молекулами протеинкиназ, связанных с различными субъединицами димера.

Неслучайная локализация сигнальных белков является фундаментальным принципом СТ, и пространственное разделение белков широко используется как механизм предотвращения спонтанной сигнальной активации. Локальное перемещение белковых молекул происходит при индуцибельной мембранной ассоциации цитоплазматических белков с фосфотирозинсвязывающими доменами, при активации сигнальных белков в клетке и при транслокации их в ядро и из ядра. Например, фосфорилирование транскрипционных факторов семейства STAT по тирозину индуцирует их димеризацию и ядерный импорт, а фосфорилирование киназой Akt/PKB транскрипционного фактора FKHR проявляется в его ядерном экспорте. Везикулярная транслокация белков тоже может использоваться как механизм СТ. Например, большинство лигандов индуцирует эндоцитоз их рецепторов посредством специализированных для выполнения сигнальных функций везикул.

Сигнальные сети и сигнальная специфичность. Одна из целей изучения сигнальных сетей — объяснить, как достигается сигнальная специфичность, если одни и те же кодовые сигнальные пути, активированные разными рецепторами, вызывают различные клеточ-

ные ответы. Например, почему активация фосфатидилинозитол-3-киназы инсулиновым рецептором приводит к таким метаболическим ответам как транслокация переносчика глюкозы GLUT4, а активация этой же киназы рецепторами ростовых факторов в той же самой клетке — нет? Сигнальная специфичность может быть результатом активации уникальных сигнальных путей рецепторами. Либо, поскольку клеточные ответы отражают интеграцию сигналинга по всем путям, активированным одним и тем же рецептором, сигнальная специфичность может быть результатом уникальной комбинации сигнальных путей, активированных этим рецептором. Рецепторные РТК используют не только аутофосфорилирование по тирозину, но и специальные белки, изолирующие фосфорилированный сайт (например, IRS1 и IRS2 для инсулинового рецептора и FRS2 для FGF- и NGF-рецепторов), для разделения сигналинга и обеспечения специфичности. Точная локализация лиганд-активированных рецепторов на клеточной поверхности может предопределять путь, подлежащий активации, т.е. пространственное разделение — это еще один способ обеспечить специфичность. Различные тканеспецифичные ядерные ответы на активацию определенного рецептора могут быть объяснены экспрессией различных репертуаров внутриклеточных сигнальных белков, включая транскрипционные факторы, и распределением активных участков хроматина, доступных для индукции транскрипции в каждом типе клеток.

Очевидная избыточность сигнальных путей доказывается тем, что мутация индивидуального сайта фосфорилирования по тирозину в рецепторных РТК часто не отменяет специфический ответ, индуцируемый рецепторной активацией. Это может объясняться существованием более чем одного способа активации определенного сигнального пути, как, например, Ras/MAP-киназный путь, который может быть активирован несколькими различными механизмами. Такое часто наблюдается в семействах близкородственных белков, где возможна и функциональная избыточность. Хороший пример — Src-семейство, где белки c-Src, Fyn, c-Yes обычно ко-экспрессируются и где любой из них может быть достаточен для распространения сигнала.

Src-семейство тирозиновых протеинкиназ является частью комплексной сети внутриклеточных путей передачи сигналов, состоит из ряда родственных молекул (Src, Fyn, Yes, Lck, Blk, Lyn, Hck, Yrk, Fgr), чьи биологические функции не до конца изучены. Src, Fyn и Yes повсеместно экспрессируются в клетках млекопитаю-

щих, тогда как экспрессия остальных членов семейства более ограничена. Онкоген c-Src — основной член этого большого семейства, представляет собой клеточный гомолог вирусного онкогена v-Src, ответственного за развитие саркомы птиц (Rous' sarcoma). Дальнейшее обсуждение касается в основном его. Белок Src локализуется в тех же областях цитоплазмы, где находятся интегриновые кластеры так называемой фокальной адгезии в фибробластах и кадерин-опосредованной межклеточной адгезии в эпителиальных клетках. Перемещение активированного протеина Src из перинуклеарной области к клеточной периферии необходимо для организации актинового цитоскелета.

Молекулярная структура и регуляция. Структура молекулы Src показана на рис. 2.2. В числе субстратов Src-киназы она сама (аутофосфорилирование по тирозину-416), регуляторная субъединица p85 фосфатидилинозитол-3-киназы (PI3K) и киназа фокальной адгезии FAK. Эти и другие субстраты Src-киназы взаимодействуют с ее SH-доменами (доменами Src-гомологии, SH3 и SH2) своими полипролиновыми и фосфотирозин-содержащими последовательностями соответственно. Карбокситерминальный тирозин-527 молекулы Src регулирует ее каталитическую активность. Фосфорилирование тирозина-527 вызывает такое конформационное изменение молекулы, вследствие которого он взаимодействует с ее собственным SH2-доменом и инактивирует его. Потеря этого регуляторного участка молекулы, как и замена тирозина-527 другим аминокислотным остатком, может служить примером активирующей онкогенной мутации, так как только тирозин-527 и только в фосфорилированном состоянии, связываясь с доменом SH2, замыкает молекулу и лишает ее тирозинкиназной активности (рис. 2.2). Белок c-Src инактивируется тирозинкиназой Csk, которая фосфорилирует тирозин-527.

Роль Src в клеточном росте и выживании. Молекулярные события, сопровождающие активацию Src-киназы, в точности не известны, но ее роль в СТ проявляется в регуляции генной экспрессии, прогрессии клеточного цикла, усилении клеточной подвижности, инвазивности, адгезии. Один из регулируемых ею эффекторов — митоген-активирующая протеинкиназа MAP (mitogen activated protein) участвует в регуляции транскрипционного комплекса AP-1 (activator protein 1), без которого невозможен процесс инвазии. Сама Src-киназа является эффектором индуцированной ростовыми факторами прогрессии клеточного цикла и активирует митоз-специфичный субстрат SAM68. Src-киназа принимает участие и в сигнальных путях клеточного выживания, в частности, она может быть

звеном между активированными лимфокиновыми рецепторами и ингибированием апоптоза через активацию Akt-киназы.

Роль Src-киназы в опухолях человека. Активирующая онкогенная мутация (замена тирозина-527 в молекуле Src-киназы), которая подобна по своим функциональным последствиям делеции карбокситерминального района и придает гену трансформирующие свойства, присущие v-Src, обнаружена в подгруппе высокоагрессивных метастазирующих колоректальных опухолей. Экспрессия и активность Src-киназы повышены во многих опухолях человека, включая опухоли молочной железы, яичника, головы и шеи, поджелудочной железы, а также в клеточных линиях из опухолей молочной железы. Таким образом, получены доказательства того, что усиленная экспрессия Src-киназы способствует развитию эпителиального рака.

Тирозинкиназа FAK (focal adhesion kinase) впервые обнаружена вместе с интегриновым кластером как фосфорилированный по тирозину белок в сайтах клеточной фокальной адгезии Src-трансформированных клеток. Первичная аминокислотная последовательность ее весьма консервативна и различается у курницы, мыши и человека не более чем на 10%. Молекула FAK содержит центральный каталитический домен и ряд сайтов межбелкового взаимодействия, включая два полипролиновых домена, которые могут связывать p130^{CAS} и другие белки, ассоциированные с клеточной миграцией. Регуляция активности FAK осуществляется альтернативным сплайсингом, в результате которого происходит автономная экспрессия карбокситерминальной части молекулы, называемой FRNK (FAK-related non-kinase), которая действует как молекулярный ингибитор процессов, контролируемых белком FAK. Кроме этого способа регуляции, существует механизм, в котором FAK сама является объектом регуляторного фосфорилирования. Она аутофосфорилируется по тирозину-397, что повышает киназную активность после связывания интегрин. В клетках, трансформированных геном Src, несущим активирующую мутацию, FAK фосфорилирована по нескольким другим тирозиновым остаткам. Интегрин-индуцированное аутофосфорилирование тирозина-397 создает в молекуле FAK высокоаффинные Src-специфичные фосфоакцепторные сайты, а также сайты связывания p85 — регуляторной субъединицы PI3-киназы. Связывание с Src-киназой способствует активации Src-киназы и усиливает фосфорилирование FAK. FAK также является медиатором интегринового сигнального пути, который требует активации MAP-киназы ростовыми факторами, хотя существует и FAK-независимый механизм интегрин-индуцированной MAP-киназной активности.

Функция FAK. Тирозинкиназа FAK может способствовать опухолевой трансформации различными механизмами, так как она связана со многими ключевыми аспектами клеточной регуляции и является точкой пересечения ряда сигнальных путей, ассоциированных с клеточной адгезией, митогенезом и онкогенной трансформацией. Роль FAK в адгезии комплексная. Src-индуцированное фосфорилирование FAK связано с разрушением фокальной адгезии в процессе трансформации. FAK-дефицитные мыши погибают в раннем эмбриональном периоде в результате аномальной гастрюляции, а клетки, полученные из таких эмбрионов, проявляют дефект миграции в результате ослабления фокальной адгезии. Роль FAK в клеточной миграции была подтверждена введением мутантного гена FAK, дефектного по домену киназной активности. Ингибирование фокальной адгезии подавляет клеточную пролиферацию и подвижность. Таким образом, активная FAK участвует в динамической регуляции интегриновой фокальной адгезии во время клеточной миграции, а усиленная экспрессия FAK через взаимодействие с p130^{CAS} может стимулировать клеточную миграцию.

На роль FAK в сигнальных путях клеточного выживания указывает то, что ингибирование FAK $\beta 1$ -интегрином, который связывает FAK, или FAK-специфичными антителами вызывает апоптоз. Напротив, экспрессия конститутивно активированной FAK предотвращает клеточную гибель после отделения клетки от ЭКМ. Редуцированная экспрессия FAK в опухолевых клетках в результате гибридизации с антисмысловыми олигонуклеотидами или доминантно-негативной мутации приводит к потере адгезивных свойств и апоптозу. При апоптозе, индуцируемом разнообразными факторами во множестве клеточных типов, обнаружена деградация белка FAK протеазами (каспазами). Следовательно, дерегуляция FAK будет влиять на способность раковых клеток умирать в ответ на апоптоз-индуцирующие стимулы, которые убивают их нормальные аналоги.

Фосфатидилинозитол-3-киназа (phosphatidylinositol-3-kinase, PI3K) фосфорилирует инозитольные липиды в 3'-положении инозитольного кольца с образованием PI-3-фосфатов (PI-3-монофосфата, PI-3,4-бифосфата и PI-3,4,5-трифосфата). Эти липидные продукты участвуют в ряде клеточных процессов, включая пролиферацию, выживание, реорганизацию цитоскелета и мембранный транспорт.

PI3K представляет собой гетеродимер, состоящий из регуляторной субъединицы 85 кДа и каталитической субъединицы 110 кДа. Регуляторная субъединица содержит два SH2-домена и один SH3-

домен. Эти домены непосредственно взаимодействуют с белками СТ — рецепторами ростовых факторов, активированными связыванием с их лигандами, и активированными онкогенами, такими как c-Src и c-Abl. Трансформирующая способность некоторых онкогенов обусловлена их конститутивно активированным состоянием и вследствие этого постоянным взаимодействием с PI3K. Онкогенный потенциал PI3K подтверждается трансформирующей способностью ее каталитической субъединицы.

PI3K и клеточное выживание. Трансформация клеток онкогенами Ras и Src придает клеткам способность расти и выживать в суспензии. Этот феномен имеет большое значение для опухолевой прогрессии, так как метастазирование в отдаленные области организма зависит, по крайней мере отчасти, от способности клеток выживать в циркуляции. Активированная форма PI3K защищает клетки от гибели, индуцированной отделением от ЭКМ. Этот эффект PI3K обусловлен активацией эффекторной молекулы PKB/Akt. Активация Akt-киназы происходит путем ее взаимодействия с PI-3,4-бифосфатом или PI-3,4,5-трифосфатом, сопровождающего ее транслокацией Akt к плазматической мембране.

Фосфатидилинозитол-3-киназный путь сигнальной трансдукции и канцерогенез. Доказательство роли PI-3-киназного пути СТ в канцерогенезе получено при изучении физиологического антагониста PI3K — опухолесупрессорного белка PTEN, известного еще как MMAC и TEP-1. Дерегуляция PI3K приводит к злокачественной трансформации. В 86% образцов колоректальных опухолей активность PI3K была повышена по сравнению с прилежащей нормальной слизистой, причем повышенный уровень активности PI3K (и ее субстрата Akt-киназы) обнаруживается в PTEN-дефицитных опухолевых клетках.

Ген PTEN (phosphatase and tensin homolog) локализован на хромосоме 10q23 и является одним из наиболее распространенных мутантных генов в опухолях человека. Делеции этого локуса встречаются в опухолях предстательной железы, эндометрия, почки, легкого и меланомах, но особенно часто в глиомах поздних стадий. Наследственные мутации гена PTEN обнаружены при синдромах Cowden и Bannayan-Zonana, характеризующихся предрасположенностью к злокачественным опухолям молочной и щитовидной желез. Белок PTEN обладает двойной специфичностью и дефосфорилирует фосфорилированные по тирозину и серину/треонину белки, а также вторичный липидный мессенджер, основной клеточный продукт PI3K — PI-3,4,5-трифосфат. Липидфосфатазная активность имеет важное значение

для опухолесупрессорной функции PTEN. Восстановление экспрессии PTEN в опухолевых клетках, лишенных ее, восстанавливает негативный контроль роста. Идентифицированы различные механизмы супрессии роста белком PTEN, которые зависят от клеточного типа. Остановка клеточного цикла в фазе G1 наблюдается в клетках глиобластомы и почечной карциномы, а индукция апоптоза — в опухолях предстательной и молочной желез. Эти эффекты могут быть преодолены экспрессией конститутивно активированной Akt-киназы. Соответственно PTEN-дефицитные фибробласты имеют повышенную активность Akt и резистентны к проапоптозным стимулам. На рис. 2.3 показано влияние экспрессии PTEN на сигнальную трансдукцию. Трансфер нормальной копии гена PTEN восстанавливает нормальную регуляцию Akt-киназы (через регуляцию циклина D1) и чувствительность к апоптозу.

Клиническое значение этих знаний. Широко распространенное вовлечение протеинкиназ и фосфатаз в патогенез злокачественных

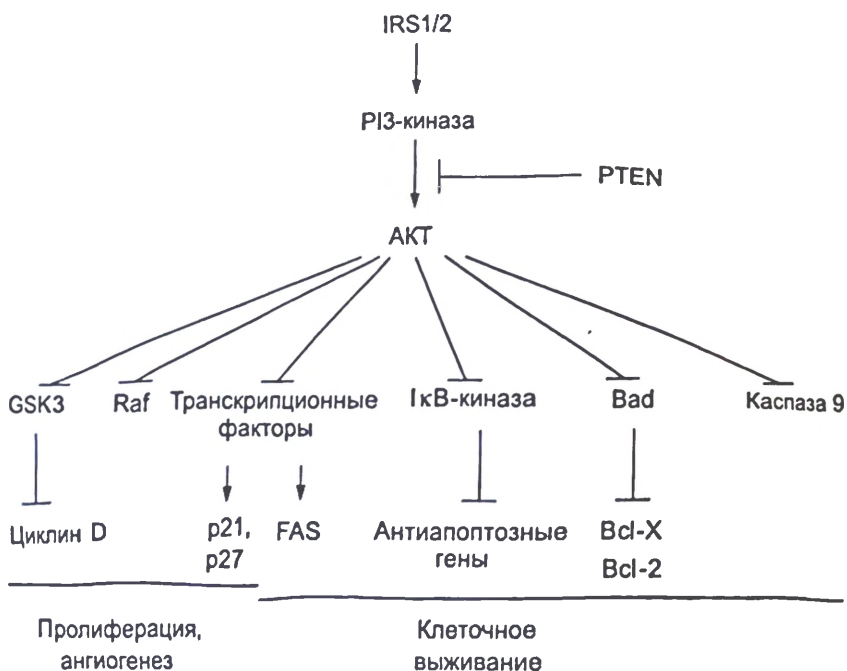


Рис. 2.3. Действие опухолесупрессорного белка PTEN на сигнальную трансдукцию. GSK3 — glycogen synthase kinase 3, остальные символы в тексте.

опухолей обусловило усиленный поиск химических агентов, активирующих или, чаще, ингибирующих их. Такие агенты можно разделить на две основные категории: моноклональные антитела или модифицированные протеиновые лиганды и низкомолекулярные синтетические вещества.

Например, 1) разработана группа низкомолекулярных ингибиторов рецепторов фактора VEGF, существенного для опухолевого ангиогенеза; 2) моноклональное антитело Herceptin — антагонист рецептора EGF белка ErbB2, который уже поступил в продажу и используется в адъювантной терапии рака молочной железы (опухоли с гиперэкспрессией ErbB2, которые составляют значительную часть случаев); 3) вещество CGP57148 — ингибитор онкобелка BCR-ABL, эффективный при лечении ХМЛ; 4) синтетическое низкомолекулярное соединение AG1296 избирательно ингибирует фосфорилирование тирозинкиназного рецептора Flt3. Flt3 является членом FLT-семейства тирозинкиназных рецепторов типа III (вместе с рецепторами PDGF и гемопозитическими рецепторами c-kit и Fms) и компонентом PI3K-, Ras/GTase- и JAK/STAT-путей СТ. Все эти противоопухолевые агенты оказывают антипролиферативное действие, ингибируя СТ на разных этапах и индуцируя апоптоз. Этот подход пригоден для лечения не только злокачественных заболеваний, но и других генетических болезней, связанных с мутациями протеинкиназ и фосфатаз: мнотонической дистрофии, периферической нейропатии, инсулинонезависимого диабета, разнообразных синдромов.

2.4. ВНУТРИКЛЕТОЧНЫЕ СИГНАЛЬНЫЕ ПУТИ

2.4.1. G-белки

ГТФ-связывающие белки исполняют в клетке роль молекулярных переключателей, регулирующих ряд физиологических процессов. К ним относятся гетеротримерные G-белки, состоящие из α -, β - и γ -субъединиц, и семейство мономерных Ras-белков (Ras, Rho, Rac, Cdc42, TC21/R-Ras, Rab и Ran). Эти белки связывают гуанозинтрифосфат (ГТФ) и гуанозиндифосфат (ГДФ), и возникающие в результате конформационные изменения приводят молекулу протеина в состояние «включен» или «выключен». Позитивные регуляторы или их мишени (эффекторные белки) приводят их в ГТФ-связанное состояние, в котором они активно участвуют в СТ. Негативные регуляторы стимулируют свойственную G-белкам и

белкам Ras-семейства ГТФазную активность, возвращая их в ГДФ-связанное «выключенное» состояние. Стабильное ГТФ-связанное состояние, которое может возникнуть в результате, например, мутации α -субъединицы, может привести к конститутивной активации переключателя.

G-белки продуцируются как физиологически неактивные молекулы-предшественники и превращаются в зрелые белки после серии посттрансляционных модификаций, придающих им гидрофобные свойства, важные для межпротеиновых взаимодействий. Активация рецепторов, соединенных с G-белками, приводит к диссоциации α -субъединицы от β - и γ -субъединиц, в результате чего и α -субъединица, и β/γ -субъединица приобретают эффекторные функции. В трансдукции митогенного сигнала с этих рецепторов β/γ -димерный комплекс активирует MAP-киназный каскад через протеинкиназу C (protein kinase C, PKC). PKC-зависимая активация MAP-киназного каскада — основной, «классический» путь митогенной и онкогенной СТ. α -субъединицы некоторых G-белков также могут функционировать в качестве онкогенов. Некоторые мутации α -субъединицы лишают G-белки ГТФазной активности и оставляют их в конститутивно активированном ГТФ-связанном состоянии, благодаря которому они приобретают онкогенный потенциал.

Белки суперсемейства Ras. Важным этапом в изучении СТ было открытие большого мультигенного семейства маленьких мономерных G-белков, служащих молекулярными переключателями сигналинга, главным представителем которого является белок Ras. Каждая клетка организма содержит минимум 3 близко-родственных, но различных белка Ras-семейства. Активирующие онкогенные мутации в генах Ras-белков проявляются в конститутивном сигналинге (стабильной непрерывной передаче митогенного сигнала), неконтролируемой пролиферации и ингибиции апоптоза. Такие мутации в генах Ras присутствуют в 30% опухолей человека: мутации Ki-Ras часто встречаются в колоректальных, панкреатических карциномах и в немелкоклеточных карциномах легкого, Ha-Ras — в карциномах мочевого пузыря, почки и щитовидной железы, N-Ras — в гепатоклеточной карциноме, меланоме и гематологических опухолях.

Белки суперсемейства Ras регулируют митогенный сигналинг (белки Ras-семейства), организацию цитоскелета (белки Rho и Rac), ядерные функции (Ran), мембранный и белковый транспорт (Rab). Семейство Ras включает белки Ha-Ras, Ki-Ras, N-Ras и R-Ras/TC21, которые обладают трансформирующей активностью, так как уча-

ствуют в трансдукции множества сигналов от рецепторов ростовых факторов (таких как PDGF — platelet-derived growth factor, EGF — epidermal growth factor и FGF — fibroblast growth factor) и интегринов. Связываясь с лигандом, рецепторы димеризуются и аутофосфорилируются по тирозиновым остаткам, что является предпосылкой их активации, привлечения и активации протеинкиназ, таких как тирозинкиназы Src и FAK (focal adhesion kinase). Эти киназы способны запускать в клетке множество биохимических ответов, в том числе активацию Ras-белков и стимуляцию Ras-зависимых путей СТ. Адапторные молекулы GRB2 и SHC, соединяясь с фосфорилированными тирозинами в молекуле рецептора, активируются и связываются с полипролиновыми последовательностями белка SOS. Активированный белок SOS (son-of-sevenless — акроним его гомолога, обнаруженного у дрозофилы), который является фактором нуклеотидного обмена, облегчает освобождение белка Ras от ГДФ и стабилизирует его в свободном от связи с ГДФ состоянии. Сразу после этого Ras быстро ассоциируется с ГТФ, так как концентрация последнего в клетках 10-кратно превышает концентрацию ГДФ. В таком ГТФ-связанном состоянии Ras может взаимодействовать со специфическими эффекторными белками, опосредующими следующие этапы СТ, в том числе протеинкиназами Raf и MEK (MAP-kinase/ERK-kinase), которые инициируют активацию MAP(mitogen-activated protein)- и SAPK(stress-activated protein kinase)-киназных каскадов, с фосфоинозитидкиназой PI3K (phosphoinositide 3'-hydroxykinase) и нейрофиброминном — продуктом гена NF-1 (neurofibromatosis type 1), также проявляющим GAP-подобную активность. (Следует отметить, что каждый из этих эффекторных белков непосредственно связывается с Ras в составе мультипротеиновых комплексов, но может быть активирован и без участия Ras-семейства, например, прямым взаимодействием с клеточно-поверхностными рецепторами.)

Таким образом, трансдукция митогенного сигнала в ядро через Ras-зависимые сигнальные пути происходит при условии соединения Ras с ГТФ. ГДФ-связанные Ras-белки биологически нейтральны. В своем нормальном физиологическом состоянии Ras расщепляет ГТФ до ГДФ посредством присущей ему, как и всем G-белкам, ГТФазной активности. Анализ функции белка Ras привел к открытию белка GAP (GTPase activating protein), который стимулирует гидролиз ГТФ и таким образом действует как ингибитор Ras-сигналинга. Белок GAP усиливает способность Ras расщеплять ГТФ более чем в 10 000 раз. Протеинкиназа C активирует Ras-путь иначе

тивацией GAP — негативного регулятора белка Ras. Инактивация GAP стимулирует Ras, что проявляется в усилении AP-1-связывающей активности. AP-1 (activator protein 1) может затем стимулировать экспрессию цитокинов, в том числе IL-3.

Практически все мутации гена Ras, которые обнаруживаются в злокачественных опухолях человека, лишают белок ГТФазной активности и приводят к его конститутивной активации, так как Ras остается в ГТФ-связанном состоянии, что придает гену Ras онкогенный потенциал. Такие же последствия имеют мутации гена GAP. Клеточная трансформация, индуцированная конститутивно активированными Ras-белками, сопровождается усилением синтеза ДНК через «классический» MAP-киназный каскад СТ и изменениями клеточной морфологии, которые не зависят от MAP-киназного пути.

Претерпевая С-терминальную липидную модификацию и прикрепляясь к внутренней поверхности плазматической мембраны, белок Ras активируется конверсией соединенного с ним ГДФ в ГТФ, катализируемой факторами обмена ГДФ/ГТФ. Уровень Ras•ГТФ повышается при активации многих типов рецепторов. Таким фактором является белок SOS, который конститутивно ассоциирован через свой SH3-домен с адапторным SH2/SH3-содержащим белком GRB2. Комплекс GRB2/SOS привлекается к активированной рецепторной PTK при связывании SH2-домена белка GRB2 с аутофосфорилированным тирозином в соответствующем аминокислотном контексте, при этом каталитический домен белка SOS приводится в непосредственную близость с белком Ras на плазматической мембране и стимулирует конверсию ГДФ в ГТФ. Однажды активированный Ras•ГТФ взаимодействует с серией эффекторных белков (включая Raf и PI3K), которые инициируют дальнейшую передачу сигнала.

Другие малые G-белки, которые активируются рецептор-индуцированным обменом ГТФ, тоже функционируют как «переключатели» сигнала. Например, G-белки Rho-семейства (Rho, Rac и Cdc42) индуцируют различные сигнальные пути, которые приводят к генной экспрессии, и, что, возможно, не менее важно для сигнальной трансдукции, обуславливают перестройки в актиновом цитоскелете.

Ras был первым сигнальным белком, чья функция была показана как эволюционно консервативная от дрожжей до позвоночных, а сигнальный путь «рецепторная PTK/Ras/MAPK» оказался предвестником открытия многих высококонсервативных сигнальных

путей, сохраняющихся через всю эволюционную вертикаль эукариотического царства.

2.4.2. Путь сигнальной трансдукции Ras/Raf/MEK/ERK

МАР-киназный каскад является основным высококонсервативным модулем СТ, который активируется в ответ на многие ростовые факторы, и одним из наиболее изученных путей трансмиссии митогенных и антиапоптозных сигналов от мембранных рецепторов к транскрипционным факторам. В частности, ген Ras повсеместно экспрессируется и часто мутирует в опухолях человека, поэтому он был одним из первых онкогенов, идентифицированных как мишень химиотерапии. Данный ген кодирует малый мономерный белок, который в ГТФ-связанной форме взаимодействует со своей мишенью — белком из Raf-семейства (рис. 2.4). В 25% опухолей человека (карциномах толстой кишки, поджелудочной железы, легкого, щитовидной железы, при лимфо- и миелопролиферативных заболеваниях и др.) белок Ras присутствует в структурно измененной форме, которая превращает его в непрерывный митогенный

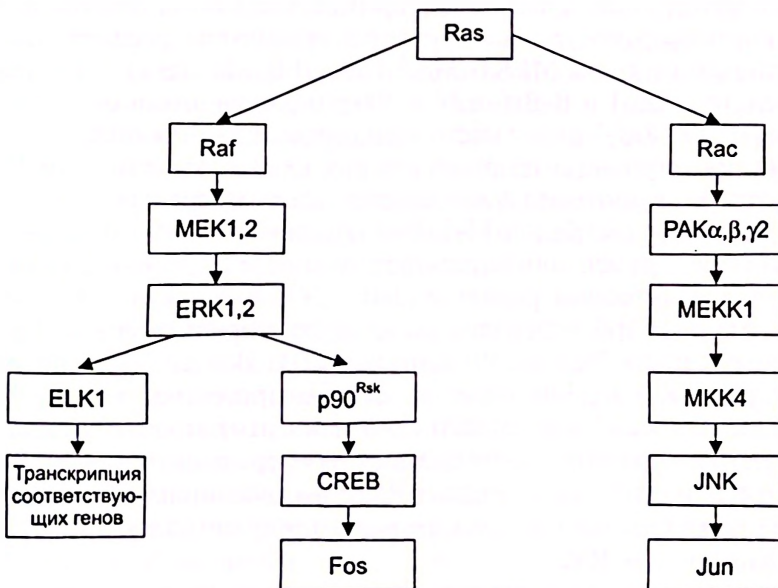


Рис. 2.4. Альтернативные Ras-пути СТ.

сигнал без стимуляции регуляторами, находящимися «выше по течению» сигнального каскада. По всей видимости, ростовые сигнальные пути дерегулированы во всех опухолях человека и остальные 75% опухолей несут дефекты в других компонентах этих путей, образующие фенокопии Ras-активации.

Семейство Ras включает 3 родственных гена: Ha-Ras, Ki-Ras и N-Ras. Повреждение этих генов наблюдается приблизительно у половины пациентов со злокачественными опухолями, обычно это точечные мутации в высококонсервативных кодонах: в 12-м кодоне (Ha-Ras), в 12-м или 13-м (Ki-Ras) и в 61-м кодоне (Ha-Ras, N-Ras), которые превращают Ras-протенины в конститутивно активные. Дерегулированная экспрессия и конститутивная активация, а также мутантные формы Ras наблюдаются в опухолях молочной железы, мочевого пузыря, почки, пищевода, печени, легкого и кроветворной ткани.

Активированный Ras передает митогенный сигнал на белки Raf-семейства, состоящего из трех серин/треонинкиназ Raf-1, A-Raf и B-Raf. Большинство исследований функции Raf выполнено на Raf-1, так как он экспрессируется во всех изученных тканях. Однако, поскольку некоторые лишённые Raf мутанты летальны, ясно, что эти 3 белка имеют уникальные, неперекрывающиеся функции, не полностью компенсирующие одна другую. В отношении фосфорилирования субстрата — белка MEK1 (MAP-kinase/ERK-kinase 1) A-Raf менее активен, чем Raf-1 и B-Raf, в 10 и 500 раз соответственно.

Активация Raf-1 имеет место в индуцированной ростовыми факторами пролиферации гемопоэтических клеток. Неактивный Raf-1 присутствует в цитозоле в связанном с белком-шапероном 14-3-3 виде. Ras вытесняет белок 14-3-3 из комплекса с Raf-1 и открывает его киназный домен, позволяя протеинкиназе c-Src фосфорилировать два регуляторных тирозина (340 и 341) в молекуле Raf-1. Удаление белка 14-3-3 позволяет также дефосфорилировать два регуляторных серина (621 и 259) киназы Raf-1. Все эти модификации активируют Raf-1. Некоторые изоформы протеинкиназы C могут активировать Raf-1 непосредственно или стимулировать аутокринные ростовые факторы, которые в свою очередь активируют Raf-1. При условии фосфорилирования Raf-1 по тирозинам 340 и 341 возможна перекрестная передача сигнала между сигнальными путями JAK/STAT и Ras/Raf.

Удаление аминотерминальных регуляторных доменов связывания с Ras у всех 3 белков Raf проявляется в конститутивной активации этих онкобелков, которые приобретают способность трансформиро-

вать фибробласты и отменять цитокиновую зависимость некоторых гемопозитических клеток. Фосфорилирование тирозинов 340 и 341 является важнейшим этапом этого процесса. Мутации этих аминокислотных остатков в аспарат, имеющий конформационное сходство с фосфорилированным тирозином, превращают Raf-1 в постоянно активную онкогенную структуру. Замена этих тирозинов фенилаланином превращает Raf-1 в белок, неспособный трансформировать клетки.

Некоторые Raf-белки могут промотировать остановку клеточного цикла. Высокий уровень B-Raf и Raf-1 индуцирует экспрессию белка p21^{CIP1} (Cdk-interacting protein), который ингибирует прогрессию клеточного цикла. B-Raf наименее эффективен из Raf-онкопротеинов в отмене цитокиновой зависимости гемопозитических клеток человека. Это может быть отражением усиленной способности B-Raf индуцировать экспрессию ингибиторов пролиферации. Существует специфическое взаимодействие между членами семейств Raf и 14-3-3, которое может модулировать активность белков Raf и регулировать их способность прямо или косвенно фосфорилировать проапоптозный белок Bad.

Дерегулированная экспрессия и конститутивная активация, а также мутантные формы Raf наблюдаются в опухолях молочной железы, мочевого пузыря, почки, пищевода, печени, легкого и кровеносной ткани. Механизмы, ответственные за конститутивную экспрессию активированного Raf, включают точечные мутации, делеции, генные реаранжировки и амплификацию. Встречаются также мутации (замены лизина в АТФ-связывающем сайте каталитического домена), которые являются доминантно-негативными и лишают Raf-1 каталитической активности. Такие мутации ингибируют Ras-индуцированную трансформацию, хотя Ha-Ras может в клетках некоторых типов проводить сигнал, минуя Raf.

В митоген-активированном каскаде Ras/Raf/MEK/ERK серин/треонинкиназа Raf, непосредственный эффектор онкобелка Ras, активируется связыванием с ним на цитоплазматической мембране, фосфорилирует и активирует фермент с двойной специфичностью серин/треонин- и тирозинкиназу MEK1 (MAP-kinase/ERK-kinase 1), которая в свою очередь активирует MAP-киназы ERK1 и ERK2 (p42 и p44). Аминотерминальный домен молекулы содержит негативный регуляторный элемент, делеция которого конститутивно активирует протеинкиназу. Каталитический домен локализован в карбокситерминальной части белка. Raf-1-активация белка MEK1 заключается в фосфорилировании сериновых остатков 218 и 222.

Замещение любого из них аспарагином или глутамином повышает активность MEK1 в 10 и 50 раз соответственно, а замена обоих — в 400–6000 раз. Трансфекция фибробластов такими мутантными формами MEK1 приводит к конститутивной активации ERK1/2. Конститутивная активация протеинкиназы MEK1, как и Raf, ассоциируется с разнообразными опухолями, включая карциномы печени, почки, предстательной и молочной желез, плоскоклеточные карциномы, острый и хронический миелолейкоз. Кроме того, конститутивная активация дистальных членов этого пути способствует инвазии, ангиогенезу, метастазированию, радио- и химиорезистентности.

Белок MEK1 имеет партнера — неферментативный поддерживающий белок MPI, который служит якорем для MEK1 и его субстрата ERK1 и облегчает активацию обоих. MPI функционирует как адаптор, который усиливает эффективность Ras/Raf/MEK/ERK-каскада.

Активированная ERK затем фосфорилирует ряд белковых субстратов, в том числе транскрипционных факторов, которые вызывают повышение транскрипции среднеранних генов клеточного ответа на митогенный сигнал, может входить в ядро, где фосфорилирует несколько ключевых регуляторных белков, например, ELK1 и p90^{Rsk} (рис. 2.4). Регуляторная фосфатаза MKP-1 (mitogen activated protein kinase phosphatase 1), которая активируется митогенными сигналами и уровнем кальция, выключает активированную сигнальную киназу ERK по механизму негативной обратной связи и ингибирует ERK-стимулированный синтез ДНК. Потеря этой контролирующей активности также ассоциируется с неоплазиями.

Конечный этап трансмиссии сигнала по альтернативным Ras-путям СТ — активация транскрипционных факторов в ядре, в том числе c-Jun и c-Fos. c-Jun и c-Fos соединяются в гетеродимер AP-1 (activator protein 1), который связывается с элементами, содержащимися в промоторах многих цитокин-зависимых среднеранних генов, управляющих входением в митоз. Одновременно активируются путем фосфорилирования факторы TAR и ATF3, которые в комплексе с c-Jun участвуют в промоции пролиферации. Удаление ростовых факторов приводит к формированию комплекса JunD/ATF2, который действует как репрессор этого ответа.

Существуют параллельные элементы MAP-киназного каскада, такие как SAPK-киназный путь (stress-activated protein kinase), который активируется в ответ на различные клеточные стрессы, ультрафиолетовое облучение и повышение температуры, и p38-зави-

симый путь, который активируется как элемент воспалительного ответа моноцитов и клеток других типов. Конститутивная активация любого члена этого киназного каскада выводит из-под репрессивного контроля синтез ДНК, пролиферацию и вызывает клеточную трансформацию.

Преходящий характер митогенной активации подразумевает существование механизма негативной регуляции, роль которого играет дезактивирующее дефосфорилирование сигнальных белков. Например, дефосфорилирование фактора гуанин-нуклеотидного обмена белка SOS подавляет активность Ras и всего MAP-киназного каскада.

Интеграция разнообразных экстраклеточных сигналов в унифицированный клеточный ответ осуществляется благодаря относительной субстратной специфичности активированных протеинкиназ и фосфатаз. Белки MAP-каскада ERK, SAPK и p38 содержат различные сайты фосфорилирования, хотя могут быть активированы одними и теми же киназами. Дополнительная специфичность возникает из того обстоятельства, что многочисленные изоформы каждого компонента этого сигнального пути различаются тканеспецифичной экспрессией. При этом возможна и нередко происходит перекрестная передача информации между различными MAP-киназными путями, например, SAPK фосфорилирует белок ELK-1, который является также субстратом для ERK-киназ. Таким образом, модульные киназные каскады с определенными позитивными и негативными регуляторными взаимодействиями обеспечивают тонкий контроль основных клеточных функций.

2.4.3. Ядерная транслокация транскрипционных факторов

NF- κ B (nuclear factor kappa B) — пример цитоплазматического латентного транскрипционного фактора. Он удерживается в цитоплазме через связывание с ингибиторным белком I κ B. Активирующие молекулы индуцируют фосфорилирование I κ B и его убиквитин-опосредованную протеосомную деградацию, освобождая тем самым NF- κ B и позволяя ему мигрировать в ядро. К этому типу регуляторных механизмов относится и система JAK/STAT, в которой связывание лиганда с цитокиновым рецептором активирует ассоциированную с ним протеинтирозинкиназу семейства JAK-киназ. JAK-киназа фосфорилирует специфические транскрипционные факторы STAT, которые после этого димеризуются, мигрируют в ядро и активируют транскрипцию генов-мишеней.

Активация пути Wnt/Frizzled, которая проявляется транслокацией в ядро комплекса β -катенин/LEF1, и активация рецепторов фактора TGF β , которая приводит к фосфорилированию и транслокации в ядро рецептор-специфичных транскрипционных факторов Smad, также иллюстрируют последний этап СТ, который заключается в изменении генной экспрессии под действием активированных транскрипционных факторов.

Ядерные рецепторы. Жирорастворимые лиганды, такие как ретиноевая кислота, эстроген и другие гормоны, могут проходить через плазматическую мембрану, не используя поверхностные рецепторы, и индуцировать клеточные ответы, связывая и активируя цинк-фингерные транскрипционные факторы. Эти так называемые ядерные рецепторы представляют собой простейший из возможных механизмов ядерного сигналинга, хотя изучение транскрипционных ответов обнаруживает удивительно сложный аппарат, в котором рецепторные гетеродимеры, не связанные с лигандом, действуют как репрессоры транскрипции в результате ассоциации с гистондеацетилазами, а связывание с лигандом превращает их в активаторы транскрипции в результате диссоциации гистондеацетилаз и привлечения гистонацетилаз.

Тиреоидный гормон ТЗ также осуществляет свою биологическую активность через взаимодействие со специфическими ядерными рецепторами, которые функционируют как лигандзависимые транскрипционные факторы генов, содержащих промоторные элементы TRE (T response element).

Ядерные рецепторы относятся к наиболее важным медиаторам физиологических функций низкомолекулярных гормонов и других лигандов и содержат два ключевых структурных элемента, ответственных за димеризацию: ДНК-связывающий домен (DNA-binding domain, DBD) в центральной части молекулы и гормон-связывающий домен (ligand-binding domain, LBD) в С-терминальной части. ДНК-связывающий домен имеет характерную структуру и содержит две цинк-фингерные последовательности, посредством которых рецептор связывается со специфическими последовательностями в промоторах определенных генов. Домен LBD, а также N-терминальная часть молекулы рецептора участвуют в трансактивирующей функции.

Обычно ядерные рецепторы находятся в цитоплазме или ядре клетки в латентном состоянии, поддерживаемом белками теплового шока до вступления в контакт с родственными лигандами. Связываясь с лигандами, эти рецепторы претерпевают структурные изменения, индуцирующие их димеризацию и транслокацию в ядро, где лиганд-рецепторный комплекс распознает специфические последо-

вательности ДНК и модулирует транскрипцию соответствующих генов. Результатом соединения лиганд-рецепторного комплекса с промоторными элементами гена может быть активация или репрессия транскрипции, но некоторые из них проявляют двойную функциональную специфичность, так как один и тот же лиганд-рецепторный комплекс стимулирует транскрипцию одних генов и репрессирует транскрипцию других в одной и той же клетке или в разных клетках.

Классические рецепторы стероидных гормонов (эстрогена, прогестерона, андрогенов и глюкокортикоидов) формируют при связывании с лигандом гомодимеры. Ядерные рецепторы из группы так называемых сиротских рецепторов (*orphan receptors*) могут связываться с ДНК и как димеры, и как мономеры. В отличие от стероидных рецепторов они способны связывать химически более разнообразные лиганды, но для многих из них лиганды не установлены. В некоторых случаях это обусловлено тем, что они не имеют специфического лиганда. Первым в этой группе был идентифицирован ретиноевый рецептор RXR, лигандом которого оказалась 9-цис-ретиноевая кислота. Он может формировать гетеродимеры с рядом других рецепторов, включая рецепторы витамина D₃, тиреоидных гормонов, RAR (*all-trans-retinoic acid receptor*) и др.

Клеточный ответ на ядерный лиганд-рецепторный комплекс определяется уровнем экспрессии рецептора в ткани-мишени, а также множеством факторов, влияющих на связывание с ДНК. Оптимальное специфичное связывание ядерных рецепторов с ДНК зависит от наличия в молекуле двух копий их коровых мотивов (DBD и LBD), распознающих гексануклеотидные последовательности, называемые гормон-зависимыми элементами (*hormone response element*). На активность связывания влияют также присутствие и ориентация в геномишени других типов последовательностей ДНК, например, прямых повторов, палиндромов и соединений между этими элементами. Биологическая активность ядерных рецепторов модулируется их способностью формировать гомо- или гетеродимеры. Например, хотя гомодимерный RAR обнаружен в клетках, с ДНК связывается преимущественно гетеродимер RAR/RXR.

2.5. ЦИТОКИН-ИНДУЦИРОВАННАЯ СИГНАЛЬНАЯ ТРАНСДУКЦИЯ

Цитокины стимулируют прогрессию клеточного цикла, пролиферацию, дифференцировку, а также ингибируют апоптоз гемопо-

этических клеток. Такие цитокины, как IL-3, GM-CSF, SCF (stem cell factor) или c-kit-L (фактор роста макрофагов, лиганд рецептора c-kit), Flt-L (лиганд рецепторов Flt2 и 3), EPO (эритропоэтин) и др., влияют на рост и дифференцировку ранних гемопоэтических предшественников в клетки миелоидного, лимфоидного и эритроидного ростков (табл. 1). Наиболее изучено рост-прототирующее действие IL-3. Механизмы действия цитокинов на клеточный рост, сигнальную трансдукцию и апоптоз изучали в основном на IL-3-зависимых клеточных линиях. Некоторые другие цитокины (GM-CSF и IL-5) осуществляют свои эффекты сходными механизмами.

Рецепторы цитокинов (IL-3, GM-CSF, IFN), не имеющие внутриклеточной тирозинкиназной активности, передают свои регуляторные сигналы через рецептор-ассоциированное семейство JAK-тирозинкиназ. Эти киназы активируют транскрипционные факторы STAT, которые транслоцируются в ядро и модулируют там генную экспрессию. Цитокиновые рецепторы с цитоплазматической тирозинкиназной активностью (в частности, c-kit — рецептор SCF) трансдуцируют свои сигналы независимо от серин/треонинкиназного каскада. Сигнальные пути обоих типов максимально эффективно работают тогда, когда тирозинкиназные каскады включают в себя серин/треонинфосфорилирование.

Общий сигнальный каскад, начинающийся от цитокиновых рецепторов, — это Ras/Raf/MEK/ERK(MAPK). Фосфорилирование и активация киназ и транскрипционных факторов «ниже по течению» (таких как p90^{Rsk}, CREB, ELK и Egr1), т.е. выбор пути дальнейшей передачи сигнала, зависит от клеточного контекста.

Рецепторы типа c-kit с тирозинкиназной активностью привлекают сигнальные молекулы, которые связываются с аутофосфорилированными рецепторами или с их тирозинфосфорилированными субстратами. Это связывание осуществляется посредством домена SH2 (Src homology 2 — домен белковой молекулы, гомологичный фосфотирозинсвязывающему домену Src-киназы).

ERK1 и 2 (extracellular regulated kinase 1 и 2), p38^{MAPK} и PI3K активируются мембраносвязанной (но не полноразмерной растворимой) формой фактора SCF, экспрессируемой стромальными клетками костного мозга. Пролиферативные и дифференцировочные эффекты SCF-стимуляции могут вовлекать тирозин- и серин/треонинкиназы, например, регуляторную субъединицу PI3K p85.

РКВ-киназа — член мультигенного семейства, как и PI3K. Все члены семейства содержат домен PH (pleckstrin homology) и каталитический домен. Активация РКВ-киназы происходит в два эта-

Таблица 1. Цитокины и их функции

Символ	Полное наименование	Функция или клетки-мишени
EGF	Epidermal growth factor	Ростовой фактор многих типов клеток
Epo	Erythropoietin	Эритроидные клетки
Flt2/Flt3-L	Лиганд рецептора flt2/flt3	Ранние предшественники гемопоэтических клеток
G-CSF	Granulocyte-colony stimulating factor	Клетки-предшественники гранулоцитов и макрофагов
GM-CSF	Granulocyte/macrophage-colony stimulating factor	Ранние клетки-предшественники миелоидного ростка, нейтрофильных гранулоцитов, моноцитов-макрофагов, эозинофилов; способен активировать макрофаги
gp130	Glicoprotein 130	Рецепторный белок сигнальной трансдукции, общий для IL-6, LIF, oncoM и других цитокинов
IL-3	Interleukin 3	Ранние предшественники миелоидного и лимфоидного ростков
IL-3R	Рецептор для IL-3	Присутствует на многих ранних клетках-предшественниках
IL-4	Interleukin 4	В- и М-клетки, некоторые Т-клетки
IL-5	Interleukin 5	В-клетки, эозинофилы
LIF	Leukemia inhibitory factor	Влияет на клетки многих типов, ингибирует пролиферацию опухолевых клеточных линий, имеет гомологию с oncoM
M-CSF	Macrophage-colony stimulating factor	Предшественники гранулоцитов и макрофагов, его рецептор – продукт онкогена c-fms
oncoM	Oncostatin M	Влияет на клетки многих типов, ингибирует пролиферацию опухолевых клеточных линий, индуцируется через путь СТ JAK/STAT
SCF	Stem cell factor, также известный как c-kit-L (лиганд рецептора c-kit)	Стимулирует пролиферацию ранних предшественников гемопоэтических клеток всех ростков, его рецептор – продукт онкогена c-kit
TGF-β	Transforming growth factor-beta	Ингибирует клеточную пролиферацию во многих тканях
TPO	Thrombopoietin	Фактор роста и дифференцировки мегакариоцитов, его рецептор – продукт онкогена c-mpl

па: 1) фосфорилирование серина-473 и треонина-308; 2) прикрепление к клеточной мембране N-терминального конца РН-домена. Два события фосфорилирования, осуществляемые двумя разными киназами – PDK1 и PDK2 (PtdIns(3,4)P₂(3,4,5)P₃-dependent kinase), могут происходить порознь или вместе (достигая в последнем случае максимальной активности PKB) и являются, по всей видимости, результатом различных физиологических ситуаций.

Относительно простая модель цитокиновой сигнальной трансдукции включает в себя активацию JAK-киназы лиганд-индуцированной олигомеризацией. Многие цитокиновые рецепторы (IL-2R, IL-3R, IL-5R, Еро-R, GM-CSFR и др.) используют эту базовую модель. На рис. 2.1 представлены пути, индуцируемые IL-3. Рецептор IL-3 (IL-3R) состоит из α - и β -цепей, в активации сигнальной трансдукции участвует β -цепь, привлекая необходимые киназы. При связывании IL-3 с IL-3R α - и β -цепи рецептора гетеродимеризуются, и цельный рецептор олигомеризуется с тирозинкиназами JAK-семейства: JAK1, 2, 3 и Tyk2. JAK2 является молекулой, ответственной за некоторые непосредственные ответы на IL-3-стимуляцию и необходимой для митогенеза. Непосредственным ответом клеток на IL-3-активацию становится фосфорилирование по тирозину белков JAK и STAT и активация белков Ras, Raf, MEK и MAPK. MAPK (MAP kinase, mitogen-activated protein kinase) – общее название группы серин/треонинкиназ – ERK1/2, p38 и JNK/SAPK (Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase). Дальнейшая трансдукция сигнала в ядро приводит к транскрипционной индукции онкогенов c-Myc и c-Fos.

JAK-киназы существенны, хотя и необязательны для активации тирозинкиназ STAT такими рецепторами, как c-kit, *flt2/3* и M-CSFR (c-Fms), но совершенно необходимы для их активации нетирозинкиназными рецепторами, такими как IL-3R. Фосфорилирование STAT-киназ по тирозину приводит к их активации. Фосфорилированные киназой JAK2 белки STAT димеризуются, транслоцируются в ядро и действуют там как транскрипционные факторы, связываясь с регуляторными сайтами в промоторных районах среднеранних генов митогенного ответа. Транслокация STAT в ядро усиливается треонинфосфорилированием в результате активации сигнального каскада Raf/MEK/ERK. Конститутивная активация членов JAK-STAT-пути ассоциируется с Т-клеточным ОЛЛ, но встречается и в других опухолях, а мутации JAK-киназ наблюдаются у некоторых пациентов с иммунодефицитом.

Чтобы определить биологическую функцию различных JAK-белков, создали JAK-дефицитные генетические линии мышей. JAK1-

дефицитные мыши погибали вскоре после рождения вследствие неспособности клеток отвечать на ряд цитокинов (IFN- γ , IL-2, 4, 6, 9, 11, 13, 15, LIF). JAK2-дефицит – эмбриональная леталь, обусловленная отсутствием эритропоэза вследствие неспособности отвечать на IL-3, GM-CSF, IFN- γ , EPO и TPO. JAK3-дефицит проявляется в отсутствии ответа на IL-2, IL-4, IL-7, усилении Т-клеточного апоптоза, а дифференцировка В-клеток блокируется у JAK3-дефицитных особей на пре-В-клеточной стадии. Аналогично были изучены функции белков STAT:

- ✓ отсутствие STAT1 приводит к иммунодефициту вследствие неспособности клеток отвечать на IFN- α и - γ ;
- ✓ отсутствие STAT3 летально на эмбриональной стадии вследствие неспособности клеток отвечать на GM-CSF, IL-6 и EGF;
- ✓ отсутствие STAT4 является причиной дефекта ответа на IL-12, который опосредует дифференцировку Т-хелперов (либо Th1, либо Th2);
- ✓ отсутствие STAT5 замедляет рост лимфоидных клеток и редуцирует экспрессию Cis и Bcl2-подобного белка A1;
- ✓ отсутствие STAT6 обуславливает сниженный клеточный ответ на IL-4 и IL-13, гиперреактивность на дыхательные аллергены, сниженную экспрессию антигенов HLA класса II, повышенную экспрессию p27^{KIP1}.

Таким образом, правильно функционирующий сигнальный путь JAK-STAT обязателен для развития иммунного ответа, дифференцировки лимфоцитов и эритроцитов.

Кроме JAK-STAT-пути сигнальной трансдукции, существуют и другие пути передачи регуляторных сигналов от IL-3R в гемопоэтических клетках. В результате стимуляции IL-3 адапторная молекула SHC быстро фосфорилируется и ассоциируется с фосфорилированной β -цепью IL-3R. Фосфорилированный белок SHC связывается с другим адапторным белком, GRB2 (growth factor bound protein 2), который в свою очередь ассоциируется с белком mSOS (mammalian son of sevenless homologue) – фактором обмена GTP и активирует Ras. IL-3-стимуляция проявляется также в фосфорилировании белка SHIP (SH2 containing inositol phosphatase), который формирует комплекс с киназами SHC, GRB и SOS.

Белок VAV, участвующий в обмене гуанина, – еще одна сигнальная молекула, активируемая стимуляцией цитокинами IL-3/GM-CSF. VAV фосфорилируется и активируется JAK2-киназой. Фосфорилирование VAV активирует каскад сигнальной трансдук-

ции через PI3K. Протеинкиназа C также может активировать белок VAV, что приводит к активации Ras/Raf-сигналинга.

IL-3-стимуляция миелоидных клеток быстро активирует PI3K и стимулирует фосфорилирование адапторного белка p80, который ассоциирован с β -цепью рецептора и с p85. P85^{PI3K} фосфорилируется и активирует p110^{PI3K}, который в свою очередь активирует p70S6K, протеинкиназу PKB/Akt и NF- κ B. Активированная Akt фосфорилирует проапоптозный белок Bad и тем самым осуществляет антиапоптозное действие IL-3. NF- κ B в зависимости от обстоятельств может промотировать рост и предотвращать апоптоз.

2.6. ИНТЕРФЕРОН- И РЕТИНОИД-ИНДУЦИБЕЛЬНАЯ СИГНАЛЬНАЯ ТРАНСДУКЦИЯ

Ретиноевая кислота (retinoic acid, RA) и интерфероны (IFN- α , - β и - γ) обладают синергической антипролиферативной, антиангиогенной, дифференцирующей и антивирусной активностью в различных клеточных системах, включая происходящие из гематологических и солидных опухолей человека. Хотя интерфероны сами по себе не индуцируют дифференцировку, их комбинация с RA потенцирует клеточную дифференцировку, индуцированную ретиноидами. Это может объясняться взаимобменом сигналами между RA- и IFN-индуцируемыми путями сигнальной трансдукции. Выяснение того, как RA усиливает IFN-индуцированную биологическую активность, будет способствовать поиску новых подходов к терапии рака.

Интерфероны и RA известны как ингибиторы клеточной пролиферации, усиливающие действие друг друга *in vitro* и *in vivo*. Комбинированные RA-IFN эффекты коррелируют с повышенным уровнем экспрессии многих IFN-индуцибельных генов. RA усиливает экспрессию транскрипционных факторов, играющих центральную роль в механизмах действия IFN: сигнального трансдуктора и активатора транскрипции STAT1 и фактора IRF1 (interferon regulatory factor 1). Дополнительные механизмы, вовлекающие RA, — индукция и секреция IFN- α . Этот интерферон участвует в ингибции клеточного роста и облегчает RA-индуцированную клеточную дифференцировку. В результате этих событий RA усиливает IFN-индуцированную активацию STAT. Кроме STAT1 и IRF1, интерферон и RA также ко-регулируют белок p21^{WAF/CIP1}. В промоторе гена p21 идентифицирован функциональный элемент RARE, необходимый для RA-индукции через рецепторный гетеродимер RAR/RXR. По-

зитивная регуляция p21 интерфероном и ретиноевой кислотой – еще один прямой механизм, которым эти агенты действуют синергически на транскрипционном уровне, ингибируя рост и индуцируя клеточную дифференцировку (рис. 2.5).

Интерфероны – группа мультифункциональных цитокинов, которые регулируют иммунный и противоопухолевый ответы через экспрессию IFN-индуцибельных генов. Интерфероны человека классифицируются как кислотоустойчивые IFN типа 1 (α , β и ω) и кислотолабильные IFN типа 2 (γ) на основании их антигенных свойств. IFN- α и - ω продуцируются лейкоцитами, IFN- β – фибробластами, IFN- γ – Т-лимфоцитами и NK-клетками в ответ на митогены и вирусные антигены. IFN- α/β и IFN- γ после взаимодействия со специфическими рецепторами клеточной поверхности активируют различные сигнальные каскады, приводящие к транскрипции определенных групп генов, опосредующих биологические эффекты этих цитокинов. Промоторы IFN- α/β -индуцибельных генов характеризуются наличием консенсусных элементов ISRE (IFN-stimulated response element), а промоторы IFN- γ -индуцибельных генов – элементы GAS (IFN- γ -activated site). Связывание интерферонов обоих



Рис. 2.5. Усиление IFN-индуцированных биологических эффектов ретиноевой кислотой.

типов проявляется в дифференциальной активации семейства латентных цитоплазматических факторов STAT, которые действуют на различные шис-активируемые элементы ДНК. Взаимодействие IFN типа I/рецептор сопровождается олигомеризацией рецепторных цепей, при этом IFN- α -связанный IFN- α R2 ассоциируется с IFN- α R1. Это взаимодействие запускает каскад тирозинфосфорилирования (рис. 2.6, см. вклейку).

Фосфорилирование STAT1, STAT2 и STAT3 киназами JAK1 и Tyk2 ведет к образованию гомо- и гетеродимеров через взаимодействие доменов SH2. Фактор ISGF3 (IFN-stimulated gene factor 3) формируется из STAT1 и STAT2 (STAT1:2) в ассоциации с ДНК-связывающим белком p48, членом семейства IRF. Фактор ISGF3 и STAT1-гомодимерный комплекс связываются с промоторными элементами ISRE, а гомо- и гетеродимеры STAT1 и STAT3 (STAT1:1, STAT3:3 и STAT1:3) — с элементами GAS, регулируя экспрессию различных IFN-индуцибельных генов.

Для IFN- γ -сигналинга требуется обязательное участие 5 белков; это интегральные мембранные рецепторные белки IFNGR1 и IFNGR2, киназы JAK1 и JAK2, транскрипционный фактор STAT1. Функционально активный IFN- γ представляет собой гомодимер, который связывается с двумя субъединицами IFNGR1, создавая тем самым сайты связывания с двумя субъединицами IFNGR2. Активированные этим комплексом киназы JAK1 и JAK2 фосфорилируют STAT1 с последующей его гомодимеризацией и связыванием с элементами GAS. IFN-индуцибельный по причине наличия в его промоторе элемента GAS транскрипционный фактор IRF-1 способен связываться с ISRE, промоторными элементами IFN- α/β -индуцибельных генов, непосредственно активируя их. Этот механизм объясняет перекрывающиеся или синергические эффекты разных интерферонов.

Транскрипционные факторы IRF-1 и 2 (interferon regulatory factor). IRF-1 — транскрипционный активатор IFN- α и - γ индуцируется вирусной инфекцией, двучепочечной РНК, IFN I и II и другими цитокинами (TNF, IL-1, IL-6, LIF — leukemia inhibition factor). IRF-2 — репрессор IFN-индуцибельных генов. В настоящее время известны еще 7 членов семейства IRF: IRF-3, p48/ISGF3 γ , ICSBP, Pip/ICSAT/IRF-4, IRF-5, IRF-6 и IRF-7. IRF-1-3 и p48 экспрессируются в большинстве клеточных типов, ICSBP — в клетках иммунной системы, IRF-4 — только в лимфоидных клетках. Остальные белки слабо изучены.

В настоящее время уже известно более 60 IFN-индуцибельных белков, но физиологическая роль большинства пока не установле-

на. Лишь для некоторых из них доказано антипролиферативное и антивирусное действие, а именно для двуцепочечной протеинкиназы PKR (protein kinase R – interferon inducible regulator), 2'5'-олигоаденилатсинтетазы, белков PML (promyelocytic leukemia) и 9-27. IFN широко применяются в лечении злокачественных опухолей и вирусных заболеваний. Показана терапевтическая активность IFN- α в лечении меланомы, ХМЛ, В- и Т-клеточных лимфом, саркомы Капоши, а также хронического гепатита С, а IFN- β – в лечении рассеянного склероза.

Ретиноиды – группа молекул, производных ретинола (витамина А), которые выполняют множество регуляторных функций (ингибирование пролиферации и индукция дифференцировки) не только в нормальных клетках, но и в опухолях, таких как лейкозы и тератокарциномы. Их общим прототипом является естественный метаболит ATRA (all-trans retinoic acid). В цитозоле RA может быть связана с белками CRABP (cytoplasmic RA binding proteins), которые регулируют распределение и метаболизм RA. В ядре RA связывается со специфичными ядерными рецепторами и модулирует экспрессию генов, необходимых для выполнения ее биологических функций. Описаны два семейства рецепторов RA: RAR (retinoid acid receptor) и RXR (retinoid X receptor). Каждое семейство включает 3 члена: α , β и γ . RA связывается с гетеродимером из рецепторов, принадлежащих к этим двум классам (RAR/RXR), которые затем ассоциируются со специфическими элементами ДНК (RARE) генов-мишеней и стимулируют их экспрессию. Кроме ATRA, лигандами рецепторов RAR/RXR являются изомеры 13-cis-RA и 9-cis-RA, а лигандом гомодимерного рецептора RXR/RXR является только 9-cis-RA. Клиническое применение ретиноидов имело реальный успех при лечении острого промиелоцитарного лейкоза (ОПМЛ), где RA предоставила первый пример дифференцировочной терапии. RA может индуцировать полную ремиссию через дифференцировку бластных клеток. Механизм противоопухолевой активности RA заключается в способности модулировать рост, дифференцировку и апоптоз нормальных, предраковых и злокачественных клеток *in vitro* и *in vivo*.

Известно, что RA повышает уровень STAT1 и STAT2 в различных клеточных линиях. Дефект IFN-сигнальной трансдукции в злокачественных клетках может быть одной из причин их резистентности к антипролиферативному действию интерферонов. Усиление экспрессии STAT1, индуцированное RA, может восстановить чувствительность к интерферонам. В промоторе гена STAT1 обнару-

жен элемент RARE, а в промоторе гена STAT2 — элемент ISRE, что позволяет предполагать возможность его регуляции фактором IRF-1 или IFN- α .

Обработка клеточных культур опухолевого происхождения линии NB4 (ОПМЛ) только ретиноевой кислотой не вызывает тирозинфосфорилирования фактора STAT1, но значительно усиливает его активацию в ответ на IFN- α и - γ , т. е. повышение внутриклеточного уровня STAT1, обусловленное действием RA, на самом деле является результатом усиления трансдукции интерфероновых сигналов. Резистентность клеток Т-лимфомной линии к рост-ингибирующему действию IFN- α ассоциируется с отсутствием экспрессии STAT1 и устраняется предварительной обработкой культуры RA или IFN- γ .

RA и IFN- α с одинаковой эффективностью стимулируют экспрессию гена IRF-1 в клетках линии NB4 (ОПМЛ). В промоторе этого гена, кроме элемента GAS, через который осуществляется индукция транскрипции в ответ на RA и IFN, обнаружен сайт связывания другого транскрипционного фактора — NF- κ B, через который генная экспрессия регулируется фактором TNF. Соответственно возможна синергическая активация гена IRF1 IFN- γ и TNF.

Другой член IRF-семейства, белок p48, также является RA-индуцибельным, но механизм его регуляции еще не изучен; не известно, индуцируется ли он, подобно гену IRF1, на транскрипционном уровне.

RA индуцирует синтез IFN- α не только в нормальных клетках, но и в клеточной линии NB4 (ОПМЛ). RA-индуцированный IFN- α ингибирует пролиферацию и облегчает дифференцировку клеток. В качестве сильного цитодифференцирующего агента RA применяется в клиническом лечении ОПМЛ (ОМЛ М3 по FAB-классификации). ОПМЛ характеризуется остановкой гранулопоэза на стадии промиелоцитов. Эта патология ассоциирована с транслокацией t(15;17) и формированием слитных генов PML/RAR α и RAR α /PML, которые транскрипционно активны и кодируют соответствующие химерные белки. PML/RAR α обнаруживается у всех пациентов с ОПМЛ, а RAR α /PML — у большинства. Химерный белок PML/RAR α содержит функциональные домены обоих исходных белков и является молекулярной основой лейкемогенеза. Формируя гетеродимеры с белками PML и RXR, он действует как доминантный ингибитор PML и RXR. В результате страдает гетеродимеризация RXR с рецепторами некоторых гормонов (RA, тиреоидный гормон, витамин D₃) и происходит остановка клеточной дифференцировки.

Клетки линии NB4 (ОПМЛ) несут транслокацию t(15;17), характеризуются промиелоцитарной морфологией и проявляют чувствительность к антипролиферативному, дифференцирующему и проапоптозному действию RA. Хотя IFN- α и - γ индуцируют экспрессию и химерного белка PML/RAR α (так как промотор гена PML содержит элементы ISRE и GAS и является в норме мишенью интерфероновой регуляции), а IFN-индуцированная продукция PML/RAR α сопровождается уменьшением количества свободных молекул его партнера по гетеродимеризации RXR, обработка клеточной культуры NB4 интерферонами- α и - γ проявляется в усилении экспрессии многих IFN-индуцибельных генов, а также ингибции роста клеток. Как упоминалось выше, в лейкозных промиелоцитах RA индуцирует экспрессию белков STAT1, STAT2, p48 и IRF-1, а также синтез IFN- α . Протеолитическая деградация белка PML/RAR α является первым этапом ответа на RA, осуществляется с участием каспаз и может быть предотвращена ингибиторами каспаз.

Одна из основных проблем в терапии ОПМЛ – это возникновение RA-резистентности. Молекулярные механизмы, ответственные за этот феномен, остаются невыясненными, хотя некоторые гипотезы и были предложены. Во-первых, RA-резистентность может развиваться в результате мутационных изменений рецепторов RA. Моделью взаимодействия RA- и IFN-сигнальных путей служат RA-резистентные клетки. Показано, что миелоидные клетки линии HL-60 приобретают резистентность к дифференцирующему действию RA после возникновения мутации в гене RAR α , которая преодолевается трансфекцией клетки кДНК нормального гена RAR α . Другой потенциальный механизм клинической RA-резистентности состоит в фармакологическом изменении метаболизма RA. Уменьшение концентрации активных ретиноидов происходит в результате индукции цитохрома P-450, белка CRABP (cellular RA-binding protein) и P-гликопротеина (продукта гена MDR1). Интересно отметить, что IFN- α подавляет цитохром-P-450-зависимые монооксигеназы.

Относительно мало известно о генах-мишенях RA, вовлеченных в регуляцию клеточной пролиферации и дифференцировки. Показано, что RA-резистентность клеток линий NB4-R1 и NB4-R2 (производных RA-чувствительной клеточной линии NB4) ассоциирована с утратой синтеза IFN- α и белков STAT1, p21^{WAF/CIP1}, PKR, Sp100 и p48, тогда как экспрессия гена IRF-1 даже повышена. Имеющиеся данные легли в основу модели активации IFN-индуцибельных генов ретиноидами. Одним из ранних событий, индуцированных

ретиноидами, согласно этой модели, является прямая индукция экспрессии гена IRF-1, а ключевым моментом этой модели является активация продукции IFN и STAT. IFN и RA потенцируют действие друг друга *in vitro* и *in vivo*, поскольку многие IFN- и RA-индуцибельные гены, включая химерный ген PML/RAR α , содержат в своих промоторах сайты связывания обоих факторов. Благодаря этому обстоятельству комбинированная IFN/RA-терапия весьма эффективна при некоторых злокачественных опухолях.

Глава 3

КЛЕТОЧНЫЙ ЦИКЛ

3.1. РЕГУЛЯЦИЯ КЛЕТОЧНОГО ЦИКЛА

Клеточный цикл и процесс деления соматической клетки (митоз) находятся под строгим контролем сложной системы регуляции. Реплицированные и конденсированные эукариотические хромосомы должны сегрегировать к противоположным концам ядра. После деления ядра хромосомы деконденсируются, и цитокинез завершается делением цитоплазмы и клеточной мембраны. Клеточный цикл делится на фазы в соответствии со стадиями этого процесса (рис. 3.1). S-фаза (синтез/репликация ДНК) и M-фаза (митоз) должны быть координированы, чтобы обеспечить поддержание постоянства и целостности генетического материала. Предложена относительно простая модель прогрессии клеточного цикла. Клетка в фазах G₀(фаза покоя)/G₁, предшествующих митозу, получает позитивные (митогены и ростовые факторы) и негативные (контактная ингибция и повреждение) стимулы. Эти сигналы интегрируются клеткой для принятия решения, входить или не входить в клеточный цикл. Момент принятия решения о переходе из фазы G₁ в S-фазу называется точкой R (от англ. restriction – рестрикция). Совокупность сигнальных и ре-

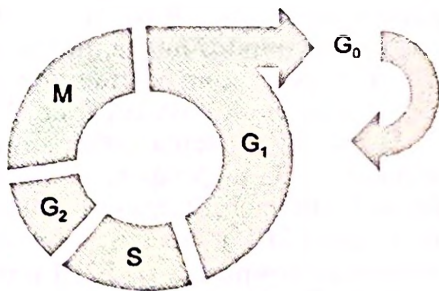


Рис. 3.1. Клеточный цикл.

гуляторных молекул играет роль часового механизма клеточного цикла.

Координация прогрессии клеточного цикла через фазы роста и фазы синтеза управляется событиями фосфорилирования/дефосфорилирования, которые промотируются регуляторными субъединицами, называемыми циклинами, в соединении с каталитическими субъединицами, известными как циклинзависимые киназы (cyclin depending kinase, Cdk). Циклинзависимые киназы, активированные фосфорилированием Cdk-активирующей киназой (CAK), интегрируют митогенные и рост-ингибиторные сигналы и координируют клеточный цикл. В настоящее время принята классификация циклинов в соответствии с фазами клеточного цикла: циклины фазы G1 – D1, D2 и D3, циклины S-фазы – A и E, фазы G2/M – B1 и B2. Прогрессию фаз G1→S регулируют циклин-D-, E- и A-зависимые киназы, а фаз G2→M – циклин-B-зависимые. В нормальной клетке субъединицы присутствуют в четырехмерных комплексах, содержащих также ядерный антиген пролиферирующей клетки (PCNA – proliferating cell nuclear antigen) и член семейства малых ингибиторных молекул. Идентифицированы два семейства ингибиторов циклинзависимых киназ: семейство INK4 (белки p15^{INK4B}, p16^{INK4A}, p18^{INK4C}, p19^{INK4D}, связывающие циклин-D-зависимые киназы Cdk4 и Cdk6) и семейство CIP/KIP (p21^{CIP1}, p27^{KIP1} и p57^{KIP2}). Ассоциация соответствующего количества этих ингибиторных молекул с циклиновым комплексом ингибирует киназную активность. В нормальных клетках эти молекулы действуют совместно в ответ на клеточные сигналы остановки клеточного цикла. В опухолевых клетках все эти молекулы часто бывают мутационно повреждены, а циклиновые комплексы разрушены. Рearанжировки, амплификации или гиперэкспрессия циклиновых генов, а также повышенный уровень мРНК или белка циклинзависимых киназ встречаются при разных типах рака. В результате опухолевые клетки проходят через стадии клеточного цикла, несмотря на неподходящие условия. Нарушения регуляции клеточного цикла – отличительный признак злокачественной опухоли (рис. 3.2, 3.3).

Белок Rb является субстратом Cdk-опосредованного фосфорилирования. Гипофосфорилированный (функционально активный) белок Rb (retinoblastoma susceptibility) связывается с фактором транскрипции E2F1 и препятствует формированию транскрипционно активного комплекса из E2F1 и онкогена с-Мус. Гиперфосфорилирование белка Rb инактивирует его функцию и вытесняет его из комплекса с транскрипционным фактором, таким как E2F, так что

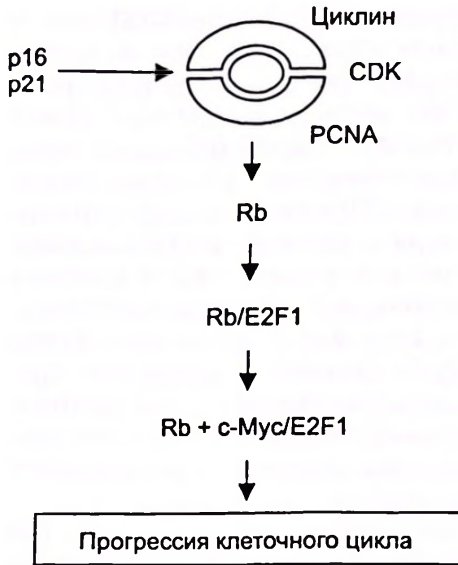


Рис. 3.2. Negативный контроль пролиферативной активности.

последний может активировать генную цепочку, дающую возможность клетке перейти в S-фазу. Ингибиторные белки (p16, p21 и другие) связываются с циклинзависимыми киназами, входящими в состав циклиновых комплексов циклин/Cdk/PCNA, и подавляют фосфорилирование супрессорного белка Rb.

В клетках млекопитающих с прогрессией G1-фазы ассоциированы 3 основные циклинзависимые киназы. Cdk4 и Cdk6 функционируют в составе комплексов с циклинами D1-D3 во второй половине фазы G1, а Cdk2, активированная циклином A или E – в

Активная репрессия
генов-мишеней фактора E2F

Трансактивация
генов-мишеней фактора E2F

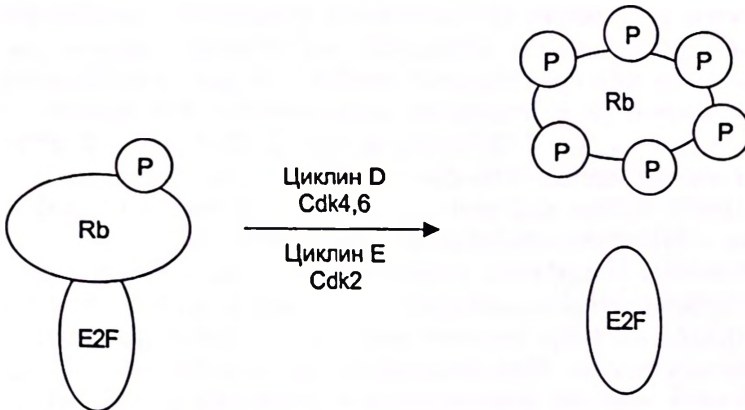


Рис. 3.3. Регуляция активности транскрипционного фактора E2F через фосфорилирование белка Rb.

поздней G1-фазе. Циклин Е экспрессируется только в G1-фазе и исчезает, как только клетки вступают в S-фазу. Циклин А, напротив, экспрессируется в G1-фазе позднее, чем циклин Е, и накапливается в течение S- и G2-фаз. Cdk1 ассоциирована с митозом и действует при переходе G2→М. Уровень циклинзависимых киназ остается относительно постоянным в течение клеточного цикла. Эктопическая гиперэкспрессия циклина D или Е может промотировать прогрессию клеточного цикла и приводить к укорочению фазы G1, редуцировать размер клетки и зависимость от ростовых факторов, тогда как отсутствие их активности (нейтрализация антителами или антисмысловыми олигонуклеотидами) эффективно блокирует входение клеток в S-фазу. Циклин А, кроме того, требуется для перехода из S-фазы в митоз, так как он активирует Cdk1. Его отсутствие предотвращает репликацию ДНК и нарушает последовательность событий, соединяющих завершение репликации с инициацией митоза.

Циклинзависимые серин/треонинкиназы в составе циклиновых комплексов фосфорилируют белок p110 Rb (retinoblastoma susceptibility) и Rb-подобные белки p130 и p106 с общим названием «pocket proteins». Белок p110^{Rb} дифференциально фосфорилируется на разных стадиях клеточного цикла. В фазе G1 он преимущественно гипофосфорилирован, становится полностью фосфорилированным, когда клетка входит в S-фазу, и это состояние поддерживается до выхода из метафазы. Нормальная функция pocket-белков — негативный контроль перехода из фазы G1 в S-фазу путем связывания и подавления транскрипционного фактора E2F, контролирующего активацию генов, ответственных за прохождение клеткой критической точки G1/S (рис. 3.3). Pocket-белки фосфорилируются комплексом циклин D/Cdk4/6, а затем комплексом циклин E/Cdk2. К генам-мишеням фактора E2F относятся регуляторы входа в S-фазу (B-Myb, Cdk1, циклины Е и А) и гены, необходимые для репликации ДНК (гены дигидрофолатредуктазы, ДНК-полимеразы- α и тимидинкиназы).

Активность механизма регуляции клеточного цикла контролируется присутствием упомянутых выше ингибиторов, которые могут останавливать прогрессию клеточного цикла в определенных критических точках. Эти ингибиторы заслужили имя «опухолевые супрессоры», так как отсутствие их экспрессии или потеря активности проявляется в канцерогенезе. В клетках млекопитающих два семейства ингибиторов Cdk вовлечены в регуляцию прогрессии G1: INK4 и CIP/KIP. Их структура и спектр субстратов различны, по-

этому эти два семейства действуют согласованно в регуляции клеточного цикла без какой-либо избыточности.

Семейство *INK4* включает 4 члена: $p16^{INK4A}$, $p15^{INK4B}$, $p18^{INK4C}$ и $p19^{INK4D}$, которые специфически связывают Cdk4 и ее близкий гомолог Cdk6. Это прямое связывание может предотвратить димеризацию киназ с их циклиновыми партнерами и, следовательно, блокировать их активность. Их эктопическая экспрессия индуцирует остановку клеточного цикла в фазе G1. Такая индукция предотвращает пролиферацию только клеток Rb^{+} , но не Rb^{-} . Экспрессия белка $p15$ индуцируется в эпителиальных клетках *in vitro* обработкой фактором TGF β , т. е. он функционирует как эффектор TGF β . При всем сходстве белков семейства *INK4* различия по частоте их мутирования в опухолях человека и различные паттерны экспрессии позволяют предположить, что *in vivo* они имеют различные функции.

Гомо- и гетерозиготные делеции в гене $p16$ встречаются с высокой частотой во многих видах опухолей человека, что указывает на функцию гена $p16$ классического опухолевого супрессора. 85% аденокарцином поджелудочной железы, 30% немелкоклеточных карцином легкого, 52% карцином пищевода, 80% астроцитомных клеточных линий, более 80% Т-клеточных ОЛЛ несут делеции гена $p16$. Необходимо принимать во внимание, что делеция может вовлекать не только $p16$, но и какие-то другие гены-супрессоры этого локуса. Высокая частота делеций или гиперметилирования промоторов генов $p15$ и $p16$ наблюдается в карциномах легкого, почки, мочевого пузыря, глиомах, опухолях головы и шеи, предстательной железы, лейкозах и лимфомах. Мутации или изменения паттерна метилирования генов $p18$ и $p19$ не столь часто определяются в опухолях человека или клеточных линиях опухолевого происхождения.

Семейство *CIP/KIP* состоит из белков $p21^{CIP1}$, $p27^{KIP1}$ и $p57^{KIP2}$ (табл. 2). Они содержат гомологичный аминотерминальный домен с элементом связывания циклинов и циклин-зависимых киназ. Компоненты клеточного цикла, которые являются мишенью их ингибирующего действия, — комплексы циклин D/Cdk4/6 и циклин E/Cdk2 в поздней G1-фазе и циклин A/Cdk2 в критической точке G1/S и всей S-фазе. Связывание циклиновых комплексов ингибиторами блокирует фосфорилирование циклинзависимыми киназами белка Rb и других белков, которые должны быть фосфорилированы во время прогрессии клеточного цикла. Белок $p21$ ингибирует все циклиновые комплексы, т. е. является универсальным ингибитором.

Таблица 2. Функциональные признаки ингибиторов циклинзависимых киназ CIP/KIP группы

Ингибитор	p21 ^{CIP/KIP}	p27 ^{KIP1}	p57 ^{KIP2}
Локализация	6p21.2	12p12.3	11p15.5
Тип регуляции	p53-регулируемый, индуцируется повреждениями ДНК и TGFβ	Не регулируются белком p53. Индуцируются межклеточными контактами, антипролиферативными сигналами и TGFβ	
Тип экспрессии	Повсеместная тканевая экспрессия		Тканеспецифичная экспрессия (плацента, сердце, скелетные мышцы, терминально дифференцированные клетки)

Механизм, которым p21 ингибирует циклиновые комплексы, не до конца ясен. То, что p21 ассоциирован с PCNA (proliferating cell nuclear antigen), субъединицей ДНК-полимеразы-δ, которая участвует в репарации, означает, что p21 может координировать регуляцию прогрессии клеточного цикла с репаративным синтезом ДНК. Исследования *in vitro* репликации ДНК продемонстрировали, что p21 инактивирует ДНК-полимеразу-δ, связываясь с PCNA. Клетки, лишенные p21, получившие повреждение ДНК, проходят S-фазу. Это приводит к репликации ДНК в отсутствие клеточного деления, анеуплоидии и неизбежному в этих случаях апоптозу. Усиленная экспрессия p21 в клетках анапластической крупноклеточной лимфомы приводит к гипофосфорилированию белка Rb и ингибции PCNA.

P21 является транскрипционной мишенью белка p53 и первичным медиатором p53-зависимой остановки фазы G1 после повреждения ДНК, а p53 – транскрипционным фактором для p21 и связывается непосредственно с его промотором, хотя p53 может контролировать пролиферацию p21-независимым путем, как и p21 может экспрессироваться независимо от p53. Так, клетки карциномы молочной железы показывают повышенную экспрессию p21 независимо от того, несут они wt p53 или мутантный p53. Например, TGFα усиливает экспрессию p21 в карциноме молочной железы, а TGFβ – в карциноме толстой кишки, отвечающих соответственно на эти факторы. В промоторе гена p21 идентифицирована последовательность из 10 пар нуклеотидов, которая отвечает за активацию транскрипции фактором TGFβ. TGFβ и p53 активируют транскрипцию p21 через различные элементы его промотора.

Супрессия пролиферации фактором TGF β является результатом редукции циклин E/киназной активности, которая в свою очередь приводит к супрессии фосфорилирования белка Rb. В клетках, обработанных TGF β , p21 и другие Cdk-ингибиторы (KIP1 и INK4B) связываются с комплексами циклин/CDK и ингибируют их активность. Описана также конститутивная экспрессия p21, за которую ответственны специальные сайты в проксимальном районе промотора гена p21. Этот же район отвечает за активацию p21 транскрипционными факторами семейства Smad.

Как известно, клеточная пролиферация и дифференцировка – взаимоисключающие феномены, поэтому клетки, коммитированные на путь дифференцировки, прекращают клеточное деление. Экспрессия p21 может быть индуцирована во время дифференцировки опухолевых клеток при промиелоцитарном лейкозе с p53-нулевым фенотипом ретиноевой кислотой, диметилсульфоксидом и IFN- γ . В p53-дефицитных клетках остеосаркомы и в клетках гепатомы экспрессия p21 также может быть активирована индуцирующими дифференцировку агентами. p53-независимая индукция p21, опосредованная транскрипционными факторами семейства MyoD, играет роль в дифференцировке миогенных клеток и транскрипции миоспецифических генов.

Протеин p27^{KIP1} идентифицирован как медиатор остановки клеточного цикла в G1-фазе фактором TGF β , который опосредует внешние сигналы, такие как межклеточный контакт или действие антипролиферативных факторов. TGF β представляет собой семейство пептидов, регулирующих рост и дифференцировку. Он состоит из двух идентичных димеров и существует в виде нескольких изоформ. Ингибиторное влияние TGF β на рост клеток различных типов (эпителиальных, эндотелиальных, гемопоэтических клеток, кератиноцитов, лимфоцитов и гепатоцитов) связано с индукцией ингибиторов циклинзависимых киназ, в том числе p27, ингибированием фосфорилирования и накоплением нефосфорилированного Rb.

Подобно белку p21^{KIP1}, p27 влияет на эффективность многих циклинзависимых киназ и связывается с комплексами Cdk–циклин эффективнее, чем только с Cdk. Он имеет значительную гомологию с p21, но домен связывания с PCNA в нем отсутствует. Уровень мРНК p27 не изменяется после обработки TGF β , как показано в клетках остеосаркомы, возможно, регуляция p27 происходит в основном на посттранскрипционном уровне.

Накопление p27^{KIP1} наблюдается в клетках в результате действия и других антипролиферативных агентов. Антипролиферативный

эффект не ограничивается $p27^{KIP1}$, он также повышает уровень $p21$ и $p15^{INK4B}$. $p27^{KIP1}$, связанный с комплексом циклин E/Cdk, может быть изолирован из клеток, деление которых остановлено действием фактора TGF β , но не из пролиферирующих. IFN, который является мощным антипролиферативным агентом, останавливает клетки лимфомы Беркитта в фазе G1, усиливает экспрессию $p27^{KIP1}$, но не $p21$, и наоборот, ингибиторы циклинзависимых киназ инактивируются митогенами. Например, пролиферация Т-лимфоцитов зависит от двух митогенных сигналов. Первый обеспечивается стимуляцией Т-клеточного антигенного рецептора и является причиной индукции соответствующих циклинов и циклинзависимых киназ. ИЛ-2 служит вторым сигналом, который облегчает переход G1→S инактивацией KIP1.

$P57^{KIP2}$ обнаруживается преимущественно в дифференцированных клетках и, видимо, может служить сигналом для выхода дифференцирующихся клеток из клеточного цикла. $P57^{KIP2}$ структурно ближе к $p21$, чем к $p27$, так как тоже содержит домен PCNA-связывания. Он может ингибировать киназную активность комплексов циклин D/Cdk4(6), циклин E(A)/Cdk2 и циклин E/Cdk3 *in vitro* и в составе этих комплексов индуцировать остановку G1-фазы. Нарушение этой функции $p57$ ведет к неконтролируемому росту клеток.

Мутации какого-либо белка из этих семейств проявляются в злокачественной трансформации. Влияние этих мутаций представляет собой феномен, сложный для понимания. Неясно, почему мутация, приводящая к утрате функции одного из этих белков, приводит к раку, если система контроля явно избыточна, и почему требуются два семейства ингибиторов для контроля клеточной прогрессии. Известно, что между ними осуществляется кооперация, примером которой служат отношения, возникающие между $p15$ и $p27$ в эпителиальных клетках под действием цитокина TGF β . $P27$ может связываться с киназными комплексами циклин D/Cdk4(6) и циклин A(E)/Cdk2, но его взаимодействие с ними очень различается, так как $p27$ ингибирует только комплекс циклин A(E)/Cdk2, но не циклин D/Cdk4(6). В быстро пролиферирующих клетках $p27$ связывается в основном с циклин D/Cdk4(6), не ингибируя киназную активность. При этом комплекс циклин D/Cdk4(6) служит резервуаром для изоляции свободного $p27$ от его главной мишени — комплекса циклин A(E)/Cdk2. В клетках, культивируемых в присутствии TGF β , быстро индуцируется экспрессия $p15$, который вытесняет $p27$ из комплекса циклин D/Cdk4(6), в результате чего повышается уровень свободного $p27$, который связывается с комп-

лексом циклин A(E)/Cdk2 и ингибирует его киназную активность. Таким образом, имеет место комбинированная ингибция обоих типов комплексов, и клеточный цикл останавливается в фазе G1.

Таким образом, фосфорилирование белка Rb циклинзависимыми киназами позволяет клетке пройти критическую точку G1→S. Ингибиторы циклинзависимых киназ блокируют их активацию Cdk-активирующими киназами (CAK), что проявляется в ингибции фосфорилирования Rb и, следовательно, в остановке клеточного цикла в G1. В связи с этим, подобно p53 и Rb, ингибиторы циклинзависимых киназ тоже считаются опухолевыми супрессорами.

Ген p53. На клеточном уровне существует комплекс молекулярных путей восприятия генетических повреждений и ответа на них. Мутации на этих путях могут привести к опухолевой прогрессии. Существуют гены, которые интегрируют правильное восприятие средовых сигналов и соответствующий клеточный ответ. В клетках млекопитающих такую интегральную функцию выполняет ген p53, который называют «хранителем генома» (guardian of the genome). Ген p53 — наиболее известный супрессор опухолей и ключевой элемент пути, который позволяет остановить клеточный цикл в неблагоприятных для роста условиях и предотвращает появление резистентных клонов. Он получает информацию о повреждении ДНК и запускает каскад событий, приводящих к остановке роста. Повреждения ДНК обуславливают быстрое накопление белка p53 в клетке и индуцируют регуляторные или контролируемые механизмы, блокирующие клеточный цикл. По завершении репарации блок снимается и клеточное деление может продолжаться. Ген p53 играет ключевую роль в этом процессе, мутантные по p53 клетки вынуждены входить в клеточный цикл с поврежденной и нерепарированной ДНК. Отсутствие продукта гена p53 дестабилизирует геном. Приблизительно 50% первичных опухолей человека несут мутации p53, опухоли с мутантным p53 клинически более агрессивны. Соматические мутации p53 и других генов-супрессоров опухолей могут быть ранним или поздним этапом канцерогенеза. В норме белок p53 живет приблизительно 20 минут, мутантный p53 — от нескольких часов до дней и накапливается в ядрах опухолевых клеток, что дает возможность иммуногистохимического окрашивания специфическими антителами. Трансфекция wt p53 в клетки, лишенные его, восстанавливает функцию p53 и повышает экспрессию генов-мишеней.

Ген p53 (17p13.1) имеет протяженность в 20 000 пар нуклеотидов, высококонсервативен у всех изученных видов, состоит из 11 экзонов (1-й — некодирующий). Транскрипция p53 контролирует-

ся двумя регуляторными сайтами. Один из этих элементов расположен на 400 нуклеотидов выше 1-го экзона (P1), 2-й промоторный элемент находится в 1-м интроне, примерно на 1000 нуклеотидов ниже 1-го элемента. Зрелый транскрипт p53 содержит 2800 нуклеотидов. Продукт — фосфопротеин 53 кДа состоит из 393 аминокислот. 5 высококонсервативных сайтов белка (I-V) соответствуют кодомам 13-19, 120-143, 172-182, 238-259, 271-290 в экзонах 4, 5, 7 и 8. Мутации p53, встречающиеся в опухолевых образованиях, обнаруживаются в «горячих» точках — консервативных сайтах II-V функционально важного домена сайт-специфичного ДНК-связывания, состоящего из аминокислотных остатков 90–290. Этот основной ДНК-связывающий домен содержит 10 цистеиновых остатков, заставляющих предположить связывание ионов металла. Действительно, ДНК-связывание отменяется металл-хелатирующими (изымающими ион из участия в биохимической реакции) агентами. Кбровый домен содержит ион цинка, т.е. p53 является цинковым металлопротеином. Олигомеризация — важное событие для ДНК-связывания, и p53 обнаруживается преимущественно в четырехмерной форме. Связывание ДНК регулируется конформационными изменениями тетрамера от высоко- до низкоаффинного состояния. Каждый ДНК-связывающий домен распознает одну из 4 повторяющихся последовательностей ДНК и, следовательно, тетрамер более прочно связывается с ДНК, чем мономер. Гетероолигомер, сформированный мутантным p53 и wtp53 (p53 дикого типа), не способен связываться с ДНК. Белок p53 содержит еще несколько функциональных доменов для связывания с белками, такими как белки теплового шока, E1B, MDM2 и др.

Биохимическая основа функции p53 как транскрипционного фактора — способность регулировать транскрипцию генов-мишеней. Область молекулы, включающая аминокислоты 120-290, представляет собой ДНК-связывающий домен. P53-связывающим сайтом в промоторах генов-мишеней является последовательность 5'-Pu-Pu-Pu-C-A/T-A/T-G-Py-Py-Py-3'. P53 усиливает транскрипцию генов, имеющих этот элемент. Wtp53 может подавлять экспрессию генов β-актина, HSP70, c-jun, c-fos, mdrl и PCNA (proliferating cell nuclear antigen). *In vitro* p53 связывается с ДНК только вместе с ядерным экстрактом, т.е. это связывание нуждается в формировании комплексов с другими ядерными белками. Белок TBP (TATA-binding protein) взаимодействует с wtp53 и с мутантным p53 и затем связывается с промоторной последовательностью, называемой ТАТА-боксом.

Альтернативный сплайсинг транскрипта p53 является способом регуляции функции этого гена. Основная форма p53 экспрессируется в фазе G1, альтернативная (отличающаяся на 96 нуклеотидов в результате альтернативного сплайсинга 10 интрона) — в основном в фазе G2. Ясно, что эта дифференциальная экспрессия имеет отношение к переходу клеткой критических точек $G1 \rightarrow S$ и $G2 \rightarrow M$. Альтернативно сплайсированная форма (p53as) является конститутивно сайт-специфично связывающейся с ДНК изоформой, которая утратила свою способность неспецифично связываться с ДНК. p53as с редуцированной транскрипционной активностью экспрессируется только в покоящихся клетках. Видимо, сайт не зависящего от последовательности ДНК связывания, утраченный изоформой p53as, регулирует сайт-специфичную активность p53. p53as встречается во многих нормальных тканях и клеточных линиях, включая нормальные человеческие лимфоциты. Альтернативный сплайсинг p53 по аналогии с другими альтернативно сплайсируемыми макромолекулами представляет собой механизм регуляции транскрипционной функции p53.

Инактивация белка может происходить и без изменения последовательности гена. Онкогенные белки онковирусов совершают клеточную трансформацию, формируя комплексы с wt-p53 и тем самым инактивируя его. Белок вируса SV40 блокирует связывание p53 с ДНК и его функцию транскрипционного фактора. Белок E1B аденовируса тоже связывает и нейтрализует p53. В клетках, трансформированных вирусом SV40 или аденовирусом, определяется более высокий уровень p53, что обусловлено повышением стабильности и увеличением продолжительности жизни белка при одновременной инактивации его функции. Белок E6 папилломавируса (HPV) связывает p53 при участии ассоциированного белка (E6-AP), но это приводит к быстрой деградации p53 путем убиквитин-зависимого протеолиза, редукции уровня p53 и иммортализации клетки. То же происходит при введении в клетку одного гена E6. Функциональная инактивация белка p53 белками онковирусов HPV в нормальных клетках вызывает разрушение контроля клеточного цикла и накопление генетических аномалий: транслокаций, амплификаций и делеций, активирующих онкогены и инактивирующих гены-супрессоры опухолей. В настоящее время считается, что папилломавирусная инфекция ответственна за 15% случаев рака у женщин и 5% у мужчин. Вирусные онкопротеины E6 и E7 дают плеiotропный эффект. Они взаимодействуют с p53, pRb и другими клеточными белками. Продемонстрировано функциональное взаимодействие

вирусных онкобелков с ингибиторами циклин-зависимых киназ $p16^{INK4}$, $p21^{CIP1}$ и $p27^{KIP1}$, блокирующее негативную регуляцию ими клеточного цикла.

Вирусные и клеточные онкобелки могут инактивировать белок p53 через протенин/протенин-взаимодействие. Они ингибируют его функции транскрипционного фактора (трансактивацию и транскрепессию) и p53-зависимый апоптоз. Связывание p53 с вирусными белками побудило к поиску клеточных белков, связывающихся с ним. Продукт гена *mdm2* (*murine double minute 2*) связывается с геном p53 и ингибирует его транскрипционную активность. Ген *mdm2* транскрипционно активируется белком p53, но белок MDM2 также связывается с белком p53, блокирует его функционирование как транскрипционного фактора в ядре и опухолевого супрессора и промотирует его быструю деградацию в цитоплазме. Таким образом, p53 и MDM2 формируют регуляторную петлю обратной связи, в которой p53 лимитирует собственную активность продукцией белка MDM2 (рис. 3.4). Амплификация и гиперпродукция MDM2 часто обнаруживаются в опухолях того типа, где редко встречаются мутации p53.

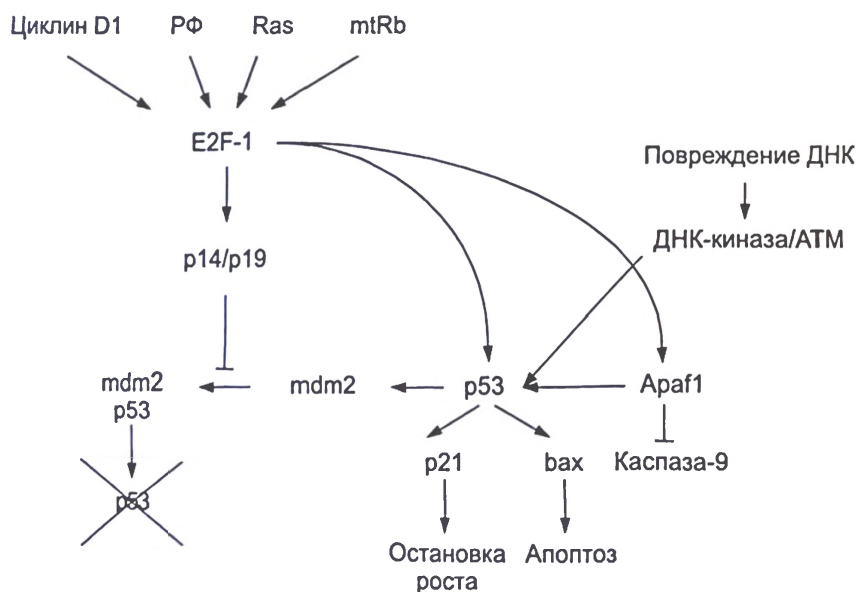


Рис. 3.4. Связь между контролем повреждений ДНК и клеточным ростом в нормальной клетке.

РФ — ростовые факторы; mtRb — мутантный белок Rb.

Белок MDM2 проявляет онкогенность (по крайней мере, отчасти) через подавление p53 аналогично вирусным онкопротейинам.

Гиперэкспрессия гена *mdm2* ассоциирована с высоким канцерогенным потенциалом. Он часто амплифицирован в злокачественных опухолях человека. Онкогенные свойства *mdm2* связаны с инактивацией p53. MDM2-связывающий сайт находится на N-терминальном конце p53. Человеческий гомолог *mdm2* содержит два промотора: кроме основного промотора P1, в первом интроне имеется дополнительный P2. Этот паттерн активации проявляется в продукции двух различных транскриптов, которые транслируются в белки с различной p53-связывающей активностью.

Значимая ассоциация между мутантным p53 и гиперэкспрессией белка MDM2 без амплификации гена в одних и тех же клетках описана в карциномах щитовидной железы и при болезни Ходжкина. Во многих других опухолях, например, в карциномах яичника и пищевода, мутации p53 и *mdm2* не совпадают. При лейкозах мутации *mdm2* встречаются вместе с мутациями p53 или без таковых. 10-кратно повышена экспрессия *mdm2* в клетках трети ХЛЛ и НХЛ. Клеточные линии из детских лимфобластных лейкозов гиперэкспрессируют *mdm2* без амплификации гена и с *wt*p53.

Mdm2 связывает N-терминальный конец p53, и мутации в ДНК-связывающем домене p53 не влияют на его связывание с *mdm2*. Кроме того, изоформы *mdm2* обладают разной p53-связывающей способностью. Mdm2 регулируется белком *wt*p53, но может экспрессироваться независимо от мутантного p53. Mdm2 и p53 функционально независимы во время клеточной пролиферации, и если синтез p53 идет параллельно синтезу ДНК, то синтез *mdm2* — нет. Mdm2 — компонент системы ауторегуляторной обратной связи p53. Транскрипционная регуляторная роль *mdm2*, не зависящая от p53, подтверждена его способностью взаимодействовать с ТВР *in vitro* и *in vivo* в отсутствие p53. Мутации p53 и *mdm2* могут представлять различные, но не взаимоисключающие пути канцерогенеза и опухолевой прогрессии.

Многие клеточные функции модулируются взаимодействием типа белок-белок. Клеточные процессы (инициация транскрипции РНК-полимеразой, эксцизионная репарация, пострепликативная репарация, гомологичная рекомбинация и др.) обычно нуждаются в формировании мультипротеинового комплекса. Различные белковые комплексы часто экономно используют одни и те же белковые факторы в различных функциональных целях. Связывание p53 с белком ТВР (TATA-binding protein) вовлечено в p53-опосредован-

ную репрессию транскрипции. В число генов, подверженных ей, входят гены IL-6, PCNA, Rb, MDR1, fos, p53, Bcl2, тромбоспондина I и индуцибельной нитрооксидсинтетазы (NOS2). Белок p53 связывается с белком репликативного комплекса RPA (replication protein A) и с белками системы эксцизионной репарации, с человеческим гомологом белка RAD51, катализирующего некоторые этапы процесса рекомбинации, что указывает на участие p53 в этих процессах.

Ген p53 действует как сенсор повреждения ДНК и индуцирует репарацию, но если повреждение существенно и необратимо (нерепарабельно), он направляет клетку по пути апоптоза, чтобы предотвратить размножение клетки, имеющей протяженную мутацию. Способность индуцировать апоптоз – важная составляющая его опухолесупрессорной функции. p53 активирует экспрессию генов – супрессоров опухолей p21^{WAF1}, Bax и Fas и подавляет экспрессию гена Bcl2 (рис. 3.5, 3.6, см. вклейку). Все они участвуют в модуляции апоптоза. Таким образом, p53 – член многих биохимических путей: транскрипции, репарации, поддержания геномной стабиль-

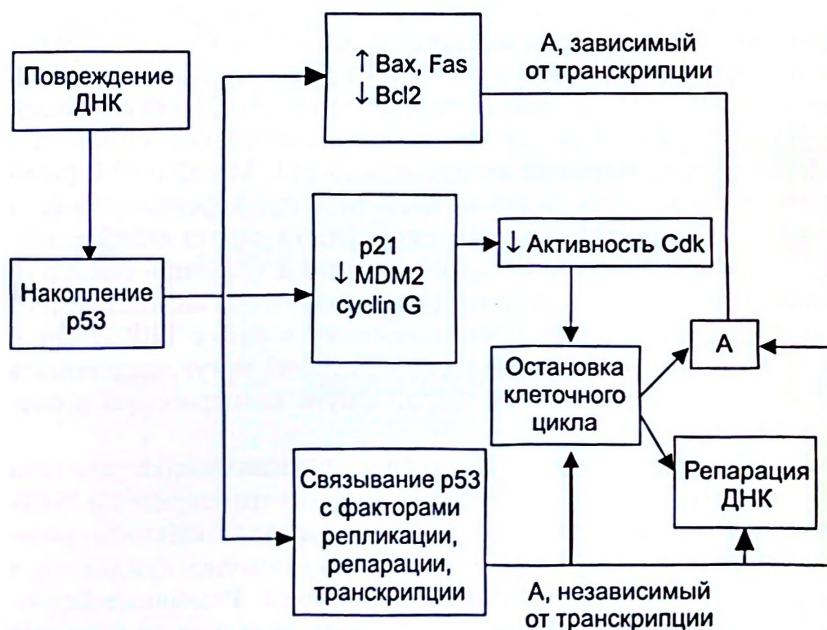


Рис. 3.5. Белок p53 – ключевой элемент пути ответа на повреждение ДНК. Эта простейшая модель не учитывает ни внутриклеточного, ни экстраклеточного окружения.

ности, контроля клеточного цикла и апоптоза. Понимание механизмов опухолевой супрессии даст молекулярные мишени для мультимодальной противораковой терапии, включая химио-, иммуно- и генотерапию.

Получив информацию о повреждении ДНК, белок p53 активирует транскрипцию гена p21, продуцирующего белок – ингибитор циклинзависимых протеинкиназ. Повышение уровня белка p21 ингибирует фосфорилирование, способствующее прогрессии клеточного цикла. Ясно, что потеря функции p53 проявляется в отсутствии транскрипционной активации p21 и последующего ингибирования прогрессии клеточного цикла. Многие мутации дают эффект прерывания остановки роста (активация онкогенов и инактивация онкосупрессии). Мутации, инактивирующие ген p53 и его регуляцию гена p21, будут иметь эффект отмены контроля клеточного цикла. Мутации p53-зависимого пути могут проявляться одинаково – потерей ответа на негативные ростовые сигналы. В этот путь сигнальной трансдукции вовлечены многие другие гены. Функция самого p53 также регулируется на многих уровнях. Она может изменяться мутациями самого гена и мутациями пути метаболизма белка p53, например, фосфорилирования, мутациями, влияющими на степень и длительность экспрессии, локализацию и конформацию белка.

Существует такой же многоступенчатый контроль сборки и функционирования циклиновых комплексов. Их транскрипция и трансляция находятся под сложным и жестким контролем. Циклинзависимые киназы активируются и инактивируются путем фосфорилирования/дефосфорилирования. Ассоциация белков в четырехмерные комплексы также управляется дополнительными белками. Все эти процессы играют важную роль в контроле критических точек клеточного цикла.

Вся эта молекулярная сеть контроля существует для репарации или, если она невозможна, для элиминации клеток с геномными повреждениями. Редкие наследственные мутации в этой сети проявляются в накоплении геномных повреждений в клетках, которые не элиминируются из организма, а носители таких мутаций имеют наследственную предрасположенность к неоплазиям и заболевают чаще, чем в среднем в популяции. Примером такого рода является синдром Ли–Фраумени, редкое аутосомно-доминантное состояние с повышенным риском раннего развития множественных первичных опухолей различных типов. При культивировании фибробластов пациентов с синдромом Ли–Фраумени в них накапливаются геномные

изменения и перестройки. Они гетерозиготны по гену p53, один аллель которого несет специфическую мутацию. Члены семьи с мутацией имеют 50% риск развития рака к 30 годам и 90% — к 65 годам.

Другой пример наследственного заболевания, обусловленного дефектом гена-супрессора опухолей — атаксия-телеангиэктазия (АТ). Ген АТМ (ataxia-telangiectasia mutation) кодирует белок, участвующий в пути сигнальной трансдукции, инициируемом повреждающими ДНК агентами. АТМ-киназа, активированная радиацией, фосфорилирует p53 по серину-15. Плейотропная природа этого гомозиготного наследственного заболевания проявляется в клеточном фенотипе нарушениями клеточного цикла, хромосомной нестабильностью и ингибированием репликативного синтеза ДНК. Гомозиготы встречаются с частотой 1/50 000, гетерозиготы составляют 0,5–1% популяции. Встречаемость рака повышена у первых в 100 раз, у вторых — в 3–5 раз по сравнению с нормой. Мутанты по АТМ-киназе характеризуются иммунодефицитом, хромосомной нестабильностью, гиперчувствительностью к радиации и другим агентам, вызывающим двуцепочечные разрывы, аномалиями клеточного цикла и предрасположенностью к раку. АТ-клетки менее чувствительны к индукции p53 радиацией, хотя ионизирующая радиация индуцирует p53-зависимый апоптоз в АТ-клетках, т.е. существуют, видимо, зависимый и независимый от АТМ-киназы механизмы индукции p53. p53-негативные клетки, в отличие от АТ-клеток, радиорезистентны. *In vivo* в АТ-клетках не наблюдается значительный дефицит репарации двуцепочечных разрывов, но их уровень после облучения выше нормального, а точность соединения концов ниже. В свете того, что АТМ-киназа функционирует как часть комплекса, который защищает концы ДНК от нуклеаз и от вовлечения в рекомбинацию, неудивительно, что АТ-клетки проявляют повышенный уровень спонтанной и радиационно-индуцированной внутрихромосомной рекомбинации. Таким образом, родственные белки функционируют в детекции повреждений и репарации ДНК. Члены семейства активируемых повреждениями ДНК протеинкиназ могут функционировать и в репарации двуцепочечных разрывов, и в рекомбинации. Злокачественные опухоли у больных АТ в 80% случаев лимфоидного происхождения. Инактивация АТМ препятствует нормальной лимфоидной дифференцировке и представляет собой важный этап патогенеза этих опухолей.

Связь между каскадом Ras/Raf/MEK/ERK и белками клеточного цикла. Ras-активированный путь сигнальной трансдукции обеспечивает связь между ростовыми факторами (IL-3, GM-CSF) и аппа-

ратом клеточного цикла. Ras требуется для активации Cdk2 и 4 в фазе G1. Эктопическая гиперэкспрессия Ras или регулируемых им молекул (ERK или Ets-2) индуцирует циклин D, но слабо влияет на циклины E и A. Регуляция циклина D более существенна из-за его быстрой деградациии.

В промоторе гена Bcl1/CCND1, кодирующего циклин D1, имеются сайты для активации его транскрипции субъединицами транскрипционного фактора AP-1 онкобелками c-Jun и c-Fos. Экспрессия генов c-Jun и c-Fos индуцируется трансдукцией митогенных сигналов, а мутации в AP-1-связывающих сайтах промотора гена Bcl1/CCND1 отменяют Ras-зависимую активацию экспрессии циклина D1. Повышенный уровень циклина D1 обнаруживается в 86% случаев карциномы молочной железы. Механизм действия многих противоопухолевых препаратов заключается в ингибировании специфических фаз клеточного цикла.

В экспериментах *in vitro* показано, что, лишаясь ростовых факторов более чем на 48 ч, цитокин-зависимые клетки входят в фазу G0. Когда ростовые факторы возвращаются в среду, клетки снова входят в клеточный цикл и пролиферируют. Если же клетки остаются без ростовых факторов более чем на 72 часа, они претерпевают апоптоз, причем количество выживших клеток обратно пропорционально длительности периода, в течение которого клетки были лишены пролиферативной стимуляции.

Большинство сигнальных киназ, промотирующих рост и выживание, трансдуцирует пролиферативные эффекты ростовых факторов через путь Raf/MEK/ERK, следовательно, разрушение этого пути сигнальной трансдукции будет иметь эффект отмены клеточной зависимости от ростовых факторов, а это прямой путь к злокачественной трансформации, что экспериментально показано в многочисленных исследованиях на мышах и клеточных линиях. Ростовые факторы промотируют выживание клеток мобилизацией среднеранних генов митогенного каскада, которая приводит к экспрессии генов, необходимых для клеточного роста и предотвращения апоптоза. Аутокринная стимуляция роста происходит, когда клетка приобретает способность продуцировать ростовые факторы, необходимые для ее собственного выживания и пролиферации, что часто встречается при острых миелоидных лейкозах. Продукция аутокринных факторов роста наблюдается в гемопоэтических клетках и фибробластах после трансформации активированным онкогеном Raf. Таким образом, конститутивная активация сигнального пути Raf/MEK/ERK может проявляться в аутокринной трансфор-

мации. Исследования способности активированных онкогенов индуцировать аутокринный цитокиновый синтез *in vitro* дают противоречивые результаты, что объясняется различиями анализируемых клеточных типов и генетической уникальностью каждой опухоли. Не следует забывать, что интерпретация информации, полученной в исследованиях *in vitro*, требует особой осторожности, если нет прямых однозначных доказательств ее адекватности процессам, происходящим *in vivo*.

У трансгенных мышей, экспрессирующих активный Raf, ускоряется Т-клеточная дифференцировка в тимусе. Присутствие Raf важно для индукции p21, когда сигнальный путь MEK/ERK остается интактным. Истощение пула Raf-1 в клетке отменяет индукцию p21 таксомом в клетках опухоли предстательной железы. Неясно, почему гиперэкспрессия Raf может приводить к таким противоречивым результатам. Для примирения противоречий предложена модель интеграции пролиферативных сигналов для остановки клеточного цикла. Эффект активации Raf детерминирован либо уровнем, либо длительностью его экспрессии. После стимуляции Raf доставляет пролиферативный сигнал, что проявляется в индукции циклинов и активации среднеранних генов пролиферативного ответа. Однако пролонгированный сигналинг через каскад MEK/ERK проявляется в индукции экспрессии p21 и остановке клеточного цикла. Эта двойная активность Raf может служить средством аутоингибиции и поддержания баланса при генерации пролиферативных сигналов. Три различных Raf-белка имеют различные уровни киназной активности, пропорционально которой они в разной степени индуцируют экспрессию p21 и блок клеточного цикла.

TGFβ и остановка клеточного цикла. Фактор TGFβ (transforming growth factor β) может индуцировать сильный рост-ингибирующий эффект во многих типах клеток и стимулировать пролиферацию других. TGFβ – важный регулятор прогрессии клеточного цикла и поэтому имеет значительный терапевтический потенциал. Стимулирующий эффект TGFβ скорее всего не прямой (через экспрессию других эндогенных ростовых факторов, таких как PDGF – ростовой фактор соединительной ткани, или через повышение экспрессии рецепторов EGF). Остановку роста, напротив, TGFβ индуцирует непосредственно и коррелирует с поддержанием опухолесупрессорного белка Rb в гипофосфорилированном состоянии.

В большинстве клеток TGFβ проявляет рост-ингибирующую активность. Влияние, которое он оказывает на экспрессию цикли-

нов, циклинзависимых киназ и их ингибиторов, хорошо изучено. Обработка эпителиальных клеток фактором TGF β ингибирует циклины A и E и Cdk2/4, а также фосфорилирование Rb, и клеточный цикл останавливается в G1-фазе. Гиперэкспрессия Cdk4 может отменить остановку G1-фазы, индуцированную TGF β в эпителиальных клетках. TGF β может также индуцировать экспрессию Cdk-ингибиторов p15^{INK4B} и p21^{CIP1}, супрессировать экспрессию онкогена c-Мус, блокируя таким образом прохождение клеткой фазы G1, и стимулировать перераспределение свободного и связанного с циклиновыми комплексами p27^{CIP1}. При этом TGF β индуцирует конкурентное связывание p15 с Cdk4/6 и, следовательно, ингибирует функцию последних, рост-ингибирующий белок p27 вытесняется из места его депонирования — комплекса циклин D/Cdk4/6 и связывается со своей истинной мишенью, комплексом циклин E/Cdk2.

Обработка клеток TGF β может привести к фосфорилированию транскрипционного фактора CREB и усилить связывание CREB с AP-1 и CRE-элементом в промоторе гена коллагеназы. На этом основании предполагается, что CREB участвует в транскрипционной активации некоторых генов в ассоциации с Smad-комплексом. Ими могут быть гены Cdk-ингибиторов, так как их активность индуцируется после обработки клеток TGF β .

Семейство TGF β состоит из 3 изоформ с различной тканевой специфичностью. Основным источником TGF β — тромбоциты и клетки костной ткани, но активированные лимфоциты, макрофаги и нейтрофилы также секретируют его. TGF β секретируется как часть неактивного латентного комплекса, который активируется отщеплением от молекулы-предшественника субъединиц LAP (latency-associated protein) и LTBP (latent TGF β -binding protein). Активный TGF β осуществляет свои разнообразные биологические эффекты передачей сигнала через гетеродимерный рецепторный комплекс, состоящий из двух типов рецепторов — T β RI и T β RII с серин/треонинкиназной активностью. Обе субъединицы экспрессируются на поверхности большинства клеток как гомодимеры. TGF β связывается с T β RII, который фосфорилирует сериновые и треониновые остатки в T β RI и активирует его.

Следующий передающий сигнал интермедиат идентифицирован как гомолог соответствующего белка дрозофилы Mad (Mathers against decapentaplegic) и получил название Smad. Семейство Smad включает 6 гомологов. В отсутствие лигандной стимуляции белки Smad существуют в цитоплазме в виде мономеров. Активированный рецептор привлекает Smad2 и Smad3 к мембране и фосфорилирует

их. После стимуляции Smad2 и Smad3 фосфорилируются рецептором T β RI, который имеет цитоплазматический домен с серин/треонинкиназной активностью. Фосфорилированный комплекс Smad2/3 отделяется от рецептора и формирует олигомер с белком Smad4, который транслоцируется в ядро и связывается там с транскрипционными факторами, такими как c-Jun и c-Fos, компонентами клеточного цикла или непосредственно со специфическими последовательностями ДНК, функционируя там как транскрипционный фактор и индуцируя экспрессию своих генных мишеней. Некоторые белки являются негативными регуляторами TGF β -сигнального пути. Smad6 ингибирует транслокацию комплекса Smad2/Smad4, препятствуя фосфорилированию Smad2. Рост-ингибирующее действие TGF β на гемопоэтические предшественники осуществляется с участием белка Smad5.

TGF β оказывает глубокое плеiotропное влияние на иммунную систему, он является самым мощным иммуносупрессором из известных сегодня. Мыши с фенотипом TGF β ⁻ имеют тяжелые нарушения иммунитета, приводящие к смерти в течение месяца. У них развиваются множественные инфильтраты воспалительных клеток во многих органах и усиленная лимфоидная пролиферация. Важная роль TGF β в поддержании иммунного гомеостаза подтверждается следующим наблюдением: *in vitro* активация растущих Т-лимфоцитов сопровождается усилением экспрессии TGF β и его рецепторов, проявляющимся в самоограничении клональной экспансии. TGF β супрессирует экспрессию Fas-лиганда — одной из ключевых молекул индукции апоптоза в клетках-мишенях цитотоксической активности, экспрессирующих Fas.

TGF β ингибирует не только Т-клеточную пролиферацию, но и продукцию Т-клетками иммуностимулирующих цитокинов IFN γ и TNF α , а также IL-2-зависимые пролиферативные сигналы. Добавление IL-2 к TGF β -обработанным культурам клеток из лимфоцитарных опухолей восстанавливает Т-цитотоксическую активность. TGF β в свою очередь ингибирует экспрессию рецепторов IL-2 и IL-1, а также рецептора c-kit на незрелых тимоцитах. На клетках из лимфоидных опухолей TGF β , наоборот, усиливает экспрессию c-kit.

Таким образом, TGF β является важнейшим регулятором гемопоза и иммунного ответа. Он регулирует пролиферацию и дифференцировку ранних предшественников, но не влияет на более зрелые. Что касается злокачественного роста, влияние TGF β варьиabelно и зависит от степени потери чувствительности клеток к нему, которая колеблется от нормальной до полной резистентнос-

ти даже в пределах одного типа опухоли. Механизмы онкогенеза при TGF β -резистентности иллюстрирует рис. 3.7. Резистентность к рост-ингибирующему действию TGF β может быть обусловлена отсутствием функционального рецептора T β RI, устойчивостью к TGF β -индуцированному апоптозу или фенотипом TGF β ⁺ самих опухолевых клеток. В последнем случае сохраняется чувствительность к экзогенному TGF β , что может быть полезным при разработке новых терапевтических подходов, например, в комбинации TGF β с глюкокортикоидами. Однако важно помнить, что TGF β -сигналинг зависит от контекста:

- различные гены-мишени в разных клеточных типах;
- некоторые гены активируются, другие репрессируются;
- некоторые типы ответов могут быть утрачены в опухоли, другие — нет.

Клеточная пролиферация зависит от упразднения не только цитостатических антиростовых сигналов, но и сигналов, принуждающих клетки к необратимому вхождению в постмитотическое состояние готовности к дифференцировке, механизмы которого не вполне понятны. По всей видимости, опухолевые клетки используют различные стратегии избегания терминальной дифференцировки. Одна из них непосредственно вовлекает ген с-Мус, который кодирует транскрипционный фактор. В ходе нормального развития рост-сти-

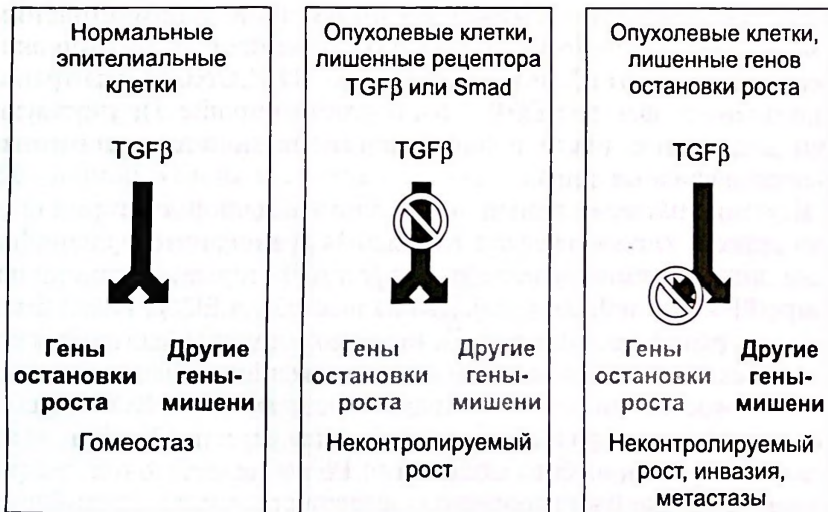


Рис. 3.7. Двойная роль TGF β в онкогенезе.

мулирующее действие Мус в ассоциации с фактором Мах может быть замещено альтернативным комплексом Мах с одним из факторов группы Mad. Формирование комплекса Мах/Mad является сигналом, индуцирующим дифференцировку. Однако гиперэкспрессия с-Мус, наблюдаемая во многих опухолях, сдвигает баланс в сторону комплекса Мус/Мах, отвергая таким образом дифференцировку и промотируя рост. Взаимодействие различных антипролиферативных и индуцирующих дифференцировку сигналов с основным механизмом клеточного цикла всегда тем или иным образом нарушено в процессе канцерогенеза.

3.2. МИШЕНИ ГЕНОВ-СУПРЕССОРОВ ОПУХОЛЕЙ И ОНКОГЕНОВ

Повреждение ДНК, гипоксия, оксидативный (окислительный) стресс, нуклеотидное истощение, гиперэкспрессия онкогенов активируют ген p53, изменяют фосфорилирование и стабильность белка p53. Ген p53 содержит 3 функционально важных домена: N-терминальный домен отвечает за трансаktivацию, центральный домен — за ДНК-связывание и C-терминальный домен — за тетрамеризацию. Мутантный белок в опухолях почти всегда лишен трансаktivирующей функции, т.е. эта функция существенна для p53-опосредованной опухолевой супрессии. К генам-мишеням трансаktivирующей функции гена p53 относятся повсеместно экспрессируемые гены p21 и mdm2, циклина G1 (CCNG1), ген транскрипционного фактора EGR-1 (early growth response 1), участвующий в контроле роста и дифференцировки, а также многие тканеспецифичные гены.

Изучение паттерна генной экспрессии клеточной линии из опухоли толстой кишки человека выявило 14 транскриптов, специфически индуцируемых минимум 10-кратно, которые получили название PIG (p53-induced gene). Два из них (p21 и E24/PIG68) были известны ранее как мишени p53, несколько других участвуют в регуляции редокс-статуса (redox — от англ. oxidation-reduction — окислительно-восстановительные реакции) и образовании ROS (reactive oxygen species), чья роль в апоптозе хорошо изучена. Хотя эктопическая экспрессия любого единичного PIG и недостаточна для индукции апоптоза, блокирование их активности заметно ингибирует клеточную смерть. Все это привело к гипотезе о том, что p53 индуцирует апоптоз, увеличивая продукцию ROS. Это приводит к окис-

лительному стрессу, повреждению митохондрий и клеточной смерти. Данная гипотеза позднее была подтверждена биохимически.

Если р53-опосредованная остановка G1 фазы зависит от p21 — ингибитора циклинзависимых киназ, то молекулярной основой остановки фазы G2 является ген 14-3-3σ (сигма). Ген 14-3-3σ — гомолог гена дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, от которого зависит индуцированная радиацией остановка митотического цикла в фазе G2. Экспрессия этого гена активируется эктопической экспрессией гена p53 и γ-облучением. Ген 14-3-3σ, как и p21, — непосредственная транскрипционная мишень p53. Его элиминация путем гомологичной рекомбинации из клеток опухоли толстой кишки человека линии НСТ116 отменяет радиационно-индуцированную остановку в фазе G2.

Еще одна группа p53-индуцибельных генов — семейство РЕТ (p53 early transcripts) экспрессируется сразу или вскоре после p53-индукции.

Анализ p53-зависимых транскриптов показал, что p53 осуществляет свои разнообразные клеточные функции, влияя на экспрессию большой группы генов, варьируемых в отношении степени p53-зависимости, уровня и времени экспрессии. Эта вариабельность обусловлена клеточным контекстом (клеточный тип, внутри- и внеклеточные сигналы).

Клинические исследования проводились фармацевтической компанией ONYX, разработавшей аденовирусный вектор, который не реплицируется в клетках с нормальным геном p53, но реплицируется и убивает клетки p53⁻, т.е. лишенные его функционально активного продукта. Эта экспериментальная терапия была применена к пациентам в терминальной стадии с опухолями головы и шеи, поджелудочной железы и яичника, гастроинтестинальными опухолями.

Ген-супрессор опухолей Rb (retinoblastoma susceptibility), который кодирует регуляторный клеточный белок, впервые идентифицирован в ретинобластоме. Ретинобластома — рак сетчатки глаза у детей, чаще наследственный (билатеральный и мультифокальный), реже спорадический (унилатеральный и унифокальный). Ретинобластома индуцируется биаллельной инактивацией гена Rb, который экспрессируется во всех нормальных тканях и клеточных линиях. В опухолях либо экспрессируется мутантная форма, либо продукт гена отсутствует. Аномалии этого гена описаны при многих других опухолях: мелкоклеточном и немелкоклеточном раке легкого, опухолях мочевого пузыря и др. Его опухолесупрессорная функция в основном заключается в способности действовать как негативный регулятор.

тор прогрессии клеточного цикла. Продукт гена — фосфопротенин $p110^{Rb}$. Он дифференциально фосфорилируется в течение клеточного цикла, фосфорилирование инактивирует его. Нефосфорилированный $p110^{Rb}$ обнаруживается преимущественно в фазе G1. В норме процесс фосфорилирования начинается в поздней фазе G1, за несколько часов до перехода в S-фазу.

Стимуляция растущих клеток митогенами ассоциируется с фосфорилированием Rb и переходом G1→S. Относительно повышенный уровень фосфорилированного Rb обнаружен в логарифмической фазе роста клеток сравнительно с клетками в фазе G1. Следовательно, нефосфорилированная форма является супрессором пролиферации. Гиперфосфорилированный статус поддерживается до конца клеточного цикла, и дефосфорилирование происходит на выходе из митоза. Стадиоспецифическое фосфорилирование Rb опосредуется циклином D и Cdk4/6. Циклин E тоже может участвовать в фосфорилировании Rb в составе комплекса циклина E/Cdk2.

Белок Rb контролирует транскрипцию генов, необходимых для прогрессии клеточного цикла, и его эффективность зависит от взаимодействия с белком E2F. Фосфорилирование Rb вытесняет его из комплекса Rb/E2F. Семейство транскрипционных факторов E2F (E2 binding factor) описано первоначально по способности связывать промотор аденовирусного гена E2 и включает 5 идентифицированных членов: E2F1, E2F2 и т.д. В виде гомодимеров они сайтспецифично связываются с ДНК. Освободившийся от Rb фактор E2F активирует транскрипцию генов, необходимых для прогрессии клеточного цикла, таких как гены дигидрофолатредуктазы (DHFR) и тимидинсинтетазы (TS), экспрессия которых важна для вхождения клеток в S-фазу. Таким образом, взаимодействие Rb с E2F подавляет E2F-зависимую транскрипцию.

Функция регуляции клеточного цикла белка Rb может вовлекать другие транскрипционные факторы, такие как члены Ets-семейства, которые вовлечены в прогрессию клеточного цикла активированных Т-клеток. Ets-родственный транскрипционный фактор Elf-1 содержит Rb-связывающий мотив, подобный Rb-связывающему мотиву вирусных онкопротеинов. Как и в случае E2F, фосфорилирование Rb проявляется в высвобождении Elf-1. Кроме того, Rb активирует экспрессию гена TGFβ2 посредством регуляции транскрипционного фактора ATF2, мишенью транскрипционной активности которого является ген TGFβ2.

Облучение клеток с неповрежденным геном p53 ионизирующей радиацией индуцирует повышение экспрессии p21 и накопление

гипофосфорилированного Rb. Наоборот, когда p53 структурно и/или функционально инактивирован, эти процессы не наблюдаются.

p53 репрессирует транскрипцию ряда генов, таких как ген тимидинкиназы, c-Myc и ДНК-полимеразы α , и эти гены также трансктивируются белком E2F. Таким образом, p53 и Rb являются компонентами одного контролирующего пути, причем p53 может непосредственно регулировать транскрипцию Rb. Совместная экспрессия wtp53 и E2F1 задерживает клетку в фазе G1 и направляет ее к апоптозу.

Примером относительно тканеспецифичного опухолевого супрессора может служить ген APC (adenomatosis polyposis coli). Элиминация функции гена APC приводит к инициации канцерогенеза в толстой кишке. Одно из проявлений опухолесупрессорной функции APC — привлечение онкобелка β -катенина в мультимолекулярный комплекс, который включает в себя GSK3 β -киназу и структурный белок аксин. Включенный в этот комплекс и фосфорилированный GSK3 β -киназой β -катенин затем расщепляется убиквитиновыми протеосомами. β -катенин в комплексе с кадгеринами и десмоглекином связывается с транскрипционными факторами семейства TCF (T-cell factor) и активирует генную транскрипцию. Инактивация APC и некоторые мутации в гене β -катенина придают β -катениновой молекуле резистентность к деградации, которая приводит к усилению регулируемой комплексом β -катенин/TCF транскрипции. Наиболее известным геном-мишенью (в числе 15 других) регуляторного пути APC/ β -катенин/TCF является онкоген c-Myc. Идентификация онкогена c-Myc как мишени (APC/ β -катенин/TCF)-пути сигнальной трансдукции объяснила некоторые особенности колоректальных опухолей человека: 1) невзирая на стадию заболевания, генетические перестройки, вовлекающие локус c-Myc (амплификации, транслокации), крайне редко встречаются в опухолях этого типа, хотя в большинстве случаев наблюдается гиперэкспрессия мРНК и белка c-Myc; 2) в отличие от многих других типов опухолей человека, очень редко встречаются колоректальные опухоли с мутациями в генах p15, p16, циклина D1, Cdk4, Rb. Поскольку c-Myc-сигналинг может обойти p16- и pRb-опосредованную ингибицию роста, необходимость в элиминации функции этих генов снимается активацией гена c-Myc по механизму APC/ β -катенин/TCF.

Не менее важна способность APC подавлять экспрессию онкогена PPAR δ (peroxisome proliferator-activated receptor delta). В промоторе гена PPAR δ имеется функциональный сайт связывания комплекса APC/ β -катенин/TCF. Белок PPAR δ — член суперсемейства

ядерных рецепторов для лиганд-зависимых транскрипционных факторов. Это обстоятельство особенно интересно в связи с тем, что PPAR δ связывает нестероидные противовоспалительные препараты — вещества, известные своим противоопухолевым действием в толстой кишке. Нестероидные противовоспалительные препараты разрушают PPAR δ /RXR α -ДНК-связывающий комплекс и нейтрализуют функцию PPAR δ .

Таким образом, эктопическая экспрессия APC проявляется в подавлении двух важных мишеней APC/ β -катенин/TCF-механизма (рис. 3.8, см. вклейку): с-Мус — позитивного регулятора пролиферации; PPAR δ — объекта противоопухолевого действия нестероидных противовоспалительных препаратов.

Онкоген с-Мус (myelocytomatosis) кодирует HLH-содержащий лейцин-зипперный транскрипционный фактор, вовлеченный в канцерогенез множества типов опухолей. Установлено, что с-Мус индуцирует пролиферацию, промотируя вхождение в клеточный цикл, но гены-мишени, ответственные за эту функцию, в основном остаются неизвестными. Экспрессия с-Мус необходима, но недостаточна, чтобы индуцировать пролиферацию в отсутствие сывороточных ростовых факторов, следовательно, анализ профиля генной экспрессии в клетках *in vitro* позволяет идентифицировать прямые мишени с-Мус, а не просто гены, чья функция является вторичным следствием с-Мус-индуцированной пролиферации. Гиперэкспрессия с-Мус и циклинзависимой киназы Cdk4, которая в составе циклинового комплекса участвует в регуляции прогрессии фазы G1 клеточного цикла, может привести к иммортализации клетки, что часто наблюдается в опухолях человека. Непосредственная активация гена Cdk4 белком с-Мус верифицирована идентификацией четырех с-Мус-связывающих сайтов в промоторе гена Cdk4, которые необходимы и достаточны для индукции транскрипции гена Cdk4 белком с-Мус. Учитывая, что с-Мус является мишенью регуляторного пути APC/ β -катенин/TCF и что этот путь часто нарушен в колоректальных опухолях, гиперэкспрессия Cdk4 в этих опухолях указывает, что Cdk4, по всей видимости, является мишенью с-Мус-онкогенного пути.

Семейство рецепторных тирозинкиназ erbB состоит из 4 членов: erbB1/EGFR, erbB2/neu/HER-2, erbB3/HER-3 и erbB4/HER-4. Они содержат цистеинбогатый экстраклеточный домен, трансмембранный домен и внутриклеточный каталитический домен, функционируют как рецепторы ряда пептидных ростовых факторов (EGF, TGF α , эстрогена и др.). Связывание лигандов приводит к димеризации и аутофос-

форилированию рецепторов. Активированные рецепторы связываются с белками, имеющими домены SH2, распознающими специфические фосфотирозинсодержащие последовательности активированного рецептора. Эти SH2-содержащие адапторные молекулы передают сигнал, приводящий к генной активации. Вовлеченность продуктов генов семейства *erbB* в экстраклеточную сигнальную трансдукцию обуславливает их участие в опухолевой трансформации и прогрессии. Ген *ErbB2* (*neu/HER-2*) кодирует трансмембранный гликопротеин 185 кДа. Он активируется точечной мутацией, которая проявляется аминокислотной заменой валин-664-глутамин, и это изменение трансформирует клетку. Амплификация этого гена описана во множестве типов опухолей, таких как карцинома молочной железы, мочевого пузыря, толстой кишки, легкого, желудка, яичника.

Гиперэкспрессия EGFR, обнаруженная при немелкоклеточном раке легкого, обусловлена делецией 267 аминокислоты в аминотерминальном конце молекулы. Последствия активации EGFR при связывании лиганда в опухолевой клетке иллюстрирует рис. 3.9 (см. вклейку).

Ген *WT1* (*Wilms' tumor*) относится к семейству *Egr* (early growth response)-генов, которое включает 5 транскрипционных факторов: *Egr1-4* и *WT1*, объединенных по признаку наличия высокомолекулярных цинк-фингерных доменов, связывающихся с ДНК. Репрессорная функция белка *WT1* относится к пролин-глутамин-богатой области молекулы, и если этот участок оказывается объединенным с цинк-фингерным доменом *Egr*, то белок превращается в транскрипционный репрессор. Так как белки *Egr-1* и *WT1* связываются с одним и тем же *Egr*-связывающим элементом ДНК, относительная концентрация активирующих и репрессирующих белков детерминирует направление регуляции.

Опухоль Вилмса — детская нефробластома, которая может развиваться и спорадически, и семейно (1%) в результате aberrантной дифференцировки почечных стволовых клеток вследствие утраты супрессорной функции генов-супрессоров опухолей, ассоциированных с данным видом опухоли. Тотальный синдром описан как WAGR-синдром (*Wilms'—aniridia—genitourinary—mental retardation*). Ген *WT1* картирован в локусе 11p13. В этом локусе, кроме *WT1*, ближе к центромере расположены гены, кодирующие каталазу и β -субъединицу фолликулостимулирующего гормона FSH- β , а ближе к теломере — гены *PAX6* (ген аниридии), *MR* (*mental retardation*) и *UG* (*urino-genital malformation*).

Ген *WT1* имеет определенный пространственно-временной паттерн экспрессии в развивающейся почке, а также генитальном греб-

не, фетальных гонадах и мезотелии. Экспрессия WT1 не обнаружена в фетальных сердце, коже, надпочечниках, желудке, печени, глазах и мышцах. Супрессия миеогенеза во время развития почки — нормальная функция WT1. Изменения в паттерне экспрессии гена во время эмбрионального развития совместимы с представлением о переключении дифференцировки мезенхимальных клеток в клетки эпителия. Белок WT1 супрессирует транскрипцию генов, кодирующих некоторые ростовые факторы: PDGF-A (platelet-derived growth factor), IGF-II (insulin-like growth factor), TGFβ1. Экспрессия рецепторов ростовых факторов также модулируется им. Белок WT1 содержит ДНК-связывающую последовательность, гомологичную таковой NGF (neural growth factor)-индуцибельного транскрипционного фактора. Неудивительно, что инактивация этого гена может приводить к нерегулируемой клеточной пролиферации, aberrантной дифференцировке и канцерогенезу.

Альтернативный сплайсинг про-мРНК WT1 приводит к образованию изоформ WT1, различающихся наличием/отсутствием некоторых последовательностей [5-го экзона и лизин/треонин/серин-богатого (KTS) фрагмента между цинк-фингерными доменами 3 и 4], от которых зависит функция белка. Существование изоформ WT1 имеет функциональное значение. В промоторах многих генов встречается сайт Egr-связывания, и WT1 может, следовательно, связываться с этими промоторами. Изоформа KTS+ имеет гораздо меньшую ДНК-связывающую активность. Нарушение баланса между двумя изоформами проявляется тяжелыми аномалиями развития. Значительная часть опухолей Вилмса содержит изоформу WT1, лишенную 5-го экзона, которая отличается пониженной способностью функционировать как транскрипционный регулятор.

С помощью антител против WT1 и сплайсинговых комплексов (малых ядерных рибонуклеопротеинов SnRNP) показано, что WT1 ко-локализован с SnRNP. Это говорит о том, что WT1 выступает как регулятор транскрипции и фактор сплайсинга.

Инактивация функции WT1 может быть следствием мутации. При опухоли Вилмса мутации обнаруживаются в кодирующей части гена, но не в промоторе. Соматические мутации — редкое событие. Мутации в цинк-фингерном домене гена WT1, которые полностью лишают белок ДНК-связывающей способности, встречаются у 95% пациентов с синдромом Denys-Drash. Пациенты с этим синдромом, у которых развиваются опухоли Вилмса, страдают почечной недостаточностью, псевдогермафродитизмом и дисгенезом гонад. Мутации в других областях гена, которые приводят к обра-

зованию усеченного транскрипта или его аномальному процессингу, проявляются в образовании функционально неактивного белка.

Транскрипционный фактор WT1 регулирует экспрессию ряда генов, среди которых CSF1, TGF β , RARA, с-Мус, с-туб и Bcl2, ассоциирующиеся с пролиферацией, дифференцировкой или апоптозом гемопоэтических клеток. Ген IGF-II, который гиперэкспрессируется в опухолях Вилмса, может обеспечить аутокринную стимуляцию роста в результате индукции рецептора IGF-II. Стабильная трансфекция клеток геном WT1 индуцирует в них экспрессию этого рецептора, которая усиливается, если WT1 несет специфическую мутацию в трансактивирующем домене. Описана негативная корреляция между WT1 и IGF-Ig на уровне мРНК: количество WT1-мРНК обратно пропорционально мРНК IGF-Ig. Экспрессия экзогенного WT1 ингибирует пролиферацию трансфицированных клеток вместе с редукцией уровня транскриптов IGF-Ig. Другой рецептор ростового фактора, чья экспрессия подавляется фактором WT1, — рецептор эпидермального фактора роста EGF α , который считается маркером плохого прогноза при ряде опухолей человека. Микроинъекции мРНК WT1 могут блокировать входение клетки в S-фазу, индуцированное сывороточной стимуляцией. Таким образом, WT1 является фактором негативного контроля клеточного цикла и соответственно опухолевым супрессором, но может функционировать и как онкоген, например, в лейкозных клетках. Экспрессия WT1 определена у 80% нелеченых пациентов с острым миелолейкозом. Большинство пациентов в полной ремиссии теряли ее, а в 75% случаев редицива экспрессия WT1 определялась еще до его начала. Белок WT1 может быть обнаружен только в ядрах лейкозных бластов, но не в нормальных CD34⁺-предшественниках, и у большинства пациентов с лейкозом бласты экспрессируют WT1. Следовательно, при ОМЛ экспрессия WT1 может служить маркером злокачественных бластных клеток.

Опухоли Вилмса часто несут аномалии хромосомы 17, в связи с чем было интересно оценить возможную роль p53 в регуляции функции WT1 как транскрипционного фактора. Оказалось, что WT1 действует как транскрипционный активатор в отсутствие wtpr53 и как транскрипционный репрессор в его присутствии. Индукция IGF-II белком WT1 также может быть связана с присутствием мутантного p53. В полном соответствии с представлением о стабилизации p53 клеточными белками WT1 формирует комплекс с p53. Это взаимодействие заставляет оба белка трансактивировать их гены-мишени.

Выявление связи между экспрессией WT1, ростовых факторов и их рецепторов, p53-статусом и клеточной пролиферацией привело к оценке экспрессии WT1 как маркера опухолевой прогрессии и прогностического фактора. Потеря гетерозиготности в локусе WT1 наблюдается в 50% случаев рака мочевого пузыря, а также ассоциирована с поздними стадиями немелкоклеточного рака легкого и метастазами в лимфатические узлы, при плоскоклеточном раке легкого — с метастазами в лимфатические узлы и снижением общей выживаемости.

Гены развития и их супрессорная функция. Клеточная дифференцировка и пролиферация являются интегральными, но взаимоисключающими компонентами роста, развития и морфогенеза. Тем не менее развитие и неопластический процесс обладают общими чертами, которые наводят на мысль, что неопластическая трансформация может быть патологическим двойником нормальной дифференцировки и развития, возникающим в результате сбоя в программе генной экспрессии. Наиболее заметна среди них инвазивная способность, которой обладают опухолевые клетки, подобно эмбриональным клеткам. Ряд генов, контролирующих дифференцировку и эмбриональное развитие, идентифицирован, и некоторые из них функционируют как супрессоры опухолей. Механизмы канцерогенеза, инактивирующие супрессорную функцию этих генов, приводят к нарушению связанной с развитием координации генной экспрессии.

Семейство Wnt (wingless-type MMTV integration site family) состоит более чем из 20 генов, которые действуют преимущественно в эмбриональном развитии и дифференцировке, а также в неопластической трансформации. Гены Wnt кодируют гликопротеины, которые тесно ассоциируются с экстраклеточным матриксом. Основным член семейства — ген Wnt1. Компонентами Wnt1-пути сигнальной трансдукции являются β -катенин и γ -катенин (плакоглобин), ассоциированные с кальций-зависимой клеточной адгезией в эпителии. Экспрессия Wnt1 усиливает накопление β -катенина и плакоглобина, связывание β -катенина с кадерином, которое опосредует клеточную адгезию, а также ко-активаторную функцию β -катенина, действующего в ассоциации с транскрипционными факторами Tcf/LEF. В отсутствие Wnt-стимуляции редуцированный уровень β -катенина делает возможной репрессию генов-мишеней Wnt-сигналинга путем ассоциации транскрипционных факторов Tcf/LEF с их ко-репрессорами.

Клетки линии C57MG из молочной железы отвечают на митогенную стимуляцию ростовыми факторами EGF и FGF, но их частич-

ная трансформация геном Wnt1 может замеснить эти ростовые сигналы. Белки Wnt способны индуцировать пролиферацию и трансформацию клеток *in vitro* и *in vivo*. Трансформирующая способность разных генов Wnt-семейства различна. Гены Wnt-3a и Wnt-7a обладают высокой трансформирующей способностью, Wnt-2, -5b и -7b менее эффективны. В конце этого списка стоят Wnt-4 и Wnt-5a, которые не обладают трансформирующей способностью.

Клеточная трансформация генами Wnt может происходить по паракринному механизму. Клетки, экспрессирующие Wnt1, хотя сами не трансформируются, могут индуцировать трансформацию совместно культивируемых клеток-мишеней. В процессе клеточной трансформации гены Wnt могут кооперировать друг с другом и с другими онкогенами. Эксперименты с мышами, битрансгенными по генам Wnt1 и Int2 (член семейства ростовых факторов FGF), показали, что опухоли молочной железы у битрансгенных мышей (особенно самцов), несущих оба гена, образуются чаще, чем у мышей, трансгенных по одному из этих генов. В течение 8 месяцев опухоли образовались у всех битрансгенных мышей, но только у 15% мышей, трансформированных геном Wnt1, и ни у одной мыши с геном Int2.

Экспрессия гена Wnt1 может быть активирована инсерционной мутацией. Около 40% опухолей с различным генетическим фоном несут инсерционную мутацию в гене Wnt1. Активация этого гена может усилить экспрессию других генов семейства Wnt. Промотор гена Wnt1 содержит сайт связывания WIF-1 (Wnt1-inducing factor 1). Этот белок определяется в клетках эмбриональной карциномы, дифференцирующихся по нейроэктодермальному пути под действием ретиноевой кислоты, и не определяется в клетках, дифференцирующихся в мезодерму под действием диметилсульфоксида.

Поскольку эктопическая экспрессия Wnt-генов ассоциируется с пролиферацией, интересно было выяснить, не являются ли они мишенью регуляции геном p53. У мышей, трансгенных по Wnt1 и p53-негативных, опухоли развиваются раньше, чем у p53-позитивных. Это наблюдение ясно указывает на регуляторную роль p53 в индукции пролиферации и канцерогенеза генами Wnt.

3.3. БЕЛКИ ТЕПЛОВОГО ШОКА В ПРОЛИФЕРАЦИИ, ДИФФЕРЕНЦИРОВКЕ И КАНЦЕРОГЕНЕЗЕ

Белки теплового шока (heat shock proteins, HSP) – семейство белков, которые индуцируются в клетке в ответ на различные стрес-

сы, такие как повышение температуры, воздействие тяжелых металлов, токсинов, бактериальных и вирусных инфекций. Эти белки получили свое название в связи с тем, что впервые были открыты в клетках дрозофилы, подвергшихся тепловому воздействию. Их эволюционная консервативность, однотипная природа ответа у разных видов предполагают общий механизм, которым клетки справляются со средовыми стрессами. Вирусы и некоторые другие средовые факторы считаются этиологическими агентами канцерогенеза, следовательно, изучение HSP представляет интерес в контексте клеточной пролиферации и канцерогенеза. HSP ассоциируются с микротрубочками и участвуют в их сборке. Тепловой шок дезорганизует цитоскелет и влияет на его компоненты, такие как актиновые филаменты и микротрубочки, изменяющие клеточную морфологию, что может повлиять на пролиферацию и инвазивное поведение клеток.

Семейство HSP состоит из нескольких членов, которые называются по молекулярной массе их субъединиц (HSP15-30, HSP70, HSP90), и убиквитина, маленького по сравнению с другими членами семейства белка молекулярной массой 8 кДа, участвующего вместе с протеосомой в протеолизе полипептидов. Значение белков теплового шока в контроле клеточной пролиферации связано с их функцией молекулярных шаперонов в свете их роли в регуляции белкового синтеза, в сборке, транспорте, стабилизации или, наоборот, протеолизе ядерных белков, связанных с контролем клеточного цикла, таких как p53, c-Myc, E1A, c-fos и др. HSP тесно ассоциированы с фазой клеточного цикла. Стимуляция роста митогенами или ростовыми факторами проявляется в синтезе HSP. Экспрессия HSP70 индуцируется при переходе клетки из фазы G1 в S-фазу и особенно в S-фазе.

Гены белков теплового шока наряду с генами c-fos, c-jun, геном β -актина, некоторыми генами среднераннего ответа на митогенные сигналы относятся к мишеням транскрипционной функции транскрипционного фактора p53. Wtp53 подавляет экспрессию HSP70, но мутантный p53 является причиной его трансактивации. Онкобелки c-Myc и E1A тоже активируют промотор гена HSP70. Транскрипционная регуляция гена HSP70 обусловлена цис-активирующим элементом с определенной нуклеотидной последовательностью, известным как элемент теплового шока (heat shock element, HSE), который расположен выше сайта начала транскрипции.

Белки теплового шока оказывают заметное супрессивное влияние на клеточную трансформацию, которое является следствием

образования комплексов с трансформирующими агентами. Например, трансфекция гена HSP70 в клетки, трансформированные мутантным p53 и онкогенами Ras и Мус, супрессирует процесс трансформации. Комплексообразование между белками теплового шока и p53 встречается также в ряде опухолей, например, комплекс p53/HSP70 обнаружен в первичных инвазивных карциномах молочной железы. Протеиновые комплексы p53/HSP могут образовываться как с wt p53, так и с мутантным p53, возможно, для того, чтобы улавливать и обезвреживать его. HSP70 супрессирует трансформацию мышинных эмбриональных фибробластов мутантным p53. Эмбриональные фибробласты с фенотипом p53^{-/-} содержат в 1000 раз больше белка HSP70, чем клетки с p53^{+/+}. Известно, что HSP70 интегрируется с wt p53 или с мутантным p53, онкобелками с-Мус и E1A в механизме, контролирующем прогрессию клеточного цикла. Обнаружено специфическое комплексообразование мутантного инактивированного p53, не способного функционировать в негативном контроле прогрессии клеточного цикла, с белком HSP70. Связывание HSP70 с гипофосфорилированной формой Rb позволяет клеткам входить в S-фазу, что свидетельствует о вовлеченности HSP70 в контроль клеточного цикла.

Тепловой шок подавляет экспрессию гена h-Mts1, а в термоустойчивой линии HTG, происходящей из меланомной линии B16-BL6, его экспрессия ингибирована конститутивно. Клетки линии HTG характеризуются 3-4-кратным усилением экспрессии HSP28 и заметным сокращением S-фазной фракции. Эксперименты показали, что HSP28 может быть ассоциирован с ингибцией клеточной пролиферации. Этот белок высоко экспрессируется в покоящихся кератиноцитах по сравнению с аналогичными пролиферирующими клетками. В митоген-стимулированных В-лимфоцитах индукция HSP28 совпадает с пиком пролиферации и началом остановки роста. Преходящее повышение уровня HSP28 обнаружено в лейкозных клетках, индуцированных к дифференцировке ретиноевой кислотой, одновременно с остановкой роста. Изменения экспрессии HSP28 не ограничиваются изменением его уровня, но включают также состояние фосфорилированности, которое возникает перед ингибцией роста. В индуцированных к дифференцировке клетках HL-60 белок HSP28 быстро фосфорилируется. TGFβ1 и TNF также быстро увеличивают фосфорилирование белка HSP28 в фазе G1, когда клетки чувствительны к ингибции роста этими факторами.

Экспрессия HSP27 в клетках опухолей молочной железы и шейки матки в состоянии дифференцировки рассматривается как ин-

дикатор хорошего прогноза. Это подтверждает ассоциацию HSP27 с ингибцией клеточной пролиферации.

Все перечисленное свидетельствует, что p53 и белки теплового шока вовлечены в координированный контроль критической точки G1→S.

Глава 4

АПОПТОЗ

4.1. ОБЩИЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ

В самообновляющихся тканях, таких как кожа, кишечный эпителий и костный мозг, среднестатистического организма 50–70 млрд клеток ежедневно погибают путем программированной клеточной смерти из-за необходимости освободить место для миллиардов новых клеток. Масса продуцируемых и параллельно обновляющихся в течение года клеток равна массе тела. В отличие от случайной клеточной смерти, вызываемой, например, травмой, эта физиологическая смерть осуществляется каскадом внутриклеточных протеаз из семейства каспаз и морфологически выражается в фрагментации клеток на окруженные мембраной тельца, которые подвергаются фагоцитозу соседними клетками без воспалительных реакций и рубцевания ткани.

Основной признак апоптоза — фрагментация ДНК Ca^{2+} - Mg^{2+} -зависимыми эндонуклеазами, расщепляющими ДНК в межнуклеосомных сайтах на 180–200-нуклеотидные олигомеры, которая визуализируется в агарозном гель-электрофорезе в виде так называемой апоптозной лестницы. Апоптоз нуждается в синтезе РНК и белка и является следствием активации генетической программы естественной клеточной деструкции. Ряд генов, которые тесно связаны с клеточной пролиферацией и канцерогенезом, также ассоциирован с апоптозом, и, следовательно, регуляция этих процессов имеет общие механизмы. Дерегуляция контроля клеточного цикла может склонять клетку на путь апоптоза, а дерегуляция апоптоза — способствовать канцерогенезу.

Апоптоз — это нормальный процесс элиминации лишних клеток в ходе развития, в поддержании гомеостаза, а также аутореактивных иммунных клеток, клеток с нерепарабельными повреждениями или представляющих по какой-либо причине угрозу для организма. Подобно циклу клеточного деления, механизмы апоптоза являются комплексной сетью блокаторов и индукторов клеточной смерти, действующих разнонаправленно в тонком равновесии для достижения надлежащего тканевого гомеостаза. Кóровый механизм апоптоза может быть редуцирован несколькими критическими белками, которые эволюционно консервативны и часто являются мишенью вирусной эксплуатации. У млекопитающих эти кóровые регуляторы обычно существуют как мультигенное семейство гомологов, каждый из которых имеет собственный уникальный паттерн экспрессии в разных тканях.

К стрессовым факторам, способным индуцировать апоптоз, относятся облучение, ишемия, гипоксия, вирусная инфекция, а также удаление ростовых факторов. Дизрегуляция апоптоза может привести к иммортализации клетки и раку или, наоборот, к нежелательному усилению клеточной гибели, как при СПИДе и некоторых нейродегенеративных заболеваниях. Факторы, индуцирующие и репрессирующие апоптоз, приведены на рис. 4.1 и в табл. 3. Морфологические изменения клеток, претерпевающих апоптоз, включают потерю клеткой объема и спадение ее стенок, тогда как клетки, погибающие по механизму некроза, разбухают. Хроматин конденсируется, формируя мелкие диффузные образования, которые могут сливаться и мигрировать к ядерной мембране в виде круглых плотных структур. Ядра часто расщепляются на мембраносвязанные тельца, которые могут содержать хроматин или не содержать его. Сама клетка может расщепляться на множество апоптозных телец, содержащих фрагменты ядра, или спадаться и превращаться в единичное круглое плотное апоптозное тело. Биохимические изменения при апоптозе включают специфическое расщепление ДНК, рибосомальной РНК и белков, повышение внутриклеточного уровня ионов кальция, потерю митохондриального трансмембранного потенциала (ψ) и высвобождение из митохондрий цитохрома С, выделение фосфатидилсерина из внутренней плазматической мембраны. Общепризнанный биохимический индикатор апоптоза — расщепление ДНК на олигонуклеосомальные фрагменты. Набор этих морфологических и биохимических признаков апоптоза может варьировать между клеточными типами и индуцирующими факторами.

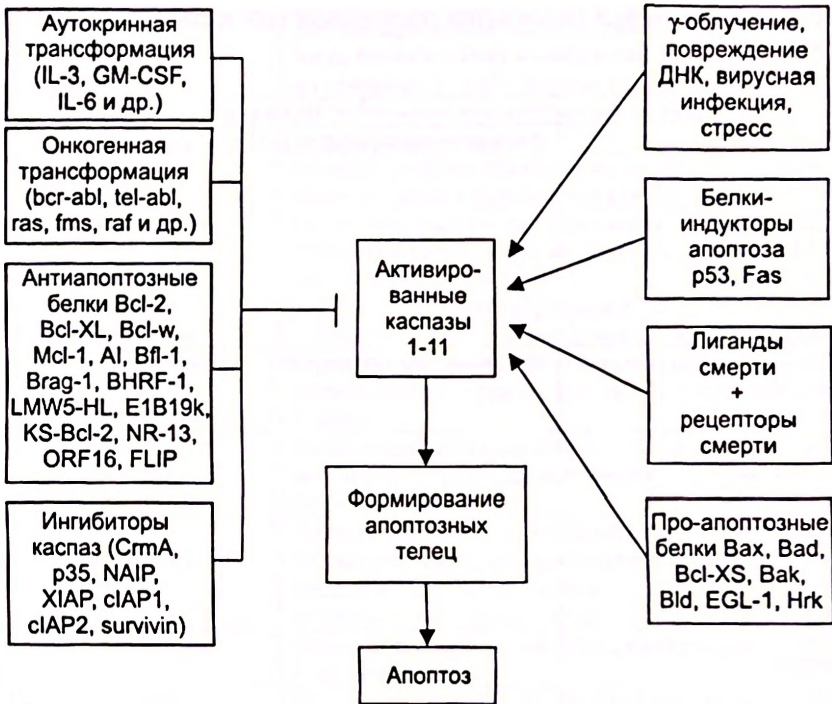


Рис. 4.1. Апоптоз в гемопоэтических клетках.

В отличие от клеток, умирающих по неапоптозным механизмам, характеризующимся повышенной проницаемостью мембран и разбуханием клетки, случайной деградацией хроматина и, наконец, клеточным лизисом, апоптозные клетки обычно остаются мембраносвязанными, что исключает воспалительную реакцию. Распознавание апоптозных клеток фагоцитирующими клетками отчасти обусловлено выделением фосфатидилсерина во время апоптоза.

В настоящее время известен ряд примеров патологических изменений экспрессии и функции генов апоптоза, которые ответственны за дисрегуляцию апоптоза в раковой клетке, и те пути, которыми aberrантная регуляция этих генов способствует агрессивному поведению опухолевых клеток. В частности, онковирусы способны инактивировать клеточные апоптозные гены.

Таблица 3. Символы и термины для обозначения про- и антиапоптозных факторов

Символ	Функция
Bcl-2	Антиапоптозный фактор Bcl2-семейства
Bcl-X _L	“
Bcl-w	“
Mcl-1	“
A1 (bfl-1)	“
Boo/Diva	“
NR-13	“
Bag	“
Bax	Проапоптозный фактор Bcl2-семейства
Bok/Mid	“
Bcl-X _S	“
Bak	“
Bid (Box1)	“
Bik/Nbk	“
Blk	“
Hrk (Harakiri)/DP5	“
Bim _L /Bod	“
Bmf	“
Bad	“
BNIP3	“
Nix	“
Noxa	“
Puma	“
$\Delta\varphi_m$	Митохондриальный трансмембранный потенциал
AIF (apoptosis-inducing factor)	Белок, высвобождаемый из митохондрий апоптозной клетки
Araf-1 (apoptotic protease activating factor 1)	Активатор каспазы 3
Апоптосома	Цитоплазматический каспазоактивирующий комплекс, состоящий из цитохрома C, Араф-1, dATP и прокаспазы 9
CAD (caspase-activated deoxyribonuclease)	Генерирует олигонуклеосомальные фрагменты
CARD (caspase recruitment domain)	Каспазный домен для взаимодействия с Араф-1
Caspases (cystein aspartases)	Каспазы – семейство протеаз, расщепляющих белки по аспарагиновым остаткам на карбоксильном конце молекулы
cIAP1 и 2	Антиапоптозные белки, ингибиторы каспаз 3 и 7
CrmA (cytokine response modifier)	Вирусный белок Рох, псевдосубстрат каспазы 1, ингибитор апоптоза

Цитохром С	Митохондриальный белок окислительной цепи; высвобождаясь из митохондрий и связываясь с Араf-1, активирует каспазу 3; высвобождение из митохондрий регулируется белками семейства Bcl2
DD (death domain)	Молекулярный модуль межбелкового взаимодействия в молекулах рецепторов смерти и адапторных белков
DcR's/Decoy receptors	Белки, подобные рецепторам смерти, лишённые DD, связывают TRAIL, но не индуцируют апоптоз, могут быть утрачены в процессе злокачественной трансформации
DED (death effector domain)	Молекулярный модуль межбелкового взаимодействия в молекулах некоторых каспаз для связывания с лиганд-активированными рецепторами смерти и адапторными белками
DISC (death-inducing signaling complex)	Каспазоактивирующий комплекс лиганд-активированных рецепторов смерти / адапторных белков и каспаз 8 и 10
FADD/MORT1 (Fas-associated death domain protein)	Адапторный белок, содержащий DD, через который он связывается с активированными рецепторами смерти, и DED, через который он связывается с прокаспазами
Fas	Рецептор Fas-L, в комплексе со своим лигандом индуцирует апоптоз
Fas-L (Fas ligand)	Цитокин семейства TNF, индуктор апоптоза
c-FLIP (FADD-like interleukin-1 β converting enzyme-like protease inhibitory protein) известен также под именами Casper, I-FLICE, CASH, CLARP, MRIT)	Белки, которые конкурируют с DED факторов FADD/MORT1,2; гиперэкспрессия FLIP защищает от DD-индуцированного апоптоза
GAS2 (growth arrest gene 2)	Белок микрофиламентов, субстрат апоптозной деградаци
Granzyme B	Серинпротеаза цитотоксических Т-клеток и естественных киллеров
ICAD/DFF45 (inhibitor of CAD/DNA fragmentation factor 45 kDa)	Ингибитор эндонуклеазной активности CAD
NAIP	Ингибитор апоптоза
NO (nitric oxide)	Эндогенный ингибитор каспаз
iNOS, eNOS, nNOS	Ферменты – катализаторы продукции NO и его активных форм
PAK2/hPAK65 (p21-activated kinase)	Белок, проявляющий проапоптозную активность после расщепления каспазами

PARP (poly(ADP-ribose) polymerase)	Один из субстратов каспаз
TNF α	Фактор некроза опухолей α , индуктор апоптоза
TRAF1 и 2 (TNF receptor-associated factor)	Адапторные белки, активируемые TNF-рецепторами, передают сигнал к NF- κ B
TRAIL/Apo2L	Индуктор апоптоза, лиганд рецепторов смерти
TRAIL-R1/DRS/DR4 TRAIL-R2/Trick2/ KILLER	Рецептор смерти “
XIAP/HILP1/MILHA	Ингибитор каспаз 3 и 7
z-DEVD-FMK (z-DEVD-fluoromethyl ketone)	Ингибитор каспаз
z-VAD-FMK (z-VAD-fluoromethyl ketone)	Ингибитор каспаз

4.2. МЕХАНИЗМЫ АПОПТОЗА

Каспазы. Эффекторное плечо апоптозного пути представлено семейством внутриклеточных протеаз, называемых каспазами. Термин «каспаза» (caspase) отражает свойства белков данного семейства: «с» подчеркивает цистеинпротеазный (cystein protease) механизм действия, «asp» — способность расщеплять белки после аспартата (aspartic acid), «ase» указывает на каталитическую функцию. Идентифицированы 13 каспаз. Каспазы 1–13 синтезируются как зимогены (неактивные проферменты), состоящие из аминотерминального продомена и большой и малой субъединиц, но могут быть активированы протеолитическим расщеплением в консервативных сайтах (аспарагиновых остатках), генерирующим субъединицы ферментативно активных протеаз. Каспазные продомены содержат модули межбелкового взаимодействия, которые облегчают ассоциацию множества факторов, необходимых для каспазной активации в ответ на апоптоз-индуцирующие стимулы. Активация требует протеолитического удаления продомена и формирования гетеродимера между большой и малой субъединицами. Каспазная активация завершается формированием тетрамера из этих гетеродимеров.

Активные протеазы представляют собой гетеротетрамеры, состоящие из двух больших и двух малых субъединиц. Каспазы расщепляют субстраты в аспарагиновых остатках и сами активируются расщеплением в аспарагиновых остатках, таким образом, возникает протеолитический каскад. В соответствии с концепцией каскадного

механизма активации каспазы делятся на инициаторные (каспазы 8 и 10) и эффекторные (в основном каспазы 3, 6 и 7). Каспаза 9 служит медиатором митохондриального пути апоптозного сигналинга (рис. 4.2, см. вклейку). Инициаторные каспазы содержат большие аминотерминальные продомены, которые связываются с другими протеинами, вовлеченными в процесс запуска каскада. Все эффекторные каспазы содержат малые продомены и активируются расщеплением инициаторными каспазами. Необратимое расщепление специфических белковых клеточных субстратов эффекторными каспазами опосредованно или непосредственно приводит к морфологическим изменениям, распознаваемым как апоптоз: характерной конденсации хроматина, ядерной фрагментации, сморщиванию клетки, пузырчатости плазматических мембран и другим ультраструктурным изменениям.

Продомены инициаторных каспаз содержат домен DED (death effector domain), которым они связываются с DED-доменом адапторного белка FADD/MORT1 (Fas-associated death domain protein). Это привлекает каспазу к лиганд-активированным рецепторам смерти на клеточной мембране, где формируется DISC-комплекс (death-inducing signaling complex) и происходит ее активация. Формирование DISC-комплекса запускается связыванием лигандов смерти (FasL, TNF α и TRAIL) с соответствующими рецепторами смерти. В настоящее время известны 6 рецепторов смерти: TNF receptor 1, Fas (CD95/APO-1), TRAIL-R1 (TNF-related apoptosis-inducing ligand receptor 1), TRAIL-R2 (TNF-related apoptosis-inducing ligand receptor 2), TRAMP (TNF receptor-related apoptosis mediating protein), DR6 (death receptor 6).

Апоптоз может быть инициирован двумя альтернативными путями: связыванием лиганда смерти (например, CD95/FasL) с его рецептором (DR) на клеточной поверхности и через митохондрию. Оба пути приводят к активации инициаторных каспаз (каспаз 8 и 10 в первом случае и каспазы 9 во втором).

Продомены других каспаз содержат домен CARD (caspase recruitment domain), посредством которого они связываются с фактором Apaf-1 (apoptotic protease activating factor-1) во время формирования апоптосомы — цитоплазматического каспазоактивирующего комплекса. В обоих случаях для каспазной активации требуется сборка мультифакторных комплексов, в которых происходит расщепление прокаспазы. Рецепторы смерти содержат цитоплазматические домены смерти DD (death domain), которые, связываясь с лигандом смерти, привлекают адапторные белки, содержащие домены DD и DED. Взаимодействие DED-доменов адаптора и про-

каспазы приводит к аутопротеолитической активации и включению каспазного каскада.

В ответ на апоптоз-индуцирующие стимулы, действующие через рецепторы смерти, каспаза 8 активирует (расщепляет) белок Bid (Bcl2, член Bcl2-семейства), который транслоцируется в митохондрии и усиливает проапоптозный сигнал. В результате происходит высвобождение цитохрома C, который выходит из митохондрий в цитозоль и включает формирование апоптосомы. Апоптосома состоит из цитохрома C, прокаспазы-9 и протеазоактивирующего фактора белка Araf-1, который может взаимодействовать как с прокаспазой-9, так и с ингибитором апоптоза белком Bcl-X_L. В первом случае происходят расщепление и активация каспазы-9, которая затем активирует следующие каспазы, подобные каспазе-3, непосредственно расщепляющие белки, обеспечивающие жизнедеятельность клетки. Во втором случае связывание Araf-1 с Bcl-X_L ингибирует этот процесс. Митохондриальный путь апоптоза может быть ингибирован на различных уровнях антиапоптозными белками семейств Bcl-2 (Bcl-2 и Bcl-X_L) и IAP (inhibitors of apoptosis proteins), которые в свою очередь ингибируются белком SMAC/DIABLO (second mitochondria-derived activator of caspase/direct IAP binding protein with low pI). Другая возможность заключается в трансдукции сигналов выживания (ростовых факторов и цитокинов), которые активируют PI3K-путь. Протеинкиназа PI3K активирует АКТ-киназу, которая фосфорилирует и инактивирует Bad, проапоптозный белок Bcl2-семейства (рис. 4.2).

Активация каспаз происходит в тех опухолевых клетках, в которых апоптоз индуцирован химиотерапевтическими агентами. Все традиционные цитостатики, а также рентгеновское облучение используют апоптозные пути для осуществления цитостатического действия. Следовательно, дефекты в регуляции апоптоза могут придавать опухолевой клетке резистентность к терапии. Известны примеры отсутствия экспрессии или мутационной инактивации специфических каспазных генов в опухолевых клетках человека.

Каспазы определяются почти во всех клеточных типах, но их экспрессия может быть дифференциально регулируемой в ответ на различные стимулы. Для некоторых каспаз определено множество вариантов альтернативного сплайсинга и изоформ белка.

Субстраты каспазного протеолиза в апоптозных клетках. Расщепление каспазами некоторых киназ (PAK2, изоформ PKC δ и θ , MEKK-1) придает им проапоптозные свойства. Мишенями каспаз являются также некоторые структурные белки, поддерживающие клеточную

архитектуру, расщепление которых приводит к морфологическим изменениям, ассоциированным с апоптозом. Каспазы также расщепляют и инактивируют ингибиторы апоптоза (ICAD, Bcl2 и Bcl-X_L) и киназы, вовлеченные в антиапоптозный сигналинг (Raf-1 и Akt).

Каспаза 8 активируется рецептором FAS, а каспаза 9 – цитохромом С. Эти проксимальные каспазы активируют эффекторные каспазы, исполняющие программу смерти, подвергая деструкции клеточные органеллы и геном. Каспаза-3-подобные протеазы ответственны также за активацию цитоплазматической эндонуклеазы CAD (caspase-activated deoxyribonuclease), которая расщепляет ДНК на олигонуклеосомальные фрагменты. CAD находится в инактивированном состоянии благодаря ассоциации с белком ICAD/DFF-45 (inhibitor of CAD/DNA fragmentation factor). При индукции апоптоза ICAD подвергается расщеплению, CAD при этом активируется, транслоцируется в ядро и там деградирует ДНК.

Семейство TNF-рецепторов. Наиболее изучены механизмы каспазной активации, вовлекающие семейство TNF-рецепторов, включая TNF-R1 (CD120a), Fas (CD95), DR3 (Wsl-1; Tramp), DR4 (TRAIL-R1), DR5 (TRAIL-R2), DR6 и CAR-1, которые трансдуцируют проапоптозные сигналы. Эти «рецепторы смерти» (DR – death receptor) содержат цитозольный домен, известный как домен смерти, который ответственен за привлечение адапторных белков, таких как FADD/MORT1, к рецепторному комплексу после связывания лиганда. Белок FADD/MORT1 содержит домен смерти и дополнительный домен межпротеинового взаимодействия, называемый DED (death effector domain). Домен DED белка FADD/MORT1 связывает каспазы 8 и 10, которые содержат его гомологи в своих продоменах. Олигомеризация каспаз приводит к транспроцессингу зимогенов, обладающих низкой протеолитической активностью до того, как они полностью процессируются в активные каспазы. В ходе процессинга каспазы 8 происходят удаление DED-содержащего продомена и высвобождение активированной протеазы в цитозоль, где она может расщеплять и активировать другие прокаспазы (рис. 4.3, см. вклейку).

Описано несколько механизмов резистентности клеток к апоптозу, индуцируемому Fas и другими рецепторами смерти:

- а) мутации в генах, кодирующих рецепторы;
- б) подавление экспрессии рецепторов;
- в) дефекты в путях апоптозной сигнальной трансдукции.

DED-содержащие ингибиторы передачи сигналов рецепторов смерти идентифицированы у человека и других млекопитающих, а

также у вирусов. Один из таких антиапоптозных белков, с-FLIP/FLAME, является гомологом каспаз 8 и 10 и содержит DED, но лишен протеолитической активности. FLIP и другие антиапоптозные белки DED-семейства конкурируют с каспазами, вовлеченными в TNF-сигналинг, за связывание с белком FADD/MORT1 и, следовательно, функционируют как трансдоминантные ингибиторы этих каспаз. Повышенная экспрессия белка FLIP ассоциируется с Fas-резистентностью в опухолях некоторых типов. Развивающаяся по механизму Fas-L/Fas резистентность дает опухоли ряд преимуществ.

Во-первых, она позволяет опухолевым клеткам избегать цитотоксического действия Т-клеток и естественных киллеров, которое обусловлено экспрессией на их поверхностной мембране Fas-лиганда (Fas-L) и индукцией апоптоза в клетках-мишенях. Во-вторых, она позволяет опухолевым клеткам экспрессировать Fas-L на собственной поверхности, не убивая при этом самое себя по аутокринному механизму Fas-L/Fas. Это так называемая опухолевая контратака, ответственная за индуцированную опухолью гибель иммунных клеток, которая создает брешь в Т-клеточном репертуаре, убивая любые активированные Т-хелперы, в том числе способные распознавать опухолевые антигены. В-третьих, экспрессия Fas-L может также быть основным способом мигрирующих опухолевых клеток расчистить себе путь от других, нормальных, клеток. Кроме того, в некоторых, но, конечно, не во всех типах опухолевых клеток цитостатики индуцируют апоптоз, усиливая экспрессию Fas-L, Fas или других лигандов и рецепторов семейства TNF, доставляя апоптозный сигнал через аутокринный механизм. Следовательно, резистентность к сигналам рецепторов смерти наделяет опухолевые клетки химиорезистентным фенотипом. Интересно, что опухолевый супрессор p53 усиливает транскрипцию Fas и DR5, таким образом, становится понятной связь между рецепторами смерти и этим апоптоз-индуцирующим геном.

Фактор Araf-1 (apoptotic protease activating factor 1). Еще один механизм каспазной активации у млекопитающих зависит от фактора Araf-1. У человека белок Araf-1 имеет сложную структуру и участвует в цитохром-С-зависимой активации каспазы 3. Молекула Araf-1 содержит домен, предположительно обладающий АТФ-связывающей активностью, и N-терминальный домен, гомологичный продоменам каспаз 2 и 9. Первый предположительно участвует в олигомеризации и процессинге неактивной формы в активную, второй взаимодействует с продоменом каспазы 9 и индуцирует ее аутопроцессинг.

Карбоксильный конец АТФ-связывающего домена фланкирован 12 тандемными копиями WD-домена. Этот участок молекулы функционирует как негативный регулятор, который удерживает Араф-1 в латентном, неактивном состоянии, предотвращая его связывание с каспазой 9. Существование этого негативного регуляторного домена предопределяет необходимость активационного этапа для взаимодействия с каспазами и индукции апоптоза. Цитохром С, связываясь с Араф-1, снимает репрессию, налагаемую WD-доменами. В норме цитохром С имеет локализацию, ограниченную внутренностью митохондрии. Он высвобождается в цитозоль после экспозиции клетки к различным проапоптозным факторам, включая химиотерапевтические препараты, радиацию и удаление ростовых факторов. Роль Араф-1 в апоптозе, индуцированном радиацией и некоторыми цитостатиками, доказана в экспериментах на мышах, лишенных гена Араф-1 путем гомологичной генетической рекомбинации. Клетки таких мышей проявляют резистентность к широкому кругу апоптоз-индуцирующих агентов, но остаются чувствительными к Fas-опосредованной клеточной смерти. И наоборот, гиперэкспрессия Араф-1 в трансгенных лейкозных клетках человека HL-60 является причиной повышенной чувствительности к апоптоз-индуцирующим противоопухолевым препаратам. Утрата экспрессии Араф-1, при которой один аллель гена делетирован, а другой инактивирован гиперметилированием, характерна для метастазирующей меланомы.

4.3. ЭНДОГЕННАЯ РЕГУЛЯЦИЯ АПОПТОЗА

Семейство Bcl2. Семейство клеточных белков Bcl2 насчитывает 17 членов. Ген Bcl2 кодирует основной член данного семейства, антиапоптозный белок Bcl2, который экспрессируется в клеточных типах, характеризующихся большой продолжительностью жизни: нейронах, гемопоэтических стволовых клетках и стволовых клетках дифференцирующегося эпителия кожи и кишечника, а также в железистом эпителии, где гиперплазия и инволюция контролируются гормонально. В большинстве случаев экспрессия Bcl2 происходит в зонах, содержащих пролиферирующие клетки или клетки с большой продолжительностью жизни, т.е. его экспрессия оказывает гомеостатическое влияние на численность клеточной популяции. Экспрессия Bcl2 продлевает жизнь В-клеток памяти и поддерживает долговременный иммунный ответ. Белок Bcl2 ассоциируется в основном с внутренними и внешними мембранами митохондрий,

но обнаруживается также на ядерной мембране и эндоплазматическом ретикулуме. Он супрессирует перекисное окисление липидов, и его локализация связана с его функцией супрессора генерации свободных радикалов. Высказывалась и противоположная точка зрения, что Bcl2 функционирует как прооксидант.

Белки Bcl2 содержат трансмембранный домен и до 4 консервативных последовательностей (домены BH1-BH4, Bcl2 homology). Семейство Bcl2 включает в себя субсемейства, несколько различающиеся функционально и структурно:

- 1) субсемейство Bcl2 наиболее близких гомологов, содержащих 2-4 BH-домена (Bcl2, Bcl-X_L, Bcl-w, Mcl-1, A1/Bfl-1), ингибирует апоптоз;
- 2) субсемейство Bax (Bax, Bak, Bok) промотирует апоптоз;
- 3) белки субсемейства BH3 содержат только домен BH3 и промотируют апоптоз (Bik, Blk, Hrk, Bim_L, Bad, Bid, BNIP3).

Белки семейства Bcl2 функционируют, формируя в зависимости от концентрации гомо- или гетеродимеры с другими членами семейства через домены BH. Если в избытке присутствует Bcl2, формируются ингибирующие апоптоз гетеродимеры Bcl2/Bax; если преобладает Bax, формируется гомодимер Bax/Bax и клетки становятся чувствительными к апоптозу. Аминокислотные замены в домене BH1 могут препятствовать гетеродимеризации между Bax и Bcl2 и осуществлению функции Bcl2 как ингибитора апоптоза. Относительный уровень Bax и Bcl2 определяет судьбу клетки — апоптоз или жизнь, и димеризация различных компонентов — существенное событие в дифференциальной регуляции функции Bcl2.

Bax подвергается избирательной димеризации и с другими белками семейства Bcl2. Апоптоз, встречающийся во время инволюции желез, регулируется индукцией белков Bax и Bcl-X(S). Белок Bcl-X существует в двух формах: Bcl-X(L) и Bcl-X(S), образующихся в результате альтернативного сплайсинга мРНК. Bcl-X(L) ингибирует, а Bcl-X(S) промотирует апоптоз и противодействует Bcl2-опосредованной ингибиции апоптоза. Клетки с высокой экспрессией Bcl-X(L) резистентны к апоптозу, индуцируемому повреждением ДНК химиотерапевтическими агентами. Белок Bad содержит последовательность, гомологичную доменам BH1 и BH2 гена Bcl2, и избирательно димеризуется с белками Bcl2 и Bcl-X(L). Вытесняя белок Bax из комплекса Bcl-X(L)/Bax, он восстанавливает механизм апоптоза.

Таким образом, белки семейства Bcl2 проявляют широкий спектр активности от ингибирования апоптоза до его индукции. образо-

вание димеров обеспечивает механизм, которым контролируется гомеостаз клеточной популяции. Конкурирующие белки, сила и избирательность их связывания создают иерархию комплексов с апоптозной функцией. Один из альтернативных механизмов потери апоптоз-супрессирующей функции Bcl2 обусловлен усиленным фосфорилированием.

Многие Bcl2-родственные белки, включая Bcl2, Bcl-X(L) и Bax, локализируются во внешней мембране митохондрий. Bcl2 и другие антиапоптозные белки способствуют выживанию преимущественно связыванием с белком Араф-1 во время формирования апоптосомы, что предотвращает активацию финального звена в цепи эффекторов апоптоза — каспазного каскада, но не ингибируют апоптоз, индуцированный рецепторами смерти.

Апоптоз ассоциируется с различными изменениями в митохондриях, включая редукцию мембранного потенциала и высвобождение в цитоплазму цитохрома С и белка AIF (apoptosis inducing factor). Bcl2-родственные белки включены в регуляцию этих изменений путем формирования пор (каналов) в мембране, через которые происходит пассаж цитохрома С и AIF. При этом Bcl2 и Bcl-X_L ингибируют выброс цитохрома С, а Bax стимулирует, но Bcl2 может ингибировать способность Bax формировать поры. Кроме того, Bcl2 и Bcl-X_L могут связывать цитохром С непосредственно и вытеснять его из апоптосомы, предотвращая этим активацию каспаз.

Молекулы Bcl2 и других родственных белков семейства Bcl2 содержат от 1 до 4 функциональных доменов ВН (Bcl2 homology) и домен FLD (рис. 4.4). Домены ВН1, ВН2 и ВН4 являются анти-



Рис. 4.4. Молекула Bcl2 содержит 4 домена Bcl2-гомологии (ВН1-4) и регуляторный домен FLD (flexible loop domain), в котором находятся сайт функционального фосфорилирования серин-70 и сайт каспазного расщепления аспарагин-34.

апоптозными, тогда как домен ВНЗ функционирует в индукции апоптоза.

Гиперэкспрессия белка Bcl2 впервые была показана в фолликулярных и диффузных лимфомах, каковому обстоятельству он и обязан своим названием (B cell lymphoma 2), а позднее — во многих типах солидных опухолей. Однако при некоторых злокачественных и аутоиммунных заболеваниях повышенная экспрессия Bcl2 не супрессирует индуцированный цитостатиками апоптоз, следовательно, должны существовать другие факторы и(или) регуляторные механизмы, не связанные с уровнем экспрессии. Антиапоптозная функция Bcl2 зависит от гетеродимеризации с родственным белком Бах, а мутации, нарушающие функцию гетеродимеризации с белком Бах, отменяют апоптоз-репрессирующую активность Bcl2, но соотношение Bcl2 и Бах не всегда коррелирует с химиорезистентностью. Оказалось, что статус фосфорилирования Bcl2 изменяет его способность формировать гетеродимер с Бах: только нормальный (wild type — «дикий тип») wtBcl2, но не мутант S70A (функционально неактивный, нефосфорилируемый) способен стабильно ассоциироваться с Бах. Таким образом, ингибирование апоптоза протеином Bcl2 регулируется событиями фосфорилирования / дефосфорилирования молекулы Bcl2 протеинкиназами и фосфатазами соответственно.

Мультисайтовое фосфорилирование домена FLD (flexible loop domain) белка Bcl2 сопряжено с клеточной смертью. Напротив, в цитокин-зависимых клеточных линиях цитокин-индуцированное фосфорилирование по серину-70 в домене FLD предотвращает апоптоз (рис. 4.5, см. вклейку). Эти модели не являются взаимоисключающими, а отражают различия клеточного контекста. Во время остановки митоза сигнальная трансдукция фундаментально отличается от митогенного сигналинга, так как генная экспрессия редуцирована, а ряд протеинкиназ и регуляторных белков гиперфосфорилированы. Митоз ассоциирован с ингибцией функциональной активности Bcl2 серин/треонинфосфатазой PP2A (protein phosphatase 2A). События фосфорилирования/дефосфорилирования (активация/ингибция протеинкиназ и фосфатаз) радикально изменяют клеточные функции. Передача регуляторных сигналов (сигнальная трансдукция) в митозе уникальна и отличается от интерфазной. В интерфазе клетка мониторирует внешние сигналы и передает их от клеточной мембраны в ядро, модулируя генную экспрессию и клеточный цикл. В митозе клетка мониторирует функционирование микротрубочек митотического веретена и сегрегацию хромо-

сом. В митотической клетке ядра нет и транскрипция редуцирована или отсутствует. Сборка и функционирование митотического веретена зависят от фосфорилирования некоторых сигнальных белков по серину. Мутант Bcl2 с заменой серина-70 на аспарагин (S70A) не фосфорилируется ими и не способен поддерживать клеточное выживание, а мутант с заменой серина-70 на глутамин (S70E), который может имитировать фосфорилирование, даже сильнее супрессирует апоптоз, чем wtBcl2. Длительность фосфорилирования, различная при митозе и митотической остановке, играет ключевую роль в судьбе клетки. Одно и то же событие может служить сигналом клеточной пролиферации и апоптоза в зависимости от клеточного и особенно экстраклеточного контекста.

Как уже говорилось выше, серин/треонинфосфорилирование молекул семейства Bcl2 участвует в регуляции роста и апоптоза. При этом некоторые события фосфорилирования, индуцированные цитокинами, являются антиапоптозными, тогда как другие, запускаемые химиотерапевтическими агентами (например, таксанами), ассоциированы со смертью клетки. Обратимое фосфорилирование Bcl2 индуцируется в гематопоетических клетках под действием рост-промотирующего цитокина IL-3. IL-3 индуцирует экспрессию Bcl2 и супрессирует апоптоз через некоторые изоформы протеинкиназы C (рис. 4.5, см. вклейку).

Фосфорилирование не изменяет продолжительность жизни молекулы и, следовательно, непосредственно влияет на ее функцию. Bcl2 может быть фосфорилирован различными протеинкиназами, вовлеченными в различные внутриклеточные пути сигнальной трансдукции. Физиологическая Bcl2-киназа — это PKC α из семейства протеинкиназ C (PKC α , β I, β II и γ), активируемая IL-3. Она фосфорилирует Bcl2 исключительно по серину в одних и тех же сайтах *in vivo* и *in vitro*, но только мутация S70A проявляется в нефосфорилируемости Bcl2 и лишает его функциональной активности при действии апоптоз-индуцирующих агентов. Кроме IL-3 и бриостатина, фосфорилирование Bcl2 индуцируют таксаны, винкристин, этопозид, долистатин (dolistatin), ретиноевая кислота и другие химиотерапевтические агенты. Паклитаксел (paclitaxel) индуцирует стабильное мультисайтовое (серин-87, треонин-69, серин-70) гиперфосфорилирование Bcl2, в отличие от динамического моносайтового (серин-70) фосфорилирования, ассоциированного с естественным клеточным выживанием, и ингибирует антиапоптозную функцию; гиперэкспрессия экзогенного wtBcl2 защищает трансгенные клетки от цитотоксического эффекта таксанов. Деления dome-

на FLD в молекулах Bcl2 или Bcl-X_L проявляется в повышенной клеточной выживаемости *in vitro*, причем защищает от индуцированного паклитакселом апоптоза лучше, чем трансген wtBcl2.

Протеинкиназы главного митогенного сигнального пути ERK1 (p44) и ERK2 (p42) и стресс-активируемые протеинкиназы (JNK/SAPK, PKA, ASK) также фосфорилируют Bcl2 *in vitro*. Фосфорилирование Bcl2 усиливается при обработке клеточной культуры ингибитором фосфатаз, в том числе физиологической Bcl2-фосфатазы — PP2A (protein phosphatase 2A), которая ко-локализуется с Bcl2 на митохондриальной мембране. Быстрая и обратимая регуляция фосфорилирования Bcl2 является результатом баланса индукторов и ингибиторов Bcl2-специфических протеинкиназ и служит сенсором соответствующих стимулов: благоприятные для роста условия активируют фосфорилирование Bcl2; неблагоприятные, апоптоз-индуцирующие условия побуждают церамид (и, возможно, другие негативные регуляторы) активировать дефосфорилирование Bcl2.

Другие члены семейства Bcl2 (Bad, Bcl-X_L, Mcl1) также подвержены фосфорилированию. IL-3 и эритропоэтин индуцируют фосфорилирование Mcl1 и Bad в условиях, благоприятствующих росту, а паклитаксел приводит к мультисайтовому гиперфосфорилированию Mcl1 и Bcl-X_L. Прямая или непрямая активация сигнальных протеинкиназ Akt, PKA и MAPK может вызывать фосфорилирование Bad по серину. Белок Bad проявляет проапоптотную активность при гетеродимеризации с Bcl-2 и Bcl-X_L. Фосфорилированный Bad связывается белком 14-3-3 и в таком виде уже не имеет доступа к митохондриальным Bcl-2 и Bcl-X_L, что имеет антиапоптотный эффект. Нейтрализация фосфорилированной формы Bad белком 14-3-3 позволяет Bcl-2 и Bcl-X_L связываться с Bax, что проявляется в предотвращении апоптоза. В процессе фосфорилирования Bad участвуют киназы Raf, Akt, PKA и PI3K.

При удалении ростовых факторов (IL-3) Bad дефосфорилируется и проявляет повышенное сродство к проапоптотному белку Bcl-X_L. Связывание Bad с Bcl-X_L является причиной высвобождения белка Bax из гетеродимера Bax/Bcl-X_L. Таким образом, функциональная активность других членов семейства, подобно Bcl2, динамически регулируется фосфорилированием, а цитокиновая стимуляция IL-3-подобными цитокинами может супрессировать апоптоз.

Расщепление Bcl2 и Bcl-X_L молекулярными ножницами — протеиназами семейства каспаз влияет на их апоптотную функцию. Например, расщепление Bcl2 каспазой-3 по остатку аспарагина-34 в домене FLD превращает Bcl2 в проапоптотную молекулу. Однако

клетки, экспрессирующие мутантный Bcl2, который имитирует фосфорилированное состояние, резистентны к TNF α -индуцированному апоптозу; экспрессия такого мутантного Bcl2 пролонгирована, поскольку он не поддается деградации протеосомами.

Фосфорилирование Bcl2 может способствовать клеточной химиорезистентности. Интактный серин-70 необходим для осуществления антиапоптозной функции Bcl2. Замена серина-70 на другую аминокислоту приводит к потере функциональной активности белка. Мутации Bcl2 по серину-70 идентифицированы в опухолевых клетках пациентов с химиорезистентными неходжкинскими лимфомами и ассоциированы с транслокацией t(14;18). Вероятно, перенос гена Bcl2 в локус IgH может приводить к гипермутабельности Bcl2, причем у всех пациентов мутации обнаружены в домене FLD. Следовательно, мутации в домене FLD гена Bcl2 могут быть клинически значимыми. Высокий уровень экспрессии Bcl2 выявлен во многих гематологических опухолях, в том числе НХЛ, причем не только в фолликулярных, но и почти в 100% случаев лимфом из клеток мантийной зоны и в 60% случаев плазмочитом. Физиологическая Bcl2-киназа PKC α , которая фосфорилирует его в регуляторном сайте серин-70, является, как обнаружено в ретроспективных исследованиях, прогностическим фактором для пациентов с ОМЛ и ОЛЛ. Лейкозные клетки с фосфорилированным по серину-70 Bcl2 проявляют более высокую резистентность к химиотерапии. Новая терапевтическая стратегия может заключаться в попытке использовать ингибиторы PKC-зависимых путей сигнальной трансдукции, чтобы блокировать фосфорилирование Bcl2 и тем самым лишить его антиапоптозной функции. ERK2 тоже может фосфорилировать Bcl2 по серину-70. Взаимодействие между серинтреонинкиназами и апоптозными компонентами представляет собой потенциальную мишень для химиотерапии.

Некоторые белки семейства Bcl2 (Bad, Bik, Bid, Bim, Hrk) связываются с белками, супрессирующими апоптоз (Bcl2, Bcl-X_L, Bcl-W, Mcl-1, A1/Bfl-1), и ингибируют их. Димеризация этих проапоптозных белков с Bcl2 или Bcl-X_L предотвращает взаимодействие последних с Araf-1 и другие функции. Некоторые проапоптозные белки семейства Bcl2 (Bax, Bak и Mtd/Bok) имеют самостоятельную цитодеструктивную функцию, отличную от их способности связываться с Bcl2, Bcl-X_L и другими антиапоптозными членами семейства. Антиапоптозные гомологи Bcl2 закодированы также в геноме герпесвирусов, которые предположительно играют роль в канцерогенезе человека, например, вируса Эпштейна-Барр и вируса саркомы Капоши (герпесвирус 8).

Структурное сходство белков семейства Bcl2 и пороформирующих доменов некоторых бактериальных токсинов подсказывает, что эти белки могут функционировать, по крайней мере отчасти, формируя каналы во внутриклеточных мембранах, где они обычно пребывают, а именно в наружной мембране митохондрий, эндоплазматическом ретикулууме и ядерной мембране. Известно, например, что белок Вах индуцирует выброс цитохрома С из митохондрий – свойство, аналогичное таковому структурно близкого дифтерийного токсина. Наоборот, антиапоптозные белки семейства Bcl2 предотвращают митохондриальные изменения, ассоциированные с апоптозом, и блокируют высвобождение цитохрома С.

Известно множество примеров изменения экспрессии как апоптоз-супрессирующих, так и апоптоз-индуцирующих членов семейства Bcl2 в опухолях человека. Наиболее известны структурные изменения, такие как транслокация t(14;18), которая активирует ген Bcl2 в неходжкинских В-клеточных лимфомах, инактивирующие мутации гена Вах в опухолях толстой кишки, желудка и кроветворной системы и ретровирусные инсерции, которые активируют ген Bcl-X_L при лейкозе. При транслокациях t(14;18)(q32;q21) разрыв в хромосоме 18 происходит в 3'-нетранслируемой области гена Bcl2. Т-клеточные лимфомы, в которых не встречается эта транслокация, экспрессируют Bcl2, хотя и на более низком уровне, чем В-клеточные. В большинстве случаев, однако, аберрантные уровни белков семейства Bcl2 отражают изменения в сети транскрипционной и посттранскрипционной регуляции, контролирующей выработку продуктов этих генов.

Дисбаланс в соотношении анти- и проапоптозных членов семейства Bcl2 в пользу выживания может придать клеткам опухоли резистентность к широкому кругу индукторов клеточной смерти, в том числе практически ко всем химиотерапевтическим агентам, радиации, гипоксии, отделению клетки от ЭКМ, удалению ростовых факторов, глюкозному голоданию, повышенному уровню цитозольного кальция, оксидантам, индуцирующему апоптоз опухолевому супрессору p53 и повышенному уровню экспрессии онкогенов, таких как с-Мус и Bcl-1, которые управляют клеточным циклом, но могут также промотировать клеточную смерть. Способность антиапоптозных белков Bcl2-семейства блокировать клеточную смерть, индуцированную противоопухолевыми препаратами, позволяет считать их одним из типов белков мультилекарственной резистентности. В отличие от белков токсин-выводящей помпы семейства MDR-1, гиперэкспрессия Bcl2 не препятствует накоплению лекарственных веществ в опу-

холевых клетках. Bcl2 также не устраняет повреждения, причиненные лекарствами, и не изменяет уровень репарации, а просто предотвращает их перевод в клеточную смерть. Опухолевые клетки, которые содержат большое количество Bcl2, испытывают на себе ингибирующее клеточный цикл действие цитостатиков, например, остановку синтеза ДНК или формирования микротрубочек во время митоза, но, несмотря на это, остаются жизнеспособными в течение продолжительного времени, что во многих случаях приводит к повышению клоногенности. В целом Bcl2 превращает цитотоксический эффект противоопухолевых лекарств в только цитостатический.

Дополнительная связь между семейством белков Bcl2 и ответом на цитотоксические вещества заключается в экспрессии белка Bax после успешной индукции апоптоза. Индукция экспрессии Bax после генотоксического стресса приписывается транскрипционному фактору p53, который связывается со специфическими элементами распознавания в промоторе гена Bax и непосредственно трансктивирует его. Ген-супрессор опухолей p53 не только контролирует прогрессию клеточного цикла, но и способен индуцировать апоптоз, причем в этом случае он тоже функционирует как транскрипционный фактор, непосредственно активирует экспрессию Bax и подавляет экспрессию Bcl2, сдвигая этим баланс в сторону апоптоза. Нарушение этой функции отрицательно сказывается на возможности p53-зависимой индукции апоптоза. Его антагонист ген mdm2 может противодействовать p53-опосредованному апоптозу. Протективный эффект протеина MDM2 имеет место только тогда, когда формируется комплекс MDM2/p53, т. е. он заключается в отмене функции p53 как транскрипционного фактора.

Опухолевые клетки, взятые у больного миелолейкозом M1, не экспрессирующие эндогенный p53, были трансфектированы температурочувствительным мутантным геном p53. Пермиссивная температура (32,5°C) индуцирует экспрессию p53 и апоптоз, но кинетика апоптозной индукции белком p53 медленнее, чем фактором TGF-β. TGF-β подавляет экспрессию Bcl2, а p53 индуцирует экспрессию Bax. Нормальный белок p53 подавляет экспрессию Bcl2 и стимулирует экспрессию Bax на уровне мРНК. Следовательно, p53 и TGF-β индуцируют апоптоз различными путями, хотя TGF-β-опосредованный апоптоз может управляться через гены GADD45 и Myd118, которые являются эффекторами функции гена p53. Транскрипция гена Bax может прямо активироваться белком p53, но повышенной экспрессии одного Bax недостаточно для того, чтобы направить клетку по пути апоптоза.

Способность радиации и химиотерапевтических агентов индуцировать экспрессию p53 и, следовательно, Вах может объяснить, каким образом некоторые опухоли с высоким уровнем белка Bcl2, такие как неходжкинские лимфомы низкой степени злокачественности и мелкоклочные опухоли легкого, первоначально хорошо отвечают на терапию. Однако клинический ответ недостаточен для полной эрадикации всех опухолевых клеток, и рецидив неизбежно наступает. Обычно он ассоциирован с потерей функционально активного p53.

Химио- и радиотерапия убивает клетки злокачественных опухолей, в первую очередь индуцируя в них апоптоз. Антиметаболиты и ДНК-повреждающие агенты являются причиной клеточного стресса, а ключевым элементом стресс-индуцированного апоптоза служит белок p53, который является транскрипционным фактором проапоптозных белков семейства Bcl2 и рецепторов смерти Fas, TRAIL-R1 и TRAIL-R2. Другой путь стресс-индуцированного апоптоза активирует протеинкиназу SAPK/JNK, которая в свою очередь активирует транскрипционный фактор AP-1. К числу его мишеней относятся гены проапоптозных лигандов FasL и TNF- α .

Клинические коррелятивные исследования подтверждают, что высокий уровень экспрессии антиапоптозных белков семейства Bcl2 придает клинически значимый химиорезистентный фенотип опухолевым клеткам при ОМЛ, ОЛЛ, ХЛЛ, НХЛ, ММ и опухолях предстательной железы. Сравнение относительных уровней Bcl2 и других антиапоптозных белков этого семейства до лечения и во время рецидива у пациентов с гемопозитическими или солидными опухолями показало очевидное усиление экспрессии Bcl2 и селективное выживание тех опухолевых клеток, которые содержат более высокий уровень Bcl2.

Редуцированный уровень проапоптозных белков семейства Bcl2 ассоциирован с плохим ответом опухоли на химиотерапию и сокращением продолжительности жизни пациентов с метастазирующими опухолями молочной железы, опухолями толстой кишки и желудка с микросателлитной нестабильностью. Хотя оценка генетической активности семейства Bcl2 в некоторых типах опухолей имеет прогностическое значение, сложность распределения большого мультигенного семейства и множественность биохимических механизмов действия его белков ограничивают возможность клинического использования этой информации и интерпретации ее биологического значения. Вероятно, поэтому повышенный уровень Bcl2 далеко не всегда коррелирует с худшим прогнозом, а некоторые клинические

исследования показывают, что экспрессия Bcl2 сильно ассоциирована с благоприятным течением болезни.

Ингибиторы апоптоза. Клетки защищены от неразборчивой индукции смерти эндогенными ингибиторами апоптоза. Многие из них вовлечены в инициацию и прогрессию рака. Апоптоз, индуцированный через рецепторы смерти, может быть ингибирован DED-содержащим белком FLIP (FADD-like inhibitor protein), который конкурирует за домен DED адапторного белка FADD/MORT1 (Fas-associated death domain protein) и либо удаляет прокаспазу из комплекса DISC, либо препятствует ее включению в него. Гиперэкспрессия FLIP обнаружена в метастазирующих меланомах человека.

Индукцированная рецепторами смерти активация каспаз может быть ингибирована экспрессией рецепторов для белка TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand), которые либо содержат усеченные нефункциональные DD-домены, либо вовсе лишены их. Нейтрализация TRAIL такими рецепторами предотвращает формирование DISC-комплексов и TRAIL-индуцированный апоптоз. Многие клеточные опухолевые линии проявляют специфичную чувствительность к TRAIL-индуцированному апоптозу, вероятно, по причине утраты рецепторов для TRAIL во время трансформации.

Оксид азота может непосредственно инактивировать многие каспазы нитрозилированием каталитических цистеиновых остатков. Продукция оксида азота регулируется белками iNOS (индуцибельной нитрооксидсинтетазой) и cNOS.

Семейство белков IAP. Протенны IAP (inhibitor of apoptosis protein) — группа эволюционно консервативных супрессоров апоптоза, гомологи которых идентифицированы у дрозофилы, нематоды *Caenorhabditis elegans*, вирусов, мыши и человека. Механизмы их действия еще недостаточно изучены, идентифицирована только активность этих протеннов как ингибиторов каспаз, которую проявляют некоторые IAP при непосредственном связывании с каспазами 3, 7 и 9. Семейство ингибиторов проапоптозных белков IAP включает NIAP (нейрональный IAP), XIAP (X-сцепленный IAP), IAP1, IAP2 и белок сюрвивин (survivin). Сюрвивин характеризуется уникальной структурой, так как, в отличие от других членов семейства, содержит IAP-последовательность бакуловируса. Он регулирует прогрессию клеточного цикла в фазах G2/M, ассоциируясь с микротрубочками митотического веретена, и непосредственно ингибирует активность каспаз 3 и 7. Кроме того, сюрвивин освобождает циклинзависимую киназу Cdk4 от ее ингибитора белка p16 и транслоцирует ее в ядро, где она иницирует входение клетки в

S-фазу клеточного цикла. Клетки, в которых происходит гиперэкспрессия IAP, защищены от апоптоза, индуцированного множеством стимулов.

Каспазы 1, 6 и 8 не являются мишенью ингибирующего действия IAP. Значение этой избирательности в том, что ингибированию подвержены каспазы, действующие в дистальной части апоптозного протеолитического каскада, которые функционируют как конечные эффекторы апоптоза, расщепляющие различные клеточные белки и ответственные за клеточную смерть. Мало известно об экспрессии большинства белков семейства IAP в нормальных тканях и в опухолях. Описана гиперэкспрессия белка сюрвивина в значительной части опухолей человека, но не в нормальных тканях, что является доказательством его участия в процессе канцерогенеза. Повышенный уровень сюрвивина ассоциирован с худшим прогнозом для пациентов.

Что определяет этап коммитирования, из которого клетка уже не может быть спасена, и какое значение имеют различные апоптозные белки, регулирующие этот этап? Блокирование апоптоза, индуцированного противоопухолевыми лекарствами, не обязательно тождественно блокированию его коммитирования. Обработка опухолевых клеток химиотерапевтическими препаратами однозначно проявляется в протеолитическом процессинге каспаз и расщеплении их субстратов, таких как полиаденозин-5'-дифосфорибозилполимераза. Хотя ингибирование каспаз низкоспецифичными ингибиторами обычно блокирует все признаки апоптоза, индуцированного противоопухолевыми веществами, во многих случаях такие поврежденные цитостатиками клетки все-таки погибают в результате отсроченного (замедленного) некроза (рис. 4.6). Этой замедленной неапоптозной смерти предшествует (и, вероятно, действительно обуславливает ее) повреждение митохондрий, сопровождающееся высвобождением ряда митохондриальных белков, в том числе цитохрома C, прерыванием цепи электронного транспорта и продукцией свободных радикалов, потерей электрохимического градиента мембран и истощением пула АТФ.

Интересно, что хотя ингибиторы каспаз не предотвращают индуцированное цитостатиками повреждение митохондрий и коммитирование клетки к клеточной смерти, в некоторых случаях белки Bcl-2 и Bcl-X_L могут предотвратить или редуцировать индуцированную клеточную гибель. Таким образом, как это следует из результатов исследований, белки семейства Bcl2 контролируют этап коммитирования клетки к смерти до индуцированной цитостати-

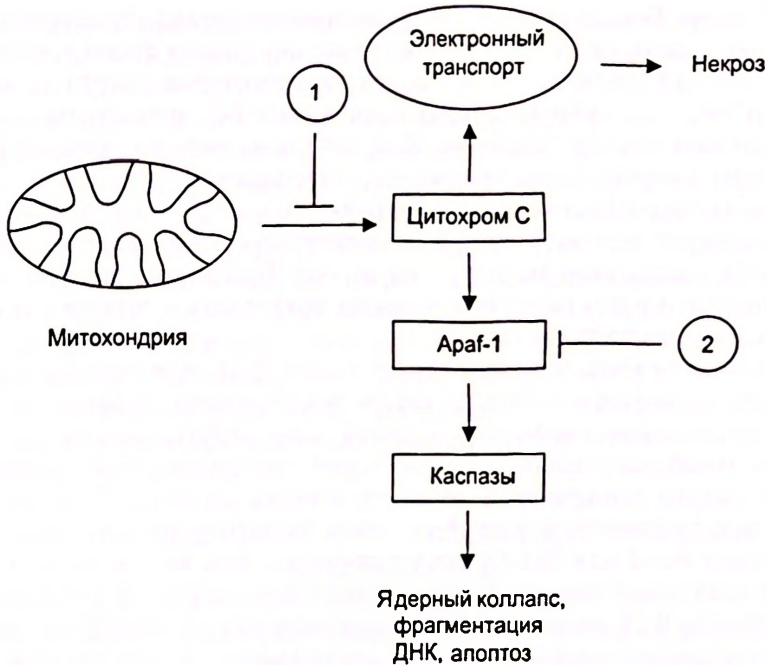


Рис. 4.6. Высвобождение цитохрома С из митохондрии под действием цитостатиков может индуцировать и апоптоз, и некроз.

1 – выброс цитохрома С блокируется белком Bcl2; 2 – Bcl2 или его гомологи (Bcl-X_L) также способны связываться с Араф-1 и препятствовать активации каспаз.

ками активации каспаз. Bcl-2 и Bcl-X_L могут предотвращать митохондриальные изменения, ассоциированные с индуцированной цитостатиками клеточной смертью (выброс цитохрома С, потерю разности потенциалов и продукцию свободных кислородных радикалов), а Вах может индуцировать эти изменения посредством каспазозависимых механизмов. Однако в контексте митохондриально-зависимой клеточной смерти активация каспаз может контролировать митохондриальный этап коммитирования на путь апоптоза активацией проапоптозных белков семейства Bcl-2 (Bid), инактивацией антиапоптозных белков (Bcl-2 и Bcl-X_L) или обоими этими способами. Это создает возможность для развития цепной реакции, в которой повреждение нескольких митохондрий, сопровождающееся выбросом цитохрома С и активацией каспаз, может индуцировать дальнейшее повреждение митохондрий и дальнейшую активацию каспаз.

Помимо Bcl2-зависимого пути активации каспаз, существует и Bcl2-независимый. В клетках некоторых, но не всех типов апоптоз, запускаемый посредством Fas и других рецепторов смерти семейства TNF, не блокируется гиперэкспрессией Bcl2 или других антиапоптозных членов семейства Bcl2. Это означает, что данные рецепторы смерти, непосредственно индуцируя активацию каспаз путем лиганд-зависимого привлечения прокаспаз, могут восстановить блокированную белком Bcl2 критическую точку контроля клеточного выживания, несмотря на то, что Bcl2 и его гомологи накапливаются в митохондриях и других органеллах и остаются там в качестве интегральных белков.

Трудно предсказать, насколько важен Bcl2-независимый путь активации каспаз в контексте клинического ответа на радио- и химиотерапию, так как многие опухоли, если не большинство, в том числе гематологические, не используют опосредованный рецепторами смерти аутокринный механизм запуска апоптоза. Даже апоптоз, индуцированный через Fas, может быть блокирован гиперэкспрессией Bcl-2 или Bcl-X_L в некоторых клетках, хотя и не во всех.

В клеточных линиях идентифицированы два типа клеточного контекста: Bcl2-независимый, в котором комплекс Fas/Fas-L приводит к усиленному процессингу каспазы 8, и Bcl2-супрессибельный, в котором Fas активно индуцирует активацию лишь малого количества каспазы 8. Суть этого различия сводится к тому, нуждается или не нуждается каспаза 8 в митохондриально-зависимом этапе амплификации для достаточной активации эффекторных каспаз. Bcl2 может блокировать каспаза-8-опосредованный апоптоз, если митохондриально-зависимая амплификация каспазного каскада необходима. При всем этом разделение этих путей не является абсолютным, и они могут пересекаться. Например, инициаторные каспазы могут индуцировать необратимое повреждение митохондрий и выброс цитохрома C в ответ на активацию рецепторов смерти на клеточной поверхности, а Bcl-X_L способен ко-иммунопреципитировать с неактивной формой прокаспазы 8 и не пропускать ее к комплексу Fas/Fas-L на плазматической мембране.

Важным фактором, влияющим на апоптоз, является полифункциональный транскрипционный фактор NF-κB (nuclear factor κB), кодируемый геном REL (гомолог вирусного онкогена reticuloendotheliosis, v-rel), который активируется антиапоптозными сигналами, передаваемыми с рецепторов смерти TRAF1 и 2 по PI3K-пути. В норме он находится в цитоплазме в латентном состоянии, в комплексе с ингибитором IκB. Многие внешние стимулы, в том числе цитокины и

цитостатики, разрушают этот гетеродимер, IκB подвергается фосфорилированию и деградации протеасомами, и ДНК-связывающая часть NF-κB мигрирует в ядро, где активирует гены-мишени, чьи промоторы содержат последовательности, известные как κB-сайты. Гены-мишени NF-κB можно разделить на 4 класса: 1) иммунорегуляторные и воспалительные; 2) про- и антиапоптозные; 3) позитивные регуляторы пролиферации; 4) негативные регуляторы активности самого NF-κB (IκB α и β). В зависимости от стимулов и клеточного контекста NF-κB может активировать проапоптозные гены, такие как Fas/CD95, FasL и TRAIL-рецепторы, и антиапоптозные гены семейств Bcl2 и IAP и ингибитор каспазы-8 белок FLIP. Конститутивная активация NF-κB ассоциирована с несколькими аспектами канцерогенеза: бесконтрольной пролиферацией, предотвращением апоптоза, опухолевым ангиогенезом и метастазированием.

4.4. СВЯЗЬ АПОПТОЗА С ДРУГИМИ КЛЕТОЧНЫМИ ПРОЦЕССАМИ

Пролиферативный ответ клеток на действие ростовых факторов — нормальное физиологическое событие. Дeregуляция клеточной пролиферации в отсутствие таких стимулов в определенных условиях может вызвать апоптоз. Этот феномен получил название «смерть по умолчанию» (death by neglect). Восприимчивость клетки к апоптозу повышается при гиперэкспрессии протеинкиназ и других белков митогенной сигнальной трансдукции, таких как c-Myc, E1A, E2F, циклины и др. Например, онкоген c-Myc в присутствии ростовых факторов индуцирует клеточную пролиферацию, но если их действие заблокировано, то происходит апоптоз. Усиленная экспрессия c-Myc является индуктором экспрессии p53 и приводит к неконтролируемому клеточному росту в случае отсутствия активного p53, в норме индуцирующего апоптоз. Регулятором эффекта c-Myc на p53 является белок Mcl-1, член семейства Bcl-2. Индукция Mcl-1 — ранний этап ответа на повреждение ДНК. Помимо этого, активация p53 сопровождается его фосфорилированием по серину-15 и приводит, как обычно, к повышению уровня ингибиторов пролиферации белков p21 и MDM2.

Ген Rb, который участвует в регуляции прохождения клеткой критической точки G1→S, ассоциирован с апоптозом, как и другие гены, имеющие отношение к клеточной пролиферации. Фосфорилирование Rb — ключ к его функции регулятора клеточной пролиферации. Гипофосфорилированная форма Rb ингибирует клеточную проли-

ферацию связыванием с E2F, мешая ему активировать гены клеточного цикла. Однако E2F, фосфорилированный специфичным Cdk-циклиновым комплексом, вытесняется из его комплекса с Rb, что приводит к дерепрессии генов клеточного цикла, имеющих E2F-связывающую последовательность в промоторе.

Другие Rb-связывающие белки (с-Мус, белок аденовируса E1A и белок HPV E7) индуцируют апоптоз, препятствуя осуществлению негативной регуляторной функции Rb. Клетки, в которых апоптоз индуцирован экзогенными факторами, характеризуются активацией ряда генов (с-Мус, с-jun, с-fos и Cdc2) одновременно с фосфорилированием белка Rb. Мутантный Rb не способен связываться с его обычными партнерами, не способен и защитить клетку от апоптоза. Обработка мышинных эмбриональных фибробластов метотрексатом индуцирует p53, активацию E2F-индуцибельных генов и апоптоз. Мышинные клетки, несущие температурочувствительный мутант p53, трансфектировали вектором, экспрессирующим человеческий ген E2F. Когда p53 экспрессировался при 32°C, трансфектанты подвергались усиленному апоптозу, что указывает на связь между Rb- и p53-путями апоптоза.

Экспрессия белка Bcl2 дает аддитивный эффект в сочетании с другими онкогенами. Например, накопление p53 и экспрессия Bcl2 вместе означают худший прогноз, чем только p53. У с-Мус/Bcl2-трансгенных мышей лимфомы развиваются быстрее, чем у мышей, трансгенных только по одному из этих генов.

Апоптоз-промотирующие гены рассматриваются как супрессоры канцерогенеза. Среди них привлекает внимание ген Вах. Вах- α , альтернативно сплайсированный вариант Вах, экспрессируется на высоком уровне в нормальных тканях молочной железы и на сравнительно низком — в опухолях молочной железы. Трансфектированные геном Вах- α клетки опухолевых линий приобретают чувствительность к цитостатику эпирубицину, обусловленную промоцией апоптоза. Экспрессия Вах сенситизирует опухолевые клетки к радиационно-индуцированному апоптозу.

Важно обращать внимание на пропорциональную экспрессию апоптоз-промотирующих и апоптоз-ингибирующих генов, что иллюстрирует наблюдение клеток, происходящих из ХЛЛ. В этих клетках белки Вах и Bcl2 не были непосредственно связаны с прогрессией заболевания, но соотношение Bcl2/Вах- α на уровне мРНК было выше в группе пациентов с прогрессирующей болезнью.

Индукция дифференцировки лейкозных клеток интерлейкином-6 и дексаметазоном дифференциально модулирует экспрессию раз-

ных генов семейства Bcl2, подавляет экспрессию Bcl-X_L и Bcl-2, усиливает экспрессию Bax.

4.5. КЛИНИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ ЗНАНИЯ МЕХАНИЗМОВ РЕГУЛЯЦИИ АПОПТОЗА

Исследование фундаментальных механизмов регуляции апоптоза и идентификация различных генов клеточного выживания, часто активированных в опухолях, открывают широкие терапевтические возможности. Например, агенты, которые препятствуют действию Bcl2 или других антиапоптозных генов, повышают чувствительность опухоли к химио- и радиотерапии и облегчают их противоопухолевое действие, predisposing клетки к смерти. Использование антисмысловых олигонуклеотидов к мРНК Bcl2 у пациентов с рецидивирующими и рефрактерными лимфомами дает обнадеживающие результаты. Предпринимаются также попытки идентифицировать низкомолекулярные вещества, которые, связываясь с Bcl2 или Bcl-X_L, имитируют эффект про-апоптозных трансдоминантных ингибиторных белков, таких как Bad, Bik, Bim, Bid и Hrk.

Другой терапевтический подход направлен на белки семейства IAP и их взаимодействие с каспазами. Идея состоит в том, чтобы идентифицировать структуру веществ, которые блокируют связывание IAP с каспазами и тем самым активируют последние, чтобы убить опухолевую клетку. Выполнимость этого замысла показана для соответствующих белков дрозофилы. Аналогичную функцию могут, вероятно, выполнять и низкомолекулярные вещества непептидной природы.

Существует множество менее прямых подходов к изменению экспрессии или функции апоптоз-регулирующих генов и кодируемых ими белков, например, создание веществ, способных ингибировать протеинкиназы, фосфорилирующие проапоптозные белки, или транскрипцию их генов. Некоторые протеинкиназы, например, Akt, фосфорилируют и инактивируют отдельные проапоптозные белки семейства Bcl2. Мишенью активированной Akt-киназы является компонент апоптозного механизма член Bcl2-семейства белок Bad, а также проапоптозный фермент каспаза 9. Ингибирование фосфорилирования проапоптозных белков способствует их поддержанию в функционально активном состоянии.

Еще один подход касается антиангиогенной стратегии, так как направлен на $\alpha_v\beta_3$ -интегрин эндотелиальных клеток, чтобы лишить

их сигнальных молекул выживания, необходимых мигрирующим эндотелиальным клеткам для супрессии апоптоза. Дело в том, что антагонисты $\alpha_v\beta_3$ -интегрина уменьшают соотношение Bcl2/Bax в эндотелиальных клетках. Таким образом, некоторые способы влияния на сигнальную трансдукцию и клеточную адгезию могут пересекаться в точке, приходящейся на одно из ключевых звеньев механизма апоптоза.

Глава 5

МЕТАСТАЗИРОВАНИЕ

5.1. КЛОНАЛЬНАЯ ЭКСПАНСИЯ СУБПОПУЛЯЦИЙ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК

Метастазы являются причиной смерти 2/3 пациентов с злокачественной опухолью. Понимание того, как опухолевые клетки осуществляют метастатическое распространение, чрезвычайно важно для успешного лечения и предотвращения вторичного распространения. Метастазирование, как и лекарственная резистентность опухолевых клеток, способствует неудаче лечения, но остается слабо изученным на биохимическом и молекулярном уровнях.

Метастазирование — это комплексный процесс, который часто сопровождается дерегуляцией фаз роста и может быть описан как каскад физиологически определенных стадий (рис. 5.1). Диссеминации опухолевых клеток способствуют: а) продукция опухолевыми клетками ростовых факторов или способность отвечать на них паракринным образом; б) васкуляризация опухоли; в) эмиссия клеток, опосредованная протеолитическими ферментами, продуцируемыми и секретируемыми опухолью в экстраклеточную среду; г) адгезия опухолевых клеток к базальной мембране сосудистой стенки, инвазия через базальную мембрану в кровеносные сосуды, попадание их в кровеносную или лимфатическую систему и далее в отдаленные области организма.

Клональная эволюция опухоли, в том числе формирование вариантов с лекарственной резистентностью и вариантов с различной степенью и паттерном метастазирования не только представляет научный интерес, но и имеет непосредственное отношение к



Рис. 5.1. Этапы опухолевой прогрессии.

лечению рака, так как предопределяет успех наших усилий. И первичные и вторичные (метастазы) опухоли являются моноклональными, но и в тех, и в других со временем происходит клеточная дивергенция. Это обусловлено феноменом генетической нестабильности, которая является основным источником генетического разнообразия и клональной эволюции опухоли. Нарастание генетической нестабильности приводит к возникновению внутри опухоли субклонов с более агрессивным фенотипом. Клональная экспансия может зависеть от того, как опухолевые клетки отвечают на паракринные сигналы. Метастазы опухоли могут сами метастазировать в третичные сайты. Инвазивное и метастатическое поведение опухоли детерминировано аномальной экспрессией многих генов, в число которых входят онкогены, гены ростовых факторов и адгезионных молекул, гены-супрессоры метастазирования и другие, поэтому развитие метастазов — следствие взаимодействия множества онкобелков и кумулятивное проявление ряда изменений в спектре биологических свойств клетки.

Процесс метастазирования регулируется множеством генных продуктов. Среди них рецепторы межклеточных и матрично-клеточных взаимодействий; протеолитические ферменты, которые облегчают разрушение и инвазию базальной мембраны сосудов и органов; факторы подвижности, которые позволяют опухолевым клеткам мигрировать сквозь ткани; рецепторы органоспецифичной инвазии; ростовые и ангиогенные факторы, способствующие гематогенному

распространению метастатических клеток, неоваскуляризации метастатических опухолей, получению ими питательных веществ, удалению метаболитов. В настоящее время известны несколько биохимически и генетически различных семейств адгезионных молекул: кадерины, интегрины, адгезионные молекулы из суперсемейства иммуноглобулинов, селектины и клеточный детерминант CD44. Нарушения их экспрессии придают опухолевым клеткам метастатический потенциал и способствуют опухолевой прогрессии. Часто затруднительно отнести специфическую функцию на счет конкретного фактора, так как возможно параллельное участие в процессе дегградации экстраклеточного матрикса и промоции локальной и сосудистой инвазии многих ферментов и кофакторов.

Различные фенотипы, возникающие во время опухолевой экспансии, прекращают пролиферацию и распространение *ad infinitum* и подвергаются селективной эволюции. Например, они подвержены действию защитных механизмов, могут испытывать потребность в ростовых факторах и различаются по способности отвечать на них. Наиболее распространенные варианты отличаются более агрессивным ростом и склонностью к метастазированию. Проллиферативная экспансия уравнивается элиминацией путем переключения клеток на путь апоптоза. Не все микрометастазы развиваются в метастатические опухоли в отдаленных органах, т.е. они гетерогенны в этом отношении. Метастатические варианты могут иметь одинаковый уровень репарации спонтанных и индуцированных повреждений ДНК, но различаться по точности репарации, в частности, воссоединения разрывов. Например, высокометастазирующие клоны проявляют 60–90% точность сшивки, а низкометастазирующие — 24% точность.

Прогрессия опухоли может идти двумя независимыми путями: потеря гетерозиготности генов-супрессоров опухолей и накопление ошибок репликации (RER^+ , микросателлитная нестабильность) в результате мутаций в генах пострепликативной репарации. RER^+ -фенотип редко встречается в печеночных метастазах, если соответствующая первичная опухоль была RER^- , подтверждая, что микросателлитная нестабильность (МН) — раннее событие канцерогенеза.

В то же время МН выявляется в 55% метастазов немелкоклеточных карцином легкого по сравнению с 12% первичных опухолей. МН — позднее событие в прогрессии опухолей желудка и встречается чаще на поздних, чем на ранних стадиях болезни, т.е. может быть ответственной за изменение функций генов, направляя опухоль на путь метастазирования. Анализ микросателлитных локусов

в клетках карцином желудка показал, что МН более чем в двух локусах соответствует меньшему нодальному поражению, чем при МН менее чем в двух локусах. Кроме того, опухоли с МН более чем в двух локусах показывают большую лимфоидную инфильтрацию, т.е. проявляют менее агрессивное опухолевое поведение и означают лучший прогноз. Во многих случаях корреляция между МН и метастатической диссеминацией отсутствует.

Связь теломеразной активности с опухолевой прогрессией. Теломеры — терминально локализованные области хромосом, которые существенны для поддержания функции и целостности хромосом, предохраняют их от фрагментации. Прогрессирующее укорочение теломер с каждым раундом репликации делает хромосомы нестабильными и приводит к незаконной рекомбинации и деградации хромосом. Потеря теломерной ДНК приводит к формированию «липких» концов, которые способствуют слиянию концов сестринских хроматид или слиянию с другими хромосомами с образованием дицентриков или кольцевых хромосом. Укорочение хромосом, наблюдаемое *in vitro* и *in vivo*, сокращает число циклов репликации и продолжительность жизни клетки, а экспериментальная элонгация теломер продлевает ее. Теломерные ассоциации являются характерным признаком потери теломерной ДНК и приводят к апоптозу.

Теломераза защищает клетки от апоптоза и промотирует иммортализацию, проявляющуюся в продолжающейся пролиферации, свойственной раковым клеткам. Теломераза представляет собой рибонуклеопротеиновый комплекс, который использует для синтеза в качестве матрицы участок своей интегральной РНК, комплементарный теломерной ДНК (рис. 5.2, см. вклейку). Большинство соматических тканей, в отличие от репродуктивных, не содержит теломеразу даже на фетальных стадиях развития. Теломеразная активность не индуцируется пролиферацией в этих клетках.

Активность теломеразы зависит от стадии клеточного цикла. В S-фазе отмечается наиболее высокий уровень теломеразы, затем он снижается вплоть до неопределимого в клетках, синхронизированных в фазе перехода G2→M. Это подтверждает вовлеченность теломеразы в прогрессию клеточного цикла и пролиферацию. Предполагается, что укорочение теломер до критической длины активизирует ген p53. Теломераза стабилизирует теломеры, которые были бы слишком короткими в ее отсутствие (рис. 5.3, см. вклейку), причем для выполнения этой функции необходимы две копии гена теломеразной РНК. Теломеразозависимая иммортализация клеток

одновременно с инактивацией генов p53 или Rb приводит к прогрессии опухоли к метастатическому состоянию. Теломеразная активность, как и утрата теломерной ДНК, ассоциирована с поздними стадиями болезни и неблагоприятным прогнозом, но не обнаруживается на ранних стадиях, коррелирует с инвазивностью и метастазированием.

Несмотря на множество фактов, указывающих на высокую корреляцию теломеразной функции с опухолевой прогрессией, имеются сообщения, не подтверждающие ее. Ряд исследователей показали отсутствие корреляции активности теломеразы со стадией заболевания.

Эффективность проникновения опухолевых клеток сквозь эндотелиальный барьер сосудов в значительной степени определяет успешность метастатической диссеминации. Инвазивность отчасти обусловлена пролиферативным потенциалом опухоли и секреторной спектра протеолитических ферментов. На экспериментальных животных показано, что из нескольких миллионов клеток, которые первичная опухоль эмиттирует в сосудистую систему, только 0,01% могут преодолеть иммунный и другие защитные механизмы организма хозяина и успешно формировать вторичные опухоли. Эта клеточная фракция должна снова преодолеть сосудистый барьер, чтобы попасть в паренхиму органа, в котором будет формироваться метастаз. Для роста опухолевой клетки во вторичную опухоль требуется не только наличие адгезионных молекул на поверхности клетки и ферментов, ассоциированных с внутренней поверхностью клетки и влияющих на адгезию и межклеточные взаимодействия, но и оптимальные ростовые условия в паренхиме органа. Если они отсутствуют, то опухолевые клетки могут оставаться в органе как «спящие» микрометастазы.

Размер первичной опухоли — важный параметр клинического стадирования болезни, но прямая корреляция между ним и способностью к метастазированию отсутствует. Опухоли часто гетерогенны в отношении распределения фракций с различной пролиферативной активностью. Инфильтрирующие или инвазивные опухоли молочной железы, например, имеют более высокий пролиферативный индекс, чем интрадуктальные компоненты. Хотя переход первичной опухоли к метастатическому состоянию сопровождается усилением пролиферации, пролиферативный пресс — это только один из факторов инвазивного поведения, так как есть примеры отсутствия взаимосвязи между размерами опухоли, пролиферацией и инвазивностью. Другим фактором может быть активация генов, промотирующих

метастатическое распространение, но существуют гены, контролирующие оба процесса — пролиферацию и метастазирование.

5.2. РЕГУЛЯЦИЯ КЛЕТОЧНОГО ЦИКЛА И ОПУХОЛЕВАЯ ПРОГРЕССИЯ

Рак называют болезнью клеточного цикла. Накопление геномных изменений проявляется в потере контроля клеточного цикла и ассоциируется с опухолевой прогрессией. Потеря функциональной активности многих генов-супрессоров пролиферации часто связана с переходом в метастатическую стадию. Это утверждение справедливо и для главного «стража» генома — гена p53.

Ген-супрессор опухолей p53 индуцирует экспрессию некоторых ингибиторов, блокирующих активацию циклинзависимых киназ Cdk-активирующей киназой, и тем самым участвует в контроле клеточного цикла. Существуют указания, что другие гены, например, ген h-Mts1, доминантно ассоциированный с метастазированием, подавляют функцию p53 и отменяют его контроль прохождения клеткой критической точки $G1 \rightarrow S$.

Вторая критическая точка обнаружена на границе фаз $G2 \rightarrow M$, где клетки задерживаются, если они получили повреждение после вхождения в S-фазу. Изучение температурочувствительных мутантов p53, проявляющих конформационно-зависимую активность «дикого» типа, показало, что p53 контролирует также переход $G2 \rightarrow M$. Клетки фибросаркомы с мутантным геном p53, синхронизированные и облученные в фазе G1, останавливаются в точке $G2 \rightarrow M$, в отличие от клеток линий с wt p53, которые проходят эту точку, так как радиационные повреждения были уже репарированы. Если клетки с wt p53 были облучены в S-фазе, то они тоже останавливаются в точке $G2 \rightarrow M$. В контроле этой точки участвует ген STMN (Stathmin), чью экспрессию контролирует ген p53, причем p53 подавляет экспрессию гена STMN одновременно с остановкой клеточного цикла в фазе G2. Его продукт — цитозольный фосфопротейн статмин взаимодействует с тубулином и вовлечен в динамику микротрубочек, ассоциированную с митозом. Он подвержен фосфорилированию MAP-киназой, а также циклинзависимыми киназами в ответ на пролиферативные и дифференцировочные сигналы. Переход клетки через точку $G2 \rightarrow M$ включает фосфорилирование специфических сайтов статмина циклинзависимыми киназами. Индукция дифференцировки нервных клеток *in vitro*

фактором роста нервов зависит от фосфорилирования статина MAP-киназой.

Средняя длительность жизни пациентов с глиомой НСЗ не зависит от p53-статуса, но 5-летняя выживаемость составила 46% в p53-негативной группе и 21% в p53-позитивной. Эти данные интерпретированы таким образом, что субпопуляция, несущая специфическую мутацию, впоследствии развивается в агрессивную опухоль ВСЗ, что подтверждается высокодостоверной корреляцией между первичными и рецидивирующими глиомами по p53-статусу, т.е. первичные опухоли НСЗ с мутантным p53 рецидивировали как анапластические глиомы. Глиомы НСЗ и ВСЗ различаются по типу мутаций гена p53: опухоли НСЗ были гетерозиготны по p53, а в опухолях ВСЗ оба аллеля были мутантными. У больных с опухолями толстой кишки аномалии p53 ассоциируются с метастазами в печень.

Соматические мутации p53 чаще происходят на поздних этапах канцерогенеза, ассоциированы с лимфатической и васкулярной инвазией, опухолевой прогрессией и клинически агрессивным поведением опухоли.

Ген mdm2 и опухолевая прогрессия. Высокая экспрессия mdm2 и окрашивание на p53 в одной и той же опухоли коррелируют с низкой выживаемостью пациентов. При лейомиосаркоме аномалия одного из них ассоциируется с более поздней стадией болезни. При саркоме Ewing амплификация mdm2 ассоциируется с метастазированием. В метастазирующих опухолях был также ко-амплифицирован ген Cdk4, поэтому трудно оценить значение амплификации определенного онкогена в метастатическом процессе. То же можно сказать и об опухолях молочной железы, в которых выявляется ко-амплификация генов mdm2, Wnt2, Myc, Ras, erbB2, p53 и других.

Повышенная экспрессия гена mdm2 коррелирует с утратой признаков дифференцировки при липосаркоме, предзлокачественных и злокачественных поражениях слизистых оболочек ротоглотки.

Трансактивация генов рецепторов ростовых факторов белком p53. Экспрессия рецептора эпидермального ростового фактора считается индикатором злокачественности при некоторых формах рака у человека. Высокая экспрессия EGFR часто сопровождается аномалиями p53. Такая корреляция обнаруживается при карциноме пищевода, молочной железы, мочевого пузыря и аденосаркоме желудка.

GADD (growth arrest and DNA damage inducible) – семейство генов, индуцируемых повреждениями ДНК и ассоциированных с

супрессией роста. Ген GADD45 имеет p53-связывающий элемент в 3-м интроне, и его транскрипция повышается при повреждении ДНК. Активация wtp53 индуцирует GADD45, p21, mdm2. Очевидно, p53 регулирует два различных типа генов в порядке выполнения своей функции задерживания клетки с поврежденной ДНК в точке G1→S и снятия ингибции по завершении репарации ДНК. GADD45 — ядерный белок, экспрессирующийся в нормальных тканях, особенно в покоящихся клеточных популяциях. Его экспрессия высока в фазе G1, но редуцирована в S-фазе. Еще один общий с другими p53-регулируемыми генами признак — способность взаимодействовать с PCNA — компонентом комплексов репликации и репарации ДНК и с ингибитором пролиферации белком p21.

Транскрипционный ответ генов GADD45, p21 и mdm2 на ионизирующую радиацию, как показано в нескольких клеточных линиях человека, приблизительно одинаков и p53-зависим. Агенты, усиливающие радиочувствительность, повышали, а кофеин ингибировал индукцию GADD45 и p21 радиацией. GADD45 и p21 показали сходный рост-супрессирующий эффект. При атаксии-телеангиэктазии, когда радиоиндукция гена p53 замедлена, транскрипция GADD45 и p21 также замедлена. Wtp53 может модифицировать экспрессию других негативных регуляторов роста.

Митогенный сигнал, проводимый инсулиноподобным ростовым фактором 1 (IGF-1), ингибируется IGF-связывающим протеином 3 (IGF-BP3), экспрессию которого также индуцирует wtp53.

Ассоциированный с метастазированием ген h-Mts1. Название гена h-Mts1 отличает его от опухолевого супрессора MTS, продукт которого p16/INK4 ингибирует циклин-D-зависимую киназу Cdk4. Повсеместно экспрессирующийся в нормальных пролиферирующих тканях белок h-Mts1 относится к семейству низкомолекулярных белков S100, формирующих гомо- и гетеродимеры из α - и β -субъединиц и содержащих множественные копии кальций-связывающей области с общей структурной кальций-связывающей последовательностью, известной как EF-мотив. Обычно EF-мотив состоит из 12-аминокислотной петли, фланкированной двумя α -спиралями. EF-содержащие белки участвуют в кальций-сигнальной трансдукции и контролируют кальций-зависимые процессы, некоторые из них взаимодействуют с другими клеточными белками кальций-зависимым образом и регулируют их биологическую активность. Обнаружены две альтернативно сплайсруемые формы белка h-Mts1, которые дифференциально экспрессируются в нормальных и опухолевых тканях. Гиперэкспрессия p21Ras, обеспечивающая непре-

рывный сигнал для клеточной пролиферации и онкогенной трансформации, усиливает экспрессию белков S100, в том числе h-Mts1. Функция h-Mts1 в метастатической прогрессии рака связана с его участием в сигнальной трансдукции ростовых факторов и клеточной подвижности.

Кальций-связывающие белки семейства S100 обслуживают несколько важных физиологических функций. Их экспрессия тесно ассоциирована с прогрессией клеточного цикла. Несколько членов этого семейства, например, S100 β , кальциктин (calcyctin), h-Mts1 и др., экспрессируются на специфических стадиях клеточного цикла. h-Mts1 является p53-связывающим белком. Эти два белка функционируют координированно в контроле опухолевого роста, инвазии и метастазирования. Детекция p53 увеличивается и уменьшается параллельно понижению и повышению экспрессии h-Mts1. При повышении уровня h-Mts1 уровень p53 падает, h-Mts1 промотирует деполимеризацию тубулина и передает сигнал к переходу G1→S. Усиление экспрессии h-Mts1 приводит к большей деформируемости мембран и тем самым усиливает инвазивность. Преобладание p53 снижает уровень h-Mts1, приводя к ингибированию деполимеризации тубулина, и останавливает клетку в G1. Корреляция экспрессии p53 и h-Mts1, по-видимому, обусловлена формированием комплекса и вследствие этого стабилизацией p53, позволяющей определять его иммуногистохимически. Это комплексообразование препятствует реализации нормальной функции p53 останавливать клетки в фазе G1. Повышенный уровень белка p53 определяется, когда он формирует комплексы с другими макромолекулами, которые приводят к его стабилизации.

В опухолях зависимость экспрессии белка h-Mts1, ассоциированного с инвазивным и метастатическим поведением опухолевых клеток, от фазы клеточного цикла сохраняется: высокий уровень его экспрессии отмечается в S-фазной фракции карциномных клеток. Клеточные линии человека опухолевого происхождения, в которых h-Mts1 конститутивно экспрессируется на высоком уровне, в большей степени состоят из клеток в S-фазе по сравнению с линиями с низким уровнем h-Mts1. Введение экзогенного h-Mts1 в клетки мышинной меланомы индуцирует их переход из фазы G1 в S-фазу и параллельно увеличивает накопление p53, позволяя предположить, что переход G1→S индуцирован инактивацией p53 в результате его связывания белком h-Mts1. Опухолевые клетки с повышенным уровнем h-Mts1 показывают усиленное метастазирование в легкие.

Еще один член семейства S100 — белок S100A4 проявляет сильную корреляцию с метастазами в лимфатических узлах, низкой дифференцированностью опухолевых клеток и смертностью больных карциномой молочной железы, причем анти-S100A4-антитела окрашивают не только опухолевые, но и стромальные клетки и лимфоциты.

Кооперация Rb и p53 в регуляции клеточного цикла. Инактивация гена Rb наблюдается при прогрессии опухоли. Например, мутации гена Rb отсутствуют в неинвазивных опухолях мочевого пузыря HC3, но присутствуют в 85% инвазивных опухолей BC3. Поскольку Rb и p53 ассоциируются с супрессией перехода клеточного цикла в S-фазу, следует ожидать их кооперативного влияния на рост и прогрессию опухолей, когда оба гена экспрессируются в инактивированной форме или отсутствуют вследствие делеции. Аномалии одного или обоих генов проявляются в значительном повышении пролиферативного индекса опухоли по сравнению с опухолями, не несущими таких аномалий, причем аномалии этих генов наиболее распространены в поздних стадиях заболевания.

Циклины как онкогены в прогрессии клеточного цикла. Инициация синтеза ДНК и митоз контролируют два ключевых фермента: циклинзависимая протеинкиназа, содержащая регуляторную субъединицу из семейства киназ, контролирующих клеточное деление (p34Cdc2 — cell division control 2), и ингибитор Cdk. Образование комплекса из Cdk, Cdc2 и циклинов обеспечивает проведение регуляторного сигнала, необходимого для прогрессии клеточного цикла. Наиболее хорошо охарактеризован p34Cdc2-киназно-циклиновый комплекс, известный как S-фазный промотирующий фактор. В состав этого комплекса входит циклин В, который синтезируется во время S-фазы. В фазе G2 образование комплекса Cdc2 с циклином В индуцирует фосфорилирование треонина-161 в молекуле киназы, необходимое для ее активации. Ферментативная активность Cdc2 подавляется фосфорилированием треонина-14 и тирозина-15 в АТФ-связывающем сайте во время перехода S→G2. Когда ингибирующие фосфаты удаляются из комплекса Cdc2/циклин В, киназа активируется и направляет клетку через границу G2/М в митоз. Клетка выходит из митоза при деградации циклина В убиквитином и происходящей при этом инактивации p34Cdc2.

Циклины фазы G1 также формируют комплексы и активируют киназу p34Cdc2, что обеспечивает передачу сигнала к переходу клетки из фазы G1 в S-фазу, индуцируя репликацию ДНК. Этот переход негативно регулируется белком p53, который индуцирует p21,

ассоциирующийся с циклиновым комплексом и ингибирующий его функцию. Отмена функции p53 может достигаться его собственной инактивацией, а также отсутствием его молекулярных мишеней. p53 взаимодействует с p34Cdc2 *in vivo*, и Cdc2-киназа фосфорилирует его серин-315. Аналогичным образом белок Rb также является субстратом Cdc2-киназы. Таким образом, инактивация p53/Rb может осуществляться путем мутаций, фосфорилирования или связывания вирусными либо клеточными онкобелками и приводит к переходу клетки из фазы G1 в S-фазу.

В свете значения для регуляции клеточного цикла циклины играют важную роль в неопластической трансформации и прогрессии. Циклины фазы G1 можно рассматривать как онкобелки. В клетках В-клеточных лимфоидных опухолей встречается реципрокная хромосомная транслокация t(11;14)(q13;q32), которая активирует ген циклина D1 Bcl1/PRAD1. Амплификация локуса 11q13, в котором находится ген Bcl1/PRAD1, позитивно коррелирует с метастазами в лимфатические узлы, укороченной ремиссией при раке молочной железы и является фактором прогноза пониженной выживаемости.

Повышенная экспрессия циклина D1 описана при НХЛ из клеток мантийной зоны, плоскоклеточной карциноме головы и шеи, гепатоклеточной карциноме, карциноме толстой кишки и молочной железы. Она встречается как раннее событие и сохраняется при прогрессии опухоли к метастатической стадии. При ларингеальной карциноме амплификация гена циклина D1 ассоциируется с метастазами в лимфатические узлы. При гепатоклеточной карциноме она ассоциируется с высокой скоростью роста и агрессивностью заболевания. Таким образом, дерегуляция циклинов может быть вовлечена не только в трансформацию, но и в опухолевую прогрессию.

Белки теплового шока при раке и их прогностическое значение. Высококонсервативные стрессовые белки, так называемые белки теплового шока (heat shock protein, HSP), повсеместно экспрессируются во всех клетках организма. Функция HSP как молекулярных шаперонов (chaperones) заключается в поддержании правильной упаковки и пространственной организации белков, а также в их участии во внутриклеточном транспорте. HSP соединяются с разнообразными пептидами, возникающими в процессе внутриклеточной деградации белков, в том числе с антигенными пептидами из опухолевых клеток. Подобно молекулам главного комплекса гистосовместимости, HSP принимают участие в формировании врожденного и адаптивного иммунитета и могут использоваться в созда-

нии новых вакцин для иммунотерапии рака. В качестве молекулярных шаперонов для антигенных пептидов опухолевого происхождения HSP способствуют их иммунному распознаванию цитотоксическими Т-лимфоцитами и наоборот, экспрессируются на самих опухолевых клетках для преодоления стрессовых факторов, с которыми сталкивается опухоль (лишение нутриентов, кислорода, антиопухолевый иммунный ответ).

Таким образом, белки теплового шока способствуют клеточному выживанию в непермиссивных условиях, возникающих при действии средовых и патофизиологических стрессовых факторов. Они могут переправлять белки через внутриклеточные мембраны и вызывать иммунный ответ, способствуя эффективной антигенной презентации. Это подтверждается наблюдением, что иммунный ответ на p53 был только у тех пациентов, у которых обнаружены комплексы p53/HSP70. И наоборот, пациенты, не имеющие антител к p53, не содержали комплексов p53/HSP70. Кроме того, белки теплового шока могут быть вовлечены в транслокацию клеточных белков, участвующих в поддержании клеточной формы и межклеточной адгезии. HSP70, например, связывается с актиновыми микрофиламентами, вовлечен в димеризацию тубулина. Белки, обладающие способностью промотировать цитоскелетную деполимеризацию, такие как h-Mts1, привлекаются белками теплового шока к месту сборки микротрубочек, составляющих цитоскелет, которые увеличиваются во время митоза. Экспрессия белка Hsp70, который участвует в межпротеиновом взаимодействии, в том числе с онкобелками, негативно коррелирует с тяжестью заболевания и метастазированием в лимфатические узлы, а также по результатам мультивариантного анализа является независимым прогностическим фактором выживаемости пациентов. Один из механизмов опухолесупрессорной функции этого белка заключается в презентации Т-лимфоцитами CD8⁺ опухолеспецифичных антигенов.

Примечательно, что экспрессия белков теплового шока негативно коррелирует с экспрессией рецептора эпидермального ростового фактора, т. е. изменение экспрессии белков теплового шока может быть одним из событий, ассоциированных с прогрессией опухолей молочной железы. Пациенты с опухолями p53⁺/HSP⁺ имеют большую общую выживаемость, чем пациенты с опухолями p53⁻/HSP⁻.

Роль экспрессии белков теплового шока в опухолевых клетках неоднозначна. Экспрессия значительно выше в циркулирующих опухолевых клетках пациентов с ОМЛ, чем пациентов с ХМЛ, и в

обоих случаях выше, чем в мононуклеарах здоровых людей. Экспрессия Hsp27 в опухоли желудка IV стадии коррелирует с выживаемостью пациентов и может служить фактором прогноза возникновения метастазов в лимфатических узлах. Повышенный уровень высокомолекулярных белков теплового шока описан также при раке легкого и предстательной железы, но считать экспрессию белков теплового шока маркером опухолевой прогрессии и инструментом для прогноза преждевременно.

5.3. АПОПТОЗ В ОПУХОЛЕВОМ РОСТЕ И МЕТАСТАЗИРОВАНИИ

Широкий спектр биологических процессов, включающий в себя клеточный рост, дифференцировку и морфогенез, показывает абсолютную зависимость достижения гомеостаза от кинетики размножения клеточной популяции путем либо регуляции клеточного роста, либо регуляции апоптоза, либо их комбинации. Дерегуляция этих механизмов приводит к популяционной экспансии, которая характеризует опухолевый рост и развитие метастазов. Размер первичной опухоли связан с ее биологическим поведением. Если клеточный рост в месте метастатического депонирования остается под безупречным контролем, то метастаз не развивается, остается «спящим». Его развитие во вторичную опухоль может зависеть от стимуляции клеточной пролиферации ростовыми факторами. Метастазы могут возникать и тогда, когда популяционная кинетика нарушена дерегуляцией апоптоза. Вовлечение в процесс метастазирования генов, контролирующих клеточный цикл и апоптоз, продемонстрировано в подавляющем большинстве опухолей.

Дерегулированная экспрессия генов семейства Bcl2. Ген Bcl2 считается онкогеном с точки зрения его функции в апоптозе и поддержании тонкого гомеостаза клеточной популяции. Дерегуляция Bcl2 часто обнаруживается в аденокарциноме предстательной железы, карциноме легкого, толстой кишки и гемопозитических опухолях и может быть ранним событием канцерогенеза, изменяет кинетику опухолевого роста и клинический исход болезни. Первичные и вторичные опухоли заметно различаются по степени апоптоза. Высокометастатические варианты более резистентны к апоптозу, чем варианты с низким метастатическим потенциалом, и апоптозный индекс напрямую связан с выживаемостью пациентов. Экспрессия Bcl2 возрастает при прогрессии опухоли от ранних к поздним ста-

дням. Метастазы в лимфатические узлы встречаются у пациенток с Bcl2-позитивными опухолями молочной железы чаще, чем у пациенток с Bcl2-негативными опухолями.

Аноикис (anoikis) — особый случай «смерти по умолчанию», который развивается через PI3K/АКТ-путь сигнальной трансдукции в результате неадекватных, несоответствующих контактов клеточных интегринов с экстраклеточным матриксом и вовлекает проапоптотные белки Bcl2-семейства Bim и Bmf. В здоровых клетках белки Bim и Bmf связаны с белками цитоскелета, но после отделения клетки от экстраклеточного матрикса соответствующей ткани они высвобождаются и взаимодействуют с антиапоптотным белком Bcl2. Резистентность к аноикису облегчает метастазирование, позволяя клеткам выживать после отделения от тканевого матрикса и путешествовать в отдаленные органы.

5.4. ОПУХОЛЕВЫЙ АНГИОГЕНЕЗ

Ангиогенез важен для многих биологических процессов, таких как эмбриональное развитие, заживление раны и хроническое воспаление. Формирование временного экстраклеточного матрикса — характерный признак ангиогенеза, который наблюдается при повреждении сосудов, воспалении и в опухолях. Во время ангиогенеза экстраклеточный матрикс непрерывно перестраивается благодаря сбалансированному процессу деградации и ресинтеза. В этом процессе участвуют ангиогенные факторы (особенно VEGF), плазматические белки (фибронектин, протромбин, витронектин, плазминоген и др.), тканевой фактор (фактор образования фибрина), матриксные металлопротеиназы, адгезионные и другие молекулы. Ангиогенез является также ключевой предпосылкой роста и распространения опухоли. Идентифицированы две фазы опухолевого роста: аваскулярная и васкулярная. Аваскулярная фаза является самоограничивающейся из-за недостаточной диффузии питательных веществ и продуктов катаболизма через опухолевую поверхность. Васкулярная фаза роста опухоли представляет собой фазу быстрой экспоненциальной экспансии. Например, опухоли, имплантированные в аваскулярную среду передней глазной камеры, дают ограниченный рост, но когда они достигают васкулярного слоя радужной оболочки, они васкуляризируются и начинают быстро расти. Опухолевый рост стимулируется факторами, усиливающими ангиогенез, и подавляется агентами, блокирующими ангиогенез. Ингиби-

ция опухолевого ангиогенеза, следовательно, потенциально представляет собой новый подход к терапии рака.

Опухоли способны индуцировать пролиферацию проксимальных капилляров. Новые капилляры возникают главным образом из малых венул в ответ на ангиогенную стимуляцию самой опухоли. Первоначально происходит распад базальной мембраны сосудистой стенки, возможно, под влиянием протенназ, которые синтезируются в эндотелиальных клетках под действием ангиогенного фактора — основного фактора роста фибробластов (basic fibroblast growth factor, bFGF). bFGF обратимо связывается с секретируемым белком, который защищает его от деградации. Этот процесс сопровождается миграцией эндотелиальных клеток в направлении источника ангиогенного фактора.

Известен ряд факторов с ангиогенной активностью, некоторые из них секретируются самой опухолью (табл. 4). Механизм локализации ростовых факторов на клеточной поверхности и презентации их соответствующим рецепторам в наиболее предпочтительной конформации заключается в связывании этих ростовых факторов

Таблица 4. Индукторы и ингибиторы ангиогенеза

Индукторы	Ингибиторы
Ростовые факторы	Wt p53
FGF	Wt Rb
VEGF	IL-1
HGF	Интерфероны
TGFβ	Тромбоспондин-1
TNF	Тканевые ингибиторы металло-
IL-1, 4, 6, 8	протенназ
Ангиогенин	Мотив YIGSR (Tyr-Ile-Gly-Ser-Arg)
Простагландины E ₁ , E ₂	мультимерной формы ламинина
Активаторы плазминогена	
Эстроген	
Ангиотензин	
Субстанция Р	
Липополисахарид	
Тимидинфосфорилаза (эндотелиальный	
ростовой фактор тромбоцитов)	
Е- и Р-селектины	
Гаглинозид GD3	
Полиамины	
Катепсин В	
Молекулы клеточной адгезии	
Рецепторы интегринов	

с гепарансульфатпротеогликаном (HSPG). Ангиогенные ростовые факторы стимулируют подвижность эндотелиальных клеток при участии онкогена Ras. Антитела к белку Ras ингибируют bFGF-стимулированную подвижность и могут даже ингибировать инициацию этого процесса, следовательно, Ras необходим для трансдукции соответствующего сигнала.

5.4.1. Индукторы ангиогенеза

Ростовой фактор сосудистого эндотелия VEGF (vascular endothelial growth factor) был первоначально выделен как фактор сосудистой проницаемости и лишь впоследствии — как ростовой фактор, который индуцирует пролиферацию эндотелиальных клеток, но не фибробластов или эпителиальных клеток. Идентифицированы 4 формы VEGF: VEGF121, VEGF165, VEGF180 и VEGF206, различающиеся числом аминокислотных остатков в зрелом белке. Основной субтип VEGF121 состоит из 5 экзонов, кодирующих 141-аминокислотную последовательность N-терминального района, и 6 C-терминальных аминокислот, кодируемых экзоном 8. Другие изоформы содержат дополнительные экзоны: VEGF165 — экзон 7, VEGF189 — экзоны 6 и 7, VEGF206 — экзоны 6, 7 и укороченный экзон 6'. N-терминальный район VEGF содержит 8 цистеиновых остатков, которые участвуют в димеризации молекул. Экзон 6 кодирует цепочку высокоосновных аминокислот, а экзон 7 — гепарин-связывающий район молекулы. Аминокислоты C-терминальной части 111-165 существенны для митогенной активности VEGF. Различия в митогенной активности изоформ и способности регулировать сосудистую проницаемость зависят от сплайсинга функциональных доменов в молекуле. Два VEGF-родственных плацентарных ростовых фактора, PlGF-1 и PlGF-2, продуцируются альтернативным сплайсингом пре-мРНК, транскрибированной с гена VEGF.

Промотор гена VEGF содержит сайты связывания транскрипционных факторов AP-1, AP-2 и SP-1. Его экспрессия индуцируется ростовыми факторами EGF (рис. 5.4, см. вклейку), TGF α , PDGF, простагландинами E1 и E2 и в значительной степени гипоксией, а также IL-1. Регуляция VEGF всеми этими факторами происходит посредством участия протеинкиназы C, которая активируется фоболовыми эфирами. Активация гипоксией происходит благодаря наличию гипоксизависимых элементов в 5'-конце гена VEGF и при участии онкогена c-Src. Гипоксия усиливает киназную активность белка p60Src, причем индукция VEGF гипоксией не происходит в

с-Src-негативных клетках. Следовательно, ген VEGF является мишенью сигнала, передаваемого посредством функциональной активности с-Src-киназы. Онкоген Ras, который часто мутирует при раке, также имеет отношение к ангиогенезу, так как его экспрессия ассоциируется с повышением уровня мРНК и белка VEGF. Это повышение подавляется обработкой клеток агентами, блокирующими функцию белка Ras, и отсутствует в клетках с дефектом Ras.

VEGF специфичен для сосудистого эндотелия, так как его рецепторы обнаружены только в эндотелиальных клетках. Мембранные рецепторы VEGF, к которым относятся Flt1 (Fms-like tyrosine kinase 1), Flt4 и Flk1 (известный еще как KDR), принадлежат к семейству тирозинкиназ — рецепторов факторов роста и имеют некоторые общие свойства с другими тирозинкиназными рецепторами. Это трансмембранные белки с экстраклеточными, трансмембранными и цитоплазматическими доменами. Экстраклеточные области содержат иммуноглобулиноподобные домены, которые связываются с VEGF. Внутриклеточный домен VEGF-рецепторной молекулы подобен цитоплазматическим доменам других тирозинкиназ. Связывание рецепторов VEGF с лигандом инициирует каскад сигнальной трансдукции.

Ангиогенный эффект VEGF убедительно продемонстрирован трансфекцией клонированной кДНК VEGF в клетки линии MCF-7 из карциномы молочной железы. Трансфектированный клон V12 стимулировал рост капилляров при его трансплантации в роговицу кролика. V12-опухоли росли быстрее, чем нетрансфектированные трансплантаты, и были лучше васкуляризированы. Экспрессия VEGF тесно коррелирует со степенью ангиогенеза в эпидермоидной карциноме легкого у человека. Он является потенциальным митогеном, так как коррелирует с высоким уровнем пролиферации, определяемым по экспрессии PCNA.

VEGF является главным ангиогенным фактором и в нормальных, и патологических условиях. Хорошо известна его роль в развитии ревматоидного артрита. Он играет выдающуюся роль в эмбриогенезе и обнаружен в развивающихся органах. Три изоформы VEGF и две изоформы VEGF-специфичного рецептора тирозинкиназного типа, Flt1 и KDR/Flk1, обнаружены в развивающейся почке человека. TNF α ингибирует VEGF-индуцированную пролиферацию эндотелиальных клеток человека путем подавления экспрессии Flk1. Гипоксия вызывает 13-кратное усиление экспрессии Flk1, а TGF β подавляет ее.

Экспериментально показано, что мутации даже в одном аллеле гена VEGF летальны для мышинных эмбрионов, так как приводят к серьезным нарушениям ангиогенеза. Эмбриональные стволовые клетки, лишенные активного VEGF, не формируют опухоли при имплантации мышам.

Экспрессия VEGF сильно повышена в карциномах молочной железы и эндометриальных карциномах, эндотелиальные клетки микрососудов в этих опухолях показывают заметную экспрессию мРНК Flt1 и Flk1. Экспрессия и VEGF, и его рецепторов усилена также в опухолях яичника и коррелирует со степенью васкуляризации опухолей. мРНК Flk1 и Flt1 экспрессируются в эндотелиальных клетках глиом BC3, но не HC3. Рецепторы VEGF не экспрессируются в нормальной эндотелии мозга, поэтому неоваскуляризация, ассоциированная с опухолями BC3, может быть паракринным ответом на координированную активацию рецепторных генов. В гемангиобластомах и при синдроме von Hippel-Lindau изоформы VEGF секретируются стромальными клетками и взаимодействуют с рецепторами Flt1 и Flk1, находящимися в опухолевом эндотелии. Рецептор Flk1 вовлечен в рост многих типов человеческих опухолей. Экспрессия VEGF коррелирует с метастазированием в лимфатические узлы, риском системного метастазирования и выживаемостью больных.

Факторы роста фибробластов в ангиогенезе. Факторы роста фибробластов представляют собой большое семейство структурно родственных ростовых факторов, участвующих в ряде биологических процессов, таких как дифференцировка, подвижность, пролиферация, заживление ран и язв, а также в ангиогенезе и патогенезе рака. Наиболее хорошо охарактеризованы кислый (aFGF) и основной факторы роста фибробластов (bFGF).

Полипептид bFGF участвует во всех перечисленных выше процессах. Он не секретируется клетками обычным способом, так как не содержит сигнальных последовательностей для секреции, но может высвобождаться поврежденными или умирающими клетками. bFGF чувствителен к деградации протеолитическими ферментами. Он локализуется в месте своей биологической функции и сохраняет активность благодаря формированию комплекса с гепарансульфатпротеогликанами.

FGF легче высвобождается из комплексов с гепарансульфатом, чем из комплексов с рецепторами. FGF выходит из этих комплексов под действием гипариназы. Функция обеих его изоформ заключается в связывании с рецепторами, которые обладают признаками тирозинкиназных рецепторов других ростовых факторов.

Изоформы рецептора FGF возникают в результате альтернативного сплайсинга единого пре-мРНК-транскрипта. Так как обе изоформы FGF имеют одинаковую аффинность к изоформам рецептора, должна существовать комплексная система регуляции FGF-сигнальной трансдукции. Ингибирование bFGF полисульфатированным производным глюкозамингликана ингибирует ангиогенез. И наоборот, усиление экспрессии bFGF промотирует ангиогенез, например, ангиогенность $\text{TNF}\alpha$ заключается в его способности усиливать продукцию и секрецию bFGF.

Ростовой фактор FGF-3, кодируемый онкогеном Int2 (murine mammary tumor virus integration site 2), высокоомологичен bFGF. Онкоген Int2 участвует в эмбриональном развитии. Его экспрессия и амплификация изучены в ряде опухолей человека. Обнаружена его гиперэкспрессия при карциноме молочной железы, пищевода, яичника и саркоме Капоши. Амплификация Int2 строго коррелирует с метастазами в лимфатические узлы при раке молочной железы и достоверно ассоциирована с повышенным риском рецидива. Ассоциация экспрессии Int2 с агрессивным поведением опухоли обусловлена способностью FGF-3 индуцировать ангиогенез.

Фактор роста гематоцитов (HGF). HGF открыт как фактор рассеивания (scatter factor). Он секретируется фибробластами и является митогеном для эпителиальных и эндотелиальных клеток, гепатоцитов и меланоцитов, но не для фибробластов. Добавление HGF в культуру клеток панкреатических линий сильно промотирует их пролиферацию и подвижность. Его паракринный эффект обусловлен связыванием с тирозинкиназным рецептором, кодируемым онкогеном c-Met. Экспрессия белка c-Met изучена в опухолях разных типов. Она значительно выше в карциномах молочной железы, чем в доброкачественных опухолях этого органа. Обнаружена связь окрашивания на белок c-Met со степенью злокачественности опухолей предстательной железы. 45% карцином предстательной железы и 75% метастазов показывают присутствие белка c-Met. При колоректальном раке экспрессия белка c-Met повышена 5-50-кратно приблизительно в половине первичных карцином и 70% печеночных метастазов, а амплификация гена c-Met определена в 10% первичных опухолей и 90% печеночных метастазов. Экспрессия c-Met в желудочных карциномах коррелирует с метастазами в лимфатические узлы, серозной инвазией и диссеминацией в брюшную полость.

HGF индуцирует ангиогенез и в первичных опухолях молочной железы. Обнаружено, что опухолевая васкуляризация коррелирует

с уровнем HGF в опухоли и с опухолевой пролиферацией, измеренной по Ki-67-индексу (маркеру пролиферации). Это согласуется с повышением экспрессии его рецептора и опухолевой прогрессией. Экспрессия c-Met на уровне мРНК и белка активируется ростовыми факторами bFGF и TGF, которые мощно индуцируют ангиогенез. Интерферон- γ , который ингибирует ангиогенез, подавляет также экспрессию гена c-Met. Это открытие имеет особое значение для модуляции паракринного механизма, по которому HGF и c-Met придают опухолевым клеткам селективное преимущество в росте, инвазивность и метастатические свойства.

Другие ангиогенные факторы. Эндотелиальный ростовой фактор тромбоцитарного происхождения PDGF, известный также под именем тимидинфосфорилазы (TP), обладает онкогенностью и способностью стимулировать опухолевый рост. Индукция ангиогенеза тимидинфосфорилазой в моделях *in vitro* может быть нейтрализована анти-TP-антителами.

Уровень урокиназы (активатора плазминогена uPA) коррелирует с плотностью микрососудов, скоростью пролиферации и сосудистой инвазией опухолевых клеток.

Молекулы клеточной адгезии, такие как VCAM-1, E- и P-селектины и другие, также принимают участие в ангиогенезе. Антитела против E-селектина и VCAM ингибируют ангиогенные свойства опухоли. TNF индуцирует экспрессию VCAM-1 и соответственно ангиогенез. Эти молекулы вовлечены в адгезивное взаимодействие между опухолью и эндотелиальными клетками.

5.4.2. Ингибиторы неоваскуляризации

Ангиостатин. Удаление первичной опухоли часто приводит к быстрому росту ранее неопределимых метастазов. Это может означать, что первичная опухоль продуцирует факторы, ингибирующие прорастание отдаленных метастазов. На основании этой концепции был обнаружен ингибитор ангиогенеза ангиостатин — протеолитический фрагмент плазмينا (плазминогена), состоящий из 4 доменов. Систематическое введение ангиостатина экспериментальным животным блокирует неоваскуляризацию и рост метастазов в отсутствие первичной опухоли, а в высоких дозах он ингибирует рост и самой первичной опухоли. *In vitro* ангиостатин ингибирует bFGF-индуцированную пролиферацию и миграцию эндотелиальных клеток.

Эндостатин. Карбокситерминальный фрагмент коллагена XVIII, названный эндостатином, идентифицирован как потенциальный

ингибитор пролиферации эндотелиальных клеток и ангиогенеза. Его антиангиогенный эффект зависит от взаимодействия с гепарином. Мутации, которые влияют на связывание с гепарином, отменяют ингибирование эндостатином bFGF-индуцированного ангиогенеза. В противоопухолевой активности эндостатина важную роль играют карбокситерминальные лизины. Эндостатин связывает плазминоген и стимулирует образование плазмина лизин-зависимым образом. Выделенный из плазмы раковых больных эндостатин лишен этой аминокислоты и вместе с ней способности ингибировать пролиферацию эндотелиальных клеток.

Ангиогенез представляет собой ценную мишень для противоопухолевой терапии. Некоторые ингибиторы опухолевого роста, например, интерфероны α и β , подавляют ангиогенез. p53 способен ингибировать bFGF-опосредованный ангиогенез. Трансфекция нормального аллеля (дикого типа) гена p53 — wt p53 в глиому с фенотипом p53^{-/-} ингибирует ангиогенез, усиливая продукцию тромбоспондина-1 (TPS-1). TPS-1 — гликопротеин экстраклеточного матрикса, который связывается с $\alpha v \beta 3$ -интегрином, регулирует клеточную адгезию, подвижность и ингибирует опухолевый рост и метастазирование, что связано с его способностью ингибировать ангиогенез, супрессируя функцию bFGF. В некоторых типах клеток TSP-1 может взаимодействовать с некоторыми рецепторами клеточной поверхности и усиливать метастатическую диссеминацию. Таким образом, модуляция клеточного поведения тромбоспондином может быть специфичной к клеточному типу. Гены p53 и Rb позитивно регулируют транскрипцию гена TSP-1. Потеря функционально активного p53 может, следовательно, позволить нормальную ангиогенную функцию bFGF вместе с потерей контроля опухолевого роста. Утрата ограничителя роста и переключение на васкулярную фазу развития являются важными событиями опухолевой прогрессии.

Адгезионный мембранный гликопротеин ламинин (laminin) ингибирует ангиогенез. $\beta 1$ -цепь ламинина имеет активный центр, состоящий из последовательности тирозин-изолейцин-глицин-серин-аргинин (YIGSR). Синтетические пептиды, содержащие эту последовательность, промотируют клеточную адгезию и ингибируют экспериментальное метастазирование и ангиогенез. Ингибиторный эффект пропорционален числу мотивов YIGSR в полипептиде, например, молекула, содержащая 16 повторов, дает более сильный ингибиторный эффект, чем мономер. Мультимерный YIGSR-пептид может индуцировать апоптоз в клетках фибросаркомы человека.

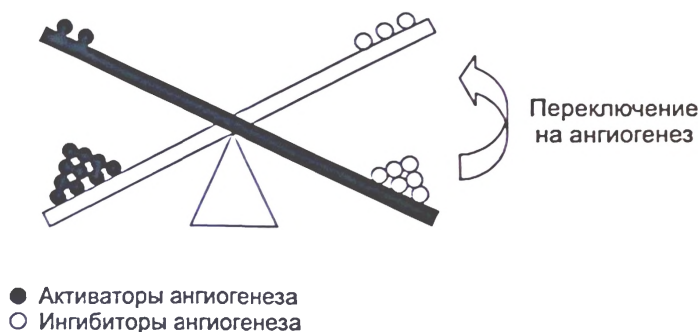


Рис. 5.5. Ангиогенное переключение.

Усиление продукции активаторов ангиогенеза и/или утрата в результате мутации активности ингибиторов ангиогенеза стимулируют образование новых микрососудов и прораствание их в опухоли.

Таким образом, очевидно, что нарушение баланса индукторов и ингибиторов ангиогенеза приводит к так называемому ангиогенному переключению (рис. 5.5).

5.4.3. Ангиогенез как прогностический признак при раке

Процесс неоваскуляризации опухоли — критический шаг в прогрессии болезни. Адекватная васкуляризация важна не только для продолжения опухолевого роста, но и для диссеминации опухоли в отдаленные метастазы, так как сосудистая и лимфатическая системы — основное передаточное средство опухолевых клеток, эмиттируемых опухолью. Рост вторичных опухолей тоже зависит от ангиогенеза: легочные метастазы остаются спящими в условиях экспериментально супрессированного ангиогенеза; быстрый рост метастазов обеспечивается удалением ингибиторов ангиогенеза. Самое интересное, что при этом уровень пролиферации в них остается таким же, как в «спящих». Это противоречие объясняется тем, что 3-кратное усиление апоптоза в спящих метастазах сравнимо с активным ростом вторичных опухолей. В отсутствие достаточного ангиогенеза метастазы остаются «спящими», чем и достигается равновесие между скоростью пролиферации и апоптозом клеток. В свете чрезвычайного значения ангиогенеза для процесса метастатического распространения логично исследовать возможность его применения в качестве прогностического фактора.

- Приобретение ангиогенных свойств может предшествовать злокачественной трансформации. 75–100% имплантированных карцином молочной железы, по данным разных источников, продуцируют ангиогенный ответ в отличие от гиперпластических, но доброкачественных тканей, которые индуцируют ангиогенез приблизительно в 25% случаев, и нормальных тканей, которые, будучи имплантированными, не вызывают ангиогенез. Клиническое значение степени опухоль-ассоциированного ангиогенеза определяют путем вычисления плотности микрососудов и исследования экспрессии ангиогенных факторов в опухоли.

Клиническое значение плотности микрососудов. Плотность опухолевых микрососудов обычно измеряется иммуногистохимическим окрашиванием антителами против фактора Виллебранда и эндотелиально-специфических антигенов, таких как CD31 (молекула адгезии тромбоцит/эндотелиальных клеток, PE-CAM). С помощью антител против E-CAM (endothelial cell adhesion molecule) показана значительно бо́льшая васкуляризация опухолей молочной железы по сравнению с нормальными тканями, которая коррелирует с метастазами в лимфатические узлы. Метастазы в лимфатических узлах выявлены у 80% пациенток, в чьих опухолях плотность микрососудов более 140/мм², и только у 4% пациенток, в чьих опухолях плотность микрососудов меньше или равна 99/мм². Установлено, что неоваскуляризация коррелирует с размерами, степенью дифференцированности и злокачественности опухоли.

В другой серии опухолей молочной железы ранней стадии с медианой длительности наблюдения 5 лет опухолевый ангиогенез был значимым и независимым прогностическим индикатором. Васкуляризация опухоли коррелировала с вероятностью рецидива и с уменьшенной общей и безрецидивной выживаемостью пациенток.

Карциному желудка исследовали на плотность микрососудов и определили экспрессию PCNA, чтобы оценить клеточную пролиферацию. Оказалось, что оба признака ассоциированы с худшим прогнозом, а высокая плотность микрососудов — с риском печеночных метастазов. Васкуляризация опухоли коррелирует с низкой выживаемостью больных немелкоклеточной карциномой легкого и развитием метастазов. Плотность микрососудов высокодостоверно коррелирует со стадией заболевания и TNM(tumor-node-metastasis)-стадией и является значимым прогностическим фактором выживания пациентов с переходноклеточной карциномой мочевого пузыря.

При оценке васкуляризации имеет значение число исследованных областей опухоли. Обычно выбирают наиболее активные обла-

сти неоваскуляризации. Возможно, такой подход порождает тенденциозную оценку результатов, так как способность к ангиогенезу может быть одним из критериев гетерогенности опухоли. Известно, что и сам васкулярный эндотелий гетерогенен по антигенам, поэтому для оценки ангиогенеза следует применять не менее двух маркеров.

Второй подход к оценке неоваскуляризации как прогностического признака — измерение экспрессии ангиогенных факторов в опухолях. Ангиогенные факторы, продуцируемые опухолью, могут связываться с соответствующими рецепторами опухоль-ассоциированного эндотелия паракринным образом и экспрессия тех и других координированно регулируется в ангиогенном ответе. Несколько ангиогенных ростовых факторов, в том числе VEGF, PDGF, aFGF и bFGF, экспрессируются в опухолях молочной железы. HGF также продуцируется в опухолях молочной железы, и его экспрессия коррелирует с рецидивированием болезни и общей выживаемостью. bFGF и его рецептор (FGFr) экспрессируются в большинстве карцином желудка поздних стадий (самых низкодифференцированных опухолях) и в инвазивных аденокарциномах, их экспрессия коррелирует с метастазами в лимфатические узлы и низкой общей выживаемостью пациентов. Ганглиозид GD3, который участвует в процессе секреции VEGF клетками глиомы человека, всегда определяется в глиобластомах и в большинстве анапластических астроцитом, но не в глиомах НСЗ.

Плотность микрососудов в инвазивной опухоли молочной железы коррелирует со степенью инфильтрации макрофагами, которые обладают способностью продуцировать ангиогенные факторы. Степень инфильтрации опухоли макрофагами прямо пропорциональна дифференцированности опухоли и обратно пропорциональна степени злокачественности. Экспрессия ангиогенных факторов происходит и в самих опухолевых клетках.

Способность неопластического образования индуцировать ангиогенный ответ предшествует состоянию, когда трансформированные клетки становятся злокачественными, обладающими инвазивностью и способностью индуцировать неоваскуляризацию для метастатической диссеминации. Следовательно, важно исследовать, как и когда соответствующие гены включаются в процесс перехода в злокачественное заболевание. Некоторые из ангиогенных факторов увеличивают проницаемость эндотелия, и это может помочь проникновению опухолевых клеток в сосудистую систему и затем в отдаленные области организма.

5.5. ГЛИКОПРОТЕИНЫ КЛЕТОЧНОЙ ПОВЕРХНОСТИ

Взаимодействие опухолевых клеток с клетками микрососудов является необходимой предпосылкой раковой инвазии и метастазирования. Экспрессию факторов клеточной адгезии и ее регуляцию ростовыми факторами изучают в раковых клетках в свете их функции в опухолевой инвазии и метастазировании. Идентифицированы несколько семейств адгезионных молекул, их синтез и экспрессия на клеточной поверхности изучены в отношении инвазивного и метастатического поведения опухолей. Эти молекулы могут быть делетированы или проявлять избирательный паттерн экспрессии. Взаимодействие рецепторов клеточной поверхности со структурами экстраклеточного матрикса имеет большое значение в процессах роста, дифференцировки, апоптоза, клеточной миграции и является основным элементом инвазии и диссеминации опухолевых клеток.

Интегрины — семейство трансмембранных линкерных белков, гетеродимерных рецепторных гликопротеинов, состоящих из α - и β -субъединиц, которые относятся к адгезионным молекулам, вовлеченным в хоминг лимфоцитов, и функционируют как катионзависимые молекулы клеточной адгезии. В виде $\alpha\beta$ -гетеродимеров они участвуют в формировании взаимодействий между клеткой и макромолекулами ЭКМ. Их основная функция заключается в прикреплении клеток к ЭКМ, но они также вовлечены в направленную инвазию и движение клеток. Внеклеточная часть молекулы интегринна содержит сайт распознавания специфических матриксных макромолекул. Протеолиз ЭКМ изменяет механизм, которым интегрины взаимодействуют с ним. Например, $\alpha\nu\beta3$ -интегрин не прикрепляется к нативному коллагену, но прикрепляется к нему после его частичной протеолитической деградации. Экспрессия рецептора $\alpha\nu\beta3$ -интегринна придает инвазивные свойства клеткам меланомы. Клетки меланомы, экспрессирующие этот интегрин, приобретают способность связывать активную форму MMP-2, которая облегчает деградацию коллагена — основного компонента базальной мембраны сосудистой стенки.

Интегрины участвуют в движении лимфоцитов по посткапиллярным венам в лимфоидной ткани. Остановка этого движения в нужном месте определяется активированными интегринными на поверхности лимфоцитов, взаимодействующими с иммуноглобулиновыми рецепторами на клетках эндотелия, что приводит к экстравазации лимфоцитов. Комбинаторика множества раз-

личных α - и β -субъединиц образует большую вариабельность гетеродимеров, служащих рецепторами множеству лигандов из числа компонентов экстраклеточного матрикса, таких как фибронектин, ламинин, витронектин, тромбоспондин, тенаскин, остеопонтин, и молекул клеточной адгезии (VCAM, ICAM-1 и -2 и др). Интегриновые рецепторы распознают сигналы из экстраклеточного матрикса и трансдуцируют их через структуры цитоскелета.

Интегрины могут влиять на транскрипцию генов MMP: гиперэкспрессия $\alpha 2 \beta 1$ -интегрина в клетках некоторых линий ассоциирована с усилением транскрипции MMP-1. Возможно, в этом механизме интегрин действует как сигнальный трансдуктор в ответ на информацию о состоянии ЭКМ. Показана индукция секреции MMP-9 $\alpha \nu \beta 6$ -интегрином в клетках колоректальной опухоли. Повышенная экспрессия $\alpha \nu \beta 6$ -интегрина в этих клетках по сравнению с нормальной слизистой оболочкой ассоциирована с усиленным клеточным ростом, а усиленная секреция MMP-9 параллельно уровню поверхностной экспрессии $\alpha \nu \beta 6$ -интегрина — с усилением протеолиза на клеточной поверхности. Иммуноглобулиноопосредованная кластеризация интегриновых рецепторов проявляется в фосфорилировании тирозиновых остатков комплекса субстратных белков.

Лейкоцитарный интегрин LFA-1 (lymphocyte function-associated molecule 1) — один из важнейших интегринов иммунной системы. Его взаимодействие с лигандами на эндотелиоцитах, адгезионными молекулами ICAM-1, -2 и -3 участвует в лимфоцитарной адгезии и трансмиграции через высокий эндотелий венул. Показана негативная корреляция экспрессии ICAM-1 с диссеминацией и общей выживаемостью больных. Взаимодействие LFA-1 с ICAM и $\alpha 4 \beta 1$ -интегрина с VCAM-1 ингибирует апоптоз В-лимфоцитов из герминального центра *in vitro* и участвует в В-клеточной селекции. LFA-1 экспрессируется большинством циркулирующих лимфоцитов и лимфоцитов в лимфатических узлах, особенно экстрафолликулярными Т-клетками и герминальными В-клетками. Экспрессия этой молекулы в диссеминированных лимфомах выше, чем в локализованных, и усиливает их агрессивность, вероятно, способствуя уклонению от иммунного контроля.

Клинические наблюдения показывают корреляцию между экспрессией β -интегринов и вероятностью полной ремиссии, общей и безрецидивной выживаемостью пациентов с В-клеточными диффузными крупноклеточными лимфомами. Кроме того, средний и высокий уровни экспрессии интегрин VLA-5 (very late antigen)

значимо ассоциирован с экстранодальными поражениями. Сильная экспрессия VLA-4 коррелирует с инфильтрацией костного мозга и экстранодальными поражениями. Поскольку комплекс VLA-4/VCAM-1 отвечает за экстравазацию нормальных лимфоцитов, эти данные подтверждают давнее предположение, что VLA-4 участвует в рециркуляции лимфomных клеток.

Экспрессия адгезивного гликопротеина витронектина и его рецептора $\alpha V\beta 3$ -интегрина ассоциирована с глиобластомами, но не определяется в клетках нормальной глии и глиомах НСЗ. Считается, что $\alpha 7$ -, αV - и $\beta 3$ -интегрины вовлечены в инвазию клеток глиомы в базальную мембрану сосудистой стенки, поскольку антитела против данных интегринов ингибируют этот процесс в реконструированной *in vitro* мембране. Экспрессия $\alpha V\beta 3$ -интегрина наблюдается в первичной и метастазирующей меланоме, но отсутствует в доброкачественных новообразованиях кожи и 50–100-кратно повышается во время прогрессии меланомы к поздним метастатическим стадиям.

Ламинины — семейство адгезионных гликопротеинов базальной мембраны, которые состоят из тяжелой α -цепи и двух легких β - и γ -цепей. Это семейство играет важную роль в клеточной дифференцировке, адгезии и миграции. Известны 11 изоформ, которые имеют различное тканевое распределение и соответственно выполняют различные функции. Ламинин из опухолевых клеток представляет собой тример из субъединиц α -1 (A), β -1 (B1) и γ -2 (B2). Он взаимодействует с другими макромолекулами базальной мембраны сосудистой стенки, такими как коллаген IV типа, гепарансульфатпротеоглики, а также составляет гомодимеры для обеспечения и поддержания стабильности базальной мембраны. Связывание молекул ламинина с клеточной поверхностью осуществляется посредством $\alpha\beta 1$ -интегрина.

Множество различных молекул вовлечено как в процессы заживления ран (регенерацию ткани), так и в опухолевую инвазию, что позволяет предположить, что клетки инвазивной опухоли используют генетическую программу регенерации. Различие между этими процессами заключается в самоограничении регенерации и его отсутствии у опухолевой инвазии. Одна из генетических детерминант, ответственных за это различие, — гиперэкспрессия белка экстраклеточного матрикса ламинина-5. В нормальной коже он локализуется в базальной мембране как лиганд $\alpha\beta 4$ -интегрина, промотирует миграцию и рассеяние клеток в культуре, миграцию клеток и заживление раны в поврежденной ткани, усиленно эксп-

рессируется в инвазивном фронте аденокарцином поджелудочной и молочной желез, желудка, толстой кишки, меланом, плоскоклеточных карцином мочевого пузыря и легкого и может служить маркером стромальной инвазии опухолевых клеток. Его гиперэкспрессия ассоциируется с васкулярной инвазией и является независимым прогностическим признаком для пациентов с I стадией, но утрачивает прогностическое значение у больных с поздними стадиями, так как опухоли могут приобретать метастатический потенциал, не зависящий от уровня экспрессии ламинина. Например, мелкоклеточная карцинома легкого, очень агрессивная опухоль, имеет низкий уровень экспрессии ламинина-5.

В химически трансформированных клетках экспрессия рецепторов ламинина и коллагена $\alpha\beta 1$ -, $\alpha 2\beta 1$ - и $\alpha 1\beta 1$ -интегринов усилена более чем в 10 раз, но уровень рецепторов фибронектина остается неизменным. Показана прямая корреляция между наличием рецепторов ламинина в опухолях желудка и толстой кишки, вовлечением лимфатических узлов и отдаленными метастазами. Обнаружена негативная корреляция между уровнем рецепторов ламинина и безрецидивной выживаемостью пациенток при раке молочной железы. Шестилетнее наблюдение показало, что ламинин-рецепторный статус обладает прогностической ценностью при раке молочной железы с метастазами в лимфатические узлы. Гиперэкспрессия $\alpha\beta 1$ -интегрина обнаружена в высокометастатических меланомах и карциномах. Антитела против $\alpha 6$ -цепи интегрин ингибируют колонизацию легких опухолевыми клетками, инъецированными в хвостовую вену экспериментальных животных.

Кадерины и катенины. Кадерины — трансмембранные гликопротеины, опосредующие кальций-зависимую межклеточную адгезию в составе комплекса из нескольких внутриклеточных белков. Идентифицировано более двух десятков кадеринов и кадериноподобных молекул. Семейство кадеринов широко распространено в нормальных тканях, но индивидуальные члены демонстрируют тканеспецифичность. Наиболее изучен Е-кадгерин в связи с его ролью в опухолевой инвазии. Ген Е-кадгерина CDH1 картирован в локусе 16q22.1. Его транскрипция регулируется метилированием CpG-островков в 1-м интроне и изменением структуры хроматина в промоторе. Зрелая молекула состоит из высококонсервативного карбокситерминального цитодомена, трансмембранного домена и сложного экстраклеточного домена, который представляет собой 5 tandemно повторяющихся субдоменов (C1-C5), каждый с двумя кальций-связывающими сайтами, обуславливающими участие в межклеточной

адгезии. Цис- и транс-взаимодействия между экстраклеточными доменами молекул Е-кадерины смежных клеток формируют клеточную адгезию.

Цитоплазматический домен Е-кадерины содержит высококонсервативный участок, общий для всех членов семейства, который связывает Е-кадгерин с актиновым цитоскелетом через взаимодействие с катениновым комплексом, состоящим из α - (102 кДа), β - (92 кДа) и γ -катенина/плакоглобина (83 кДа). Соответствующие гены локализованы на хромосомах 5q31, 3p21 и 17q21. Ген 4-й катенин-подобной молекулы p120ctn (или p120CAS) локализован в области 11q11, в непосредственной близости к центромере. Он кодирует белок p120 — тирозинкиназный субстрат рецепторов EGF и PDGF. Катенины по-разному связываются с Е-кадерином. Е-кадгерин связывается либо с β -, либо с γ -катенином, а α -катенин связывается с β - или с γ -катенином, но не с Е-кадерином. В одной и той же клетке могут существовать два различных комплекса, состоящих из Е-кадерины, α - и β -катенинов или из Е-кадерины, α - и γ -катенинов.

Адгезионная функция кадгерин-катенинового комплекса, в частности, связывание с элементами цитоскелета, регулируется фосфорилированием компонентов комплекса. К внешним факторам, которые оказывают регуляторное влияние на Е-кадгерин/катениновый комплекс, относятся эпидермальный фактор роста (EGF), гепарин-связывающий EGF-подобный фактор роста (HB-EGF), аутокринный фактор подвижности (autocrine motility factor, AMF), фактор, стимулирующий миграцию (migration stimulation factor, MSF), фактор роста гепатоцитов (scatter factor/hepatocyte growth factor, SF/HGF), аутоаксин. Взаимодействие рецептора SF/HGF (трансмембранная протеинкиназа, кодируемая онкогеном c-Met) с лигандом регулирует рост, развитие, подвижность и морфогенез, подавляя Е-кадгерин/катенин-зависимую клеточную адгезию и индуцируя рассеяние клеток.

Ростовой фактор EGF действует через EGFR — семейство рецепторных тирозинкиназ, в которое входят erbB1 (также называемый EGFR), erbB2 (c-neu/HER2), erbB3 и erbB4. Кроме EGF, лигандом, специфичным для erbB1, является TGF α (см. рис. 3.9). Гепарин-связывающий EGF-подобный ростовой фактор (HB-EGF) связывается и с erbB1, и с erbB4. Активация и процессы сигнальной трансдукции после связывания молекул EGFR с лигандами исключительно сложны и включают в себя множество белков, активируемых тирозинфосфорилированием, и адапторных молекул

(рис. 5.6, см. вклейку). В ответ на повреждение эпителия секретируются EGF и TGF α , которые являются важными медиаторами заживления ран. Под действием этих митогенных сигналов происходит тирозинфосфорилирование E-кадгерина и β -катенина, которое проявляется в диссоциации комплекса. В результате EGFR подавляет E-кадгерин-зависимую клеточную адгезию, что освобождает клетки от прикрепления и позволяет им мигрировать. Это наблюдается в области язв желудочно-кишечного тракта. Обработка клеточной культуры из опухоли фактором EGF также проявляется в более инвазивном фенотипе.

Механизм клеточного рассеяния, индуцированного действием HGF через рецептор c-Met, заключается в активации киназных каскадов и передаче сигнала белкам Ras и Cdc2 из Rho-семейства малых ГТФаз, которые в активной ГТФ-связывающей форме стабилизируют E-кадгерин/катениновый комплекс, связывая фактор IQGAP1 (IQ motif containing GTPase activating protein 1) и предотвращая его взаимодействие с β -катенином. В неактивных формах они не могут связывать белок IQGAP1, позволяя ему диссоциировать β -катенин из E-кадгерин/катенинового комплекса и разрушая его связь с актином цитоскелета.

Большинство факторов осуществляет свое влияние через действие на β -катенин, либо стабилизируя его связь с E-кадгерин и α -катенином и промотируя клеточную адгезию, либо разрушая эту связь и подавляя адгезию. Комбинированная стимуляция рецепторов EGFR и c-Met имеет эффект перемещения β -катенина в цитозольный пул, где он может деградировать. Если одновременно с этими сигнальными путями активирован Wnt1-путь сигнальной трансдукции, то деградация β -катенина ингибируется и он транслоцируется в ядро, чтобы в составе комплекса с LEF/TCF активировать транскрипцию гена циклина D1 и супрессировать ген CDH1. Результат всех этих взаимодействий – редукция E-кадгерин-зависимой адгезии и пролиферация. При заживлении язв, например, пролиферирующая клеточная популяция с редуцированной клеточной адгезией будет замещать разрушенный травмированный эпителий.

E-кадгерин считается супрессором инвазии. Подавление его экспрессии в результате репрессии транскрипции обнаруживается одновременно с приобретением инвазивности. Мутации гена E-кадгерина приводят к появлению нефункционального продукта. Биохимические модификации катенинов и плакоглобина, связывающих кадгерин с цитоскелетом, или потеря одного из этих элементов также делает E-кадгерин неэффективным. Потеря E-кадери-

на — характерный признак инвазивных клеток, и эта инвазивность может быть ингибирована трансфекцией клеток геном Е-кадгерина. Трансформация геном H-Ras клеток *in vitro* редуцирует уровень Е-кадгерина с одновременным изменением клеточной морфологии и повышением злокачественности. При восстановлении уровня кадгерина путем трансфера соответствующего гена морфология трансфицированной клетки возвращается к норме и к доброкачественному состоянию. Клетки приобретают инвазивность после обработки антителами против Е-кадгерина. Тесная связь между инвазивностью опухоли и экспрессией Е-кадгерина подтверждается тем, что трансфекция кДНК Е-кадгерина в клетки линий, происходящих из ряда карцином (мочевого пузыря, молочной железы, легкого и поджелудочной железы), лишает их инвазивности. Частота потери или редукции экспрессии Е-кадгерина возрастает с 20% в интрадуктальной карциноме до 52% в инвазивной канальцевой карциноме и 64% в рецидивирующей карциноме молочной железы. Экспрессия Е-кадгерина редуцирована только в 20% поверхностных опухолей и в 75–90% инвазивных опухолей мочевого пузыря.

Стимуляция EGFR на опухолевых клетках факторами EGF и TGF α проявляется подавлением экспрессии Е-кадгерина и ассоциирована с более инвазивным фенотипом, метастазами в лимфатические узлы и худшим прогнозом для опухолей множества типов, включая мелкоклеточную карциному легкого, плоскоклеточную карциному гортани, карциномы щитовидной и молочной желез и др. Повышенная экспрессия TGF α , EGF, IGF-I и TNF α позволяет значительной части карцином трансформироваться в инвазивные опухоли.

Мутации в гене Е-кадгерина CDH1 и потеря гетерозиготности в его локусе могут приводить к потере экспрессии или продукции неактивного Е-кадгерина. Усечение экстраклеточного домена кадгерина приводит, например, к ухудшению межклеточных контактов и адгезии. Супрессия инвазивного потенциала клеток Е-кадгерин-зависит также от его способности формировать прочную связь с актином цитоскелета. Для этого необходима функциональная активность всех линкерных элементов кадгеринового комплекса. Например, редуцированная экспрессия или потеря α -катенина описаны при раке молочной железы; повышенный уровень фосфорилирования по тирозину β -катенина проявляется в дефектном взаимодействии с Е-кадгерин-комплексом в опухолях молочной железы. Мутации генов, кодирующих белки Е-кадгерин-катенинового комплекса, которые проявляются в их структурных и функциональных изменениях и приводят к редукции клеточной адгезии, обнаружены при разных типах опухолей. Наследствен-

ные мутации гена CDH1 (ген Е-кадерины) описаны при синдроме наследственного диффузного рака желудка (причина преобладания именно желудочных опухолей неизвестна); соматические мутации выявляются в 50% случаев инвазивной карциномы молочной железы и диффузного рака желудка. Мутации гена α -катенина находят в карциномах легкого, толстой кишки и предстательной железы, β -катенина (делеции) — в опухолях желудка. Все эти мутации связаны с агрессивным поведением опухоли и худшим прогнозом.

Редукция или потеря экспрессии Е-кадерины показана в метастазирующих опухолях толстой кишки, желудка, легкого, мочевого пузыря, поджелудочной, предстательной, молочной и щитовидной желез, пищевода, печени, матки, яичника, кожи и ротоглотки. Экспрессия кадеринов связана с опухолевой дифференцировкой, так как степень дифференцированности опухоли коррелирует с уровнем экспрессии Е-кадерины. Ретиноевая кислота, которая индуцирует дифференцировку и ингибирует инвазивность опухолевых клеток, активирует функциональный комплекс Е-кадерины/катенин. *In vivo* Е-кадерины экспрессируются в высокодифференцированных гепатоклеточных карциномах, тогда как в более агрессивных низкодифференцированных опухолях может быть обнаружен только низкий уровень Е-кадерины. Редуцированная экспрессия Е-кадерины описана в слабо дифференцированных плоскоклеточных и мелкоклеточных карциномах легкого. Большинство метастазов также показывает редуцированный уровень Е-кадерины. Эти исследования показали, что Е-кадерины могут участвовать в процессах межклеточных контактов и адгезии и функционировать как антиинвазивный протеин, т.е. супрессировать инвазию и метастазирование. Утрата этого адгезионного белка ассоциируется с плохим прогнозом, что вполне согласуется с его антиинвазивностью и супрессирующими метастазирование свойствами при мелкоклеточной карциноме легкого и карциноме мочевого пузыря. Редуцированный уровень Е-кадерины при раке мочевого пузыря связан не только с инвазивностью, но и с укороченной безрецидивной выживаемостью, при раке молочной железы — с агрессивностью заболевания.

CD44 и его изоформы. Поверхностный рецептор CD44 (называемый также антигеном Hermes-1, белком Pgp-1, рецептором экстраклеточного матрикса, рецептором хоминга лимфоцитов и т.д.) представляет собой трансмембранный гликопротеин, кодируемый единственным геном (на хромосоме 11), который экспрессируется в несколько изоформ, образующихся в результате альтернативного сплайсинга и различных паттернов гликозилирования. Антиген CD44

обнаружен на поверхности клеток разных типов, таких как лимфоциты, протимоциты костного мозга, фибробласты, астроциты и эпителиальные клетки. Он участвует в клеточной адгезии и связывании компонентов экстраклеточного матрикса и является главным рецептором для гликозаминогликангиалуроната, но может связывать и другие лиганды, например, фибронектин. Он вовлечен в хоминг и активацию лимфоцитов, пролиферацию активированных лимфоцитов, секрецию цитокинов, активацию интегринов, опухолевую прогрессию и метастазирование. CD44-опосредованная активация и пролиферация лимфоцитов связана с активацией протеинкиназ митогенного сигналинга. Экстраклеточный домен CD44, который известен как индуктор роста и метастазирования опухолевых клеток, взаимодействует с другим компонентом инвазионной программы — матриксной металлопротеиназой MMP9. CD44 вместе с белками эзрином, MMP9 и Krp1 (kelch-related protein 1) участвует в контроле элонгации псевдоподий опухолевой клетки. Разрушение комплекса MMP9/CD44 уменьшает инвазивность опухолевых клеток *in vivo*. Локализация MMP9 на клеточной поверхности важна с точки зрения ее способности промотировать опухолевую инвазию и ангиогенез.

В глиомах BC3 CD44 высоко экспрессируется по сравнению с глиомами HC3. Считается, что CD44 ассоциирован с инвазивностью, так как антитела против CD44 ингибируют инвазивность глиомных клеток *in vitro*, а инвазивность клеток рака молочной железы коррелирует с количеством ассоциированных молекул CD44. Инвазивная карцинома желудка сильнее окрашивается на CD44, чем диспластическая ткань или неинвазивная карцинома слизистой оболочки, причем степень окрашивания коррелирует с общей выживаемостью пациентов. Сывороточный уровень CD44 20-кратно повышен у пациентов с карциномой толстой кишки по сравнению с тканями здоровых людей и может служить индикатором опухолевой массы и метастатического распространения. Отмечена значительно укороченная безрецидивная выживаемость пациенток с CD44-позитивной карциномой яичника, чем CD44-негативных пациенток. В большом многоцентровом исследовании показано, что экспрессия CD44 является IPI-независимым прогностическим фактором общей и безрецидивной выживаемости пациентов с локализованными В-клеточными нодальными лимфомами.

Интересно, что при нейробластоме экспрессия CD44 наблюдалась во всех опухолях ранних стадий и только в половине случаев — в опухолях поздних стадий, т.е. отсутствие CD44 коррелирует с аг-

рессивностью опухоли. CD44 связан с состоянием дифференцировки, так как ретиноевая кислота активирует его экспрессию параллельно индукции дифференцировки. В опухолях этого типа потеря CD44 ассоциируется с гиперэкспрессией онкогена N-Мус.

Кроме «классического» CD44, злокачественные опухоли могут экспрессировать варианты CD44 с большей длиной молекулы, что характерно для агрессивных форм заболевания, так как эти изоформы CD44 придают опухолевым клеткам метастатические свойства. Экспрессия варианта CD44v6 отражает склонность опухолей к метастазированию. При раке молочной железы изоформа CD44v6 коррелирует с клинической агрессивностью, и CD44v6-негативность считают фактором благоприятного прогноза. Опухоли шейки матки, экспрессирующие CD44v6, чаще метастазируют в лимфатические узлы и чаще наблюдается сосудистая инвазия их клеток, а CD44v6-негативные пациентки имеют лучший прогноз относительно общей выживаемости. Экспрессия изоформ CD44v8-v10 в метастатических опухолях выше, чем в первичных, и значительно выше в карциномах, ассоциированных с печеночными метастазами. Аберрантная экспрессия может быть связана с прогрессией карциномы желудка. Все первичные и метастатические опухоли имели гиперэкспрессию CD44-вариантов длиной более 1000 нуклеотидов. Около 70% высокодифференцированных опухолей гиперэкспрессировали более 3 аберрантных транскриптов, 90% слабо дифференцированных — 1 или 2. Количественная оценка генерации и экспрессии сплайс-вариантов может быть потенциально более ценной, чем оценка экспрессии общего CD44 или отдельного сплайс-варианта.

Гиалуроновая кислота, которая является лигандом рецептора CD44, индуцирует кэплинг CD44 (capping — миграция молекул к сайту межклеточного взаимодействия, образование «шапочки») и адгезию клеток мышины Т-лимфомы к «облицованному» гиалуроновой кислотой субстрату. Связывание гиалуроновой кислоты может быть независимым от фосфорилирования, так как оно происходит и в отсутствие цитоплазматического домена CD44, но димеризация экстраклеточного домена необходима в этом случае. В молекуле CD44 фосфорилируются серин-325 и серин-327, а мутационная замена серина-325 на глицин и серина-327 на аланин проявляется в дефектном связывании гиалуроната. Эти замены также влияют на лиганд-индуцированную модуляцию рецептора CD44 и CD44-опосредованную адгезию Т-клеток к клеткам гладкой мускулатуры. Таким образом, фосфорилирование серина-325 и серина-327 может быть необходимо для взаимодействия цитоплазматичес-

кого домена с компонентами цитоскелета. Очевидно, следовательно, что CD44-кэппинг является индикатором мембранной активности, связанной с клеточной адгезией и изменением клеточных очертаний. Перераспределение молекул CD44v6 может быть интерпретировано как изменение такой мембранной активности в ассоциации с повышенным метастатическим потенциалом, порожденным гиперэкспрессией гена h-Mts1. Эти исследования показали значение экстраклеточного домена CD44 в адгезионно-зависимых феноменах, но трансмембранная часть молекулы также играет важную роль в перераспределении CD44.

Гиперэкспрессия CD44 индуцируется активированными генами Ras и Src. Это указывает, что CD44 может быть только геном-мишенью, который должен получить сигнал в специфической стадии метастатической прогрессии. Показана достоверная корреляция экспрессии CD44 с накоплением p53 и с поздними стадиями карциномы толстой кишки. Изучение экспрессии CD44, p53 и супрессора метастазирования pm23 в опухолях этого вида показало, что экспрессия CD44 коррелирует с печеночными метастазами и рецидивированием. Индукция экспрессии гена Ras вызывает изменение уровня CD44s — сплайс-варианта, ассоциированного с легочной колонизацией, и временные изменения экспрессии CD44v6, который считается маркером метастатического фенотипа.

Молекулы клеточной адгезии конститутивно экспрессируются в лейкоцитах и могут быть индуцированы к экспрессии на клетках сосудистого эндотелия. К собственно молекулам клеточной адгезии относятся ICAM-1,2,3 (intercellular cell adhesion molecule), адгезионные молекулы сосудистых клеток VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule) и углевод-связывающие молекулы, так называемые селектины: L-селектин (экспрессируется на лимфоцитах), E-селектин (он же ELAM — endothelial leukocyte adhesion molecule, экспрессируется на эндотелиоцитах) и P-селектин.

Молекулы клеточной адгезии функционируют как лиганды для лейкоцитарных интегринов CD11/CD18. Эти интегрины в норме не адгезивны, но активируются связыванием с молекулами ICAM. Пептид из молекулы ICAM-2 (CD102) может связываться с лейкоцитарными интегринными и активировать лейкоцитарную адгезию. Этот пептид специфически связывается с иммуноглобулиноподобным доменом интегринна CD11/CD18 и стимулирует агрегацию моноцитов и их связывание с субстратом. В молекулах ICAM и VCAM идентифицирован консервативный аминокислотный мотив, который функционирует как сайт связывания с рецептором интегринна LFA-1.

ICAM-1 — гликозилированный белок, относящийся к иммуноглобулиновому семейству адгезионных факторов и экспрессирующийся в гемопоэтических клетках, клетках сосудистого эндотелия, эпителиальных клетках слизистых оболочек и Т-лимфоцитах. Молекула ICAM-1 имеет 5 экстраклеточных иммуноглобулиноподобных доменов и может выпадать из клеточной поверхности в растворимую форму, определяемую в циркуляции, которая тоже содержит эти домены, но отличается от поверхностного ICAM размерами молекулы. Растворимая форма не является результатом альтернативного сплайсинга.

Эндотелиальные клетки и лимфоциты отвечают на стимуляцию такими агентами, как IL-1, TNF- α и INF- γ , которые могут активировать экспрессию ICAM-1. TNF α индуцирует также экспрессию Р- и Е-селектинов. Индукция молекул клеточной адгезии и селектинов включает активацию транскрипционного фактора NF κ B, который контролирует экспрессию генов, кодирующих адгезионные факторы. Активация эндотелиальных клеток пупочной вены интерлейкином-1 β индуцирует транслокацию NF κ B в ядро и индукцию экспрессии Е-селектина и ICAM-1, это проявляется в усилении адгезии опухолевых клеток к рецепторам на поверхности эндотелиальных клеток.

При хроническом воспалении, например, при ревматоидном артрите, ICAM экспрессируется в эндотелиальных клетках на более высоком уровне, чем у здоровых людей. Он также активирован в макрофагах и покоящихся лейкоцитах, но не в эндотелиальных клетках. Эта дифференциальная экспрессия указывает на различные роли ICAM в патогенезе ревматоидного артрита. ICAM-1 может быть ассоциирован с макрофагальной инфильтрацией и тканевыми поражениями. Инфильтрированная активированными Т-лимфоцитами синовиальная мембрана обладает повышенным сродством к белкам ECAM, VCAM-1 и ICAM-1. ICAM-1 не определяется на нормальных гепатоцитах, но конститутивно экспрессируется клетками гепатоклеточных карцином. Высокий уровень растворимого ICAM-1 определяется в сыворотке пациенток с эпителиальной карциномой яичника по сравнению с сывороткой пациенток с доброкачественными опухолями яичников, хотя этот уровень не коррелирует ни со стадией, ни с гистологическим типом опухоли.

Адгезия опухолевых клеток к эндотелиальным клеткам может быть усилена любыми агентами, способными активировать экспрессию ICAM, а трансфекция гена ICAM-1 в клетки фибросаркомной линии MCA-105 усиливает их адгезию к эндотелиальным клеткам *in*

vitro. Уровень экспрессии ICAM-1 в ренальных карциномах негативно коррелирует с 5-летней безрецидивной выживаемостью больных. Уровень растворимого ICAM-1 значительно выше у пациентов, чья болезнь прогрессировала к метастатическому состоянию.

Молекулы клеточной адгезии, называемые селектинами, участвуют в движении лимфоцитов по посткапиллярным венулам в лимфоидной ткани. Остановка этого движения в нужном месте определяется активированными интегринами на поверхности лимфоцитов, взаимодействующими с иммуноглобулиновыми рецепторами на клетках эндотелия, что приводит к экстравазации лимфоцитов. Селектины связываются с карбогидратными антигенами, представленными на эндотелиальных клетках, активированных цитокинами. Они экспрессируются в опухолях человека и способствуют адгезии опухолевых клеток к эндотелию. Давно известно, что опухолевые клетки распознают и связывают Е-селектин эндотелиальных клеток. Экспрессия Е- и Р-селектинов гораздо интенсивнее в эндотелии инвазивных опухолей, но опухолевые клетки могут к тому же активировать другие клеточные элементы, например, тромбоциты, и индуцировать секрецию ими фактора, индуцирующего экспрессию селектинов эндотелиальными клетками. Это усиливает взаимодействие и адгезию между опухолевыми и эндотелиальными клетками, облегчая опухолевую инвазию микрососудов. Антитела против Е-селектина ингибируют адгезию клеток карциномы молочной железы к TNF-стимулированным эндотелиальным клеткам. IL-1 усиливает формирование легочных колоний у мышей из меланомных клеток человека, введенных внутривенно, а антитела к рецептору IL-1 ингибируют это экспериментально индуцированное интерлейкином-1 метастазирование, индукцию Е-селектина и экспрессию VCAM-1 на эндотелиальных клетках. Это строгое доказательство важной роли адгезионных молекул в процессах, приводящих к выходу опухолевых клеток из микрососудов и их закреплению в органах-мишенях отдаленного метастазирования. Однако не всегда удается выявить различия в уровне растворимых форм селектина, ICAM-1 и VCAM-1 в сыворотке больных раком и здоровых людей.

Проведено сравнение Е-селектин-опосредованной адгезии клеток нескольких линий из эпителиальных опухолей человека и лейкозных линий. Адгезия эпителиальных опухолевых клеток к цитокин-активированным пупочным эндотелиальным клеткам человека в этих исследованиях зависела исключительно от Е-селектина. Только в 3 из 12 лейкозных линий показана Е-селектин-опосредован-

ная адгезия. Возможно, существует тканевая специфичность молекулярного взаимодействия при адгезионных контактах. Клетки солидных опухолей показывают преимущественно Е-селектин-опосредованную адгезию к эндотелиальным клеткам, тогда как лейкозные клетки связываются с эндотелием через Р-селектин.

Эндотелий в метастатических поражениях при карциноме толстой кишки экспрессирует гораздо больше Е-селектина, чем эндотелий в соответствующих первичных опухолях, и более высокий уровень растворимого Е-селектина обнаружен в сыворотке крови пациентов с метастазами, чем у пациентов без метастазов.

Первичная опухоль может сама активировать эндотелиальные клетки и индуцировать экспрессию Е-селектина. *In vitro* этот процесс может быть усилен добавлением мононуклеаров в культуральную среду, а антитела против IL-1 β ингибируют индукцию экспрессии Е-селектина. Первичная опухоль может быть гетерогенной в отношении экспрессии цитокинов, индуцирующих экспрессию Е-селектина, и эти клеточные субпопуляции могут различаться по способности к метастазированию. Клеточные линии из опухолей толстой кишки человека различаются по адгезии к Е-селектин-экспрессирующим эндотелиальным клеткам, и эта адгезионная способность прямо коррелирует с метастатическим потенциалом.

Как известно, глиомы редко метастазируют экстракраниально. Оказалось, что различия между метастазирующими и неметастазирующими глиомами по крайней мере отчасти зависят от уровня экспрессии селектин-связывающего антигена CD15. Среди других адгезионных молекул, изучаемых в контексте опухолевой инвазии, есть молекулы адгезии нейрональных (NCAM) и нейроглиальных клеток (NG-CAM). NCAM, подобно другим молекулам клеточной адгезии, содержит иммуноглобулиноподобные домены. Они обнаружены в фетальных и неопластических тканях, особенно в нейроэндокринных клетках. Экспрессия NCAM-мРНК ассоциирована с индукцией нейрональной дифференцировки во время раннего эмбрионального развития. Идентифицированы две трансмембранные изоформы NCAM-140 и NCAM-180, а в сыворотке присутствуют их производные, лишенные внутриклеточных доменов, с молекулярной массой 110-130 и 150-170 кДа соответственно. Первая обнаружена только в сыворотке здоровых людей, а последняя — только в сыворотке больных раком.

В кооперации с кадерином NCAM может пролонгировать межклеточные контакты. Адгезия клеток ренальной опухоли к эндотелиальным клеткам ингибируется антителами к NCAM. Экспрессия NCAM ассоциирована с усиленным клеточным ростом и определяется в ак-

тивно пролиферирующих районах опухоли. Карцинома щитовидной железы, которая экспрессирует NCAM, показывает склонность к капсулярной инвазии. Экспрессия NCAM клетками опухоли желчного пузыря ассоциирована с перинейрональной инвазией опухоли в желчный проток.

Ген MCAM кодирует мембранный гликопротеин MUC-18. MUC-18 — член семейства иммуноглобулинов, адгезионная молекула, имеющая гомологию с другими молекулами клеточной адгезии (NCAM и ICAM). MCAM обнаружен в некоторых мезенхимальных тканях, например, в клетках гладких мышц, эндотелиальных и шванновских клетках, но не в эпителиальных и гемопоэтических. MCAM стойко экспрессируется в опухолях гладкомышечного и эндотелиального происхождения, а также в капиллярном и опухолевом эндотелии, но не обнаружен в эндотелии артерий и больших вен. MCAM отсутствует в нормальных меланоцитах и доброкачественных кожных невусах, но экспрессируется в высокозлокачественных меланомх и их метастазах. MCAM-трансфектированные клетки демонстрируют повышенную инвазивность и усиленную адгезию к эндотелиальным клеткам, которая ингибируется антителами к гликопротеину MCAM. Экспрессия MCAM активируется трансфекцией меланомных клеток геном карциноэмбрионального антигена, который считается биомаркером общей опухолевой массы. Она регулируется транскрипционным фактором AP-2, который регулирует также гены, кодирующие E-кадерин, PAI, инсулиноподобный фактор роста, гены Bcl2 и c-kit. Координированная экспрессия нескольких адгезионных факторов и металлопротеиназ может быть вовлечена в регуляцию инвазивного и метастатического поведения меланомы. Присутствие гликопротеина MUC-18 в опухолевом эндотелии коррелирует с его пролиферацией, подтверждая ее тесную связь с ангиогенезом.

Таким образом, некоторые гликопротеиновые медиаторы клеточной адгезии вместе с соответствующими рецепторами могут быть ассоциированы с повышенной злокачественностью, так как адгезионные взаимодействия играют важную роль в опухолевой инвазии и метастазировании.

5.6. ПРОТЕИНАЗЫ И ИХ ИНГИБИТОРЫ В ОПУХОЛЕВОЙ ИНВАЗИИ

Нормальные биологические процессы морфогенеза, дифференцировки, заживления язвы, ангиогенеза, клеточной подвижности и

аберрантные процессы опухолевой инвазии и метастазирования нуждаются в реконструкции экстраклеточного матрикса. Реконструкция ЭКМ состоит из следующих этапов:

- 1) деградация ЭКМ путем эксцизии его компонентов;
- 2) регенерация компонентов ЭКМ;
- 3) пространственная реорганизация компонентов ЭКМ.

Чтобы успешно основать метастатическое отложение, адгезионная способность опухолевых клеток регулируется сложным образом. В начальной стадии диссеминации эмиссия клеток из первичной опухоли нуждается в уменьшении межклеточной адгезии. Уже отделившиеся от опухолевой ткани клетки должны иметь способность прилипать и пронизывать барьеры в форме ЭКМ, стромальной ткани и сосудистого эндотелия. Клеточное взаимодействие с ЭКМ и другими клеточными элементами обеспечивается реконструкцией ЭКМ. Этот процесс облегчается протеолитическими ферментами опухолевых клеток. Некоторые из них сами являются интегральными компонентами ЭКМ, другие могут секретироваться или оставаться ассоциированными с клеточной мембраной, и те, и другие являются неотъемлемыми компонентами регуляции реконструкции ЭКМ. Среди них серинпротеазы, катепсины и матриксные металлопротеиназы. Протеолитическая функция ферментов уравнивается и регулируется специфическими протеазными ингибиторами и катализируется их удалением. Эти протеазы и их ингибиторы активно участвуют в детерминации комплексной структуры и биохимических характеристик ЭКМ, специфического биологического поведения.

Урокиназа (urokinase-type plasminogen activator, uPA) — серин-протеаза, которая секретируется как одноцепочечный неактивный профермент, который затем расщепляется на две цепи, удерживаемые вместе дисульфидной связью. Проурокиназа может активироваться другими мембраноассоциированными протеиназами, такими как катепсин В. Урокиназная активность определяется преимущественно в мембранной фракции, при этом неактивная А-цепь связывается со специфическим мембранным рецептором, а В-цепь катализирует превращение плазминогена в плазмин. Урокиназа и тканевой активатор плазминогена (tPA) обнаружены в ткани опухолей молочной железы, а урокиназоспецифический рецептор — в опухолях молочной железы и толстой кишки. Урокиназа может быть прогностическим фактором у пациенток, позитивных по рецептору эстрогена (ER) и без метастазов в лимфатических узлах, но у пациенток с ER-негативной опухолью клинический исход не связан с

уровнем РА. Инвазивная способность опухолевых клеток не связана напрямую с уровнем синтеза или секреции урокиназы опухолевыми клетками, но зависит от экспрессии соответствующих рецепторов (рецепторов активатора плазминогена, PAR). PAR — высокогликозилированный протеин, который связывается с клеточной мембраной посредством своего гликолипидного домена и взаимодействует с РА через свой N-терминальный домен. Рецептор может связывать и урокиназу, и проурокиназу, при этом неактивный фермент активируется на мембране.

Функциональный механизм деградации ЭКМ урокиназой — генерация плазмина, который деградирует компоненты ЭКМ ламинин и коллаген IV типа. Регуляция инвазивного поведения клеток опухоли молочной железы эстрогеном представляет собой часть этого пути. В другом механизме РА активирует ангиогенез и сосудистую инвазию посредством активации фактора роста гепатоцитов HGF, который является мощным митогеном и стимулятором ангиогенеза. Топографическое распределение активаторов плазминогена в опухолях дает основание считать, что они способствуют инвазии опухоли в смежные ткани. Уровень uPA в клетках экспериментальной мышинной меланомы коррелирует с ее способностью формировать легочные метастазы. Ингибирование связывания эндогенного РА с его рецепторами на мембране может проявляться в ингибировании инвазивности опухолевых клеток.

В карциномах эндометрия и желудка показан повышенный уровень урокиназы по сравнению с нормальными тканями. В опухолях желудка с метастазами уровень урокиназы выше, чем в опухолях без метастазов. Слабо дифференцированные карциномы желудка содержат больше РА, чем хорошо дифференцированные. Высокий уровень РА наблюдается в зоне между нормальным эпителием толстой кишки и аденокарциномой. Рецепторы РА обнаружены в тканях инвазивной карциномы молочной железы, но не в нормальных тканях. Гемобластомы содержат высокий уровень PAR в инвазивном крае. Исследования, выполненные на клеточных линиях из опухолей молочной железы, показали, что линии с более высоким уровнем РА обладают большей инвазивностью. Экспрессия и uPA, и tPA повышается после добавления в культуральную среду эстрогена, и одновременно вдвое возрастает инвазивность. Если клетки одновременно обработать эстрогеном и его антагонистом тамоксифеном, повышение инвазивности блокируется.

В норме достижению равновесия в отношении клеточной инвазивности способствует экспрессия PAI (plasminogen activator

inhibitor), который связывается с РА ковалентно и ингибирует его активность. Инвазия ЭКМ опухолевыми клетками может быть предотвращена специфическим ингибитором активатора плазминогена PAI или блокированием урокиназных рецепторов антителами против А-цепи урокиназы. Трансфекция кДНК PAI в клетки меланомы человека, продуцирующие РА, обуславливает тотальную ингибицию растворимого и мембраноассоциированного РА вместе с ингибцией деградациии ЭКМ.

Соотношение уровней продукции РА и PAI не только отражает инвазивность опухоли, но и коррелирует со степенью ее дифференцированности, клинической стадией и метастатическим статусом, и, следовательно, РА/PAI-статус имеет прогностическое значение для больных с колоректальными опухолями. Как и ряд других маркеров (с-erbB-2, p53, uPA и VEGF), PAI коррелирует с метастатическими свойствами и имеет прогностическое значение для больных с опухолями молочной железы.

Катепсины — лизосомальные ферменты, которые участвуют во многих физиологических функциях благодаря своей протеолитической активности. Катепсин D — аспартатпротеиназа, катепсины В и L — цистеинпротеиназы, катепсин G — серинпротеиназа. Биохимически катепсины относятся к гликопротеинам, содержащим фосфоманнозильные остатки, которые связываются с рецепторами различных лигандов маннозо-6-фосфатом и доставляются к лизосомам. Повышенная активность всех протеолитических ферментов семейства катепсинов в опухолевых клетках, особенно в инвазивных зонах опухоли или в области соприкосновения опухоли и ее стромального компонента, способствует росту метастатического потенциала многих типов злокачественных опухолей.

Катепсин D играет заметную роль в опухолевой инвазии и метастазировании. Его активность регулируется внутриклеточным pH, ростовыми факторами, гормонами и специфическими эндогенными ингибиторами. Эстроген и ростовые факторы, такие как IGF-I, EGF, bFGF, стимулируют экспрессию катепсина D в опухолевых клетках при раке молочной железы, но она не зависит от стероидорецепторного статуса опухоли. В опухолях многих типов обнаружены гиперэкспрессия, аномальный процессинг или секреция катепсина D. Усиленная экспрессия катепсина D показана в гепатомах, тиреоидных карциномах, меланом, гинекологических опухолях, опухолях желудка, предстательной железы, мочевого пузыря, толстой кишки, молочной железы и в плазме больных раком молочной железы. На ранних стадиях рака желудка наличие микромета-

стазов в лимфатических узлах и инвазивность опухоли коррелируют с уровнем экспрессии катепсина D в первичной опухоли.

Значение катепсина D в опухолевой инвазии изучено экспериментально. Инвазивные свойства клеток глиобластомы ингибируются антителами против катепсина D, а клеток опухоли молочной железы — антисмысловыми кДНК катепсина D. *In vivo* инвазивность опухоли может быть связана со степенью экспрессии катепсина D. Например, глубина инвазии миометрия коррелирует с содержанием катепсина D в аденокарциноме эндометрия. Обнаружены заметная ассоциация катепсина D с инфильтрирующими карциномами ВСЗ молочной железы и его локализация по периферии опухоли. Уровень экспрессии фермента коррелирует со степенью злокачественности и с пролиферативным индексом, но прогностическое значение в отношении общей и безрецидивной выживаемости имеет активная процессированная форма. Макрофагальные инфильтраты, содержащие большие количества катепсина D, также описаны в инвазивных переходноклеточных карциномах мочевого пузыря и карциномах желудка, особенно в периферической инвазивной зоне опухолей. Метастатическое поражение лимфатических узлов при колоректальном раке коррелирует с различиями во внутриклеточной локализации катепсина D и особенно с экспрессией катепсина D стромальными клетками. Таким образом, при изучении роли катепсина D в процессах метастазирования происходит смещение акцентов с опухолевых клеток на стромальные.

Катепсин В секретируется клетками в форме неактивного прокатепсина В. Он активируется во внеклеточной среде и способствует деградации ЭКМ превращением проурокиназы в активную форму, как это происходит в культуре клеток из опухоли предстательной железы, и активацией пролиферации эндотелиальных клеток, как показано в глиомах. Ассоциация катепсина В с плазматической мембраной эндотелиальных клеток обнаружена и в карциноме предстательной железы. При изучении тканевой локализации катепсина В в опухоли он выявлялся в основном в васкулярных структурах инвазивного фронта, и, следовательно, его патогенная роль относится к опухолевому ангиогенезу. Процесс неоваскуляризации, сопровождаемый развитием опухоли, начинается с локального растворения базальной мембраны протеолитическими ферментами, которые стимулируют эндотелиальные клетки в ответ на ангиогенные стимулы, такие как bFGF. IL-1, который является индуктором ангиогенеза, может значительно повысить уровень катепсина В.

В соответствии с корреляцией между инвазией и степенью экспрессии катепсина В последний можно считать индикатором опухолевой прогрессии. Уровень катепсина В коррелирует не только с TNM-стадией, со степенью злокачественности и метастазирования в лимфатические узлы, но и с общей выживаемостью и риском рецидива. Гиперэкспрессия катепсина В ассоциирована с деградацией базальной мембраны и нодальной инвазией. При этом опухоли поздних стадий содержат значительно большие количества катепсина В, чем на стадии I. Уровень катепсина В обратно пропорционален 5-летней общей выживаемости. Низкий уровень катепсина В в стадии I аденокарциномы легкого ассоциирован с 94% 5-летней общей выживаемостью при только 45% выживаемости больных с высоким уровнем катепсина В. Низкое содержание катепсина В является индикатором лучшего прогноза и в поздних стадиях болезни.

Экспрессия катепсина В связана со степенью агрессивности глим, соответственно более высокая пропорция катепсин-В-позитивных клеток встречается в анапластических астроцитомах и глиобластомах, чем в дифференцированных астроцитомах. Инвазивные клетки глиобластомы склонны быть катепсин-В-позитивными, при этом количество и транскриптов, и белка катепсина В увеличено в опухолях ВСЗ. В карциномах желудка с метастазами содержится больше катепсина В, чем в карциномах без метастазов.

Катепсин-В-содержащие везикулы в клетках линий, различающихся по степени злокачественности, локализованы по периферии клеток с большей злокачественностью, что проявляется в постепенной редукции количества внутриклеточного катепсина В и увеличении его секреции. Следовательно, внутриклеточное движение и секреция катепсина В могут быть важным признаком клеток, обладающих инвазивностью.

Цистеинпротеаза катепсин L влияет на подвижность и инвазивные свойства опухолевых клеток, вызывая деградацию клеточных мембран и ряда компонентов ЭКМ (ламинина, фибронектина, протеогликанов, коллагенов, эластина и др.) и способствуя тем самым усилению клеточной миграции и опухолевой прогрессии к метастатической стадии при опухолях различных типов. Ее активность подвержена модуляции цитокинами, например, IL-6 усиливает, а TGF β подавляет экспрессию катепсина L. Японские онкологи считают, что катепсиновый статус желудочной карциномы на ранней стадии может служить критерием выбора хирургической тактики. Они полагают, что, хотя гастрэктомия с иссечением лимфатических узлов является стандартным методом лечения карциномы же-

лудка ранней стадии, пациенты без метастазов могут быть излечены шадящей органосохраняющей операцией без иссечения лимфатических узлов.

Лизосомальная мультифункциональная пептидаза катепсин А играет роль как в злокачественной трансформации кожи, так и в метастатической диссеминации первичной меланомы. В отличие от других членов семейства катепсинов, онкогенный потенциал катепсина А обладает высокой тканеспецифичностью, что объясняется, по-видимому, высокой тканеспецифичностью его функции.

Матриксные металлопротеиназы (matrix metalloproteinases, MMP) — семейство высококонсервативных эндопротеиназ, содержащих атом металла и способных деградировать большинство, если не все, компоненты базальной мембраны и ЭКМ. Известно более 20 MMP человека (табл. 5).

Для прогрессии опухоли необходимы специфически измененные процессы матриксной деградации и клеточной адгезии. Исследования последних лет установили, что существует механистичес-

Таблица 5. Классификация и номенклатура MMP человека

Семейство MMP	№ MMP	Название MMP
Коллагеназы	1	Интерстициальная коллагеназа
	8	Нейтрофильная коллагеназа
	13	Коллагеназа-3
Желатиназы	2	Желатиназа типа IV 72 кДа
	9	Желатиназа типа IV 92 кДа
Стромелизины	3	Стромелизин-1
	10	Стромелизин-2
	11	Стромелизин-3
	18	Стромелизин-подобная MMP
MMP мембранного типа	14	MI-1-MMP (membrane-inserted)
	15	MI-2-MMP
	16	MI-3-MMP
	17	MI-4-MMP
	24	MI-5-MMP
	25	MI-6-MMP
Другие MMP	7	Матрилизин (PUMP-1)
	12	Эластаза макрофагов
	19	MMP, ассоциированная с ревматоидным артритом
	20	Энамелизин
	21	Недавно клонированная MMP
	22	Недавно клонированная MMP
	23	Недавно клонированная MMP

кая и функциональная связь между этими двумя процессами и что MMP участвуют в обоих через множественные координированные взаимодействия с элементами аппарата клеточной адгезии для облегчения движения клеток через ЭКМ. Например, MMP-2 расщепляет ламинин-5 — белковый компонент базальной мембраны, которым эпителиальные клетки прилипают и взаимодействуют с трансмембранными интегринами. Расщепление ламинина-5 индуцирует клеточную миграцию.

Регуляция MMP. Гены MMP экспрессируются в норме на низком конститутивном уровне, но индуцируются в различных физиологических условиях, когда требуется перестройка ЭКМ, например, в эмбриогенезе, при заживлении язвы и реконструкции кости. Повышенная экспрессия или активация MMP наблюдается в различных патологических состояниях, например, при артритах и раке. Ферменты с такими потенциально разрушительными эффектами должны очень строго регулироваться, и действительно, экспрессия индивидуальных членов семейства MMP регулируется отдельно, тканеспецифично и на различных временных и пространственных уровнях. Некоторые гены MMP (MMP-1, -3, -7, -9, -10, -12 и -13) являются индуцибельными, их промоторы содержат высококонсервативные регуляторные элементы. Два основных типа сайтов связывания в промоторах этих генов — сайты связывания транскрипционного фактора AP-1 (activating protein 1) и PEA-3 (polyoma enhancer activator 3). Сайт связывания AP-1 является сайтом инициации базальной транскрипции гена MMP, а также связывания молекул, ингибирующих экспрессию индуцибельных MMP-генов. Этот сайт необходим для транскрипционного ответа на множество сигналов, например, IL-1, TNF α , интерферон- β , глюкокортикоиды, ретиноиды и TGF β . Связывание AP-1 активирует экспрессию генов MMP.

Гиперэкспрессия MMP характерна для большинства злокачественных опухолей. Матричным металлопротеиназам принадлежит центральная роль в процессах ангиогенеза, опухолевой инвазии и метастазирования (рис. 5.7). Индивидуальные MMP могут иметь различные, возможно, противоположные, функции в ангиогенезе. Протеолиз ЭКМ — предпосылка ангиогенеза, и активированные MMP (главным образом MMP-2) присутствуют в местах ангиогенеза. Однако некоторые MMP (MMP-2, -3, -7, -9) способны к протеолизу плазминогена с образованием ангиостатина, эндогенного ингибитора ангиогенеза, который специфически ингибирует пролиферацию эндотелиальных клеток через взаимодействие

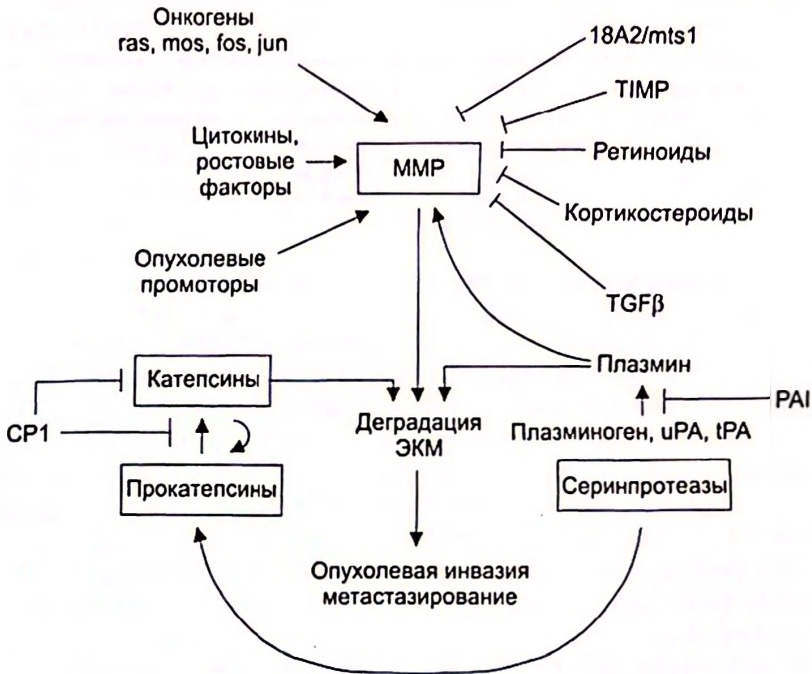


Рис. 5.7. Роль MMP в реконструкции ЭКМ, опухолевой инвазии и метастазировании. Экспрессия MMP находится под влиянием разнообразных биологических модификаторов (ростовых факторов, цитокинов, онкогенов). Функция MMP контролируется ингибиторами (TIMP) и модулируется ретиноидами и кортикостероидами. Серинпротеазы также влияют на активность MMP, но они могут участвовать в дегградации ЭКМ и другим путем, а именно через активацию катепсинов. CP — фермент церулоплазмин (ceruloplasmin), белок острой фазы, неспецифический онкомаркер.

с рядом молекул клеточной адгезии. MMP участвуют в изменении адгезии между опухолевыми клетками и их микросредой и движении клеток через ЭКМ.

Члены семейства MMP близкородственны по структуре (рис. 5.8). Они содержат 4 основных домена: 1) домен транслокационного сигнала; 2) продомен, который важен для поддержания фермента в латентной форме; 3) каталитический домен и 4) TIMP-связывающий домен. Домен транслокационного сигнала содержит пептидную последовательность для передачи сигнала к транслокации молекулы в эндоплазматический ретикулум. В процессе активации фермента происходит так называемое цистеиновое переключение. N-терми-

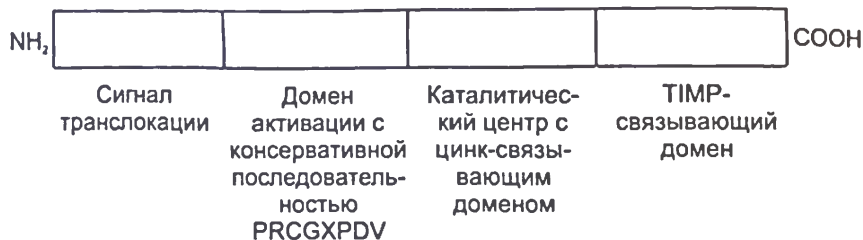


Рис. 5.8. Структура молекулы MMP.

нальная часть молекулы изгибается таким образом, что цистеиновый остаток в консервативной последовательности продомена (домена активации) взаимодействует с атомом цинка каталитического центра молекулы (Zn^{2+} -связывающего домена). Нарушение этого взаимодействия — первый этап активации проMMP, затем следует протеолитическое расщепление пептида PRCGXPDV. Активированная MMP удаляет продомен аутопротеолизом.

Идентифицированы 4 ингибитора MMP, названные тканевыми ингибиторами металлопротеиназ (tissue inhibitors of metalloproteinases, TIMP-1, 2, 3).

Несколько модификаторов биологического ответа способны регулировать синтез MMP. Некоторые цитокины, в частности, интерлейкины участвуют в регуляции MMP на транскрипционном или посттранскрипционном уровне. Было показано, что IL-1 индуцирует MMP-1 и MMP-3 в фибробластах. Эта транскрипционная активация супрессируется интерлейкином-4. IL-6 вовлечен в регуляцию экспрессии MMP-2, MMP-9 и TIMP-1 в клетках неходжкинских лимфом. Повышение уровня IL-6 коррелирует с усилением экспрессии генов MMP-2 и MMP-9, которое ухудшает прогноз заболевания. IL-10 стимулирует продукцию TIMP-1 и ингибирует секрецию желатиназ (MMP-2 и MMP-9) в иммортализованных клеточных линиях из предстательной железы человека и препятствует ангиогенезу *in vitro*. В отличие от антиангиогенного IL-10, IL-8 является проангиогенным цитокином. Трансфекция меланомных клеток геном IL-8 приводит к усилению активности MMP-2 и инвазивности клеток. Ультрафиолетовые лучи и гипоксия индуцируют IL-8 и соответственно увеличивают агрессивность меланомы. Цитокины и ростовые факторы усиливают продукцию MMP-1 и MMP-3 на транскрипционном уровне. Продукция нейтрофильной коллагеназы стимулируется форболовыми эфирами.

Промоторы генов коллагеназы и стромелизина содержат сайты связывания AP-1, который представляет собой гетеродимерный ком-

плекс из белков *c-fos* и *c-jun* и опосредует клеточный ответ на ростовые факторы и цитокины. Эти сайты отвечают и за позитивную, и за негативную регуляцию генов MMP. Ретиноиды, TGF β и кортикостероиды ингибируют синтез MMP-1 и -3, блокируя AP-1-связывающий элемент в промоторе гена. К индукторам MMP относятся интерфероны α , β , γ , IL-1, TNF, ростовые факторы EGF, bFGF и PDGF, онкобелки *c-fos*, *c-jun*, H-Ras и Mos, а также тепловой шок и некоторые другие факторы.

Регуляция функций MMP и TIMP — тонко координированный процесс. TIMP-1 экспрессируется во множестве клеточных типов (макрофагах, фибробластах, эндотелиальных клетках). Его экспрессия регулируется ростовыми факторами (bFGF, TGF β , EGF), цитокинами (TNF α , IL-1, -6, -11), ретиноидами, фиброblastическими факторами, глюкокортикоидами и стероидными гормонами. Эти биологические модуляторы дифференцированно регулируют синтез MMP. Например, глюкокортикоиды и TNF подавляют продукцию MMP, но усиливают экспрессию TIMP. Лютеинизирующий гормон и 12-О-тетрадеканойлфорбол-13-ацетат усиливают экспрессию ингибитора и тем самым обеспечивают контроль протеолиза и реконструкции фолликулярной соединительной ткани, ассоциированной с овуляцией. Следовательно, регуляция активности MMP контролируется не только дифференциальной индукцией экспрессии протеиназ, но и компенсаторной модуляцией экспрессии соответствующих ингибиторов. Эстрогены усиливают инвазивность клеток из карциномы молочной железы при усилении деградации коллагена IV типа. В эстроген-чувствительных линиях эстроген не изменяет экспрессию MMP-2, но подавляет экспрессию TIMP-2 на 50%. Регуляция MMP/TIMP может быть тканеспецифической, и общий протеолитический ответ управляется несколькими факторами. В фибробластах экспрессия стромелизина индуцируется фактором EGF, а в нервных клетках — NGF. TGF β супрессирует экспрессию коллагеназы и одновременно, взаимодействуя с bFGF и EGF, промотирует индукцию TIMP. Этот комплексный процесс регуляции протеолитической активности, демонстрируемый опухолевыми клетками, сопутствует инвазивности и метастазированию, как показано ниже.

Реконструкция ЭКМ в раннем эмбриональном развитии включает несколько MMP, что позволяет эмбриональным клеткам участвовать в межклеточных и клеточно-ЭКМ-адгезионных взаимодействиях, важных для клеточной миграции, роста и морфогенеза. Индукция дифференцировки клеток эмбриональной карциномы ретиновой

кислотой усиливает экспрессию генов MMP и TIMP, свидетельствуя о том, что контроль эмбрионального развития достигается регуляцией MMP-TIMP-системы. Кроме вышеназванных, к ингибиторам синтеза MMP относятся тиреоидные гормоны, глюкокортикоиды, прогестерон и андрогены. Все эти агенты связываются с молекулами из суперсемейства ядерных рецепторов, которые контролируют генную экспрессию MMP различными механизмами. Ядерные рецепторы могут связываться с элементами HRE (hormone responsive element) в промоторах генов MMP и формируют комплексы с ДНК при взаимодействии с белками AP-1. Глюкокортикоиды репрессируют транскрипцию гена MMP-1, взаимодействуя с белками AP-1. Ретиноиды супрессируют транскрипцию MMP-1 по механизму, включающему ингибирование мРНК и белков Fos и Jun, а также формирование комплексов рецепторов ретиноевой кислоты с AP-1. Ядерные рецепторы и их лиганды могут ингибировать MMP непрямым путем. Ретиноиды и глюкокортикоиды индуцируют транскрипцию TIMP. Центральную роль в модуляции уровня экспрессии MMP играет посттранскрипционная регуляция, так как все растворимые MMP секретируются в виде неактивной формы и активируются после отщепления N-терминального продомена. MMP мембранного типа отличаются наличием трансмембранного домена и внутриклеточной (до попадания на клеточную поверхность) активацией.

Прямая корреляция между инвазивностью / метастазированием и продукцией MMP опухолевыми клетками известна давно. Онкогенная трансформация генами Ras и Muc часто генерирует метастатический фенотип, но может быть ингибирована введением в клетку гена E1A, которое является одновременно причиной ингибирования MMP. В промоторе гена MMP-1 описан однонуклеотидный полиморфизм, который влияет на его транскрипцию. Дополнительный гуанин-1607 усиливает транскрипцию гена MMP-1 и в нормальных, и в опухолевых клетках. Этот генотип обнаружен в 62,5% клеточных линий опухолевого происхождения (рак молочной железы и меланома) и в 30% контрольных. У пациенток с опухолью яичника аллель GG встречается значительно чаще, чем у онкологически здоровых людей. Уровень MMP-1 у больных с фенотипом GG значительно выше, чем у больных с фенотипом G. Промоторы некоторых MMP-генов содержат сайт связывания белка p53. Взаимодействие с p53 подавляет экспрессию гена MMP-1 и индуцирует транскрипцию гена MMP-2.

Трансформированные клетки с высоким метастатическим потенциалом имеют высокий уровень продукции MMP стромелизи-

нов 1-3 по сравнению с клетками с низким метастатическим потенциалом. Антитела против коллагеназы IV ингибируют инвазию базальной мембраны клетками меланомы человека. В метастатических вариантах опухолевых линий определена редукция экспрессии TIMP по сравнению с неметастатическими вариантами. Введение экзогенного TIMP-2 или антител против MMP-2 подавляет инвазивную способность клеток фибросаркомы человека. Экспрессия TIMP-2 полностью подавлена в инвазивных клетках глиомы по сравнению с неинвазивными линиями и фетальными клетками мозга человека. В инвазивных линиях глиомы показан высокий уровень транскрипции гена h-Mts1, который придает клеткам инвазивные и метастатические свойства. Предполагается, что это происходит через усиление активности MMP и подавление TIMP.

Высокая экспрессия стромелизина-3 определена в стромальных клетках инвазивных опухолей молочной железы и головы и шеи. Экспрессия стромелизина-3 и коллагеназы IV типа коррелирует с метастазированием опухоли молочной железы и легкого в лимфатические узлы. MMP-2 и -9 ассоциированы больше с инвазивной, чем с поверхностной опухолью и экспрессируются в большей степени в стромальных, чем в опухолевых клетках. Секретция MMP стромальными клетками способствует диссеминации метастатической субпопуляции.

Таким образом, существует бесспорная корреляция между экспрессией и регуляцией активности матриксных протеиназ и метастатическим процессом. Экспрессия протеиназ часто резко увеличена в инвазивных зонах опухоли или в области соприкосновения опухоли и ее стромального компонента. «Колонизация» протеиназами клеточной поверхности, инициация протеолитического каскада и избирательная деградация белков экстраклеточного матрикса предшествуют метастатической диссеминации и прогрессии опухоли.

5.7. ОНКОГЕНЫ И МЕТАСТАЗИРОВАНИЕ

Природа генетических изменений, претерпеваемых опухолевыми клетками в ходе прогрессии опухоли, в целом и в отношении метастатического потенциала изучена недостаточно. Идентификация этих генетических изменений должна стать одной из первоочередных целей онкологических исследований, так как способность к метастазированию — генетически детерминированное свойство,

прогрессия опухоли к метастатическому состоянию подразумевает изменения в экспрессии генов.

Одна из особенностей злокачественных опухолей, которая придает им метастатический потенциал, — инвазия опухолевых клеток в окружающие ткани. Профиль специфически раковой генной экспрессии включает как активируемые (усиливающие трансформирующий фенотип), так и подавляемые (супрессоры трансформирующего фенотипа) гены. Среди этих дифференциально экспрессирующихся генов имеются ответственные за инвазию, которая может быть результатом координированного взаимодействия между опухолью, стромой и инфильтрирующими воспалительными клетками. Стромальные клетки могут способствовать инвазии через паракринную продукцию цитокинов, ростовых факторов и экстраклеточных протеиназ, но могут также вырабатывать супрессоры инвазии, такие как ингибиторы экстраклеточных протеаз.

Инвазия — строго регулируемый процесс, используемый нормальными клетками многих типов, когда для них возникает необходимость мигрировать через тканевые границы. Инвазия, подобно пролиферации, прекращается, когда исчезает действие соответствующих стимулов, и, следовательно, существует транскрипционно регулируемая мультигенная программа инвазии, которая, подобно пролиферативной, активируется экстраклеточными сигналами. В качестве основных транскрипционных факторов, которые функционируют на путях сигнальной трансдукции и активируют инвазионную программу, идентифицированы NFκB (nuclear factor kappa B) и AP-1 (activator protein 1).

Трансформация онкогенами, которые функционируют на путях трансдукции сигналов от ростовых факторов, такими как *ras*, *raf* и *mek*, проявляется в резком усилении экспрессии компонентов и функциональной активности AP-1. Представление о том, что AP-1-регулируемые гены играют важную роль в инвазии, основано на следующих наблюдениях. Во-первых, индуцибельные ММР имеют AP-1-связывающие сайты в позиции 66-72 своих промоторов, которые ответственны за базальную экспрессию и ответ на ростовые факторы. Во-вторых, повышенная экспрессия компонентов AP-1 усиливает клеточную инвазию. Доминантные негативные мутации гена *c-jun*, ингибирующие активность AP-1, редуцируют инвазивность многих клеточных типов, включая карциномы человека. Трансформация клеток геном *c-fos* активирует мультигенную программу инвазии без стимуляции прогрессии клеточного цикла. Это отделяет пролиферативный компонент трансформации от морфологического

компонента, ассоциированного с инвазией. Мутационный анализ онкопротеинов семейства *fos* демонстрирует, что их трансформирующая активность зависит от способности связываться с белками семейства *jun* и трансктивировать генную экспрессию.

Для изучения мультигенной программы инвазии создана библиотека кДНК более 200 генов, дифференциально экспрессирующихся (активируемых и репрессируемых) в *fos*-трансформированных фибробластах. Более половины активируемых генов экспрессируются в клетках после приобретения ими инвазивности. Функциональные исследования показали, что активируемые гены кодируют белки, ассоциированные с инвазией, такие как экстраклеточные протеазы, молекулы межклеточной адгезии, клеточные рецепторы для компонентов ЭКМ, регуляторные белки цитоскелета, факторы подвижности, ингибиторы апоптоза, регуляторы транскрипции и ангиогенеза (табл. 6).

В число активируемых в *fos*-трансформированных клетках генов входит ген эзрина (*ezrin*), который кодирует один из белков, регулирующих взаимодействия между мембранными белками и актином цитоскелета. Эзрин в нормальных клетках существует в первую очередь как цитоплазматический белок с латентным актин-связывающим потенциалом. Стимуляция ростовыми факторами приводит к фосфорилированию эзрина, его транслокации к складчатым участкам мембраны, где он взаимодействует с внутриклеточным доменом CD44.

CD44 и эзрин ко-локализуются в расширяющейся псевдоподии *fos*-трансформированных клеток. Удаление эзрина из псевдоподий приводит к их исчезновению и ингибирует клеточную подвижность, которая необходима для инвазии. Экспрессия эзрина, как и CD44, в нормальных клетках не придает им инвазивность. Это означает, что утрата функции единичного компонента инвазионной программы достаточна для ингибции одного из важных аспектов инвазии, но экспрессия единичного компонента недостаточна для придания клетке инвазивности.

Некоторые AP-1-активируемые гены (*Sap18*, *RbAp46* и *MTA1*) являются компонентами гистондеацетилазного комплекса, ассоциированного с супрессией генной экспрессии, и этим объясняется подавление экспрессии большого количества генов в трансформированных фибробластах и опухолях. ДНК-5'-метилтрансфераза (кодируемая геном *dnmt1*) может формировать комплексы с гистондеацетилазами, которые участвуют в регуляции морфологической трансформации и инвазии. Ингибция экспрессии *dnmt1* или об-

Таблица 6. AP-1-активируемые гены

Генный продукт	Функция
MMP2, 9, 10	Протеазы
Урокиназа	“
Катепсины L, B, D	“
PAI1	Ингибитор активатора плазминогена
h-Mts1	S-100 Ca ²⁺ -связывающий белок
Онкомодулин	“
IBP (laminin binding protein) p67	Ламинин-связывающий белок
CD44	Рецептор гиалуроната
TGFβ-индуцируемый белок	Клеточная адгезия
Эзрин	Актин/мембраносвязывающий белок
Виментин	Белок цитоскелета
Arf-1 (ADP-ribosylation factor)	Актин-цитоскелетный регулятор
Scar2	ARP2/3 регуляция семейства WASP (Wiscott-Aldrich syndrome protein)
p16-субъединица Arp2/3 (actin-related protein)	Актин-цитоскелетный регулятор
Rho-киназа α	Rho-зависимая киназа
GAK (cyclin G-associated kinase)	Циклин G-зависимая киназа
Krp1 (kelch related protein)	Kelch-родственный белок
Циклооксигеназа (Cox) 2	Циклооксигеназа 2
Тирозинфосфатаза	Тирозинфосфатаза
Протенинфосфатаза (PP) 2A	Регуляция PP2A
N-ацетилтрансфераза (NAT1)	Репрессор трансляции
Гистондеацетилаза (HDA) C4	Гистондеацетилаза
Метастазассоциированный белок	Субъединица гистондеацетилазы
RbAp46 (Rb-associated protein)	“
SAP18 (mSin3-associated polypeptides)	“
Dnmt (DNA 5-methylcytosine transferase) 1	ДНК-метилтрансфераза
Tip30	Транскрипционный фактор
Fra1, 2 (Fos related antigen 1 и 2)	“
c-jun	“
junD	“
VEGF	Ангиогенез
Ангиогенин	“
Кластерин	Апоптоз

работка клеток трихостатином А (TSA), ингибитором гистондеацетилазной активности, ингибирует морфологическую трансформацию онкопротеином fos, и поэтому гистондеацетилазы следует рассматривать как компонент инвазионной программы, а TSA – как потенциальный ингибитор инвазии в fos-трансформированных и стимулированных ростовыми факторами фибробластах.

AP-1-репрессируемые гены кодируют опухолевые супрессоры, ингибиторы протеаз, компоненты ЭКМ, белки межклеточной и матриксноклеточной адгезии, негативные регуляторы Ras-, Wnt- и TGF β -сигнальных путей и транскрипционные факторы (табл. 7).

Некоторые опухолевые супрессоры функционируют как супрессоры инвазии, например, PTEN, E-кадгерин, SMAD/DPC4. Эпигенетическое подавление функции генов на уровне генной экспрессии, например, метилированием ДНК или гистонацетилированием, встречается в опухолях значительно чаще, чем мутационная инак-

Таблица 7. AP-1-репрессируемые гены

Генный продукт	Функция
PTEN	Ингибитор сигнальной трансдукции
E-кадгерин	Ингибитор инвазии
SMAD/DPC4	Ингибитор инвазии
Лизилоксидаза	Поперечные сшивки коллагена
Фибронектин	Компонент ЭКМ
Коллаген типа 1	"
SPARC	"
MGC-24 (mucin-like glycoprotein)	Адгезия
TSC-1 (tuberous sclerosis complex)	Адгезия/опухолевая супрессия
Фибриллин-1	Компонент ЭКМ
β -актин	Цитоскелет
Тубулин- β 5	Микротрубочки
TSC-36/FRP (TGF β 1-stimulated clone / follistatin related protein)	Фоллистатин-родственный белок
PKC-связывающий белок	Регуляция PKC
TGF β -связывающий белок	Регуляция TGF β
Протокадгерин 43	Межклеточное взаимодействие
Frizzled-родственный белок	Антагонист Wnt
FISP-12	ЭКМ-сигналинг
Fez	Регуляция протеинкиназы C
Субъединица PP2A β	Протеинфосфатаза PP2A
Некдин (necdin)	Супрессор роста
Капаза 11	Апоптоз
Gas-5 (growth arrest specific)	Процессинг РНК
РНК-расщепляющий фактор	"
Транскрипционный фактор S-II	Элонгация РНК
IRF-1 (interferon regulatory transcription factor)	Транскрипционный фактор
CRBP (cell retinol binding protein)	"
STAT6	"
c-fos	"

тивация. Ген Dgr-1, изолированный из клеток опухоли толстой кишки, считается супрессором метастазирования. Обработка опухолевых клеток ингибитором гистондеацетилаз трихостатином А восстанавливает экспрессию Dgr-1, поэтому можно заключить, что она была подавлена вследствие метилирования и деацетилирования хроматина. Гиперэкспрессия Dgr-1 в метастатических клетках опухоли толстой кишки редуцирует инвазию и метастатический потенциал. Из опухоли предстательной железы изолирован ген KAI1 (CD82), экспрессия которого супрессирует инвазию через ингибирование клеточной адгезии и подвижности. Ген SPARC, кодирующий белок ЭКМ, экспрессия которого подавлена в v-jun-трансформированных клетках, ингибирует формирование опухоли, не влияя на ростовые характеристики клеток. Эти примеры показывают, что подавление экспрессии ряда генов в трансформированных клетках является частью мультигенной инвазионной программы.

Некоторые онкогены протестированы на способность придавать инвазивность и метастатическую способность нормальным клеткам (гомологи Ras, гены семейства S100 и др.). С этой целью используют два основных экспериментальных подхода к исследованию метастатической способности *in vivo*: 1) экспериментальное моделирование метастазов внутривенной инъекцией опухолевых клеток и измерение легочной колонизации (этот подход не может обеспечить полную картину ассоциированных событий, так как введение клеток прямо в сосудистую систему, очевидно, пропускает несколько ранних стадий метастатического каскада); 2) модели спонтанного метастазирования, которые измеряют различные параметры метастатического процесса.

Активированный ген Ras индуцирует экспрессию поверхностного гликопротеина CD44, который ассоциирован с повышенным метастатическим потенциалом. Активация Ras не является обязательным событием опухолевой прогрессии, так как активирующие мутации не обнаруживают специфического паттерна клинического или биологического поведения злокачественной опухоли. Ras стимулирует подвижность эндотелиальных клеток, которая необходима для формирования микрососудов, способствующих диссеминации опухолевых клеток в отдаленные метастазы.

Аберрации гена erbB2, кодирующего рецептор эстрогена, могут быть как ранним, так и поздним событием патогенеза опухоли молочной железы. Амплификация этого гена в опухолях молочной железы позитивно коррелирует с метастазами в лимфатические узлы и негативно — с общей, безрецидивной и безметастатической вы-

живаемостью. По классификации Коллегии американских патологов, мультидисциплинарной группы клиницистов, патологов и статистиков, ген *c-erbB2* наравне с маркерами пролиферации, лимфатической и васкулярной инвазии и геном *p53* относится ко второй категории прогностических факторов при опухолях этого типа.

Экспрессия рецептора эстрогена в опухолях яичников ассоциирована с высокой злокачественностью, а у пациенток с метастазами в лимфатические узлы является маркером неблагоприятного прогноза. Карцинома *in situ*, которая экспрессирует *erbB2* и содержит анеуплоидную ДНК, имеет склонность перерождаться в инфильтрирующую карциному. Больные с назофарингеальной карциномой, экспрессирующей *erbB2*, имеют худшие общую и безрецидивную выживаемость. Амплификация этого гена в опухолях мочевого пузыря определяется только после прогрессии болезни к инвазивной стадии. При орофарингеальной карциноме экспрессия *erbB2* признана в качестве фактора метастазирования в лимфатические узлы, при раке желудка — в качестве промотора инвазии и метастазирования, независимого прогностического фактора и потенциальной мишени антиинвазивной терапии.

Онкогенность *erbB2* была изучена в экспериментах *in vitro*. Эпителиальные клетки молочной железы человека трансфицировали нормальным или генетически измененным *erbB2*. Оказалось, что гиперэкспрессия нормального *erbB2* или его специфическая мутация приводит к злокачественной трансформации клеток, придает им инвазивные свойства и способность давать начало росту опухоли в легком экспериментального животного. *ErbB2*-трансфектанты демонстрируют повышенную адгезию к эпителиальным клеткам легкого мыши по сравнению с исходными родительскими клетками.

Феномен межклеточной адгезии формируется при участии нескольких белков, в числе которых Е-кадгерин, супрессор инвазивности. Как упоминалось выше, потеря или редукция экспрессии Е-кадгерина связана с утратой маркеров дифференцировки и повышением инвазивного потенциала. Функциональный белок *erbB2* связан с регуляцией экспрессии Е-кадгерина и $\alpha 2$ -интегрина, и его гиперэкспрессия в эпителиальных клетках молочной железы человека проявляется в редукции экспрессии генов Е-кадгерина и $\alpha 2$ -интегрина.

Способность деградировать базальную мембрану эндотелия — важная предпосылка проникновения опухолевых клеток в сосудистую систему. Инвазивность опухолевых клеток тесно связана со способностью секретировать соответствующие ферменты. Клеточные линии, несущие трансген *erbB2*, секретируют такие ферменты, например, коллагеназу IV типа, на уровне, примерно в 10 раз пре-

вышающем контрольный, а также повышенное количество активатора плазминогена. Аденовирусный белок E1A, способный ингибировать онкогенную трансформацию, инвазию и метастазирование, редуцирует трансформирующую активность гена *erbB2* и отменяет усиление инвазивности и легочной колонизации, индуцированных трансформацией *erbB2*. Еще один путь ингибиции *erbB2* – репрессия его транскрипции белком Rb.

Рост многих опухолей контролируется и модулируется связыванием эпидермального ростового фактора (EGF) с его специфическим рецептором EGFR, который кодирует ген *erbB1* (рис. 3.9, см. вклейку). Присутствие EGFR оценивается как индикатор клинической агрессивности и повышенного метастатического потенциала опухоли. EGFR-позитивность первичной опухоли молочной железы выше у пациенток с вовлечением подмышечных лимфатических узлов или лимфатической инвазией опухоли, чем у пациенток без метастазов в лимфатических узлах. Метастатические опухоли имеют более высокий уровень EGFR, чем соответствующая первичная опухоль, и EGFR-позитивность коррелирует с меньшей дифференцированностью и большей злокачественностью. Многие онкологи считают его наиболее важным прогностическим маркером, так как он указывает на низкую безрецидивную выживаемость, в частности, EGFR-статус опухоли молочной железы тесно связан с опухолевой прогрессией и метастазированием. Обнаружено более чем 5-кратное повышение количества белка и мРНК EGFR в клетках карциномы толстой кишки с высоким метастатическим потенциалом по сравнению с клетками с низким метастатическим потенциалом. EGFR гиперэкспрессируется в опухолях эндометрия и яичника, причем EGFR-статус коррелирует с гистологическим типом, клеточной пролиферацией и метастатической диссеминацией, общей выживаемостью пациенток. Среди пациенток с поздними стадиями болезни более высокая экспрессия EGFR помогает идентифицировать подгруппу с худшим прогнозом. Таким образом, конститутивная экспрессия или гиперэкспрессия ростовых факторов и/или их рецепторов может быть важным элементом прогрессии злокачественных опухолей.

5.8. ГЕНЫ-СУПРЕССОРЫ МЕТАСТАЗИРОВАНИЯ

При семейном аденоматозном полипозе (familial adenomatous polyposis, FAP) у пациентов развиваются многочисленные доброка-

чественные аденоматозные полипы, которые со временем прогрессируют в карциному. Мутации *гена-супрессора опухолей APC* (adenomatous polyposis coli), приводящие к потере его супрессорной функции, идентифицированы как причина FAP. И наследственные (более 150), и соматические (более 300) мутации описаны в коло ректальных аденомах и карциномах у пациентов с FAP. Супрессорная функция экспериментально подтверждена трансфекцией полноразмерного нормального гена APC в клеточные линии из опухолей толстой кишки. Клоны, несущие трансген APC, имеют измененную клеточную морфологию и утрачивают способность к опухолевому росту при трансплантации мышам. Механизм, которым белок APC супрессирует опухолевый процесс, хорошо известен. В интестинальном эпителии APC ассоциируется с вспомогательным клеточным белком, кодируемым геном EBI, и α -катенином, который в свою очередь сшит с актиновыми элементами цитоскелета и вовлекает APC в клеточную адгезию. Усеченный в результате делеции С-терминальной области, что часто происходит при раке, белок APC не может ассоциироваться с цитоплазматическими микротрубочками. Введение хромосомы 5 (в которой локализованы гены APC и α -катенина) в клетки опухоли предстательной железы проявляется в восстановлении экспрессии APC и может супрессировать метастатическую активность этих клеток, но это возможно только при условии экспрессии Е-кадгерина. Белок APC редуцирует уровень β -катенина, промотируя его деградацию. Мутантный APC лишен способности регулировать уровень β -катенина, что связано с делецией центральной части молекулы APC и отражается в изменении адгезивных свойств эпителиальных клеток и их биологического поведения, в частности, через регуляцию экспрессии матрилизина (MMP-7, PUMP-1).

Ген APC состоит из 15 экзонов. Известно несколько изоформ мРНК, продуцируемых альтернативным сплайсингом кодирующих и некодирующих областей. Они экспрессируются дифференциально и тканеспецифично. Множественные изоформы могут транскрибироваться в APC-белки с различными биологическими свойствами. Например, изоформа APC, транскрибированная с кДНК, лишенной 1-го экзона, не содержит последовательности, необходимой для формирования гомодимера. Манифестация атипичных фенотипов FAP, вариабельность тяжести и возраста начала болезни может быть обусловлена существованием изоформ APC.

Кроме прогрессии опухолей толстой кишки, ген APC вовлечен в патогенез других опухолей человека. Инактивация гена APC обна-

ружена в аденомах желудка, оральных плоскоклеточных карциномах, эпителиальных опухолях яичника, немелкоклеточных опухолях легкого. Высокая частота потери гетерозиготности в локусе 5q21 коррелирует с метастазированием в лимфатические узлы и низкой общей выживаемостью. Потеря гетерозиготности по APC встречается только в дифференцированных карциномах желудка и почти не встречается в недифференцированных опухолях.

Супрессорный ген DCC (deleted in colorectal carcinoma) вовлечен в поздние стадии патогенеза колоректальных опухолей. Он картирован в локусе 18q21.3, который часто делетирован в опухолях. Этот большой сложный ген, состоящий из 29 экзонов, высоко экспрессируется в нормальной слизистой оболочке толстой кишки и других тканях, включая мозг. Присутствие белка DCC показано иммуногистохимически в ретикулоэндотелиальных клетках тимуса, миндалин и лимфатических узлов, но его экспрессия сильно редуцирована в карциномах. Ген DCC кодирует трансмембранный белок семейства иммуноглобулинов, содержащий 1447 аминокислотных остатков, имеющий значительную гомологию с адгезионной молекулой нервных клеток NCAM (neural cell adhesion molecule) и выполняющий функцию адгезионной молекулы. Экстраклеточный домен этого белка состоит из 4 иммуноглобулиноподобных и 6 фибронектин-подобных доменов.

Супрессорная функция гена DCC доказана введением нормальной копии гена в опухолевые клетки. Одновременно с усилением генной экспрессии после трансфекции полноразмерной кДНК DCC в трансформированные эпителиальные клетки происходила супрессия их способности к опухолевому росту.

Развитие карциноматозных очагов в ворсинчатоклеточных аденомах, но не рост аденомы, характеризуется потерей гетерозиготности в локусе DCC, поэтому не удивительно, что обращено внимание на корреляцию аномалий DCC с метастатическим потенциалом. Потеря гетерозиготности по хромосомному локусу 18q, как и по 17p, чаще встречается в карциномах поздних стадий, чем в локализованных внутримуккозных карциномах. Потеря гетерозиготности в локусе 17p13.1, где картирован ген p53, коррелирует с сосудистой инвазией, а в локусе 18q, где локализован ген DCC, — с печеночными и нодальными метастазами. Экспрессия гена может быть подавлена в опухолях эндометрия, шейки матки и яичника, чаще в поздних стадиях, чем в ранних. Ассоциация потери гетерозиготности гена DCC с инвазивным поведением отмечена в опухолях молочной железы, карциномах мочевого пузыря. При эзофагеальных опухолях потеря

гетерозиготности по DCC встречается в основном в слабодифференцированных опухолях и ассоциирована с метастазированием в отдаленные сайты. Таким образом, доказана связь между потерей гетерозиготности по DCC в первичной опухоли и ее способностью к метастазированию.

Ген BRCA1 (breast and ovarian carcinoma susceptibility gene 1) картирован в локусе 17q21. Мутации этого гена predisполагают к раку молочной железы и яичника, так как ассоциированы более чем с 45% наследственных опухолей молочной железы без рака яичника и выявляются в 80% семей с опухолями молочной железы и яичника. Потеря гетерозиготности по гену BRCA1 при семейном раке указывает, что он представляет собой классический супрессорный ген. Соматические мутации рассматриваются как центральное событие в развитии рака молочной железы и яичника в отсутствие наследственных мутаций. Спорадические опухоли молочной железы не несут мутаций BRCA1. Высокая частота потери гетерозиготности в микросателлитных локусах в области гена BRCA1 подтверждает роль инактивации супрессорной функции гена BRCA1 в патогенезе опухоли.

Ген BRCA1 кодирует ядерный фосфопротеин с характерной структурой транскрипционных факторов, секреция которого регулируется эстрогеном. Две изоформы мРНК, различающиеся наличием/отсутствием первого экзона, встречаются в нормальных и иммортализованных эпителиальных клетках молочной железы человека. Функция белка BRCA1 тканеспецифична и заключается в негативной регуляции клеточного цикла, так как ингибция его экспрессии антисмысловыми олигонуклеотидами проявляется в ускорении пролиферации нормальных и опухолевых эпителиальных клеток. Нормальная копия гена BRCA1, трансфектированная в клетки различных опухолей, ингибирует *in vitro* рост опухолевых клеток молочной железы и яичника, но не легкого и толстой кишки.

Наследственные мутации BRCA1 проявляются в продукции усеченного белка и развитии опухолей с агрессивным фенотипом, анеуплоидией и повышенной скоростью пролиферации. Переход опухоли молочной железы *in situ* в инвазивную стадию сопровождается понижением экспрессии BRCA1. Потеря гетерозиготности по гену BRCA1 гораздо чаще встречается в печеночных и мозговых метастазах, чем в первичной опухоли молочной железы. Таким образом, BRCA1 участвует в процессах опухолевого роста, инвазии и прогрессии к метастатическому состоянию.

Ген-супрессор метастазирования nm23 (non-metastatic cells 1 protein) картирован в локусе 17q21.3. Уровень экспрессии гена и

его продукта белка NDP (nucleoside diphosphate kinase) негативно коррелирует с метастатическим потенциалом опухоли. Низкий уровень экспрессии nm23 в клетках опухоли ассоциирован с низкой дифференцированностью и метастазами в печени и лимфатических узлах при опухоли желудка. У пациентов с меланомой более низкий уровень мРНК nm23 коррелирует с большей агрессивностью болезни. Экспрессия nm23 в метастазах редуцирована по сравнению с соответствующими первичными карциномами печени, толстой кишки, желудка, яичника. Низкая экспрессия NDP-киназы коррелирует с редуцированной выживаемостью пациенток с инфильтрирующей карциномой молочной железы. Мутации гена nm23 могут снижать его экспрессию и усиливать агрессивность опухоли.

Экспрессия NDP-киназы в колоректальных опухолях не коррелирует с размерами опухоли, метастазированием, индикаторами плохого прогноза и выживаемостью пациентов. Возможно, различная природа мутаций гена, уровень фосфорилирования белка или его взаимодействие с другими клеточными белками в осуществлении супрессорной функции объясняют такое его неоднозначное поведение в опухолях. Действительно, было показано, что трансфекция мышинных и человеческих опухолевых клеток нормальной копией гена nm23 ингибирует инвазию, индуцированную ростовыми факторами, но не ингибирует инвазию нестимулированных клеток. Обработка клеток высокометастатической сублинии ML8 мышинной меланомы ретиноевой кислотой увеличивает соотношение nm23/Mts1 и уменьшает колонизацию легких этими клетками у экспериментальных животных. Следовательно, можно предположить, что метастатический фенотип предопределяется относительной экспрессией этих генов, а не каждым из них в отдельности.

Исследование дифференциально экспрессирующихся генов в опухолях молочной железы позволило выделить и детально изучить ген *Mta1* (*metastasis associated gene*) с наиболее высокой вариабельностью экспрессии. Ген *Mta1* экспрессируется на низком уровне в большинстве органов и только в семенниках и злокачественных опухолях он экспрессировался на очень высоком уровне. Метастазирующие опухоли экспрессируют его значительно сильнее, чем неметастазирующие. 4-кратное повышение транскрипции человеческого гомолога гена *Mta1* отмечено в ассоциации с повышенными инвазивными и метастатическими способностями клеточных линий из опухолей молочной железы. Продукт гена *Mta1* состоит из 703 аминокислотных остатков, его С-терминальный домен содержит полипролиновую последовательность, имеющую гомологию

с SH3-доменом. Это важное обстоятельство указывает на функцию белка Mta1 как протеинкиназы, относящейся к группе нерцепторных внутриклеточных киназ, которые взаимодействуют с активированными рецепторами факторов роста в ходе сигнальной трансдукции. Активация опухолеспецифичного белка Mta1 приводит к фосфорилированию фосфолипазы C, которая взаимодействует со структурами цитоскелета и обеспечивает механизм инвазии.

5.9. РОЛЬ ГИПОКСИИ В ПРОГРЕССИИ ОПУХОЛИ

Большинство солидных опухолей размером более 1 мм³ содержат участки гипоксии. Опухолевая гипоксия развивается в результате дисбаланса между потребностью в кислороде и его доставкой. Ангигенная стимуляция в опухоли и быстрая пролиферация опухолевых клеток приводят к аномальному, хаотичному и неадекватному кровоснабжению, которое не удовлетворяет потребности всей опухолевой массы в кислороде и нутриентах. Редуцированное парциальное давление кислорода является общим признаком всех солидных опухолей. Например, при опухолях молочной железы на всех стадиях болезни среднее pO_2 составляет приблизительно 30 мм рт. ст. (а в трети случаев менее 2,5 мм рт. ст.), тогда как в нормальных тканях молочной железы — 65 мм рт. ст. В опухолях всех исследованных типов обнаружена большая внутриопухолевая вариабельность оксигенации, которая слабо коррелирует или вовсе не коррелирует с другими параметрами, такими как клиническая стадия, гистологический тип, степень некроза и др.

Клеточные ответы на облучение, химиотерапию и цитокины подвержены модифицированию напряжением кислорода. Показана связь между опухолевой гипоксией и плохим ответом на лечение при саркомах мягких тканей, опухолях головы и шеи и шейки матки, а также вероятностью отдаленных метастазов. Эти данные привели к предположению, что опухолевая гипоксия связана с опухолевой прогрессией. Из общих соображений можно было бы ожидать, что тяжелая гипоксия приведет к клеточной смерти и действительно, следствием длительной гипоксии нормальных клеток является апоптоз. Индуцированный гипоксией апоптоз редуцирован в клетках с инактивированным опухолевым супрессором p53, следовательно, гипоксия является фактором отбора клеток, лишенных p53.

В отличие от здоровых клеток, злокачественно трансформированные клетки могут долго существовать в условиях дефицита кис-

лорода и нутриентов. Клинические и экспериментальные данные указывают, что опухолевая гипоксия способствует формированию более агрессивного фенотипа. Однако высокая плотность ангиогенеза до лечения, так называемые сосудистые горячие точки (области опухоли с максимальным количеством микрососудов), идентифицированные иммуногистохимически, также ассоциированы с плохими результатами лечения. По-видимому, гипоксические опухоли являются более проангиогенными, а продолжающаяся гипоксия, ассоциированная с опухолевым ростом, стимулирует ангиогенез с последующей реоксигенацией гипоксических областей опухоли.

Многие гены, контролирующие биологическое поведение опухоли, являются гипоксининдуцибельными, и список таких генов постоянно растет. Наиболее важными из них являются транскрипционные факторы p53 и HIF-1 (hypoxia inducible factor 1); ангиогенные факторы VEGF, PDECGF (platelet derived endothelial cell growth factor) и белки, специфичные для метастазирования, — MMP (табл. 8).

HIF-1 представляет собой гетеродимер, состоящий из субъединиц HIF-1 α и HIF-1 β . Гиперэкспрессия HIF-1 α , наблюдаемая в 70% опухолей, коррелирует с накоплением aberrантного p53, клеточной пролиферацией в клинических образцах и повышенным метастатическим потенциалом. P53 промотирует деградацию HIF-1 α , и потеря p53 приводит к повышению уровня HIF-1 α . Эффективная гипоксининдуцированная транскрипция нуждается в формировании мультипротеинового комплекса, в котором HIF-1 α связывается с HIF-1 β , транскрипционным активатором p300 (CBP), молекулярным шапероном Hsp90 и опухолевым супрессором VHL (von Hippel Lindau). Болезнь von Hippel Lindau — наследственная предрасположенность к развитию высокоангиогенных раковых опухолей. Интересно, что в опухолевых клетках, лишенных белка VHL, в условиях гипоксии обнаруживается в большом количестве эндогенная антисмысловая последовательность HIF-1 α , представляющая собой нетранслируемую область HIF-1 α -мРНК. В VHL-компетентных клетках ее появление индуцируется гипоксией и сопровождается временным падением уровня HIF-1 α -мРНК.

Считается, что экспрессия HIF-1 α , в отличие от кислород-резистентного HIF-1 β , является гипоксининдуцибельной на посттрансляционном уровне. Количество HIF-1 α в нормальных клетках увеличивается в условиях гипоксии и уменьшается при реоксигенации. Взаимодействие HIF-1 α с транскрипционными факторами SRC-1 (steroid receptor coactivator) и TIF-2 (transcription intermediary factor)

Таблица 8. Гипоксииндуцибельные гены

Ген	Функция белка	Уровень регуляции
Транскрипционные факторы		
HIF-1	Гипоксический транскрипционный фактор	Стабильность белка
HIF-1 α	Субъединица HIF-1	Стабильность белка
AP-1	Стресс-активируемый транскрипцион. фактор	Транскрипция, стабильность мРНК
jun	Субъединица AP-1	Высвобождение ингибиторной частицы IkB
NF κ B	Стресс-активируемый транскрипционный фактор	Транскрипция, синтез белка?
p53	Транскрипционный фактор, опухолевый супрессор, регулятор индуцированного гипоксией апоптоза	Транскрипция
Ростовые факторы		
EPO	Эритропоэтин	Транскрипция, стабильность мРНК
VEGF	Главный ангиогенный фактор в опухолях, регулятор сосудистой проницаемости	Транскрипция, стабильность мРНК
PDECGF	Ангиогенный ростовой фактор	Синтез белка ?
Регуляторы кровотока		
NOS	Регулятор вазодилатации, антицитотоксическая защита	Транскрипция ? Конститутивная экспрессия ?
ecNOS (эндотелиальных клеток)	Регулятор вазодилатации	Транскрипция
iNOS (индуцибельный)	Регулятор вазодилатации, антицитотоксическая защита	Транскрипция
EDN-1	Эндотелин, вазоконстриктор	

также потенцирует гипоксическую активацию. Идентифицированы HIF-1 α -подобные белки EPAS1 (endothelial PAS1) и HLF (HIF-1 α -like factor).

Гипоксия может также влиять на эпигенетические механизмы генной регуляции, а именно на процесс метилирования. HIF-1-связы-

вающие сайты в промоторах генов-мишеней (например, гена эритропоэтина) содержат CpG-островки, метилирование которых может отменять генную активацию.

В условиях гипоксии повышается экспрессия VEGF, а при реоксигенации уровень мРНК VEGF возвращается к норме. Экспрессия гена EDN1 (6p23–24) потенциального вазоконстриктора эндотелина-1 находится под контролем HIF-1. VEGF усиливает секрецию эндотелина-1, а эндотелин-1 усиливает экспрессию и секрецию VEGF. Экспрессия VEGF в условиях гипоксии регулируется на всех уровнях:

- ✓ транскрипции (гипоксииндуцированный ответ зависит от последовательности HRE [hypoxia regulated element] в 5'- и 3'-областях гена VEGF);
- ✓ стабильности мРНК (3'-нетранслируемый район мРНК VEGF содержит гипоксииндуцибельный сайт связывания РНК с белком HuR, повышающим стабильность РНК);
- ✓ трансляции (5'-нетранслируемый район мРНК VEGF формирует структуру, которая облегчает трансляцию в условиях гипоксии, когда обычная трансляция подавлена).

PDECGF/TP — эндотелиальный митоген идентичен, как оказалось, ферменту тимидинфосфорилазе, регулирующей клеточный уровень тимидина и превращающей химиотерапевтический препарат 5-фторурацил в цитотоксический агент. PDECGF/TP придает резистентность к гипоксииндуцированному апоптозу и коррелирует с плохим прогнозом при немелкоклеточном раке легкого.

Роль гипоксии в регуляции E-кадгерина. Среда, в которой существуют трансформированные клетки злокачественной опухоли, очень отличается от нормальной ткани. Дезорганизованная архитектура, которая характеризует злокачественность, не обеспечивает эффективного удаления отработанных продуктов метаболизма, и трансформированные клетки продолжают пролиферировать в относительно токсичной среде. Среди специфичных для злокачественной опухоли факторов есть гипоксия, которая приводит к клеточной ишемии и со временем к некрозу опухолевой массы. Гипоксия в опухоли ассоциирована с усилением инвазивности, метастазированием и худшим прогнозом.

Неконтролируемый рост опережает кровоснабжение, и это приводит к гипоксии, нехватке нутриентов и как следствие к некрозу и высвобождению цитокинов, пептидных ростовых факторов и цитотоксических факторов, таких как оксид азота, который действует как свободный кислородный радикал. В результате возникает по-

пуляция клеток, подвергшихся действию сублетальной ишемии, с редуцированной клеточной адгезией и повышенным уровнем генетической нестабильности, которая стимулирует ангиогенез. С вращением сосудов в опухолевую массу и восстановлением ее кровоснабжения появляются клеточные клоны с более агрессивным поведением и метастатическим фенотипом. Трансформированные, слабо прикрепленные клетки с редуцированной экспрессией Е-кадгерина имеют теперь идеально благоприятные возможности проникать в смежные ткани, используя все существующие механизмы метастатического каскада. Эта гипотеза постулирует, что, хотя развитие гипоксии внутри опухоли существенно для инициации и промоции метастатического каскада, главным обстоятельством, позволяющим опухоли приобрести метастатический потенциал, является ангиогенный ответ. Действительно, ростовой фактор EGF и цитокин TNF α , высвобождаемые в ответ на гипоксию, подавляют экспрессию Е-кадгерина, а EGF к тому же оказывает протективное действие на клетки, подвергшиеся действию гипоксии. Образование оксида азота в опухолях высокой степени злокачественности может обеспечить позитивный ростовой сигнал в гипоксической внутриопухолевой среде, увеличение плотности сосудов, усиление роста и инвазивности. Активатор плазминогена урокиназного типа и его рецептор, IL-8 и гипоксиииндуцибельный фактор 1 α , экспрессия которых индуцируется гипоксией, усиливают инвазивность и метастатический потенциал опухолевых клеток.

5.10. КЛИНИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ ФАКТОРОВ МЕТАСТАЗИРОВАНИЯ

Один из основных признаков, характеризующих развитие опухоли, — это ее вторичное распространение. Опухолевая эволюция ассоциирована с генетической нестабильностью, которая приводит к появлению клеточных вариантов, имеющих более агрессивные свойства, и вовлечению в патогенез, прогрессию и прогноз рака широкого спектра биологических процессов. Множественные генетические механизмы, вовлеченные в инвазивное и метастатическое поведение опухоли, дифференциально экспрессируются в нормальных тканях и их соответствующих неопластических двойниках и влияют на опухолевый рост и прогрессию. Изучение профилей генной экспрессии, специфичных для разных типов опухолей, позволило сформулировать концепцию опухолевой прогрессии, со-

гласно которой опухоль реализует собственную уникальную «метастатическую программу». Генетические и биохимические детерминанты инвазии и метастазирования являются прогностическими факторами выживаемости и мишенями специфической терапии, направленной на подавление ангиогенеза, инвазии и роста отдаленных метастазов.

В мультивариантном анализе показано прогностическое значение экспрессии протеолитических факторов и их ингибиторов относительно ответа на противоопухолевую терапию, риска образования метастазов и выживаемости пациентов. Такие данные получены о роли катепсина В, ассоциированного с метастазированием белка S100A4, факторов инвазии и ангиогенеза uPA, PAI-I и VEGF. Катепсины D и L и PAI сохраняют независимое прогностическое значение даже через 10 лет наблюдения. Установлена корреляция с агрессивным клиническим поведением опухоли и прогностическая ценность катепсина D и PAI в отношении ответа первичной инвазивной опухоли молочной железы на адъювантную терапию.

Во многих случаях картина усложняется тем, что не абсолютный уровень, а соотношение уровней белка и его ингибитора играет определяющую роль и имеет прогностическое значение, как это наблюдается для цистеинпротеаз и их ингибиторов, участвующих в процессах васкуляризации, инвазии и метастазирования.

Глава 6

НОВАЯ ПАРАДИГМА И НОВЫЕ МИШЕНИ ТЕРАПИИ РАКА

6.1. КОНЦЕПЦИЯ ТЕРАПИИ СИГНАЛЬНОЙ ТРАНСДУКЦИИ

Из информации, изложенной в предыдущих главах, следует, что причины злокачественной трансформации кроются в комплексном нарушении функционирования генетических систем, контролирующих жизнь и смерть клетки, обусловленном активирующими мутациями протоонкогенов и повреждающими мутациями опухолевых супрессоров. Многие онкогены характерны для широкого круга опухолей, некоторые проявляют тканеспецифичность. Различия их онкогенного потенциала и распространенности связаны с уровнем регуляции клеточного деления.

1-й уровень — экстраклеточные сигналы деления: цитокины, гормоны и другие ростовые факторы. Мутации, приводящие к усиленной секреции какого-либо ростового фактора, будут способствовать усиленной пролиферации соответствующих клеток-мишеней. Ростовые факторы относительно тканеспецифичны, поэтому для разных видов опухолей характерны свои наборы онкогенов, контролирующих ростовые факторы.

2-й уровень — рецепторы ростовых факторов. В большинстве случаев они состоят из 3 доменов: экстраклеточного, трансмембранного и цитоплазматического. Цитоплазматический домен рецепторной молекулы, как правило, обладает тирозинкиназной активностью и фосфорилирует тирозиновые остатки в молекулах цитоплазматических белков, передающих сигнал по внутриклеточному сигнальному пути. При взаимодействии экстраклеточного домена с лигандом (внеклеточным сигналом) конформация рецепто-

ра изменяется, и цитоплазматический домен активируется. В опухолях различных типов часто встречаются мутации, приводящие к усиленной экспрессии и/или конститутивной активации рецепторов ростовых факторов.

3-й уровень — цитоплазматическая сигнальная система. После активации клеточных рецепторов факторов роста они запускают каскад сигнальной трансдукции, т.е. механизм многоэтапной передачи сигнала в ядро клетки и подготовки клеточного деления. Онкогенные свойства сигнальным молекулам придают активирующие мутации. Мишенью сигнальной трансдукции являются циклиновые комплексы, управляющие прогрессией клеточного цикла через фазы роста и фазы синтеза. В опухолевых клетках все эти молекулы часто бывают мутационно изменены.

4-й уровень — ядерные онкогены и антионкогены — факторы транскрипции. Вступление клетки в цикл деления требует экспрессии около 100 генов. Транскрипционные факторы, активированные в результате сигнальной трансдукции, связываются с регуляторными элементами генов раннего ответа и инициируют синтез РНК или способствуют усилению транскрипции.

В ходе опухолевой прогрессии в клетках опухоли появляются все новые генетические изменения, и в полностью трансформированных злокачественных клетках имеются нарушения сразу на нескольких уровнях регуляции клеточного деления.

Генетическая нестабильность, присущая клеткам злокачественных опухолей, большое количество мутационно поврежденных генов-супрессоров и активированных онкогенов, с одной стороны, и развитие онкологии, ее методологической базы, — с другой, породили проблему рационального выбора диагностических, прогностических, а теперь и терапевтических опухолевых маркеров. В настоящее время благодаря знанию молекулярных механизмов трансформации развиваются новые терапевтические подходы: 1) ингибирование клеточного цикла и неоангиогенеза с помощью нового класса противоопухолевых агентов — ингибиторов с индивидуальной специфичностью; 2) иммунотерапия с применением моноклональных антител против онкобелков; 3) блокирование трансляции онкобелков антисмысловыми олигонуклеотидами к онкогенным мРНК.

Раковая клетка лишена сложно переплетенной сигнальной сети, которая характеризует нормальную клетку. Ее жизнь зависит от немногих, но усиленно функционирующих сигнальных путей, придающих ей селективное преимущество перед окружающей нормальной тканью. Однако те же конститутивно экспрессирующиеся

сигнальные элементы раковой клетки, которые позволяют ей бесконтрольно пролиферировать и лишают ее чувствительности к индукции клеточной смерти, являются ее «ахиллесовой пятой». Их существование создает возможность «перекрыть» сигнальные пути, трансформирующие клетку, и причинить ей тем самым смертельный вред с минимальным ущербом для пограничных нормальных клеток, остающихся жизнеспособными. Данное рассуждение послужило предпосылкой для развития нового направления в лечении рака — так называемой *терапии сигнальной трансдукции* (ТСТ). Новая парадигма борьбы со злокачественной опухолью базируется на том, что основную фракцию усиленно функционирующих сигнальных элементов, от которых зависит выживание опухолевых клеток, составляют протеинкиназы, и, следовательно, ингибиторы протеинкиназ в комбинации с проапоптозными агентами эффективно угнетают злокачественный рост и индуцируют апоптоз опухолевых клеток.

В течение последних 20 лет идентифицировано множество соматических онкогенных молекулярно-генетических aberrаций, которые представляют собой потенциальные мишени ТСТ. К новым противоопухолевым лекарственным средствам, препятствующим действию молекулярных механизмов, измененных (конститутивно активированных) в злокачественной клетке, относятся ингибиторы ростовых факторов, их рецепторов и других компонентов сигнальной трансдукции, а также антитела к онкобелкам и антисмысловые олигонуклеотиды, комплементарные онкогенным мРНК (рис. 6.1, см. вклейку). Противоопухолевые агенты второго поколения дают синергический эффект в сочетании с традиционными цитостатиками, антиметаболитами и модуляторами апоптоза, они клинически активны у пациентов с рефрактерными к химиотерапии опухолями, у пациентов с поздними и даже претерминальными стадиями заболевания. Умеренная токсичность современных противоопухолевых препаратов, которая объясняется их специфическим летальным действием на опухолевые, но не на здоровые клетки, позволяет оптимизировать дозы применяемых лекарств и добиваться максимального ингибирования молекул-мишеней.

6.2. СИНТЕТИЧЕСКИЕ ИНГИБИТОРЫ СИГНАЛЬНОЙ ТРАНСДУКЦИИ

Исследование структуры и функций тирозинкиназных рецепторов семейства EGFR и их роли в инициации и прогрессии различ-

ных опухолей привело к поиску ингибиторов сигнальных молекул, которые могли бы сделать лечение рака более избирательным (и, следовательно, менее токсичным) и эффективным. Комплексная природа биологических свойств EGFR благоприятствует влиянию EGFR-ингибиторов одновременно на пролиферативный, ангиогенный, инвазивный и метастатический аспекты противоопухолевой терапии. Инактивация EGFR-зависимых сигнальных путей возможна либо при связывании экстраклеточного лиганд-связывающего домена моноклональными антителами и лиганд-связывающими цитотоксическими агентами, либо при взаимодействии низкомолекулярных ингибиторов с внутриклеточным киназным доменом. В последние 3 года достигнут значительный прогресс в создании новых синтетических ингибиторных молекул, комплементарных по структуре и электростатическим свойствам киназному домену EGFR, дизайн которых основан на молекулярном моделировании.

Эпидермальный ростовой фактор и его рецептор часто конститутивно экспрессируются в большинстве опухолей человека и играют важную роль в их клиническом поведении. В исследованиях *in vitro* показано, что ингибиторы тирозинкиназной активности рецептора EGF подавляют рост экспрессирующих его опухолевых клеток. Такие соединения различаются по уровню специфичности к различным членам семейства EGF-рецепторов и обратимости связывания с ними, но главная их особенность заключается в том, что они активны в опухолях многих типов и нетоксичны. Ингибитор тирозинкиназной активности рецептора EGF (erbB1, HER1, EGFR) препарат ZD1839 (EGFR-TKI, iressa) относится к группе обратимо связывающих EGFR и избирательно блокирует пролиферативные и антиапоптозные пути сигнальной трансдукции в опухолевых клетках. Продемонстрирована клиническая активность iressa против немелкоклеточного рака легкого, в том числе рефрактерных к химиотерапии опухолей, карциномы яичника, опухолей головы и шеи, гормон-резистентных опухолей предстательной железы. При лечении больных с различными солидными опухолями отмечено, что препарат iressa не влияет на функцию печени. У пациентов со среднетяжелой и тяжелой печеночной недостаточностью профиль толерантности к iressa не отличался от такового у больных с нормальной функцией печени.

Новая программа полихимиотерапии химиорезистентного немелкоклеточного рака легкого включает препараты genistein, vinorelbine, fostriecin и celecoxib. Тирозинкиназный ингибитор genistein подавляет активность EGFR, Ras и дальнейшую передачу митогенного

сигнала через Raf/MEK/MAPK-, PI3K/Akt- и STAT3-пути сигнальной трансдукции. Ингибция EGFR угнетает пролиферацию и дезорганизует клеточную систему актиновых микрофиламентов. Кроме того, он ингибирует циклин В, Cdk2, VEGF и MMP2 и фосфорилирует p53, что приводит к индукции ингибиторов циклинзависимых протеинкиназ p21^{Waf1} и p27^{Kip1}. Синергическое действие fostriecin и genistein ингибирует активность топоизомеразы II. Топоизомераза II — это повсеместно экспрессируемый ядерный белок, который катализирует топологические изменения, необходимые для репликации и транскрипции, а именно двуцепочечные разрывы ДНК с образованием интермедиатов ДНК/фермент. Ингибиторы топоизомеразы II (антрациклины и эпиподофиллотоксины) стабилизируют ковалентные связи в комплексе, формируемом между топоизомеразой II и ДНК, и способствуют накоплению двуцепочечных разрывов и ДНК-протеиновых сшивок. Генотоксические повреждения потенциально стимулируют апоптоз, который и обуславливает антинеопластический эффект терапии. Наконец, genistein отделяет эпителиальные опухолевые клетки от ЭКМ, вызывая этим их аноикис. Fostriecin, кроме того, индуцирует aberrантную амплификацию центросом и формирование аномального митотического веретена. Celecoxib активирует опухоль-инфильтрирующие Т-лимфоциты, которые секретируют противоопухолевые цитокины IFN- γ , TNF α и IL-2 с последующей активацией натуральных киллеров. Vinorelbine фосфорилирует и инактивирует антиапоптозный белок Bcl2, а также нарушает митоз. Формирующиеся апоптозные тельца подвергаются фагоцитозу соседними опухолевыми клетками. Клинические исследования показали, что комбинированные эффекты компонентов данной программы ПХТ способствовали эрадикации опухоли в обход механизмов химиорезистентности.

Константно активированный специфической мутацией тирозинкиназный рецептор фактора стволовых клеток (stem cell factor, SCF) c-kit является причиной развития редкого типа гастроинтестинальных стромальных опухолей (gastrointestinal stromal tumor, GIST). Непрерывная пролиферация стромального злокачественного фенотипа происходит даже в отсутствие лиганда SCF, но может быть прекращена специфическим ингибитором c-kit — препаратом imatinib (gleevec). Применение этого препарата позволяет ингибировать опухолевый рост у 80–90% пациентов, но реальный регресс опухоли наблюдается редко. Описано клиническое наблюдение 47-летней пациентки с GIST и метастазами в печень в претерминаль-

ной стадии. Несмотря на тяжелое общее состояние, ей назначили *imatinib*, в результате чего была достигнута ремиссия. Спустя 10 месяцев после начала терапии компьютерная томография выявила множественные очаги кальцификации в первичной опухоли и печеночных метастазах. Этот случай иллюстрирует новый критерий радиологической оценки опухолевого ответа. Лечение эффективными мишень-специфичными противоопухолевыми агентами может вызвать вместо регресса остановку роста и кальцификацию опухоли.

Онкобелок *Ras*, который является важным элементом одного из центральных модулей сигнальной трансдукции, ответственных за контроль многих клеточных процессов, в том числе пролиферации, дифференцировки, ангиогенеза и апоптоза, экспрессируется повсеместно и часто мутирует в разных типах опухолей человека, поэтому он был одним из первых идентифицирован как мишень химиотерапии. Для функциональной активации он должен быть фарнезиллизован ферментом фарнезилтрансферазой (ФТ), которая присоединяет к белку 15-членную жирную кислоту. Посттрансляционная модификация позволяет привязать белок *Ras* к плазматической мембране. Следовательно, ингибитор ФТ, инактивируя белок *Ras*, блокирует пролиферацию и тем самым оказывает терапевтическое действие. Избирательное ингибирование ФТ разрушает многие сигнальные *Ras*-зависимые пути сигнальной трансдукции, которые патологически активированы в опухолевых клетках. Ингибиторы ФТ оказывают антипролиферативное, антиангиогенное и проапоптозное действие во множестве клеточных линий опухолевого происхождения. К классу ингибиторов ФТ, которые не обладают сильно выраженной токсичностью и, возможно, будут предложены для клинического использования, относятся вещества SCH66336, R115777 и BMS214662. Потенциальный ФТ-ингибитор R115777 (ZARNESTRA™) проявил противоопухолевую активность с приемлемым уровнем токсичности при ОМЛ и всех типах МДС, включая группы неблагоприятного прогноза. Дальнейшие исследования направлены на поиск молекулярных прогностических маркеров, способных предсказать клинический ответ на использование ингибиторов ФТ в лечении рака.

Мишенями специфической ингибиции митоген-активированных эффектов может быть не только сам белок *Ras*, но и его эффекторы — протеинкиназы *Raf-1*, *MEK1* и *MEK2*. Ингибитор *Raf-1*-киназы препарат BAY43-9006 и *MEK*-киназный ингибитор CI-1040 продемонстрировали в фазе I клинических испытаний биологическую активность

в опухолевых тканях, способность профиликтировать метастатическую прогрессию и хорошую переносимость больными.

Одной из новых терапевтических мишеней в онкологии является неоангиогенез, формирование новых кровеносных сосудов растущей опухоли, регулируемое балансом про- и антиангиогенных условий. Антиангиогенная терапия направлена на нормальные, генетически стабильные эндотелиальные клетки. Несмотря на избыточность ангиогенных медиаторов и множественность путей ангиогенной активации, появились новые терапевтические средства, такие как ингибиторы рецепторных тирозинкиназ, инактивирующие сигналинг через VEGF и VEGFR и способные существенно подавлять опухолевый ангиогенез. Показано, что использование ингибиторов онкопротенинов повышает эффективность радио- и химиотерапии. К сожалению, многие новые ингибиторы проявляют не только антиангиогенные свойства, но и определенную токсичность, поэтому важнейшей задачей является поиск их оптимальных комбинаций с другими цитотоксическими агентами для включения в программы противоопухолевой терапии и повышения выживаемости пациентов.

Примером успешного применения нового подхода — терапии определенного вида опухоли, направленной на конкретную молекулярную мишень, — служит создание препарата STI-571. Конститутивная тирозинкиназная активность химерного белка BCR-ABL является причиной злокачественной трансформации почти во всех случаях ХМЛ и подходящей мишенью фармакологической ингибции. ABL-специфичный ингибитор сигнальной трансдукции соединение STI-571 (малая ингибиторная молекула) инактивирует химерную протенинкиназу, которая является продуктом гибридного гена Bcr-Abl и избирательно убивает BCR-ABL-экспрессирующие клетки *in vitro* и *in vivo*. Судя по результатам клинических исследований, STI-571 будет эффективным дополнением в лечении ХМЛ.

Ингибитор STI-571 проявляет активность также по отношению к молекуле c-kit, тирозинкиназному рецептору фактора стволовых клеток SCF и ростового фактора тромбоцитарного происхождения PDGF, позволяет получить хороший клинический ответ не только у пациентов с Bcr-Abl-позитивным ХМЛ, но и c-kit-позитивными гастроинтестинальными стромальными опухолями.

Ингибирование протеосомы является причиной остановки клеточного цикла и апоптоза. Протеосома — это мультикаталитический фермент, присутствующий во всех клетках организмов от дрожжей до человека, который играет центральную роль в протеолитической деградации поврежденных и большинства различных коротко-

живущих внутриклеточных белков, вовлеченных в контроль клеточного цикла и генной экспрессии. Сотни копий протеосомы обнаруживаются в цитоплазме и ядре клеток и составляют до 3% всех клеточных белков. В число субстратов протеосомы входят циклины, сигнальные белки, ингибиторы циклинзависимых киназ и другие регуляторные белки. Протеосома участвует в корректной синхронизации продукции и деградации этих белков, поэтому ее функциональная активность исключительно важна для регуляции клеточного цикла. Одна из важнейших мишеней протеосомной активности – транскрипционный фактор NFκB, который регулирует экспрессию цитокинов (IL-1, -6, -8, TNF), факторов ангиогенеза (VEGF), молекул клеточной адгезии (ICAM и VCAM), антиапоптотических факторов (Bcl2, сюрвивин) и других клеточных белков. Стимуляция клеток ростовыми факторами запускает каскад сигнальных событий, приводящих к деградации протеосомой латентного комплекса NFκB/IκB и высвобождению активного NFκB. Ингибиторы протеосомы (ИП) стабилизируют комплекс NFκB/IκB и предотвращают активацию фактора NFκB.

Опухолевые клетки более чувствительны к проапоптотному эффекту ИП, чем нормальные, и это обстоятельство используется в противораковой фармакологии. Протеосомный ингибитор PS-341 (bortezomid, VELCADE™), первый агент класса ИП, влияет на процессы злокачественного роста, проявляя аддитивную или синергическую противоопухолевую активность в комбинации со стандартными химиотерапевтическими агентами в лечении солидных опухолей толстой кишки, яичников, поджелудочной, предстательной и молочной желез и гематологических опухолей. Ингибирование протеосом в клетках разных типов опухолей инициирует клеточную смерть различными механизмами, включая стабилизацию опухолесупрессорных белков, ассоциированных с остановкой клеточного цикла (например, p21 и p27), стабилизацию проапоптотических белков (например, p53), редукцию активности транскрипционных факторов (например, NF-κB, имеющего ряд рост-стимулирующих эффектов). PS-341 способствует преодолению химиорезистентности независимо от механизма ее возникновения (гиперэкспрессия антиапоптотического белка Bcl2 или онкогена NF-κB) и промотирует апоптоз опухолевых клеток.

В экспериментальных моделях PS-341 лимитирует ангиогенез и образование метастазов. По результатам клинических исследований, PS-341 обладает противоопухолевой активностью и удивительно низкой токсичностью у пациентов с солидными (предстательной железой, толстой кишки, почки, легкого и др.) и гематологическими (ММ,

НХЛ, лейкозы) опухолями. Алоpecia, желудочно-кишечные расстройства и миелосупрессия наблюдаются редко. Наиболее перспективным признано применение PS-341 в лечении ММ, так как он влияет на миеломоспецифичные сигнальные пути и микросреду костного мозга. Текущие клинические протоколы включают изучение поведения молекулярно-генетических маркеров, которые являются мишенью PS-341.

Перспективными агентами для терапии солидных опухолей считаются бифункциональные («двуглавые») ингибиторы, подавляющие активность катепсинов В и L, а также взаимодействие урокиназы с ее мембранным рецептором uPAR, ингибиторы $\alpha V\beta 3$ -интегрина и теломеразы, способные предотвратить инвазию и метастазирование, даже если не могут быстро убить опухоль.

Белки семейства HSP (heat shock protein) обладают цитопротективной активностью и часто гиперэкспрессируются в злокачественно трансформированных клетках. Они защищают клетки не только от теплового шока, но и от большинства проапоптозных факторов, в частности, от химиотерапии и гиперэкспрессии каспазы 3. Пептидсвязывающие свойства стрессовых белков используют в иммунотерапии при создании противоопухолевых вакцин. Особенно эффективны в борьбе против рака растворимые комплексы из опухолеассоциированных антигенов с низкомолекулярными белками теплового шока (soluble low-molecular-mass heat shock proteins and tumor-associated antigens, STAA). Такие комплексы обладают не только терапевтической, но и профилактической противоопухолевой активностью. На экспериментальных моделях показано, что STAA оказывают опухолесупрессорное и опухолепревентивное действие, так как способны предупреждать развитие химически индуцированных опухолей толстой кишки, кожи и молочной железы. Эти эффекты связаны с активацией иммунной системы, особенно Т- и В-лимфоцитов.

Противоопухолевая вакцина HSPPC-96 (oncoprage) прошла клинические испытания в онкологических центрах ряда стран, в которых приняли участие пациенты с опухолями желудка, толстой кишки, поджелудочной железы, почки, меланомы, неходжкинскими лимфомами и саркомами после хирургического лечения. Oncoprage представляет собой аутологичный иммунотерапевтический комплекс из HSP опухолевого происхождения, «сшитых» с опухолевыми антигенами. При введении вакцины oncoprage в организм пациента антигенные опухолевые пептиды экспрессируются на поверхности антиген-презентирующих иммунных клеток (макрофагов и дендритных клеток). Это стимулирует значительно более мощный

противоопухолевый иммунный ответ, нежели тот, который может быть генерирован экспрессией самого антигена опухолевыми клетками. Особую привлекательность этой технологии придает высокая индивидуальная специфичность, которая сочетается с возможностью обойтись без идентификации специфичных антигенов опухолевых клеток и определения их антигенных эпитопов. Ее применение позволяет преодолеть иммунную толерантность большинства злокачественных опухолей. В настоящее время более 500 пациентов с раком почки принимают участие в проведении фазы III международного многоцентрового рандомизированного исследования клинической эффективности вакцины oncophage.

Белок Hsp90 — молекулярный шаперон, обеспечивающий стабильность и функционирование многих мутантных, химерных и гиперэкспрессирующихся сигнальных белков, промоторов роста и/или выживания раковых клеток, таких как мутантный p53, Akt и HIF-1 α (hypoxia inducible factor 1 alpha), тирозинкиназы v-Src, Bcr-Abl, серин/треонинкиназа Raf-1, тирозинкиназный рецептор ErbB2, некоторые ростовые факторы и стероидные рецепторы, поэтому Hsp90-активные соединения инактивируют ряд онкобелков и индуцируют их протеосомную деградацию. В зависимости от клеточного контекста Hsp90-активные агенты вызывают остановку роста, дифференцировку или апоптоз клетки. Атакую такую неспецифичную мишень как белок Hsp90, Hsp90-активные соединения убивают предпочтительно опухолевые клетки, так как в них определяется повышенная экспрессия белка Hsp90 и «обслуживаемых» им белков. Hsp90-специфичные ингибиторы, взаимодействующие с единственной молекулярной мишенью, обуславливают стабилизацию и последующую деградацию Hsp90-зависимых белков и оказывают противоопухолевое действие в доклинических модельных системах. Один из таких ингибиторов, 17-аллиламиногелданамицин (17-allylaminogeldanamycin, 17AAG), в настоящее время проходит клинические испытания. Поскольку некоторые Hsp90-зависимые белки обладают химиопротективными свойствами, комбинация ингибитора Hsp90 со стандартными химиотерапевтическими препаратами резко усиливает их клиническую эффективность.

6.3. МОНОКЛОНАЛЬНЫЕ АНТИТЕЛА

Одно из новых направлений иммунотерапии рака связано с технологией получения рекомбинантных моноклональных антител, кото-

рые блокируют связывание экстраклеточного домена молекулы рецептора с лигандом или активность онкобелков на посттрансляционном уровне. Рекомбинантные моноклональные антитела trastuzumab (Herceptin®; «Genetech», USA), созданные для лечения метастазирующих опухолей молочной железы, направлены против трансмембранного гликопротеинового тирозинкиназного рецептора HER2 с молекулярной массой 185 кДа, ассоциированного с неблагоприятным прогнозом (рис. 6.2, см. вклейку). Гиперэкспрессия p185HER2 коррелирует с метастазированием в лимфатические узлы и отдаленные органы, а также с высоким риском рецидивирования и пониженной общей и безрецидивной выживаемостью. Клеткой-мишенью trastuzumab является опухолевая клетка молочной железы, гиперэкспрессирующая p185HER2, но он оказался способным ингибировать пролиферацию и клеточной линии из аденокарциномы желудка, гиперэкспрессирующей p185HER2, хотя антипролиферативный эффект слабее по сравнению с таковым в клеточной линии из опухоли молочной железы. Доклинические модельные исследования показали, что herceptin ревертирует резистентность метастатических опухолей молочной железы к тамоксифену в чувствительность, поэтому показания к применению тамоксифена в сочетании с herceptin распространяются и на тамоксифен-резистентные случаи. В рандомизированных исследованиях комбинации herceptin с цитостатиками (vinorelbine, docetaxel, cisplatin, антимаболиты) повышают выживаемость больных, даже если большинство из них получали лечение при рецидиве заболевания. В сочетании с паклитакселем trastuzumab пролонгировал общую выживаемость и повышал качество жизни пациенток с метастатическими опухолями молочной железы.

Комбинированная терапия в основном является эмпирической, и оптимальные режимы применения herceptin в клинической практике пока не известны. Многие вопросы остаются без ответа и нуждаются в дальнейших исследованиях, например, как долго может или должно продолжаться лечение пациенток в полной или стабильной частичной ремиссии.

25–30% опухолей молочной железы гиперэкспрессируют рецептор HER2. Trastuzumab связывает экстраклеточный домен HER2 и ингибирует их пролиферацию, особенно в сочетании с цитостатиками таксановой группы (паклитаксел). Предложено применение комбинированной схемы паклитаксел+trastuzumab в качестве терапии 1-й линии и trastuzumab как единственного противоопухолевого препарата в качестве терапии 2-й или 3-й линии для лечения пациенток с метастатическими опухолями молочной железы, гипер-

реэкспрессирующими HER2. В настоящее время исследования направлены на определение оптимальных комбинированных режимов с использованием trastuzumab и антинеопластических препаратов, числа курсов, последовательности и длительности лечения.

Препарат ритуксимаб (Rituximab, лимфомоспецифичные анти-CD20-моноклональные антитела) — новое терапевтическое средство, созданное специально для лечения больных В-клеточными лимфомами с неблагоприятным прогнозом. Пациенты с фолликулярной лимфомой, которые после лечения по стандартной программе ХТ были в полной клинической ремиссии, но в крови и/или костном мозге которых имелись резидуальные опухолевые клетки, получили дополнительное лечение ритуксимабом. Комбинация ритуксимаба с другими препаратами индуцировала клиническую ремиссию у всех пациентов и молекулярную у большинства. Присоединение ритуксимаба к высокодозной химиотерапии позволило получить у всех первичных пациентов с индолентными НХЛ поздних стадий полную клиническую и молекулярную ремиссию без угрожающей жизни токсичности, но при лечении пациентов с рецидивом или рефрактерным заболеванием следует учитывать риск тяжелых осложнений. Терапевтическая эффективность ритуксимаба после химиотерапии или трансплантации достигает 70%, а общая 3-летняя выживаемость всей группы пациентов, леченных ритуксимабом, — 95%. Как показал молекулярный анализ, использование ритуксимаба помогает увеличить количество аутотрансплантатов, свободных от лимфомной контаминации. Применение ритуксимаба для уменьшения опухолевой массы у пациентов с индолентными CD20-позитивными лимфомами позволяет снизить интенсивность кондиционирующей химиотерапии и соответственно выраженность токсических эффектов и смертность пациентов, а значит, расширить возможности использования аллогенной трансплантации стволовых клеток крови у тех пациентов, для которых этот вид терапии считался до сих пор непригодным.

Cetuximab (IMC-C225) — рекомбинантные моноклональные антитела против экстраклеточного домена рецептора эпидермального ростового фактора (EGFR). Проведено клиническое исследование эффективности cetuximab в комбинации со стандартным режимом лечения метастатического колоректального рака, принятым в Европе, который включает иринотекан, 5-фторурацил и фолиевую кислоту. Более половины EGFR-позитивных пациентов с рефрактерными к стандартной химиотерапии опухолями толстой кишки в стадии IV, которые получили лечение по этой комбинированной

схеме, достигли ремиссии. В сочетании с радиотерапией cetuximab позволил получить полную ремиссию у 14 из 15 пациентов с опухолями головы и шеи поздних стадий (фаза I клинических исследований). Продемонстрирована противоопухолевая активность cetuximab в комбинации с цисплатиной при немелкоклеточном раке легкого, с гемцитабином при опухолях поджелудочной железы и с СРТ-11 при колоректальном раке (фаза III клинических исследований).

ING-1(heMAb) — высокоаффинные моноклональные антитела против E-CAM, адгезионной молекулы эпителиальных клеток, потенциально способствующие гибели опухолевых клеток от антитело-зависимой клеточной токсичности и комплемент-опосредованного цитолиза. У экспериментальных животных ING-1(heMAb) ингибируют развитие опухоли и формирование метастазов из привитых опухолевых клеток.

Моноклональные анти-CD33-антитела CMA-676 могут способствовать достижению полной ремиссии у некоторых пациентов с рефрактерным или рецидивирующим ОМЛ и последующей аллогенной трансплантации стволовых клеток.

6.4. АНТИСМЫСЛОВЫЕ ОЛИГОНУКЛЕОТИДЫ

Принцип антисмысловой технологии заключается в гибридизации коротких (13–25 нуклеотидов) синтетических антисмысловых олигонуклеотидов (АСО) с определенными последовательностями в мРНК. Образование такого дуплекса препятствует процессу сплайсинга мРНК или трансляции белка, вовлеченного в патогенез заболевания. Фермент РНКазы H распознает мРНК-олигонуклеотидные комплексы и расщепляет мРНК, оставляя АСО интактным. Освободившийся из дуплекса АСО может связываться с другой молекулой мРНК и т.д. Привлекательность методу придает высокая избирательность специфического связывания. Ряд АСО, в том числе к мРНК онкобелков MDM2, Bcl-X_L, RelA, Ras, Bcr-Abl, JNK1 и 2, c-Myc и c-Myc, проявили противоопухолевую активность *in vitro* и в экспериментальных моделях. АСО к мРНК протеинкиназы Cα, протеинкиназы A, ДНК-метилтрансферазы, Bcl2 и Raf проходят клинические испытания. Они проявляют терапевтическую активность и хорошо переносятся пациентами.

Белок сюрвивин (survivin) — член семейства ингибиторов проапоптозных белков IAP, который экспрессируется только в злокачественных опухолях. Экспрессия сюрвивина укорачивает жизнь па-

пациентов, так как положительно коррелирует с пролиферацией, ангиогенезом и ингибированием апоптоза. В исследованиях *in vitro* и *in vivo* антисмысловые олигонуклеотиды к мРНК гена BIRC5 (baculoviral IAP repeat-containing 5, survivin) индуцируют апоптоз, редуцируют опухолевый потенциал и сенсибилизируют клетки опухоли к химио- и радиотерапии, что привлекает к нему внимание как к новому диагностическому маркеру и терапевтической мишени. АСО к нуклеотидам 232–251 мРНК сюрвивина индуцирует апоптоз в клетках опухолей легкого и сенсибилизирует их к химиотерапии.

Высокая экспрессия каталитической субъединицы теломеразы (hTERT) ассоциируется с плохим ответом на лечение, быстрым рецидивом и неблагоприятным исходом заболевания у пациентов с различными опухолями, включая нейробластома, карциномы желудка, молочной железы, легкого, хроническую лимфоцитарную лимфому, менингиому и опухоль Вилмса. В общей сложности 80–90% злокачественных опухолей проявляют теломеразную активность. Показано, что у пациентов с карциномой поджелудочной железы теломеразная активность может быть диагностическим и прогностическим маркером. Теломеразная активность коррелирует не столько с пролиферацией непосредственно, сколько с миграцией и инвазией клеток. Ее ингибирование антисмысловыми олигонуклеотидами увеличивает чувствительность опухоли к индуцированному традиционной цитостатической химиотерапией апоптозу.

Цитокин остеопонтин играет роль в диссеминации различных опухолей. Экспрессия как самого остеопонтина, так и основных его рецепторов (CD44 и $\alpha V\beta 3$ -интегрин) на опухолевых клетках может быть блокирована на уровне мРНК антисмысловыми олигонуклеотидами.

К новым мишеням АСО-терапии, число которых постоянно растет, относятся онкобелки AML1 (21q22), MLL (11q23), TEL (12p13), MLT (18q21), ETO (8q22), NF κ B, HER2/neu; циклинзависимые киназы, рецепторы ростовых факторов VEGFR, bFGFR, матриксные металлопротеиназы, интегрины и белки теплового шока.

6.5. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

До последнего времени лечение рака ограничивалось применением цитотоксических и гормональных агентов. Благодаря информации о молекулярно-генетических механизмах канцерогенеза начинается эра так называемой прицельной терапии. Арсенал средств

борьбы с злокачественными опухолями обогатился принципиально новыми подходами, преследующими цель инактивировать ключевые молекулярные звенья патогенетической цепи. Центральное место среди них занимают тирозинкиназные рецепторы ростовых факторов и сигнальные протеинкиназы. Существует уже ряд соединений, ингибиторов подобных молекулярных мишеней, которые распадаются на два основных класса: моноклональные антитела и низкомолекулярные ингибиторы. Таким образом, лекарственная терапия злокачественных заболеваний переживает переходный период от догеномной цитотоксической эры к новой постгеномной эре. Терапевтические агенты нового поколения, создаваемые на основе знания молекулярных механизмов трансформации, действуют на молекулярные мишени, вовлеченные в патогенез рака. Такие агенты обладают большей избирательностью по отношению к опухолевым клеткам, проявляют значительно меньшую токсичность и легче переносятся пациентами.

ERK1 и 2	?	Онкогены	Extracellular regulated kinases 1 (p42 ^{MAPK}) и 2 (p44 ^{MAPK})
FADD	11q13.3	Супрессор	Fas-associated death domain protein
FLIP/ FLAME	?	Онкоген	FADD-like inhibitor protein
Flt	13q12	Онкоген	Fms-like tyrosine kinase, рецептор VEGF
GADD45	Семейство	Супрессор	Growth arrest and DNA damage-induced
GAP	?	Супрессор	GTPase activating protein
Gas2	11p14.3- 15.2	Супрессор	Growth arrest-specific gene 2
Grb2	17q24-25	Онкоген	Growth factor receptor bound protein 2, белок сигнального каскада
HIF1A	14q21-24	Онкоген	Hypoxia inducible factor 1 α , транскрипционный фактор
h-Mts1	?	Онкоген	Человеческий гомолог мышинного гена 18A2/Mts1
Int2	11q13	Онкоген	Murine mammary tumor virus integration site 2, ростовой фактор FGF-3
IQGAP1	15q26.1	Онкоген	IQ motif containing GTPase activating protein 1
IRF1	5q23-q31	Онкоген	Interferon regulatory factor 1
IRS1 IRS2	2q36 ?	Онкогены	Insulin receptor substrate 1, insulin receptor substrate 2
JNK/SAPK	?	Онкоген	Jun N-terminal kinase / stress-activated protein kinase
c-kit	4q11-q12	Онкоген	R-клеточный гомолог вирусного онкогена v-kit, рецептор фактора SCF
Lef1/Tcf	4q23-q25		Lymphoid enhancer-binding factor 1/ transcription factor
MAPK1	22q11.2	Онкоген	Mitogen-activated protein kinase 1
p38 ^{MAPK}	Семейство	Онкоген	Одна из MAP-киназ
MDM2	12q13	Онкоген	Mouse double minute 2
MDR1	?	Онкоген	
MEK	Семейство	Онкогены	MAP-kinase/ERK-kinase, сигнальные протеинкиназы
C-Met	7q31	Онкоген	Трансмембранная протеинкиназа, рецептор SF/HGF
MKP-1	?	Онкоген	Mitogen activated protein kinase phosphatase 1
Mta1	?	Онкоген	Metastasis associated gene
c-Myc	8q24	Онкоген	Myelocytomatosis
NF1	17q11.2	Супрессор	Neurofibromatosis type 1
NF- κ B1	4q24	Онкоген	Nuclear factor kappa B 1
NF- κ B2	10q24	Онкоген	Nuclear factor kappa B 2

nm23	17q21.3	Супрессор	Non-metastatic cells protein, белок NDP (nucleoside diphosphate kinase)
p21/ WAF1/ CIP1	6p21.2	Супрессор	p21/ wild-type p53 activated fragment 1/ Cdk-interacting protein
p27/Kip1	12p12.3	Супрессор	Ингибитор циклинзависимых киназ
p57/Kip2	11p15.5	Супрессор	Ингибитор циклинзависимых киназ
p53	17p13.1	Супрессор	Транскрипционный фактор
p70S6K	?	Онкоген	p70 ribosomal S6 kinase
PAK2	3	Супрессор	p21 (CDKN1A)-activated kinase 2, про-апоптозный белок
PDK1и 2	?	Онкогены	PtdIns(3,4)P ₂ (3,4,5)P ₃ -dependent kinase
PI3K α β	5q12-q13 19q13	Онкогены	Phosphatidylinositol-3-kinase, α-p85 и β-p85субъединицы PI3-киназы
PLAU	10q24-qter	Онкоген	uPA, plasminogen activator, urokinase
PKA	?	Онкоген	Protein kinase A
PKB/ Akt	?	Онкоген	Protein kinase B
PKC	?	Онкоген	Protein kinase C
PML	15q22	Онкоген	Promyelocytic leukemia
PPARδ	6p21.2	Онкоген	Peroxisome proliferator-activated receptor delta
PP2A	?	Онкоген	Protein phosphatase 2A, ингибитор bcl2
PTEN/ MMAC1	10q23	Супрессор	Phosphatase and tensin homologue deleted / mutated in multiple advanced cancers 1
RBI	13q14	Супрессор	Retinoblastoma susceptibility 1
REL	11q13	Онкоген	NF-κB (nuclear factor kappa B)
Smad	Семейство	Супрессор	Человеческий гомолог гена дрозофилы Mad (Mathers against decapentaplegic), транскрипционный фактор
mSOS1 mSOS2	2p22-p21 14q21	Онкогены	Mammalian son of sevenless homologue (<i>Drosophila</i>)
Src	20q11.2	Онкоген	Sarcoma, сигнальная протеинкиназа
STAT	Семейство	Онкоген	Signal transducer and activator of transcription, транскрипционный фактор
TBP	6q27	Онкоген	TATA-binding protein
TCF	5q31	Супрессор	T-cell factor, транскрипционный фактор
TNF	6p21.3	Супрессор	Tumor necrosis factor (TNF superfamily, member 2)
TRAIL	?	Супрессор	TNF-related apoptosis-inducing ligand
VHL	3p	Супрессор	Von Hippel Lindau syndrome
WNT1	12q13	Онкоген	Wingless-type MMTV integration site family member 1
WT1	11p13	Супрессор	Wilms' tumor, транскрипционный фактор семейства EGR



Рис. 1.1. Пострепликативная репарация.

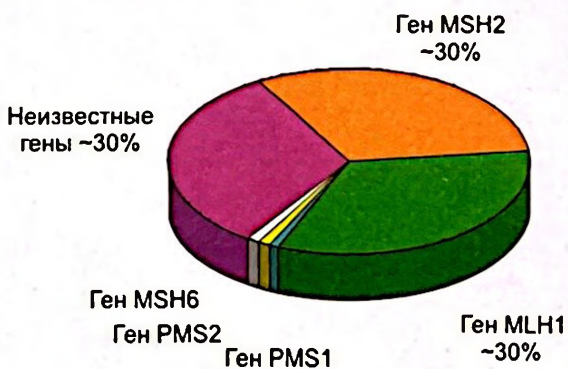


Рис. 1.2. Мутации генов репарации, способствующие развитию неполипозного колоректального рака.

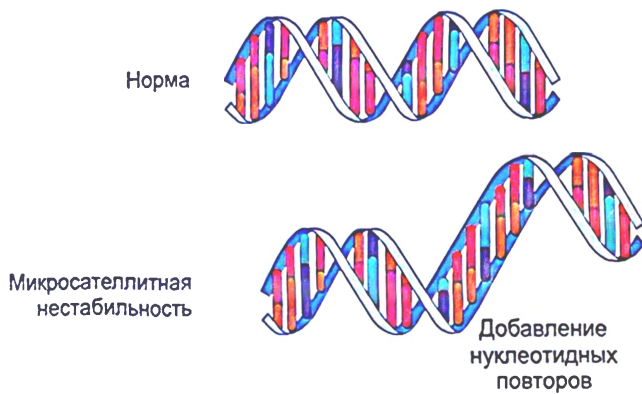


Рис. 1.3. Дефекты пострепликативной репарации, приводящие к МН.

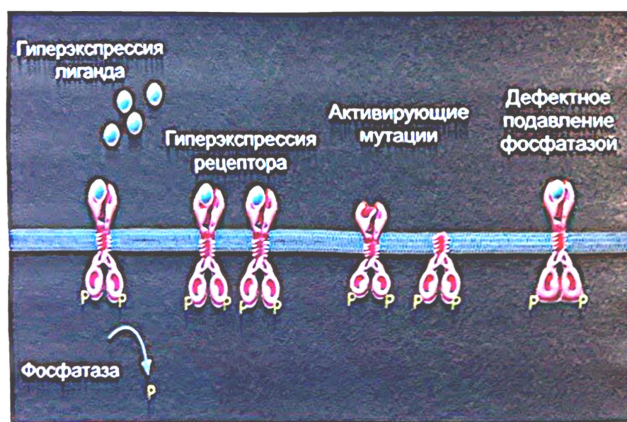


Рис. 1.4. Основные механизмы дерегуляции EGFR.

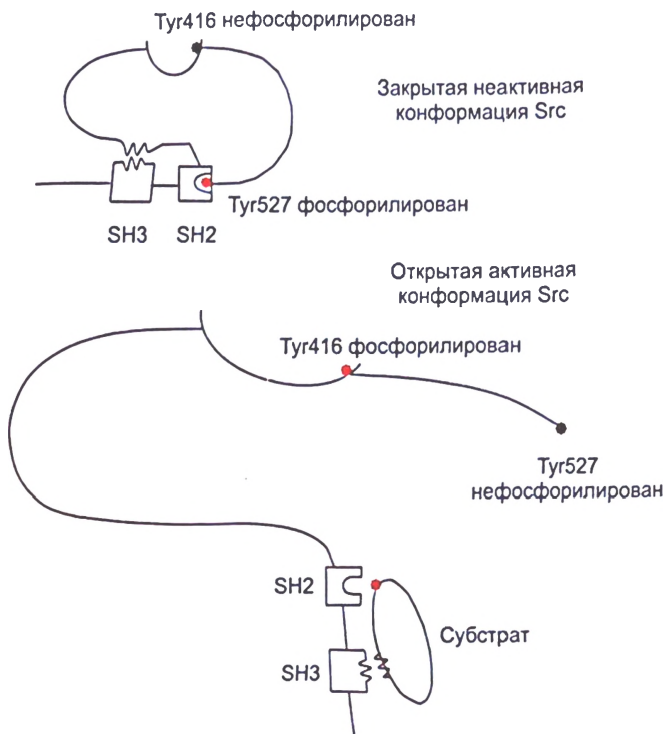


Рис. 2.2. Структура тирозинкиназы Src.

SH2 и SH3 (Src homology) – функциональные субстрат-связывающие домены киназной молекулы.

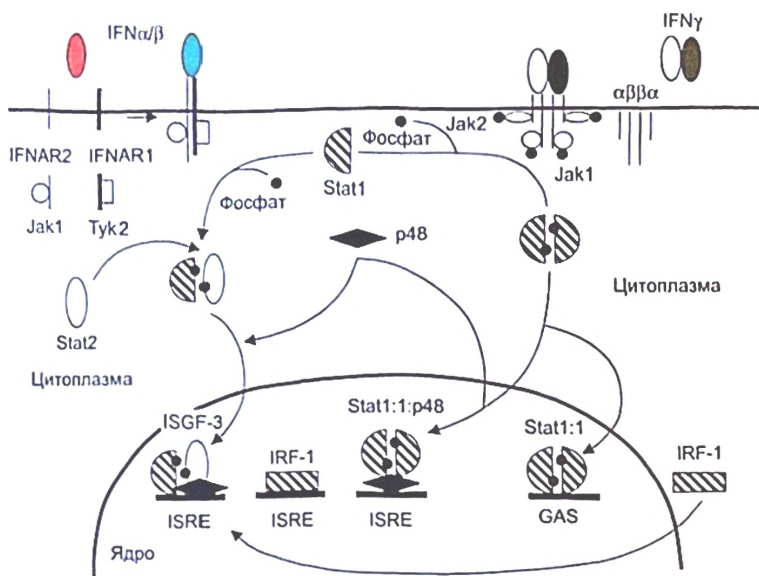


Рис. 2.6. Механизм генной активации интерферонами.

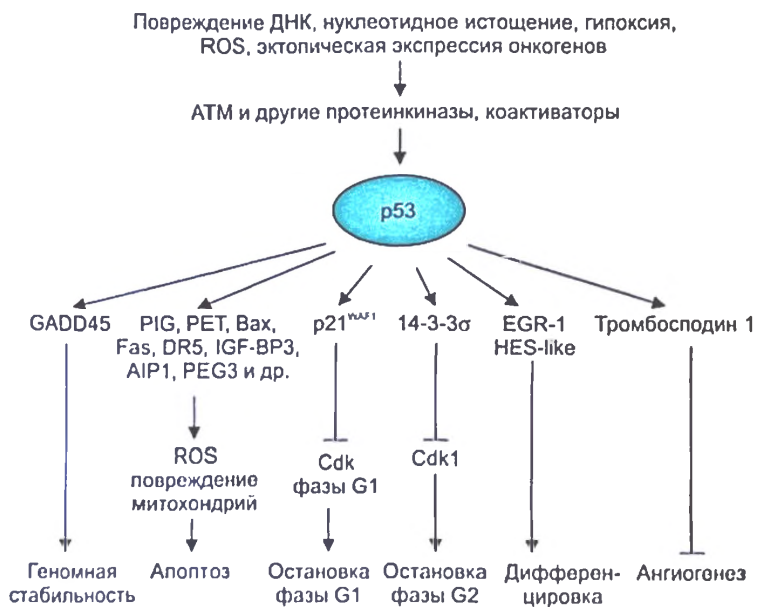


Рис. 3.6. P53-зависимая регуляция генной экспрессии.

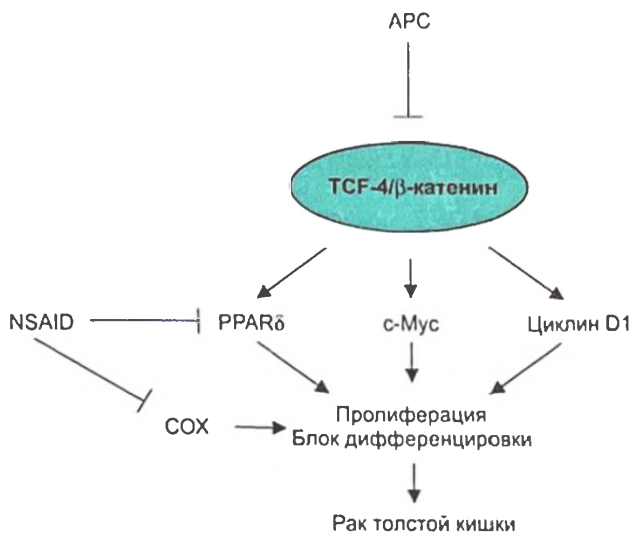


Рис. 3.8. Путь сигнальной трансдукции APC/β-катенин/TCF.

NSAID (nonsteroidal anti-inflammatory drugs) – нестероидные противовоспалительные препараты.

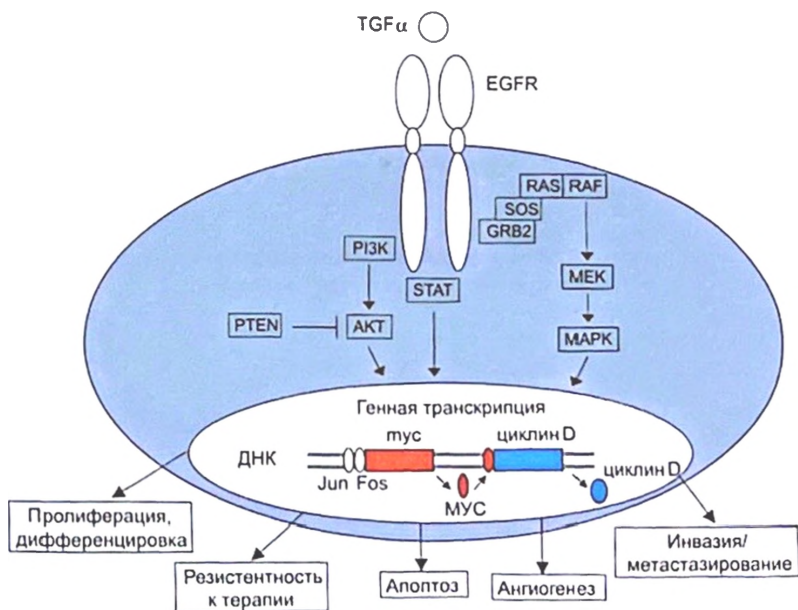


Рис. 3.9. Пути сигнальной трансдукции, активируемые гиперэкспрессией EGFR.

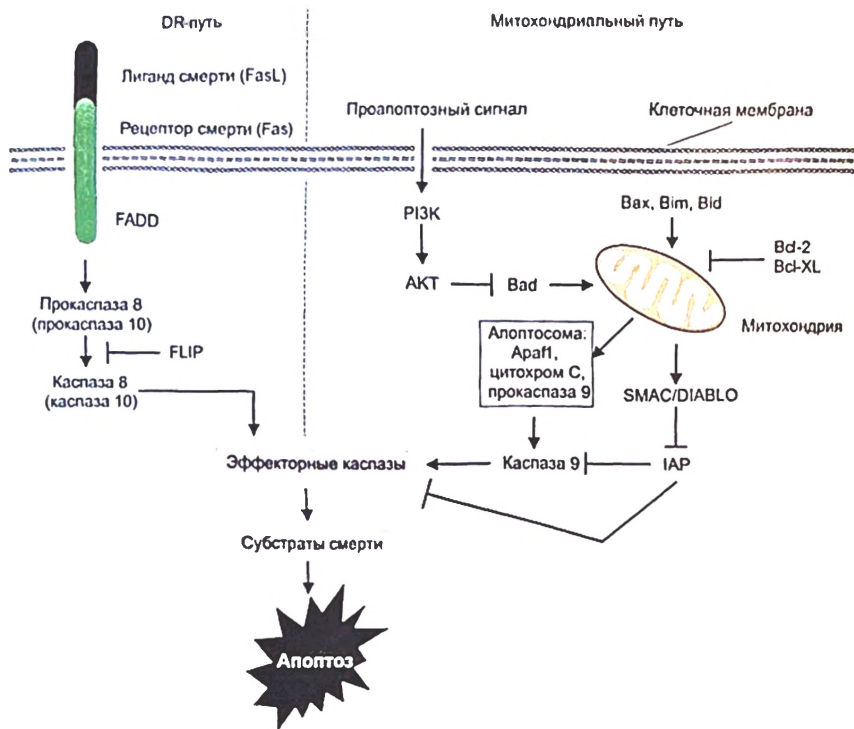


Рис. 4.2. Основные пути индукции апоптоза.

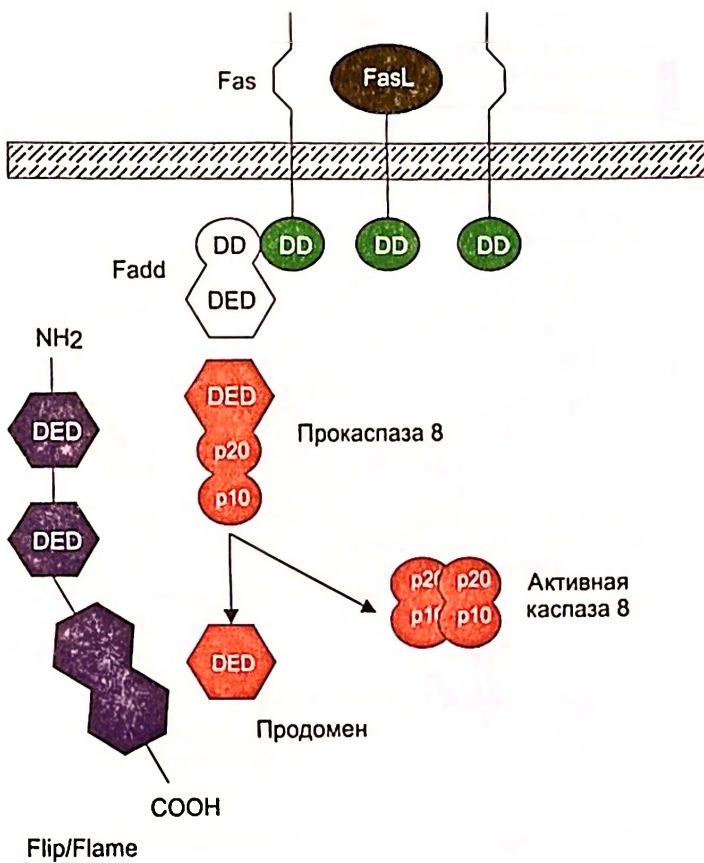


Рис. 4.3. Модель Fas-опосредованной сигнальной трансдукции.

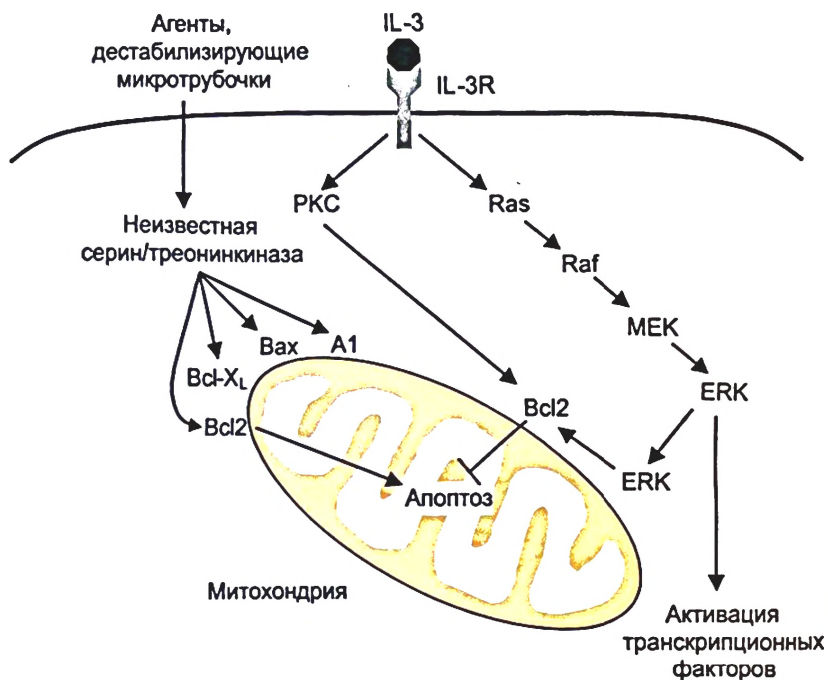


Рис. 4.5. Фосфорилирование Bcl2 в регуляции апоптоза.

Фосфорилирование и аутофосфорилирование Bcl2 по серину-70 предотвращает апоптоз, а мультисайтовое фосфорилирование — индуцирует апоптоз.

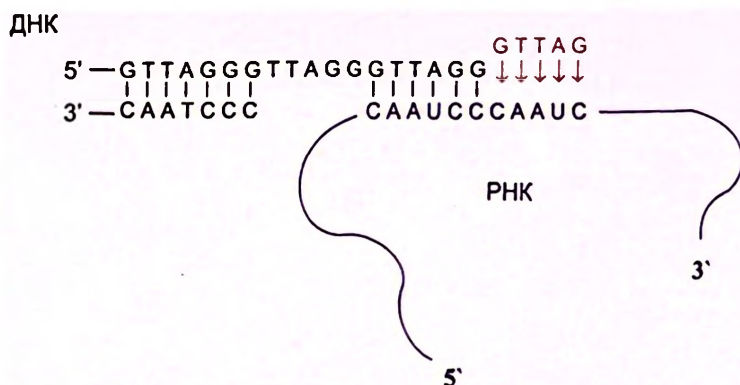


Рис. 5.2. Теломераза — теломеросинтезирующая обратная транскриптаза.

Теломеры человека содержат tandemные повторы гексамера ТТАГГГ/ААТССС длиной от 2000 до 20 000 оснований. В иммортализованных клетках теломерная функция восстанавливается благодаря синтезу теломерной ДНК теломеразой. Черным цветом обозначены нуклеотиды теломеры, синим — теломеразная РНК, красным — нуклеотиды, которыми теломераза достраивает теломерную ДНК по своей интегральной РНК-матрице.

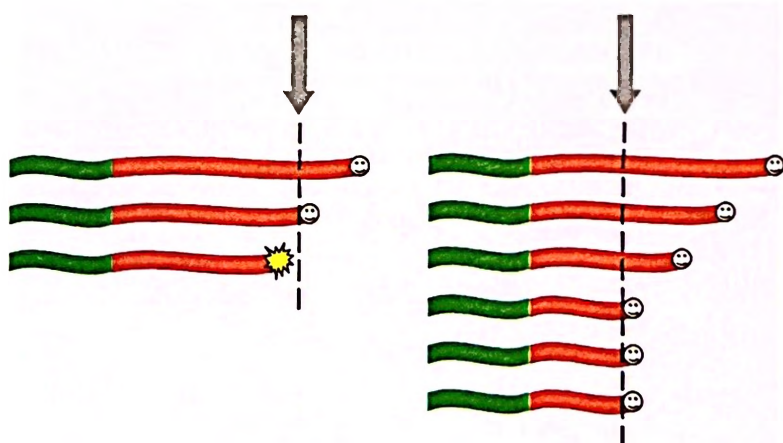


Рис. 5.3. Теломераза стабилизирует теломеры, которые были бы слишком короткими в ее отсутствие.

Короткие теломеры способны функционировать в клетках, отвергающих сигнал старения, — трансформированных клетках, экспрессирующих теломеразу. Зеленым цветом окрашены хромосомы, красным — теломеры. Стрелками и пунктирной линией отмечено допустимое укорочение теломер без теломеразы (слева) и с теломеразой (справа).

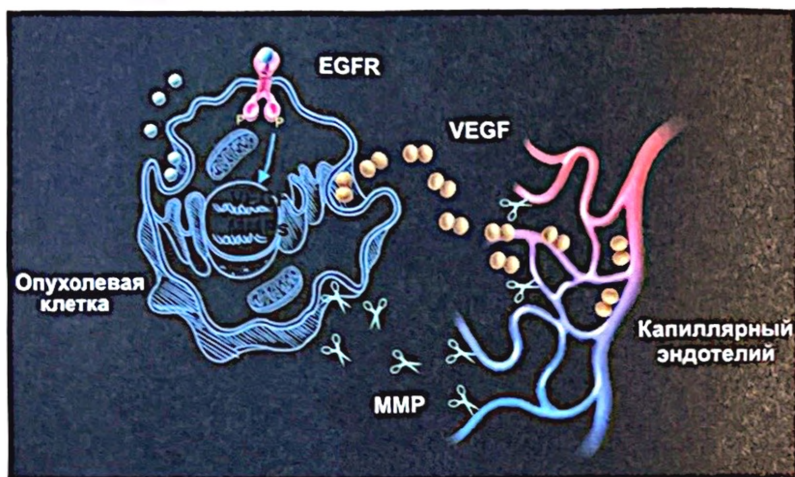


Рис. 5.4. EGFR и ангиогенез.

Активация EGFR при связывании с лигандом (EGF) повышает уровень экспрессии VEGF и матричных металлопротеиназ.

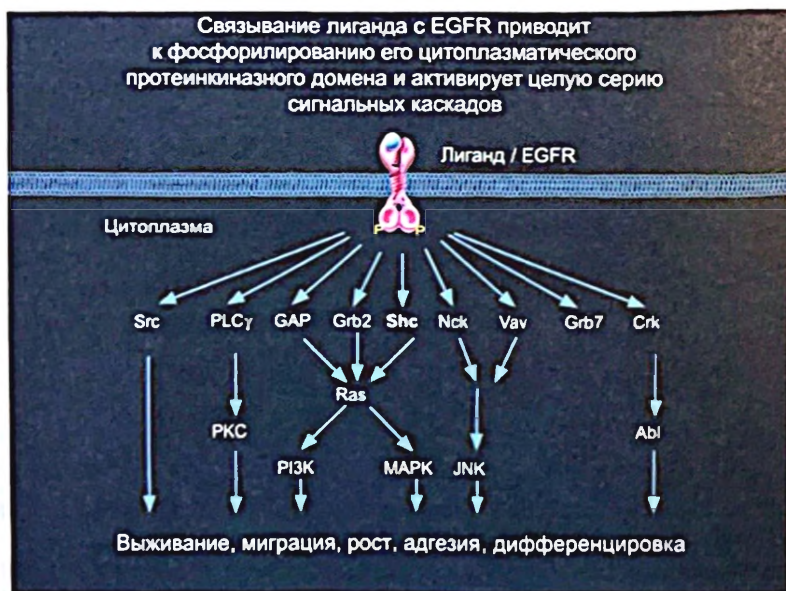


Рис. 5.6. Пути EGFR-сигналинга и последствия его активации, зависящие от клеточного и особенно экстраклеточного контекста.

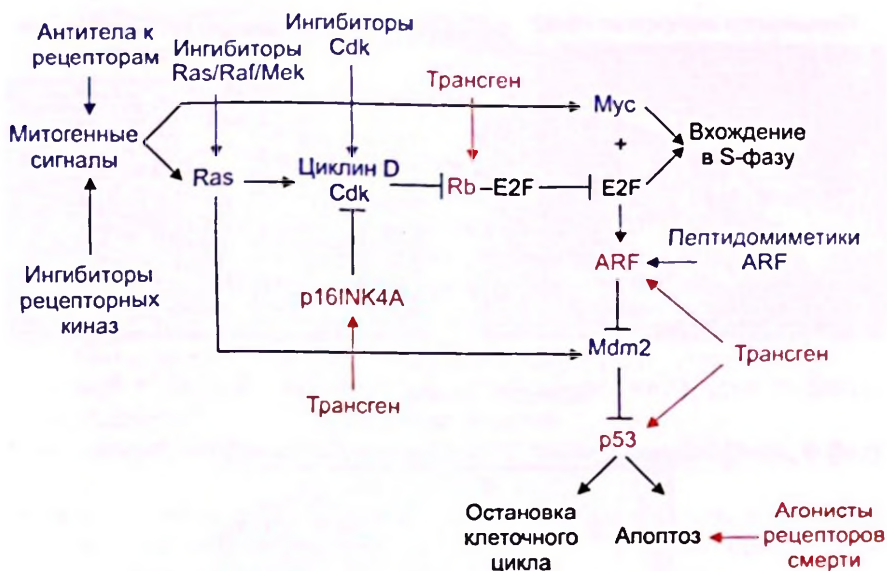


Рис. 6.1. Пути сигнальной трансдукции в опухолевой клетке и терапевтический выбор. Красным цветом выделены активируемые, синим — ингибируемые мишени.

Нормальная экспрессия HER2



Гиперэкспрессия HER2 управляет опухолевым ростом



Моноклональные антитела Herceptin против HER2

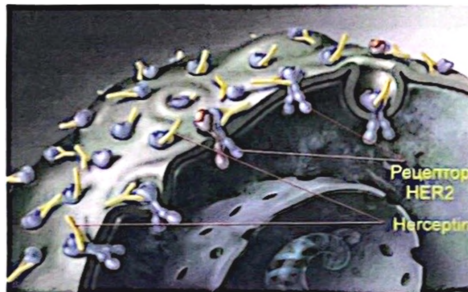


Рис. 6.2. Рецептор HER2 — потенциальный медиатор нормального клеточного цикла и пролиферации. Амплификация гена HER2 приводит к 10-100-кратному усилению экспрессии HER2 на клеточной поверхности, формированию димеров HER2-HER2 и конститутивной активации рецептора. ≈ 25% опухолей молочной железы характеризуются гиперэкспрессией HER2. Моноклональные антитела trastuzumab (Herceptin) блокируют митогенный сигнал и оказывают цитостатический эффект.

СЛОВАРЬ

- Дикий тип (wild type)** — нормальный аллель, а также фенотип, соответствующий ему.
- Домен** — функциональный участок белковой молекулы.
- Зимоген** — функционально неактивный профермент, который активируется при удалении из молекулы фрагмента, способствующего поддержанию латентного состояния.
- Конститутивная экспрессия, или гиперэкспрессия** — постоянная экспрессия, не зависящая от факторов негативной регуляции, невосприимчивая к ингибирующим сигналам.
- Кóровый** — осевой, центральный, главный (от англ. core — центр, сердцевина).
- Митогенный (сигнал)** — побуждающий клетку к вхождению в фазу митоза.
- Потеря гетерозиготности** — делеция интактного аллеля, в результате которой в геноме остается и проявляется только один, мутантный, аллель, и формируется мутантный фенотип.
- Протеинкиназа** — фермент, катализирующий фосфорилирование (и/или аутофосфорилирование) белка, обычно по тирозиновым, сериновым и/или треонинным остаткам.
- Протенинфосфатаза** — фермент, катализирующий дефосфорилирование белка.
- Процессинг (транспроцессинг или аутопроцессинг)** — образование функционально активной молекулы в результате удаления из молекулы-предшественника последовательностей, поддерживающих ее в латентном состоянии.
- Секвенирование** — установление нуклеотидной последовательности ДНК.
- Сигнальная трансдукция (сигналинг)** — передача регуляторного (митогенного или апоптозного) сигнала в ядро клетки.
- Сплайсинг** — процесс созревания мРНК, в ходе которого происходит вырезание «лишних» последовательностей;
— сплайсинг альтернативный — разрезание транскрипта в нетипичных сайтах сплайсинга с образованием мРНК, кодирующих изоформы белка.
- Трансактивация** — функция транскрипционного фактора, активация экспрессии гена-мишени.
- Трансген** — чужеродный ген, введенный в клетку искусственным путем.

Трансдукция — введение в клетку рекомбинантной ДНК (трансгена) без использования вирусного вектора.

Трансфекция — введение в клетку рекомбинантной ДНК (трансгена) с использованием вирусного вектора.

Транскрипционный фактор — белок, активирующий или репрессирующий генную экспрессию (транскрипцию).

Трансрепрессия — функция транскрипционного фактора, подавление экспрессии гена-мишени.

ЛИТЕРАТУРА

Adjei A.A. Blocking oncogenic Ras signaling for cancer therapy // *J. Natl. Cancer Inst.* — 2001. — Vol. 93, No. 14. — P. 1062-1074.

Allgayer H., Babic R., Gruetzner K.U. et al. c-erbB-2 is of independent prognostic relevance in gastric cancer and is associated with the expression of tumor-associated protease systems // *J. Clin. Oncol.* — 2000. — Vol. 18, No. 11. — P. 2201-2209.

Almasan A., Yin Y.X., Kelly E.Y.H.P. et al. Deficiency of retinoblastoma protein leads to inappropriate S-phase entry, activation of E2F-responsive genes, and apoptosis // *PNAS USA.* — 1995. — Vol. 92. — P. 5436-5440.

Aplin A.E., Howe A., Alahari S.K., Juliano R.L. Signal transduction and signal modulation by cell adhesion receptors: the role of integrins, cadherins, immunoglobulin-cell adhesion molecules, and selectins // *Pharmacol. Rev.* — 1998. — Vol. 50. — P. 197-263.

Armand J.-P. Antiangiogenesis in solid tumors: Is there any promise at all? // *Ann. Oncol.* — 2002. — Vol. 13. — Suppl. 5. — P. 6.

Ashkenazi A., Dixit V.M. Apoptosis control by death and decoy receptors // *Curr. Opin. Cell Biol.* — 1999. — Vol. 11. — P. 255-260.

Baselga J. Current status of anti-EGFR tyrosine kinase receptor therapies // *Ann. Oncol.* — 2002. — Vol. 13. — Suppl. 5. — P. 6.

Beavon I.R.G. The E-cadherin-catenin complex in tumour metastasis: structure, function and regulation // *Eur. J. Cancer.* — 2000. — Vol. 36. — P. 1607-1620.

Blagosklonny M.V. Unwinding the loop of Bcl2 phosphorylation // *Leukemia.* — 2001. — Vol. 15, No. 6. — P. 869-874.

Blalock W.L., Weinstein-Opppenheimer C., Chang F. et al. Signal transduction, cell cycle regulatory, and anti-apoptotic pathways regulated by IL-3 in hematopoietic cells: possible sites for intervention with anti-neoplastic drugs // *Ibid.* — 1999. — Vol. 13. — P. 1109-1166.

Blume-Jensen P., Hunter T. Oncogenic kinase signalling // *Nature.* — 2001. — Vol. 411. — P. 355-365.

Bozcuk H., Uslu G., Pestereli E. et al. Predictors of distant metastasis at presentation in breast cancer: a study also evaluating associations among common biological indicators // *Breast Cancer Res. Treat.* – 2001. – Vol. 68, No. 3. – P. 239–248.

Cancer vaccine – Antigenics. Review literature // *Biodrugs.* – 2002. – Vol. 16, No. 1. – P. 72–74.

Chant J., Stowers L. GTPase cascades choreographing cellular behavior: movement, morphogenesis, and more // *Cell.* – 1995. – Vol. 81. – P. 1.

Chelbi-Alix M.K., Pelicano L. Retinoic acid and interferon signaling cross talk in normal and RA-resistant APL cells // *Leukemia.* – 1999. – Vol. 13. – P. 1167–1174.

Cohen G.B., Ren R., Baltimore D. Modular binding domains in signal transduction proteins // *Cell.* – 1995. – Vol. 80. – P. 237.

Curran S., Murray G.I. Matrix metalloproteinases: molecular aspects of their roles in tumour invasion and metastasis // *Eur. J. Cancer.* – 2000. – Vol. 36, No. 13. – P. 1621–1630.

Dachs G.U., Tozer G.M. Hypoxia modulated gene expression: angiogenesis, metastasis and therapeutic exploitation // *Ibid.* – P. 1649–1660.

Datta S.R., Brunet A., Greenberg M.E. Cellular survival: a play in three acts // *Genes Dev.* – 1999. – Vol. 13. – P. 2905–2927.

Derynck R., Feng X.-H. TGF- β receptor signaling // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1997. – Vol. 1333. – P. F105–F150.

DeVisser K.E., Kast W.M. Effects of TGF- β on the immune system: implications for cancer immunotherapy // *Leukemia.* – 1999. – Vol. 13, No. 8. – P. 1188–1199.

Drexler H.G. Review of alterations of the cyclin-dependent kinase inhibitor INK4 family genes p15, p16, p18, and p19 in human leukemia-lymphoma cells // *Ibid.* – 1998. – Vol. 12. – P. 845–859.

Elliott P.J., Ross J.S. The proteasome: a new target for novel drug therapies // *Am. J. Clin. Pathol.* – 2001. – Vol. 116, No. 5. – P. 637–646.

Evan G., Vousden K.H. Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer // *Nature.* – 2001. – Vol. 411. – P. 342–348.

Fambrough D., McClure K., Kazlauskas A., Lander E.S. Diverse signaling pathways activated by growth factor receptors induce broadly overlapping, rather than independent, sets of genes // *Cell.* – 1999. – Vol. 97. – P. 727–741.

Fedi P., Tronick S.R., Aaronson S.A. Growth factor / *Cancer Medicine* / Ed. J.F. Holland. – Baltimore: Williams and Wilkins, 1997. – P. 41–64.

Fitzgibbons P.L., Page D.L., Weaver D. et al. Prognostic factors in breast cancer // *Arch. Pathol. Lab. Med.* – 2000. – Vol. 124, No. 7. – P. 966–978.

Folkman J. Tumor angiogenesis / *Cancer Medicine* / Eds J.F. Holland *et al.* – Baltimore: Williams and Wilkins, 1997. – P. 181–201.

Giancotti F.G., Ruoslahti E. Integrin signalling // *Science*. — 1999. — Vol. 285. — P. 1028–1032.

Green D.R., McGahon A., Martin S.J. Regulation of apoptosis by oncogenes // *J. Cell. Biochem.* — 1996. — Vol. 60. — P. 33–38.

Green D.R., Reed J. Mitochondria and apoptosis // *Science*. — 1998. — Vol. 281. — P. 1309–1312.

Hanahan D., Weinberg R.A. The hallmarks of cancer // *Cell*. — 2000. — Vol. 100, No. 1. — P. 57–70.

Heimbrook D.C., Oliff A., Gibbs J.B. Essentials of signal transduction // *Cancer: principles and practice of oncology*. / Ed. V.T. DeVita *et al.* — 5th ed. — Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, 1997. — Chap. 2. — P. 35–45.

Herr I., Debatin K.M. Cellular stress response and apoptosis in cancer therapy // *Blood*. — 2001. — Vol. 98. — P. 2603–2614.

Hideshima T., Richardson P., Chauhan D. et al. The proteasome inhibitor PS-341 inhibits growth, induces apoptosis and overcomes drug resistance in human multiple myeloma cells // *Cancer Res.* — 2001. — Vol. 61. — P. 3071–3076.

Hirama T., Koeffler H.P. Role of the cyclin-dependent kinase inhibitors in the development of cancer // *Blood*. — 1995. — Vol. 86. — P. 841–854.

Hunter T. Oncoprotein networks // *Cell*. — 1997. — Vol. 88. — P. 333–346.

Hunter T. Signaling—2000 and Beyond // *Ibid.* — 2000. — Vol. 100, No. 1. — P. 113–127.

Igney F.H., Krammer P.H. Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis // *Nature Rev.* — 2002. — Vol. 2, No. 4. — P. 277–288.

Jones R.J., Brunton V.G., Frame M.C. Adhesion-linked kinases in cancer; emphasis on Src, focal adhesion kinase and PI3-kinase // *Eur. J. Cancer*. — 2000. — Vol. 36, No. 13. — P. 1595–1606.

Karin M., Cao Y., Greten F.R., Li Z.-W. NF- κ B in cancer: from innocent bystander to major culprit // *Nature Rev.* — 2002. — Vol. 2, No. 4. — P. 301–310.

Karin M., Liu Z., Zandi E. AP-1 function and regulation // *Curr. Opin. Cell Biol.* — 1997. — Vol. 9. — P. 240–246.

Klasa R.J., List A.F., Cheson B.D. Rational approaches to design of therapeutics targeting molecular markers // *Hematology (Am. Soc. Hematol. Educ. Program)*. — 2001. — P. 443–462.

Kos J., Werle B., Lah T., Brunner N. Cysteine proteinases and their inhibitors in extracellular fluids: markers for diagnosis and prognosis in cancer // *Int. J. Biol. Markers*. — 2000. — Vol. 15, No. 1. — P. 84–89.

Levine A.J. p53, the cellular gatekeeper for growth and division // *Cell*. — 1997. — Vol. 88. — P. 323–331.

Lindahl T., Engel G., Ahlgren J. et al. Can axillary dissection be avoided by improved molecular biological diagnosis? // *Acta Oncol.* — 2000. — Vol. 39, No. 3. — P. 319–326.

Mauro M.J., O'Dwyer M., Heinrich M.C., Druker B.J. S115/1: a paradigm of new agents for cancer therapeutics // *J. Clin. Oncol.* – 2002. – Vol. 20, No. 1. – P. 325–334.

McCubrey J.A., Stratford May N., Duronio V., Mufson A. Serin/threonine phosphorylation in cytokine signal transduction // *Leukemia.* – 2000. – Vol. 14, No. 1. – P. 9–21.

McKeage K., Perry C.M. Trastuzumab: a review of its use in the treatment of metastatic breast cancer overexpressing HER2 // *Drugs.* – 2002. – Vol. 62, No. 1. – P. 209–243.

Nestl A., Von Stein O.D., Zatloukal K. et al. Gene expression patterns associated with the metastatic phenotype in rodent and human tumors // *Cancer Res.* – 2001. – Vol. 61, No. 4. – P. 1569–1577.

Ozanne B.W., McGarry L., Spence H.J. et al. Transcriptional regulation of cell invasion: AP-1 regulation of a multigenic invasion programme // *Eur. J. Cancer.* – 2000. – Vol. 36, No. 13. – P. 1640–1648.

Petit P.X., Susin S.-A., Zamzami N. et al. Mitochondria and programmed cell death: back to the future // *FEBS Lett.* – 1996. – Vol. 396. – P. 7–13.

Polyak K., Riggins G.J. Gene discovery using the serial analysis of gene expression technique: implications for cancer research // *J. Clin. Oncol.* – 2001. – Vol. 19. – P. 2948–2958.

Polyak K., Xia Y., Zweier J.L. et al. A model for p53-induced apoptosis // *Nature.* – 1997. – Vol. 389. – P. 300–305.

Reed J.C. Dysregulation of apoptosis in cancer // *J. Clin. Oncol.* – 1999. – Vol. 17, No. 9. – P. 2941–2953.

Reijerkerk A., Voest E.E., Gebbink M.F.B.G. No grip, no growth: the conceptual basis of excessive proteolysis in the treatment of cancer // *Eur. J. Cancer.* – 2000. – Vol. 36, No. 13. – P. 1695–1705.

Ruvolo P.P., Deng X., May W.S. Phosphorylation of Bcl2 and regulation of apoptosis // *Leukemia.* – 2001. – Vol. 15, No. 4. – P. 515–522.

Salvesen G.S., Dixit V.M. Caspase activation: the induced-proximity model // *PNAS USA.* – 1999. – Vol. 96. – P. 10964–10967.

Sauer G., Deissler H., Kurzeder C., Kreienberg R. New molecular targets of breast cancer therapy // *Strahlenther. Onkol.* – 2002. – Vol. 178, No. 3. – P. 123–133.

Sawyers C.L. Rational therapeutic intervention in cancer: kinases as drug targets // *Curr. Opin. Genet. Dev.* – 2002. – Vol. 12, No. 1. – P. 111–115.

Schlessinger J. New roles for Src kinases in control of cell survival and angiogenesis // *Cell.* – 2000. – Vol. 100. – P. 293–296.

Sherbet G.V., Lakshmi M.S. The Genetics of Cancer. – San Diego; Lond.; Boston: Academic Press, 1997b. – 338 p.

Sherr C.J. The Pezcoller lecture: Cancer cell cycles revisited // *Cancer Res.* – 2000. – Vol. 60. – P. 3689–3695.