

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ ПРОГРЕССИИ ОПУХОЛЕЙ

Г. П. ГЕОРГИЕВ

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова

MOLECULAR AND GENETIC MECHANISMS OF TUMOR PROGRESSION

G. P. GEORGIEV

Tumor progression is the process of the conversion from primary benign tumor into malignant tumor which is able to metastasize. This process depends on the appearance or disappearance of a number of different proteins in the tumor cell. In many cases, this is a result of mutations in corresponding genes. In addition, the mts1 gene involved in the control of tumor transformation is described in more detail.

Прогрессия опухоли – это процесс ее превращения из первичной доброкачественной опухоли в злокачественную, способную давать метастазы. Она зависит от появления или исчезновения в опухолевой клетке различных белков. Во многих случаях это является результатом мутаций в соответствующих генах. Более детально описан ген mts1, участвующий в контроле метастазирования.

www.issep.rssi.ru

ОСНОВНЫЕ ЭТАПЫ ПРОГРЕССИИ ОПУХОЛИ И ОБРАЗОВАНИЕ ЗЛОКАЧЕСТВЕННОЙ ОПУХОЛИ

В предыдущей статье¹ были рассмотрены основные механизмы превращения нормальной клетки в опухолевую. Опухолевую клетку можно охарактеризовать как клетку, во-первых приобретающую бессмертие, то есть способность делиться неограниченное число раз, и, во-вторых, приобретающую независимость от регуляторных систем организма: способность расти и размножаться независимо от сигналов, поступающих от организма.

Однако опухоли по своим свойствам крайне неоднородны. Одни образуют небольшие узелки, не причиняющие особых беспокойств и практически безвредные. Другие растут, но опять-таки в виде четко ограниченного узла, и их можно легко удалить. Это доброкачественные опухоли. Злокачественные опухоли растут агрессивно: они прорастают в окружающие ткани, разрушают их, опухолевые клетки переносятся в новые места, где образуют метастазы. Собственно злокачественные опухоли и есть основная мишень современной молекулярной медицины.

Поэтому перед молекулярными биологами возник вопрос не только о механизме превращения нормальной клетки в опухолевую, но и о механизме превращения доброкачественной опухоли в злокачественную.

Иногда мутации, произошедшие при возникновении опухолевой клетки, сразу приводят к возникновению злокачественной опухоли. Однако, по-видимому, в большинстве случаев приобретение свойств злокачественного роста происходит не одновременно.

В классическом варианте (рис. 1) вначале опухоль представляет собой узелок 1–2 мм в диаметре. Он не содержит сосудов, и все питательные вещества доставляются только с его поверхности путем диффузии.

¹ Георгиев Г.П. Как нормальная клетка превращается в раковую // Соросовский Образовательный Журнал. 1999. № 4. С. 17–22.

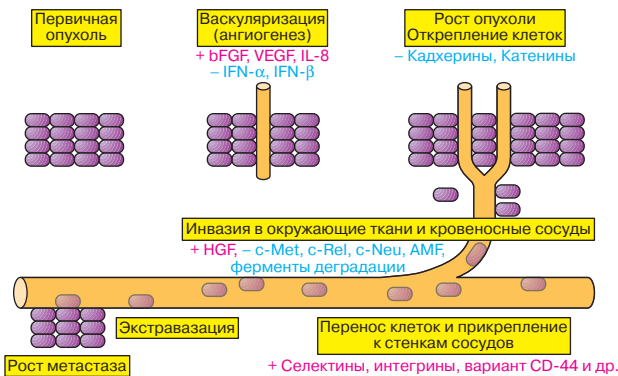


Рис. 1. Схема, иллюстрирующая основные этапы прогрессии опухоли: ангиогенез и васкуляризация первичного опухолевого узла, открепление от клеточного агрегата, вращение в сосуд, перенос на новые места в организме, экстравазация (выход из сосуда), образование метастаза. Плюсами отмечены гены или белки, способствующие прогрессии, минусами – ей препятствующие

Недостаток снабжения приводит к тому, что, хотя клетки непрерывно растут и размножаются, этот процесс уравнивается отмиранием других клеток из-за отсутствия кровоснабжения. Получается равновесная система. Такие дремлющие опухоли могут существовать многие годы, не создавая никаких проблем для организма.

Однако часто в действие вступают факторы, которые могут легко превратить такую дремлющую опухоль в тяжелую злокачественную опухоль, убивающую организм. Явление, лежащее в основе этого превращения, носит название “прогрессия опухоли”. Внешне это выражается в следующем. В первичный узелок начинают вращать сосуды. Получая обильное питание, опухоль растет. Она прорастает в окружающие ткани и разрушает их. В частности, прорастает стенки сосудов, и клетки опухоли попадают в кровотоки. Они разносятся по разным частям организма и могут оседать в новых местах, где образуется новый опухолевый узел или метастаз. Безобидный первичный узелок превращается в злокачественную опухоль. Каким образом это происходит? Вопрос крайне важный для дальнейшей разработки подходов борьбы со злокачественной опухолью.

Весьма вероятно допустить, что изменения свойств опухоли должны быть связаны с генетическими изменениями и соответственно появлением или исчезновением определенных клеточных белков. Здесь большая роль принадлежит некоторым свойствам опухолевой клетки, описанным в предыдущей статье. Сюда относятся полная или относительная независимость роста и размножения опухолевых клеток от внешних сигналов организма и способность опухоли легко накапливать новые мутации. Последнее свойство связано с повреж-

дением системы апоптоза, то есть системы самоуничтожения тех клеток, у которых имеются дефекты структуры ДНК. Важную роль играют мутации, повреждающие ген *p53*. В результате утраты системы апоптоза мутантные клетки не выбраковываются, а продолжают расти и размножаться. Если случайным образом мутация, произошедшая в клетке, окажется полезной для клетки, то она получит преимущество перед другими клетками опухоли, начнет активно размножаться и может вытеснять исходные клетки. Такие события могут повторяться и возникать новые мутации, полезные для опухолевой клетки. В результате свойства опухоли в целом будут изменяться, она постепенно будет приобретать все большую агрессивность. Иными словами, будет происходить прогрессия опухоли. Каждый этап такой прогрессии опухоли определяется изменениями того или иного гена или набора генов и соответственно изменением белкового состава клетки.

НЕКОТОРЫЕ ВАЖНЫЕ ГЕНЫ И ИХ БЕЛКОВЫЕ ПРОДУКТЫ, УЧАСТВУЮЩИЕ В ПРОГРЕССИИ ОПУХОЛЕЙ

Итак, обычно первый этап прогрессии опухолей – это вращение в первичный узел сосудов (см. рис. 1). Этот процесс обозначается терминами “васкуляризация” или “ангиогенез”. В первичный узел сосуды не прорастают, поскольку клетки эндотелия (внутреннего слоя) сосудов не получают от опухоли соответствующих сигналов. Ангиогенез начнется тогда, когда в опухоли произойдет изменение в геноме, ведущее к включению гена, который отвечает за синтез сигнальных белков. Такими белками, посылающими эндотелию сосудов сигнал к росту, являются FGFb (фактор роста фибробластов b) и VEGF (фактор роста эндотелия сосудов). Эти белки, будучи секретиремы клетками опухоли, контактируют со своими рецепторами на поверхности клеток эндотелия сосудов и передают им сигнал к росту. Клетки начинают делиться и вращать в ткань опухоли, формируя в ней капиллярную сеть. В результате начинается активное кровоснабжение опухоли и снимаются ограничения ее роста.

Приобретение опухолевыми клетками способности секретировать факторы роста эндотелия часто выступают в роли индуктора начала превращения доброкачественной клетки в злокачественную. Впрочем, иногда эту роль берут на себя нормальные клетки организма. Так, например, воспалительный процесс в области опухоли может привести к продукции клетками, участвующими в воспалении, факторов роста эндотелия и в результате произойдет васкуляризация первичного опухолевого узла. Кроме стимуляторов существуют и многочисленные факторы, подавляющие ангиогенез. Среди них хорошо известные интерферон α и β . Таким

образом, васкуляризация опухолевого узла зависит от баланса ангиогенных и антиангиогенных факторов в микроокружении этого узла.

Следующий этап прогрессии — это приобретение клетками опухоли свойства отделяться от исходной клеточной массы (рис. 1, 2). Нормальные клетки, особенно это относится к клеткам эпителия, отличаются тем, что они образуют слои, в которых отдельные клетки прочно связаны между собой и с подлежащей под ними мембраной. Основной механизм таких связей реализуется через кадгерин-катениновую систему. Рассмотрим ее на примере эпителия, из которого происходят раковые опухоли. Белок E-кадгерин (эпителиальный кадгерин) состоит из трех частей. Одна часть находится вне клетки, следующая расположена в мембране, и третья — внутри клетки. Наружные внеклеточные части молекул E-кадгерина, принадлежащих соседним клеткам, взаимодействуют между собой при участии ионов кальция и образуют скрепки между клетками. Внутренняя часть E-кадгерина связывается с одним из концов внутриклеточного β -катенина, а другой конец последнего — с молекулой α -катенина. Наконец, α -катенин взаимодействует с цитоскелетом клетки. Образуется жесткая структура, фактически связывающая между собой скелетные образования всех клеток эпителия в единую систему. Поэтому на начальных этапах развития рака его клетки входят в состав одного узла и не отделяются от этого узла. Они часто образуют характерные для определенного вида эпителия однослойные структуры типа каналов или полостей.

Если один из перечисленных выше компонентов (E-кадгерин, α -катенин или β -катенин) поврежден, например произошло повреждение гена, ведущее к утрате конца белка, или подавление работы гена, кодирующего один из белков системы, то вся система разрушается и клетка, где эти изменения произошли, получает возможность отделиться от агрегата.

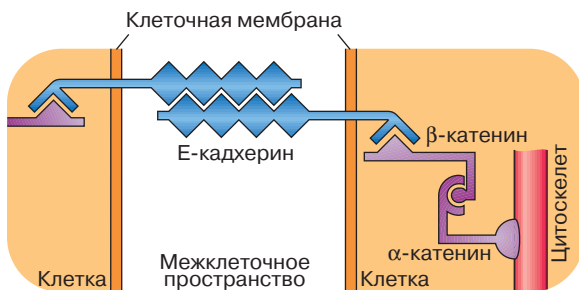


Рис. 2. Кадгерин-катениновая система для формирования жесткого слоя связанных между собой эпителиальных клеток

Действительно, оказалось, что во многих злокачественных опухолях кадгерин-катениновая система нарушена, а в большинстве доброкачественных сохранена. Более того, можно подавить злокачественность раковых клеток, в частности их способность к метастазированию путем введения в геном конструкции, содержащей ген E-кадгерина, которая будет обеспечивать выработку больших количеств белка E-кадгерина.

Отделившаяся от агрегата опухолевая клетка окажется в окружении нормальных клеток и окружена также межклеточными веществами, прежде всего межклеточными белками. Чтобы размножаться дальше и распространяться в окружающую среду, такие клетки должны приобрести аппарат для разрушения окружающей среды. Такое разрушение выполняется гидролитическими ферментами, и прежде всего различными протеиназами, то есть ферментами, разрушающими белки.

Оказалось, что злокачественные опухолевые клетки, как правило, продуцируют гораздо больше протеиназ, чем их доброкачественные собратья, имеющие происхождение из тех же самых тканей. Таких протеиназ, активность которых сильно увеличена в злокачественных клетках, много, и они даже относятся к разным классам. Усиление активности одной из протеиназ, а тем более нескольких сразу даст опухолевым клеткам преимущество — они могут захватывать новые территории, вращая в окружающие ткани. Таким образом, включение в работу генов, отвечающих за синтез протеиназ, — важный этап на пути прогрессии опухолей. Каков механизм этого включения, в большинстве случаев остается неизвестным. Это, несомненно, важный вопрос (см. рис. 1). Тем не менее определение уровня протеиназ и их ингибиторов в опухолях уже сегодня является медицинским тестом для предсказания последующего течения заболевания и для определения интенсивности необходимой терапии. Кроме различных протеиназ в разрушении окружающей опухолевую клетку среды участвуют и другие ферменты, например разрушающие углеводы, такие, как гиалуронидазы. Активность многих из них тоже довольно часто оказывается повышенной в злокачественной опухоли.

Итак, включив гены, производящие те или иные гидролитические ферменты, опухолевая клетка врастает в окружающие ткани, разъедает стенки сосудов, проникает в сосуды. Попав в сосуды, опухолевые клетки начинают разноситься по всему телу. Однако в этой необычной среде они, как правило, погибают. Лишь малая часть опухолевых клеток остается жизнеспособной и прикрепляется к стенкам сосуда. Этому служат самые разнообразные белки, которые опять-таки опухолевая клетка должна научиться синтезировать путем активации соответствующего гена. Для слабого прикрепления к стенке сосуда используются белки селектины, для

прочного связывания – различные интегрины. Процесс этот сложный, и в разных случаях в прикреплении могут участвовать разные белки. Сложность этого процесса и участие в нем разных белков определяют то, что одни опухоли предпочтительно метастазируют в одни органы, а другие опухоли – в другие. Механизм такого предпочтения во многих случаях остается непонятным.

Далее опухолевые клетки прорастают стенку сосуда и выходят из него – процесс, обозначаемый термином “экстравазация”. Образуется первичный метастаз, то есть опухолевый узелок в новом месте. Такой первичный метастаз в некоторых случаях может, однако, не васкуляризоваться, он окажется в чем-то похож на первичную опухоль, хотя другие черты агрессивности, приобретенной в ходе прогрессии, в нем сохраняются. Это “дремлющий метастаз”. Часто такая “дремота” связана с выделением первичной опухолью белковых факторов, подавляющих ангиогенез в метастазах. Тогда удаление первичной опухоли ведет к немедленной васкуляризации дремлющих метастазов и началу их активного роста. Конечно, это явление не является общим, но о нем не следует забывать. Как бы то ни было, обычно первичный метастаз начинает расти, и, таким образом, опухолевые клетки приобретают полную степень злокачественности, а болезнь становится практически неизлечимой.

Как мы видели, в ходе прогрессии опухоли от первичного доброкачественного узла до развитой злокачественной метастазирующей опухоли в клетках опухоли должны произойти многочисленные генетические изменения, мутации, или хотя бы нарушения работы тех или иных генов (активация или инактивация). Генов, вовлеченных в этот процесс, чрезвычайно много, и выше указаны лишь некоторые, для которых хорошо изучена функция и доказана важная роль в прогрессии многих типов опухолей. Однако область неизученного остается очень большой.

Важным направлением исследований является поиск таких генов и белков, которые изменены во многих злокачественных клетках, и особенно тех, которые могут контролировать различные этапы прогрессии. Поиск таких генов ведется в некоторых лабораториях. Один из них, названный *mts1*, был открыт в нашей лаборатории, и в последнем разделе статьи дано его краткое описание. На этом примере можно проследить, как реально ведутся работы по изучению прогрессии опухолей.

РОЛЬ ГЕНА *mts1* И ЕГО БЕЛКОВОГО ПРОДУКТА Mts1 (МЕТАСТАЗИНА) В МЕТАСТАЗИРОВАНИИ ОПУХОЛЕЙ

Ген *mts1* был открыт при сравнении набора генов, работающих в двух линиях клеток рака молочной железы

мышей, имеющих одно и то же происхождение. При этом одна из них не давала метастазы при подкожной перевивке мышам (линия неметастазирующая, Н), а другая в тех же условиях давала многочисленные метастазы в легкие (линия метастазирующая, М) (название условное, на самом деле линия называется CSML-0 и CSML-100).

При сравнении генов, работающих в клетках одного и другого типа, был обнаружен ген, который работал только в метастазирующих клетках (М-клетках). Это означало, что только М-клетки содержали матричную РНК, синтезированную на матрице этого гена, и только М-клетки содержали соответствующий белок. Была определена структура ДНК гена и из нее выведена структура белка. Оказалось, что этот белок относится к известному семейству белков, характерной особенностью которых является способность связывать кальций (рис. 3).

Следующий этап – это проверка того, насколько общим является экспрессия (то есть работа) обнаруженного гена в метастазирующих опухолевых клетках. Для этого исследуется значительное число линий с разным метастатическим потенциалом. Оказалось, что открытый ген избирательно экспрессируется в большом числе метастазирующих и не экспрессируется в неметастазирующих опухолях, хотя бывают и исключения из этого правила. Поэтому ген был назван *mts1*, а его белковый продукт – Mts1 или полностью метастазин 1. Как и все гены организма, *mts1* экспрессируется и в нормальных клетках, в основном тех, которые обладают агрессивностью, способностью внедряться в другие ткани. Такими, например, являются активированные макрофаги. В большинстве клеток ген молчит и белок Mts1 отсутствует.

Ключевой вопрос – имеется ли причинно-следственная связь между присутствием в опухолевой клетке белка Mts1 и ее метастатическим потенциалом. Для ответа на него ставили различные опыты. Так, можно ввести в опухолевые клетки, растущие вне организма, генетические конструкции, то есть ДНК, содержащие ген *mts1* и регуляторные элементы, обуславливающие его активную экспрессию. Другой вариант – ввести генетическую конструкцию, которая будет, наоборот, подавлять экспрессию гена *mts1*. На ряде моделей было установлено, что конструкции, введение которых в геном индуцирует продукцию белка Mts1, одновременно резко усиливают способность клеток метастазировать при их подкожной перевивке мышам. И обратно, введение подавляющих синтез белка Mts1 конструкций снижает метастатический потенциал опухолевых клеток.

Наиболее четко роль гена *mts1* проявляется при проведении опытов на трансгенных животных (рис. 4). Генетическая конструкция, обеспечивающая высокий

5' CAA ACCTCTCTAT TCAGCACTTC CTCTCTCTTG GTCTGGTCTC AACGGTTACC	53
M A R P L E E A L D V I V S T F H K Y S	20
ATGGCAAGAC CCTTGGACGA GGCCTTGGAT GTAATTGTGT CCACCTTCCA CAAATACTCA	113
G K E G D K F K L N K T E L K E L L T R	40
GGCAAAGAGG GTGACAAGTT CAAGCTGAAC AAGACAGAGC TCAAGGAGCT ACTGACCAGG	173
E L P S F L G K R T D E A A F Q K V M S	60
GAGCTGCCTA GCTTCTCTGGG GAAAAGGACA GATGAAGCTG CATTCCAGAA GGTGATGAGC	233
N L D S N R D N E V D F Q E Y C V F L S	80
AACTTGGACA GCAACAGGGA GAATGAAGTT GACTTCCAGG AGTACTGTGT CTTCCTGTCC	293
C T A M M C N E F F E D C P D K E P R K	100
TGCATTGCCA TGATGTGCAA TGAATTCTTT GAGGGCTGCC CAGATAAGGA GCCCCGGAAG	353
K *	101
AAGTGAAGAC TCCTCAGATG AAGTGTGGG GTGTAGTTG CCAGTGGGG ATCTTCCCTG	413
TTGGCTGTGA GCATAGTGCC TACTCTGGC TTCTTCGCAC ATGTGCACAG TGCTGACCAA	473
ATTCAATAAA AGGTTTAAА CT A _n 3'	495

Рис. 3. Структура гена *mts1* и белка Mts1. Последовательность нуклеотидов в гене обозначена четырьмя буквами: А – дезоксиадениловая кислота, G – дезоксигуаниловая кислота, Т – дезокситимидиловая кислота, С – дезоксицитидиловая кислота.

Последовательность аминокислот в кодируемом геном *mts1* белке Mts1 обозначена 20 буквами: А – аланин, С – цистеин, D – аспарагиновая кислота, Е – глутаминовая кислота, F – фенилаланин, G – глицин, H – гистидин, I – изолейцин, K – лизин, L – лейцин, M – метионин, N – аспарагин, P – пролин, Q – глутамин, R – аргинин, S – серин, T – треонин, V – валин, W – триптофан, Y – тирозин.

Надстрочной линией отмечены участки белка, связывающие два иона кальция

уровень экспрессии гена *mts1* в некоторых типах клеток, вводится в ядро яйцеклетки мышей. В некоторых случаях конструкция внедряется в геном и вырастающие из яйцеклетки мыши содержат дополнительный ген *mts1* во всех своих клетках, причем он работает в тех органах, где обычно не работает. Например, в описываемом эксперименте он начинал активно экспрессироваться в клетках молочной железы в период лактации (выработки молока).

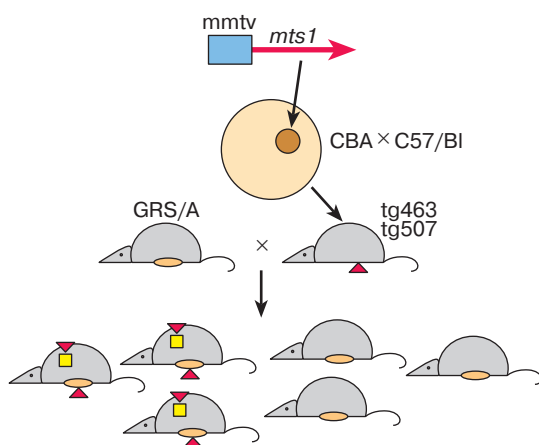


Рис. 4. Схема опыта по индукции метастазирования геном *mts1* на модели трансгенного животного

Хотя в таких молочных железах появлялся белок Mts1, ничего плохого не происходило, опухоли не возникали. Ген *mts1* не является онкогеном. Тогда трансгенные по *mts1* мыши скрестили с мышами, где очень часто возникают раки молочной железы, причем относительно малозлокачественные, не дающие метастазы. Было получено потомство, где трансген *mts1* содержала примерно половина мышей. У значительного процента мышей в потомстве возникли опухоли, причем частота их появления не зависела от наличия трансгена. Однако их дальнейшее течение резко различалось. Собственный ген *mts1* не экспрессируется в опухолях и у мышей, лишенных экзогенного *mts1*, белок Mts1 в клетках отсутствовал. Опухоли у таких мышей не давали метастазов. Однако у второй половины введенный в геном *mts1* экспрессировался не только в нормальной молочной железе, но и в опухолях. В клетках появлялся белок Mts1 и клетки одновременно приобретали способность метастазировать в легкие мышей. Этот результат является наиболее прямым доказательством важной роли белка Mts1 в метастазировании.

Следующий ключевой вопрос – каким образом один белок Mts1 способен так сильно менять метастатический потенциал раковой клетки. Оказалось, что появление в последней белка Mts1 вызывает эффекты, которые могут быть напрямую связаны с процессом метастазирования.

Наконец, совсем недавно выяснилось, что Mts1 оказывает еще один важный биологический эффект – он, по-видимому, способен индуцировать ангиогенез, вызывая дезагрегацию клеток эндотелия и их активное разрастание. Опять-таки молекулярные механизмы этого явления остаются неясными, но само значение стимуляции ангиогенеза для метастазирования огромно.

Итак, накопление в раковой клетке белка Mts1 изменяет ее свойства в направлениях, которые ведут к усилению метастатического потенциала клеток. Действие Mts1 полифункционально. Такие белки и кодирующие их гены представляют большой научный и практический интерес для понимания прогрессии опухолей и воздействия на свойства опухолевых клеток в целях терапии.

Описаны еще несколько белков, участвующих в контроле разных этапов метастазирования, но они изучены в меньшей мере и здесь за неимением места не рас-

сматриваются. Следует отметить, что, как и в случае возникновения опухолей, их прогрессия также может идти разными путями. Знание участников и механизмов процессов возникновения опухолей и ее последующей прогрессии составляет основу для разработки новых методов терапии опухолей, в частности генотерапии.

Рецензент статьи Ю.М. Васильев

* * *

Георгий Павлович Георгиев, доктор биологических наук, профессор, действительный член РАН, директор Института биологии гена РАН, лауреат Ленинской премии, государственных премий СССР и РФ, член пяти зарубежных академий. Область интересов – молекулярная генетика высших организмов. Автор одной монографии и 400 научных работ.