**Лекция 3. Понятия «онкоген» и «опухолевый супрессор». Нарушения функции онкогенов и опухолевых супрессоров, регулирующих клеточный цикл, в клетках различных новообразований человека.**

В основе образования опухоли лежит избыточное размножение определенных клеток. Совершенно естественно поэтому, что нарушения регуляции клеточного цикла являются неотъемлемым и основополагающим признаком неопластической клетки. "Мотором" клеточного цикла, как известно, служат активности последовательно сменяющих друг друга циклинзависимых киназ. Каждая циклинзависимая киназа (Сdk) представляет собой каталитическую субъединицу холоферментного комплекса, для активности которой требуется присутствие активаторной субъединицы - циклина. Регуляция активности Сdk осуществляется за счет направленного изменения уровня определенных циклинов в определенные фазы клеточного цикла. Кроме того, активность Сdk регулируется изменениями фосфорилирования их определенных аминокислотных остатков. В активной форме комплексы циклин-Cdk фосфорилируют регуляторные белки, контролирующие протекание данной фазы. Большинство из них - мишени активирующего действия онкогенов или ингибирующего действия опухолевых супрессоров Оказалось, что действие многих протоонкогенов и опухолевых супрессоров направлено на регуляцию тех или иных комплексов циклин - Cdk. Белковые продукты большинства из них повышают активность циклинзависимых киназ, ответственных за начальные этапы пресинтетической фазы G1 (комплексы циклинов D1 - D3 c Сdk4 или Сdk6 в зависимости от типа клеток) и переход из G1 в фазу синтеза ДНК (циклин E - Сdk2). Кроме того, некоторые протоонкогены и опухолевые супрессоры регулируют активность комплексов циклин А - Сdk2 (требуется для репликации ДНК) и циклин B - Cdk1 (другое название Cdk1 - Cdc2, необходима для перехода из G2 в митоз). Основным субстратом комплексов циклин D - Cdk4 и циклин D - Cdk6 является опухолевый супрессор pRb и Rb-подобные белки р105 и р130. pRb и его гомологи дефосфорилированы в неделящихся клетках и в пролиферирующих клетках, находящихся в ранней G1-фазе. В таком состоянии они связывают и блокируют транскрипционные комплексы E2F - DP (E2F-1,-2, -3, -4, -5 и DP-1, -2, -3), регулирующие активность ряда генов, продукты которых необходимы для начала и прохождения S-фазы. В частности, E2F-DP регулируют экспрессию генов тимидинкиназы, дигидрофолатредуктазы, циклина Е, циклина А, PCNA, ДНК-полимеразы a и др. Связывание белков семейства E2F c pRb ингибирует их транскрипционную активность. При митогенных сигналах, вызываемых ростовыми факторами, pRb в середине G1-фазы фосфорилируется комплексом циклин D - Сdk4 (или циклин D - Cdk6), что вызывает высвобождение транскрипционных факторов E2F - DP из комплекса с pRb и их активацию [17]. Одним из следствий этого является стимуляция транскрипции гена циклина Е, в результате чего активируются комплексы циклин Е - Cdk2, также фосфорилирующие pRb. Таким образом, возникает регуляторная петля, поддерживающая активность транскрипционных факторов E2F - DP и контролируемых ими генов, обеспечивающих репликацию ДНК. После завершения S-фазы pRb переходит в дефосфорилированное состояние, в котором он блокирует активность E2F - DP и вход в следующую S-фазу (для ее инициации необходим новый митогенный стимул, активирующий комплексы циклин D - Cdk4,6). Таким образом, опухолевый супрессор рRb играет ключевую роль в регуляции вхождения клетки в S-фазу. Продукты многих протоонкогенов являются компонентами сигнальных путей, ответственных за активацию комплексов циклин D - Cdk4(6) и циклин E - Cdk2 в ответ на действие ростовых факторов и/или адгезию клеток к белкам внеклеточного матрикса. Так, связывание рецепторов ростовых факторов со своими лигандами индуцирует димеризацию и аутофосфорилирование рецепторов (одна субъединица димера фосфорилирует другую по тирозинам). Это, в свою очередь, вызывает взаимодействие рецепторных тирозинкиназ со многими сигнальными белками, содержащими SH2-домены и связывающими фосфотирозин. Например, активированные рецепторы фактора роста из тромбоцитов (PDGF-Rb) взаимодействуют с SH2-доменами таких белков, как фосфатидилинозитол-3'-киназа (PI3K), фосфолипаза С (PLC)-g1, латентные формы транскрипционных факторов STAT и адаптерный белок Grb2, передающий сигнал к белкам Ras. Связывание каждого из этих белков с фосфотирозинами рецептора вызывает активацию пересекающихся сигнальных путей, завершающуюся активацией в ядре набора транскрипционных факторов и экспрессией специфических генов. В частности, индуцируемый Grb2 переход белков Ras в активированное (GTP-связанное) состояние ведет к стимуляции ряда его эффекторов, в том числе серин-треониновых киназ Raf\* и MEKK, запускающих МАР (Mitogen Activated Protein) киназные каскады. Конечные продукты этих каскадов, ERK (MAPK), р38 и JNK (SAPK), транслоцируются из цитоплазмы в ядро, где они фосфорилируют и активируют множество субстратов, в том числе такие транскрипционные факторы как, Elk1, Ets1\*, Ets2\*, Jun\*, ATF2, Tcf и др. Это, в свою очередь, вызывает активацию ряда других факторов транскрипции. Так, Elk1, формируя комплекс с SRF (Serum Response Factor), инициирует транскрипцию генов, содержащих в своем промоторе SRE элементы, например гена FOS\*. Рис. 2. Продукты многих протоонкогенов и опухолевых супрессоров регулируют активность циклинзависимых киназ, фосфорилирующих pRb. Фосфорилирование pRb, как и его связывание с рядом вирусных онкобелков, вызывает высвобождение и активацию транскрипционных комплексов E2F - DP, повышающих экспрессию генов, продукты которых необходимы для прохождения S-фазы Сходные реакции наблюдаются и при связывании интегринов (рецепторов, опосредующих адгезию клетки) с белками внеклеточного матрикса. Такое взаимодействие вызывает активацию и аутофосфорилирование киназы FAK (Focal Adhesion Kinase), в результате чего она связывается с SH2-доменом протоонкобелка Src, что, в свою очередь, вызывает рекрутирование адаптерного белка Grb2, активацию Ras и МАР киназных каскадов. Следствием изменений активности ряда транскрипционных факторов, индуцируемых активацией МАР-киназ, является повышение экспрессии гена циклина D1 (предполагается, что за это ответственны белки Jun, Ets1, Ets2). Кроме того, митогенные сигналы повышают экспрессию Myc, что также вызывает увеличение активности циклинзависимых киназ, оперирующих в G1 (циклин D - Cdk4 и циклин Е - Cdk2). Это связано с тем, что Myc, во-первых, трансактивирует ген Cdc25a - фосфатазы, снимающей ингибиторное фосфорилирование Cdk2 и Cdk4 по Thr-14 и Tyr-15, а во-вторых, понижает экспрессию ингибитора Сdk2, p27KIP1a. Механизмы активации Myc при действии ростовых факторов изучены пока плохо. Предполагается, что к ней могут приводить как Ras-независимые сигнальные пути, активируемые онкобелком Src, так и Ras-Raf-MAP-киназные каскады, вызывающие активацию Ets1 и/или E2F (промотор гена MYC содержит респонсивные элементы для этих транскрипционных факторов). Многие участники сигнальных путей, опосредующих в ответ на действие ростовых факторов активацию циклинзависимых киназ и, следовательно, стимуляцию клеточного деления, являются протоонкогенами. Изменения их структуры (мутации), приводящие к ускользанию от воздействия негативных регуляторных факторов и/или перманентному повышению экспрессии, превращают такие протоонкогены в онкогены. Продукты идентифицированных онкогенов представляют все этажи регуляции митогенного сигнала: ростовые факторы - PDGF-b (Sis), FGF1 и др.; рецепторные тирозинкиназы - EGF-R (ErbB), HGF-R (Met), Ret и др.; белки семейства Ras - K-Ras, H-Ras и N-Ras; эффекторы Ras - серин-треониновые киназы Raf и Mos; транскрипционные факторы - Jun, Ets1, Myc и др.; и, наконец, циклин D1 (Prad1). Складывается впечатление, что при детальном анализе в каждом новообразовании выявляются изменения хотя бы одного из компонентов сигнальных путей (протоонкогенов), вызывающие перманентную стимуляцию активности циклинзависимых киназ и инициацию клеточного деления вне зависимости от действия ростовых факторов. Интересно, что сигнальный путь Cdk-Rb-E2F контролируется не только pRB, но и многими другими супрессорными белками. Некоторые из них являются ингибиторными субъединицами Cdk (CKIs - Cdk Inhibitors), опосредующими остановку клеточного цикла в ответ на различные внеклеточные и внутриклеточные сигналы. Идентифицировано два семейства CKIs: Ink4 и Cip/Kip. Первое включает четыре представителя, в том числе опухолевые супрессоры p15INK4b и p16INK4a. Белки Ink4 обладают достаточно узкой специфичностью: связывая Cdk4 и Cdk6, они препятствуют образованию их комплексов с циклинами D. Семейство Cip/Kip состоит из трех членов: p21WAF1/CIP1, p27KIP1a и p57KIP2. Эти белки связывают и ингибируют уже полностью сформированные комплексы циклин D - Cdk4(6), циклин Е - Cdk2 и циклин А - Cdk2. Кроме того, p21WAF1/CIP1 способен блокировать и комплекс циклин B - Cdc2, ответственный за продвижение по G2-фазе и вход в митоз [16,27]. И p21WAF1/CIP1, и p27KIP1a опосредуют влияние других супрессорных белков. p21WAF1/CIP1 является одной из основных мишеней трансактивационного действия р53, а следовательно, и супрессоров, участвующих в регуляции стабильности/активности р53 (p19ARF, АТМ, WT1 или его транскрипционной активности (BRCA1 и p33ING1). (BRCA1 и WT1 способны активировать p21WAF1/CIP1 также и по неизвестным пока р53-независимым механизмам). Наряду с р15INK4b, p27KIP1a является ключевым компонентом передачи ингибиторных сигналов, индуцируемых связыванием TGF-b со своими рецепторами. Недавно обнаружено, что активированные рецепторы TGF-b фосфорилируют специфические сигнальные эффекторы, белки Smad2 и Smad3, вызывая их связывание с опухолевым супрессором Smad4. Образующиеся комплексы транслоцируются из цитоплазмы в ядро, где они регулируют транскрипцию специфических генов, в частности ингибиторов Cdk. В результате активируются и p21WAF1/CIP1, и р15INK4b. Последний вытесняет p27KIP1a из комплекса с Cdk4/6 и подавляет образование их комплексов с циклинами D, необходимых для продвижения по G1 (рис. 1). Высвобожденный p27KIP1a, в свою очередь, связывает и ингибирует комплексы циклин Е - Сdk2, ответственные за начало S-фазы. Повышение экспрессии p21WAF1/CIP1 также ведет к подавлению активности комплексов циклин D - Cdk4,6 и циклин E - Cdk2. В результате клетка останавливается в G0/G1 и не входит в S-фазу. Это приводит к активации ряда мишеней, в том числе и ингибиторов циклинзависимых киназ p21WAF1/CIP1, p15INK4b, p27KIP1a, что вызывает подавление активности Cdk4,6 и Cdk2, ответственных за продвижение по G1 и вход в S-фазу (объяснения в тексте) Ингибирующий эффект TGF-b преодолевается гиперэкспрессией онкогенов MYC или MDM2. И если действие Myc связано с активацией различных Cdk путем повышения экспрессии Cdc25A и стимуляции деградации p27KIP1a, то белок Mdm2 помимо деградации р53 вызывает и инактивацию pRb, высвобождая таким образом активные транскрипционные комплексы E2F - DP. Следовательно, и гиперэкспрессия протоонкогенов MYC или MDM2, и инактивирующие мутации в опухолевых супрессорах Smad4, p15INK4b, pRb имеют одно общее последствие - клетки ускользают от ингибирующего действия TGF-b, что представляется очень важным для развития эпителиальных опухолей, в частности раков кишечника и поджелудочной железы. Одним из наиболее ярких достижений двух последних лет явилась идентификация еще одного важнейшего сигнального пути, очень часто нарушающегося в различных новообразованиях человека и осуществляющего, вероятно, регуляцию клеточного цикла в зависимости от состояния мембранных и подмембранных структур клетки. Оказалось, что в несвязанном с E-кадхерином состоянии b-катенин может функционировать как фактор транскрипции. В цитоплазме он связывается с другим транскрипционным фактором Tcf4, после чего комплексы b-катенин - Tcf4 транслоцируются в ядро и активируют гены, имеющие в своем составе специфические респонсивные элементы. Одними из основных мишеней трансактивационного действия комплекса b-катенин - Tcf4 является гены циклина D1 и MYC. Опухолевый супрессор APC, врожденные мутации которого вызывают развитие аденоматозного полипоза кишечника, связывает свободный цитоплазматический b-катенин, что вызывает деградацию последнего. Таким образом, инактивация АРС стимулируя образование комплексов b-катенин - Tcf4, повышает транскрипцию генов циклина D1, MYC и, как следствие, ведет к активации циклинзависимых киназ, ответственных за продвижение по G1 и вход в S фазу. К таким же последствиям приводит и мутации b-катенина, увеличивающие стабильность его в цитоплазме (такие мутации обнаруживаются у пациентов с семейным полипозом, не имеющих мутаций APC; большинство из них поражает сайты b-катенина, фосфорилируемые гликогенсинтетазой-киназой-3b, GSK-3b). Сходная картина наблюдается также и при активации протоонкогена WNT1 (Wingless/INT1). Связывание его продукта Wnt1 (член семейства цистеин-богатых гликозилированных сигнальных протеинов) со своим рецептором (Frizzled) вызывает перемещение цитоплазматического белка Dsh к мембране, где он ингибирует киназную активность GSK-3b, которая, фосфорилируя b-катенин и APС, стимулирует их связывание и деградацию b-катенина. Таким образом, индуцируемое Wnt1 подавление активности GSK-3b приводит к стабилизации и повышению внутриклеточной концетрации цитоплазматического b-катенина, что повышает вероятность образования активных транскрипционных комплексов b-катенина с факторами семейства Tcf/Lef1. Не исключено, что мутации в гене Е-кадхерина также могут быть ответственны за стимуляцию сигнальных путей, опосредуемых транскрипционными активностями b-катенина. Рис. 4. Мутации опухолевых супрессоров АРС и b-катенина, как и активация онкогена wnt1, стимулируют образование транскрипционных комплексов b-катенин - Tcf4, регулирующих гены MYC и циклина D1. В результате повышается активность ряда комплексов циклин - Cdk (объяснения в тексте) Подводя итоги этого раздела, заметим, что большинство известных протоонкогенов и опухолевых супрессоров тем или иным образом регулируют активность циклинзависимых киназ, ответственных за вход в S-фазу клеточного цикла. Продукты некоторых из клеточных (Mdm2) или вирусных (Т-антиген вируса SV40, E1A аденовирусов, E7 HPV и др.) онкогенов связывают и инактивируют основной субстрат таких Cdk - pRb. По-видимому, нарушения в сигнальных путях > Cdk2,4/6 > pRb > E2F/DP являются необходимыми для появления постоянно пролиферирующих неопластических клеток.