

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ЛЕЙКОЗОГЕНЕЗА

Лекция № 1

Д.А. Домнинский

ФГУ Федеральный научно-клинический центр детской гематологии, онкологии и иммунологии Росздрава, Москва

Контакты: Дмитрий Анатольевич Домнинский D7777777@yandex.ru

MOLECULAR MECHANISMS OF LEUKEMOGENESIS

D.A. Domninskiy

Federal Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology, Moscow

Предисловие

Журнал начинает публиковать цикл лекций для врачей, который посвящен молекулярным механизмам лейкозогенеза. Современная медицина находится на пороге появления большого количества лекарственных препаратов нового поколения, активность которых направлена на модулирование (активацию или подавление) функций определенных молекул-мишеней, которые участвуют в процессах лейкозогенеза. Такими мишенями могут быть ферменты, белки с другими (не ферментативными) функциями, геномная ДНК, мРНК или, например, определенные липидные компоненты клеточных мембран. Можно ожидать, что такая целенаправленная (таргетная) терапия существенно улучшит результаты лечения гематологических опухолей. Однако ее применение внесет кардинальные изменения в работу врача-онколога. Это связано с тем, что быстро совершенствующиеся методы молекулярной диагностики позволят в ближайшее время выявлять у пациентов не только специфичные для данного типа опухоли (рекуррентные) генетические aberrации, а целый спектр геномных нарушений. А так как эволюция каждой конкретной опухоли протекает по «индивидуальной» программе, то высока вероятность того, что комбинация различных aberrаций в лейкозных клетках тоже будет иметь индивидуальный (пациент-специфичный) характер. Если при этом у врача «под рукой» будет целый набор таргетных препаратов, то это потребует от него умения самостоятельно составлять индивидуальный курс терапии для каждого пациента. Поэтому врач-гематолог должен разбираться в клеточных процессах, действие которых он собирается модулировать с помощью подобных препаратов. Например, знать, какие из них можно и нужно применять совместно, а для каких препаратов совместное применение бессмысленно или даже вредно.

В небольшом цикле лекций невозможно рассмотреть важнейшие вопросы молекулярной биологии и генетики, но автор и не ставит перед собой такую задачу. Значительно важнее научить врача понимать ключевые механизмы взаимодействий между различными клеточными молекулами и то, как эти взаимодействия нарушаются в присутствии онкоген-

ных белков. Опухолеродных молекул-мишеней много, а количество механизмов, с помощью которых они реализуют свой патологический потенциал, не так велико. Поэтому в первых лекциях будут рассмотрены основные молекулярные механизмы, нарушение функционирования которых чаще всего приводит к развитию лейкоза. В последующих лекциях будут описаны основные генетические aberrации, характерные для гематологических опухолей миелоидного и лимфоидного происхождения, а также таргетные препараты, применяемые в терапии этих заболеваний.

Сегодня существует большое количество литературы по обсуждаемым вопросам, мы будем давать ссылки на опубликованные обзоры, отдавая предпочтение работам, которые находятся в открытом доступе в Интернете. В качестве «базового» источника используется вышедший 3 года назад цикл лекций Е.Б. Владимирской «Механизмы кроветворения и лейкозогенеза» [1], поэтому вопросы, которые подробно освещены в этой работе, здесь рассматриваться не будут. Так как многие ссылки будут даваться на англоязычную литературу, то в этом цикле лекций будут использоваться широко применяемые международные наименования белков и генов, а также будут приводиться английские названия основных терминов, расшифровываться аббревиатуры и объясняться (где это нужно и возможно) происхождения названий. В качестве введения в этимологию названий генов можно рассматривать материал, приведенный в Приложении 1.

Общие признаки опухолевого фенотипа

Ключевые признаки опухолевой клетки и основные молекулярные процессы, нарушение которых лежит в основе проявления этих признаков, впервые были четко сформулированы Дугласом Ханаэном и Робертом Вайнбергом в 2000 г. [2]. Огромное разнообразие генотипов раковых клеток авторы объясняют проявлением 6 основных изменений в физиологии клетки, так называемых приобретенных способностей (acquired capabilities). Основными приобретенными способностями являются: независимость от сигналов роста и нечувствительность к ингибиторам роста

Приложение 1. О названиях и аббревиатурах генов и кодируемых ими белков

Из-за большого количества открытых и вновь открываемых генов до сих пор не принято единой системы их номенклатуры. Часто один ген имеет сразу несколько названий из-за параллельного открытия в нескольких лабораториях. Иногда название уточняется, и приоритет отдается первооткрывателю гомолога этого гена. Например, хорошо известный гематологам по своему онкогенному потенциалу ген *AML1* (acute myeloid leukemia 1) имеет и другое название – *CBFA2* (core binding factor A2), которое объясняется тем, что кодируемый этим геном фактор транскрипции связывается с так называемым кор-промотором своих генов-мишеней (см. Приложение 2). В последние годы эти названия выпесняются «историческим» именем – *RUNX1* (runt-related transcription factor 1), поскольку этот ген человека имеет гомологию с геном *runt* дрозофилы, мутации которого приводили к нарушению эмбриогенеза и эффекту «карликовости» у мух.

Многие жизненно важные гены (вернее, гомологи этих генов) были очень давно открыты генетиками на их любимом объекте (дрозофиле). Названия этим генам часто давались по различным дефектам у мух, которые проявлялись при мутациях в этих генах. Например, для семейств генов *Bithorax*, *Trithorax* и *Polycomb* свойственны специфичные дефекты в сегментации и дорзально-вентральной закладке имагинальных дисков у личинок мух. Мутации в генах, кодирующих клеточные рецепторы *Hedgehog*, вызывали у личинок мух образование выростов, похожих на иголки ежа, а название семейства генов *Wnt* является комбинацией из *Wg* (*wingless*, бескрылость у мух) и *int* (у мышей в локус одного из генов этого семейства интегрирует вирус рака молочной железы).

Многие онкогены были открыты при изучении высокоонкогенных штаммов ретровирусов. Вирусы «захватывали» протоонкогены из ДНК хозяина и включали их в свой геном, что нашло отражение в названии этих генов. Например, гены *SRC* (sarcoma, онкоген вируса саркомы Рауса), *RAS* (rat sarcoma virus), *MYC* (avian myelocytomatosis virus), *KIT* (*kit* – котенок, онкоген вируса саркомы кошек). Кроме того, в названии генов может присутствовать упоминание об их гомологии с вирусными онкогенами, например, *FLT3* (FMS-like tyrosine kinase 3, где *FMS* – McDonough feline sarcoma virus), или указание на то, что в область данного гена часто интегрируется какой-либо вирус, например, *EV1* (ecotropic viral integration site 1). Некоторые онкогены, выявленные в составе ретровирусов, получили название от штамма вируса, носящего имя своего первооткрывателя, например *ABL* (Abelson murine leukemia virus), 2 члена RAS-семейства – *K-RAS* и *H-RAS* (Kirsten и Harvey штаммы вируса саркомы мышей), или тот же *SM-FeSV* – вирус саркомы кошек (Susan McDonough).

Факторы транскрипции классифицируют по наличию в них различных функциональных белковых участков (мотивов или доменов). Например, «цинковые пальцы» (zinc finger) или «гомеодомены» (homeodomain или homeobox), обозначение которых может входить в название гена (белка). Например, один из важнейших факторов регуляции раннего гемопоэза *IKZF1* (Ikars family zinc finger 1), который часто называют просто *Икар* (Ikars). Интересно, что другим членам IKZF-семейства краткие наименования тоже дали в честь персонажей древнегреческих мифов – Эол (Aiolos), Гелий (Helios) и т. п. В честь мифического острова, обитатели которого не старели, был назван фактор регуляции эмбриональных стволовых клеток *Nanog*.

Такой необычный подход к названию генов можно встретить довольно часто. Например, названия членам *Hedgehog*-семейства (*Hh*) давали просто в честь различных видов ежей – «индийский еж», «ушастый (пустынный) еж» и т. п., но так как видов ежей было меньше, чем видов *Hh*-рецепторов, то скоро перешли на сказочных персонажей. Например, самый известный *Hh*-ген человека получил название в честь «героя» компьютерной игры – *sonic Hh*.

клетки, уклонение от процесса запрограммированной смерти клетки (апоптоза), безграничный репликационный потенциал (иммортализация, бессмертие клеток), поддержка регенерации тканей (ангиогенез), способность к тканевому проникновению (инвазия) и отсутствию тканевой видоспецифичности (метастазирование). В последующие годы список приобретенных способностей опухолей неоднократно уточнялся и дополнялся [3–6]. К наиболее важным дополнениям можно отнести блокировку клеточной дифференцировки и генетическую нестабильность. Генетическая нестабильность является движущей силой постоянных изменений в геноме опухолевых клеток. Такая нестабильность приводит к генерации большого числа генетически неоднородных субклонов клеток опухоли, способных к селективному преодолению (генетическая пластичность) различных барьеров в организме, в том числе и привнесенных терапевтическими процедурами. Различные стрессовые состояния, возникающие в клетках опухоли под влиянием враждебной окружающей среды, помогают им приобретать новые способности. Например, использование гликолиза при метаболическом стрессе позволяет опухолевым клеткам адаптироваться к гипоксии и при этом закислять свое микроокружение, что, в свою очередь, позволяет им уклоняться от иммунного надзора. А повышенная концентрация реактивных форм кислорода при окислительном стрессе приводит к увеличению уровня повреждений ДНК, что становится причиной появления новых генетических aberrаций.

Все опухоли в процессе своей эволюции приобретают набор перечисленных выше способностей, однако последовательность их появления и молекулярные механизмы, лежащие в их основе, сильно варьируют. Поэтому каждая опухоль, по сути, является индивидуальным, пациент-специфичным образованием. Существование сравнительно небольшого набора молекулярно-физиологических изменений, которые приводят к неопластической трансформации, указывает на то, что все клетки организма имеют схожие молекулярные «машины», регулирующие их пролиферацию, дифференцировку и смерть. Гены, контролирующие эти процессы можно условно разделить на 2 группы: 1) доминантные онкогены (позитивные регуляторы роста), которые возникают из нормальных генов клетки (протоонкогенов) в результате их неконтролируемой активации; 2) рецессивные гены-супрессоры опухоли (негативные регуляторы роста), которые, как правило, являются ингибиторами протоонкогенов. Активация онкогенов и инактивация генов-супрессоров приводит к одинаковым, по своей сути, опухолеродным эффектам.

Важно отметить, что комплекс генетических изменений, приводящий к появлению у раковых клеток полного спектра приобретенных способностей, характерен в основном для солидных опухолей (которые претерпевают довольно длительный первичный этап эволюции), в меньшей степени это относится к лимфомам и лейкозам на последних стадиях развития.

С генетической точки зрения лейкозы на стадии манифестации являются довольно «простыми» опухолями, для их инициации и развития иногда достаточно приобретения небольшого числа новых способностей. Вероятно, это связано с тем, что в клетках крови заложена природная программа автономного существования. По сравнению со строго структурированными тканями, регуляция поведения клеток крови соседними клетками (стромальными клетками костного мозга или «проплывающими мимо» другими клетками крови) более ограничена. Такая регуляция присуща нормальным клеткам крови в основном для реализации программ пролиферации, дифференцировки и выполнения определенных функций. Лейкозные клетки избегают такой регуляции, так как процесс лейкозогенеза начинается с генетических aberrаций, которые позволяют им стать независимыми от внешних пролиферативных сигналов.

Кроме того, лимфоидные клетки обладают способностью покидать костный мозг и целенаправленно мигрировать (хоуминг) по кровотоку в периферические кроветворные органы, где они претерпевают окончательную дифференцировку. Реализация такой программы поведения позволяет лейкозным клеткам свободно проникать в кровоток. А отсутствие недостатка питания приводит к экспансии первичной популяции лейкозных клеток, что, в свою очередь, позволяет диагностировать (бластоз), выделять и изучать лейкозные клетки на ранних стадиях эволюции опухоли. То есть в случае лейкозов имеется возможность выявлять в опухолевых клетках первичные, инициирующие лейкозогенез, геномные aberrации.

Эти геномные aberrации условно можно разделить на 2 группы. К I классу относятся мутации, повышающие пролиферативный потенциал клеток и их выживаемость (устойчивость к сигналам, индуцирующим апоптоз), а ко II классу – мутации, приводящие к блокировке дифференцировки и аномальному уровню самоподдержания клеток. Так называемая двухшаговая модель (two hits) лейкозогенеза подразумевает, что в лейкозных клетках присутствует как минимум одна мутация из каждой такой группы (так называемых групп комплементации), и эти мутации взаимно дополняют онкогенный потенциал [7] (рис. 1).

Действительно, детальный анализ генома больных острыми лейкозами выявляет небольшое число генетических aberrаций, например, у детей с острым миелобластным лейкозом (ОМЛ) в геноме присутствует в среднем 2,4 онкогенных мутаций, для острого лимфобластного лейкоза (ОЛЛ) этот показатель несколько выше – 6,5 [8]. Однако такие цифры не идут ни в какое сравнение с клетками солидных опухолей, в геноме которых выявляются десятки, и даже тысячи генетических аномалий. Гематологические опухоли становятся генетически гетерогенными на поздних этапах своей эволюции, когда они пред-

ставляют собой множество различных клеточных

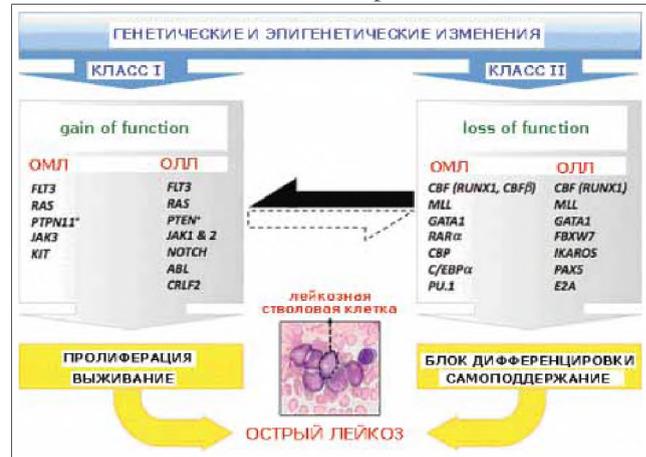


Рис. 1. Генетические aberrации при острых лейкозах. Мутации I класса активируют процессы пролиферации и выживаемости клеток. Эти мутации обычно активируют (gain of function) околочелювные компоненты путей сигнальной трансдукции (рецепторы и медиаторы). Мутации II класса приводят к блоку дифференцировки и аномальному клеточному самоподдержанию. Эти мутации, как правило, инактивируют частично или полностью (loss of function) белки комплексов активации транскрипции (см. Приложения 3–4). Подробнее эта схема будет разобрана в лекциях, посвященных молекулярным aberrациям при лейкозах человека. Рисунок адаптирован из статьи [9]

субклонов, несущих целый спектр дополнительных геномных изменений. Нельзя исключать возможность того, что движущей силой такой эволюции лейкозов могут быть и лечебные процедуры, которые по своей сути являются селективными средами для отбора наиболее устойчивых к терапии и склонных к рецидиву субклонов популяции опухолевых клеток.

Механизмы коммитирования кроветворных клеток

Общие вопросы кроветворения не будут рассмотрены, тем более что они недавно были подробно освещены [1, 10]. Несмотря на колоссальный прогресс в установлении различных внеклеточных факторов и сигнальных клеточных путей, которые участвуют в определении судьбы кроветворных стволовых клеток (HSCs, hematopoietic stem cells) и клеток-предшественников различного происхождения, пока не удастся составить «более или менее ясную картину оркестровки генов в ходе кроветворных дифференцировок» [10]. Этот вопрос действительно сложный и спорный, так как помимо хорошо известных свойств соматических стволовых клеток, таких как самоподдержание и способность к дифференцировке (коммитированность), в последнее 10-летие для многих типов взрослых стволовых клеток выявлена, но до сих пор строго не доказана, способность к дифференцировке в клетки других тканей (пластичность стволовых клеток) [11].

Долгое время господствовали представления о том, что судьба и поведение HSCs и кроветворных клеток-предшественников определяются в основном внеклеточными сигналами (цитокины, хемокины, факторы роста и т. п.), которые эти клетки получа-

ют из своего микроокружения (от стромальных или других кроветворных клеток). Однако сегодня становится понятно, что эти клетки обладают определенным уровнем *liberum arbitrium* (свобода воли), и достаточно случайные внутриклеточные события могут в корне изменить судьбу клетки. Действительно, так ли уж клетка (и не только стволовая) зависит от внешних сигналов, с помощью которых организм контролирует многочисленные популяции клеток, из которых он состоит? Или все-таки клетки в некоторых случаях сами могут определять свою судьбу? Рассмотрим эти вопросы на примере дифференцировки кроветворной клетки-предшественницы по эритроидному или миелоидному пути [12, 13].

Общая миелоидная клетка-предшественник (CMP, **common myeloid progenitor**) может дифференцироваться в 2 типа клеток-предшественников: мегакариоцитарно-эритроидного (MEP, **megakaryocyte erythrocyte precursor**) и гранулоцитарно-макрофагального (GMP, **granulocyte macrophage precursor**) происхождения. Оказалось, что процесс выбора между этими двумя типами дифференцировки контролируется всего двумя факторами активации транскрипции (см. Приложения 2 и 3): **GATA1** (**GATA-binding protein 1**), определяющим MEP-путь дифференцировки, и **PU.1**, экспрессия которого приводит к реализации GMP-пути развития. Как видно из названия, **GATA1** связывается с **GATA**-последовательностью ДНК (сайт связывания) в промоторной области своих генов-мишеней. Название фак-

тора **PU.1** обусловлено присутствием пуринов (**purine**, например, **GGAA**) в его сайте связывания. Ген **PU.1** имеет и другое название – **Spi1** (**SFFV proviral integration site 1**), поскольку он является местом интеграции высокоонкогенного провируса **F-SFFV** (**Friend spleen focus-forming virus**, вирус открыт Шарлотой Френд), вызывающего эритролейкоз у мышей. Интересно отметить, что **F-SFFV** индуцирует эритролейкоз у мышей с помощью двойного механизма. С одной стороны в результате интеграции провируса разрушается ген **PU.1** и прекращается экспрессия белка **PU.1**, а с другой стороны, один из белков вируса является структурным «миметиком» эритропоэтина (**Epo**), т. е. зараженная клетка становится эритропоэтин-независимой, она сама может возбуждать рецептор эритропоэтина и дифференцироваться в эритроидном направлении.

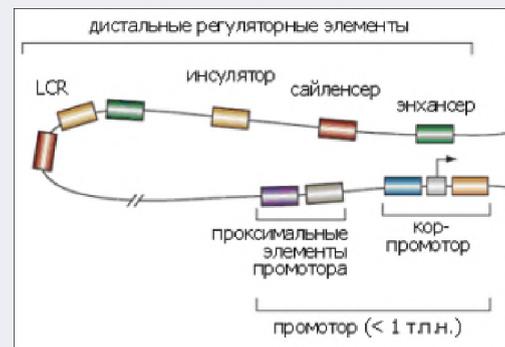
В CMP-клетках могут синтезироваться как **GATA1**, так и **PU.1**-факторы активации транскрипции, причем эти факторы являются антагонистами, каждый из них подавляет транскрипционную активность оппонента с помощью взаимодействий в промоторной области. Кроме того, эти факторы транскрипции могут прямо или опосредованно активировать свою собственную экспрессию (рис. 2). Таким образом, любая даже кратковременная флуктуация (случайное отклонение) концентрации (например, ее увеличение) одного из этих факторов в ядре приведет к лавинообразному росту концентрации этого фактора и к полному подавлению экспрессии его антагониста. В результате этого клетка начнет экспрессировать белки, которые кодируются



Приложение 2. Промоторы и другие регуляторные элементы генов [21]

В последовательности ДНК закодирована не только информация о белках, которая считывается с ДНК в процессе транскрипции, но также и разнообразная информация, которая используется для регулировки активности генов. Такая регуляторная информация представляет собой набор коротких последовательностей ДНК (сайтов), которые «узнают» и с которыми взаимодействуют регуляторные белки – факторы транскрипции (**TF**, **transcription factors**), использующие для этого специфические ДНК-связывающие участки (домены) – **DBD** (**DNA-binding domain**). Набор сайтов для различных факторов транскрипции, который прилегает непосредственно к кодирующей белок последовательности ДНК, называется промотором. Промоторная область генов эукариот обычно имеет размер не более 1 тыс. пар нуклеотидов (т.п.н.) и состоит из основного («кор») промотора (**core promoter**, в отечественной литературе иногда используется термин «минимальный промотор») и проксимальных промоторных элементов. Некоторые сайты кор-промотора являются общими для всех генов, например, «ТАТА-бок», который участвует в опосредованном (через **TFIID**) связывании РНК-полимеразы II с матрицей ДНК. Другие сайты присутствуют только в определенных группах генов, например, сайт связывания с активатором транскрипции **AML1** (другое название этого фактора – **CBFa**, **core binding factor alpha**) представляет собой **AACCGCA** последовательность ДНК, а сайт связывания с **CEBPa** (**CCAAT enhancer binding protein alpha**), как следует из его названия, имеет **CCAAT**-последовательность.

Дистальные регуляторные элементы, могут располагаться на значительных расстояниях (до 1 млн п.н.) от промотора и подразделяются на группы на основании своей функции (в отечественной литературе применяются английские названия этих элементов). С энхансерами (**enhancer**) и сайленсерами (**silencer**) взаимодействуют факторы транскрипции, которые активируют и подавляют транскрипцию, соответственно. Инсуляторы («изоляторы») блокируют гены от воздействия на них элементов регуляции транскрипции соседних генов. Локус-контролирующая область (**LCR**, **locus control regions**) обычно состоит из нескольких регуляторных элементов, попеременное функционирование которых позволяет осуществлять временную экспрессию разных генов в генном кластере (расположенные рядом гены). Примером **LCR** являются локусы генов глобина, экспрессия которых последовательно меняется в процессе эмбрионального развития. Дистальные регуляторы могут связываться с белками кор-промотора или проксимального промотора в результате изгибания протяженных участков ДНК с образованием временных «петель». Такие петли образуются в результате того, что регуляторные белки связываются, с одной стороны, с различными регуляторными элементами ДНК, а с другой стороны, взаимодействуют друг с другом.



Дистальные регуляторные элементы, могут располагаться на значительных расстояниях (до 1 млн п.н.) от промотора и подразделяются на группы на основании своей функции (в отечественной литературе применяются английские названия этих элементов). С энхансерами (**enhancer**) и сайленсерами (**silencer**) взаимодействуют факторы транскрипции, которые активируют и подавляют транскрипцию, соответственно. Инсуляторы («изоляторы») блокируют гены от воздействия на них элементов регуляции транскрипции соседних генов. Локус-контролирующая область (**LCR**, **locus control regions**) обычно состоит из нескольких регуляторных элементов, попеременное функционирование которых позволяет осуществлять временную экспрессию разных генов в генном кластере (расположенные рядом гены). Примером **LCR** являются локусы генов глобина, экспрессия которых последовательно меняется в процессе эмбрионального развития. Дистальные регуляторы могут связываться с белками кор-промотора или проксимального промотора в результате изгибания протяженных участков ДНК с образованием временных «петель». Такие петли образуются в результате того, что регуляторные белки связываются, с одной стороны, с различными регуляторными элементами ДНК, а с другой стороны, взаимодействуют друг с другом.

Приложение 3. Белковые комплексы регуляции транскрипции [21, 22]

Белковые факторы, которые участвуют в регуляции транскрипции можно разделить на 3 группы. К 1-й группе относятся так называемые основные TFs (**GTFs**, **general TFs**), которые участвуют в активации транскрипции всех генов, кодирующих белки. Помимо РНК-полимеразы II, к GTFs относятся несколько общих TFs: TFIIA, TFIIB, TFIID (связывается с «TATA-боксом»), TFIIE, TFIIH и TFIIH. Все эти факторы собираются на кор-промоторе в форме упорядоченного комплекса инициации транскрипции (**PIC**, **preinitiation complex**), который осуществляет перемещение РНК-полимеразы II на сайт начала синтеза мРНК (**TSS**, **transcription start site**).

На первый взгляд, сборки PIC кажется достаточно для начала синтеза мРНК. Однако это не так. Для активной и эффективной (т. е. доходящей до конца, а не обрывающейся в самом начале) транскрипции необходимо участие целой группы других белковых факторов – активаторов и коактиваторов транскрипции. Активаторы и коактиваторы транскрипции не только стимулируют формирование PIC и участвуют в активации РНК-полимеразы II (с помощью фосфорилирования), но также реализуют модификацию хроматина, которая делает геномную ДНК более доступной для синтеза мРНК (см. Приложение 4).

Белки-регуляторы транскрипции имеют различные функциональные участки (домены). Кроме DBD, они имеют один или несколько доменов активации (**AD**, **activation domain**), которые необходимы не только для стимуляции транскрипции, но также и для взаимодействия с другими белками комплекса. Действительно, для того чтобы «собрать» такой огромный комплекс требуется привлечь (рекрутировать) в него большое число различных белков. Этот процесс осуществляется за счет существования в регуляторных белках одного или нескольких так называемых «стыковочных» участков (**docking site**), с помощью которых белки взаимодействуют друг с другом. Так как сходство активаторов транскрипции к «своим» сайтам на ДНК существенно выше, чем, например, сходство TFIID к последовательностям «TATA-бокса», то сборка транскрипционного комплекса и дальнейшие процессы ремоделирования хроматина обычно начинаются именно с присоединения активатора транскрипции к промотору. Связывание активатора транскрипции с ДНК (через DBD) приводит к последовательному рекрутированию и связыванию с ним большого числа других белков. Все эти сложные процессы сборки облегчаются за счет их координации белковыми комплексами «медиаторов», которые также участвуют в процессах конденсации (или деконденсации) хроматина и активации РНК-полимеразы II, используя для этой работы энергию гидролиза АТФ.

Точно также, через сборку комплексов репрессии, действуют факторы ингибирования транскрипции – репрессоры (связываются с сайленсерами) и корепрессоры. Наличие таких тонких белок–ДНК и белок–белковых взаимодействий, контролирующих активацию и репрессию генов в определенных онтогенетических условиях, лежит в основе предположения о возможном существовании уникального «транскрипционного кода», управляющего этими антагонистическими процессами.

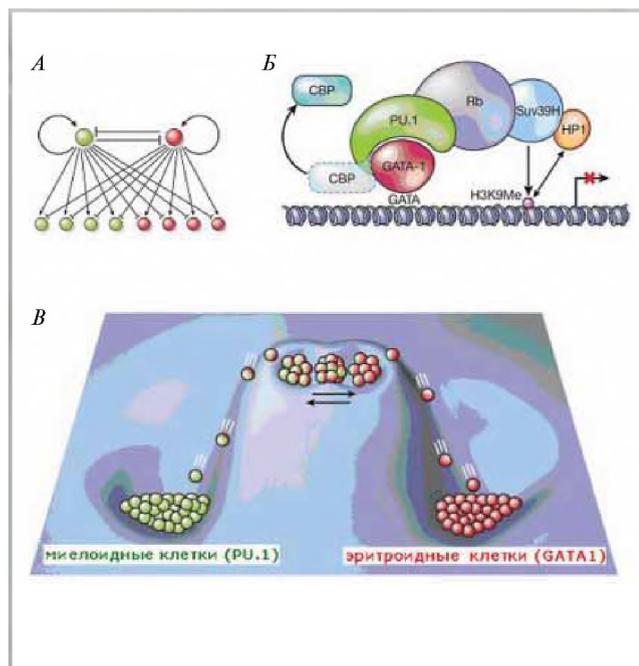
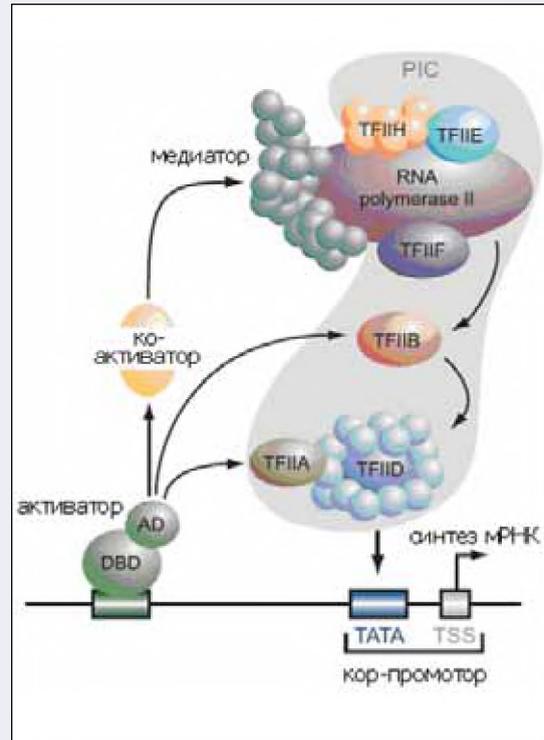


Рис. 2. Взаимный антагонизм факторов транскрипции PU.1 и GATA1

А. Схема, показывающая взаимный антагонизм факторов транскрипции PU.1 (зеленая сфера) и GATA1 (красная сфера). Факторы PU.1 и GATA1 подавляют экспрессию друг друга, а также авторегулируются. Кроме того, они оказывают позиционную или негативную регуляцию репертуара своих собственных генов-мишеней и генов-мишеней фактора-антагониста (мелкие зеленые и красные сферы) соответственно. Такое взаимодействие обеспечивает формирование «петли авторегуляции» (autoregulatory loop), которая стабилизирует выбор развития в случае доминирования одного из факторов.

Б. Схема механизма, лежащего в основе репрессии транскрипции GATA1 генов-мишеней фактором PU.1 (см. также Приложения 3–4). Фактор GATA1, связываясь с промоторами своих генов-мишеней, рекрутирует гистон ацетилазу CBP (CREB-binding protein), которая необходима для ремоделирования хроматина. Фактор PU.1 вытесняет CBP и, связываясь с GATA1, рекрутирует в транскрипционный комплекс репрессорные белки Rb (retinoblastoma) и Suv39H (suppressor of variegation 3-9 homolog 1). Suv39H является гистон-метилтрансферазой, которая осуществляет метилирование лизина 9 в гистоне H3 (H3K9Me). H3K9Me, в свою очередь, является «стыковочным» сайтом для белка HP1 (heterochromatin protein 1), связывание которого с нуклеосомой вызывает репрессию гена-мишени.

В. Схема, показывающая популяцию СМР-клеток (сферы, окрашенные двумя цветами), экспрессирующих PU.1 и GATA1-факторы. Эти клетки-предшественники колеблются между разными состояниями, которые определяются относительным количеством PU.1 и GATA1-факторов. При спонтанном или индуцированном коммитировании они перемещаются из верхнего «резервуара» (где еще сохраняется возможность «выбора») в нижние «резервуары» (где «выбора» уже нет). Зеленые сферы – моноцитарные клетки, экспрессирующие высокий уровень PU.1; красные сферы – эритроидные клетки, экспрессирующие высокий уровень GATA1. Рисунок адаптирован из статьи [13].

генами-мишенями для «победившего» фактора активации транскрипции. Это могут быть белки, которые формируют и поддерживают нужный клеточный фенотип, например, белок рецептора эритропоэтина (EpoR) в случае «успеха» GATA1-фактора. Активная экспрессия EpoR приведет к увеличению его концентрации на клеточной мембране, что делает клетку более чувствительной к Epo и ведет к активации путей сигнальной трансдукции, связанных с этим рецептором. При этом одним из генов-мишеней EpoR-пути сигнальной трансдукции является ген *GATA1*. То есть в данном случае формируется так называемая позитивная «петля обратной связи» (feedback loop), в которой каждый ее компонент активирует своего партнера, результатом чего является быстрая ответная реакция клетки (в данном случае — вступление клетки в эритроидную дифференцировку). Следует обратить внимание на тот факт, что в описанной выше регуляторной «петле» один ее компонент (EpoR) зависит от внешних (инструктивных) сигналов, а второй

компонент (GATA1) является источником внутренних (стохастических) сигналов. Вероятно, большинство клеточных процессов регулируется именно таким способом — тонкой «настройкой», сочетающей внешние и внутренние стимулы.

Описанный выше дуализм выбора дальнейшей судьбы клеткой-предшественницей, основанный на своеобразном «соревновании» пар факторов-антагонистов, выявлен еще для многих участков разветвления «дерева» гемопоэза, а также для ряда узловых точек дифференцировки эмбриональных стволовых клеток [13, 14]. Такой дуализм осуществляется на эпигенетическом уровне, т. е. на уровне активации-репрессии транскрипции, и любые факторы, участвующие в эпигенетическом контроле, могут влиять на выбор клеткой своей судьбы. Например, на выбор клетки может влиять соотношение уровней активности репрессивных и активирующих транскрипцию комплексов Поликомб и Триторакс [15] (см. Приложение 4).

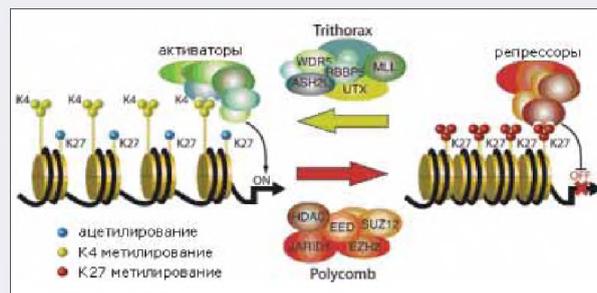
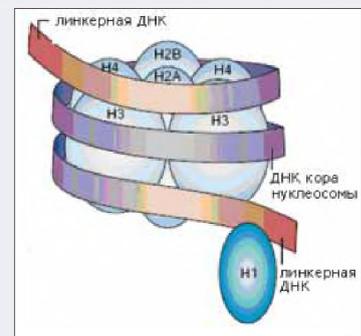


Приложение 4. Структура хроматина и «гистоновый код» [23, 24]

Длина ДНК всех хромосом клетки человека равна примерно 2 метрам. Для того чтобы она уместилась в клеточном ядре (размер ядра ~10 мкм), ее необходимо каким-то образом сконденсировать в более компактную структуру (хроматин). Существует несколько степеней конденсации хроматина — от нуклеосома до хромосомы.

Нуклеосома — основная единица хроматина, состоит из участка ДНК длиной ~200 п.н., который намотан в 2 оборота на белковый октамер, состоящих из димеров основных гистонов нуклеосома — H2A, H2B, H3 и H4. Так как гистоны имеют положительный заряд, а ДНК заряжена отрицательно, то нуклеосома представляет собой очень стабильные комплексы. Поэтому даже уже собранный РИС можно сравнить с паровозом, который стоит под парами на рельсах, но ехать не может, так как пути перед ним забаррикадированы.

Процесс «открывания» хроматина (белками комплекса активации транскрипции) или его «закрывания» (белками комплекса репрессии транскрипции) носит название «ремоделирование хроматина». Ремоделирование хроматина заключается во внесении в аминокислотные остатки «хвостов» гистонов (короткие концевые пептидные участки, лежащие на поверхности глобулярного белка) различных модификаций. Например, гистон ацетилаза (**HAT**, **histone acetylase**) могут ацетилировать (Ac) 9-й или 14-й остатки лизина (K) в гистоне H3 (H3K9ac или H3K14ac). Ацетильная группа заряжена отрицательно, поэтому ацетилирование приводит к ослаблению связи гистонов с ДНК, к «разрыхлению» структуры хроматина («открыванию» ДНК), что позволяет осуществить транскрипцию. Кроме ацетильных меток остатки аминокислот гистонов могут метилироваться (Me) гистон-метилтрансферазами (**HMT**, **histone methyltransferase**), например, метилтрансферазной активностью обладает белок **MLL** (**mixed lineage leukaemia**), хорошо известный гематологам по своему лейкозогенному потенциалу. Метильные группы, внесенные в гистоны, служат своеобразными метками, указывающими на состояние хроматина (активный — не активный). Эти метки (которые представляют собой «стыковочные» сайты) могут «узнаваться» белками комплекса транскрипции, что позволяет перемещать комплекс в нужном направлении (своеобразные указатели для нашего «паровоза»). Метильные группы распознаются специфическими белковыми «хромодоменами» (**chromodomain — chromatin organization modifier**), а ацетильные группы узнаются белками, имеющими «бромодомены» (**bromodomain**, название из рубрики «ученые шутят»: хром — бром).



Вариантов модификации гистонов существует достаточно много, и процесс установления «текста» гистонного кода еще продолжается. Можно лишь отметить, что метилирование 4-го и 36-го остатков лизинов гистона H3 (H3K4 и H3K36), например, считается важным маркером активации транскрипции. H3K9 и H3K27 являются маркерами репрессии транскрипции, а трижды метилированный 9-й лизин гистона H3 (H3K9me3) — признак конститутивного гетерохроматина (постоянно неактивной области генома). Метка H3K27me3 характерна для репрессорных комплексов семейства Поликомб (Polycomb), а метка H3K4me3 — для активирующих транскрипцию комплексов Триторакс-семейства (Trithorax) (см. Приложение 1).

Кроме белков, обладающих HAT- и HMT-активностями, транскрипционные комплексы содержат ферменты, которые могут убирать Ac- и Me-метки с гистонов: гистон деацетилазы (**HDAC**, **histone deacetylase**) и гистон деметилазы (**HDM**, **histone demethylases**) соответственно. Белки комплексов активации или репрессии транскрипции, участвующие в ремоделировании хроматина, обычно подразделяют на 2 группы — «писатели» (writers, которые вносят определенные метки в гистоны) и «читатели» (readers, которые узнают эти метки). Совокупность различных меток, являющихся сигналами, которые «читаются» сами по себе или в комбинации с другими модификациями на тех же самых или соседних гистонах, получила название «гистоновый код».

Приложение 5. РНК-интерференция [25–27]

Сегодня уже стало ясно, что РНК-интерференция (одно из значений слова *interference* – помеха, вмешательство) является важнейшим эпигенетическим механизмом регуляции активности генов. Суть его заключается в том, что небольшие молекулы РНК (размером в 19–25 нуклеотидов) могут или блокировать синтез белка на уровне транскрипции и трансляции, или просто разрушать мРНК. На сегодняшний день известно уже огромное количество таких РНК, многие из которых имеют прямое отношение к онкогенезу. Молекулы РНК, участвующие в процессе РНК-интерференции, по ряду признаков подразделяются на несколько классов. У человека наиболее часто выявляются так называемые короткие интерферирующие РНК (**siRNA**, *short interfering*) и микроРНК (**miRNA**, для удобства далее мы будем использовать термин **miРНК** для обоих типов РНК). Гены, кодирующие miРНК, могут располагаться как в межгенных участках ДНК (часто образуя кластеры генов), так и во внутригенных участках (интронах). Синтезированная с этих генов РНК претерпевает ряд модификаций (процессинг), осуществляемых ферментами, некоторые из которых имеют своеобразные названия. Например, фермент (РНКаза), который первым разрезает незрелую miРНК, называется «Дроша» (**Drosha** – на иврите это слово предшествует проповеди, типа, «Ну, с Богом!»), а белок, который работает с Drosha в комплексе (связывается и «закрывает» от гидролиза функциональные фрагменты РНК), получил созвучное имя «Паша» (**Pasha**). Еще одна разрезающая miРНК РНКаза получила имя **Dicer** (овощерезка), а семейство белков, формирующих финальный активный комплекс с miРНК, названо «аргонавтами» (**AGO**, *argonaute*).

Молекулы miРНК содержат комплементарные друг другу участки (палиндромы), поэтому образуют вторичную структуру в виде «шпильки». В ядре Drosha отрезает концевые участки исходной miРНК (**pri-miRNA**), не входящие в «шпильку», и образующаяся при этом **pre-miRNA** экспортируется транспортными белками (*exportin's*) в цитоплазму. Здесь РНКаза Dicer отрезает часть от pre-miRNA, при этом образуется короткий (19–25 н.) РНК-дуплекс (**miРНК-miРНК***), который вместе с Dicer и белком семейства AGO (также является РНКазой) образует РНК-зависимый комплекс репрессии (**RISC**, *RNA-induced silencing complex*). Одна из цепей РНК-дуплекса («пассажирская», miРНК*) расщепляется AGO и удаляется вместе с Dicer. Получившийся активный комплекс, содержащий «рабочую» цепь (miRNA), атакует молекулы мРНК, синтезированные на гене-мишени данного вида miРНК. Связываясь с мРНК, комплекс RISC может действовать двумя способами: если структура miРНК полностью комплементарна участку связывания на мРНК, то AGO расщепляет мРНК, если же miРНК и мРНК не полностью соответствуют друг другу, то образующийся miРНК–мРНК-дуплекс просто блокирует синтез белка, препятствуя прохождению мРНК через рибосому.

Основные отличия miRNA от siRNA заключаются в том, что гены miRNA обычно имеют внутригенную локализацию, а гены siRNA располагаются в межгенных локусах. Кроме того, если miRNA репрессирует синтез белка, то молекулы siRNA вызывают деградацию мРНК. По своим опухолеродным свойствам гены miРНК могут быть как онкогенами (если они инактивируют гены-супрессоры), так и генами-супрессорами (если они инактивируют онкогены). Онкогенным потенциалом могут также обладать гены, которые кодируют ферменты, участвующие в процессинге miРНК.

Молекулы miРНК стали уникальным инструментом для молекулярно-клеточных исследований *in vitro* и *in vivo*, который позволяет относительно легко включать и выключать нужные гены. Для их применения достаточно только знать нуклеотидную последовательность генов, на которые вы собираетесь воздействовать. Эти же особенности применения miРНК, вероятно, позволят разработать на их основе новое поколение универсальных (по механизму действия и способу производства) лекарственных препаратов с идеальной специфичностью. Например, лекарств, которые будут нацелены только на мРНК, несущие патологические мутации, или на участки «стыковки» в химерных мРНК, возникающих в результате лейкозогенных хромосомных транслокаций. При этом такие miРНК не будут влиять на работу нормальных генов в здоровых и больных клетках.

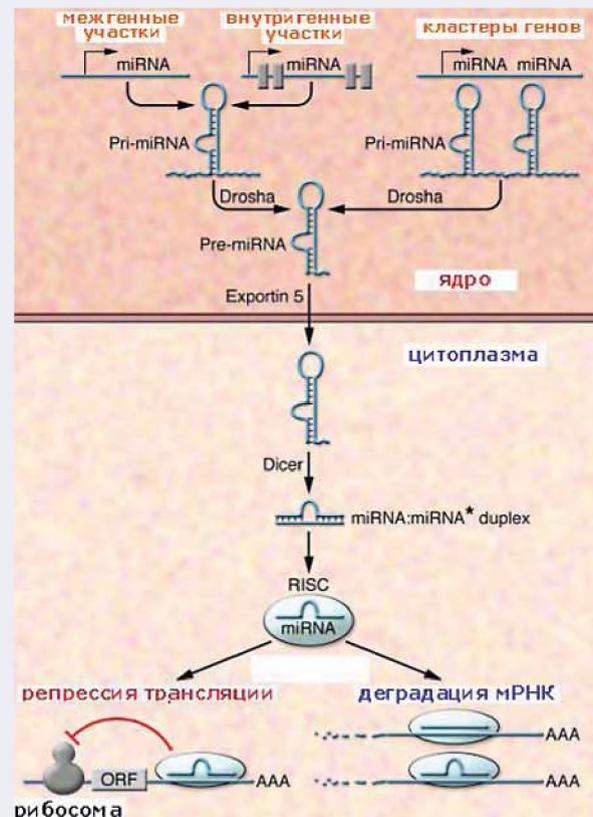
В эпигенетическом контроле дифференцировки кроветворных клеток также принимает участие большое число микроРНК различного типа (см. Приложение 5) [16].

Большие надежды в работах по перепрограммированию соматических стволовых клеток возлагаются на использование «коктейлей» из факторов активации транскрипции (подобных паре GATA1–PU.1) [17, 18]. Лейкозные стволовые клетки [19, 20], вероятно, также обладают способностью к перепрограммированию (репрограммированию, т. е. возвращению на более высо-

кий уровень потенции), так как они обладают способностью к самоподдержанию, близкой к уровню самоподдержания HSCs.

В этой лекции (в разделе «Механизмы коммитирования кроветворных клеток» и Приложениях 3–4) мы рассмотрели общие механизмы функционирования комплексов активации транскрипции, которые подвергаются нарушениям при мутациях II класса.

Следующая лекция будет посвящена функционированию основных путей сигнальной трансдукции, которые активируются при мутациях I класса.



Л и т е р а т у р а

1. Владимирская Е.Б. Механизмы кроветворения и лейкогенеза (цикл лекций). М.: Династия, 2007.
2. Hanahan D., Weinberg R. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000;100(1):57–70.
3. Копнин Б. Неопластическая клетка: основные свойства и механизмы их возникновения. *Практическая онкология* 2002;3(4):229–35.
4. Colotta F., Allavena P., Sica A. et al. Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: links to genetic instability. *Carcinogenesis* 2009;30(7):1073–81.
5. Luo J., Solimini N., Elledge S. Principles of cancer therapy: oncogene and non-oncogene addiction. *Cell* 2009;136(5):823–37.
6. Negrini S., Gorgoulis V., Halazonetis T. Genomic instability – an evolving hallmark of cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2010;11(3):220–8.
7. Kelly L., Gilliland D. Genetics of myeloid leukemias. *Annu Rev Genom Hum Genet* 2002;3:179–98.
8. Radtke I., Mullighan C., Ishii M. et al. Genomic analysis reveals few genetic alterations in pediatric acute myeloid leukemia. *PNAS* 2009;106(31):12944–9.
9. Stavropoulou V., Braut L., Schwaller J. Insights into molecular pathways for targeted therapeutics in acute leukaemia. *Swiss Med Wkly* 2010;140:1–8.
10. Чертков И.Л., Дризе Н.И., Воробьев А.И. Схема кроветворения. *Терапевтический архив* 2006;7:5–12.
11. Чертков И.Л., Дризе Н.И. Дифференцировочный потенциал стволовых клеток (проблема пластичности). *Вестник РАМН* 2005;10:37–44.
12. Burda P., Laslo P., Stopka T. The role of PU.1 and GATA-1 transcription factors during normal and leukemogenic hematopoiesis. *Leukemia* 2010;24(7):1249–57.
13. Graf T., Enver T. Forcing cells to change lineages. *Nature* 2009;462:587–94.
14. Ceredig R., Rolink A., Brown G. Models of haematopoiesis: seeing the wood for the trees. *Nat Rev Immunol* 2009;9(4):293–300.
15. Orford K., Scadden D. Deconstructing stem cell self-renewal: genetic insights into cell-cycle regulation. *Nat Rev Genet* 2008;9:115–28.
16. Gangaraju V., Lin H. MicroRNAs: key regulators of stem cells. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2009;10:116–25.
17. MacArthur B., Maayan A., Lemischka I. Systems biology of stem cell fate and cellular reprogramming. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2009;10:672–81.
18. Hochedlinger K., Plath K. Epigenetic reprogramming and induced pluripotency. *Development* 2009;136:509–23.
19. Wang J., Dick J. Cancer stem cells: lessons from leukemia. *Trends Cell Biol* 2005;15:494–501.
20. Дризе Н.И. Различия между лейкозными и нормальными кроветворными стволовыми клетками. *Онкогематология* 2006;1–2:5–9.
21. Maston G., Evans S., Green M. Transcriptional regulatory elements in the human genome. *Annu Rev Genom Hum Genet* 2006;7:29–59.
22. Fuda N., Ardehali B., Lis J. Defining mechanisms that regulate RNA polymerase II transcription *in vivo*. *Nature* 2009;461:186–92.
23. Georgopoulos K. Haematopoietic cell-fate decisions, chromatin regulation and Ikaros. *Nat Rev Immunol* 2002;2:162–74.
24. Cloos P., Christensen J., Agger K. et al. Erasing the methyl mark: histone demethylases at the center of cellular differentiation and disease. *Genes Dev* 2008;22:1115–40.
25. Van Rooij E., Olson E. MicroRNAs: powerful new regulators of heart disease and provocative therapeutic targets. *J Clin Invest* 2007;117(9):2369–76.
26. Jinek M., Doudna J. A three-dimensional view of the molecular machinery of RNA interference. *Nature* 2009;457:405–12.
27. Wang V. MicroRNA-based therapeutics for cancer. *BioDrugs* 2009;23(1):15–23.