

Բանախոս • Дискуссии • Discussion

Биолог. журн. Армении, 3-4 (56), 2004

УДК 616-006:577.2

К ПРОБЛЕМЕ ВИРУСНОГО ОНКОГЕНЕЗА

А.С. АГАБАЛЯН, А.М. КУШКЯН

Ереванский государственный медицинский колледж «Эребуни», 375078

Работа посвящена анализу существующих на сегодня данных по проблеме онкогенеза вообще и вирусного онкогенеза в частности. Изложены известные в настоящее время теории возникновения и развития злокачественных опухолей. Основное внимание уделено вирусно-генетической теории возникновения опухолей. Рассмотрены биологические и физико-химические свойства онкогенных вирусов, в том числе и ретровирусов. С современных позиций охарактеризованы онкогены вирусов, вирусные и клеточные трансформирующие гены, в конечном счете индуцирующие злокачественный рост.

Հետազոտությունում վերլուծված են ներկայիս գոյություն ունեցող տվյալները օնկոգենեզի խնդիրը ընդհանրապես և վիրուսային օնկոգենեզը մասնավորապես: Եւրադրված են ներկայիս հայտնի չարորակ ուռուցքների ծագումը և զարգացման տեսությունները: Ավել ուշադրություն է դարձվում ուռուցքների վիրուսագենետիկական ծագման տեսությանը: Ձեռնվում են օնկոգեն վիրուսների կենսաբանական և ֆիզիկաքիմիական հատկությունների, այդ թվում նաև հետադարձ վիրուսների (ռետրո): Ժամանակակից դիրքերից բնութագրված են վիրուսների օնկոգենները, վիրուսային և բջջային փոխակերպված գենները, որոնք վերջին հաշվով, նպաստում են չարորակ ուռուցքների աճին:

The existing data on problems of oncogenesis in general and virus oncogenesis in particular are analysed in the work. The known theories of occurrence and development cancer are also laid down here. The most attention is devoted to virus-genetic theory of cancer occurrence. The biological and physico-chemical properties of oncogene viruses, including retroviruses are examined. The viruses oncogenes, viral and transforming genes that eventually induce malignization growth are characterized as well.

Вирусный онкогенез – онкогены – ретровирусы – ДНК – РНК – обратная транскриптаза – трансформация

Разнообразие форм злокачественных опухолей и факторов, вызывающих их, говорит о множественности путей возникновения этих заболеваний. В настоящее время существует ряд теорий происхождения опухолей, разработанных с учетом их биохимических, метаболических, вирусологических, молекулярно-биологических и других предпосылок и аргументов [8, 9, 10, 18]. К числу такого рода теорий и гипотез можно отнести: *теорию метаболических нарушений как предпосылки возникновения рака, теорию индукции опухолей химическими веществами, вирусную теорию происхождения опухолей, мутационно-генетическую теорию, теорию онкогена*. В то же время было установлено, что на уровне клетки неоплазия – явление наследственное и, следовательно, связанное с изменениями в генетическом материале клеток, т.е. в ДНК. Причин возникновения рака, как уже указывалось, большое множество, но все они должны проходить через ДНК клетки, оставляя

в ней определенный след.

В основе современной теории канцерогенеза лежит модель, рассматривающая клеточный **онкоген** в качестве важного звена в процессе онкогенной трансформации [5, 19]. В соответствии с этой моделью онкоген представляет собой нормальные последовательности клеточной ДНК, чья неадекватная экспрессия меняет свойства или функции экспрессируемого продукта. В этой ситуации возможны два аспекта: 1) количественные изменения с переходом количества в другое качество и 2) качественные изменения — т.е. клеточная последовательность (**протоонкоген**) меняется под воздействием различных факторов. Косвенное подкрепление этой модели пришло из вирусологии — вирусо-генетической теории возникновения рака.

Значительный вклад в становление и развитие общей теории канцерогенеза внесло изучение молекулярных механизмов трансформации клеток онкогенными вирусами. Преимущества онкогенных вирусов по сравнению с другими канцерогенными агентами в изучении онкогенеза заключается во-первых, в скоротечности индуцируемого ими биологического действия, во-вторых, в способности опухолеродных вирусов поражать широкий круг позвоночных и клеточных популяций и, в-третьих, в относительной простоте генетической структуры вирусов [6]. В середине прошлого столетия Хьюбергом и Тодаро была разработана гипотеза **вертикальной** передачи онкогенных вирусов, согласно которой вирусы-возбудители лейкемии и других злокачественных опухолей передаются непосредственно через половые клетки от одного поколения к другому. И, наконец, еще одно предположение, что трансформация нормальных клеток в опухолевые обусловлена включением в геном клетки генетического материала вируса. Это предположение послужило основанием для рождения вирусо-генетической теории возникновения опухолей, основоположником которой явился Зильбер [8].

Во всех случаях вирусиндуцированного канцерогенеза онкогенные вирусы внедряют в инфицированную клетку свой геном, в том числе и трансформирующий ген (**вирусный онкоген, V-onc**), продукт которого индуцирует и поддерживает трансформированное состояние клеток мишени [16].

Онкогенные вирусы, согласно молекулярной структуре их генома, подразделяются на две группы: первая содержит в качестве генома ДНК (**онкоднавирусы**), вторая — РНК (**онкорнавирусы**). Онкогенные вирусы, обладающие ДНК-геномом в свою очередь подразделяются еще на несколько групп, некоторые члены которых обладают свойствами, позволяющими рассматривать их как онкогенные. Они способны индуцировать опухоли у позвоночных и трансформировать культуры клеток. К числу таких вирусов относятся папавирусы (папилома, полиома, вариола вере), аденовирусы, герпесвирусы и вирусы гепатита (**гепадна вирусы**). В то же время онкогенные РНК-содержащие вирусы являются членами одной таксономической группы семейства **ретровирусов** (*Retroviridae*). Это семейство включает все вирусы, имеющие рибонуклеиновый геном и содержащие фермент РНК-зависимую-ДНК-полимеразу, впервые выделенную и описанную в начале семидесятых годов прошлого столетия Темином и Балтимором [17, 18] и названную **ревертазой** или **обратной транскриптазой**.

По биологическим свойствам и структуре генома выделяют три основных типа онкогенных ретровирусов [11]. Аналогичные типы ретровирусов выделены также у мышей — MuSV, MuLV, MuLLV. Из этих вирусов только лимфоидно-

лейкозные (LLV) являются полноценными, способными к самостоятельному воспроизведению. Это объясняется тем, что они содержат все три гена, необходимые для воспроизведения генома ретровирусов и образования структурных белков вириона — gag, pol, env. Но, в отличие от других ретровирусов, LLV не несут онкогены (onc-гены) — генов, вызывающих трансформацию клеток. В то же время вирусы птиц типов ASV (саркомный) и ALV (лейкемический) содержат в своем геноме онкогены, что и делает их высокоонкогенными, трансформирующими вирусами, однако они не способны к размножению, так как дефектны по функциям репродукции из-за отсутствия одного, двух или всех трех соответствующих генов — gag, pol, env. Из числа трансформирующих вирусов исключение составляет только вирус саркомы птиц Рауса (BCP, RSV), который кроме онкогена — src содержит одновременно полноценные gag, pol и env.

Все ретровирусы имеют некоторые общие химические, биофизические и морфологические свойства. Они содержат 60-70% белков, в том числе продукты генов (gag — внутренние структурные белки, pol — обратная транскриптаза и env — белки вирусной оболочки).

Прошло уже много времени с тех пор как утвердилось мнение о необходимости в репродуктивном цикле ретровирусов стадии промежуточного синтеза ДНК. Предположение о том, что для репродукции и трансформации клеток, инфицированных ретровирусами, необходим синтез ДНК, впервые было высказано Теминым. Открытие обратной транскриптазы выявило необычный аспект в репликации РНК-содержащих онкогенных вирусов. Было установлено, что репликации РНК онкорнавирусов осуществляются через ДНК, синтезируемую на матрице РНК при помощи ревертазы. Схему репликации онкорнавирусов можно представить в виде следующей: РНК-ДНК-РНК. Это открытие позволило вывести онкорнавирусы в отдельную группу, принципиально отличающуюся от всех остальных живых организмов вообще и вирусов в частности. Только в онтогенезе онкорнавирусов происходит перекодирование РНК на ДНК и обратно, приводя к синтезу промежуточной ДНК или, другими словами, ДНК-провируса. Перекодированный из РНК вирионов в ДНК, геном ретровирусов интегрируется с геномом клетки. Становится очевидным, что геномы онкогенных РНК- и ДНК-содержащих вирусов, внедряясь в разные места клеточных хромосом, могут включать в свой состав и переносить между организмами гены хозяина. Вследствие этого, онкогенные вирусы не только вносят в клеточный геном свою собственную информацию, но и вызывают его генетические изменения-мутации, обеспечивают активацию *молчащих* генов, создают *поток* генов между особями даже разных видов. Поэтому онкогенные вирусы следует отнести к числу факторов, дестабилизирующих геном и вызывающих его изменчивость.

Геном недефектных высокоонкогенных ASV содержит четыре гена, кодирующих белки: gag — структурные белки нуклеоида (внутреннего рибонуклеопротеида), pol — обратную транскриптазу, env — гликопротеины оболочки вириона, src — онкоген — белок, ответственный за трансформацию клеток хозяина. Для размножения вирусных частиц необходимы gag, pol, env, а src не нужен. Структура генома нетрансформирующих лимфолейкозных вирусов отличается от RSV в основном только отсутствием онкогена. С другой стороны, ретровирусы, содержащие онкогены, весьма разнообразны по структуре внутренних районов своего генома, которая зависит от изменений, происшедших при инте-

грации онкогенов. Большинство молекул вирусной ДНК, синтезированной *in vitro*, представляют собой короткие фрагменты ограниченной части вирусного генома. В ходе репродукции ретровирусов в клетке определяются три основные формы вирусной ДНК: линейная двухспиральная, циркулярная двухспиральная и ковалентно-интегрированная в геном хозяйской клетки. Линейная форма ДНК одинаково эффективно синтезируется в цитоплазме как ядерных, так и безъядерных клеток, что свидетельствует об ее цитоплазматическом происхождении. В дальнейшем линейная ДНК транспортируется в ядро, где происходит превращение линейной формы провируса* в кольцевую. Образование кольцевого провируса является последним этапом перед интеграцией вирусного и клеточного геномов. В процессе формирования кольцевой молекулы провируса основную роль играют так называемые LTR (длинный концевой повтор), представляющие собой комбинацию последовательностей U3RU5 геномной РНК в линейной и кольцевой формах ДНК-провируса. Циркулярная ДНК выделяется только из ядерной фракции инфицированных клеток. Открытие циркулярной формы ДНК-провируса ретровирусов выдвинуло гипотезу об едином механизме интеграции в геном хозяина генетического материала не только ретровирусов, но и ДНК-содержащих вирусов. Нам в экспериментах по выявлению биологической активности ДНК, выделенной из экспериментальной опухоли саркомы-45 крыс и гепатомы 22-а мышей и введенной лабораторным животным, удалось из ядерной фракции печени экспериментальных животных выделить циркулярные, ковалентно замкнутые ДНК, по-видимому, играющие роль ДНК-провируса [2-4]. Главная функция ДНК-провируса, как вирусной матрицы в клетке, состоит в редупликации и обеспечении синтеза вирусных иРНК, образование которых говорит о начале стадии экспрессии вирусного генома. Однако, вследствие интеграции клеточного и вирусного геномов, наблюдаются также дополнительные функции провируса: мутагенез, промоция транскрипции клеточной ДНК, трансдукция, транспозиция, делеции и эксцизии, онкогенез. Функция провируса в онкогенезе в основном заключается в экспрессии его генного продукта. В связи с тем, что вирусные онкогены не всегда обнаруживаются в провирусе, который индуцирует онкогенез, предполагается, что позиция провируса в хозяйском геноме может определять малигнизацию клеток мишеней [12].

Вирусы, обладающие опс-последовательностями (онкогенами), изолированы от 6 видов животных. Сравнение опс-областей генома этих вирусов с помощью молекулярной гибридизации, фингерпринтного анализа онкобелков и пептидного картирования показало, что более 20 клеточных генов являются прародителями вирусных онкогенов.

Вирусные и родственные им клеточные последовательности принято обозначать следующими сокращениями: V - вирусный и С — клеточный онкогены. Если название онкогена представлено без префикса, то это указывает на его вирусный характер. Предположения о клеточном происхождении вирусного онкогена, который по аналогии с явлением трансдукции микроорганизма захватывается опухолеродным вирусом из клетки, превращая этот вирус в онкогенный, были высказаны еще в 60-х годах прошлого столетия [17]. Несколько отличная протовирусная гипотеза была сформулирована Темином, согласно которой все гены ретровирусов, включая и онкоген, постоянно возникают заново из клеточных генов в процессе индивидуального развития организма [18].

После идентификации онкогенов вирусов и протоонкогенов нормальных клеток наступил этап выяснения, как же обстоит дело с трансформированными клетками, есть ли у них аналогичные нуклеотидные последовательности и не обладают ли они структурными или функциональными особенностями. Сравнение нуклеотидных последовательностей показало, что разница между нормальным геном и трансформирующим состоит в одной единственной замене: гуанина на тимин в начале структурной части гена. Это приводит к тому, что изменяется 12-я аминокислота в продукте этого гена и в белке p21 вместо глицина появляется валин. Этого, как оказалось, достаточно, чтобы сообщить трансформирующие свойства продукту онкогена в клетке рака мочевого пузыря.

Сегодня уже очевидно, что открытие вирусных онкогенов определило главное направление в изучении механизмов трансформации клетки. Стало необходимым ответить на вопрос: что происходит с вирусиндуцированными клеточными онкогенами (протоонкогенами) в процессе превращения нормальной клетки в опухолевую. В конце двадцатого столетия была открыта вторая группа онкогенов, ассоциированных с клеткой, которые не имеют аналогов среди известных в настоящее время ретровирусов животных. Эти гены получили название клеточных трансформирующих генов или просто **онкогенов**. Клеточные трансформирующие гены - это локусы ДНК, которые в результате генетических перестроек или иных активирующих событий приобретают способность трансформировать некоторые реципиентные клетки [9, 10, 13].

Эксперименты по переносу генов показали, что образцы ДНК химически трансформированных клеток несут в своем составе трансформирующие последовательности, онкогены. Существование подобных трансформирующих последовательностей, выявляемых в экспериментах по переносу гена, было показано в ДНК большого количества различных опухолей, биопсийного материала человека и опухолевых клеточных линий [14].

Нашими исследованиями установлено, что ДНК, выделенная из аденокарциномы толстой кишки человека и введенная лабораторным животным в виде кальциевого преципитата, интегрирует в геном хозяина и экспрессируется, вызывая развитие злокачественного роста в толстой кишке крыс, не затрагивая другие органы. Эти результаты предполагают, что ДНК, выделенные из различных органов, обладают выраженным тропизмом к органам и тканям, из которых она получена [1].

Открытие вирусных и клеточных трансформирующих генов, индуцирующих злокачественный рост, а также доказательство клеточного происхождения вирусных онкогенов привели к заметному снижению интереса исследователей к дальнейшему поиску неизвестных вирусов. Можно считать, что это оправдано, так как за последние десятилетия из нормальных и опухолевых клеток человека было выделено лишь небольшое число реальных ретровирусов человека, не принадлежащих к эндогенным вирусам животных. Нередко в опухолевых клетках человека выявлялись следы отдельных вирусспецифических компонентов, которые, однако, при детальном рассмотрении не имели ничего общего ни с эпидемиологией определенного типа опухолей, ни с патогенетическим процессом превращения нормальной клетки в опухолевую.

Важно подчеркнуть, что роль онкогенных вирусов в происхождении опухолей человека в период становления онковирусологии была, по-видимому,

несколько завышена, что в конечном счете имело известные негативные последствия, поскольку ориентировало исследователей в более узком, вирусологическом направлении.

Недавние вирусологические и эпидемиологические исследования позволяют рассматривать три группы онкогенных вирусов в качестве реальных кандидатов на роль этиологических факторов неопластических заболеваний человека. Это прежде всего ретровирус Т-лимфолейкоза взрослых людей, а также герпес-вирусы и гепаднавирусы. Представляется интересным проследить связь вируса Т-клеточного лимфолейкоза взрослых (HTLV) с малигнизацией гемопоэтических клеток человека. HTLV-С — типа экзогенный ретровирус человека, выделенный из опухолевых клеток взрослых, больных Т-клеточной лимфомой-лейкемией. Это HTLV, новый вирусный агент, индуцирующий злокачественные заболевания человека. Он найден у всех больных, у которых содержатся антитела к вирусным белкам, индуцирует и трансформирует соответствующие клетки мишени в культуре.

Характер взаимодействия HTLV с чувствительной клеткой-хозяином (Т-лимфоцитом) оказался неожиданным. Моноклональные антитела, полученные против белка р19, продукта гена gag HTLV, перекрестно реагируют с эпителиальным антигеном тимуса здорового человека. Поскольку HTLV является экзогенным вирусом, обнаружение продукта гена gag р19 в нормальном тимусе человека могло указывать на то, что этот антиген кодируется не вирусным, а клеточным геном и попадает в вирион при сборке вирусных частиц. Однако это предположение не получило экспериментального подтверждения. Моноклональные антитела, полученные против белков р19-р24, свидетельствуют о том, что белок р 19 кодируется вирусным геном. Механизм трансформации Т-лимфоцитов HTLV остается до настоящего времени неизвестным. Предполагается, что интеграция ДНК-провируса HTLV приводит к активации одного или нескольких протоонкогенов. При изучении экспрессии с-опс в клеточной линии взрослого больного острым Т-клеточным лимфолейкозом HUT-102 выявлено присутствие иРНК, комплементарных онкогенам v-мус, v-ras и v-sis, причем экспрессия протоонкогена sis была обнаружена только в этой клеточной линии из всех тестируемых гемопоэтических клеточных линий опухолевого и нормального происхождения [15, 16].

Значительную роль в возникновении некоторых форм неопластических заболеваний человека играют вирусы группы герпеса. В некоторых опухолях человека выявлены частицы, имеющие характерные для вирусов группы герпеса свойства. Обнаружена экспрессия вирусных антигенов в опухолевых клетках и выявлены вирусспецифические РНК и ДНК. К этим опухолям относятся: лимфома Беркита, назофарингиальный рак (ассоциация с вирусом Эпштейн-Барра, EVB) и рак шейки матки у женщин (ассоциация с вирусами герпеса *Herpes simplex virus* (HSV): HSV-1 и HSV-2. Вирусы EVB и HSV способны *in vitro* трансформировать соответствующие культуры клеток, мишенями для EVB являются И-лимфоциты человека. Инфекция И-клеток человека сопровождается незлокачественной трансформацией лимфоцитов. Напротив, инактивированный ультрафиолетовым облучением HSV трансформирует культуры клеток фибробластов грызунов, которые относительно быстро приобретают раковый фенотип.

В настоящее время основное направление молекулярно-биологического изучения как генома EVB и HSV, так и трансформированных ими клеток направлено на идентификацию трансформирующих генов вирусов и продуктов их экспрессии в процессе трансформации клеток-мишеней. Механизм трансформации И-лимфоцитов человека EVB изучен наиболее полно, что позволяет объединить в единое целое несколько молекулярных процессов, приводящих к формированию лимфомы Беркитта. В процессе малигнизации В-лимфоцитов человека участвует каскад генетических элементов, в их числе трансформирующие последовательности EVB, экспрессия протоонкогена *c-myc* и активация семейства онкогенов *ras* и онкогена *B-lum*. Молекулярный механизм малигнизующего действия вирусов HSV изучен значительно хуже, установлено, в частности, что два герпесвируса обоих серотипов (1 и 2) содержат в своем геноме трансформирующие гены, способные озлокачивать компетентные клетки.

Несмотря на то что в культурах опухолевых клеток человека и животных была установлена необходимость персистенции трансформирующих генов ретровирусов и паповавирусов с целью поддержания малигнизированного статуса этих клеток, подобная связь между малигнизацией и трансформирующими генами пока не определена. Тем не менее многочисленные данные о взаимодействии генома HSV с ДНК инфицированных клеток позволяют предположить причастность герпесвирусных онкогенов к стадии инициации трансформации, но не к поддержанию малигнизированного состояния клеток по принципу *«hit and ran»* *«ударил-убежал»*. Необычность характера опухолеродного действия HSV объясняется еще и тем, что вирусы группы герпеса могут функционировать как мутагены. Идентификация трансформирующих областей генов HSV-1 и HSV-2, обнаруженных в некоторых случаях рака шейки матки, свидетельствует о возможной канцерогенной опасности герпесвирусной инфекции половых путей женщин и позволяет сделать определенные заключения по поводу природы этого заболевания. В то же время данные, полученные о герпесвирусах, пока еще не раскрывают окончательного хода молекулярных процессов при малигнизации эпителия шейки матки у женщин и связи герпесвирусов с неоплазиями людей.

При изучении молекулярных процессов, происходящих при взаимодействии вирусных генов с клеточным геном, открыты такие важнейшие биологические феномены как интеграция геномов, обратная транскрипция, трансдукция клеточных генов в вирусный геном. Все это привело к идентификации особой категории генов многоклеточных организмов, имеющих непосредственное отношение к росту (*c-sis*, *c-ras*, *c-erb*), пролиферации (*c-ras*, *c-myc*), дифференцировке (*c-fos*) и трансформации клеток.

Эволюционное происхождение ретровирусных онкогенов оставалось неясным до открытия положения о том, что ДНК как птиц, так и млекопитающих содержат нуклеотидные последовательности, гомологичные онкогену *src* вируса саркомы Рауса. Эти положения стали основой для двух предположений: 1) все позвоночные обладают высококонсервативным геном (клеточный *src*), который родственен вирусному *src* и поэтому является потенциальным онкогеном; 2) вирусный *src* возник путем трансдукции клеточного *src* в предшествующий ретровирус.

У каждого из вновь выявленных онкогенов обнаруживали клеточный гомо-

лог, из которого, по-видимому, возник вирусный онкоген. Можно предположить, что онкогены являются лишь моделью большой группы клеточных генов с онкогенным потенциалом, т.е. «*раковым геном*». По мнению Хюбнера и Тодаро, онкогены ретровирусов являются только частью генетического «багажа» всех клеток [16]. Согласно этому представлению, онкогены безобидны до тех пор, пока остаются в покое, когда же они активируются различными канцерогенными агентами, то индуцируют в клетках раковый рост.

ЛИТЕРАТУРА

1. Агабалян А.С., Агавелян А.М., Давтян О.Я. ДНАН Армении, 2, 166-169, 1998.
2. Агабалян А.С., Давтян О.Я., Багдасарян А.А. и др. ДАН Арм.ССР, 1, 31-35, 1989.
3. Агабалян А.С., Погосян Р.Г., Степанян Г.М. и др. Биолог. журн. Армении, 32, 4, 320-325, 1979.
4. Агабалян А.С., Рухкян Л.А., Захарян Р.А. ДАН Арм. ССР, 2, 93-96, 1989.
5. Агеев А.И. «Онкогены и канцерогенез», М., Медицина, 255с., 1980.
6. Альштейн А.Д. В кн: «Общая и частная вирусология», т.1, 292-322, 1982.
7. Жданов В.М. Вопр.онкологии, 1, 98-104, 1984.
8. Зильбер Л.А., Ирлин И.С., Киселев Ф.Л. «Эволюция вирусогенетической теории возникновения опухолей», М., Наука, 344с., 1975.
9. Киселев Л.Л. Журн. Всесоюз. хим. общества, 3, 242-249, 1986.
10. Киселев Ф.Л., Спитковский Д.Д. Журн. Всесоюз. хим. общества, 3, 272-277, 1986.
11. Сейц И.Ф., Князев П.Г. «Молекулярная онкология», Л., Медицина, 352с., 1986.
12. Серова И.М., Шпатарь О.А., Федоров С.Н. Вопр.онкологии, 8, 89-92, 1985.
13. Спитковский Д.Д., Зборовская И.Б. Мол. биология, 5, 1409-1421, 1986.
14. Татосян А.Г., Галецкий С.А., Киселева Н.П. ДАН СССР, 3, 726-728, 1983.
15. Alitao K. Med.Biol., 62, 304-317, 1984.
16. Hubner R., Todaro G. PNAS, 64, 1087-1094, 1969.
17. Temin G., Mizutani I. Nature, 225, 211-213, 1970.
18. Temin G., Baltimore D. Adv. Virus Res., 17, 129-186, 1972.
19. Varmus H.E. Science, 216, 812-827, 1982.

Поступила 6.11.2004