

SISUKORD

1. ONKOGENEESI MÕISTE	2
2. SIGNAALI ÜLEKANNE JA ONKOGENEES	3
2.1. G-VALKUDEGA SEOTUD RETSEPTORID JA ONKOGENEES	3
2.2. KASVUFAKTORID JA KASVAJA	4
2.3. KASVUFAKTORITE RETSEPTORID JA KASVAJAD	5
2.3.1. <i>Retseptorite avaldumine ja kasvajak</i>	5
2.3.2. <i>Kasvufaktorite retseptorid ja viiruse onkovalgud</i>	6
2.3.3. <i>Onkogeensed retseptorid</i>	6
2.4. TSÜTOPLASMAATILISED PROTEIIN-TÜROSIINKINAASID JA KASVAJAD	8
2.4.1. <i>Src kinaasid</i>	9
2.4.2. <i>Csk kinaasid</i>	10
2.4.3. <i>Btk kinaasid</i>	10
2.4.4. <i>Abl kinaasid</i>	10
2.4.5. <i>Tsütoplasmaatilised protein-türosiinkinaasid ja viiruse onkovalgud</i>	12
2.5. ADAPTERVALGUD KUI ONKOVALGUD	12
2.6. RAS VALGUD JA KASVAJAD	13
2.6.1. <i>Ras valgu ehitus ja aktivatsioon</i>	13
2.6.2. <i>Ras perekonna valgud</i>	15
2.6.3. <i>Ras perekonna valkude abivalgud</i>	17
2.7. FOSFATIDÜÜL-INOSITOL-3-KINAAS (PI3K) JA AKT KINAAS	18
2.8. RAF VALGUD JA KASVAJAD	19
2.9. MEK JA MAP KINAASID JA KASVAJAD	19
2.10. SIGNAALI ÜLEKANDES OSALEVAD TRANSKRIPTSIOONIFAKTORID KUI ONKOVALGUD	20
3. KASVAJA SUPRESSOR-VALGUD JA KASVAJAD	23
3.1. TUUMOR-SUPRESSORVALK P53	23
3.2. RETINOBLASTOOMI VALK PRB	25
3.3. TEISI KASVAJA SUPRESSORVALKE	26
3.3.1. <i>Tsükliinsõltuvate kinaaside inhibiitorid</i>	26
3.3.2. <i>TGFβ-Smad signaali rada</i>	26
3.3.3. <i>Fosfataasid</i>	26
3.3.4. <i>GTP-aasi aktivaatorid</i>	27
3.3.5. <i>APC valgud</i>	27
3.3.6. <i>BRCA valgud</i>	27
3.3.7. <i>Superoksiidi dismutaas (SOD)</i>	27
4. APOPTOOS JA KASVAJA	29
4.1. APOPTOOS	29
4.2. APOPTOOSI REGULEERIJAD	29
4.3. APOPTOOS JA VÄHIRAVI	31
4.3.1. <i>Signaali tee inhibiitorid</i>	31
4.3.2. <i>Geeniteraapiad</i>	32
4.3.3. <i>Viroteraapia</i>	32

1. Onkogeneesi mõiste

Organismis on igal rakul oma koht, arengu tee ja funktsioon. See on tagatud õige informatsiooni vahetusega raku ja teda ümbritseva keskkonna vahel. Kui mõni rakk hakkab kontrollimatult kasvama, muutub kasvajakaraks, siis on tegemist onkogeneesiga (kreeka keeles on *onkos* kasvaja ja *genos* teke). Selle protsessi käivitamiseks on raku tasemel kolm põhjust: 1) rakk saab pidevalt valesid signaale ümbuskonnast, 2) signaali ülekandes on viga, 3) viga on raku vastuses. Kasvajakarade uurimisel on leitud muutusi kõigis kolmes etapis: on muutunud signaalainete, hormoonide ja kasvufaktorite, tootmine; on muutunud signaali-ülekanne ahelas osalevate valkude omadused; on muutunud raku kasvu kontrollivad süsteemid, mutatsioonid on kasvaja supressor-geenides. Kas need muutused on onkogeneesi põhjus või tagajärg, ja milline muutus on põhjus ja milline tagajärg, see pole selge.

Kõigepealt mõistetest. **Onkovalk** on selline valk, mis on teatud tingimustel võimeline muutma rakke kasvajakaradeks. **Onkogeen** on geen, mis kodeerib onkovalku. Onkogeenid kuuluvad iga eukariootse genoomi koosseisu ja on vajalikud raku kasvamiseks ja paljunemiseks. Raku onkogeeni nimetatakse ka proto-onkogeeniks, see on raku kontrolli all olev onkogeen, avaldub siis, kui selleks on vajadus. Raku onkogeenide homologid, nende muteerunud vormid, on sageli lülitunud retroviiruste genoomi ja sellised viirused on võimelised tekitama kasvaja. Viiruse onkogeen on viiruse kontrolli all ja avaldub viirusega nakatunud rakus, seal toodetakse onkovalku suures hulgas. Enamus praegu tuntud onkogeene ongi algselt leitud just retroviirustes ja ka onkogeenide nimetused on suurelt jaolt viirusest pärit või siis arsti nimest, kes antud viirust uuris. Nii et onkogeeni nimi ei iseloomusta temalt toodetud valgu biokeemilist toimet.

Kasvaja tekkega on seotud veel teine tüüp geene, mis on sageli kasvajat muteerunud – **kasvaja supressor-geenid** e. tuumori supressor-geenid. Nendelt toodetud valgud, kasvaja supressorvalgud, kontrollivad raku normaalset elu ja tööd, ei lase rakul kontrollimatult paljunema hakata, lülitavad välja kasvusignaale.

Kolmas rühm kasvajaga seotud geene on mutaator-geenid, nendelt toodetud valgud osalevad DNA vigade parandamisel. Nende puudumine võib viia mutatsioonide tekkimisele ja proto-onkogeenide aktiveerumisele. Oma toimelt on need ka tuumori supressor-geenid.

Vähi tekkega on seotud ka mõiste **kantserogeen**. Kantserogeen ei tähenda geeni biooloogilises mõttes, vaid tähendab ainet, mis põhjustab rakus kasvajasid muutusi, sageli on see aine DNA-d muteeriv, või mingeid valke aktiveeriv või inhibeeriv. Kantserogeenne võib olla ka muu rakule toimiv faktor, näiteks on seda kiirgused ja mõned viirused. Vähi tekkes toimivad viirused ja kemikaalid sageli koos: Epstein-Barr'i viirus (EBV) ja N-nitrosoamiinid nina-neelu kasvajat, hepatiidi viirus B ja alkohol maksavähis, inimese papilloomiviirus (HPV) ja tubakas suu ja neeluvähis.

Onkogeenseid viirusi on nii RNA- kui DNA-genoomiga viiruste hulgas. RNA-viirustest mõned retroviirused omavad raku onkogeeni homoloogi, millelt toodetakse onkovalku, mis võib põhjustada rakkude onkogeenset transformatsiooni. Retroviirused, mis onkogeeni ei oma, võivad aktiveerida raku onkogeene, kui lülituvad raku genoomi onkogeeni lähedale ja võtavad selle töö oma kontrolli alla. Viirused võivad omada ka selliseid onkogeene, millel pole rakus homolooge. Mõnede retroviiruste genoomis on viirusvalkude avaldumist reguleeriv valk, mis võib sekkuda ka raku regulatsiooni protsessidesse ja põhjustada rakkude onkogeenseks muutumist. Ka DNA genoomiga onkoviirused (adenoviirused, herpesviirused, hepadnaviirused, papilloomiviirused, polüoomiviirused) omavad onkogeene, millel pole rakus homoloogi. Nende viiruste onkovalgud mõjutavad rakus mitmeid regulatsiooni protsesse, sidudes ja kõrvaldades kasvaja supressorvalke ja ka aktiveerides onkovalku. Tavaliselt on viirusel mitu onkogeneesile viivat valku: üks seob ja blokeerib kasvaja supressori ja teine aktiveerib signaaliraja valke. Selline koos toimimine aktiveerib raku

kasvu, DNA replikatsiooni, rakkude paljunemise. Miks viirus aktiveerib rakkude paljunemise? Viirusel pole endal kõiki enda paljundamiseks vajalikke valke, ta kasutab oma genoomi paljundamiseks raku nn. replikatsiooni masinavärki. Selleks, et vastavad raku valgud oleksid aktiivsed, peab viirus sundima raku paljunemise teele. Selline raku kasvu stimuleerimine võib soodustada rakkude kontrollimatut kasvu ja viia muutustele, mis on iseloomulikud kasvaja rakule, s.t. põhjustada onkogeenset transformatsiooni. See ei tähenda seda, et igasugune viiruse paljunemine raku tekitab kasvaja, sageli põhjustab viiruse kiire paljunemine rakkude lüüsi või surma apoptoosi teel. On olemas viiruseid, mis suudavad paljuned ainult kiiresti kasvavates rakkudes ja neid siis lüüvida. Kuna kasvaja rakud on sellised kiiresti kasvavad rakud, siis otsitakse viiruseid, mis just neid rakke nakataks ja lüüsid. Seda nimetatakse kasvaja viroteraapiaks. Viiruse ja eukarüootse raku vahelised suhted on üsna keerulised, ainult üks osa neist on seotud onkogeneesiga.

Kasvajakoos on muutunud rakkude omavahelised kontaktid. Mitmed raku pinna valgud, mis vahendavad rakk-rakk interaktsioone (integrinid, kadheriinid jt.), on kasvajakoos muutunud, nende poolt käivitatavad signaali teed on ka muutunud. See aitab kaasa nii rakkude kontrollimatule paljunemisele kui ka rakkudevaheliste sidemete nõrgenemisele, mis viib metastaaside tekkele.

2. Signaali ülekande ja onkogenees

Kuna rakkude kasv ja diferentseerumine on olulisel määral kasvufaktorite retseptoritelt algava signaali tee kontrolli all, sellel teel on kõik signaali kandjad raku onkogeensete produktid, siis selle osa onkogeneesis me antud peatükis põhiliselt vaatamegi. Püüame vaadata, millised muutused on toimunud signaaliülekande valkudes kasvajakudedes, millised signaaliülekande valgud võivad eksperimendi tingimustes rakke muuta kasvajakudedeks ja kuidas mõjutavad mitmed viiruste onkovalgud signaaliülekande protsessi. Väga lühidalt peatume ka G-valkudega seotud retseptoritest lähtuval onkogeneesis.¹

2.1. G-valkudega seotud retseptorid ja onkogenees

Rakus on kõik signaaliteed üksteisega läbi põimunud. Kasvajakoos on muutunud ka neurotransmitterite ja hormoonide poolt käivitatavad signaali teed, mis sageli algavad G-valkudega seotud retseptoritelt. Hormooni tootmine võib olla tõusnud ja see aktiveerib mitmeid protsesse raku. Selline parakriinne või autokriinne 7 korda membraani läbiva retseptori aktiveerimine on leitud paljudes kasvajas, eriti kehtib see neuropeptiidide retseptorite kohta. Näiteks väikese-rakulise kopsuvähi kude sekreteerib bombesiini, bradikiniini, galaniini, neurotensiini ja need stimuleerivad rakkude kasvu. Inimese kartsinoomist on eraldatud *mas*-geeni produkt, mis on 7 korda membraani läbiv retseptor ja võib olla onkogeenne. Selle retseptori loomulikuks ligandiks peetakse angiotensiini. On leitud, et serotoniini 1C retseptori avaldumine teatud rakkudes on serotoniini juuresolekul rakke transformeeriv. Ka mõnede muskariin-atsetüülkoliini (mACh) retseptorite liigne aktiveerimine viib kasvajakaraku tekkele. Kui agonistiga retseptori aktiveerimine võib viia onkogeensele transformatsioonile, siis on võimalikud ka sellised retseptori mutatsioonid, mis muudavad retseptori onkogeenseks. Tegelikult ongi selliseid mutantseid retseptoreid leitud, nad on mutatsiooni tõttu muutunud ligandist sõltumatuks aktiivseks retseptoriks, mis võib põhjustada rakkude onkogeenset transformatsiooni.

¹ Signaaliülekande radadest lähemalt ja ka kasutatud lühenditest vt. [Signaali ülekande eukarüootses raku.](#)

G-valkudega seotud retseptori geene on leitud ka mõnede viiruste genoomist, sealhulgas inimese tsütomegaloviiruse (HCMV), Kaposi sarkoomiga seotud herpesviiruse (HHV-8), ahve nakatava herpesviiruse (HVS) genoomist.

Kasvajatest on leitud muteerunud G-valgu α -alaühikuid, need on pidevalt aktiivsed signaali edastajad. Need muteerunud G-valgud võivad mitmetes raku tüüpides olla onkogeensed.

G_q -valkudega seotud retseptorid aktiveerivad fosfolipaas C (PLC) ja edasi proteiinkinaas C (PKC). Mitmete PKC alaliikide ületootmine rakus muudab rakud kasvajakudeks. Tuntud PKC aktivaator TPA (tetradekanoüül-forbool-atsetaat) on vähkitekitaav ühend ja mitmed onkogeensed viirused aktiveerivad PKC.

Kuidas G-valguga seotud retseptor ja tema poolt käivitatud signaalitee koos PKA ja PKC aktivatsiooniga onkogeneesis osaleb, pole selge. Mitmed tööd näitavad, et G-valkudega seotud retseptor aktiveerib Src-kinaasi ja retseptor-türosiinkinaase, sageli aktiveeritakse proteaasid, mis vabastavad raku pinnalt kasvufaktori, mis omakorda toimib siis retseptorile. Kokkuvõttes jõuab kasvu stimuleeriv signaal ikka välja Ras-Raf-MAPK signaali teele, s.t. kasvufaktorite retseptoritelt algavale teele.

2.2. Kasvufaktorid ja kasvaja

Kasvufaktorid toovad rakkudeni signaali kasvuks või diferentseerumiseks. Ühed rakud toodavad mingit faktorit, teised omavad selle faktori jaoks retseptorit ja vastavad signaalile. Näiteks vigastuste puhul toovad trombotsüüdid vigastuse kohta PDGF (*platelet-derived growth factor*, trombotsüütide pärane kasvufaktor), fibroblastid vastavad sellele hakates paljunema ja haav paraneb. Signaal on lühiajaline: kui vigastus on parandatud, PDGF ja tema retseptori tase langeb ning rakkude kasv lakkab. Teine olukord on krooniliste vigastuste puhul koes. Siis on PDGF tase pidevalt kõrge, pidevalt stimuleeritakse rakkude kasvu. Näiteks suitsetajatel ärritavad tahma osakesed pidevalt kopsu, indutseerides retseptori ja faktori kõrge taseme, mis soodustab lõpuks kasvaja teket. Milline rakk haiges koes toodab faktorit ja milline retseptorit, on raske öelda. Kuid mitmed inimese sarkoomi rakuliinid on muutunud PDGF tootvaks liiniks. Faktorit toodab siin sama rakk, mis sellele vastab. See on **autokriinne stimuleerimine** ja see võib viia kontrollimatule kasvule, raku paljunemine ei ole enam oma naabrite kontrolli all. Kui kasvufaktori tootmise väljalülitamine on häiritud, faktorit toodetakse liiga palju ja pika aja jooksul, siis võib täiesti normaalne faktor olla kasvajat tekitav onkovalk.

PDGF B ahel on *c-sis* geeni produkt. Geeni nimi tuleb sellest, et algselt kirjeldati tema homoloog, ahvide sarkoomi viiruse (*simian sarcoma virus*) onkogeen – *v-sis*. Selle ekspressioon fibroblastides põhjustab rakkude onkogeenset transformatsiooni.

Paljud kasvufaktorid avalduvad normaalselt ainult embrionaalses arengu etapis, täiskasvanud kude neid ei tooda. Kasvaja koed hakkavad kasvufaktoreid pidevalt tootma ja nii stimuleeritakse pidev rakkude kasv.

Kokkuvõtteks võib öelda, et kasvu stimuleerivad kasvufaktorid muutuvad kasvajaid tekitavateks onkovalkudeks kui neid toodetakse **vales kohas, vales ajal või liiga palju**.

On olemas ka inhibeerivad kasvufaktorid. Need on sellised faktorid, mis inhibeerivad rakkude kasvu või viivad rakud apoptoosi. Siia rühma kuuluvad TNF (tuumori nekroosi faktor) ja TGF β (transformeeriv kasvufaktor β). TNF toodavad peamiselt makrofaagid ja monotsüüdid, aga ka paljud teised rakud. Ta on signaali vahendaja põletikulistes protsessides ja immuunvastuse kujunemisel. Ta võib esile kutsuda rakkude nekrootilist ja apoptootilist surma. Nii TGF α kui TGF β indutseerivad fibroblastide transformatsiooni rakukultuuris,

stimuleerivad kolooniate moodustumist, sellest on nad saanud oma nime. Kuid on leitud, et TGF β on multifunktsionaalne, võimeline stimuleerima ja inhibeerima kasvu, käivitama või inhibeerima rakkude liikumise, aktiveerima PDGF. Imetajatel on leitud mitu selle rühma faktorit. Need sünteesitakse suurte polüpeptiididena ja lõigatakse hiljem monomeerideks. Need faktorid võivad olla rakkudele kasvu inhibiitoriks aktiveerides oma seriin/treoniin-kinaasse retseptori ja Smad-valkudega kulgeva signaali tee.

2.3. Kasvufaktorite retseptorid ja kasvajakad

2.3.1. Retseptorite avaldumine ja kasvajakad

Nii stimuleerivad kui ka inhibeerivad faktorid saavad toimida neile rakkudele, mis omavad faktorit siduvat retseptorit.

TGF β jaoks on 2 retseptorit, mis on mõlemad vajalikud signaali vastu võtmiseks. TGF β retseptorid on seriin/treoniin-kinaasid, mis edastavad kasvu inhibeerivaid signaale. Kasvajalistes rakuliinides sageli neid retseptoreid ei ole või on nad muteerunud. Näiteks retinoblastoomi rakuliinis ei ole TGF β retseptorit ja tema kasvu TGF β ei inhibeeri. Selle rakuliini normaalne eellane omab kõiki neid retseptoreid ja on reguleeritav TGF β -ga. TGF β retseptor II geen on inaktiivne käärsoole kasvajas, seal on sageli muteerunud või deleteerunud ka TGF β signaali vastuvõtivate ja edastavate Smad-valkude geenid. Smad-valgud on kasvaja supressorid, nad vahendavad kasvu inhibeerivaid käskke. Kui Smad-valkudes on mutatsioonid, neid ei fosforüülita õigest kohast, või need geenid on inaktiivsed, siis TGF β tee ei toimi. Näiteks pankrease kasvajas on Smad-4 geen deleteerunud, mutatsioonidega Smad-4 on käärsoole, rinna, munasarja, kopsu jt. kasvajas. Smad-valgud on fosforüülitavad MAP-kinaaside poolt ja MAPK üleaktivatsioon võib TGF β toime blokeerida. Kui võrrelda TGF β , EGF ja BMP (*bone morphogenic protein* – luukoe arengut reguleeriv valk) retseptori toimet, siis selgub, et TGF β ja BMP toimivad üle Ser/Thr kinaasse retseptori ja annavad kasvu inhibeerivaid signaale, EGF toimib üle PTK ja stimuleerib kasvu MAPK aktiveerides.

Kui kasvatatakse rakukultuure, siis lisatakse söötmele seerumit, mis sisaldab mitmeid kasvufaktoreid. PDGF retseptori avaldumine on rakukultuuris kasvavates normaalsetes fibroblastides sõltuv söötmes oleva kasvufaktori tasemest: kui on vähe kasvufaktorit, siis retseptori tase tõuseb, et seerumis olevad kasvufaktorid kõik kätte saada. Kasvajarakkudes aga retseptori tase langeb, need rakud kasvavad ka madala seerumiga söötmes. Antud katses olid rakud transformeeritud *v-src* või *v-ras*-onkogeenidega, kasvu stimuleeriv rada oli sisse lülitatud ilma kasvufaktoritagi.

PDGF ja tema retseptorit peetakse onkogeneesis oluliseks ka selles osas, et nad osalevad kasvajakoes veresoonte tekitajana. Kasvaja rakud, mis produtseerivad PDGF, soodustavad kasvajas veresoonte arengut, see võimaldab suurte kasvajakate tekkimist. Veresoonte arengut stimuleerivad ka fibroblastide kasvufaktorid (FGF) ja eriti olulised on vaskulaarse endoteeli kasvufaktorid (VEGF). Paljud faktorid toimivad üle PDGF, indutseerides PDGF ja tema retseptori tootmist. Arvestades PDGF retseptori ja teiste protein-türosiinkinaasidete retseptorite tähtsust kasvajakate tekkele nähakse PTK inhibiitorites potentsiaalseid vähivastaseid ravimeid.

Retseptorist sõltub ka see, kas TNF toimib kasvu stimulaatorina või suunab rakud apoptoosi. On kaks TNF retseptorit TNFR-1 ja TNFR-2. Kui TNF seostub retseptoriga TNFR-2, aktiveeritakse rakkude kasv üle faktori TRAF-2 (TNF retseptoriga assotseeruv factor-2) ja NF κ B (tuumafaktor κ B) aktivatsiooni. Kui TNF aktiveerib TNFR-1, võidakse

rakud apoptoosi suunata. Selleks peab TNFR-1 siduma teisi faktoreid TRADD (TNF retseptoriga assotseeruv surma domään) ja FADD (Fas-ga assotseeruv surma domään). Kui aga TRADD-valguga seostub TRAF-2, aktiveeritakse ka selle retseptori kaudu NFκB. TNF toime sõltub kõigepealt sellest, millise retseptoriga ta seostub, ja edasi sellest, millised signaali vastuvõtavad valgud rakus on. Kui TNFR-1, see raku surma põhjustav retseptor, avaldub pidevalt madalal tasemel, on kogu aeg valvel, siis rakkude elushoidmist ja paljunemist soodustava retseptori, TNFR-2, tootmine käivitatakse mitmete ärritajate poolt. On leitud, et madalal TNF kontsentratsioonil aktiveeritakse üle TNFR-2 ja NFκB rakkude kasv ja kõrgematel faktori kontsentratsioonidel käivitatakse üle TNFR-1 rakkude surma tee.

2.3.2. Kasvufaktorite retseptorid ja viiruse onkovalgud

Mõned viiruse valgud võivad põhjustada rakkude onkogeenset transformatsiooni nii, et aktiveerivad mingi retseptori poolt kontrollitava signaali tee. Näiteks Epstein-Barr'i viiruse (EBV) latentse infektsiooni membraanne valk LMP-1 (*latent infection membrane protein 1*) on vajalik B-lümfotsüütide onkogeenseks transformatsiooniks ja ainukese EBV valguna võib kasvajakarudeks muuta ka mitte-lümfoidseid rakke. Ta lokaliseerub rakus membraanis ja on võimeline oma tsütoplasmaatilise alaga siduma TRAF-2, s.o. TNF retseptoriga seostuvat faktorit. Viimane põhjustab aga NFκB aktivatsiooni ja see võib viia rakkude kasvu stimuleerimisele. Viiruse valk on membraanis pakitud nii, et ta matkib TNF retseptorit ja käivitab sellelt algava signaali tee. Kui normaalses rakus TNF trimeer seostub retseptoriga, siis põhjustab see retseptori ahelate trimeriseerumise ja seostumise rakusiseste valkudega. Tulemus sõltub faktori tasemest ja retseptorist. Viirusega nakatunud rakkudes võib rakusiseste valkude aktivatsiooni esile kutsuda viiruse valk ilma TNF ja tema retseptorita ning aktiveeritakse just paljunemisele viiv tee.

Teine näide on papilloomiviiruse onkovalgust E5. See väike hüdrofoobne valk paikneb nakatunud raku membraanis. See valk ei asenda retseptorit nagu teeb seda EBV valk LMP1, vaid seostub mõne kasvufaktori retseptoriga ja aktiveerib selle. Inimese papilloomi viiruse valk E5 võimendab kasvufaktorite efekti signaali tee aktiveerimisel. Rakkude onkogeenseks muutmiseks on siin vaja nii E5 kohalolekut kui ka kasvufaktori (EGF) toimet. Veise papilloomi viiruse BPV-1 onkovalk E5 on iseseisvalt võimeline rakke onkogeenseks muutma, kui neis töötab PDGF retseptor. BPV E5 seostub membraanis PDGF retseptoriga ja aktiveerib signaali tee. See membraanisene E5 ja PDGFR seostumine on vajalik retseptori aktivatsiooniks ja rakkude kasvu stimuleerimiseks. Kui PDGFR türosiinkinaasne aktiivsus on rikutud või ei tööta signaali tee alumised lülid (Ras- ja Raf-valgud), siis BPV E5 ei stimuleeri fibroblastide kasvu.

Eeltoodud näited kinnitavad, et viiruse onkogeensed valgud võivad sekkuda rakkude ellu aktiveerides kasvufaktorite retseptoreid ja nendelt lähtuvaid signaali teid ilma kasvufaktorita (BPV E5 näide) ja isegi ilma retseptorita (EBV LMP-1 näide). Seejuures on retseptorid ja nendega seostuvad rakusisesed valgud täiesti normaalsed, ilma mutatsioonideta. Onkogeensus seisab selles, et signaali tee käivitatakse valel ajal või vales kohas ja kuna viiruse valku on palju, siis ka pikaks ajaks.

2.3.3. Onkogeensed retseptorid

Normaalne retseptor võib muutuda rakke onkogeenseks muutvaks valguks mutatsioonide ja kromosoomide struktuursete ümberkorralduste läbi.

Mutatsiooni klassikaliseks näiteks on see kui roti epidermiaalse kasvufaktori (EGF) retseptor, mida kodeerib geen *c-erb B*, muutub onkogeenseks valguks ühe aminohappe asendamise

tõttu transmembraanses alas. Valiin asendub glutamiinhappega, seda põhjustab ühe nukleotiidi muutus T→A. See üks punkt-mutatsioon põhjustab pidevalt dimeerina oleva retseptori ja pidevalt aktiivse proteiin-türosiinkinaasi. Selline valk on leitud roti neuroglio-blastoomist ja samuti kemikaalidega tekitatud kasvajatest. Homoloogne geen inimeses *c-erb B-2 (HER2)* annab inimese EGF retseptori valgu (HER2). Selle valgu kõrge tase on leitud mitmetes kasvajates, eriti rinnavähi puhul. Seal ei ole mutatsiooni roti valgule analoogsed positsioonid, aminohappe asendamiseks oleks seal vaja kahte punkt-mutatsiooni, selle tõenäosus on väike. Kasvaja koes on aga leitud selle geeni amplifikatsioon, s.t. seda geeni on palju koopiaid, ja toodetakse palju valku. Kui retseptori valku toodetakse väga palju, esineb ta dimeerse vormina ka ilma stimulaatorita, ja annab pidevalt aktiivse retseptori. EGF retseptori rakuväline ala lõigatakse sageli proteaasidega ära ja see vabanenud 130kDa suurune valk võib olla rinnavähi diagnoosimisel oluline: selle valgu taseme tõus veres näitab selle geeni liigset avaldumist ja viitab võimalikule kasvajale. HER2 valku inaktiveerivad antikehad või tema türosiinkinaasi inhibeerivad ühendid võivad olla vähivastasteks ravimiteks.

Lindude leukeemiaviirusest on leitud geen *v-erb B*, mis on *c-erb B* geeni homoloog, ta on lühem raku normaalsest geenist, sellelt toodetud valgul puudub negatiivse regulatsiooni ala. Nii *v-erb B* kui kasvajatest eraldatud mutantsed *c-erb B* geenid on võimelised rakukultuuris muutma rakke kasvajakude sarnasteks.

Peale mutatsioonide ja geeni amplifikatsiooni võivad onkogeensed retseptorid tekkida ka **kromosomaalsete ümberkorralduste** teel. Sel viisil tekivad hübriidsed valgud, milles üks pool on retseptorist ja teine mingist paardumist soodustavast valgust.

Näited sellistest retseptoritest:

1) *c-met* geen lokaliseerub inimesel 7. kromosoomis, avaldub valikuliselt ainult teatud rakkudes, temalt toodetakse hepatotsüütide kasvufaktori (HGF) retseptorit, see on proteiin-türosiinkinaas, tsütoplasmaatilises osas on türosiinkinaasne ala. Kasvajatest, inimese luu-sarkoomist ja ka keemilisel teel indutseeritud kasvajatest, on leitud pidevalt aktiivne kinaas. See sisaldab HGF retseptori kinaasne ala ja selle ette on liitunud 1. kromosoomis olevalt geenilt pärit Tpr-järjestus (*translocated promoter region*). See viimane annab valgule võime moodustada dimeere ja seda valku toodetakse nüüd hoopis teistes rakkudes, seal, kus avaldub geeni esimene ots, türosiinkinaas ilmub raku, kus teda ei tohiks olla. Sellise hübriidvalgu geen on võimeline rakukultuuris stimuleerima rakkude paljunemist. Dimeriseerumine võimaldab kinaasi ahelatel teineteist fosforüülida, see aktiveerib retseptori, nii käivitataksegi signaali tee ilma, et retseptoriga seostuks kasvufaktor. Tpr-Met valgul ligandi siduvat rakuvälist ala ei olegi ja dimeerina esinev kinaas on tsütoplasmas pidevalt aktiivne.

2) Närvikasvu faktori (NGF) retseptori kinaasne ala on leitud olevat liitunud mitmete valkudega. Isegi NGF retseptori geeni nimetus tuleneb liitvalgust: *trk – tropomyosin receptor kinase*. Tropo-Trk – NGF retseptori kinaasiga on liitunud tropomüosiini osa, mis annab valgule võime dimeere moodustada. Peale selle annab NGF retseptor hübriidvalke veel mitme teise valguga. Tpr-Trk – Tpr on liitunud närvi-kasvu-faktori retseptori kinaasne ala ette, valk sisaldab ka transmembraanset ala, aga asub tsütoplasmas ja esineb dimeerina.

3) *c-ret* kodeerib proteiin-türosiin-kinaasne retseptorit, mis ekspresseerub varases arengu faasis ja kasvaja kudedes. Ret-retseptori ligandiks normaalses koes on GDNF, gliiapärane neurotroofne faktor. Nimetus Ret tuleneb sellest, et transformeerunud rakkudes toimuvad tema geenis tihti ümberkorraldused (*ret – rearranged during transfection*). Tema rakuväline ala on adhesiooni valgu kadheriini taoline. Mutantseid vorme on leitud mitmete haiguste puhul, retseptor on inaktiivne või muutunud aktiivsusega. Mutantsed Ret-retseptorid on iseloomulikud mitmetele pärilikele haigustele. Näiteks Hirschsprungi haigetel on mutatsioone *ret*-geeni mitmes kohas ja see valk on inaktiivne. Selle tagajärel varases arengu faasis ei arene korralikult välja jämesoole neuronid ja neil haigetel puuduvad jämesoole neuronid mõnedest aladest jämesooles, on häiritud soolte tegevus. Selle geeni mutatsioonidega on

seotud ka mitmed pärilikud kasvajakasvaja: MEN-2A ja MEN-2B (*multiple endocrine neoplasia*) ning FMTC (*familial medullary thyroid carcinoma*). Nende puhul on kindlad mutatsioonid teada: MEN-2A ja FMTC haigel on muteerunud retseptori rakuvälise ala üks tsüsteiinidest ja retseptor on pidevalt dimeerses olekus, sest üks tsüsteiin, mis lubaks tekkida molekulisisesel sidemel on puudu, ja teine tsüsteiin leiab paarilise teises retseptori ahelas. MEN-2B haigetel on mutatsioon valgu katalüütilises alas, see muudab kinaasi aktiivsust ja substraadi spetsiifilisust. Selline retseptor on pidevalt aktiivne, ka ilma dimeriseerumata. Kõigil neil juhtudel muteerunud retseptorid ei ole enam ligandiga reguleeritavad.

Peale kirjeldatud mutantsete retseptorite on kasvajatelt leitud mitmeid hübriidseid Ret-valke. Nad on tekkinud *ret*-geeni ja mingi teise geeni liitumise läbi, tekib valk, kus retseptori kinaase ala külge on liitunud dimeriseerumist soodustav valk. Need vormid on pidevalt aktiivsed kinaasid. Ret-retseptori tsütoplasmaatilisi vorme esineb sageli kiiritusega indutseeritud kasvajatelt, eriti türoidsetes kartsinoomides. Türoidsete kasvajate hulk tõusis pärast Tšernobõli katastroofi Valgevene lastel ja nendes kasvajatelt on leitud palju erinevaid Ret-valgu mutatsioone.

4) Ka PDGF β retseptori valk esineb kroonilise müeloidse leukeemia koes hübriidvalguna pidevalt aktiivses vormis. Ühe transkriptsiooni faktori osa on liitunud PDGF β retseptori türosiin-kinaase ala ette ja saadakse valk Tel-PDGF β . Tel valgus on dimeriseerumist võimaldav piirkond ja nii saadakse aktiivne retseptori dimeer.

Onkogeenseid PTK retseptori vorme on leitud paljudest kasvajatelt. Kõigile neile PTK retseptoriga liitunud valkudele on iseloomulik võime moodustada dimeere ja sellega aktiveerida retseptori kinaas. Tegelikult polegi see valk enam retseptor vaid pidevalt aktiivne türosiinkinaas. Retseptorkinaasid, mis normaalselt avalduvad embrionaalses arengu faasis, ilmuvad kasvajatelt ja on regulatsioonile allumatud ning stimuleerivad rakkude paljunemist.

Üks viis raku onkogeene aktiivseks muuta on nende **liitumine retroviirustega**. Mõned näited retroviiruse genoomiga liitunud retseptori geenidest:

Raku onkogeene *c-sea* kodeerib retseptor-PTK. Lindude erütroblastoosi-viiruse onkogeene on *env-sea*, retseptori kinaasi geen on liitunud retroviiruse *env* geeniga, rakuvälise ja transmembraanse ala asemel on viiruse valk. Viiruse valk matkib aktiivse retseptori vormi ja kinaas on pidevalt aktiivne. Pealegi on retroviirusesse liitunud raku onkogeene kaotanud ka oma transkriptsiooni ja translatsiooni reguleerivad alad, valku toodetakse vales kohas ja vales koguses.

Hübriidvalke retroviiruste valkudega ei anna mitte ainult türosiinkinaasid retseptorid, vaid ka teised. Näiteks megakarüotsüütide kasvu reguleeriva faktori, trombopoetiini (TPO), retseptori homolog on onkovalk ühes leukeemiaviiruses (*murine myeloproliferative leukemia virus*), v-Mpl. Raku valk, c-Mpl, on tüüpiline tsütokiini retseptor, mis aktiveeritakse trombopoetiiniga ja mis käivitab JAK-2 ja STAT-3/STAT-5 süsteemi ning reguleerib sellega rakkude arengut. Viiruse valgus v-Mpl on osa viiruse Env-valgust liitunud TPO retseptoriga transmembraanse ala lähedal ja see retseptor pole enam TPO-ga reguleeritav. Onkovalk võib siin takistada rakkude diferentseerumist trombopoetiini toimel ja võib soodustada vahevormi liigset vohamist.

Kokkuvõtteks, retseptori geen võib onkogeenseks muutuda mutatsioonide, geeni amplifikatsiooni, genoomsete ümberkorralduste ja retroviirustega liitumise tõttu.

2.4. Tsütoplasmaatilised proteiin-türosiinkinaasid ja kasvajakasvaja

Peale retseptor-kinaaside osalevad signaali ülekandes **tsütoplasmaatilised proteiin-türosiinkinaasid** e. mitteretseptor-proteiin-türosiinkinaasid. Ka need on raku onkogeene produktid. Need on jagatud 8 erinevasse rühma: Src perekonnas on 9 liiget, Csk – 2 liiget,

Btk – 4, Abl – 2, Fak – 1, Syk – 2, Jak – 4, Fps – 2. Nendest kinaasidest mõned asuvad ainult tsütoplasmas, teised liiguvad tsütoplasma ja tuuma vahet.

2.4.1. Src kinaasid

Src perekonda kuuluvad proteiin-türosiinkinaasid Src, Yes, Yrk, Fyn, Fgr, Blk, Hck, Lyn, Lck. Neist Src, Fyn ja Yes on üldiselt levinud, teised põhiliselt vereloome rakkudes. Src perekonna kinaasid on rasvhapete abil membraaniga seotud. Ühes valgu otsas on rasvhapetega modifitseeritav ala, sellele järgneb unikaalne variaabelala, mis iseloomustab kindlat ensüümi. Edasi tulevad konserveerunud alad SH3, SH2 ja SH1 (Src homoloogia 3, 2 ja 1). SH1 on türosiin-kinaasse aktiivsuse ala, SH2 seostub fosfotürosiiniga ja SH3 proliinirikka piirkonnaga. Sellised konserveerunud alad kirjeldati esmakordselt Src valgus ja on selle järgi oma nime saanud. Edaspidi leiti selliseid SH2 ja SH3 alasid paljudes valkudes, kus nad osalevad valk-valk kontaktides. Src valgu teises otsas on ala, mis sisaldab türosiini. See türosiin on oluline regulatsioonis: kui see on fosforüülitud, seob ta sama valgu SH2 alaga ja kinaas on kokku keeratud inaktiivsesse vormi. Normaalse c-Src kinaas ei ole transformeeriv ka ületootmise tingimustes, sest suudab ise ennast reguleerida. Seda küll ainult siis, kui rakkudes on olemas kinaas, mis fosforüülib regulaatorala Tyr, – Src-valgu C-otsa kinaas Csk.

Viiruse Src-valk leiti tibude sarkoomi viirusest. Selle viiruse avastas 1910.a. Dr. Peyton Rous ja seda nimetatakse ka Rous'i sarkoomiviiruseks (RSV). Dr. Rous võttis tibude kasvaja, tsentrifuugis rakud põhja, filtreeris superi, et bakteritest vabaneda, ja süstis siis filtraati tibudele. Tibudel tekkis kasvaja. Järelikult pidi seal olema viirus, mis kasvajat põhjustas. Rous'i sarkoomi viirusest sai alguse teooria, et vähki tekitab viirus. RSV oli esimene viirus, millega saadi tekitada kasvajat. RSV on aktiivselt uuritud alates 1960-ndatest aastatest, on kindlaks tehtud tema onkovalk – proteiin-türosiinkinaas Src. Peale selle on leitud normaalse raku c-Src ja terve perekond temaga sarnaseid kinaase. Kui võrrelda normaalse raku c-Src valku RSV onkogeeni *v-src* produktiga, siis selgub, et *v-Src* on kaotanud regulaatorala türosiini ja kinaas on pidevalt aktiivne. Sama tüüpi mutatsioonid on ka teistes retroviiruste Src perekonna kinaasides: regulaatorala on puudu või türosiin on asendunud fenüülalaniiniga.

Kuidas toimub Src-perekonna valgu aktiveerimine ja onkogeenseks muutmine? Raku c-Src on ilma aktivaatorita inaktiivne, ta on pakkunud nii, et kinaasne aktiivsus ei avaldu, molekuli sisene SH2 ja P-Tyr vaheline side hoiab valku suletud olekus. Src-kinaasi aktiivseks muutmiseks tuleb see molekulisisene SH2 \leftrightarrow P-Tyr side lõhkuda. Selleks on mitu võimalust: regulatorala Tyr kaotamine või mutatsioon, Csk kinaasi inaktiveerimine või taseme langus, PTP (proteiin-türosiinfosfaasi) taseme tõus; SH2 ja SH3 piirkondade deletsioon; mõne teise fosfotürosiini seostumine SH2-ga või mõne teise valgu SH2 ala seostumine regulatorpiirkonna fosfotürosiiniga. Viimased variandid esinevad ka normaalse signaaliülekanne puhul. Src, Yes ja Fyn kinaaside aktiivsus suureneb nende seostumisel aktiveeritud retseptor-türosiinkinaasiga. Ka Tyr-fosforüülitud peptiidid suurendavad Src kinaasest aktiivsust, kuna nad seovad tema SH2 alaga. Lck kinaasi aktivatsioonis on oluline fosfataasi aktiveerimine, aktiveeritakse PTP CD45. See fosfataas on vajalik signaali teeks üle Lck ja sellise fosfataasi ületootmine rakus võib Src kinaase aktiveerida. Kui fosfataasid on signaali ahelas üldiselt aktiveeritud oleku maha võtjad, siis Src kinaaside puhul võivad nad olla kinaasi aktiveerijad. Signaali tee võib alata mitte kinaasi aktiveerimisega, vaid fosfataasi aktiveerimisega, mis viib Src kinaasi aktiivsuse tõusule ja sealt lähtuva signaaliraja käivitamisele.

Kui Src valgus on muteerunud kinaasne ala ja kinaasest aktiivsust ei ole, siis käitub valk dominant-negatiivse mutandina, supresseerib signaali tee: seostudes aktiveeritud retseptoriga blokeerib selle, ise signaali edasi ei anna ja teist valku retseptoriga seostuma ei lase.

2.4.2. Csk kinaasid

Csk (*carboxy-terminal Src kinase*) – proteiin-türosiinkinaaside perekond, mis fosforüülivad Src valgu regulaatorala türosiini. Nad ei ole müristüülitud ja ei oma fosforüülitavat Tyr kata-lüütilises alas. Csk avaldub kõigis kudedes ja asub tsütoplasmas. Kui hiire genoomis *c-csk* geen lõhuti, põhjustas see loote surma, mutantse embrüo rakkudes oli Src kinaasi aktiivsus 10 korda normaalsest kõrgem ja regulaator-Tyr oli vähe fosforüülitud. Csk kinaaside osa onkogeneesis seisab selles, et tema madal tase tõstab Src kinaaside aktiivsust ja võib muuta need onkogeenseks.

2.4.3. Btk kinaasid

Need proteiin-türosiinkinaasid on leitud inimese ja hiire rakkudest, Btk, Tec I ja II, Itk, Etk. Erinevalt Src kinaasidest ei ole nad müristüülitavad ega oma fosforüülitavat Tyr. Peale SH1, SH2 ja SH3 ala sisaldavad nad veel PH (*pleckstrin homology*) piirkonda. See seob fosforüülitud inositoliga lipiide ning vahendab valgu sidumist membraanile. Järelikult Btk aktivatsiooniks on vaja aktiivset PI3K, mis toodab 3. positsioonist fosforüülitud inositoliga fosfolipiide. Mutatsioonid *btk* geenis on seotud X-liitelise agammaglobulineemiaga (XLA), seda haigust kirjeldas esimesena dr. Bruton ja Btk nimetus tuleneb tema nimest – *Bruton's tyrosine kinase*. Btk avaldub B rakkudes ja müeloidsetes rakkudes ja on vajalik antikehade tootmisel. Teised selle pere liikmed töötavad teistes kudedes. Leukeemia haigetel on *btk*-geenis sageli mutatsioone ja kinaas on inaktiivne.

Btk kinaasid on aktiveeritavad väga paljude retseptorite poolt, Btk rühma kinaasid osalevad nii rakkude paljunemise kui ka apoptoosi regulatsioonis.

2.4.4. Abl kinaasid

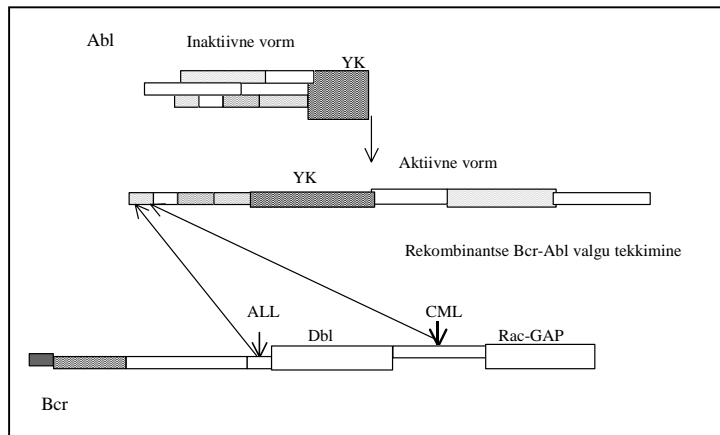
Abl kinaas kirjeldati algselt kui A-MuLV (*Abelson murine leukemia virus*) onkovaalk ja seal on ta oma nime saanud. Tema homoloog rakus on proteiin-türosiinkinaas, c-Abl. Sarnaselt Src kinaasidega sisaldab ka Abl SH1, SH2 ja SH3 alasid. Peale selle on seal ala, mis sisaldab tuuma-lokalisatsiooni signaali, DNA-sidumise ala, aktiivse sidumise ala ja proliinirikast piirkonda. Siia rühma kuulub 2 kinaasi: Abl ja Arg (*abl-related gene*). Nad on mõlemad kõigis kudedes avalduvad ja neid toodetakse kahte eri vormi: müristüülitud ja mitte-müristüülitud vormid, s.t. nii membraaniga seostuvad kui mitteseostuvad vormid. Mõlemad asuvad nii tuumas kui tsütoplasmas ja liiguvad tuuma ja tsütoplasma vahet.

On leitud, et c-Abl on raku tuumas kasvu inhibiitor ja tema kinaasne aktiivsus käivitatakse vigastatud DNA poolt. Erinevalt Src valgust ei suuda Abl end ise inaktiivsesse vormi pakkida, vaid vajab negatiivseks regulatsiooniks mingit abivaikut. Abl aktiveeritakse mitmete stressi tingimuste poolt, Abl läheb tuuma ja vigastatud DNA aktiveerib tuumas Abl kinaasi ja see aitab viia rakud apoptoosi. Kui aga RB valk on suutnud rakutsükli blokeerida ja Abl endaga siduda, siis apoptoosi ei indutseerita vaid antakse rakule aega vigastuste parandamiseks. Kasvavates rakkudes aga DNA vigastused käivitavad apoptoosi tee ja selles on osaline Abl. Kui Abl ei lähe tuuma, nagu see on viirusele omaste ja kasvajatest leitud Abl kinaaside puhul, siis DNA vigastustega rakkude kõrvaldamine on pidurdunud, sellised rakud on kiiritusele resistentsemad, s.t. nad ei sure nii kergesti DNA kahjustuste tõttu. Sellisel juhul paljunevad vigase DNA-ga rakud, see omakorda põhjustab uute DNA kahjustuste teket ja kromosoomide muutusi.

Normaalselt on c-Abl aktiivsus supresseeritud. Seda supressiooni saab kõrvaldada regulaator-piirkondade deletsioonidega või mutatsioonidega. Nii SH3 ala kui proliinirikka ala deletsioon annab pidevalt aktiivse kinaasi.

Retroviirustest omavad *abl* geeni hiirte leukeemia virus, (*Abelson murine leukemia virus, AMuLV*), ja kasside sarkoomi virus, (*Hardy-Zuckerman-II feline sarcoma virus, HZ II-FSV*). Neist viiruste genoomidest saadakse Abl kinaas hübriidvalguna koos viiruse valkudega. AMuL viiruses on *abl* geeni ees *gag* geen ja saadav valk, Gag-Abl, on onkogeenne. Selles on Abl valgust SH3 ala kadunud. Viiruses võib Abl kinaasne ala olla ka *gag* ja *pol* geeni vahel, nii on kasside viiruses FSV valk Gag-Abl-Pol ja ka see on onkogeenne. Need viiruse Abl valgud on lokaliseeritud tsütoplasmas ja on aktiivsed proteiin-türosiinkinaasid.

Ebanormaalseid Abl valke, mis lokaliseeruvad tsütoplasmas, on leitud ka leukeemia haigetel. Nii kroonilise müeloidse leukeemia (CML) kui ägeda lümfoidse leukeemia (ALL)



Joonis 1. Abl kinaasi inaktiivne ja aktiivne vorm, Bcr-valk ja Bcr-Abl liitvalgu tekkimine. YK, türosiinkinaas; Dbl ja Rac-GAP, Rho/Rac valkudega seostuvad alad; ALL, akuute lümfoidne leukeemia; CML, krooniline müeloidne leukeemia; ↓, muutumine ja kohad, kus Bcr liitub Abl-ga.

haigetele on iseloomulik **Bcr-Abl** valk (joonis 1). Need on eri haiguste puhul veidi erineva suurusega, kuid mõlemal juhul on toimunud kromosoomide muutus, kus *abl* geeni ette on liitunud *bcr*-geeni üks jupp (*break point cluster region*). Abl on 9.kromosoomis ja Bcr 22.kromosoomis, ümberkorralduste tagajärel on tekkinud nn. Philadelphia (Ph) kromosoom, millelt kahe kromosoomi liitumise kohalt toodetakse Bcr-Abl valku.

Bcr ise on mitut aktiivsust omav valk. Ta arvatakse olevat Ser/Thr proteiinkinaas, tal on Rac/Rho-valkudega seostuvad aktiivsused (Dbl ja GAP). Abl kinaasi aktiveerimiseks on oluline, et Bcr järjestus võimaldab Bcr-Abl valgul

dimeriseeruda, selle tagajärel ei ole võimalik ensüümi kinaasset ala enam peita ja Abl valgu proteiin-türosiinkinaasne ala on vaba ja ensüüm on aktiivne. Bcr-Abl asub tsütoplasmas.

Abl kinaas võib anda ka teisi hübriidvalke. Akuutse müeloidse leukeemia rakkudes on **Tel-Abl** valk, Tel osa soodustab dimeriseerumist.

Muteerunud Abl kinaase toodetakse ainult haigetes kudedes, mitte sama inimese tervetes kudedes. Kas põhjustab haigus mutatsioonide teket või muutunud Abl haiguse, pole selge. Kuid tsütoplasmas olev ja pidevalt aktiivne Abl kinaas osaleb signaali ülekandes ning aktiveerib rakkude kasvu, samal ajal puudub tuumas Abl kinaas, mis aitaks vigastatud DNA-ga rakke apoptoosi saata. Seega toimib mutantne Abl kahel viisil: stimuleerib rakkude kasvu ja sealjuures paljunevad ka vigastatud DNA-ga rakud. See võib olla põhjuseks, et haiges koes on toimunud mitmed kromosoomi ümberkorraldused ja mutatsioonid, mis omakorda annavad ebanormaalse aktiivsusega valke. Nii viiruse kui haigest koest eraldatud Abl geenid on võimelised rakukultuuris muutma rake kasvajakudeks. Kui aga Bcr-Abl valk tuuma viia, siis indutseerib ta apoptoosi. Järelikult sõltub Abl kinaasi toime rakule sellest, kas ta töötab tuumas või tsütoplasmas.

Proteiin-türosiinkinaaside inhibiitorites nähakse võimalikke vähivastaseid ravimeid. On katsetatud mitmeid inhibiitoreid. Philadelphia (Ph) kromosoomi omavad leukeemia rakuliinid olid sobivad Abl kinaaside inhibiitorite otsinguteks. On väljatöötatud ravim (imatinib, Glivec), mis viib apoptoosi rakud, kus ekspresseerub Abl kinaas, leukeemia koes haiged rakud surevad. See ravim inhibeerib ka c-Kit ja PDGFR kinaasse aktiivsuse. Nende retseptor-kinaaside kõrge tase on sageli seedetrakti kasvajat. Antud inhibiitor seostub Abl-

kinaasi ATP siduva alaga ja ei lase sinna siduda ATP, see ala on kõigil proteiinkinaasidel üsna konserveerunud ja seega inhibiitor võib toimida paljudele proteiinkinaasidele. Seni on leitud, et enamuse teiste uuritud türosiin-kinaaside inhibeerimiseks on vaja seda ravimit sisse viia kõrges kontsentratsioonis. Inhibiitorid võtavad küll maha liigse kinaasse aktiivsuse, kuid ei pane vajalikku valku õiges kohas rakus normaalselt tööle. Kui on olemas tervete rakkude populatsioon, mis suudab hakata normaalselt paljunema kui haiged rakud on kõrvaldatud, siis on võimalus haigusest vabaneda. Kuna ilma normaalse Abl kinaasita paljunevad ka vigase DNA-ga rakud, tekib ravimite suhtes kiiresti resistentsus.

2.4.5. Tsütoplasmaatilised protein-türosiinkinaasid ja viiruse onkovalgud

Mitmed viiruse onkovalgud võivad rakus aktiveerida tsütoplasmaatilisi PTK.

On leitud, et hiire polüoomiviiruse transformeeriv valk PymT seostub Src perekonna kinaasidega ja aktiveerib neid ja see aktivatsioon on vajalik rakkude onkogeenseks transformatsiooniks. Sama kehtib ka hamstri polüoomiviiruse transformeeriva onkovalgu kohta. Sealjuures toimivad hiire ja hamstri polüoomiviiruse valgud erinevatele Src perekonna kinaasidele ja onkovalgud seostuvad erinevate osadega aktiveeritud kinaasis. Ka mõnede herpesviiruste valgud aktiveerivad Src perekonna kinaase. Eelpool nimetatud viiruste onkovalkude toime seisab põhiliselt selles, et nad stabiliseerivad kinaasi aktiveeritud vormi, ei lase tal inaktiivsesse olekusse tagasi minna. Sellega tõstavad viiruse onkovalgud rakus türosiinkinaaside aktiivsust, kuna nad sisaldavad kõik ka fosforüülitavaid türosiine, võivad nad osaleda signaaliülekanne kompleksi moodustumisel.

2.5. Adaptervalgud kui onkovalgud

Tsütoplasmaatilised PTK, mis on oma kinaasse domääni kaotanud, – selliselt kirjeldati 1990. aastal väikseid valke, mis omasid SH2 ja SH3 järjestusi ja mis seostusid aktiveeritud retseptoriga ning mille geenid võisid olla ka transformeerivateks onkogeenideks. Hiljem on hakatud neid nimetama adaptervalkudeks. Adaptervalgud ei oma mingit ensümaatilist aktiivsust, vaid sisaldavad mitmeid spetsiifilisi valgu mooduleid, mis aitavad valkudel üksteisega seostuda.

Seni kirjeldatud adaptervalkudes on leitud SH2, SH3, PTB, PH jt. motiive.

SH2-ala, Src homologia 2, mis on laialt levinud tsütoplasmaatiliste valkude hulgas. SH2 on 100 am.h. suurune valgu piirkond, mis seob fosforüülitatud türosiini. Neid alasid lähemalt analüüsides on nad jagatud 4 rühma vastavalt sellele, millist **P-Tyr** ümbrust nad eelistavad. Oluline on fosfotürosiinile järgnev ala.

Fosfotürosiini seob ka **PTB** (*phosphotyrosin-binding*) ala, see on SH2-st suurem, 200 am.h. Tema spetsiifika määratakse P-Tyr ees olevate aminohapetega.

SH3-ala, Src homologia 3 on 50-60 am.h. suurune valgu motiiv, mis seob **proliinirikast ala** valgus või ka vastavat peptiidi, minimaalne ligand peaks olema 10 am h.

PH (*pleckstrin homology*) on valgu moodul, mis seob fosfoinositool-lipiide, milles inositool on 3. ja 4. positsioonist või 3., 4. ja 5. positsioonist fosforüülitud.

Signaali ülekanne kompleksi moodustamisel osalevaid adaptervalke on kirjeldatud mitmeid, nende kõrge tase põhjustab sageli rakkude muutumise kasvajakudeks. Järgnevalt iseloomustame mõningaid adaptervalke.

Shc – **SH2** domääni ja collageenile sarnast glütsiini ja proliini rikast ala kandev väike valk. On teada mitu vormi, (p46 - p66). Shc ei oma mingit ensümaatilist aktiivsust. Sisaldab P-Tyr sidumise kohti PTB ja SH2. Shc seostub kasvufaktorite retseptoritega. PDGF ja EGF

retseptori aktiveerimisel Shc fosforüülitakse Tyr jäägist. Shc ületootmine rakus suurendab MAP kinaasi aktiivsust ja rakkude kasvu. Shc võib olla retseptori aktiveerimisel esimeseks signaali vastuvõtjaks ja signaali ülekande kompleksi moodustajaks. Shc on transformeeriv onkovalk.

Nck – väike valk (p45), mis sisaldab ühe SH2 ja kolm SH3 ala. On fosforüülitav Tyr, Ser ja Thr kohalt. Nck seostub PDGFβ ahelaga kindla P-Tyr kaudu. Nck üleekspressioon põhjustab rakkude muutumist kasvajarakkudeks.

Grb2 – (*growth factor receptor-bound protein 2*), p23, sisaldab ühe SH2 ala ja kaks SH3 ala. Seob EGF ja PDGF retseptori fosfotürosiinidega. On näidatud, et Grb2 on kompleksis mSos valguga, mis on Ras valgu aktiveerija, G nukleotiidi vahetaja. Grb2 üksi ei ole võimeline onkogeenseks transformatsiooniks, küll aga koos Shc-ga, Shc on selles kompleksis limiteeriv.

Crk – (*chicken tumour virus regulator of kinase*) sisaldab ühe SH2 ala ja kaks SH3 ala, on fosforüülitav Tyr kohalt. Crk seob paljusid valke ja Crk kõrge tase muudab normaalse raku kasvajakaks. **v-Crk** on lindude sarkoomi viiruse CT10 onkovalk, tekitab lindude kasvajaid. Viiruse valk v-Crk on viiruse Gag-valgu ja raku Crk valgu hübriid Gag-Crk, sisaldab ainult ühte SH2 ala ja ühte SH3 ala. Crk-valk osaleb signaaliülekande kompleksi moodustamisel sarnaselt Grb2-ga.

14-3-3 – sellise nime sai see adaptervalkude perekond oma avastajatelt (B.E.Moore, V.J.Perez) ja peegeldab ilmselt labori nomenklatuuri. 14-3-3 valgud on väiksed happelised valgud, on kirjeldatud 7 isovormi, nad seostuvad **fosforüülitud seriiniga** kindlas motiivis. On teada üle 60 erineva valgu, mis seostuvad 14-3-3-ga. Mõnede 14-3-3 perekonna valkude ületootmine rakus põhjustab onkogeenset transformatsiooni.

On kirjeldatud ka selliseid adapterivalke, mis lokaliseeruvad membraanis ja aitavad valkudel kinnituda kindlatele kohtadale membraanis. Adaptervalgud oma mitmekülgsede seostumise võimetega aitavad moodustada signaaliülekande komplekse ja võivad aktiveeritud retseptoriga kokku viia Ras valke ja tema aktiivsust reguleerivaid valke. Sealjuures adaptervalgu liigne hulk võib valkude kompleksi moodustada ka ilma väljast tuleva signaalita. Adaptervalkudest paistavad olevat onkovalgud need, milles on fosforüülitav türosiin, mis osaleb siis signaali käivitamises.

2.6. Ras valgud ja kasvajak

2.6.1. Ras valgu ehitus ja aktivatsioon

Ras valgud kuuluvad GTPaaside hulka, neid nimetatakse ka väikesteks G-valkudeks. GTP-ga seotult on ta signaali ahelas aktiivne ja GDP-ga seotult inaktiivne. Ras valgud on nõrgad GTPaasid, GTP hüdrolyüüsi käivitamiseks vajavad nad abivalke GAP (*GTPase activating proteins*, GTPaasi aktiveerivad valgud). GAP valgud kiirendavad GTP-ga seotud Ras valgu muutumist GDP-seotud vormi, s.t. suurendavad signaaliahelas inaktiivse Ras hulka. GTP ja GDP sidumise konstandid on lähedased, kuna rakus on GTP kontsentratsioon kõrgem, siis vaba Ras seob GTP. Limiteeriv on GDP vabanemine Ras valgust. Ka selle protsessi jaoks on aktivaatorid, G-nukleotiidi vahetusfaktorid GEF (*G exchange factors*). Ras abivalkude hulka

kuulub ka GDI (guaniin-nukleotiidi dissotsiatsiooni inhibiitor), mis seostub Ras-GDP ja Ras-GTP-ga ning inhibeerib nii nukleotiidi lahkumist Ras-st kui ka seotud GTP hüdrolüüsi.

Ras valku on üsna põhjalikult uuritud, on teada struktuur ja paljud funktsionaalsed alad. Eristatakse 5 olulist piirkonda, mis on konserveerunud kõigis Ras perekonna valkudes:

G-1 regioon hõlmab 10. – 17. positsioonis olevad aminohapped. See ala võtab osa GTP fosfaatrühmade sidumisest ja GTP hüdrolüüsist, eriti oluline on 12. positsiooni glütsiin. Kui see asendada valiiniga, kaob GTP-aasne võime ja saadakse pidevalt aktiivses vormis olev mutant V12H-Ras, selline mutatsioon on sage kasvajates, kus on pidevalt aktiivses vormis Ras-valk. Mutant N17H-Ras (asparagiin on seriini või treoniini asemel positsioonis 17) on alati GDP-ga seotud vormis, ei lase GDP lahkuda ega seo GTP. See on dominant-negatiivne Ras-i mutant, ta ei lase normaalset Ras aktiveerida, kuna seob endaga aktiveerivad faktorid, aga ise ei aktiveeru.

G-2 regioon, 32. – 40. positsioonis olevad aminohapped, selles osas toimub **konformatsiooni muutus** kui GDP vahetub GTP-ga ja see ala annab signaali edasi. Selle ala mutatsioonidega on näidatud, et Ras-lt algavad erinevad signaali rajad: mutant T35S aktiveerib Raf aga ei aktiveeri RalGDS ja PI3K, E37G aktiveerib neist ainult RalGDS ja mutant Y40C mõjutab ainult PI3K teed.

G-3 regioon, 53. – 62. positsioonis olevad aminohapped, seob GTP viimast, hüdrolüüsil lahkuvat fosfaati. Glutamiin 61 asendamine 17 erineva aminohappes tekitab onkogeense Ras valgu. Regioonide G-2 ja G-3 kaudu toimib GAP valk. Mutatsioonid nendes alades muudavad Ras valgu GAP-le tundetuks ja valk on pidevalt GTP-ga seotud aktiivses vormis. Selliseid mutatsioone on leitud mitmetest kasvajatest.

G-4 regioon, 112. – 119. positsiooni hüdrofoobsed aminohapped osalevad guaniini ringi sidumises. Ka G-5 regioon 144. – 146.am.h., on oluline guaniiniringi sidumises.

G-4 ja G-5 regioonis toimunud mutatsioonid muudavad valgu guaniini-sidumisvõimet. Kui nad võimaldavad GDP-st kergemini vabaneda, tõstavad nad GTP-ga seotud vormi taset, sellised mutatsioonid on leitud kasvajatest. Selle piirkonna kaudu toimivad GDP vabastavad faktorid, nukleotiidi vahetajad.

Ras valgule on iseloomulik ühe otsa muutmise selliseks, et ta seostuks membraanile: valgule pannakse külge pika ahelaga alkohol (farnesüülitakse) ja rasvhape (palmitüülitakse). Aktiivse Ras valgu saamisel on seega tähtis ka modifitseerivate ensüümide olemasolu ja tase rakus. Kui Ras ei ole farnesüülitud, siis teda ka ei palmitüülita. Aktiivse Ras saamiseks on oluline farnesüülimine, Ras valgu C-otsas on motiiv CAAX, mis on märklaud farnesüültransferaasidele. Farnesüültransferaasi inhibeerimisega on saadud blokeerida onkogeense Ras-valgu toime. Ras on paljudes kasvajates muteerunud nii, et ta on kauem signaali edastavas olekus, mutatsioonid on sellised, mis soodustavad GDP lahkumist või takistavad GTP hüdrolüüsi, kasvu stimuleeriv signaalirada on kauem aktiivne. Ras inhibiitorid on potentsiaalsed vähivastased ravimid. On uuritud Ras inhibeerimist mitmel tasemel:

1) Muteerunud Ras valgu geeni blokeerimine.

2) Farnesüültransferaasi inhibitorid (FTI) takistavad Ras valgu membraaniga seostumist. Kasutatakse ühendeid, mis eemaldavad Ras membraanilt, näiteks *S-trans*, *-trans*-farnesüül-tiosalitsüülhape, FTS.

3) GTP-aasse aktiivsuse taastamine või võimendamine. Kui kasutada sünteetilist GTP analoogi, mis seob muteerunud Ras-ga ja on selle poolt hüdrolüüsitav, siis sellega saab viia Ras-i inaktiivsesse vormi.

4) Ras valgu ja efektori, s.t. järgmise signaali ahela lüli, vahelise kontakti takistamine. Seda suudavad teha peptiidid, mis sisaldavad Raf valgu Ras-i siduvaid aminohappeid. Siia rühma kuuluvad ka mõned mitte-steroidsed põletikuvastased rohud nagu sulindac.

2.6.2. Ras perekonna valgud

Nagu paljud onkogeenid, kirjeldati ka Ras valk algselt viirustes. 1980-ndatel aastatel leiti, et hiire sarkoomiviirused (*murine sarcoma virus*, Ha(Harvey)-MuSV, Rasheed-MuSV) toodavad transformeerivat valku **v-H-Ras**, Kirsten sarkoomi viirusel (Ki-MuSV) on **v-K-Ras**, inimese neuroblastoomist leiti **v-N-Ras**. (Harvey, Rasheed ja Kirsten on inimeste nimed, kes neid viirusi kirjeldasid).

1990-ndatel aastatel oli juba teada 50 erinevat Ras valku ja 2006. aastal üle 80 erineva väikese G-valgu, molekulkaaluga 20-29kDa. Ras perekonna valgud on jagatud alaperekondadeks Ras, Rap, Rab, Ral, Rho, Ran, Rhed, Rad, Rin, jt. Võib oletada nende valkude seost kasvajatega, 40% kasvajatest on Ras muteerunud. Inimesel on kolm erinevat *ras* geeni, millelt toodetakse nelja valku: H-Ras, N-Ras, K-Ras A ja K-Ras B. K-Ras valku toodetakse kahte vormi, neil on veidi erinev membraaniga seostumine. H-, N- ja K-Ras valgus on 85 esimest aminohapet identsed, sellele järgneb 85% homoloogiaga ala ja lõpus on variaabel-ala, päris lõpus on veel modifitseerimise kohad. Arvatakse, et erinevad Ras-valgud omavad ka veidi erinevaid funktsioone. On leitud, et variaabel-ala, mis on omane ühele Ras tüübile, on tugevalt konserveerunud erinevate imetajate seas. Kuigi kolm *ras* geeni ekspresseeruvad kõikjal inimeses, on leitud kudedevahelisi ja arengulisi erinevusi ekspressiooni tasemes. Erinevast koost kasvavad sisaldavad erineva sagedusega Ras valkude mutatsioone: müeloidses leukeemias on 70% Ras mutatsioone N-Ras valgus; põie kasvajas on ainult H-Ras mutatsioonid; pankrease adenokartsinoom sisaldab 90% juhtudel K-Ras mutatsioone. Ka Ras-valgu onkogeense transformatsiooni võime avaldub erinevatest kudedest pärit rakkudes erinevalt, mõnes mõjub H-Ras, teises jälle K-Ras. On leitud, et erinevad Ras-valgud töötavad erinevates kohtades raku membraanil ja see arvatakse olevat põhjuseks, miks H-Ras ja K-Ras aktiveerivad erinevalt Raf ja PI3K.

Normaalne Ras valk võib üleekspressiooni puhul olla onkogeneen, kuid viiruse valgud ja muteerunud Ras vormid on efektiivsemad kasvajakaraku tekitajad.

On ka selliseid Ras-perekonna valke, mis pole onkogeensed ja mis takistavad ka onkogeense Ras valgu toimet. Kuid on mitmed Ras alarühmad, mis on sarnaselt Ras-ga ka onkogeneesi stimuleerijad.

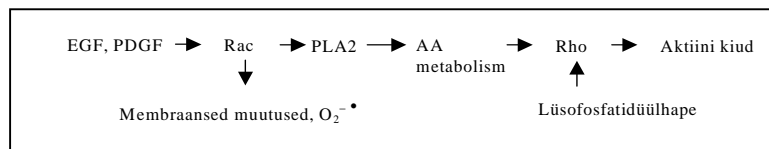
Ral valk aktiveeritakse sageli Ras-signaali rajas ja dominant-negatiivne Ral blokeerib Ras ja Src poolt käivitatud muutused NIH 3T3 rakkudes, ilmselt osaleb ta signaali rajas Ras'ist all pool. Peale selle, et Ral osaleb Ras'i rajas, võib ta olla aktiveeritud ka Ras'ist sõltumatult, Ca-ioonide poolt. Ras aktiveerib Ral valgu nukleotiidi vahetavad faktorid RalGDS. Need faktorid seostuvad Ras-GTP-ga ja on Ras toime vahendajad Ral valgule. Ras valgu põhilisteks efektoriteks, signaali vastuvõtjateks, peetakse praegu Raf, PI3K ja RalGDS. Vähemalt mõnedes rakkudes toimivad need teed vastandlikult: kui NGF poolt põhjustatud Raf ja PI3K aktivatsioon algatab teatud rakkude diferentseerumise, siis RalGDS/Ral aktiveerimine hoiab selle ära. Ras mutant Ras12V37G, mis ei aktiveeri Raf ja PI3K, aktiveerib RalGDS ja lubab rakkudel kasvada madalas seerumis ja muutuda kasvajakaradeks. ERK või PI3K aktivatsiooni puudumisel võib olla RalGDS Ras-valgu signaali edastaja ja soodustada onkogeenset transformatsiooni.

Rho valgud on ka Ras perekonna GTPaasid. Siia alarühma kuulub 14 liiget: RhoA, B, C, D, G ja E/Rnd3/Rho8, Rnd1/Rho6, Rnd2/Rho7; Rac 1, 2, 3; CDC42H/CDC42P ja TC10 ning TTF. Need on kirjeldatud imetajatel. Neil on omavaheline 50%-ne homoloogia ja 30% ulatuses on nad sarnased teiste Ras valkudega. RhoA, RhoB, RhoC osalevad tsütoskeleti muutustes. Rakkude stimuleerimisel näiteks lüsofosfatidüülhappega või Rho valgu sisse viimisel tekivad aktiini kiud. Selles protsessis osalevad ka mitmed kinaasid. On kirjeldatud Rho-GTP vormiga seostuvaid ja aktiveeritavaid Ser/Thr kinaase ROK. Just need osalevad nn.

stressi kiudude tekkimisel. Rho valgu jaoks on teada üle 20 GDP vahetava faktori ja 16 GTPaasi aktivaatorit.

Rho valkude alarühma kuuluvad **Rac** valgud Rac-1 ja Rac-2 osalevad membraani liikumise indutseerimises ja membraansete NADPH oksidaaside aktivatsioonis. Rho ja Rac valgud aktiveerivad türosiin-kinaase ACK (aktiveeritud Cdc42-ga seostuv kinaas) ja PYK (proliini rikas türosiin-kinaas) ning Ser/Thr kinaase PAK (p21,Cdc42/Rac-aktiveeritud kinaas). Peale proteiinkinaaside aktiveerivad Rho ja Rac valgu aktiivsed vormid ka lipiidide kinaase: fosfatidüül-inositol-3-kinaasi ja fosfatidüül-inositol-5-kinaasi. Rho ja Rac valkude aktivatsioon põhjustab raku morfoloogilisi muutusi. Rho valgud on olulised rakkude vahelises adhesioonis. RhoC ekspresseerub tugevalt metastaasides, Rho A, Rac ja Cdc42 on vajalikud rakkude liikumiseks. Rho perekonna valke toodetakse kõrgel tasemel paljudes kasvujates ja see korreleerub halva prognoosiga.

Kõik kirjeldatud Ras perekonna valgud osalevad onkogeneesis, kuidas nad seda teevad, pole selge. Küll aga on teada mutantseid valke, mis on pidevalt onkogeensed: V12Rac-1 on Rac-1 valgu mutant, mis on pidevalt aktiivses vormis ja stimuleerib rakkude kasvu analoogselt pidevalt aktiivse Ras mutandiga V12H-Ras; N17Rac on analoogselt N17Ras-ile dominant-negatiivne, pidurdab kasvu. Kuid ta teeb seda siis, kui kasvu aktiveerib Ras, kuid onkogeense Raf valgu toimet ta ei inhibeerib, ilmselt mõjutab Rac signaali teed ülalpool Raf valku. V14Rho A on pidevalt aktiivses vormis olev Rho valk, stimuleerib onkogeensete Ras ja Raf valkude toimet; N19RhoA on Rho valgu dominant negatiivne mutant, inhibeerib mutantsete Ras ja Raf valkude toime. Nii onkogeensete kui onkogeneesi inhibeervate mutantsete Rac ja Rho vormide olemasolu viitab sellele, et need valgud on olulised onkogeneesis. Raku kasvu käivitamiseks või muutmiseks on vaja Ras, Rho ja Rac valkude



Joonis 2. Oletatav skeem Rac- ja Rho-valgu aktiveerimisest ja nende koostoimest.

selle metaboliidid aktiveerivad Rho valgu, see omakorda põhjustab aktiini kiudude tekke. Samal ajal lüsöfosfatidüülhape aktiveerib Rho valgu ilma Rac valgu osaluseta (Joonis 2). Mõnes Rho ja Rac valgu G-nukleotiidi vahetavas faktoris on fosfolipiididega seostumise ala. Kas ja kuidas see aktivatsioonis osaleb, pole teada. Võimalik, et Rac valgu ülesanne ongi aktiveerida rasvhapete metaboliitide tootmist ja need vahendavad valkude seostumist membraanidele. Rac valk on membraansete NADPH oksidaaside käivitaja, s.t. aktiveerib superoksiidi radikaali tootmist, see põhjustab rasvhapete oksüdeerumist membraanis ja membraanide muutmist.

Rho inaktiveerimine ühe bakteri *Clostridium botulinum* mürgiga, C3 transferaasiga, mis ADP-ribosüülib RhoA valgu, aga ei toimi Rac-valgule, hoiab ära stressi kiudude tekkimise. Inaktiivne Rac-valk, RacN17, inhibeerib nii membraani muutused kui ka stressi kiudude tekkimise EGF või PDGF toimel. Järelikult kasvufaktorid toimivad Rho valgule üle Rac valgu (Joonis 2).

Kokkuvõtteks, peale palju uuritud H-, K-, N-Ras valkude võivad olla onkovalkudeks ka teised Ras perekonna valgud ja nende abivalgud. Ras perekonna valgud aktiveerivad nii üksteist (Ras aktiveerib Raf GDS/GEF valku) kui ka mitmesuguseid kinaase, fosfolipiidide kinaase (PI3K) ja proteiinkinaase (Raf). On leitud, et need aktiivsused on üksteisest lahutatavad: Ras mutant T35S aktiveerib Raf aga mitte RafGDS ja PI3K, Ras mutant E37G

aktiveerib ainult RalGDS ja mutant Y40C aktiveerib ainult PI3K. Kasvaja tekkeks on vaja aktiveerida mitut Ras-lt lähtuvat teed.

2.6.3. Ras perekonna valkude abivalgud

Ras-perekonna valgud ei tööta signaaliülekanne ahelas ilma abistajateta. Suhteliselt väikesed Ras valgud kasutavad aktivaatoreid, mis on nendest 10-15 korda suuremad. Ras toime sõltub paljudest teistest valkudest rakus. Ühed suurendavad Ras-GTP vormi hulka vabastades teda GDP-st, teised alandavad Ras-GTP taset aktiveerides tema GTP-aasset võimet.

GTP-aasi aktivaatorid (GAP).

Ras jaoks on teada mõned GTP-aasi aktivaatorid, nende hulgas NF1, neurofibromin-1, see valk on mõnedes närvikoe kasvujates defektne või puudub hoopis. Arvatakse, et selle puudumine põhjustab neurofibromatoosi. GTPaasi aktivaatorite puudumisel on Ras valk pikemalt aktiivses vormis ja osaleb signaali edastamisel. Valgul NF1 arvatakse olevat veel ka teisi toimeid, ta pärsib ka selliste Ras valkude toimet, mis ei omagi GTP-aasset aktiivsust. Ilmselt NF1 blokeerib signaali tee Ras-lt, takistades järgmise lüli seostumist.

GAPid omavad mitmeid valk-valk ja valk-membraan kontakte võimaldavaid alasid, ta võib seostuda oma SH2-ala abil aktiveeritud retseptoriga ja viia Ras valgu signaali ülekanne kompleksi.

Rho/Rac GTPaasi aktivaatoreid on teada 16, sealhulgas valgud Bcr, Abr ja PI3-kinaasi regulaator-subühik p85. Nad sisaldavad GAP-ala, mis ei ole eriti sarnane Ras valgu GAP-alaga. Mõned GAPid on spetsiifilised ainult Rac-le või Rho-le, teised on laiema spetsiifikaga. On näidatud Ras-GAPi ja Rho-GAPi omavaheline kontakt rakus, mis võib olla oluline kahe GTP-aasi Ras ja Rho aktivatsiooni koordineerimisel.

GTPaasi aktivaatorid alandavad aktiivses vormis oleva G valgu taset, võtavad signaali maha. Nende puudumine või defektid nendes võivad soodustada kasvujate teket.

GDP vabastavad faktorid e. nukleotiidi vahetusfaktorid (GRF ehk GEF).

Paremini kirjeldatud nukleotiidi vahetaja Ras valgu jaoks on Sos valk, mis seostub adapter-valgu Grb2 kaudu retseptori külge ja toob nii Ras valgu signaaliülekanne kompleksi. Erinevate Ras valkude nukleotiidi vahetavad faktorid võivad omavahel seostuda ja sel teel võib signal minna Ras-lt teistele GTP-aasidele.

Rho ja Rac-valkude GDP vabastavad faktorid on Dbl perekonna valgud. Dbl, esimene seda tüüpi valk, sai oma nime kasvujast, kust teda eraldati – inimese difuusne B-rakuline lümfoom. Dbl onkogeensus NIH-3T3 rakkudes näidati juba 1985.a., selle valgu järgi on saanud nime kogu see valkude rühm. Dbl homoloogia (DH) on kõigis Rho/Rac GDP vabastavates faktorites. Peale selle on kõigis Dbl valkudes pleksitriini homoloogia (PH). On teada üle 35 Rho/Rac'ile sobiva vahetusfaktorid, sealhulgas Dbl, Lbc, Lfc, Bcr, Abr, Sos, RasGRF, Vav, Ect2. Paljude puhul on näidatud rakke transformeeriv toime. Mõned neist omavad ka GTPaasi aktiveerivat aktiivsust, mis peaks Rho valke inaktiivsesse vormi viima. Bcr sisaldab peale GDP vabastava aktiivsuse ka GTPaasi aktiveerivat aktiivsust ja Ser/Thr proteiinkinaasset aktiivsust. Bcr võib olla osaliselt lülitunud Abl kinaasi koosseisu ja aktiveerib seda, pikem Bcr-Abl hübriid sisaldab Dbl homoloogiat, s.t. GDP vabastavat aktiivsust; lühem seda ei sisalda. Lühem Bcr on iseloomulik ägedamale haiguse vormile. Kas Bcr-Abl seostumine Rho/Rac valkudega mõjutab kuidagi haiguse kulgu, pole teada. GTPaasi aktiveeriv võime aga puudub Abl-ga liitunud Bcr osal mõlemal juhul.

Nukleotiidi vahetusfaktorid suurendavad signaaliahelas aktiivses vormis oleva Ras perekonna valkude taset ja sellega stimuleerivad rakkude paljunemist ning soodustavad rakkude onkogeenset transformatsiooni.

Ras abivalkude hulka kuuluvad ka **guaniin-nukleotiidi dissotsiatsiooni inhibiitorid** (GDI). GDI on kirjeldatud Rho/Rac valkudele. RhoGDI seob GDP-ga kompleksis olevaid RhoA ja RhoB valke ja inhibeerib GDP lahkumist. GTP-Rho võib ka GDI siduda ja siis on inhibeeritud GAP-stimuleeritud GTPaasne aktiivsus. GDI seostudes Rho valguga kaitseb teda teiste abivalkudega seostumise eest ja ka teiste signaaliraja valkudega kontaktide eest. RhoGDI on oluline Rho valkude liikumisel membraani ja tsütoplasma vahel. Puhkavates rakkudes on Rho valgud tsütosoolis kompleksis GDI-ga ja on inaktiivsed. Raku aktiveerimisel Rho vabaneb GDI-st ja liigub membraanile.

Ras perekond on suur valkude perekond, abivalgud toimivad sageli mitmele Ras perekonna valgule või kontakteeruvad teiste abivalkudega ja võivad viia erinevaid Ras valke kompleksi, koordineerida nende tööd. Nii tekib GTPaaside kaskaad, mis reguleerib rakkude kasvu ja paljunemisega seotud protsesse raku.

2.7. Fosfatidüül-inositol-3-kinaas (PI3K) ja Akt kinaas

Ras perekonna valkude kaudu on aktiveeritavad ka fosfolipiidide kinaasid. Fosfatidüül-inositol-3-kinaasid (PI3K) on suur perekond signaaliahela valke, mis katalüüsivad inositooli fosforüülimist 3. positsioonist. Srtuktuuri, regulatsiooni ja substraadi spetsiifika põhjal on nad jagatud kolme klassi. Mõned PI3-kinaasid arvatakse olevat seotud vesiikulite tekkimise ja transportiga raku.

PtdIns(3,4)P₂ ja PtdIns(3,4,5)P₃ seostuvad pleksitriin-homoloogiale, PH. PH-ala on kõigis Rho perekonna GEF-des, nii et PI3K produktid aktiveerivad Rho ja Rac valke. On leitud, et Rho valgud on sageli kompleksis fosfolipiidide kinaasidega. Üks nendest on mitmete signaalide poolt aktiveeritav PI3K, mille regulaator-alühik on adaptervalk p85, mis seob P-Y ja ka proliini-rikast ala, ja katalüütiline subühik on p110. PI3K poolt toodetud PtdIns(3,4)P₂ aktiveerib Rac-GEFi, edasi aktiveerub Rac-valk.

PI3K on iseloomustatud ka kui onkogeneen valk, tema geen eraldati lindude sarkoomi viiruse ASV16 (*avian sarcoma virus 16*) genomist. Viiruse valk on lühem kui raku c-PI3K valk, aga tema külge on liitunud viiruse gag geeni produkt, saadakse **Gag-PI3K** hübriidvalk, mis on onkovalk. Ilmselt v-PI3K poolt toodetud inositol-3-fosfaadiga lipiidseid ühendid aktiveerivad mõne PH-alaga kinaasi ja see on oluline onkogeenses transformatsioonis.

PH ala on Ser/Thr proteiinkinaasis **Akt**, mida nimetatakse ka proteiinkinaas B (**PKB**). Akt kinaasi aktivatsiooniks on vajalik tema PH-ala, kui seal on mutatsioonid, siis Akt ei seostu membraanile ega aktiveeru. PKB/Akt on PI3K poolt aktiveeritav, sealjuures inositol-lipiidid ei aktiveeri Akt-i *in vitro*, vaid raku. Ilmselt PtdIns(3,4)P₂ ja PtdIns(3,4,5)P₃ seostudes PH-ga aitavad kinaasil membraanile seostuda ja see on vajalik aktiivsuseks.

Akt kinaasi homoloog on leitud ühest hiire retroviirusest (*murine AKT8*), Gag-Akt. See on pidevalt membraaniga seotud aktiivne kinaas, onkovalk. Aktiivne Akt inhibeerib apoptoosi. Mõnedes kasvajates on Akt valgu tase ja aktiivsus tõusnud, see soodustab rakkude elus püsimist ja paljunemist.

Kui PI3K liigne aktivatsioon on onkogeneen, siis fosfolipiide inositooli-3' positsioonist defosforüüliv fosfaatas **PTEN** on kasvaja supressor. PTEN on nime saanud sarnasusest fosfaasidega (P) ja tsütoskeleti valguga tensin (TEN). PTEN geen on deleteerunud paljudes inimese kasvajates nagu glioom, prostaatavähis, rinnavähis ja väikse-rakulises kopsuvähis. PTEN on sageli muteerunud vanaea kasvajates, kinnitades, et PTEN kadumine pole esmane

kasvajatekkele viiv sündmus, vaid pigem võimendab teisi kasvajat põhjustavaid tegureid. Ilma PTEN-ta kasvajakoes on kõrgem PtdIns(3,4,5)P₃ tase ja Akt kinaasi aktiivsus.

Kokkuvõtteks, onkovalkudeks võivad olla ka signaali ahelas töötavad fosfolipiidide kinaasid ja fosfolipiididega aktiveeritavad proteiinkinaasid. Fosfolipiide defosforüülivad fosfataasid aga on kasvaja arengut pärssivad.

2.8. Raf valgud ja kasvajakad

Raf valk on tsütoplasmaatiline seriini ja treoniini fosforüüliv proteiinkinaas. Ühes otsas on katalüütiline ala ja teises otsas on regulaatorala. Viimane inaktiveerib kinaasse aktiivsuse, normaalne Raf kinaas on pakitud nii, et kinaasne ala on varjestatud. Kasvufaktorite toimel käivitatakse signaali tee ja aktiveeritakse Raf kinaas. Raf tuleb signaali ülekande kompleksi Ras valguga kaudu. Kui Raf valgust ära lõigata regulatoorne ala, saadakse pidevalt aktiivne kinaas. Sealjuures Raf valguga regulatoorne ala üksinda võib olla inhibiitor mitte ainult Raf kinaasile, vaid kogu signaali teele: ta seostub Ras valguga, aga kuna puudub kinaasne ala, siis edasist signaali teed ei aktiveerita. Ras ja Raf sidumise saab blokeerida, kui Raf fosforüüldata PKA-ga. Raf-valgu mitmed fosforüülitavad seriinid osalevad tema seostumises adapter-valguga 14-3-3, see adaptervalk võib stabiliseerida nii inaktiivset kui aktiivset Raf-valku ja osaleb Raf-valgu regulatsioonis.

Inimesel on kolm erinevat *raf* geeni ja kolm Raf-valku: **Raf-1**, **A-Raf** ja **B-Raf**. Erinevad Raf-valgud on osalised erinevates signaali teedes. Raf-1 on aktiveeritav onkogeense Ras poolt, A-Raf on aktiveeritav onkogeense Src-ga ja ka onkogeense Ras-ga. Raf-B on aktiveeritav onkogeense Ras-ga ja mitte Src-ga.

Raf on mitmete viiruste onkovalk. **v-Raf** on hiire sarkoomi viiruse onkovalk, homoloog inimese Raf-1-le. Erinevus seisneb selles, et viiruse valgul ei ole regulaatorala, selle asemel on viiruse *gag* geeni produkt. Viiruse Raf on pidevalt aktiivne kinaas. **v-Rml** on lindude retroviiruse onkovalk, pidevalt aktiivne kinas, homoloog inimese B-Raf valgule.

Kasvajatest eraldatud Raf valgud sisaldavad oma regulaatorala asemel sageli Tpr järjestust, nii nagu mõned onkogeensed retseptorid. See järjestus aitab Raf valku siduda teiste valkude külge ja sellega teda aktiveerida. Raf valku saab muuta pidevalt aktiivseks kui viia see mõnede modifikatsioonidega membraanile.

Raf-kinaas aktiveerib rakus kinaase MEK, mis fosforüülivad nii türosiini kui treoniini, s.t. nii alifaatset kui aromaatsset aminohapet. Neid kinaase aktiveerivad ka mõned teised Ser/Thr kinaasid, sealhulgas Mos ja Tpl-2, mis on ka retroviiruste onkovalgud.

2.9. MEK ja MAP kinaasid ja kasvajakad

MEK on proteiinkinaas, mis fosforüülib treoniini ja türosiini. Need kahese spetsiifikaga ensüümid ekspresseeruvad kõigis rakkudes ja on vajalikud rakkude kasvuks ja diferentseerumiseks. Ka MEK valkude hulgas on pidevalt aktiivseid vorme, mis stimuleerivad rakkude kasvu. Viirustest pole selle kinaasi homoloogid leitud. Kasvajates on MEK aktiivsus tavaliselt tõusnud.

MAPkinaasid on aktiivsed, kui MEK fosforüülib nende kindlas motiivis treoniini ja türosiini. Ise fosforüülivad MAPK-d porliini järel olevat seriini või treoniini. Siia rühma kuuluvad ERK1, ERK2, ERK5, ERK6, p38MAPK, JNK jt. Konkreetseid onkogeenseid vorme pole kirjeldatud. Kasvajates on selle rühma kinaaside aktiivsus tõusnud.

Mitmed MAPKid (p38MAPK, JNK) on aktiveeritavad stressi tingimuste poolt, oksüdeerijate poolt ja kiirguste poolt. Ka need tegurid võivad soodustada kasvajate teket, näiteks päevitamine põhjustab nahavähki, mitmed kroonilised põletikud on vähieelsed seisundid – sellises kohas on reaktiivsete hapniku ühendite tase kõrge, see aktiveerib MAPK signaali tee.

Füsioloogiline vastus sõltub sellest, kui kaua on ükski signaali ahela lüli aktiivne. Kinaasidega paralleelselt aktiveeritakse fosfataasid, mis aktiveeritud MAPK defosforüülivad ja inaktiveerivad. On kirjeldatud türosiini fosfataase, seriini/treoniini fosfataase ja kahese spetsiifikaga fosfataase, mis defosforüülivad nii türosiini kui treoniini. Fosfataasid toimivad kindlatele kinaasidele, seostudes spetsiifiliste piirkondadega aktiveeritud kinaasis. Fosfataasid PP1 ja PP2A on inhibeeritavad mõnede rasvhapete polüetritega, näiteks okadaahappega. See C-38 rasvhappe polüeeter on tuntud kui kasvajaid tekitav ühend, võib-olla ongi kasvaja tekkimiseks oluline fosfataasi inhibeerimine, mis jätab mõned signaali ahela lülid pikaks ajaks aktiivseks. Ka mõned sinivetikate poolt toodetud ühendid on fosfataaside inhibiitorid ja on kantserogeensed.

MAPK aktiveerivad transkriptsiooni faktoreid, nende kaudu läheb kasvu stimuleeriv signaal edasi tuuma.

2.10. Signaali ülekandes osalevad transkriptsioonifaktorid kui onkovalgud

Paljude stimulaatorite poolt aktiveeritakse sellised transkriptsiooni faktorid nagu Fos ja Jun. Fos ja Jun perekonna valke vaadeldakse tuumasiseste signaali vahendajatena. Nad seostuvad homo- või heterodimeeridena DNA-le, AP1 piirkonda. **Jun** valk on tavaliselt rakus olemas ja tema esmane aktivatsioon toimub fosforüülimisega. Jun valgu ühes otsas on transkriptsiooni aktiveeriv ala, kui seal fosforüülitakse seriinid, siis transkriptsiooni aktivatsiooni võime tõuseb. Teise otsas on DNA-sidumise ala ja dimerisatsiooni ala, kui selle lähedast piirkonnast fosforüülida, siis DNA-ga seostumine alaneb ja valk ei ole enam aktivaator. Kui võrrelda normaalset ja lindude sarkoomiviiruse Jun-valku, siis võib öelda, et viiruse valk on kaotanud regulaatoralad. Ta ei ole kinaasidega ega oksüdeerijatega inaktiveeritav, DNA-ga seostumise alas on fosforüülitavad Ser ja Thr ning oksüdeeritav Cys asendunud teiste aminohapetega. Selline Jun on pidevalt DNA-ga seotud. Pealegi on viiruse valgu puhul ka tema geeni regulatsioon muutunud, teda toodetakse viiruse promotori kontrolli all suuremas koguses.

Fos valgu sünteesi indutseeritakse paljude signaalide poolt. Tema geeni transkriptsiooni aktiveerivad ka Jun homodimeerid, Fos aktivatsioonile eelneb Jun valgu aktivatsioon, siis käivitatakse Fos valgu süntees. Fos valgu aktiivsuse regulatsioon toimub ka valgu tasemel, fosforüülimine teatud kohtadest pärsib tema DNA-ga seostumist või aitab teda lagundamisele viia. Hiire sarkoomiviiruse onkovalk on Fos, mis on kaotanud oma regulatsioonialad, teda kõrvaldatakse aeglasemalt, tema eluiga on pikem, ja ta on pidevalt aktiivne.

Paljude signaalide puhul aktiveeritakse ka selline transkriptsiooni faktor nagu **NFκB**. Esimene sellele faktorile vastav DNA järjestus leiti immuunoglobuliini (Ig) κ ahela promotoris, sellest siis ka nimetus – nukleaarne faktor **κB**. On suured ja väiksed alaühikud. Suuremaid alaühikuid (p65) kodeerivad *rel* onkogeenid, on kolm erinevat valku: **Rel**, **RelA**, **RelB**. Raku *c-rel* geeni homoloog on lindude retikuloendothelioosi viiruse REV-T onkogeeni *v-rel*, indutseerib lümfoidseid kasvajaid. Viirusega nakatatud rakkudes on **v-Rel** valk tuumas ja ta viib sinna ka raku enda c-Rel valgu. Normaalselt läheb see valk tuuma ainult teatud signaalide peale. NFκB aktiveerib ka oma inhibiitori IκB-α sünteesi ja see toob aktiivse faktori tuumast ära, seega on normaalselt NFκB aktivatsioon lühiajaline.

Tibude c-Rel ja v-Rel-valgu ehituse võrdlus näitab, et kõik nad kannavad Rel-homoloogia ala (RHD) ja transkriptsiooni aktiveerivat ala. Erinevused on selles, et **v-Rel** on kaotanud mõned aminohapped otstest ja keskel on mõned mutatsioonid, temaga on liitunud jupid

viiruse Env valgust, saadakse hübriidvalk Env-Rel-Env. See valk ongi siis pidevalt tuumas ja stimuleerib rakkude kasvu.

Kasvajatest on leitud muutunud Rel valke: Rel homoloogia ala on liitunud mõne teise geeniga, *nrg* – *non-rel gene*. Rel-Ngr valk sisaldab osa Rel valgust ja osa teisest valgust. Selline hübriidvalk, milles transkriptsiooni aktiveeriv ala on asendunud, on leitud lümfoidsetest kasvajatelt. Ta seob DNA-ga, aga ilmselt ei oma transkriptsiooni aktiveerivat võimet, sest just see osa on puudu. Tema ülesandeks võib olla ka teatud promotoorite inaktiveerimine, mida c-Rel aktiveeriks. Kas need Rel valkudega toimunud muutused on olulised onkogeneesis või on nad sellega kaasnev nähtus, pole teada.

Väikeste subühikute eellased (p100, p105) sisaldavad inhibiitor-järjestust, kasvajatelt eraldatud valkudes on see ala oluliselt väksem või asendatud mõne teise valguga. Sellised faktorid lokaliseeruvad tuumas. Väiksed subühikud transkriptsiooni aktiveerivat võimet ei oma, nad seostuvad DNA-ga ja arvatakse olevat sageli promotoori supressorid. Mõnede promotoorite puhul on näidatud p52-p52 dimeeri aktiveeriv toime. Võib-olla on seal osaline mõni kolmas valk, näiteks Bcl-3.

Transkriptsiooni aktiveeriv ala on ka **Bcl-3** valgus, see valk seostub tuumas p50-p50 või p52-p52 dimeeriga ja muudab need transkriptsiooni inhibeerijad transkriptsiooni aktiveerijateks, kas lõhkudes dimeeri ja DNA vahelise sideme või andes kompleksile transkriptsiooni aktiveeriva võime. Bcl-3 üleekspressiooni on leitud kroonilise lümfoidse leukeemia haigetel. Haiges koes on sageli toimunud kromosoomi ümberkorraldused, kus *bcl-3* geen kromosoomist 19 seostub immunoglobuliini raske ahela geeniga kromosoomist 14. Sellises rakus on Bcl-3 mRNA tase kõrgem, valku toodetakse rohkem, Bcl-3 kodeerivas alas muutusi pole. Normaalse perifeerse vere mononukleaarsetes rakkudes on Bcl-3 geen indutseeritav, aktiveeritakse T-rakkude stimuleerimisel, haiges koes aga on tase pidevalt kõrge. Bcl-3 on onkogeen, tema üleekspressioon matkib kasvufaktori toimet, stimuleerib rakkude kasvu. B-rakkude lümfoomiga on seotud veel teisigi kromosoomu muutusi: p52 eellasvalgu, DNA siduv domään on liitunud immunoglobuliini $\alpha 1$ alaga. Toodetakse valku **Lyt 10**, milles $\alpha 1$ järjestus asendab inhibitor-järjestust. Seega on valk Lyt10 κB -spetsiifilise DNA siduva võimega, s.t. et lümfoomikoes toodetakse alternatiivne NF κB subühik. Transkriptsiooni aktiveerivat võimet tal ei ole, ta võib transkriptsiooni blokeerida või koos Bcl-3-ga moodustada transkriptsiooni aktiveeriva faktori. Transkriptsiooni aktivatsiooni võimet omav ja Rel homoloogia domääniga seostuv Bcl-3 annavad koos p52 homodimeeriga aktiivse NF κB . Kuna nende subühikute tase on kõrge, surutakse teised NF κB vormid DNA-lt välja, kaob või vähemalt langeb spetsiifiline promotoorite regulatsioon. Sellistes tingimustes Rel valgu üleekspressiooni polegi vaja, aktiivse faktori moodustavad p52 dimeer ja Bcl-3.

Peale selle, et Rel valk on ise onkogeenne, võivad mõned teised onkovalgud kasutada teda rakkude transformeerimiseks. Mõned näited, kus valgu transformatsiooni võime korreleerub NF κB aktivatsiooniga:

- 1) inimese T-rakkude leukeemiaviiruse-1 onkovalk Tax aktiveerib NF κB ja see aktivatsiooni võime korreleerub selle valgu onkogeensusega. Tax valk lõhub NF κB -I $\kappa B\beta$ kompleksi, NF κB ei aktiveeri I $\kappa B\beta$ sünteesi, inhibiitori tase ei tõuse ja faktor jääb aktiivseks.
- 2) EBV LMP1 käivitab TNF retseptoriga assortseeruva faktori (TRAF) kaudu NF κB aktivatsiooni ja põhjustab onkogeenset transformatsiooni. LMP1 kõrge tase roti fibroblastide kultuuris muudab rakud kasvajalisteks.
- 3) Hepatiit B viiruse krooniline infektsioon põhjustab maksa kasvajaid. Oluline osa selles paistab olevat X geeni produktil pX. See on 17kDa suurune valk, mis aktiveerib NF κB , mehhanismi pole teada, aga see ei toimu üle Ras-Raf tee.

Väga paljud viiruse valgud aktiveerivad NF κB . Selle faktori kaudu aktiveeritakse immuunvastus, see arvatakse toimuvat I $\kappa B\alpha$ -NF κB kompleksi lõhkumise teel. NF κB

aktivatsiooniks on vaja degradeerida inhibiitor valk, mis hoiab faktorit tsütoplasmas. NF κ B ise aktiveerib oma inhibiitori I κ B α sünteesi ja värskelt sünteesitud inhibiitor seostub NF κ B-ga ja viib selle inaktiivsesse vormi. See mehhanism hoiab ära faktori üleaktivatsiooni. Faktor on aktiveeritud lühikeseks ajaks. Kui selles mehhanismis tasakaal rikutakse, Rel-valkude üleekspressiooniga, inhibiitori tootmise maha surumisega või regulatsiooni mehhanismi puudumisega, võib see viia rakkude kontrollimatule kasvule. v-Rel ekspressioon lümfooidsetes rakkudes kaitseb neid apoptoosi eest, mitmed apoptoosi indutseerivad faktorid neile rakkudele ei mõju. Inhibiitori I κ B antisens-RNA-ga tema tootmise blokeerimine põhjustab rakkude muutumise kasvalisteks, mitte-degradeeritava I κ B ekspressioon rakkudes takistab nende kasvu ja kutsub esile apoptoosi. See fakt, et NF κ B inhibiitorid põhjustavad rakkude apoptoosi, annab lootust kasutada neid vähivastaste ravimitena. Muuhulgas on sellisteks inhibiitoriteks ka aspiriin ja salitsülaad.

Nii Fos, Jun kui Rel ja p52 valkude onkogeensetele vormidele on iseloomulik nende suurenenud võime DNA-ga siduda. Samal ajal on nende transkriptsiooni aktiveeriv võime mõnel juhul (Rel) hoopis kadunud. Transkriptsiooni faktori transkriptsiooni aktiveeriva võime tõus ei korreleeru tema onkogeensusega, küll aga paistab sellega seotud olema tema hulk ja DNA-ga sidumine.

Rakkude paljunemise regulatsioonis on üks oluline transkriptsiooni faktor **Myc**. Myc ekspressioon on kõrge kiirelt kasvavates rakkudes: embrüonaalses koes ja kasvajakoes. Inimese genoomis on teada 3 *myc*-geeni. *c-Myc* on üleekspressioneerunud rinna-, jämesoole-, emakakaelavähis, väikese-rakulises kopsuvähis, osteosarkoomis, glioblastoomis, melanoomis ja müeloidse leukeemia koes. *N-myc* geen on amplifitseerunud neuroblastoomis ja on seotud kiire ja agressiivse rakkude kasvuga. *L-Myc* geen on amplifitseerunud väikese-rakulises kopsuvähis. Myc valgu geen on kasvajates sageli liitunud mõne teise geeniga ja tema toime ei allu siis enam normaalsele kontrollile, valku toodetakse valedel aegadel ja palju. Myc valgu kõrge tase on rakkude paljunemist stimuleeriv ja koos teiste aktiveeritud onkogeenidega transformeeriv. Algselt leiti Myc valgu geen retroviiruses, lindude müelotsütomatoosiviiruse onkogeen – *v-myc*. Normaalses rakus Myc valgu tase tõuseb väga lühikeseks ajaks, kui rakkudel on kasvu stimuleeriv signaal. Sellega sarnaneb Myc signaaliülekanne valkudega. Myc on transkriptsiooni faktor, mis aitab sisse lülitada rakutsükli ja käivitada rakkude paljunemise, rakkude mineku S-faasi. Rakutsükli teistes faasides on Myc valgu tase madal. Kui Myc valgu taset hoitakse kunstlikult kõrgel, siis paljunevad rakud aktiivselt.

Kokkuvõtteks võib öelda, et kasvajarakkudes on signaali ülekandes osalevad valgud sageli muutunud, regulatsiooni mehhanismid on rikutud. Valdavalt on mutatsioonid sellised, mis tagavad PTK-Ras-Raf-MAPK signaali tee aktiveeritud oleku tõusu, negatiivse regulatsiooni alad on signaaliraja valkudes kadunud. Kas see on onkogeense transformatsiooni protsessi põhjustaja, tagajärg või kaasnev nähtus, pole selge. Ühelt poolt võib järeldada, et mutatsioonide tõttu pidevalt aktiivse signaali teega rakul on suurem tõenäosus muutuda kasvajakas, kuna rakus pidevalt stimuleeritakse kasvu. Teiselt poolt, võib-olla on vastavad mutatsioonid tekkinud sellepärast, et signaali tee on mingil põhjusel olnud pikka aega aktiveeritud, ülekoormatud. Selleks, et PTK, Ras, Raf, MAPK inhibiitoritega kasvaja teket ära hoida, peavad olema väga spetsiifilised inhibiitorid, mis toimivad just valkude mutantsetele vormidele. Normaalsel kasvu stimuleerivat signaali rada on ka täiskasvanud koes aegajalt vaja ja selle blokeerimine pikaks ajaks pole organismile ohutu.

3. Kasvaja supressor-valgud ja kasvajakasv

Kuidas rakk signaalidele vastab, sõltub mitte ainult onkogeenidest vaid ka kasvu maha suruvatest geenidest, kasvaja supressorgeenidest. Kuidas need avastati? Genoomi uuringud on näidanud, et teatud kromosoomi lõikude puudumisel või teatud kohtades mutatsioonide olemasolul on kasvajakasv sagedus suur. Kui tehti hübriidseid rakke normaalsest ja kasvajakasvurakust, defektse genoomiga rakuliinist, siis saadi normaalne rakk. Tähelepanek, normaalne rakk toodab valku, mis surub maha kasvaja fenotüübi, kasvajas see valk ilmselt puudub. Need hübriidsed rakud võisid aga mõne mutatsiooni läbi jälle kasvajakasvuliseks muutuda. Kasvajakasvu puuduvate või muteerunud geenide viimine rakukultuuris neisse rakkudesse muutis need kasvajakasvulised rakud jälle normaalseks, nende kasv pidurdus teatud arvu pooldumiste järel. Ilmselt on mingid geenid, mille ekspressioon pidurdab rakkude kasvu ja võib maha suruda kasvaja teket. Neid gene nimetatakse kasvaja supressor-geenideks ja nendelt toodetud valgud on kasvaja supressor-valgud.

Kasvaja supressor-valgud kontrollivad rakutsükli toimimist, blokeerivad selle, kui on käsk paljunemine peatada. Kuid sellesse rühma kuuluvad ka valgud, mis lülitavad välja signaali teid või soodustavad rakkude suremist. Kudede normaalne areng saab toimuda, kui rakkude paljunemine ja rakkude kadumine (apoptoos) on tasakaalus. Seega on oluline nende kõikide protsesside õigeaegne toimumine ja selle eest vastutavad mitmed raku valgud. Praeguseks on teada mõned sellised valgud, mille puudumine aitab kaasa kasvajakasvule.

3.1. Tuumor-supressorvalk p53

Valk molekulkaaluga 53kDa – **p53** – on leitud olevat mitmes kasvajas muteerunud ja inaktiivne. See valk aktiveeritakse normaalses rakus mitmesugustes stressi tingimustes, tema aktiveerijaks on DNA vigastused ja tema toimet mõjutavad paljud asjaolud. Aktiveeritakse p53 nii valgu fosforüülimisega kui ka tema tootmise tõusuga. Aktiivne p53 on transkriptsiooni faktor, seostub DNA-ga ja reguleerib mitmete valkude sünteesi rakus. Ta seostub ka paljude valkudega, mõjutab nende tööd ja on ise nende poolt mõjutatav. Otsene mõju rakkude paljunemisele, rakutsüklile, toimub üle tsükliin-sõltuvate kinaaside inhibiitorite. P53 aktiveerib selliste inhibiitorite nagu p21CIP1/Waf1, p27KIP1 geenide ekspressiooni, nende valkude tase tõuseb. Need inhibiitorid takistavad tsükliinide ja tsükliin-sõltuvate kinaaside kompleksi tööd ja rakutsükkel peatub G1 faasis, ei algata uut DNA sünteesi. Samal ajal aktiveeritakse DNA vigu parandavad valgud. Kui DNA on parandatud, p53 tase langeb ja rakutsükkel läheb edasi. Kui parandus ei õnnestu, suunatakse rakk apoptoosi, ka selle raja aktiveerimises on oluline p53. Ilus kaitse mehhanism! Kuidas see kõik täpselt käib, pole päris selge. Aktiivne p53 on tetrameerne valk, milles iga alaühik peab olema aktiivne. Transkriptsioonifaktor p53 aktiveerib ka teda ennast lagundamisele viiva valgu tootmise, ubikvitiini ligaasi Mdm2. See valk seostub p53-ga ja lisab talle ubikvitiini suunates ta sellega lagundamisele. Nii et p53 ise aktiveerib enda lagundamise raja, kaitstes sellega raku liigse p53 taseme eest. Kui p53 fosforüülida teatud kohast, siis p53 ei saa siduda Mdm2, ta on stabiilsem ja aktiivne transkriptsiooni aktivaator.

Kasvajakasv on p53 sageli muteerunud just DNA siduvas domäänis, seal on arginiin muteerunud. Arginiin kui aluseline aminohape on oluline DNA-ga sidumisel ja tema puudumine vähendab valgu ja DNA kontakti. Kui valk ei seostu DNA-ga, siis ei reguleeri ta ka transkriptsiooni.

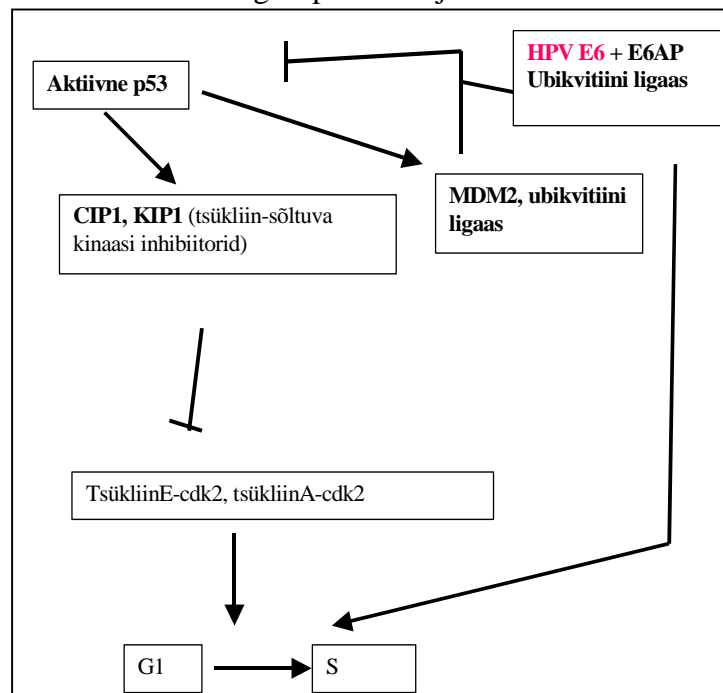
Valgul p53 on ka sugulasi, temast veidi suuremad valgud **p63** ja **p73**, viimane toimib umbes samuti kui p53, ta aktiveeritakse DNA vigastuste poolt ja ta peatab rakutsükli või

saadab rakud apoptoosi, kui tsükkel ei saa edasi minna. p63 pole apoptoosi esilekutsuv valk, nagu on seda p53 ja p73. p63 ekspressiooni on näidatud epiteeli rakkudes. Põiekasvajates on tema tase langenud või ta puudub seal. Kui p53 indutseerib apoptoosile viiva raja, siis on seal vajalikud ka p63 ja p73. On uuritud p73 mutatsioone kasvujates, neuroblastoomis on tema geen deleteerunud. Kuid kasvujates on mutatsioone selles geenis vähe (0.5% uuritud kasvujatest) võrreldes p53 geeniga, milles on 50% kasvujates mutatsioonid. Erinevalt p53-st valke p63 ja p73 toodetakse rakkudes ka lühemas variandis, ilma transkriptsiooni aktiveeriva alata. Need reguleerivad täispikkade p63 ja p73 tööd lülitudes nendega koos kompleksi ja blokeerides siis selle kompleksi töö.

On tehtud hiiri milles need geenid puuduvad. Ilma p53-ta hiired on normaalsed, kuid saavad kiiresti kasvujad. Ilma p63-ta või ilma p73-ta hiirtel on häireid epiteeli või närvisüsteemi arengus.

p53 ja viiruste onkovalgud

Selleks, et viirus saaks rakus paljuneda, peab ta aktiveerima nakatunud raku replikatsiooni valgud, s.t. sunnib rakud paljunema. Viirus püüab kõrvaldada need raku mehhanismid, mis takistavad rakkude kiiret kasvu. Mitmed viiruse valgud blokeerivad kasvaja supressor-valku p53 ja tema sugulasi. Adenoviiruse ja papilloomiviiruse mõned valgud inaktiveerivad kasvaja supressor-valku p53. Joonisel 3 on skeem, kuidas toimib inimese papilloomiviiruse (HPV) onkovalk E6. Normaalselt reguleerib p53 oma taset ise aktiveerides peale tsükliinsõltuvate kinaaside inhibiitorite ekspressiooni ka ubikvitiini ligaasi geeni *mdm2*. Ubikvitiini ligaas Mdm2 märgib p53 ubikvitiiniga ja selliselt märgitud valk degradeeritakse proteasoomides. See mehhanism tagab p53 lühiajalise aktivatsiooni. Kui p53 tase langeb, siis aktiveeruvad



Joonis 3. HPV onkovalk E6 mõjutab tuumor-supressorvalgu p53 toimet. G1 ja S, rakutsükli faasid; cdk, tsükliin-sõltuvad kinaasid.

jälle tsükliin-sõltuvad kinaasid ja rakutsükkel läheb edasi. Kui rakus on HPV nakkus ja seal toodetakse HPV valku E6 kõrgel tasemel, käivitub uus p53 lagundamise tee. HPV E6 seostub ühe ubikvitiin-ligaasiga E6AP (E6-ga assotseeruv proteiin), see kompleks seostub p53-ga ja aitab p53-le ubikvitiinid külge panna. Ubikvitiinidega märgitud valk viiakse lagundamisele. Kui p53 tase langeb, langeb ka rakutsükli inhibiitorite tase ja tsükliit ei peatata isegi siis, kui on olemas vigastatud DNA, mis vajaks parandamist. Uue DNA süntees ja rakkude paljunemine jätkub, paljunevad ka vigase DNA-ga rakud. See põhjustab omakorda mutatsioonide teket ja kromosoomide ebastabiilsust. On leitud, et need HPV tüübid, mis tekitavad pahaloolumulisi kasva-

jaid, toodavad sellist E6 onkovalku, mis seostub tugevamini E6-AP-ga ja p53-ga, kui teiste viiruste E6-valgud. Pealegi on vähkkasvajates HPV sageli liitunud peremeesraku genoomi ja sealjuures kaotanud oma regulaatorvalgu E2, mis hoiaks kontrolli all onkovalkude E6 ja E7

tootmist. Seega toodetakse sellises kasvajas E6 valku palju ja pidevalt, p53 toime rakkudele on täielikult kõrvaldatud.

Ka adenoviiruse onkovalgud (E1B, E1A) kõrvaldavad p53, et siis viirus saaks paljuned. Alati ei degradeerita p53, vaid ta lihtsalt inaktiveeritakse. Sealjuures inaktiveeritakse just p53 rakutsükli peatav funktsioon, aga apoptoosi indutseeriv toime võib jääda alles ja p53 kogunemine kutsub esile rakkude apoptoosi. Kui adenoviirusest deleteerida valgu E1B geen, siis selline viirus paljuneb ainult rakkudes, kus pole aktiivset p53, ja põhjustab lõpuks rakkude surma. Seda omadust proovitakse kasutada vähiravis. Rakukultuuris sellised modifitseeritud adenoviirused tapavad efektiivselt rakke, milles p53 ei tööta.

3.2. Retinoblastoomi valk pRB

Retinoblastoom on lastel esinev pärilik silmakasvaja. Retinoblastoomi haigetel on tihti muutunud 13. kromosoom, sealt on midagi kadunud. Järelikult peaks seal olema mingi kasvajat ärahoidev geen, selle geeni produkti hakati nimetama retinoblastoomi valguk **pRB**. Ühe mutantse geeni saab laps vanematelt ja kui teine geen koopia ka muteerub, tekib kasvaja. Hiljem on leitud selle valgu geeni deletsiooni ka paljudes teistes kasvajates. RB on tuumavalk, fosforüülitakse paljudest kohtadest, fosforüülitus muutub rakutsükli käigus: kui valk fosforüülitakse, algab uus DNA süntees. RB valku fosforüülivad valgu kompleksid, mis koosnevad tsükliinist ja tsükliinsoltuvast kinaasist. Seega kontrollivad RB tööd rakutsükli reguleerivad valgud (*cdc – cell-division cycle*, on teada üle 70 *cdc* geeni; *cdc2* on proteiinkinaas; *cdc25* on proteiin-fosfataas). Fosforüülimata RB on kompleksis transkriptsiooni faktoritega E2F ja transkriptsiooni faktorid ei pääse DNA juurde. Kui RB fosforüülitakse, siis ta vabastab E2F ja see aktiveerib transkriptsiooni mitmetelt promootoritelt, mis toodavad DNA replikatsiooniks vajalikke valke, käivitatakse DNA replikatsioon. Kui RB puudub, siis toimub kontrollimatu DNA süntees ja rakud paljunevad. RB geen on muteerunud sarkoomikoos, rinna-, põie-, prostata-, neeru-, maksa-, pankrease-, kopsu- ja emakakaelavähis ning leukeemiate puhul. Normaalse RB geeni rakkudesse viimine inhibeerib nende kasvu.

RB perekonnas on veel valgud p107 ja p130. Kõiki neid RB perekonna valke nimetatakse tasku-valkudeks. Nad seovad tuumas peamiselt transkriptsiooni faktoreid ja hoiavad neid nn. taskus, DNA-st eemal.

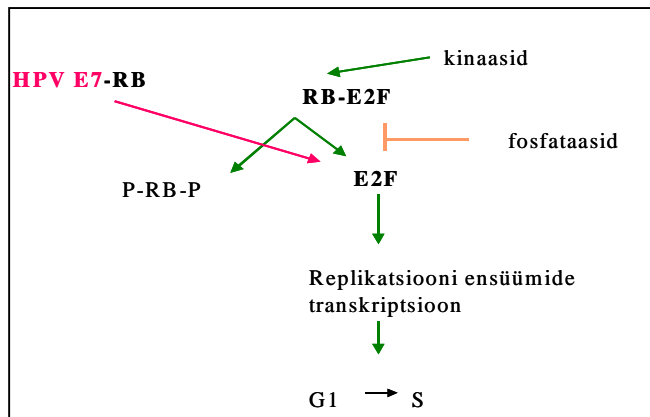
On tehtud ilma RB-ta hiiri. Ilma RB-ta hiired surid embrionaalses arengu faasis defektide tõttu vereloomes ja neurogeneesis ning maksa arengus. RB^{+/-} hiired said kilpnäärme ja ajuripatsi kasvajak, aga mitte retinoblastoomi, nagu see on inimestel.

RB ja viiruse onkovalgud

RB funktsioonide inaktiveerimine võib toimuda ka viirustega nakatunud rakkudes. Normaalses rakus RB seob transkriptsioonifaktoreid E2F, mis reguleerivad transkriptsiooni. Kui RB seostub mõne viiruse valguga, siis E2F vabaneb ja aktiveerib transkriptsiooni. RB reguleerib paljude rakutsükli valkude tootmist ja lubab neid geene E2F kaudu aktiveerida ainult õigel ajal. Kui see ajaline regulatsioon on viiruse valkude toimel häiritud, RB seotakse pikaks ajaks, siis on raku DNA replikatsioon ka pikka aega aktiveeritud ja see viib rakkude kontrollimatule paljunemisele.

RB seostub adenoviiruse ja papilloomiviiruse valkudega. Selle seostumise tagajärjel vabaneb E2F ja aktiveeritakse transkriptsioon ja DNA replikatsioon. (joonis 4)

Rakud, kuhu inimese papilloomiviirus siseneb, ei paljune piisava kiirusega, seal on rakutsükkel kindla kontrolli all.



Joonis 4. HPV E7 seob RB ja aktiveerib rakutsükli S-faasi.

Viirusel on vaja see kontroll eemaldada. Seda teevad valgud HPV E6, mis seob ja viib lagunemisele p53, ja HPV E7, mis seob RB, vabastades seega E2F ja see aktiveerib transkriptsiooni replikatsiooni valkude geenidelt. Raku replikatsiooni masinavärk käivitatakse, rakud paljunevad, viirus saab ka paljuneda. Mõlemad viiruse valgud blokeerivad rakutsükli inhibiitoreid ja käivitavad sellega rakkude DNA sünteesi. Rakud paljunevad, pal-

junevad ka vigase DNA-ga rakud, sest nende kasvu kontrolliv p53 on kõrvaldatud. Sellistes tingimustes koguneb genoomi üha rohkem defekte, kromosoomide stabiilsus väheneb.

3.3. Teisi kasvaja supressorvalke

3.3.1. Tsükliinsõltuvate kinaaside inhibiitorid

Kasvaja supressor-valkudeks on ka mõned teised p53 raja valgud, need rakutsükli inhibiitorid, mille tootmist p53 aktiveerib, p16INK4a, p15/14INK4b, p21CIP/Waf1, p27KIP, ja p53 lagundamist takistav valk p19ARF. Nende geenides on deletsioone mitmete kasvajaete puhul: melanoomis, glioomis, leukeemias, põie-, pea- ja kaelavähis. Nende valkude puudumisel toimub pidevalt uue DNA süntees ja rakud paljunevad.

2.3.2. TGF β -Smad signaali rada

Kasvaja supressoriteks on ka kasvu pidurdavate signaaliradade valgud. Näiteks TGF β poolt käivitatava signaaliraja valgud: TGF β retseptorid ja Smad-valgud. See signaali rada blokeerib paljudes rakkudes kasvu stimuleerivaid signaale. TGF retseptor, TGFRII, on puudu käärsoole kasvajas, retinoblastoomis jt kasvajat. TGF retseptorilt signaali vastu võttev Smad-valk on muteerunud mitmetes kasvajat. Kasvaja rakkude paljunemist ei reguleeri siis enam kasvu inhibeeriv faktor TGF β . Kuidas see signaali rada kasvu blokeerib, pole täpselt teada, kuid mõnedel andmetel see rada aktiveerib eespool mainitud rakutsükli inhibiitorite geenide ekspressiooni.

2.3.3. Fosfataasid

Rakkude kasvu stimuleerivas signaali rajal aktiveeritakse valke fosforüülimisega. Enamasti on fosforüülitatud valgud signaali edastajad ja üleaktiveeritud kinaasid võivad põhjustada onkogeneesi. Sellele vastupidiselt toimivad fosfataasid, mis defosforüülivad kineeritud valke. Fosfataasid võivad olla kasvaja supressorvalgud, lülitavad välja kinaaside poolt aktiveeritud signaali. Seda on nii proteiinfosfataasid, mis defosforüülivad Ser või Thr, kui ka proteiintürosiin-fosfataasid, mis defosforüülivad valkudes Tyr. Proteiinfosfataaside inhibiitorid on

tuntud kantserogeensete ühenditena (okaadahapped, sinivetikate poolt toodetav mürk jt). Sama ajal on kantserogeensed kinaase aktiveerivad ühendid (TPA).

Peale proteiinfosfataaside on tuumori supressorid ka fosfolipiidide fosfataasid nagu PTEN, mis defosforüülib fosfatidüül-inosool-3'-ühendeid inosooli rõnga 3-ndast positsioonist, s.t. sealt kust PI3K seda fosforüülib. PTEN on paljudes kasvujates muteerunud, või on tema geen vaikiv. PTEN mutatsioonid on iseloomulikud vanaea kasvujatele.

2.3.4. GTP-aasi aktivaatorid

Tuumor-supressoriks võivad olla Ras-valgu abivalgud GTP-aasi aktivaatorid (GAP), mis viivad Ras-valgu inaktiivsesse vormi. Nende valkude puudumisel on Ras valk pikka aega aktiivses signaali edasi andvas olekus ja stimuleeritakse rakkude kasvu. Üks GAP valkudest on neurofibromin-1, NF1, selle valgu geen on sageli muteerunud inimestel, kes põevad neurofibromatoosi tüüp 1 või teisi närvikoe kasvujaid. Selle geeni mutatsioone on leitud ka jämesoolevähis, melanoomis, leukeemias. Sellises haiges koes on Ras-GTP tase tõusnud ja see võib soodustada kasvaja teket ja kasvu.

2.3.5. APC valgud

Tuumor-supressor on valk APC (*adenomatosus polyposis coli*), selle geen on jämesoolevähis sageli muteerunud. Kui APC valk on puudu, siis on neil inimestel jämesoole polüübid, adenomatoosne polüpoos, mis on sageli pärilik haigus. Edasi võib tekkida adenoom, lõpuks kujuneb välja kartsinoom ja metastaseeruv kartsinoom. Selle protsessi käigus toimuvad seal veel mõnede geenide mutatsioonid, sageli on lõpuks muteerunud ka p53.

APC valk, seostub paljude valkudega, reguleerib valk-komplekside moodustumist. APC hoiab kompleksis β -kateniini ja glükogeeni süntaasi kinaasi (GSK3) ning aksiini, selles kompleksis GSK3 fosforüülib β -kateniini ja see viiakse degradeerimisele. Kui seda ei degradeerita, siis β -kateniini koguneb ja muutub transkriptsiooni aktivaatoriks ning koos teiste faktoritega stimuleerib rakkude kasvu. APC kui tsütoplasmas teisi valke kinni hoidev valk, toimib mõnes mõttes sarnaselt tuumas oleva RB valguga: üks hoiab transkriptsiooni faktorit paigal tsütoplasmas ja teine tuumas, mõlemal juhul on transkriptsioon teatud geenidelt pärsitud. APC valku võib vaadata ka kui adaptervalgu, mis moodustab valk-valk komplekse, hoiab koos erinevaid valke ja aitab neil üksteist modifitseerida, ja sellega muudab nende valkude toimet rakkudele.

2.3.6. BRCA valgud

Tuumor-supressor-valkudeks on BRCA1 ja BRCA2 (*breast cancer*) valgud. Perekondades, kus esineb nii rinnavähki kui munasarjavähki, on sageli muteerunud geenid BRCA1 ja BRCA2. Need valgud lokaliseeruvad tuumas ja seostuvad mitmete transkriptsiooni kompleksi valkudega. BRCA valke peetakse DNA reparatsiooni ja transkriptsiooni reguleerijateks ja ilmselt töötavad nad koospetsiifiliselt.

Transkriptsiooni kompleksi kuuluvate valkude deletsioone ja mutatsioone on leitud mitmetest kasvujatest ja sageli on nad päriliku iseloomuga. Ka DNA reparatsiooni kompleksi kuuluvaid valke, mis võivad olla tuumorsupressoriteks, on peale BRCA-de veel kirjeldatud.

2.3.7. Superoksiidi dismutaas (SOD)

On teada, et aktiivsed hapnikuühendid põhjustavad kasvujaid, ja antioksidandid takistavad seda. Üks antioksidantseid ensüüme on SOD: mitokondris MnSOD, tsütosoolis CuZnSOD,

raku välispinnal ekstratsellulaarne SOD. Juba 25 a tagasi leiti, et MnSOD tase on alanenud transformeerunud rakkudes. Kasvajarakud omavad peaaegu alati madalat MnSOD ja tavaliselt ka madalat CuZnSOD aktiivsust. SOD muudab superoksiidi radikaali vesinikperoksiidiks. On näidatud, et MnSOD üleekspressioon inhibeerib kiirgusest indutseeritud fibroblastide muutumist kasvajalisteks, et MnSOD geeni viimine inimese melanoomi rakkudesse kaotas nende kasvajalise fenotüübi. Sarnaseid tulemusi on saadud ka fibrosarkoomi, inimese rinnavähi, viirusega transformeeritud kopsu fibroblastide, roti ja inimese glioomi, inimese oraalse kartsinoomi ja prostata kartsinoomi puhul. Järelikult võib MnSOD geeni pidada kasvaja supressor-geeniks. MnSOD geeni kasvajasse viimisega on saadud kasvaja rakke apoptoosi saata, kasvaja suurus kahanes. Mehhanismiks on pakutud, et MnSOD soodustab superoksiidi muutumist vesinikperoksiidiks ja viimane indutseerib ümbritsevates rakkudes apoptoosi. Seda seletust kinnitas ka fakt, et kui lisati katalaasi ja glutatiooni peroksidaasi inhibiitoreid, mis takistasid vesinikperoksiidi lagundamist, siis saadi tugevam kasvajat pidurdav efekt. Aga siin võib toimeid olla aga veel teisigi. Superoksiidi on vaja rakkude kiireks paljunemiseks, kui see kõrvaldada, siis kasv pidurdub ja sealjuures alati ei lähegi rakud apoptoosi.

Kokkuvõtteks võib öelda, et kasvaja supressor-geene võib olla mitmesuguseid, nad töötavad mitmetes raku arengu etappides. Nad lülitavad välja rakule tulnud kasvu stimuleerivad signaalid või käivitavad kasvu pidurdavad signaalid. Kasvaja supressorid osalevad signaali radade kõigil etappidel ja raku tuumas rakutsükli regulatsioonis. Kasvaja genoomis on muutunud üsna mitmed kohad, aga kõik geenid, mis seal puuduvad, pole kasvaja supressorite geenid.

Kasvaja tekkes on tegemist mitme sündmuse koostoimega, onkogeen on aktiveerunud, tuumor-supressor on inaktiveerunud, apoptoos on pidurdunud. Ainult üks muutus tavaliselt kasvajat esile ei kutsu.

4. Apoptoos ja kasvaja

4.1. Apoptoos

Kudede areng ja kasvamine on reguleeritud rakkude paljunemise ja rakkude suremisega. Normaalses koes peaksid need protsessid tasakaalus olema ja toimuma ilma kõrvalolevaid kudesid häirimata. Nekrootiline rakkude surm, mille käigus rakk laguneb ja tema sisu valgub teiste rakkude vahele, on põletikele iseloomulik. Rakkude ettemääratud, programmeeritud jäljetu kadumine on apoptoos. Apoptoos tähendab kreeka keeles lehtede langemist puudelt, lehesadu, sügiseti normaalne nähtus. Raku apoptoos on raku surm, kus raku osad lõhutakse kindlas järjekorras, pakitakse apoptootilistesse kehadesse, mis siis teiste rakkude poolt kõrvaldatakse. Apoptoos on vajalik organismi arengus igasugu õõnsuste tekkimisel, sõrmevahede ja varbavahede tekkimisel, aga ka kahjustatud rakkude kõrvaldamisel. Kui apoptoos on maha surutud, siis vigaseid rakke ei kõrvaldata, nad võivad paljuneda ja tekib üha rohkem mutatsioonidega rakke, need hakkavad pidurdamatult paljunema. Selline olukord on kasvaja koes, seal on apoptoosi rajad välja lülitatud. Kui aga apoptoos on mingitel põhjustel võimendunud, kaovad organismile vajalikud rakud. Nii toimub vananevas organismis paljudes kudedes rakkude apoptoos aktiivsemalt kui uute rakkude kasvamine. Apoptoos võib kiireneeda mõnede haiguste puhul, näiteks närvirakkude kadumine on iseloomulik neurodegeneratiivsetele haigustele. Normaalses koes peavad olema tasakaalus ühelt poolt rakkude paljunemine või elus püsimine ja teiselt poolt rakkude kadumine, apoptoos.

Apoptoos on rangelt reguleeritud, kindlad geenid aktiveeritakse teatud järjekorras. Käivitatakse valkude ja nukleiinhappe lagundamine. On tehtud kindlaks mitmed apoptoosi geenid rakus, neilt toodetud valgud viivad läbi apoptoosi. Bcl-2 on regulaator, mis aktiveeritakse, kui on käsk ellu jääda. Seda aktiveerivad mitmed signaali teed. Signaalid tulevad väljast või raku seest. Näiteks punased verelibled kasvavad kui toimib erütropoetiini, see aktiveerib Jak-Stat signaali raja, aktiveeritakse antiapoptootilise valgu Bcl-2 tootmine, punaliblede eellased ei sure, vaid arenevad erütrotsüütideks. Mitmed neurotroofsed faktorid hoiavad elus neuroneid käivitades Bcl-2 aktiveeriva signaaliraja.

Apaf-1 on apoptootilisi proteaase aktiveeriv faktor. Kui rakul pole käsku ellu jääda või on käsk apoptoosi minna, siis Apaf-1 aktiveerib kaspasid. Kaspasid on proteaasid, mis lõikavad valku kindlast kohast. Kaspaside rühmas on 10 proteaasi, nad aktiveerivad ennast ise autokatalüütiliselt ja edasi juba teisi kaspase. Prokaspas lõigatakse mitmest kohast, fragmentidest moodustavad suur ja väike alaühik aktiivse kaspasi, mis aktiveerib järgmisi kaspase.

Kaspasid lõikavad katki raku elusks vajalikud valgud, sealhulgas DNA-aasi inhibiitorid, DNA-aas aktiveerub ja lõikab katki DNA. Apoptoosi toimumist hinnatakse selle järgi, kas DNA laguneb väikesteks juppideks ja kas lõigatakse katki teatud valgud. On värvaineid, mis lähevad ainult elusatesse rakkudesse, nendega raku populatsiooni töödeldes saab hinnata apoptoosi ulatust. DNA-siduva värviga rakupopulatsiooni analüüsidest saab välja tuua apoptootiliste rakkude hulga.

4.2. Apoptoosi reguleerijad

Apoptoosi reguleerivad mitmed rakkudele mõjuvad faktorid. Mõned rakud lähevad apoptoosi, kui ei saa teatud kasvu stimuleerivaid faktoreid, teised lähevad apoptoosi, kui neile toimivad apoptoosi põhjustavad faktorid. Peale välisfaktorite võidakse apoptoosi tee käivi-

tada ka raku seest, kui on DNA kahjustused või rakutsükli häired, mida ei saa kõrvaldada. DNA vigastuste poolt indutseeritud apoptoosi käivitamises on oluline osa tuumor-supressor-valkudel p53, p73 ja türosiinkinaasil Abl. Milliste mehhanismidega seda reguleeritakse, pole selge.

Seni on kirjeldatud apoptoosi regulatsioonis osalevate valkude perekond Bcl-2/Bcl-X-/Bax-/Bad. Need on mitokondri membraaniga seotud valgud. Normaalses rakus on tsütokroom C mitokondri membraanis, apoptootilises rakus ta tuleb sealt välja, mitokondrid lähevad katki. Selle mitokondrite lagunemise ja tsütokroom C välja tuleku saab blokeerida Bcl-2 kõrge tasemega. Bcl-2 kui onkogeen kirjeldati algselt inimese B-rakkude lümfoomis, kus tema geen on liitunud immuunoglobuliini raske ahela geeniga ja Bcl-2 valku toodetakse palju ning rakkude apoptoos on pärsitud. Bcl-2-ga sarnaselt käitub Bcl-X-valk. Bax-valgu toime on aga vastupidine, tema kõrge tase võimendab apoptoosi, toob tsütokroomi mitokondrist välja tsütoplasmasse. Tsütosoolis tsütokroom C seostub Apaf-1-ga ja käivitab kaspaside aktivatsiooni. Bad valk reguleerib Bcl-2/Bcl-X tööd ja Bad valgu seostumist Bcl-2/Bcl-X-ga reguleeritakse Bad valgu fosforüülimisega.

Rakkudes, mis ei leia nende elus hoidmiseks vajalikku faktorit, on Bad seotud Bcl-2-ga mitokondri membraanis. See põhjustab membraani muutuse, tsütokroom C tuleb mitokondrist välja, aktiveerib Apaf-1 abil kaspas-9 ja edasise kaspaside kaskaadi, rakud lähevad apoptoosi. Kui aktiveeritakse kinaasid, mis fosforüülivad Bad, siis fosforüülitud Bad seostub tsütosoolis adaptervalguga 14-3-3 ja Bcl-2 jääb vabaks ja toimib antiapoptootilise valguna, hoiab mitokondri membraanid terved ja tsütokroom C ei pääse välja. Närvirakud jäävad elama, kui saavad faktoreid ja need aktiveerivad PI3K ja Akt raja, mis fosforüülib Bad valku. Ka teised kasvu stimuleerivad faktorid käivitavad kinaaside kaskaasi, mis soodustab kasvu ja pidurdab apoptoosi.

Mõned faktorid aga käivitavad apoptoosi. Aktivin ja TGF β indutseerivad läbi Smad valkude paljudes rakkudes apoptoosi. TGF β ja tema retseptor avaldub pea kõigis rakkudes ja nende madal tase seostub kasvajatega. Smad-4 peetakse tuumor-supressoriks, tema viib aktiveeritud Smad valgud tuuma ja nad reguleerivad seal transkriptsiooni. TGF β ja aktivin indutseerivad kasvu inhibeerimise ja apoptoosi nii rakukultuuris kui primaarsete lümfootsüütide puhul. On leitud Bcl-2 perekonna valkude taseme langus, NF κ B inhibeerimine, proapoptootilise valgu Bax tõus ja kaspaside aktivatsioon – kõik see toimub pärast mitmesuguste müeloidse leukeemia ja B lümfoomi rakkude töötlemist TGF β -ga. Milliseid gene ja kuidas reguleeritakse, on veel ebaselge. Leiti, et TGF β mõjutab inositolfosfolipiidi fosfataasi taset SHIP (SH2 ala sisaldav inositooli rõngast 5'positsioonist defosforüüliv ensüüm), selle fosfataasi tase tõuseb, tema geeni transkriptsioon tõuseb. Seega langeb 5'positsioonist fosforüülitud inositol-fosfolipiidide tase, see viib Akt/PKB aktiivsuse langusele ja elumuse langusele. See võib olla üks tee, kuidas TGF β suunab rakud apoptoosi. Kõik need faktorid, mis aktiveerivad proteiinkinaasi Akt, takistavad rakkude apoptoosi. Selle proteiinkinaasi inaktiveerijad aga soodustavad rakkude apoptoosi.

Apoptoosi algatavad mitmed tsütokiinid, näiteks TNF ja Fas ligand. TNF kasutab kahte raku pinna retseptorit, üks nendest aktiveerib apoptoosi raja. Fas retseptor on membraanne valk, TNFR perekonnas, omab raku sees surma domääni, mis seob apoptoosile viivaid valke. Avaldub tüümuses, maksas, südames jm. Fas ligand (FasL) on membraanne valk, mille üks ots on tsütoplasmas ja teine ots rakust väljas. Ta avaldub T-lümfootsüütides, NK rakkudes (*natural killer*, tapja-rakud), silmas ja testises. Fas ja FasL puudumine pärsib rakkude apoptoosi. Fas-retseptoriga seostuvad tsütoplasmaatilised valgud FADD või MORT1 ja need vahendavad surma signaali. Aktiveeritakse kaspas-8 ja edasi kaspaside kaskaad.

4.3. Apoptoos ja vähiravi

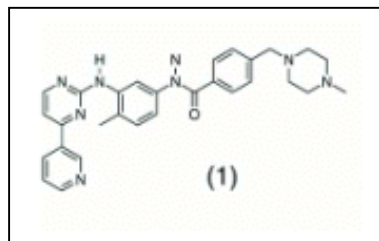
Kui mingis koes on apoptoos võimendunud, surevad vajalikud rakud enneaegselt. Närvi-rakkude surmaga on seotud mitmed närvisüsteemi häired. Kui aga on vastupidine olukord ja rakkude apoptoos on blokeeritud, võivad need rakud hakata kontrollimatult paljunema, tekib kasvaja. Kasvaja raviks oleks vaja stimuleerida tema rakkude apoptoosi. Selleks on mitmeid võimalusi: inhibeerides kasvu signaale või aktiveerides apoptoosi põhjustavaid valke. Oluline on sealjuures seda kõike teha ainult kasvajakoes, mitte kogu organismis.

4.3.1. Signaali tee inhibiitorid

Kuni 1980-ndate aastateni oli vähiravi suunatud otseselt DNA sünteesi pidurdamisele. See on üsna ebaspetsiifiline, blokeerib kõikide rakkude kasvu.

On vaja vahendeid, mis toimiksid üleaktiveeritud onkogeenile. Kuna kinaasid on kasvaja-koes sageli üleaktiveeritud, hakati otsima kinaaside inhibiitoreid.

Krooniline müeloidne leukeemia, mis on seotud Bcr-Abl valgu tootmisega, oli üks esimesi vähivorme, kus geneetiliste muutuste seos haigusega kindlaks tehti. Pidevalt aktiivne türosiinkinaas oleks sobivaks märklauaks ravimitele. Sellest kasvajast oli tehtud ka rakuliinid, mida sai kasutada inhibiitorite välja otsimisel. Alustati PKC inhibiitori fenüülamino-



Joonis 5. Abl-kinaasi inhibiitor, imatinib

pürimidiini derivaatidest, parima tulemuse andis metüül-piperasiini derivaat STI571 (signaali transduktsiooni inhibiitor 571), imatinib (joonis 5), tuntud Clivec või Gleevec nime all. Röntgenkristallograafia näitas, et ta seostub kinaasi ATP-sidumise kohta ja kinaas on inaktiivne. Ta inhibeerib Abl, Arg ja ka retseptor-kinaase c-Kit, PDGFR mis on sageli liigselt aktiveerunud seedetrakti kasvajates. Abl kinaasi inhibeerimine viib Bcr-Abl aktiivsust omavad rakud apoptoosi. Ravim mõjub hästi kroonilise faasi haigetele, aktuutses faasis on mõju lühiajaline, tekib resistentsus. Ebanormaalse Abl

kinaasiga koes paljunevad ka vigase DNA-ga rakud ja nii tekivad ka Abl kinaasis uued mutatsioonid, mis muudavad ta inhibiitorile tundetuks.

c-Kit ja PDGFR on üleaktiveeritud seedetrakti kasvajates, ägedas müeloidses leukeemias, munasarja ja testise kasvajates. Ka nendele mõjub Glivec.

PDGFR-PDGF süsteem on mitmete kasvajate tekitaja, näiteks glioomis, dermatofibrosarkoomis, kroonilises müeloproliferatiivses haiguses. PDGFR on osaline ka veresoonte tekkimises suurtes kasvajates ja tema inhibeerimine peatab kasvaja.

Ravi eesmärgil püütakse allasuruda ka ületoodetud aktiivse retseptori taset. EGFR toodetakse mitmetes rinnavähi vormides väga palju ja ta aktiveerub seal ilma faktori stimulatsioonita. Kui viia organismi selle retseptori vastaseid antikehi, siis nad seovad retseptori ja kõrvaldavad selle, ja signaali teed ei aktiveerita. On ravim herceptin, mis sisaldab EGFR ühe isovormi vastaseid antikehi ja pärsib mõningaid rinnavähi vorme.

Ravimina püütakse kasutada ka ühendeid, mis takistavad Ras valgul membraaniga seostuda. Sellised on farnesüültransferaasi inhibiitorid. Nad takistavad Ras valgu ja ka tema mutantsete, kasvajatele iseloomulike vormide farnesüülumist ja seega membraaniga sidumist. Kui Ras-valk ei tööta, on ka kasvu stimuleeriv Ras-Raf-signaali tee välja lülitatud.

Ideaalselt peaksid inhibiitorid toimima ainult kasvaja rakkudele ja kui seal on kasvurada blokeeritud, siis need rakud surevad. Tegelikult mõjuvad kõik need keemilised inhibiitorid ka normaalse raku valkudele ja kuigi täiskasvanud koes on kasvustimuleerivad signaalid lühiajaliselt sisse lülitatud, on neid aegajalt ikka vaja. Kui pikka aega on kasvu stimuleerivad rajad blokeeritud, kahjustab see ka normaalseid kudesid. Ideaalsel juhul peaks ravim lühikese

ajaga kõik kasvajarakud apoptoosi saatma, kui koes on piisavalt normaalseid rakke, mis peale ravi tööle hakkavad, võib haigusest vabaneda.

4.3.2 Geeniteraapiad

Geeniteraapia on see, kui püütakse onkogeneesi mõjutava geeni toimet kas pidurdada (onkogeeneid) või taastada (kasvaja supressorgeeneid). Aga geeniteraapia on ka see, kui kasutatakse mingit võõrast geeni ravimi tootmiseks otse kasvaja rakus.

Geeniteraapia variante on mitmeid. Püütakse viia kasvaja rakkudesse võõrgeene, et seal toota mingit ensüümi, mis siis muudab mingi ohutu keemilise ühendi rakkudele toksiliseks. Seda rakkude kasvu pärssivat või neid tapvat ühendit siis toodetakse ainult seal, kuhu see uus geen on viidud, mitte teistes rakkudes. See on ensüüm-prodroog tehnika, kus kasutatakse mingit ensüümi ja kahjutut ravimi eellast. On mitmeid viiruste või bakterite geene, mis suudavad nukleotiidide analooge muuta nii, et neid hakatakse lülitama raku DNA-sse, aga kuna nad ei moodusta normaalset DNA, siis sellised vigase DNA-ga rakud hävitatakse. Üks selline kasutatav viiruse geen on herpesviiruse tümidinkiinaasi geen. See geen fosforüülib nukleotiidi analooge (näiteks atsüklovir) ja nii lülitatakse need ka nukleiinhappesse, aga seal nad tekitavad DNA vigastusi ja sellised rakud lähevad apoptoosi. Seda viiruse ensüümi võimet kasutatakse ka herpese raviks: rakkudes, kus on aktiveerunud herpesviirus on ka aktiivne tema tümidin-kinaas, kui siis seda kohta määrada atsükloviri salviga, siis nakatunud rakk hakkab hukkuma, ei teki villikest ja viirus ei paljune seal edasi. Sel juhul on viiruse geen rakus olemas, aga kasvajaraviks tuleb vastav geen õigesse kohta viia. See on üsna keeruline, kasutatakse mitmesuguseid viirusvektoreid. Ensüüm-prodroog tehnikas kasutatakse nii nukleotiidi analooge kui mitmeid alküülivaid ühendeid tootvaid ensüüme. Viimased kahjustavad ka DNA sünteesi. Selline ensüüm-prodroog meetod töötab siis, kui rakus on normaalne tuumorsupressor p53, mis aitab vigase DNA-ga rakke apoptoosi saata. Kasvajates sageli see nii pole, oleks vaja siis see geen rakkudesse viia.

Teine geeniteraapia liik ongi see, kui rakkudesse viiakse rakutsükli kontrollivate valkude geene: p53 ja teisi rakutsükli inhibiitoreid. Katseliselt on saadud p53 geeni viimisega kopsukasvajasse selle kasvu pidurdada ja isegi kasvaja taanduma sundida.

Geeniteraapiat saab kasutada ka onkogeene avaldumise blokeerimiseks. Viiakse rakkudesse kindla nukleotiidse järjestusega oligonukleotiide, mis blokeerivad vastava geeni avaldumise või siis käivitavad geenilt toodetud RNA lagundamise. Nii saab üsna täpselt just mutantse onkogeeni blokeerida. Probleem on jälle vastavate oligonukleotiidide kohale viimine.

Geeniteraapias kasutatakse ka immuunsust tõstvate geenide organismi viimist, et siis selle kaudu kasvaja taanduma sundida. Üks selle meetodi alaliike on geen-vaktsineerimine. Selle näiteks võib tuua papilloomiviiruse vastased vaktsiinid.

4.3.3 Viroteraapia

Viroteraapia algus ulatub 20. sajandi algusse, kui juhuslikult avastati, et peale viirushaiguse põdemist taandarenes leukeemia. Kuna viiruste paljunemiseks sobivad rakud, kus on aktiivne DNA ja RNA süntees, siis peaksid kasvajarakud viirustele üsna hästi sobima. Viirused kõrvaldavad rakutsükli kontroll-valke, et rakkude paljunemist kiirendada. Kasvajarakus ongi sellised tingimused, pole üllatav, et mõned viirused kasvavad paremini kasvajarakus. Otsitakse viiruseid, mis spetsiifiliselt paljunevad kasvajarakus ja lüüsivad neid. Selleks on replikatsiooni selektiivsed onkolüütilised viirused. Viiruse replikatsioon kasvaja koes lubab sisse viidud doosi suurt amplifikatsiooni (1000-10 000 korda) kasvajas. Nii toodavad kasvaja rakud ise ravimit, viirused tapavad raku ja lähevad naaberrakkudesse. Sealjuures replikatsioon normaalses rakus ei toimu ja nii pole ravi toksiline kogu organismile.

Viroteraapiasse sobiv viirus peaks nakatama inimese kasvaja rakke, aga mitte normaalselt jagunevaid rakke. Viirus peaks olema geneetiliselt stabiilne ja tema replikatsioon normaalses rakus peaks välja lülituma. Viirus ei tohiks inimesel haigusi põhjustada. Ta ei tohiks genoomi lülituda, peaks aktiivselt paljunema. Viirust peaks saama mugavalt toota ja kasutada haiglas. Viiruseid, mis rakukultuuris ainult kasvajakasvade tapavd on olemas, kuid nende kasutamine haigete inimeste puhul on siiski keeruline, on vaja viirus õigesse kohta toimetada ja ta peab seal levima, aga ei või teisi rakke nakatada. Viirus ei või ka teistele inimestele levida. Tänu geenitehnoloogiale on mõned geneetiliselt muundatud viirused siiski juba haiglates katsetustes. Neist on eemaldatud need geenid, mis on vajalikud normaalses rakus paljunemiseks. Näiteks ei suuda nad kasvaja supressorvalke kõrvaldada ja seega ka normaalses rakus paljuneda, küll aga paljunevad nad kasvajates, kus p53 või RB on puudu.

Kokkuvõtteks, mida rohkem kasvajakasvade seotud genee ja valke teada saadakse, seda mitmekesisemaks muutub ka ravimite valik, mida kasvajakasvade ravis kasutatakse. Kuna tavaliselt ei ole haigus tingitud ainult ühe geeni valest tööst, siis ainult ühe märklaua vastane ravim ei anna häid tulemusi. Pealegi on kasvajakasvades, kus kontroll-mehhanismid on kõrvaldatud, genoom muutunud ebastabiilseks ja geenide muutusi tekib üha juurde, see soodustab ka ravimi resistentsuse kiiret teket. Mitme ravimeetodi koostoime annab paljude kasvajakasvade puhul paremaid tulemusi.