

УДК 616-006-056

ТЕОРИЯ ЭВОЛЮЦИОННОЙ РОЛИ НАСЛЕДУЕМЫХ ОПУХОЛЕЙ (*CARCINO-EVO-DEVO*): ИСТОРИЯ РАЗВИТИЯ И СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ. ЧАСТЬ 1. ОТ ОБЩИХ ПРИНЦИПОВ К ГИПОТЕЗЕ И ОТ ГИПОТЕЗЫ К КОНЦЕПЦИИ

© 2024 г. А. П. Козлов^{1, 2, 3, *}

¹Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, Москва, Россия

²Биомедицинский центр, Санкт-Петербург, Россия

³Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург, Россия

*e-mail: contact@biomed.spb.ru

Поступила в редакцию 20.02.2024 г.

После доработки 20.02.2024 г.

Принята в печать 22.03.2024 г.

Теорию эволюционной роли наследуемых опухолей, или теорию *carcino-evo-devo*, можно считать следующим шагом в развитии теории филэмбриогенезов А.Н. Северцова, теории *evo-devo* и теории эволюции путем дубликации генов Сусуму Оно. Она претендует на роль объединяющей биологической теории, поскольку объединяет в рамках единого рассмотрения три основных вида биологического развития — индивидуальное, эволюционное и опухолевое развитие. Теория *carcino-evo-devo* объясняет целый ряд необъясненных биологических явлений, в первую очередь механизмы прогрессивной эволюции и увеличения сложности, с привлечением представлений об относительно нестабильных переходных формах и автономных нерегулируемых процессах. Теория эволюционной роли наследуемых опухолей сформулировала целый ряд нетривиальных предсказаний в различных областях биологии, которые были подтверждены в лаборатории автора и в других лабораториях. Выводы и следствия теории *carcino-evo-devo* имеют значение для биотехнологии и медицины. В первой части статьи рассматриваются исходные принципы, которые привели к возникновению концепции эволюционной роли наследуемых опухолей, поступательное развитие этой концепции и первые экспериментальные данные по подтверждению нетривиальных предсказаний, полученные в лаборатории автора в период до 2014 г., когда вышла в свет наша книга “Evolution by Tumor Neofunctionalization”.

Ключевые слова: генная конкуренция, эволюция генома, эволюционная роль опухолей

DOI: 10.31857/S0042132424030013, **EDN:** PSFNGP

“...Теория преследует две цели:

1. Охватить по возможности все явления в их взаимосвязи (полнота).
2. Добиваться этого, взяв за основу как можно меньше логически взаимосвязанных логических понятий и произвольно установленных соотношений между ними (основных законов и аксиом). Эту цель я буду называть “логической единственностью”.

Эйнштейн А. Физика и реальность. М., 1965. С. 264.

ВВЕДЕНИЕ

В статье рассматривается история развития концепции эволюционной роли наследуемых опухолей, которая привела к возникновению на ее основе новой биологической теории *carcino-evo-devo*.

Теория *carcino-evo-devo* предлагает механизм увеличения сложности в процессе прогрессивной эволюции — неофункционализацию наследуемых опухолей в результате экспрессии эволюционно новых генов и сочетаний генов; развивает представления об относительно нестабильных

переходных формах в эволюции — организмах-опухоленосителях; рассматривает наследуемые опухоли как поисковики в пространстве биологических возможностей. Она находится в комплементарных отношениях с существующими биологическими теориями, объясняя целый ряд необъясненных биологических феноменов и формулируя нетривиальные предсказания в нескольких областях биологии.

Учение об эволюционно новых опухолеподобных органах, являющееся составной частью теории *carcino-evo-devo*, позволяет объяснить целый ряд медицинских проблем, в частности проблему ожирения, намечая радикальный переворот в этой области медицины.

Новый класс генов *TSEEN* (*tumor specifically expressed, evolutionarily new*), открытый в соответствии с предсказанием теории *carcino-evo-devo*, может использоваться в биотехнологических целях для создания противоопухолевой реagenтики.

Работа над теорией *carcino-evo-devo* охватывает длительное время, что не удивительно для новой эволюционной теории. С определенной долей условности можно выделить два периода — до и после выхода в свет монографии “*Evolution by Tumor Neofunctionalization*” (Kozlov, 2014), которая обозначила переход концепции в теорию.

В период, предшествовавший выходу книги, можно выделить следующие основные направления работы: 1) работа над исходными принципами и формулировка основной гипотезы; 2) разработка более широкой концепции эволюционной роли наследуемых опухолей; 3) накопление и анализ биологических свидетельств в пользу эволюционной роли наследуемых опухолей; 4) экспериментальное подтверждение нетривиальных предсказаний концепции. Статьи, посвященные принципу генной конкуренции и другим исходным принципам, были опубликованы в 1976–1983 гг. (Козлов, 1976, 1983; Kozlov, 1979). Гипотеза эволюционной роли опухолей была впервые сформулирована в 1979 г. (Kozlov, 1979). Первый анализ биологических примеров в поддержку эволюционной роли опухолей был опубликован в 1987 г. (Козлов, 1987). Собственные экспериментальные данные в поддержку нетривиальных предсказаний теории впервые опубликованы в 1989 г. (Евтушенко и др., 1989). Работы по каждому из перечисленных направлений продолжаются до сих пор.

Ниже мы рассмотрим историю развития теории *carcino-evo-devo* в период с 1976 по 2014 г. более подробно.

ИСХОДНЫЕ ПРИНЦИПЫ И ОСНОВНАЯ ГИПОТЕЗА

Основной гипотезой теории *carcino-evo-devo* является гипотеза положительной эволюционной роли наследуемых опухолей, которая вытекает из более общих принципов. Формирование основной гипотезы напоминает подход, который осуществляется в физике.

Более общими принципами, из которых вытекает основная гипотеза, являются принцип генной конкуренции (Козлов, 1976; Weismann, 1893; Waddington, 1948; Spiegelman, 1948; Kozlov, 1979), принцип увеличения числа генов в геномах эволюционирующих организмов в прогрессивной эволюции, или принцип эволюции генетической информации (Козлов, 1976; Kozlov, 1979), и принципы многоуровневого развития организмов (Козлов, 1983; Kozlov, 1979).

В наших статьях 1976 и 1979 гг. принцип генной конкуренции обсуждался впервые после длительного периода молчания на эту тему в литературе.

В статье “Регуляторные механизмы как выражение и результат эволюции конкурентных отношений между генами” (Козлов, 1976) мы рассматривали генную конкуренцию как общий принцип взаимодействия генов. Под генной конкуренцией мы понимали отношения борьбы, определяющиеся общностью ресурсов, в которые вступают гены через посредство своих продуктов (Козлов, 1976).

В нашей статье 1979 г. было дано развернутое определение принципа генной конкуренции:

“I would like to suggest considering gene competition, or genes’ struggle for the realization of their genetic information, as a general principle of the functioning of the genome. It could be formulated as follows: at different levels of realization of genetic information genes (*via* gene products) come into relations of struggle, which result from community of their aims and resources and the consequence of which is mutual restriction of the synthetic capacities of the genes, mutual restriction of the functional abilities of enzymes, which have been already synthesized” (Kozlov, 1979, pp. 4–5).

В статье (Козлов, 1983) приводится следующая формулировка принципа генной конкуренции:

“На различных этапах реализации закодированной генетической информации гены (через генные продукты) вступают в отношения борьбы, которая вытекает из общности их целей и ресурсов и следствием которой является

взаимное ограничение синтетических способностей генов, взаимное ограничение функциональных возможностей уже синтезированных ферментов”.

К этой формулировке в статье (Козлов, 1988) была добавлена фраза “Крайним проявлением конкуренции между генами являются антагонистические отношения, или несовместимость между генами, при которой наблюдается инактивация гена или полное ингибирование фермента”.

В статье (Kozlov, 1996, p. 82) дается следующая формулировка принципа генной конкуренции: “At different levels of the expression of genetic information genes (via gene products) enter the struggle for common resources and space, the consequence of which is mutual reduction of their activity (Kozlov, 1979). The increase in the gene number during genome evolution leads to the intensification of the gene competition and to the appearance in some cases of incompatibility between the genes (Kozlov, 1979)”.

Принцип генной конкуренции основывался на теоретических соображениях и на анализе большого объема экспериментальных данных (Козлов, 1976; Kozlov, 1979). В нашей статье, в которой рассматривались законы молекулярной биологии, мы отнесли генную конкуренцию к фундаментальным молекулярно-биологическим законам (Козлов, 1988). За прошедшее с тех пор время объем данных о конкурентных отношениях между генами значительно возрос, что подтверждает фундаментальный характер принципа генной конкуренции (Sabi, Tuller, 2019; Wei et al., 2019; Hardison, 2022; Topfer et al., 2022; Goetz et al., 2022).

Принцип эволюции геномов был сформулирован нами следующим образом:

“Прогрессивная эволюция сопровождается увеличением количества генов в геномах эволюционирующих форм” (Козлов, 1976), или “Progressive evolution is connected with an increase of the number of qualitatively different genes in the genomes of evolving organisms” (Kozlov, 1979). В статье (Козлов, 1983) принцип эволюции генетической информации был сформулирован так: “Прогрессивная эволюция связана с увеличением числа качественно отличающихся генов в геномах эволюционирующих организмов”.

Принцип эволюции геномов основывался на идеях С. Оно о происхождении эволюционно новых генов путем дупликации (Ohno, 1970), что подтверждается последующим развитием представлений об эволюции генома, механиз-

мах происхождения эволюционно новых генов и связи этих процессов с эволюцией сложности (Kozlov, 2014; Markov et al., 2019).

Увеличение числа генов в геномах эволюционирующих организмов, которое происходит в соответствии с принципом эволюции геномов, должно сопровождаться обострением конкурентных отношений между генами и появлением антагонистических отношений, или отношений несовместимости между генами. В статье (Козлов, 1976) был сделан вывод, что для обеспечения дальнейшей эволюции генома необходима нейтрализация антагонистических отношений между генами, которая может быть достигнута за счет пространственного либо временного разграничения продуктов генов, между которыми возникают антагонистические отношения, на клеточном и многоклеточном уровнях организации, в том числе за счет специализации клеток у многоклеточных. Источник дополнительных клеток, необходимых для специализации, еще не обсуждался.

В статье (Kozlov, 1979) был сделан следующий принципиальный шаг вперед — была впервые сформулирована гипотеза, что опухоли могли принимать участие в эволюции организмов как источник дополнительных клеток (основная гипотеза):

“Gene incompatibility may be neutralized by spatio-temporal disconnection of products of incompatible genes at cellular and multicellular levels. The larger cells and multicellular aggregates can be stabilized by the increased complexity of their structure, which is the consequence of the origin of new genes. Using the concept of feedback, one may describe the reciprocity between processes of evolution at different levels in the following way:

$$\text{MML} \rightleftharpoons \text{CL} \rightleftharpoons \text{MCL}$$

Where MML is macromolecular level of organization, CL is cellular level of organization, and MCL is multicellular level of organization.

The concept of feedback is used here in its general meaning, as discussed by Ashby (1956). Arrows in this diagram denote influences, which the processes of evolutionary development at one level exert on the processes of development at another level. These processes are of different quality, and the influences denoted by the arrows are indirect. That is, the formation of stable organisms of higher complexity may be due to a coincidence of otherwise relatively independent processes of development at different levels. For example, tumors could have formed new tissues and organs

if neoplastic development occurred simultaneously with the origin and expression of new genes in their cells. Organisms of higher complexity are then subjected to natural selection and population processes. The origin of new species established a new step in progressive biological evolution” (Kozlov, 1979, pp. 11–12).

ПОСТУПАТЕЛЬНОЕ РАЗВИТИЕ КОНЦЕПЦИИ ВОЗМОЖНОЙ ЭВОЛЮЦИОННОЙ РОЛИ НАСЛЕДУЕМЫХ ОПУХОЛЕЙ

В начале нашей работы над принципом генной конкуренции роль опухолей совершенно не просматривалась. В 1975 г., вскоре после защиты кандидатской диссертации, автор выступил с докладом о генной конкуренции на семинаре лаборатории биохимии НИИ онкологии им. проф. Н.Н. Петрова. Заведующий лабораторией, выдающийся отечественный биохимик профессор И.Ф. Сейц, задал вопрос, какое все это имеет отношение к онкологии? И ответ автора был: “Пока не знаю”. В статье (Козлов, 1976) эволюционной роли опухолей еще не было, но уже в статье (Kozlov, 1979) эволюционная роль опухолей естественным образом “вывалилась” из более общих принципов (см. выше). Это может быть интересным примером для историков науки.

В нашей следующей статье, посвященной принципам многоуровневого эволюционного развития организмов (Козлов, 1983), уже целый раздел был посвящен возможной эволюционной роли опухолей. Этот раздел так и назывался: “Возможная эволюционная роль опухолей”. Автор писал: “Рассмотрим более детально, как могли реализоваться эволюционные обратные связи, описываемые нашей теорией. В частности, рассмотрим механизмы возникновения новых тканей. Прежде всего должны возникнуть новые тканеспецифические гены (Ohno, 1970). После их возникновения новые гены должны экспрессировать закодированную в них генетическую информацию в таком количестве клеток, которое было бы достаточно для возникновения новой ткани (органа). Предсуществующие типы клеток имеют очень ограниченные возможности для экспрессии новых генов из-за высокого уровня генной конкуренции и несовместимости между генами. Согласно нашей теории, увеличение числа клеток в многоклеточном организме обеспечивало пространство для активации новых генов. Таким образом продукты новых генов пространственно разобщались с продуктами старых, и их несовместимость нейтрали-

зовывалась. Но невозможно представить, чтобы возникновение новых генов непосредственно вызывало адекватное увеличение числа клеток в многоклеточном организме. Даже если они потенциально адаптивно выгодны, наличие новых генов само по себе недостаточно для возникновения новых тканей. Новый ген в течение долгого времени может оставаться “молчащим” до тех пор, пока не появятся условия (главным образом, пространство) для его экспрессии. Увеличение числа клеток в многоклеточных организмах происходит за счет их пролиферации. В многоклеточных организмах имеет место множество пролиферативных процессов. Новые ткани могли образовываться, если новые гены активировались в клетках пролиферата. Какие именно пролиферативные процессы участвовали в формировании новых тканей? Как и в случае возникновения новых генов из экстракопий старых (Ohno, 1970), новые ткани должны возникать из избыточных клеточных масс, функционально не необходимых организму. Для того чтобы обеспечить активацию новых генов, генная конкуренция в этих клетках должна быть понижена. Требование уменьшения генной конкуренции означает, что старые гены должны быть неактивны или менее активны по сравнению с их активностью в предсуществующих типах клеток. Таким образом, для обеспечения активации новых генов клетки избыточной клеточной массы должны быть недифференцированными. Это находится в соответствии с требованием о том, чтобы они не были функционально необходимы организму.

Пролиферативный процесс, в результате которого образуются нефункциональные клетки, не может регулироваться и, следовательно, автономен. Автономный пролиферативный процесс, который поставляет недифференцированные (анапластические) клетки, приводит, как известно, к образованию опухоли. Таким образом, именно опухоли могли быть тем пролиферативным процессом, который снабжал эволюционирующие многоклеточные организмы клеточными массами для экспрессии новых генов.

После экспрессии новых генов клетки опухоли должны приобретать функцию в организме. После этого они с необходимостью должны терять свою прежнюю автономность” (Козлов, 1983, с. 57–58).

В нашей следующей работе (Козлов, 1987) было сделано еще несколько шагов вперед в развитии концепции позитивной эволюционной роли опухолей.

В этой работе впервые было сформулировано представление об эволюционной роли клеточных онкогенов и сделано предсказание о числе клеточных онкогенов, намного опередившее состояние науки на тот момент времени: “Эволюционной ролью клеточных онкогенов, или протоонкогенов, могло быть то, что они поддерживали в эволюционирующих популяциях организмов определенный, наследственно детерминированный уровень автономных пролиферативных процессов и способствовали экспрессии эволюционно новых генов в анапластических клетках избыточных клеточных масс. После возникновения новых типов клеток соответствующие онкогены должны были превратиться в типоспецифические регуляторы деления клеток. Отсюда, в частности, следует, что должно существовать около 200 различных протоонкогенов — по числу типов клеток, насчитывающихся у высших животных” (Козлов, 1987). Это предсказание было впоследствии нами доказано (Makashov et al., 2019). Напомним, что в 1987 г. было известно только 12 онкогенов, и считалось, что их может быть не больше 20.

В (Козлов, 1987) была приведена более точная формулировка основной гипотезы: “Итак, опухоли могут рассматриваться как проявление эволюционирующего организма или эволюционной тенденции к увеличению количества клеток в многоклеточных организмах (Kozlov, 1979). Опухоли могли давать начало новым типам клеток, если неопластическое развитие совпадало с экспрессией в этих клетках эволюционно новых генов, имеющих адаптивное значение. Имеется в виду, что эти гены возникли в ДНК зародышевых клеток предков, а не в клетках опухолей. До момента экспрессии эти гены могли быть “молчащими”. Таким образом, опухоли, хотя и редко, могли играть положительную эволюционную роль” (Козлов, 1987, с. 138–139).

Приведенная выше формулировка уже специально оговаривает, что эволюционно новые гены возникают в ДНК зародышевых клеток, а не в ДНК опухолевых клеток.

Кроме того, в работе (Козлов, 1987) были приведены первые факты и экспериментальные данные в поддержку основной гипотезы (см. ниже в разделе, посвященном накоплению и анализу материалов, свидетельствующих в пользу эволюционной роли наследуемых опухолей).

В резюме нашей следующей теоретической статьи, которая называлась “Gene competition and the possible evolutionary role of tumors” (Koz-

lov, 1996), была приведена развернутая формулировка концепции эволюционной роли опухолей:

“The evolutionary role of tumors might consist of providing the conditions for the expression of evolutionarily new genes and thus in providing material for the origin of new cell types. To approach this concept the principle of gene competition is essential. With an increase in gene number in the genomes of evolving multicellular organisms the enforcement of gene competition should take place. Therefore, the pre-existing cell types possess limited possibilities for the expression of evolutionarily new genes. Like evolutionarily new genes originated from extra copies (duplicates) of old genes, evolutionarily new cell types had to originate from extra cells which were not functionally necessary to the organism. Tumors could have supplied the evolving multicellular organisms with extra cells for the expression of originating evolutionarily new genes. Of course, on the basis of this proposal only tumors at the earlier stages of progression are considered to be meaningful, or some kind of tumor-like processes, but not the malignant tumors at late stages of progression. The evolutionarily new genes originate in the DNA of germ line cells but not in DNA of tumor cells. Until the moment of their expression in the tumor cells these genes could stay silent. After the expression of these genes, tumor cells should acquire the function in the organism, differentiate and lose their previous autonomy” (Kozlov, 1996, p. 81).

Этот текст содержит уточнение, что эволюционно значимыми являются опухоли на ранних стадиях прогрессии, но не злокачественные опухоли на поздних стадиях прогрессии.

В статье (Kozlov, 1996) эволюционная роль опухолей выводится из более общих принципов; приводится расширенный (по сравнению с (Козлов, 1987)) список свидетельств в поддержку этой гипотезы (см. обсуждение ниже); и впервые в ясном виде формулируется экспериментально проверяемое предсказание об экспрессии в опухолях эволюционно новых генов. Более того, в этой статье впервые обсуждается экспериментальная работа, которая уже проводилась в лаборатории автора в сотрудничестве с В.И. Евтушенко по экспериментальному подтверждению этого нетривиального предсказания (Евтушенко и др., 1989; Evtushenko et al., 1989; Kozlov et al., 1992) (более подробно см. ниже в разделе “Нетривиальные предсказания и их экспериментальное подтверждение”).

В статье “Опухоли и эволюция” (Козлов, 2008) мы впервые отошли от дедуктивного способа изложения концепции эволюционной роли

опухолей и использовали более традиционный для биологии подход, связанный с обобщением имеющегося биологического материала. В статье были рассмотрены данные в пользу возможной эволюционной роли опухолей: распространенность опухолей среди многоклеточных организмов; активацию многих генов и способность к дифференцировке с потерей злокачественности; примеры патологических процессов и патогенов, играющих роль в эволюции, и примеры опухолевых процессов, уже сыгравших роль в эволюции. Лишь после этого была сформулирована гипотеза возможной положительной роли опухолей: “Мы полагаем, что опухоли могли быть полигоном (или резервуаром) экспрессии эволюционно новых и/или спящих генов, возникающих в процессе эволюции генома в клетках зародышевой плазмы (но не в клетках опухолей). В тех случаях, когда экспрессия эволюционно нового гена в клетках опухоли приводила к возникновению новой функции, одновременно возникали новые обратные связи и регуляция. Клетки опухоли дифференцировались, и возникал новый тип клеток для данного вида многоклеточных организмов, который наследовался благодаря эпигеномным механизмам, как и предсуществовавшие типы клеток” (Козлов, 2008, с. 700).

В статье впервые было указано на наследуемую природу опухолей, сыгравших роль в эволюции, и впервые была предложена диаграмма, описывающая концепцию возможной эволюционной роли опухолей.

В ней впервые были рассмотрены отдельные положения концепции возможной эволюционной роли опухолей вместе с биологическими примерами, рассмотренными в этой статье: “Популяции организмов-опухоленосителей, у которых опухоли были генетически или эпигенетически детерминированы, могли представлять переходные формы между видами организмов, находящихся на разных ступенях прогрессивной эволюции. Примером такого рода популяций могут быть гадрозавры, обсуждавшиеся выше.

В определенные периоды филогенеза дифференцировка опухолевых клеток в популяциях опухоленосителей должна была быть достаточно частым явлением, чтобы давать популяции организмов с новым типом клеток. Организмы с новым клеточным типом затем должны были подвергаться отбору на приспособленность и конкурентоспособность. Примером могут служить рыбы рода *Xiphophorus*.

Новые типы клеток могли принимать участие в образовании новых тканей и органов. Примером могут служить клубеньки у бобовых, которые иногда называют новыми органами. У различных видов обсуждавшихся выше гадрозавров встречаются необычные разрастания на голове, имеющие форму гребня и участвовавшие в издании различных звуков” (Козлов, 2008, с. 700).

Также впервые в статье появился целый раздел, посвященный результатам экспериментального подтверждения нетривиальных предсказаний концепции возможной эволюционной роли опухолей. Были подробно обсуждены наши первые результаты, подтверждающие экспрессию эволюционно новых генов в опухолях.

Суммируя рассмотрение этой статьи, можно сказать, что она явилась кратким прообразом нашей будущей монографии, опубликованной в 2014 г. (Kozlov, 2014).

В следующей статье (Kozlov, 2010) сохраняется структура предыдущей статьи, т.е. сначала рассматриваются данные в пользу возможной эволюционной роли опухолей, а затем формулируются теоретические положения концепции. В разделе “The origin of cell types by means of expression of evolutionarily new genes in tumors or evolution by tumor cell differentiation”, наша концепция впервые получила название “эволюция путем дифференцировки опухолевых клеток”. Впервые приводится перечень типов опухолей, которые могли бы играть роль в эволюции: “Genetically or epigenetically predetermined tumors at the early stages of progression, benign tumors, and some tumor-like processes in invertebrates and plants, all of which are modes of excess cell growth which provide evolving multicellular organisms with extra cell masses, are considered as potentially evolutionarily meaningful. Malignant tumors at the late stages of progression, however, are not” (Kozlov, 2010, p. 180). Впервые формулируются “сильные” и более “слабые” нетривиальные предсказания (см. более подробное обсуждение ниже), а также впервые обсуждаются результаты альтернативного подхода к изучению эволюционно новых генов, экспрессирующихся в опухолях (см. ниже раздел “Экспериментальное подтверждение нетривиальных предсказаний”). Впервые добавлен раздел “Other evidence in support of the hypothesis of evolution by tumor cell differentiation”, в котором, в частности, обсуждается положительный отбор некоторых генов, связанных с опухолями. Впервые сделано важное заключение о генах, которые могут работать в опухолях: “So, in tumors, three kinds of sequenc-

es/genes are expressed: neutrally evolving sequences without function, positively selected evolutionarily new genes with recently originated and evolving functions, and older genes with established functions, which are negatively selected. From the point of view of the hypothesis under consideration, tumors are instrumental in the expression of non-functional neutrally evolving sequences and weakly functional (evolutionarily new) genes. After stronger function has evolved because of positive selection, tumor cells become differentiated and regulated, with the loss of autonomy” (Kozlov, 2010, p. 183).

В заключение автор пишет: “The theory of the positive evolutionary role of tumors as a new scientific paradigm may considerably expand our understanding of the nature of tumors and of possibilities for influencing tumor processes”, таким образом намечая переход от концепции к теории.

В работе (Козлов, 2011) были впервые рассмотрены механизмы эпигенетического наследования возникающего эволюционно нового типа клеток. Наследование эволюционно нового типа клеток — необходимое условие для того, чтобы опухоли могли играть эволюционную роль. Это вопрос, имеющий принципиальное значение для будущей теории.

Итак, основная гипотеза все время развивалась в рамках более широкой концепции. Концепция позитивной эволюционной роли опухолей развивалась в серии публикаций (Козлов 1983, 1987, 2008, 2011; Kozlov, 1979, 1996, 2010). В каждой публикации делался очередной шаг в развитии концепции. Сначала она формировалась как следствие некоторых общих принципов, затем — в контексте накапливавшихся данных в пользу возможной эволюционной роли опухолей и экспериментальных результатов по подтверждению нетривиальных предсказаний основной гипотезы, полученных в лаборатории автора.

НАКОПЛЕНИЕ И АНАЛИЗ БИОЛОГИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ, СВИДЕТЕЛЬСТВУЮЩИХ В ПОЛЬЗУ ПОЗИТИВНОЙ ЭВОЛЮЦИОННОЙ РОЛИ НАСЛЕДУЕМЫХ ОПУХОЛЕЙ

Традиционным подходом в биологии всегда было формулирование обобщений на основе изучения большого числа биологических примеров. В нашей работе мы также использовали этот подход, который привел к представлениям, сходным с полученными при использова-

нии подхода, основывавшегося на более общих принципах.

Первые факты и экспериментальные данные в поддержку гипотезы эволюционной роли опухолей были приведены в работе (Козлов, 1987). К ним мы отнесли широкую распространенность опухолей и опухолеподобных процессов у многоклеточных организмов, в том числе у беспозвоночных и растений; тканеспецифичность экспрессии и эволюционный консерватизм клеточных онкогенов у позвоночных, наличие похожих протоонкогенов у беспозвоночных; способность опухолевых клеток к дифференцировке, в том числе в новых направлениях; активацию в опухолевых клетках большого числа генов, не работающих в гомологичных нормальных клетках; примеры процессов, патологических для индивидуальных организмов, но имеющих положительное эволюционное значение. К таким процессам мы отнесли мутационный процесс и вирусы, переносящие гены между различными группами организмов. Здесь и ниже мы не цитируем соответствующие ссылки, которые могут быть найдены в наших оригинальных статьях.

Похожую классификацию групп данных, поддерживающих возможную положительную эволюционную роль опухолей, мы сохранили в последующих статьях, хотя объем данных увеличивался, а число и наименование разделов несколько изменялось.

В статье (Kozlov, 1996) приводится расширенный (по сравнению с (Козлов, 1987)) список свидетельств в поддержку основной гипотезы. Впервые было упомянуто о способности опухолей участвовать в морфогенетических процессах. В добавок к упомянутым выше примерам патологий, имеющим эволюционное значение, был приведен пример серповидноклеточной анемии: “Sickle cell trait provides some protection against *Plasmodium falciparum*, the parasite responsible for the most severe form of malaria”.

В этой статье сделан принципиально важный шаг вперед: впервые появился раздел, посвященный опухолям, уже сыгравшим роль в эволюции. В этом разделе приводится пример азотфиксирующих клубеньков бобовых растений, которые приобрели функцию в организме благодаря экспрессии эволюционно новых генов: “Thus, at least in legumes and *Parasponia* there is already evidence that the expression of evolutionarily new gene occurs in tumor-like nodules, which acquire new function in the organism” (Kozlov, 1996).

Статья “Опухоли и эволюция” (Козлов, 2008) включала следующие разделы, посвященные позитивной эволюционной роли наследуемых опухолей: распространенность опухолей среди многоклеточных организмов; активацию многих генов и способность к дифференцировке с потерей злокачественности; примеры патологических процессов и патогенов, играющих роль в эволюции, и примеры опухолевых процессов, сыгравших роль в эволюции. Эти разделы значительно увеличились в объеме по сравнению с предыдущими статьями — если раньше это были абзацы, то теперь — целые страницы текста. Увеличилось число ссылок и примеров. Так, число ссылок в разделе “Распространенность опухолей среди многоклеточных организмов” увеличилось с двух в (Козлов, 1987; Kozlov, 1996) до двадцати четырех в (Козлов, 2008). В разделе, посвященном активации новых генов в опухолях, впервые подробно обсуждались данные, полученные в сотрудничестве с В.И. Евтушенко и К.П. Хансоном методом молекулярной гибридизации. Согласно этим данным число генов, экспрессирующихся только в опухолях и ни в каких экспериментально доступных нормальных клетках, составляло от нескольких сотен до нескольких тысяч генов со средним размером 4.5 тыс.п.н. В более развернутой форме обсуждались примеры участия опухолей в морфогенетических процессах.

Интересный пример представляет парадокс эволюционной и патологической роли мутаций. В статье (Козлов, 1987) ему была посвящена одна строка, в (Kozlov, 1996) — один абзац, а в (Козлов, 2008) — три больших абзаца. Автор пишет: “Аналогичный парадокс может быть справедлив для опухолей. Опухоли можно представить как мутационный процесс на многоклеточном уровне. С одной стороны, опухолевые процессы приводят к различным злокачественным патологиям, вредным для и индивидуальных организмов. С другой стороны, опухолевые процессы поставляют избыточные клеточные массы, характеризующиеся высоким уровнем биосинтезов, и это может использоваться в прогрессивной эволюции организмов для возникновения новых клеточных типов” (Козлов, 2008, с. 698).

В разделе, посвященном опухолям, уже сыгравшим роль в эволюции, появилось два новых примера — макромеланофоры и “шапочки” у рыб.

У рыб рода *Xiphophorus* имеются макромеланофоры — гигатские меланоциты, локализованные по бокам тела. В нашей статье (Козлов, 2008) мы привели данные, согласно которым

макромеланофоры произошли из клеток меланомы, стабилизировавшихся в результате удачной комбинации онкогена *Xmrk*, гена опухолевого супрессора *R* и возникновения функции, связанной с геном *Mdl*.

Другим новым примером были “шапочки” золотых рыбок — доброкачественные папилломы, искусственно отобранные на декоративность с формированием нового органа — “шапочки” у львинноголовки.

Кроме того, в качестве контрпримера клубенькам бобовых, в статье был приведен пример истинных опухолей растений, вызываемых *Agrobacterium tumefaciens*. В случае корончатых галлов, индуцируемых *A. tumefaciens*, синтезируемые в них опионы используются только бактериями, т. е. имеет место паразитизм, вредный для растений. Интересно, что ризобии, вызывающие клубеньки, и *A. tumefaciens* принадлежат к одному роду *Rhizobium*.

В следующей статье (Kozlov, 2010) патологическая роль *A. tumefaciens* и молекулярные механизмы вызываемой этой бактерией патологии разбираются еще более подробно. В этой же статье более подробно и с новыми недавно опубликованными данными разбирается возможная эволюционная роль вирусов в переносе генетического материала между организмами и между экосистемами. В пример, касающийся макромеланофоров у рыб, была добавлена ссылка о роли полового отбора в возникновении признака spotted caudal.

В предыдущих статьях в качестве объяснения возможных механизмов наследования нового типа клеток делалась ссылка на аналогичные механизмы в предсуществующих типах клеток. В статье (Козлов, 2011) впервые более подробно рассматриваются *цис*- и *транс*-типы эпигенетической регуляции, краткосрочное (митотическое) и долгосрочное (мейотическое) сохранение активного или молчащего состояния гена, а также сохранение эпигенетических сигналов при мейозе, важное для наследования клеточных типов. Кроме того, в этой статье впервые в качестве примера был рассмотрен злокачественный папилломатоз, который у некоторых грызунов дал начало макроворсинкам, имеющим функциональное значение.

Следующей нашей публикацией по анализу биологических материалов, свидетельствующих в пользу позитивной эволюционной роли наследуемых опухолей, стала монография “Evolution by Tumor Neofunctionalization” (Kozlov, 2014).

Как можно видеть, результаты анализа биологических примеров начали публиковаться несколько позже первых работ по исходным принципам и теоретической концепции позитивной эволюционной роли опухолей, с 1987 г. (Козлов, 1987, 2008, 2011; Kozlov, 1996, 2010). Именно развитие новой концепции позволило увидеть в бесконечном разнообразии биологических данных примеры в пользу эволюционной роли наследуемых опухолей, которые раньше не замечали или интерпретировали иначе. Причем мы сразу опубликовали несколько групп таких примеров в (Козлов, 1987), после чего накопление биологических примеров происходило не быстро, в каждой из статей делался какой-то шаг в этом направлении. В результате к моменту начала написания книги в 2011 г. накопился значительный объем биологических данных, структурированных, как это было описано выше.

Наличие биологических данных, свидетельствовавших в пользу позитивной эволюционной роли наследуемых опухолей, помогло автору преодолеть психологический барьер, связанный с парадоксальностью основной гипотезы.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ПОДТВЕРЖДЕНИЕ НЕТРИВИАЛЬНЫХ ПРЕДСКАЗАНИЙ

Следующим направлением работы в период “до книги” была работа по экспериментальному подтверждению нетривиальных предсказаний теории.

В этот период мы работали над тремя нетривиальными предсказаниями: 1) существуют гены, экспрессирующиеся только в опухолях и не экспрессирующиеся в нормальных тканях; 2) существуют эволюционно новые гены, которые экспрессируются в опухолях и не экспрессируются в нормальных тканях; 3) опухоли могут отбираться на новые функции в организме, и эволюционно молодые органы обладают признаками опухолей.

Эта работа существенным образом отличалась от традиционной работы биологов-экспериментаторов в раз и навсегда выбранном направлении, в котором вы со временем становитесь лучшим специалистом. Опыт такой работы также имеется у автора. В отличие от узкоспециализированной профессиональной работы экспериментальное подтверждение нетривиальных предсказаний теории отличалось тем, что теория формулировала предсказания в разных областях биологии, в которые нам приходилось вторгаться,

и иногда процесс освоения новой области занимал несколько лет.

ПОИСКИ ГЕНОВ, ЭКСПРЕССИРУЮЩИХСЯ ТОЛЬКО В ОПУХОЛЯХ

Эксперимент по насыщающей молекулярной гибридизации. Примером эксперимента, продолжавшегося около 10 лет, был эксперимент по определению верхнего предела величины экспрессии генома крысы (Евтушенко и др., 1989). Этот эксперимент был предпринят нами для того, чтобы доказать, что в опухолях экспрессируются гены, не работающие ни в одной из экспериментально доступных нормальных тканей (“слабое предсказание”).

Автор хочет высказать свое уважение памяти Дэвида Гиллеспы (David Gillespie, 1940–1993), классика метода молекулярной гибридизации, впервые осуществившего гибридизацию на фильтрах. У него автор освоил методологию насыщающей гибридизации, использовавшуюся в обсуждаемом эксперименте, во время своей стажировки в NCI/NIH (National Cancer Institute/National Institutes of Health) в 1978–1979 гг.

Мы использовали насыщающую молекулярную гибридизацию уникальной (неповторяющейся) ДНК, меченой радиоактивным йодом или радиоактивным фосфором, с суммарной ядерной РНК (яРНК). Препарат суммарной яРНК представлял собой смесь яРНК, выделенной из 12 органов крысы и из эмбрионов крысы на трех стадиях развития. Это было особенностью нашего подхода, который был применен впервые в мировой литературе и использовался нами в дальнейшем для получения генов, экспрессирующихся опухолеспецифически. Кроме того, нами использовались очень высокие концентрации РНК (до 80 мг/мл) и очень продолжительное время гибридизации (до 10 сут) при максимальной жесткости условий реакции и детекции гибридов. Согласно полученным нами данным суммарная экспрессия (со всеми соответствующими поправками, см. обсуждение в статье) составила 55% уникального генома (Евтушенко и др., 1989). По нашей оценке, а также по оценке независимых авторов (Lennon, Lehrach, 1991), это было самое большое значение экспрессии у высших организмов, описанное в литературе на тот период.

Этот эксперимент стал возможным благодаря высочайшему экспериментальному мастерству В.И. Евтушенко, ныне доктору биологических

наук, руководителю лаборатории Российского научного центра радиологии и хирургических технологий им. акад. А.М. Гранова.

Экспрессия 55% уникального генома соответствует экспрессии 2.2×10^5 различных транскриптов со средним размером 4500 нуклеотидов (Евтушенко и др., 1989). Современная оценка общего числа разных транскриптов у человека (total transcripts) методом RNA-seq в разных базах данных (Gencode, Ensemble, RefSeq, and CHES) дает значения 203835, 203903, 154484 и 323827 разных транскриптов, соответственно (Salzberg, 2018). То есть наша оценка верхнего предела величины экспрессии генома крысы была достаточно точной для своего времени.

Однако, при всей значимости этого результата, для нас он был лишь промежуточным для доказательства того, что в опухолях экспрессируются гены, не работающие ни в одной нормальной ткани многоклеточного организма.

Для этой цели мы использовали меченую пробу уникальной ДНК, рециркулированную после гибридизации с опухолевой РНК. Значения гибридизации рециркулированной пробы с опухолевой РНК были всегда на несколько процентов выше значений ее гибридизации с суммарным препаратом яРНК. Разница в значениях гибридизации соответствовала числу генов, экспрессирующихся только в опухолевых клетках. В наших экспериментах это число составляло от нескольких сотен до нескольких тысяч генов со средним размером 4500 п.н. (Козлов, 2008; Evtushenko et al., 1989; Kozlov et al., 1992).

В дальнейшем мы постоянно использовали вычитание суммарного значения экспрессии в нормальных тканях или сравнение с максимально возможным числом нормальных тканей (например, с последовательностями кДНК-библиотек из максимально доступного числа нормальных тканей) для поиска генов с опухолеспецифической экспрессией, или экспрессирующихся преимущественно в опухолях.

Работа с библиотеками кДНК *in silico*. К концу 1990-х гг. было получено большое число библиотек кДНК из нормальных и опухолевых тканей. По состоянию на сентябрь 2000 г., в базе данных Cancer Gene Anatomy Project Национального ракового института США (NCI, National Cancer Institute) содержалось 1.5 млн EST (expressed sequence tags), соответствовавших участкам экспрессирующихся генов. Были разработаны технологии работы с последовательностями EST (Vazmatzis et al., 1998), в том числе для поиска по-

следовательностей, экспрессирующихся в опухолях (Scheurle et al., 2000). При этом использовалось традиционное попарное сравнение норма—опухоль. Мы решили использовать эти технологии для глобального сравнения последовательностей кДНК всех библиотек, полученных из опухолей, с последовательностями кДНК всех библиотек, полученных из нормальных тканей. Это было повторением наших предыдущих экспериментов с суммарными препаратами РНК с использованием иного методического подхода.

В статье (Baranova et al., 2001) было сделано компьютерное вычитание всех описанных к этому времени последовательностей EST из библиотек кДНК нормальных тканей человека (1087 библиотек) из последовательностей EST кДНК библиотек опухолевых тканей человека (2681 библиотека). Было обнаружено несколько десятков кластеров EST (кластер EST приблизительно соответствует транскрипционной единице), сохранивших EST преимущественно из опухолей.

В этой работе ведущую роль сыграла Анча Баранова, в то время работавшая в ИОГен РАН им. Н.И. Вавилова и по совместительству в Биомедицинском центре (Санкт-Петербург).

В дальнейшем мы неоднократно повторяли глобальное вычитание суммарных EST из нормальных библиотек из суммарных EST опухолевых библиотек, используя модифицированное программное обеспечение и расширяя наборы нормальных библиотек (до 2304) и опухолевых библиотек (до 4564) (Galachyants, Kozlov, 2009). Соответственно росло число выявляемых опухолеспецифических кластеров EST.

В наших руках доля экспериментально подтвержденных за все время работы с библиотеками EST опухолеспецифически экспрессирующихся последовательностей составляла около 15% от всех проверенных последовательностей, полученных *in silico* (см. обзор в (Kozlov, 2014)).

Сходные результаты при экспериментальной проверке опухолеспецифичности экспрессии последовательностей, полученных *in silico* при работе с библиотеками кДНК, были получены другими авторами (Scheurle et al., 2000). В дальнейшем, с развитием геномных и транскриптомных технологий, для поиска опухолеспецифически экспрессирующихся генов мы использовали другие базы данных и другие компьютерные инструменты (Козлов и др., 2021).

Работа с панелями кДНК *in vitro*. Появление на рубеже веков коммерческих панелей кДНК из большого числа нормальных тканей человека

определило принципиально важный шаг в экспериментальном изучении опухолеспецифичности экспрессии тех или иных генов. Эта реактика позволила перейти от попарного сравнения опухолевых и соответствующих им нормальных тканей к более основательному исключению экспрессии целевых генов в каких-то других нормальных тканях или в эмбриональных тканях.

В статье (Krukovskaja et al., 2005), с использованием кДНК 27 разных нормальных тканей и 8 разных опухолей, этим методом была показана экспрессия в опухолях шести последовательностей. Экспрессия двух из этих последовательностей (Hs.426704 и Hs.202247) экспериментально не была обнаружена ни в одной из 27 использованных нормальных тканей. Другие изучавшиеся в этой статье последовательности EST давали слабые сигналы также в некоторых нормальных тканях (Krukovskaja et al., 2005).

Работа с панелями кДНК была длительной и дорогой. Она заняла много лет и до сих пор используется нами для изучения опухолеспецифичности экспрессии генов. Общее число использованных в наших экспериментах кДНК из нормальных тканей достигало 37–38 типов, а опухолевых — более 20. В этой работе определяющую роль сыграла и продолжает играть сотрудница нашей лаборатории Лариса Круковская.

Описание опухолеспецифичности экспрессии гена *Brachyury*. С использованием вышеописанных подходов нами была впервые описана опухолеспецифичность экспрессии гена *Brachyury* человека (Круковская и др., 2008; Palena et al., 2007). Были получены данные об экспрессии *Brachyury* в 15 различных типах опухолей человека и об отсутствии экспрессии в подавляющем большинстве нормальных тканей. Очень незначительная экспрессия была обнаружена только в образцах тканей тонкого кишечника, яичках, CD19⁺-лимфоцитах и селезенке (возможно, из-за присутствия в ней В-лимфоцитов). Было также показано, что специфичные к белку *Brachyury* цитотоксические лимфоциты человека лизируют раковые клетки, экспрессирующие *Brachyury*. Вместе с данными других авторов об участии транскрипционного фактора *Brachyury* в формировании мезодермы, в эпителиально-мезенхимальном переходе и метастазировании, наши данные (Круковская и др., 2008; Palena et al., 2007) предопределили разработку и клинические испытания противоопухолевых вакцин на основе гена *Brachyury*. Более подробно это будет обсуждаться в третьей части настоящей работы.

Заключение по поиску генов, экспрессирующихся только в опухолях. Таким образом, в работах (Евтушенко и др., 1989; Козлов, 2008; Круковская и др., 2008; Evtushenko et al., 1989; Kozlov et al., 1992; Baranova et al., 2001; Krukovskaja et al., 2005; Palena et al., 2007; Galachyants, Kozlov, 2009) мы с использованием разных методов показали, что предсказанные основной гипотезой гены, экспрессирующиеся в опухолях и не экспрессирующиеся в экспериментально доступных нормальных тканях, действительно существуют. Это явилось подтверждением “слабого” предсказания.

ОПИСАНИЕ ПЕРВЫХ ЭВОЛЮЦИОННО НОВЫХ ГЕНОВ, ЭКСПРЕССИРУЮЩИХСЯ В ОПУХОЛЯХ

“Сильным” предсказанием основной гипотезы является предсказание о специфической или преимущественной экспрессии в опухолях эволюционно новых последовательностей/генов.

Очевидно, что для поиска эволюционно новых генов, экспрессирующихся в опухолях, необходимо либо сначала показать опухолеспецифичность экспрессии кандидатных генов, а затем их эволюционную новизну, либо сначала охарактеризовать эволюционно новые гены, а затем искать среди них экспрессирующиеся в опухолях и не экспрессирующиеся в нормальных тканях. В наших работах мы использовали оба подхода.

Впервые эволюционная новизна последовательностей, экспрессирующихся в опухолях, была описана в нашей статье (Kozlov et al., 2006).

В этой работе эволюционная новизна четырех последовательностей (GenBank: AA166653, AL040372, AI952931 и AI792557, все — некодирующие), экспрессировавшихся специфически или преимущественно в опухолях, изучалась методом Саузерн-гибридизации на так называемой эволюционной панели ДНК, а также сравнительно-геномными методами. Эволюционная панель содержала ДНК миноги, рыбы, лягушки, курицы, голубя, мыши, крысы, морской свинки, овцы, лошади и человека.

Я хорошо помню, как проявлялась первая рентгеновская пленка с результатами Саузерн-гибридизации. В ожидании мы с Л.Л. Круковской гадали, у каких организмов появится сигнал, и я сказал, что, учитывая роль рыб в эволюции позвоночных, даже в рыбах было бы хорошо. Каков же был наш восторг, когда для всех

генов, изучавшихся в этом опыте, сигнал появился только на дорожке, соответствовавшей ДНК человека! Это удивительное ощущение, когда теоретическое предсказание получает экспериментальное подтверждение...

В сравнительно-геномном анализе использовали секвенированные к тому времени геномы фугу, тетрадона, полосатого данио, лягушки, курицы, мыши, крысы, коровы, собаки, макаки и шимпанзе. Он показал присутствие родственных последовательностей только у приматов (93–99% гомологии) и некоторых млекопитающих (52–75% гомологии выровненных последовательностей).

Таким образом, данные, полученные в (Kozlov et al., 2006), свидетельствовали в пользу эволюционной новизны описанных ранее последовательностей с опухолеспецифической экспрессией.

В следующих статьях (Самусик и др., 2007, 2009; Samusik et al., 2011) было проанализировано большее число опухолеспецифических последовательностей, описанных нами ранее. В дополнение к сравнительно-геномному анализу был проведен анализ консервативности, основанный на сравнении скоростей нуклеотидных замен. Всего было проанализировано девять последовательностей, в том числе несколько белок-кодирующих. Было показано, что восемь из девяти последовательностей или эволюционно новые (три из них специфичны для приматов), или сравнительно молодые и эволюционируют нейтрально (Самусик и др., 2007, 2009; Samusik et al., 2011; Kozlov, 2014).

***ELFN1-AS1*: ген, экспрессирующийся преимущественно в опухолях, эволюционно новый.** В статьях (Самусик и др., 2007, 2009; Krukovskaja et al., 2005) была впервые описана экспрессирующаяся преимущественно в опухолях эволюционно новая последовательность Hs.633957. Более подробно эта последовательность была изучена в работах, где первым автором был Д. Полев, впоследствии защитивший на эту тему кандидатскую диссертацию (Полев и др., 2009, 2011; Polev et al., 2014). В работах Д. Полева с соавт. было доказано, что соответствующий локус, расположенный на 7-й хромосоме, является отдельным геном, имеющим собственный промотор и возможности для альтернативного сплайсинга. Ген возник *de novo* из интронной области гена *ELFN1* и поэтому получил название *ELFN1-AS1* – *ELFN1* антисенс РНК 1 (не кодирующая белок), которое было утверждено Комитетом

по номенклатуре генов человека (HUGO Gene Nomenclature Committee).

***PBOV1*: эволюционно новый ген с опухолеспецифической экспрессией.** Ген *PBOV1* привлек наше внимание в связи с тем, что в работе (Clamp et al., 2007) он был упомянут в числе генов человека, не имеющих ортологов в геномах мыши и собаки. Мы впервые описали его *de novo* происхождение у человека, его экспрессию в широком круге опухолей и отсутствие экспрессии в нормальных тканях (Круковская и др., 2010; Samusik et al., 2013). При этом сначала изучалась его эволюционная новизна, а затем была показана опухолеспецифичность его экспрессии, которая была предсказана нами на основании эволюционной новизны этого гена.

Описание эволюционной новизны целого класса генов, экспрессирующихся в опухолях, – генов, кодирующих раково-тестикулярные антигены. Как уже было известно к моменту начала нашей работы, гены раково-тестикулярных антигенов (СТА- или СТ-гены) экспрессируются в семенниках и в широком круге опухолей. Автора в течение некоторого времени занимал вопрос, может ли теория эволюционной роли опухолей объяснить феномен раково-тестикулярных антигенов. И решение пришло: поскольку эволюционно новые гены возникают в ДНК зародышевых клеток, и для этого в случае ретропозиции необходима экспрессия генов (см. обзор Kozlov, 2014), гены, кодирующие раково-тестикулярные антигены, должны быть эволюционно новыми, и поэтому экспрессируются в семенниках и опухолях. И действительно, в нашей работе (Dobrynin et al., 2013) мы впервые показали, что семейство генов, кодирующих раково-тестикулярные антигены, является относительно эволюционно новым.

Заключение по первым работам, посвященным поиску эволюционно новых генов, экспрессирующихся в опухолях. Таким образом, уже в наших первых работах по поиску эволюционно новых генов, экспрессирующихся в опухолях, мы обнаружили как отдельные гены (*ELFN1-AS1* и *PBOV1*), так и целый класс таких генов (СТ-генов). Мы использовали оба подхода, обозначенных выше, – изучение опухолеспецифичности экспрессии сначала, а эволюционной новизны потом, и, наоборот, изучение эволюционной новизны сначала, а опухолеспецифичности экспрессии потом. В наших руках второй подход в дальнейшем получил большее развитие (Круковская и др., 2016; Козлов и др., 2021). С его использованием нами впоследствии была полу-

чена и зарегистрирована база данных эволюционно новых генов, экспрессирующихся в опухолях (Козлов и др., 2021).

Гены *ELFN1-AS1* и *PBOV1* оказались одними из первых описанных в мировой литературе генов человека, возникших *de novo*, и сейчас активно изучаются и цитируются в мировой литературе (см. обзор в (Kozlov, 2022)).

Эволюционная новизна генов класса СТ (Cancer/Testis antigen genes) была подтверждена вскоре после выхода в свет нашей статьи в работе известных в области молекулярной эволюции авторов (Zhang, Long, 2014) со ссылкой на наш приоритет и стала достоянием науки.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИЗУЧЕНИЯ “ШАПОЧЕК” ЗОЛОТЫХ РЫБОК

Следующим нетривиальным предсказанием, доказанным в период “до книги”, было предсказание того, что опухоли могут отбираться на новые функции в организме и что эволюционно молодые органы должны обладать признаками опухолей. Фактически, это два предсказания, изученные нами на модели “шапочек” золотых рыбок.

Как уже отмечалось выше, наша теория формулировала предсказания в разных областях биологии, в которые нам приходилось вторгаться, и иногда процесс освоения новой области занимал несколько лет. Выше уже приводился пример эксперимента по молекулярной гибридизации, продолжавшегося около 10 лет (Евтушенко и др., 1989). Эксперименты с “шапочками” золотых рыбок также продолжались несколько лет. Первая попытка, предпринятая в 1990-х гг., была неудачной. Эксперимент, проводившийся в 2009–2012 гг., оказался успешным. На первом этапе проводили макро- и микроскопические исследования уже сформировавшихся “шапочек” у львинноголовок и оранды (Шилов и др., 2009; Забежинский и др., 2010). На втором этапе изучали динамику развития “шапочек” (Козлов и др., 2012).

Взрослых рыбок и мальков золотых рыбок покупали у аквариумистов. Рыбок мы покупали на свои деньги, и я хорошо помню, что первая львинноголовка с большой “шапочкой” обошлась в половину “Жигулей”, что по тем временам было очень много.

Рабочей гипотезой эксперимента с “шапочками” золотых рыбок была гипотеза, что “шапочка” золотой рыбки является доброка-

чественной опухолью, прошедшей процесс искусственного отбора на красоту. Не все участники эксперимента в это верили. Так, выдающийся отечественный онколог, д.м.н. М.А. Забежинский был сначала настроен очень скептически. Но именно он получил данные, подтверждавшие эту гипотезу, и написал значительную часть текста статьи, опубликованной в 2012 г. (Козлов и др., 2012).

Рыбки находились под постоянным наблюдением. В ходе эксперимента периодически отбирали особей для гистологического исследования кожи головы. Большую роль в течение длительного времени в поддержании стада рыбок и обработке материалов исследования сыграли сотрудники Биомедицинского центра Б.В. Мурашев и Е.С. Шилов.

В результате в возрасте 6 месяцев “шапочки” были выявлены у 39% рыбок, а в возрасте 14 месяцев — у 60% рыбок. Гистологическое исследование “шапочек” на разных фазах их развития позволило сделать вывод, что изучавшееся разрастание кожи золотых рыбок представляет собой доброкачественную опухоль (Козлов и др., 2012).

Симметричная форма “шапочек”, расположение в определенном месте и появление на определенной стадии развития являются признаками нормального органа. Способность к неограниченному росту и данные гистологического анализа свидетельствуют об опухолевой природе “шапочек”.

Разновидности золотых рыбок, у которых развиваются “шапочки” (Oranda, Red cap Oranda, Lionhead, Ranchu), были искусственно отобраны селекционерами в течение последних нескольких сотен лет. То есть “шапочки” золотых рыбок являются самым молодым из описанных в литературе органов.

Таким образом, данные, полученные при изучении “шапочек” золотых рыбок, подтверждают предсказание о том, что эволюционно молодые органы должны обладать признаками опухолей.

“Шапочка” львинноголовок является примером искусственного отбора доброкачественной опухоли, которая приобрела функцию в организме (в данном случае — функцию красоты) и стала новым органом. Это первый пример такого рода, описанный в мировой литературе (Козлов и др., 2012).

Золотая рыбка с “шапочкой” была вынесена на обложку нашей монографии, опубликованной в 2014 г., и стала символом теории эволюционной роли наследуемых опухолей (рис. 1).

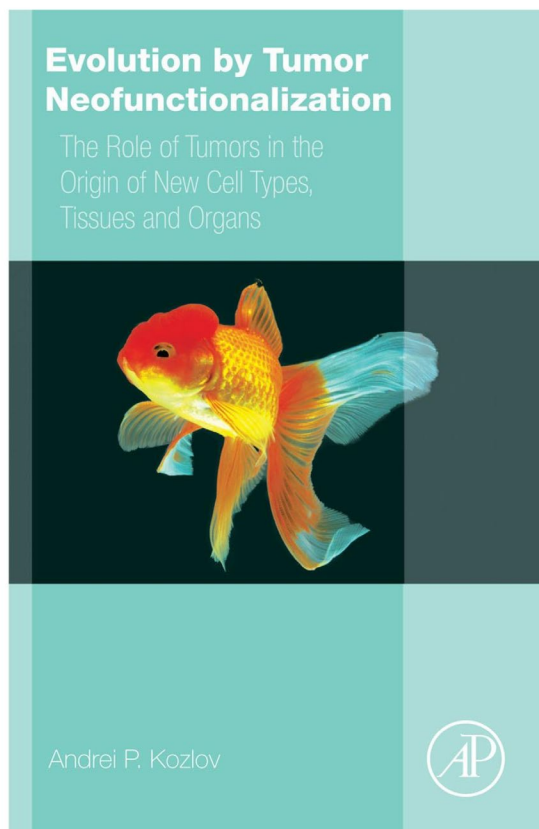


Рис. 1. Золотая рыбка с “шапочкой” на обложке монографии.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, за период с 1976 по 2014 г., предшествовавший публикации книги “*Evolution by Tumor Neofunctionalization*”, была в основном сформирована концепция эволюционной роли наследуемых опухолей. Были определены фундаментальные исходные принципы, из которых вытекала основная гипотеза; были накоплены и проанализированы биологические примеры, свидетельствовавшие в пользу позитивной эволюционной роли наследуемых опухолей, и описаны первые примеры типов клеток, тканей и органов, произошедших из опухолей; были сформулированы и подтверждены экспериментально первые нетривиальные предсказания. Постоянно происходило накопление все новых и новых данных, концепция постепенно развивалась. Автор много выступал в различных аудиториях и в печати и получал многочисленные комментарии. В результате к 2011 г., когда началась работа над книгой, накопилась некая критическая масса материала, обусловившая потребность в более глубоком обобщении.

Работа над книгой продолжалась три года. Монография “*Evolution by Tumor Neofunctionalization*”, опубликованная в 2014 г. в издательстве Elsevier/Academic Press (Kozlov, 2014), стала важным шагом в возникновении новой биологической теории *carcino-evo-devo*, и в значительной мере обусловила все ее дальнейшее развитие.

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает благодарность эволюционной школе Санкт-Петербургского государственного университета, онкологической школе НИИ онкологии им. проф. Н.Н. Петрова, Национальному онкологическому институту, США (National Cancer Institute, National Institutes of Health, USA), Институту общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, Санкт-Петербургскому Биомедицинскому центру и Санкт-Петербургскому политехническому университету Петра Великого.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Никаких дополнительных грантов на проведение или руководство данным конкретным исследованием получено не было.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

В данной работе отсутствуют исследования с участием человека или животных.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Евтушенко В.И., Хансон К.П., Барабицкая О.В. и др. Определение верхнего предела величины экспрессии генома // Мол. биол. 1989. Т. 23. С. 663–675.
- Забезинский М.А., Полев Д.Е., Шилов Е.С. и др. Изучение развития “шапочек” на голове золотых рыбок // Рус. журн. “СПИД, рак и общественное здоровье”. 2010. Т. 14 (1). С. 21.
- Козлов А.П. Регуляторные механизмы как выражение и результат эволюции конкурентных отношений между генами. Солёностные адаптации водных организмов. Л.: Наука, 1976. С. 237–245.
- Козлов А.П. Принципы многоуровневого развития организмов. Проблемы анализа биологических систем. М.: МГУ, 1983. С. 48–62.
- Козлов А.П. Генная конкуренция и возможная эволюционная роль опухолей и клеточных онкогенов. Теоретические и математические аспекты морфогенеза. М.: Наука, 1987. С. 136–140.
- Козлов А.П. Принципы сохранения в системе молекулярно-биологических законов // Теоретическая биоло-

- гия: структурно-функциональный подход. Л.: ЛГУ, 1988. С. 4–21.
- Козлов А.П. Опухоли и эволюция // *Вопр. онкол.* 2008. Т. 54 (6). С. 695–705.
- Козлов А.П. Роль опухолей в эволюции многоклеточных организмов // *Биосфера*. 2011. Т. 3. С. 369–378.
- Козлов А.П., Забежинский М.А., Попович И.Г. и др. Гиперпластические разрастания на коже головы золотых рыбок – сравнительно-онкологические аспекты // *Вопр. онкол.* 2012. Т. 58 (3). С. 387–393.
- Козлов А.П., Матюнина Е.А., Макашов А.А. База данных генов *TSEEN* Биомедицинского центра. Свидетельство о государственной регистрации базы данных № 2021621840. Санкт-Петербург, 2021.
- Круковская Л.Л., Полев Д.Е., Носова Ю.К. и др. Изучение экспрессии транскрипционного фактора *BRACHYURY (T)* в нормальных и опухолевых тканях человека // *Вопр. онкол.* 2008. Т. 54 (6). С. 739–743.
- Круковская Л.Л., Самусик Н.Д., Шилов Е.С. и др. Опухолеспецифическая экспрессия эволюционно нового гена *PBOV1* // *Вопр. онкол.* 2010. Т. 56 (3). С. 327–332.
- Круковская Л.Л., Полев Д.Е., Курбатова Т.В. и др. Изучение опухолеспецифичности экспрессии некоторых эволюционно новых генов // *Вопр. онкол.* 2016. Т. 62 (3). С. 495–500.
- Полев Д., Носова Ю., Круковская Л. и др. Экспрессия транскриптов, соответствующих кластеру *HS.633957* в тканях и опухолях человека // *Мол. биол.* 2009. Т. 43 (1). С. 97–102.
- Полев Д.Е., Круковская Л.Л., Козлов А.П. Экспрессия локуса *HS.633957* в органах пищеварительной системы и опухолях человека // *Вопр. онкол.* 2011. Т. 57 (1). С. 48–49.
- Самусик Н.А., Галачянц Ю.П., Козлов А.П. Сравнительно-геномный анализ опухолеспецифических транскрибируемых последовательностей человека // *Рус. журн. “СПИД, рак и общественное здоровье”*. 2007. Т. 10. С. 30–32.
- Самусик Н.А., Галачянц Ю.П., Козлов А.П. Анализ эволюционной новизны последовательностей, экспрессирующихся в опухолях // *Экол. генетика*. 2009. Т. 7. С. 26–37.
- Шилов Е.С., Мурашев Б.В., Попович И.Г. и др. Возможная новая модель опухолей у рыб // *Рус. журн. “СПИД, рак и общественное здоровье”*. 2009. Т. 13 (2). С. 49–50.
- Ashby W.R. An introduction to cybernetics. London: Chapman & Hall, 1956. 295 p.
- Baranova A.V., Lobashev A.V., Ivanov D.V. et al. In silico screening for tumour-specific expressed sequences in human genome // *FEBS Lett.* 2001. V. 508. P. 143–148.
- Clamp M., Fry B., Kamal M. et al. Distinguishing protein-coding and noncoding genes in human genome // *PNAS USA*. 2007. V. 104. P. 19428–19433.
- Dobrynin P., Matyunina E., Malov S., Kozlov A. The novelty of human cancer/testis antigen encoding genes in evolution // *Int. J. Genom.* 2013. V. 2013. № 105108.
- Evtushenko V.I., Barabitskaya O.V., Emeljanov A.V., Kozlov A.P. Estimation of the maximal expression of the rat genome and the complexity of tumor-specific transcripts // Abstracts of the First International Conference on Gene Regulation Oncogenesis, and AIDS. Loutráki, Greece, September 15–21, 1989.
- Galachyants Y., Kozlov A.P. CDD as a tool for discovery of specifically-expressed transcripts // *Russ. J. “AIDS, Cancer and Related Problems”*. 2009. V. 13 (2). P. 60–61.
- Goetz H., Stone A., Zhang R. et al. Double-edged role of resource competition in gene expression noise control // *Adv. Genet.* 2022. V. 3 (1). P. 2100050.
- Hardison R.C. Promoter competition in globin gene control // *Blood*. 2022. V. 139 (14). P. 2089–2091.
- Kozlov A.P. Evolution of living organisms as a multilevel process // *J. Theor. Biol.* 1979. V. 81 (1). P. 1–17.
- Kozlov A.P. Gene competition and the possible evolutionary role of tumors // *Med. Hypoth.* 1996. V. 46 (2). P. 81–84.
- Kozlov A.P. The possible evolutionary role of tumors in the origin of new cell types // *Med. Hypoth.* 2010. V. 74. P. 177–185.
- Kozlov A.P. Evolution by Tumor Neofunctionalization: The role of tumors in the origin of new cell types, tissues and organs. Amsterdam, Boston, Heidelberg, London, New York, Oxford, Paris, San Diego, San Francisco, Singapore, Sydney, Tokyo: Academic Press/Elsevier, 2014. 248 p.
- Kozlov A.P. The theory of carcino-evo-devo and its non-trivial predictions // *Genes*. 2022. V. 13 (1). P. 2347.
- Kozlov A.P., Emeljanov A.V., Barabitskaya O.V., Evtushenko V.I. The maximal expression of mammalian genome, the complexity of tumor-specific transcripts and the cloning of tumor-specific cDNAs // Abstract of Annual Meeting Sponsored by Laboratory of Tumor Cell Biology. Bethesda, Maryland: National Cancer Institute (U.S.), 1992.
- Kozlov A.P., Galachyants Y.P., Dukhovlinov I.V. et al. Evolutionarily new sequences expressed in tumors // *Infect. Agent Cancer*. 2006. V. 25. P. 1–8.
- Krukovskaja L.L., Baranova A., Tyezelova T. et al. Experimental study of human expressed sequences newly identified *in silico* as tumor specific // *Tumor Biol.* 2005. V. 26 (1). P. 17–24.
- Lennon G.G., Lehrach H. Hybridization analyses of arrayed cDNA libraries // *Trends Genet.* 1991. V. 7. P. 314–317.
- Makashov A.A., Malov S.V., Kozlov A.P. Oncogenes, tumor suppressor and differentiation genes represent the oldest human gene classes and evolve concurrently // *Sci. Reports*. 2019. V. 9. № 16410.
- Markov A.V., Anisimov V.A., Korotayev A.V. Relationship between genome size and organismal complexity in the lineage leading from prokaryotes to mammals // *History & Mathematics: Big History Aspects*. Volgograd: ‘Uchitel’ Publishing House, 2019. P. 122–141.

- Ohno S. Evolution by gene duplication. New York, Berlin, Heidelberg, USA, Germany: Springer-Verlag, 1970. 175 p.
- Palena C., Tsang K.Y., Fernando R.I. et al. The human T-box mesodermal transcription factor *Brachyury* is a candidate target for T-cell-mediated cancer immunotherapy // Clin. Cancer Res. 2007. V. 13 (8). P. 2471–2478.
- Polev D.E., Karnaukhova I.K., Krukovskaya L.L., Kozlov A.P. *ELFN1-AS1*: a novel primate gene with possible microRNA function expressed predominantly in human tumors // BioMed. Res. Internat. 2014. V. 2014. № 398097.
- Sabi R., Tuller T. Modelling and measuring intracellular competition for finite resources during gene expression // J. R. Soc. Interface. 2019. V. 16. № 20180887.
- Salzberg S.L. Open questions: how many genes do we have? // BMC Biol. 2018. V. 16 (94).
- Samusik N., Galachyants Y., Kozlov A.P. Analysis of evolutionary novelty of tumor-specifically expressed sequences // Russ. J. Genet. Appl. Res. 2011. V. 1 (2). P. 138–148.
- Samusik N., Krukovskaya L., Meln I. et al. *PBOV1* is a human *de novo* gene with tumor-specific expression that is associated with a positive clinical outcome of cancer // PLoS One. 2013. V. 8 (2). P. e56162.
- Scheurle D., DeYoung M.P., Binniger D.V. et al. Cancer gene discovery using digital differential display // Cancer Res. 2000. V. 60 (15). P. 4037–4043.
- Spiegelman S. Differentiation is controlled production of unique enzymatic patterns // Symp. Soc. Exp. Biol. 1948. V. 2. P. 286–325.
- Topfer S.K., Feng R., Huang P. et al. Disrupting the adult globin promoter alleviates competition and reactivates fetal globin gene expression // Blood. 2022. V. 139 (14). P. 2107–2118.
- Vazmatzis G., Essand M., Brinkman U. et al. Discovery of three genes specifically expressed in human prostate by expressed sequence tag database analysis // PNAS USA. 1998. V. 95. P. 300–304.
- Waddington C.H. The genetic control of development // Symp. Soc. Exp. Biol. 1948. V. 2. P. 145–154.
- Weismann A. The germ plasm: a theory of heredity. New York: Charles Scribner's Sons, 1893. 517 p.
- Wei L., Yuan Y., Hu T. et al. Regulation by competition: a hidden layer of gene regulatory network // Quantitat. Biol. 2019. V. 7 (2). P. 110–121.
- Zhang Y.E., Long M. New genes contribute to genetic and phenotypic novelties in human evolution // Curr. Opin. Genet. Dev. 2014. V. 29. P. 90–96.

A Theory of the Evolutionary Role of Hereditary Tumors (*carcino-evo-devo*): the History and the Current State. Part 1. From General Principles to Hypothesis, and from Hypothesis to New Concept

A. P. Kozlov^{a, b, c, *}

^aVavilov Institute of General Genetics, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

^bBiomedical Center, St. Petersburg, Russia

^cPeter the Great St. Petersburg Polytechnic University, St. Petersburg, Russia

*e-mail: contact@biomed.spb.ru

The theory of the evolutionary role of hereditary tumors, or *carcino-evo-devo* theory, may be considered as the next step after A.N. Severtsov theory of phylembryogenesis, the theory of *evo-devo*, and Susumu Ohno theory of evolution by gene duplication. The *carcino-evo-devo* theory pretends to be a unifying biological theory, because it unifies within an integrated consideration three main types of biological development – individual, evolutionary and neoplastic development. The *carcino-evo-devo* theory explains a series of unexplained biological phenomena. In the first place, it explains the mechanisms of progressive evolution and biological complexity increase using the concept of relatively unstable transitory forms and autonomous uncontrolled processes. The theory of the evolutionary role of hereditary tumors has formulated several non-trivial predictions in various fields of biology, which have been confirmed in the lab of the author and in other laboratories. The consequences of the *carcino-evo-devo* theory have implications in medicine and biotechnology. The first part of the article describes the basic principles from which the main hypothesis followed, the progressive developments of the concept, and the first experimental data in support of non-trivial predictions obtained in the laboratory of the author in the period before 2014, when our monograph “Evolution by Tumor Neofunctionalization” (Kozlov, 2014) has been published.

Keywords: gene competition, genome evolution, the evolutionary role of tumors