

Курс «Биология опухолевой клетки»
(2019 г.)

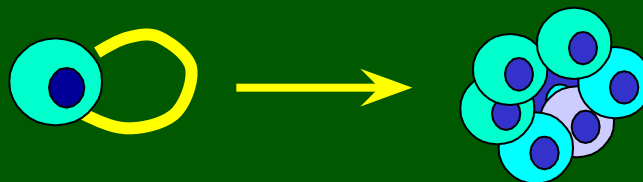
Н.Л. Лазаревич

Лекция 2

**Нарушения регуляции клеточного цикла в
неопластических клетках: роль онкогенов и
опухолевых супрессоров**

Злокачественные новообразования возникают в результате нарушений в системах, обеспечивающих естественный процесс обновления тканей, когда вследствие мутаций и эпигенетических изменений в стволовых клетках или их незрелых потомках образуются т.н. «стволовые клетки опухолей», способные к неограниченному размножению, выходу за пределы собственной ткани и росту на территориях других тканей.

Из-за высокой генетической изменчивости и селекции, происходящей под давлением со стороны организма, в популяции клеток такого клона постоянно возникают и отбираются все более и более автономные и агрессивные субклоны, что описывается термином "опухолевая прогрессия". В результате довольно длительной эволюции первичного неопластического клона формируется опухоль, способная убить организм.



**Неограниченное деление
стволовых клеток
опухолей**

Стимуляция деления

Иммортализация

**Пониженная потребность во
внешних сигналах для
инициации и поддержания
пролиферации
(генерирование внутренних
пролиферативных стимулов)**

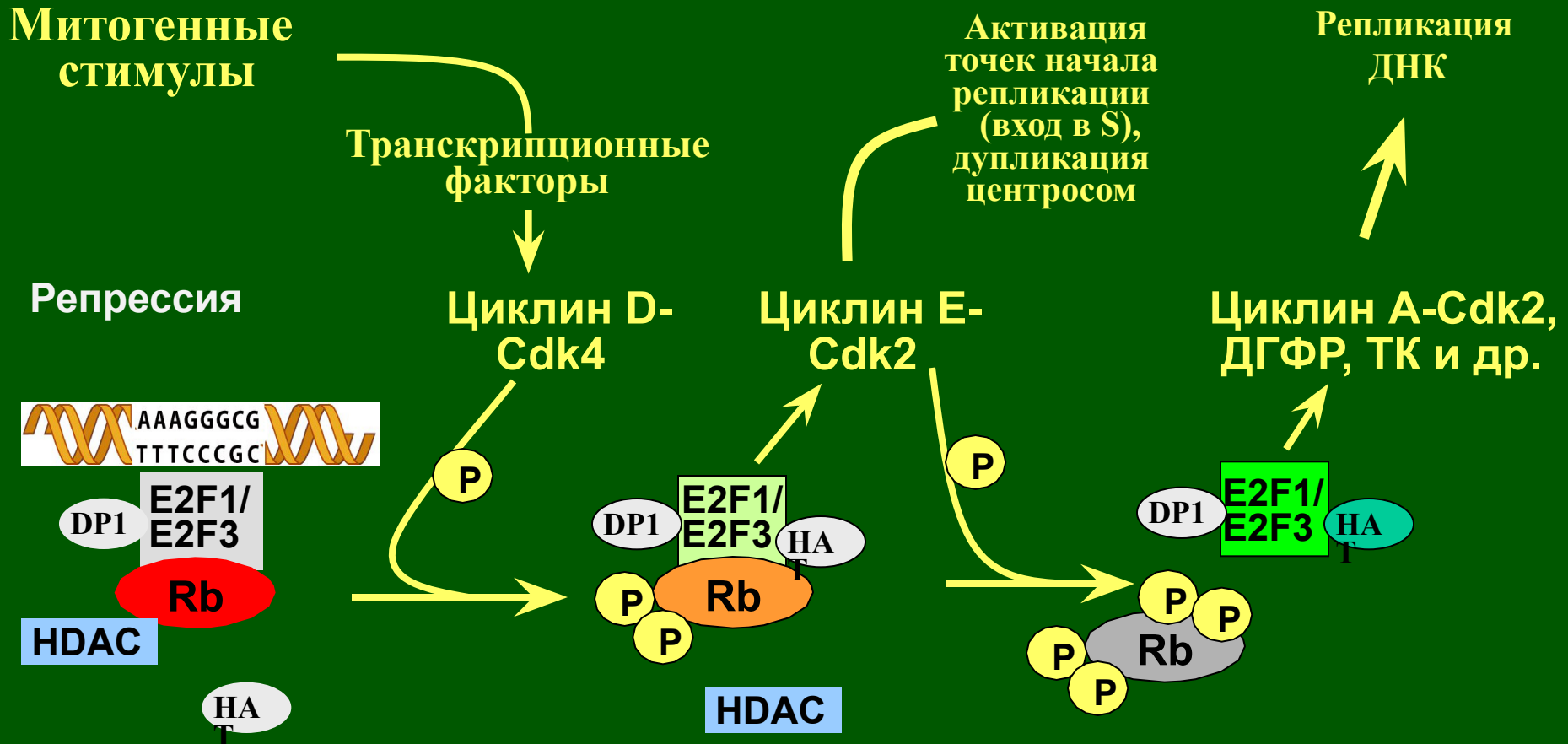
**Отмена рост-
инигибирующих
сигналов и/или
нечувствительность
к их действию**

**Высокая активность
теломеразы, поддержание
нормальной структуры
концов хромосом**

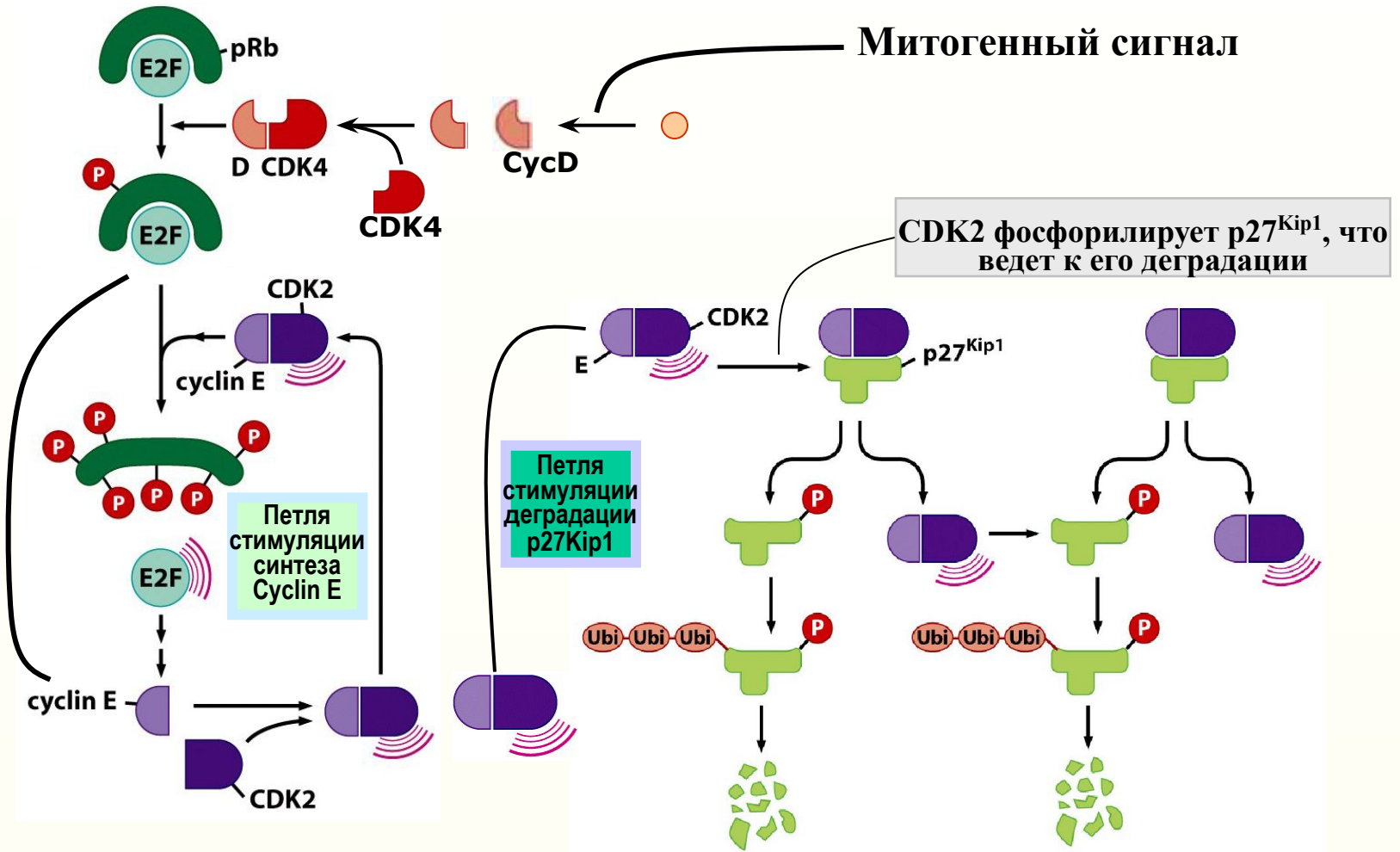
“Мотором” клеточного цикла служат активности последовательно сменяющих друг друга циклин-зависимых киназ (Cdks)

Какие белки являются мишенями Cdks?

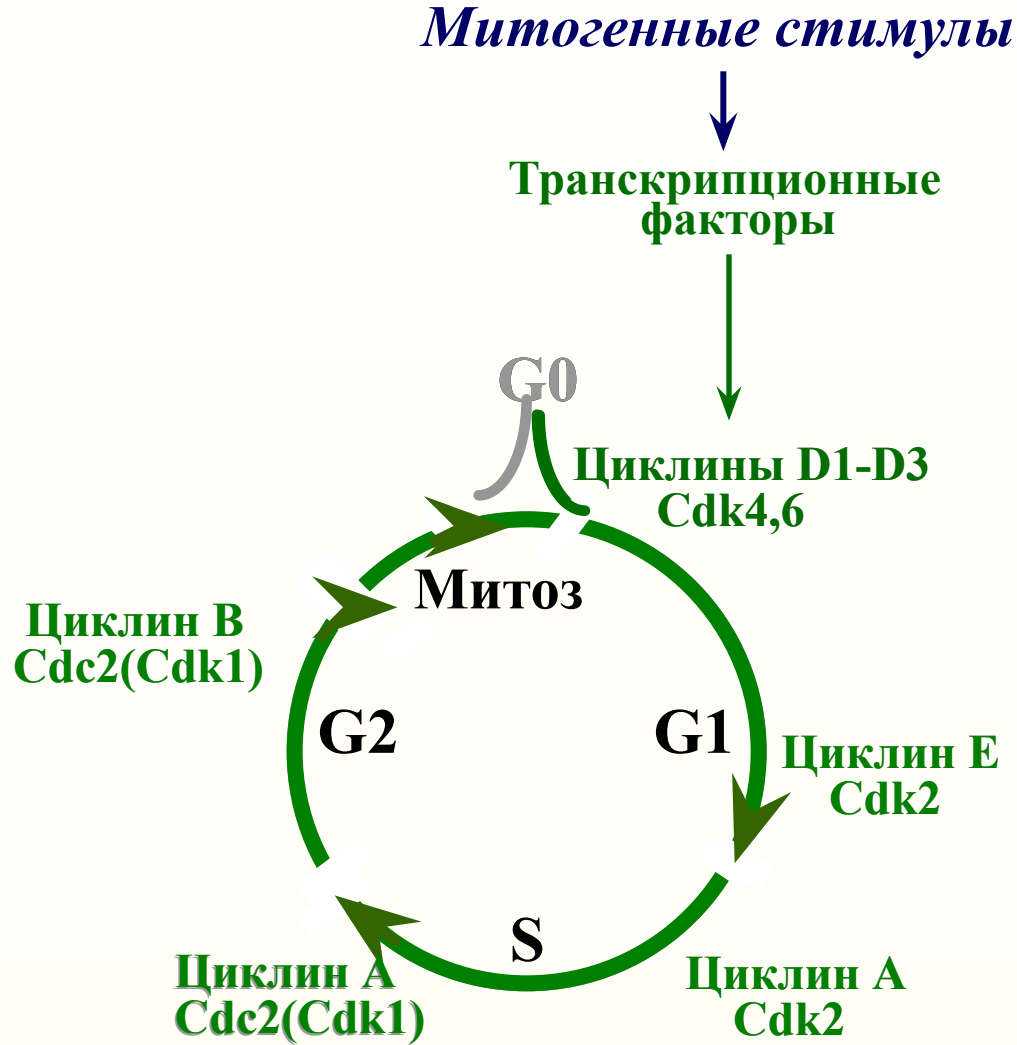
Важнейшей мишенью киназ Cdk4/6 и Cdk2 является белок pRb, регулирующий вход в S-фазу и репликацию ДНК



Фосфорилирование pRb включает петли позитивной регуляции комплексов CysE/CDK2



В норме митогенная сигнализация имеет квантовый характер



Основополагающее свойство неопластических клеток – пониженная потребность во внешних сигналах для инициации и поддержания пролиферации. Оно возникает вследствие различных генетических изменений, обеспечивающих способность генерировать внутри себя митогенные сигналы, в норме исходящие от внешних стимулов



Основной механизм:

запуск в отсутствие ростовых факторов каскада событий, в норме иницируемого их связыванием со своими рецепторами

Дополнительные механизмы:

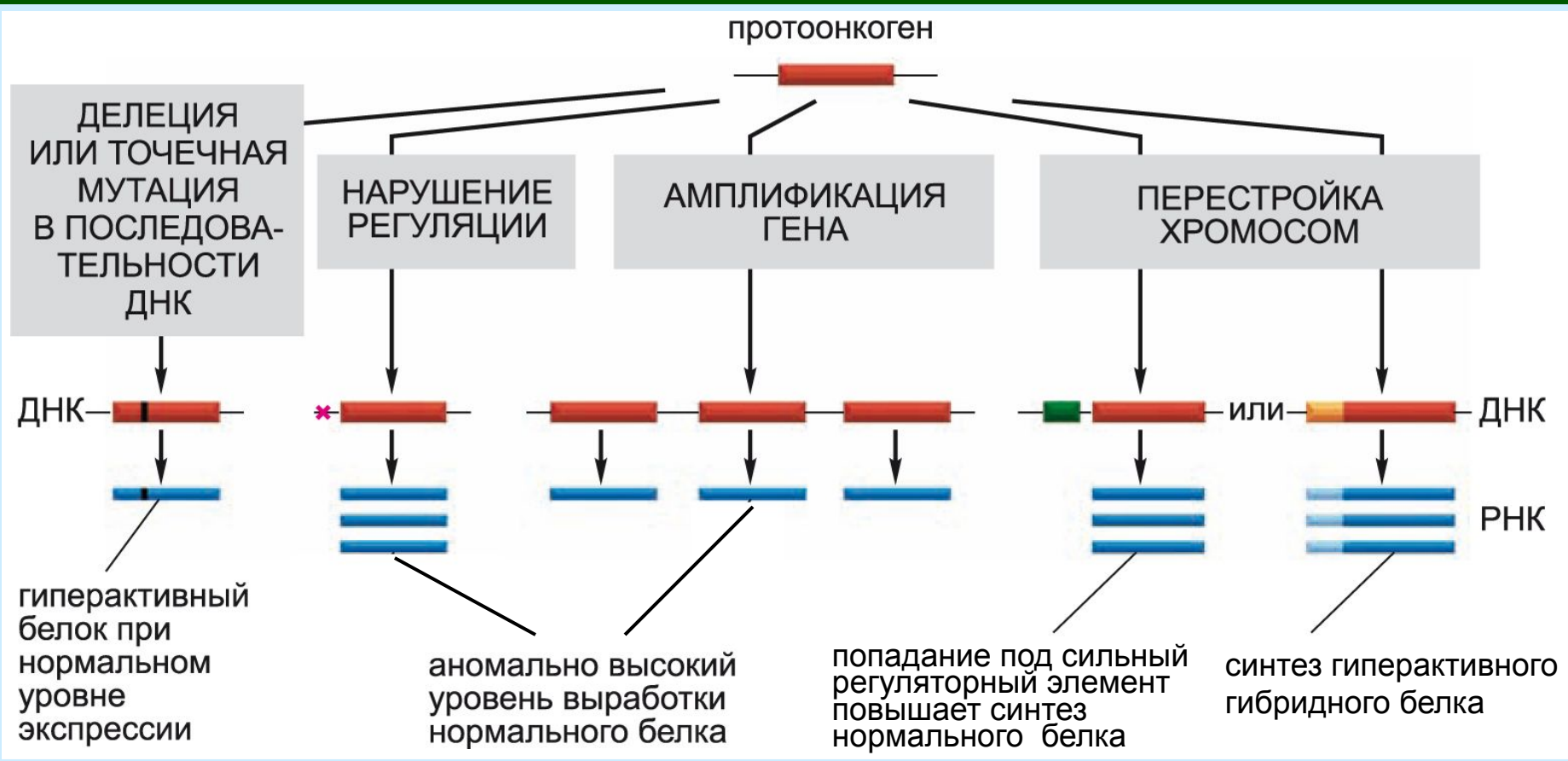
- синтез и секреция факторов роста самими неопластическими клетками;
- увеличение числа рецепторов для необходимых факторов роста; и т.д.

Для опухолевых клеток характерны генетические изменения компонентов передачи митогенных сигналов



Онкогены - клеточные или вирусные гены, экспрессия которых ведет к развитию новообразований

Протоонкогены - нормальные клеточные гены, усиление или модификация функции которых превращает их в онкогены



Онкогены - клеточные или вирусные гены, экспрессия которых ведет к развитию новообразований.

Протоонкогены - нормальные клеточные гены, усиление или модификация функции которых превращает их в онкогены.

Опухолевые супрессоры (антионкогены, рецессивные опухолевые гены) - клеточные гены, инактивация которых резко увеличивает вероятность развития новообразований, а восстановление функции, наоборот, может подавить рост опухолевых клеток.

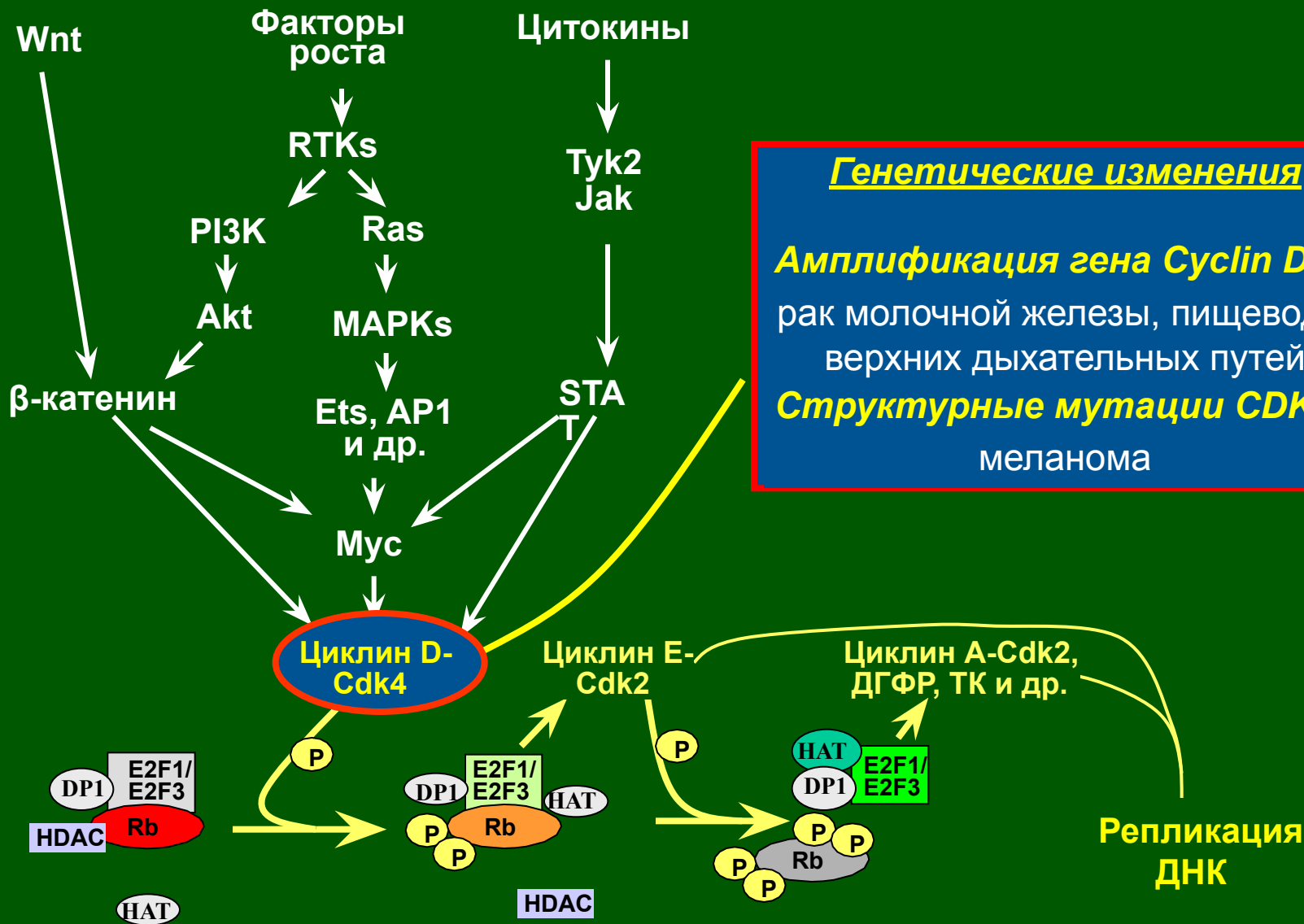
Механизмы инактивации

- 1) Генетические (мутации, делеции, потеря хромосом, митотическая рекомбинация, конверсия гена)
- 2) Эпигенетические (метилирование промотора, микроРНК и др.).

Критерии принадлежности к онкогенам/опухолевым супрессорам:

- Закономерные изменения структуры и/или экспрессии данного гена в клетках новообразований
- Возникновение определенных форм опухолей у индивидов с передающимися по наследству герминальными (т.е. произошедшими в половой клетке) мутациями данного гена
- Резкое повышение частоты появления опухолей у трансгенных животных, экспрессирующих активированную (онкогены) или инактивированную (опухолевые супрессоры) формы данного гена
- Способность вызывать в культивируемых *in vitro* клетках морфологическую трансформацию и неограниченный рост (онкогены), или подавление роста и выраженности признаков трансформации (опухолевые супрессоры)

Митогенные сигналы:



Генетические изменения

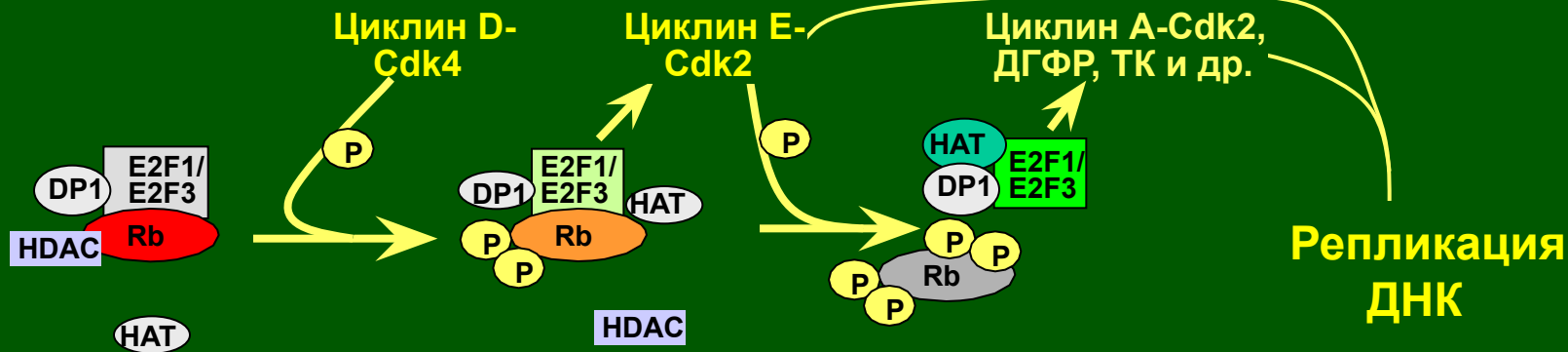
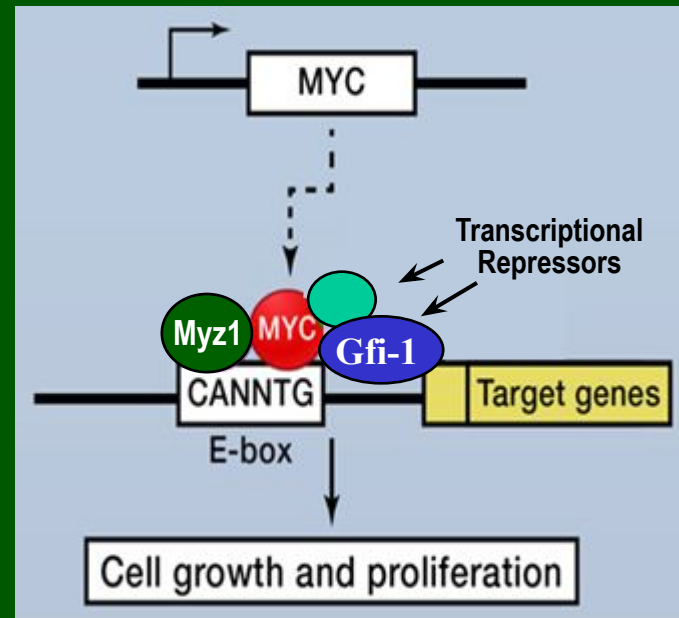
Амплификация гена Cyclin D1:

рак молочной железы, пищевода, верхних дыхательных путей

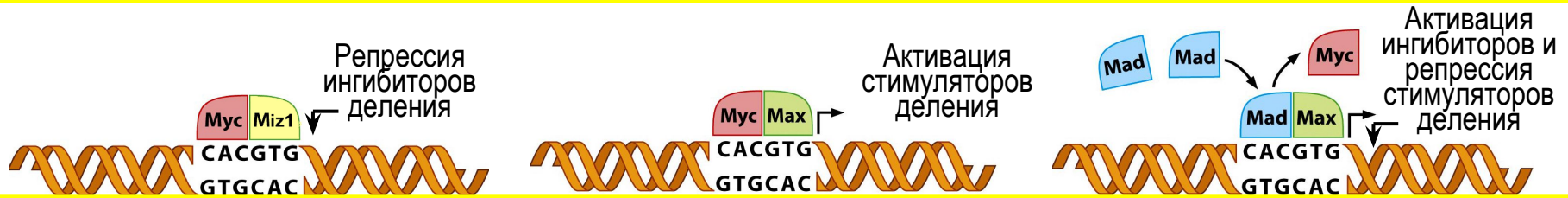
Структурные мутации CDK4:

меланома

Митогенные сигналы:



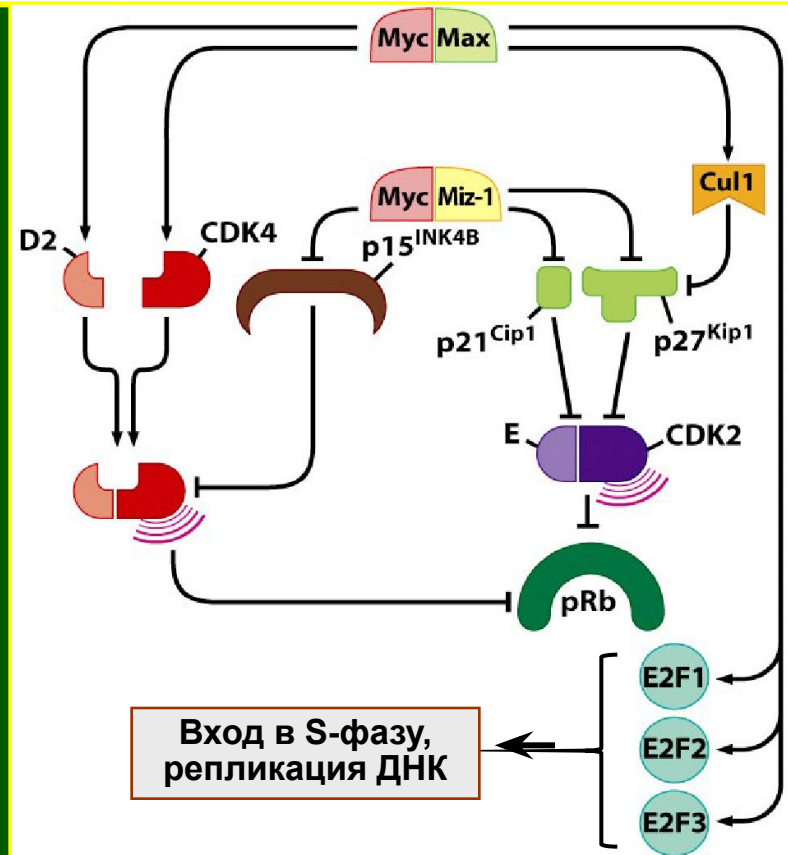
Транскрипционные комплексы Мус (Мус-Мах, Мус-Миз1) стимулируют деление клеток за счет множества механизмов



Репрессия генов *p15InkB*, *p21Cip1*, *p27Kip1*.

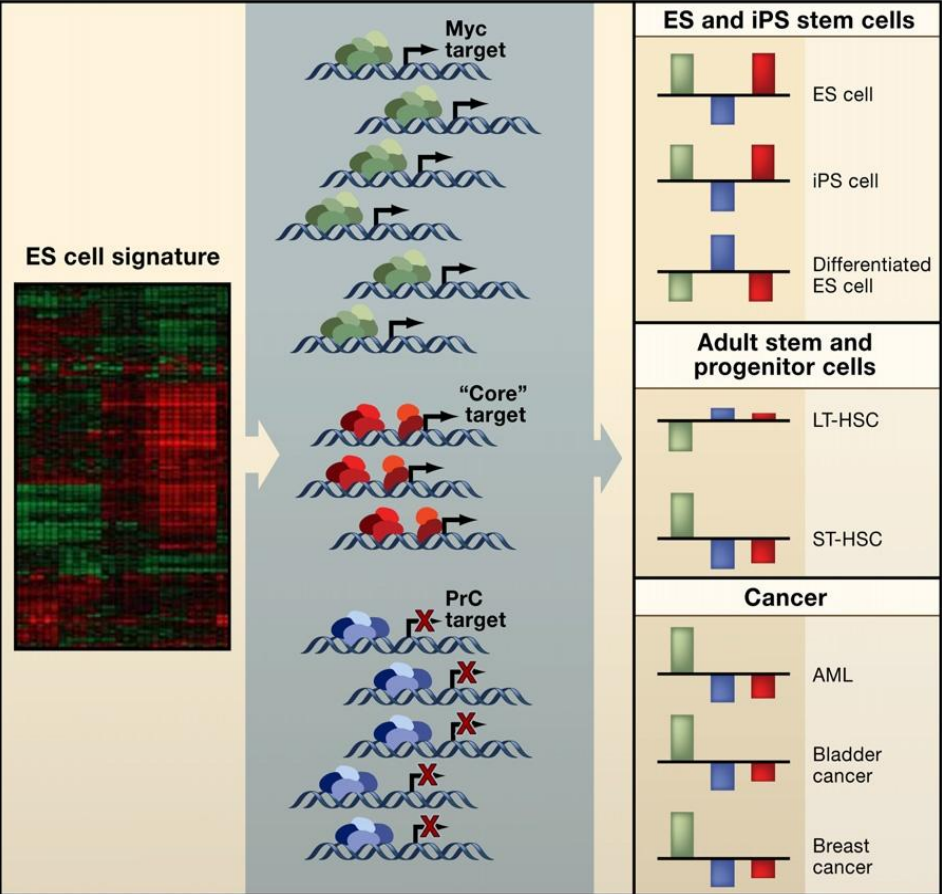
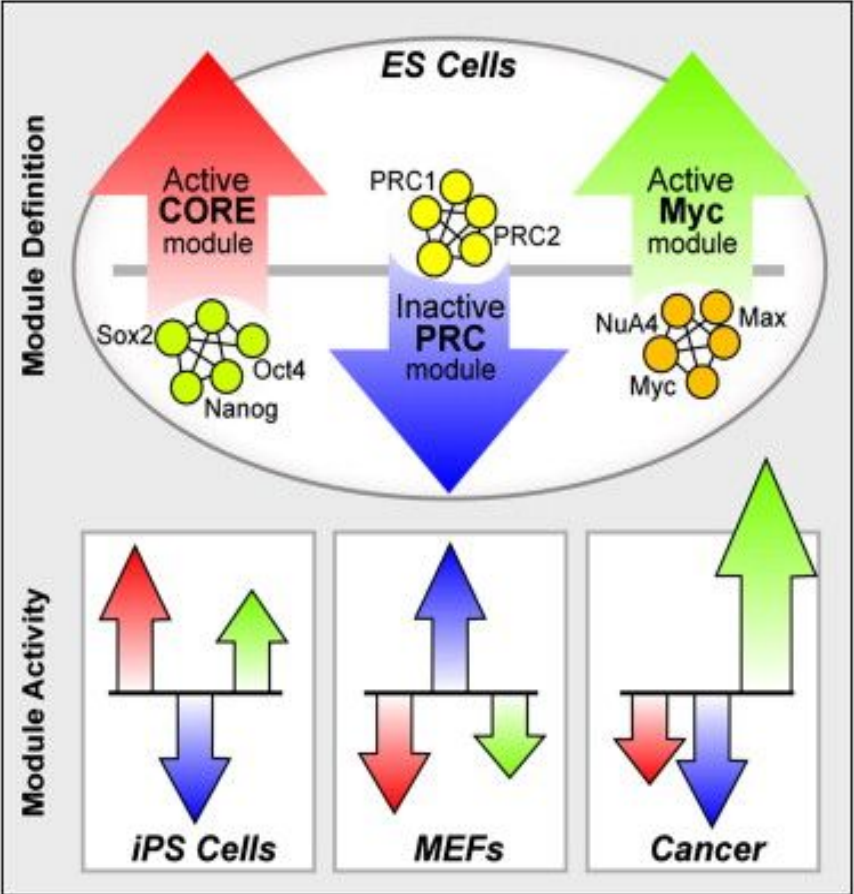
Активация генов, кодирующих:

- Циклин D2, CDK4 и E2F1/3;
- Убиквитинлигазы CUL1 и SKC, обеспечивающие деградацию p27Kip1;
- ID2, связывающий фосфорилированный pRb, стабилизируя высвобождение E2F1/3;
- ODC и CAD, катализирующие биосинтез соответственно полиаминов и пиримидинов, необходимых для репликации ДНК;
- Факторы инициации трансляции eIF4E и eIF2a - увеличивается интенсивность синтеза белков, происходит более быстрый рост массы клеток (клетки вступают в деление после достижения определенной массы)



Мус является одним из 4-х факторов транскрипции (**Мус+Klf4+Oct4+Sox2**), включение экспрессии которых может вернуть дифференцированным клеткам присущую стволовым клеткам плюрипотентность [Yamanaka, 2006 – Nobel Prize 2012]. **Мус глобально изменяет структуру хроматина** [Knoepfler, Cancer Res., 2007, Kim et al., Cell, 2008, 132:1049-1062].

Сходство транскрипционных профилей в стволовых и опухолевых клетках

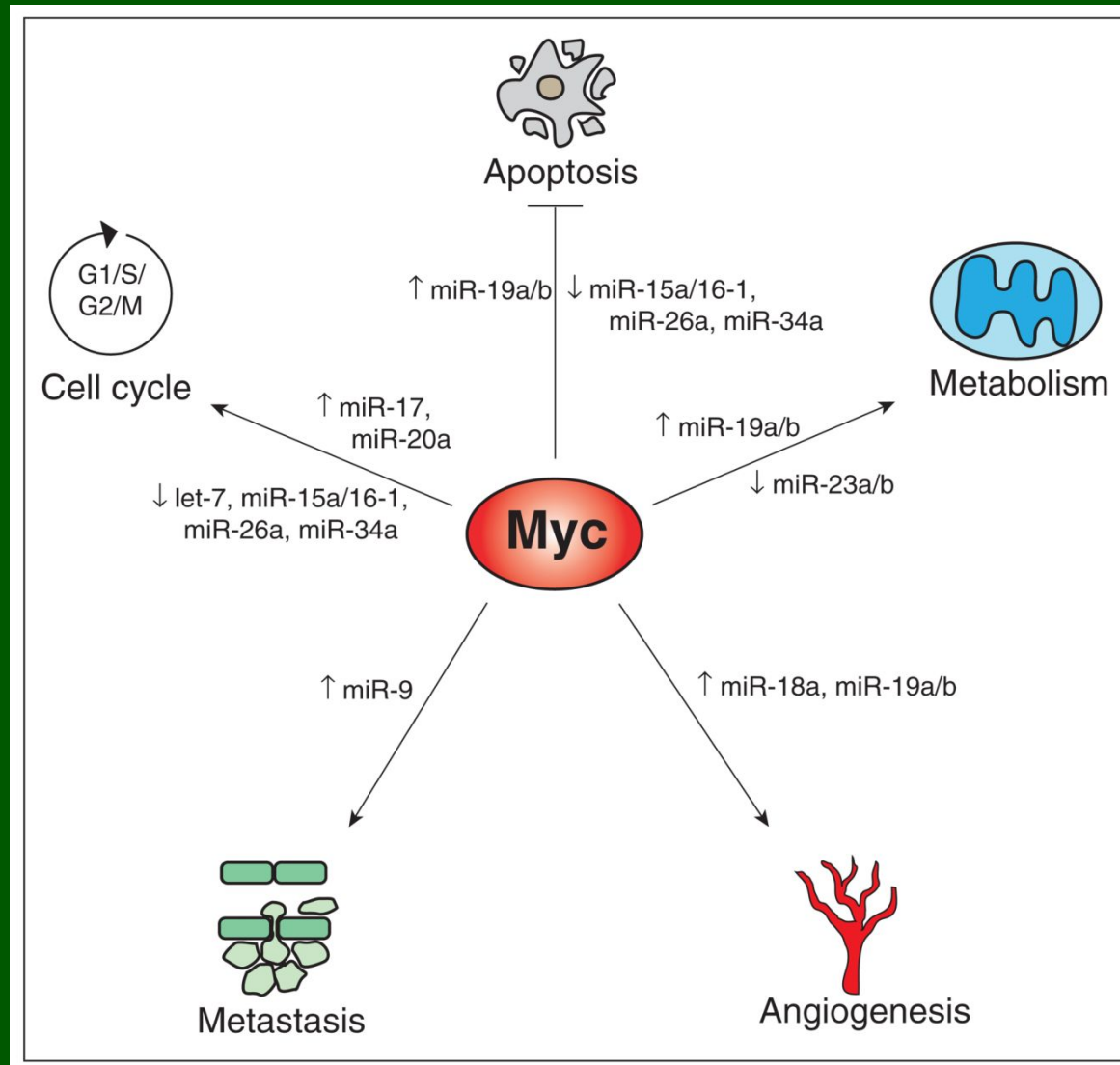


Myc module (green), the Polycomb module (blue), and the Core module (red).

Kim et al. "A Myc network accounts for similarities between embryonic stem and cancer cell transcription programs". Cancer Cell, 2010, v. 143, pp. 313-324

Rothenberg et al. "The Myc connection: ES cells and cancer". Cancer Cell, 2010, v. 143, pp. 184-186

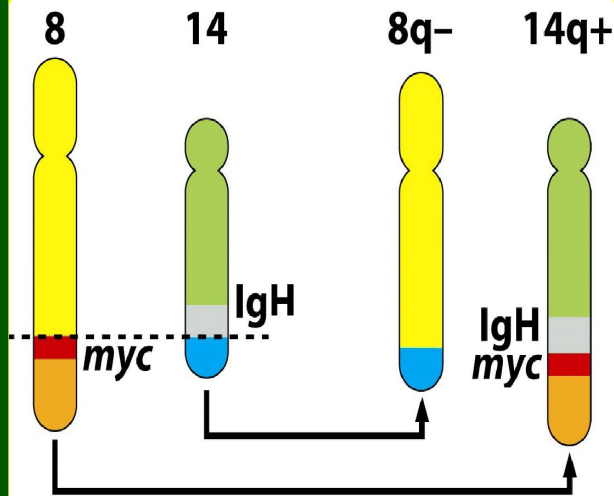
Наряду с белок-кодирующими генами Мус контролирует транскрипцию большой группы регуляторных микроРНК



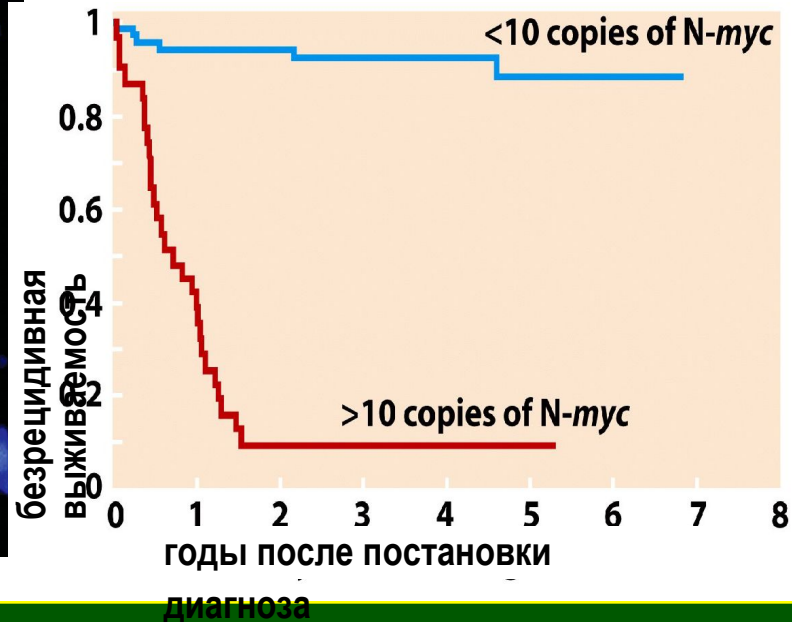
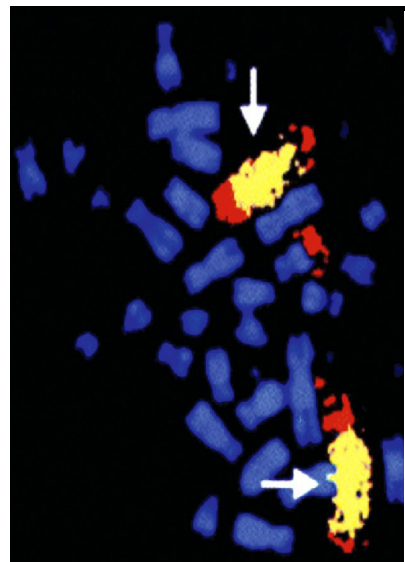
Изменения генов Мус в неопластических клетках:

- 1) Хромосомные транслокации, перемещающие *МУС* под контроль регуляторных элементов генов иммуноглобулинов (лимфома Беркитта и др. злокачественные лимфомы);
- 2) Амплификация и гиперэкспрессия гена (рак молочной железы, простаты, нейробластома и др.);
- 3) Мутации, повышающие стабильность белка (лимфома Беркитта и др.)

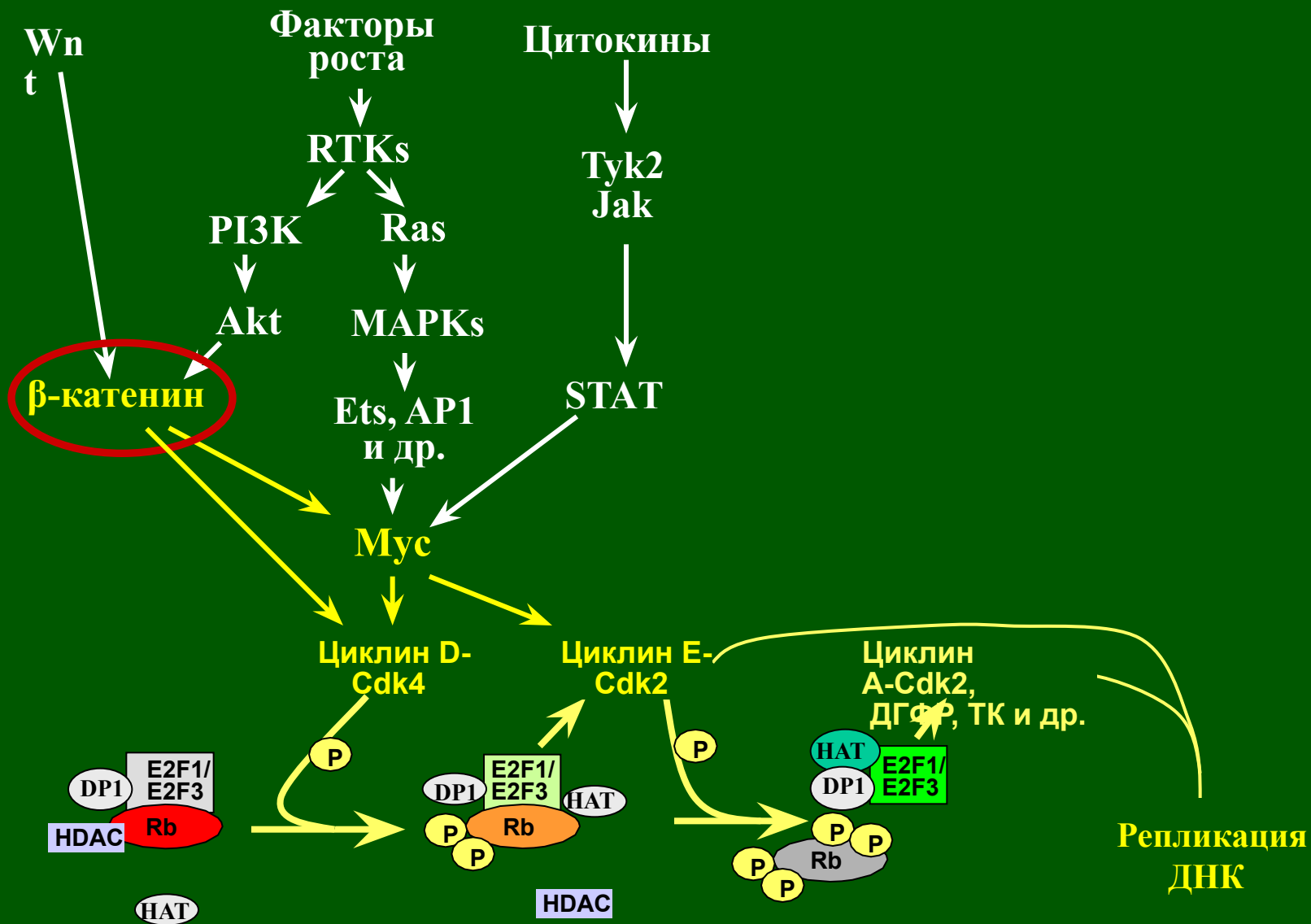
Транслокация гена *c-MYC* при лимфоме Беркитта



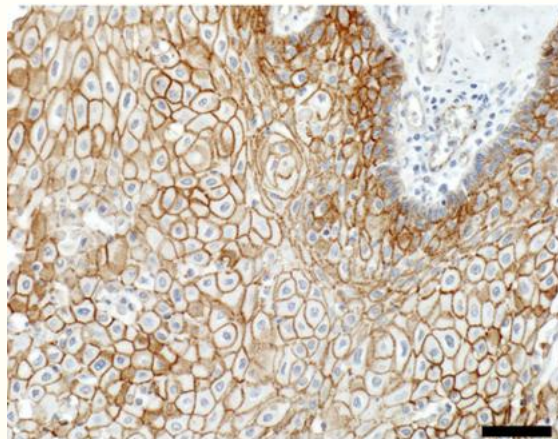
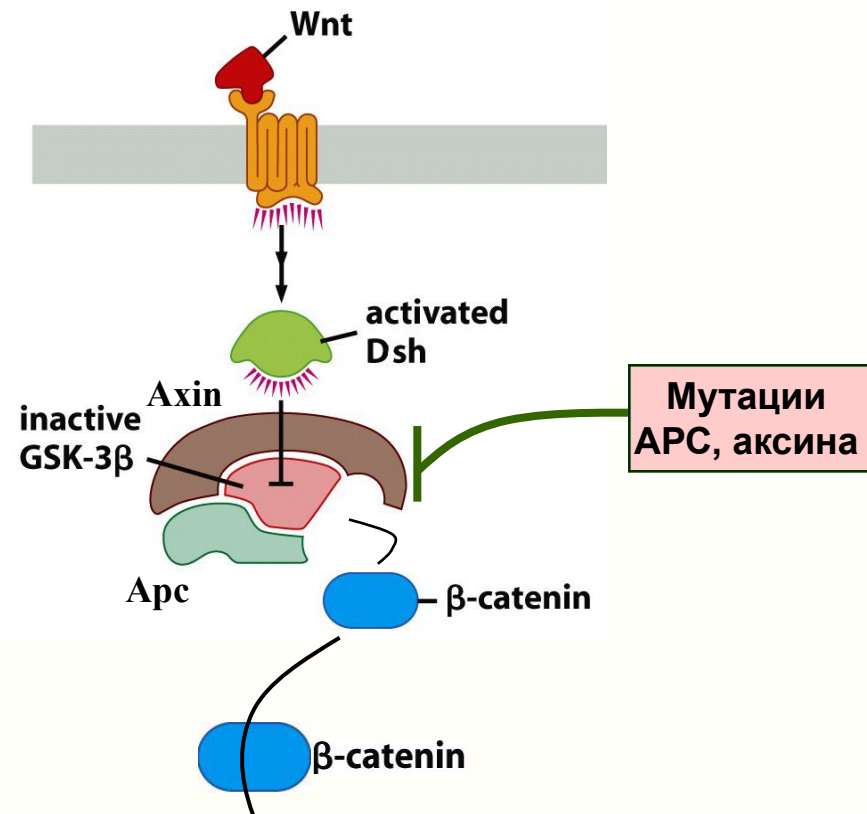
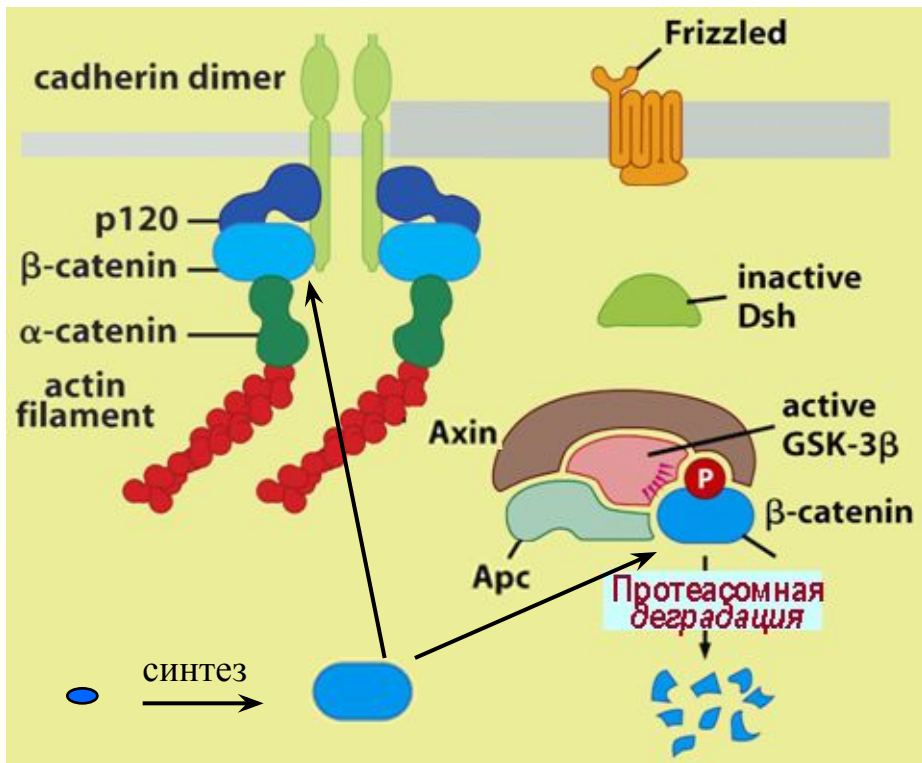
Амплификация гена *N-MYC* в нейробластомах у детей



Митогенные сигналы:

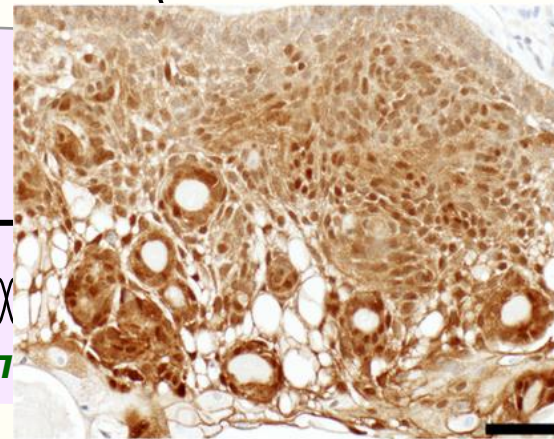


Алгоритм функционирования β -катенина



инскрипция
нов-мишеней

Цикл



Генетические изменения в новообразованиях человека, активирующие сигнальный путь Wnt

Мутации *CTNNB* (β -катенина)

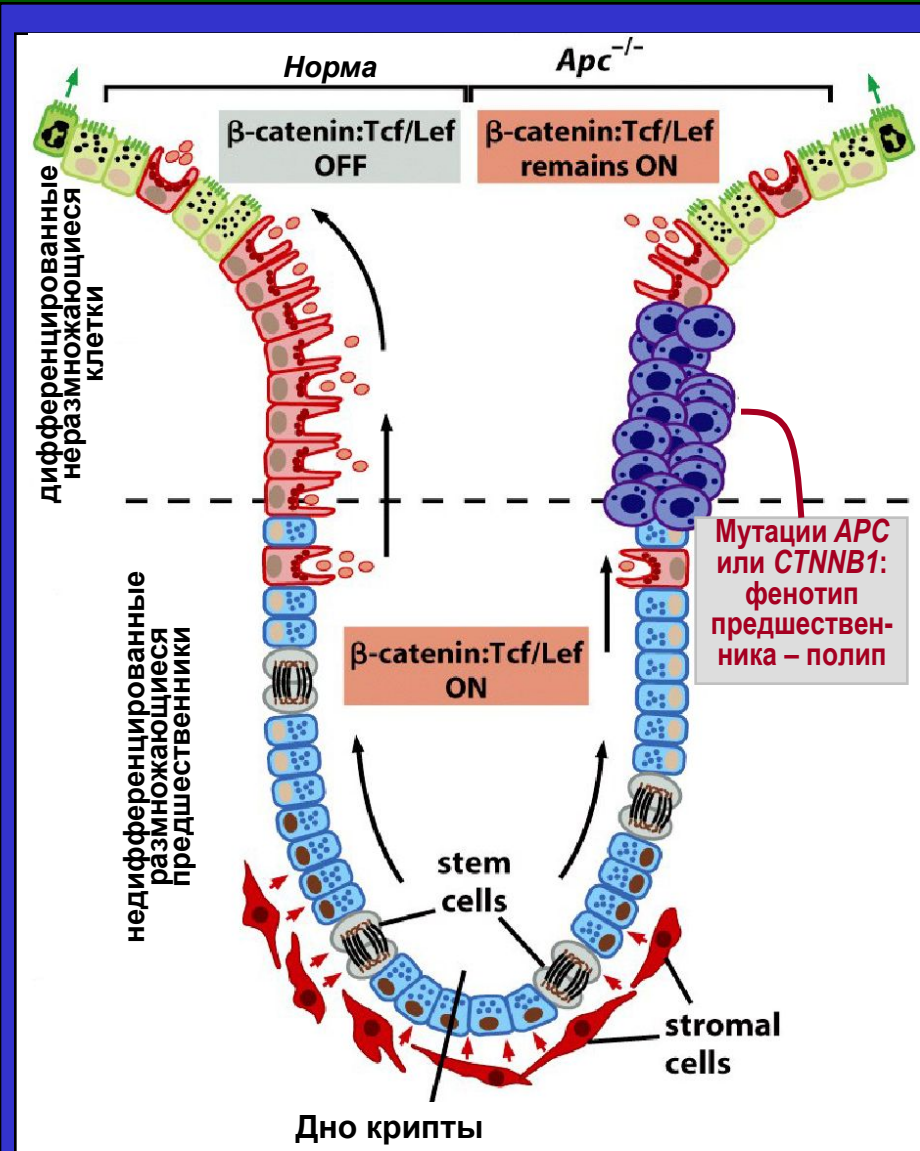
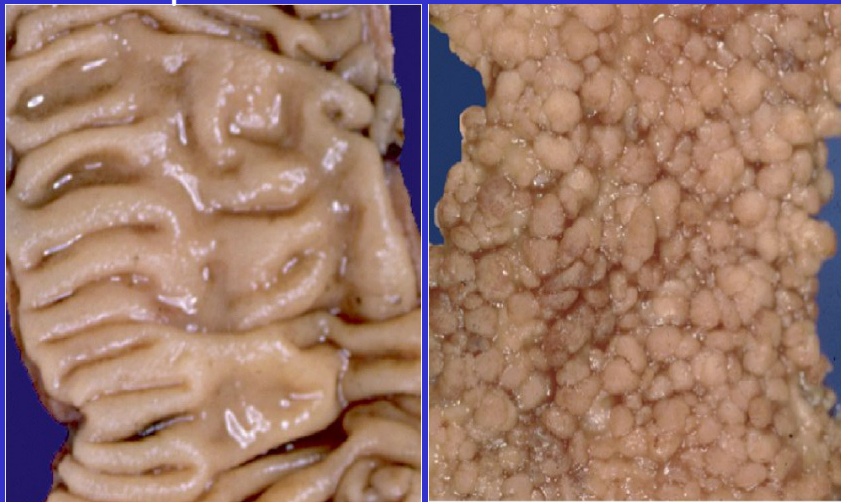
- наследственный ¹аденоматозный полипоз толстой кишки,
- разные спорадические опухоли

Мутации/делеции *APC* или аксина

- наследственный аденоматозный полипоз толстой кишки,
- разные спорадические опухоли

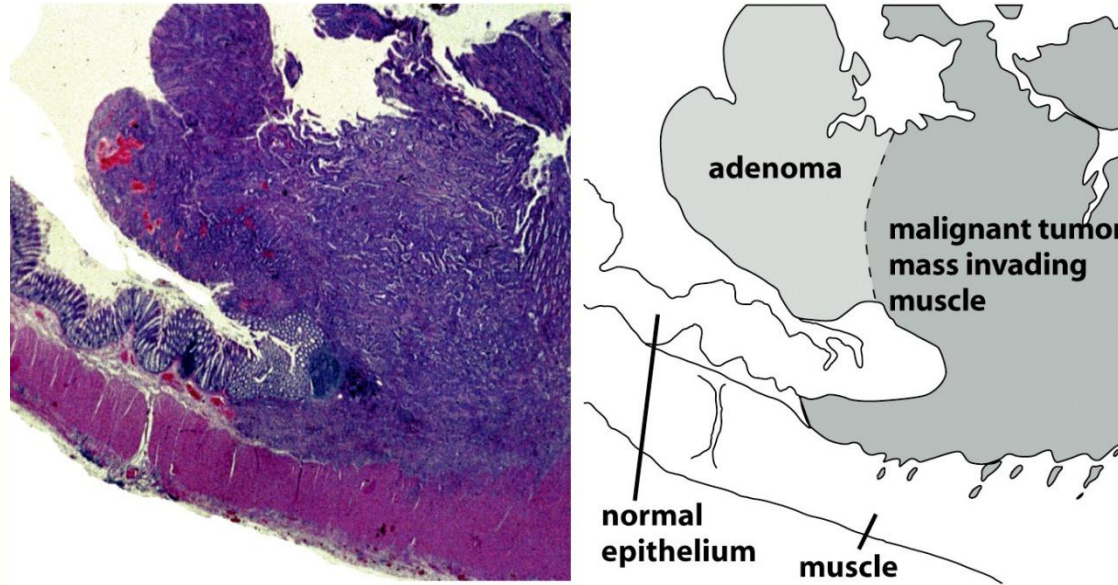
норма

полипоз

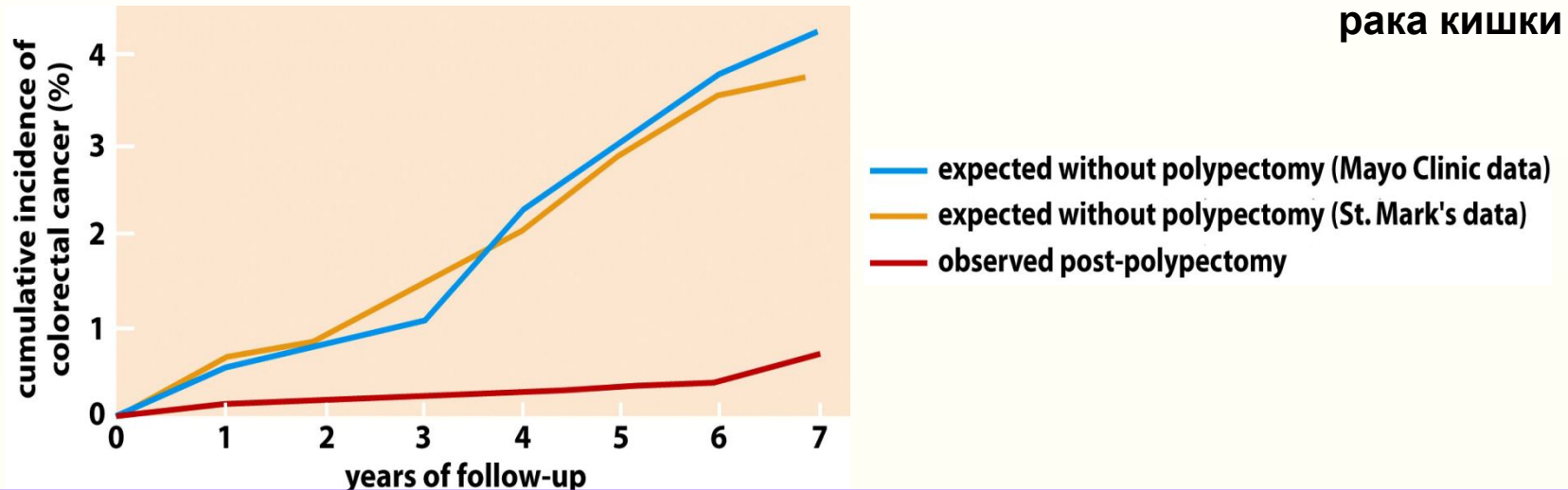


Свидетельства происхождения рака из полипов

1. Опухоли содержат (сохраняют) участки доброкачественных аденом



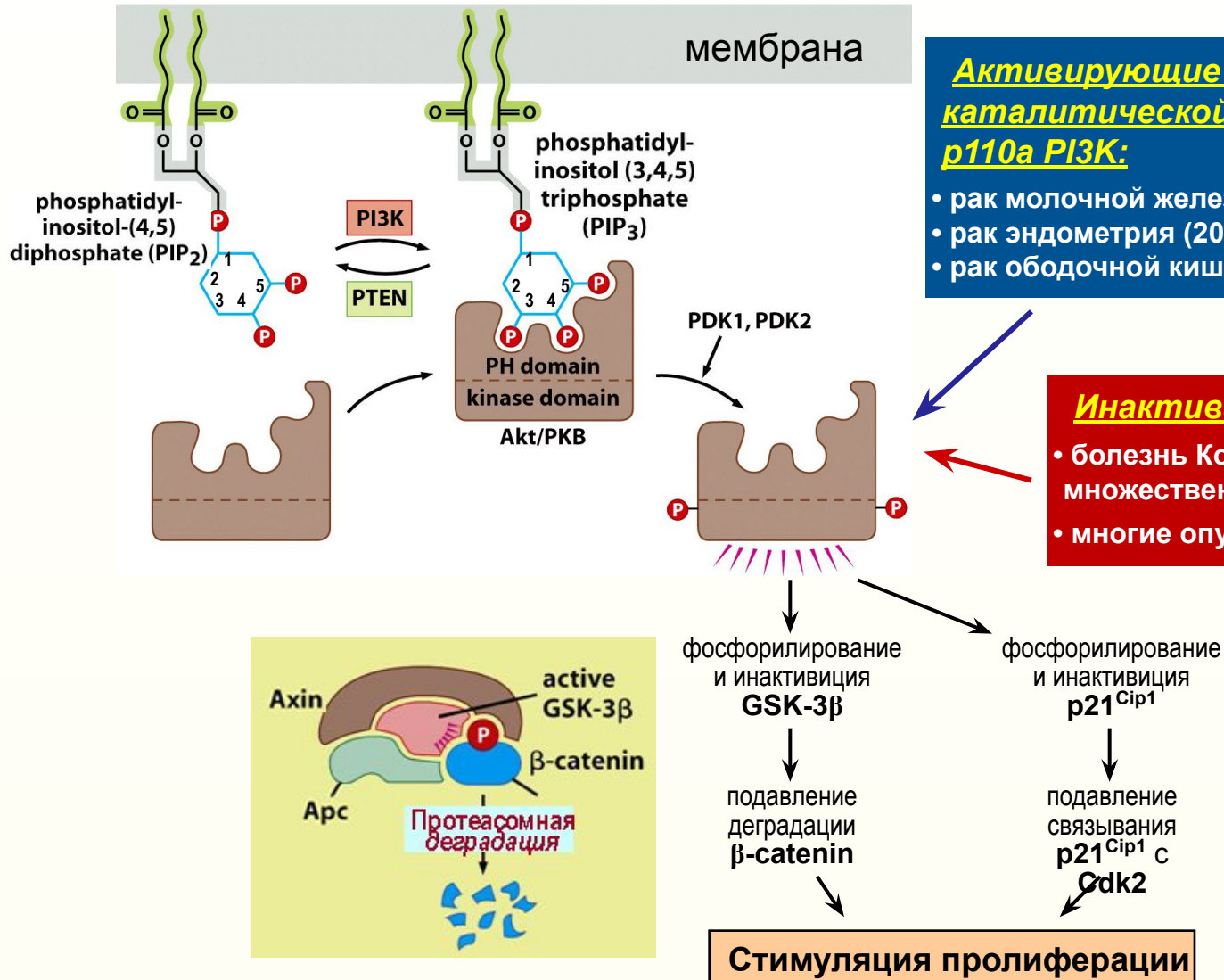
2. Удаление полипов при колоноскопии снижает частоту ненаследственного рака кишки



Митогенные сигналы:



Сигнальный путь PI3K-PIP3-Akt в регуляции деления клеток



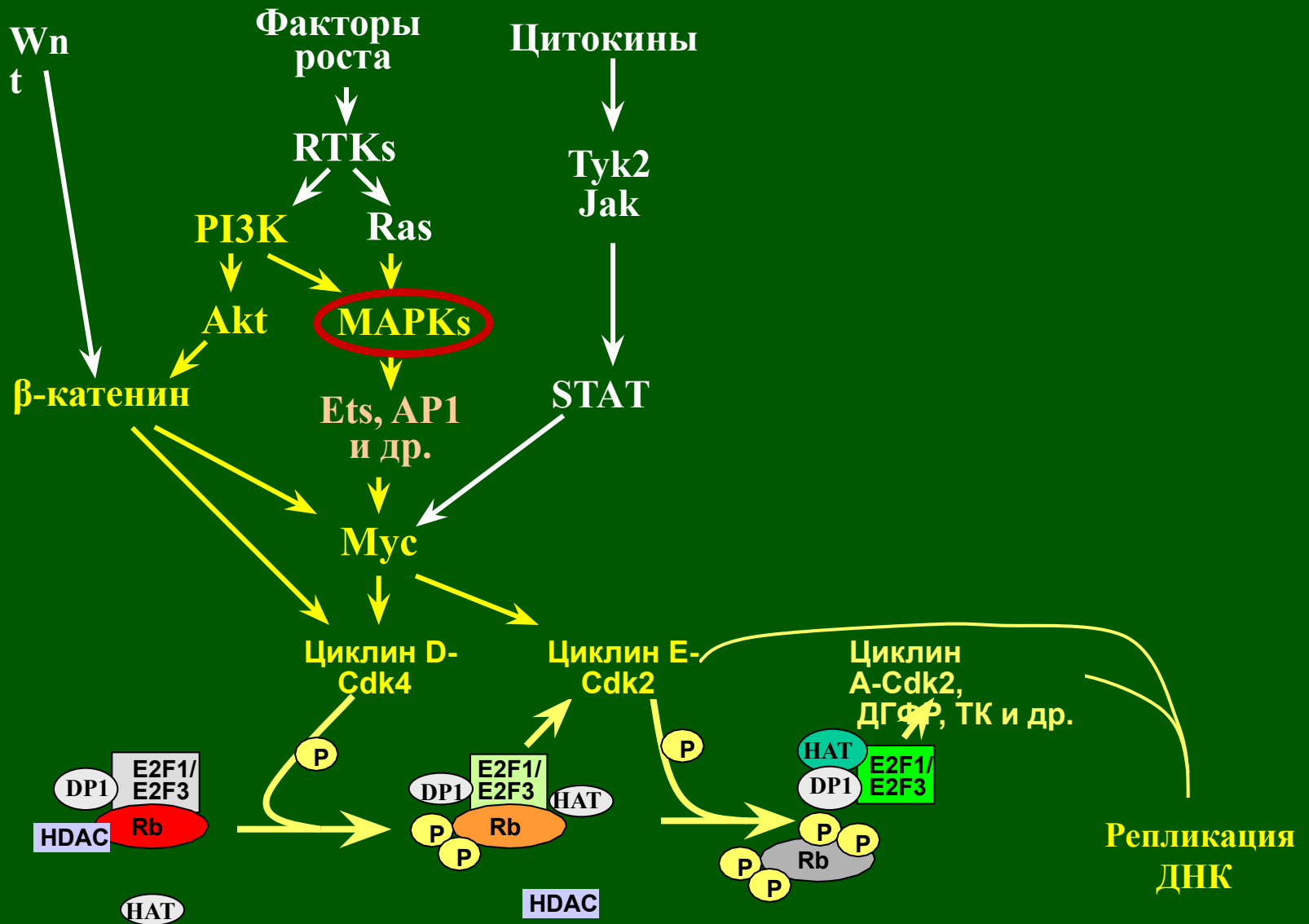
Активирующие мутации каталитической субъединицы p110α PI3K:

- рак молочной железы (25%)
- рак эндометрия (20%)
- рак ободочной кишки (15%)

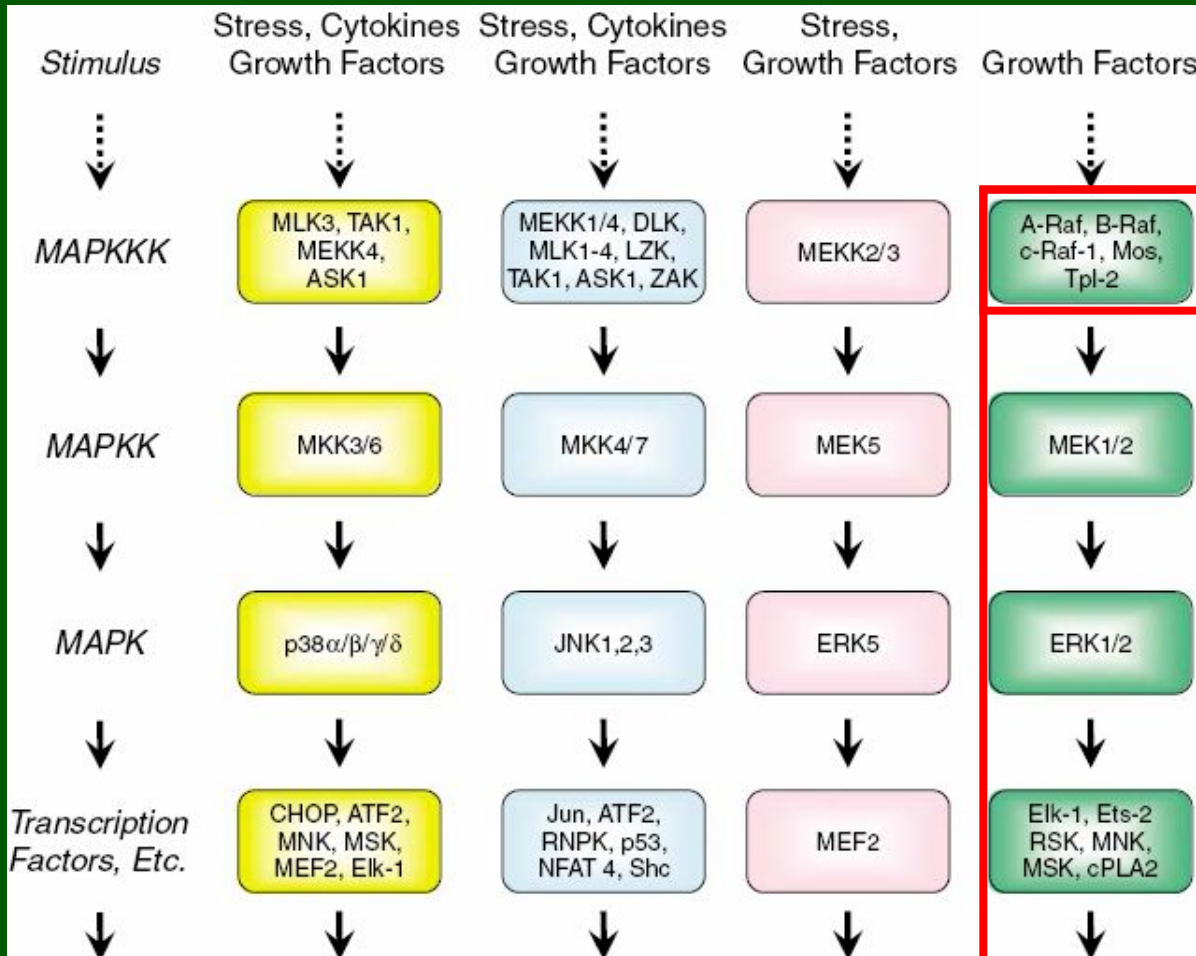
Инактивация PTEN:

- болезнь Коудена (синдром множественных гамартом)
- многие опухоли

Митогенные сигналы:



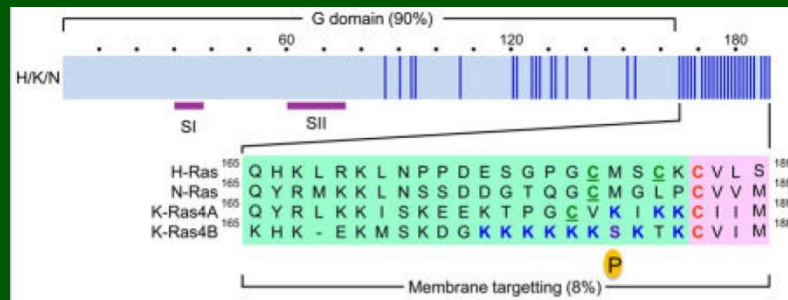
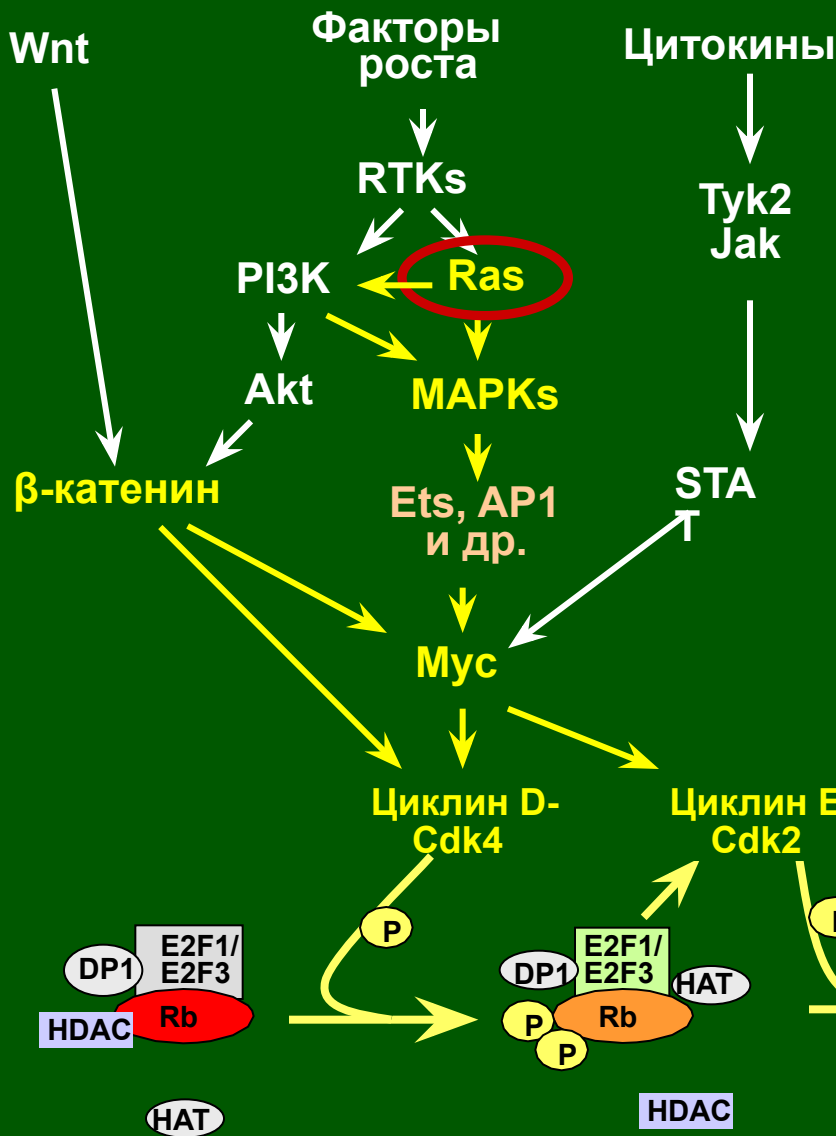
Для ряда опухолей человека характерны генетические изменения проксимальной MAP-киназы (MAPKKK) Raf



Активирующие мутации B-Raf:

- меланома (70%)
- рак щитовидной железы (50%)
- рак ободочной кишки (10%)

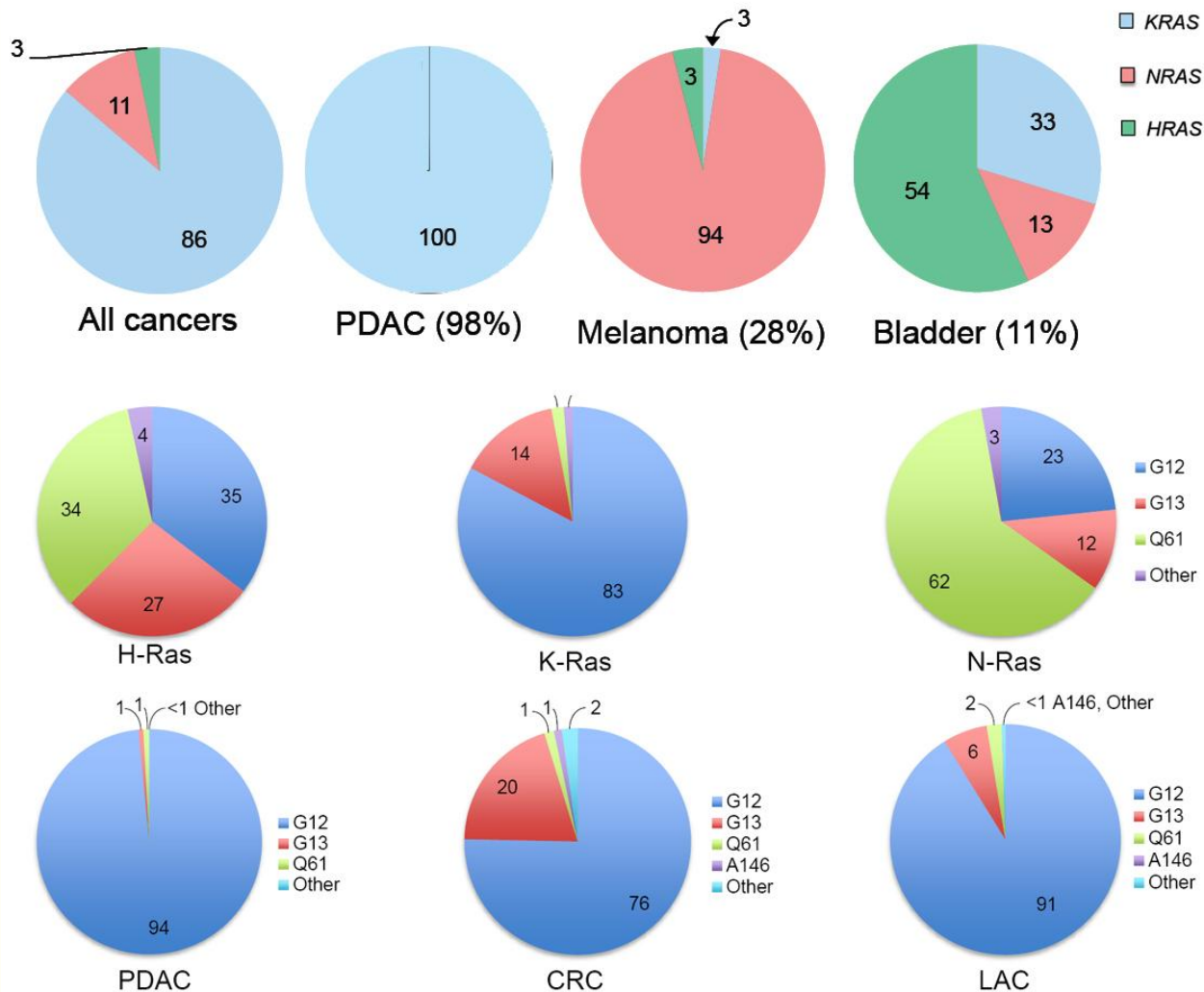
Митогенные сигналы:



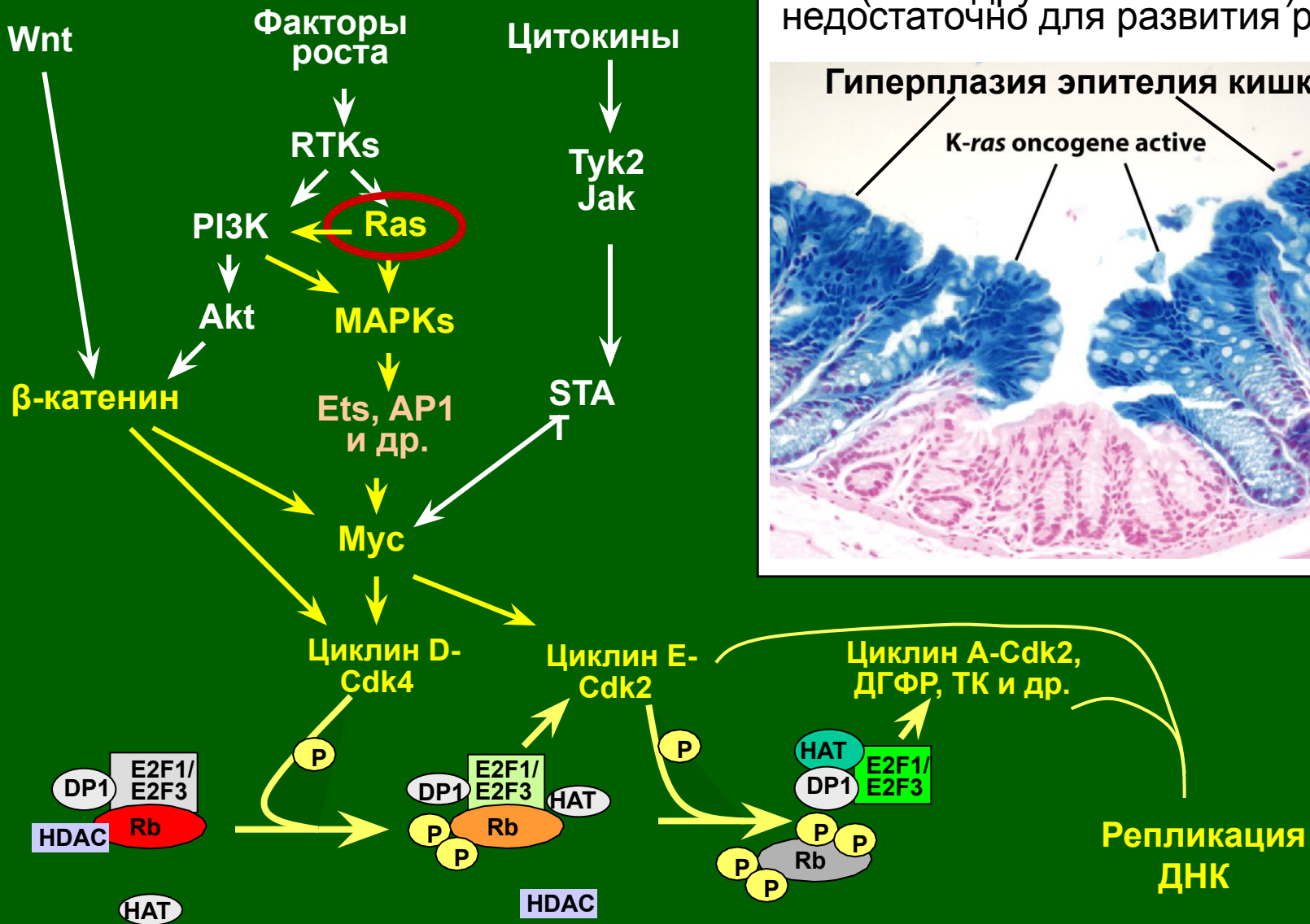
Активирующие мутации Ras (K-, H-, N-):

- рак поджелудочной железы (95%, K-)
- рак ободочной кишки (50%, K-)
- множественная миелома (40%, K- + N-)
- рак легкого (30%, K-)
- меланома (30%, N-)
- многие другие опухоли (20-25%)

Спектр мутаций генов семейства RAS в разных типах опухолей



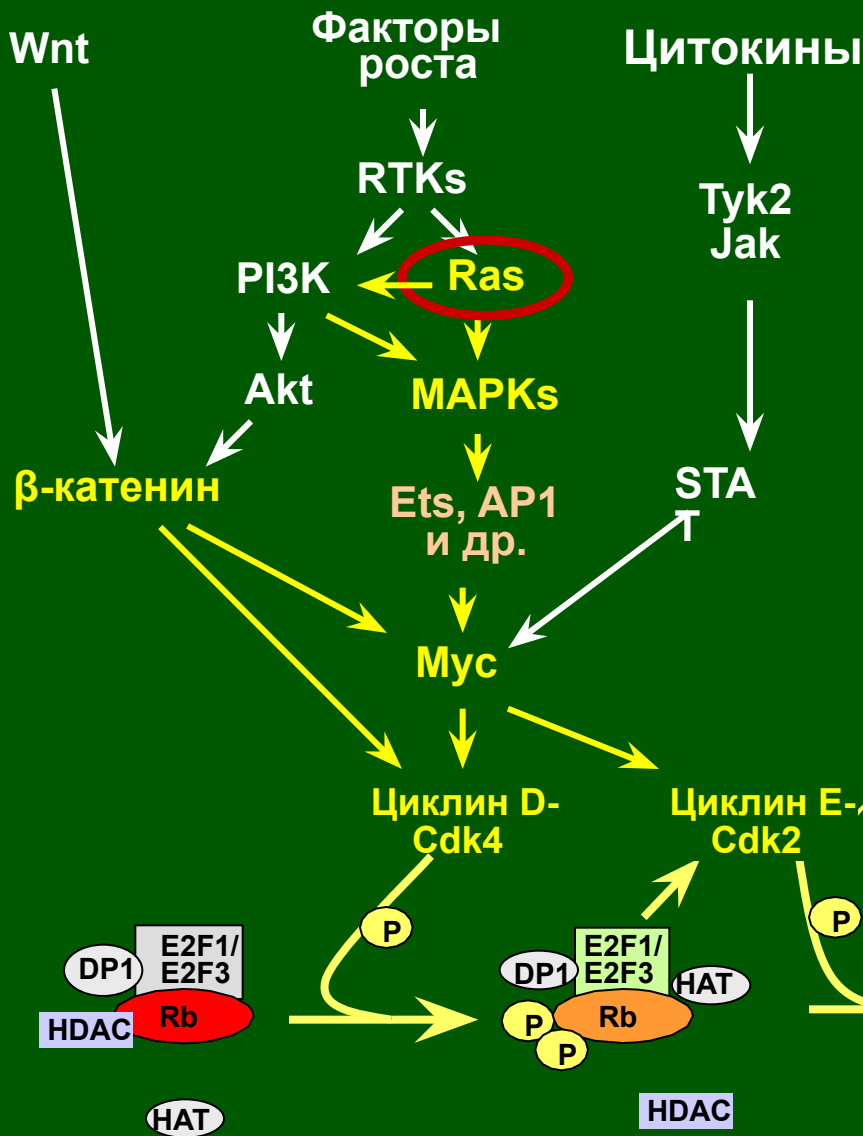
Митогенные сигналы:



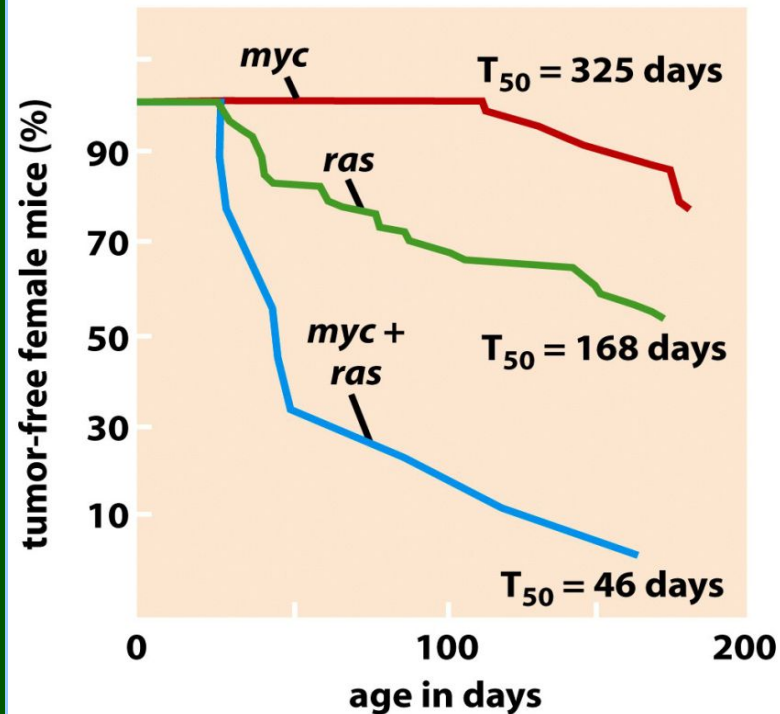
Одной мутации Ras (как и других онкогенов) недостаточно для развития рака



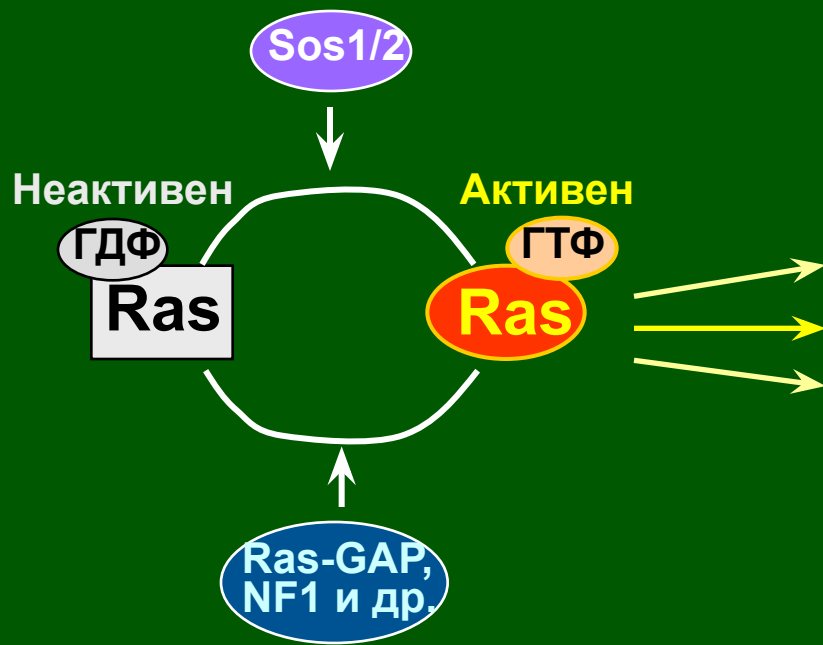
Митогенные сигналы:



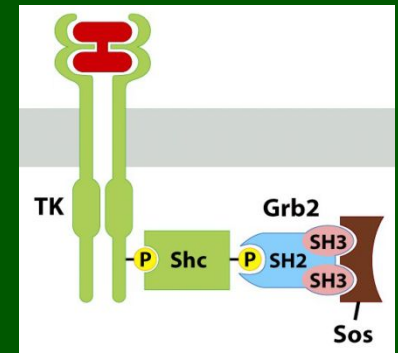
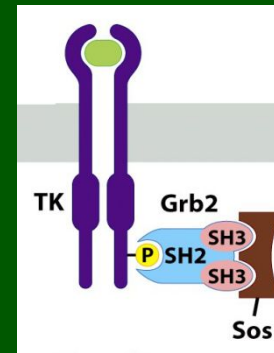
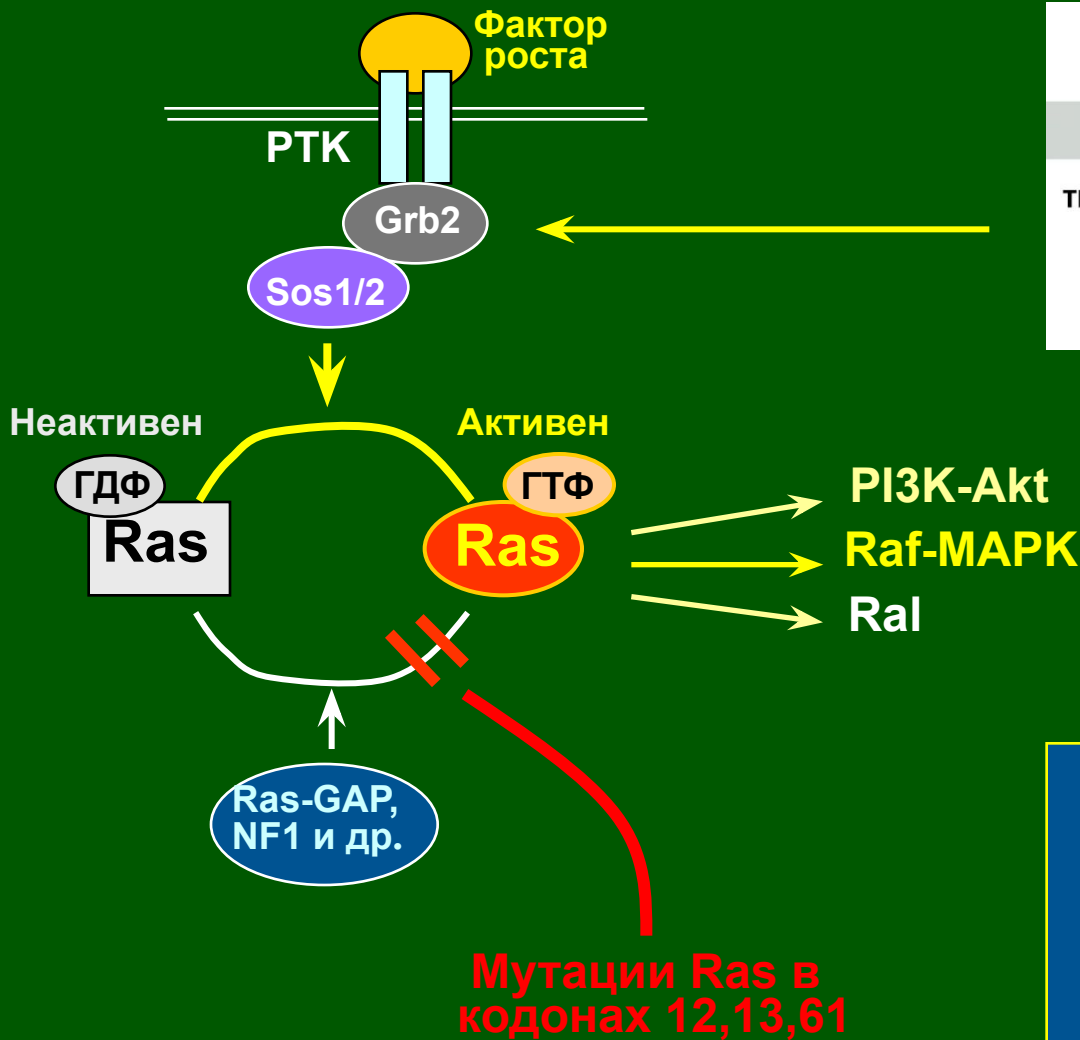
Рак молочной железы у мышей с трансгенами MMTV-ras, MMTV-myc



Алгоритм функционирования белков Ras



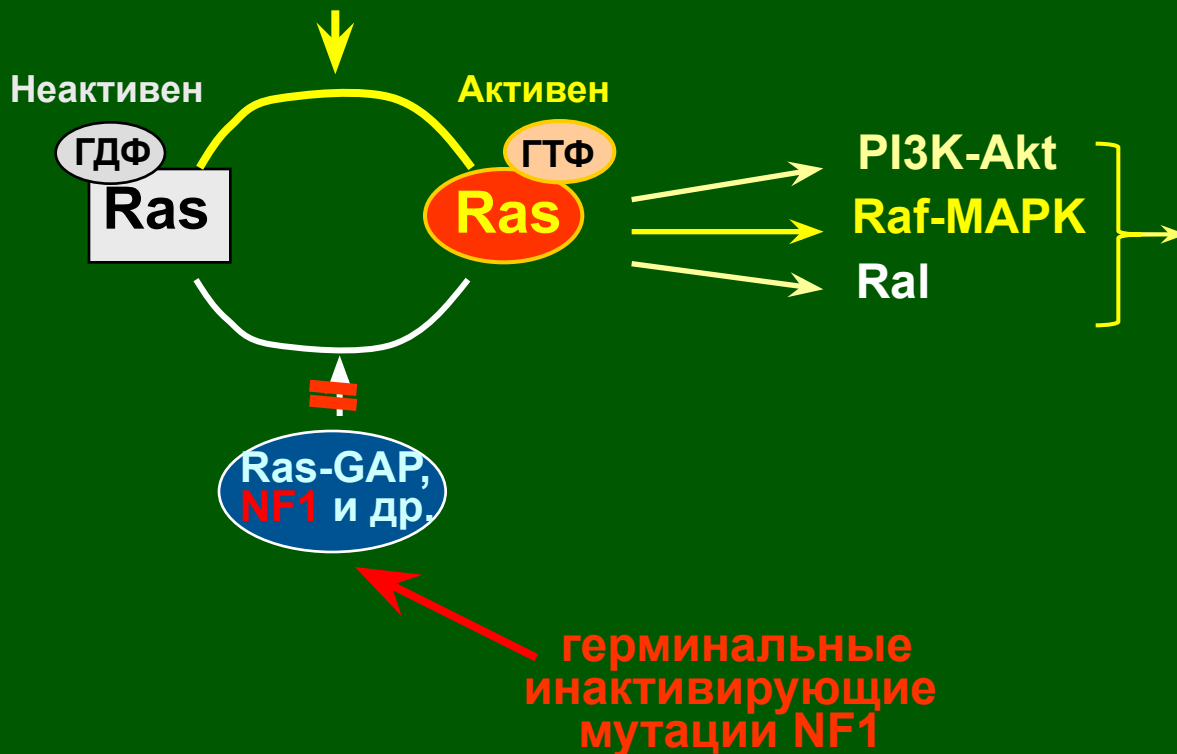
Алгоритм функционирования белков Ras



Стимуляция размножения
(изменения активности циклинзависимых киназ - увеличение синтеза и стабильности циклина D1 и др.)

Стимуляция движения клетки, подавление апоптоза, генетическая нестабильность индукция ангиогенеза

Алгоритм функционирования белков Ras



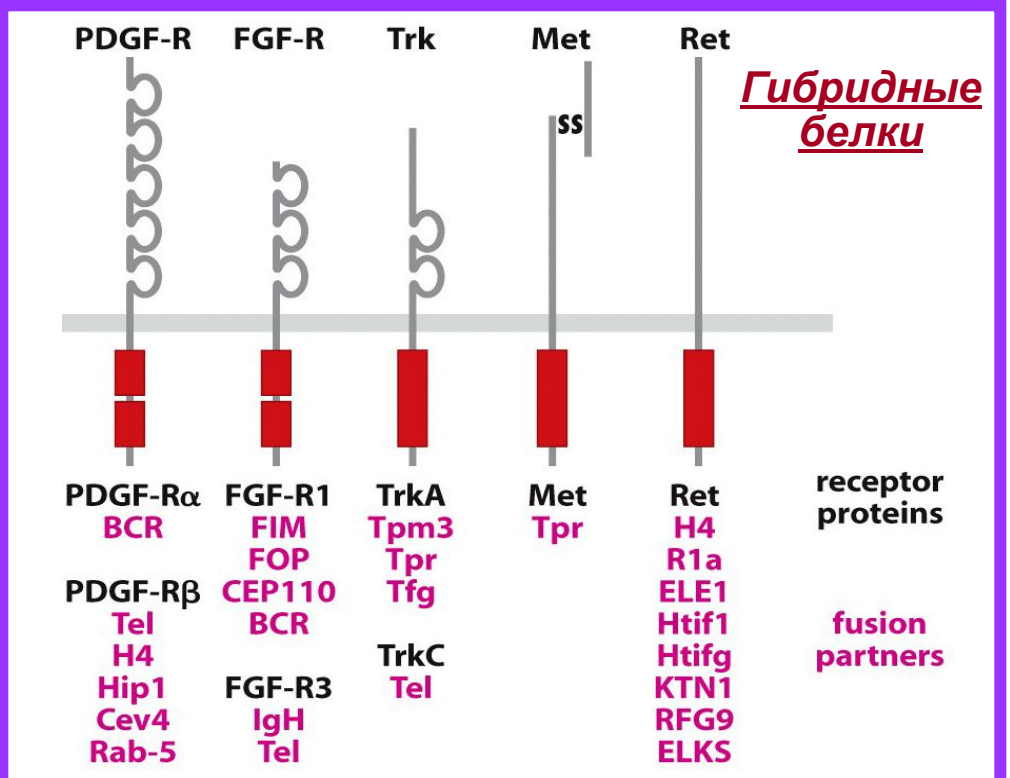
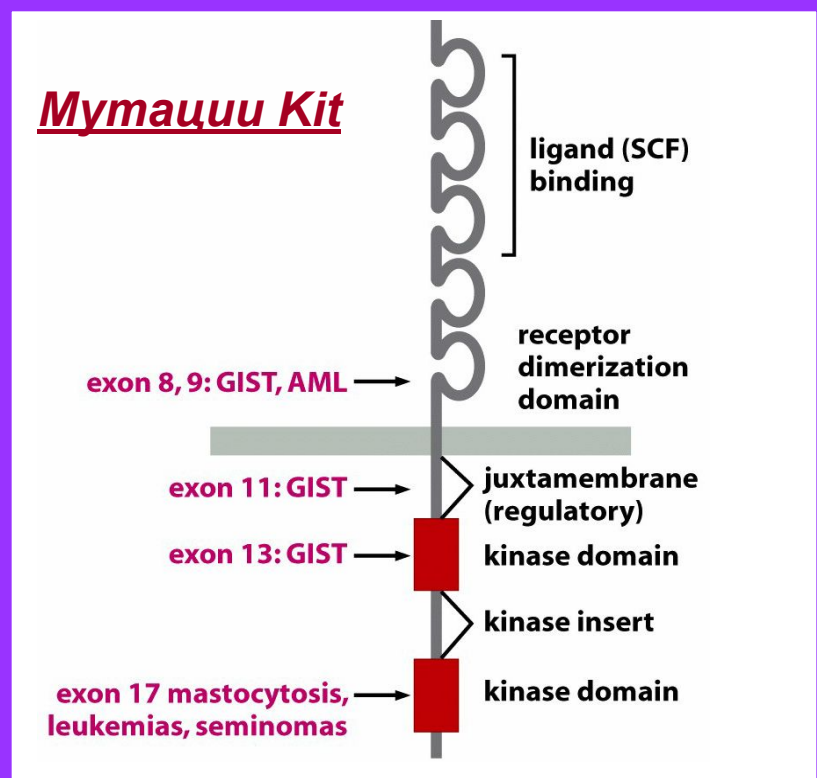
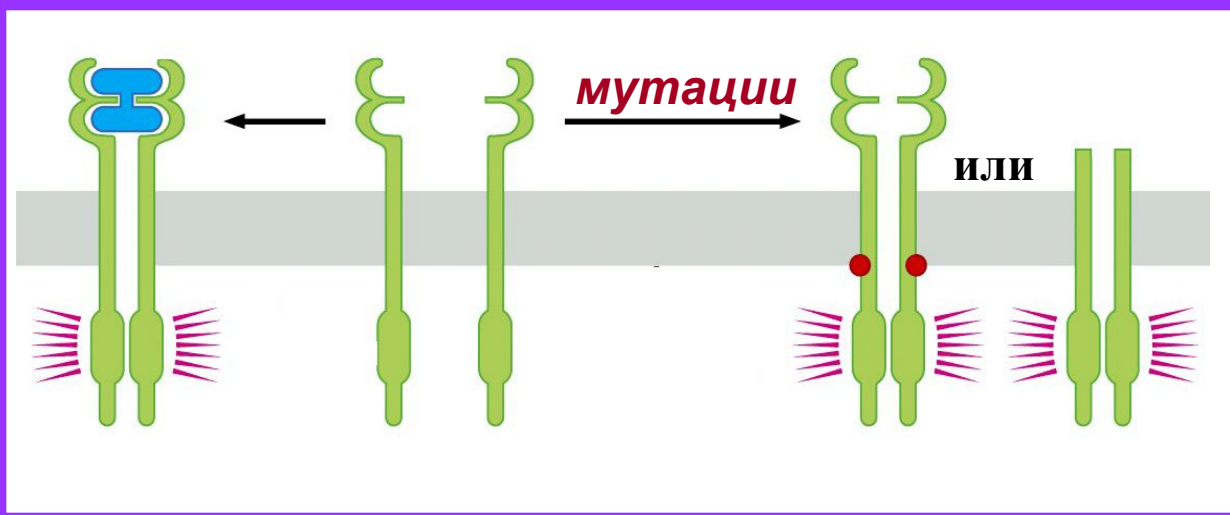
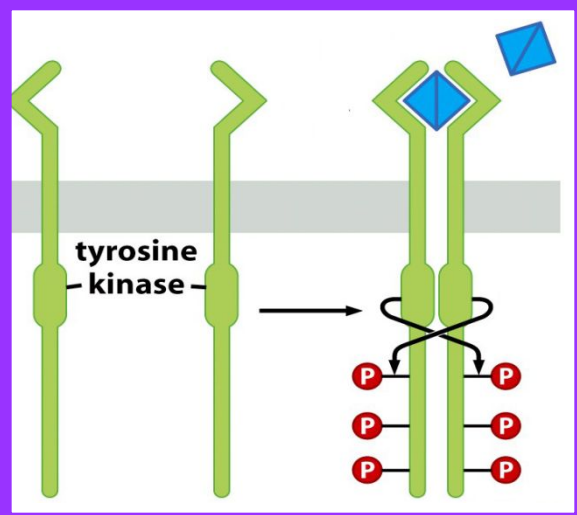
Нейрофиброматоз 1
(болезнь Реклингаузена),
(из шванновских клеток)



Митогенные сигналы:



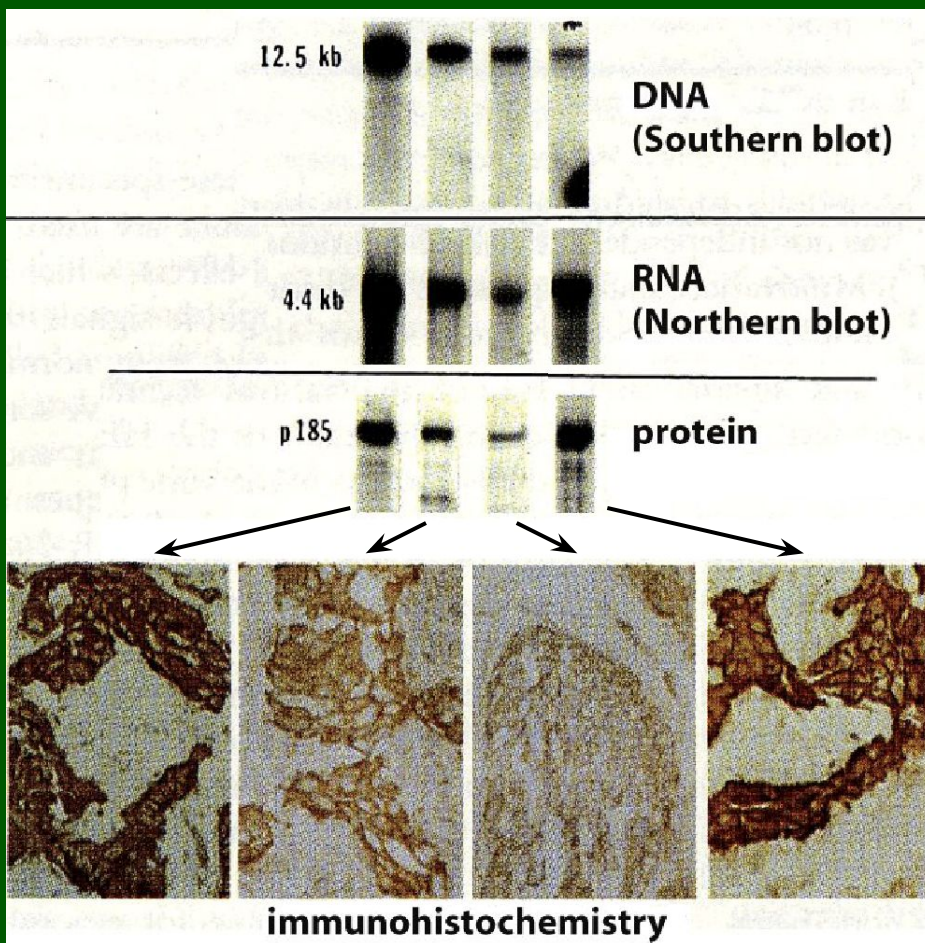
Пути активации рецепторов факторов роста



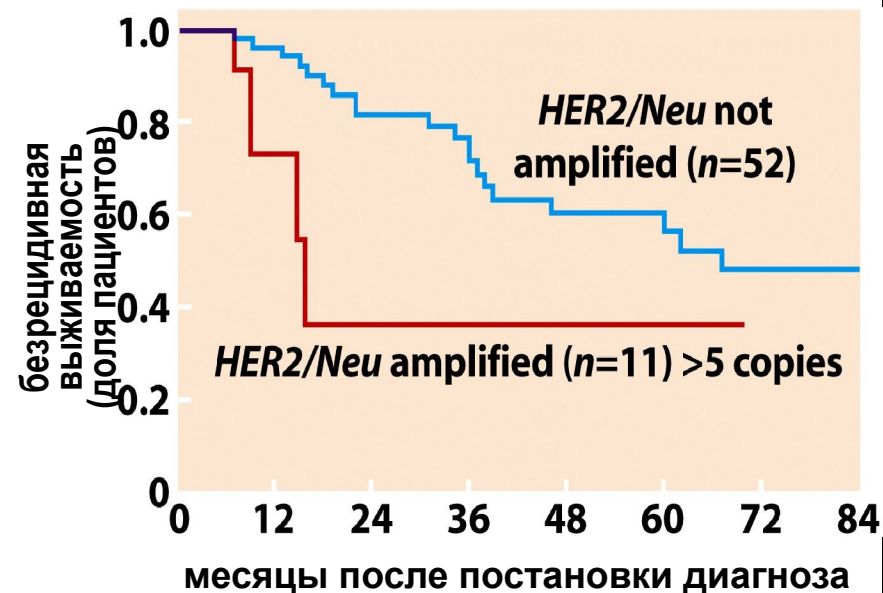
Характерные для опухолей человека изменения рецепторов факторов роста

Рецептор	Лиганд	Изменение	Опухоли
EGFR/ErbB1	EGF, TGF α	делеция эктодомена, амплификация и др.	рак легкого, молочной железы, кишки, желудка и др.
ErbB2/HER2	NRG, EGF	амплификация и/или гиперэкспрессия	рак молочной железы (30%)
Kit	SCF	миссенс-мутации	гастроинтестинальные стромальные опухоли (GIST)
GDNFR/Ret	GDNF, нейртурин	точечные мутации, хром. транслокации слитые белки →	рак щитовидной железы, множественные эндокринные неоплазии (MEN2A, MEN2B)
FGFR3	FGF	миссенс-мутации, гиперэкспрессия	множественная миелома, рак мочевого пузыря, шейки матки
Flt3	FL	тандемные дупликации	острый миелолейкоз

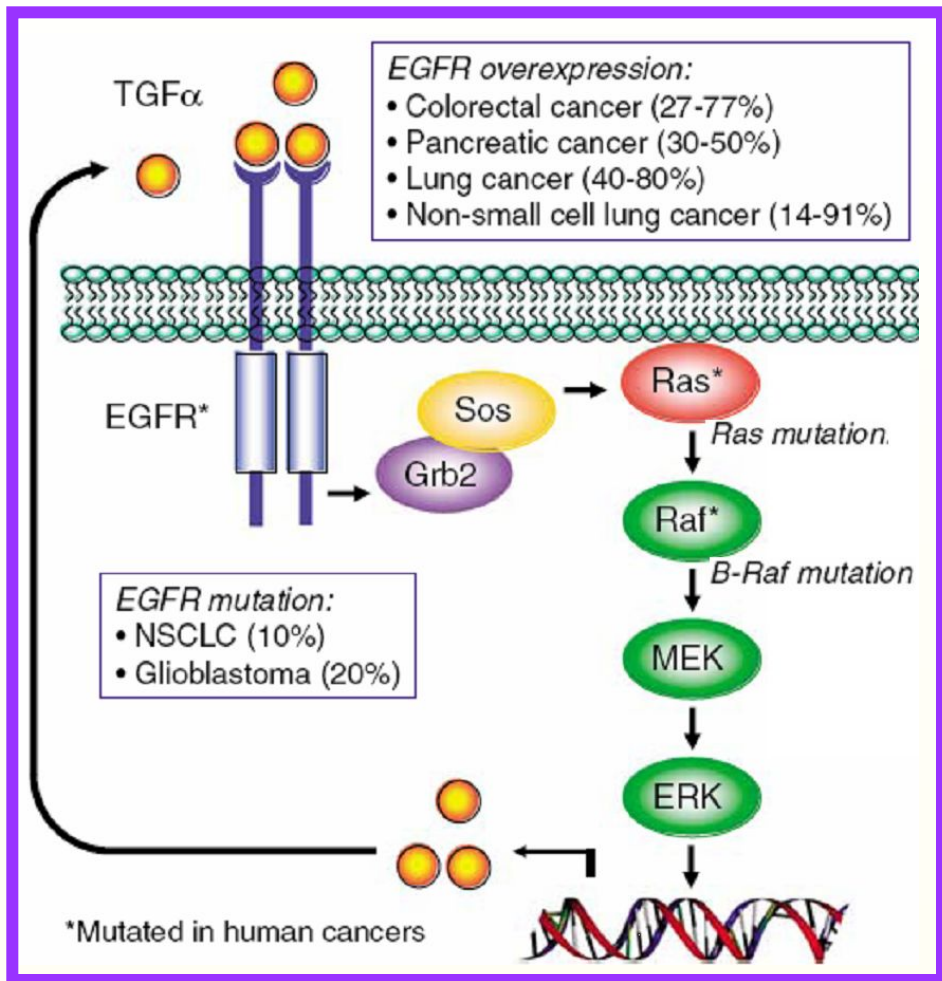
Амплификация и/или гиперэкспрессия *ERBB2/HER2/NEU* при раке молочной железы



Влияние амплификации *HER2/NEU* на течение болезни



Для неопластических клеток характерны изменения, придающие им способность продуцировать факторы роста, стимулирующие их собственное размножение (аутокринная регуляция)



Примеры опухолей с аутокринной регуляцией

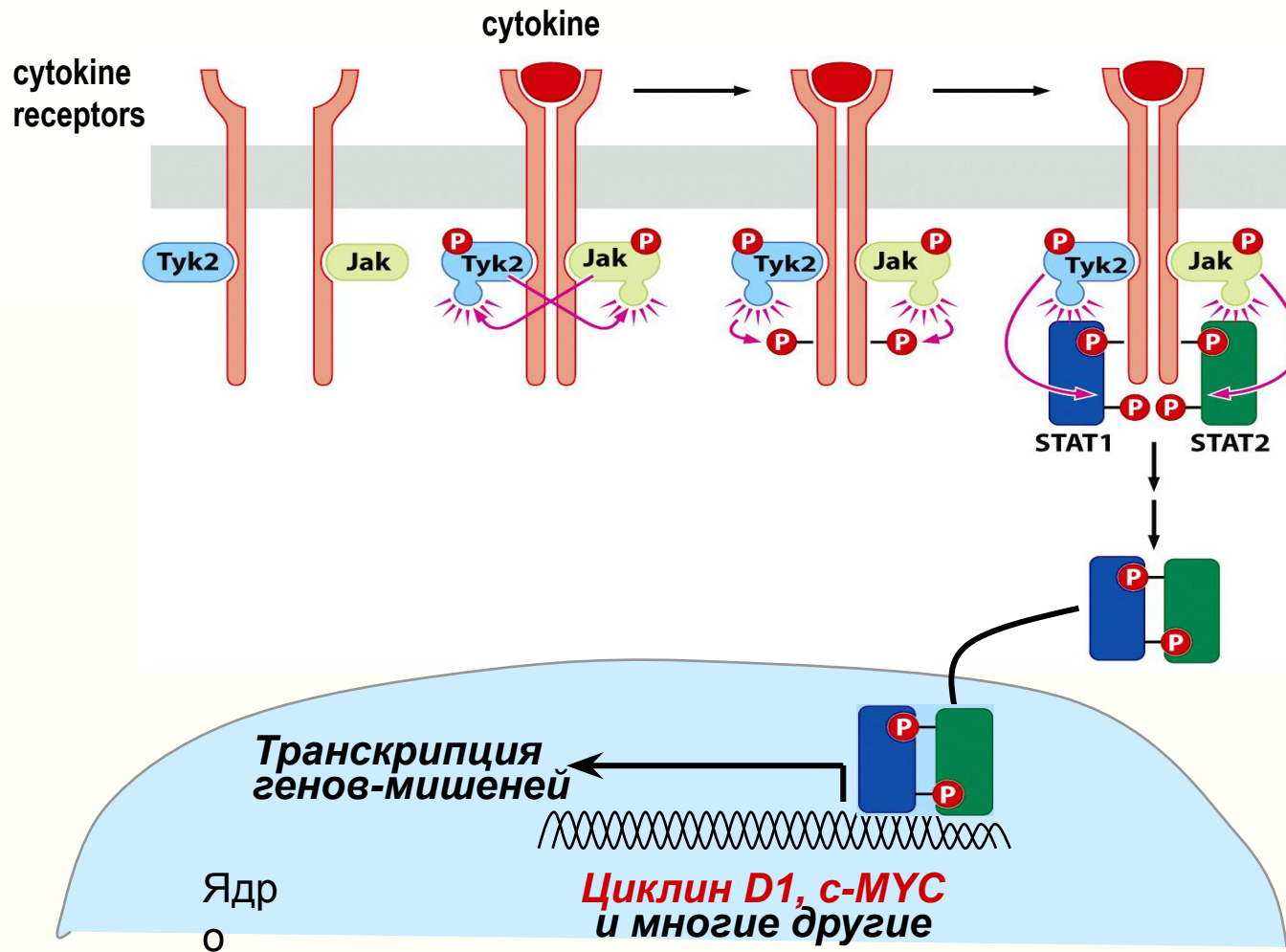
Ligand	Receptor	Tumor type(s)
HGF	Met	breast, lung cancers, osteosarcoma
IGF-2	IGF-1R	colorectal
IL-6	IL-6R	myeloma, HNSCC
IL-8	IL-8R A	bladder cancer
NRG	ErbB2/ErbB3	ovarian carcinoma
PDGF-BB	PDGF-R α/β	osteosarcoma, glioma
PDGF-C	PDGF- α/β	Ewing's sarcoma
PRL	PRL-R	breast carcinoma
SCF	Kit	Ewing's sarcoma, SCLC
VEGF-A	VEGF-R	neuroblastoma, prostate cancer
TGF- α	EGF-R	lung, breast and prostate mesothelioma, pancreatic

Митогенные сигналы:

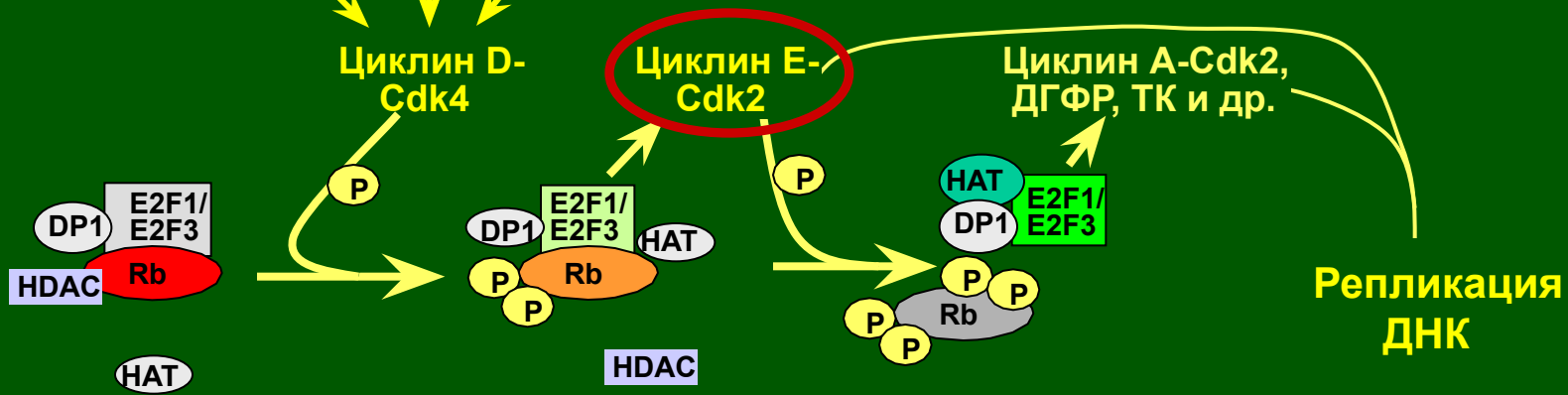
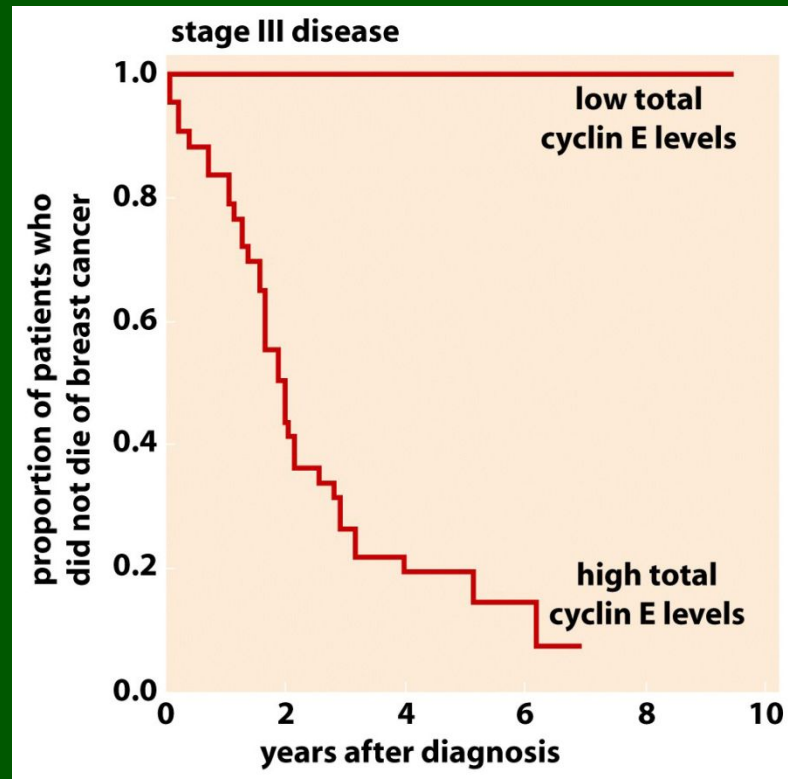
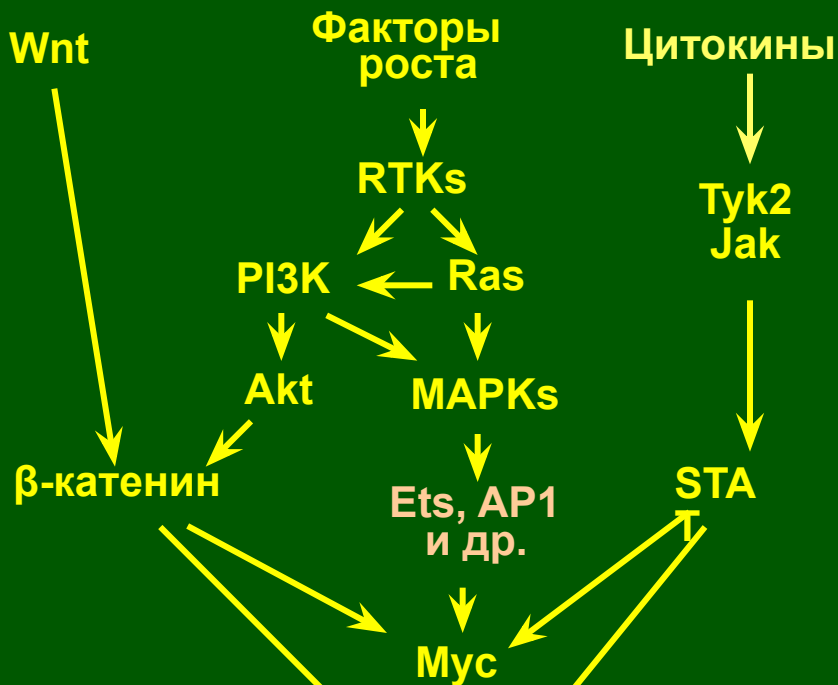


Рецепторы цитокинов не имеют собственных тирозин-киназных доменов. Вместо этого они образуют нековалентные комплексы с тирозин-киназами семейства Jak (JAK1, JAK2, JAK3, TYK2)

Сигнальный путь Jak-STAT в регуляции деления клеток



Митогенные сигналы:



Примеры изменений различных протоонкогенов, контролирующих вход в S-фазу, в новообразованиях человека

Рецепторные тирозинкиназы:

мутации, инверсии RET/GDNF-R
амплификация ERBB2/HER2
транслокации PDGF-Rb

Рак щитовидной железы
Рак молочной железы
Острый и хрон. миелолейкозы

Подмембранные киназы:

хромосом. транслокации BCR/ABL
мутации, амплификация PIK3CA
мутации SRC

Хронический миелоидный лейкоз
Рак желудка, ободочной кишки и др.
Рак ободочной кишки

G-белки семейства Ras:

мутации K-RAS, N-RAS, H-RAS

Многие новообразования

Компоненты STAT путей:

хромосом. транслокации JAK2

Острый лимфолейкоз

Факторы транскрипции:

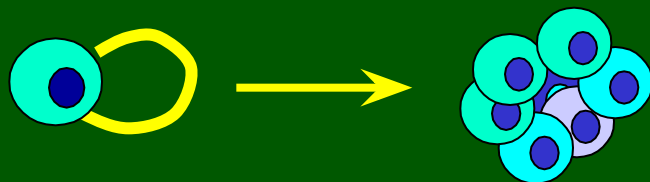
транслокации, амплификация MYC
мутации CTNNB1 (β-катенина)
хром. транслокации FLI1
мутации GLI

Лимфомы, рак молочной жел. и др.
Опухоли толстого кишечника
Саркома Юинга
Глиобластомы, рак кожи

Циклинзависимые киназы:

амплификация PRAD1/циклин D1
циклина E

Рак молочной железы, кожи,
пищевода, печени и др. опухоли



Неограниченное деление стволовых клеток опухолей

Стимуляция деления

Иммортализация

Пониженная потребность во
внешних сигналах для
инициации и поддержания
пролиферации
(генерирование внутренних
пролиферативных стимулов)

Отмена рост-
ингибирующих
сигналов и/или
нечувствительность
к их действию

Высокая активность
теломеразы, поддержание
нормальной структуры
концов хромосом

Нечувствительность к рост-супрессирующим сигналам

1. Отсутствие “контактного торможения” размножения клеток

Нормальные клетки



Размножение



Остановка размножения

Опухолевые клетки



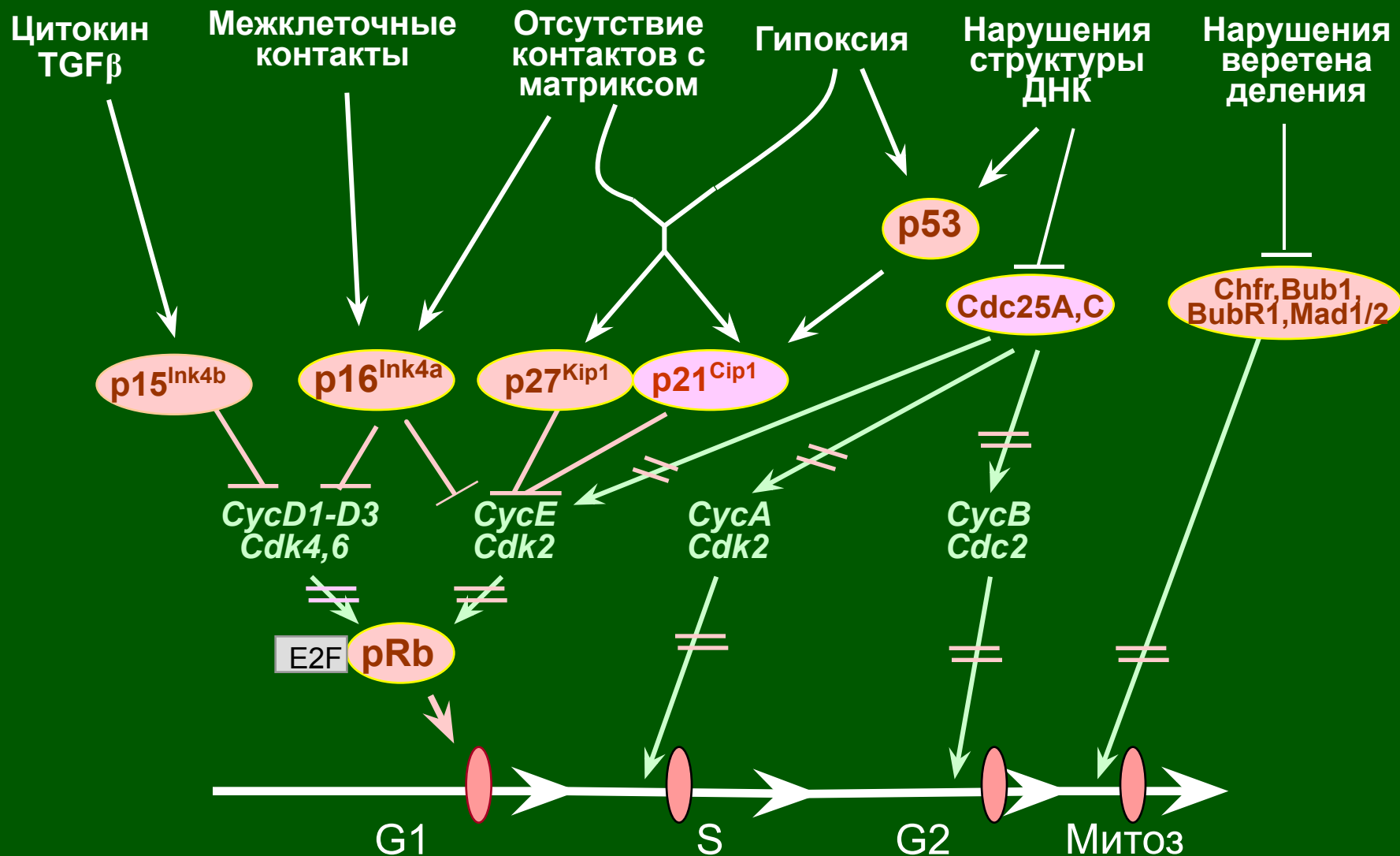
Продолжение размножения



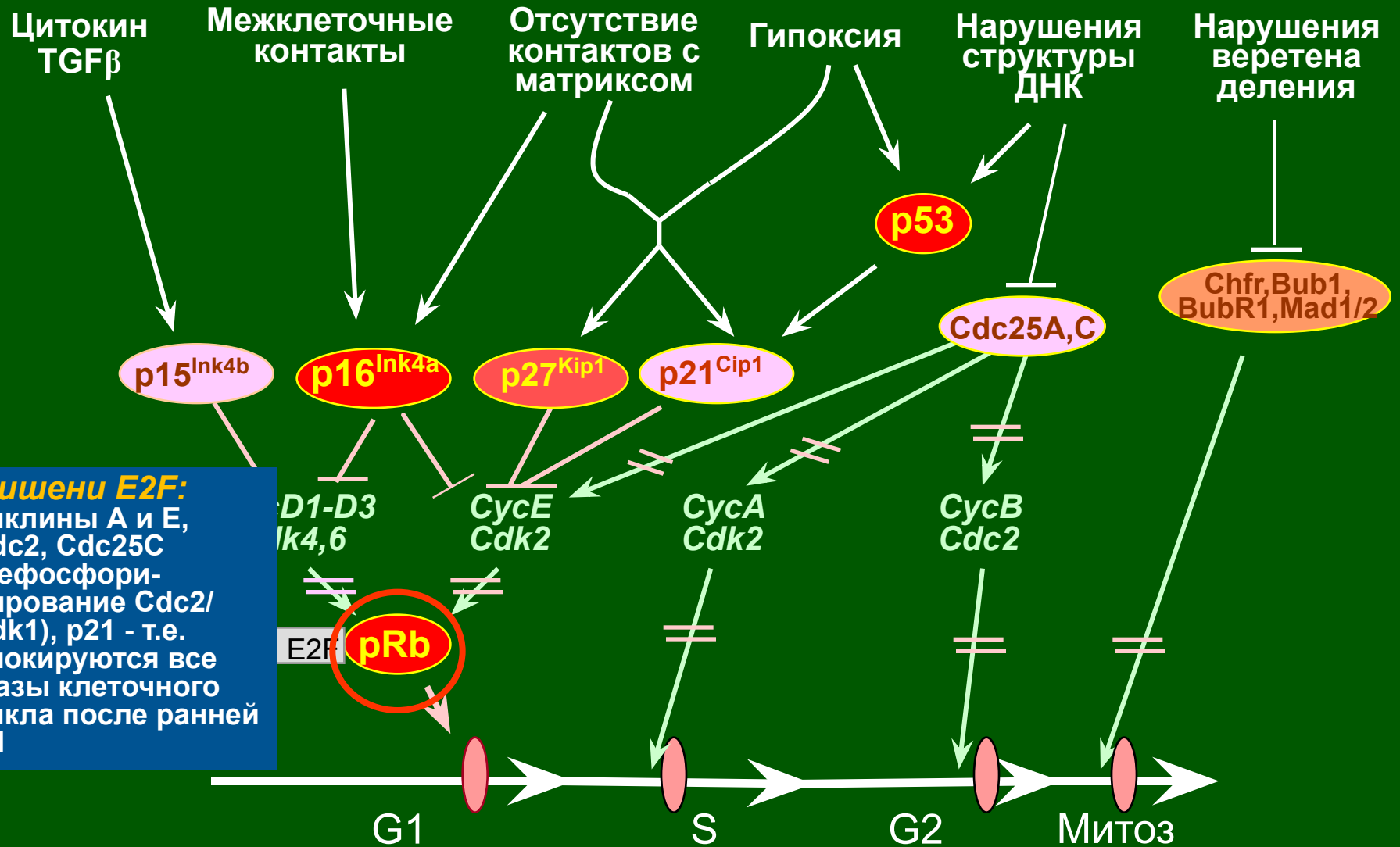
Продолжение размножения

2. Отсутствие остановки клеточного цикла при действии ингибирующих цитокинов, повреждениях ДНК, недостатке пула нуклеотидов и других неблагоприятных воздействиях

Различные рост-ингибирующие воздействия вызывают активацию чекпойнтов и остановку клеточного цикла



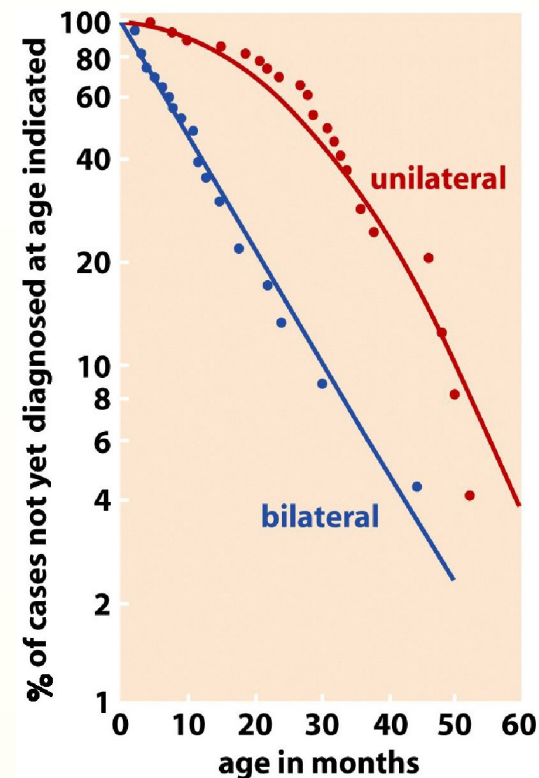
Компоненты трансдукции рост-ингибирующих сигналов являются опухолевыми супрессорами



Ретинобластома – опухоль из предшественников клеток сетчатки - имеет две формы: спорадическую (односторонняя) и семейную (часто двусторонняя)



Дисплазия ретины Ретинобластома



- unilateral cases (25)
- bilateral cases (23)
- two-hit theoretical curve
- one-hit theoretical curve

Семья с наследственной ретинобластомой

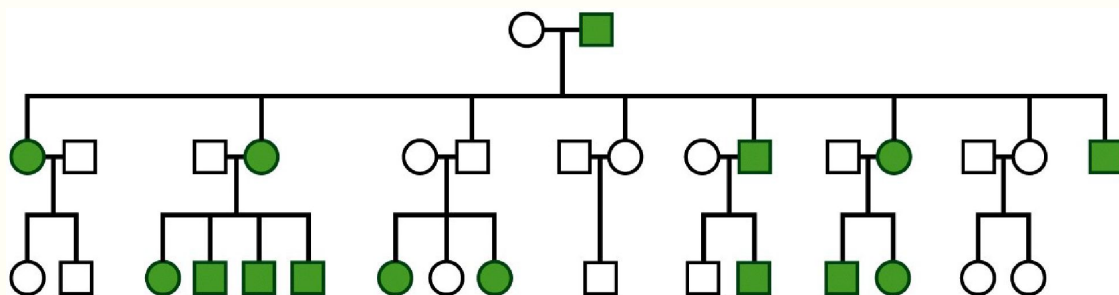
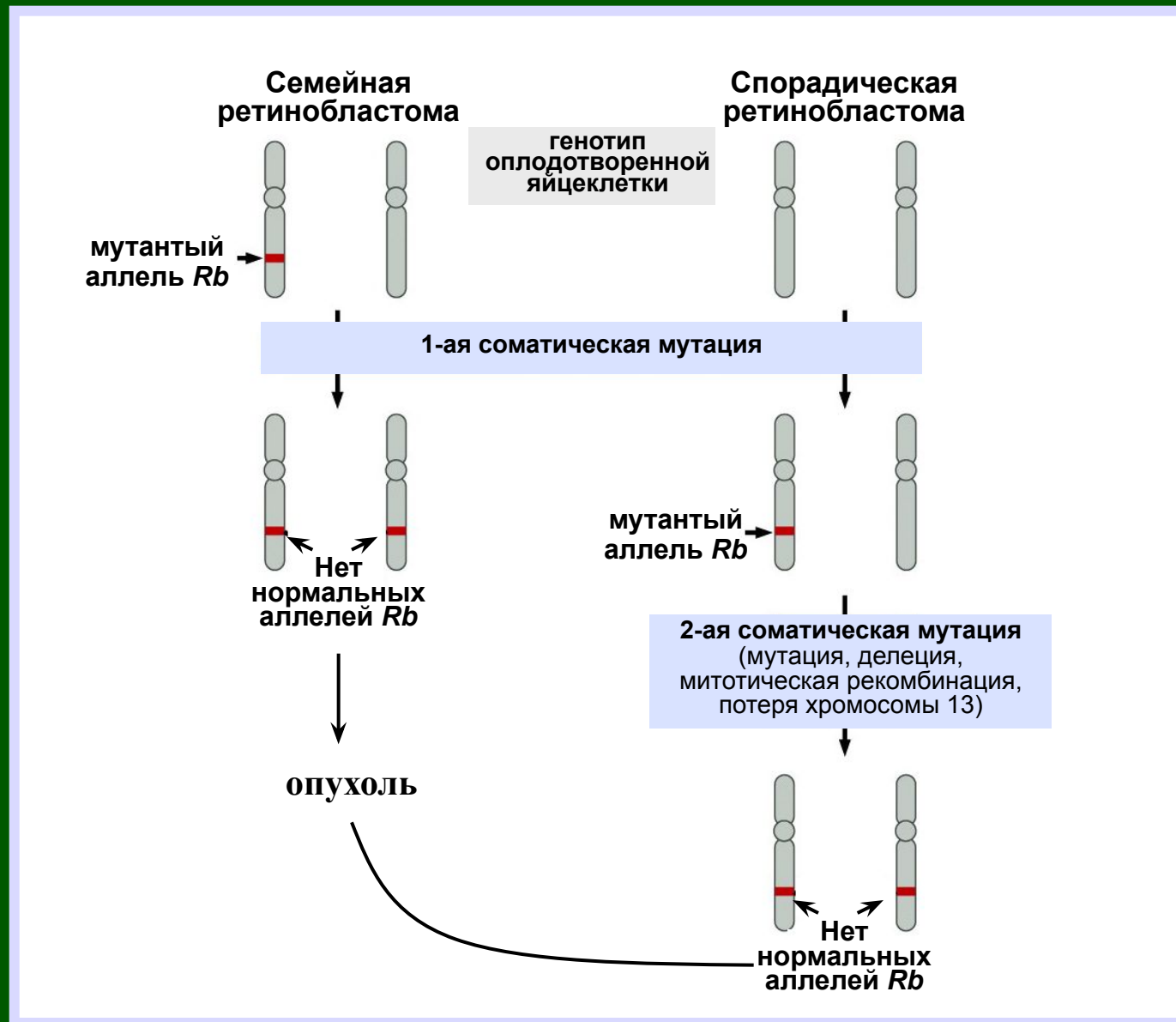


Схема развития семейных и спорадических ретинобластом



Последствия мутаций генов Rb

Человек

Герминальные мутации

RB +/- Ретинобластома, остеосаркома

Соматические мутации, метилирование (оба аллеля)

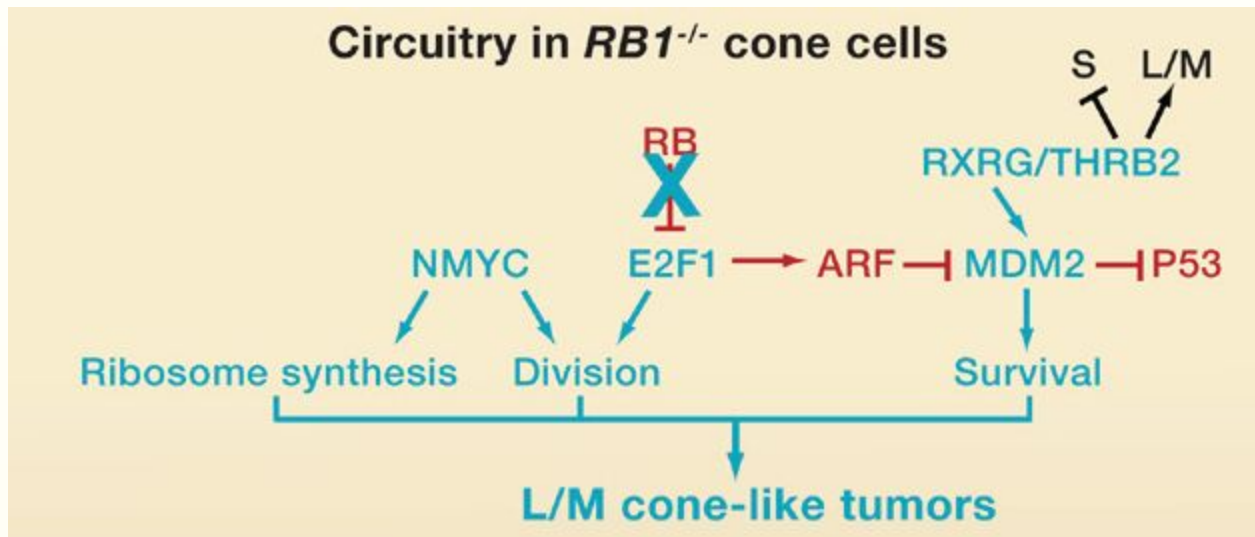
Различные новообразования

Нокаут у мышей

RB +/- Аденома гипофиза

Почему при инактивации pRb возникают именно ретинобластомы и почему у мышей другие опухоли?

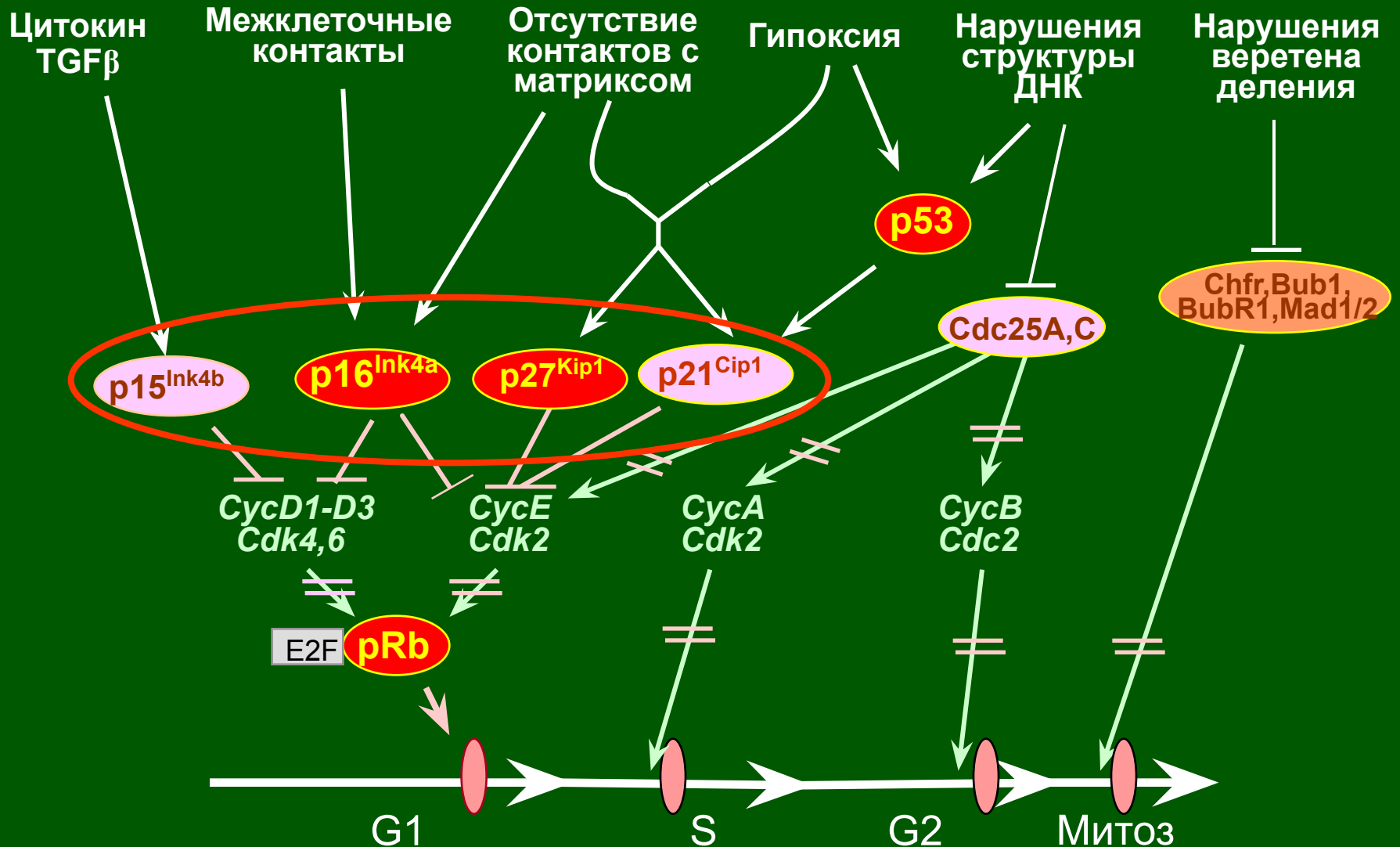
- 1) Ретинобластомы возникают из определенных предшественников колбочек (cones; ответственны за цветное зрение)
- 2) Ряд особенностей предшественников колбочек по сравнению с др. клетками (конститутивная активность NMYC, MDM2) обеспечивает их жизнеспособность и пролиферацию при инактивации pRb



Xu et al., *Cell*, 2009 Jun 12;137(6):1018-1031;

Bremner, *Cell*, 2009 Jun 12;137(6):992-994

Компоненты трансдукции рост-ингибирующих сигналов являются опухолевыми супрессорами



Последствия мутаций генов Rb и CKIs

Человек

Герминальные мутации

<i>RB +/-</i>	Ретинобластома, остеосаркома
<i>p16^{INK4A} +/-</i>	Меланома
<i>p27^{KIP1} +/-</i>	Эндокринные опухоли (вариант синдрома MEN1)

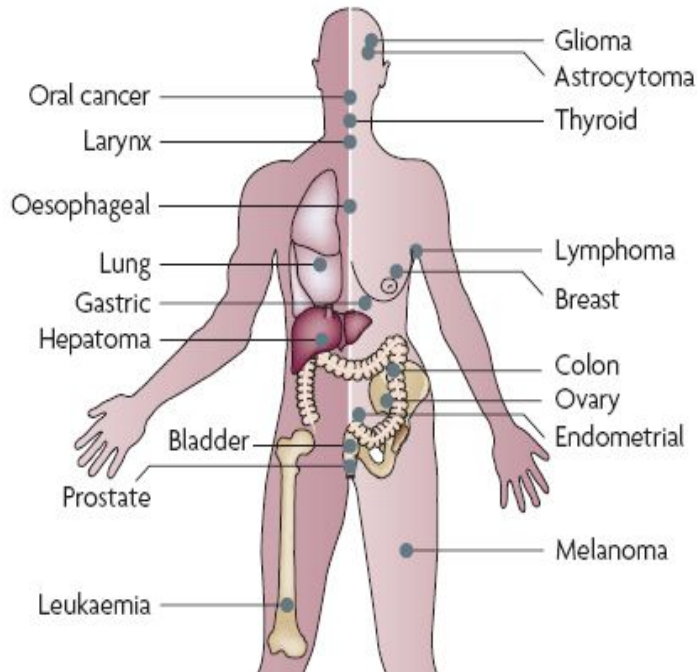
Соматические мутации, метилирование и др.

<i>RB</i>	Различные новообразования
<i>p16^{INK4A}</i>	Различные новообразования
<i>p27^{KIP1}</i>	Различные новообразования

Нокаут у мышей

<i>RB +/-</i>	Аденомы гипофиза
<i>p16^{INK4A} +/-</i>	Фибросаркома, лимфомы и др.
<i>p27^{KIP1} +/-</i>	Аденомы гипофиза
<i>p21^{CIP1} +/-</i>	Частота опухолей не повышается
<i>p15^{INK4B} +/-</i>	Частота опухолей не повышается

Подавление антипролиферативной функции p27^{Kip1} в новообразованиях человека

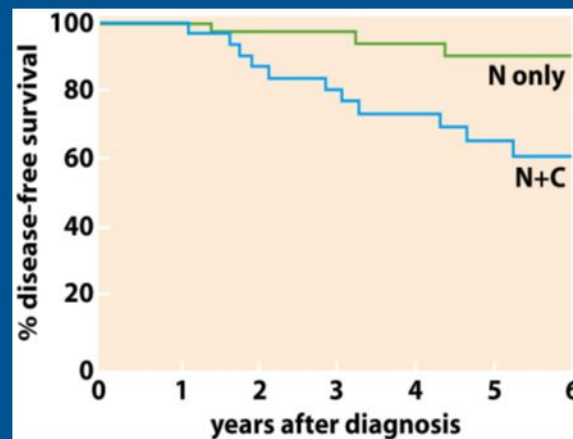
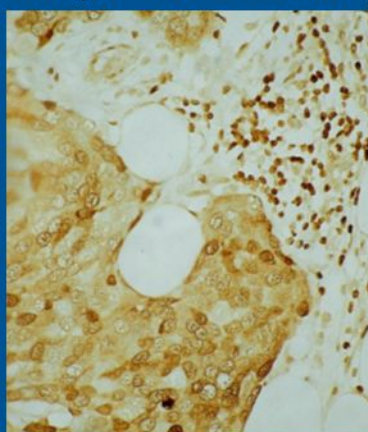
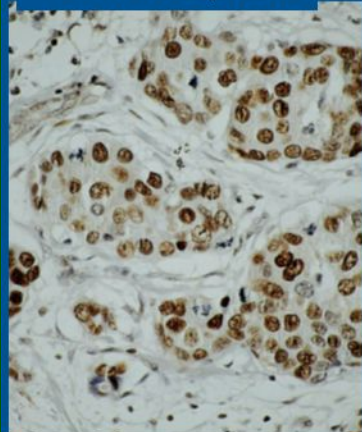


- **Герминальные и соматические мутации (MEN1, редко)**
- **Подавление транскрипции** вследствие нарушений регулирующих ген p27 транскрипционных факторов *MYC*, *MENIN*, *FOX-O*, *PML* (многие раки)
- **Подавление трансляции** вследствие гиперэкспрессии *miR 221/222* (многие раки);
- **Усиленная деградация** вследствие амплификации или гиперэкспрессии гена *SKP2* и др. механизмов (многие раки);
- **Подавление связывания с Cdk4/6 и секвестрации от Cdk2** из-за фосфорилирования онкобелками сем. Src, Abl (лейкозы, рак ободочной кишки и др.);
- **Транслокация из ядра в цитоплазму** вследствие фосфорилирования онкобелком Akt/PKB и др., где p27 функционирует как онкобелок, стимулируя миграцию клеток за счет регуляции RhoA (лекция 5) (многие раки)

Рак молочной железы

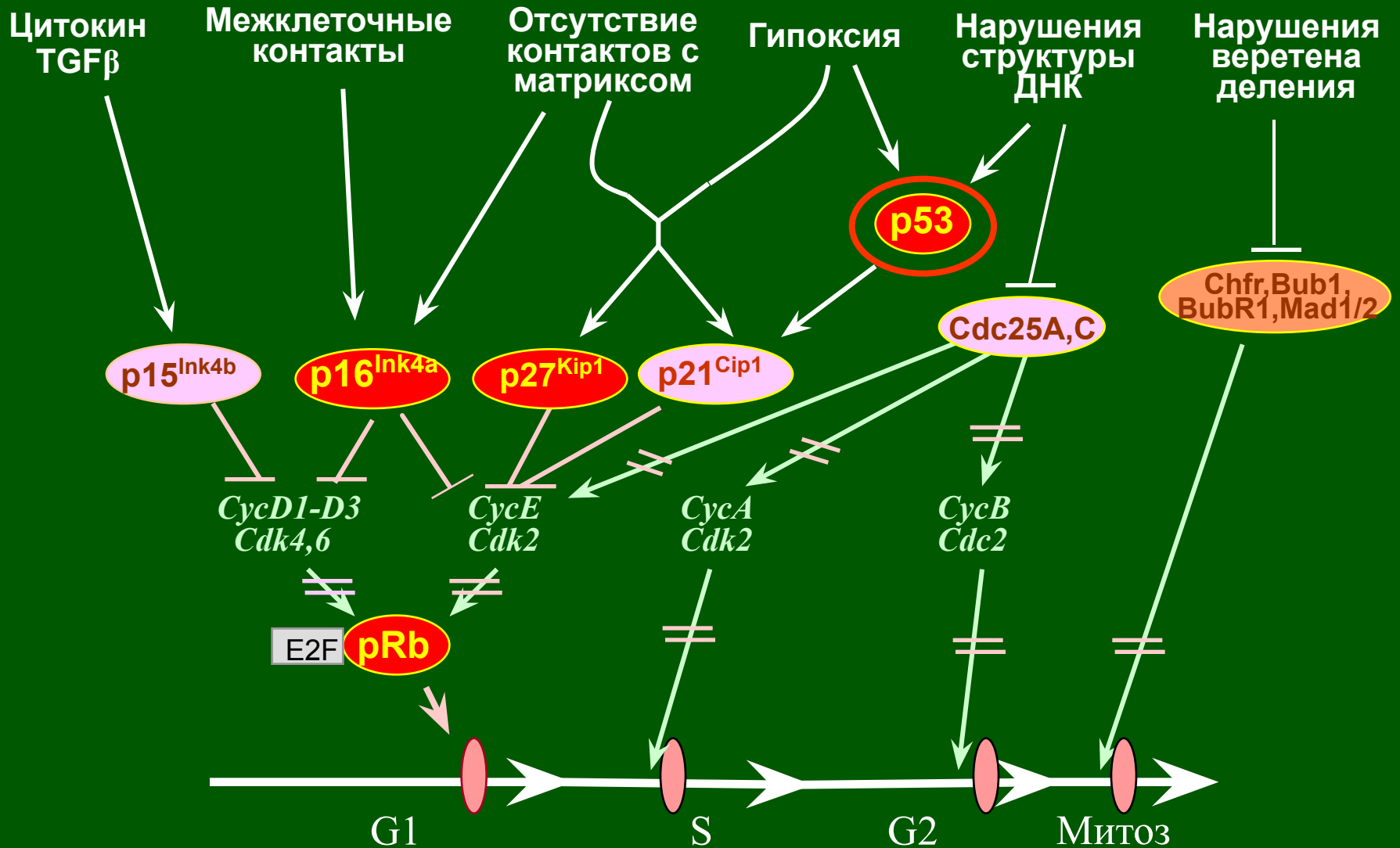
>50% ядерная

ядер<цитоплазм



Понижение экспрессии p27 или его локализация в цитоплазме является неблагоприятным фактором прогноза течения болезни

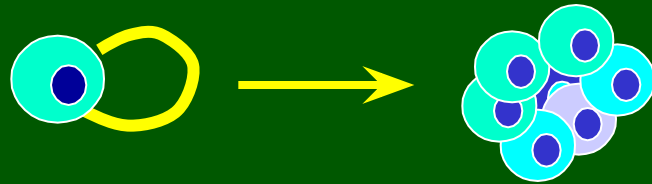
Компоненты передачи рост-ингибирующих сигналов являются опухолевыми супрессорами



Инактивация опухолевого супрессора p53 (мутации и др. аномалии) – наиболее универсальное молекулярное изменение в опухолях человека. Она характерна для большинства новообразований 50 разных типов.

Врожденные мутации p53 в половых клетках ведут к синдрому Ли-Фраумени – наследственной предрасположенности к развитию в молодом возрасте сарком, рака молочной железы, опухолей мозга, лимфолейкозов, и других новообразований.

Подробнее об инактивации p53 – в лекции 8



**Неограниченное деление
стволовых клеток опухолей**

Стимуляция деления

Иммортализация

Курс «Биология опухолевой клетки»
(2019 г.)

Н.Л. Лазаревич

Лекция 3

Иммортализация (неограниченный репликативный потенциал) стволовых клеток опухоли