

Курс «Биология опухолевой клетки»
(2019 г.)

Н.Л. Лазаревич

Лекция 4

**Подавление программируемой клеточной смерти
в опухолевых клетках**

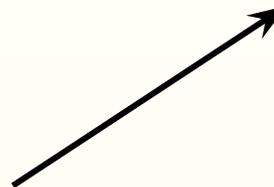
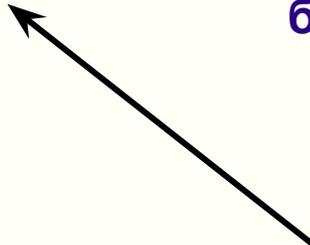
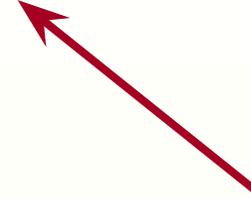
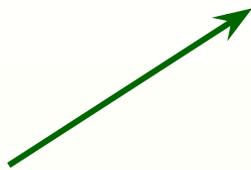
**Интенсивное и
неограниченное
во времени
деление клеток**

**Постоянная
инициация
митотических
циклов**

**Нечувствительность к
рост-ингибирующим
сигналам
(приобретение
бессмертия и др.)**

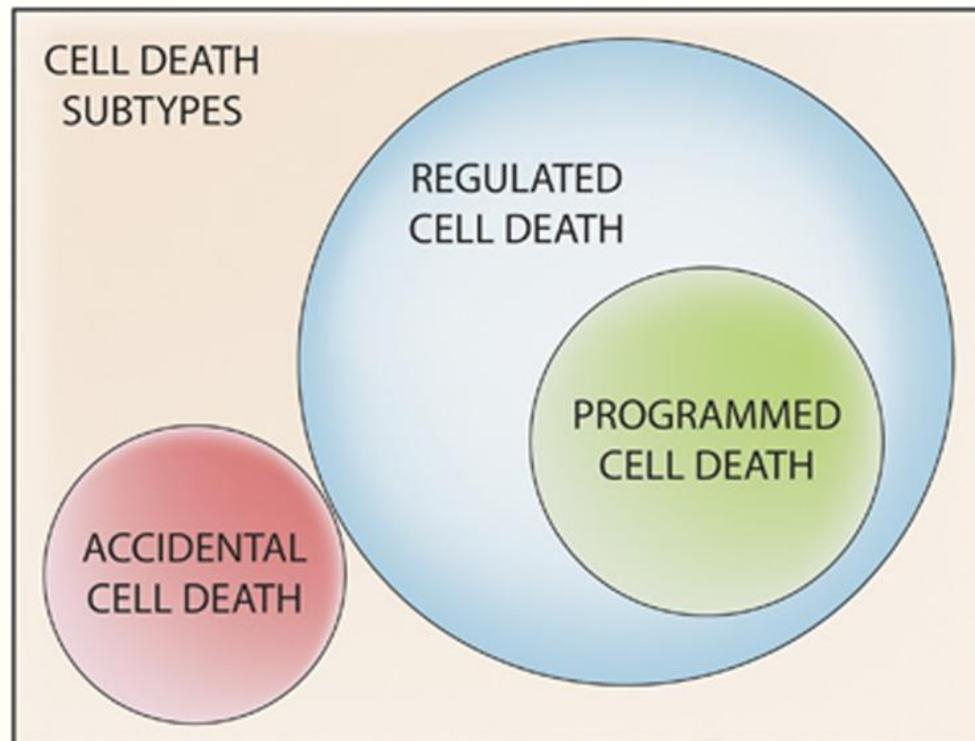
**Подавление
программируемой
гибели клеток
(апоптоза и др.)**

**Нестабильность генома
(мутации и эпигенетические изменения)**



Типы клеточной смерти

- 'Accidental cell death' (ACD) – «смерть от несчастного случая» (химические, физические или механические повреждения)
- 'Regulated cell death' (RCD) – регулируемая клеточная смерть, инициируется **генетическим аппаратом** клетки, и, следовательно, может быть модифицирована фармакологическим или генетическим воздействием. 'Programmed cell death' (PCD) реализуется как часть программы развития или для поддержания гомеостаза тканей.



Способы программируемой гибели клеток: Классификация Номенклатурного Комитета (2012)

Table 1 Functional classification of regulated cell death modes

	Main biochemical features	Caspase dependence	Examples of inhibitory interventions ^a
Anoikis	Downregulation of EGFR Inhibition of ERK1 signaling Lack of β 1-integrin engagement Overexpression of BIM Caspase-3 (-6,-7) activation	++	BCL-2 overexpression Z-VAD-fmk administration
Autophagic cell death	MAP1LC3 lipidation SQSTM1 degradation	--	VPS34 inhibitors AMBRA1, ATG5, ATG7, ATG12 or BCN1 genetic inhibition
Caspase-dependent intrinsic apoptosis	MOMP Irreversible $\Delta\psi_m$ dissipation	++	BCL-2 overexpression Z-VAD-fmk administration
Caspase-independent intrinsic apoptosis	Release of IMS proteins Respiratory chain inhibition	--	BCL-2 overexpression
Cornification	Activation of transglutaminases Caspase-14 activation	+	Genetic inhibition of TG1, TG3 or TG5 Genetic inhibition of caspase-14
Entosis	RHO activation ROCK1 activation	--	Genetic inhibition of metallothionein 2A Lysosomal inhibitors
Extrinsic apoptosis by death receptors	Death receptor signaling Caspase-8 (-10) activation BID cleavage and MOMP (in type II cells) Caspase-3 (-6,-7) activation	++	CrmA expression Genetic inhibition of caspases (8 and 3) Z-VAD-fmk administration
Extrinsic apoptosis by dependence receptors	Dependence receptor signaling PP2A activation DAPK1 activation Caspase-9 activation Caspase-3 (-6,-7) activation	++	Genetic inhibition of caspases (9 and 3) Genetic inhibition of PP2A Z-VAD-fmk administration
Mitotic catastrophe	Caspase-2 activation (in some instances) TP53 or TP73 activation (in some instances) Mitotic arrest	--	Genetic inhibition of TP53 (in some instances) Pharmacological or genetic inhibition of caspase-2 (in some instances)
Necroptosis	Death receptor signaling Caspase inhibition RIP1 and/or RIP3 activation	--	Administration of necrostatin(s) Genetic inhibition of RIP1/RIP3
Netosis	Caspase inhibition NADPH oxidase activation NET release (in some instances)	--	Autophagy inhibition NADPH oxidase inhibition Genetic inhibition of PAD4
Parthanatos	PARP1-mediated PAR accumulation Irreversible $\Delta\psi_m$ dissipation ATP and NADH depletion PAR binding to AIF and AIF nuclear translocation	--	Genetic inhibition of AIF Pharmacological or genetic inhibition of PARP1
Pyroptosis	Caspase-1 activation Caspase-7 activation Secretion of IL-1 β and IL-18	++	Administration of Z-YVAD-fmk Genetic inhibition of caspase-1

Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death and Differentiation* (2012) 19, 107–120

Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death and Differentiation* (2018) 25, 486-541

Для неопластических клеток характерно подавление большинства типов программируемой гибели клеток:

1. Апоптоз

2. Митотическая катастрофа

3. Аутофагия

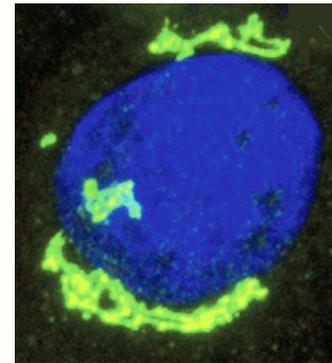
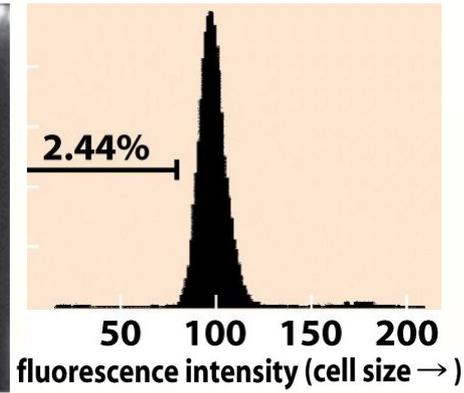
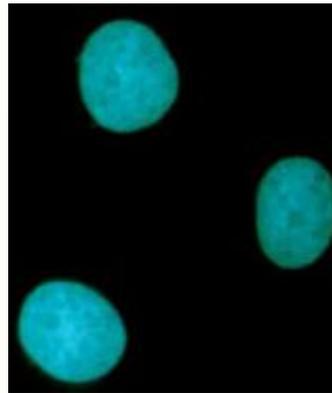
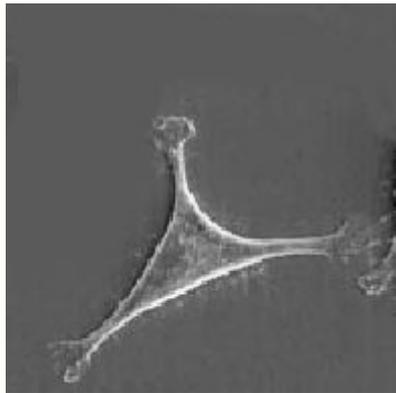
4. Некроптоз

5. Энтоз

Апоптоз - важнейший физиологический механизм элиминации из организма нежелательных клеток

Апоптоз характеризуется «блеббингом» плазматической мембраны, конденсацией ядра, расщеплением ДНК и ряда белков (*Kerr et al, 1972*)

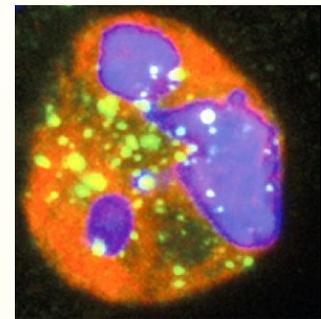
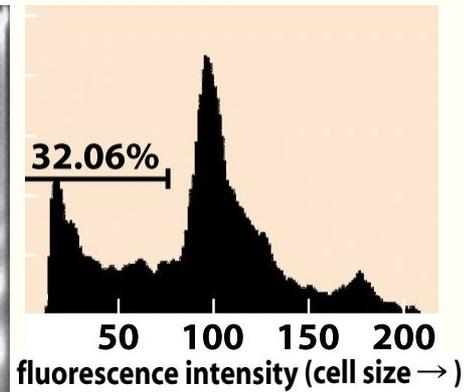
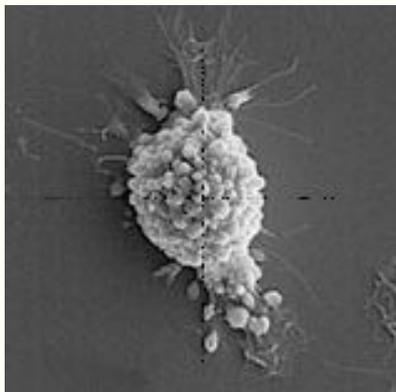
Норма



DNA, Golgi, PARP



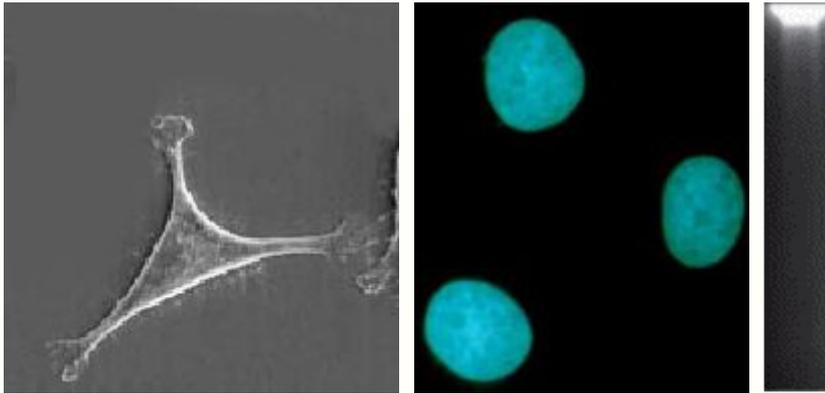
Апоптоз



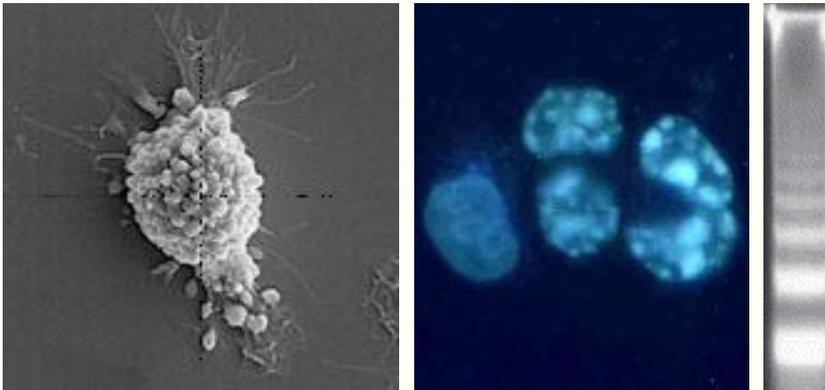
Апоптоз - важнейший физиологический механизм элиминации из организма нежелательных клеток

Апоптоз характеризуется «блеббингом» плазматической мембраны, конденсацией ядра, расщеплением ДНК и ряда белков (*Kerr et al, 1972*)

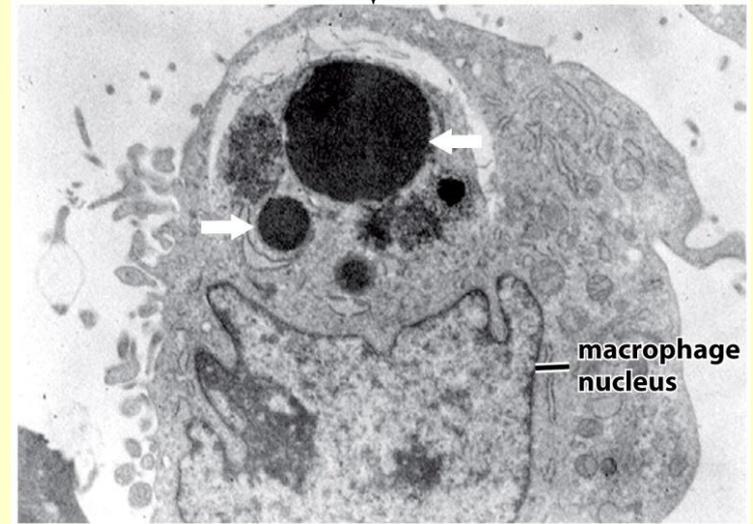
Норма



Апоптоз



Погибающие клетки дают сигналы «*Найди меня*» (лизосфосфатидилхолин и др.) и «*Съешь меня*» (опсонины, связанные с фосфатидилсерином) и поглощаются макрофагами



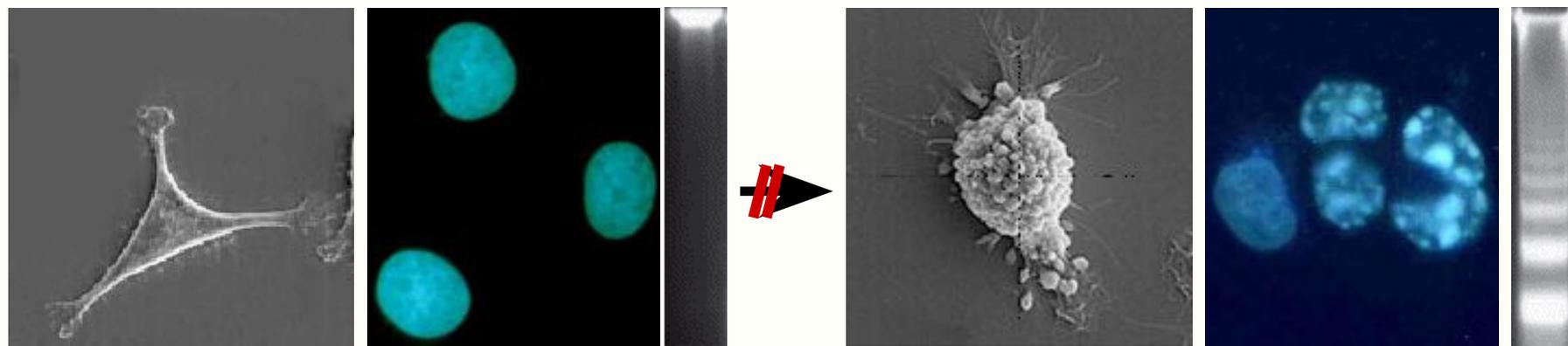
Существенные отличия апоптоза от некроза:

а) содержимое погибшей клетки не выходит в межклеточное пространство; апоптотические клетки, в отличие от некротических, не выпускают «алармины» (SAP130 и др.), привлекающие нейтрофилы →
нет воспаления

б) программа, требующая затраты энергии и экспрессии определенных генов

Апоптоз - важнейший физиологический механизм элиминации из организма нежелательных клеток

Апоптоз характеризуется «блеббингом» плазматической мембраны, конденсацией ядра, расщеплением ДНК и ряда белков (*Kerr et al, 1972*)



Норма

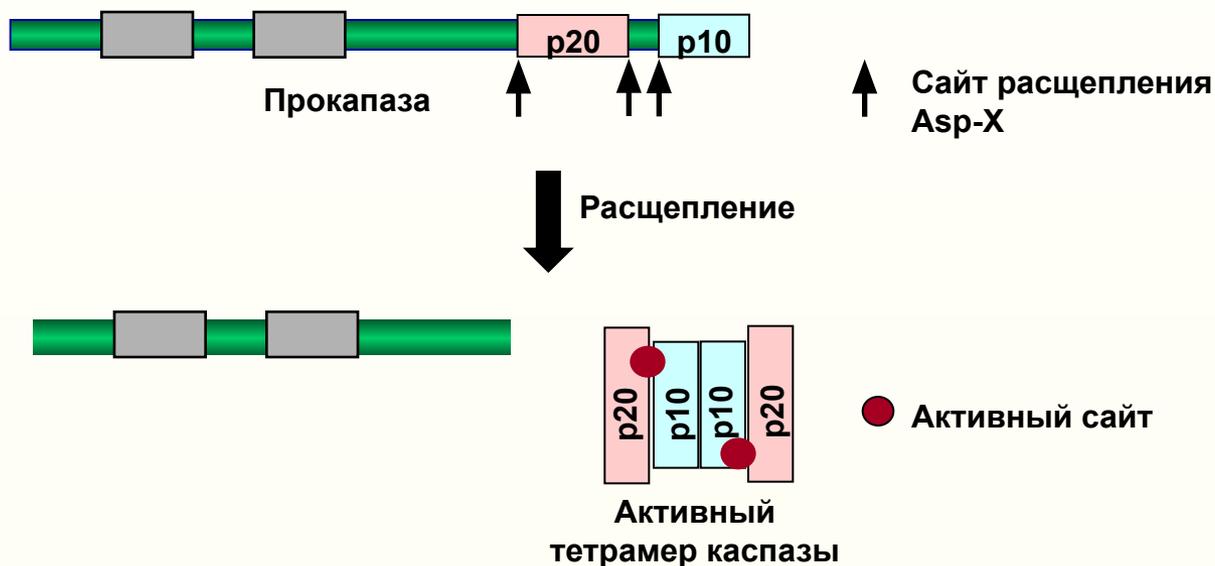
Апоптоз

Подавление апоптоза в какой-либо из клеток:

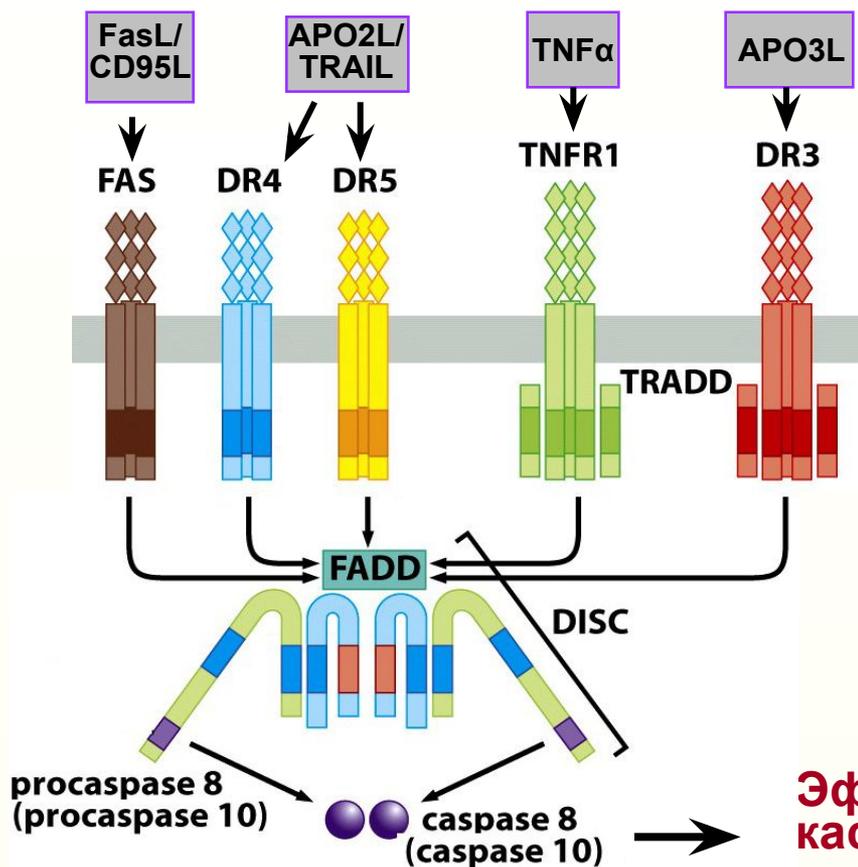
- а) увеличивает вероятность образования из нее неопластического клона;**
- б) понижает ее чувствительность к изменениям микроокружения и цитотоксическому действию терапевтических средств**

Ключевую роль в реализации апоптоза играют **каспазы** – семейство протеаз, для которых характерно:

- а) синтез в виде неактивных предшественников, т.н. прокаспаз, которые активируются после саморасщепления многокомпонентных комплексов, в состав которых они входят;
- б) расщепление полипептидной цепи после остатков аспарагиновой кислоты;
- в) присутствие цистеинового остатка в активном центре



«Инструктивный» (extrinsic) апоптоз вызывается активацией «рецепторов смерти» (Death receptors)



Киллерный лиганд
(Fas-L, TNF α , TRAIL и др.)

Рецепторы смерти
(Fas, TNF-R1, DR5 и др.)

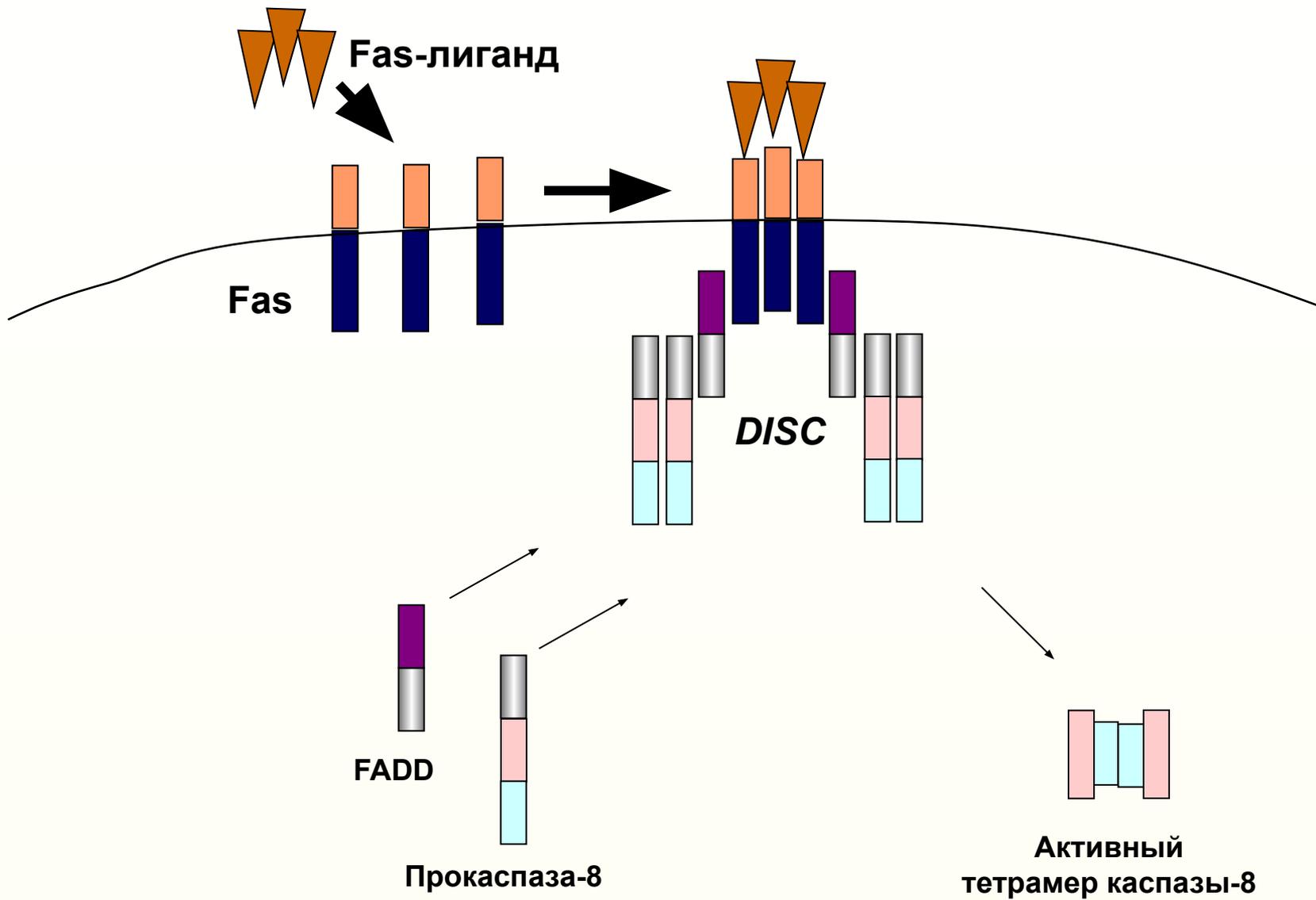
Адапторные молекулы
FADD (TRADD)

(про)каспаза 8 (10)

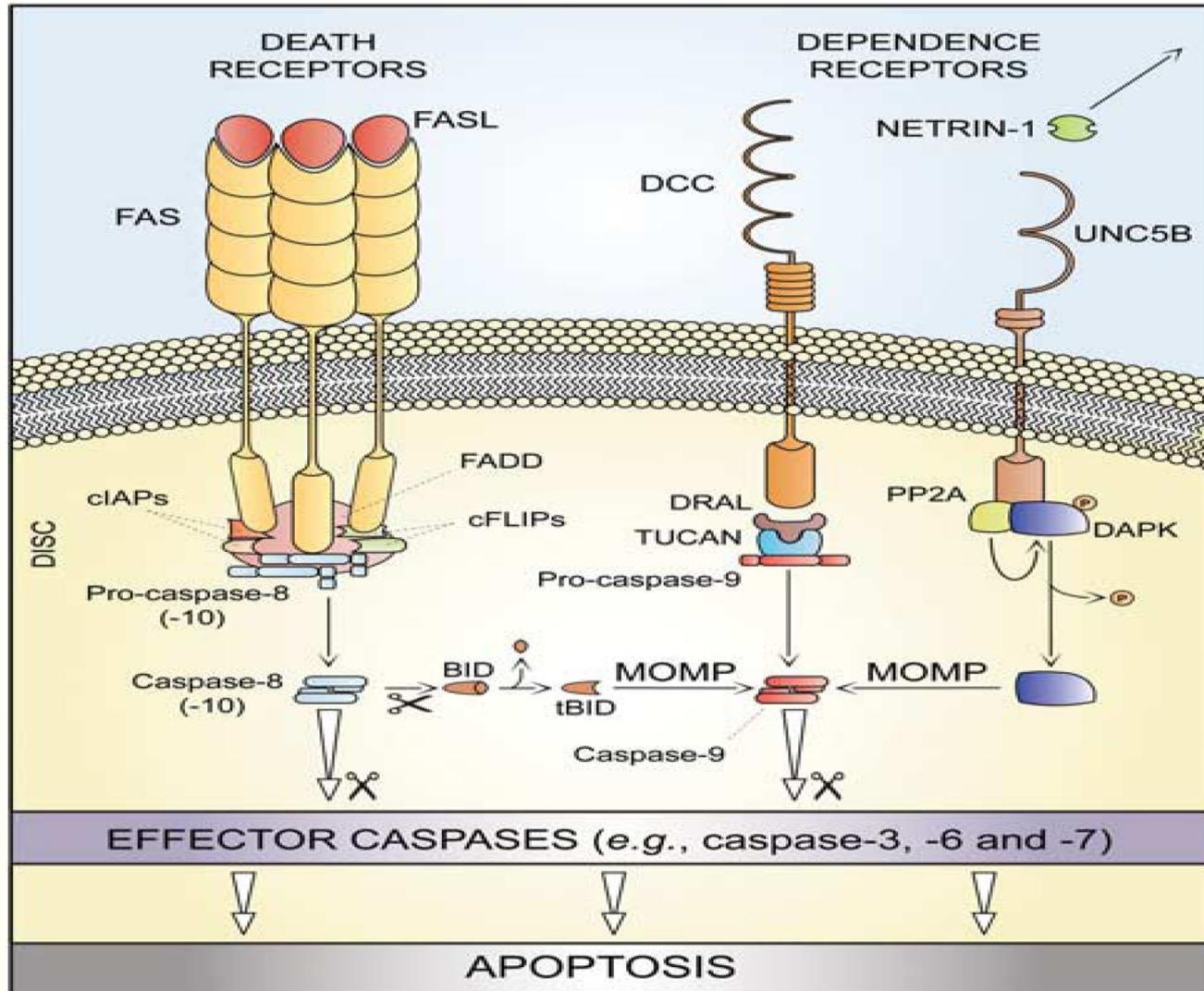
Эффекторные
каспазы 3, 6, 7

АПОТОЗ





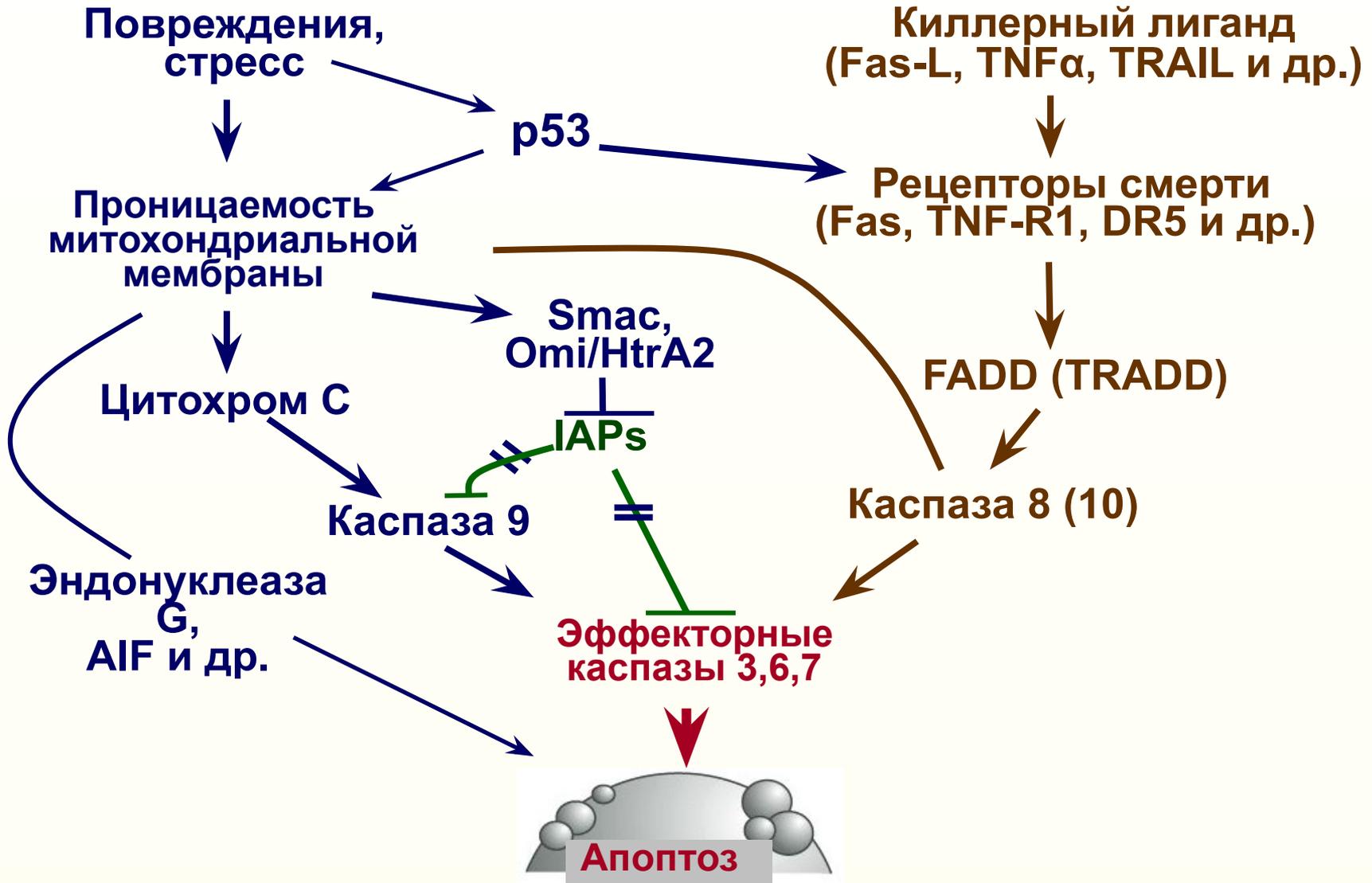
2 варианта запуска инструктивного пути – рецепторы смерти или рецепторы зависимости

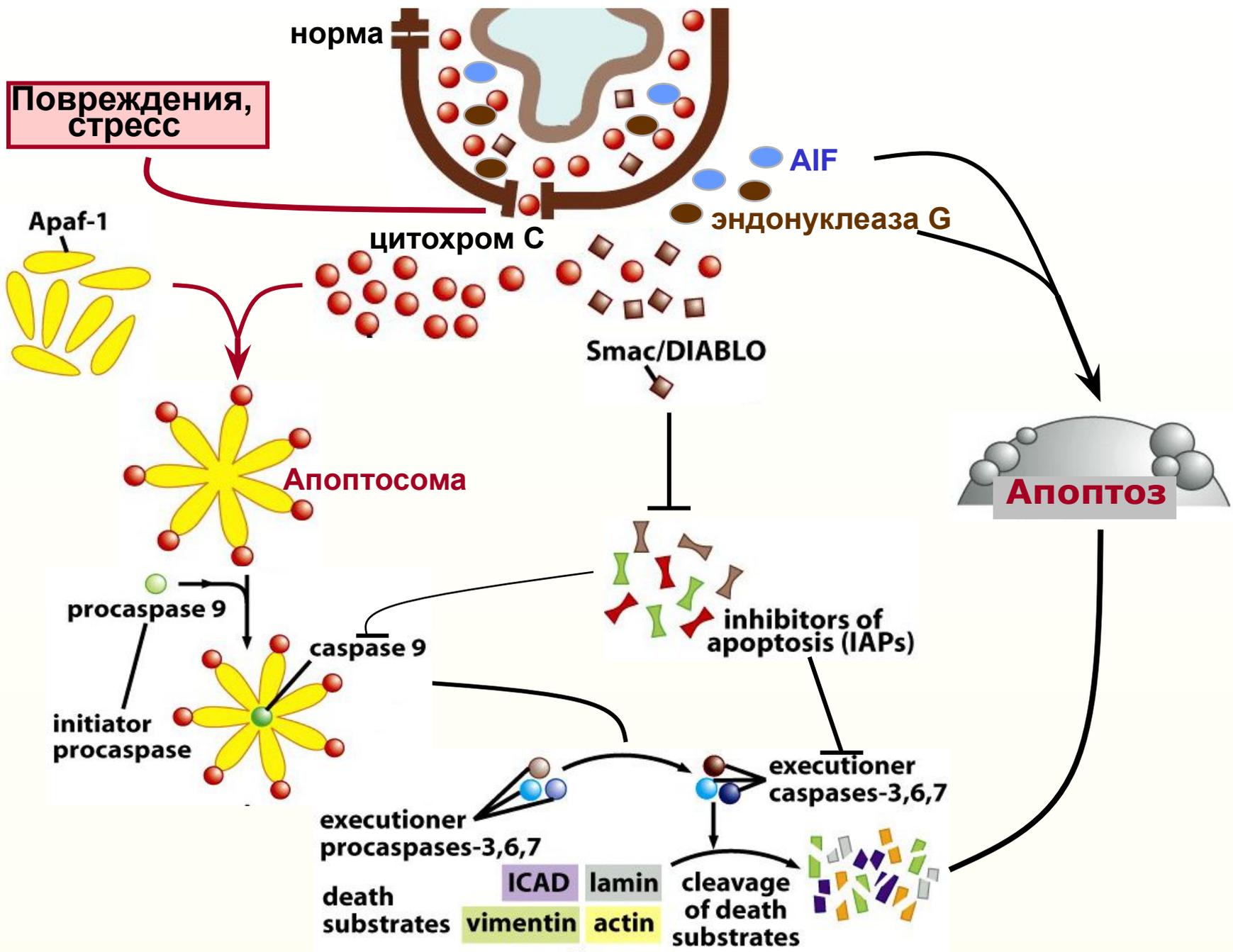


Две основные стратегии индукции апоптоза

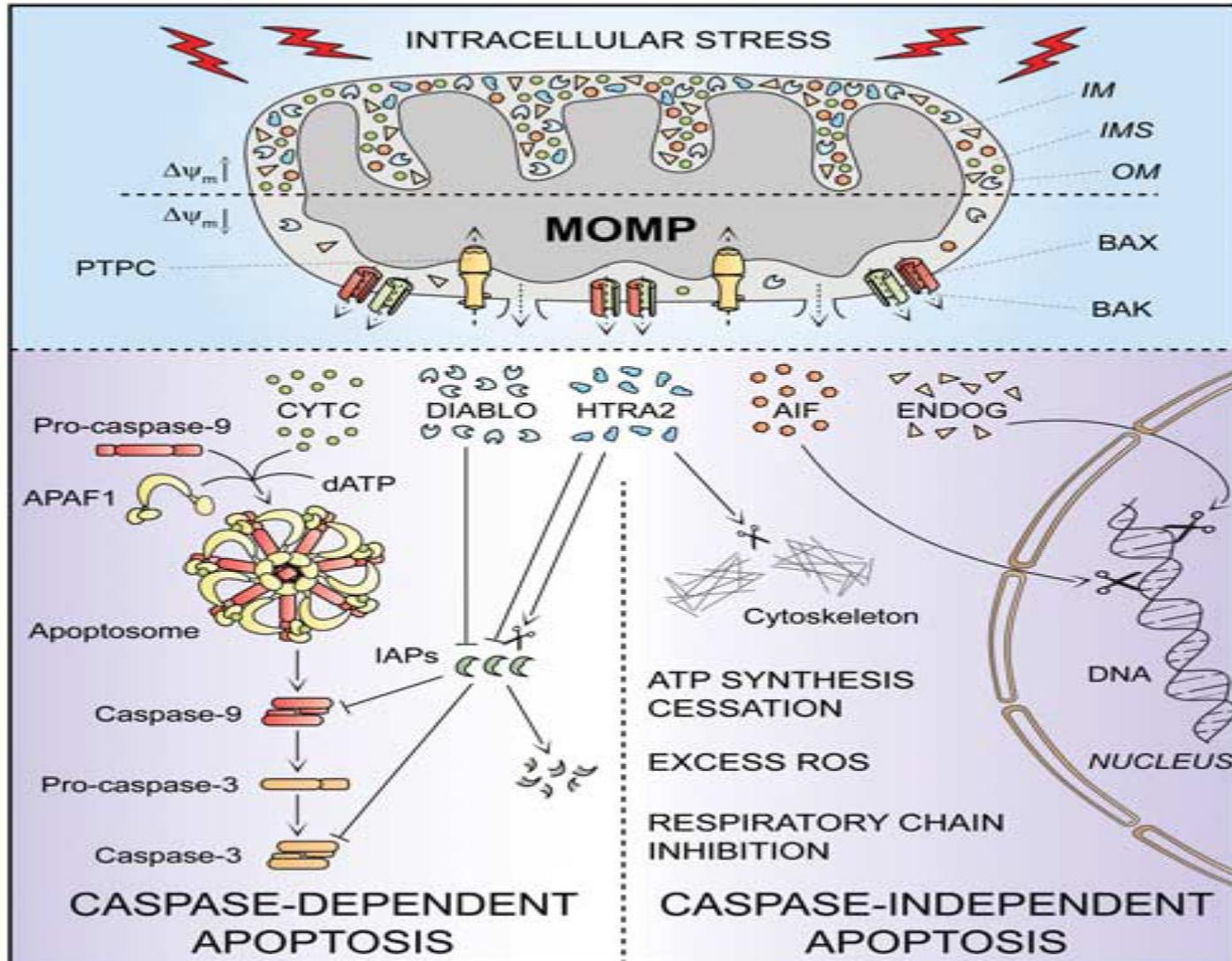
Митохондриальный апоптоз

Инструктивный апоптоз





Intrinsic (mitochondrial) apoptosis



Механизмы ослабления индукции апоптоза в опухолевых клетках:

- **нечувствительность к апоптогенному действию Fas-L**
(потеря экспрессии или мутации рецептора смерти *Fas*, гиперэкспрессия рецептора-ловушки *DCR3*);
- **потеря рецептора нетрина-1 DCC**
- **нарушения проведения сигнала к митохондриям**
(инактивация опухолевых супрессоров *p53*, *PTEN* и др.);
- **подавление выброса из митохондрий цитохрома C**
(увеличение экспрессии онкогенов семейства *Bcl2* и др.);
- **подавление активации каспаз**
(потеря экспрессии белка *APAF-1*, инактивация *p53* и др.);
- **уменьшение времени жизни каспаз**
(связывание каспаз с белками *IAP* (*Inhibitors of Apoptosis*), экспрессия которых повышается вследствие активации протоонкогенов *Ras*, *Akt/PKB* или инактивации опухолевых супрессоров *p53*, *PTEN* и др.)

Онкогены и опухолевые супрессоры регулируют:

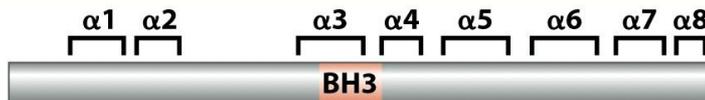
а) проницаемость митохондриальной мембраны

Члены семейства Bcl2

Про-апоптогенные

сем. BH3 (инициаторы)

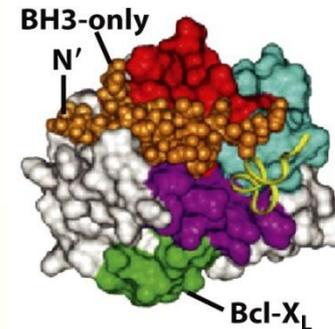
Bad, tBid,
Puma



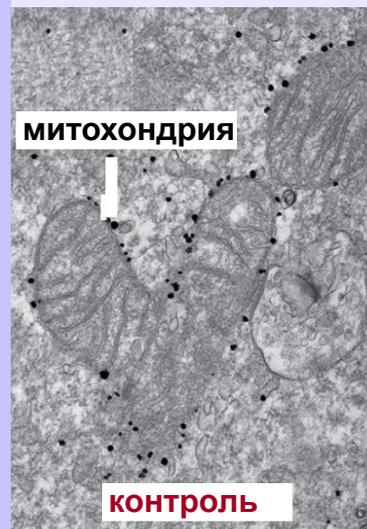
Bik, Bim,
Bmf, Noxa,
Hrk (Harakiri)



Bcl-X_L + BH3-only ligand



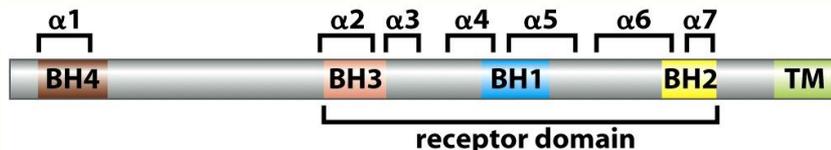
Иммуноэлектронная
микроскопия Ваk



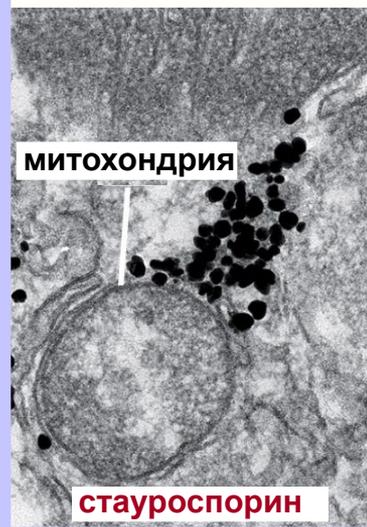
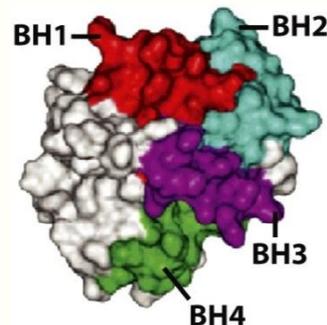
Анти-апоптогенные

сем. Bcl2 (защитники)

Bcl2,
Bcl-X_L,
Bcl-W,
Mcl1, A1,
Bcl-B



Bcl-X_L



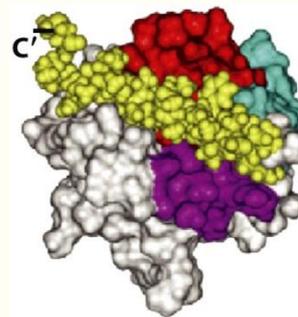
Про-апоптогенные

сем. Bax (эфффекторы)

Bax,
Bak,
Bok



Bax



Онкогены и опухолевые супрессоры регулируют:

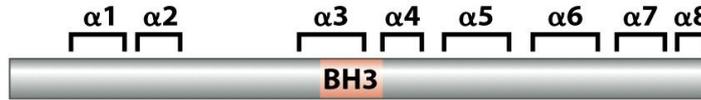
а) проницаемость митохондриальной мембраны

Члены семейства Bcl2

Про-апоптогенные

а) сем. BH3 (инициаторы)

Bad, tBid,
Puma



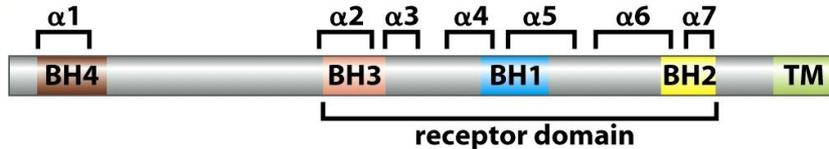
Bik, Bim,
Bmf, Noxa,
Hrk (Harakiri)



Анти-апоптогенные

сем. Bcl2 (защитники)

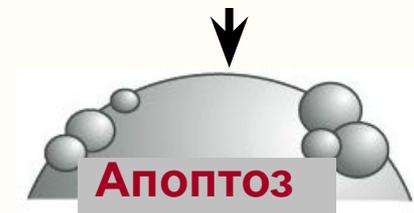
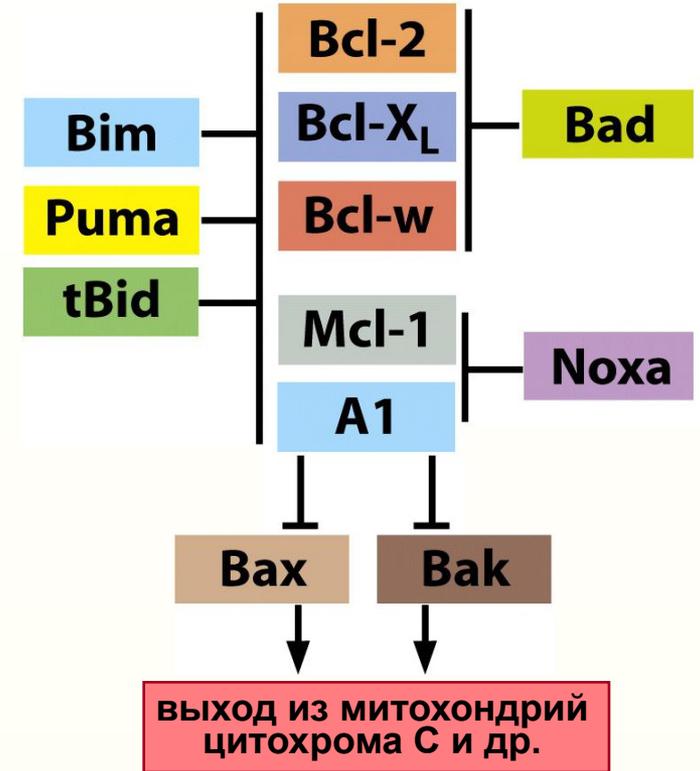
Bcl2,
Bcl-X_L,
Bcl-W,
Mcl1, A1,
Bcl-B



Про-апоптогенные

сем. Bax (эффекторы)

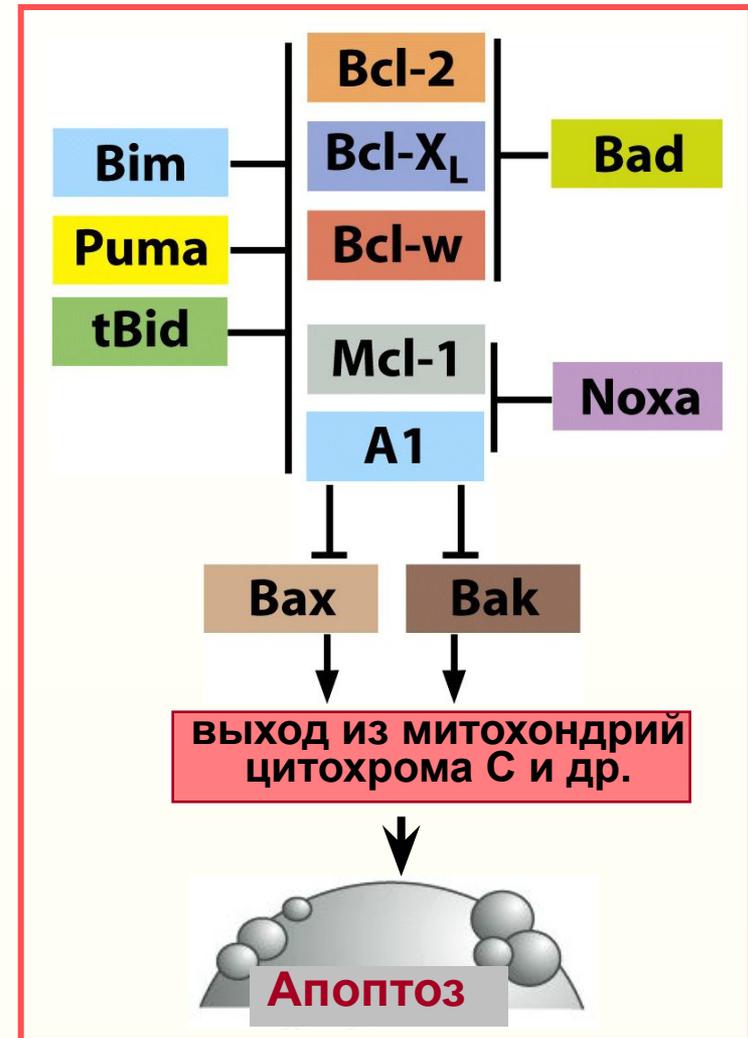
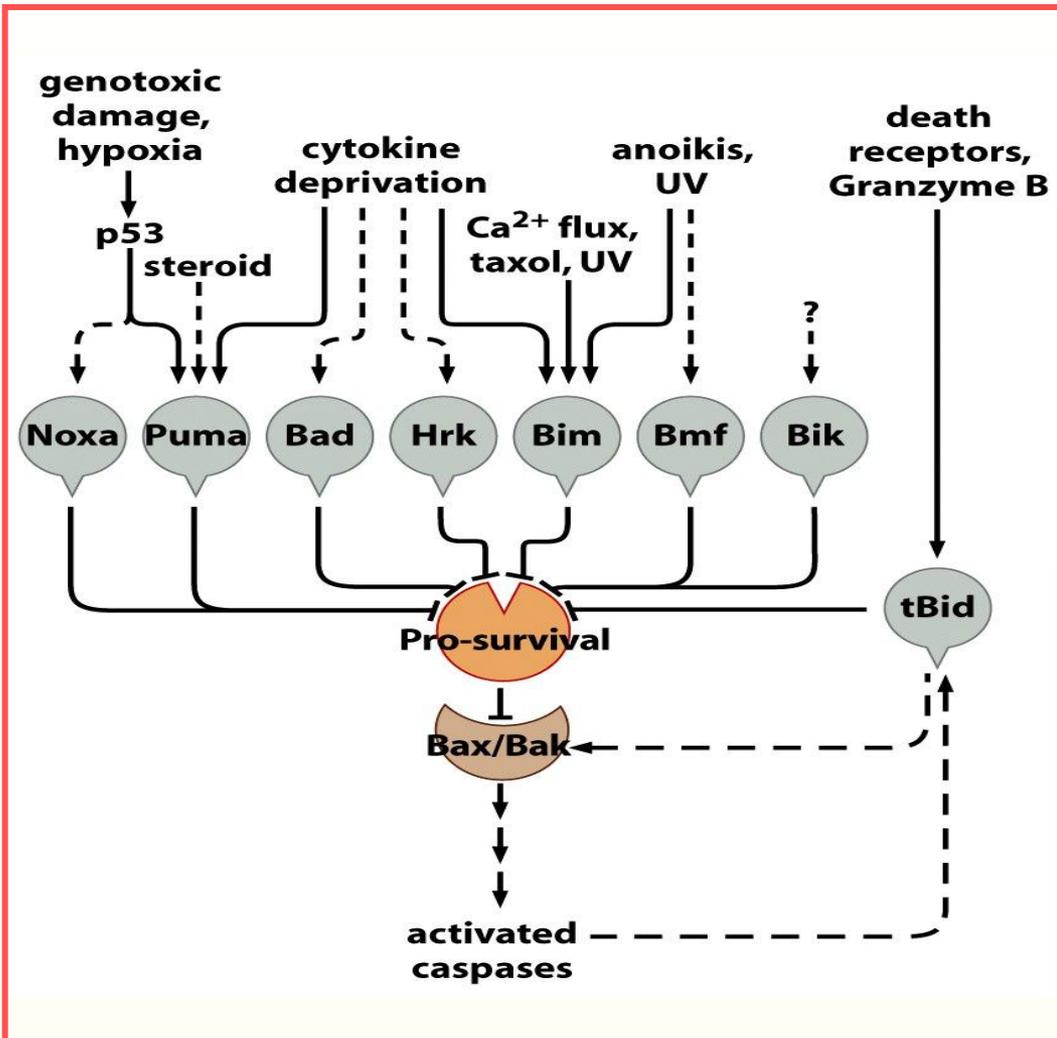
Bax,
Bak,
Bok



Онкогены и опухолевые супрессоры регулируют:

а) проницаемость митохондриальной мембраны

Члены семейства Bcl2



Для ряда новообразований человека характерны изменения генов семейства *Bcl2*

$t(14;18) \rightarrow IgH/Bcl2 \rightarrow$
 \rightarrow гиперэкспрессия *Bcl2* (защитник)

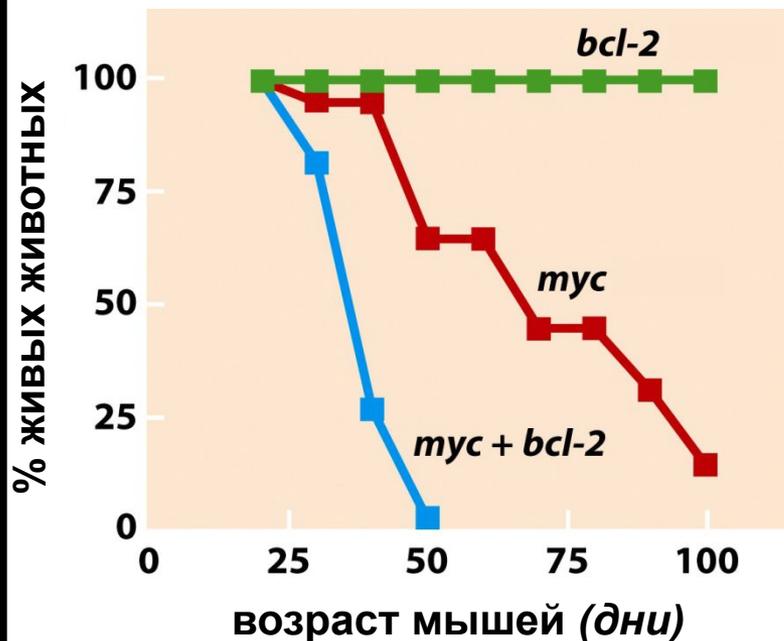
Мутации/инактивация *Bax*
(эффектор)

- В-клеточные лимфомы

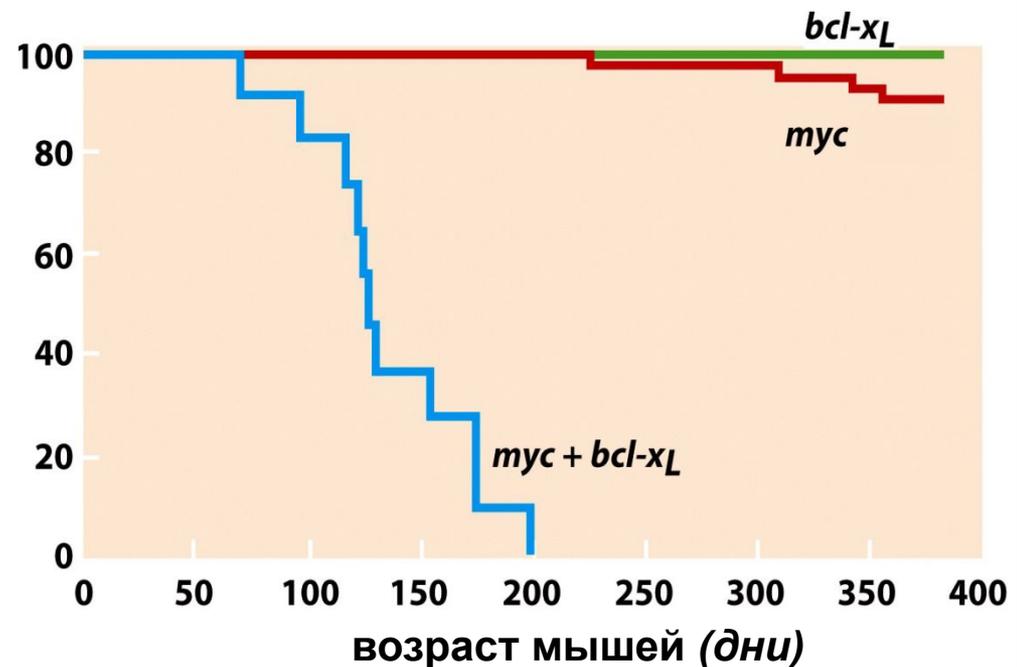
- Рак толстой кишки, простаты

Экспрессия *Bcl2/BclX_L* ускоряет развитие лимфом у мышей

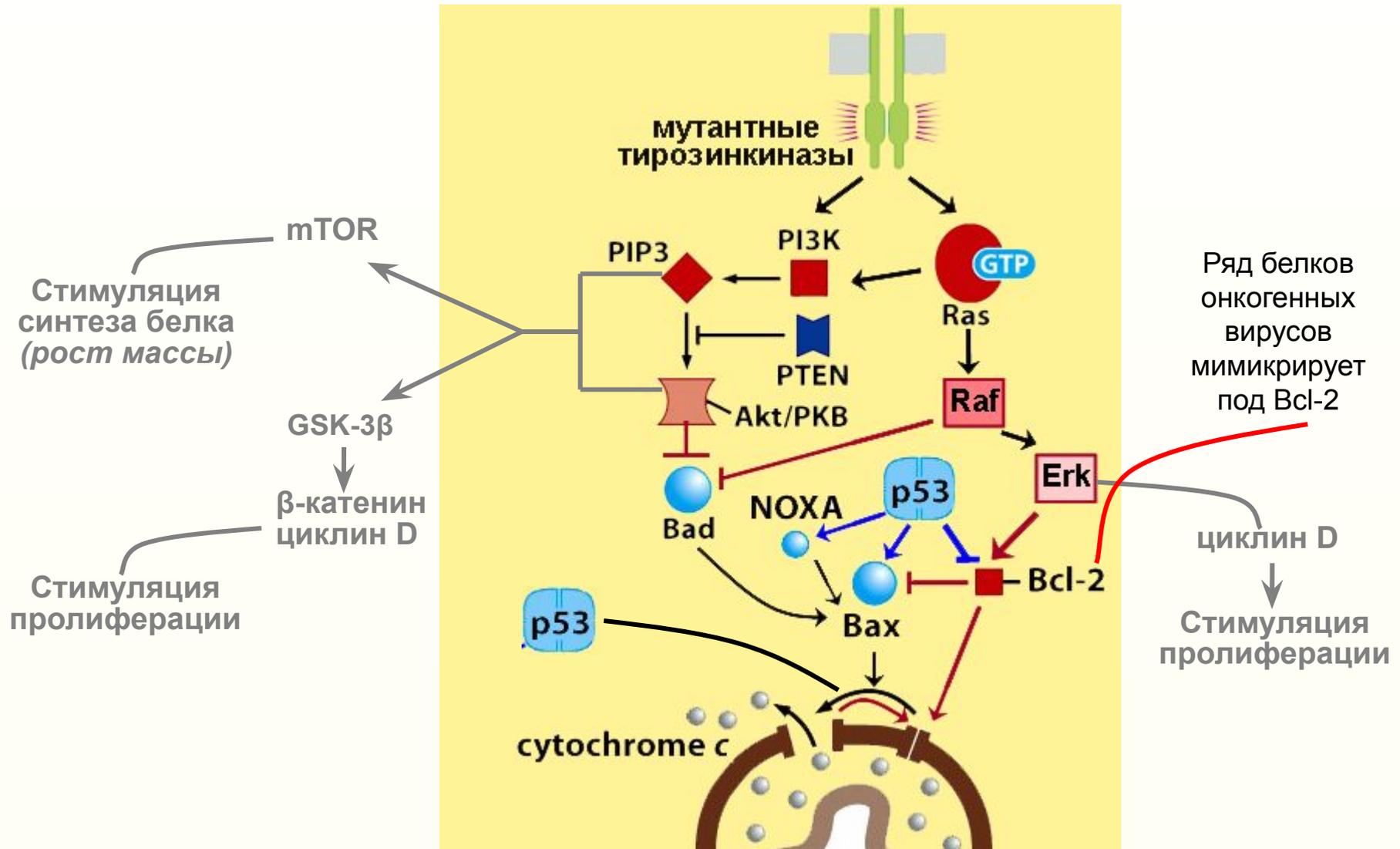
Экспрессия трансгена *IgH/bcl-2*
во всех В-клетках



Экспрессия трансгена *IgH/bcl-x_L*
в плазматических клетках



Ряд онкогенов и опухолевых супрессоров регулирует экспрессию белков семейства Bcl2 и/или проницаемость митохондриальной мембраны



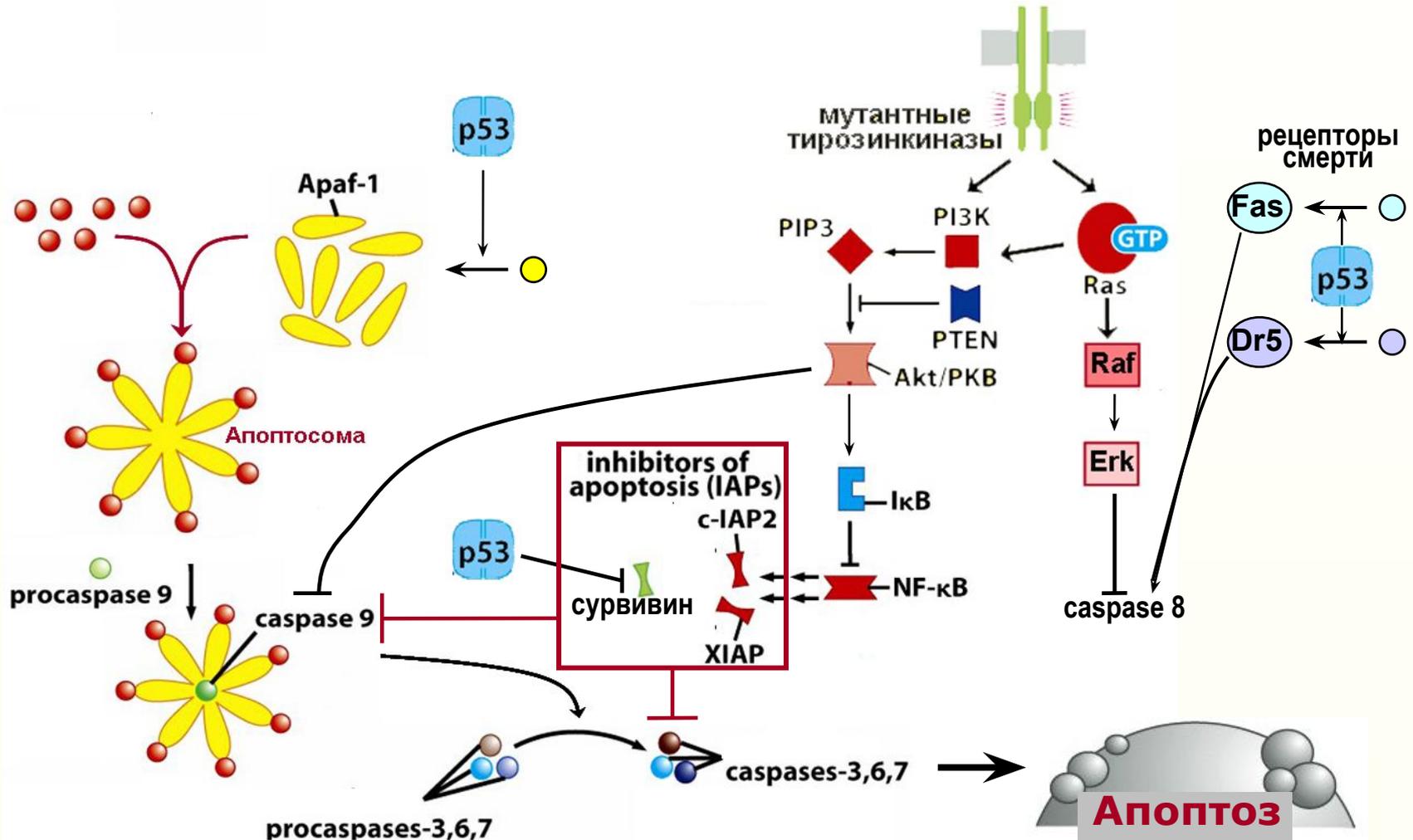
Механизмы ослабления индукции апоптоза в опухолевых клетках:

- **нечувствительность к апоптогенному действию Fas-L**
(потеря экспрессии или мутации рецептора смерти Fas, гиперэкспрессия рецептора-ловушки DcR3);
- **нарушения проведения сигнала к митохондриям**
(инактивация опухолевых супрессоров p53, PTEN и др.);
- **подавление выброса из митохондрий цитохрома C**
(увеличение экспрессии онкогенов семейства Bcl2 и др.);
- **подавление активации каспаз**
(инактивация APAF-1, мутации Ras, PI3K, PTEN, p53 и др.);
- **уменьшение времени жизни каспаз**
(связывание каспаз с белками IAP (*Inhibitors of Apoptosis*), экспрессия которых повышается вследствие активации протоонкогенов Ras, Akt/PKB или инактивации опухолевых супрессоров p53, PTEN и др.)

Онкогены и опухолевые супрессоры регулируют:

а) проницаемость митохондриальной мембраны

б) активность каспаз (онкогены *HER2, Ras, Raf, PI3K, Akt, NFκB*, опухолевые супрессоры *PTEN, p53* и др.)



Характерные для новообразований человека изменения генов, продукты которых регулируют апоптоз

Мутации/инактивация p53

- Многие новообразования

Мутации/активация Ras

- Многие новообразования

Мутации/инактивация PTEN

- Многие новообразования

Гиперэкспрессия сурвивина

- Многие новообразования

*t(14;18) → IgH/ Bcl2 →
→ гиперэкспрессия Bcl2*

- В-клеточные лимфомы

Мутации/инактивация Bax

- Рак толстой кишки, простаты

Метилирование Araf1

- Рак толстой кишки

Мутации/инактивация Fas

- Лимфомы, рак яичка, мелкоклеточный рак легкого

Амплификация гена DCR3

- Рак желудка, толстой кишки, печени

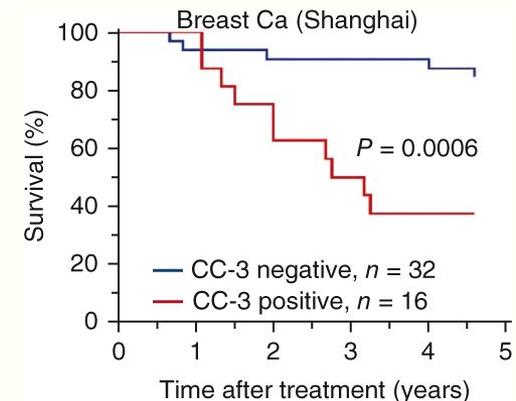
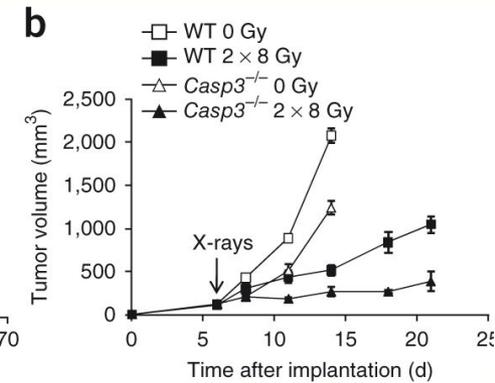
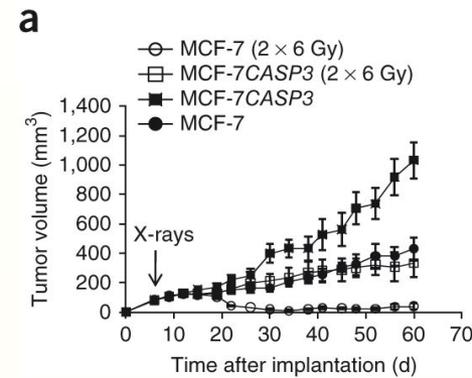
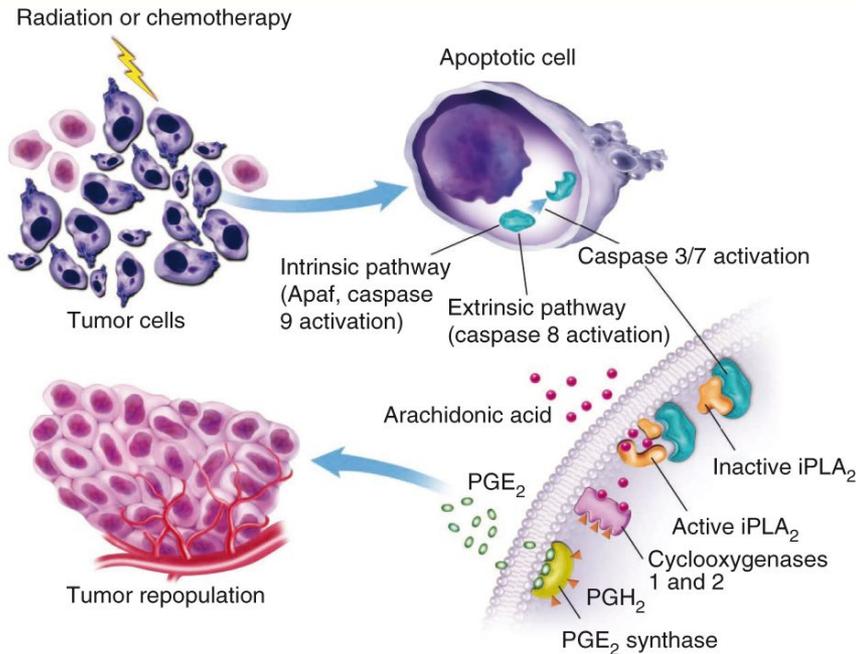
Caspase 3–mediated stimulation of tumor cell repopulation during cancer radiotherapy

Dying tumor cells can use the apoptotic process to generate potent growth-stimulating signals to stimulate the repopulation of tumors undergoing radiotherapy. Activated caspase 3, a key executioner in apoptosis, is involved in the growth stimulation.

Caspase 3 regulates **prostaglandin E2 (PGE2)**, which can potently stimulate growth of surviving tumor cells.

Deficiency of caspase 3 either in tumor cells or in tumor stroma caused substantial tumor sensitivity to radiotherapy.

In human tumors higher amounts of activated caspase 3 correlate with markedly increased rate of recurrence and death.

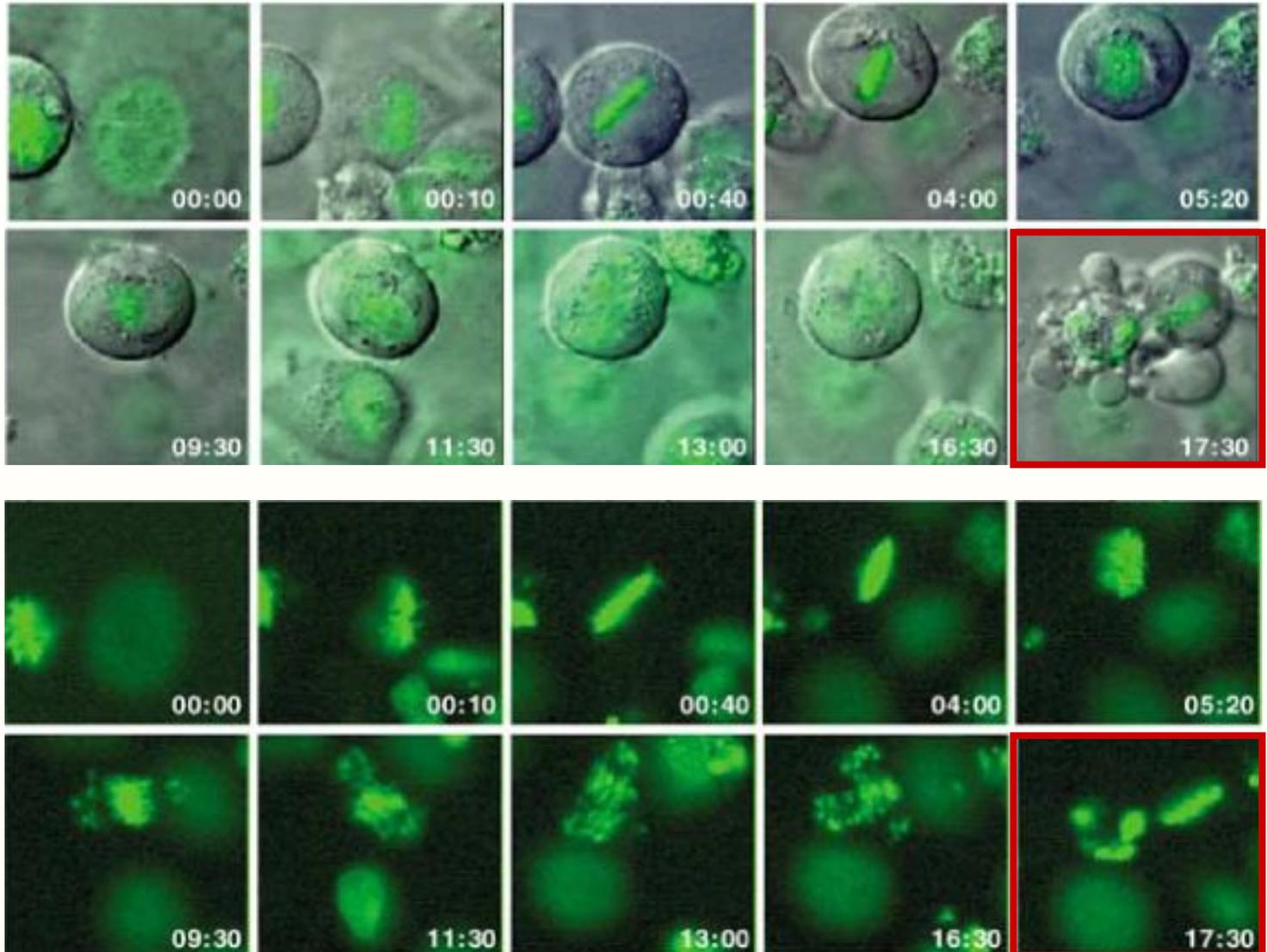


Huang et al., *Nature Medicine*, 2011, 7:859-867

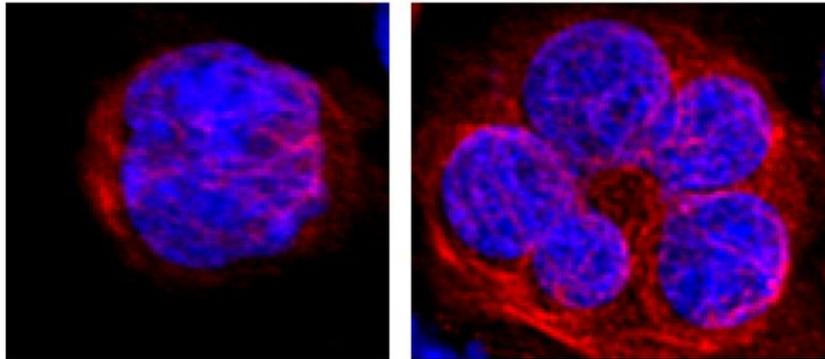
Выход – блокировать каспазу-3 при терапии:

- Ингибиторы каспаз (Z-VAD-fmk),
- Блокирование ферментов биосинтеза PGE2 (ингибитор COX1/2 indomethacin, Indo)
- Блокирование взаимодействия PGE2–рецептор EP2 на поверхности опухолевых клеток

Митотическая катастрофа - смерть клетки во время митоза или вследствие его неправильного завершения

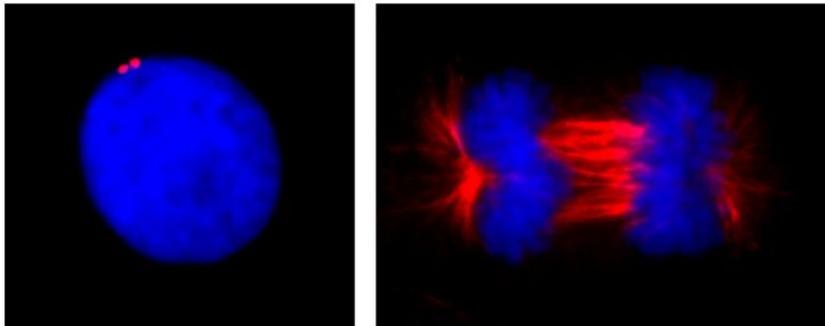


Морфологические признаки митотической катастрофы



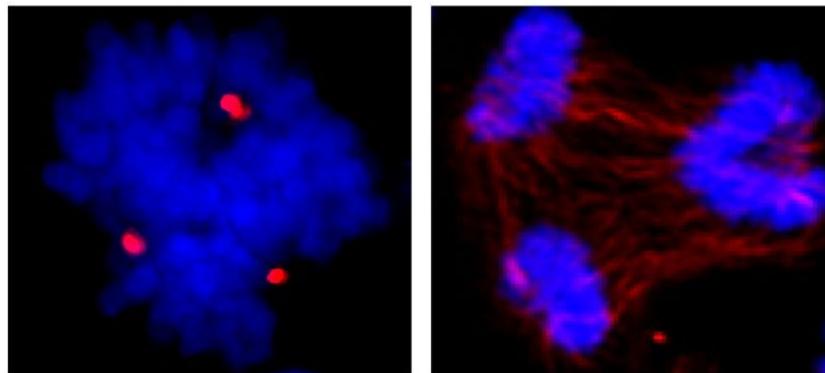
(a)

(b)



(c)

(d)



(e)

(f)

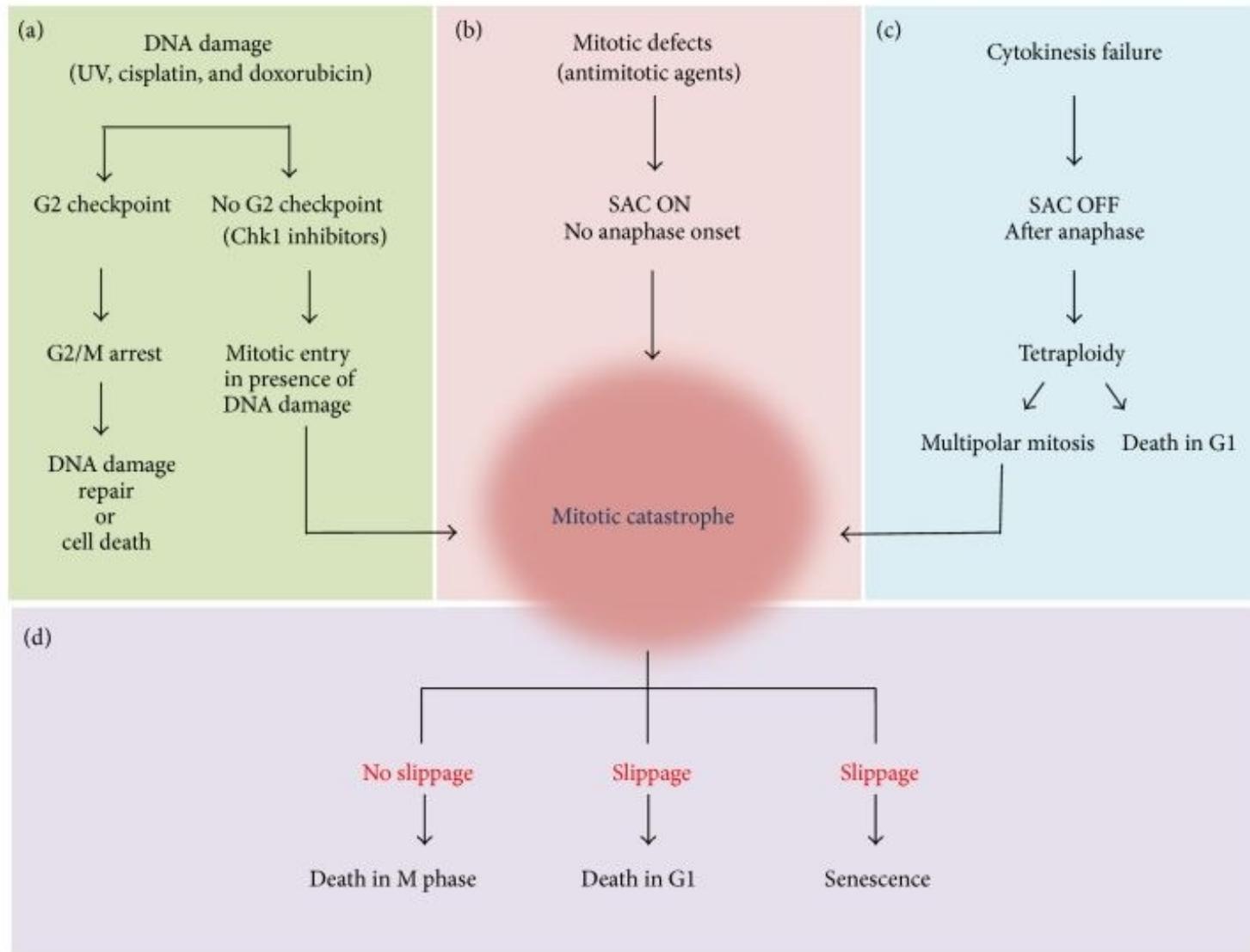
Клетки хронического миелоидного лейкоза человека K562

(a) Нормальная интерфаза
(b) Гигантские многоядерные клетки после разрушения микротрубочек

(c) Интерфаза с двумя центросомами и (d) нормальная сегрегация хромосом в анафазе.

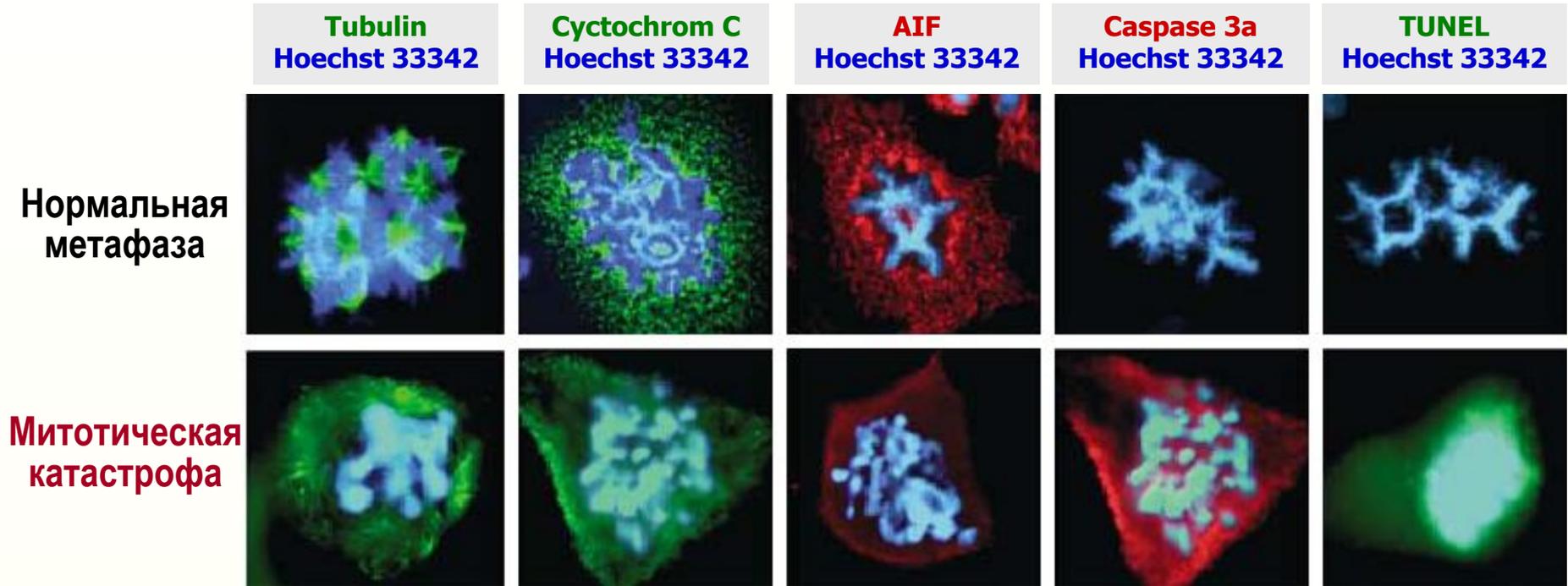
(e) Клетка, у которой больше 2 центросом,
(f) образует многополярное веретено деления, что ведет к анеуплоидии в результате отмены митотической катастрофы.

Механизмы индукции митотической катастрофы



SAC - spindle assembly checkpoint

Гибель клетки при митотической катастрофе, как правило, происходит апоптоз-подобным путем



Преждевременный вход в митоз
и/или невозможность его завершения

Каспаза-зависимый
апоптоз

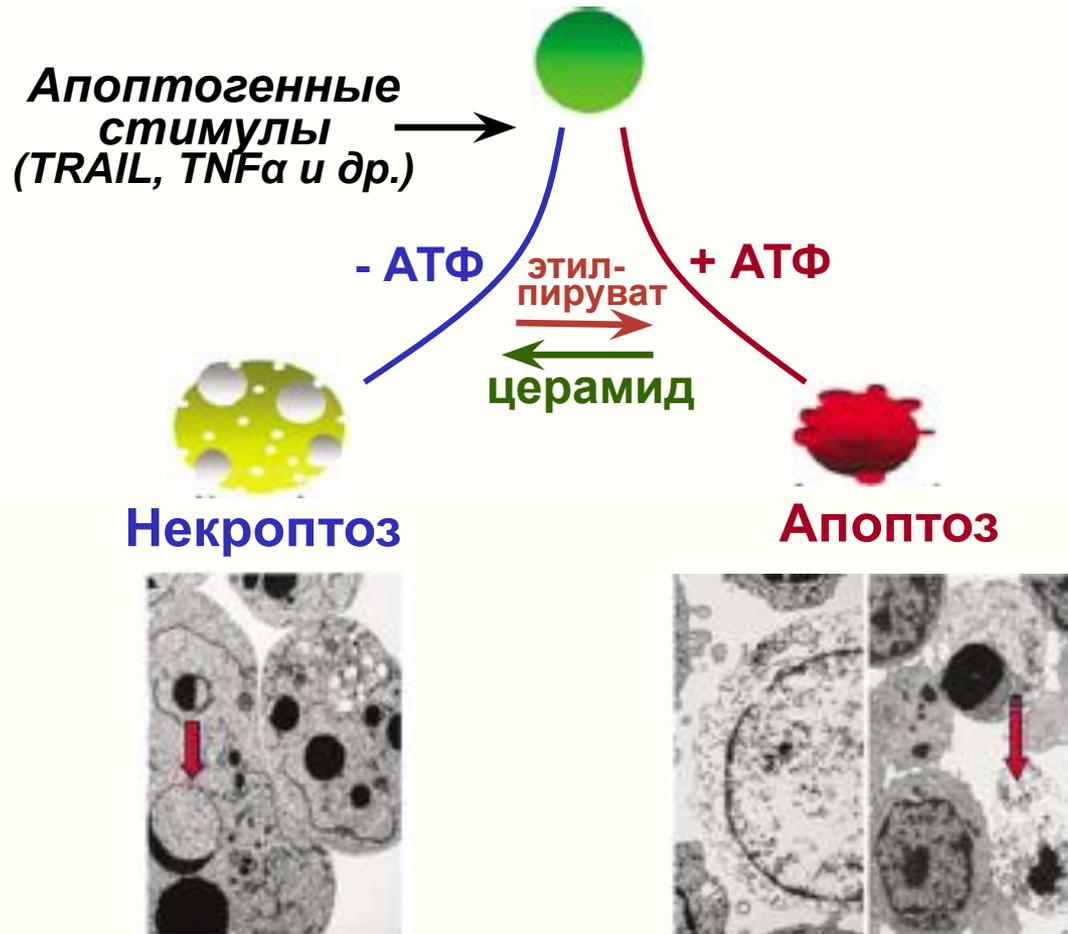
Каспаза-независимый
апоптоз

Отличия некроза от апоптоза

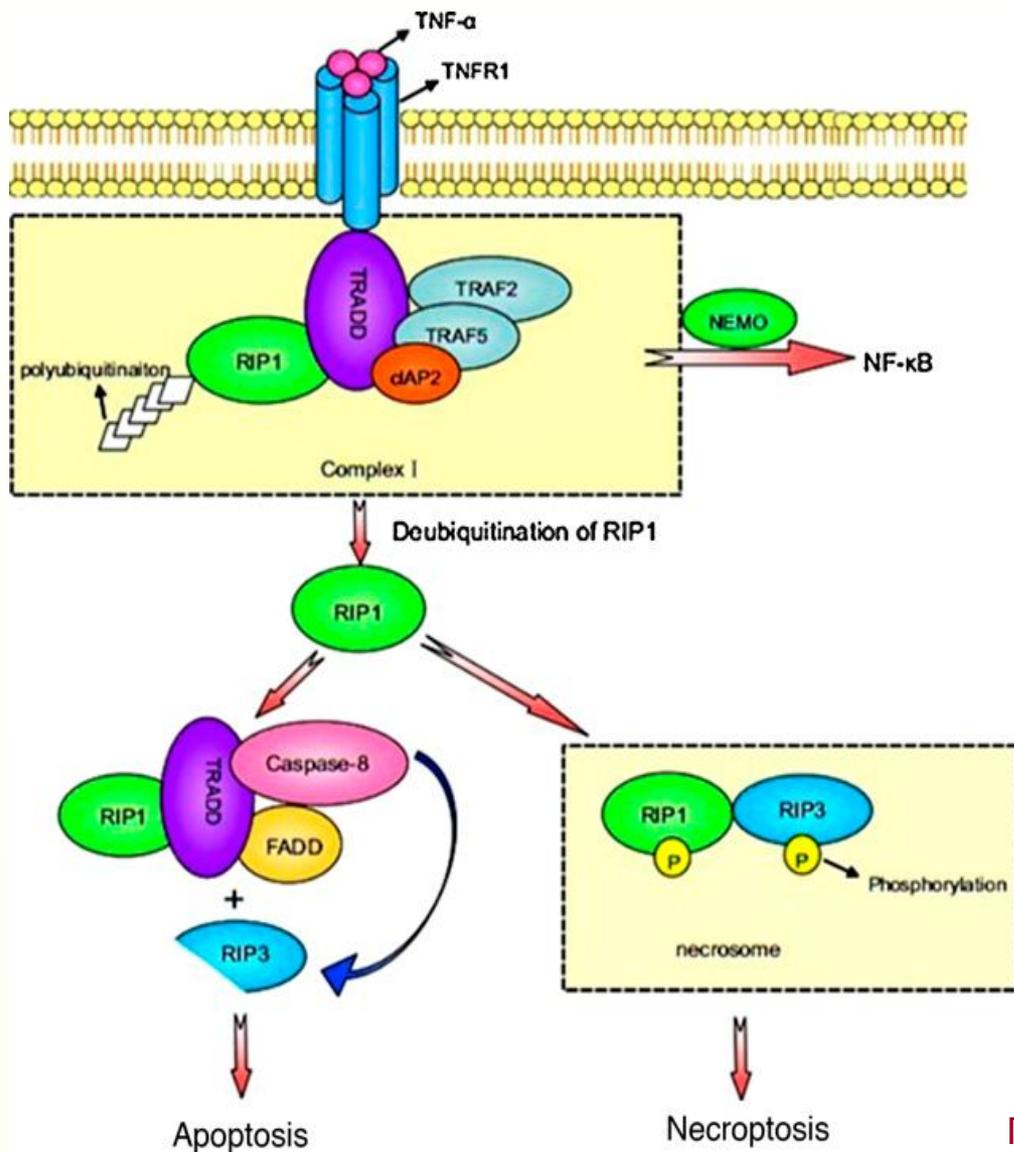
	Apoptosis	Necrosis
Provoking stimuli	programmed tissue remodeling maintenance of cell pool size genomic damage metabolic derangement hypoxia imbalances in signaling pathways	metabolic stresses absence of nutrients changes in pH, temperature hypoxia, anoxia
Morphological changes		
Cell volume	decreased	increased
Chromatin	condensed	fragmented
Lysosomes	unaffected	abnormal
Mitochondria	morphologically normal initially	morphologically aberrant
Inflammatory response	none	marked
Cell fate	apoptotic bodies consumed by neighboring cells	lysis
Molecular changes		
Gene activity	required for program	not needed
Chromosomal DNA	cleaved at specific sites	random cleavage
Intracellular calcium	increased	unaffected
Ion pumps	continue to function	lost

Некроптоз – программируемый некроз

Переключения **апоптоз \rightleftharpoons некроптоз**



Ключевую роль в индукции некроптоза играют белки RIP1 и RIP3 (Receptor Interaction Proteinkinase 1, 3)



Formation of necrosome.

After binding to TNF- α , the intracellular domain of TNFR1 summons TNF receptor-associated death domain (TRADD), receptor-associated death protein1 (RIP1), and Fas-associated death domain (FADD). Meanwhile, several E3 ligases, such as TNF receptor associated factor 2/5 (TRAF2/5), inhibitor of apoptosis proteins (IAPs) cIAP1 and cIAP2 are also recruited to TNFR1. Those proteins mentioned above form “complex I”.

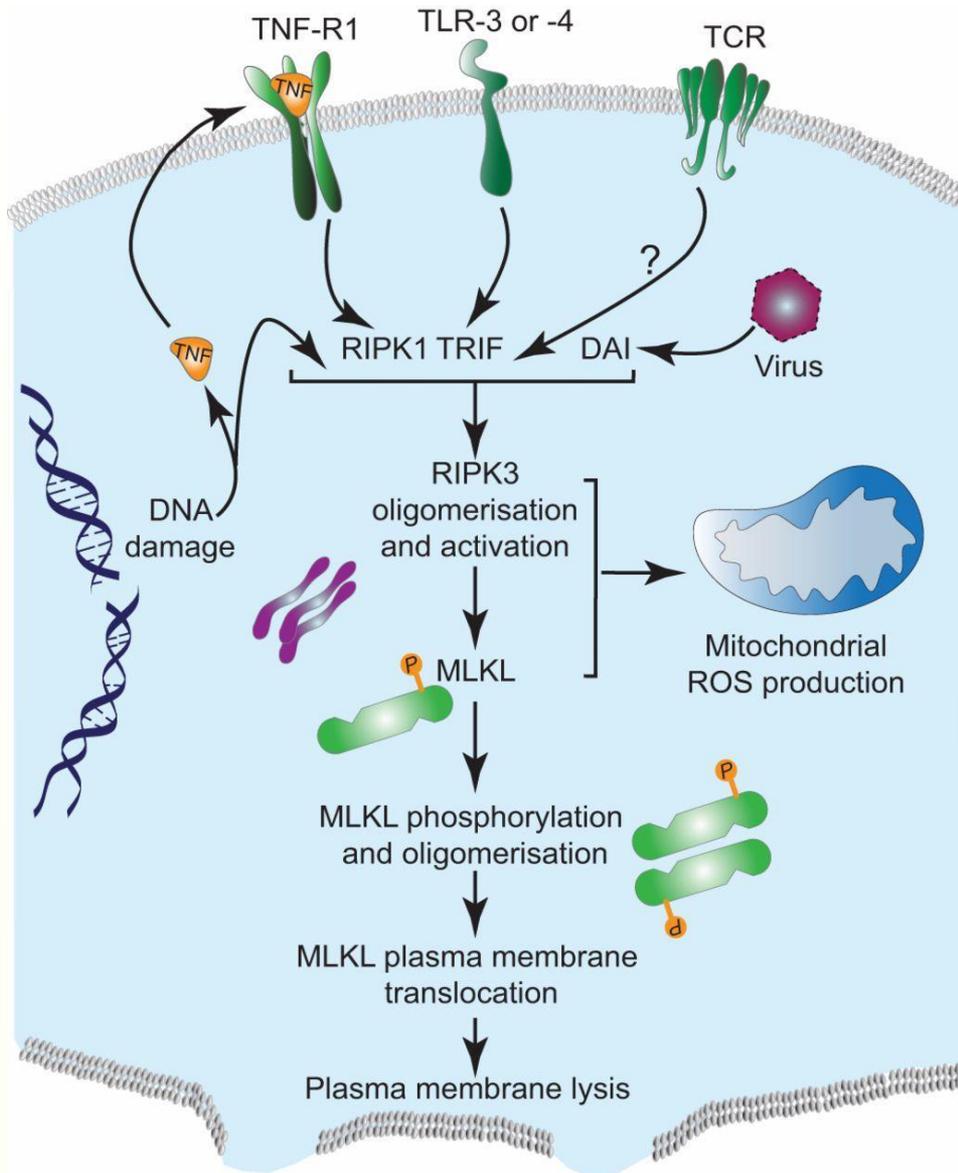
When RIP1 is ubiquitinated in complex I, it has the ability to activate of the I B kinase (IKK) complex and NF- B essential modulator (NEMO), leading to the activation of **pro-survival NF- kB** pathway in consequence.

When RIP1 is deubiquitilized by cylindromatosis (CYLD), it is released to the cytoplasm, and forms complex II with TRADD, FADD, RIP3 and caspase-8. While caspase-8 is activated, it would cleave RIP3 and induce apoptosis through caspase cascade.

However, **when caspase-8 is blocked, phosphorylated RIP1 and RIP3 form necrosome and initiate necroptosis.**

При остром миелоидном лейкозе ингибируется экспрессия RIP3, но не RIP1 (индукция некроптоза отменяется, способность к выживанию остается)

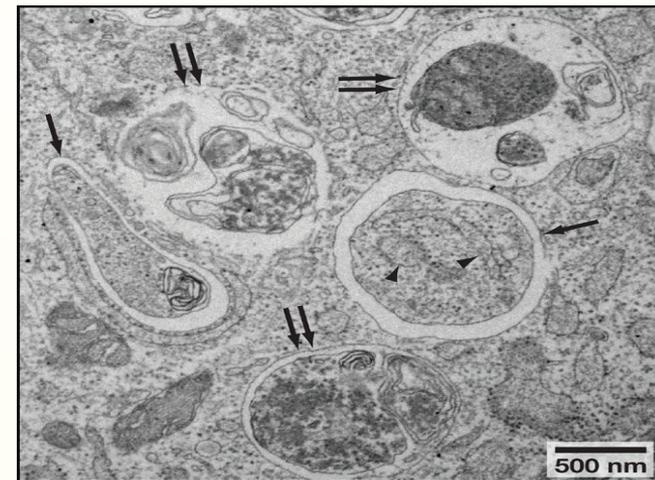
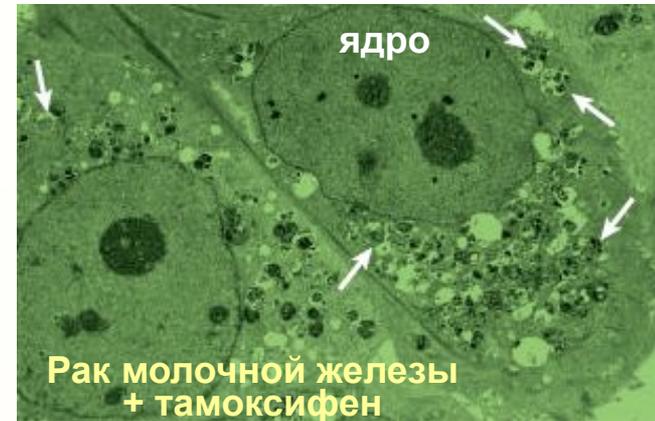
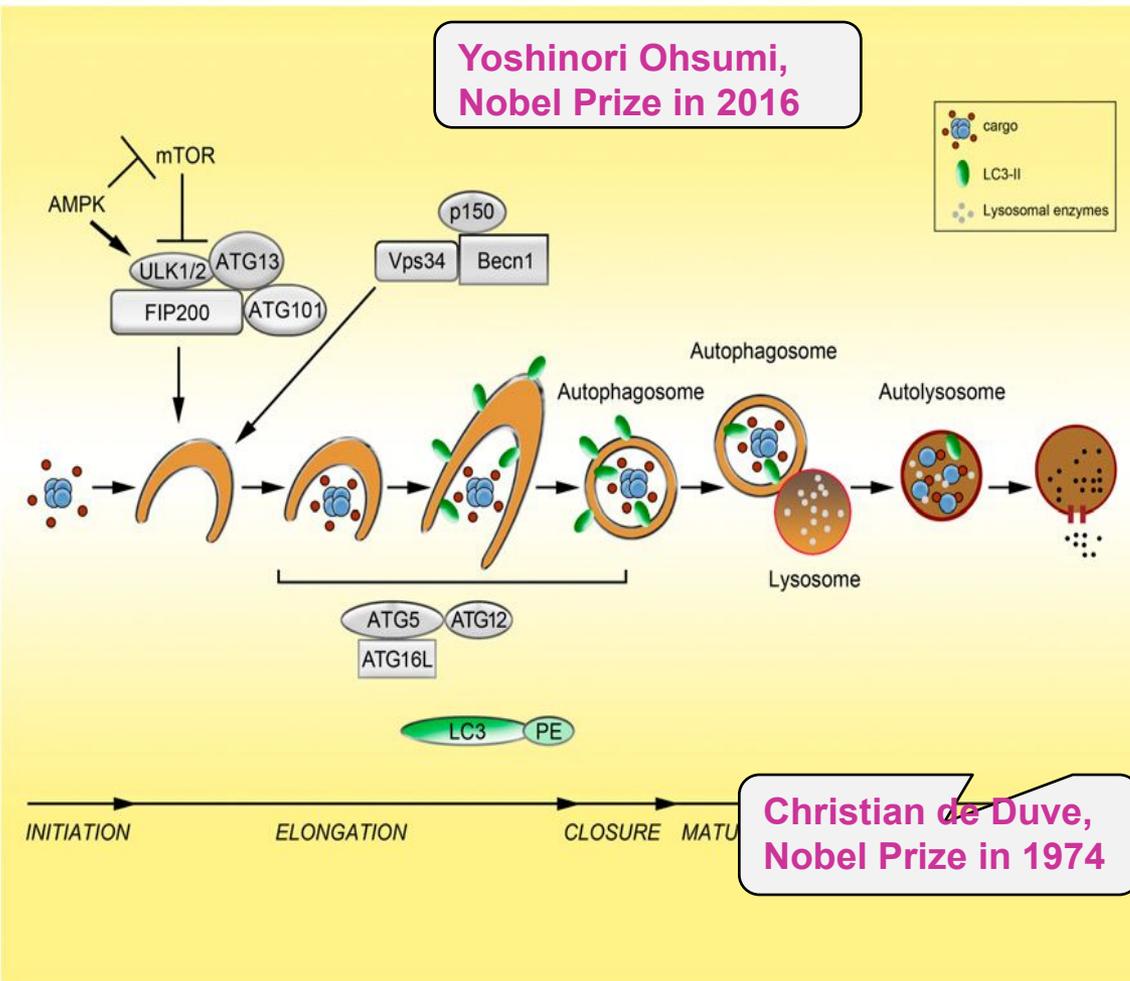
Механизм реализации некроптоза



MLKL - псевдокиназа, фосфорилируется Rip3, олигомеризуется и встраивается в плазматическую мембрану, разрушая ее

Аутофагия – программа лизосомальной деградации белков и других компонентов клетки.

Индукцируется голоданием (недостатком глюкозы, факторов роста, гормонов и др.), окислительным стрессом и т.д.



Аутофагосомы – стрелки;
аутолизосомы – двойные стрелки

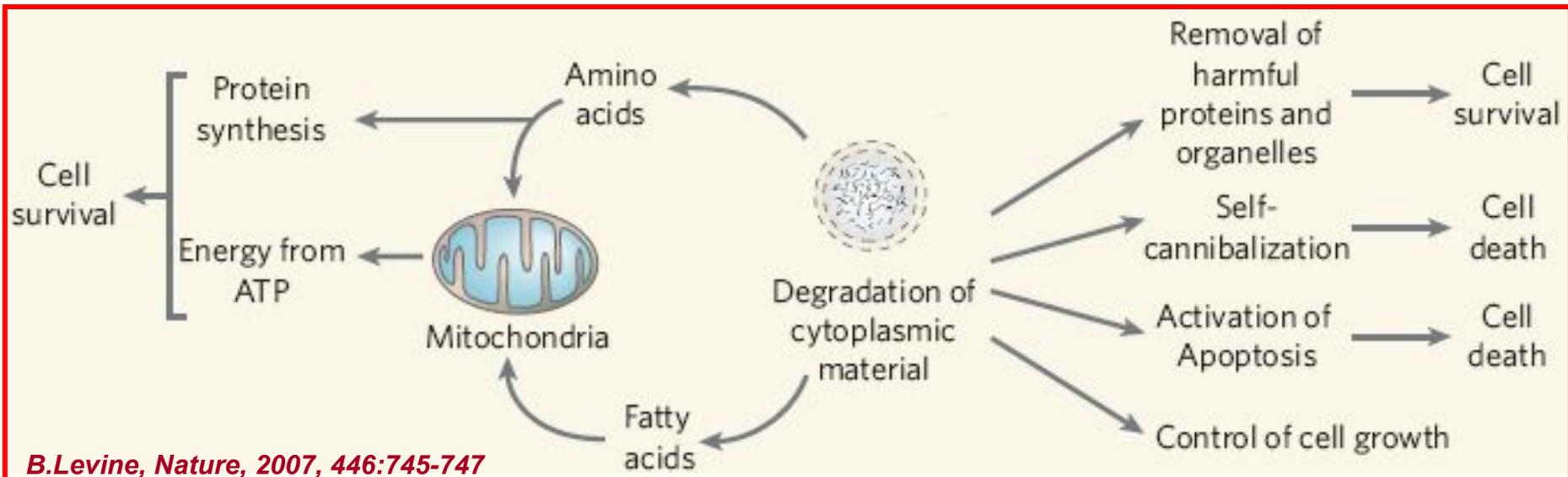
Аутофагия

Умеренная
(очистение клетки)

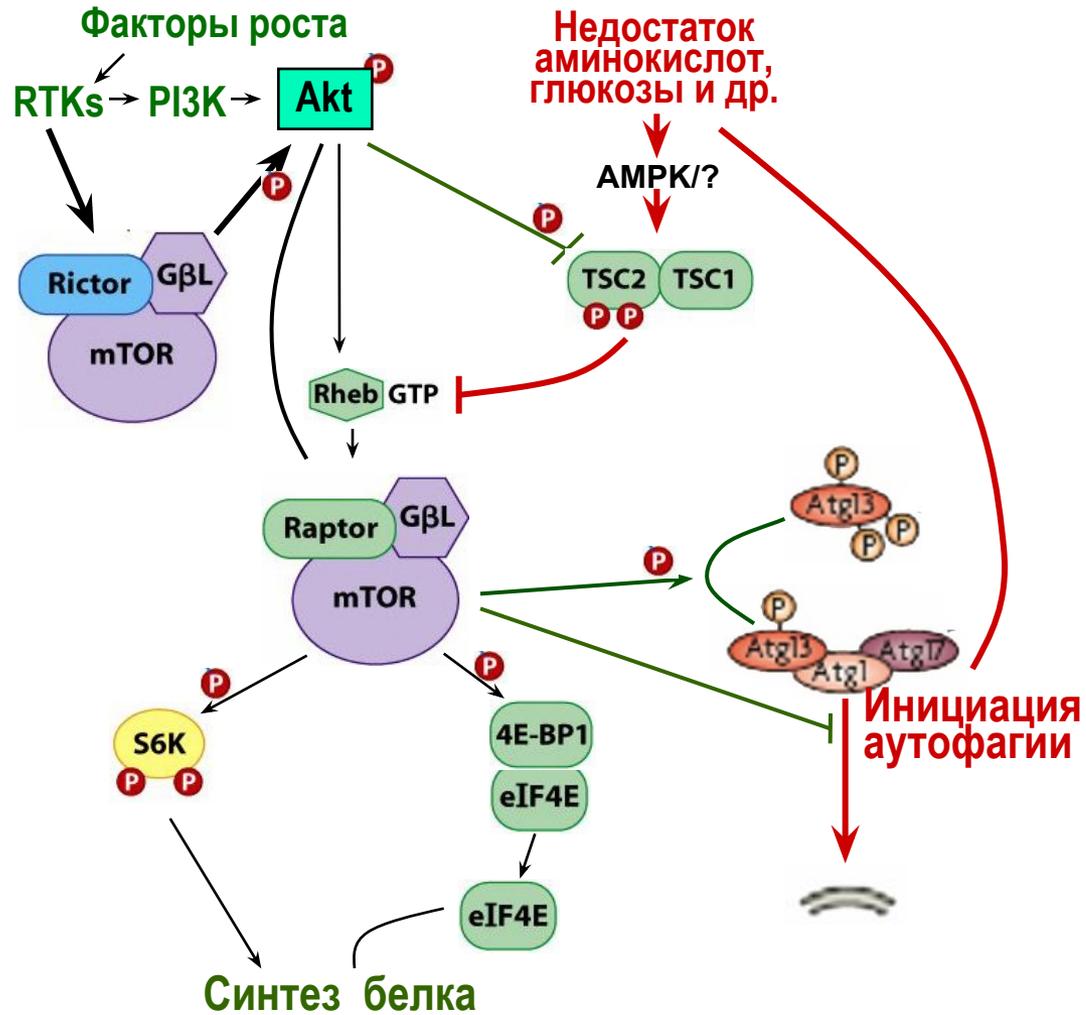
Сильная

Фактор
выживания клетки

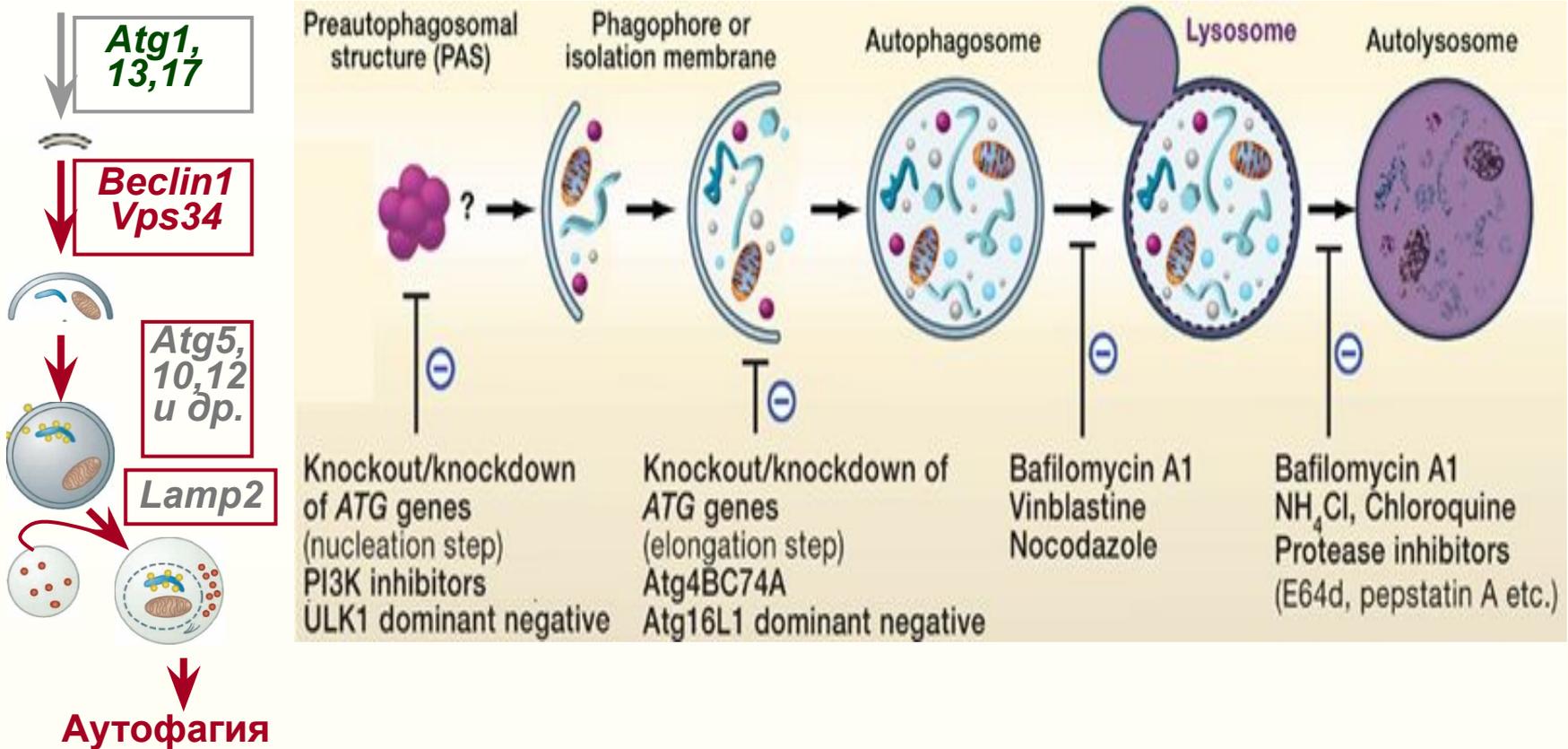
Смерть клетки;
выживание организма(?)



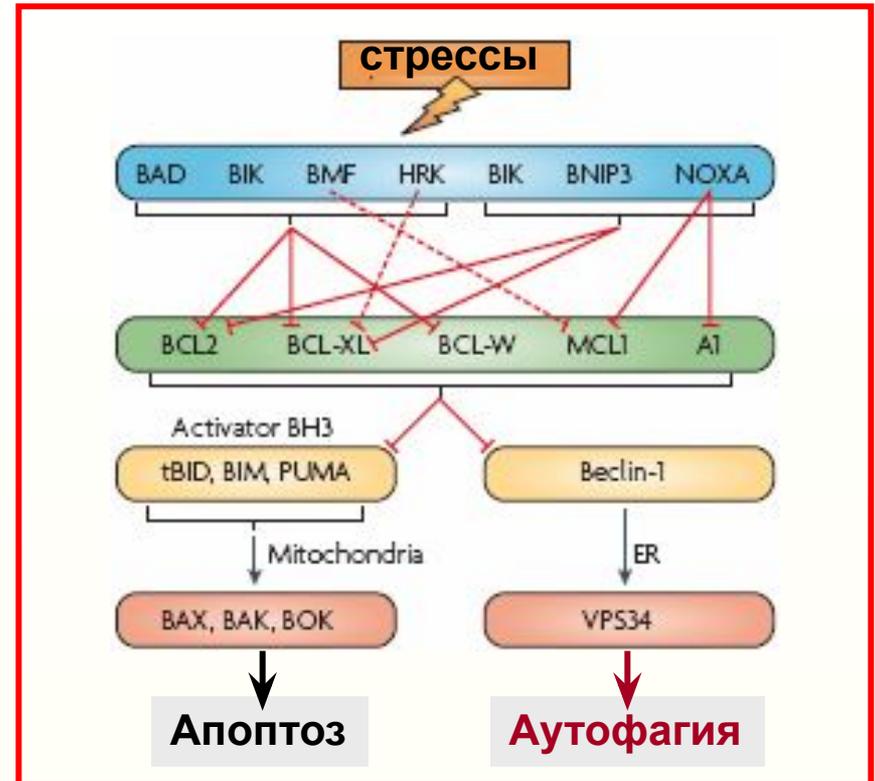
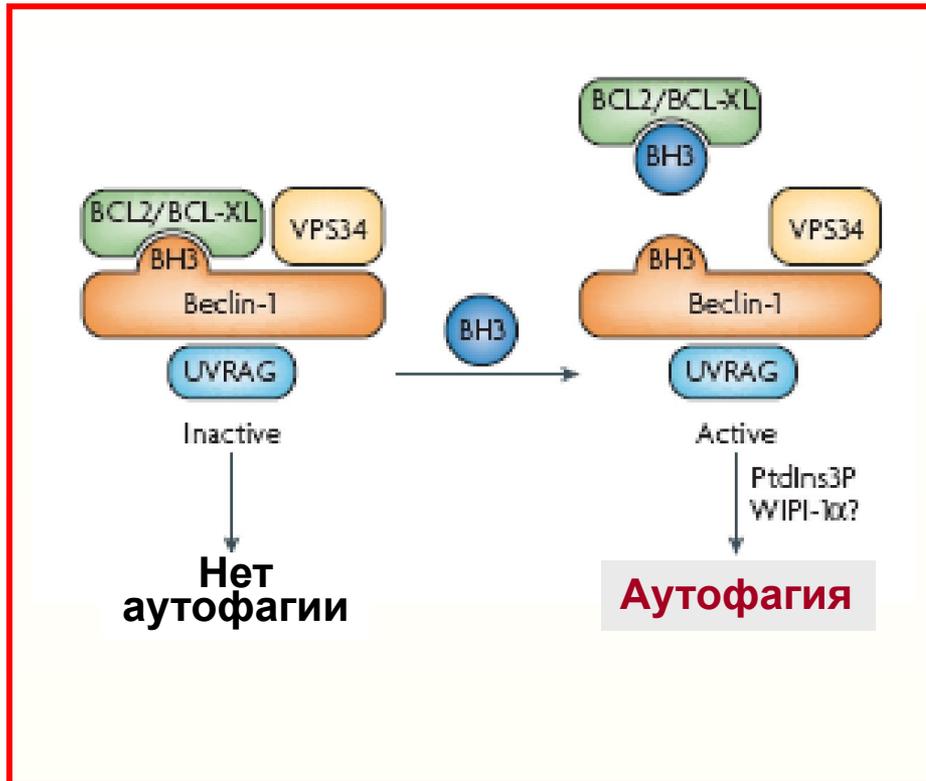
Регуляция аутофагии



Регуляция аутофагии

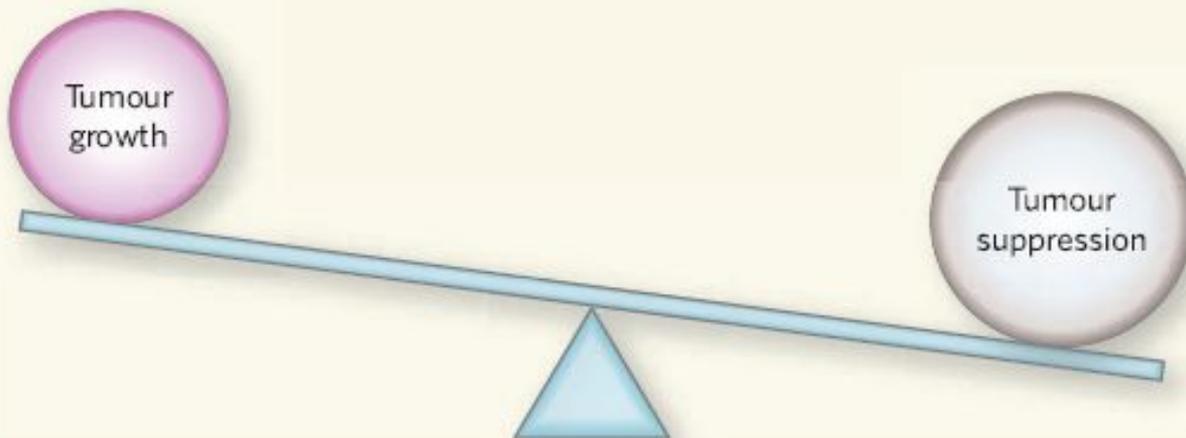


Белки семейства Bcl2 регулируют не только апоптоз, но и аутофагию



Сигнальные молекулы, регулирующие и апоптоз, и аутофагию:

- mTOR, Akt/ПКВ, PTEN, Ras
- белки сем. Bcl2
- DAP-киназы
- p14Arf/smArf, Mdm2, p53



- Cell survival during nutrient and oxygen shortage
- Cell survival during treatment with chemotherapy
- Prevention of apoptosis

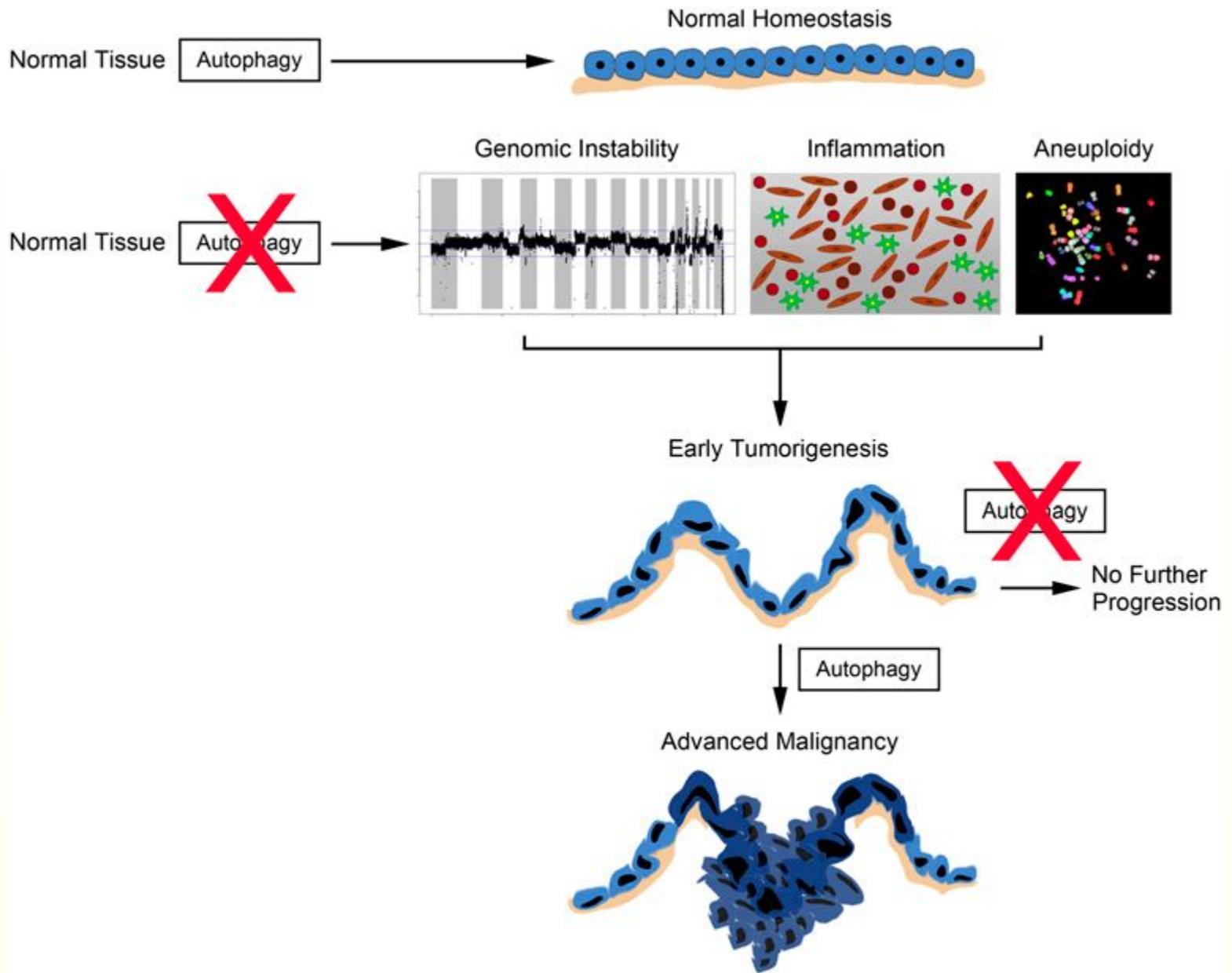
Autophagy

- Cell growth control
- Mitochondrial quality control (prevention of DNA-damaging stress)
- Physiological autophagic cell death
- Chemotherapy and radiation-induced autophagic cell death
- Endogenous antigen presentation/ tumour immunity
- Inhibition of blood-vessel formation

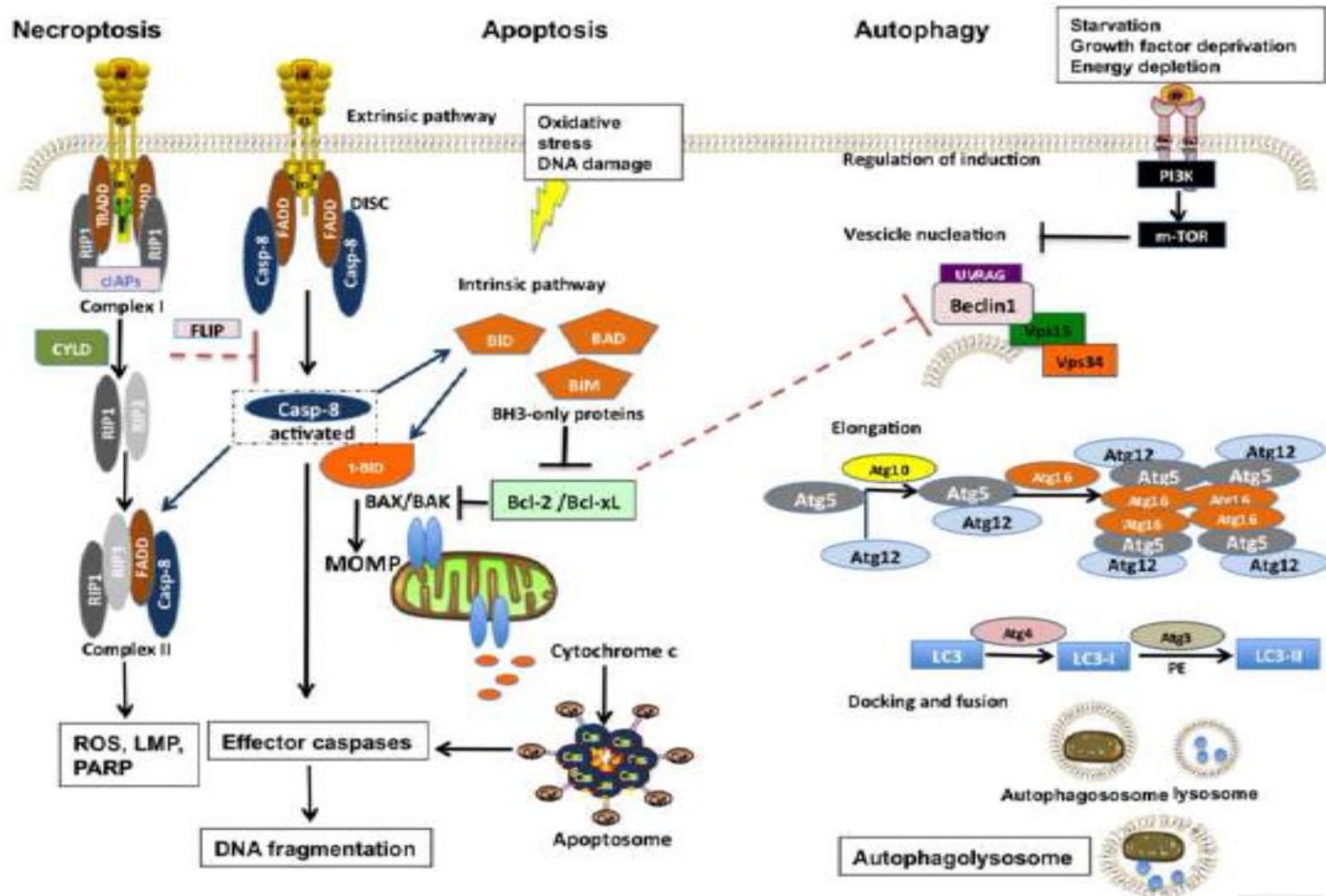
B.Levine, Nature, 2007, 446:745-747

У мышей гетерозиготный нокаут гена *Becclin1* (+/-) резко увеличивает вероятность развития лимфом, рака легкого и печени (*опухоли возникают у 60% животных*)

У человека гетерозиготные делеции гена *Becclin1* (+/-) характерны для рака молочной железы, яичника, простаты

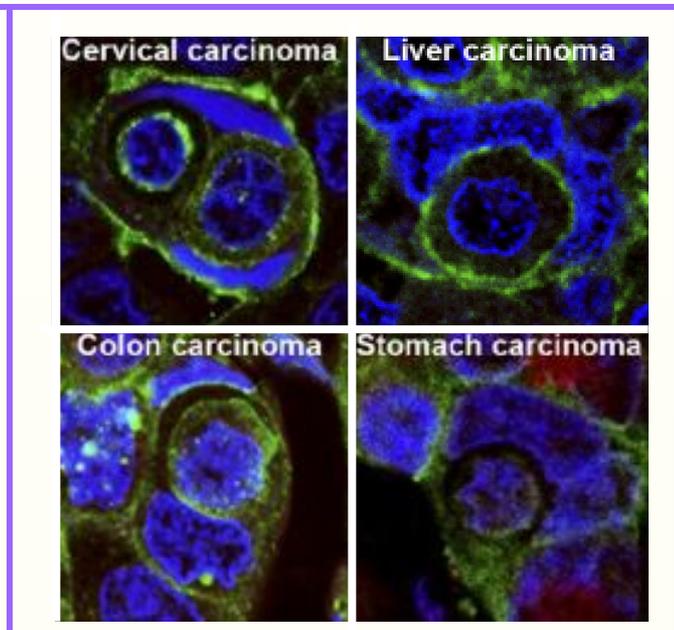
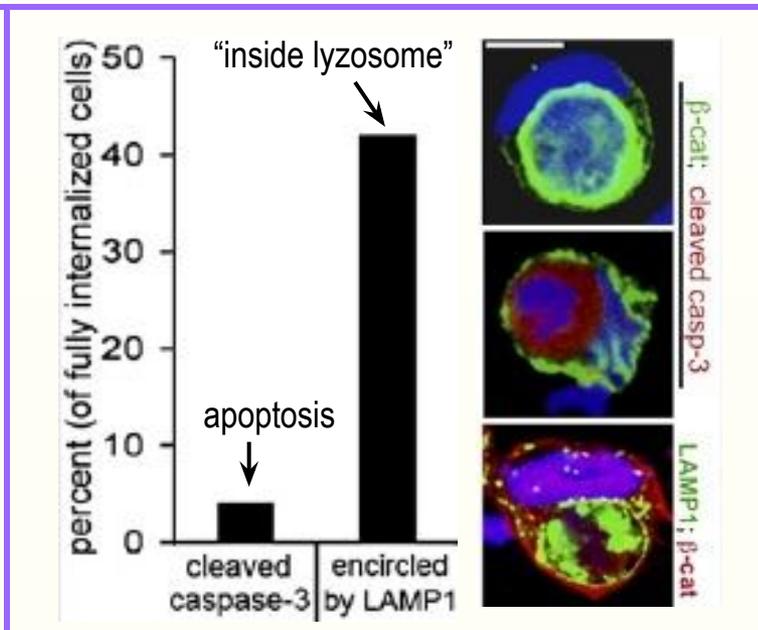
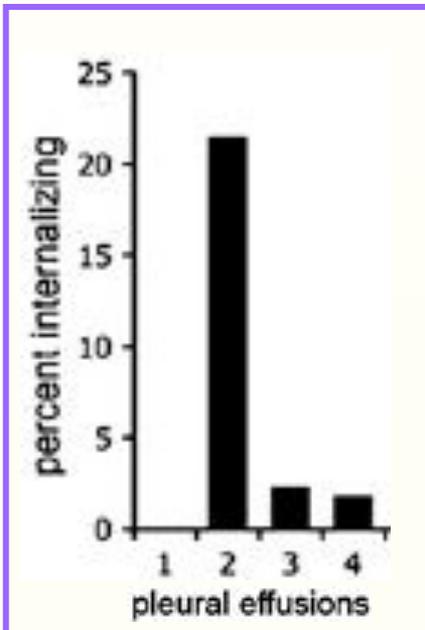
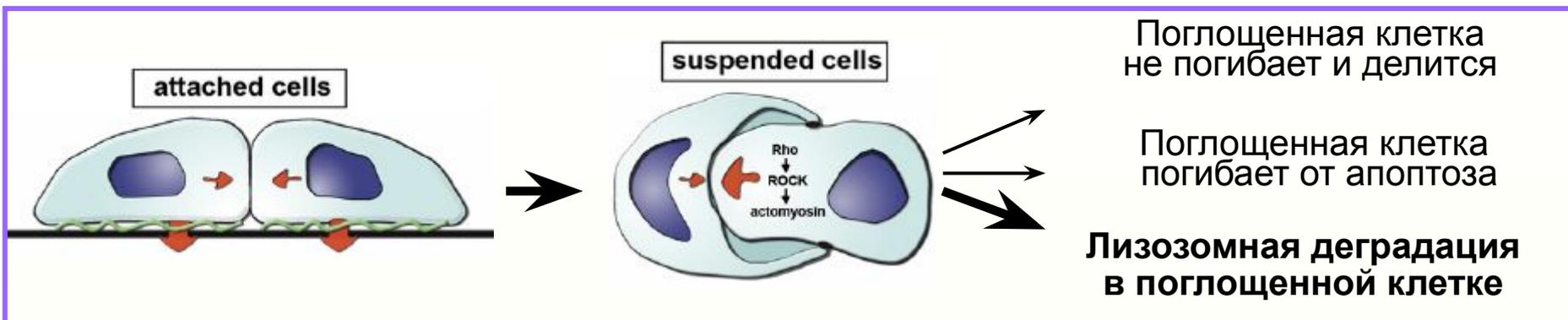


Взаимосвязь разных путей клеточной гибели

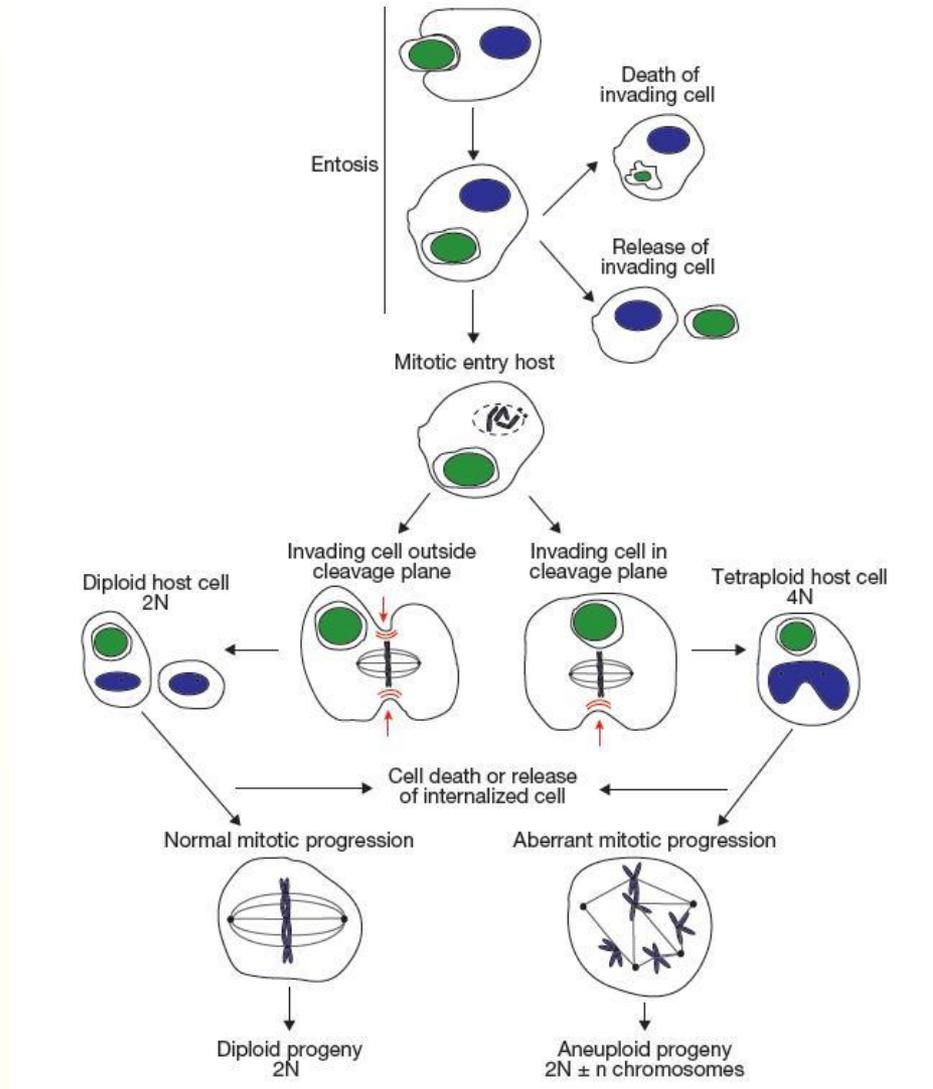


Энтоз – процесс поглощения одной клетки другой

Наблюдается, когда у клеток с межклеточными контактами теряются или ослабевают контакты с белками внеклеточного матрикса (фокальные контакты)



Энтоз индуцирует анеуплоидию



Роль энтоза в канцерогенезе

A

Entosis as a tumor accelerator



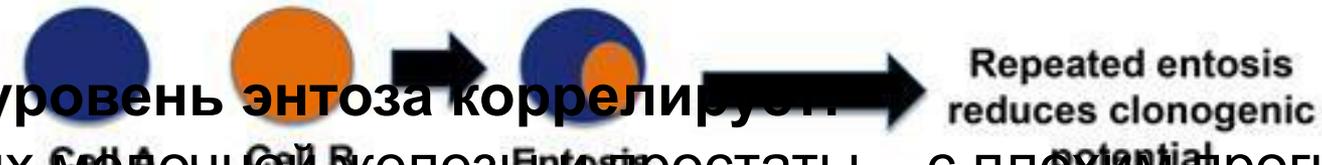
Поглощение нетрансформированных клеток трансформированными при ко-культивировании

Энтоз индуцируют:

- активированный онкоген K-Ras (через Rac1, PI3K/AKT/mTOR?)
- опухолевые супрессоры E- и P-кадхерины (RhoA, ROCK зависимо)

B

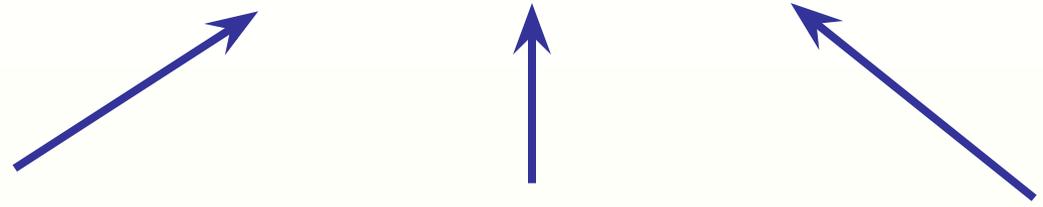
Entosis promotes suppression



Высокий уровень энтоза коррелирует с:

- в опухолях молочной железы и простаты – с плохим прогнозом
- в опухолях поджелудочной железы – со сниженной частотой метастазирования

**Интенсивное и
неограниченное
во времени
деление клеток**



**Постоянная
инициация
митотических
циклов**

**Нечувствительность к
рост-ингибирующим
сигналам
(приобретение
бессмертия и др.)**

**Подавление
программируемой
гибели клеток
(апоптоза, аутофагии
и др.)**



***Нестабильность генома
(мутации и эпигенетические изменения)***

Курс «Биология опухолевой клетки»
(2019 г.)

Н.Л. Лазаревич

Лекция 5

Нестабильность генома неопластических клеток