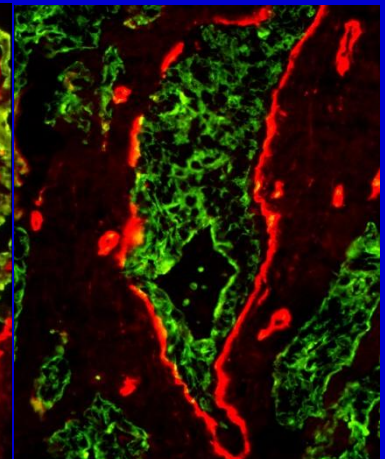
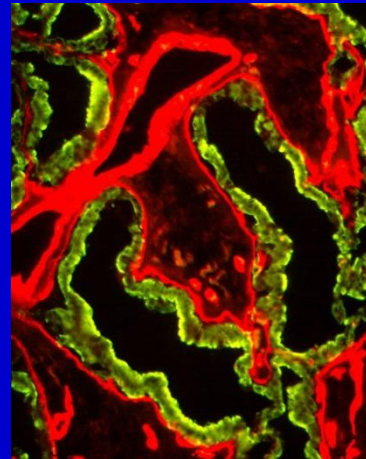
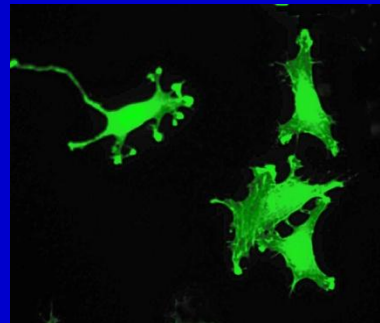
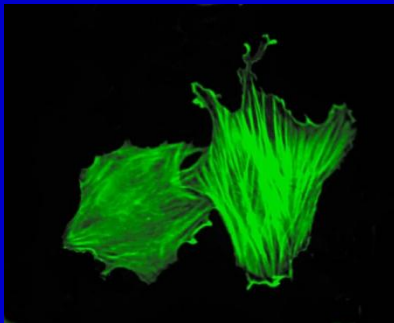
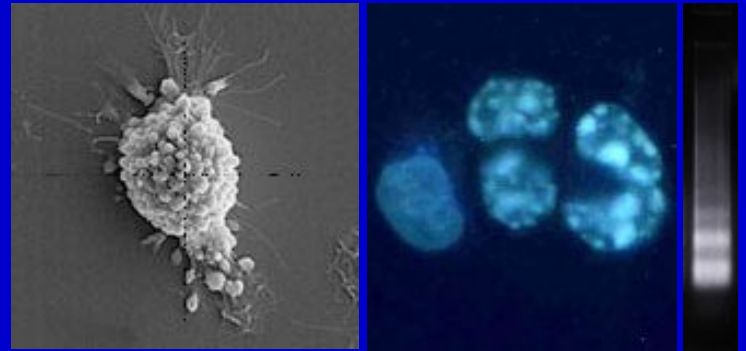
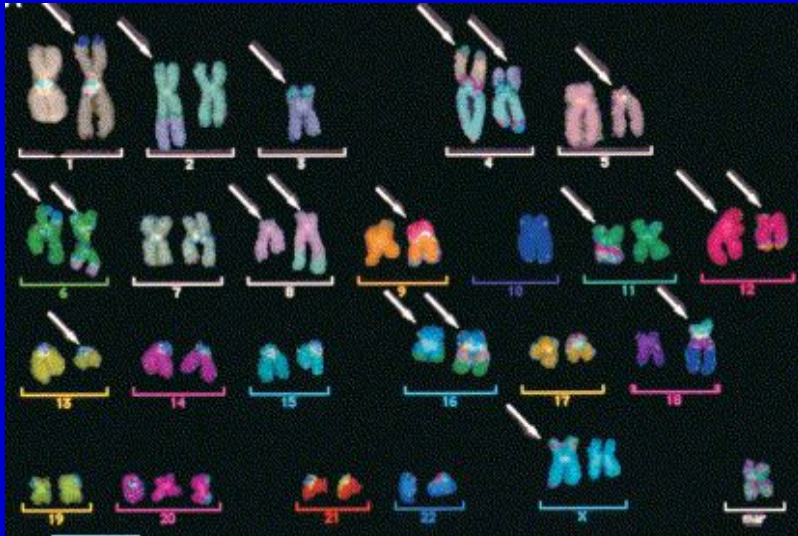


Курс «Биология опухолевой клетки»

(Н.Л. Лазаревич, 2019 г.)



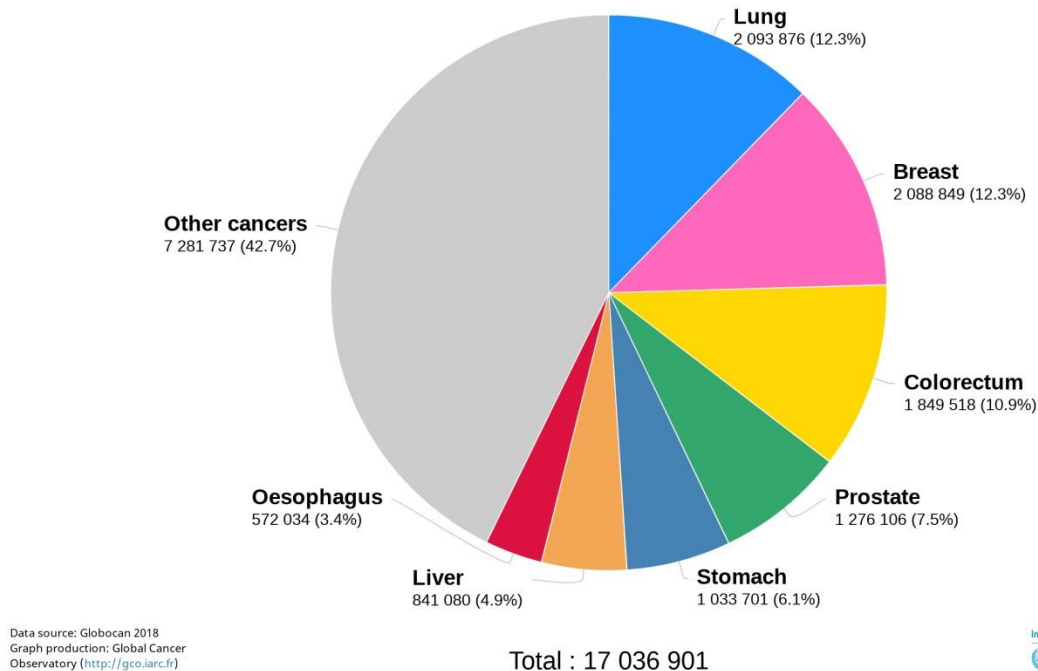
Важность проблемы:

1) Медицинское значение

(опухоли - одна из основных причин смерти)

В мире в год регистрируется около **17 млн.** новых случаев злокачественных опухолей в год, количество смертей – **9.5 млн.**

Estimated number of new cases in 2018, worldwide, all cancers excl. NMSC, both sexes, all ages



Global cancer statistics
2018 (GLOBOCAN),
DOI:[10.3322/caac.21492](https://doi.org/10.3322/caac.21492)

Наиболее распространены:

рак легких, молочной железы, толстой/прямой кишки, простаты, желудка, печени и шейки матки.

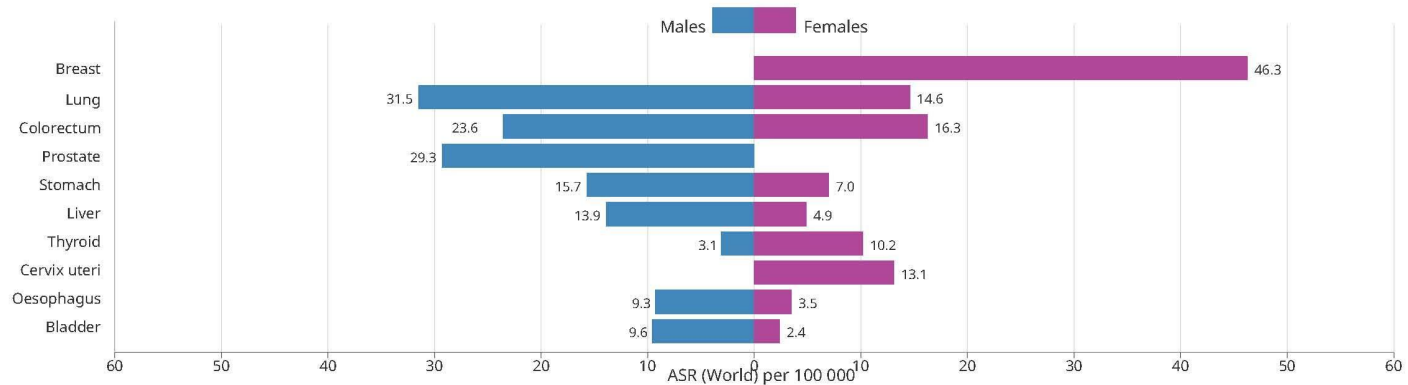
*Случаи рака кожи (1 млн. случаев), не являющегося меланомой, легко излечиваются и не учтены как злокачественные.

Важность проблемы:

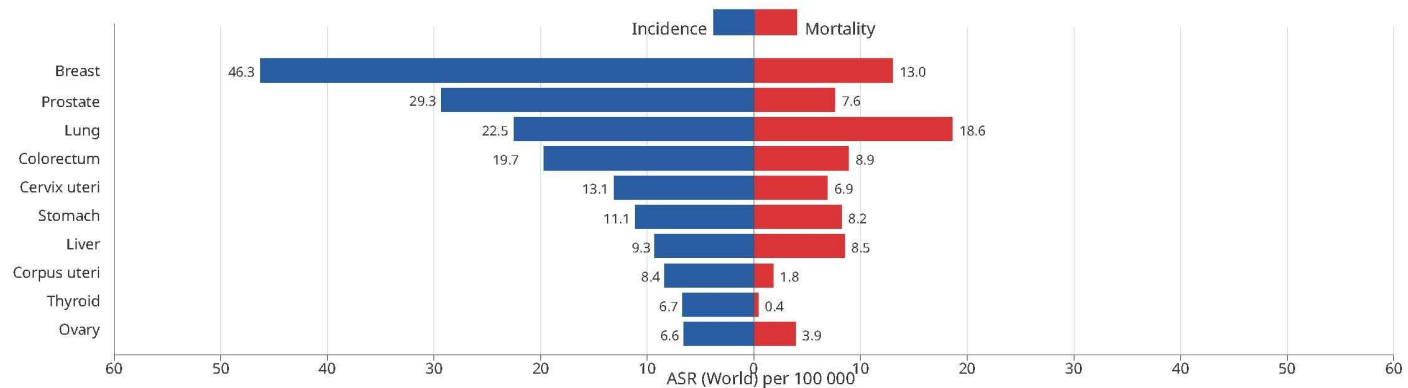
1) Медицинское значение

(опухоли - одна из основных причин смерти)

Age-standardized (World) incidence rates per sex, top 10 cancers



Age-standardized (World) incidence and mortality rates, top 10 cancers

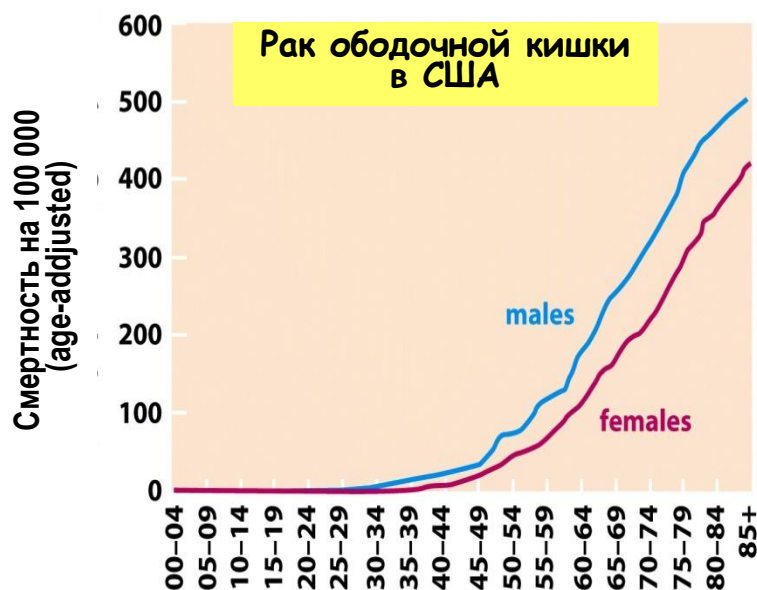


Возрастная зависимость заболеваемости и смертности



Возрастная зависимость заболеваемости.
Приведено число диагнозов рака толстой кишки в год у женщин в зависимости от их возраста на момент постановки диагноза.
Цифры нормированы на общее число представителей данной возрастной категории.

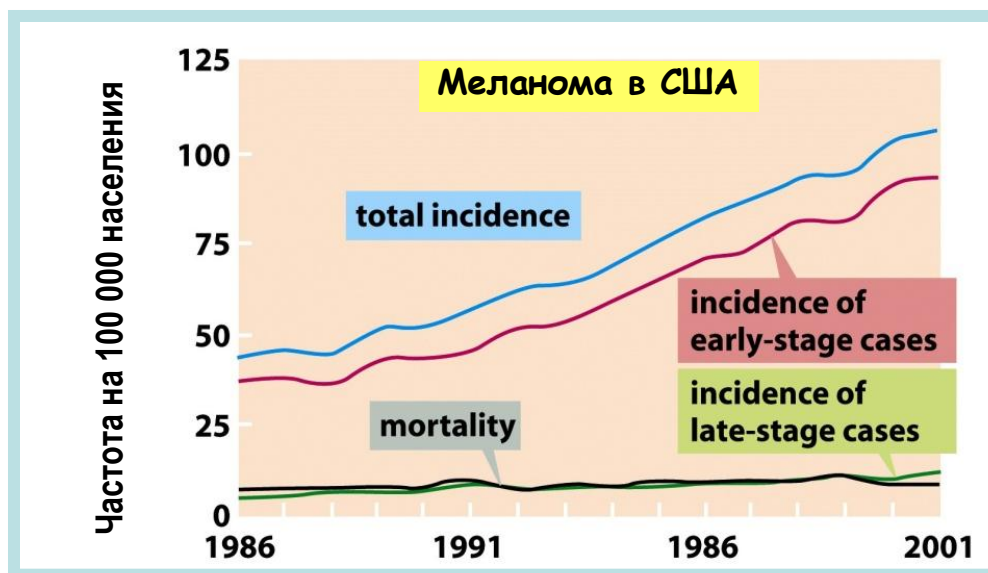
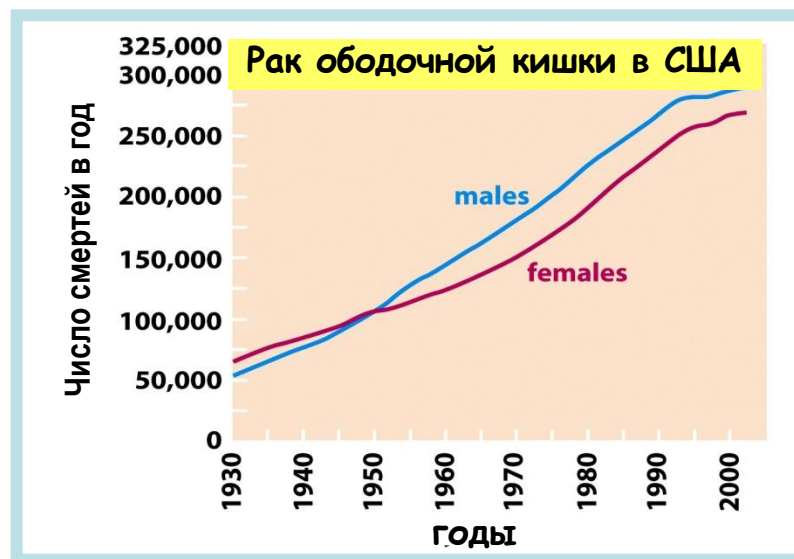
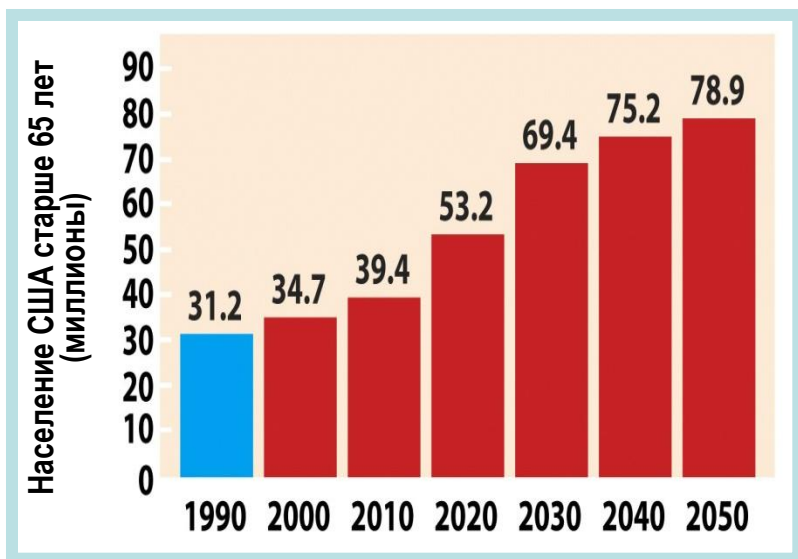
(*Cancer Incidence in Five Continents, International Agency for Research on Cancer, 1987*)



Возрастная зависимость смертности.
Приведено число смертей пациентов разного возраста с диагнозом рак толстой кишки.
Цифры нормированы на общее число представителей данной возрастной категории.

(Adapted from **R. Weinberg, The Biology of Cancer**
© **Garland Science 2007, 2013**)

Увеличение частоты заболеваемости и смертности



Важность проблемы:

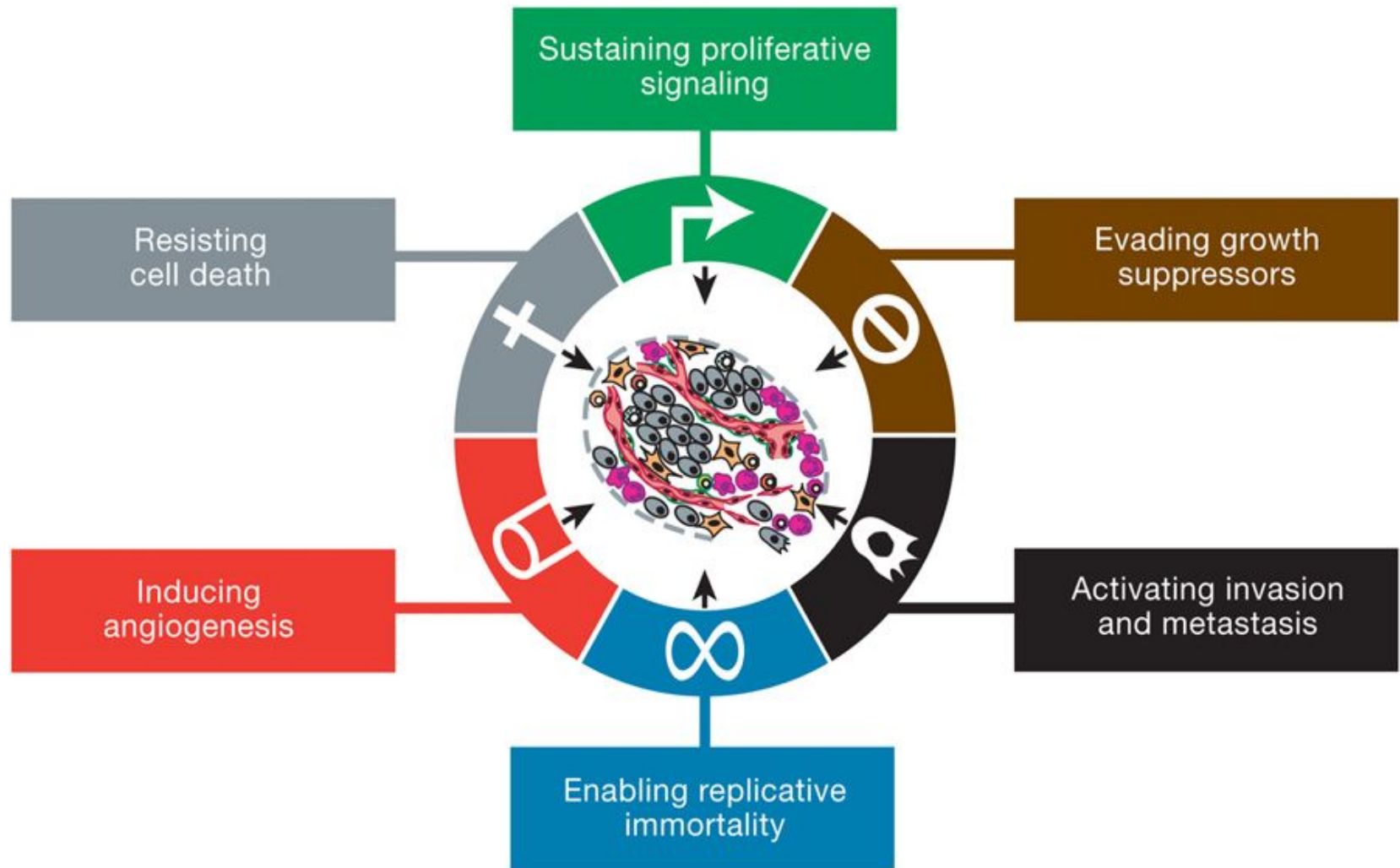
1) **Медицинское значение**
(опухоли - одна из основных причин смерти)

2) **Общебиологическое значение**
(исследование опухолевых клеток помогло раскрыть множество фундаментальных принципов регуляции размножения клеток и поддержания многоклеточного организма)

Опухолевые клетки ведут себя вопреки большинству принципов построения многоклеточного организма. Изучая эти отклонения, мы узнаем, что является для клетки нормой и что заставляет клетки следовать этой линии поведения.

Многие открытия в клеточной биологии совершены в стремлении победить рак. Обнаружены многие неизвестные до тех пор белки, нарушение функции которых может привести к неконтролируемому росту, ускоренному делению, повышенной жизнеспособности и другим аномальным свойствам раковых клеток.

Основные свойства опухолевых клеток (hallmarks of cancer)



1. Вводная лекция: понятие опухоль, классификация новообразований, базовые механизмы канцерогенеза.
2. Регуляция клеточного цикла и ее нарушения в неопластических клетках: роль онкогенов и опухолевых супрессоров.
3. Механизмы репликативного старения клеток и их нарушения при канцерогенезе.
4. Программируемая гибель клеток (апоптоз, аутофагия и др.) и ее нарушения в опухолевых клетках.
5. Генетическая нестабильность неопластических клеток: пути возникновения и роль в опухолевой прогрессии.
6. Изменения актинового цитоскелета и контактных структур, повышение двигательной активности опухолевых клеток.
7. Воздействие опухолевых клеток на микроокружение; роль модификаций микроокружения в прогрессии опухолей. Механизмы метастазирования эпителиальных опухолей.
8. Наиболее универсальные молекулярные изменения в опухолевых клетках: дисфункции белков Ras и p53 и их роль в канцерогенезе.
9. Роль химических канцерогенов, радиации и инфекционных агентов в развитии опухолей. Онкогенные вирусы человека: механизмы онкогенного действия и типы возникающих опухолей.
10. Иммунологический надзор в предотвращении опухолей и уход от него неопластических клеток.
11. Новые способы профилактики, диагностики и лечения опухолей, основанные на выяснении молекулярных механизмов канцерогенеза.

Курс «Биология опухолевой клетки»
(2019 г.)

Н.Л. Лазаревич

Лекция 1

**Понятие опухоль,
классификация новообразований,
базовые механизмы канцерогенеза**

Некоторые понятия и термины:

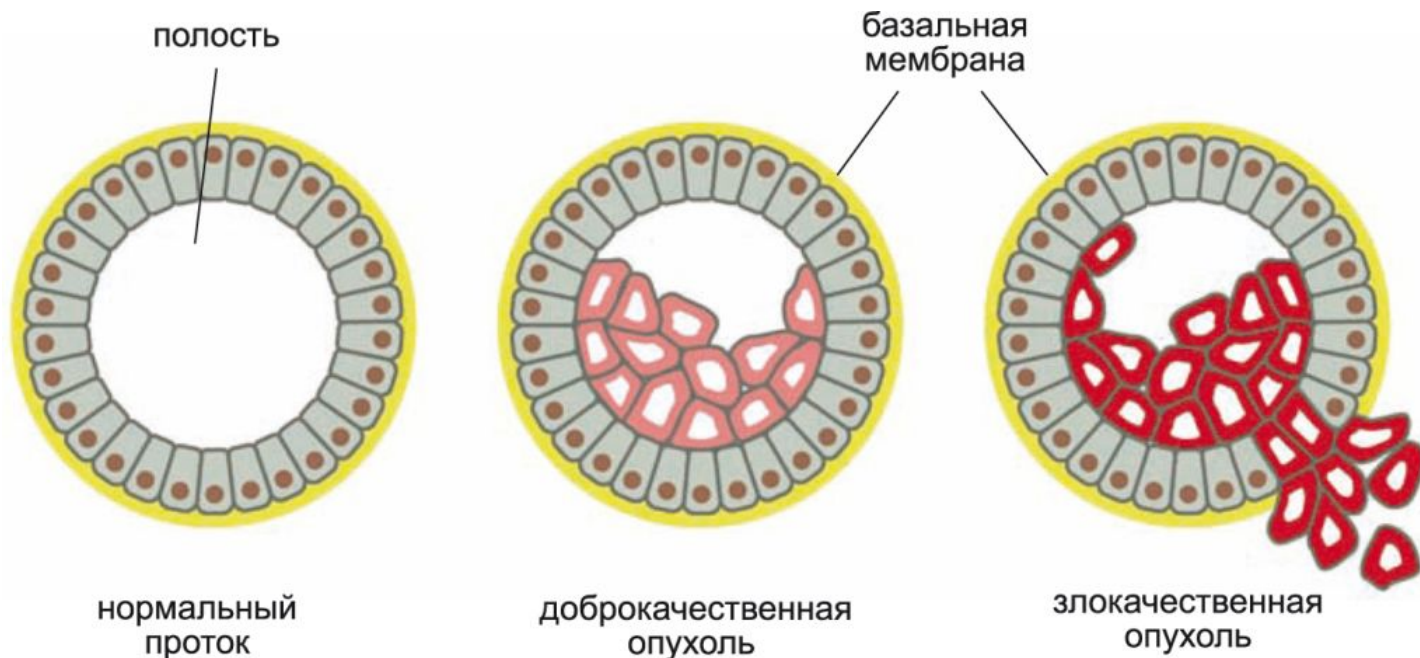
Опухоли – избыточно и неконтролируемо размножающиеся клоны клеток, образующие дополнительную ткань в каком-либо органе

В отличие от одноклеточных (бактерий и др.), клетки многоклеточного организма обречены на сотрудничество, согласовывая свое поведение с помощью огромного количества сигналов, которые они посылают друг другу, воспринимают, а затем интерпретируют. Эти сигналы действуют подобно *общественному контролю* и направляют действия каждой отдельной клетки. В итоге каждая клетка ведет себя (то есть пребывает в покое, растет, делится, дифференцируется или умирает) *сообразно нуждам целого организма*. Нарушение этой гармонии может обернуться для многоклеточного сообщества большими проблемами. В теле человека, содержащем более 10^{14} клеток, каждый день миллиарды клеток претерпевают мутации, которые могут привести к выходу из-под общественного контроля. Наиболее опасны мутации, дающие одной из клеток *селективное преимущество*, позволяя ей расти и делиться более интенсивно, чем соседние клетки, и при этом легче выживать. Такая клетка может стать основательницей *избыточно растущего*

Некоторые понятия и термины:

Опухоли – избыточно и неконтролируемо размножающиеся клоны клеток, образующие дополнительную ткань в каком-либо органе

Злокачественные опухоли – новообразования, развитие которых может вызвать смерть организма-хозяина. Клетки таких опухолей проникают в окружающие нормальные ткани (**инвазия**) и/или отдаленные органы, образуя там вторичные очаги опухолевого роста (**метастазы**)



Некоторые понятия и термины:

Опухоли – избыточно и неконтролируемо размножающиеся клоны клеток, образующие дополнительную ткань в каком-либо органе

Злокачественные опухоли – новообразования, развитие которых может вызвать смерть организма-хозяина. Клетки таких опухолей проникают в окружающие нормальные ткани (**инвазия**) и/или отдаленные органы, образуя там вторичные очаги опухолевого роста (**метастазы**)



Метастазы рака кишки в печени



Метастазы рака молочной железы в мозге



Метастазы меланомы в легкие и мышцы



Прижизненное выявление метастазов

Приведены результаты сканирования всего тела пациента с метастатической неходжкинской лимфомой (non-Hodgkins lymphoma, NHL). Изображение получено при наложении результатов **позитронной эмиссионной томографии (PET)** на картинку, получающуюся при сканировании методом рентгеновской компьютерной томографии (КТ). Рентгеновская томография дает изображение тканей организма; метод PET позволяет выявить участки тела, поглощающие меченную радиоактивным фтором **фтордезоксиглюкозу (FDG)**: в таких участках находится опухолевая ткань (желтый цвет). Высокий уровень поглощения FDG служит маркером опухолевых клеток, у которых метаболизм глюкозы необычайно интенсивен (**эффект Варбурга**). Желтые точки в области

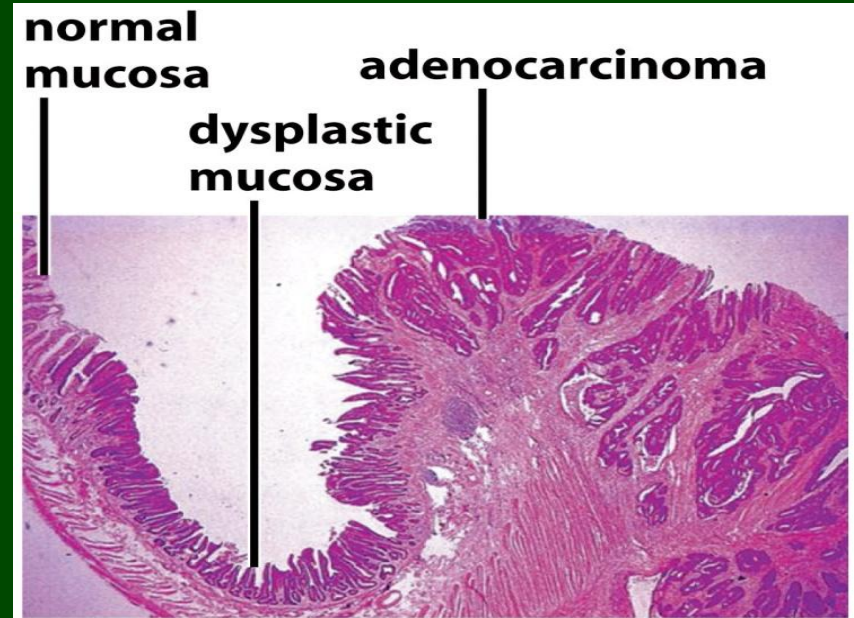
Некоторые понятия и термины:

Опухоли – избыточно и неконтролируемо размножающиеся клоны клеток, образующие дополнительную ткань в каком-либо органе

Злокачественные опухоли – новообразования, развитие которых может вызвать смерть организма-хозяина. Клетки таких опухолей проникают в окружающие нормальные ткани (инвазия) и/или отдаленные органы, образуя там вторичные очаги опухолевого роста (метастазы)

Опухолевая прогрессия –

постоянное появление и отбор в опухолевой ткани клонов клеток, обладающих все большей и большей автономностью, миграционной активностью, агрессивностью и устойчивостью к терапевтическим воздействиям



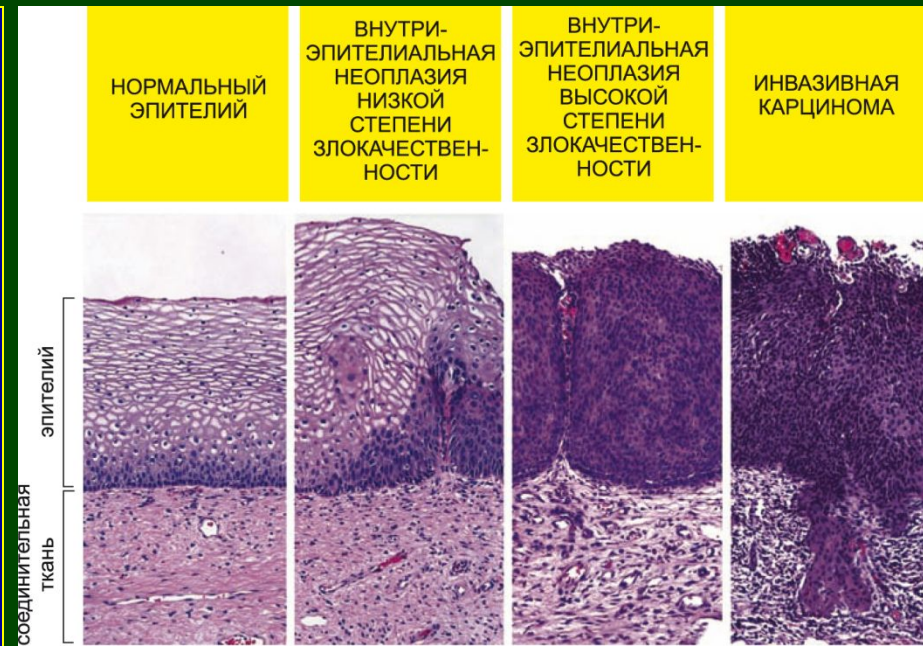
Некоторые понятия и термины:

Опухоли – избыточно и неконтролируемо размножающиеся клоны клеток, образующие дополнительную ткань в каком-либо органе

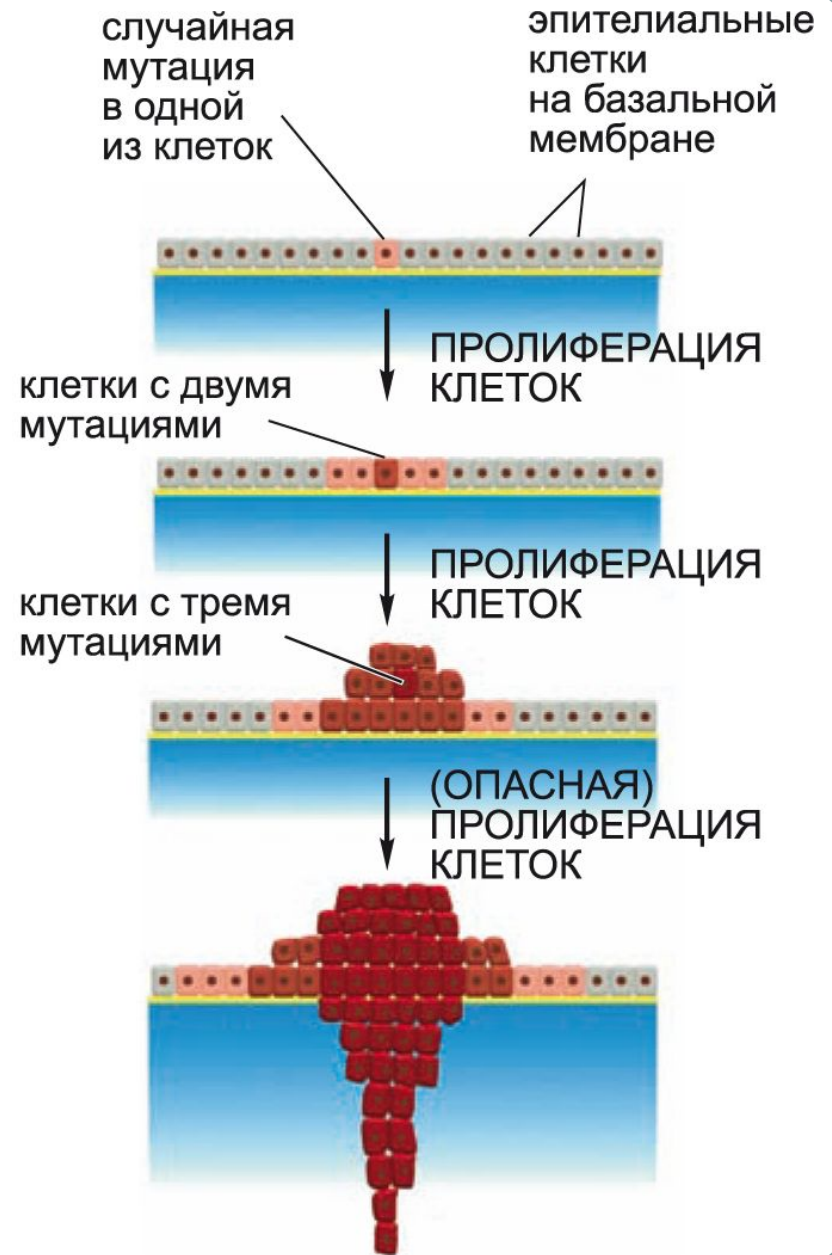
Злокачественные опухоли – новообразования, развитие которых может вызвать смерть организма-хозяина. Клетки таких опухолей проникают в окружающие нормальные ткани (инвазия) и/или отдаленные органы, образуя там вторичные очаги опухолевого роста (метастазы)

Опухолевая прогрессия –

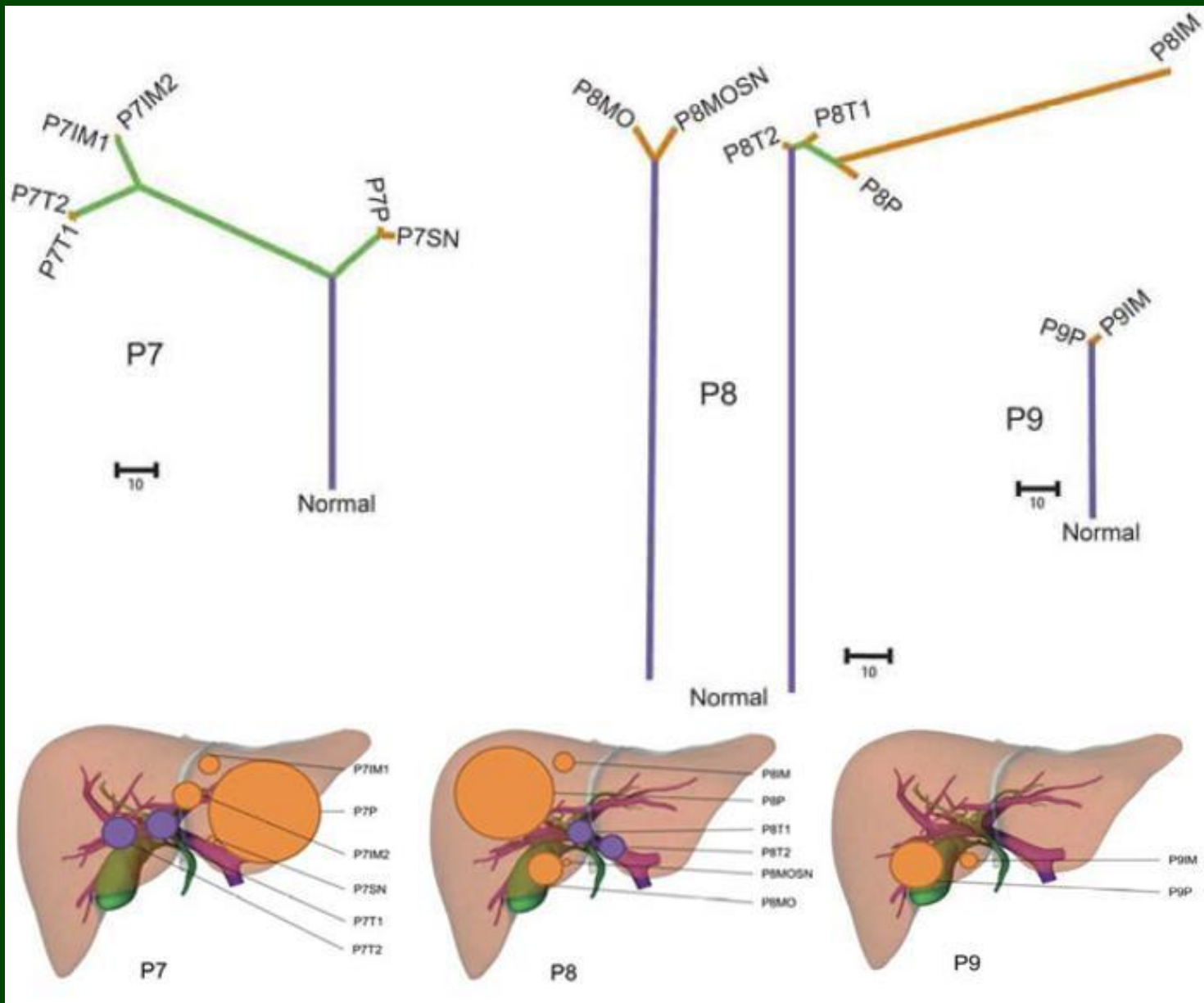
постоянное появление и отбор в опухолевой ткани клонов клеток, обладающих все большей и большей автономностью, миграционной активностью, агрессивностью и устойчивостью к терапевтическим воздействиям



***В основе опухолевой
прогрессии лежит
накопление генетических
и эпигенетических
изменений в потомках
клетки-родоначальницы
опухоли***

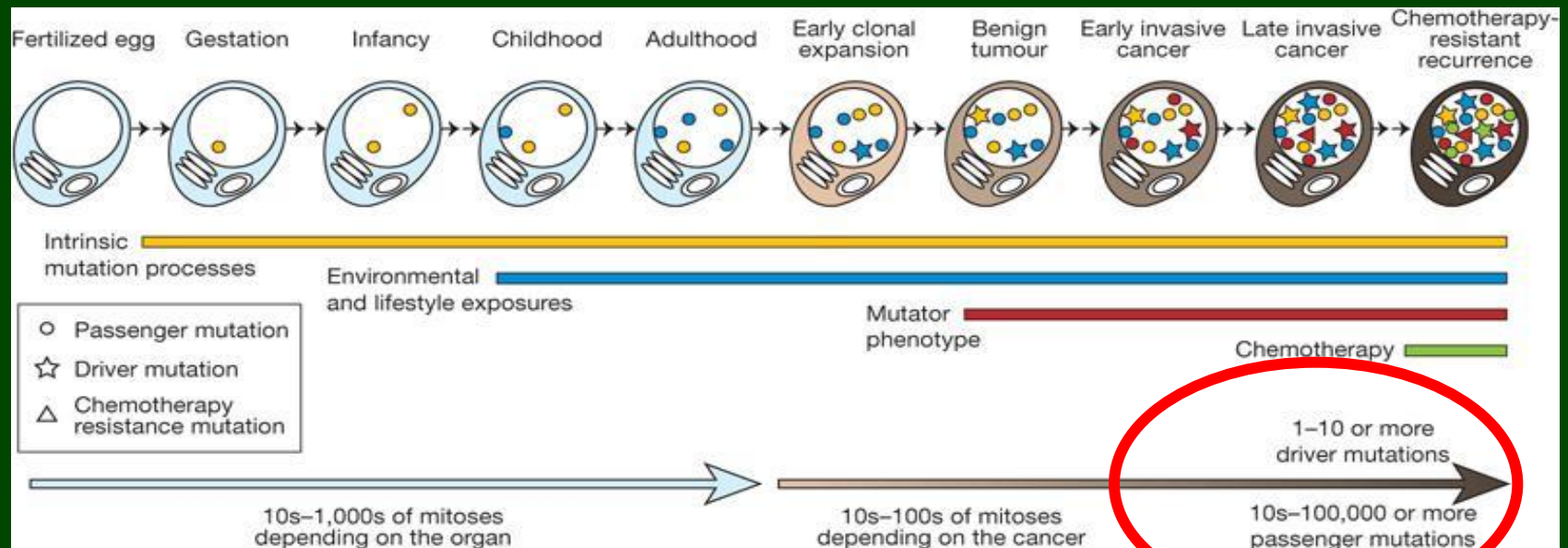


Клональная эволюция опухолей

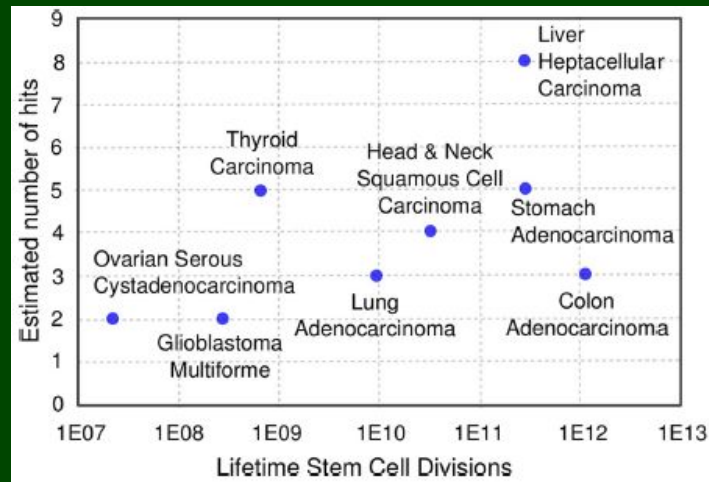
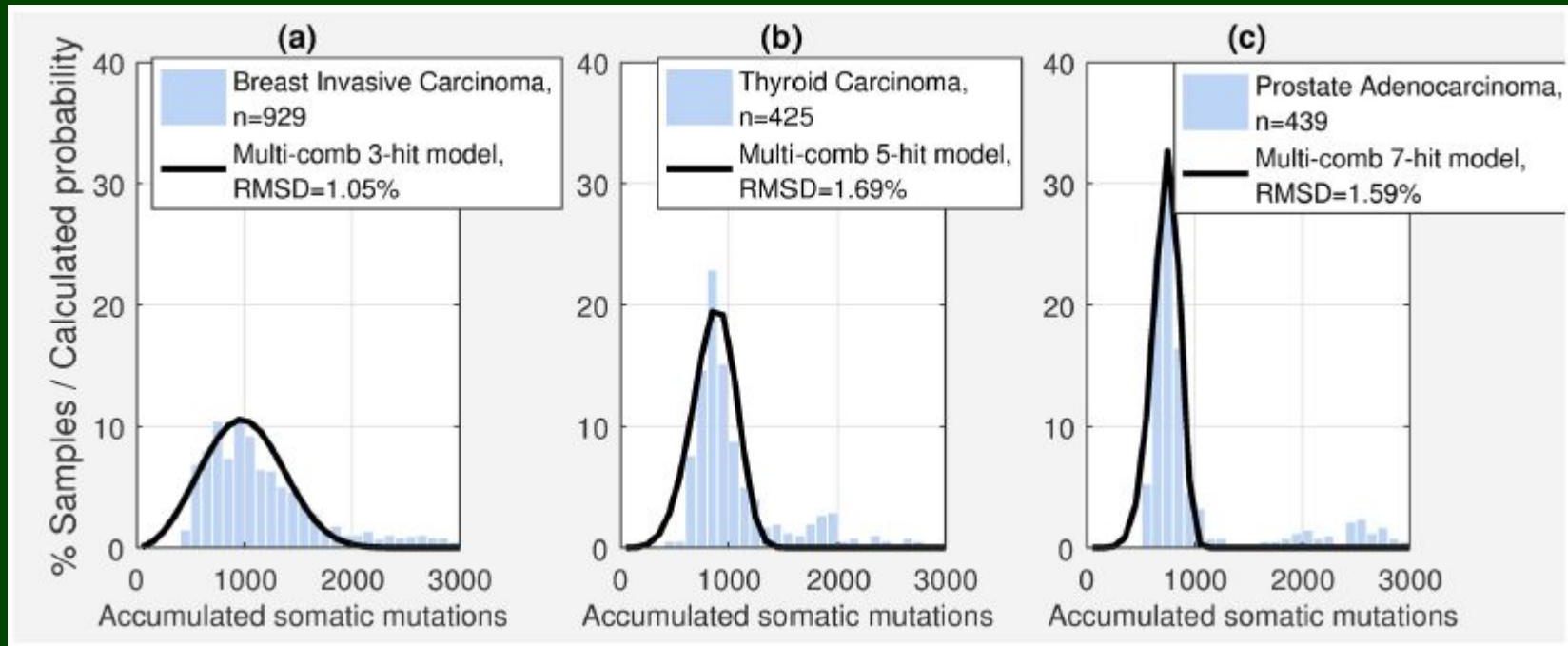


"Драйверные" и "пассажирские" мутации

- "Драйверы" – способствуют канцерогенезу, обеспечивают клональную экспансию трансформированных клеток
- "Пассажиры" – случайные мутации, не способствуют отбору опухолевых клеток



Сколько драйверных мутаций нужно для возникновения опухоли?



Anandakrishnan et al., 2019,
doi:10.1371/journal.pcbi.1006881

Некоторые понятия и термины:

Название опухоли зависит от типа клеток, из которых она возникает/состоит, и ее злокачественности/доброкачественности:

Происхождение

Доброкачественные

Злокачественные

Эпителий

Многослойный плоский
(кожа, шейка матки и др.)

**Папиллома/интраэпители-
альная неоплазия (ИЭН)**

Рак (carcinoma)

**Плоскоклеточный
рак**

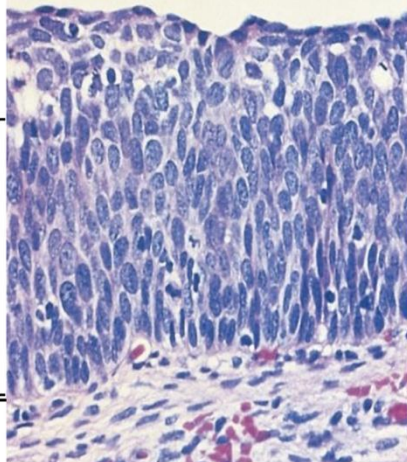
Железистый

(мол. железа, кишка и др.)

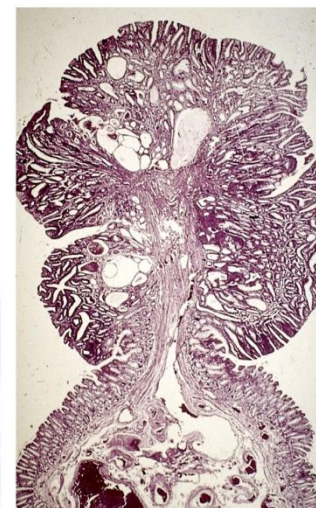
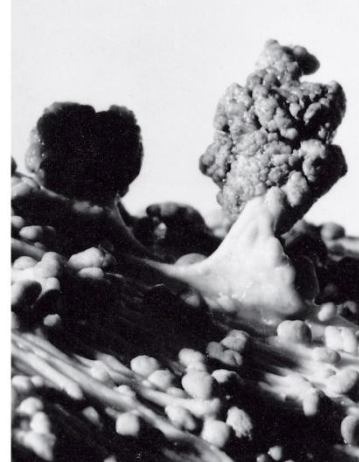
Аденома/полип

Аденокарцинома

ИЭН шейки матки



Полип в кишке

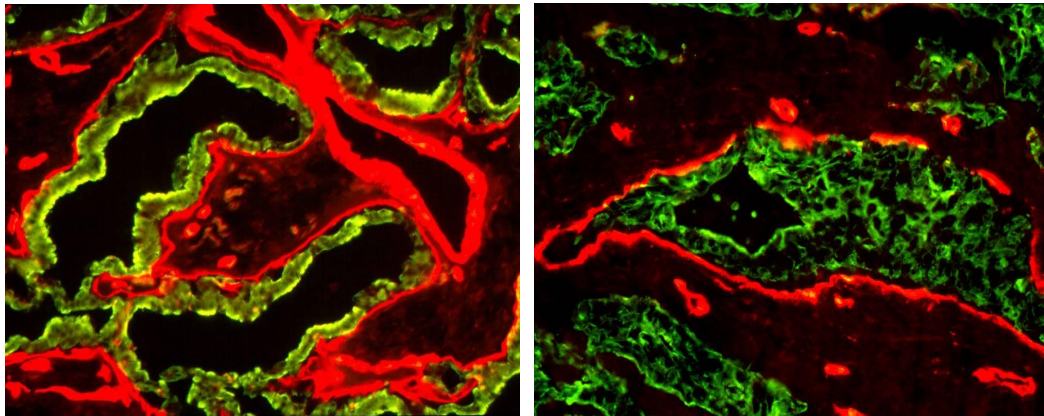


Некоторые понятия и термины:

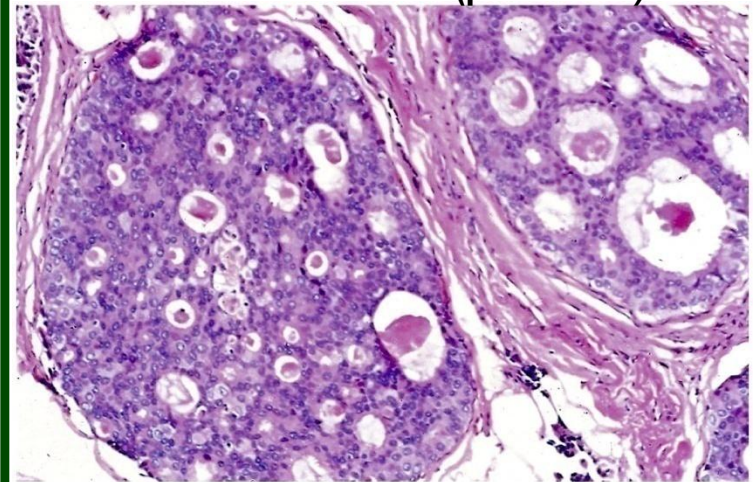
Название опухоли зависит от типа клеток, из которых она возникает/состоит, и ее злокачественности/доброкачественности:

Происхождение	Доброкачественные	Злокачественные
Эпителий		Рак (carcinoma)
Многослойный плоский (кожа, шейка матки и др.)	Интраэпителиальная неоплазия (ИЭН)	Плоскоклеточный рак
Железистый (мол. железа, кишка и др.)	Аденома/полип	Аденокарцинома

Норма (слева) и инвазивный рак (справа) молочной железы.
Зеленый – эпителиальные клетки (окраска на цитокератины)
красный – базальные мембраны (окраска на ламинин)



Внутрипротоковый рак
молочной железы (рак *in situ*)



Некоторые понятия и термины:

Название опухоли зависит от типа клеток, из которых она возникает/состоит, и ее злокачественности/доброкачественности:

Происхождение	Доброкачественные	Злокачественные
Эпителий		Рак (carcinoma)
Многослойный плоский (кожа, шейка матки и др.)	Интраэпителиальная неоплазия (ИЭН)	Плоскоклеточный рак
Железистый (мол. железа, кишка и др.)	Аденома/полип	Аденокарцинома
Клетки соедин. ткани		Саркома
Фибробласты	Фиброма	Фибросаркома
Остеобласты	Остеома	Остеосаркома
	Кроветворные клетки	
Хронический лейкоз, Лимфома		Острый лейкоз, Злокач. лимфома

Злокачественные новообразования возникают в результате неограниченной пролиферации клеточных клонов, выходящих за пределы собственной ткани и способных к росту на территориях других тканей



**Инвазивный рост,
метастазирование**

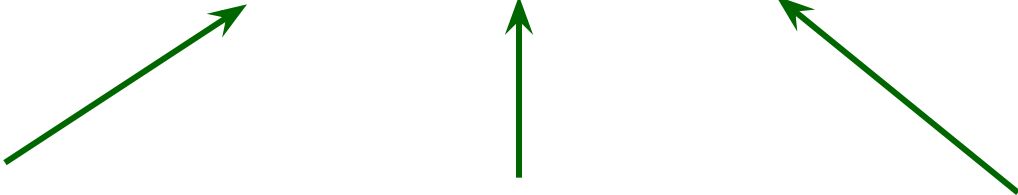
**Интенсивное и
неограниченное
во времени
деление клеток**

**Изменения морфологии
клетки, «локомоторный»
фенотип**

**Модификация
микроокружения
(ангиогенез и др.)**

**Ускользание от
иммунологического
надзора**

**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.)**



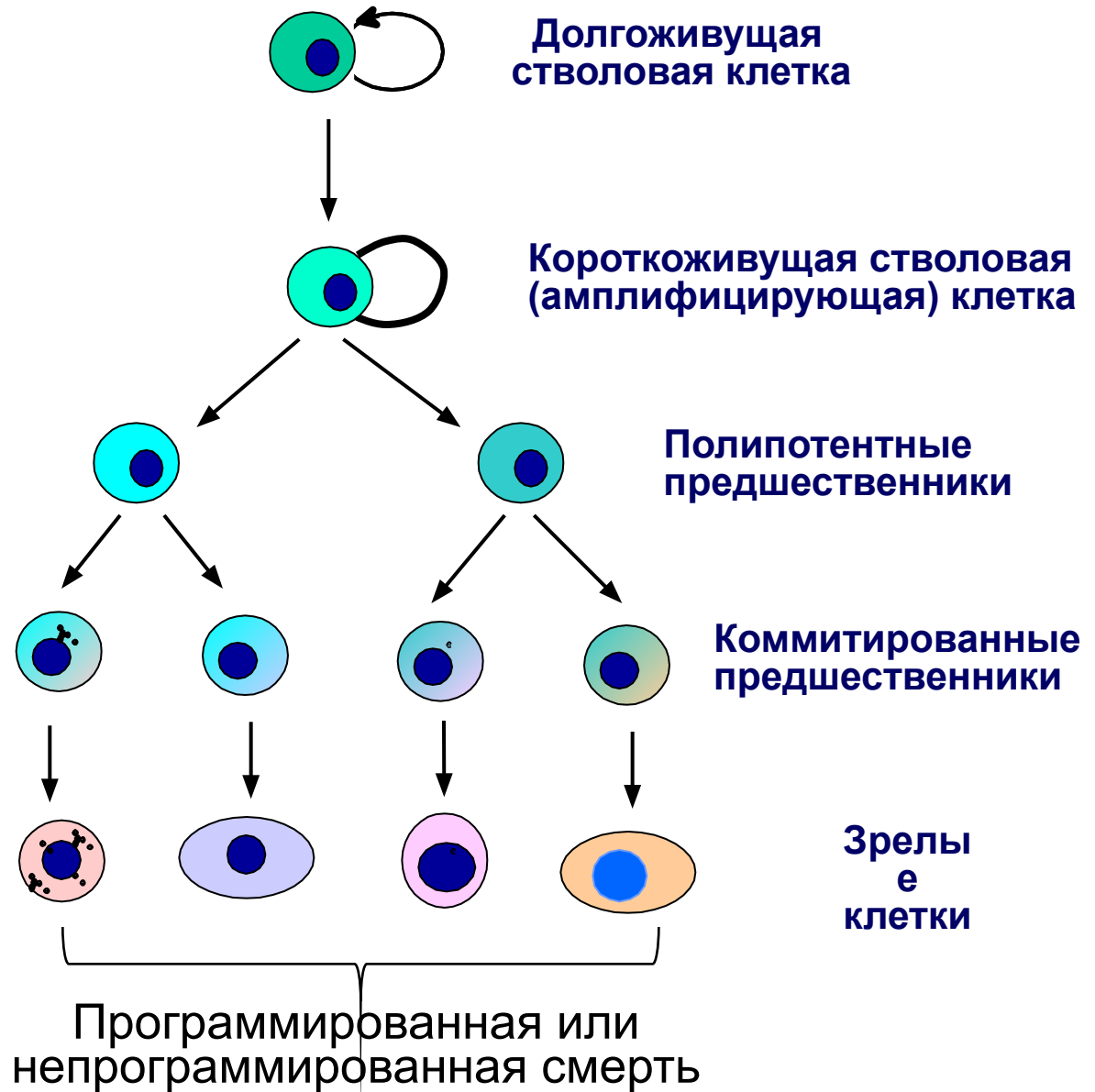
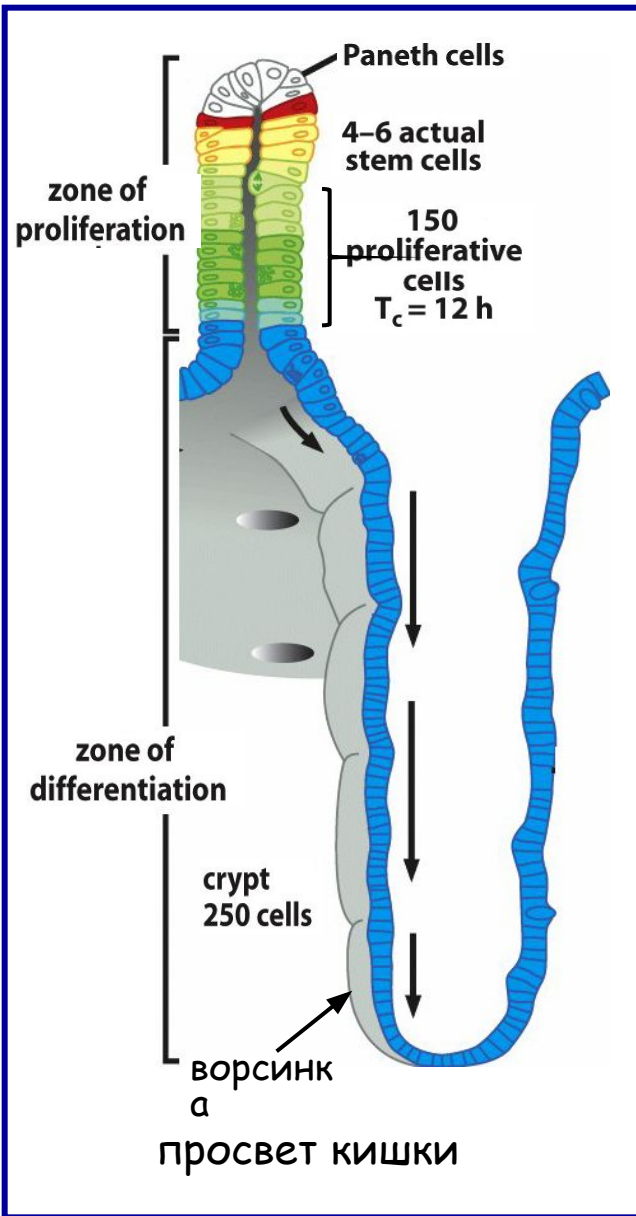
***Нестабильность генома
(мутации и эпигенетические изменения)***

Интенсивное и неограниченное во времени деление клеток

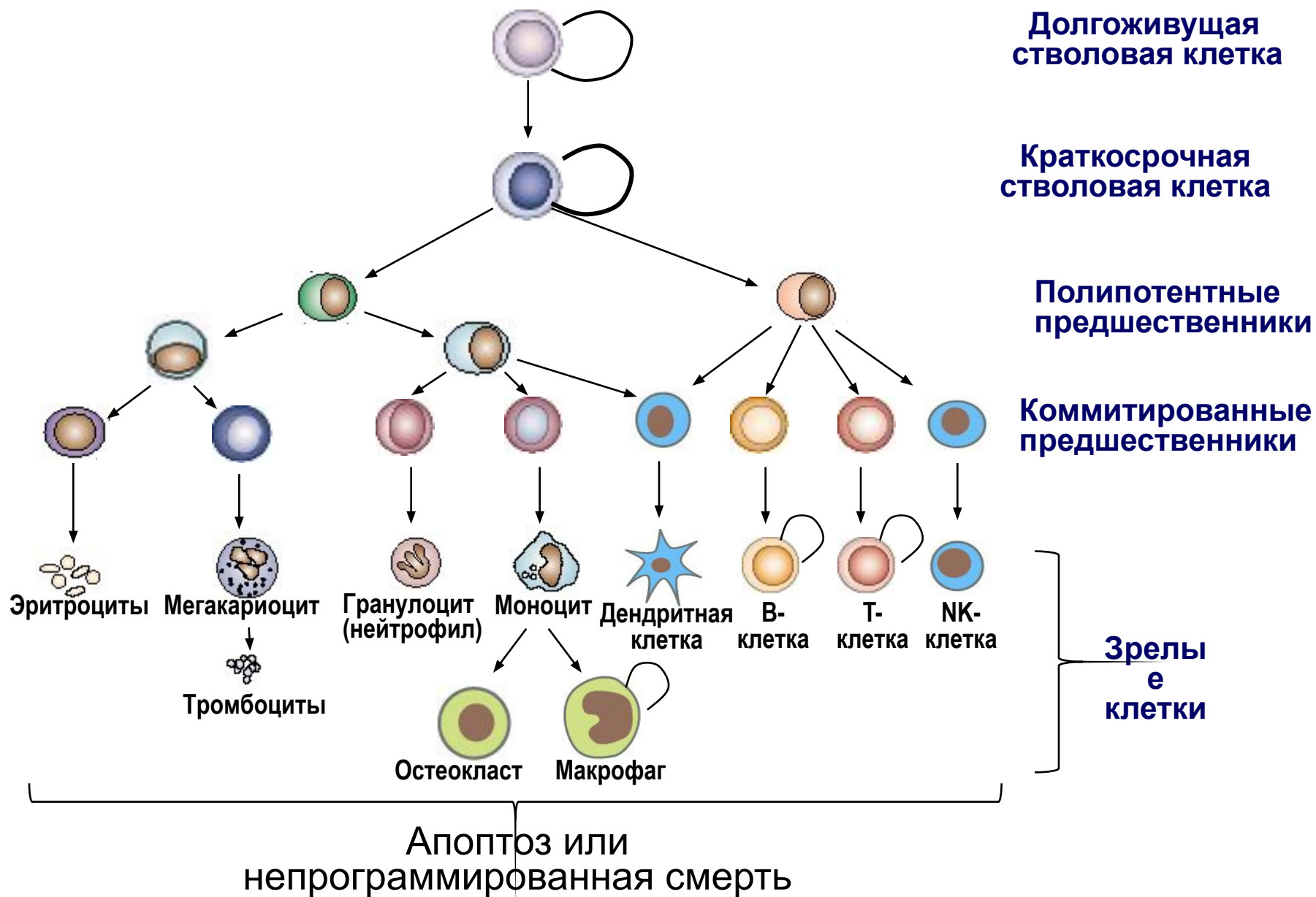
Опухоли возникают вследствие нарушения контроля размножения клеток, обеспечивающего:

- 1) эмбриональное и постнатальное развитие
(опухоли у детей - относительно редко);
- 2) естественный процесс обновления тканей
(опухоли у детей и взрослых, чаще возникают в среднем и пожилом возрасте - большинство случаев)

Рост и обновление нормальных тканей

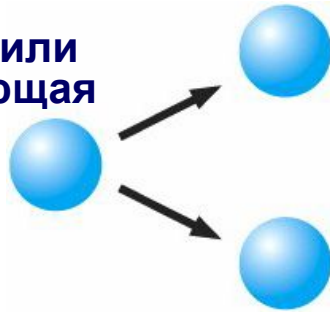


Дифференцировка и обновление клеток крови



Симметричное деление

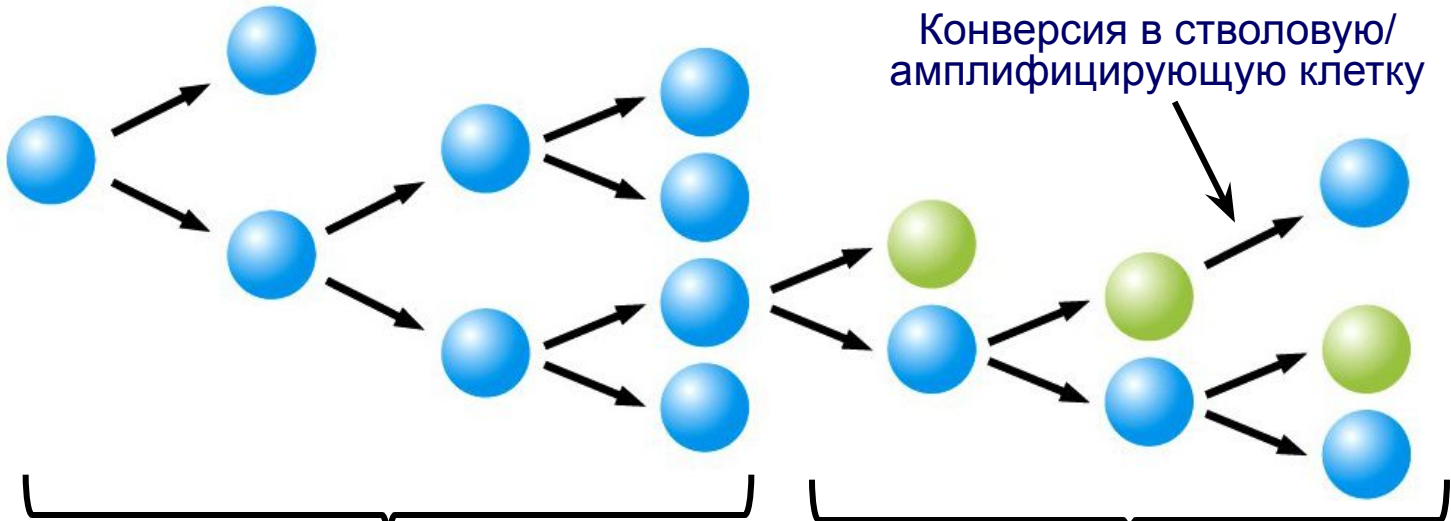
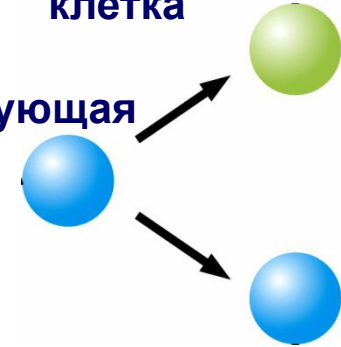
Стволовая или
амплифицирующая
клетка



Асимметричное деление

Дифференцирующаяся
клетка

Амплифицирующая
клетка

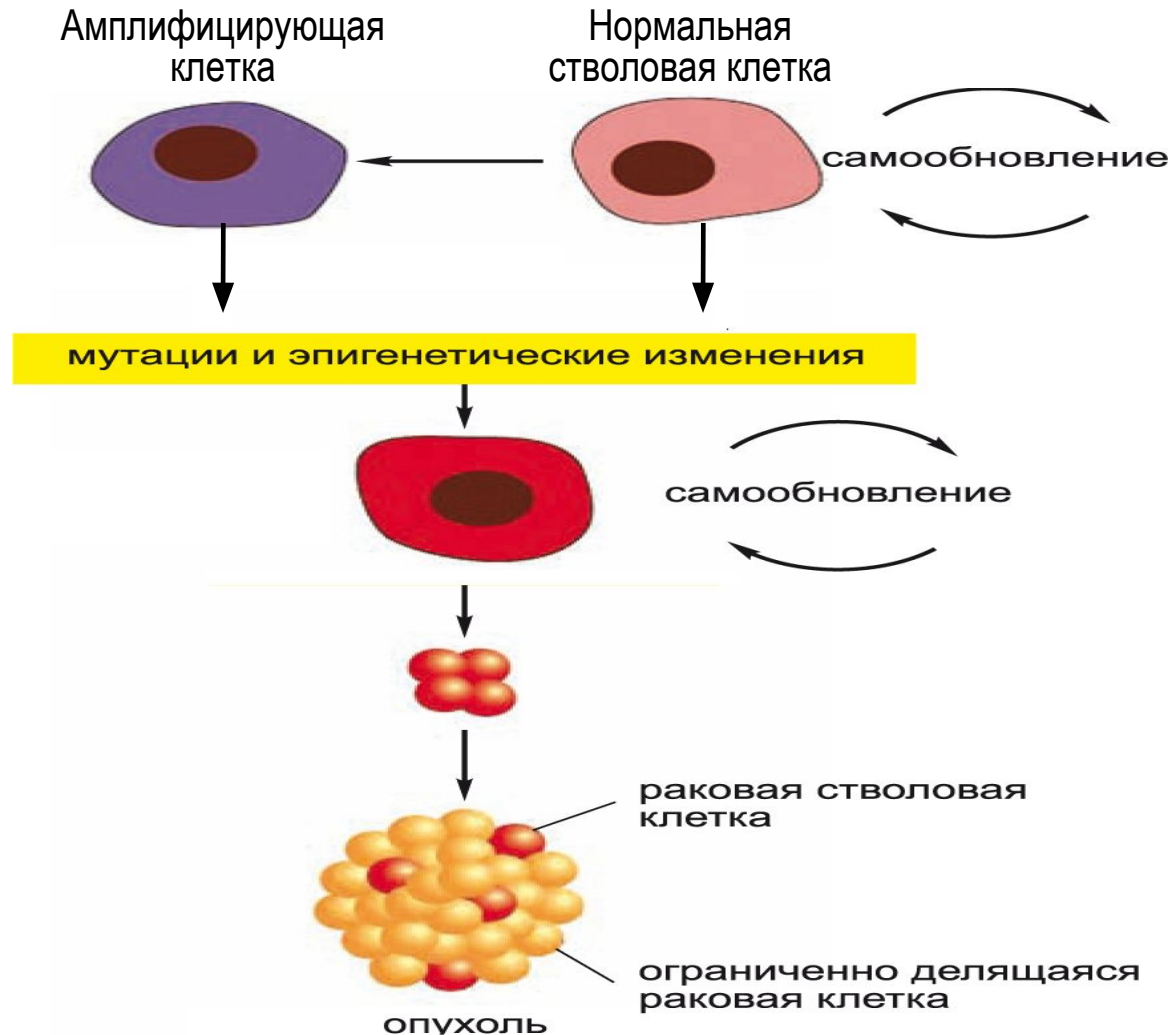


Рост органа

Поддержание размера органа

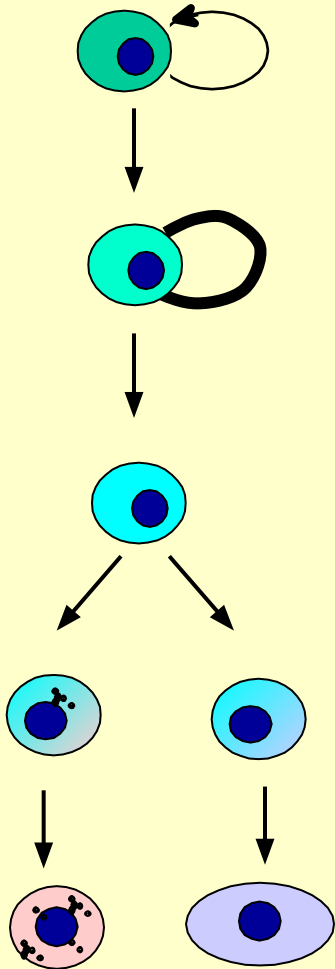
Опухолевые (раковые) стволовые клетки

За возникновение и рост новообразований ответственны «опухолевые (раковые) стволовые клетки» (“cancer stem cells”) способные к самообновлению, неограниченному делению и (необязательно) частичной дифференцировке. Их доля в разных опухолях колеблется от 0,1% до 10-15%

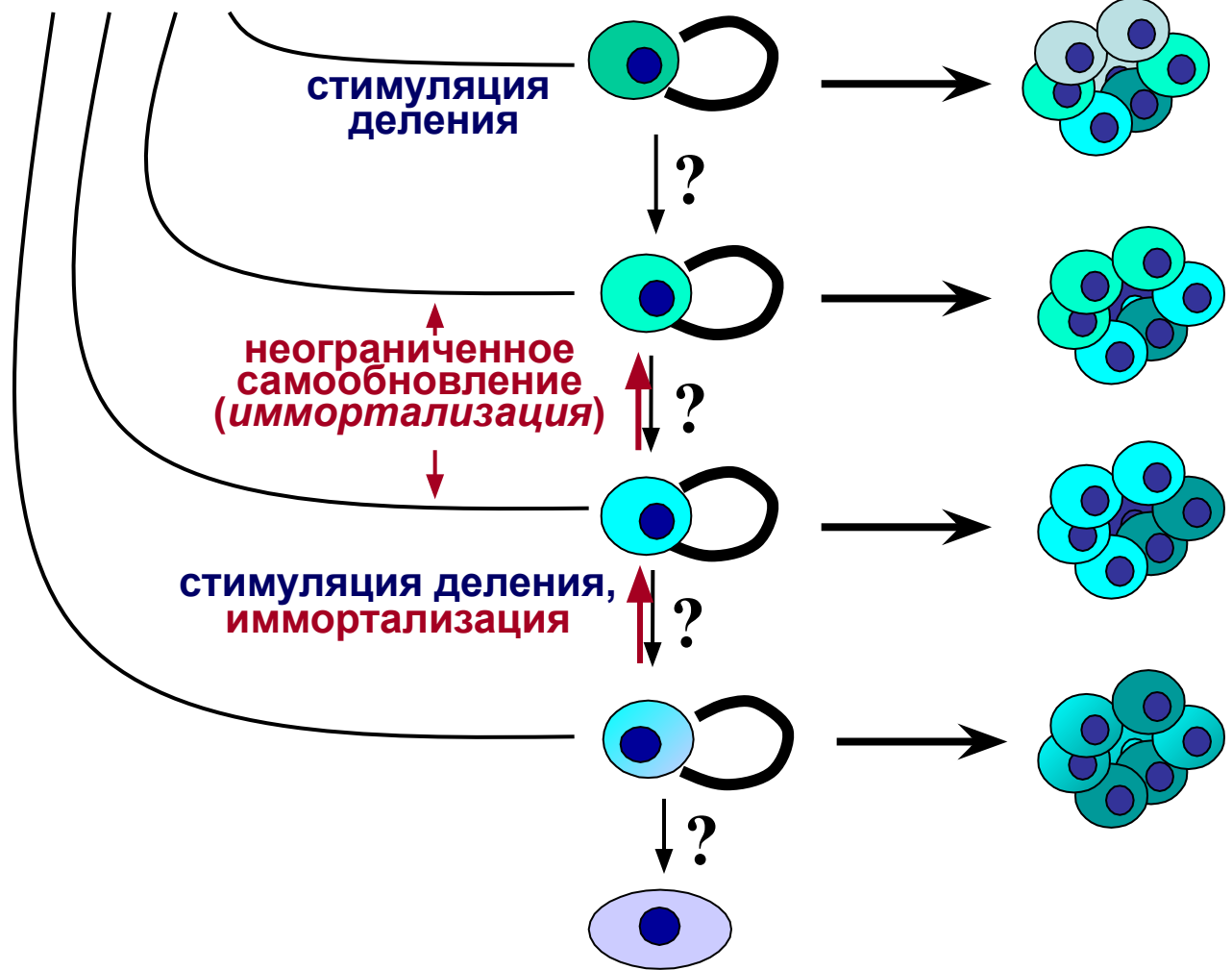


Образование опухолевых стволовых клеток

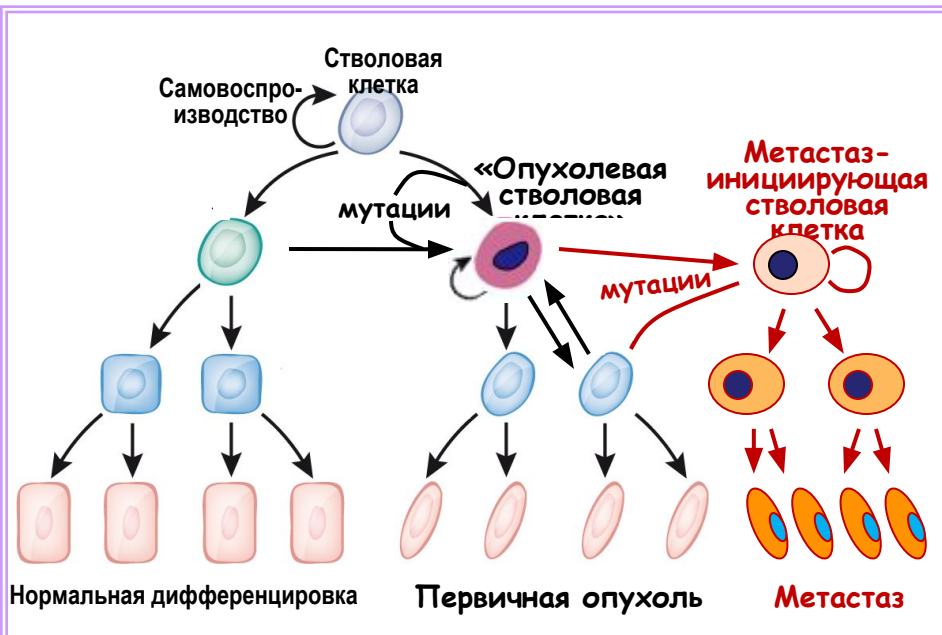
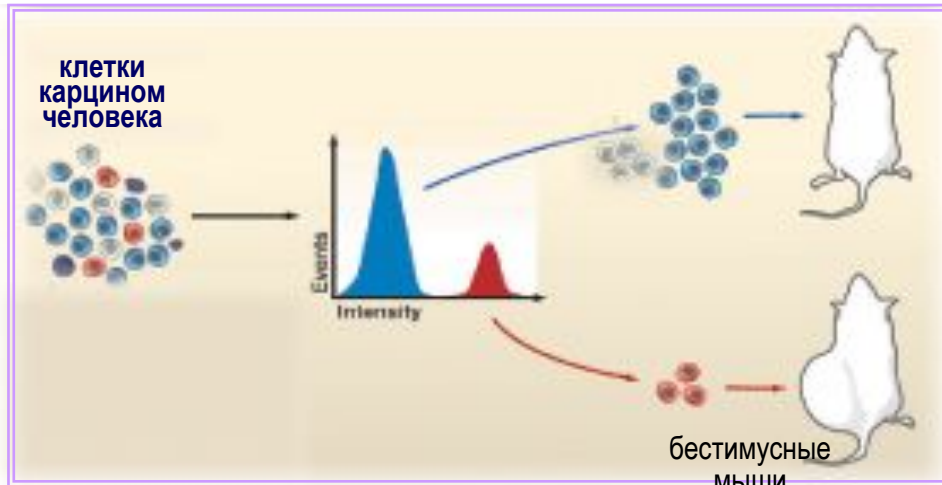
Норма



Онкогенные события



Опухолевые стволовые клетки



• Популяция неопластических клеток каждой опухоли человека гетерогенна. В ряде типов новообразований некоторые клетки (0,5-10%) обладают значительно более высокой способностью образовывать опухоли – т. н. **«опухолевые стволовые клетки» (ОСК)**

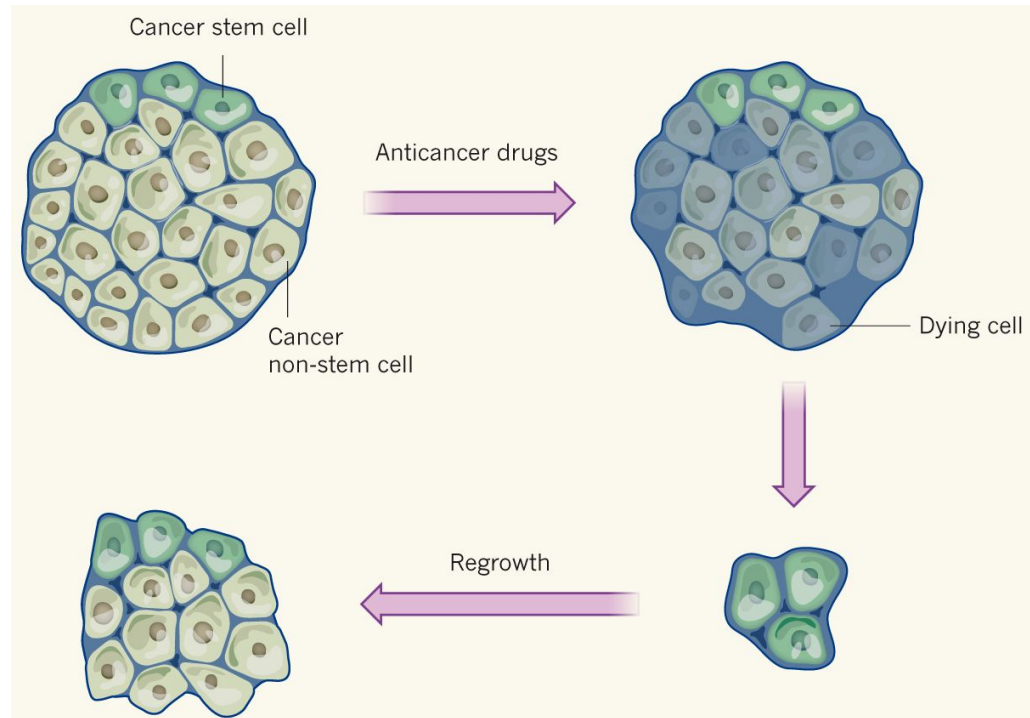
• Предполагается, что существуют первичные **ОСК** и их мутантные производные с более злокачественным фенотипом, в том числе **со способностью давать метастазы**

• Охарактеризованы клеточные фенотипы, **сильно обогащенные ОСК**: рак молочной железы – CD44+/CD24-; глиобластома и др. – CD133+; острый миелолейкоз – Sca1+/CD34+/CD38-/Lin-. (В меланомах и саркомах большинство клеток – ОСК).

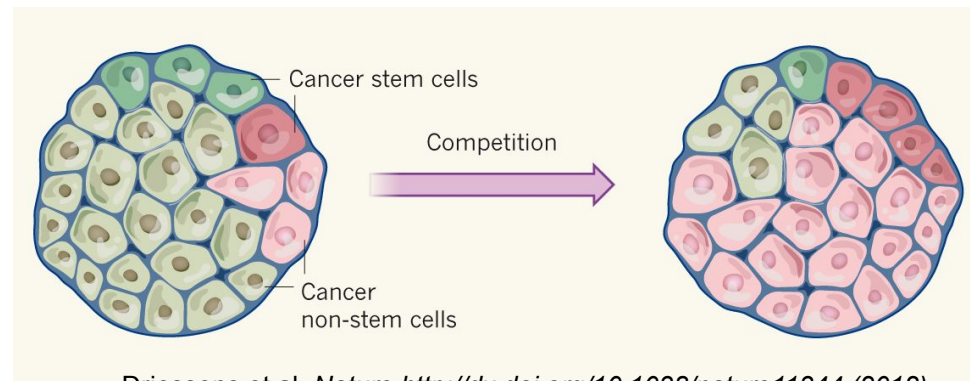
• В эпителиальных опухолях маркеры ОСК сопряжены с признаками **эпителиально-мезенхимального перехода**, ответственного за повышенную миграционную активность

• ОСК обладают **повышенной устойчивостью** к химиопрепаратам и γ -облучению. Найдены агенты, избирательно дифференцирующие ОСК некоторых опухолей (антипсихотическое средство **тиоридазин** - антагонист допаминовых рецепторов и др.)

Not all cells in a tumor are equal. *Chen et al., Driessens et al. and Schepers et al. show that brain, skin and intestinal tumors include cancer stem cells (CSCs) that self-renew and that produce other, more-differentiated (non-stem) cells that constitute the bulk of the tumor-cell population. Chen and colleagues' results indicate that, although current anticancer drugs can wipe out most of the dividing non-stem cells, surviving CSCs can repopulate the tumor. Therefore, targeting both CSCs and the dividing cells would be required for complete tumor eradication. Driessens et al. report that CSCs continuously compete with each other for a place in the tumor, and that the winners' daughter cells predominate. Red and green colors indicate different clonal populations, each one originally derived from an individual CSC*



Chen et al. *Nature* <http://dx.doi.org/10.1038/nature11287> (2012)
 Driessens et al. *Nature* <http://dx.doi.org/10.1038/nature11344> (2012)
 Schepers et al. *Science* <http://dx.doi.org/10.1126/science.1224676> (2012)

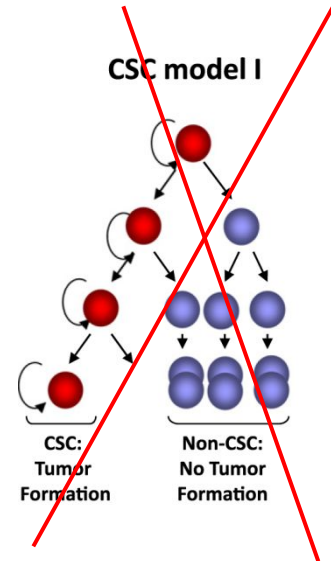
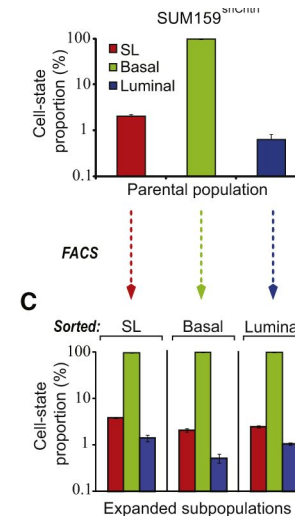
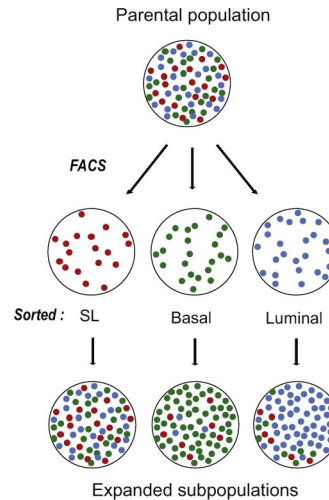


Driessens et al. *Nature* <http://dx.doi.org/10.1038/nature11344> (2012)

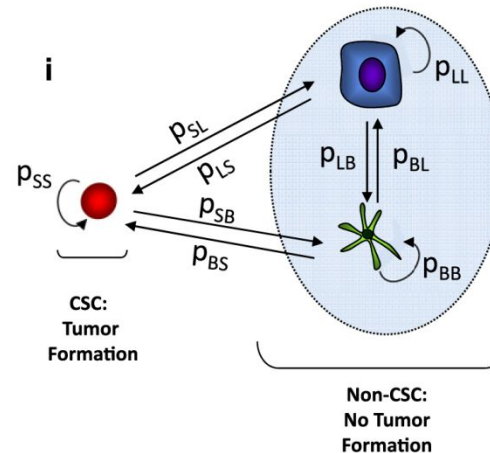
Stochastic State Transitions Give Rise to Phenotypic Equilibrium in Populations of Cancer Cells

SUMMARY

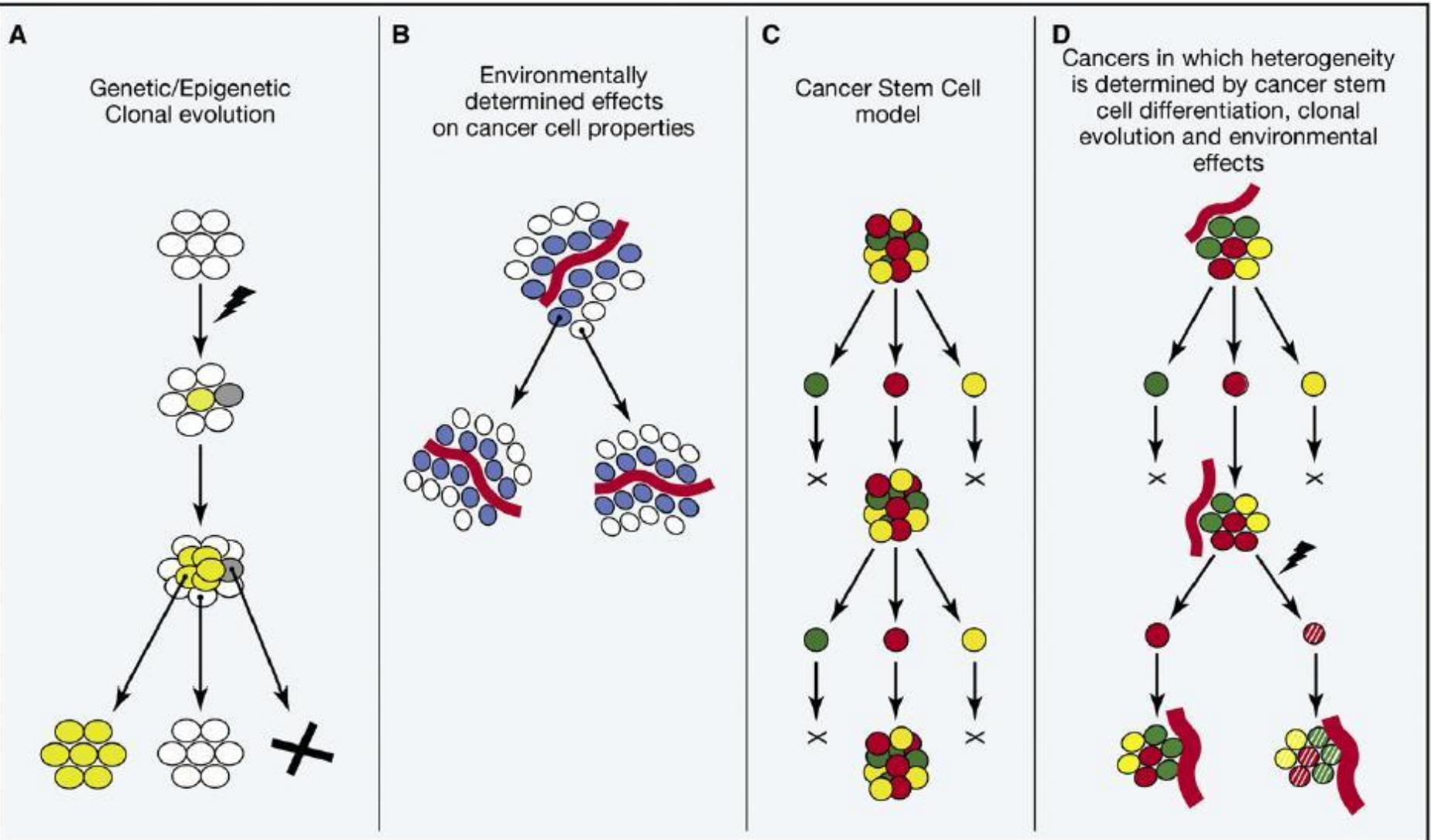
Cancer cells within individual tumors often exist in distinct phenotypic states that differ in functional attributes. While cancer cell populations typically display distinctive equilibria in the proportion of cells in various states, the mechanisms by which this occurs are poorly understood. Here, we study the dynamics of phenotypic proportions in human breast cancer cell lines. We show that subpopulations of cells purified for a given phenotypic state return towards equilibrium proportions over time. These observations can be explained by a Markov model in which cells transition stochastically between states. A prediction of this model is that, given certain conditions, any subpopulation of cells will return to equilibrium phenotypic proportions over time. A second prediction is that breast cancer stem-like cells arise de novo from non-stem-like cells. These findings contribute to our understanding of cancer heterogeneity and reveal how stochasticity in single-cell behaviors promotes phenotypic equilibrium in populations of cancer cells

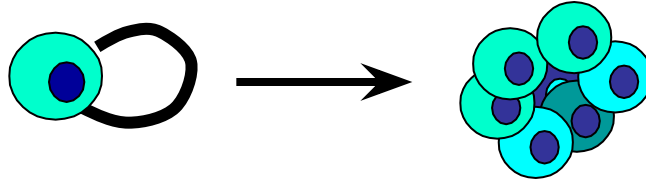


CSC model II



Внутриопухолевая гетерогенность и ее источники





**Неограниченное деление
стволовых клеток опухолей и/или
их недифференцированных
потомков**

Стимуляция деления

Иммортализация

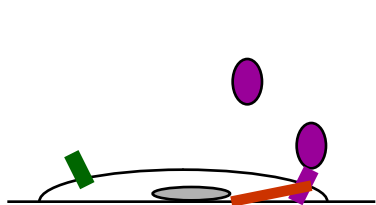
**Пониженная потребность во
внешних сигналах для
инициации и поддержания
пролиферации
(генерирование внутренних
пролиферативных стимулов)**

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

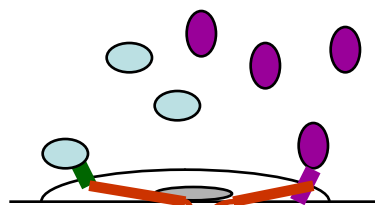
**Высокая активность
теломеразы, поддержание
нормальной структуры
концов хромосом**

1. Пониженная потребность в факторах роста

Нормальные клетки

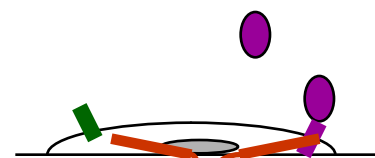


Размножения нет



Пролиферация

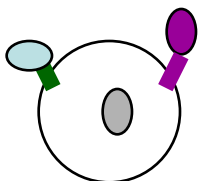
Опухолевые клетки



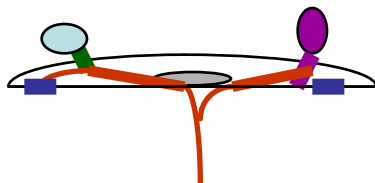
Пролиферация

2. Размножение без прикрепления к внеклеточному матриксу

Нормальные клетки

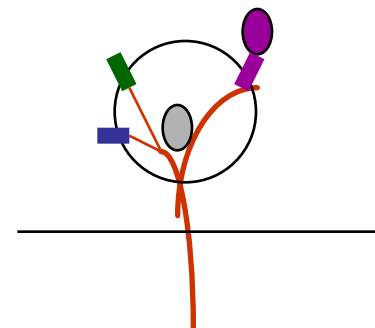


Размножения нет



Пролиферация

Опухолевые клетки



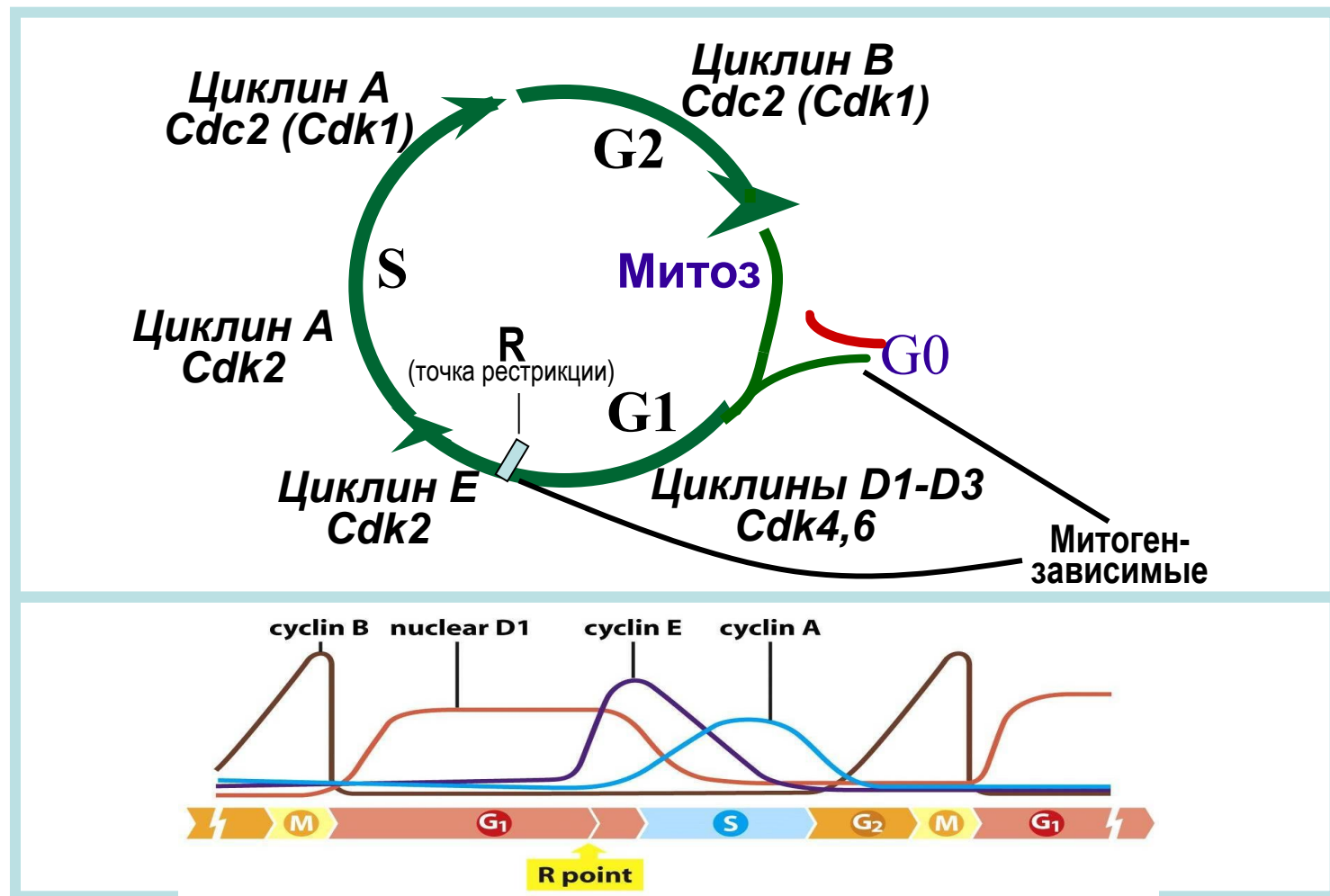
Пролиферация

Алгоритм реализации митогенных сигналов



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

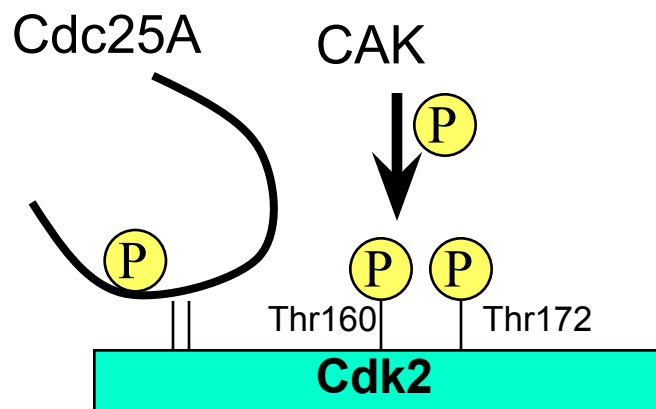
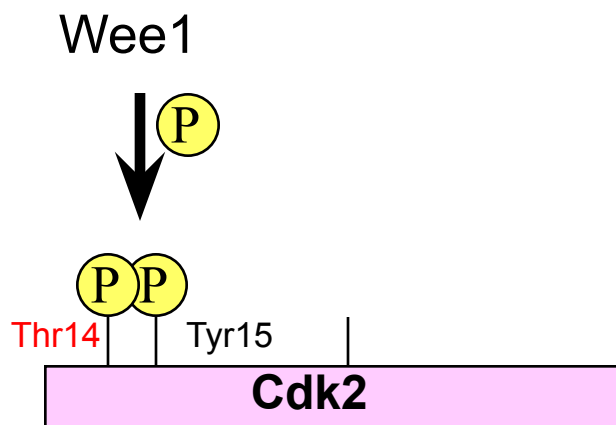
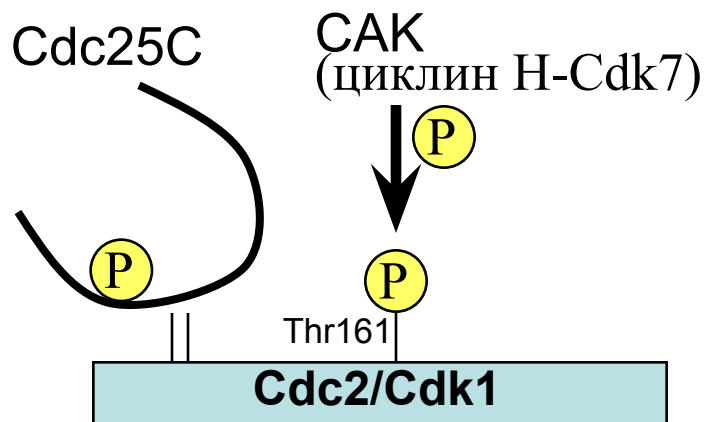
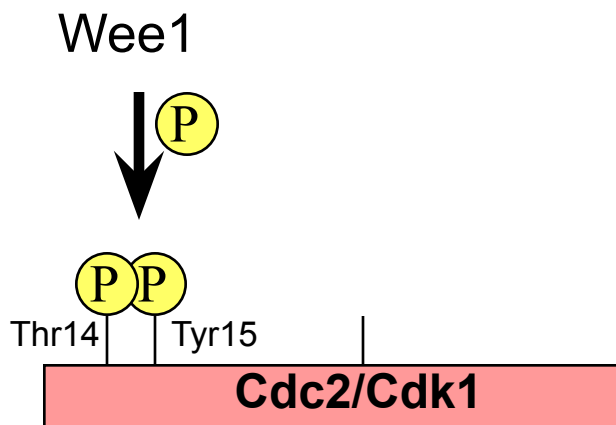
Повышение киназной активности Cdks, их локализация и субстратная специфичность определяется связыванием с активаторными субъединицами – циклинами, уровень которых направленно изменяется в определенных фазах клеточного цикла



Активность Cdk's зависит от:

а) связывания с циклинами

б) фосфорилирования/дефосфорилирования



Неактивные формы

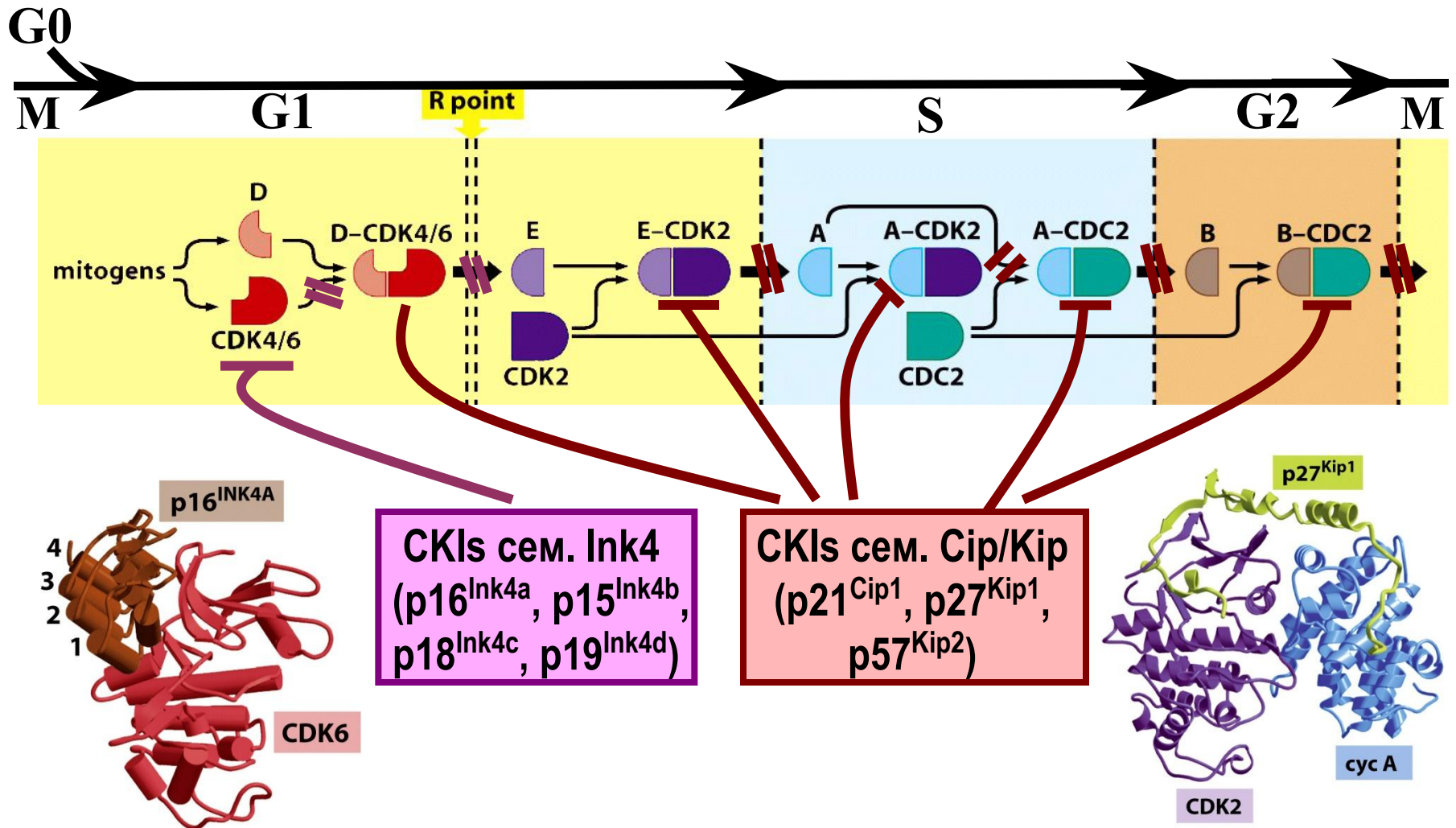
Активные формы

Активность Cdk's зависит от:

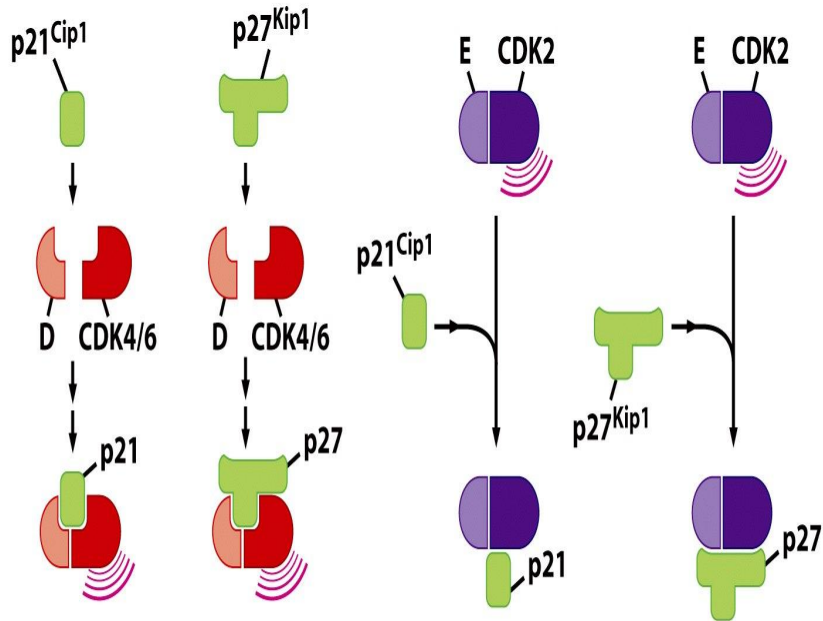
а) связывания с циклинами

б) фосфорилирования/дефосфорилирования

в) взаимодействия с CKIs (ингибиторами Cdk's)



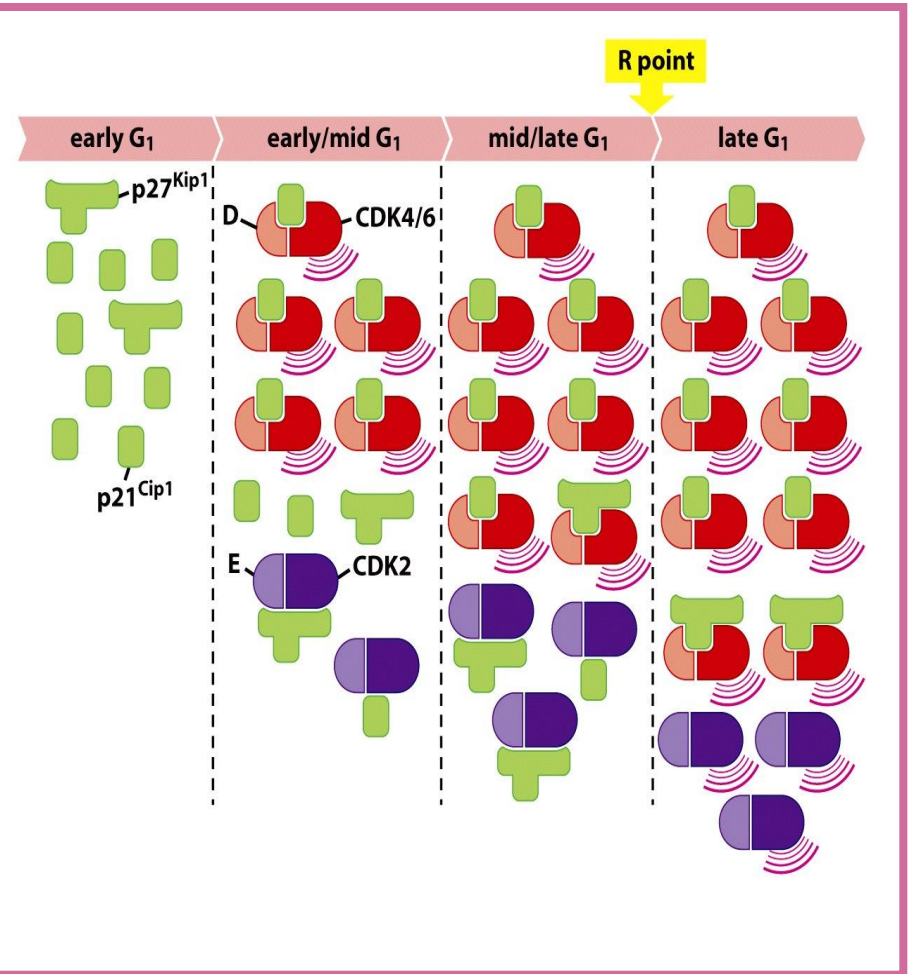
CKIs сем. Cip/Kip ингибируют активность Cdk2, но активируют Cdk4/6, которые их секвестрируют, что приводит к активации Cdk2 в поздней G1



Стимуляция*

Ингибирование

* Комплексы p27^{Kip1}/Cdk4 могут быть и неактивны – при дефосфорилировании Y88/89 p27^{Kip1}, что наблюдается при рост-ингибирующих сигналах (УФ-облучение, контактное торможение и и др.)

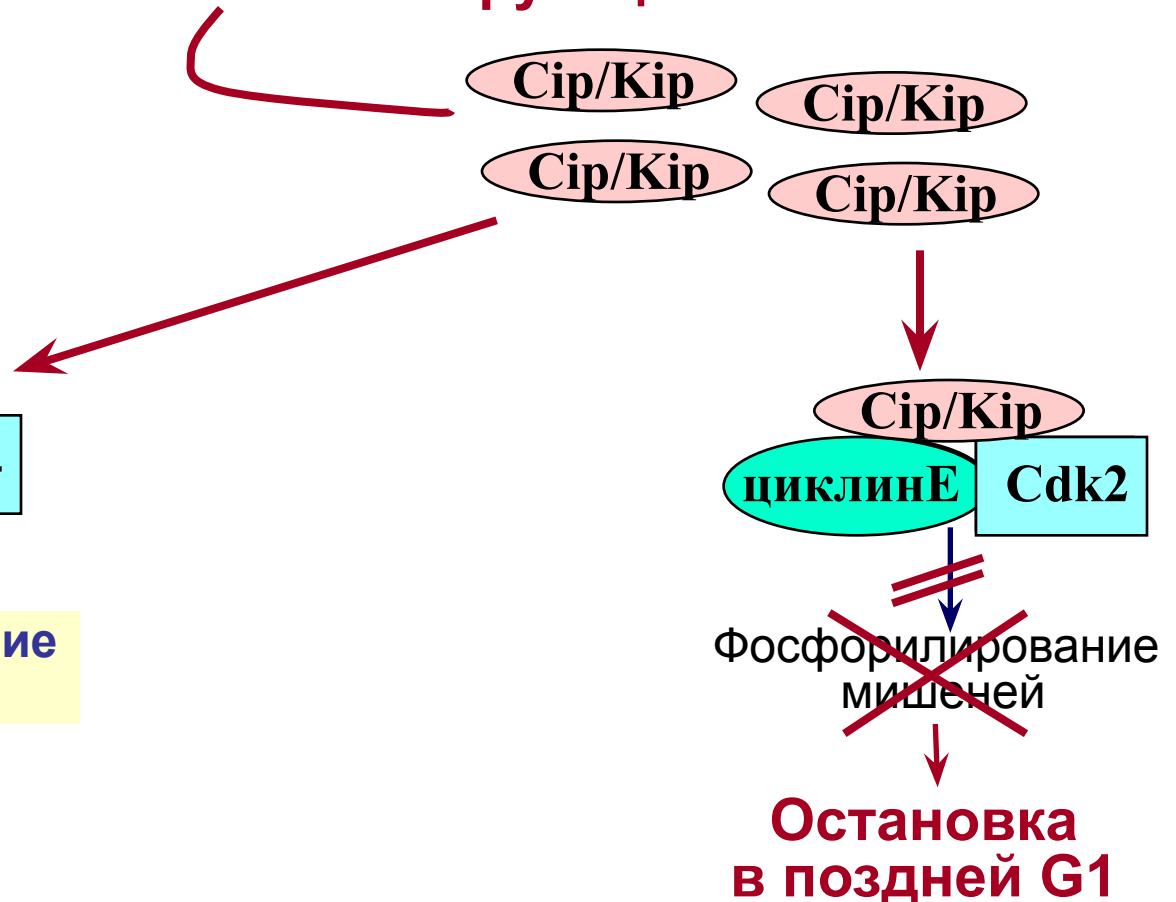


Различные **рост-ингибирующие сигналы** вызывают резкое увеличение содержания CKIs сем. **Cip/Kip**. Комплексов Cdk4/6 уже недостаточно, чтобы их секвестрировать. Это ведет к ингибированию Cdk2 и остановке клеточного цикла

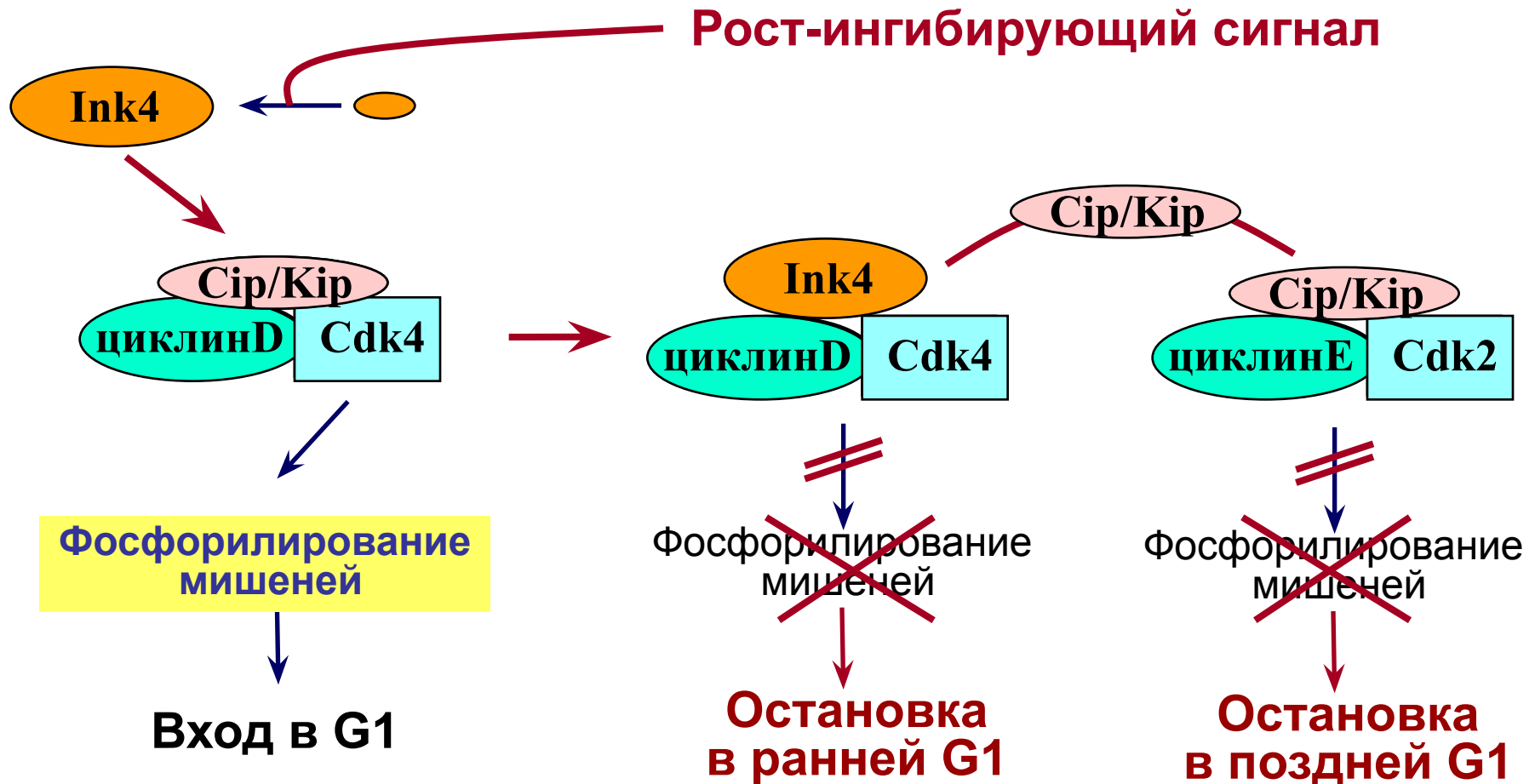
Митогенный сигнал



Рост-ингибирующий сигнал



Ряд **рост-ингибирующих сигналов** вызывает резкое увеличение содержания CKIs сем. **Ink4**. Это ведет не только к ингибированию Cdk4/6 и остановке в ранней G1, но и к высвобождению белков сем. Cip/Kip и, как следствие, инактивации Cdk2 и остановке в поздней G1



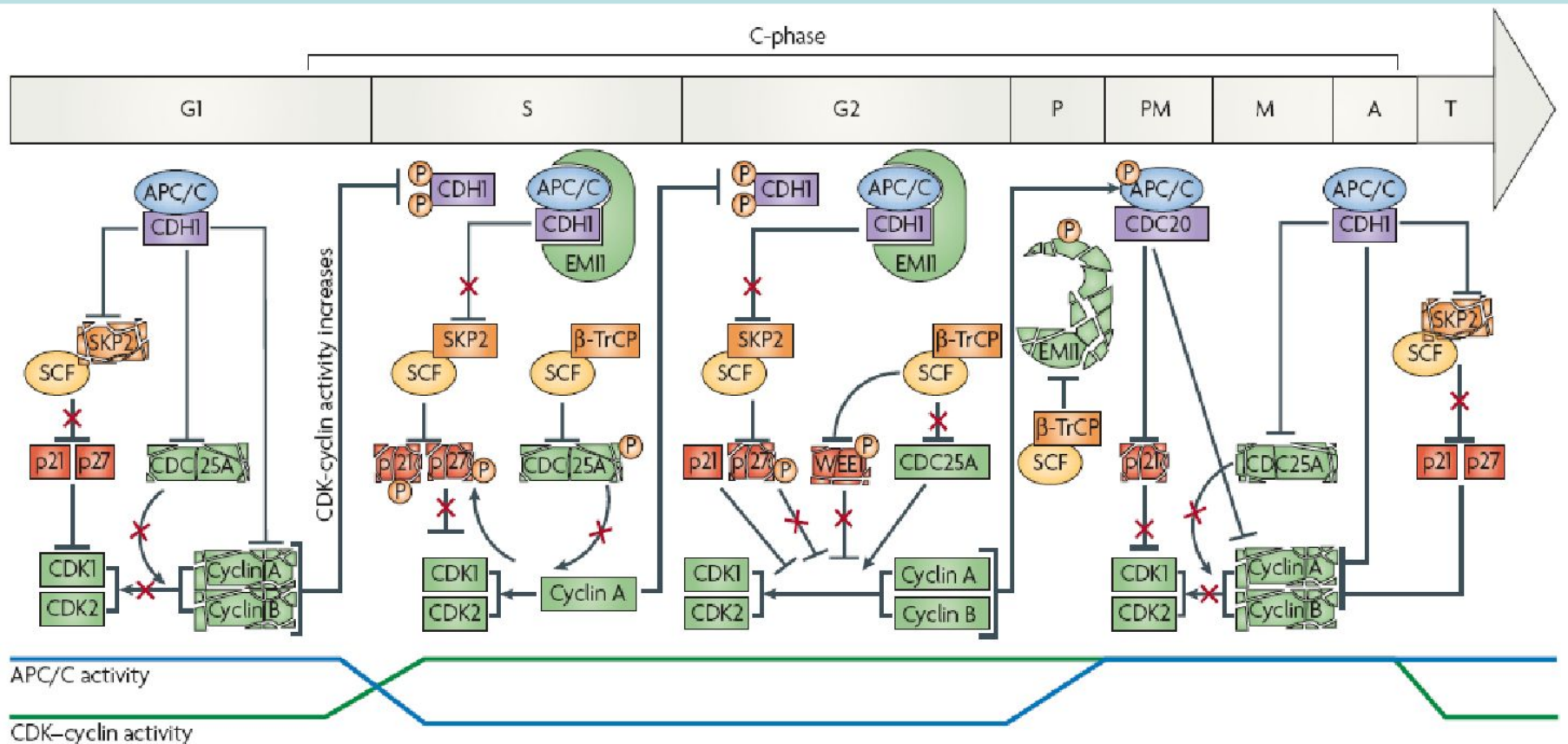
Активность Cdk's зависит от:

а) связывания с циклинами

б) фосфорилирования/дефосфорилирования

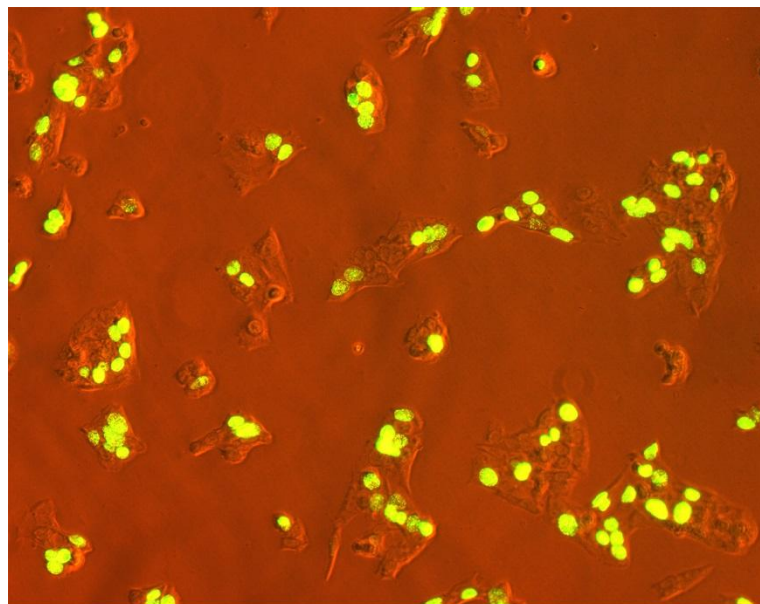
в) взаимодействия с CKIs (ингибиторами Cdk's)

г) активности убиквитин-лигаз (APC/C, SCF, SKP2, bTrCP), вызывающих деградацию Cdc25, CKIs, CusB и др.



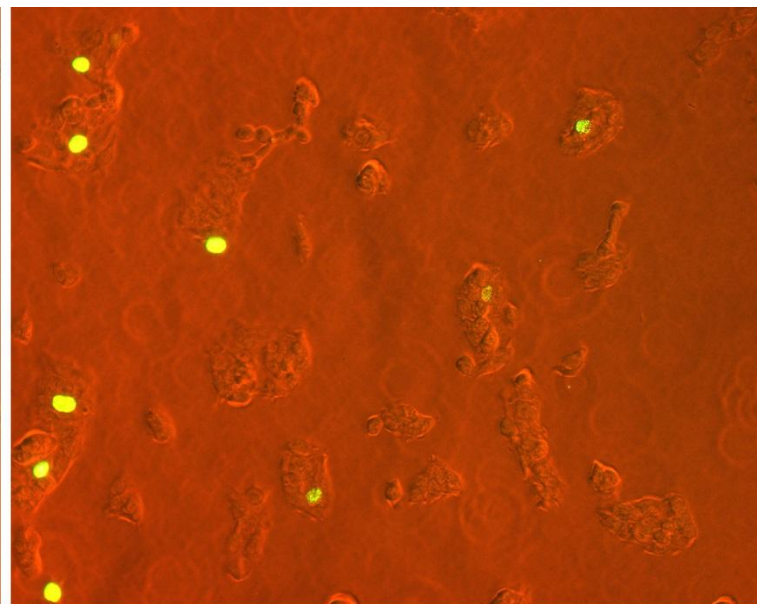
Подавление пролиферации культуры клеток гепатокарциномы HepG2 под действием ингибитора CDK4/6 PD-0332991 (Palbociclib)

Контроль



52.1%

PD0332991, 1мкМ



4.8%

Тест на включение 5-бромдезоксимуридина (5-BrdU)

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

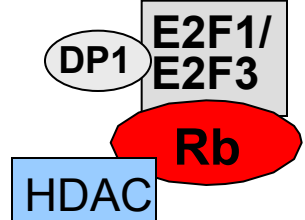
Какие белки являются мишенями Cdks?

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

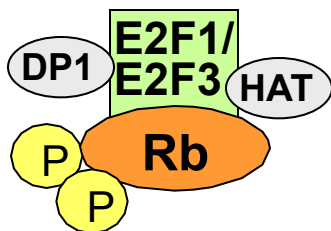
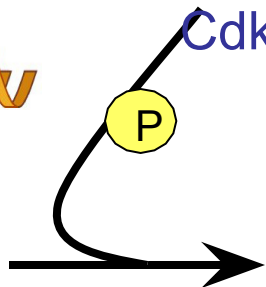
Митогенные стимулы

Транскрипционные факторы

Репрессия

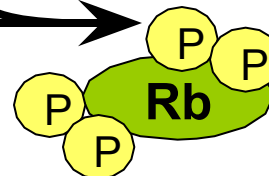


Циклин D-
Cdk4



HDAC

Циклин E-
Cdk2



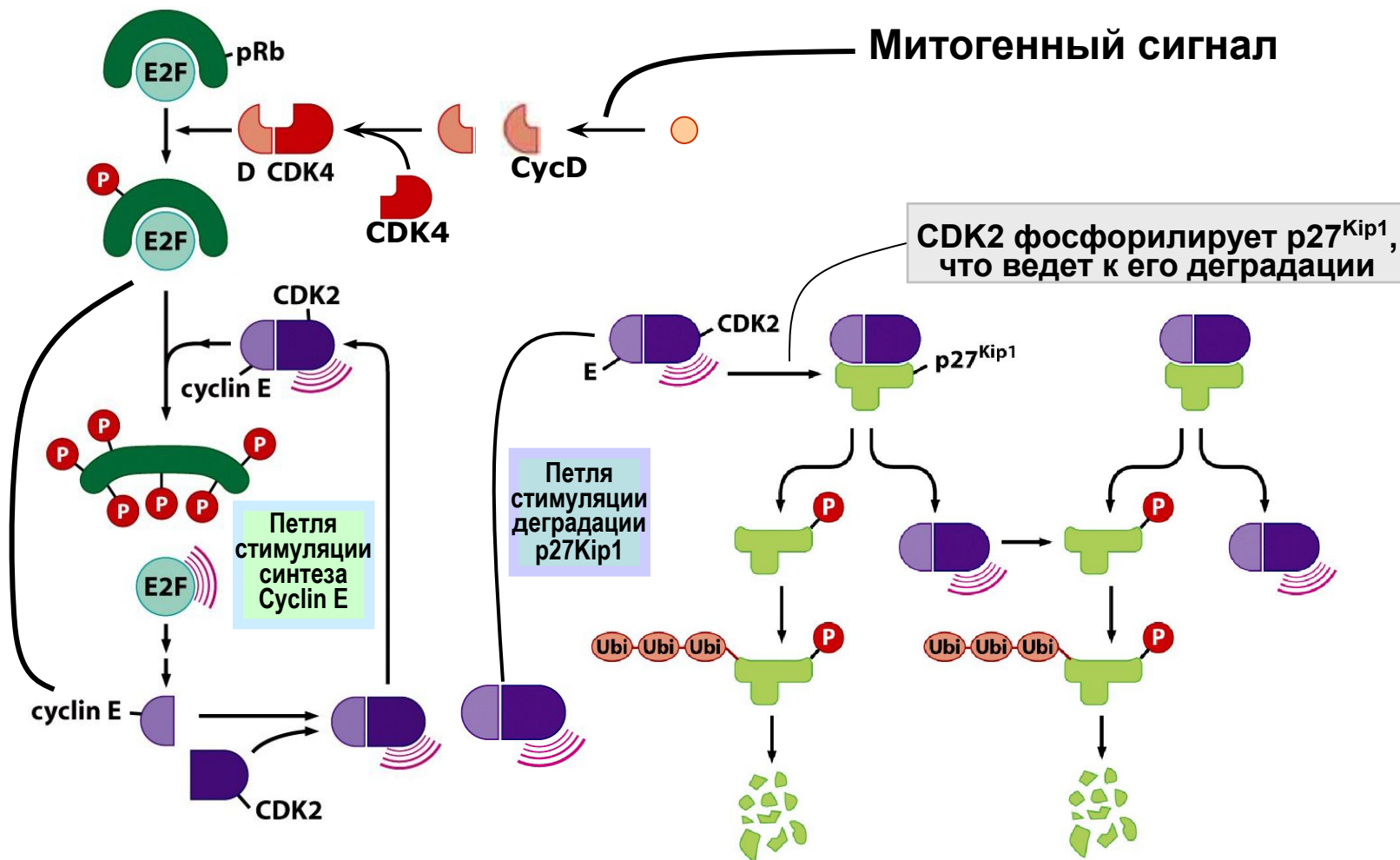
Циклин A-Cdk2,
ДФФР, ТК и др.

Активация точек начала репликации (вход в S), дупликация центросом

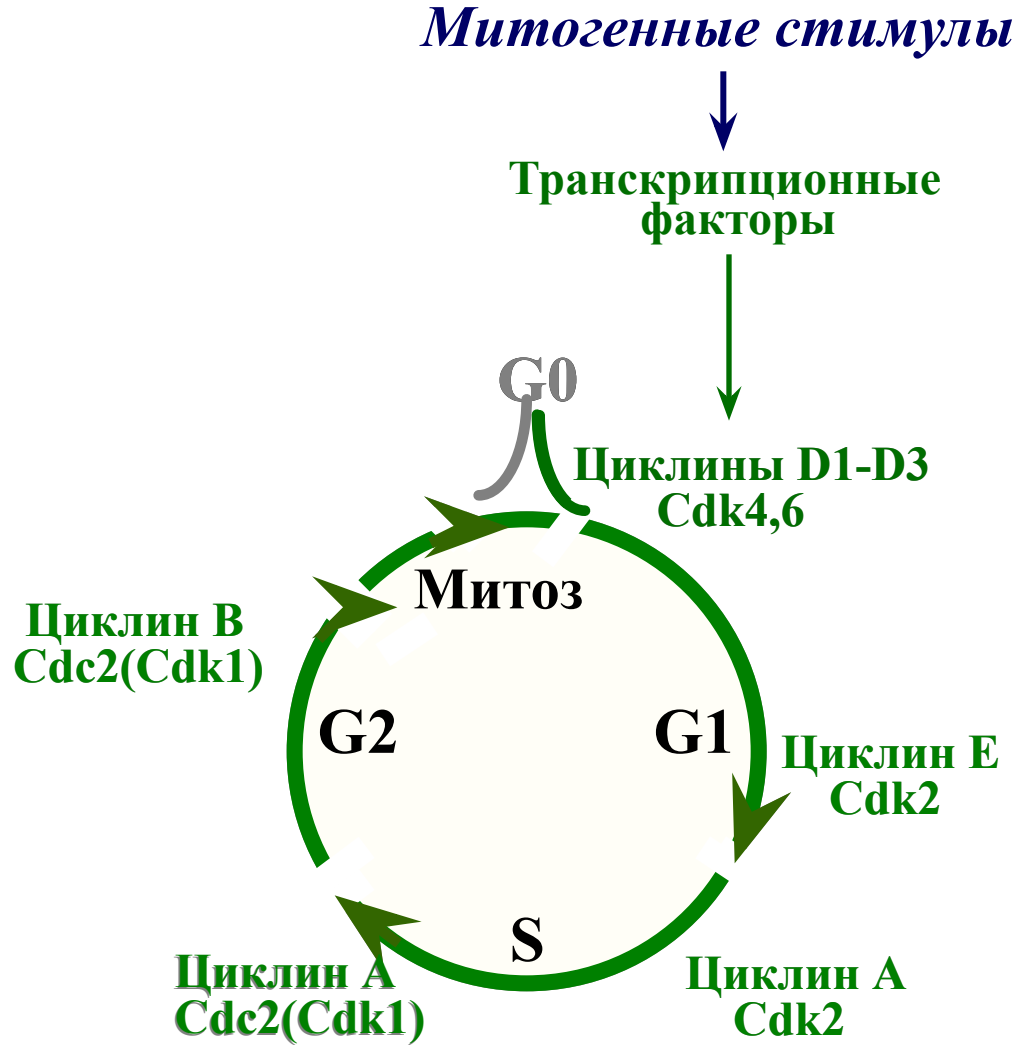
Репликация ДНК



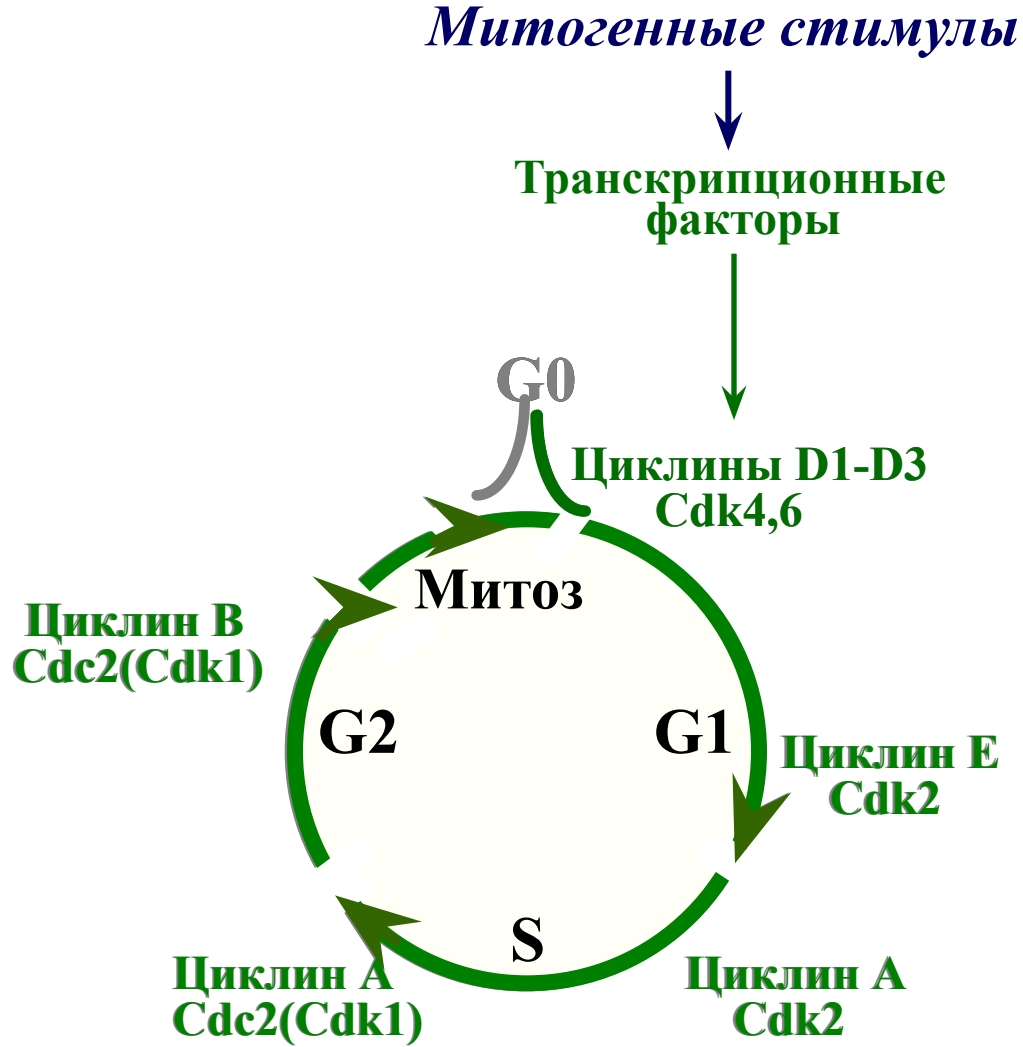
Фосфорилирование pRb включает петли позитивной регуляции комплексов CysE/CDK2



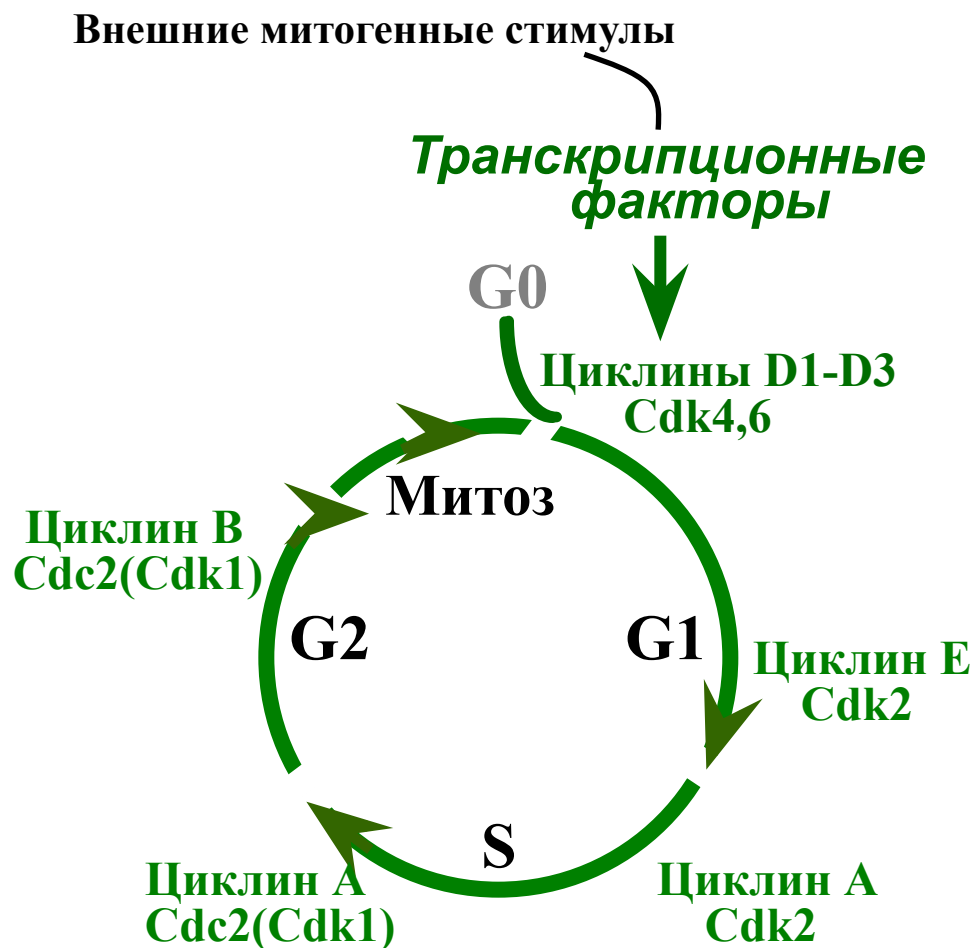
В норме митогенная сигнализация имеет квантовый характер



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.*

Курс «Биология опухолевой клетки»
(2019 г.)

Н.Л. Лазаревич

Лекция 2

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