

Курс «Биология опухолевой клетки»
(2019 г.)

Н.Л. Лазаревич

Лекция 6

**Изменения морфологии неопластических клеток,
детерминирующие «локомоторный» фенотип**

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**

**Ускользание от
иммунологического
надзора**

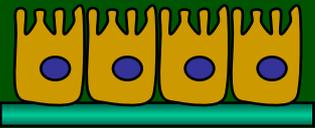
**Модификация
микроокружения
(ангиогенез и др.)**

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



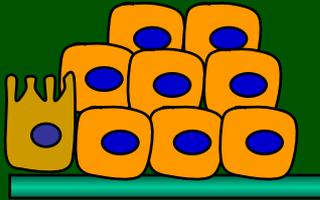
Прогрессия эпителиальных опухолей

Нормальный
эпителий

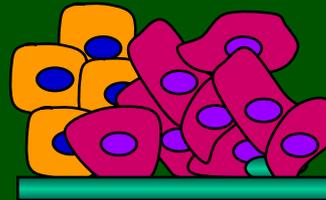


Базальная мембрана

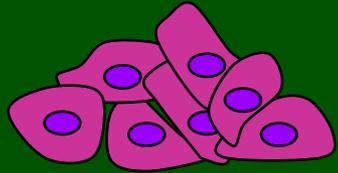
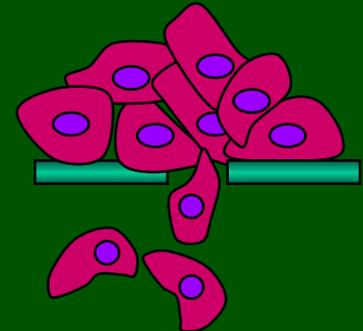
Аденома



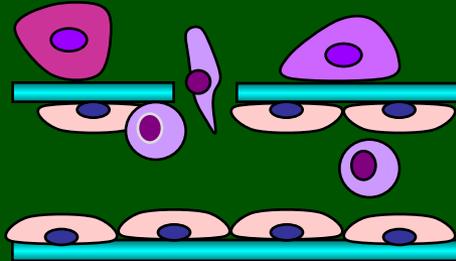
Рак *in situ*



Инвазивный
рак



Макрометастаз

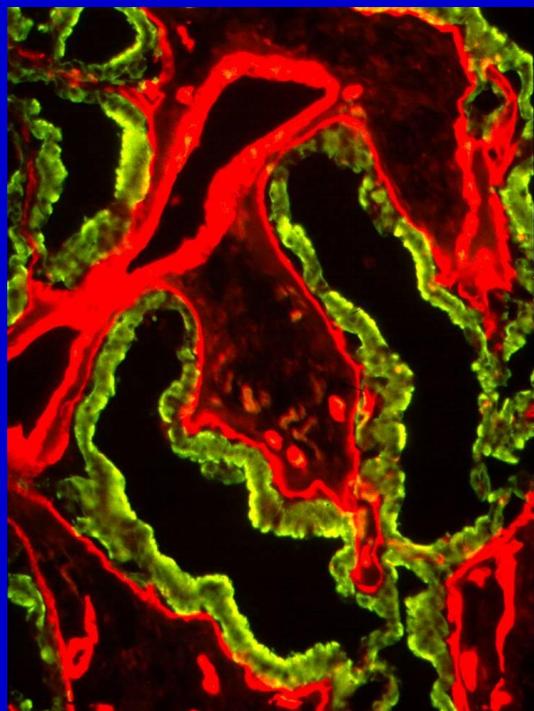


Выход из сосуда
(экстравазация)
микрометастазы

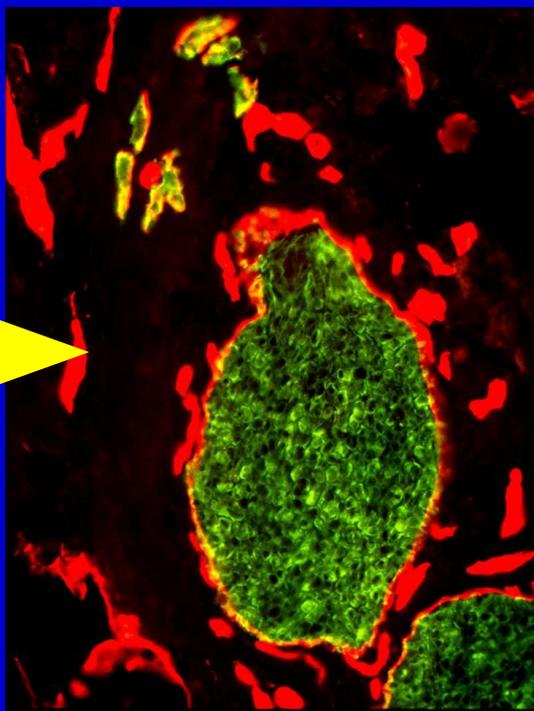
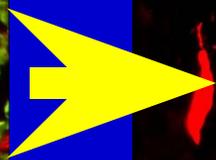


Проникновение в сосуд
(интравазация)

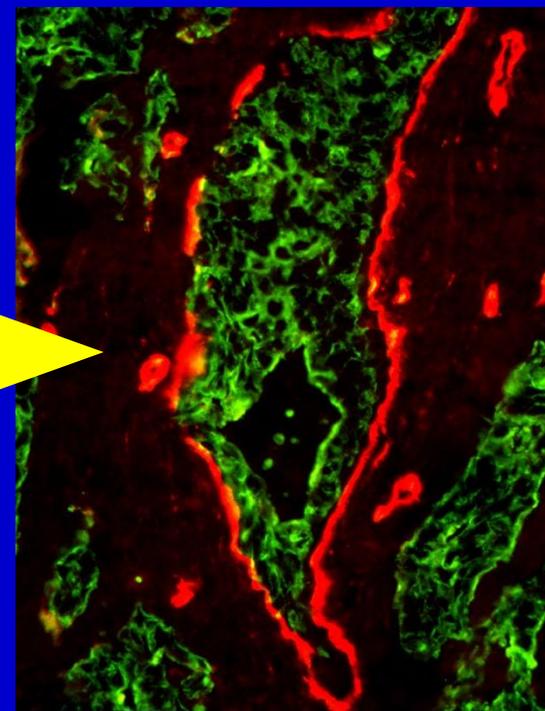
Инвазия клеток рака молочной железы



Нормальная ткань
молочной железы

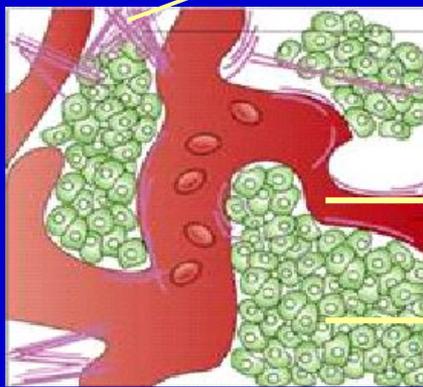
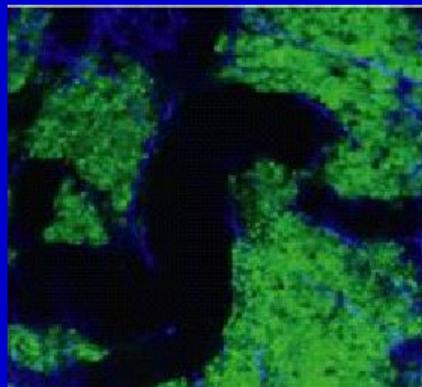


Рак *in situ*
(внутрипротоковый рак)



Инвазивный рак

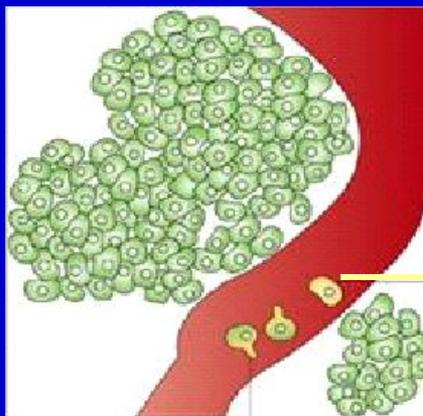
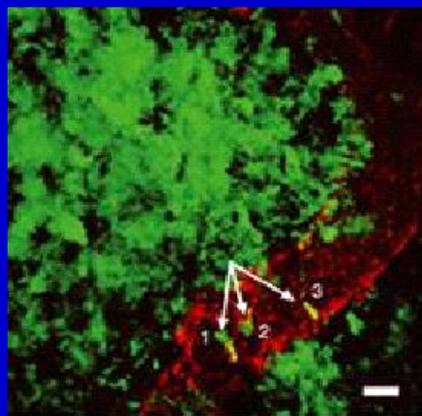
Прижизненная мультифотонная микроскопия:



Внеклеточный матрикс

Кровеносный сосуд

Опухолевые клетки



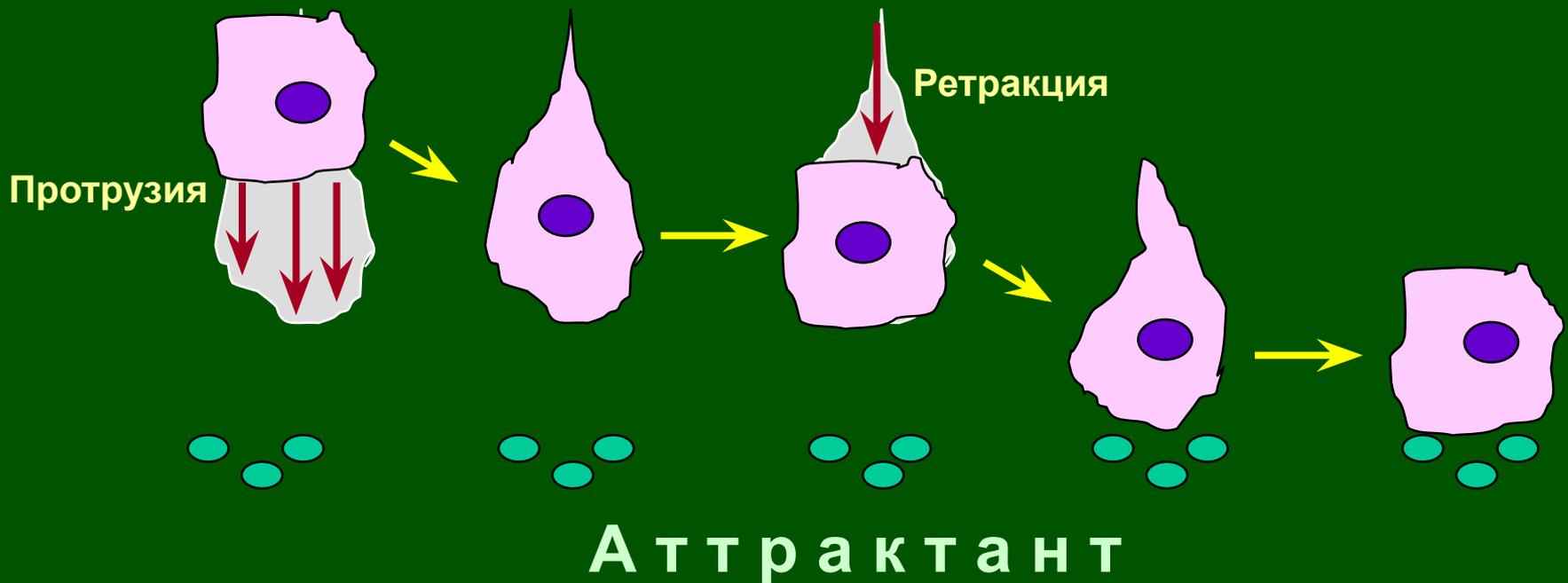
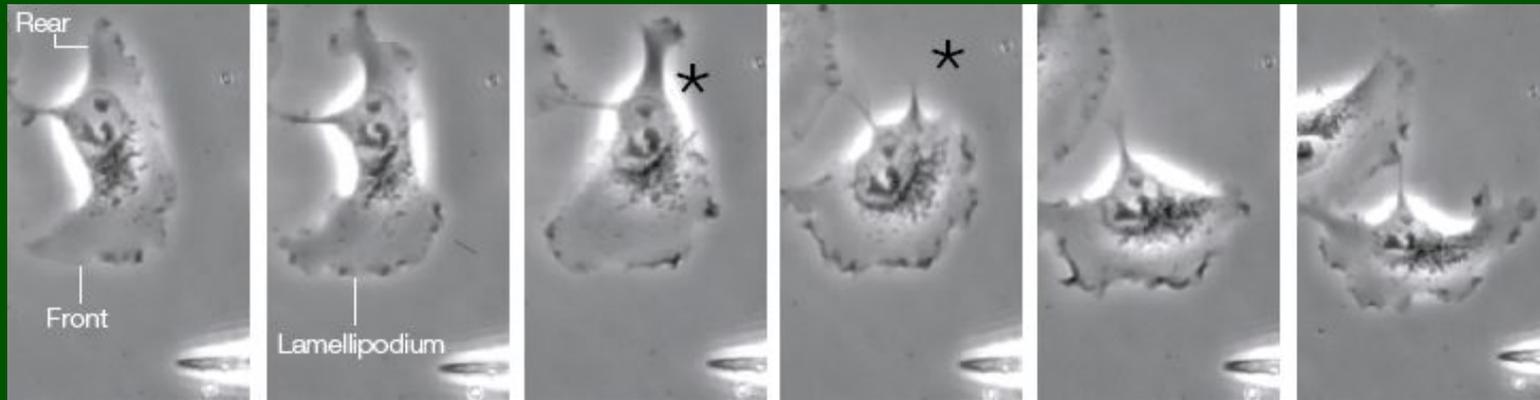
Опухолевые клетки в кровеносном сосуде

Как клетки приобретают повышенную локомоторную активность и способность к инвазии?



Видеосъемка А. Александровой и М. Ломакиной

Направленное движение клетки:

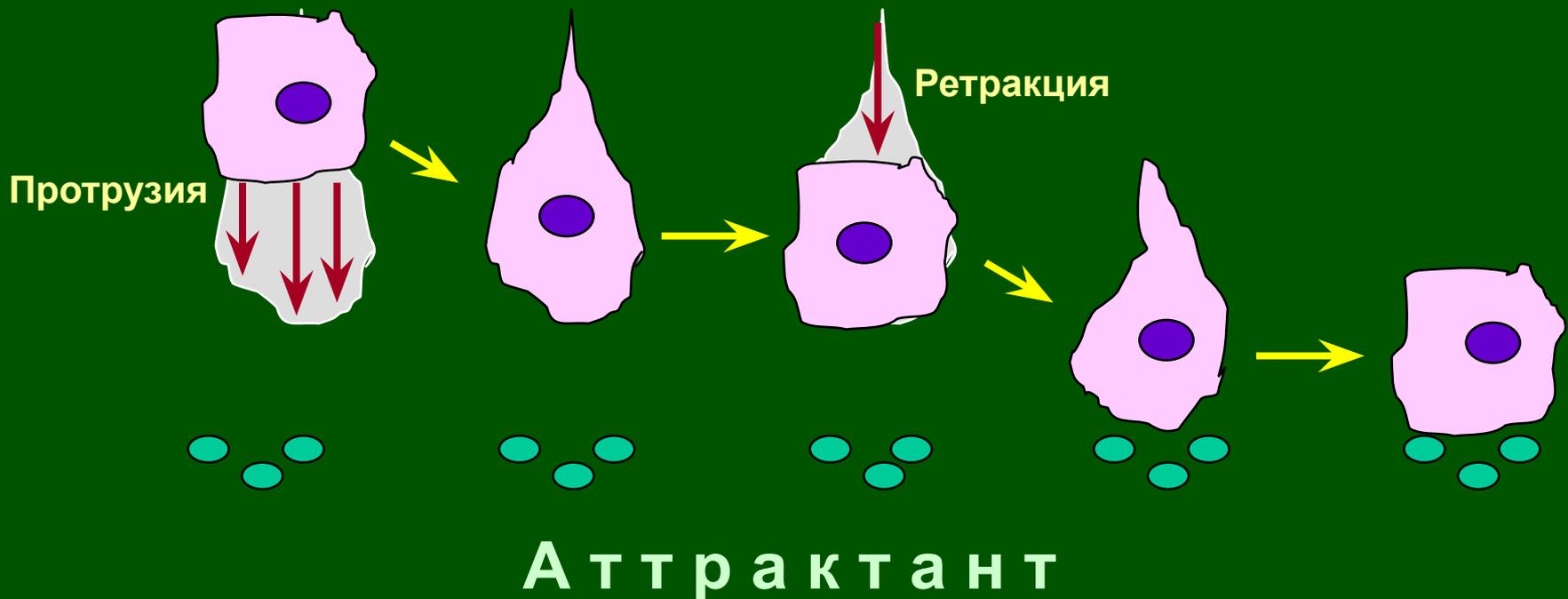


Направленное движение клетки:

Протрузия – формирование выроста, образующего контакты с внеклеточным матриксом

Ретракция – разрушение контактов на хвосте клетки и подтягивание хвоста к телу клетки

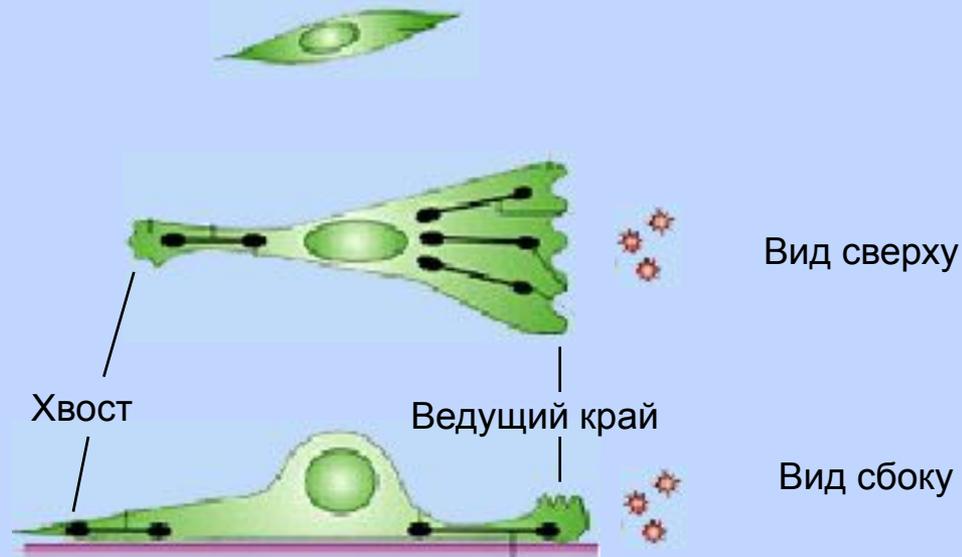
Протрузия и ретракция обеспечиваются координированными изменениями актинового цитоскелета и контактных структур



Типы направленного движения клетки:

1. «Фибробластоподобное» движение

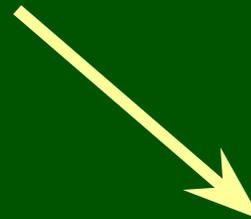
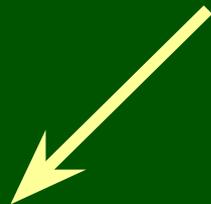
Фибробласты и другие типы мезенхимальных клеток



циклы «протрузия-ретракция»

«Фибробластоподобное» движение

**Рецепторы
мотогенных факторов**



*Разрушение контактов
клеток друг с другом,
изменения контактов с
внеклеточным матриксом*



*Активность псевдоподий и
перестройка актинового
цитоскелета, обеспечивающая
протрузии и ретракции*

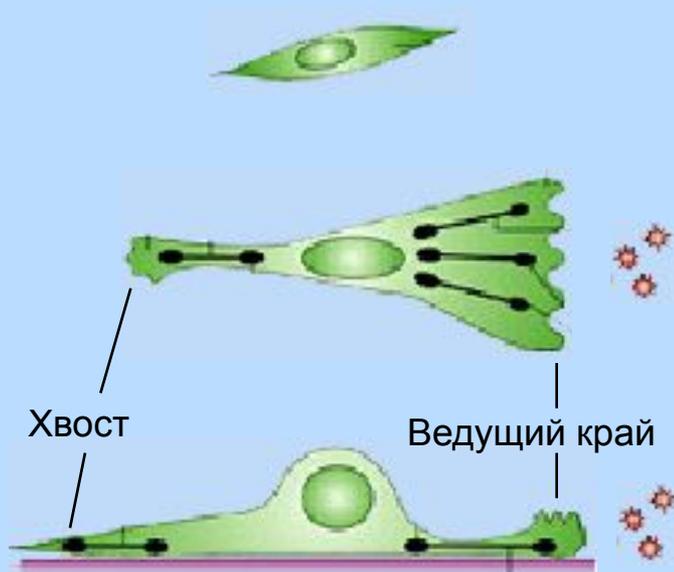


Локомоция

Типы направленного движения клетки:

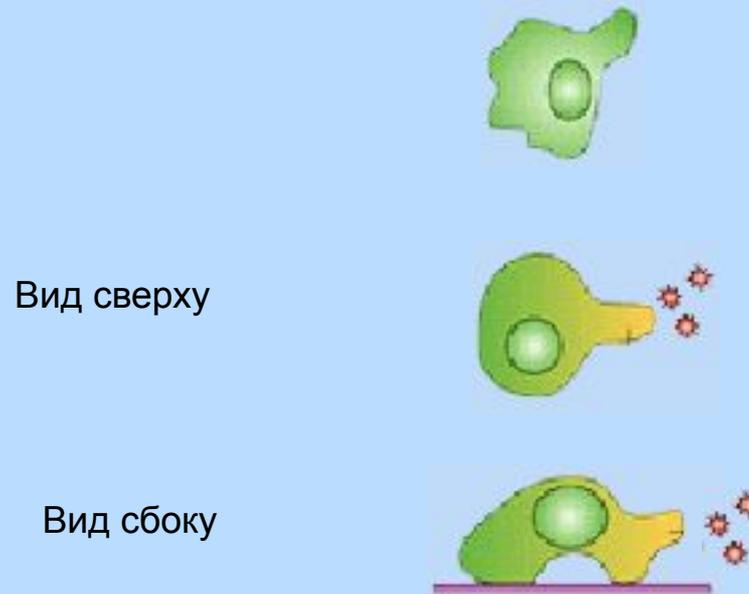
1. «Фибробластоподобное» движение
2. «Амебоидное» движение
3. Движение эпителиального пласта (коллективная миграция)

Фибробласты и многие другие типы клеток



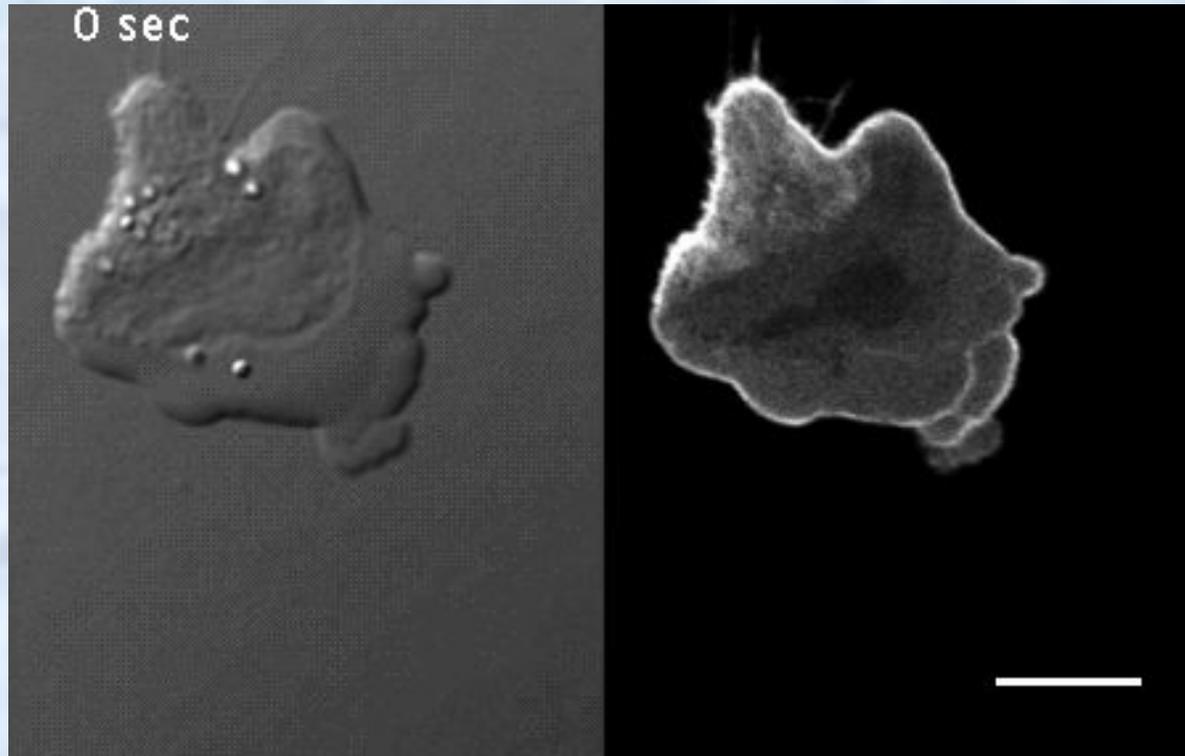
Фибробластоподобное движение (циклы «протрузия-ретракция»)

Лимфоциты и некоторые другие типы клеток



Амебоидное движение (формирование блебов и «перетекание»)

Амебоидная миграция клеток карциносаркомы Уокера под агарозой



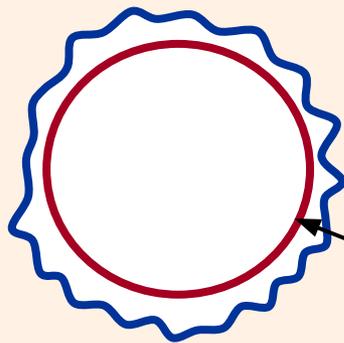
Разные типы клеток исходно обладают разной способностью к миграции:

клетки крови, фибробласты – высокой
эпителиальные клетки - низкой

Различия в миграционной способности разных типов клеток обусловлены разной организацией их цитоскелета и контактных структур

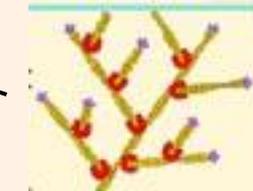
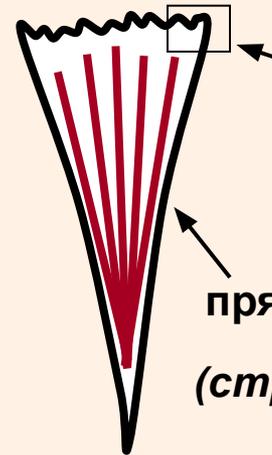
Различия морфологической организации эпителиоцитов и фибробластов

Эпителиальная клетка



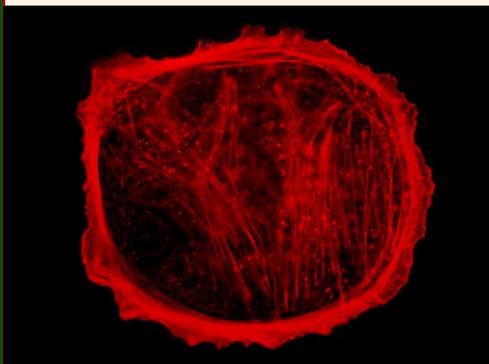
кольцевой актиновый пучок

Фибробласт

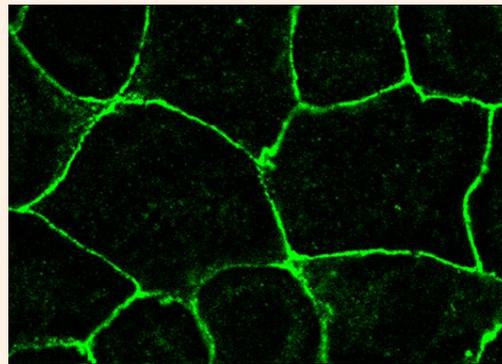


актиновая сеть на ведущем крае

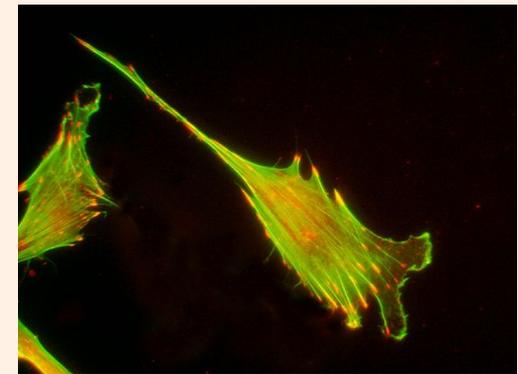
прямые актиновые пучки (стресс-фибриллы)



Актиновые пучки

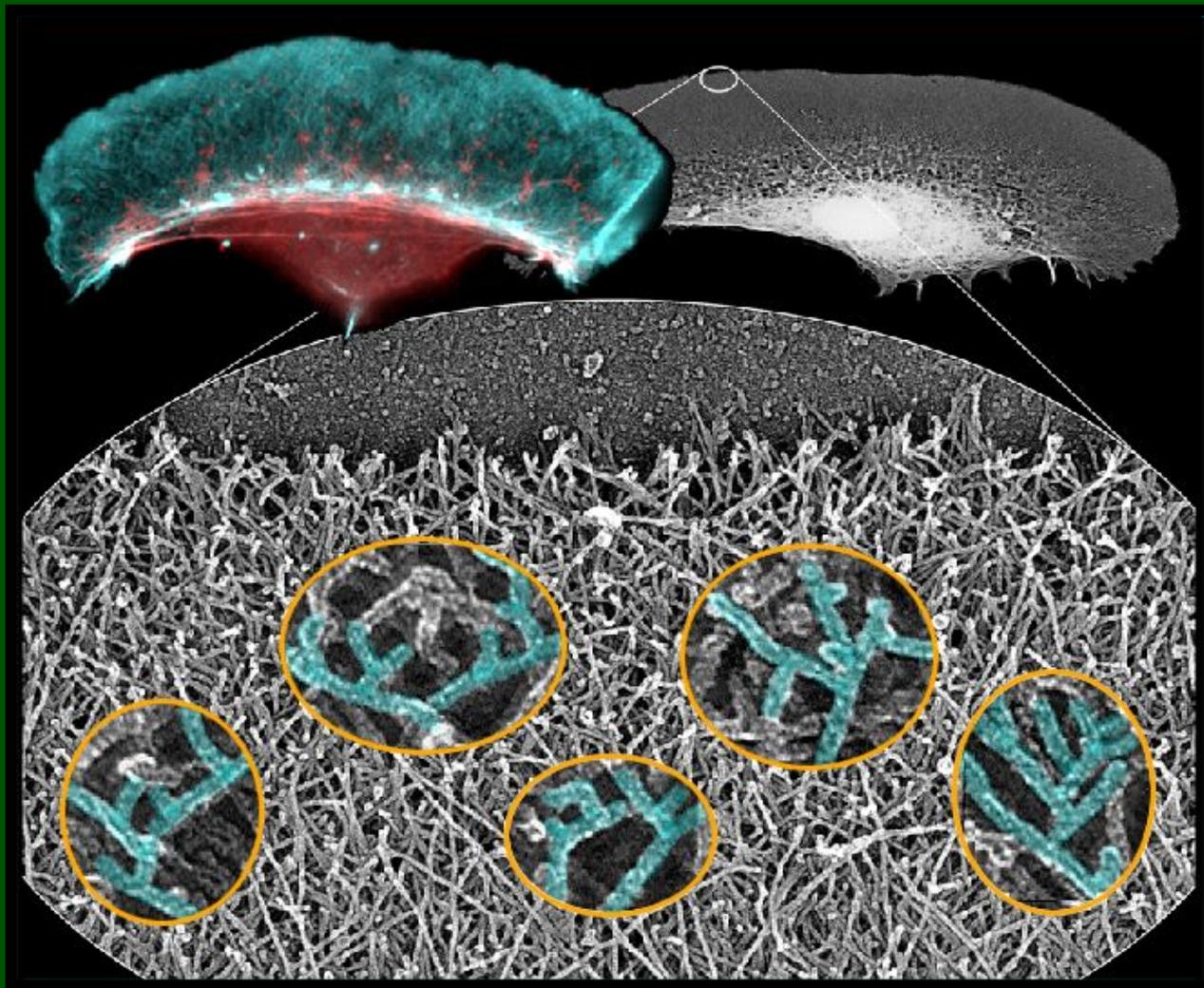


Межклеточные контакты (Е-кадгерин)



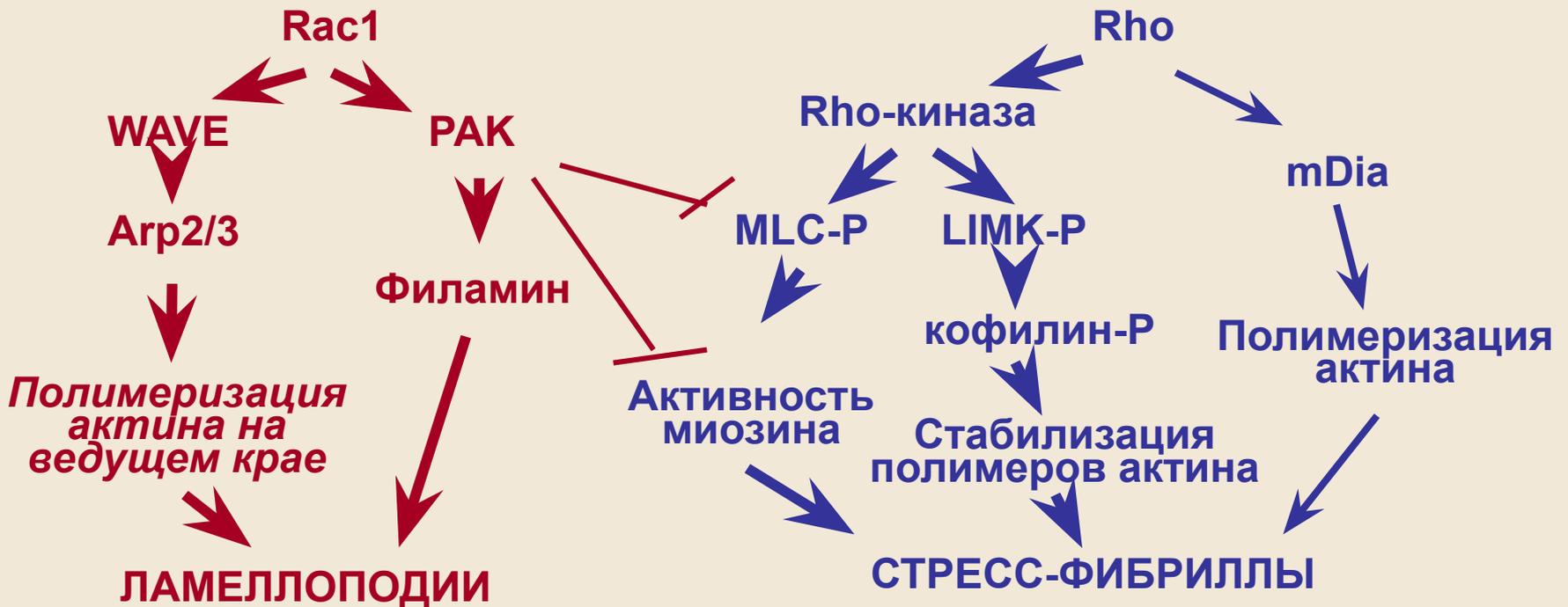
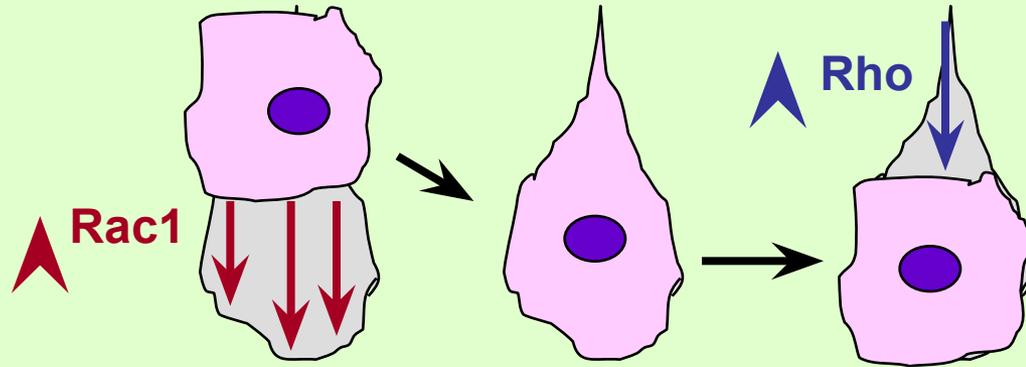
Актиновые пучки (зеленый) и фокальные контакты (винкулин, красный)

Организация актина на ведущем крае клетки при фибробластоподобном движении

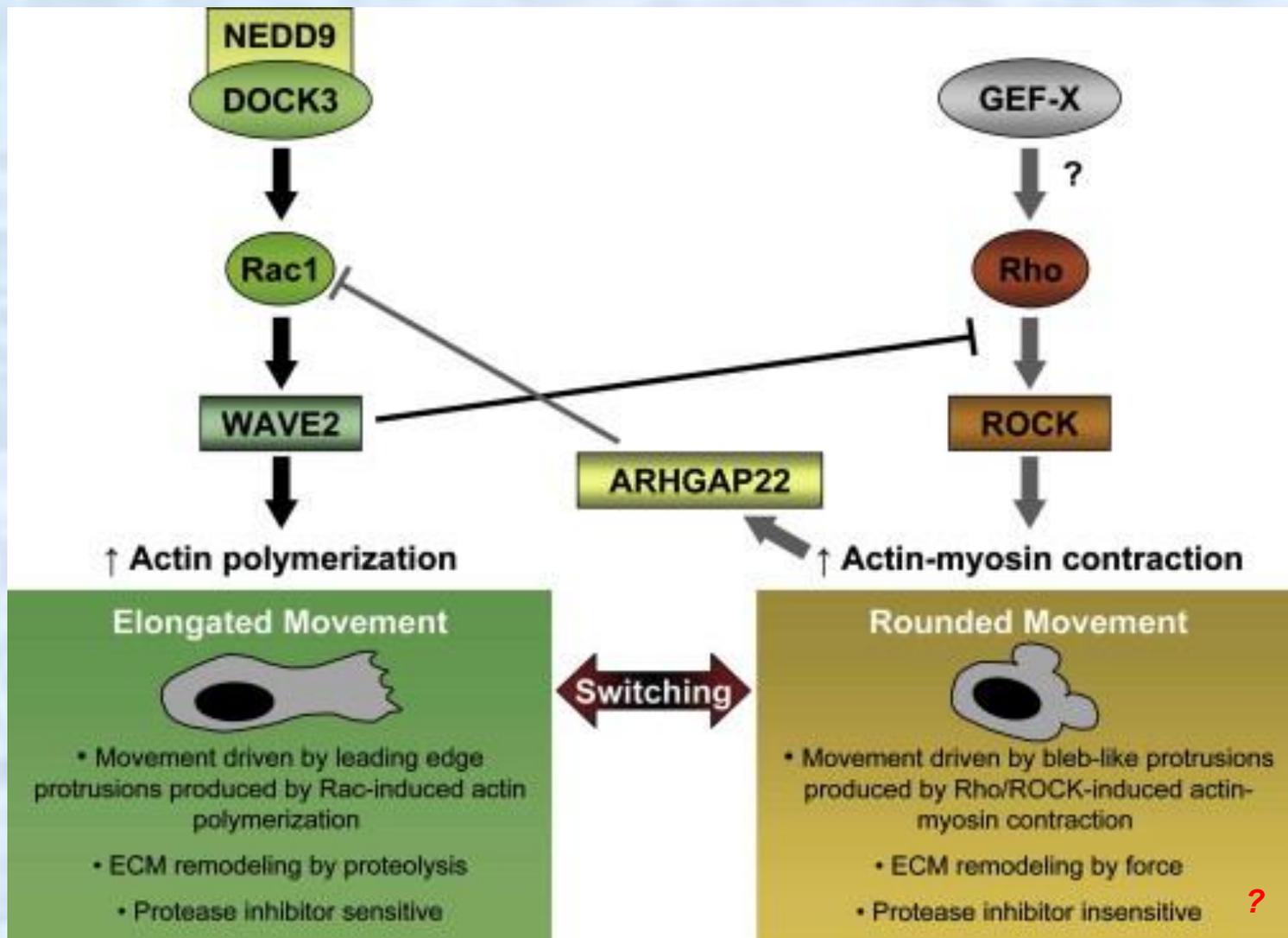


Протрузия обеспечивается полимеризацией и ветвлением актиновых фибрилл

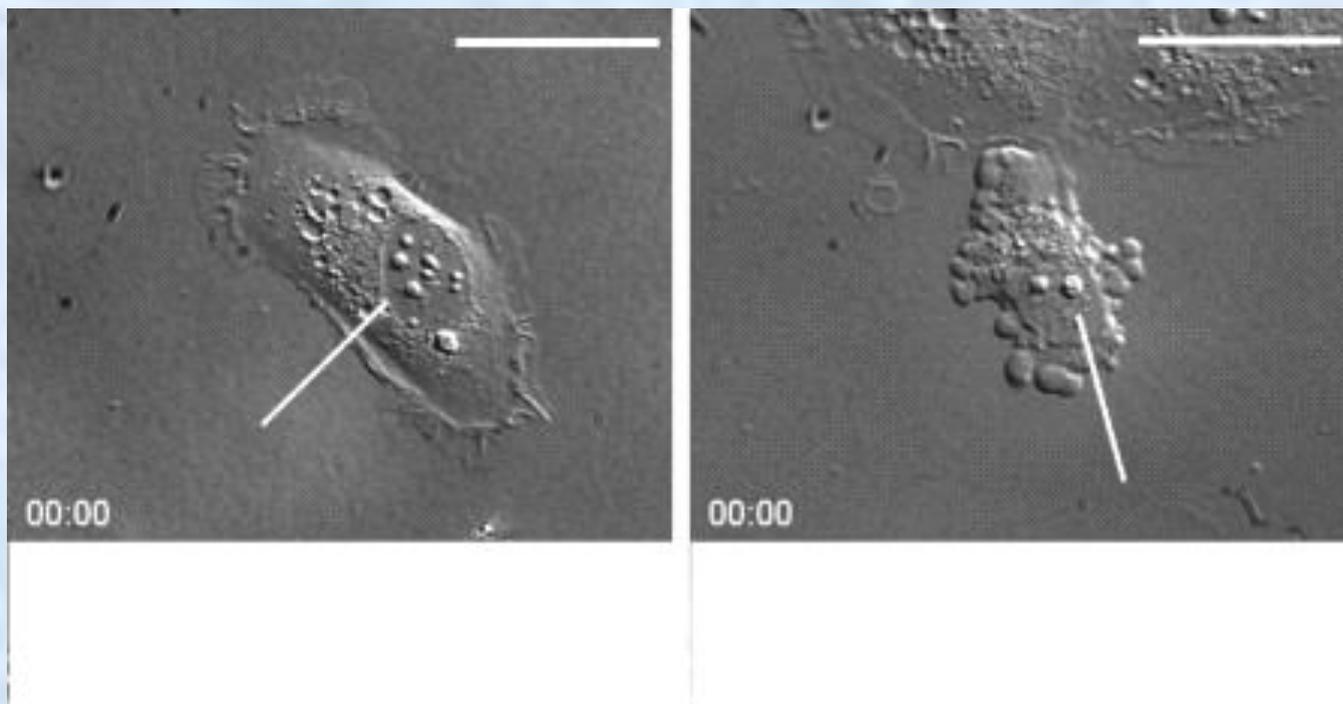
Функция Rac1 обеспечивает формирование протрузий (полимеризация актина → ламеллоподии), функция Rho ответственна за ретракции (активность стресс-фибрилл)



Регуляция фибробластоподобного и амeboидного движения в клетках меланомы



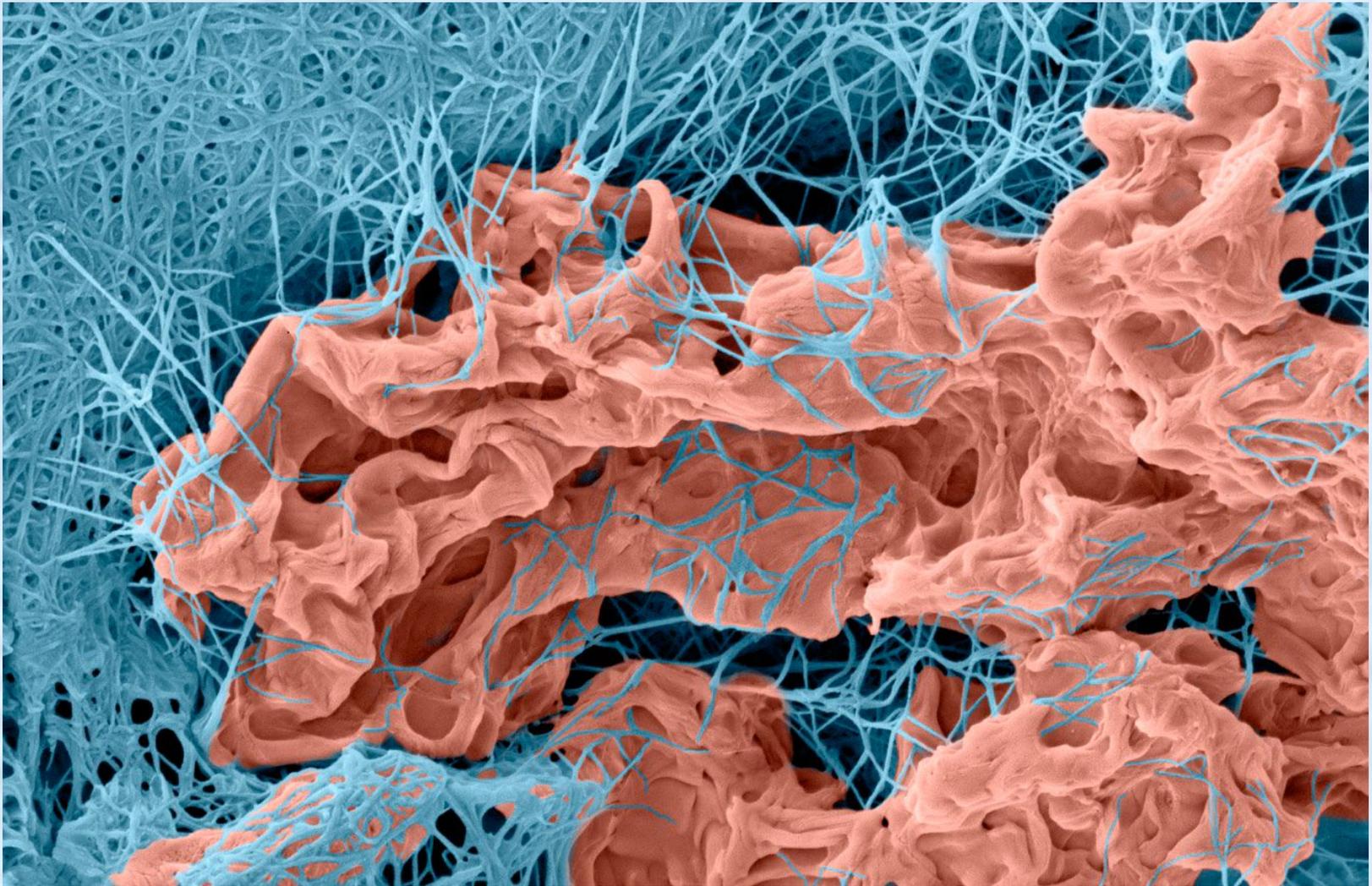
Изменение типа клеточной подвижности при переключении активности внутриклеточных сигнальных путей (ламеллиподии и блебы)



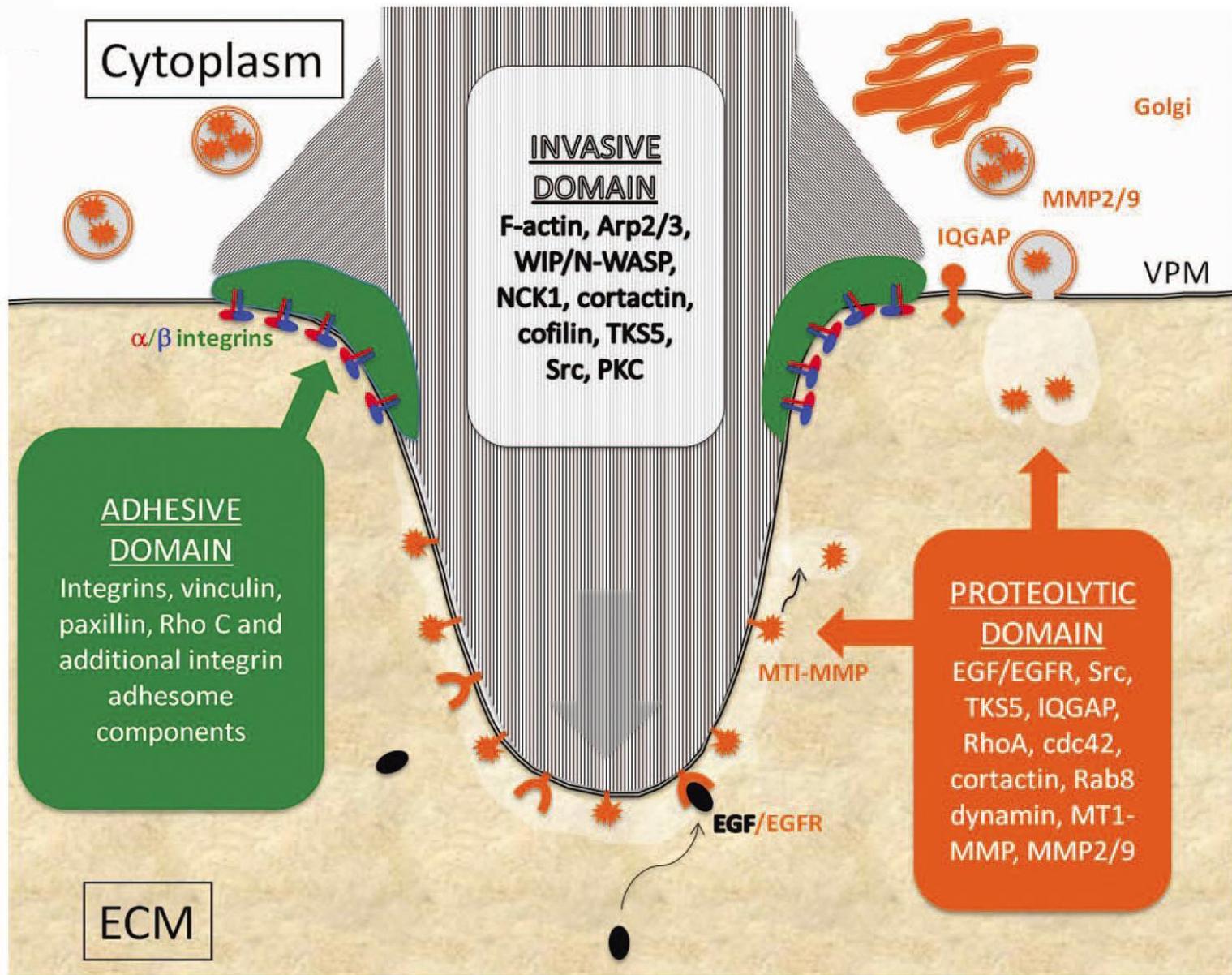
HT1080

HT1080 + Inh Arp2/3

(блокирует полимеризацию
актина на ведущем крае)



3D cancer cell invasion. Multicellular spheroids of HT-1080 fibrosarcoma cells were embedded within 3D gels of native type I collagen for 3 d. Gels were fixed in 2% glutaraldehyde/1.5% paraformaldehyde in 0.1 M sodium cacodylate buffer, freeze-fractured, and processed for SEM. Images of infiltrating cells and the surrounding ECM were digitally imaged using XStream imaging software.

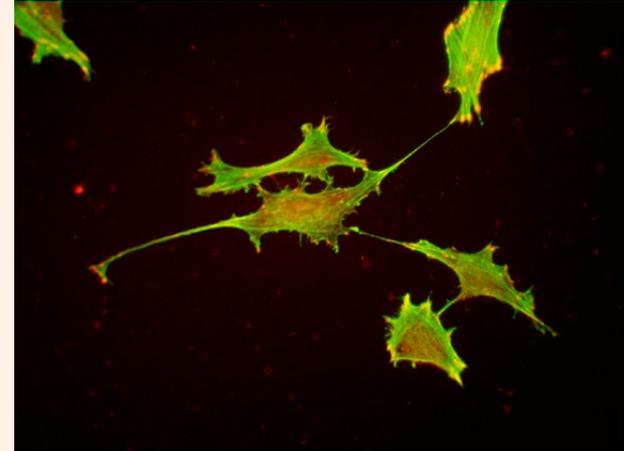


Изменения формы клеток и организации актинового цитоскелета при неопластической трансформации

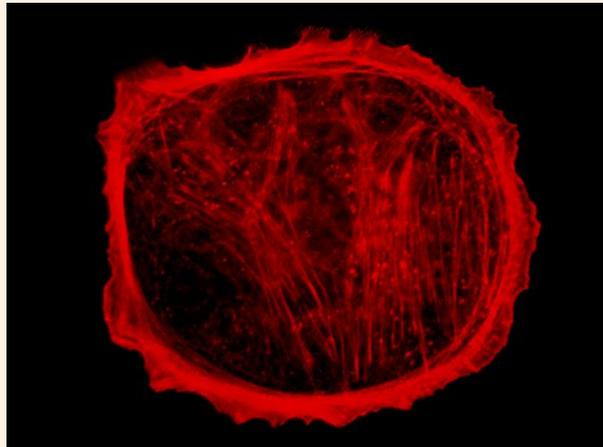
Фибробласты



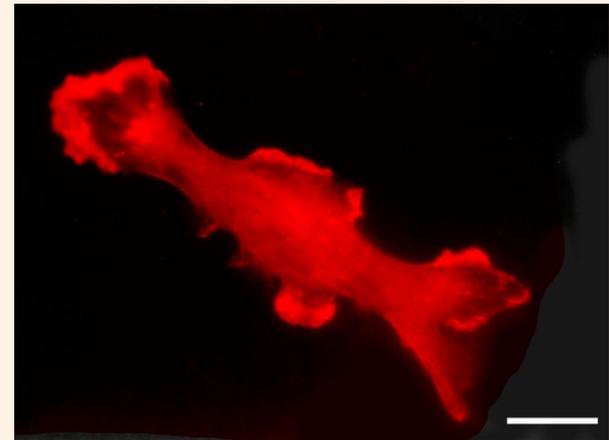
Ras
→



Эпителиоцит

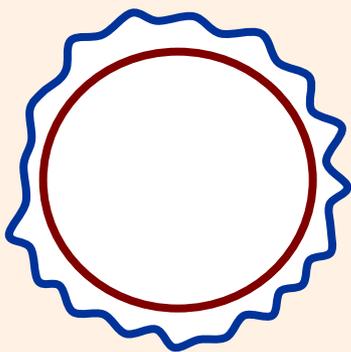


Ras
→

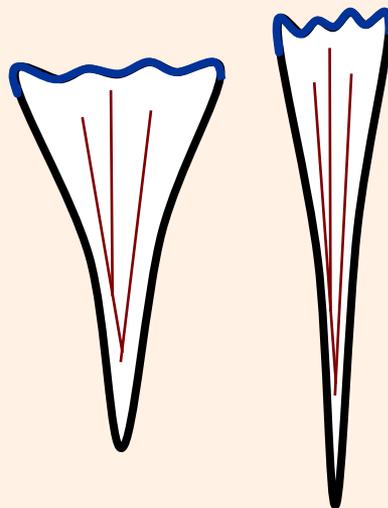


Неопластическая трансформация морфологии

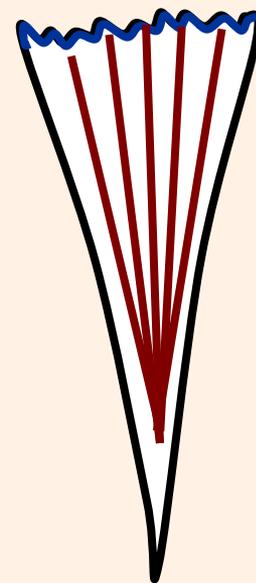
Эпителиальная
клетка



Трансформированные
клетки



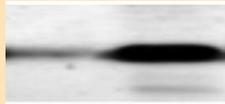
Фибробласт



Ras-индуцированные изменения морфологии фибробластов связаны с повышением активности Rac1 и подавлением способности Rho вызывать фосфорилирование кофилина

Клетки REF52

N-Ras



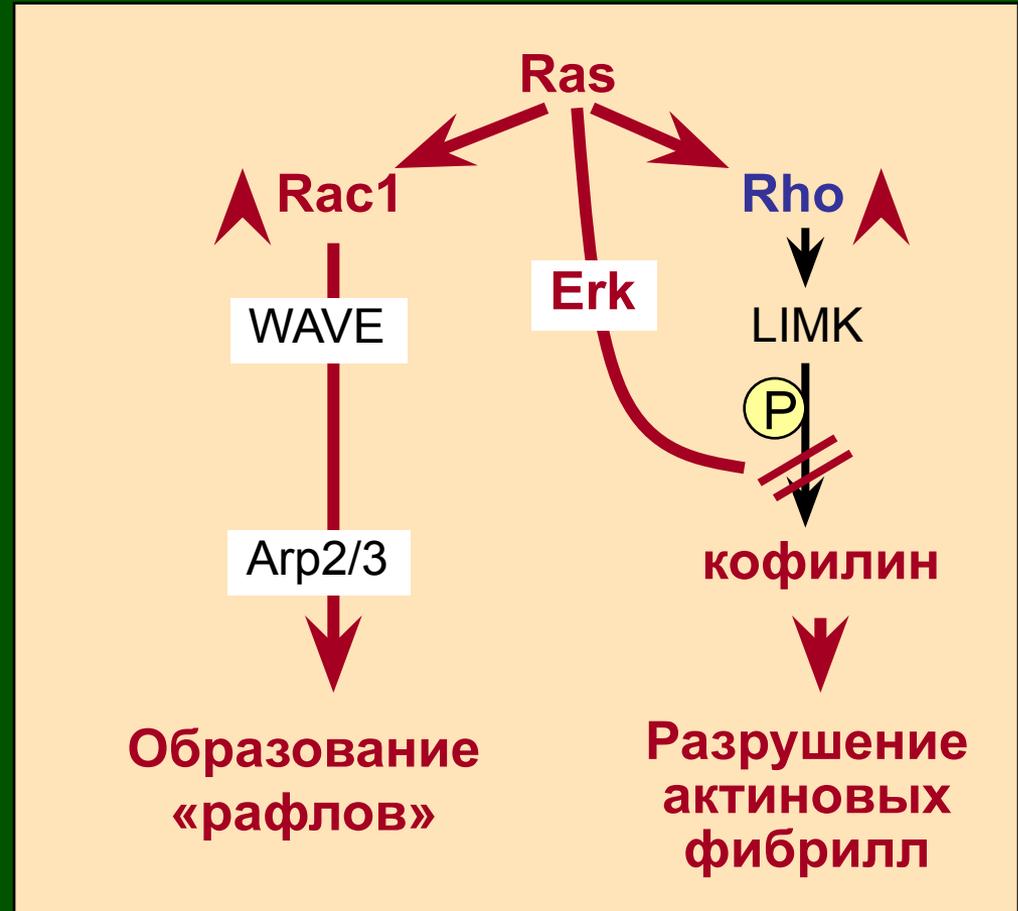
Rac1/GTP



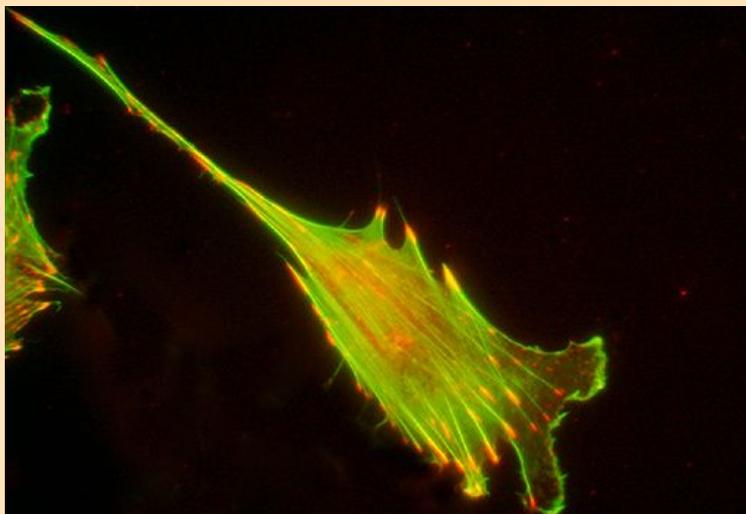
Rho/GTP



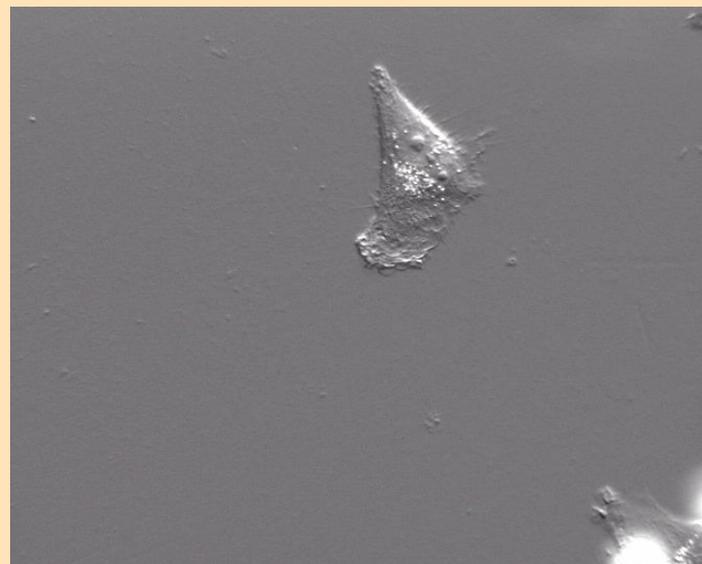
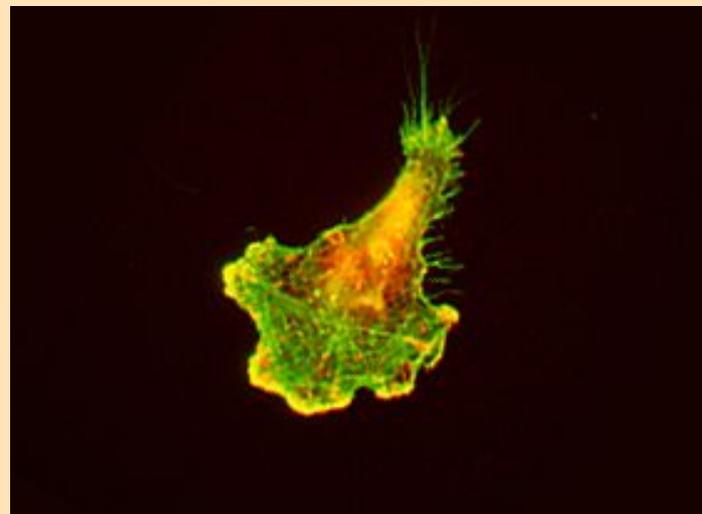
P-cofilin



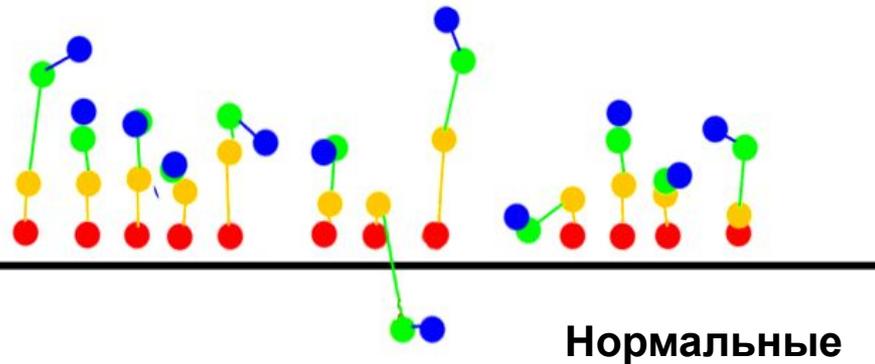
Нормальный фибробласт
человека



Фибробласт человека,
трансформированный SV40

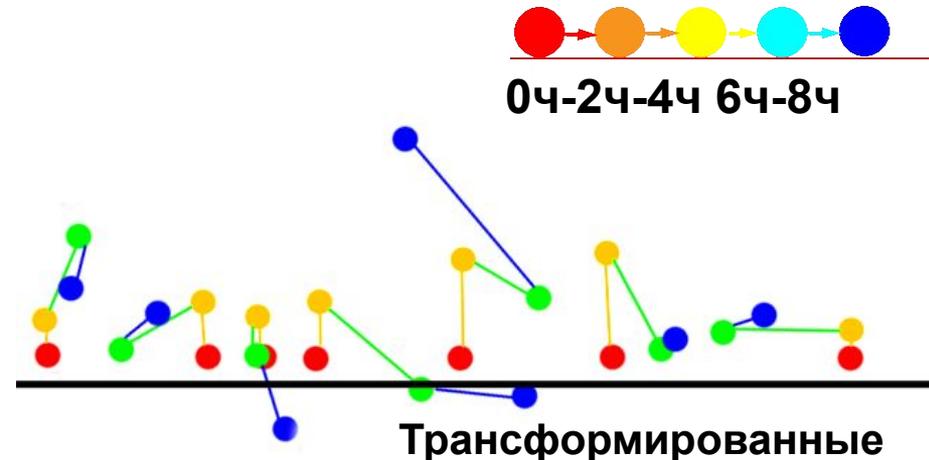


Изменение характера движения трансформированных фибробластов (без аттрактанта)



Нормальные

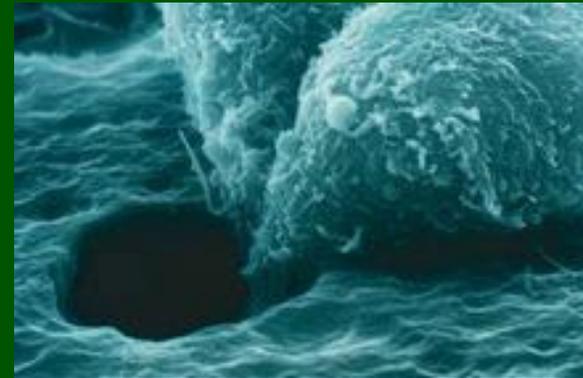
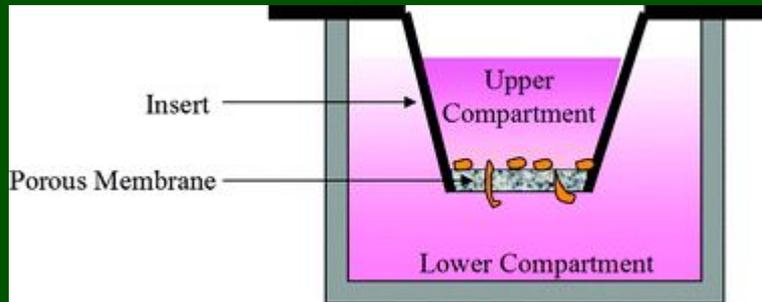
Пройденный путь (мкм)	$43,62 \pm 3,7$
Средняя скорость (мкм/ч)	5,45 мкм/ч



Трансформированные

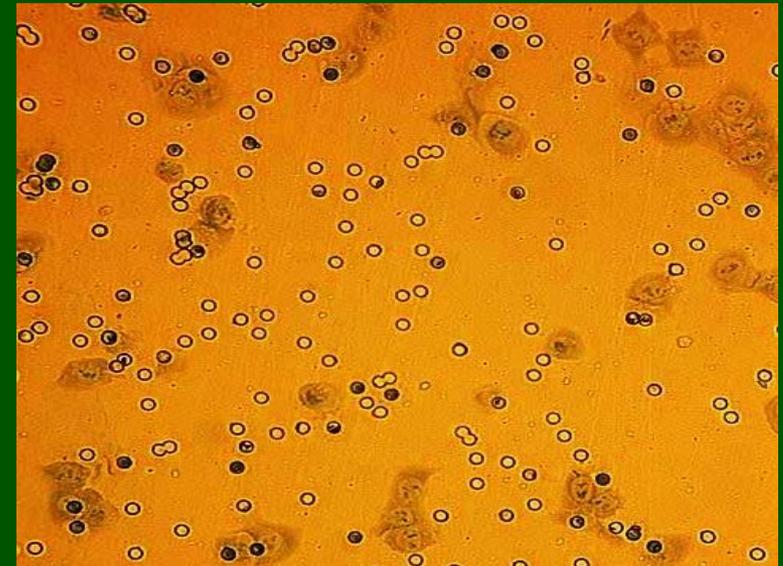
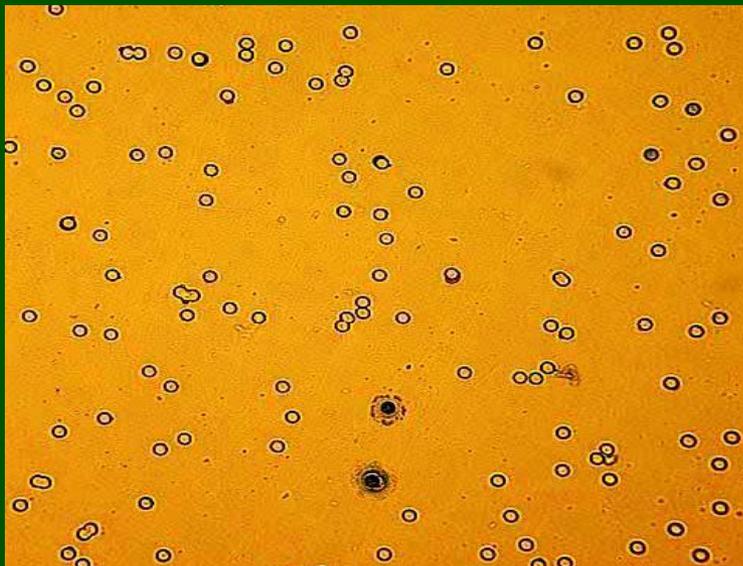
Пройденный путь (мкм)	$57,16 \pm 6,5$
Средняя скорость (мкм/ч)	7,145 мкм/ч

Тесты на миграционную и инвазивную способность клеток *in vitro*: миграция через фильтры (8 μM), покрытые матригелем, по градиенту сыворотки



Нормальные

Трансформированные



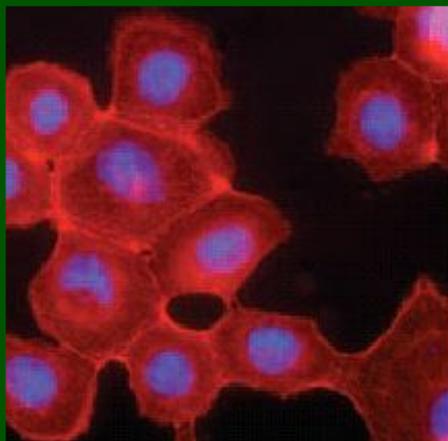
Локомоторный фенотип эпителиальных неопластических клеток часто связан с эпителиально-мезенхимальным переходом (ЭМП) (перестройка актинового цитоскелета, исчезновение E-кадгериновых контактов, экспрессия виментина и др.)

Эпителий молочной железы

Нормальный

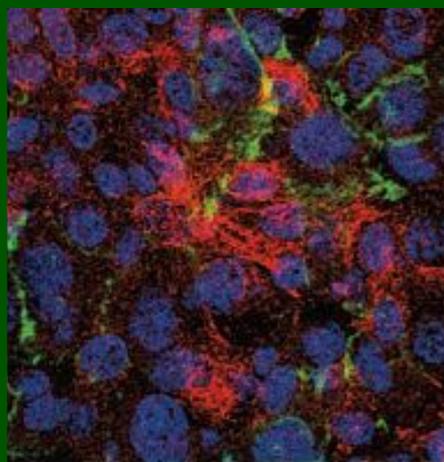
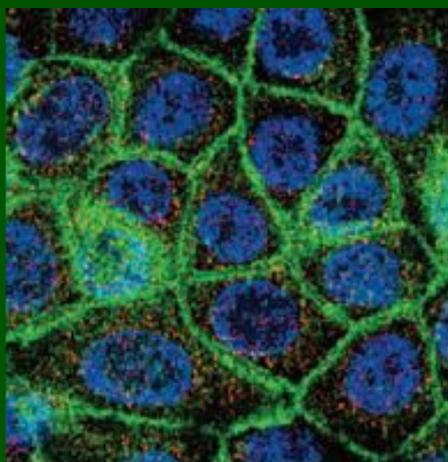
Трансформированный

F-актин
(красный)

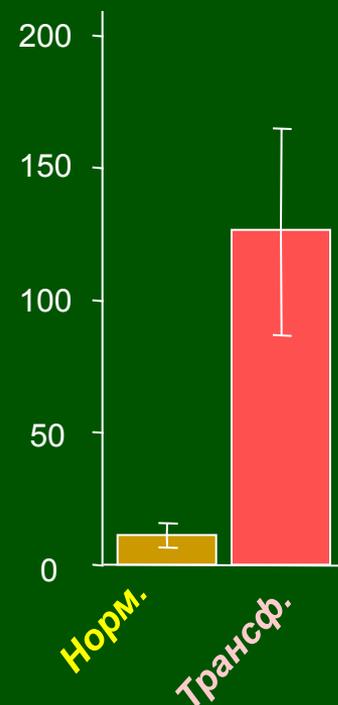


E-кадгерин
(зеленый)

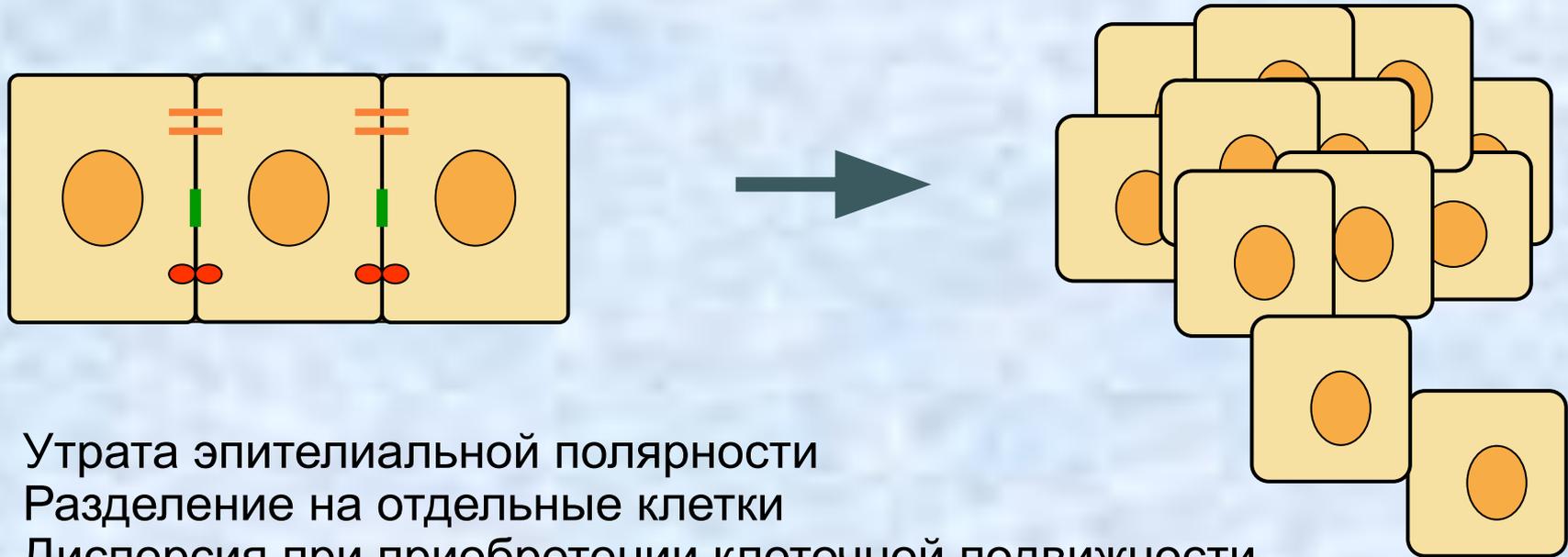
Виментин
(красный)



Число клеток, мигрировавших
через фильтры с матригелем



Эпителиально-мезенхимальный переход



- Утрата эпителиальной полярности
- Разделение на отдельные клетки
- Дисперсия при приобретении клеточной подвижности

Признаки ЭМП:

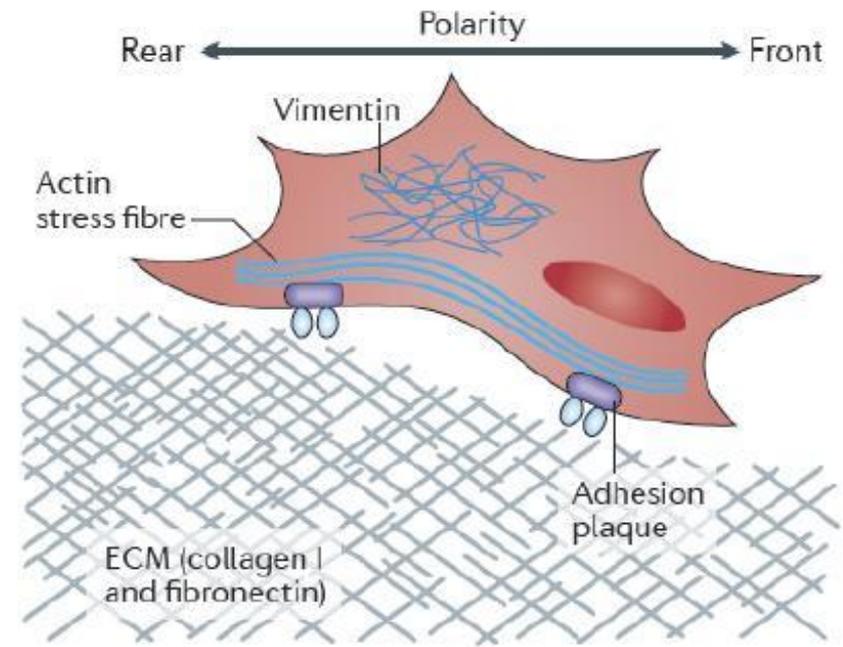
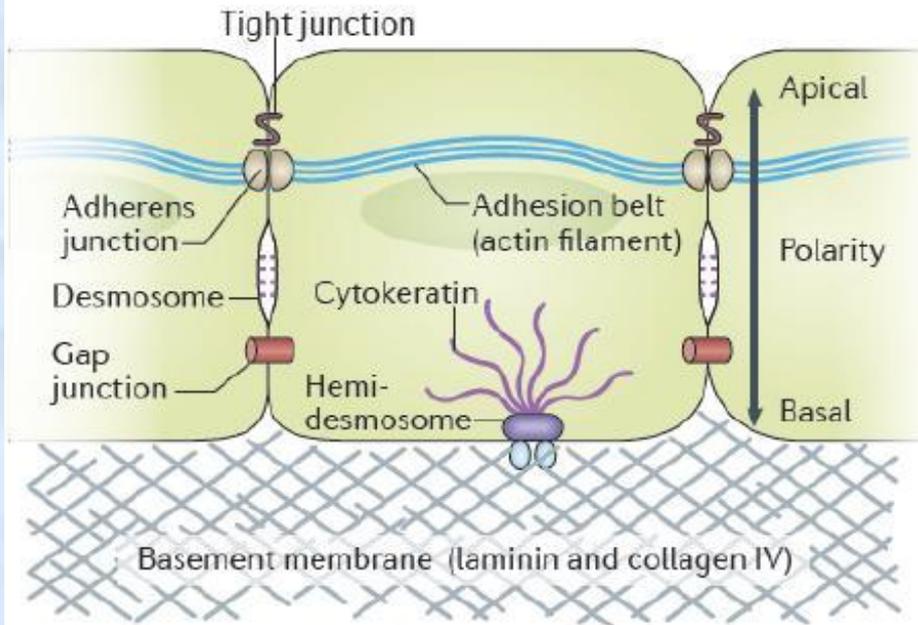
- Разрушение плотных, щелевых, адгезионных контактов и десмосом
- Изменение цитоскелета - переход от цитокератиновых промежуточных филаментов к виментиновым
- Изменение профилей транскрипции генов, кодирующих компоненты межклеточных контактов (эпителиальные: E-кадгерин, ZO-1, клаудины, окклюдин), цитоскелета и ВКМ

Epithelial cell

EMT

Mesenchymal cell

MET



Tight junctions, adherens junctions, gap junctions, and desmosomes

Cell-cell junctions

Minimal

- Actin filaments are aligned with adherens junctions (adhesion belt)
- Cytokeratin intermediate filaments

Cytoskeleton

- Actin stress fibres
- Vimentin intermediate filaments

Via integrin $\alpha_6\beta_4$ at hemidesmosomes; linked to cyokeratins

Interactions with ECM

Via β_1 -containing or β_3 -containing integrins at adhesion plaques; linked to actin stress fibres

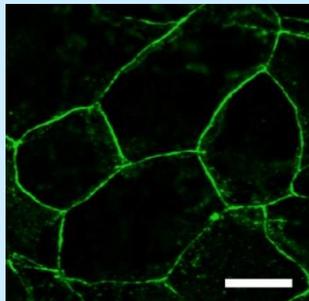
Apical-basal polarity

Polarity

Front-rear polarity

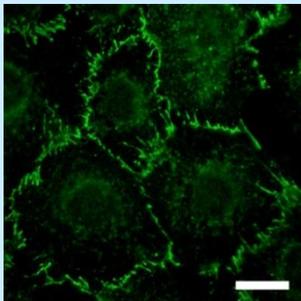
Нормальный эпителий

Е-кадгерин



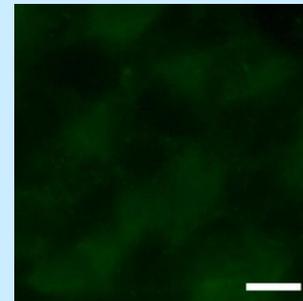
Стабильные
тангенциальные
контакты

Ранние этапы ЭМП

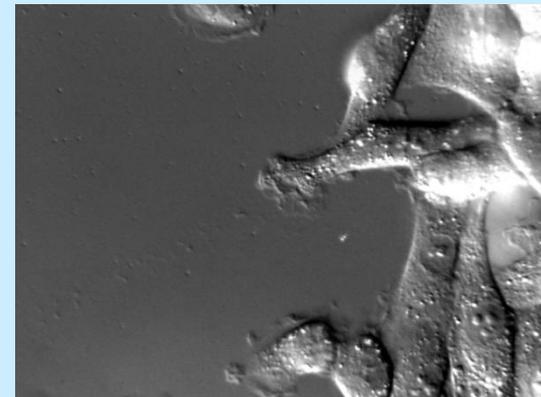
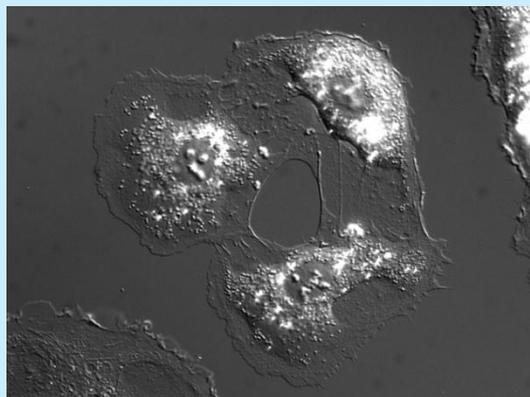


Динамичные
радиальные
контакты

Выраженный ЭМП



Отсутствие
экспрессии
Е-кадгерина



На ранних этапах ЭМП происходит разрушение краевого актинового пучка и перестройка стабильных тангенциальных Е-кадгерин-содержащих контактов между клетками в динамичные радиальные контакты, что приводит к ослаблению межклеточной адгезии и стимулирует клеточную подвижность.

Физиологические механизмы ЭМП (эмбриогенез, заживление ран)

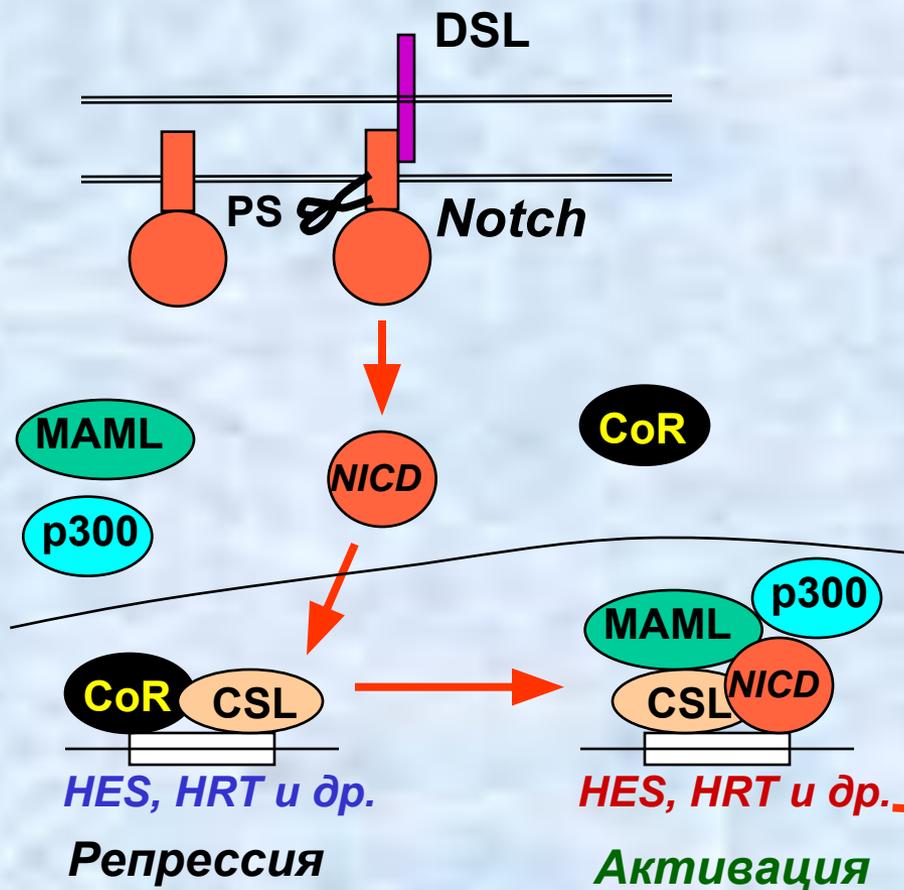
Активация рецепторов
факторов роста
(HGF/SF, TGF β и др.)

Активация Notch*

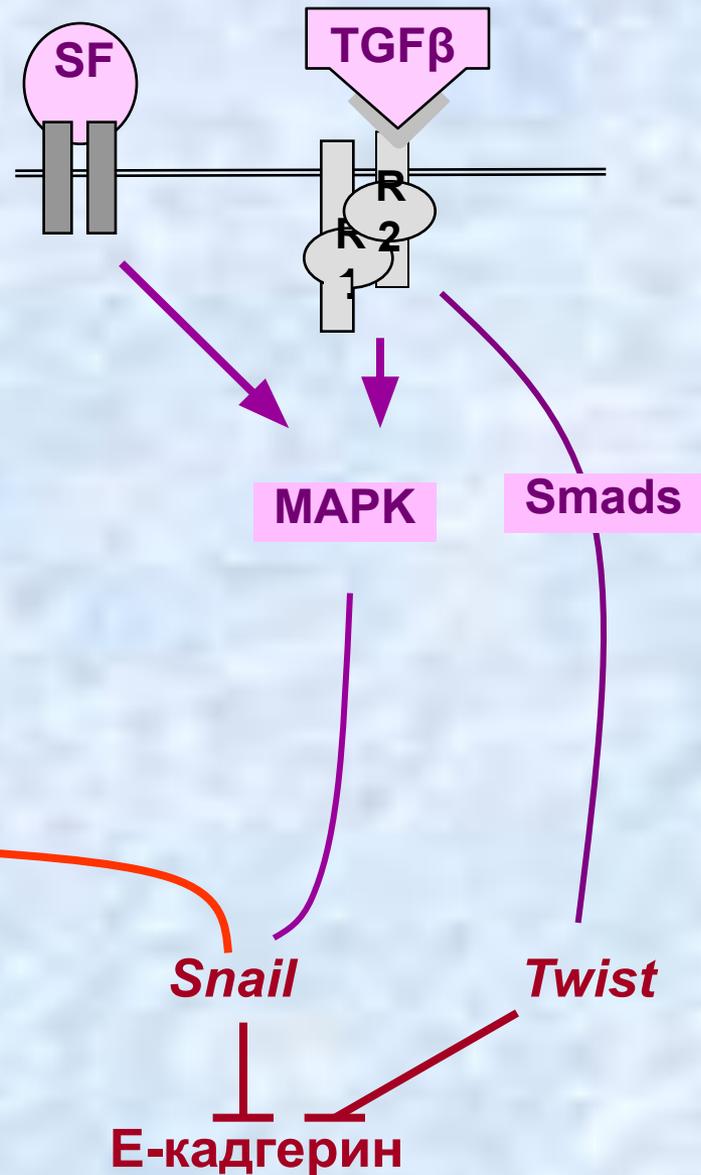
Активация факторов транскрипции
Snail/Slug, Twist, Zeb и др.

Репрессия транскрипции генов E-кадгерина и др. белков
эпителиальной дифференцировки;
активация генов мезенхимальных белков;
реорганизация цитоскелета и клеточных контактов

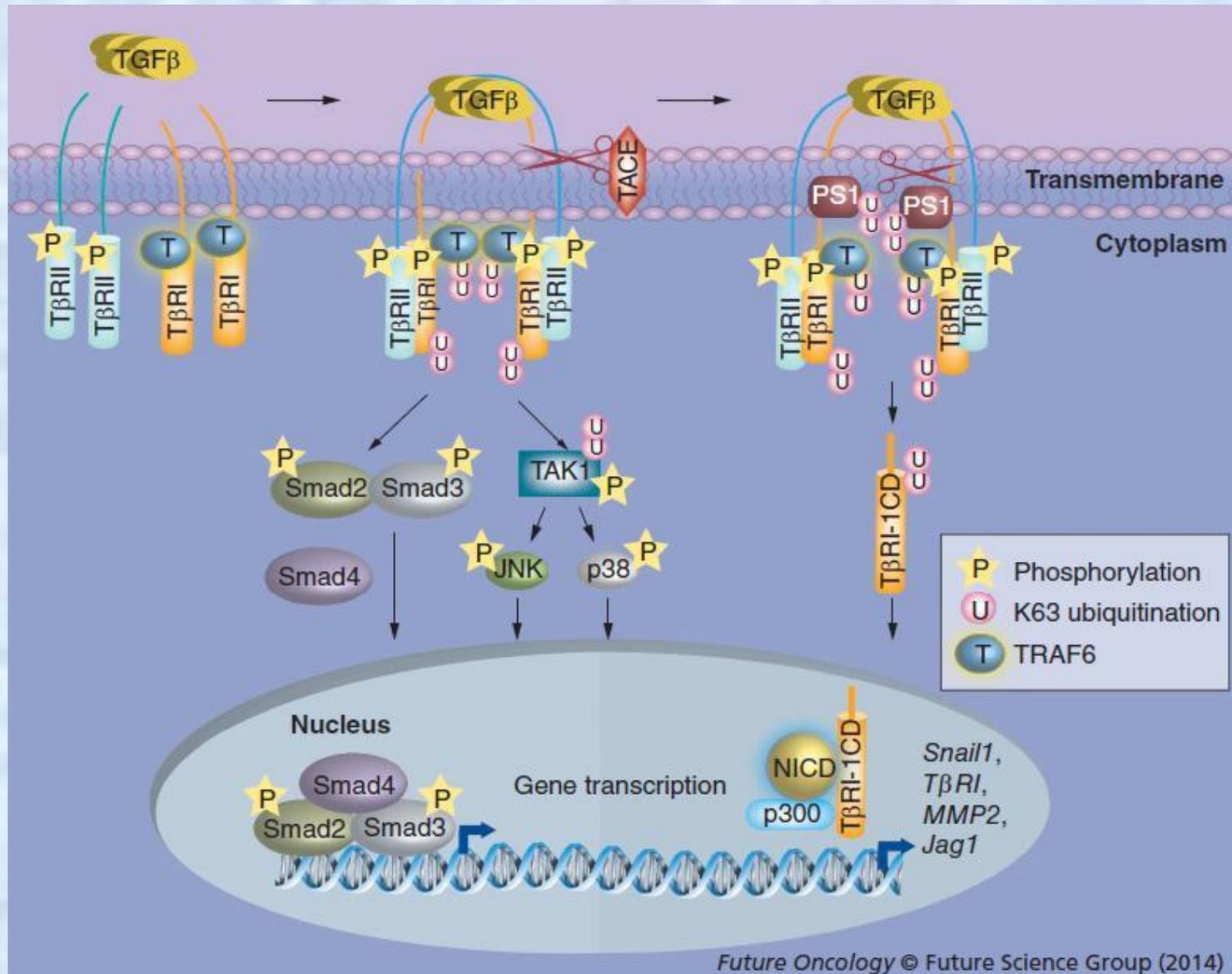
Notch – семейство трансмембранных белков, преобразующих контакты с окружающими клетками в генетические программы, регулирующие судьбу клетки: сохранение полипотентного состояния, вступление на путь дифференцировки и/или выбор направления созревания



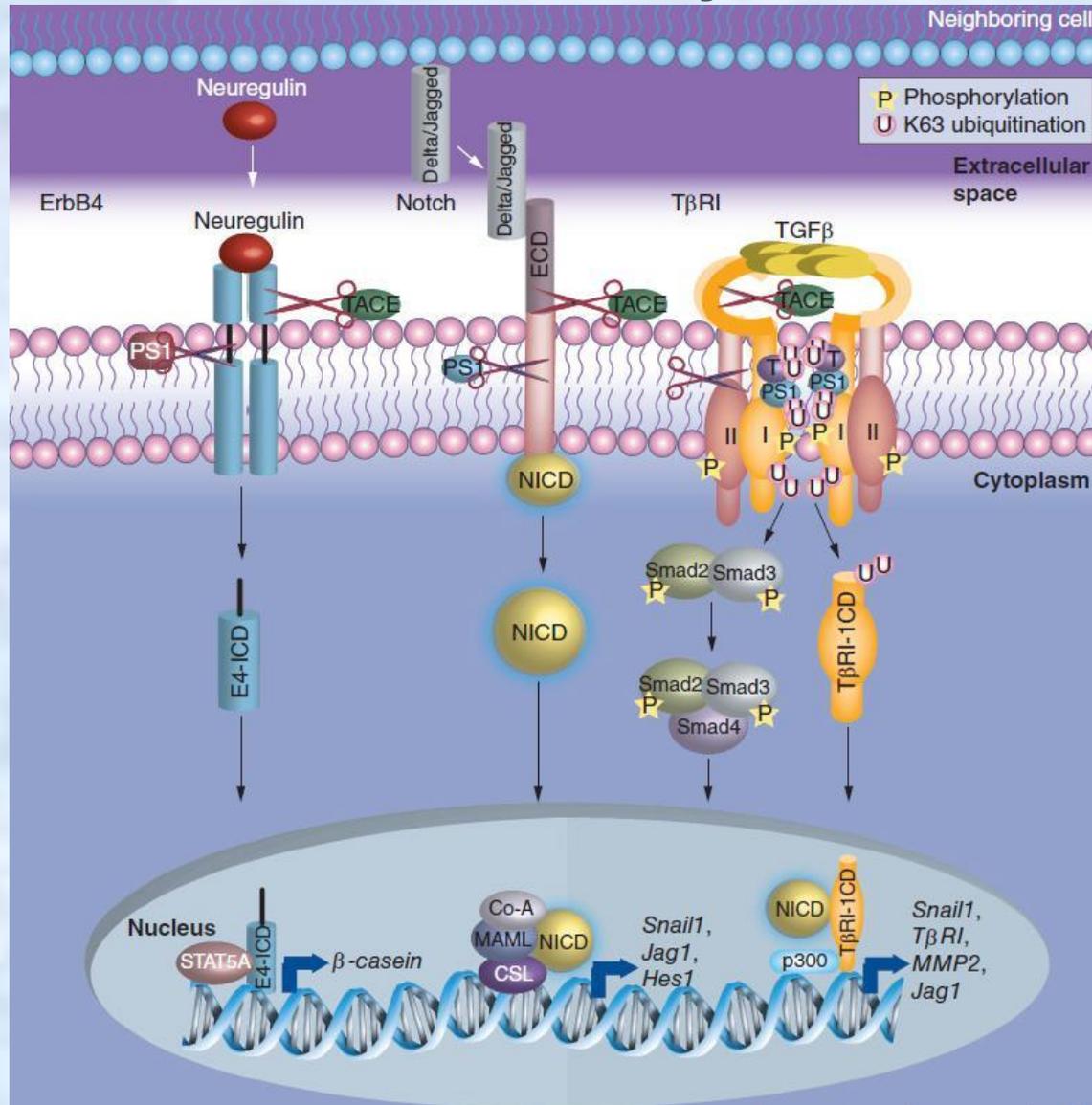
Изменение экспрессии генов, контролирующих размножение и дифференцировку клеток



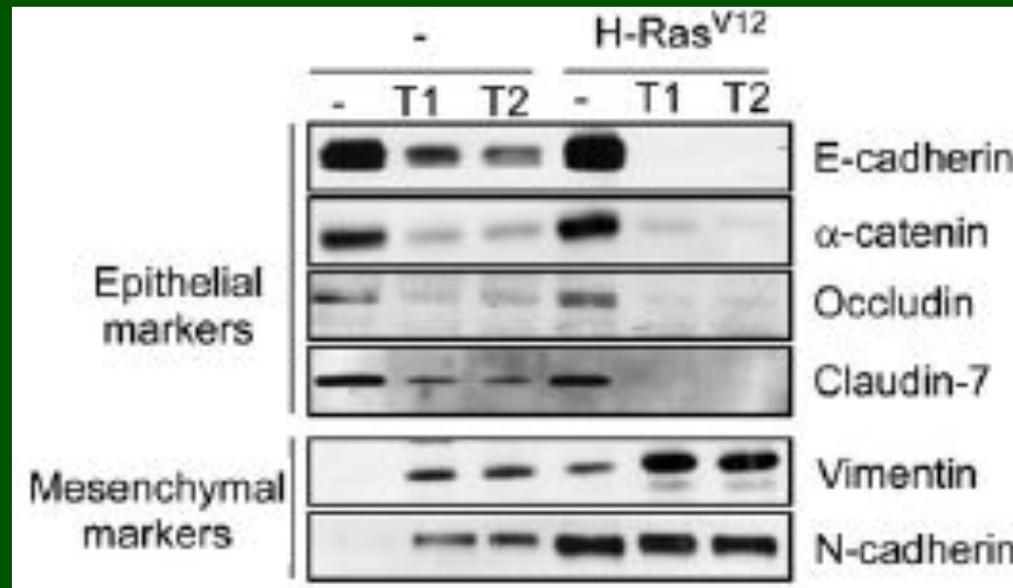
TGFβ-зависимая сигнализация

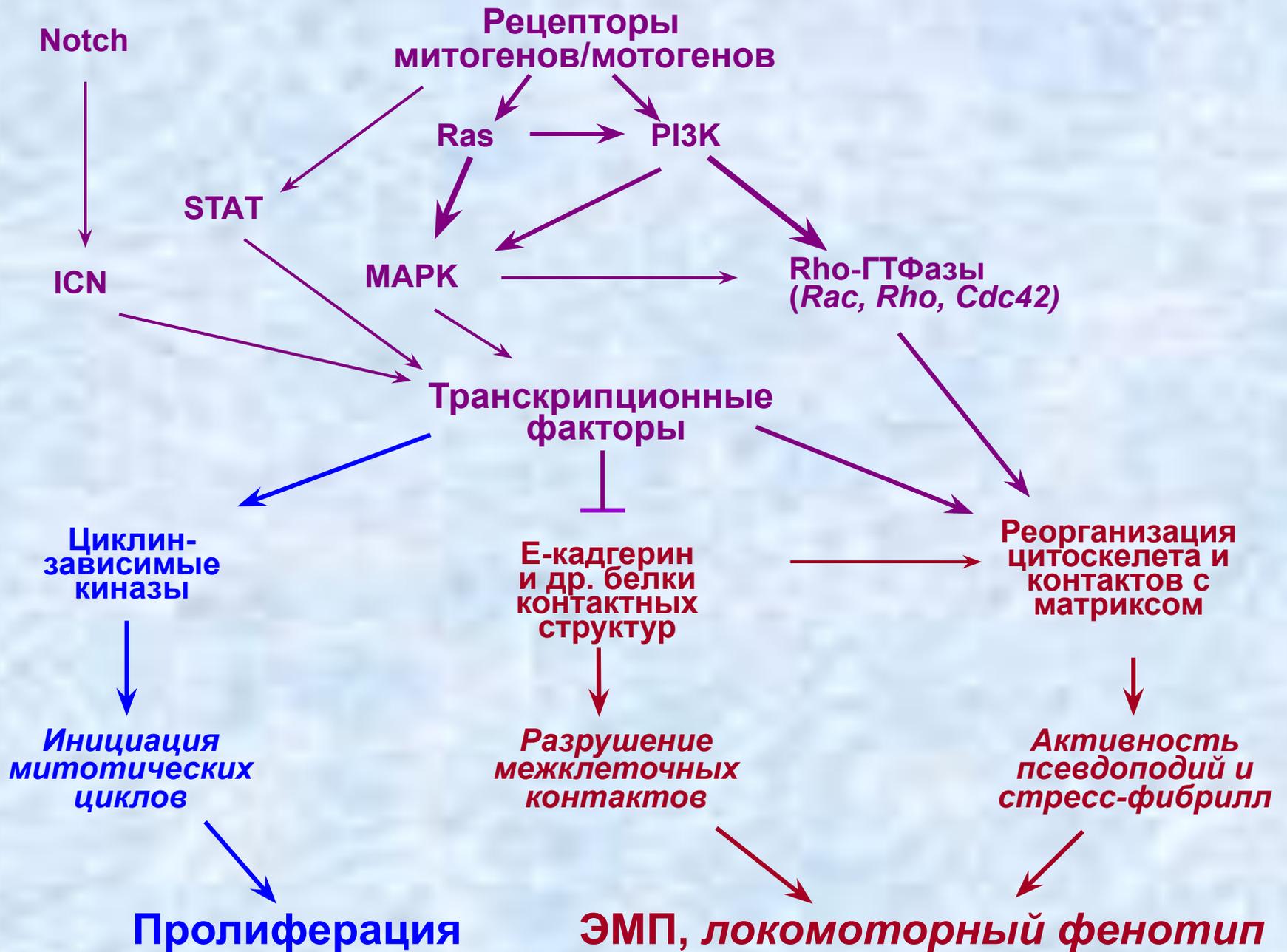


Регулируемый транс-мембранный протеолиз – общий механизм активации внутриклеточной сигналикации в опухолях



Переключение маркеров эпителиальной
и мезенхимальной дифференцировок при экспрессии
мутантного онкобелка Ras
в эпителиальных клетках молочной железы с
трансдуцированными генами TWIST1, TWIST2





Механизмы ЭМП

Физиологические:

- Активация рецепторов HGF/SF, TGF β и др. цитокинов
- Активация Notch

Обратимые

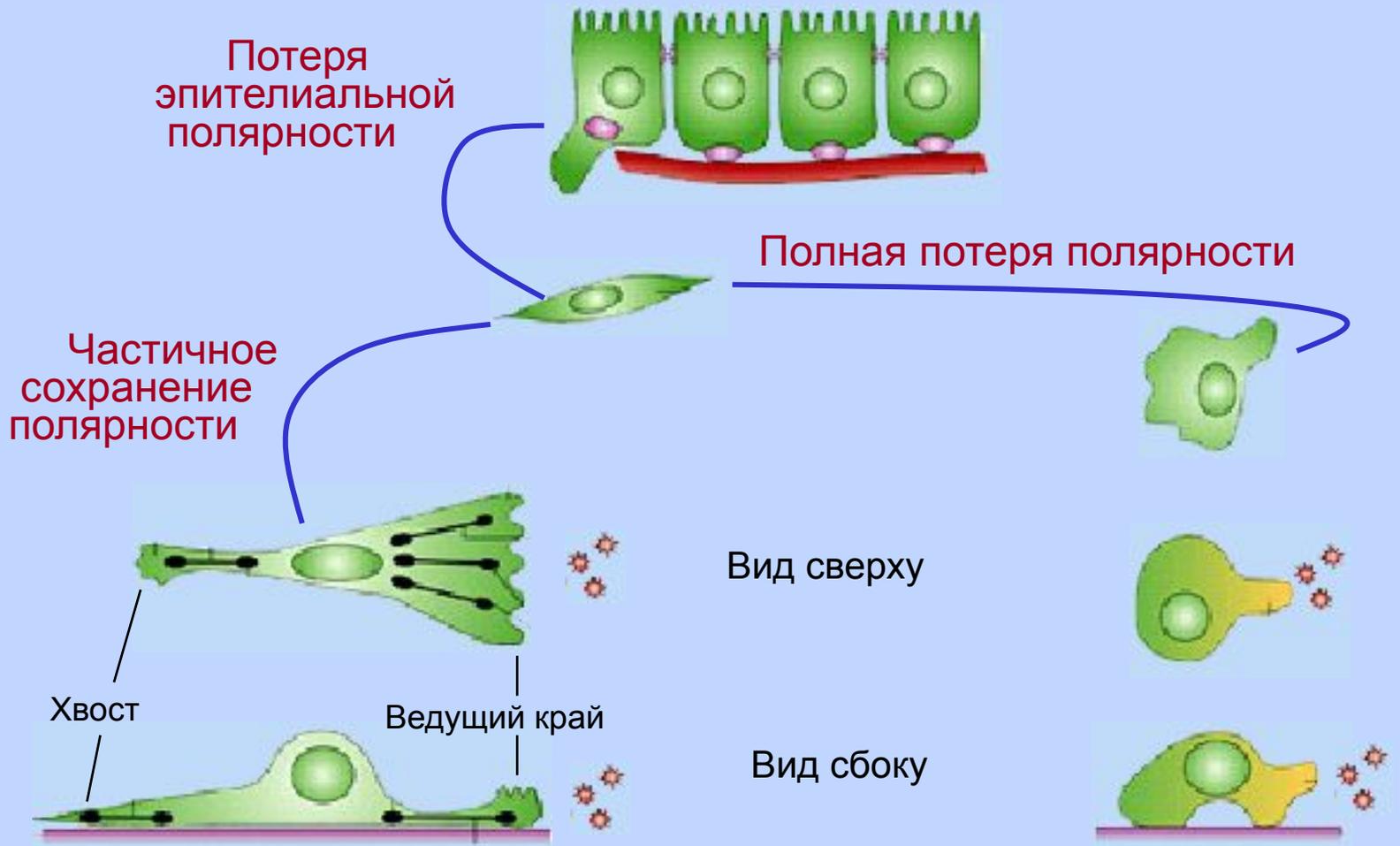
Репрессия транскрипции генов E-кадгерина и др. эпителиальных белков, активация генов мезенхимальных белков, реорганизация цитоскелета

В неопластических клетках:

- Активирующие мутации генов рецептора HGF/SF (c-Met), Ras и др.
- Мутации/перестройки, гиперэкспрессия генов Notch и их лигандов
- Гиперметилирование, инактивирующие мутации гена E-кадгерина

Необратимые

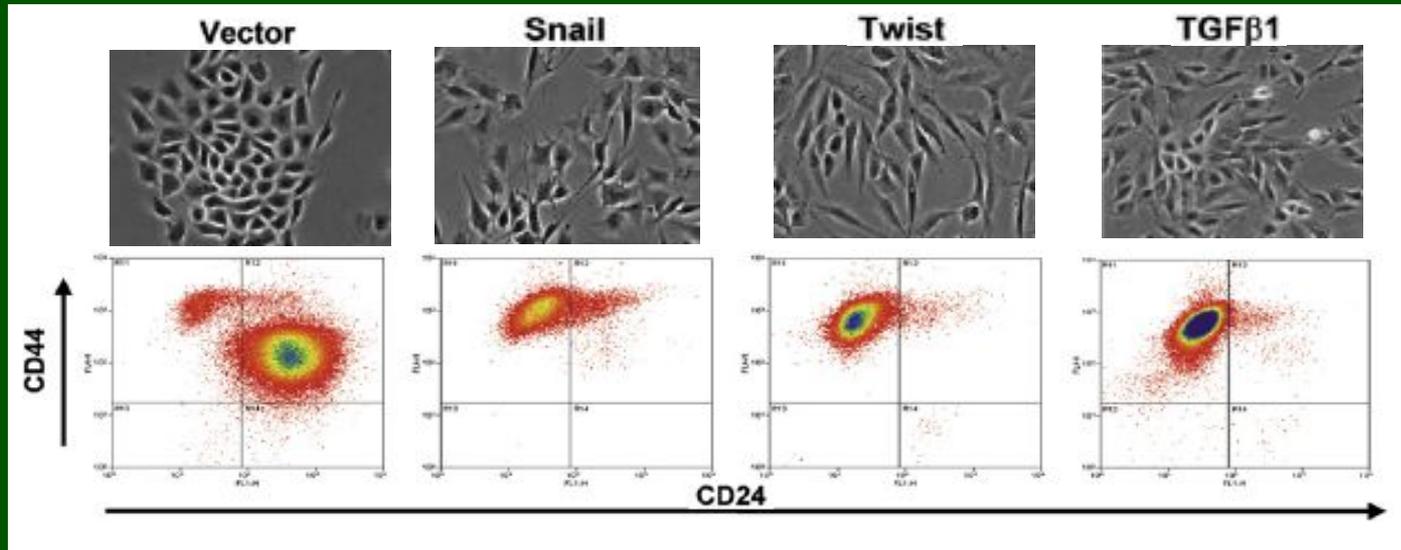
ЭМП может вызывать фибробластоподобное и амебоидное движение клеток



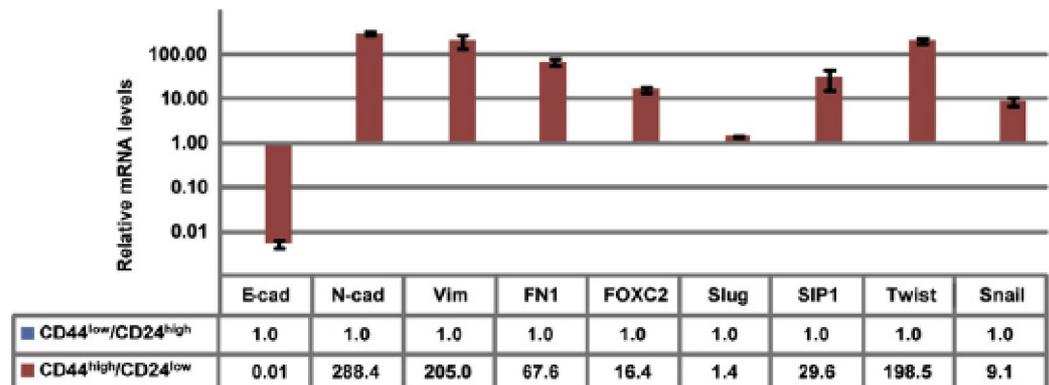
Фибробластоподобное движение

Амебоидное движение

ЭМП сопровождается приобретением ряда характеристик/маркеров стволовых опухолевых клеток ($CD44^+/CD24^-$ и др.)



Изолированная популяция клеток $CD44^+/CD24^-$, обогащенная стволовыми опухолевыми клетками, имеет маркеры ЭМП



Рецепторы МИТОГЕНОВ/МОТОГЕНОВ

Транскрипционные
факторы

Протеазы

Разрушение
внеклеточного
матрикса

Е-кадгерин
и др. белки
контактных
структур

Разрушение
межклеточных
контактов

Миграция

Подопланин
(плоскоклеточные раки,
рак молочной железы)

ГТФ-азы сем. Rho
(*Rac*, *Rho*, *Cdc42*)

Реорганизация
цитоскелета и
контактов с
матриksom

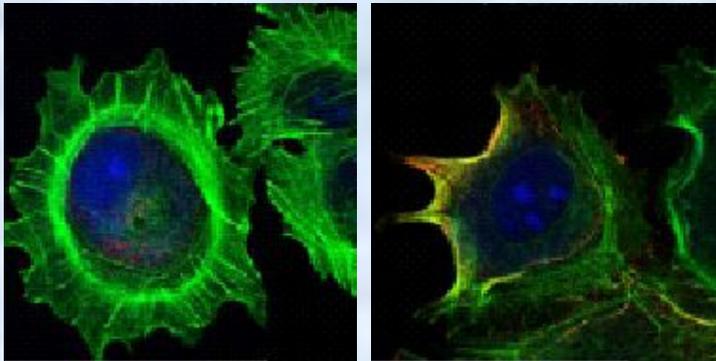
Активность
псевдоподий и
стресс-
фибрилл

Экспрессия подопланина вызывает перестройку цитоскелета и приобретение локомоторного фенотипа, не связанные с классическим ЭМП (коллективная миграция)

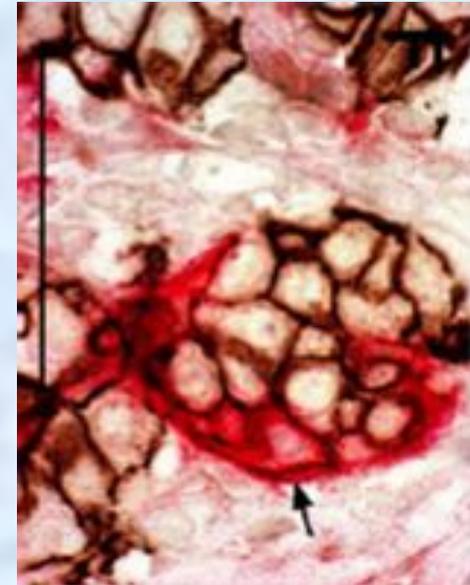
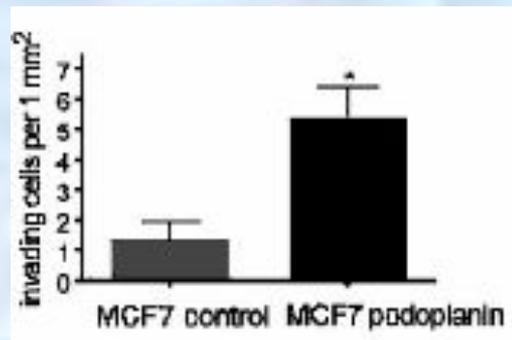
Эпителиальные клетки молочной железы

MCF7

MCF7/Podo

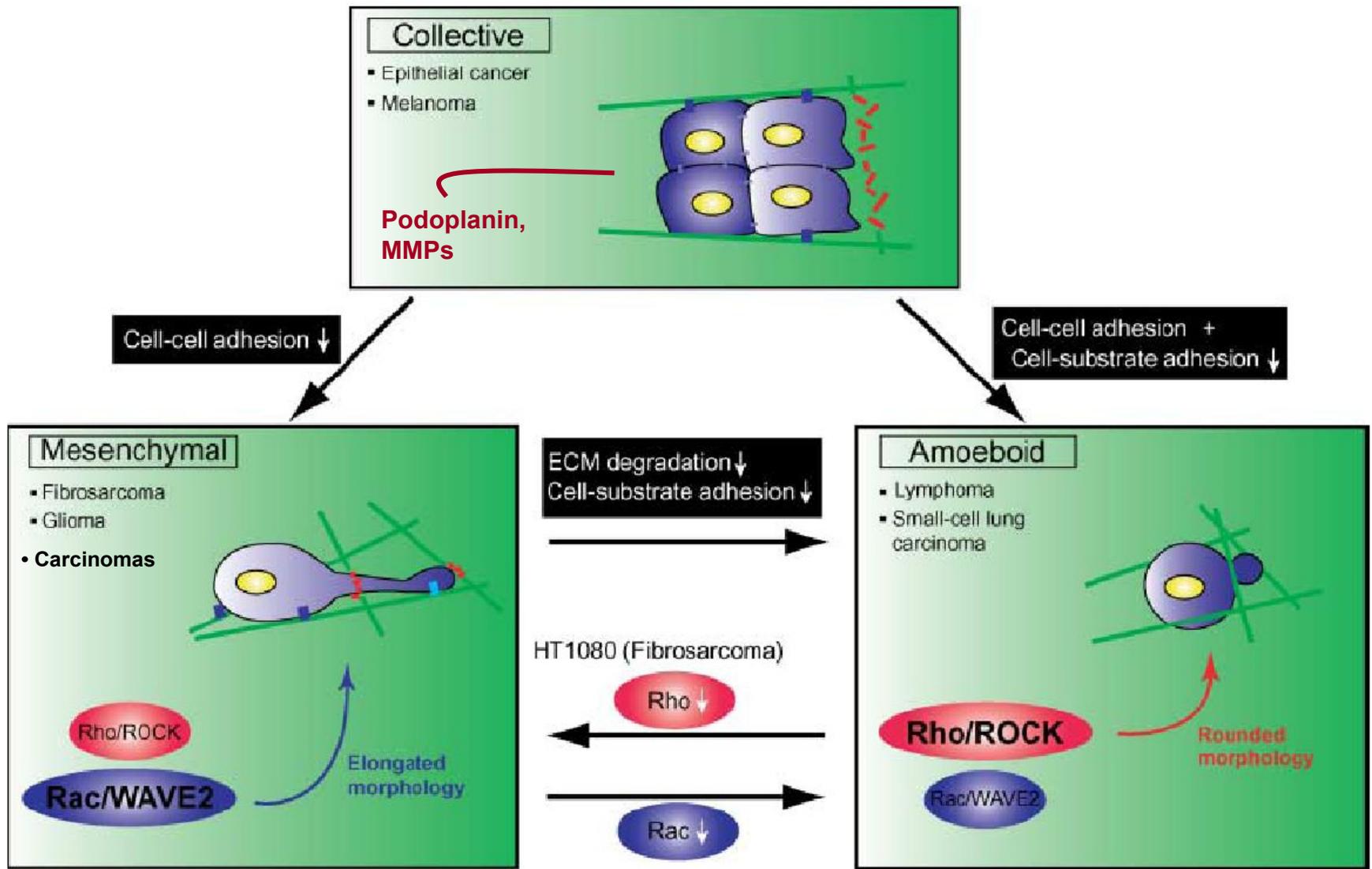


Актин (зеленый), подоплагин (красный)

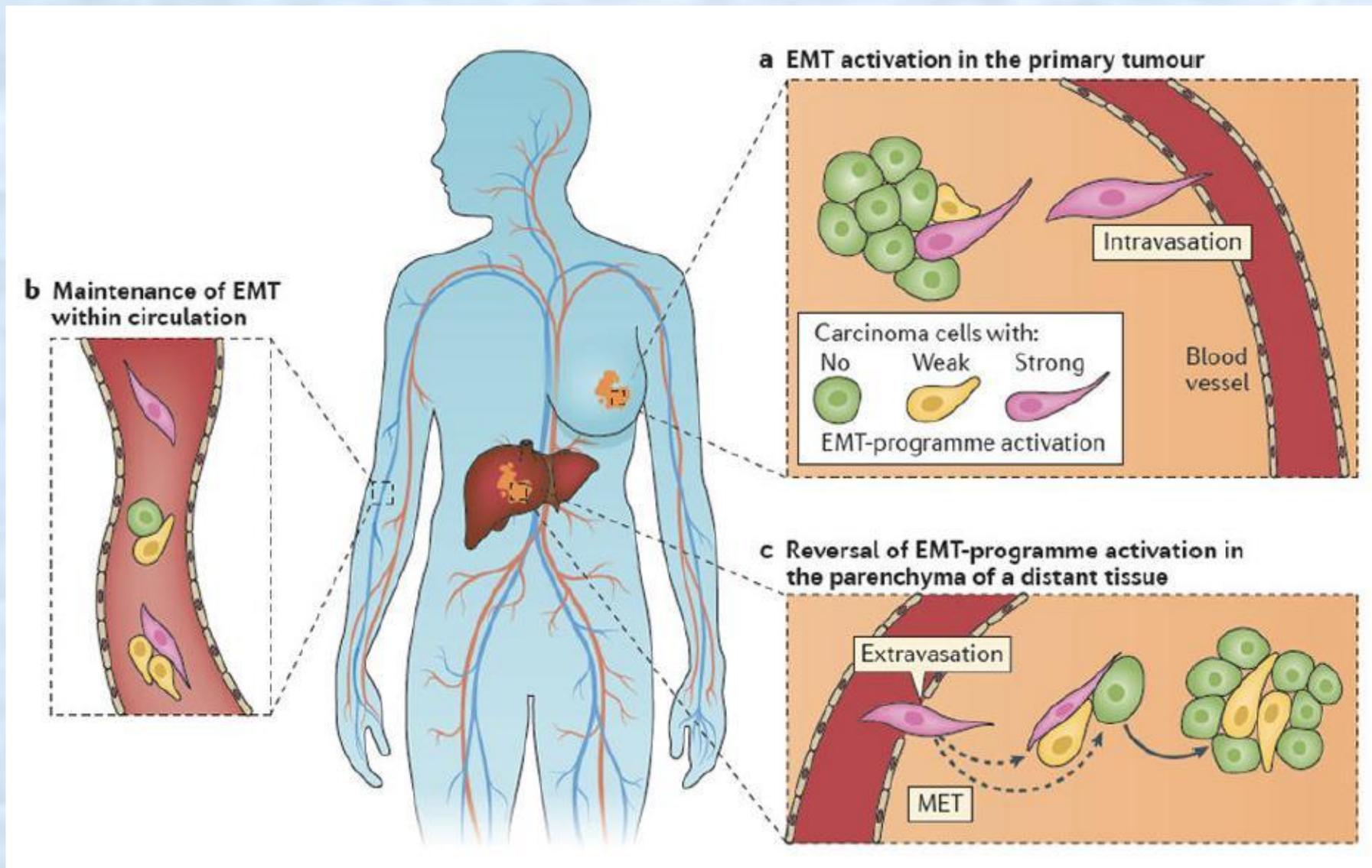


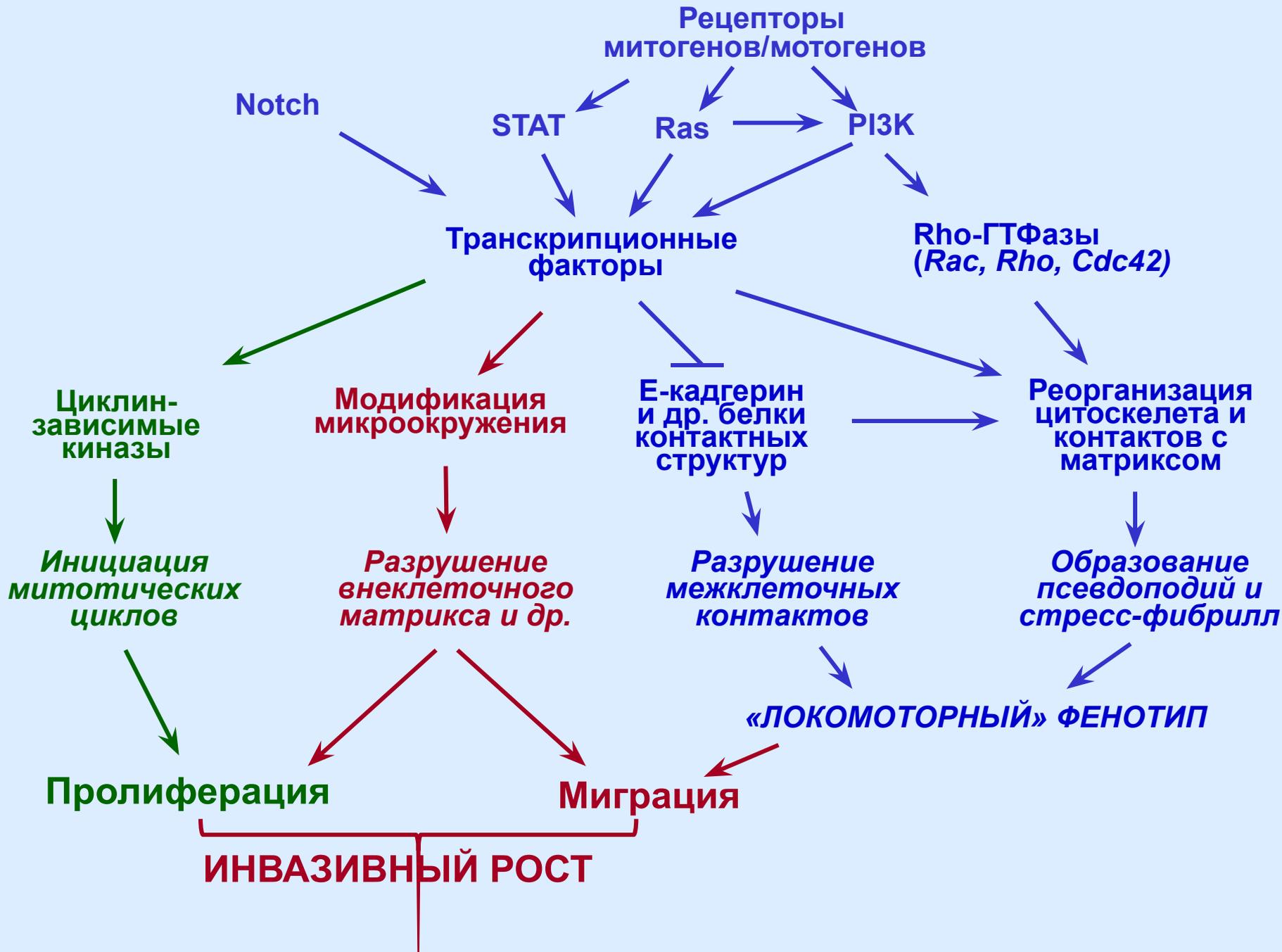
Подоплагин (красный) и E-кадгерин (коричневый) ко-экспрессируются на инвазивном фронте рака молочной железы

Стратегии миграции опухолевых клеток



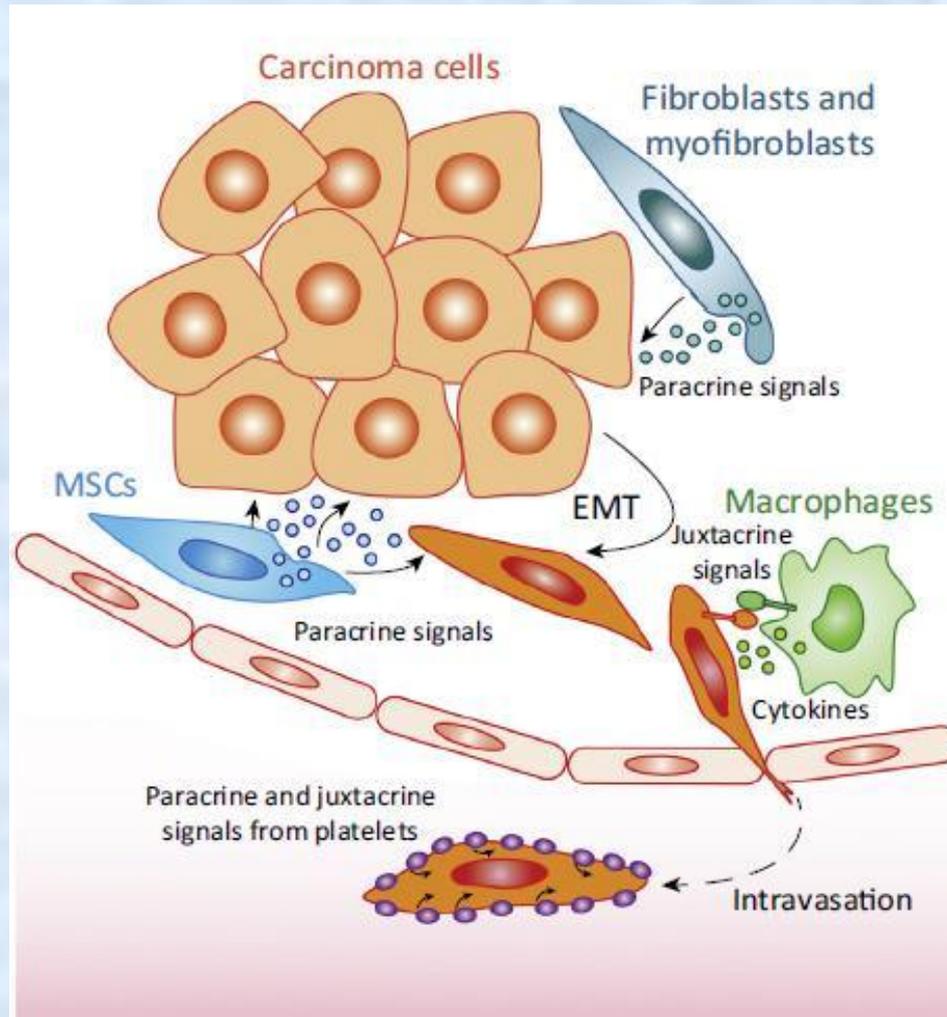
ЭМП и МЭП при прогрессии опухолей



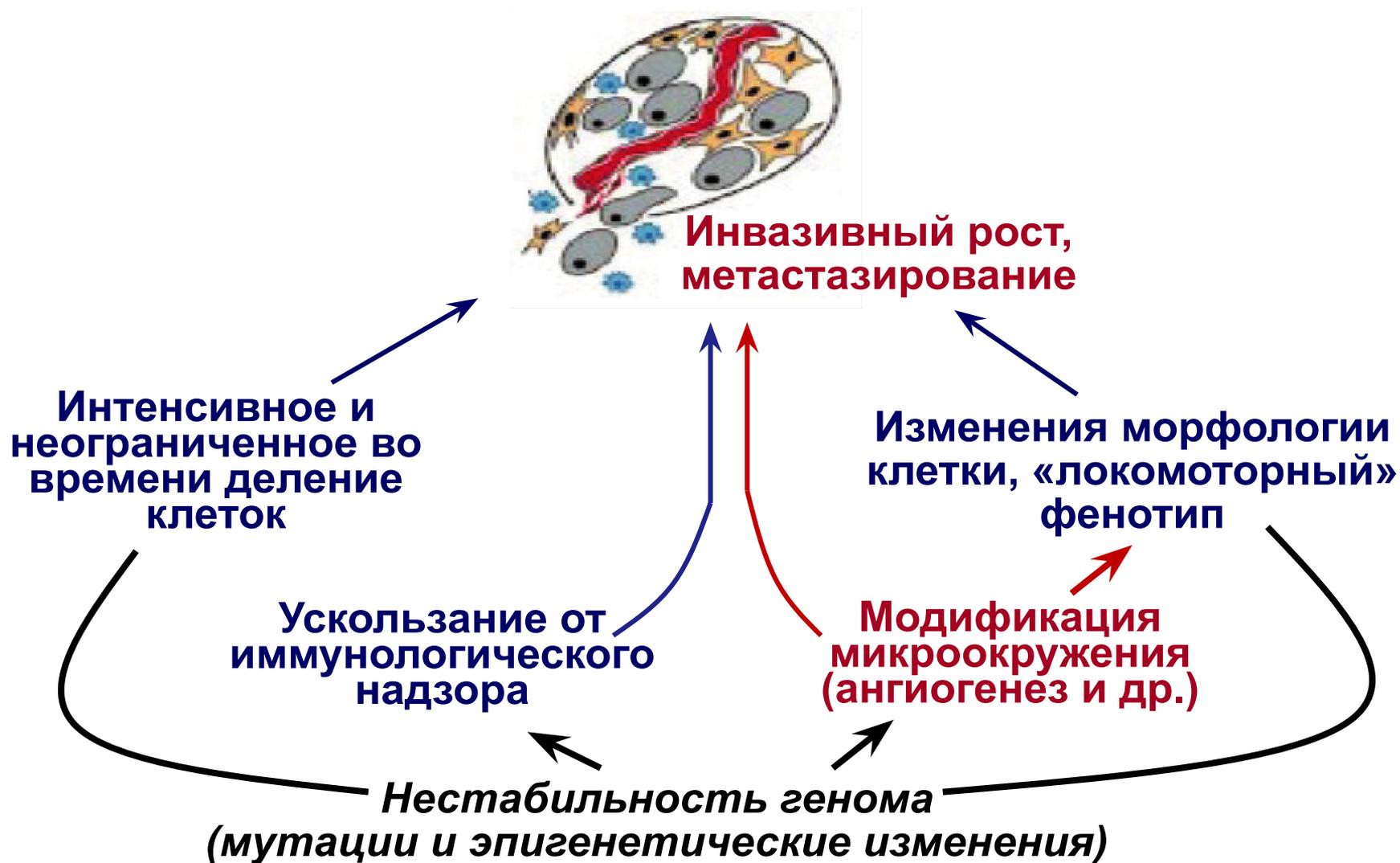


Откуда приходят сигналы, индуцирующие ЭМП?

- Мутации рецепторов и других компонентов сигнальных путей в опухолевой клетке, активация аутокринной регуляции (TGF β)
- **Факторы, продуцируемые клеточным микроокружением**



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



Курс «Биология опухолевой клетки»

(2019 г.)

Н.Л. Лазаревич

Лекция 7

**Способность неопластических клеток
модифицировать микроокружение**