

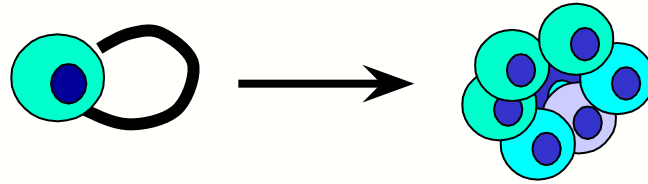
Курс «Биология опухолевой клетки»

(2019 г.)

Н.Л. Лазаревич

Лекция 3

Иммортализация (неограниченный репликативный потенциал) опухолевых клеток



*Неограниченное деление
стволовых клеток опухолей*

**Стимуляция деления,
потеря чувствительности к
рост-ингибирующим сигналам**

**Иммортализация
(приобретение бессмертия)**

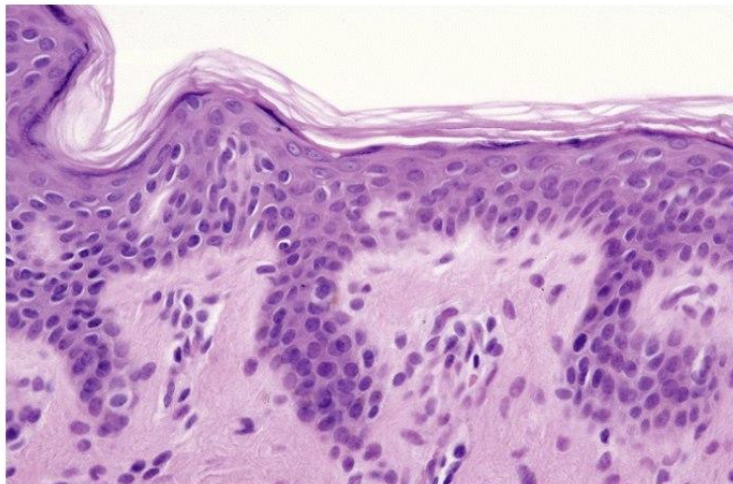
Старение организма (Ageing, senescence) –
исчерпание пула стволовых клеток различных тканей

“Старение” клеток (“Cell senescence”) –
необратимая остановка клеточного цикла

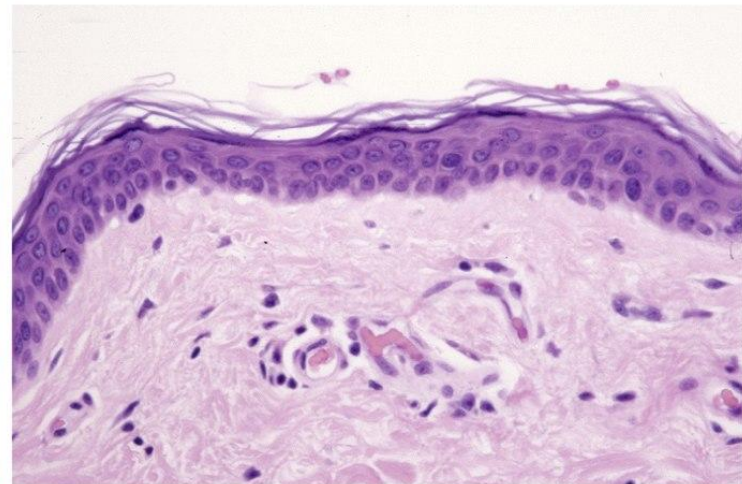
а) «репликативное» старение клеток

б) стресс-индуцированное старение клеток

Кожа человека в разном возрасте



18 лет



76 лет

Старение организма (Ageing, senescence) –
исчерпание пула стволовых клеток различных тканей

“Старение” клеток (“Cell senescence”) –
необратимая остановка клеточного цикла

а) «репликативное» старение клеток

б) стресс-индуцированное старение клеток

Иммортализация – отмена репликативного
клеточного старения

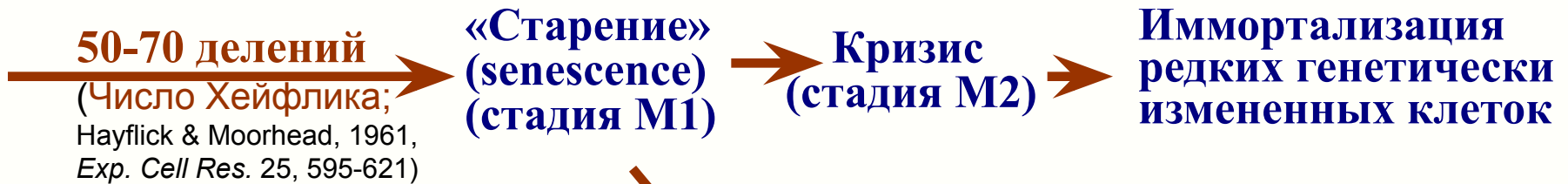
Нормальные клетки могут быть иммортальны
– эмбриональные стволовые клетки

Феномен:

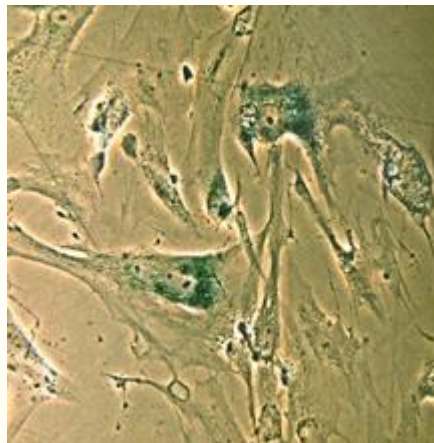
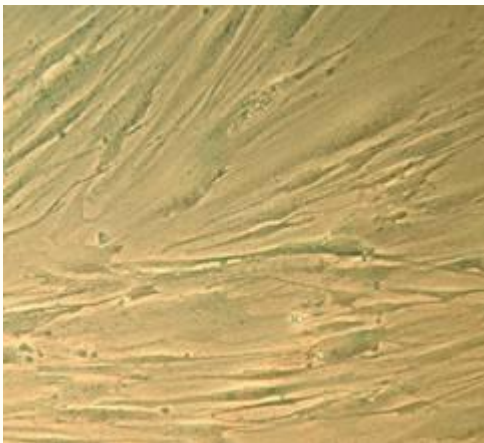
“Репликативное старение” и “иммортализация” клеток *in vitro*

Человек:

Фибробласты кожи:



Норма



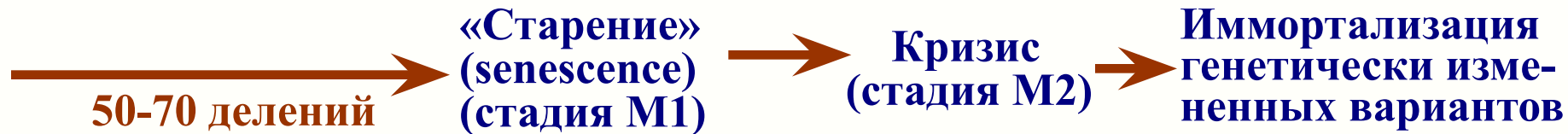
Окраска на β -галактозидазу

Феномен:

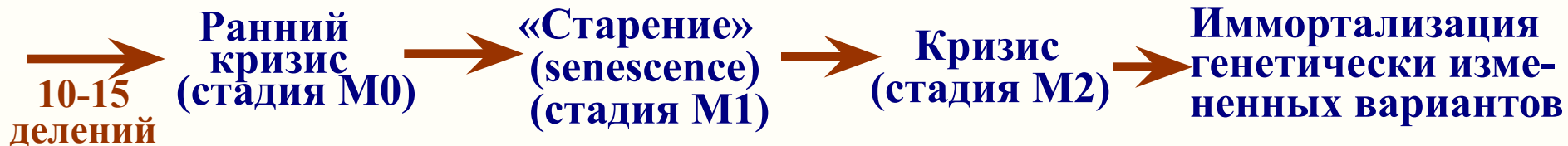
“Репликативное старение” и “иммортализация” клеток *in vitro*

Человек:

Фибробласты кожи:



эпителиоциты:



Мышь:

фибробласты:



Старение организма (Ageing, senescence) –
исчерпание пула стволовых клеток различных тканей

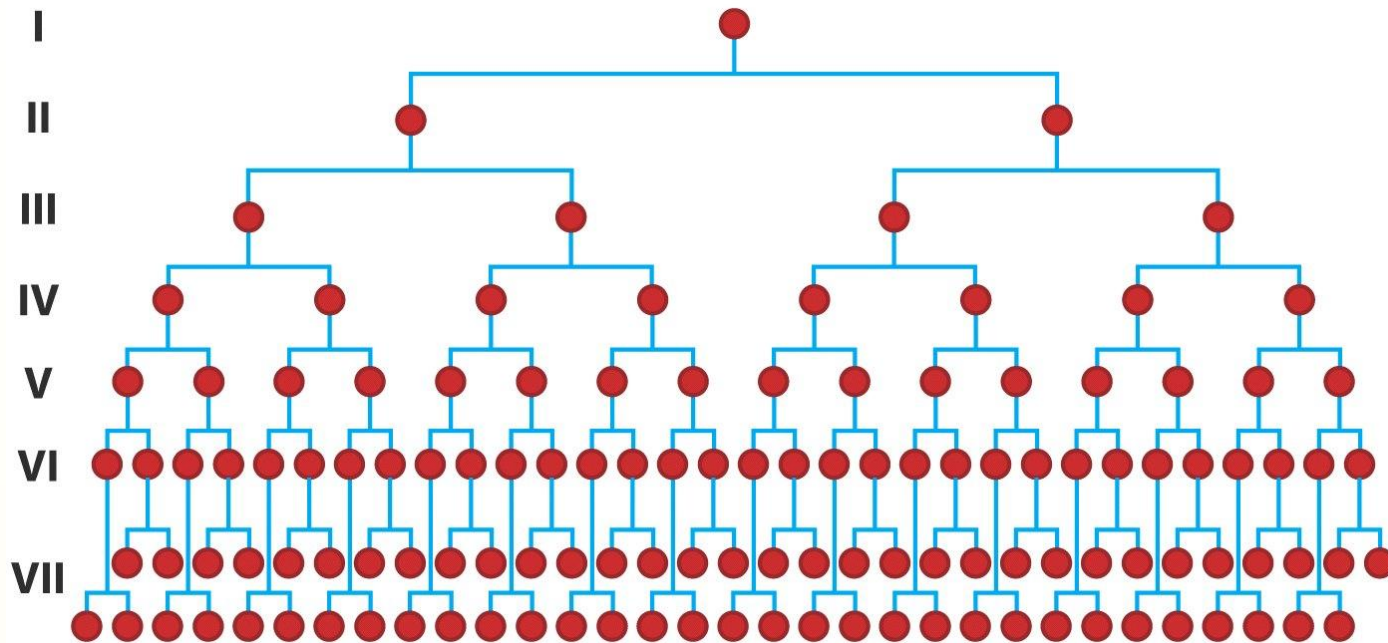
“Старение” клеток (“Cell senescence”) –
необратимая остановка клеточного цикла

а) «репликативное» старение клеток

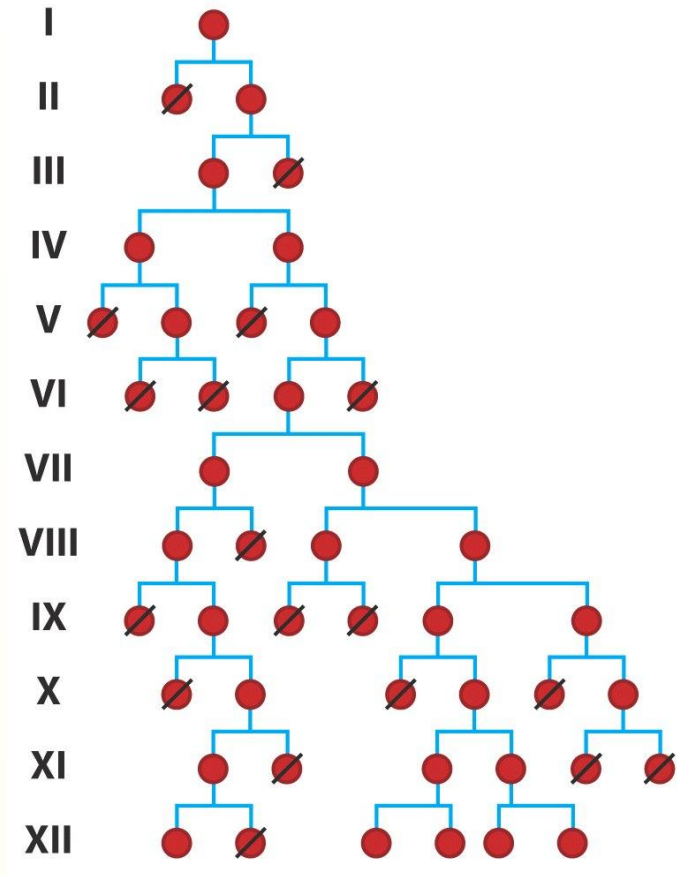
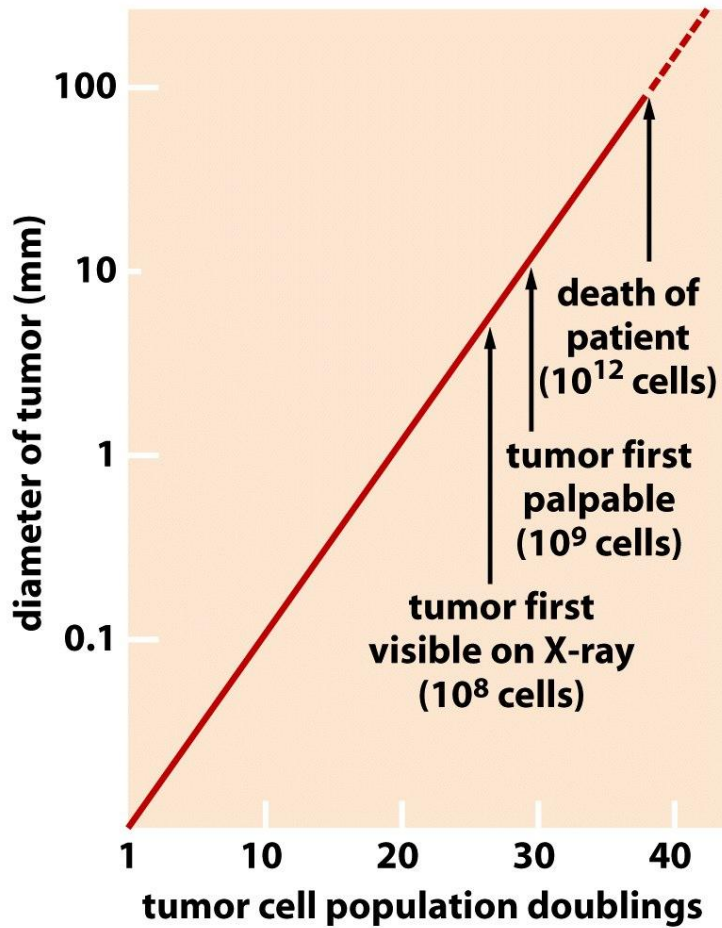
б) стресс-индуцированное старение клеток

Иммортализация – отмена репликативного
клеточного старения

Опухолевые клетки иммортальны –
перевиваемые линии клеток (асцит Эрлиха,
HeLa и др.) – делятся неограниченно долго



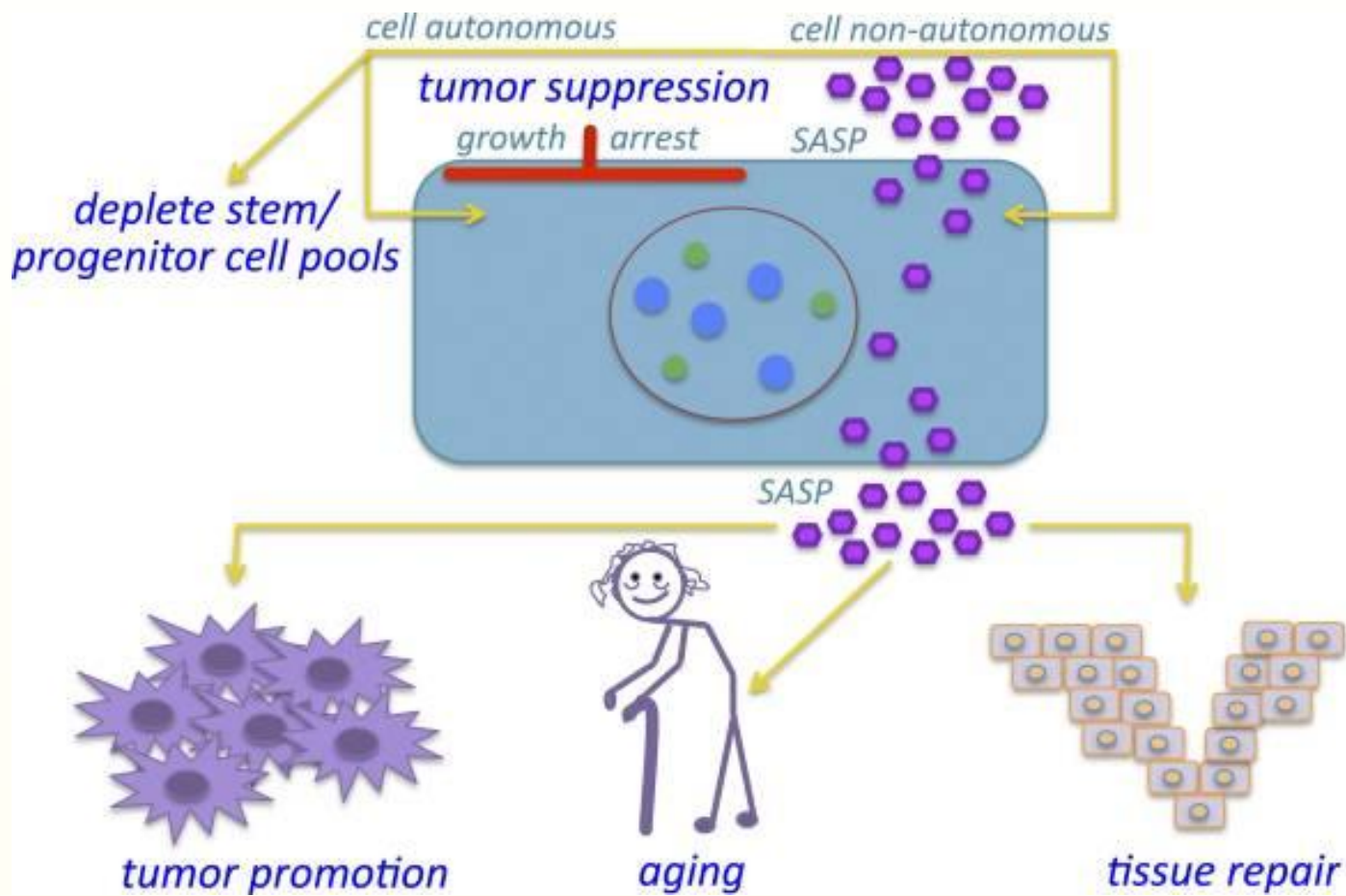
60 делений → 10^{18} клеток



Наиболее общие признаки репликативного старения клеток

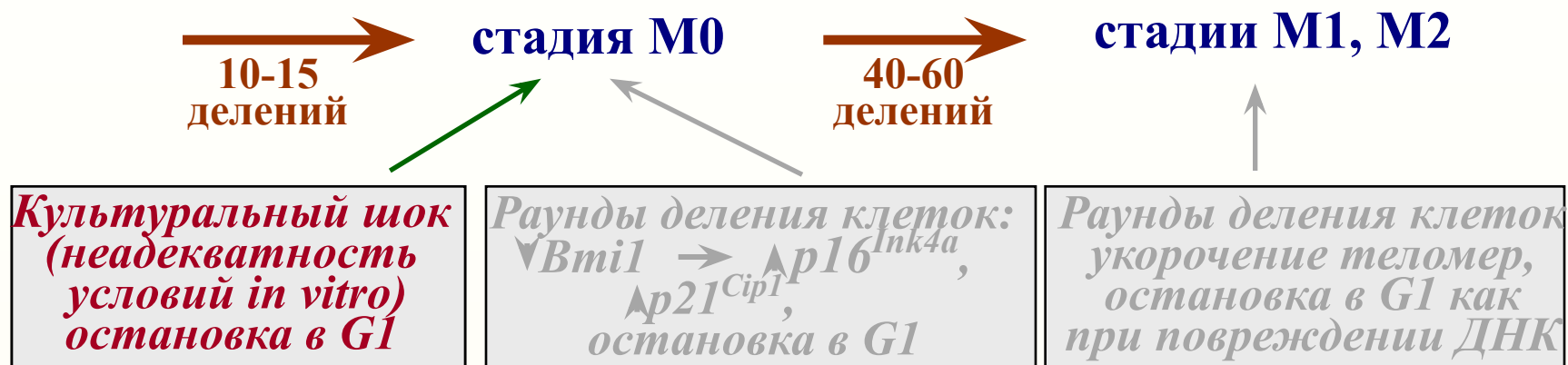
- **Необратимый** арест пролиферации (не может быть отменен физиологическими стимулами)
- Увеличение клеток в размере
- Экспрессия β -галактозидазы
- Экспрессия *Ink4A* (ведет к активации *pRB*)
- Секреция факторов роста, протеаз, цитокинов, хемокинов и других белков с аутокринной и паракринной активностью - *senescence-associated secretory phenotype (SASP)*, например:
 - CXCL1* – стимулируют пролиферацию «предопухолевых» эпителиальных клеток
 - IL-6, 8* – стимулируют инвазию эпителиальными опухолевыми клетками базальной мембраны
 - VEGF* – стимулирует миграцию и инвазию эндотелиальных клеток
 - Металлопротеиназы (*MMPs*) – стимулируют инвазию опухолевых клеток

Четыре функции клеточного старения



Человек

(эпителиоциты и др. клетки
кроме фибробластов кожи):



Мышь
(теломераза активна):

10-20 делений \rightarrow «Старение», кризис



Неадекватные условия культивирования (культуральный шок) ускоряют старение клеток

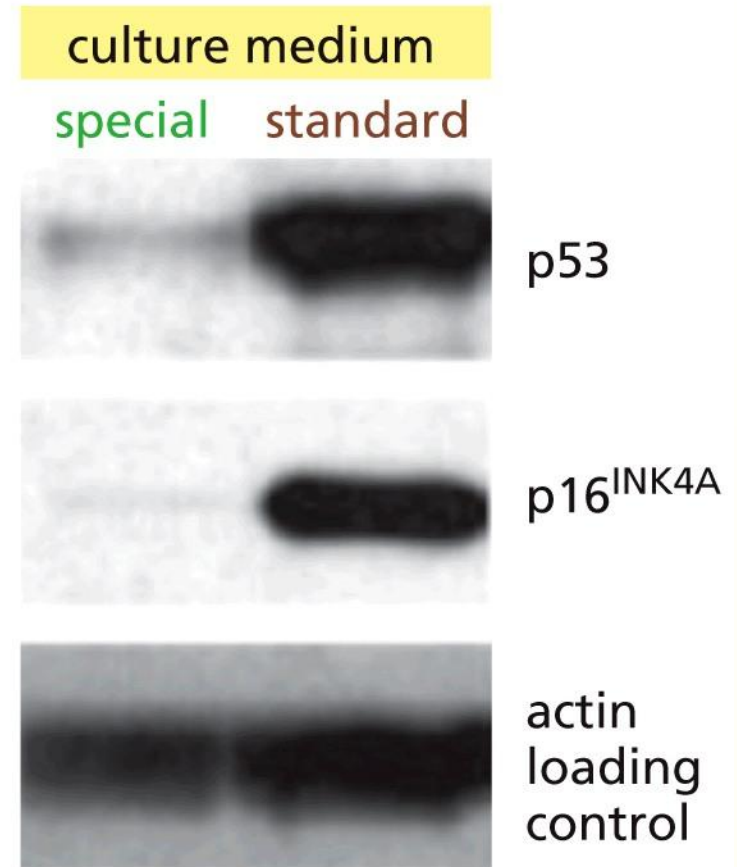
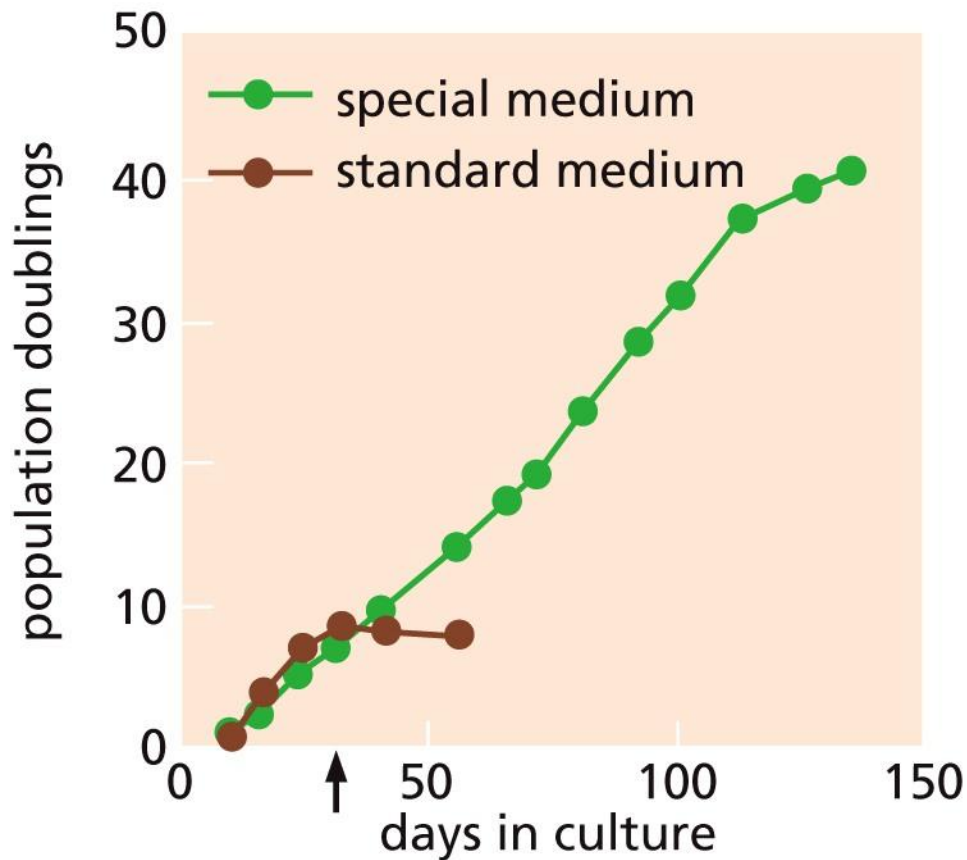
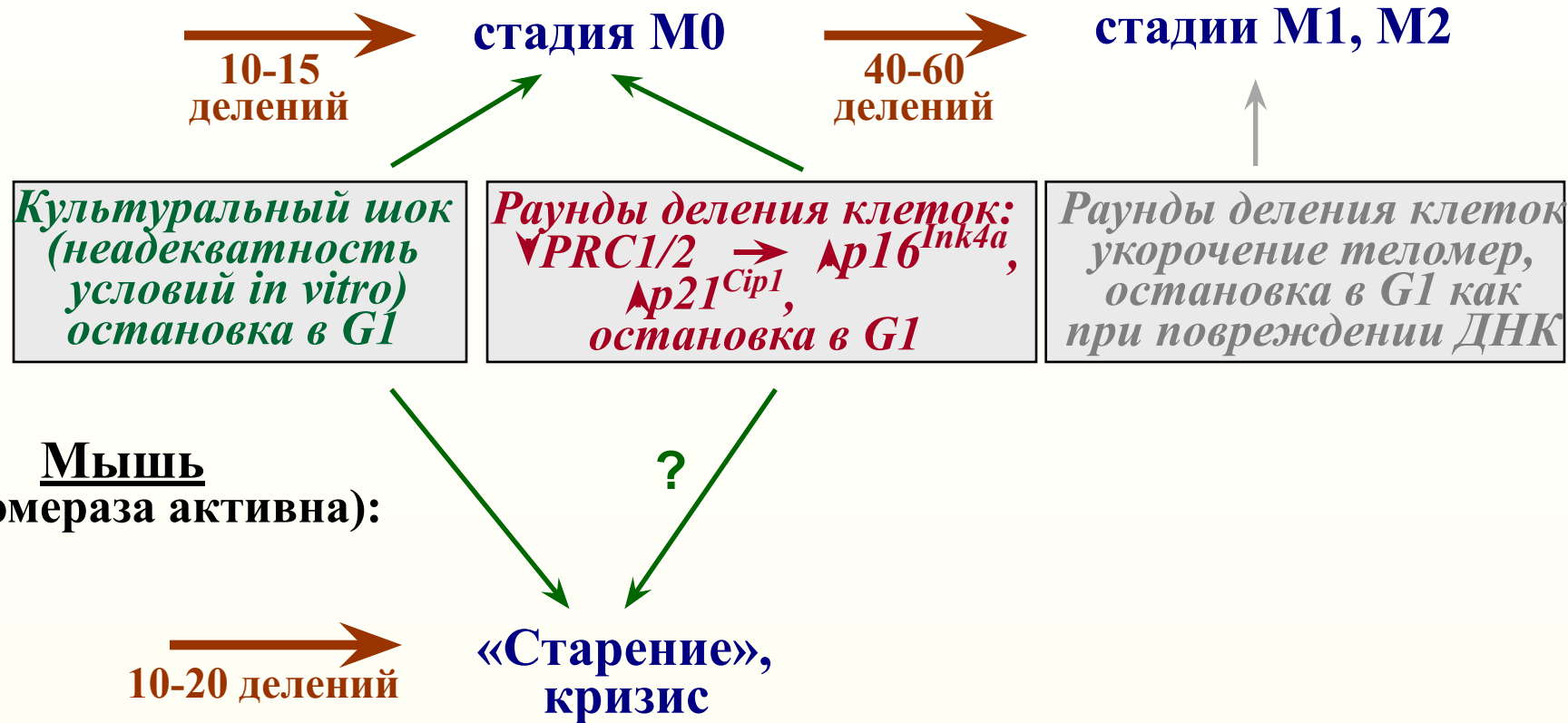


Figure 10.7c The Biology of Cancer (© Garland Science 2014)

Человек

(эпителиоциты и др. клетки
кроме фибробластов кожи):



**Прогрессивное увеличение содержания ингибиторов
циклинзависимых киназ $p16^{INK4A}$ и $p21^{Cip1}$ в ходе
культивирования клеток**



Неадекватные условия культивирования кератиноцитов человека ускоряют старение, повышая уровень мРНК p16^{INK4A}



Роль p16^{Ink4a} в «старении» гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) *in vivo*

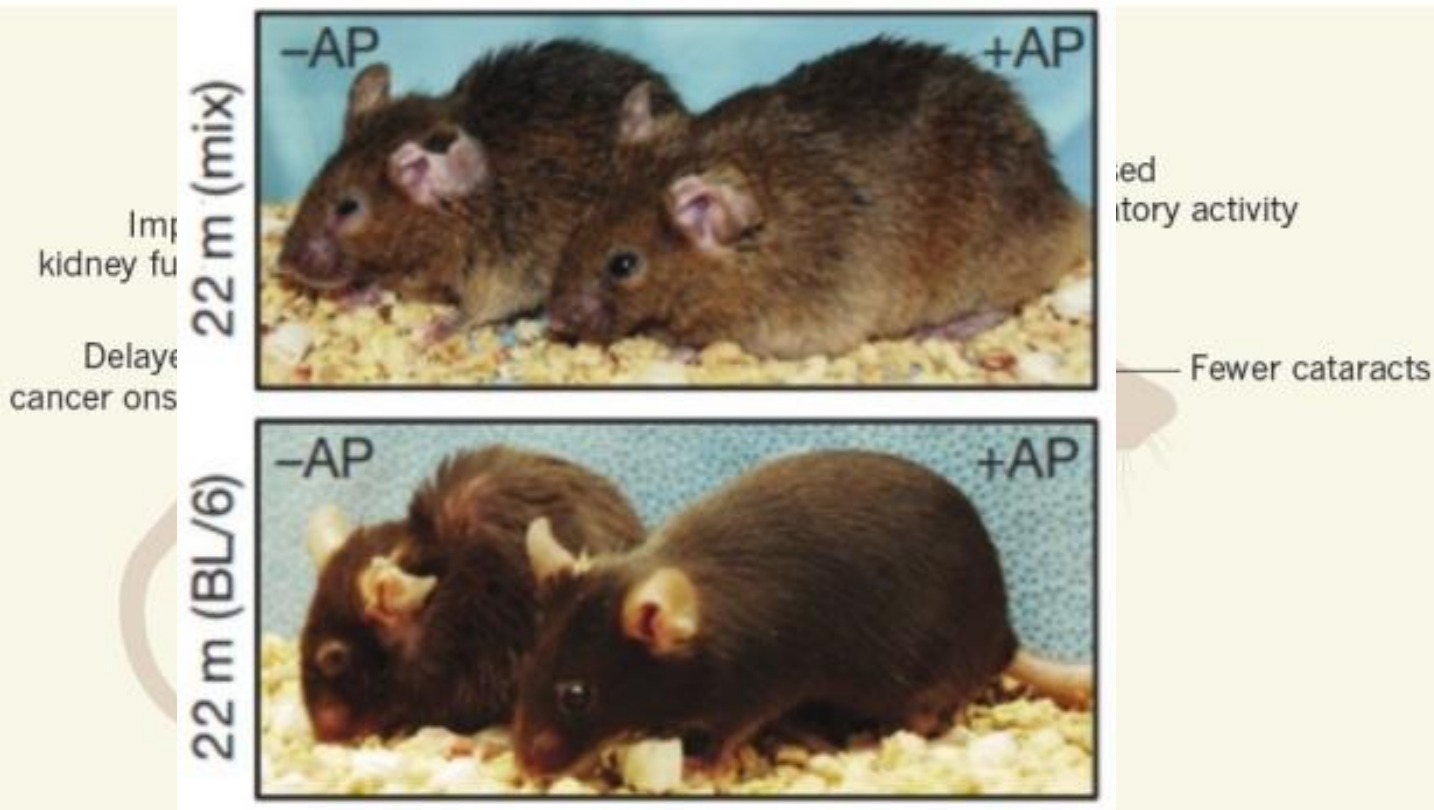
- 1. В популяции отсортированных ГСК уровень мРНК p16^{Ink4a} повышается с увеличением возраста;**
- 2. При нокауте гена p16^{Ink4a} возрастное уменьшение пула ГСК в костном мозге замедляется, а репопуляционная способность таких ГСК и их жизнеспособность при стрессе увеличиваются**

Yanzen et al., Nature, 2006, 28, v.443, p.421-426

Репликативное старение стволовых и недифференцированных клеток *in vivo*

Ключевой механизм – увеличение содержания p16^{Ink4a} вследствие инактивации Polycomb Repressive Complex PRC1/2 (Bmi1 и др.), Twist1/2 и, вероятно, других событий

p16^{Ink4a}-positive cells shorten healthy lifespan

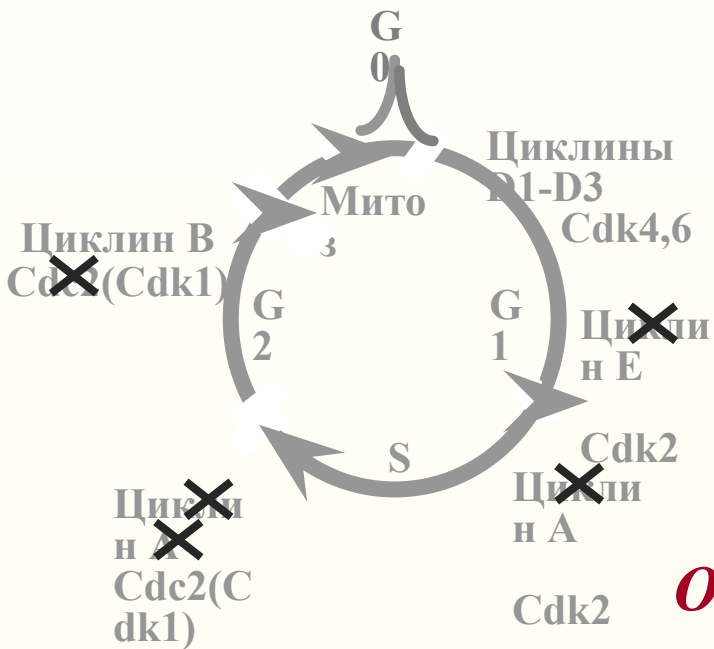
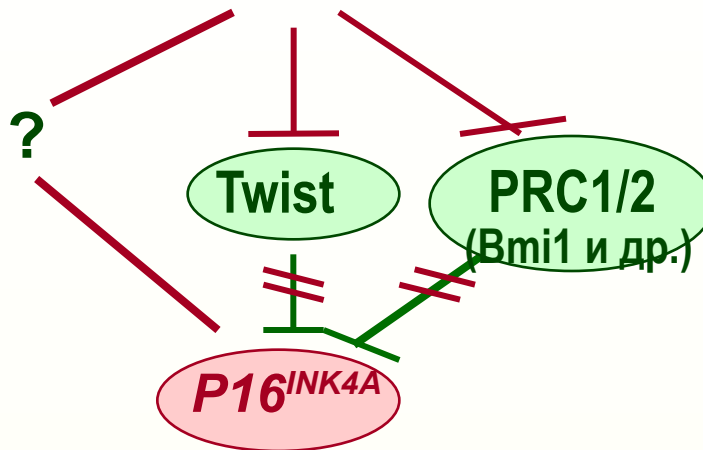


INK-ATTAC mice produce a caspase enzyme specifically in cells that express the p16Ink4a

gene. Injection of AP20187 (AP) activate caspase that triggers cell death, eliminating senescent cells in which it is expressed. Senescence-associated macrophages (SAMS), описанные у старых мышей, имеют те же маркеры, что и сенесцентные клетки - экспрессируют бета-галактозидазу и

Elimination of p16Ink4a-expressing cells increased lifespan (17-35%) and ameliorated a range of age-dependent, disease-related abnormalities. Senescent-cell removal also delayed the onset of cancer, without affecting the range of observed tumor types. ген p16(Ink4a); возможно скопления SAMS могли в прошлом ошибочно приниматься за скопления сенесцентных клеток.

Раунды деления клеток



Дефосфорилирование pRb

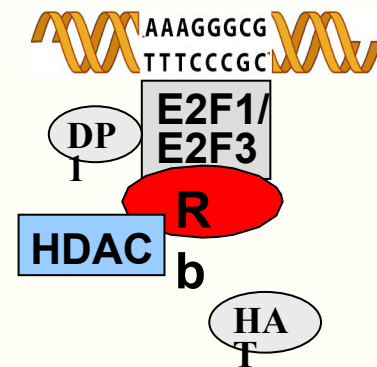
E2F

Hes1

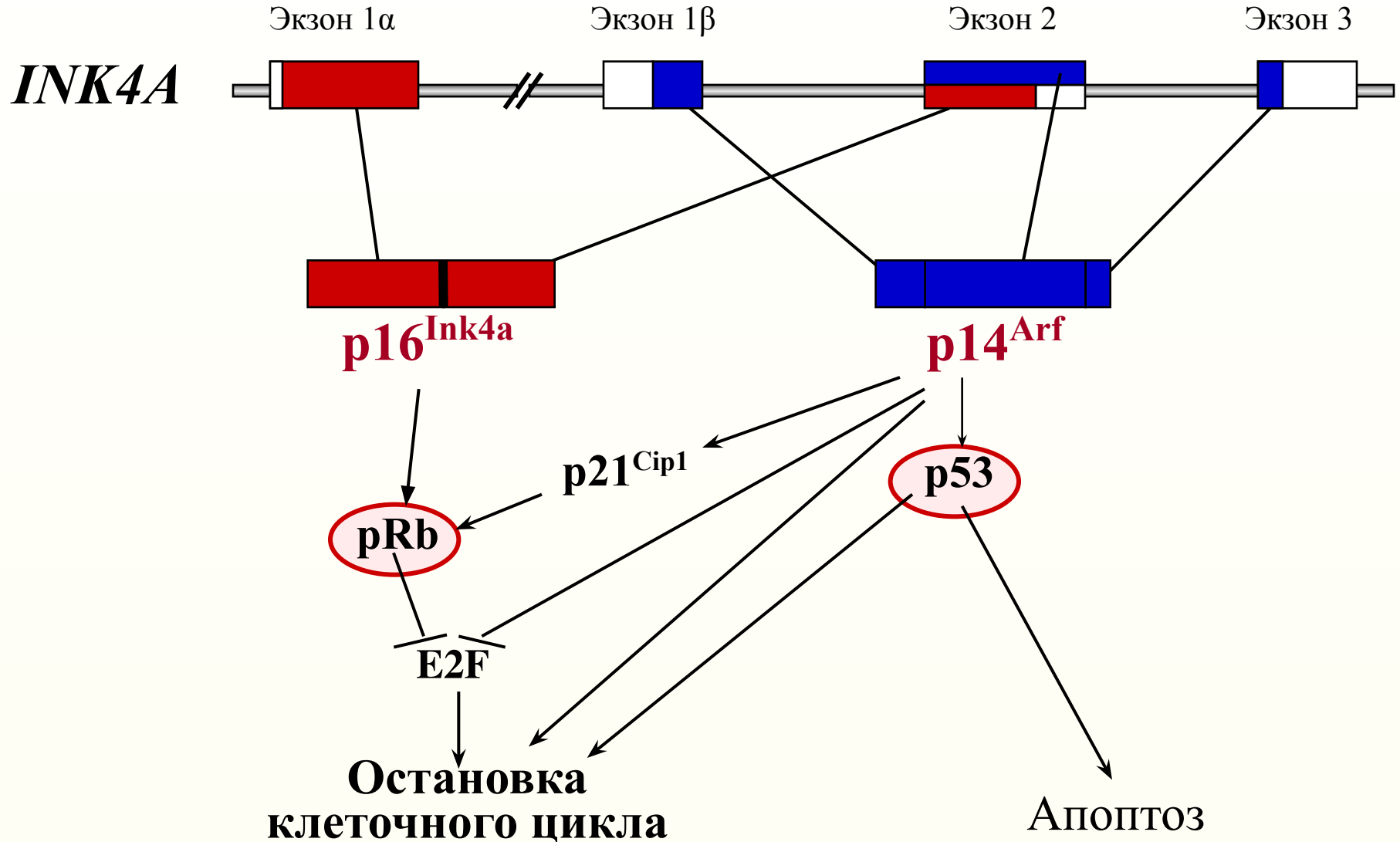
Остановка в G1

Дифференцировка

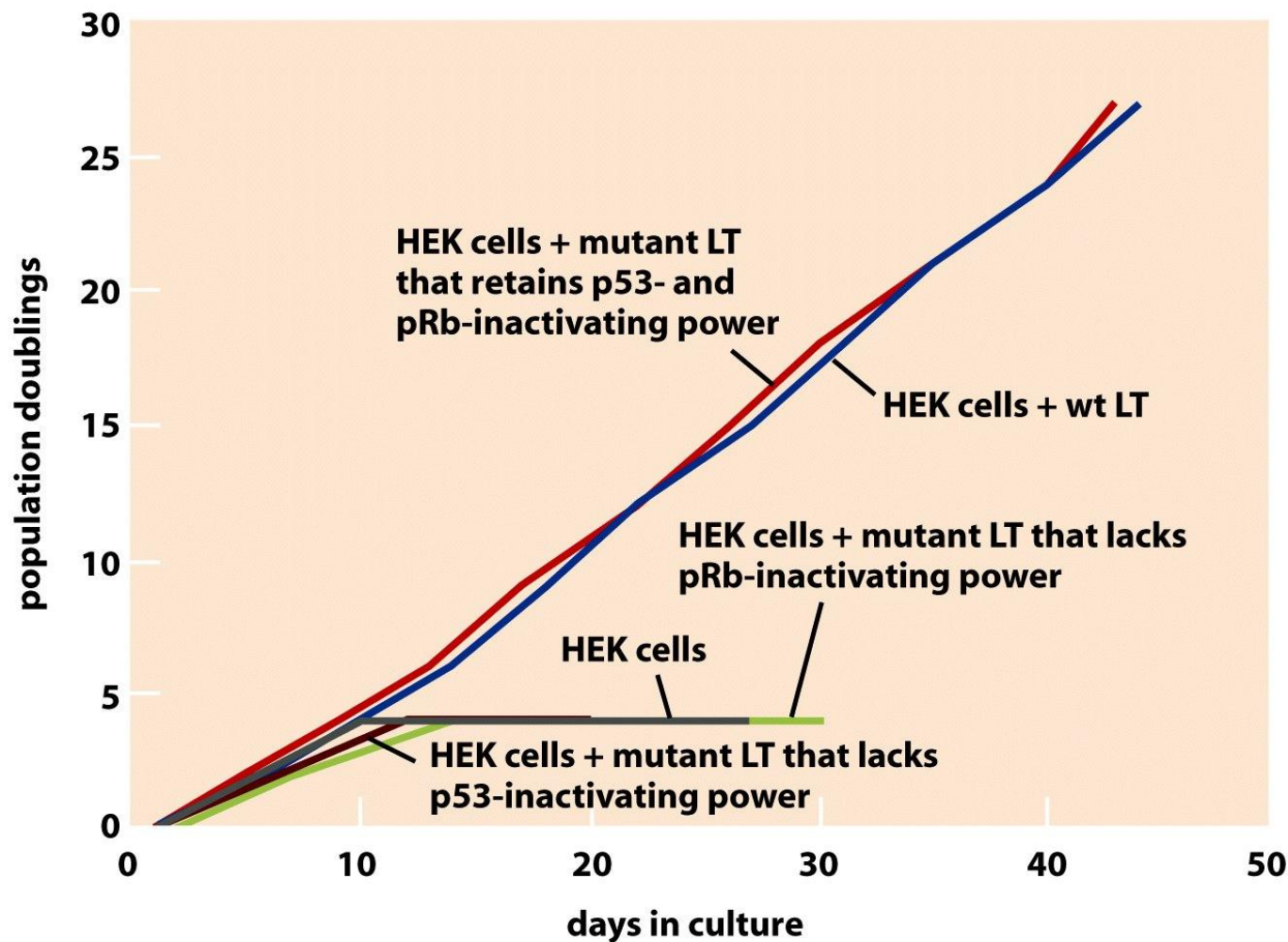
Репрессия



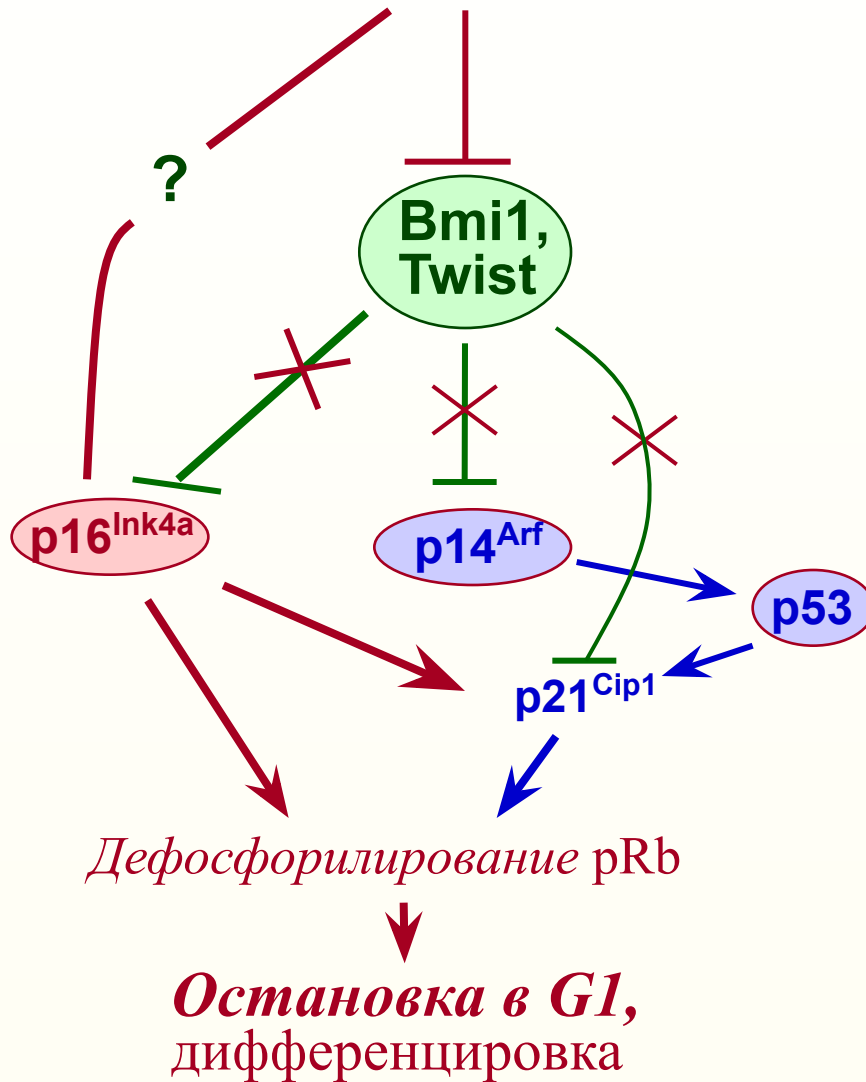
Локус *INK4A* кодирует два негомологичных белка, инактивирующих сигнальные пути, регулируемые *pRb* и *p53*



Эксперименты с введением гена большого T-антигена вируса SV40 в эмбриональные клетки почки человека (HEK) указывают на участие Rb и p53 в старении клеток



Раунды деления клеток



Изменения в опухолевых клетках:

+Twist

+Bmi1

E7 + E6

Дисфункция **p16^{Ink4a}**, **p14^{Arf}**,
p53, **pRb**, **Мyc**, **Cdk4** и др.

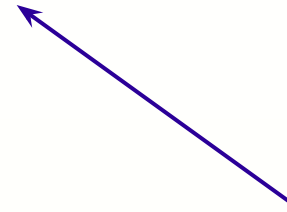
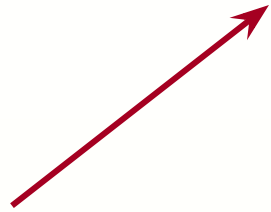
**Отмена остановки
клеточного цикла**

Другие функции *Bmi1*

- **Компонент *PRC1* комплекса, участвующего в remodelировании структуры хроматина и модификации гистонов**
- **Активирован во многих опухолях и стволовых опухолевых клетках**
- **Ингибирует *TGFβ*-сигнализацию**
- **Индуктирует пролиферацию, эпителиально-мезенхимальный переход, инвазию *in vitro*, размер опухолей *in vivo*, количество метастазов, устойчивость к химиотерапии**
- **Активация теломеразы (*TERT*)**

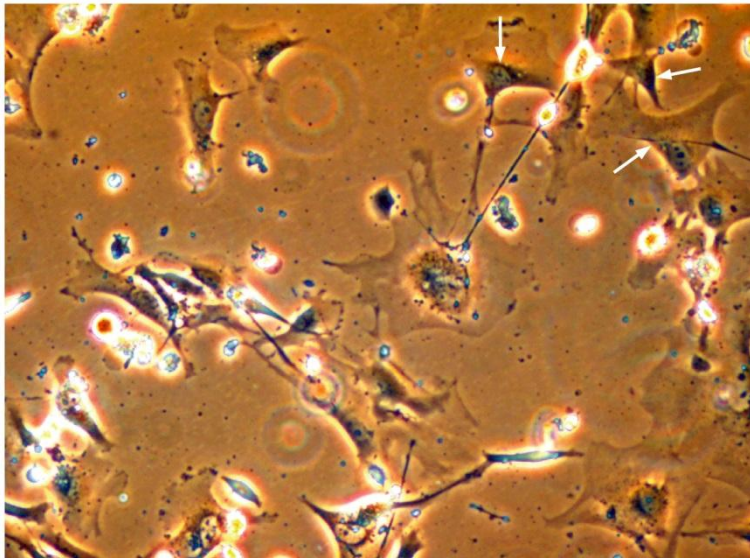
Ингибитор *Bmi1* блокирует рост колоректальной карциномы человека, привитой иммунодефицитным мышам

ИММОРТАЛИЗАЦИЯ



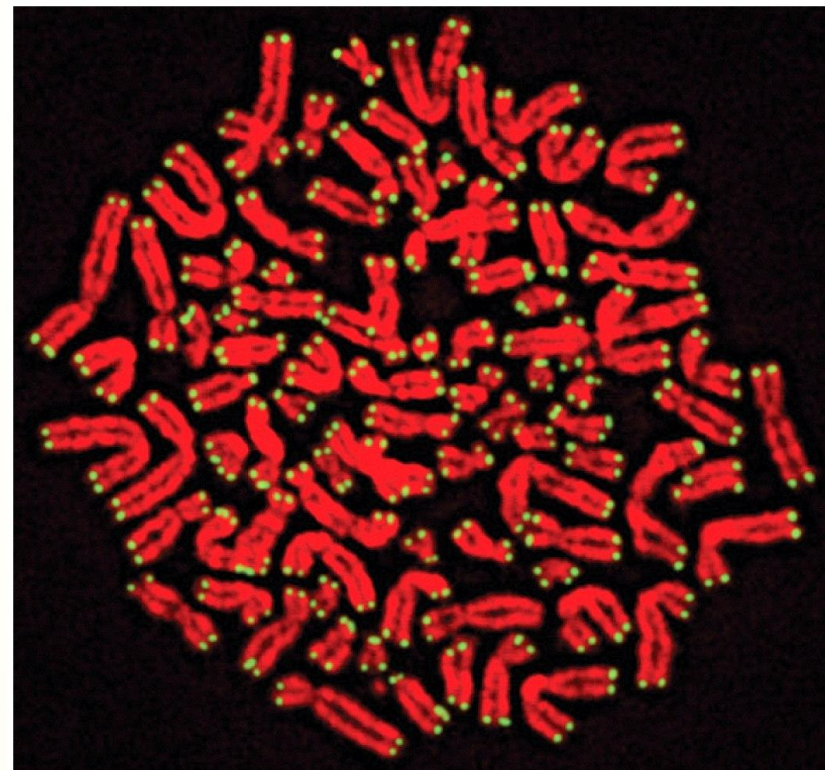
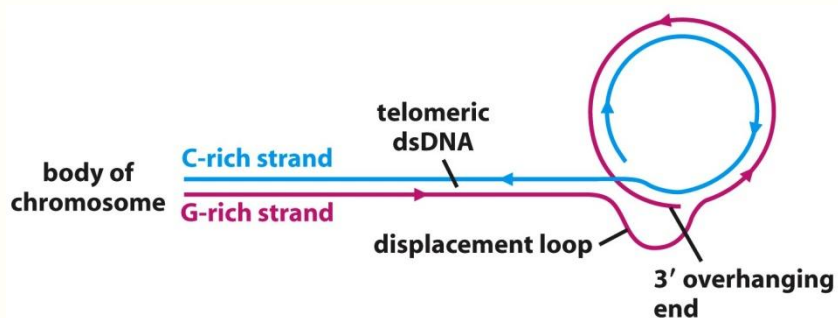
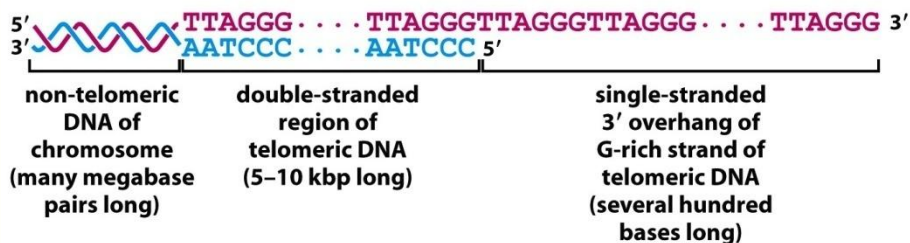
**Отмена рост-ингибирующих
сигналов и/или
нечувствительность
к их действию**

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



Нормальные клетки,
избежавшие репликативного
старения, входят в кризис

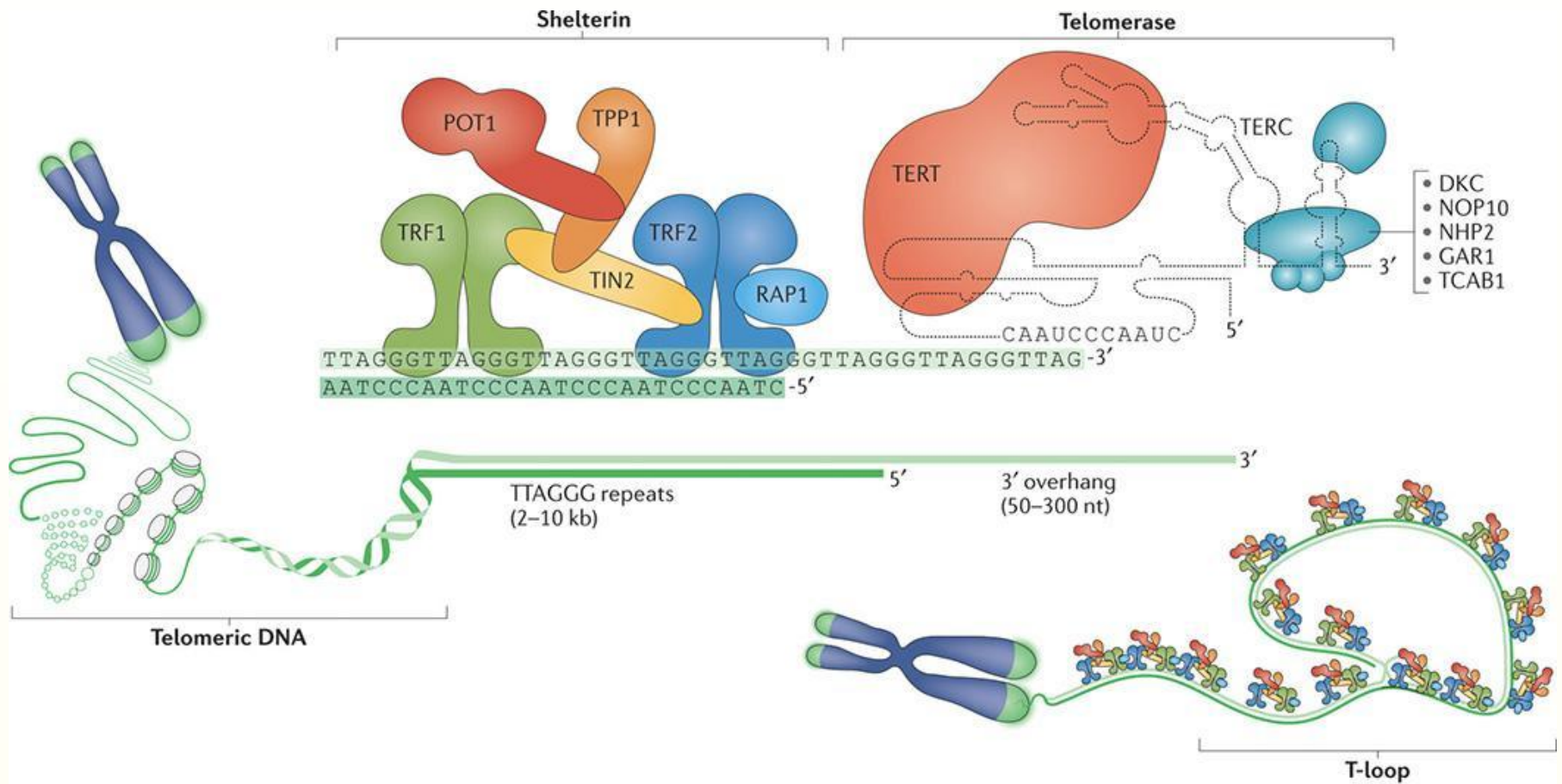
Теломеры



- multiprotein complex shelterin
- telomeric repeat-containing long noncoding RNAs (TERRA) (100-9000 н.)

FISH на метафазных хромосомах

Строение теломер



Проблема недорепликации концов ДНК

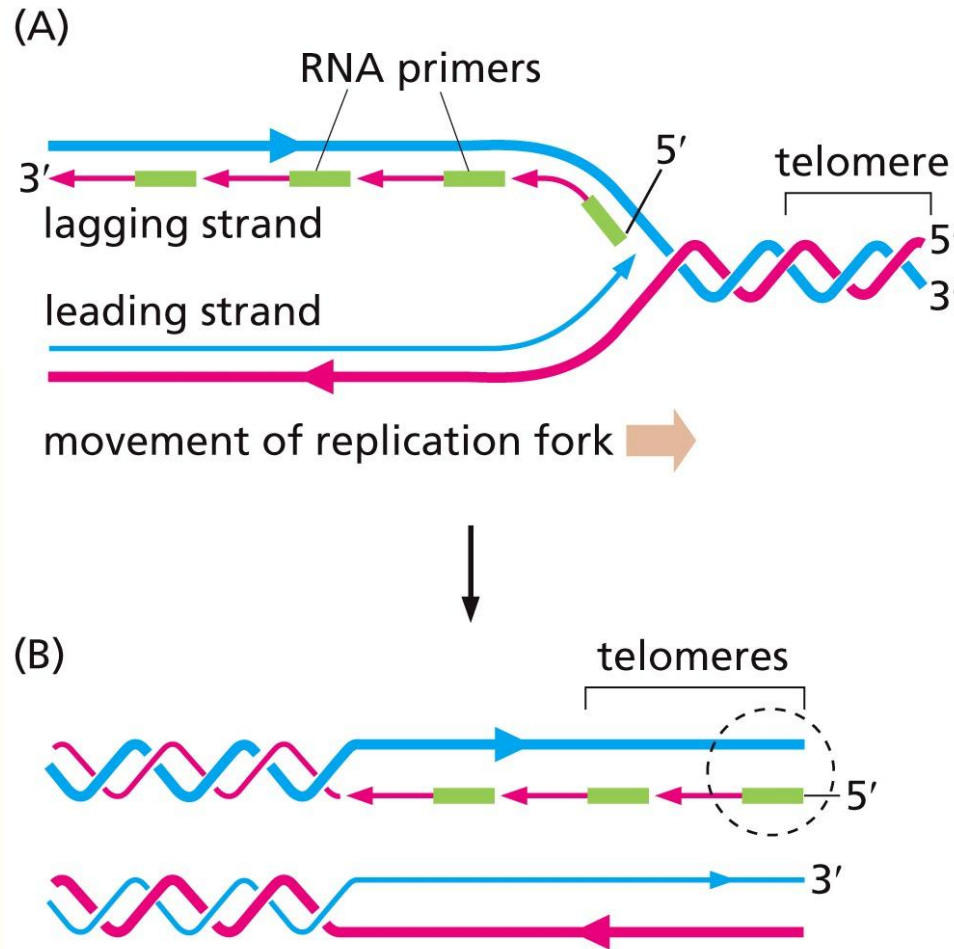


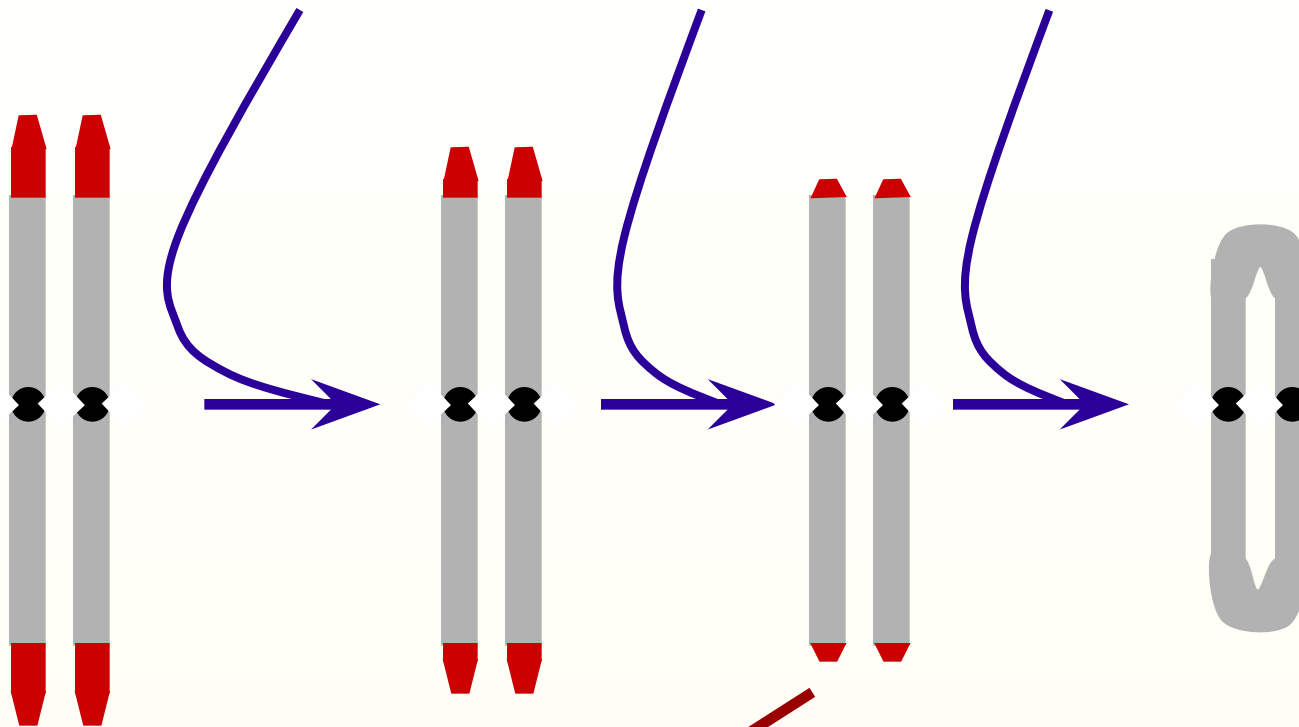
Figure 10.20 The Biology of Cancer (© Garland Science 2014)

Теломеры теряют 50-100 пар нуклеотидов за один раунд репликации

Классическая модель репликативного старения

(предложена А.М.Оловниковым в 1971 г)

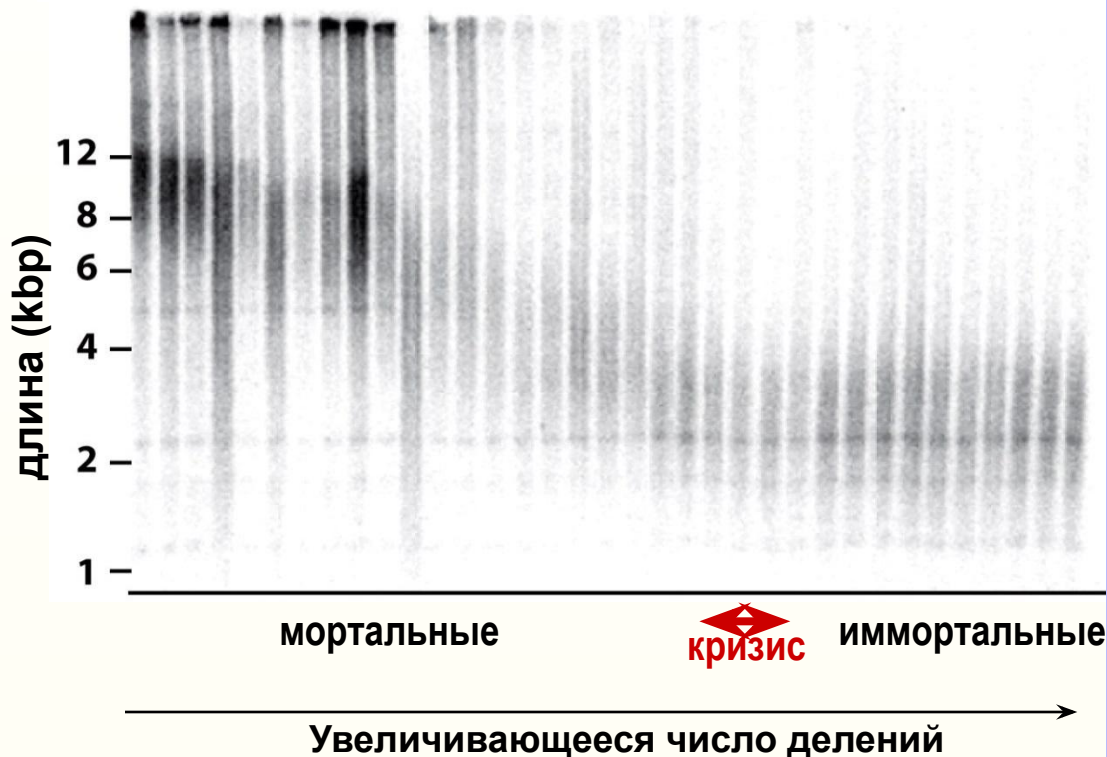
Неполная репликация концов линейной ДНК,
прогрессивное укорочение длины теломер



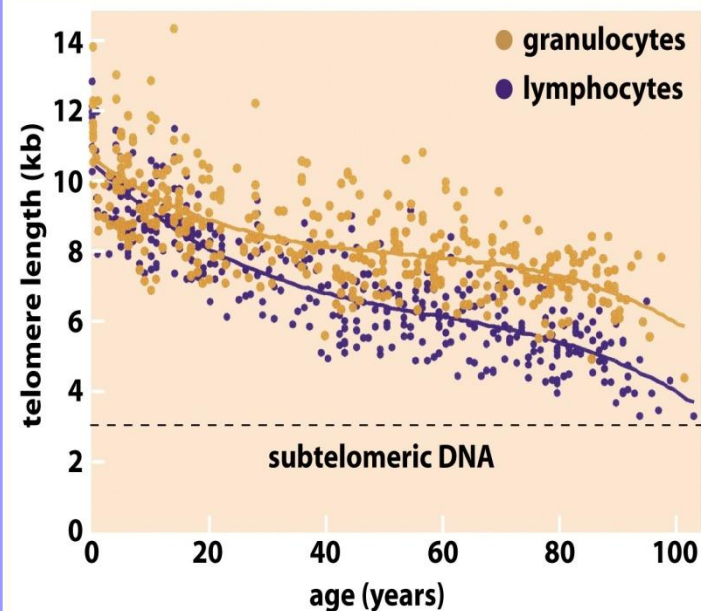
**«Репликативное старение»
(стадия М1),
остановка деления как
при повреждениях ДНК**

**«Генетическая катастрофа»
кризис (стадия М2),
слипание хромосом,
разрывы и перестройки**

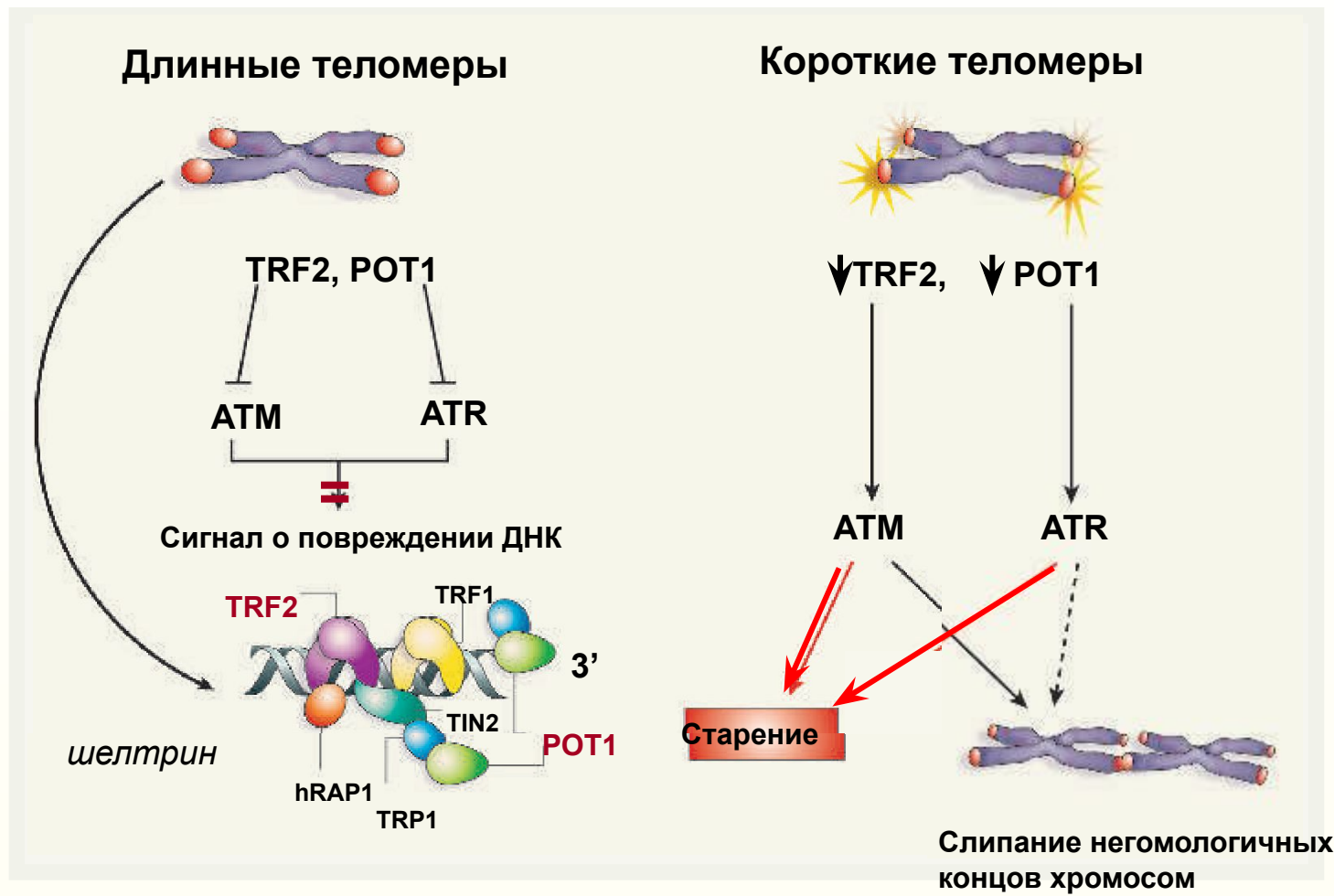
Укорочение длины теломерной ДНК при культивировании лимфоцитов человека (TRF-assay – обработка набором рестриктаз, не имеющих сайтов в повторах TTAGGG, шаг – 6 клеточных делений)



С увеличением возраста длина теломерной ДНК укорачивается



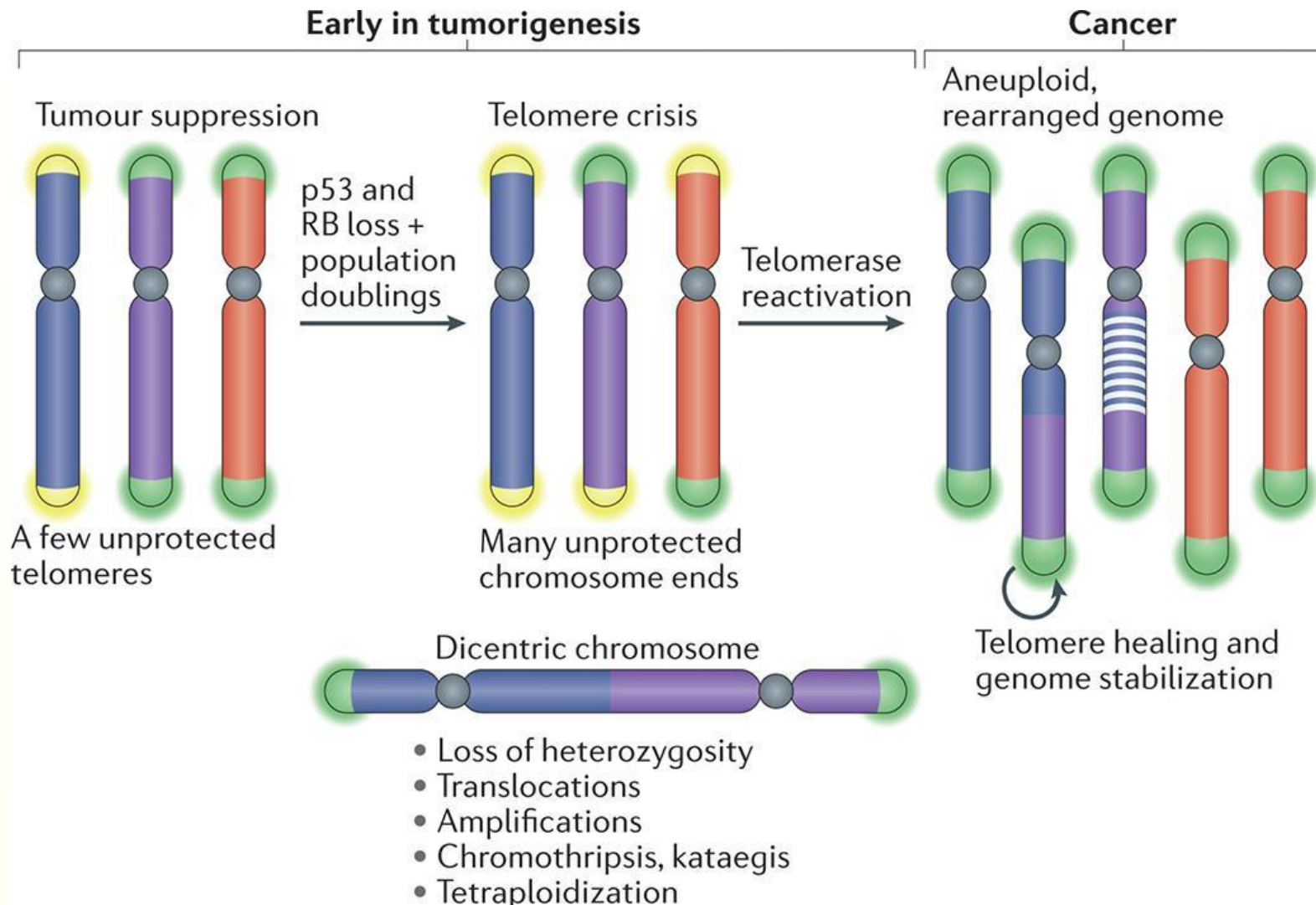
Как при укорочении/нарушении структуры 3'-конца теломерной ДНК индуцируется остановка клеточного цикла?



Azzalin & Lingner, *Nature*, 2007, 448, p.1001-1002

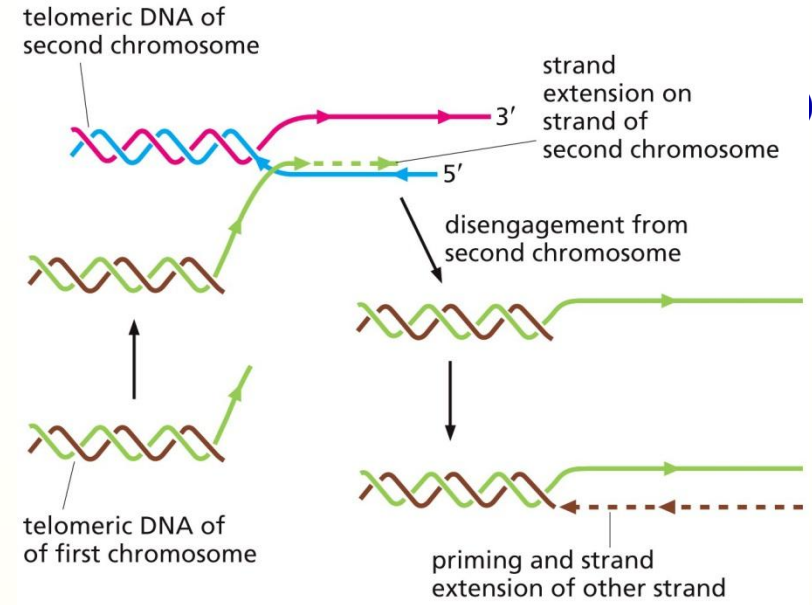
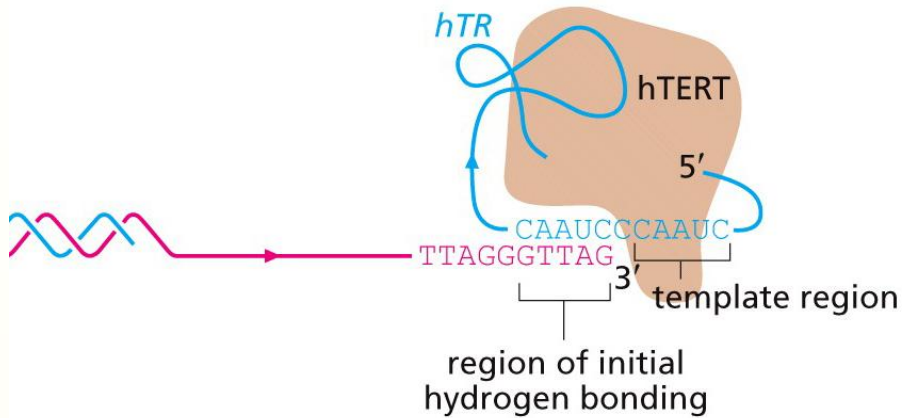
Lazzerini Denchi & de Lange, *Nature*, 2007, 488, 1068–1071

Теломерный кризис и хромосомные перестройки



Механизмы поддержания постоянной длины теломер

Активация теломеразы
(эмбрионы, половые клетки,
опухоли (85-90%))

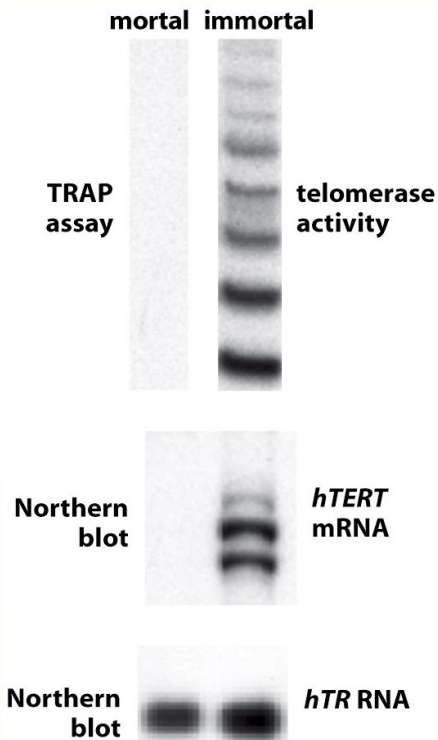


Достраивание теломерных
повторов (TTAGGG)

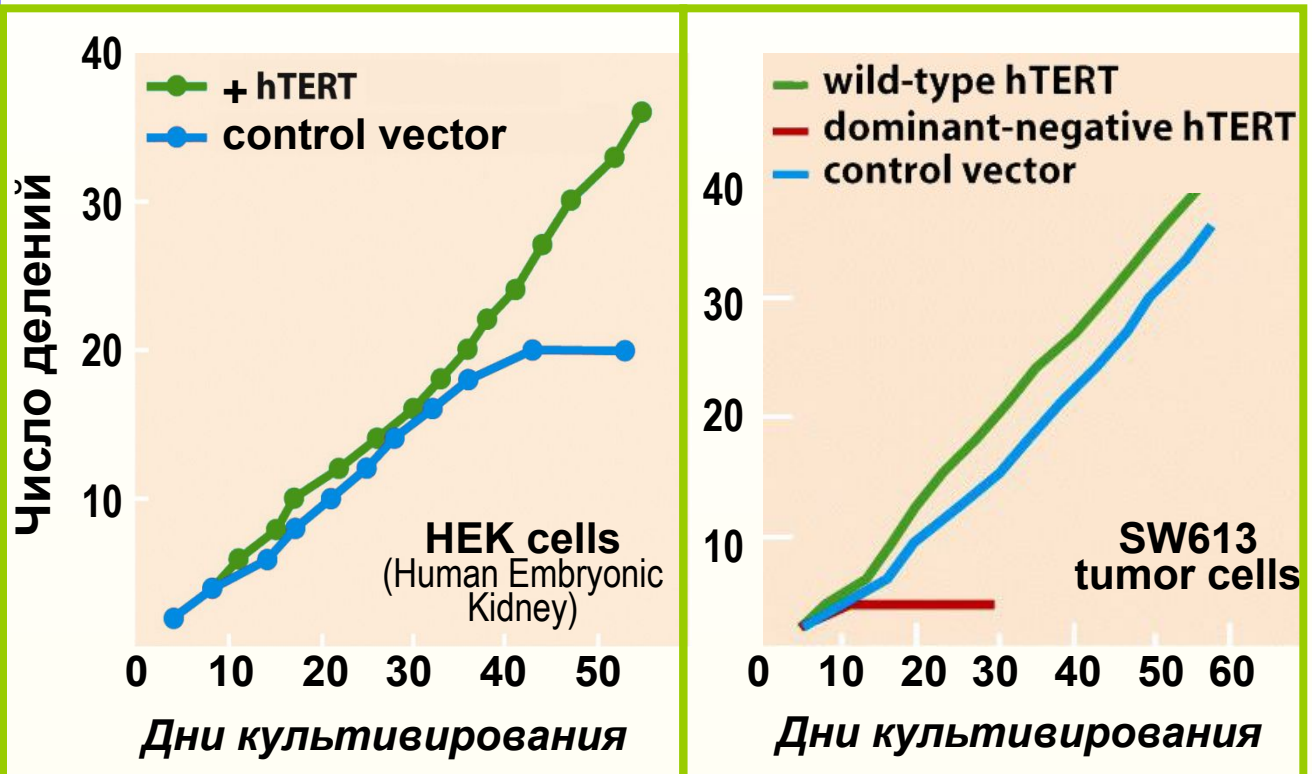
Иммортализация (?)

Доказательства роли hTERT в иммортализации клеток

Повышение уровня и активности hTERT в культурах В-клеток, прошедших кризис



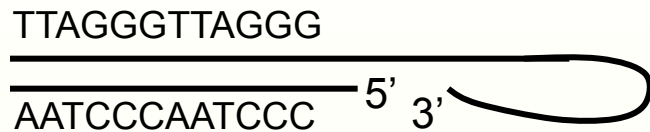
Введение гена hTERT повышает репликативный потенциал нормальных клеток (слева), а его доминантно-негативный мутант подавляет размножение опухолевых клеток с короткими теломерами (3-4 kbp) (справа)



Усовершенствованная теломерная модель клеточного старения

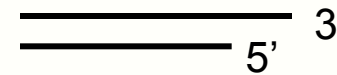
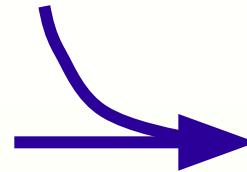
(R. Weinberg, 2003)

Деление клеток,
генотоксические стрессы



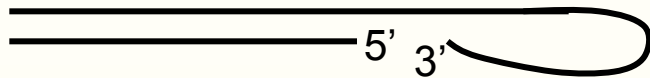
Теломерные
повторы ДНК

«Однонитчатая
петля»



Уменьшение длины и/или
нарушения структуры
однонитчатой петли

Теломераза

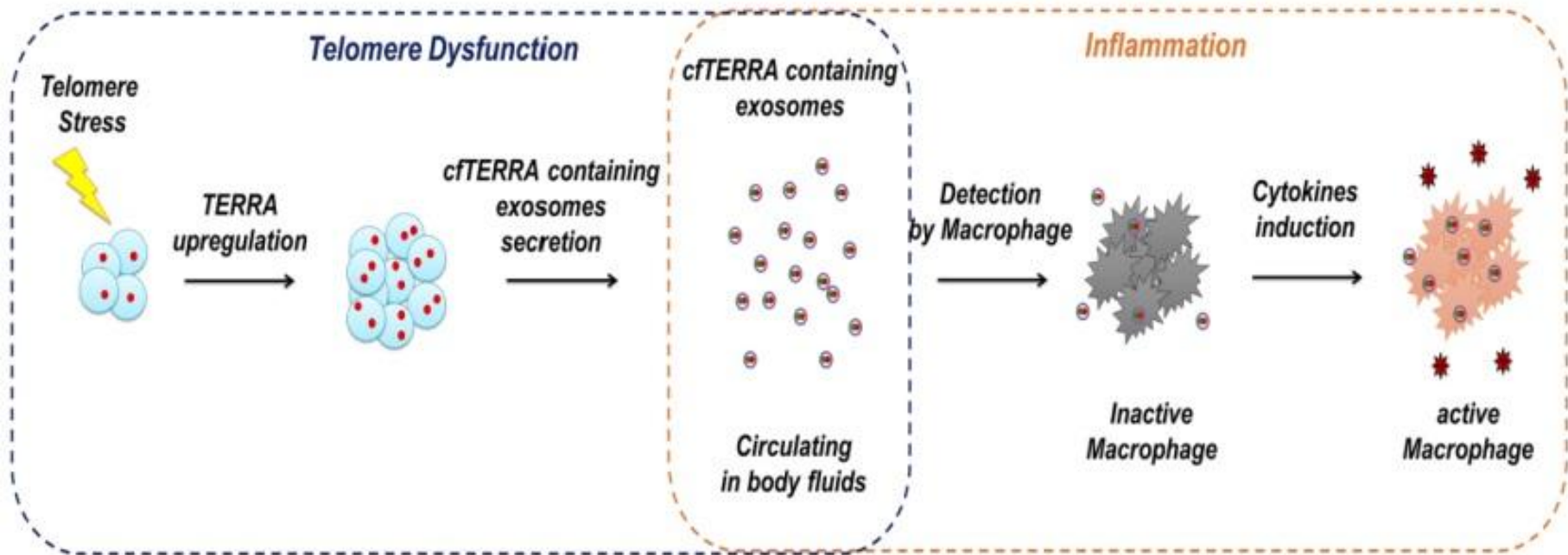


Продолжение пролиферации

Остановка деления
клеток (стадия M1)

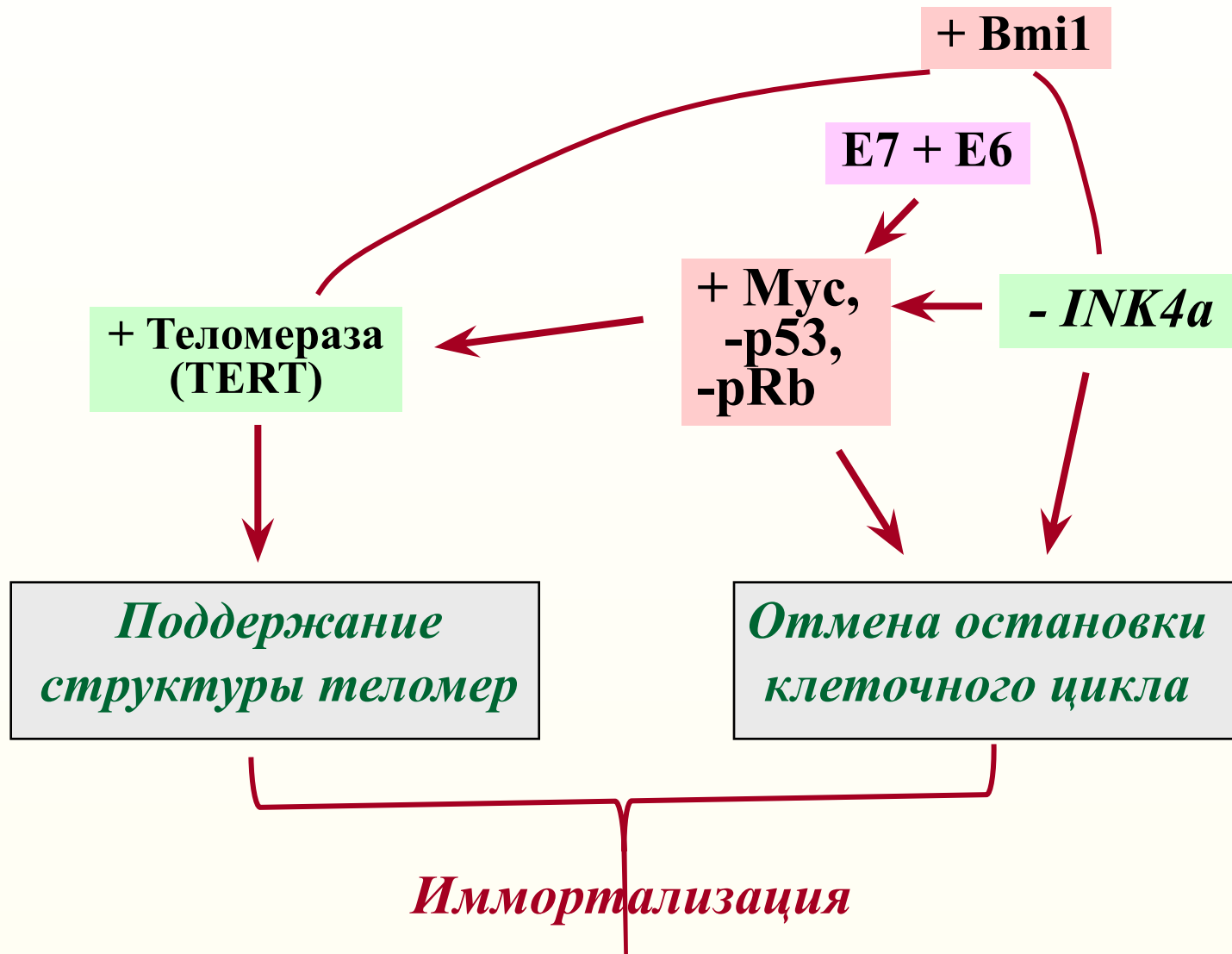


Возможная связь между дисфункцией теломер и воспалением



Длинные некодирующие РНК, содержащие теломерные повторы (TERRA) формируют G-квадруплексные структуры, взаимодействующие с белками, регулирующими поддержание теломер (TRF1, TRF2 и др.). При дисфункции теломер экспрессия TERRA увеличивается и они начинают секретироваться в составе экзосом, стимулируя макрофаги, которые секретируют провоспалительные цитокины

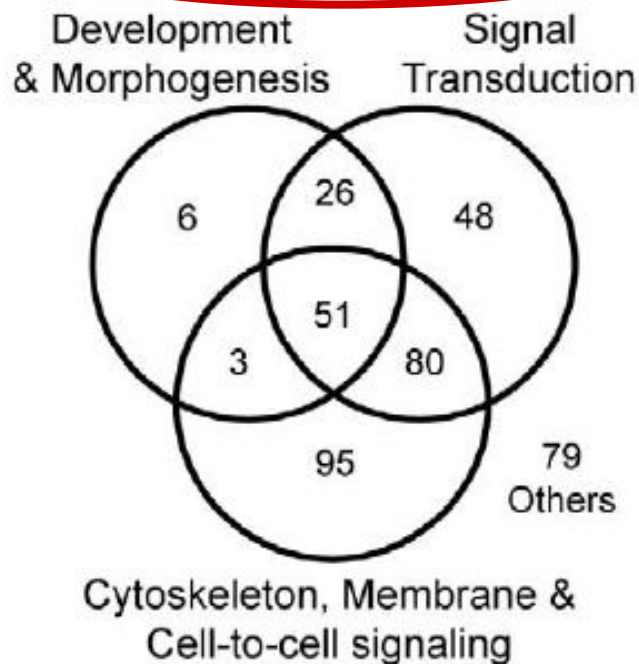
Ряд характерных для опухолевых клеток изменений генома могут обеспечить оба важных компонента иммортализации клеток



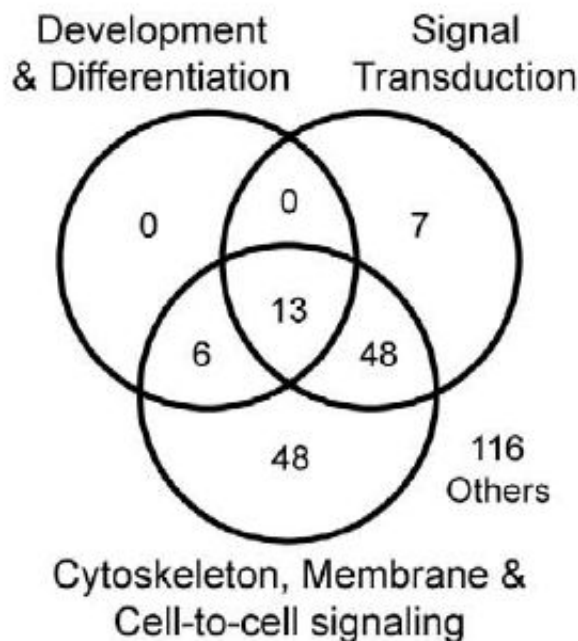
Функция TERT в стволовых и недифференцированных клетках не ограничивается поддержанием структуры теломер

Экспрессия TERT с дефектной RT-функцией в клетках кожи мышей активирует транскрипционные программы, схожие с активацией **Мус** и **Wnt** сигнализации, и изменение экспрессии большой группы генов (функция Мус), что ведет к стимуляции пролиферации клеток, подавлению в них ряда чекпойтов клеточного цикла (*активируемых повреждениями ДНК*) и ряду других клеточных реакций

388 TERT-activated genes



238 TERT-repressed genes

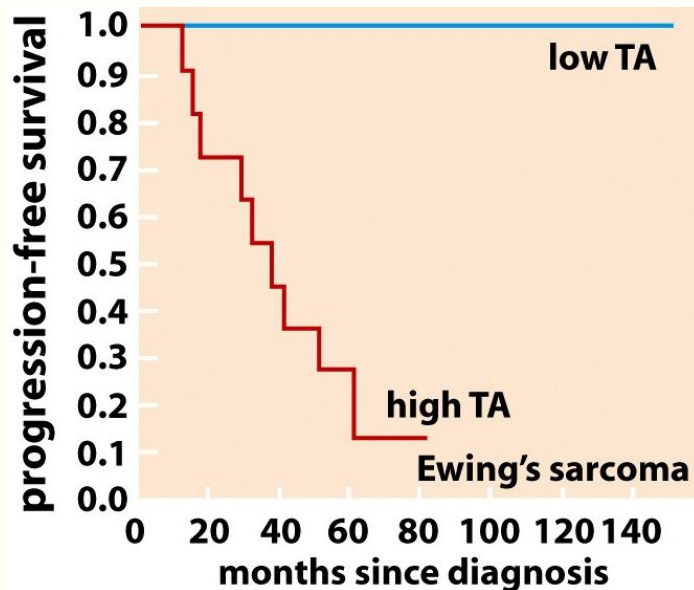
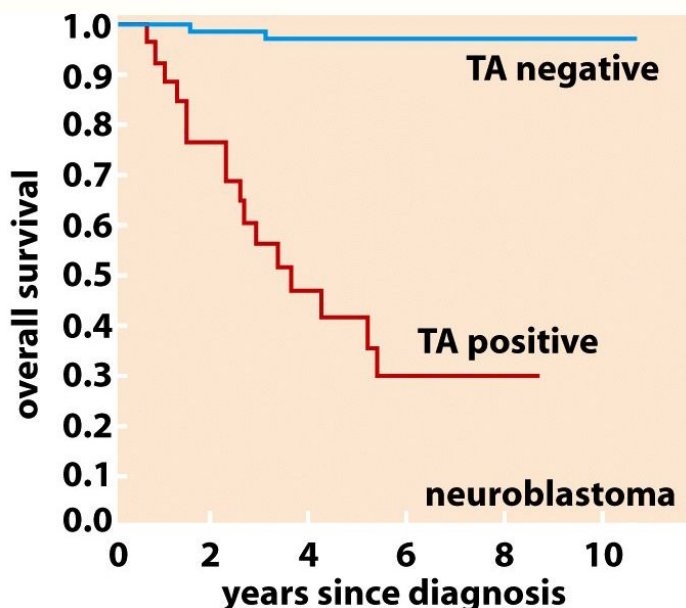


Функция hTERT в стволовых и недифференцированных клетках не ограничивается поддержанием структуры теломер

Экспрессия TERT с дефектной RT-функцией активирует транскрипционные программы, схожие с активацией **Мyc** и **Wnt** сигнализации, и изменение экспрессии большой группы генов (функция Мyc), что ведет к стимуляции пролиферации клеток, подавлению в них ряда чекпойтов клеточного цикла и ряду других клеточных реакций

Теломерная и нетеломерные функции hTERT вносят существенный вклад в образование пролиферирующих «бессмертных» стволовых неопластических клеток и определяют клиническое течение опухолей

(hTERT экспрессируется в 90% опухолей человека)



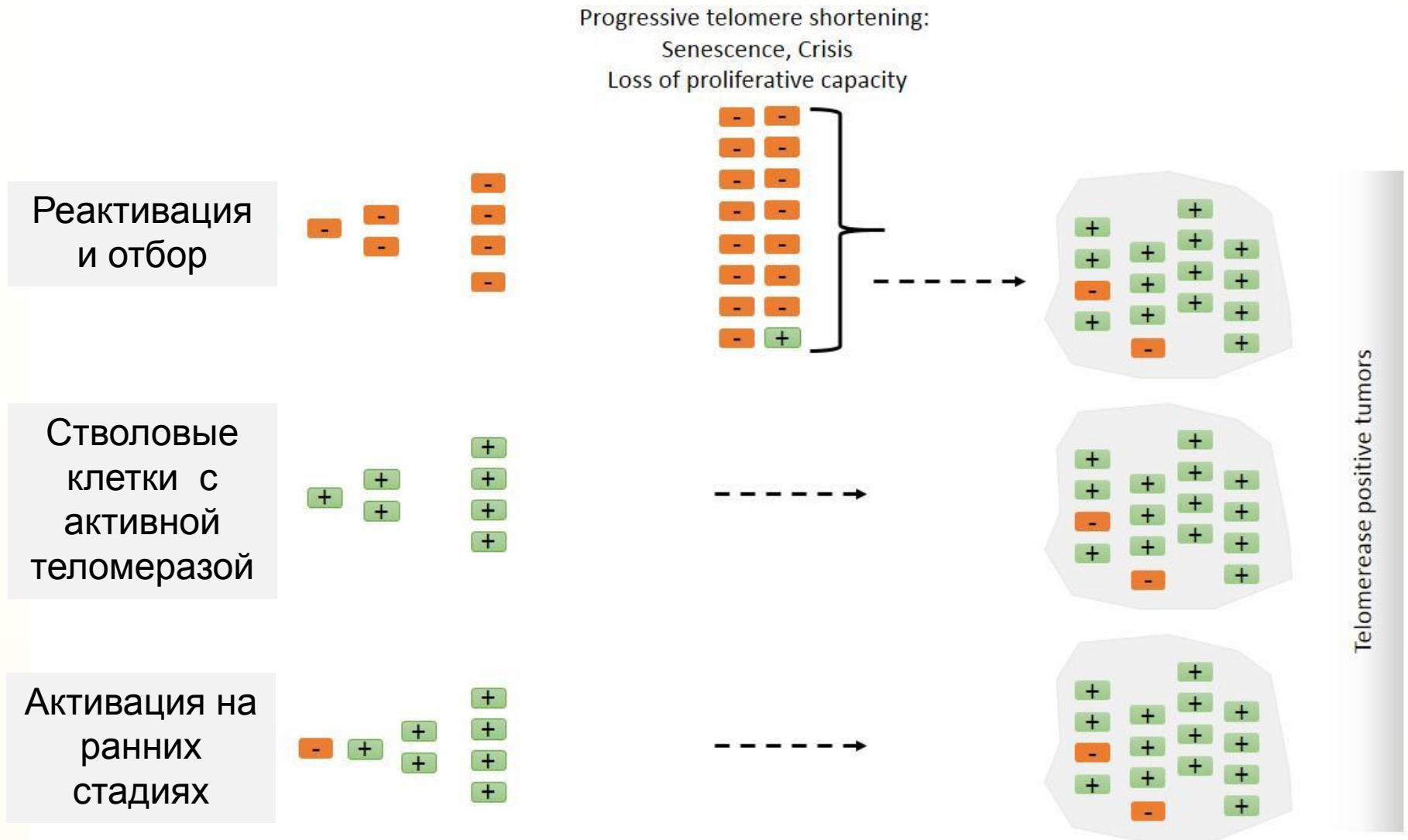
Предполагаемые «неканонические» функции теломеразы (экспрессия каталитически неактивной TERT)

- Активация сигнальных путей факторов роста, Wnt, NF-κB
- Усиление стволовых характеристик клетки
- Улучшение рибосомного биогенеза
- Подавление апоптоза и блока репликации при укорочении теломер
- Усиление адгезии и миграции
- Повышение частоты возникновения опухолей

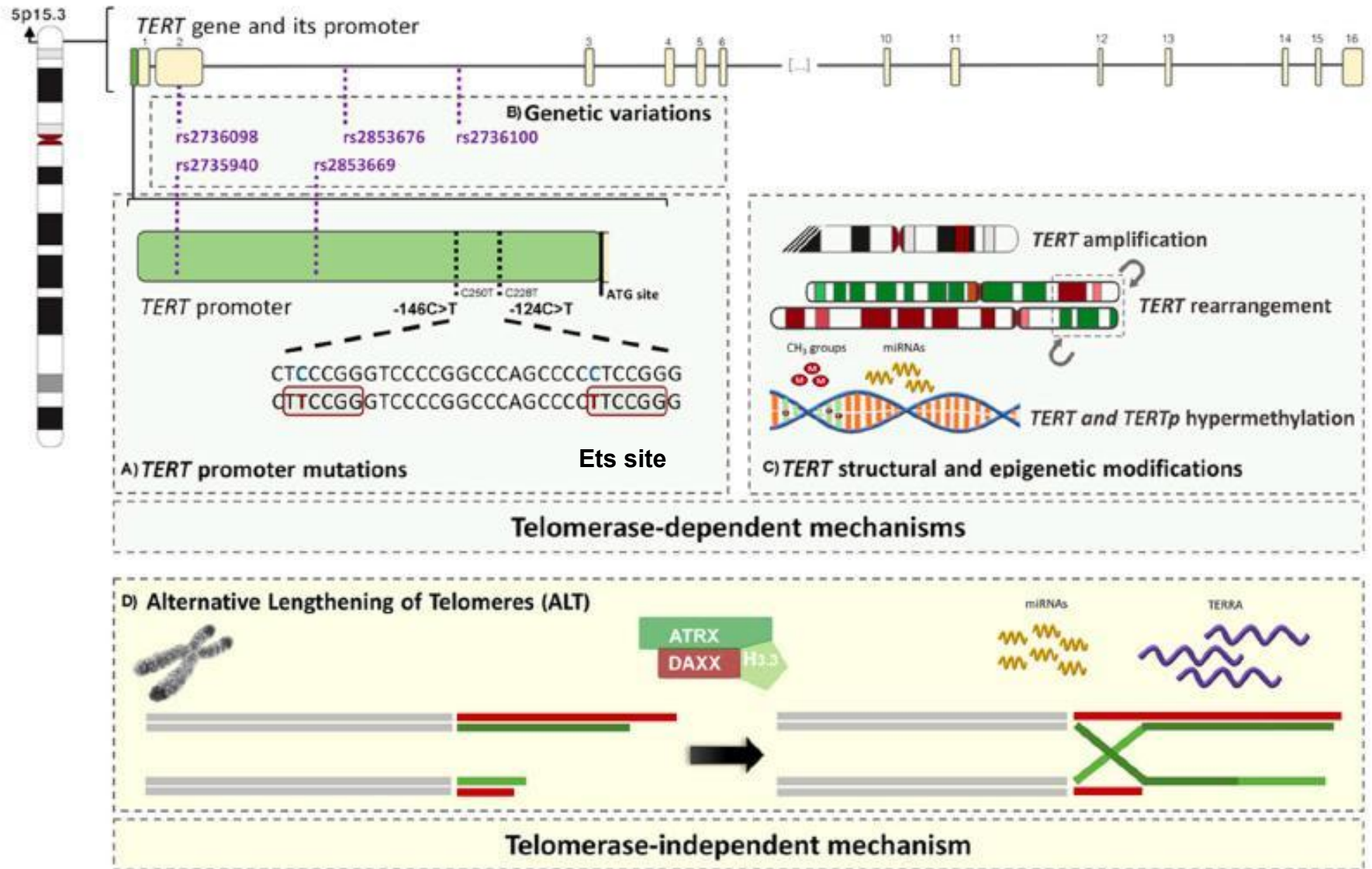
Однако нокаут TERT и TR у мышей с длинными теломерами не влияет на профиль экспрессии генов и ответ на повреждения ДНК

Возможное объяснение – существование альтернативных изоформ TERT с различными свойствами

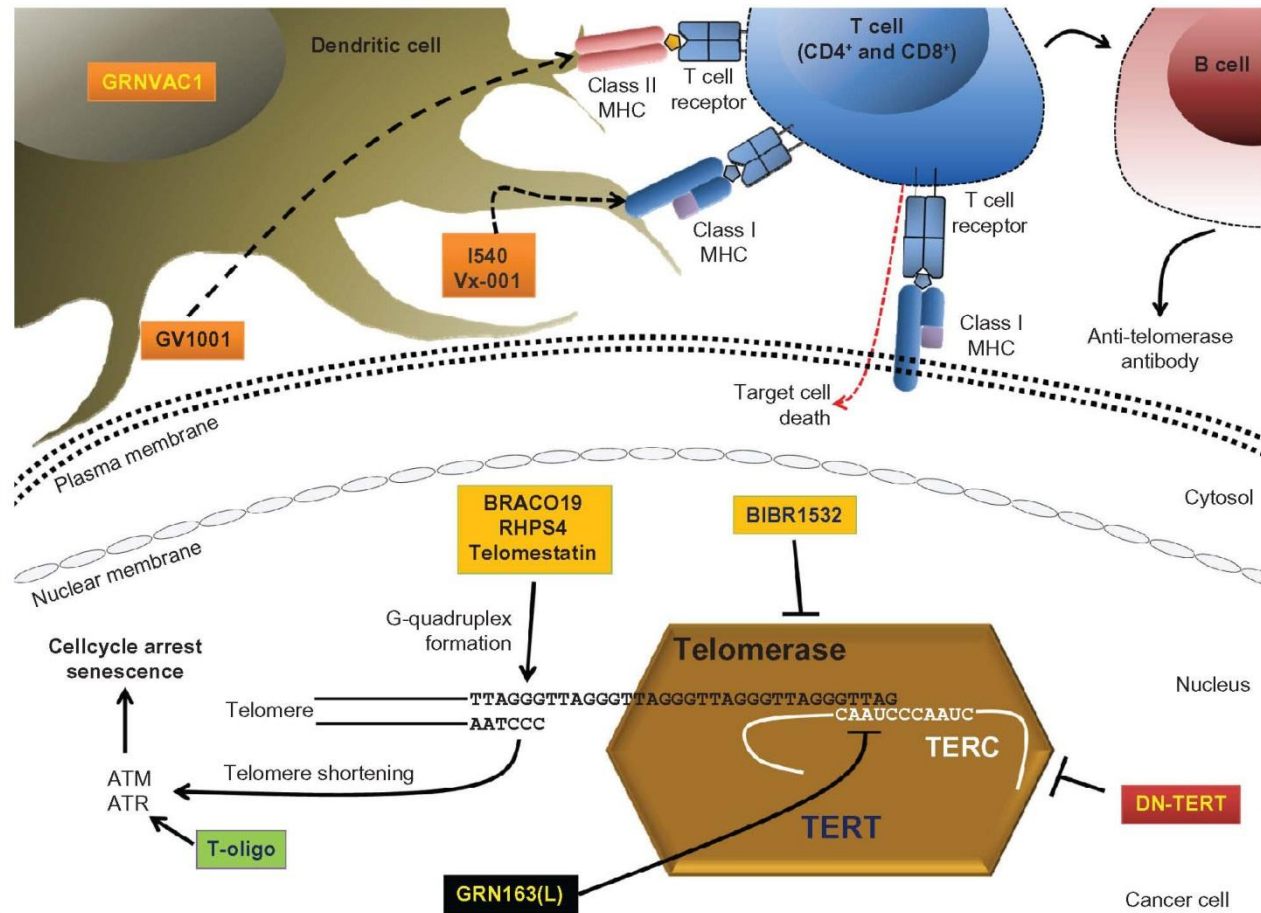
Почему теломераза активирована в опухолях?



Механизмы, определяющие удлинение теломера в опухолевых клетках

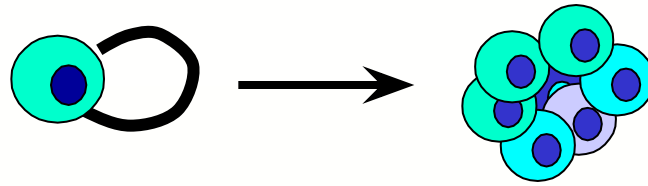


Возможные стратегии антителомерной терапии



(Roh, Sung and Lee, 2013)

- Прямое ингибирование теломеразы (ингибирование TR и TERT).
- Формирование G-квадруплексов на концах теломер – ингибирование их элонгации.
- Стимуляция ATM/ATR-опосредованного ареста клеточного цикла и репликативного старения за счет внутриклеточной сигнализации - T-oligo.
- Вакцинация и другие методы иммунологического распознавания TERT+ клеток.
- **Ингибирование неканонических функций?**



Неограниченное деление стволовых клеток опухолей

Стимуляция деления

Иммортализация

Перепрограммирование
хроматина

▲ Мус.
▼ p53
и др.

▲ TERT

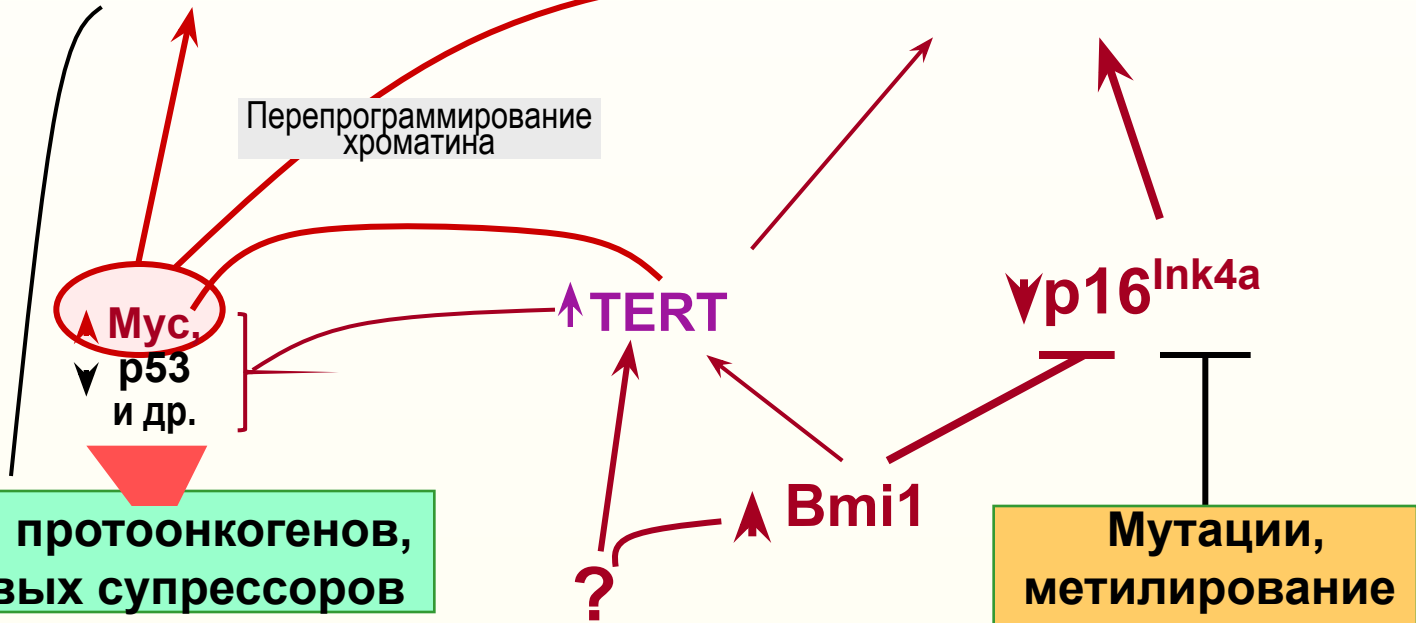
▼ p16^{Ink4a}

?

▲ Bmi1

Мутации протоонкогенов,
опухолевых супрессоров

Мутации,
метилование



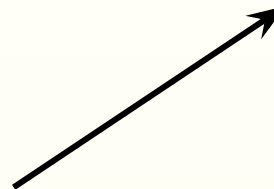
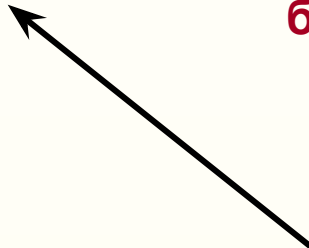
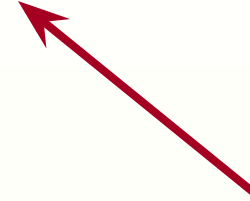
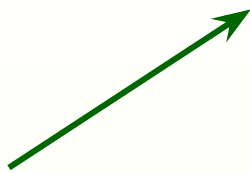
**Интенсивное и
неограниченное
во времени
деление клеток**

**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)**



Способы программируемой гибели клеток:

1. Апоптоз

2. Митотическая катастрофа

3. Аутофагия

4. Некроптоз

5. Энтоз

Курс «Биология опухолевой клетки»
(2019 г.)

Н.Л. Лазаревич

Лекция 4

**Подавление программируемой клеточной смерти
в опухолевых клетках**