

Курс «Биология опухолевой клетки»

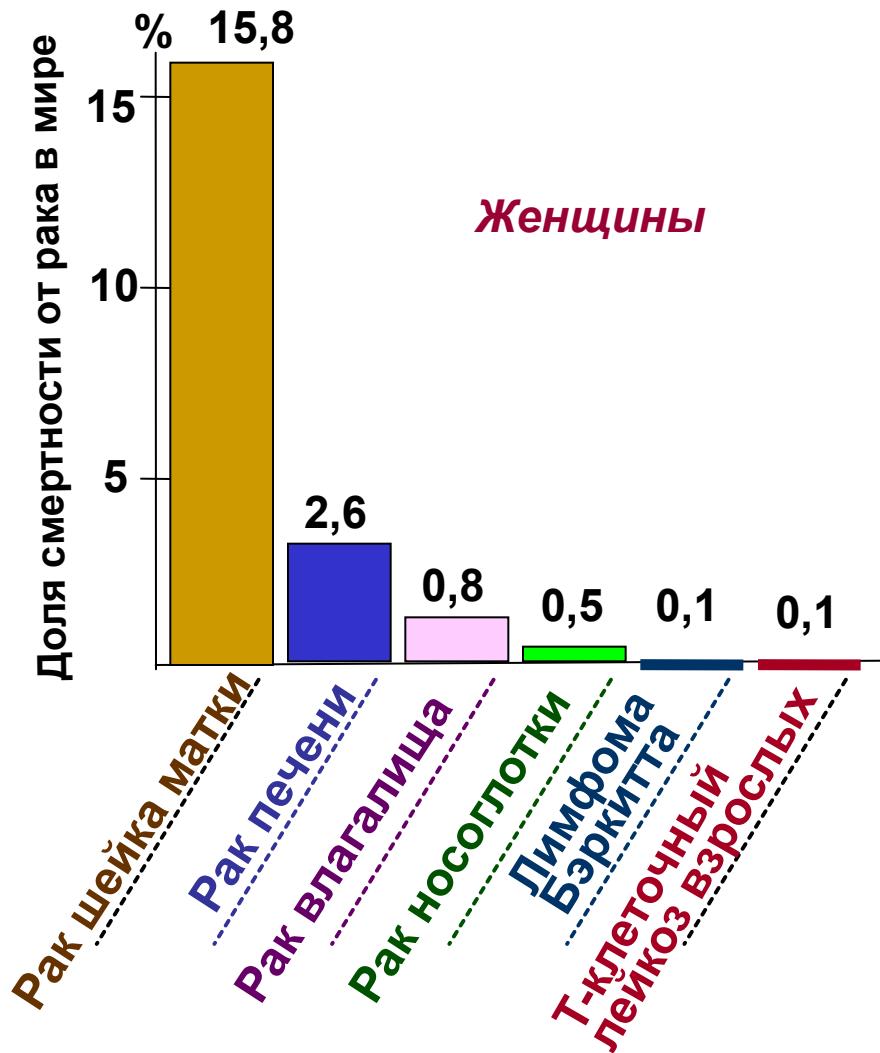
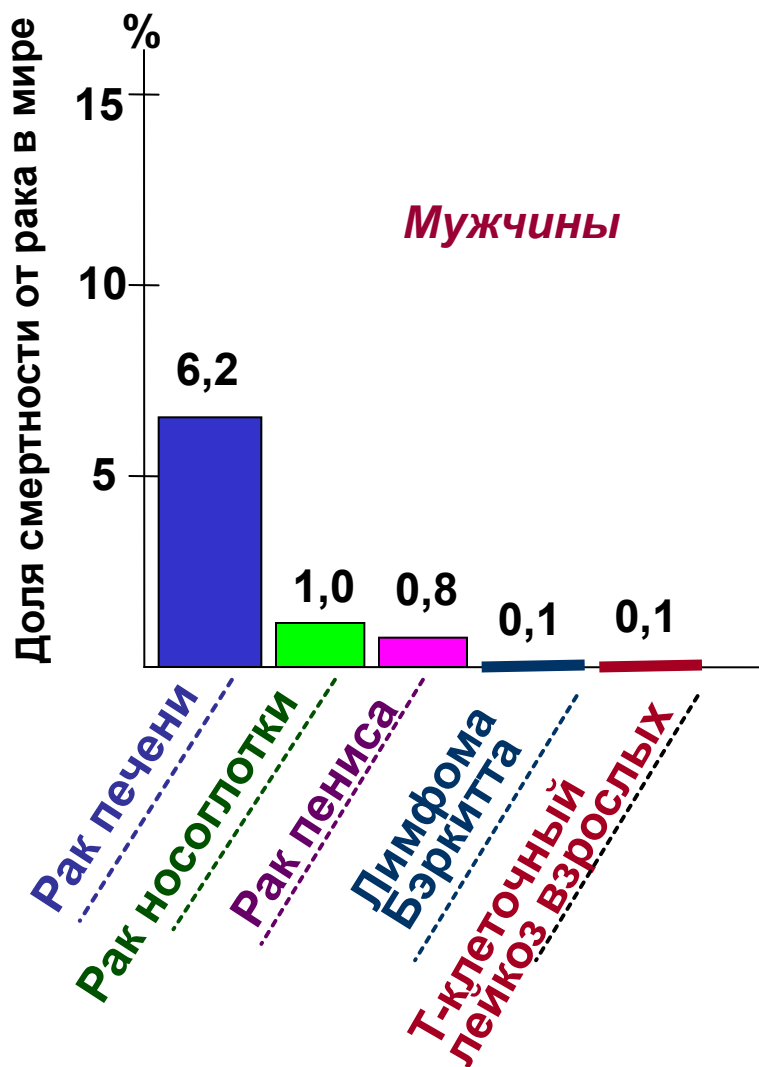
(2019 г.)

Н.Л. Лазаревич

Лекция 10 (часть 1)

Онкогенные вирусы человека (продолжение)

Вирус-ассоциированные опухоли у населения мира



Особенности вирусного канцерогенеза у людей

- Для злокачественной трансформации инфицированных клеток необходимы дополнительные факторы и условия, ведущие к отбору опухолевого клона клеток
- Опухоль у инфицированных лиц возникает, как правило, редко, примерно, 1 случай заболевания на десятки, сотни, а иногда и тысячи инфицированных лиц
- После инфицирования до возникновения опухоли проходит длительный латентный период, длящийся годами и даже десятилетиями
- У большинства инфицированных лиц возникновение опухоли не является обязательным событием, но они входят в группу риска

Онкогенные вирусы человека

РНК-содержащие

- HTLV-1
- Вирус гепатита С (HCV)

Новообразования

Т-клеточный лейкоз взрослых
Гепатоцеллюлярная карцинома

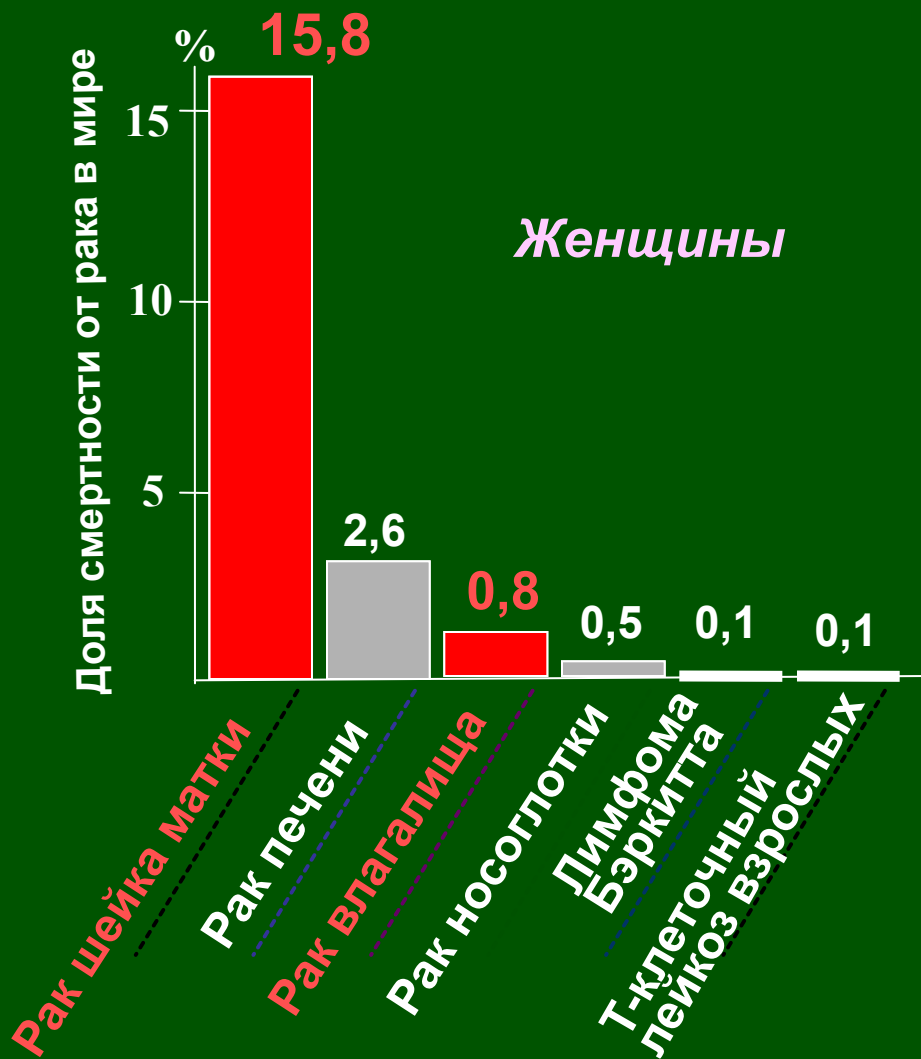
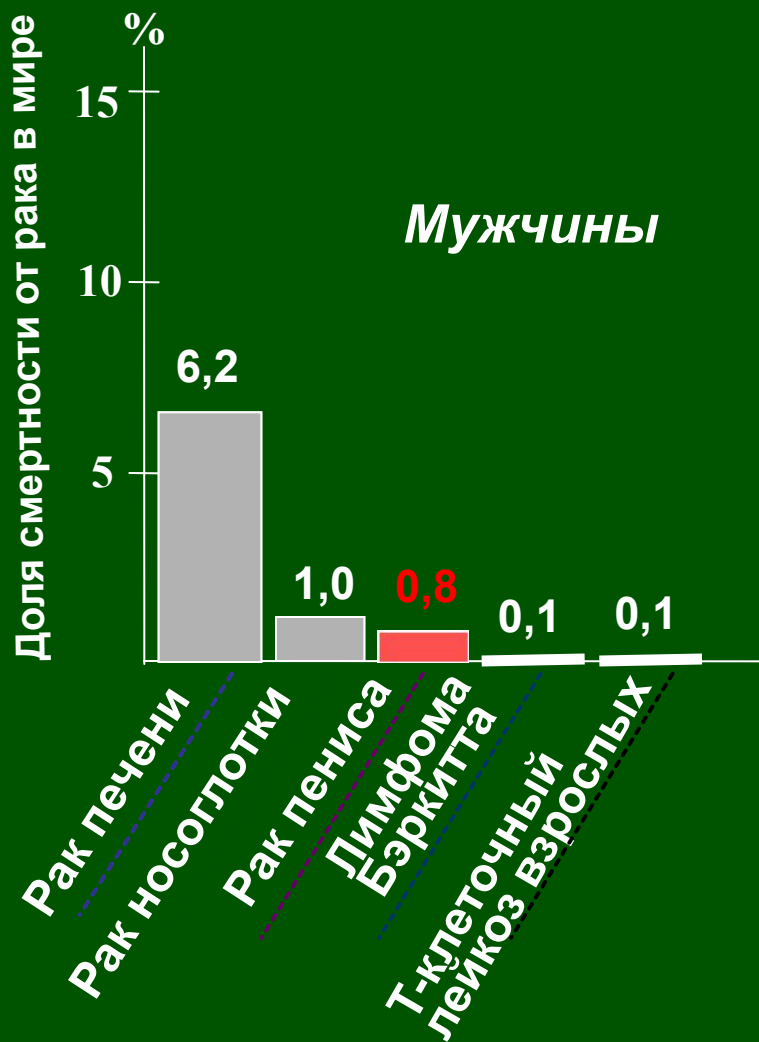
ДНК-содержащие

- Вирус гепатита В (HBV)
- Вирус папилломы (HPV)
- Вирус Эпштейна-Барр (EBV)
- Герпесвирус-8 (HHV-8/KSHV)
- Полиомавирус клеток Меркеля (MCPyV/HPyV5)

Новообразования

Гепатоцеллюлярная карцинома
Рак шейки матки и др.
Лимфома Беркитта, рак носоглотки, лимфогранулематоз
Саркома Капоши и др.
Карцинома клеток Меркеля

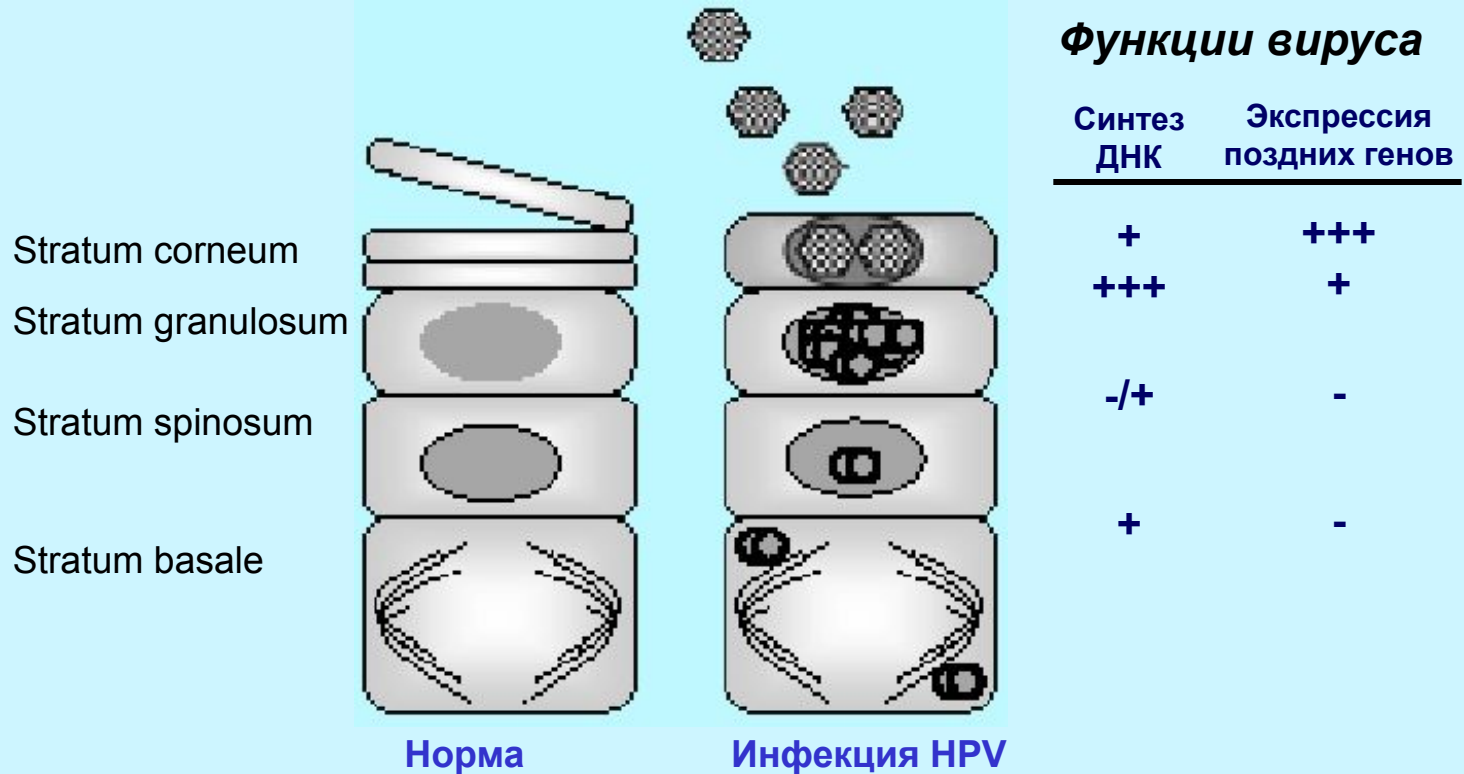
Вирус-ассоциированные опухоли у населения мира



Вирус папилломы человека (HPV)

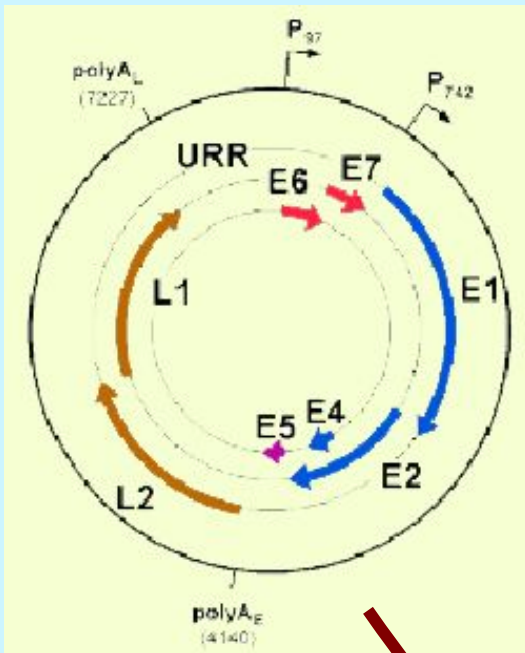
- Известно более 150 типов (5 групп) HPV, но лишь некоторые из них (альфа-группа) поражают слизистый эпителий и увеличивают риск возникновения опухолей. Высоко онкогенные - HPV16 и HPV18.
- HPV16 ответственен за 50% случаев рака шейки матки; HPV18, 31, 33, и 45 – за 20% случаев; другие типы – за часть остальных случаев (< чем в 5% раков шейки матки HPV не выявляется).
- Другие новообразования – опухоли аногенитальной области (ануса, вульвы и влагалища) – 85-95%, рак ротоглотки – 50% и др.
- У 90% женщин HPV инфекция исчезает самостоятельно через год после инфицирования под воздействием иммунной системы организма. У меньшинства возникают опухоли.

Вирус папиллом человека (HPV)



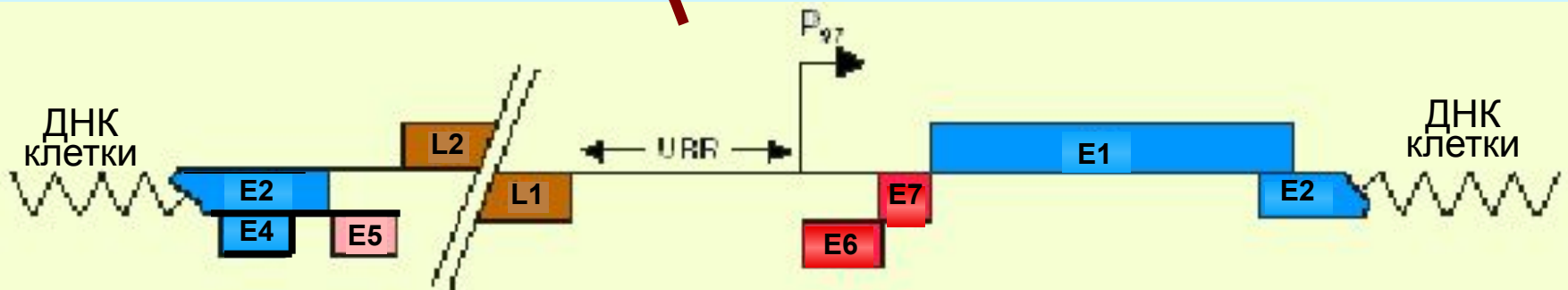
Многослойный ороговевающий эпителий
(кожа, слизистые)

Геном вируса папилломы человека (HPV)



- ДНК HPV, ~8000 п.о., содержит 9 ORF, 2 из которых (L1 и L2) кодируют структурные белки вириона, а 7 других (E1-E7), т.н. ранние гены, контролируют репродукцию вируса.
- Эписомная форма (50-100 копий). На поздних этапах малигнизации может происходить интеграция ДНК HPV в ДНК клетки может привести к малигнизации.
- Онкогенный эффект HPV обусловлен экспрессией E6, E7 и, в меньшей степени, E5.

интеграция



Онкобелки высокоонкогенных типов HPV (HPV16, HPV18 и др.):

E6

Связывание и
инактивация
p53

Активация
генов
MYC, hTERT

Нарушение
контроля
чекпойнтов
и апоптоза;
мутагенез

Стимуляция
деления;
отмена реп-
ликативног
о
старения

E7

Связывание и
инактивация
pRb, p107, p130

Связывание и
инактивация
p21^{Cip1}, p27^{Kip1}

Отмена
негативног
о
контроля
входа в
S-фазу

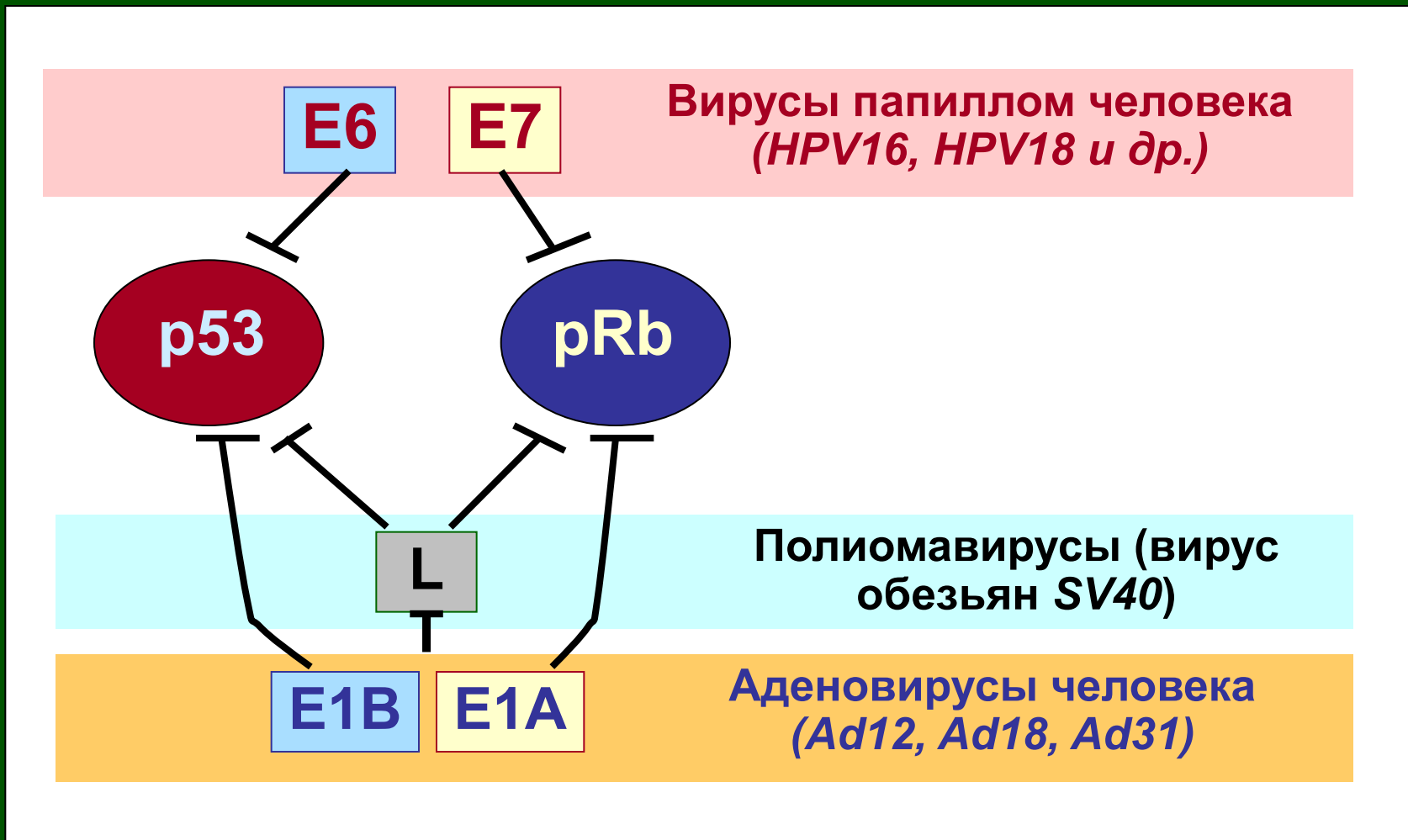
E5

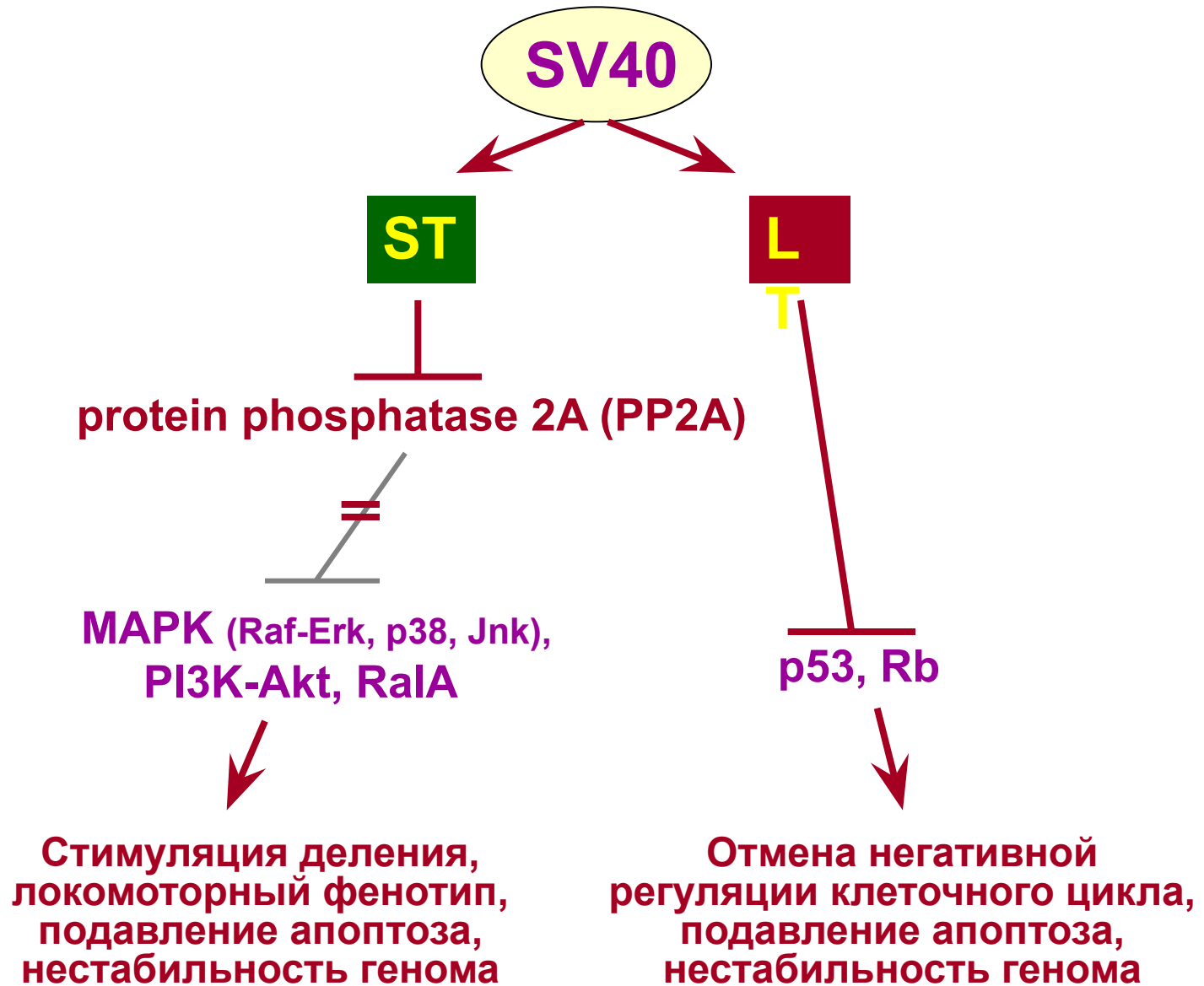
Усиление
тирозинкиназной
активности EGFR,
стимуляция
MAP киназ

Инициация
митотических
циклов

Неконтролируемое размножение клеток,
накопление дополнительных генетических изменений

Одновременная инактивация p53 и pRb
продуктами ранних генов – общая стратегия
ряда ДНК-содержащих онкогенных вирусов





Полиомавирус клеток Меркеля (Merkel cell polyomavirus, MCPyV)

Карцинома клеток Меркеля (ККМ) - редкая злокачественная опухоль кожи нейроэндокринного происхождения, описанная Cyril Toker в 1972 году. До 1972 года такие опухоли относили к недифференцированному раку кожи.

В 1978 году Tang и Toker предположили возникновение этих опухолей из клеток Меркеля (механорецепторы в нижних слоях эпидермиса).

Хотя заболеваемость ККМ примерно в 30 раз ниже, чем заболеваемость меланомой кожи, смертность составляет 46%, что почти в 4 раза больше, чем при инвазивной меланоме (12,5%).

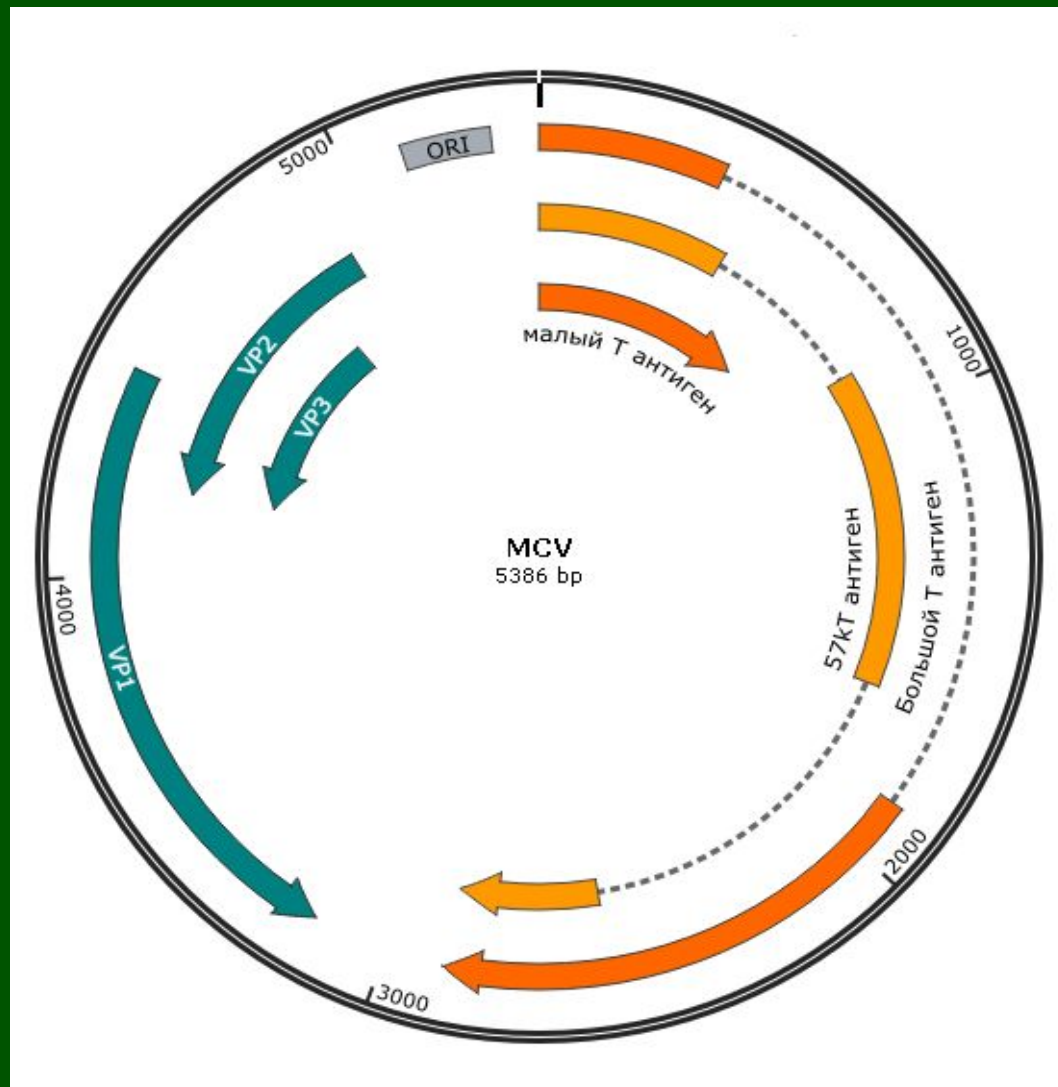


Полиомавирус клеток Меркеля (Merkel cell polyomavirus, MCPyV)

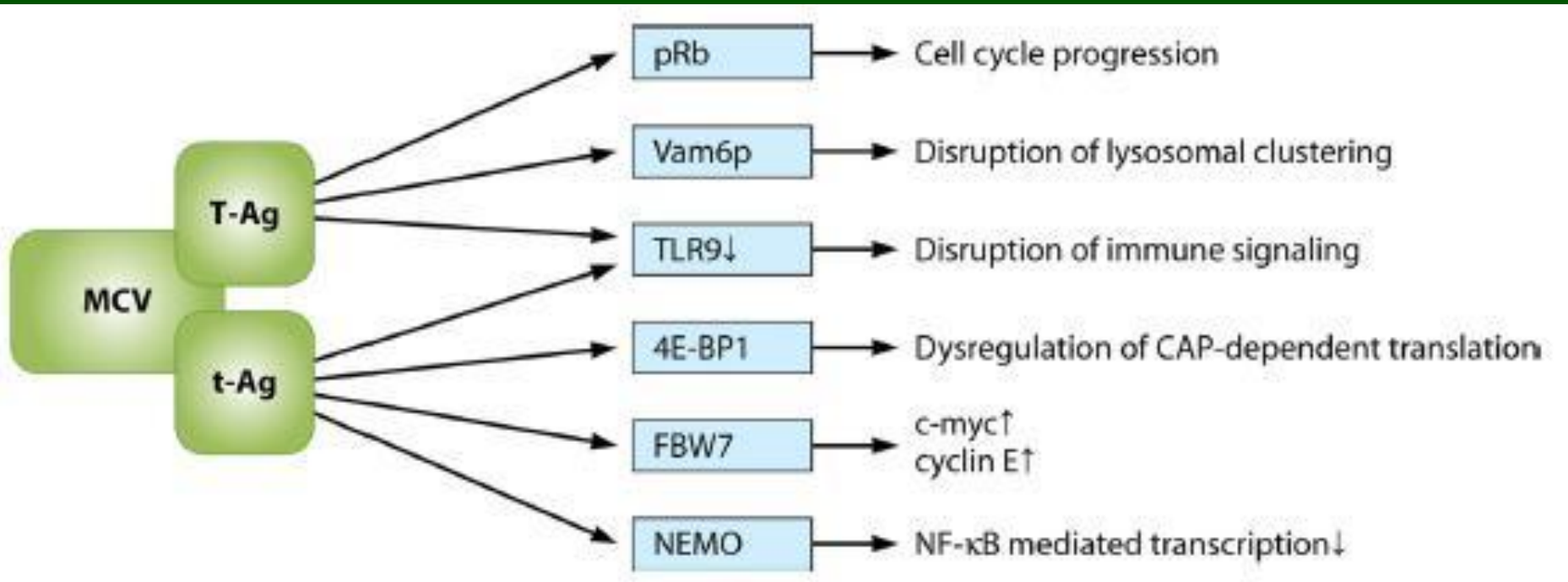
В 2008 году Feng и соавт. выделили из клеток рака Меркеля неизвестный ранее вирус, который был обнаружен в 85% опухолевых образцов ККМ.

Заражение MCPyV происходит в раннем детстве, у детей до 5 лет – 80%.

Другие факторы риска для возникновения ККМ – УФ, возраст (75-80 лет), иммунодефицит.



Онкогены МСРyV



Для МСРyV-негативных МКК характерны замены С>Т, инактивирующие мутации генов pRb, p53, системы ремоделирования хроматина и системы репарации ДНК

Заболевания человека, ассоциированные с вирусом Эпштейна-Барр (EBV)

% EBV-ассоциир.

Доброкачественная реактивная инфекция

- Инфекционный мононуклеоз >99

Злокачественные новообразования

Лимфоидные

- Лимфогрануломатоз (ЛГМ), смешанно-клеточный 70
- ЛГМ, ассоциированный со СПИД >95
- Лимфома Беркитта, Африканская >95
- Лимфома Беркитта, Северо-американская 20
- Лимфома Беркитта, СПИД-ассоциированная 30
- Неходжкинская лимфома, СПИД-ассоциированная 40
- Назальная Т/НК-клеточная лимфома >95

Раки

- Рак носоглотки, Азия >95
- Рак носоглотки, США 75
- Рак желудка, Япония, США 6-16

EBV – ДНК-содержащий вирус

(сем. герпесвирусов, род *Lymphocryptoviruses*;
геном – 172 т.п.н.)

- Персистирует у 80-95% взрослого населения планеты. Заражает В-лимфоциты, Т/НК-клетки и некоторые типы эпителиоцитов.
- Инфицирование обычно происходит в раннем детстве и протекает бессимптомно. При более позднем контакте у половины индивидуумов развивается инфекционный мононуклеоз. После первичного инфицирования EBV человек пожизненно становится носителем вируса.

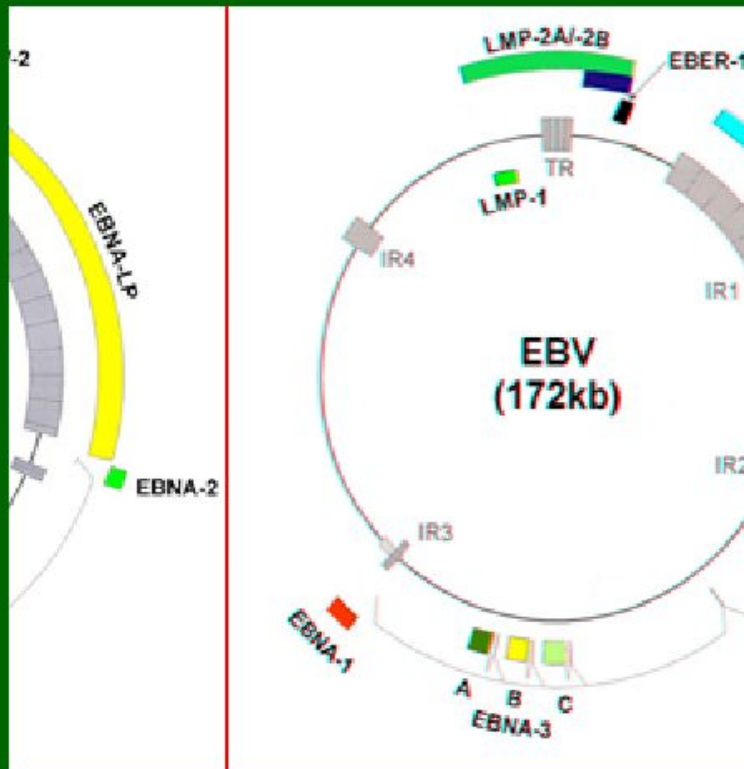
EBV nuclear antigens (EBNAs) and
latent membrane proteins (LMFs)

Стратегии взаимодействия EBV с клеткой:

- а) продуктивная литическая инфекция**
(плазматические В-клетки, эпителиоциты ротоглотки; экспрессируется 90 вирусных генов);
- б) программа стимуляции пролиферации**
(дифференцирующиеся В-клетки; индуцируется экспрессией белков EBNA1-6, LMP1, LMP2);
- в) программа «спасения вирусов»**
(В-иммунобласты, Т/НК-клетки, эпителиоциты; экспрессируются EBNA1, LMP1, LMP2);
- г) программа «сокрытия вируса»**
(В-клетки памяти и эпителиоциты, уход от иммунологического распознавания и уничтожения зараженных клеток; вирусные белки не экспрессируются, либо фенотипы LMP2A⁺ или LMP2A⁺/EBNA1⁺)

Риск трансформации увеличен при каждой из 3-х форм латентной инфекции (программы б-г),

Геном ВЭБ и его экспрессия в латентно инфицированных клетках



EBNA-1 - поддержание
в эписомальном состоянии

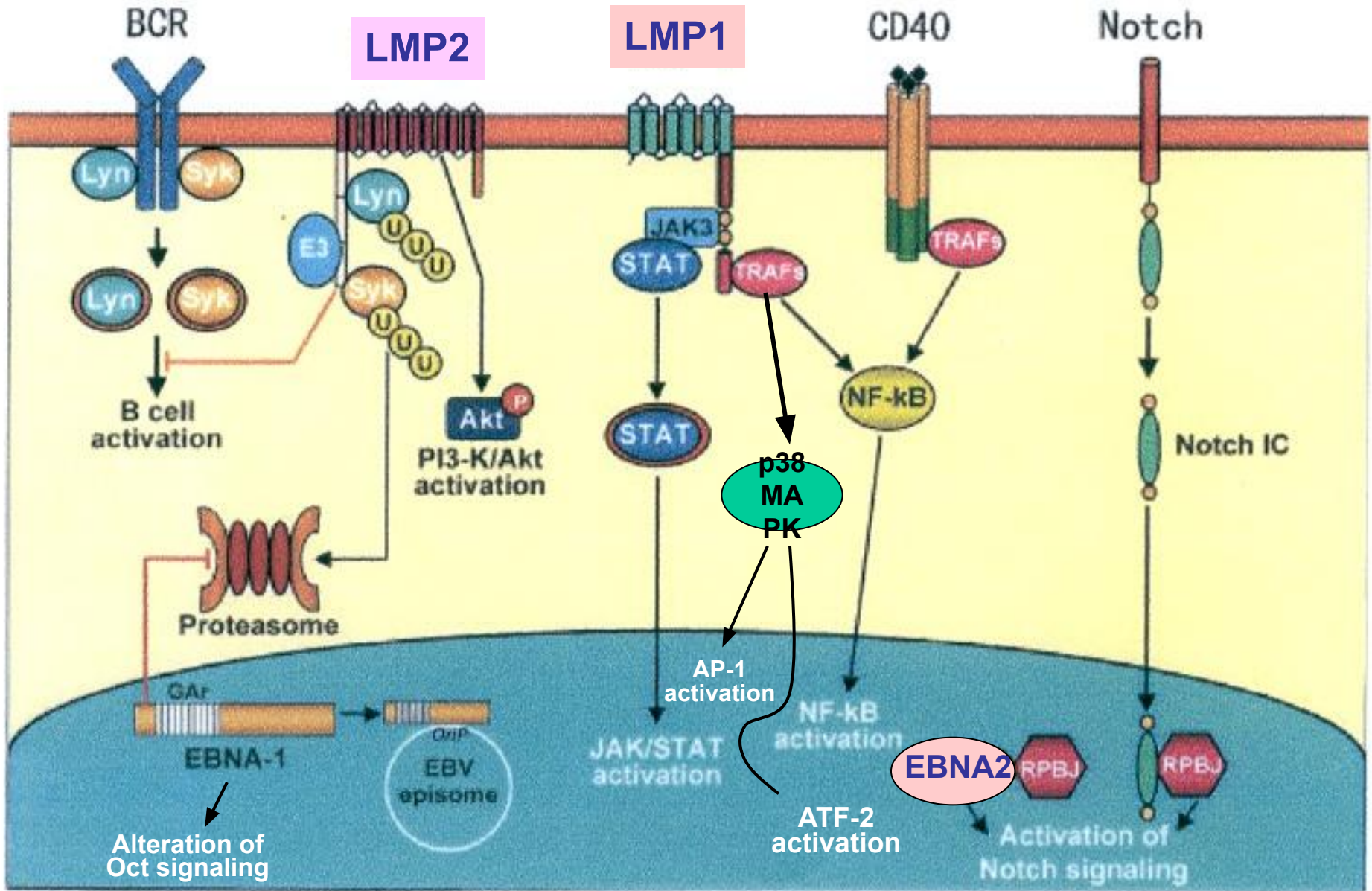
EBNA-2, EBNA-3A, EBNA-3C, EBNA-LP -
трансформация, трансактивация

EBNA-3B - функции не известны

LMP-1 - трансформация, анти-
апоптотическое действие (онкоген)

LMP-2A/-2B - поддержание
латентного состояния

Воздействие LMP1, LMP2 и EBNA2 на сигнальные пути



Герпесвирус человека, ассоциированный с саркомой Капоши (KSHV/HHV-8)

(подсемейство гамма-герпесвирусов, род радиновирусов)

Саркома Капоши – многофокусный неопластический процесс, возникающий из эндотелия лимфатических и кровеносных сосудов, главным образом дермы. Опухоль включает также размножающиеся периваскулярные фибробласты.

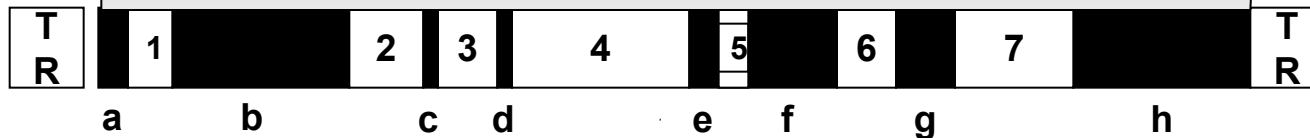
Инфицированность населения HHV-8 сильно варьирует в разных географических областях:

- регионы Африки и Средиземноморья – большинство;
- страны Западной Европы и США – редко и ассоциирована с отдельными группами (гомосексуалисты, больные СПИДом и другими формами иммунодефицитов).

Вирус заражает эпителиоциты простаты, эндотелиоциты сосудов и кроветворные клетки. Передача инфекции в основном происходит половым путем.

**Линейный геном HHV-8 содержит длинную уникальную область (LUR)
(140.5 тысяч пар оснований, 81 ген)**

Некоторые из генов LUR кодируют белки,
гомологичные известным белкам человека,
участвующим в процессах канцерогенеза



20 т.п.н.

Геном HHV-8 подразделяется на 7 блоковых областей (1-7), которые кодируют структурные белки и ферменты, участвующие в репликации клетки. Межблоковые области генома (a-h) кодируют уникальные вирусные белки

Белки HHV-8, гомологичные клеточным белкам:

v-Vcl-2 – гомолог анти-апоптотического белка Vcl-2;

vFLIP – гомолог ингибитора прокаспазы-8 c-FLIP;

v-cyclin D – гомолог циклина D2;

vMIP-I, vMIP-II – гомологи хемокинов макрофагов MIP-I, MIP-II;

vIL6 – гомолог IL6;

vIRF – гомолог IRF-1 и IRF-2 (передают сигналы от интерферонов);

vGPCR – гомолог рецептора IL8

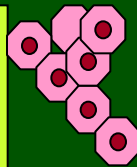
Другие потенциально онкогенные белки HHV-8

ORF K1 – трансмембранный гликопротеин;

Капошин (ORF K12)

HHV-8

**Персистентная
инфекция**



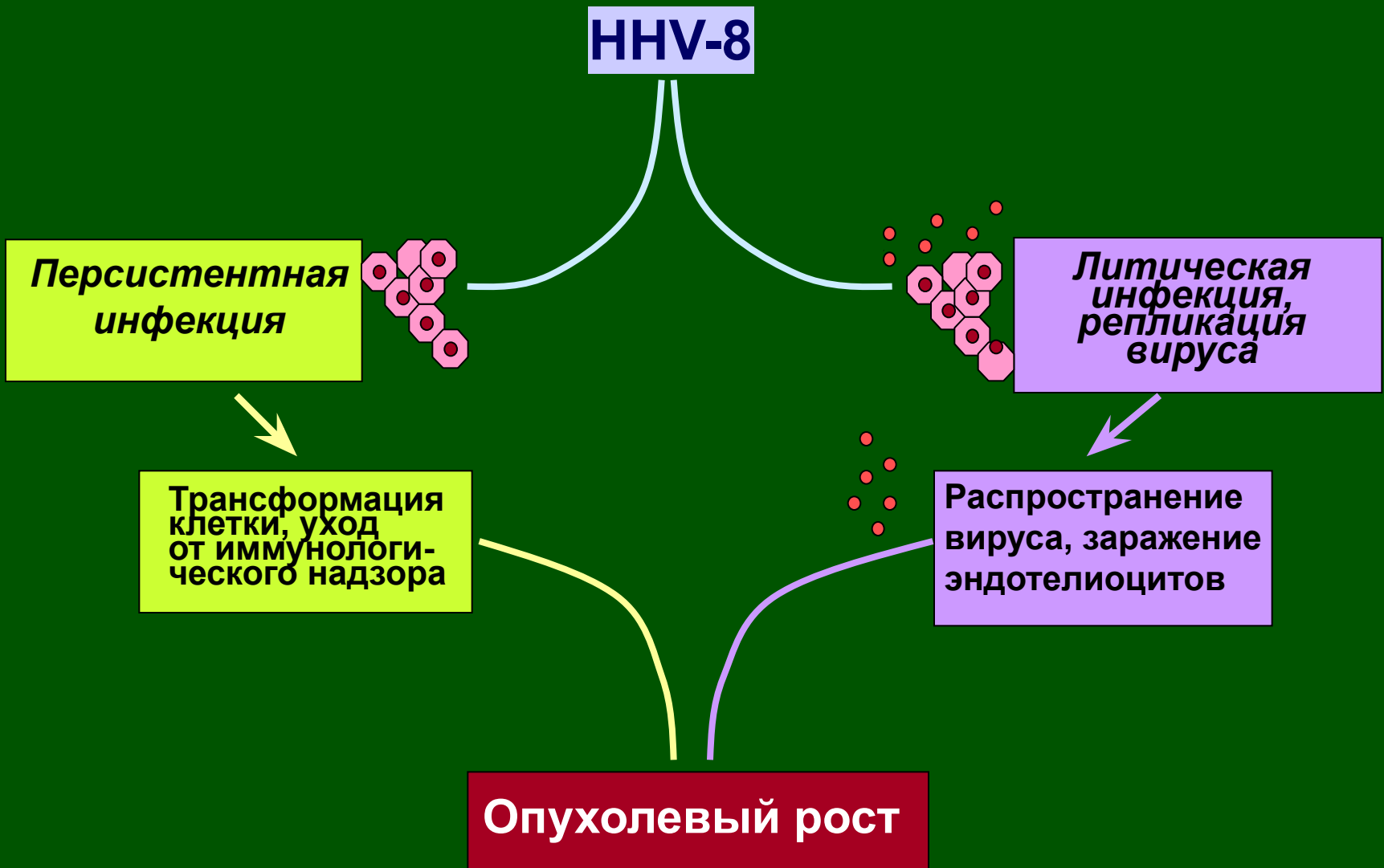
**Литическая
инфекция,
репликация
вируса**



**Трансформация
клетки, уход
от иммунологи-
ческого надзора**

**Распространение
вируса, заражение
эндотелиоцитов**

Опухолевый рост



Онкогенные вирусы

Ретровирусы

ДНК-содержащие вирусы

Инсерционный мутагенез

Вносят вирусные онкогены

Вносят вирусные онкогены

Tax

vBcl2, vFLIP
vCycD и др.

E6, LMP1, E1B

T-SV40

E7, E1A

Активированные клеточные протоонкогены

Изменение транскрипции клеточных белков

Гомологи/имитаторы клеточных белков

Подавление активности p53

Подавление активности pRb, p105, p130

Стимуляция размножения и миграции клеток, отмена негативного контроля пролиферации, подавление апоптоза, генетическая нестабильность

Канцерогенез при инфекции *Helicobacter pylori*

H. pylori – грам-отрицательные бактерии, обитающие в желудке (20-30% населения развитых стран и 50-70% - в слаборазвитых странах).

Ключевую роль в играет белок CagA, кодируемый участком генома *cagPAI* (присутствует у ~60% штаммов). Рак развивается у 1-2% индивидуумов, инфицированных такими штаммами.

Дополнительные факторы риска - генетическая предрасположенность (полиморфизмом генов определенных цитокинов), высокосолевая диета и др.

Специфические эффекты

Впрыскивание белка CagA:

связывание Grb2 → ↑ Ras-МАРК

↑ NFκB → ↑ BclX, IAPs, FLIP, IL1, IL6, IL8, TNFα, Cox2, iNOS и др.



стимуляция размножения и миграции клеток, подавление апоптоза, мутагенез

Неспецифические эффекты

Хронический гастрит:

↑ кислородные и азотные радикалы
↑ гастрин



мутагенез, стимуляция размножения

Рак желудка

Курс «Биология опухолевой клетки»

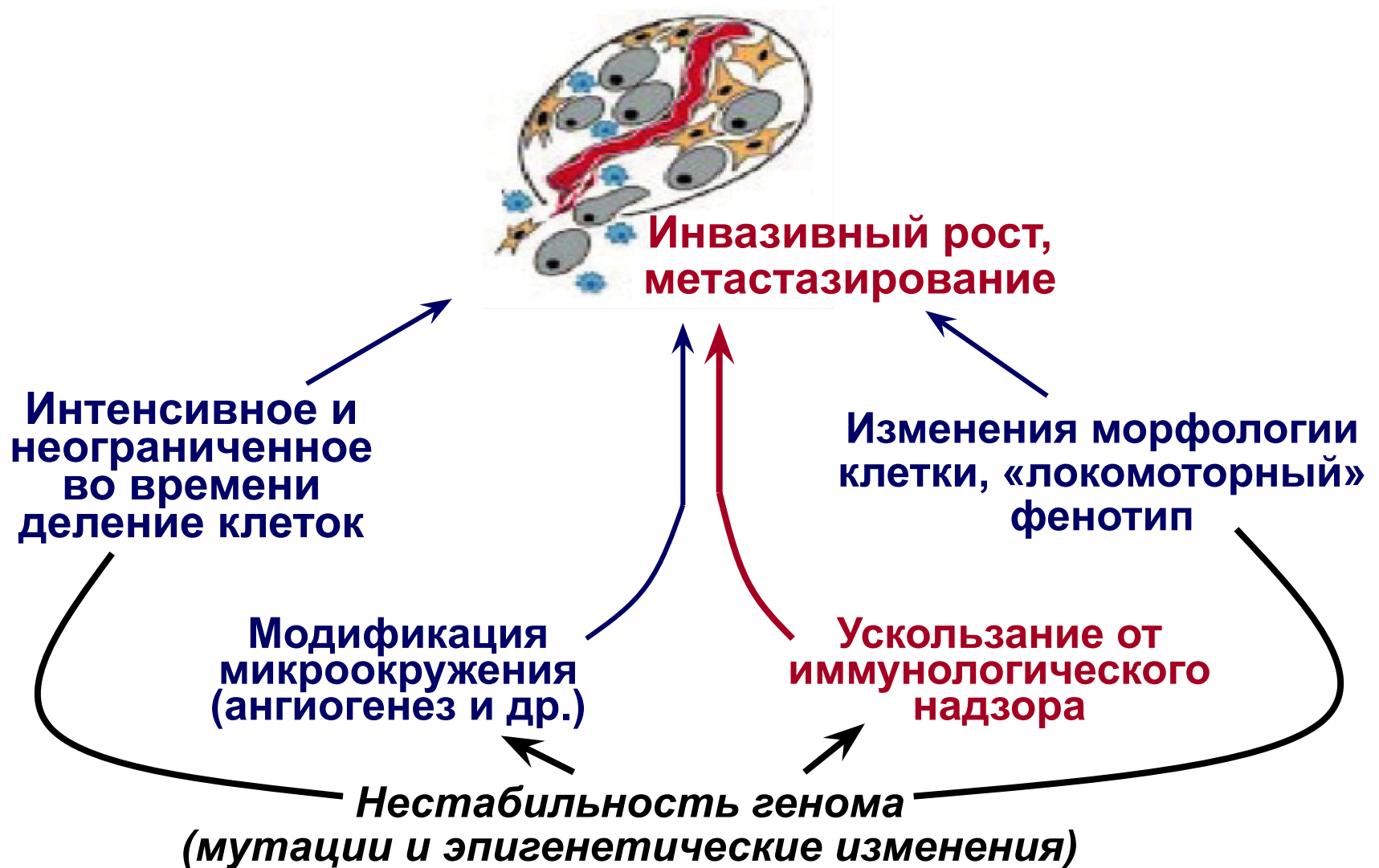
(2019 г.)

Н.Л. Лазаревич

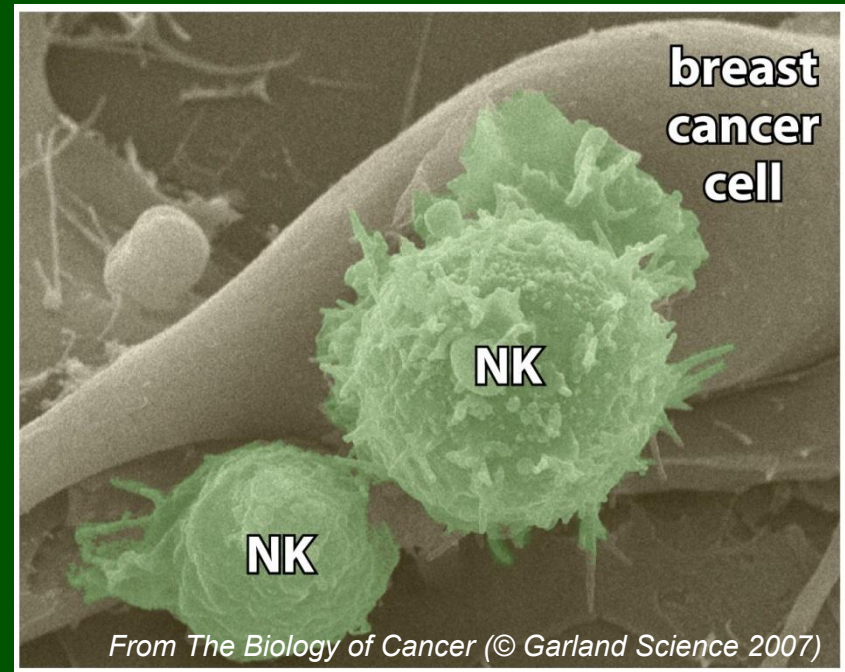
Лекция 10 (часть 2)

Ускользание опухолей от иммунологического надзора

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



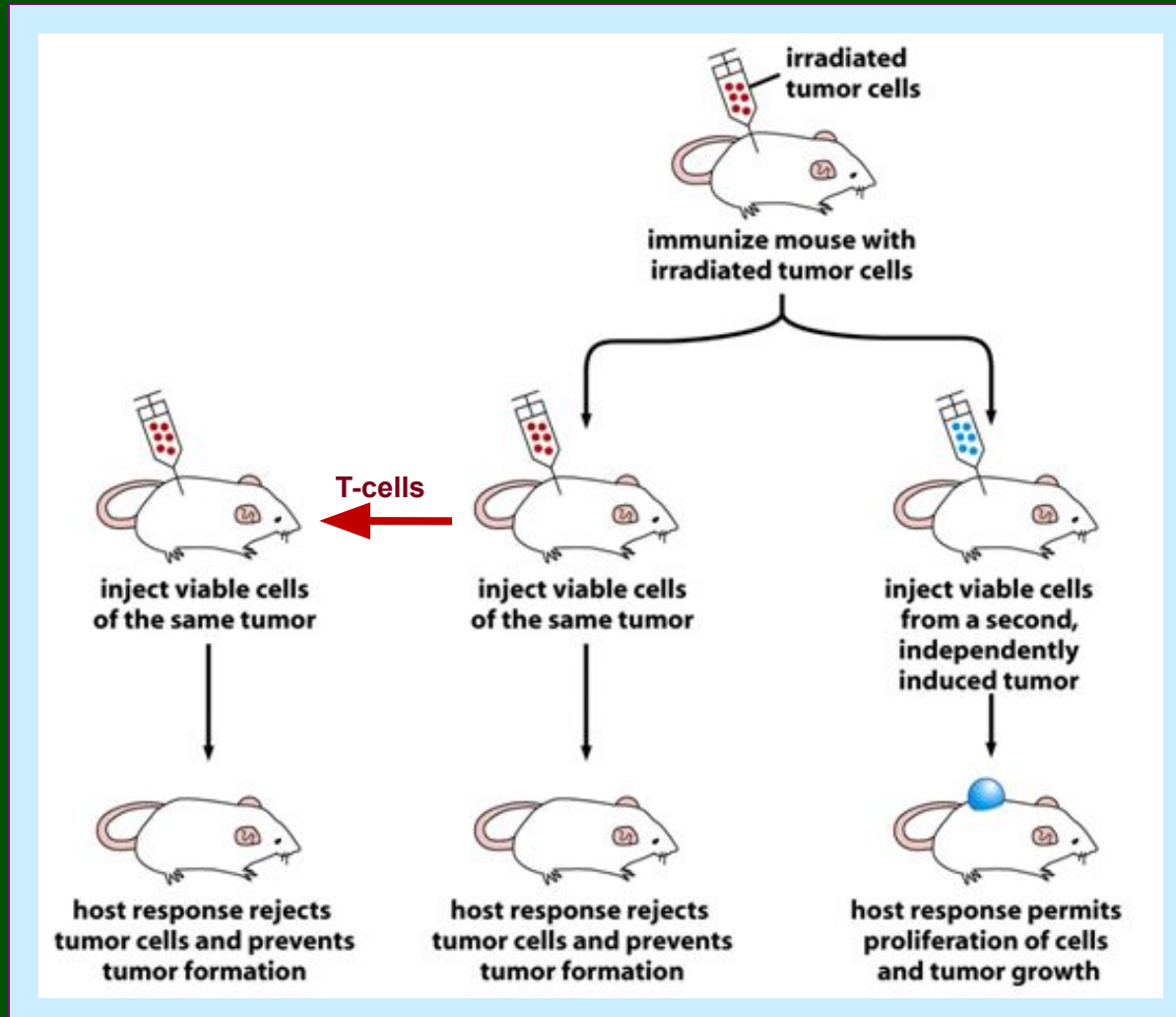
Иммунный ответ на опухоли



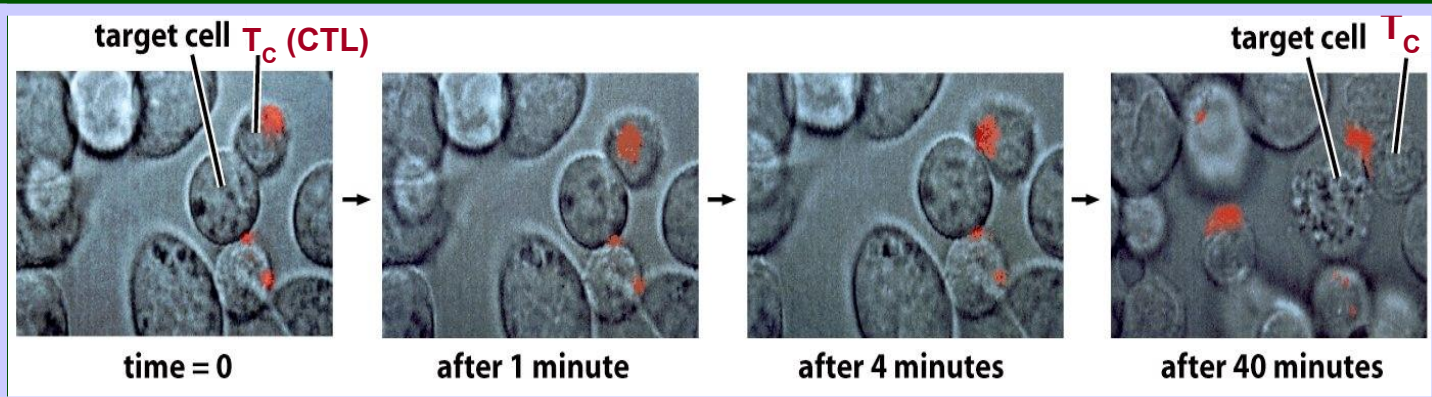
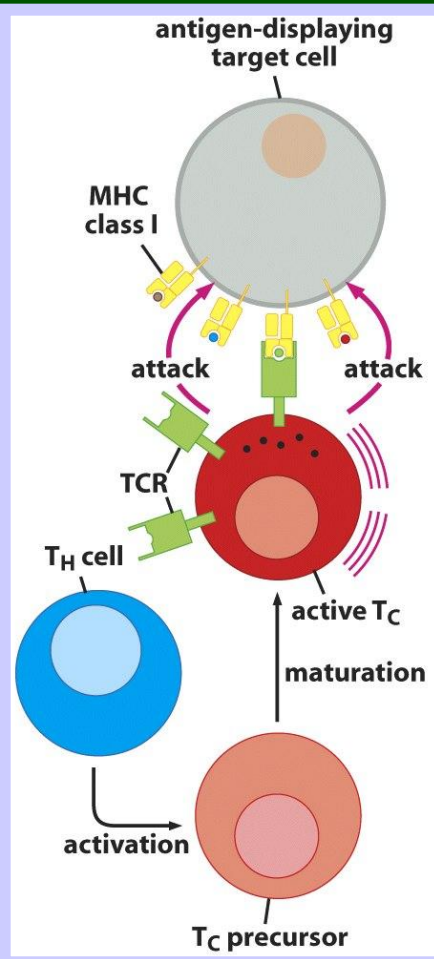
1957 г. – BURNET – концепция иммунологического надзора (tumour immunosurveillance):

“... small accumulations of tumour cells may develop and, because of their possession of **new antigenic potentialities**, provoke an effective immunological reaction with regression of the tumour and no clinical hint of its existence”

Доказательства существования специфического противоопухолевого иммунитета

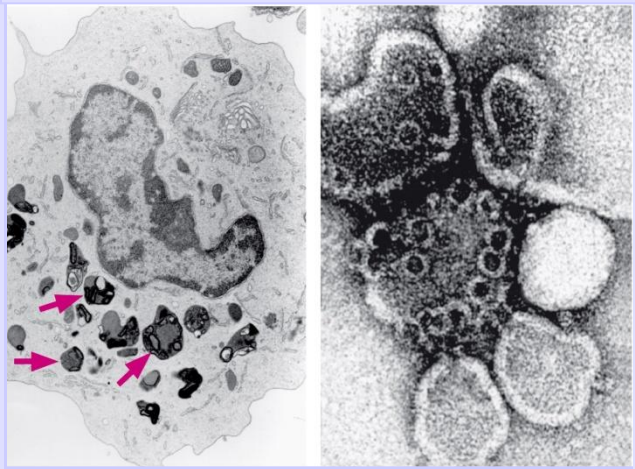


Формирование и действие цитотоксических Т-клеток (T_C /CTL)

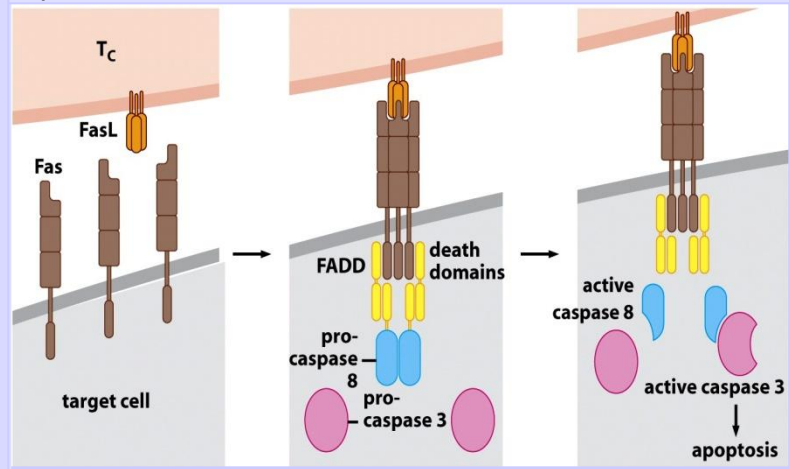


Механизмы индукции апоптоза цитотоксическими Т-лимфоцитами:

1) Секреция перфоринов, инъекция гранзимов



2) Активация Fas-сигнализации



Увеличение частоты ряда форм опухолей после пересадки органов и подавления иммунной системы

Резко повышается риск развития вирус-ассоциированных опухолей:

- саркома Капоши (HHV-8) – 400-500 раз
- рак влагалища и анальной области (HPV) – ~100 раз
- лимфома Ходжкина (EBV) – 28-49 раз
- рак печени (HBV, HCV) – 20-38 раз

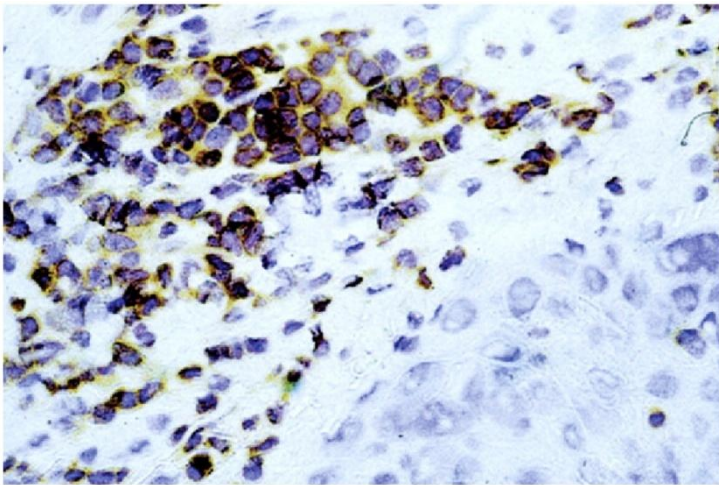
Частота других опухолей:

Site of cancer	No. of cases observed	No. of cases expected ^b	Ratio observed/expected
Non-melanoma skin	127	5.1	24.7
Thyroid, other endocrine	30	2.1	14.3
Mouth, tongue, lip	22	1.6	13.8
Cervix, vulva, vagina	39	3.6	10.8
Non-Hodgkin's lymphoma	25	2.4	10.3
Kidney, ureter	32	3.5	9.1
Bladder	26	4.7	5.5
Colorectal	38	10.5	3.6
Lung	30	12.5	2.4
Brain	10	4.1	2.4
Prostate	11	5.2	2.1
Melanoma	7	4.1	1.7
Breast	15	13.6	1.1

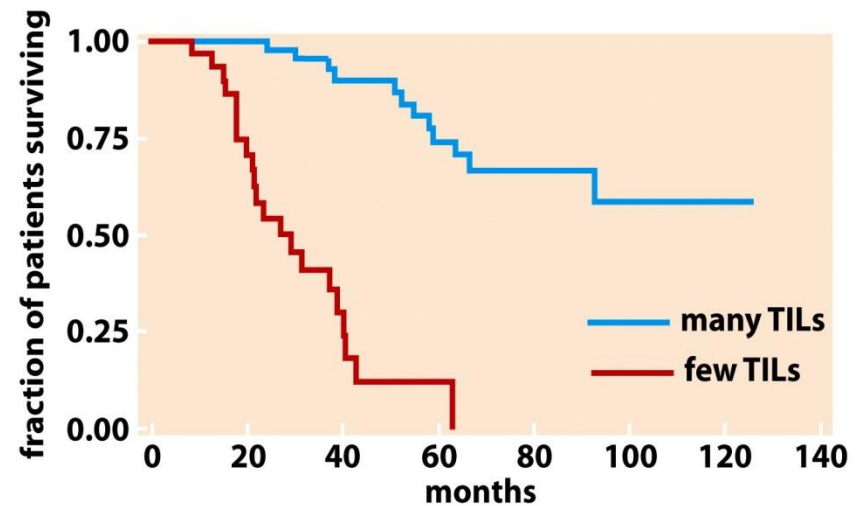
^aData from S.A Birkeland, H.H. Storm, L.U. Lamm et al., *Int. J. Cancer* 60:183–189, 1995, as adapted by J. Peto, *Nature* 411:390–395, 2001.

^bThese numbers represent the numbers of cases of the various cancers expected to occur in an age-matched control population over the same period of time.

Опухоли отличаются по содержанию в них Т-клеток (Tumor-Infiltrating Lymphocytes, TILs), что влияет на выживаемость пациентов



Рак ротовой полости, окраска антителами на CD3, экспрессируемый Т-клетками



Выживаемость пациентов с раком яичников в зависимости от содержания в опухолях Т-клеток

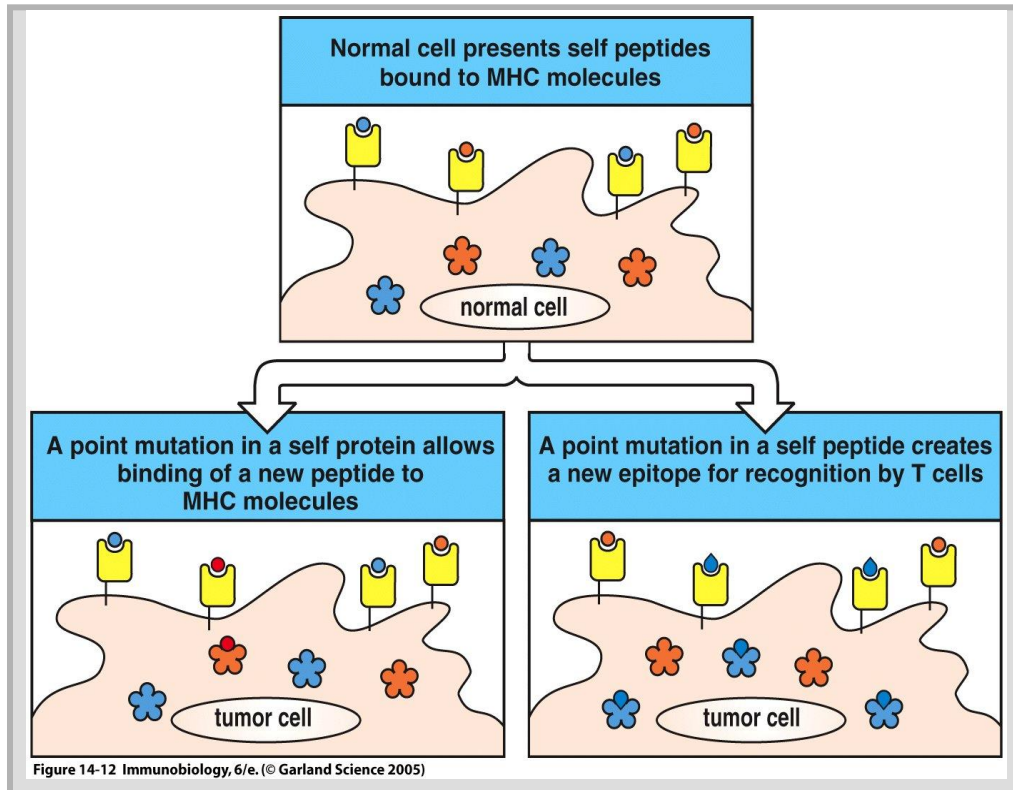
Антигены опухолевых клеток, распознаваемые цитотоксическими Т-клетками

- 1. Опухоль-специфические антигены (*Tumor-Specific Antigens, TSAs*)
(для мышей – *Tumor-Specific Transplantation Antigens, TSTAs*)**
- 2. Опухоль-ассоциированные антигены (*Tumor-Associated Antigens, TAAs*)
(для мышей – *Tumor Associated Transplantation Antigens, TATAs*)**

Опухоль-специфические антигены (TSAs) – мутантные онкобелки, опухолевые супрессоры и другие белки и/или пептиды, присутствующие в опухолевых клетках и отсутствующие в нормальных клетках.

Это не обязательно детерминанты канцерогенеза, но и «случайно» мутированные (вследствие генетической нестабильности) белки, обладающие сильной иммуногенностью.

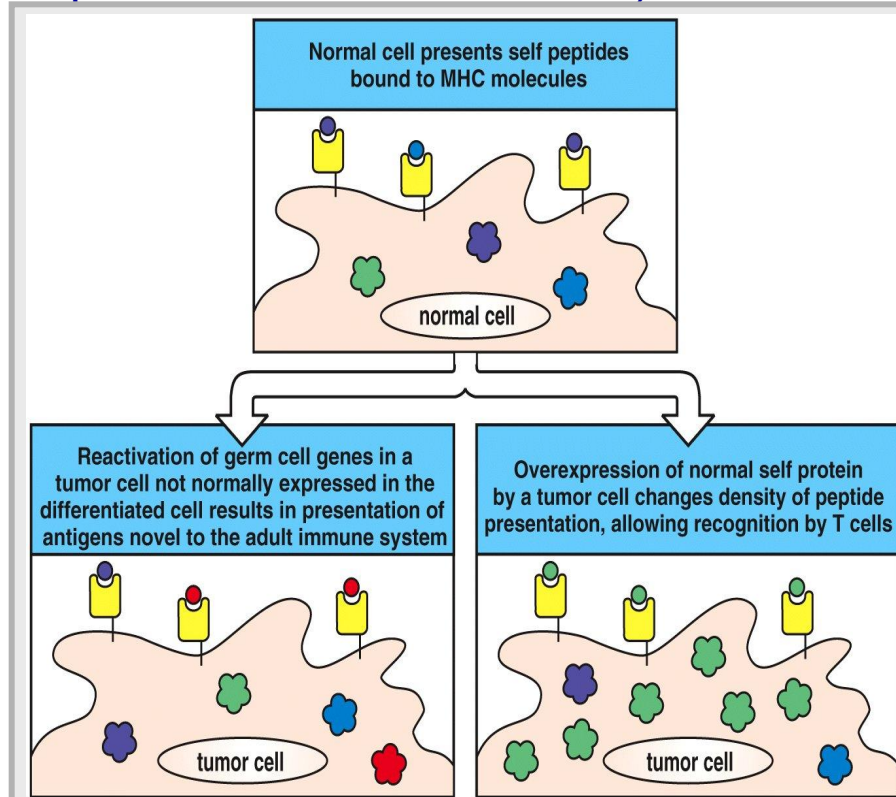
С другой стороны, многие важные для канцерогенеза мутации (Ras и др.) не создают значимые для отторжения антигены вследствие низкого содержания данных белков и/или их слабой иммуногенности.



Примеры TSAs:

Class of antigen	Antigen	Tumor type
Tumor-specific mutated oncogene or tumor suppressor	Cyclin-dependent kinase 4	Melanoma
	β-Catenin	Melanoma
	Caspase-8	Squamous cell carcinoma
Abnormal post-translational modification	MUC-1	Breast Pancreas

Опухоль-ассоциированные антигены (TAAs) – присутствующие в опухолевых клетках нормальные белки, к которым, в силу той или иной причины, не развилась иммунотолератность (не распознаются как «свои»)



Protein	Antigenic peptide
MAGE tyrosinase	EADPTGHSY, SAYGEPKRL
carcinoembryonic antigen (CEA)	MLLAVLYCL, YMNGTMSQV
HER2/Neu	YLSGANLNL
prostate-specific antigen (PSA)	KIFGSLAFL
	FLTPKKKLQCV, VISNDVCAQV

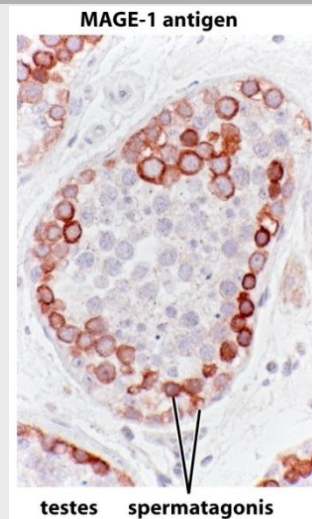
From R.A. Goldsby et al., *Immunology*, 5th ed. New York: Freeman, 2002:
 B.J. Van den Eynde and P. van der Bruggen, *Curr. Opin. Immunol.*
 9:684–693, 1997.

Class of antigen	Antigen	Nature of antigen	Tumor type
Germ cell	MAGE-1 MAGE-3	Normal testicular proteins	Melanoma Breast Glioma
Differentiation	Tyrosinase	Enzyme in pathway of melanin synthesis	Melanoma
	Surface Ig	Specific antibody after gene rearrangements in B-cell clone	Lymphoma
Abnormal gene expression	HER-2/neu	Receptor tyrosine kinase	Breast Ovary

MAGE-1 – представитель многочисленной (>50) группы тестис-специфических раковых антигенов (cancer-testis antigens, CTA; у женщин ни в одном типе клеток этих белков нет). В норме иммунные клетки не обучены их распознавать, так как:

- ряд типов тестикулярных клеток не экспрессируют MHC-I и не презентуют CTA иммунной системе;
- тестикулярные клетки являются иммунопривилегированными вследствие высокой продукции ими FasL.

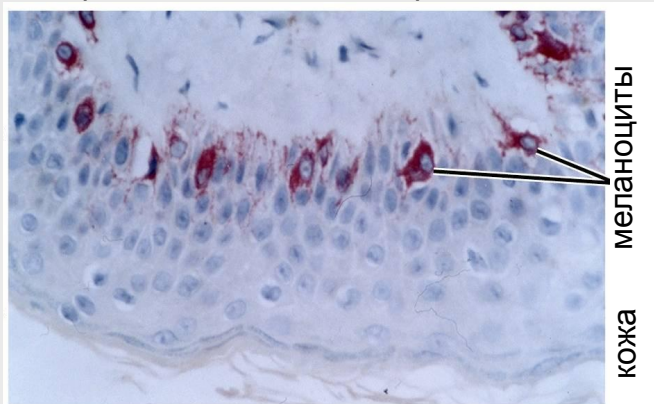
Во многих типах неопластических клеток гены CTA реактивированы вследствие их деметилирования.



Опухоль-ассоциированные антигены (TAAs) и паранеопластический синдром

Витилиго при меланомах

Окраска антителами к тирозиназе

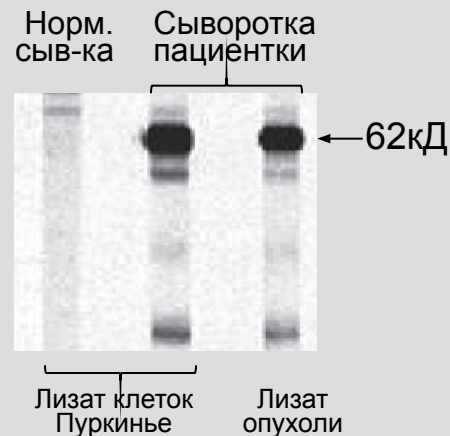
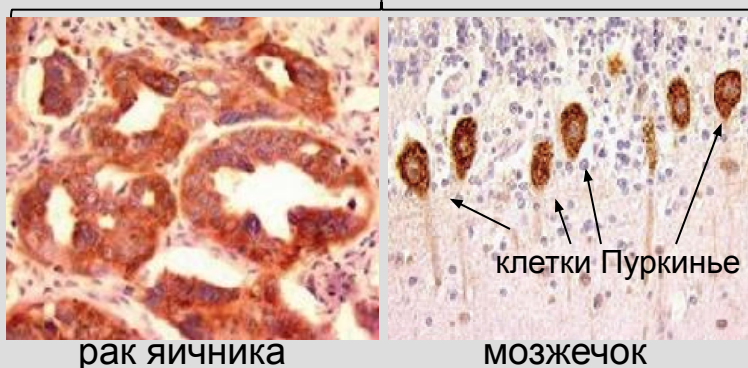


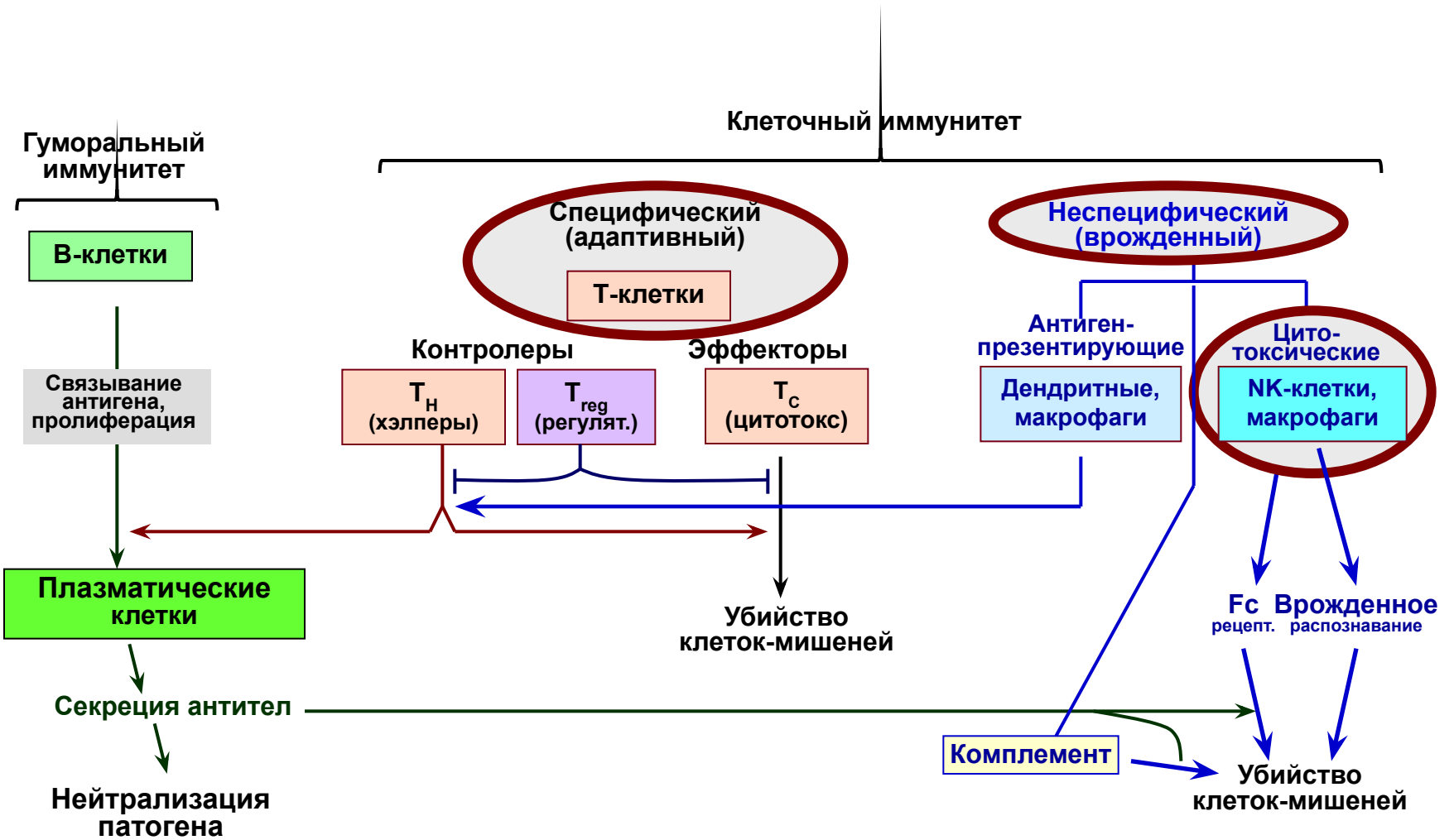
Исходно темнокожий пациент



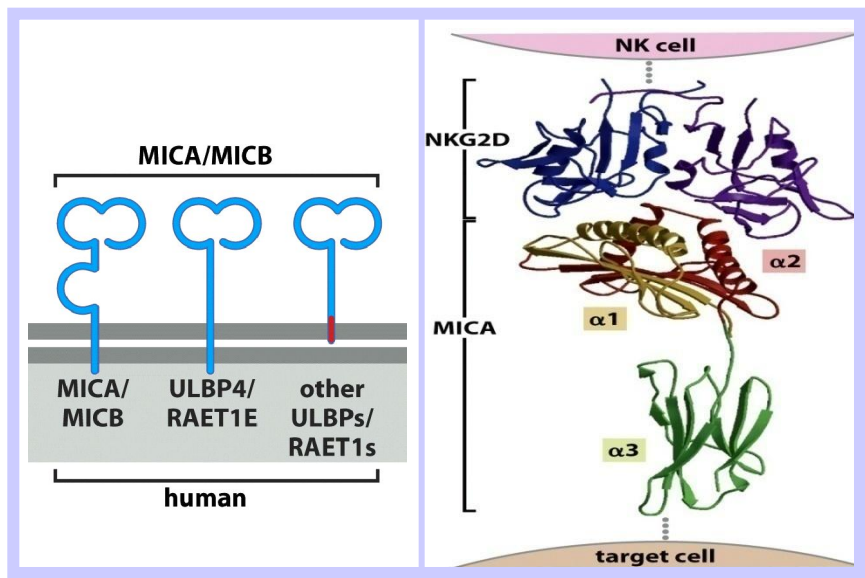
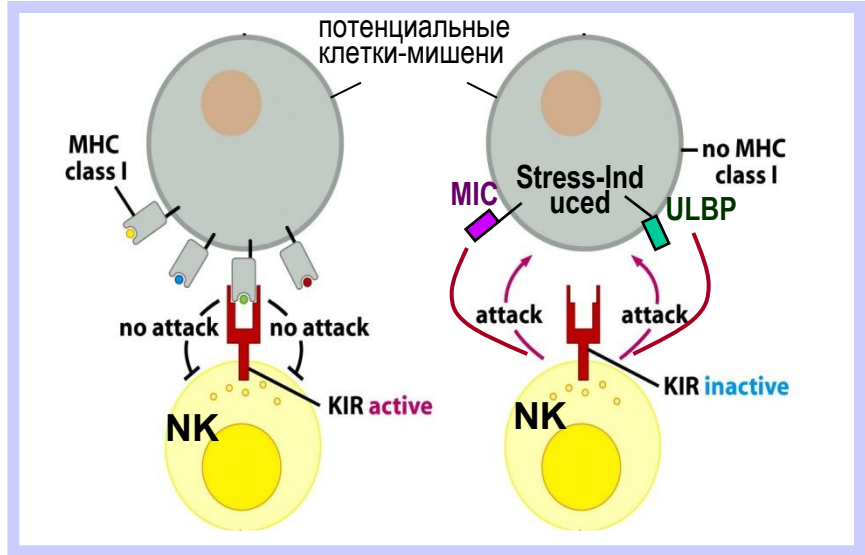
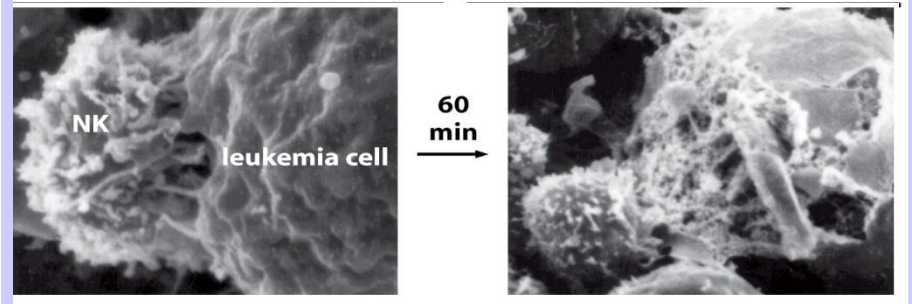
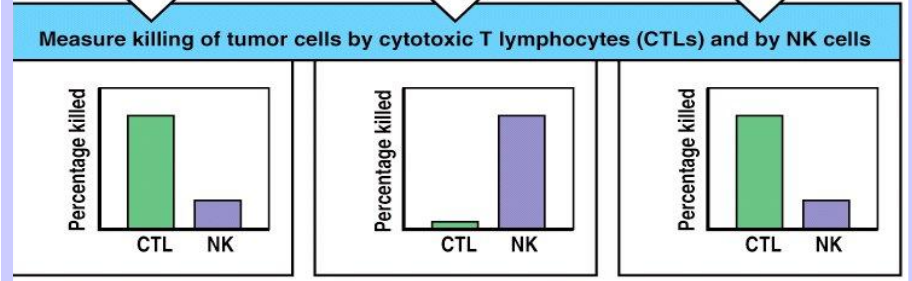
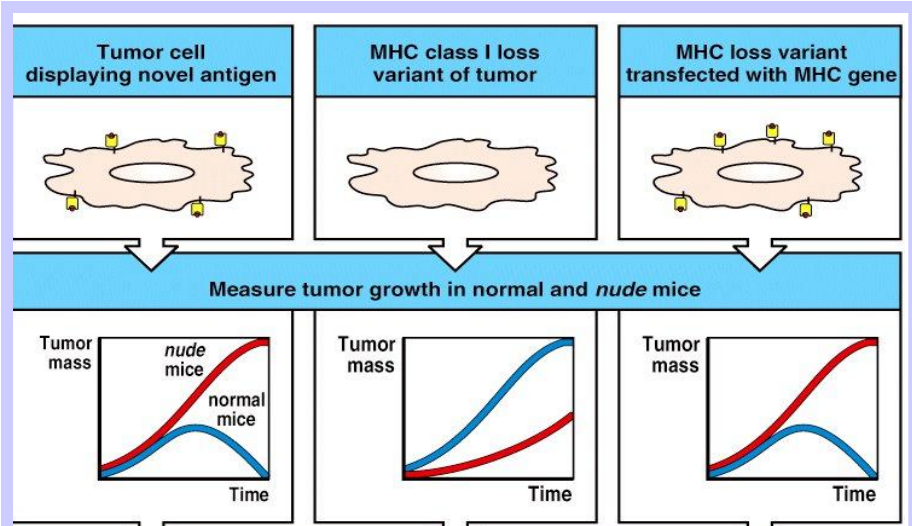
Паранеопластическая неврологическая дегенерация при мелкоклеточных раках легкого и других опухолях

Окраска сывороткой пациентки

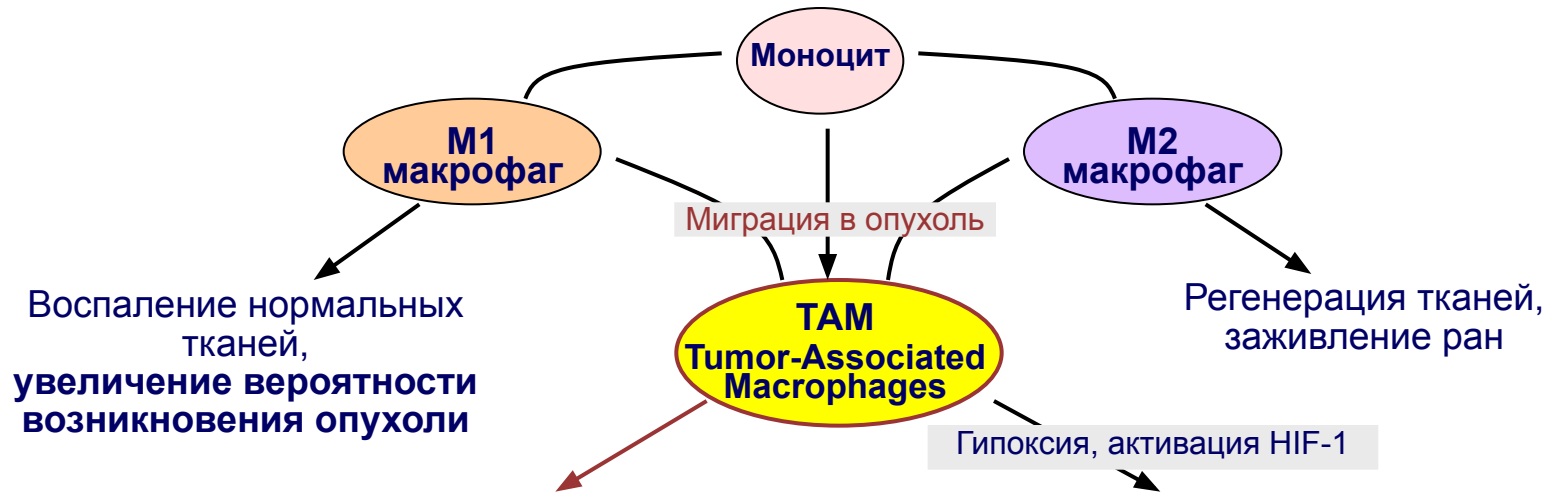




Противоопухолевый иммунный ответ у бестимусных мышей обеспечивают NK-клетки, активированные отсутствием взаимодействия их ингибиторного рецептора с MHC-I и экспрессией опухолевыми клетками MHC-подобных стресс-индуцируемых белков (MICA и др.)



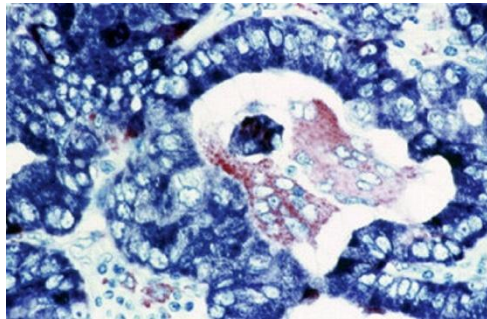
Многогранная роль макрофагов в канцерогенезе



Противоопухолевый эффект

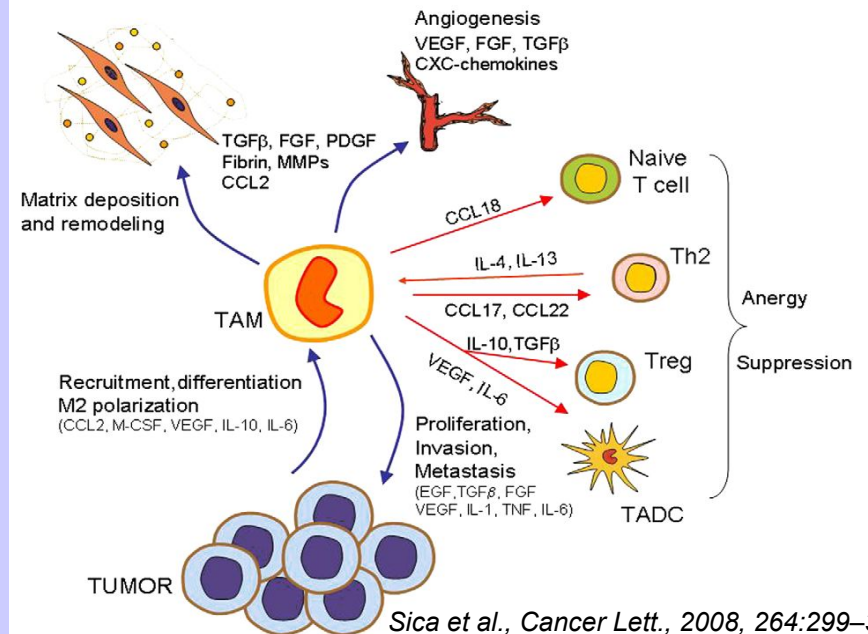
стимуляция Т-клеток

фагоцитоз опухолевых клеток

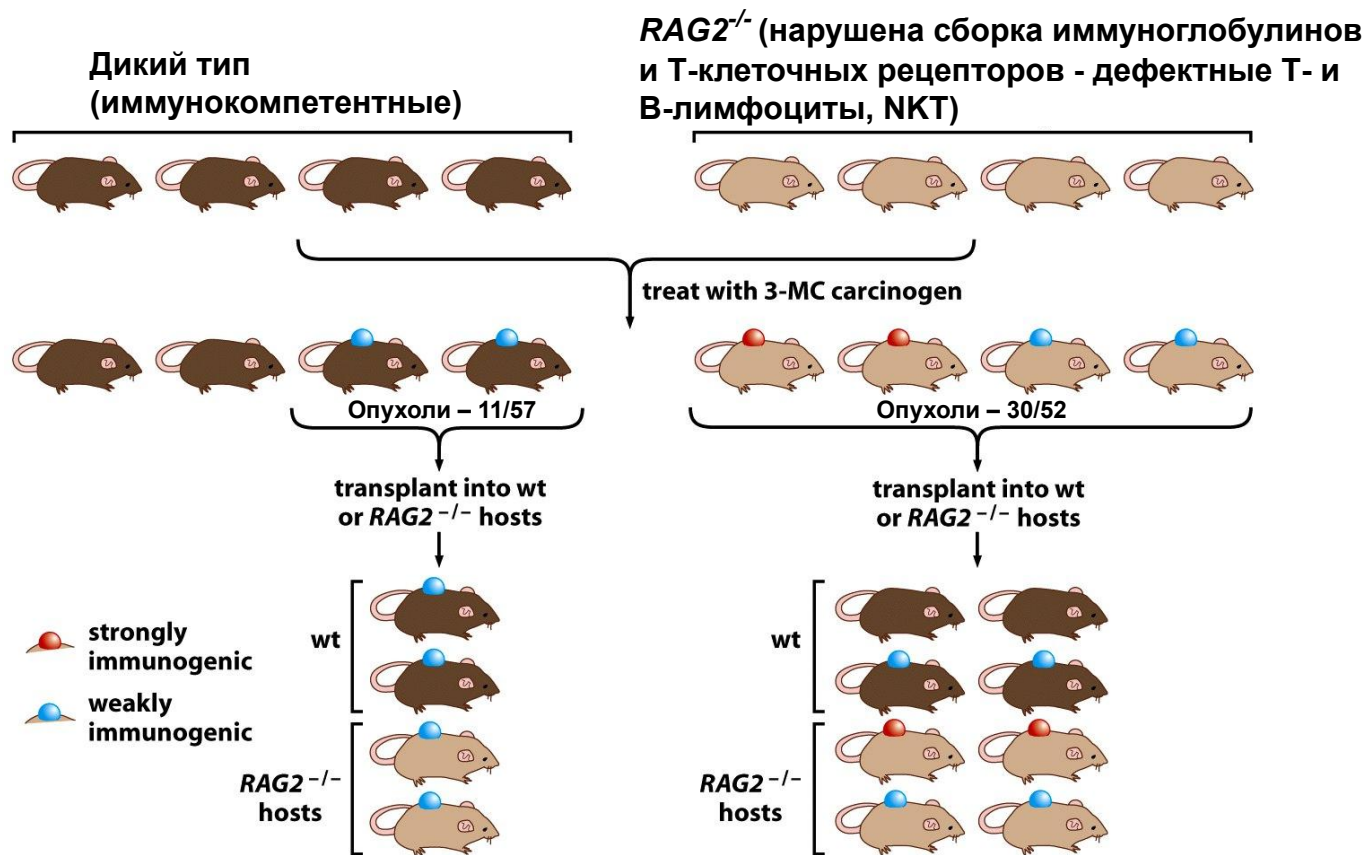
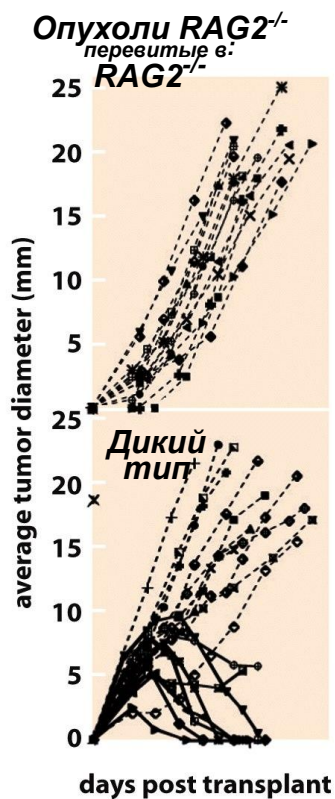


Папиллярный рак щитовидной железы

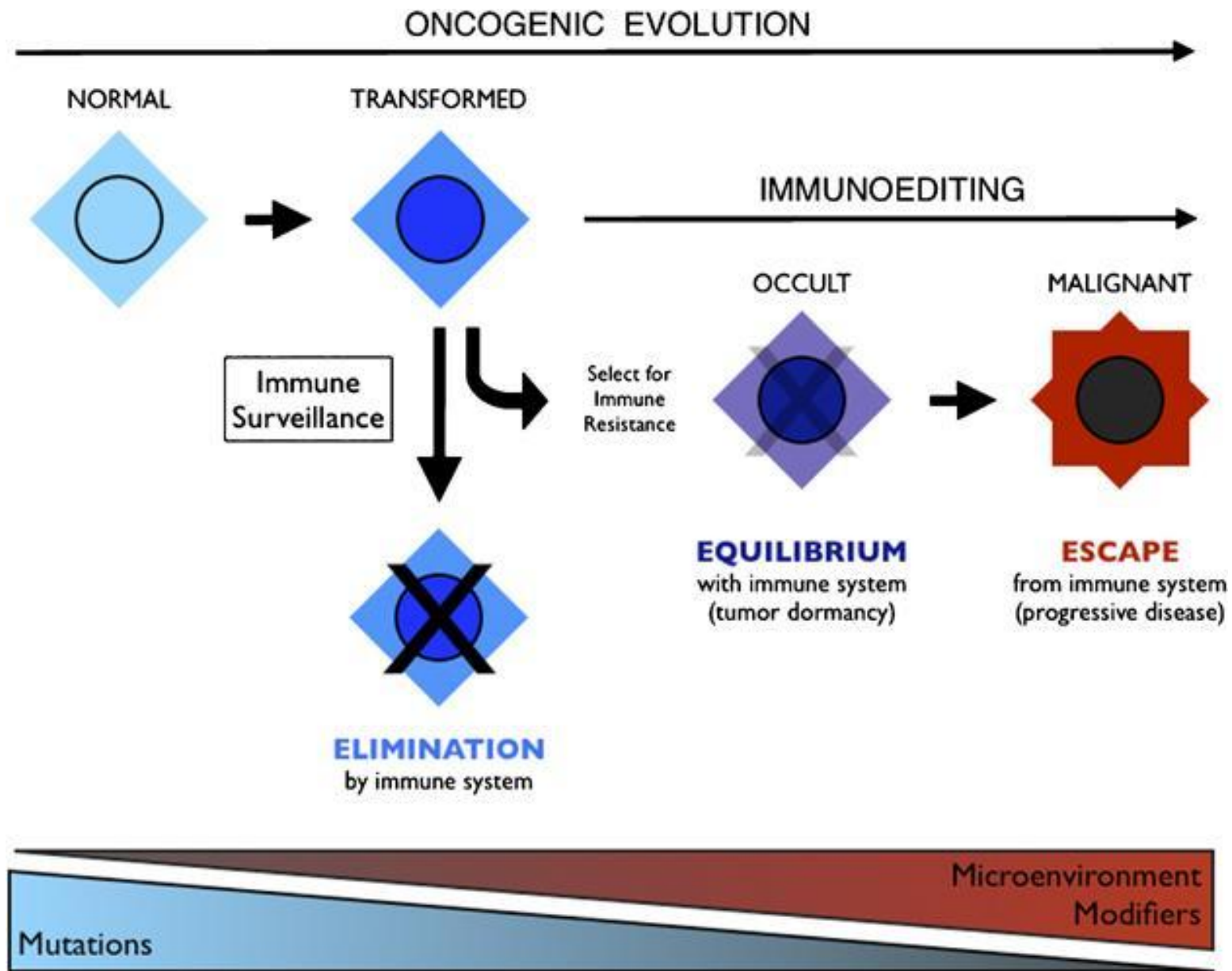
Стимуляция роста опухоли

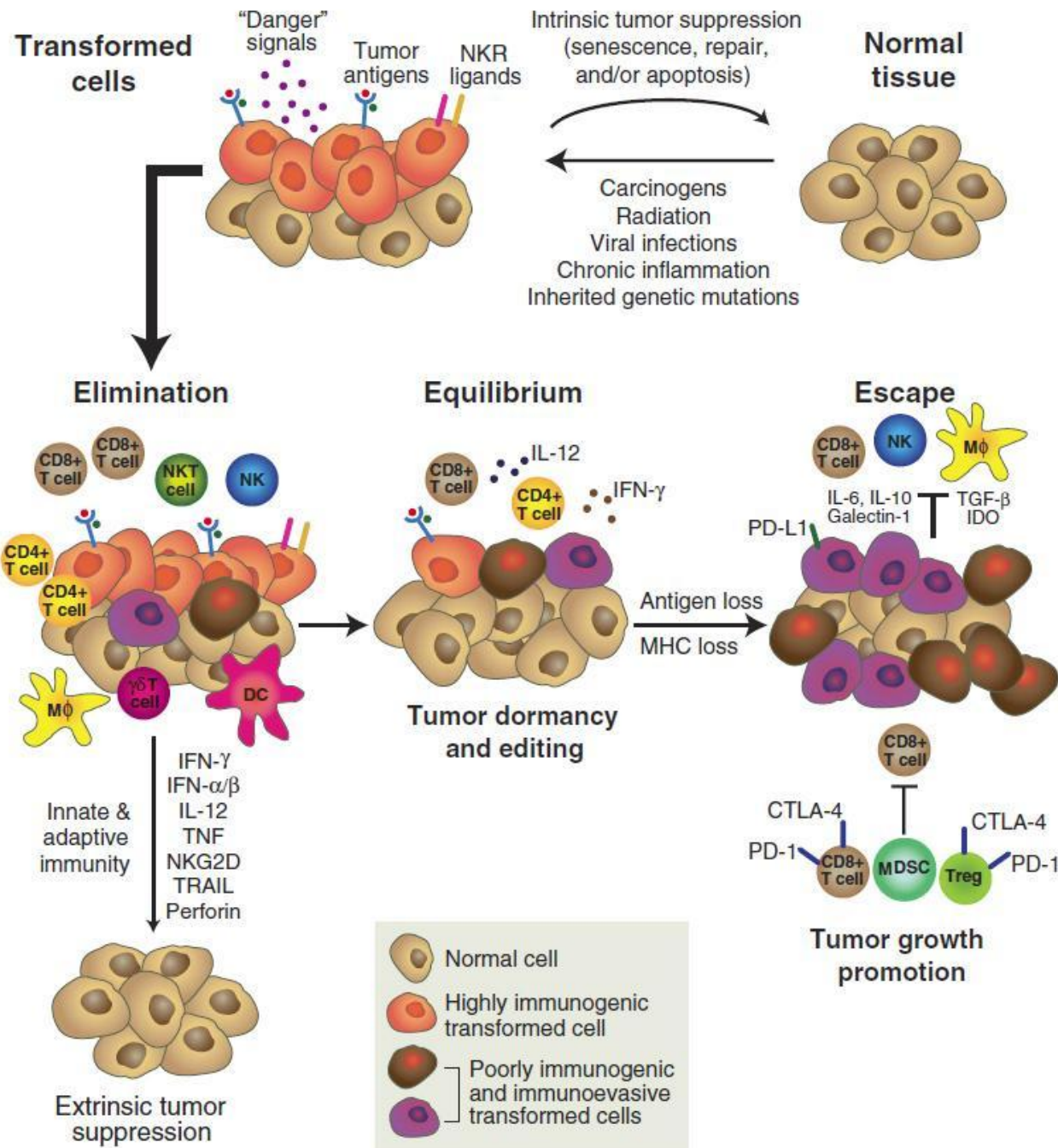


Эксперименты на мышах $RAG2^{-/-}$ указывают на «иммуноредактирование» (*immunoediting*) опухолевых клеток при развитии новообразований



У диких мышей не возникает сильно иммуногенных опухолей





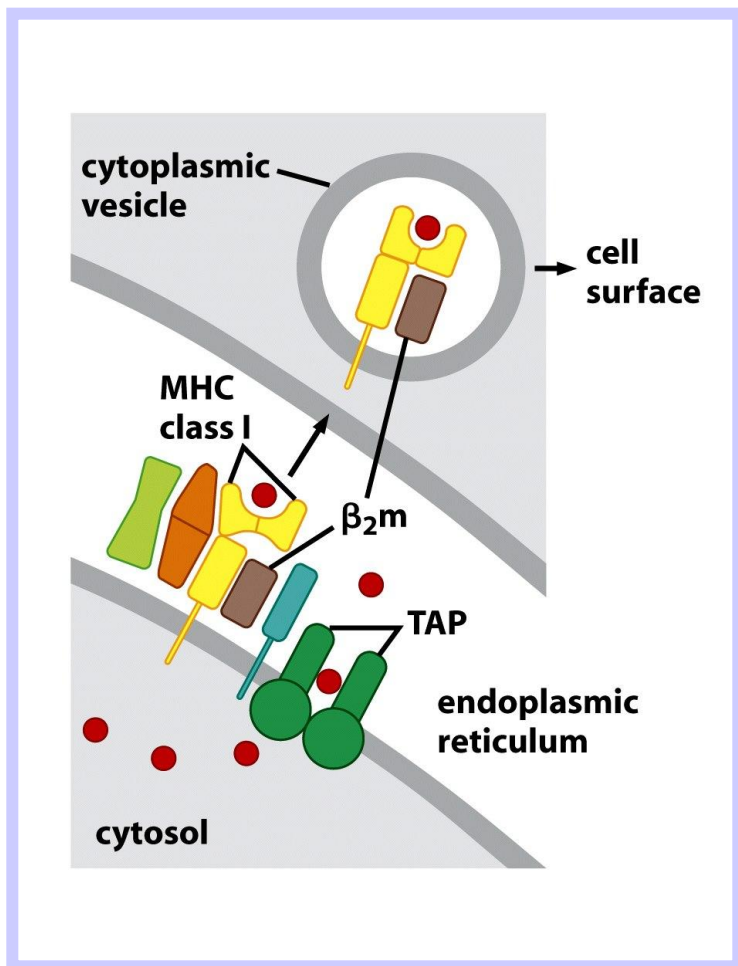
Как опухолевые клетки уходят от иммунологического надзора ?

- 1. Понижение иммуногенности опухолевых клеток**
- 2. Инактивация иммуночитов, создание защитного барьера**
- 3. Подавление внутриклеточных реакций, ведущих к смерти клетки при ее взаимодействии с иммуночитами, антителами и белками комплемента (*подавление апоптоза и др. – лекция 4*)**

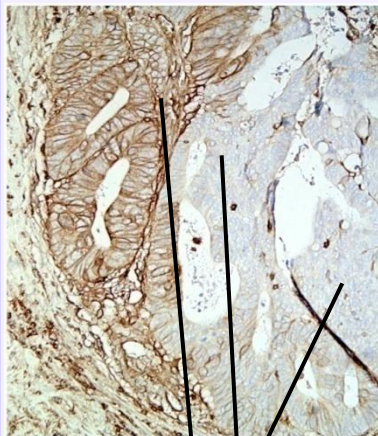
Ускользание от иммунного надзора:

1. Понижение иммуногенности опухолевых клеток

- а) потеря антигенов в ходе опухолевой прогрессии (метилирование и делеции генов, эндоцитоз рецепторов, связанных с антителами и др.)
- б) потеря белков, обеспечивающих презентацию антигенов (представителей МНС-I, β 2-микроглобулина, транспортеров TAP)

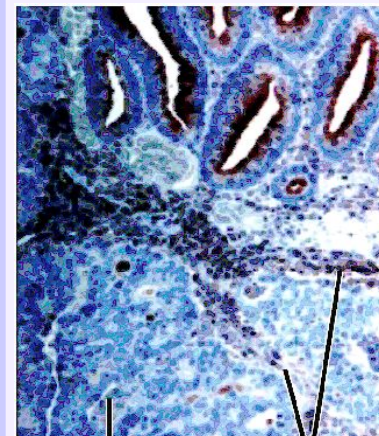


Рак толстой кишки, окраска на HLA-A



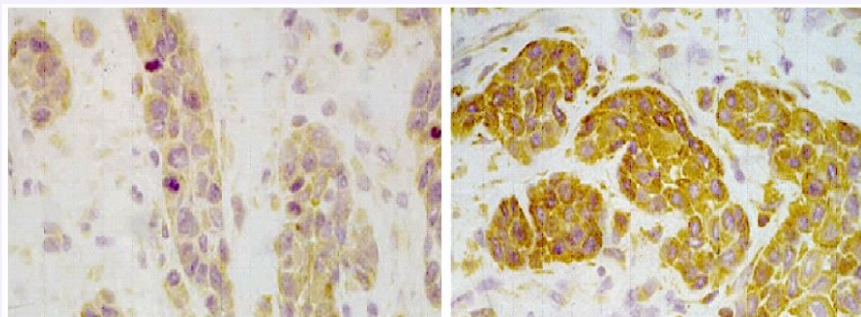
раковые клетки

Рак толстой кишки, окраска на β 2m



раковые клетки лимфоциты

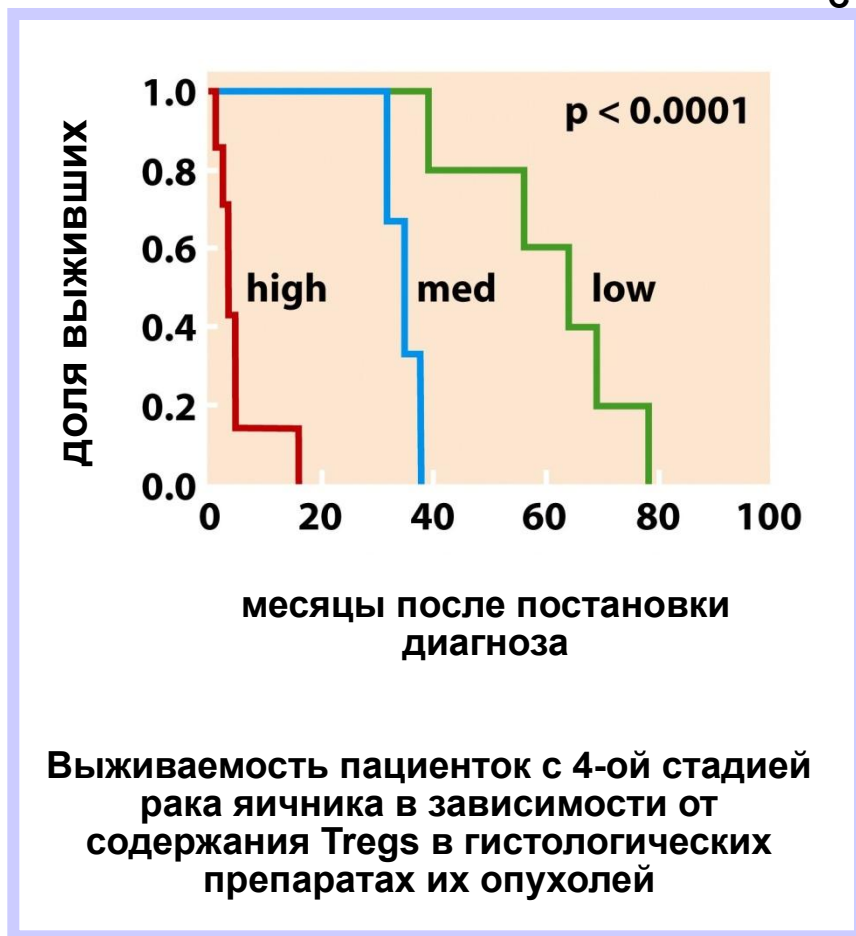
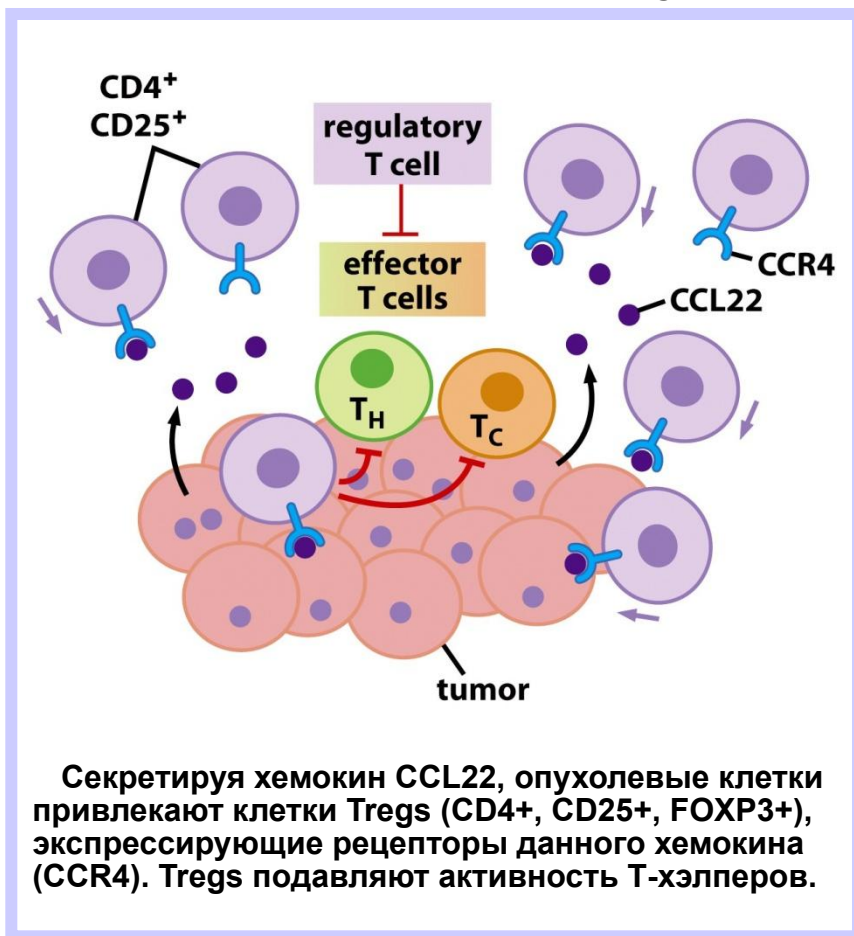
Различия в экспрессии TAP1 в 2-х плоскоклеточных раках



Ускользание от иммунного надзора:

2. Создание защитного барьера, инактивация иммуноцитов

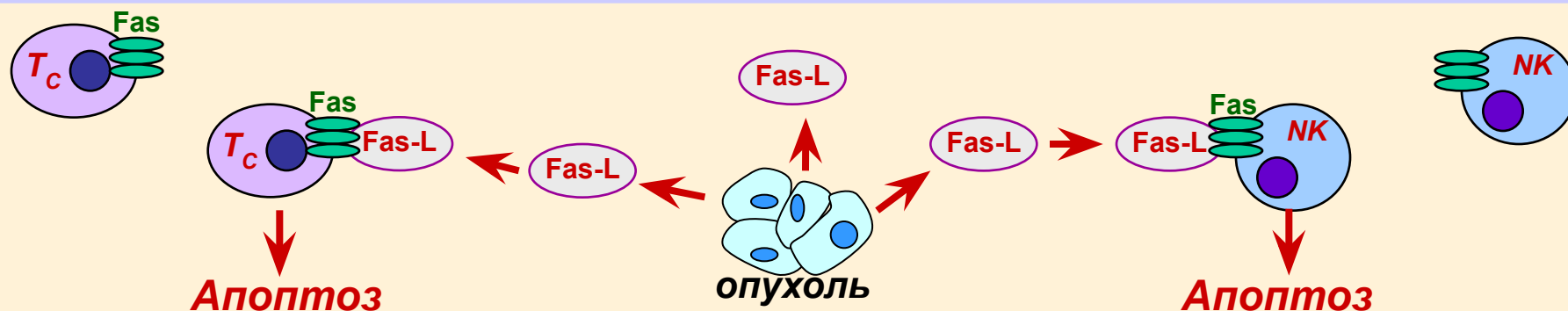
- секреция растворимых форм белка MICA, взаимодействующего с NKG2D рецепторами NK- и T_C -клеток, что ведет к их инактивации
- привлечение в опухоль регуляторных T_{reg} s, супрессирующих T_H и T_C
- экспрессия лигандов иммунных чекпоинтов (PD-L1, 2), подавляющих T_C



Ускользание от иммунного надзора:

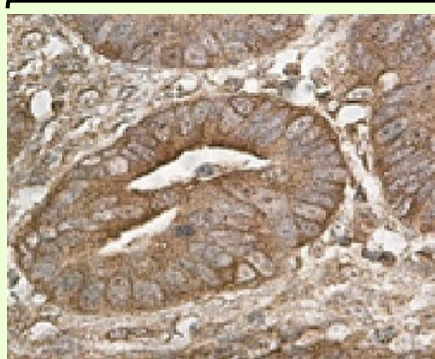
2. Создание защитного барьера, инактивация иммунцитов

в) стратегия «контратаки» (1) – потеря Fas и секреция FasL, убивающего Fas-позитивные NK- или T-клетки



Повышение экспрессии Fas-L в неопластических клетках может являться следствием гиперфункции в них транскрипционных факторов AP-1 и NF-kB, которые активируются многими онкогенами и осуществляют позитивную регуляцию гена *Fas-L*

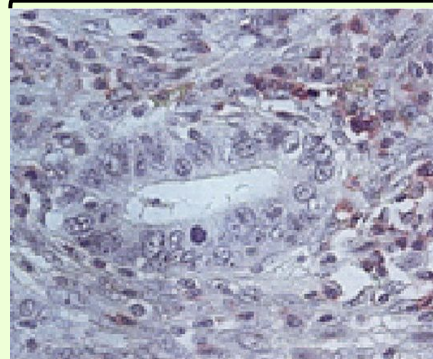
Два участка аденокарциномы толстой кишки



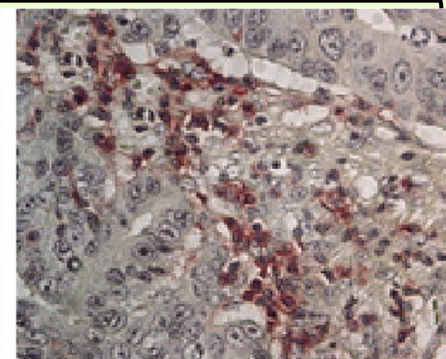
Много FasL,



мало TILs



Мало FasL,

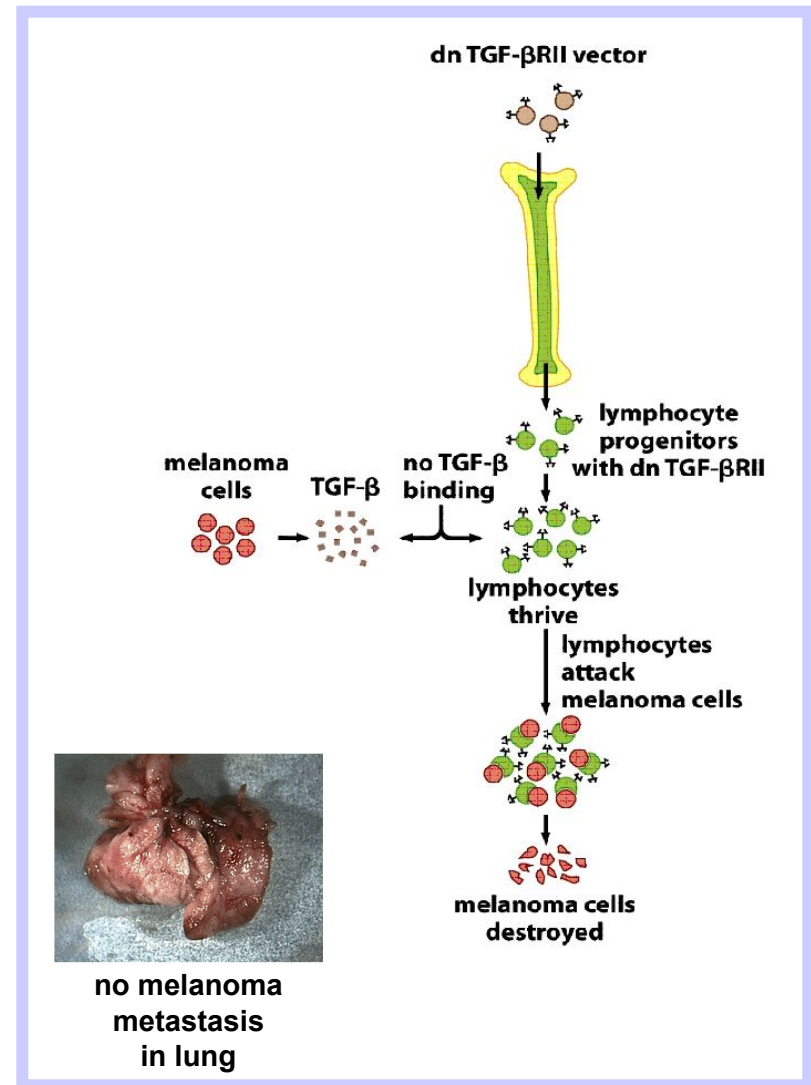
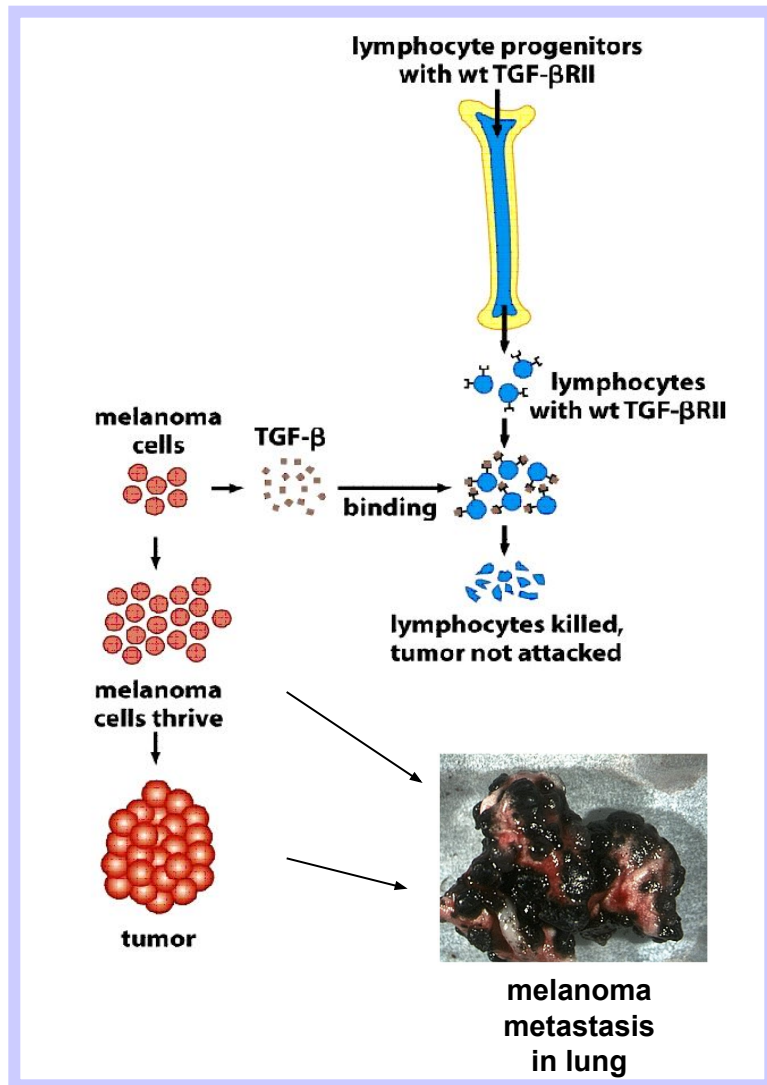


много TILs

Ускользание от иммунного надзора:

2. Создание защитного барьера, инактивация иммунцитов

г) стратегия «контратаки» (2) – секреция цитокинов TGF β и/или IL-10, индуцирующих апоптоз в Т-лимфоцитах

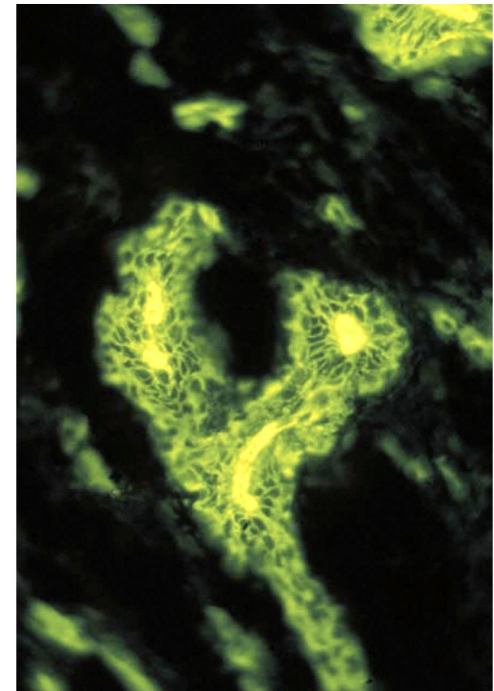
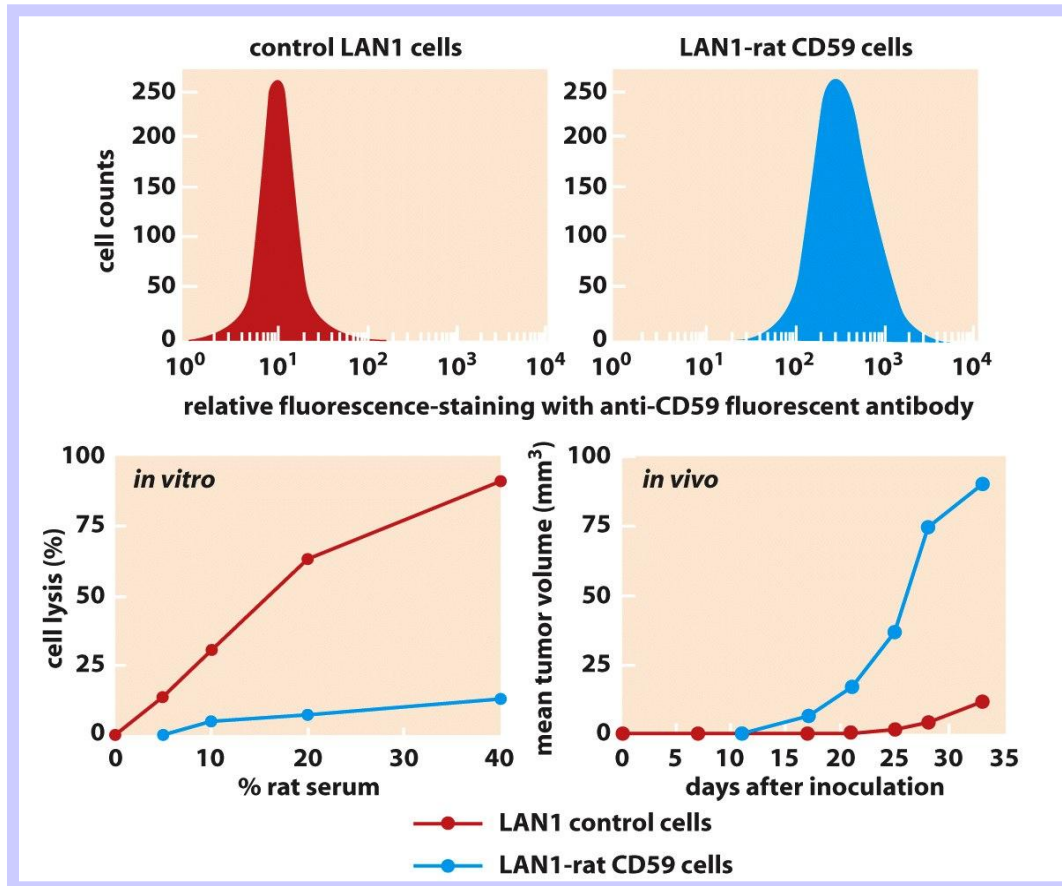


Ускользание от иммунного надзора:

2. Создание защитного барьера

д) подавление сборки киллерного комплекса комплемента (MAC, membrane-attack complex), ответственного за лизис клеток

Достигается путем повышенной экспрессии на поверхности клетки белков mCRPS (CD46, CD55, CD59), связывающих определенные компоненты комплемента, что препятствует образованию полноценного комплекса MAC



Протоковый рак молочной железы, окраска антителами к CD59

Курс «Биология опухолевой клетки»
(2019 г.)

Н.Л. Лазаревич

Лекция 11

Новые методы профилактики, диагностики, мониторинга и лечения рака, основанные на знаниях о механизмах канцерогенеза