

Злокачественный рост

Солидные опухоли
(раки, саркомы и др.)

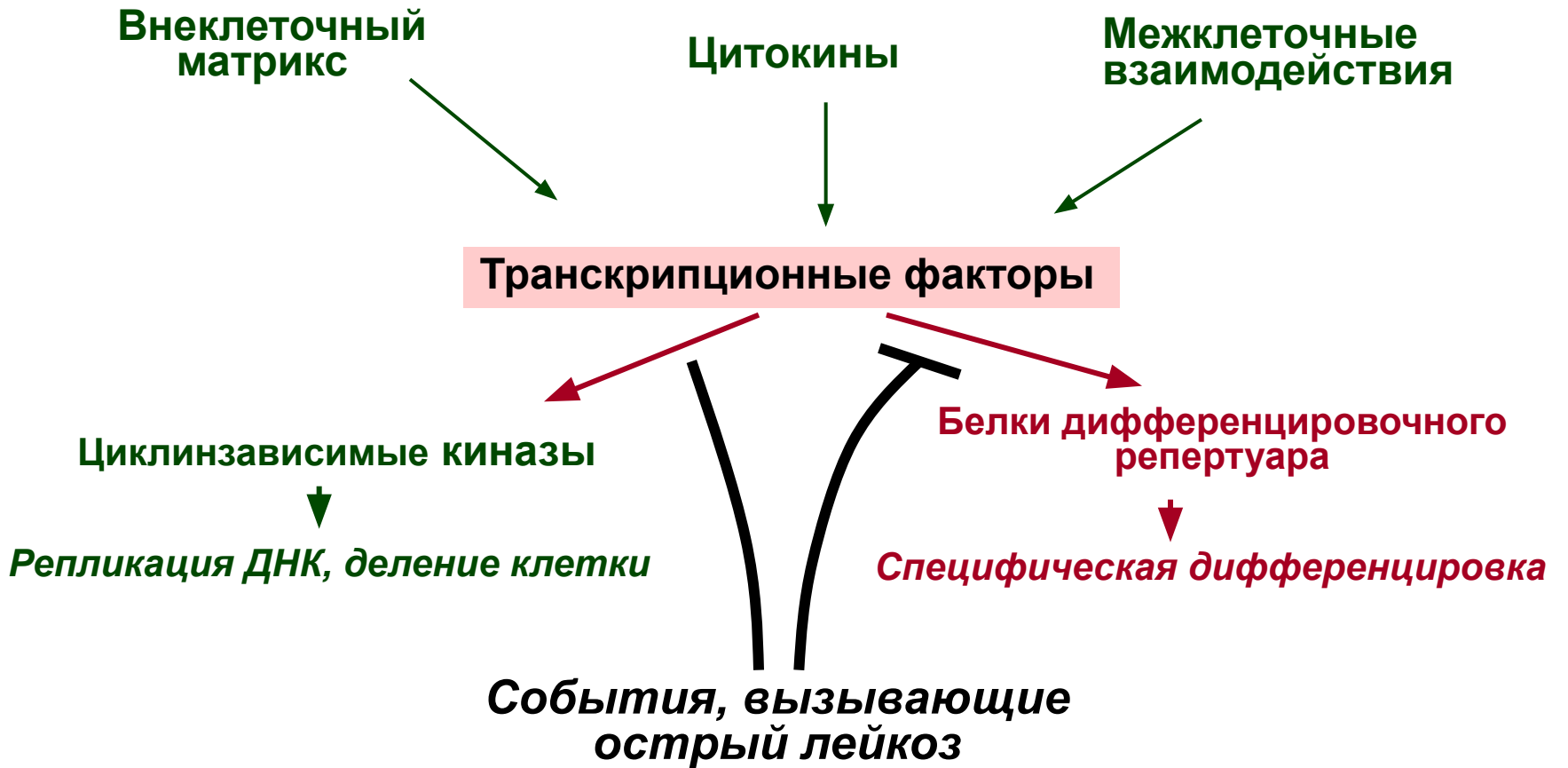
**Инвазия,
метастазирование**

**Интенсивное и
неограниченное во
времени деление
клеток**

Острые лейкозы

**Блок
дифференцировки**

Злокачественность лейкозов детерминируется блоком дифференцировки неопластических клеток, подавлением нормального кроветворения и возникающей в связи с этим недостаточностью функции костного мозга (гибель больных от инфекций, кровотечений и т.д.)



**Стимуляция размножения,
подавление апоптоза (класс 1)**

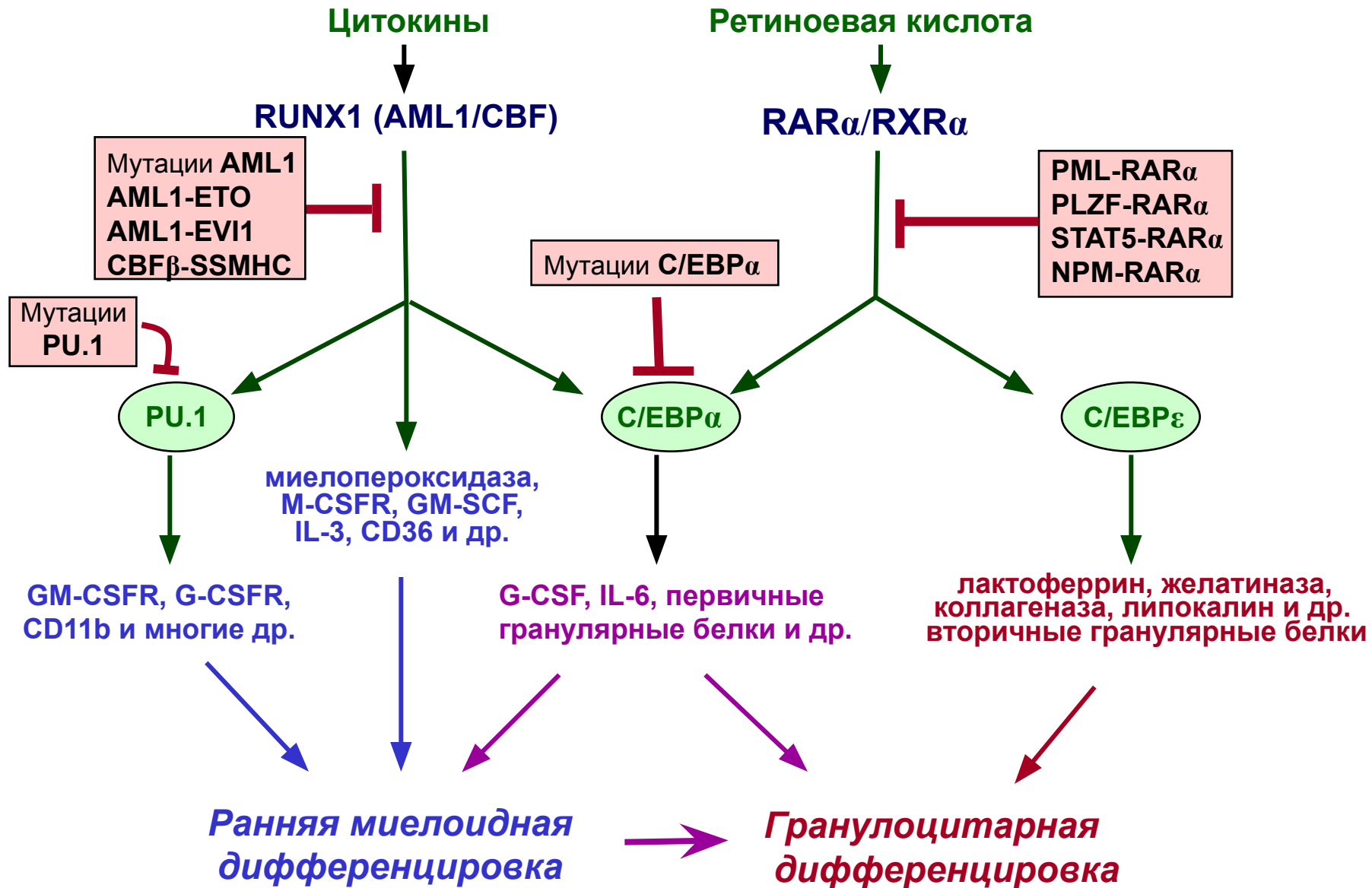
**Блок дифференцировки
класс 2**

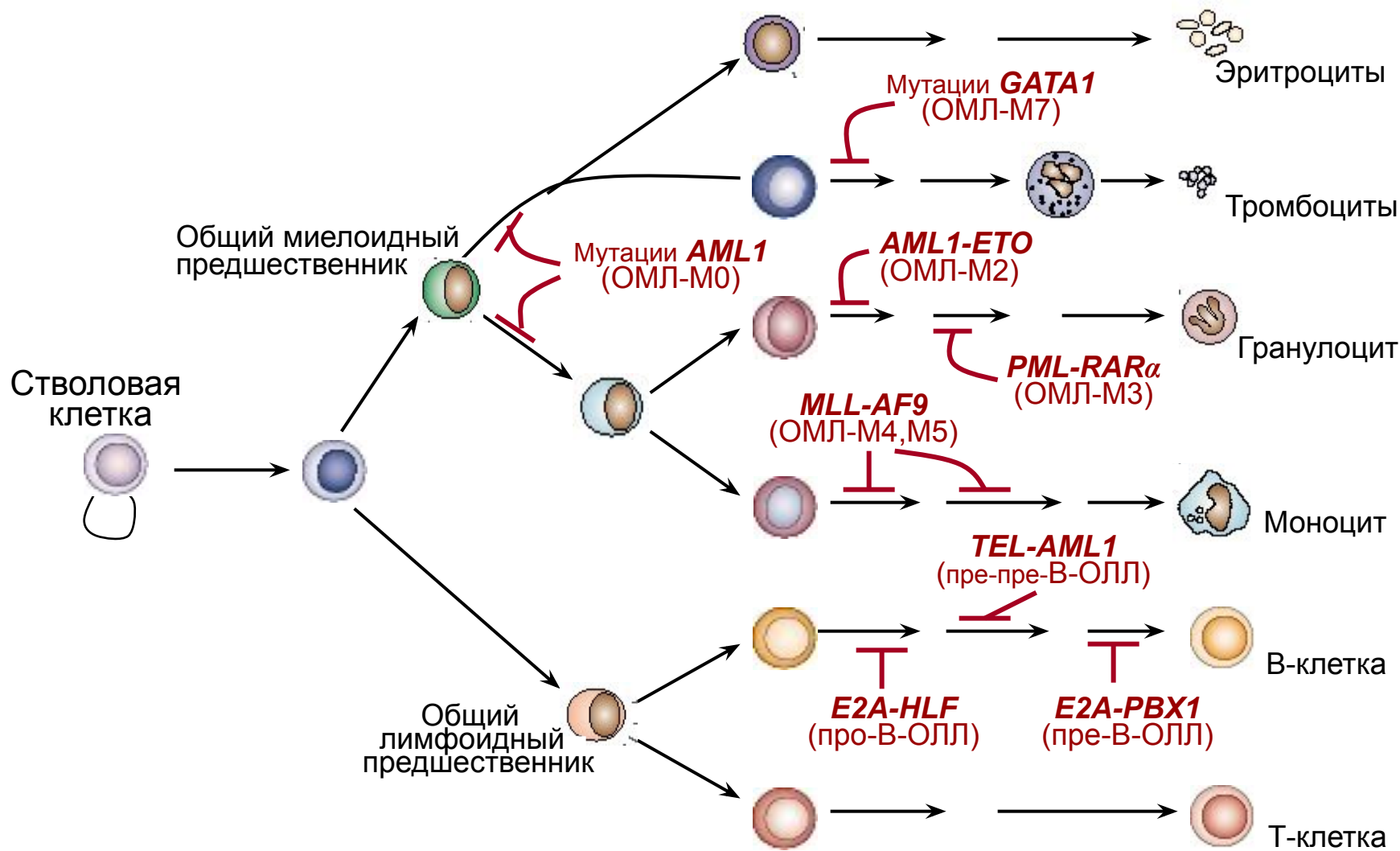
Мутации *FLT3*,
Мутации *RAS*,
Мутации *c-KIT*,
TEL-PDGFR β ,
BCR-ABL и др.

AML1-ETO,
CBF β -SMMHC,
RAR α -PML,
TEL-AML1;
Мутации *AML1*, *PU.1*,
GATA1, *C/EBP α* и др.

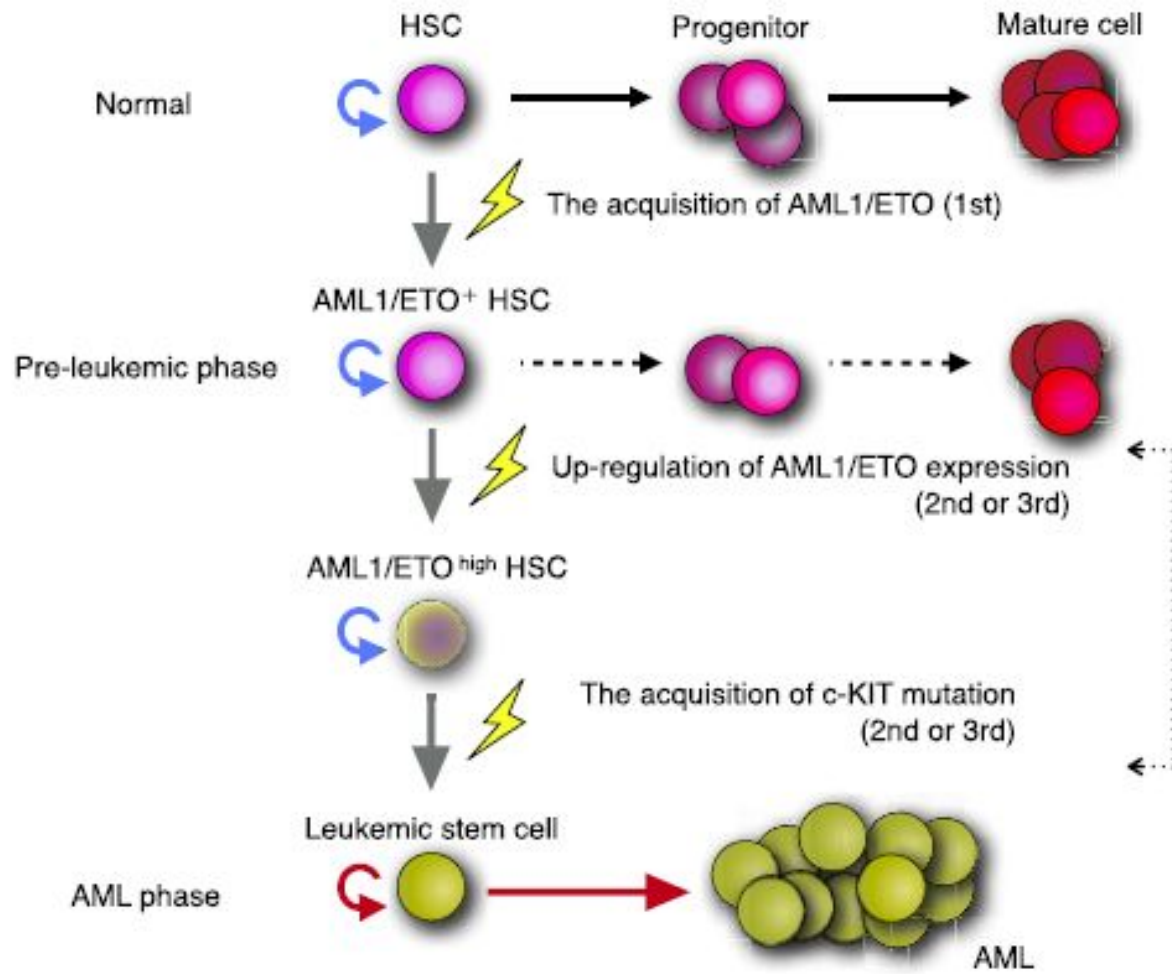
Острый лейкоз

Ранняя миелоидная дифференцировка и ее нарушение при остром миелобластном лейкозе





Мультистадийная схема развития лейкозов



Курс «Биология опухолевой клетки»

(2019 г.)

Н.Л. Лазаревич

Лекция 8

Опухолевый супрессор p53: как один белок контролирует многие аспекты канцерогенеза

“p53 is a protein of many talents ...”
K.Vousden, Cell, 2000

В PubMed число публикаций про p53 на 28.11.2019 - **97931**

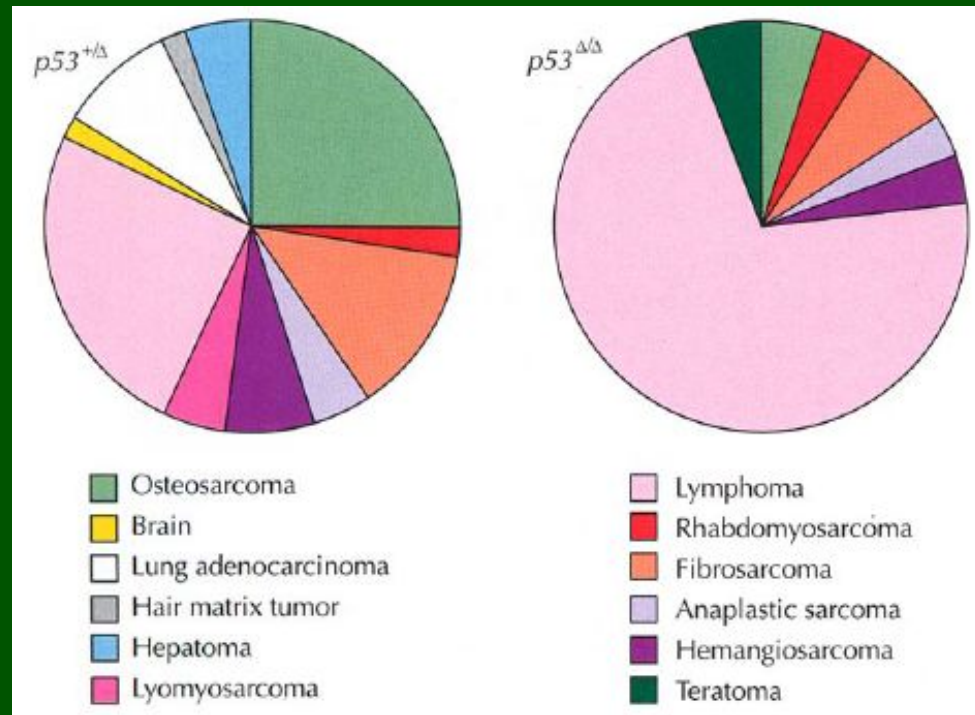
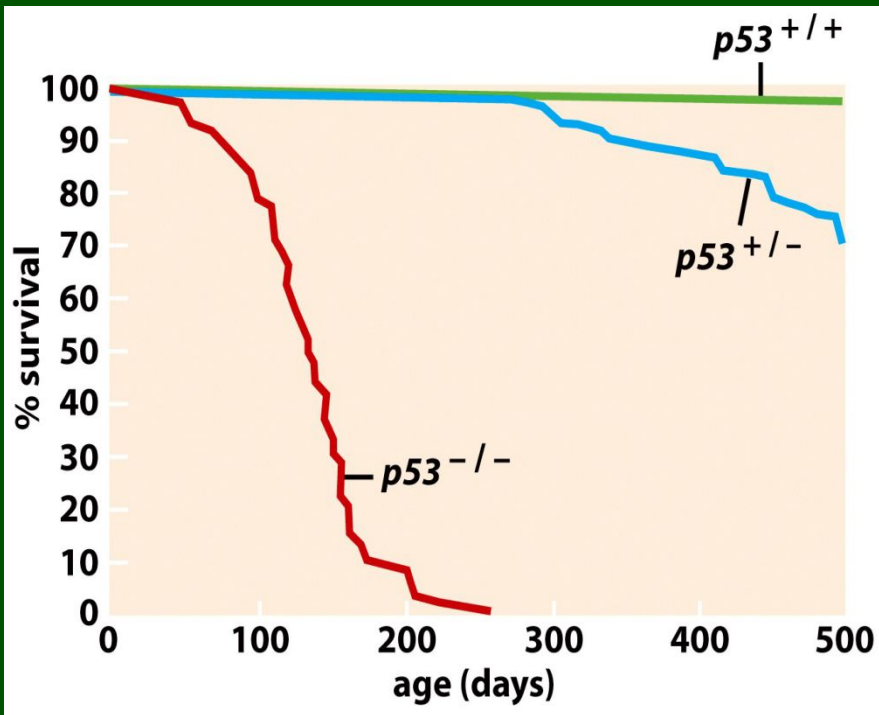


Дисфункция p53 (мутации и др. аномалии) – наиболее универсальное молекулярное изменение в опухолях человека. Она характерна для большинства новообразований 50 разных типов.

Врожденные мутации p53 в половых клетках ведут к синдрому Ли-Фраумени – наследственной предрасположенности к развитию в молодом возрасте сарком, рака молочной железы, опухолей мозга, лимфолейкозов, и других новообразований.

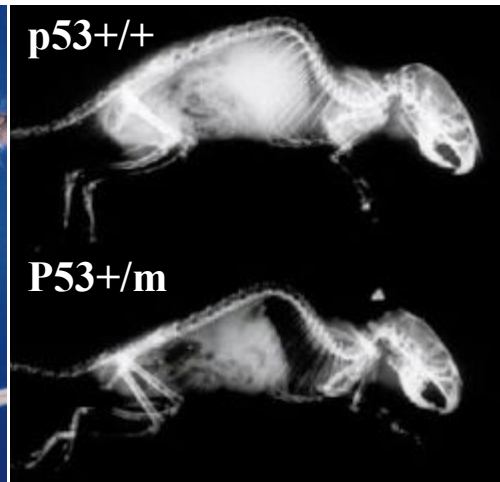
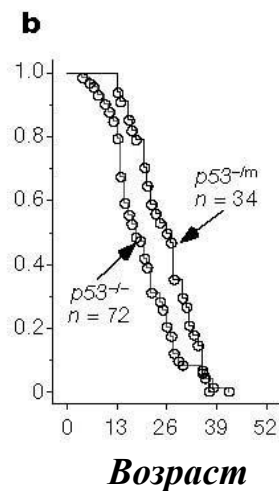
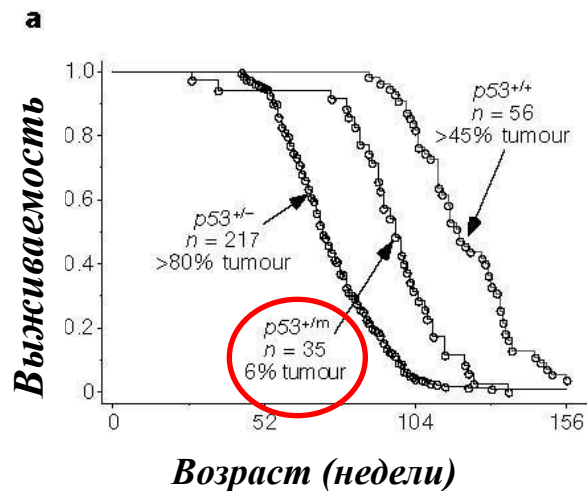
Манипуляции с геном p53 у мышей:

- Гомозиготный нокаут гена p53 приводит к развитию новообразований в молодом возрасте у 95-100% животных



Манипуляции с геном p53 у мышей:

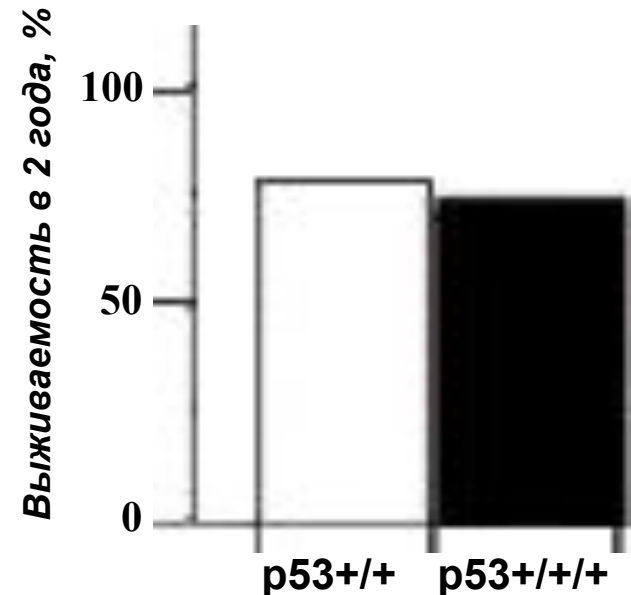
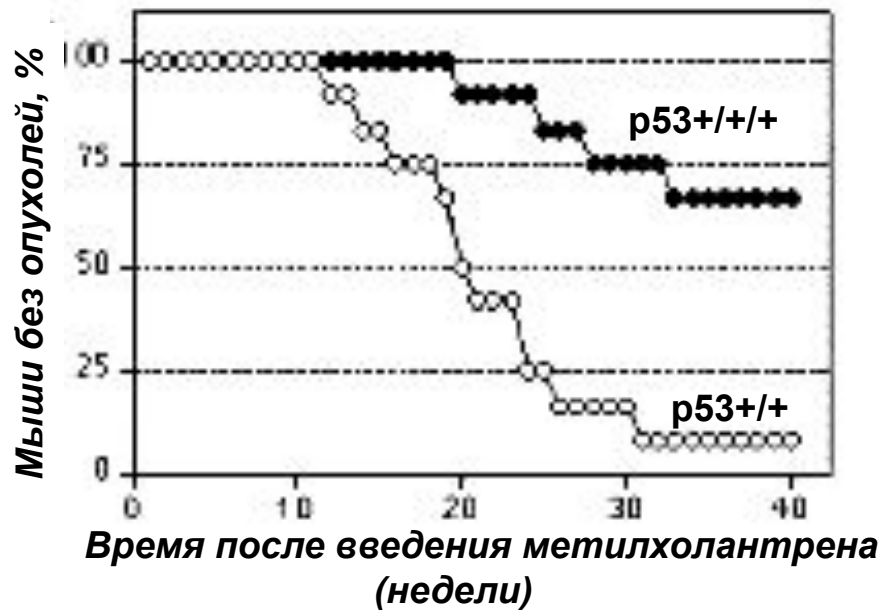
- 1) Гомозиготный нокаут гена p53 приводит к развитию новообразований в молодом возрасте у 95-100% животных;
- 2) У животных, экспрессирующих мутантный (m) “гиперактивный” p53, опухоли не возникают, но наблюдается преждевременное старение.



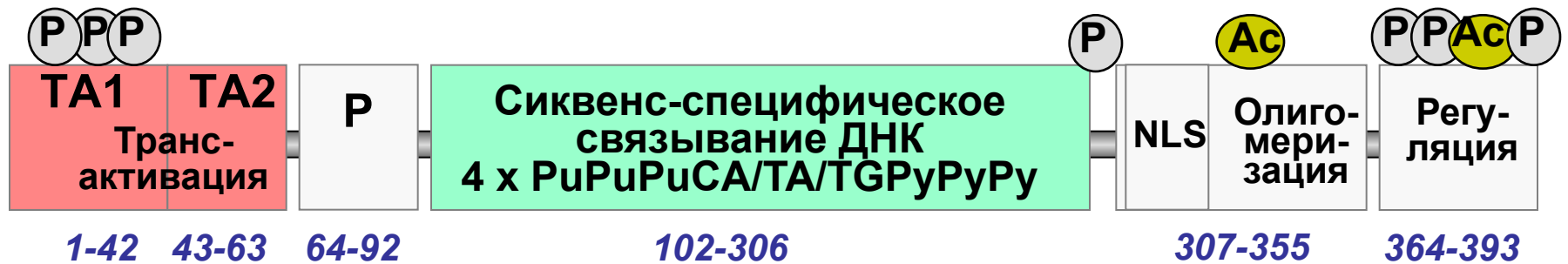
20 недель

Манипуляции с геном p53 у мышей:

3) У трансгенных животных с дополнительной копией нормального гена p53 ниже вероятность развития опухолей (спонтанных и индуцированных химическими канцерогенами). При этом нет преждевременного старения



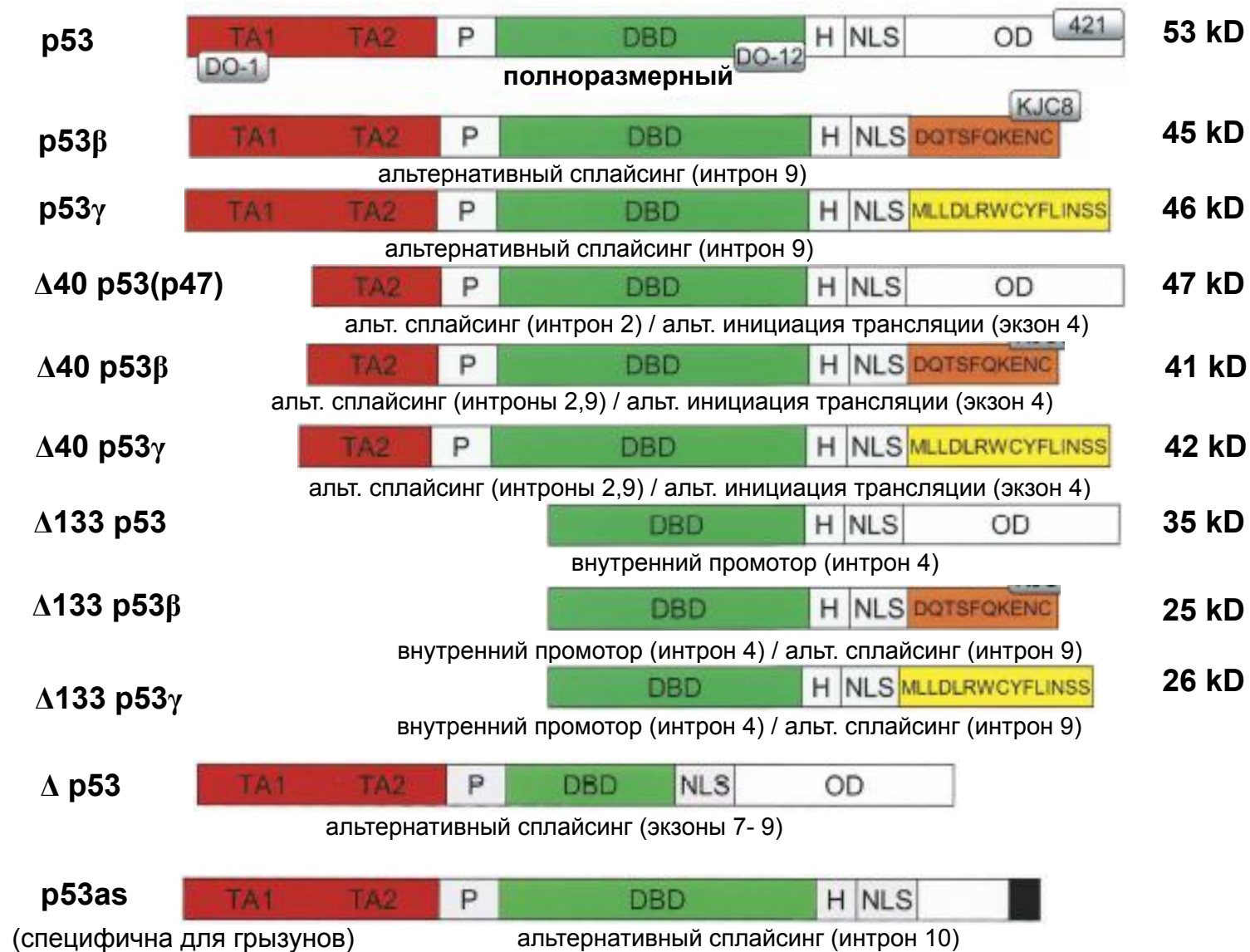
Структурные домены полноразмерного p53



Ⓟ - сайты фосфорилирования; Ⓜ - сайты ацетилирования

Р – пролин-богатый домен (взаимодействие с другими белками)

Изоформы p53



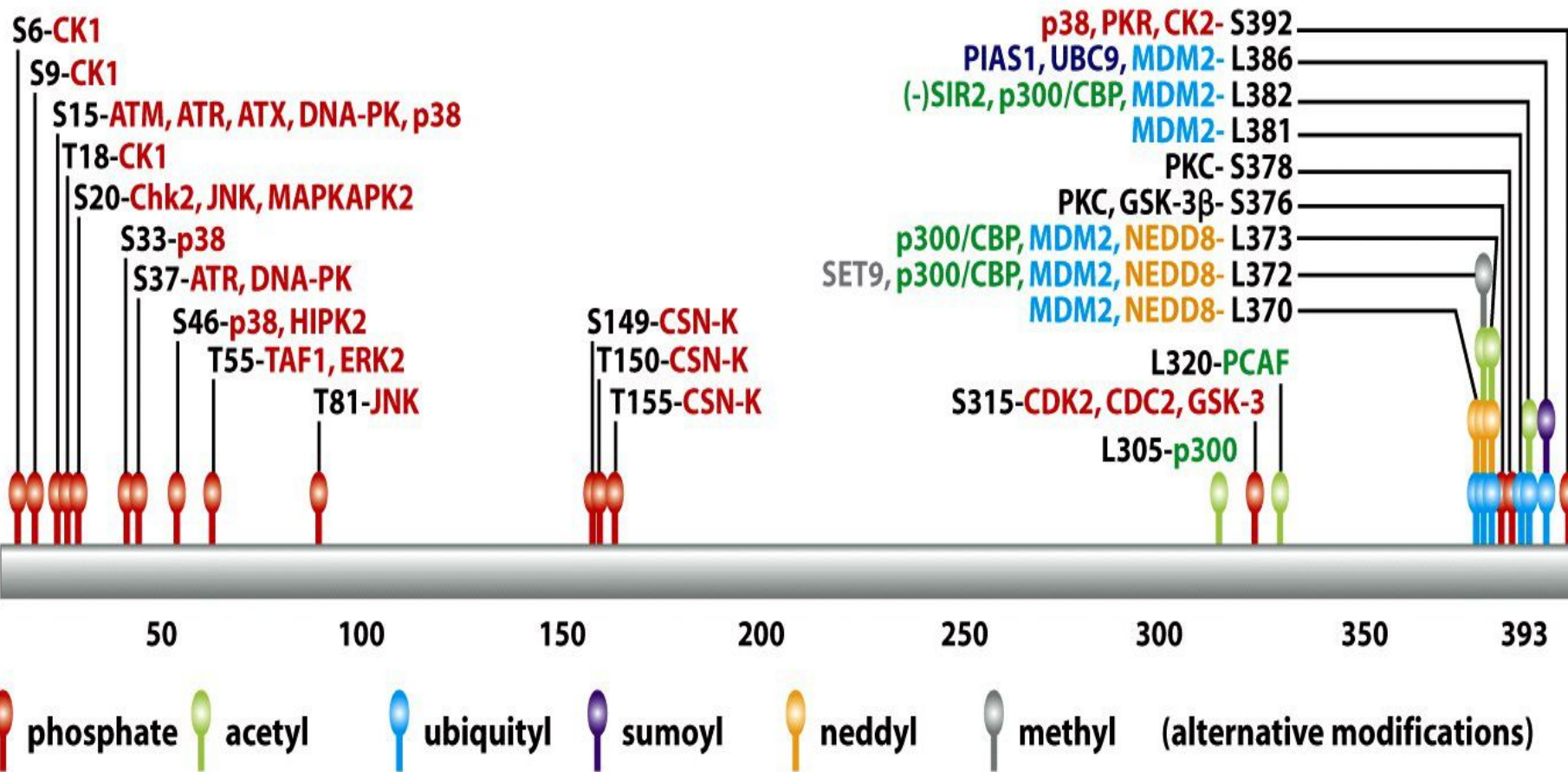


Конформация молекул белка p53 претерпевает значительные изменения

В зависимости от приобретаемой конформации p53 способен:

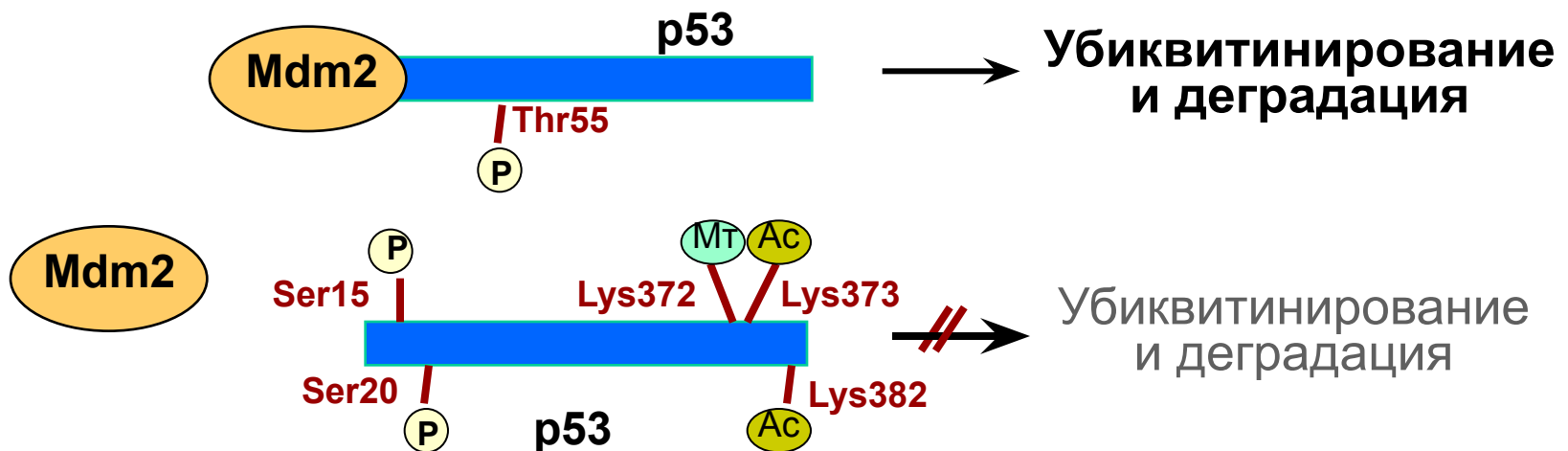
- ✓ Повышать транскрипцию определенных генов;
- ✓ Подавлять транскрипцию ряда генов;
- ✓ Стимулировать репарацию ДНК;
- ✓ Подавлять репликацию ДНК вирусов;

Конформация и функции p53 регулируются фосфорилированием, ацетилированием, убиквитинированием, сумоилированием, неддилированием, метилированием, окислением и др.



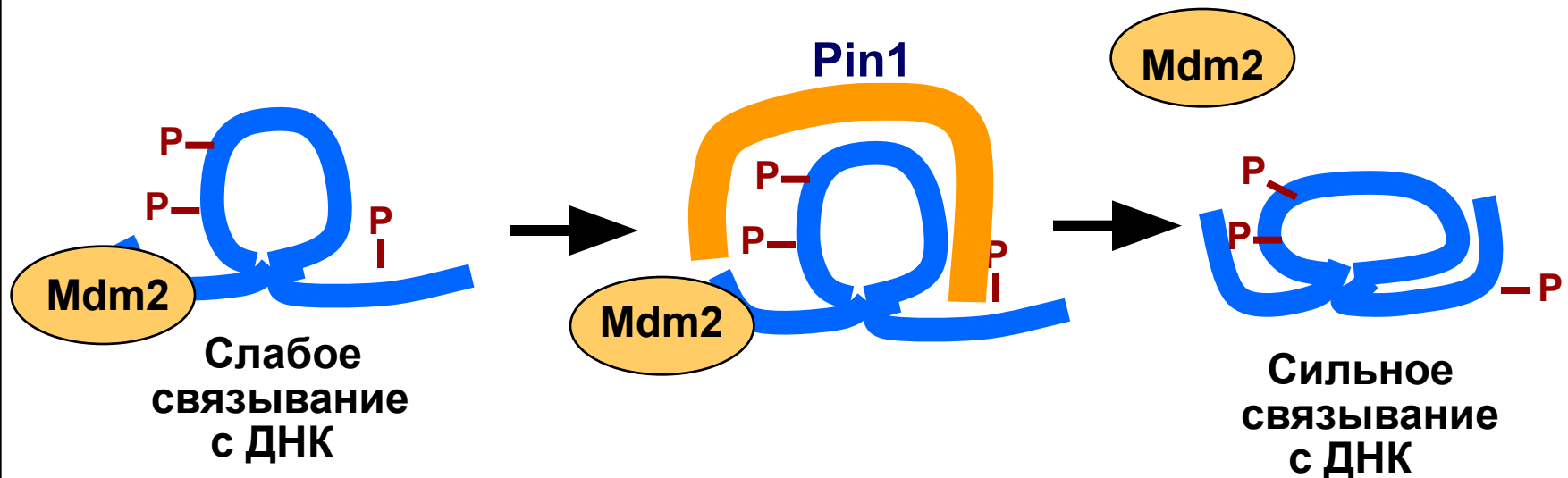
Конформация и функции p53 регулируются фосфорилированием, ацетилированием, убиквитинированием, сумоилированием, неддидированием, метилированием, окислением и др. **Вызываемые этими событиями модификации конформации p53 изменяют его способность связываться с другими белками и ДНК**

а) фосфорилирование N-конца (Ser15, Ser20), дефосфорилирование Thr55, ацетилирование C-конца (Lys373, Lys382) и/или метилирование C-конца (Lys372) **увеличивают время жизни/содержание и активность p53**



б) фосфорилирование *Ser33*, *Thr81*, *Ser315* вызывает взаимодействие с белком *Pin1* (пролин-пептидил-цис/транс-изомеразой).

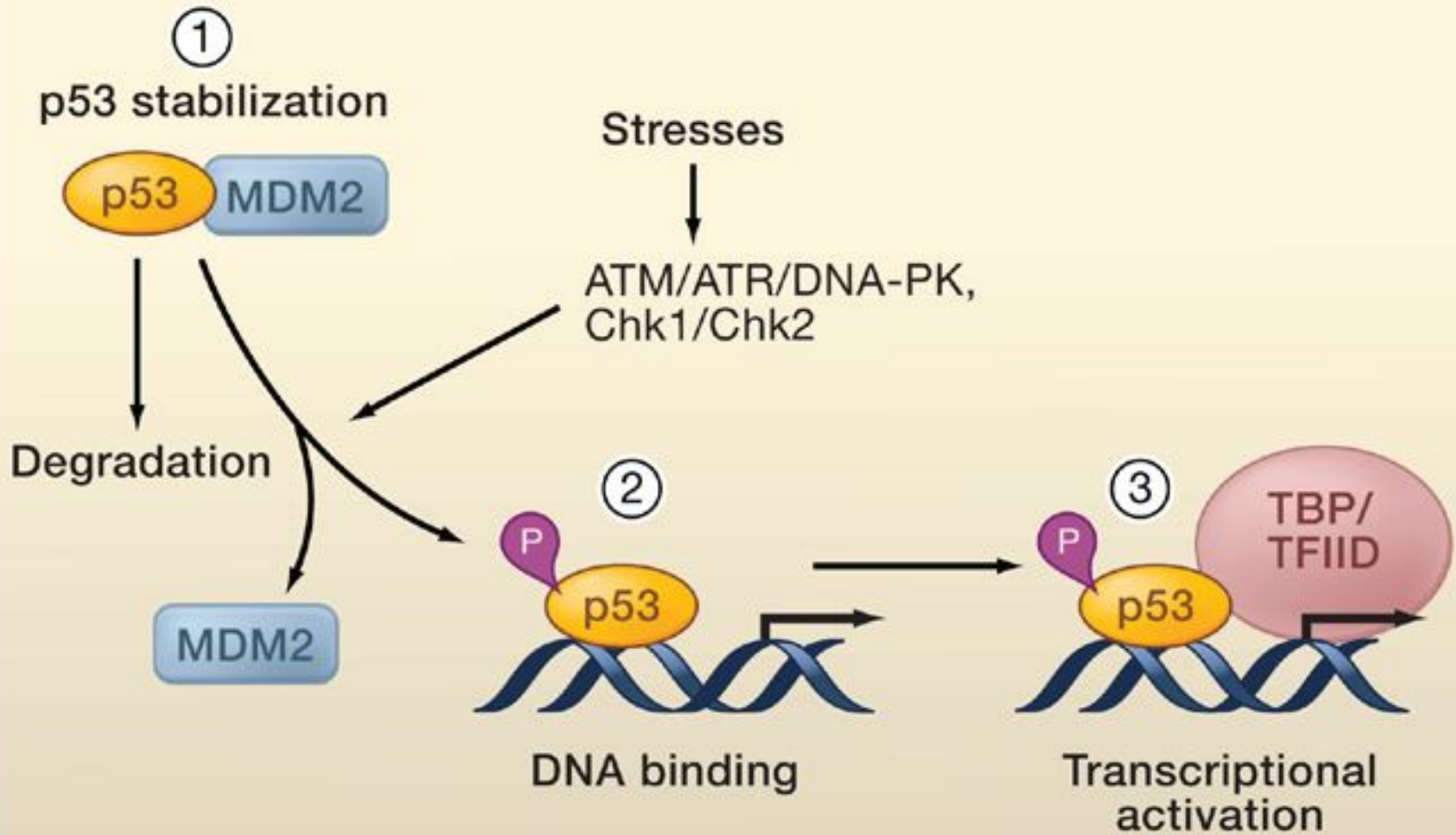
В результате меняется конформация *p53* и увеличивается его время жизни и способность связываться с определенными последовательностями ДНК;

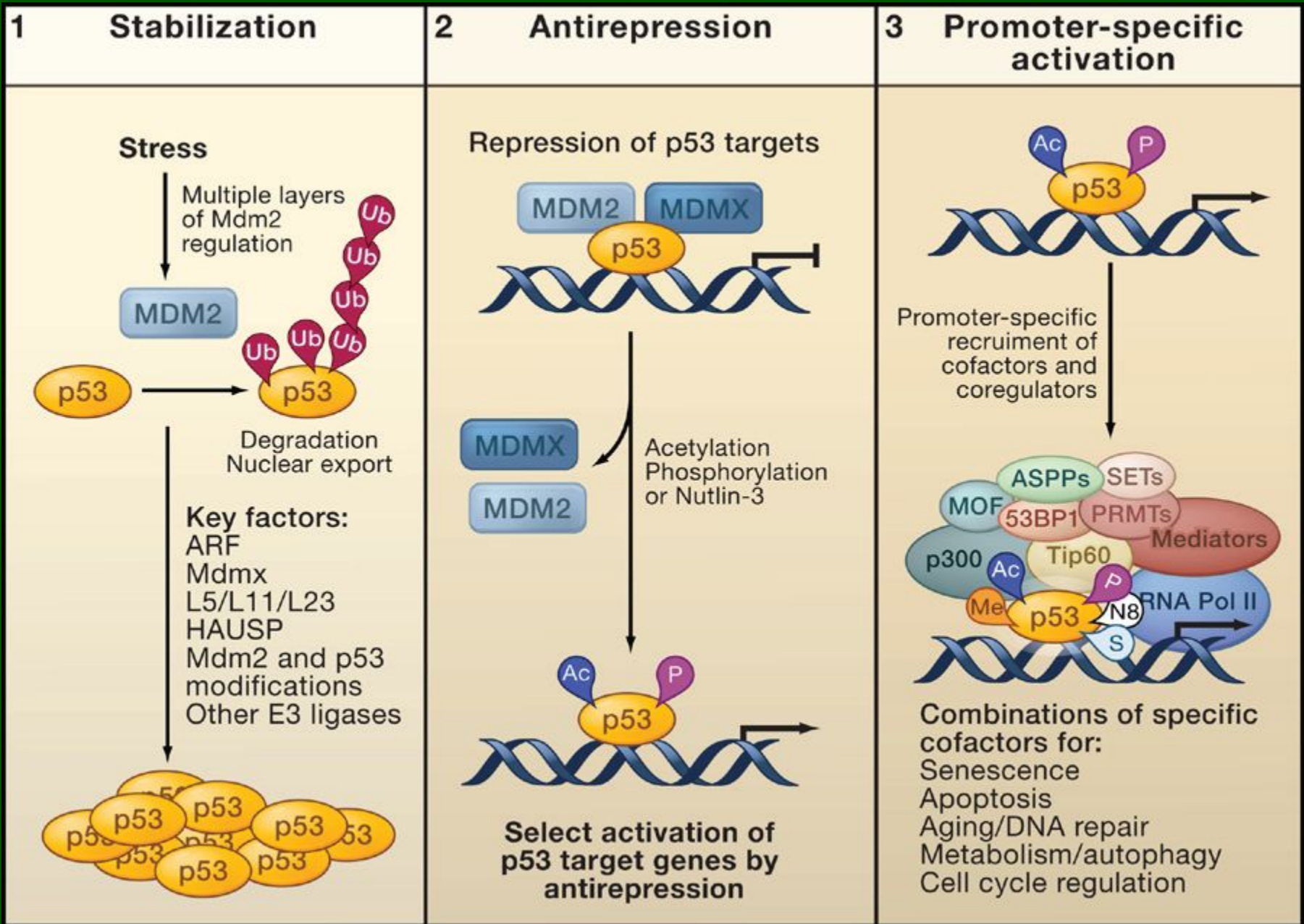


в) сумоилирование *Lys385* изменяет транскрипционную активность *p53*

г) восстановление *Cys275* и *Cys277*, осуществляемое белком *Ref1*, увеличивает способность *p53* репарировать ДНК

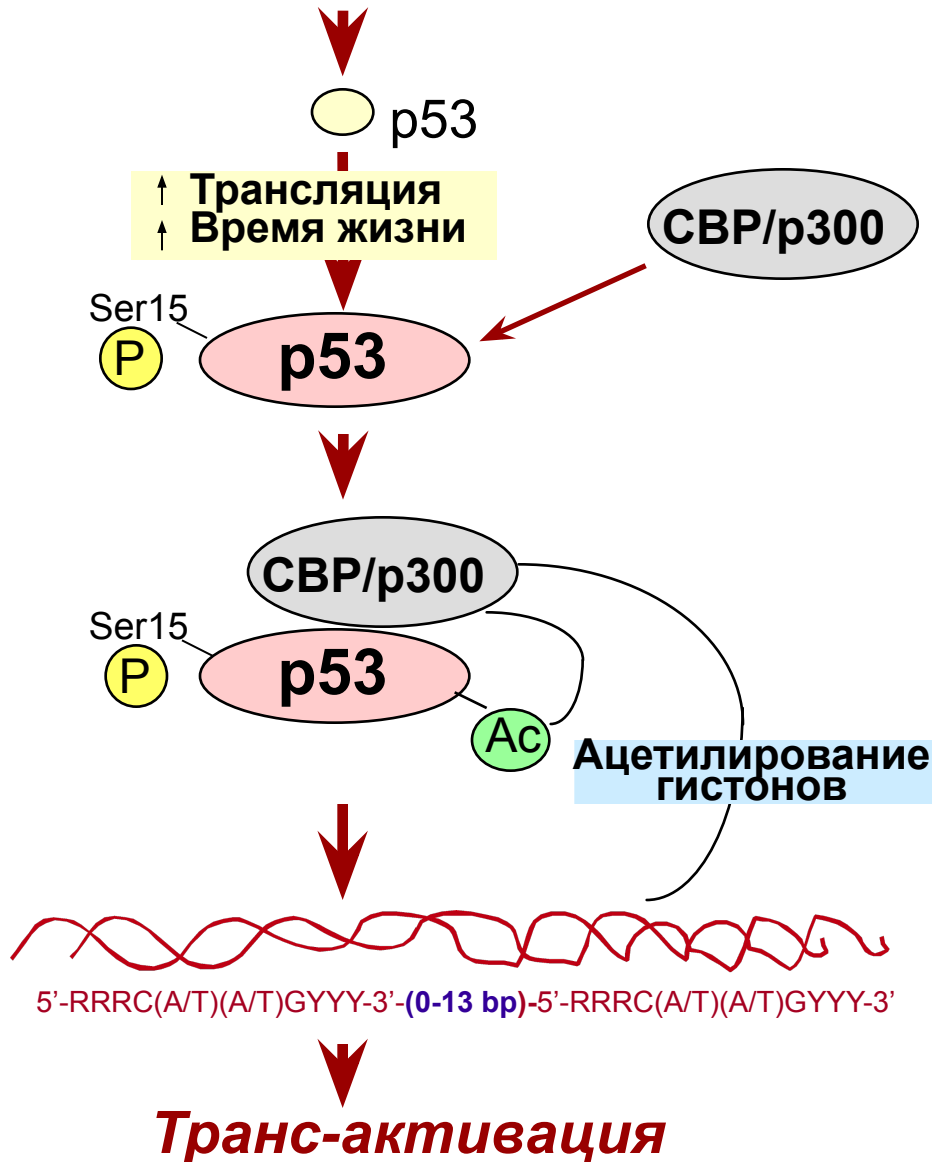
Classic model of p53 activation



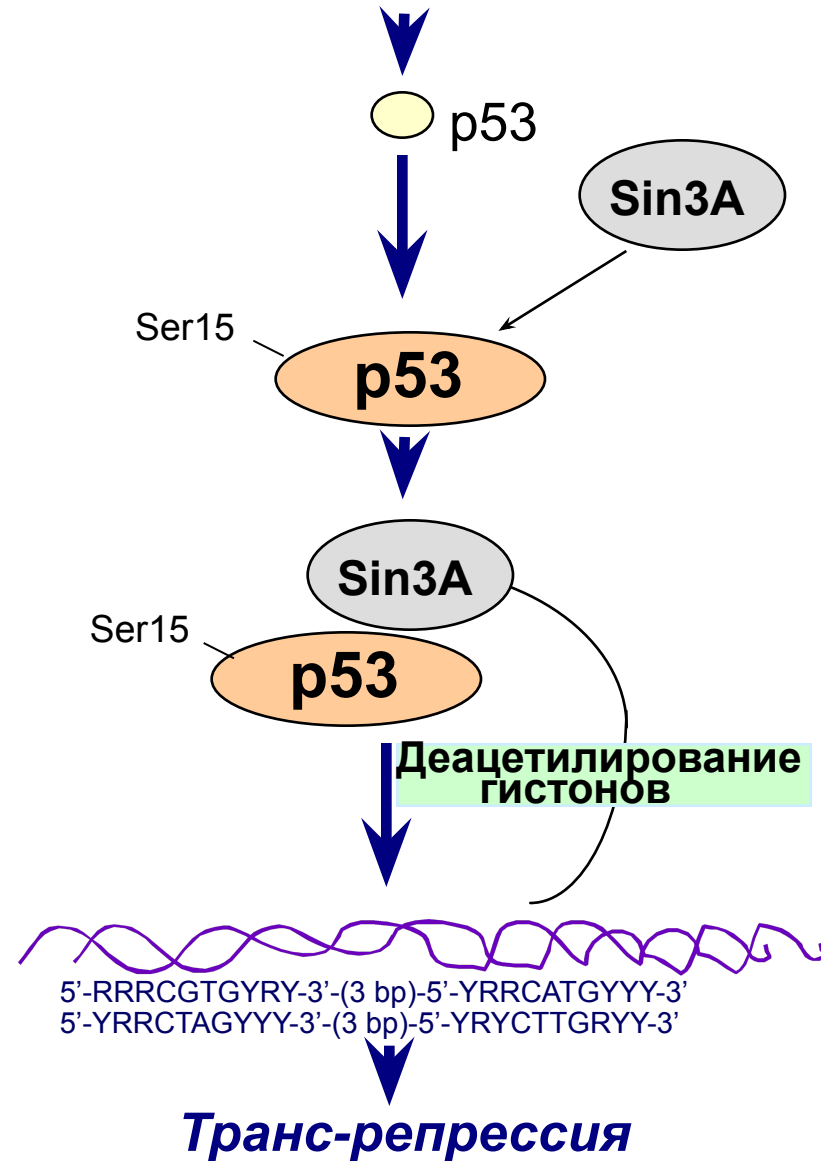


Зависимость пост-трансляционных модификаций p53 и изменений его транскрипционной активности от типа стресса

Повреждение ДНК

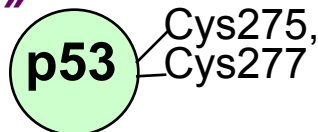


Гипоксия



Пост-трансляционные модификации регулируют биологические активности p53

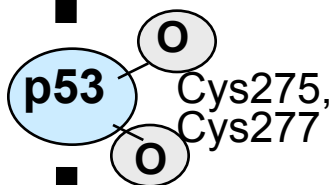
«Репарационная»
форма



Репарация ДНК

Селен

«Латентная»
форма



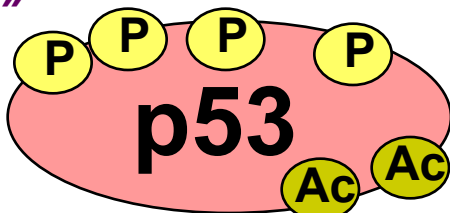
Регуляция экспрессии генов,
контролирующих

- антиоксидантную защиту;
- движение и адгезию клеток;
- подавление репликации вирусных ДНК

Повреждения ДНК,
стрессы

«Стрессовые»
формы

Ser15, Ser20, Ser33,
Ser46, Thr81, Ser315

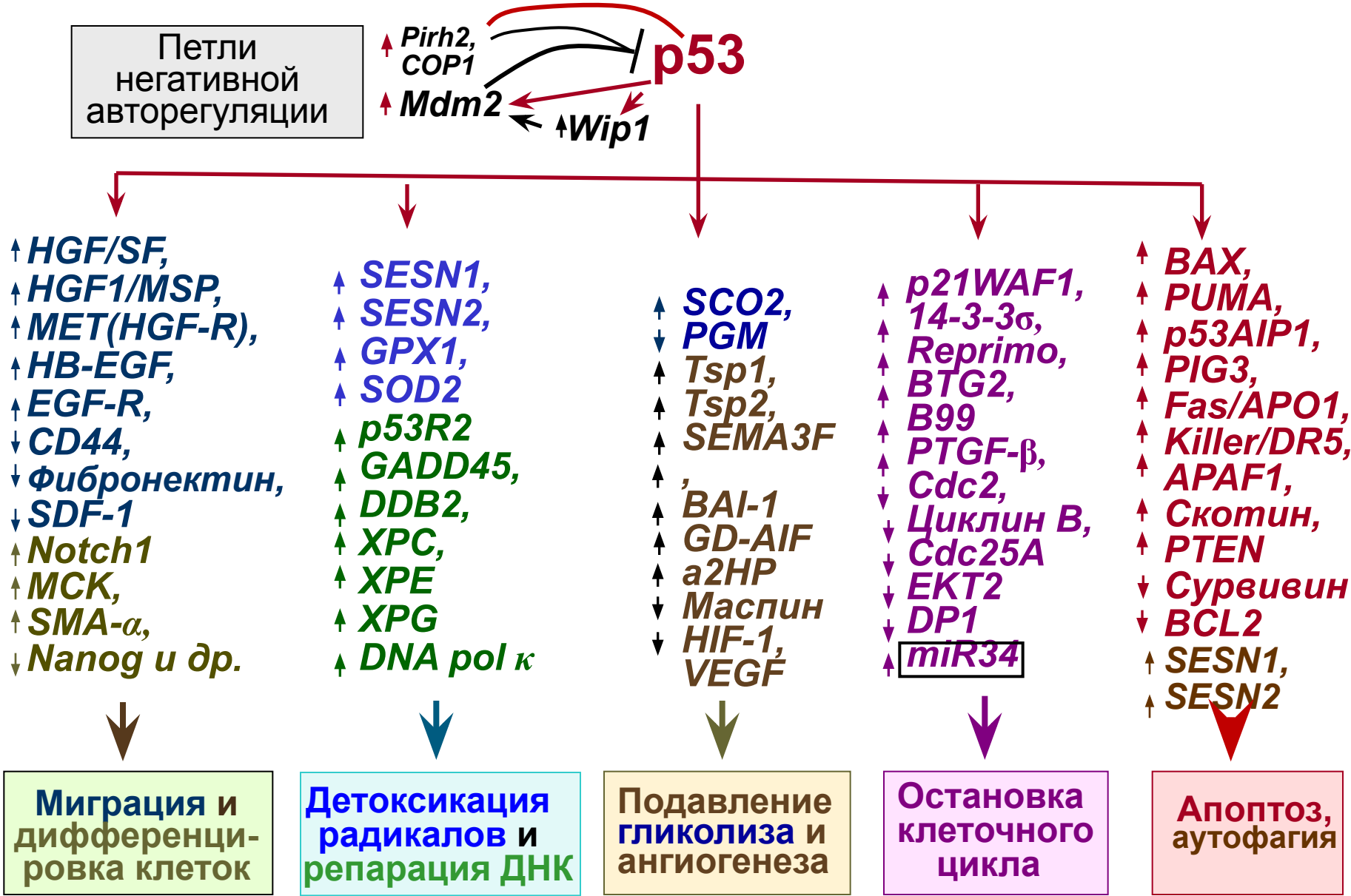


Изменения экспрессии генов,
индуцирующие:

- арест клеточного цикла;
- апоптоз

Lys373, Lys382

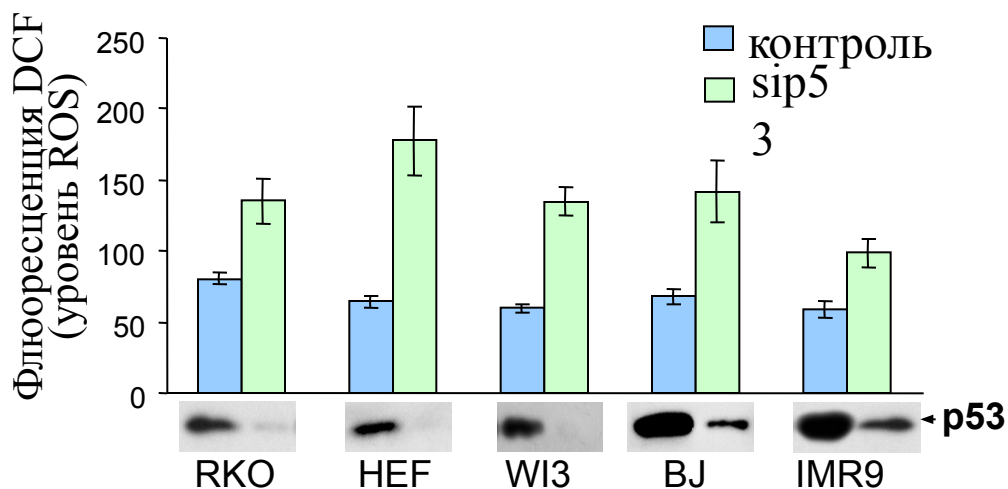
Некоторые гены-мишени p53 и регулируемые ими биологические функции (всего в геноме человека ~450 сайтов связывания p53)



Функции «латентного» p53:

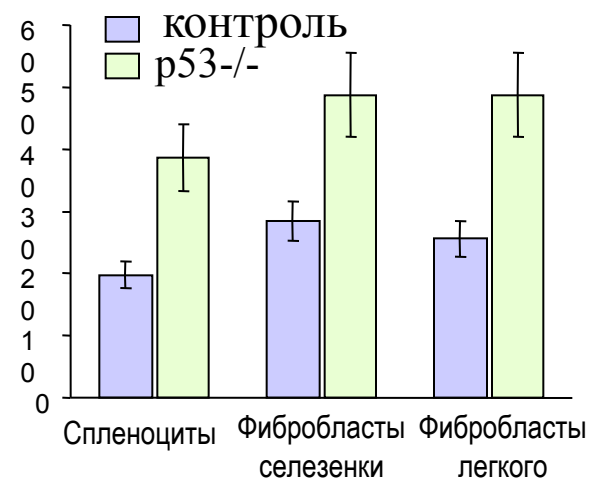
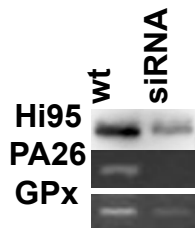
1. Антиоксидантная защита

Инактивация p53 понижает экспрессию генов сестринов и глутатион-пероксидазы и, как следствие, повышает содержание кислородных радикалов

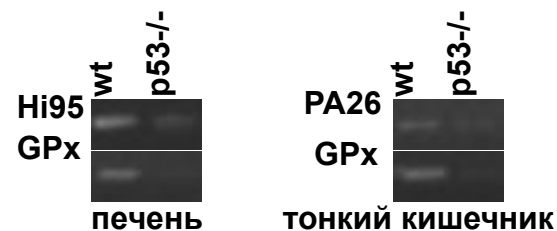


Выключение экспрессии p53 в клетках человека с помощью РНК-интерференции

Клетки RKO:

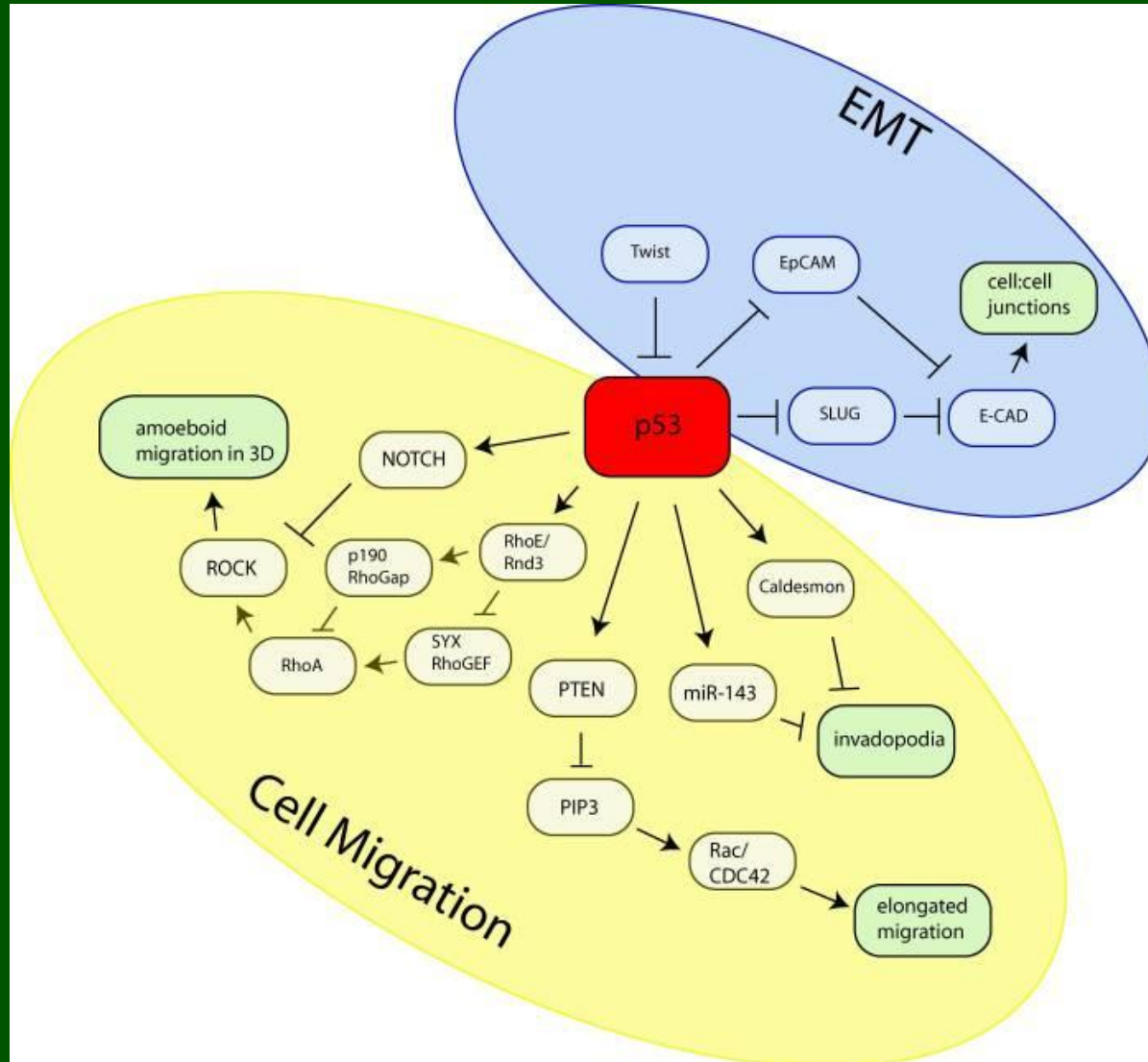


Нокаут гена p53 у мышей



Функции «латентного» p53:

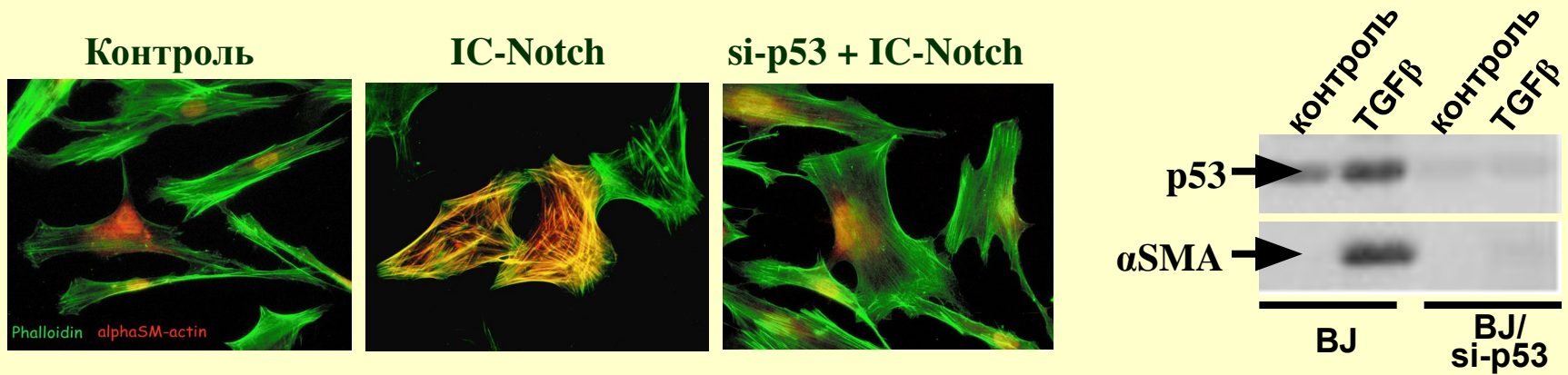
2. Участие в регуляции морфологии и движения клеток



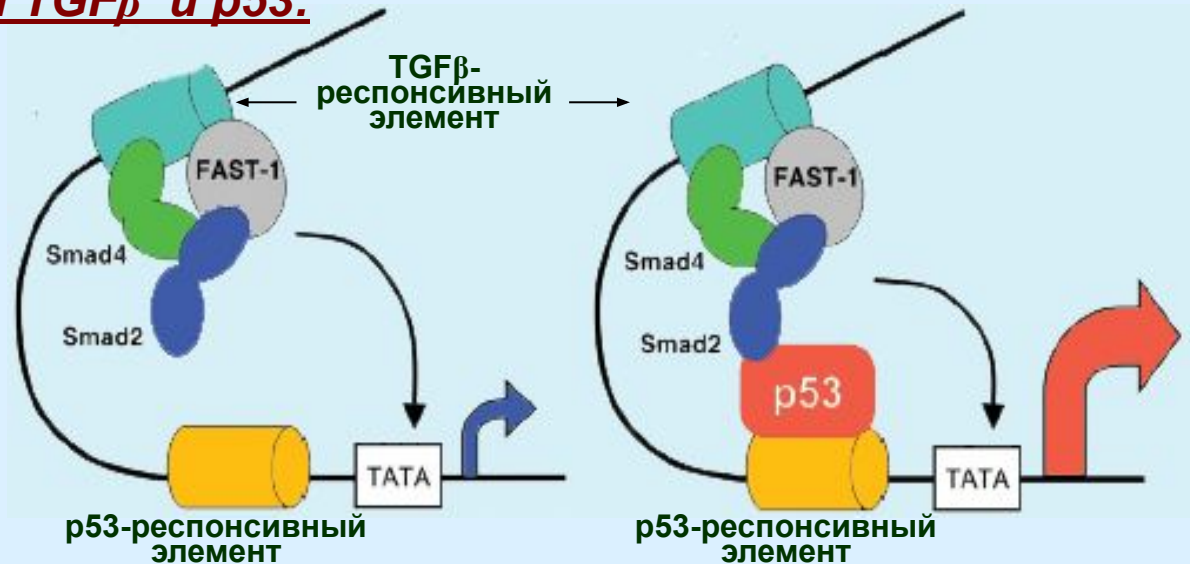
Функции «латентного» p53:

3. Участие в регуляции дифференцировки

Транс-дифференцировка фибробластов в миофибробласты

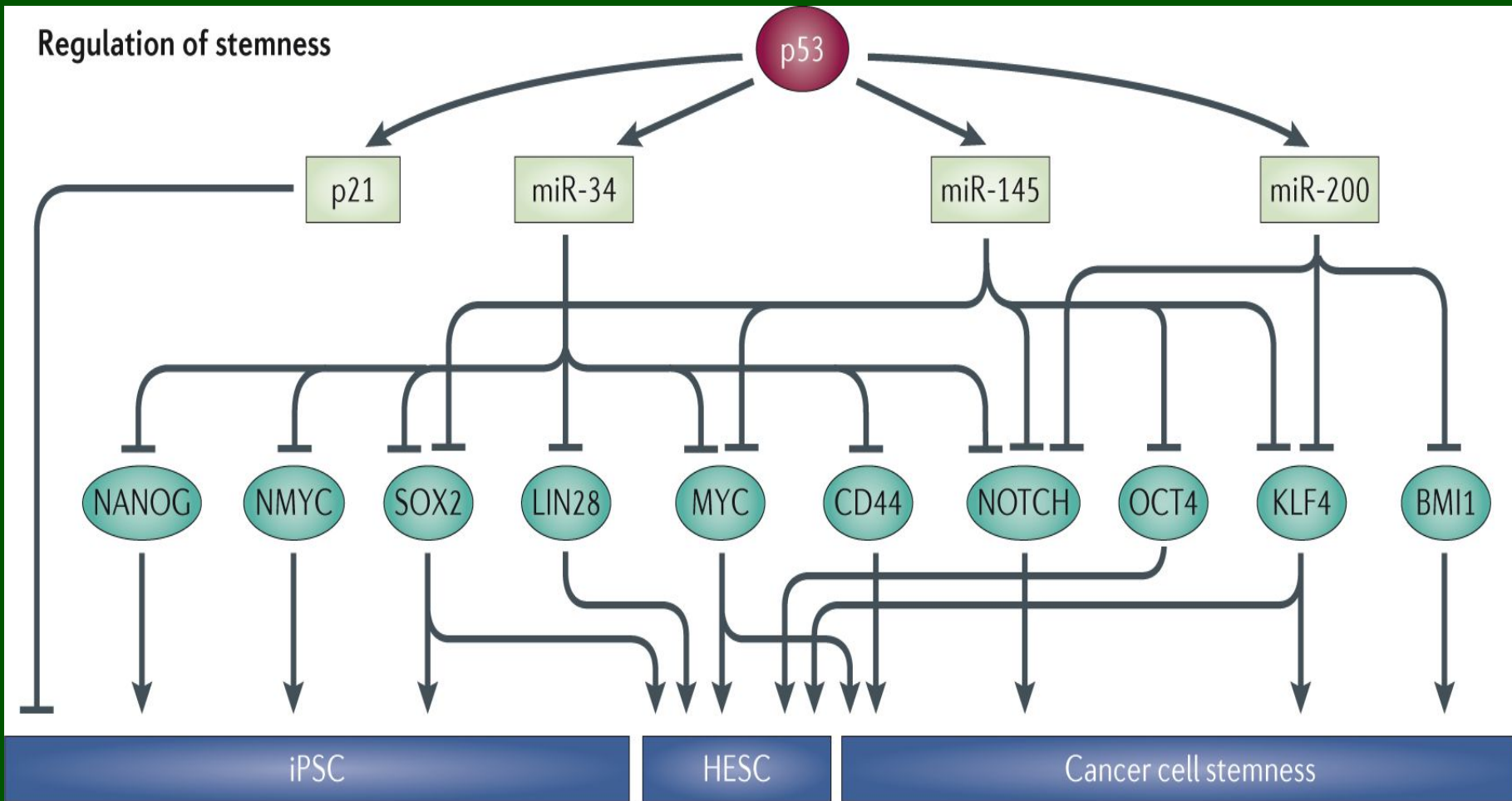


Модель взаимодействия TGFβ и p53:

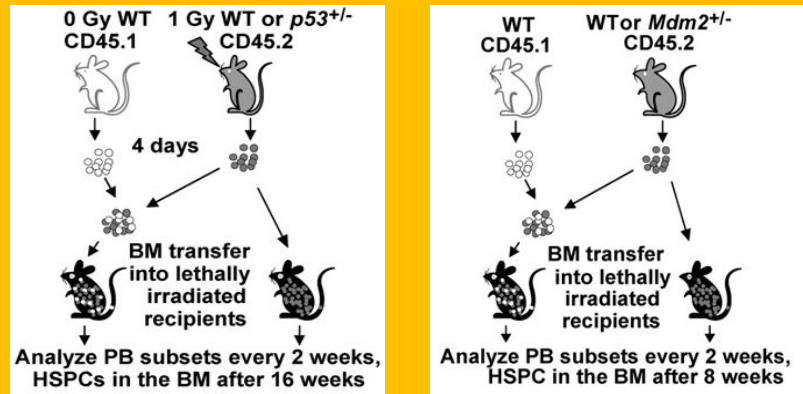
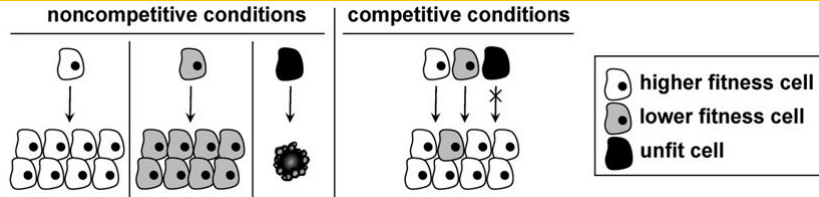


Функции «латентного» p53:

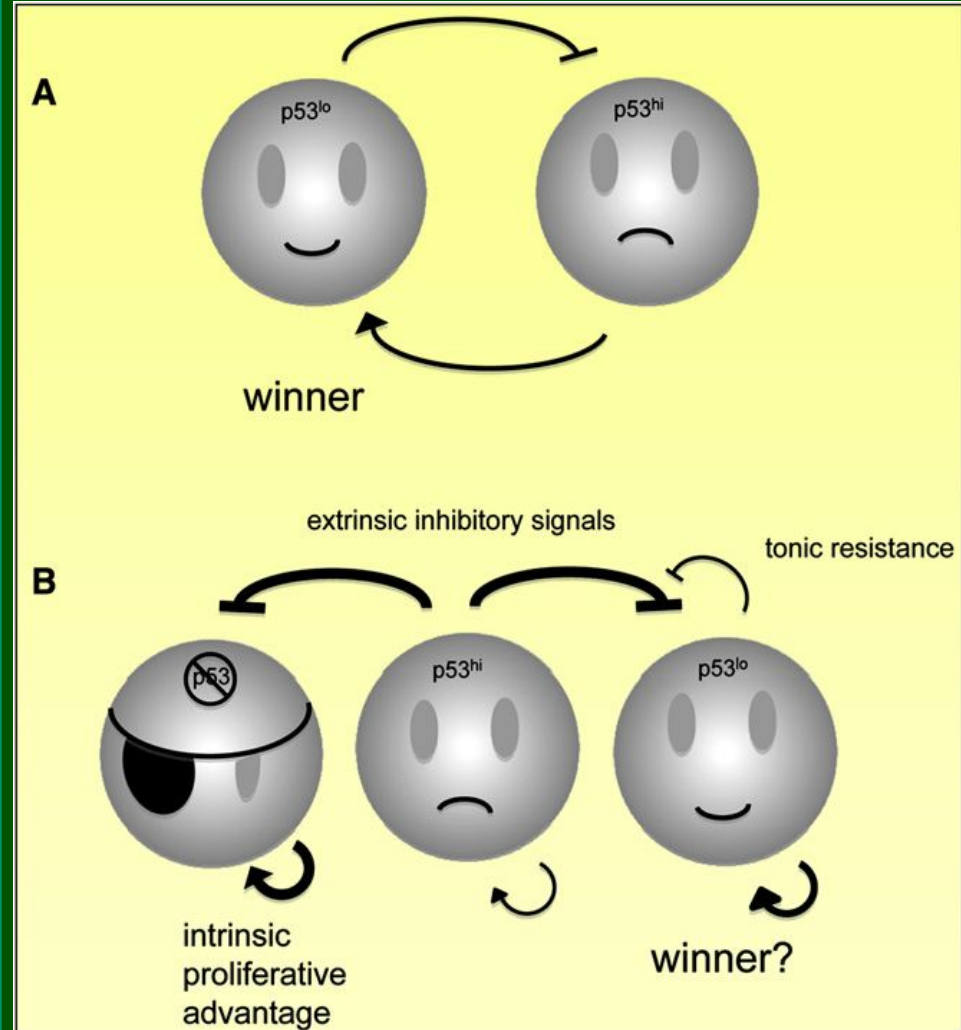
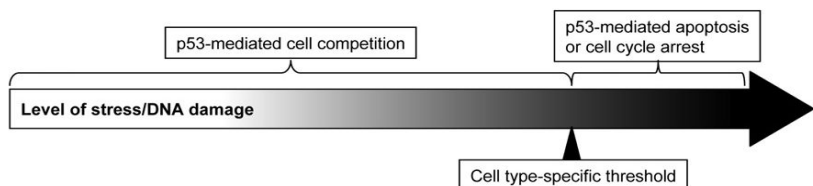
4. Участие в регуляции плюрипотентности

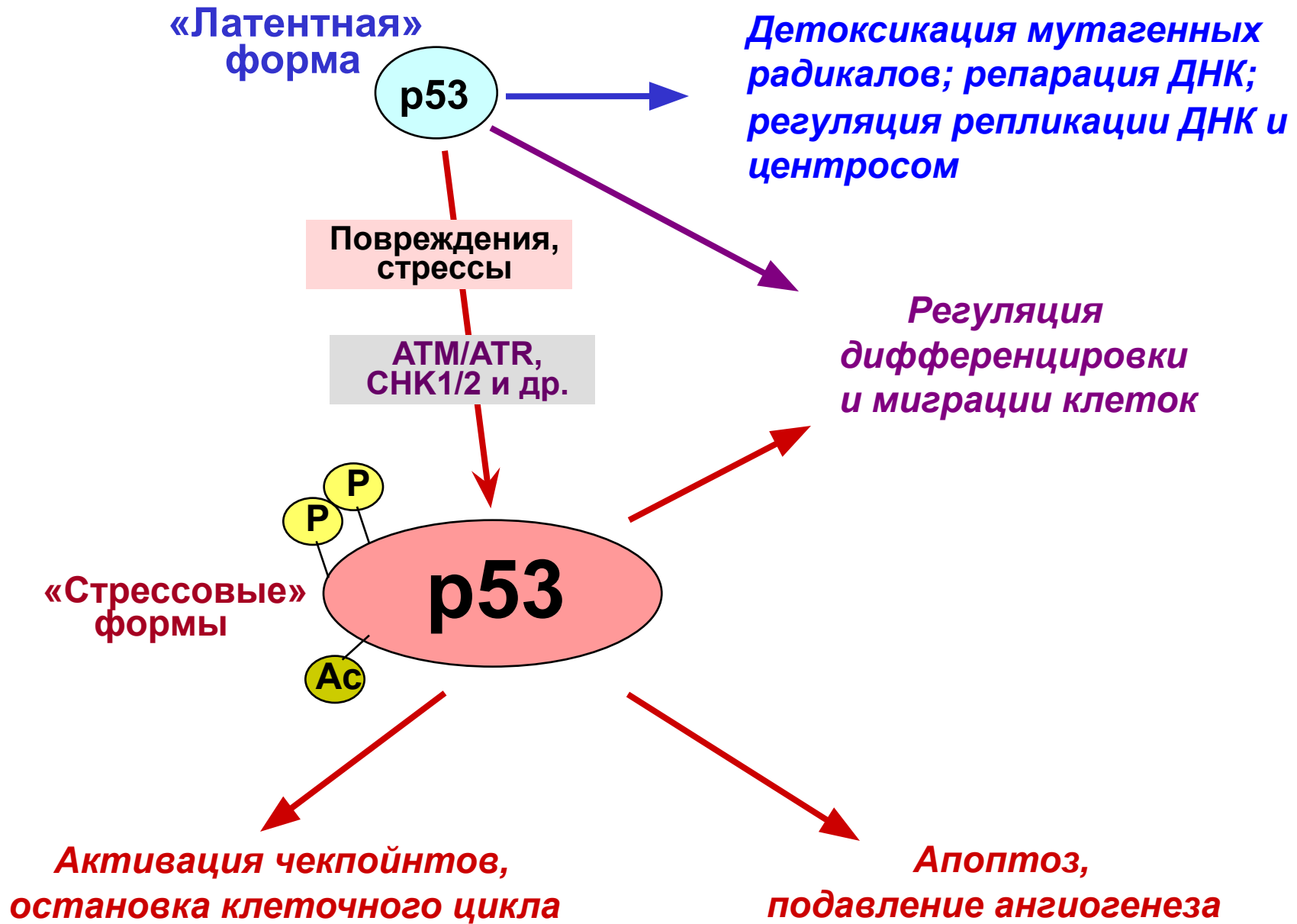


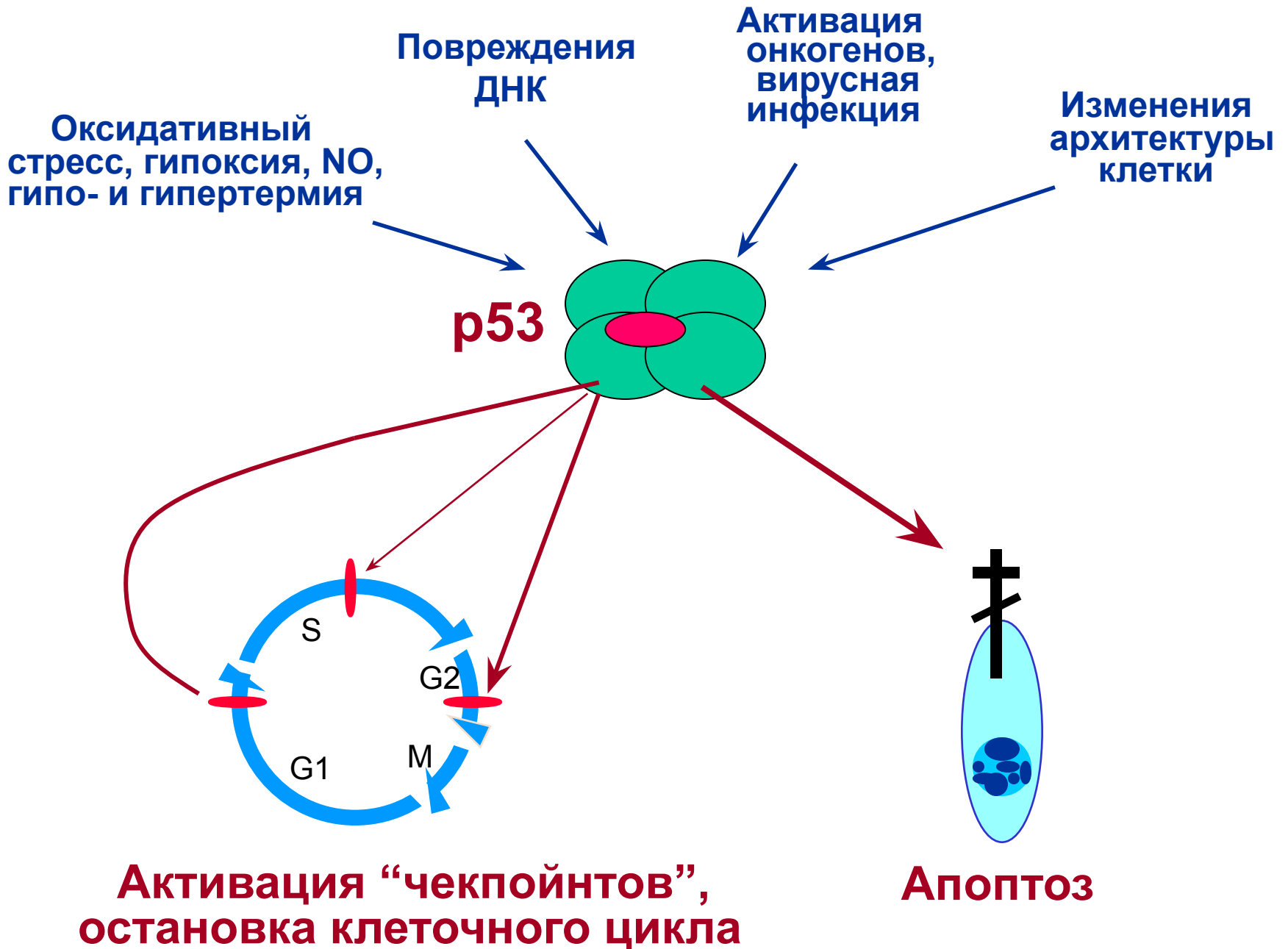
Уровень p53 определяет результаты конкуренции гемопоэтических стволовых клеток и предшественников



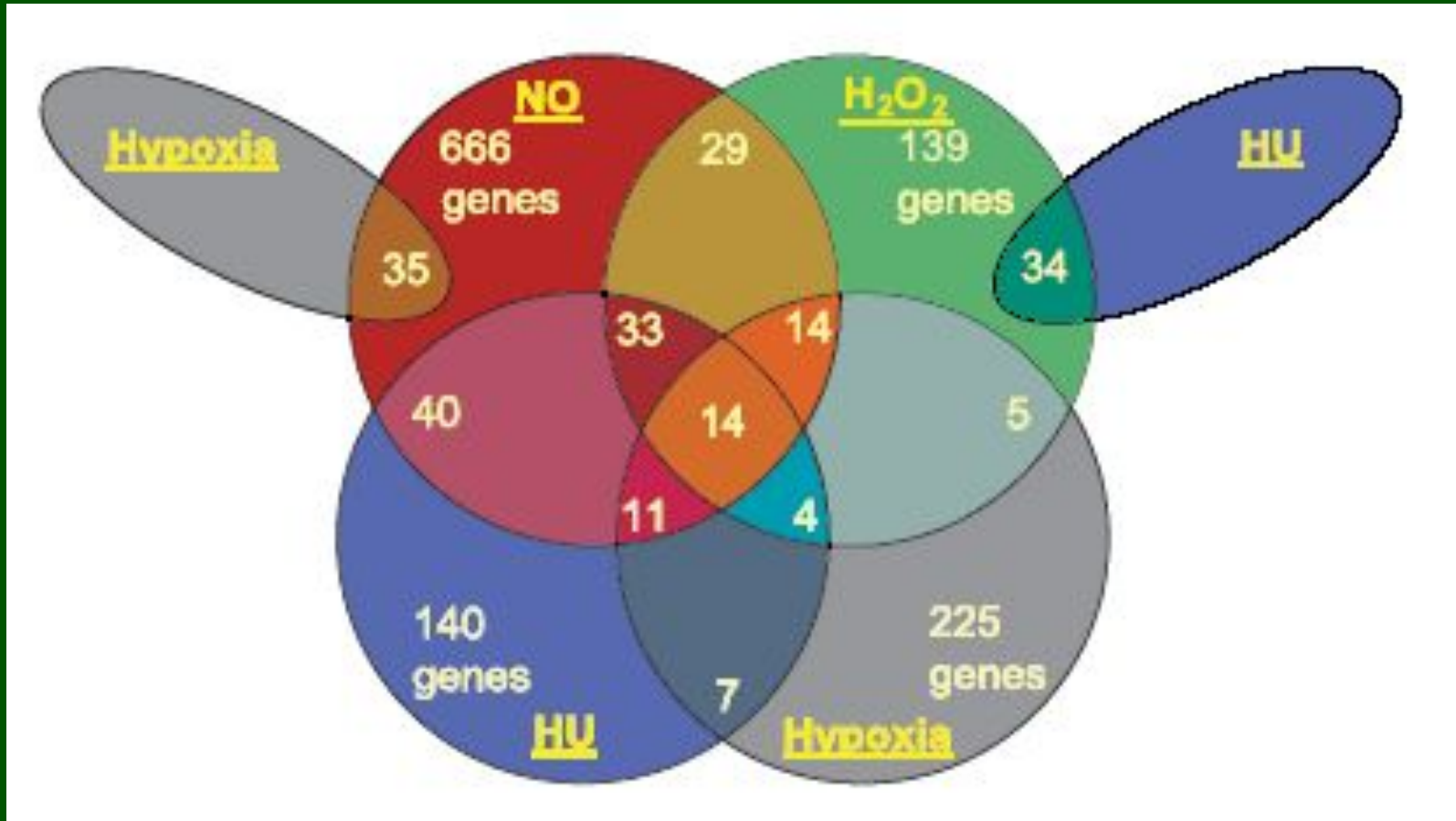
Cellular responses and biological outcomes	Cell-autonomous functions (Group A)	Cell communication and interaction with the environment (Group B)
Apoptosis vs survival	Noxa, Puma, Bax	DR4, DR5, Fas, Unc5B
Growth arrest vs proliferation	P21, cdc25c, 14-3-3 σ	IGF1R, PTEN, TSC2, sestrins, SOCS2, SOCS3, <i>Pdcd4</i>
Self-renewal vs differentiation	Nanog, Gfi-1, <i>necln</i>	Notch1, RAR β , LIF, Fzd7, Dkk3, GCNF, Wisp3, EphA2
DNA repair and stress adaptation	GADD45, XPC, DDB2	
Cell adhesion and migration		<i>CD44</i> , RHAMM, versican, maspin, <i>L-selectin</i> , thrombospondin, <i>Robo4</i> , <i>TGFbRIII</i> , <i>P-selectin</i>
Cytokines and growth factors		MIC-1, TGF β , SCF, FGF2







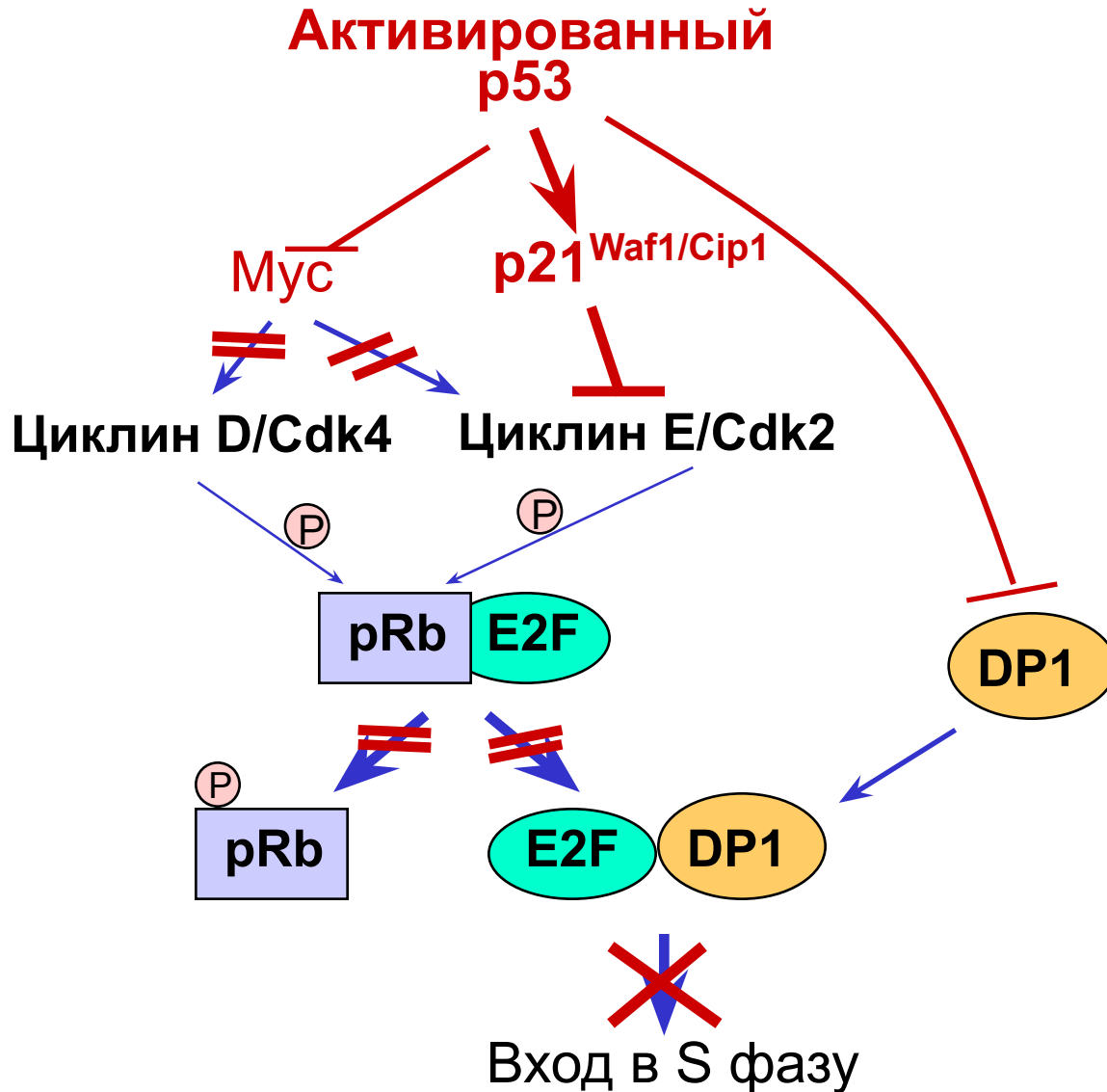
Наборы генов, экспрессия которых изменяется вследствие активации p53, зависят от типа стресса



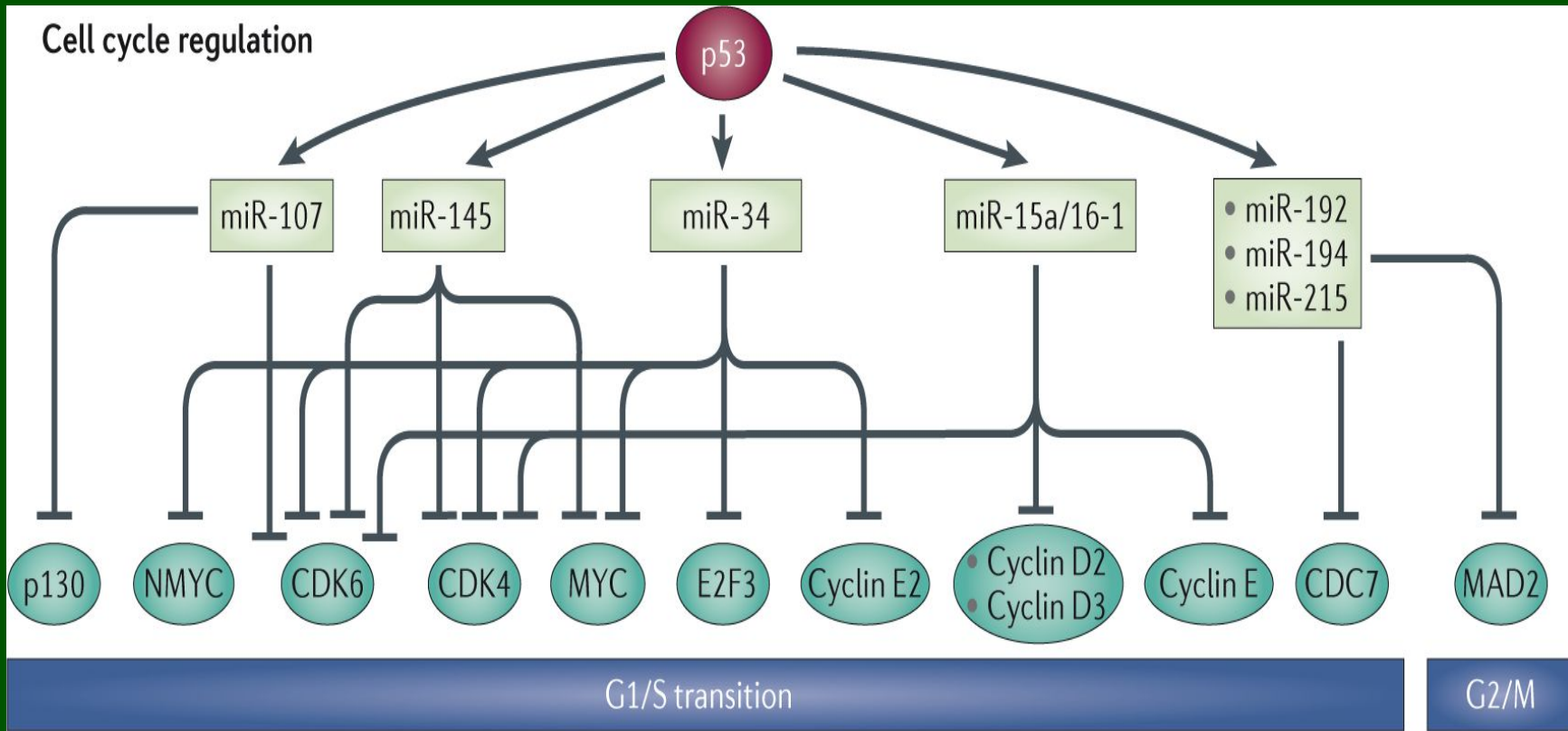
(Microarray analysis, HCT116 p53^{+/+} vs. HCT116 p53^{-/-})

Функции активированного (“стрессового») р53:

1. Остановка в G1

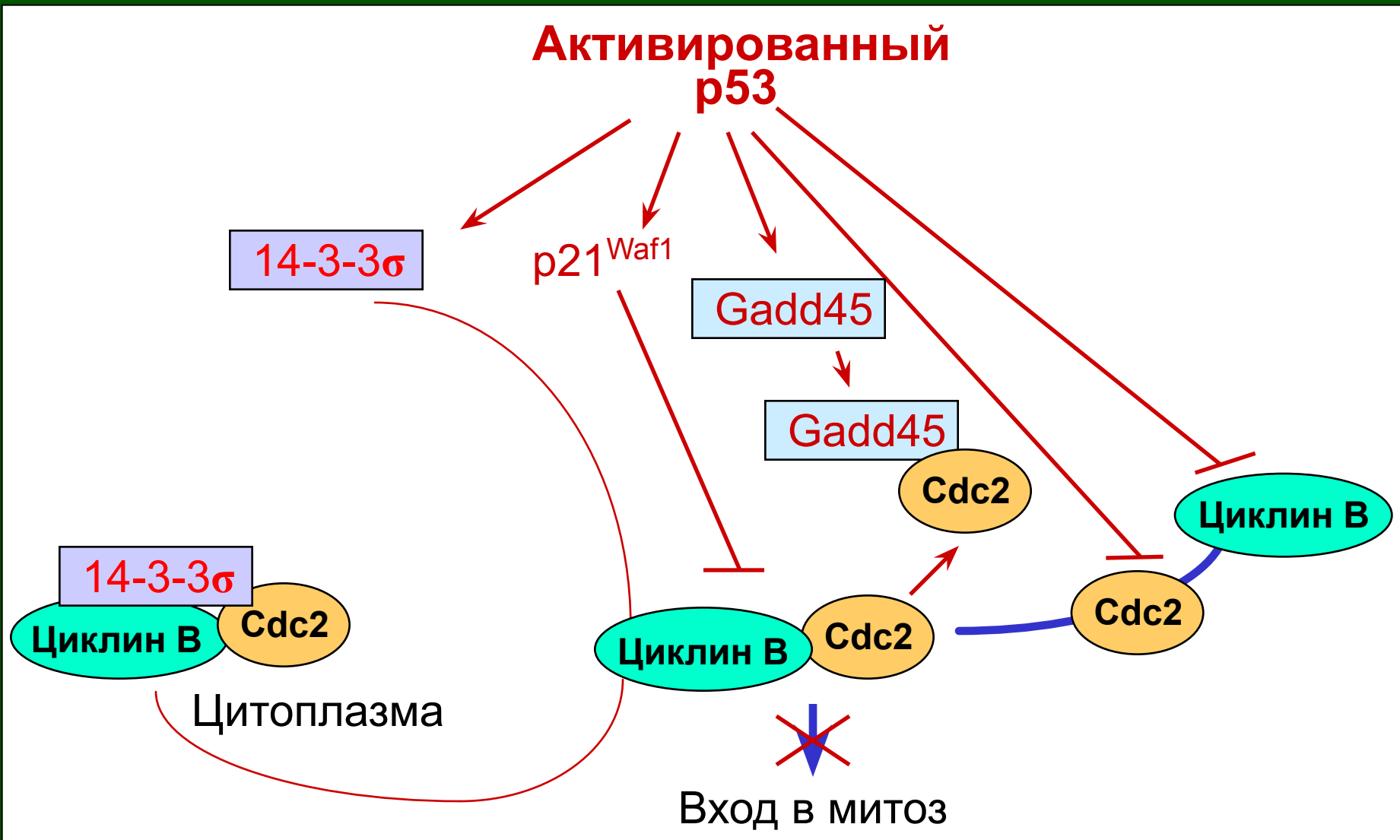


Cell cycle regulation



Функции активированного (“стрессового») р53:

2. Остановка в G2



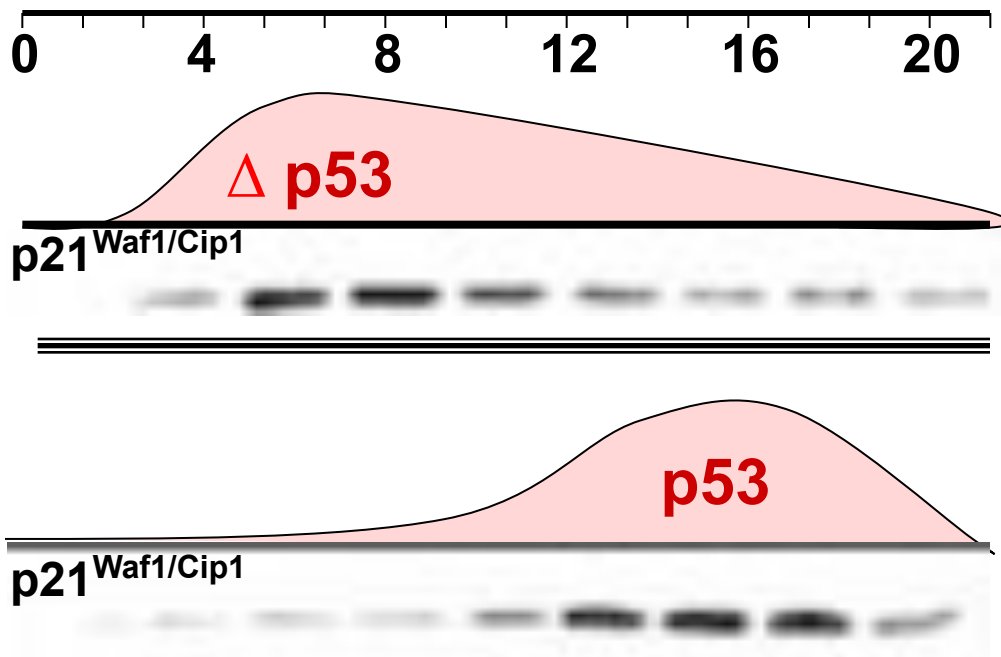
Функции активированного (“стрессового») p53:

3. Остановка в S



Δ p53 не активирует апоптоз

Время после повреждения ДНК в G1→S (часы)



Повреждение ДНК в S

Активированный
Δ p53 (P-Ser15 и др.)

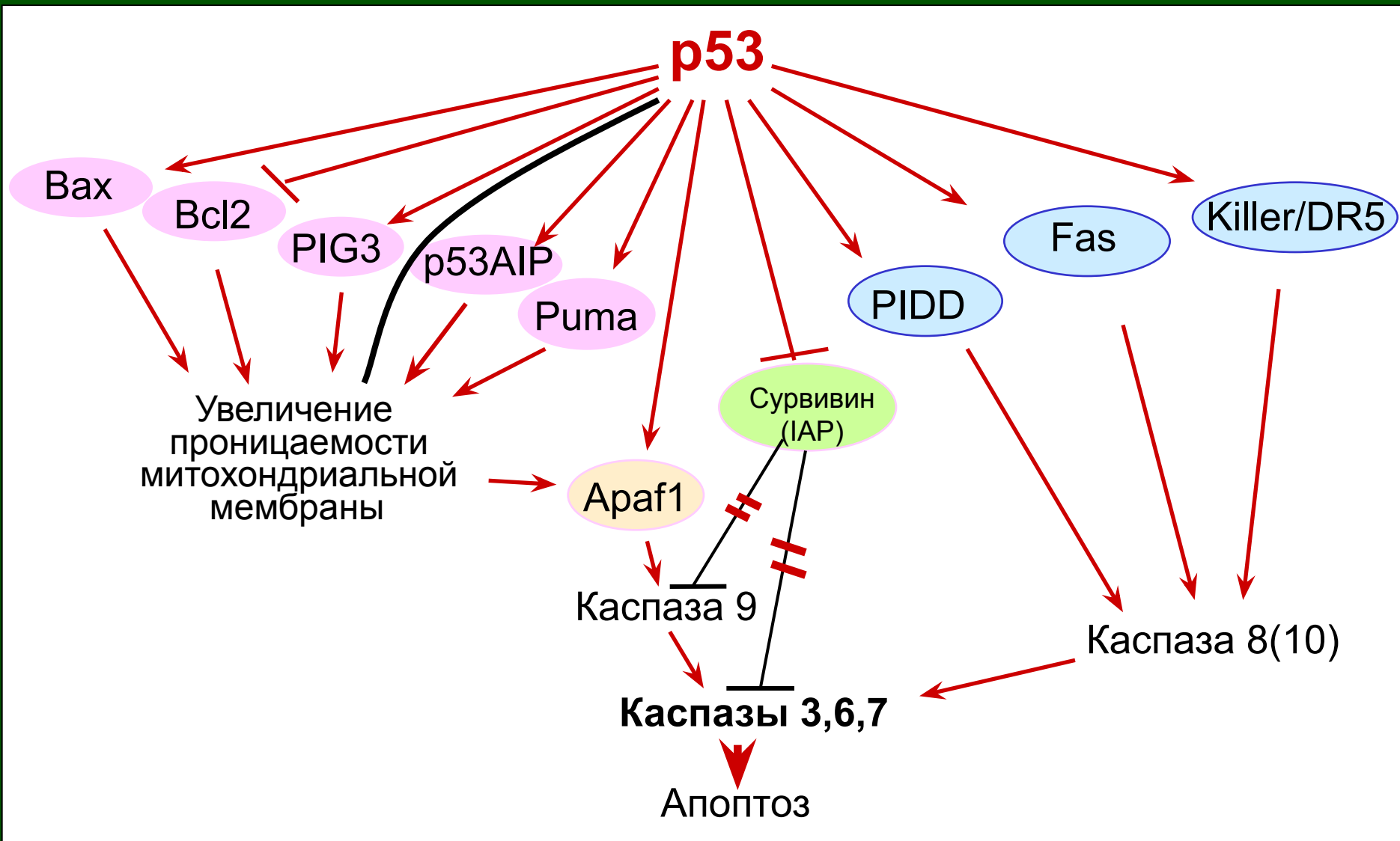
p21^{Waf1/Cip1}

⊥
Циклин A/Cdk2

⊗
Продвижение по S фазе

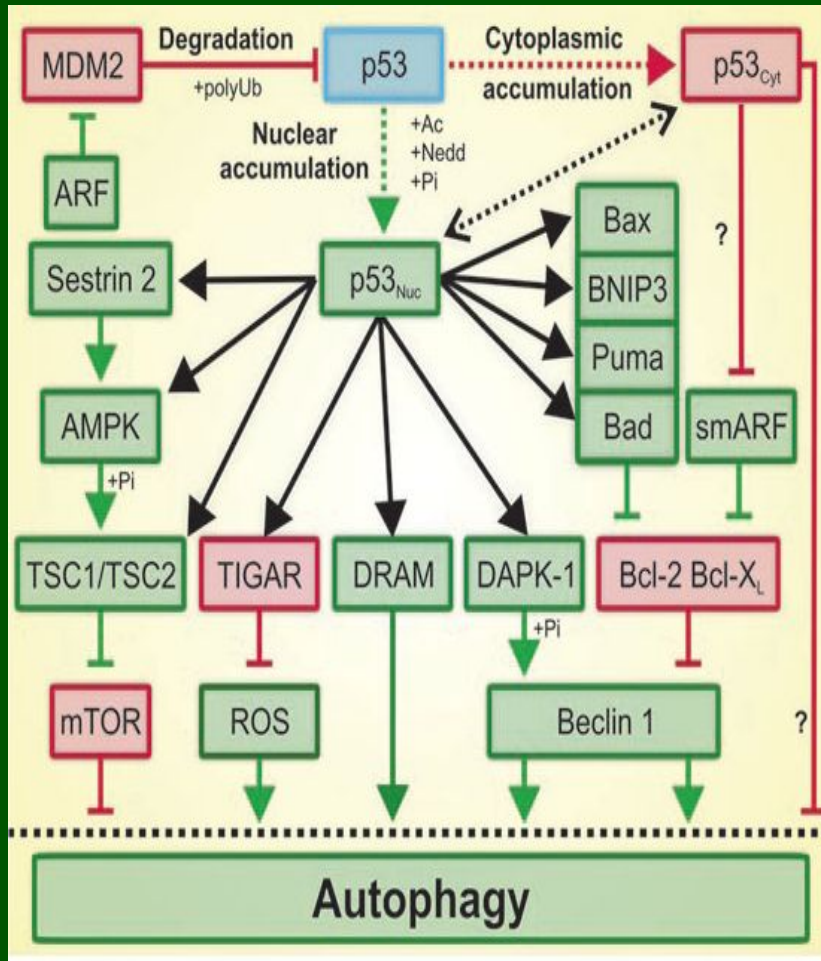
Функции активированного («стрессового») p53:

4. Индукция апоптоза



Функции p53:

5. Регуляция аутофагии

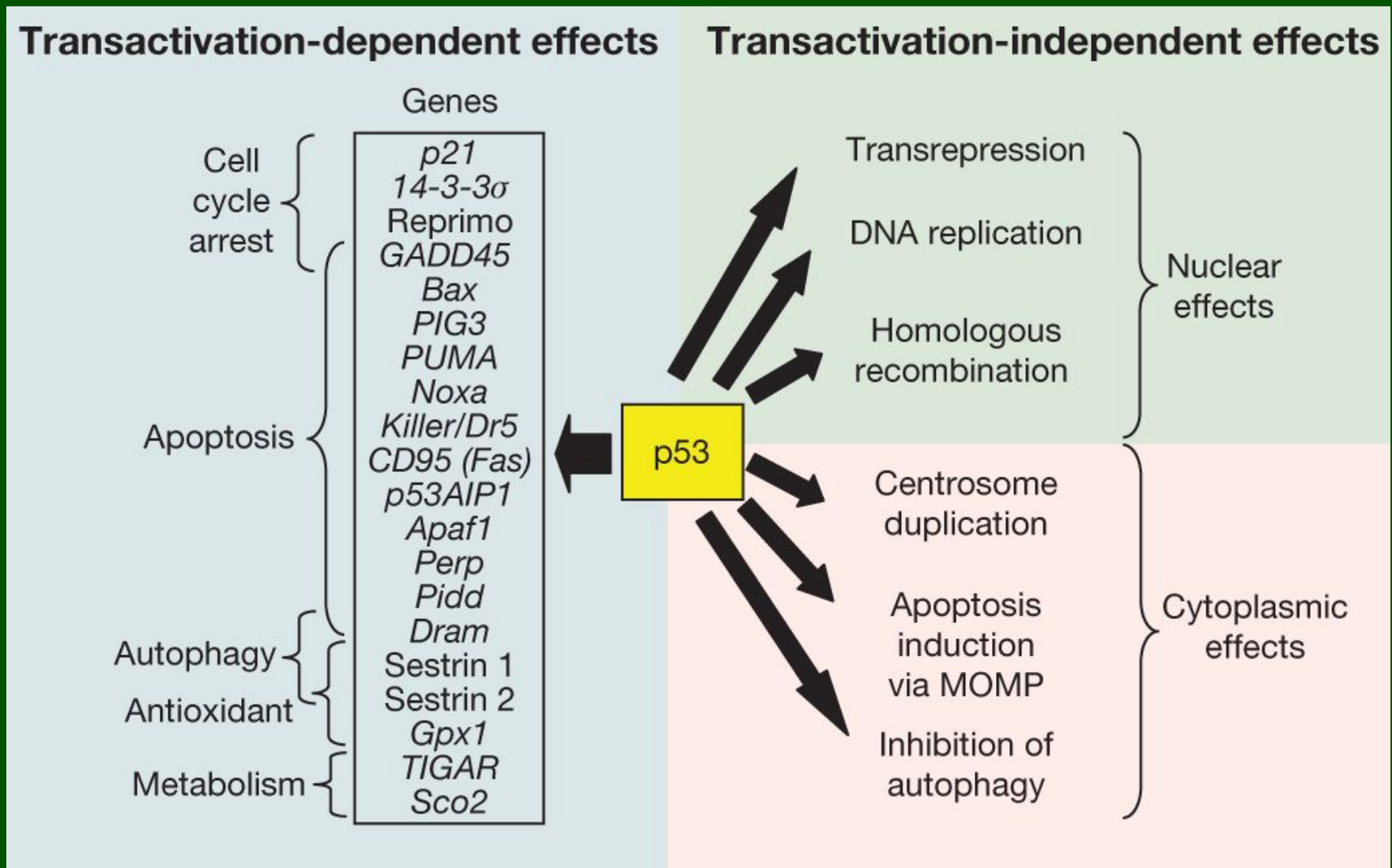


Cells with low autophagic rates show a p53-dependent increase in autophagy in response to starvation, whereas cells with high autophagic rate show a p53-dependent decrease in autophagy in response to the same conditions — the end result in both cases is the promotion of cell survival

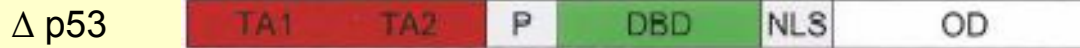
Scherz-Shouval et al., 2010, *Proc Natl Acad Sci USA* 107:18511–18516;

Maddox and Vousden, 2011, *J Mol Med*, 89:237–245.

Функции p53 не ограничиваются регуляцией транскрипции

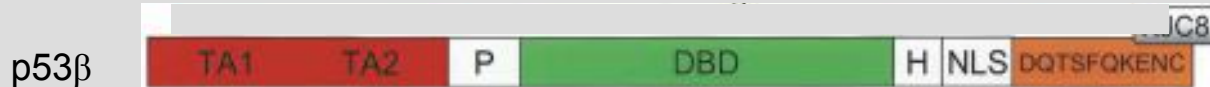


Отличия функциональных активностей активированных (“стрессовых») изоформ р53



альтернативный сплайсинг (экзоны 7- 9)

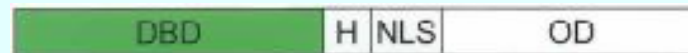
Δ p53 - активирует *p21^{Waf1/Cip1}*, *14-3-3 σ* , но не *MDM2*, *BAX*, *PIG3*



альтернативный сплайсинг (интрон 9)

p53 β -активирует *p21^{Waf1/Cip1}*; сильнее чем p53 активирует *BAX*, очень слабо активирует *MDM2*

Δ 133 p53



внутренний промотор (интрон 4)

Δ 133 p53- ингибирует активацию p53-респонсивных генов (доминантно-негативный эффект)

При активации полноразмерного p53 судьба клетки (апоптоз или остановка цикла)

ЗАВИСИТ ОТ:

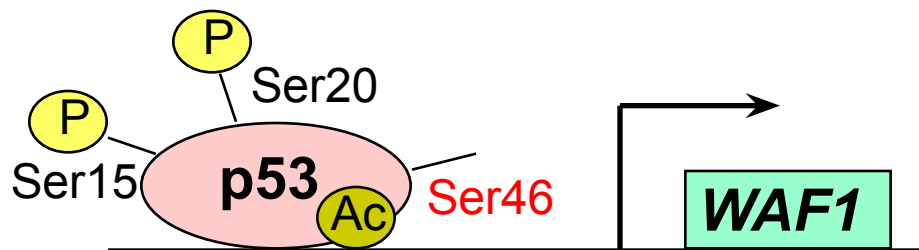
1. Количественного уровня p53

Не все p53-респонсивные элементы имеют одинаковую аффинность к p53. p21^{WAF1} и Gadd45 активируются при значительно меньшем уровне p53. Поэтому, мало p53 - остановка цикла; много – апоптоз

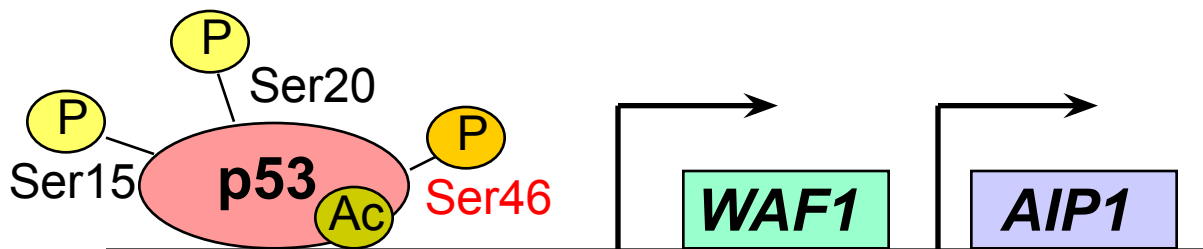


При активации p53 судьба клетки (апоптоз или остановка цикла) зависит от:

2. характера модификаций молекул p53 а) сайтов фосфорилирования

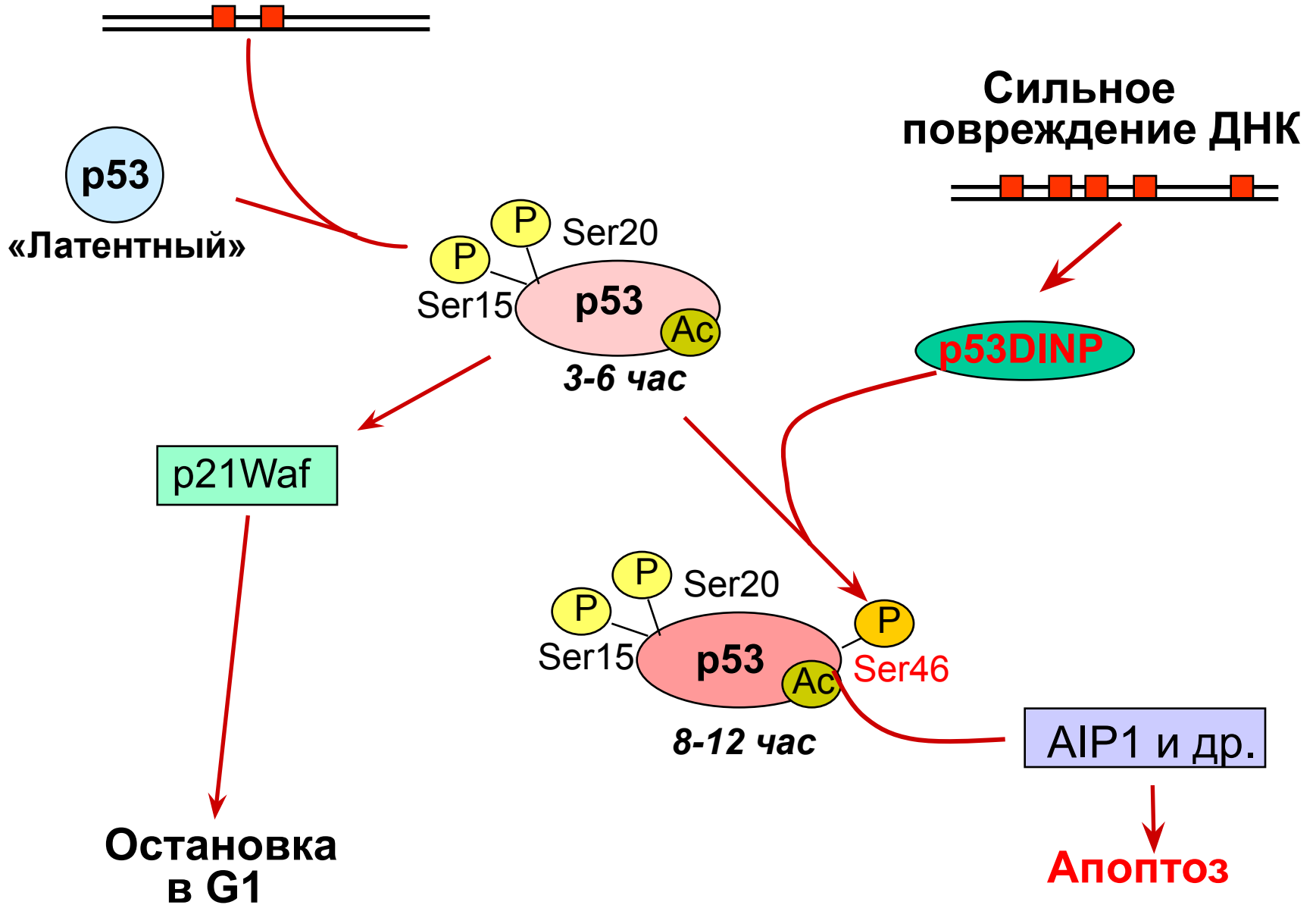


Остановка
в G1





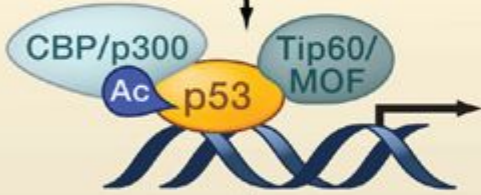
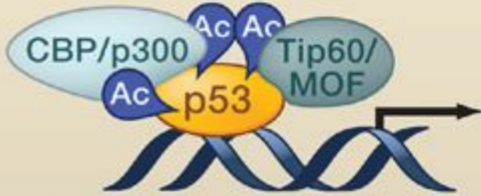
Апоптоз

Повреждение ДНК



При активации p53 судьба клетки зависит от:

2. характера модификаций молекул p53 б) уровня и специфики ацетилирования

 DNA damage & other types of stress	Transcriptional targets	Biological consequence	p53 modification requirement
A 	MDM2 Pirh2	Feedback and cell survival	Acetylation is not required
B 	p21 GADD45	Growth arrest DNA repair	Partial acetylation is sufficient
C 	BAX PUMA FAS NOXA	Irreversible apoptosis	Specific acetylation is required

При активации p53 судьба клетки (апоптоз или остановка цикла) зависит от:

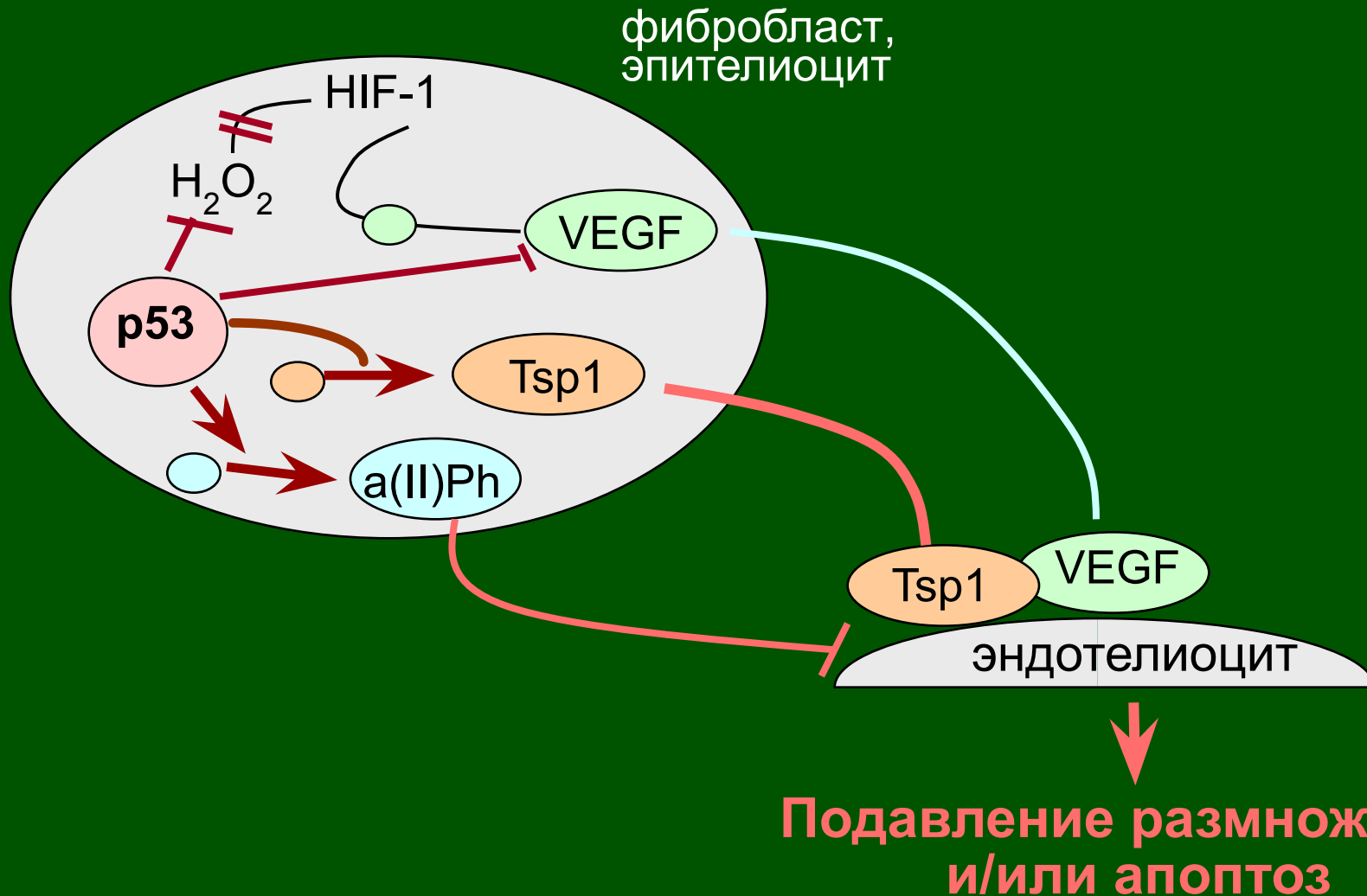
3. Экспрессии ко-факторов транскрипции, избирательно усиливающих ту или иную функцию p53

При связывании p53 с ASPP (TP53BP) -1 и -2 повышается его аффинность к респонсивным элементам, содержащимся в проапоптозных генах



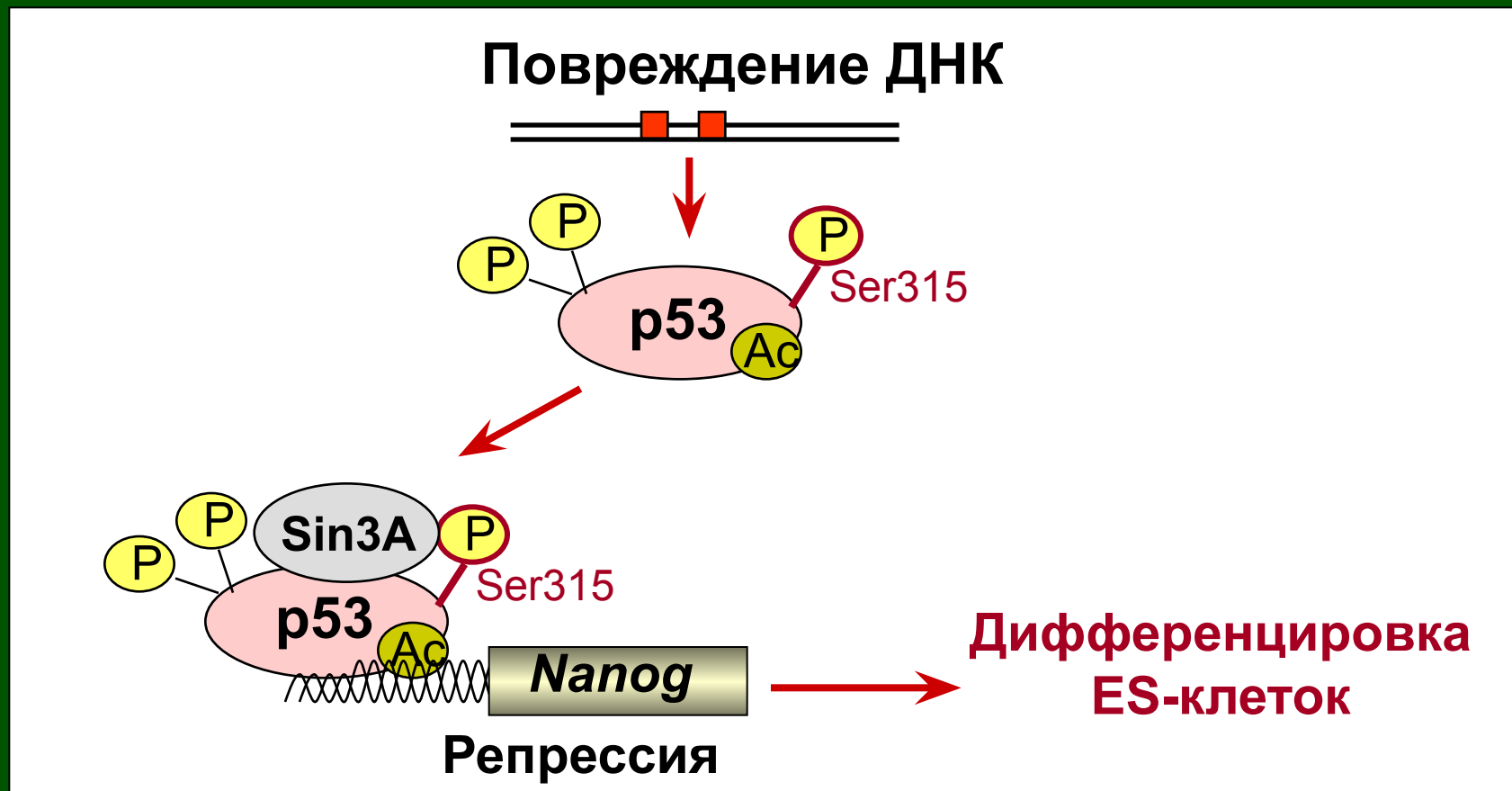
При связывании с Hzf (ZNF385), наоборот, уменьшается аффинность к респонсивным элементам, содержащимся в проапоптозных генах, и увеличивается способность активировать гены, продукты которых останавливают клеточный цикл

Некоторые р53-зависимые механизмы подавления ангиогенеза

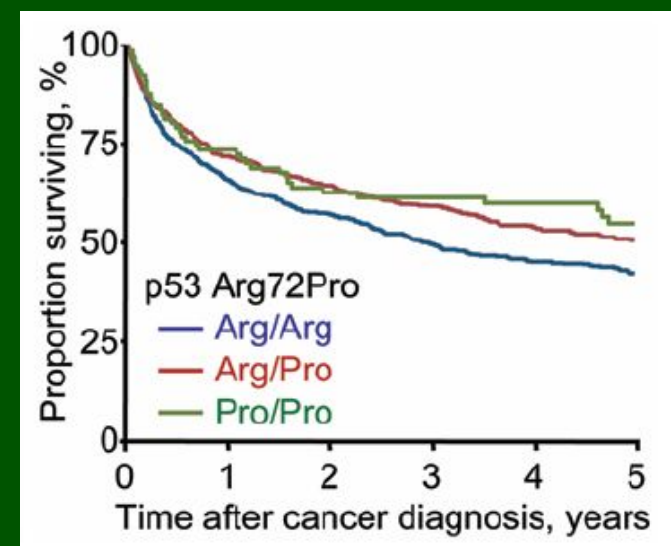
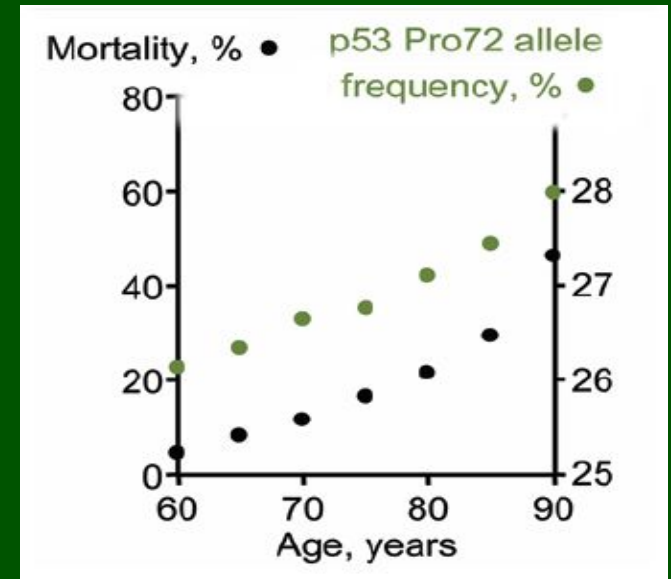
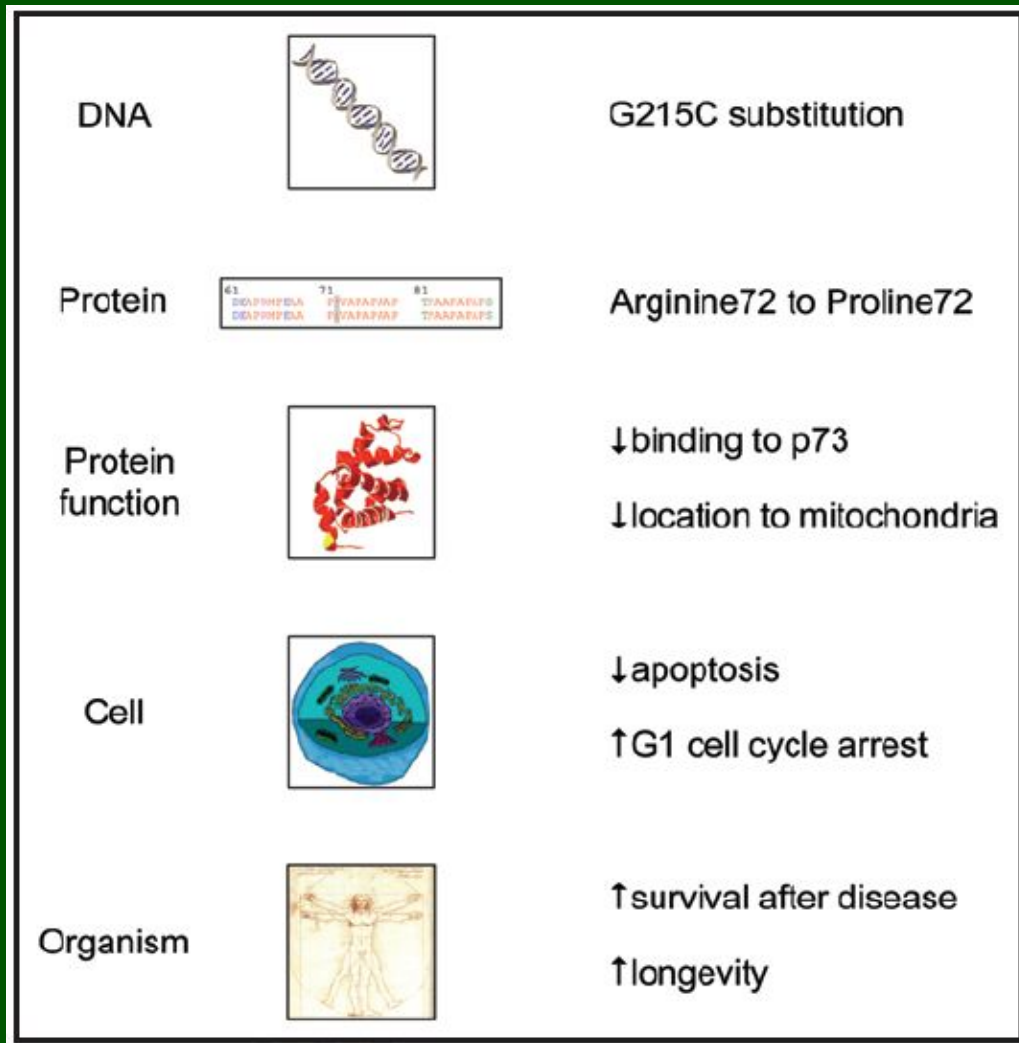


Активированный p53 препятствует накоплению генетических повреждений в эмбриональных стволовых клетках путем репрессии гена *Nanog*

Nanog необходим для самоподдержания ES-клеток, при его репрессии – дифференцировка.



У людей с аллелем p53 Pro72, менее подвержены раку, но умирают раньше, опухоли не возникают, но наблюдается преждевременное старение (данные получены на датской популяции, n=9912)



Инактивация функции 53



- Повышение содержания кислородных радикалов
- Ослабление G1- и G2-чекпойнтов
- Подавление индукции апоптоза
- Ослабление репарации ДНК
- Стимуляция ангиогенеза и васкулогенной мимикрии
- Гликолитический тип дыхания
- Повышение активности теломеразы
- Увеличение экспрессии маркеров плюрипотентности



- Мутагенез
- Нечувствительность к рост-супрессирующим сигналам
- Увеличение пролиферативного потенциала (“иммортализация”)
- Увеличение доли клеток со свойствами ОСК

Нарушения функции p53

```
graph TD; A[Нарушения функции p53] --> B[Нормальная клетка]; A --> C[Опухолевая клетка]; B --> D[Резкое увеличение вероятности возникновения новообразования (синдром Ли-Фраумени и др.)]; C --> E[Прогрессия новообразования (увеличение агрессивности, устойчивость к химиотерапии)];
```

Нормальная
клетка



Резкое увеличение вероятности
возникновения новообразования
(синдром Ли-Фраумени и др.)

Опухолевая
клетка



Прогрессия новообразования
(увеличение агрессивности,
устойчивость к химиотерапии)

Пути инактивации p53 в опухолевых клетках:

1) Мутации гена p53

- 30-60% опухолей разной локализации.

2) Амплификация и гиперэкспрессия онкогена Mdm2

- 15-25% остеосарком и фибросарком.

3) Экспрессия онкобелка E6

- HPV-позитивные раки шейки матки.

4) Нарушения транспорта p53 в ядро

- большая часть нейробластом и 10-15% раков молочной железы (взаимодействие с эстрогеновыми рецепторами).

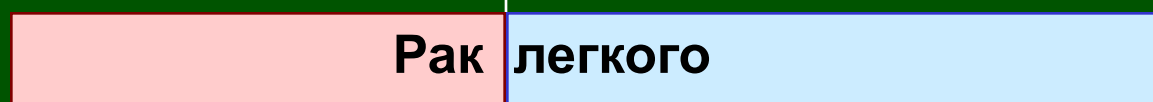
5) NF-κB-зависимое подавление функциональной активности p53

- подавляющее большинство раков почки

Мутации p53 - наиболее универсальное молекулярное изменение в опухолях человека

Число случаев (x1000) с мутациями p53

250 200 150 100 50 50 100 150 200 250
Развивающиеся страны Развитые страны



Рак легкого



Рак толстой кишки



Рак желудка



Рак мочевого пузыря



Рак молочной железы

% опухолей 3-4 стадий с мутациями p53

70%

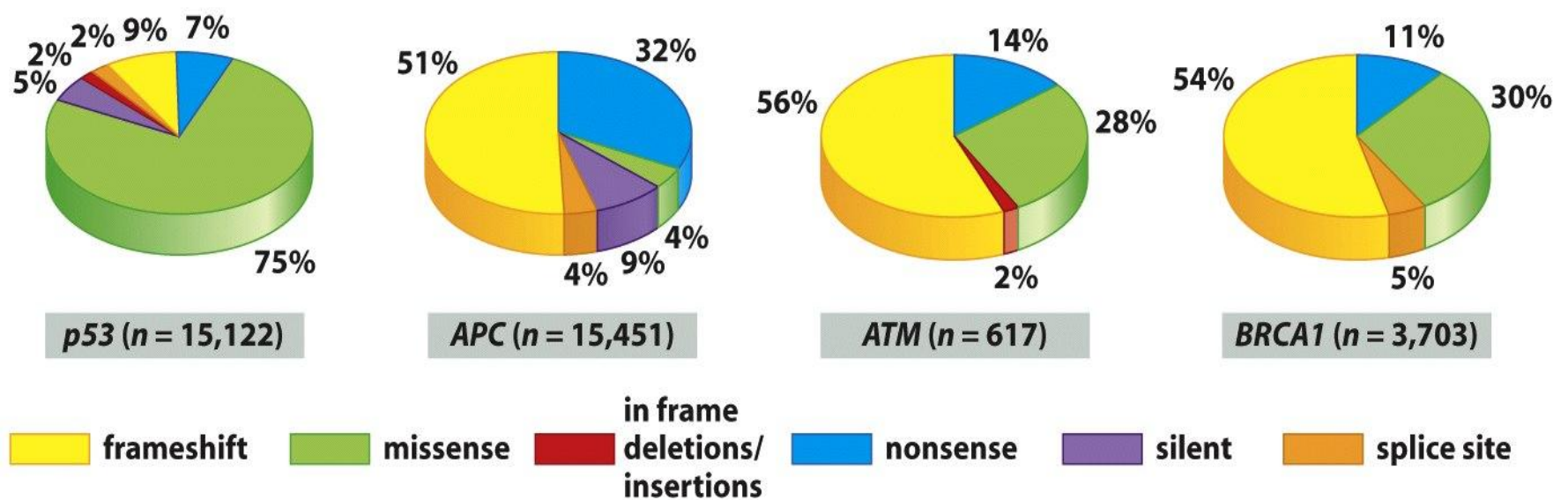
65%

45%

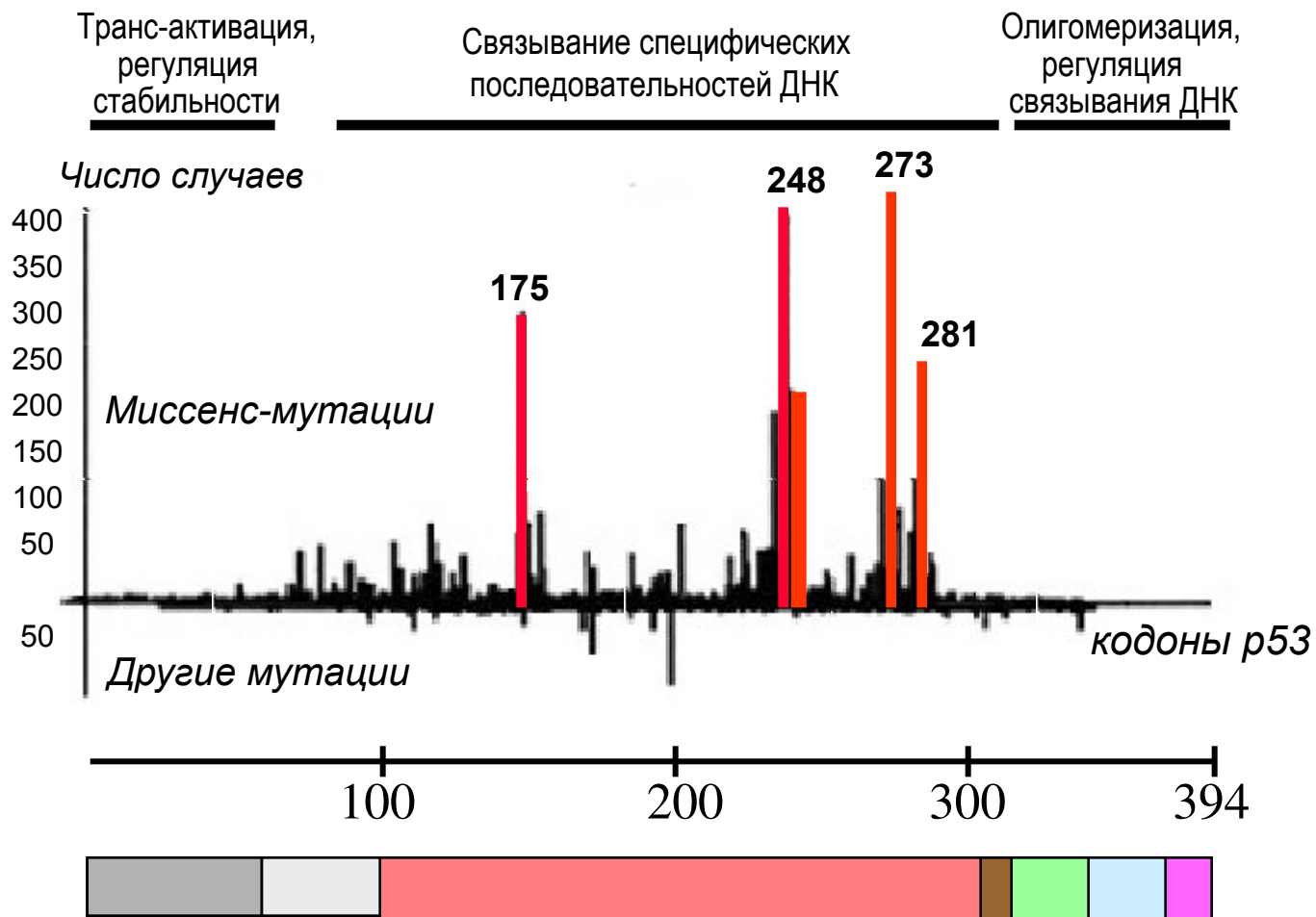
61%

30%

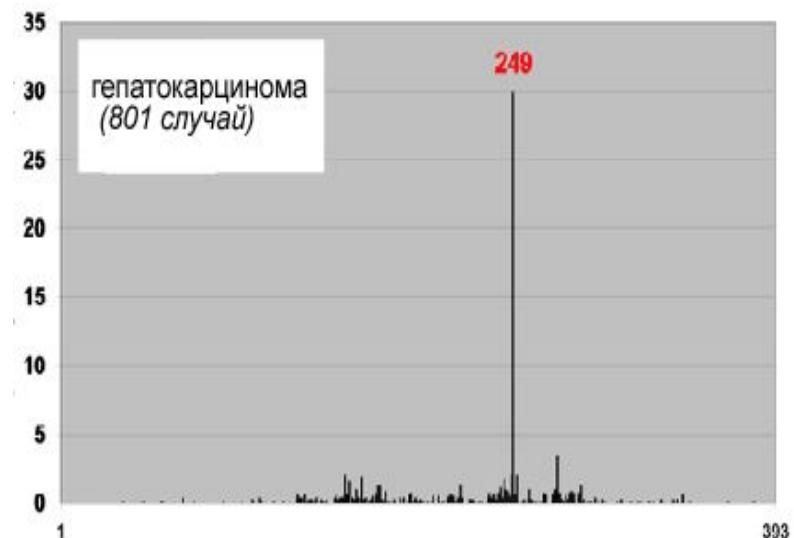
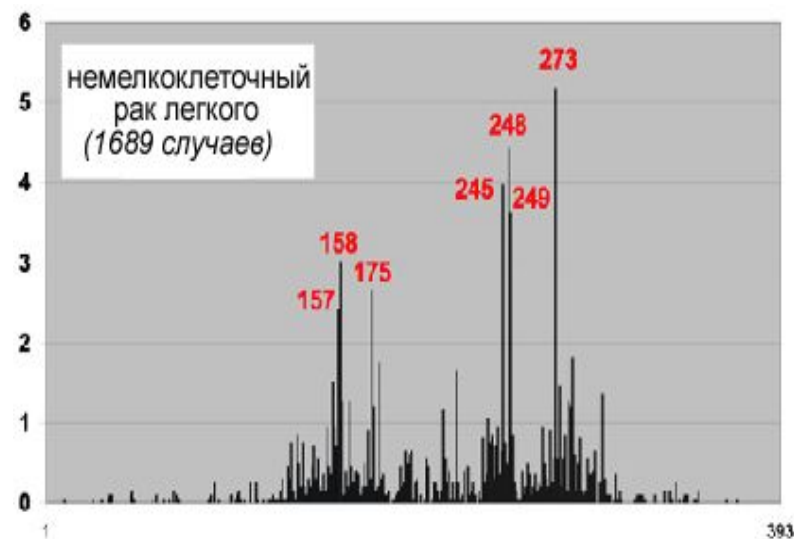
В отличие от других опухолевых супрессоров, большинство мутаций p53 являются миссенс-мутациями, приводящими к замене аминокислотных остатков



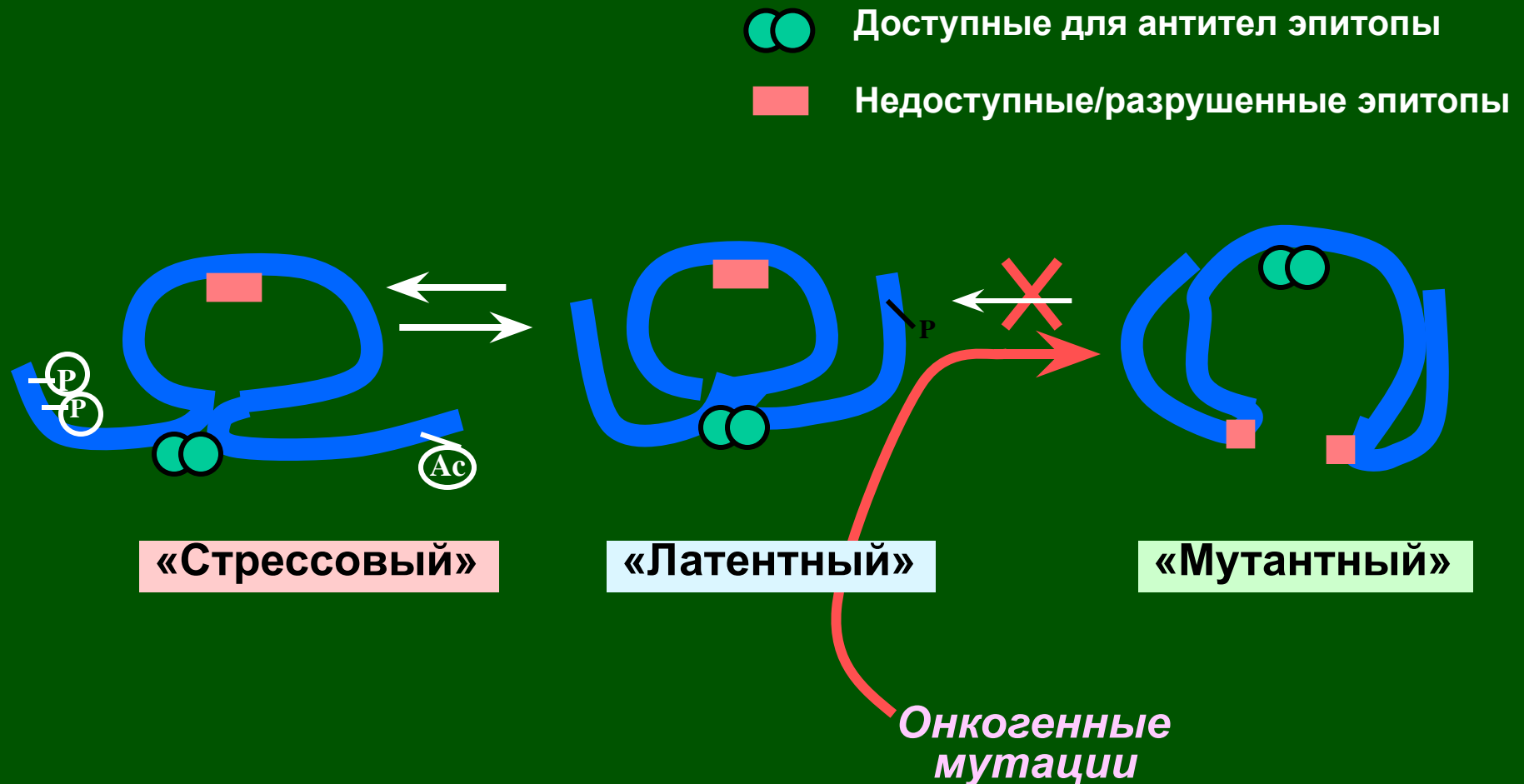
Распределение мутаций p53 в опухолях человека по кодонам (все типы новообразований)



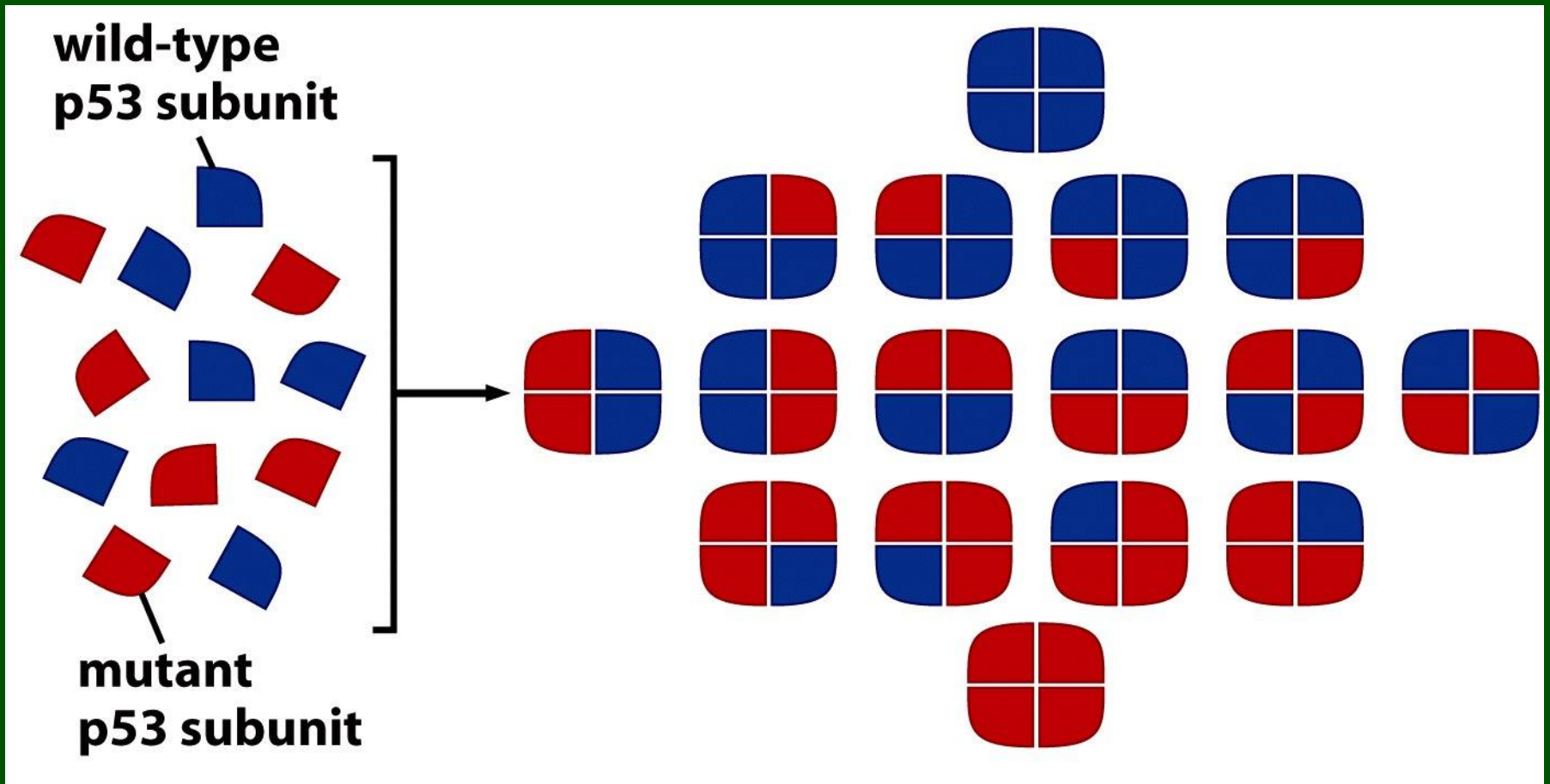
«Горячие точки» мутаций p53 при разных формах опухолей



Наиболее характерные для опухолей мутации необратимо изменяют конформацию белка, что позволило получить антитела, различающие нормальные и мутантные формы p53



Наиболее характерные для опухолей мутантные p53 инактивируют продукт неизмененного аллеля за счет образования транскрипционно-неактивных тетрамеров



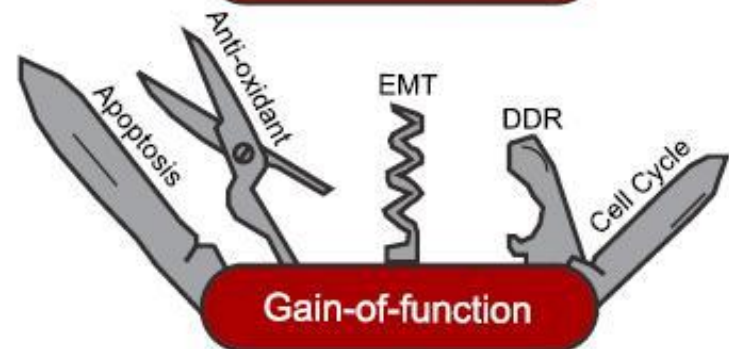
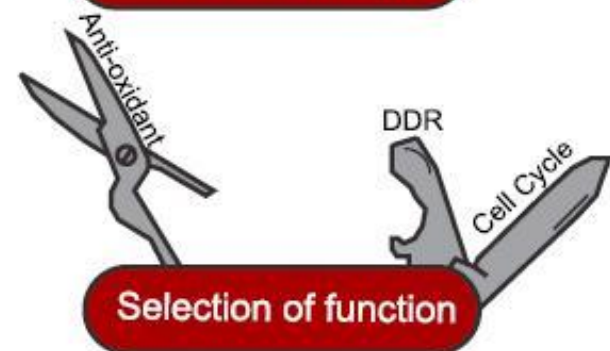
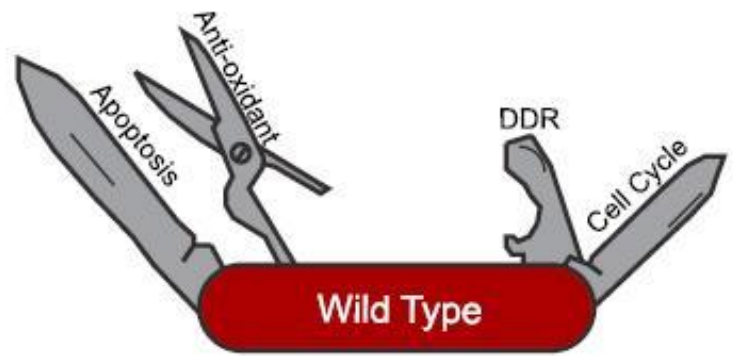
Мутантный p53

Доминантно-негативный эффект

Инактивация p53-зависимых путей регуляции антиоксидантной защиты, клеточного цикла, апоптоза и т.д.

Возд
ме

↑ MYC (Myc)
↑ NFkB2
↑ dUTPa
↓ гомоло



Гомологи p53:



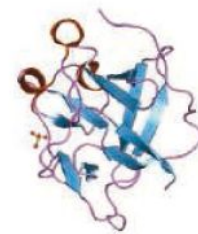
November 28, 2019

Total PubMed Citations



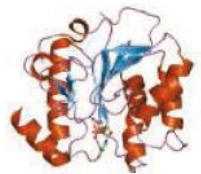
p53

97931



p63

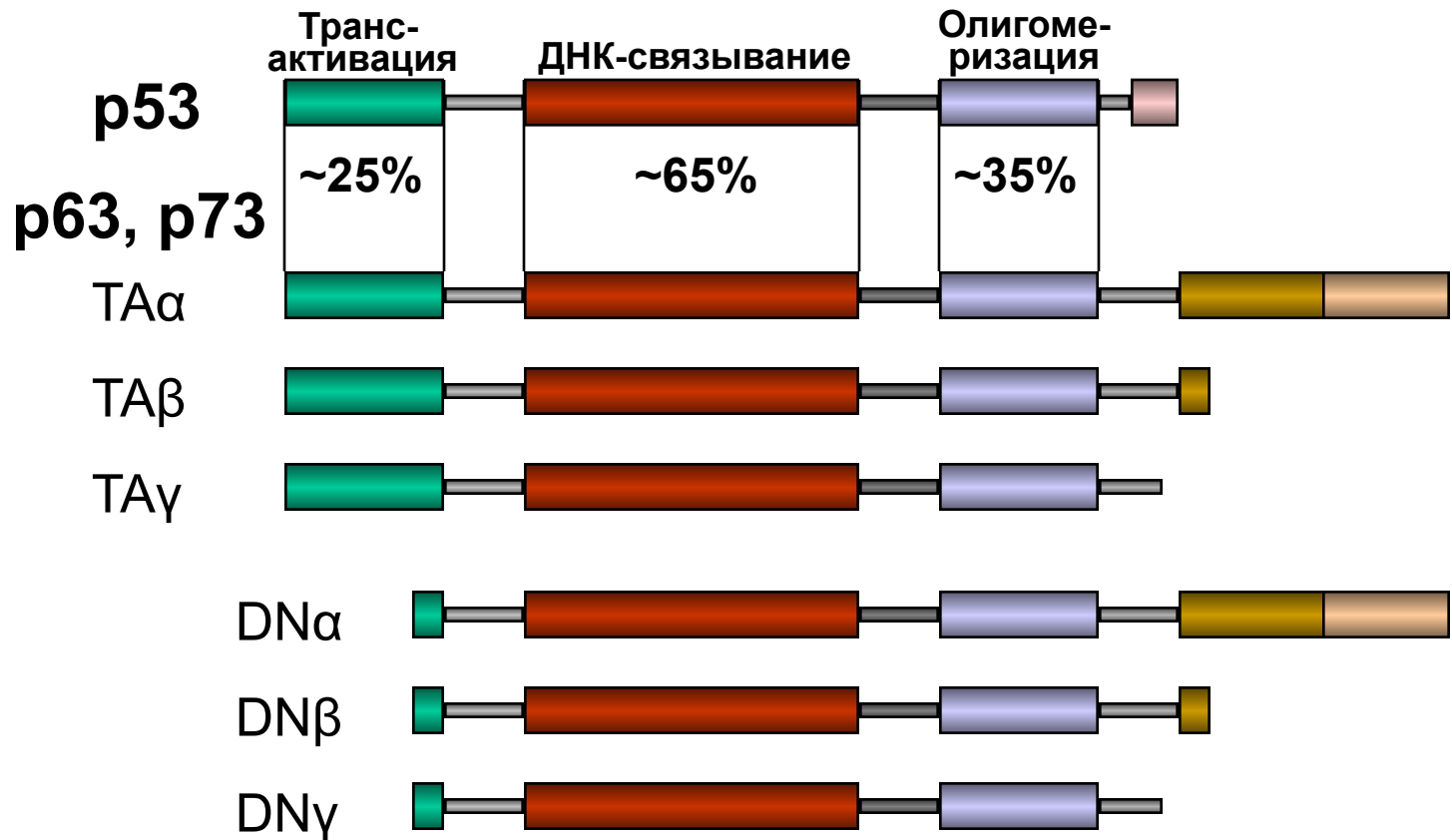
4986



p73

2448

Гомологи p53:



РНК каждого из генов, p63 и p73, экспрессируется с двух промоторов и подвергается альтернативному сплайсингу. В результате образуется как минимум 6 изоформ белка p63 и 14 изоформ белка p73, обладающих (ТА) или не обладающих (DN) способностью транс-активировать p53-респонсивные гены и индуцировать остановку клеточного цикла и апоптоз.

Нокаут у мышей:

p53-/-



~Нормальное развитие, опухоли у 100% мышей в возрасте до 1 года: лимфомы, саркомы и др.

p63-/-



Гибель после рождения: отсутствие кожи и др. эпителия

p73-/-



Жизнеспособные мыши с расстройствами зрения, слуха, поведения. Нет вомероназального органа. Отсутствие опухолей в возрасте до 2-х лет.

р53

р63

р73

Экспрессия:

Клетки
всех тканей

Стволовые и недифференци-
рованные клетки ряда тканей
(в основном DN формы)

Активация:

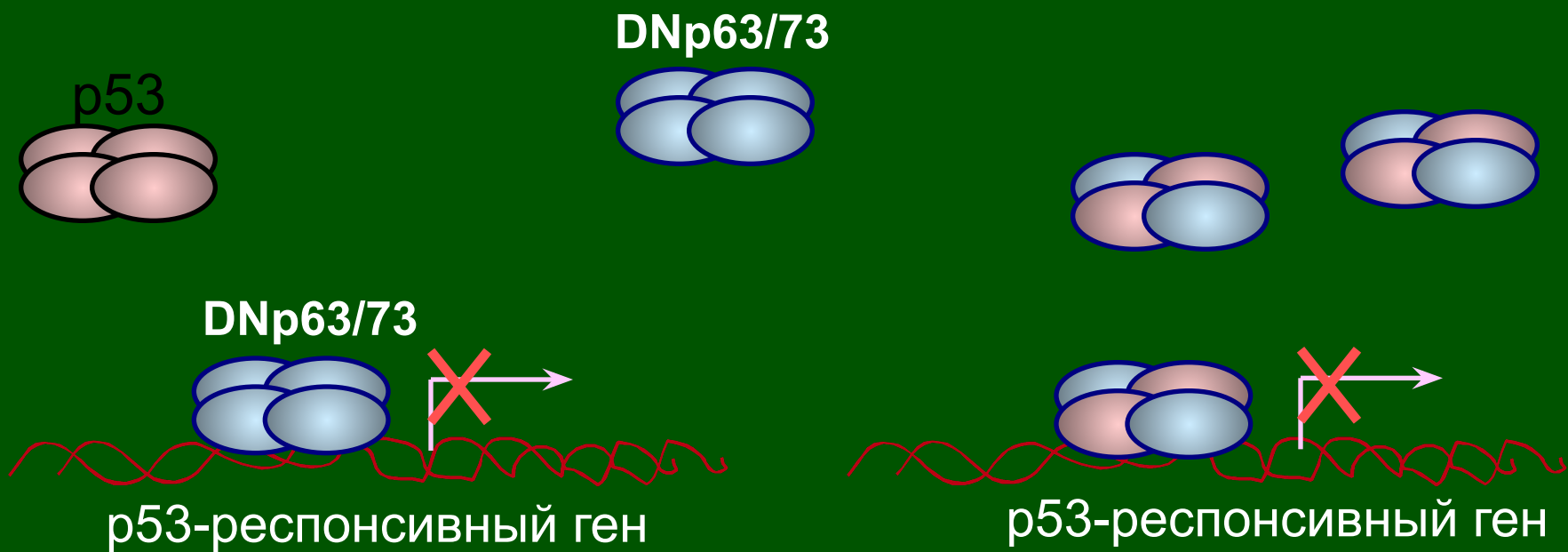
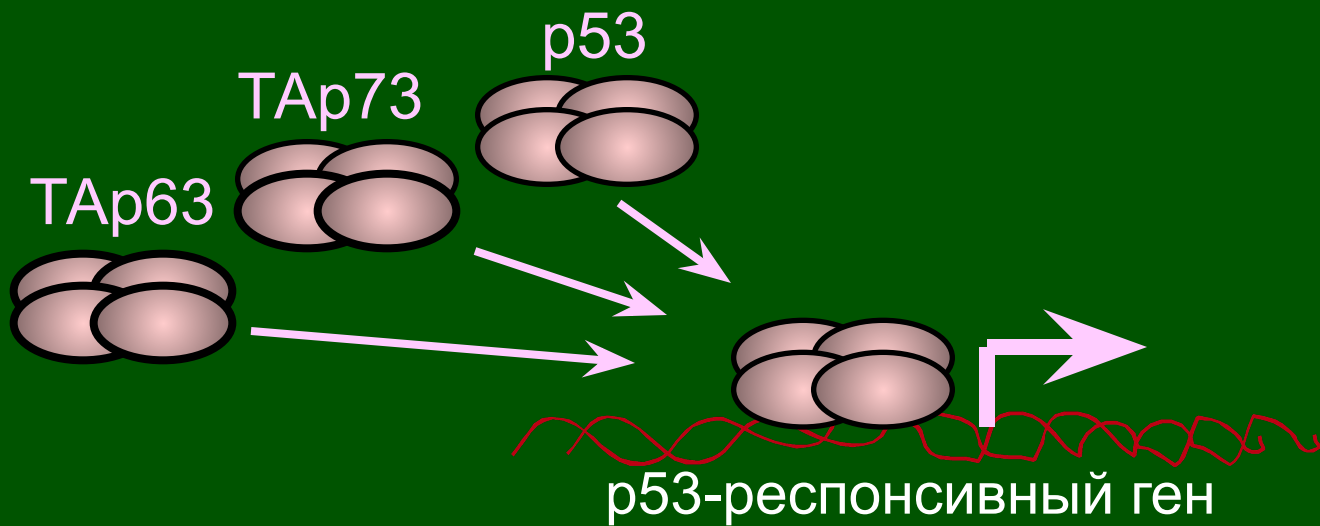
Самые разные
стрессы

Некоторые стрессы

Опухоли:

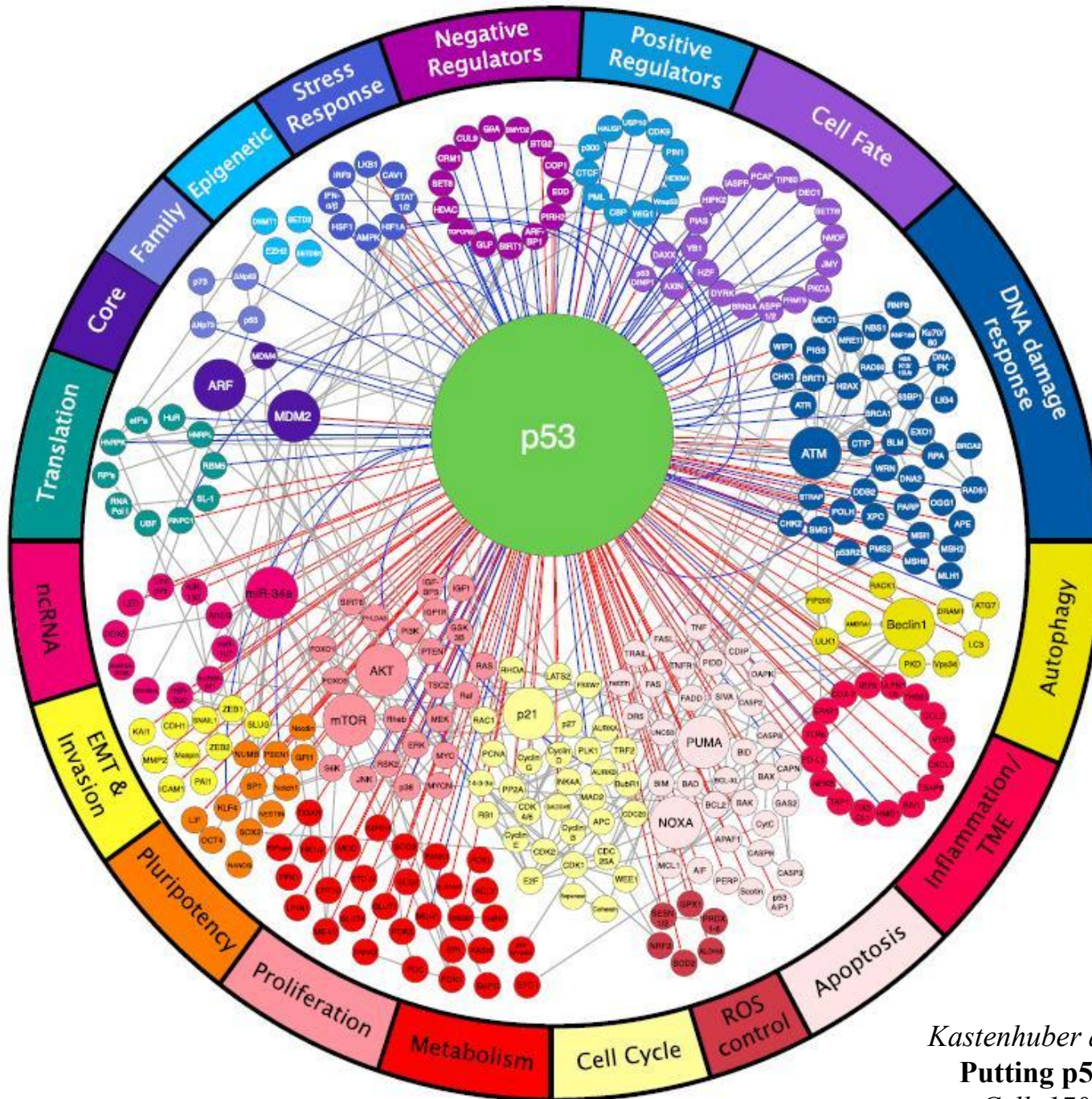
Инактивация

Повышение экспрессии
DN форм



Конкуренция с p53

Секвестрирование p53



Kastenhuber and Lowe, 2017.
Putting p53 in Context.
Cell, 170: 1062-1078

Курс «Биология опухолевой клетки»
(2019 г.)

Н.Л. Лазаревич

Лекция 9

Эндогенные и экзогенные канцерогенные факторы