

# Злокачественный рост

**Солидные опухоли**  
(раки, саркомы и др.)

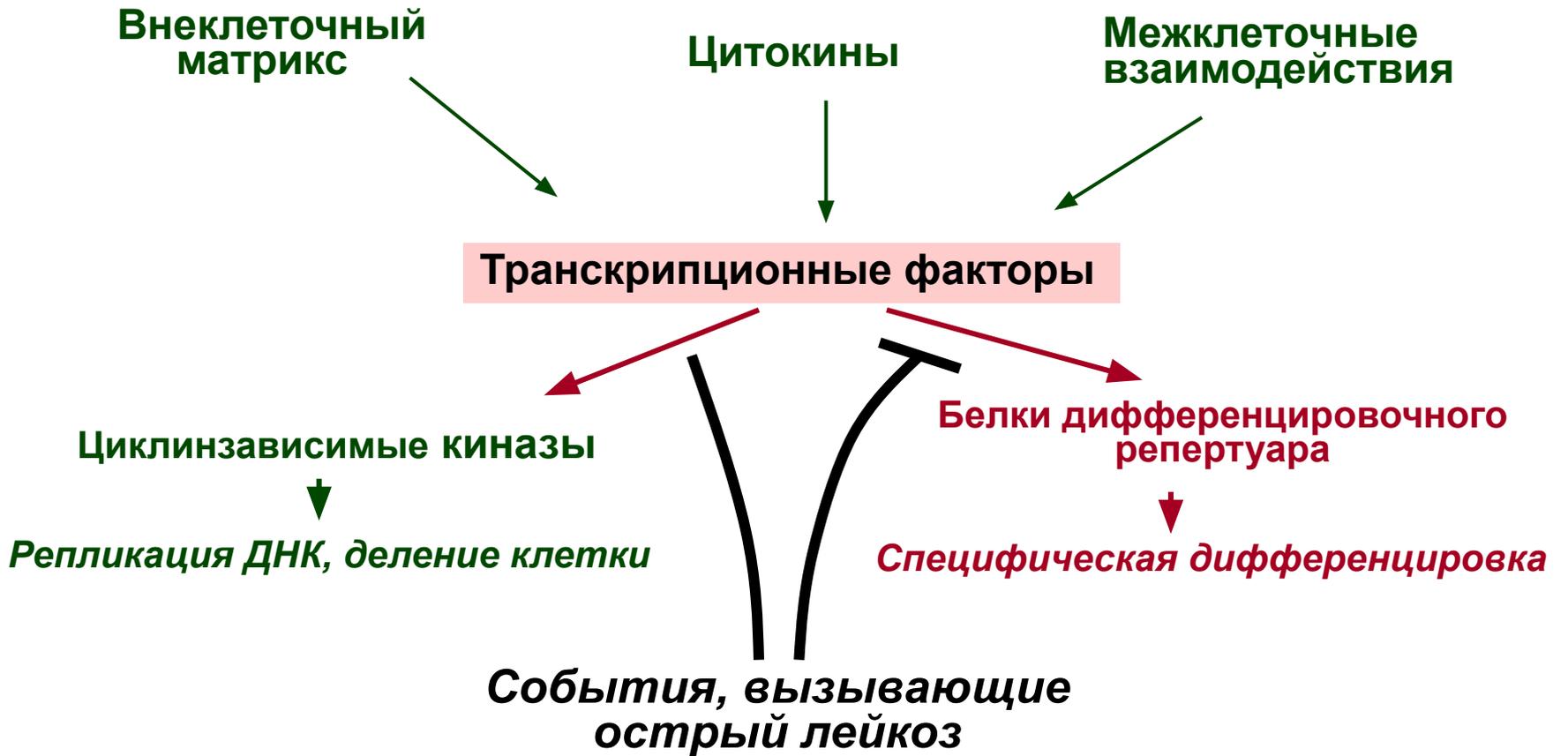
**Инвазия,  
метастазирование**

**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)**

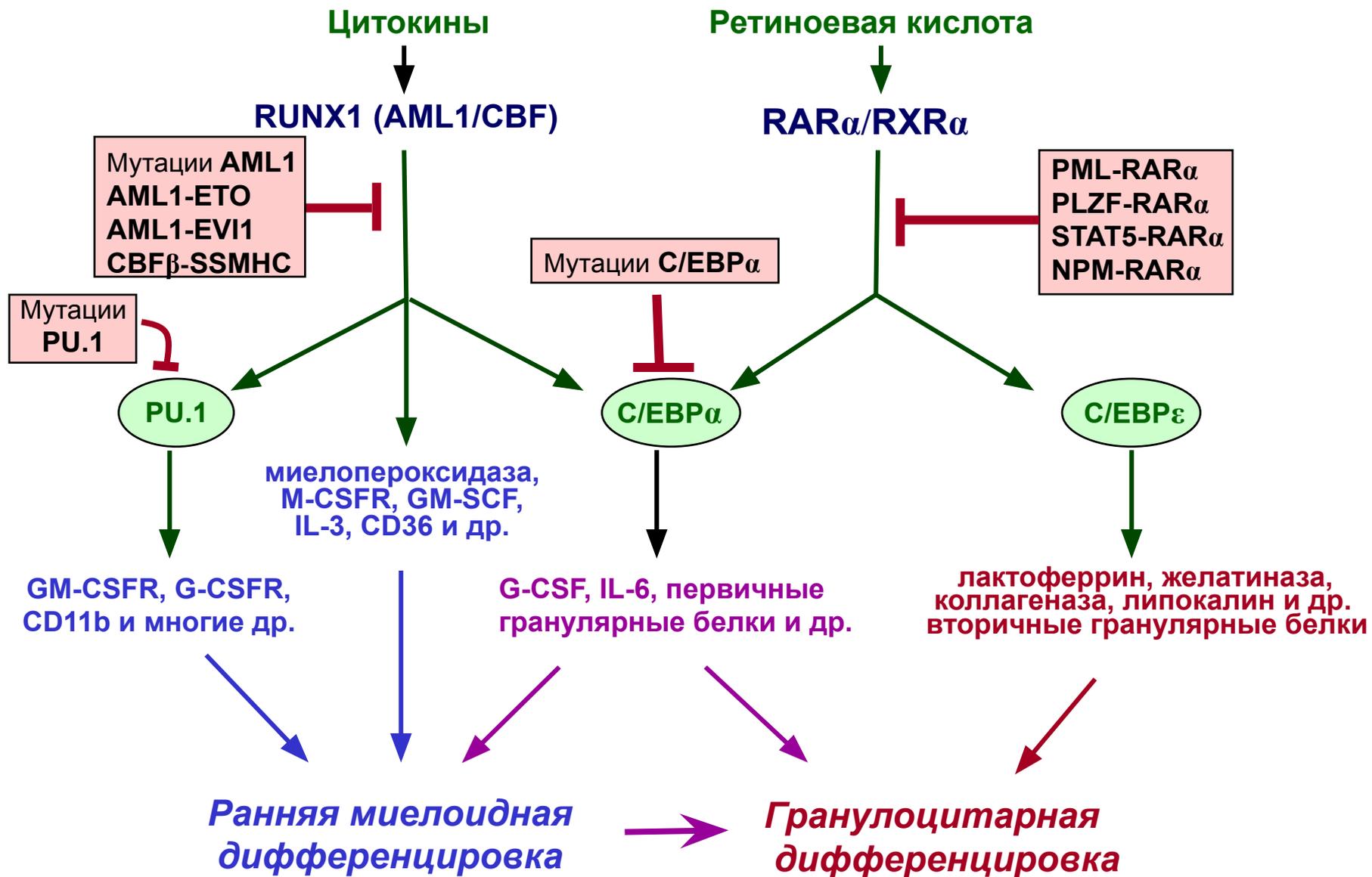
**Блок дифференцировки  
класс 2**

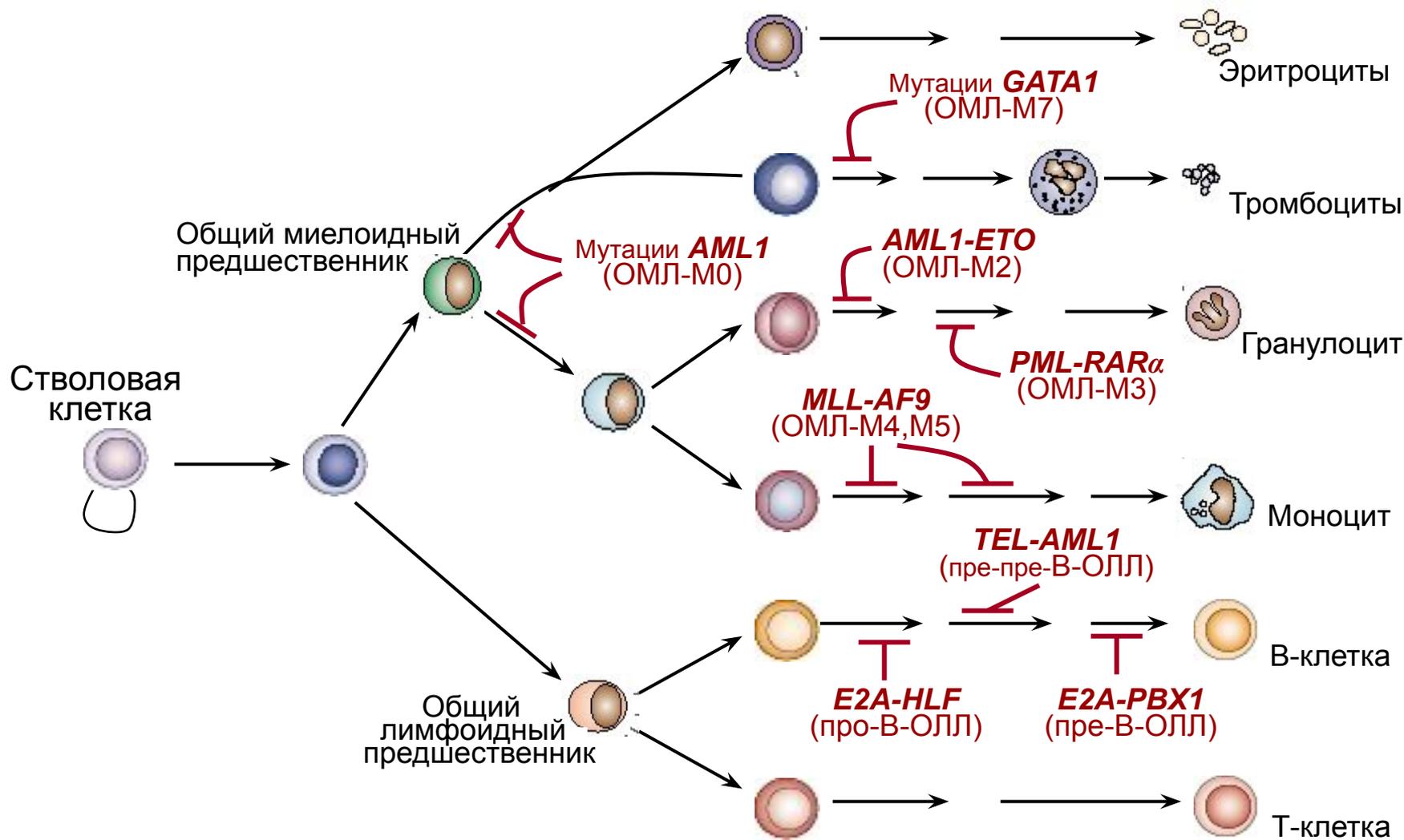
Мутации *FLT3*,  
Мутации *RAS*,  
Мутации *c-KIT*,  
*TEL-PDGFR $\beta$* ,  
*BCR-ABL* и др.

*AML1-ETO*,  
*CBF $\beta$ -SMMHC*,  
*RAR $\alpha$ -PML*,  
*TEL-AML1*;  
Мутации *AML1*, *PU.1*,  
*GATA1*, *C/EBP $\alpha$*  и др.

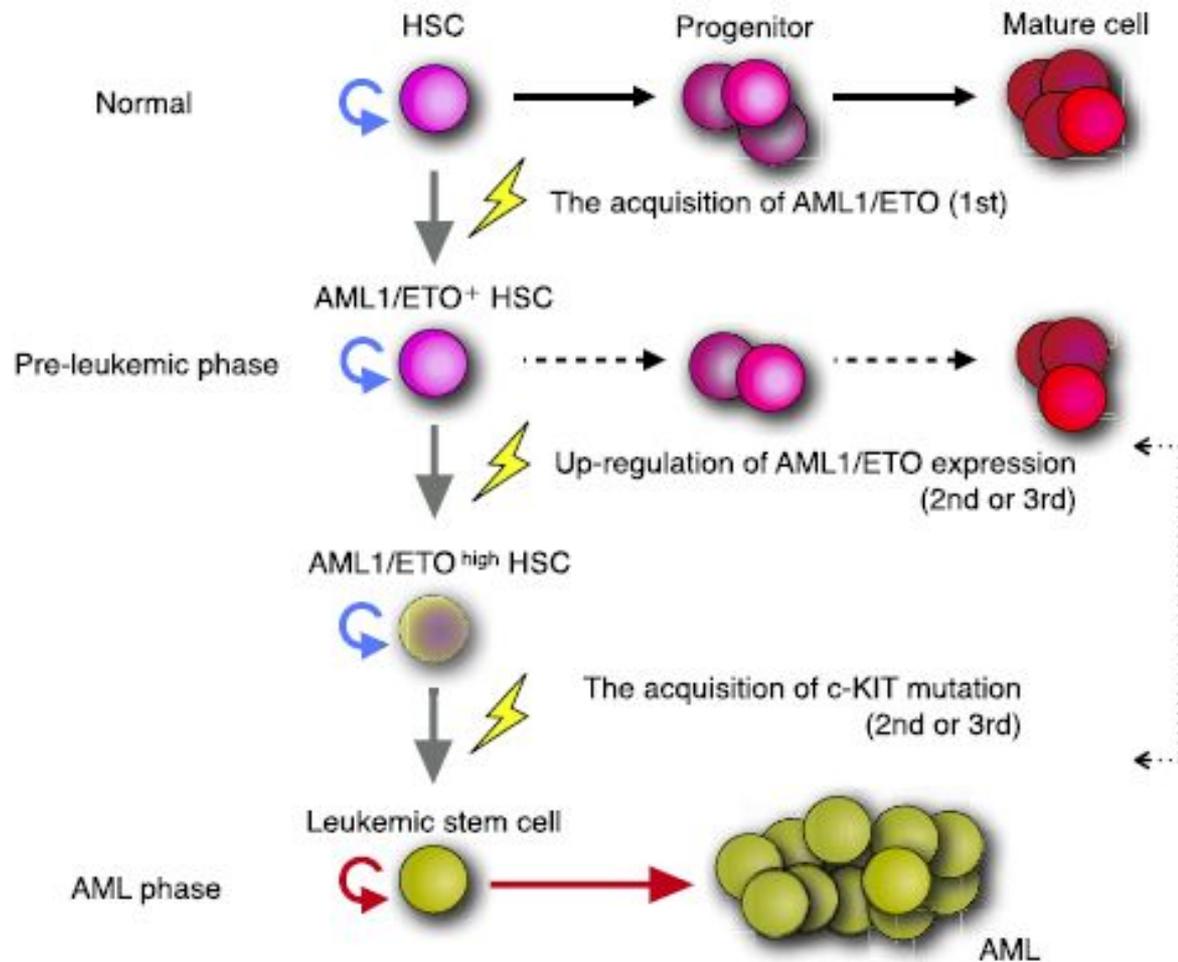
Острый лейкоз

# Ранняя миелоидная дифференцировка и ее нарушение при остром миелобластном лейкозе





# Мультистадийная схема развития лейкозов



**Курс «Биология опухолевой клетки»**  
(2019 г.)

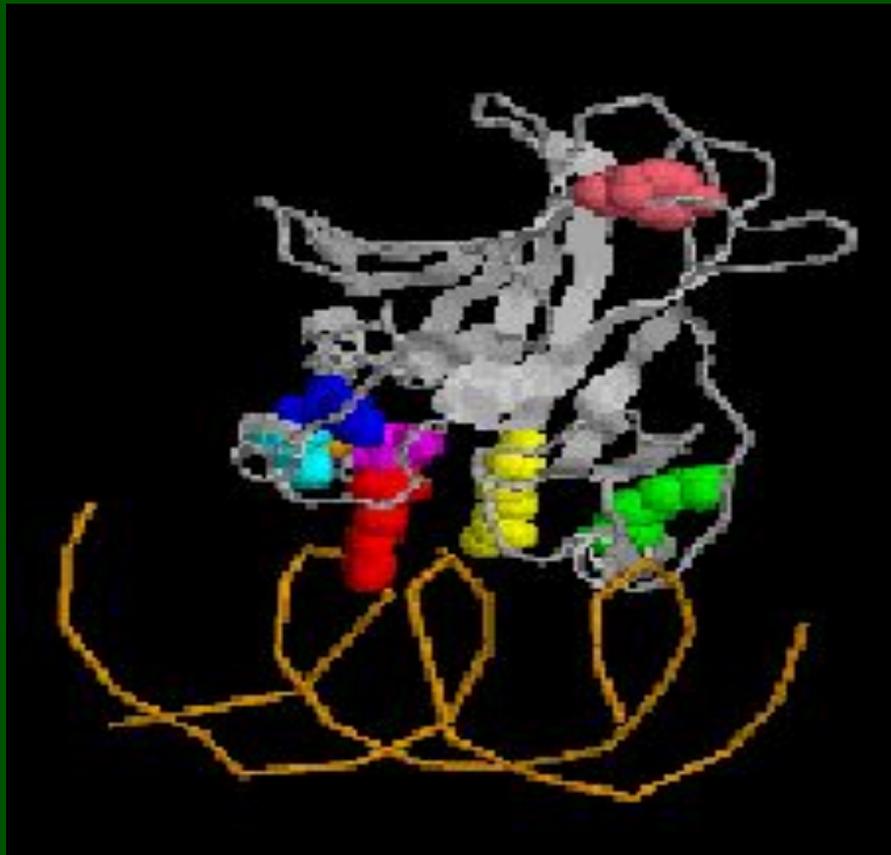
**Н.Л. Лазаревич**

**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**

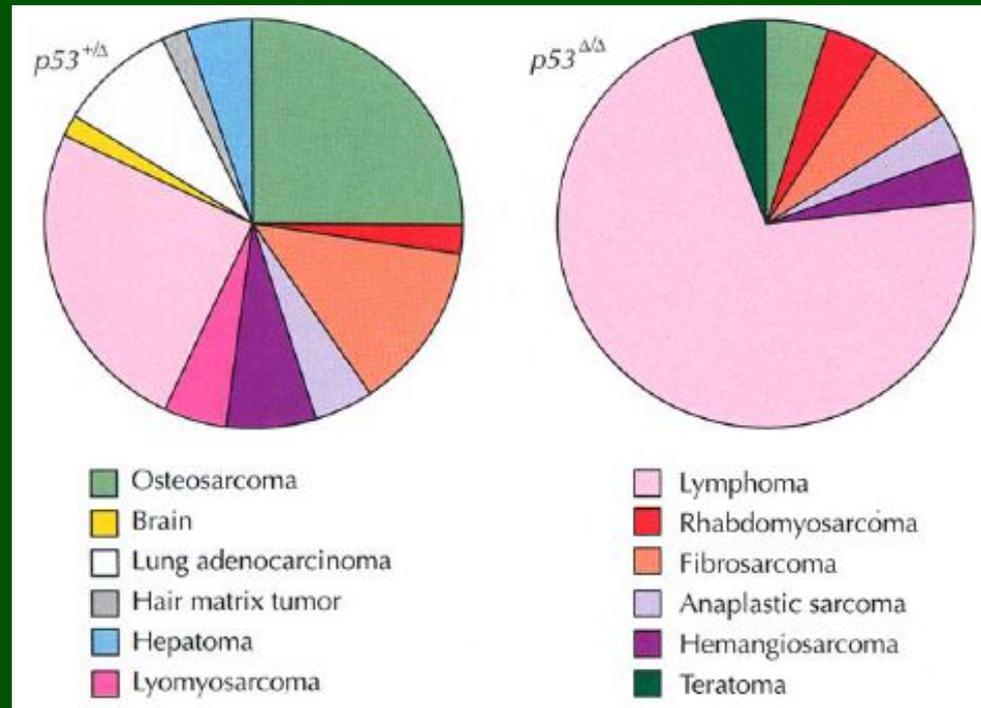
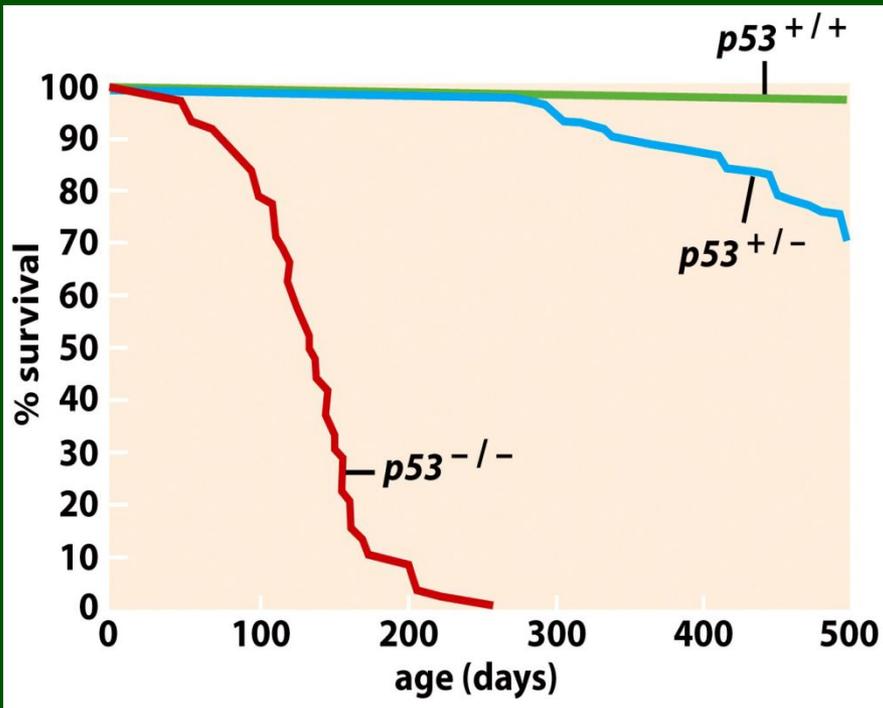


**Дисфункция p53 (мутации и др. аномалии) – наиболее универсальное молекулярное изменение в опухолях человека. Она характерна для большинства новообразований 50 разных типов.**

**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.**

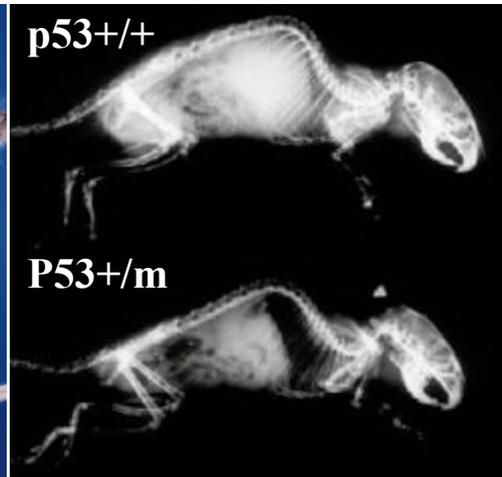
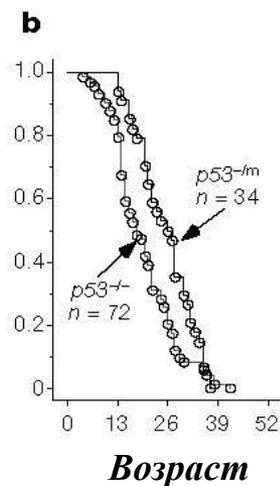
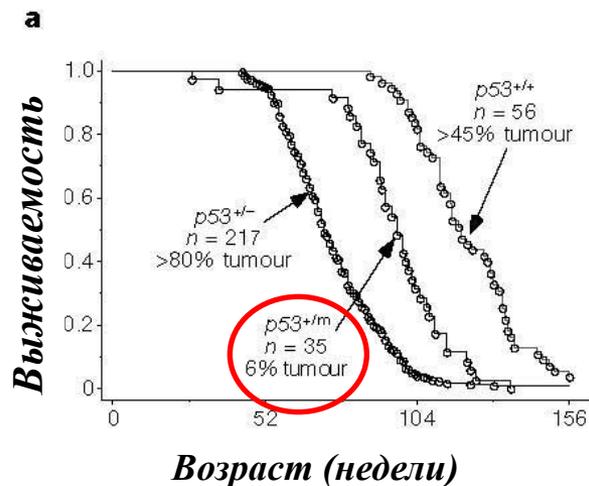
# Манипуляции с геном p53 у мышей:

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



# Манипуляции с геном p53 у мышей:

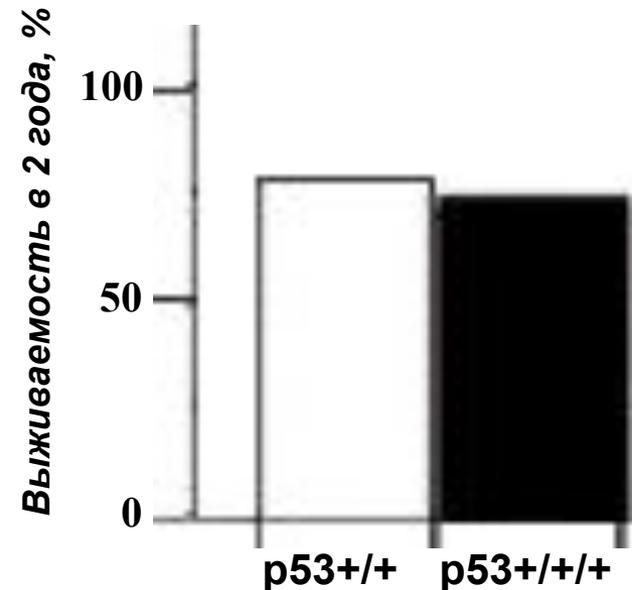
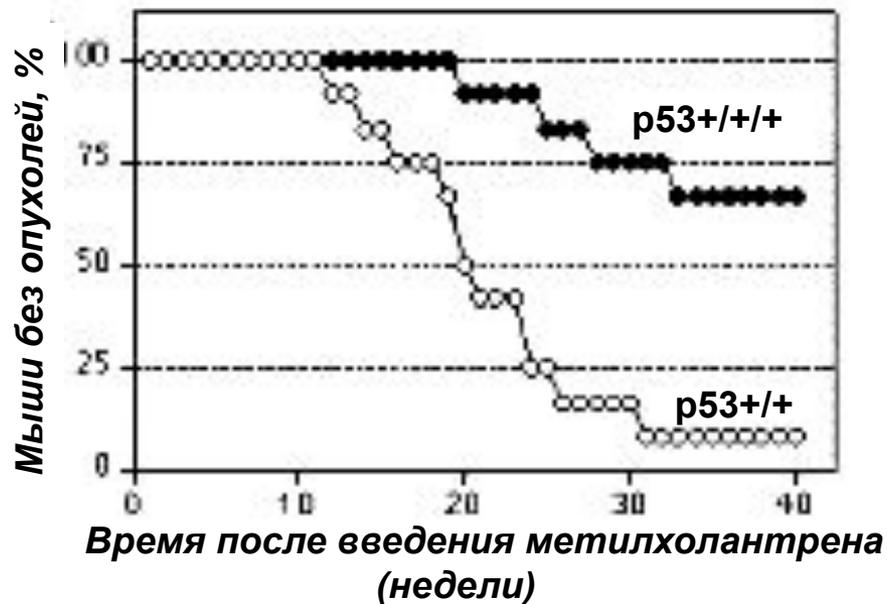
- 1) Гомозиготный нокаут гена p53 приводит к развитию новообразований в молодом возрасте у 95-100% животных;
- 2) У животных, экспрессирующих мутантный (m) “гиперактивный” p53, опухоли не возникают, но наблюдается преждевременное старение.



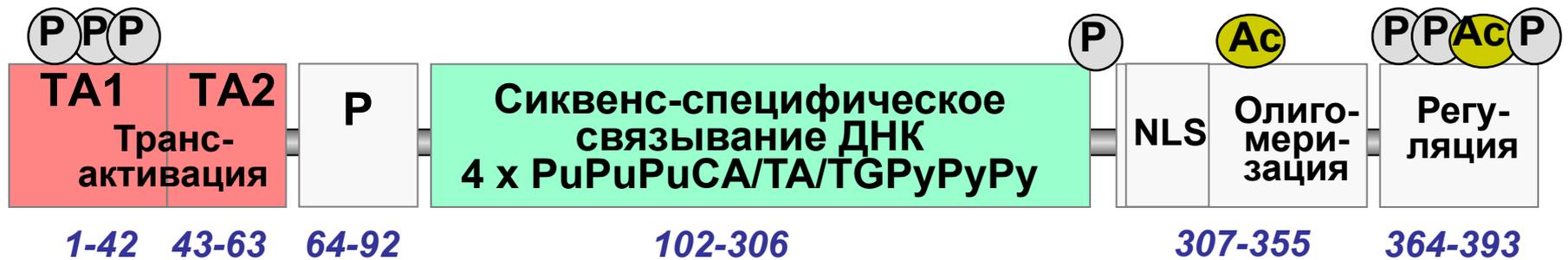
20 недель

## 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



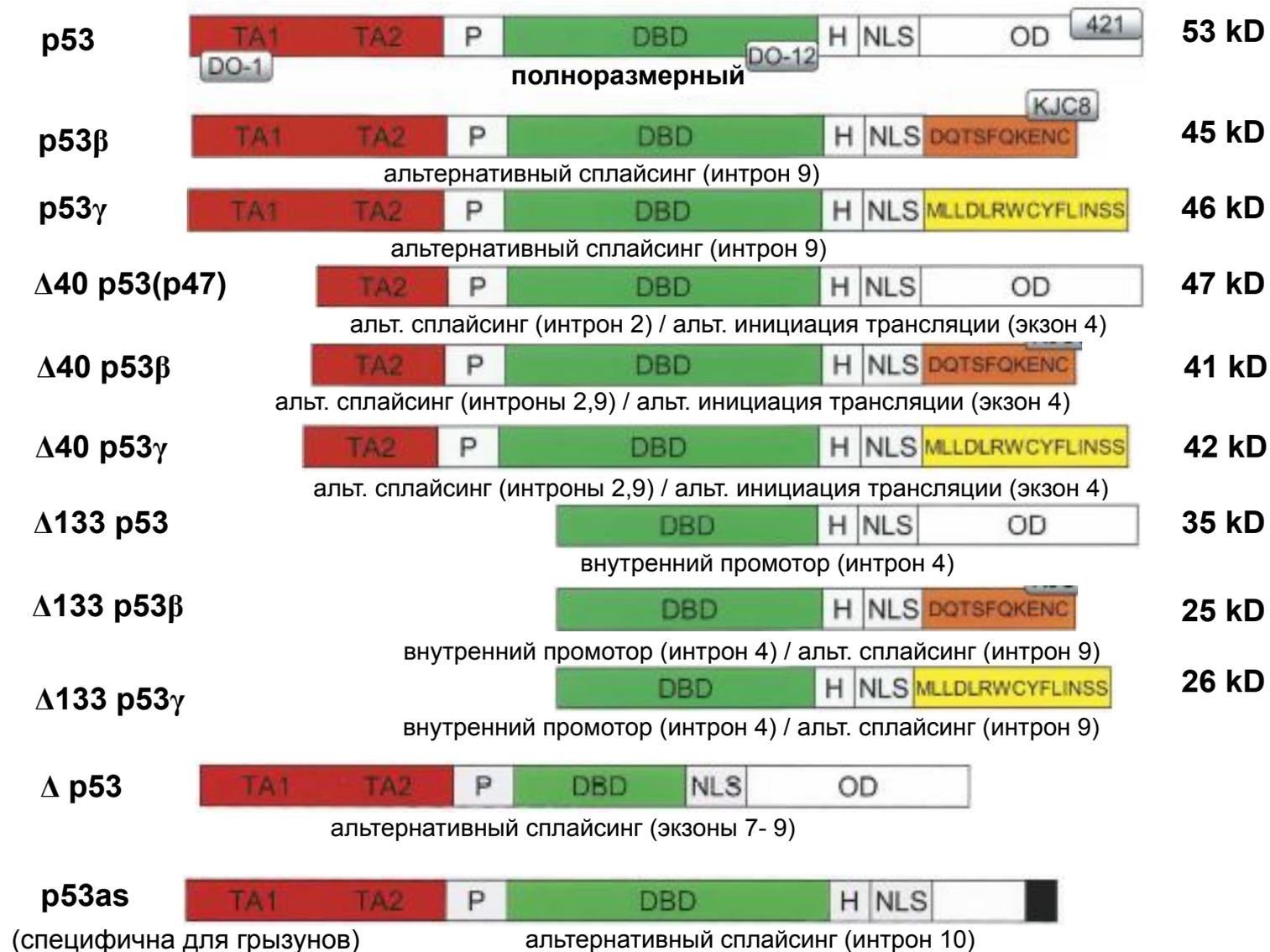
# Структурные домены полноразмерного p53



Ⓟ - сайты фосфорилирования; Ⓜ - сайты ацетилирования

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

# Изоформы p53



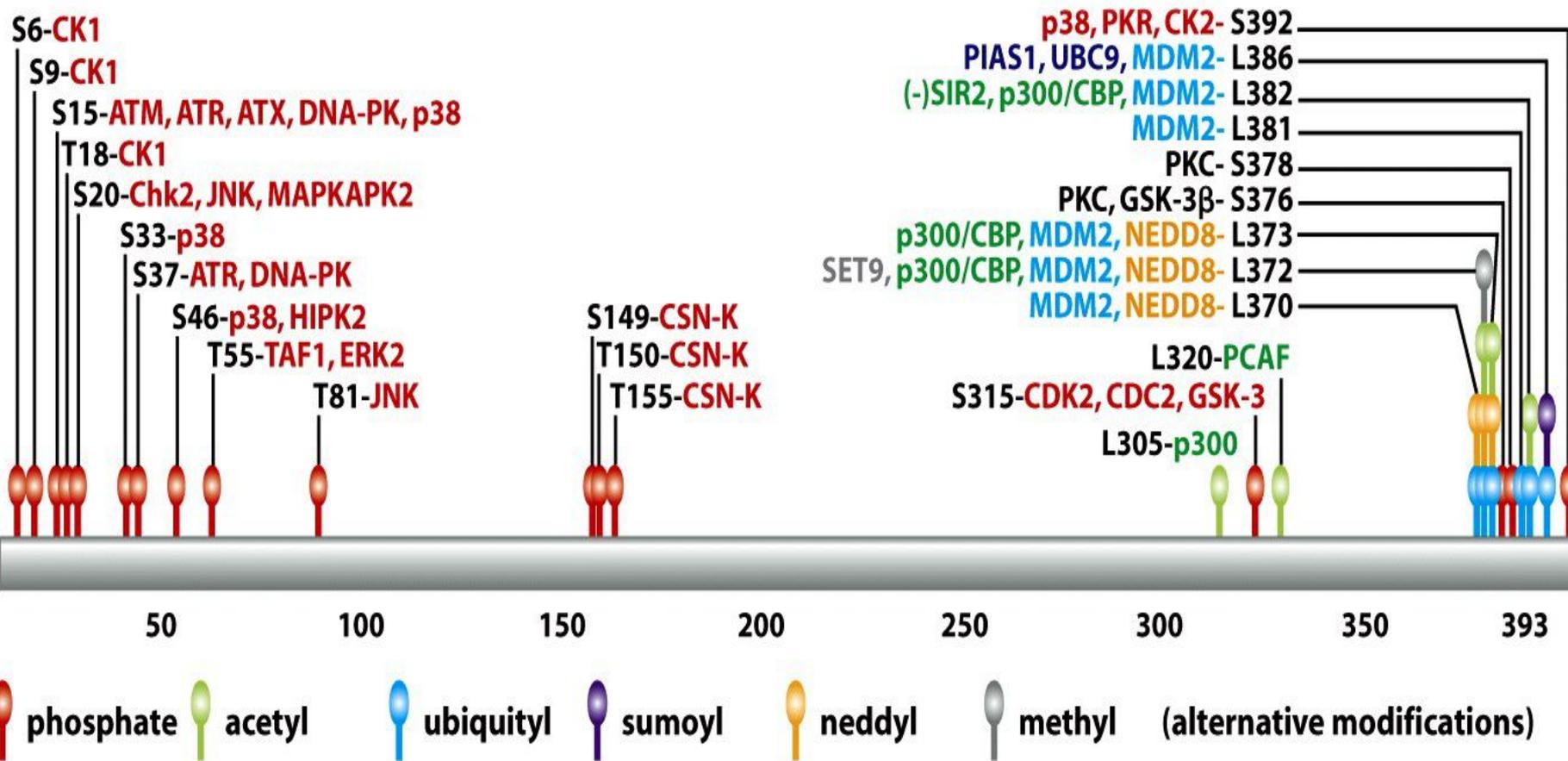


## Конформация молекул белка p53 претерпевает значительные изменения

В зависимости от приобретаемой конформации p53 способен:

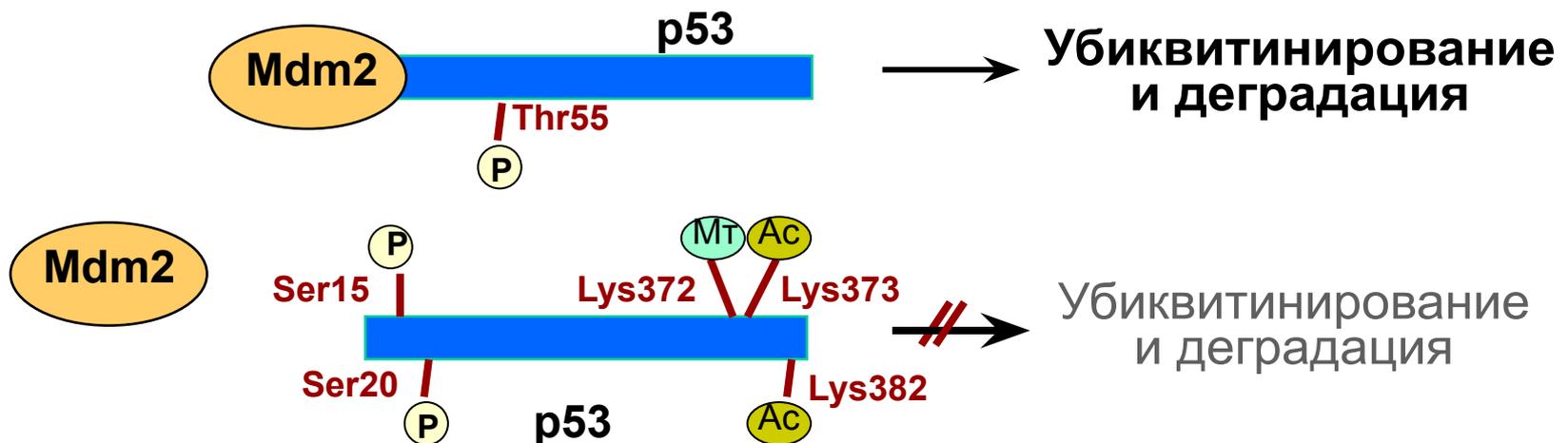
- ✓ Повышать транскрипцию определенных генов;
- ✓ Подавлять транскрипцию ряда генов;
- ✓ Стимулировать репарацию ДНК;
- ✓ Подавлять репликацию ДНК вирусов;

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



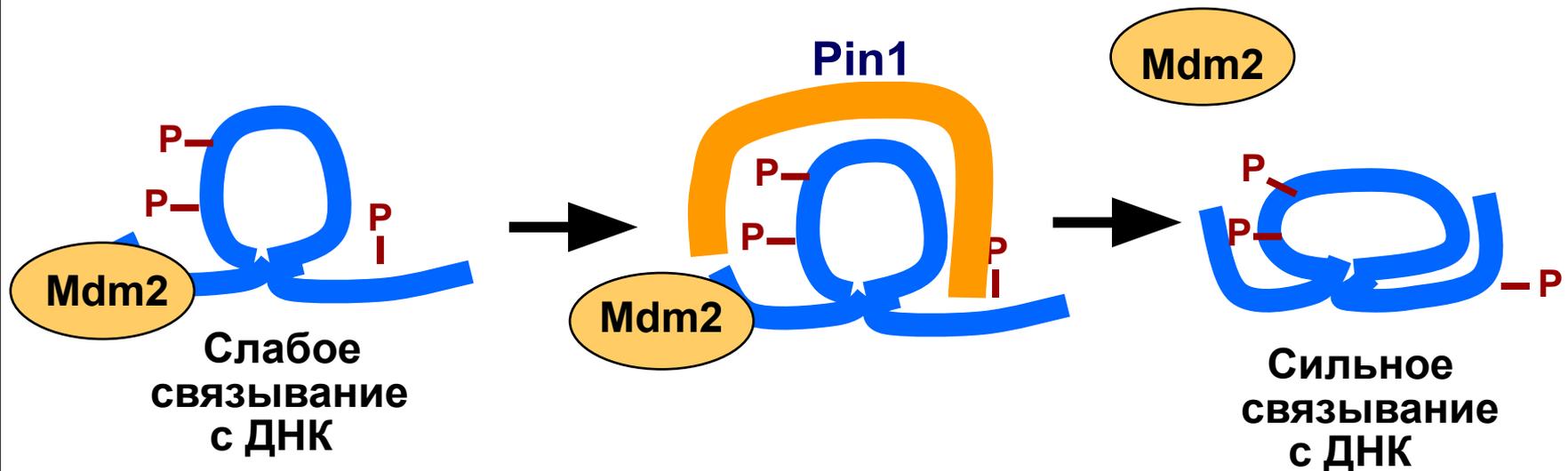
Конформация и функции p53 регулируются фосфорилированием, ацетилированием, убиквитинированием, сумоилированием, неддилированием, метилированием, окислением и др. **Вызываемые этими событиями модификации конформации p53 изменяют его способность связываться с другими белками и ДНК**

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).

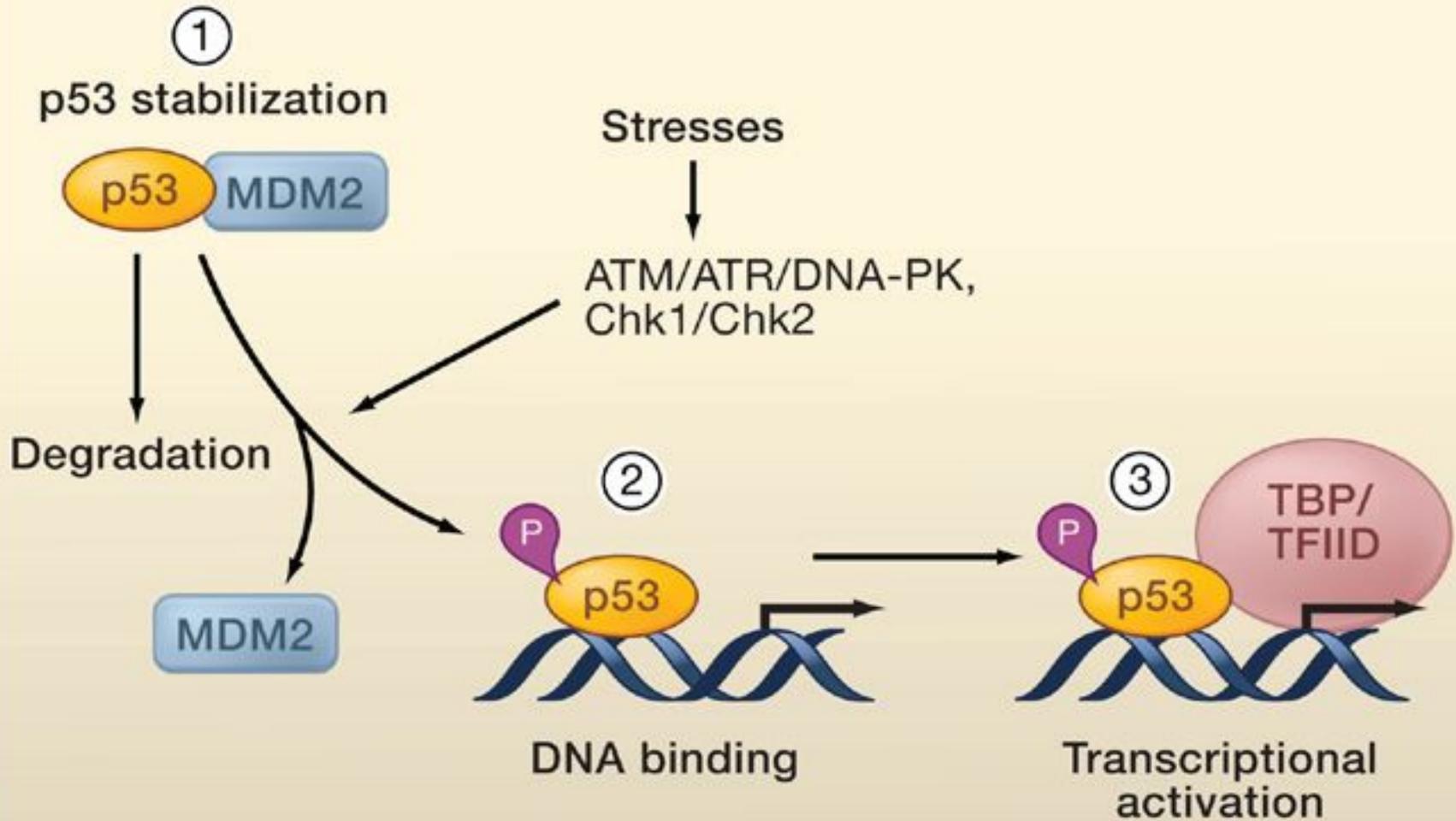
В результате меняется конформация *p53* и увеличивается его время жизни и способность связываться с определенными последовательностями ДНК;

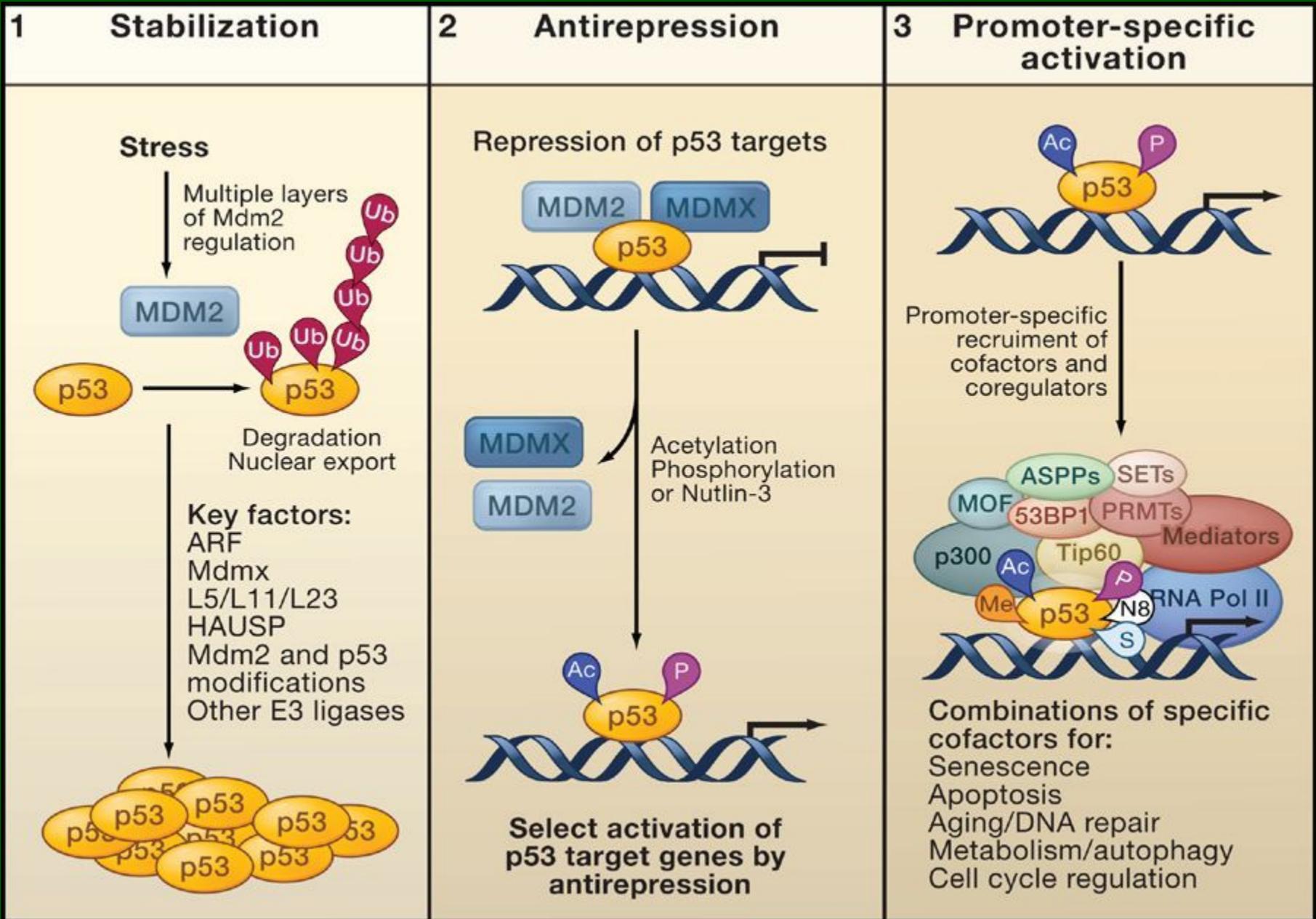


в) сумоилирование *Lys385* изменяет транскрипционную активность *p53*

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

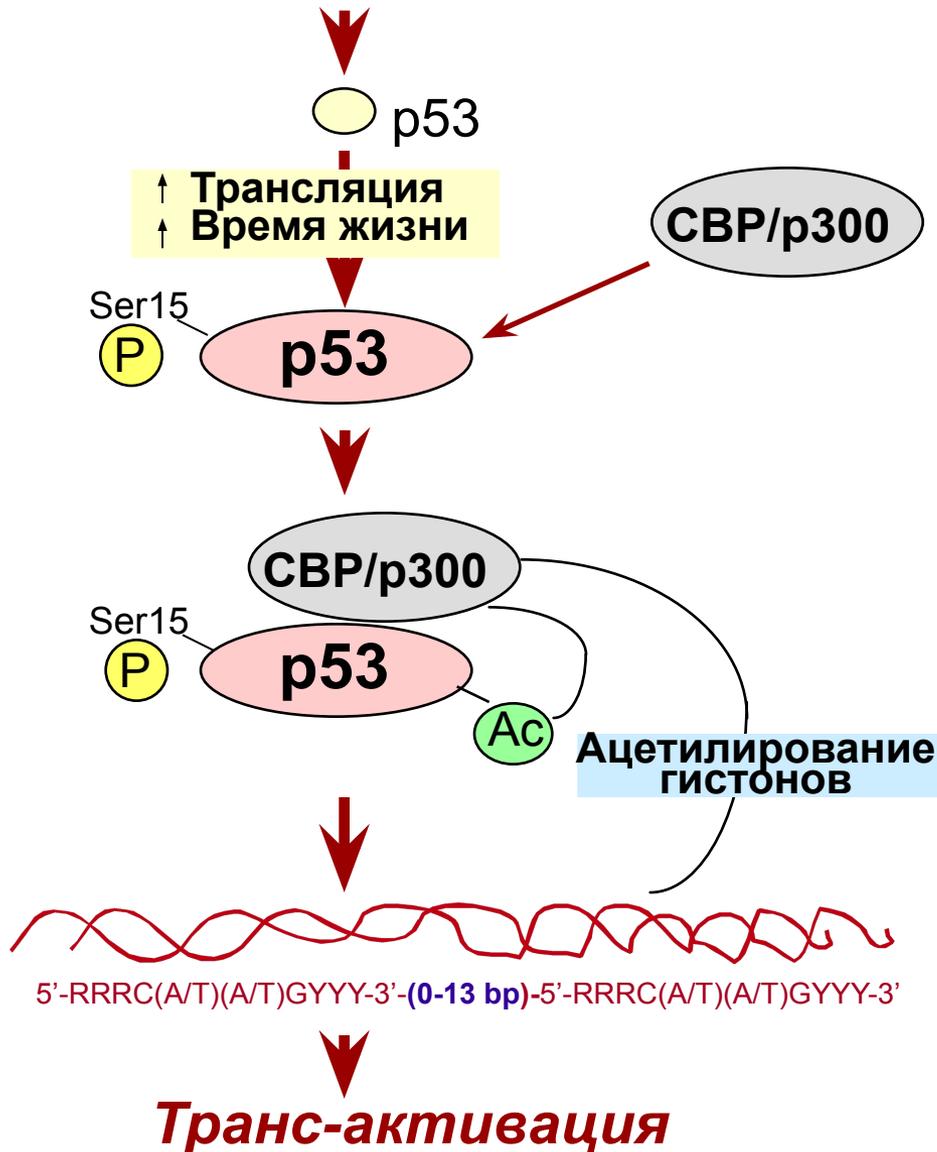
## Classic model of p53 activation



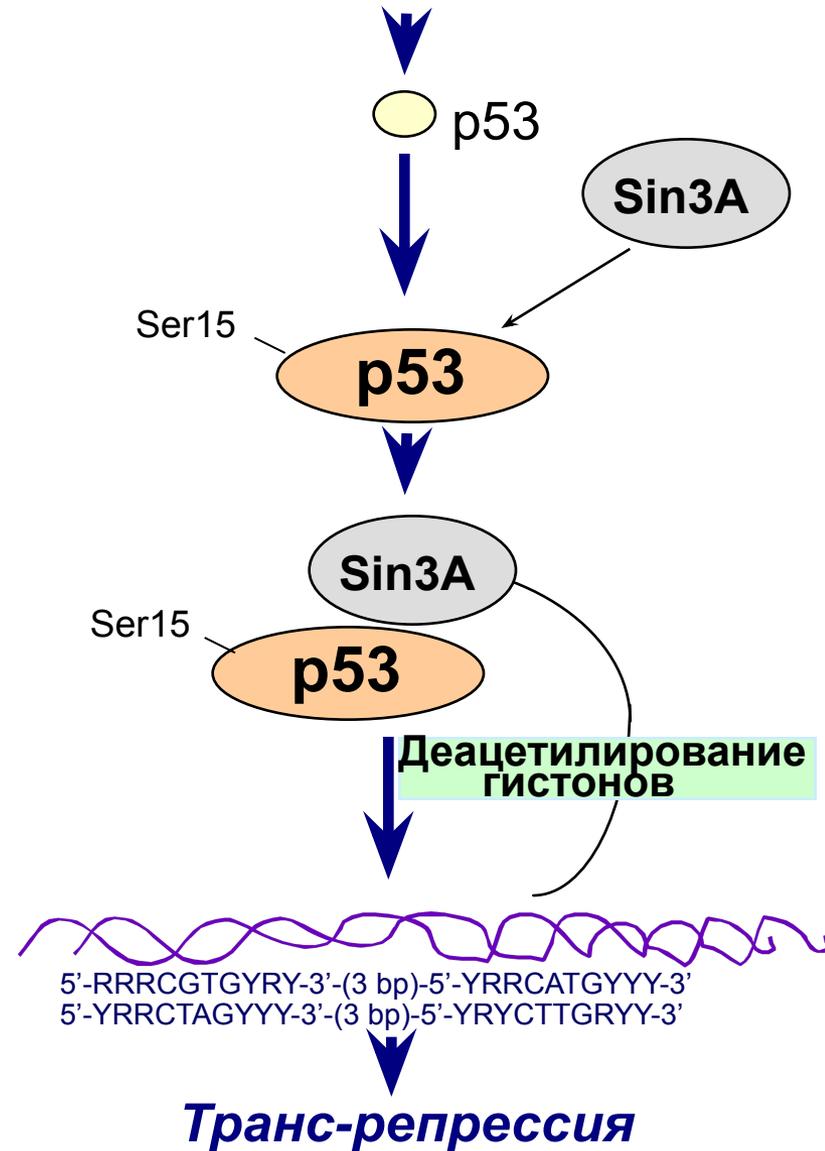


# Зависимость пост-трансляционных модификаций p53 и изменений его транскрипционной активности от типа стресса

## Повреждение ДНК

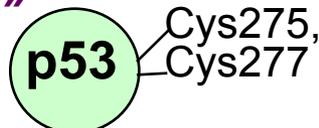


## Гипоксия



# Пост-трансляционные модификации регулируют биологические активности p53

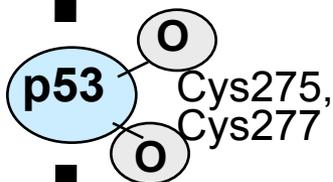
«Репарационная»  
форма



Репарация ДНК

Селен

«Латентная»  
форма



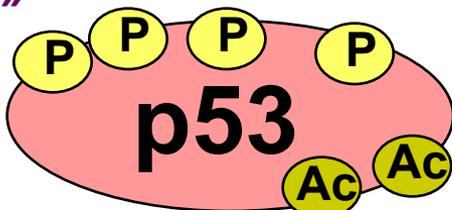
Регуляция экспрессии генов,  
контролирующих

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

Повреждения ДНК,  
стрессы

«Стрессовые»  
формы

Ser15, Ser20, Ser33,  
Ser46, Thr81, Ser315

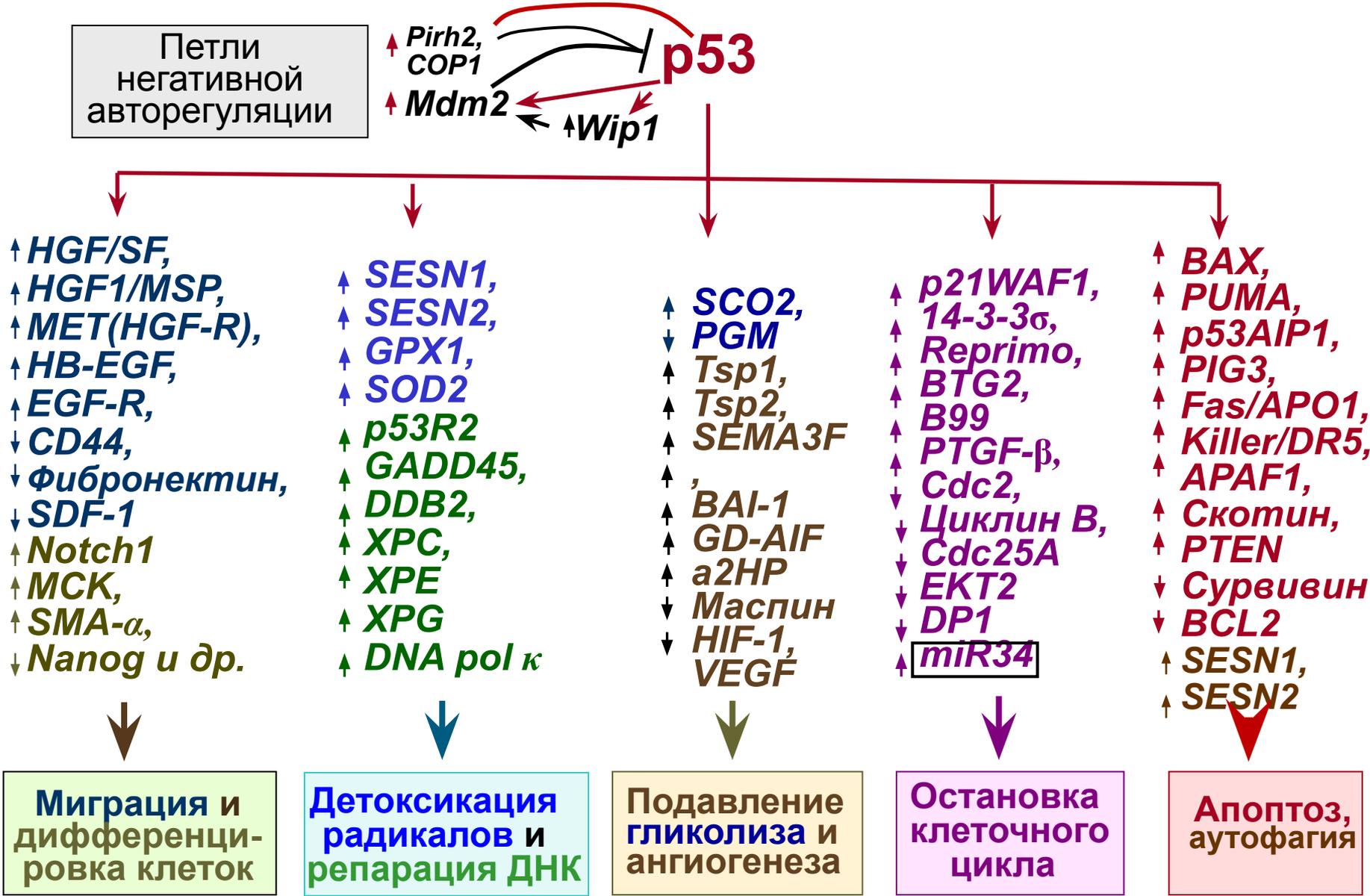


Изменения экспрессии генов,  
индуцирующие:

- арест клеточного цикла;
- апоптоз

Lys373, Lys382

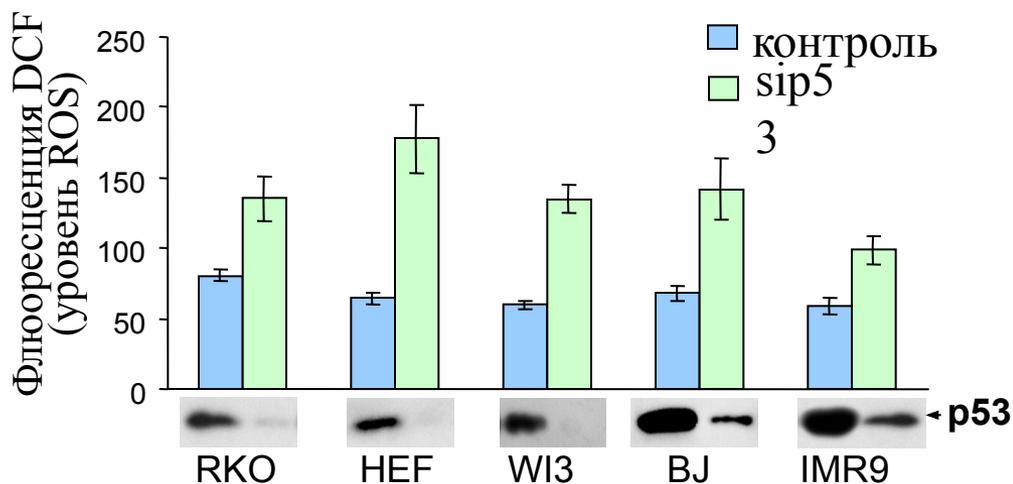
# Некоторые гены-мишени p53 и регулируемые ими биологические функции (всего в геноме человека ~450 сайтов связывания p53)



# Функции «латентного» p53:

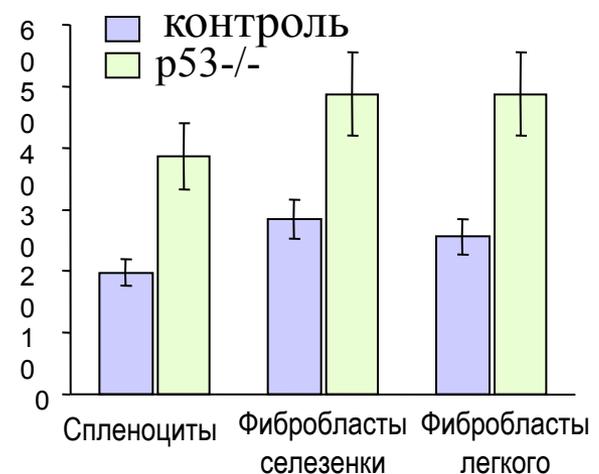
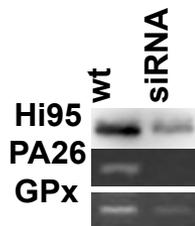
## 1. Антиоксидантная защита

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:

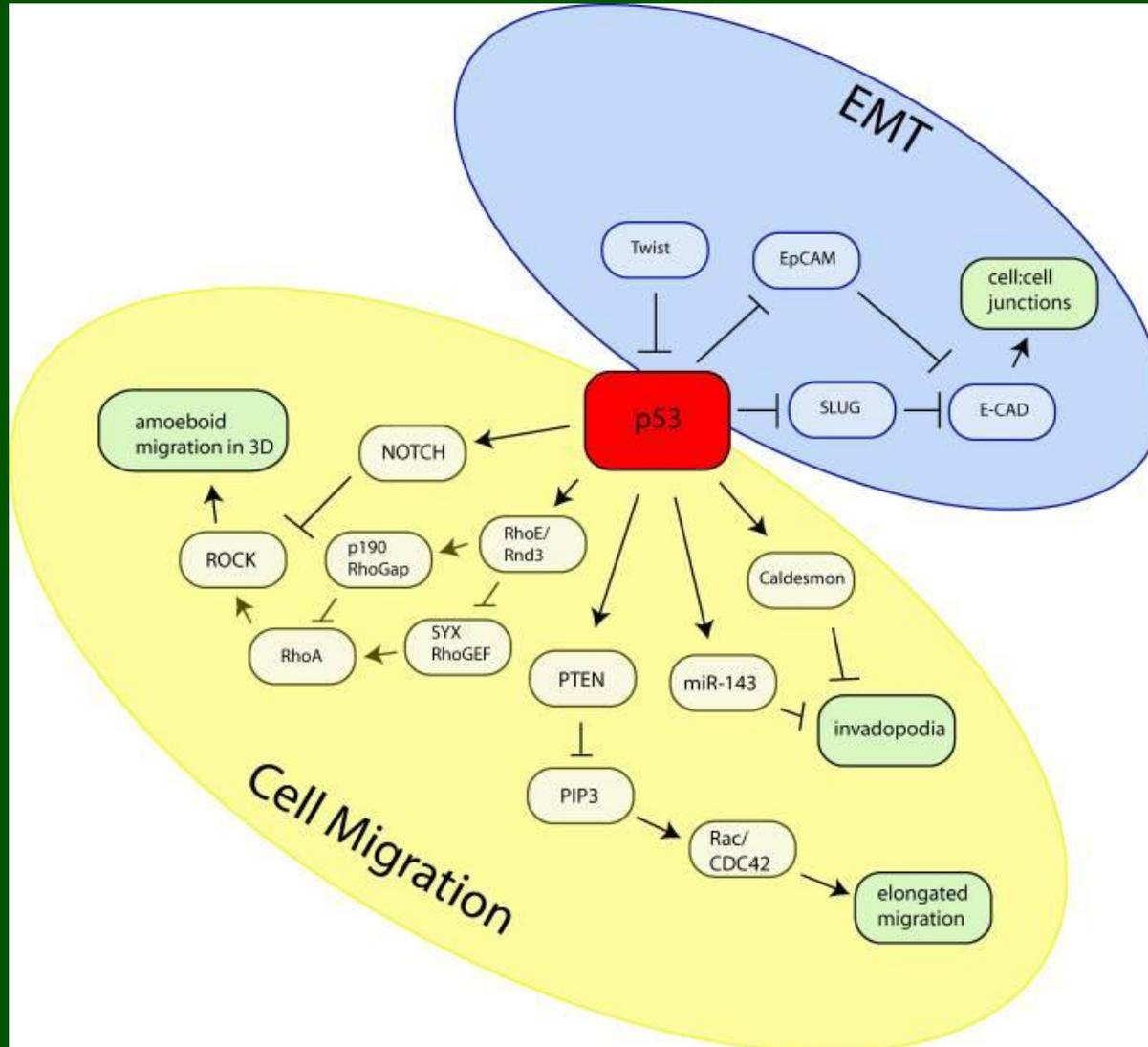


Нокаут гена p53 у мышей



# Функции «латентного» p53:

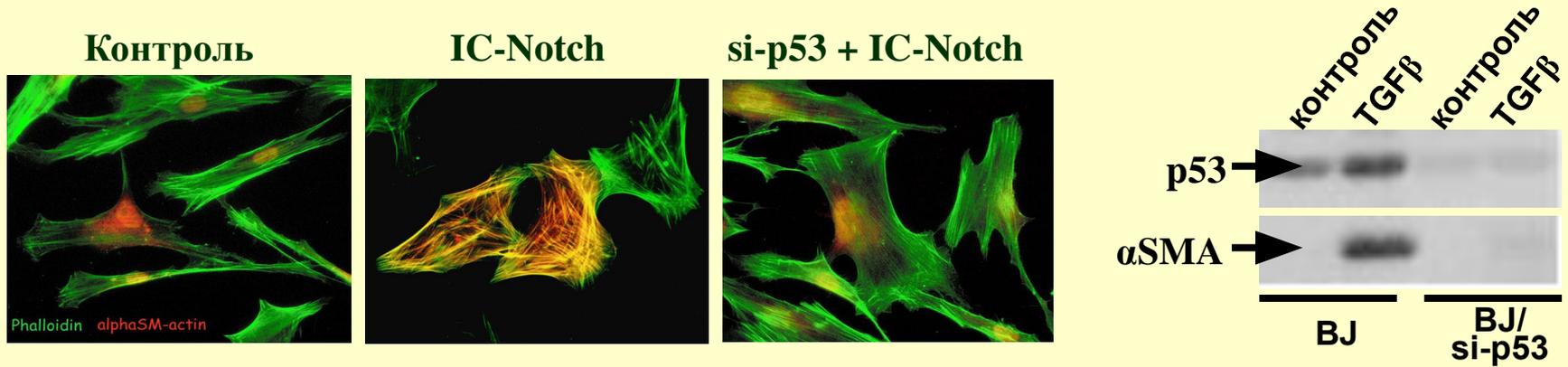
## 2. Участие в регуляции морфологии и движения клеток



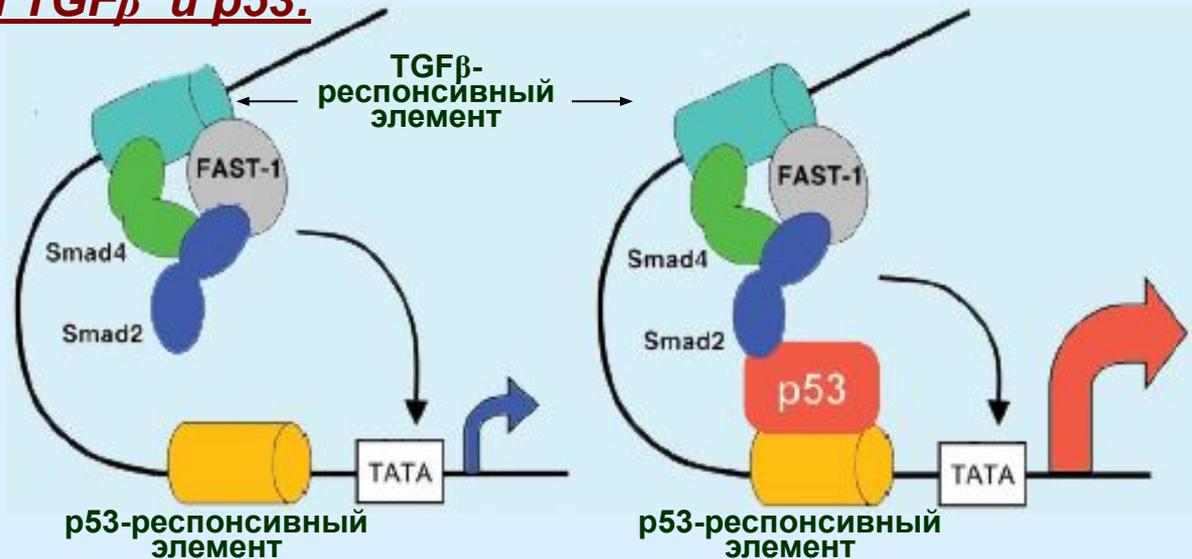
# Функции «латентного» p53:

## 3. Участие в регуляции дифференцировки

### Транс-дифференцировка фибробластов в миофибробласты

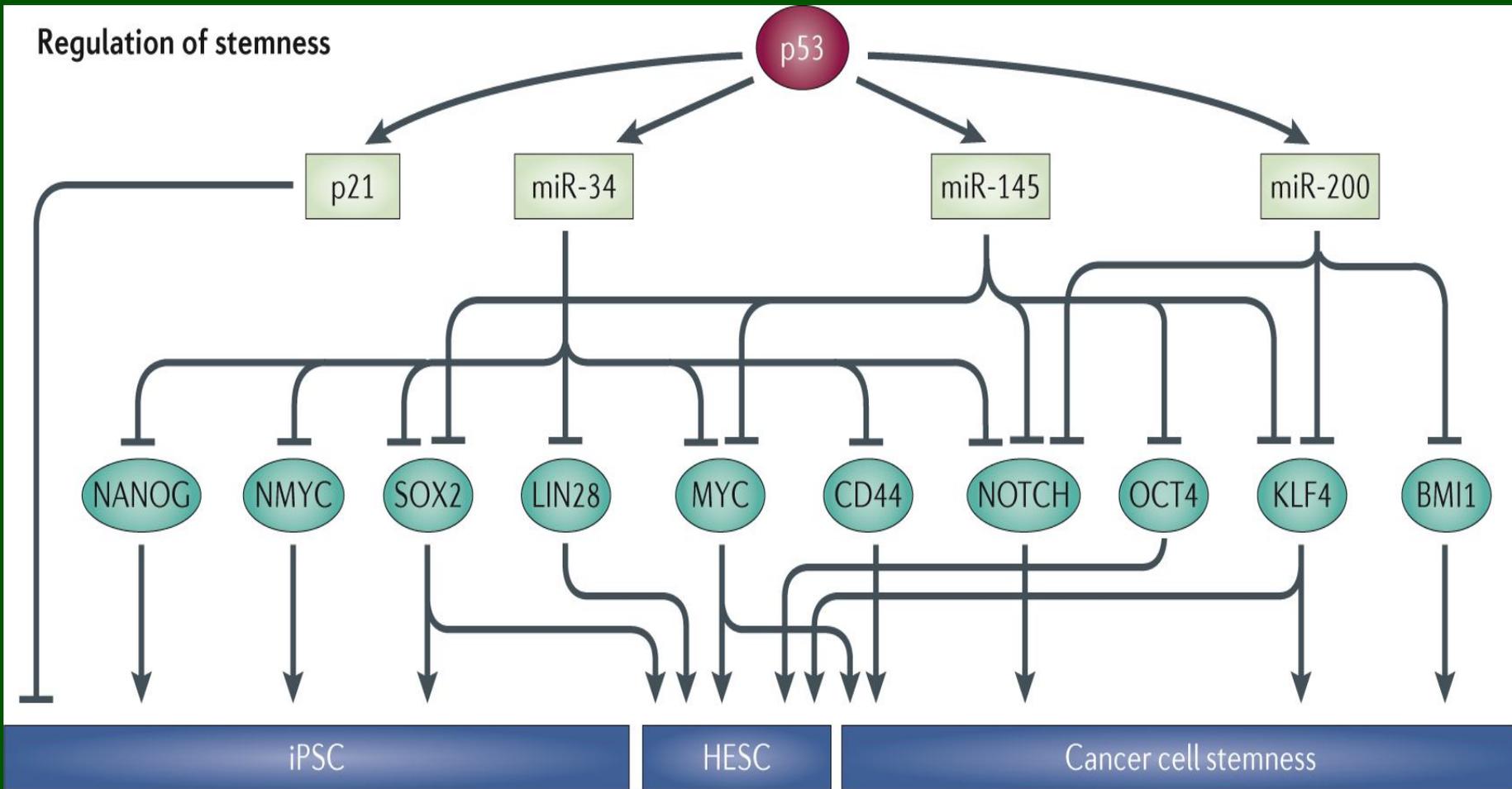


### Модель взаимодействия TGFβ и p53:

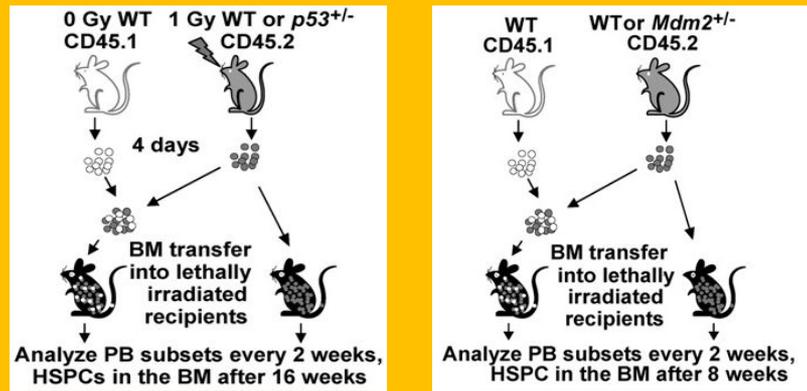
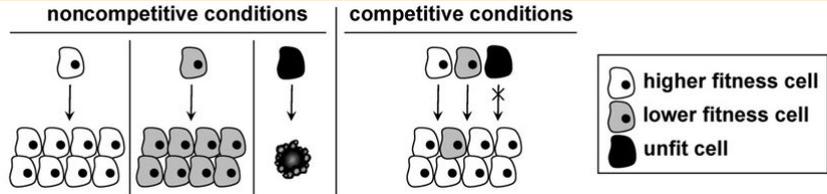


# Функции «латентного» p53:

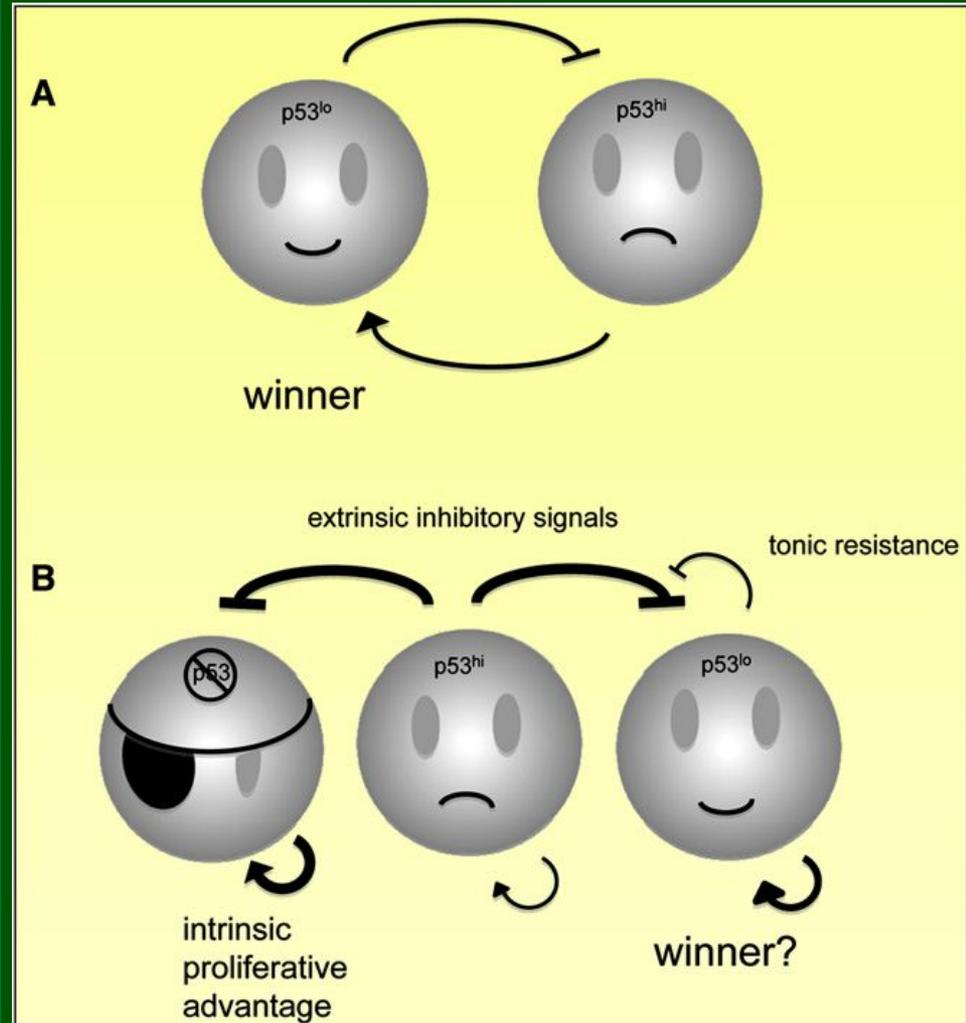
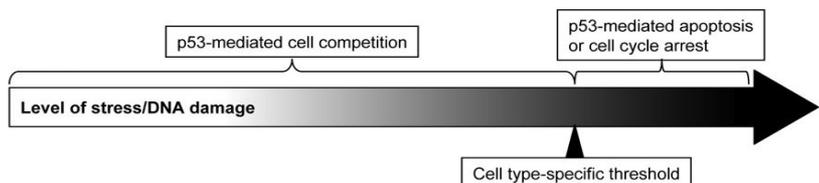
## 4. Участие в регуляции плюрипотентности

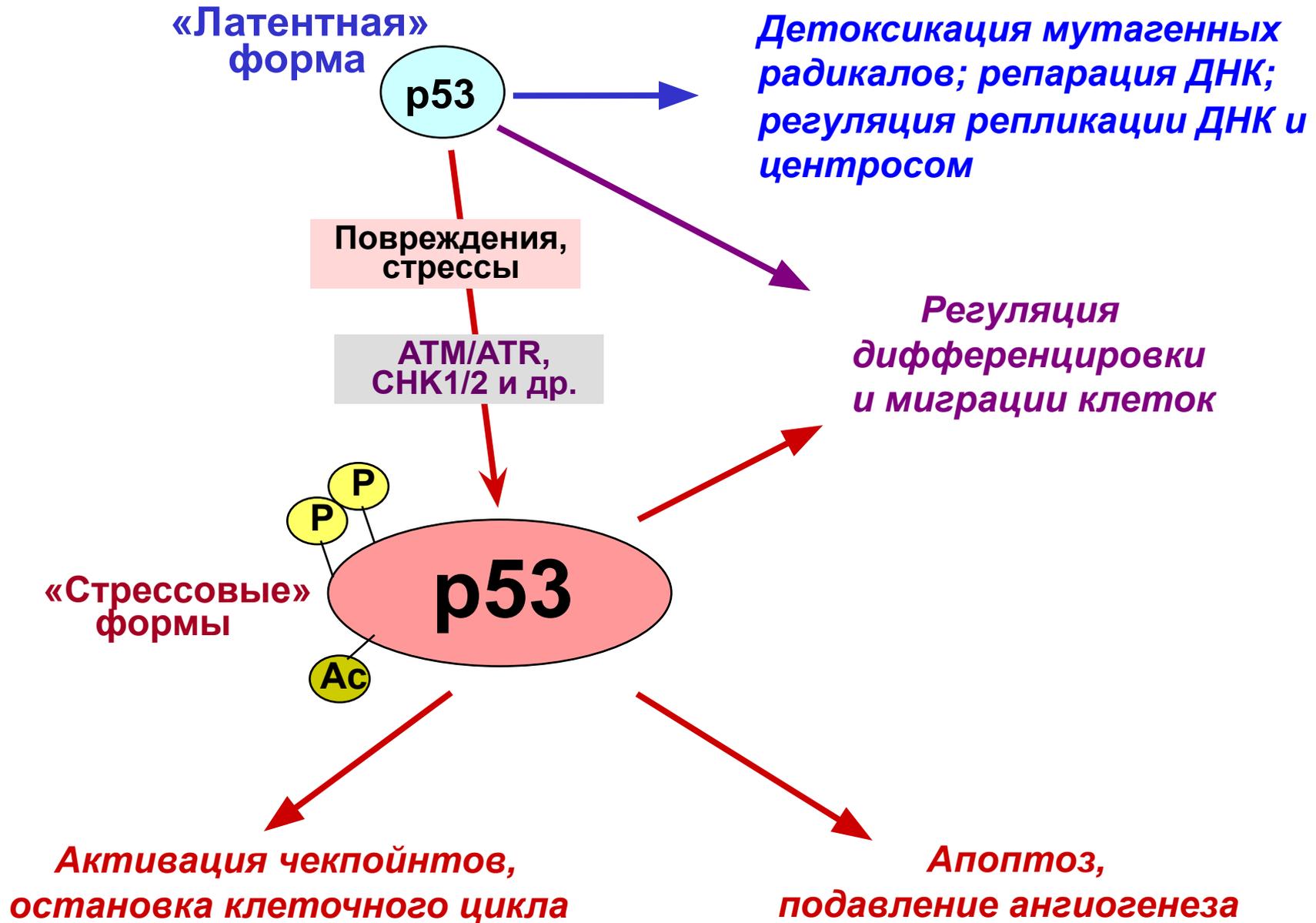


# Уровень p53 определяет результаты конкуренции гемопоэтических стволовых клеток и предшественников



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, 14-3-3σ	IGF1R, PTEN, TSC2, sestrins, SOCS2, SOCS3, <i>Pdcd4</i>
Self-renewal vs differentiation	Nanog, Gfi-1, <i>necln</i>	Notch1, RARβ, 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>TGFβRIII</i> , <i>P-selectin</i>
Cytokines and growth factors		MIC-1, TGFβ, SCF, FGF2





«Латентная»  
форма

p53

Детоксикация мутагенных  
радикалов; репарация ДНК;  
регуляция репликации ДНК и  
центросом

Повреждения,  
стрессы

АТМ/ATR,  
CHK1/2 и др.

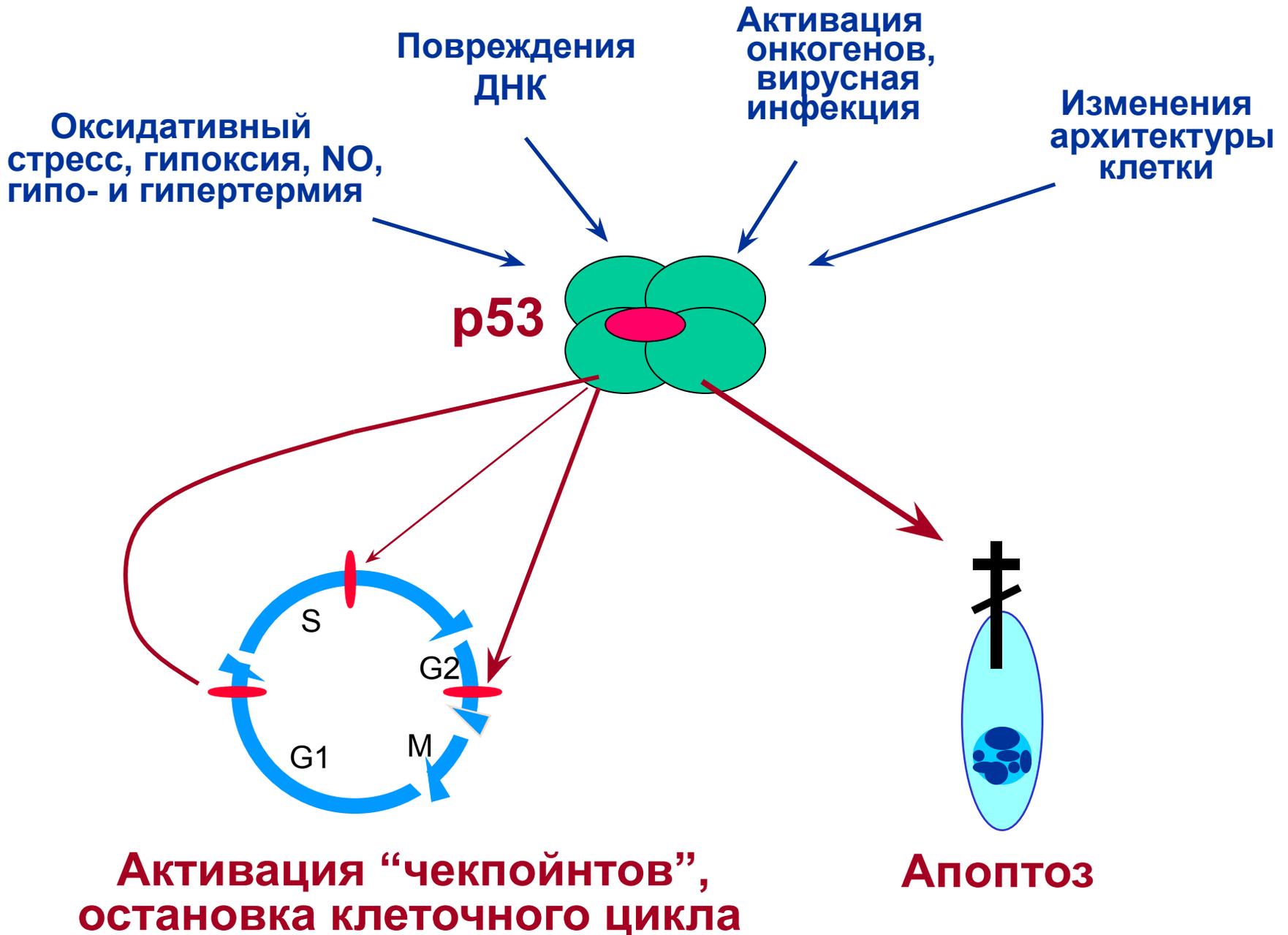
Регуляция  
дифференцировки  
и миграции клеток

«Стрессовые»  
формы

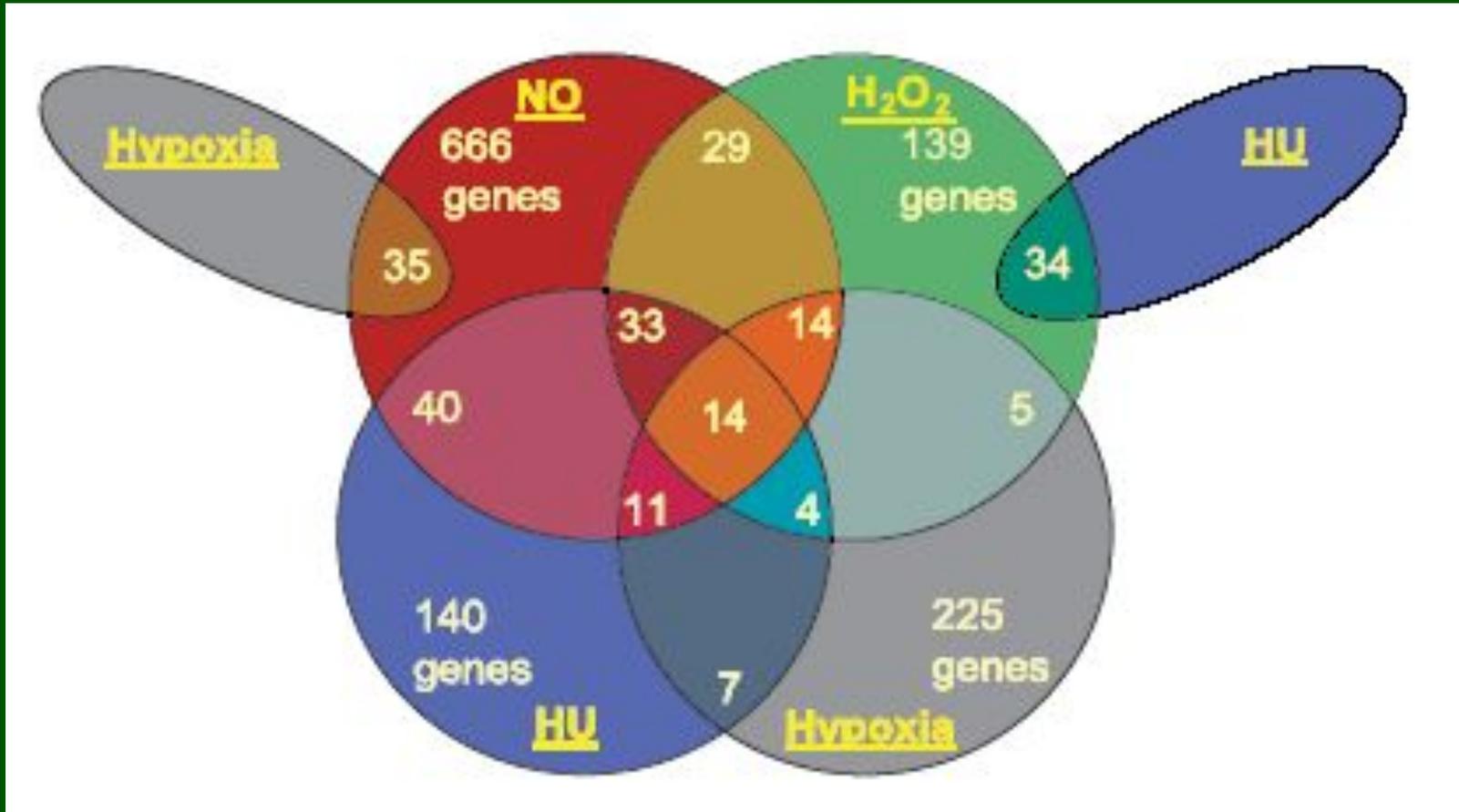
p53

Активация чекпойнтов,  
остановка клеточного цикла

Апоптоз,  
подавление ангиогенеза



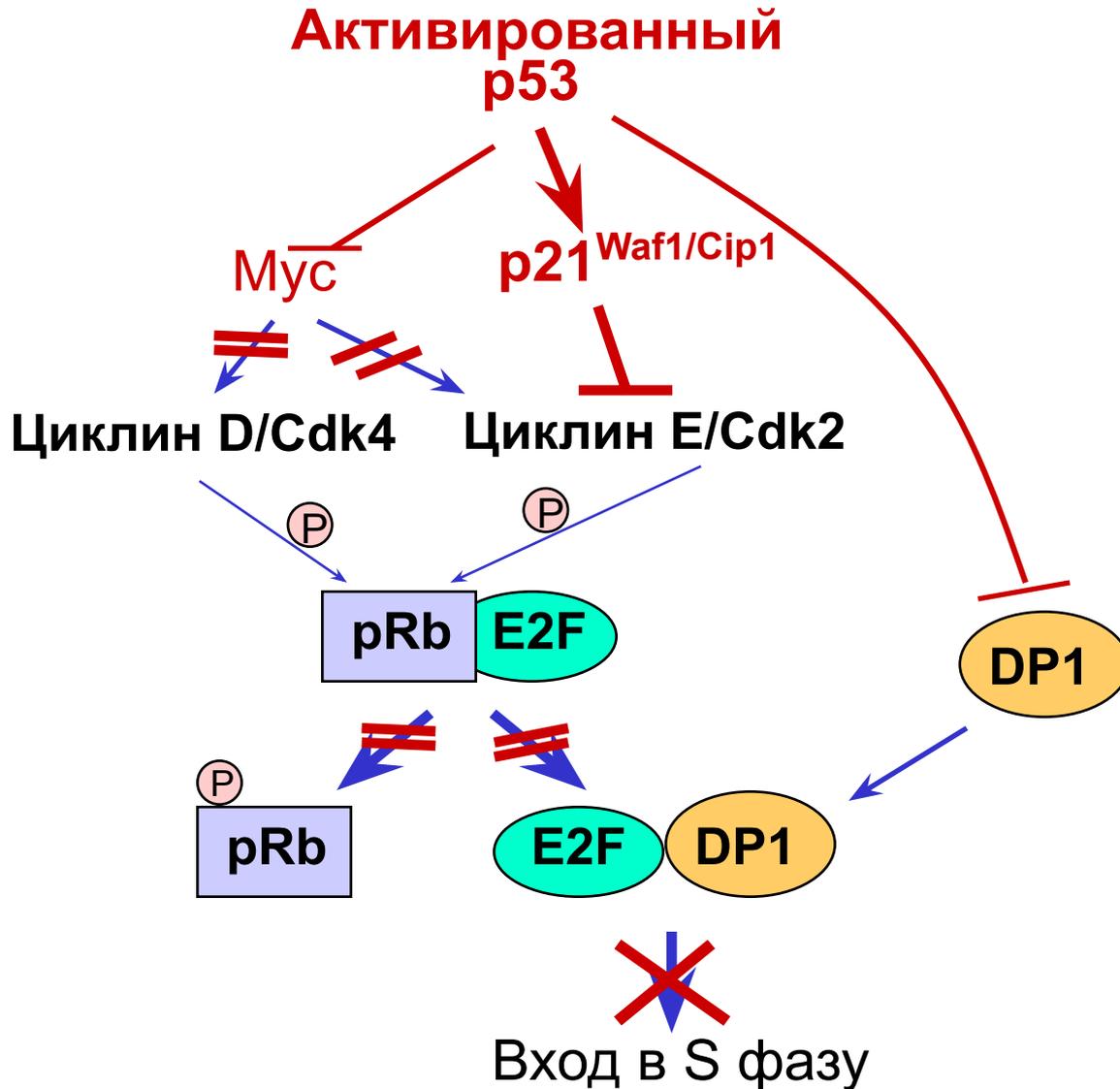
# Наборы генов, экспрессия которых изменяется вследствие активации p53, зависят от типа стресса



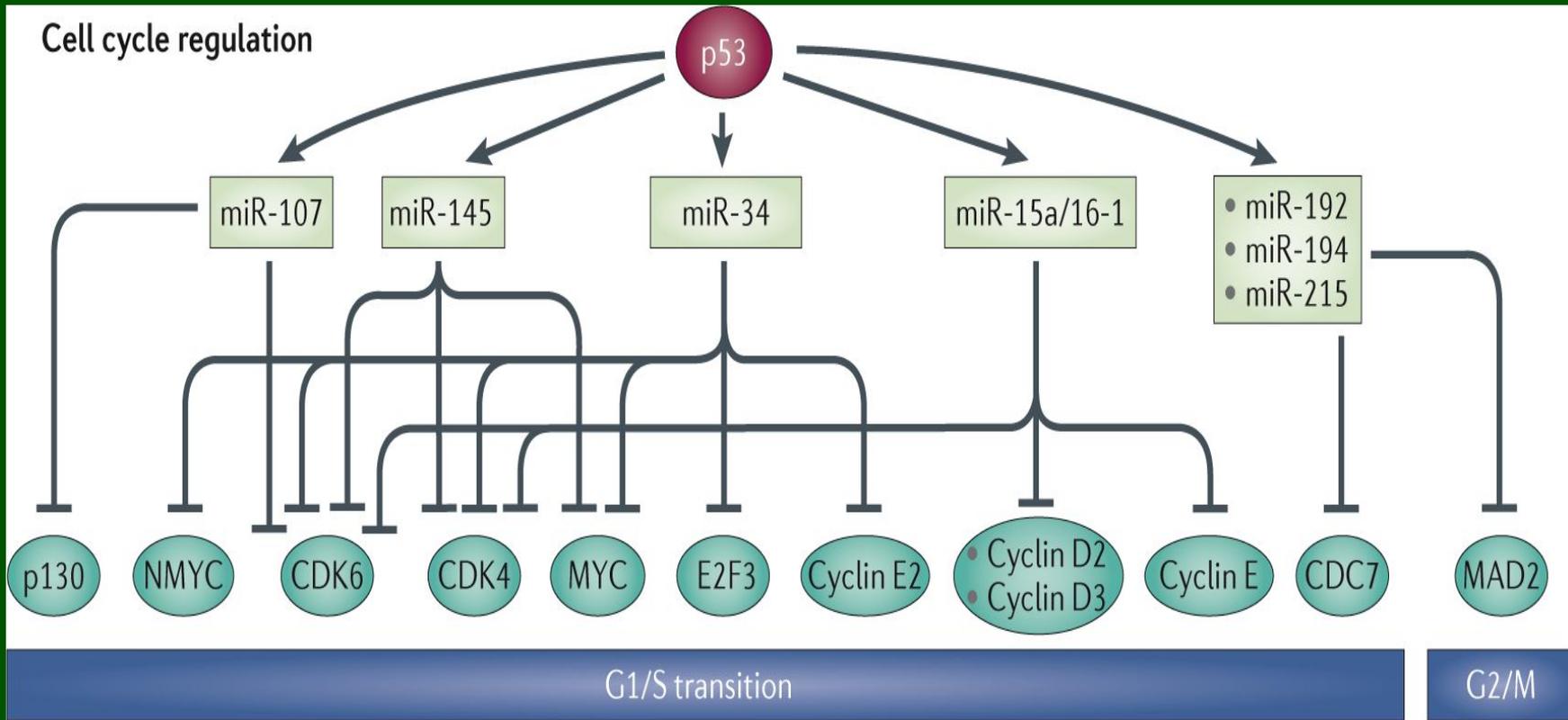
(Microarray analysis, HCT116 p53<sup>+/+</sup> vs. HCT116 p53<sup>-/-</sup>)

# Функции активированного (“стрессового») р53:

## 1. Остановка в G1

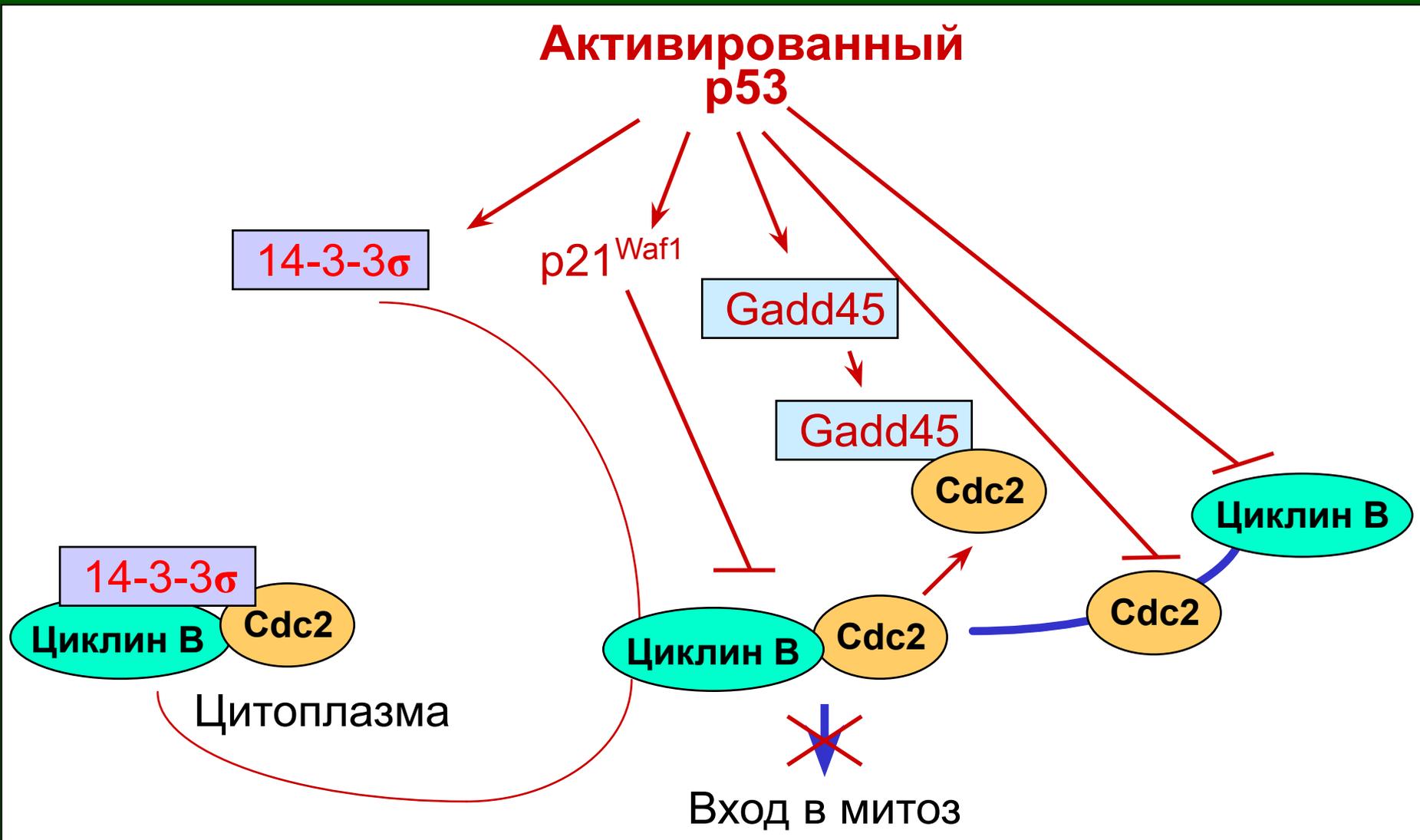


## Cell cycle regulation



# Функции активированного (“стрессового») р53:

## 2. Остановка в G2



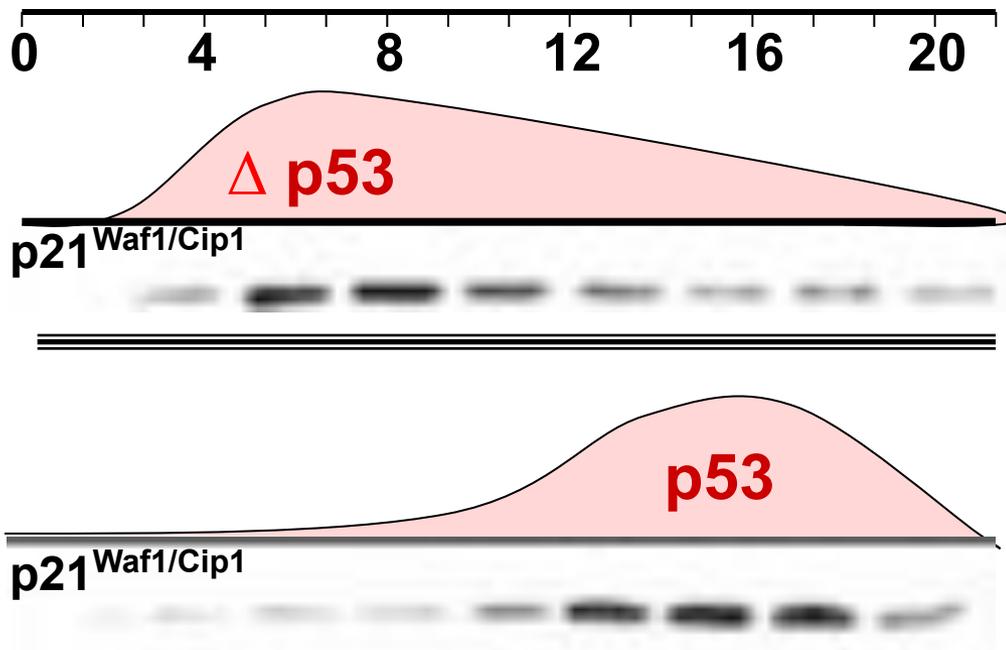
# Функции активированного (“стрессового») p53:

## 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.)

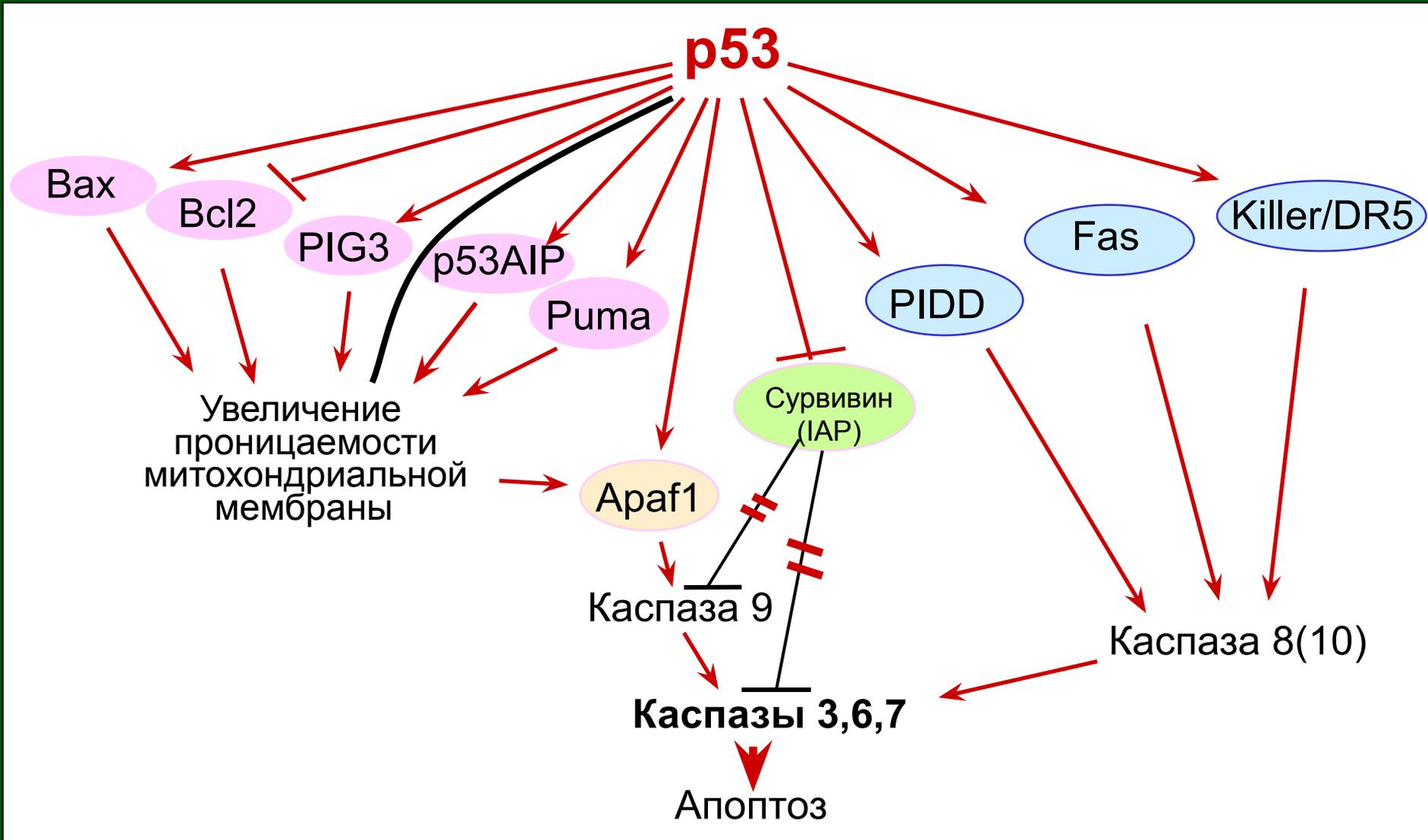
p21<sup>Waf1/Cip1</sup>

⊥  
Циклин A/Cdk2

⊗  
Продвижение по S фазе

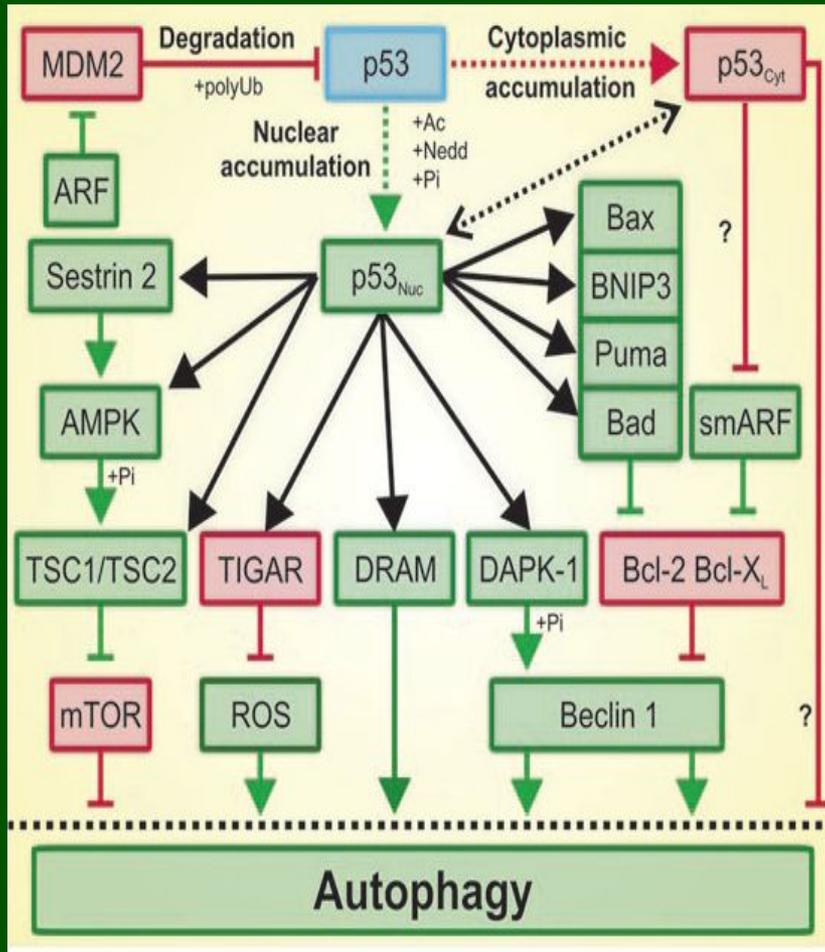
# Функции активированного («стрессового») p53:

## 4. Индукция апоптоза



# Функции p53:

## 5. Регуляция аутофагии

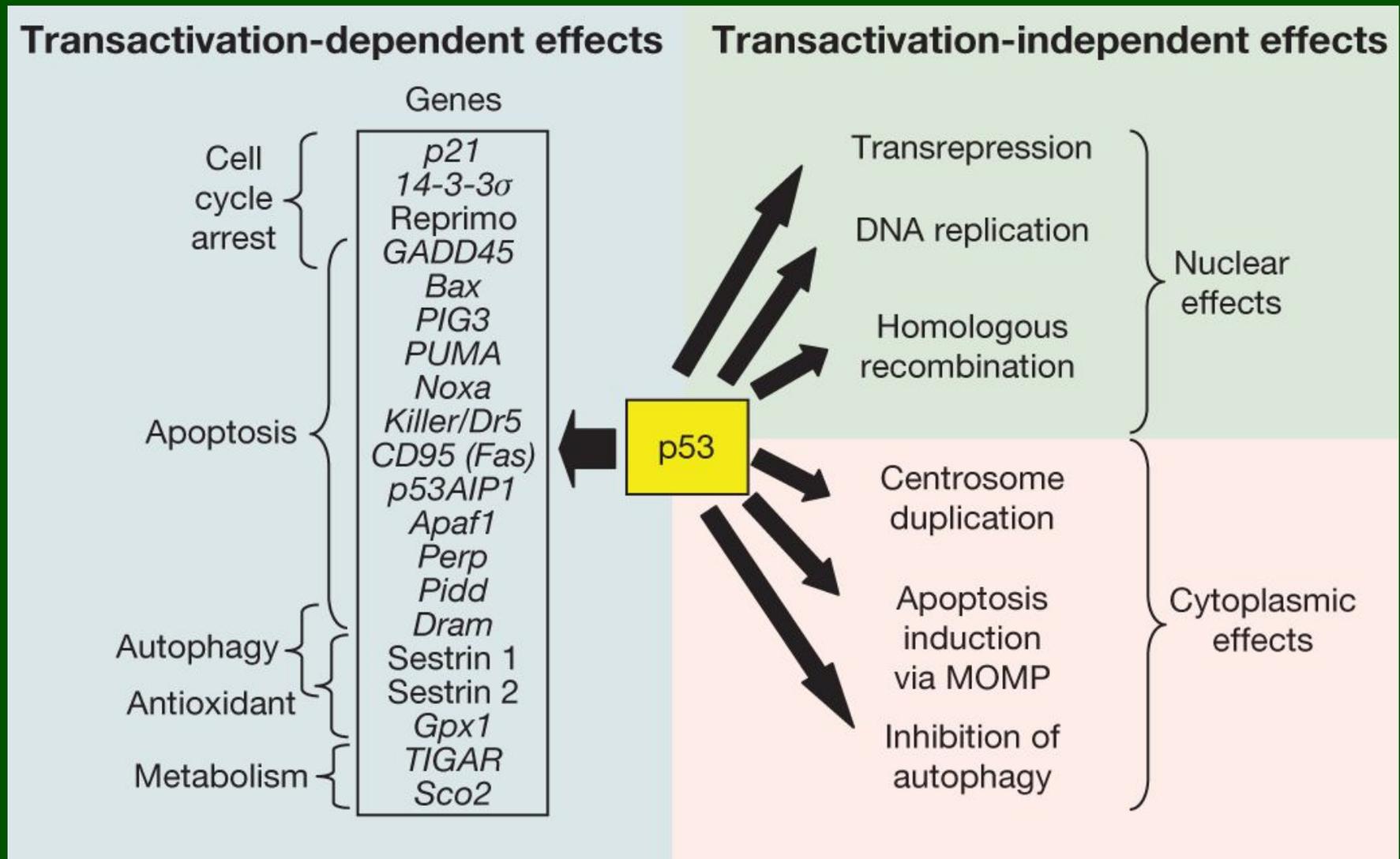


Cells with low autophagic rates show a p53-dependent increase in autophagy in response to starvation, whereas cells with high autophagic rate show a p53-dependent decrease in autophagy in response to the same conditions — the end result in both cases is the promotion of cell survival

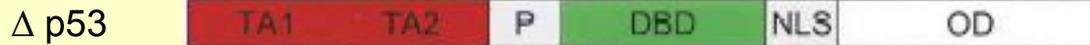
Scherz-Shouval et al., 2010, *Proc Natl Acad Sci USA* 107:18511–18516;

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

# Функции p53 не ограничиваются регуляцией транскрипции

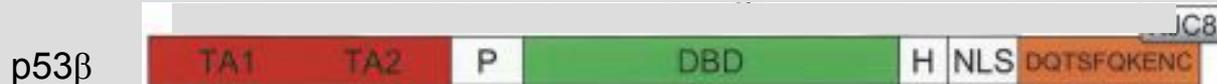


# Отличия функциональных активностей активированных (“стрессовых») изоформ р53



альтернативный сплайсинг (экзоны 7- 9)

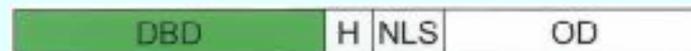
$\Delta$  p53 - активирует *p21<sup>Waf1/Cip1</sup>*, *14-3-3 $\sigma$* , но не *MDM2*, *BAX*, *PIG3*



альтернативный сплайсинг (интрон 9)

p53 $\beta$ -активирует *p21<sup>Waf1/Cip1</sup>*; сильнее чем p53 активирует *BAX*, очень слабо активирует *MDM2*

$\Delta$ 133 p53



внутренний промотор (интрон 4)

$\Delta$ 133 p53- ингибирует активацию p53-респонсивных генов (доминантно-негативный эффект)

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

ЗАВИСИТ ОТ:

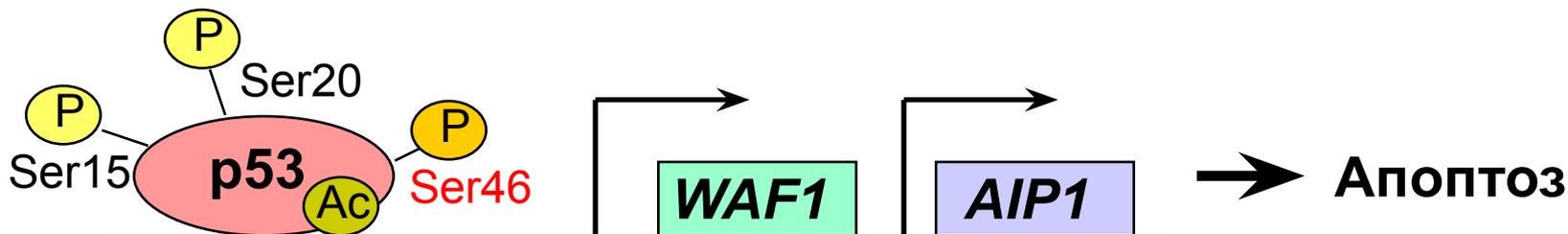
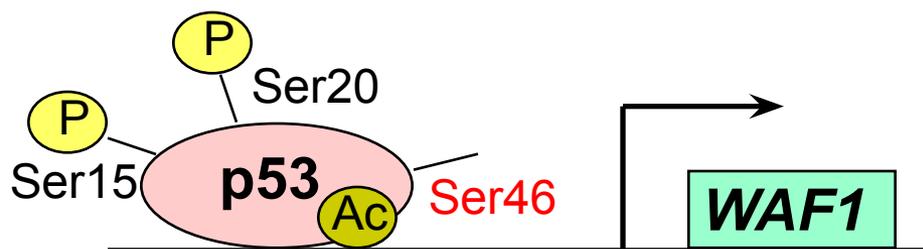
## 1. Количественного уровня p53

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

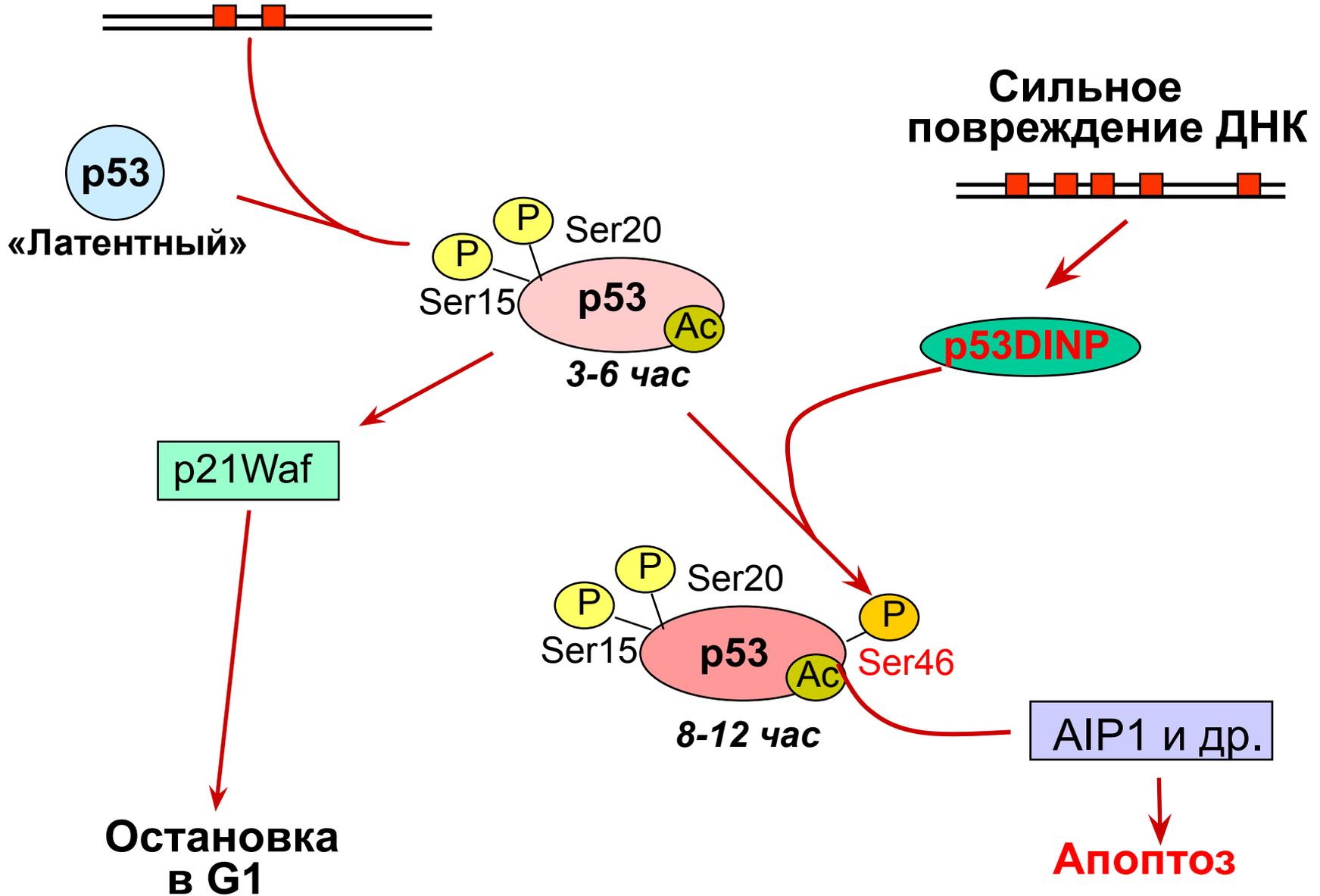


# При активации p53 судьба клетки (апоптоз или остановка цикла) зависит от:

## 2. характера модификаций молекул p53 а) сайтов фосфорилирования

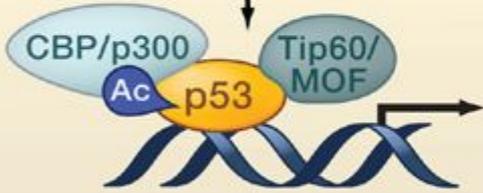
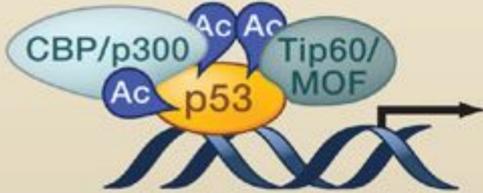


# Повреждение ДНК



# 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
<b>A</b> 	<b>MDM2</b> <b>Pirh2</b>	Feedback and cell survival	Acetylation is not required
<b>B</b> 	<b>p21</b> <b>GADD45</b>	Growth arrest DNA repair	Partial acetylation is sufficient
<b>C</b> 	<b>BAX</b> <b>PUMA</b> <b>FAS</b> <b>NOXA</b>	Irreversible apoptosis	Specific acetylation is required

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

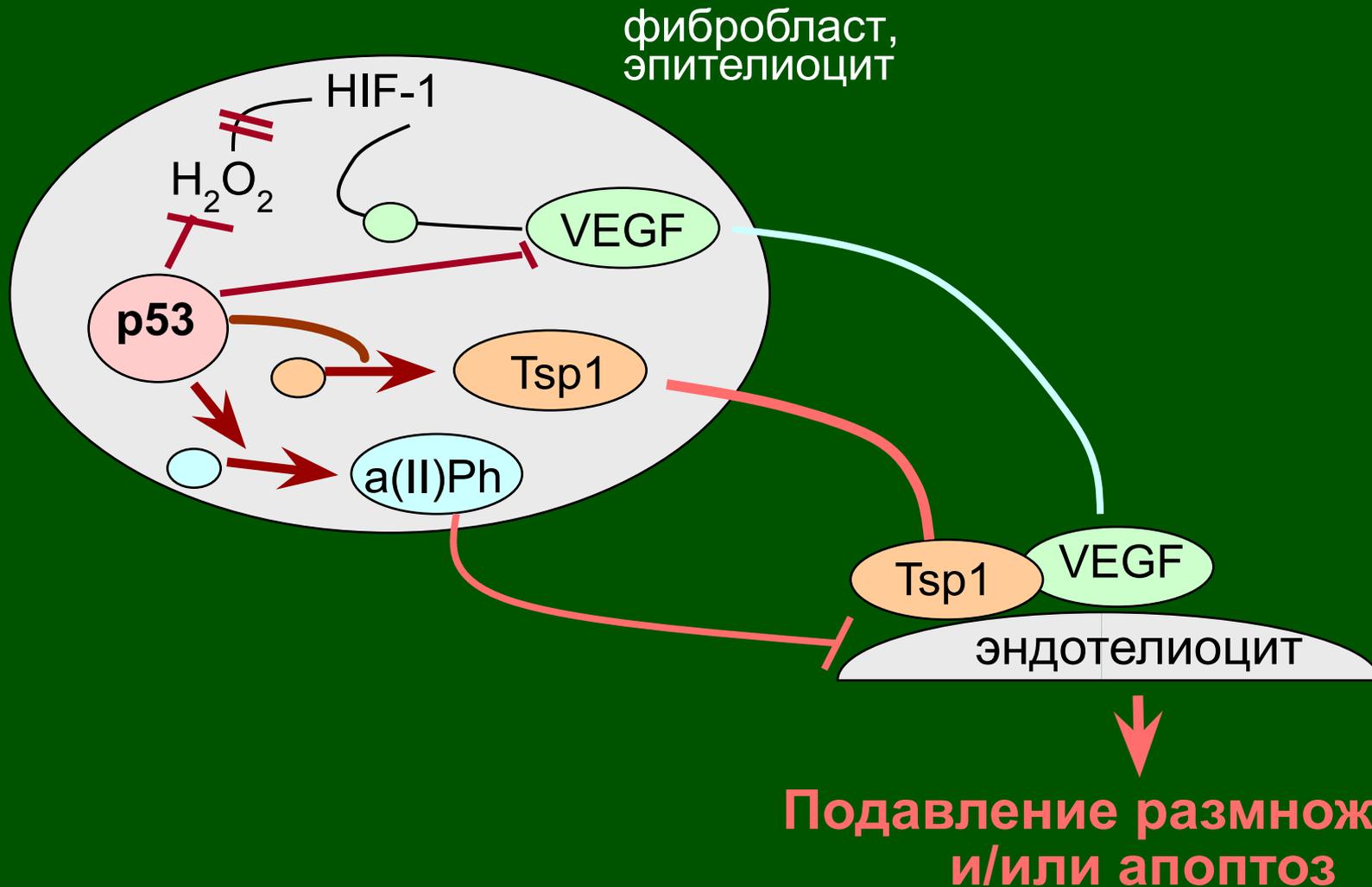
## 3. Экспрессии ко-факторов транскрипции, избирательно усиливающих ту или иную функцию p53

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



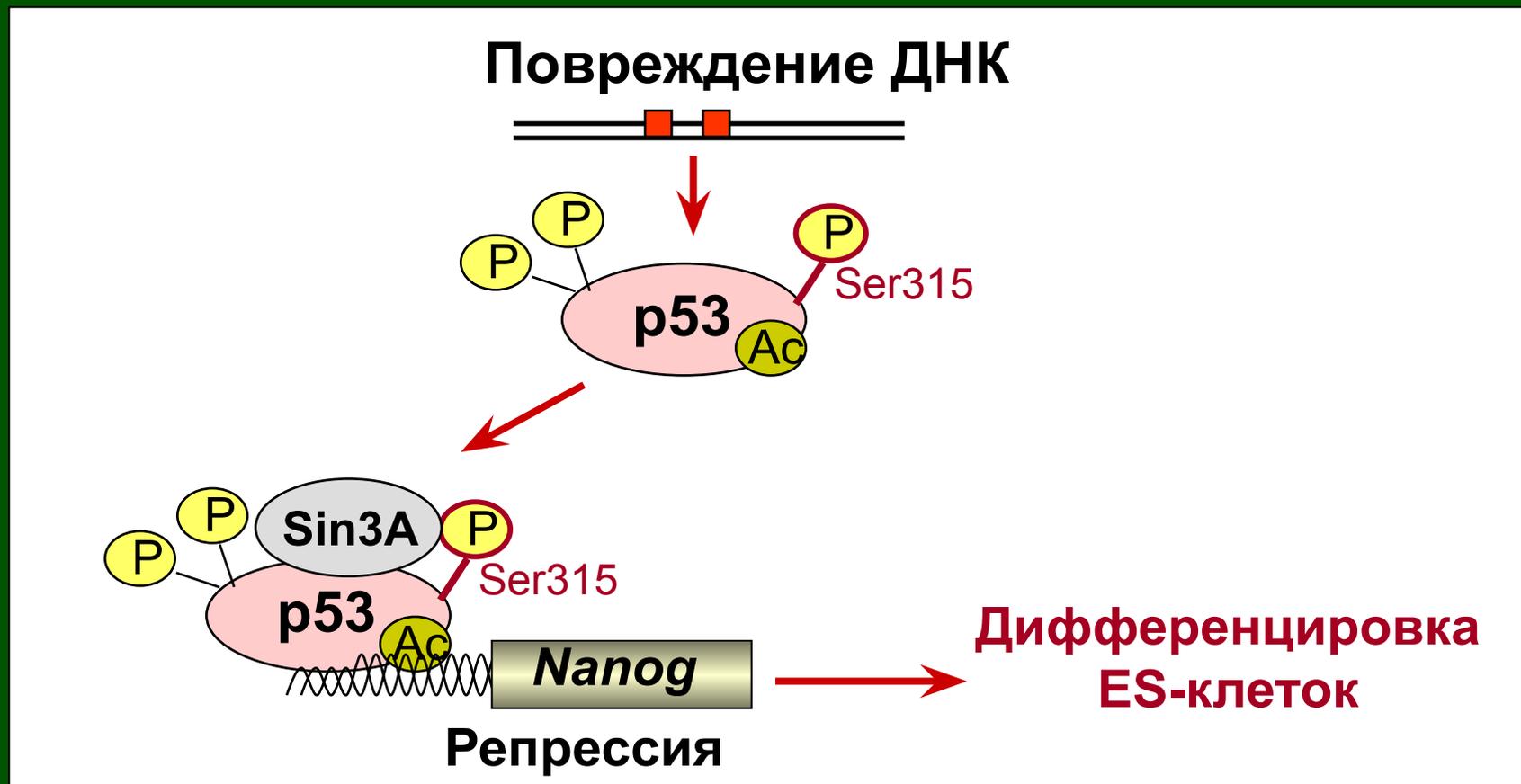
При связывании с Hzf (ZNF385), наоборот, уменьшается аффинность к респонсивным элементам, содержащимся в проапоптозных генах, и увеличивается способность активировать гены, продукты которых останавливают клеточный цикл

# Некоторые p53-зависимые механизмы подавления ангиогенеза

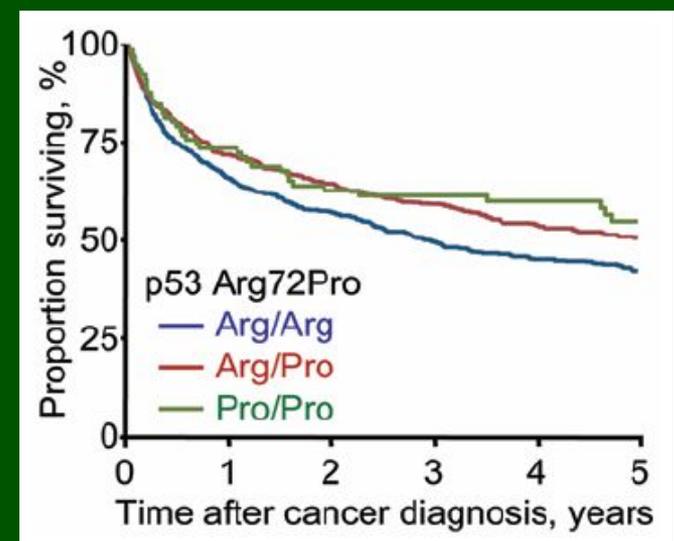
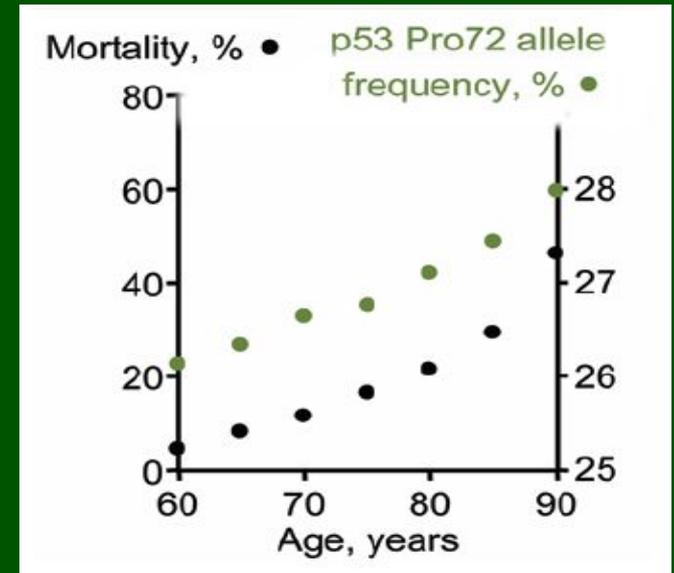
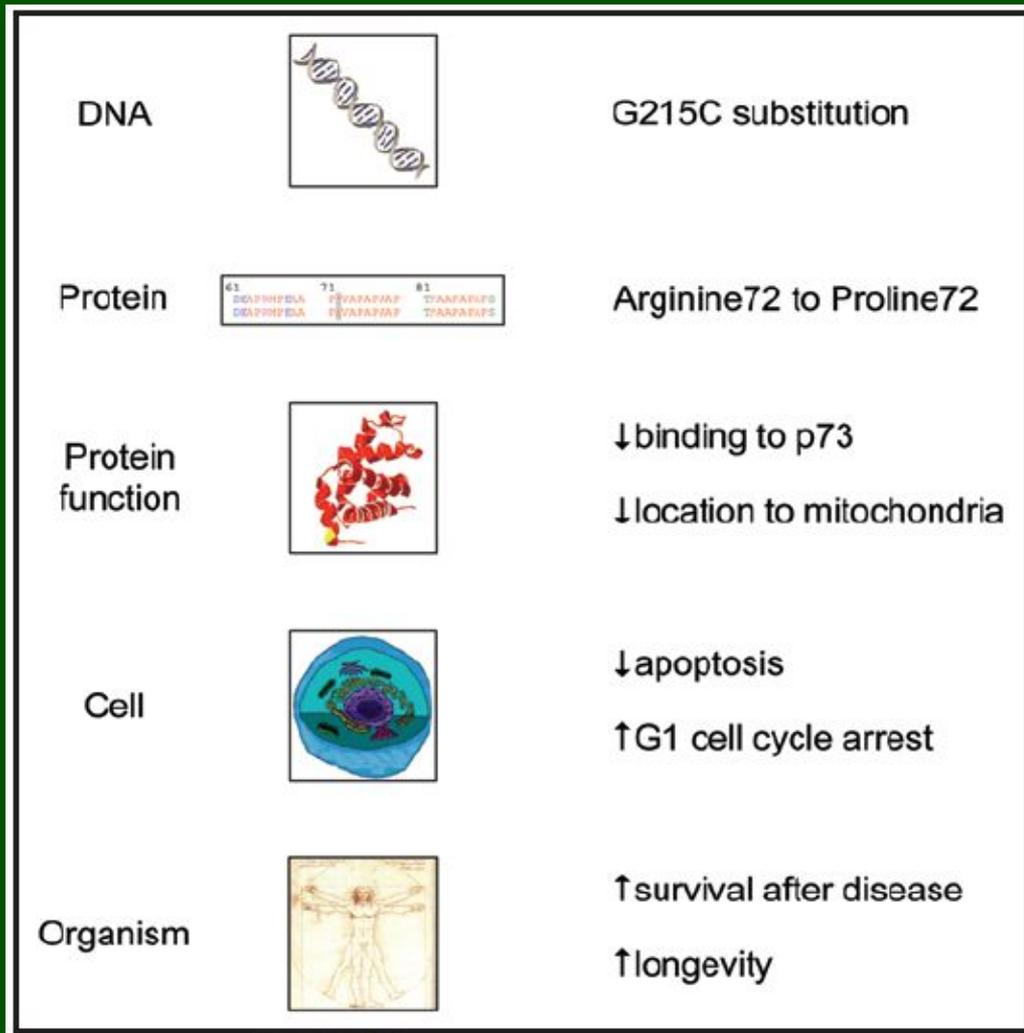


# Активированный p53 препятствует накоплению генетических повреждений в эмбриональных стволовых клетках путем репрессии гена *Nanog*

*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



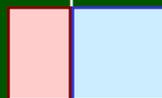
Рак легкого



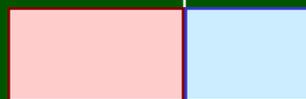
Рак толстой кишки



Рак желудка



Рак мочевого пузыря



Рак молочной железы

% опухолей 3-4 стадий с мутациями p53

70%

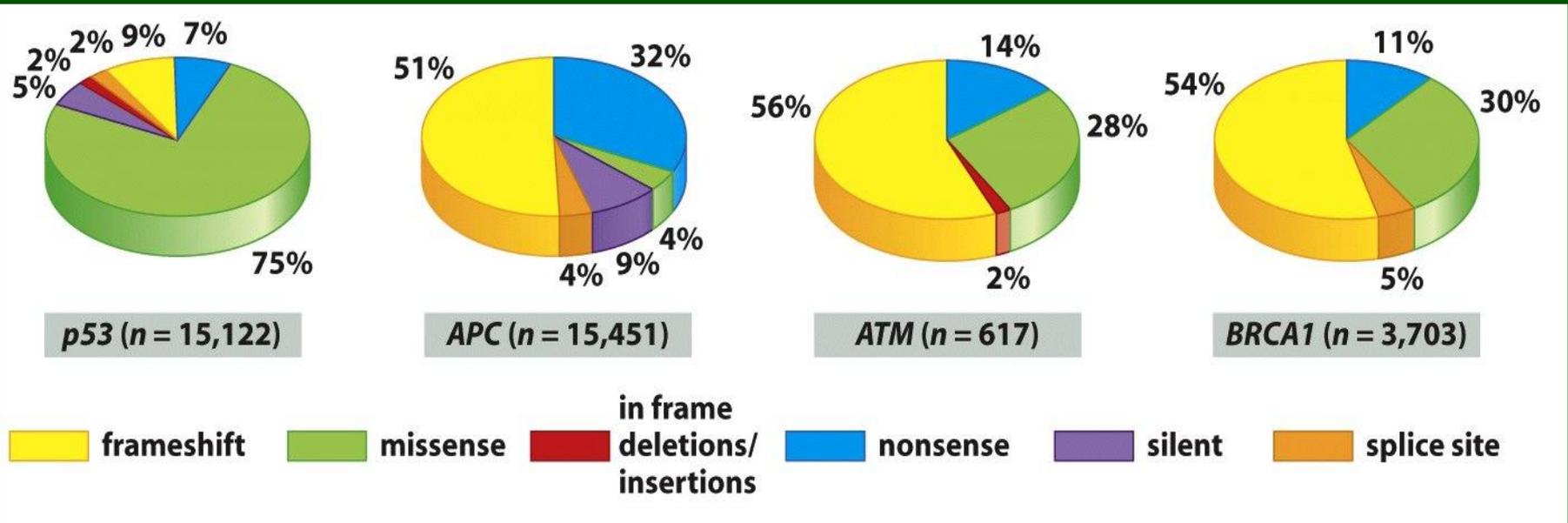
65%

45%

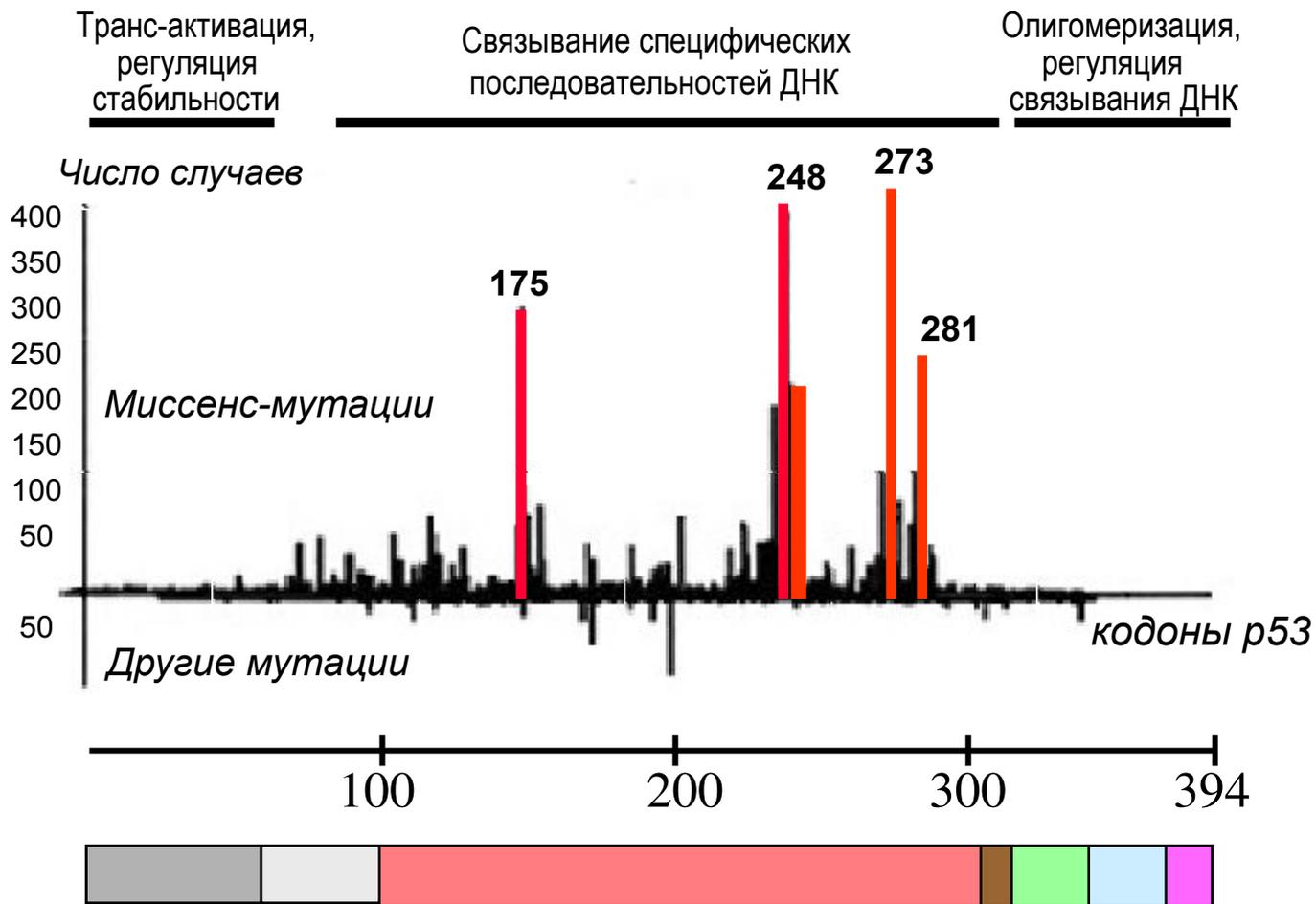
61%

30%

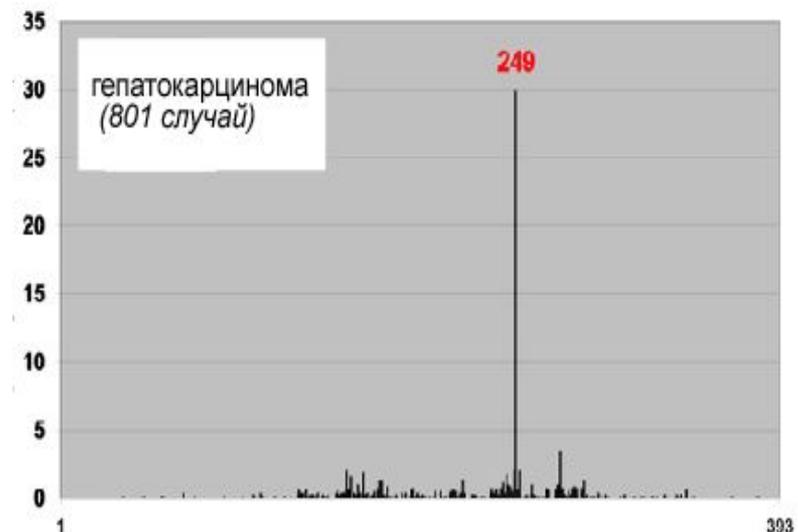
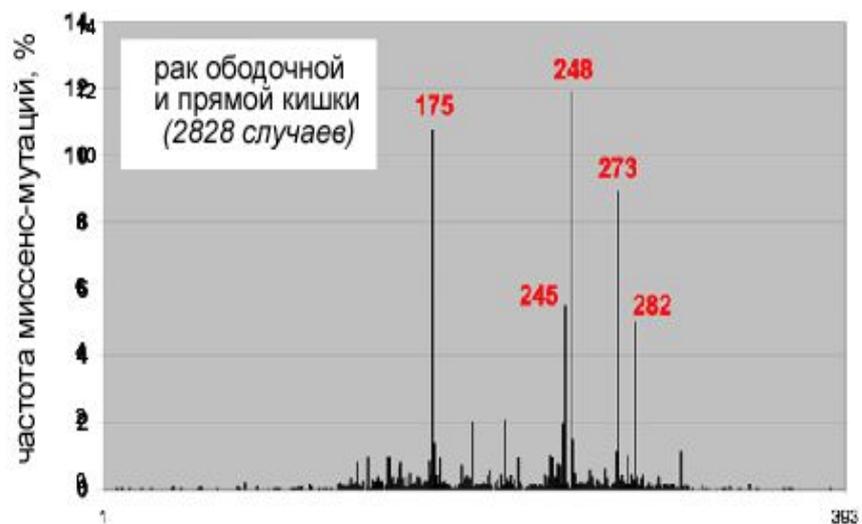
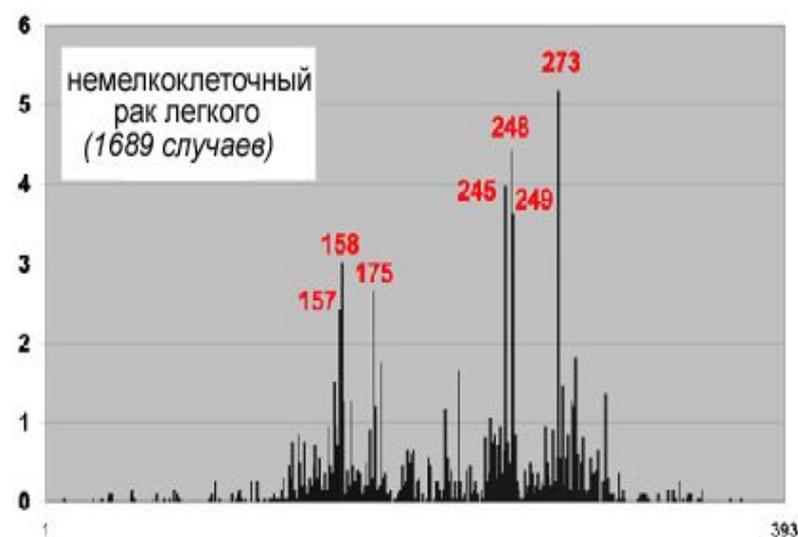
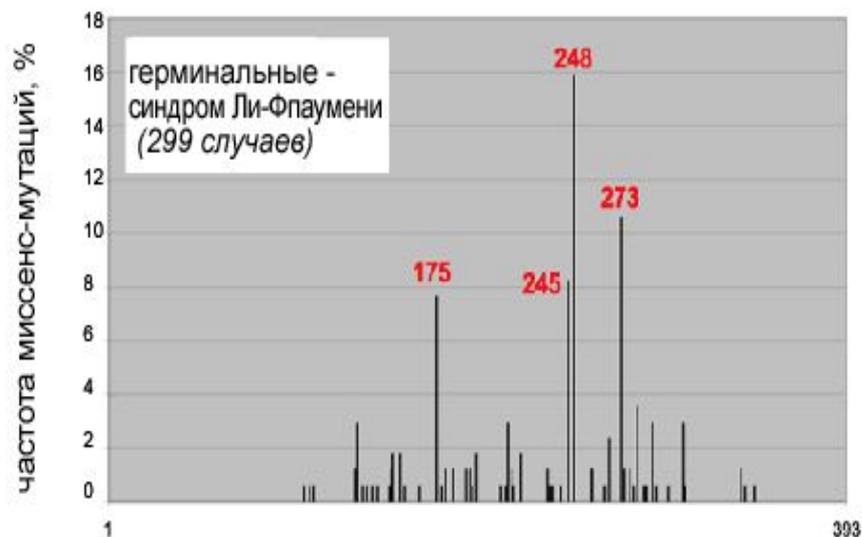
# В отличие от других опухолевых супрессоров, большинство мутаций p53 являются миссенс-мутациями, приводящими к замене аминокислотных остатков



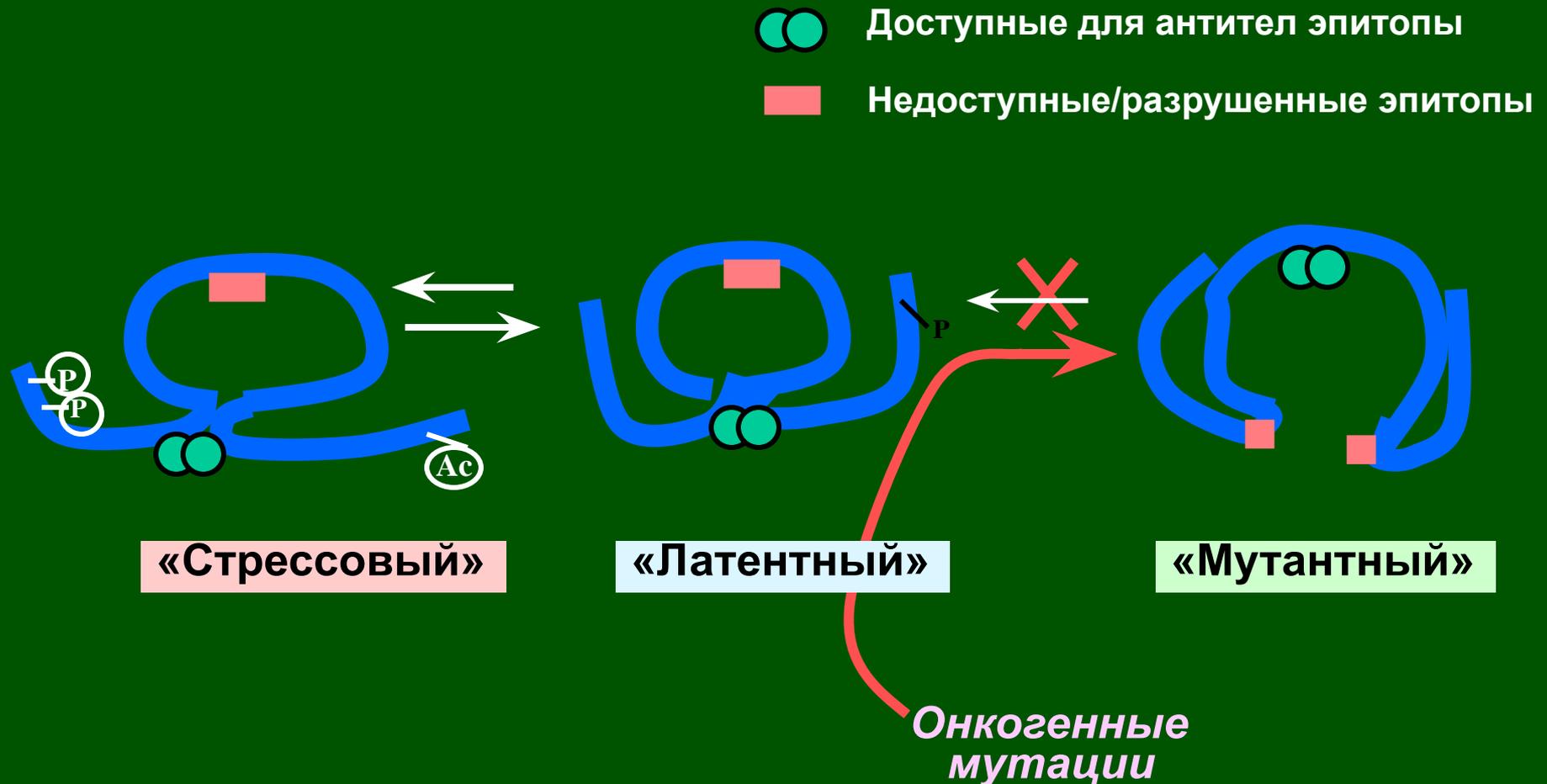
# Распределение мутаций p53 в опухолях человека по кодонам (все типы новообразований)



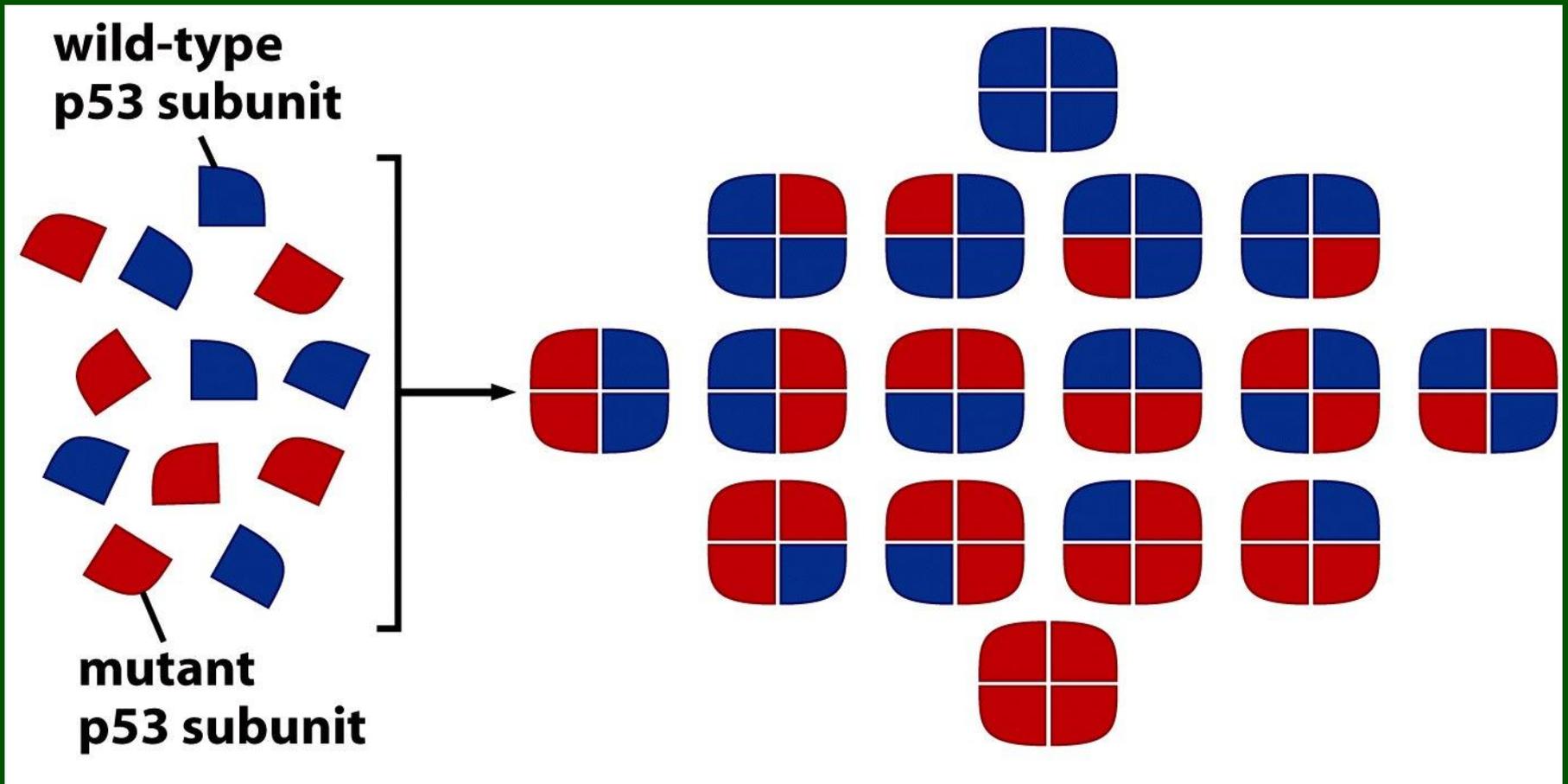
# «Горячие точки» мутаций p53 при разных формах опухолей



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**



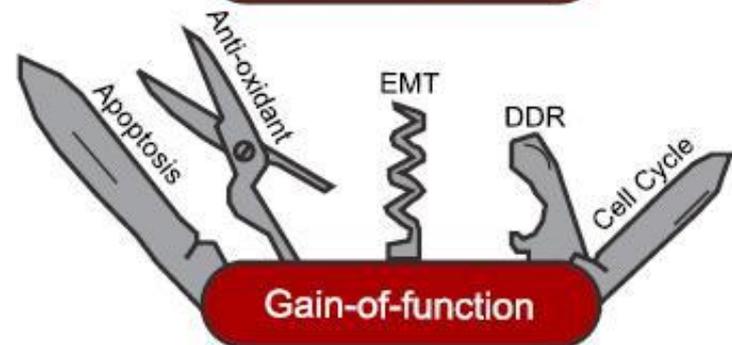
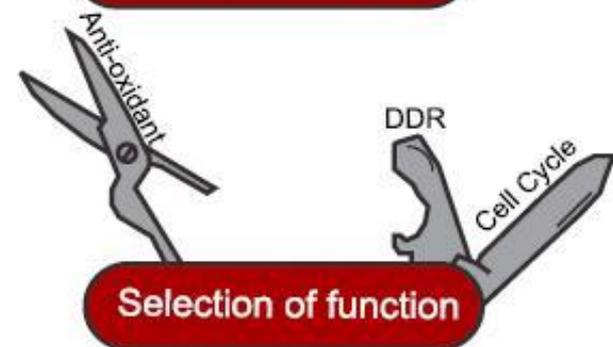
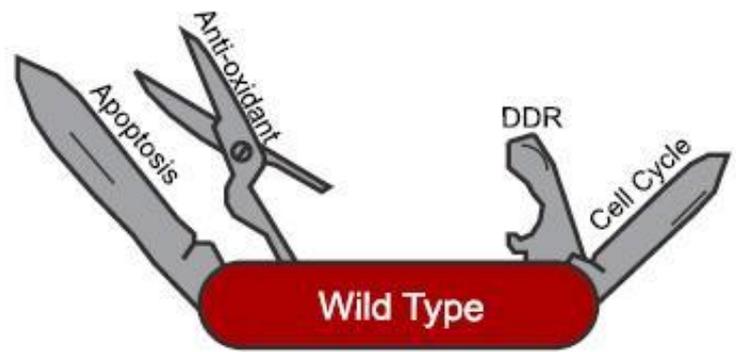
# Мутантный p53

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:



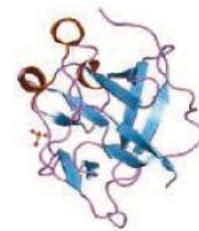
November 28, 2019

Total PubMed Citations



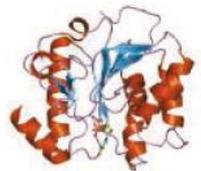
p53

97931



p63

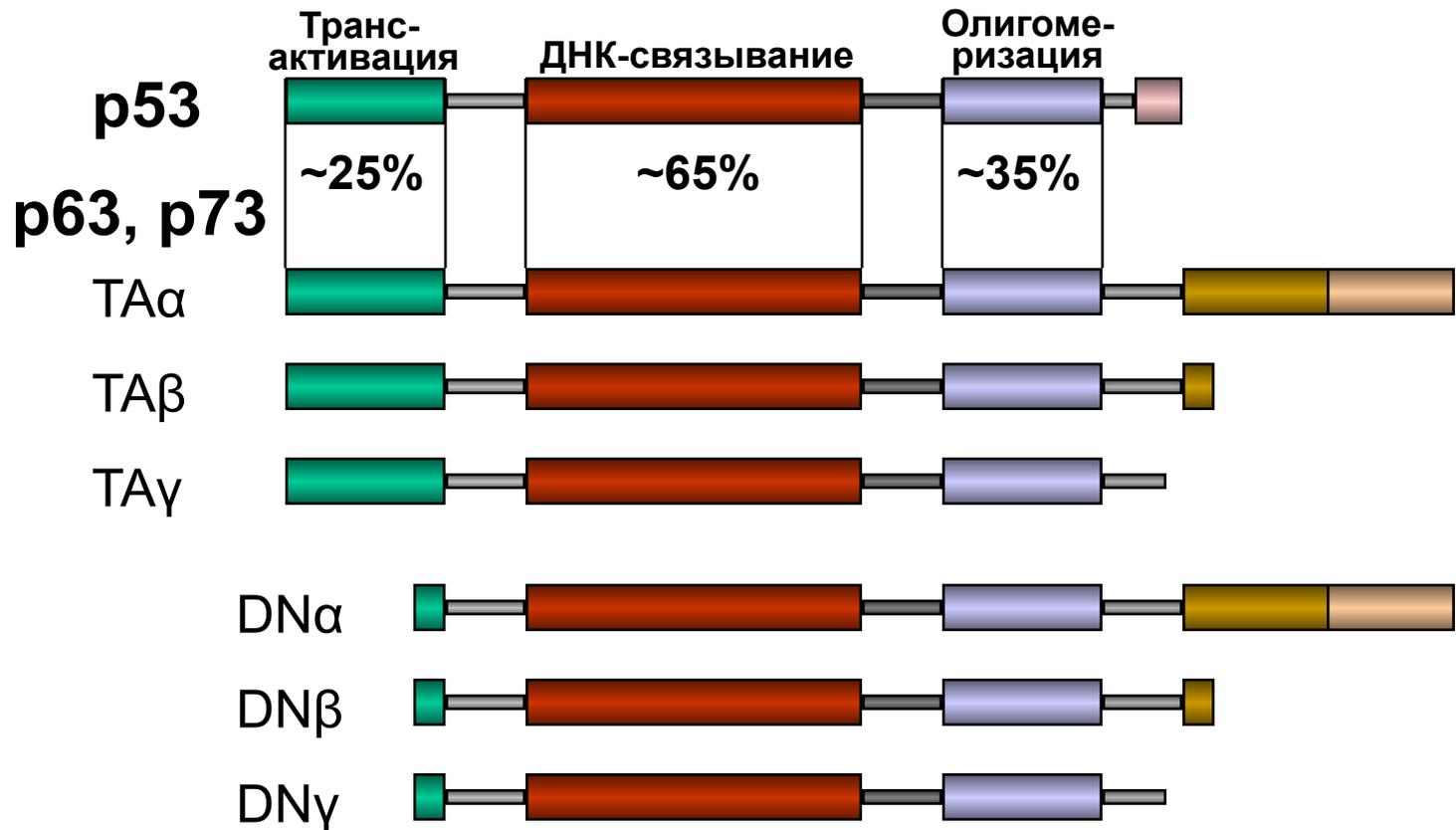
4986



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:**

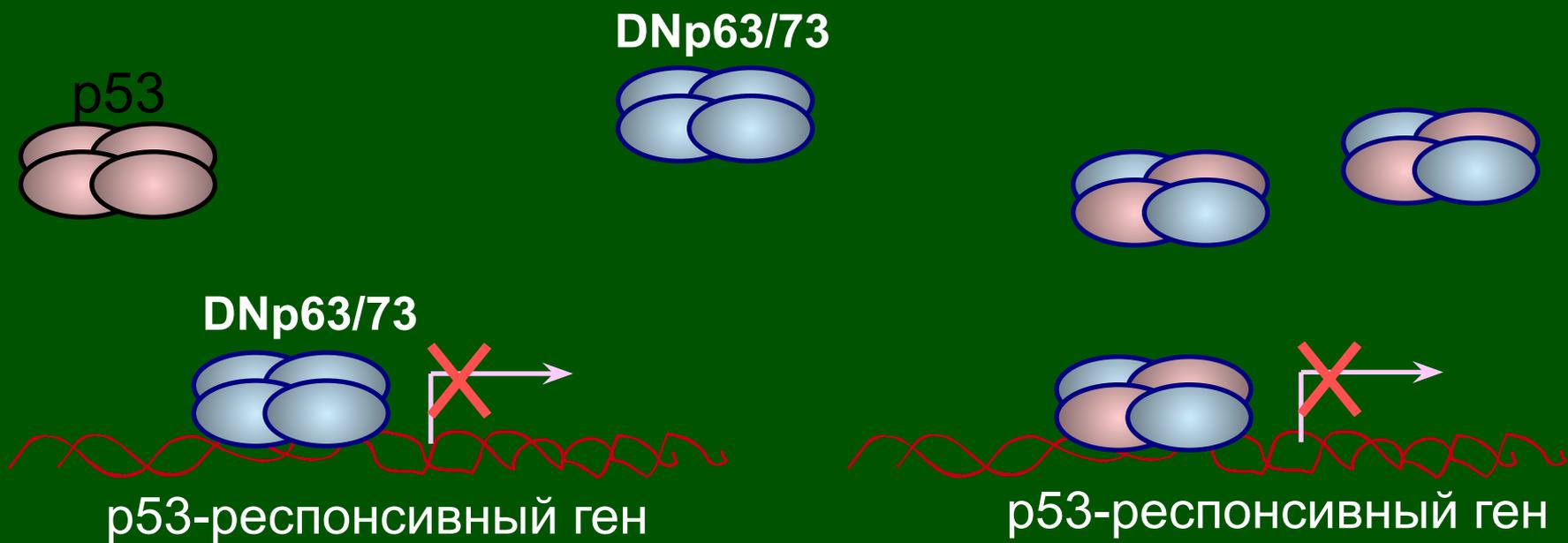
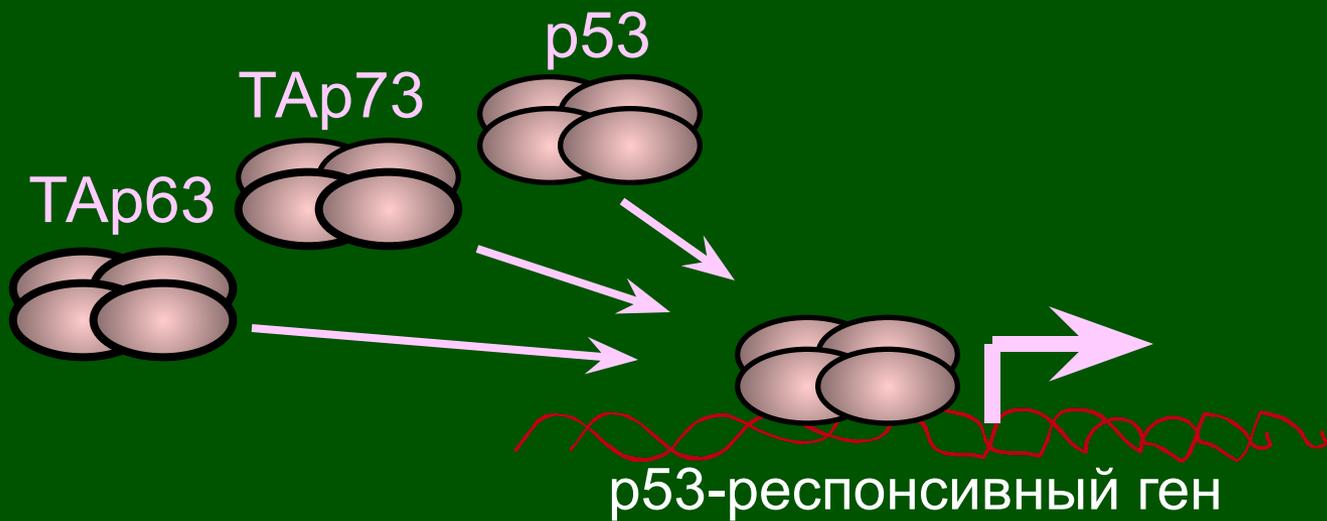
Самые разные  
стрессы

Некоторые стрессы

**Опухоли:**

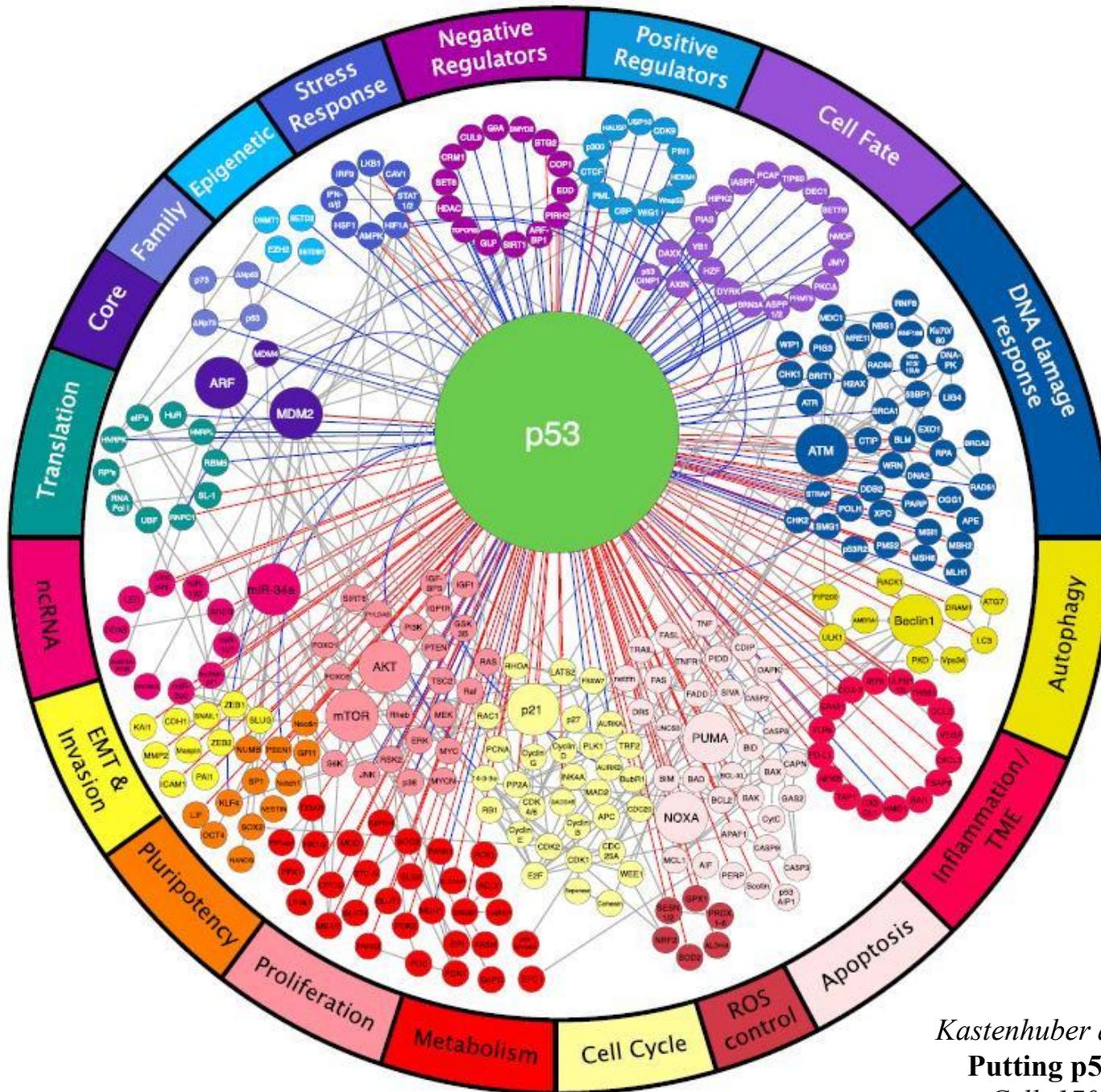
Инактивация

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**