

**Семинар 8
Немцова М.В.**

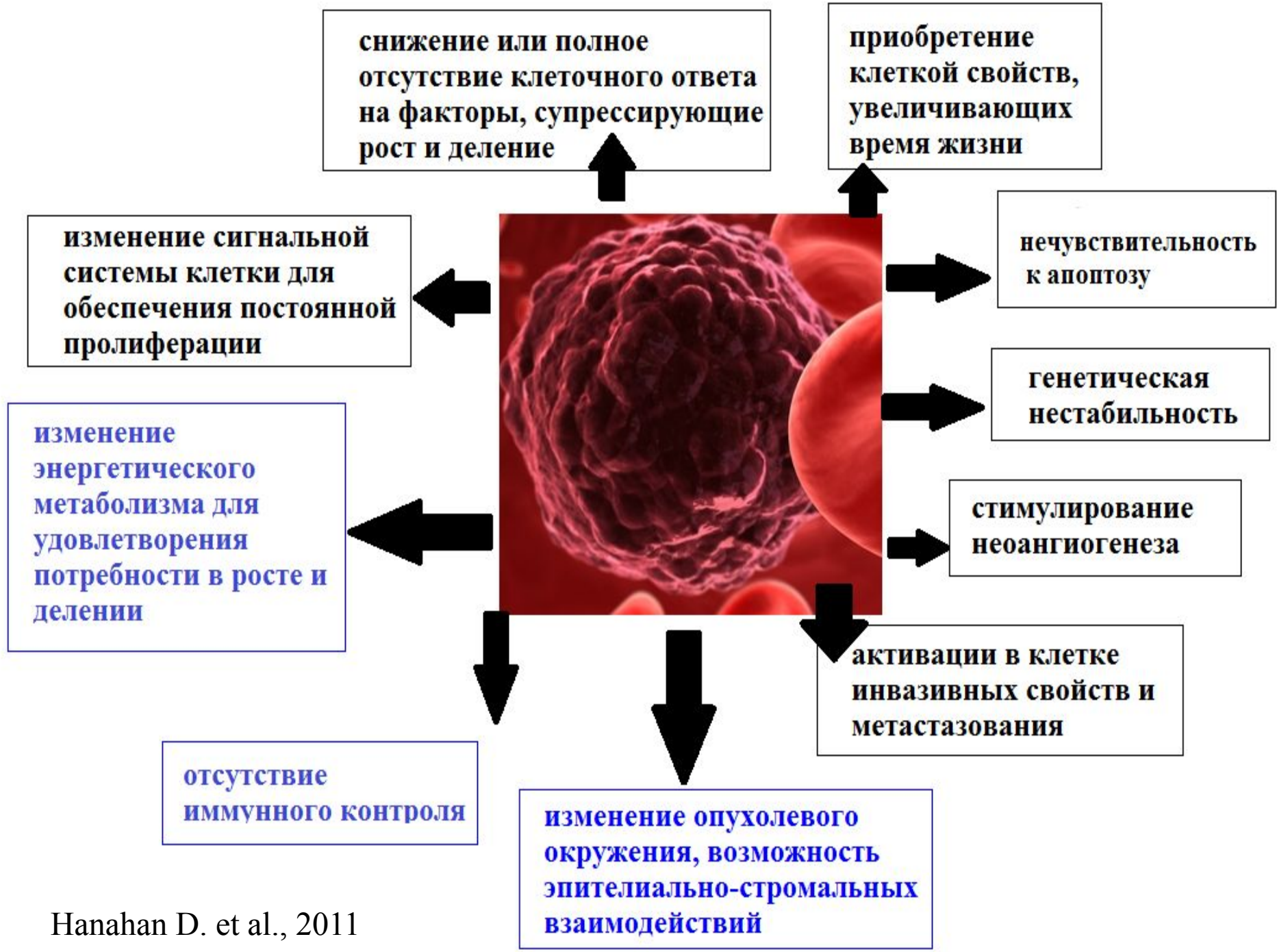
Медицинская генетика

**Фармация Курс 3 ЦИОП «Медицина
будущего»**

**Молекулярные основы
канцерогенеза. Рак- заболевание
генома. Основные свойства
злокачественных клеток.**

Основная причина злокачественных новообразований – генетические факторы. Рак – заболевание генома.

- **1) наличие в опухолевых тканях большого числа хромосомных перестроек, как численных изменений числа хромосом, так и их структурных повреждений.**
- **2) наличие в опухолевых тканях большого числа мутаций в генах.**
- **3) существование наследственных форм рака**
- **4) онкогенное действие ряда вирусов, способных взаимодействовать с геномом хозяина и встраиваться в молекулы ДНК.**
- **5) химические вещества и физические воздействия, обладающие мутагенным эффектом, имеют также и канцерогенный эффект.**



Нестабильность генома - отличительная характеристика опухолевой клетки

Генетическая нестабильность

- Наличие изменений в хромосомах, как числа хромосом (анеуплоидия и полиплоидия), так и внутренних хромосомных перестроек (делеций, инсерций, транслокаций)
- Наличие точковых мутаций в генах, приводящих к активации или инактивации генной функции
- Существование нестабильности микросателлитных повторов

Эпигенетическая нестабильность

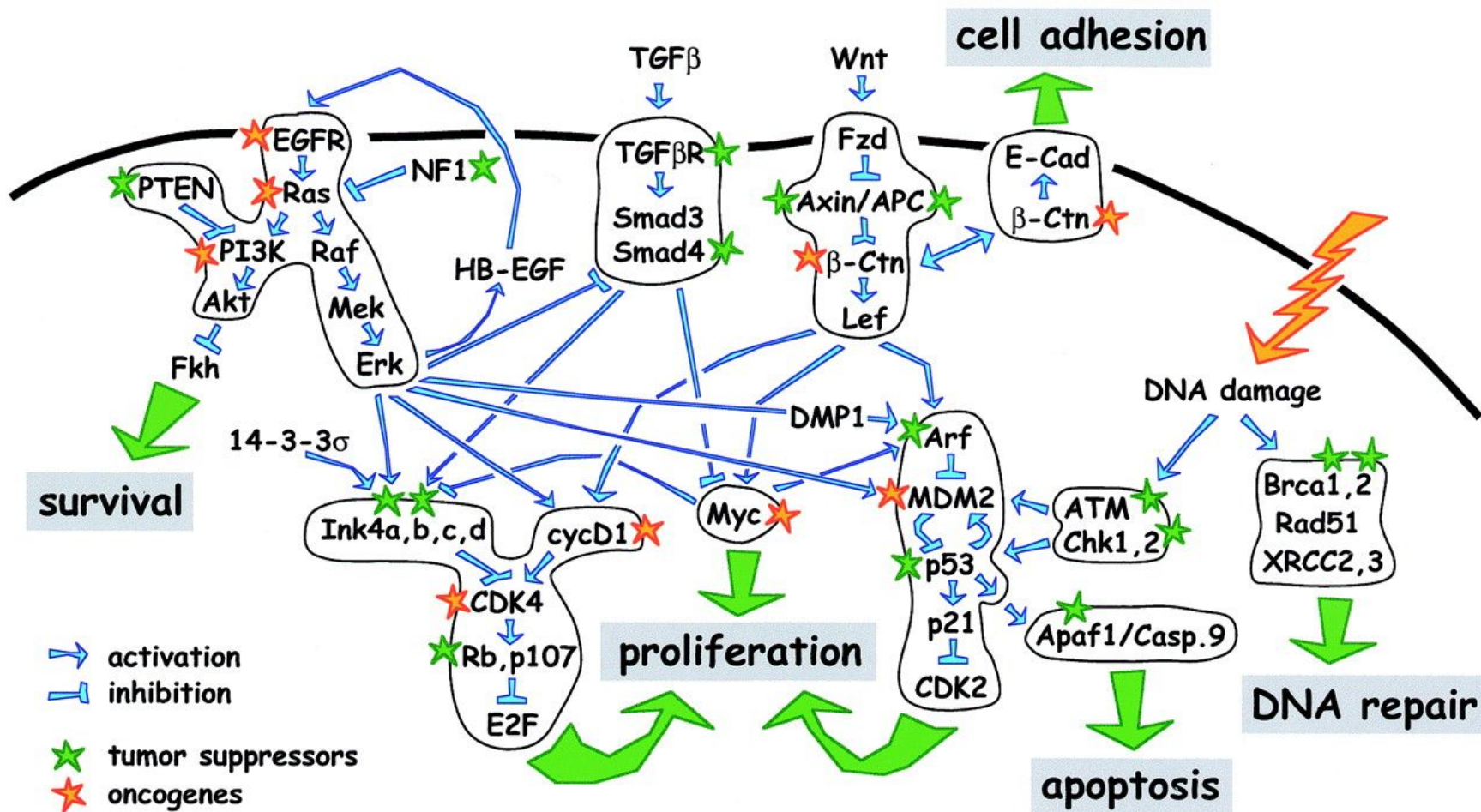
- Нарушение баланса метилирования/деметилирования
- Деметилирование транспозонов и вирусных частиц, инактивированных в нормальной клетке
- Деметилирование гетерохроматина, в том числе и центрального, что приводит к нарушению распределения хромосом при делении клетки
- Гиперметилирование регуляторных районов генов-супрессоров, приводящее к отсутствию их экспрессии



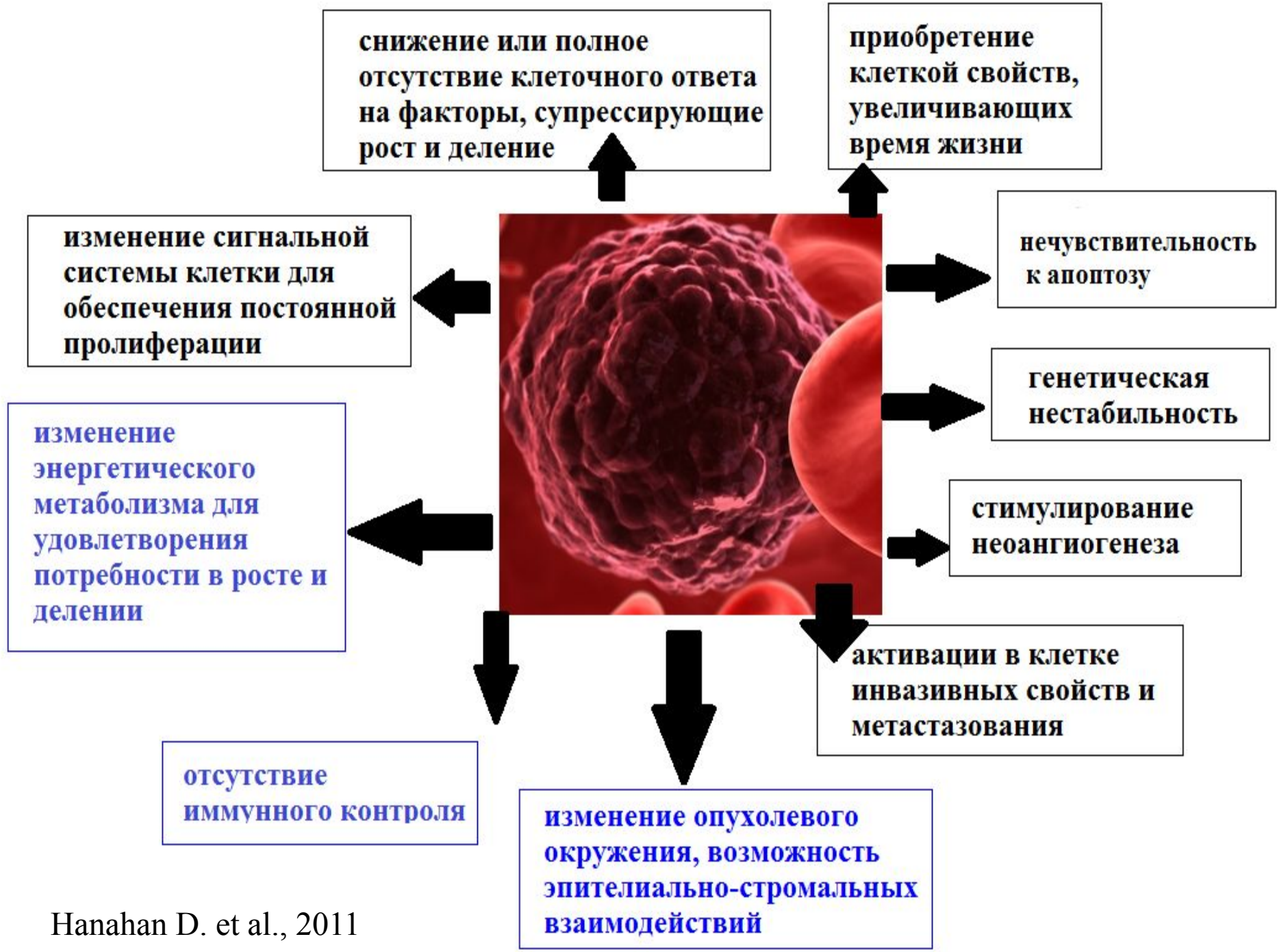
Образование опухоли



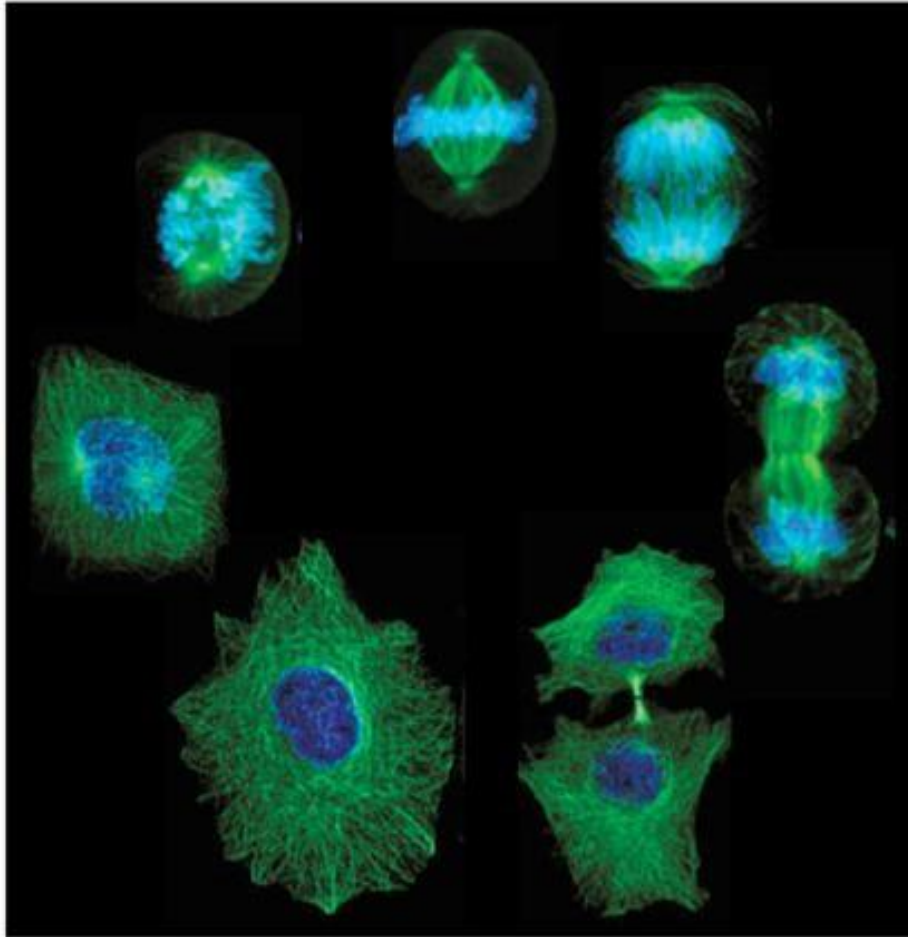
Генные каскады в процессах пролиферации, репарации ДНК, клеточных контактов, апоптоза.



По экспериментальным оценкам около 200 генов мутируют в злокачественных опухолях молочной железы и толстого кишечника, со средним показателем – 11 мутаций в каждой опухоли. Аномально метилированные промоторные районы (CpG-островки) составляют 100-400 в каждой опухоли.



Изменение сигнальной системы для обеспечения постоянной пролиферации



Активация деления клетки происходит вследствие воздействия на нее внешних или внутренних факторов. Процесс деления клетки с момента ее активации называется **пролиферацией**. Иными словами, **пролиферация** - это размножение клеток, т.е. увеличение числа клеток (в культуре или ткани), происходящее путем **митотических делений**. Время существования клетки как таковой, от деления до деления, обычно называют **клеточным циклом**.

ростовой фактор

рецептор для фактора роста

клеточная мембрана

protein 1

тирозинкиназный домен

protein 2

protein 3

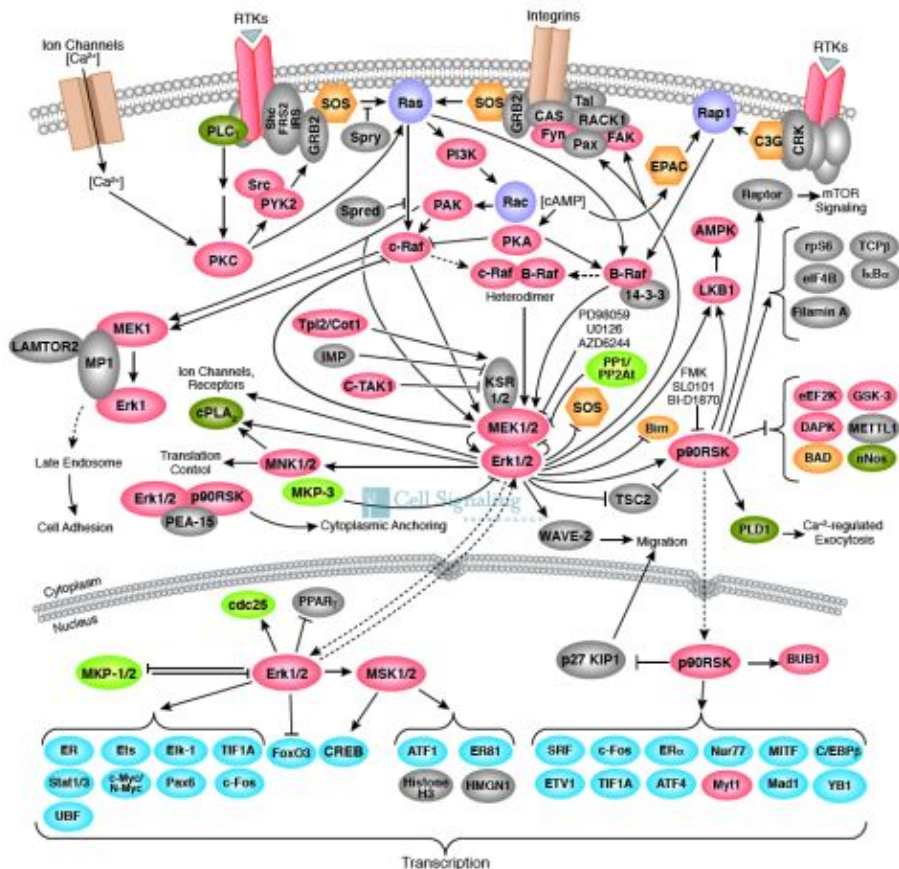
ядерная мембрана

ядро

DNA

активация генов, которые контролируют рост, пролиферацию и выживание клетки

P = phosphate molecule

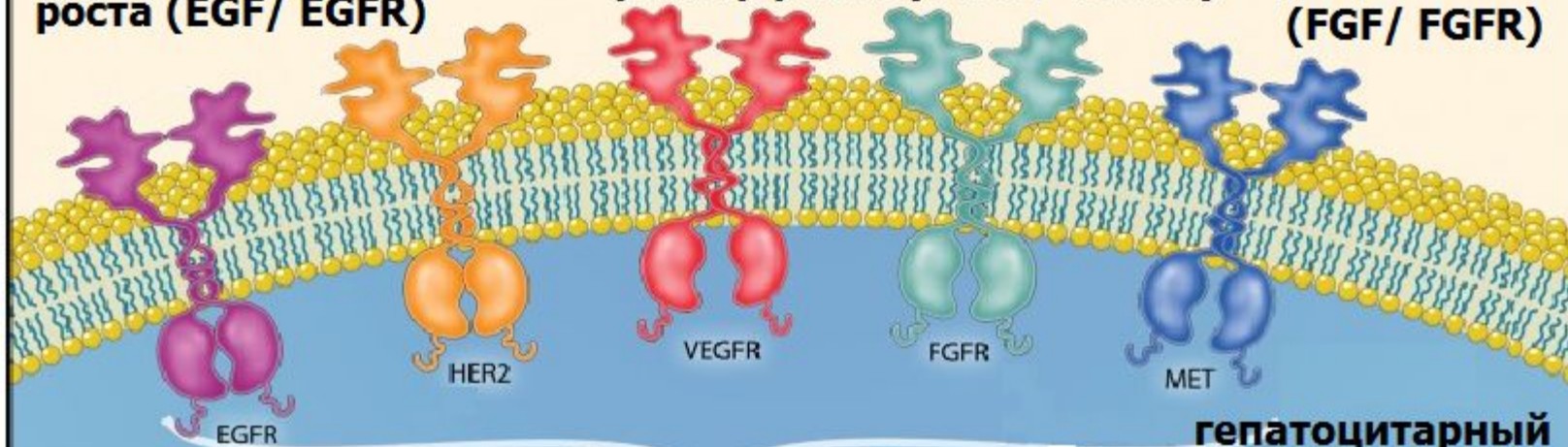


Изменение сигнальной системы клетки для обеспечения постоянной пролиферации

Эпидермальный фактор роста (EGF/ EGFR)

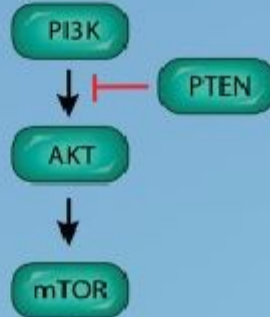
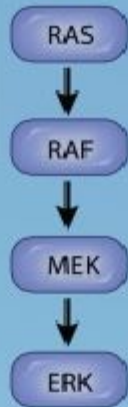
Васкулоэндотелиальный фактор роста (VEGF/ VEGFR)

Фактор роста фибробластов (FGF/ FGFR)

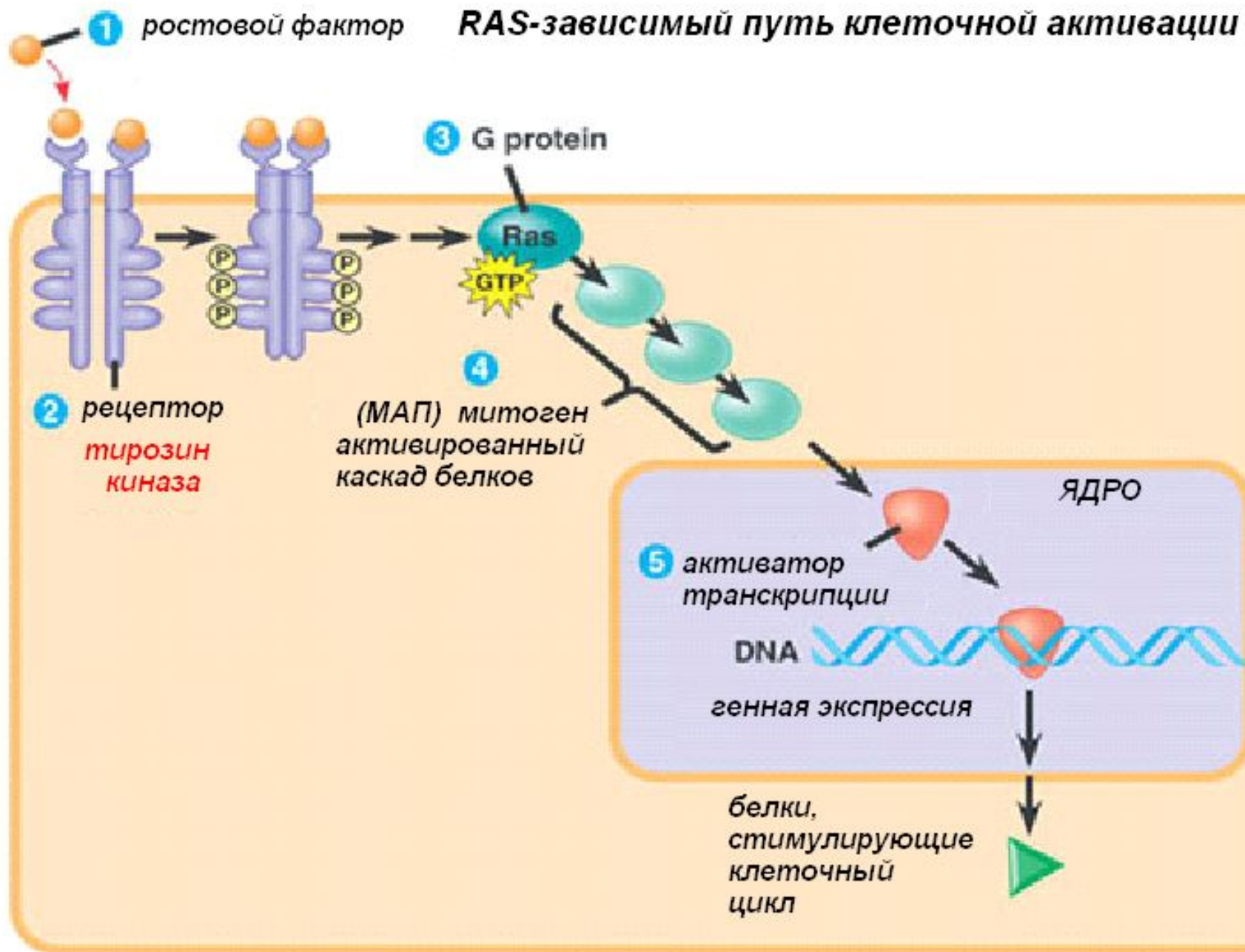


гепатоцитарный фактор роста HGF/MET

Тромбоцитарный фактор роста (PDGF/ PDGFR)



Cell survival/
proliferation



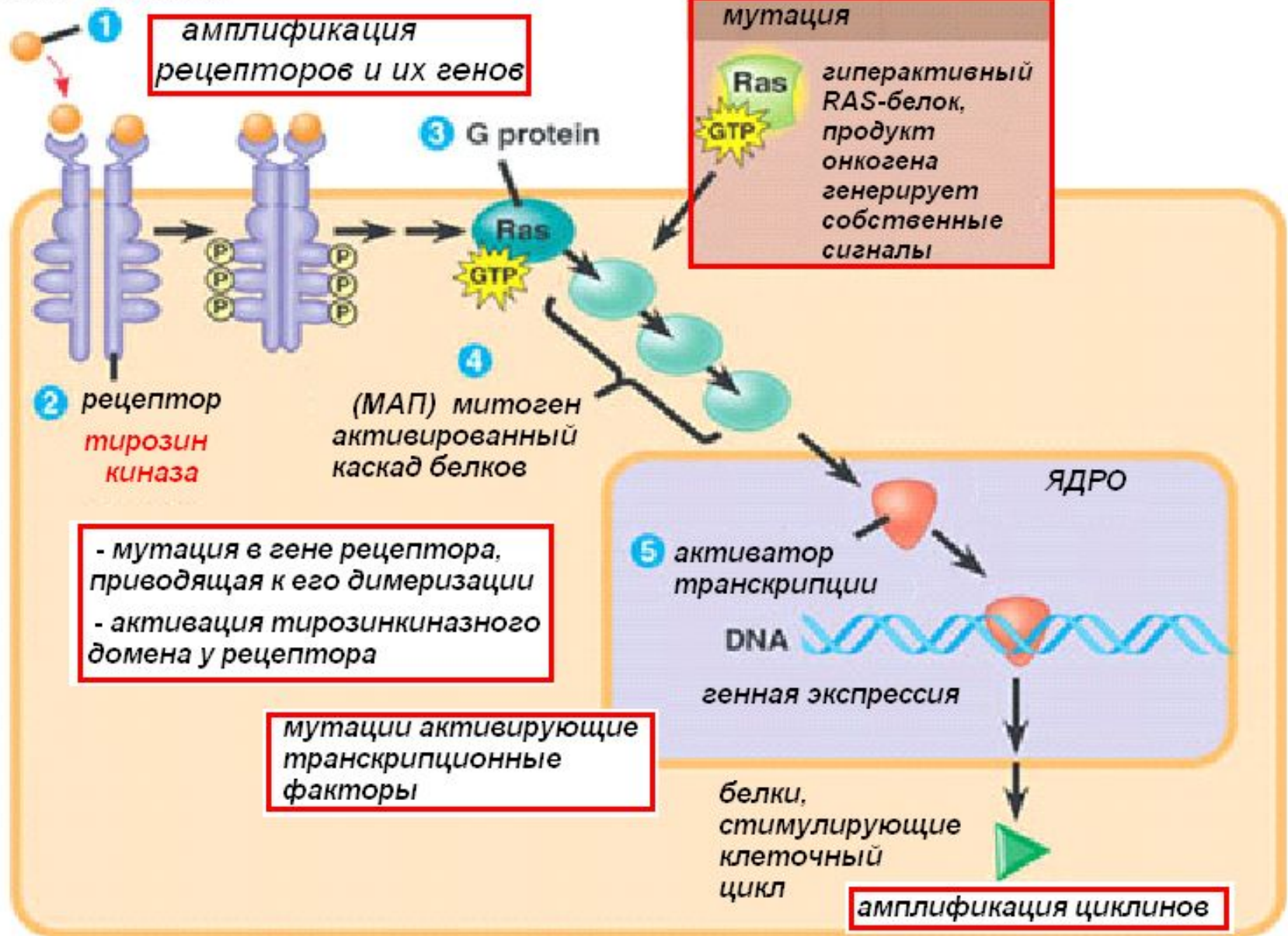
Активация сигнальной системы клетки в опухоли

- **Во-первых**, опухолевые клетки могут сами вырабатывать факторы роста, в результате амплификации или мутации в генах, кодирующих ростовые факторы. Клетки опухоли могут сами посылать сигнал, стимулируя нормальные клетки опухоль-ассоциированной стромы к выработке различных, необходимых для них факторов роста. Увеличение концентрации факторов роста приводит к стимуляции пролиферации.
- **Во-вторых**, к изменению сигнальной системы в опухолевых клетках может привести увеличение уровня рецепторов, расположенных на их поверхности, что приводит такие клетки в гиперчувствительное состояние по отношению фактору роста.

- **В-третьих**, аналогичные последствия могут быть вызваны мутациями или перестройками в генах, кодирующих рецепторы факторов роста, что приведет к изменениям в молекуле рецептора. Мутантный рецептор может иметь постоянно активированный тирозинкиназный домен, или находиться в комплексе с другими молекулами, что приведет либо к запуску системы, независимо от наличия ростового фактора, либо к ее запуску при взаимодействии с неспецифическим лигандом.
- **В-четвертых**, активация сигнальной системы опухолевой клетки может возникать независимо от факторов роста и их рецепторов - на нижестоящих уровнях регуляции, независимо от образования комплекса лиганд-рецептор.

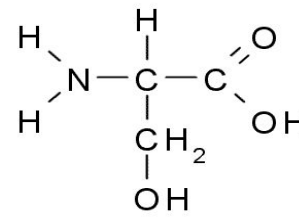
RAS-зависимый путь клеточной активации

ростовой фактор

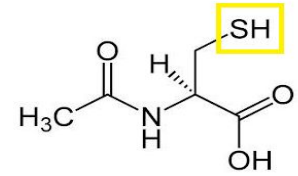


Мутация в 249 кодоне гена *FGFR3* приводит к замене серина на

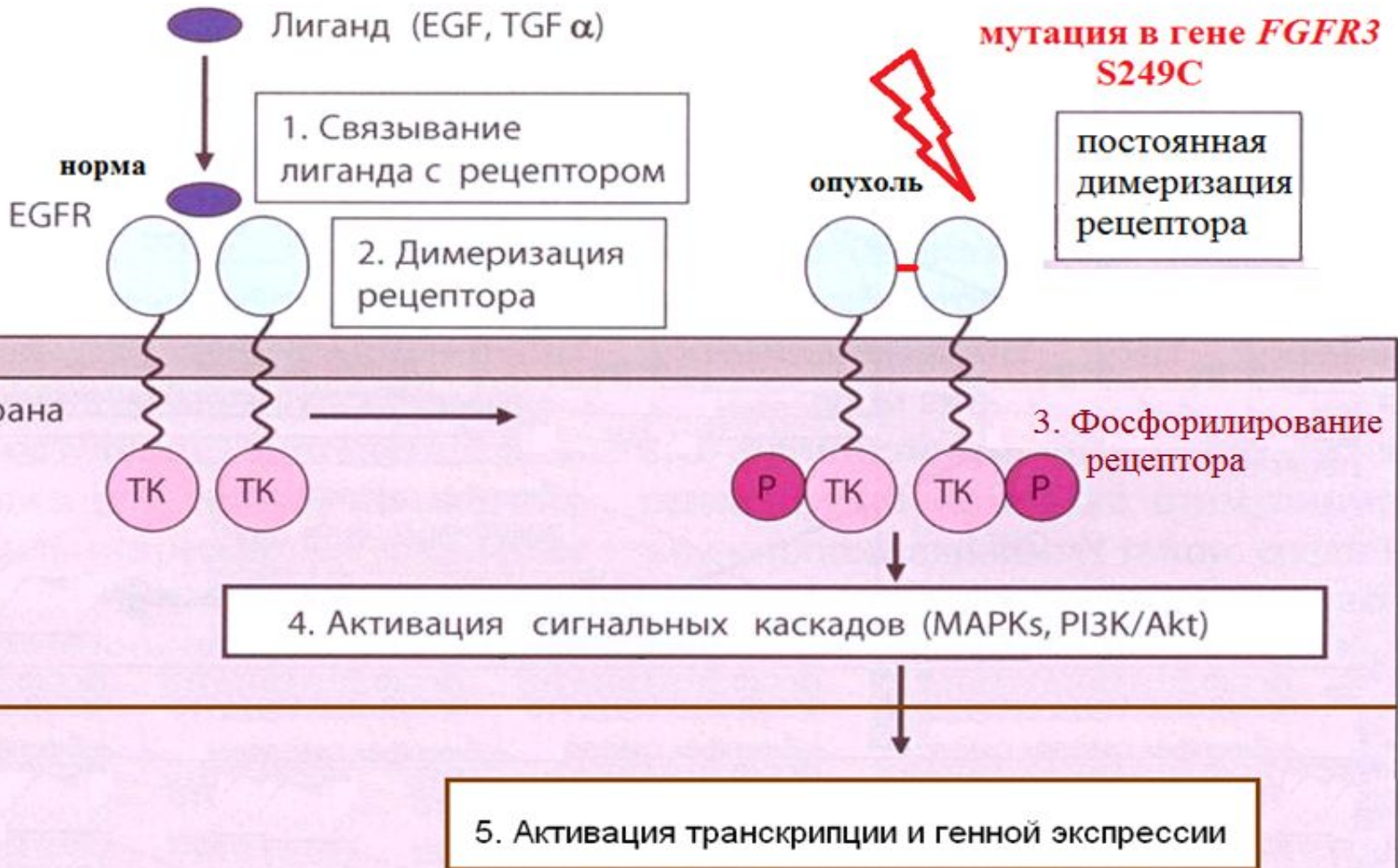
ЦИСТЕИН



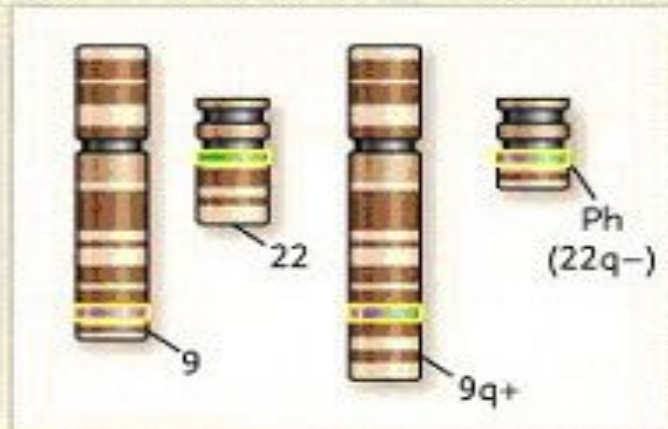
серин



цистеин



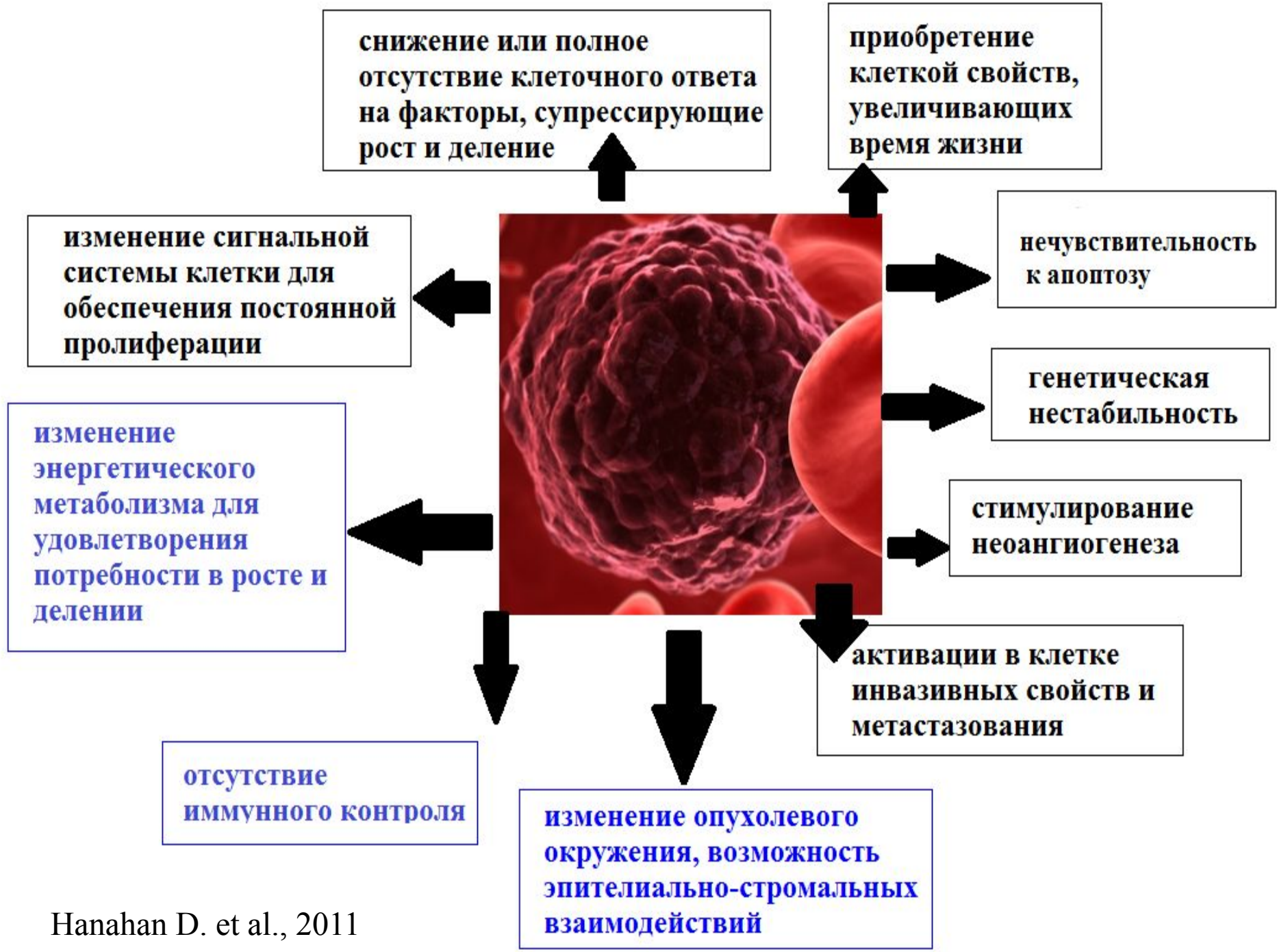
Филадельфийская хромосома – маркер хронического миелоидного лейкоза, встречается у 90% больных.



онкоген *BCR-ABL*
 $t(9;22)(q34;q11)$



Протоонкоген *ABL1* (9q) соединяется с геном *BCR* (22q), образуя тирозинкиназу с высокой активностью

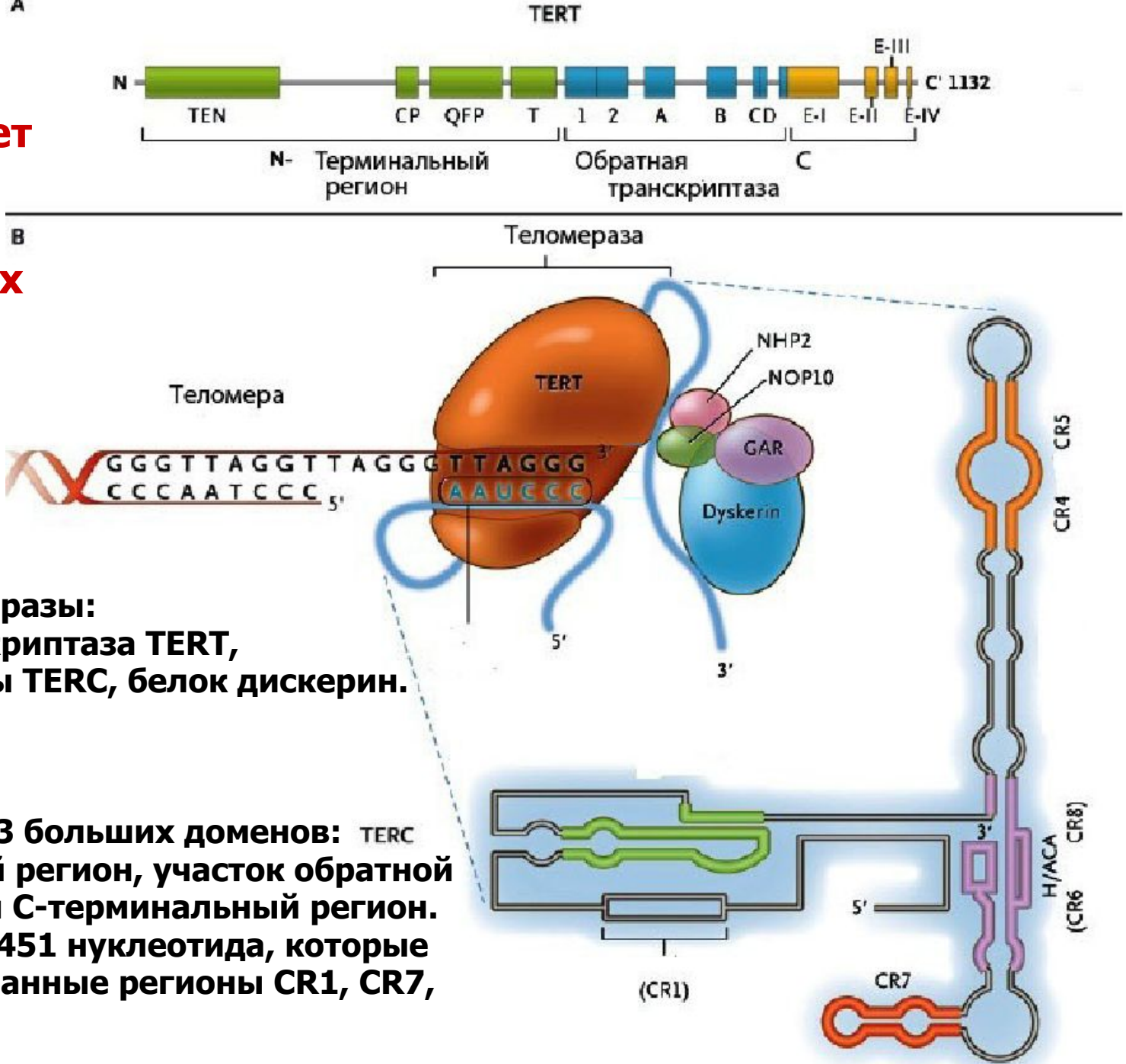


Приобретение клеткой свойств, увеличивающих время жизни

- Во взрослом организме человека клетки различных тканей и органов имеют неодинаковую способность к делению. При старении интенсивность пролиферации клеток снижается, увеличивается интервал между митозами.
- Еще в 60-ых годах прошлого века **Леонард Хейфлик** установил, что в клеточных культурах соматические клетки человека способны делиться ограниченное число раз. При этом предельное число делений (названное лимитом Хейфлика) сильно зависит от возраста индивидуума, которому эти клетки принадлежат: так клетки новорожденных делились 80-90 раз, а 70-летние 20-30 раз.
- Достигнув лимита клетки, переходили в **состояние сенесенса – одряхления**, которое характеризовалось резким изменением метаболизм, и в первую очередь нарушением репликации ДНК, а затем наступала гибель клеток.

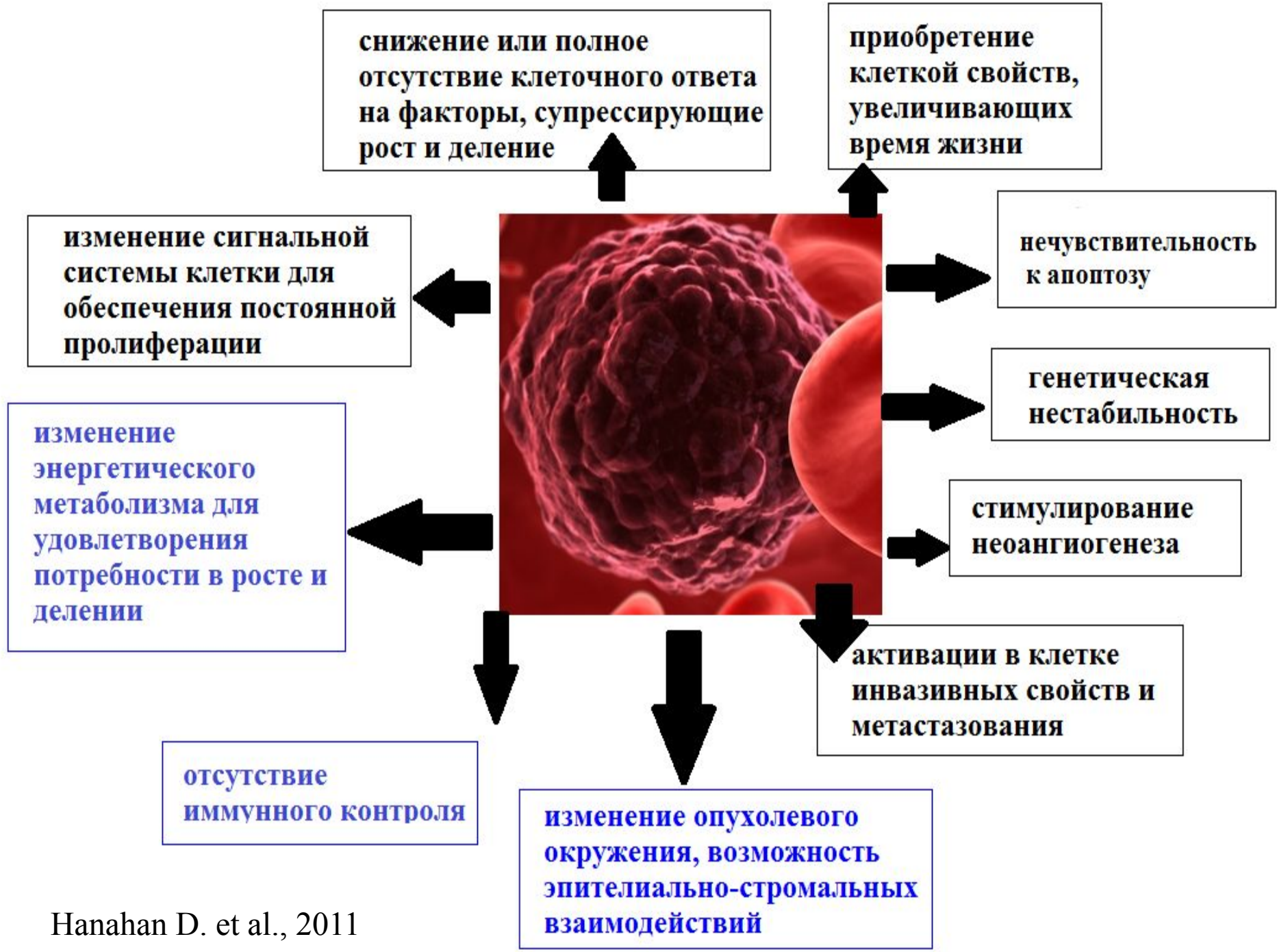
- **1. Теломераза** синтезирует теломерные ДНК-последовательности, идущие от 5' к 3' концу по направлению к окончаниям хромосом. Восстановление хромосомной ДНК необходимо для компенсации укорочения, которое возникает в результате активности нуклеазы и неполной концевой ДНК-репликации.
- **2. Критически короткие теломеры (3000-5000 пар нуклеотидов или менее 2 kb)** неспособны защитить хромосомы от повреждения при делении клетки. Их появление является сигналом для выхода клеток из митотического цикла. Если этой величины достигает хотя бы одна теломера, то в клетке происходит резкое изменение метаболизма, и в первую очередь нарушение репликации ДНК, которые запускают механизмы **клеточного сенесенса (репликативное старение) и апоптоза (гибель, разрушение клетки)**.

Теломераза катализирует добавление ТTAGGG гексамерных повторов к окончаниям теломер.



строение теломеразы: Обратная транскриптаза TERT, РНК компоненты TERC, белок дискерин.

TERT состоит из 3 больших доменов: N-терминальный регион, участок обратной транскриптазы и C-терминальный регион. TERC состоит из 451 нуклеотида, которые образуют несвязанные регионы CR1, CR7, H/ACA

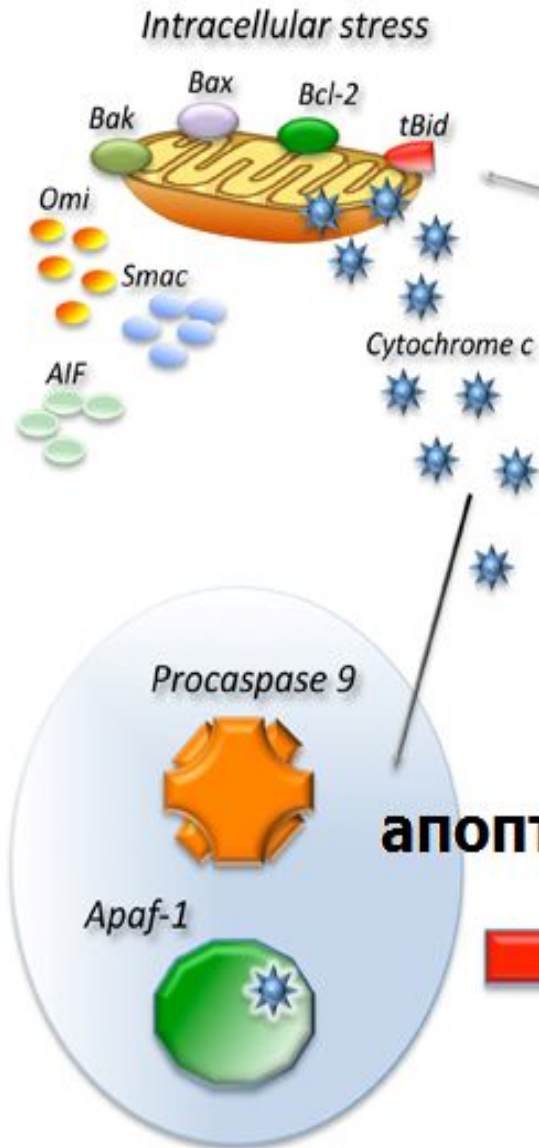


- Термин "апоптоз", предложенный в 1972 г. английскими учеными J.F.R. Kerr, A.H. Wyllie и A.R. Currie, состоит из двух греческих слов и означает в буквальном смысле "отделение лепестков от цветов", а применимо к клетке - особый тип смерти путем деления ее на части ("**апоптозные тельца**"), которые впоследствии фагоцитируются соседними клетками разного типа.
- Термин "**программированная клеточная смерть**" отражает функциональное назначение этого процесса, представляет естественную часть жизни многоклеточного организма, связанного с метаморфозом и развитием.

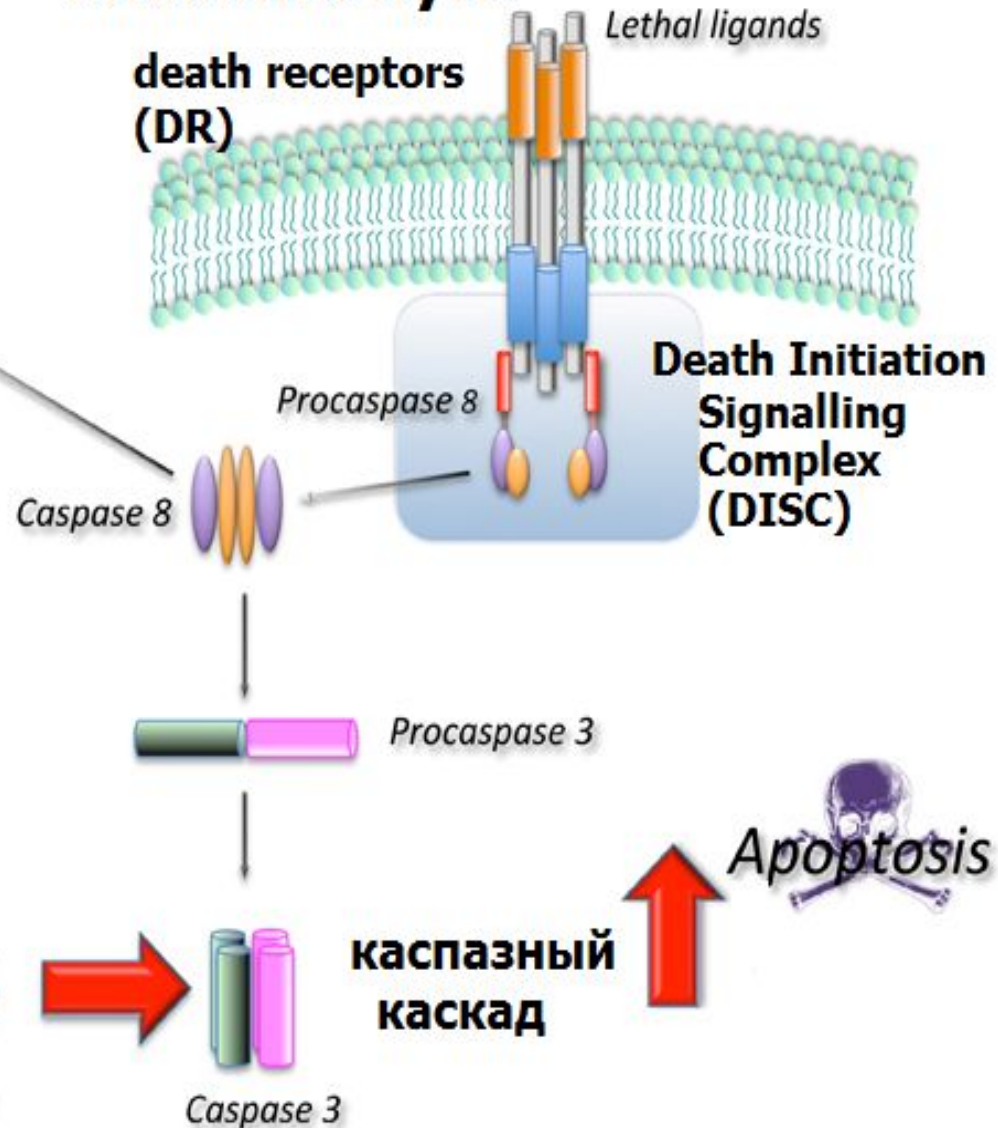
- У млекопитающих апоптоз часто начинается с активации так называемых "индуцирующих смерть сигнальных комплексов" на плазматической мембране. Эти комплексы образуются при взаимодействии определенных **внеклеточных лигандов** - например, **Fas** или **TNF** (tumor necrosis factor) с белками семейства рецепторов фактора некроза опухолей (**TNFR**) на клеточной мембране, называемых "**рецепторами смерти**".
- **Рецепторы смерти** имеют прямую связь с механизмом апоптоза. Сигналы выживания от окружения клетки и от внутренних сенсоров контролирующей целостность клетки нормально поддерживают механизм апоптоза в состоянии готовности. В случае, если клетка теряет контакт с окружением или в ней происходит невосстановимое внутреннее повреждение, клетка входит в апоптоз. Клетки, которые одновременно получают конфликтующие сигналы о продолжении или прекращении цикла деления также переходят в апоптоз.
- Рецепторы смерти - поверхностные рецепторы клетки, которые передают апоптотические сигналы инициируемые специфическими "**лигандами смерти**" - играют главную роль в апоптозе. Эти рецепторы могут активировать стимулирующие смерть каспазы за время порядка секунд с момента связывания лигандов, вызывая апоптотическое разрушение клетки в течение часов.
- Рецепторы смерти принадлежат к **суперсемейству фактора некроза опухолей (TNF)**, и все они имеют сходные внеклеточные домены богатые цистеином. Рецепторы смерти содержат вдобавок гомологичную последовательность, называемую домен смерти.

Индукция апоптоза

внутренний путь



внешний путь



Внешний путь активации апоптоза

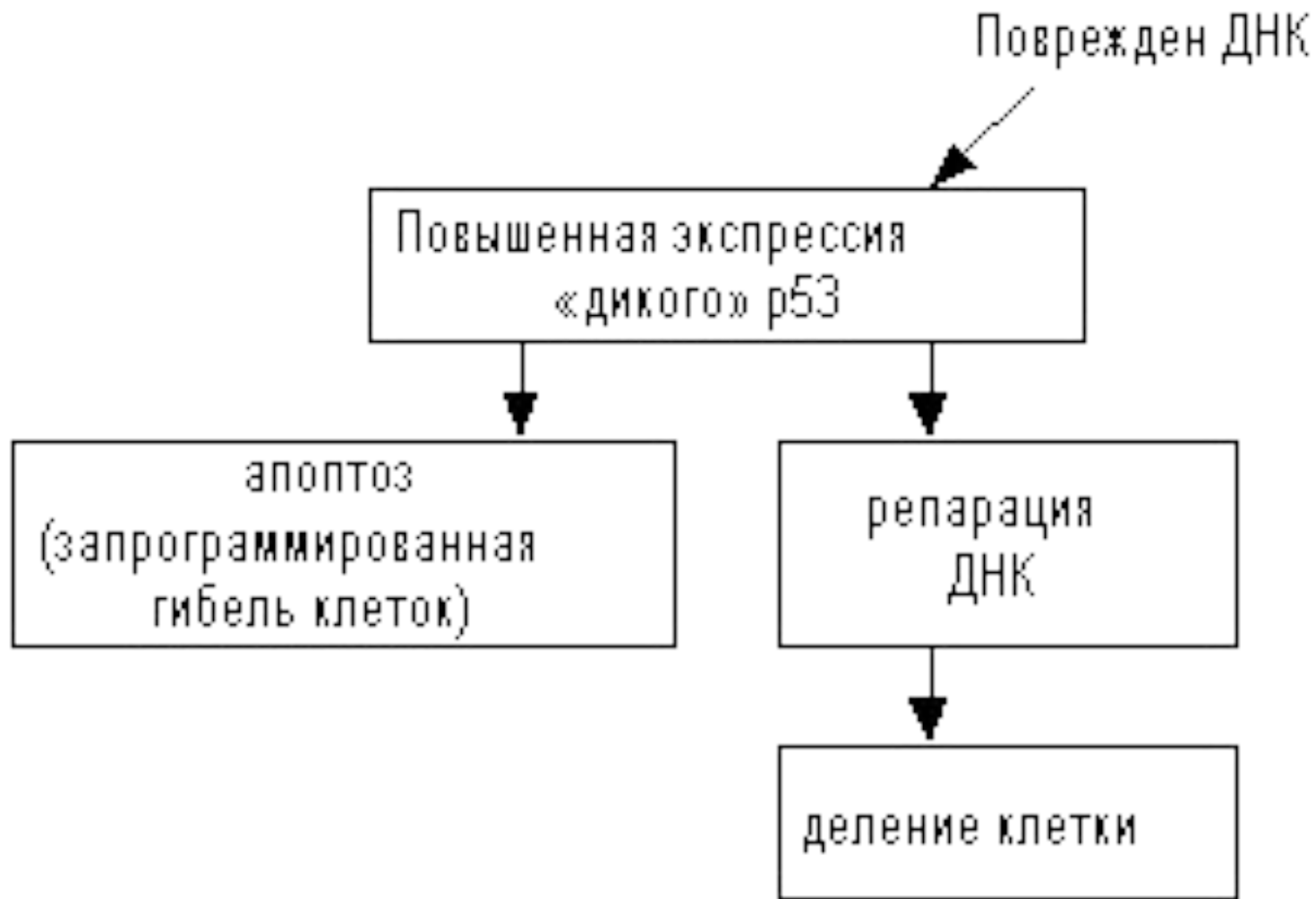
Внешний путь начинается со связывания **CD95** со своим **лигандом, CD95L**. В результате этого происходит **димеризация рецептора** и, соответственно, его **цитоплазматических доменов смерти**, которые активируют внутриклеточный адаптерный белок **FADD**. Этот белок **активирует прокаспазу 8**, которая формирует **смерть-индуцирующий сигнальный комплекс (DISC)**. Прокаспаза 8 активируется путем расщепления на более мелкие субъединицы, **высвобождая каспазу 8**. Каспаза 8 затем **активирует другие каспазы**, такие как **каспаза 3 (исполняющая каспаза)**, которая расщепляет ДНК и другие субстраты, вызывая гибель клетки.

Внутренний путь активации апоптоза

Внутренний путь апоптоза запускается различными воздействиями (**отсутствие ростовых факторов, стресс и повреждение**). Активация этого пути ведет к **повышению проницаемости наружной мембраны митохондрий** с последующим **выходом цитохрома C**, который инициирует апоптоз.

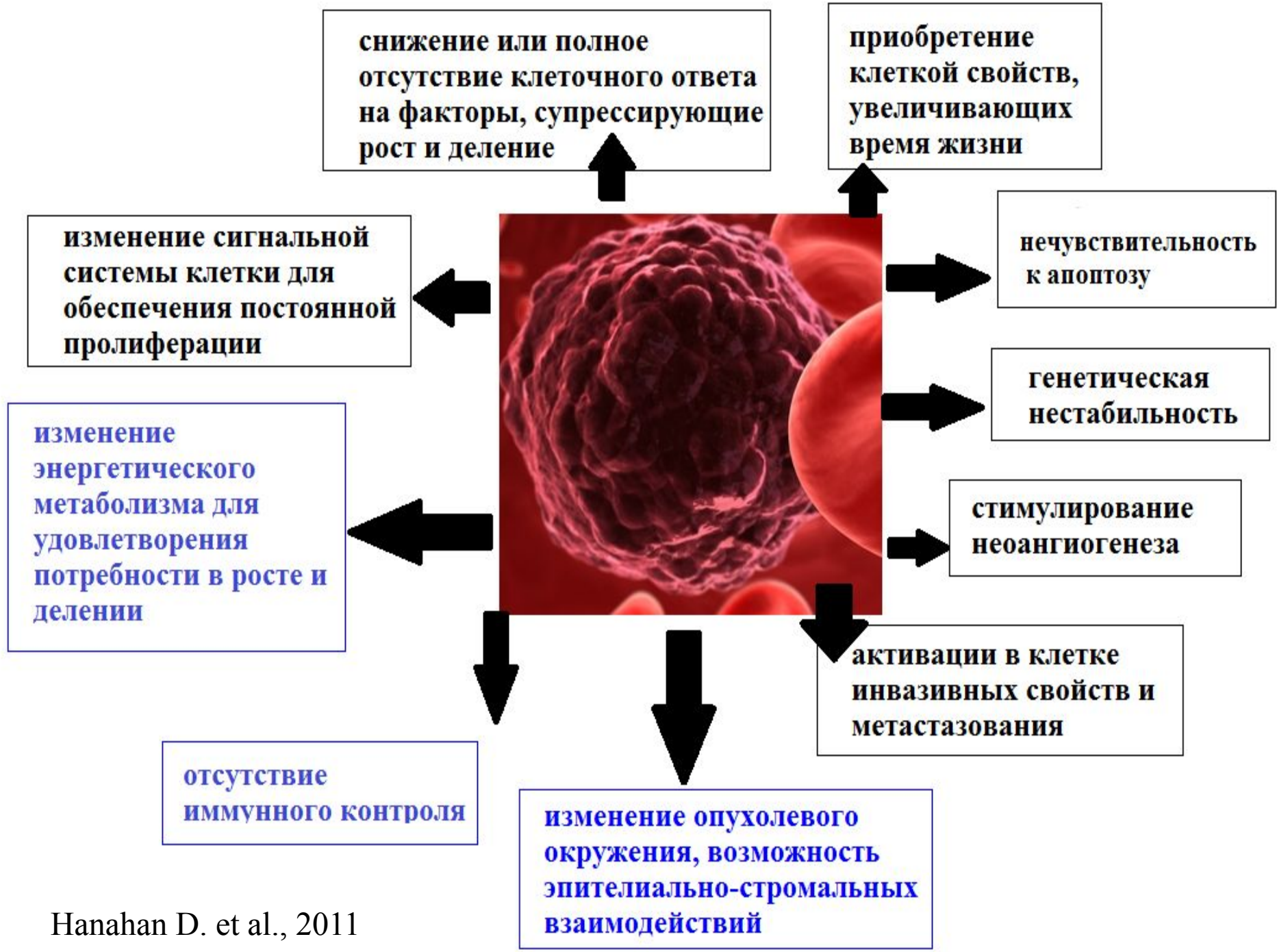
Целостность митохондриальной мембраны регулируется про- и антиапоптотическими белками семейства BCL2. Активность проапоптотических белков, BAX и BAK ингибируется антиапоптотическими белками семейства BCL2 и BCL-XL. Третья группа белков (т.н. BH3-only белки: BAD, BID и PUMA) регулируют баланс между про- и антиапоптотическими членами семейства BCL2. BH3-only белки стимулируют апоптоз, нейтрализуя действие антиапоптотических белков (BCL2, BCL-XL). Когда суммарный эффект всех экспрессируемых белков BH3 «перекрывает» антиапоптотическое действие белков BCL2/BCL-XL, белки BAX и BAK активируются и формируют поры в митохондриальной мембране. Цитохром C выходит в цитозоль, где связывается с APAF-1, активируя каспазу 9.

Функция гена Р53



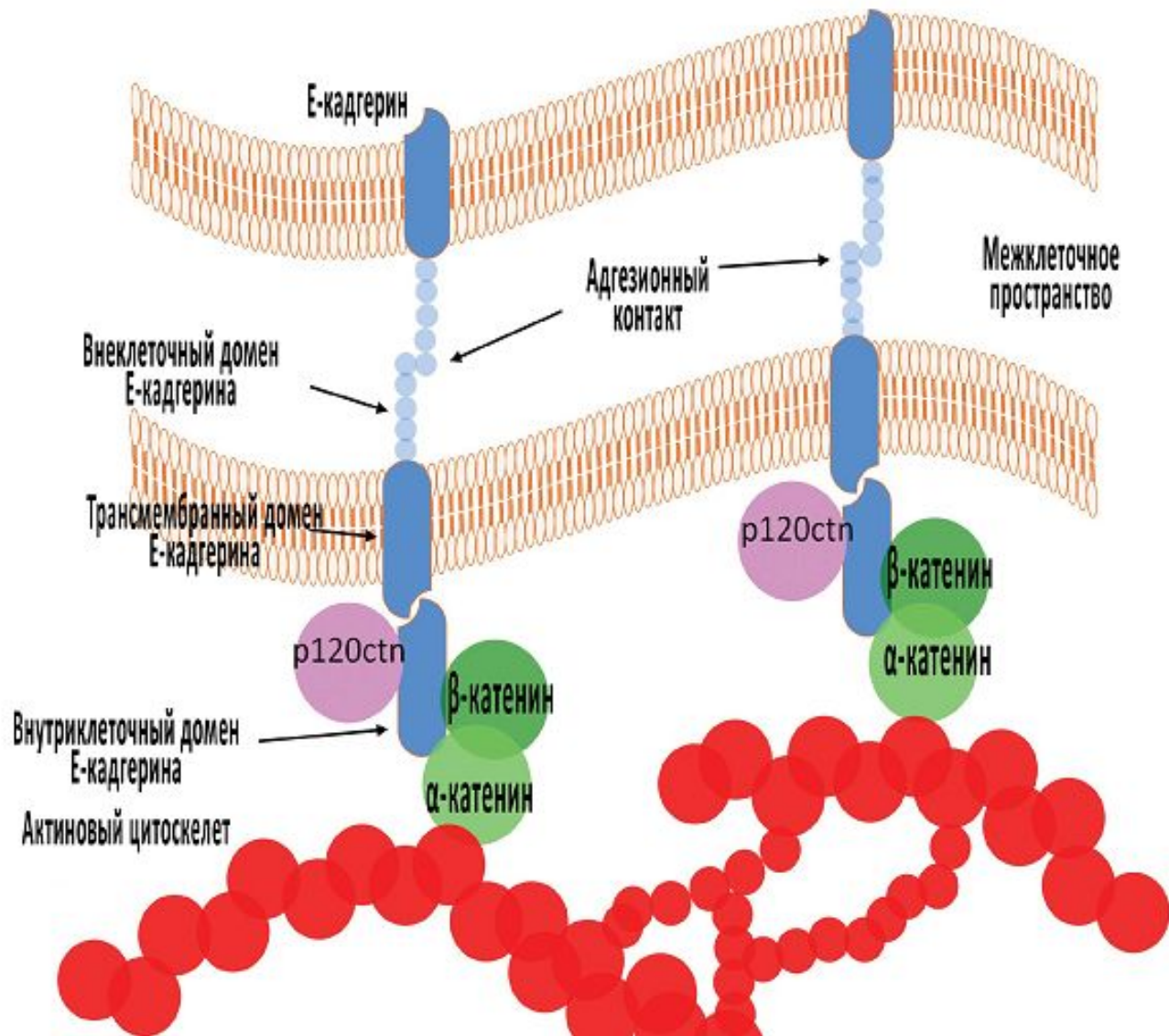
Опухолевые клетки используют разные возможности для ограничения или обхода апоптоза.

- **Опухоли часто ингибируют функцию TP53, что устраняет этот критический фактор из схемы индуцированного апоптоза.**
- **Опухоли могут увеличивать экспрессию антиапоптотических регуляторов (Bcl-2, Bcl-xL) и сигналов выживания (ИФР-1, ИФР-2) или снижают уровень проапоптотических факторов (Bax, Bim, Puma)**
- **Опухоли могут ингибировать апоптоз, который стимулируется внешним лигандом.**



Активация в клетке свойств инвазии и метастазирования

- **Опухолевая инвазия — процесс, при котором опухолевые клетки или группы клеток распространяются из первичного очага опухоли в соседние ткани. В случае карцином этот процесс включает проникновение опухолевых клеток через разрушаемую ими базальную мембрану.**



Кадгерин-катениновые взаимодействия необходимы для образования и поддержания межклеточных контактов

Ген *CDH1* локализуется на хромосоме 16q22.1, занимая объем около 100 кб. *CDH1* содержит 16 экзонов и 15 интронов. Наследственные мутации гена *CDH1* обнаружены только в семьях с диффузным РЖ и никогда в семьях с интестинальным РЖ. Наследственные мутации *CDH1*

- **Инвазия является первым этапом сложного инвазивно-метастатического каскада, приводящего в дальнейшем к метастазированию.**
- **Основным признаком инвазии служит прорыв базальной мембраны и выход опухолевых клеток за её пределы, позволяющий им приобретать дополнительные преимущества (улучшенное обеспечение кислородом и питательными веществами).**

Коллективная миграция

Коллективная миграция, представляя собой один из вариантов инвазивного роста, характеризуется миграцией целых групп клеток, соединенных между собой посредством молекул адгезии и коммуникационных контактов.

Коллективную клеточную миграцию наблюдали при развитии и прогрессировании рака молочной железы и эндометрия, рака предстательной железы, колоректального рака, крупноклеточного рака легкого, рабдомиосаркомы, меланомы, а также большинства плоскоклеточных карцином.

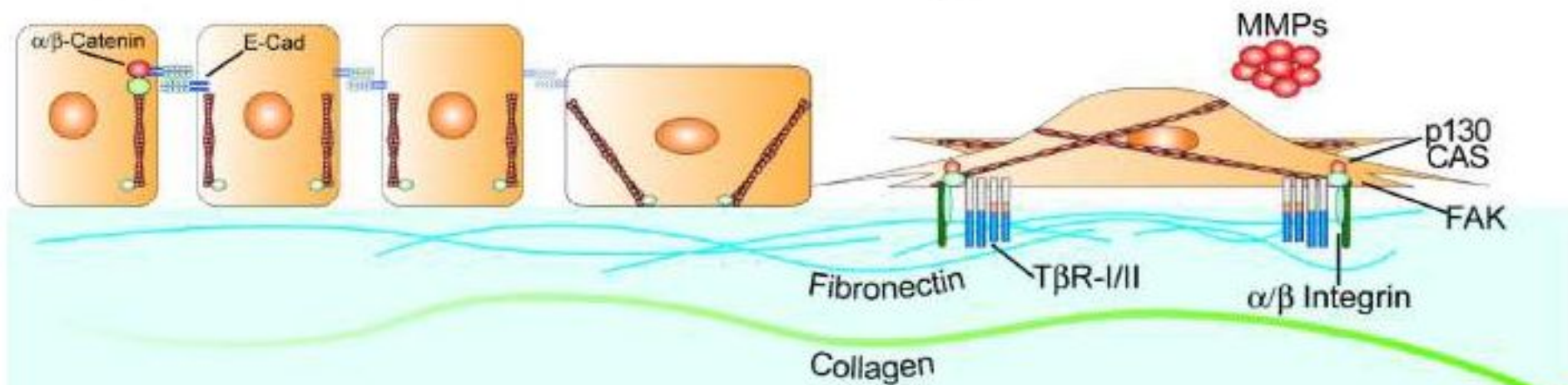
Эпителиально-мезенхимальный переход

В ходе опухолевой инвазии некоторые раковые клетки претерпевают эпителиально-мезенхимальный переход:

- приобретают фенотип мезенхимальных клеток, которые обладают повышенной подвижностью
- приобретают способностью секретировать компоненты внеклеточного матрикса, продуцировать некоторые ростовые факторы.
- Эти клетки при помощи ферментов — матриксных металлопротеиназ запускают деградацию коллагена IV, ламининов — компонентов базальной мембраны.

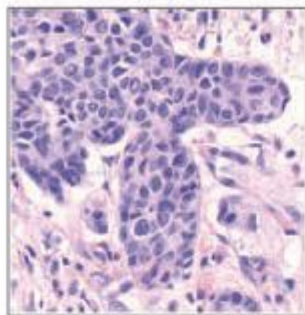
эпителиальная
клетка

мезехимальная
клетка



Коллективная миграция

↑ E-кадгерин
↑ Интегрины



эпителиально-мезенхимальный переход

ЭМП ↑ TWIST1, Snail, Slug, ZEB 1/2
↑ Протеазы
↓ E-кадгерин



Парциальный ЭМП

Инвазивный фронт

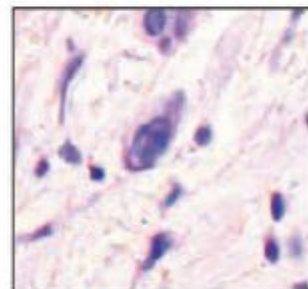
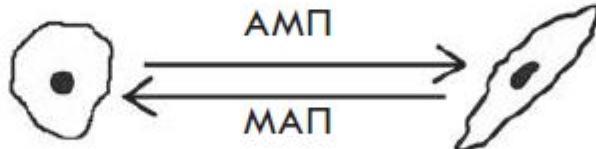
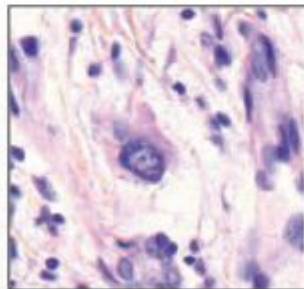
коллективно-амебоидный переход

↓ Интегрины

ЭМП

Амебоидная миграция

Мезенхимальная миграция



Инвазия одиночными клетками

↓ Rac1
↑ RhoA
↓ Протеазы
↓ Интегрины
«Мягкий» матрикс

↑ Rac1
↓ RhoA
↑ Протеазы
↑ Интегрины
«Плотный» матрикс

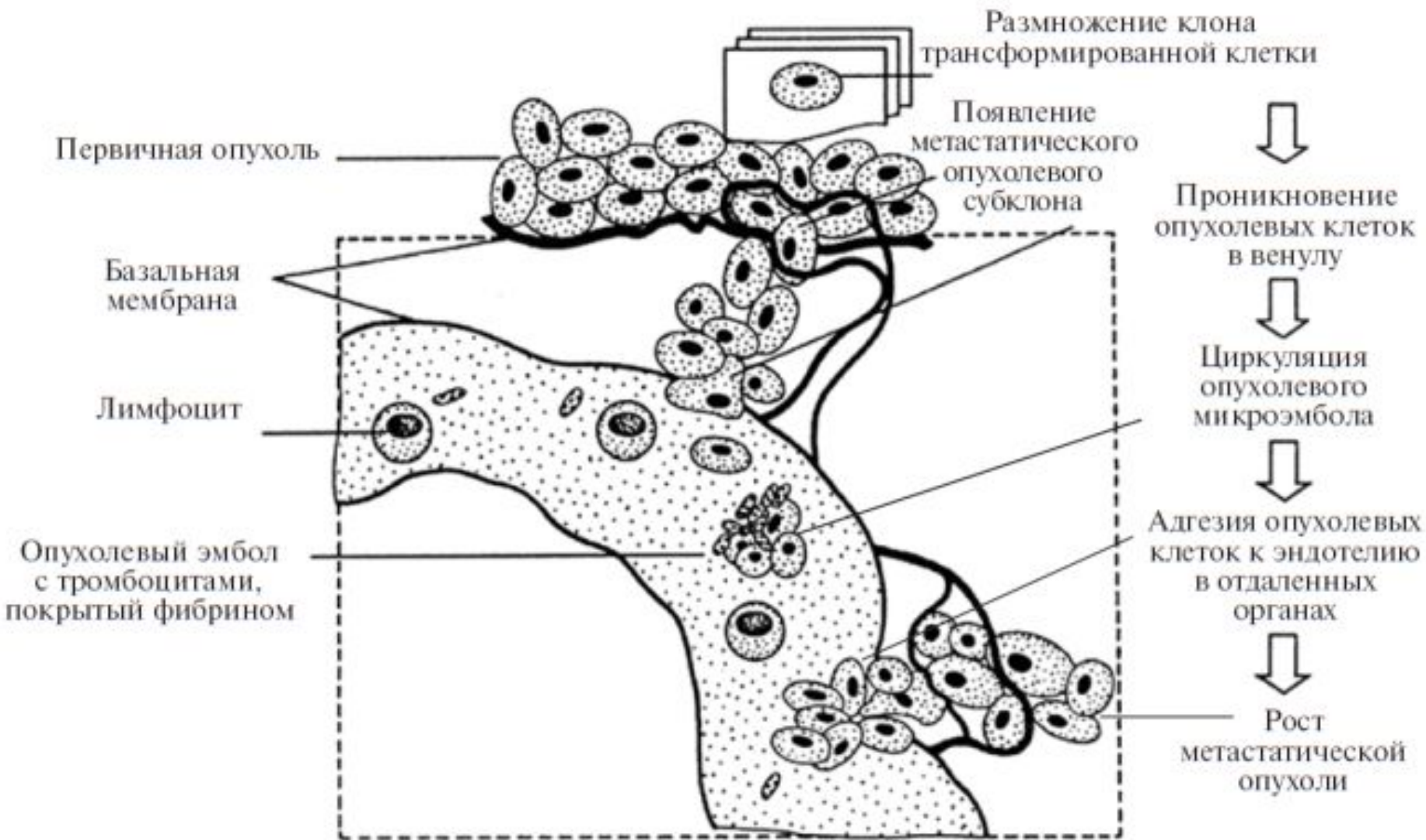
Процессы инвазивного роста обладают определенной пластичностью и возможностью «переключения» в рамках индивидуальной клеточной инвазии с одного типа миграции на другой (с мезенхимального на амебоидный и наоборот).

Это обусловлено возникновением изменений в активности определенных клеточных молекул и необходимостью адаптироваться к условиям тканевого микроокружения.

Закономерности метастатического распространения

- **Процесс метастазирования не хаотичен, как представлялось раньше, а подчиняется строго регулируемым биологическим и информационным механизмам;**
- **Метастазирование – волнообразный и дискретный процесс, имеет множество промежуточных стадий;**
- **Ход метастазирования может как ускоряться, так и замедляться под воздействием определенных факторов;**
- **Каждая ступень метастатического каскада может быть мишенью и объектом противоопухолевой терапии.**

Метастатический каскад



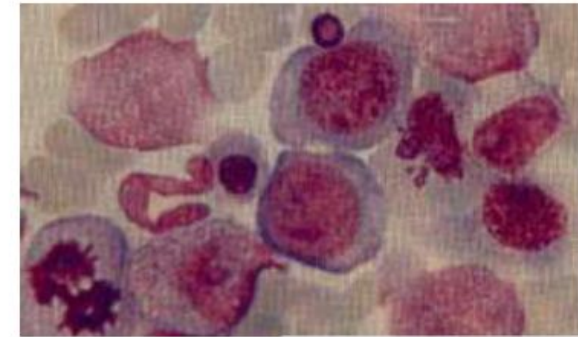
Состояние метастатической ниши может меняться: «созревание ниши» приводит к реализации метастазирования.

Активация покоящихся опухолевых клеток связана с процессами повреждения (травмы, операции, радио- и химиотерапия) с активацией процессов регенерации, стрессами, болезнями.

C. Coghlin, I. Murray. Current and emerging concepts in tumour metastasis. *J Pathol* 2010

Факторы развития ниши

Развитие провоспалительного микроокружения (хроническое воспаление :Th2 лимфоциты, альтернативно-активированные макрофаги M2, набор цитокинов, индуцированных CD4 + Т клетками (Muller-Hermelink N, et al. TNFR1 signaling and IFN-gamma signaling determine whether T cells induce tumor dormancy or promote multistage carcinogenesis. *Cancer Cell*. 2008;13(6):507–518.)

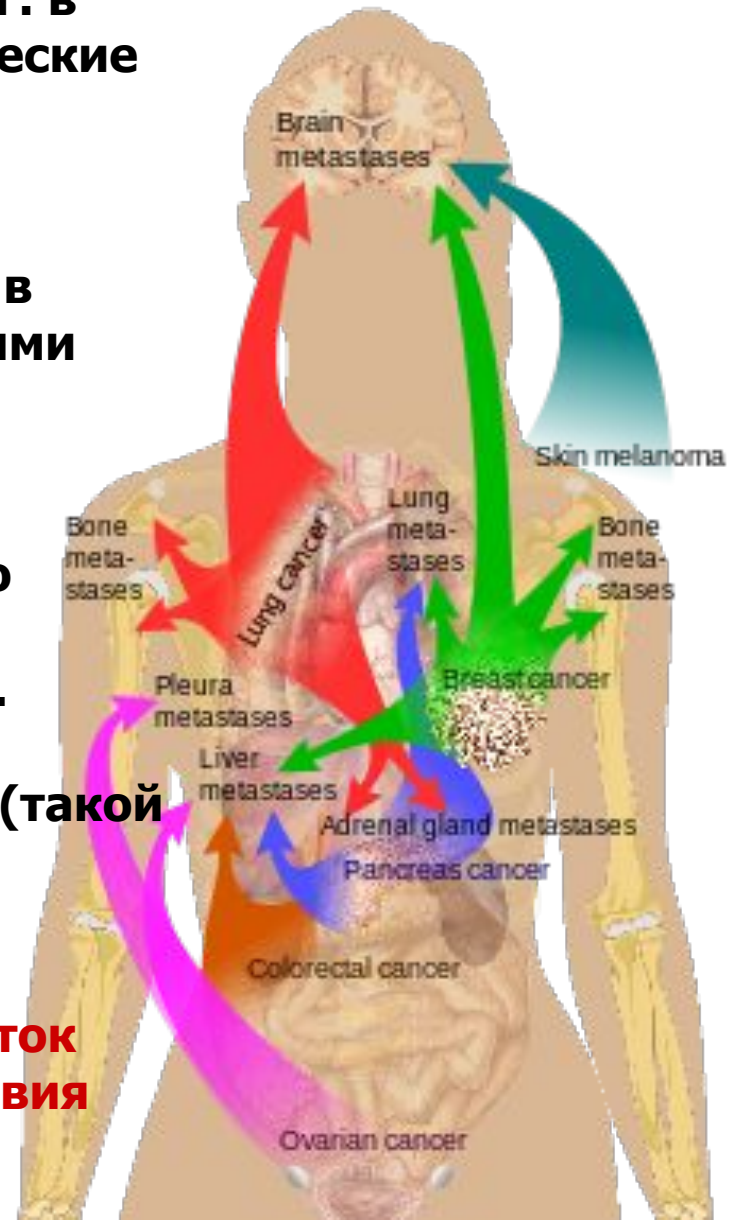


Гипотеза органспецифической колонизации «seed and soil»

Английский врач Стивен Педжет уже в 1889 г. в журнале *Lancet* впервые описал «метастатические странности рака» и сформулировал свою знаменитую гипотезу органспецифической колонизации. Он предположил, что раковая опухоль метастазирует не хаотично, а строго в соответствии с определенными биологическими законами.

Согласно теории Педжета, («seed and soil» — гипотеза «зерна и почва»), ведущую роль в процессе метастазирования играют не только злокачественные клетки («зерна»), но и их тканевое микроокружение («почва»). Педжет впервые высказал предположение о существовании «преметастатической ниши» (такой термин появился спустя 100 лет).

По теории Педжета **«метастазирование произойдет тогда и там, где для раковых клеток будут созданы наиболее благоприятные условия для развития и роста».**



Теории метастазирования

Гуморальные теории

Рудольф Вирхов, находясь под влиянием гуморальной теории Галена, считал, что опухоли метастазируют **«клеточными ядами»**.

Циркулирующие клетки

Первым обнаружил инвазию раковыми клетками вен и лимфатических сосудов Карл Тирш (1865 г.). Впоследствии циркулирующие в крови опухолевые клетки (ЦОК) **«метастазы в кровь»** стали объектом пристального изучения онкологов.

Механическая сосудистая теория Юинга

В 1920-х гг. Джеймс Юинг, «шеф американских патоморфологов», оспаривая теорию Педжета, считал, что развитие метастазов в отдаленных органах **обусловлено, в основном, анатомическими и механическими факторами**. Юинг предполагал, что опухолевые клетки попадают в ловушку капиллярной сети, где и происходит их экстравазация с последующим формированием метастатических очагов. Согласно «механической» сосудистой теории метастазирования Юинга **вероятность развития метастазов в отдаленном органе зависит от плотности сосудов и интенсивности кровообращения в нем**. Такая точка зрения существовала в практической онкологии вплоть до 1980-х гг., так считает большинство практикующих онкологов в возрасте.

Теория линейной прогрессии принадлежит Уильяму Холстеду. До 1960-х гг. считалось, что раковые клетки из первичной опухоли вначале обязательно должны попасть в регионарные лимфатические узлы, а затем гематогенным путем — в отдаленные висцеральные органы.

Из гипотезы **линейной прогрессии** следует, что формируют метастазы только раковые клетки, которые обладают высоким злокачественным потенциалом. Метастазирование начинается на поздних стадиях рака и также возможно развитие метастаза из метастаза.

Альтернативная теория метастазирования Бернарда Фишера — **теория ранней диссеминации**

он рассматривал канцерогенез как системное явление, канцерогенез в солидных опухолях он приравнивал к канцерогенезу при гемобластозах.

Концепция Фишера объясняла появление метакронных метастазов после, казалось бы, «радикального» лечения первичной опухоли и привела к возникновению **теории адьювантной терапии**.

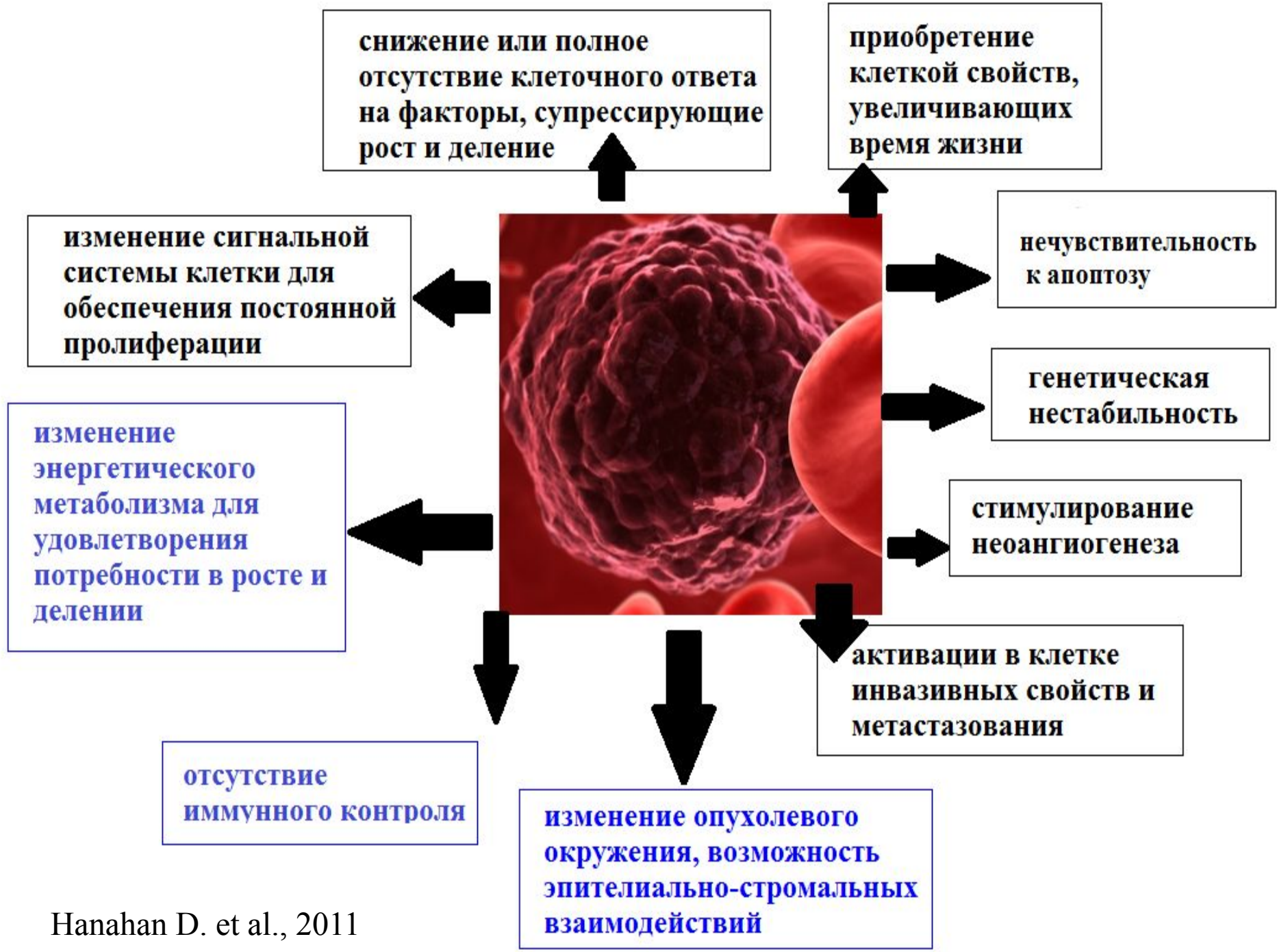
Гипотеза параллельной прогрессии

Продолжением теории ранней диссеминации опухолевых клеток стала гипотеза параллельной прогрессии, предложенная Кристофером Кляйном (*Nature Reviews Cancer*, April 2009).

Согласно этой гипотезе **процесс метастазирования начинается на самых ранних стадиях канцерогенеза**, сразу после активации в клетке протоонкогенов, а не в результате длительного накопления онкогенных мутаций отдельными клеточными клонами в первичной опухоли. Эпителиальная клетка уже после фазы инициации способна активировать скрытые эмбриональные программы эпителиально-мезенхимального перехода, приобретать нехарактерную для нее патологическую подвижность, разрушать базальную мембрану, проникать в системный кровоток, достигать преметастатической ниши в тканях отдаленного органа и формировать метастаз.

Исходя из теории ранней диссеминации, сформулированной К. Кляйном *in silico*, **формирование метастаза происходит независимо и параллельно с ростом первичной опухоли**, что было доказано в эксперименте.

Эта концепция позволяет объяснить наличие метастазов опухоли без выявленной первичной локализации и отдаленных метастазов при ранних клинических стадиях рака (T1-2N0M1), а также частые различия в рецепторных и генетических характеристиках первичной опухоли и ее метастазов.



ОНКОГЕНЫ

Позитивные регуляторы, способные индуцировать деление клетки в отсутствие внешнего стимула

В нормальных тканях имеют фоновый уровень экспрессии в качестве протоонкогенов

Действие проявляется в результате активации протоонкогена даже в гетерозиготном состоянии (достаточно активации одного аллеля)

АКТИВАЦИЯ

1. Нарушение экспрессии

- гиперэкспрессия;**
- эктопическая экспрессия**
- производство нового химерного белка с аномальной функцией**

2. Механизм

- точковая активирующая мутация**
- амплификация гена**
- переход гена под более активный промотор, или активация промотора старого**

ГЕНЫ-СУПРЕССОРЫ

Негативные регуляторы, препятствующие делению клетки

В норме экспрессируются почти во всех тканях

Действие проявляется только при наличии повреждения обоих аллелей (полная инактивация функции)

ИНАКТИВАЦИЯ

1. Мутации

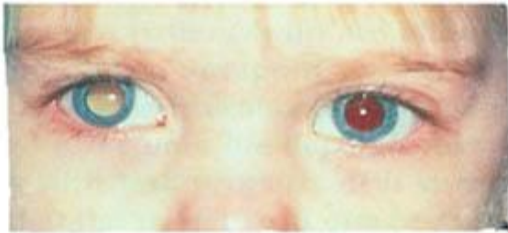
гетерозиготы по мутантным аллелям генов-супрессоров имеют повышенную предрасположенность к опухолям

2. Потеря гетерозиготности

в опухолевых тканях - делеции районов локализации генов-супрессоров

3. Метилирование регуляторных районов, приводящее к отсутствию экспрессии гена

Ретинобластома

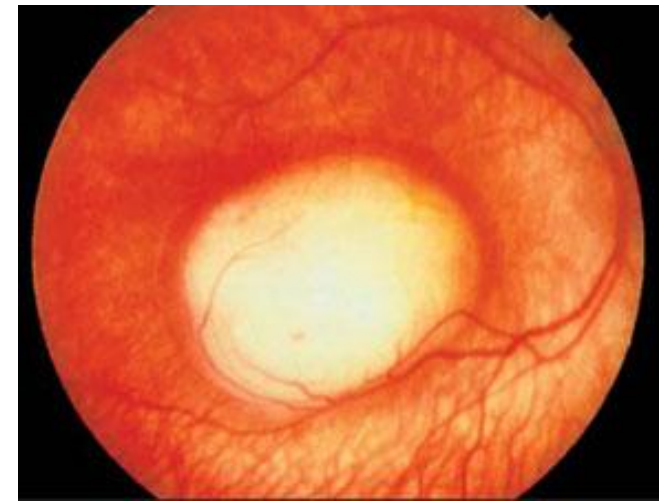


Лейкокория (белый цветовой рефлекс) в правом глазу.

Ретинобластома – злокачественная опухоль глаза, развивается преимущественно в детском возрасте из тканей эмбрионального происхождения. Пик заболевания приходится на 2 года. Почти все случаи заболевания выявляются до 5-летнего возраста. Распространенность ретинобластомы небольшая – примерно 1 случай на 20 000 новорожденных.

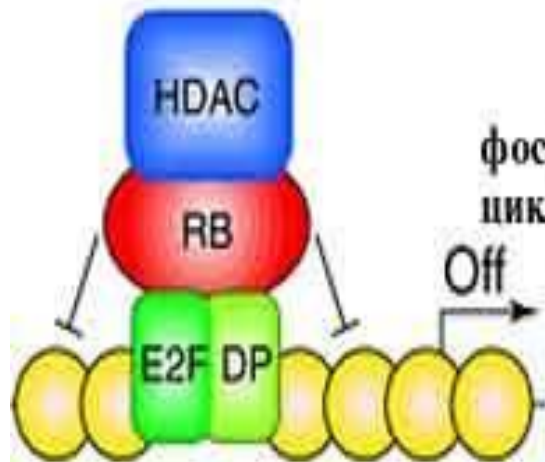
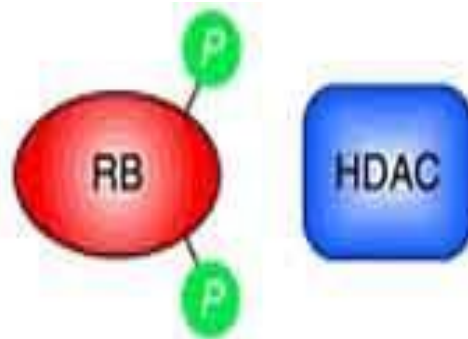
**односторонняя
двусторонняя**

**спорадическая форма
семейная форма**



Глазное дно при экзофитно растущей опухоли.

Регуляция экспрессии гена белком RB1

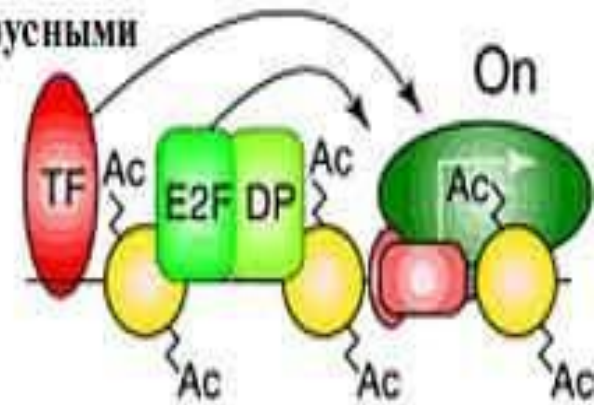


G1 фаза

фосфорилирование
циклин-зависимой
киназой

связывание с вирусными
онкопротеинами
или мутации RB

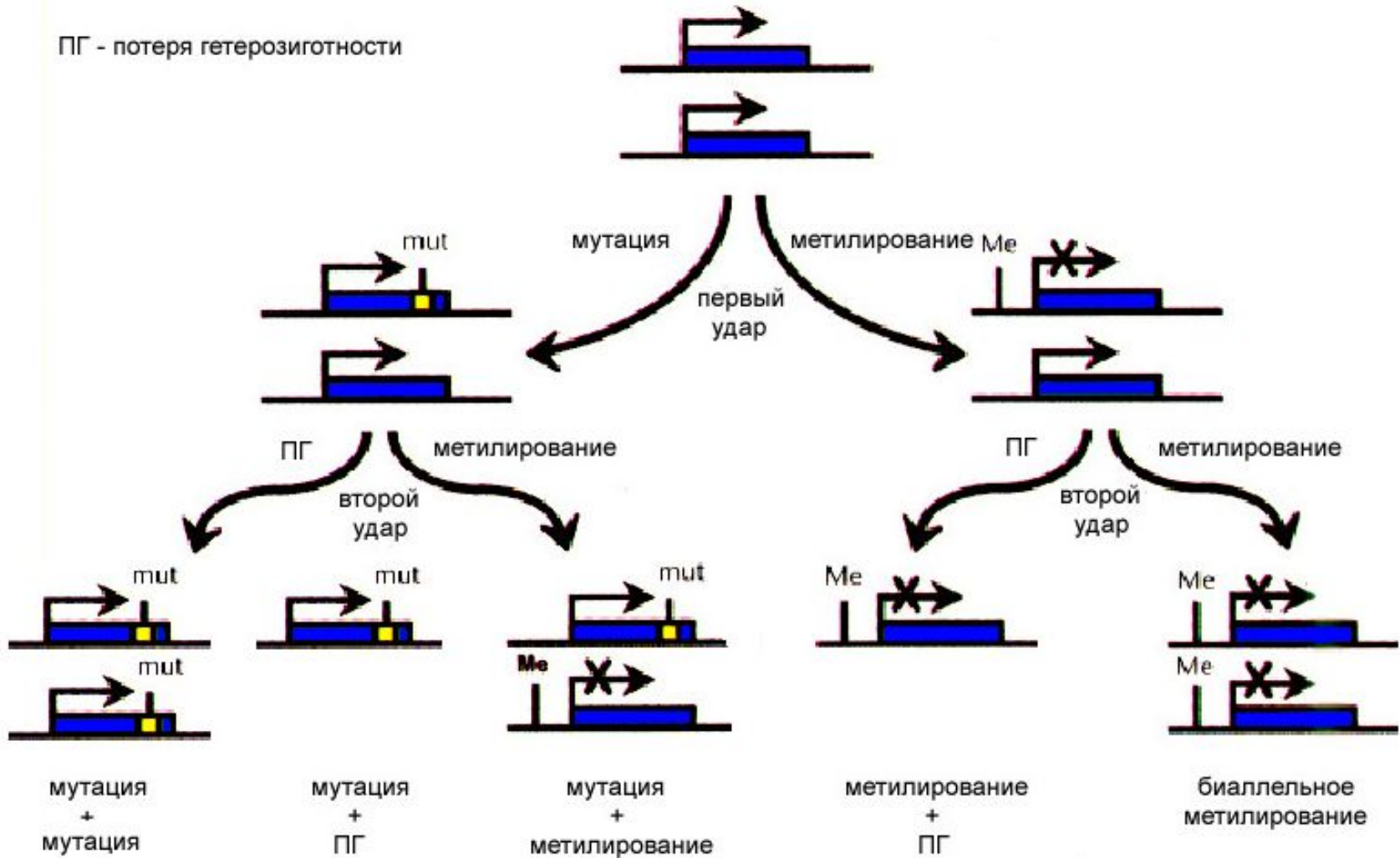
G1-S



S фаза

Современная двухударная модель канцерогенеза

ПГ - потеря гетерозиготности



Клетки, составляющие опухоль

Эндотелиальные
клетки



Перициты



Фибробласты,
ассоциированные
с опухолью



Иммунные
воспалительные
клетки



Опухолевые
стволовые клетки



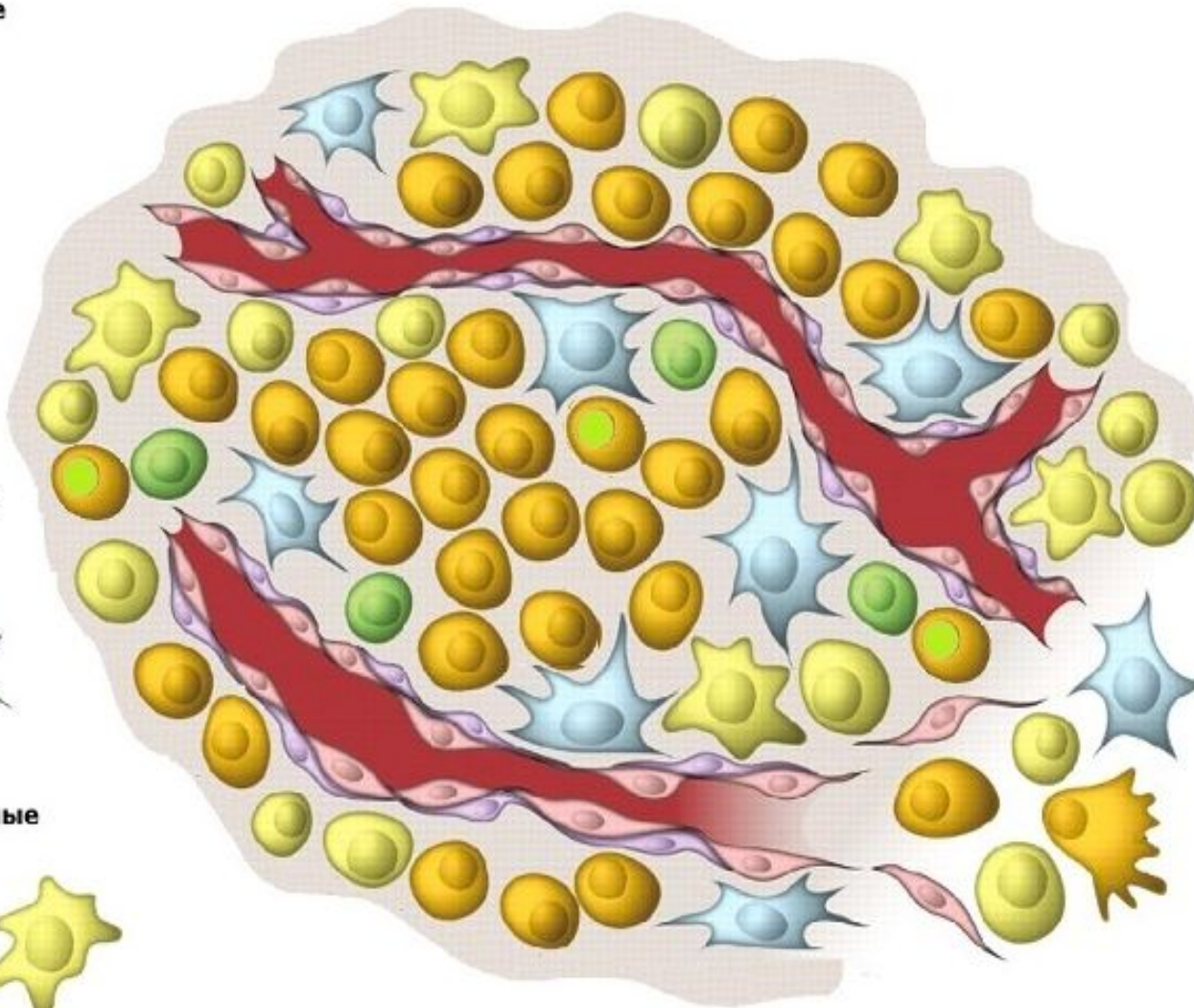
Опухолевые
клетки



инвазивные
опухолевые
клетки



Клетки-
предшественники
опухолевой
стромы



Строма опухоли

Второй важный структурный компонент опухоли — ее **stroma**. **Строма в опухоли**, так же как и строма в нормальной ткани, в основном выполняет трофическую, модулирующую и опорную функции. **Стромальные элементы** опухоли представлены клетками и экстрацеллюлярным матриксом соединительной ткани, сосудами и нервными окончаниями.

Экстрацеллюлярный матрикс опухолей представлен двумя структурными компонентами: базальными мембранами и интерстициальной соединительной тканью. В состав базальных мембран входят коллагены IV, VI и VII типов, гликопротеиды (ламинин, фибронектин, витронектин), протеогликаны (гепаран-сульфат и др.). Интерстициальная соединительная ткань опухоли содержит коллагены I и III типов, фибронектин, протеогликаны и гликозаминогликаны.

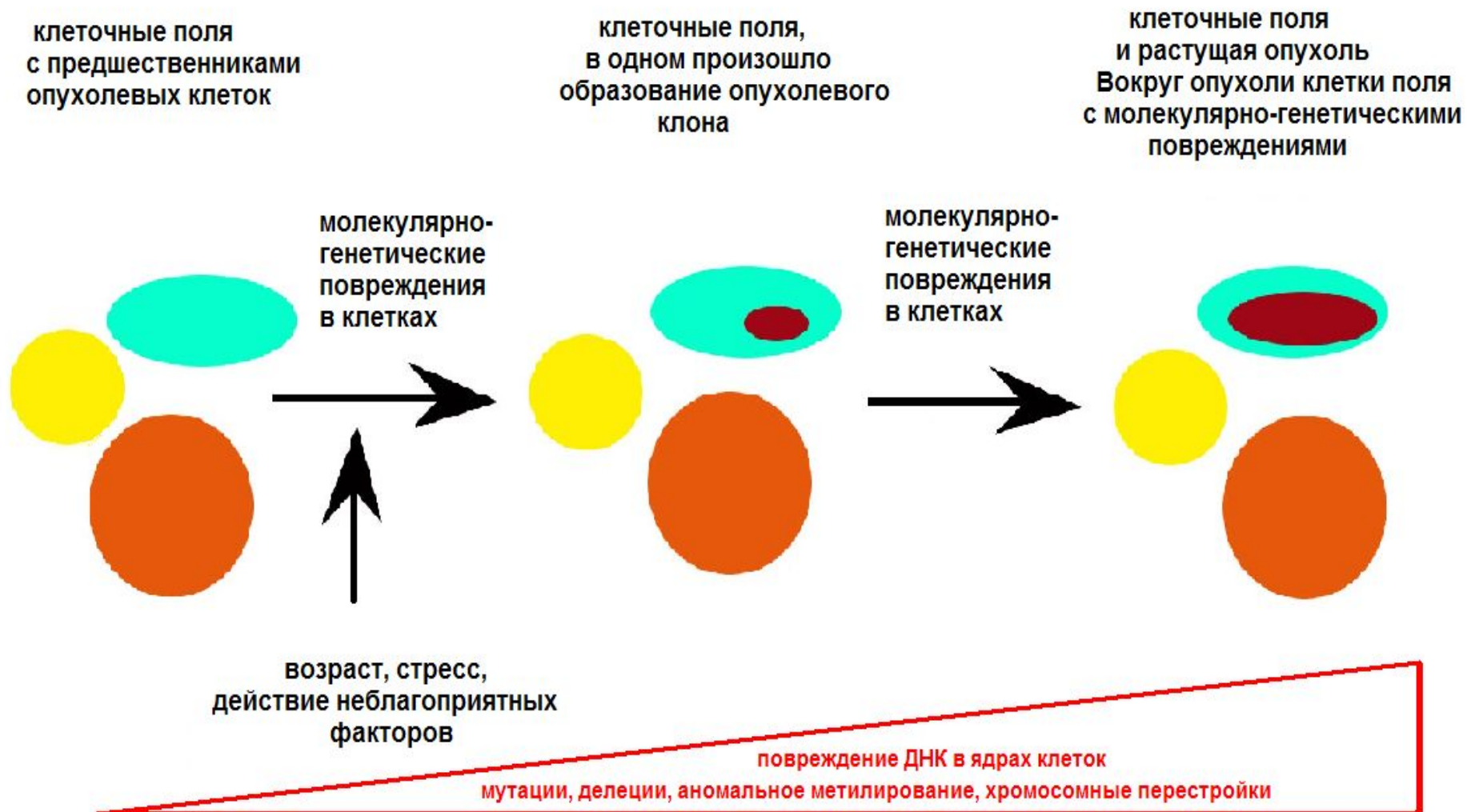
В 2000-х годах было показано, что связанное с опухолью воспаление усиливает опухолеобразование и прогрессию.

□ При воспалении в опухолевом микроокружении происходит выработка биологически активных молекул, включая факторы роста, которые поддерживают пролиферацию.

□ Воспаление активирует факторы выживания, проангиогенные факторы, ферменты, модифицирующие клеточный матрикс и способствующие ангиогенезу, инвазии и метастазированию, а также индуктивные сигналы, которые активируют ЭМП.

□ Воспалительные клетки выделяют активные формы кислорода, которые являются сильными мутагенами для близлежащих клеток, что ускоряет их генетическую трансформацию в состояние повышенной злокачественности.

Теория «полей канцеризации»



СПАСИБО ЗА ВНИМАНИЕ!



