



KAPITAŁ LUDZKI
NARODOWA STRATEGIA SPÓJNOŚCI

UNIA EUROPEJSKA
EUROPEJSKI
FUNDUSZ SPOŁECZNY



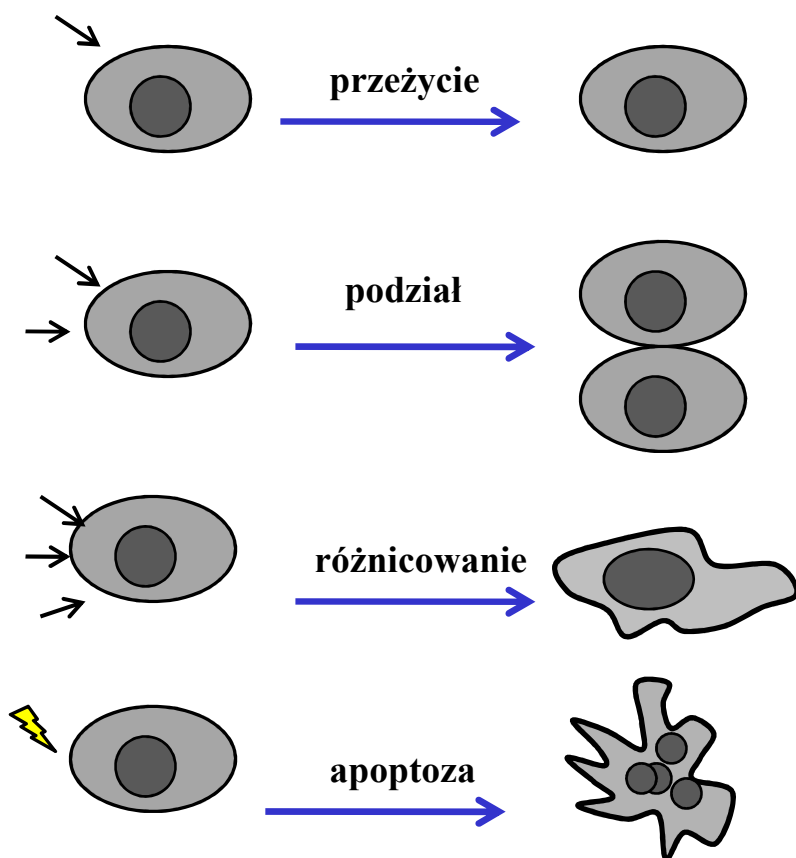
Cykl komórkowy i nowotwory

Materiały dydaktyczne współfinansowane ze środków Unii Europejskiej w ramach Europejskiego Funduszu Społecznego.

Kilka podstawowych informacji

- Komórki wielokomórkowego organizmu mają zróżnicowaną zdolność do podziału i występują w kilku, szeroko rozumianych, stanach funkcjonalnych:
 1. Komórki silnie zróżnicowane, które utraciły zdolność do dzielenia się (np. neurony, k-ki mięśni prążkowanych, erytrocyty).
 2. Komórki zestarzałe, które wyczerpały zdolności do podziału na skutek wyczerpania „limitu podziałowego” lub na skutek stresu.
 3. Komórki zróżnicowane, które zachowały zdolność do podziału (np. fibroblasty, k-ki naczyń krwionośnych).
 4. Komórki dzielące się w tkankach nieustannie odnawiających się (naskórek, nabłonek jelitowy, krew).
 5. Komórki zarodkowe (ang. *stem cells*).
-

Zachowanie komórki (np. podziały komórkowe) jest regulowane przez wiele czynników aktywujących i hamujących. Ostateczny rezultat (np. podział lub spoczynek) zależy od tego, w którą stronę przechyli się równowaga.



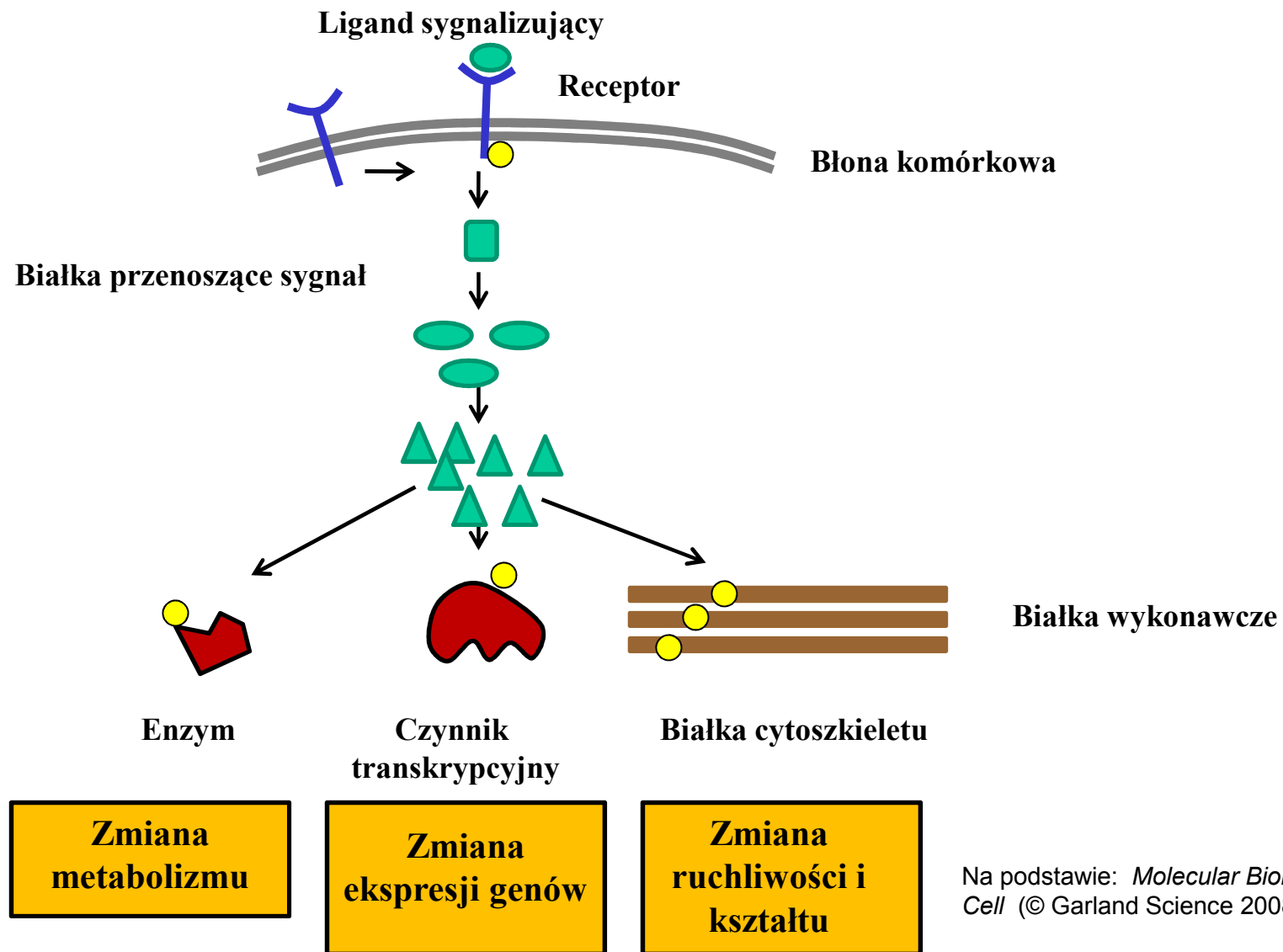
- **Sygnały hamujące**

1. Uszkodzenie DNA
2. Brak czynników wzrostowych
3. Zróżnicowanie
4. Starzenie komórkowe

- **Sygnały stymulujące**

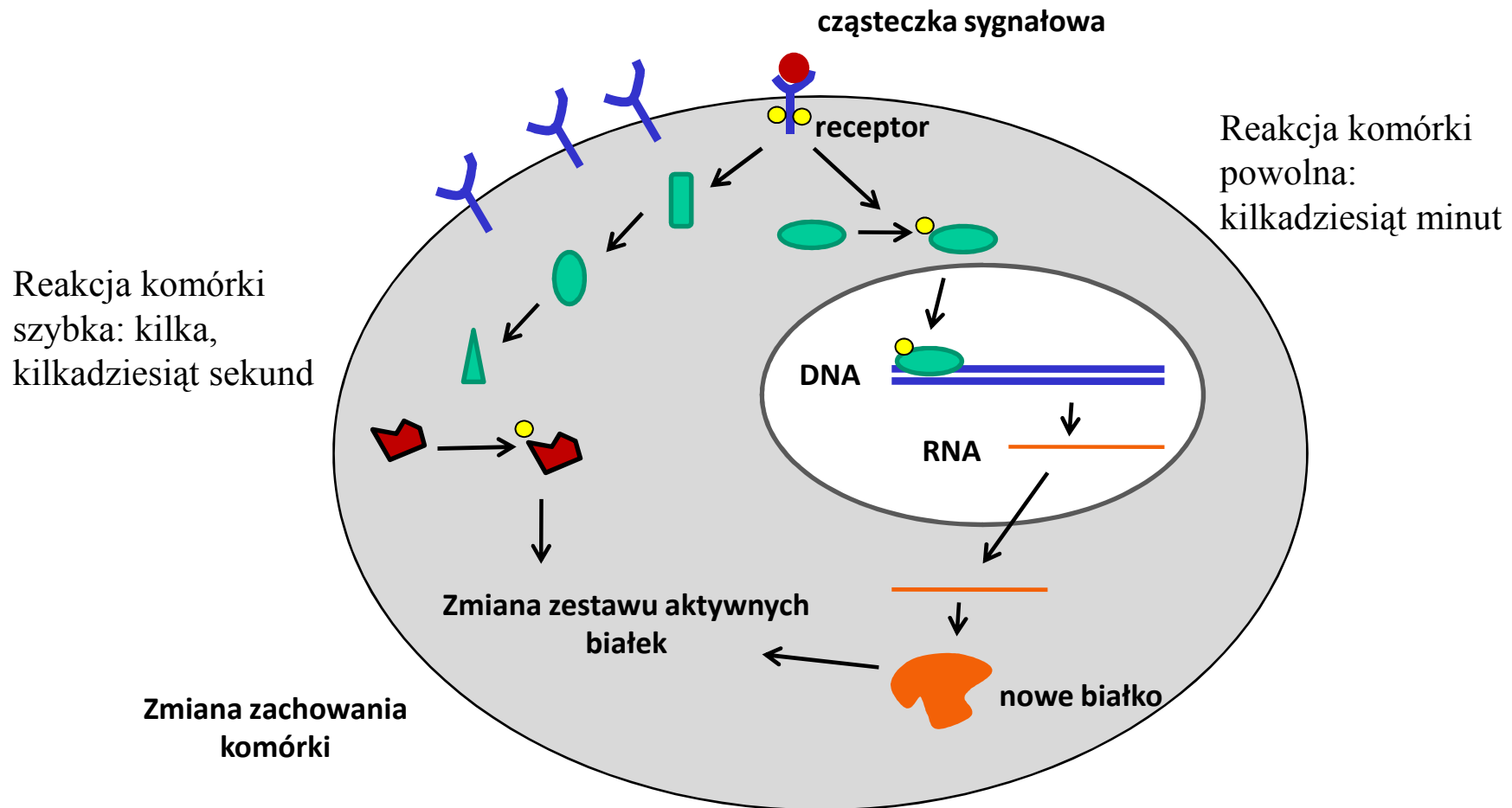
1. Czynniki wzrostowe
2. Infekcje wirusowe
3. Transformacja nowotworowa

Ogólny schemat ścieżki sygnalizacyjnej odbierającej sygnał ze środowiska i prowadzącej do zmiany funkcjonowania komórki.



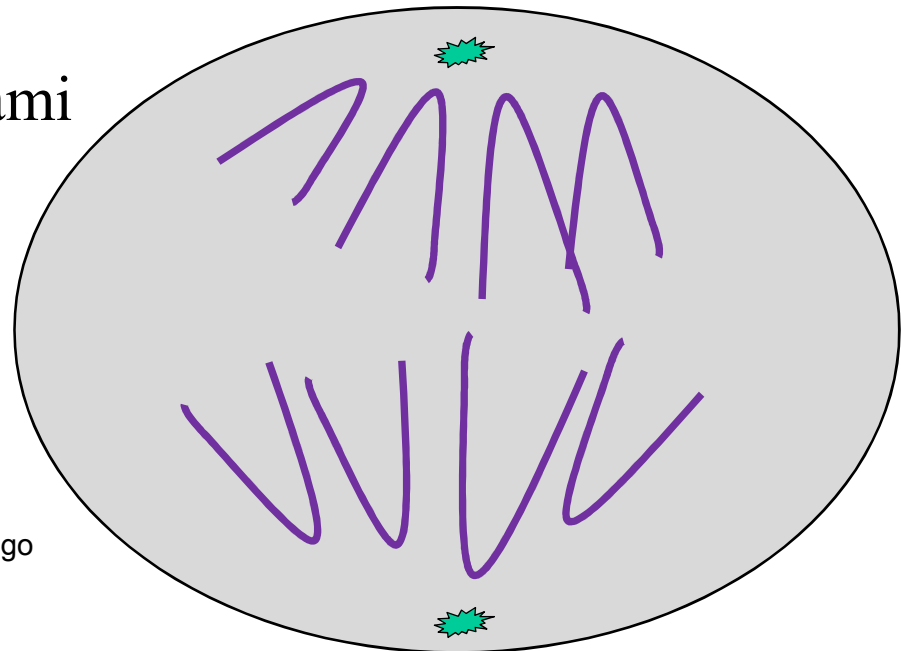
Na podstawie: *Molecular Biology of the Cell* (© Garland Science 2008)

Zewnątrzkomórkowe sygnały wywołują reakcję komórek szybko lub wolno w zależności od typu aktywowanych mechanizmów sygnalizacyjnych.



O dzielących się komórkach mówimy, że są w cyklu komórkowym (ang. *the cell cycle*).

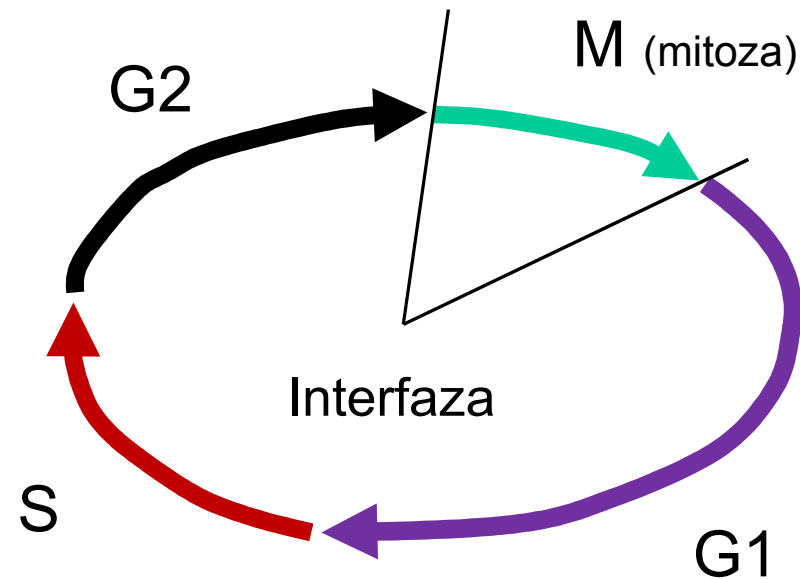
- W rosnących i dzielących się komórkach można morfologicznie zauważyć dwie fazy: mitozę (M) czyli rzeczywisty, fizyczny podział komórki macierzystej na dwie komórki potomne, w której wyróżnia się kariokinezę (podział jądra komórkowego) oraz cytokinezę (podział cytoplazmy).
- Pomiedzy dwoma mitozami występuje przerwa międzymitotyczna (ang. *gap* - G).



Schemat dzielącej się komórki: zauważ brak jądra komórkowego i widoczne chromosomy przemieszczające się do biegunów wrzeciona podziałowego

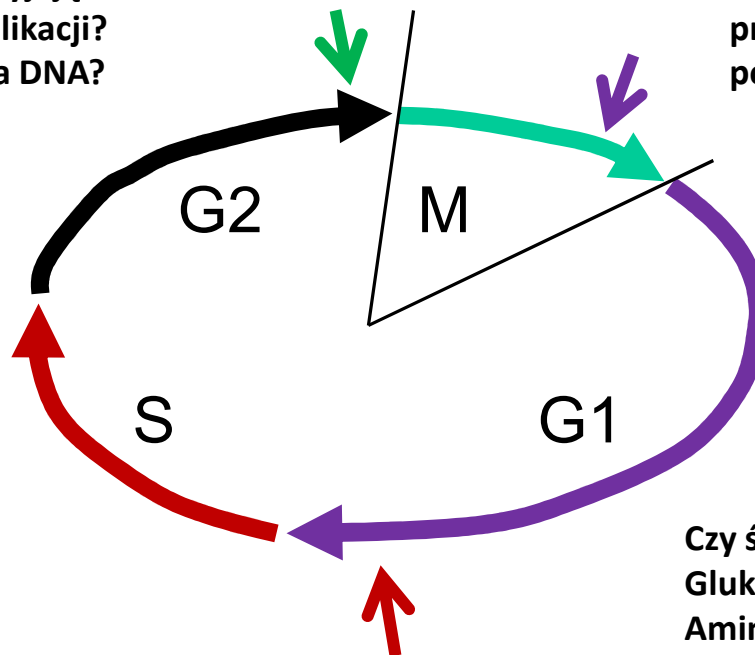
Synteza DNA występuje w interfazie i dzieli przerwę międzymitotyczną na przerwę przedreplikacyjną G1 i przerwę poreplikacyjną G2. Fazę replikacji (syntezy) DNA zwie się fazą S.

Faza cyklu	Czas trwania
G1 (przerwa)	ok. 10 h
S (synteza DNA)	ok. 8 h
G2 (przerwa)	ok. 5 h
M (mitoza)	ok. 45 min.



Podział komórkowy jest bardzo istotny dla życia organizmu dlatego wszystkie fazy są przez komórkę skrupulatnie regulowane. W cyklu komórkowym występuje kilka tzw. punktów kontrolnych (ang. *checkpoints*). Ich przekroczenie i wejście do następnej fazy jest możliwe tylko wtedy gdy ściśle określone warunki środowiskowe i wewnątrzkomórkowe na to pozwalają.

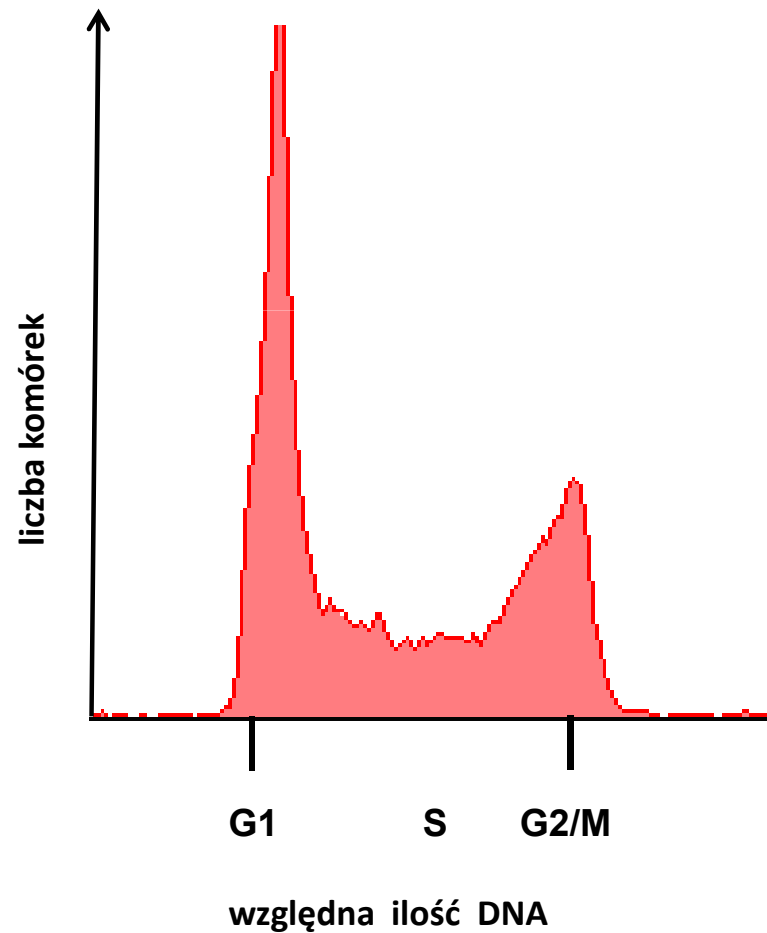
Czy środowisko jest sprzyjające?
Czy całe DNA uległo replikacji?
Czy występują pęknięcia DNA?



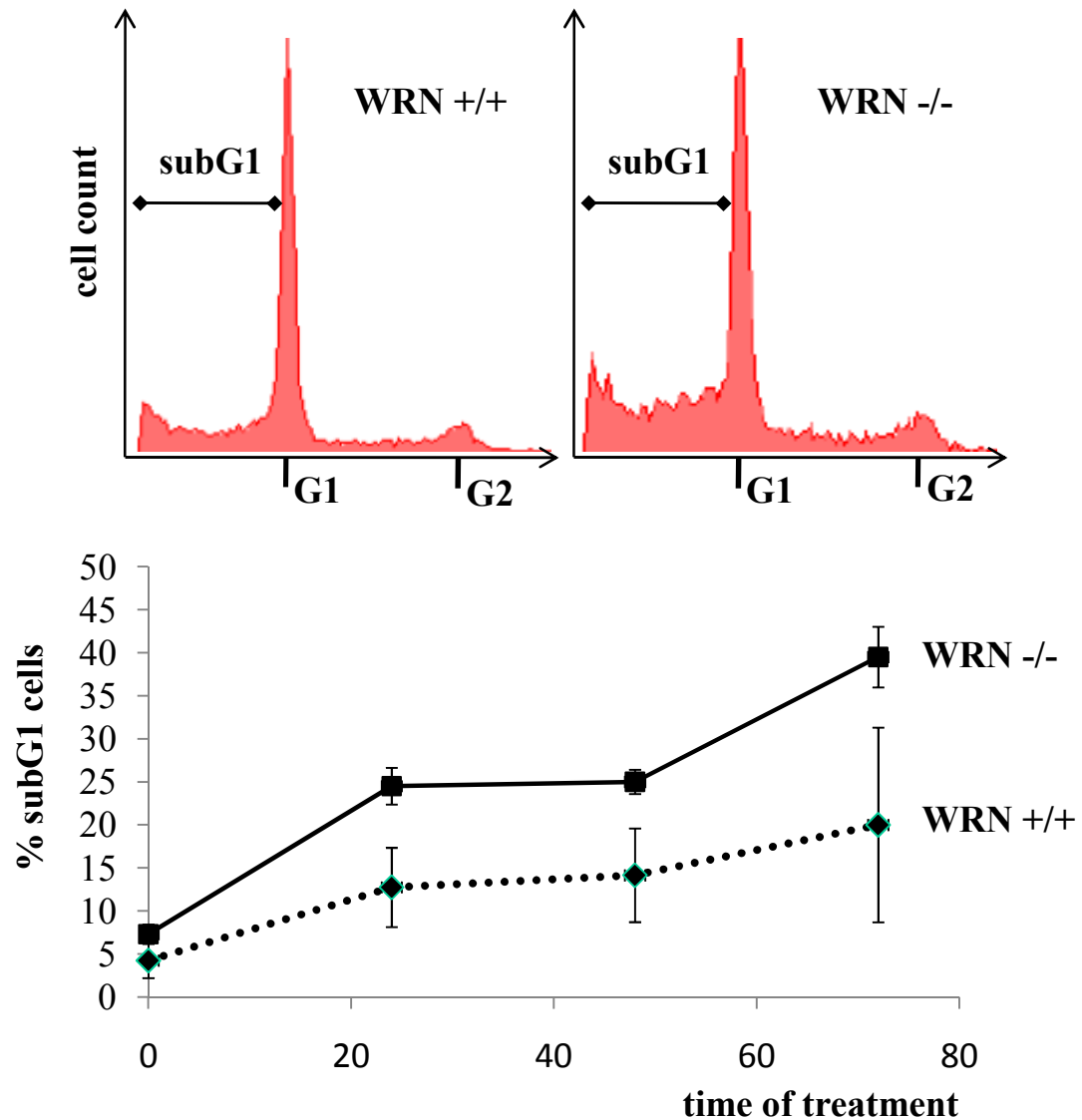
Czy wszystkie chromosomy są
przyczepione do wrzeciona
podziałowego?

Czy środowisko sprzyja podziałom?
Glukoza?
Aminokwasy?
Czynniki wzrostowe?
Czy DNA jest uszkodzone?

Rozmieszczenie komórek w poszczególnych fazach cyklu można badać za pomocą cytometru przepływowego. Komórki po utrwaleniu barwi się jodkiem propidyny, który wiąże się z DNA. Ilość jodku związanego z komórką jest proporcjonalna do ilości DNA.

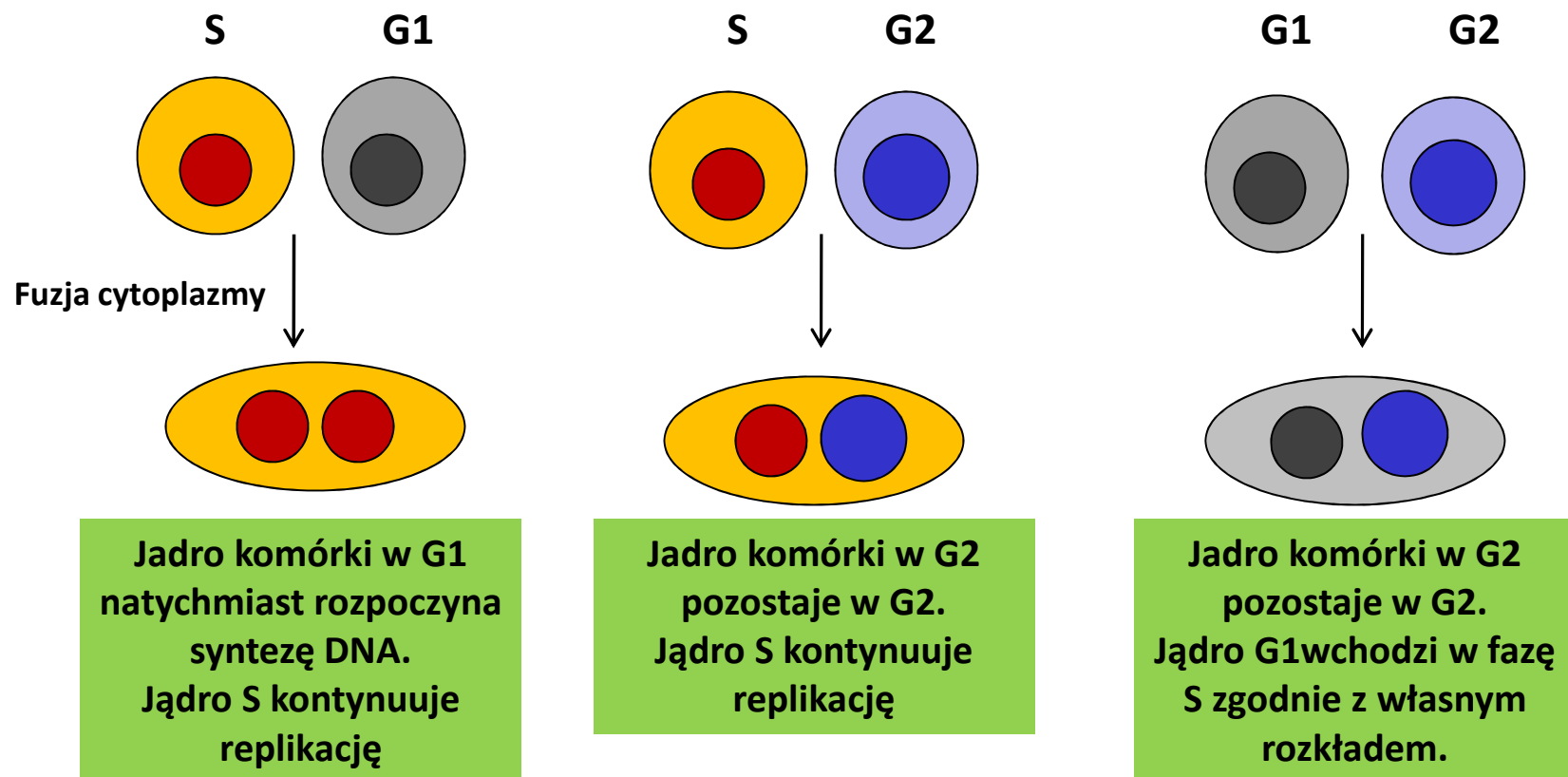


Przykład wykorzystania cytometru przepływowego do badania apoptozy – programowanej śmierci komórki.



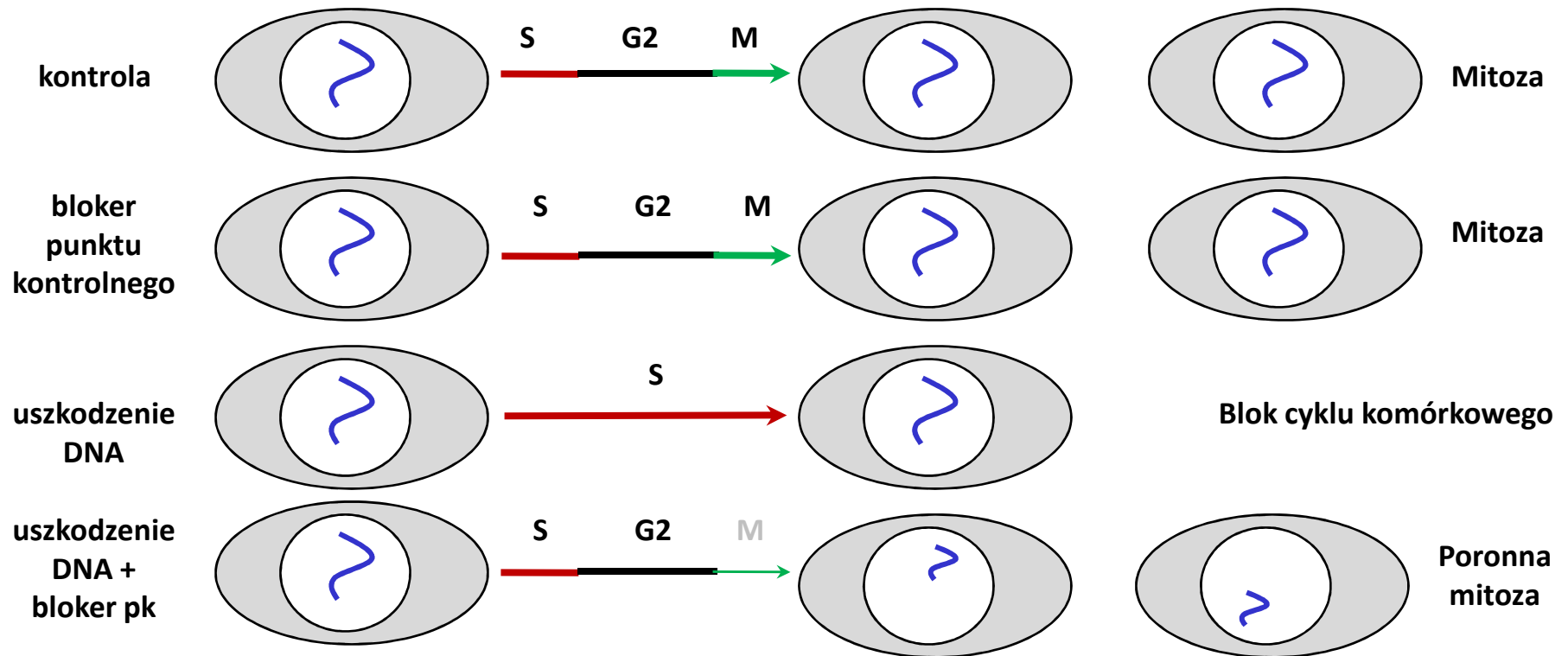
Źródło: badania własne

Bardzo ważnym zjawiskiem jest tzw. blok powtórnej replikacji. Każdy fragment DNA może być tylko powielony jeden raz w trakcie cyklu komórkowego. Brak bloku mógłby doprowadzić do poważnego zaburzenia struktury chromosomów powodującego albo śmierć komórki albo jej przekształcenie w komórkę nowotworową.



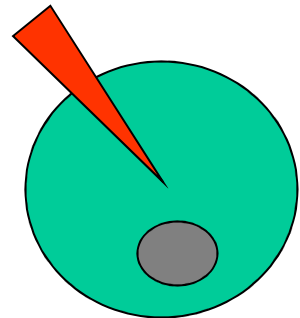
Punkt kontrolny G2 chroni komórkę przed rozpoczęciem mitozy z nie w pełni zreplikowanym DNA. Niektóre punkty kontrolne można zlikwidować farmakologicznie – można się wtedy przekonać przed czym chroni komórkę ich obecność.

Silnym inhibitorem punktu kontrolnego G2 jest duża dawka kofeiny.



Odkrycie czynnika MPF (M-phase or mitosis promoting factor).

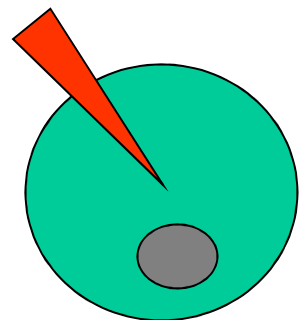
Ekstrakt cytoplazmy
z komórki w fazie M



M

Ekstrakt cytoplazmy
z komórki interfazowej

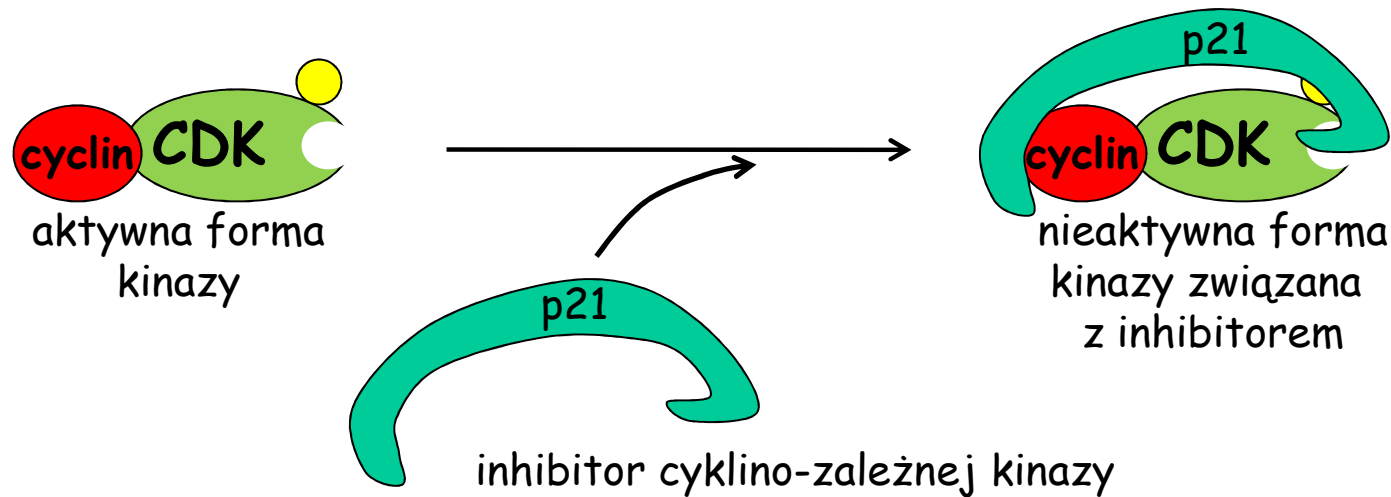
Oocyt żaby, faza G2



G2

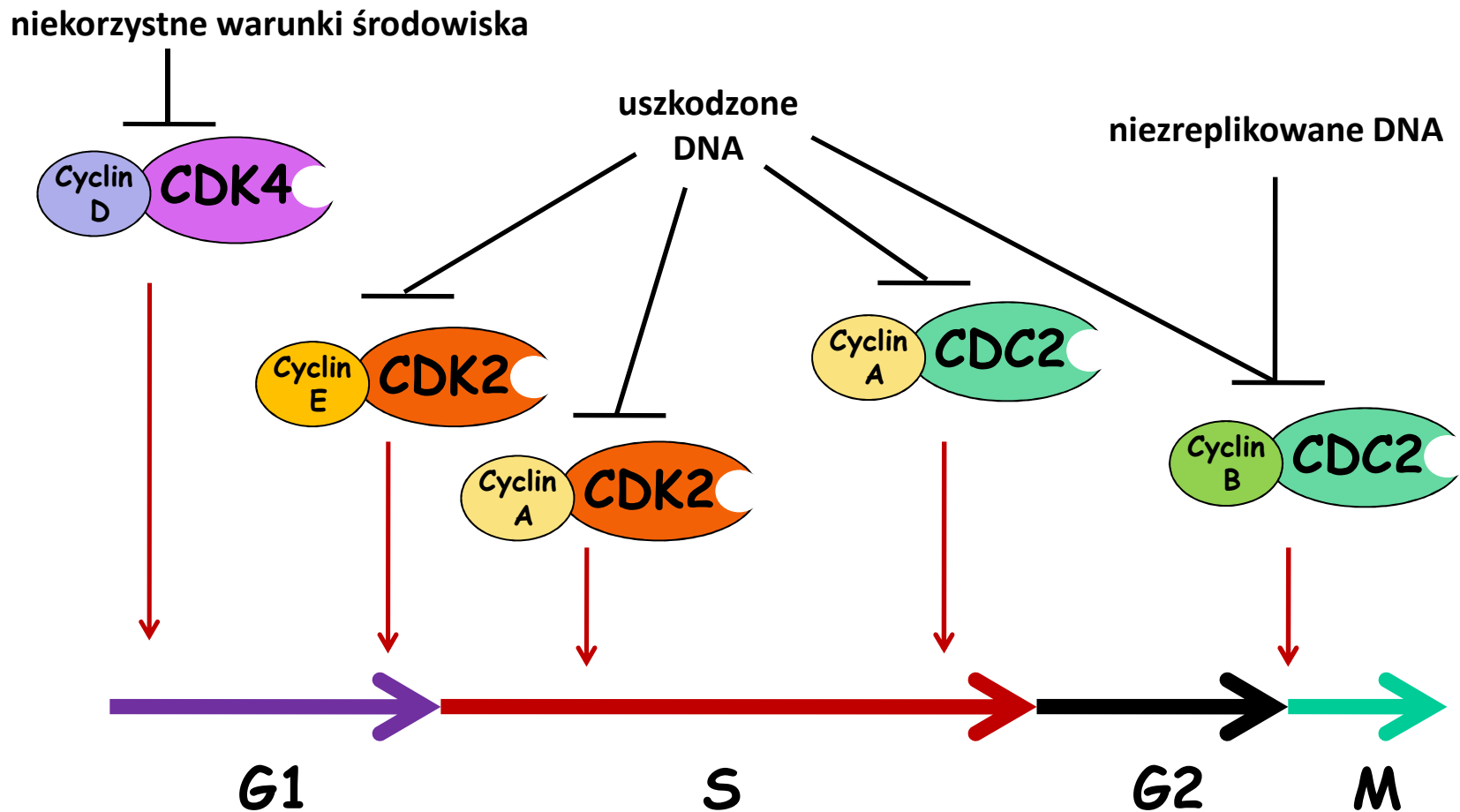
Oczyszczono MPF, składa
się z podjednostki p34 (kinaza)
i 45 kDa białka (cyklina B)

Cykliny nie posiadają właściwości katalitycznych, wiążą się z białkami zwanymi kinazami cyklinozależnymi (ang. *cyclin-dependent kinases* - Cdk). Aktywne kinazy fosforylują swoje białka docelowe aktywując w gwałtowny sposób („zero-jedynkowo”) kolejne etapy cyklu komórkowego.



Kinazy Cdk są regulowane nie tylko przez cykliny ale również przez inne kinazy oraz przez inhibitory cyklinozależnych kinaz – stwarza to pole do precyzyjnej wieloczynnikowej regulacji.

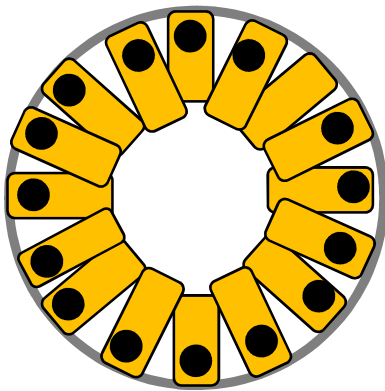
Poszczególne punkty kontrolne cyklu są regulowane przez różne pary cyklina-cyklino-zależna kinaza. Niekorzystne czynniki środowiska lub nieprawidłowości wewnątrzkomórkowe powstrzymują cykl blokując aktywność poszczególnych kinaz.



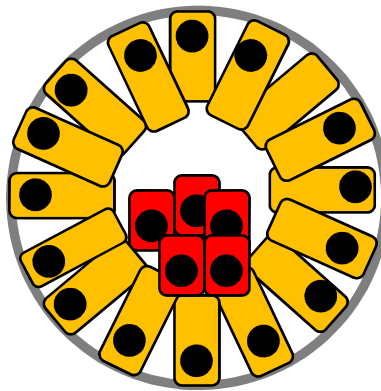
Cechy komórek nowotworów złośliwych

1. Komórki nowotworów różnych typów i tego samego typu bardzo różnią się właściwościami (choroba heterogenna).
2. Komórki dzielą się w sposób niekontrolowany – dlatego często tworzą guzy – zwarte masy komórek.
3. Komórki mogą zasiedlać sąsiednie tkanki i odległe narządy tworząc tzw. przerzuty stwarzające często większe problemy medyczne niż guz pierwotny.
4. W komórkach dochodzi do zaburzeń metabolizmu - gospodarują one energią w sposób rozrzutny.
5. Komórki wydzielają do środowiska wiele substancji bardzo aktywnych biologicznie powodując niekorzystne zmiany w całym organizmie.

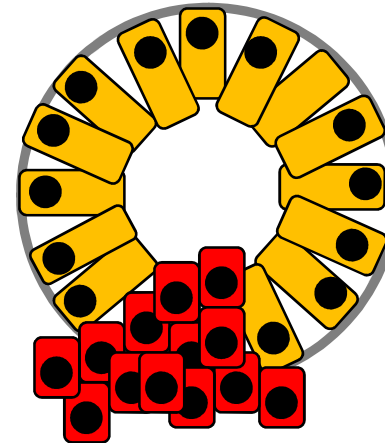
Prawidłowy nabłonek



Rozrost łagodny

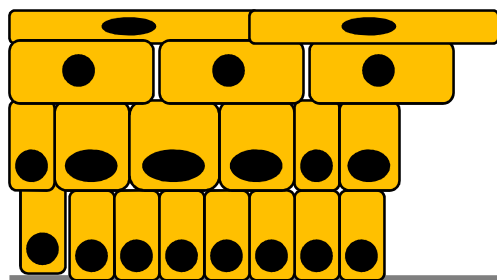


Nowotwór złośliwy

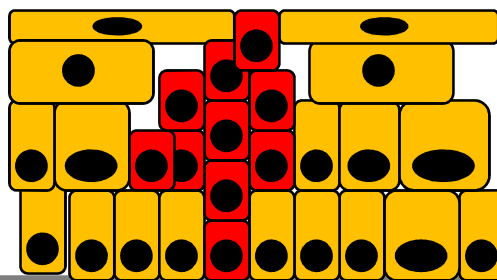


Powstawanie nowotworów złośliwych odbywa się stopniowo. Proces ten może zachodzić wiele lat. Stadia przedrakowe można zaobserwować badając mikroskopowo przekroje tkanek.

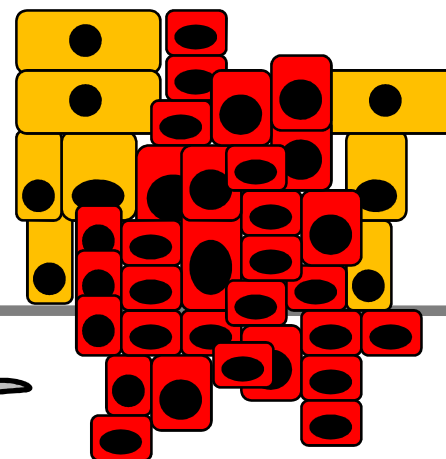
Nabłonek prawidłowy



Nowotwór nieinwazyjny



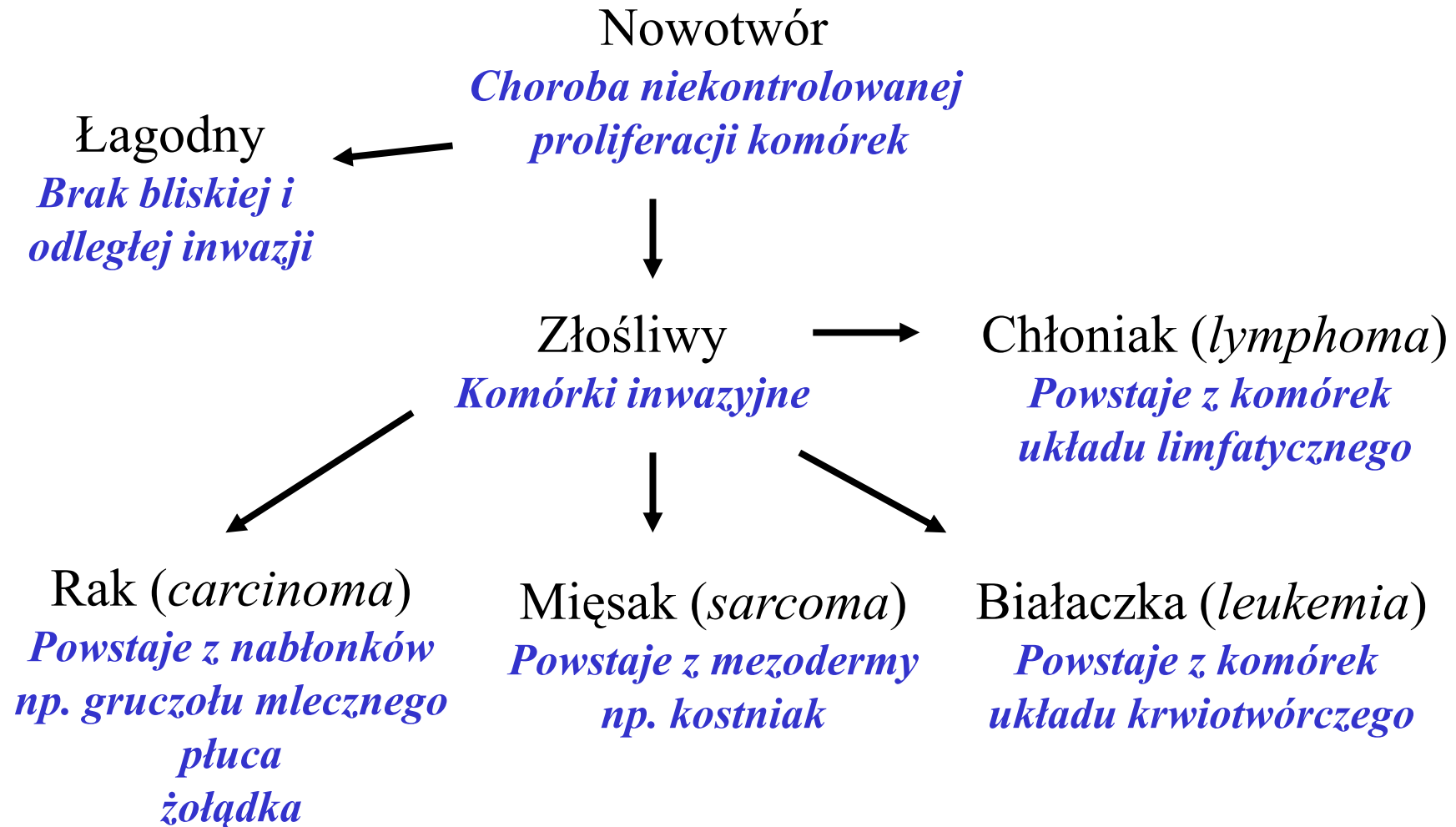
Rak



Tkanka łączna



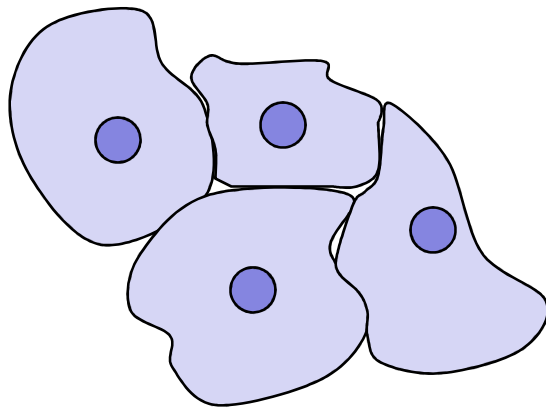
Nazewnictwo



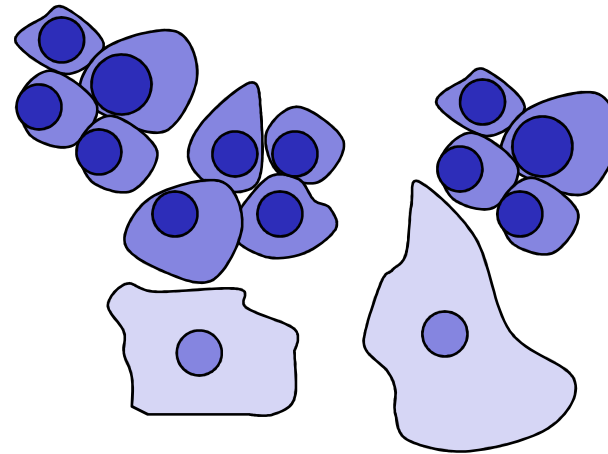
Komórki rakowe w hodowli *in vitro*.

1. Brak tzw. kontaktowego hamowania wzrostu.
 2. Mała zależność od obecności w środowisku tzw. czynników wzrostowych.
 3. Zdezorganizowany cytoszkielec.
 4. Zdolność do wzrostu bez kontaktu z podłożem.
 5. Zdolność wywoływania guzów u zwierząt laboratoryjnych.
 6. Zwykle – liczne aberacje chromosomowe.
-

Niektóre nowotwory można wykryć na bardzo wczesnym etapie rozwoju. Jest to możliwe ze względu na łatwy dostęp do badanych tkanek. Takim nowotworem jest np. rak szyjki macicy wykrywany dzięki mikroskopowym badaniom wymazu z pochwy. Niektóre nowotwory trudniej wykryć ze względu na konieczność wykonania inwazyjnych procedur nie nadających się do badań przesiewowych.

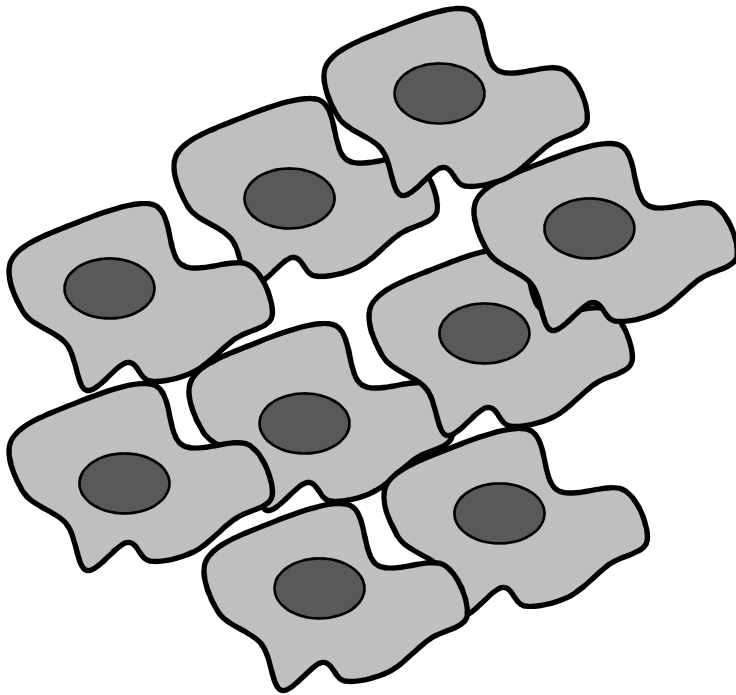


Prawidłowe komórki
szyjki macicy

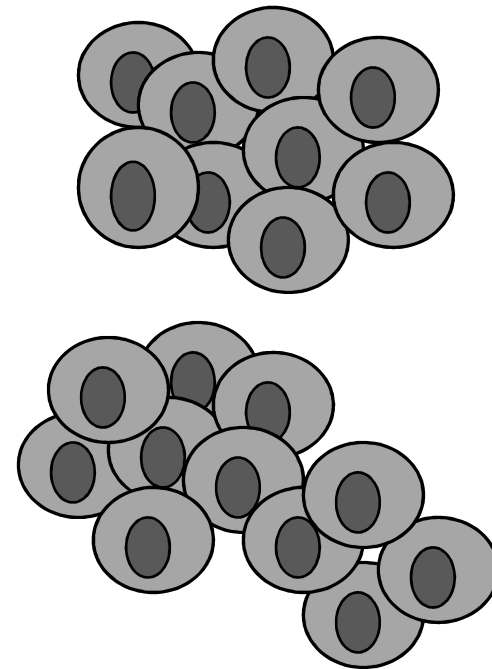


Komórki raka
szyjki macicy wykryte
w wymazie z pochwy.

Transformację nowotworową komórek można przeprowadzić w hodowli. Transformacji można dokonać czynnikiem chemicznym, wirusem lub samym DNA wyizolowanym np. z komórek nowotworowych lub fragmentem genomu wirusa.



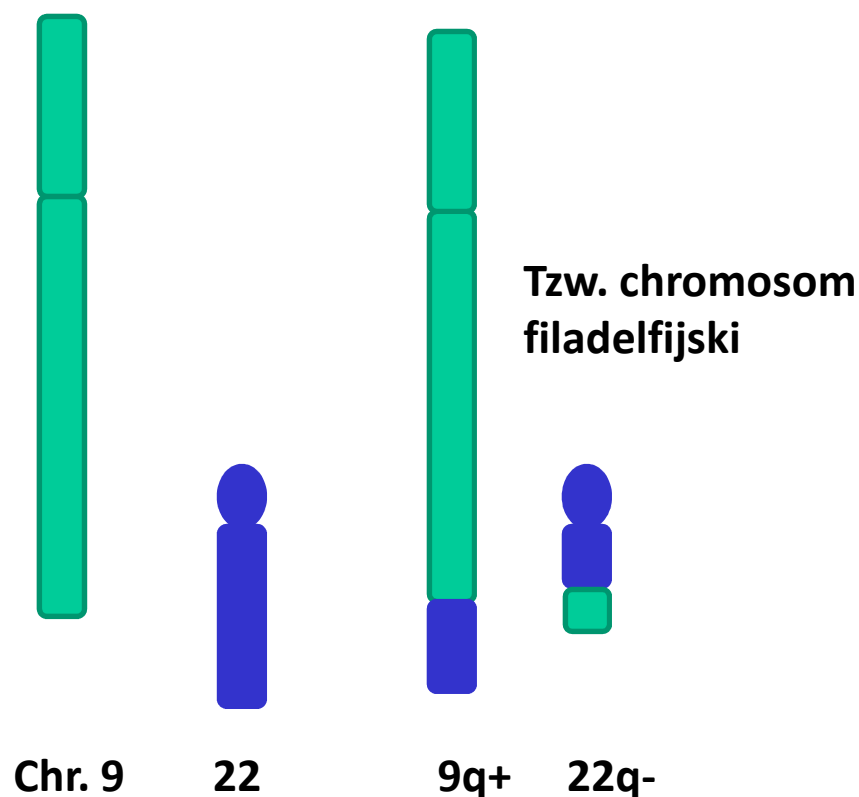
Komórki prawidłowe



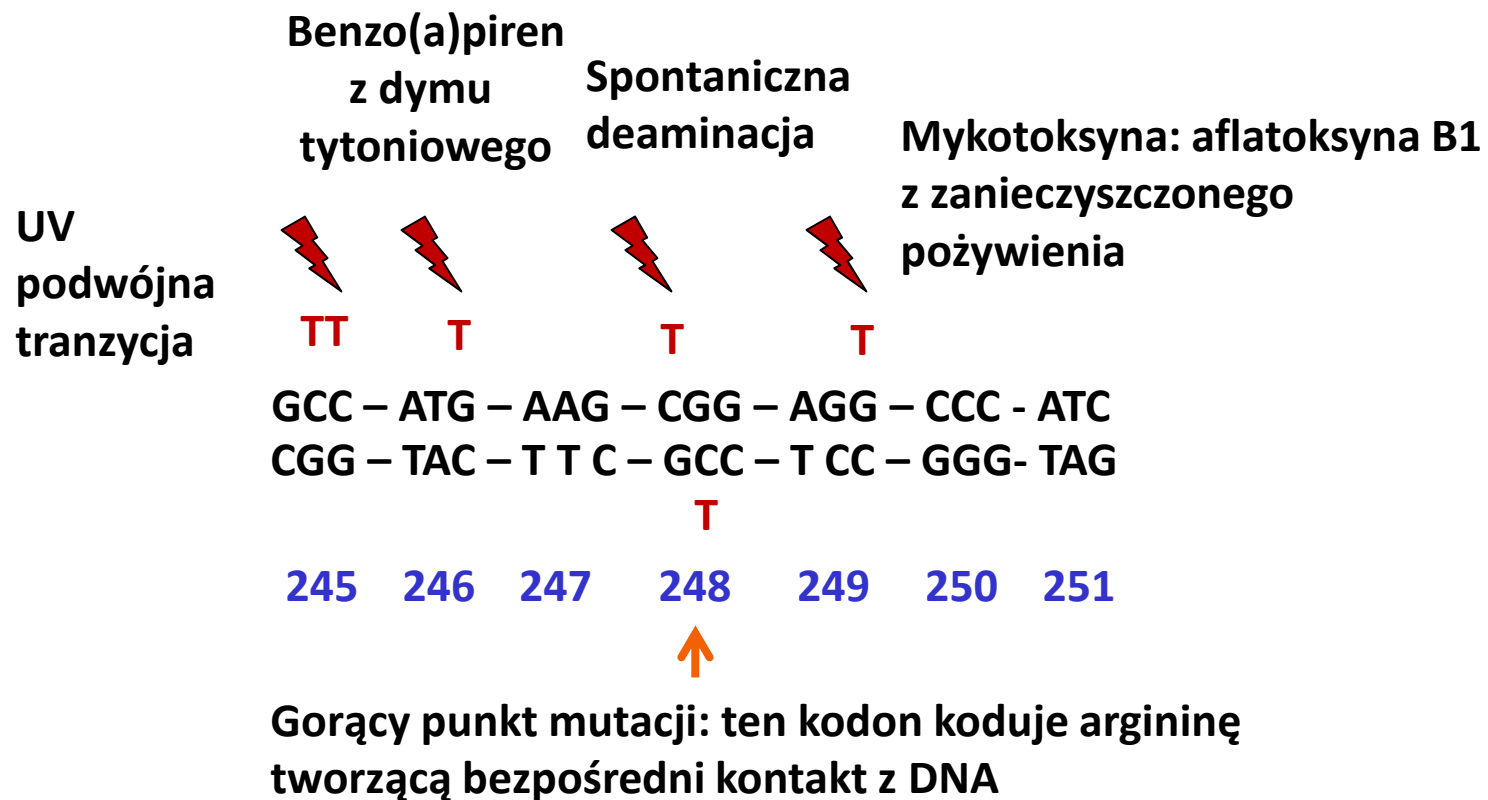
Komórki transformowane

Komórki nowotworowe charakteryzują się występowaniem aberacji chromosomowych. Niektóre nowotwory cechują się masowymi zmianami kariotypu, podczas gdy w innych występują tylko drobne, nieliczne nieprawidłowości.

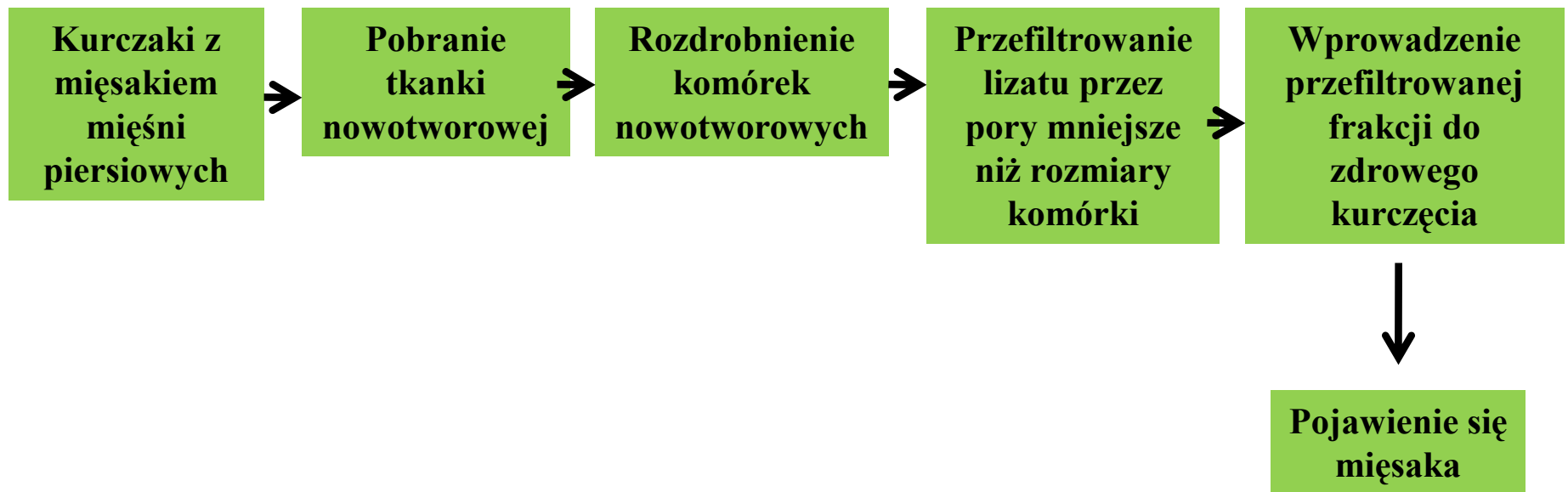
Niektóre aberacje często powtarzają się, np. jak ta związana z białaczką CML, polegająca na translokacji między chromosomami 9 i 22, tworząca tzw. chromosom filadelfijski.



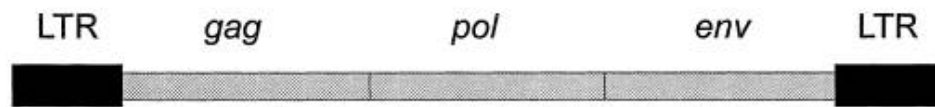
Czynniki mutagenne wywołują nowotwory. Czynniki mutagenne pozostawiają ślad w spektrum mutacji genetycznych spotykanych w nowotworach. Na ilustracji przypuszczalne miejsce indukcji mutacji w genie *TP53*.



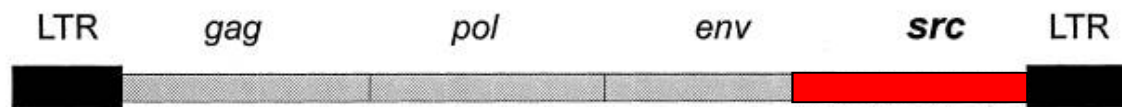
Schemat doświadczenia Rous'a z 1911 roku: wniosek cząsteczka wyizolowana z nowotworu, mniejsza niż bakteria, jest w stanie wywołać nowotwór u potraktowanych nią kurcząt. Cząsteczką tą okazał się retrowirus RSV – Rous sarcoma virus.



Składniki genomu niektórych onkogennych retrowirusów.



Genom wirusa ALV



Genom wirusa RSV



Genom wirusa AMV

Gag – koduje strukturalne białka wirusa

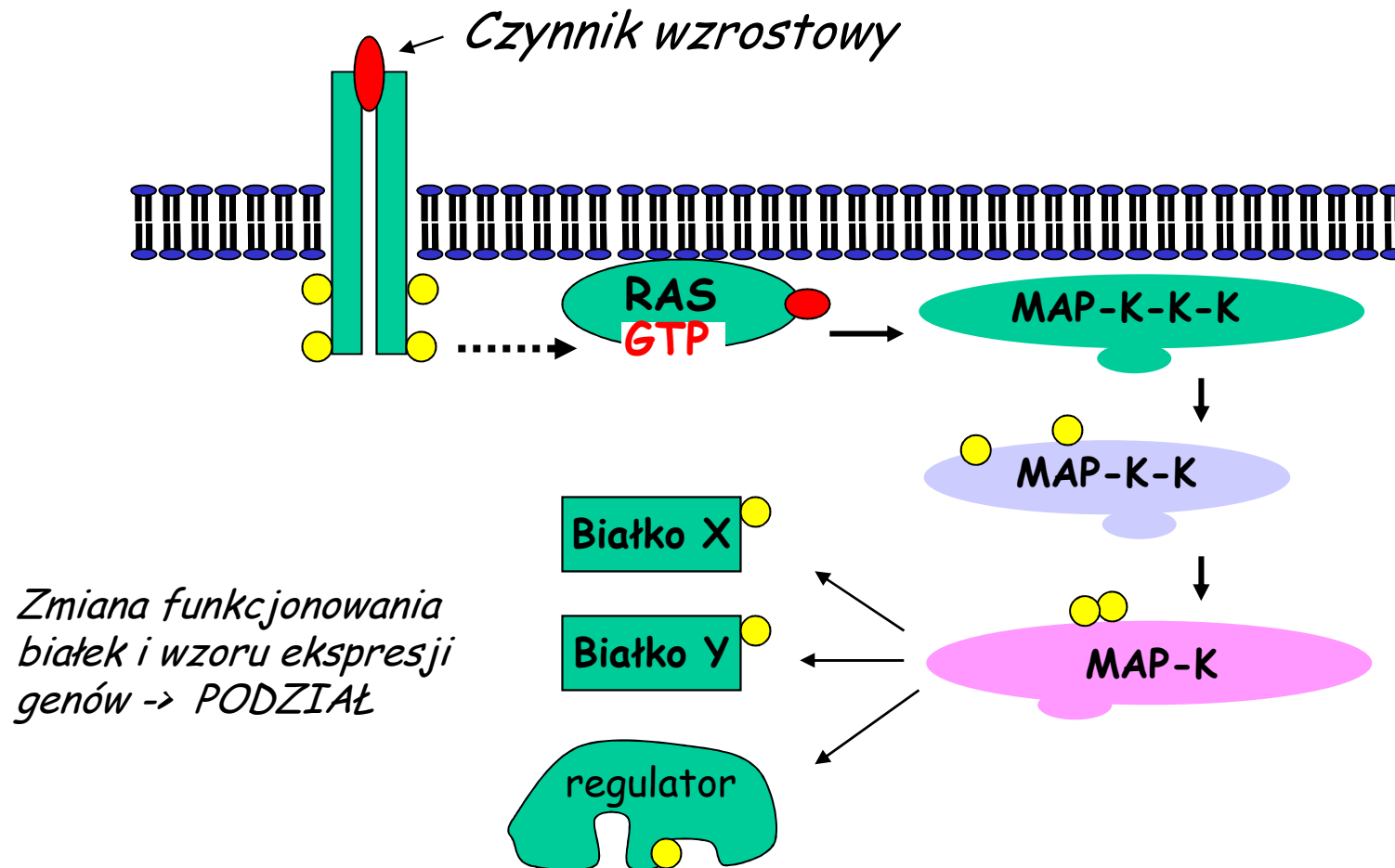
Pol – koduje odwrotną transkryptazę i integrazę

Env – koduje powierzchniowe glikoproteiny wirionu

Co to są onkogeny?

- Protoonkogeny - geny kodujące białka promujące, w warunkach fizjologicznych, wzrost i podziały komórkowe lub hamujące apoptozę.
 - Onkogeny – powstają, w wyniku mutacji, z onkogenów. Wysyłają silny, niefizjologiczny, sygnał promujący podział komórki lub hamujący jej apoptozę (samobójczą śmierć komórki).
 - Onkogeny mogą kodować: czynniki wzrostowe, receptory czynników wzrostowych, cytoplazmatyczne kinazy białkowe, czynniki transkrypcyjny, białka antyapoptotyczne.
-

Jak aktywacja onkogenu *RAS* sprzyja transformacji nowotworowej komórek?



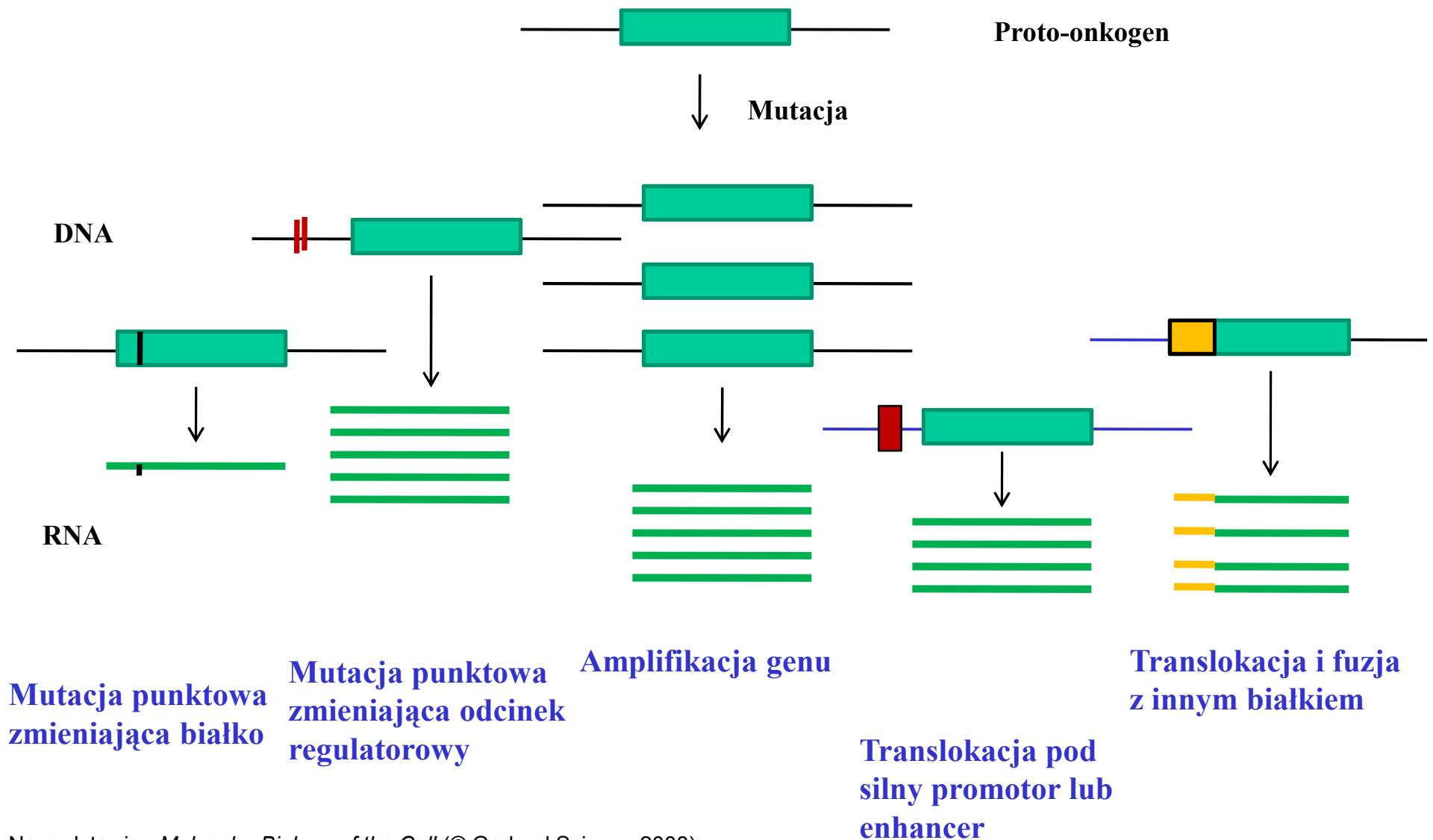
Aktywacja onkogenu *RAS* zachodzi poprzez mutację pojedynczego nukleotydu w genie kodującym białko RAS. Na ilustracji zaznaczono mutację w kodonie 12 zmieniającą kodon glicyny GGC w kodon waliny GTC. Ta substytucja powoduje, że białko wysyła sygnał mitogeny pomimo braku odpowiedniego liganda w środowisku komórki.

ATG ACG GAA TAT AAG CTG GTG GTG GTG GGC GCC GGC GGT GTG
Met Thr Glu Tyr Lys Leu Val Val Val Gly Ala Gly Gly Val
Val

Przykłady protoonkogenów

Nazwa genu	Funkcja białka	Najczęściej zmutowany w:
<i>H-RAS</i>	Przełącznik sygnału z receptora czynnika wzrostu	Rak jelita grubego, płuca, trzustki
<i>L-MYC</i>	Czynnik transkrypcyjny	Rak płuca
<i>CYCD1</i>	Cyklina D1	Rak piersi
<i>BCL-2</i>	Czynnik antyapoptotyczny	Chłoniak
<i>HER2</i>	Receptor czynnika wzrostu	Rak piersi, jajnika, żołądka

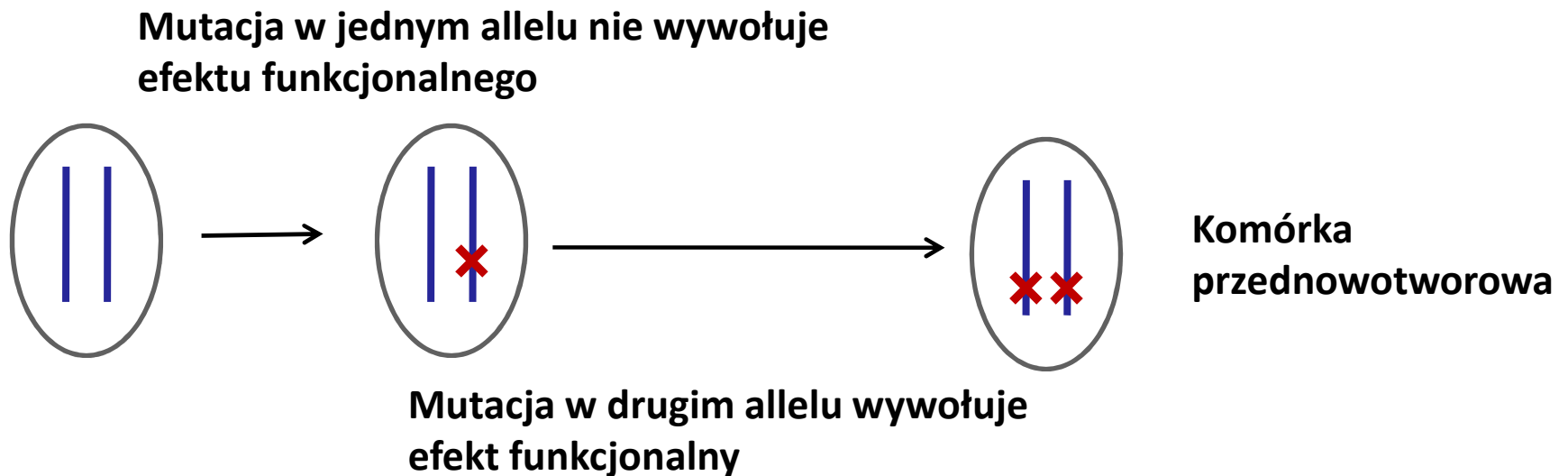
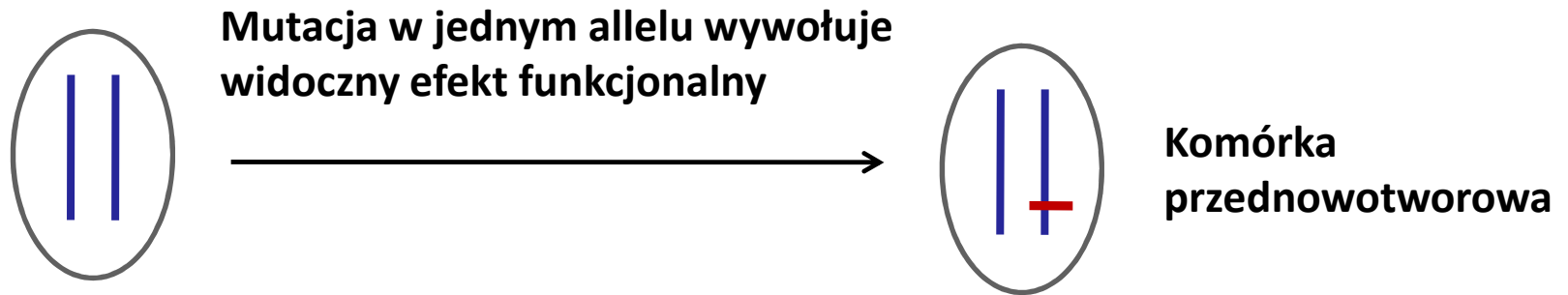
Sposoby aktywacji protoonkogenów



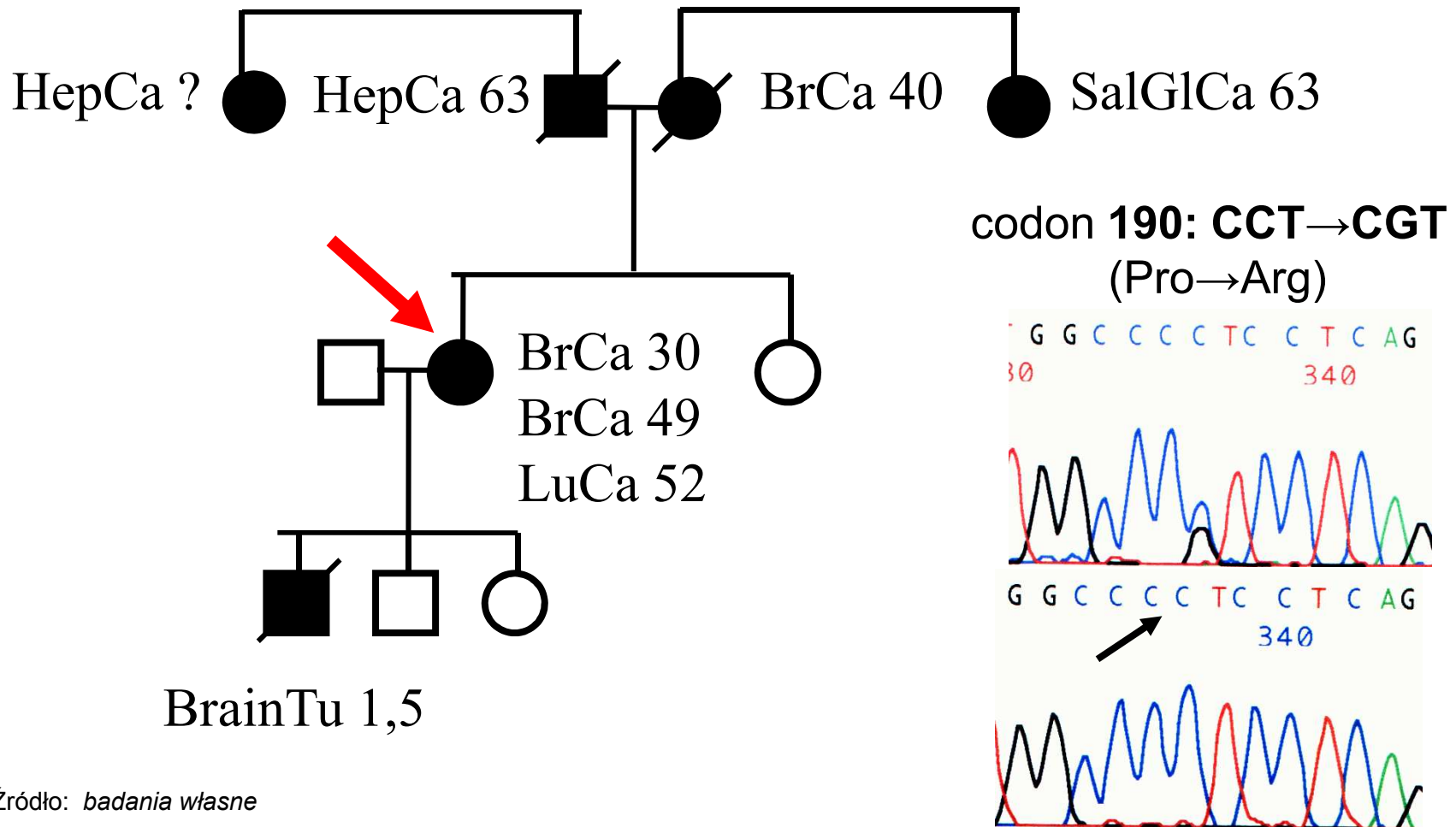
Co to jest supresor fenotypu nowotworowego, w skrócie, gen supresorowy?

- Geny supresorowe kodują białka, które w fizjologicznych warunkach powstrzymują wzrost komórek lub w inny sposób chronią komórkę przed transformacją nowotworową, np. poprzez ochronę przed mutacjami.
 - Utrata dwu kopii genu supresorowego (na każdym z chromosomów homologicznych) sprzyja transformacji nowotworowej komórek.
 - Zmutowana forma genu przekazywana z pokolenia na pokolenie znacząco zwiększa ryzyko choroby nowotworowej.
 - Supresory kodują, m.in.: regulatory cyklu komórkowego (np. *RB*), białka promujące apoptozę (np. *TP53*), białka naprawy DNA (np. *BRCA1*, *BRCA2*).
-

Genetyczna różnica między onkogenem a supresorem fenotypu nowotworowego.



Mutacje w genach supresorowych przenoszone przez komórki rozrodcze są przyczyną rodzinnego występowania nowotworów. Na ilustracji – przykład rodziny, w której jest dziedziczona mutacja genu TP53.

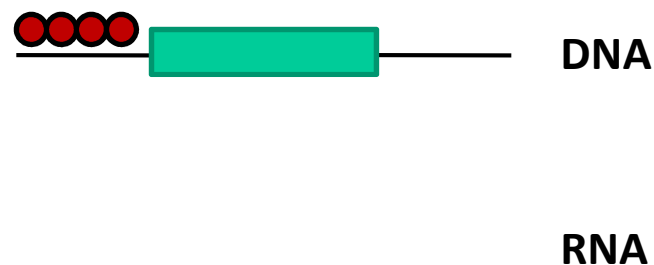
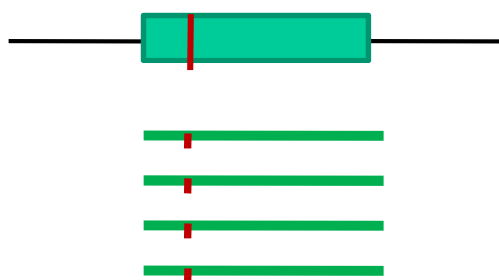


Geny supresorowe mogą ulec inaktywacji na wiele sposobów.

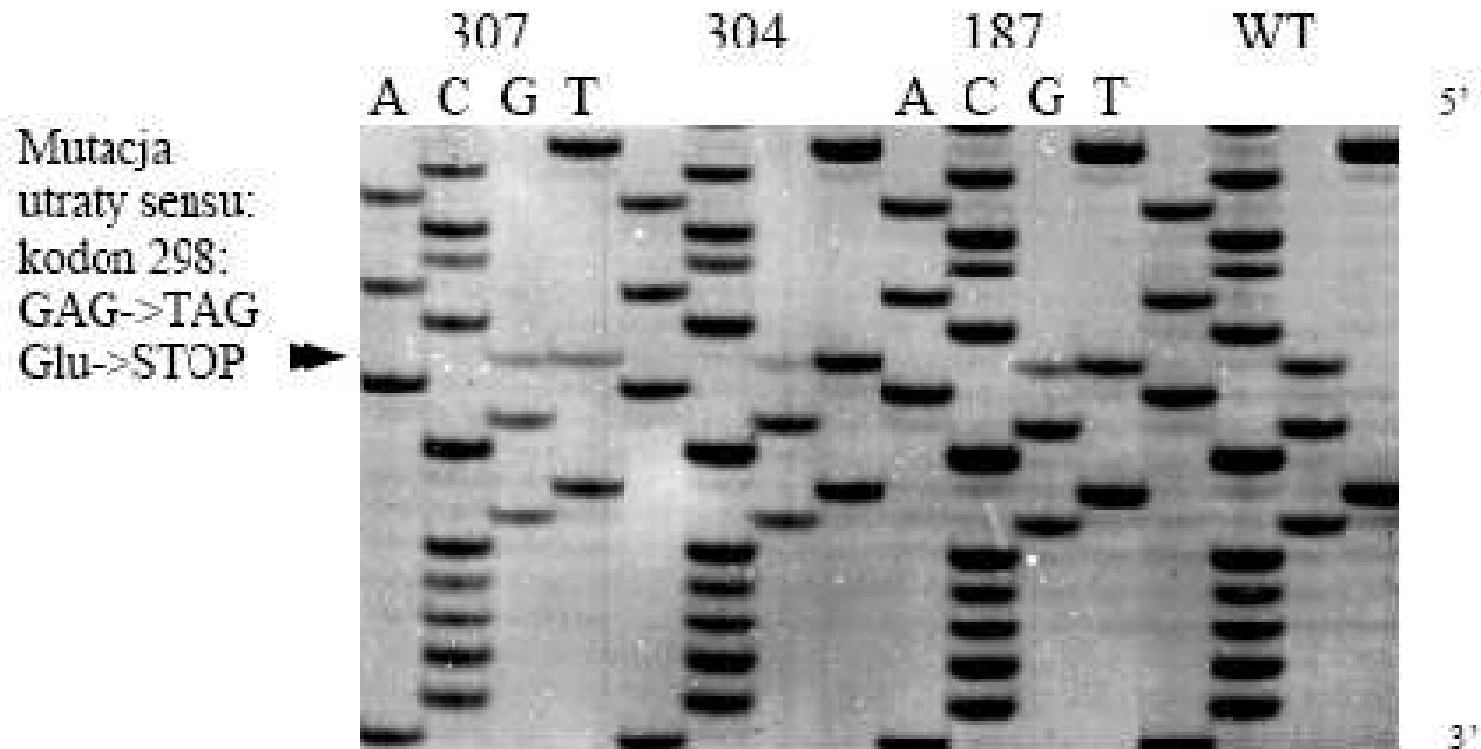
Mutacje punktowe powodujące inaktywację białka

Rozległe delecje powodujące utratę całego lub dużych fragmentów genu

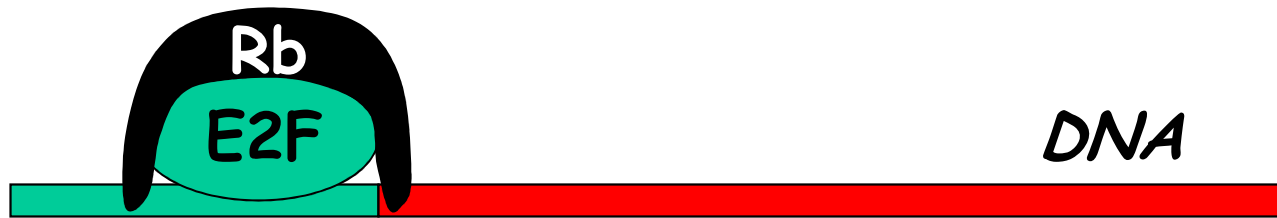
Zmiany epigenetyczne: gen nie ulega mutacji ani delecja lecz jego transkrypcja jest wyciszona np. poprzez hipermetylację cytozyny w promotorze



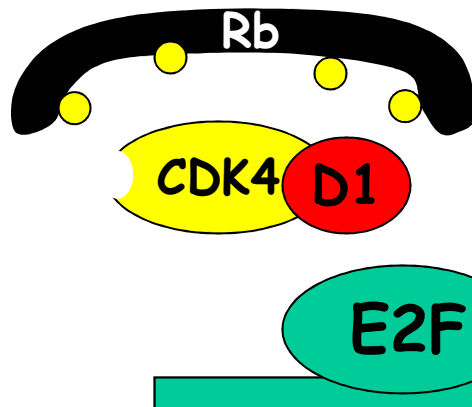
Mutacje somatyczne w onkogenach i genach supresorowych można stosunkowo prosto badać dzięki zastosowaniu reakcji PCR oraz sekwencjonowania. Poznanie mutacji może pomóc w prognozowaniu przebiegu choroby lub podatności komórek nowotworowych na niektóre leki. Na ilustracji: mutacja genu TP53 w komórkach raka płuca mieszkańców Górnego Śląska.



Jak działa białko pRB, kodowane przez jeden z supresorów - *RB*?



Białka fazy S nie są produkowane.

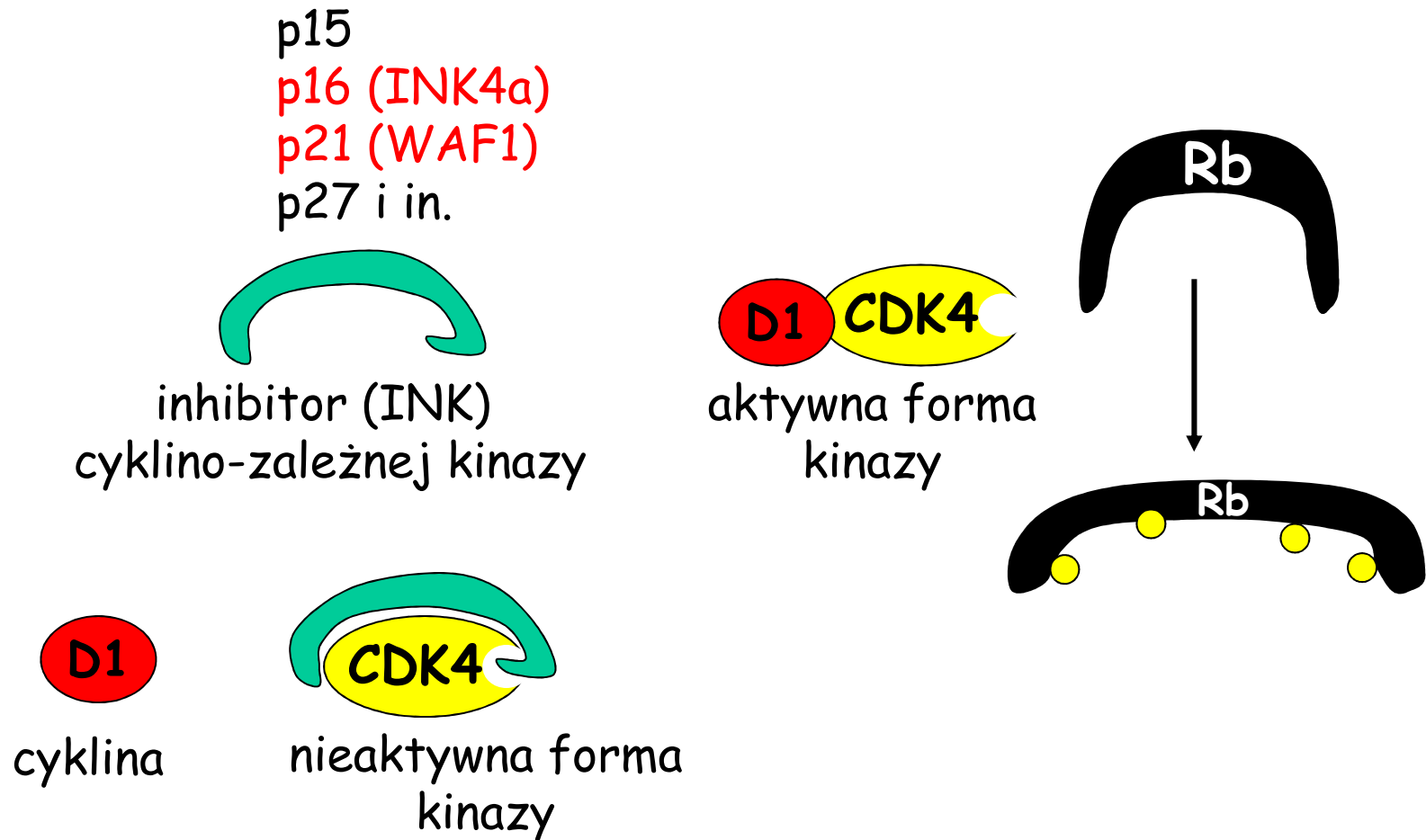


Kinaza CDK4 zaktywowana przez cyklinę fosforyluje Rb, które odskakuje od E2F.

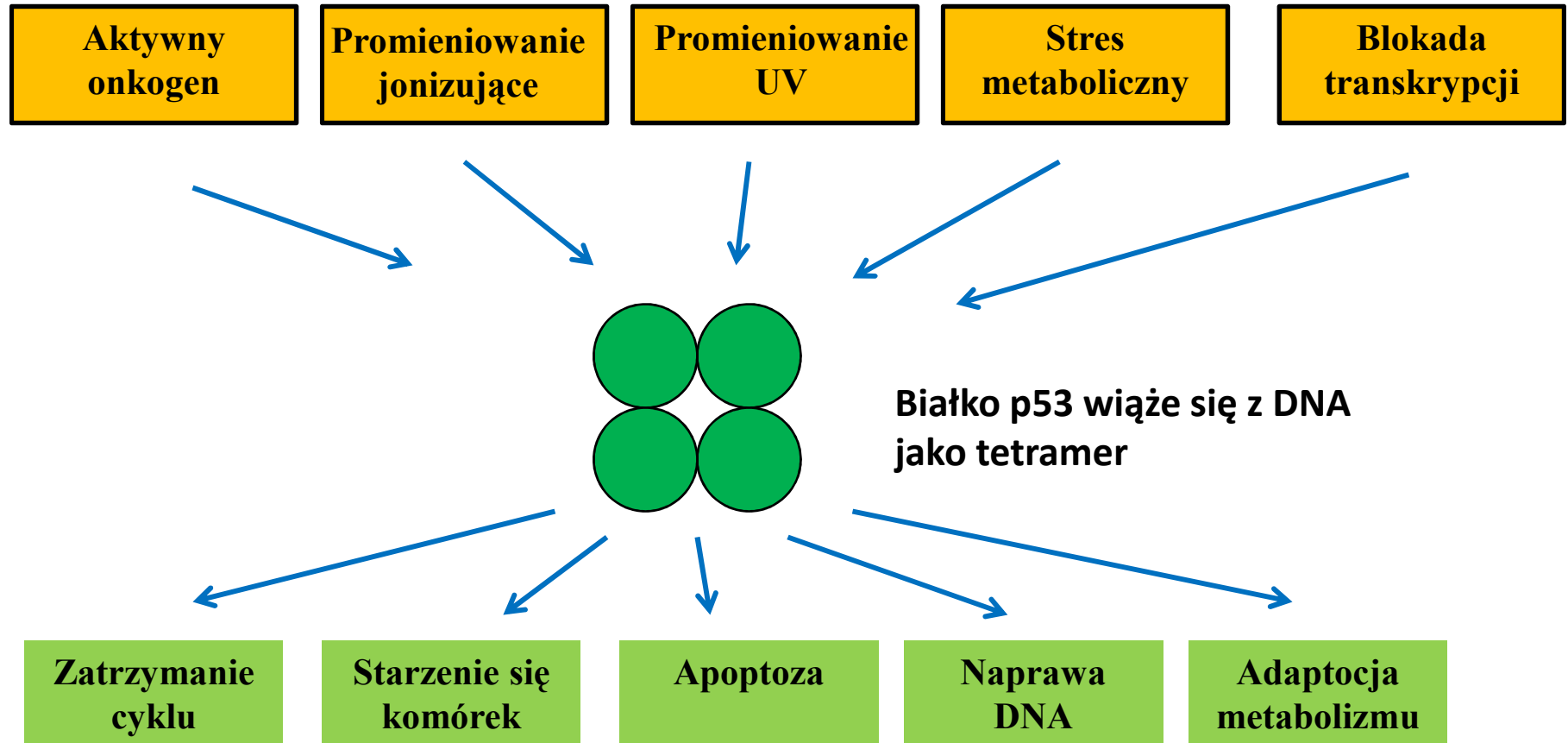


Produkcja białek fazy S -> PODZIAŁ.

Jakie są elementy szlaku sygnalizacyjnego Rb?



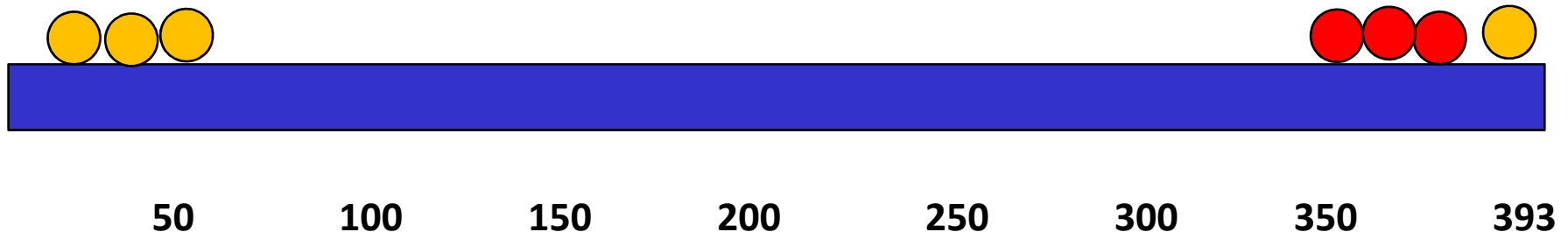
Mechanizm hamowania rozwoju nowotworu przez białko p53 kodowane przez supresor *TP53*.



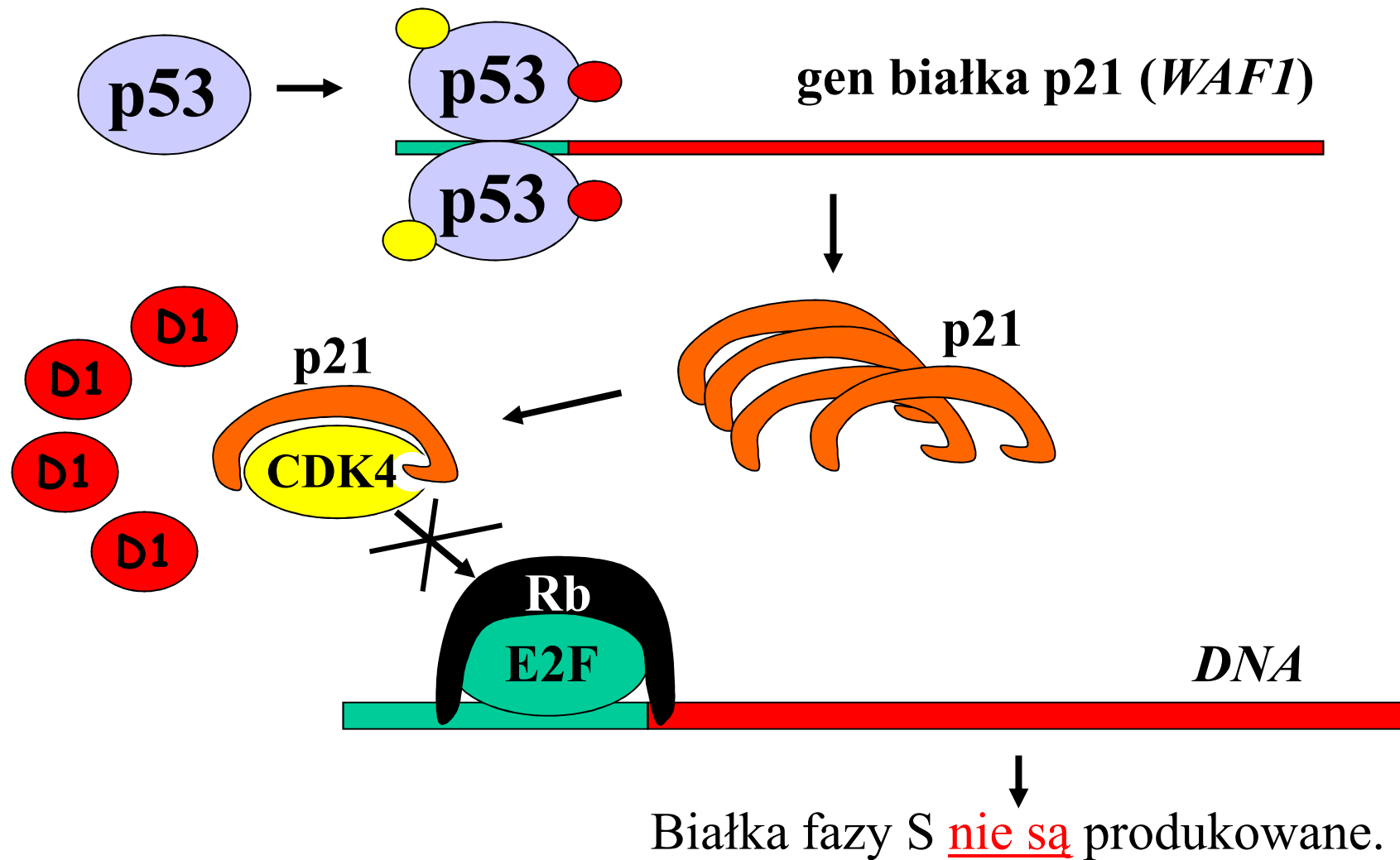
Białko supresorowe p53 ulega wielu modyfikacjom potranslacyjnym takim jak: fosforylacja, acetylacja, metylacja, sumolacja, ubiquitynacja. Te modyfikacje zmieniają stabilność białka, jego oddziaływanie z innymi białkami, z DNA, zdolność tworzenia oligomerów. Kombinacje poszczególnych modyfikacji modulują sposób funkcjonowania białka. Można powiedzieć, że białko p53 ma strój na każdą okazję.

Fosforylacja końca aminowego
zwiększa aktywność pro-transkrypcyjną
utrudnia wiązanie z inhibitorem MDM2

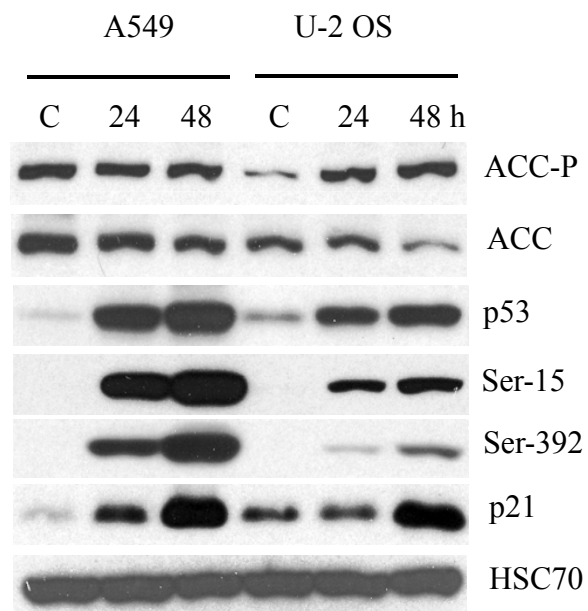
Acetylacja końca karboksylowego
zwiększa aktywność pro-transkrypcyjną
utrudnia wiązanie z inhibitorem MDM2



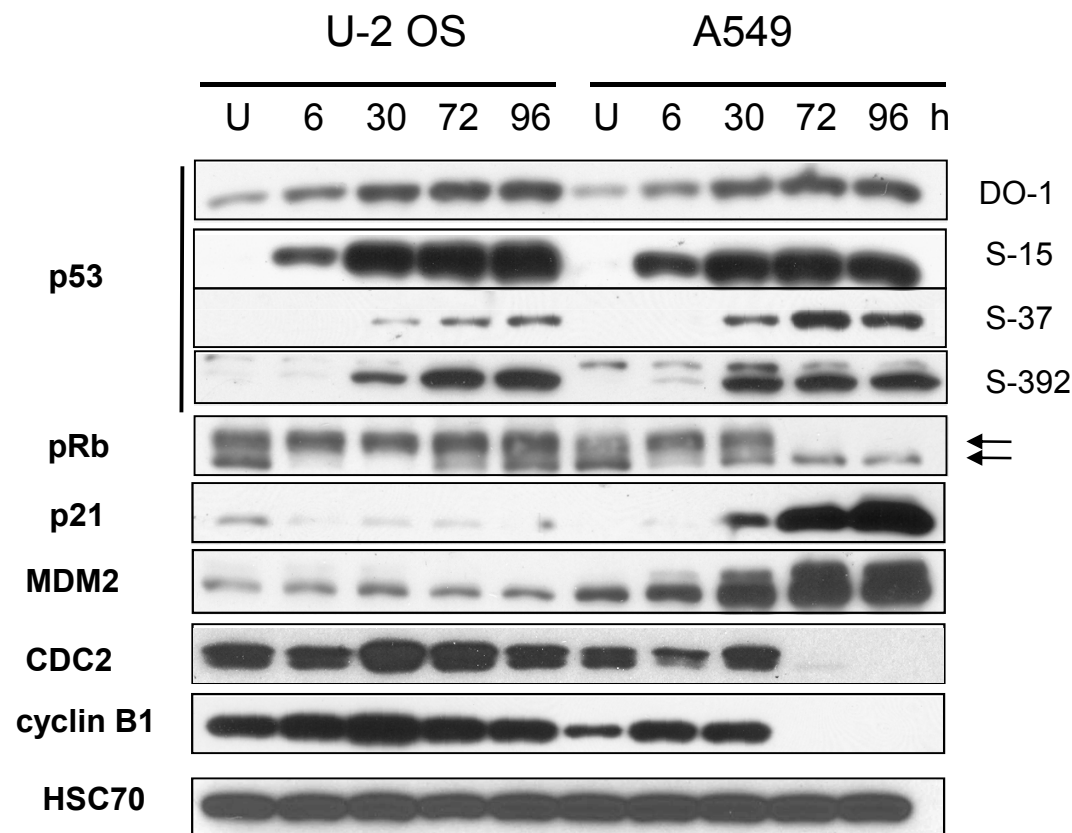
Co dzieje się z p53 i pRb po uszkodzeniu DNA?



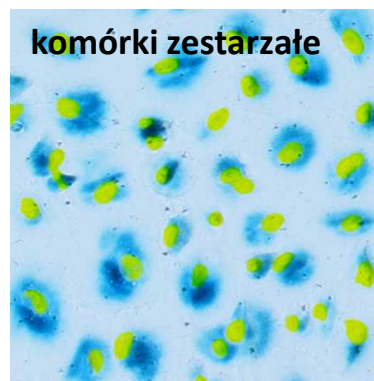
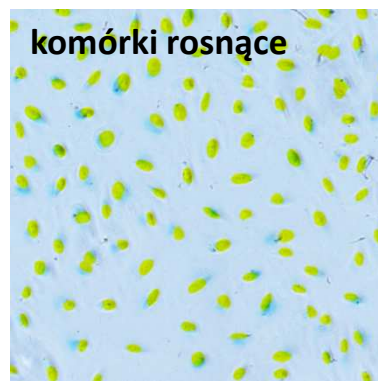
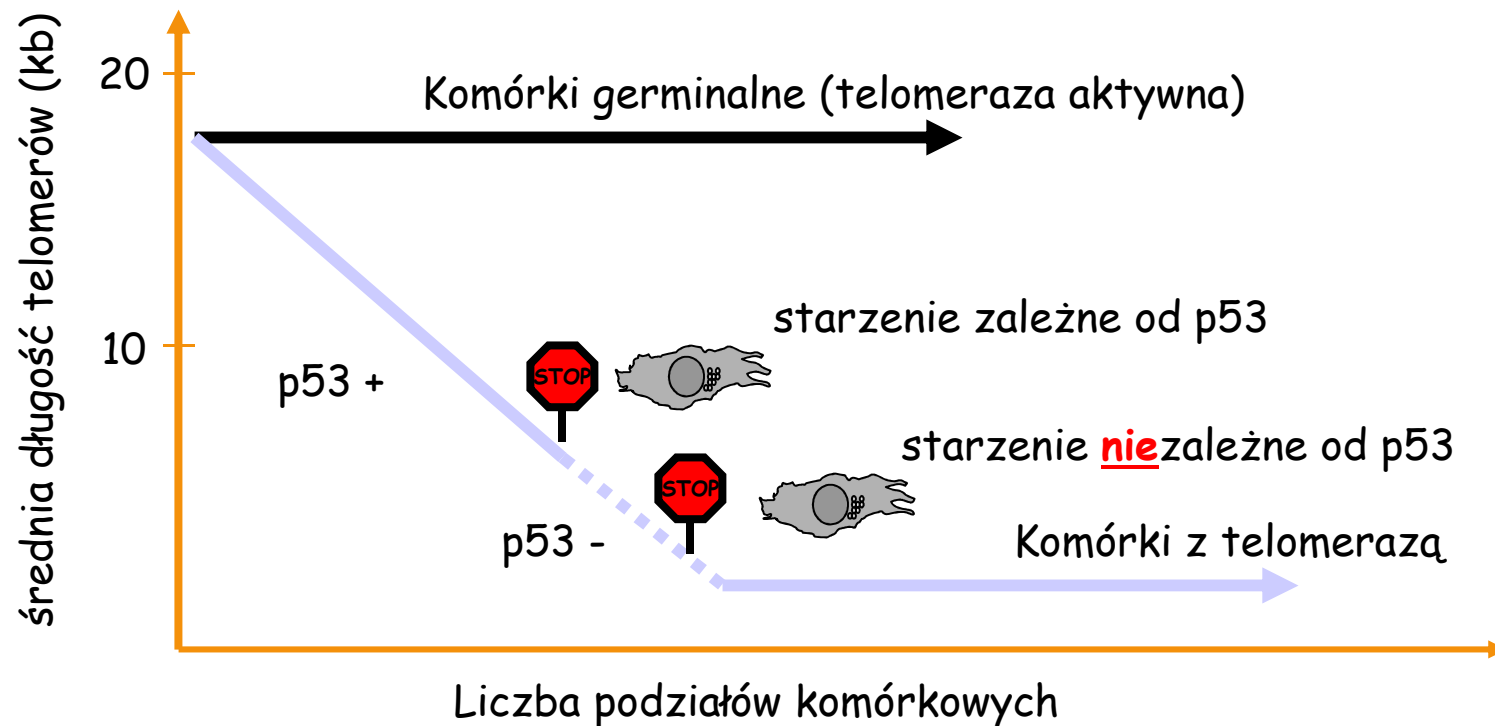
Przykład aktywacji szlaku sygnalizacyjnego zależnego od białka p53 w różnych typach komórek traktowanych przez 24 i 48 godzin substancją generującą stres metaboliczny.



W niektórych komórkach nowotworowych działanie szlaku sygnalizacyjnego zostaje zaburzone, najczęściej poprzez mutację genu TP53, ale występują również inne mechanizmy. Na ilustracji przedstawiono zmiany ekspresji białek pod wpływem rezweratrolu.

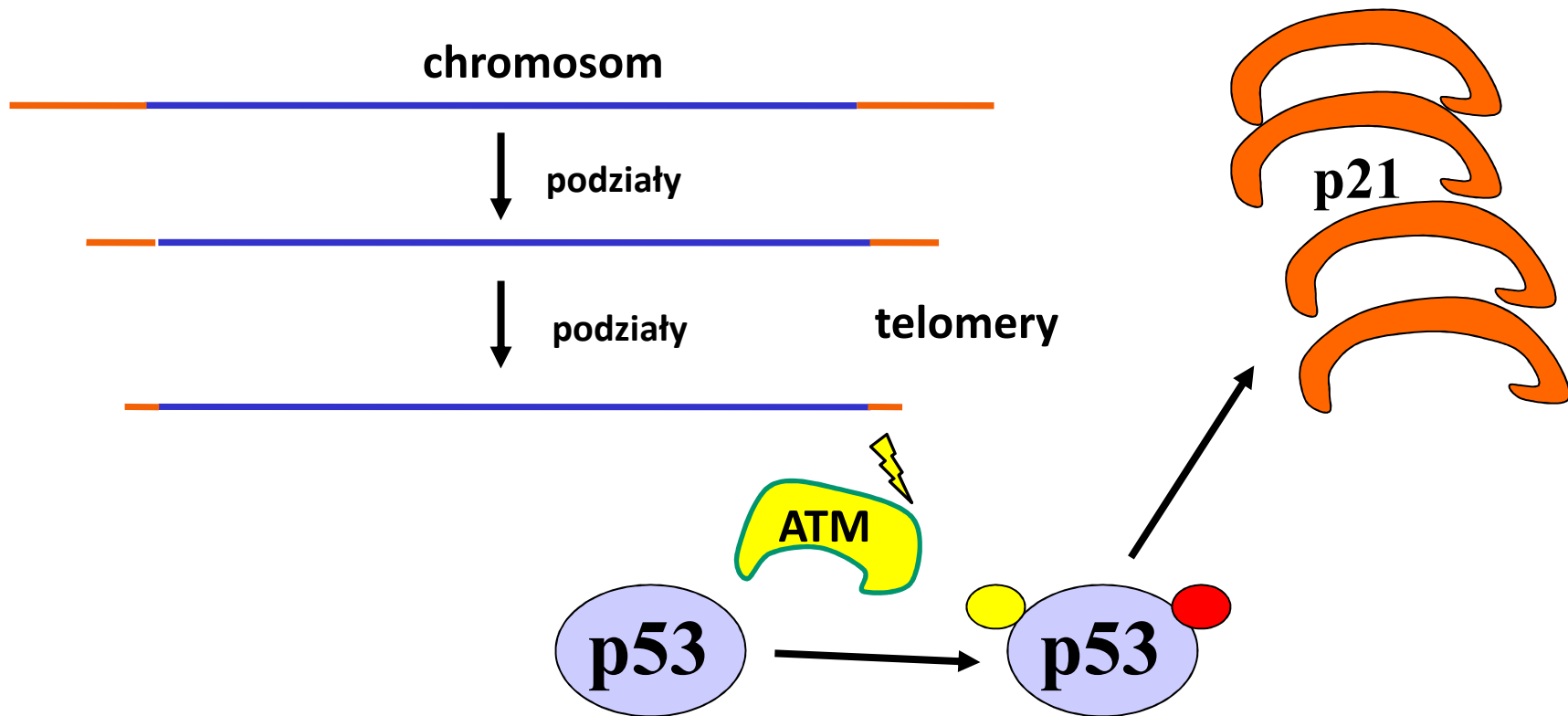


Jak komórki zliczają podziały i z czego składa się mechanizm wyzwalający fenotyp zestarzałej komórki?

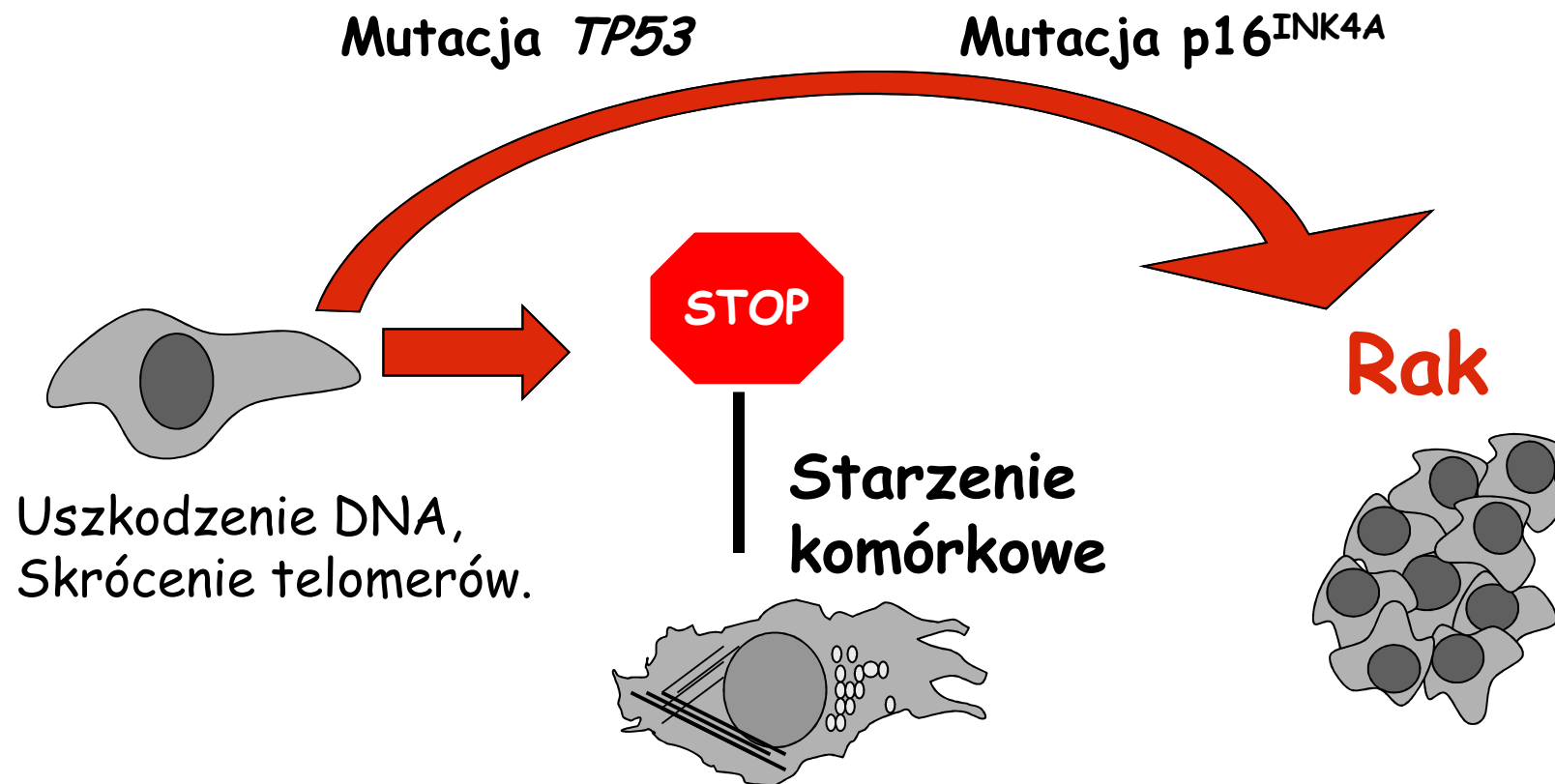


Źródło: badania własne

W komórkach pozbawionych telomerazy (większość komórek somatycznych) telomery skracają się przy każdym podziale komórkowym. Gdy telomery skrócą się do pewnej krytycznej długości, uruchamiają szlak sygnalizacyjny podobny do sygnału dwuniciowego pęknięcia DNA i podziały komórkowe zostają zatrzymane.



Starzenie komórkowe jest bardzo ważnym mechanizmem przeciwnowotworowym.



Aby mogło dojść do rozwoju nowotworu musi nastąpić:

1. Aktywacja onkogenów.
2. Inaktywacja supresorów.
3. Aktywacja telomerazy.
4. Uzyskanie zdolności inwazji.
5. Uzyskanie zdolności tworzenia nowych naczyń.
6. Zdolność do wzrostu w sąsiednich tkankach.

Każdy z powyższych etapów jest związany z wystąpieniem nowego wzoru ekspresji genów wywołanego najczęściej mutacją !!!



KAPITAŁ LUDZKI
NARODOWA STRATEGIA SPÓJNOŚCI

UNIA EUROPEJSKA
EUROPEJSKI
FUNDUSZ SPOŁECZNY



Materiały dydaktyczne współfinansowane ze
środków Unii Europejskiej w ramach
Europejskiego Funduszu Społecznego.
