

Nádorová transformace buněk.

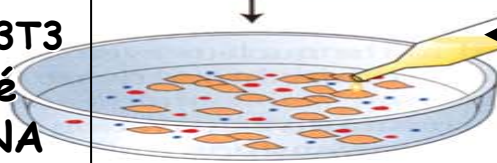
Marie Kopecká,
Biologický ústav LF MU Brno
2006

Nádorová transformace linie myších fibroblastů 3T3 pomocí lidské nádorové DNA (=transfekce)

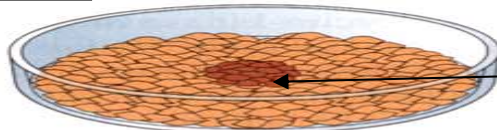
DNA izolovaná z lidských nádorových buněk

Transfect mouse 3T3 cells

Transfekce myších fibroblastů lidskou nádorovou DNA

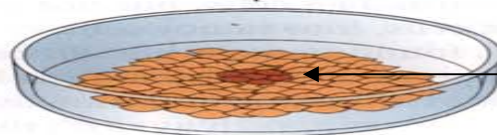


Culture for 2 weeks



Po 2 týdnech vzniká ohnisko myších transformovaných buněk

Extract DNA, transform new mouse cells



Second cycle

Druhý cyklus transfekce

Extract genomic DNA



DNA izolovaná z ohniska transformovaných myších fibroblastů

Surviving human DNA

Introduce into phage vector



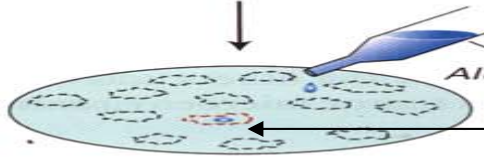
Z izolované DNA konstrukce genomové knihovny ve fágových vektorech

Plate phage on *E. coli*

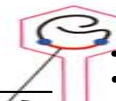


Kolonie bakterií obsahující fágové vektory (genomová knihovna transformovaných myších buněk)

Replica on filter paper



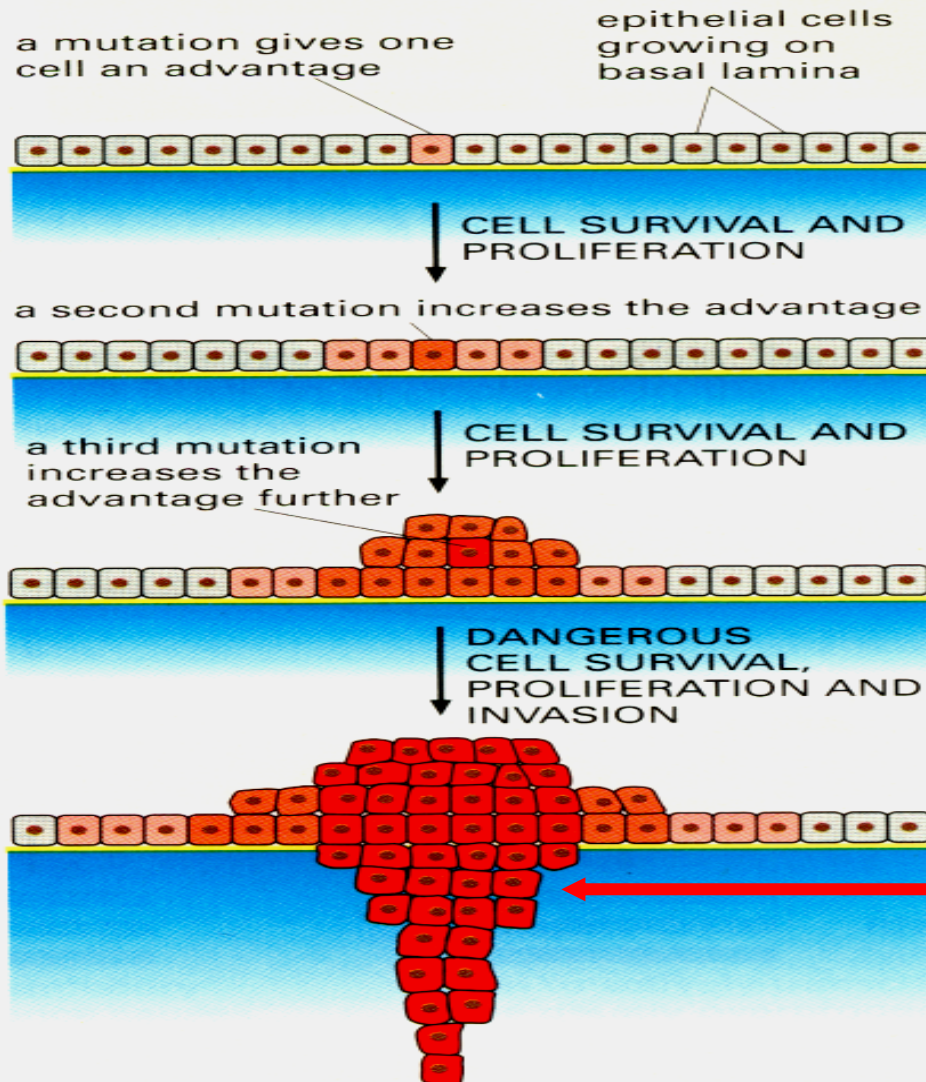
Alu probe



Identifikace lidského onkogenu RAS v myší DNA pomocí Alu sondy

- Podstata nádorové transformace je genetická.
- Mutace postihují geny signálních drah, kontrolních bodů buněčného cyklu, buněčné diferenciace, apoptosy, reparace DNA...
- V průběhu buněčných dělení jedné kmenové buňky nastává postupná akumulace několika mutací v uvedených skupinách genů, které resultují v její nádorovou transformaci.

Nádorová transformace nastává postupnou akumulací několika mutací v životně důležitých genech kmenové buňky



První mutace:

Buňka začíná proliferovat bez růstových faktorů

Druhá mutace:

Buňka přežívá a dál proliferuje bez růstových faktorů (benigní nádor)

Třetí mutace

Buňka přežívá nebezpečně dlouho, neustále proliferuje a začíná invaze do okolí

vzniká maligní nádor

Nádorové buňky

- mají poruchu regulace buněčného cyklu,
- nereagují na signály z okolí buněk,
- vykazují autonomní („asociální“) chování,

- nejevící odchylky od výchozí buňky a
- dělicí se v místě svého vzniku
- jsou buňky **nádoru benigního** (menší riziko),

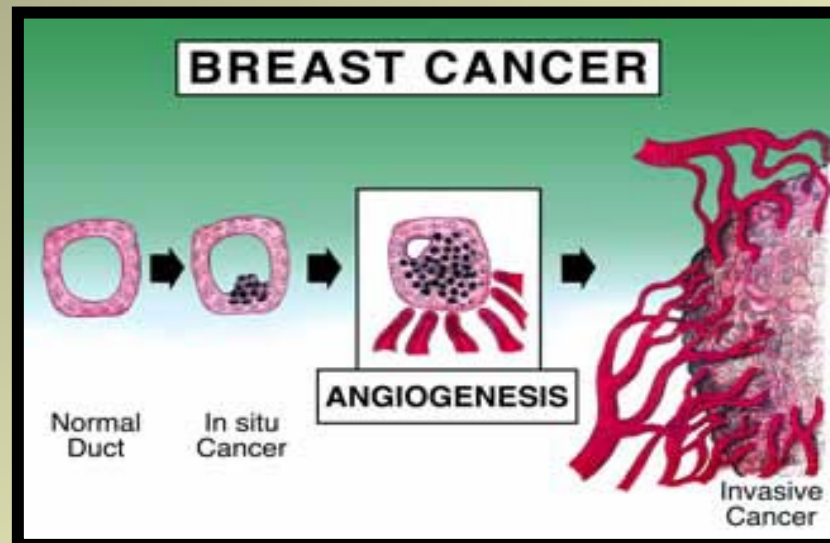
- odchylující se od výchozí buňky,
- vyznačující se invazivitou („prorůstáním“ do okolí) a
- vytvářející vzdálené metastázy,
jsou buňky **nádoru maligního** (vysoká úmrtnost).

Průběh nádorového onemocnění lze shrnout do tří údobí:

• *Iniciace*: nevratná mutace určitého kritického genu (např. genu kontrolního bodu buněčného cyklu).

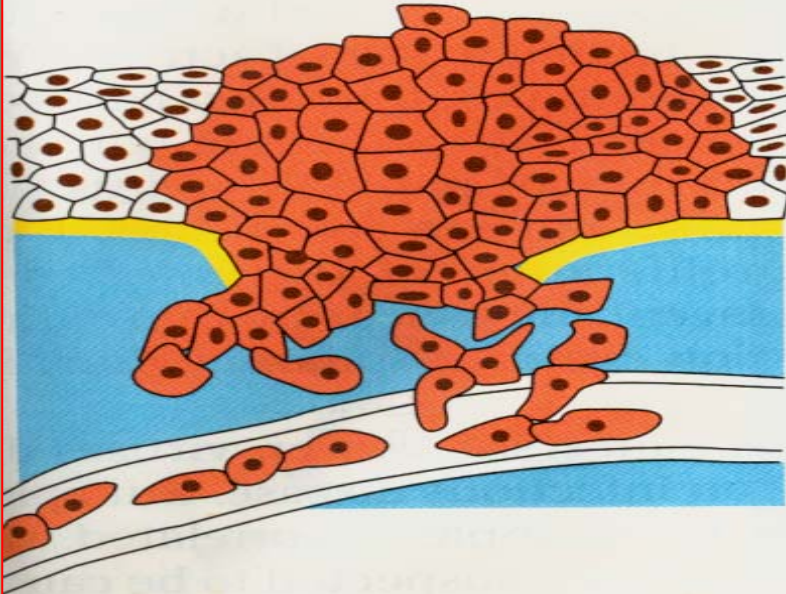
• *Promoce*: bývá dlouhá (i desetiletí), nenápadný vývoj, mutované buňky stimulovány dalšími faktory k výraznější proliferaci. Může, ale nemusí vést k výrazné manifestaci choroby.

• *Progrese*: nárůst mutací genů stimulace růstu, genů kontrolních bodů buněčného cyklu, transkripčních faktorů... Nádor se stává invazivní (prorůstá do okolí), metastazuje na vzdálená místa, vaskularizuje - (prorůstání cévami).

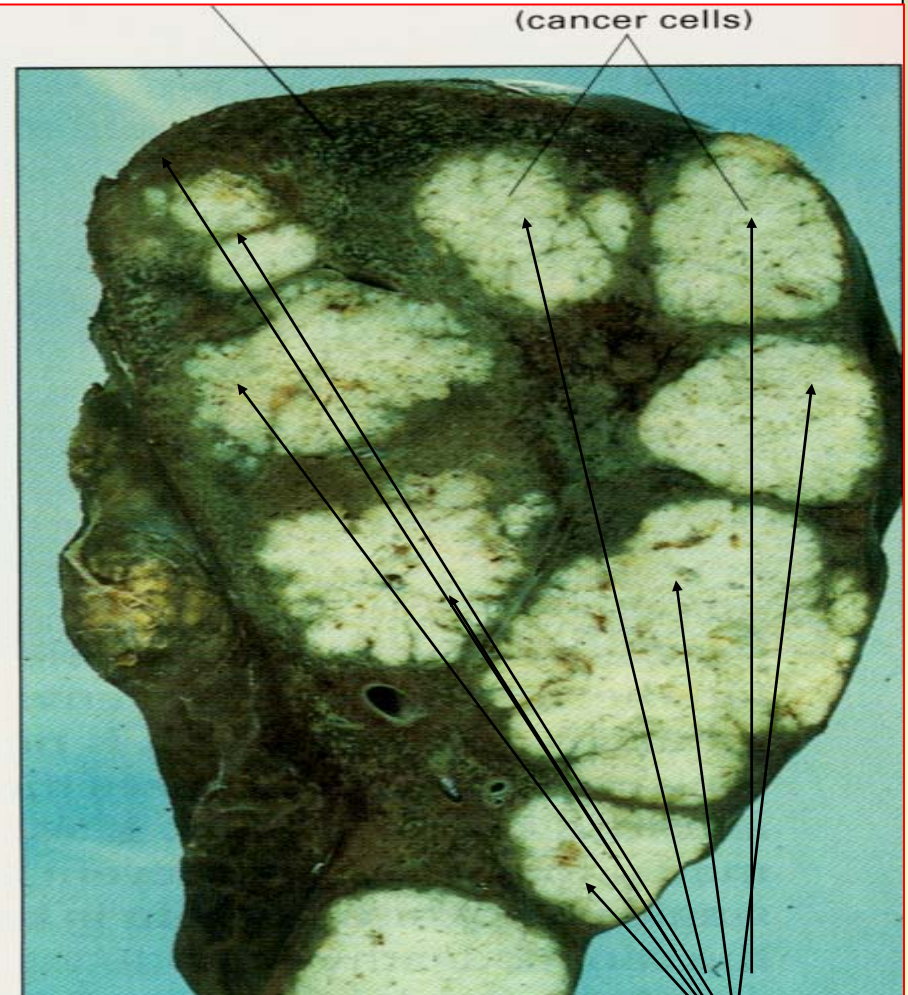


Nádorově transformovaná buňka maligního nádoru:

- 1) Nekontrolovaná proliferace (bez přítomnosti stimulů k dělení)
- 2) Invaze
- 3) Kolonizace nových teritorií-metastázy.



Primární nádor v epitelu se šíří přes bazální laminu do pojivové tkáně, do krevních i lymfatických cév. (Alberts a kol. 2004)



Sekundární nádory = metastázy nádoru tlustého střeva v játrech

Nádory benigní a maligní

1: nádory benigní:

buňky prolifерují nadměrně,
nádor odstranitelný chirurgicky,
př.: papilom (z epitelu), adenom (ze žláz.epitelu);

2: nádory maligní:

buňky prolifерují nadměrně,
invaze buněk do okolní tkáně,
do krevních a lymfatických cév,
kolonizace nových teritorií,
vznik sekundárních nádorů (*metastáz*)
př.: karcinom (z epitelu), adenokarcinom
(ze žláz. epitelu), obtížně odstranitelný;

Příklady nádorů

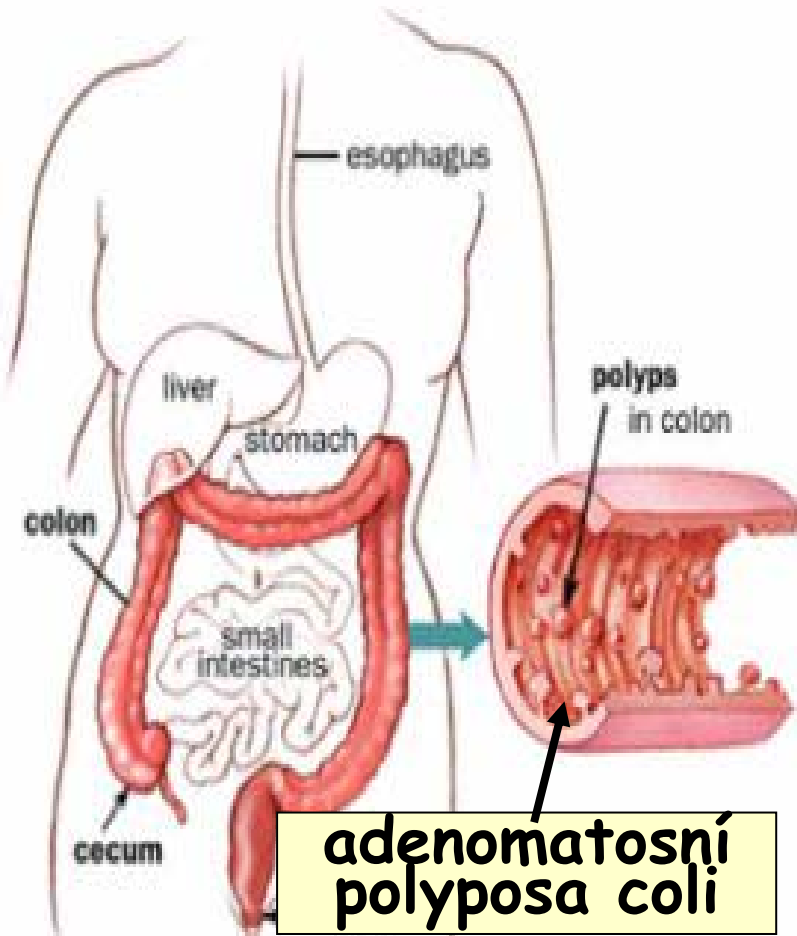
- Nádory benigní (nezhoubné):

z povrchového epitelu:	papilom
ze žláзовého epitelu:	adenom
z pojiva:	fibrom
z chrupavky:	chondrom
z kosti:	osteom
ze svalů:	myom

- Nádory maligní (zhoubné):

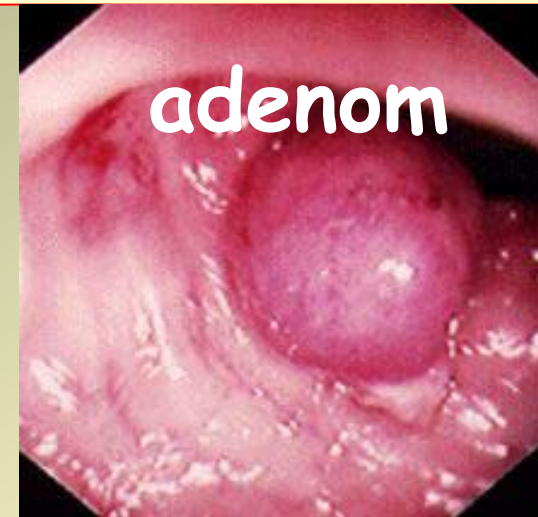
karcinom
adenokarcinom
fibrosarkom
chondrosarkom
osteosarkom
myosarkom

Stádia vývoje nádoru v colon: normální sliznice → polyp → adenom → kolorektální adenokarcinom. Dědičná predispozice: adenomatosní polyposa coli (mutace 1 alely genu APC).



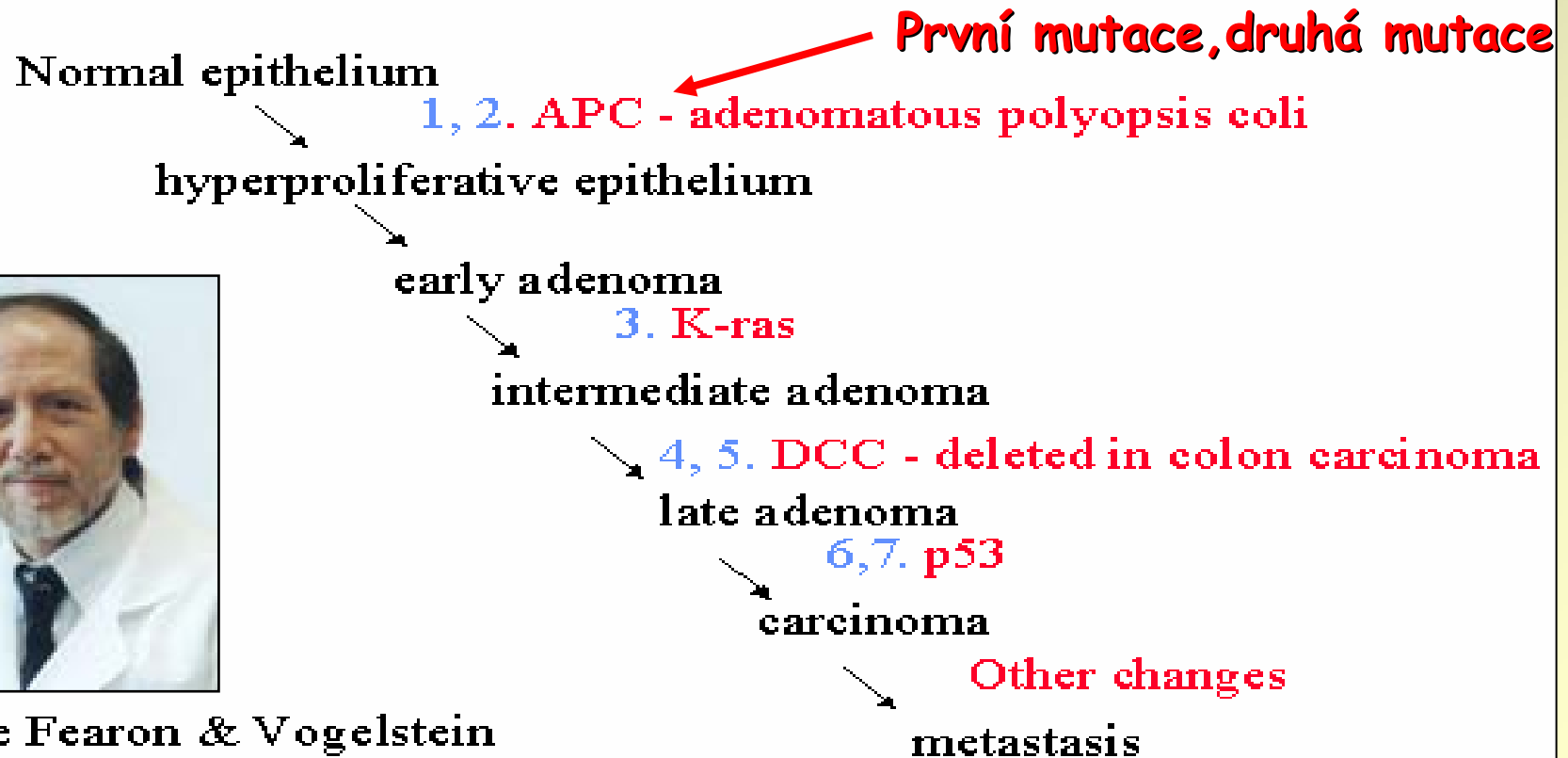
(mutace genu APC)

This is what polyps look like inside the colon



Nádorová onemocnění vznikají kaskádou mutací genů.
Geneze kolorektálního karcinomu (Vogelstein).

7 Mutations Lead to Colorectal Carcinoma



See Fearon & Vogelstein

Při vzniku kolorektálního nádoru první mutace je v APC v signální dráze „Wnt pathway“. A) vlevo dráha vypnutá, B) vpravo dráha „zapnutá“.

Mutace APC → vznik nádoru. Jak? Mutovaný APC nedegraduje ve vypnuté dráze β -catenin, který stimuluje transkripci genů, tím proliferaci buněk → nádor.

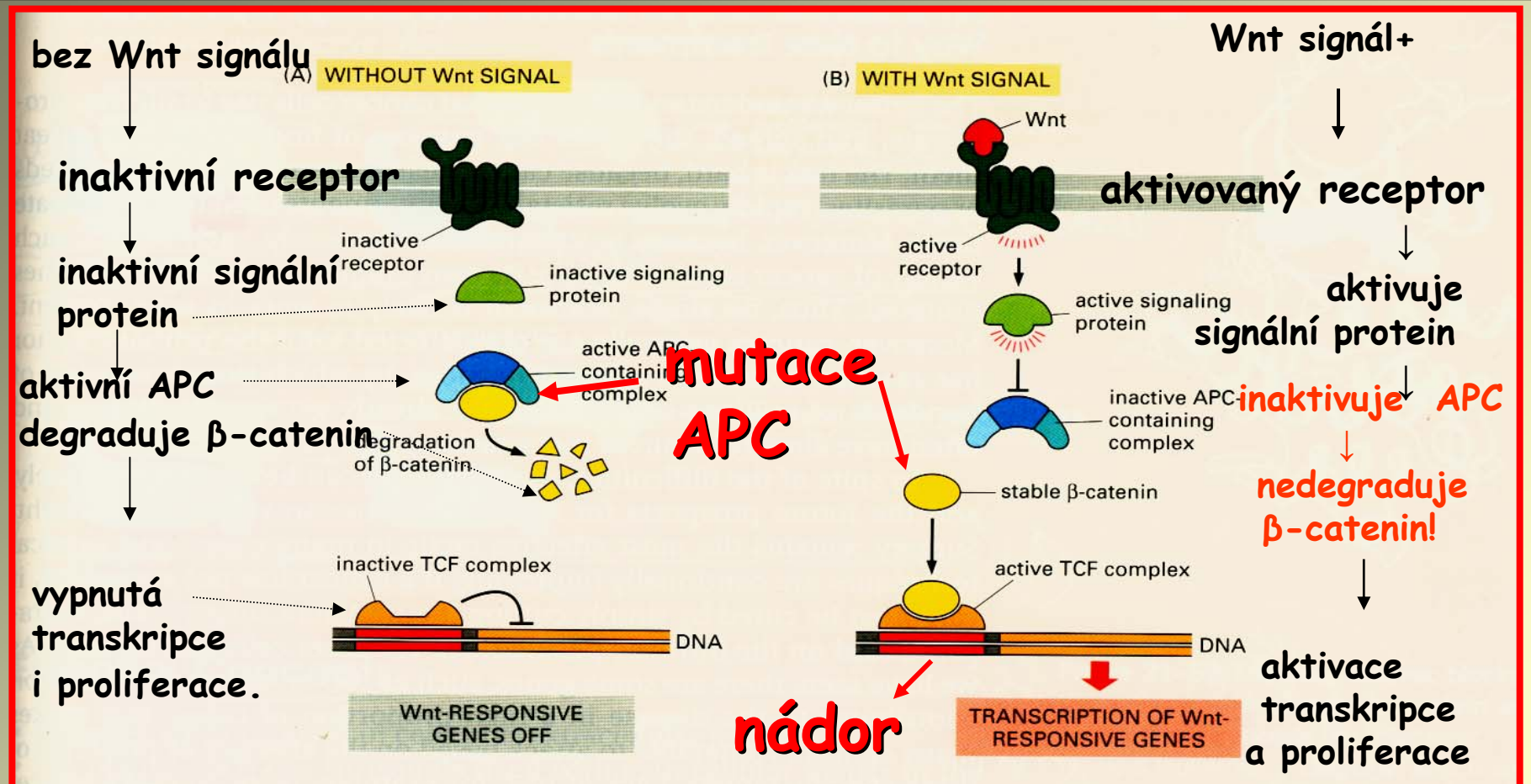


Figure 21–50 The APC protein keeps the Wnt signaling pathway inactive when the cell is not exposed to Wnt protein. It does this by promoting degradation of the signaling molecule β -catenin. In the presence of Wnt, or in the absence of active APC, free β -catenin becomes plentiful and combines with the gene regulatory protein TCF to drive transcription of Wnt target genes.

- Stupňovité hromadění mutací v průběhu nádorové transformace postihuje:
- **proto-onkogeny** (projekt HUGO - asi 100 protoonkogenů v lidské somatické buňce);
- **tumor-supresorové geny** (projekt HUGO -asi 40 tumor-supresorových genů v lidské somatické buňce)
- a některé další

Proto-onkogeny a onkogeny.

- Proto-onkogeny: jsou součástí genomu každé lidské buňky,
- kódují cykliny a cyklin-dependentní kinázy řídící buněčný cyklus,
- kódují růstové faktory a jejich receptory,
- kódují proteiny transdukující signály (tzv. nereceptorové proteinkinázy) a transkripční faktory,
- kódují proteiny buněčné diferenciaci, apoptozy...
- Příklady proto-onkogenů: Ras, Abl, Src, cyklin D1, CDK4, Myc...

- Onkogeny: vznikají mutací proto-onkogenů, mají tumorigenní charakter.
- Mutace dominantní: k expresi stačí mutace 1 alely.
- Mechanismy vzniku:
 - genová mutace
 - genová amplifikace
 - virová transdukce
 - virová inzerce
 - chromosomová přestavba (Klener, 2002).
- Při nádorové transformaci nastává transkripce onkogenů → onkoproteiny → nádor.

Příklad Ras proto-onkogenu a Ras onkogenu

Ras protein leží na vnitřní straně plasmamembrány. Je součástí signální dráhy od receptoru plasmamembrány do jádra.

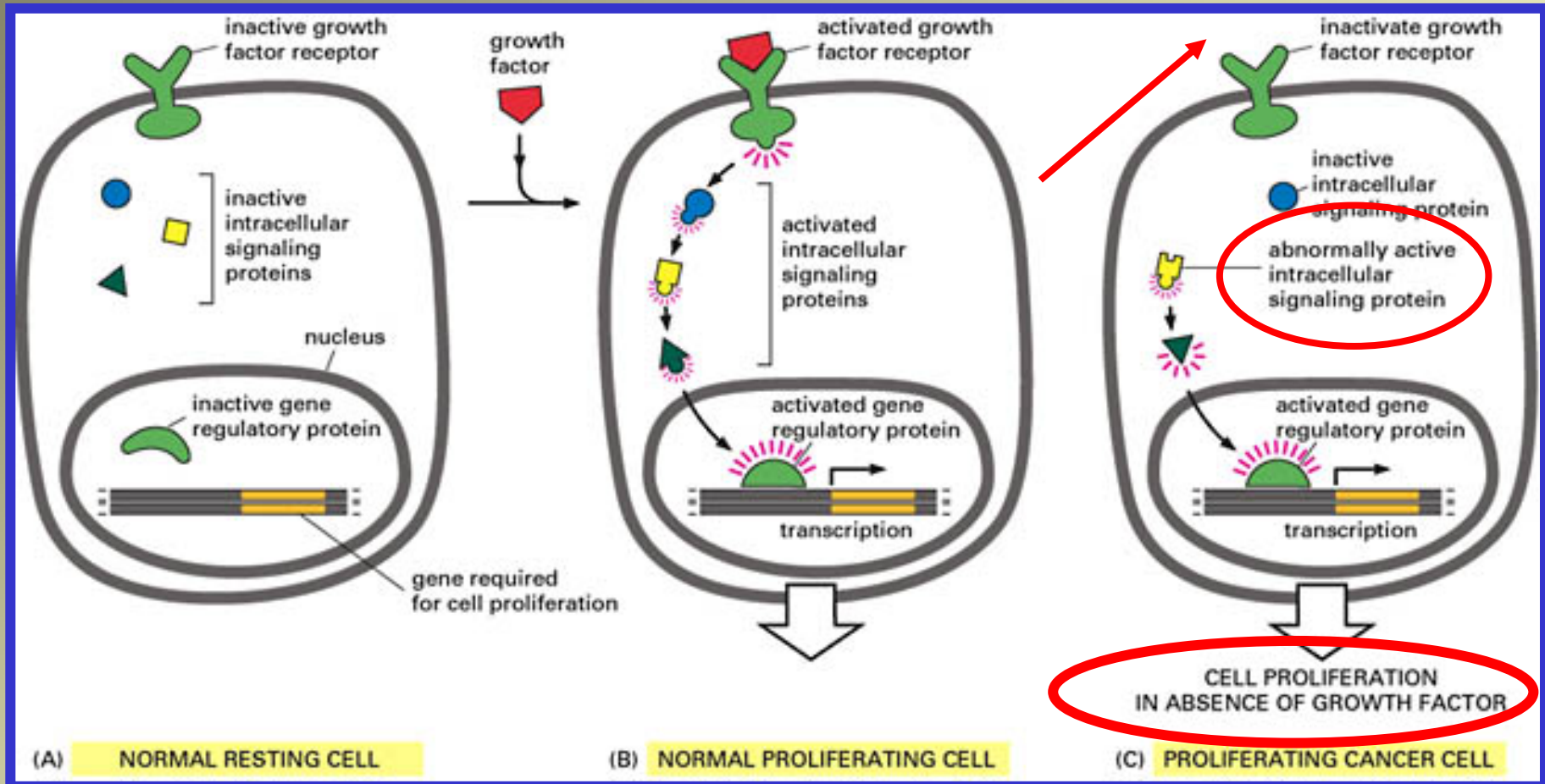
V normální buňce se signální dráha „zapíná“, když se růstový faktor naváže na receptor PM → aktivace RAS (RAS-GTP) → přenos signálu na další protein → inaktivace RAS (RAS-GDP) → vypnutí signální dráhy.

- Mutace proto-onkogenu Ras → onkogen Ras:

Mutovaný Ras-GTP neustále vysílá signál a aktivuje MAPKinásovou dráhu transkripce a proliferace i bez růstových faktorů ⇒ nekontrolovaná proliferace
„jako když se pokazí zvonek u dveří → zvonek neustále zvoní, aniž někdo u dveří zvoní“.

Poruchy signalizace u nádorové buňky

- Př.: Ras, Abl, Src-kódují proteiny signálních drah buňky.
- Ačkoliv je receptor inaktivní, mutovaný signální protein navozuje dělení nádorové buňky (vpravo) i v nepřítomnosti růstového faktoru.



Tumor-supresorové geny.

V nenádorové buňce kódují proteiny, které brzdí buněčný cyklus („molekulární brzdy“), a proteiny reparující DNA.

Jejich mutace vede k nekontrolované buněčné proliferaci, a k hromadění mutací v genomu.

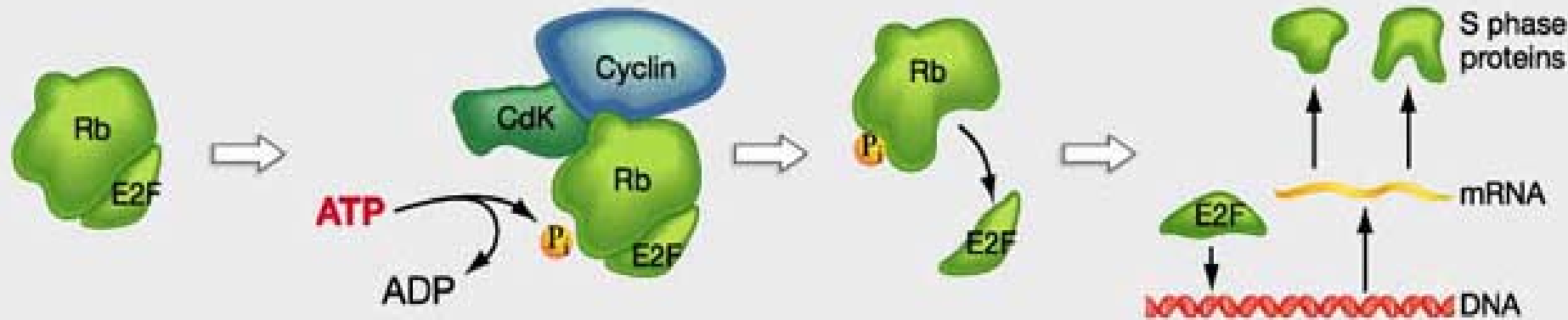
Mají recesivní charakter, k jejich expresi je třeba mutace obou alel. Mohou být zděděny (5-10%).

Př: Retinoblastomový gen *Rb* - mutace retinoblastomového genu ve zhoubném nádoru sítnice retinoblastomu, ale i v dalších lidských nádorech. Jeden z prvních objevených tumor-supresorových genů. Nemutovaný gen přítomen v buňkách a zapojen do regulace buněčného cyklu v tzv. restričním bodu v G1 fázi. Jiné příklady: geny *p53*, *APC*, *BRCA 1,2*, *NF...*

Kontrola bodu R („restrikční bod“) přechodu buňky z *G1* do *S* fáze (R-bod v *G1* fázi) je založena na regulaci vazebné aktivity proteinu p105 Rb (retinoblastomový protein).

Gen Rb byl poznán jako mutovaný v nádoru sítnice oka - retinoblastomu. Později zjištěno, že jeho nemutovaná forma přítomná v normální lidské buňce, kde protein pRb váže transkripční faktory E2F, které jsou nutné pro přechod buňky z *G1* do *S* fáze. Inaktivace pRb závisí na fosforylaci pomocí CDK4,6+cyklinů D. Fosforylace proteinu pRb změní jeho konformaci a tím se uvolní transkripční faktory E2F, které stimulují transkripci genů pro cykliny E,A a další geny, nutné pro postup buňky do *S*-fáze.

HOW ARE S PHASE PROTEINS ACTIVATED?



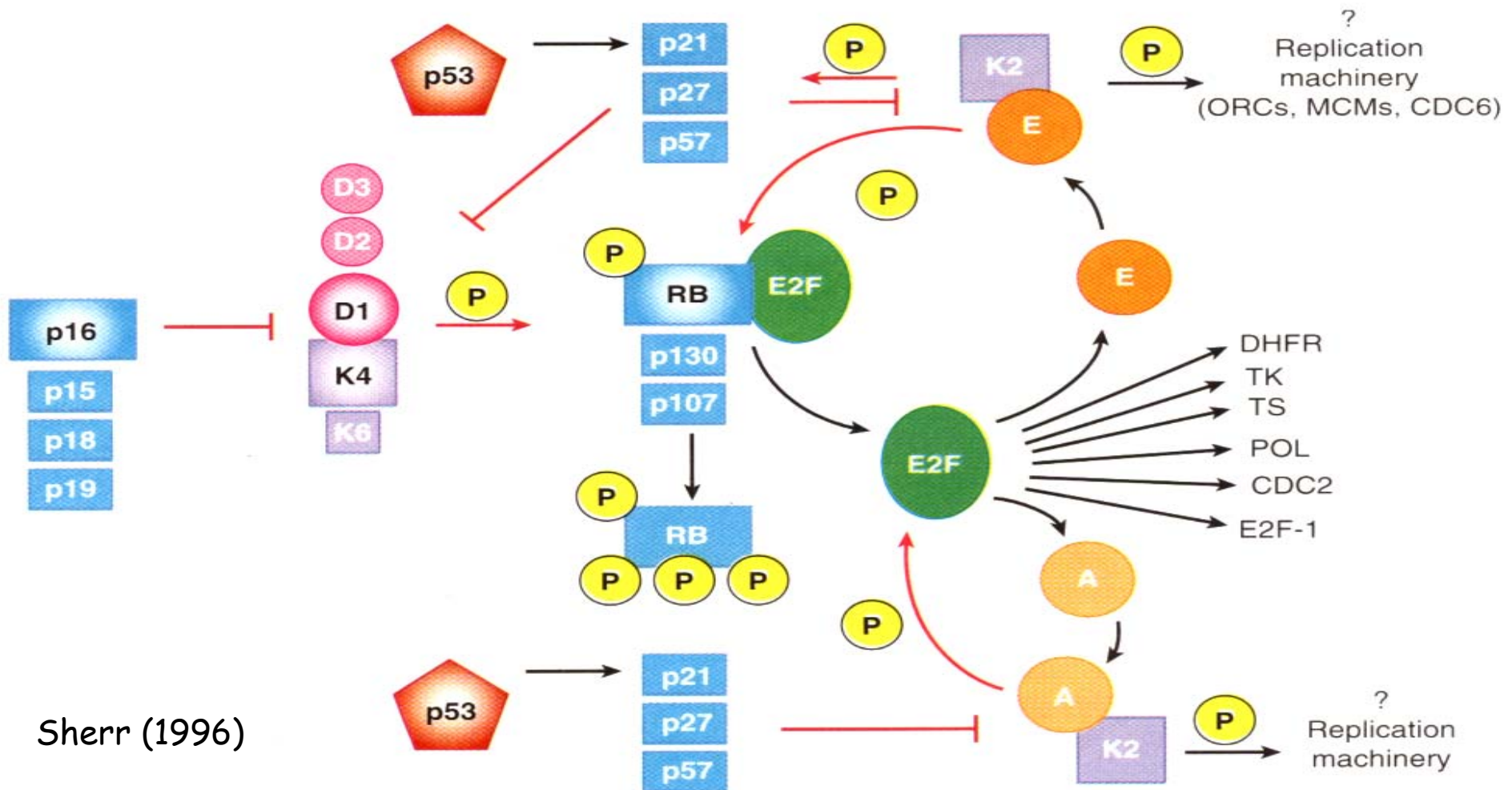
1. In normal cells, the Rb protein binds to E2F and shuts down the cell cycle.

2. If growth factors arrive and activate the cyclin-Cdk complex, Rb becomes phosphorylated.

3. E2F is released.

4. E2F stimulates the production of S phase proteins.

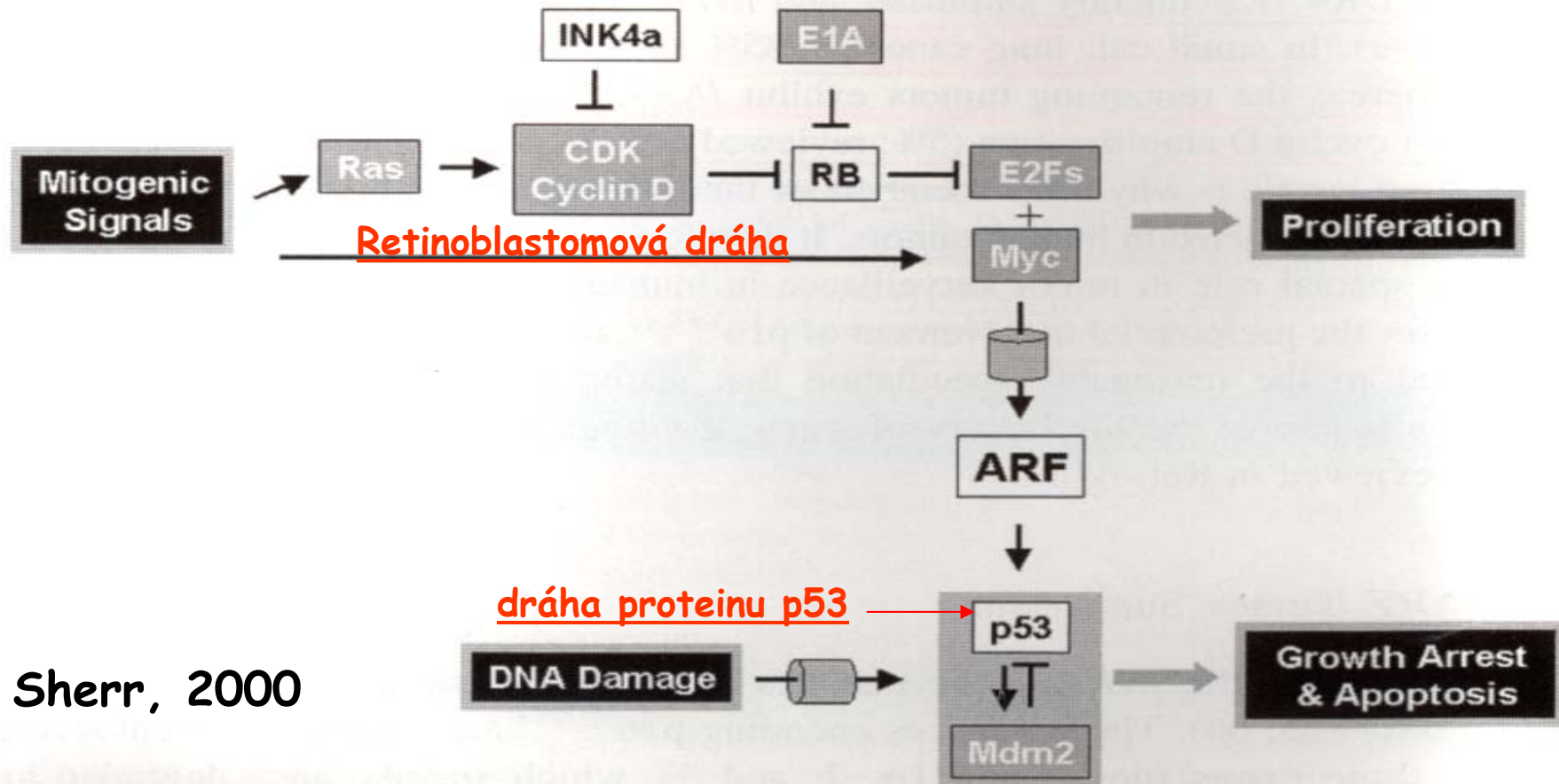
Ještě jednou G1 fáze buněčného cyklu a průchod do S fáze: cyklin D-CDK fosforylují pRb, tím se uvolní transkripční faktory E2F, které spustí expresi cyklinů E a A, a enzymů replikace DNA: DHFR, TK, DNA pol- α , CDC2, E2F. Cyklin E-CDK2 dokončí fosforylaci pRb \rightarrow výstup z restričního bodu G1 \rightarrow autonomní průběh, nezávislý na mitogenních faktorech.



Retinoblastomová dráha a dráha proteinu p53:

šedé čtverce \Rightarrow potenciální onkogeny (Ras, CyklinD, CDK4..),
bílé čtverce \Rightarrow tumorové supresory (INK4, Rb, p53..).

V lidských nádorových buňkách jsou mutace v těchto genech, které ruší molekulární „brzdy“ v buněčném cyklu a způsobují poruchy kontroly buněčného dělení.



- **Alfred G. Knudson (1971)** -autor **dvouzásahové hypotézy vzniku nádorů**, vysvětlující, proč vzácný oční nádor retiny se v dědičně postižených rodinách vyskytuje častěji, než nádor vzniklý náhodnou mutací u jedinců z dědičně nezatížených rodin.

U rodin s dědičnou predisposicí jedinci mají jednu alelu *Rb* genu mutovanou ve všech svých buňkách (jsou heterozygoti *Rb/rb*), mutace druhé alely (vznik *rb/rb*) během života u nich vyvolá retinoblastom.

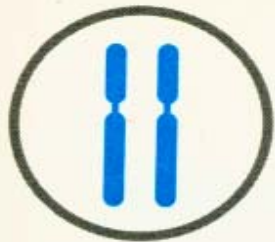
Naproti tomu u jedinců dědičně nezatížených (homozygotů *Rb/Rb*) mutace jedné alely chorobu nevyvolá (vznikne jen heterozygot *Rb/rb*) a ke vzniku nádoru musí nastat „druhý zásah“ působící mutaci i druhé alely homologního chromosomu (musí vzniknout homozygot recesivní s oběma nefunkčními alelami *rb/rb*).



•The child above has advanced retinoblastoma. The tumor is protruding from the left orbit, after removal of the eye approximately two months earlier.

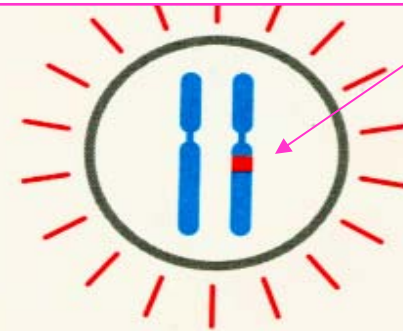
Proto-onkogen → onkogen:
dominantní mutace → hyperaktivní produkt

(A) overactivity mutation (gain of function)



normal cell

single mutation event
in proto-oncogene
creates oncogene



excessive
survival and
proliferation

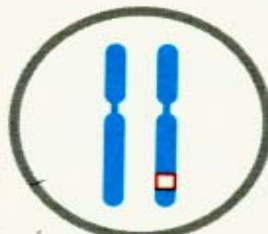
activating mutation
enables **oncogene** to
stimulate cell survival

(B) underactivity mutation (loss of function)



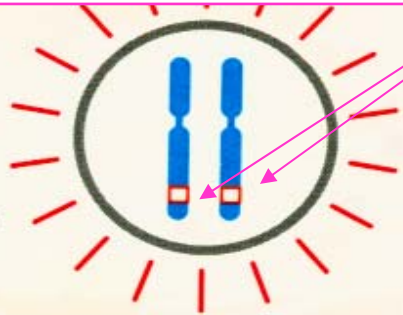
normal cell

mutation
event
inactivates
tumor
suppressor
gene



no effect of
mutation in one
gene copy

second
mutation
event
inactivates
second gene
copy

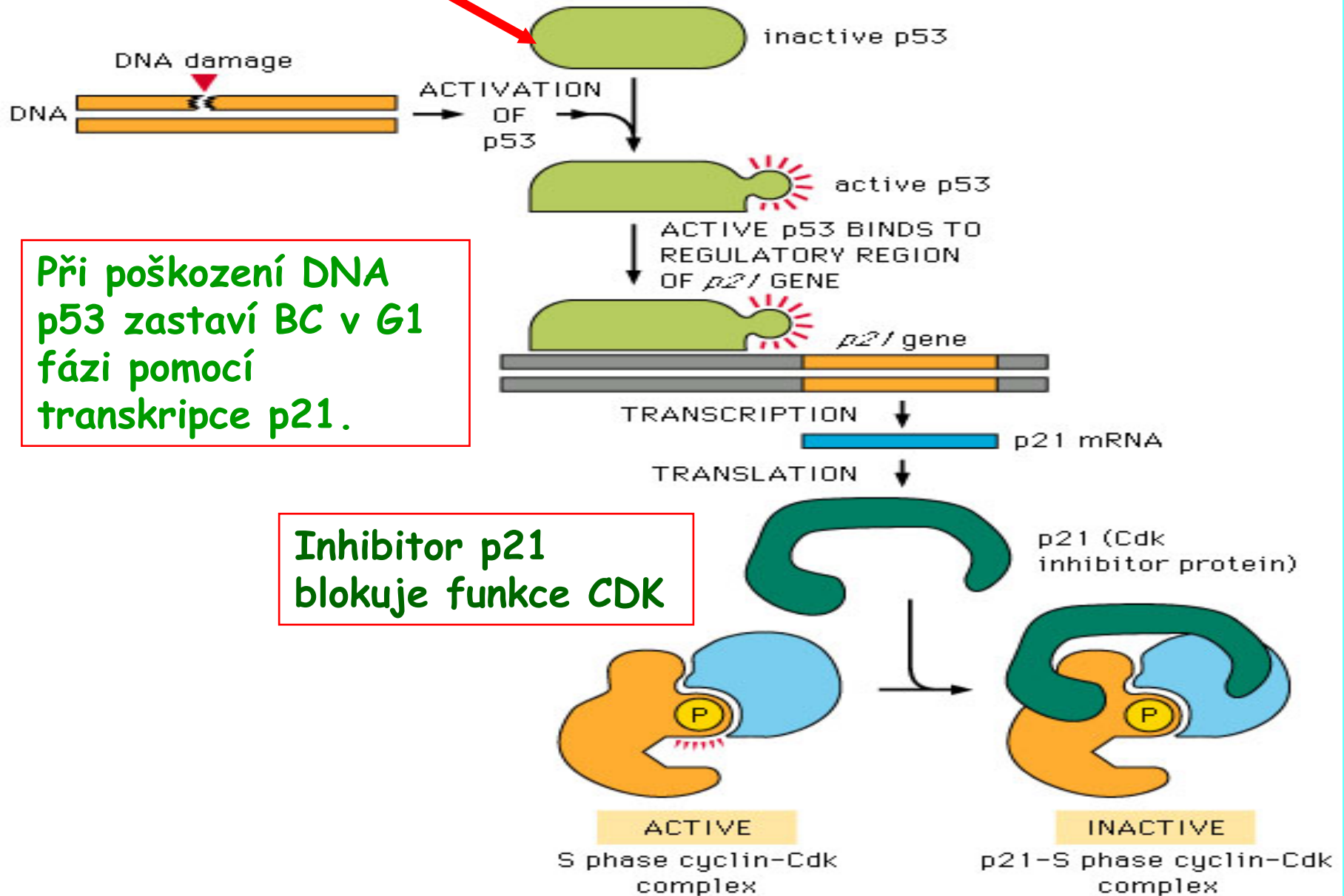


excessive
survival and
proliferation

two inactivating mutations
functionally eliminate the
tumor suppressor gene,
stimulating cell survival
and proliferation

Tumor-supresorový gen:
recesivní mutace → ztráta funkce

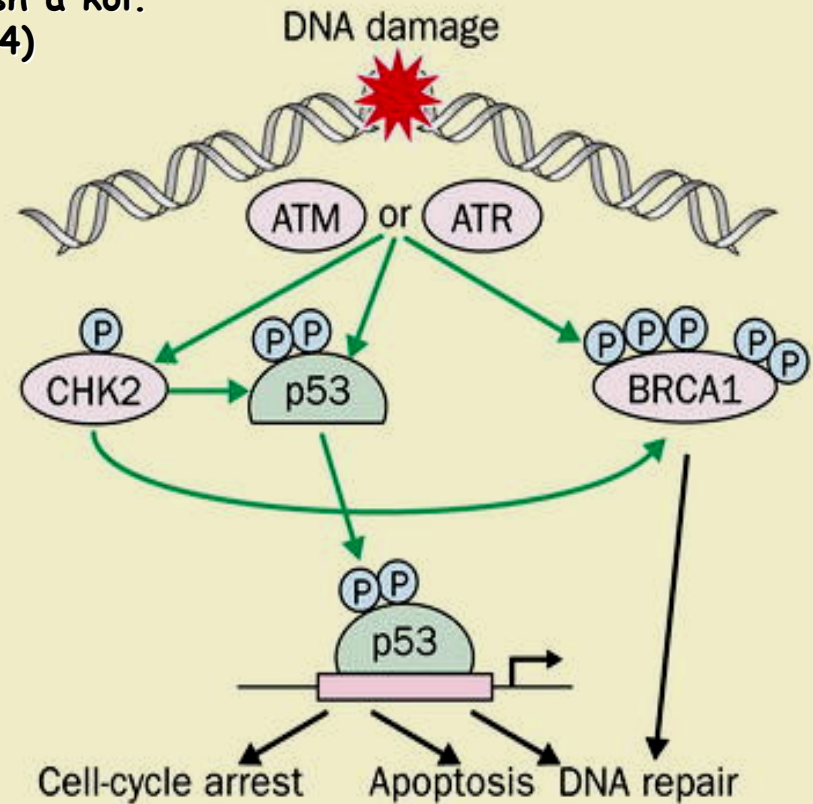
Protein p53 - „strážce genomu“



Další funkce p53:

- Poškození DNA detekují kiny **ATM/ATR** (od názvu choroby *Ataxia teleangiectasia* mutated).
- Tyto kiny aktivují:
- **CHK2** kinasu kontrolních drah poškození DNA, která fosforylací stabilizuje protein **p53**, který je důležitým faktorem při rozhodování o dalším osudu buňky
- a produkt genu **BRCA1** (Breast Cancer 1), aby mutace mohla být reparována.
- Po zástavě cyklu a reparaci buňka pokračuje v buněčném cyklu.
- Nelze-li reparovat, je navozena apoptosa.

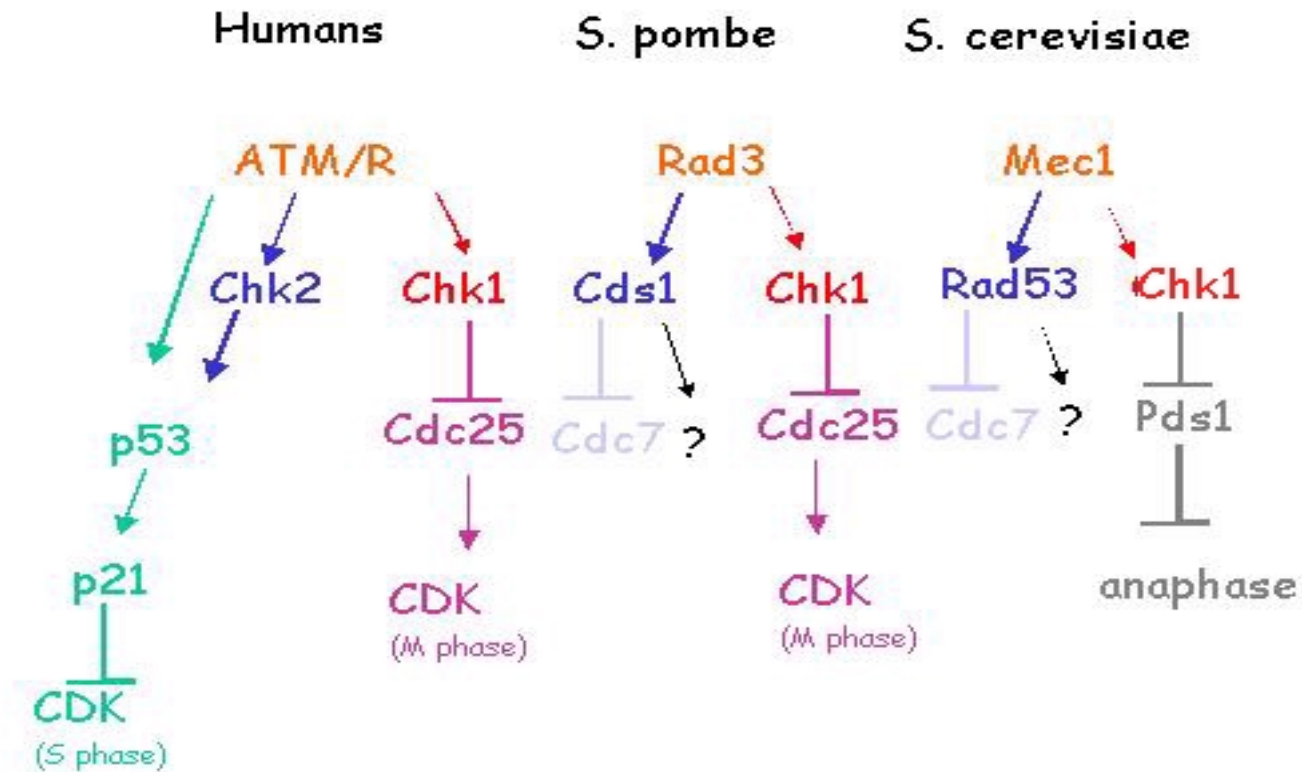
Lodish a kol.
(2004)



• Mnohostrannost p53 naznačuje, že jeho mutace je zdrojem řady poruch. Mutace p53 jsou nalézány u poloviny všech lidských nádorů (sarkomy, leukemie, karcinomy plic, mléčné žlázy, tlustého střeva).

Paralelní dráhy monitorující poškození DNA („checkpoint pathways“) u člověka a kvasinek v časně G1 a pozdní G2 fázi buněčného cyklu vykazují jisté homologie.

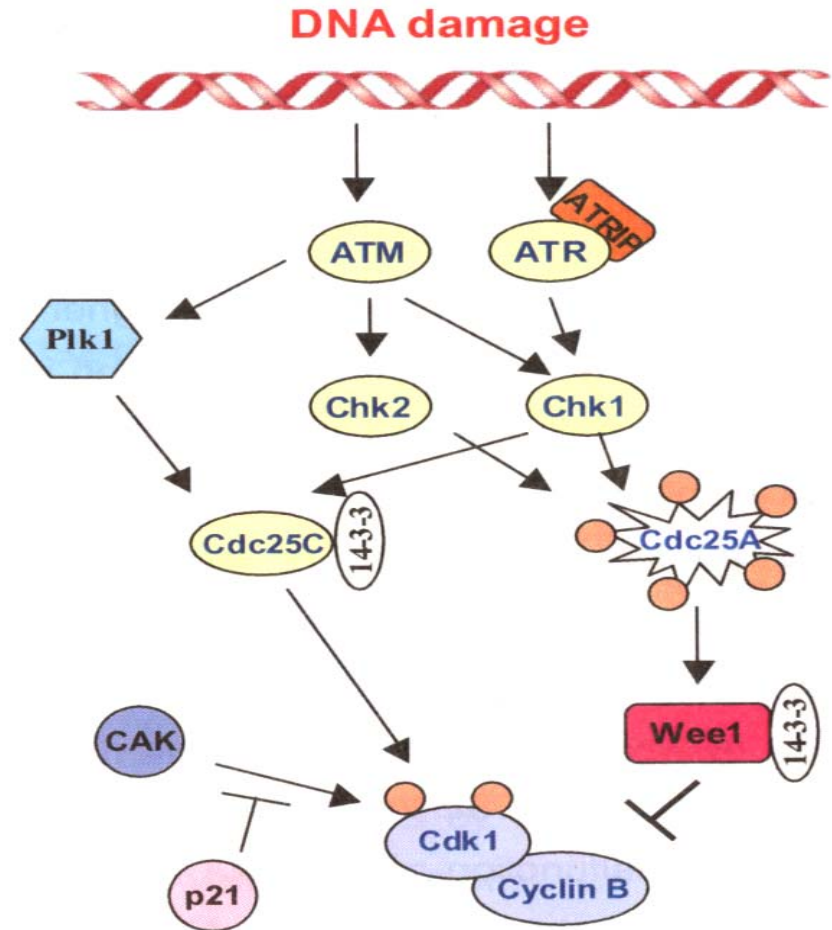
Parallel pathways in **early** and **late** S phase checkpoint response



Geny udržující stabilitu genomu.

- Produkty těchto genů se uplatňují v opravných mechanismech poškozené DNA. V případě poškození DNA zastavují buněčný cyklus a dávají buňce možnost opravy poruchy.
- Jejich mutace samy o sobě neposkytují buňce možnost nekontrolované proliferace, ale - zvyšují frekvence mutovaných onkogenů a tumor-supresorů.
- Patří sem např. dříve zmíněné geny kódující proteinkinasy *ATM*, *ATR*, *CHK1*, *CHK2* (*CHK*=„Checkpoint pathways Kinase“).

Mutace *CHK* nalezena v lidských nádorech (kolorektální karcinom) (Kastan a Bártek 2004).



Iliakis(2003)

Molecular organization of the G2 checkpoint.

Organizace kontrolního bodu G2 fáze.

Nádorové buňky versus normální buňky

Nádorové buňky:

- Aneuploidní
- Neomezená délka života
- Nekontrolovaný růst
- Redukovaná adheze k substrátu
- Žádná kontaktní inhibice
- Desorganizovaný růst, více vrstev
- Nediferencované buňky
- Abnormální jádra
- Neprodělávají apoptosu

Normální buňky:

- Diploidní
- Limitovaná délka života
- Kontrolovaný růst
- Adherence k substrátu
- Kontaktní inhibice růstu
- Vytvářejí jednu organizovanou vrstvu (monolayer)
- Diferencované buňky
- Normální jádra
- Prodělávají apoptosu

Vlastnosti nádorově transformovaných buněk.

- Snížená závislost na signálech pro růst, přežití a dělení (*mutace v genech signálních drah - např. Ras*).
- Neochota k sebevraždě apoptosou (např. *mutace p53, bcl-2, mdm2...*), „nesmrtelné“ buňky (*reaktivace telomeráz*).
- Neomezená proliferace (poruchy molekulárních brzd např. - *Rb, p53, p16-INK4, p21 ...*).
- Ztráta kontaktní inhibice (např. *mutace p27*).
- Genetická nestabilita (aneuploidie, zvýšená četnost genových mutací, snížená účinnost reparací), (poruchy „*checkpoint pathways*“ - např. *ATM, CHK2*).
- Abnormální invazivita (postrádají kadheriny, poruchy aktinového cytoskeletu) ...
- Proliferace, invase a metastázy v cizí tkáni (produkce aktivátoru plasminogenu).

Nádorová transformace buněk nastává při expresi mutovaných forem u těchto supin proteinů:

- 1) signální molekuly;
- 2) signální receptory;
- 3) intracelulární transducery (přenašeče signálů);
- 4) transkripční faktory;
- 5) apoptotické proteiny;
- 6) proteiny kontroly buněčného cyklu;
- 7) proteiny reparace DNA.

Děkuji za pozornost.

**Připomínky na adresu
mkopecka@med.muni.cz**