

Předmět: **GENOTOXICITA A KARCINOGENEZE**  
**SYLABUS**

**VZNIK A ROZVOJ NÁDOROVÉHO ONEMOCNĚNÍ**

**Genetické (genotoxické) a epigenetické (negenotoxické) aspekty vzniku a rozvoje nádorů**

***Fáze karcinogeneze***

Iničiační, podpůrná (promoční) a progresivní fáze, genetické a epigenetické faktory, karcinogeny a kokarcinogeny, antikarcinogeny

***Typy nádorů***

Nádory spontánní a indukované (onkogenní viry, chemické a fyzikální karcinogeny), nádory benigní a maligní, invaze, metastázy, klasifikace podle tkání.

**Molekulární základy vzniku a rozvoje nádorového onemocnění**

***Genetické mechanismy***

Mutace a mutageny, nádorově promoční faktory (exogenní a endogenní)  
Protoonkogeny, onkogeny, nádorově supresorové geny

***Transformace buněk***

Denzitně závislá inhibice růstu (kontaktní inhibice), odlišnosti normálních a transformovaných buněk, změny závislosti na pozitivních a negativních růstových faktorech, maligní transformace

***Imortalizace***

Význam telomer, telomerázy a dalších faktorů

***Negenotoxické (epigenetické) mechanismy***

Metylace DNA, acetylace histonů, změny exprese genů

***Změny v regulaci proliferace, diferenciace a apoptózy***

Změny v mechanismech přenosu (transdukce) signálů

Antiproliferační molekuly - jejich vztah k růstovým faktorům, receptorům a dalším součástem kaskády přenosu signálů.

Úloha buněčného cyklu a jeho změny v karcinogenezi

Rovnováha v buněčných populacích

Poruchy proliferace, diferenciace a apoptózy (apoptóza a nekróza)

### ***Patologické účinky cytokinů***

parakrinní a autokrinní regulace, poruchy pozitivních a negativních regulátorů, důsledky.

### ***Význam oxidativního metabolismu***

rovnováha oxido-redukčních dějů, aktivační a deaktivující enzymy, pro- a antioxidační systémy, oxidativní stres

Úloha oxidačních procesů v apoptóze

### ***Komunikace buněk***

Mimobuněčná, mezibuněčná a vnitrobuněčná komunikace, úloha mezerovitých spojení tzv. "gap junctions" (GJIC) v udržování tkáňové homeostázy, poruchy mezibuněčné komunikace u nádorových buněk, snižování počtu gap junctions, klonální množení iniciované buňky. Změny membránových vlastností, rozpoznávání a komunikace buněk, kadheriny, kateniny, integriny, konexiny.

### ***Metastázy***

Příčiny vzniku, metastatická kaskáda, kontakt buňka-buňka, buňka - mimobuněčná matrix, povrchové molekuly, adheze, imunitní systém

### ***Angiogeneze***

Význam, induktory a inhibitory angiogeneze

## **Vznik a rozvoj specifických typů nádorů (jejich genetické a epigenetické příčiny)**

### ***Poruchy krvetvorby - leukémie***

Chronická myeloidní l., myelodysplastický syndrom, akutní l., genetické poruchy, rozpojení procesu proliferace a diferenciace, poruchy apoptózy

### ***Nejčastější typy nádorů - kolorektální karcinomy, nádory prsu, prostaty, kůže***

Genetické a negenetické příčiny, prekancerózní stavy, etiologie, rozvoj, vnější faktory

### ***Endogenní karcinogeneze, hormonálně závislé nádory***

### ***Přirozené protinádorové obranné mechanismy***

Úloha imunitního systému, cytostatické a cytotoxické účinky monocytů a makrofágů, působení cytokinů a eikosanoidů

## **FAKTORY VNĚJŠÍHO PROSTŘEDÍ V PROCESU KARCINOGENEZE**

*Záření* - neionizující a ionizující

*Chemické karcinogeny* - polycyklické aromatické uhlovodíky (PAH), halogenované aromatické uhlovodíky (PCB, PCDD), peroxisomové proliferátory, xenobiotické lipidy, chlorované pesticidy, atd.

*Onkogenní viry a bakterie*

***Důsledky působení škodlivých faktorů vnějšího prostředí***

*Genotoxické vs. negenotoxické účinky (epigenetická toxicita)* - charakteristika

Poruchy homeostázy - modulace buněčné proliferace, diferenciaci a apoptózy - příčiny a důsledky, vztah ke karcinogenezi

*Mechanismy* - změny v reparaci DNA, specifické vnitrobuněčné receptory, působení reaktivních forem kyslíku – oxidativní stres, inhibice GJIC, ovlivnění mechanismů transdukce signálu, změny metylace DNA, ovlivnění exprese onkogenů a nádorově supresorových genů

***Nutriční aspekty karcinogeneze***

Karcinogeny v potravě, promoční a antipromoční působení složek potravy (vitamíny, antioxidanty)

Obsah a složení tuků v potravě, polynenasycené mastné kyseliny (n-6 a n-3 mastné kyseliny) a jejich metabolity jako mediátory a modulátory buněčných signálů, mechanismy působení, oxidativní metabolismus, lipidová peroxidace, imunitní systém, úloha eikosanoidů v karcinogenezi – interakce s cytokiny

**Současný systém detekce karcinogenních účinků látek**

Genotoxicita (mutagenní účinky) – testy mutagenity

Problémy detekce negenotoxicky působících karcinogenů. Dlouhodobé testy na laboratorních zvířatech, krátkodobé testy - testy buněčné transformace, změny proliferace a apoptózy v tkáních, změny GJIC, detekce specifických biomarkerů (aktivity specif. buněčných enzymů a receptorů).

Modely karcinogeneze – studium iniciačního a promočního působení látek - kůže, játra, ledviny, moč. měchýř, čichové orgány

Příčiny rozdílné citlivosti (organismů, tkání a buněk) k působení karcinogenních látek

Odhady rizik – otázky dávek, prahové hodnoty, křivky dávka-odpověď, působení směsí látek (aditivita, synergismus, antagonismus)

***Význam experimentální ekotoxikologie*** – perspektivy, propojení s experimentální a prediktivní onkologií

## **PREVENCE, DIAGNOSTIKA A LÉČBA NÁDOROVÝCH ONEMOCNĚNÍ**

Experimentální, epidemiologické a klinické studie, populační screening

Genetická predispozice, životní styl

**Terapie** - chirurgie, záření, chemoterapie, imunoterapie

### ***Prediktivní onkologie***

Typizace nádorů, diagnostické markery, prognostické vs. prediktivní faktory

Detekce specifických parametrů - cytokinetické parametry, molekulární a jiné markery

Moderní metody (průtoková a vysokorozlišovací cytometrie, laser scanning, molekulární a další metody, microarrays), stanovení proliferační aktivity, detekce apoptózy

Srovnání metod a interpretace naměřených parametrů

**Data management** - význam vícerozměrných matematických analýz, prediktivní markery

## **Doporučená literatura**

- B. Alberts et al.: Molecular Biology of the Cell, 4rd edition, Garland Science, New York 2002
- B. Alberts et al.: české vydání – Základy buněčné biologie, Espero Publishing, Ústí n./Labem 1998
- U.R. Folsch, K. Kochsiek, R.F. Schmidt: Patologická fyziologie, GRADA Publishing, Praha 2003
- Z. Adam, J. Vorlíček, J. Koptíková: Obecná onkologie a podpůrná léčba, GRADA Publishing, Praha 2003
- P. Klener: Klinická onkologie, Nakladatelství Galén a Karolinum UK Praha, 2002
- J. Krejsek, O. Kopecký: Klinická imunologie, NUCLEUS HK, 2004
- Z. Adam, J. Vorlíček, J. Vaníček a kol.: Diagnostické a léčebné postupy u maligních chorob, 2. vydání, GRADA Publishing, Praha 2004
- A. Rejthar, B. Vojtěšek: Obecná patologie nádorového růstu, GRADA Publishing, s. r. o., 2002
- S. Štípek a kol.: Antioxidanty a volné radikály ve zdraví a v nemoci, GRADA Publishing, s.r.o. 2000
- V. Hořejší, J. Bartůňková: Základy imunologie, 2. vydání, Triton, Praha 2002
- What you need to know about cancer, Scientific American - Special Issue, September 1996
- Carcinogenesis, Vol. 21, 2000 – celé číslo
- J. Hofmanová, A. Kozubík: Apoptóza a nádorová onemocnění - Přehled, Klinická onkologie 8, 5, 1995.
- A.Kozubík, J. Hofmanová: Význam nenasycených mastných kyselin v rozvoji a chemoprolaxi nádorů kolorekta - Přehled, Klinická onkologie 1999
- J. Hofmanová, M. Machala, A. Kozubík: Epigenetic mechanisms of carcinogenic effects of xenobiotics and *in vitro* methods of their detection. Review. Folia Biologica (Prague) 46, 165-173, 2000.

Doporučené speciální separáty

## **RAKOVINA**

**nejrozšířenější epiteliální nádory - karcinomy**

**řecky - karkinos -rak**

**onkos (krab)**

**cancer (angl.)**

**der Krebs (něm.)**

**ONKOLOGIE - věda o nádorech**

**Onkologická onemocnění - nádorová onemocnění**

**KARCINOGENEZE (kancerogeneze, onkogeneze,  
tumorigeneze)**

**vznik a rozvoj nádorového onemocnění**

Pojem „rakovina“ odpovídá více než sto formám této choroby. Téměř všechny tkáně v těle mohou podlehnout malignitě.

Asi 30 trilionů buněk v normálním zdravém organismu žije ve složitě vzájemně propojeném svazku, regulujíc vzájemně svou proliferaci. Vzájemná spolupráce buněk zajišťuje, že každá tkáň těla udržuje svou velikost a architekturu .

Nádorové buňky naopak ničí toto schema, stávají se hluchými k obvyklé kontrole proliferace a vytvářejí si svůj vlastní vnitřní program reprodukce.

Kromě toho mají ještě nebezpečnější vlastnost - schopnost migrovat a tvořit masu ve vzdálených částech těla. Nádory z takovýchto buněk se stávají čím dál agresivnější a stávají se letální, jestliže rozrušují tkáně a orgány důležité pro přežití organismu jako celku.

**Nádory vznikají z naší vlastní tkáně. Jsou obecně odvozeny od jedné buňky („kmenová buňka“), která se dramaticky mění po sérii genetických změn.**

**Zdravá buňka** má definovaný tvar a strukturu a prosperuje mezi uspořádanými okolními buňkami. Odpovídá na podněty ze svého okolí a dává vznik dceřinným buňkám jen tehdy, jestliže rovnováha stimulačních a inhibičních signálů z okolí upřednostní buněčné dělení.

Avšak v procesu replikace nebo dělení existuje stálá hrozba **vzniku mutací**, náhodných změn, které mohou tento regulační cyklus porušovat. Jedna mutace může způsobit, že buňka, která vypadá normálně a je méně citlivá na vnější signály se může příležitostně začít nekontrolovaně dělit.

Akumulace genetických změn může způsobit, že se dceřinná buňka stane zcela hluchou k externím signálům a vykazuje znaky malignity.

Buňka ztrácí přesný tvar a hranice, nereaguje na růstově inhibiční signály a získává schopnost nekontrolovaně se dělit.

Vznikající masa stlačuje a poškozují zdravou tkáň ve svém sousedství a může dále překonávat bariéry jednotlivých orgánů a metastázovat, což znamená, že kolonizuje vzdálené tkáně.



**MUTACE - dědičná genetická změna v buňce** (vzniká bodovou mutací, delecí nebo inzercí jednoho či více nukleotidů, amplifikací segmentů DNA, inverzí nebo získáním či ztrátou chromozomu, translokací). Základem je změna genetického materiálu v buňce nikoli změna v jeho expresi.

**EPIGENETICKÁ ZMĚNA - je změna v genové expresi beze změny v sekvenci DNA nebo genetickém obsahu buňky** – může být dědičná

**INICIOVANÁ BUŇKA, TRANSFORMOVANÁ BUŇKA - buňka se změněnou genetickou informací.** Vzniká spontánně nebo je indukována virem, chem. látkami nebo fyzikálními faktory. Má potenciální schopnost stát se nádorovou nebo maligní.

**BENIGNÍ NÁDOR - je lokální rozrůstání iniciované buňky.**

**MALIGNÍ NÁDOR - nádor se schopností vrůstat do tkání a rozšiřovat se do vzdálených míst.**

**MALIGNÍ TRANSFORMACE - přeměna buňky s normálními růstovými vlastnostmi na buňku maligní ztrácející schopnost adekvátně reagovat a odpovídat na růstové signály. Ztráta kontaktní inhibice růstu. Porušení negativní zpětné vazby. Snížená schopnost komunikace pomocí mezibuněčných spojení - gap junctions.**

**Termín NEOPLASIE (nový růst) se používá pro celý rozsah benigního i maligního chování buněk.**

## ZÁKLADNÍ KLASIFIKACE NÁDORŮ

Výchozí tkáň	Zralé benigní buňky (nezhoubné)	Nezralé maligní buňky (zhoubné)
<b>EPITEL</b> povrchový	papilom	karcinom
žlázový	adenom	adenokarcinom
<b>POJIVO</b> kolagenní	fibrom	fibrosarkom
tukové	lipom	liposarkom
chrupavka	chondrom	chondrosarkom
kost	osteom	osteosarkom
Sval	myom	myosarkom
Cévní	angiom	angiosarkom
<b>KRVETVORNÁ LYMFATICKÁ</b>	mononukleóza?	leukemie lymfom, myelom
<b>NERVOVÁ</b> centrální	gliom	glioblastom
periferní	ganglioneurom pargangliom	neuroblastom maligní paragangliom
<b>ZÁRODEČNÁ</b>	gonadoblastom	seminom dysgerminom
	teratom zralý	teratom nezralý

Vznik nádoru je **vícestupňovitý proces**, který je výsledkem složité **interakce genetických a negeneticky působících faktorů**

- 1) Indukce mutací - **fáze iniciace**
- 2) Preferovaný klonální růst iniciovaných preneoplastických buněk - **fáze podpůrná - promoční** – karcinom *in situ*
- 3) **Fáze konverze či transformace** – změna fenotypu, vznik maligního klonu
- 4) **Fáze progresu** – lokální rozrůstání nádoru, neschopnost odpovídat na regulační mechanismy, vzrůstající rychlost proliferace
- 5) Invazivita – šíření nádoru mimo prvotní ložisko - **vznik metastáz**

**Onemocnění vzniká v zásadě porušením homeostázy na úrovni buněk a buněčných populací**

## **INICIACE (initiation)**

### **změna genetického materiálu buňky - mutace**

ireverzibilně mění normální buňku v preneoplastickou

## **PROMOČNÍ STADIUM (promotion)**

### **indukce proliferace (klonální množení) iniciované buňky po působení tzv.**

**nádorově promočních podnětů** (regenerace po odstranění části buněčné populace nebo po smrti buněk, růstové signály, působení vnějších signálů - chem. a fyz. faktorů)

zpočátku reverzibilní, později ireverzibilní – přechod do maligní transformace

## **PROGRESE (progression)**

**akumulace dalších mutací + působení promočních faktorů, ztráta regulačních mechanismů**

**invazivita a vznik metastáz**

## **ZÁKLADNÍ ZNAKY NÁDOROVÉ POPULACE**

**ztráta kontaktní inhibice a kontroly růstu**

**ztráta schopnosti terminální diferenciac**

**ztráta schopnosti apoptózy**

**snížení nebo inhibice mezibuněčné komunikace**

## Ztráta kontaktní inhibice v buněčné kultuře

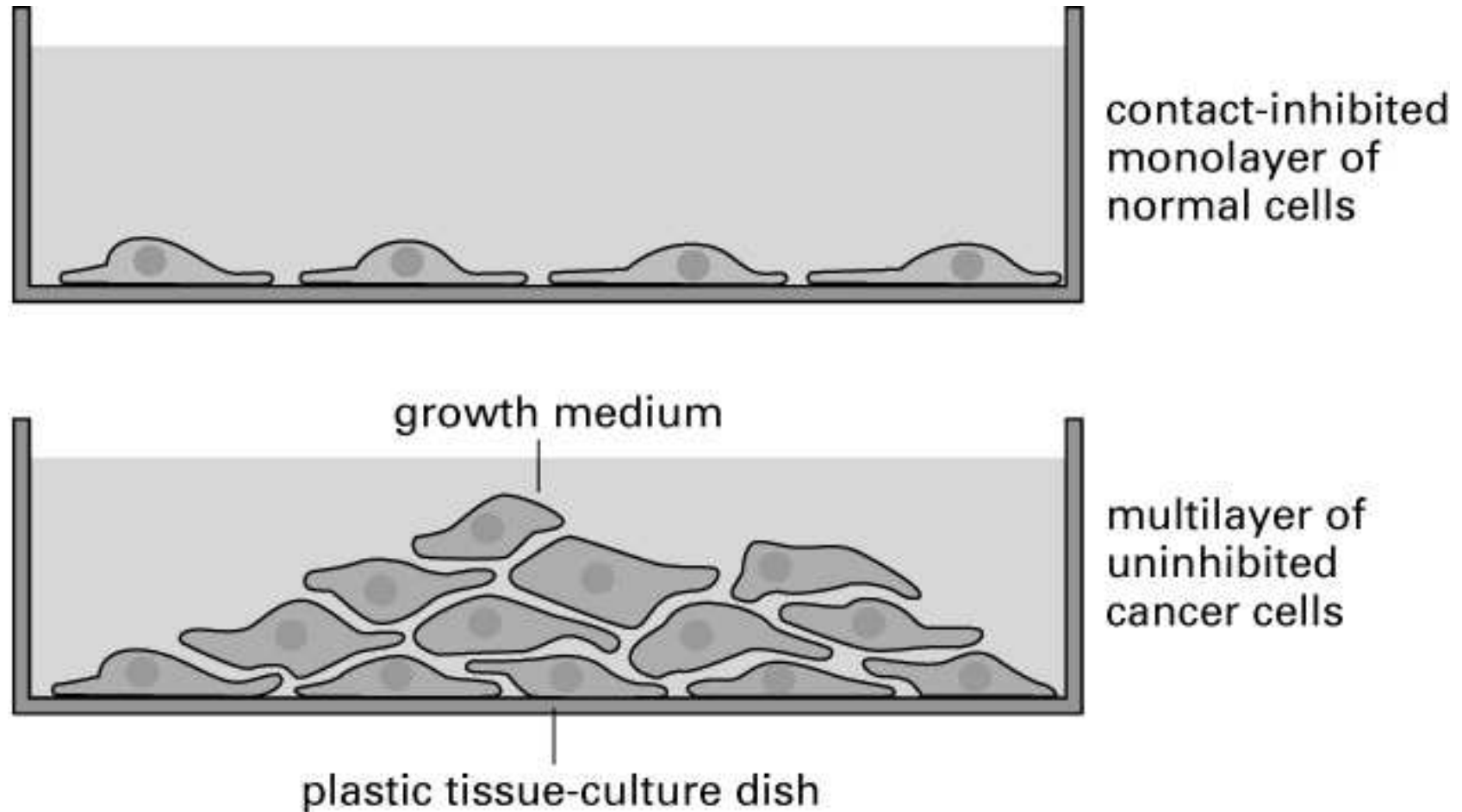
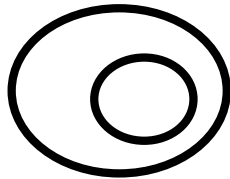


Figure 23–25. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.

**INICIACE**

MUTAGENY  
RADIACE  
VIRUSY....

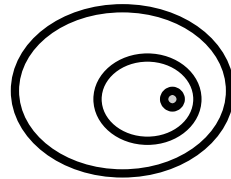
GENOTOXICITA



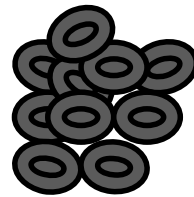
NORMÁLNÍ  
BUŇKA

**PROMOCE**

NEGENOTOXICKÉ  
KARCINOGENY



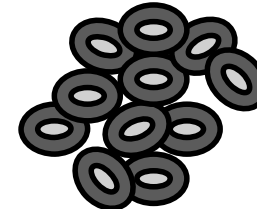
INICIOVANÁ  
BUŇKA



PRENEOPLASTICKÉ  
PORUCHY

**PROGRESE**

GENOTOXICKÉ  
+NEGENOTOXICKÉ  
FAKTORY



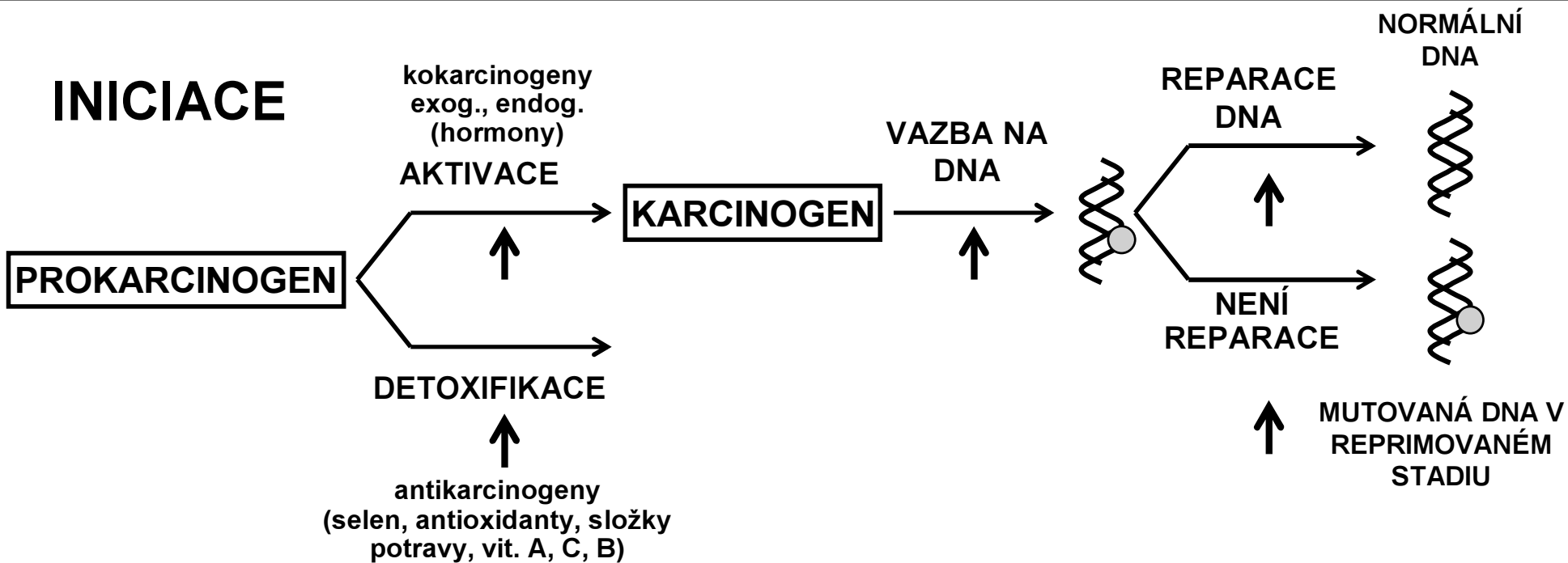
MALIGNÍ  
NÁDOR

INVAZE  
METASTÁZY

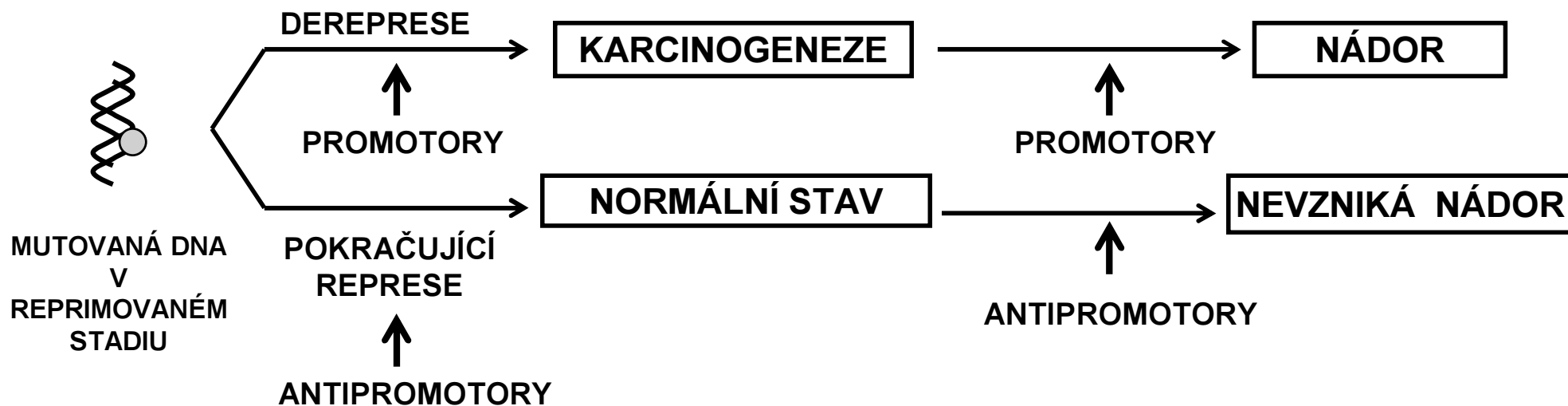
AKTIVACE PROTO-ONKOGENŮ  
INAKTIVACE NÁDOROVĚ SUPRESOR. GENŮ  
INAKTIVACE ANTIMETASTAT. GENŮ

**Mnohostupňový proces karcinogeneze**

# INICIACE



# PROMOCE



## Homeostáza ve tkáních

je udržována integrovaným systémem komunikačních mechanismů (mimo-, vnitro- a mezibuněčných) a reguluje chování buněk především s ohledem na schopnost proliferace, diferenciaci, adaptivní odpovědi a apoptózy.

Iniciované preneoplastické buňky jsou udržovány v latentním stavu v důsledku působení těchto "přirozených" regulačních mechanismů.

V podpůrné (promoční) fázi rozvoje nádorů se uplatňují látky působící negenotoxickými (nebo epigenetickými) mechanismy, tzv. nádorové promotory, které způsobují změny chování buněk v důsledku deregulace zmíněných procesů.

Zásahy, které vedou ke změnám v expresi genů a k poruchám homeostázy se odehrávají v buňce na různých úrovních a různými mechanismy.



# Způsoby promoce iniciované buňky

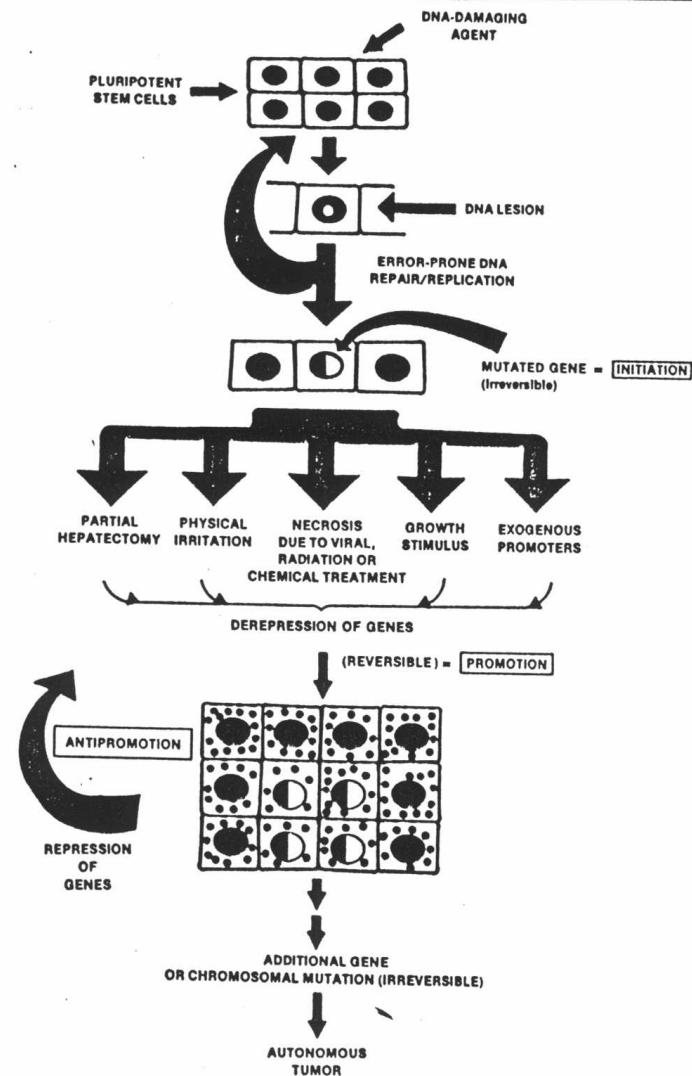


FIG. 1. Multiple modes by which initiated cells can be promoted. The concept of promotion is shown as a process that allows cells with a specific carcinogen-induced mutation to multiply, enabling them either to reach a "critical mass" and become resistant to the antiproliferative influences of normal cells or to increase the chance that one of these mutated cells would accumulate a second mutation. [From Ref. (93) with permission from Churchill Livingstone Medical Journal.]

## BIOLOGICKÉ CHARAKTERISTIKY STÁDIÍ KARCINOGENEZE

### **INICIACE**

Genotoxický děj (mutace)

Změna v genetickém materiálu (nukleotidy, chromozómy)

Ireverzibilní změna

Vznik preneoplastické buňky

Vyazuje dávkově závislé vlastnosti

Možný "spontánní vznik iniciované buňky"

Je nutné buněčné dělení pro "fixaci" mutace

Při dávkové závislosti neexistuje práh

### **PROMOCE**

Negenotoxické (epigenetické) děje

Změny v genové expresi

Reverzibilní změny

Selektivní klonální expanze preneoplastické bun. populace

Závislá na konstatní expozici látkou s promočními účinky

Vyazuje dávkově závislé vlastnosti

Je zjevný práh

### **PROGRESE**

Genotoxické i negenotoxické děje

Změny karyotypu a genetická nestabilita

Ireverzibilní změna

Tvorba neoplastických útvarů (adenomy a karcinomy)

Změny podporující přechod preneoplastických buněk v neoplastické

Autonomie nádorové populace

Vznik metastáz

# MUTACE

definována jako kvalitativní nebo kvantitativní změna v genetické informaci obsažené v DNA.

Je považována za ireverzibilní změnu a může být indukována viry, fyzikálními nebo chemickými faktory.

Mutace mohou vznikat na úrovni genů nebo chromozómů. Jeden specifický gen může být změněn přidáním, ztrátou nebo záměnou jedné baze.

Protein kódovaný tímto genem pak může být změněn s ohledem na strukturu a funkci.

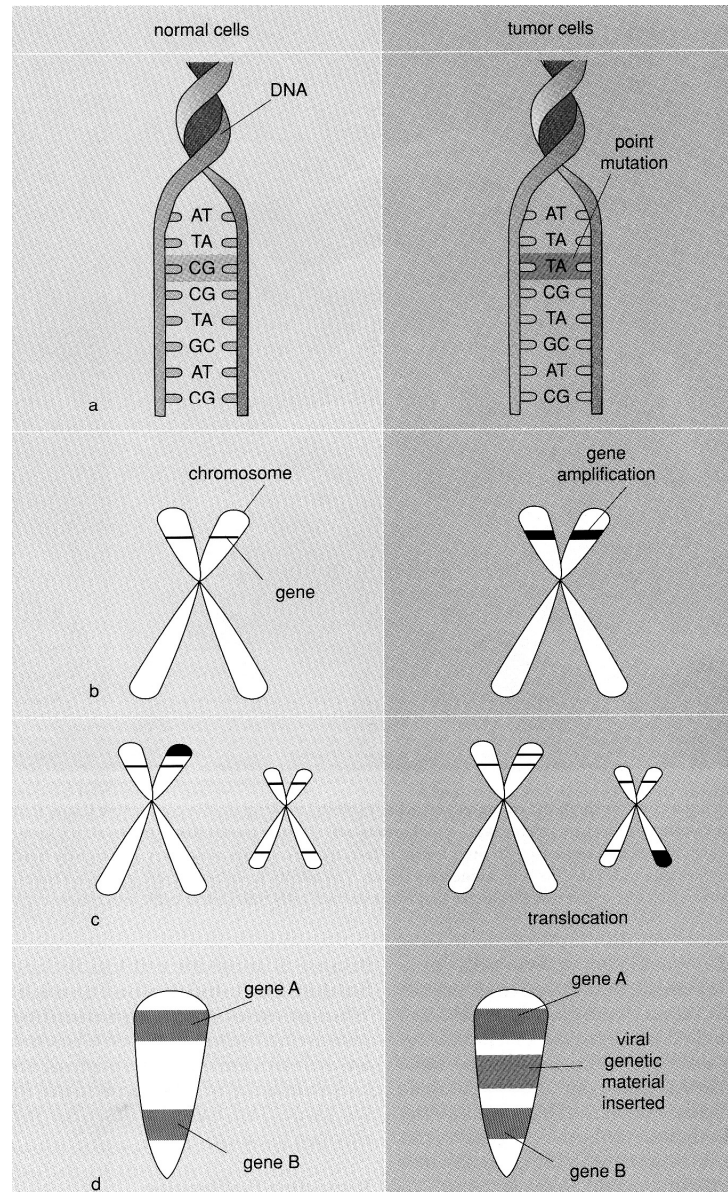
Jestliže mutace zahrnuje změnu v počtu chromozómů v buňce (nondisjunkce, polyploidizace), tak potom, i když jednotlivé geny jsou normální, jejich počet může narušit jejich funkci.

Změny v uspořádání chromozómů způsobené delecí nebo translokací části jiných chromozómů také mohou způsobit jak mutace genů tak abnormální expresi genů umístěných na takovémto chromozómu.

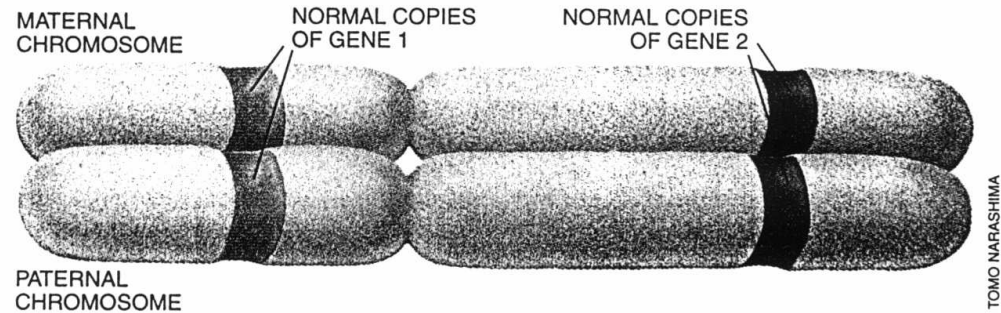
**Dědičné mutace** (Xeroderma pigmentosum, Wilmsův tumor, albinismus atd.) mohou předurčovat jedince k určitým typům nádorů.

**Fyzikální a chemické faktory**, které působí jako mutageny též přispívají k nádorovému procesu jako iniciátory nebo progresory.

# Genetické změny a disorganizace chromosomů v nádorových buňkách

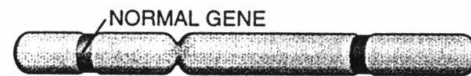
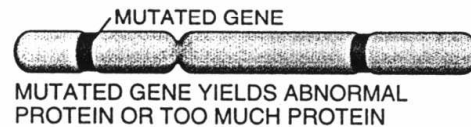


# Geny se dědí v odpovídajících párech



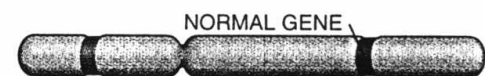
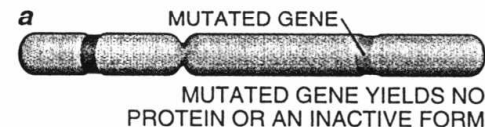
TOMO NARASHIMA

## ACTIVATING MUTATIONS



Cell proliferates excessively

## INACTIVATING MUTATIONS



HEALTHY GENE YIELDS NORMAL PROTEIN IN NORMAL AMOUNTS

Cell continues to function properly



Cell proliferates excessively

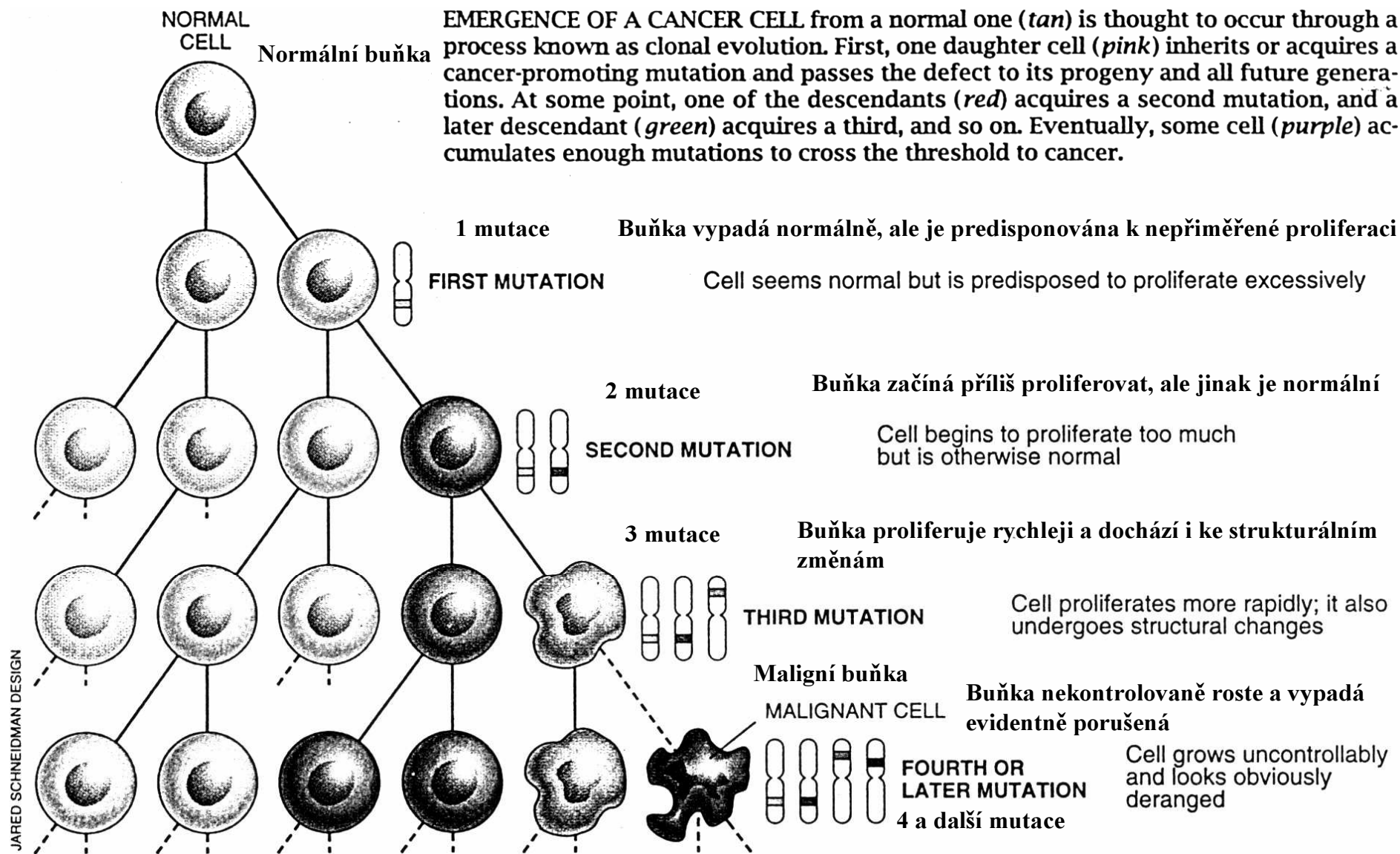
JARED SCHNEIDMAN DESIGN

GENES ARE INHERITED IN MATCHING PAIRS—one from the mother and one from the father (*top*). Sometimes mutation of a single copy pushes a cell toward cancer (*left*)—such as when it leads to production of a protein that activates excessive cell division. (Oncogenic mutations fall into that category.) Other times both copies must be altered—such as when a gene coding for a protein that stalls cell division is inactivated (*right*). If only one copy of such a gene is affected (*a*), the other copy can still generate the needed protein. But if both copies are hobbled (*b*), an important brake on tumor development is lost.

Mateřský a otcovský chromozóm nesou každý jednu normální kopii příslušného genu

- Aktivační mutace – mutovaný gen produkuje protein aktivující bun. proliferaci, stačí mutace v jedné kopii genu, dominantní
- Inaktivační mutace – mutovaný gen neprodukuje protein zastavující bun. proliferaci nebo produkuje jeho inaktivní formu. K mutaci musí dojít u obou kopií genu, recesivní

# Vznik nádorové buňky – klonální evoluce



# VÝZNAM MUTACÍ U NÁDOROVÝCH ONEMOCNĚNÍ

Normální frekvence mutací  $10^{-7}$ -  $10^{-8}$  /nukleotid/bun. dělení.

Zvýšená frekvence mutací podporuje karcinogenezi.

Mutace jsou nejen znakem nádorů, ale jsou také zásadní pro jejich vývoj.

**Genom nádorových buněk je nestabilní** a tato nestabilita vyúsťuje v kaskádu mutací, z nichž některé umožňují nádorovým buňkám obejít regulační procesy, které kontrolují lokalizaci buňky, její dělení, adaptaci a smrt.

**Genetická nestabilita** je manifestována velkou **heterogenitou buněk** v každém nádoru.

Dva hlavní mechanismy vzniku mutací v nádorových buňkách:

- ▶ deficit v reparaci DNA (kopírování nereparovaných poškození v DNA nebo chyby během syntézy DNA)
- ▶ deficit v rozdělování chromozómů při buněčném dělení

V buněčné DNA dochází ke stálému poškozování (environmentálními i endogenními zdroji) a k resyntéze. Mnoho z takto působících látek jsou mutageny a řada z nich i karcinogeny.

Poškození DNA chemikáliemi spadá do dvou kategorií:

- ▶ rozsáhlé adukty reparované excisí (vystřihnutím) nukleotidů
- ▶ malé změny vznikající např. po alkylačních činidlech, která přidávají metyl- a etylskupiny do nukleotidů, a ty jsou pak reparovány excisní reparací bází.

Další zdroje poškození DNA:

- ▶ přírodní látky v potravě
- ▶ buněčné metabolické procesy (reaktivní kyslíkové produkty-ROS)

Vzhledem k vysoké frekvenci poškození je pravděpodobné, že významná část poškození unikne reparaci a produkuje mutace během replikace této nereparované DNA polymerázami.

Mutace mohou vznikat též chybnou inkorporací nukleotidů DNA polymerázami při kopírování nepoškozeného templátu DNA, během replikace nebo reparační syntézy.

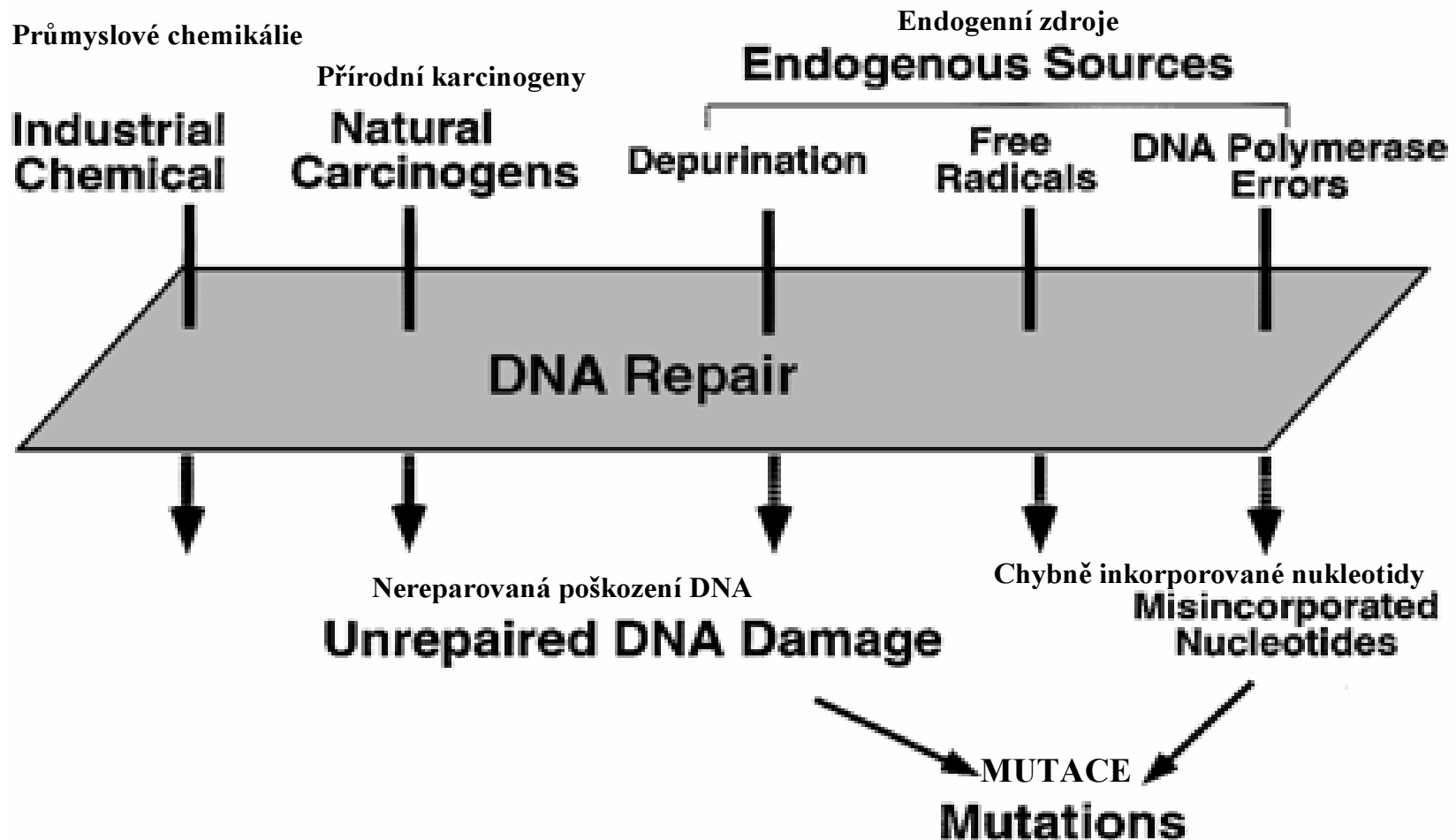
**Nukleotidové sekvence v buněčné DNA jsou udržovány v homeostatické rovnováze, kdy vzrůst poškození DNA nebo snížení reparace vedou ke zvýšené frekvenci mutací.**



## Faktory vedoucí k akumulaci mutací v nádorových buňkách

Mutace vznikají poškozením DNA a poruchami v reparačních mechanismech, čímž je narušena dynamická rovnováha mezi poškozením a reparací DNA.

# Mutagenesis Homeostasis



Ke genetické nestabilitě přispívají dva překrývající se mechanismy :

- ▶ nádorové buňky vykazují mutovaný fenotyp založený na vzrůstajícím počtu chyb v syntéze DNA během replikace. Tyto chyby vznikají v důsledku mutací
  - v DNA polymerázách, takže vnáší chyby
  - v DNA reparačních proteinech, které jsou potom defektní
- ▶ akumulace mutací založená na postupných vlnách klonální selekce.

### **Buněčný cyklus a apoptóza**

V průběhu **buněčného cyklu** existuje několik **kontrolních bodů**, kde je monitorována reparace poškození před vstupem do následující fáze. Při aktivaci se v těchto bodech cyklus přechodně zastavuje, aby mohla být poškození reparována. Eliminace těchto kontrolních bodů (např. mutace v p53, pRb) vede k vývoji mutovaného fenotypu.

V případě vzniku nereparovatelného poškození se normálně spouští **apoptóza**, která zabrání rozšíření mutací. Mutace, které zpožďují nebo zabraňují apoptóze tak podporují přežití geneticky nestabilních maligních buněk.

## Mikrosatelity

Velké množství mutací (až 100 000 např. u nádoru kolonu) se nachází v tzv. **mikrosatelitech** - repetitivních (opakovaných) sekvencích mezi geny. Repetitivní sekvence jsou i uvnitř genů a jsou u nádorových buněk zkracovány nebo prodlužovány s vysokou frekvencí. Tak dochází patrně k inaktivaci nádorově supresorových genů během rozvoje nádorů. Na nestabilitě mikrosatelitů se ve velké míře podílejí ROS, takže se uvažuje o využití látek působících jako antioxidanta.

Nádory vykazující nestabilitu mikrosatelitů obsahují často změny v délce repetit. sekvencí uvnitř řady genů spojených s nádory jako je APC, spec. růstové faktory-IGF, TGF-beta, metastatické geny-hMSH3, hMSH6. Téměř všechny nádory prsu a vaječníků studované s využitím srovnávací genomové hybridizace obsahují řadu změn v počtu genových kopií.

## **Genetická nestabilita nádorových buněk se projevuje** na úrovni

▶ **nukleotidů - bodové mutace**

▶ **celých chromozómů** - translokace, delece, amplifikace a aneuploidie.

Nestabilita vede k mutantnímu fenotypu prostřednictvím změněné exprese proteinů, funkcí nebo efektem genové dávky.

**Aneuploidie** - změna v počtu chromozómů - vlastnost řady nádorů. Může vzniknout fragmentací chromozómů, translokací, amplifikací nebo nondisjunkcí. Progresivní růst aneuploidie je raným počátečním dějem vedoucím ke genet. nestabilitě a je nezávislý na akumulaci jiných typů mutací.

Obecně existuje **pozitivní korelace mezi počtem chromozomálních změn v nádoru a maligním potenciálem tohoto nádorového onemocnění.**

Existují tetraploidní mezistupně po **defektní mitóze** nebo **endoreduplikaci**. Po přechodné zástavě mitózy v přítomnosti poškození vřeténka, jsou některé nádorové buňky (zejména buňky, které postrádají funkční produkty genů kontrolujících přechod G1/S fáze jako jsou p53, pRb, p16, p21 i buňky overexprimující myc) schopny obnovit bun. cyklus vstupem do dalšího kola syntézy DNA, což vede k endoreduplikaci.

## **Dva základní mechanismy vzniku genetické nestability:**

▶ mechanismus zahrnující mutace v genech pro opravu nesprávných spojení DNA („mismatch repair“) a manifestují se nestabilitou mikrosatelitů.

Nutná mutace v obou alelách – recesivní charakter.

▶ mutace v genech pro segregaci chromozómů manifestující se fragmentací chromozómů nebo duplikací či delecí celých chromozómů.

Stačí pouze jedna mutace, tj. fenotyp nestability chromozómů má dominantní charakter.

S růstem počtu mutací přispívá ke genetické nestabilitě **jev klonální selektivity**.

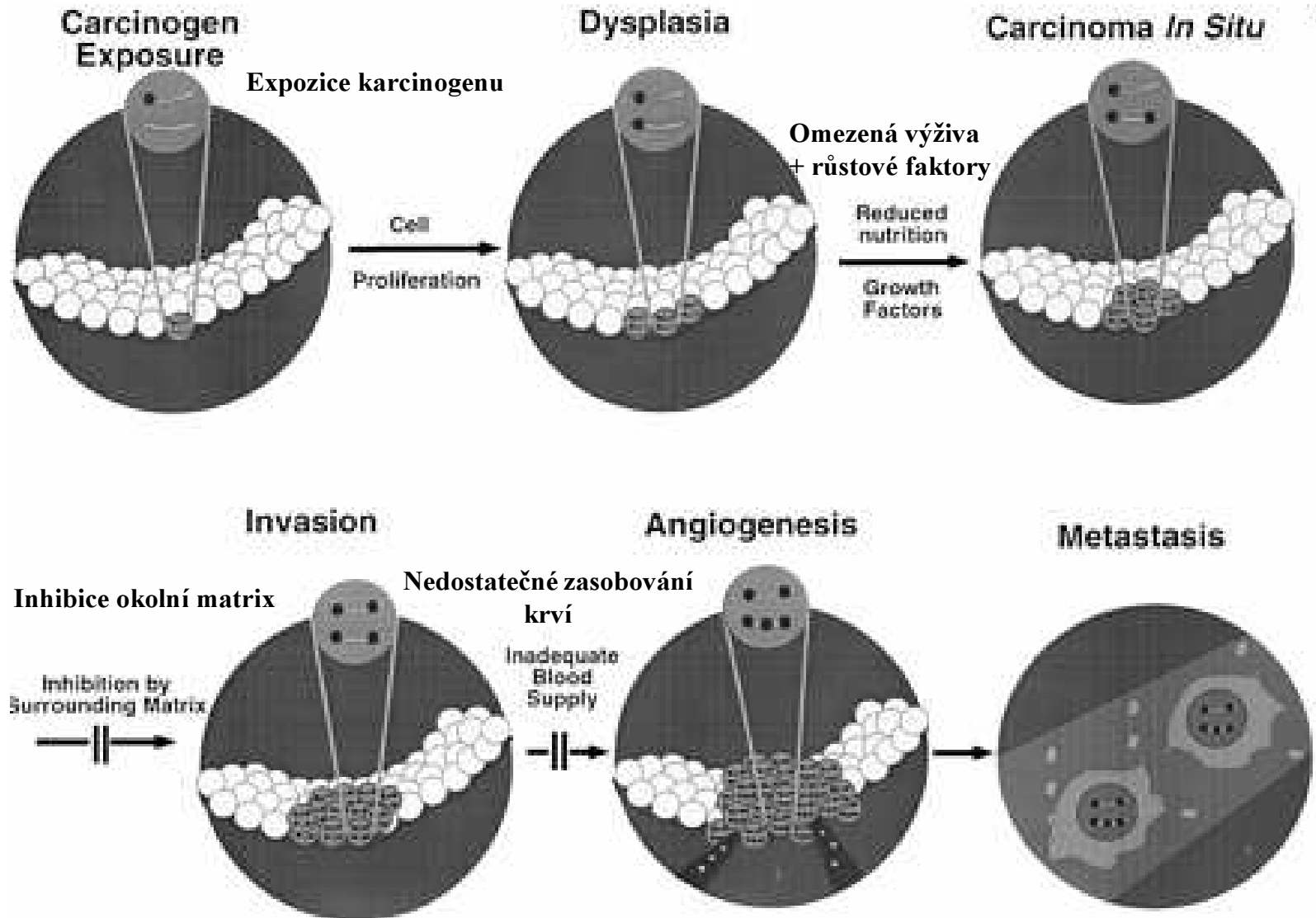
Překážky omezující růst nádorů:

- ▶ vliv okolních tkání
- ▶ omezená výživa a přístup kyslíku
- ▶ potřeba růstových faktorů
- ▶ nedostatečné zásobování krví atd.

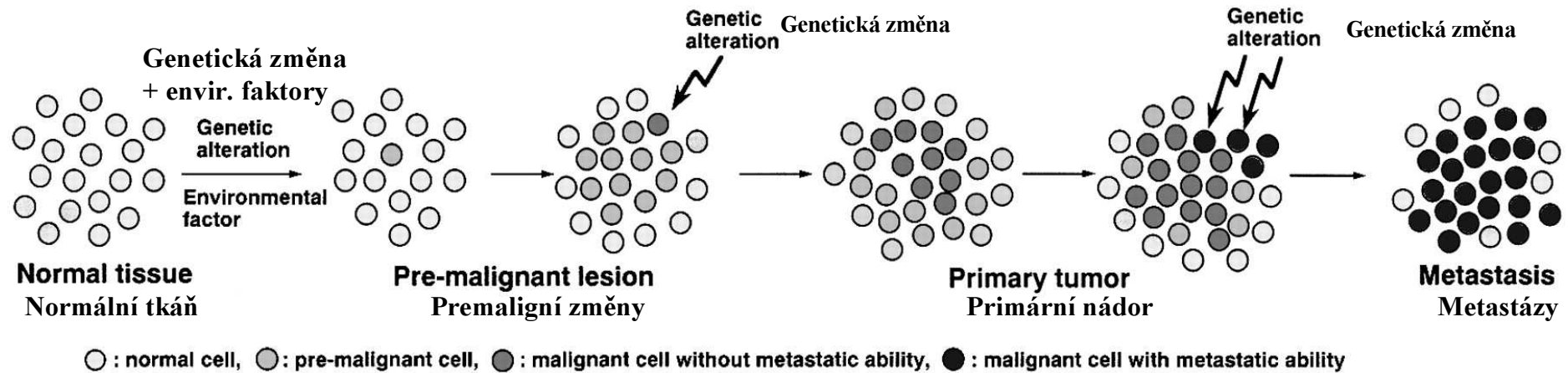
Každá z těchto překážek může být překonána v důsledku mutací, které poskytují růstovou výhodu a ustanovují novou klonální populaci.

Z každým kolem selekce dochází také ke vzniku dalších mutací.

Vývoj nádoru založený na selekci mutovaného fenotypu. Jen málo mutovaných buněk překonává bariéry dalšího růstu. V každém dalším kole selekce dochází k progresivnímu obohacení o mutace v tzv. mutátorových genech nutných pro udržení genetické stability.

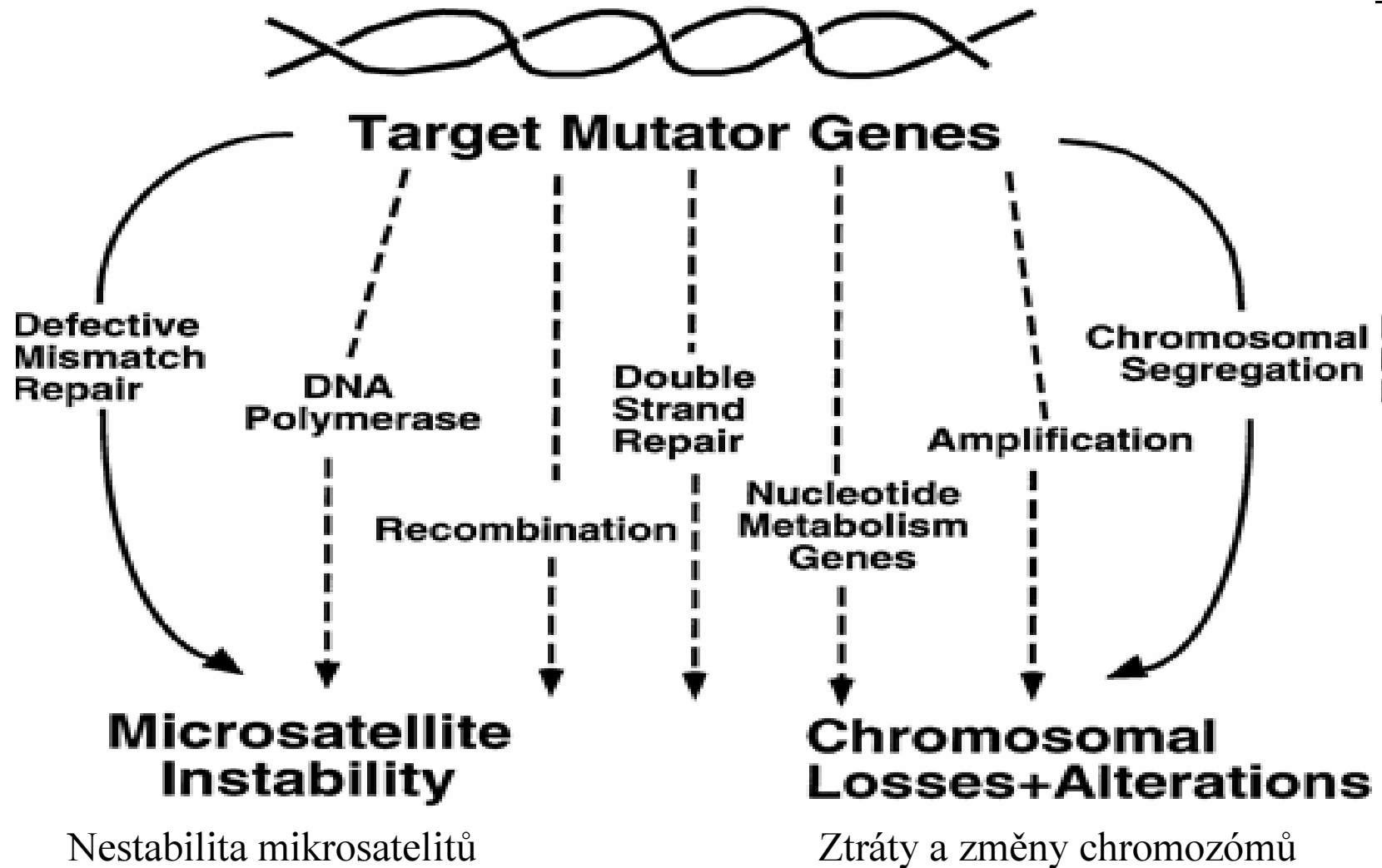


# Postupná maligní progrese nádoru spojená s akumulací genetických změn v buňkách





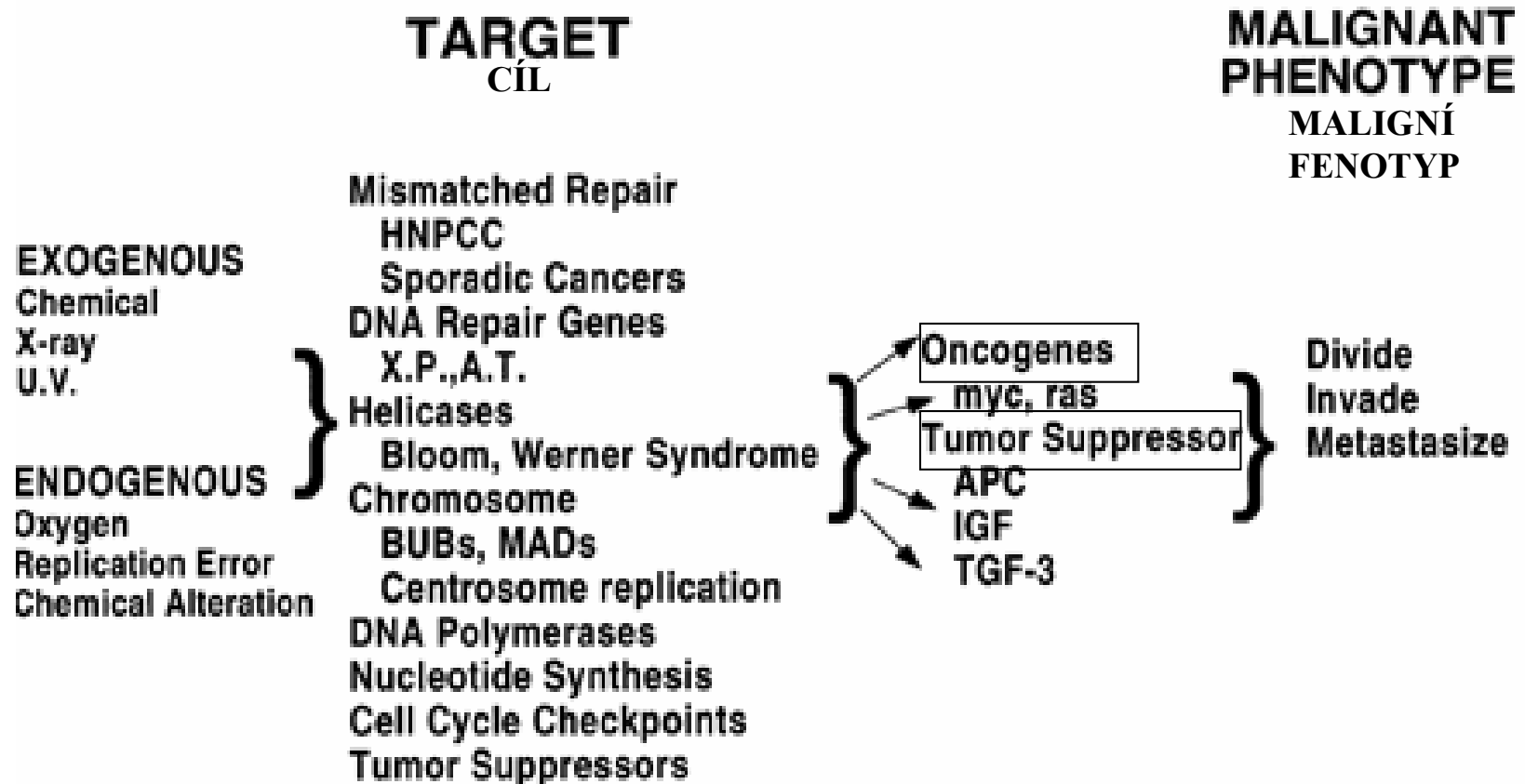
**Různé dráhy vedoucí ke vzniku  
mutovaného fenotypu nádorové buňky  
cílové mutátorové geny**



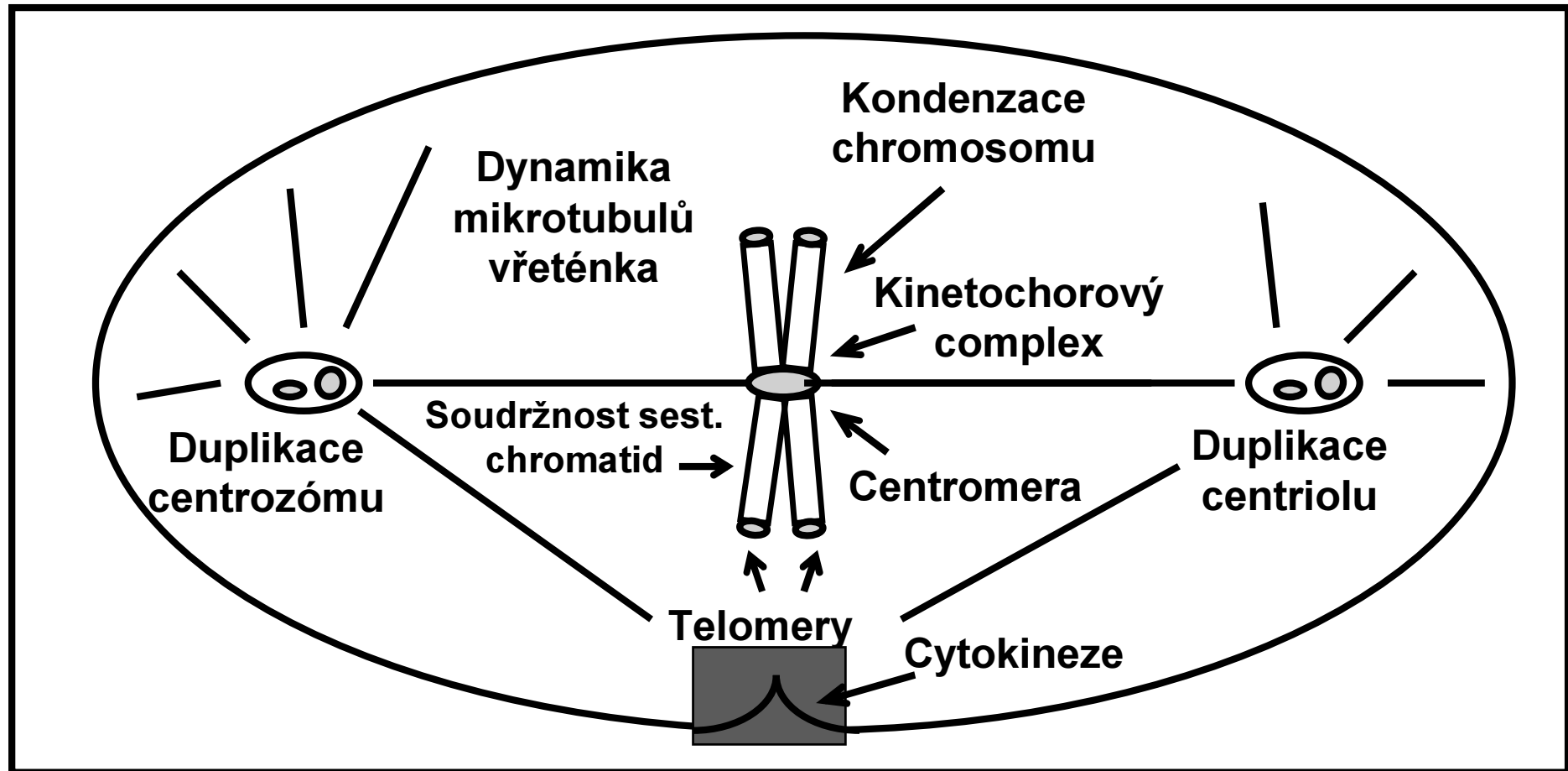
Hypotéza mutovaného fenotypu předpokládá, že geny vyžadované pro udržení genetické stability jsou prvním cílem poškození DNA karcinogeny. Mutace těchto genů pak vyvolávají mutace dalších genů v genomu.

# Sources of a Mutator Phenotype

Zdroj mutátorového fenotypu



## Potenciální mitotické cíle vedoucí k aneuploidii



Poruchy několika procesů zahrnující jako cíle chromozómy, mikrotubuly vřeténka a centrozómy mohou (kromě abnormální cytokineze) vést k nerovnoměrnému rozdělení chromozómů během mitózy vedoucího k aneuploidii.

# **Karcinogeneze však znamená víc než jen mutagenezi**

**Kromě genových a chromozomálních mutací zahrnuje i  
negenetické (epigenetické) změny.**

## **EPIGENETICKÉ DĚJE**

**způsobují změny v expresi genetické informace na transkripční, translační nebo  
postranslační úrovni**

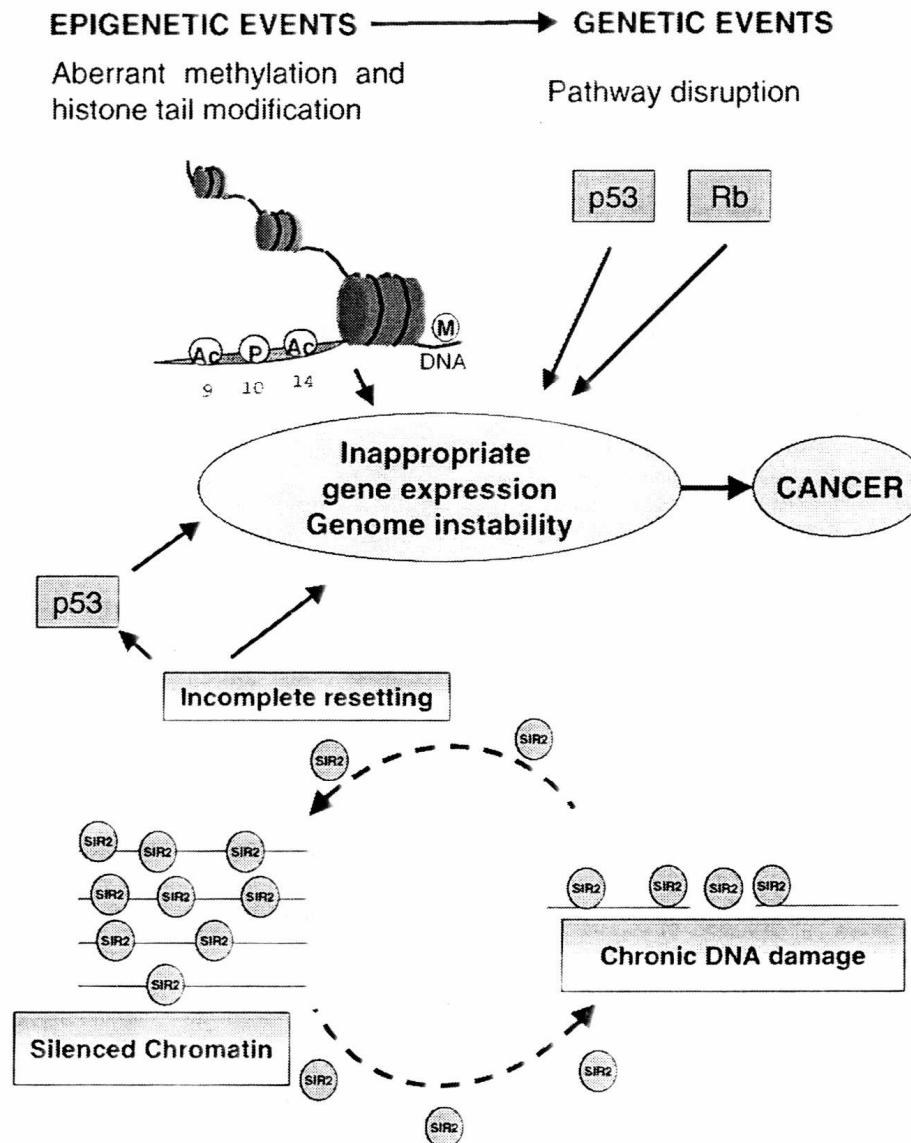
Geny jsou zapínány a vypínány

- ▶ během vývoje
- ▶ během buněčného cyklu, když buňka proliferuje
- ▶ když buňka diferencuje
- ▶ když je diferencovaná buňka stimulována k adaptivní odpovědi

Iniciovaná kmenová buňka je omezena v dalším růstu okolními normálními buňkami.

Po expozici nádorovým promotorem nebo promočními podmínkami (buněčná smrt nebo odstranění buněk) suprimující účinek okolních buněk prostřednictvím kontaktní inhibice mizí.

# Aberantní epigenetické a genetické děje mohou vést prostřednictvím nesprávné genové exprese k tvorbě nádorů



► **Iniciovaná buňka** se může dělit ale není schopna terminální diferenciace jako normální kmenová buňka, akumulují se klony dysfunkčních buněk (papilomy, polypy, noduly, enzymově změněné fokusy).

Faktory, které fungují jako **nádorové promotory** působí jako mitogeny a inhibitory programované buněčné smrti.

**Hormony, růstové faktory, cytokiny** mohou fungovat jako přirozené nebo **endogenní nádorové promotory**.

**Chemikálie**, mohou indukovat v buňkách různé transdukční signály, které vedou k blokádě kontaktní inhibice prostřednictvím inhibice mezibuněčné komunikace zprostředkované tzv. **gap junctions**.

► Totipotentní kmenová buňka je buňka, která může dát vznik všem buňkám v mnohobuněčném organismu, jako je oplodněné vajíčko nebo raná embryonální buňka.

► Brzy po embryonálním vývoji, některé buňky částečně diferencují v pluripotentní kmenové buňky.

► Z nich pak vznikají různé třídy buněk pro několik různých orgánů (např. slinivku a játra). Během dalšího vývoje jsou některé buňky omezeny tak , aby z nich vznikalo jen málo buněčných typů, stávají se z nich tzv. "komitované buňky".

► Konečným výsledkem komitovaných buněk je produkce terminálně diferencovaných buněk (spermie, vajíčka, keratinocyty, červené krvinky, neurony atd.).

V dané tkáni a orgánu je důležitá

správná regulace a rovnováha procesů

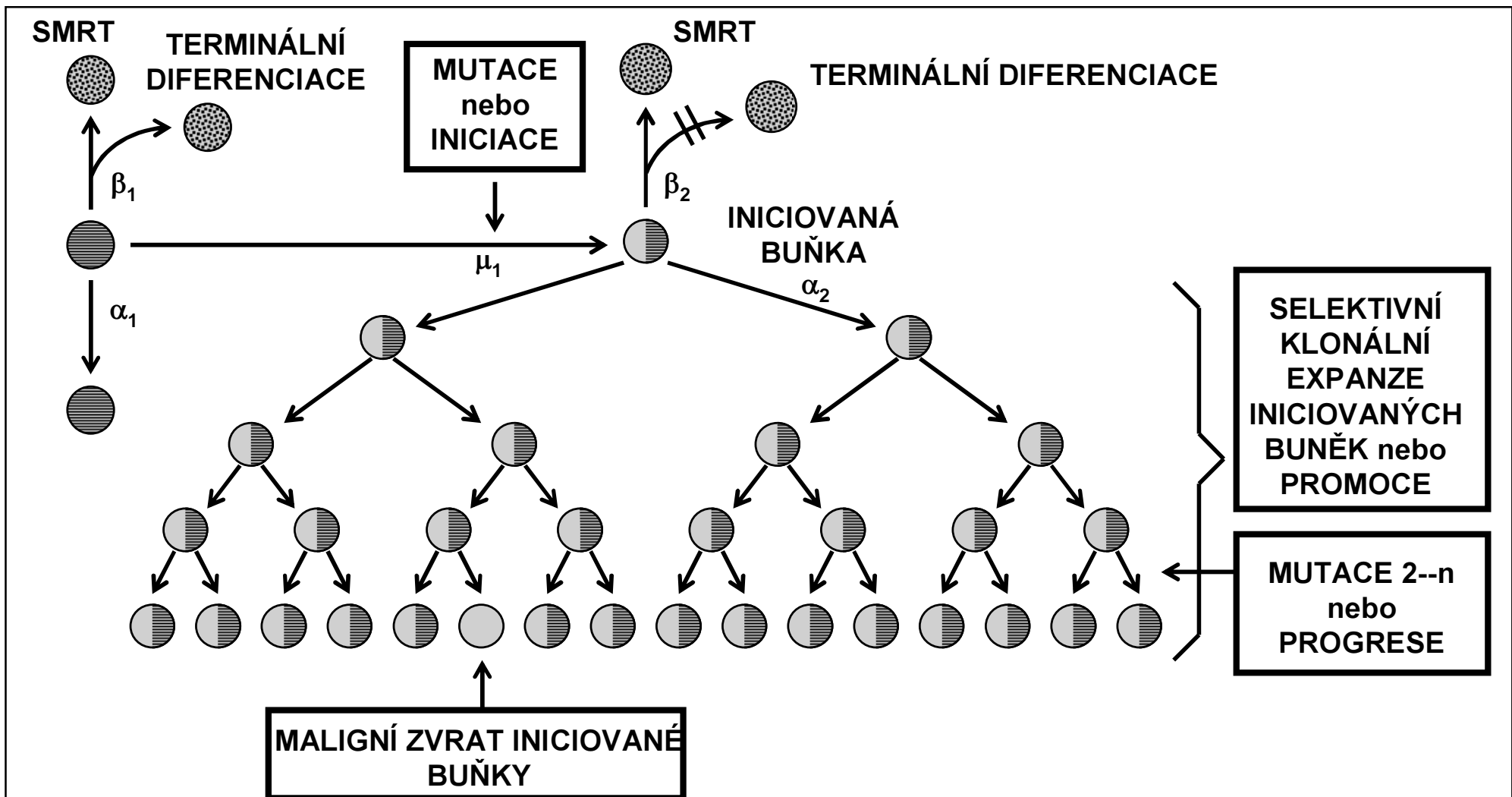


**PROLIFERACE**

**DIFERENCIACE**

**APOPTÓZA**

Deregulace těchto procesů vede k poruše homeostázy ve tkáni a ke vzniku nádorů



**Model iniciace/promoce/progrese v karcinogenezi.  $\beta_1$ , míra terminální diferenciace a smrti kmenové buňky;  $\beta_2$ , míra smrti, ale nedochází k term. diferenciaci iniciované buňky;  $\alpha_1$ , míra buněčného dělení kmenových buněk;  $\alpha_2$ , míra buněčného dělení iniciovaných buněk;  $\mu_1$ , míra molekulárních dějů vedoucích k iniciaci (tj., eventuálně mutaci);  $\mu_2$ , míra výskytu druhého zásahu v iniciované buňce.**



**Nádor je výsledkem mnohočetných genetických a epigenetických změn, kdy normální buňky s kontrolovaným růstem a schopností terminálně diferencovat ztrácí tyto schopnosti a zároveň získávají schopnost rozšiřovat se do jiných tkání v těle - metastázovat.**

Jednu z hlavních teorií karcinogeneze představuje tzv. **teorie kmenových buněk.**

Pozorování, že každý nádor se jeví jako monoklonální ve svém původu, tj. přes všechny genotypové a fenotypové rozdíly se všechny buňky nádoru vytvořily z jedné původní kmenové.

Základní předpoklad zmíněné teorie karcinogeneze je, že normální kmenová buňka je nesmrtelná. Smrtelnou se stává při indukci terminální diferenciace. Kmenové buňky se dělí "asymetricky", tj. jedna dceřinná buňka zůstává jako kmenová a druhá získává schopnost terminálně diferencovat. S tím souvisí domněnka, že prvním krokem v karcinogenezi je imortalizace buňky.

Při vzniku nádorů působí dva typy mechanismů:

## **environmentální faktory a genetické vybavení jedince**

V některých případech je primární envir. faktor, který způsobí vznik nádoru u "normálního" jedince.

Avšak i v tomto případě jsou zasaženy geny, protoonkogeny a nádorově supresorové geny.

Kromě toho existují další geny, které mohou způsobit větší či menší citlivost (susceptibility) jedince k envir. faktorům.

Předpokládáme-li, že všechny nádory jsou výsledkem iniciační, promoční a progresivní fáze karcinogeneze, měly by existovat geny, které

- a) buď chrání nebo predisponují protoonkogeny nebo nádorově supr. geny k aktivaci nebo inaktivaci,
- b) selektivně podporují nebo suprimují růst a expanzi iniciované buňky,
- c) zabraňují nebo zvyšují možnosti získání genetické/epigenetické nestability iniciované buňky, které zapříčiňují její malignitu.

### **Lidské genetické syndromy:**

Albinismus - jedinci nemají melaninovou pigmentaci, která chrání kůži nebo oči před škodlivými účinky UV záření. Normální DNA reparační mechanismy, ale množství poškození je větší než je tento systém schopen zvládnout. Nereparovaná poškození DNA fungují jako substrát pro vznik mutací v protoonkogenech nebo nádorově supr. genech. Syndrom je klasifikován jako jako typ náchylný ke vzniku nádorového onemocnění. Protože poškození DNA je velké, mnoho buněk umírá a smrt kožních buněk stimuluje kompenzační - regenerační růst buněk přežívajících – možnost promoce iniciovaných buněk. Klony iniciovaných buněk dále exponované UV - zvýšena pravděpodobnost dalších mutačních (genetických) změn - postup populace buněk do progresivního stadia.

**Xeroderma pigmentosum** - genetický syndrom, který také předurčuje jedince k rakovině kůže, avšak na jiném principu. Jedinci jsou nositeli genu, který neumožňuje reparovat poškození DNA indukované UV. Výsledkem jsou nereparovaná poškození DNA, která vedou ke smrti buněk nebo k mutacím. Podobně jako u albínů dochází ke kompenzační hyperplazii při náhradě odumřelé tkáně. Iniciovaná buňka kůže proliferuje, ale nediferencuje. Vytváří klon iniciovaných buněk (papilom) citlivý k indukci dalších genet/epigenet. změn a k progresivnímu rozvoji. Jedinci s albinismem nebo XP však nejsou odsouzeni k nádorovému onemocnění. Jestliže je pokožka chráněna před UV, nemusí být vyvoláno.

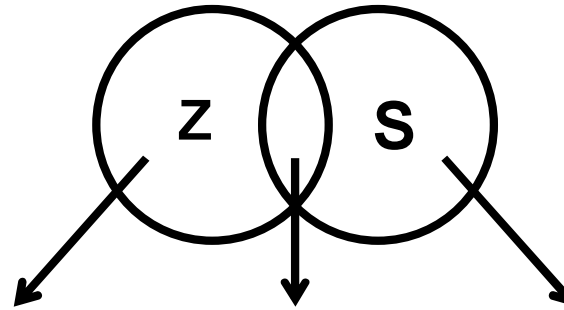
Při nadměrném působení UV mohou být postiženi i “normální” jedinci. Reparační systém přetížen a vzniká poškození DNA vedoucí opět k mutacím a ke smrti buněk podobně jako v předchozích případech. Jedinci s větší pigmentací jsou lépe chráněni před škodlivými účinky UV.

Existuje řada envir. faktorů a genů, které předurčují nebo chrání jedince před vznikem nádorů. Existuje řada chemikálií buď exogenních (dieta, životní styl, léčiva, polutanty) nebo endogenních (hormony, růstové faktory), které nepoškozují DNA a nejsou mutagení. Jsou to negenotoxicky působící látky, které mohou působit jak promoční stimulací proliferace iniciované buňky tak supresí apoptózy. Jedinci, kteří jsou normálně exponováni a akumulují iniciované buňky (což se normálně děje s přibývajícím věkem), ale kteří jsou exponováni abnormálnímu množství promočních látek v těle v důsledku genetického defektu jsou označováni jako "promotion-prone".

Vyloučení působení nádorových promotorů může u normálních jedinců snížit vznik nádorů přesto, že dojde k iniciaci. Naopak pravidelná a chronická expozice dostatečnému množství nádorového promotoru zvyšuje riziko vzniku nádoru. Podobně jako existují antiiniciátorové geny a látky, tak existují i geny a látky působící antipromočně.

# NÁDOROVÁ GENETIKA

Zárodečná b. (Z) and somatická b. (S)



Bloom S.  
Fanconi S.  
AT  
XP

RB1  
TP53  
WT1  
NF1

BL t(8; 14)  
ALL t(11; )  
CML t(9; 22)  
ES t(11; 22)  
ARMS t(2; 13)

Geny predisponující jedince k nádorům mohou být mutovány v zárodečné linii a produkovat recesivně děděné onemocnění jako je Bloomův a Fanconiho syndrom, AT a xeroderma pigmentosum. Ostatní, jako RB1, TP53, NF1 a Wilmsův tumor 1 (WT1), mohou být mutovány v zárodečné linii, čímž vzniká náchylnost u heterozygotů nebo somaticky v případě nedědičných případů nádorů. Mnoho somatických translokací je spojeno se specifickými chorobami, jako je Burkittův lymfom (BL), akutní lymfocytární leukémie (ALL), chronická myeloidní leukémie (CML), Ewingův sarkom (ES) a alveolární rhabdomyosarkom (ARMS). t(11; ) translokace může zahrnovat kterýkoli z velkého počtu chromozómů partnerských k chromozómu 11.

## SETTING THE STAGE FOR CANCER

V jednotlivé buňce mutace postupně a společně podporují odchylku od regulovaného růstu a zastavují nebo revertují specializaci buňky. Změny buněčné topografie a uchycení mění vlastnosti povrchu buňky a umožňují její odpoutání od sousedních buněk. Pozměněné nebo nefunkční receptory pak ovlivňují transport přes membránu. Uvnitř buňky se mění metabolismus, jádro mění tvar, dochází ke shlukování chromatinu, zlomům v chromosomech a poruchám buněčného dělení. Pod vrstvou epitelu jiné buňky produkují kolagenázu a jiné proteázy, které narušují extracelulární matrix a usnědňují tak další fázi – invazi.

In a lone cell, mutations sequentially and collectively promote deviation from normal growth constraints, while halting or reversing specialization. Alterations in the cell's surface and attachments make its surface oilier, causing it to pull away from its neighbors. As impaired or missing receptors compromise transport across the membrane, metabolism revs as the nucleus appears to undulate, chromatin clumping and chromosomes break, while at the same time division preparations ensue. Beneath the epithelial lining, the errant cell releases collagenase and other proteases that begin to eat away at the extracellular matrix, facilitating the next stage: Invasion.

