

Molekulární podstata nádorového bujení klíč k porozumění procesů v základech lidské rakoviny.

Nádor vzniká ze společné buňky, ve které byl - většinou desítky let před vznikem viditelného nádoru - zahájen program neregulovaného dělení.

Maligní transformace buňky probíhá přes akumulaci mutací ve specifických třídách genů.

Existují **dvě třídy genů**, které dohromady tvoří jen malou část celé genetické výbavy, ale hrají hlavní úlohu v zahájení procesu tvorby nádoru.

Ve své normální konfiguraci **řídí životní cyklus buňky, tj. sled dějů, při kterých se buňka zvětšuje a dělí.**

PROTOONKOGENY

jsou normální buněčné geny mající základní význam ve fyziologii buňky.

Hrají úlohu především v regulaci životního cyklu buněk:

- ▶ Buněčného cyklu
- ▶ Buněčné proliferace
- ▶ Diferenciace
- ▶ Apoptózy

V průběhu evoluce dobře konzervovány a jejich přítomnost v normálních buňkách všech vyšších organismů předpokládá, že mají základní význam v buněčné fyziologii.

Kódují proteiny, které hrají klíčovou na různých úrovních **integrace mitogenních signálů nesených růst. faktory a hormony**. Jsou-li modifikovány, ať na strukturální nebo kontrolní úrovni, začnou se chovat jako onkogeny a podporují vývoj nádoru.

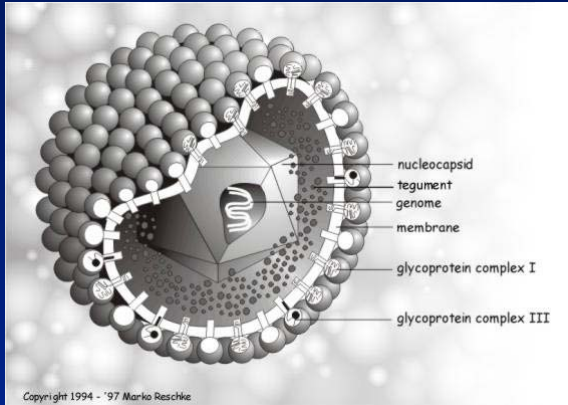
ONKOGENY

mutované nebo aktivované protoonkogeny

Proces karcinogeneze zahrnuje změněné exprese nebo funkce protoonkogenů na různých stupních transdukce signálů.

NÁDOROVĚ SUPRESOROVÉ GENY (ANTI-ONKOGENY)

zabraňují abnormální buněčné proliferaci



V posledních 30 letech byla objevena **řada genů odpovědných za vývoj nádorů**. Na porozumění maligní transformaci má zásluhu zejména široká škála dřívějších prací s **onkogenními virusy**.

První tzv. ONKOGEN *s r c* (sarcoma) byl izolován v roce 1970 z viru Rousova sarkomu u kuřat. Virus Rousova sarkomu má dvě rozdílné části: část **kódující proteiny** odpovědné za replikaci viru a část **kódující *s r c* gen** umožňující vznik nádorů *in vivo* u kuřat. Normální kuřecí genom obsahuje příbuzný gen *c-src*. Později se ukázalo, že **řada retrovirů je onkogenních**. Bylo též prokázáno, že *src* není jednoznačně retrovirový gen, ale spíše téměř přesná kopie genu nalezeného ve všech kuřecích buňkách.

Tento **normální gen, tzv. proto-onkogen** je v retroviru modifikován (aktivován) tak, že působí po přenesení do buněk nádor.

Objev s onkogeny příbuzných sekvencí v eukaryotickém genomu stimuloval úsilí **transformovat normální buňky DNA** stejným způsobem jaký užívají retrovirusy.

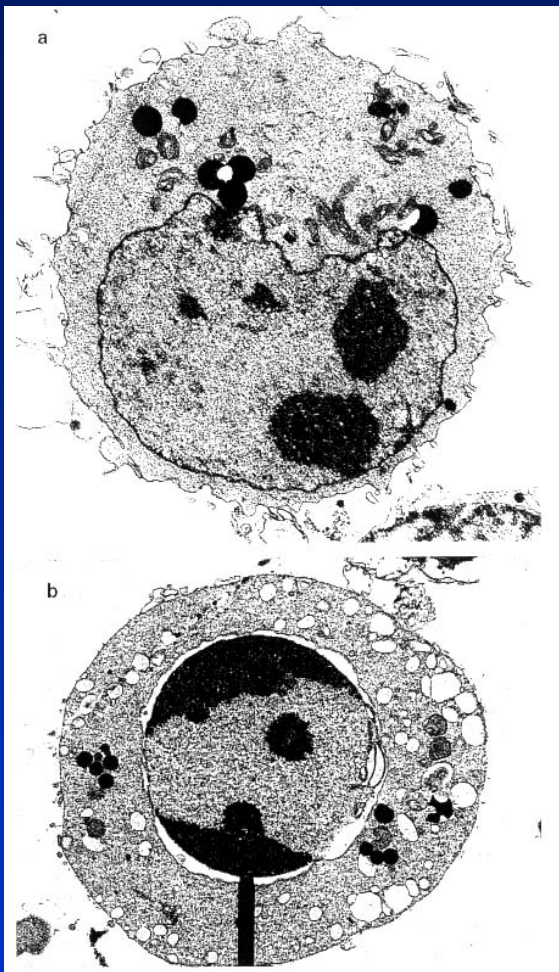
Mnoho **protoonkogenů kóduje proteiny mající vztah k růstově stimulačním signálům přecházejících z vnějšího prostředí do nitra buňky.** Růst buňky je deregulovaný, jestliže mutace v protoonkogenu způsobí **trvalou aktivaci růstově stimulační dráhy.**

Toto souvisí se signály, které si navzájem předávají buňky v tkáních. Jedny buňky uvolňují růstové faktory, proteiny (glyko), které se pohybují mezi buňkami a po vazbě na vhodný receptor na povrchu jiných buněk vyvolávají kaskádu dějů, které přenáší tento signál přes cytoplasmu až do jádra.

V jádře pak proteiny nazývané **transkripční faktory** odpovídají tím, že aktivují řadu genů, které pomáhají buňce procházet buněčným cyklem. Podobně funguje i **přenos růstově inhibičního signálu.**

V normální buňce je **rovnováha stimulačních a inhibičních signálů pečlivě regulována, protože to souvisí s regulací buněčného cyklu,** který je rozhodující pro buněčnou proliferaci a diferenciaci.

V nádorové buňce je v důsledku změn v signálních drahách organizace buněčného cyklu narušena.



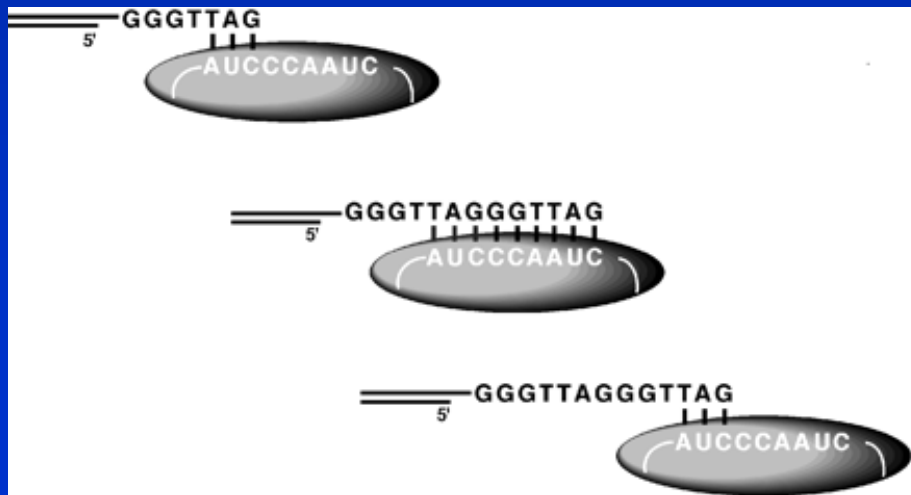
Buňka je vybavena také **zpětnovazebnými mechanismy**, které mohou působit proti neobvyklým změnám v procesu bun. dělení.

Apoptóza - schopnost buňky spáchat za určitých podmínek „sebevraždu“, tj. jestliže její základní komponenty jsou porušeny nebo jestliže je její kontrolní systém deregulován. Tak působí např. poškození chromozomální DNA.

V tomto procesu se účastní také **specifické geny** např. **p53** nebo **bcl-2**. Mutace těchto genů pak způsobují **poruchy apoptózy**. Bylo zjištěno, že neschopnost apoptózy přispívá ke vzniku nádorů a k jejich rezistenci k terapii.

Druhým obranným mechanismem proti neustálé proliferaci je **vestavěný buněčný mechanismus, který sčítá a limituje celkový počet dělení buňky, buňka stárne a hyne.**

Molekulárním nástrojem tohoto sčítání jsou segmenty DNA na koncích chromosomů tzv. **telomery**. Ty se při každém dělení zkracují a když dosáhnou kritické délky dochází k stárnutí a krizi. Jestliže tento sčítací systém funguje v nádorové buňce řádně, její nadměrná proliferace je přerušena předtím, než je nádor příliš velký. Aktivací genu, který kóduje enzym **telomerázu**, který není v normálních buňkách, ale byl nalezen v nádorových buňkách, však dochází k obnově telomerických segmentů a to umožňuje buňce se nekonečně množit, tj. stát se nesmrtelnou.



Protoonkogeny lze dělit

► Podle lokalizace jejich produktu na ty, které kódují

- 1) sekreční proteiny
- 2) proteiny buněčného povrchu
- 3) cytoplasmatické proteiny
- 4) jaderné proteiny

► Podle funkce jejich produktů na

- 1) růstové faktory (např. sis, hst),
- 2) receptory pro růst. faktory (např. fms, kit, erb B),
- 3) cytoplasmatické proteiny - protein kinázy (např. raf) a G-proteiny (např. ras),
- 4) jaderné proteiny (např. myc, myb, fos, jun)

Jaderné protoonkogeny jako jsou c-myc, c-fos, c-jun, c-myb - tzv. geny rané odpovědi (immediate early genes) a jejich produkty jsou proteiny vážící se na DNA a fungující jako tzv. **transkripční faktory**, které regulují transkripci pozdních genů.

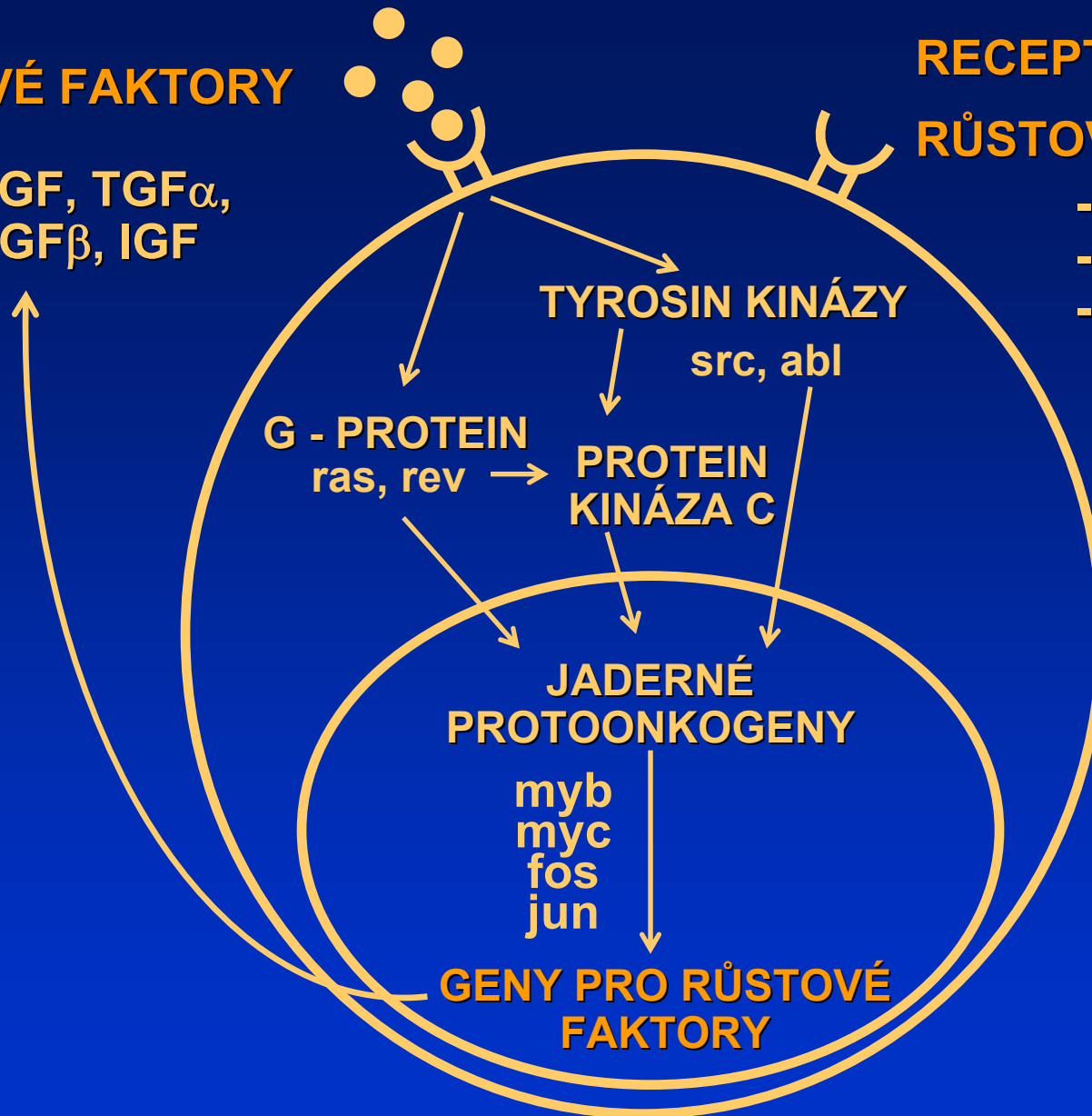
Jsou většinou aktivovány **overexpresí**, která může být indukována různými způsoby: translokací (Burkitt lymphoma), insercí retroviru (spíše v experimentálních systémech), amplifikace genů - to je obecný mechanismus aktivace jader. protoonkogenů a byla pozorována u řady nádorů.

RŮSTOVÉ FAKTORY

- EGF, TGF α ,
TGF β , IGF

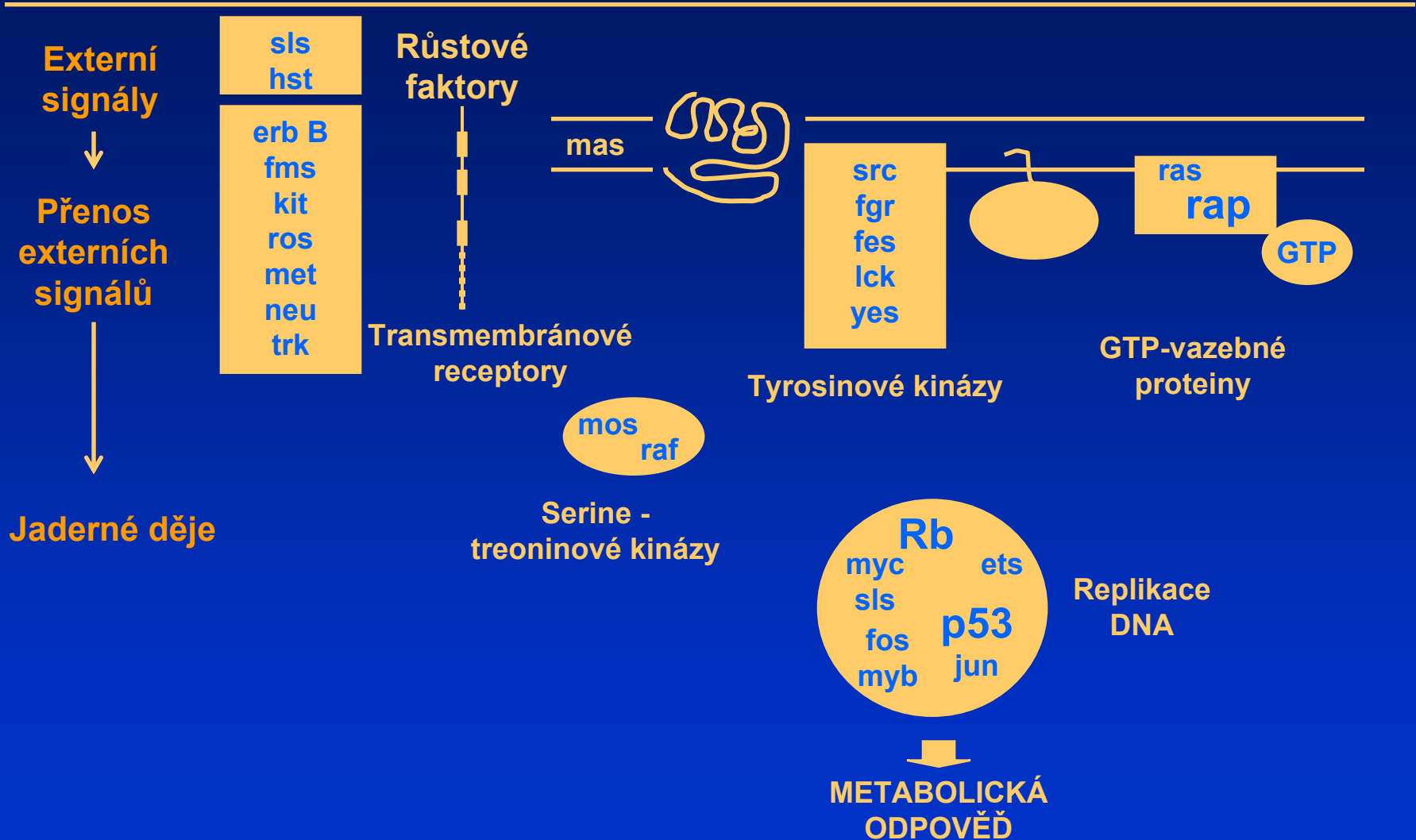
RECEPTORY PRO RŮSTOVÉ FAKTORY

- EGF-R
- NEU
- PDGF-R



Přenos signálů a růstová regulace v eukaryotických buňkách. Jsou znázorněny reprezentativní protoonkogeny v signálních drahách.

ONKOGENY a ANTI-ONKOGENY



Onkogeny a anti-onkogeny: hlavní funkční skupiny onkogenních proteinů a jejich pravděpodobná vnitrobuněčná lokalizace. Anti-onkogeny jsou označeny větším písmem.

Mutace protoonkogenu vedoucí k transformaci můžeme funkčně rozdělit do dvou tříd:

získání funkce (gain-of-function), kde aktivita protoonkogenu vzrůstá a má za následek abnormální nebo nadměrnou růstovou stimulaci

ztráta funkce (loss-of-function), která vede k inaktivaci represorové složky, která normálně negativně ovlivňuje buněčnou proliferaci (nádorově supresorové geny - p53, RB, geny pro antiproliferační molekuly - TGF β , TNF α , interferon γ)

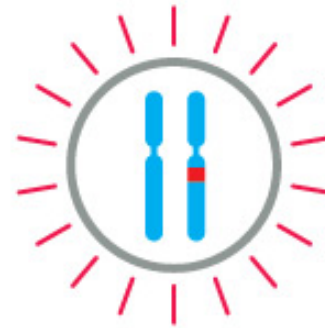
V obou případech je výsledkem nadměrná stimulace růstu.

Geny kritické pro vývoj nádorů spadají do dvou jasně rozlišitelných kategorií: dominantní a recesivní

(A) **overactivity mutation** (gain of function)



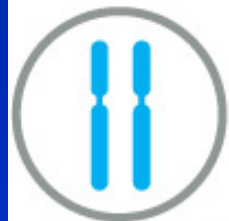
single mutation event
creates oncogene



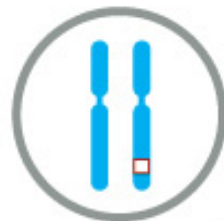
activating mutation
enables oncogene to
stimulate cell
proliferation

cells that
proliferate
abnormally

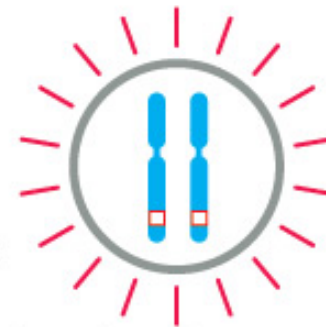
(B) **underactivity mutation** (loss of function)



mutation
event
inactivates
tumor
suppressor
gene

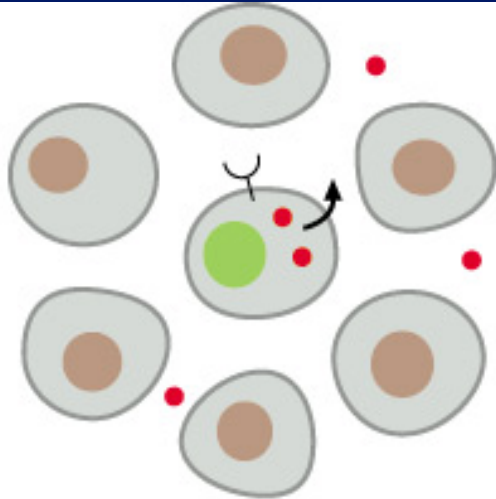


second
mutation
event
inactivates
second gene
copy

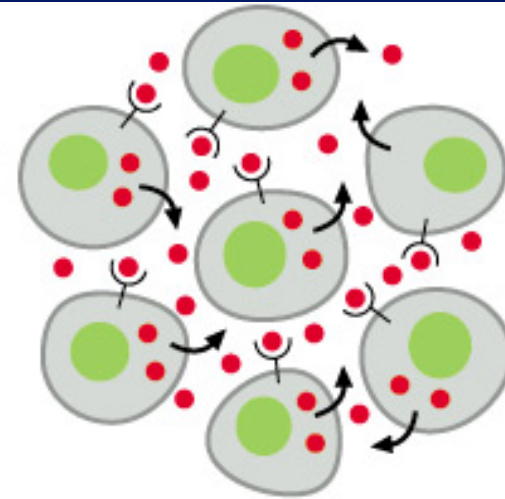


two inactivating mutations
functionally eliminate the
tumor suppressor gene,
stimulating cell proliferation

Autokrinní signál



A SINGLE SIGNALING CELL
RECEIVES A WEAK AUTOCRINE
SIGNAL



IN A GROUP OF IDENTICAL SIGNALING
CELLS, EACH CELL RECEIVES A STRONG
AUTOCRINE SIGNAL

Figure 15–6. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.

Při buněčné transformaci a karcinogenezi se uplatňují autokrinní mechanismy (vznik autokrinní smyčky) - neplánovaná produkce růstových faktorů buňkami nesoucími odpovídající receptory nebo aberantní exprese receptorů.

Tři způsoby aktivace a změny protoonkogenu v onkogen

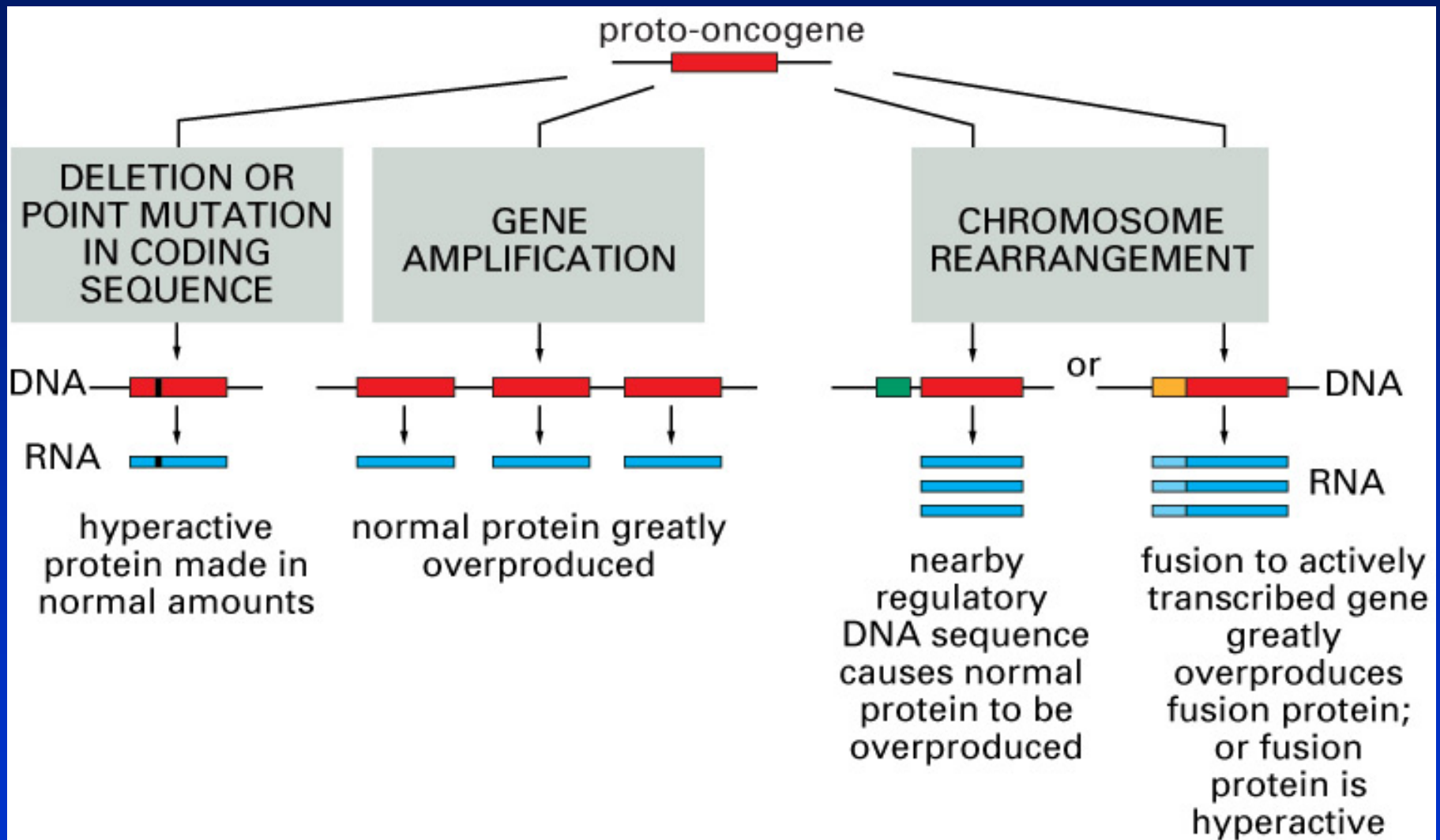


Figure 23–27. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.

Šest způsobů ztráty zbývající dobré kopie nádorově supresorového genu

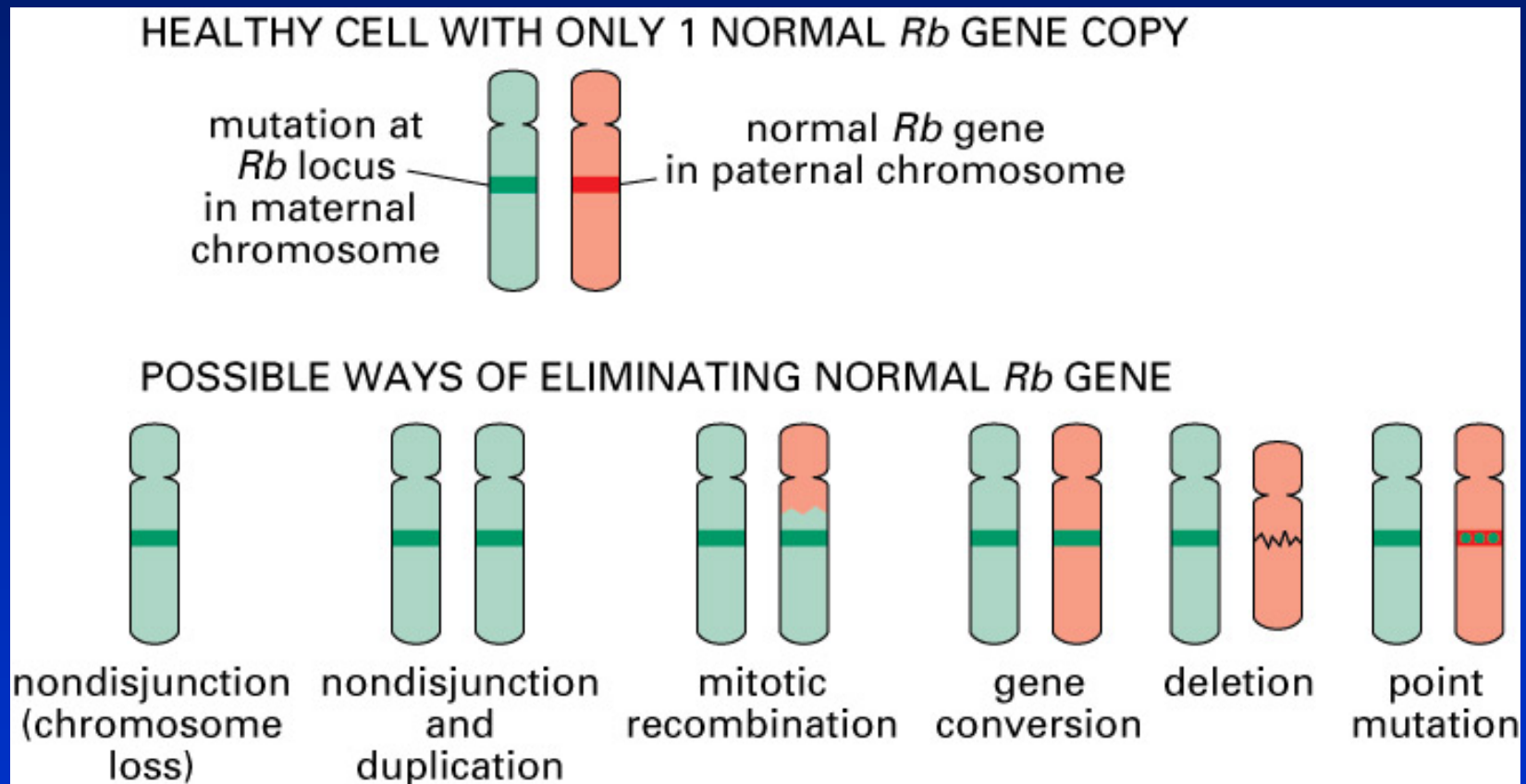


Figure 23–29. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.

Spektrum účinků p53 v modulaci přežívání a frekvence změn genu p53 u lidských nádorů

Fig. 1 The spectrum of survival-modulation effects of p53

p21: promotes growth arrest
bcl-x: blocks apoptosis
gadd-45: DNA repair (?)

CD95 (?)
Cyclin G (?)

p21: promotes growth arrest
bax: promotes apoptosis
IGF-BP3: inhibition of IGF signalling

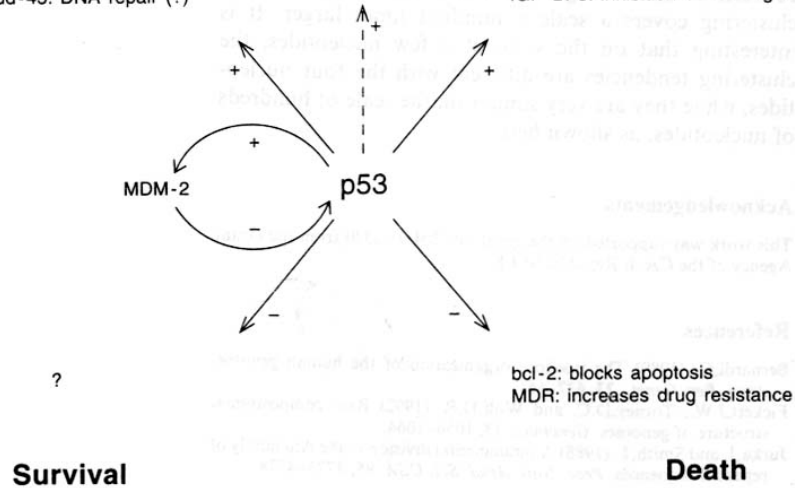
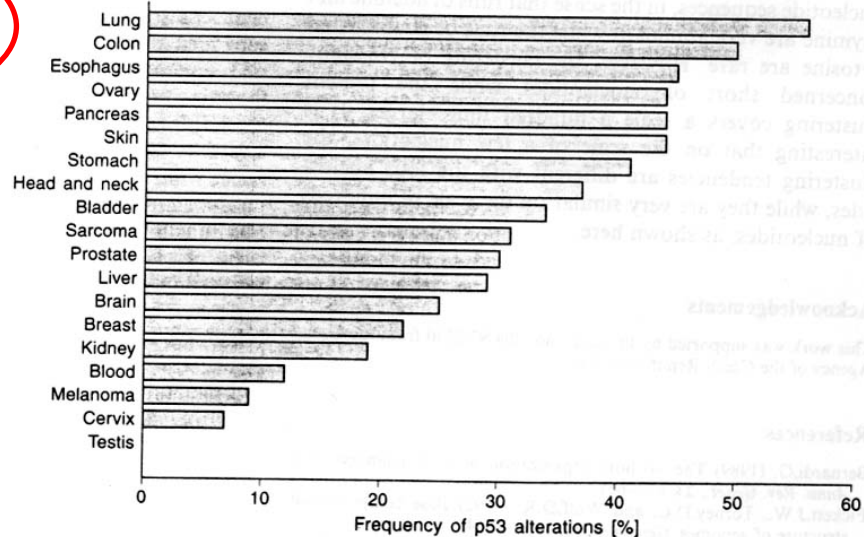
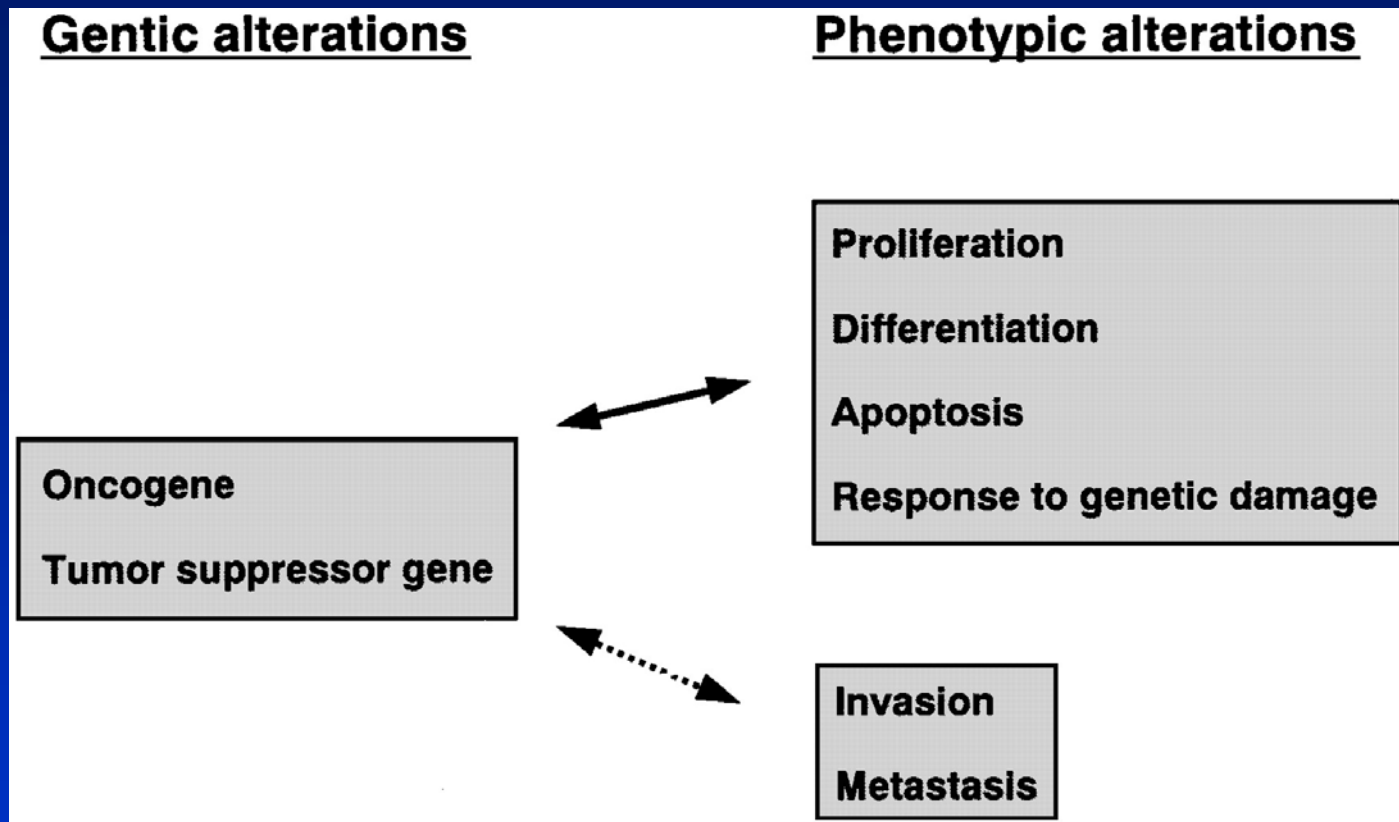


Fig. 2 Frequency of p53 gene alterations in human cancer (Greenblatt et al. 1994)

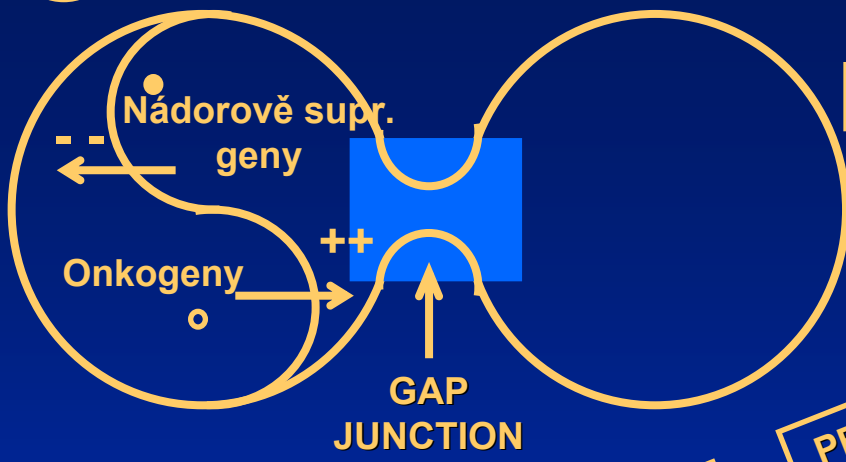


Vztahy mezi genetickými a fenotypovými změnami u nádorů

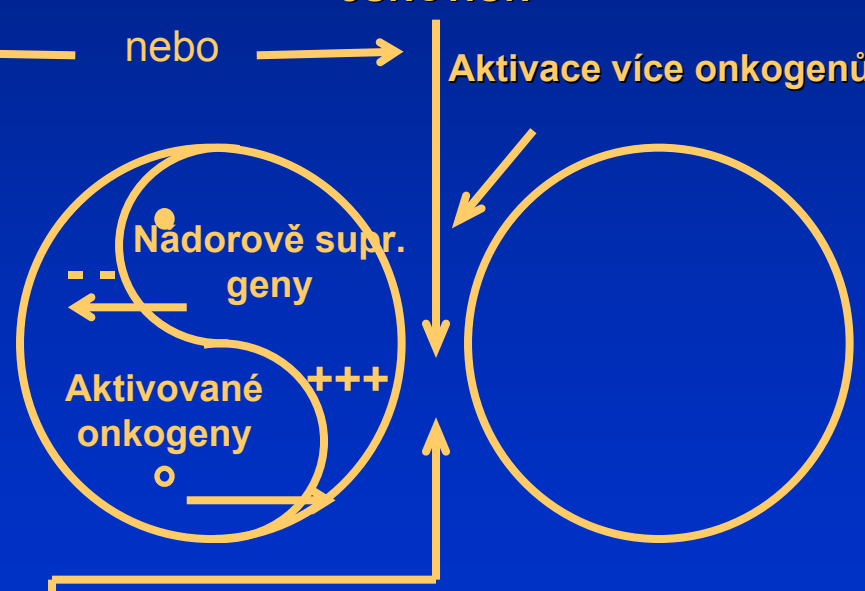
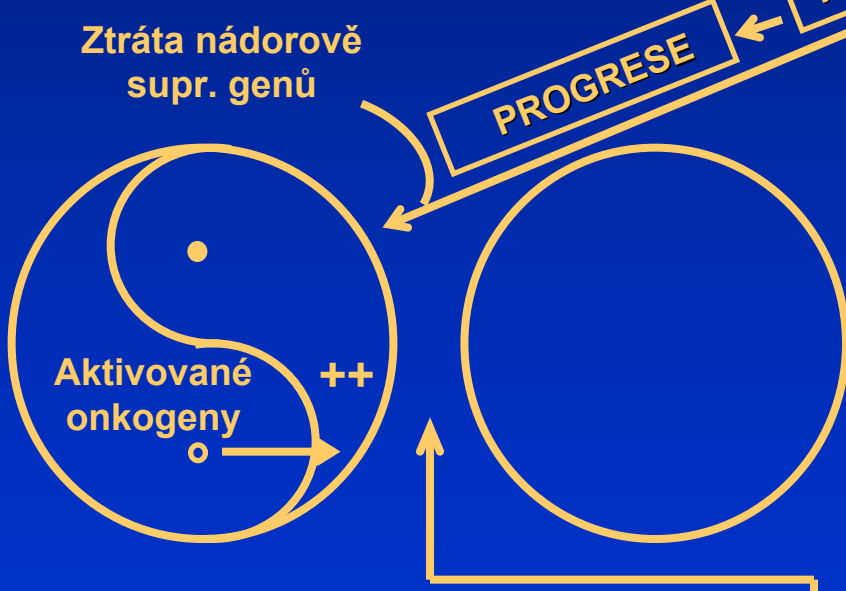
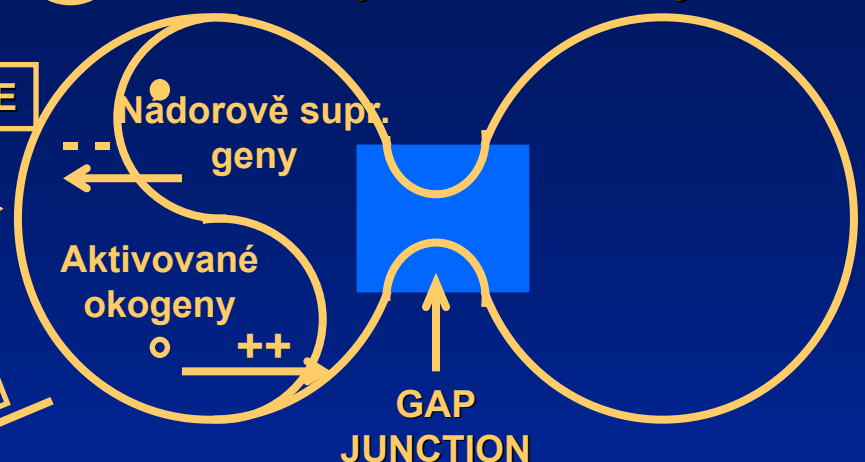


Onkogeny a nádorově supresorové geny mají funkce v regulaci proliferace, diferenciaci, apoptózy a odpovědi na genetické poškození. Jejich úloha v invazi a vzniku metastáz je však nejasná.

A NORMÁLNÍ , KONTROLOVANÝ RŮST



B ABNORMÁLNÍ RŮST, ale stále ještě nějak kontrolovaný



C NEKONTROLOVANÝ RŮST

D NEKONTROLOVANÝ RŮST

Nefunkční mezibuněčná komunikace



Poznatky o molekulárně genetické podstatě nádorového onemocnění lze shrnout takto:

- ▶ primární pro vznik nádoru jsou změny vyvolané jak genetickými (mutace v DNA) tak negenetickými příčinami (ovlivnění exprese genů)
- ▶ karcinogeneze je několikastupňový proces založený na poruše genetické homeostázy a pouze dílčí změna v kterémkoliv článku ke vzniku nádoru nevede
- ▶ ke vzniku nádoru může vést jen kombinace poruchy několika různých mechanismů, přičemž cesty, kterými se tak děje mohou být velmi rozdílné
- ▶ byly nalezeny velké individuální a mezidruhové rozdíly i tkáňová a orgánová specifita ve spojitosti se vznikem nádorů
- ▶ na vzniku nádoru se mohou významně podílet látky z vnějšího prostředí

ZMĚNY METYLACE DNA A ACETYLACE HISTONŮ

NÁDOROVÁ EPIGENETIKA

EPIGENETIKA – dědičné změny v genové expresi beze změn v sekvenci DNA

Epigenetické změny hrají významnou úlohu v karcinogenezi.

Savčí buňky mají schopnost epigeneticky modifikovat svůj genom prostřednictvím

► **METYLACE DNA**, tj. kovalentního přidávání metylových skupin do 5 pozice na cytosinovém kruhu v CpG dinukleotidu s účastí enzymu metyltransferázy. Přibližně 70% CpG zbytků v savčím genomu je metylováno, ale většina genomu je chudá na CpG (2-5%). Distribuce je nerovnoměrná – nahromaděny buď v rozsáhlých repetitivních sekvencích (satelity, centromerické repetice) nebo v krátkých úsecích bohatých na CG, tzv. „CpG islands“ (především v promotorových úsecích genů, blízko místa startu transkripce).

Jsou normálně nemetylované a tak je umožněna transkripce genů za přítomnosti příslušného transkripčního faktoru.

Metylace cytosinových zbytků je spojena s: navázáním specifických proteinů (methyl-binding domain proteins), aktivací histon deacetyláz (HDAC) a histon metyltransferáz, modifikací histonů, kondenzací chromatinu a transkripční inaktivací příslušného genu.

Souhra metylace CpG islands pomocí metylačních a demetylačních enzymů je jednou z částí epigenetické kontroly zárodečné a tkáňově specifické genové exprese.

Repetitivní genomické sekvence roztroušené mezi zbytkem genomu jsou naopak silně metylovány a hrají asi roli ve vývoji nekódujících oblastí DNA a v utlumení endoparazitických a retrovirových transposonů.

Metylace DNA tedy hraje zásadní úlohu v normálním vývoji, v inaktivaci chromozómu X a supresi tzv. parazitických sekvencí DNA.

Umožňuje „zapínat a vypínat“ geny na správném místě a ve správné době.

Aberantní metylace DNA v promotorové oblasti je však také **klíčovým mechanismem inaktivace nádorově supresorových genů**. Může způsobit zvýšení mutací a dědičně tlumí geny, jejichž promotory jsou asociovány s CpG „islands“ a které kontrolují buněčnou proliferaci. Zatím neznámé mechanismy zabraňují *de novo* metylaci těchto promotorů u normálních buněk.

Důkazy spojitosti mezi metylací DNA a genovou expresí s využitím inhibitoru metylace - 5-azacytidinu (5-AZA)- mnoho genů může být reaktivováno.

Hypo- nebo hypermethylace DNA (obsah 5-metylcytosinu) patří mezi epigenetické (negenotoxické) mechanismy karcinogeneze. Metylační struktura v nádorových buňkách se liší od normálních buněk. Globální hypomethylace genomu je doprovázena místně specifickou hypermethylací. Hypermethylace promotorů pro nádorově supresorové geny v CpG „islands“ je doprovázena jejich utlumením a růstovou výhodou pro tyto buňky. Hypomethylace DNA je naopak spojena se zvýšenou genovou expresí.

Methylace DNA může též usnadňovat mutagenézi (5MeC může spontánně deaminovat na thymin - hypermutabilita).

► ACETYLACE HISTONŮ

Genová exprese je regulována i strukturou chromatinu. **Histony** jsou považovány za důležité „překladače“ mezi genotypem a fenotypem – mají dynamickou funkci v regulaci struktury chromatinu a genové aktivity. Mohou být modifikovány acetylací, metylací, fosforylací, ubiquitinací. Specifická modifikace konců histonů je přímo spojena s aktivní nebo utlumenou transkripcí – enzymy histontransferázy.

Chromatin obsahující hypoacetylované lysiny v histonech má kompaktní strukturu represivní pro transkripci. Inhibitory histonových deacetyláz (HDAC) mohou vytvářet otevřenou strukturu chromatinu a aktivovat určité geny inhibující nádorový růst využití v terapii (butyrát, trichostatin). Histony se podílejí na tvorbě a udržování „epigenetické paměti“.

Existuje významný „crosstalk“ mezi metylací DNA a acetylací histonů při aktivaci i tlumení (silencing) genové exprese.

5AZA a HDAC inhibitory v kombinaci způsobují reaktivaci nádorově supresorových genů

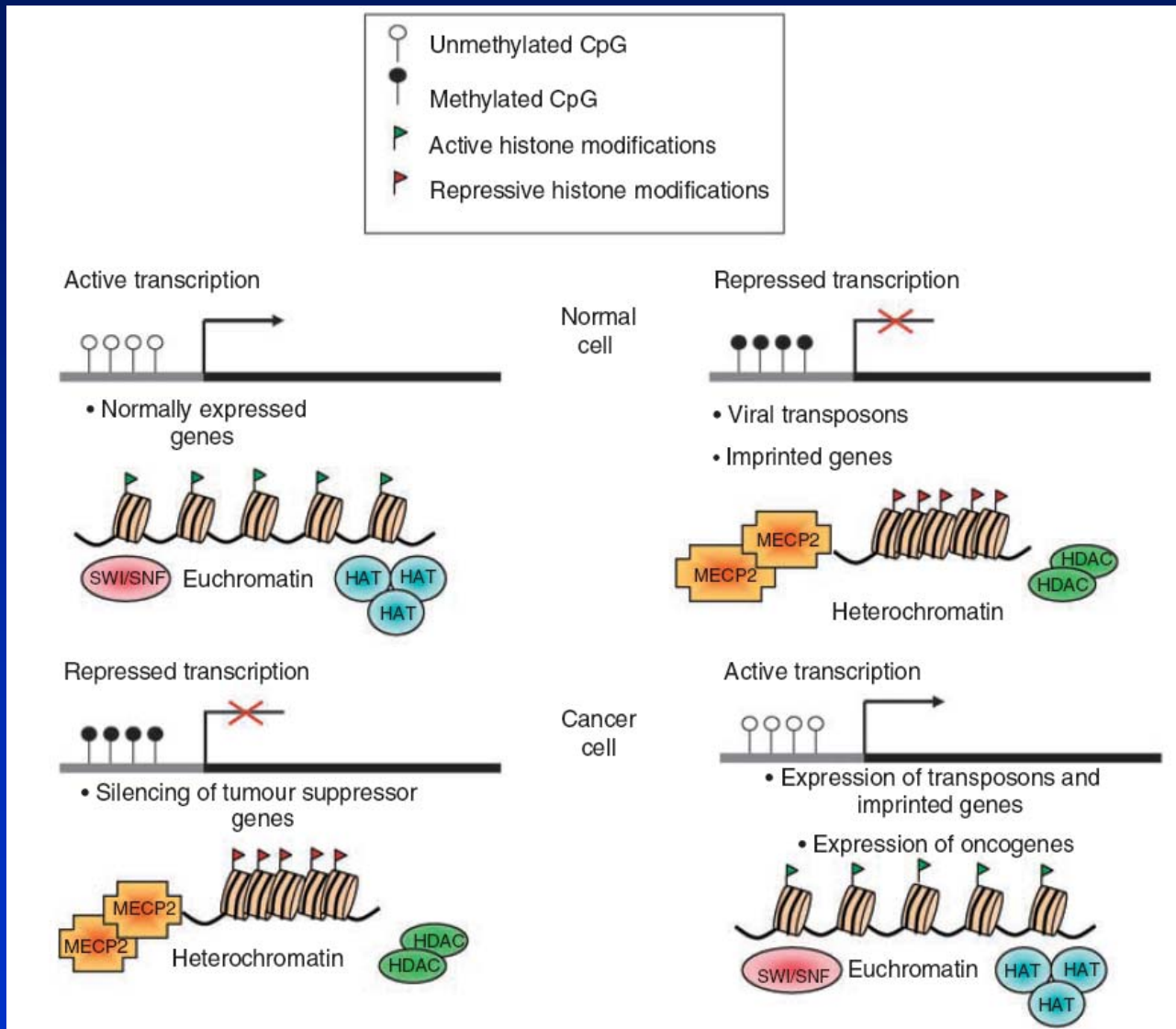
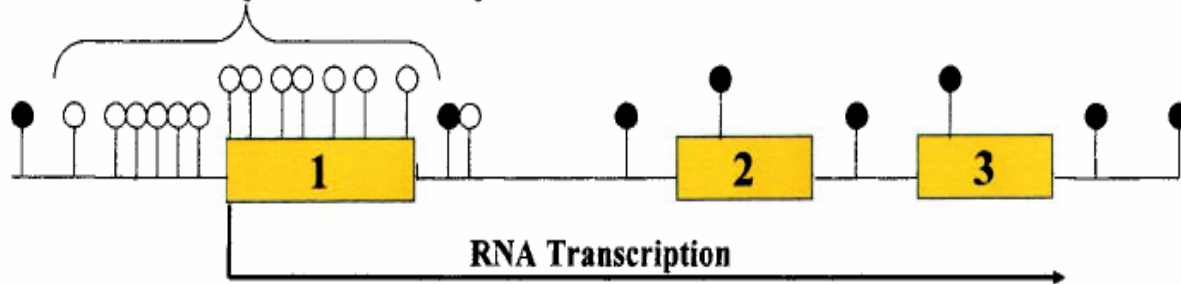


Figure 1 Current understanding of some of the changes to DNA and chromatin that occur in cancer cells. In the normal cell, promoters of actively transcribed genes are unmethylated and found within regions of euchromatin. Expression of other genes is repressed by promoter methylation and heterochromatin formation. In cancer, this is deregulated, resulting in the aberrant expression of normally silent genes and repression of tumour suppressor genes. Abbreviations: HAT, histone acetyltransferase; SWI/SNF, switch/sucrose nonfermentable nucleosome remodelling complex; MeCP2, methyl CpG-binding protein 2; HDAC, histone deacetylase.

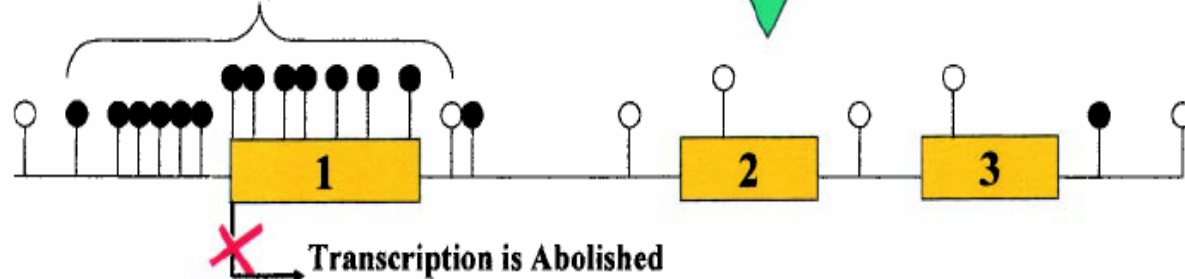
Unmethylated CpG Island

Activators, Histone Acetyltransferases,
Basal Transcriptional Machinery Protect the Island



Hypermethylated CpG Island

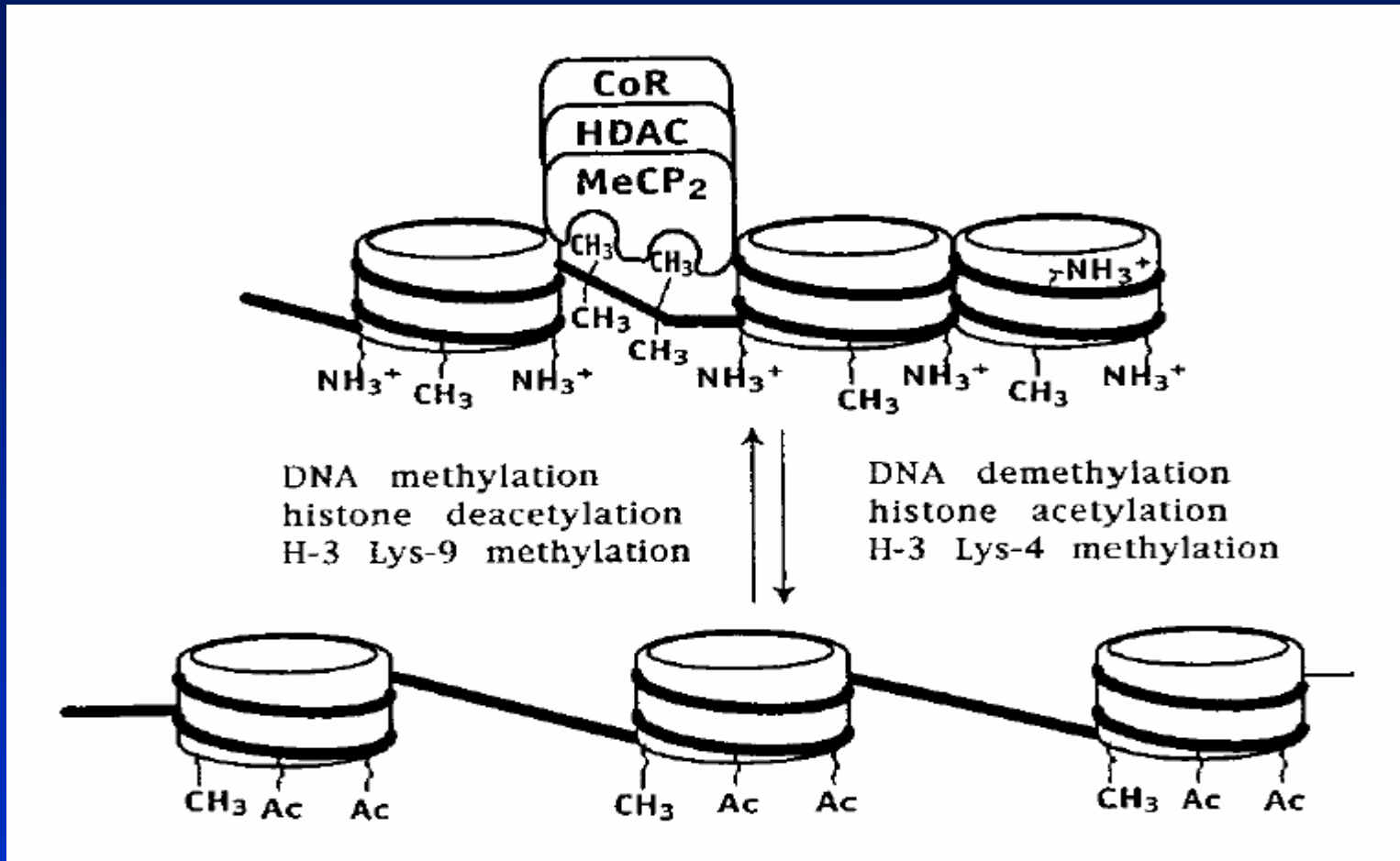
Transcriptional Repressors, Histone Deacetylases,
DNA Methyltransferases and Methyl-binding Proteins
Shut-Down the Island



Spreading from
Methylation Centers,
Seeding of Methylation,
Selective Advantage...

Figure 1 The typical CpG island of a tumor suppressor gene is represented in a normal and a tumor cell. The presence of a dense hypermethylation changes completely its molecular environment. White dots, unmethylated CpGs; Black dots, methylated CpGs

Utlumení genové exprese aberantní metylací DNA a modifikací histonů



Nukleosomy v promotorové oblasti. Proteiny vážící se k 5MeC (MeCP₂) se váží k metylovaným CpG místům a způsobují tlumení genové exprese histon deacetylázou (HDAC). Přítomnost tohoto komplexu, deacetylace lysinu v histonech a metylace histon-3 lysin-9 histon metyltransferázou přeměňuje nukleosom v kompaktní konfiguraci, která zabraňuje vazbě transkripčních faktorů. Demethylace a deacetylace způsobuje pak zase uvolnění inhibičního proteinového komplexu a tvorbu otevřené struktury nukleosomu, která umožňuje transkripci.

Metody využívané pro analýzu metylace – např. metylačně specifická PCR. Primery rozlišují metylovanou a nemetylovanou DNA v nádorových biopsiích nebo tekutině. Další metodou je v současnosti imunoprecipitace purifikované metylované DNA, umožňující detekovat metylační profil DNA celého genomu – DNA methylom).

mi RNAs

Důležitou součástí epigenetické regulace jsou tzv. malé regulační RNA – mikroRNA (miRNA).

V tzv. RISC komplexu se miRNA vážou na částečně komplementární cílová místa genů a mohou řídit buď translační inhibici nebo degradaci mRNA.

Tato represe prostřednictvím miRNA je další cestou jak může být modulována genová exprese.

miRNAs jsou deregulovány u řady nádorových typů a mohou fungovat jako nádorové supresory.

Hypermethylace CpG islands spojených se specifickými miRNAs může být jedním z mechanismů, kterým může být miRNA selektivně downregulována. V případě, že je miRNA situována v kódující oblasti genu, metylace může zároveň tlumit expresi jak genu kódujícího protein tak příslušné miRNA.

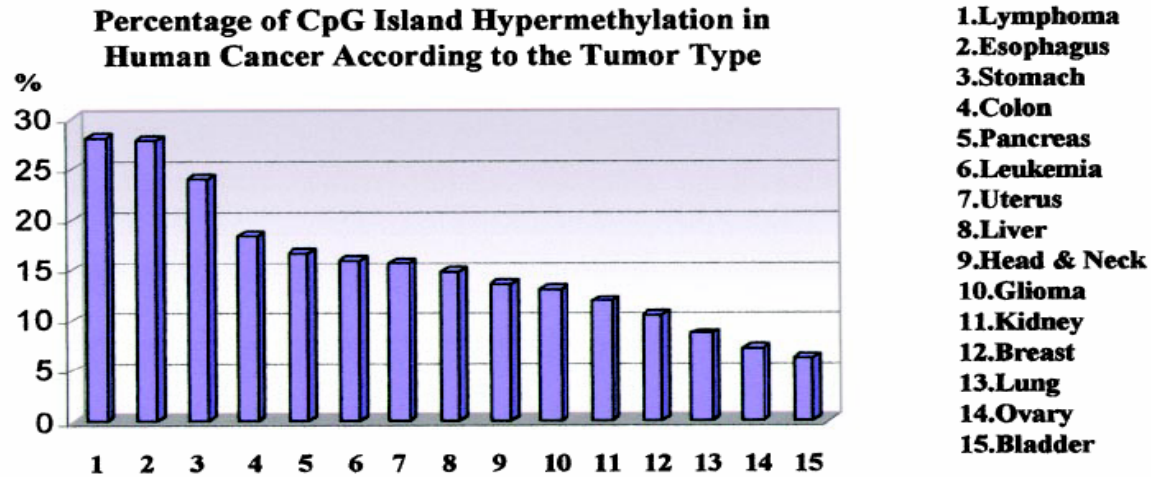
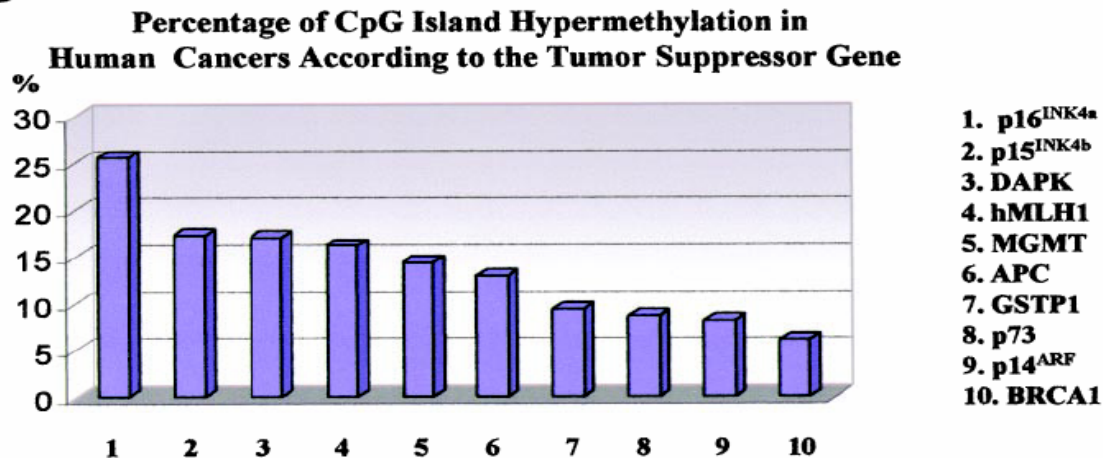
A**B**

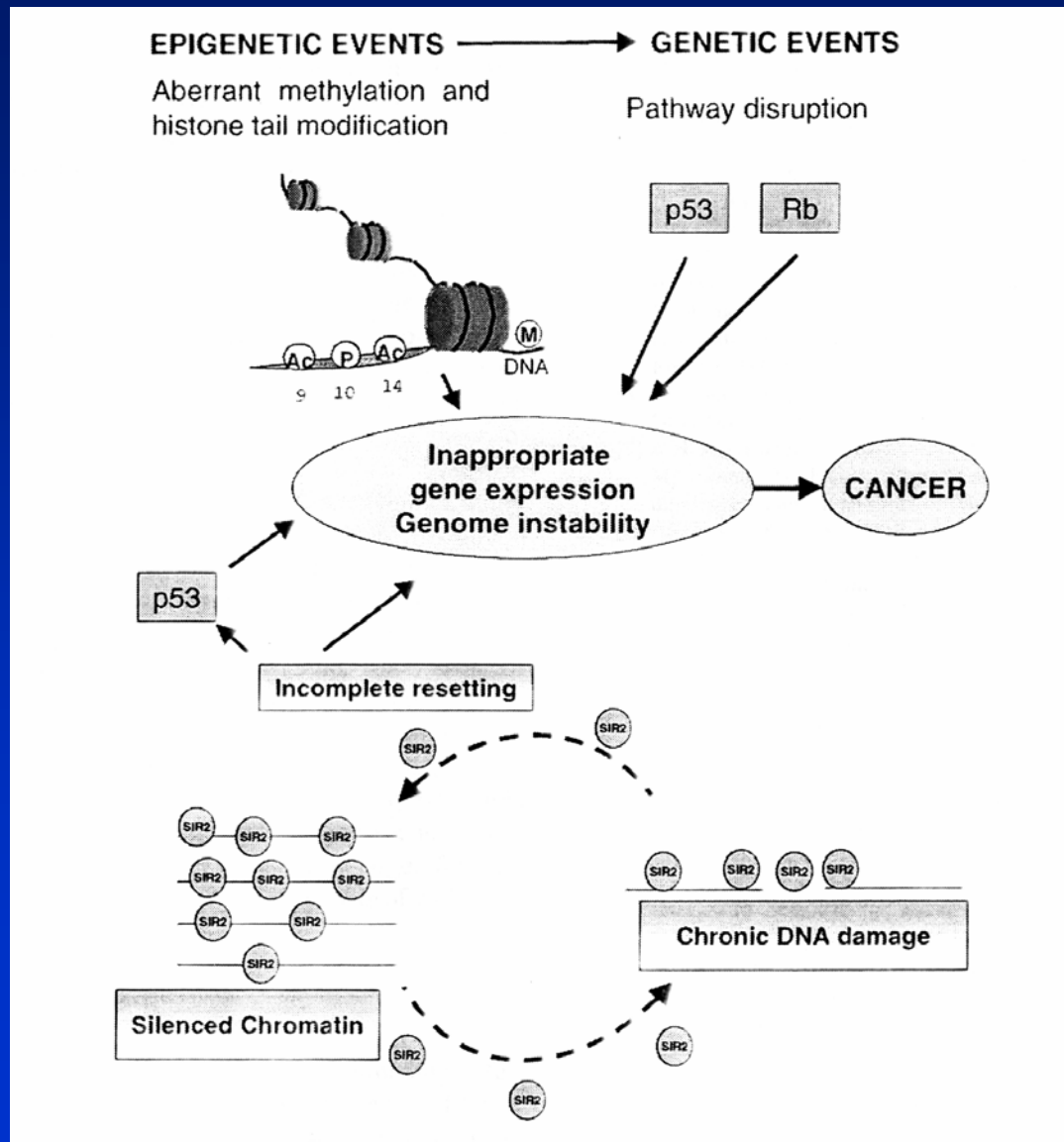
Figure 3 (a and b) are alternative ways to present our CpG island hypermethylation profile of human cancer (Esteller *et al.*, 2001a). (a) an average value of the frequency of hypermethylation of 11 tumor suppressor genes (p16^{INK4a}, p14^{ARF}, p15^{INK4b}, MGMT, hMLH1, BRCA1, GSTP1, DAPK, CDH1, p73 and APC) is shown according to the most common types of human tumors. (b) the other side of the coin: the frequency of CpG island hypermethylation of ten particular tumor suppressor genes in the tumor types described in a. In the cases of p15^{INK4b} and hMLH1 an overestimation exists due to the high number of leukemias and microsatellite unstable tumors included, respectively

Table 1 Hallmarks of cancer and different types of genes silenced by aberrant DNA methylation

<i>Hallmark^a (acquired capability)</i>	<i>Gene silenced by DNA methylation</i>	<i>Gene function</i>	<i>References</i>
Insensitivity to antigrowth signals	p16CDKN2A	Cyclin-kinase inhibitor induce differentiation cell cycle arrest	Herman <i>et al.</i> (1995)
	RAR β		Coté <i>et al.</i> (1998)
Self-sufficiency in growth signals	Sigma 14-3-3		Umbricht <i>et al.</i> (2001)
	RASSF1A	Regulation Ras pathway	Dammann <i>et al.</i> (2000)
Evading apoptosis	Capase-8	Initiate apoptosis	Teitz <i>et al.</i> (2000)
	TMS1	Proapoptosis	Stimson and Vertino (2002)
Limitless replicative potential	DAP-kinase	Proapoptosis	Kissil <i>et al.</i> (1997)
	p14ARF	Proapoptosis	Robertson and Jones (1998)
Sustained angiogenesis	Rb	Tumor suppressor gene	Ohtani-Fujita <i>et al.</i> (1993)
	Thrombospondin-1	Angiogenesis inhibitor stimulate angiogenesis	Li <i>et al.</i> (1999)
Increased invasion And metastasis	VHL		Herman <i>et al.</i> (1994)
	E-cadherin	Suppress metastasis	Graff <i>et al.</i> (1995)
Genome instability (enabling characteristic)	TIMP3	Inhibit metastasis	Bachman <i>et al.</i> (1999)
	hMLH1	DNA mismatch repair	Esteller (2000)
	MGMT	Repair alkylated guanine	Qian and Brent (1997)
	BRCA1	Repair DNA damage	Bianco <i>et al.</i> (2000)

DAP-kinase, death-associated protein kinase; MGMT, O₆-methylguanine DNA methyltransferase; RAR β , retinoic acid receptor- β 2; Rb, retinoblastoma; TIMP3, tissue inhibitor of metalloproteinase-3; VHL, von Hippel-Lindau tumor suppressor gene. The table is illustrative, but not comprehensive. For a list of many cancer-related genes silenced by aberrant methylation, see Tsou *et al.*, 2002. ^aanahan and Weinberg (2000).

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



IMORTALIZACE BUNĚK

Imortalizace zahrnuje inaktivaci specifických nádorově supresorových genů jako jsou RB a p53, které se účastní regulace přechodu G1-S fáze buněčného cyklu a indukce apoptózy i dalších genů spojených s buněčným cyklem a apoptózou.

Kromě toho existuje v buňkách mechanismus - **buněčné hodiny** - odpočítávající počet dělení a regulující stárnutí buňky.

Normální somatická buňka má omezený počet dělení, tj. limitovanou schopnost proliferovat a nastává ireverzibilní zástava růstu tzv. **replikativní stárnutí (senescence)**.

TELOMERY - jsou vysoce konzervované nukleoproteinové komplexy přítomné na koncích chromozómů a obsahují tandemové opakující se sekvence DNA bohaté na guanin (TTAGGG) obalené specifickými na DNA se vážajícími proteiny. Telomery tvoří protektivní čepičku kolem genomové DNA a zabraňují chromozomálním ztrátám a aberantním fúzím během mitotického cyklu. Telomery se zkracují s dalšími buněčnými děleními, což může způsobit genovou nestabilitu a změněnou genovou expresi. Buňky procházejí krizovým stadiem (Hayflickův limit) nebo umírají. Zkracování telomer vybudí proliferativní stárnutí přes aktivaci pRB a p53 kontrolních bodů, což vede u p53-wild typů k zástavě proliferace.

Dochází k bariéře v proliferaci charakterizované dysfunkcí telomer, extrémní genomovou nestabilitou a rozsáhlou smrtí buněk mechanismy závislými i nezávislými na p53.

Délka telomer koreluje s buněčným stárnutím, ale neexistují žádné důkazy pro jasnou korelaci na organismální úrovni a korelace s délkou života člověka či jiných druhů.

Heterogenita průměrné délky telomer odráží genetické rozdíly a komplexní rovnováhu mezi procesy, které vedou k degradaci a těmi, které prodlužují telomery.

Např. buňky se sebeobnovnou kapacitou mají delší telomery než diferencované, nebo telomery lab. myši jsou delší než u člověka. Telomery jsou kratší u lidských somatických tkání ze starších lidí než u mladších jedinců nebo u zárodečných buněk. Děti s genetickými nemocemi projevujícími se rychlým stárnutím tzv. progerickým syndromem (Down, Werner, At. telangiectasia) umírají v raném věku s tělem 90ti letých a jejich telomery jsou drasticky zkráceny.

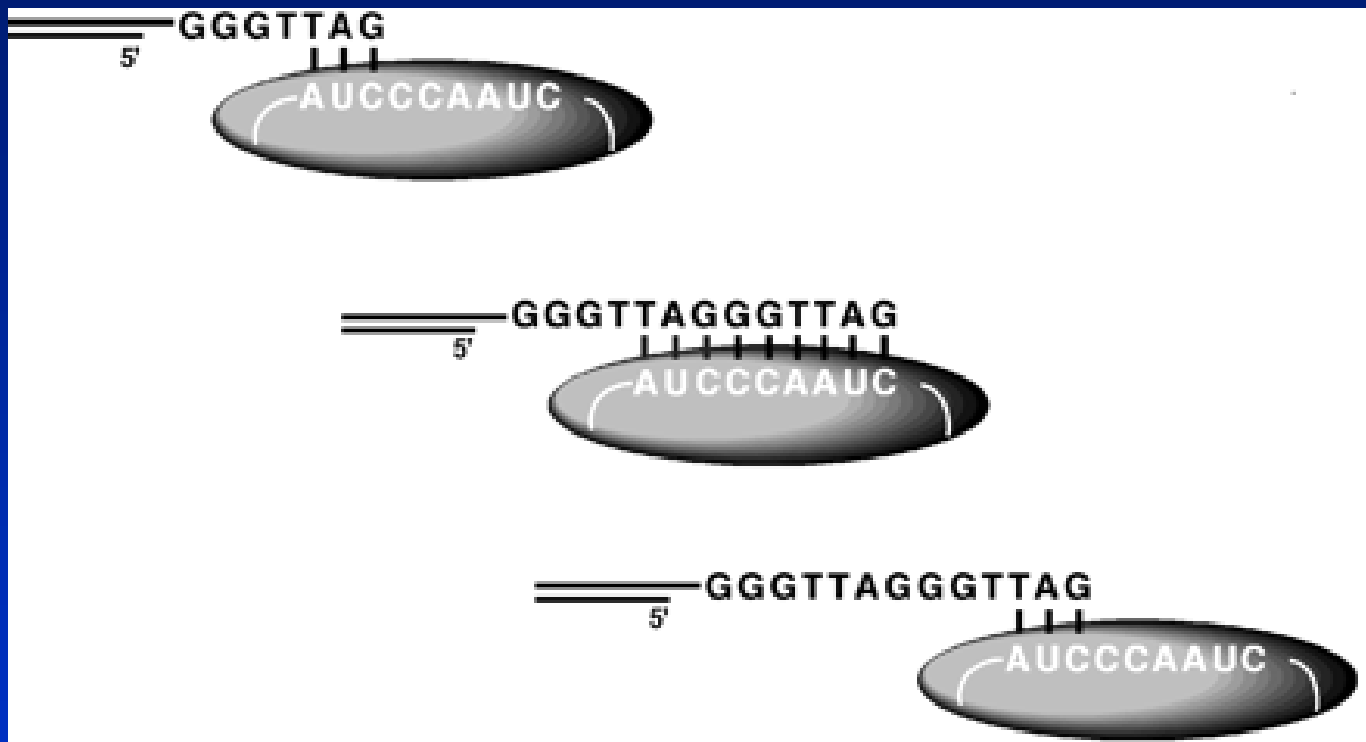
Imortalizované buňky vznikající z krizového stadia (inaktivací p53 a pRB, overexpresí cMyc a Ras a v důsledku vážné genové nestability) obnovují funkci telomer aktivací telomerázy, alternativním telomery udržujícím mechanismem (ALT) nebo jiným adaptivním mechanismem. Ve skutečnosti mají nádorové buňky kratší telomery než jejich odpovídající normální buněčné typy. Tyto telomery se dále zkracují během progresu nádoru a u myších exp. modelů, jsou zkrácené telomery spojeny se zvýšenou genetickou nestabilitou a zvýšenou nebo redukovanou spontánní malignitou v závislosti na genetickém kontextu. Mnoho faktorů (genetických, nutričních, hormonálních, environmentálních, farmakologických) může modulovat udržování telomer a potenciál buněčného života.

TELOMERÁZA. Telomery nejsou udržovány normálním replikačním procesem. U kmenových, nádorových a imortalizovaných buněk, je zkracování telomer zastaveno aktivací telomerázy - reverzní transkriptázy, která rozšiřuje telomerické TTAGGG opakované sekvence.

3 hlavní složky: s telomerázou spojený protein, TLP1, telomerázovou RNA -hTR a telomerázovou katalytickou jednotku TP2 - lidská telomerázová reverzní transkriptáza.

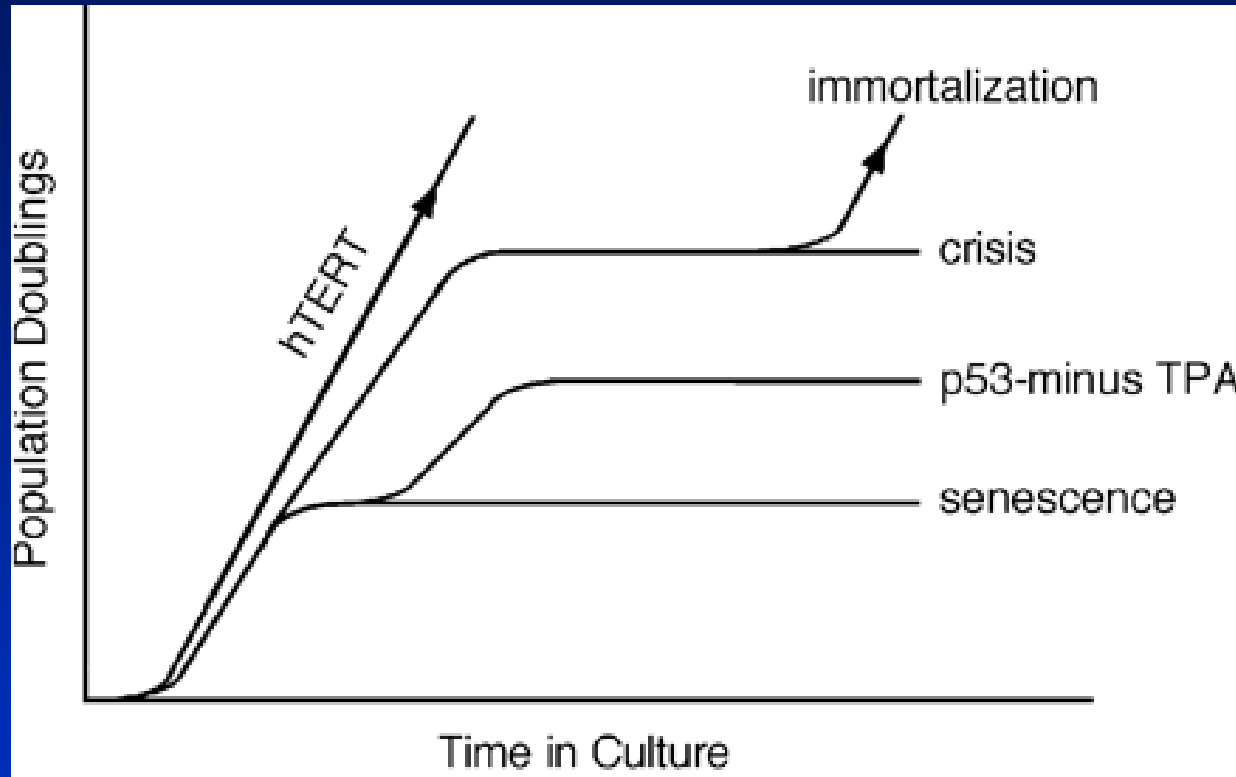
Telomeráza používá svou RNA k navázání na telomery, zatímco katalytická proteinová jednotka syntetizuje DNA přímo na koncích chromozómů reverzní transkripcí templátu RNA.

Rozšiřování na guanin (G) bohatých telomerových vláken telomerázou



Holoenzym **telomeráza** obsahuje proteinové subjednotky včetně katalytické subjednotky s aktivitou **reverzní transkriptázy** a molekulu RNA, která slouží jako templát pro přidání **opakujících se motivů TTAGGG**

Stadium terminální proliferací zástavy (TPA)



Normální buňky absolvují určitý počet dělení než navždy opustí buněčný cyklus a zůstanou ve viabilním neproliferujícím stavu – **senescence**. Při inaktivaci p53 se tyto buňky ještě nějakou dobu dělí a pak zastavují buněčný cyklus (p53-minus TPA). Při narušení jak p53 tak pRb/p16 (např. přítomností virových onkoproteinů), buňka obejde stav senescence a následně je zastavena ve stavu krize. Vyjíměčně (1 buňka z 10^7) může překonat krizi a stát se nesmrtelnou. Transdukce několika normálních buněk s expresním konstruktem hTERT může vyústit v **expresi telomerázy** a obejít stav senescence.

Telomeráza je vysoce exprimována ve většině nádorů a kmenových buněk, středně v hyperplastických a metaplastických buňkách a velmi nízká nebo žádná v normálních dif. tkáních a postupně se snižuje s věkem. Její exprese je spojena s vysokým proliferačním indexem a obnovným tkáňovým potenciálem, agresivitou nádorů, vysokým histopatologickým gradem a s proliferací cévního endotelu.

Telomerázová aktivace a overexprese je často nezbytným a raným dějem v mnohastupňové karcinogenezi: vzrůstá rychle při chemické karcinogenezi a po zkrácení telomer. Telomeráza není ani onkogen ani nádorově supresorový gen, ale regulována nahoru nebo dolů mnoha faktory a stává se důležitým predisponujícím dějem u karcinogeneze nebo cílené nádorové terapie.

Homeostáza systému telomery – telomeráza je komplexní a je svázána s genetickými a environmentálními faktory.

Řada faktorů snižuje (↓diferenciační činidla, epigallocatechin gallate (z čaje), antineoplastické látky - cisplatina, doxorubicin, protein fosfatáza 2, MAPK, tamoxifen, androgeny, volné radikály, inhibitory reverz. transkriptázy) a řada zvyšuje (↑ chemické karcinogeny, mutace telomerických sekvencí, gamma záření, PKC, EGF, estrogeny) telomerázovou aktivitu.

Vztahy mezi telomerázovou aktivitou a nádorovým onemocněním jsou složité a jen částečně objasněné. Telomeráza může paradoxně buď podporovat nebo inhibovat tvorbu nádorů v závislosti na genetickém kontextu.

U nádorových buněk jsou telomery kratší a telomerázová aktivita obvykle následuje po zkracování telomer. Ztráta funkce telomer při raném dělení zahajuje genetickou nestabilitu, zatímco v pozdějším bodě progresu nádoru absence telomerázy inhibuje růst. Tak zatímco inhibice telomerázy u ustanovených nádorů může být cenným terapeutickým přístupem, na věku závislé zkracování telomer může být rizikovým faktorem pro nádory tím, že umožňuje obejít kontrolní bod mortality.

System telomery-telomeráza představuje komplexní skupinu molekul interagujících navzájem a modulujících věk buněk, genetickou stabilitu a nádorovou transformaci.

Vnější zásahy mohou modulovat žití zvyšováním nebo snižováním délky života, ale s tímto přístupem jsou spojeny také odpovídající problémy.

Udržování telomer by mohlo být důležité pro prodloužení života, ale vzhledem ke složitosti fyziologických mechanismů na buněčné a zejména organismální úrovni, nelze tento problém zjednodušovat. Z onkologického hlediska, může overexprese telomerázy zvyšovat riziko vzniku nádorů. Ačkoliv normální buňky s delší dobou života a udržovanými telomery se nejeví jako neoplastické, zpoždění fyziologické smrti může zvyšovat pravděpodobnost kontaktu s karcinogeny. Telomeráza sama také zvyšuje onkogenní potenciál predisponovaných buněk a je cílem protinádorových terapií. Zatím se pozornost soustřeďuje na zvýšení doby života několika cílových buněk nebo snížení proliferujících nádorových buněk. Málo pozornosti je věnováno organismální úrovni, mikro- a makroprostředí, ve kterém tyto buňky rostou jako normální nebo imortalizované nádorové buňky: tj. angiogenezi, růstovým a diferenciacním faktorům, cytokinům, hormonům, imunitnímu systému a environmentálním faktorům.

????? Zbývá odpovědět na otázky:

Je bezpečné prodlužovat lidský život použitím terapeutických látek?

Je lepší prodlužovat lidský život nebo zlepšovat kvalitu života?

Zkracování telomer může vést k chromosomální nestabilitě a vzniku nádoru

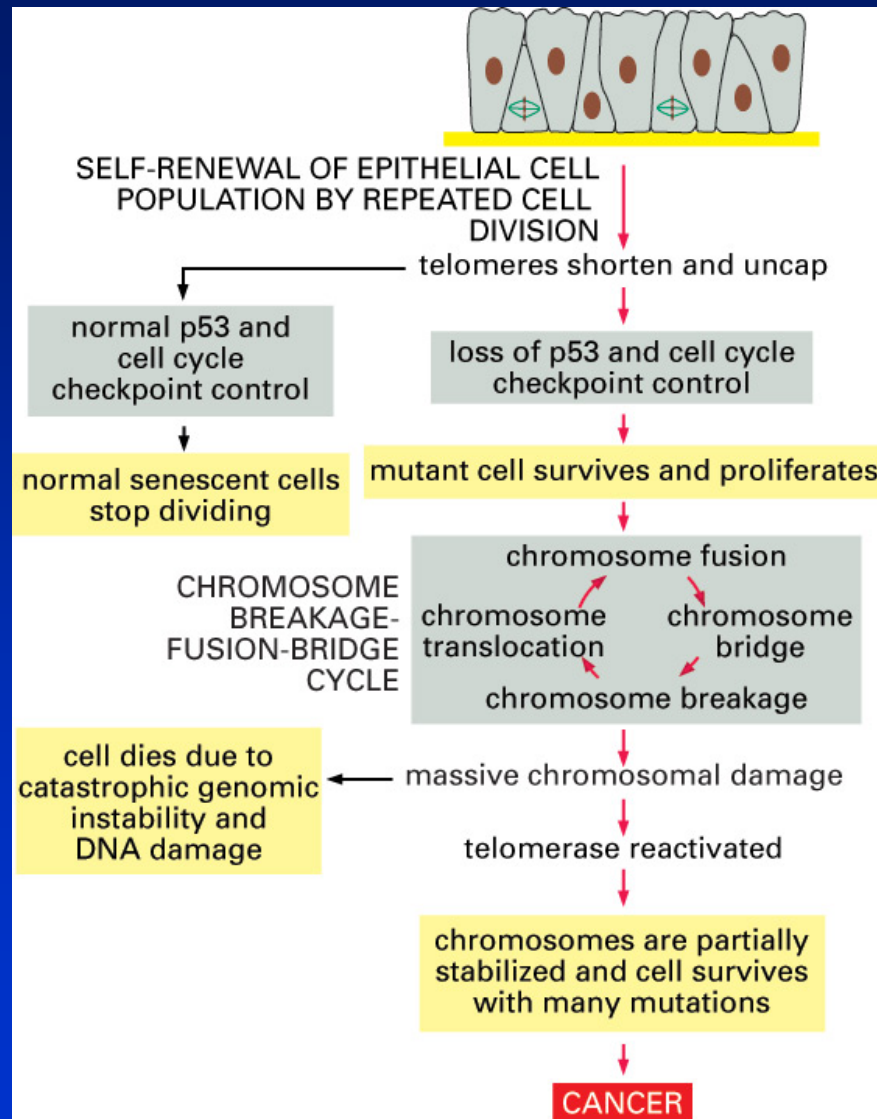
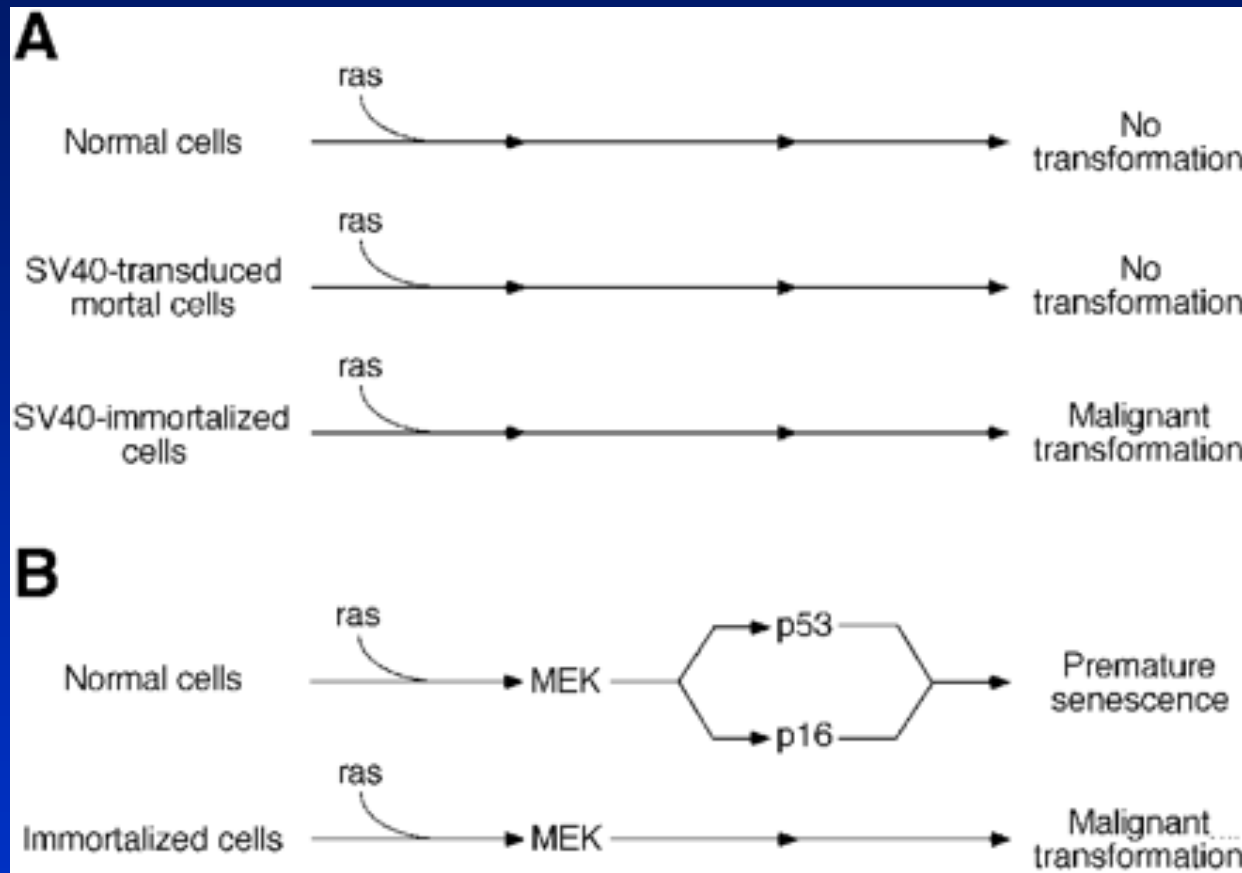


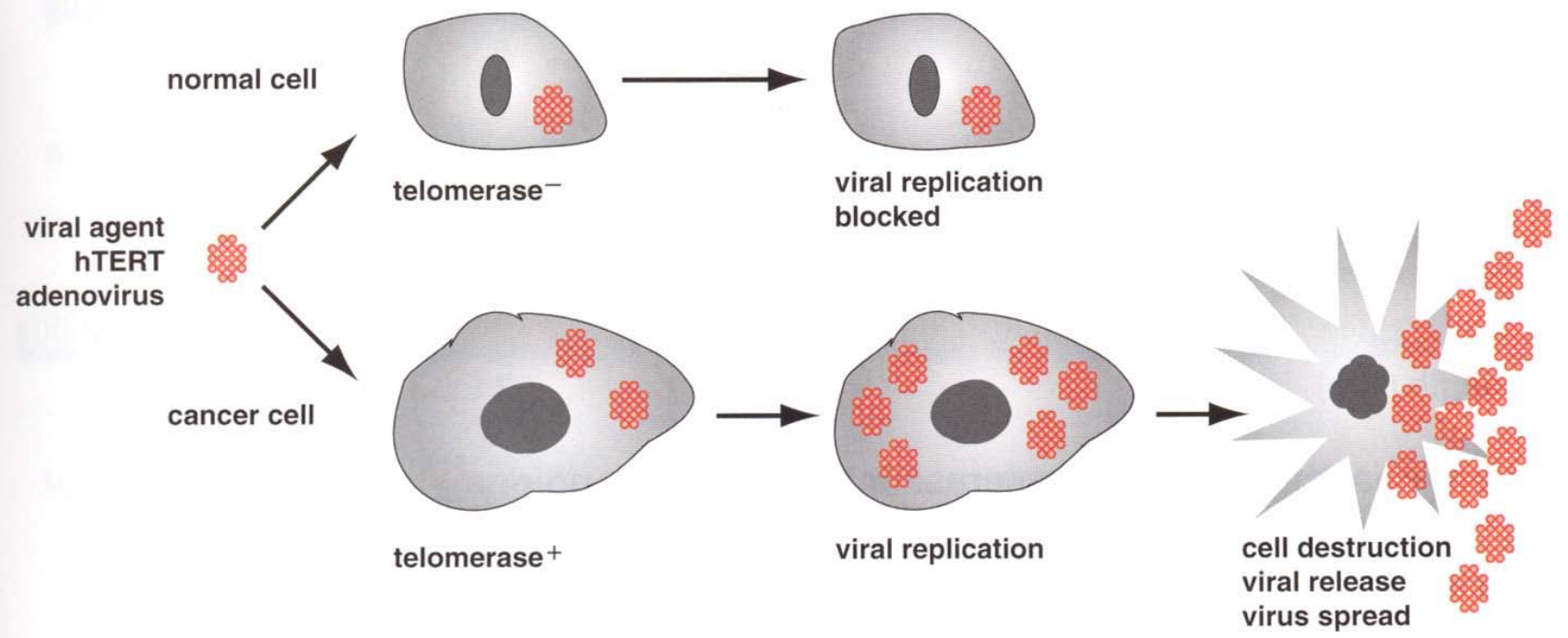
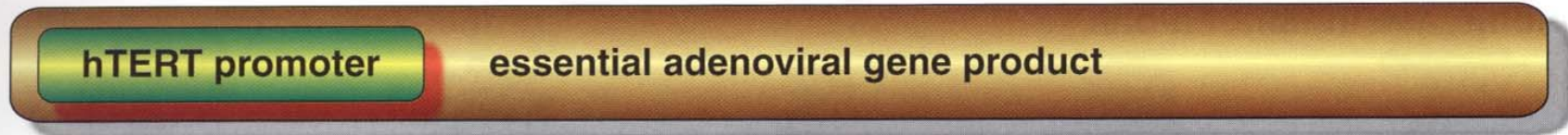
Figure 23–36. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.

Immortalization is necessary, but not sufficient for malignant transformation



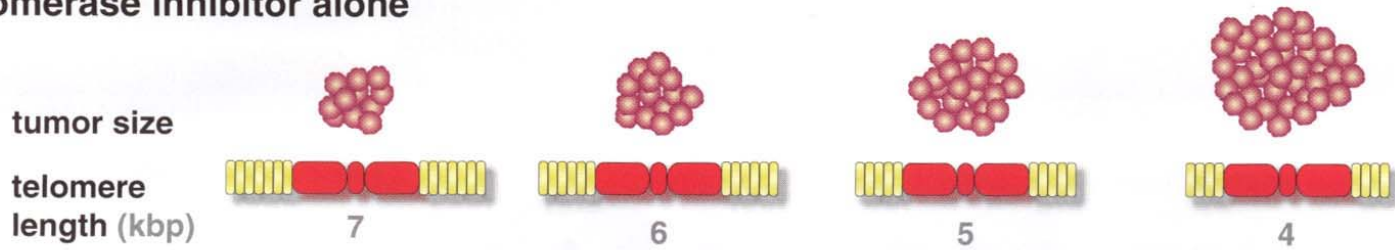
A) In a number of *in vitro* models it has been shown that oncogenes, such as activated *ras*, can cause malignant transformation of immortalized cells but not their normal mortal counterparts. In the example illustrated, activated *ras* caused malignant transformation of SV40-immortalized fibroblasts, but not normal fibroblasts nor SV40-transduced fibroblasts that had not become immortalized (67). (B) Mouse fibroblasts transduced with activated *ras* obtain a constitutively active MEK signaling pathway. In immortalized cells this may result in malignant transformation, but in normal cells this results in upregulation of p53 and p16^{INK4a} and premature senescence (74).

Adenovirová terapie využívající promotoru pro telomerázu

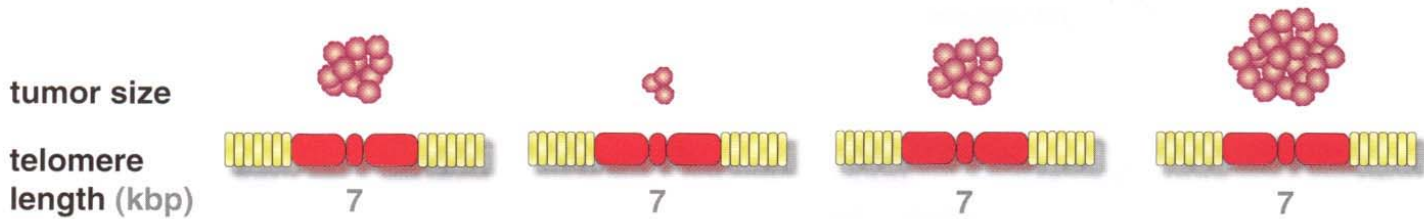


Inhibitory telomerázy a konvenční terapie

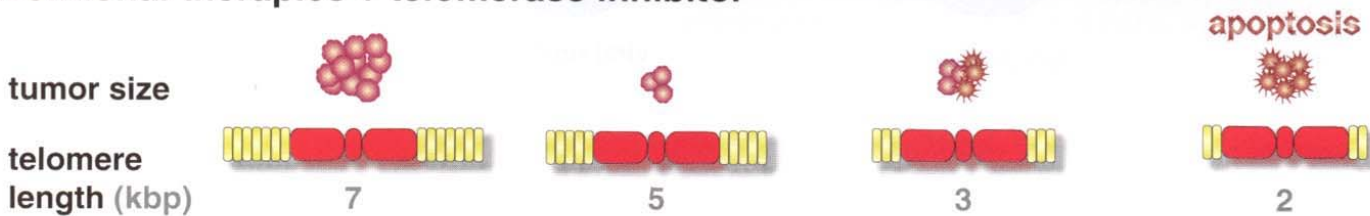
telomerase inhibitor alone



conventional therapies alone



conventional therapies + telomerase inhibitor



time of treatment