Molekulární biologie nádorů

Prof. RNDr. Jana Šmardová, CSc.

Ústav patologie, FN Brno
Přírodovědecká fakulta MU Brno
Lékařská fakulta MU Brno

2011

4. Individuální dispozice

k nádorům II

Xeroderma pigmentosum - XP

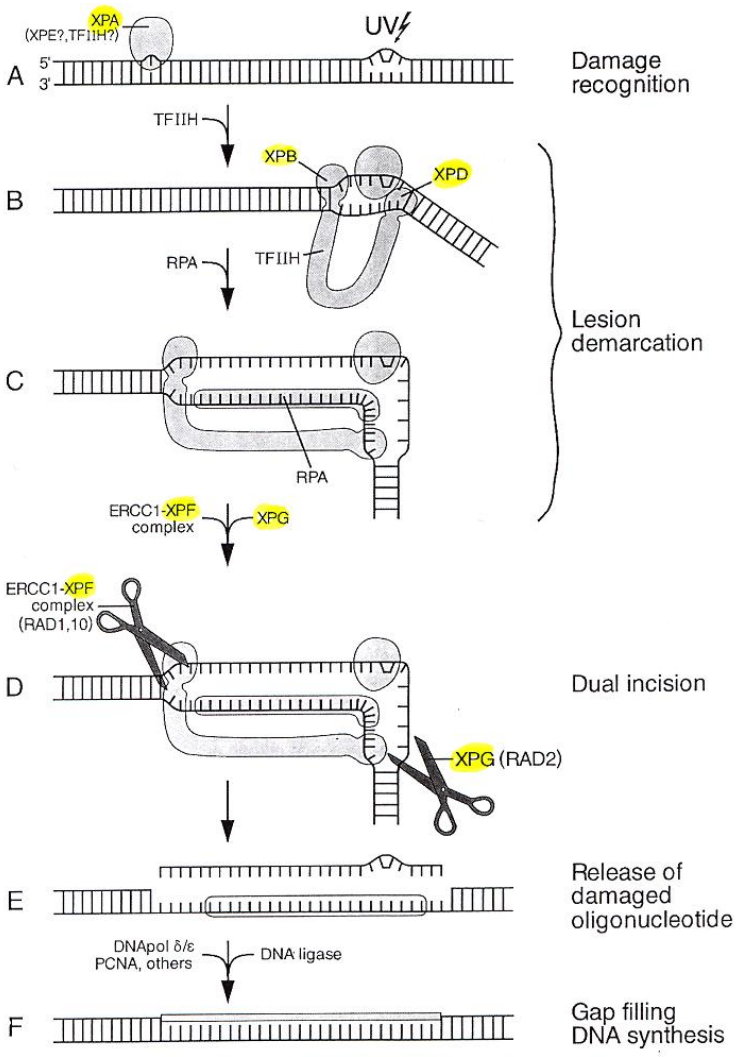
- Vzácné **autozomálně recesivní** onemocnění.
- Frekvence výskytu asi 1:1.000.000 v USA a Evropě a asi 1:100.000 v Japonsku a severní Africe.
- Vysoká citlivost k UV: extenzivní léze na kůži exponované slunečnímu záření, asi **1000x** zvýšené riziko „sunlight-induced" nádorů kůže*, dále zvýšené riziko leukémií a nádorů žaludku, mozku, plic.
- U některých pacientů (18%) spojeno s neurologickými abnormalitami.

  * XP je spojena se zvýšeným výskytem jak melanomů (5%) tak nemelanomových (dlaždicobuněčných a z bazálních buněk odvozených) nádorů kůže (45%).

Xeroderma pigmentosum

- 90% nádorů kůže se objevuje na obličeji, krku, a hlavě - místech nejvíce vystavených slunci.
- Průměrný věk výskytu nádorů kůže je **8 let** (sporadicky průměrně v 60ti letech).
- Spojeno se zárodečnými mutacemi v některém genu ze sedmi komplementačních skupin ***XP-A*** až ***XP-G***. Proteiny kódované těmito geny se podílí na nukleotidové excizní opravě **(NER)** jako součást multiproteinového komplexu. ***XP-V*** kóduje (error-prone) DNA polymerázu pol-η (→celkem 8 komplementačních skupin).

Model mechanismů NER



NER je proces, kterým se UV-světlem (nebo dalšími exogenními mutageny) poškozené báze enzymaticky vyštěpují z DNA a následně se nahrazují správnými nukleotidy.

NER zajištěna multiproteinovým komplexem asi o 24 podjednotkách.

Z toho sedm proteinů kódováno geny, které tvoří 7 komplementačních skupin XPA – XPG, vyskytujících se u XP.

Osmou skupinu tvoří XPV kódující tzv. „by-pass (error-prone) polymerase" pol-η.

Měsíční děti

- Terapie velmi omezená
- Spíše prevence – omezení sluneční expozice: přesun aktivit do nočních hodin, speciální oblečení s UV protektory,…

A

Gorlinův syndrom - Névoidní basocelulární syndrom

- Autozomálně dominantní nádorový syndrom, vzácný (1: 50-100 000 obyvatel; u pacientů s bazocelulárními karcinomy 1:200).
- Souvisí s vrozenými mutacemi **PTCH**, které v 80% vedou ke zkrácenému proteinu PTCH a způsobují zvýšenou expresi a pozitivní aktivaci Gli1.
- Gen kódován v oblasti 9q22.3
- Vývojové abnormality: skeletální defekty, kraniofaciální defekty, polydaktylie a syndaktylie
- Zvýšené riziko nádorů: **basaliom kůže** (téměř všichni postižení GS onemocní v průběhu života kožními nádory), dále cysty čelistí, **meduloblastom** (odvozen z buněk mozečku), fibromy ovaria, meningiomy, fibrosarkomy, rhabdomyosarkomy
- Asi 1/3 germ-line mutací je *de novo*.

Maligní melanom

- Frekvence výskytu MM (9. nejčastější nádorové onemocnění v USA) v západních zemích roste nejrychleji ze všech nádorů. 1930 → 1995: 20x vyšší výskyt.
- Melanomy se vyvíjejí transformací **melanocytů** - buněk kůže, které produkují melanin. Melanin je součást ochrany kůže před působením UV.
- Počet melanocytů je u lidí se světlou a tmavou kůží stejný, odlišné je množství produkovaného melaninu. Bílá populace má 10x vyšší riziko výskytu melanomu než Černoši, Asiaté, Hispánci.

Maligní melanom

- Vyšší riziko: světlé vlasy, oči a pleť, neschopnost se opálit, tendence ke spálení na slunci; opalování.
- Melanocyty mohou na kůži tvořit pigmentovaná znaménka a névy: není jisté, zda individuální znaménko je přímým prekurzorem melanomu, ale vysoká hustota névů je znakem zvýšeného rizika vývoje melanomu.
- 5-10 (8-12)% melanomů je **familiálních**, penetrance se odhaduje na asi 53% ve věku 80 let (variabilita - dvojčata).
- **DNS - „dysplastic nevus syndrome"** (= AMS - „atypical mole syndrome"): velké množství atypických névů svědčí o dědičné formě - téměř 100% riziko melanomu.
- DNS je **autozomálně dominantní** onemocnění

Syndrom dysplastických névů

Maligní melanom

- V 9p21-22 oblasti gen ***cdkn2a*** pro **p16^{INK4A}** - mutace *p16* odpovídají asi za 40% dědičných melanomů, nepochybně existují další geny zodpovědné za MM. v postižených rodinách se vyskytují i jiné typy nádorů, především nádory pankreatu, vzácněji děložního čípku, močového měchýře, prsu, gliomy a některé hematologické malignity.
- p16^{INK4A}: protein má 158 AA - tvoří binární komplexy specificky s Cdk4 a Cdk6, inhibuje jejich aktivitu (a tedy fosforylaci RB) (INK4A - **in**hibitor of Cd**k4**)
- *p16* je velmi často mutován u řady sporadických nádorů.
- Dědičná forma MM spojena s vrozenou mutací genu pro **Cdk4**. Záměna cysteinu 24 za arginin: interferuje s vazbou p16 a p15, ale ne s vazbou cyklinu D.

  Vrozená mutace Cdk4 mnohem vzácnější než p16.

$\Rightarrow$ Vzácný případ vrozené mutace protoonkogenu!

Maligní melanom

V oblasti 9p21 další geny:

- ***p15***^{INK4B} - veliká homologie s p16, také inaktivuje Cdk4 a Cdk6: vrozené mutace nedetekovány
- ***p14***^{ARF} - váže MDM2 a zabraňuje ubikvitinaci a degradaci p53; p14^{ARF} je kódovaný stejnou částí jako p16 DNA, ale v jiném čtecím rámci („**a**lternative **r**eading **f**rame") - lze vyřadit zároveň dvě dráhy klíčové pro kancerogenezi (p53 a RB). Neuplatňuje se u vrozených dispozic k MM.

Vrozené mutace *p16* jasně spojeny s vrozenou dispozicí k MM - asi u 40% postižených rodin; v postižených rodinách se vyskytují i jiné typy nádorů, především nádory pankreatu, vzácněji děložního čípku, močového měchýře, prsu, gliomy a některé hematologické malignity.

Wilmsův tumor - nefroblastom

- Maligní nádor ledvin dětského věku.
- Jedná se o **autozomálně dominantní** onemocnění s neúplnou penetrancí.
- Frekvence výskytu asi 1:10.000.
- Vyskytuje se v dědičné formě i jako sporadický nádor.
- Vznik a charakteristické histologické rysy tumoru jsou výsledkem aberantního embryonálního vývoje.
- Sporadický nádor se typicky u dětí vyskytuje kolem **4. až 5. roku** života, o něco častěji u dívek než chlapců, se stejnou pravděpodobností v různých etnických skupinách. Dědičná forma nádoru se typicky objevuje během **2. roku života**, často **bilaterálně**.
- Vzácně se vyskytuje i u dospělých, z toho 20% mezi 15. a 20. rokem života, 80% do 7. dekády.

Nádorový supresor WT1

- WT spojeno s mutacemi více genů.
- První byl popsaný (1990) nádorový supresor **WT1**, lokalizovaný v oblasti 11p13. Jeho mutace jednak spojeny s tvorbou Wilmsova nádoru a také s vývojovými malformacemi urogenitální oblasti - výrazněji u chlapců (mechanismus haploinsuficience).

- Asi 1% postižených vykazuje tzv. syndrom WAGR (**W**ilmsův tumor, **A**niridie, **G**enitální vady, růstová a mentální **R**etardace).

  WT u 1 dítěte z 10.000, aniridie u 1 dítěte ze 70.000. Aniridie se vyskytuje u 1 ze 70 dětí s WT, WT se vyvine u 1 ze 3 dětí s aniridií!
- Aniridie souvisí s mutací genu *Pax6*. Lokusy pro aniridii a WT (*Pax6* a *WT1*) jasně odděleny, ale leží blízko sebe.

  WAGR syndrom je spojen s rozsáhlejšími cytogenetickými delecemi oblasti 11p13 (typický mikrodeleční syndrom).

Nádorový supresor WT1

- Je exprimován v ledvinách, jeho exprese je přísně během vývoje regulována: časově i prostorově.
- 49-52 kDa, lokalizovaný v jádře
- *WT1* kóduje tkáňově specifický transkripční faktor se specifickou vazbou na DNA, další roli hraje zřejmě při posttranskripčních úpravách - interakcí s RNA.
- Má antiproliferativní účinek a zřejmě schopnost stimulovat specifické diferenciační procesy.
- WT1 zřejmě hraje nějakou roli v hematopoietickém vývoji: nejčastějším dalším primárním onemocněním je leukémie; asi u 20% AML/ALL se popisují mutace *WT1*.

Syndrom von Hippel-Lindau - VHL

Autozomálně dominantní dědičné onemocnění, které je spojeno s vysokým rizikem vývoje nádorů v mnoha orgánech, především:

- **retinální hemangiomy**: zpravidla nejčasnější detekce (v průměru 25 let)
- **hemangiomy CNS a páteře**: průměrný věk při detekci 30 let
- **karcinomy ledvin**: průměrný věk při diagnóze 37 let, objevují se u 28 - 45% postižených; jsou maligní a mohou metastazovat

Onemocnění spojeno s vrozenými mutacemi genu *VHL*, který je zmapován do oblasti 3p25.5.

Syndrom von Hippel-Lindau

- Frekvence výskytu je asi 1:36.000.
- Penetrance je 80-90%.
- Expresivita je vysoce variabilní - klinická variabilita je přímo znakem VHL.

  Popsány dvě formy VHL: **typ 2 VHL** („low risk") je spojen s výskytem feochromocytomů a missense mutacemi (96%), **typ 1 VHL** („high risk") spojen spíše s delecemi/inzercemi, nesmyslnými kodóny → vývoj feochromocytomů zřejmě spojen s pouze částečnou ztrátou aktivity pVHL
- Somatické mutace jsou také běžné u sporadických hemangioblastomů a nádorů ledvin (gen *VHL* může být také inaktivován methylacemi CpG ostrůvků v promotorové oblasti).

VHL - protein

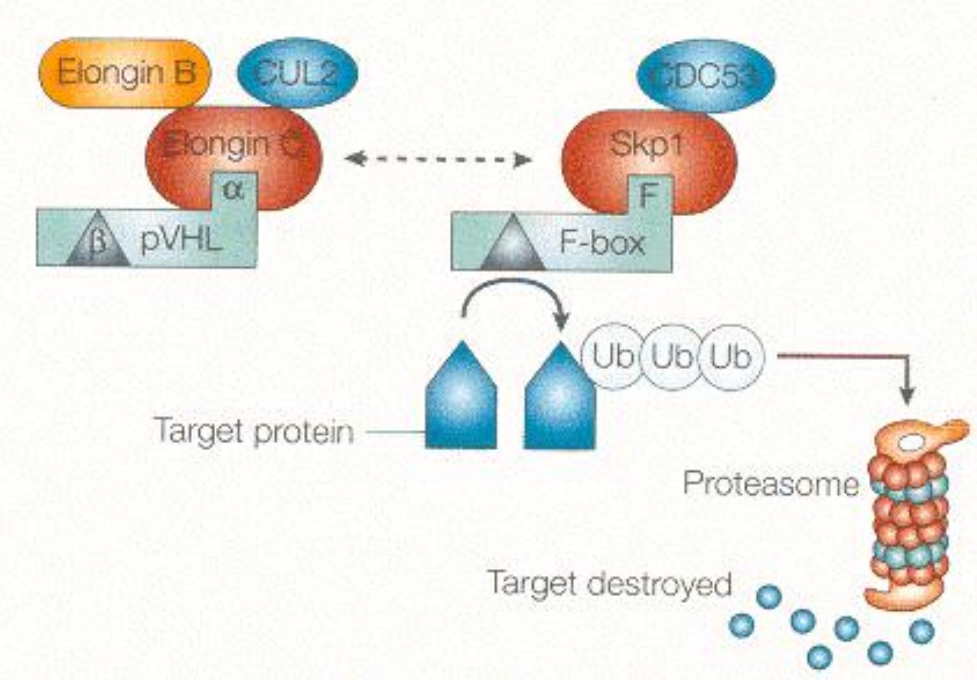
- Protein **pVHL** má 213 AA, v buňkách se tvoří 2 isoformy (19 až 30 kDa).

- Je lokalizován v jádře i v cytoplasmě, převaha proteinu je v cytoplasmě.

- Typicky koimunoprecipituje se specifickou sadou proteinů. Interaguje s proteinem **elonginem C**, ten interaguje dále s **elonginem B** a proteinem **cullin-2** (CUL2) – tento komplex homologní s ubikvitin ligázovým komplexem SCF (Skp1 – Cdc53 – F-box) kvasinek – z této podobnosti se usuzuje na funkci VHL a celého komplexu:

Funkce pVHL

pVHL jako součást komplexu s Elonginem B, C a CUL2 rozpoznává cílové proteiny, komplex poté způsobuje jejich ubikvitinaci a následnou degradaci proteazomem



Funkce pVHL

- Hemangiomy a nádory ledvin mají dva společné znaky:
  1. vysoká **vaskularizace** spojená s vysokou hladinou **VEGF**
  2. produkce erythropoietinu (**EPO**), který způsobuje navýšení počtu červených krvinek (toto platí i pro feochromocytomy)

  - tyto proteiny kódovány **geny indukovatelnými hypoxií** (*„hypoxia-inducible genes"*)

- Buňky s nefunkčním pVHL produkují vysoké hladiny mRNA genů indukovatelných hypoxií – bez ohledu na hladiny kyslíku – to je molekulárním markerem inaktivace VHL.

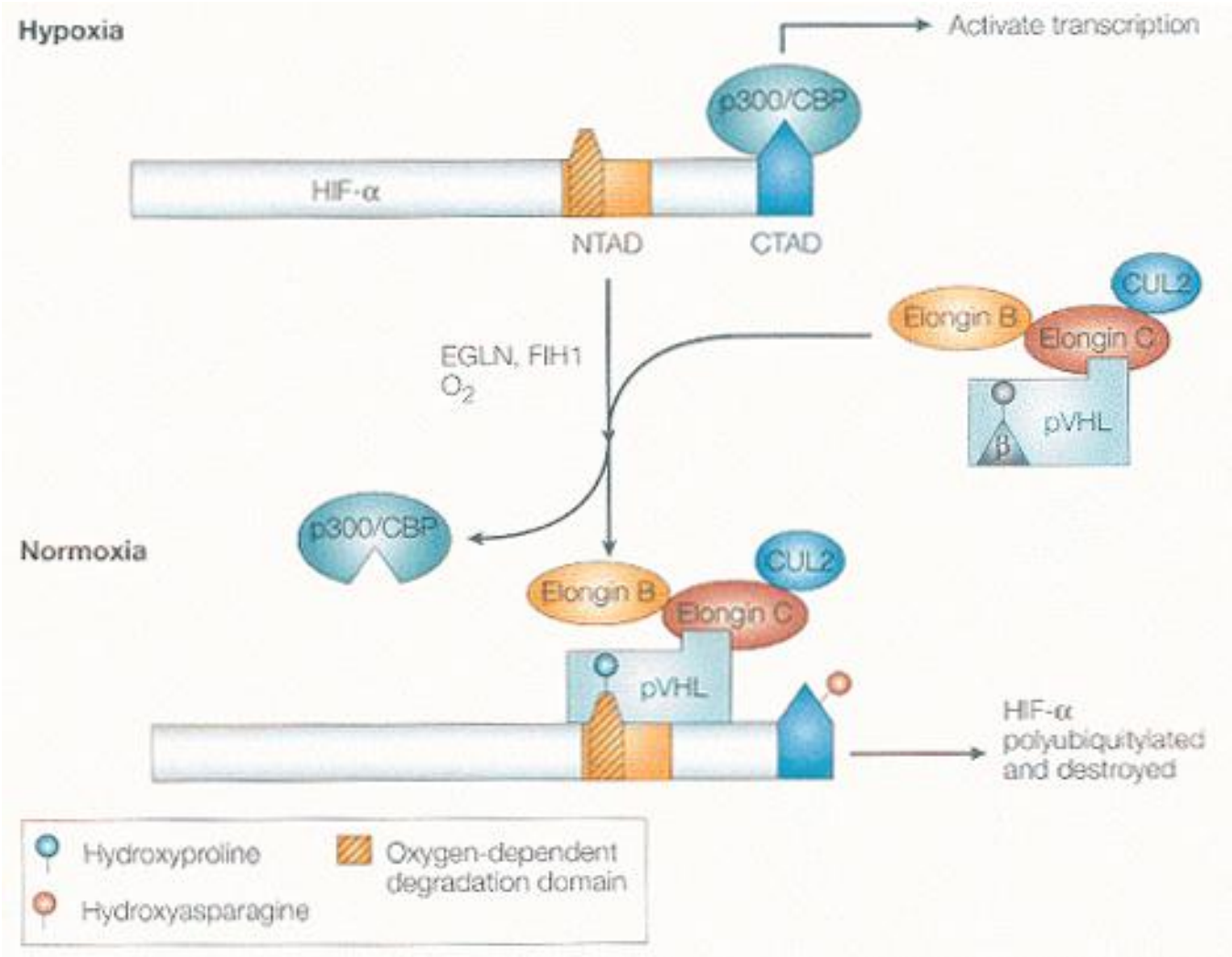
Funkce pVHL: regulace HIF-1

- Mnohé geny idukovatelné hypoxií (včetně VEGF a EPO) jsou pod kontrolou transkripčního faktoru **HIF-1** („*hypoxia-inducible factor*"). Je to heterodimer složený z podjednotek **HIF-1α** a **HIF-1β**.

- V přítomnosti kyslíku je HIF-1α je ubikvitinován a degradován. To je podmíněno hydroxylací prolinu na HIF-1α (Ŷ kyslík v těchto hydroxylových skupinách pochází přímo z molekulárního kyslíku!).

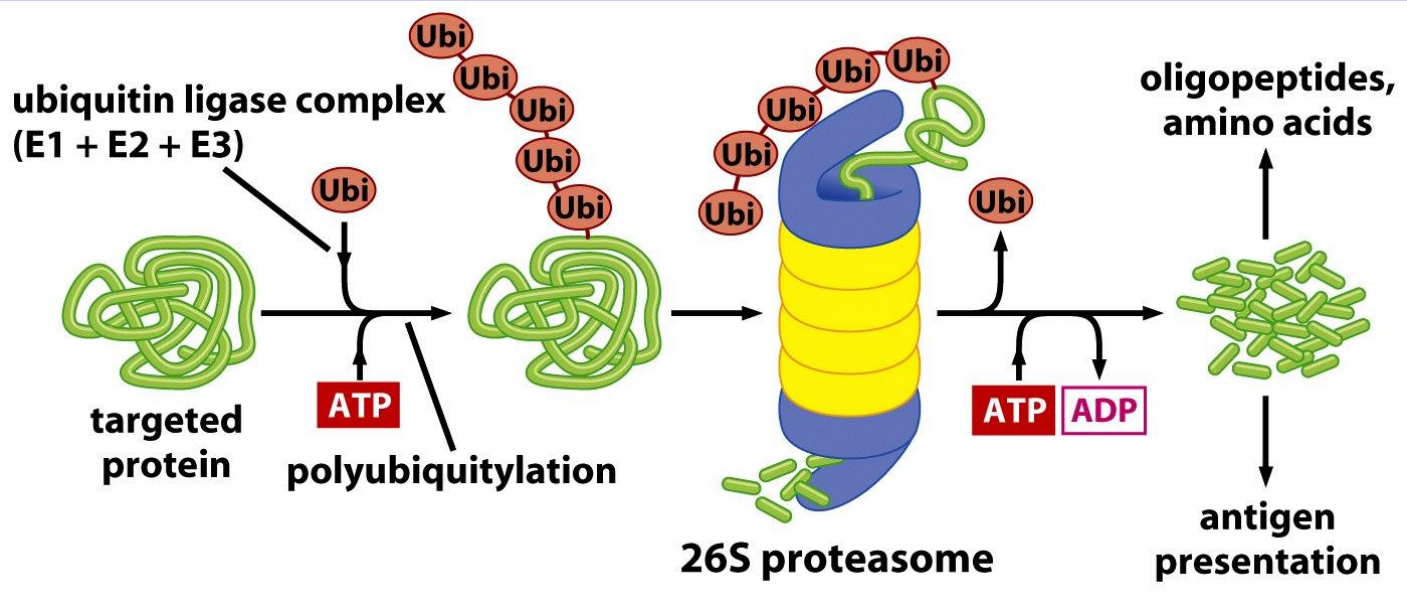
- Při nedostatku kyslíku (hypoxie) se HIF-1α akumuluje, dimerizuje s HIF-1β, s C-koncem HIF-1α interagují p300 a CBP a HIF-1 poté transaktivuje své cílové geny.

Funkce pVHL: regulace HIF-1



NTAD, CTAD ï transaktivační domény

Ubikvitinace a proteasom

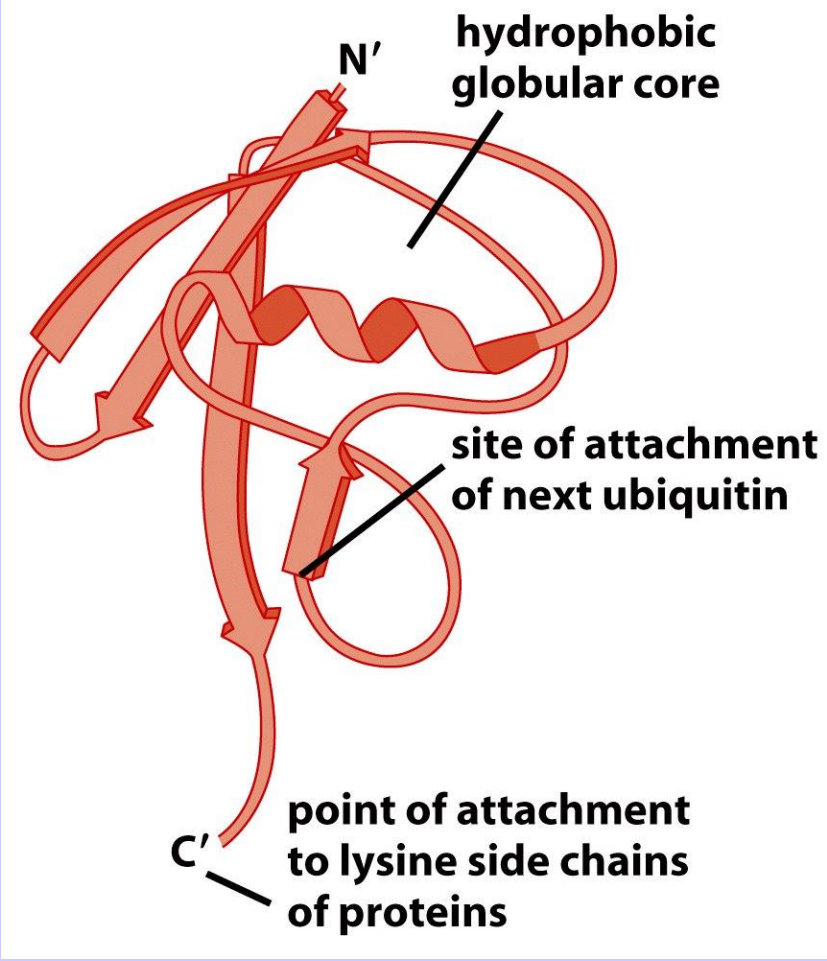


komplex ubikvitin ligázy (E1, E2 a E3) rozpoznává protein určený k degradaci → označuje ho připojením řetězce ubikvitinů: polyubikvitinuje jej → označený protein je zachycen proteasomem, ubikvitin je odstraněn a protein degradován na oligopeptidy

1. aktivace ubikvitinu enzymem **E1**; 2. ubikvitin konjugující enzym **E2**; 3. vazba na substrát (zbytek lysinu) ubikvitin ligázou **E3** – ta je specifická, je to klíčový enzym

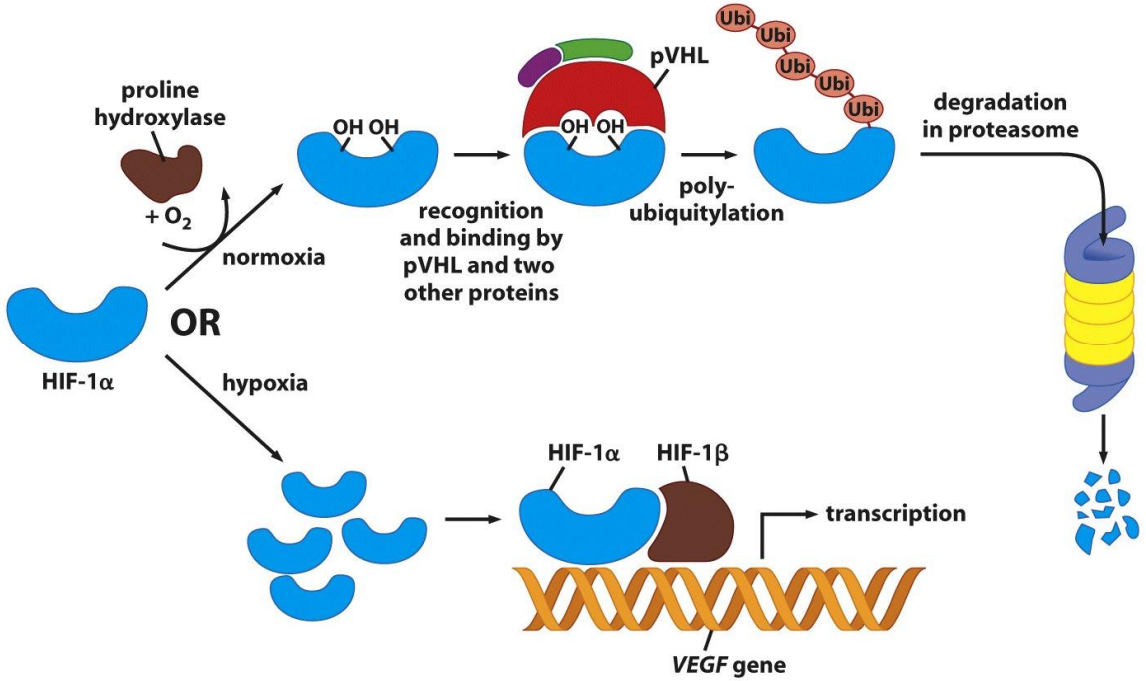
E3: např. **SCF**, **APC/C** („anaphase-promoting complex"), **MDM2**, **pVHL**

Ubikvitin



Ubikvitin je relativně malý peptid, složený ze 76 aminokyselinových zbytků. Jeho struktura je téměř úplně konzervovaná mezi eukaryotickými buňkami.

HIF-1 a jeho regulace pVHL



Při dostatku kyslíku (**normoxie**) je HIF-1a silně exprimován a téměř okamžitě účinně degradován účinkem pVHL. Prolin hydroxyláza oxiduje až dva zbytky prolinu na molekule HIF-1a na hydroxyprolin. Tyto hydroxyproliny umožňují vazbu pVHL, který spolu s dalšími 2 proteiny ubikvitinuje HIF-1a.

Při nedostatku kyslíku (**hypoxie**) prolin hydroxyláza nedokáže oxidovat proliny, HIF-1a uniká degradaci, tvoří dimer s HIF-1β a transaktivuje své cílové geny (např. VEGF).

Kolorektální nádory - CRC

Sporadické:

Dědičné:

- **Nepolypózní**

  Lynchův syndrom

- **Polypózní**

  Familiální adenomatózní polypóza coli FAP

  Peutz-Jeghersův syndrom

  Familiální juvenilní polypóza

  Hyperplastická polypóza

Phakomatosy

„phakos" (řec.) - mateřské znaménko

1932 - takto označena kategorie syndromů, které se vyznačují velkým množstvím benigních lézí, které tak představují znamení, předzvěst možného vývoje nádoru

- původně zařazeny: **neurofibromatóza**, **syndrom von Hippel-Lindau**

- dnes asi 10 onemocnění: **FAP**, **juvenilní polypóza**, **Peutz-Jeghersův syndrom**, **Gorlinův syndrom**, **Cowdenův syndrom**, **syndrom dysplastických névů**,...

Familiální adenomatózní polypóza - FAP

- **Autosomálně dominantní** dědičné onemocnění.
- U pacientů s FAP se vyvíjejí stovky až tisíce benigních kolorektálních nádorů, z nichž některé progredují do karcinomů, nejčastěji během druhé a třetí dekády života. Průměrný věk detekce nádoru u FAP pacientů je 40 let.

Polypy, které se objevují u pacientů s FAP, jsou totožné s polypy sporadickými a také nemají větší riziko maligní progrese než sporadické polypy. Ale jejich velký počet „zajišťuje", že některé se s jistotou v maligní vyvinou.

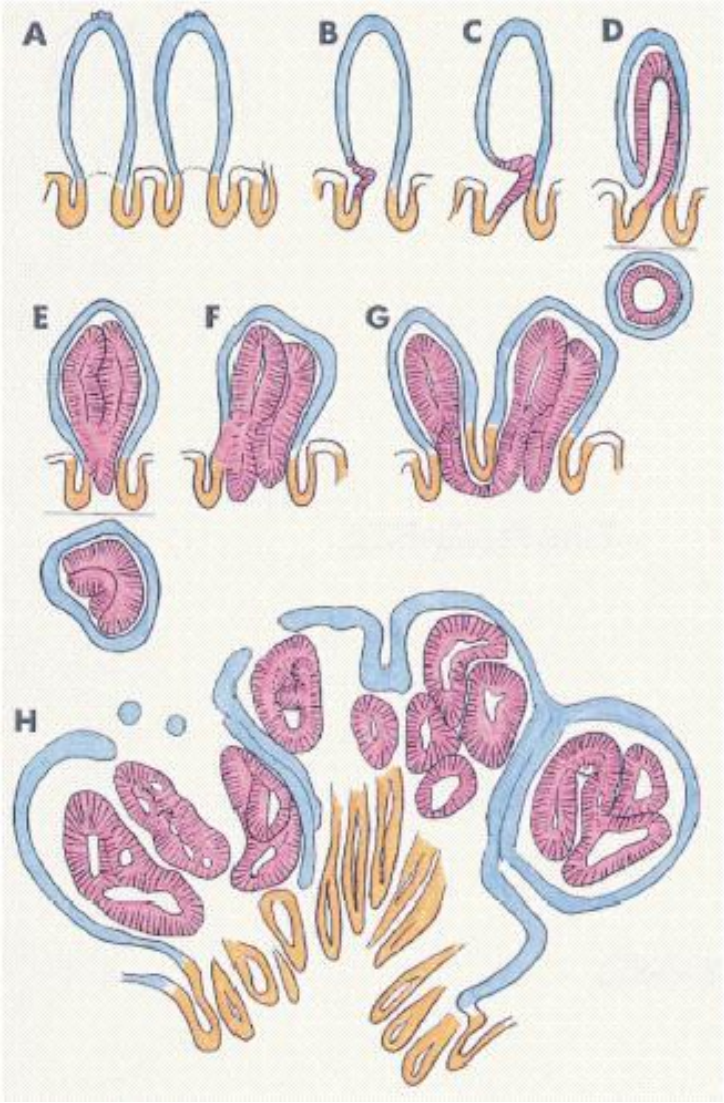
Familiální adenomatózní polypóza

- Pacienti s FAP mají zvýšené riziko vývoje thyroidních nádorů, nádorů tenkého střeva, žaludku a mozku.
- U pacientů s FAP se často vyvíjejí i mimostřevní projevy, včetně poškození sítnice, osteomy, desmoidy kůže.

Mezi pacienty s FAP je pozorována velká variabilita, byly popsány varianty FAP:

- **Gardnerův syndrom** - charakteristické jsou nádory měkkých tkání, osteomy, abnormality zubů, …
- Některé formy FAP s nižším počtem střevních polypů (10 až 100)
- **Turcotův syndrom** - typická je kombinace nádorů nervového systému a nádorů střeva (ne všechny případy Turcotova syndromu jsou „FAP" - nesouvisí s mutacemi *APC*)

Tvorba adenomatózních polypů u FAP



A. Normální střevní epitel:
zárodečné buňky krypt,
diferencované buňky klků

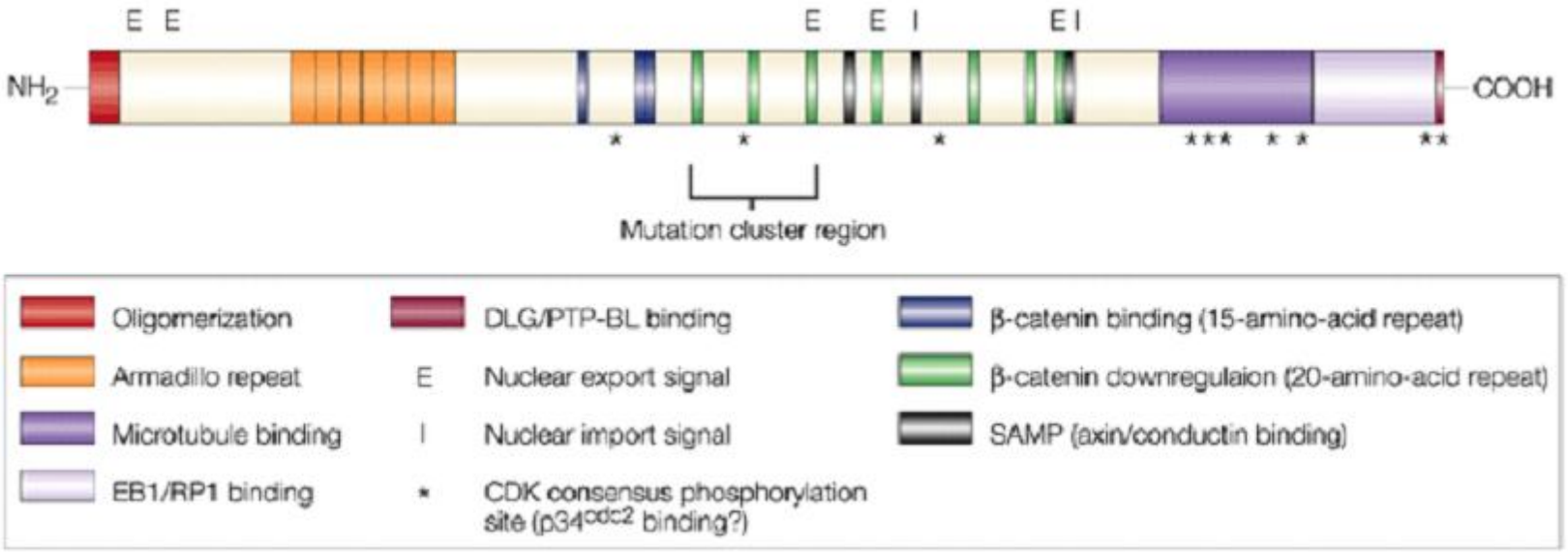
B. - C. vývoj polypu:
adenomatózní tkáň

D. - F. mikroadenomy

Familiální adenomatózní polypóza

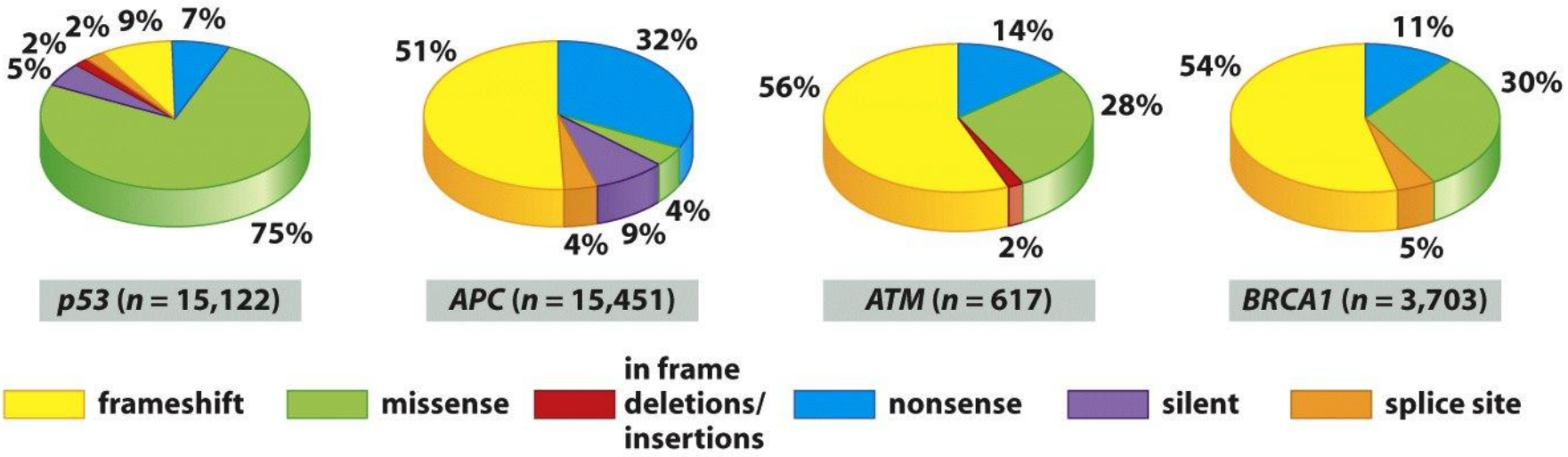
- FAP je spojena s vrozenými mutacemi genu *APC*.
- Ten je lokalizován v oblasti **5q21**.
- Během kancerogeneze musí být inaktivovány obě kopie genu *APC* (⇔ častý „LOH" 5q).
- Somatické mutace *APC* také hrají klíčovou úlohu při vývoji sporadických kolorektálních karcinomů, jsou detekovány alespoň u 80% všech CRC.
- Vysoký podíl mutací, které vedou ke zkráceným proteinům.
- Relativní vztah mezi typem mutace a průběhem onemocnění.

Struktura proteinu APC

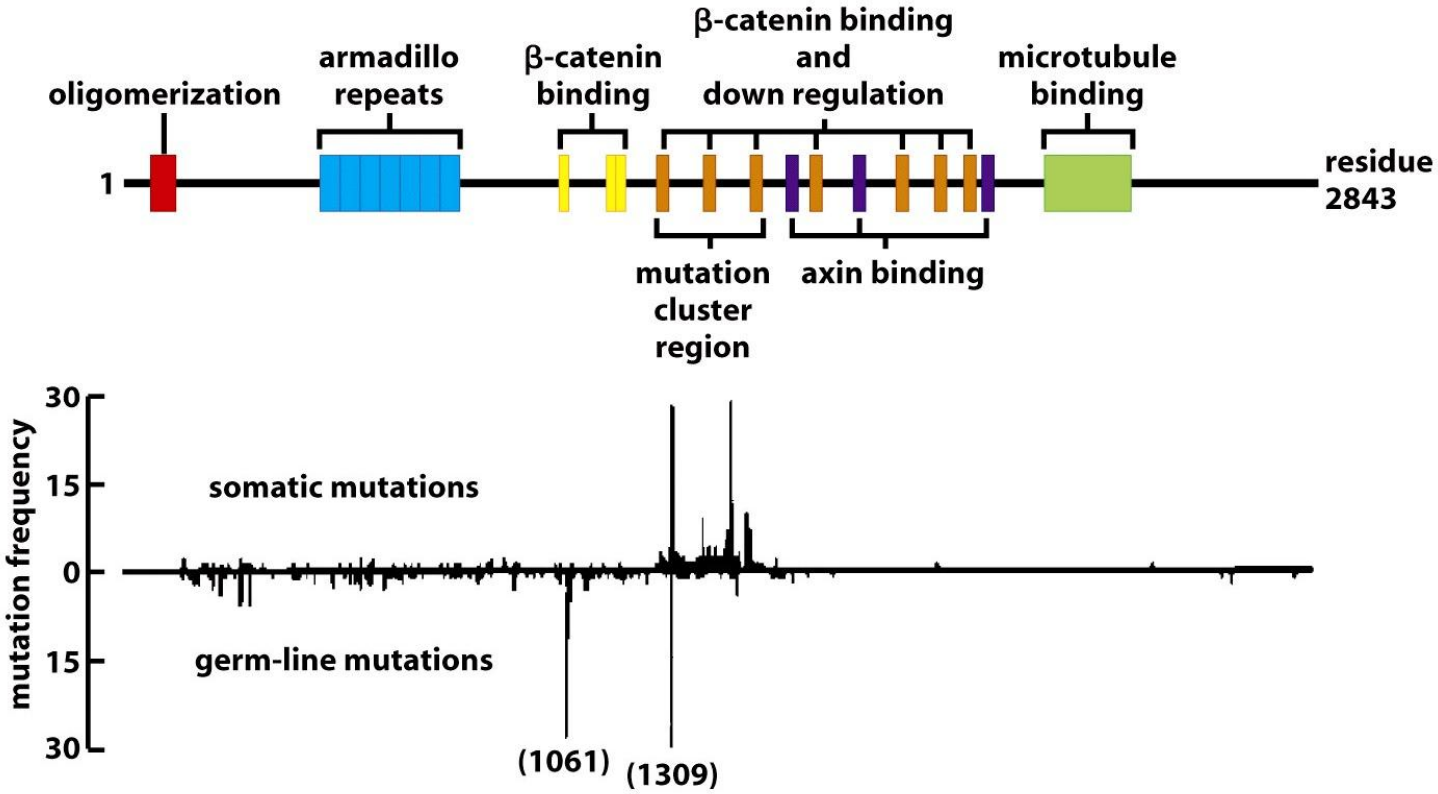


Mutace APC

- Většina mutací APC vede ke zkráceným proteinům, které postrádají různý počet sekvencí nutných k regulaci β-kateninu.
- Vrozené mutace se nacházejí v 5´ polovině molekuly APC, somatické mutace potom především mezi kodóny 1286 a 1513.



Struktura APC a mutační spektrum



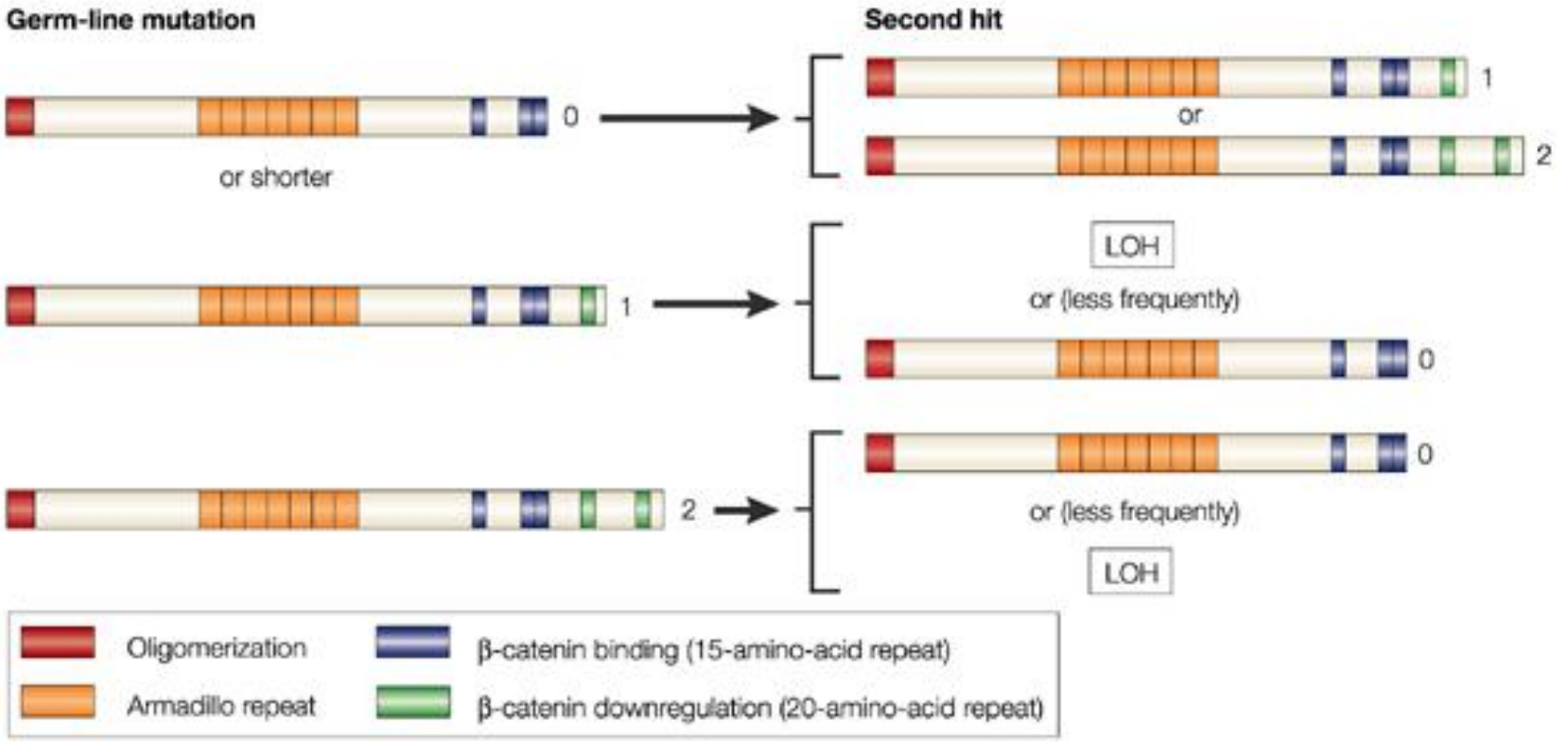
Mutace APC

- **Pozice a typ druhé mutace u FAP závisí na místě první mutace!** Specifické genotypy jsou selektovány během časné fáze kancerogeneze CRC tak, aby zbytková hladina β-kateninu byla „optimální", nikoli maximální (apoptóza).

  (princip „**tak akorát**")

⇒Alespoň jedna mutace zachovává ve výsledné molekule alespoň jednu (20 AA) sekvenci nutnou k regulaci β-kateninu.

Závislost vrozených a somatických mutací APC



Nature Reviews | Cancer

Dvojí úloha proteinu APC v buňce: Dvojí úloha APC při vývoji CRC

APC se zřejmě uplatňuje jak při iniciaci vývoje nádoru (v důsledku selektivní výhody získané aktivací Wnt-1/β-katenin dráhy), tak také v pozdějších fázích vývoje nádoru tím, že je příčinou chromozomální nestability.

APC je „caretaker" i „gatekeeper".

Další stadia vývoje kolorektálního karcinomu

Kolorektální karcinomy představují výborný **model pro studium kancerogeneze**:

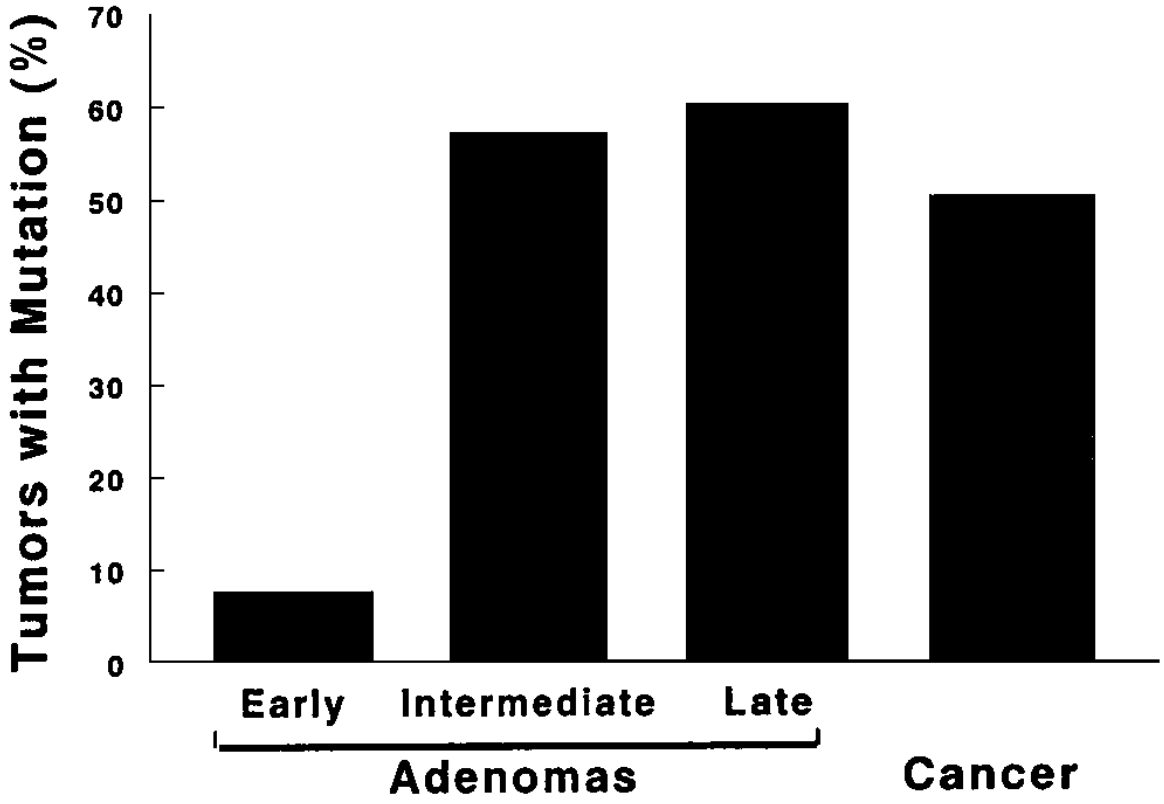
- relativně „standardní" průběh od malých adenomů (do 1 cm), přes středně pokročilé (více než 1 cm bez známek transformace) a velké adenomy až po plně rozvinutý maligní CRC
- souvislost mezi „anatomií", morfologií jednotlivých stadií a molekulárními změnami, které se odehrály
- model kooperace onkogenů a nádorových supresorů během kancerogeneze

Další stadia vývoje kolorektálního karcinomu - aktivace *ras*

- Specifické bodové mutace protoonkogenu K-*ras* nebo N-*ras* jsou detekovány alespoň u 50% kolorektálních adenomů větších než 1 cm a asi u 50% karcinomů.
- Mutace *ras* jsou jen vzácně (do 10%) detekovány u adenomů menších než 1cm.

$\Rightarrow$ mutace *ras* se typicky objevují při progresi adenomů

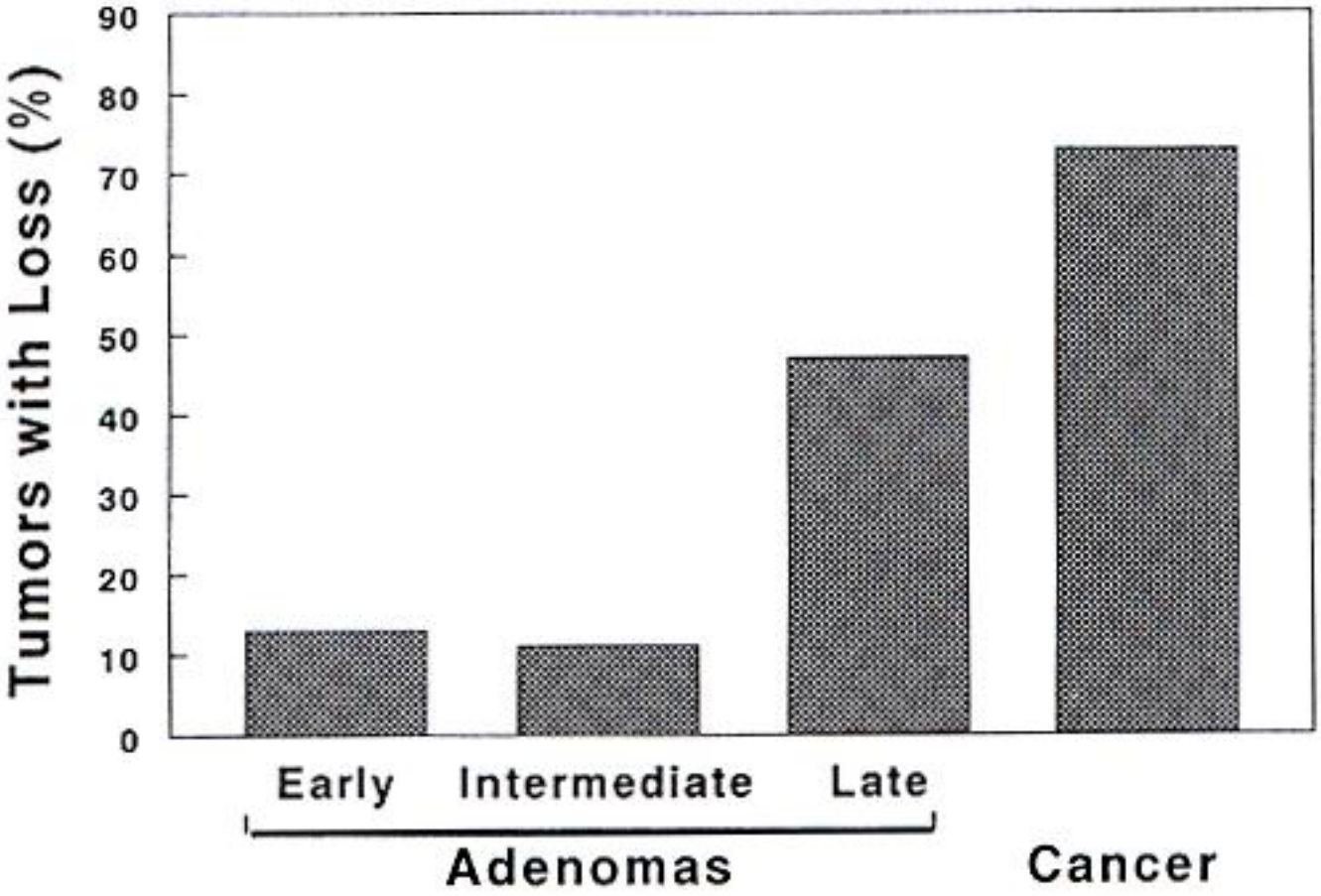
Frekvence mutací *ras* u kolorektálních karcinomů



Další stadia vývoje kolorektálního karcinomu - „LOH" 18q

- Delece oblasti 18q detekovány u 50% velkých adenomů a 70% karcinomů.
- Na chromosomu 18q detekován gen pro ***SMAD4***, někdy označovaný jako *DPC4* („deleted in pancreatic cancer").
- SMAD4 je součástí signální dráhy TGF-β.

Frekvence delecí oblasti 18q u kolorektálních karcinomů

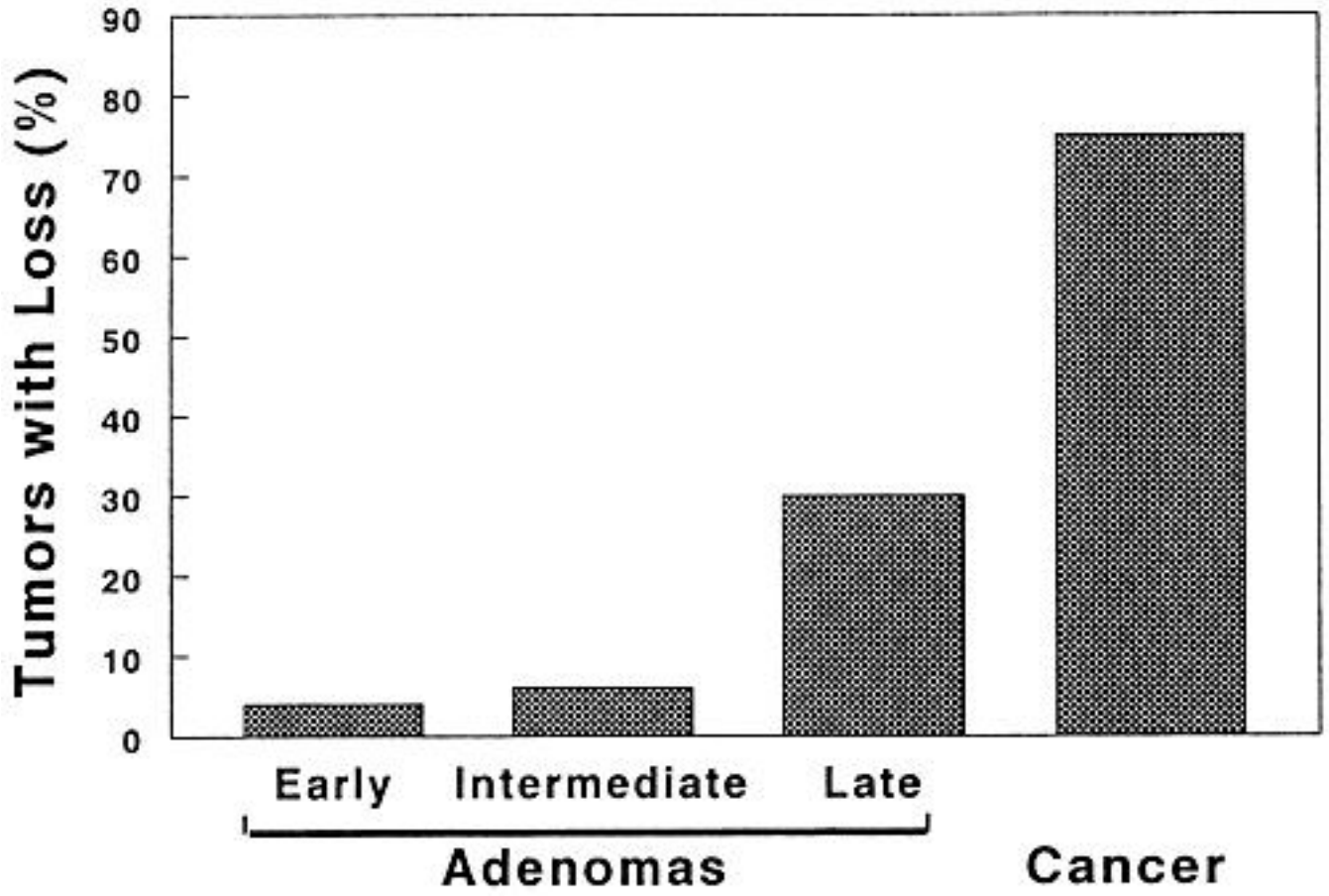


Další stadia vývoje kolorektálního karcinomu - inaktivace p53

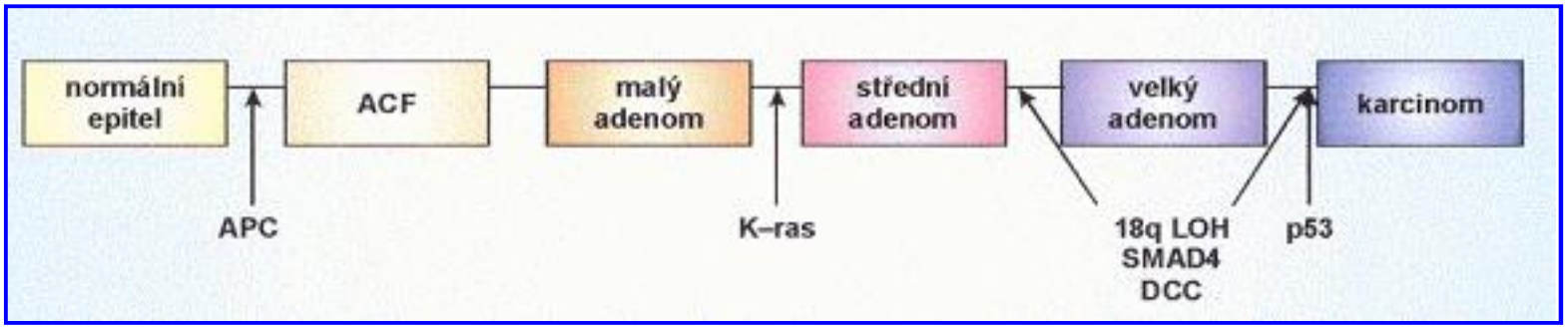
- Ztráta 17p je detekována u 75% kolorektálních karcinomů.
- Ztráta 17p je jen vzácně detekována u kolorektálních adenomů.

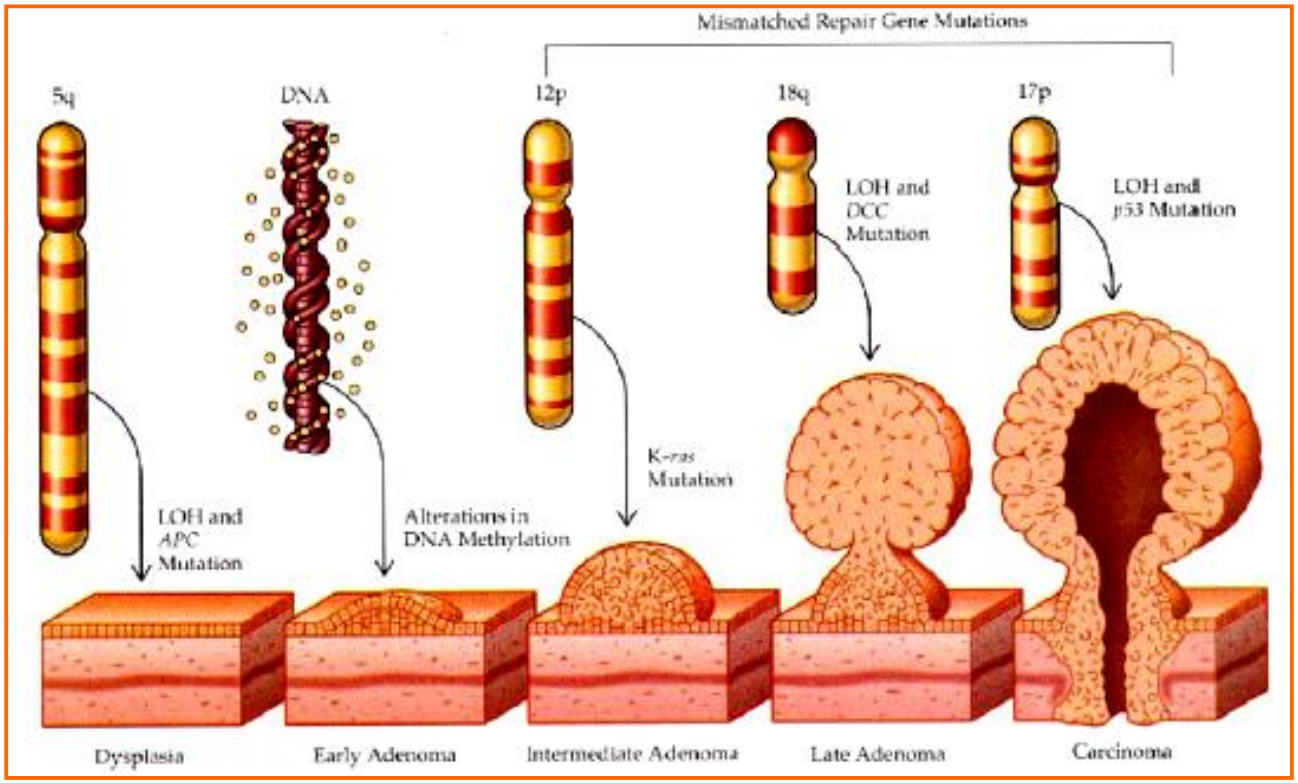
⇒ Inaktivace nádorového supresoru p53 je typicky pozdní událost během vývoje kolorektálních karcinomů.

Frekvence mutací p53 u kolorektálních karcinomů

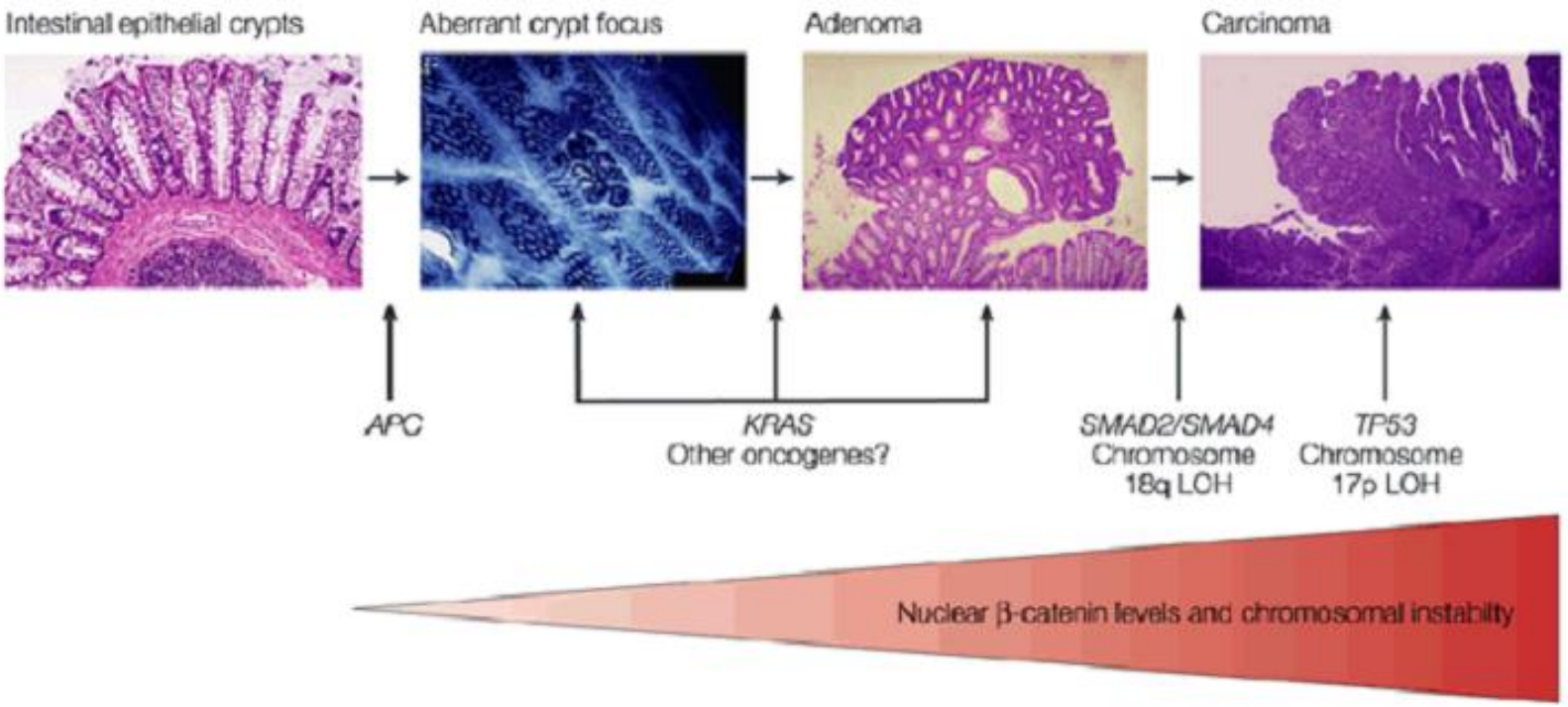


Genetický model kancerogeneze CRC



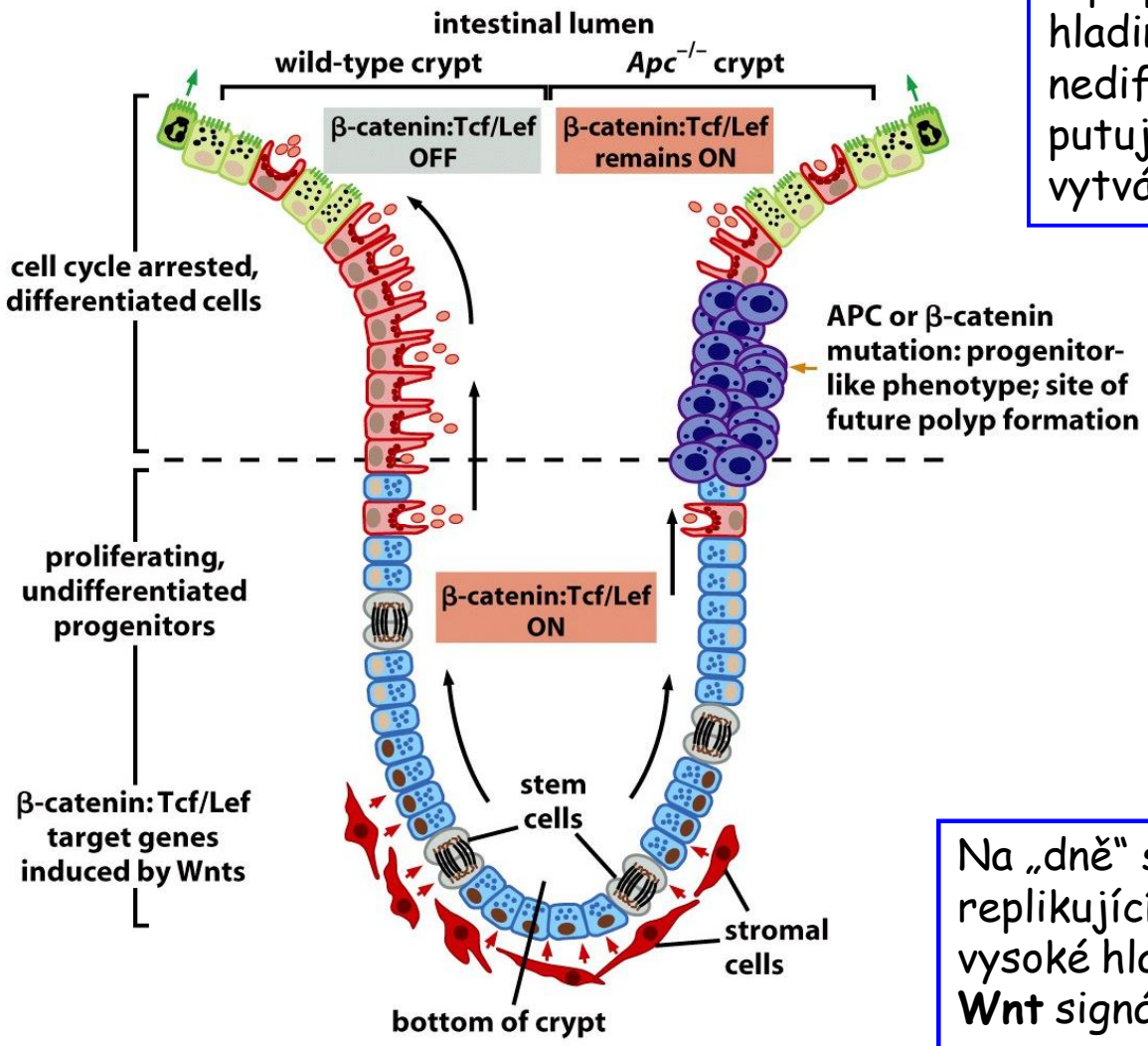


Genetický model kancerogeneze CRC



Rostoucí tolerance ke zvyšující se hladině ß-kateninu!

β-katenin a biologie střevních krypt

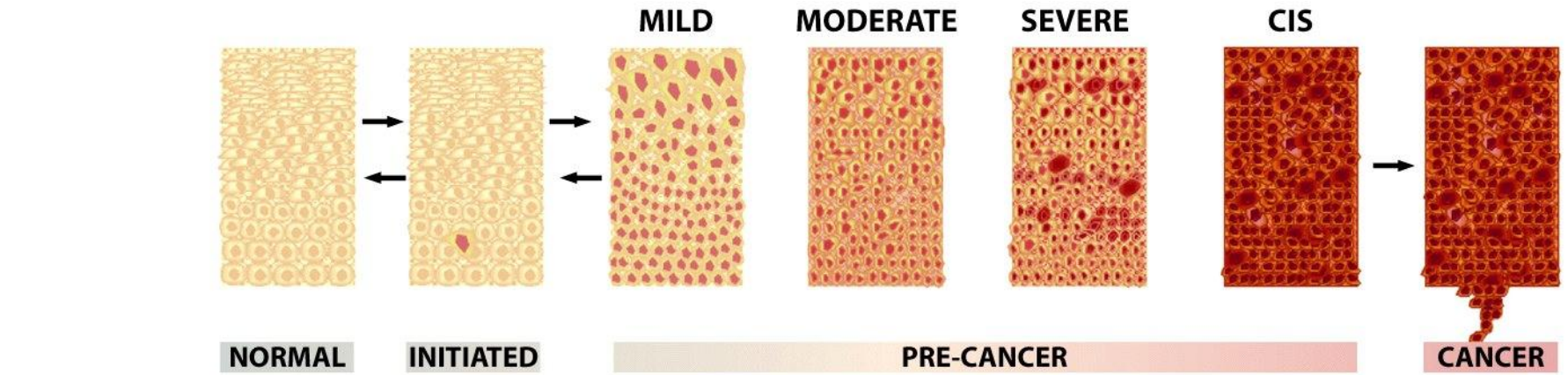


V případě **mutace *APC*** jsou vysoké hladiny β-kateninu i bez signálu Wnt, nediferencované proliferující buňky putují na vrcholek střevní krypty a vytvářejí polyp.

Proliferující nediferencující progenitorové buňky putují vzhůru: snižuje se stimulace Wnt signálem a zvyšuje se tak degradace β-kateninu. Snižuje se proliferace a postupuje diferenciace. Diferencované buňky odumírají apoptózou po 3 až 4 dnech.

Na „dně" střevních krypt se nacházejí replikující se kmenové buňky, které obsahují vysoké hladiny β-kateninu, protože dostávají **Wnt** signály z okolních stromálních buněk.

Vývoj nádorů trvá roky



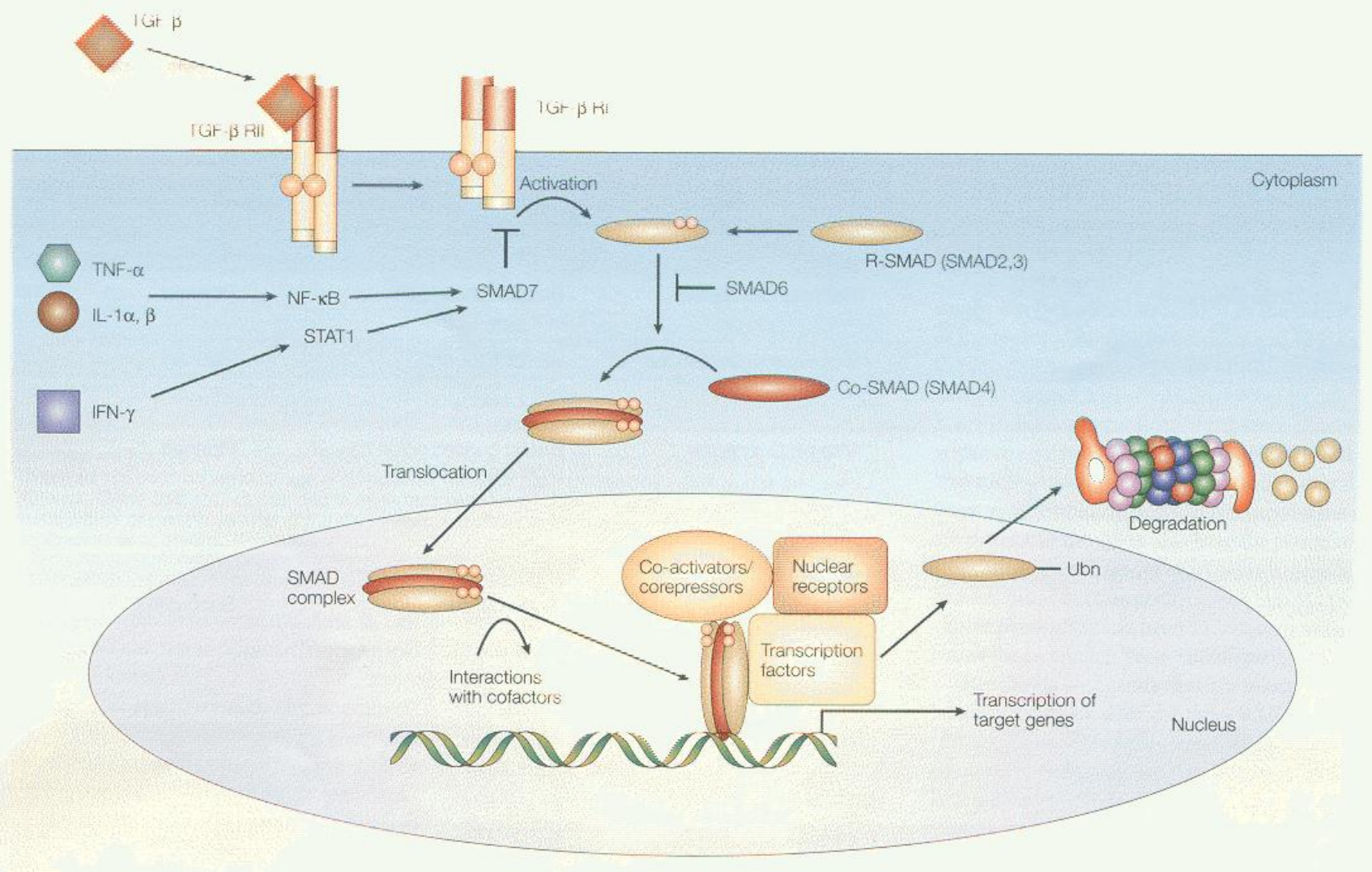
colon	5–20 years	adenoma	5–15 years			
head and neck	tobacco use 4–10 years	dysplastic oral leukoplakia	6–8 years			
cervix	CIN 1	9–13 years	CIN 3/CIS	10–20 years		
lung (smokers)	20–40 pack-years					
breast	atypical hyperplasia		DCIS	6–10 years		
prostate	20 years	PIN	≥10 years	latent cancer	3–15 years	

Juvenilní polypóza coli

- **Autozomálně dominantní** syndrom.
- Název „**juvenilní**" u JPS ani tak neodráží věk postižených, jako spíš histologii polypů, která se podobá juvenilním polypům.
- 34x zvýšená pravděpodobnost CRC; celoživotní riziko CRC asi 40%; průměrný věk dg. CRC 44 let.
- Některé případy JPS (asi 20%) jsou spojeny s vrozenými mutacemi *SMAD4* (*DPC4*) (18q21.1).

- Proteiny SMAD jsou cytoplazmatické přenašeče signální dráhy TGF-β; TGF-β inhibuje růst mnoha různých tkání, rezistence k signalizaci TGF-β je spojována s kolorektálními nádory; Vazba TGF-β k příslušnému receptoru vede k fosforylaci **SMAD2** a/nebo **SMAD3**, ty potom tvoří komplex se **SMAD4** a tento komplex migruje do jádra, kde ve spolupráci s dalšími TF spouští transkripci cílových genů dráhy TGF-β (např. $p21^{CIP1}$, $p15^{INK4B}$, a další).

Signální dráha TGF-β



Dědičný nepolypózní kolorektální karcinom - HNPCC = Lynchův syndrom

- HNPCC představují asi 2-4% všech **kolorektálních nádorů** v západních zemích.
- Průměrný věk detekce nádoru u HNPCC pacientů je 40 let.
- Pacienti nemají zvýšený počet prekurzorových adenomů.
- Celoživotní riziko vývoje CRC je pro ženy 50%, pro muže 80% a celoživotní riziko vývoje nádoru **dělohy** je 60%.
- Pacienti s HNPCC ohroženi dále nádory vaječníků, žaludku, pankreatu a močových cest.
- Vývoj nádorů souvisí s mutacemi genů MMR, nádory jsou geneticky nestabilní a progredují rychle, jsou ale méně agresivní než FAP (jsou diploidní).
- Somatické mutace v genech MMR (nejčastěji metylace *MLH1*) se nejčastěji vyskytují u kolorektálních nádorů, u nádorů dělohy, a u nádorů žaludku (asi 13-15%), u jiných typů nádorů jsou vzácné (asi 2%).

Dědičný nepolypózní kolorektální karcinom

- Syndrom je spojen s vrozenými mutacemi genů pro opravu chybného párování („mismatch repair"):
- ***MSH2*** (první detekovaný; 2p15-16, 106 kDa)
- ***MLH1*** (3p21; 85 kDa)

  - tyto dva odpovídají za více než **90%** HNPCC
- ***PMS2*** (7p22; 96 kDa)
- ***MSH6*** (2p16) - odpovídá za odlišný fenotyp

  - tyto dva odpovídají jen za malý podíl HNPCC
- ***PMS1*** (2q31)
- ***MSH3*** (5q11-q12)

  - jejich význam v MMR je stejně velký, ale jejich mutace jsou jen vzácně předávány v zárodečné linii
- ***MLH3*** (14q24.3)

Oprava chybného párování

- MMR studován v souvislosti s nádory po objevení skupiny sporadických kolorektálních nádorů, u kterých byly v genomu nalezeny rozsáhlé změny v oblastech poly(A). Později byly nalezeny obdobné změny také v poly(CA) opakováních a tento jev dostal označení **mikrosatelitová nestabilita**.

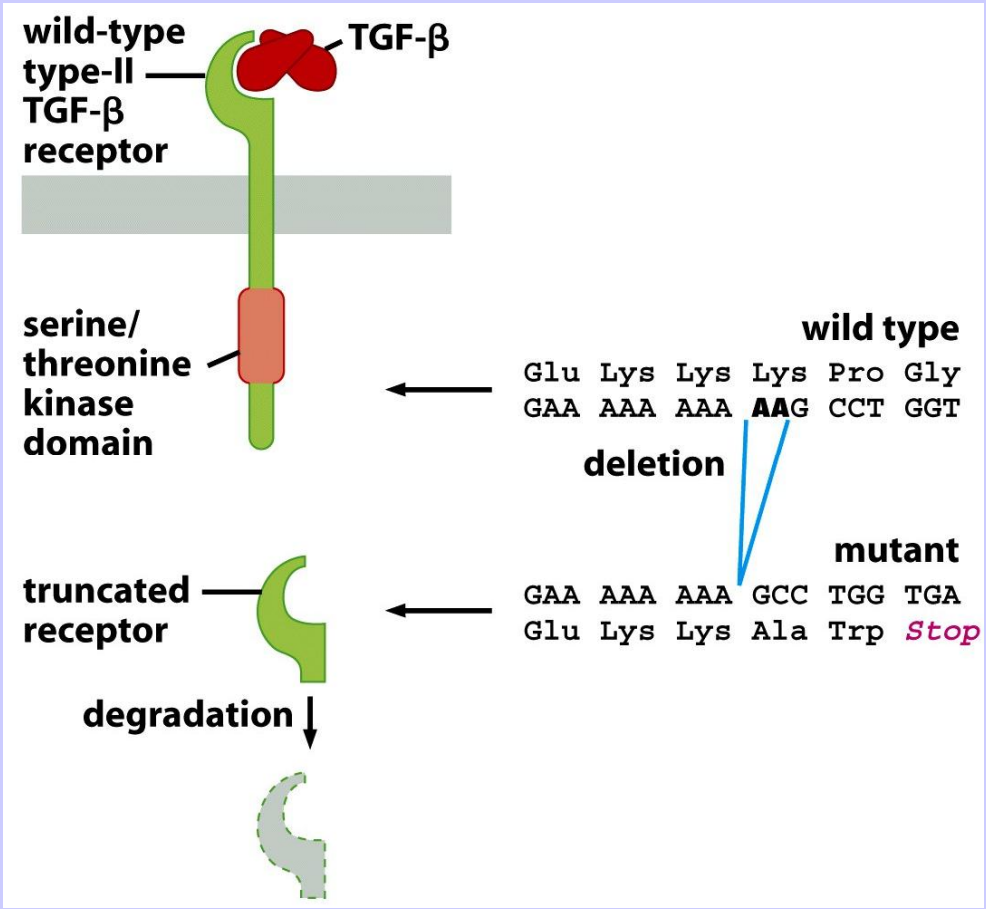
- Mikrosatelitová DNA se zdá být zvláště náchylná k chybnému párování, protože při syntéze krátkých tandemových repetic DNA může snadněji dojít ke **sklouznutí syntetizovaného řetězce vůči templátu**:

  např. A7 → A6 nebo A8

Důsledky defektů v opravě chybného párování

„Onkogenní" mutace vznikající sekundárně v důsledku nestability repetic se mohou objevit v kterémkoliv genu. Popsáno např. u ***APC***, **receptoru pro TGFßII** (sekvence 10A kódujících 3 lyziny), gen pro **BAX** (obsahuje sekvenci 8G - kodóny 38-41: u MMR^+ nádorů se v této sekvenci vyskytují časté inzerce nebo delece jedné báze – to typicky spojeno s nepřítomností mutace p53).

Příklad důsledku chyb v MMR: mutace TGF-βRII



Tento gen často mutován u CRC s mikrosatelitovou nestabilitou.

V genu se nachází mikrosatelit 10A. Často deletován 1 nebo 2 A → non-sense mutace → předčasně ukončená translace → ztráta C-terminální signální domény ⇒ rezistence k signalizaci TGFβ.

(výsledný protein má 129 nebo 161 namísto 565 AA)

Table 12.2 Genes and proteins that have been inactivated in human cancer cell genomes because of mismatch repair defects

Gene	Function of encoded protein	Wild-type coding sequence	Colon	Stomach	Endometrium
ACTRII	GF receptor	A_8	X		
AIM2	interferon-inducible	A_{10}	X		
APAF1	pro-apoptotic factor	A_8	X	X	
AXIN-2	Wnt signaling	A_6, G_7, C_6	X		
BAX	pro-apoptotic factor	G_8	X	X	X
BCL-10	pro-apoptotic factor	A_8	X	X	X
BLM	DNA damage response	A_9	X	X	X
Caspase-5	pro-apoptotic factor	A_{10}	X	X	X
CDX2	homeobox TF	G_7	X		
CHK1	DNA damage response	A_9	X		X
FAS	pro-apoptotic factor	T_7	X		X
GRB-14	signal transduction	A_9	X	X	
hG4-1	cell cycle	A_8	X		
IFRIIR	decoy GF receptor	G_8	X	X	X
KIAA097	unknown	T_9	X		
MLH3	MMR	A_9	X		X
MSH3	MMR	A_8	X	X	X
MSH6	MMR	C_8	X	X	X
NADH-UO8	electron transport	T_9	X		
OGT	glycosylation	T_{10}	X		
PTEN	pro-apoptotic	A_6	X		X
RAD50	DNA damage response	A_9	X	X	
RHAMM	cell motility	A_9	X		
RIZ	pro-apoptotic factor	A_8, A_9	X	X	X
SEC63	protein translocation into endoplasmic reticulum	A_{10}, A_9	X		
SLC23A1	transporter	C_9	X		
TCF-4	transcription factor	A_{10}	X	X	X
TGF-βRII	*TGF-β receptor*	A_{10}	X	X	X
WISP-3	growth factor	A_9	X		

From A. Duval and R. Hamelin, *Cancer Res.* 62:2447–2454, 2002.

Cowdenův syndrom - CS

- **Autosomálně dominantní** onemocnění - charakteristické vývojem násobných hamartomů (benigní nádorky) v mnoha orgánech (kůže, mamární tkáň, štítná žláza, trávicí trakt) a zvýšeným rizikem vývoje nádoru prsu a thyroidních nádorů.
- První příznaky CS se většinou objeví nejpozději ve 3. dekádě života.
- Převážná většina nádorů (i nádorů prsu a thyroidních nádorů) je benigních, asi u **10%** postižených Cowdenovým syndromem se vyvine nemedulární **thyroidní karcinom** a asi u **30 až 50%** postižených žen se vyvine zhoubný **nádor prsu**.

Cowdenův syndrom

- Variantou Cowdenova syndromu je forma charakteristická vývojem hamartomů trávicího traktu a zvýšeným rizikem vývoje nádoru trávicího traktu, především pankreatu.

  (**Hamartomy** jsou odlišitelné od adenomů - svou histologickou strukturou – buňky normálně diferencované, ale neuspořádané.)
- Obě onemocnění souvisejí s vrozenou mutací genu *PTEN*, který je lokalizován na chromozomu **10q23.3**. (Mutace *PTEN* nalezena asi u 80% pacientů s CS.)
- Fenotypické rozdíly mohou souviset s různými mutacemi genu *PTEN*.

Úloha proteinu PTEN v buňce

- PTEN je protein/lipid fosfatáza.

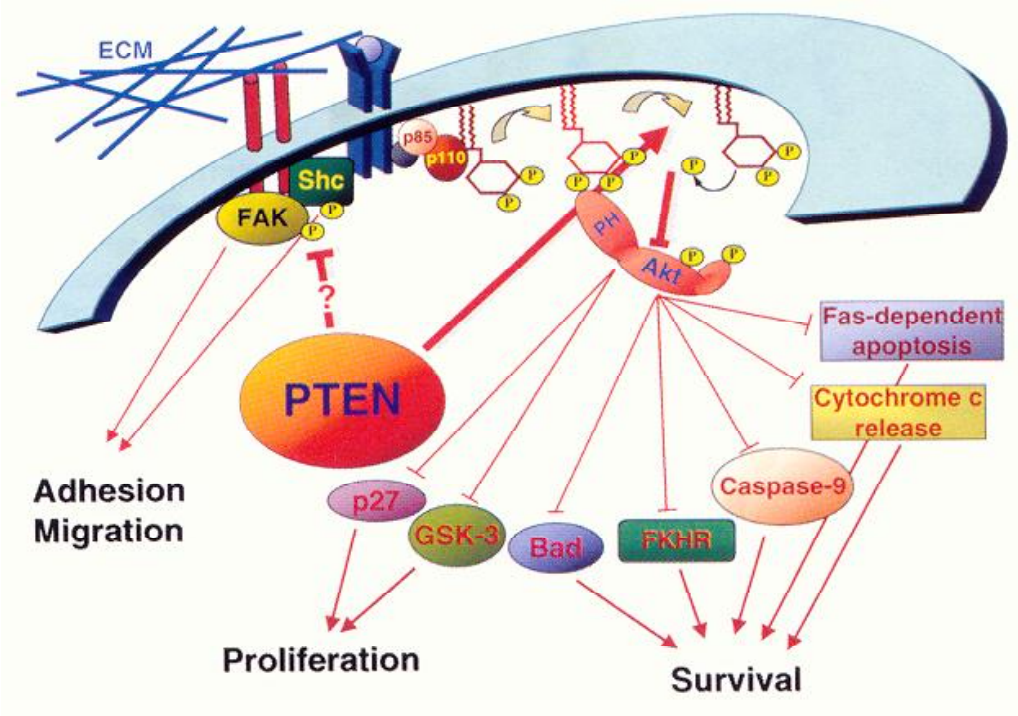
  („Phosphatase and Tensin homolog deleted on chromosome **TEN**")

  MMAC1 („mutated in multiple advanced cancers")
- Defosforyluje jak Thr/Ser, tak Tyr, ale pro jeho nádorově supresivní funkci je klíčová schopnost defosforylovat **fosfatidylinositol(3,4,5)-trifosfát** (**PIP-3**), který je produkován kinázou **PI3K** po aktivaci mitogenními signály. PIP-3 aktivuje ***Akt***, který blokuje apoptózu a přispívá k přežití buňky.
- Úloha PTEN je udržovat hladinu PIP-3 nízkou: inaktivace PTEN způsobuje zvýšení hladiny PIP-3 a hyperaktivaci Akt.

Úloha PTEN v řízení buněčné smrti, proliferace a buněčné adheze

1. PTEN vykonává svou funkci nádorového supresoru primárně indukcí bloku buněčného cyklu ve fázi G1, případně umožněním apoptózy tím, že inhibuje signály přežití vyvolané růstovými faktory.

2. Dalším substrátem PTEN je kináza **FAK** („focal adhesion kinase"): defosforylací FAK tak PTEN inhibuje migraci buněk zprostředkovanou integriny (tato funkce je závislá na schopnosti defosforylovat Tyr).



Úloha proteinu PTEN v kancerogenezi

- „LOH" 10q23 je u primárních nádorů častá - 25 až 50%, ale kompletní ztráta funkce PTEN v časných stádiích kancerogeneze je běžná jen u nádorů dělohy a vaječníků.
- U dalších nádorů je kompletní ztráta funkce PTEN spojena až s pozdními stádii kancerogeneze a je spojena s agresivními, metastatickými stádii.

Model: V počátečních stádiích kancerogeneze se PTEN uplatňuje mechanismem „haploinsuficience", úplná ztráta funkce se objevuje až v pozdějších stádiích.

Tuberózní skleróza

- Autozomálně dominantní nádorový syndrom.
- Souvisí s vrozenými mutacemi *TSC1* (9q34; kóduje hamartin) nebo *TSC2* (16p13,3; kóduje tuberin).
- charakterizováno vývojem benigních nádorů hamartomů v mnoha orgánech; vzácně spojeno s vývojem maligních nádorů.
- Pro onemocnění typická značná variabilita symptomů, různá závažnost postižení; variabilita souvisí s typem mutace, ale taky s věkem postižených (výskyt mutace druhé alely).
- Popsáno přes tisíc mutací (cca 30% v *TSC1*, 70% v *TSC2*); 2/3 mutací vznikají *de novo*.
- **Tuberin** reguluje malé G-proteiny (Rap1a, Rab5, RheB), translaci, buněčnou proliferaci.
- **Hamartin** interaguje s rodinou aktin vázajících proteinů (ezrin-radixin-moesin), reguluje buněčný cyklus interakcí s CDK.

Peutz-Jeghersův syndrom - PJS

- Autozomálně dominantní dědičné onemocnění (Peutz 1921; Jeghers 1949).

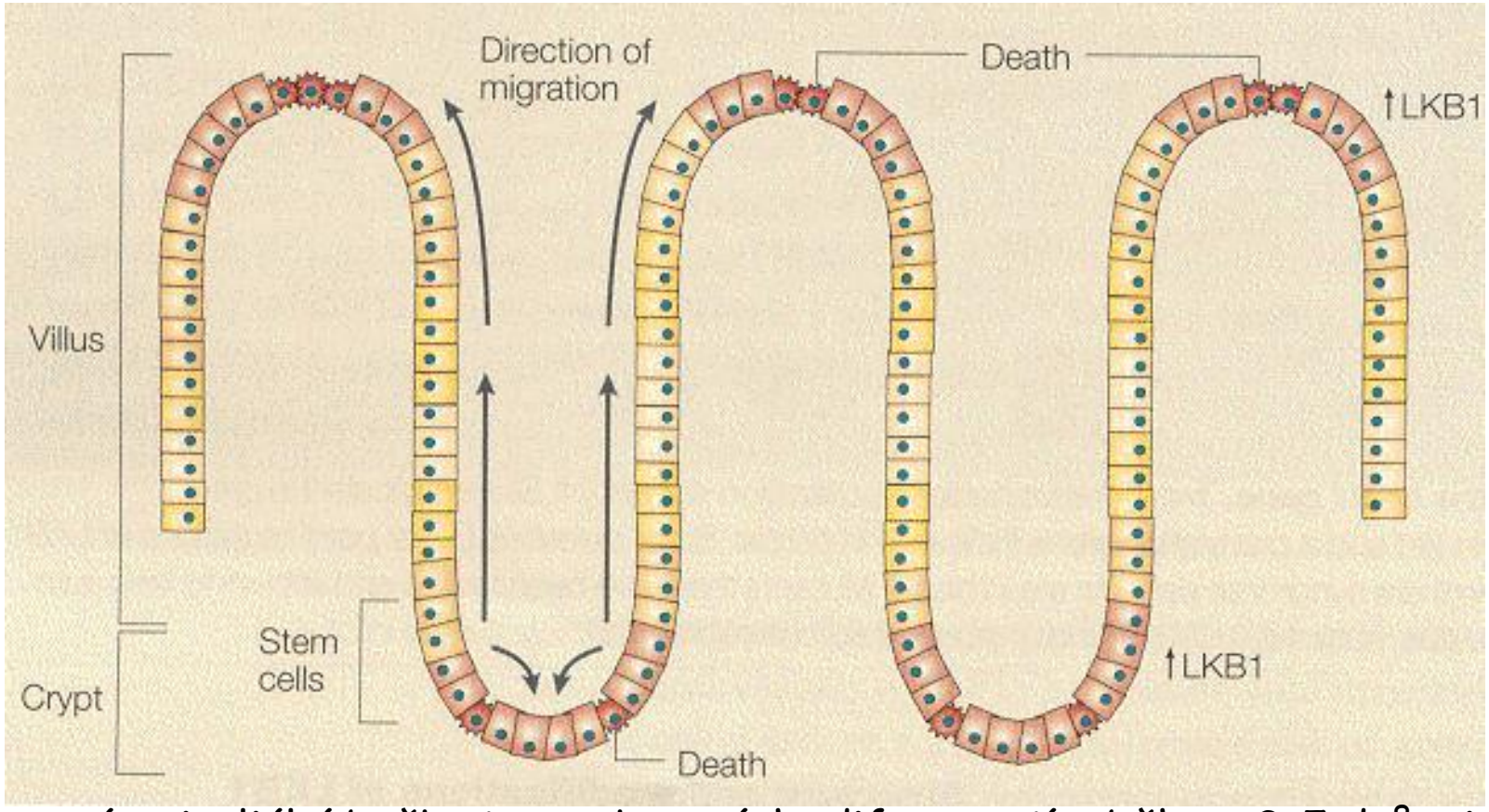
- Spojeno s výskytem typických **pigmentových lézí** okolo rtů a na sliznicích (nepodléhají maligní transformaci) a s tvorbou **hamartomatózních polypů**, především v **tenkém střevu**, ale i v tlustém střevu a žaludku. Tyto polypy obvykle zůstávají benigní, ale mohou malignizovat (pravděpodobně přes adenomy a dále karcinomy; phakomatosa).

- Zvýšené riziko různých typů nádorů, především nádorů **pankreatu**, **gastrointestinálního traktu**, bilaterálních nádorů **prsu**, vzácněji gynekologických nádorů.

Peutz-Jeghersův syndrom

- PJS spojen s mutacemi genu ***LKB1*** (***STK11***) na chromozomu 19p13.3.
- LOH pozorována u menšího podílu hamartomatózních polypů a u 70% maligních nádorů PJS pacientů → haploinsuficience *LKB1* iniciuje tvorbu hamartomů.
- Hamartomy (také u *PTEN*, *SMAD4*): polypy složené z neorganizovaných, ale diferencovaných buněčných typů.
- Mutace *LKB1* jsou vzácné u sporadických nádorů.
- Zárodečné mutace *LKB1* asi u 70% postižených rodin, penetrance téměř úplná (93%). Průměrný věk detekce maligního nádoru je 43 let. Předpokládá se existence dalšího genu zodpovědného za PJS.
- Produktem genu je serine-threoninová protein kináza vyskytující se v jádře i cytoplazmě.
- Většina mutací vede k úplné ztrátě proteinu LKB1, bodové mutace inaktivují kinázovou aktivitu.
- Aktivita LKB1 je regulována fosforylací.

Exprese LKB v tenkém střevu



Kmenové epiteliální buňky jsou v kryptách, diferencují a během 3-5 dnů migrují na vrchol klků; frakce buněk migruje do bází krypt.
Na vrcholku klků i v bázi krypt buňky prodělávají apoptózu.
Vysoká exprese *LKB1* je na vrcholcích klků a na bázi krypt – především v buňkách procházejících apoptózou.

Funkce LKB1

- *LKB1* je exprimován v buňkách procházejících apoptózou.
- Vysoká exprese *LKB1* indukuje apoptózu.
- V apoptotických buňkách je protein LKB1 translokován do mitochondrií.

→ Vyslovena hypotéza, podle které protein LKB1 hraje roli v regulaci apoptózy. To by také vysvětlovalo, proč se ve tkáni s nefunkčním LKB1 tvoří hamartomy.

- Některé studie ukazují, že v nádorech s mutacemi *LKB1* jsou vzácné mutace p53 – to naznačuje funkční souvislost LKB1 a **p53** (apoptóza?).
- LKB1 pravděpodobně také indukuje blok buněčného cyklu, pravděpodobně indukcí **p21**$^{WAF1/Cip1}$.

Dědičné nádory endokrinního systému

- Mnohočetná endokrinní neoplasie typu 1 - **MEN1**: kumulace nádorů příštítných tělísek, endokrinních ostrůvků pankreatu, předního laloku hypofýzy a nadledvinek

- Mnohočetná endokrinní neoplasie typu 2

  MEN2A: medulární karcinom štítnice, hyperparathyreoidismus, feochromocytom

  MEN2B: medulární karcinom štítnice, feochromocytom, ganglioneuromy GIT, neuromy sliznic
- Familiální medulární karcinom štítné žlázy **FMTC**

Mnohočetná endokrinní neoplasie typu 1 - MEN1

- **Autozomální dominantní** onemocnění spojené s vývojem nádorů příštítných tělísek (90 - 97 % pacientů), endokrinních ostrůvků pankreatu (30 - 80 % pacientů) a předního laloku hypofýzy (15 - 50 %), vzácněji i nádory neendokrinní tkáně.

- Téměř 100 % penetrance.

- Prvním příznakem onemocnění je většinou hyperfunkce endokrinních žláz.
- Syndrom spojen s vrozenými mutacemi genu *MEN1* (11q13), v nádorech doprovázenými LOH.

Mnohočetná endokrinní neoplasie typu 1

- Produktem genu *MEN1* je **menin**, převážně jaderný protein, nepříbuzný s žádným dalším proteinem. Popsán jeden interagující protein - JunD.
- Popsáno přes 250 různých mutací *MEN1* podél celého genu, asi 80 % všech mutací vede ke zkrácenému proteinu.

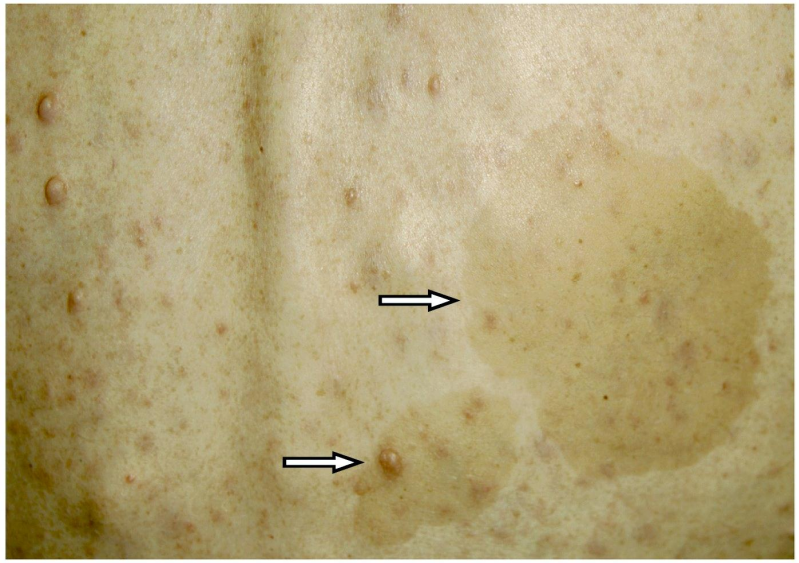
Mechanismus fungování *MEN1*?

- Plasma pacientů má mitogenní aktivitu na *in vitro* kultivované hovězí parathyroidní buňky. Předpokládá se existence mitogenního faktoru, který interaguje s produktem *MEN1* možná mechanismem podobným VHL.
- Chromozomální nestabilita: zvýšená frekvence chromozomálních zlomů, změněné počty chromozomů, předčasné dělení centromer,...

Neurofibromatóza typu 1 - NF1

- Autozomálně dominantní dědičnost.
- U postižených se vyvíjejí násobné benigní neurofibromy, z některých se mohou dále vyvíjet neurofibrosarkomy. U postižených dětí je také zvýšené riziko vývoje AML.
- Inaktivace obou alel *NF-1* byly popsány u melanomů a neuroblastomů.
- Gen ***NF1*** se nachází na chromozomu 17q11.2
- Produktem NF-1 je protein **neurofibromin**, který patří do rodiny GTP aktivujících proteinů (negativní regulace Ras)

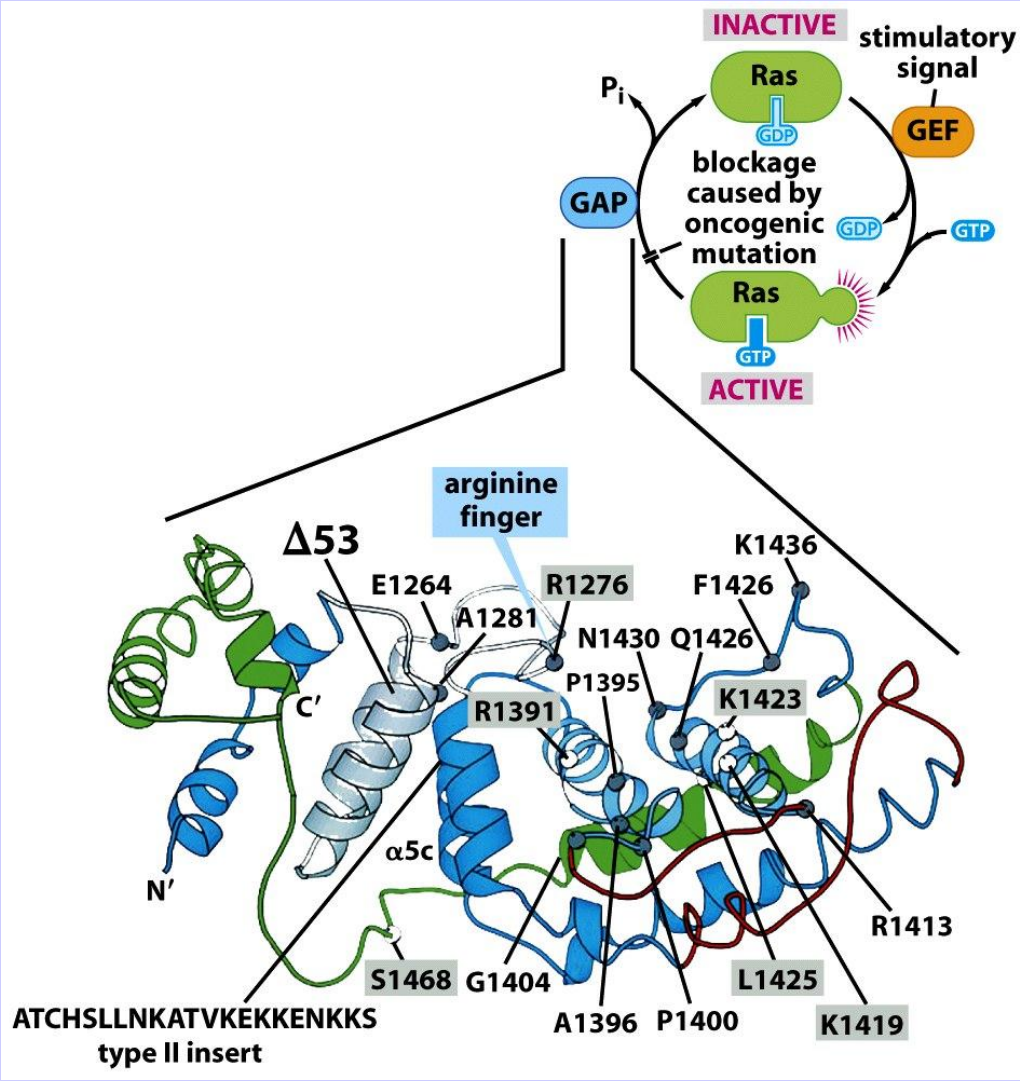
Neurofibromatóza typu 1



kožní skvrny barvy bílé kávy

pigmentované hamartomy duhovky,
tzv. Lischovy noduly

Neurofibromin



NF1 je **GAP** (GTPase activating protein) proteinu **Ras**.

Interakce Ras s NF1 může zvýšit GTPázovou aktivitu Ras více než 1000x.

Pro funkci NF1 je kritický arginin R1276, který interaguje s Ras a přispívá k hydrolýze GTP na GDP.

Šedivou jsou vyznačena nalezená místa mutací NF1.

Neurofibromatóza typu 2 - NF2

- **Autozomální dominantní** onemocnění charakteristické vývojem bilaterálních schwanomů akustického nervu.
- Spojeno s výskytem násobných benigních nádorů intrakraniálních, páteřních a periferních nervů, nádory jsou jen vzácně maligní. Hamartomy sítnice.

- Onemocnění se začíná manifestovat v průměru ve 21 letech, průměrný věk úmrtí je 36 let; velká variabilita.
- Vzácné onemocnění s výskytem 1:40.000.
- Spojeno s vrozenou mutací genu *NF2* na chromozomu 22q12.2. Produktem genu je protein **merlin** (schwanomin).

Neurofibromatóza typu 2

- Asi polovina **mutací** je *de novo*, polovina zděděných.
- Většina mutací inkativujících: delece, ztráta chromozomu, chromozomální přestavby, zkrácené varianty proteinu.

- **Merlin** patří do velké rodiny proteinů (merlin - moesin, ezrin, radixin-like protein), které interagují s membránovými proteiny. Merlin pravděpodobně interaguje na jedné straně s aktinem, na druhé straně s transmembránovým proteinem CD44.
- Nepřítomnost funkčního merlinu mění mírně intracelulární signalizaci, vede ke zvýšení proliferace Schwannových buněk.

Hereditary diffuse gastric cancer

- *CDH1* (E-kadherin)

Rhabdoidní predispoziční syndrom

- ***SNF5/INI1*** (ATP-dependentní remodelační komplex)