

Molekulární a buněčná biologie nádorů

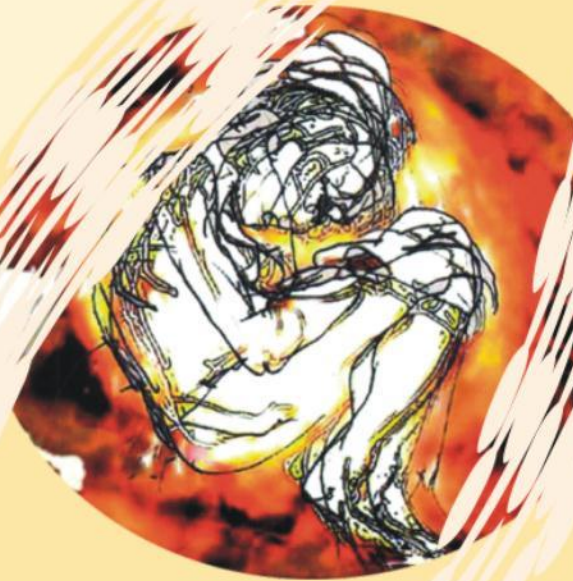
Prof. RNDr. Jana Šmardová, CSc.

Ústav experimentální biologie
Přírodovědecká fakulta
MU Brno

Bi9910

pondělí 16.00 – 18.00

A11 – č. 305



Mgr. Jana Koptíková, Ph.D.
Institut biostatistiky a analýz LF MU Brno

2020

Molekulární a buněčná biologie nádorů

1. Úvodní přednáška

základní pojmy, historický přehled,
klasifikace nádorů, onkogenní viry

Bi9910

pondělí 16.00 – 18.00

A11 – č. 305



2020

Organizační poznámky



❖ Molekulární biologie nádorů **Bi9910**

- středa 14.00 – 16.00, A11 – učebna 306
- státní svátek
- způsob ukončení: **ZKOUŠKA**
 - **písemná část** (25 otevřených otázek, max. 50 - min. 30 bodů)
 - **ústní část**
- smysl kursu:
 - ✓ **Bi7090** Molekulární biologie eukaryot
 - **Bi9915** Speciální seminář z biologie nádorů
 - **Bi1500** Biologie nádorů pro nebiology aneb buněčná filosofie

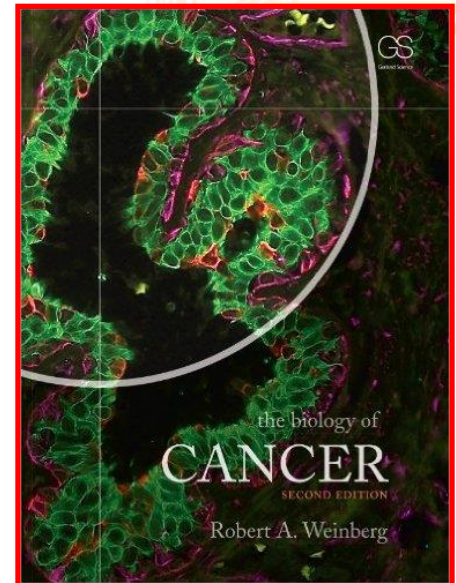
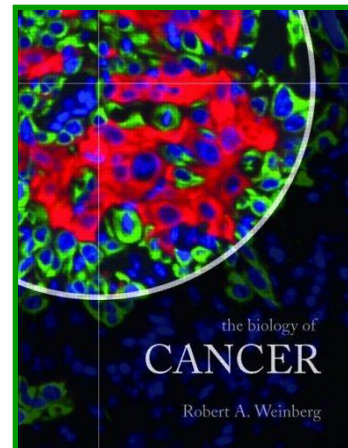
Studijní materiály



- **přednášky**
- **podklady k přednáškám**

Studijní literatura I

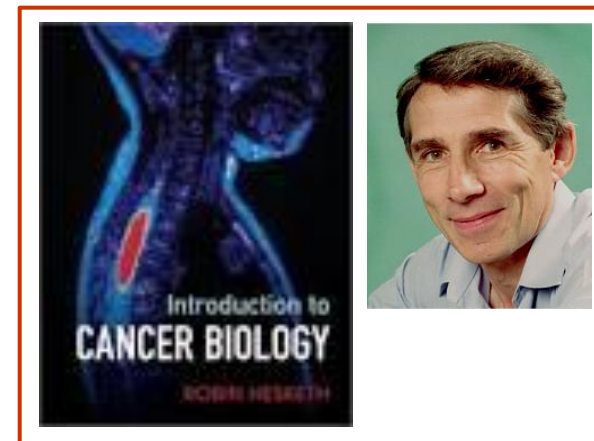
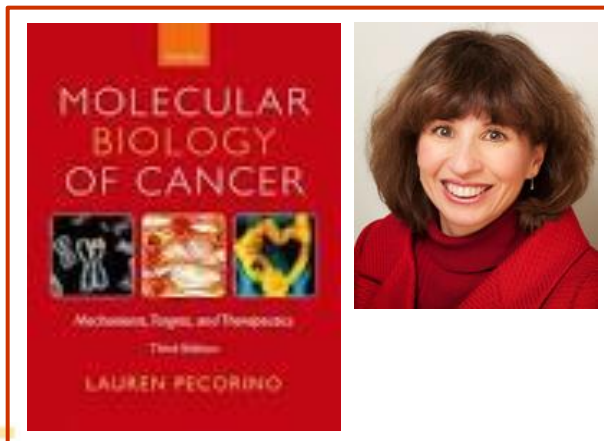
- Robert Allan Weinberg:
„**The Biology of Cancer**“
GS Garland Science, **2013**
(**2007**)



Další učebnice nádorové biologie



- Lauren Pecorino: „**Molecular Biology of Cancer. Mechanisms, Targets, and Therapeutics**“ Oxford University Press **2012**, ISBN 978-0-19-957717-0
- Robin Hesketh: „**Introduction to Cancer Biology**“ Cambridge University Press **2013**, ISBN 978-1-107-60148-2



Studijní literatura II

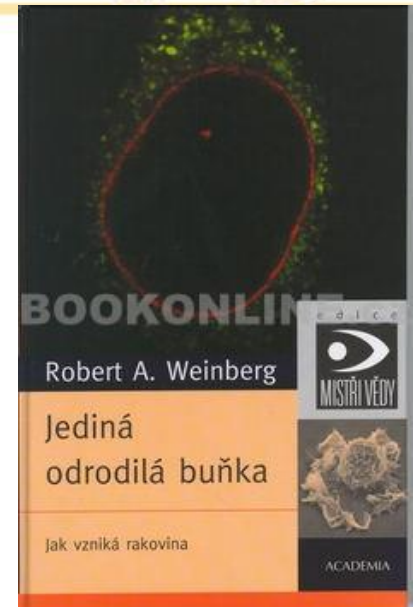


- Hanahan D. and Weinberg R.A.: **Hallmarks of Cancer**. *Cell* (**2000**) 100: 57-70.
- Hanahan D. and Weinberg R.A.: **Hallmarks of Cancer: The Next Generation**. *Cell* (**2011**) 144: 646-674.

„Studijní literatura III“



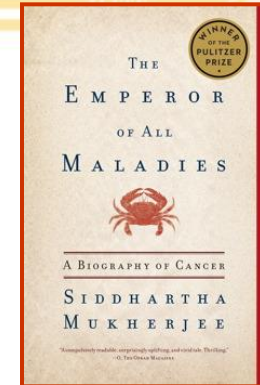
- Robert Allan Weinberg: „**Jediná odrodilá buňka. Jak vzniká rakovina.**“ Academia 2003, ISBN 80-200-1071-8.
- Robert Allan Weinberg: **Coming full circle – from endless complexity to simplicity and back again.** *Cell* (**2014**) 157: 267-271.



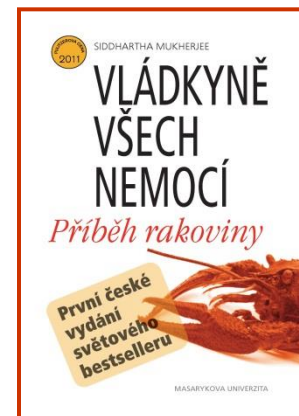
„Studijní literatura IV“



- Siddhartha Mukherjee: **The Emperor of all Maladies.** A Biography of Cancer. *Scribner* 2010



- **Vládkyně všech nemocí.** Nakladatelství Masarykovy univerzity, 2015





Motto: Alfred G. Knudson (2000)

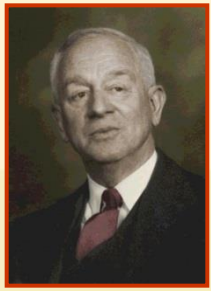


„Všichni pronásledovatelé démona nádoru v minulém století museli být fascinováni předmětem svého pronásledování a zároveň museli cítit frustraci z jeho neuchopitelnosti. Se vstupem do nového milénia máme naději, že démon bude nakonec pochopen a že na základě tohoto pochopení najdeme způsob, jak ho přemoci.“

Historický přehled



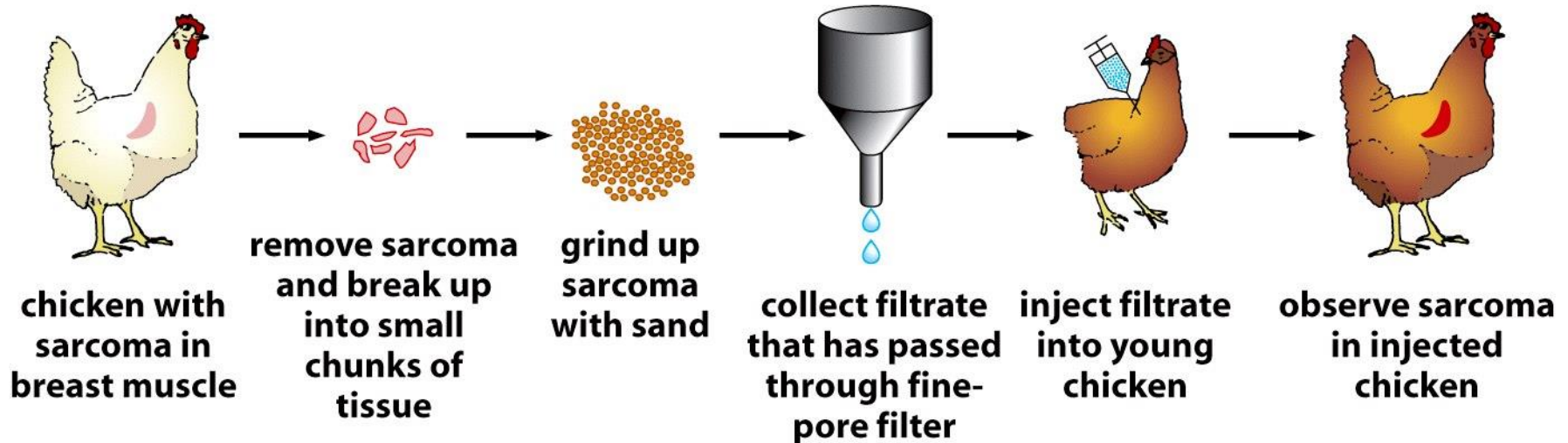
- 400 p.n.l. **Hippocrates** popsal rakovinu jako dlouhé výběžky (podobné račím nohám) vybíhajícím do zdravých tkání:
 - řec: karkinos = rak; onkos = krab
 - lat: cancer = rak
- popisné (**epidemiologické**) poznatky:
 - 1848 - zvýšený výskyt rakoviny prsu u jeptišek (souvislost s bezdětností a nekojením)
 - 1775 - rakovina šourku u kominíků (souvislost s výskytem škodlivin v sazích; souvislost s hygienickými návyky)
 - 1902 - souvislost RTG paprsků a vzniku rakoviny
 - poč. 20. stol. - **rodinný výskyt** nádorů



Historický přehled



- 1909 – **Peyton Rous** - infekční přenos nádoru u kuřat
studium nádorových virů (**onkogen** - fragment virových genů způsobujících nádor) (1961 – Nobelova cena; poprvé navržen 1926)





Historický přehled: zlomový rok 1971



- 1971 – president Nixon vyhlásil „**War on Cancer**“, což bylo spojeno s uvolněním velkých dotací ze strany americké vlády a s vírou, že nádory jsou způsobeny viry (výzkum DNA onkogenních virů se „svezl“ spolu)
- 1976 – Bishop, Varmus – objeven **c-src (protoonkogeny)**: souvislost s mitogenní signální dráhou
v souvislosti se studiem akutně transformujících virů rozpoznáno asi **30** různých onkogenů
- pomalou transformující viry (inserční mutageneze): postupně rozpoznáno **25** různých protoonkogenů
- 1982 – objeven onkogen *ras* a zjištěno, že rozdíl mezi v-onkogenem a c-protoonkogenem může být v jediné bázi!!

Historický přehled



- lidské nádory vyvolané retroviry ale objeveny nebyly!
- (později znalost retrovirů umožnila rychlý objev příčiny AIDS)
- 1969 - Henry Harris (fúze buněk) - **nádorové supresory** – recesivní geny (brzdy)
- 1971 – Alfred **Knudson** – retinoblastom – „two hits hypothesis“
- 1989 – Bert **Vogelstein** – specifické mutace v konkrétních genech (onkogenech i nádorových supresorech) jsou spojeny s konkrétními stádii vývoje kolorektálního karcinomu
- přenosy DNA (transformace, transfekce)...

Historický přehled



- biochemie: studium onkoproteinů, jejich lokalizace, interakcí
- molekulární biologie: izolace, charakterizace a cílená exprese eukaryotických genů
- buněčná biologie: studium molekulárních mechanismů řídících růst buněk, buněčné dělení
- genetika somatických buněk a virů: funkční testy jednotlivých genů
- **epigenetika**

p21: WAF1 - „*wild type p53-activated fragment*“
cip1 - „*Cdk-interacting protein 1*“
sdi1 - „*senescent cell-derived inhibitor 1*“
gen: *CDKN1A* (6p21.2)

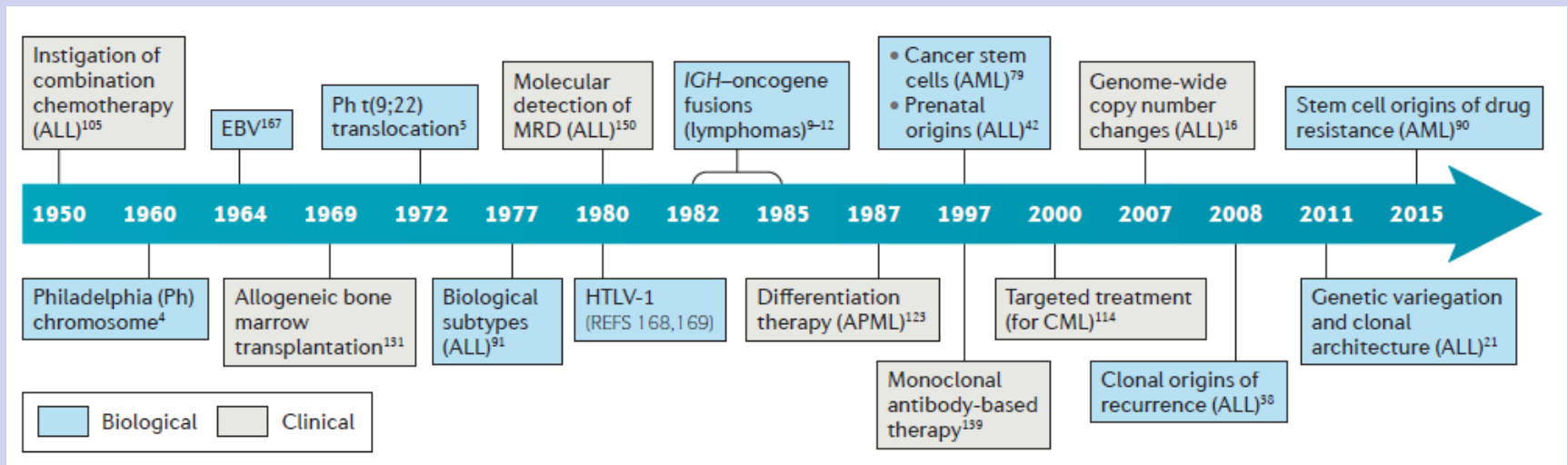
Historický přehled



- éra „omik“: genomika, transkriptomika, proteomika, epigenomika, kinomika, metylomika, glykomika,...
- ...Robert Allan Weinberg: **Coming full circle – from endless complexity to simplicity and back again.** *Cell* (2014) 157: 267-271.

Historický přehled II

- milníky ve výzkumu leukémie, které dlužily cestu k výzkumným, biologickým i klinickým onkologickým objevům



Základní pojmy



Nádor, tumor, neoplazma, novotvar

- je nová a abnormální tkáň v mnohobuněčném organismu, která v tomto organismu nemá fyziologickou funkci a roste neregulovaným způsobem
- je geneticky podmíněný abnormální přírůstek buněčné tkáňové hmoty klonálního charakteru; jeho růst není v koordinaci s růstem okolních tkání a rovnovážným stavem organismu

Základní pojmy

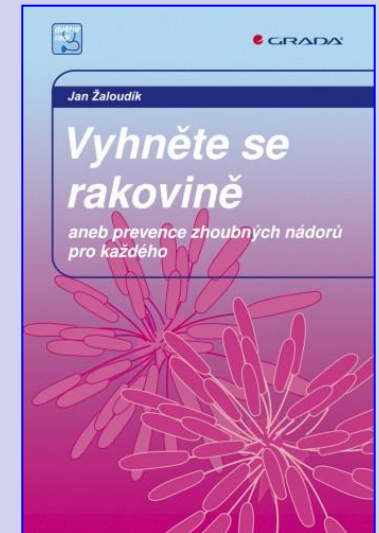
Zhoubný nádor nebo rakovina?

„Pane doktore, tak co jsem to tam měla?“ ...

„Měla jste tam malý zhoubný nádor!“

„No tak to jsem si oddechla, zaplať pánbůh, že to nebyla rakovina...“

- Zhoubný nádor a rakovina znamenají v češtině prakticky totéž.
- Malý zhoubný nádor je jistě nepříjemnost, ale nezabíjí. Zabíjí rakovina, čili pokročilý nádor šířící se dále do organismu.
- Někteří jazykoví fundamentalisté: termín rakovina je lidový, nepřesný, nesprávný, měl by být nahrazen termínem: zhoubný nádor



Klasifikace nádorů I:

podle schopnosti infiltrovat se do jiné tkáně



- **benigní (nezhoubné)**: zůstávají v místě svého vzniku, nemigrují, neinvadují jiné tkáně
- **maligní (zhoubné)**: pronikají do okolních tkání a prostřednictvím krevního a lymfatického systému do celého těla, v nových tkáních vyvolávají tvorbu sekundárních nádorů (metastází)
- z tohoto pohledu lze klasifikovat nádory na **primární** a **sekundární**

(pozor: sekundární – (i) therapy-related; (ii) vývoj z jiného méně závažného stavu)

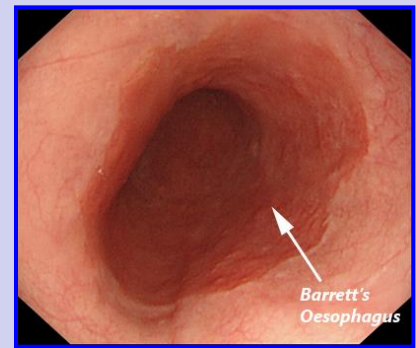
pozor: maligní, tj. zhoubný, tj. smrtelný může být i nemetastázující nádor)

Normální → maligní tkáň



- **hyperplasie** - buňky nezměněné, ale zmnožené
- **metaplasie** – přechodná změna fenotypu buněk - v důsledku vnějších signálů; buňky lokalizované na nesprávném místě, často v místě, kde se setkávají dva typy epitelu: děložní čípek – děloha; jícen – žaludek - tzv. Barrettův jícen: premaligní, metaplasie – dlaždicobuněčné buňky nahrazeny sekreторickými obvykle se nacházejícími v žaludku: ~ 30x zvýšené riziko vývoje karcinomu jícnu
- **dysplasie** – obsahují již cytologicky abnormální buňky (velikost, tvar, barvitelnost jádra, poměr jádro/cytoplazma, změněná mitotická aktivita) a abnormální poměr buněčných typů

Barrettův jícn



- Stav, kdy dochází ve sliznici jícnu k intestinální metaplazii z důvodu refluxní esofagitidy. Normální sliznice jícnu (**dlaždicobuněčný** epitel) není odolná vůči kyselým šťávám žaludku, vzniká zde zánět a při dlouhodobém dráždění (kvůli nedostatečné funkci dolního jícnového svěrače, či jiné anomálii) dochází k přestavbě v **cyldrický** epitel, který je vůči agresivnímu prostředí odolnější. Obvykle bývá v dolní části jícnu na přechodu do žaludku. Tato intestinální metaplazie patří mezi prekancerózy, zvyšuje riziko vzniku adenokarcinomu jícnu.
- Kromě potíží spojených s refluxní chorobou, jako je **pálení žáhy**, se nemusí nijak projevovat.
- **Refluxní choroba jícnu** je onemocnění způsobené patologickým gastroezofageálním refluxem. Její nejčastější komplikací je poškození sliznice jícnu (**refluxní ezofagitida**).
- **Gastroezofageální reflux** (GER) je proniknutí žaludečního obsahu do jícnu. K epizodám krátkodobého GER dochází běžně. Patologickým se stává, pokud vyvolává obtíže a/nebo zánětlivé změny sliznice jícnu

Normální → maligní tkáň



- **polypy, papilomy, warty** – útvary již viditelné okem, obsahují buňky jako normální tkáň, ale expandují a tvoří makroskopickou masu; jsou dysplastické, nepenetrují bazální membránu, jsou benigní
- **invadující nádory** – překračují/prostupují bazální membránu, jsou tedy již **maligní**
- **metastazující nádory** – zakládají sekundární ložiska, jsou nejenom invadující, ale mají navíc schopnost adaptace na nové prostředí (+ motilita)

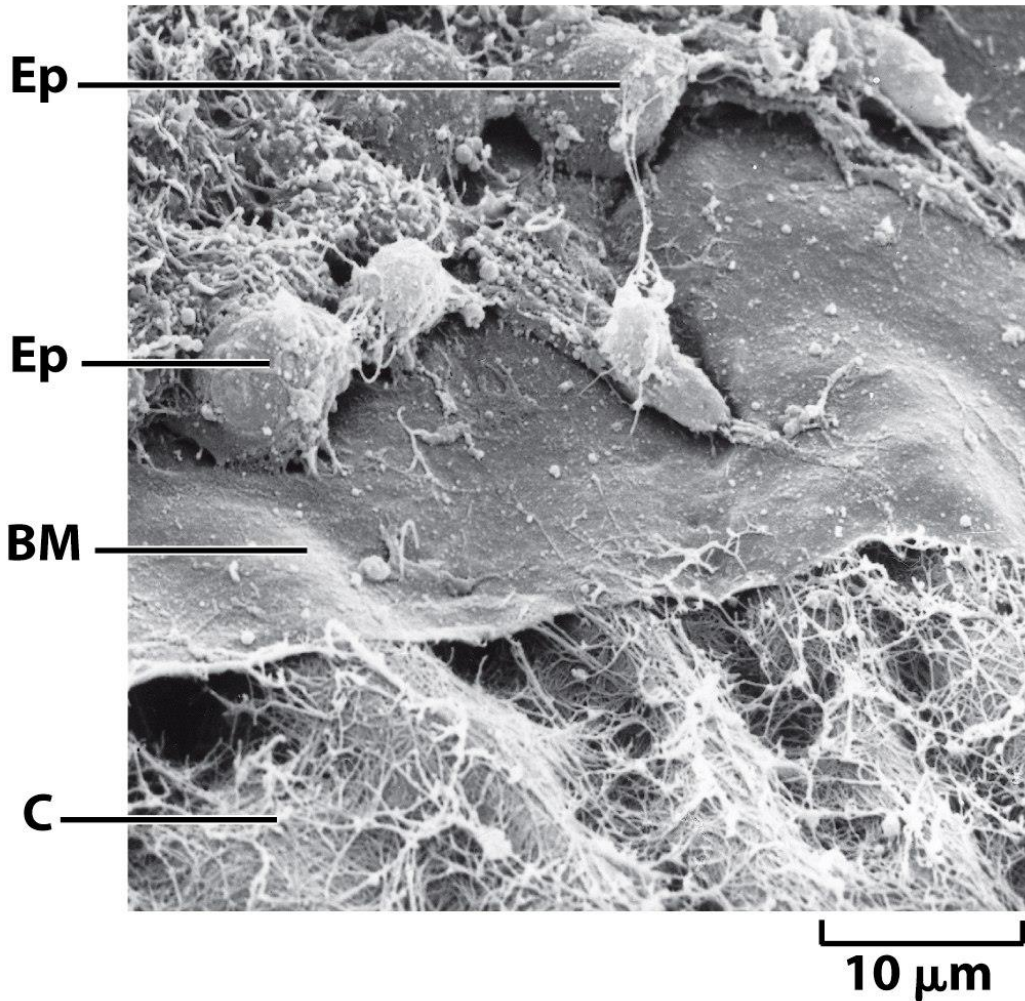
Klasifikace nádorů II:

podle typu buněk (tkání), ze kterých vznikají



- **karcinomy** – nádory epiteliálních buněk (asi 80-90% lidských nádorů)
- **sarkomy** – pevné nádory pojivových tkání – svalů, kostí, chrupavky
- **leukémie a lymfomy** - odvozené z hematopoietických buněk a buněk imunitního systému
- **neuroektodermální** nádory – odvozené z nervové tkáně
- **germinální** nádory – odvozené z totipotentní zárodečné buňky
- **smíšené** nádory

Karcinomy



Odvozeny z **epiteliálních tkání**:

Epiteliální buňky (**Ep**) tvoří vrstvu buněk, které tvoří výstelku tělních dutin a kanálů, povrch těla. Nacházejí se na jedné straně bazální membrány (**BM**), pod BM jsou stromální buňky a kolagenová vlákna (**C**), která spojují BM s extracelulární matrix (ECM).

Karcinomy



- tvoří asi **80-90%** nádorů
- **spinocelulární / dlaždicobuněčné / skvamózní** – odvozeny z buněk, které tvoří ochrannou vrstvu
- **adenokarcinomy** – odvozeny ze specializovaných buněk secernujících do dutin a kanálů nejrůznější látky, jejichž účelem je ochrana epiteliálních buněk před obsahem dutin,...
- **smíšené** – oba typy koexistují

Sarkomy / mesenchymální nádory



- tvoří asi **1%** nádorů
- nádory odvozené z pojivových tkání, z mesenchymálních buněk:
 - fibrosarkomy - odvozeny z fibroblastů, buněk secernujících kolagen
 - liposarkomy - z adipocytů, buněk, které ukládají v cytoplasmě tuky
 - osteosarkomy - z osteoblastů, buněk, které sestavují kalcium fosfátové krystaly v kolagenu – tvoří kosti
 - leiomyosarkomy a rhabdomyosarkomy - z myocytů, které tvoří svaly
 - angiosarkomy – vznikají z prekurzorů endoteliálních buněk

Leukémie a lymfomy



- nádory odvozené z hematopoietických buněk a buněk imunitního systému
- leukémie – z buněk, které se volně pohybují cirkulací
- lymfomy – (z B a T lymfocytů) agregují a tvoří solidní nádory, často v lymfatických uzlinách

Neuroektodermální nádory



- nádory odvozené z různých buněk centrálního a periferního nervového systému
 - gliomy
 - glioblastomy
 - neuroblastomy
 - schwannomy
 - meduloblastomy

- tvoří asi **1,3%** diagnostikovaných nádorů, ale představují asi 2,5% úmrtí spojených s nádory

Další nádory



- některé nádory nezapadají do uvedené klasifikace:
 - melanomy - odvozeny z melanocytů, buněk, které secernují pigment
 - malobuněčné karcinomy plic – obsahují buňky se znaky neurosekrečních buněk
 - **transdiferenciace** – přepnutí/změna tkáňové linie, získání nových diferenciačních znaků
 - **dediferenciace** – nelze vystopovat typ tkáně, z níž je nádor odvozen: anaplastické nádory (**1 až 2%** nádorů)

Klasifikace nádorů III:

podle postiženého orgánu nebo tkáně



- **karcinom plic**
- **kolorektální karcinom**
- **karcinom prsu**

- **akutní myeloidní leukémie**

- **a mnoho dalších**

Vsuvka: Klasifikace solidních nádorů v praxi

Co všechno stanovuje patolog?

- typing
- grading
- staging
- rating

„Typing“

Přesný typ nádorového procesu. Vychází ze závazných klasifikací, obvykle doporučených WHO. Každá jednotka má přidělen svůj unikátní číselný kód **ICDO** (International Classification of Diseases for Oncology)

Např. kód 8850/0 je lipom.

První číslo za lomítkem označuje biologické vlastnosti:

0: benigní

1: nejisté chování

2: karcinom in situ

3: maligní

6: metastáza

Např. kód 8850/3 je liposarkom.

„Grading“

Stupeň diferenciace (jak moc se nádorové buňky podobají normálním buňkám)

G1: dobře diferencovaný nádor s dobrou prognózou

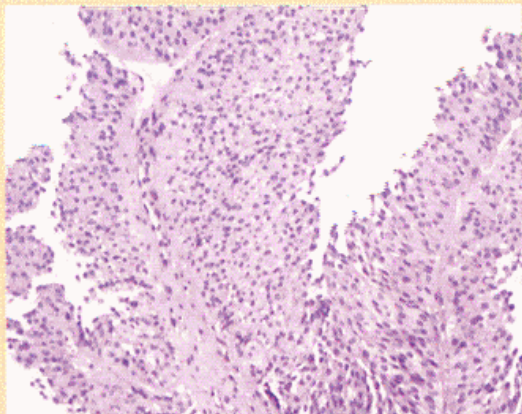
G2: středně diferencovaný nádor s prostřední prognózou

G3: málo diferencovaný nádor se špatnou prognózou

Příklad: karcinom močového měchýře

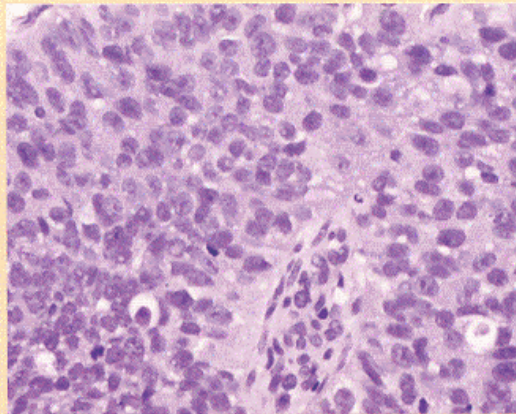
Grade 1

dobře diferencované



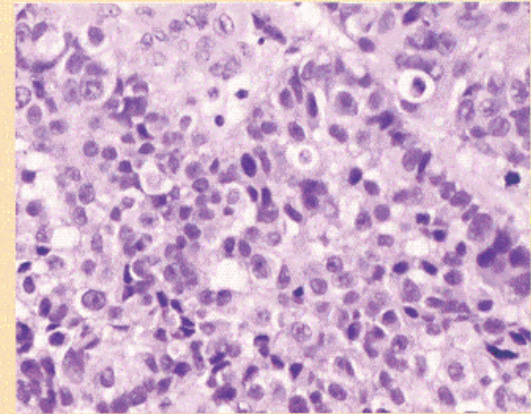
Grade 2

středně diferencované



Grade 3

málo diferencované



„Staging“

Anatomický rozsah choroby (jak dalece je nádor rozšířen) podle světově unifikovaných systémů. Každá topika má svůj vlastní systém. Kategorizace podle velikosti a anatomických bariér, které nádor svým růstem překonal.

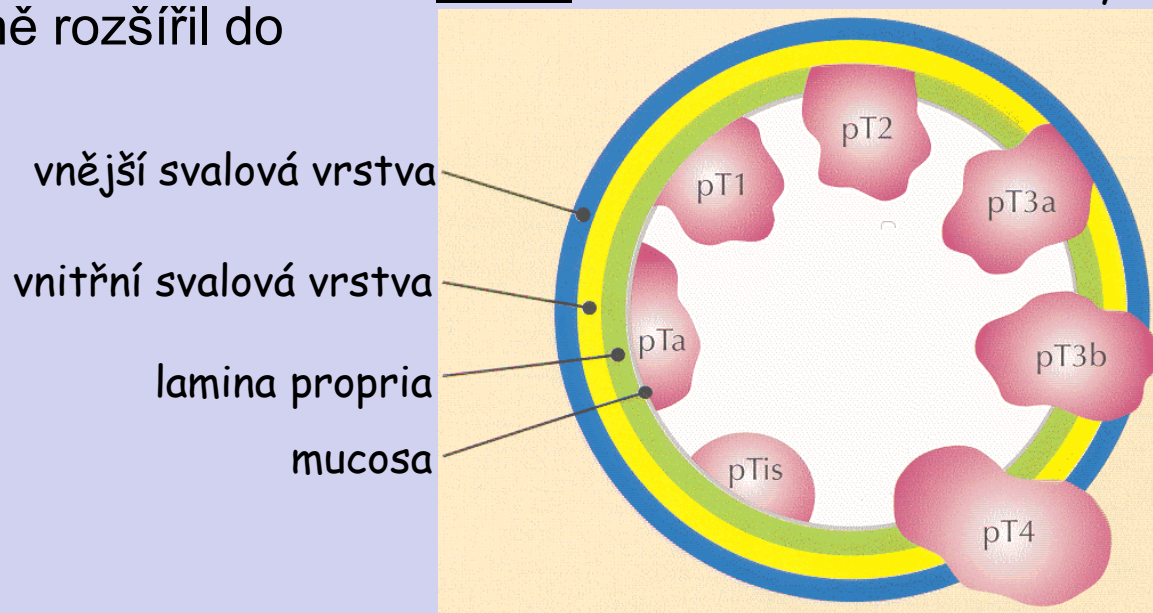
T1: malý lokalizovaný nádor

T2: větší, ale ohraničený uvnitř orgánu

T3: nádor na hranici orgánu

T4: nádor, který se lokálně rozšířil do dalších orgánů

Příklad: karcinom močového měchýře



„Rating“

Změny detekovatelné na [molekulární úrovni](#).

- Některé jsou přímo **diagnostické** pro danou nosologickou jednotku (např. specifické chromozomální translokace u lymfomů či některých sarkomů, specifický imunofenotyp u lymfomů či leukémií).
- Jiné mají vysokou **prognostickou** váhu a tím bezprostřední vliv na volbu terapie (např. amplifikace genu *N-myc* u neuroblastomu, amplifikace *HER2/neu* u karcinomu prsu).
- Další molekuly jsou cílem protinádorových léčiv a jejich přítomnost/stav v buňce **predikují** účinnost této léčby (např. Herceptin, Rituximab, Glivec,..).

Kancerogeneze

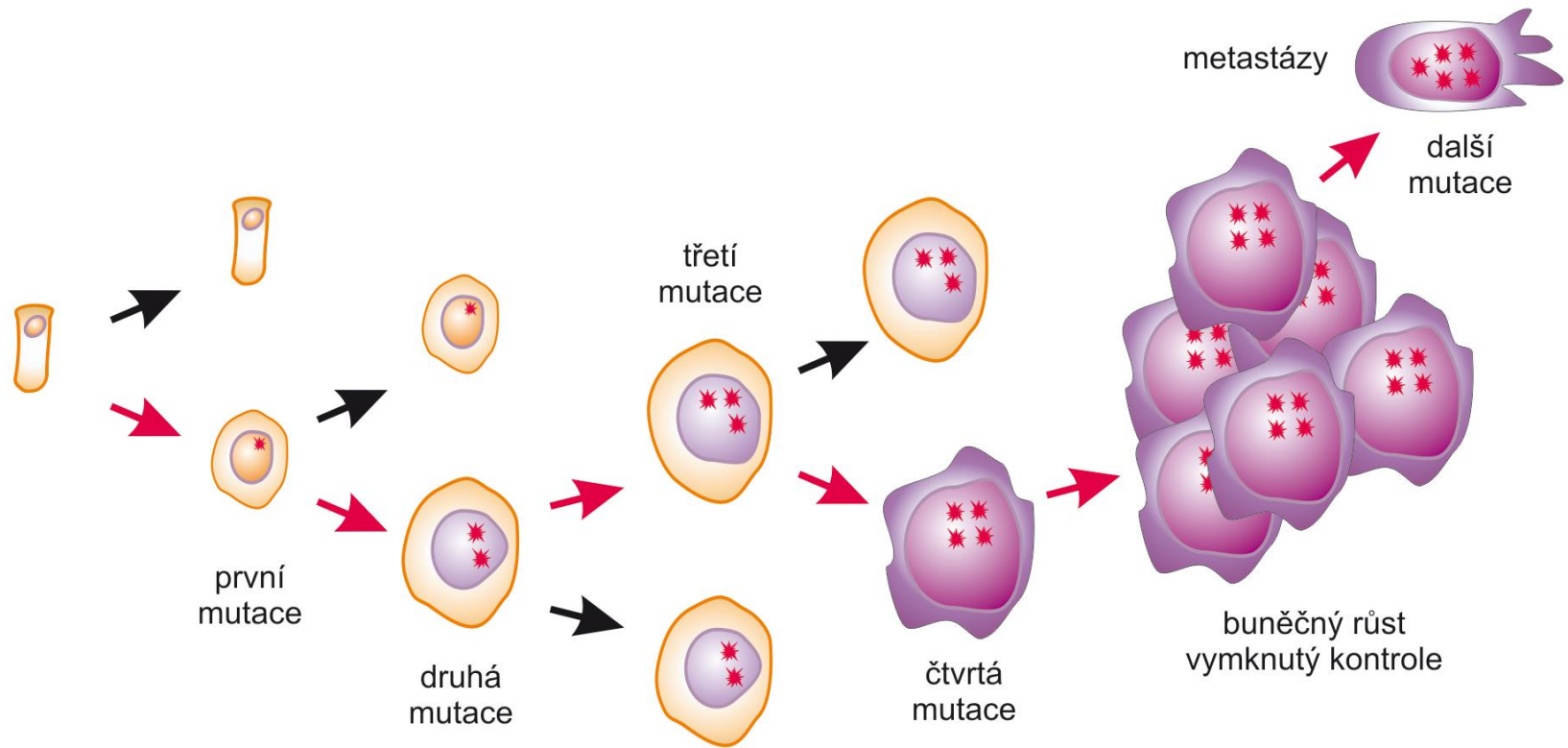


- proces vzniku a vývoje nádoru
- je vícestupňový proces
- podstatou kancerogeneze je postupné hromadění genetických (a epigenetických) změn

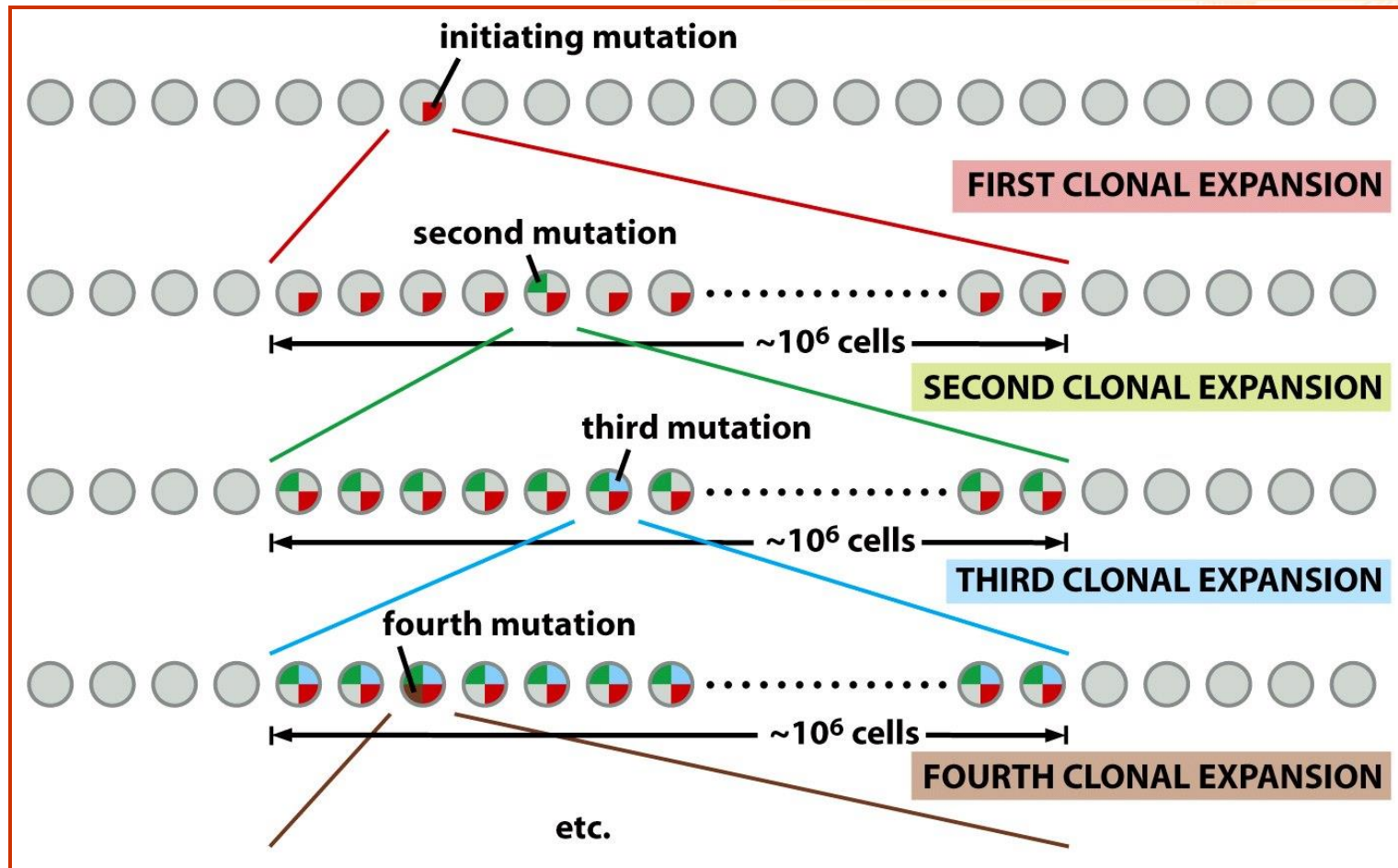
Neoplastická transformace

- přeměna somatické **buňky** v buňku nádorovou

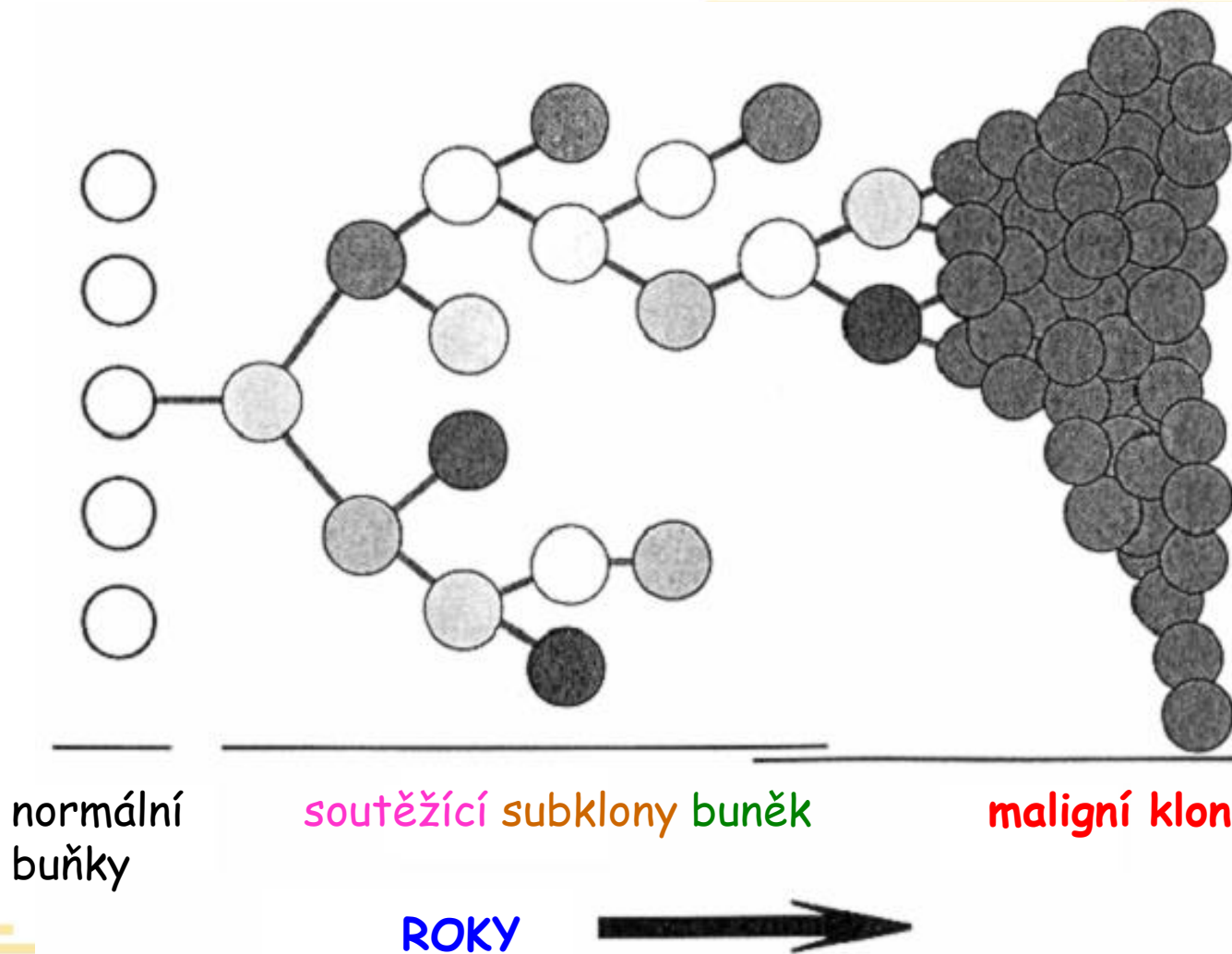
Podstatou kancerogeneze je postupné hromadění genetických změn



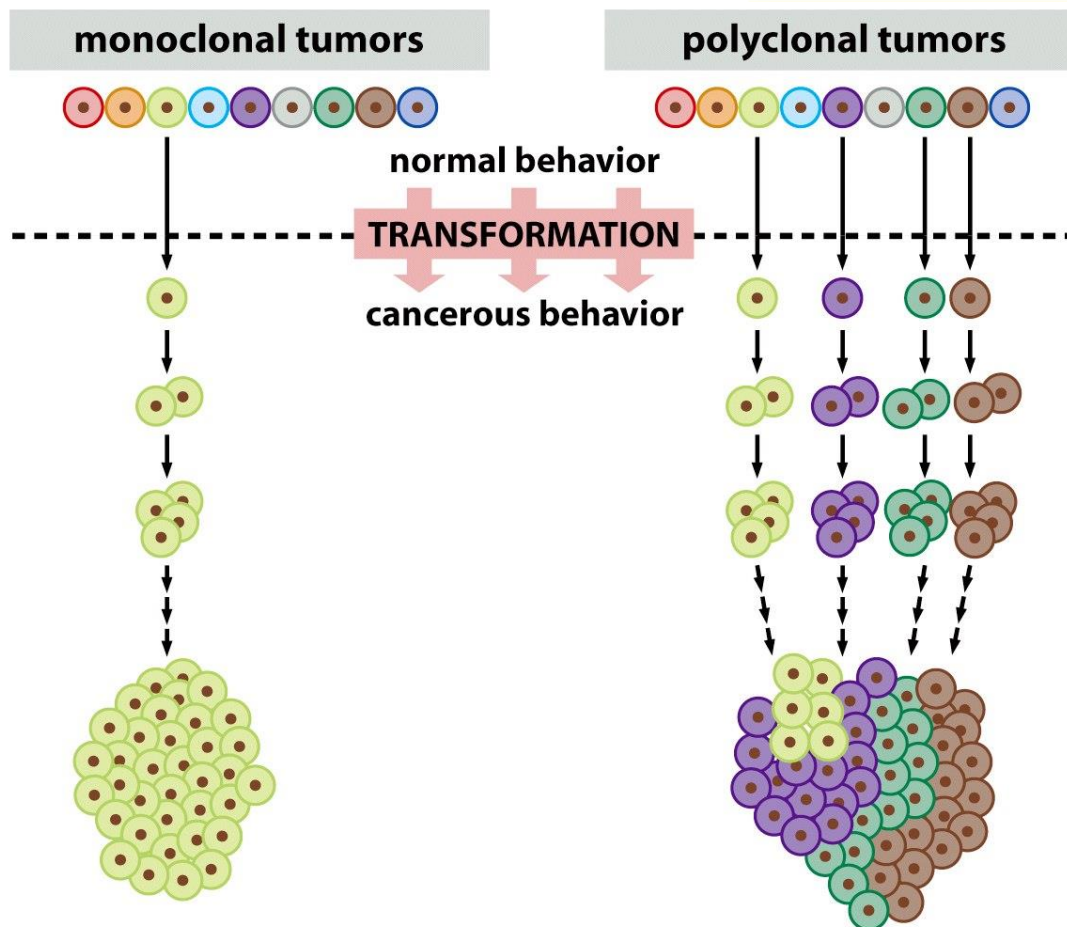
Vícestupňová kancerogeneze spojená s kroky klonální expanze



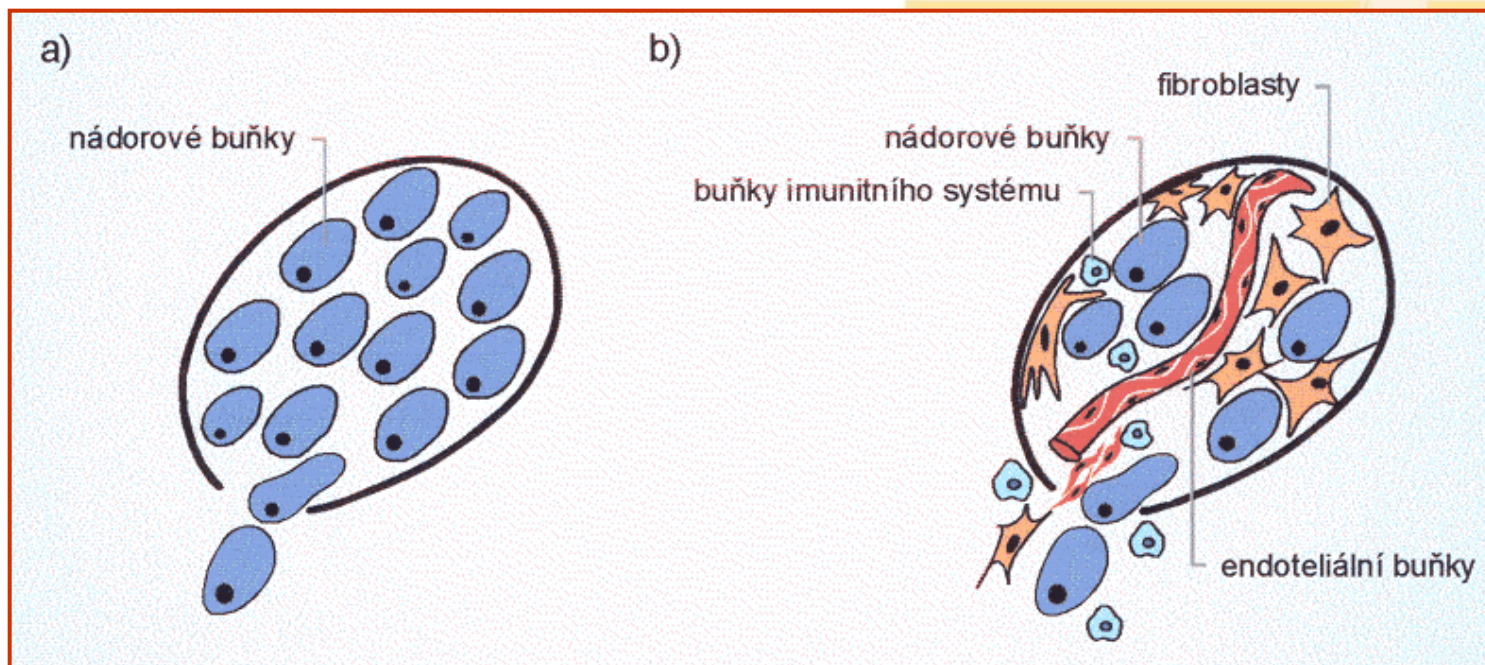
Klonální model vývoje nádoru: selekce, klonální expanze



Jsou nádory monoklonální nebo polyklonální?



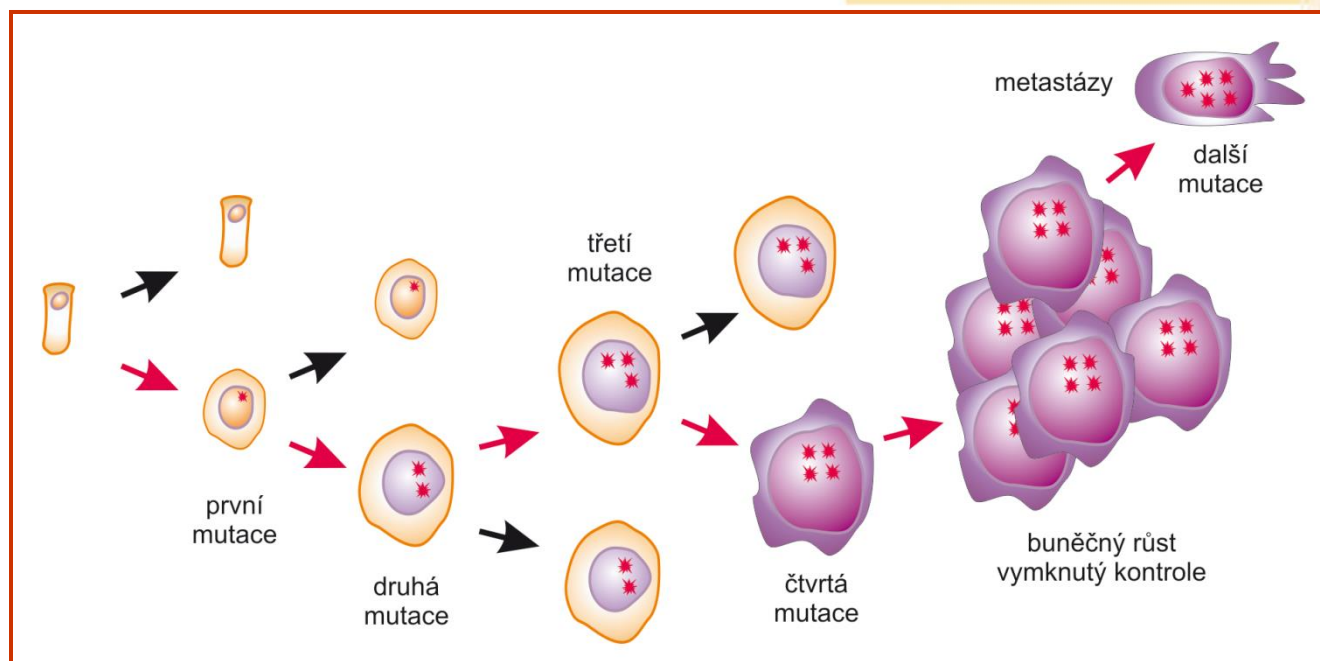
Nádor je komplexní tkáň



V nádorové tkáni se vyskytují nejenom transformované nádorové buňky (a), ale také normální „nepozměněné“ buňky, které „spolupracují“ při vývoji nádoru (b).

kancerogeneze vs. buněčná transformace

Nádor je komplexní tkáň



V nádorové tkáni se vyskytují nejenom transformované nádorové buňky, ale také normální „nepozměněné“ buňky, které „spolupracují“ při vývoji nádoru.

kancerogeneze vs. buněčná transformace

Histologická skladba nádoru



1. Nádorový parenchym

- vlastní nádorově transformovaný parenchym/buňky

2. Nádorové stroma

- mezenchymální tkáňové složky: cévní komponenty, podpůrné mezenchymální tkáně, lymfocyty, makrofágy,..
- slouží hlavně k výživě parenchymu a jako kostra pro uspořádání parenchymu
- transportní úloha (přenos signálů, rezervoár růstových faktorů...)
- klíčová úloha při nádorové angiogenezi a metastázování



GIT vs. GIST
VS.
lymfomy...

Klasifikace nádorů IV:

podle histologické skladby



1. Nádory organoidní

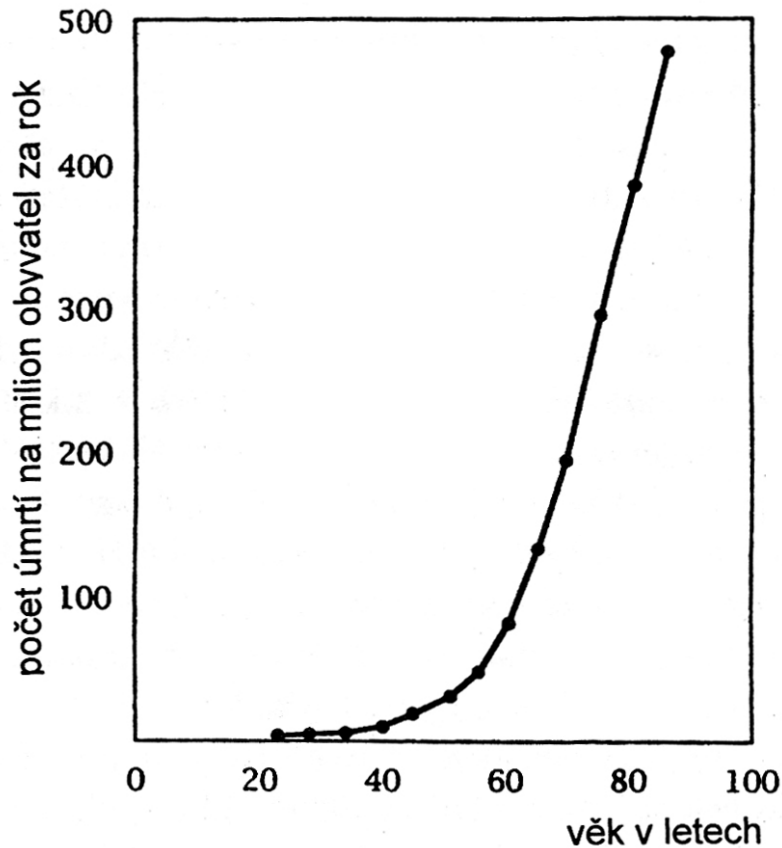
dobře patrné rozdíly mezi stromatem a parenchymem

2. Nádory histoidní

při vysoké proliferační aktivitě transformovaných i netransformovaných buněk v nádoru a odchylkách v jejich diferenciaci může docházet k setření cytomorfológických rozdílů mezi parenchymem a stromatem

Nádor je komplexní tkáň!

Kolik a které geny jsou změněny během kancerogeneze?



- Kdyby k vývoji nádoru stačila jediná změna, byla by pravděpodobnost onemocnění rakovinou stejná v každém věku člověka - křivka závislosti by byla lineární.
- Pravděpodobnost prudce roste s věkem. Křivky závislosti odpovídají složitým procesům, kdy jednotlivé na sobě nezávislé události nastávají postupně jedna za druhou.



Carl O. Nordling

- 1953: byla poprvé vyslovena myšlenka, že k přeměně normální zdravé buňky v buňku nádorovou nedochází v jediném kroku
- architekt Carl O. Nordling studoval frekvence úmrtí na různé typy nádorů u lidí ve věku od 25 do 74 let a zjistil, že u nich pravděpodobnost smrti z důvodu nádorového onemocnění roste se šestou mocninou věku
- z toho vyvodil předpoklad, že k vývoji nádorové buňky je nezbytných alespoň šest genetických změn



Carl O. Nordling

A NEW THEORY ON THE CANCER-INDUCING MECHANISM.

C. O. NORDLING.

Received for publication December 29, 1952.

RECENT research in genetics and pathology has shown an amazing consistency between the agents causing mutations and those causing—or contributing to the development of—cancer. One of the more prominent theories, which since the 1920's has been advocated by Bauer (1949), Strong (1949) and others, claims that the original cancerous cell is nothing but an ordinary cell affected by genetic mutation of some kind. One of the main objections to this theory has been that it does not explain the age variation of the cancer frequency. In reply, Bauer



Carl O. Nordling

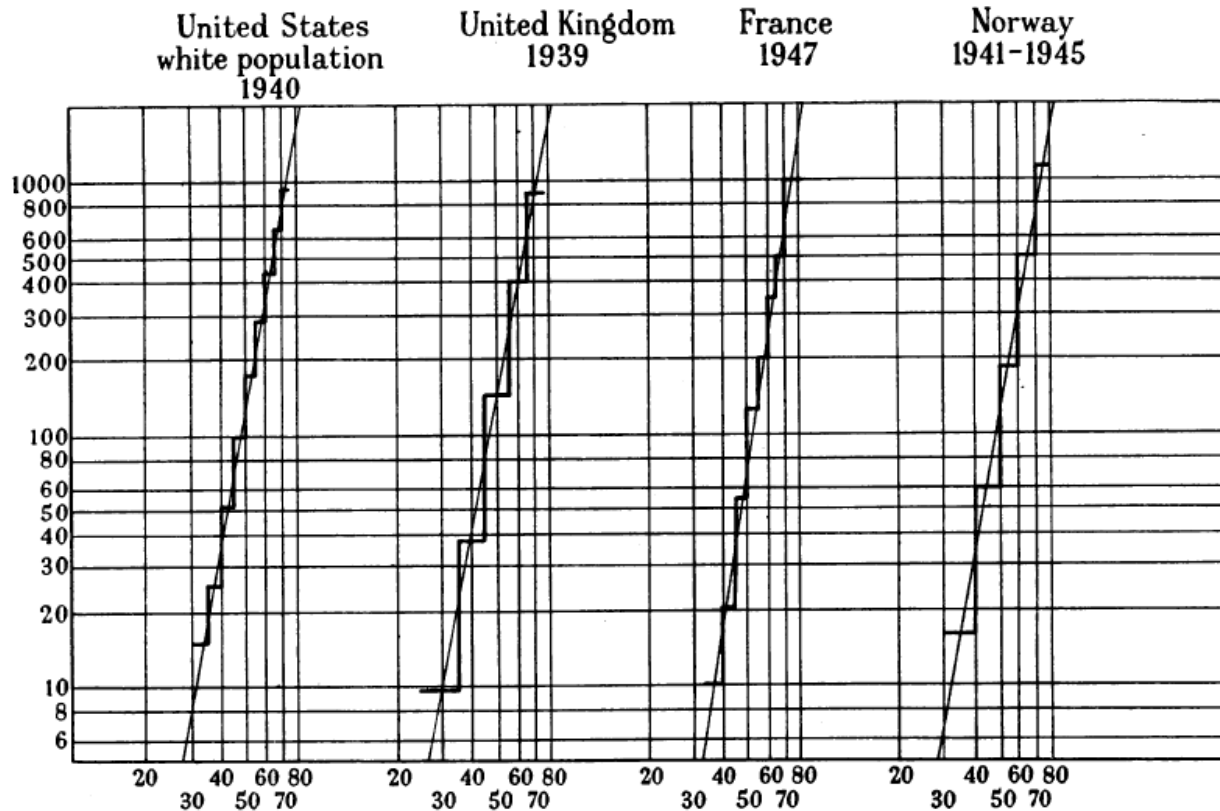


FIG. 1.—Diagram drawn to double logarithmic (log/log) scale showing the cancer death-rate (in the case of the United Kingdom, the carcinoma death-rate) in males at different ages. Deaths per 100,000 males are shown on the vertical scale, age figures on the horizontal scale.



Carl O. Nordling

72

C. O. NORDLING

SUMMARY.

The theory is put forward that the cancerous cell contains not one but a number of mutated genes. The occurrence of such accumulations of mutations may be expected to increase according to a certain exponent of age, as well as according to the increase of cell proliferation. Cancer statistics also show that the frequency of carcinoma increases according to the sixth exponent of age in males.

The unexpectedly high incidence of internal neoplasms in childhood is explained by the high frequency of cell division in the foetal stage. Other high cancer incidence rates in particular organs may be explained on the basis of exposure of the tissues either to mutagens or to agents increasing cell proliferation.



Carl O. Nordling

(1919-2007)

- architekt, urbanista, amatérský historik
- narodil se ve Finsku (1919), kde vystudoval architekturu (1939)
- 1944: emigroval do Švédska
- publikoval v odborných historických časopisech články o Holokaustu (1990, 1991), o Stalinovi (2006)
- Jako statistik aplikoval statistické metody na řadu vědeckých problémů a publikoval mnoho článků, především ve švédštině. Je nejznámější svými pracemi ve vědeckých disciplínách mimo svůj obor
- 1953: publikoval „*A new theory on cancer-inducing mechanism*“ v *British Journal of Cancer*
- později psal především o tématech z nordické a germánské historie a mimo jiné přispěl i do debaty o identitě Shakespeara

První odrodilá buňka



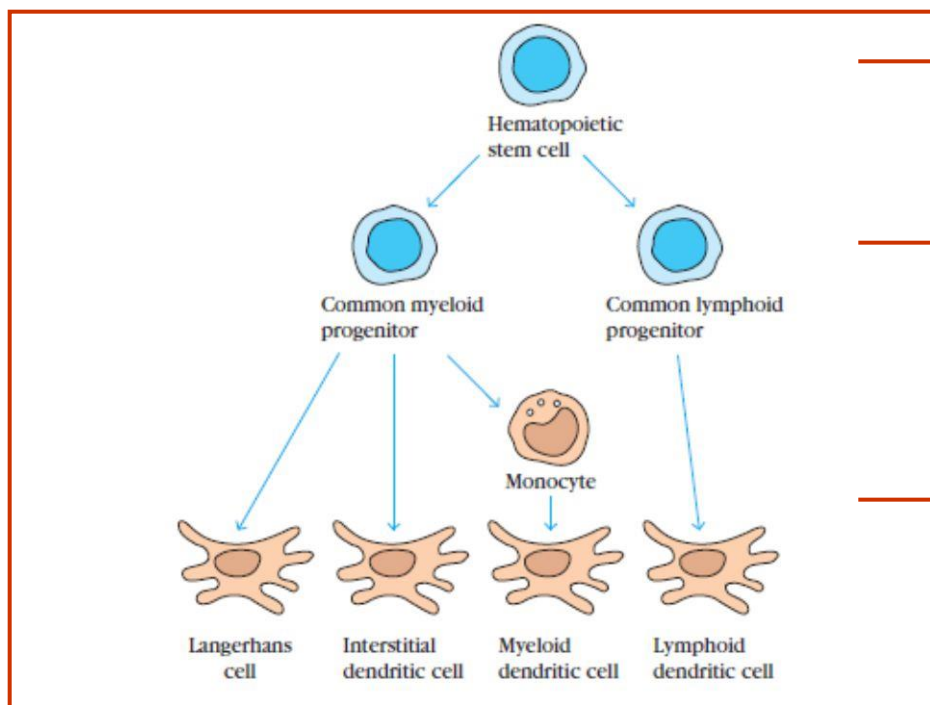
- Co je to za buňku??

GIT vs. GIST
vs. lymfomy...

První odrodilá buňka



- Co je to za buňku??



→ kmenová buňka??

→ progenitorová buňka??

→ diferencovaná buňka??

Nádorové kmenové buňky

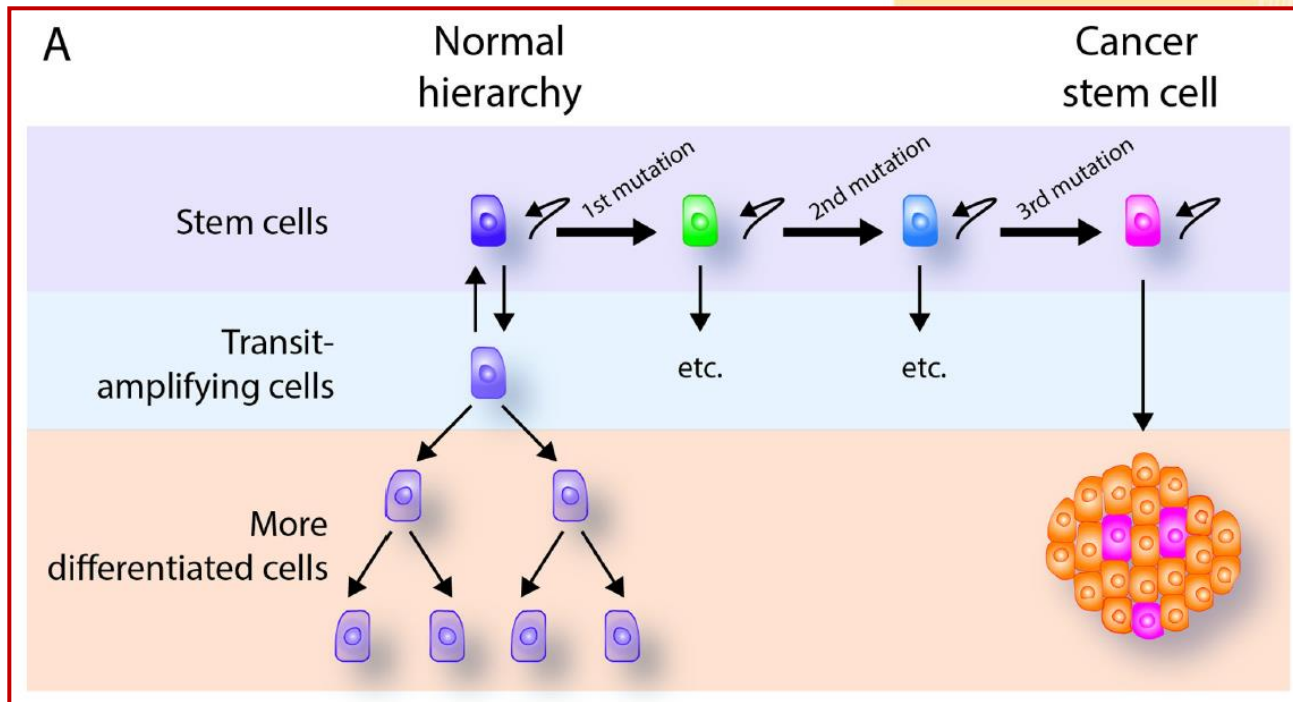


- jak normální, tak nádorová tkáň obsahuje subpopulaci kmenových buněk
- **nádorové kmenové buňky (CSCs):**
 - mají potenciál dát vzniknout novému nádoru, včetně jeho heterogenity, po implantaci do vhodného hostitele
 - podíl CSCs v nádorové tkáni koresponduje s prognózou nádoru
- existují dva modely vysvětlující vznik CSCs

Kmenové buňky

- schopnost sebeobnovy i produkce buněk podstupujících diferenciaci
- relativně vzácné
- klidové (quiescentní)
- rezistentní k toxinům a chemikáliím
- intenzivní oprava DNA

Nádorové kmenové buňky: model A



- CSCs vznikají transformací normálních kmenových buněk

Nádorové kmenové buňky: model A



Co nesedí:

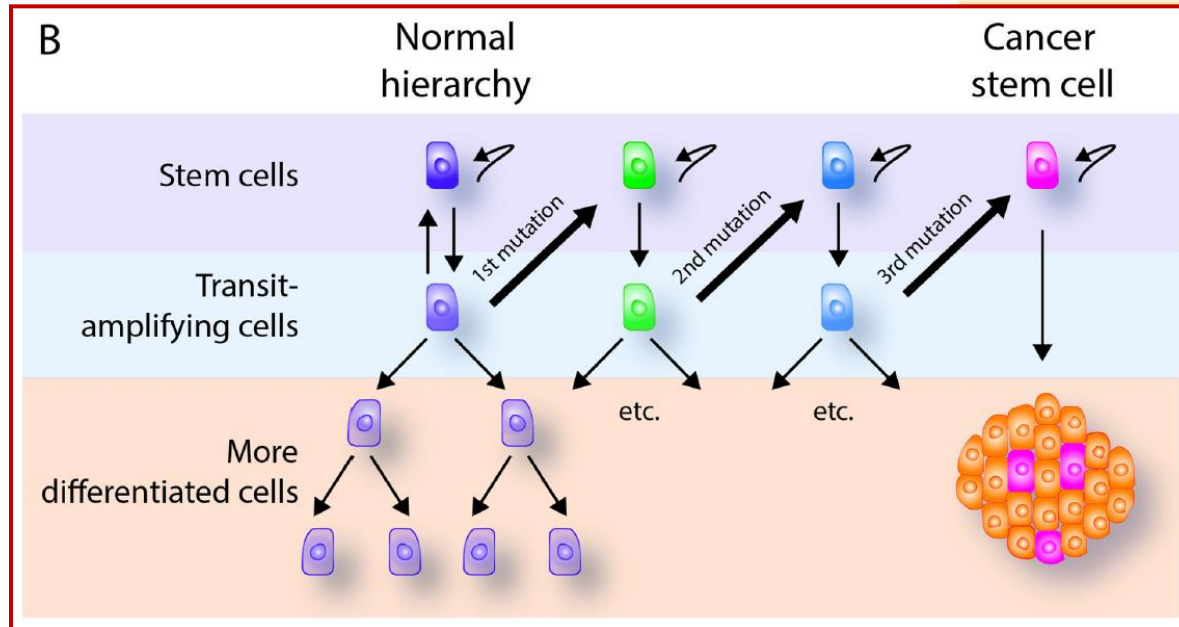
1. malá pravděpodobnost, že se vzácné, nahodilé, zvýhodňující mutace objeví, když potenciální cílová skupina buněk je tak malá
2. většina mutací se objevuje mnohem častěji v rychle se dělících buňkách než v buňkách, které se dělí pomalu (populace epiteliálních SC se dělí mnohem pomaleji než jejich bezprostřední potomci – progenitorové buňky, které jsou odpovědné za exponenciální expanzi a mají vysokou mitotickou aktivitu)
3. klonální expanze buněčných variant závisí na zvýhodňujícím fenotypu; nediferencované SCs mají mnohem menší šanci, že budou vykazovat takový fenotyp, než jejich potomci, u kterých je již zahájen diferenciační program

Nádorové kmenové buňky: model A



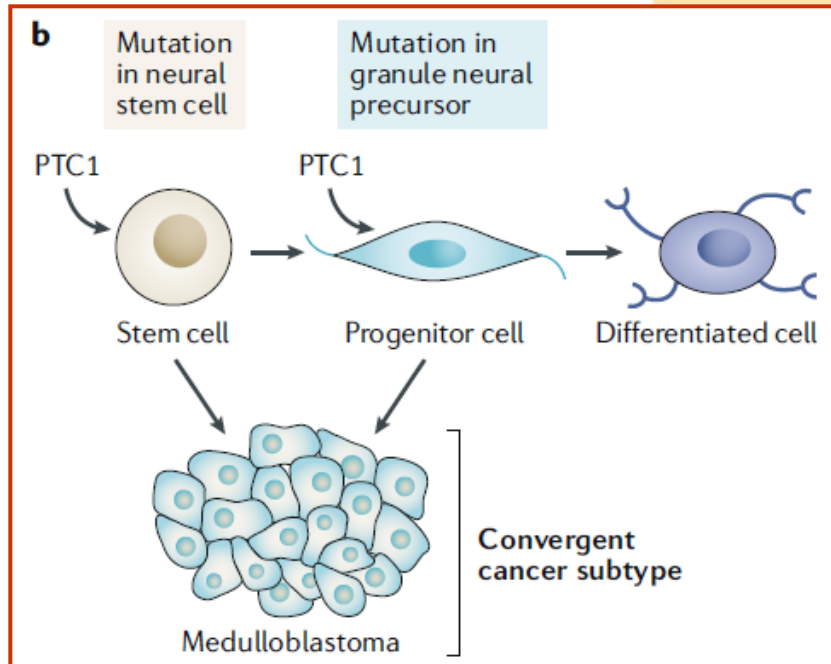
- Model, podle kterého normální epiteliální SCs jsou buňkami, kterými začíná vývoj karcinomů, je matematicky i biologicky **málo pravděpodobný!**

Nádorové kmenové buňky: model B



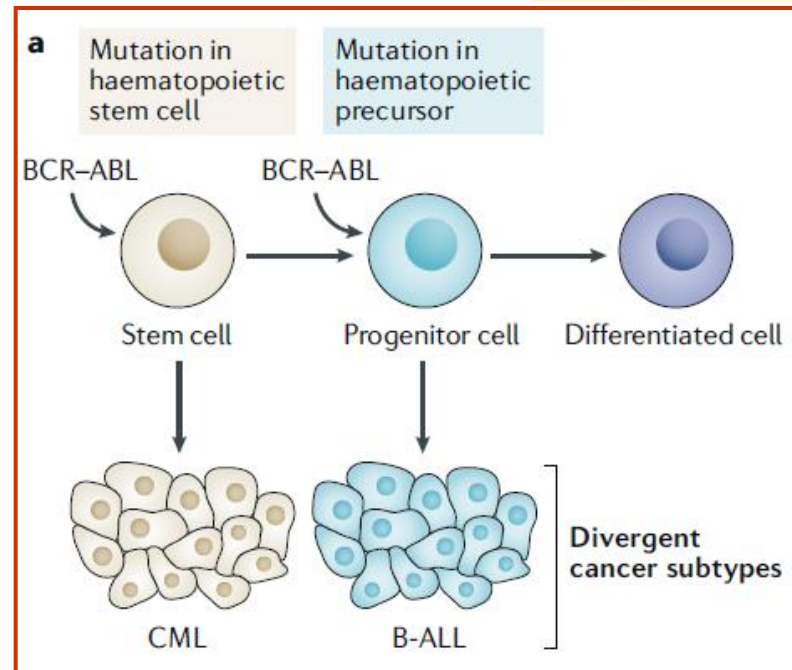
- Ke genetickým (a epigenetickým) změnám (zásahům) dochází v progenitorových buňkách, které se transformují a také dediferencují v SCs (CSCs).

Nádorové kmenové buňky: „model A/B“



- onkogenní mutace v různých „původních“ („odrodilých“) buňkách mohou vést k vývoji stejných typů nádorů (konvergence) ⇒ některé řídicí mutace jsou v určování buněčného osudu tak silné, že překonávají transkripční kontext a původ buněk

Nádorové kmenové buňky: „model A/B“



- onkogenní mutace mohou vést k vývoji různých typů nádorů (divergence) v závislosti na typu výchozí („odrodilé“) buňky, tj. v závislosti na transkripčním a epigenetickém profilu

Kolik a které geny jsou změněny během kancerogeneze?



- nádor není monogenní onemocnění
- odhaduje se, že pro vývoj nádoru je nezbytných **4-7 událostí** (zásahů)
- konkrétních genů, které mohou být během kancerogeneze změněny, jsou desítky, stovky....

Cancer Genome Atlas consortium

- stanovení sekvence genomu nádorů
- 2009: dokončeno sekvenování genomů nádorů vaječníků, slinivky, melanomu, rakoviny plic a několika forem leukémie
- tak se podařilo získat úplný katalog mutací u těchto nádorů

Wood LD et al. *Science* 318: 1108-1113, 2007

Mukherjee S: Vlákyně všech nemocí. *Nakladatelství MU* 2015

Cancer Genome Atlas consortium

- u jednotlivých vzorků nádorů prsu a střeva bylo mutováno **50 - 80** genů; u nádorů slinivky **50 – 60** mutací
- dokonce u nádorů mozku, které se často vyvíjejí v mladším věku, a proto by se dalo čekat, že se v nich nahromadí mutací méně, bylo nalezeno **40 - 50** mutovaných genů
- u jednoho vzorku rakoviny prsu 43leté ženy bylo mutováno **127** genů
- pouze několik typů nádorů, které nesou v genomu jen pár mutací, se z tohoto pravidla vymyká; například akutní lymfoblastická leukémie (ALL): nalezeno „jen“ **5-10** změn

Wood LD et al. *Science* 318: 1108-1113, 2007

Mukherjee S: Vlákyně všech nemocí. *Nakladatelství MU* 2015

Cancer Genome Atlas consortium

- v rámci jednoho typu nádoru existuje „skličující“ (Bert Vogelstein) mutační heterogenita
- při srovnání dvou vzorků nádoru prsu není soubor mutovaných genů zdaleka stejný
- sekvenování genomu nádorů potvrzuje stovky let klinických pozorování: rakovina každého pacienta je jedinečná, protože každý nádorový genom je jedinečný!!

Wood LD et al. *Science* 318: 1108-1113, 2007

Mukherjee S: Vlákyně všech nemocí. *Nakladatelství MU* 2015

Genomic landscapes of human cancers

Bert Vogelstein: mutace v nádorech jsou dvou typů:

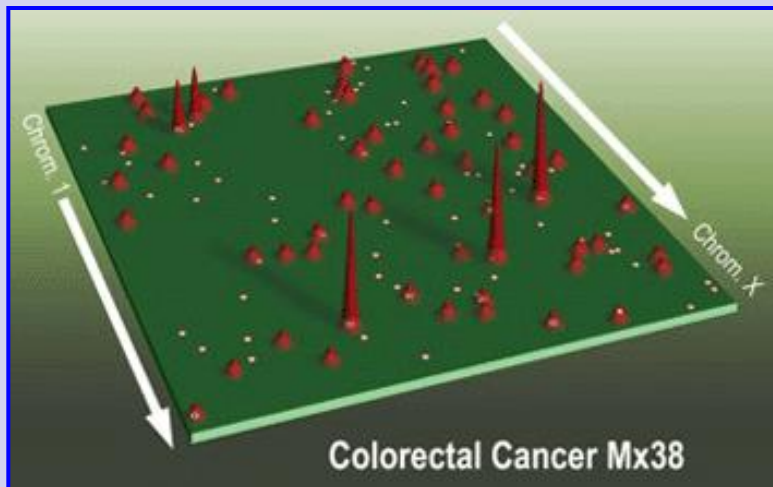
- (1) **pasivní**: jak se rakovinné buňky dělí, hromadí se v nich mutace v důsledku nehod při kopírování DNA, ale tyto mutace na biologii rakoviny nemají žádný vliv; jsou s genomem spojené a pasivně se při buněčném dělení přenáší dále; jsou identifikovatelné, ale bezvýznamné; jsou to „**přihlížející**“ mutace nebo mutace, „které se vezou“
- (2) „**driver**“: řídí, tj. přímo stimulují růst a biologické chování nádorových buněk; hrají rozhodující úlohu v biologii rakovinné buňky
- „přihlížející“ mutace se objevují náhodně, jsou rovněž v genomu náhodně umístěny; „řídící“ mutace zasahují klíčové onkogeny a nádorové supresory a takových genů je v genomu omezený počet

Wood LD et al. *Science* 318: 1108-1113, 2007

Mukherjee S: Vládkyně všech nemocí. *Nakladatelství MU* 2015

Genomic landscapes of human cancers

- „přihlížející“ mutace se objevují náhodně, jsou rovněž v genomu náhodně umístěny
- „řídící“ mutace zasahují klíčové onkogeny a nádorové supresory a takových genů je v genomu omezený počet; takové mutace (např. v genech jako *ras*, *myc* a *RB*) se ve vzorcích objevují opakovaně; na „Vogelsteinově mapě“ vyčnívají jako vysoké hory, zatímco mutace „přihlížející“ zde typicky představují údolí

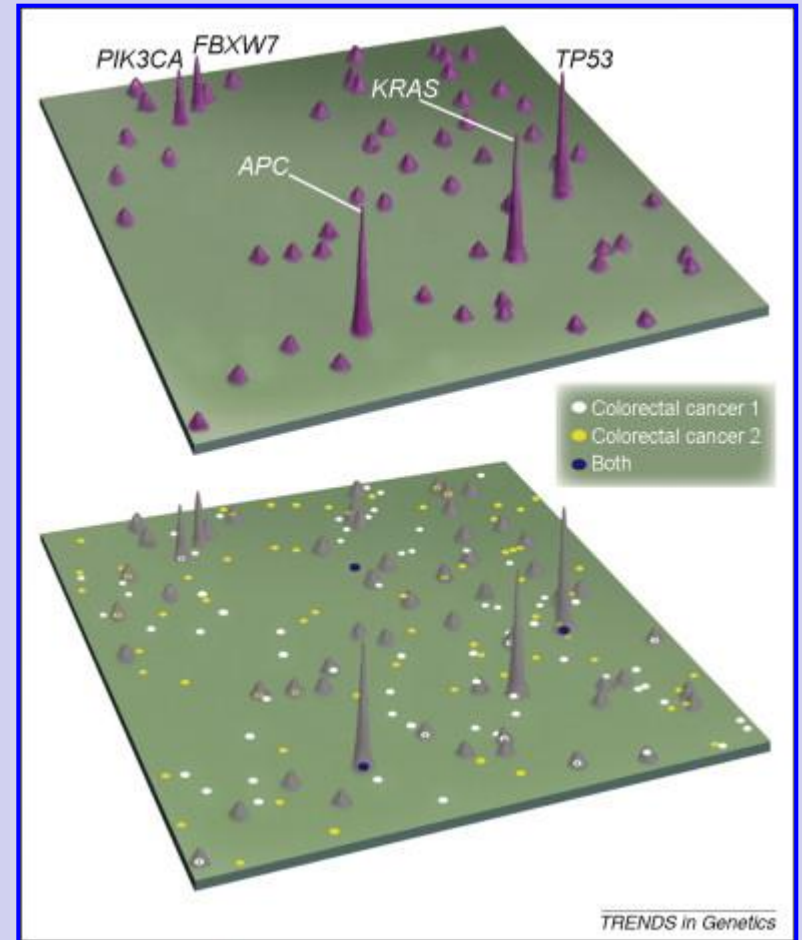


Wood LD et al. *Science* 318: 1108-1113, 2007

Mukherjee S: Vládkyně všech nemocí. *Nakladatelství MU* 2015

Genomic landscapes of human cancers

- „**hory**“ rakovinného genomu – tj. nejčastěji mutované geny u určitého typu nádoru - mohou být sestaveny do **signálních drah** (např. Ras-Mek-Erk)
- Kolik drah je u nádorových buněk obvykle deregulováno? Vogelstein zjistil, že typicky mezi **11** a **15**, v průměru **13**



Wood LD et al. *Science* 318: 1108-1113, 2007

Mukherjee S: Vládkyně všech nemocí. *Nakladatelství MU* 2015

Kolik a které geny jsou změněny během kancerogeneze?

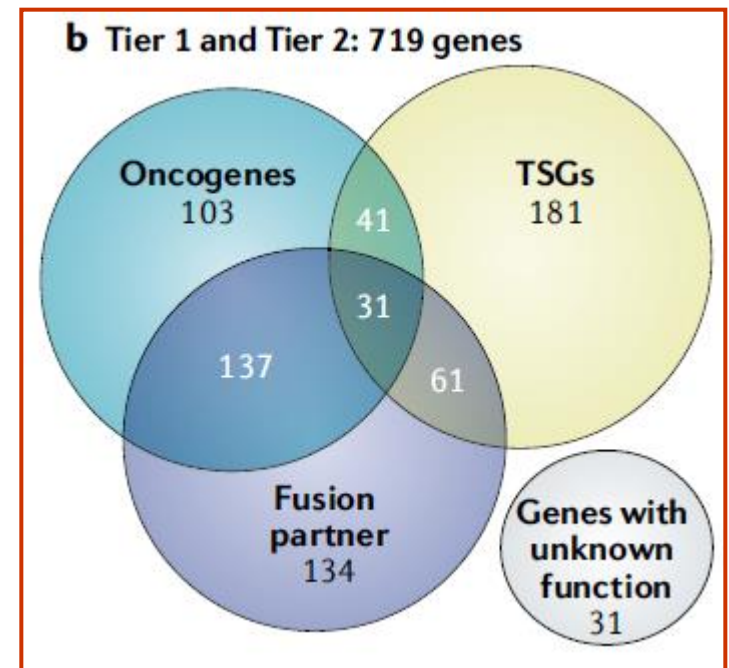


- nádor není monogenní onemocnění
- odhaduje se, že pro vývoj nádoru je nezbytných 4-7 událostí (zásahů)
- **konkrétních** genů, které mohou být během kancerogeneze změněny, jsou **desítky, stovky***

Konkrétních genů, které mohou být během kancerogeneze změněny, jsou stovky*



- Catalogue of Somatic Mutations in Cancer (COSMIC) Cancer Gene Census (CGC)
- verze 86, srpen 2018: **719** „cancer-driving“ genů: onkogeny + nádorové supresory (554 genů), fúzní geny
- úroveň 1 (574 genů): jasná funkce a jasný dopad na transformaci
- úroveň 2: (i) méně jasný mechanismus transformace + (ii) partnerské geny ve fúzích s nejasnou funkcí, s prokázaným onkogenním dopadem partnerského genu



Konkrétních genů, které mohou být během kancerogeneze změněny, jsou desítky, stovky*



- Catalogue of Somatic Mutations in Cancer (COSMIC) Cancer Gene Census (CGC)
- **719** „cancer-driving“ genů (onkogeny, nádorové supresory, fúzní geny) + **145** expanding genes from more recent cancer studies that show supportive but less detailed indications of a role in cancer

Kolik a které geny jsou změněny během kancerogeneze?









- nádor není monogenní onemocnění
- odhaduje se, že pro vývoj nádoru je nezbytných 4-7 událostí (zásahů)
- konkrétních genů, které mohou být během kancerogeneze změněny, jsou desítky, stovky*
- obecně existuje **šest** (sedm? jedenáct?) **základních vlastností** plně maligního nádoru:

Šest získaných vlastností maligního nádoru



získaná schopnost

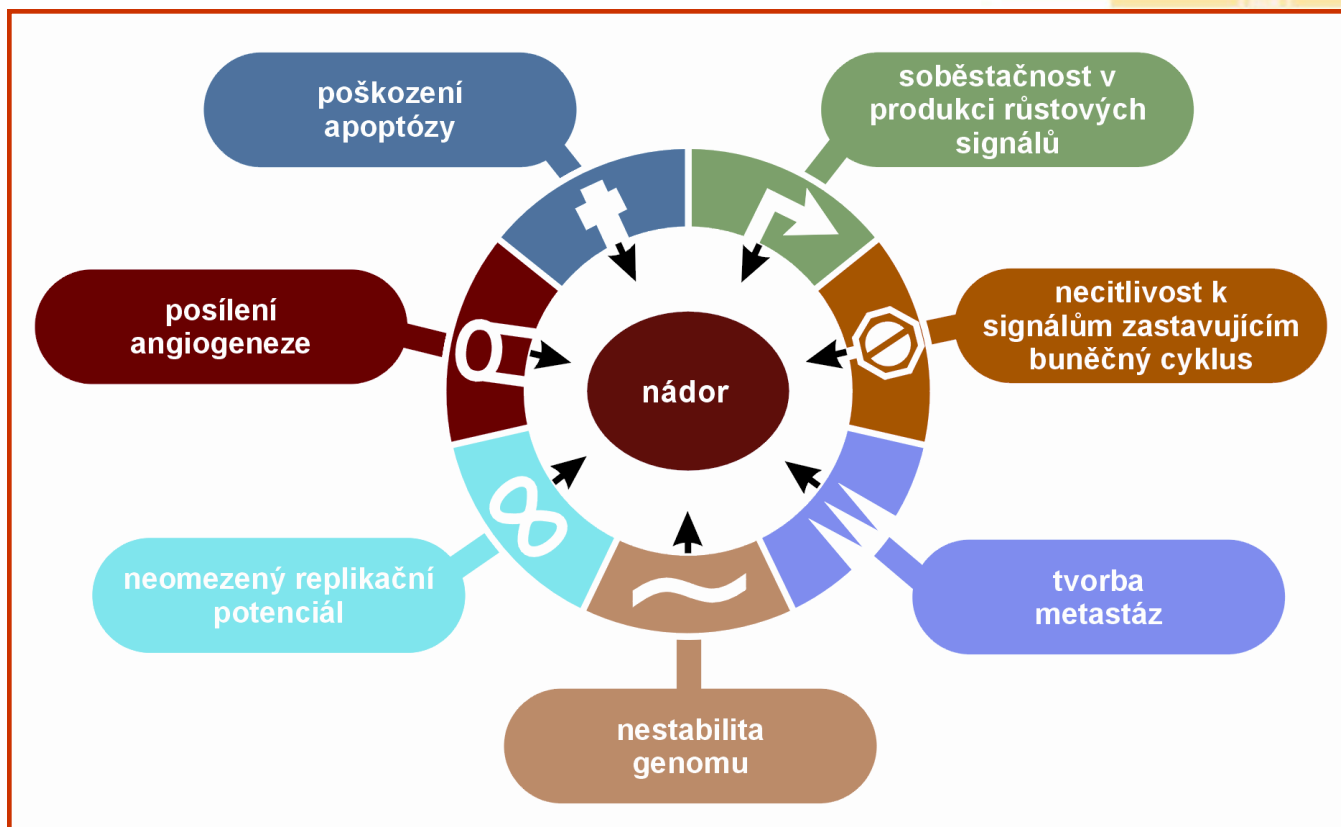
-  soběstačnost v produkci růstových signálů
-  necitlivost k signálům zastavujícím b.c.
-  poškození apoptózy
-  neomezený replikační potenciál
-  posílení angiogeneze
-  tvorba metastáz

příklad

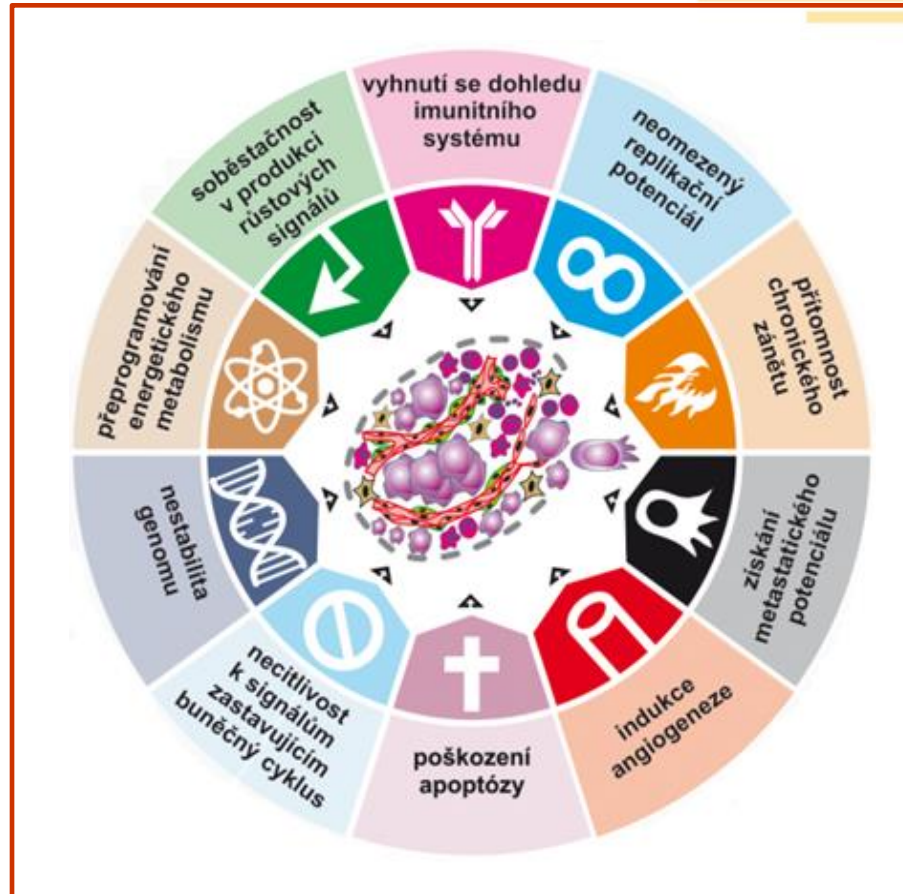
- aktivace *H-ras*
- ztráta RB
- produkce IGF
- aktivace telomerázy
- produkce VEGF
- inaktivace E-kadherinu

Nestabilita genomu jako podmínka akumulace všech nutných změn.

Sedm typických znaků nádorových buněk



Jedenáct typických znaků nádorových buněk



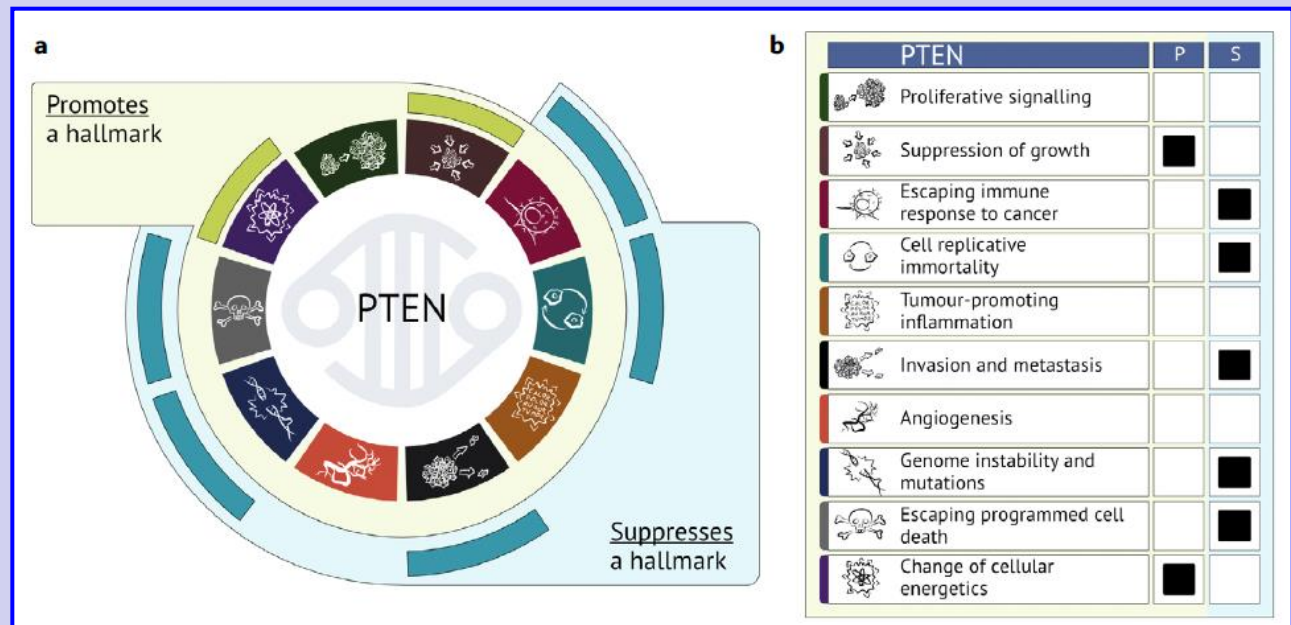
Získané vlastnosti maligního nádoru



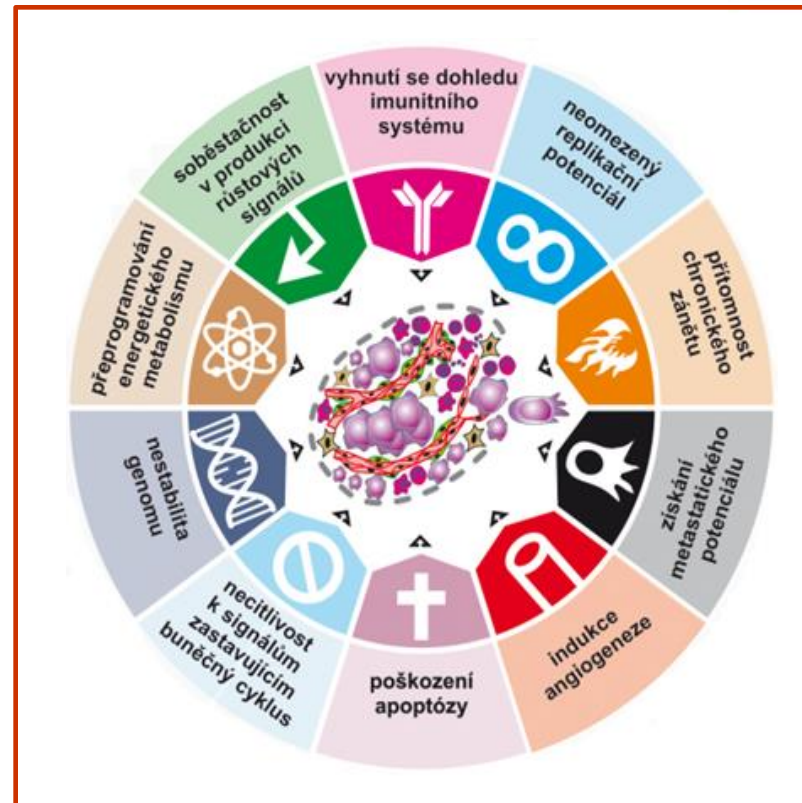
- (1) produkce vlastních proliferačních signálů
- (2) necitlivost k signálům zastavujícím buněčné dělení
- (3) odolnost k buněčné smrti
- (4) neomezený replikační potenciál
- (5) indukce angiogenese
- (6) aktivace invazivity a metastazování
- (7) genetická nestabilita a mutace
- (8) přítomnost zánětu podporující nádor
- (9) přeprogramování energetického metabolismu
- (10) schopnost vyhnout se destrukci imunitním systémem
- (11) změny mikroprostředí nádoru

Konkrétních genů, které mohou být během kancerogeneze změněny, jsou desítky, stovky

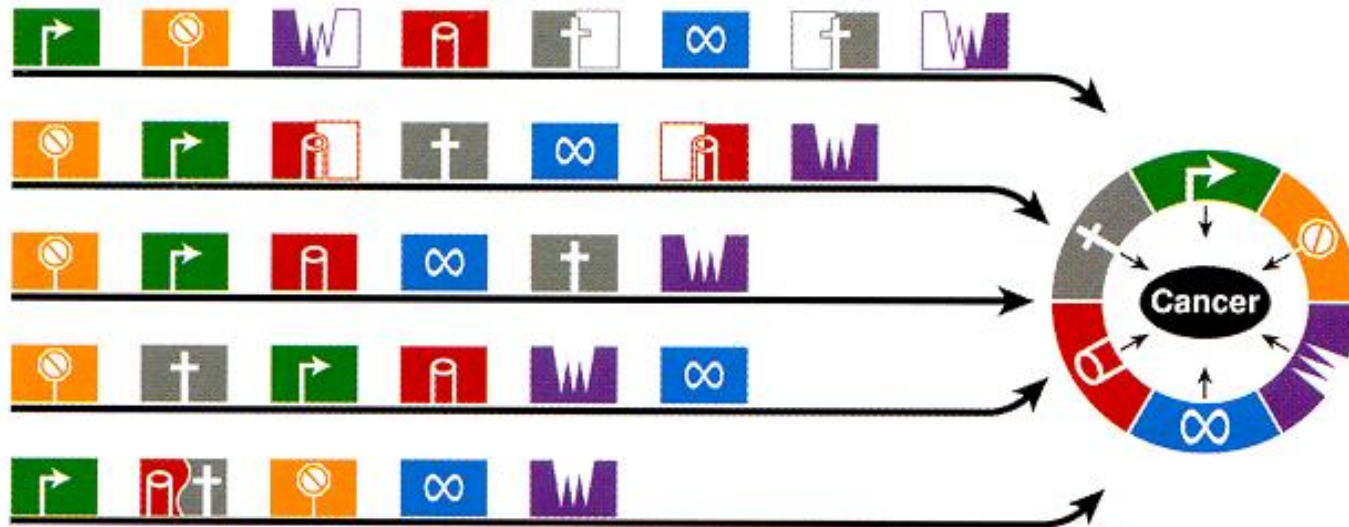
- Catalogue of Somatic Mutations in Cancer (COSMIC) Cancer Gene Census (CGC)



Kancerogeneze má obecné rysy



Kancerogeneze má individuální průběh



Individuální je - pořadí zásahů

- počet zásahů

- konkrétní zasažené geny

Onkogeny



Protoonkogen je strukturní gen eukaryotické buňky, který se svým translačním produktem podílí do značné míry na regulaci (**stimulaci**) dělení buněk a jejich diferenciaci.

Onkogen je protoonkogen pozměněný nebo aktivovaný tak, že vyvolává neoplastickou transformaci buňky.

Aktivace protoonkogenu je přeměna protoonkogenu na onkogen.

Mutace protoonkogenů jsou:

- aktivující
- dominantní
- vyskytují se v somatických buňkách a jen výjimečně v zárodečných buňkách

Nádorové supresory

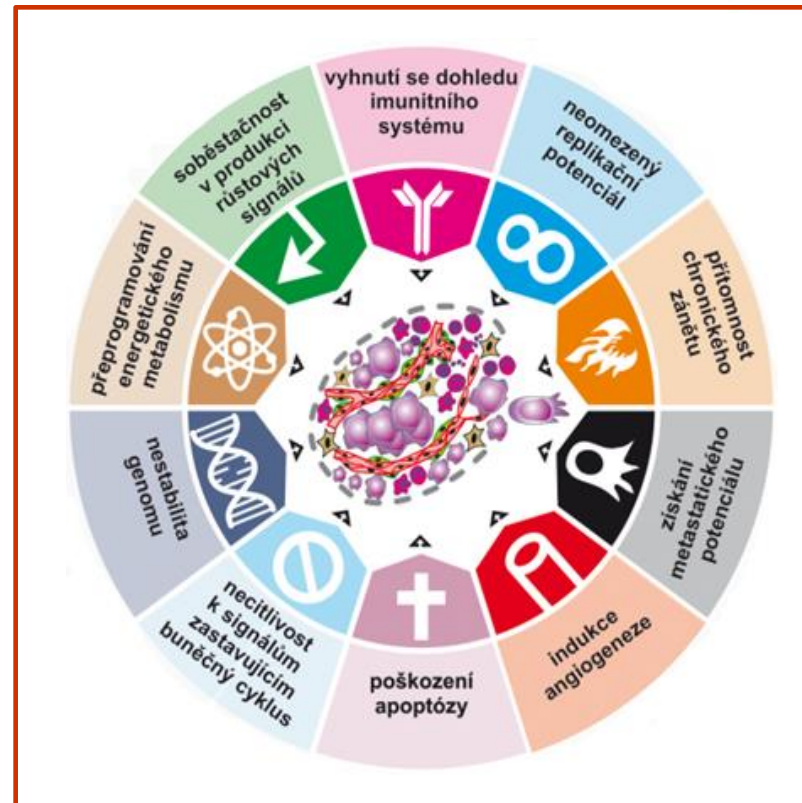


Produkty genů pro nádorové supresory („*antionkogeny*“) v normálních buňkách nevyvolávají proliferaci, ale naopak ji **potlačují** a udržují buňky ve stadiu klidu (G_0). Jejich ztráta se projevuje neregulovanou proliferací.

Mutace nádorových supresorů jsou:

- inaktivující
- recesivní (spojeno s **LOH**) („*recesivní onkogeny*“)
- vyskytují se v somatických a také v zárodečných buňkách

Jedenáct získaných vlastností maligního nádoru

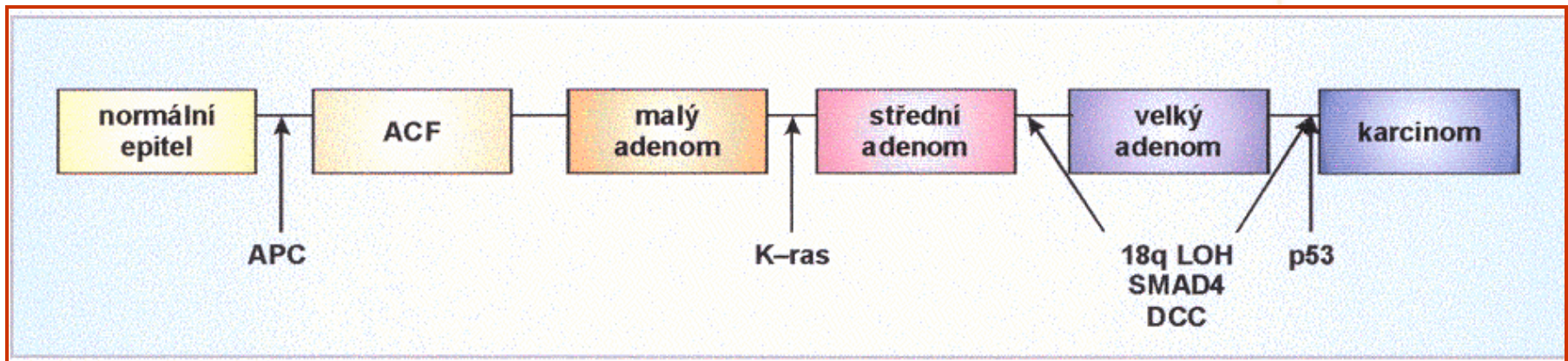


⇒ vícestupňová kancerogeneze ⇒ modely

Modely vícestupňové kancerogeneze



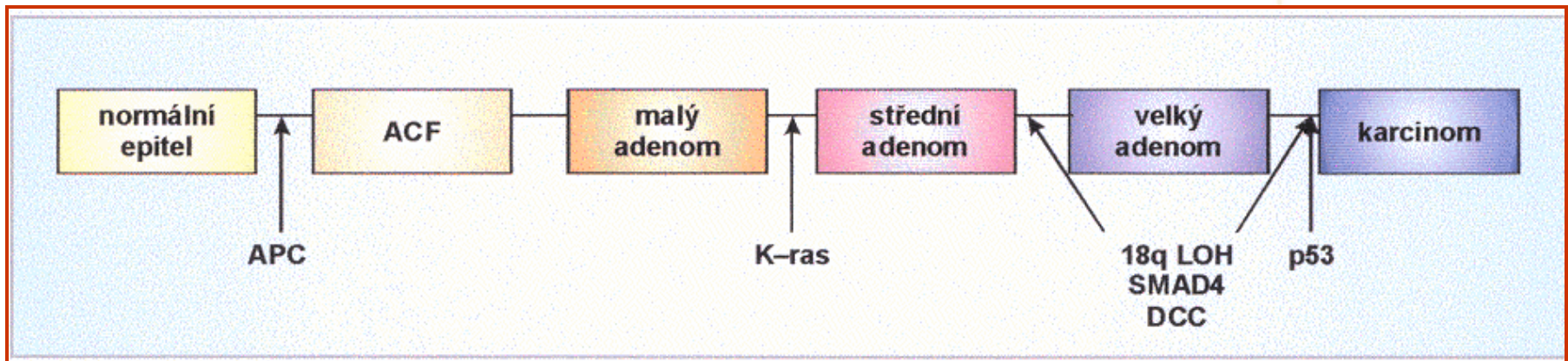
1. vývoj kolorektálního karcinomu



Modely vícestupňové kancerogeneze



1. vývoj kolorektálního karcinomu

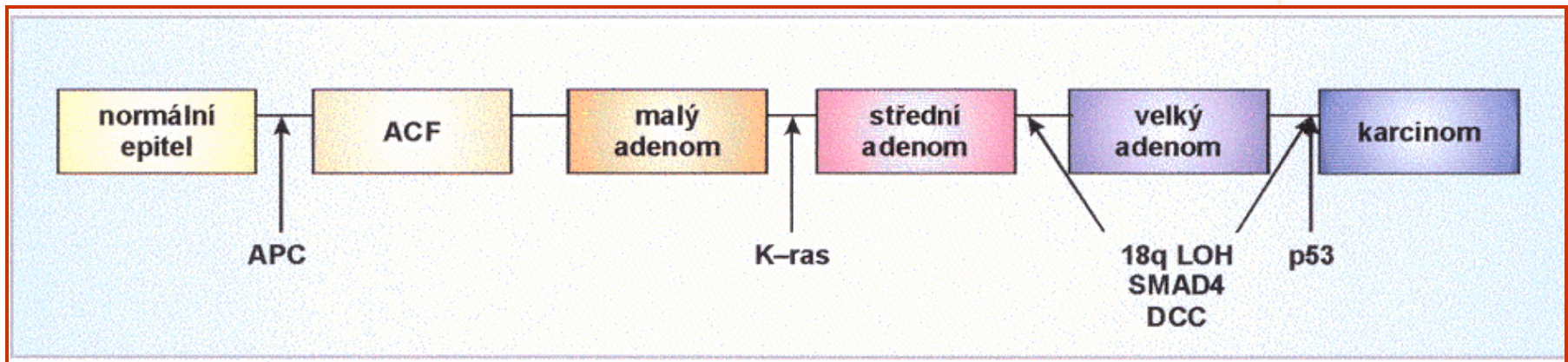


2. vývoj lymfomů

Modely vícestupňové kancerogeneze



1. vývoj kolorektálního karcinomu



3. „transformace onkogenními DNA viry“

Onkogenní (nádorové) viry



- **Retroviry** (RNA viry): obsahují ve svém genomu **onkogen** (akutně transformující viry) nebo aktivují **protoonkogen**, vedle kterého se integrovaly (inzerční mutageneze; pomalu transformující)
- **DNA nádorové viry** používají jinou strategii transformace: kódují proteiny (**virové onkoproteiny**), které interagují s **nádorovými supresory** (**RB**, **p53**, **p300/CBP**) hostitelské buňky a tak hostitelskou buňku tlačí do S fáze:

SV40: **velký T antigen** různými doménami interaguje s p53, RB, p300/CBP

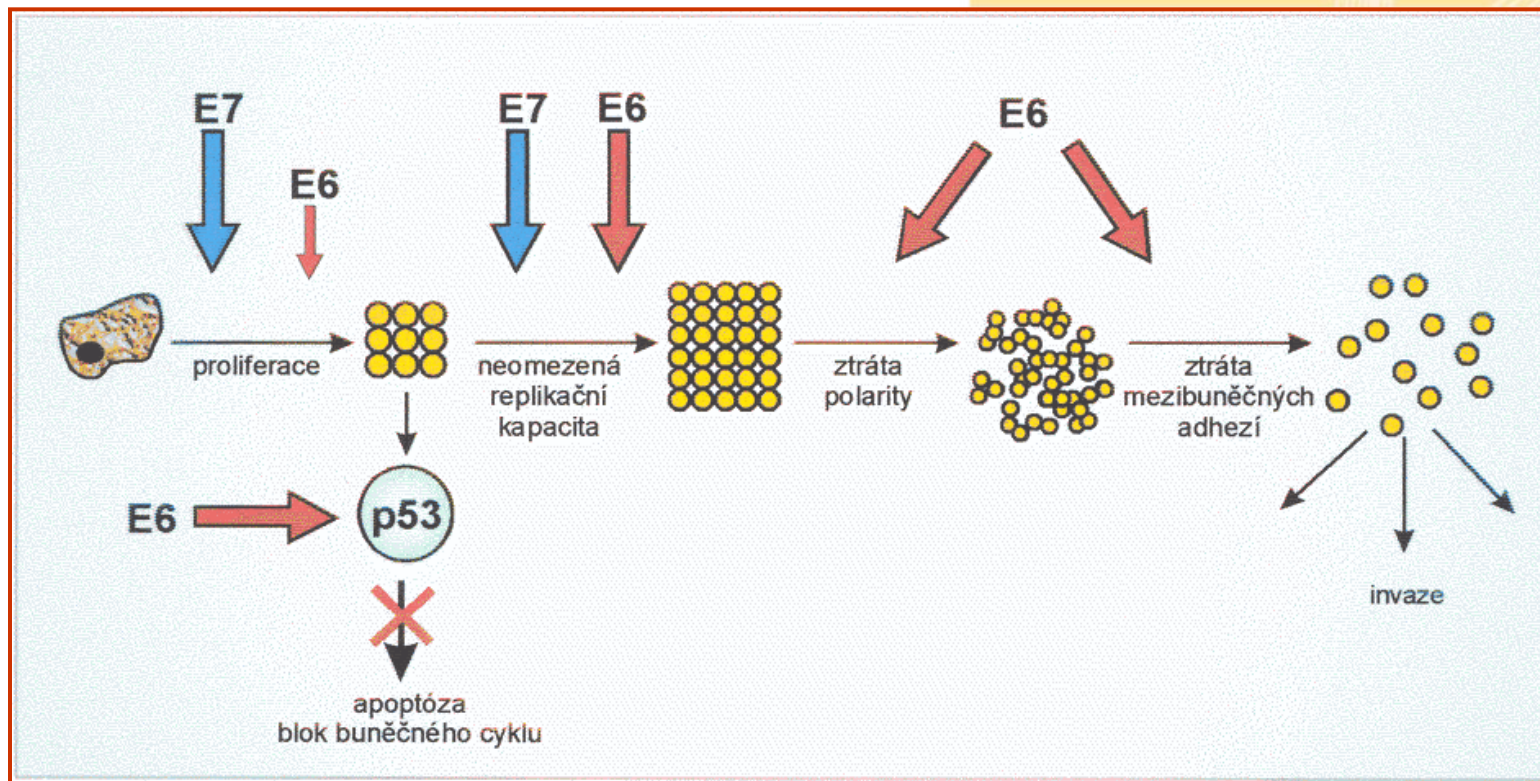
adenoviry: **E1A** interaguje s RB a p300/CBP; **E1B** interaguje s p53

papilomaviry HPV-16, HPV-18: **E6** interaguje s p53, p300/CBP; **E7** interaguje s RB

Některé způsoby inaktivace **p53** virovými onkoproteiny

- inaktivace p53 patří ke klíčovým událostem při transformaci buňky DNA viry
 - **LT** (SV40) - váže se do DNA vazebné domény p53 a znemožňuje vazbu p53 na DNA
 - **E1B** (adenovirů) - váže se do transkripční domény p53 a znemožňuje transkripci cílových genů
 - **E4orf6** (adenovirů) - způsobuje degradaci p53
 - **HBV X** (viru hepatitidy B) - zadržuje p53 v cytoplasmě
 - **E6** (papilomavirů) - indukuje degradaci p53 užitím ubikvitin ligázy E6AP; E6 dále inhibuje i přímo transkripční schopnost p53

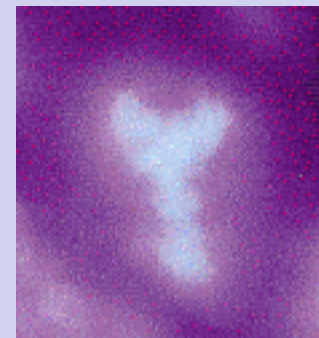
Podíl proteinů E6 a E7 papilomavirů na transformaci buňky



virové onkoproteiny: stimulují proliferaci, inhibují apoptózu, zvyšují replikační potenciál, mění morfologii buněk, indukují maligní fenotyp

Podíl proteinů E6 a E7 papilomavirů na transformaci buňky

- E6** - inaktivuje **p53** (blok G_1 , dep. apoptóza, gen. stabilita)
- interaguje s **p300/CBP** (narušení homeostáze)
 - aktivuje expresi **hTERT** (aktivace telomerázy)
 - inaktivuje **p16^{ink}** (narušení udržování klidového stádia)
 - interaguje s **Bak** (inhibice apoptózy)
 - interaguje s **E6BP/ERC-55** (inhibice terminální diferenciace)
 - indukuje degradaci **hDlg** (a další interakce s proteiny obsahujícími vazebný motiv PDZ) (změna morfologie, získání invazivního charakteru)
- E7** - váže se na **RB** (uvolnění TF E2F)
- inaktivace **p21^{Cip}** a **p27^{Kip}** (rozpojení: diferenciace - proliferace)
 - ruší inhibiční působení **TGF- β** na růst buněk
 - způsobuje tvorbu **násobných centrozómů**

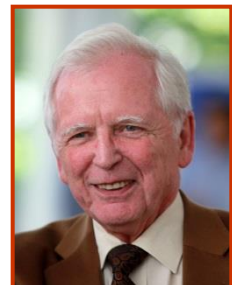


Klinický význam papilomavirů



- popsáno více než 100 odlišných typů papilomavirů
- dělí se na „high-risk“ a „low-risk“ typy podle prognózy, s níž jsou spojeny; „low-risk“ viry vyvolávají tvorbu benigních nádorů, „high-risk“ viry jsou spojeny s maligní progresí
- asi 30 typů HPV preferenčně infikuje anogenitální oblasti, infekce „high-risk“ viry je spojena téměř se všemi nádory děložního čípku
- asi 20% všech nádorů ústní dutiny, které nejsou spojeny s historií kouření a alkoholismu, je spojeno s infekcí HPV

2008: Nobelova cena - Harald zur Hausen



Onkogenní viry a lidské nádory



DNA viry:

- **virus Epstein-Barrové (EBV)** - Burkittův lymfom (BL), Hodgkinův lymfom (HD), další lymfomy, nazofaryngální karcinomy (NPC)
- **virus hepatitidy B (HBV)** - hepatocelulární karcinom (HCC)
- (virus hepatitidy C (HCV) – HCC a lymfomy; RNA virus!)
- **lidské papilomaviry (HPV 16, 18,..)** - anogenitální nádory, nádory ústní dutiny, bradavice
- **lidský herpesvirus typu 8 (HHV8)** - Kaposiho sarkom (KS)
- **polyomavirus merkelových buněk (MCV)** – karcinomy Merkelových buněk (neuroendokrinní karcinomy kůže)

Onkogenní viry a lidské nádory



RNA viry:

Obecně: nepotvrdila se myšlenka, že retroviry způsobují mnoho různých nádorů, ale jejich studium přineslo mnoho vzhledů do podstaty kancerogeneze

(1) akutně transformující, (2) pomalu a transformující a

(3) **lidský lymfotropní virus typu I (HTLV-1)** - T-leukémie (lymfom) dospělých (ATTL).

- infikováno asi 1% obyvatel Kyushu (jižní ostrov Japonska) a méně někteří obyvatelé Karibiku
- infekce se přenáší z matky na dítě (asi mlékem) a představuje asi 3-4% celoživotní riziko vývoje T-buněčné leukémie.
- určitě se neuplatňuje mechanismus inserční mutageneze; virový gen **tax** je odpovědný za aktivaci transkripce provirových DNA sekvencí a pravděpodobně aktivuje také 2 buněčné geny: **IL-2** (interleukin2) a **GM-CSF** („granulocyte macrophage colony-stimulating factor“); pravděpodobně stimulace těmito faktory stojí na počátku neoplasie T buněk.

(4) **HIV-1** a **HIV-2** – nezpůsobují přímo nádory, ale nepřímo – navozením imunodeficiency – zvyšují jejich výskyt

Onkogenní viry a lidské nádory

Virus	Genome	Notable cancers	Year first described
Epstein–Barr virus (EBV; also known as human herpesvirus 4 (HHV4))	Double-stranded DNA herpesvirus	Most Burkitt's lymphoma and nasopharyngeal carcinoma, most lymphoproliferative disorders, some Hodgkin's disease, some non-Hodgkin's lymphoma and some gastrointestinal lymphoma	1964
Hepatitis B virus (HBV)	Single-stranded and double-stranded DNA hepadenovirus	Some hepatocellular carcinoma	1965
Human T-lymphotropic virus-I (HTLV-I)	Positive-strand, single-stranded RNA retrovirus	Adult T cell leukaemia	1980
High-risk human papillomaviruses (HPV) 16 and HPV 18 (some other α -HPV types are also carcinogens)	Double-stranded DNA papillomavirus	Most cervical cancer and penile cancers and some other anogenital and head and neck cancers	1983–1984
Hepatitis C virus (HCV)	Positive-strand, single-stranded RNA flavivirus	Some hepatocellular carcinoma and some lymphomas	1989
Kaposi's sarcoma herpesvirus (KSHV; also known as human herpesvirus 8 (HHV8))	Double-stranded DNA herpesvirus	Kaposi's sarcoma, primary effusion lymphoma and some multicentric Castleman's disease	1994
Merkel cell polyomavirus (MCV)	Double-stranded DNA polyomavirus	Most Merkel cell carcinoma	2008

Úloha infekčních agens v kancerogenezi

Infekční agens souvisí asi s 1/5 všech úmrtí způsobených nádorem:

- 6% - světová mortalita na hepatom: spojeno s chronickou hepatitidou B a C (**HBV, HCV**)
- 5% - světová mortalita na ca děložního čípku: spojeno s infekcí **HPV**
- 9% - světová mortalita na ca žaludku: spojeno s dlouhodobou infekcí **Helicobacter pylori**

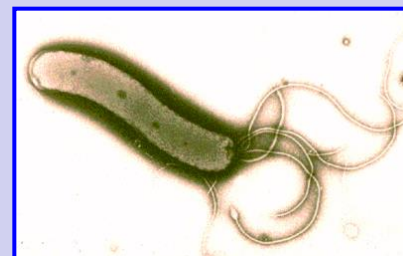
Úloha infekčních agens v kancerogenezi

Infekční agens souvisí asi s 1/5 všech úmrtí způsobených nádorem:

- 5% - světová mortalita na ca děložního čípku: spojeno s infekcí **HPV**
- 6% - světová mortalita na hepatom: spojeno s chronickou hepatitidou B a C (**HBV, HCV**)
- 9% - světová mortalita na ca žaludku: spojeno s dlouhodobou infekcí **Helicobacter pylori**

➤ asi **15-20%** všech nádorů souvisí se specifickou bakteriální infekcí (v rozvojových zemích až **40%**)

Helicobacter pylori



- spirální, mikroaerofilní, gramnegativní bakterie
- objeven **1982**
- kolonizuje žaludeční sliznici
- prevalence v naší populaci se odhaduje na 30-55%; s věkem se navyšuje (u 90-95% pacientů s duodenálním vředem, u 60-80% pacientů s žaludečním vředem; kauzální vztah k peptidickému vředu gastroduodena)
- tvoří bílkovinu stimulující tvorbu gastrinu, který zvyšuje sekreci HCl; produkuje proteázy a fosfolipázy narušující hlenovou vrstvu; mají enzym katalázu, která narušuje lokální schopnost fagocytózy buněk imunitního systému
- za objev, že záněty žaludku i žaludeční vředy způsobuje infekce, kterou vyvolává *Helicobacter pylori*: Barry Marshall a Robin Warren – **2005** – Nobelova cena za fyziologii a lékařství



Závěrečné poznámky „Úvodu“

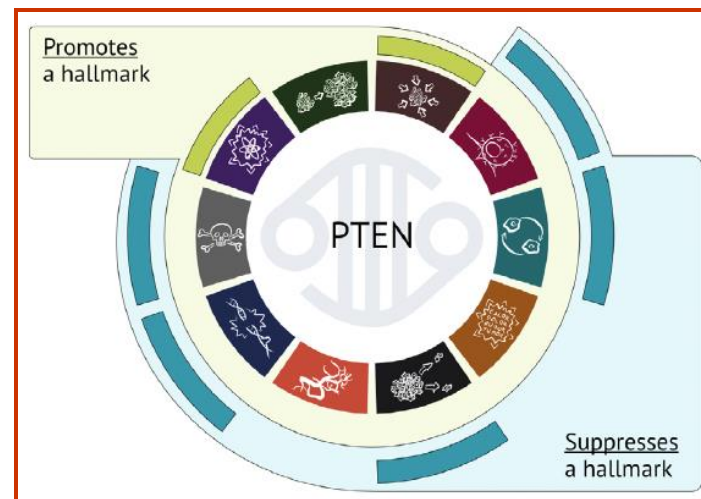


- geny nemají výlučnou funkci v jediném procesu v buňce (buněčný cyklus vs. apoptóza vs. genomová stabilita vs. ...)
- jenom omezený počet signálních drah je inaktivován téměř univerzálně u většiny nádorů (RB, p53)
- jednotlivé signální dráhy jsou většinou postižené v jediné své složce → tzv. **princip exkluzivity**
- → tzv. **princip „just right“**

Závěrečné poznámky „Úvodu“ (COSMIC)



- jen velmi málo genů ovlivňuje pouze jediný znak nádorů; mnoho genů má dopad na více znaků (hallmarks) nádorů
- odlišné mutace téhož genu mohou mít odlišný dopad
- rozdělení na onkogeny a nádorové supresory není ostré, jednoznačné
- tkáňově specifický dopad
- dopad v závislosti na stadiu vývoje nádorů



PTEN	P	S
Proliferative signalling		
Suppression of growth	■	
Escaping immune response to cancer		■
Cell replicative immortality		■
Tumour-promoting inflammation		
Invasion and metastasis		■
Angiogenesis		
Genome instability and mutations		■
Escaping programmed cell death		■
Change of cellular energetics	■	

Program kursu Bi9910



- Úvod - základní pojmy, historický přehled, klasifikace nádorů, onkogenní viry (1)
- Některé signální dráhy (protoonkogeny): regulace buněčného cyklu, mitogenní a antimitogenní signalizace (2, 3)
- Vrozené dispozice k nádorům (nádorové supresory): základní přehled syndromů spojených se zvýšeným výskytem nádorů (4, 5)
- Genetická nestabilita nádorů (6)
- Apoptóza (7)
- Telomery a telomeráza (8)
- Angiogeneze (9)
- Tvorba metastáz (10)
- Nádory a imunitní systém (11)
- Epigenetika nádorů (12)