

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



2020

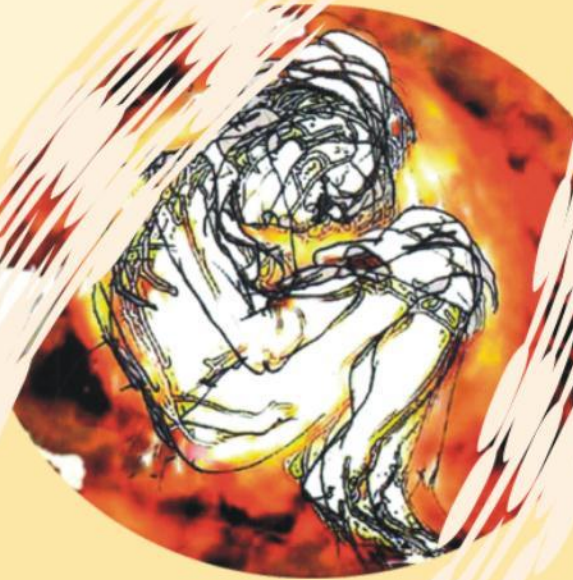
Molekulární a buněčná biologie nádorů

4. Individuální dispozice k nádorům I

Bi9910

pondělí 16.00 – 18.00

A11 – č. 305



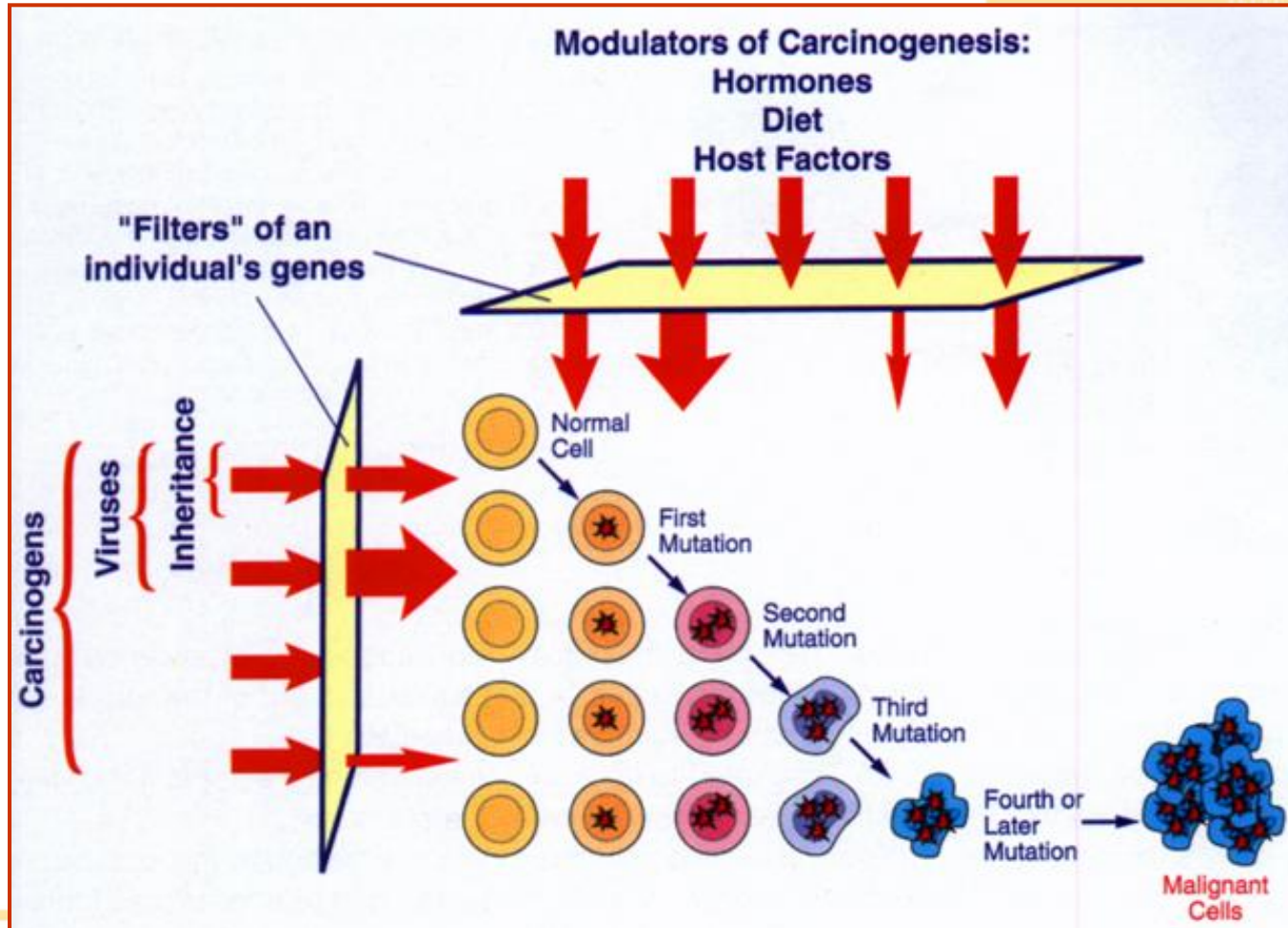
2020

Komplexní proces kancerogeneze



- Nádor vzniká akumulací **genetických změn**. Některé mohou být vrozené, jiné (somatické) mohou vznikat jako výsledek expozice kancerogenům nebo onkogenním virům.
- Častá expozice kancerogenům nemusí okamžitě vést k vývoji nádoru...
- **Modulátory** kancerogeneze zahrnují hormony, dietu, a další faktory hostitele. Dopad expozice kancerogenům stejně jako vliv modulátorů (geneticky) „**filtrovány**“ individuálními variantami genů, které eliminují, redukují nebo posilují dopad přispěvatelů tohoto procesu.
- Přesné pochopení těchto okolností vývoje nádoru vyžaduje podrobnější pochopení interakcí genů a prostředí.

Komplexní proces kancerogeneze



Individuální dispozice k nádorům



1. Rozdíly v metabolismu kancerogenů („filtry“)

(např. cytochrom P-450, CYP2D6, CYP1A1, N-acetyltransferáza - NAT, glutathion-S-transferáza M1 – GSTM1, ...)

Normální energetický metabolismus buněk uvolňuje jako vedlejší produkt značné množství reaktivních molekul včetně mutagenů / kancerogenů – ty jsou okamžitě neutralizovány a detoxikovány působením detoxikačních enzymů:

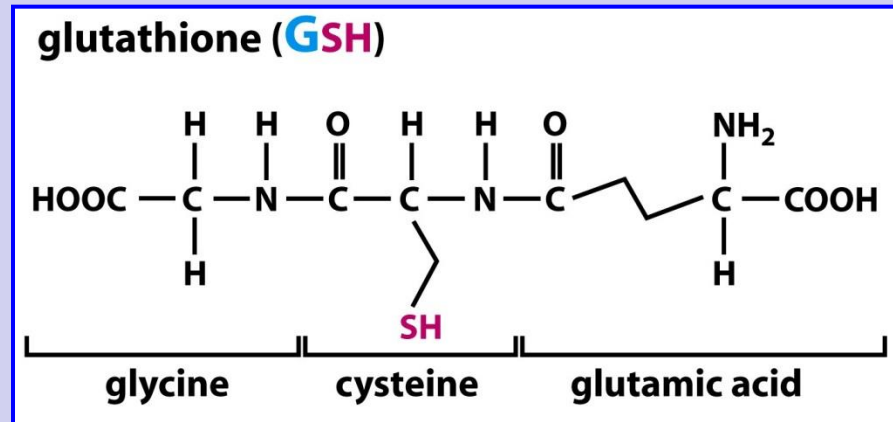
- kuřáci s nízkou hladinou NAT mají 2,5x vyšší riziko nádoru než kuřáci s vysokou hladinou NAT
- nízká hladina GSTM1 3x zvyšuje riziko nádoru plic

Funkce glutathion-S-transferázy

- GST se váže na řadu karcinogenů glutathion a tím je detoxikuje
- řada nádorů má sníženou hladinu GST (např. až 90% adenokarcinomů prostaty)

glutathion je neobvyklý tripeptid

GST využívá **SH** skupinu glutathionu k detoxifikaci mnoha karcinogenů dříve než mohou reagovat s DNA



Individuální dispozice k nádorům



2.-3. Rozdíly v procesech oprav DNA Mutace nádorových supresorů (a onkogenů)

- p53, *RB*, *WT1*, *BRCA1* a *BRCA2*,...
- *RET*, *c-met*, ...

penetrance: podíl jedinců určitého genotypu, u nichž se daný specifický genotyp fenotypicky projeví (pravděpodobnost výskytu daného nádoru v určitém věku)

Dědičné formy nádorů



příklady: Li-Fraumeniho syndrom, retinoblastom, medulární nádor štítné žlázy, Wilmsův tumor, dědičná forma nádoru prsu a vaječníků, ...

- **5-10%** nádorů tohoto typu většinou představuje **dědičnou formu** (vrozená mutace jedné alely + ztráta heterozygotnosti - LOH), ostatní jsou **sporadické**
- **dědičné formy** nádorů se objevují spíše v mladším věku než sporadické, často oboustranně nebo jako vícečetná ložiska
- **sporadické** nádory spíše ve vyšším věku a jednostranně

Indikace ke genetickému vyšetření

1. Výskyt nádoru v neobvykle časném věku.
2. Multifokální vývoj nádoru v jednom orgánu nebo bilaterální výskyt u párových orgánů.
3. Více primárních nádorů u jednoho jedince.
4. Pozitivní rodinná anamnéza stejného nádoru u blízkých příbuzných.
5. Vysoká incidence nádorů v rodině.
6. Výskyt nádorového onemocnění u jedince z rodiny s kongenitálními anomáliemi.

Genetické poradenství

1. Co nejpřesnější rodinná anamnéza (alespoň tři generace, kompletní rodokmen včetně zdravých, ověření diagnóz).
 2. Hledání postiženého genu (mutace) u probanda (pacienta s nádorem) (informovaný souhlas).
 3. Genetická analýza rodiny, včetně zdravých příbuzných - od 18 let, s informovaným souhlasem.
 4. Pozitivní výsledek: lékařský dohled, změna životního stylu, preventivní sledování, preventivní zásahy (profylaktické zákroky, chemoprevence,...).
- Psychologické a etické aspekty genetického vyšetření!!

Preimplantační genetická diagnostika

1. Moderní nástroje v diagnostice vs. relativně omezené možnosti terapeutické.
2. U nosiček mutací v genech, které způsobují vysoká rizika nádorů prsu a gynekologických nádorů, je důležité zvážit i rizika používaných hormonálních stimulací (ovariální hyperstimulace k vyvolání současného zrání více oocytů)
3. *APC, BRCA1, NF1, NF2, TP53, RB*

„gatekeepers“ a „caretakers“



„**gatekeepers**“ (**strážci**) - geny, které přímo regulují (limitují) růst nádorů buď inhibicí jejich růstu nebo indukci jejich smrti.

„**caretakers**“ (**správci**) - jejich inaktivace navozuje genetickou nestabilitu a ta pouze nepřímo indukuje růst nádorů zvyšováním mutační rychlosti.

APC, p53 - jsou zároveň „gatekeepers“ i „caretakers“

„gatekeepers“ a „caretakers“ u familiálních nádorů



„caretakers“

- NER, *xeroderma pigmentosa*, cockayne syndrom, trichothiodystrofie
- ataxia telangiectasia
- Bloomův syndrom
- Fanconiho anemie
- dědičný nepolypozní kolorektální nádor
- Wernerův syndrom
- Li-Fraumeniho syndrom
- nádory prsu

„gatekeepers“

- retinoblastom
- Li-Fraumeniho syndrom
- Wilmsův tumor
- neurofibromatóza typu 1 a 2
- renální karcinom
- MEN typu 1 a 2
- maligní melanom
- Cowdenův syndrom
- Gorlinův syndrom
- nádor prsu
- kolorektální nádor

Retinoblastom



- vzácné nádorové onemocnění dětí; incidence - 1 na 13.500 - 25.000 narozených dětí
- **prototypickým** příkladem vrozené dispozice k nádorům: na základě studia epidemiologie retinoblastomu byla vyslovena Knudsonova hypotéza → Knudsonův model
- *RB* byl prvním příkladem nádorového supresoru a první naklonovaný gen pro nádorový supresor.
- **autozomálně dominantní** dědičné onemocnění: mutace *RB* jsou **recesivní** (na úrovni buňky) a zároveň **dominantní** (na úrovni celého organismu)!!!
- vrozená mutace ***RB*** (13q14) predisponuje nositele k vývoji **retinoblastomu** (maligní tumor, který vzniká ve vyvíjející se retině) v nízkém věku a přináší 500x zvýšené riziko vývoje **osteosarkomu** během adolescence



Knudsonův model dvou zásahů



40% případů:

- průměrný věk při diagnóze - 14 měsíců
- bilaterálně v obou očích - v průměru 3 nezávislé nádory
- v případě časného odstranění retinoblastomu vysoký výskyt osteosarkomů mezi 20. a 30. rokem života
- často rodinná anamnéza

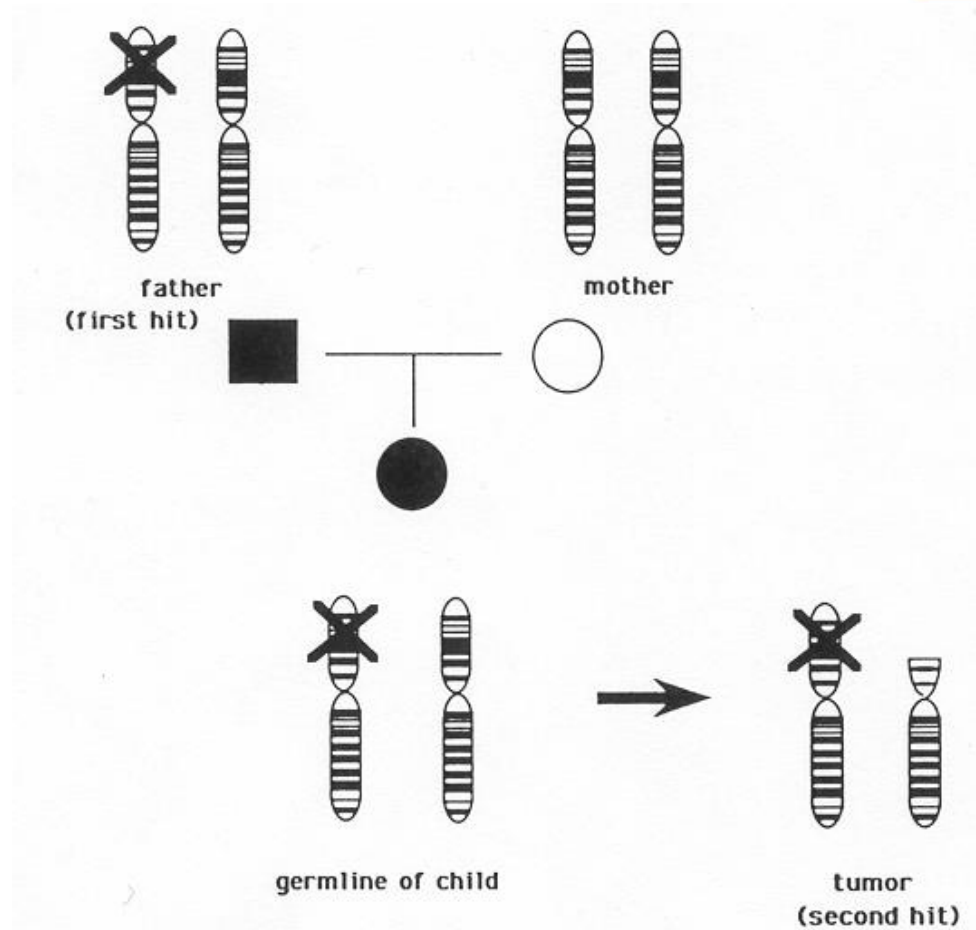
60% případů:

- bez rodinné anamnézy
- průměrný věk při diagnóze - 30 měsíců
- unilaterální výskyt

Knudson (1971):

1. skupina: 1 mutovaná alela genu *RB* je zděděná (v zárodečné linii), druhá mutace somatická
 2. skupina: nezbytnost dvou nezávislých mutací obou alel *RB*
- ⇒ jedna hypotéza vysvětlila dva epidemiologicky odlišné typy onemocnění

Knudsonův model dvou zásahů

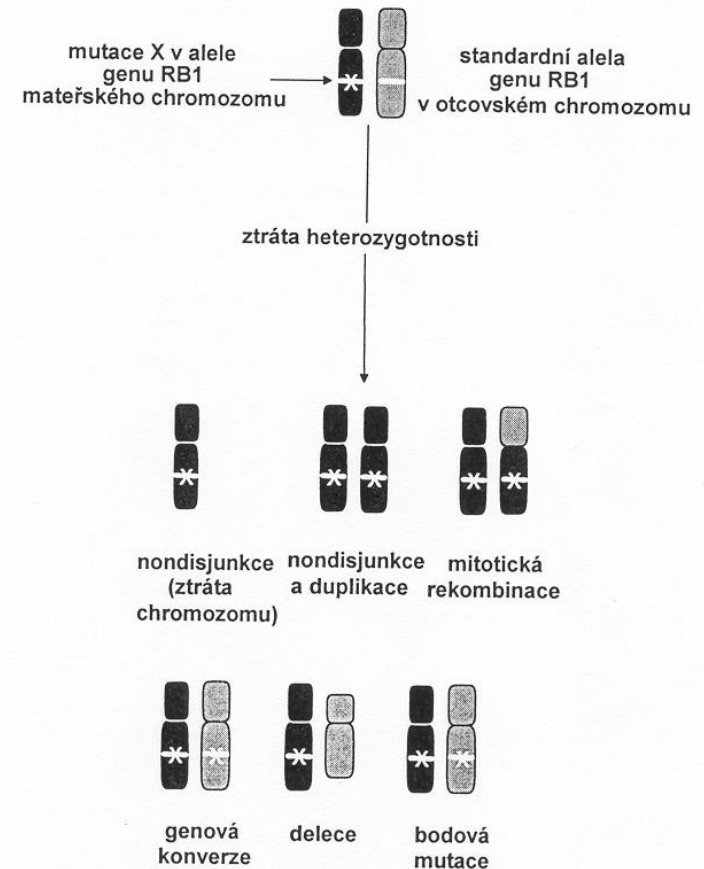


Ztráta heterozygotnosti

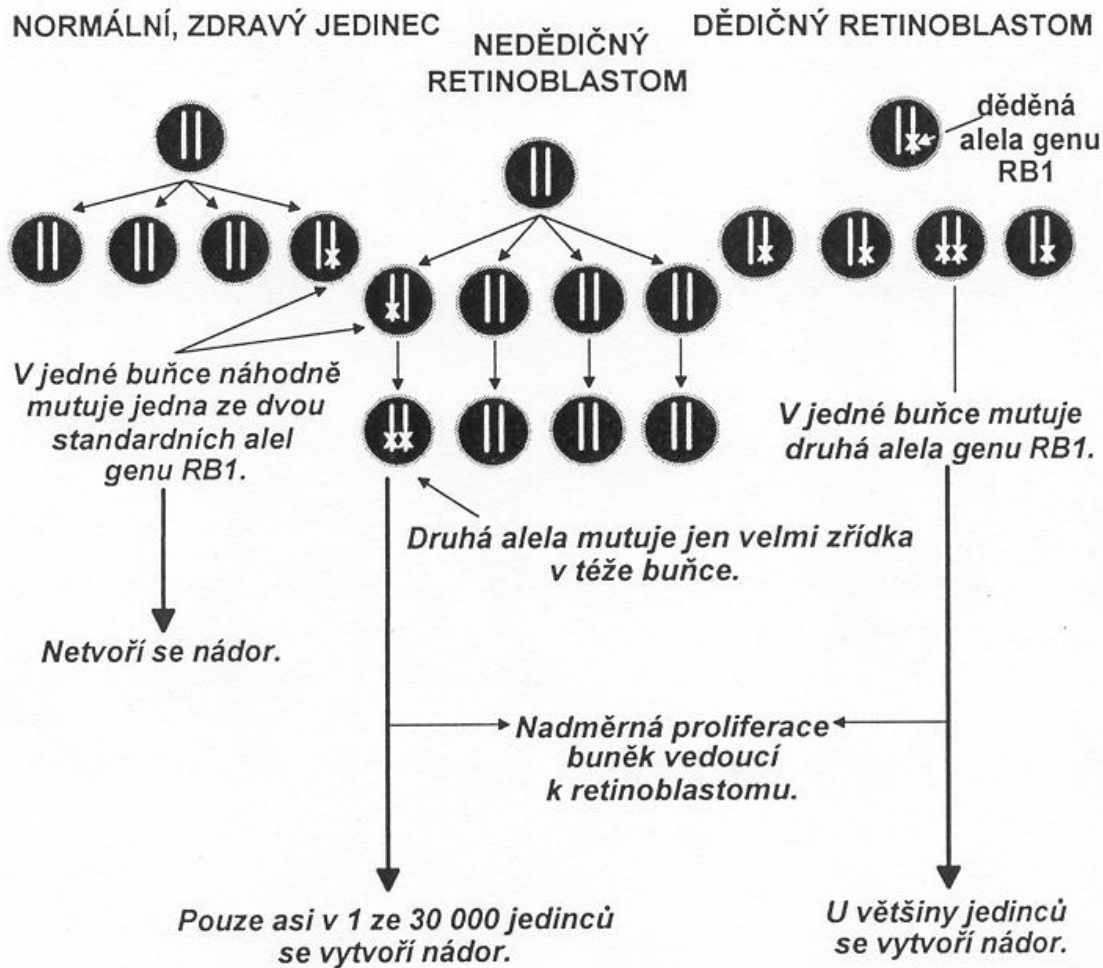


Ztráta heterozygotnosti = **LOH** („*loss of heterozygosity*“)

1. Buňky, které nesou jednu mutovanou alelu nádorového supresoru (jsou pro tento gen heterozygotní), ztrácejí jedním z více možných způsobů funkční alelu (ztrácejí heterozygotnost).
2. Buňky, které nesou jednu mutovanou alelu nádorového supresoru, ztrácejí velkou část (delece) chromozomu, který nese funkční alelu. Předpokládá se, že v oblastech s vysokou frekvencí LOH leží geny nádorových supresorů.



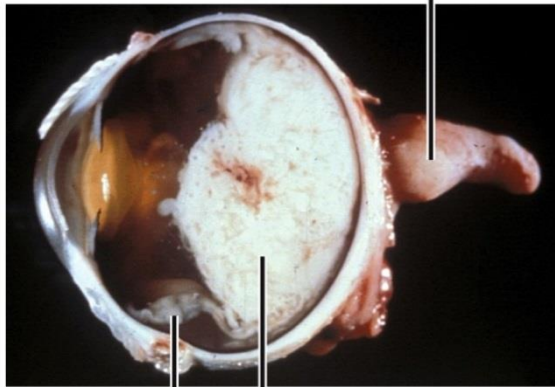
Knudsonův model dvou zásahů



Retinoblastom



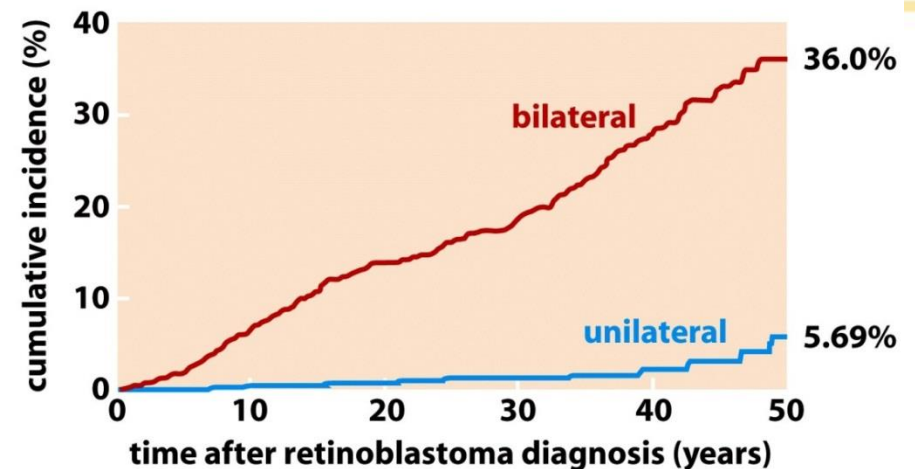
thickening of optic nerve
due to extension of tumor



displaced retinoblastoma
normal
retina



non-retinal tumors of retinoblastoma patients



Pravděpodobnost vývoje dalšího nádoru u člověka v dětství postiženého retinoblastomem:

- u unilaterálního onemocnění je zvýšený výskyt dalších nádorů důsledkem léčby zářením
- u bilaterálního onemocnění vrozená dispozice

Retinoblastom

60% - jednostranné nedědičné

10% - jednostranné dědičné (s anamnézou nebo bez)

5% - oboustranné s anamnézou

25% - oboustranné - nové „germ-line“

60% - jednostranné nedědičné

15% - jednostranné dědičné

25% - oboustranné a dědičné

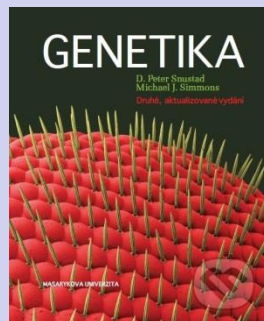
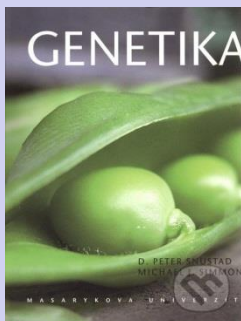
- Podle matematického modelu se asi u **5%** nositelů s vrozenou mutací *RB* **nevyvine** retinoblastom (rezistence hostitele?)
- Téměř úplná penetrance * (**95%**).
- Mnoho - možná většina - lidí má v retině „one-hit“ klony.

* Projekt „reselience“

- **reselient** – odolný
- klasické studie: detekují příčinné mutace u postižených nositelů
- komplementární přístup: vyhledat nositele vysoce penetrantních mutací způsobujících onemocnění bez projevů tohoto onemocnění
- vyšetření **874** genů (způsobujících 584 závažných dětských onemocnění) v **589 306** genomech: nalezení 13 dospělých s mutací způsobující 8 onemocnění – bez klinických projevů: 13 kandidátských odolných jedinců
- první krok na cestě k vyhledávání „ochranných“ genetických variant

Odhad mutační rychlosti u retinoblastomu

- U pacientů s **vrozenou** mutací *RB* průměrně **tři** nádory.
- Embryonální sítnici tvoří v průměru 2 miliony retinoblastů, tj. 4 miliony retinoblastů ve 2 očích.
- Průměrná mutační rychlost je $3/(4 \times 10^6) = 7,5 \times 10^{-7} / 2$ roky, tj. $3,75 \times 10^{-7} / \text{rok}$.
- Nelze očekávat, že **sporadický** retinoblastom bude bilaterální nebo vícečetný v jednom oku.

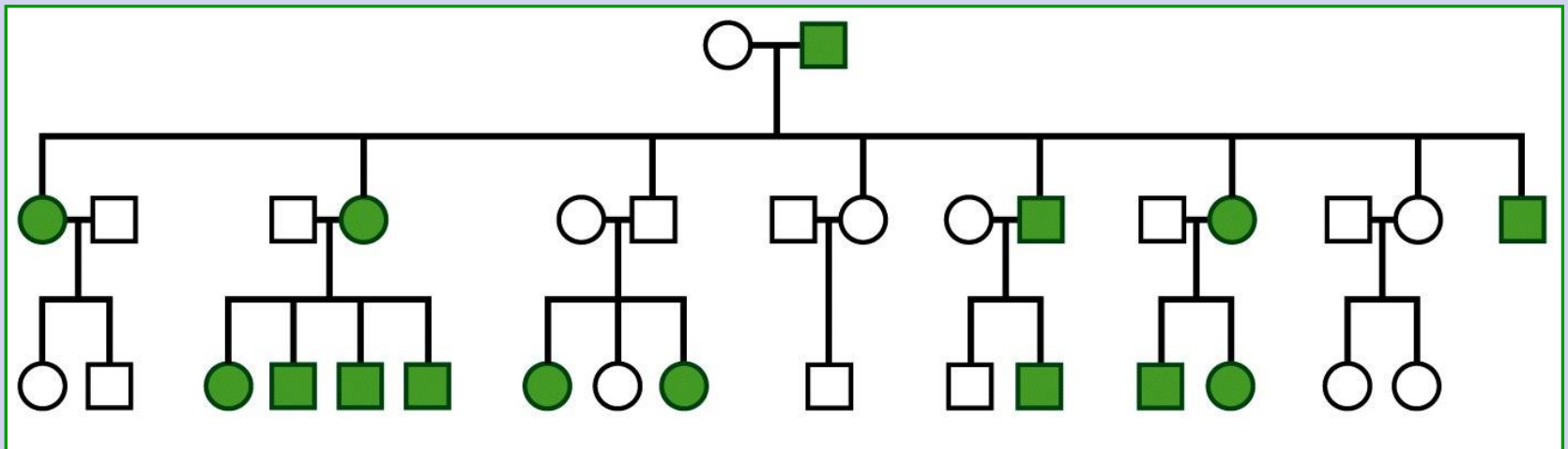


Snustad D.P., Simmons M.J.: Genetika. MU Brno **2009**

Snustad D.P., Simmons M.J.: Genetika. MU Brno **2017**

Riziko RB u členů rodiny

- Sporadický unilaterální: sourozenci 1%; potomci 2-6%
- Sporadický bilaterální: sourozenci 2%; potomci téměř 50%
- Dědičný bilaterální: sourozenci téměř 50%; potomci 50%
- Dědičný, neúplná penetrance: sourozenci < 40%; potomci < 40%



RB: gen a protein



- jaderný (85%) protein p110^{RB} (velikost 112 až 114 v proliferujících buňkách)
- v nedělících se buňkách je pRB v komplexu s TF **E2F**; E2F transaktivuje sadu genů, které jsou nutné k S fázi buněčného cyklu; pRB blokuje E2F a tím blokuje buněčný cyklus („brzda buněčného cyklu“)
- hladina proteinu pRB se v buňkách během b.c. nemění, ale mění se **stupeň fosforylace** pRB; na molekule pRB je asi 10 až 12 různých fosforylačních míst (Thr, Ser); hyposforylovaný RB je aktivní a váže E2F, fosforylovaný pRB je neaktivní

➤ pRB jako integrátor signálů

Způsoby inaktivace (dráhy) pRB v nádorech



- samotný gen *RB* může být mutován, deletován, může být metylován jeho promotor (retinoblastom, malobuněčný karcinom plic, sarkomy, karcinomy močového měchýře)
- vazbou virových proteinů E1A, LT SV40, E7 (karcinom děložního čípku)
- amplifikací cyklinu D1 (nádory jícnu, prsu, dlaždicobuněčné karcinomy) nebo zvýšenou expresí cyklinu D1 díky chromozomální translokaci (MCL); potenciálně onkogenní virus *Herpesvirus saimiri* kóduje svůj vlastní cyklin D
- amplifikací Cdk4 (glioblastomy, gliomy)
- delecí p15, p16 nebo obou (dlaždicobuněčné karcinomy jícnu, glioblastomy, karcinomy plic, močového měchýře a pankreatu)
- *ektopická exprese „wild-type“ RB není pro proliferaci inhibující, protože pRB je fosforylován a inaktivován endogenní aktivitou komplexů cyklin/cdk*

Maligní melanom



- Frekvence výskytu MM (9. nejčastější nádorové onemocnění v USA) v západních zemích roste nejrychleji ze všech nádorů. Každých 10 let se počet případů zdvojnásobí.
- 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.
- Vyšší riziko: světlé vlasy, oči a pleť, neschopnost se opálit, tendence ke spálení na slunci; opalování.



Maligní melanom



- 5-10 % melanomů je **familiálních**, penetrance se odhaduje asi na 53% ve věku 80 let.
- genetická dispozice - několik dědičně podmíněných syndromů:
 - **FAMMM** (Familial Atypical Multiple Mole and Melanoma)
 - **syndrom dysplastických névů** (Dysplastic Nevus Syndrome - DNS; Atypical Mole Syndrome – AMS)
 - **xeroderma pigmentosum**

Syndrom dysplastických névů/FAMMM



- velké množství atypických névů svědčí o dědičné formě → vysoké riziko melanomu
- autozomálně dominantní onemocnění
- melanocyty mohou na kůži tvořit pigmentovaná znaménka a névy: vysoká hustota névů je příznakem zvýšeného rizika vývoje melanomu



Pigmentové névy

- nezhoubné kožní útvary různé velikosti vzniklé místním nahromaděním melanocytů (shluk pomnožených melanocytů do tzv. hnízda), které se projevují odchylkou od normální barvy kůže
- melanocyty jsou v kůži za normálních okolností uspořádány jednotlivě, jsou od sebe vzdálené



**maligní
melanom**

Maligní melanom



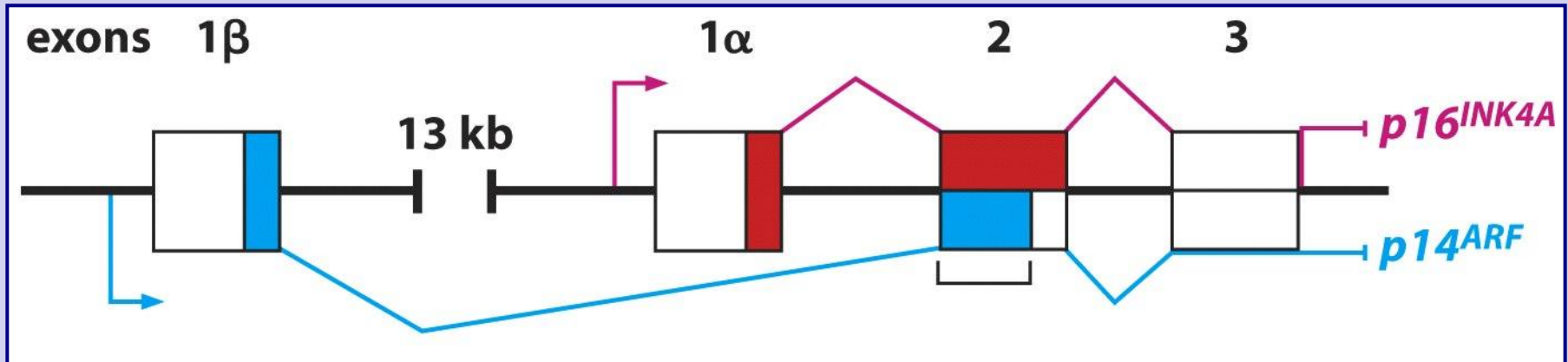
- pro MM typický výskyt komplexních cytologických přestaveb ⇒ bylo obtížné najít genetickou příčinu vývoje melanomů
- vytipovaná oblast: **9p21-22** (asi 50% postižených rodin)
- v této oblasti gen **CDKN2A** pro **p16^{INK4A}**: mutace *p16* odpovídají asi za **20-40 % dědičných** melanomů, nepochybně existují další geny zodpovědné za MM
- mutace *CDKN2A* (*p16*) u **0,2– 2% sporadických** melanomů
- protein *p16^{INK4A}*: 158 AA - tvoří binární komplexy specificky s **Cdk4** a **Cdk6**, inhibuje jejich aktivitu (a tedy fosforylaci RB) (*INK4A* - inhibitor of **Cdk4**)
- v postižených rodinách se vyskytují i jiné typy nádorů, především nádory pankreatu, vzácněji děložního čípku, močového měchýře, prsu, gliomy a některé hematologické malignity

Maligní melanom

V oblasti 9p21 další geny:

- **p15^{INK4B}** - veliká homologie s p16, také inaktivuje Cdk4 a Cdk6: vrozené mutace **ne**detekovány!
- **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); **ne**uplatňuje se u vrozených dispozic k MM!!

Geny $p16^{\text{INK4A}}$ a $p14^{\text{ARF}}$



- sdílejí exon 2 genu $p16^{\text{INK4A}}$
- využívají každý „svůj“ (alternativní) transkripční promotor
- pro translaci je využíván alternativní čtecí rámeček (Alternative Reading Frame)
- ? kumulace významných regulačních genů do jednoho lokusu (+ $p15$): „ekonomika“ vs. bezpečnost ?

Maligní melanom



- přibližně u **1%** hereditárních melanomů se nalézá zárodečná mutace v genu **CDK4** pro cyklin dependentní kinázu 4 (12q14.1)
 - záměna cysteinu 24 za arginin: interferuje s vazbou p16 a p15, ale ne s vazbou cyklinu D!!
- ⇒ vzácný případ vrozené mutace [protoonkogenu!](#)

Hereditární papilární karcinom ledviny
(*c-met*)

RASopatie
(*ras/MAPK*)

Mnohočetná endokrinní neoplazie typ2 (MEN2)
(*RET*)

Familiální medulární karcinom štítné žlázy (FMTC)
(*RET*)

Familiální gastrointestinální stromální nádory
(**GISTs**) (*c-kit*)

Maligní melanom (*CDK4*)

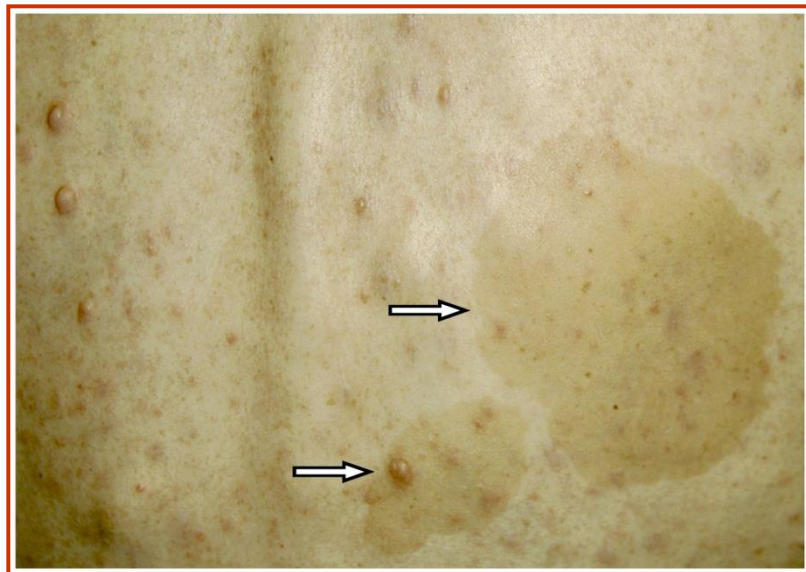


Neurofibromatóza typu 1 - NF1

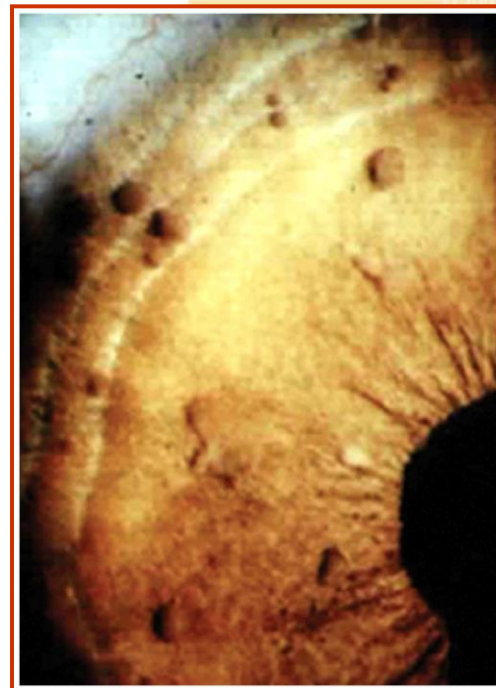


- autozomálně dominantní dědičnost
- u postižených se vyvíjejí násobné **benigní neurofibromy**, z některých se mohou dále vyvíjet **neurofibrosarkomy**, zvýšené riziko vývoje **AML**, a další
- inaktivace obou alel *NF-1* byly popsány u melanomů a neuroblastomů
- gen **NF1** lokalizovaný na chromozomu **17q11.2**
- produktem NF-1 je protein **neurofibromin**, který patří do rodiny GTPáza aktivujících proteinů (GAPs; negativní regulace Ras)
- patří mezi RASopatie

Neurofibromatóza typu 1

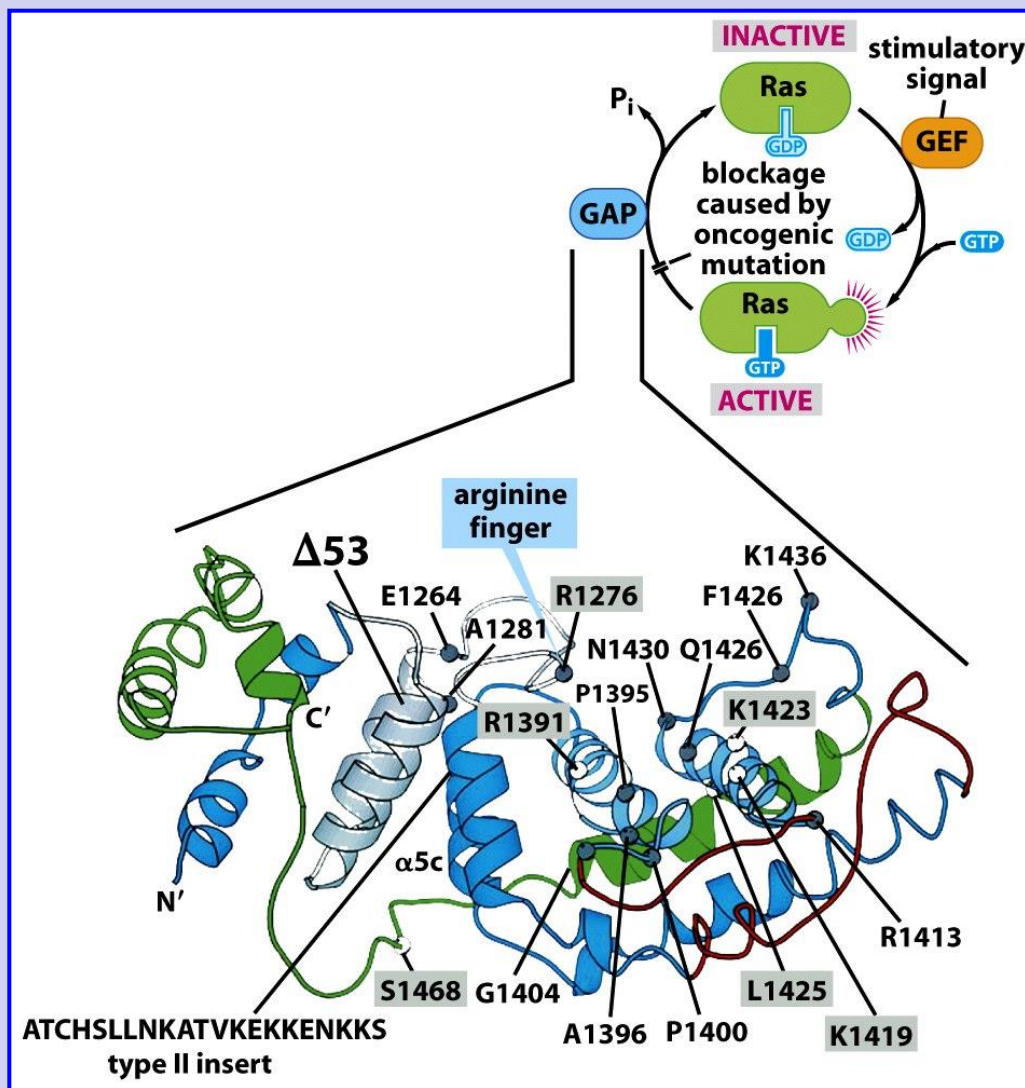


kožní skvrny barvy bílé kávy



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**; asi polovina vrozených **mutací NF2** je *de novo*
- produktem genu je protein **merlin** (schwanomin)

Neurofibromatóza typu 2



- **merlin** patří do velké rodiny proteinů (merlin - moesin, ezrin, radixin-like protein), které interagují s membránovými proteiny: cytoskeletální protein - především v adhezních pásech; merlin pravděpodobně interaguje s aktinem, a transmembránovým proteinem CD44; exprimován hlavně v nervové tkáni
- nepřítomnost funkčního merlinu mění mírně intracelulární signalizaci, vede ke zvýšení proliferace Schwannových buněk

Cowdenův syndrom - CS



- autosomálně dominantní onemocnění - charakteristické vývojem násobných hamartomů (benigní nádorky, odlišitelné od adenomů - svou histologickou strukturou: buňky normálně diferencované, ale neuspořádané) v mnoha orgánech (kůže, mamární tkáň, štítná žláza, trávicí trakt) a zvýšeným rizikem vývoje nádoru prsu a thyroidních nádorů.
- (*Cowdenové syndrom; syndrom mnohočetného hamartomu*)
- 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



- onemocnění souvisí 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



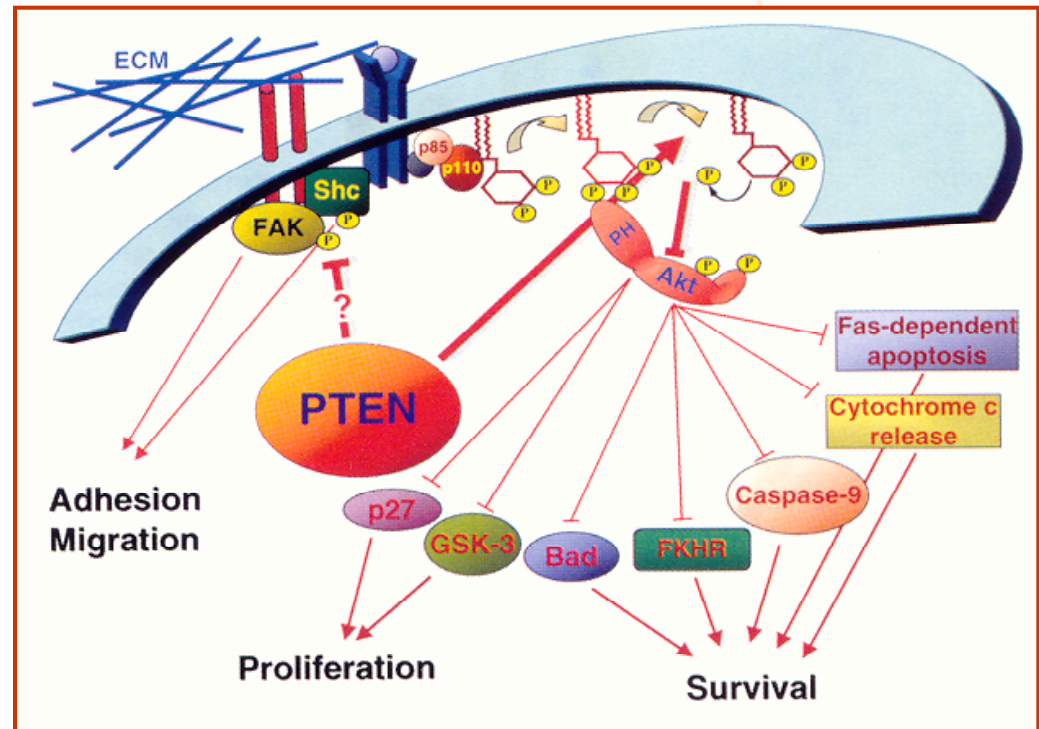
- PTEN je protein/lipid fosfatáza.
(„**P**hosphatase and **T**ensin homolog deleted on chromosome **TEN**“)
MMAC1 („**m**utated in **m**ultiple **a**dvanced **c**ancers“)
- Defosforyluje jak Thr/Ser, tak Tyr, ale pro jeho nádorově supresivní funkci je klíčová schopnost defosforylovat **fosfatidylinositol(3,4,5)-trifosfát (PIP-3)**, který je produkován kinázou **PI3K** po aktivaci mitogenními signály. (PIP-3 aktivuje **Akt**, který mimo jiné 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).



Model funkce proteinu PTEN během kancerogeneze

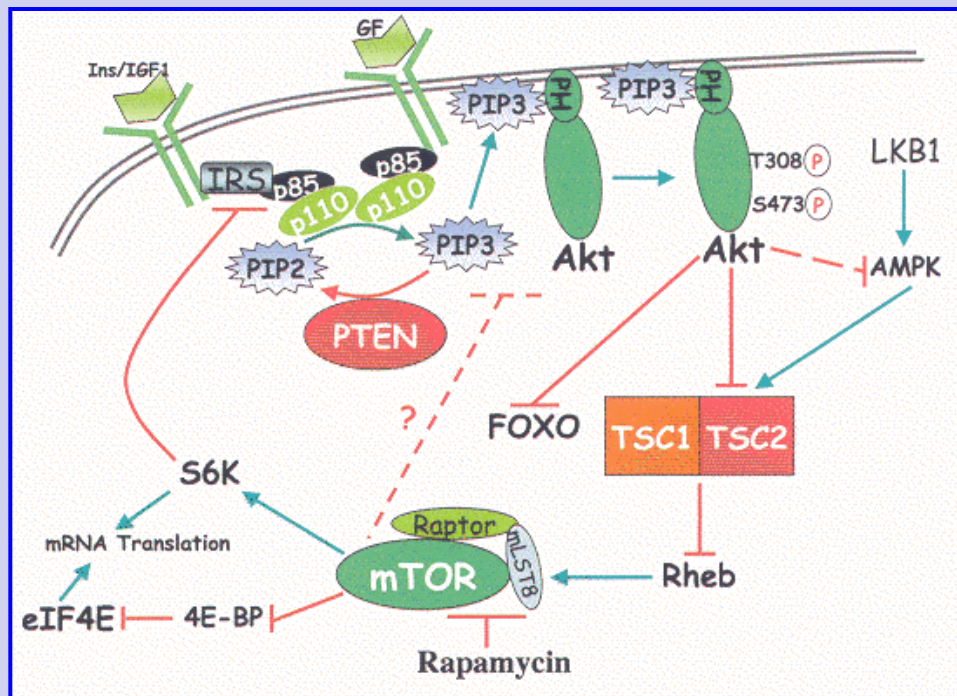
- „LOH“ 10q23 je u primárních nádorů častá - 25 až 50%, ale kompletní ztráta funkce PTEN v časných stádiích kancerogeneze je běžná jen u nádorů dělohy a vaječníků.
- U dalších nádorů je kompletní ztráta funkce PTEN spojena až s pozdními stádii kancerogeneze a je spojena s agresivními, metastatickými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

TSC1 a TSC2

(„tuberous sclerosis complex 1 a 2“)



U pacientů s vrozenými mutacemi PTEN se také vyvíjejí hamartomy, ale také maligní nádory.

Hamartomy - „správná kostka na správném místě, ale špatně otočená“ – odpovídající tkáň, správně diferencovaná a na správném místě, ale chybně fyziologicky zapojená

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, vysoký vzrůst
- zvýšené riziko nádorů: **mnohočetné basaliomy kůže** (téměř všichni postižení GS onemocní v průběhu života kožními nádory, často již v dětském věku), dále cysty čelistí, **meduloblastom** (odvozen z buněk mozečku), fibromy ovaria, meningiomy, fibrosarkomy, rhabdomyosarkomy
- asi 1/3 mutací v zárodečné linii je *de novo*



Dědičné nádory endokrinního systému



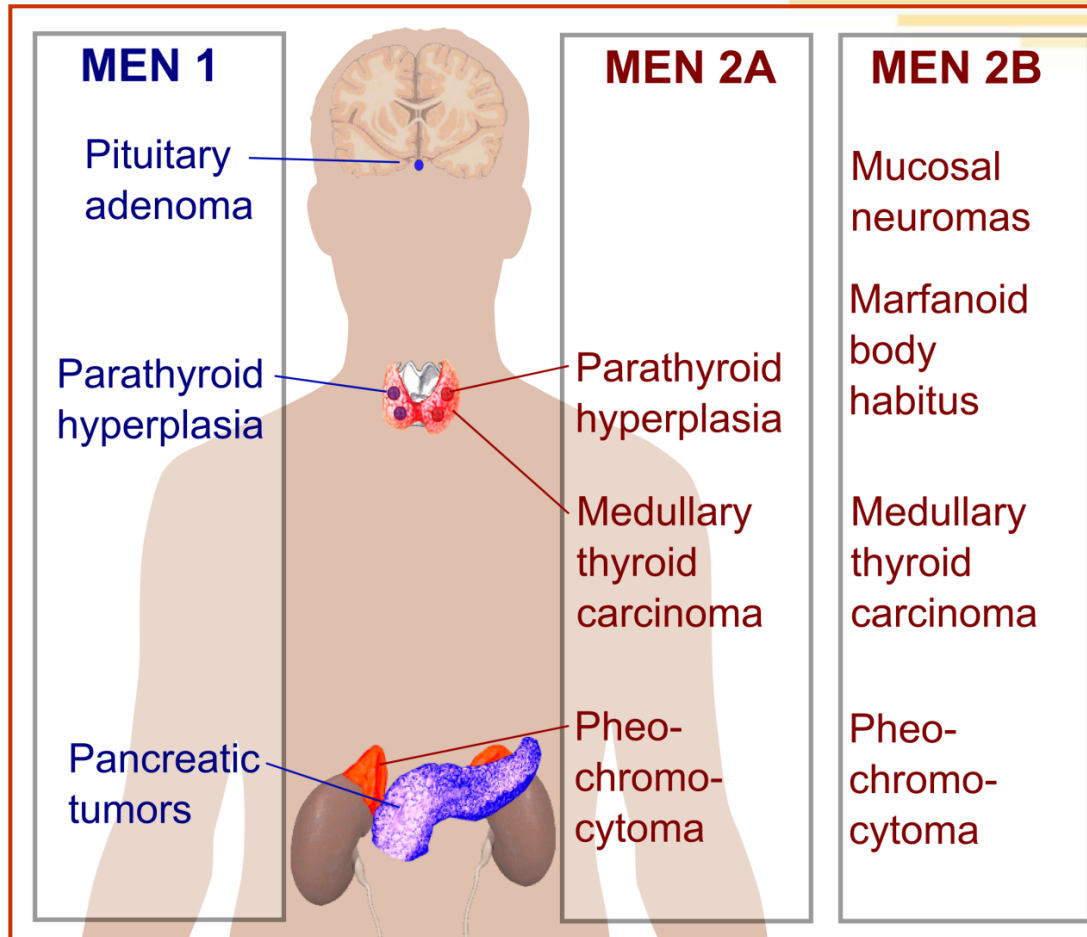
- Mnohočetná endokrinní neoplasie typu 1 - **MEN1**: kumulace nádorů příštítných tělísek, endokrinních ostrůvků pankreatu, předního laloku hypofýzy a nadledvinek
- Mnohočetná endokrinní neoplasie typu 2
MEN2A: medulární karcinom štítnice, hyperparathyreoidismus, feochromocytom
MEN2B: medulární karcinom štítnice, feochromocytom, ganglioneuromy GIT, neuromy sliznic
- Familiální medulární karcinom štítné žlázy **FMTC**

Mnohočetná endokrinní neoplazie typu 1 - MEN1



- autozomálně dominantní onemocnění spojené s vývojem adenomů příštítných tělísek (90 - 97 % pacientů), nádorů endokrinních ostrůvků pankreatu (50 - 65 % pacientů) a předního laloku hypofýzy (40 - 50 %), nádory kůže, vzácněji i nádory neendokrinní tkáně
- téměř 100 % penetrance; asi 10% mutací *de novo*
- prvním příznakem onemocnění je většinou hyperfunkce endokrinních žláz
- syndrom spojen s vrozenými mutacemi genu **MEN1** (11q13), v nádorech doprovázenými LOH
- produktem genu *MEN1* je **menin**, převážně jaderný protein, nepříbuzný s žádným dalším proteinem; pravděpodobně negativní regulátor buněčné proliferace

Srovnání MEN1 a MEN2



Wilmsův tumor - nefroblastom



- maligní nádor ledvin dětského věku; jeden z nejčastějších solidních nádorů u dětí
- frekvence výskytu asi 1:10.000
- poprvé popsán Maxem Wilmsem v roce 1899
- vznik a charakteristické histologické rysy tumoru jsou výsledkem aberantního embryonálního vývoje
- vyskytuje se v dědičné formě i jako sporadický nádor
- 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 (velmi vzácná) nádoru se typicky objevuje během **2. roku života**, často **bilaterálně**
- autozomálně dominantní onemocnění s neúplnou penetrancí

Wilmsův tumor

- Asi 10% nádorů je bilaterálních. Pokud jsou bez rodinné anamnézy, často spojeny se zárodečnou mutací *de novo*.
- Incidence dalších primárních malignit u vyléčených dětí (kolem 90%) je spíše nízká a dává se více do souvislosti s léčbou Wilmsova tumoru.
- Vzácně se vyskytuje i u dospělých, z toho 20% mezi 15. a 20. rokem života, 80% do 7. dekády.

Nádorový supresor WT1



- WT spojen s mutacemi více genů.
 - První popsáný (1990) byl nádorový supresor **WT1**, lokalizovaný v oblasti **11p13**. Jeho mutace jednak spojeny s tvorbou Wilmsova tumoru 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 mikródeleční syndrom).

Nádorový supresor WT1



- je exprimován v ledvinách, jeho exprese je přísně během vývoje regulována: časově i prostorově
- tkáňově specifický, sekvenčně specifický transkripční faktor, další roli hraje zřejmě při posttranskripčních úpravách - interakcí s RNA
- má antiproliferativní účinek a zřejmě schopnost stimulovat specifické diferenciační procesy
- zřejmě hraje i nějakou roli v hematopoietickém vývoji: nejčastějším dalším primárním onemocněním je **leukémie**; asi u 20% AML/ALL se popisují (somatické) mutace *WT1*
- další geny spouisející s vývojem Wilmsova tumora: **WT2-WT5**, **mikrodelece 11p13**

Li-Fraumeniho syndrom



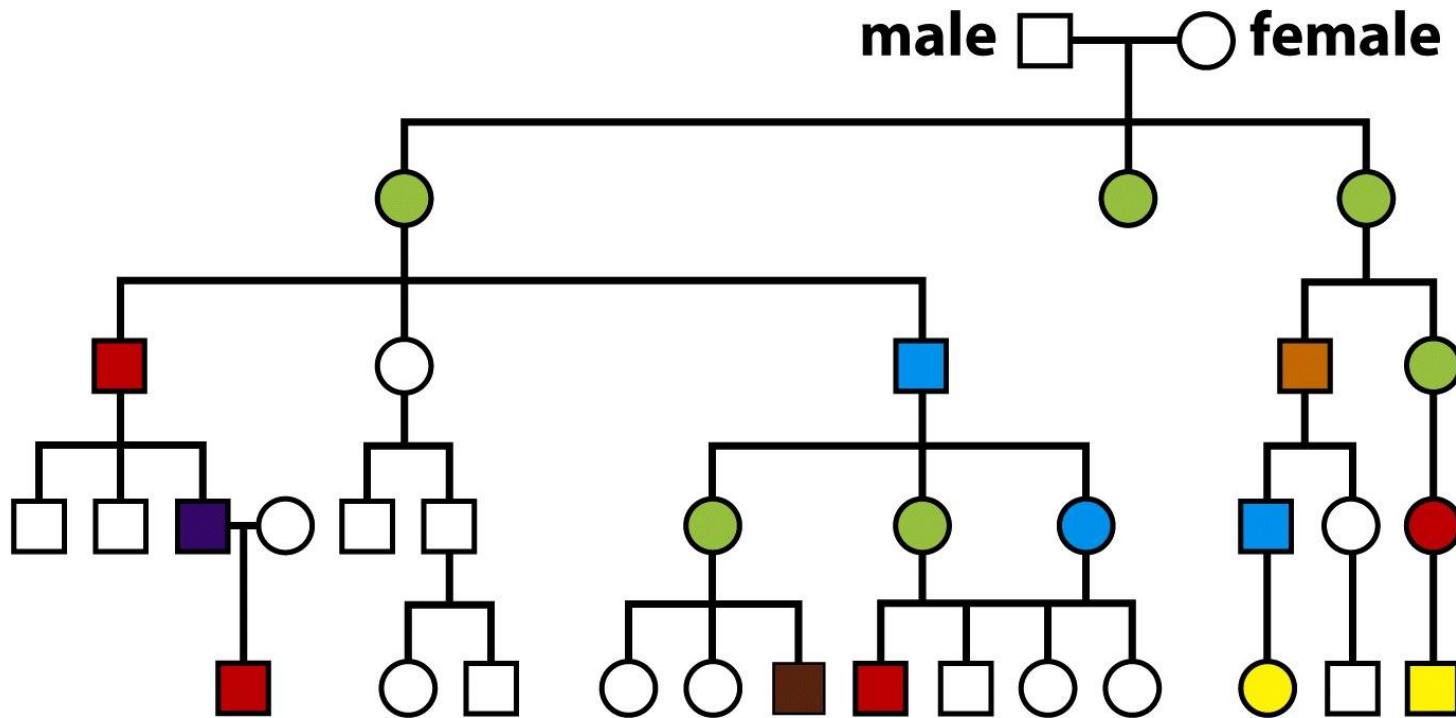
- Vzácné autozomálně dominantní dědičné onemocnění (opět: dominantní na úrovni celého organismu, recesivní na úrovni buňky).
- Rodinný syndrom charakteristický častým a časným výskytem malignit různého typu včetně **sarkomu, nádoru prsu, nádoru mozku, leukémií, adrenokortikálního nádoru dětí** (kůra nadledvin).
- Nádory u LFS mají tendenci se objevovat u dětí a mladých dospělých, často jako násobné primární nádory.
- Syndrom spojen s mutací genu pro nádorový supresor **p53** (17p13.1).

Li-Fraumeniho syndrom



- Proband se sarkomem do 45. roku života, příbuzný 1. stupně s nádorem do 45. roku života, příbuzný 1. nebo 2. stupně s jakýmkoliv nádorem do 45. roku života nebo se sarkomem v kterémkoliv věku.
- Až **80%** případů spojeno s vrozenou mutací **p53**.

Spektrum nádorů v rodině s mutací *p53* v zárodečné linii



nádory prsu
glioblastomy

nádor plic
sarkom
karcinom pankreatu

leukémie
Wilmsův tumor

Li-Fraumeniho-like syndrom



- Proband s jakýmkoliv nádorem v dětství nebo sarkomem, nádorem mozku nebo adrenokortikálním nádorem do 45. roku života, příbuzný 1. nebo 2. stupně s kterýmkoliv typickým LFS nádorem v jakémkoliv věku, další příbuzný 1. nebo 2. stupně s jakýmkoliv nádorem do 60. roku života.
- Asi **50%** případů spojeno s vrozenou mutací **p53**. (U některých LFS / LFLS rodin popsány zárodečné mutace genu **chk2**, ale úloha genu **chk2** v etiologii LFS nejasná.)

Historie LFS

1969: Li a Fraumeni retrospektivně porovnávali data a anamnézy dětských pacientů, kteří zemřeli na sarkom. Našli několik rodin, kde onemocněním byli postiženi sourozenci nebo bratřenci/sestřenice a v jejich anamnéze zjistili, že v jedné rodičovské linii je vysoký výskyt nádorů širokého spektra, především sarkomů a nádorů prsu v mladém věku, a dalších.

SBLA syndrom: **S**arcoma, **B**reast and **B**rain cancer, **L**eukemia, **L**ung and **L**aryngeal cancer, **A**drenocortical carcinoma (1978).

1988: první verze definice LFS

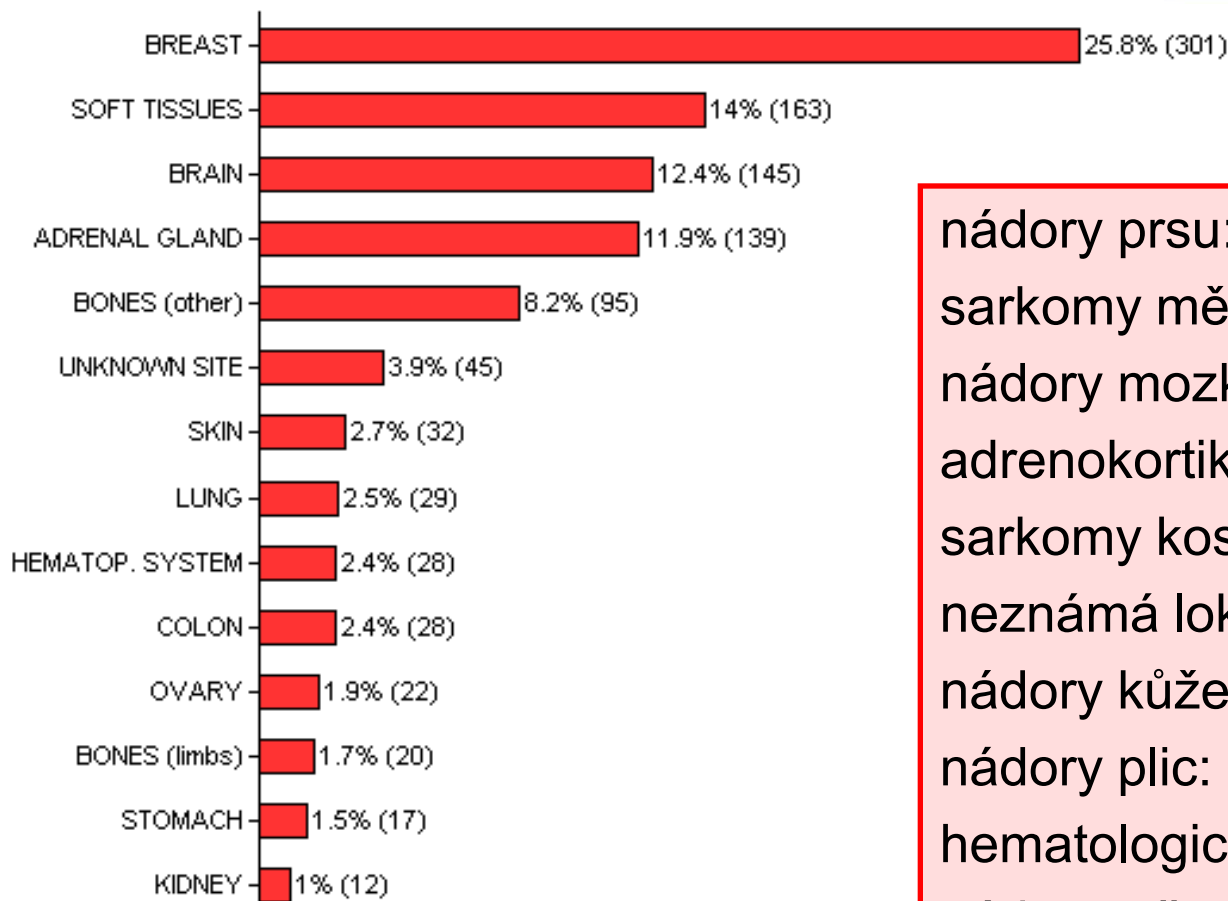
1995: vedle „klasického“ LFS volněji definován LFLS (LFS-L)

Epidemiologie LFS



- Frekvence výskytu celosvětově 1-9 na 100.000.
- Penetrance 50% ve 30 letech, 90% v 60 letech.
Penetrance vyšší u žen (~100%) - spojeno s výskytem nádoru prsu.
- Mutace v genu *p53* patří k nejčastějším genetickým (somatickým) změnám detekovaným v solidních nádorech **X** extrémně vzácný syndrom LFS.
- **Anticipace** – při přenosu genu mezi generacemi stále časnější a závažnější výskyt onemocnění (? v důsledku navyšování genetických změn?)

Cílové orgány maligní transformace u pacientů s LFS



nádory prsu: 25.8 %
sarkomy měkkých tkání: 14 %
nádory mozku: 12.4 %
adrenokortikální nádory: 11.9 %
sarkomy kostí: 8.2 %
neznámá lokalizace: 3.9 %
nádory kůže: 2.7 %
nádory plic: 2.5 %
hematologické malignity: 4.3 %
nádory střeva: 2.4 %

Gen a protein p53

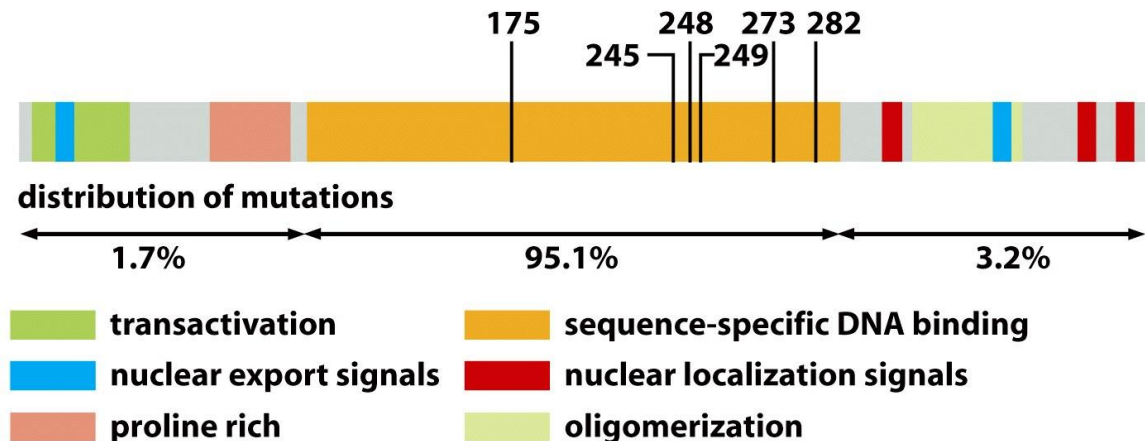


Gen lokalizován na chromozomu 17 (17p13)

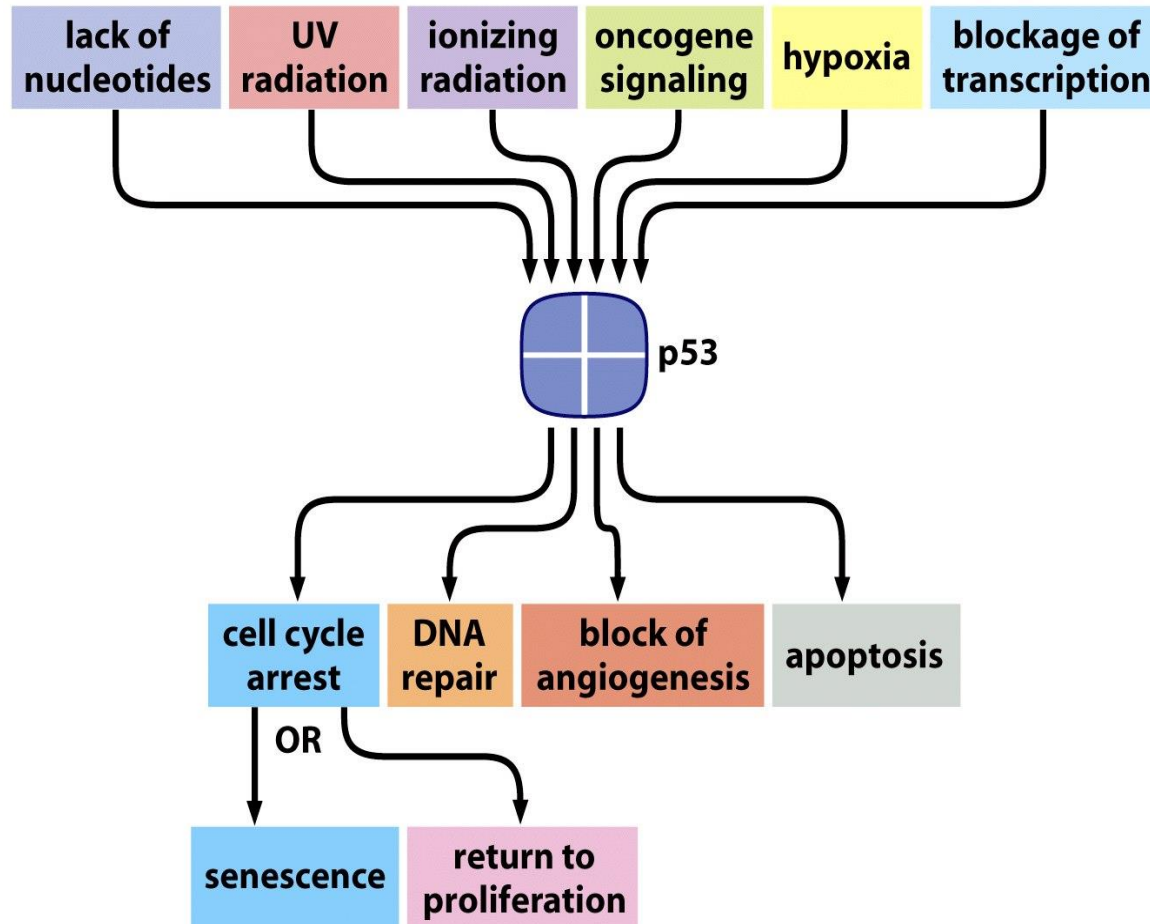
Protein - poprvé popsán díky interakci s LT SV40

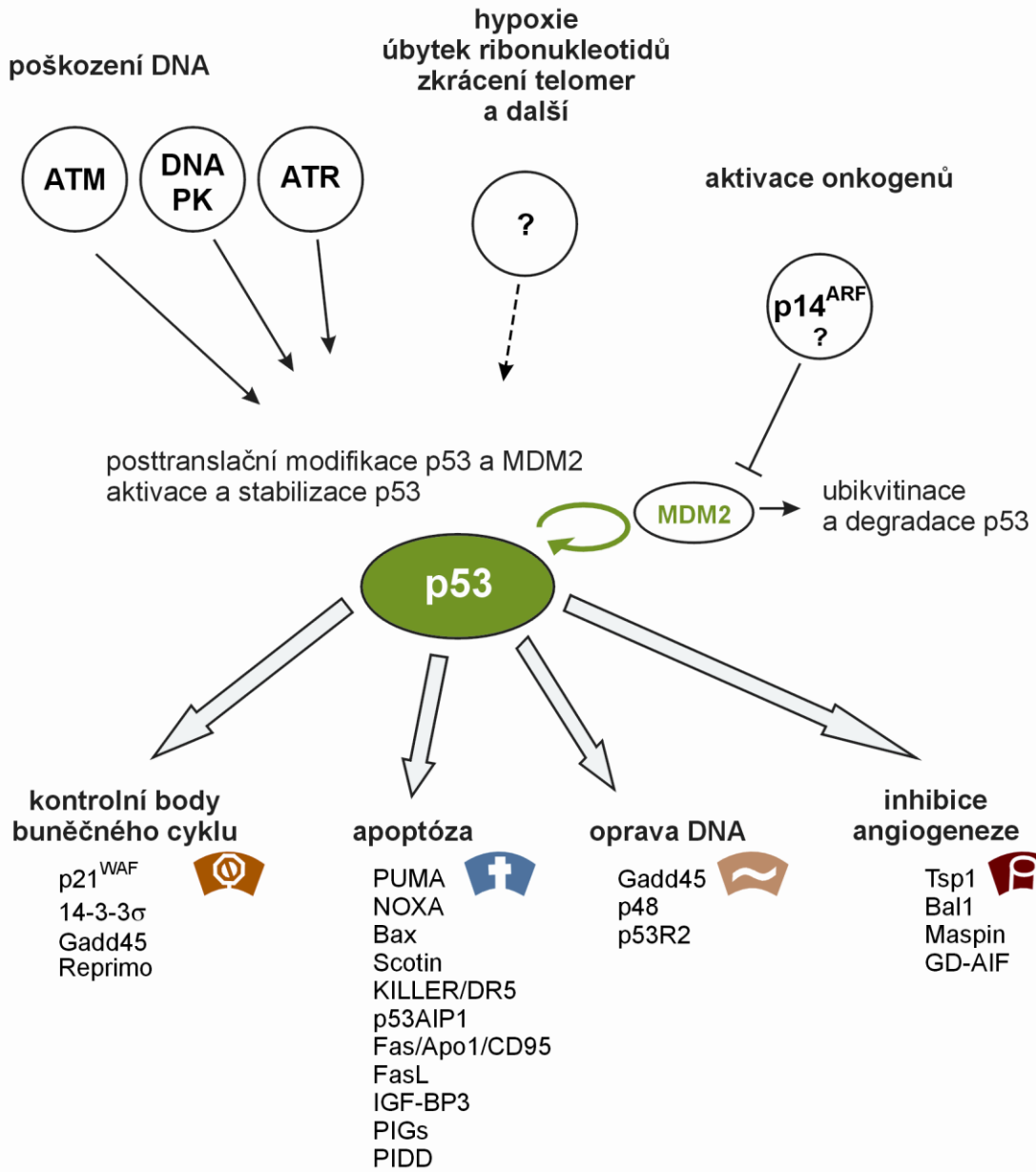
- funguje jako transkripční faktor
- funguje jako tetramer

Struktura proteinu: DNA vazebná doména, transaktivací doména, oligomerizační doména, NLS, C-koncová regulační doména



Funkční síť p53





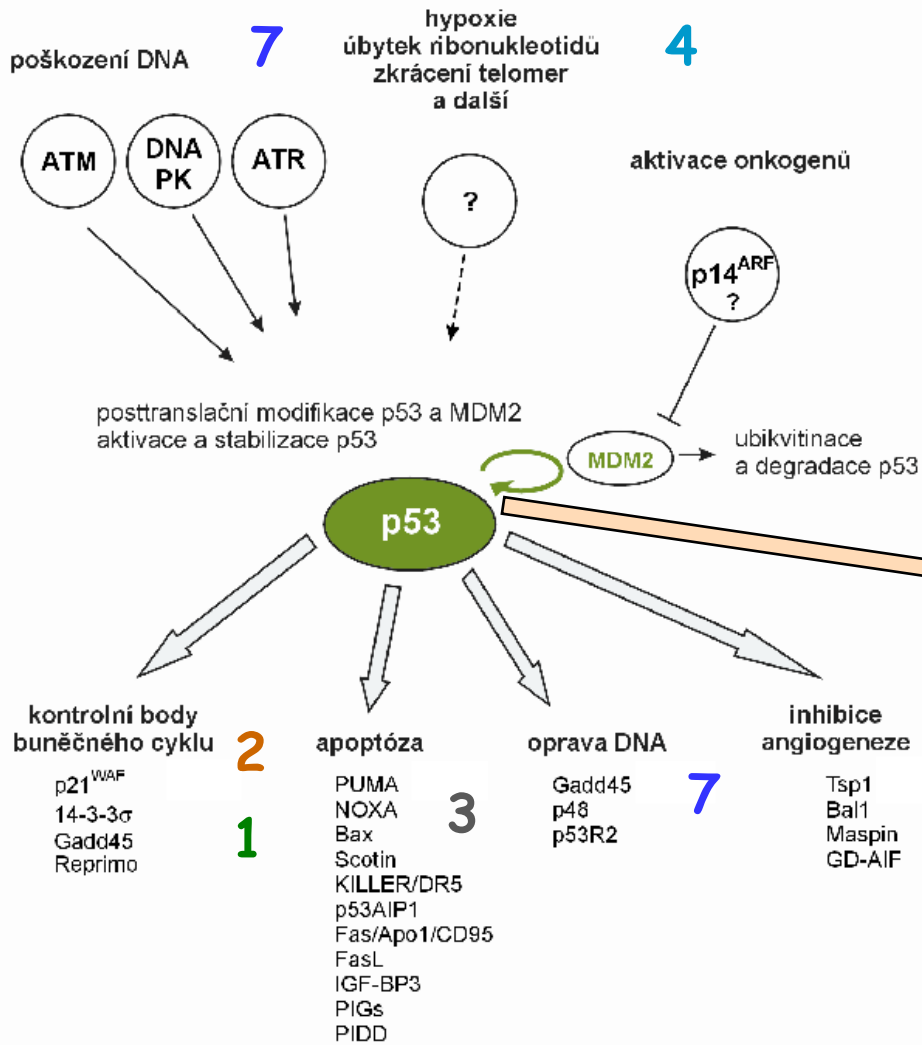
Signální sít' p53

Získané vlastnosti maligního nádoru



- (1) Produkce vlastních proliferačních signálů
- (2) Necitlivost k signálům zastavujícím buněčný cyklus
- (3) Odolnost k programované 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

Funkce p53



chronický zánět 8	modulace imunitního systému 10	přeprogramování metabolismu 9
CXCL1 (NF-κB)	CD43, ICAM1 Fractalkine CSF1, ISG15 IRF5, IRF9 MCP1, PKR	Glut1 Glut4 Glut3 TIGAR SCO2
Gudkov 2011 Cooks et al. 2014	Lowe et al. 2013 Menendez et al. 2013	Vousden a Ryan 2009

Funkce p53



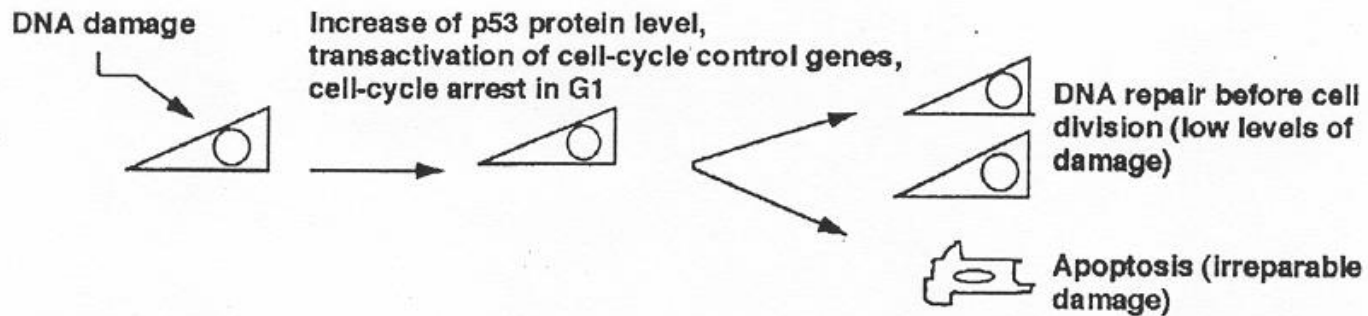
- Zprostředkovává adekvátní reakci buňky na stresové podněty.

Cílové geny: *mdm2* - zpětnovazebná inhibiční klička
p21^{CIP1/WAF1} - blok G1
bax - apoptóza
GADD45 - oprava DNA

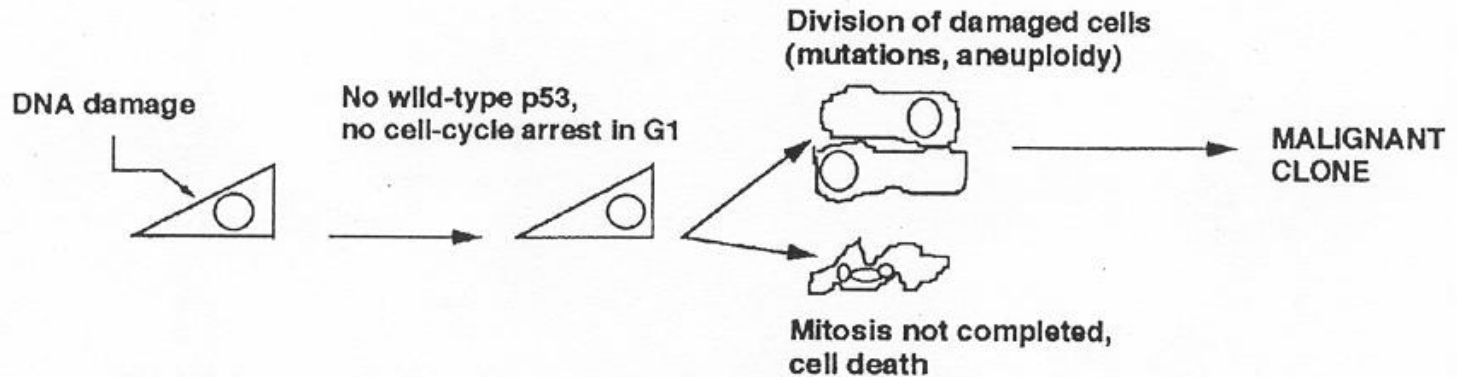
p53 - ochráníce genomu



A)



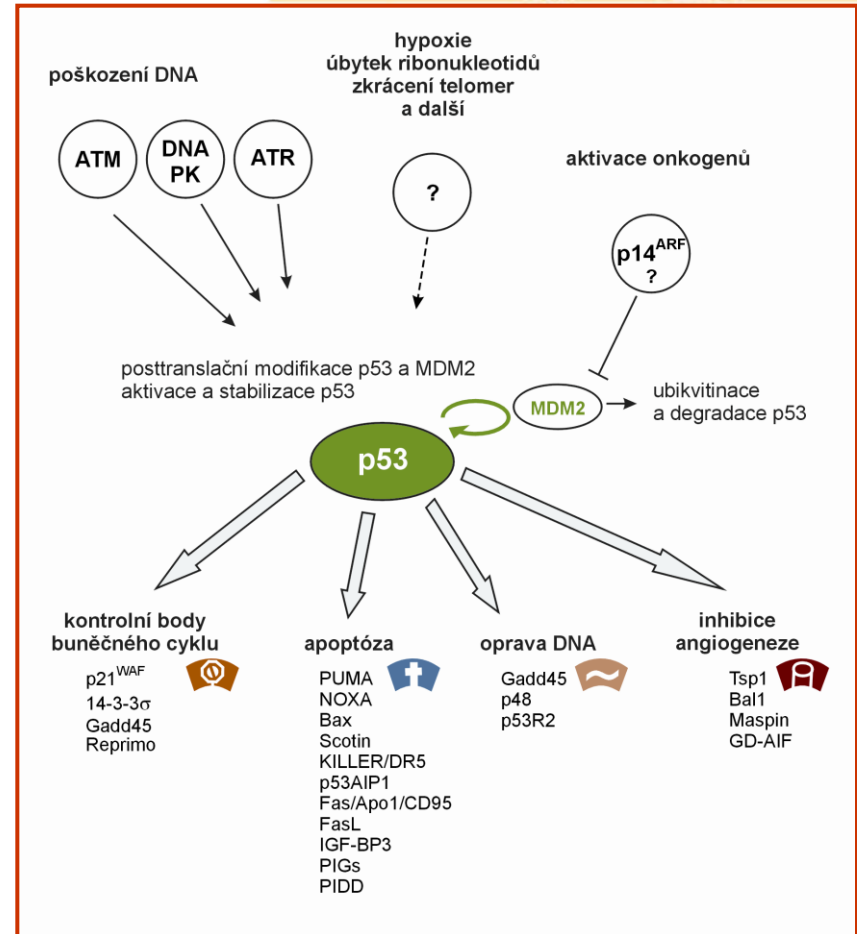
B)



Regulace p53



- regulace transkripce a translace
- regulace **hladiny/stability proteinu**
- regulace buněčné lokalizace
- regulace aktivity

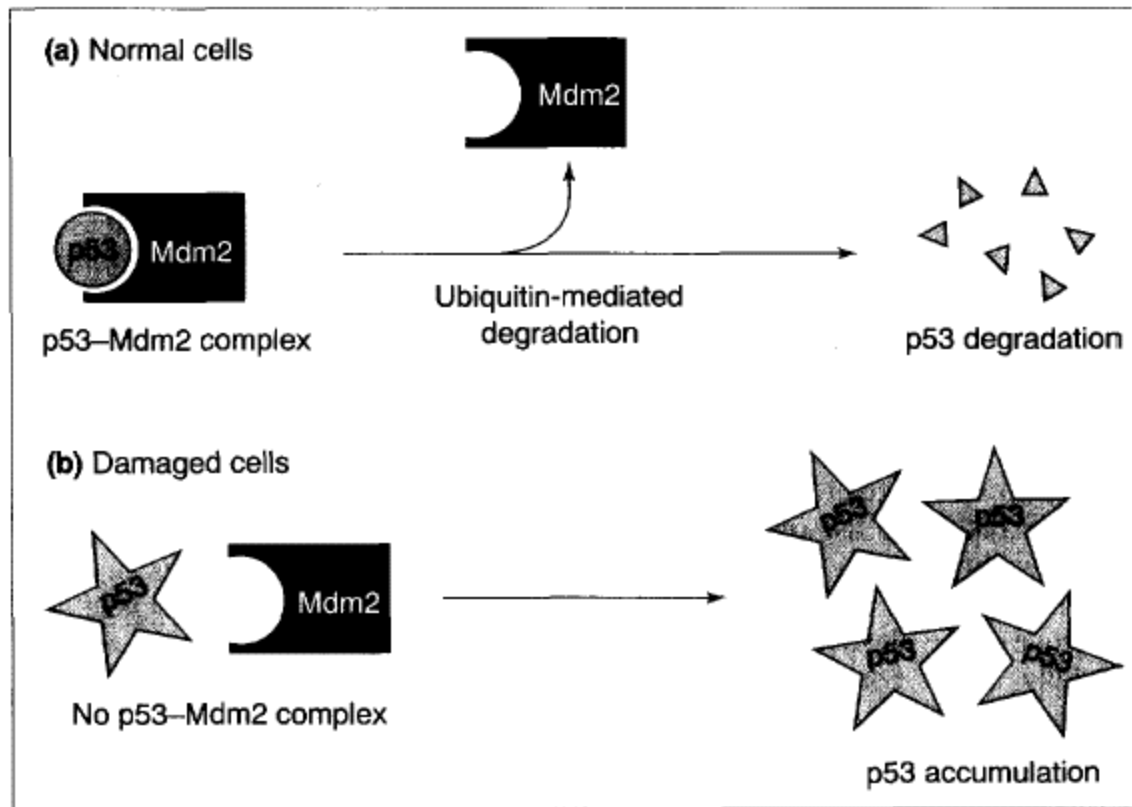


Regulace stability p53



- V normálně proliferujících buňkách je hladina proteinu p53 udržována velmi nízká rychlým odbouráváním.
- Klíčovou roli v regulaci stability p53 hraje protein **MDM2**.
- MDM2 funguje pro p53 jako ubikvitin ligáza E3: po interakci s p53 zprostředkovává ubikvitinaci p53 a jeho odbourání proteazomem.
- *mdm2* je cílovým genem p53 (→ zpětnovazebná klička)
- **MDMX** (MDM4) - další regulátor p53: nezprostředkovává jeho degradaci, ale inhibuje jeho schopnost aktivovat transkripci cílových genů.

Úloha proteinu MDM2 v regulaci p53: v normální a poškozené buňce



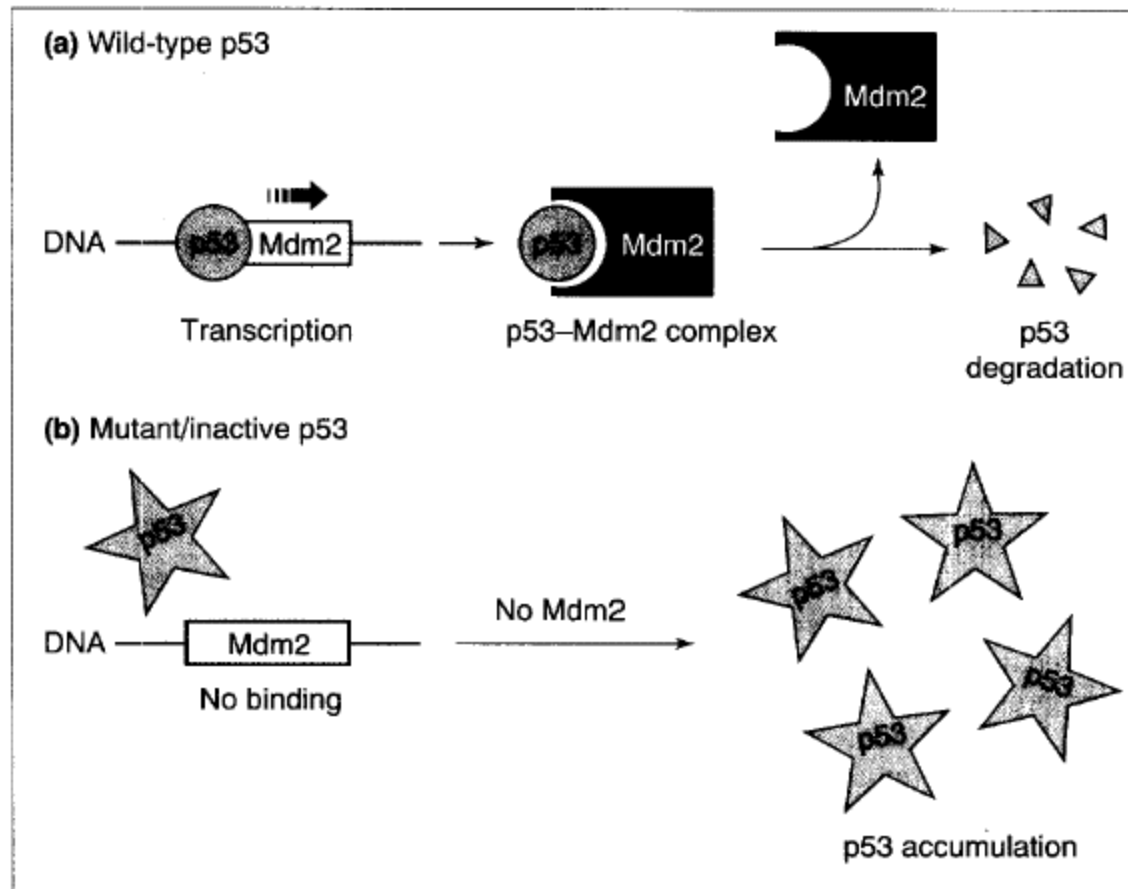
V poškozené buňce je znemožněna vazba MDM2 k p53 a p53 je stabilizován.

Regulace vazby p53 - MDM2



- interakce p53 s MDM2 je znemožněna **fosforylací**
- p53 je fosforylován jako odpověď na buněčný stres (poškození DNA, hypoxie, ...) kinázami: **Chk1**, **Chk2**, **ATM** a **ATR**, JNK, Polo-like kinase,...
- buňky s mutacemi v *ATM* a *Chk2* mají poškozenou schopnost stabilizovat p53
(**Vrozená heterozygotní mutace v genu *chk2*** („G2 checkpoint kinase“) **byla detekována u LFS**)
(Mutace *chk2* v zárodečné linii se vyskytují asi u 1,1 až 1,4% západní populace a až u 5% pacientek s nádorem prsu (tj. vrozená mutace *chk2* je spojena s vyšším rizikem vývoje tohoto nádoru).

Úloha proteinu MDM2 v regulaci p53: funkční a nefunkční p53



Regulace buněčné lokalizace p53

- p53 má na C-konci několik signálů jaderné lokalizace - **NLS**, je po syntéze transportován **do jádra**.
- p53 má dvě sekvence pro export **z jádra** - **NES**: v oligomerizační doméně (ve funkčním tetrameru odstíněno) a na N-konci v MDM2 vazebné doméně. Export z jádra je výrazně potencován vazbou MDM2 (i když vazba MDM2 není podmínkou) a také ovlivněn fosforylací v dané oblasti: fosforylace vyvolaná stresem inhibuje transport z jádra (vedle toho, že znemožňuje vazbu MDM2)
- Popsána kináza **Parc**, která zadržuje p53 v cytoplasmě.

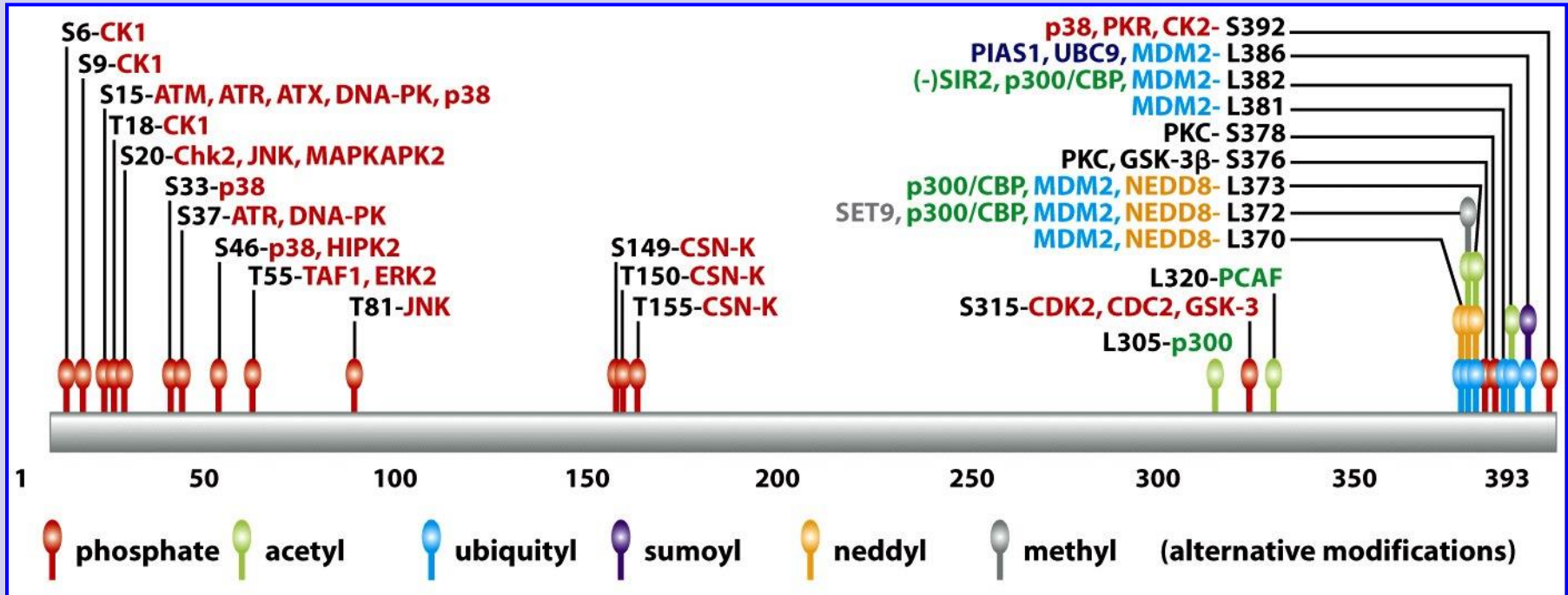
Regulace aktivity p53

Regulace schopnosti p53 vázat se na DNA a interagovat s dalšími komponentami transkripčního aparátu - regulováno **posttranslačními modifikacemi**.

Především různé kovalentní a nekovalentní modifikace (fosforylace, Sumoylace, glykosylace, acetylace, *ubiquitinace*, *neddylace*) **C-konce** p53 ovlivňují schopnost p53 vázat se na DNA: p53 je např. aktivována fosforylací ser392 (indukováno UV), Sumoylací Lys386, acetylací C-konce...

N-konec? Stresem indukovaná fosforylace N-konce potencuje interakce s acetyltransferázami, které acetylují C-konec (a také acetylují histony v nukleozomech v cílových promotorech)

Posttranslační modifikace p53



Posttranslační modifikace souvisejí s regulací aktivity a také stability p53.

Inaktivace p53 v nádorech



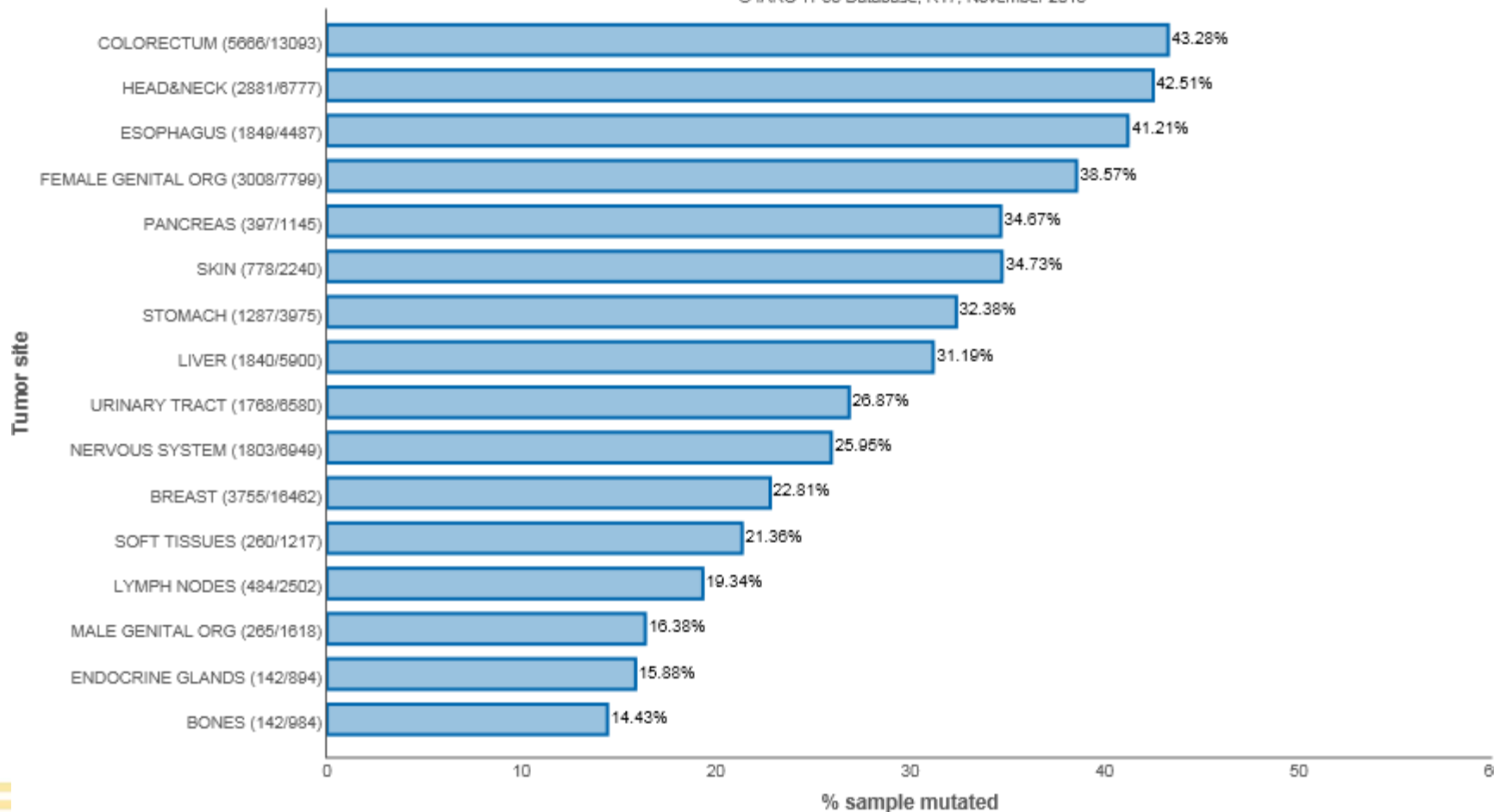
- **Mutace**
- **Jaderná exkluze** (37% zánětlivých karcinomů prsu, více než 90% nediferencovaných neuroblastomů)
- **Interakce s virovými onkoproteiny** (LT SV40, E1B, E6)
- **Amplifikace *mdm2*** (neuroblastomy), případně ***mdmX*** (gliomy)

Frekvence mutací p53 v nádorech



Somatic mutations - Mutation Prevalence (N = 26325)

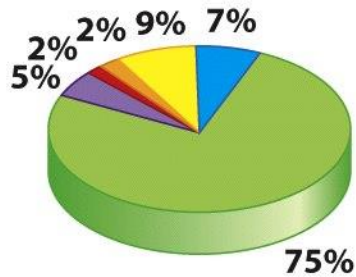
© IARC TP53 Database, R17, November 2013



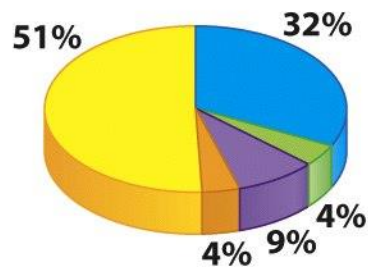
Typy mutací p53



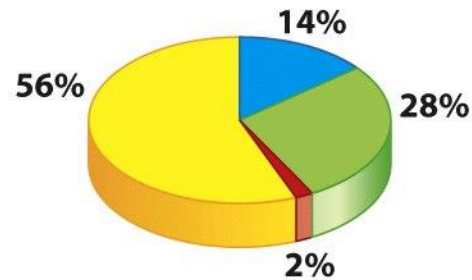
- především bodové missense mutace
- krátké delece a inserce (více v okrajových částech genu)



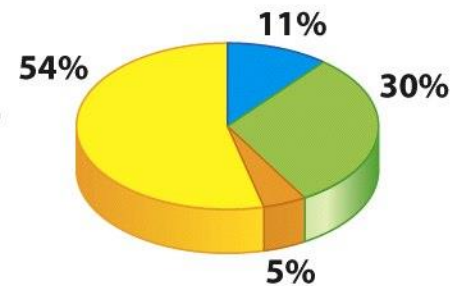
p53 (n = 15,122)



APC (n = 15,451)



ATM (n = 617)



BRCA1 (n = 3,703)

