

Molekulární genetiky člověka

Somatické mutace a rakovina

Jana Šmardová

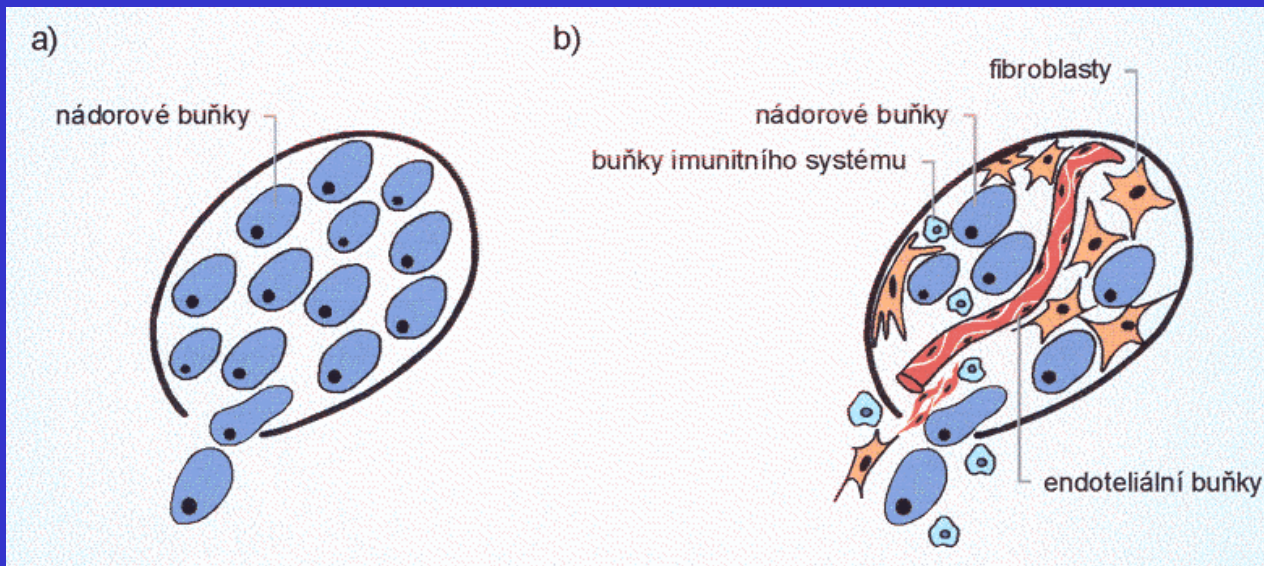
Ústav patologie FN Brno - Bohunice

Př.F a LF MU Brno

Nádor, tumor, neoplazma, novotvar

- je geneticky podmíněný abnormální přírůstek buněčné tkáňové hmoty klonálního charakteru. Jeho růst není v koordinaci s růstem okolních tkání a rovnovážným stavem organismu.

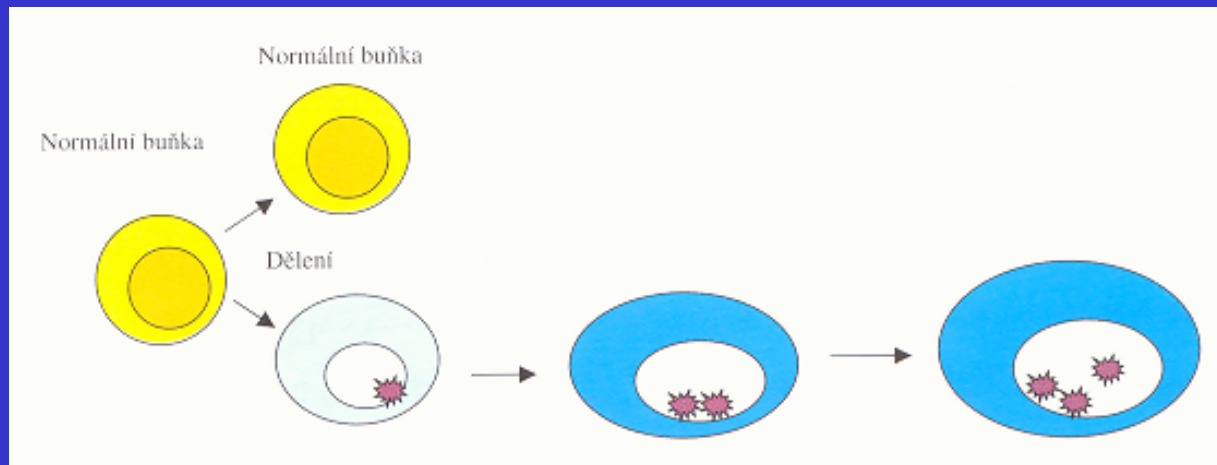
Nádor je komplexní tkáň



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

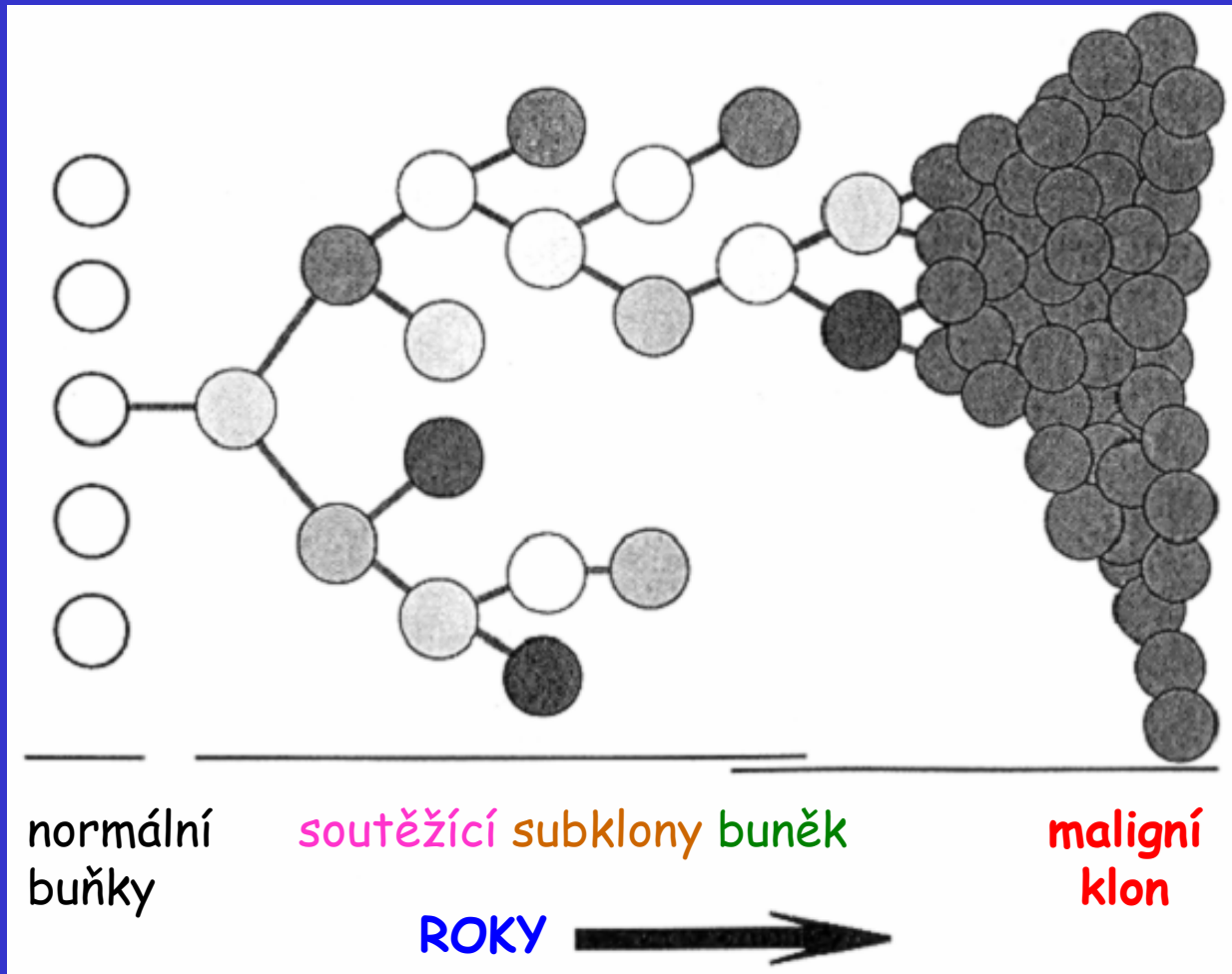
Kancerogeneze

- je proces vzniku a vývoje nádoru
- je vícestupňová
- její podstatou je postupné hromadění genetických (a epigenetických) změn



Neoplastická transformace - je přeměna somatické buňky v buňku nádorovou






Vícestupňová kancerogeneze spojená s kroky klonální expanze (selekce)



Kolik a které geny jsou změněny během kancerogeneze?

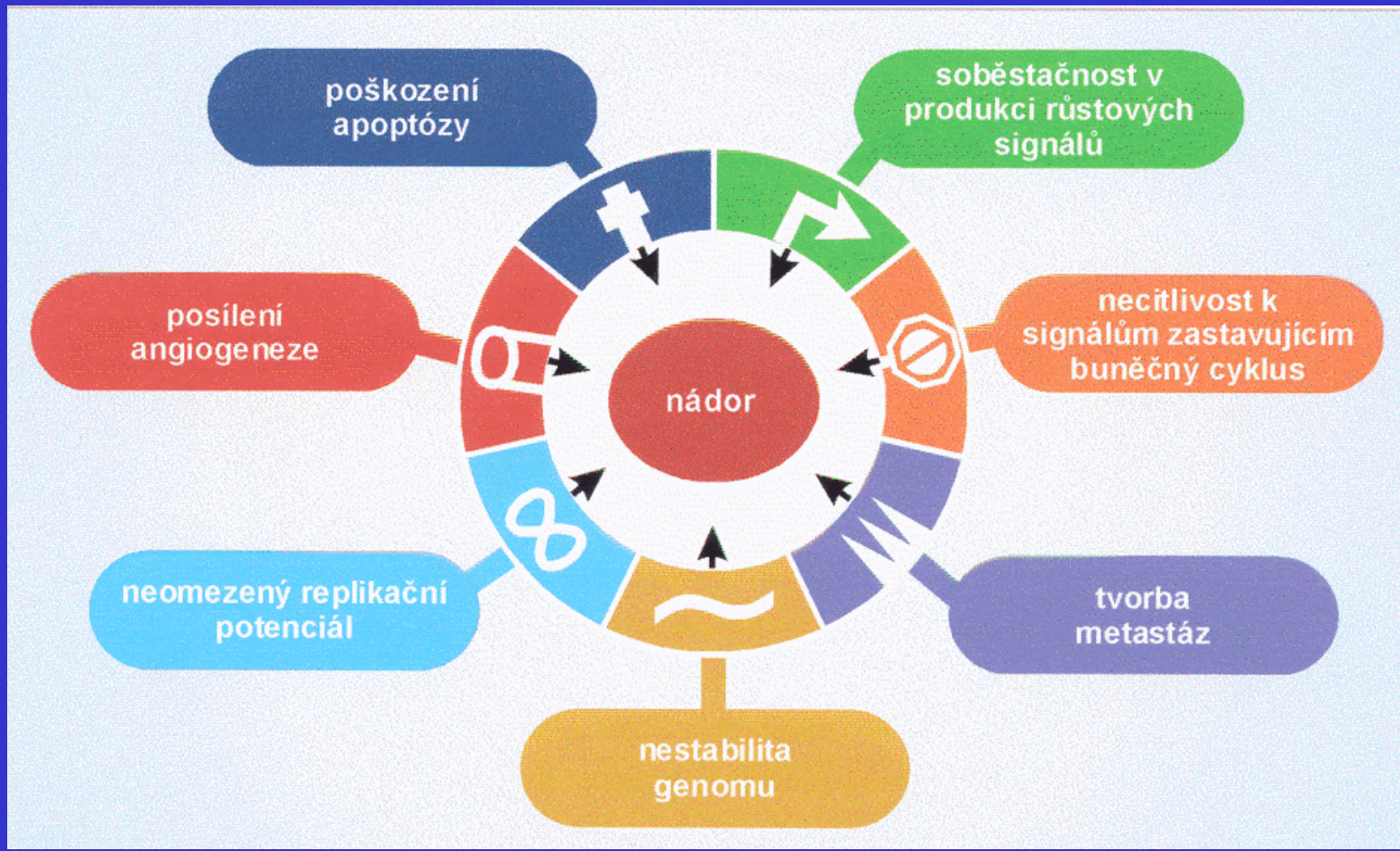
- Nádor není monogenní onemocnění (X vrozené dispozice k nádorům!!).
- Odhaduje se, že pro vývoj nádoru je nezbytných 4-7 událostí (zásahů).
- Konkrétních genů, které mohou být během kancerogeneze změněny, jsou desítky (350, 600?).
- Obecně existuje šest (sedm?) základních vlastností plně maligního nádoru:

Šest získaných vlastností maligního nádoru

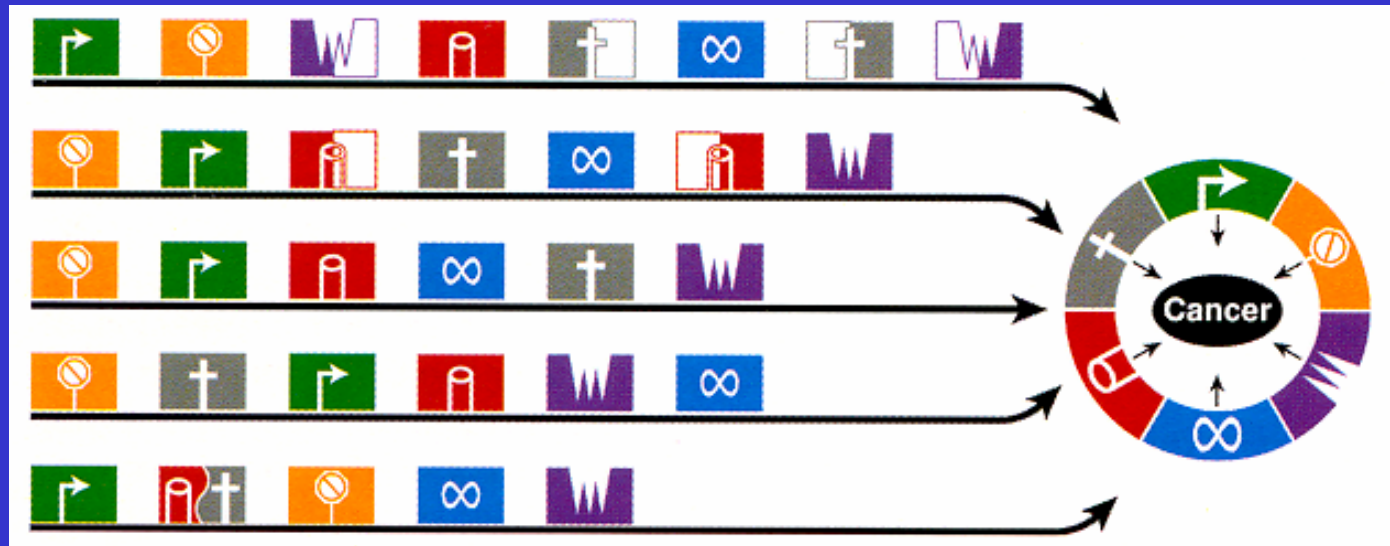
| | získaná schopnost | příklad |
|---|---|------------------------|
|  | Soběstačnost v produkci růstových signálů | aktivace <i>H-ras</i> |
|  | Necitlivost k signálům zastavujícím b.c. | ztráta RB |
|  | Poškození apoptózy | produkce IGF |
|  | Neomezený replikační potenciál | aktivace telomerázy |
|  | Posílení angiogeneze | produkce VEGF |
|  | Tvorba metastáz | inaktivace E-kadherinu |

Nestabilita genomu jako podmínka akumulace všech nutných změn?

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 dělení buněk a jejich diferenciaci.

Onkogen je protoonkogen pozměněný/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 („recesivní onkogeny“) - spojeno s LOH
- vyskytují se v somatických a také v zárodečných buňkách

Onkogenní (nádorové) RNA viry

Retroviry - obsahují ve svém genomu onkogen (akutně transformující viry) nebo aktivují protoonkogen, vedle kterého se integrovaly (pomalu transformující)

RNA viry a lidské nádory:

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

Onkogenní (nádorové) DNA viry

Používají jinou strategii transformace: neobsahují onkogeny, ale kódují proteiny, 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

Onkogenní (nádorové) DNA viry

DNA viry a lidské nádory:

- Virus Epstein-Barrové (EBV) - Burkittův lymfom (BL), Hodgkinův lymfom (HD), lymfomy, nazofaryngální karcinomy (NPC)
- Virus hepatitidy B (HBV) - hepatocelulární karcinom (HCC)
- Lidské papilomaviry (HPV 16, 18,...) - anogenitální nádory, nádory ústní dutiny, bradavice
- Lidský herpesvirus typu 8 (HHV8) - Kaposiho sarkom (KS)

Šest získaných vlastností maligního nádoru

získaná schopnost

příklad



Soběstačnost v produkci růstových signálů

aktivace *H-ras*

Necitlivost k signálům zastavujícím b.c.

ztráta RB

Poškození apoptózy

produkce IGF

Neomezený replikační potenciál

aktivace telomerázy

Posílení angiogeneze

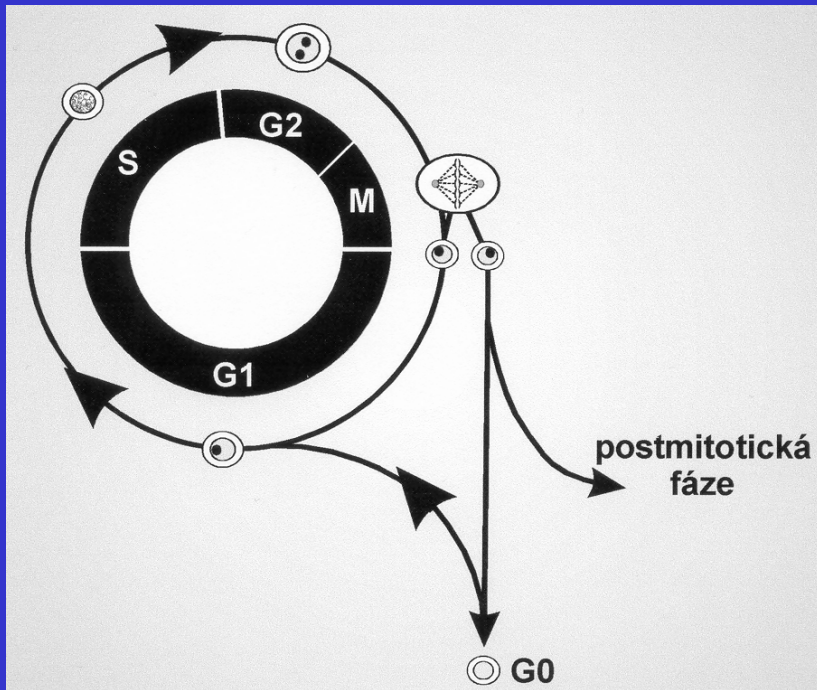
produkce VEGF

Tvorba metastáz

inaktivace E-kadherinu

Nestabilita genomu

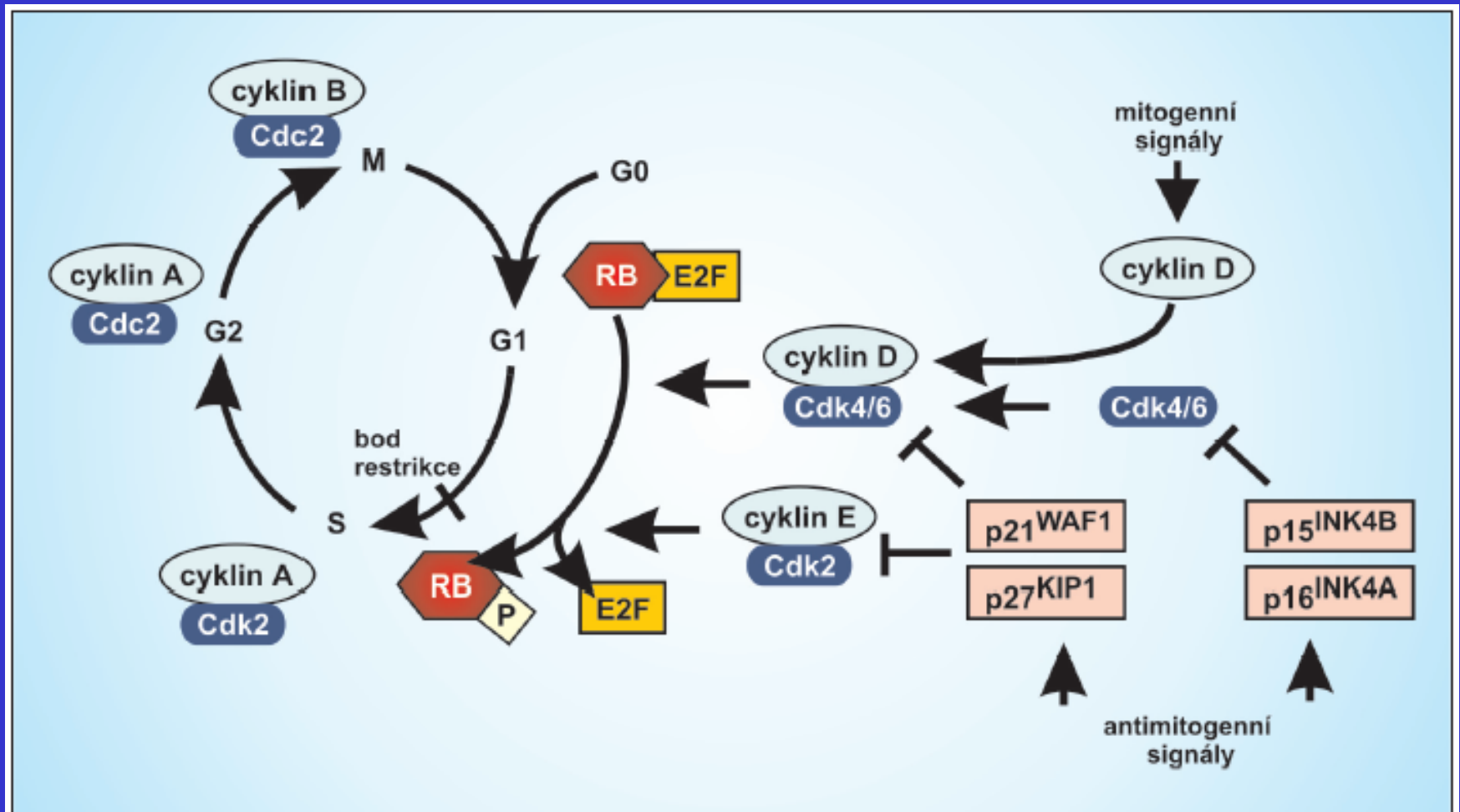
Je rakovina nemoc buněčného cyklu?



- Ztráta regulace buněčného cyklu je kritická součást buněčné transformace.
- Ztráta regulace buněčného cyklu není jedinou součástí kancerogeneze, většinou sama o sobě není plně transformující.

Onkogeny

Regulace buněčného cyklu - bod restrikce - regulace fosforylace RB

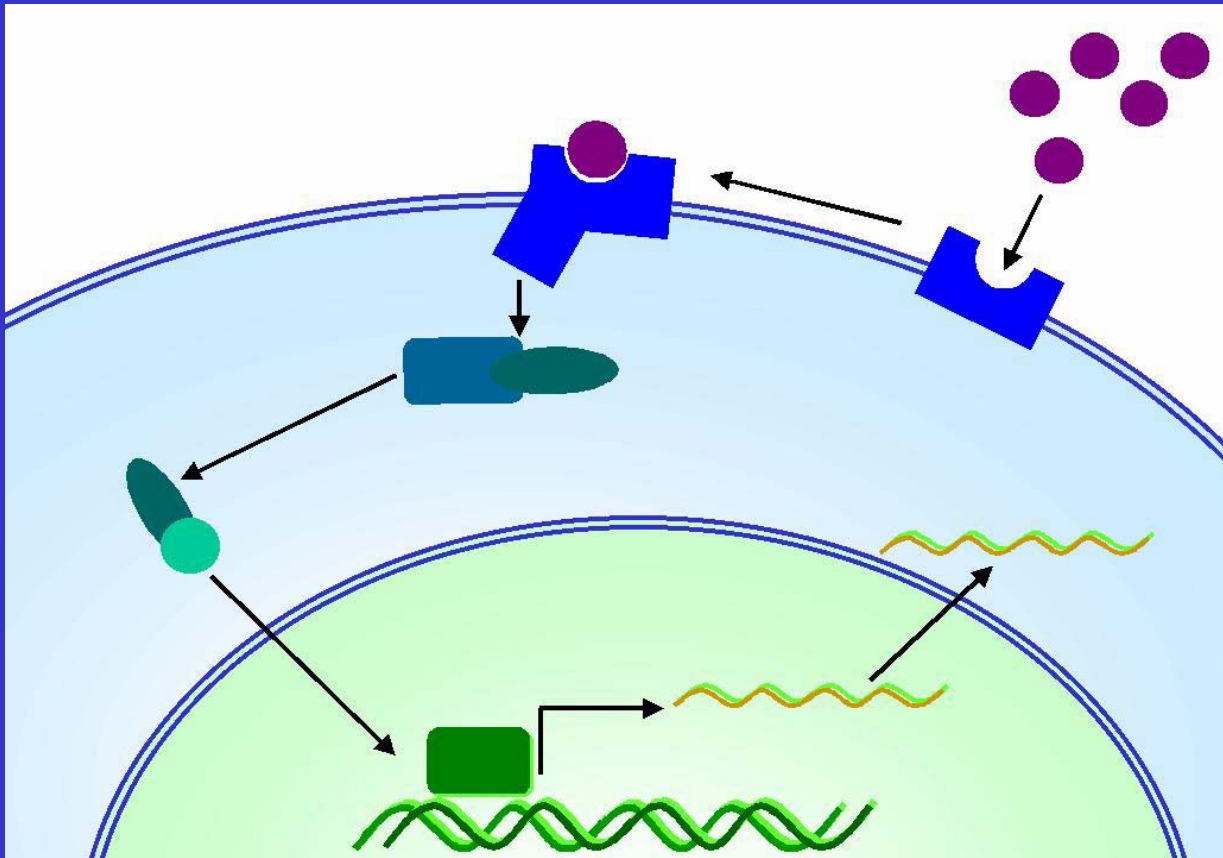


Co je poškozeno při transformaci?

- nádorový supresor **pRB** (retinoblastom, ..)
- nádorový supresor **p16^{INK4A}** (melanom, ..)
- **cykliny D** (lymfomy, ..)

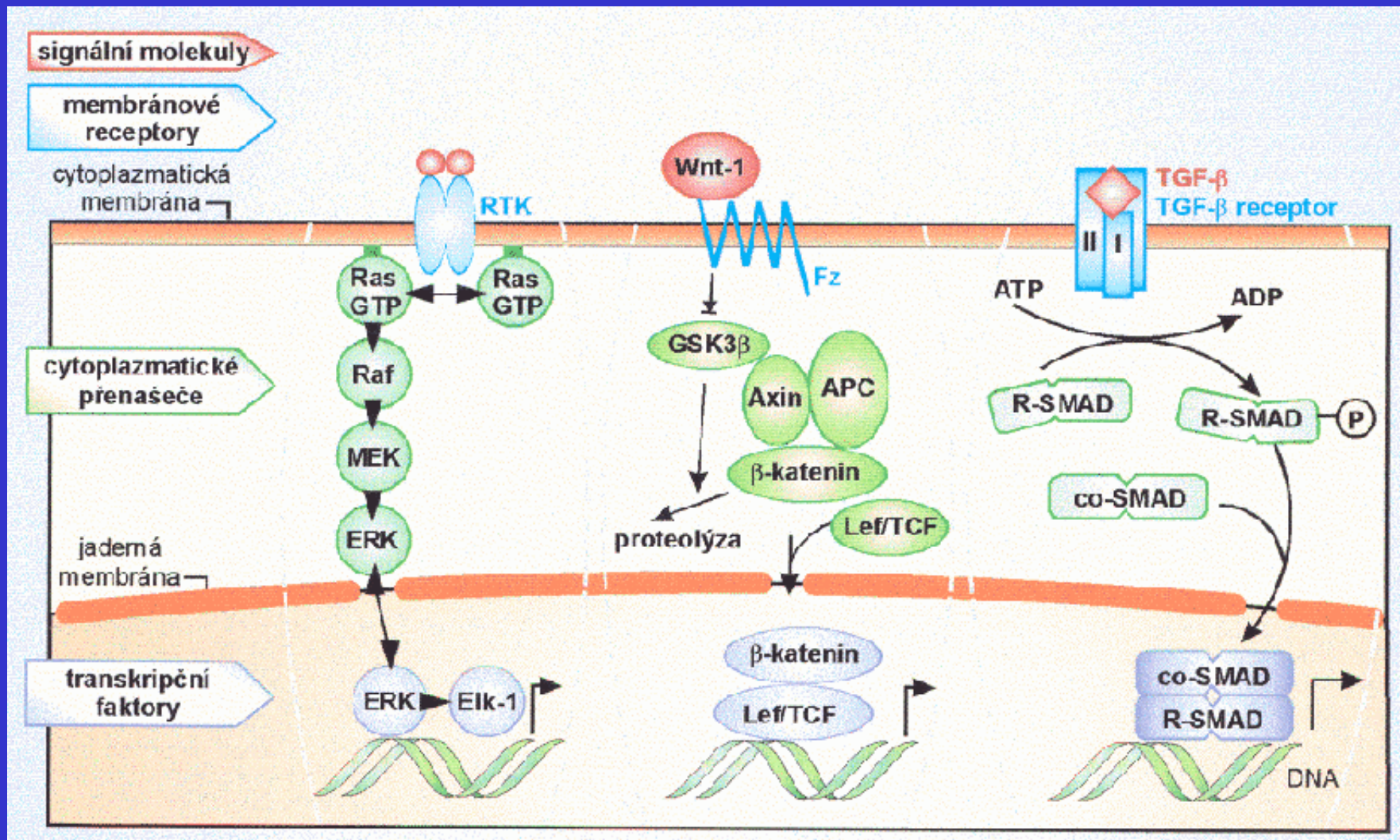
- „**periferní hráči**“ - součásti mitogenních a antimitogenních drah

Struktura signální dráhy: klasifikace protoonkogenů



- Růstové faktory
- Receptory růstových faktorů a proteiny Ras
- Cytoplazmatické přenašeče
- Transkripční faktory

Příklady signálních drah



Růstové faktory a RTK receptory

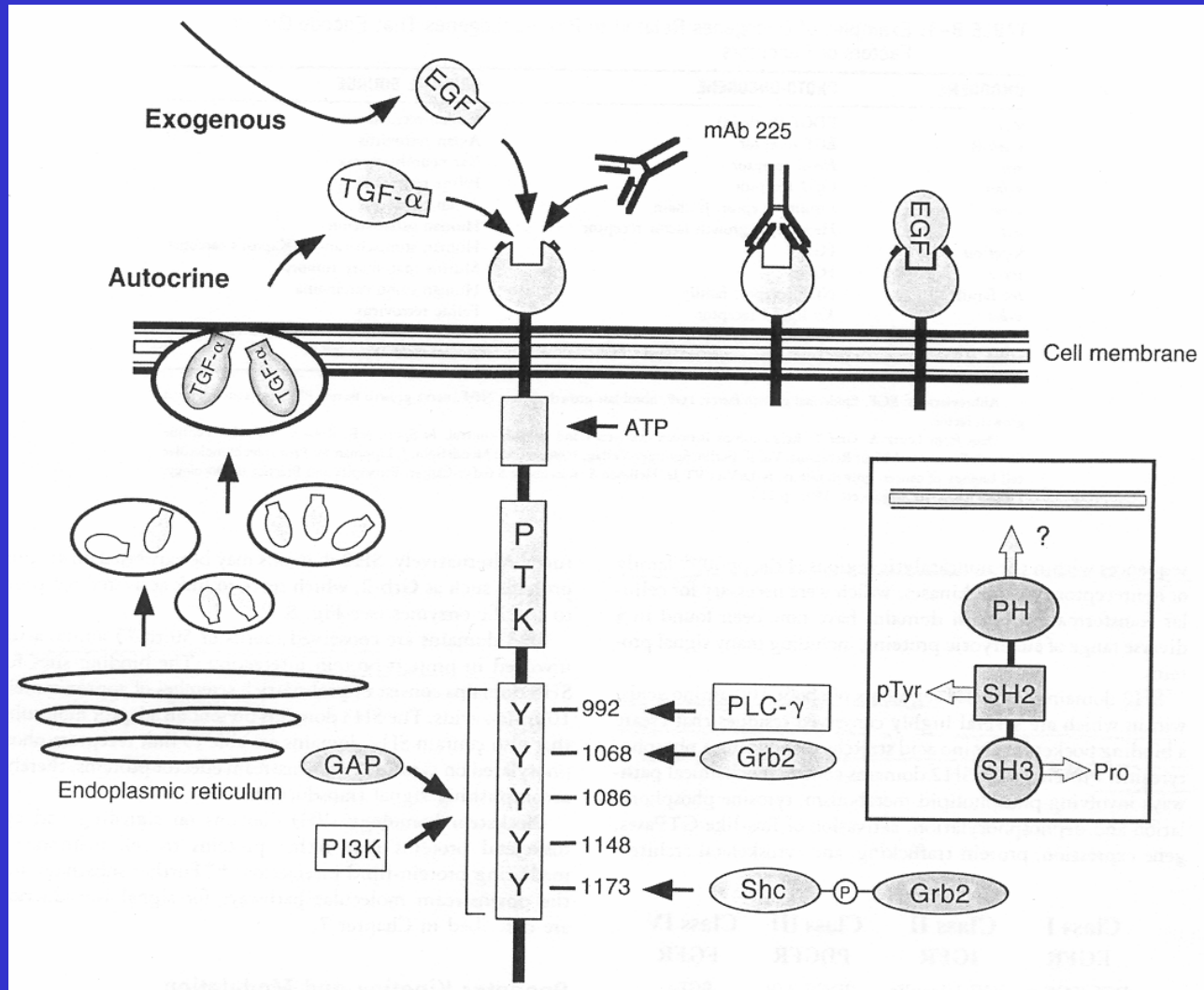


Schéma
přenosu
signálu na
EGFR

Růstové faktory a RTK receptory

- po vazbě svých specifických ligandů receptory dimerizují a dochází k autofosforylaci a také k fosforylaci dalších signálních molekul; tak může být zahájena řada vnitrobuněčných signálních kaskád
- autofosforylací se změní konformace - zpřístupní se katalytická doména a vazebná doména pro substráty
- substráty interagují především prostřednictvím svých SH2 a SH3 (Src-homology) domén

Typy mutací postihující růstové faktory a RTK receptory

- Produkce/nadprodukce (vlastních) růstových signálů
- Amplifikace receptoru: neadekvátně efektivní „vychytávání“ extracelulárního signálu - buňky s koncentrovaným receptorem jsou pozitivně stimulovány k proliferaci, i když hladina extracelulárního signálu je nízká a za normálních okolností by mitogenní dráhu neaktivovala
- Změna struktury receptoru: jeho aktivace je nezávislá na vazbě ligandu

Příklad růstového faktoru: PDGF

- PDGF („platelet-derived growth factor“) - účinný mitogen epiteliálních buněk - stimuluje endoteliální a epiteliální buňky k proliferaci v místě poranění
- homodimer (AA, BB) nebo heterodimer (AB) dvou příbuzných řetězců A a B: B je kódován *c-sis* (*v-sis* přenášen virem opičího sarkomu: pozměněný B řetězec je konstitutivně exprimován a konstantně stimuluje k proliferaci buňky s příslušným receptorem)
 - exprese PDGF A nebo B nebo obou často detekována u sarkomů, gliomů, karcinomů plic, prsu, jícnu, žaludku, střeva

Příklad membránového receptoru - HER2/neu

HER2/neu kódován genem *c-erbB2*

- receptor homologní s EGFR, ale neváže ani EGF ani TGF- α a zřejmě ani neu

- amplifikace *c-erbB2* detekována u adenokarcinomů slinných žláz, prsu, vaječníků, střeva a žaludku; u karcinomu prsu a vaječníků amplifikace a zvýšená exprese *c-erbB2* koreluje s horší prognózou a rezistencí k terapii *

- amplifikace *c-erbB2* detekována častěji ve vzdálených metastatických místech než u primárních nádorů

Příklad membránového receptoru - HER2/neu

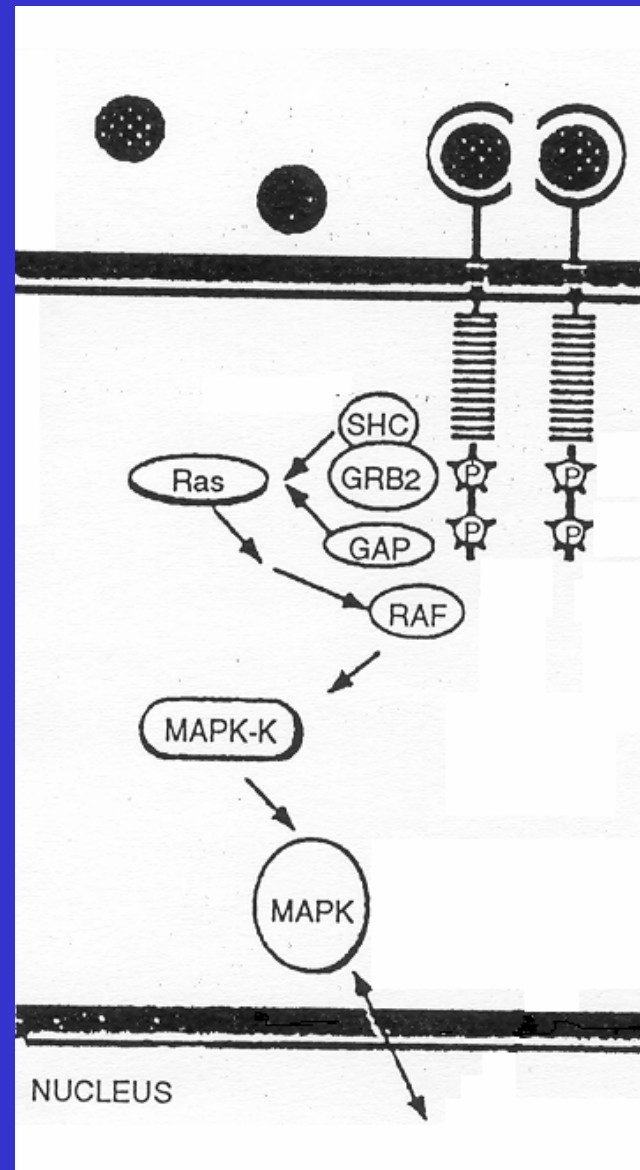
* Amplifikace HER2/neu je uznávaným prognostickým a prediktivním faktorem u nádoru prsu; pacientky s amplifikací HER2/neu podstupují radikálnější terapii a mohou být léčeny **Herceptinem** - monoklonální protilátkou rozpoznávající protein HER2/neu

- asi u 33% primárních nádorů prsu a vaječníků detekována mutace v transmembránové doméně V664E dávající vznik variantě p185erbB2, která je konstitutivně dimerizovaná - konstitutivně aktivní a konstitutivně stimulující MAPK

Proteiny Ras

Po aktivaci RTK receptoru zprostředkovávají vazbu Raf-1 k cytoplazmatické membráně, kde jsou přítomny další faktory účastnící se aktivace Raf-1, a spoluaktivují Raf-1

Fosforylované zbytky RTK jsou vazebným místem pro proteiny s SH2 doménami (GRB2). Tyto proteiny jsou fosforylovány a signál potom přenášejí dále prostřednictvím proteinů Ras.



Proteiny Ras

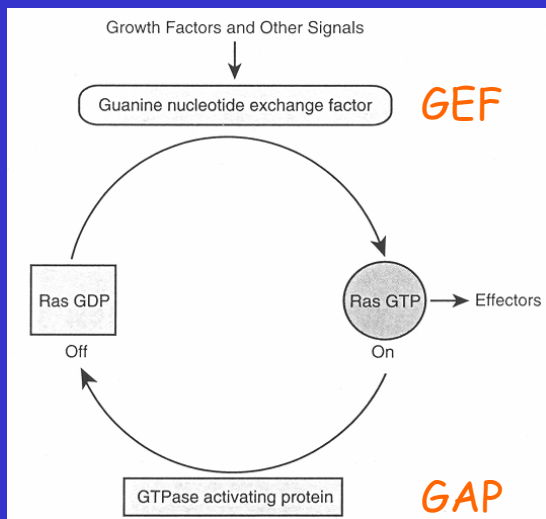
Proteiny H-Ras, N-Ras a K-Ras4A a K-Ras4B (189 AA) mají 188 aminokyselin (p21^{Ras}). Jsou lokalizovány na vnitřní straně cytoplazmatické membrány, kde fungují jako přepínače při přenosu extracelulárních signálů do cytoplazmy. Účastní se řízení buněčného cyklu, diferenciace a apoptózy.

Proteiny Ras mají GTPázovou aktivitu: jsou inaktivní, váže-li se na ně GDP, a aktivní, váže-li se na ně GTP. Vlastní schopnost proteinů Ras vyměňovat GTP/GDP a hydrolyzovat GTP je nízká, proto nutná účast dvou typů proteinů:

Proteiny Ras

Proteiny H-Ras, N-Ras a K-Ras4A a K-Ras4B (189 AA) mají 188 aminokyselin (p21^{Ras}). Jsou lokalizovány na vnitřní straně cytoplazmatické membrány, kde fungují jako přepínače při přenosu extracelulárních signálů do cytoplazmy. Účastní se řízení buněčného cyklu, diferenciaci a apoptózy.

Proteiny Ras mají GTPázovou aktivitu: jsou inaktivní, váže-li se na ně GDP, a aktivní, váže-li se na ně GTP. Vlastní schopnost proteinů Ras vyměňovat GTP/GDP a hydrolyzovat GTP je nízká, proto nutná účast dvou typů proteinů:



GEFs posilují tvorbu aktivního Ras, který váže GTP

GAPs aktivují GTPázu, posilují tvorbu inaktivního stavu Ras, který váže GDP

Onkogenní aktivace *ras*

Přítomnost onkogenní mutace *ras* detekována téměř u 35% nádorů.

- Mutace *H-ras* hlavně u nádorů kůže a dlaždicobuněčných nádorů hlavy a krku.
- Mutace *K-ras* hlavně u adenokarcinomů, karcinomů chrupavek, kolorektálních nádorů a nádorů pankreatu.
- Mutace *N-ras* jsou běžné u hematopoietických malignit, hlavně u AML a MDS.

Onkogenní aktivace *ras*

Onkogenní mutace posilují aktivitu Ras:

- V kodónech: **12, 13, 59, 61, 63** - vzniklé proteiny mají poškozenou GTPázovou aktivitu a jsou rezistentní k působení GAP proteinů
- V kodónech **16, 19, 116, 117, 119, 144, 146** - vzniklé proteiny mají usnadněnou výměnu GDP/GTP
- U některých nádorů je zvýšená exprese *ras*

Protoonkoprotein Myc

Do rodiny proteinů Myc patří tři odlišné proteiny, které se uplatňují v kancerogenezi: c-Myc, N-Myc a L-Myc.

Myc je jaderný fosfoprotein s mnoha znaky transkripčního faktoru. Myc tvoří heterodimery s proteinem Max.

- Dimer Myc/Max transaktivuje několik genů, které se podílejí na řízení buněčné proliferace.
- Myc upreguluje aktivitu telomerázy transaktivací katalytické podjednotky hTERT.
- Řada genů regulovaných Myc není transaktivována, ale naopak jejich transkripce je reprimována.

c-Myc, N-Myc, L-Myc

Jsou si podobné svou strukturou a mechanismem účinku.

Výrazně se liší expresí během vývoje a také se zdá, že ovlivňují - i ve stejném buněčném kontextu - jiné sady genů, participují - i ve stejných buněčných typech - na jiných buněčných programech.

Liší se významně také svou úlohou ve vývoji jednotlivých typů neoplastických onemocnění.

c-myc a nádory

Burkittův lymfom:

Téměř všechny případy Burkittova lymfomu souvisí s translokací genu *c-myc* (na chromozomu 8) buď s těžkým řetězcem μ nebo λ nebo lehkým řetězcem κ imunoglobulinů (na chromozomech 14, 22 a 2).

Někdy bývá translokace doprovázena i výskytem somatických mutací v genu *c-myc*, a to především v oblasti fosforylačních míst Thr58 a Ser62. Tyto mutace přispívají významně k fenotypu a progresi onemocnění.

c-myc a nádory

Ostatní lymfomy:

- Low-grade folikulární lymfom je většinou spojen s translokací Ig/bcl-2, jen vzácně lze detekovat přestavby *c-myc*. 60-80% těchto lymfomů transformuje v agresivnější formu a u těch už jsou detekovány i přestavby Ig/c-myc.
- Difúzní velkobuněčné lymfomy B-buněk jsou heterogenní a asi u 50% lze detekovat translokaci Ig buď s *bcl-2*, *bcl-6* nebo *c-myc*.

c-myc a nádory

Solidní nádory:

Amplifikace a/nebo zvýšená exprese *c-myc* se vyskytuje u významného podílu invazivních duktálních karcinomů prsu (spojeno s horší prognózou), u některých nádorů prostaty, u gastrointestinálních nádorů, u některých melanomů a u mnohočetného myelomu (koreluje s agresivitou onemocnění).

N-*myc* a nádory

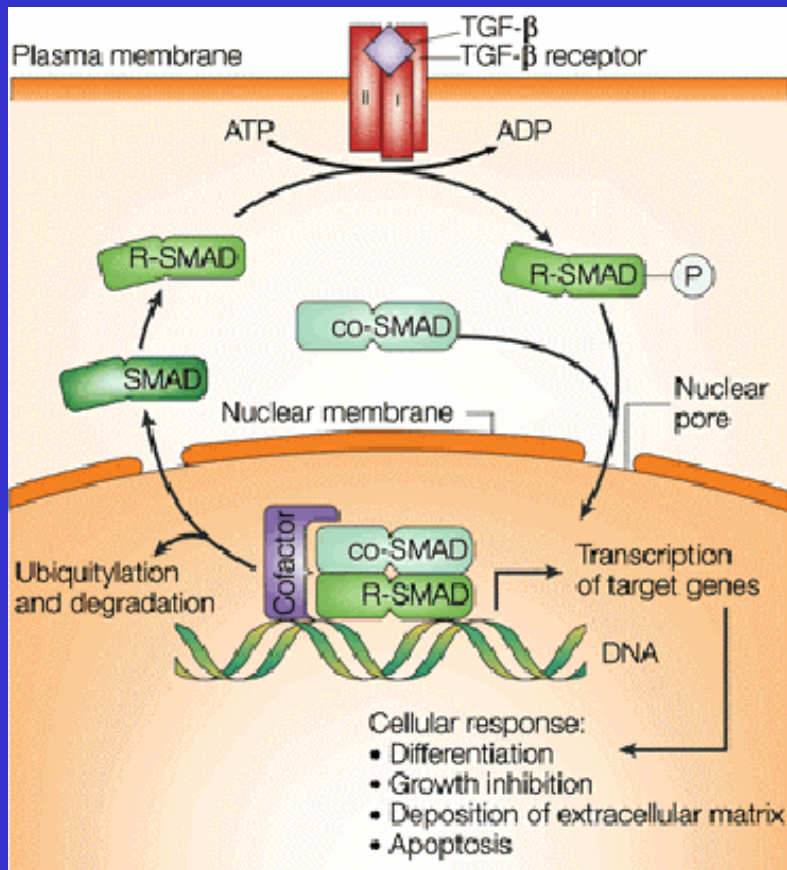
Amplifikace N-*myc* se vyskytuje asi u 1/3 případů neuroblastomu a je spojena s horší prognózou onemocnění.

Zvýšená exprese N-*myc* byla popsána u významného podílu případů malobuněčného nádoru plic a u menšího počtu případů medulárního tyroidního nádoru, retinoblastomu, rhabdomyosarkomu a nádoru prsu.

L-*myc* a nádory

Amplifikace a zvýšená exprese L-*myc* (a také c-*myc* a N-*myc*) byla pozorována u některých případů malobuněčného karcinomu plic.

Signální dráha TGF- β



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 TGF- β -cílových genů (např. **p21^{CIP1}**, **p15^{INK4B}**, a další).

⇒ antimitogenní signalizace

Nádorové supresory

Individuální dispozice k nádorům

1. Rozdíly v metabolismu kancerogenů

např. cytochrom P-450, CYP2D6, CYP1A1, N-acetyltransferáza,...

2.-3. Rozdíly v DNA repair

Mutace nádorových supresorů (a onkogenů)

- p53, RB, WT1, BRCA1 a BRCA2,...

- RET

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

Retinoblastom

Je vzácné, ale velmi dobře známé nádorové onemocnění dětí. Incidence - 1 na 13.500 - 25.000 narozených dětí.

Je prototypickým příkladem vrozené dispozice k nádorům: Na základě studia epidemiologie retinoblastomu byla vytvořena Knudsonova hypotéza → Knudsonův model.

RB byl prvním příkladem nádorového supresoru a první klonovaný gen pro nádorový supresor.

Vrozená mutace RB (13q14) predisponuje nositele k vývoji retinoblastomu (maligní tumor, který vzniká ve vyvíjející se retině) v nízkém věku a přináší zvýšené riziko vývoje osteosarkomu.

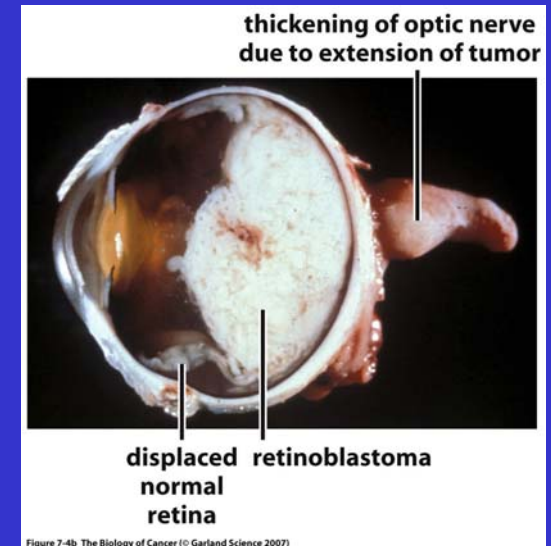
Knudsonův model dvou zásahů

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



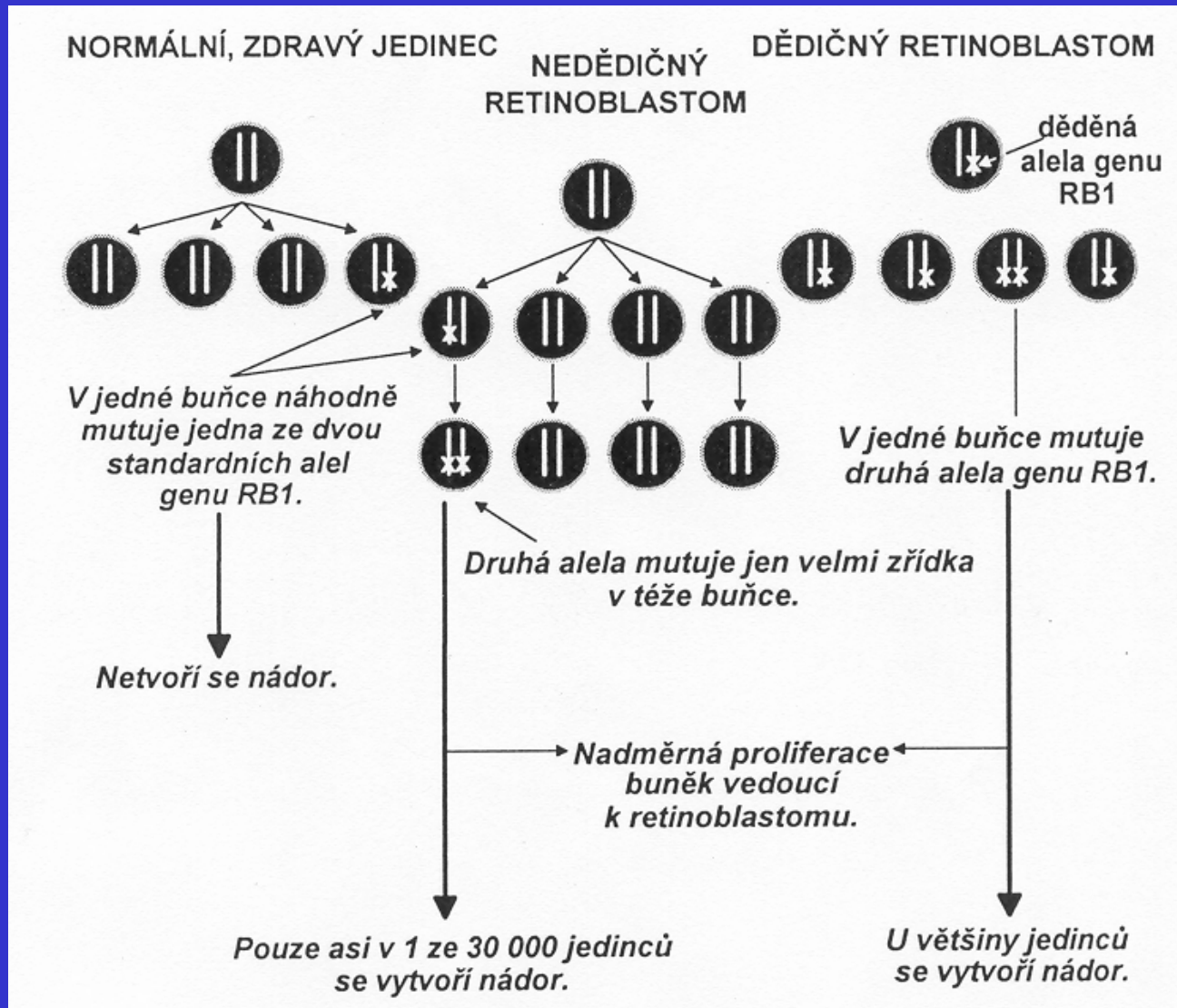
Knudsonův model dvou zásahů

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

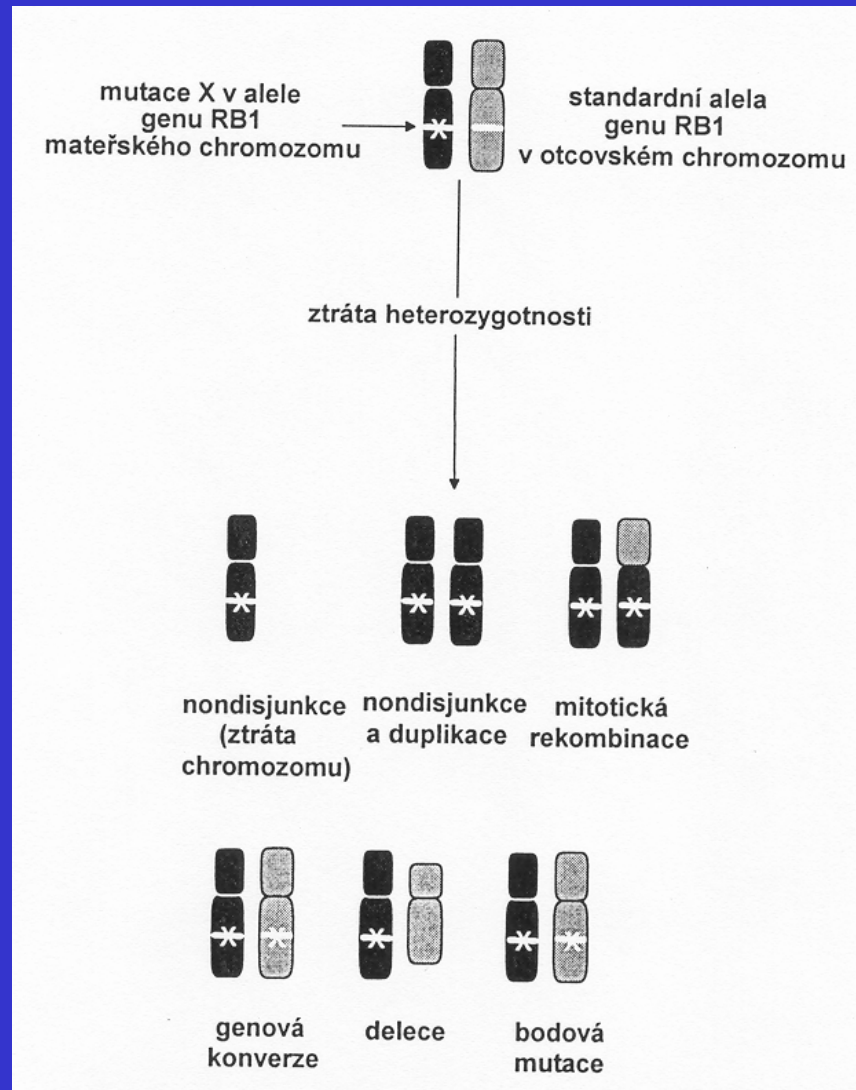


Ztráta heterozygotnosti

Ztráta heterozygotnosti = LOH („lost of heterozygosity“)

- 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.
- Buňky, které nesou jednu mutovanou alelu nádorového supresoru, ztrácejí jedním z více možných způsobů funkční alelu.

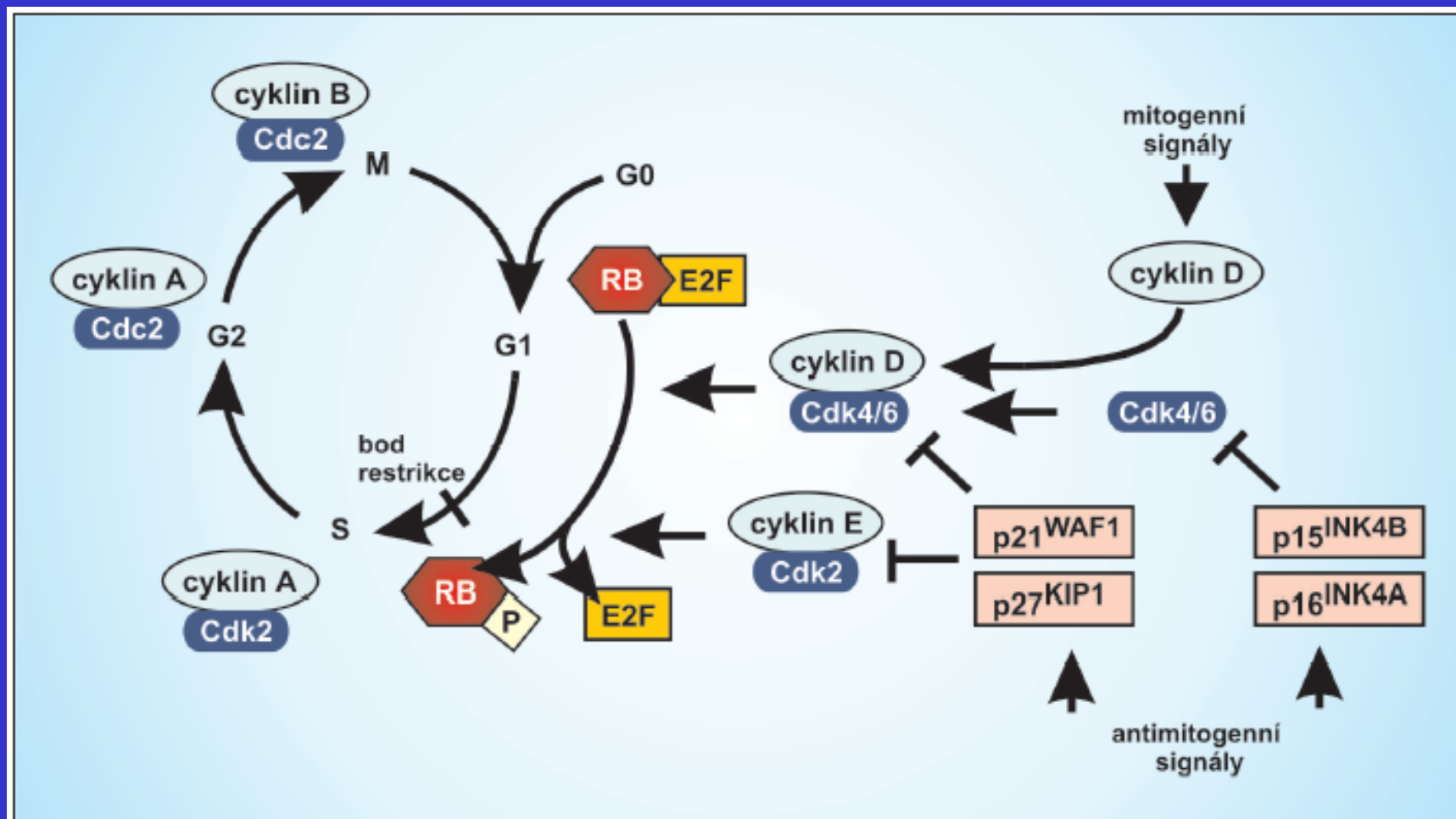
Ztráta heterozygotnosti



RB: gen a protein

- gen je lokalizován na chromozomu 13
- jaderný (85%) protein pp110^{RB} (velikost 112 až 114 v proliferujících buňkách)
- V nedělících se buňkách je RB v komplexu s TF E2F. E2F transaktivuje sadu genů, které jsou nutné k S fázi buněčného cyklu. RB blokuje E2F a tím blokuje buněčný cyklus („brzda buněčného cyklu“).
- Hladina proteinu RB se v buňkách nemění během b.c., ale mění se **stupeň fosforylace** RB. Na molekule RB je asi 10 až 12 různých fosforylačních míst (Thr, Ser). Hypofosforylovaný RB je aktivní a váže E2F, fosforylovaný RB je neaktivní.

RB a regulace buněčného cyklu



Způsoby inaktivace RB 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 (lymfomy B buněk). Potenciálně onkogenní virus *Herpesvirus saimiri* kóduje svůj vlastní cyklin D.

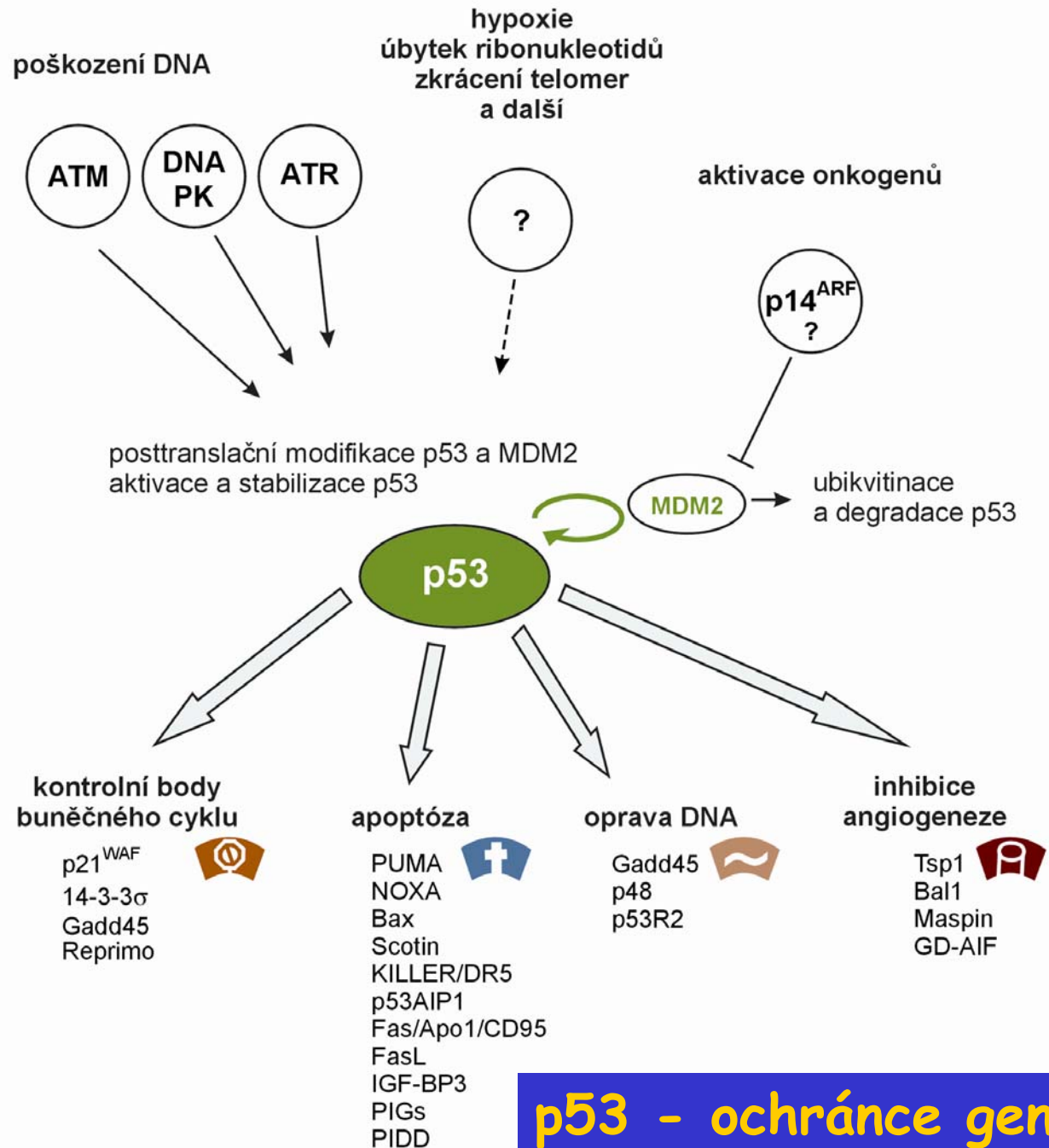
Způsoby inaktivace RB v nádorech

- 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 inhibující pro proliferaci, protože RB je fosforylován a inaktivován endogenní aktivitou komplexů cyklin/cdk.

Li-Fraumeniho syndrom

- Vzácné autozomálně dominantní dědičné onemocnění.
- Rodinný syndrom charakteristický častým a časným výskytem malignit různého typu včetně sarkomu, nádoru prsu, nádoru mozku, leukémií, adrenokortikálního nádoru.
- 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).
- p53 je transkripční faktor

Funkce p53: signální síť

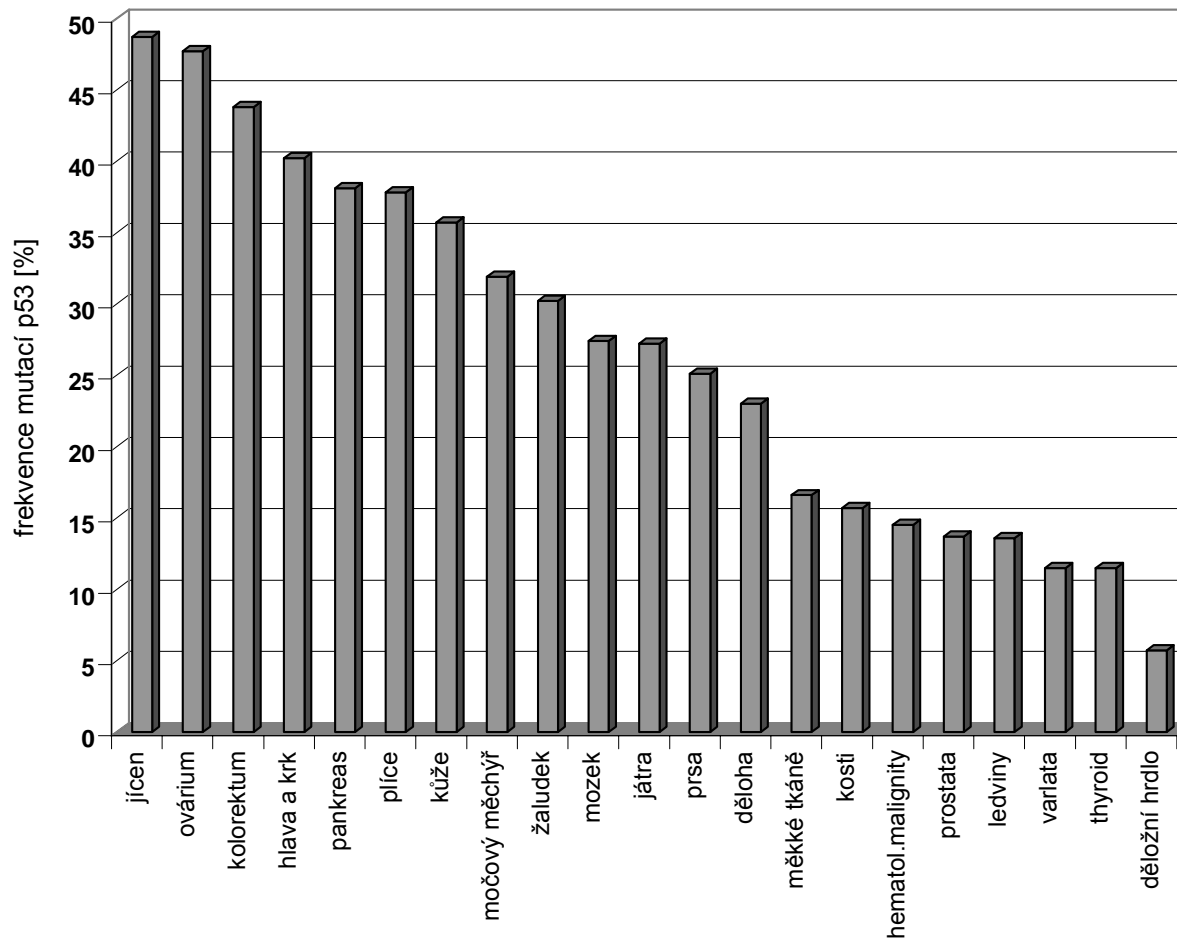


p53 - ochránce genomu

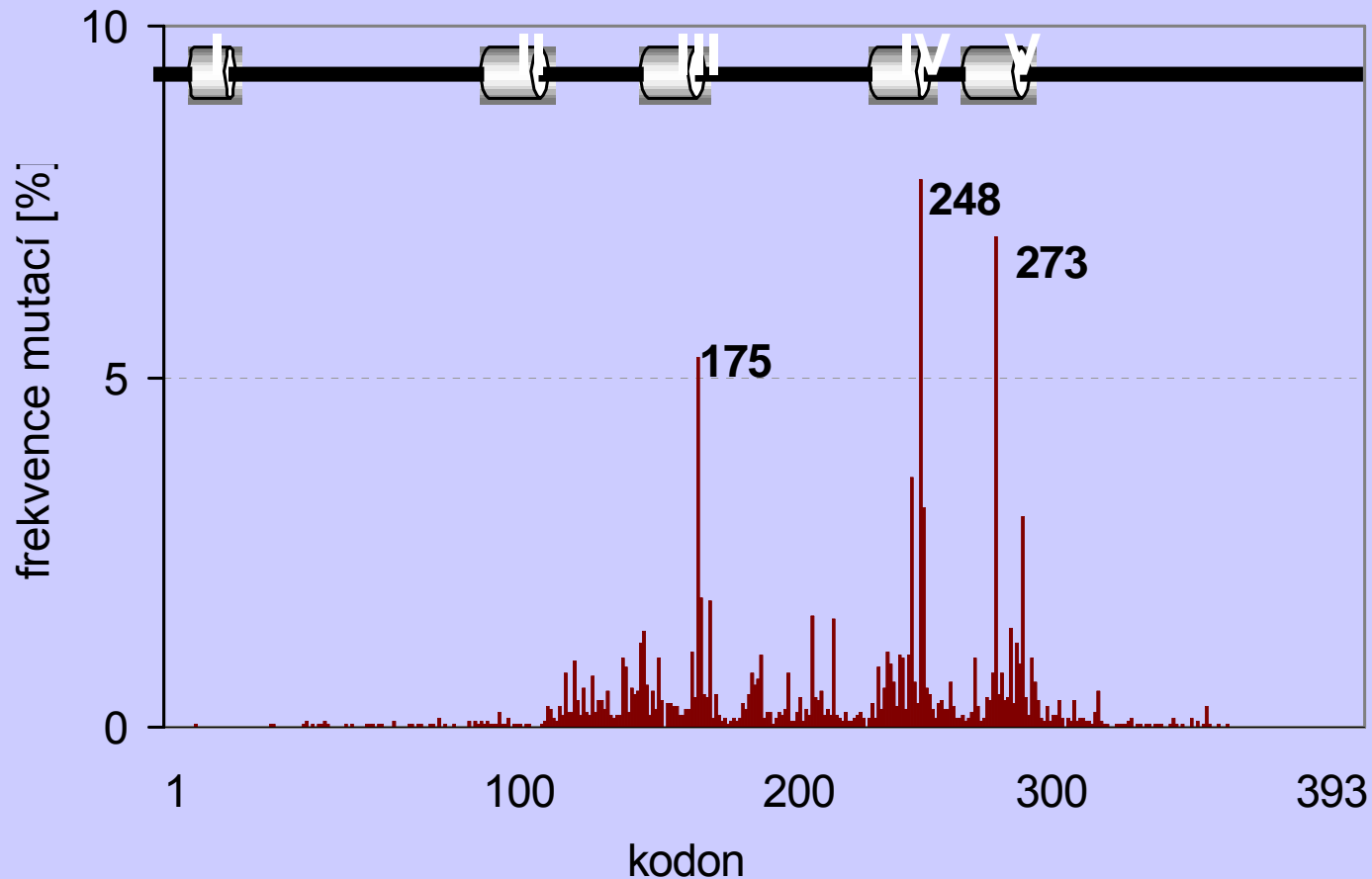
Inaktivace p53 v nádorech

- 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 u některých typů nádorů



Mutační spektrum p53



Nejčastěji mutované kodóny p53: **175, 245, 248, 249, 273, 282.**

Signální dráha Wnt-1/ β -katenin

β -kateniny hrají v buňkách dvě odlišné role a obě tyto role se mohou podílet na kancerogenezi:

1. Molekuly β -kateninu jsou strukturální součástí cytoskeletonu a **adhezivních komplexů** (zprostředkovávají vztah mezi kadheriny a aktinovými složkami cytoskeletonu). Ztráta/změna buněčné adheze se uplatňuje při metastázování nádoru.
2. **Volný β -katenin** funguje jako signální molekula dráhy Wnt-1/ β -katenin účastnící se regulace transkripce. Transkripce genů zprostředkovaná β -kateniny může zapnout geny nutné k buněčné proliferaci nebo geny s antiapoptotickou funkcí.

Regulace β -kateninů

Hladina volného β -kateninu je udržována pomocí tzv. **destrukčního komplexu**. Ten je tvořen proteiny: *GSK-3*, *Axin*, *APC* a β -TrCP/Slimb.

GSK-3 serin/threoninová kináza, která fosforyluje β -katenin (S33, S37, T47 a S45). Tato fosforylace funguje jako signál k následné ubikvitinaci a degradaci β -kateninu.

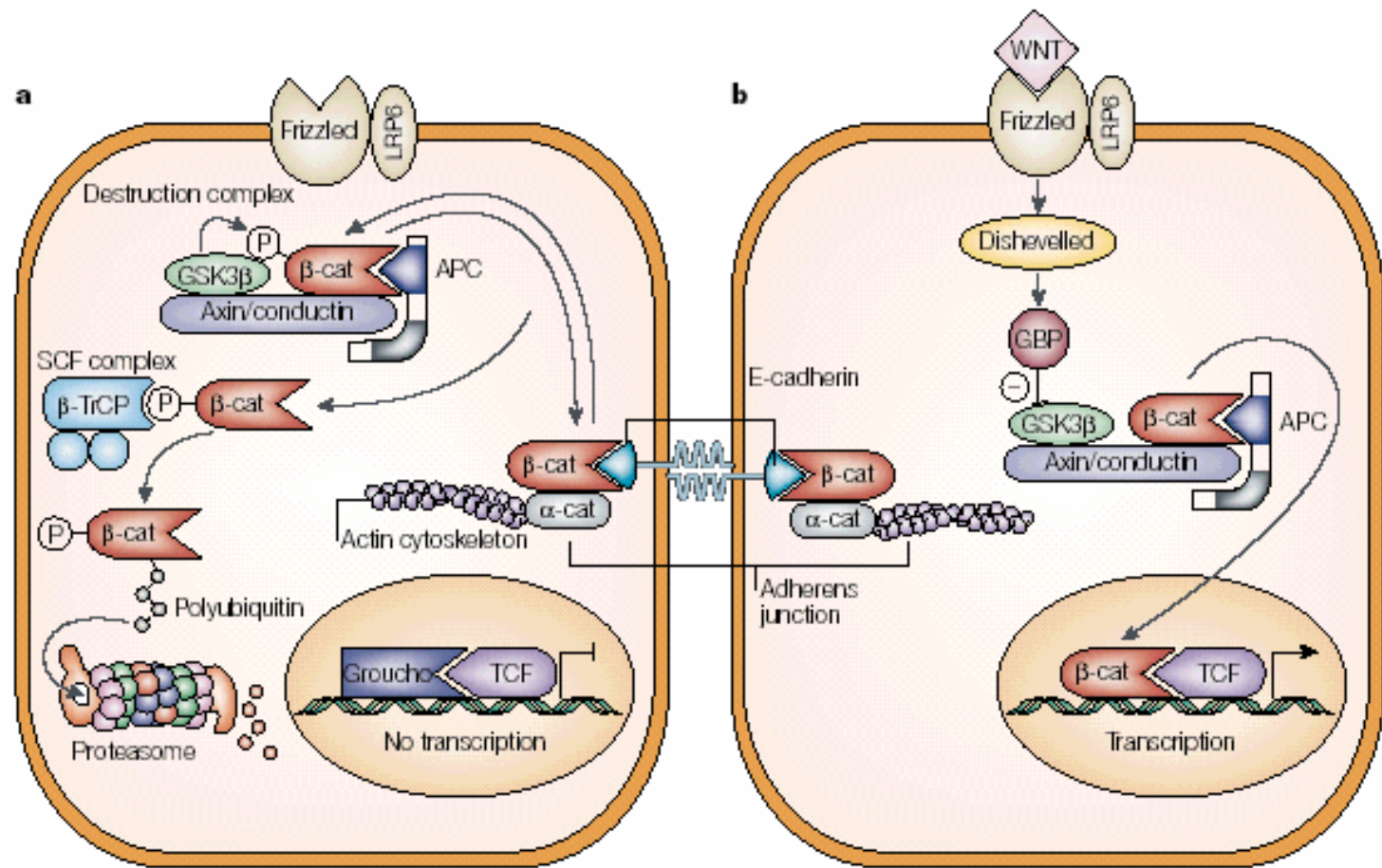
Axin a *APC* fungují jako "lešení" celého komplexu a podmiňují jeho fungování. *Axin* obsahuje vazebná místa pro všechny součásti destrukčního komplexu.

Aktivace β -kateninů

Aktivace dráhy Wnt - tj. vazba glykoproteinu **Wnt-1** na příslušný receptor **Frizzled** (ale např. i aktivace **EGFR** a dalších) vede k aktivaci proteinu **Dsh** (**disheveled**), který interaguje s destrukčním komplexem a znemožní fosforylaci β -kateninu. Tak se zvyšuje hladina volného β -kateninu. Ten se váže na DNA vazebné proteiny (**Tcf** - „T cell factor“, **Lef** - „lymphoid enhancer factor“) a společně aktivují transkripci svých cílových genů.

K cílovým genům např. **c-myc** a gen pro **cyklin D1**, což vede ke zvýšení buněčné proliferace.

Signální dráha Wnt/ β -katenin



Přebytek volného β -kateninu je degradován, což je zprostředkováno destrukčním komplexem.

Signální dráha Wnt/ β -katenin a nádory

- Ektopická exprese Wnt-1 se podílí na vzniku nádorů prsu u myši.
- Mutace APC znemožňující vazbu APC na β -katenin nebo vazbu APC na axin způsobují konstitutivní aktivaci β -kateninu.
- Mutace APC patří k nejčasnějším genetickým změnám při vývoji kolorektálních karcinomů (i vrozené mutace), dávají buňkám růstovou výhodu.
- Mutace axinu, které znemožňují vazbu axinu na β -katenin, byly nalezeny u některých hepatocelulárních nádorů.

Signální dráha Wnt/ β -katenin a nádory

- Mutace β -kateninu buď odstraňují serin nebo mění serin na jinou aminokyselinu, což vede ke zvýšení transkripční aktivity a k necitlivosti k APC zprostředkovanému odbourávání β -kateninu.
- Mutace β -kateninu se vyskytují u kolorektálních nádorů, nikdy ne zároveň s mutacemi APC (zákon exkluzivity).

Šest získaných vlastností maligního nádoru

získaná schopnost

příklad



Soběstačnost v produkci růstových signálů

aktivace *H-ras*

Necitlivost k signálům zastavujícím b.c.

ztráta RB

Poškození apoptózy

produkce IGF

Neomezený replikační potenciál

aktivace telomerázy

Posílení angiogeneze

produkce VEGF

Tvorba metastáz

inaktivace E-kadherinu

Nestabilita genomu

Genetická nestabilita nádorů

- Nádory vznikají postupnou akumulací genetických (a epigenetických) změn genů, které řídí buněčné dělení, buněčnou smrt a další důležité procesy v buňce.
- Z výpočtu, který vycházel ze známé mutační rychlosti v somatických buňkách (10^{-7} na gen na generaci buněk), se zdálo, že k takové akumulaci mutací nemůže během lidského života dojít. Jakým mechanismem dochází k této akumulaci?

Genetická nestabilita nádorů

- K akumulaci stačí normální rychlost mutací ve spojení s vlnami klonální expanze, které mohou být způsobeny pozitivní selekcí buněk "prenádorových".
- Akumulace všech nutných mutací umožněna genetickou nestabilitou (tzv. „mutator hypothesis“). Nestabilita je záležitost **rychlosti**, s jakou k mutacím dochází, existence mutací sama o sobě neposkytuje žádnou informaci o tom, s jakou rychlostí se objevila.

Většina nádorů je geneticky nestabilních..

Typy genetických změn v nádorech

1. Menší změny v sekvenci DNA - missense mutace, menší delece a inserce
2. Změny v počtu chromozomů - ztráty případně zisky celých chromozomů
3. Chromozomální translokace - fúze částí odlišných chromozomů nebo normálně nesouvisejících částí téhož chromozomu
4. Amplifikace genů

Ke genetické nestabilitě dochází na více úrovních.

Nestabilita v sekvenci DNA

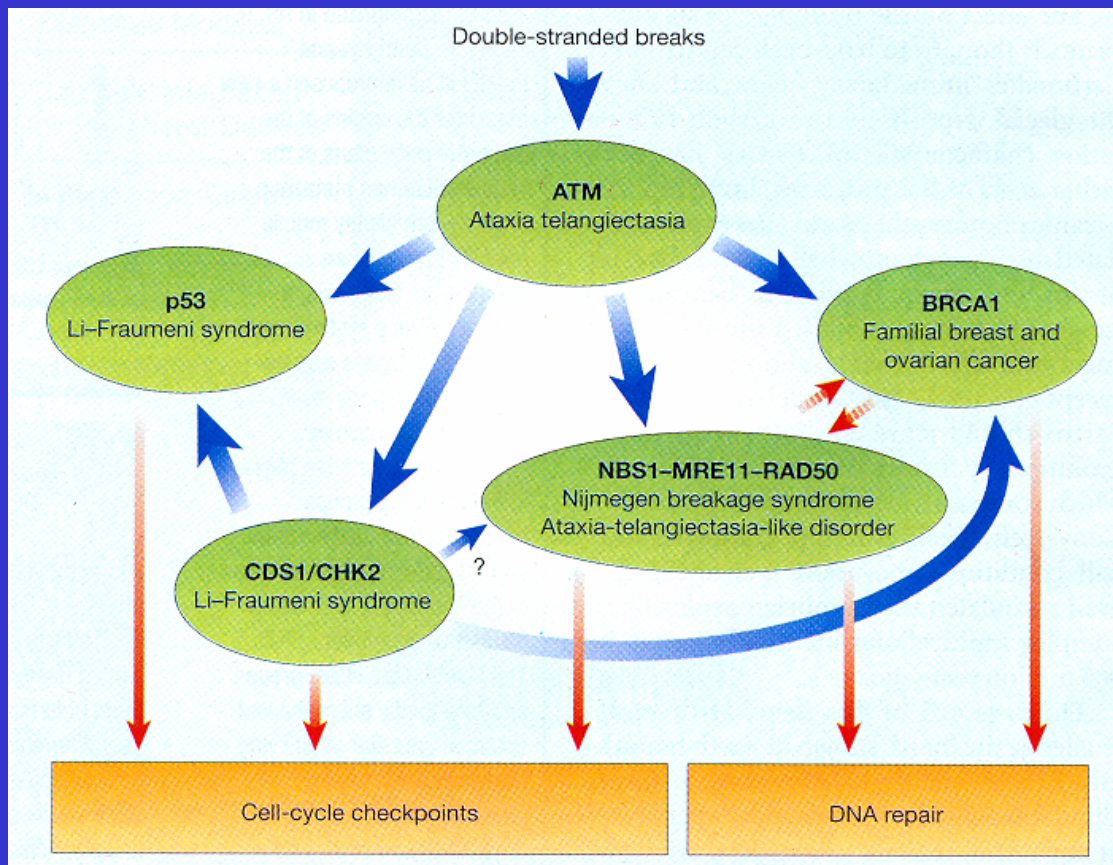
1. Nukleotidová excizní oprava („nucleotide-excision repair“ - **NER**) - s ní spojená nestabilita („NER-associated instability“ - **NIN**); *Xeroderma pigmentosum* (některý ze 7 genů: **XP-A** až **XP-G**).
2. Oprava špatného párování („mismatch repair“ - **MMR**) - s ní spojená mikrosatelitová nestabilita (**MIN**); dědičný nepolypózní kolorektální karcinom - **HNPCC** - *Lynchův syndrom* (některý z genů **MSH2**, **MLH1**, **PMS1**, **PMS2**, **MSH6**).



Figure 12-25 The Biology of Cancer (© Garland Science 2007)

Pacient s *Xeroderma pigmentosum*

Nestabilita v důsledku nedostatečných oprav dvouřetězcových zlomů DNA



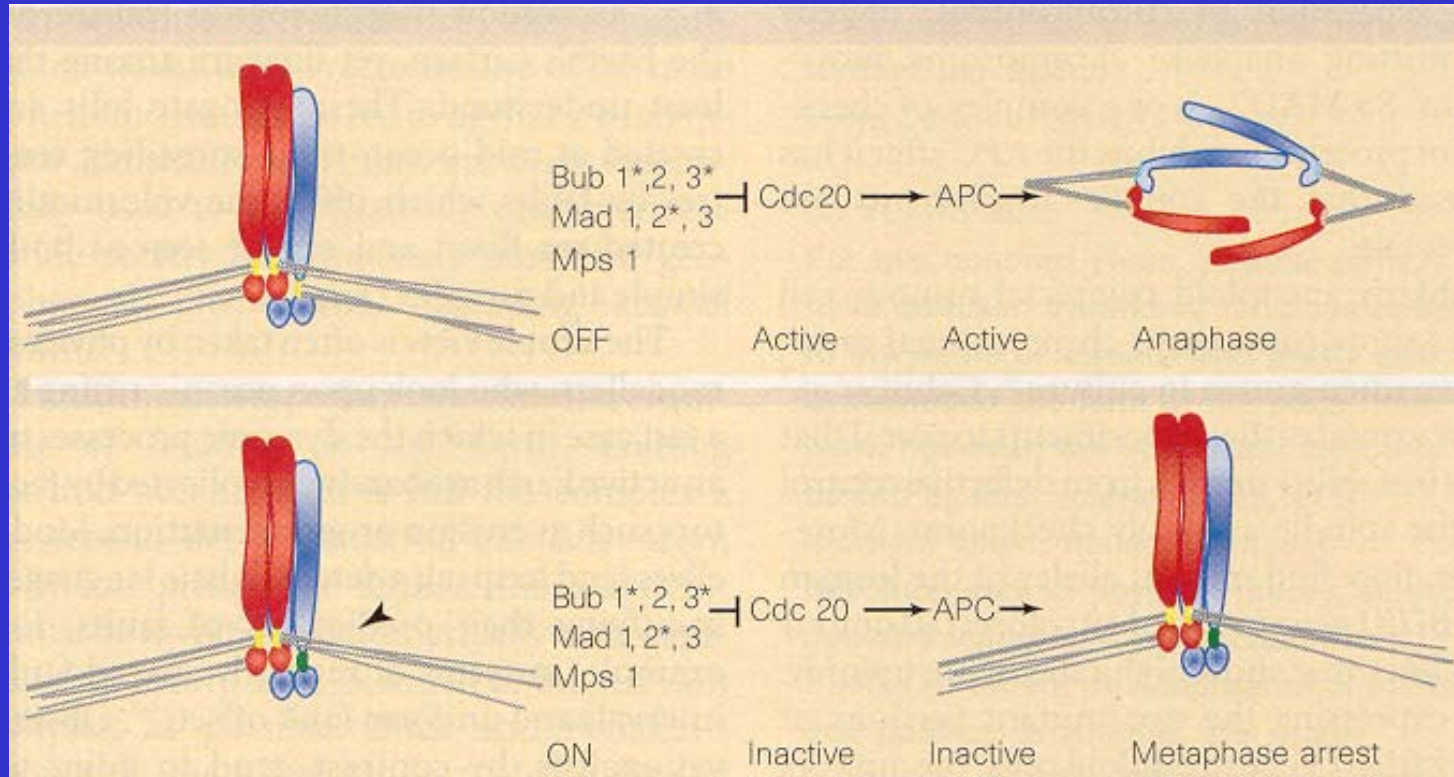
modré šipky:
fosforylace

Tyto proteiny udržují integritu genomu, jejich mutace predisponují k vývoji nádorů.

Nestabilita v počtu chromozomů (CIN)

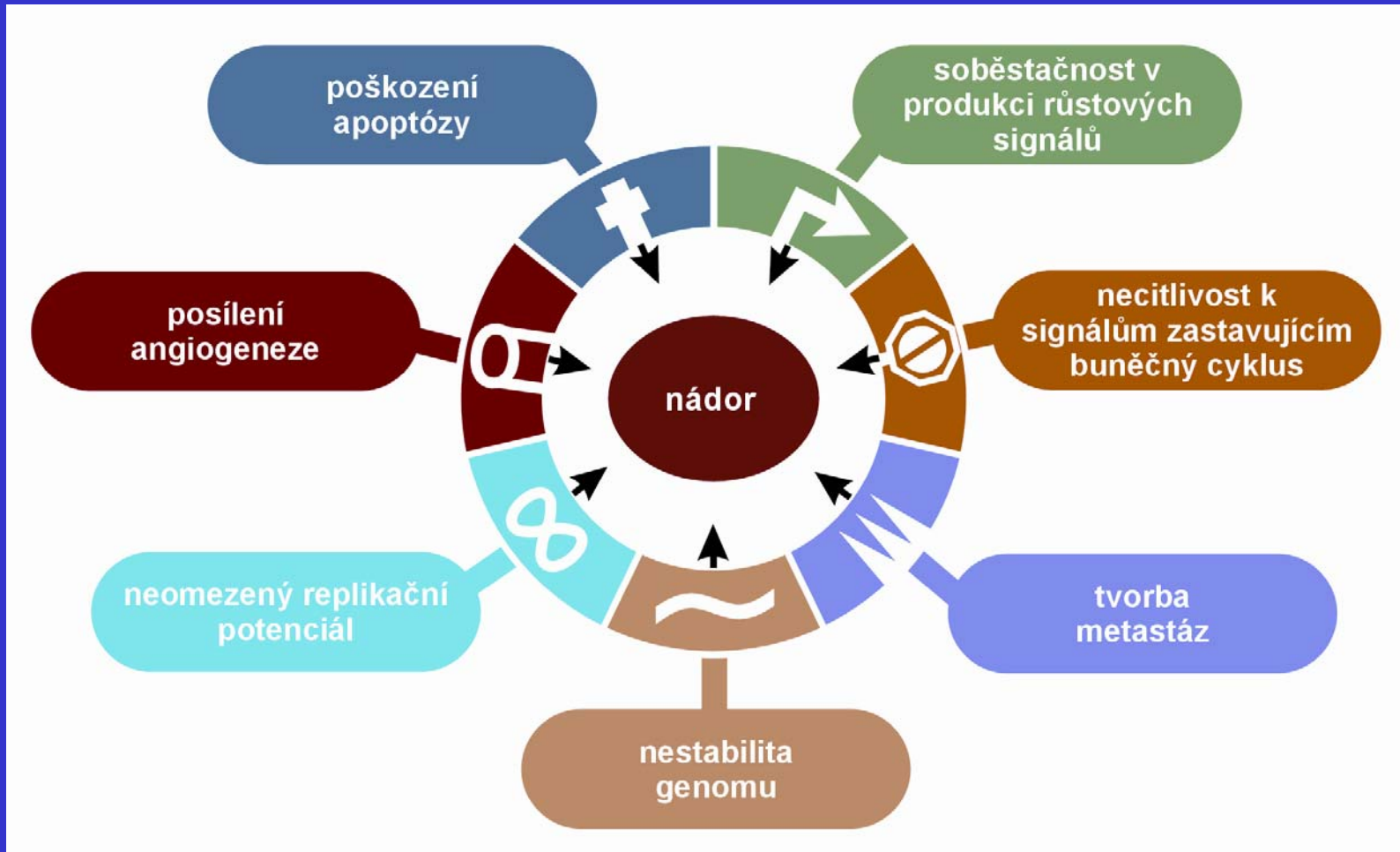
- Ve srovnání s NIN a MIN jsou ztráty nebo zmnožení celých chromozomů mnohem běžnější a vyskytují se téměř u většiny nádorů - např. 85% kolorektálních nádorů je vysoce aneuploidních.
- Souvisí s poruchami kontrolního bodu buněčného cyklu/mitózy: kontrola mitotického vřeténka („spindle check-point“) zajišťuje, aby se sesterské chromatidy nerozcházely dříve, než jsou všechny chromozomy správně uspořádány kolem mitotického vřeténka.

Kontrola mitotického vřeténka



- Jak je monitorováno sestavování vřeténka? Na nesprávné sestavení vřeténka reagují proteiny typu **Bub** a **Mad** a nedovolí aktivaci **APC/C** (**kohezin**, **sekarin**, **separin**).

Sedm typických znaků nádorových buněk



Familiální adenomatózní polypoza - 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.
- Pacienti s FAP mají zvýšené riziko thyroidních nádorů, nádorů tenkého střeva, žaludku a mozku.

Familiální adenomatózní polypoza

- FAP je spojena s vrozenými mutacemi genu APC.
- Ten je lokalizován v oblasti 5q21.
- Během kancerogeneze musí být inaktivovány obě kopie genu *APC* (\Leftrightarrow 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.

Familiální adenomatózní polypoza

Střevní stěna

pacienta s FAP

zdravého jedince

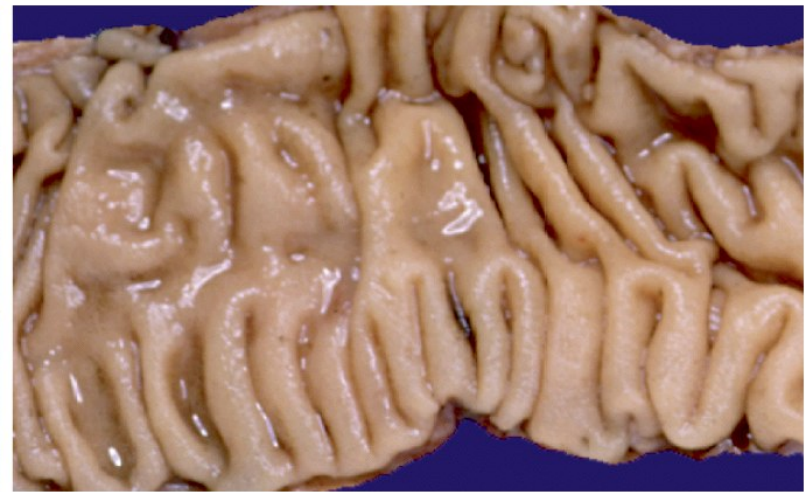
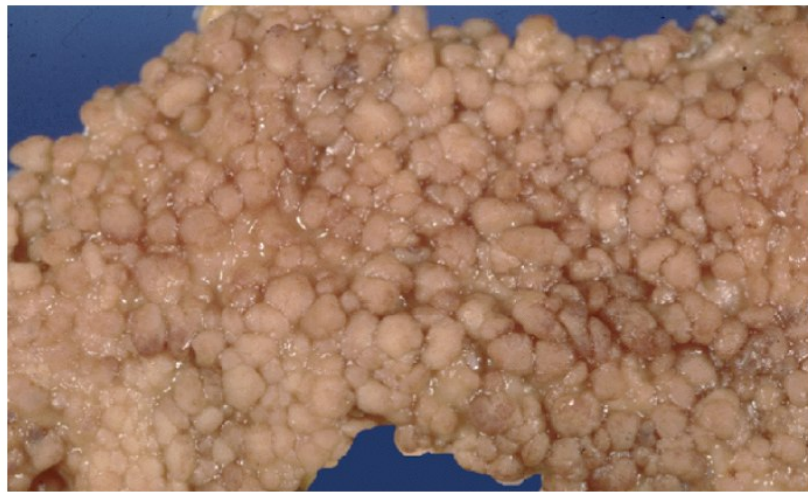
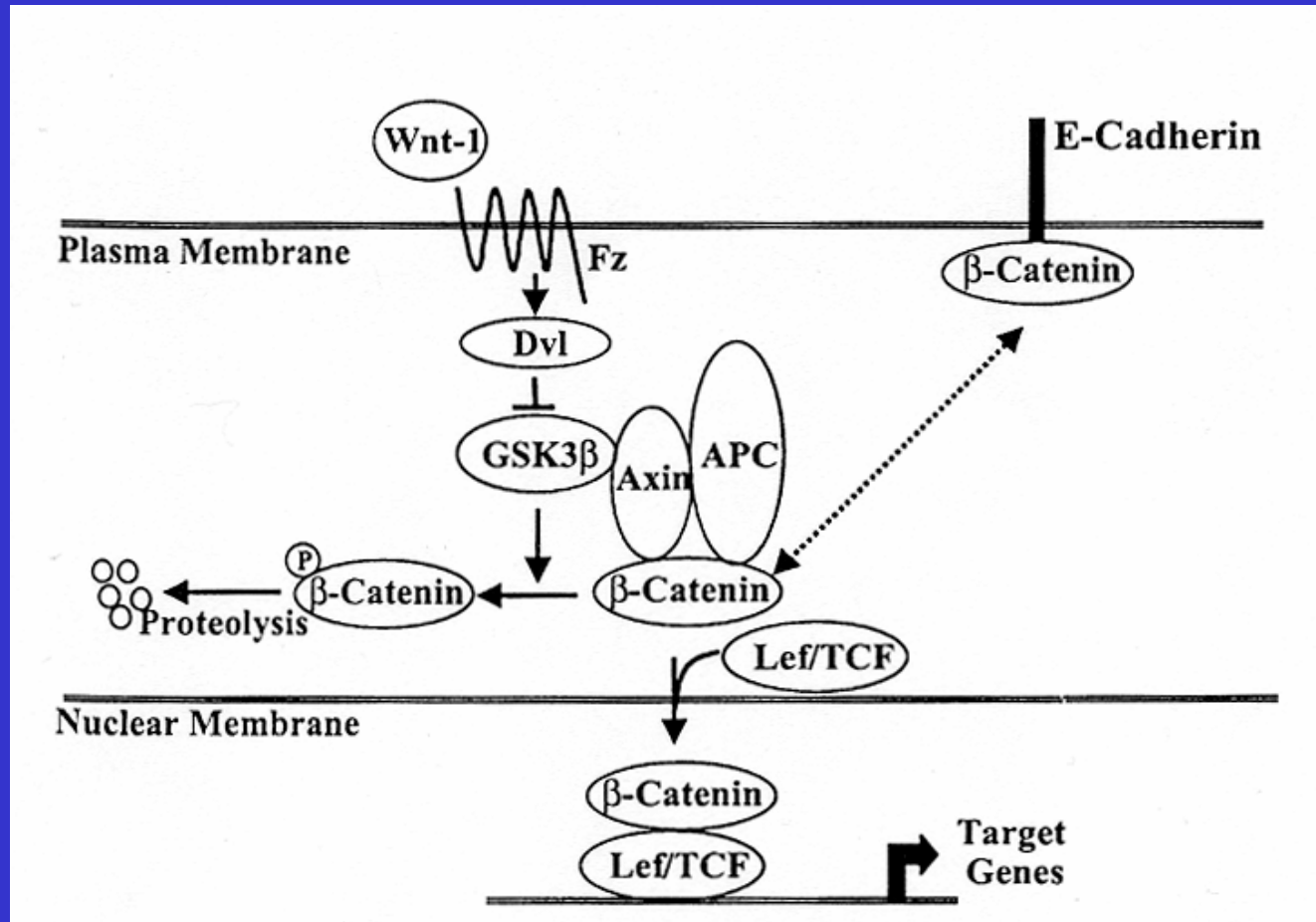


Figure 7-22 The Biology of Cancer (© Garland Science 2007)

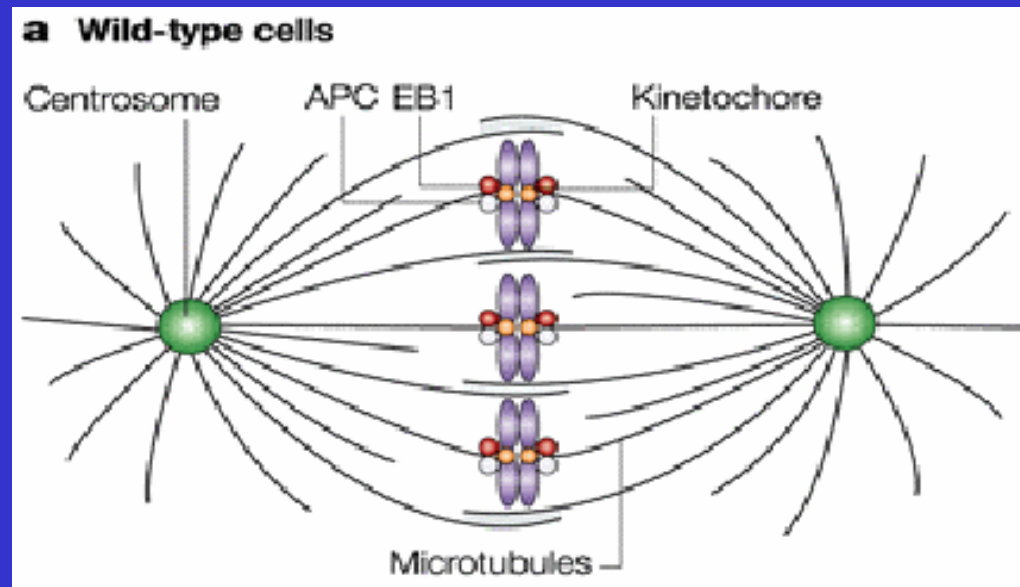
Dvojitá úloha proteinu APC v buňce:

A. Regulace hladiny volného β -kateninu



Dvojitá úloha proteinu APC v buňce:

B. účast na tvorbě mitotického vřeténka



APC je lokalizováno na kinetochorech metafazických chromozomů. Důsledkem mutace APC je poškození mitotického vřeténka a tím zvýšení chromozomální genetické nestability.

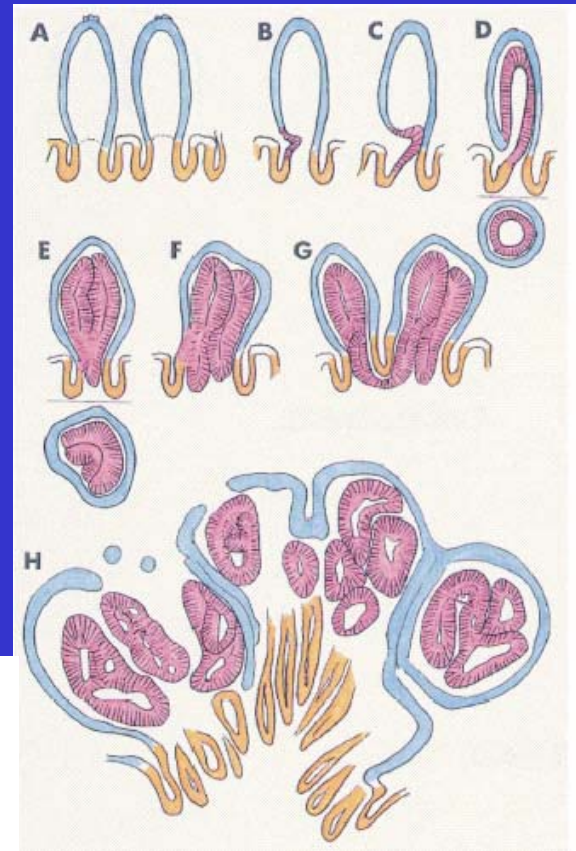
Dvojitá úloha APC při vývoji CRC

- APC se zřejmě uplatňuje jak při iniciaci vývoje nádoru (v důsledku selektivní výhody získané aktivací Wnt/ β -katenin dráhy), tak také v pozdějších fázích vývoje nádoru tím, že je příčinou chromozomální nestability.
- Mutace APC představuje nejčastější první krok v kancerogenezi kolorektálního karcinomu

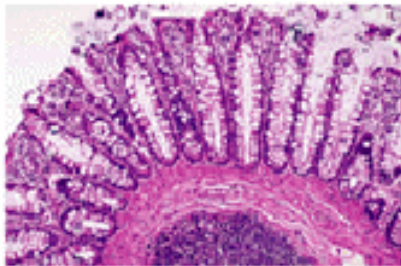
Vývoj kolorektálního karcinomu

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

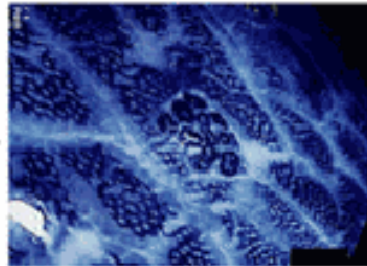
- A. Normální střevní epitel: zárodečné buňky krypt, diferencované buňky klků
B. - C. vývoj polypu: adenomatózní tkáň
D. - F. mikroadenomy



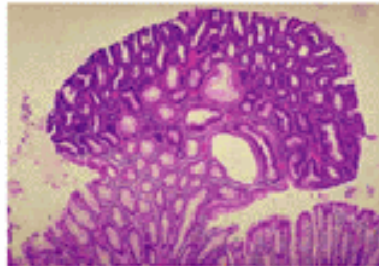
Intestinal epithelial crypts



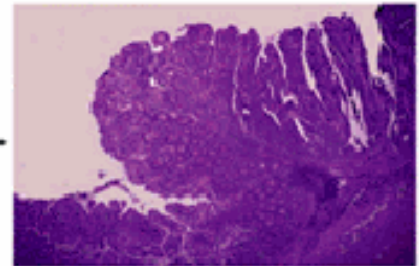
Aberrant crypt focus



Adenoma



Carcinoma



Vývoj kolorektálního karcinomu

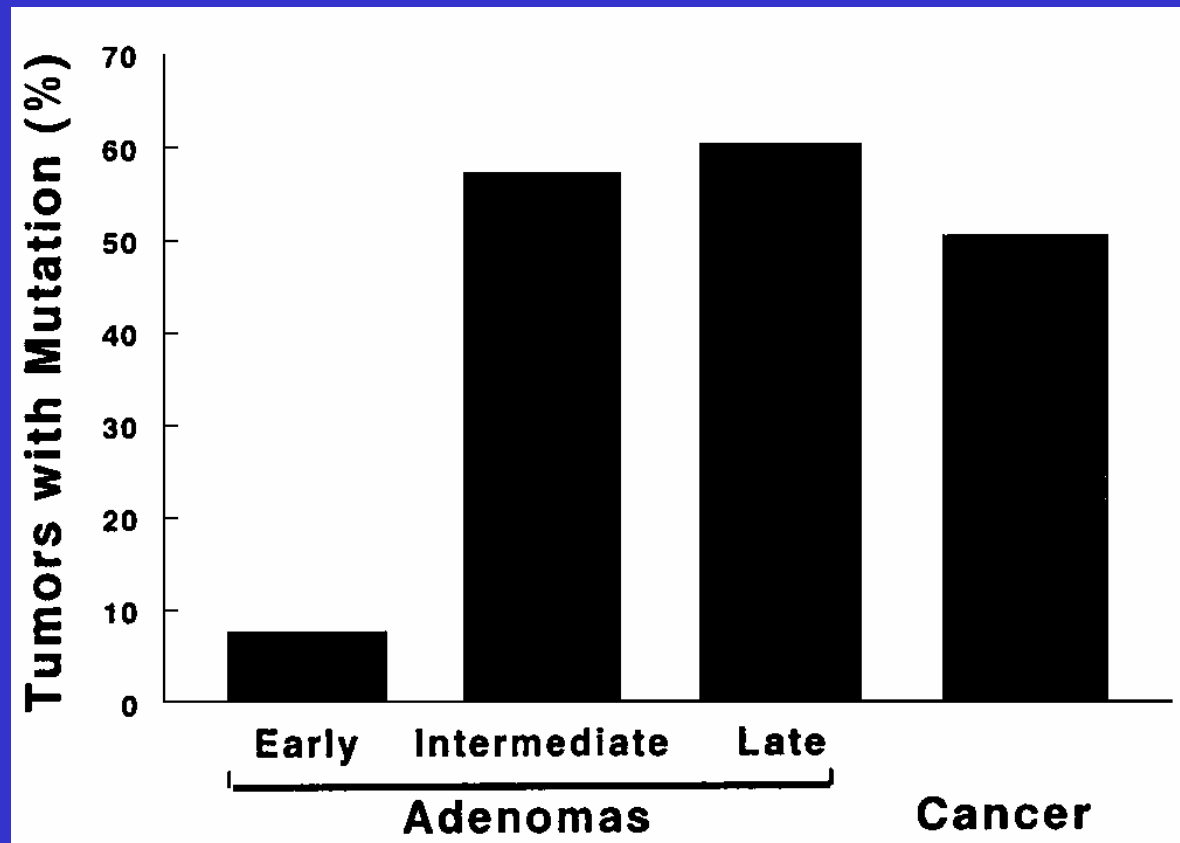
Kolorektální karcinomy představují výborný model pro studium kancerogeneze:

- 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 morfologií jednotlivých stadií a genetickými 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.
- ⇒ mutace *ras* se typicky objevují při progresi adenomů

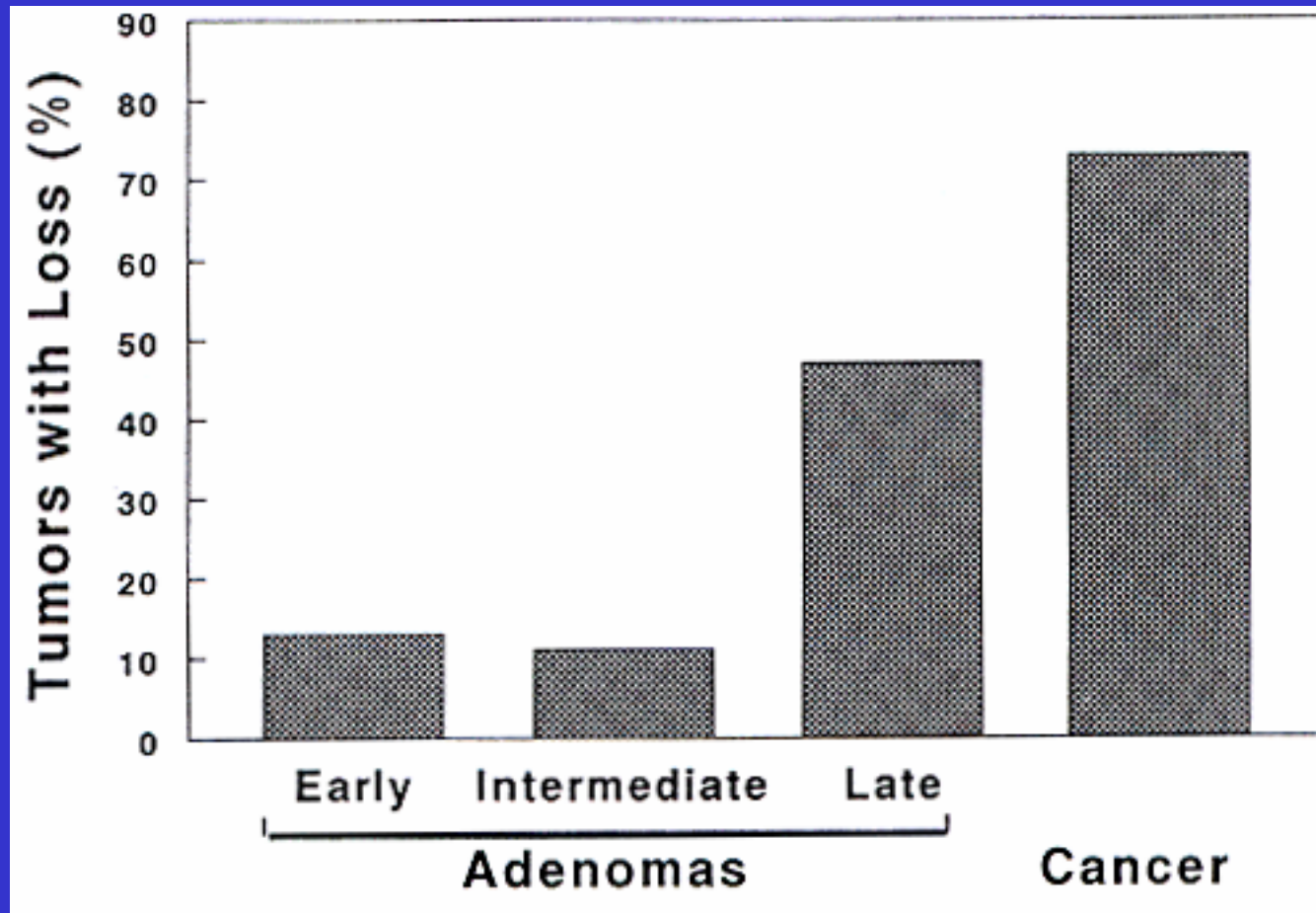
Frekvence mutací ras u kolorektálních karcinomů



Další stadia vývoje kolorektálního karcinomu - „LOH“ 18q

- Delece oblasti 18q detekovány u 50% velkých adenomů a 70% karcinomů.
- Na chromozomu 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

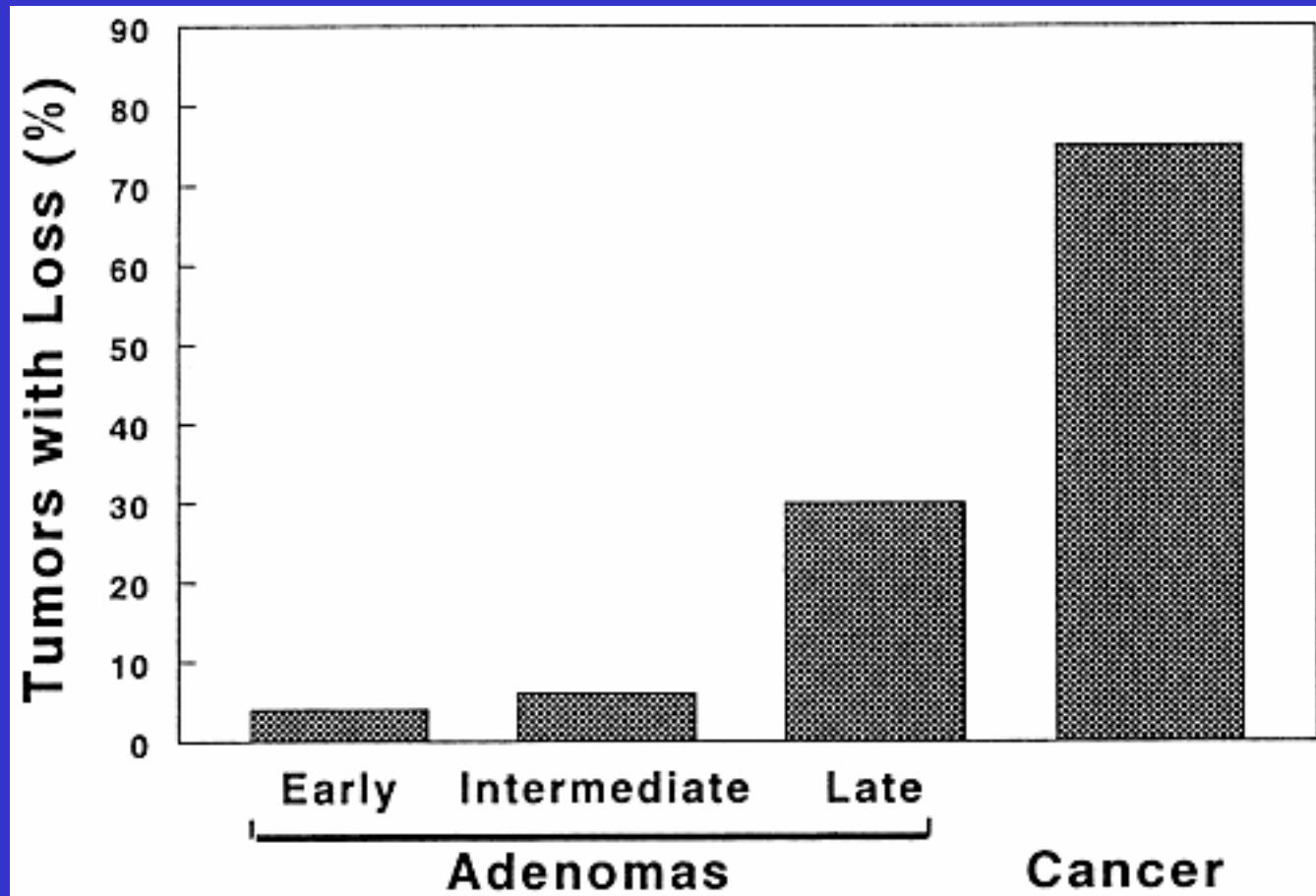


Další stadia vývoje kolorektálního karcinomu - inaktivace p53

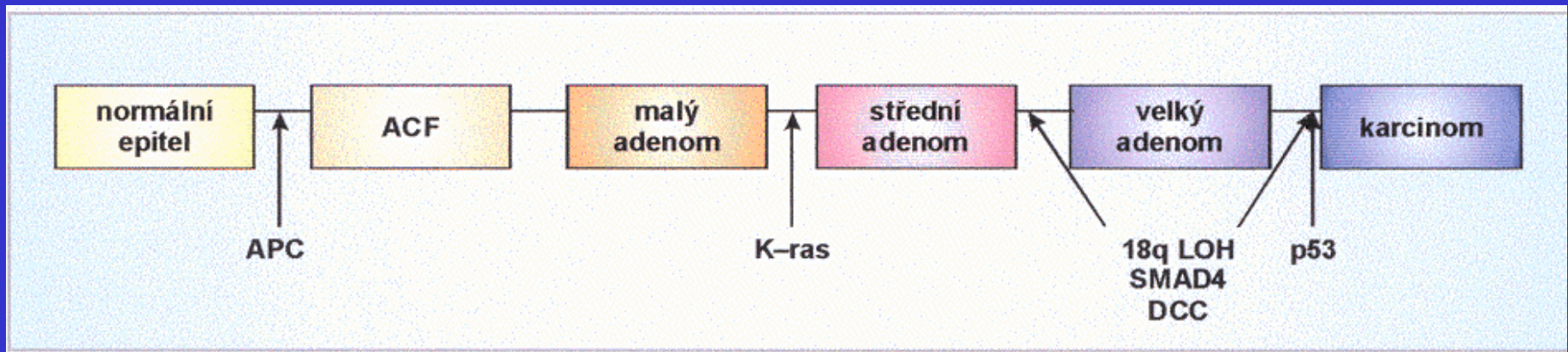
- Ztráta 17p je detekována u 75% kolorektálních karcinomů.
- Ztráta 17p je jen vzácně detekována u kolorektálních adenomů.

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

Frekvence mutací p53 u kolorektálních karcinomů



Vývoj kolorektálního karcinomu: model mnohostupňové kancerogeneze



Děkuji za pozornost !

