

Speciální seminář z biologie nádorů

Prof. RNDr. Jana Šmardová, CSc.

FN Brno, PŘF a LF MU Brno

MUDr. Pavel Fabian, Ph.D.

MOÚ Brno, LF a PŘF Brno

2013

Tento projekt je spolufinancován Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky.



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Program semináře

- 24.9.2012
- 8.10.2012
- 22.10.2012
- 5.11.2012
- 19.11.2012
- 3.12.2012

1. Monoklonální původ nádorů
2. Dva přístupy ke studiu nádorů
3. Klasifikace nádorů
4. Buněčná proliferace
5. Apoptóza, angiogeneze, metastázování
6. Metastázy: nejčastější příčina úmrtí
7. p53: příběh mutace R337H

Seminář 1

Monoklonální původ nádorů

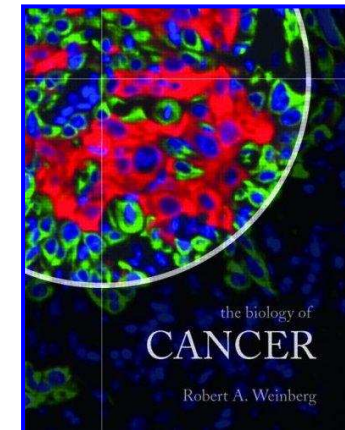
Seminář 1 - osnova

1. Monoklonální původ nádorů
2. Alternativní neovaskularizace
3. Heterogenita nádorů
4. Akumulace mutací během vývoje nádorů
5. Kancerizace pole

Robert Alan Weinberg: Jediná odrodilá buňka

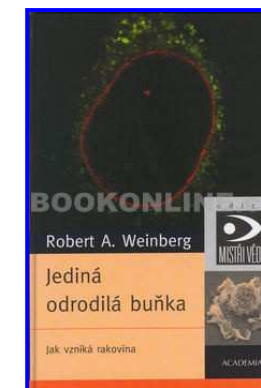


Robert Allan Weinberg: „The
Biology of Cancer“ GS Garland
Science, 2007

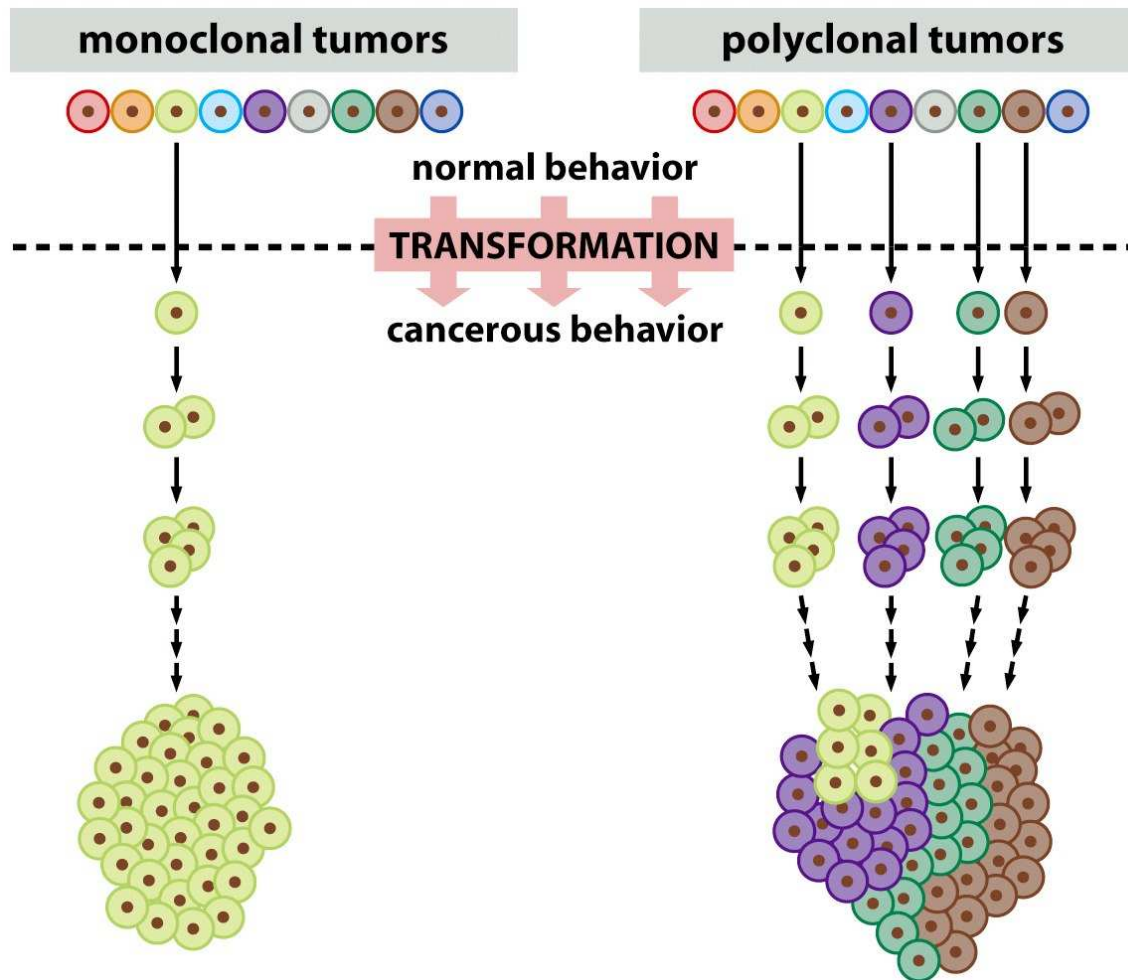


Robert Allan Weinberg: „Jediná
odrodilá buňka. Jak vzniká
rakovina.“

Academia, 2003 (1998)



(1) Jsou nádory monoklonální nebo polyklonální?



Jsou nádory monoklonální nebo polyklonální?

- Klonalitu lze studovat na základě sledování nějakého unikátního genetického/epigenetického markeru (např. Barrovo tělísko) ⇒ tak lze prokázat, že buněčná populace v nádoru je monoklonální
- X Na počátku mohl být vývoj polyklonální, ale přerostla nejúspěšnější buněčná populace.
- X Během vývoje narůstá genetická nestabilita a tedy i heterogenita.
- Nicméně obecný konsensus říká, že nádory jsou většinou **monoklonální** a jejich vývoj začíná **jedinou odrodilou buňkou**.

Jak studovat monoklonalitu/ polyklonalitu nádorů?

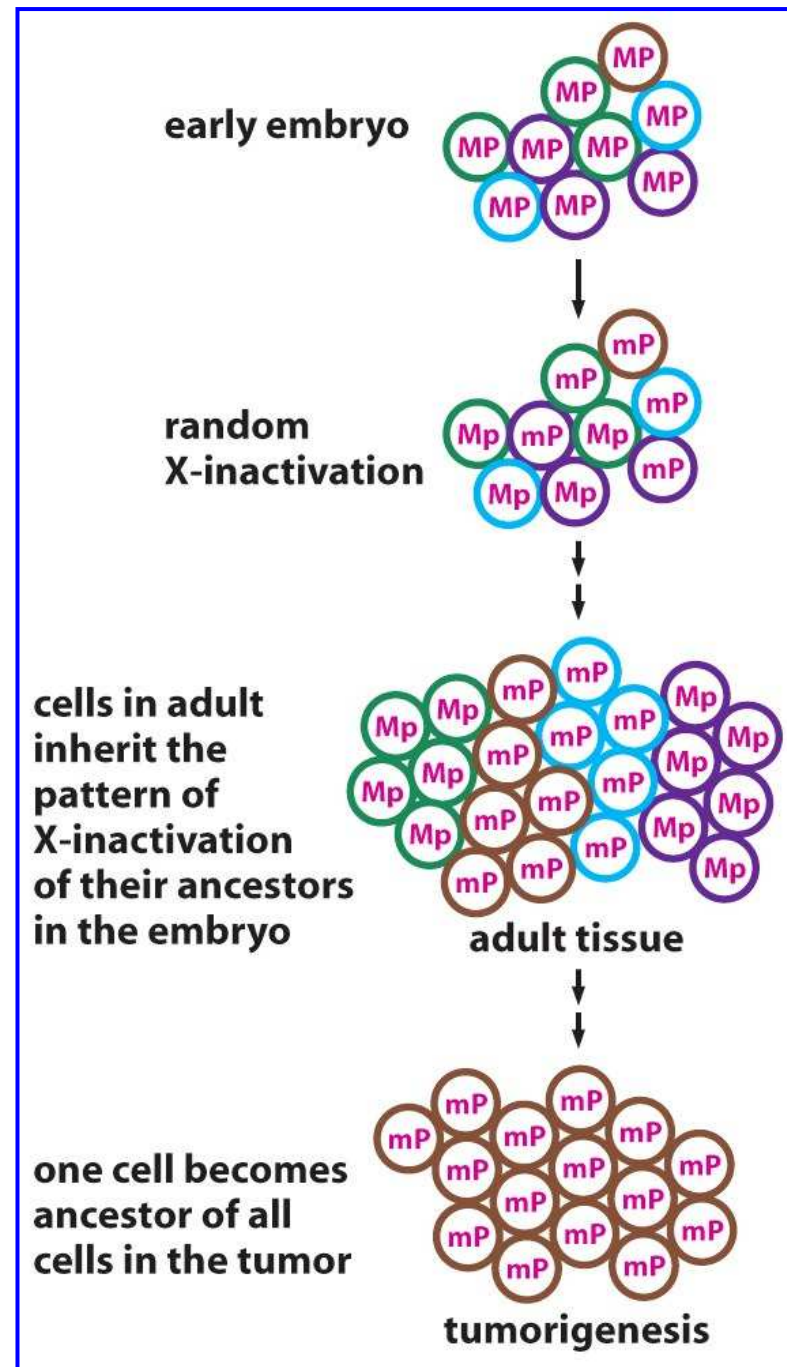
- Na základě sledování nějakého unikátního genetického/epigenetického/biochemického markeru.

například **Barrovo tělísko**

- V somatických buňkách samičího embrya dochází k nahodilé inaktivaci chromozomu X. Karyotypicky se projeví umlčený kondenzovaný chromozom jako malé, tzv. Barrovo tělísko.

Inaktivace chromozomu X

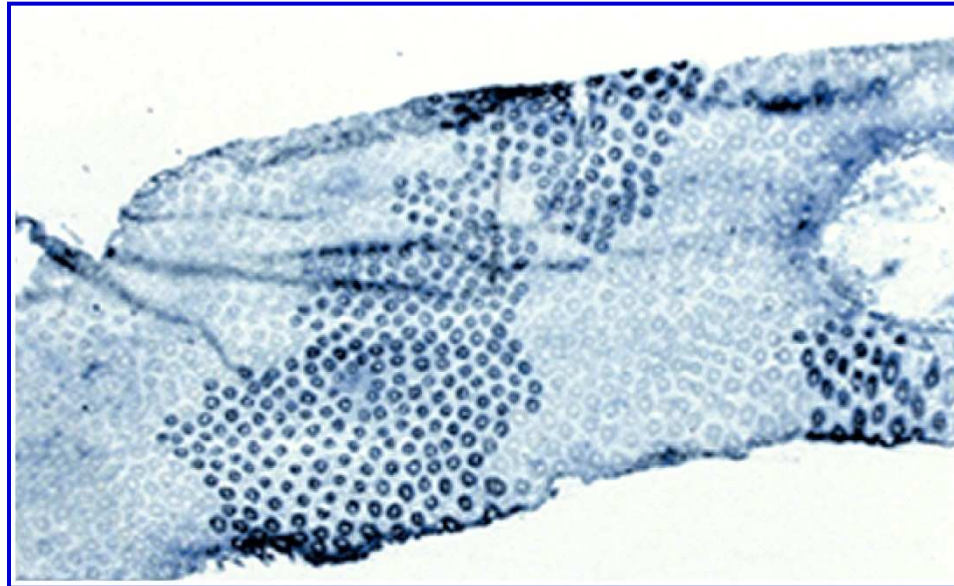
- Na počátku vývoje samičího embrya jsou oba chromozomy X (mateřský i otcovský) stejně aktivní.
- Brzy během vývoje dochází k nahodilé inaktivaci jednoho z nich, což způsobí umlčení téměř všech jeho genů. Všichni „potomci“ (celá následná linie) těchto buněk dědí tento znak.
- Dospělé samičí tělo je tvořeno klony buněk, které jsou buď **Mp** (inaktivace paternálního X) nebo **mP** (inaktivace maternálního X).



Studium monoklonality/ polyklonality nádorů pomocí Barrova tělíška

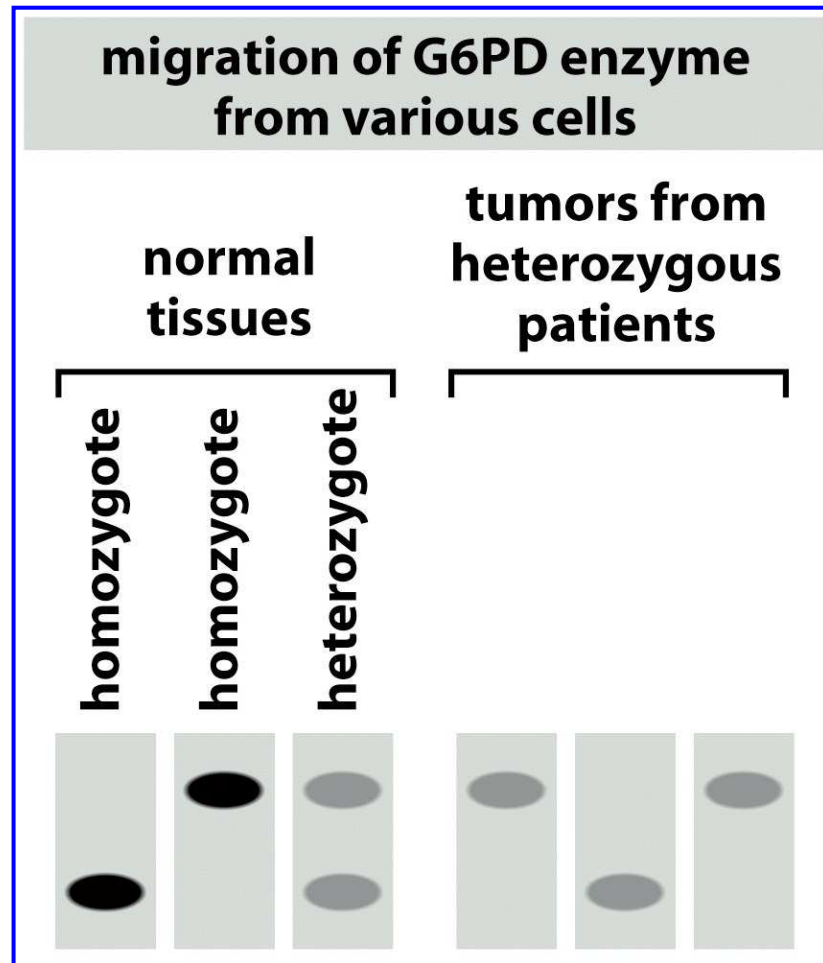
- Téměř všechny geny na inaktivovaném chromozomu jsou transkripčně reprimované.
- Na chromozomu X je lokalizován gen pro **glukoso-6-fosfát dehydrogenázu (G6PD)**. Více než 30% afro-amerických žen je v tomto lokusu heterozygotních - mají dvě různé alely tohoto genu. Dvě formy enzymu jsou rozlišitelné buď pomocí škrobové gelové elektroforézy nebo díky tomu, že jedna forma je odolnější vůči teplotní inaktivaci.
- Díky inaktivaci X exprimuje každá buňka žen - heterozygotek jen jednu alelu genu G6PD.

Rozlišení dvou variant glukoso-6-fosfát dehydrogenázy



- Opatrné zahřátí tkáně odliší oblasti (klony) buněk, které exprimují teplotně rezistentní, stále aktivní formu enzymu G6PD (tmavě modré tečky), od oblastí buněk exprimujících teplem inaktivovaný enzym.
- Buňky jednotlivých oblastí jsou potomstvem embryonální buňky, ve které došlo k inaktivaci jednoho chromozomu X.

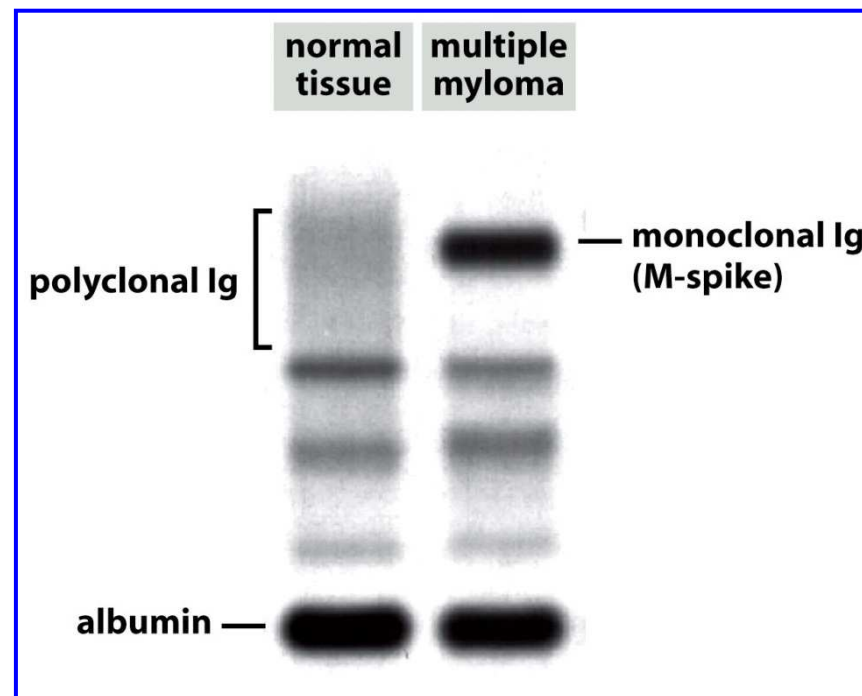
Rozlišení dvou variant glukoso-6-fosfát dehydrogenázy



- Varianty G6PD mají různou elektroforetickou pohyblivost ve škrobovém gelu.
- **1965** - analýza leiomyomů (benigní nádory děložní stěny) afro-amerických žen/heterozygotek: každý nádor nesl buď jednu nebo druhou variantu G6PD.
⇒ Každý nádor je velmi pravděpodobně klonem buněk pocházejících z **jediné** („odrodilé“) buňky!

Jak studovat monoklonalitu/ polyklonalitu nádorů?

- Myelomy (nádory odvozené z prekurzorů B-buněk produkujících protilátky. Normální populace těchto buněk sestává z tisíců až milionů odlišných subpopulací exprimujících odlišné (= s odlišnými přestavbami genových segmentů) **imunoglobuliny**.
- Myelomy jsou tvořeny buňkami s totožnou přestavbou genových segmentů

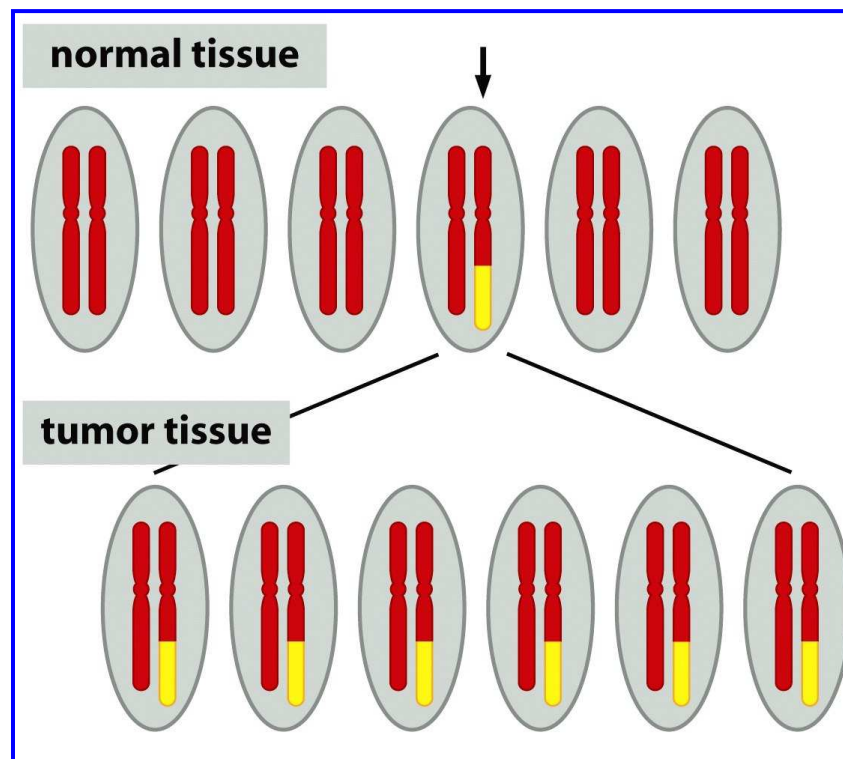


⇒ Každý nádor je velmi pravděpodobně klonem buněk pocházejících z **jediné** („odrodilé“) buňky!

Jak studovat monoklonalitu/ polyklonalitu nádorů?

- Sledování **chromozomálních aberací**.
- Někdy lze nějakou velmi specifickou chromozomální abnormalitu - následek **vzácné nahodilé** genetické aberace - sledovat ve všech buňkách daného nádoru.

⇒ Každý nádor je velmi pravděpodobně klonem buněk pocházejících z **jediné** („odrodilé“) buňky!



Mixed Epithelial and Stromal Tumors of the Kidney: Evidence for a Single Cell of Origin With Capacity for Epithelial and Stromal Differentiation

Jennifer Bup-Jong Kum, MD, David J. Grignon, MD,* Mingsheng Wang, MD,*
Ming Zhou, MD, PhD,† Rodolfo Montironi, MD,‡ Steven S. Shen, MD, PhD,§
Shaobo Zhang, MD,* Antonio Lopez-Beltran, MD,|| John N. Eble, MD,*
and Liang Cheng, MD**

Am J Surg Pathol • Volume 35, Number 8, August 2011

Bup-Jong Kum J. et al., *Am.J.Surg.Pathol.* 2011

Smíšený epiteliální a stromální nádor ledvin (MEST)

- Vzácný nádor ledvin, s výraznou převahou výskytu u žen (pravděpodobně souvislost s hladinou hormonů).
- Nádory převážně benigní, jen vzácně maligní.
- Nádor tvořen jak epiteliálními tak mesenchymálními buňkami. Obecně je přijímáno, že stromální buňky v MEST jsou neoplastické, ale není jednoznačné, zda (1) epiteliální buňky jsou také neoplastické nebo (2) nejsou a jsou ovlivněny stromálními buňkami a hormony.
- Pokud by byly skutečně neoplastické jak stromální tak epiteliální buňky, předpokládalo by to existenci (jediné „odrodilé“) progenitorové buňky s kapacitou duální (mesenchymální a epiteliální) diference.

⇒ analýza monoklonality původu

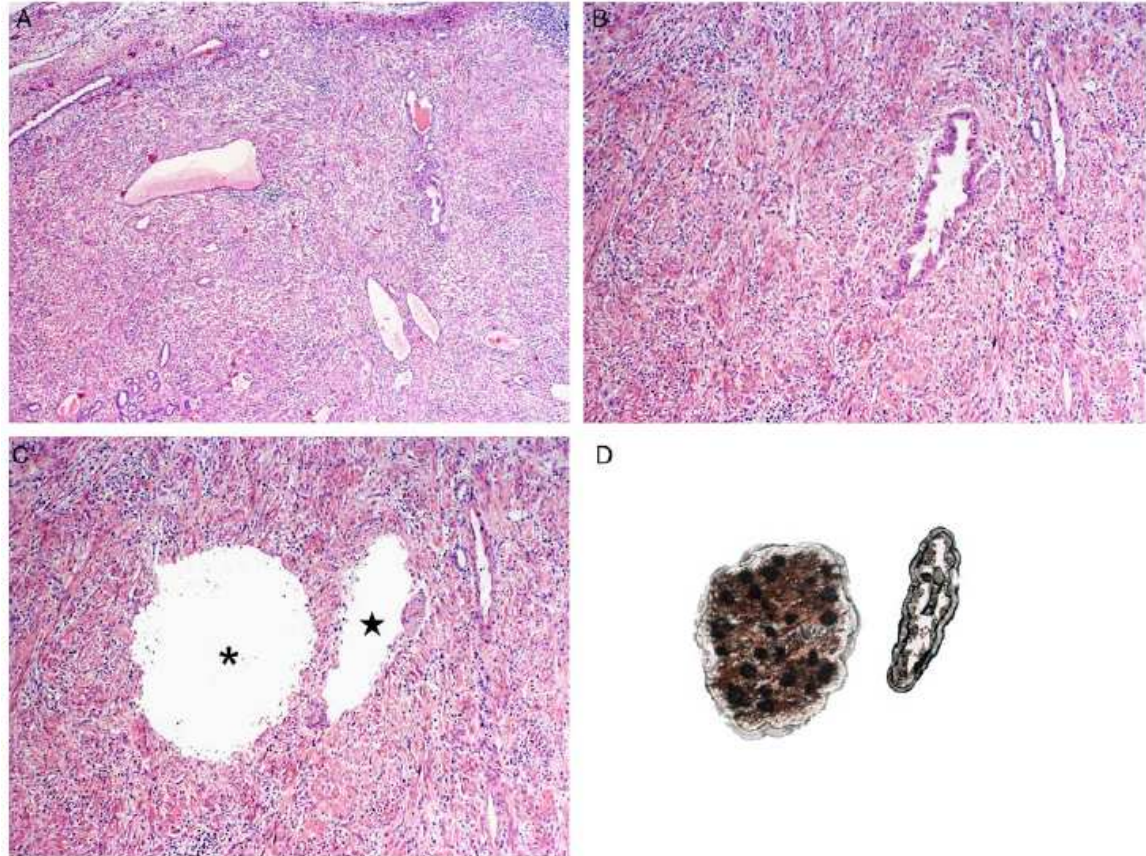
Mixed Epithelial and Stromal Tumors of the Kidney: Evidence for a Single Cell of Origin With Capacity for Epithelial and Stromal Differentiation

Jennifer Bup-Jong Kum, MD, David J. Grignon, MD,* Mingsheng Wang, MD,*
Ming Zhou, MD, PhD,† Rodolfo Montironi, MD,‡ Steven S. Shen, MD, PhD,§
Shaobo Zhang, MD,* Antonio Lopez-Beltran, MD,|| John N. Eble, MD,*
and Liang Cheng, MD**

- 21 žen s MEST, které prodělaly částečnou nebo radikální nefrektomii
- vyšetření inaktivace chromozomu X a genu pro lidský androgenní receptor (*HUMARA*) v lokusu Xq11-12
- tkáňové řezy připravené s formol-parafinových bloků

Příprava vyšetřovaného materiálu

1. **Mikrodisekce** epiteliální (**E**) a stromální (**S**) komponenty MEST a normální (**N**) tkáně z tkáňových řezů připravených z formol-parafinových bloků a obarvených hematoxylinem a eosinem.



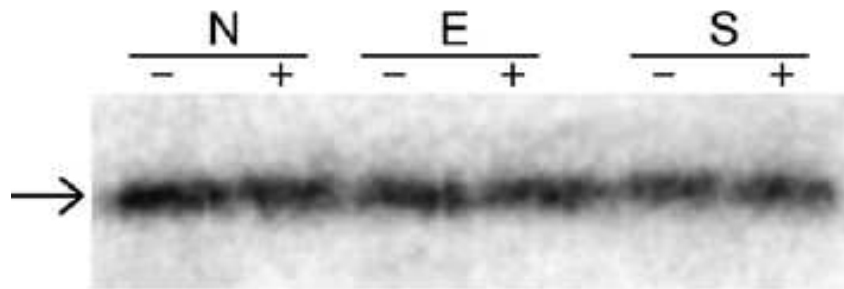
Příprava vyšetřovaného materiálu

1. Mikrodisekce E, S a N tkání
2. Izolace DNA
3. Štěpení restriční endonukleázou *HhaI*, citlivou na metylaci DNA
4. Amplifikace štěpené a neštěpené DNA
5. Elektroforéza DNA

Interpretace výsledků

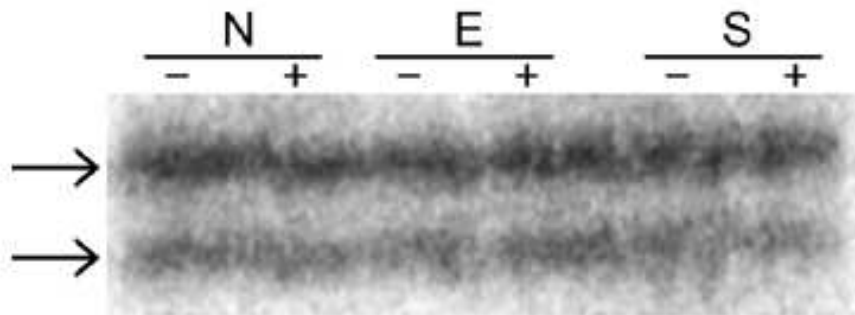
1. Informativní byly vzorky, u kterých v neštěpené kontrole byly dva bandy pro dvě alely genu *HUMARA*
2. V nádorové tkáni byla nenahodilá (tedy klonální) inaktivace chromozomu X prokázána vymizením jednoho bandu ve vzorku štěpeném *HhaI*)
3. Společný progenitor E a S komponenty byl předpokládán tam, kde u E i S komponenty chyběla stejná alela *HUMARA*

Interpretace výsledků



Case 12

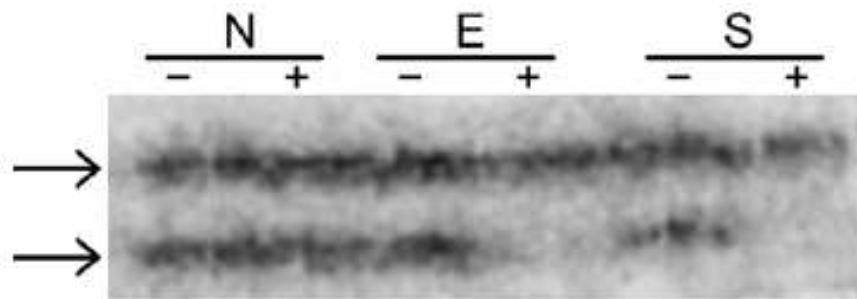
← neinformativní vzorek, pouze 1 alela genu FUMARA v normální tkáni



Case 16

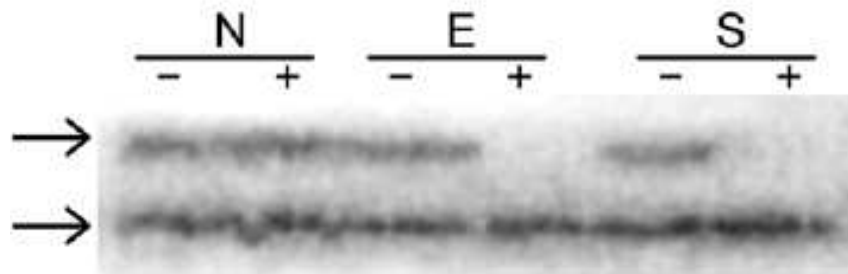
← informativní vzorek, neklonální, dvě alely genu FUMARA ve všech typech tkáně

Interpretace výsledků



Case 2

← převaha „vrchní“ alely genu FUMARA v epiteliální i stromální složce nádoru - klonální změna, společný progenitor



Case 8

← převaha „spodní“ alely genu FUMARA v epiteliální i stromální složce nádoru - klonální změna, společný progenitor

Výsledky

- z 21 případů, **19** bylo informativních
- v **7** případech byla neklonální inaktivace chromozomu X (nekompletní štěpení *HhaI*? kontaminace nenádorovou tkání?)
- ve **12** případech byla detekována klonální inaktivace chromozomu X (tj. přítomnost jen jednoho alelického bandu genu *FUMARA*)
- ve **všech 12 případech** byla shodná inaktivace chromozomu X v epiteliální a stromální složce MEST

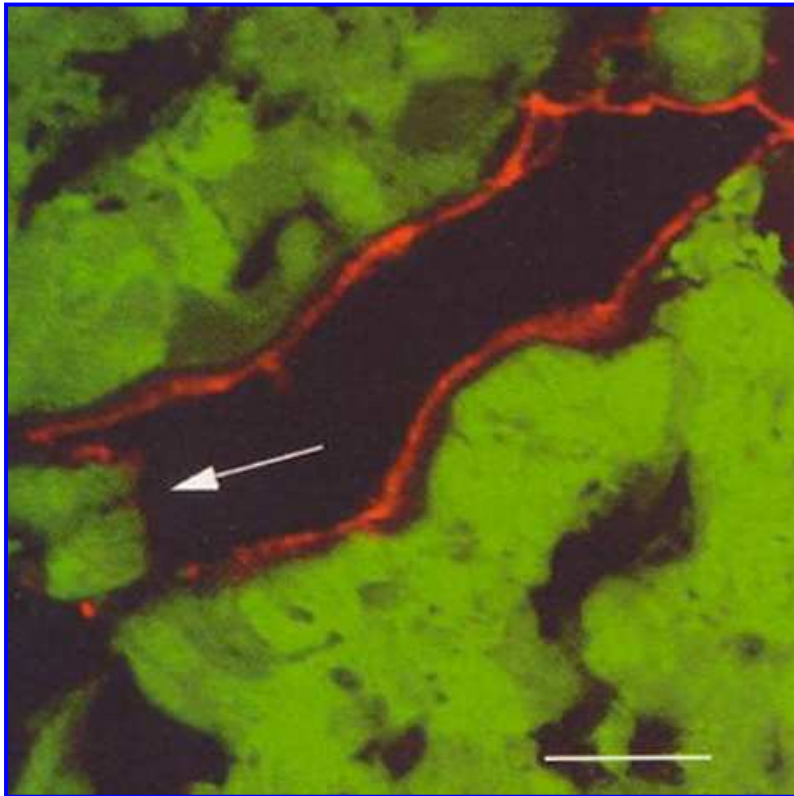
Závěry

1. Silná podpora toho, že neoplastické jsou jak buňky mesenchymální složky, tak buňky epiteliální složky MEST.
2. Silná podpora teorie, že obě složky nádoru - epiteliální i stromální - se vyvinuly ze společné progenitorové („**jediné** odrodilé“) buňky, která měla kapacitu k duální diferenciaci.

(2) Alternativní vaskulogeneze (pseudoangiogeneze)

Z Úvodní přednášky kurzu Molekulární biologie nádoru:

Struktura nádorové vaskulatury



Struktura krevní kapiláry v kolorektálním karcinomu.

Umístění **nádorové buňky** (zelená fluorescence) uvnitř krevní kapiláry (**endoteliální buňky** - červená fluorescence) - tzv. mozaikovitá struktura.

Glioblastoma multiforme (GBM)

GMB

- nej malignější nádor mozku
- velmi rezistentní k intenzivní kombinované terapii
- jeden s nejvíce vaskularizovaných nádorů
- VEGF produkovaný nádorovými buňkami nejvýznamnějším faktorem nádorové angiogeneze

Terapie GMB

- chirurgie, ozařování, temozolomid
- v další linii následuje **bevacizumab**: humanizovaná monoklonální protilátka, která se váže na VEGF a zabraňuje jeho interakci s VEGFRs; u podílu pacientů prodlužuje PFS, ale téměř vůbec OS, všichni pacienti relabují
- podobné výsledky dávají malé inhibitory kinázové domény VEGFR
- Proč nakonec všichni GMB pacienti během anti-angiogenní terapie relabují?

Vaskulatura mozku

Normální vaskulatura

- endoteliální buňky (ECs), pericyty, astrocyty - společně vytvářejí BBB (*blood-brain barrier*)
- základem BBB jsou (1) pevná spojení mezi ECs, znemožňující průchod látek do mozku, a (2) aktivní pumpy

Vaskulatura GBM

- cévy jsou nepravidelné, zamotané, vysoce propustné (i díky vlivu VEGF), mají abnormální endoteliální stěny, nestandardní interakce s pericyty, pozměněnou strukturu bazální membrány...
- porušená BBB, což vede k častým edémům mozku
- nepravidelná vaskulatura s nevyrovnanou BBB navíc ovlivňuje i transport terapeutik do nádoru

Proč nakonec všichni GMB pacienti během anti-angiogenní terapie relabují?

Adaptivní odpověď nádoru

- tranzice k více invazivnímu fenotypu v jednoznačné návaznosti na anti-angiogenní terapii
- potvrzeno i na myších a krysích modelech: inhibice VEGF vede k posílení invazivity

- klíčovým zprostředkovatelem této reakce je tyrozin-protein kinázový receptor **MET** (receptor HGF - *hepatocyte growth factor*): když je inhibována signalizace VEGF, je aktivován MET a to stimuluje invazivitu!
- potenciálně úspěšná terapie: spolu s inhibicí VEGF také inhibice MET

Neovaskularizace GBM

Součást neovaskularizace GBM

- angiogeneze: zprostředkovaná proliferací a migrací ECs
- vaskulogeneze: na jejímž počátku stojí endoteliální prekurzorové buňky (EPCs) z kostní dřeně

- alternativní neovaskularizace:
 - (1) vaskulogenní mimikry (VM)
 - (2) transdiferenciace
- v obou případech jsou zdrojem nových nádorových vlásečnic nádorové buňky, především **GSCs** (*glioma stem-like cells*)

Vaskulogenní mimikry

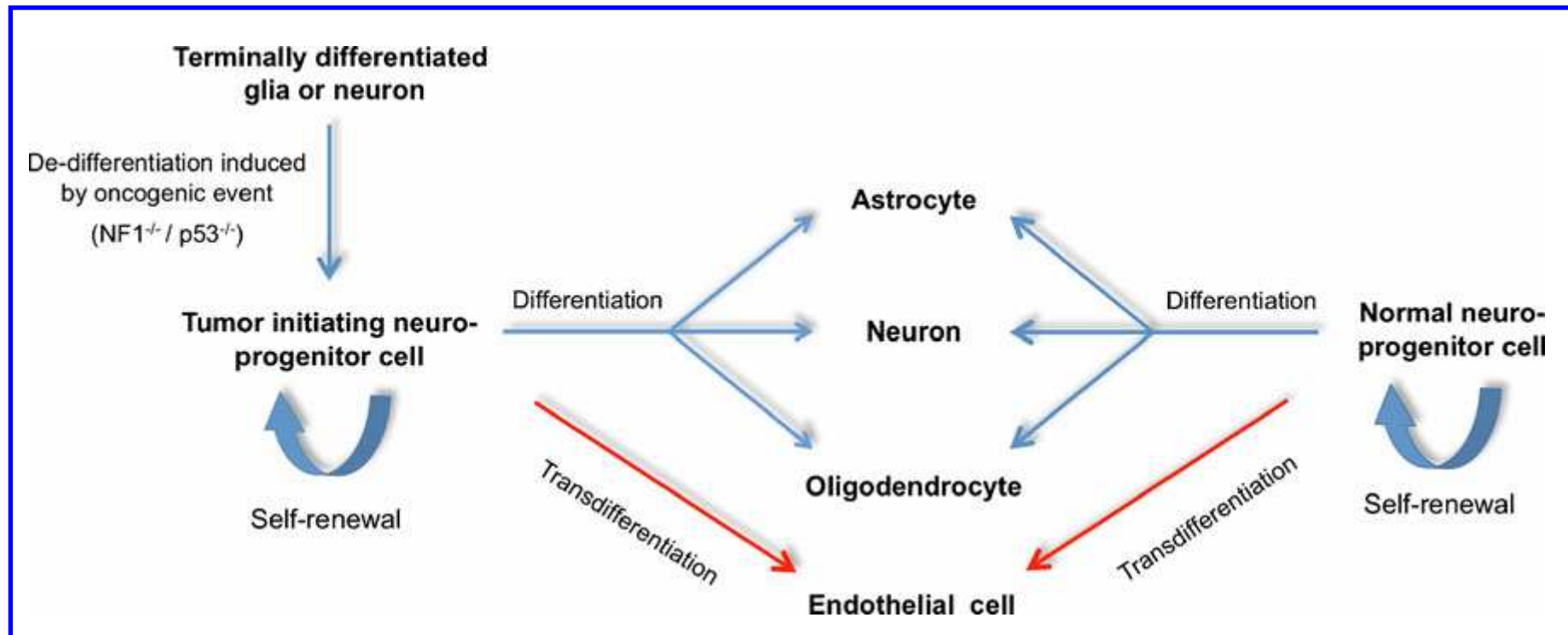
- nádorová tkáň, která je málo prokrvovaná a má nedostatečný přísun živin, se může reorganizovat a pomoci s „opravami“ poškozeného cévního systému nádorovými buňkami (mozaikovitě cévy)
- některé nádory (popsáno například u melanomů, ale i GBM) mohou tvořit struktury vysoce podobné cévám téměř výhradně z nádorových buněk
- u GBM proces VM zprostředkován GSCs

Transdiferenciace

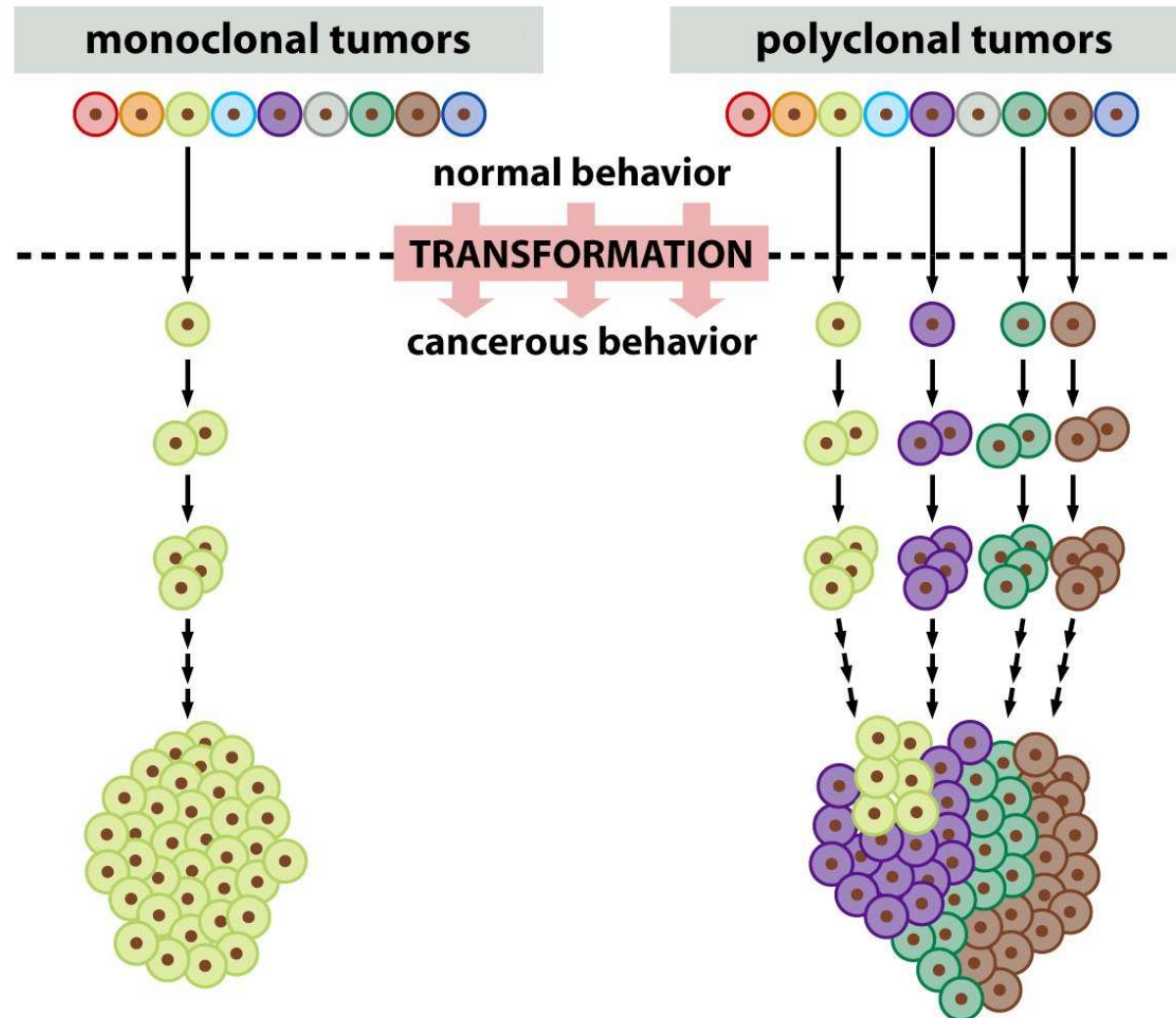
- transdiferenciace nádorových buněk v buňky endoteliální (tzv. **TDECs** - *tumor-derived endothelial cells*)
- nejnovější koncept nádorové neovaskularizace
- výchozími buňkami pravděpodobně *GSCs*
- signalizace souvisejícími s transdiferenciací pravděpodobně zahrnují: **Notch**, **VEGFR2**, **HIFs**, (**hypoxie**)
- experimentálně prokázáno na myším modelu (Friedmann-Morvinski D. et al. *Science* 338 (2012) 1080-1084)
- implikace pro budoucí terapii!!

Transdiferenciace u GBM

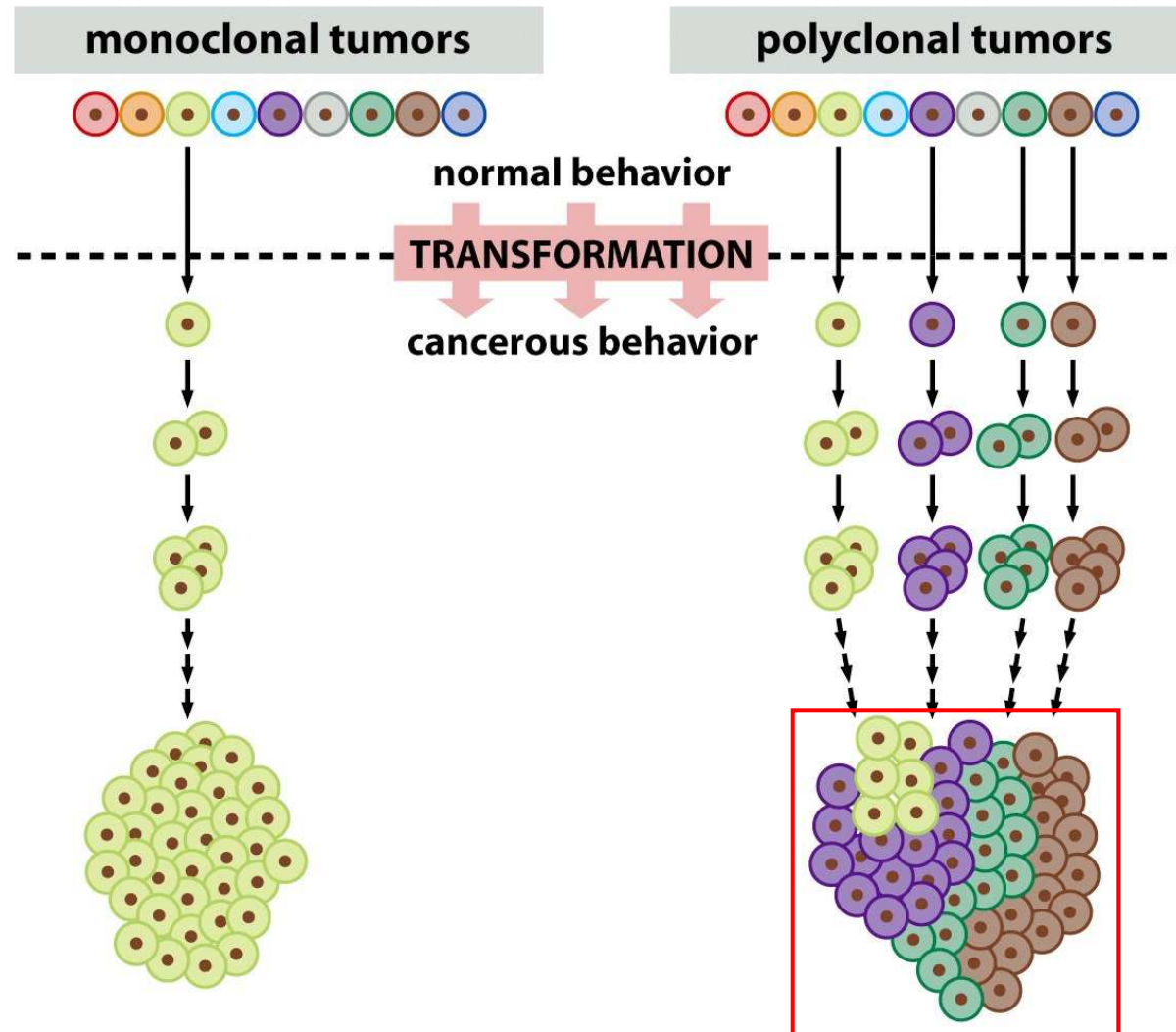
- transdiferenciace nádor iniciujících neuro-progenitorových buněk
- transdiferenciace normálních neuro-progenitorových buněk



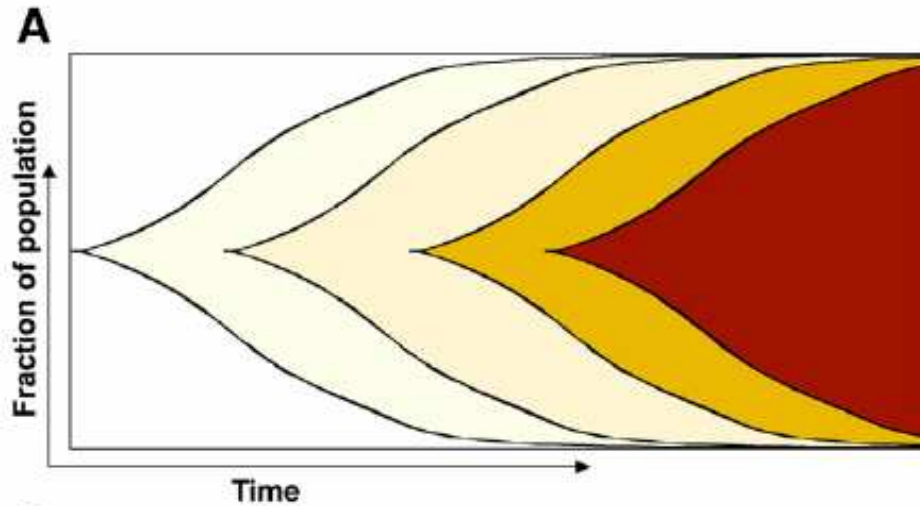
(3) Nádorová heterogenita



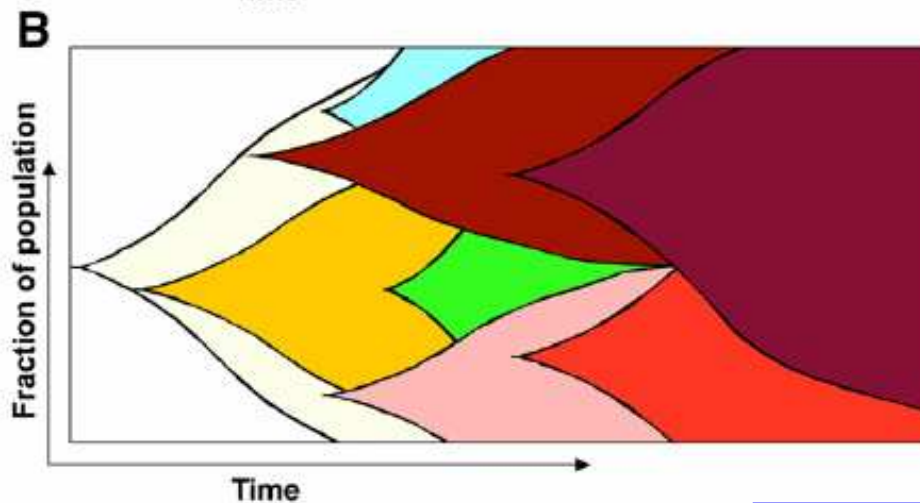
Nádorová heterogenita



Monoklonální (A) a multiklonální (B) model progrese nádorů



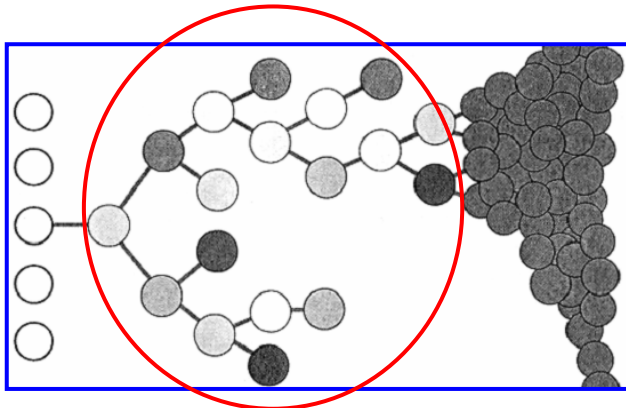
- odlišné barvy ~ různé klony
- intenzita barvy ~ progrese



Nádorová heterogenita

Genetická heterogenita

- Na počátku vývoje nádorů stojí několik mutací aktivujících protoonkogeny a inaktivujících nádorové supresory (monoklonální původ nádorů).
- Nicméně vývoj nádorů je mnohem komplexnější proces připomínající Darwinovskou evoluci.
- Kombinace mnoha buněčných cyklů nutných k vývoji makroskopického nádoru a zvýšené genetické nestability umožňují značnou genetickou diverzifikaci populace nádorových buněk.



Genetická nádorová heterogenita

Pro Darwinův vývojový model jsou klíčové tři proměnné:

- velikost populace
- četnost mutací
- selektivní tlaky

Četnost mutací navýšena v důsledku:

poškození reparačních mechanismů, narušení chromozomové stability, expozice mutagenům v prostředí (kouření, UV záření,...), epigenetických mechanismů, zvýšené produkce kyslíkových radikálů např. v důsledku metabolických změn...

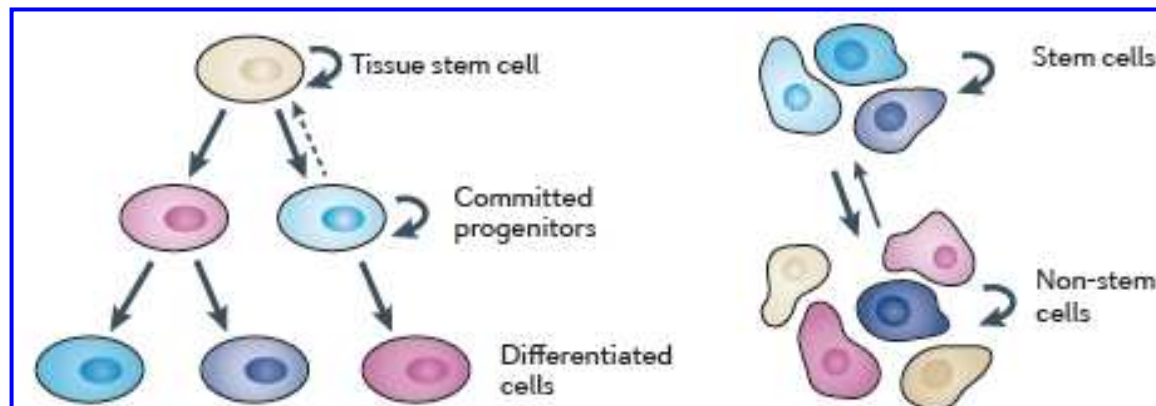
Typy nádorů z hlediska genetické nádorové heterogenity

- Jednoduché klonální nádory
mají minimální úroveň genetické nestability; jsou často řízeny balancovanou translokací; jsou málo geneticky heterogenní.
- Nádory s komplexními klony
nesou stejné řídící mutace, ale rozdílné subpopulace v nádoru mají privátní genetické anomálie; ty jsou „běžně“ neutrální, ale mají potenciál stát se řídícími mutacemi rezistence k cílené léčbě.
- Mozaikové nádory
složeny z buněk, které sdílejí některé prvotní genetické události, ale klonální heterogenita je značná.

Nádorová heterogenita

Negenetická heterogenita

- Je vlastní normálním tkáním: téměř všechny buňky mají stejný genotyp, ale výrazně se fenotypově liší.
- Je dvou typů: (1) **deterministická**: související s tkáňově specifickou diferenciační hierarchií; a (2) **stochastická**, která je odrazem přechodných rozdílů mezi jednotlivými buňkami v důsledku fluktuace biochemických procesů, genové exprese a organizace chromatinu.
- Diferenciační hierarchie nádorových tkání (i) odráží to, co je shrnuto v konceptu *CSC (Cancer Stem Cell)*: do určité míry kopíruje normální diferenciaci v normálních tkáních plus navýšená ochota k dediferenciaci v důsledku onkogenních mutací; (ii) míra diferenciace je významným prognostickým faktorem.

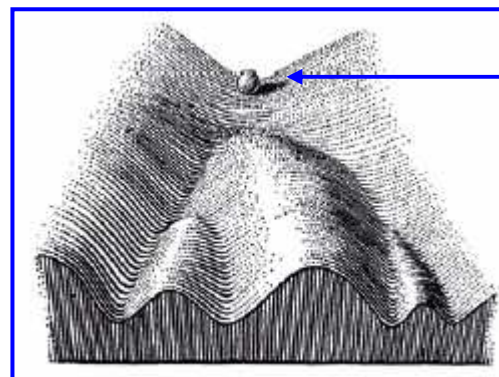
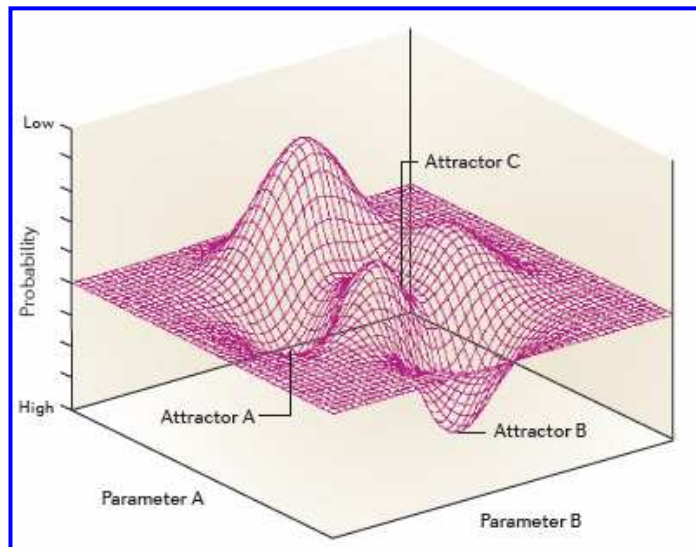


Marusyk A. et al., *Nature Rev.*
2012

Nádorová heterogenita

Negenetická heterogenita nádorových tkání

- Epigenetická krajina a síť genové regulace: (a) vrcholy a údolí znázorňují přechodné a stabilní fenotypové stavy; (b) na osách hladiny některých určujících faktorů: (i) např. transkripčních faktorů spojených s diferenciací, tj. vnitřní stav buněk; (ii) růstových faktorů v okolí buňky, tj. vliv nádorového mikroprostředí (komplexní: angiogeneze, přestavba ECM, zánět, ...)
- Dynamika evoluce populace nádorových buněk vede ke koexistenci klonálních variant s genetickými a epigenetickými rozdíly - a to vše s mnoha biologickými a klinickými důsledky.



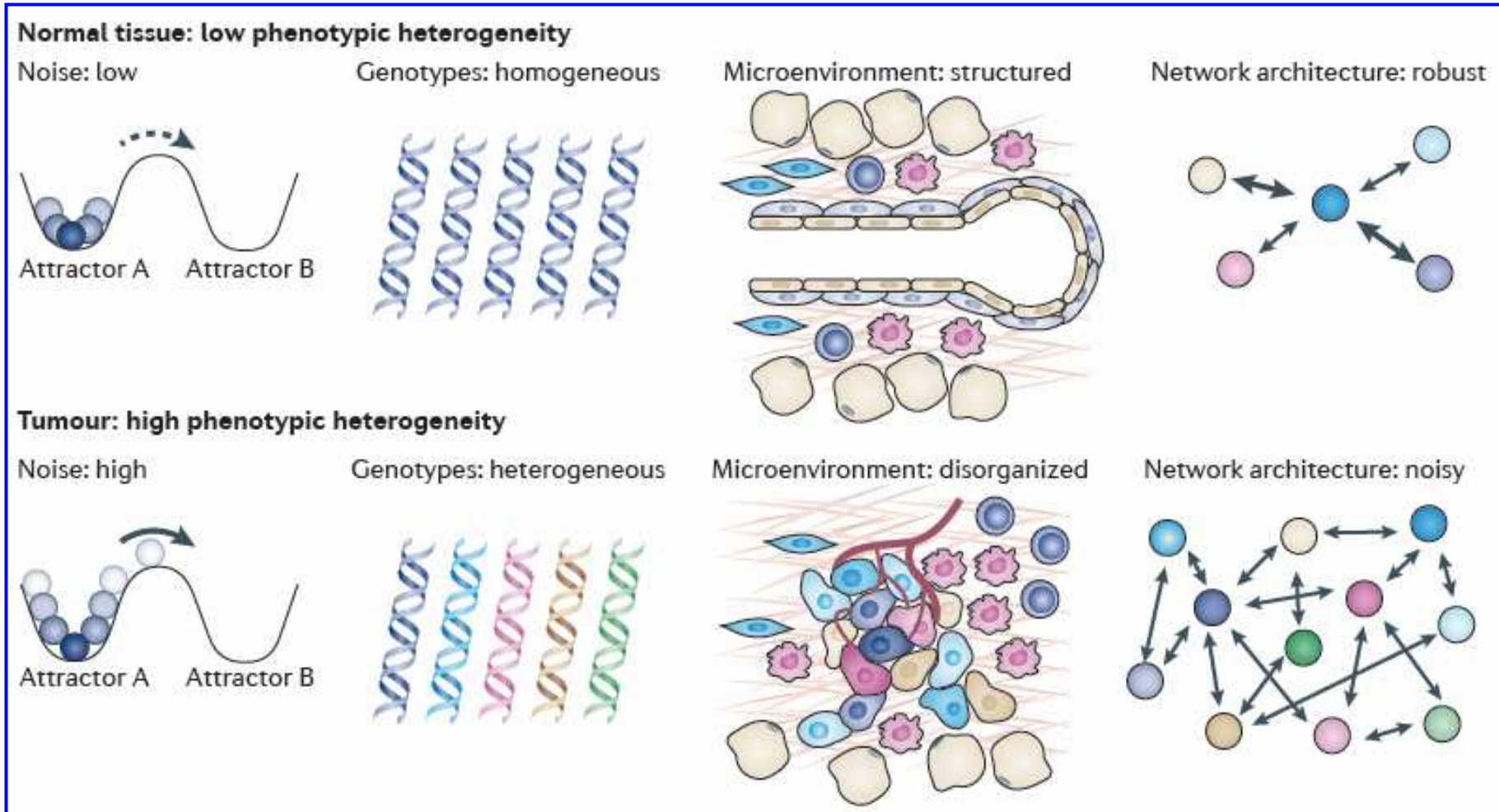
buňka

Marusyk A. et al., *Nature Rev.* 2012

Co ovlivňuje buněčný fenotyp: normální vs. nádorová tkáň

- Onkogenní mutace v nádorových buňkách navyšují stochastickou fluktuaci (noise) buněčných procesů, což může navyšovat šanci na překonání „hřebene“ epigenetické krajiny a k fenotypovému „přepnutí“.
 - Genotyp je homogennější v normální tkáni než v nádorové tkáni (genetická nestabilita).
 - Mikroprostředí je v normální tkáni mnohem strukturovanější a má jen omezený a organizovaný počet niches. Nádorová tkáň je dezorganizovaná, má mnohem více a méně vyhraněných niches.
 - V normální tkáni je stabilnější regulační síť s nižším počtem signálů ovlivňujících genovou expresi.
- ⇒ Integrace všech těchto vlivů vede k **vyšší variabilitě méně stabilních buněčných fenotypů** u nádorů ve srovnání s normální tkání.

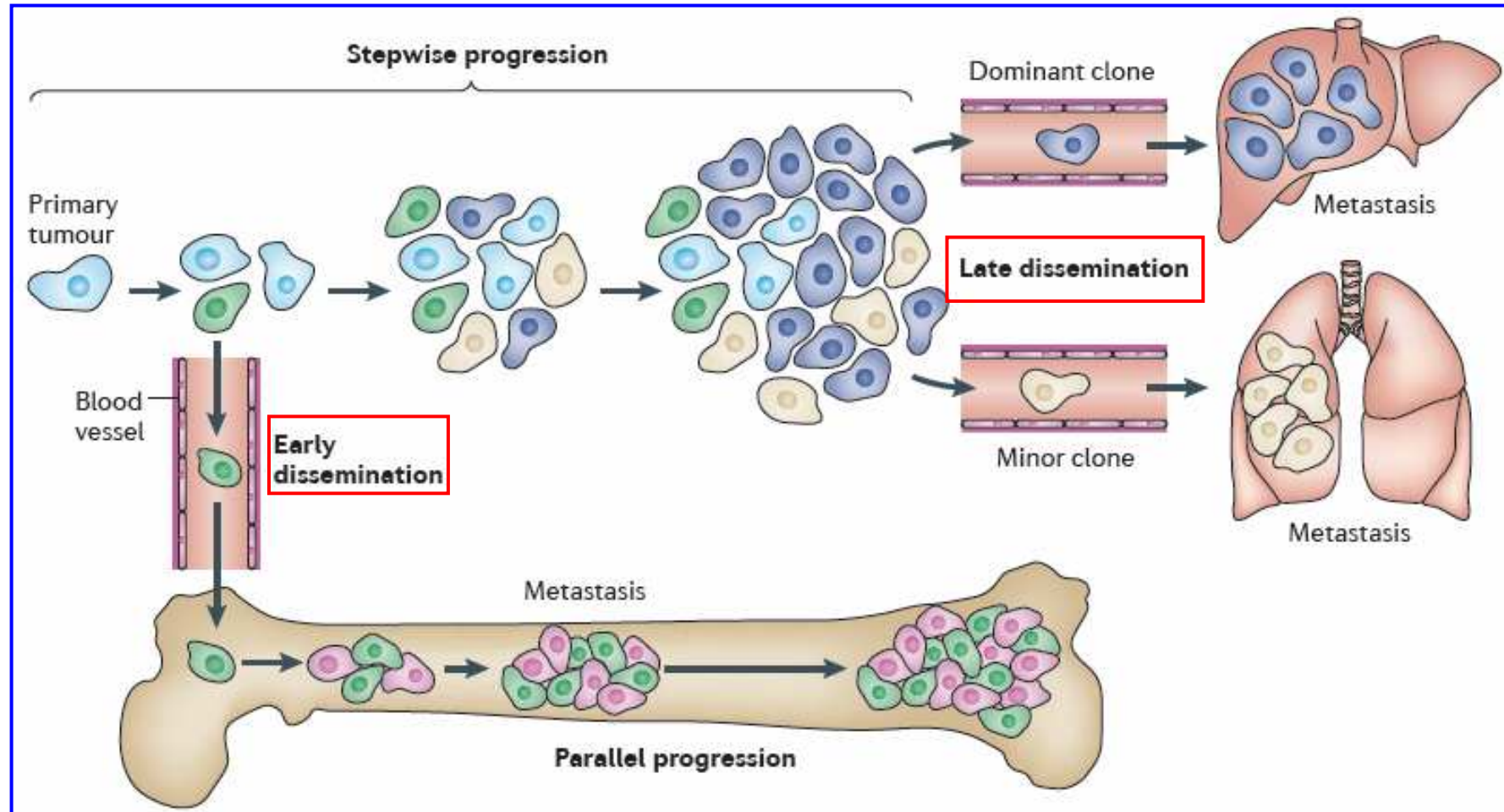
Co ovlivňuje buněčný fenotyp: normální vs. nádorová tkáň



Heterogenita v metastázách

- Otázka intranádorové - včetně „intra- i inter-metastázové“ - heterogenity je nesmírně důležitá i v souvislosti s tím, že terapeutická rozhodnutí se nejvíce dělají na základě analýzy primárních nádorů, ale nejčastější příčinou smrti bývají vzdálené metastázy...
- Dva krajní modely: (1) získání metastatického potenciálu jako finální krok v progresi nádoru z nejagresivnějšího klonu primárního nádoru → pak značná podobnost primárního nádoru a metastáz; (2) raný rozsev nádoru a spíše paralelní progrese nádoru primárního a metastáz → může vést ke značným rozdílům...
- Experimentálně lze doložit oba modely a samozřejmě mnoho možných variant mezi nimi..
- Obecně: nelze zobecňovat - ani jeden ze dvou uvedených modelů...

Heterogenita v metastázách



Důsledky nádorové heterogenity

Biologické

- Klonální heterogenita jako pohon evoluce nádoru
- Biologické interakce mezi odlišnými nádorovými klony

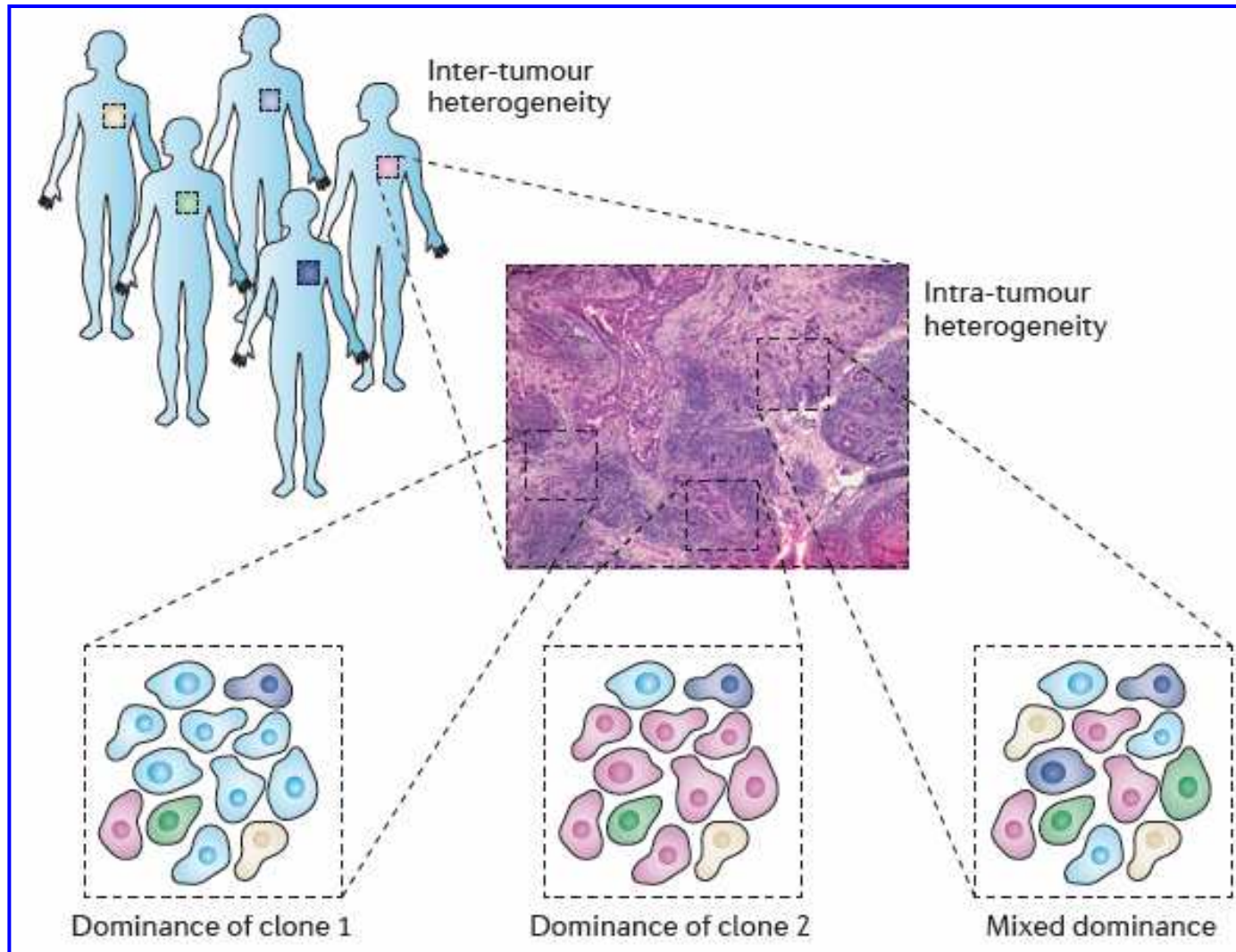
Klinické

- „**Sampling**“ (výběr vzorku k analýze) a heterogenita v klinické diagnóze
- ...

Marusyk A. and Polyak K., *Biochim Biophys Acta* 2010

Marusyk A. et al., *Nature Rev.* 2012

Heterogenita v klinické diagnóze



Důsledky nádorové heterogenity

Biologické

- Klonální heterogenita jako pohon evoluce nádoru
- Biologické interakce mezi odlišnými nádorovými klony

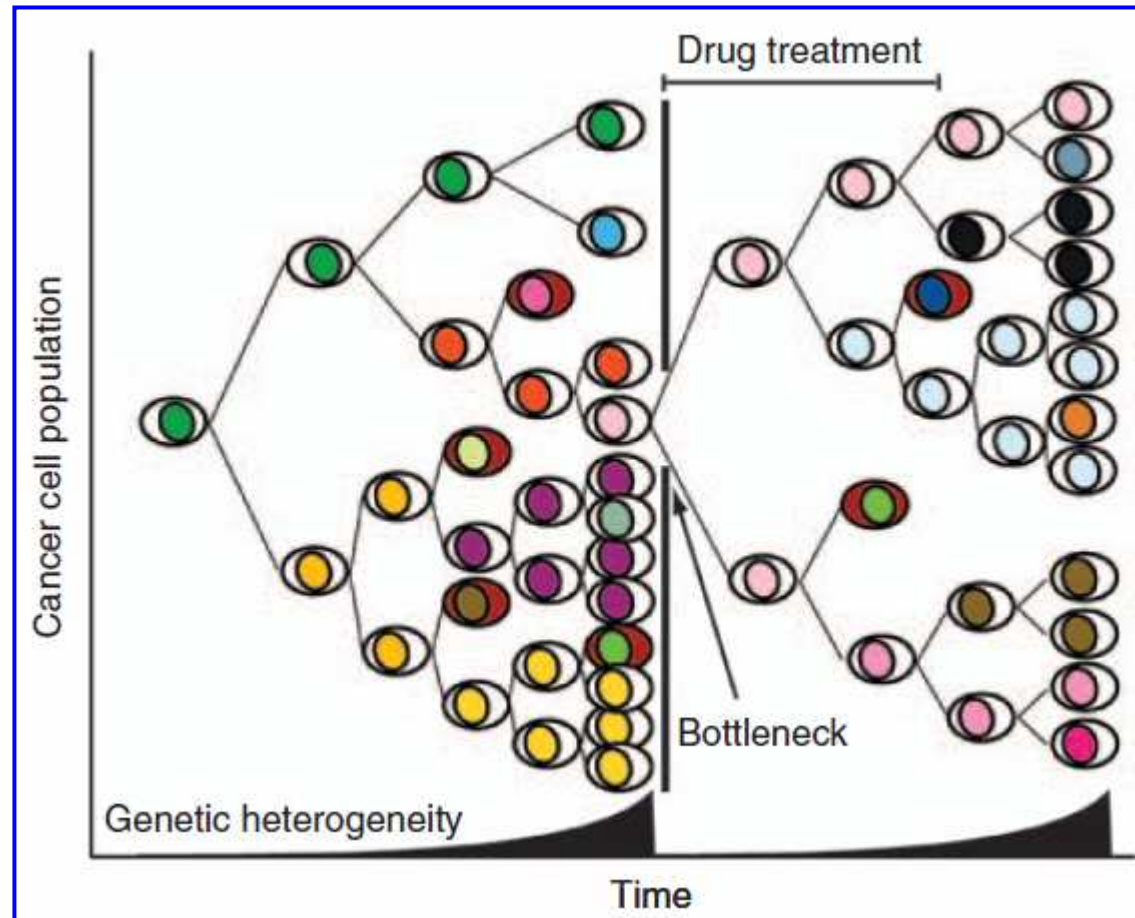
Klinické

- „Sampling“ (výběr vzorku k analýze) a heterogenita v klinické diagnóze
- Heterogenita v odpovědi na **terapii** (→ selekce: „bottleneck“ a dočasná redukce heterogenity → další evoluce, progresse rezistentních klonů...)

Marusyk A. and Polyak K., *Biochim Biophys Acta* 2010

Marusyk A. et al., *Nature Rev.* 2012

Heterogenita v odpovědi na terapii



„Získaná“ rezistence k terapii

- Podle současných znalostí je klinický odraz tzv. získané rezistence k terapii spíše následkem přítomnosti již existujících odolných klonů, které jsou „pouze“ vyselektovány léčbou. Např. v komplexních klonálních *GIST* s mutací *KIT* nesou všechny buňky aktivační mutaci *KIT*, ale mnohočetné sekundární mutace *KIT* lze nalézt u podklonů daného nádoru a mají schopnost způsobit rezistenci k léčbě.
- obecně: Nádory s vysokou mírou genetické nestability a s vysokým stupněm genetické heterogenity jsou spojeny se špatnou prognózou.

(4) Akumulace somatických mutací během vývoje nádorů

mutátorová hypotéza (tzv. „mutator hypothesis“)

• (rychlá) akumulace mutací umožněna zvýšenou genetickou nestabilitou, která je důsledkem (vrozeného nebo somatického) poškození DNA opravných mechanismů a kontrolních bodů buněčného cyklu

Orr B., Compton D.A.: *Frontiers in Oncology* 3 (2013) 164

Negrini S et al.: *Nat Rev Mol Cell Biol* 11 (2010) 220-228

(4) Akumulace somatických mutací během vývoje nádorů

mutátorová hypotéza (tzv. „mutator hypothesis“)

• (rychlá) akumulace mutací umožněna zvýšenou genetickou nestabilitou, která je důsledkem (vrozeného nebo somatického) poškození DNA opravných mechanismů a kontrolních bodů buněčného cyklu

Z Úvodní přednášky kurzu Molekulární biologie nádoru:

Orr B., Compton D.A.: *Frontiers in Oncology* 3 (2013) 164

Negrini S et al.: *Nat Rev Mol Cell Biol* 11 (2010) 220-228

Akumulace somatických mutací během vývoje nádorů

mutátorová hypotéza (tzv. „mutator hypothesis“)

• (rychlá) akumulace mutací umožněna zvýšenou genetickou nestabilitou, která je důsledkem (vrozeného nebo somatického) poškození DNA opravných mechanismů a kontrolních bodů buněčného cyklu

model DNA replikačního stresu způsobeného onkogeny

•

Orr B., Compton D.A.: *Frontiers in Oncology* 3 (2013) 164

Negrini S et al.: *Nat Rev Mol Cell Biol* 11 (2010) 220-228

DNA replikační stres

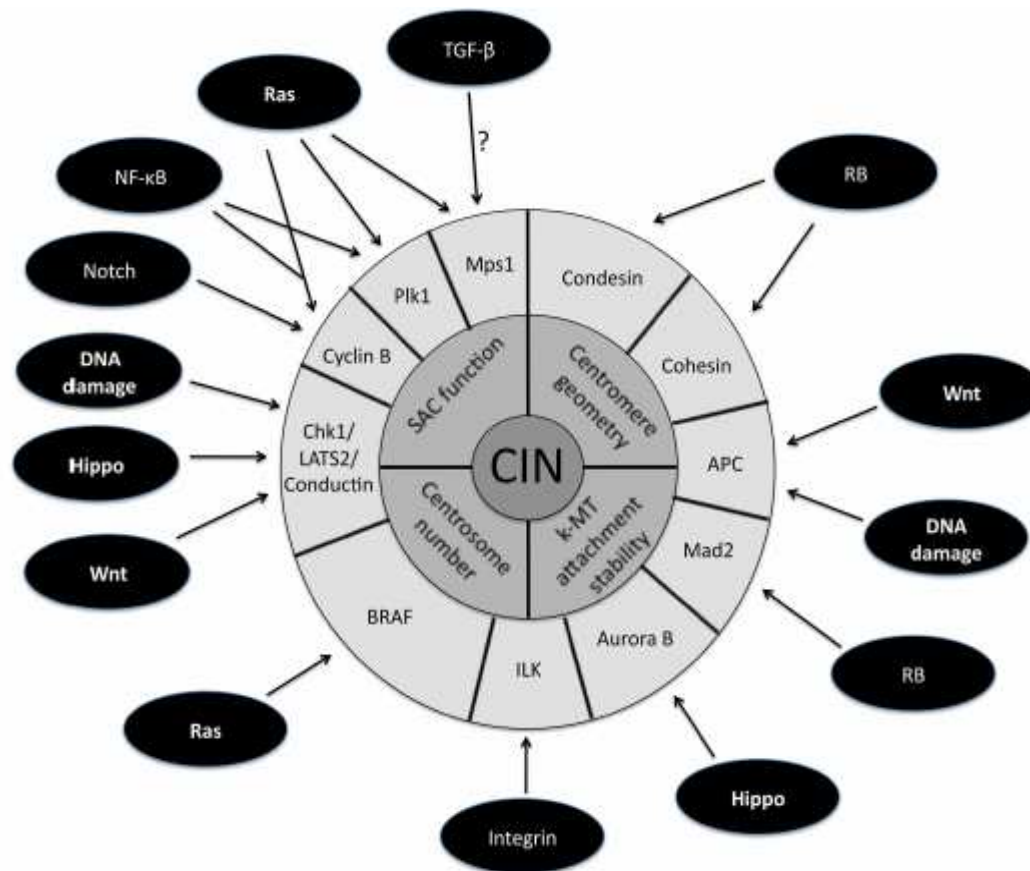
DNA replikační stres

➤ neefektivní replikace DNA, která způsobí, že se postup replikační vidlice zpomalí nebo zastaví

Příčiny:

- nedostatek nukleotidů nebo jejich prekurzorů
- změny v expresi proteinů nutných k syntéze nukleotidů a dalších složek DNA
- snížená frekvence iniciace replikace v bodech počátku replikace
- hyper-replikace DNA
- poškození DNA, které blokuje replikační vidlici
- inhibice replikace působením inhibitorů
- sekundární struktury na DNA, které brání replikaci
- vazba proteinů na DNA, která brání replikaci

Jak onkogeny vyvolávají DNA replikační stres



Akumulace somatických mutací během vývoje nádorů

mutátorová hypotéza (tzv. „mutator hypothesis“)

• (rychlá) akumulace mutací umožněna zvýšenou genetickou nestabilitou, která je důsledkem (vrozeného nebo somatického) poškození DNA opravných mechanismů a kontrolních bodů buněčného cyklu

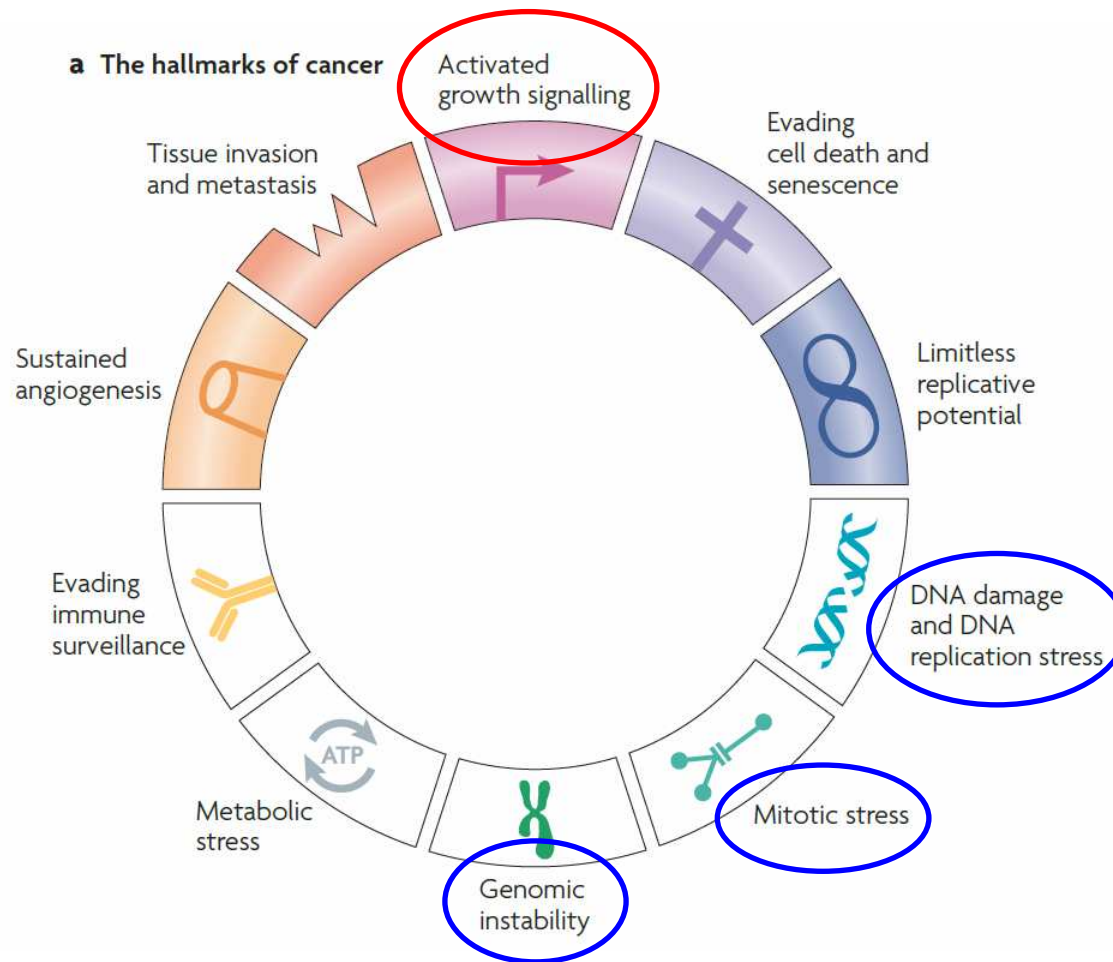
model DNA replikačního stresu způsobeného onkogeny

- onkogenní signální dráhy mají dvojí roli:
 1. stimulují buněčné dělení a růst
 2. indukují genetickou nestabilitu, především CIN, tím, že narušují jemně vyladěné procesy vedoucí k přesné segregaci chromozomů během mitózy

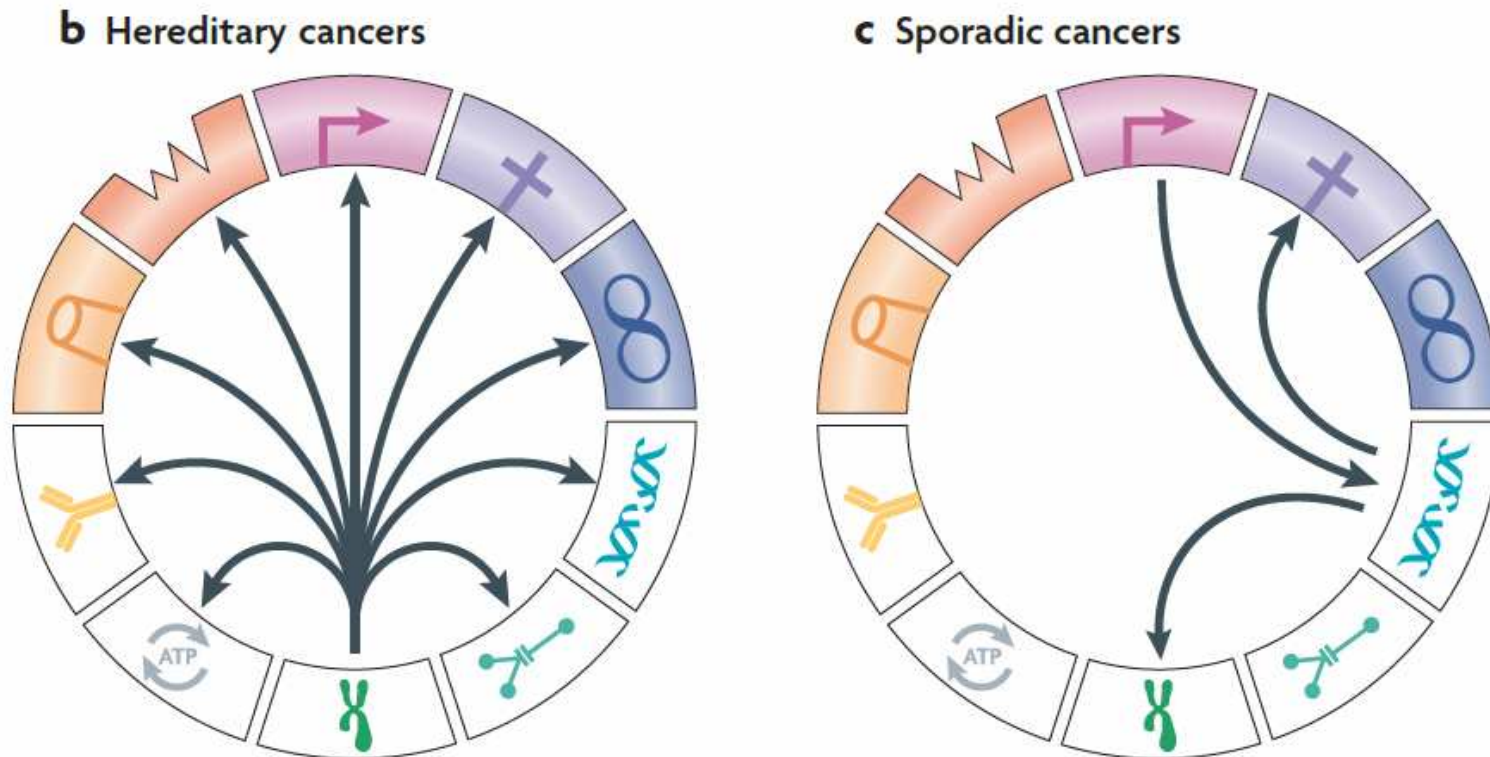
Orr B., Compton D.A.: *Frontiers in Oncology* 3 (2013) 164

Negrini S et al.: *Nat Rev Mol Cell Biol* 11 (2010) 220-228

Pozměněná struktura hlavních znaků nádorů



Genetická nestabilita sporadických a dědičných nádorů



(5) Kancerizace pole

Pojem „field cancerization“ (FC) poprvé použit v roce 1953, Slaughter D.P. et al.

1. statisticky významný podíl dlaždicobuněčných orálních karcinomů se vyskytuje multifokálně
2. nádory jsou obklopeny histologicky pozměněnou tkání
3. nádory často tvořeny násobnými nezávislými lézemi, které splývají
4. perzistence pozměněné tkáně po chirurgickém odstranění nádorů může vysvětlit výskyt dalších primárních nádorů („second primary tumors“ SPT)

→ definice FC (1953): oblast („patches“) epitelu pozměněná působením karcinogenu jako (nutný) předpoklad vývoje nádoru

Kancerizace pole

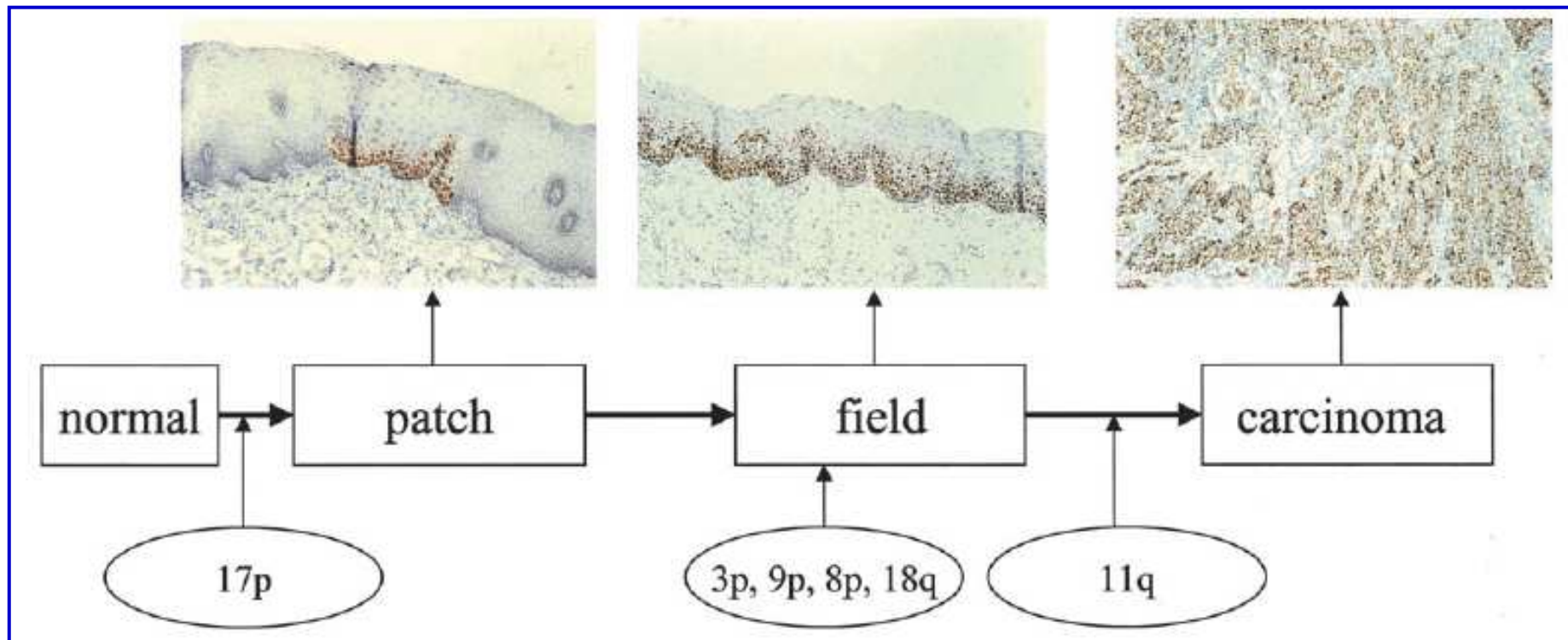
- alternativní názvy: *field effect*, *field defect*
- Smysl konceptu „kancerizace pole“?
Především snaha vysvětlit multifokální výskyt primárních nádorů, opakovaný výskyt nádoru ve stejném místě, výskyt abnormální tkáně v okolí nádoru, multifokální výskyt prekancerózních stavů.

Kancerizace pole

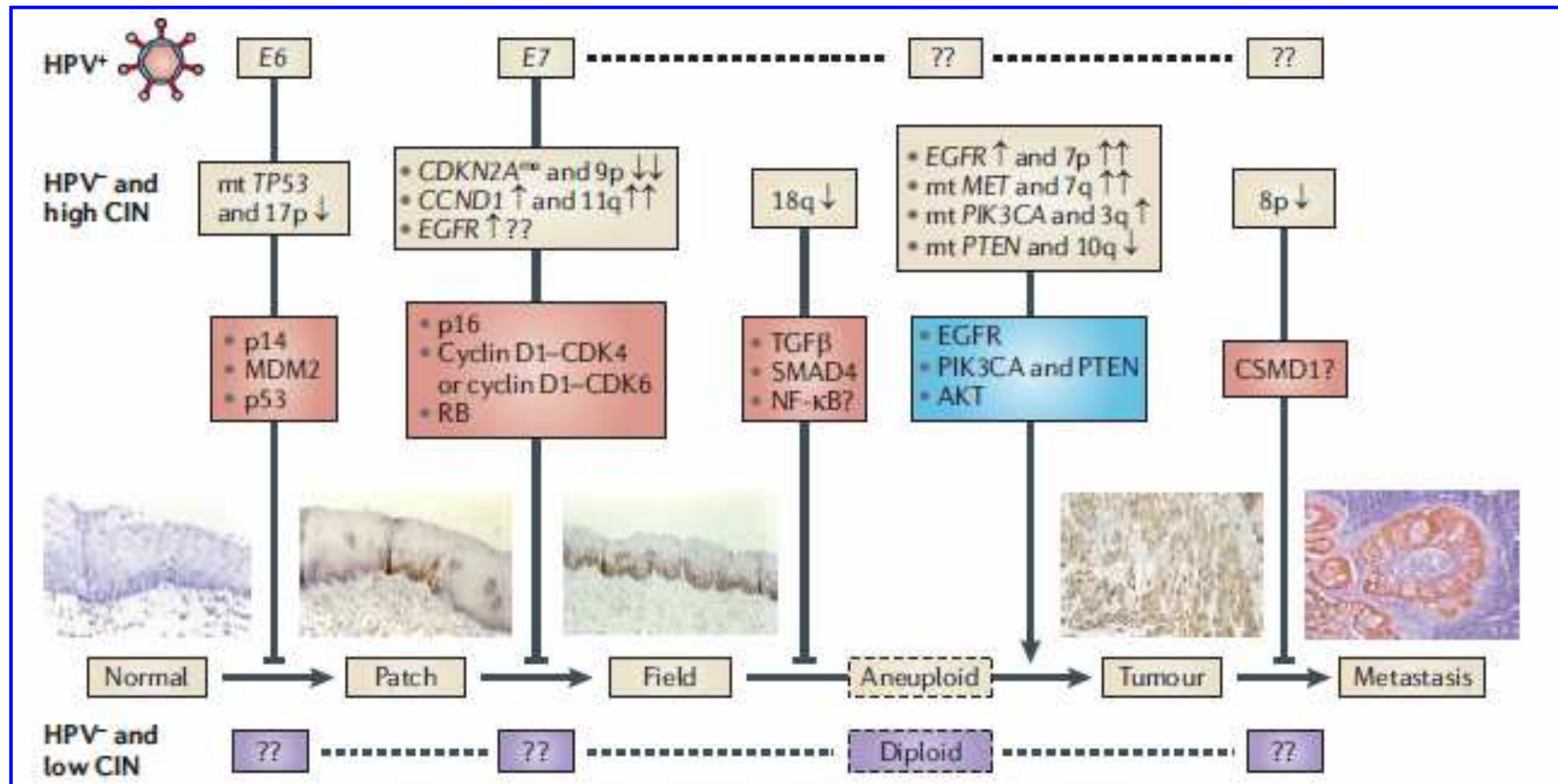
- **orgány postižené FC:** hlava a krk, plíce, pochva, jícn, děložní čípek, prsa, kůže, prostata, střevo, močový měchýř
 - genetická analýza oblastí přilehlých k primárnímu nádoru („LOH“, mikrosatelitové změny, chromozomální nestabilita, *p53*) často ukázala, že se jedná o klony proliferujících mutovaných buněk, i když morfologicky nezměněných nebo jen mírně dysplastických
- **definice FC (2003):** přítomnost jedné nebo více oblastí epiteliálních buněk s genetickými změnami; pole má monoklonální původ, nevykazuje invazivní nebo metastatické znaky

Kancerizace pole -postupný vývoj: model pro HNSCC

- vývoji preneoplastického pole předchází vývoj „patches“, skvrn, shluků buněk, které sdílejí stejný genotyp (např. mutace p53), který je pozměněný oproti nezasaženým buňkám; tyto buňky dále expandují a vytvářejí pole buněk, ve kterých může docházet k dalším změnám



Kancerizace pole: integrovaný a molekulární model vývoje HNSCC



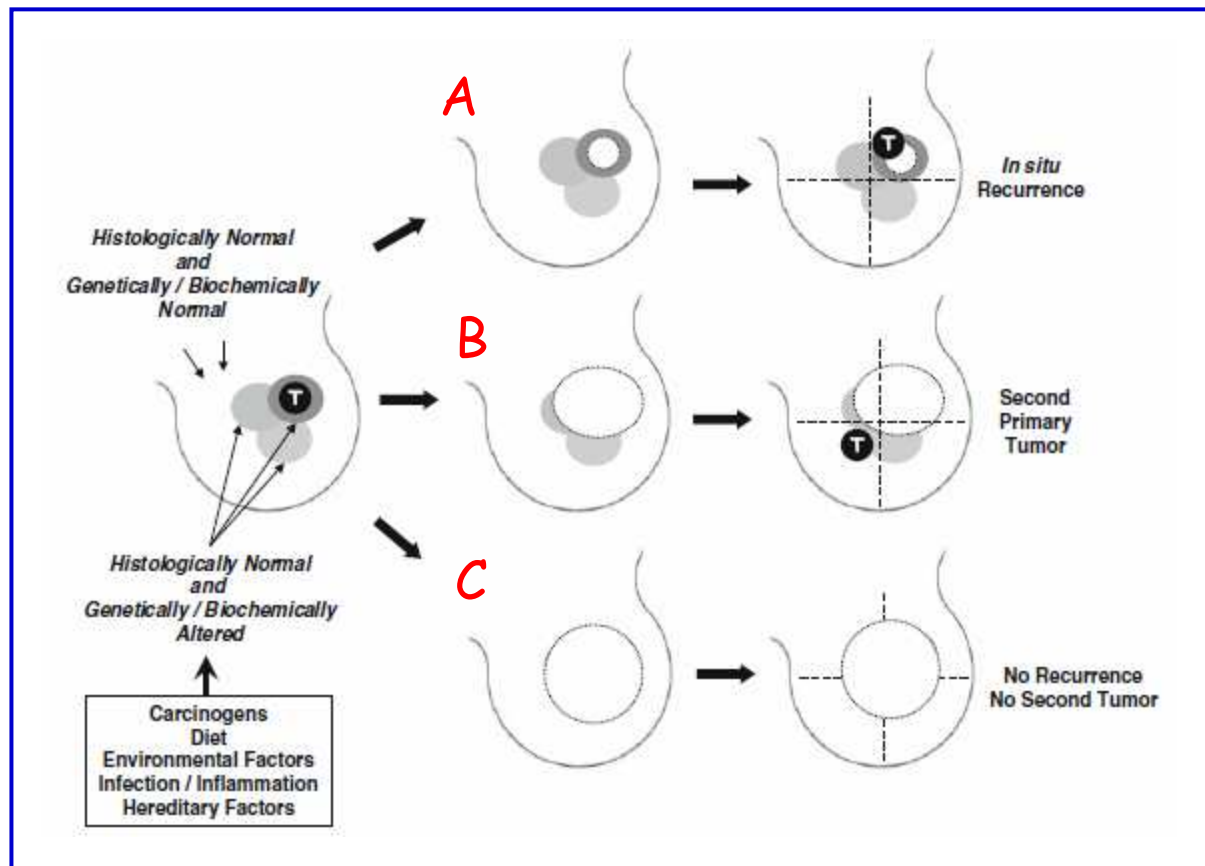
Kancerizace pole

- **monoklonalita FC (2003)**: spíše ano, ale zůstává trochu nejasná, otevřená
- **klinické důsledky FC**: riziko dalších primárních nádorů ⇒ diagnostika a léčba karcinomů s rizikem FC se nemůže omezovat na samotné nádory, musí zahrnovat celou oblast, celé „pole“ (←velký počet preneoplastických buněk dramaticky navyšuje pravděpodobnost vývoje nádoru a souvisí s vysokou incidencí dalších primárních nádorů po chirurgickém odstranění nádoru prvního)

Kancerizace pole: nádory prsu

- K většině (63%) opakovaných výskytů primárních nádorů prsu dochází ve stejném místě, kde byl chirurgicky odstraněn první nádor.
- To lze částečně vysvětlit minimální zbytkovou nemocí a/nebo změněným mikroprostředím v místě hojení jizvy.
- Koncept FC podporuje fakt, že 23% všech opakovaných výskytů nádoru prsu je ve stejném kvadrantu, nikoli však ve stejném místě!
- Díky informačním kampaním a mamografii stále vyšší záchyt časných, indolentních nádorů. S tím roste nutnost účinných prognostických markerů, protože stoupá riziko „přeléčení“ (overtreatment) s vedlejšími účinky fyzickými a psychickými, které vedou ke snížení kvality života. I zde spojitost s definicí FC.

Kancerizace pole: nádory prsu



Pravděpodobnost výskytu dalšího nádoru může ovlivnit rozsah chirurgického zákroku (A) a/nebo výskyt FC (A, B). Výskytu dalších ložisek nádoru by zabránil jen dostatečně rozsáhlé odstranění prvního nádoru (C).

Definice „dostatečného rozsahu“ úzce souvisí s definováním FC!

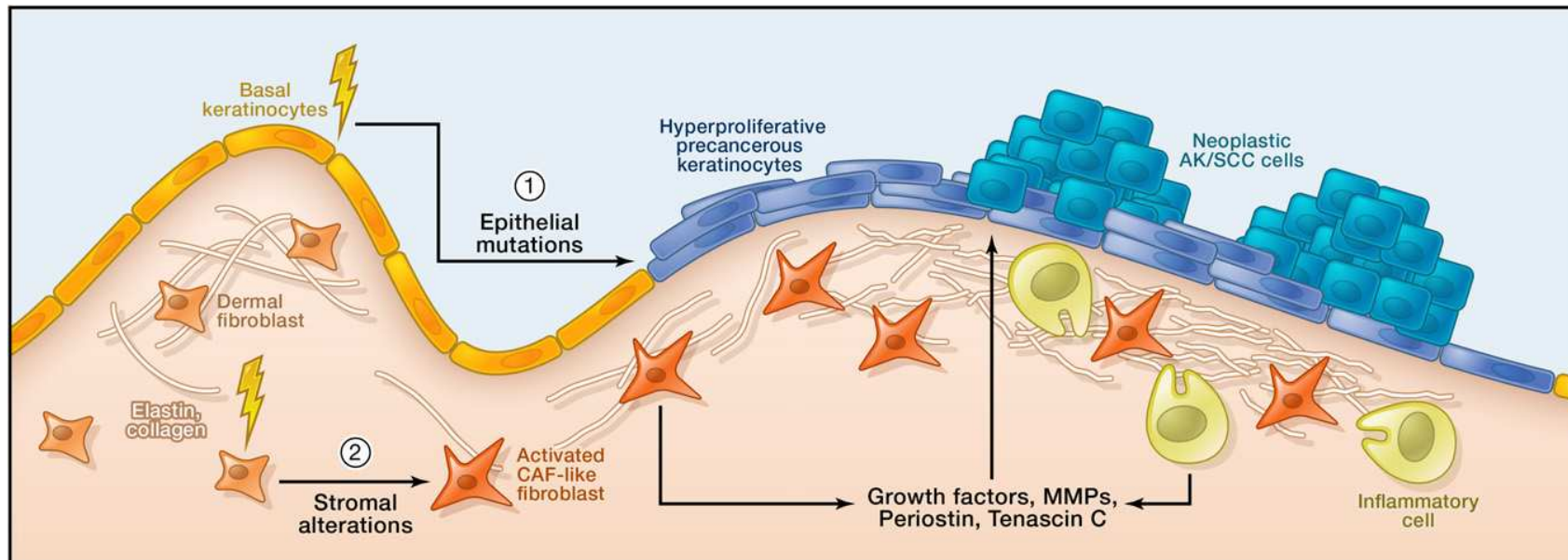
Kancerizace pole

- Definování FC nemůže být omezeno jen na preinádorové změny epiteliální složky, ale musí zahrnovat také změny stromální složky.
 - FC může být detekováno roky před detekcí vlastního nádoru.
 - Mutace související s vývojem FC mohou zvyšovat pravděpodobnost vývoje nádoru buď zvýšenou proliferací zasažených buněk nebo jejich zvýšeným přežíváním po jejich poškození.
 - Takto zasažené buňky by mohly sloužit jako skvělé nádorové markery.
- **definice FC (2011):** oblast epitelu změněná tak, že to zvyšuje pravděpodobnost vývoje nádorů buď klonální proliferací mutované buňky anebo soustavnou změnou stromální složky v dané oblasti

Kancerizace pole: cosi nového pod sluncem?

- Nádorové mikroprostředí ovlivňuje vývoj nádoru. Velký význam mají fibroblasty, tj. nádorové fibroblasty, tj. fibroblasty již ovlivněné působením vyvíjejících se nádorových buněk.
- Normální architektura a stav tkáně má nádorově supresivní charakter! (*organicisté*)
- Co když je to naopak? Vznik a vývoj „nádorového“ (tj. pozmeněného, nádor podporujícího) stroma předchází vývoji nádorového parenchymu??
- Experimenty s indukci dlaždicobuněčných nádorů kůže působením UV vedly k formulování cesty (2) jejich vývoje, která je „alternativní“ k dosud akceptované představě (1):

FC: dvě cesty k vývoji dlaždicobuněčných karcinomů kůže



1. Indukce mutací působením UV v bazálních keratinocytech: p53 → Notch1/Notch2 →→ SCC
2. Působením UV epigenetická inaktivace (DNA metylace) dráhy Notch v dermálních fibroblastech → vyšší sekrece FGFs, proteinů ECM a proteáz → stimulace proliferace keratinocytů, vyvolání zánětu →→→ SCC

Hu B et al., *Cell* 2012

Vanharanta S a Massagué J, *Cell* 2012

Kancerizace pole: cosi nového pod sluncem?

- Pokud by platila i druhá dráha vývoje dlaždicobuněčných karcinomů kůže působením UV, znamenalo by to významný zobecňující důsledek pro **definici FC (2012)**: výskyt násobných primárních nádorů po působení mutagenů může být zprostředkován změnami stromálních buněk.
- Podobně lze interpretovat např. zjištění, že ulcerózní kolitida navyšuje riziko vývoje kolorektálního karcinomu. Ulcerózní kolitida je stav chronického zánětu, který (1) zvyšuje incidenci mutací v epiteliálních buňkách (např. zvýšeným uvolňováním reaktivních kyslíkových molekul), ale také (2) mění mikroprostředí tím, že do něj uvolňuje řadu růstových faktorů a cytokinů.

Metylace DNA a kancerizace pole

- Úroveň metylace DNA jako marker FC?
- Sledován vliv užívání alkoholu, betelu a cigaret (tzv. **ABC** faktor) na úroveň metylace 4 genů v mukóze v oblasti hlavy a krku. Detekovány 4 různé úrovně:
 1. nejnižší v tkáni zdravých kontrol bez expozice ABC faktoru
 2. zdravé kontroly s pozitivním ABC faktorem
 3. normální tkáň pacientů s nádorem
 4. nádorová tkáň
- Podobně vytipovány epigenetické markery pro karcinomy žaludku ve spojitosti s expozicí *Helicobacter pylori*: Působení *H. pylori* navyšuje úroveň metylace DNA a toto navýšení zůstává i po odeznění infekce. To pravděpodobně navyšuje riziko vývoje ca žaludku.

Metylace DNA a kancerizace pole

- Další studie na ca žaludku ve spojitosti s expozicí *H. pylori* poukázaly na některé konkrétní geny se změněnou expresí (*IL1 β* , *Nos2*) a jejich vliv na aktivitu DNA metyltransferázy.
 - Nejenom hypermetylace, ale také hypometylace je součástí FC.
- To vše doplňuje **definici FC (2012)** o koncept epigenetického FC, který sebou přináší nové možnosti detekce FC a také nové možnosti nádorové chemoprevence.

Děkujeme za pozornost!

Tento projekt je spolufinancován Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky.



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ