

C7188 Úvod do molekulární medicíny 2/10



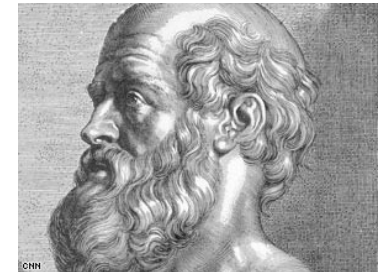
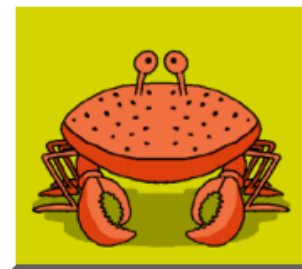
Molekulární patologie nádorových onemocnění When good cells go bad

Ondřej Slabý & Jiří Šána
*Lékařská fakulta & CEITEC, Masarykova univerzita
Masarykův onkologický ústav
Fakultní nemocnice Brno*



Historie

- Nejstarší popis rakoviny 1600 p.n.l. pochází z Egypta **Papyrus Edwina Smithe** popisuje 8 tumorů nebo ulcerací prsu ošetřovaných kauterizací nástrojem označovaným „the fire drill“. Tato nemoc není léčitelná (termín rakovina nebyl použit)
- 400 p.n.l. **Hippocrates** popsal rakovinu jako dlouhé výběžky (podobné račím nohám) vybíhajícím do zdravých tkání:
 - řec: karkinos = rak; onkos = krab
 - lat: cancer = rak
- popisné (**epidemiologické**) poznatky:
 - 1848 - zvýšený výskyt rakoviny prsu u jeptišek (souvislost s bezdětností a nekojením)
 - 1775 - rakovina šourku u kominíků (souvislost s výskytem škodlivin v sazích; souvislost s hygienickými návyky)
 - 1902 - souvislost RTG paprsků a vzniku rakoviny
 - poč. 20. stol. - **rodinný výskyt** nádorů



Historie molekulární biologie nádorů viz přednáška 1/12

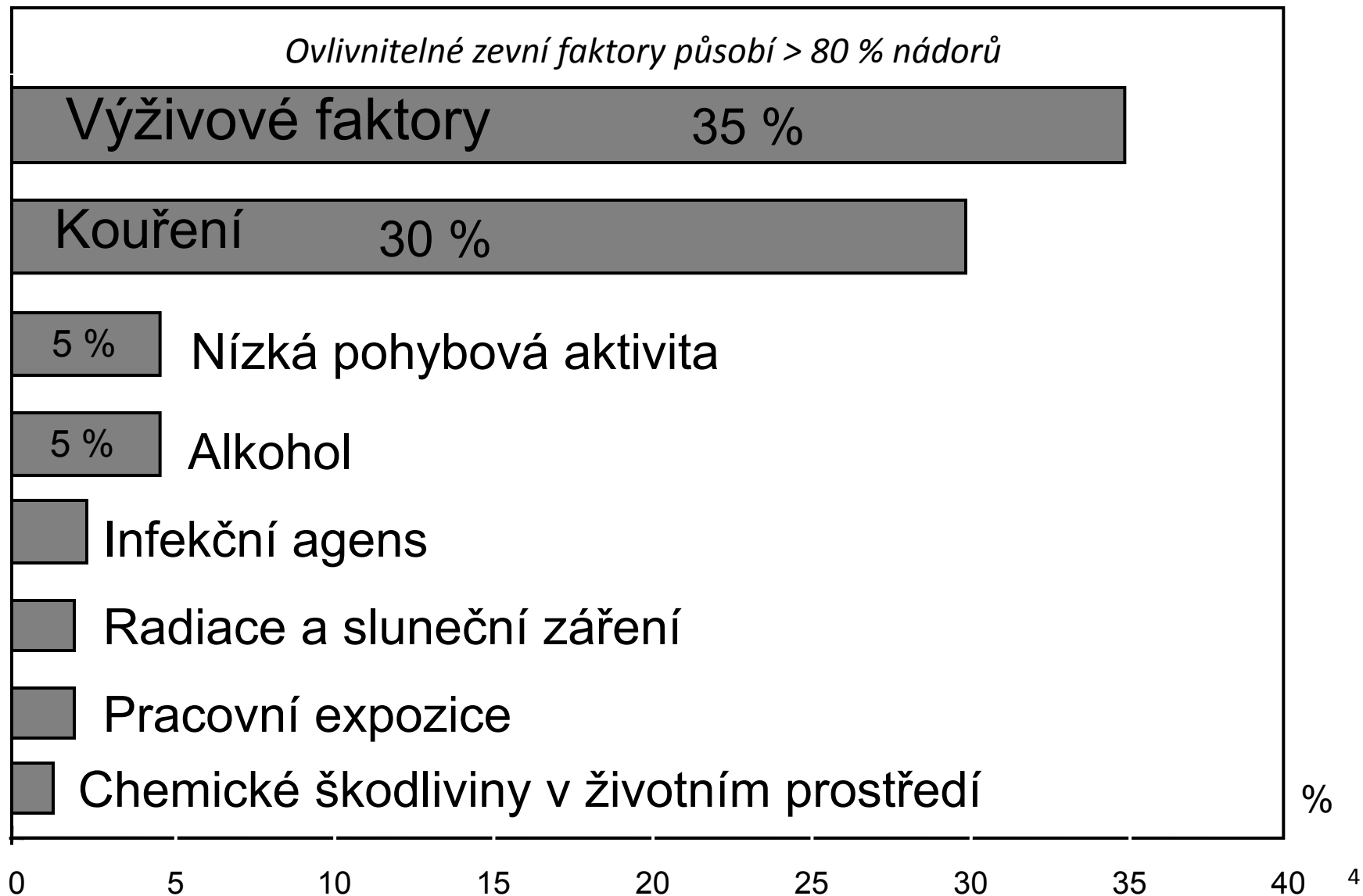
Epidemiologie zhoubných nádorů v České republice

incidence – nová onem/počet obyvatel
prevalence – celkový počet onem/počet obyvatel
mortalita – počet úmrtí/počet obyvatel
letalita – počet zemřelých na onem/počet nem (%)

Systém pro Vizualizaci Onkologických Dat – SVOD verze 7.0 (www.svod.cz)

Pracuje s validovanými epidemiologickými daty Národního onkologického registru NOR za období 1977-2005 (databáze obsahující přibližně 1,5 mil. záznamů), spravovaných Ústavem zdravotnických informací a statistiky ČR (ÚZIS ČR)

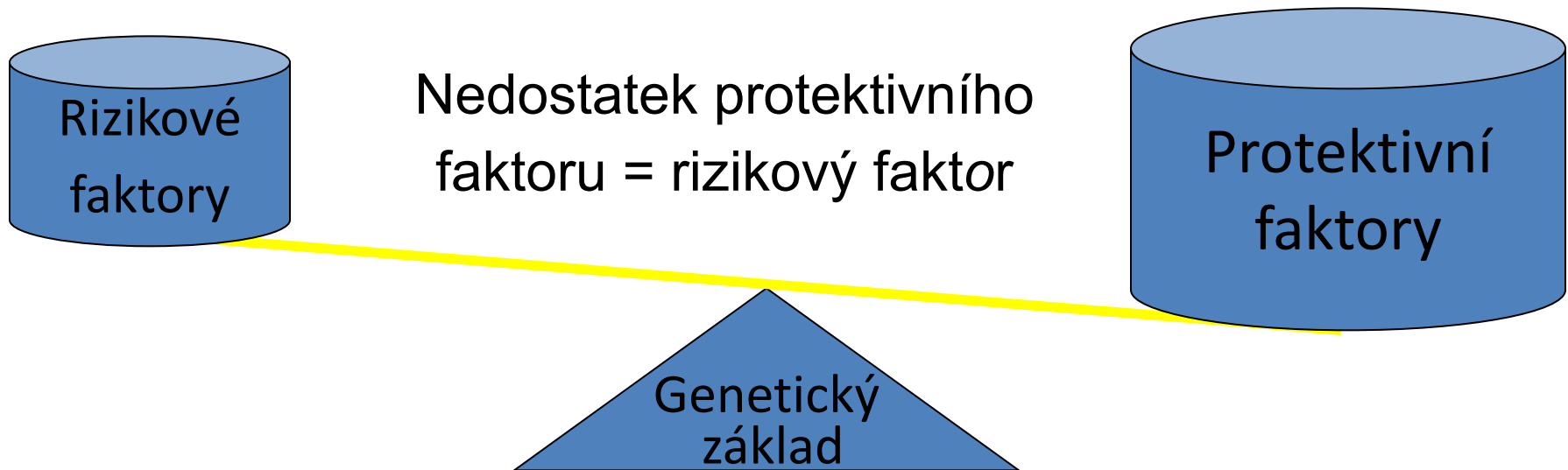
DUŠEK Ladislav, MUŽÍK Jan, KUBÁSEK Miroslav, KOPTÍKOVÁ Jana, ŽALOUĐÍK Jan, VYZULA Rostislav. Epidemiologie zhoubných nádorů v České republice [online]. Masarykova univerzita, [2005], [cit. 2009-10-04]. Dostupný z WWW: <http://www.svod.cz>. Verze 7.0 [2007], ISSN 1802 – 8861.

Nádorová onemocnění – etiologie (Atributivní příspěvní k celk. úmrtnosti na nádory)

Nádorová onemocnění – etiologie (Atributivní příspěvní k celk. úmrtnosti na nádory)

Faktory prostředí:

- chemické - karcinogeny
- fyzikální - UV, ionizující záření
- biologické - DNA nádorové viry
- RNA nádorové viry - retroviry



Nádorová onemocnění – etiologie

Ústa, pharynx, nasopharynx

Larynx

Jícen

Plíce

Žaludek

Pancreas

Játra

Colon, rectum

Prs

Ovarium

Endometrium

Cervix

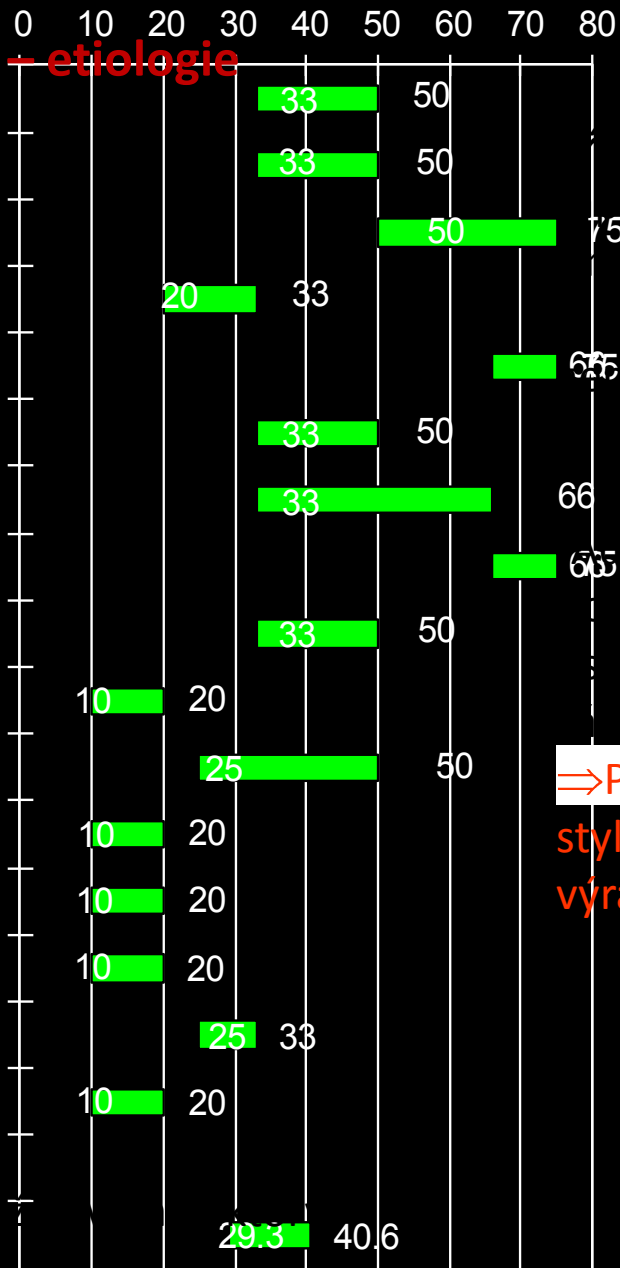
Prostata

Štitná žláza

Ledviny

Močový měchýř

Celkově



ady

inci přestěhovaní do

riky: Japonsko 6-8x vyšší

ence nádorů žaludku, příští

race již srovnatelná

ence.

entisté sedmého dne: asi

viční výskyt nádorů oproti

stní americké populaci (←

z kouření, alkoholu, masa).

⇒ Pouze změnou životního stylu by bylo možné snížit výrazně incidenci nádorů

Nádorová onemocnění – prevence

Primární prevence - zábránění vzniku nemoci odstraněním rizik. faktorů

Sekundární prevence - časná detekce nemoci (často v preklin. stadiu), kdy je dostupná léčba efektivní

Terciární prevence - zabránění rozvoje komplikací při manifestním onemocnění efektivní léčbou

Dosud převážně omezena pouze na prevenci sekundární – časný záchyt

Karcinom prsu

Palpační vyšetření

Mamografie, sonografie

Nádory děložního čípku

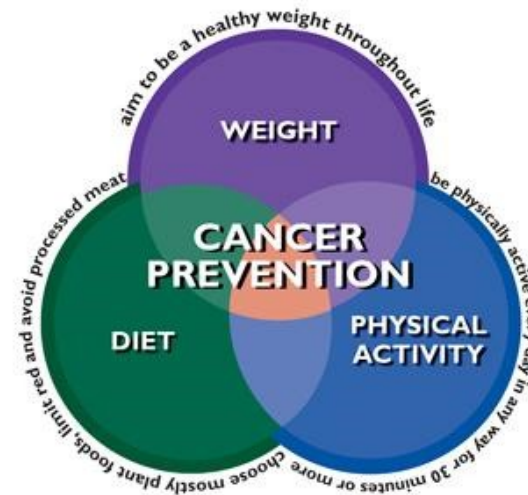
Pap test (Papanicolaouův test)

Kolorektální karcinom

Palpační vyšetření per rectum

Test stolice na okultní krvácení

Kolonoskopické vyšetření



Evropský kodex proti rakovině

1. Nekuřte
2. Mírněte se v konzumaci alkoholu
3. Vyhýbejte se nadměrnému slunění
4. Dodržujte zdravotní a bezp. pokyny při práci
5. Často jezte zeleninu a ovoce, obiloviny
6. Vyvarujete se vzniku nadváhy
7. Navštivte lékaře, jestliže objevíte.....
8. Navštivte lékaře, jestliže máte přetrv. potíže

Základní pojmy a klasifikace

Hyperplasie – buňky nezměněné, ale zmnožené

Metaplasie – přechodná změna fenotypu buněk, buňky lokalizované na nesprávném místě, často v místě, kde se setkávají dva typy epitelu: děložní čípek – děloha; jícen – žaludek - tzv. Barrettův jícen

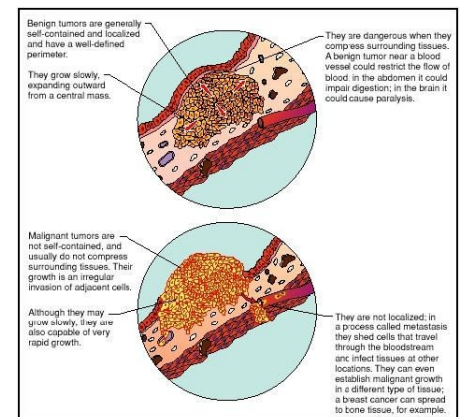
Dysplasie – obsahují již cytologicky abnormální buňky (velikost, tvar, barvitelnost jádra, poměr jádro/cytoplazma, změněná mitotická aktivita) a abnormální poměr buněčných typů

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. (Rejthar)

Klasifikace nádorů I - podle schopnosti infiltrovat se do jiné tkáně

Benigní (nezhoubné) nádory zůstávají v místě svého vzniku, jsou ohraničené, neinvadují jiné tkáně, nemigrují a nezakládají metastázy (polypy, lipomy, chondromy, leiomyom, fibrom,...)

Maligní (zhoubné) nádory infiltrují a destrukují okolní tkáně a prostřednictvím krevního a lymfatického systému se šíří do celého těla, v nových tkáních vyvolávají tvorbu sekundárních nádorů (metastáz) X *sekundární nádory (therapy-related)*



Klasifikace nádorů II - podle typu buněk (tkání), ze kterých nádorová buňka vzniká

karcinomy – nádory epiteliálních buněk (asi 80-90% lidských nádorů)

sarkomy – pevné nádory pojivových tkání – svalů, kostí, chrupavky, tvoří asi 1% nádor, z mezenchymálních buněk

leukémie a lymfomy - odvozené od hematopoietických buněk a buněk imunitního systému

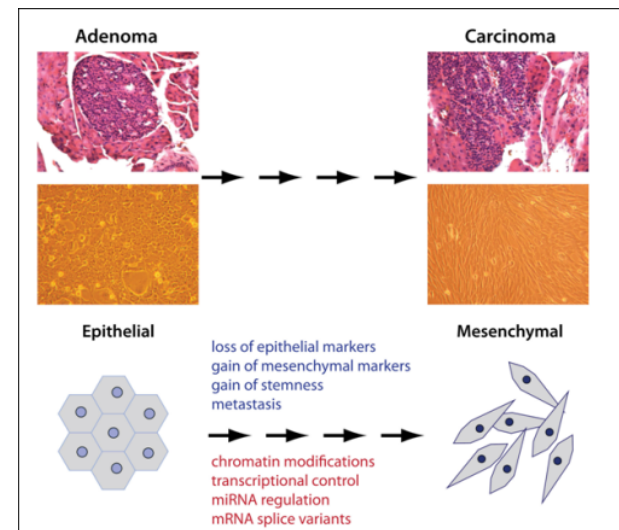
neuroektodermální - nádory odvozené z nervové tkáně (gliomy, neuroblastomy, medulloblastomy,...)

germinální nádory – odvozené z totipotentní zárodečné buňky

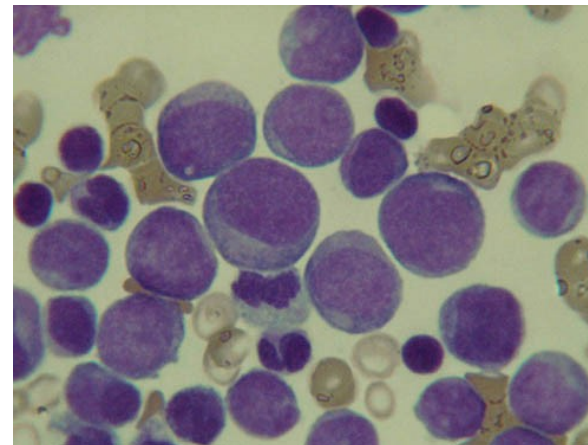
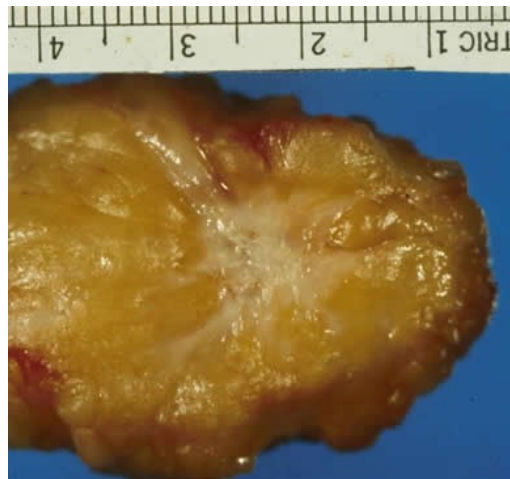
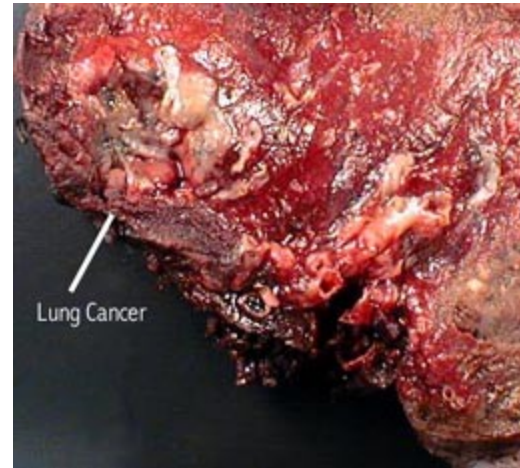
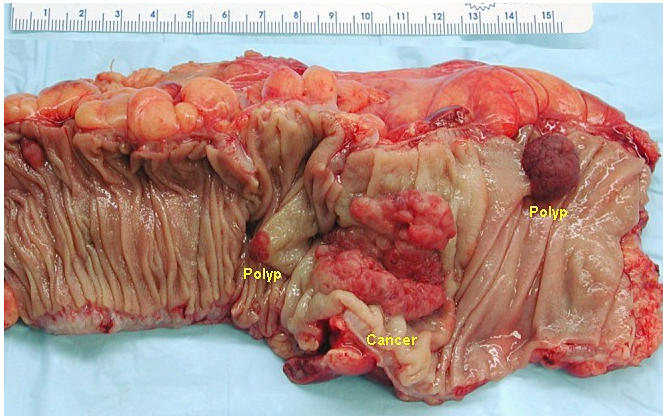
smíšené nádory

Anaplastické nádory, nádory neznámého původu
(1 až 2% nádorů) není možné určit z jaké tkáně je nádor odvozen – **dediferenciace**

Transdiferenciace - EMT



Klasifikace nádorů III - podle postiženého orgánu nebo tkáně karcinom plic, kolorektální karcinom, nádor prsu, akutní myeloidní leukémie...



Histopatologická klasifikace nádorů

STAGING

TNM SYSTÉM

T - rozsah primárního nádoru

N - nepřítomnost či přítomnost
a rozsah metastáz v regionálních
mízních uzlinách

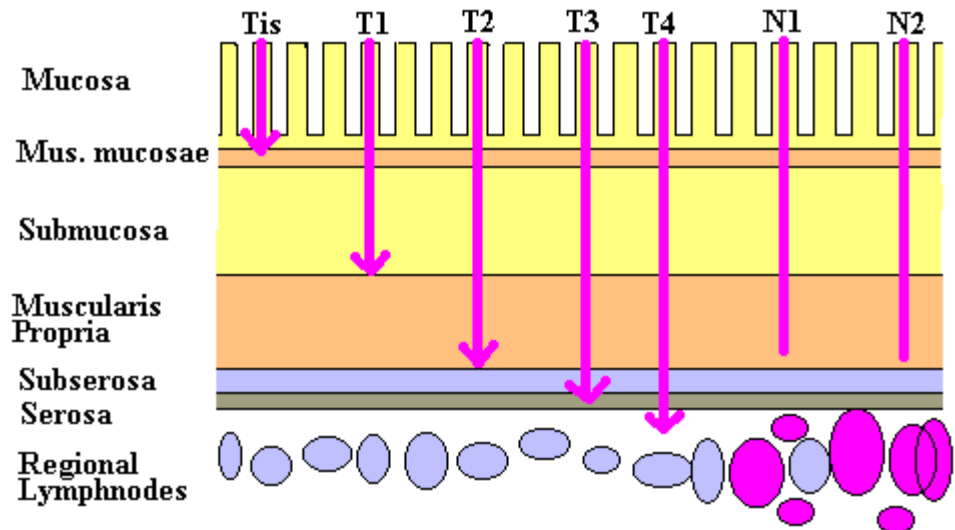
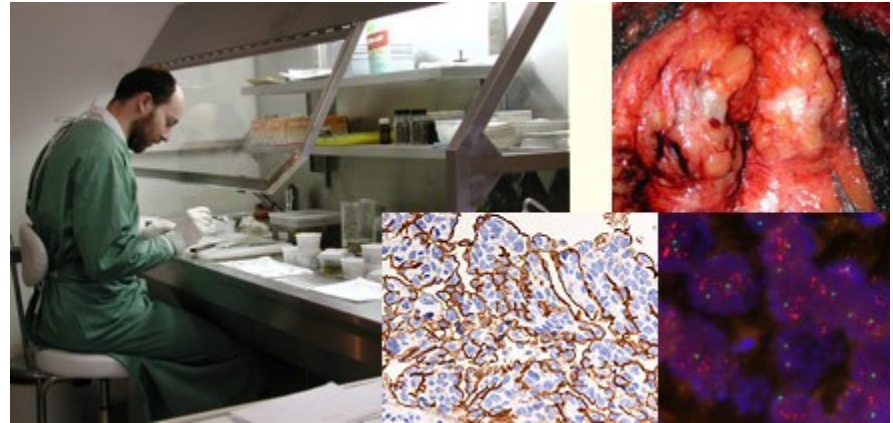
M - nepřítomnost či přítomnost
vzdálených metastáz

T0, T1, T2, T3, T4;

N0, N1, N2, N3;

M0, M1

System je v podstatě „těsnopisem“
pro popis rozsahu určitého
zhoubného nádoru.



T1: malý lokalizovaný nádor, **T2**: větší, ale ohraničený uvnitř orgánu

T3: nádor na hranici orgánu, **T4**: nádor, který se lokálně rozšířil do dalších orgánů

Histopatologická klasifikace nádorů

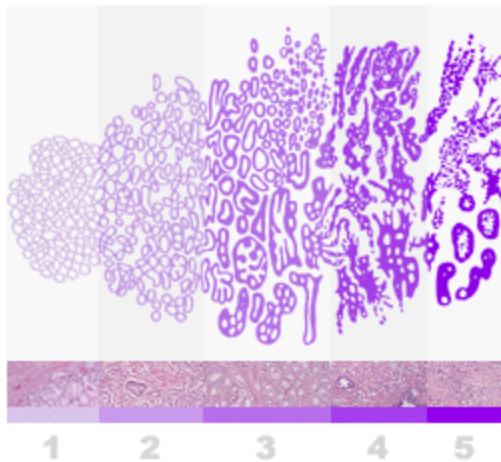
GRADING

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

G1: dobře diferencovaný nádor s dobrou prognózou

G2: středně diferencovaný nádor s prostřední prognózou

G3: málo diferencovaný nádor se špatnou prognózou



TYPING – morfologická diagnostika

Vychází ze závazných klasifikací, obvykle doporučených

WHO. Každá jednotka má přidělen svůj číselný kód

ICDO (International Classification of Diseases for Oncology)

Např. kód 8850/0 je lipom.

Např. kód 8850/6 je metastáza liposarkomu.

První číslo za lomítkem označuje biologické vlastnosti:

0: benigní

1: nejisté chování

2: carcinoma in situ

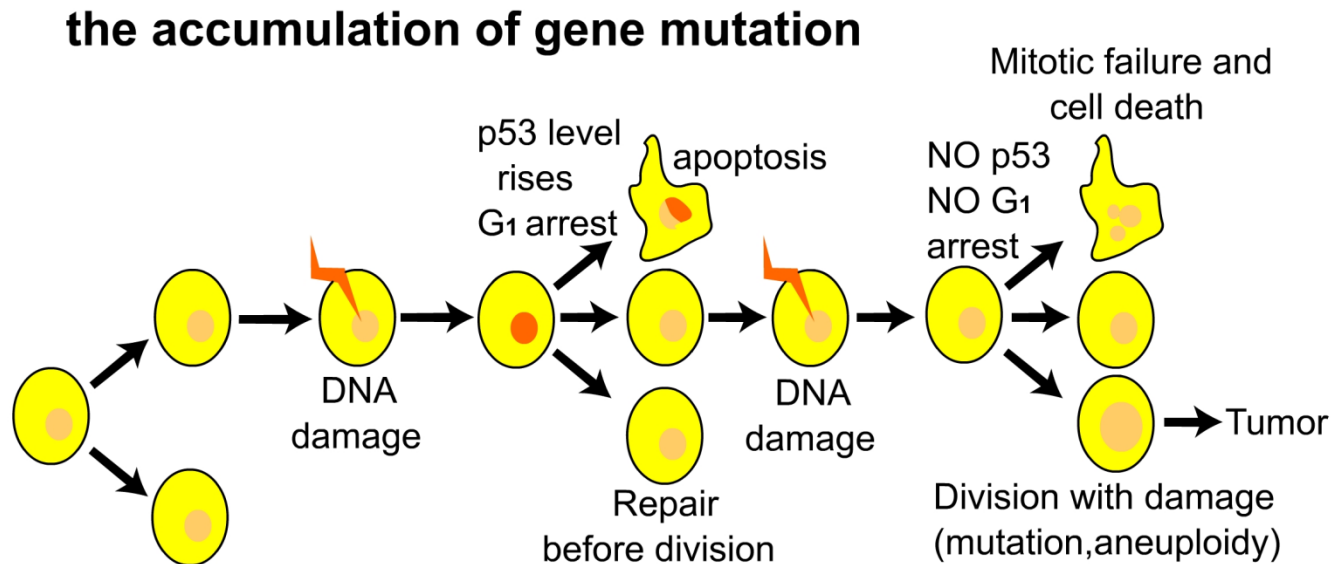
3: maligní

6: metastáza

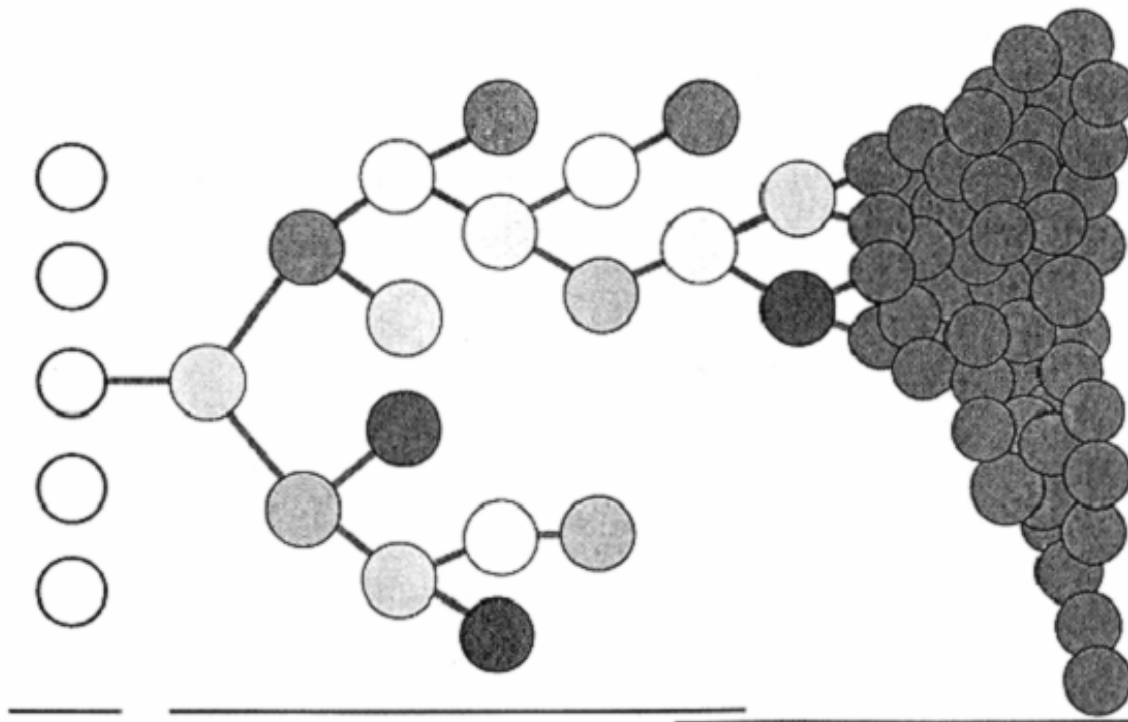
Proces kancerogeneze

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

Neoplastická transformace - je přeměna somatické buňky v buňku nádorovou



Klonální model vývoje nádoru: selekce, klonální expanze



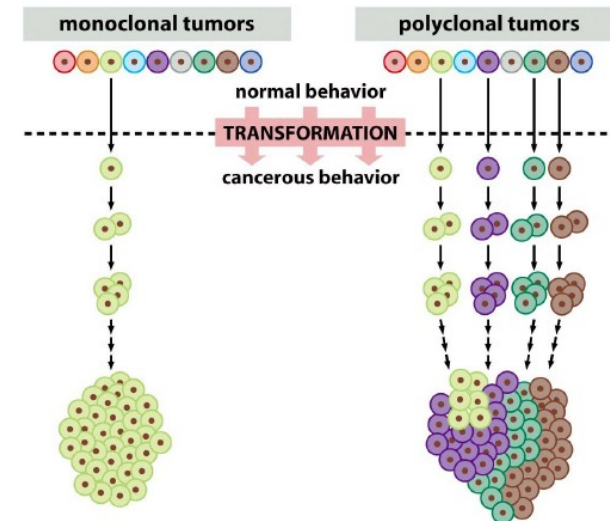
normální buňky

soutěžící subklony buněk

maligní klon



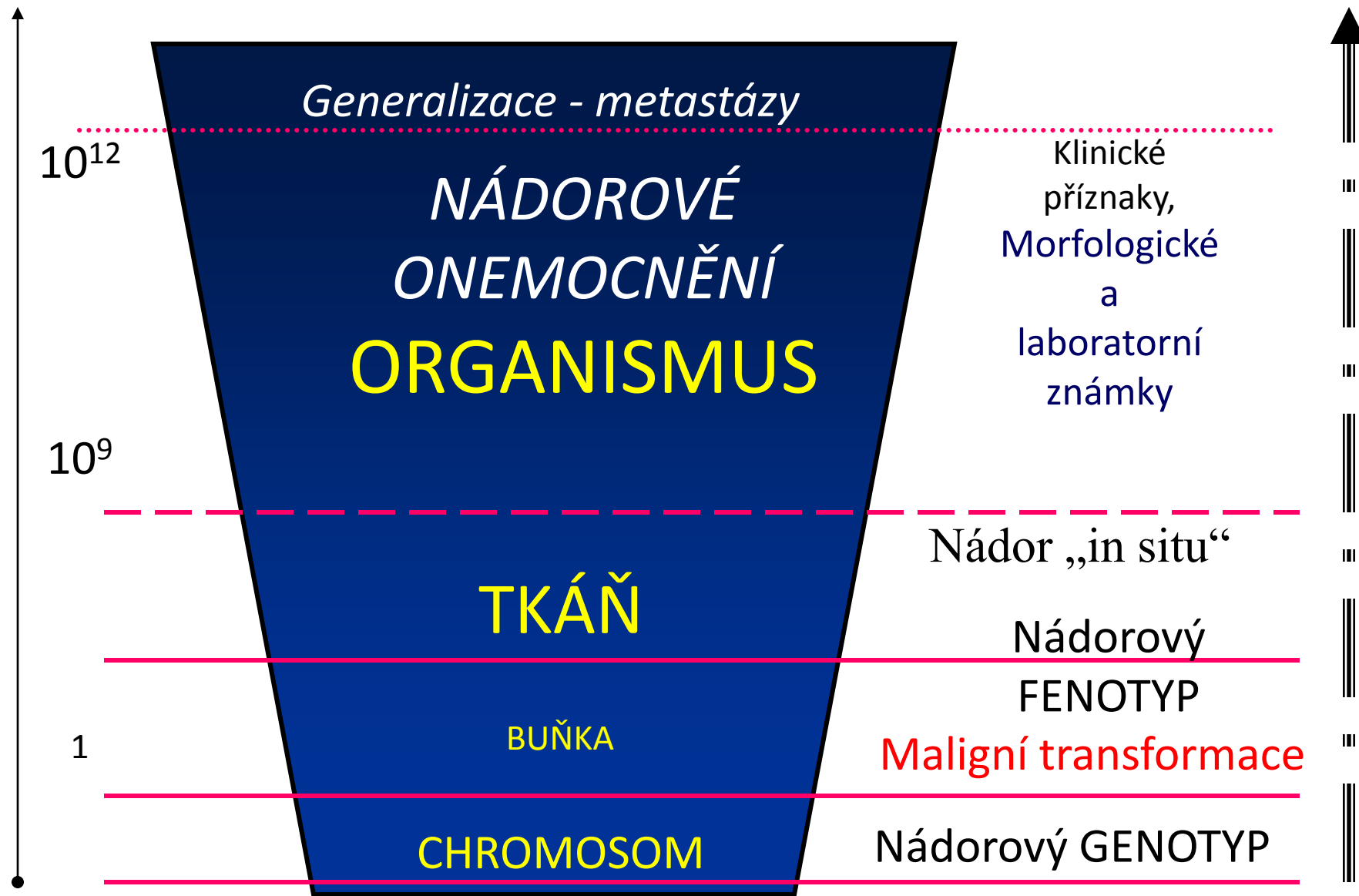
ROKY

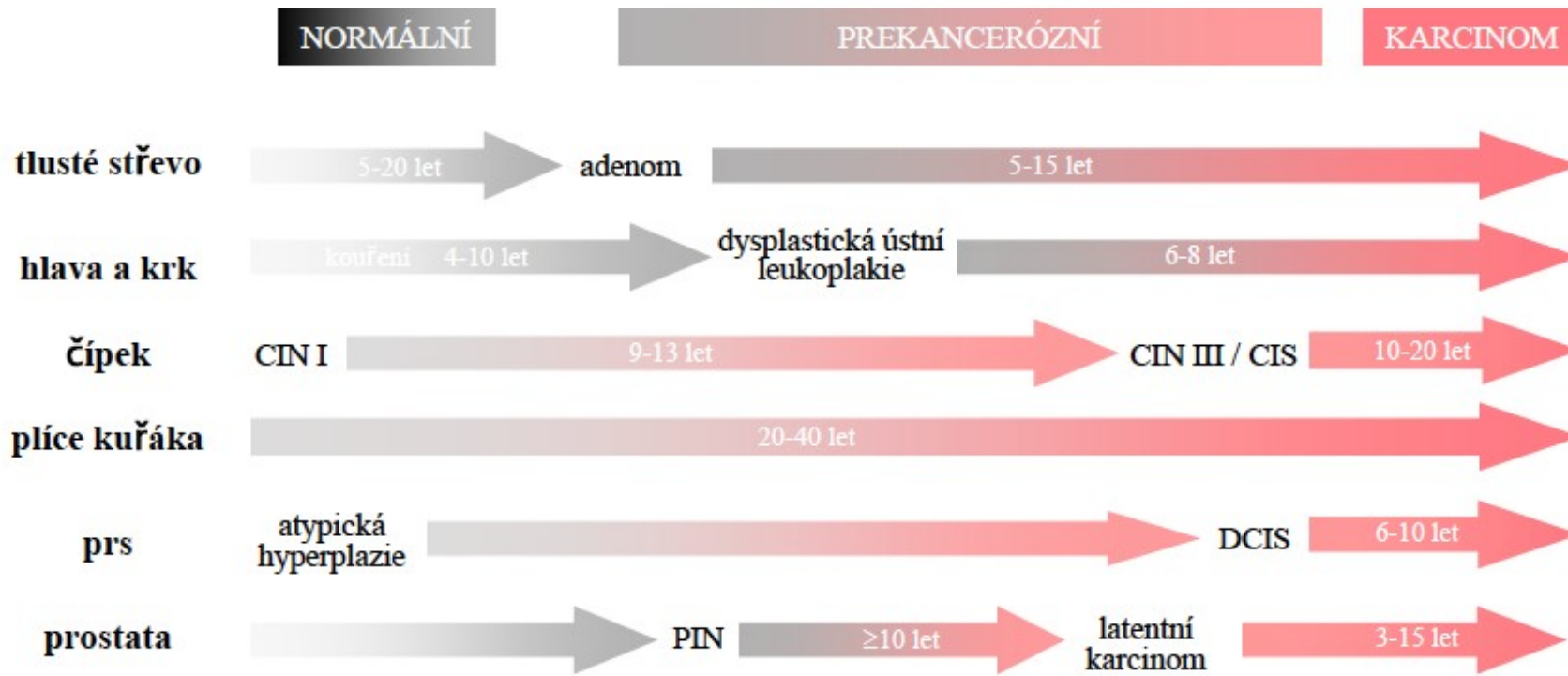
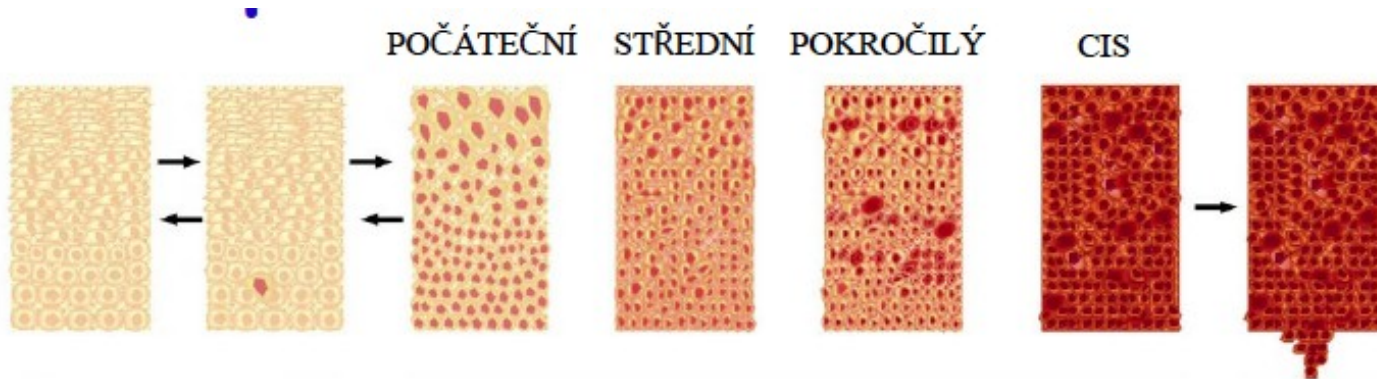


Jsou nádory monoklonální nebo polyklonální?

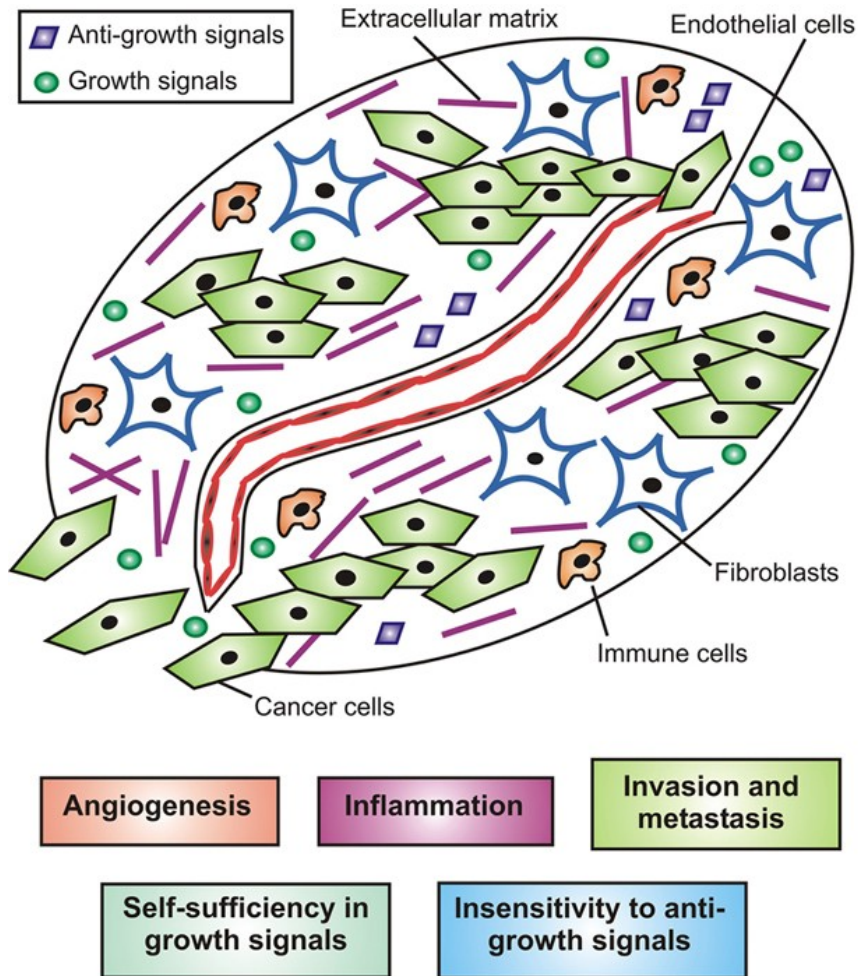
Počet buněk

Progrese





Histologická skladba nádoru – nádor je komplexní tkáň



Nádorové stroma







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

Nádorový parenchym

- vlastní nádorově transformovaný parenchym

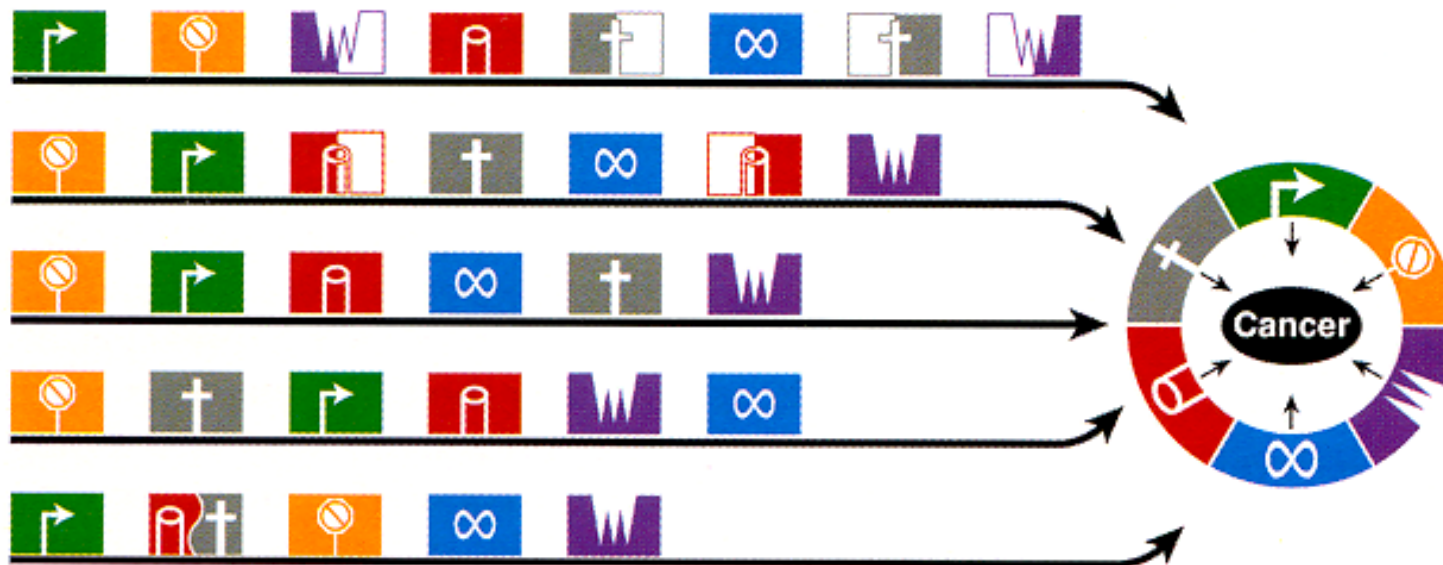
Nádory organoidní, nádory histoidní

Šest získaných vlastností maligního nádoru (Robert A. Weinberg 2000)

získaná schopnost	příklad
 Soběstačnost v produkci růstových signálů	aktivace <i>K-ras</i>
 Necitlivost k signálům zastavujícím b.c.	ztráta RB, p53
 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 individuální průběh



Individuální je

- pořadí zásahů
- počet zásahů
- konkrétní zasažené geny

Mutace protoonkogenů

jsou:

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

PROTOONKOGENY

(kontrolují růst a diferenciaci buněk)

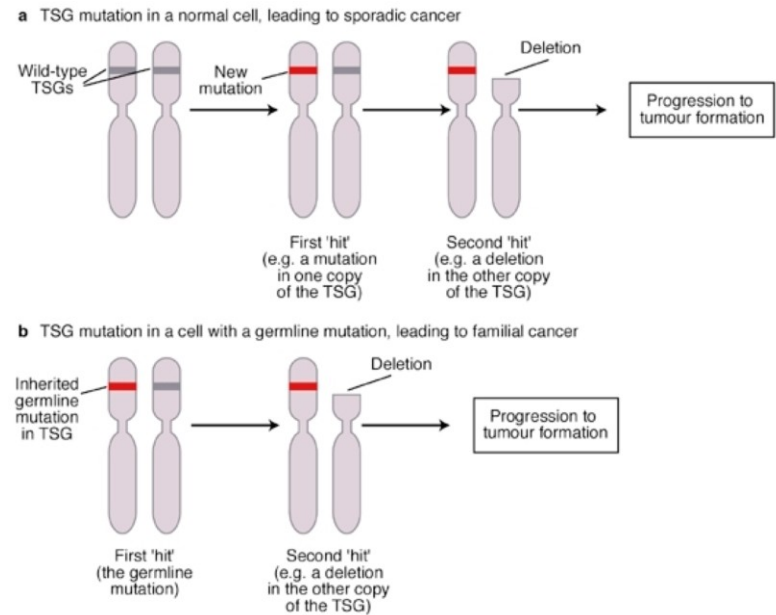
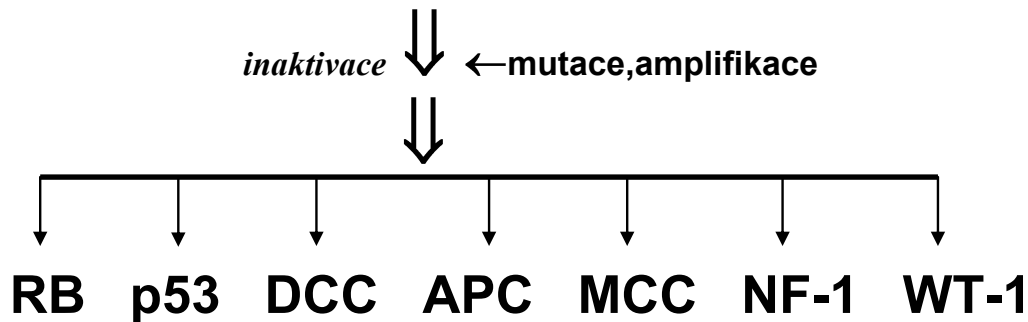
aktivace ↓↓ ← mutace, translokace, amplifikace

**ONKOGENY**

pro růstový faktor	pro receptory růst.faktorů	intracelul. kinasy	pro transkripční faktory	pro transdukční proteiny
sis	erbB-1 erbB-2 fms, trk net, ros	src, abl	c-myc, L-myc N-myc, E 2A fcs, gli	K-ras H-ras N-ras gip

TUMOROVÉ SUPRESOROVÉ GENY (= ANTIONKOGENY)

(účastní se na přenosu signálu mezi buňkami a kontrolují programovaný zánik buněk)



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.

Knudsonova „two hits hypothesis“ (RB)

Mutace nádorových supresorů jsou:

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

Onkogenní (nádorové) viry

- **Retroviry** (RNA viry): obsahují ve svém genomu onkogen (akutně transformující viry) nebo aktivují protoonkogen, vedle kterého se integrovaly (pomalu transformující=inzerční mutageneze)
 - v-onc (virový onkogen)= gen akutně transformujícího retroviru
 - c-onc (celulární onkogen)= gen vznikající aktivací protoonkogenu, genu normálních buněk eukaryontů
 - myc - v. ptačí myelocytomatózy, Ki-Ras – Kirstenův myší sark. v.
 - erbA – v. ptačí erytroblastózy, kit – kočičí sarkomový v.
- **DNA nádorové 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 (objev p53)

adenoviry (EBV, HBV): 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

(Reprinted from Nature, Vol. 278, No. 5701, pp. 261-263, March 15, 1979)

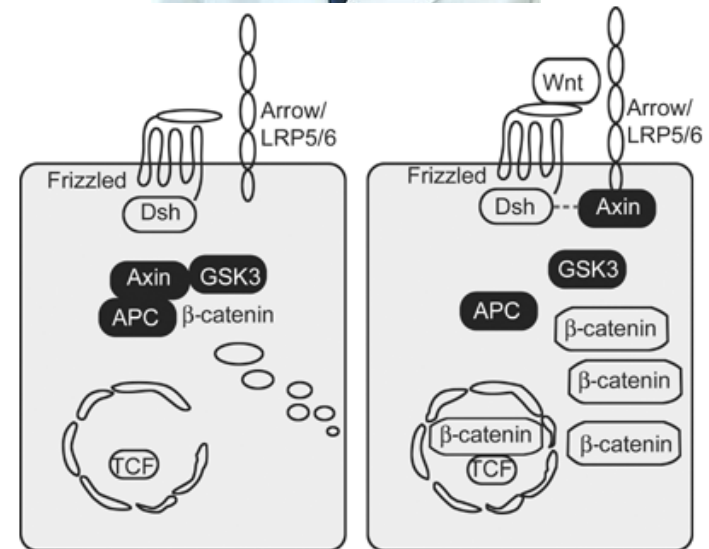
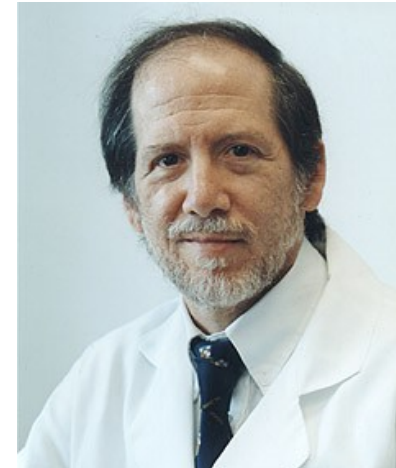
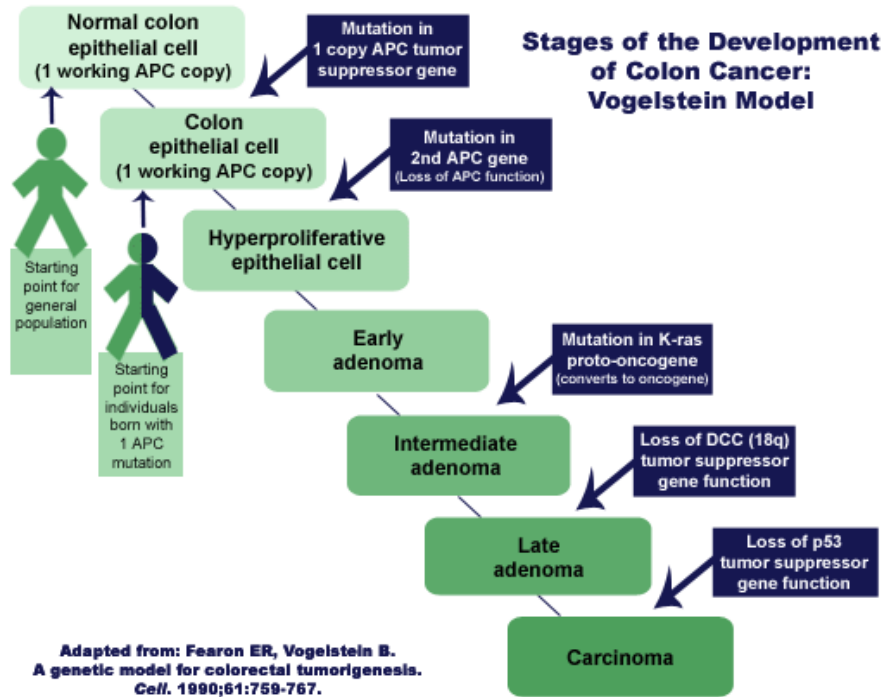
© Macmillan Journals Ltd., 1979

T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells

THE early region of the small DNA tumour virus, simian virus 40 (SV40), is known to code for at least two polypeptides, the t and T antigens ('small t' and 'large T'). Both these polypeptides are expressed in cells transformed by the virus^{1,2}, and the T antigen is essential for both the initiation and maintenance of the transformed state^{3,4}. We therefore need to know the mechanism of SV40-induced transformation. We report here that the T antigen in a line of SV40-transformed mouse cells forms an oligomeric complex with the protein p53. This complex is essential for the maintenance of the transformed state. The SV40-transformed mouse cell line was initiated by as little as 1 µl of a rabbit



Vogelsteinuv model vzniku nádorů tlustého střeva



FAP – mutace APC

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 k takové akumulaci mutací nemůže během lidského života dojít.

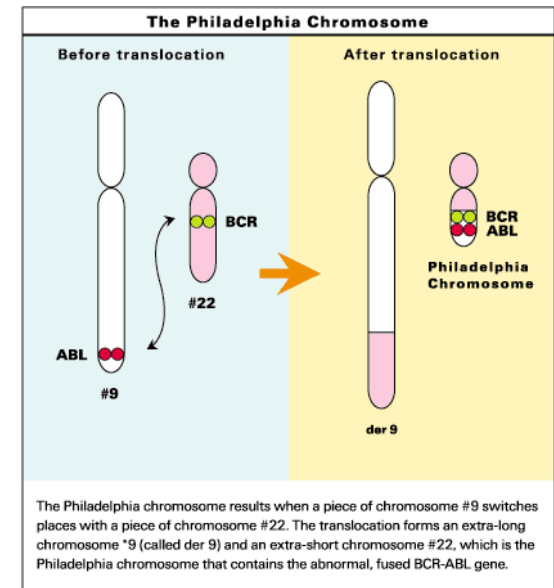
Co umožňuje nádorovou transformaci?

- Akumulace všech nutných mutací umožněna **genetickou nestabilitou** (tzv. „mutator hypothesis“). Nestabilita je záležitost **rychlosti**, s jakou k mutacím dochází
 - K akumulaci stačí **normální rychlost mutací ve spojení s vlnami klonální expanze, které mohou být způsobeny pozitivní selekcí buněk** „prenádorových“.
- **Většina nádorů je geneticky nestabilních**

Typy genetických změn v nádorech

1. Menší změny v sekvenci DNA - missense mutace, menší delece a inserce (např. missense mutace *K-ras* se vyskytuje u 80% nádorů pankreatu, převážně missense mutace *p53* u téměř poloviny všech nádorů,..)
2. Změny v počtu chromozomů - ztráty případně zisky celých chromozomů (ztráta chromozomu 10 u glioblastomů spojena se ztrátou nádorového supresoru *PTEN*; získání chromozomu 7 u papilárních renálních karcinomů spojeno s duplikací mutantního onkogenu *c-met*)
3. Chromozomální translokace - fúze částí odlišných chromozomů nebo normálně nesouvisejících částí téhož chromozomu (na molekulární úrovni může být doprovázeno fúzemi mezi dvěma odlišnými geny) (Philadelphský chromozom a další translokace typické pro řadu leukémií)
4. Amplifikace genů (amplifikace genu *N-myc* u 30% neuroblastomů)

Ke genetické nestabilitě dochází **na více úrovních**.



1. Nestabilita v sekvenci DNA – NIN a MIN

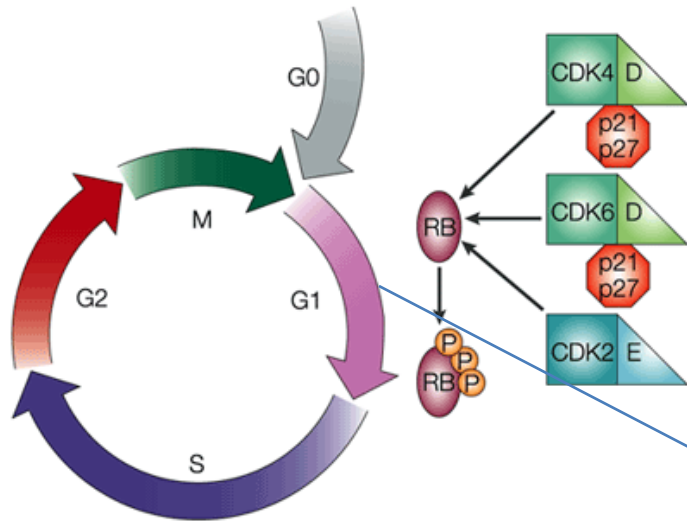
- Tento typ nestability je u lidských nádorů vzácnější, ale když se vyskytne, má dramatické následky. Zdrojem nepřesností při replikaci DNA jsou chyby vzniklé při DNA polymeraci (tj. kvalita DNA polymeráz a souvisejících „proofreadingových“ procesů) a chyby v systémech oprav DNA.
- 1. Nukleotidová excizní oprava („nucleotide-excision repair“ - **NER**) - s ní spojená nestabilita („NER-associated instability“ - **NIN**)
2. Oprava špatného párování („mismatch repair“ - **MMR**) - s ní spojená mikrosatelitová nestabilita (**MIN**)

2. 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. Běžná je ztráta chromozomu související s LOH, často je doprovázena získáním opačného chromozomu. ⇒ Ne vždy změny karyotypu souvisejí s CIN! Během buněčného cyklu se vyskytuje několik **kontrolních bodů**, které monitorují správný postup buněčného dělení. Zatím chybí jednoznačná kritéria k určení genů odpovědných za CIN a k určení jejich „míry zodpovědnosti“.

Poruchy regulace buněčného cyklu

Ztráta regulace buněčného cyklu je kritická součást transformace



Nature Reviews | Molecular Cell Biology

M - kopie DNA jsou separovány;
kondenzované chromozomy

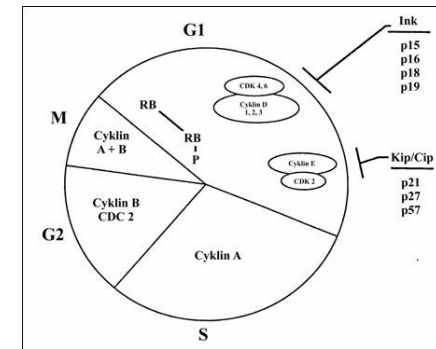
G1 - obsah DNA: 2N

S - replikace DNA; inkorporace značených nukleotidů

G2 - obsah DNA: 4N

G0 - stárnoucí nebo dlouhodobě se nedělící buňky

bod restrikce: klíčový
regulační / rozhodovací bod
buněčného cyklu



Každá fáze cyklu je katalyzovaná specifickými **komplexy cyklin-dependentní kinázy a cyklinu.**

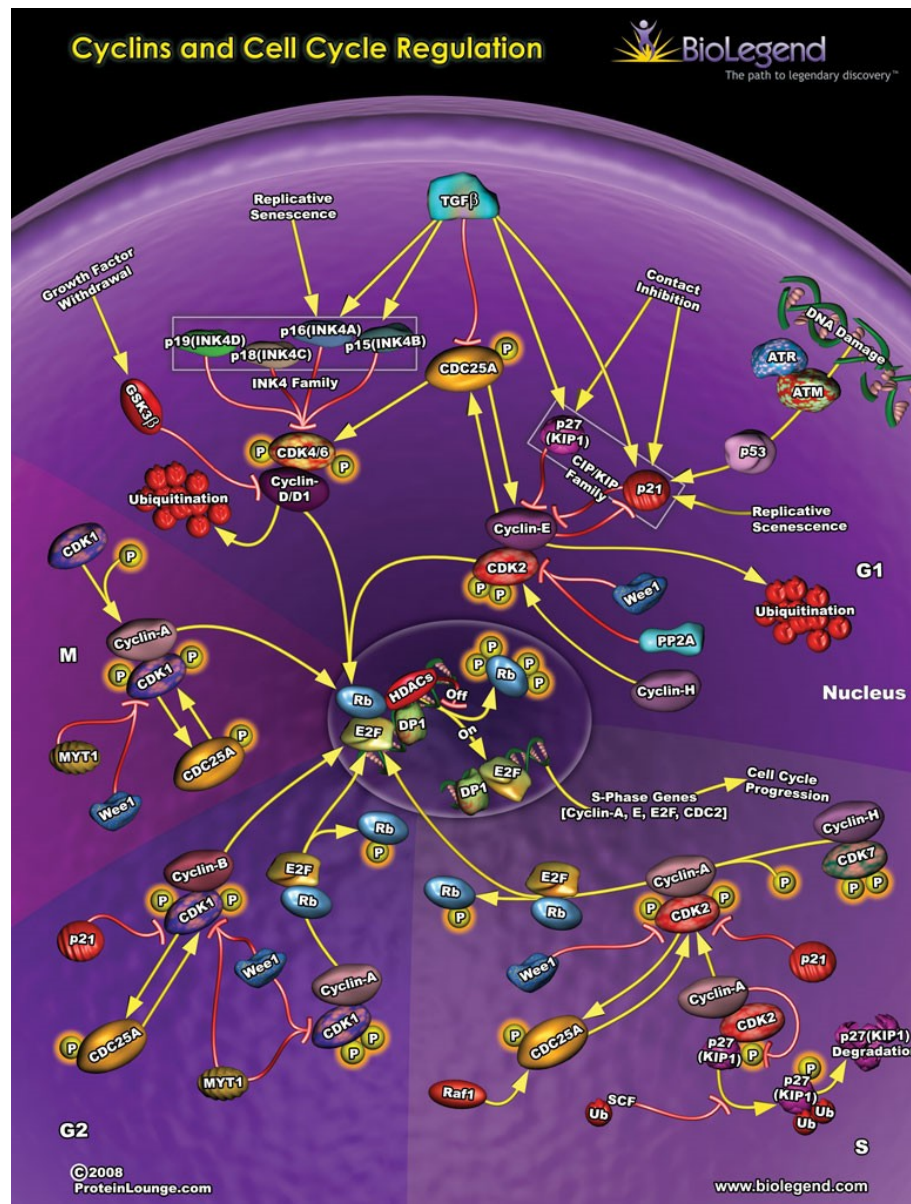
cyklin-dependentní kinázy (CDK, CDC) – aktivita je závislá na vazbě cyklinu

cykliny - jejich hladina kolísá v závislosti na fázi buněčného cyklu

RB- retinoblastomový gen, nefosforylovaná forma pRB blokuje přestup z G1 do S fáze (E2F)

Fosforylovaná nebo **hyperfosforylovaná forma pRB – neaktivní – proliferace**

Retinoblastom – maligní nádor retiny, obě alely pRB mutovány nebo deletovány



Nekróza vs. apoptóza

Nekróza:

týká se skupiny postižených buněk
vyvolána nefyziologickým poškozením
(virová infekce, hypotermie, hypoxie,
metabolické jedy, ..)

fagocytóza makrofágy

významná **zánětlivá reakce**

Apoptóza –

programovaná buněčná smrt:

postihuje jednotlivé buňky

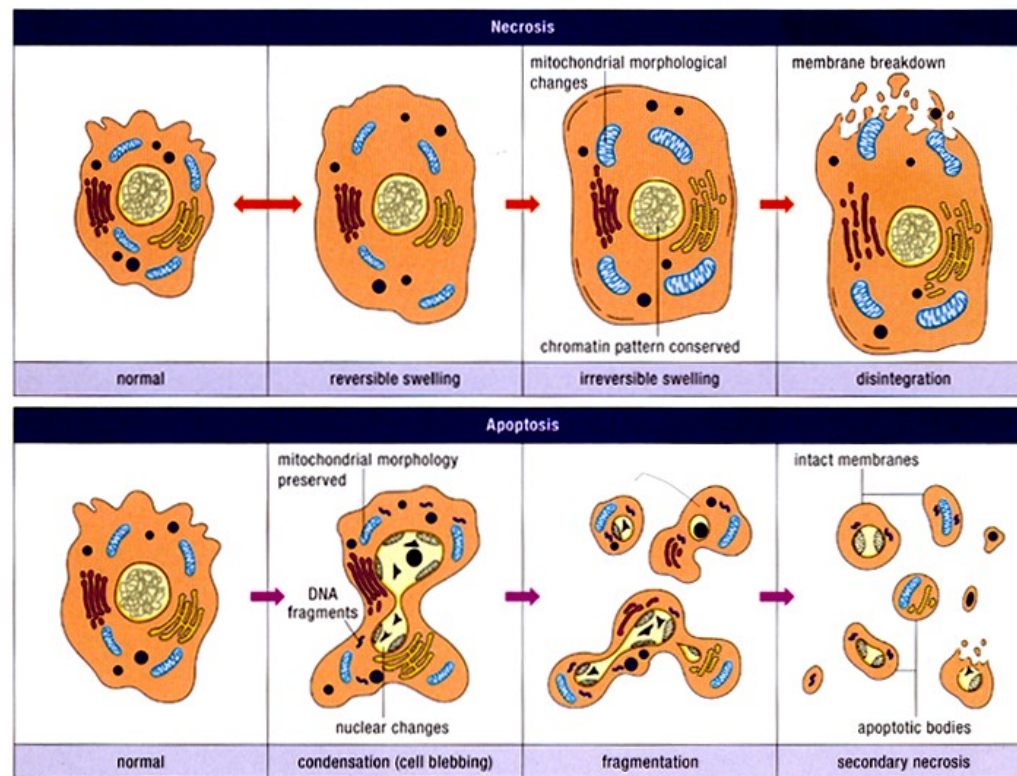
indukována fyziologickými stimuly
(nedostatek růstových faktorů, změny
hormonálních hladin, ..)

fagocytóza okolních buněk nebo

makrofágy žádná zánětlivá reakce

na rozdíl od nekrózy je popsáno

mnoho příkladů **fyziologické** apoptózy.



Zvýšená apoptóza

syndrom získané imunodeficience AIDS (CD4+ T-buňky),

neurodegenerativní nemoci (Alzheimerova, Parkinsonova nemoc)

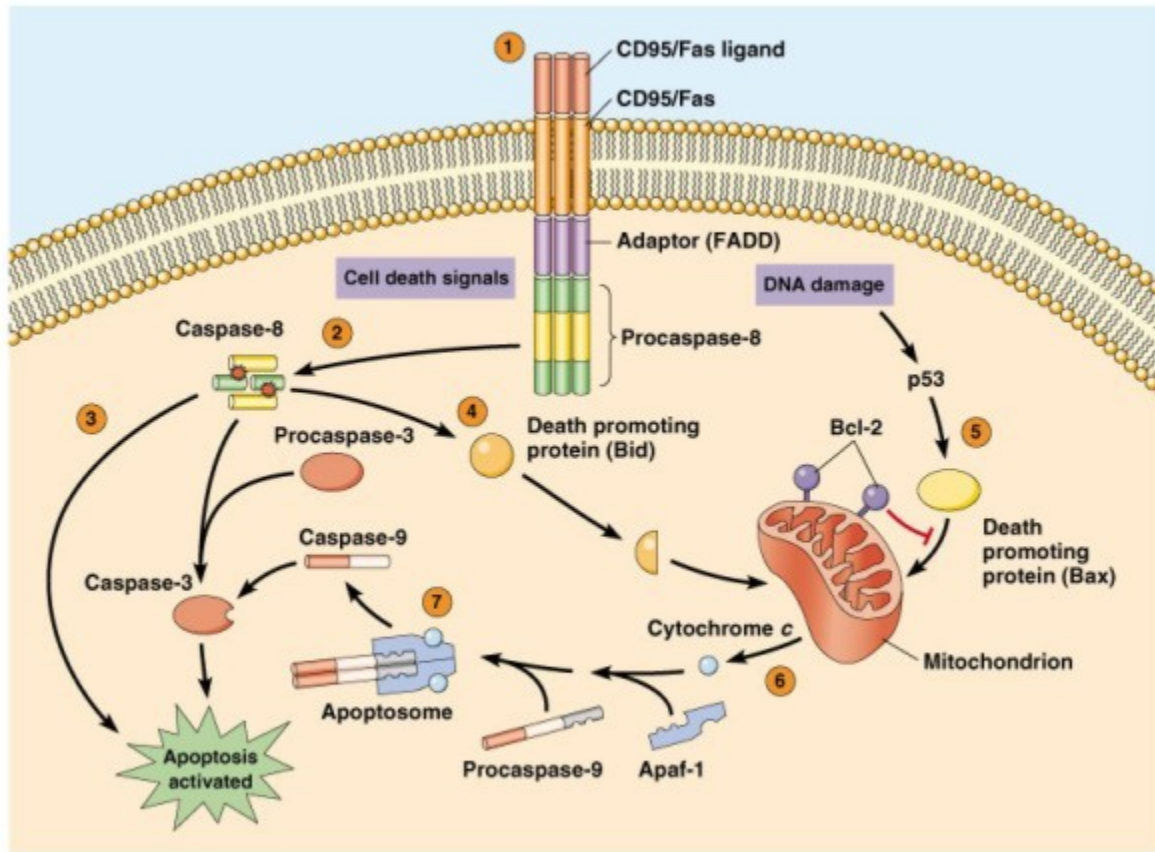
myelodysplastický syndrom (hypercelulární dřev, periferní cytopenie)

některé autoimunitní nemoci

Suprese apoptózy

Nádory, některá autoimunitní onemocnění, virové infekce

Regulace a průběh apoptózy



Vnější cesta receptorová:

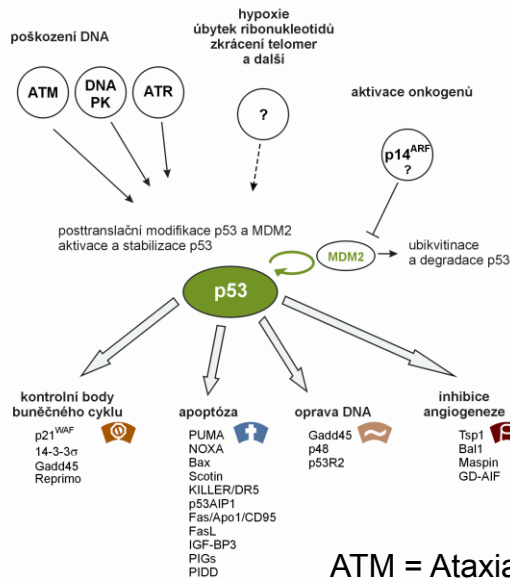
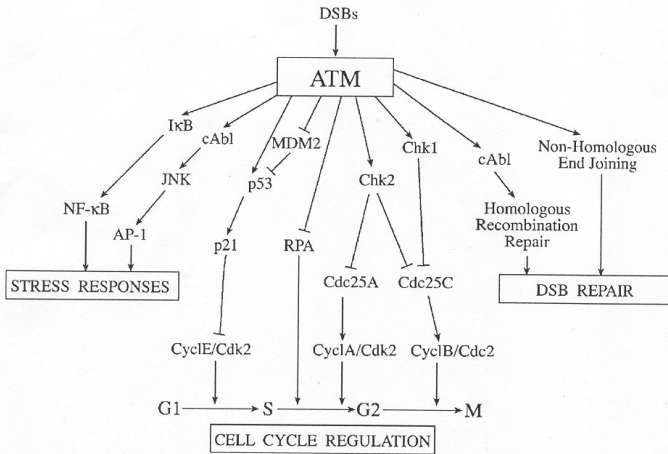
vazbou ligandu na příslušný **receptor smrti** vzniká proapoptotický signál. Ten vede k aktivaci domény smrti za kooperace dalších proteinů. Cílem je aktivace **prokaspázy 8**.

3 geny Ced3,4,9 kontrolující apoptózu u *C. elegans*
 13 kaspáz homologů Ced3
Apaf1 homolog Ced4
Bcl2 rodina-17 homologů Ced9
 supresory apoptózy brání uvolnění cyt-c z mitochondrií

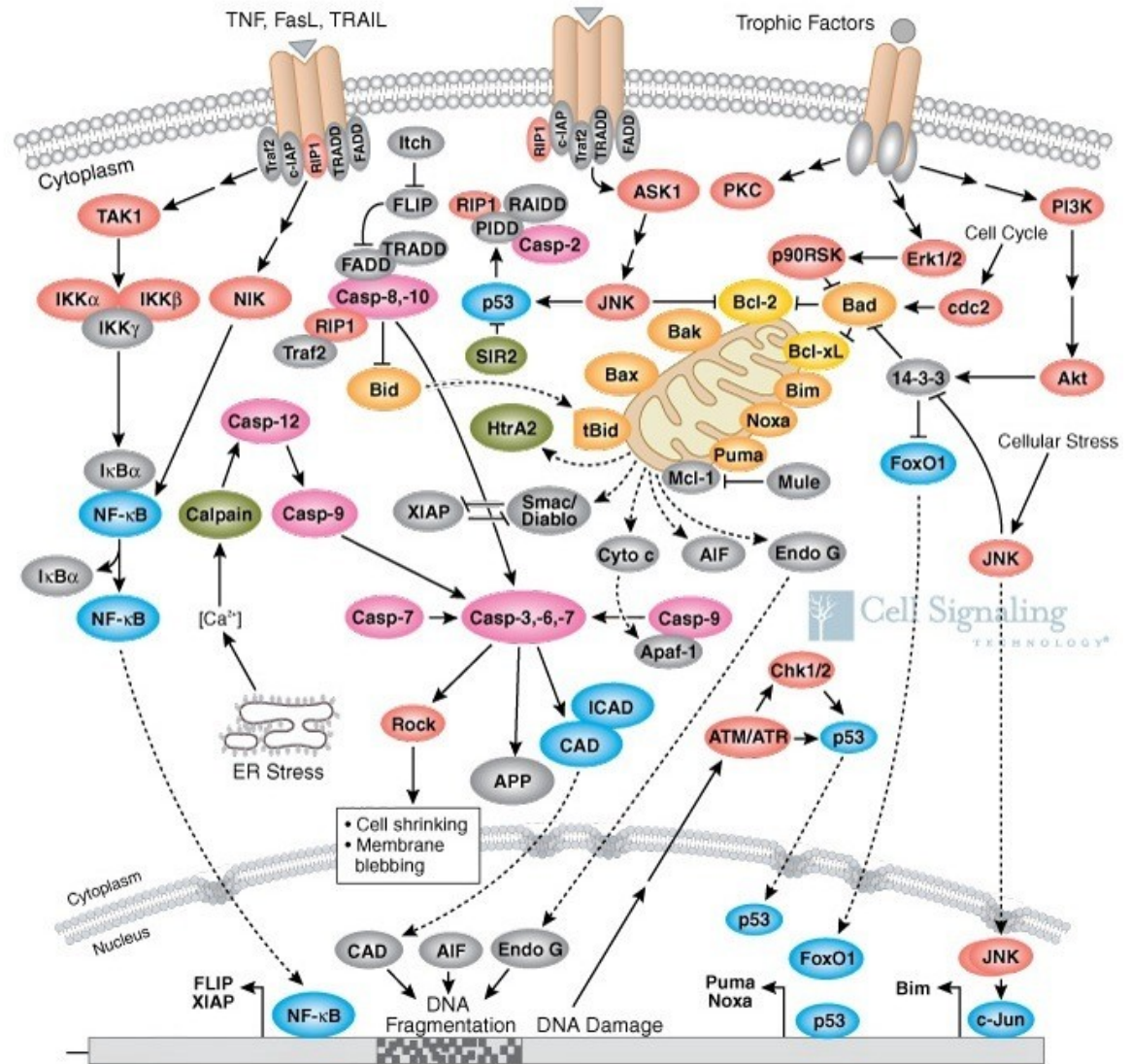
Vnitřní cesta: signalizací např. přes p53 je zahájen apoptotický děj, jehož složkou je systém **Bcl-2/Bax**, signalizace přes **mitochondrie**, tvorba komplexu nazývaného **apoptozóm** a cílem je aktivace **prokaspázy 9**.

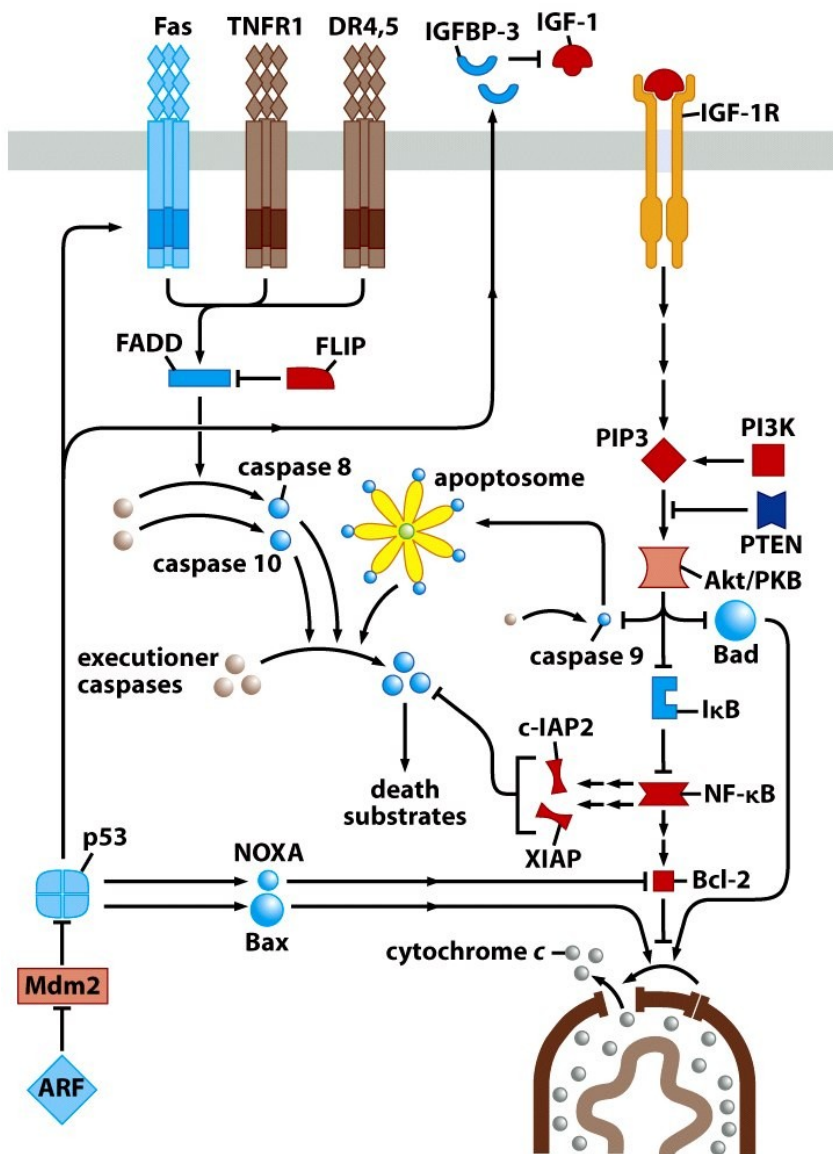
Regulace a průběh apoptózy

Signalizace ATM, p53



ATM = Ataxia telangiectasia mutated





Anti-apoptické strategie nádorů

Nádory používají nejrůznější strategie, jak zmenšit šanci na vstup do apoptózy. Buď snižují hladinu/aktivitu proapoptických (modře) proteinů, nebo zvyšují hladinu/aktivitu antiapoptických (červenohnědě) proteinů.

Nádory a „nesmrtelnost“ buněk, neomezený replikační potenciál

Opakované dělení buněk je limitováno **zkracováním telomer**

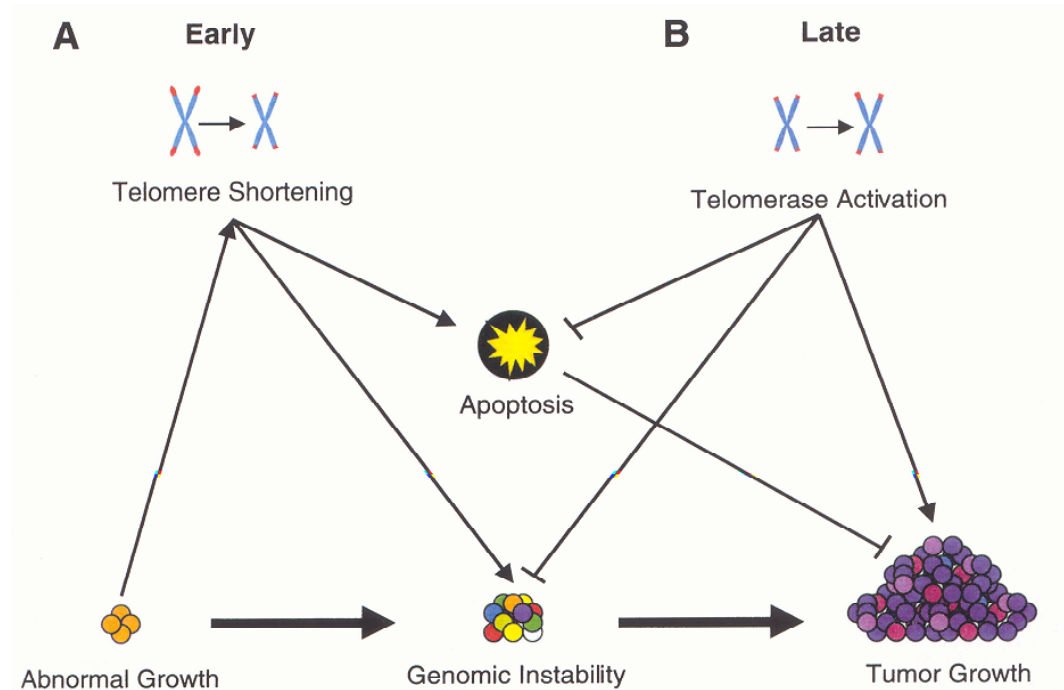
Telomery jsou stabilizačním faktorem terminální části chromosomů a ukotvují je k nukleární matrix. Telomery mají opakující se sekvence nukleotidů TTAGGG
telos = konec (end), meros = část (part)

Délka telomer se zkracuje (1 dělení = 1 telomerická sekvence)
a destabilizuje tak chromosomy

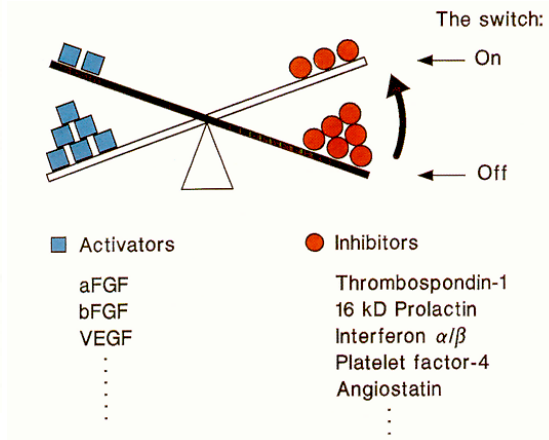
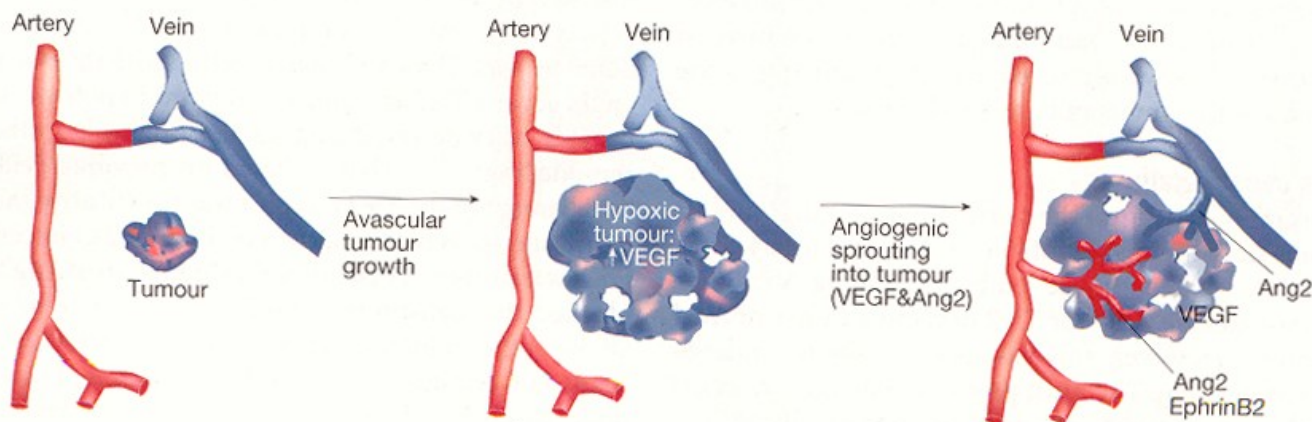
Obnovování telomerických sekvencí umožňuje enzym telomeráza.

85 až 90% nádorů má aktivní telomerázu.

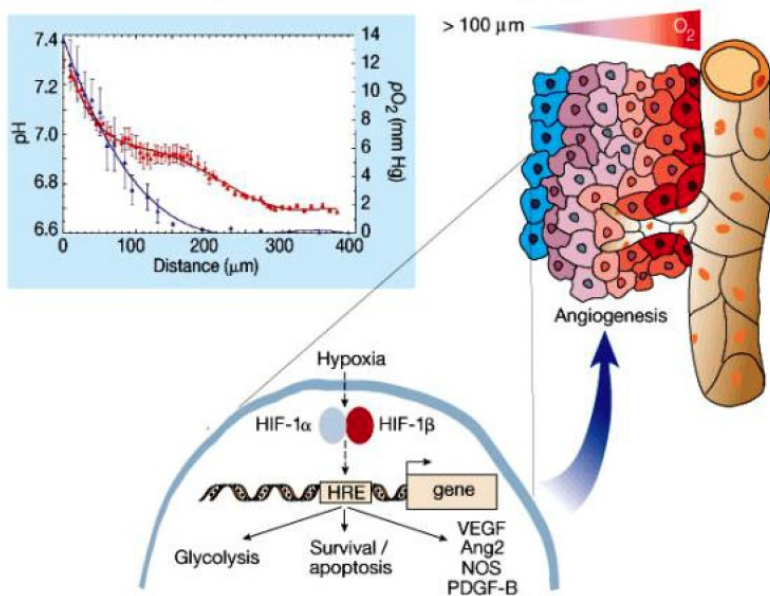
K aktivaci telomerázy dochází v **pozdních** stadiích kancerogeneze.



Význam angiogeneze v rozvoji nádorového onemocnění

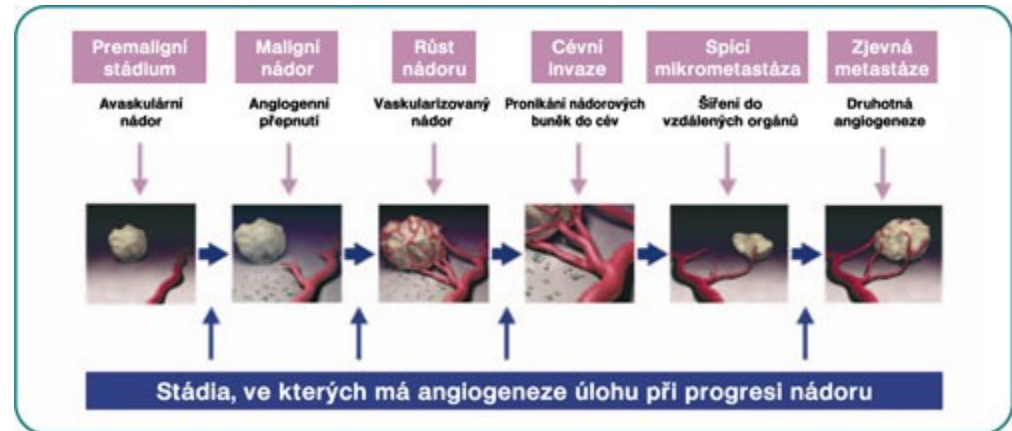


Role of hypoxia in Tumor angiogenesis

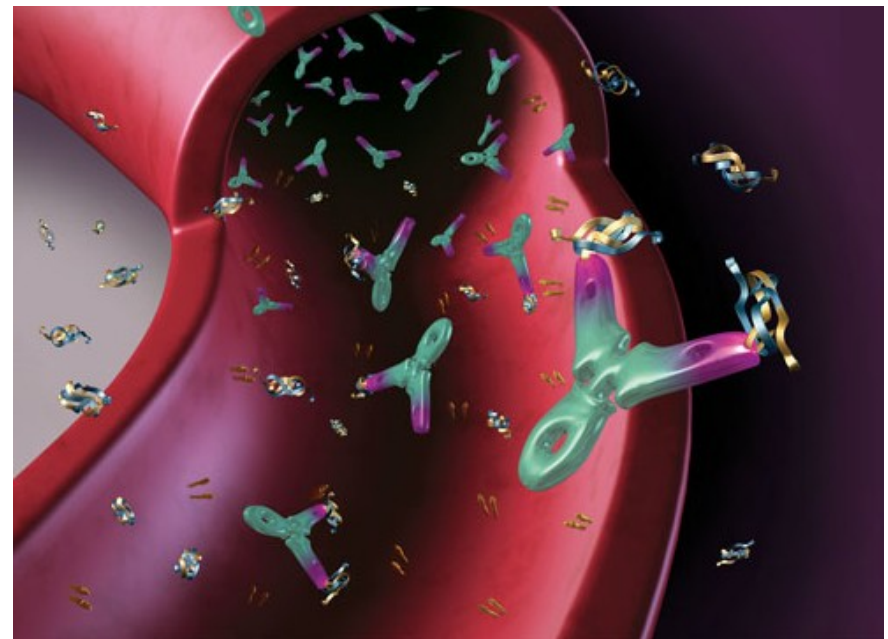
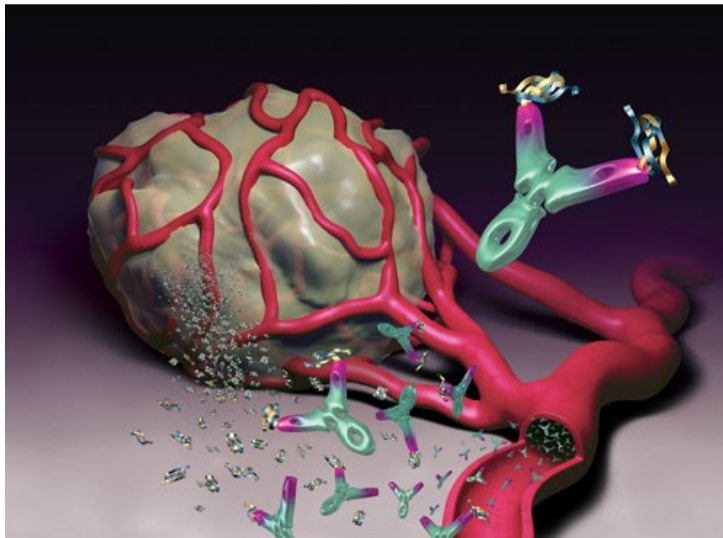


Angiogeneze má klíčový význam pro nádorový růst
 Rostoucí nádorové ložisko může bez cévního zásobení
 dosáhnout pouze velikosti 1-2 mm³
 Neoangiogenezi indukuje vzniklá hypoxie
 Nerovnováha mezi proangienními a
 antiangienními faktory = „angienní switch“

Cílená antiangiogenní léčba

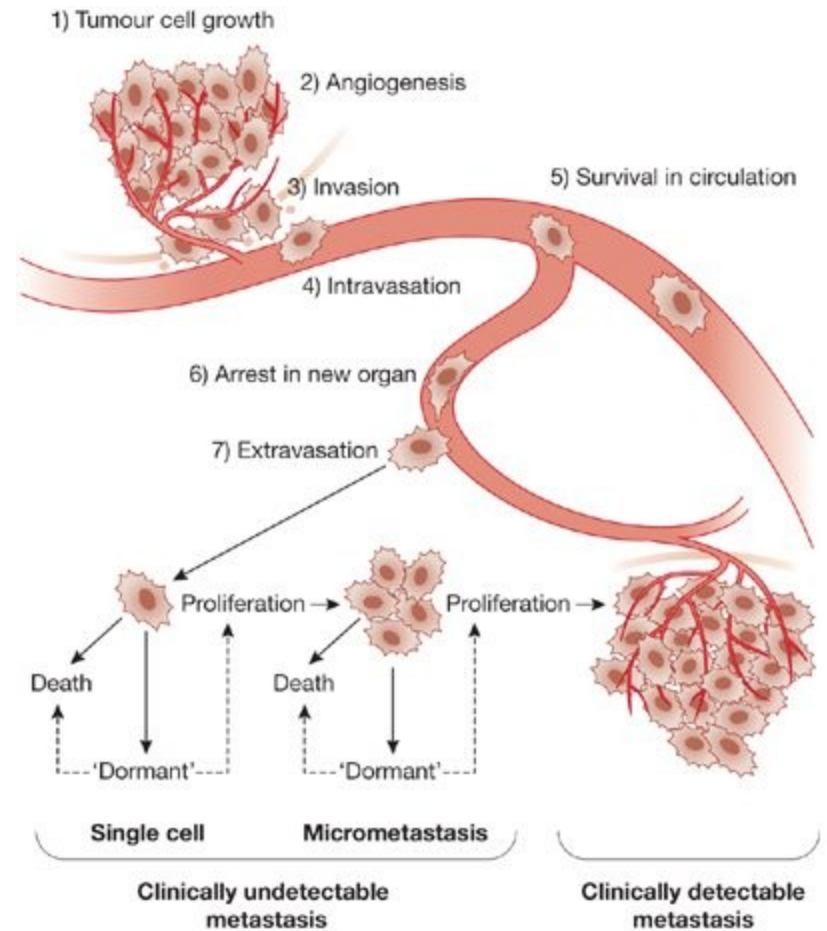


**VYPNĚTE ANGIOGENEZI
PRODLUŽTE ŽIVOT**



METASTATICKÁ KASKÁDA

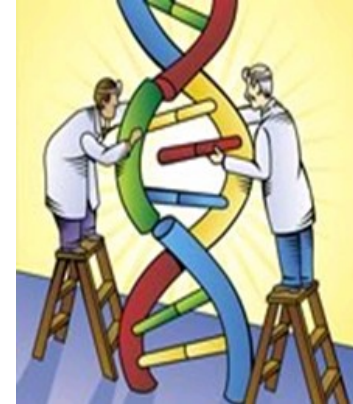
- **Zvýšení motility (invazivita)**
(průnik do stromatu a přes cévní stěnu)
- **Vytváření embolů v cirkulaci**
- **Adherence** ke stěně cévy
- **Průnik do parenchymu**
- **Vytvoření metastázy** (proliferace v místě, angiogeneze, odpověď na mikroprostředí)
- **Metastázy metastáz**
- **Nádorová generalizace**



Metastasis –related genes (adhezivní molekuly, MMP, proteázové inhibitory, růstové faktory,...)

Take home

- 1) Epidemiologie zhoubných nádorů v České republice
- 2) Etiologie nádorových onemocnění a prevence, příklady
- 3) Základní pojmy a klasifikace nádorových onemocnění
- 4) Histopatologická klasifikace nádorů
- 5) Proces kancerogeneze, klonalita
- 6) Histologická skladba nádoru – nádor je komplexní tkáň
- 7) Šest získaných vlastností maligního nádoru
- 8) Onkogeny a nádorové supresory
- 9) Genetická nestabilita nádorů
- 10) Poruchy regulace buněčného cyklu
- 11) Regulace a průběh apoptózy, antiapoptotické strategie nádorů
- 12) Telomery -neomezený replikační potenciál nádorové buňky
- 13) Význam angiogeneze v rozvoji nádorového onemocnění
- 14) Metastatická kaskáda
- 15) Metastasis-related genes



Náplň příští přednášky

Moderní metodické přístupy v molekulární medicíně I – příprava biologického materiálu (tkáň, krev, stolice, FFPE) a izolace nukleových kyselin (kontrola kvality), genomika (Real-Time qPCR, DNA čipy, SNP čipy, CGH čipy, mikroRNA čipy, Real-Time PCR Arrays – srovnání technologických principů a přehled nejpoužívanějších technologií), využití genomiky pro molekulární klasifikaci nádorových onemocnění, jak navrhovat studie a jak číst publikace – výhody a limitace genomických metod

Dotazy?

