

TZKM 19. 9. 2018

# KONCEPCE GENOMU „READ AND WRITE“ A DŮSLEDKY JEJÍ APLIKACE V ONKOLOGII

---

# KONCEPCE „**READ AND WRITE GENOME**“

---

- × Genomy jsou databáze DNA, které obsahují kódující a formátující sekvence, které umožňují dědičné předání schopnosti syntetizovat biologicky adaptivní molekuly RNA a proteinů. V průběhu evoluce se kódující sekvence i formátující signály mění, což umožňuje stále nové adaptace pomocí restrukturalizace genomu ([Shapiro, 2011](#) a [Shapiro, 2013](#)).
- × Dynamický read–write (RW) genome střídá tradiční představu „**read only memory**“ (ROM) genomu.

## KONCEPCE „READ AND WRITE (RW) GENOME“

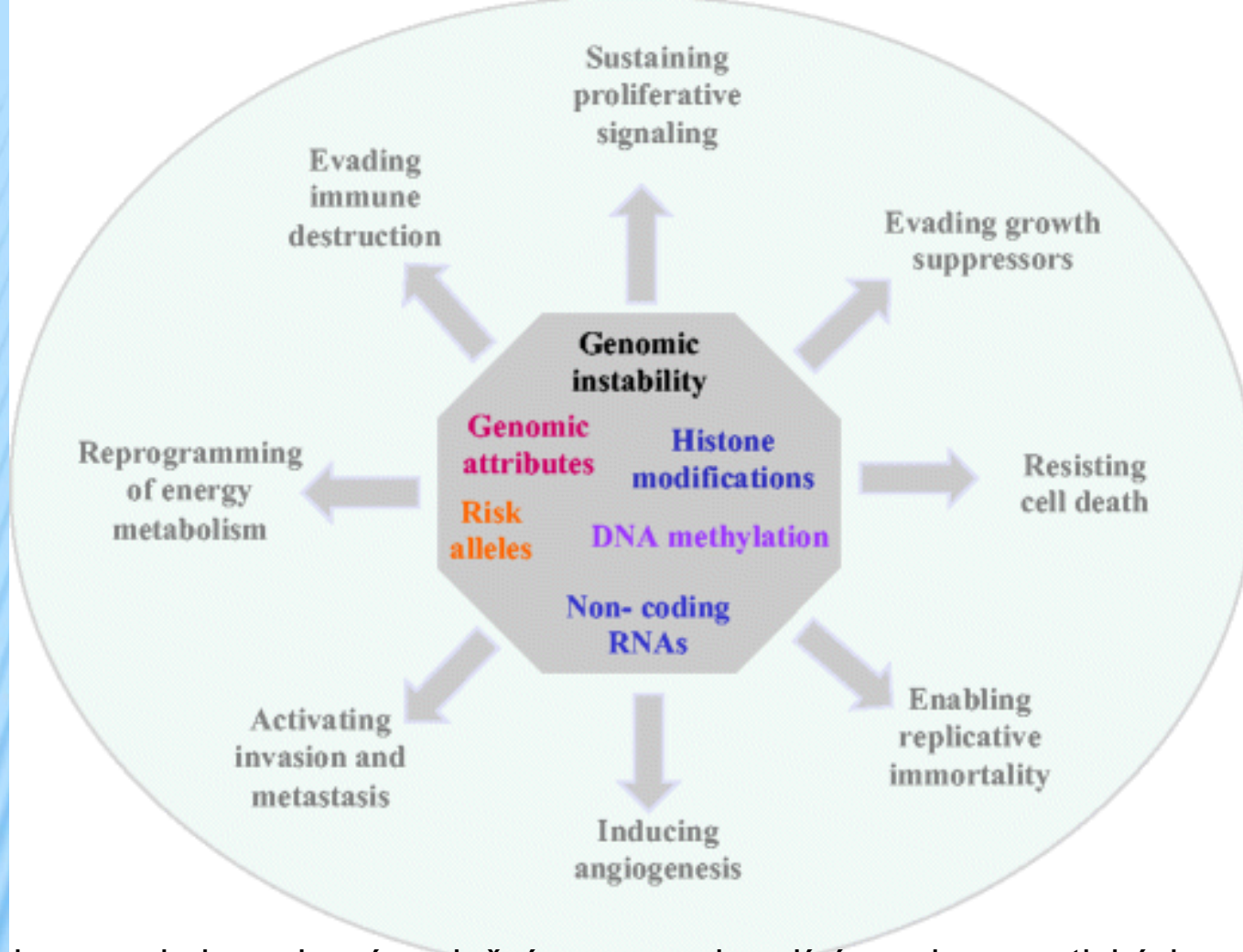
- × Základní ideou této koncepce je myšlenka, že buňky používají DNA jako modifikovatelný prostředek skladující data („data storage medium“), který kóduje RNA a proteinové molekuly: tyto molekuly si musejí poradit s měnícím se prostředím.
- × Změna je pro žijící organismy kontinuálním dějem. Ke změnám dochází během průchodu buněk cyklem buněčného dělení, s měnícími se vlastnostmi vnějšího prostředí, se zkušeností buněk s poškozením, s vývojem multicekulární morfogenezy a s interakcí buněk s jinými buňkami a organismy.



# KONCEPCE „READ AND WRITE (RW) GENOME“

---

- × Ke zvládnutí **krátkodobých změn** buňky primárně nasazují přechodně vznikající nukleoproteinové komplexy, které jsou schopny regulaci exprese genomických dat a umožňují tak **růst a replikaci buněk**.
- × Pro **dlouhodobější změny**, jako je **buněčná diferenciacce a multiceulární morfogeneze**, vstupují do hry dědičné epigenetické modifikace genomu.
- × Pro **nejdlouhodobější změny**, které vytvářejí nové biologické funkce během evoluce, buňky nasazují schopnost „**natural genetic engineeringu**“, které umožňují přebírat a alterovat sekvence DNA a rekonfigurovat organizaci genomu. Někdy tyto funkce mění strukturu DNA také v zájmu **krátkodobých cílů** (např. rychlá nastolená diverzita mezi receptory adaptivního imunitního systému).



Tumorigeneze je komplexní evoluční proces zahrnující mnoho genetických a epigenetických alterací. Epigenetické změny během iniciace a progresu tumoru poskytují abundantní zdroj variability, která podporuje rychlou adaptaci tumoru a poskytuje bohatý zdroj labilních biomarkerů pro genetickou analýzu.



# PRŮBĚH KANCEROGENEZE

---

- Tři stádia:
- (1) Iniciační stádium, které představuje prvotní genetickou událost, tj. *mutaci určitého kritického genu*. Jde o období časově krátké, ale nevratné; iniciovaným buňkám přináší růstovou selekční výhodu. Buňka tak získává potenciál maligní transformace; v tomto stádiu se může proces zastavit.
- (2) Promoční stádium, které trvá léta, až desetiletí; postižené buňky (klon) jsou stimulovány ještě k intenzivnější proliferaci. Promoční faktory samy o sobě nejsou však schopny vyvolat maligní nádorovou transformaci, jen ji podpořit. Intenzita promočních mechanismů musí dosáhnout určitého stupně, aby byl iniciovaný klon stimulován, a naopak odstranění podpůrných faktorů může proces kancerogeneze zpomalit nebo i zastavit.
- (3) Stádium progresu je charakterizováno dalším postupným nahromaděním genetických změn jako je
  - ✓ (a) *nekontrolovaný růst* pro trvalou aktivaci signální transdukce růstového stimulu,
  - ✓ (b) *alterace kritických bodů buněčného cyklu*,
  - ✓ (c) *deregulace DNA- transkripčních faktorů*.
- ✗ Nádor zůstává nejprve v místě svého vzniku, ale aktivací dalších faktorů se začne šířit do nejbližšího okolí (*invaze*) a cestou krevního oběhu na místa vzdálená (*metastázy*). Velmi důležitou podmínkou pro růst nádoru je dostatečný přísun živin a kyslíku, který musí být zajištěn vytvořením cévního zásobení (*nádorová neoangiogeneze*).

# Schéma vývoje tumorigeneze



# ZTRÁTA KONTROLY BUŇKY NAD SYNTÉZOU DNA U MALIGNÍCH TUMORŮ

---

- × Buněčný cyklus je u zdravého jedince regulován tak, že každý buněčný typ v daném orgánu „ví“, kdy přestat s růstem.
- × U dospělého jedince jsou téměř všechny tkáně kontinuálně regenerovány a buňky opět „vědí“, kdy přestat s dělením.
- × U rakoviny buňka selhává ve schopnosti přijmout nebo interpretovat signály prostředí.



# BUNĚČNÝ CYKLUS A NÁDOROVÉ BUJENÍ

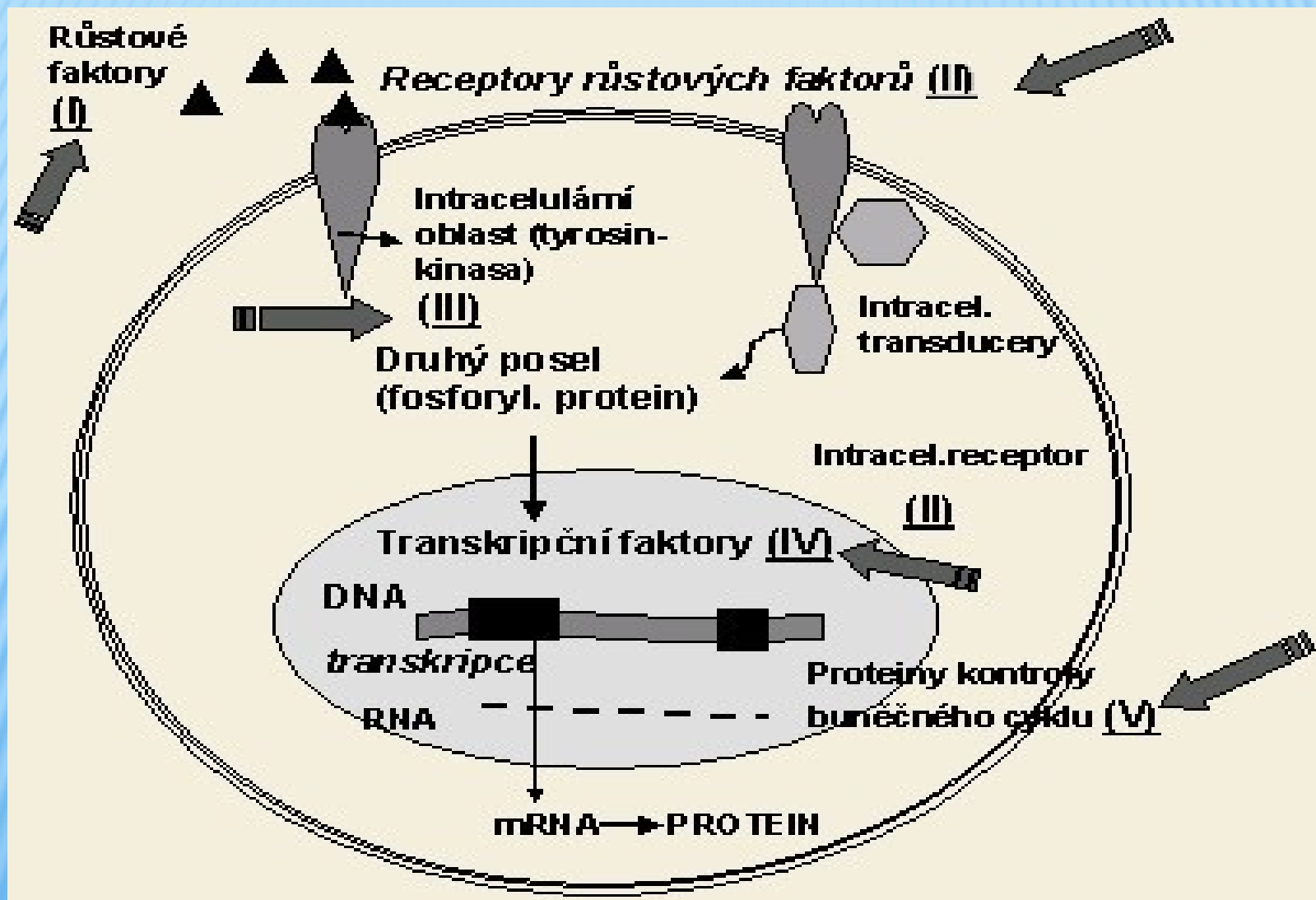
- \* U nádorového bujení je postižena především regulace přechodu G1-fáze do S-fáze. Tři komplexy cyklindependentních kinas, cyklin D/cdk4, cyklin D/cdk6 a cyklin E/cdk2 fosforylují produkt retinoblastomového genu – Rb, a to na 10ti různých místech a mění tak schopnost Rb asociovat s buněčnými proteiny. Jeden takový protein – E2F – je transkripční faktor, který tvoří heterodimer s jiným transkripčním faktorem DP1, čímž se aktivuje několik genů nutných pro rozvoj S-fáze. Znamená to indukci aktivace dihydrofolátreduktasy, thymidinkinasy, DNA-polymerasy a, c-myc, c-myb a cdc2. Kromě této podpory růstových faktorů podporuje Rb také diferenciaci prostřednictvím jeho asociace s transkripčními faktory jako je MyoD a aktivovaný transkripční faktor, kterým jsou komplexy (ATF)/cAMP-response element binding proteiny (CREB). Rb je také místem zásahu pro transformující viry jako SV40 large T-antigen, adenovirový E1A a antigen E7 lidského papillomaviru (human papilloma virus E7).

# BUNĚČNÝ CYKLUS A NÁDOROVÉ BUJENÍ

- × Je-li poškození DNA příliš rozsáhlé a tedy neopravitelné, buňka se stává nenormální a je eliminována apoptózou.
- × Nedojde-li však k apoptóze, vzniklá mutace přetrvává a může být při dělení takto mutované buňky přenesena na buňky dceřiné. Vzniká tak fenomén *genové nestability*, který podporuje maligní transformaci. Stává se to častěji kupř. u nosičů genu HNPCC (hereditární nepolypózní kolorektální karcinom). Je zde defekt v „opravném čtení“, takže chyba v replikaci DNA není zjištěna a opravný mechanismus není nastartován.



# Základní skupiny proteinů regulujících buněčný růst



# STÁRNUTÍ BUNĚK

---

- s postupujícím věkem se objevují funkční i morfologické změny skoro ve všech orgánech a tkáních. Tyto změny mají svůj podklad též ve stárnutí buněk.
- *V mitochondriích se postupně snižuje kapacita oxidační fosforylace*
- *mění se syntéza strukturálních proteinů i enzymů pro alterace v DNA a RNA vznikající s narůstajícím věkem.*
- *stárnoucí buňky mají sníženou schopnost opravovat poškozené chromosomy; snižuje se jejich potřeba množství živin.*
- *Změny v morfologii buňky: Jádro se stává abnormálně laločnaté a nepravidelné, dochází k pleomorfní vakuolizaci mitochondrií, ubývá endoplasmatického retikula a Golgiho aparát se zkrucuje. V buňkách se hromadí lipofuscin jako produkt lipidové peroxidace.*



# TEORIE STÁRNUTÍ BUNĚK

---

Příčiny stárnutí buněk jsou pravděpodobně multifaktoriální:

- endogenní molekulární program stárnutí
- vliv exogenních škodlivých faktorů, který ovlivňuje životaschopnost buněk
- **Dlouhověkost** je patrně specificky regulována na genové úrovni a řídí takové aktivity, jako je opravné mechanismusy pro DNA nebo antioxidační obrana).
- Kandidátní geny dlouhověkosti mohou též souviset s genetickým polymorfismem protektivních alel lipidového metabolismu, jako je např. *e2 alela u apolipoproteinu E2*. U dlouhověkých zjištěna též prevalence genetického polymorfismu genu *paraoxonasy* na kodónu 192.

# STÁRNUTÍ BUŇKY

---

- Dochází k progresivnímu poškozování buněk reaktivními formami kyslíku a dusíku. Děje se tak nepříznivými vlivy z okolí, jako je ionizující záření a stále se snižující kapacita antioxidačních mechanismů.
- Peroxidace poškozují nukleové kyseliny. Reaktivní formy kyslíku (ROS) způsobují denně alteraci 10 000 bazí DNA v jedné buňce, což převyšuje možnosti opravného mechanismu, jehož kapacita se s narůstajícím věkem snižuje. Mutace se hromadí nejen v DNA v jádře, ale též v mitochondriální DNA. Tento jev dramaticky roste s věkem.
- Volné kyslíkové radikály katalyzují oxidační modifikaci proteinů, včetně enzymů, což vede k jejich degradaci cytosolovými proteázami. Znamená to další omezení funkce buněk.



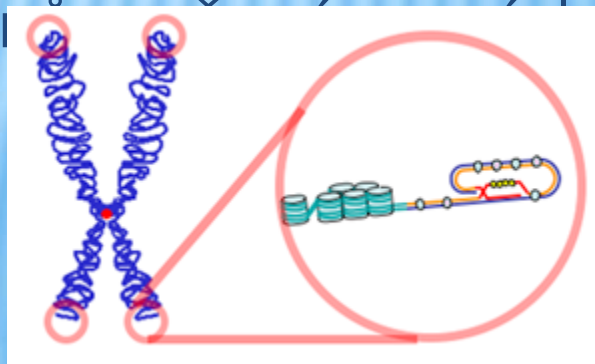
# STÁRNUTÍ BUŇKY

---

- U stoletých lidí byla prokázána vyšší poly(ADP-ribosyl)ací aktivita. Poly(ADP-ribosyl)ace nukleárních proteinů katalysováná poly(ADP-ribosa)-polymerasou (PARP-1) (s NAD<sup>+</sup> jako substrátem) je posttranslační děj ovlivňující DNA-šroubovici, což má vliv na instabilitu genomu způsobovanou endogenními i exogenními genotoxiny.
- S věkem stoupají *post-translační modifikace intracelulárních a extracelulárních proteinů*, což vede k funkčním i morfologickým změnám. Jednou z nich je neenzymová glykace proteinů a vznik *konečných produktů pokročilé glykace (AGE-products)*.
- změny v indukci *proteinů tepelného šoku (heat shock proteins)*, zvláště *Hsp70*. Tyto proteiny jsou velmi důležitým obranným mechanismem vůči různým formám nadměrné zátěže.

# STÁRNUTÍ BUŇKY - TELOMERY

- Telomery jsou klíčovým stabilizačním faktorem terminální části chromosomu. Skládají se ze složky DNA (repetitivní sekvence 5'-TTAGGG-3,) a z 6 proteinů.
- Délka telomer se zmenšuje po mnohonásobných pasážích (cekem se předpokládá 50-80 buněčných dělení / život).
- Nejdelší jsou u spermií; u buněk fetálních jsou delší než u buněk z dospělých jedinců.
- Jejich obnovování je katalyzováno *telomerázou*; délka telomer koreluje s obsahem telomeráz. Z toho důvodu se předpokládá, že úbytek DNA od konce chromosomů zkracováním telomer vede k delecí nezbytných genů, což vede k omezení života buněk.





# STÁRNUTÍ BUŇKY - TELOMERY

---

- × Telomery jsou koncové části chromosomů. Při buněčném dělení se telomery zkracují kvůli neschopnosti syntetizovat konce lineárních nukleových kyselin.
- × Původní délka se obnovuje obvykle během tvorby pohlavních buněk činností telomerázy, což je neobvyklá RNA dependentní DNA polymeráza nesoucí si vlastní molekulu [RNA](#) jako templát pro tvorbu DNA. Kromě pohlavních buněk jsou své telomery schopné znovu prodlužovat i kmenové buňky díky přítomnosti vlastní telomerázy.
- × Většina rakovinných buněk také obnovuje své telomery pomocí telomerázy, což umožňuje potlačit růst řady rakovinných buněk blokadou telomerázy, část rakovinných buněk ale opravuje své telomery alternativním systémem využívajícím rekombinaci.
- × Postupné zkracování délky telomer vede ke stárnutí buňky (senescence).



# HERITABILITA NÁDORŮ

---

- **Familiární**- více členů téže rodiny má nádor
- **Sporadické** – jen jeden člen rodiny má nádor
  
- Různé mechanismy

# HERITABILITA NÁDORŮ

---

- Ačkoli některé formy nádorů jsou dědičné, většina vzniká na podkladě **remodelace somatických buněk** a je způsobena **endogenními chybami v replikaci DNA, které jsou vyvolány genetickými (mutace v DNA, chromosomální aberace) i epigenetickými změnami.**
- Vliv kancerogenů
- UV-záření příslušné vlnové délky může být absorbováno bazemi DNA, která je tak poškozena za vzniku dimerů dvou sousedících pyrimidinů. Tato změna překáží normální transkripci i replikaci DNA.
- Účinek ionizujícího záření je odlišný: dochází k rozštěpení (přerušení) DNA-řetězce; vznikají tak volné řetězce DNA, které musí být beze zbytku opět navázány opravným mechanismem. Nestane-li se tak (buňka netoreluje volné konce DNA), může dojít k translokaci určitých úseků chromosomů, což bývá příčinou aktivace proto-onkogenů.



# HERITABILITA NÁDORŮ

---

Jedna genetická změna však nestačí navodit maligní transformaci buňky; ta obvykle vzniká až po několika (5ti až 10ti) genových mutacích v průběhu řady let.

- *Genová alterace navodí vznik nádorového fenotypu, např.:*
- *proliferace epitelové buňky → hyperplazie → adenom → dysplazie → karcinom „in situ“ → karcinom invazivní.*
- *Přeměna normální tkáně organismu do stavu invazivní nádorové choroby trvá v průměru 5 – 10 let. Ovlivňují to hereditární genetické faktory a somatické faktory genetické i epigenetické.*



# GERMINATIVNÍ VS. SOMATICKÉ MUTACE

---

- × Germinativní mutace přítomny ve všech buňkách. V průběhu života se nemění (*genetická predispozice*)
- × Somatické mutace vznikají v somatických buňkách v průběhu života (*maligní transformace*).

# VZÁCNÉ ALELY A POLYMORFISMY

---

- × *Vzácné alely jsou „špatné“* (loss of function, gain of function)
- × Jsou často pod tlakem selekce
- × *Polymorfismy* (> 1% frekvence v populaci)
- × Význam:
- × Zdroj vrozené variability genomu
- × Faktor přežití vzhledem k patogenům?
- × Jak vzácné mutace, tak polymorfismy jsou způsobeny *genovými mutacemi*.
- × *Genom současníků je výrazně modifikován evolucí (dlouhodoběji-paleolit) a historií pandemií (krátkodoběji-mor, syfilis, černé neštovice v Evropě)*

# VZNIK GENOVÉ MUTACE

---

- × Pravděpodobnost chyby při replikaci DNA během buněčného dělení je vysoká. Proto je nad stavem DNA ustaven přísný dohled, který zajišťuje stabilitu genomu (supresorové geny, např. P53).
- × Porucha supresorových genů (zejména obou alel) zakládá přirozeně větší riziko vzniku mutací.

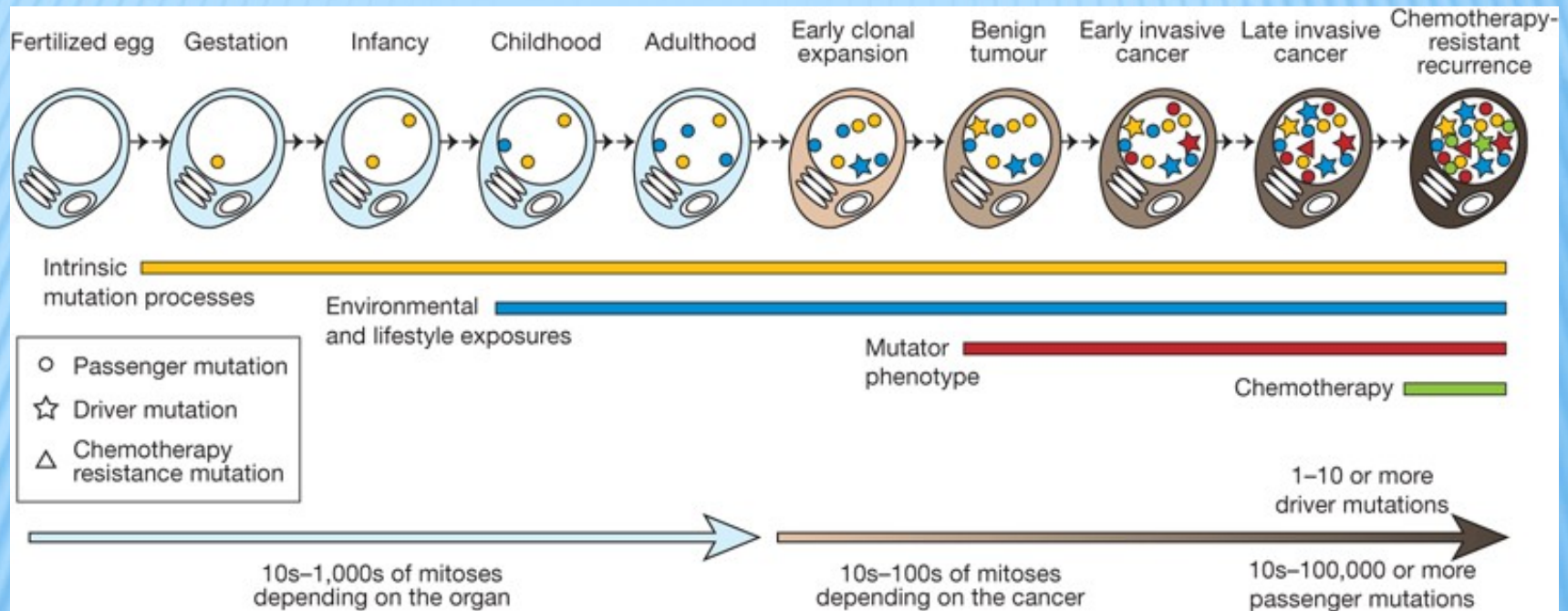


# NÁDOROVÝ GENOTYP

---

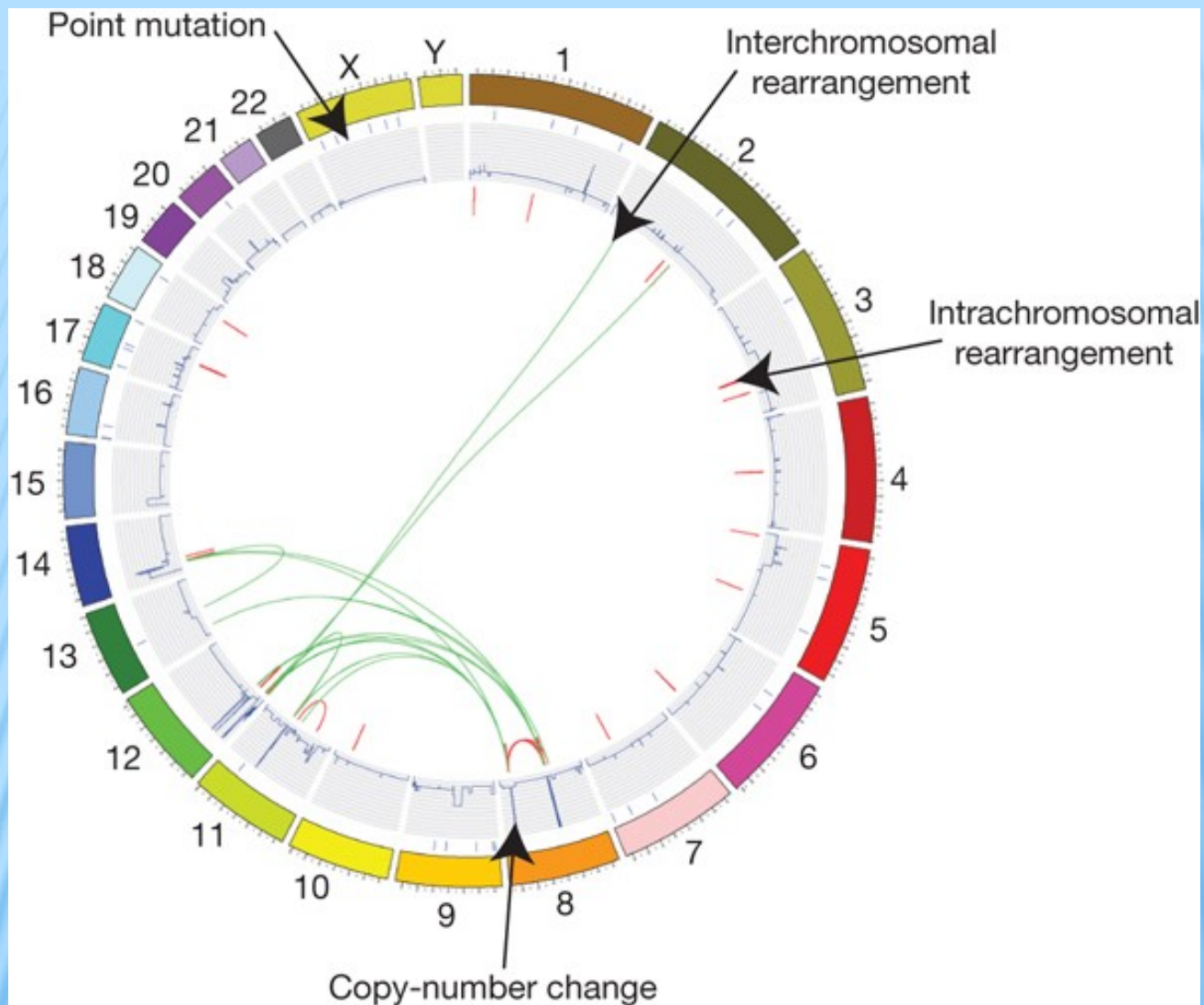
- Současná koncepte modelu *vícestupňového vývoje maligního nádoru* předpokládá, jak bylo řečeno, nejprve *postupné hromadění genetických změn*. Ty se odehrávají v určitých skupinách genů jako jsou:
  - ✓ **proto-onkogeny**
  - ✓ **tumor-supresorové geny**
  - ✓ **geny udržující stabilitu genomu**
  - ✓ **modifikující geny.**

# Mutace somatických buněk: kolorektální karcinom



MR Stratton *et al.* *Nature* **458**, 719-724 (2009)





MR Stratton *et al. Nature* **458**, 719-724 (2009)

Mutace somatických buněk: příklad  
Sporadický kolorektální karcinom

nature



# PROTO-ONKOGENY A ONKOGENY

---

- × *Proto-onkogeny* tvoří normální vybavení genomu;
- × *kódují proteiny, které řídí proliferaci, diferenciaci a přežívání buněk.*
- × 100 různých lidských proto-onkogenů v každé somatické buňce.
- × Jsou cílem extra- a intracelulárních cest transdukce signálů (zejména mitogenních), kterými se reguluje jejich exprese.

# PROTO-ONKOGENY A ONKOGENY

---

- × Dojde-li k mutaci proto-onkogenů, mění se na onkogeny a jejich aktivita získává tumorigenní charakter.
- × K přeměně proto-onkogenu na onkogen stačí alterace pouze jedné alely genu – tzv. *dominantní mutace* a gen má charakter *dominantního onkogenu*.
- × Mechanismy aktivace mají různé cesty:
  - × (a) virová transdukce (kupř. onkogen *src*)
  - × (b) genová amplifikace (*myc, abl*),
  - × (c) virová inzerce (*myc*)
  - × (d) chromosomální přestavba (*myc, abl*)
  - × (e) mutace (*ras*)



# PROTO-ONKOGENY A ONKOGENY

---

- × Onkogen může vzniknout mutací genů kódujících proteiny signálních drah, které realizují přenos růstového stimulu (růstového faktoru), dojde-li k jeho abnormální aktivitě. To může být způsobeno tím, že se tvoří v buňce, kde se normálně netvoří nebo se tvoří v nadměrném množství anebo v tak pozměněné formě, která se vymyká normální regulaci.
- × Takovéto mutované geny jsou tumorigenní, protože umožňují buňce proliferovat i v nepřítomnosti extracelulárního signálu.

# TYPY ONKOGENŮ

---

- × Jsou klasifikovány do 5 tříd:
- × (1) růstové faktory
- × (2) receptory pro růstové faktory
- × (3) komponenty intracelulárních signálních drah
- × (4) jaderné transkripční faktory
- × (5) proteiny řídící buněčný cyklus



# Onkogeny a antionkogeny, jejich produkty

**PROTOONKOGENY** (normální gen)

↓ (*mutace, delece, inserce*)

**ONKOGENY** (mutovaný gen)



*GENOVÉ*

*Transkripční faktory*

*(fos, jun, myc, myb)*

*Signální molekuly*

*(ras, raf, PKC)*

*Hormonové receptory*

*(v-erbA)*

*Růstové faktory*

*(v-sis, EGF, TGF $\alpha$ )*

*Receptorové kinasy*

*(erbB, neu, v-kit, v-fms)*

*Intracelulární kinasy*

*(src, abl)*

*Heterotrimerní G-proteiny*

**TUMOROVÉ  
SUPRESOROVÉ GENY  
(ANTI-ONKOGENY)**

↓ ANTI-

↓ APOPTÓZOVÉ

↓ GENY (*Bc/2*)



*PRODUKTY*

*p53, RB*



*Produkty*  
*(bcl2 $\alpha$ , bcl2 $\beta$ )*

# Regulátory buněčného cyklu u maligních nádorů

GEN	Alterace genu	TUMOR
Retinoblastoma gen (Rb)	Delece Bodová mutace	Retinoblastomy, osteosarkomy sarkomy měkkých tkání, Malobuněčné karcinomy plic, karcinomy močového měchýře a prsu
Cyklin D	Translokace chromosomů, Genová amplifikace	Adenom parathyreoidey, Některé lymfomy, Karcinomy mléčné žlázy, hlavy a krku, jater (primární), jícnu
cdk4	Amplifikace, Bodová mutace	Glioblastom, sarkom, melanoblastom
p16 <sup>INK4a</sup> (p15 <sup>INK4b</sup> )	Delece, bodová mutace, metylace	Karcinomy pankreatu, ezofagu, plic (malobuněčné), Glioblastomy, sarkomy, familiární melanomy a karcinomy pankreatu



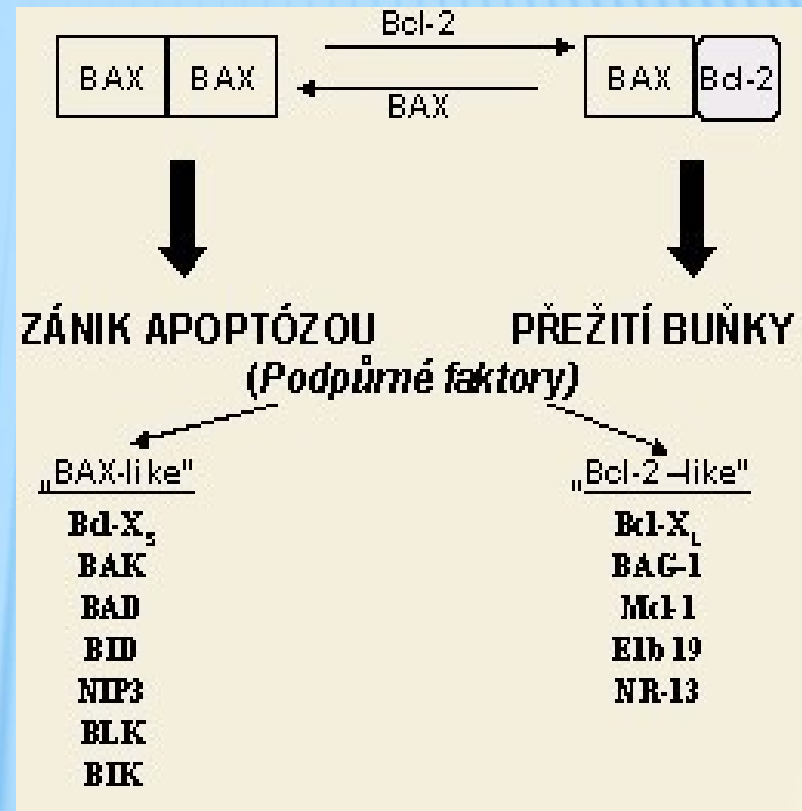
# Přehled některých recesivních onkogenů podmiňujících nádorová onemocnění

Symbol	Název	Nádorové onemocnění
<b>APC</b>	Gen adematózní polypózy tlustého střeva	Kolorektální karcinom Karcinom pankreatu Desmoidy Hepatoblastom
<b>BRCA1</b>	Gen 1 pro familiární karcinom prsu/vaječníku	Hereditární karcinom prsu/ ovaria
<b>BRCA2</b>	Gen 2 pro familiární karcinom prsu/vaječníku	Hereditární karcinom prsu/ ovaria
<b>CDH1</b>	Gen pro kadherin 1	Familiární karcinom žaludku Lobulární karcinom prsu
<b>CDNK2A</b>	Gen inhibitoru cyklin-dependentní kinasy 2A (p16)	Maligní melanom kůže
<b>CYLD</b>	Gen familiární cylindromatózy	Cylindromy
<b>EP300</b>	Gen vazebného proteinu 300 kD-E1A	Karcinomy kolorektální, pankreatu, prsu

Vliv apoptózy na přežití nádorových buněk (pro- a anti-apoptózoové faktory)

Zvýšená exprese Bcl-2 inhibuje zánik buněk apoptózou.

Je to způsobeno vazbou Bcl-2 proteinu na BAX-protein, což zabrání jeho homodimerizaci, která podporuje apoptózu.

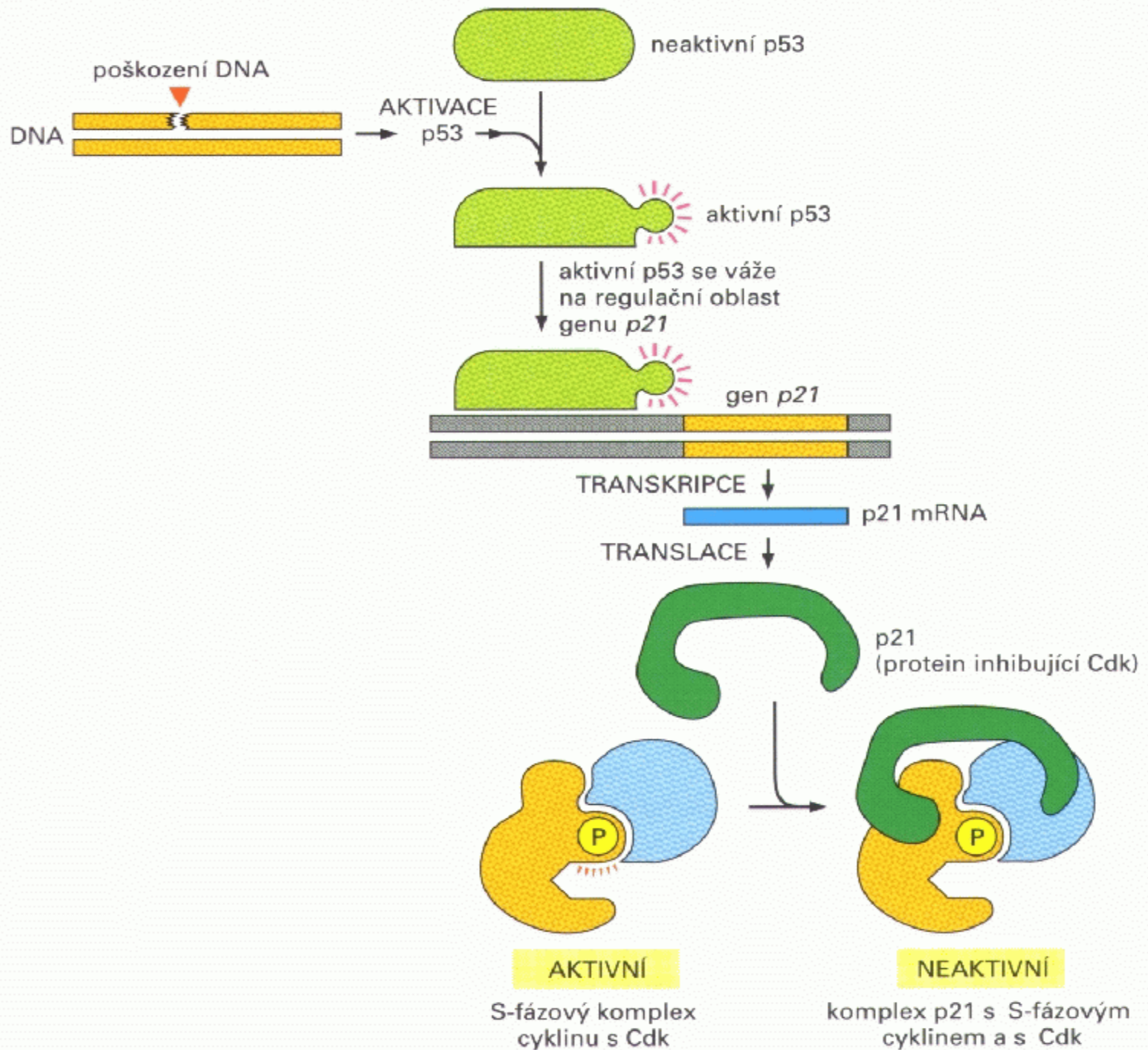




# GENY UDRŽUJÍCÍ STABILITU GENOMU

---

- × Označují se někdy jako *mutatorní geny* a bývají i řazeny k *tumor-supresorovým genům*. Produkty těchto genů se uplatňují v opravných mechanismech poškozené DNA.
- × Jejich mutace vede ke zvýšené frekvenci mutovaných onkogenů a tumor-supresorových genů, někdy až 1000krát.





# GENY UDRŽUJÍCÍ STABILITU GENOMU

---

- × Patří sem geny, jejichž produkty zajišťují vystřížení poškozeného úseku DNA a umožňují **excizní opravný proces**. Jejich recesivní mutace způsobuje onemocnění zvané *xeroderma pigmentosum* a *Cockayenův syndrom*, což jsou prekancerózy se zvýšenou náchylností ke karcinomům kůže navozeným expozicí na UV-záření.

# GENY UDRŽUJÍCÍ STABILITU GENOMU

---

×

Další skupinou mutatorních genů jsou „**mismatch opravné geny**“; kódované proteiny opravují chybné zařazení baze při replikaci DNA (nikoliv však komplementární). Projevem mutací těchto genů je instabilita na nukleotidové úrovni – *mikrosatelitová instabilita*. Zárodečné mutace zejména MSH2 a MLH1 genů jsou podkladem *hereditárního nepolypózního kolorektálního karcinomu (HNPCC)* .

×

Mutace genů, jejichž produkty zajišťují „**opravné čtení**“, jehož úkolem je identifikace chybných úseků DNA při replikaci, byly prokázány u karcinomu žaludku a tlustého střeva. Jedná se především o mutaci genu pro *polymerasu d*.



# GENY UDRŽUJÍCÍ STABILITU GENOMU

---

- × Rozpoznání poškozené DNA a aktivace p53 vyžaduje přítomnost ATK. Tento gen kóduje kinasu, která aktivuje jak CHK2 tak p53 při poškození DNA. Děti trpící *ataxií-teleangiectazií* mají inaktivující mutaci obou alel.
- × V klinickém obraze je pak imunodeficience, mozečkové příznaky a zvýšené riziko vzniku maligního nádorového onemocnění, především lymfomů. Buňky těchto pacientů nemohou aktivovat p53 jako odpověď na poškození DNA.



# GENY UDRŽUJÍCÍ STABILITU GENOMU

×

Jiný syndrom označovaný jako *NBS (Nijmegen breakage syndrom)* je způsoben homozygotní inaktivací genu *NBS*, který se podílí přímo na opravách poškozené DNA. Do tohoto mechanismu rozpoznávajícího a opravujícího poškozenou DNA vstupuje též gen *BRCA1*. Mutace v jedné alele zárodečných buněk nesoucích tento gen je odpovědná asi za polovinu případů karcinomu mléčné žlázy s familiárním výskytem. Při účinku proteinu *BRCA1* hraje důležitou funkci jak *ATM* tak *CHK2*, které umožňují jeho fosforylaci, když dojde k poškození DNA. *ATM* také fosforyluje kofaktor *BRCA1* - *CtIP*, který reguluje transkripci genu *BRCA1*. Defekty DNA-opravného mechanismu přispívají k akumulaci genetických defektů (viz genová nestabilita navozená genem *HNPCC* = gen pro hereditární nepolypózní kolorektální karcinom) podporují progresi maligně transformovaných buněk.

# TUMOR-SUPRESOROVÝ PROTEIN P53 (TP53)

- × je jeden z nukleárních proteinů, který má klíčovou úlohu v regulaci cyklu buněčného dělení při přechodu z G0 do G1-fáze. Obsahuje domény pro vazbu na specifický úsek DNA, dále oligomerizující a transkripci aktivující domény. Váže se jako tetramer na vazebné místo na určitém úseku DNA a tím aktivuje expresi genů, kódujících faktory inhibující proliferaci a podporující invazivitu buněk.
- × *Mutanty genu p53 jsou nalézána u řady maligních tumorů. Pozměněný TP53 ztrácí schopnost vazby na příslušný lokus DNA, což vede k nedostatečné produkci faktorů potlačujících nádorový růst. Alterace genu p53 se objevuje nejen jako somatická mutace, ale též jako mutace v zárodečných buňkách u některých nádorových onemocnění s familiárním výskytem (syndrom Li-Fraumeni)*



# TUMOR-SUPRESOROVÝ GEN P53

---

- je klíčovým regulačním faktorem, který monitoruje poškození DNA.
- inaktivace *p53* bývá jedním z prvních kroků, který vede k maligní transformaci při vývoji řady nádorových onemocnění.
- Pacienti s *Li-Fraumeniho syndromem* mají obvykle jednu mutantní alelu v zárodečných buňkách a tím i riziko vzniku sarkomů, leukemie a karcinomu mléčné žlázy. Vzácně pacienti s *Li-Fraumeniho syndromem* nemají v zárodečných buňkách tuto mutaci, ale mutaci genu *CHK 2*, kódující proteinkinasu, která fosforyluje protein *p53*, čímž dochází k jeho aktivaci. Tito pacienti však mívají alteraci v jiných genech – *MDM 2* a *p14ARF*, které regulují expresi *p53*.



# TUMOR-SUPRESOROVÉ GENY (ANTI-ONKOGENY TAKÉ RECESIVNÍ ONKOGENY)

---

- × Kromě mutací v proto-onkogenech mohou vznikat mutační změny v anti-onkogenech (tumor-supresorové geny).
- × Na rozdíl od onkogenů jimi kódované proteiny mají *antiproliferační účinek, podporují diferenciaci a apoptózu*. V každé somatické buňce je asi 40 tumor-supresorových genů. Aby se staly tumorigenními, musí být mutovány obě jejich alely – proto název *recesivní onkogeny*. S tím souvisí tzv. *dvouzásahová teorie*, kterou po prvé formuloval Knudson, když vysvětloval vznik vzácného *hereditárního retinoblastomu*. Na rozdíl od mnohem častějšího *sporadického retinoblastomu*, kde se jedná o náhodné mutace jedné a posléze druhé alely v buňce sítnice, je u hereditární formy jedna mutovaná alela zděděna, příslušný jedinec je heterozygot, u něhož se zděděná nádorová predispozice zatím neprojevuje. Dojde-li však k mutaci/eliminaci druhé alely, iniciuje se rozvoj nádorového klonu buněk sítnice. Tomuto procesu se říká *ztráta heterozygosity (LOH=loss of heterozygosity)*. Prvně objevený tumor-supresorový gen byl nazván *retinoblastomový gen = Rb-gen* a jeho produkt RB-protein. Vyskytuje se v každé buňce, kde reguluje buněčný cyklus dělení.

# VARIANTY S RŮZNÝM POČTEM KOPIÍ

- × Varianty s různým počtem kopií jsou asociovány s různými fenotypy. Naůř. Trisomie 21 chromosomu způsobuje *Downův syndrom*.
- × Zvýšená exprese genů na chromosomu 21 má za následek klinicky heterogenní onemocnění z příznaky *poruchy kognitivních funkcí, obličejové dysmorfie, opožděného růstu, predispozice k nádorům, mikrocefalie a abnormalit srdce a kostry.*



# MODIFIKUJÍCÍ GENY

---

- × Jde o geny, jejichž mutace může ovlivnit vznik a rozvoj nádorového procesu.
- × Jejich produkty mohou pozitivně nebo negativně působit na průběh kancerogeneze, a to s interindividuální nebo interfamiliární variabilitou.
- × Na jejich prozkoumání se teprve čeká; bude umožněno nejnovějšími technikami molekulové biologie v oblasti genomiky a proteomiky.



# EPIGENETIKA TUMORŮ

---

- × Lidské rakovinné buňky nesou řadu genetických abnormalit
- × Eepigenetické alterace mohou být odpovědné za začátek tumorigeneze ([Baylin and Jones, 2011](#); [Sandoval and Esteller, 2012](#); [Sharma et al., 2010](#)).
- × Tumorózní epigenom je charakteristický podstatnými epigenetickými změnami.
- × Jedná se především o změny v metylaci DNA a histonů a v acetylaci histonů.

# DNA METHYLATION

---

- × Human malignant tumors are characterized by pervasive changes in the patterns of DNA methylation. These changes include a globally hypomethylated tumor cell genome and the focal hypermethylation of numerous 5'-cytosine-phosphate-guanine-3' (CpG) islands, many of them associated with gene promoters.
- × Specific DNA methylation changes were linked with tumorigenesis in a cause-and-effect relationship.
- × **Cancer-associated DNA hypomethylation** may increase genomic instability.
- × Promoter hypermethylation events can lead to silencing of genes functioning in pathways reflecting hallmarks of cancer, including **DNA repair, cell cycle regulation, promotion of apoptosis or control of key tumor-relevant signaling networks**.
- × Many of the most commonly **hypermethylated genes encode developmental transcription factors**, the methylation of which may lead to permanent gene silencing. Inactivation of such genes will deprive the cells in which the tumor may initiate from the option of undergoing or maintaining lineage differentiation and will lock them into a perpetuated stem cell-like state thus providing an additional window for cell transformation.



# MALIGNÍ TRANSFORMACE BUŇKY

---

- Dělení buněk je velmi pečlivě řízeno tak, aby odpovídalo potřebám celého organismu.
- V časných fázích života jedince kapacita dělení buněk převažuje nad jejich zanikáním, v dospělosti je v dynamické rovnováze, ve stáří začíná převažovat involuce.
- Některé buňky se však vyhnou kontrole replikace (neodpovídají na vnější signály, kontrolující jejich dělení, jsou autonomní), a mění se tak na *buňky nádorové*.
- Ty, které si alespoň přibližně zachovávají vzhled i funkci buněk normálních a především zůstávají stále na místě, kde vznikly, jsou buňky benigní a jejich proliferace dá vzniknout *benigním tumorům*. Buňky, které ztratily většinu vlastností buněk, od kterých jsou odvozeny a mají snahu pronikat do svého okolí (*invazivita*) i na vzdálená místa (*metastázy*), jsou buňky maligní a tvoří *maligní tumory*.



# MALIGNÍ TRANSFORMACE BUŇKY

---

Navození *transkripce onkogenů*, kódujících syntézu *onkoproteinů*, transkripčními faktory zahajuje maligní transformaci buňky. Onkoproteiny jsou velmi podobné (někdy i shodné) s proteiny kódované proto-onkogeny normálních buněk, jejichž úkolem je řídit a kontrolovat růst, proliferaci, diferenciaci a zánik buněk. Klasifikují se do pěti tříd:

- × (1) *růstové faktory*
- × (2) *receptory růstových faktorů*
- × (3) *intracelulární transducery signálu*
- × (4) *nukleární transkripční faktory*
- × (5) *proteiny kontrolující buněčný cyklus.*

# NÁDOROVÉ BUŇKY

---

- Nádorové buňky proliferují neomezeně – jsou „nesmrtelné“. Úplné vysvětlení tohoto replikačního stárnutí není zatím jasné. Bylo navrženo několik možných mechanismů:
  - ✓ (a) *aktivace genů pro stárnutí na chromosomu 1 a 4,*
  - ✓ (b) *alterace nebo ztráta genů pro regulaci buněčného růstu (c-fos nebo Rb-gen),*
  - ✓ (c) *indukce inhibitorů buněčného růstu,*
  - ✓ (d) *další příčiny, např. zkracování telomer.*



# NÁDOROVÝ FENOTYP

---

- se vyznačují především pokračujícím dělením.
- Snižují se u nich požadavky na přítomnost hormonů a růstových faktorů.
- Některé transformované buňky produkují vlastní specifické růstové faktory (*autokrinní stimulace*).
- Dochází ke *ztrátě schopnosti zastavit růst*. U normálních buněk totiž snížení hladiny isoleucinu, fosfátu, epidermálního růstového faktoru a dalších látek, které regulují růst, pod určitou prahovou koncentrací, navodí přesun do klidového stavu (G0-fáze). Normální buňky začínají růst (dělit se) pouze, když jejich nutriční požadavky jsou řádně zajištěny. Nádorovým buňkám tato schopnost zastavit růst jako reakce na nedostatek živin a růstových faktorů schází; dokonce pokračují v proliferaci, i když přitom mohou zahynout.

# NÁDOROVÝ FENOTYP

---

- × *Transformované buňky* vykazují *zvýšené vychytávání glukosy* pro vyšší afinitu glukózového transportéru v membráně, podobně jako je tomu normálně pouze u erytrocytů nebo buněk v mozku. Koreluje to s vysokou glykolytickou aktivitou.
- × Chybí u nich dále *povrchový fibronektin*, který mají klidové buňky a který udržuje jejich tvar.
- × *Změny cytoskeletových elementů* (aktinová mikrofilamenta nejsou difuzně rozptýlena, ale koncentrují se blíže povrchu) jsou příčinou zvýšené mobility povrchových proteinů.
- × *Nepřiměřená sekrece transformujícího růstového faktoru  $\alpha$  a  $\beta$*  a dalších růstových faktorů, které řídí normálně vývoj embryonálních buněk.
- × Produkuje též *plasminogenový aktivator*, což je proteáza přeměňující plasminogen na plasmin. Vysoká tvorba plasminu nádorovou buňkou pomáhá penetraci skrz lamina basalis.
- × *Mikroprostředí* nebo stroma, v kterém se nádorové buňky nalézají, mají rovněž vliv na progresi („teorie semene a půdy“). Bylo prokázáno, že *metaloproteinasy stromální proteinové matrix (MMP 9)* hrají významnou úlohu v časných stádiích vývoje tumoru a při angiogenezi.  
U metastáz karcinomu prostaty do kostí se předpokládá jakýsi „osteomimetický“ účinek (chemoatrakce a podpora adherence ke kostnímu endotelu) a ovlivňování vlastností a chování osteoblastů a osteoklastů.



# NÁDOROVÝ FENOTYP

---

- ✓ Nádorový fenotyp je charakterizován **maligní transformací buňky**, která se projevuje:
  - **ztrátou kontroly buněčného dělení** (alterace buněčného cyklu, antiapoptóza – „nesmrtelnost“ nádorové buňky, alterace v transdukci signálů),
  - **ztrátou kontaktu buňka-buňka**, invazivitou,
  - **změnami v metabolismu** (podpora enzymů anaerobní glykolýzy a potlačení enzymů oxidace cestou Krebsova cyklu, „uchvacování“ dusíku nádorovými buňkami, zvýšená lipolýza, tvorba nádorových antigenů),
  - **podporou angiogeneze**.
- ✓ Maligně transformované buňky jsou pravděpodobně odolné vůči stresovým faktorům okolí jako je hypoxie, kyselé pH, nedostatek glukosy a živin, odloučení od bazální membrány, které normální buňky ničí.

# VZNIK METASTÁZ

---

- Při vzniku metastáz hrají důležitou úlohu *chemokiny*.
- Úloha chemokinů u nádorového bujení je složitá:
  - ✓ podporují vrozenou nebo specifickou protinádorovou imunitu,
  - ✓ mohou podporovat nádorový růst a tvorbu metastáz tím, že posilují proliferaci nádorových buněk, migraci a neovaskularizaci.
  - ✓ Chemokiny tvořené nádorovými buňkami mohou působit inhibicí protinádorové imunitní odpovědi, stejně jako autokrinním mechanismem působí jako růstové faktory.



# METASTATICKÝ FENOTYP



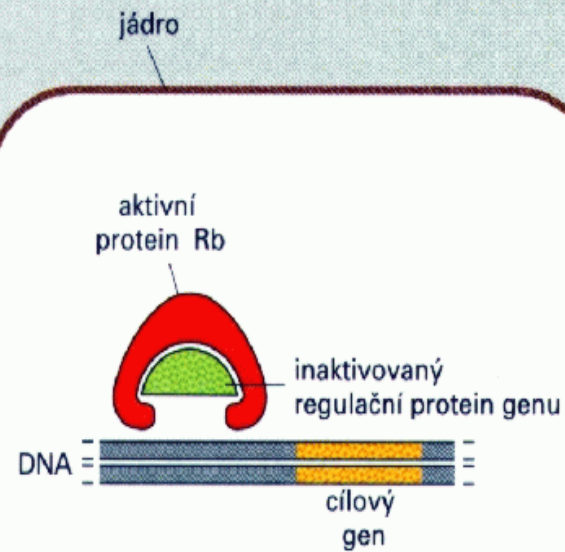
Dalším rysem maligně transformované buňky je *ztráta závislosti adherovat k podkladu (substrátům)*. V buněčné kultuře normální buňky, plovoucí volně v živném roztoku (gelu), mohou sice metabolizovat (žít), ale nikoliv se dělit; nádorové buňky ano.

- *Ztráta inhibice motility kontaktem se sousedními buňkami* je další charakteristika nádorových buněk. Znamená to, že mohou růst jedna přes druhou, mohou být na sobě i pod sebou a jen zřídka vytvářejí mezerové spoje (gap junction).
- *Změny na buněčné membráně* jako je modifikace glykolipidů a glykoproteinů (snížení množství sialové kyseliny vázané na proteiny, redukce gangliosidů). To sice nemění strukturu transformované buňky, ale zvyšuje laterální mobilitu povrchových lipidů, respektive vazbu membránových proteinů na cytoskelet.

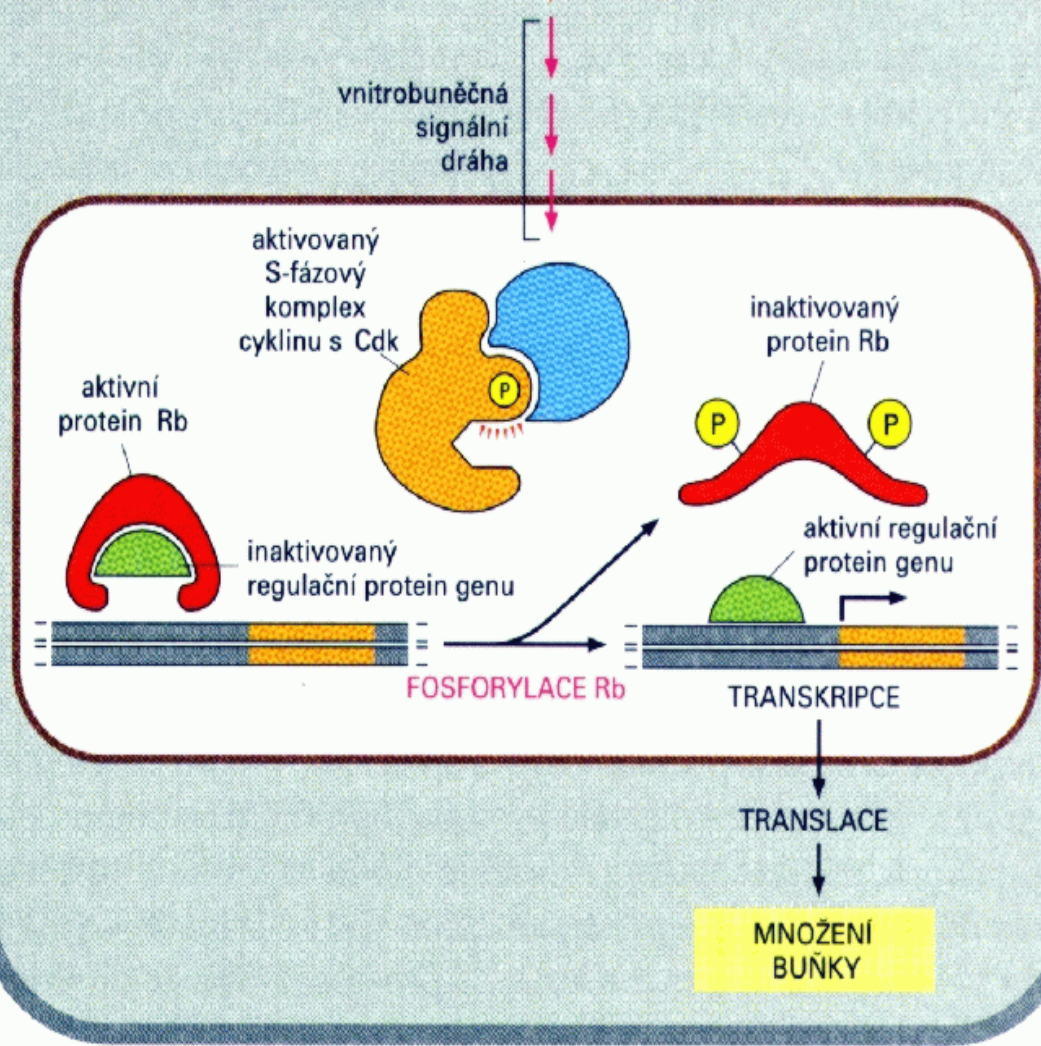
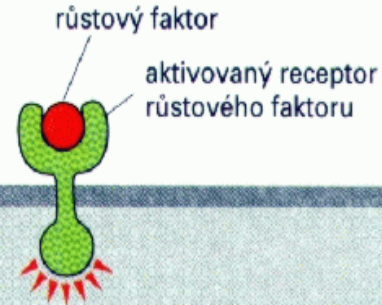
# METASTATICKÝ FENOTYP

- Maligní buňky mají zvýšenou *motilitu* a schopnost pronikat do okolí (*invazivitu*) a po průniku do krevní cirkulace usadit se a množit na jiném místě (tvořit *metastázy*).
- K tomu jsou vybaveny schopností produkovat receptory, aby se mohly zachytit na proteinech bazální membrány (tvorba adhezních molekul), dále tvorbou hydrolytických enzymů, které pomohou rozrušit kolageny, proteoglykany a glykosaminoglykany bazální laminy a umožnit tak pronikání do okolí, natrávit stěnu cév, zachytit se v cirkulaci na shlucích trombocytů a vytvořit tak nádorové emboly, odolávat účinkům protinádorového imunitního mechanismu, zachytit se na stěně cév vzdáleného místa, proniknout do intersticia tkáně, založit metastázu, proliferovat, podporovat angiogenezi a případně vytvářet metastázy metastáz.
- To je tzv. *metastázový fenotyp*.

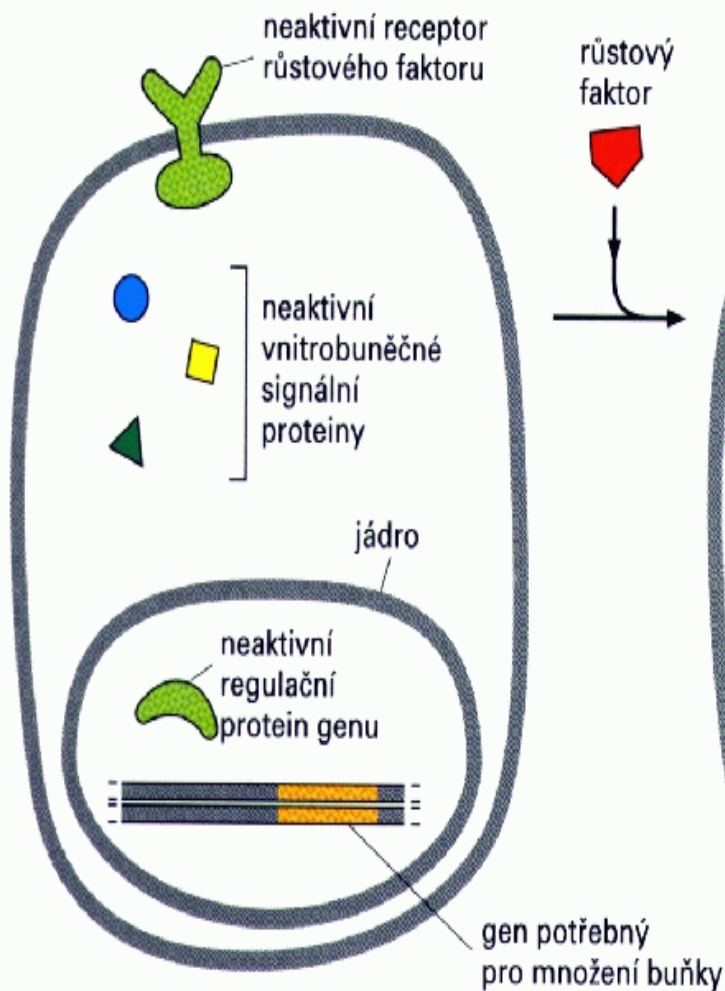




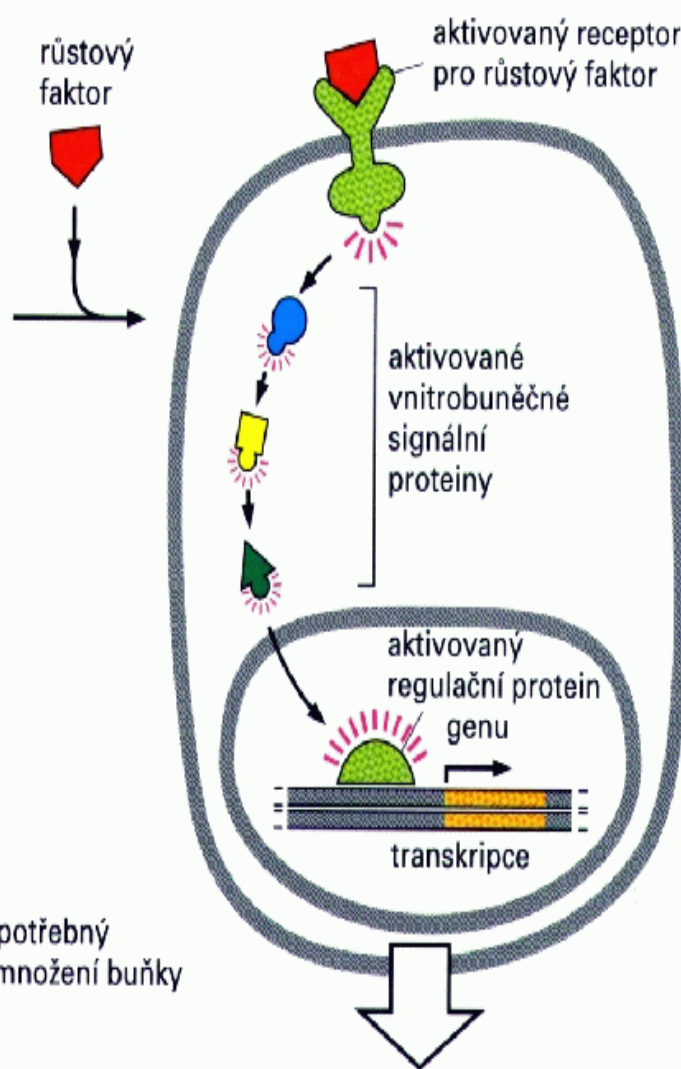
(A) KLIDOVÁ BUŇKA



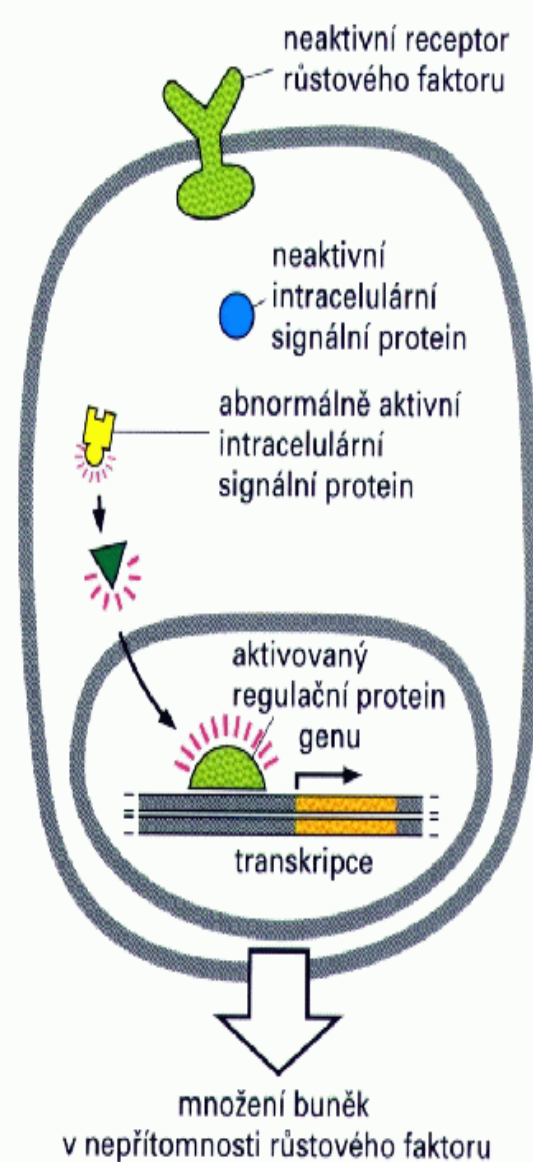
(B) MNOŽÍCÍ SE BUŇKA



(A) **NORMÁLNÍ KLIDOVÁ BUŇKA**



(B) **NORMÁLNÍ MNOŽÍCÍ SE BUŇKA**



(C) **MNOŽÍCÍ SE RAKOVINNÁ BUŇKA**



# APOPTÓZA A TUMORIGENEZE

---

- × Růst nádorových buněk je podmíněn nejen nekontrolovaným buněčným dělením, ale také snížením jejich opotřebovatelnosti a naopak zvýšenou schopností přežít.
- × Většina nádorových buněk, ne-li všechny, získala rezistenci vůči mechanismům vedoucím k jejich programovanému zániku – apoptóze. Existují experimentální důkazy, že narušení signalizace apoptózy je obecným předpokladem existence a rozvoje nádorových buněk. Velmi důležitou úlohu přitom má pravděpodobně *onkogenní potenciál faktoru rodiny Bcl2*.

# APOPTÓZA A TUMORIGENEZE

---

- × *Bcl2* (B-cell lymphoma 2) gen byl původně objeven jako gen napojený na imunoglobulinový lokus v průběhu chromosomové translokace u folikulárního lymfomu. Přitom se též zjistilo, že jeho nadměrná exprese má spíše než na proliferaci vliv na apoptózu, respektive na její narušení. Znamená to, že nascentní neoplastické buňky získávají touto inhibicí programovaného zániku selekční výhodu. Mohou setrvávat zahnízděny jako ložiska v hostitelské tkáni, zejména v místech, kam se nedostanou cytokiny a kyslík. Tento únik před apoptózou je pak podpořen dalšími onkogenními sebezáchovnými mechanismy, které vedou ke vzniku agresivnějších klonů; defektní apoptóza též usnadňuje metastázování, protože buňky mohou ignorovat restriční signály přicházející z okolí a přežívat odděleně od extracelulární matrix. Mutace, které favorizují rozvoj nádoru, odvracejí odpověď na cytotoxickou terapii a vznikají tak refrakterní klony. Úloha *Bcl2* (a jeho homologů – *Bcl-xL* a *Bcl-w*) v mechanismu inhibice apoptózy spočívá pravděpodobně v ochranném účinku na integritu mitochondrií tím, že brání výstupu cytochromu c do cytoplasmy, což znemožní aktivaci kaspasové kaskády.



## „NESMRTELNOST BUŇKY“

Normální somatická buňka má omezenou kapacitu proliferace danou určitým počtem možných dělení a řízenou *opakovanou* sekvencí konce DNA

- TTAGGG tzv. telomery

1 cyklus = zkrácení o 1 telomer

Nové nastavení umožňuje **TELOMERA SA**

**Zvýšená aktivita telomerasy u nádorových buněk**

# NÁDORY A „NESMRTELNOST“ BUNĚK

---

- × Nádorová buňka se stává „nesmrtelnou“. Je to způsobeno zvýšenou aktivitou enzymu *telomerasy*. Opakované dělení buněk je omezeno - zkracováním *telomer*.
- × Telomery jsou klíčovým stabilizačním faktorem terminální části chromosomu a ukotvují je k nukleární matrix. Telomery mají opakující se sekvenci nukleotidů TTAGGG. Délka telomer se zmenšuje po mnohonásobných pasážích (1 buněčný cyklus = zkrácení o 1 telomeru) a dále v buněčných kulturách od pacientů v pokročilém věku. Jejich obnovování je katalyzováno *telomerasou*; délka telomer koreluje s obsahem *telomeras*. Z toho důvodu se předpokládá, že úbytek DNA od konce chromosomů zkracováním telomer vede k delecii nezbytných genů, což má za následek omezení života buněk.



# NÁDORY A „NESMRTELNOST“ BUNĚK

---

Počet telomer slouží jako *generační hodiny*, které odpočítávají jednotlivé cykly buněčného dělení a určují tak životnost buněk a replikační potenciál. *Nádorové buňky mají replikační potenciál vysoký; umožňují jim to nejméně dva mechanismy, kterými si udržují dostatečný počet telomer, respektive jejich obnovování. Nejběžnější (aktivita prokázána u 85-90% nádorových buněk) je*

mechanismus TERT, což je proteinová komponenta telomerasy; jen malá část nádorových buněk využívá další mechanismus

tzv. alternativní prodlužování telomer (ALT), které umožňuje udržování počtu telomer bez účinku telomerasy.

# VÝZNAM ANGIOGENEZE V ROZVOJI NÁDOROVÉHO ONEMOCNĚNÍ

---

- × Angiogeneze má klíčový význam pro růst nádoru. Rostoucí nádorové ložisko může bez cévního zásobení dosáhnout velikosti pouze 1 – 2 mm<sup>3</sup>, kdy přívod kyslíku a živin je možný ještě difúzí z okolní tkáně. Nádor pro další růst potřebuje vlastní cévní zásobení. Popud je tomu dán vzniklou hypoxií nádorových buněk. Ta navodí genetickou nestálost, dochází ke vzniku mutací; mutace genu p53, který je ochráncem genomu, neumožní opravu chyby v záměně bází.



# VÝZNAM ANGIOGENEZE V ROZVOJI NÁDOROVÉHO ONEMOCNĚNÍ

---

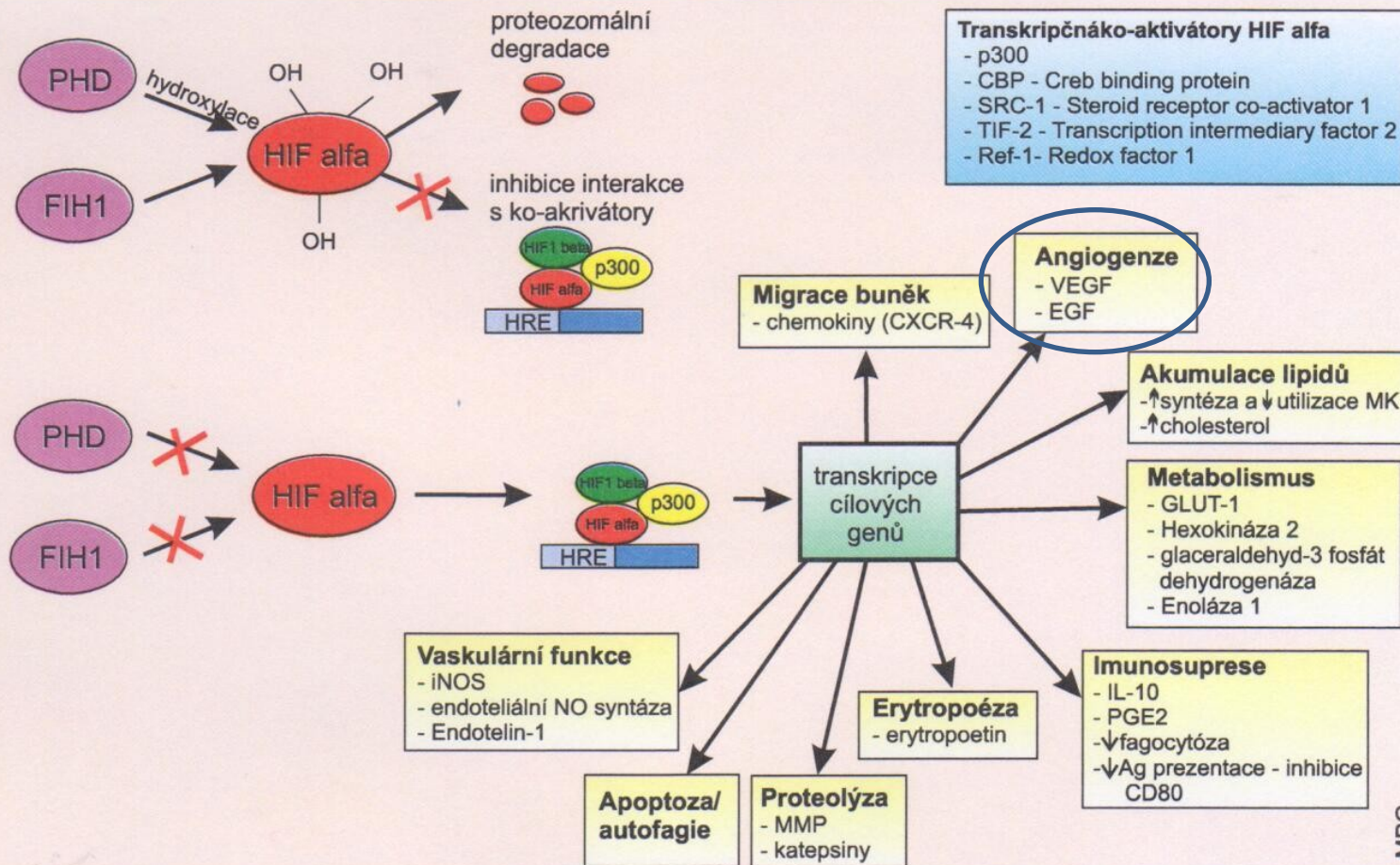
- × Dochází dále k nerovnováze mezi antiangiogenními a proangiogenními faktory. Tato změna, kterou se zahájí proces nádorové angiogeneze, se nazývá „angiogenní switch“. Objevuje se nový fenotyp nádorových buněk, vyznačující se potlačením antiangiogenních faktorů – thrombospondinu – a zvýšenou tvorbou angiogenních působků. Buňky nádoru a sousední endoteliální buňky se v tomto směru vzájemně ovlivňují parakrinní, ale i autokrinní sekrecí angiogenetických faktorů.



Normoxie

Kyslík

Hypoxie



MPG

Buněčná reakce na hypoxii: Hladiny hypoxického indukibilního faktoru-1 (HIF-1) jsou regulovány úrovní buněčné oxigenace prostřednictvím hydroxylace prolinu. Reakce je katalyzována enzymy: prolyl 4-hydroxyláza (PHD1, 2 a 3). Za normoxie je intracelulární hladina HIF-1 $\alpha$  udržována na nízké úrovni rychlou ubikvitinací a následnou proteasomální degradací prostřednictvím von Hippel-Lindau proteinu (pVHL) závislého na hydroxylaci prolinových zbytků. Za hypoxie jsou intracelulární hladiny i transkripční aktivita HIF-1 $\alpha$  zvýšené, a to v důsledku potlačení aktivity PHD. HIF-1 $\alpha$  tvoří heterodimer s HIF-1 $\beta$  a mění míru transkripce HIF-1-regulovaných genů za hypoxie. Mezi takto modulované procesy patří angiogeneze, migrace buněk, zánět, modulace metabolismu, akumulace lipidů (zvýšené TG a cholesterol), vaskulární funkce, proteolýza, erytropoéza a buněčná smrt.

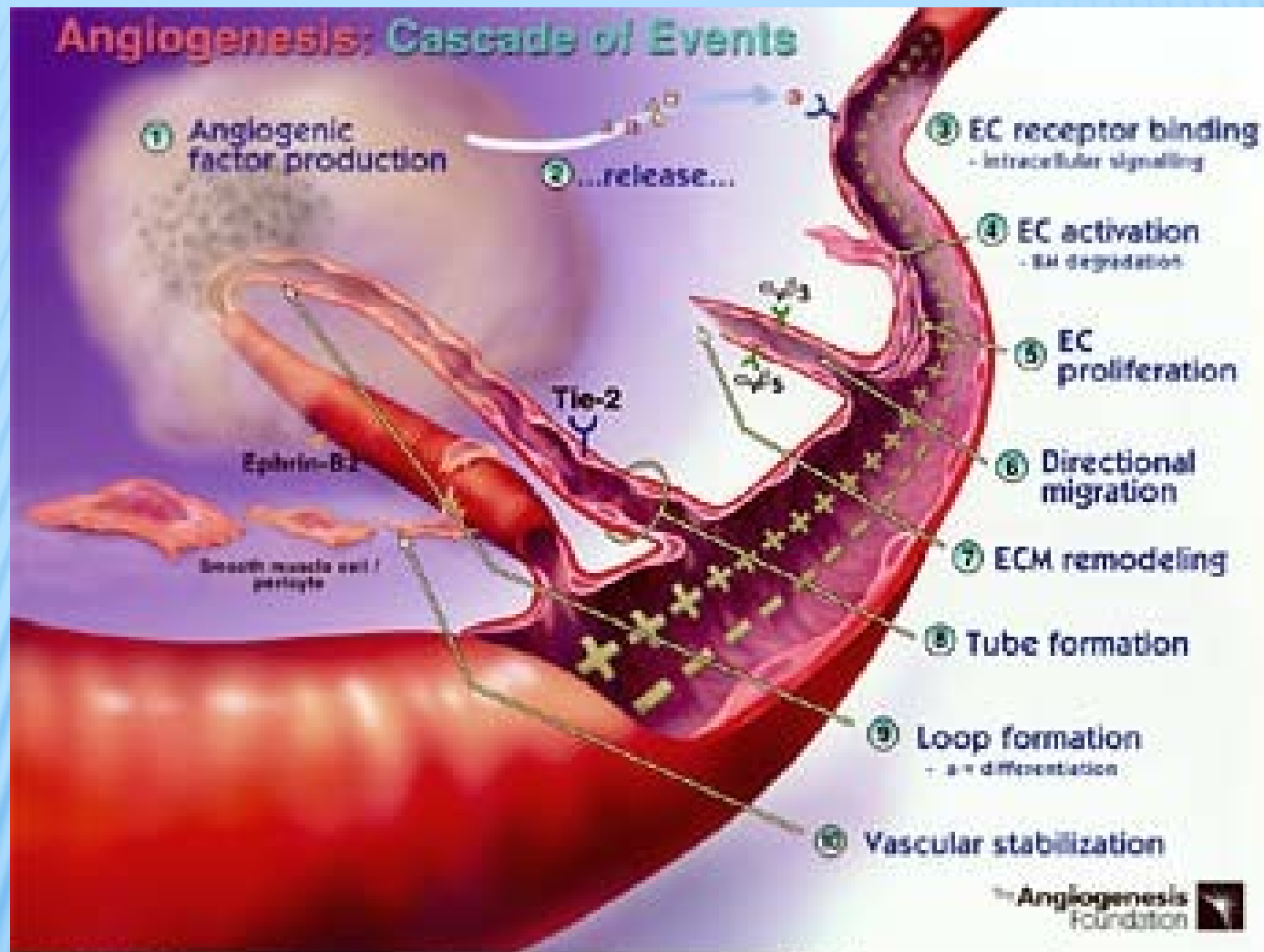


# TUMOROVÁ NEOVASKULARIZACE

---

- × Novotvorbu cév v nádorovém ložisku předchází
- × Vazodilace cév v nejbližším okolí navozená především zvýšenou aktivitou NO-syntasy a tím produkcí NO-radikálů. To také potencuje mitogenní účinek VEGF.
- × Produkce metaloproteináz rozrušuje bazální membránu, čímž se usnadňuje nejen migrace endotelových buněk po fibrinových vláknech tvořených stimulací fibroblastů, ale i migrace tumorových buněk.
- × Migrující endotelie jsou zdrojem integrinů zajišťujících jejich životnost.
- × Kapilární morfogenezi podporují ještě další působky – (např. E-selektin). Vaskularizace nádorového ložiska umožní jeho prokrvení (perfuzi), a tím jeho další růst.
- × Tyto procesy jsou alespoň částečně koordinovány HIF

# Angiogenesis: Cascade of Events



© 2000 The Angiogenesis Foundation, Inc. All rights reserved.

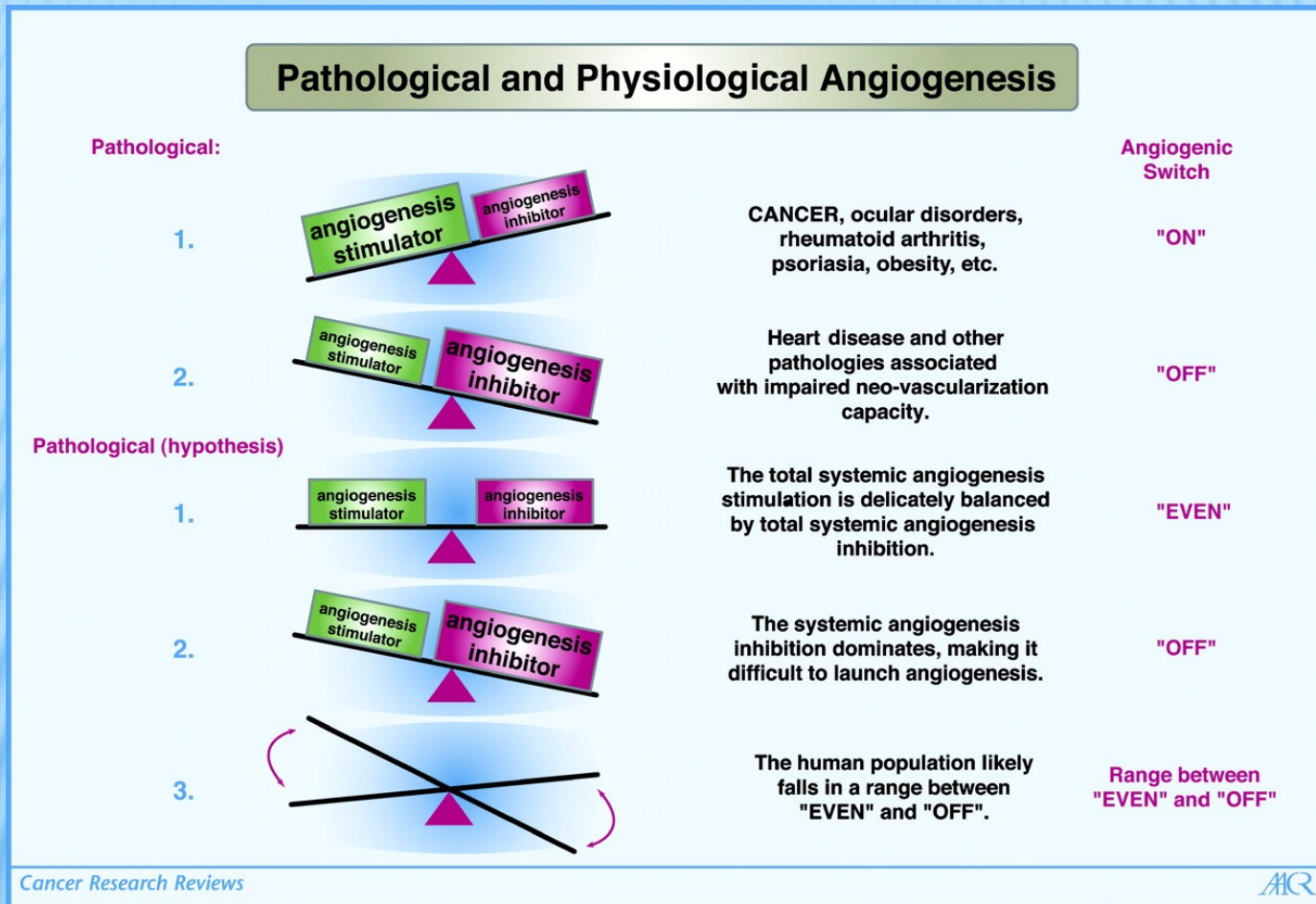


# TUMOROVÁ NEOVASKULARIZACE

---

- Čím je angiogeneze intenzivnější, tím je prognóza nádorového onemocnění nepříznivější; zvyšuje se riziko metastáz.
- Stupeň angiogeneze může sloužit jako prognostický faktor.
- Nejintenzivnější angiogeneze bývá na okraji nádorového ložiska, kde lze její intenzitu posoudit histologicky. Používá se také zviditelnění tzv. *horkých ložisek* (hot spots) pomocí monoklonálních protilátek proti cévním endoteliím nebo proti adhezivním molekulám (CD31, CD34), event. proti von Willebrandovu faktoru.
- Citlivým ukazatelem hustoty kapilárního řečiště je *stanovení akvaporinu-1 (AQP-1)*; jde o faktor působící synergicky s VEGF a významně zvyšující cévní propustnost.

**Figure 1. The pathologic and physiologic angiogenic balance**



Nyberg, P. et al. Cancer Res 2005;65:3967-3979



# ZÁNĚT A TUMORIGENEZE

---

- × Epigenetické změny („switches“) hrají důležitou roli v rozvoji rakoviny.
- × Většina až dosud objevených „switches“ je indukována zánětem nebo používá zánětlivé signální cesty.
- × Chronické infekce a zánět se účastní asi u 25 % všech maligních tumorů.
- × V mnoha případech je vyvolávají prozánětlivý faktor (např. IL-6) dále aktivován v nádorových buňkách k udržení nového (nádorového) fenotypu.

# ZÁNĚT A TUMORIGENEZE

---

- × To znamená, že zánětlivá signalizace, která pochází z imunitních buněk, je rakovinnými buňkami „adoptována“ prostřednictvím epigenetických „switchů“. Protože tyto „switche“ jsou reverzibilní, mohou se stát cílem protinádorové léčby.



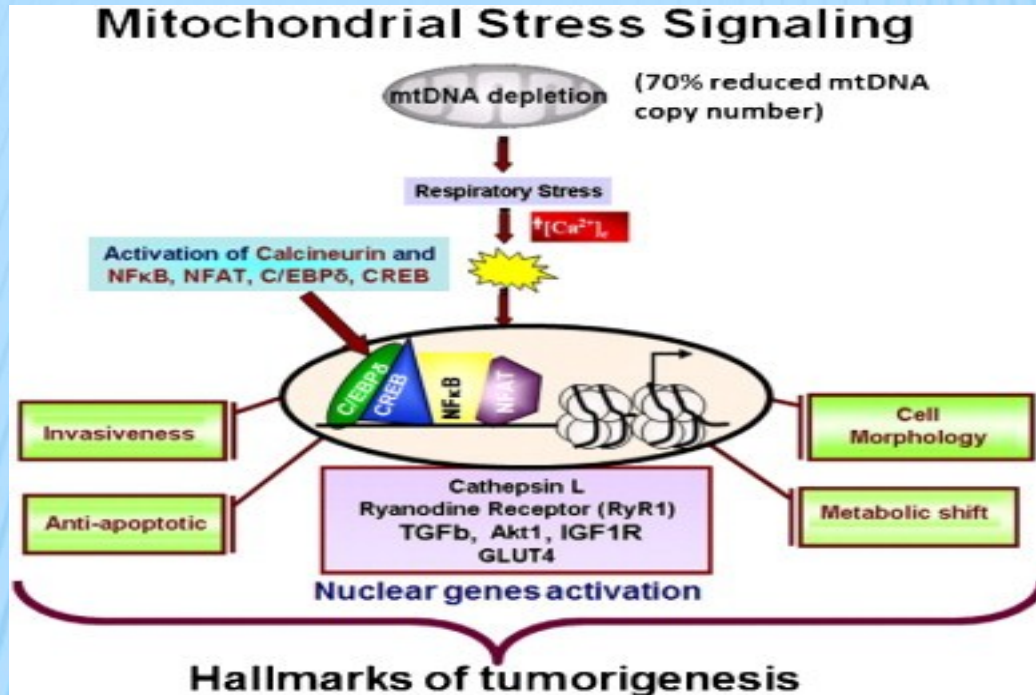


Fig. 2 Schematic outline of the reduced mtDNA copy number mediated mitochondrial retrograde signaling in C2C12 myocytes. Reduction of mtDNA content below 70% disrupts  $\Delta\psi_m$  which results in elevated cytosolic  $Ca^{2+}$  and activation of Calc...

Manti Guha , Narayan G. Avadhani

**Mitochondrial retrograde signaling at the crossroads of tumor bioenergetics, genetics and epigenetics**

Mitochondrion Volume 13, Issue 6 2013 577 - 591

<http://dx.doi.org/10.1016/j.mito.2013.08.007>

DĚKUJI ZA POZORNOST

