

Molekulární biologie nádoru

Vybrané kapitoly z molekulární
biologie nádoru

Studijní literatura

1. **Texty přednášek**
2. Zdeněk Adam, Jiří Vorlíček, Jana Koptíková:
„Obecná onkologie a podpůrná léčba“
kapitola 2: Jana Šmardová, Jitka Pacholíkova:
Molekulární podstata kancerogeneze
3. Robert A. Weinberg: **„Jediná odrodilá buňka.
Jak vzniká rakovina.“**

Alfred G. Knudson (2000)

„Všichni pronásledovatelé démona nádoru v minulém století museli být fascinováni předmětem svého pronásledování a zároveň museli cítit frustraci z jeho neuchopitelnosti. Se vstupem do nového milénia máme naději, že démon bude nakonec pochopen a že na základě tohoto pochopení najdeme způsob, jak ho přemoci.“

Historický přehled

- 400 p.n.l. **Hippocrates** popsal rakovinu jako dlouhé výběžky (podobné račím nohám) vybíhajícím do zdravých tkání:
 - řeč: 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

Historický přehled

- 1909 - Rous - infekční přenos nádoru u kuřat
- studium nádorových virů (**onkogen** - fragment virových genů způsobujících nádor) (1961 - Nobelova cena)
- 1976 - Bishop, Varmus - objeven c-src (**protoonkogeny**)
- souvislost s mitogenní signální dráhou
- pomalu transformující viry
- Henry Harris (fúze buněk) - **nádorové supresory** - recesivní geny (brzdy)
- Knudson - retinoblastom - „two hits hypothesis“
- přenosy DNA (transformace, transfekce)

Historický přehled

- biochemie: studium onkoproteinů, jejich lokalizace, interakcí
- molekulární biologie: izolace, charakterizace a cílená exprese eukaryotických genů
- buněčná biologie: studium molekulárních mechanismů řídících růst buněk, buněčné dělení
- genetika somatických buněk a virů: funkční testy jednotlivých genů

p21: **WAF1** - „wild type p53-activated fragment“
 cip1 - „Cdk-interacting protein 1“
 sdi1 - „senescent cell-derived inhibitor 1“

Základní pojmy

Nádor, tumor, neoplazma, novotvar

- je nová a abnormální tkáň v mnohobuněčném organismu, která v tomto organismu nemá fyziologickou funkci a roste neregulovaným způsobem.
- je geneticky podmíněný abnormální přírůstek buněčné tkáňové hmoty klonálního charakteru. Jeho růst není v koordinaci s růstem okolních tkání a rovnovážným stavem organismu.

Klasifikace nádorů I:

podle schopnosti infiltrovat se do jiné tkáně

- **Benigní (nezhoubné):** zůstávají v místě svého vzniku, nemigrují, neinvadují jiné tkáně.
- **Maligní (zhoubné):** pronikají do okolních tkání a prostřednictvím krevního a lymfatického systému do celého těla, v nových tkáních vyvolávají tvorbu sekundárních nádorů (metastází)
- Z tohoto pohledu lze klasifikovat nádory na **primární a sekundární**.
(Pozor: sekundární - therapy-related: vývoj z jiného méně závažného stavu.)

Klasifikace nádorů II:

podle typu buněk (tkání), ze kterých vznikají

- **Karcinomy** - nádory epiteliálních buněk (asi 90% lidských nádorů)
- **Sarkomy** - pevné nádory konektivních tkání - svalů, kostí, chrupavky
- **Leukémie a lymfomy** - odvozené od hematopoietických buněk a buněk imunitního systému
- **Gliomy** - nádory odvozené z nervové tkáně

Klasifikace nádorů III:

podle postiženého orgánu nebo tkáně

- karcinom plic
- kolorektální karcinom
- nádor prsu
- akutní myeloidní leukémie

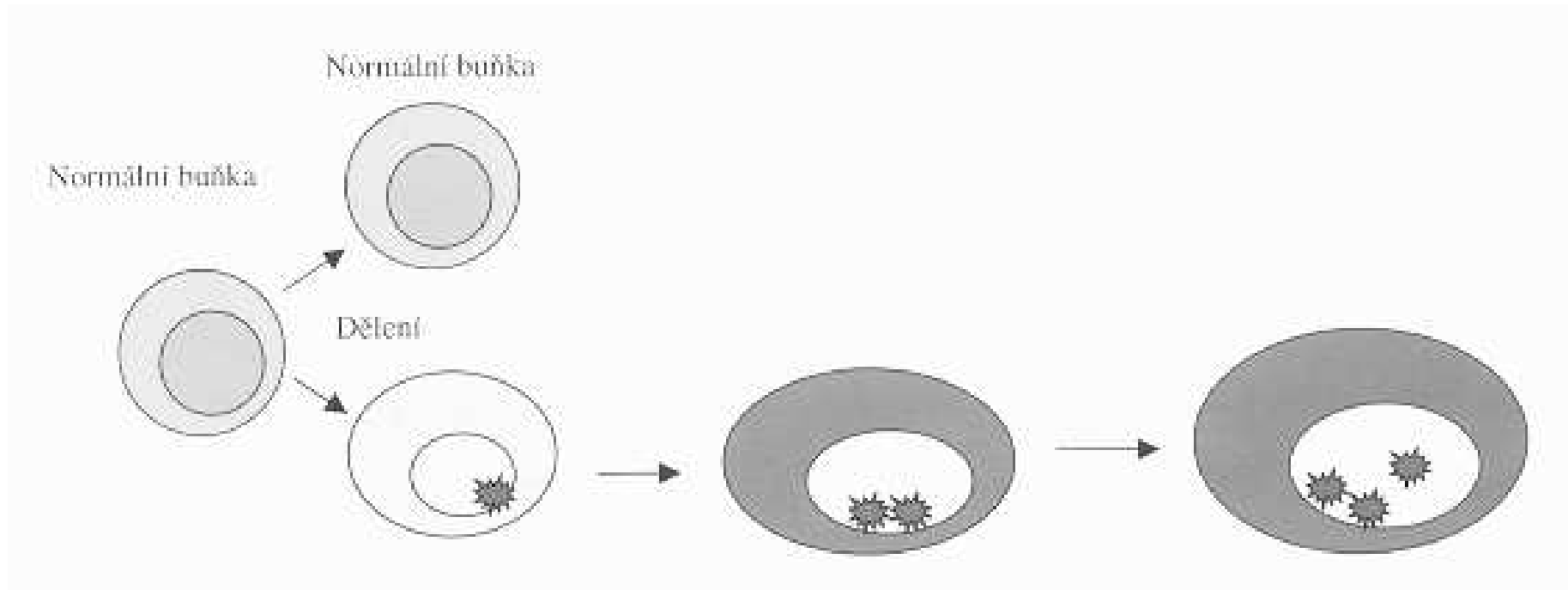
- a mnoho dalších

Kancerogeneze

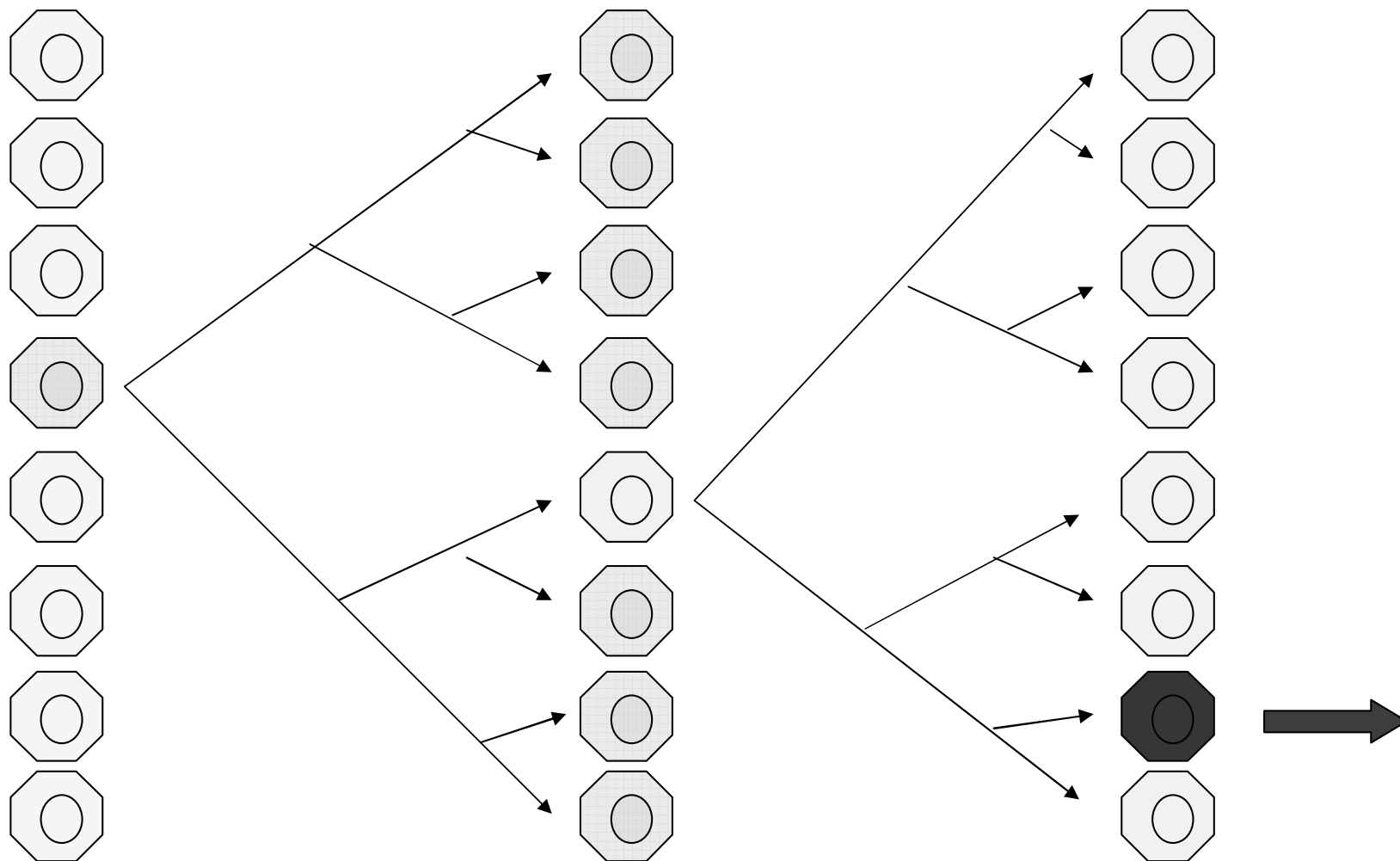
- je proces vzniku a vývoje nádoru
- je vícestupňový proces
- podstatou kancerogeneze je postupné hromadění genetických (a epigenetických) změn

Neoplastická transformace - je přeměna somatické buňky v buňku nádorovou

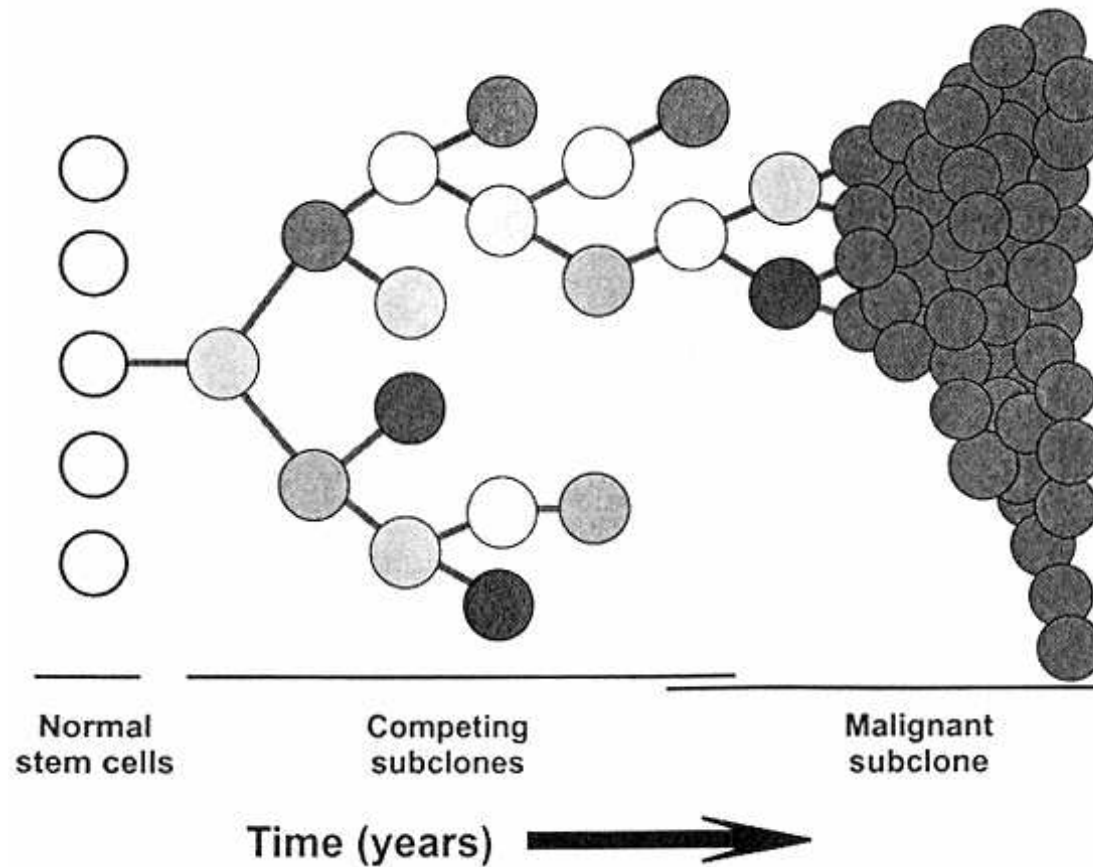
Podstatou kancerogeneze je postupné hromadění genetických změn



Vícestupňová kancerogeneze spojená s kroky klonální expanze









Klonální model vývoje nádoru: selekce, klonální expanze



Kolik a které geny jsou změněny během kancerogeneze?

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

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

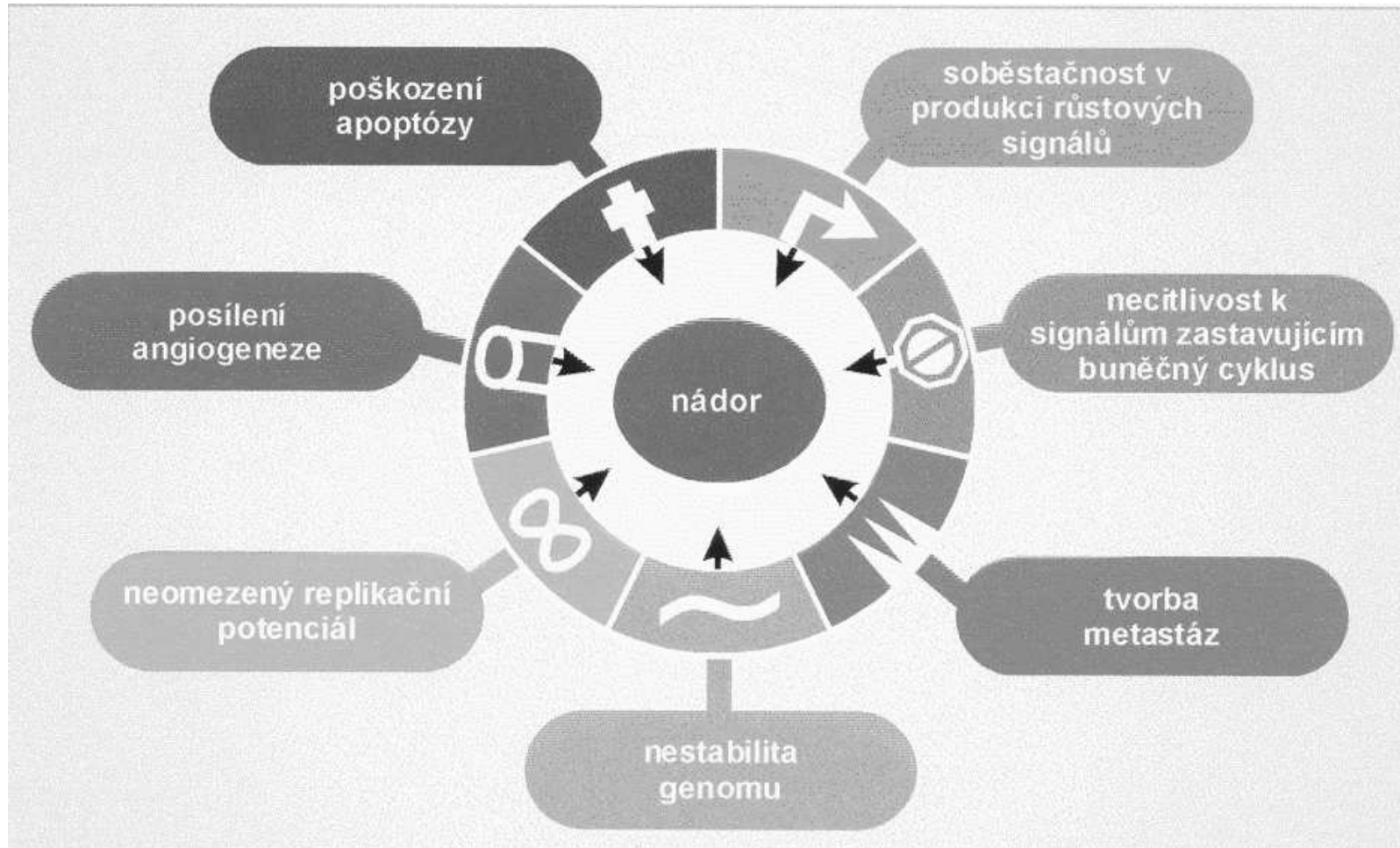
	získaná schopnost	příklad
	Soběstačnost v produkci růstových signálů	aktivace <i>H-ras</i>
	Necitlivost k signálům zastavujícím b.c.	ztráta RB
	Poškození apoptózy	produkce IGF
	Neomezený replikační potenciál	aktivace telomerázy
	Posílení angiogeneze	produkce VEGF
	Tvorba metastáz	inaktivace E-cadherinu

Nestabilita genomu jako podmínka akumulace všech nutných změn.

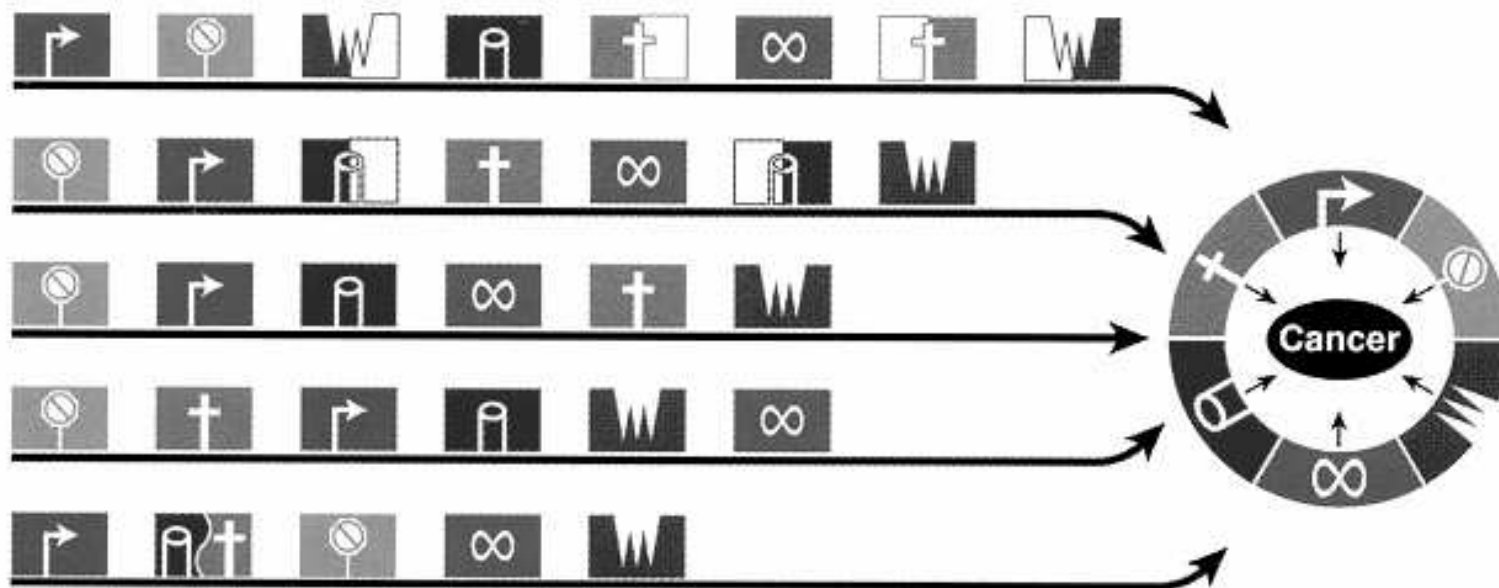
Tři vlastnosti vystihující maligní nádor (Richard Klausner 2002)

- Nemoc genomové nestability
(výjimky: leukémie, některé lymfomy, Ewingův sarkom)
- Nemoc změněného buněčného chování
- Nemoc změněného tkáňového chování

Kancerogeneze má obecné rysy



Kancerogeneze má individuální průběh



Individuální je - pořadí zásahů

- počet zásahů

- konkrétní zasažené geny

Onkogeny

Protoonkogen je strukturní gen eukaryotické buňky, který se svým translačním produktem podílí do značné míry na regulaci dělení buněk a jejich diferenciaci.

Onkogen je protoonkogen pozměněný nebo aktivovaný tak, že vyvolává neoplastickou transformaci buňky.

Aktivace protoonkogenu je přeměna protoonkogenu na onkogen.

Mutace protoonkogenů jsou:

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

Nádorové supresory

Produkty genů pro nádorové supresory (**antionkogeny**) v normálních buňkách nevyvolávají proliferaci, ale naopak ji potlačují a udržují buňky ve stadiu klidu (G_0). Jejich ztráta se projevuje neregulovanou proliferací.

Mutace nádorových supresorů jsou:

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

Geny poškozené během kancerogeneze

1. Onkogeny
Nádorové supresory
2. Onkogeny
Nádorové supresory
Geny zajišťující genomovou stabilitu („stability genes“)

Sedm získaných vlastností maligního nádoru



soběstačnost v produkci růstových signálů



necitlivost k signálům zastavujícím buněčný cyklus



poškozená apoptóza



neomezený replikační potenciál



posílená angiogeneze



tvorba metastáz

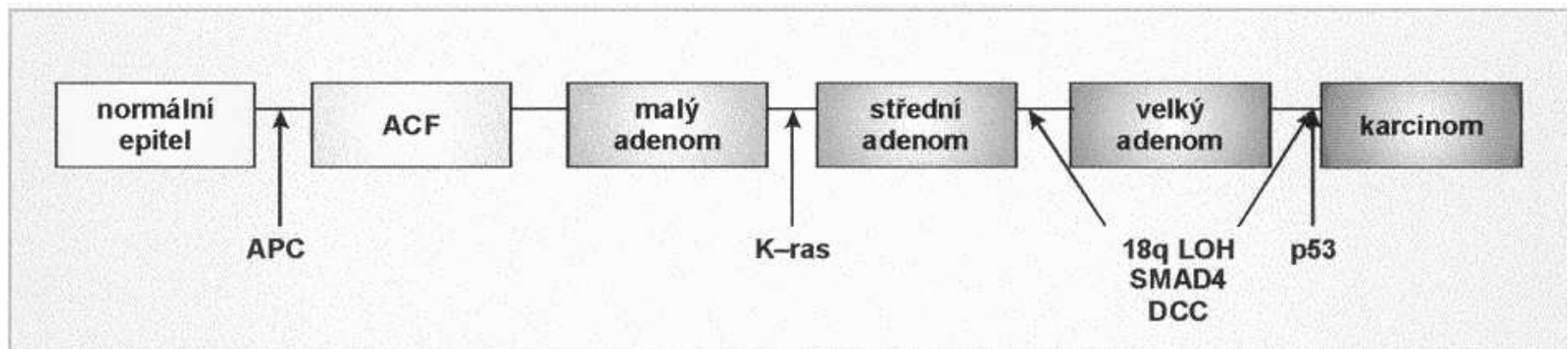


nestabilita genomu

⇒ **vícestupňová kancerogeneze** ⇒ **modely**

Modely vícestupňové kancerogeneze

- Vývoj kolorektálního karcinomu



- Transformace onkogenními DNA viry

Onkogenní (nádorové) viry

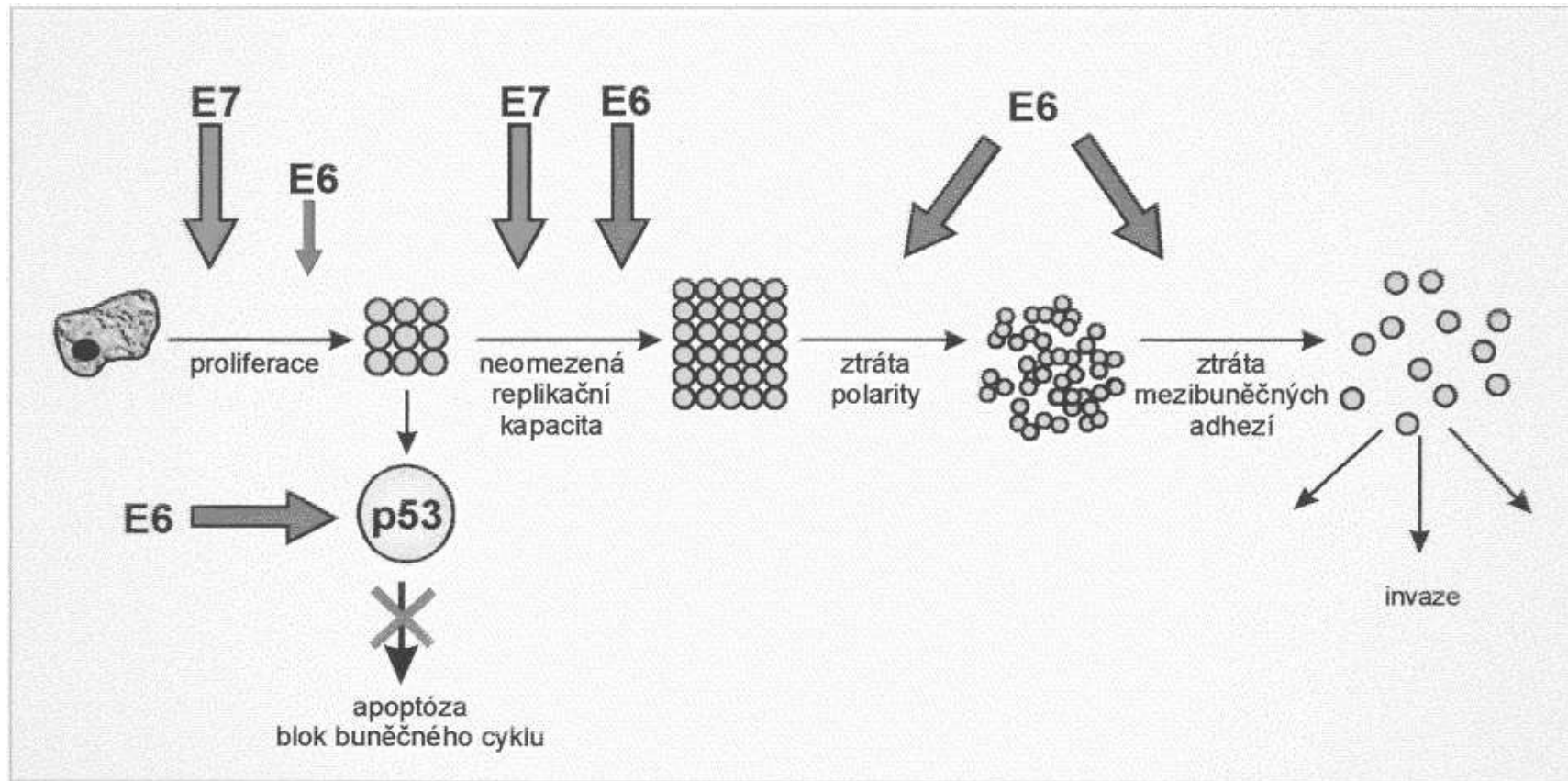
- **Retroviry** (RNA viry): obsahují ve svém genomu onkogen (akutně transformující viry) nebo aktivují protoonkogen, vedle kterého se integrovaly (pomalu transformující)
- **DNA nádorové viry** používají jinou strategii transformace: neobsahují onkogeny, ale kódují proteiny, které interagují s nádorovými 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
 - adenoviry**: E1A interaguje s RB a p300/CBP; E1B interaguje s p53
 - papilomaviry HPV-16, HPV-18**: E6 interaguje s p53, p300/CBP; E7 interaguje s RB

Některé způsoby inaktivace p53 virovými onkoproteiny

Inaktivace p53 patří ke klíčovým událostem při transformaci buňky DNA viry.

- **LT (SV40)** - váže se do DNA vazebné domény p53 a znemožňuje vazbu p53 na DNA
- **E1B (adenovirů)** - váže se do transkripční domény p53 a znemožňuje transkripci cílových genů
- **E4orf6 (adenovirů)** - způsobuje degradaci p53
- **HBV X (viru hepatitidy B)** - zadržuje p53 v cytoplasmě
- **E6 (papilomavirů)** - indukuje degradaci p53 užitím ubiquitin ligázy E6AP; E6 dále inhibuje i přímo transkripční schopnost p53

Podíl proteinů E6 a E7 papilomavirů na transformaci buňky



Virové onkoproteiny: stimulují proliferaci, inhibují apoptózu, zvyšují replikační potenciál, mění morfologii buněk, indukují maligní fenotyp

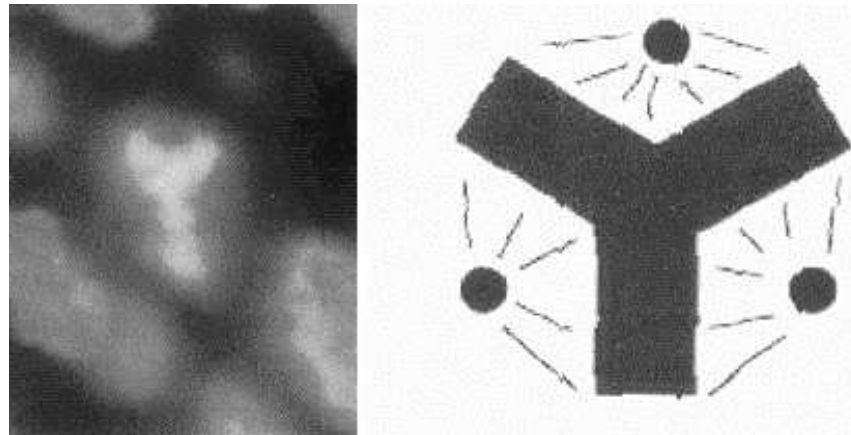
Podíl proteinu E6 papilomavirů na transformaci buňky

- E6** - inaktivuje **p53** (blok G_1 , dep. apoptóza, gen. stabilita)
- interaguje s **p300/CBP** (narušení homeostáze)
 - aktivuje expresi **hTERT** (aktivace telomerázy)
 - inaktivuje **p16^{ink}** (narušení udržování klidového stádia)
 - interaguje s **Bak** (inhibice apoptózy)
 - interaguje s **E6BP/ERC-55** (inhibice terminální diferenciacce)
 - indukuje degradaci **hDlg** (a další interakce s proteiny obsahujícími vazebný motiv PDZ) (změna morfologie, získání invazivního charakteru)

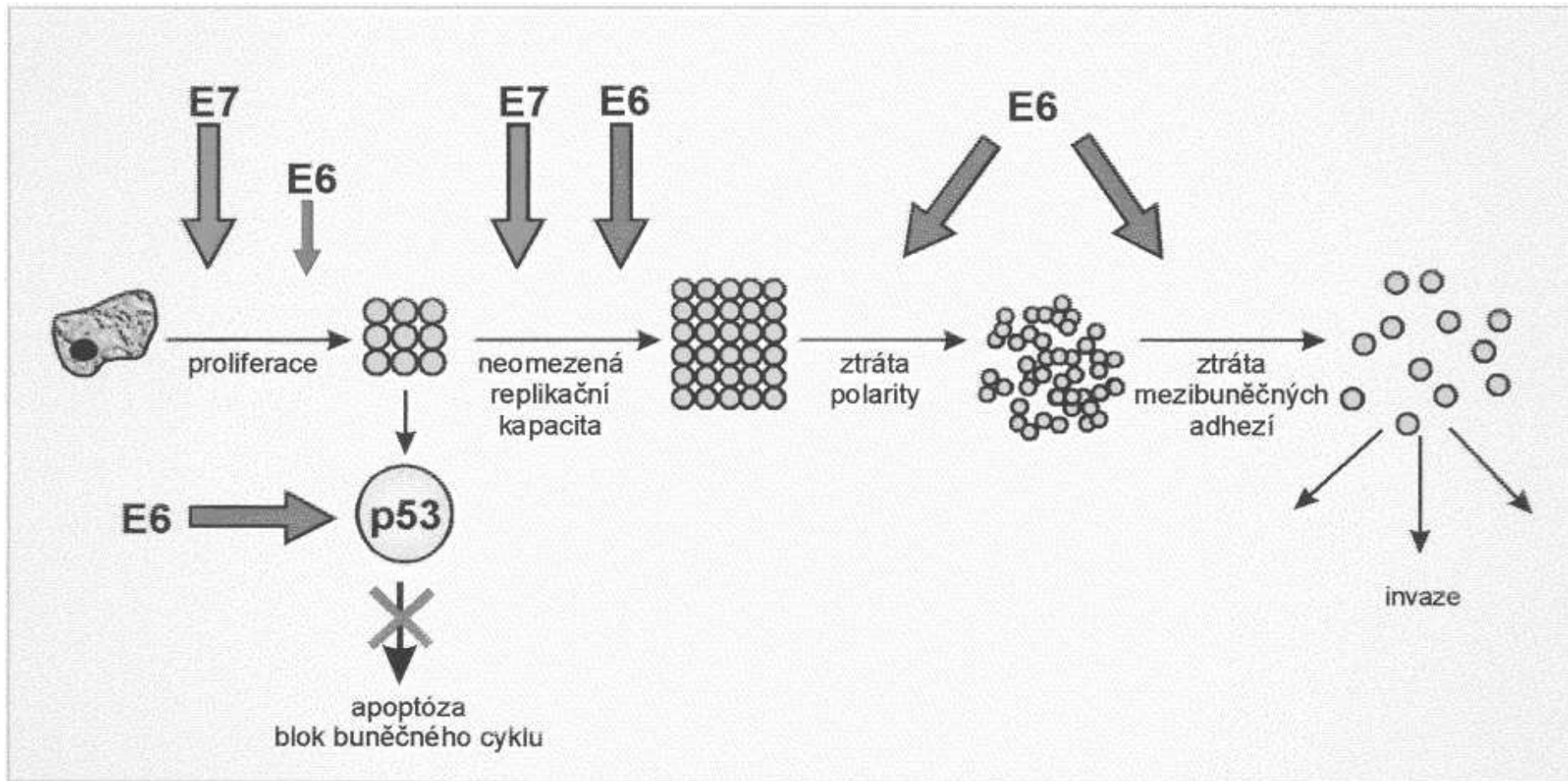
Podíl proteinu E7 papilomavirů na transformaci buňky

E7 - váže se na RB (uvolnění TF E2F)

- inaktivace **p21^{Cip}** a **p27^{Kip}** (rozpojení: diferenciace - proliferace)
- ruší inhibiční působení **TGF- β** na růst buněk
- způsobuje tvorbu násobných centrozóm



Podíl proteinů E6 a E7 papilomavirů na transformaci buňky



Klinický význam papilomavirů

- Popsáno více než 100 odlišných typů papilomavirů.
- Dělí se na „high-risk“ a „low-risk“ typy podle prognózy, s níž jsou spojeny. „Low-risk“ viry vyvolávají tvorbu benigních nádorů, „high-risk“ viry jsou spojeny s maligní progresí.
- Asi 30 typů HPV preferenčně infikuje anogenitální oblasti, infekce „high-risk“ viry je spojena téměř se všemi nádory děložního čípku.
- Asi 20% všech nádorů ústní dutiny, které nejsou spojeny s historií kouření a alkoholismu, je spojeno s infekcí HPV.

Onkogenní viry a lidské nádory

RNA viry:

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

DNA viry:

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

Sedm získaných vlastností maligního nádoru:

kancerogeneze je vícestupňový proces



soběstačnost v produkci růstových signálů



necitlivost k signálům zastavujícím buněčný cyklus



poškozená apoptóza



neomezený replikační potenciál



posílená angiogeneze

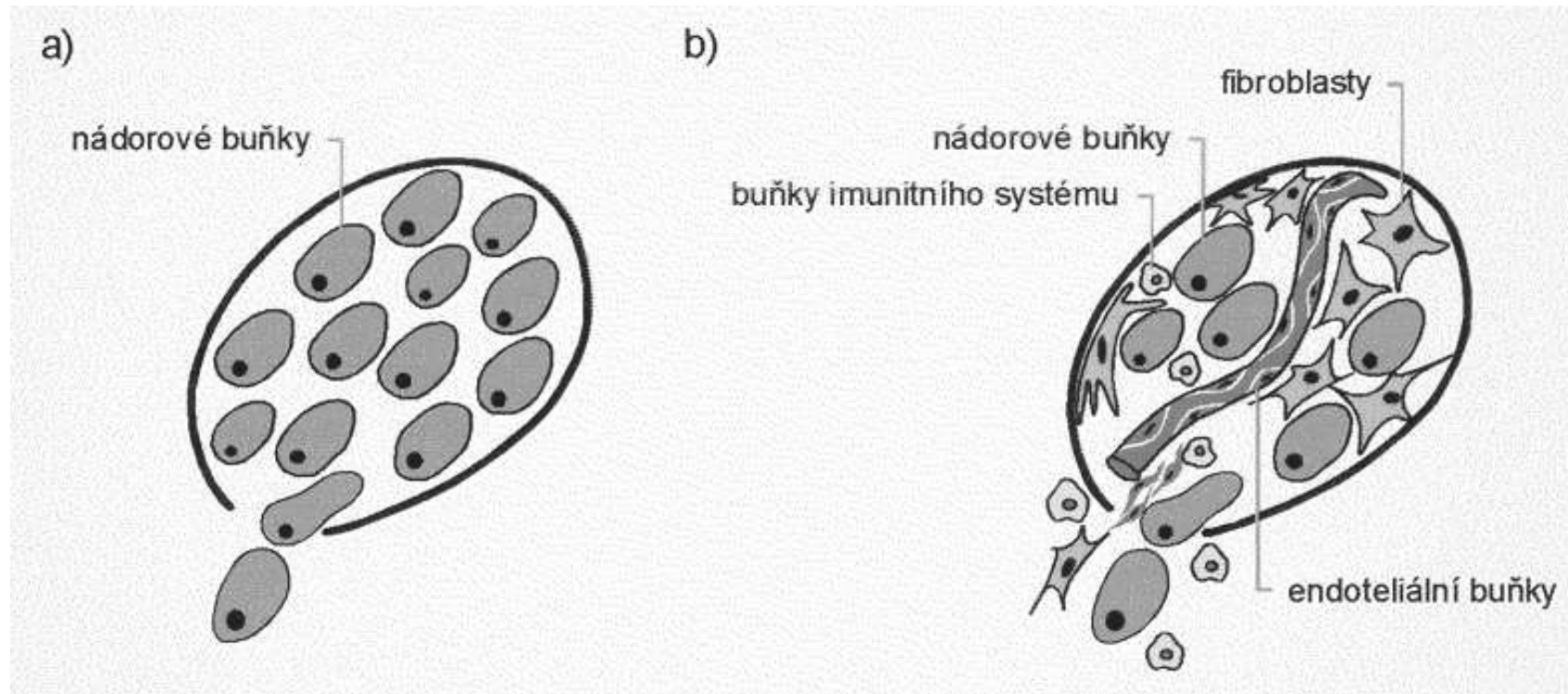


tvorba metastáz



nestabilita genomu

Nádor je komplexní tkáň



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

Histologická skladba nádoru

1. 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

2. Nádorový parenchym

- vlastní nádorově transformovaný parenchym

Histologická skladba nádoru

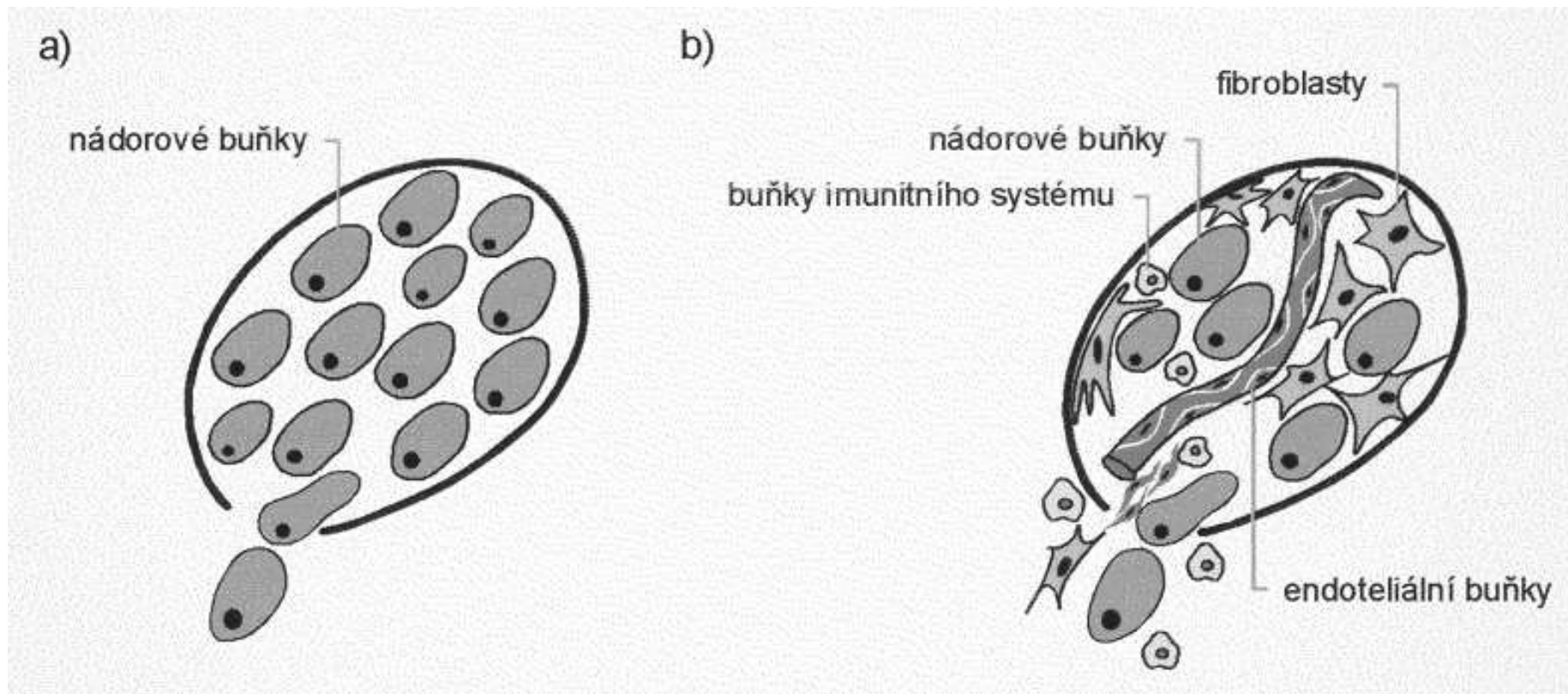
1. Nádory organoidní

- dobře patrné rozdíly mezi stromatem a parenchymem

2. Nádory histoidní

- při vysoké proliferační aktivitě transformovaných i netransformovaných buněk v nádoru a odchylkách v jejich diferenciaci může docházet k setření cytomorfologických rozdílů mezi parenchymem a stromatem

Nádor je komplexní tkáň



Závěrečné poznámky „Úvodu“

- Geny nemají výlučnou funkci v jediném procesu v buňce (buněčný cyklus vs. apoptóza vs. genomová stabilita vs. ...).
- Jenom omezený počet signálních drah je inaktivován téměř univerzálně u většiny nádorů (RB, p53).
- Jednotlivé signální dráhy jsou vždy postižené v jediné své složce → tzv. **princip exkluzivity**
- Existují „párové mutace“: mutace příčinná a mutace navozující toleranci k příčinné mutaci (zajišťující přežití).
- Existují specifické nebo preferované kombinace změn v nádorových buňkách?

Solidní vs. „tekuté“ nádory

- „Tekuté“ nádory: leukémie a lymfomy.
 - Prekurzory L a L jsou mobilní, zatímco epiteliální a mezenchymální buňky jsou imobilní.
 - K vývoji L a L stačí menší počet mutací (1-3).
 - Translokace je nejčastějším mechanismem aktivace onkogenů pozorovaným u leukémií a lymfomů.
- ⇒ Solidní nádory na straně jedné a leukémie a lymfomy na straně druhé mají odlišnou biologii, chování a patogenezi.

Program přednášky

- Úvod - základní pojmy, historický přehled, onkogenní viry
- Některé signální dráhy (protoonkogeny): regulace buněčného cyklu, mitogenní a antimitogenní signalizace
- Genetická nestabilita nádorů
- Genetické dispozice k nádorům (nádorové supresory): základní přehled syndromů spojených se zvýšeným výskytem nádorů

Program přednášky - 2

- Apoptóza
- Telomery a telomeráza
- Angiogeneze
- Tvorba metastáz
- Epigenetika nádorů
- Leukémie (Dr. Jitka Berkovcová)
- (Nádor jako komplexní tkáň)

Konec úvodní přednášky