

Předmět: **GENOTOXICITA A KARCINOGENEZE**
SYLABUS

VZNIK A ROZVOJ NÁDOROVÉHO ONEMOCNĚNÍ

Genetické (genotoxické) a epigenetické (negenotoxické) aspekty vzniku a rozvoje nádorů

Fáze karcinogeneze

Iničiační, podpůrná (promoční) a progresivní fáze, genetické a epigenetické faktory, karcinogeny a kokarcinogeny, antikarcinogeny

Typy nádorů

Nádory spontánní a indukované (onkogenní viry, chemické a fyzikální karcinogeny), nádory benigní a maligní, invaze, metastázy, klasifikace podle tkání.

Molekulární základy vzniku a rozvoje nádorového onemocnění

Genetické mechanismy

Mutace a mutageny, nádorově promoční faktory (exogenní a endogenní)
Protoonkogeny, onkogeny, nádorově supresorové geny

Transformace buněk

Denzitně závislá inhibice růstu (kontaktní inhibice), odlišnosti normálních a transformovaných buněk, změny závislosti na pozitivních a negativních růstových faktorech, maligní transformace

Imortalizace

Význam telomer, telomerázy a dalších faktorů

Negenotoxické (epigenetické) mechanismy

Metylace DNA, acetylace histonů, změny exprese genů

Změny v regulaci proliferace, diferenciaci a apoptózy

Změny v mechanismech přenosu (transdukce) signálů

Antiproliferační molekuly - jejich vztah k růstovým faktorům, receptorům a dalším součástem kaskády přenosu signálů.

Úloha buněčného cyklu a jeho změny v karcinogenezi

Rovnováha v buněčných populacích

Poruchy proliferace, diferenciaci a apoptózy (apoptóza a nekróza)

Patologické účinky cytokinů

parakrinní a autokrinní regulace, poruchy pozitivních a negativních regulátorů, důsledky.

Význam oxidativního metabolismu

rovnováha oxido-redukčních dějů, aktivační a deaktivující enzymy, pro- a antioxidační systémy, oxidativní stres

Úloha oxidačních procesů v apoptóze

Komunikace buněk

Mimobuněčná, mezibuněčná a vnitrobuněčná komunikace, úloha mezerovitých spojení tzv. "gap junctions" (GJIC) v udržování tkáňové homeostázy, poruchy mezibuněčné komunikace u nádorových buněk, snižování počtu gap junctions, klonální množení iniciované buňky. Změny membránových vlastností, rozpoznávání a komunikace buněk, kadheriny, kateniny, integriny, konexiny.

Metastázy

Příčiny vzniku, metastatická kaskáda, kontakt buňka-buňka, buňka - mimobuněčná matrix, změny adhezivních molekul a vnitrobuněčného signálování, imunitní systém

Angiogeneze

Význam, induktory a inhibitory angiogeneze

Vznik a rozvoj specifických typů nádorů (jejich genetické a epigenetické příčiny)

Poruchy krvetvorby - leukémie

Chronická myeloidní l., myelodysplastický syndrom, akutní l., genetické poruchy, rozpojení procesu proliferace a diferenciacie, poruchy apoptózy

Nejčastější typy nádorů - kolorektální karcinomy, nádory prsu, prostaty, kůže

Genetické a negenetické příčiny, prekancerózní stavy, etiologie, rozvoj, vnější faktory

Endogenní karcinogeneze, hormonálně závislé nádory

Přirozené protinádorové obranné mechanismy

Úloha imunitního systému, cytostatické a cytotoxické účinky monocytů a makrofágů, působení cytokinů a eikosanoidů

FAKTORY VNĚJŠÍHO PROSTŘEDÍ V PROCESU KARCINOGENEZE

Záření - neionizující a ionizující

Chemické karcinogeny - polycyklické aromatické uhlovodíky (PAH), halogenované aromatické uhlovodíky (PCB, PCDD), peroxisomové proliferátory, xenobiotické lipidy, chlorované pesticidy, atd.

Onkogenní viry a bakterie

Důsledky působení škodlivých faktorů vnějšího prostředí

Genotoxické vs. negenotoxické účinky (epigenetická toxicita) - charakteristika

Poruchy homeostázy - modulace buněčné proliferace, diferenciaci a apoptózy - příčiny a důsledky, vztah ke karcinogenezi

Mechanismy - změny v reparaci DNA, specifické vnitrobuněčné receptory, působení reaktivních forem kyslíku – oxidativní stres, inhibice GJIC, ovlivnění mechanismů transdukce signálu, změny metylace DNA, ovlivnění exprese onkogenů a nádorově supresorových genů

Nutriční aspekty karcinogeneze

Karcinogeny v potravě, promoční a antipromoční působení složek potravy (vitamíny, antioxidanty)

Obsah a složení tuků v potravě, polynenasycené mastné kyseliny (n-6 a n-3 mastné kyseliny) a jejich metabolity jako mediátory a modulátory buněčných signálů, mechanismy působení, oxidativní metabolismus, lipidová peroxidace, imunitní systém, úloha eikosanoidů v karcinogenezi – interakce s cytokiny

Vláknina – mastné kyseliny s krátkým řetězcem - butyrát

Současný systém detekce karcinogenních účinků látek

Genotoxicita (mutagenní účinky) – testy mutagenity

Problémy detekce negenotoxicky působících karcinogenů. Dlouhodobé testy na laboratorních zvířatech, krátkodobé testy - testy buněčné transformace, změny proliferace a apoptózy v tkáních, změny GJIC, detekce specifických biomarkerů (aktivity specif. buněčných enzymů a receptorů).

Modely karcinogeneze – studium iniciačního a promočního působení látek - kůže, játra, ledviny, moč. měchýř, čichové orgány

Příčiny rozdílné citlivosti (organismů, tkání a buněk) k působení karcinogenních látek

Odhady rizik – otázky dávek, prahové hodnoty, křivky dávka-odpověď, působení směsí látek (aditivita, synergismus, antagonismus)

Význam experimentální ekotoxikologie – perspektivy, propojení s experimentální a prediktivní onkologií

PREVENCE, DIAGNOSTIKA A LÉČBA NÁDOROVÝCH ONEMOCNĚNÍ

Experimentální, epidemiologické a klinické studie, populační screening

Genetická predispozice, životní styl

Terapie - chirurgie, záření, chemoterapie, imunoterapie

Prediktivní onkologie

Typizace nádorů, diagnostické markery, prognostické vs. prediktivní faktory

Detekce specifických parametrů - cytokinetické parametry, molekulární a jiné markery

Moderní metody (průtoková a vysokorozlišovací cytometrie, laser scanning, molekulární a další metody, microarrays), stanovení proliferační aktivity, detekce apoptózy

Srovnání metod a interpretace naměřených parametrů

Data management - význam vícerozměrných matematických analýz, prediktivní markery

Doporučená literatura

- B. Alberts et al.: Molecular Biology of the Cell, 4rd edition, Garland Science, New York 2002
- B. Alberts et al.: české vydání – Základy buněčné biologie, Espero Publishing, Ústí n./Labem 1998
- U.R. Folsch, K. Kochsiek, R.F. Schmidt: Patologická fyziologie, GRADA Publishing, Praha 2003
- Z. Adam, J. Vorlíček, J. Koptíková: Obecná onkologie a podpůrná léčba, GRADA Publishing, Praha 2003
- P. Klener: Klinická onkologie, Nakladatelství Galén a Karolinum UK Praha, 2002
- J. Krejsek, O. Kopecký: Klinická imunologie, NUCLEUS HK, 2004
- Z. Adam, J. Vorlíček, J. Vaníček a kol.: Diagnostické a léčebné postupy u maligních chorob, 2. vydání, GRADA Publishing, Praha 2004
- A. Rejthar, B. Vojtěšek: Obecná patologie nádorového růstu, GRADA Publishing, s. r. o., 2002
- S. Štípek a kol.: Antioxidanty a volné radikály ve zdraví a v nemoci, GRADA Publishing, s.r.o. 2000
- V. Hořejší, J. Bartůňková: Základy imunologie, 2. vydání, Triton, Praha 2002
- D. Heber et al., Nutritional Oncology, Elsevier Inc., 2006
- Carcinogenesis, Vol. 21, 2000 – celé číslo
- J. Hofmanová, A. Kozubík: Apoptóza a nádorová onemocnění - Přehled, Klinická onkologie 8, 5, 1995.
- A.Kozubík, J. Hofmanová: Význam nenasycených mastných kyselin v rozvoji a chemoprolaxi nádorů kolorekta - Přehled, Klinická onkologie 1999
- J. Hofmanová, M. Machala, A. Kozubík: Epigenetic mechanisms of carcinogenic effects of xenobiotics and *in vitro* methods of their detection. Review. Folia Biologica (Prague) 46, 165-173, 2000.
- Doporučené speciální separáty

RAKOVINA

nejrozšířenější epiteliální nádory - karcinomy

řecky - karkinos -rak

onkos (krab)

cancer (angl.)

der Krebs (něm.)

ONKOLOGIE - věda o nádorech

Onkologická onemocnění - nádorová onemocnění

KARCINOGENEZE (kancerogeneze, onkogeneze, tumorigeneze)

vznik a rozvoj nádorového onemocnění

Pojem „rakovina“ odpovídá více než sto formám této choroby. Téměř všechny tkáně v těle mohou podlehnout malignitě.

Asi 30 trilionů buněk v **normálním zdravém organismu** žije ve složitém vzájemně propojeném svazku, regulujíc vzájemně svou proliferaci. Vzájemná spolupráce buněk zajišťuje, že **každá tkáň těla udržuje svou velikost a architekturu** .

Nádorové buňky naopak ničí toto schéma, stávají se hluchými k obvyklé kontrole proliferace a vytvářejí si svůj **vlastní vnitřní program reprodukce**.

Kromě toho mají ještě nebezpečnější vlastnost - **schopnost migrovat** a tvořit masu ve vzdálených částech těla. Nádory z takovýchto buněk se stávají čím dál agresivnější a stávají se letální, jestliže rozrušují tkáně a orgány důležité pro přežití organismu jako celku.

Nádory vznikají z naší vlastní tkáně.

Teorie „nádorové kmenové buňky“ – nádor je obecně odvozen od jedné buňky která se dramaticky mění po sérii genetických změn.

Zdravá buňka má definovaný tvar a strukturu a prosperuje mezi uspořádanými okolními buňkami. Odpovídá na podněty ze svého okolí a dává vznik dceřinným buňkám jen tehdy, jestliže rovnováha stimulačních a inhibičních signálů z okolí upřednostní buněčné dělení.

Avšak v procesu replikace nebo dělení existuje stálá hrozba **vzniku mutací**, náhodných změn, které mohou tento regulační cyklus porušovat. Jedna mutace může způsobit, že buňka, která vypadá normálně a je méně citlivá na vnější signály se může příležitostně začít nekontrolovaně dělit.

Akumulace genetických změn může způsobit, že se dceřinná buňka stane zcela hluchou k externím signálům a vykazuje znaky malignity.

Buňka ztrácí přesný tvar a hranice, nereaguje na růstově inhibiční signály a získává schopnost nekontrolovaně se dělit.

Vznikající masa stlačuje a poškozují zdravou tkáň ve svém sousedství a může dále překonávat bariéry jednotlivých orgánů a **metastázovat**, což znamená, že kolonizuje vzdálené tkáně.

MUTACE - dědičná genetická změna v buňce (vzniká bodovou mutací, delecí nebo inzercí jednoho či více nukleotidů, amplifikací segmentů DNA, inverzí nebo získáním či ztrátou chromozomu, translokací). Základem je změna genetického materiálu v buňce nikoli změna v jeho expresi.

EPIGENETICKÁ ZMĚNA - je změna v genové expresi beze změny v sekvenci DNA nebo genetickém obsahu buňky – může být dědičná

INICIOVANÁ BUŇKA, TRANSFORMOVANÁ BUŇKA - buňka se změněnou genetickou informací. Vzniká spontánně nebo je indukována viry, chem. látkami nebo fyzikálními faktory. Má potenciální schopnost stát se nádorovou nebo maligní.

BENIGNÍ NÁDOR - je lokální rozrůstání iniciované buňky.

MALIGNÍ NÁDOR - nádor se schopností vrůstat do tkání a rozšiřovat se do vzdálených míst.

MALIGNÍ TRANSFORMACE - přeměna buňky s normálními růstovými vlastnostmi na buňku maligní ztrácející schopnost adekvátně reagovat a odpovídat na růstové signály. Ztráta kontaktní inhibice růstu. Porušení negativní zpětné vazby. Snížená schopnost komunikace pomocí mezibuněčných spojení - gap junctions.

Termín **NEOPLASIE** (nový růst) se používá pro celý rozsah benigního i maligního chování buněk.

ZÁKLADNÍ KLASIFIKACE NÁDORŮ

| Výchozí tkáň | Zralé benigní buňky (nezhoubné) | Nezralé maligní buňky (zhoubné) |
|----------------------------------|------------------------------------|--------------------------------------|
| EPITEL povrchový | papilom | karcinom |
| žlázový | adenom | adenokarcinom |
| POJIVO kolagenní | fibrom | fibrosarkom |
| tukové | lipom | liposarkom |
| chrupavka | chondrom | chondrosarkom |
| kost | osteom | osteosarkom |
| Sval | myom | myosarkom |
| Cévní | angiom | angiosarkom |
| KRVETVORNÁ LYMFATICKÁ | mononukleóza? | leukemie lymfom, myelom |
| NERVOVÁ centrální | gliom | glioblastom |
| periferní | ganglioneurom pargangliom | neuroblastom maligní paragangliom |
| ZÁRODEČNÁ | gonadoblastom | seminom dysgerminom |
| | teratom zralý | teratom nezralý |

Vznik nádoru je **vícestupňovitý proces**, který je výsledkem složité **interakce genetických a negeneticky působících faktorů**

- 1) Indukce mutací - **fáze iniciace**
- 2) Preferovaný klonální růst iniciovaných preneoplastických buněk - **fáze podpůrná - promoční** – karcinom *in situ*
- 3) **Fáze konverze** či **transformace** – změna fenotypu, vznik maligního klonu
- 4) **Fáze progresu** – lokální rozrůstání nádoru, neschopnost odpovídat na regulační mechanismy, vzrůstající rychlost proliferace
- 5) Invazivita – šíření nádoru mimo prvotní ložisko - **vznik metastáz**

Onemocnění vzniká v zásadě porušením homeostázy na úrovni buněk a buněčných populací

INICIACE (initiation)

změna genetického materiálu buňky - mutace

ireverzibilně mění normální buňku v preneoplastickou

PROMOČNÍ STADIUM (promotion)

indukce proliferace (klonální množení) iniciované buňky po působení tzv.

nádorově promočních podnětů (regenerace po odstranění části buněčné populace nebo po smrti buněk, růstové signály, působení vnějších signálů - chem. a fyz. faktorů)

zpočátku reverzibilní, později ireverzibilní – přechod do maligní transformace

PROGRESE (progression)

akumulace dalších mutací + působení promočních faktorů, ztráta regulačních mechanismů

invazivita a vznik metastáz

ZÁKLADNÍ ZNAKY NÁDOROVÉ POPULACE

ztráta kontaktní inhibice a kontroly růstu

ztráta schopnosti terminální diferenciaci

ztráta schopnosti apoptózy

snížení nebo inhibice mezibuněčné komunikace

Ztráta kontaktní inhibice v buněčné kultuře

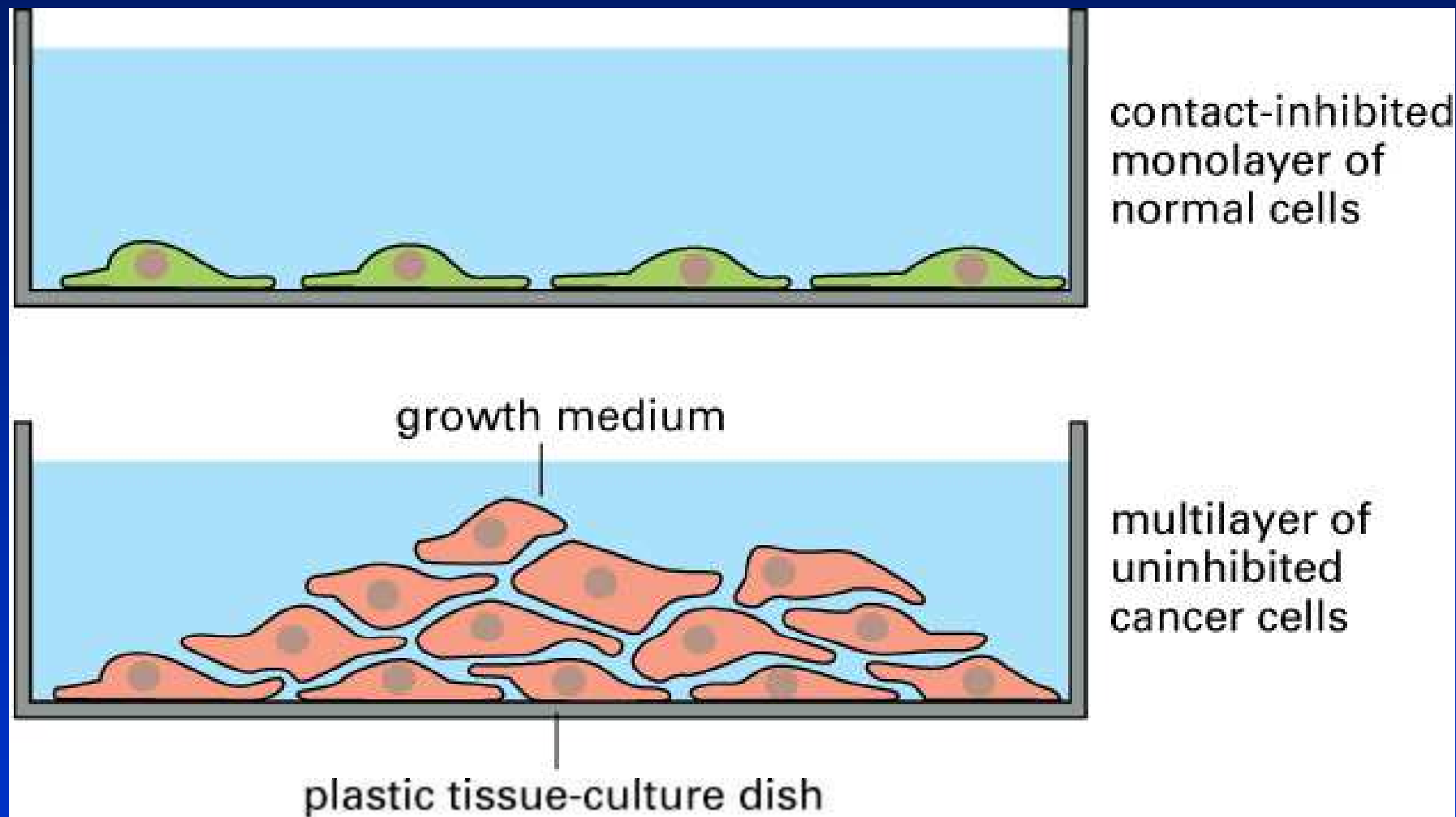


Figure 23–25. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.

INICIACE

PROMOCE

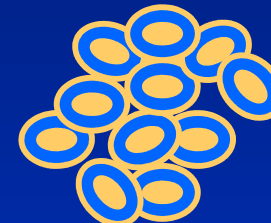
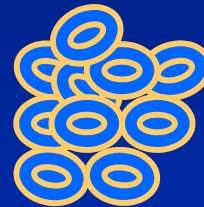
PROGRESE

MUTAGENY
RADIACE
VIRUSY....

NEGENOTOXICKÉ
KARCINOGENY

GENOTOXICKÉ
+NEGENOTOXICKÉ
FAKTORY

GENOTOXICITA



NORMÁLNÍ
BUŇKA

INICIOVANÁ
BUŇKA

PRENEOPLASTICKÉ
PORUCHY

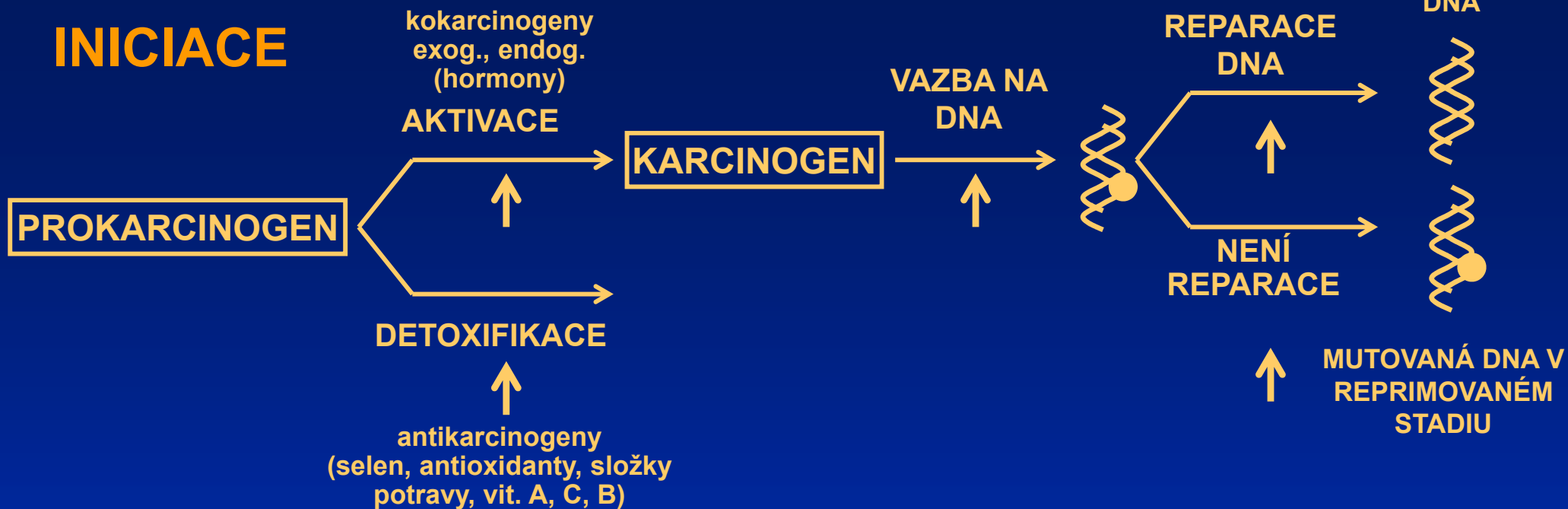
MALIGNÍ
NÁDOR

INVAZE
METASTÁZY

AKTIVACE PROTO-ONKOGENŮ
INAKTIVACE NÁDOROVĚ SUPRESOR. GENŮ
INAKTIVACE ANTIMETASTAT. GENŮ

Mnohostupňový proces karcinogeneze

INICIACE



PROMOCE



Homeostáza ve tkáních

je udržována integrovaným systémem komunikačních mechanismů (mimo-, vnitro- a mezibuněčných) a reguluje chování buněk především s ohledem na schopnost proliferace, diferenciaci, adaptivní odpovědi a apoptózy.

Iniciované preneoplastické buňky jsou udržovány v latentním stavu v důsledku působení těchto "přirozených" regulačních mechanismů.

V podpůrné (promoční) fázi rozvoje nádorů se uplatňují látky působící negenotoxickými (nebo epigenetickými) mechanismy, tzv. nádorové promotory, které způsobují změny chování buněk v důsledku deregulace zmíněných procesů.

Zásahy, které vedou ke změnám v expresi genů a k poruchám homeostázy se odehrávají v buňce na různých úrovních a různými mechanismy.

Způsoby promoce iniciované buňky

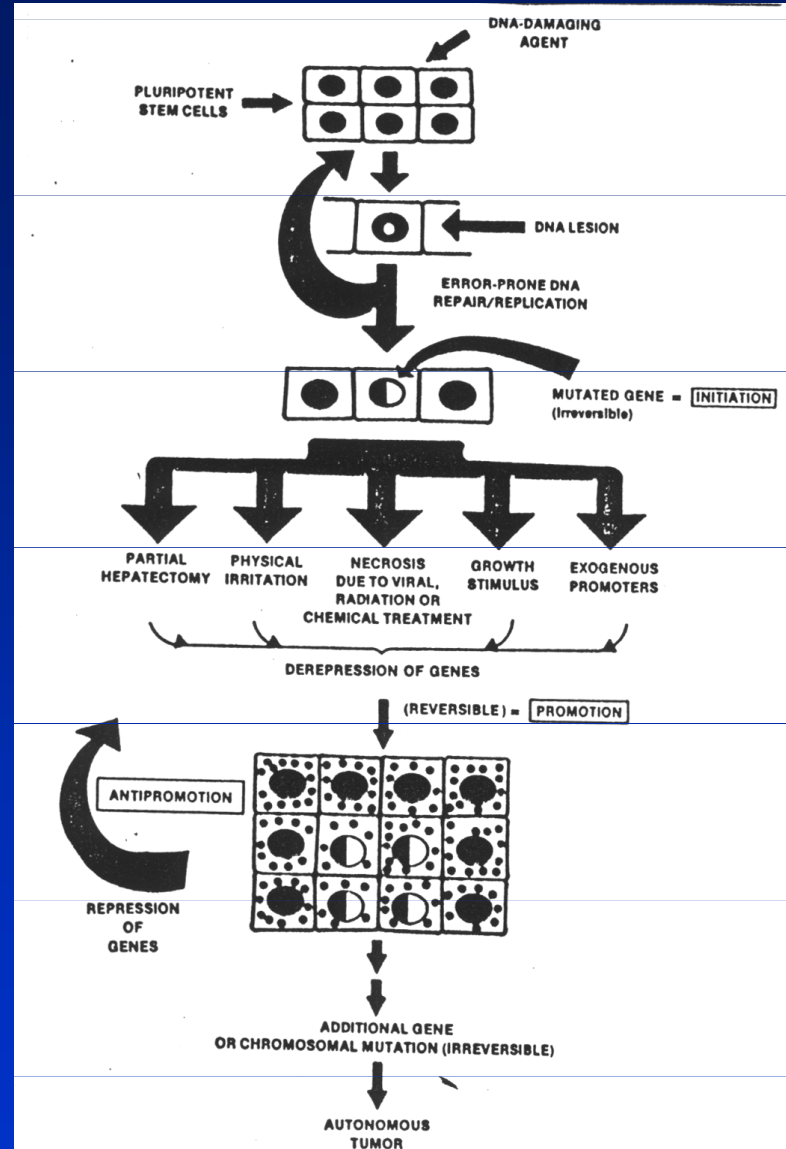


FIG. 1. Multiple modes by which initiated cells can be promoted. The concept of promotion is shown as a process that allows cells with a specific carcinogen-induced mutation to multiply, enabling them either to reach a "critical mass" and become resistant to the antiproliferative influences of normal cells or to increase the chance that one of these mutated cells would accumulate a second mutation. [From Ref. (93) with permission from Churchill Livingstone Medical Journal.]

BIOLOGICKÉ CHARAKTERISTIKY STÁDIÍ KARCINOGENEZE

INICIACE

Genotoxický děj (mutace)

Změna v genetickém materiálu (nukleotidy, chromozómy)

Ireverzibilní změna

Vznik preneoplastické buňky

Vykazuje dávkově závislé vlastnosti

Možný "spontánní vznik iniciované buňky"

Je nutné buněčné dělení pro "fixaci" mutace

Při dávkové závislosti neexistuje práh

PROMOCE

Negenotoxické (epigenetické) děje

Změny v genové expresi

Reverzibilní změny

Selektivní klonální expanze preneoplastické bun. populace

Závislá na konstatní expozici látkou s promočními účinky

Vykazuje dávkově závislé vlastnosti

Je zjevný práh

PROGRESE

Genotoxické i negenotoxické děje

Změny karyotypu a genetická nestabilita

Ireverzibilní změna

Tvorba neoplastických útvarů (adenomy a karcinomy)

Změny podporující přechod preneoplastických buněk v neoplastické

Autonomie nádorové populace

Vznik metastáz

MUTACE

definována jako kvalitativní nebo kvantitativní změna v genetické informaci obsažené v DNA.

Je považována za ireverzibilní změnu a může být indukována viry, fyzikálními nebo chemickými faktory.

Mutace mohou vznikat na úrovni genů nebo chromozómů. Jeden specifický gen může být změněn přidáním, ztrátou nebo záměnou jedné baze.

Protein kódovaný tímto genem pak může být změněn s ohledem na strukturu a funkci.

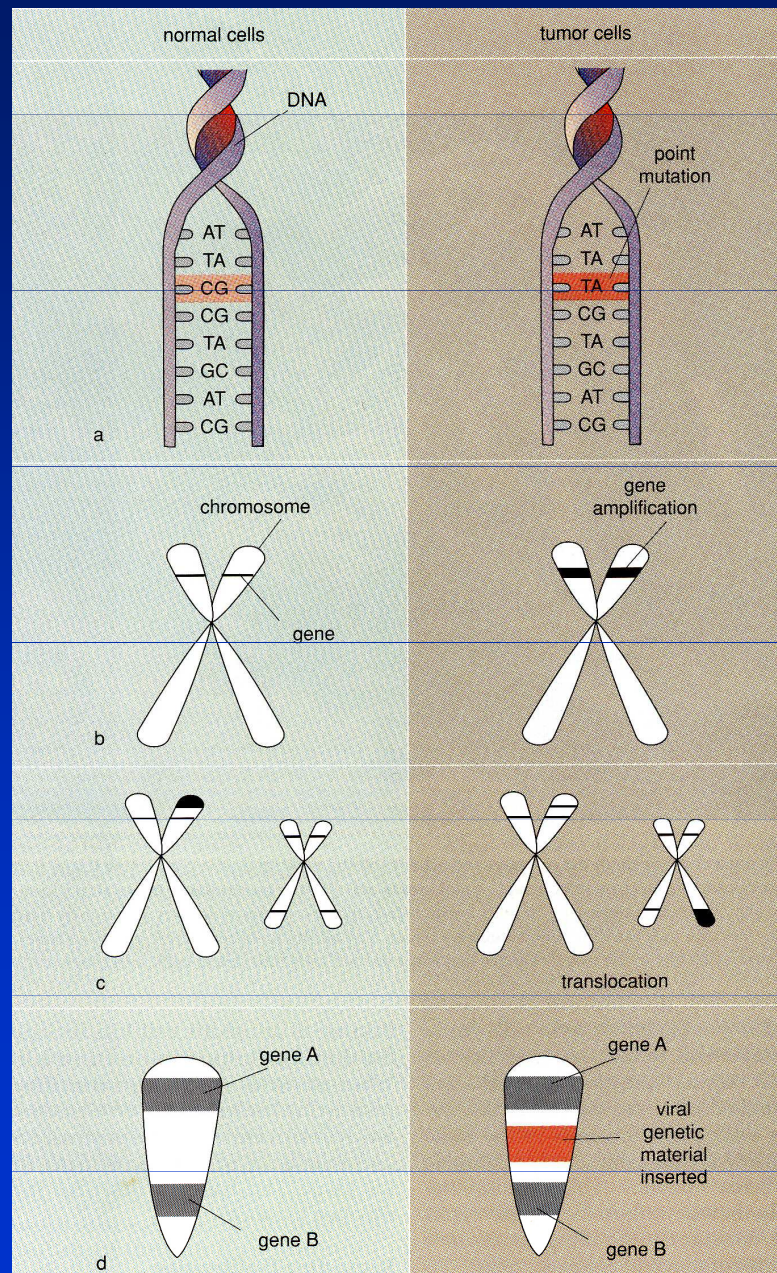
Jestliže mutace zahrnuje změnu v počtu chromozómů v buňce (nondisjunkce, polyploidizace), tak potom, i když jednotlivé geny jsou normální, jejich počet může narušit jejich funkci.

Změny v uspořádání chromozómů způsobené delecí nebo translokací části jiných chromozómů také mohou způsobit jak mutace genů tak abnormální expresi genů umístěných na takovémto chromozómu.

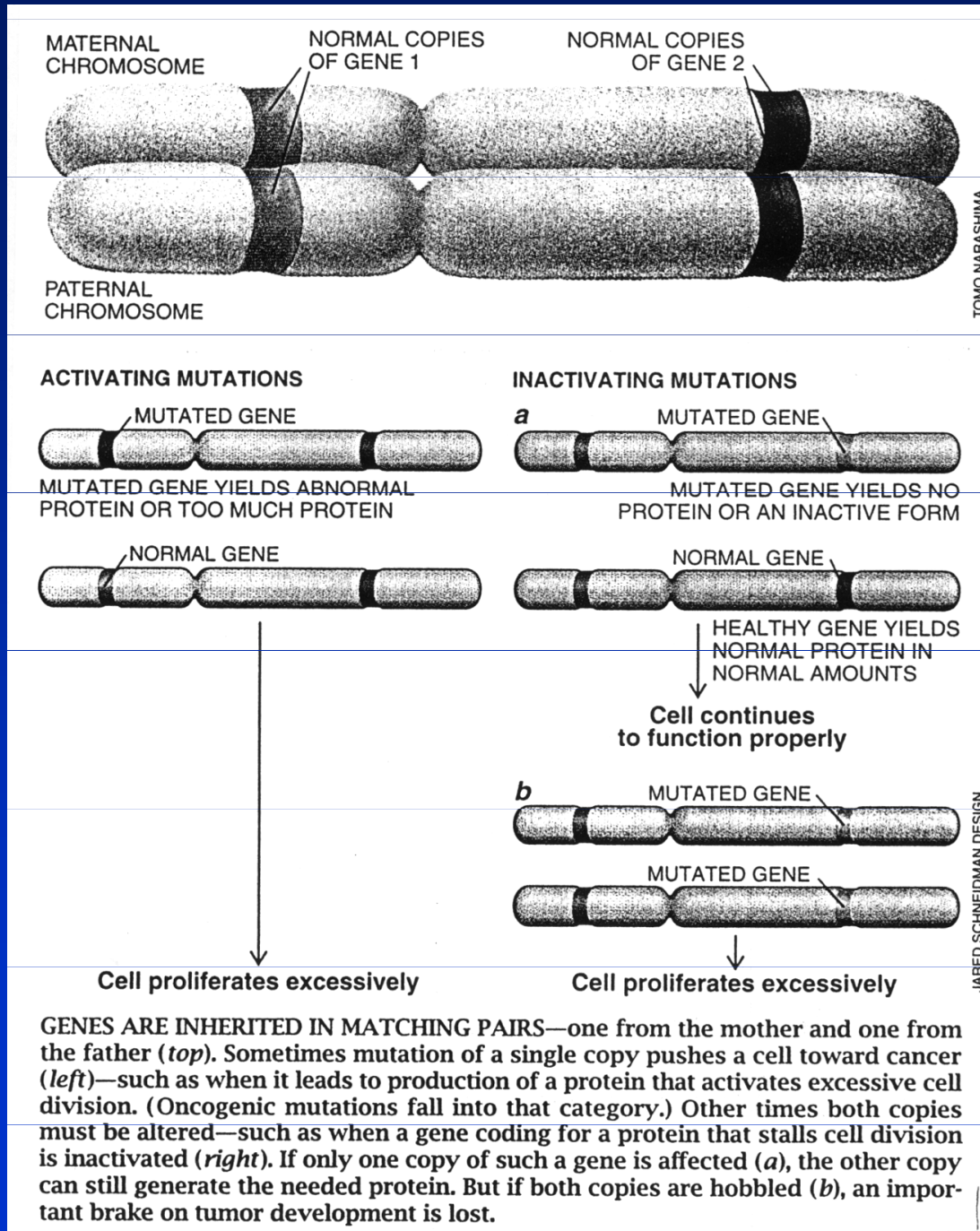
Dědičné mutace (Xeroderma pigmentosum, Wilmsův tumor, albinismus atd.) mohou předurčovat jedince k určitým typům nádorů.

Fyzikální a chemické faktory, které působí jako mutageny též přispívají k nádorovému procesu jako iniciátory nebo progresory.

Genetické změny a disorganizace chromosomů v nádorových buňkách



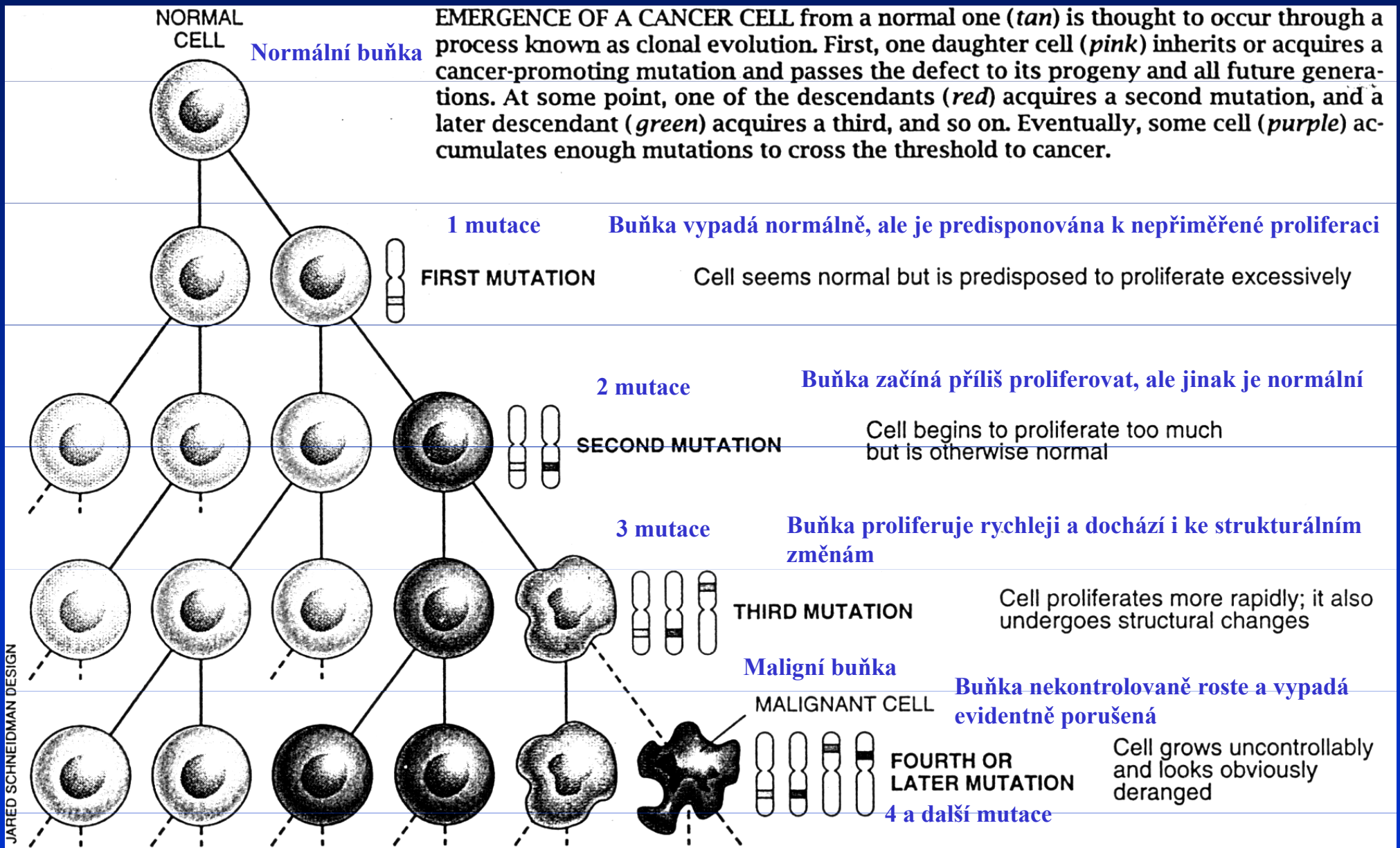
Geny se dědí v odpovídajících párech



Mateřský a otcovský chromozóm nesou každý jednu normální kopii příslušného genu

- **Aktivační mutace** – mutovaný gen produkuje protein aktivující bun. proliferaci, stačí mutace v jedné kopii genu, dominantní
- **Inaktivační mutace** – mutovaný gen neprodukuje protein zastavující bun. proliferaci nebo produkuje jeho inaktivní formu. K mutaci musí dojít u obou kopií genu, recesivní

Vznik nádorové buňky – klonální evoluce



VÝZNAM MUTACÍ U NÁDOROVÝCH ONEMOCNĚNÍ

Normální frekvence mutací 10^{-7} - 10^{-8} /nukleotid/bun. dělení.

Zvýšená frekvence mutací podporuje karcinogenezi.

Mutace jsou nejen znakem nádorů, ale jsou také zásadní pro jejich vývoj.

Genom nádorových buněk je nestabilní a tato nestabilita vyúsťuje v kaskádu mutací, z nichž některé umožňují nádorovým buňkám obejít regulační procesy, které kontrolují lokalizaci buňky, její dělení, adaptaci a smrt.

Genetická nestabilita je manifestována velkou **heterogenitou buněk** v každém nádoru.

Dva hlavní mechanismy vzniku mutací v nádorových buňkách:

- ▶ deficit v reparaci DNA (kopírování nereparovaných poškození v DNA nebo chyby během syntézy DNA)
- ▶ deficit v rozdělování chromozómů při buněčném dělení

V buněčné DNA dochází ke stálému poškozování (environmentálními i endogenními zdroji) a k resyntéze. Mnoho z takto působících látek jsou **mutageny** a řada z nich i **karcinogeny**.

Poškození DNA chemikáliemi spadá do dvou kategorií:

- ▶ rozsáhlé adukty reparované excisí (vystřihnutím) nukleotidů
- ▶ malé změny vznikající např. po alkylačních činidlech, která přidávají metyl- a etylskupiny do nukleotidů, a ty jsou pak reparovány excisní reparací bází.

Další zdroje poškození DNA:

- ▶ přírodní látky v potravě
- ▶ buněčné metabolické procesy (reaktivní kyslíkové produkty-ROS)

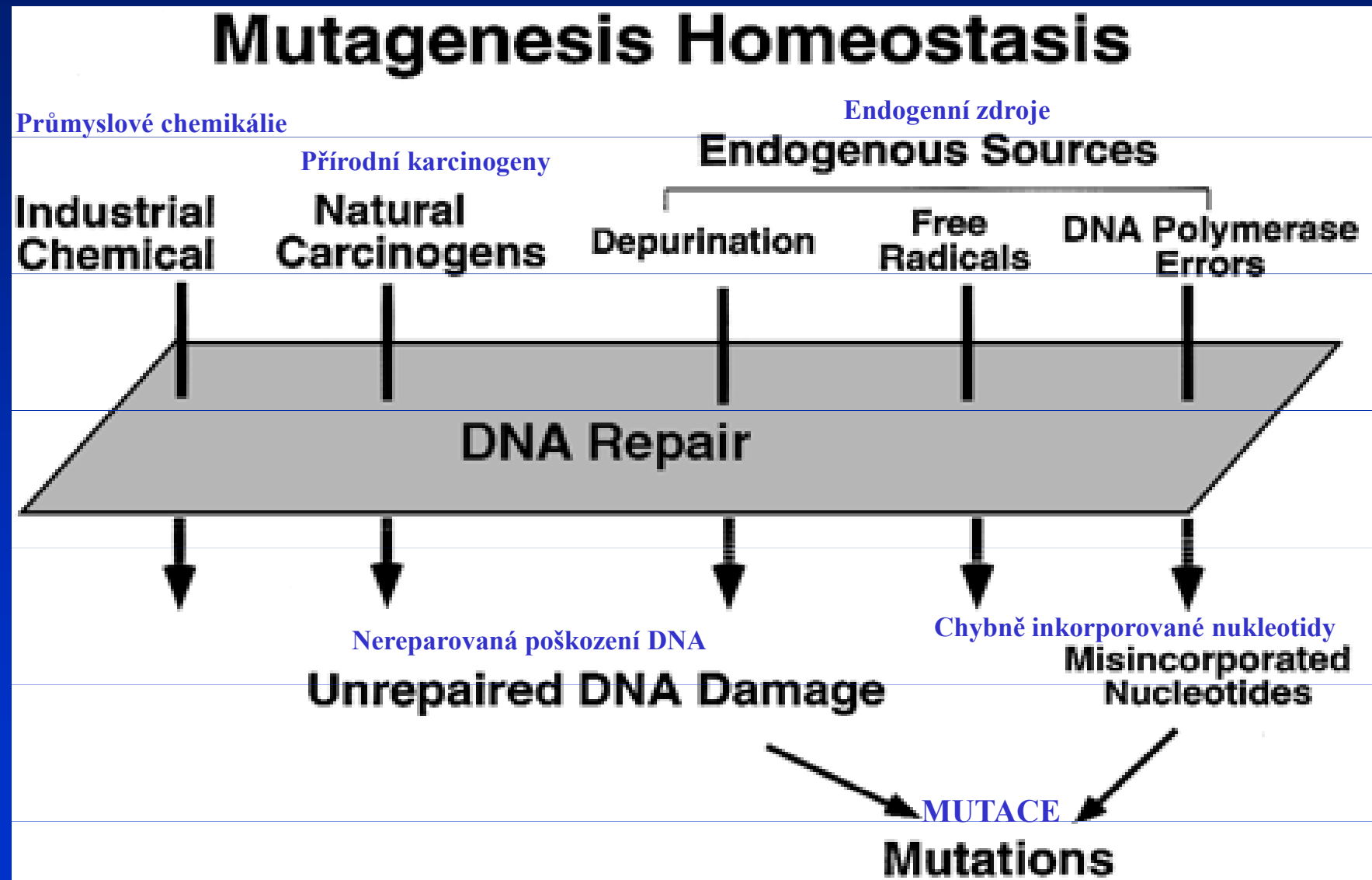
Vzhledem k vysoké frekvenci poškození je pravděpodobné, že významná část poškození unikne reparaci a produkuje mutace během replikace této nereparované DNA polymerázami.

Mutace mohou vznikat též **chybnou inkorporací nukleotidů DNA polymerázami** při kopírování nepoškozeného templátu DNA, během replikace nebo reparační syntézy.

Nukleotidové sekvence v buněčné DNA jsou udržovány v homeostatické rovnováze, kdy vzrůst poškození DNA nebo snížení reparace vedou ke zvýšené frekvenci mutací.

Faktory vedoucí k akumulaci mutací v nádorových buňkách

Mutace vznikají poškozením DNA a poruchami v reparačních mechanismech, čímž je narušena dynamická rovnováha mezi poškozením a reparací DNA.



Ke genetické nestabilitě přispívají dva překrývající se mechanismy :

- ▶ nádorové buňky vykazují mutovaný fenotyp založený na **vzrůstajícím počtu chyb v syntéze DNA během replikace**. Tyto chyby vznikají v důsledku mutací
 - v DNA polymerázách, takže vnášejí chyby
 - v DNA reparačních proteinech, které jsou potom defektní
- ▶ akumulace mutací založená na postupných vlnách **klonální selekce**.

Buněčný cyklus a apoptóza

V průběhu **buněčného cyklu** existuje několik **kontrolních bodů**, kde je monitorována reparace poškození před vstupem do následující fáze. Při aktivaci se v těchto bodech cyklus přechodně zastavuje, aby mohla být poškození reparována. Eliminace těchto kontrolních bodů (např. mutace v p53, pRb) vede k vývoji mutovaného fenotypu.

V případě **vzniku nereparovatelného poškození** se normálně spouští **apoptóza**, která zabrání rozšíření mutací. Mutace, které zpožďují nebo zabraňují apoptóze tak podporují přežití geneticky nestabilních maligních buněk.

Mikrosatelity

Velké množství mutací (až 100 000 např. u nádoru kolonu) se nachází v tzv. **mikrosatelitech** - repetitivních (opakovaných) sekvencích mezi geny. Repetitivní sekvence jsou i uvnitř genů a jsou u nádorových buněk zkracovány nebo prodlužovány s vysokou frekvencí. Tak dochází patrně k **inaktivaci nádorově supresorových genů** během rozvoje nádorů. Na nestabilitě mikrosatelitů se ve velké míře podílejí např. ROS, takže se uvažuje o využití látek působících jako antioxidanta.

Nádory vykazující **nestabilitu mikrosatelitů** obsahují často změny v délce repetit. sekvencí uvnitř řady genů spojených s nádory jako je APC, spec. růstové faktory-IGF, TGF-beta, metastatické geny-hMSH3, hMSH6. Téměř všechny nádory prsu a vaječníků studované s využitím srovnávací genomové hybridizace obsahují řadu **změn v počtu genových kopií**.

Genetická nestabilita nádorových buněk se projevuje na úrovni

▶ **nukleotidů - bodové mutace**

▶ **celých chromozómů - translokace, delece, amplifikace a aneuploidie.**

Nestabilita vede k mutantnímu fenotypu prostřednictvím změněné exprese proteinů, funkcí nebo efektem genové dávky.

Aneuploidie - změna v počtu chromozómů - vlastnost řady nádorů. Může vzniknout fragmentací chromozómů, translokací, amplifikací nebo nondisjunkcí. Progresivní růst aneuploidie je raným počátečním dějem vedoucím ke genet. nestabilitě a je nezávislý na akumulaci jiných typů mutací.

Obecně existuje **pozitivní korelace mezi počtem chromozomálních změn v nádoru a maligním potenciálem tohoto nádorového onemocnění.**

Existují tetraploidní mezistupně po **defektní mitóze** nebo **endoreduplikaci**. Po přechodné zástavě mitózy v přítomnosti poškození vřeténka, jsou některé nádorové buňky (zejména buňky, které postrádají funkční produkty genů kontrolujících přechod G1/S fáze jako jsou p53, pRb, p16, p21 i buňky overexprimující myc) schopny obnovit bun. cyklus vstupem do dalšího kola syntézy DNA, což vede k endoreduplikaci.

Dva základní mechanismy vzniku genetické nestability:

► mechanismus zahrnující mutace v genech pro opravu nesprávných spojení DNA („mismatch repair“) a manifestují se nestabilitou mikrosatelitů.

Nutná mutace v obou alelách – recesivní charakter.

► mutace v genech pro segregaci chromozómů manifestující se fragmentací chromozómů nebo duplikací či delecí celých chromozómů.

Stačí pouze jedna mutace, tj. fenotyp nestability chromozómů má dominantní charakter.

S růstem počtu mutací přispívá ke genetické nestabilitě **jev klonální selektivity**.

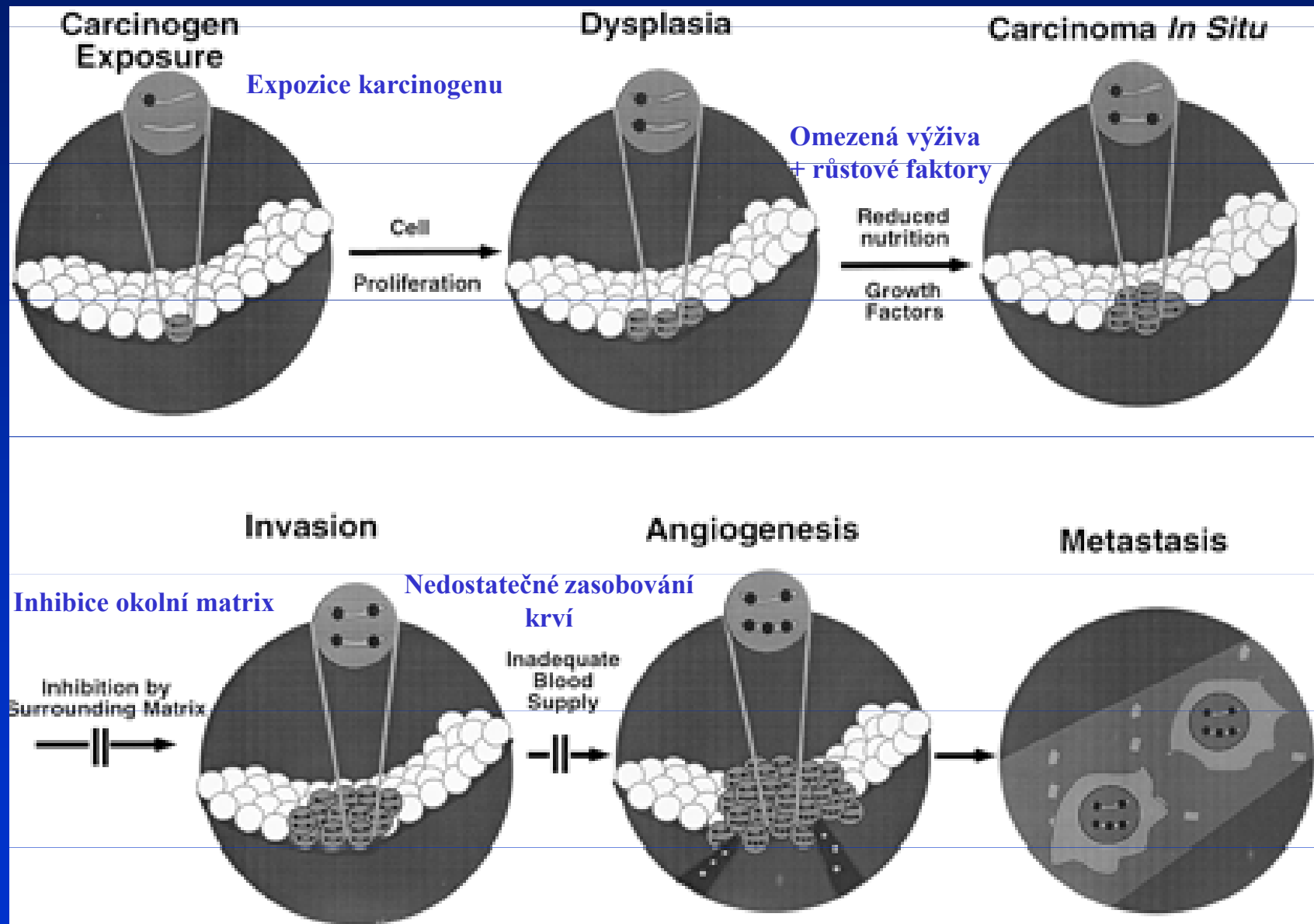
Překážky omezující růst nádorů:

- ▶ vliv okolních tkání
- ▶ omezená výživa a přístup kyslíku
- ▶ potřeba růstových faktorů
- ▶ nedostatečné zásobování krví atd.

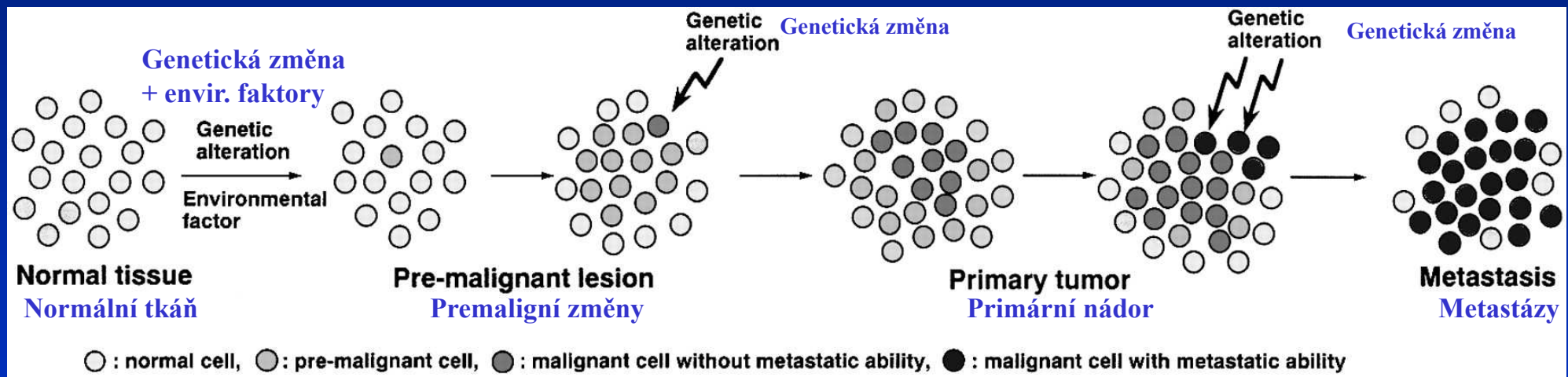
Každá z těchto překážek může být překonána v důsledku **mutací**, které poskytují **růstovou výhodu** a ustanovují **novou klonální populaci**.

Z každým kolem selekce dochází také ke vzniku dalších mutací.

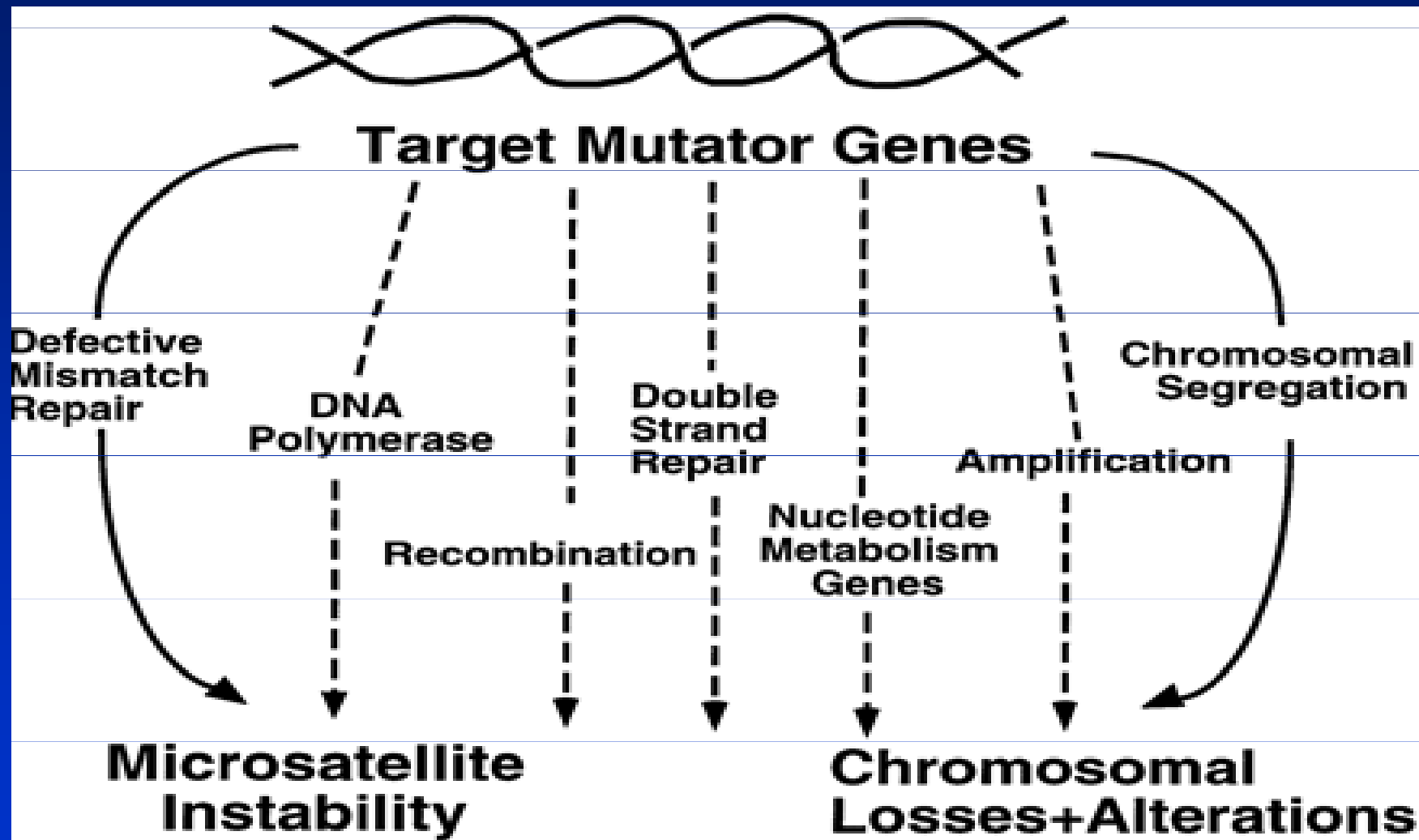
Vývoj nádoru založený na **selekcí mutovaného fenotypu**. Jen málo mutovaných buněk překonává bariéry dalšího růstu. V každém dalším kole selekce dochází k progresivnímu obohacení o mutace v tzv. **mutátorových genech** nutných pro udržení genetické stability.



Postupná maligní progrese nádoru spojená s akumulací genetických změn v buňkách



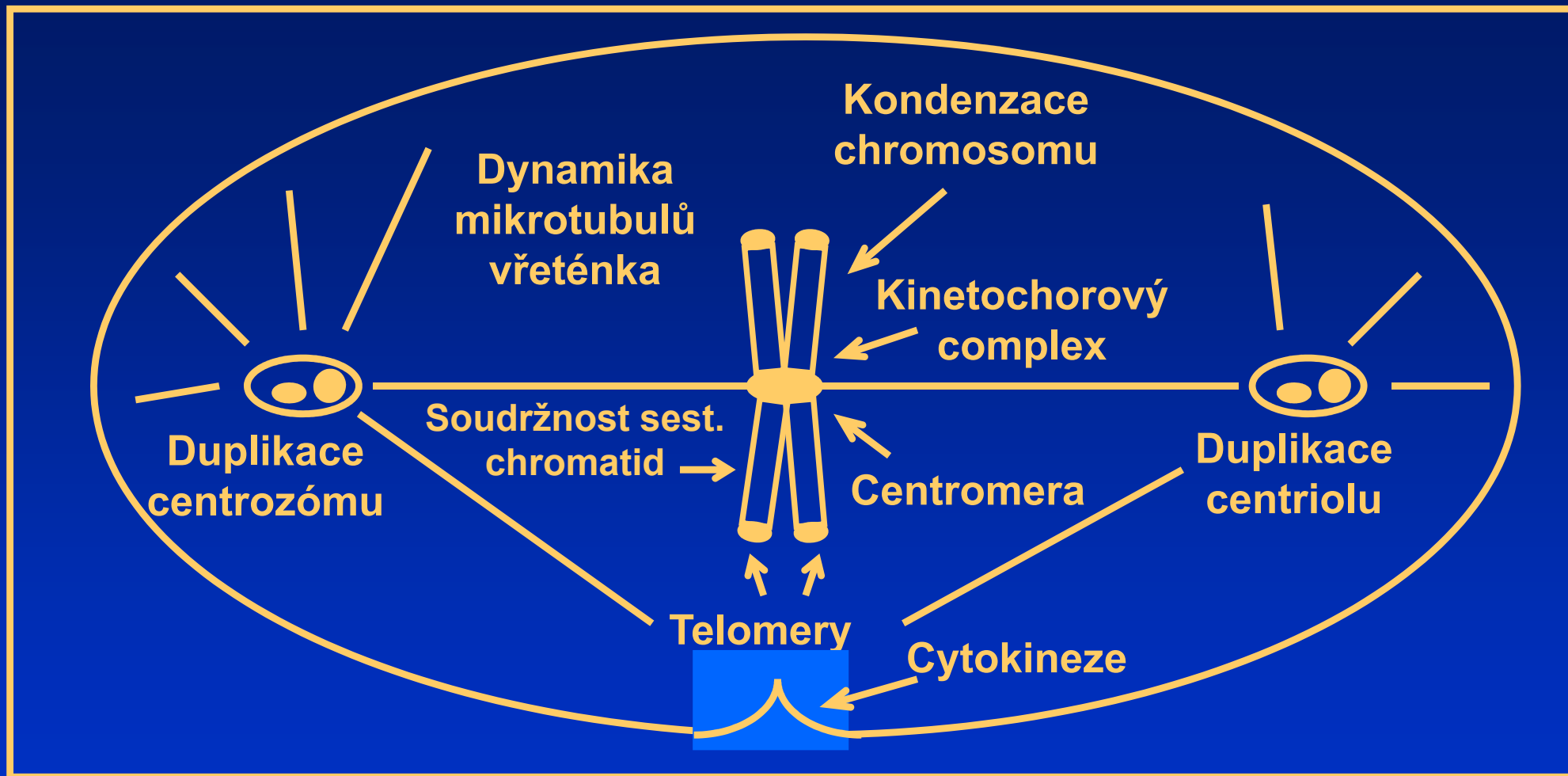
**Různé dráhy vedoucí ke vzniku
mutovaného fenotypu nádorové buňky
cílové mutátorové geny**



Nestabilita mikrosatelitů

Ztráty a změny chromozómů

Potenciální mitotické cíle vedoucí k aneuploidii.



Poruchy několika procesů zahrnující jako cíle chromozómy, mikrotubuly vřeténka a centrozómy mohou (kromě abnormální cytokineze) vést k nerovnoměrnému rozdělení chromozómů během mitózy vedoucího k aneuploidii.

Karcinogeneze však znamená víc než jen mutagenezi

Kromě genových a chromozomálních mutací zahrnuje i
negenetické (epigenetické) změny.

EPIGENETICKÉ DĚJE

způsobují změny v expresi genetické informace na transkripční, translační nebo
postranslační úrovni

Geny jsou zapínány a vypínány

- ▶ během vývoje
- ▶ během buněčného cyklu, když buňka proliferuje
- ▶ když buňka diferencuje
- ▶ když je diferencovaná buňka stimulována k adaptivní odpovědi

Iniciovaná kmenová buňka je omezena v dalším růstu okolními normálními buňkami.

Po expozici nádorovým promotorem nebo promočními podmínkami (buněčná smrt nebo odstranění buněk) suprimující účinek okolních buněk prostřednictvím kontaktní inhibice mizí.

▶ **Iniciovaná buňka** se může dělit ale není schopna terminální diferenciace jako normální kmenová buňka, akumulují se klony dysfunkčních buněk (papilomy, polypy, noduly, enzymově změněné fokusy).

Faktory, které fungují jako **nádorové promotory** působí jako mitogeny a inhibitory programované buněčné smrti.

Hormony, růstové faktory, cytokiny mohou fungovat jako přirozené nebo **endogenní nádorové promotory**.

Chemikálie, mohou indukovat v buňkách různé transdukční signály, které vedou k blokádě kontaktní inhibice prostřednictvím inhibice mezibuněčné komunikace zprostředkované tzv. **gap junctions**.

▶ **Totipotentní kmenová buňka** je buňka, která může dát vznik všem buňkám v mnohobuněčném organismu, jako je oplodněné vajíčko nebo raná embryonální buňka.

▶ Brzy po embryonálním vývoji, některé buňky částečně diferencují v **pluripotentní kmenové buňky**.

▶ Z nich pak vznikají různé třídy buněk pro několik různých orgánů (např. slinivku a játra). Během dalšího vývoje jsou některé buňky omezeny tak, aby z nich vznikalo jen málo buněčných typů, stávají se z nich tzv. "**komitované buňky**".

▶ Konečným výsledkem komitovaných buněk je produkce **terminálně diferencovaných buněk** (spermie, vajíčka, keratinocyty, červené krvinky, neurony atd.).

V dané tkáni a orgánu je důležitá

správná regulace a rovnováha procesů

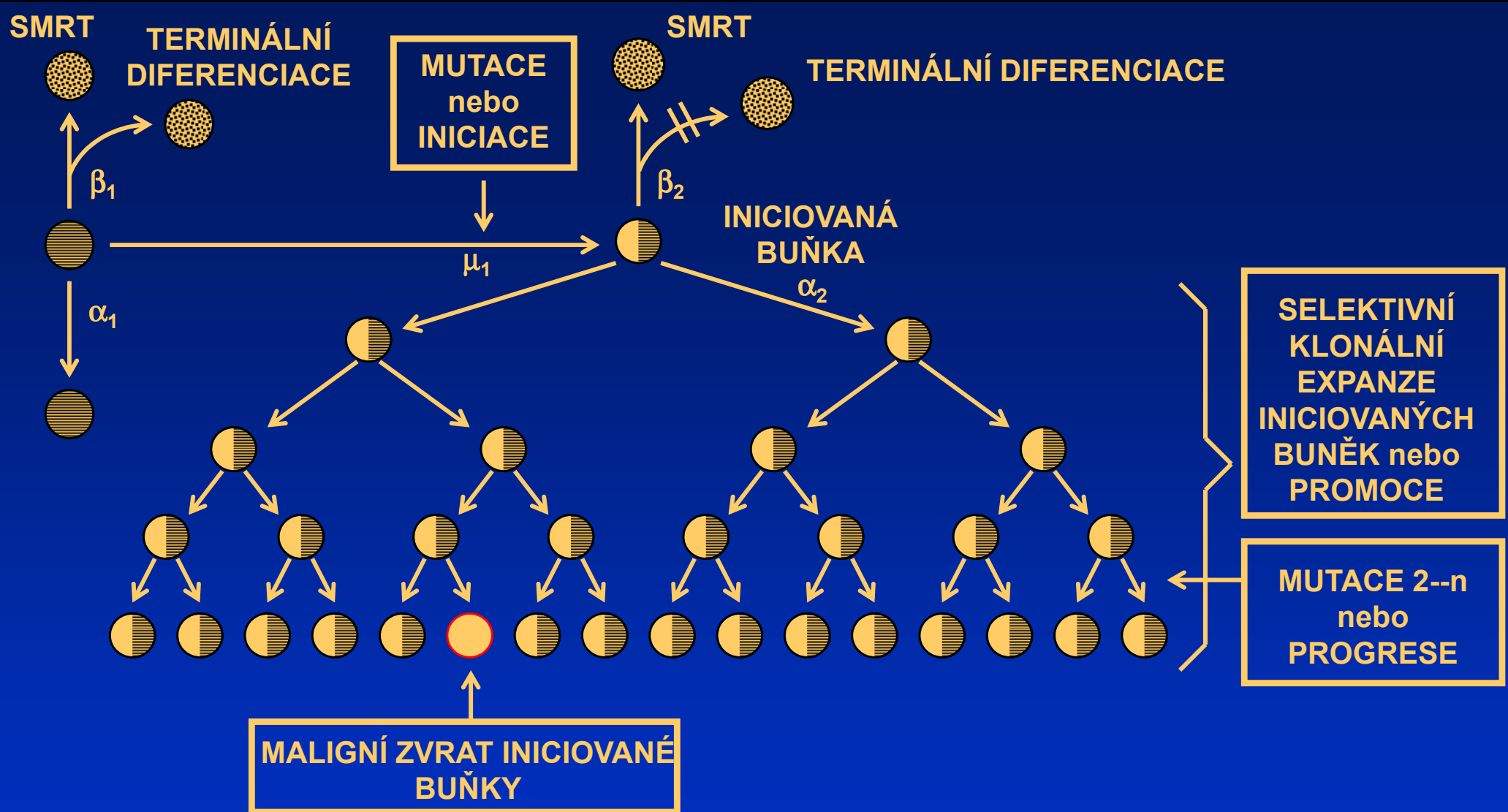


PROLIFERACE

DIFERENCIACE

APOPTÓZA

Deregulace těchto procesů vede k poruše homeostázy ve tkáni a ke vzniku nádorů



Model iniciace/promoce/progrese v karcinogenezi. β_1 , míra terminální diferenciaci a smrti kmenové buňky; β_2 , míra smrti, ale nedochází k term. diferenciaci iniciované buňky; α_1 , míra buněčného dělení kmenových buněk; α_2 , míra buněčného dělení iniciovaných buněk; μ_1 , míra molekulárních dějů vedoucích k iniciaci (tj., eventuálně mutaci); μ_2 , míra výskytu druhého zásahu v iniciované buňce.

Nádor je výsledkem mnohočetných genetických a epigenetických změn, kdy normální buňky s kontrolovaným růstem a schopností terminálně diferencovat ztrácí tyto schopnosti a zároveň získávají schopnost rozšiřovat se do jiných tkání v těle - metastázovat.

Jednu z hlavních teorií karcinogeneze představuje tzv. **teorie kmenových buněk.**

Pozorování, že každý nádor se jeví jako monoklonální ve svém původu, tj. přes všechny genotypové a fenotypové rozdíly se všechny buňky nádoru vytvořily z jedné původní kmenové.

Základní předpoklad zmíněné teorie karcinogeneze je, že normální kmenová buňka je nesmrtelná. Smrtelnou se stává při indukci terminální diferenciace. Kmenové buňky se dělí "asymetricky", tj. jedna dceřinná buňka zůstává jako kmenová a druhá získává schopnost terminálně diferencovat. S tím souvisí domněnka, že prvním krokem v karcinogenezi je **imortalizace buňky.**

Každý nádor obsahuje malou část buněk schopných sebeobnovy :

Nádorové kmenové buňky – zodpovědné za neomezený růst, minimální reziduální chorobu, následné obnovení nemoci a metastázování.

Schopnost repopulace hostitele (pacienta) danou neoplasií (včetně všech elementů, linií a subklonů primárního nádoru) po neomezenou dobu.

Důležitý cíl terapie

Neoplastické kmenové buňky identifikovány u myeloidních leukémií, nádorů prsu, prostaty, mozku a vaječníků.

3 základní kritéria kmenových buněk:

- 1) Schopnost sebeobnovy, tj. proliferace bez diferenciaci a bez ztráty proliferační kapacity, což umožňuje udržení zásoby nediferencovaných kmenových buněk během života
- 2) Seberegulace počtu kmenových buněk rovnováhou mezi sebeobnovou a diferenciací dělících se dceřinných buněk
- 3) Schopnost diferenciaci a maturace dostačující pro rekonstituci a dlouhodobé přežití všech funkčních elementů dané buněčné populace (buněčná linie, tkáň, orgán, neoplastický klon)

Při vzniku nádorů působí dva typy mechanismů:

environmentální faktory a genetické vybavení jedince

V některých případech je primární enviro. faktor, který způsobí vznik nádoru u "normálního" jedince. Avšak i v tomto případě jsou zasaženy geny, protoonkogeny a nádorově supresorové geny.

Kromě toho existují další geny, které mohou způsobit větší či menší citlivost (susceptibility) jedince k enviro. faktorům.

Předpokládáme-li, že všechny nádory jsou výsledkem iniciační, promoční a progresivní fáze karcinogeneze, měly by existovat geny, které

- a) buď chrání nebo predisponují protoonkogeny nebo nádorově supr. geny k aktivaci nebo inaktivaci,
- b) selektivně podporují nebo suprimují růst a expanzi iniciované buňky,
- c) zabraňují nebo zvyšují možnosti získání genetické/epigenetické nestability iniciované buňky, které zapříčiňují její malignitu.

Lidské genetické syndromy:

Albinismus - jedinci nemají melaninovou pigmentaci, která chrání kůži nebo oči před škodlivými účinky UV záření. Normální DNA reparační mechanismy, ale množství poškození je větší než je tento systém schopen zvládnout. Nereparovaná poškození DNA fungují jako substrát pro vznik mutací v protoonkogenech nebo nádorově supr. genech. Syndrom je klasifikován jako **typ náchylný ke vzniku nádorového onemocnění**. Protože poškození DNA je velké, mnoho buněk umírá a smrt kožních buněk stimuluje **kompensační - regenerační růst buněk přežívajících** – možnost promoce iniciovaných buněk. Klony iniciovaných buněk dále exponované UV - zvýšena pravděpodobnost dalších mutačních (genetických) změn - postup populace buněk do progresivního stadia.

Xeroderma pigmentosum - genetický syndrom, který také předurčuje jedince k rakovině kůže, avšak na jiném principu. Jedinci jsou nositeli genu, který neumožňuje reparovat poškození DNA indukované UV. Výsledkem jsou nereparovaná poškození DNA, která vedou ke smrti buněk nebo k mutacím. Podobně jako u albinů dochází ke **kompenzační hyperplazii** při náhradě odumřelé tkáně. Iniciovaná buňka kůže proliferuje, ale nediferencuje. Vytváří **klon iniciovaných buněk** (papilom) citlivý k indukci dalších genet./epigenet. změn a k progresivnímu rozvoji. Jedinci s albinismem nebo XP však nejsou odsouzeni k nádorovému onemocnění. Jestliže je pokožka chráněna před UV, nemusí být vyvoláno.

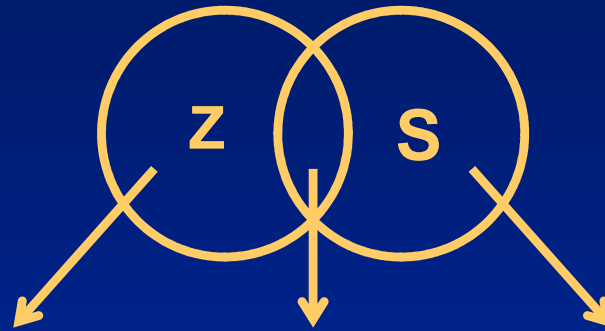
Při **nadměrném působení UV** mohou být postiženi i "normální" jedinci. **Reparační systém přetížen** a vzniká poškození DNA vedoucí opět k mutacím a ke smrti buněk podobně jako v předchozích případech. Jedinci s větší pigmentací jsou lépe chráněni před škodlivými účinky UV.

Existuje řada **envir. faktorů a genů**, které předurčují nebo chrání jedince před vznikem nádorů. Existuje řada chemikálií buď exogenních (dieta, životní styl, léčiva, polutanty) nebo endogenních (hormony, růstové faktory), které nepoškozují DNA a nejsou mutagenní. Jsou to **negenotoxicky působící látky**, které mohou působit jak **promoční stimulací proliferace iniciované buňky** tak **supresí apoptózy**. Jedinci, kteří jsou normálně exponováni a akumulují iniciované buňky (což se normálně děje s přibývajícím věkem), ale kteří jsou exponováni abnormálnímu množství promočních látek v těle v důsledku genetického defektu jsou označováni jako "promotion-prone".

Vyloučení působení nádorových promotorů může u normálních jedinců snížit vznik nádorů přesto, že dojde k iniciaci. Naopak pravidelná a chronická expozice dostatečnému množství nádorového promotoru zvyšuje riziko vzniku nádoru. Podobně jako existují **antiiniciátorové geny a látky**, tak existují i **geny a látky působící antipromočně**.

NÁDOROVÁ GENETIKA

Zárodečná b. (Z) and somatická b. (S)



Bloom S.
Fanconi S.
AT
XP

RB1
TP53
WT1
NF1

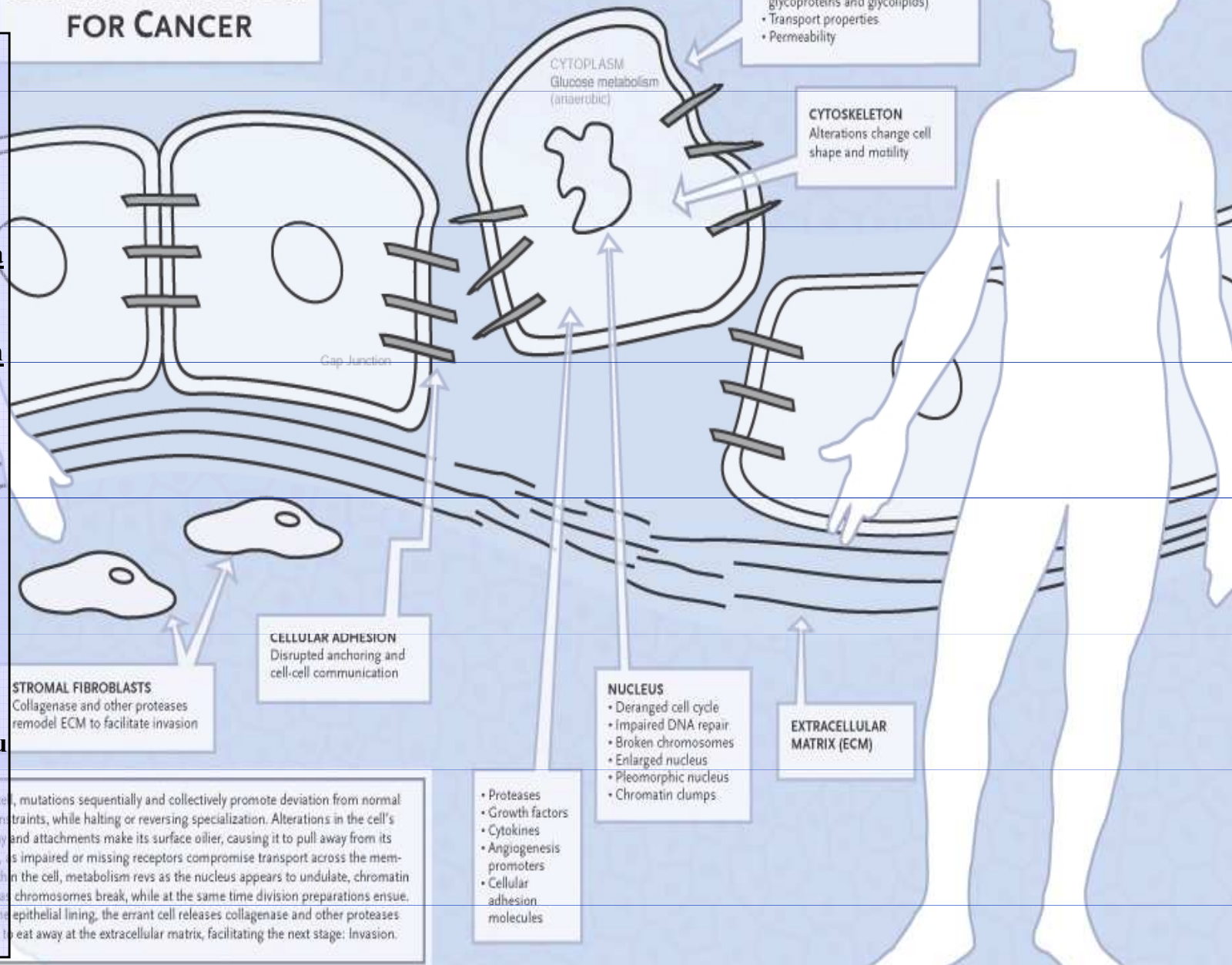
BL t(8; 14)
ALL t(11;)
CML t(9; 22)
ES t(11; 22)
ARMS t(2; 13)

Geny predisponující jedince k nádorům mohou být mutovány v zárodečné linii a produkovat recesivně děděné onemocnění jako je Bloomův a Fanconiho syndrom, AT a xeroderma pigmentosum. Ostatní, jako RB1, TP53, NF1 a Wilmsův tumor 1 (WT1), mohou být mutovány v zárodečné linii, čímž vzniká náchylnost u heterozygotů nebo somaticky v případě nedědičných případů nádorů. Mnoho somatických translokací je spojeno se specifickými chorobami, jako je Burkittův lymfom (BL), akutní lymfocytární leukémie (ALL), chronická myeloidní leukémie (CML), Ewingův sarkom (ES) a alveolární rhabdomyosarkom (ARMS). t(11;) translokace může zahrnovat kterýkoli z velkého počtu chromozómů partnerských k chromozómu 11.

SETTING THE STAGE FOR CANCER

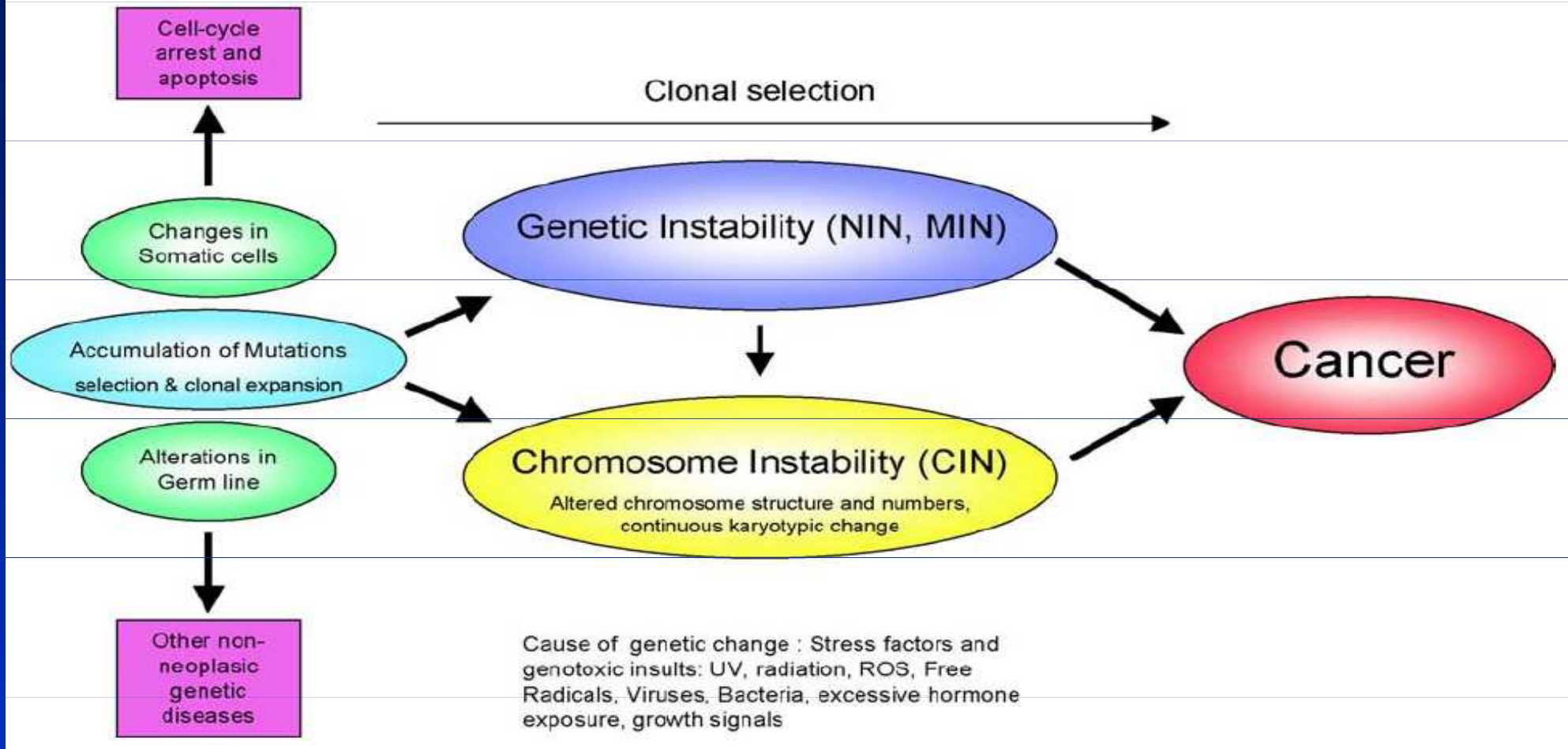
V jednotlivé buňce mutace postupně a společně podporují odchylku od regulovaného růstu a zastavují nebo revertují specializaci buňky. Změny buněčné topografie a uchycení mění vlastnosti povrchu buňky a umožňují její odpoutání od sousedních buněk. Pozměněné nebo nefunkční receptory pak ovlivňují transport přes membránu. Uvnitř buňky se mění metabolismus, jádro mění tvar, dochází ke shlukování chromatinu, zlomům v chromosomech a poruchám buněčného dělení. Pod vrstvou epitelu jiné buňky produkují kolagenázu a jiné proteázy, které narušují extracelulární matrix a usnadňují tak další fázi – invazi.

In a lone cell, mutations sequentially and collectively promote deviation from normal growth constraints, while halting or reversing specialization. Alterations in the cell's surface and attachments make its surface oilier, causing it to pull away from its neighbors. Impaired or missing receptors compromise transport across the membrane. Within the cell, metabolism revs as the nucleus appears to undulate, chromatin clumping as chromosomes break, while at the same time division preparations ensue. Beneath the epithelial lining, the errant cell releases collagenase and other proteases that begin to eat away at the extracellular matrix, facilitating the next stage: Invasion.



- Proteases
- Growth factors
- Cytokines
- Angiogenesis promoters
- Cellular adhesion molecules

How genetic mutations evolve into genomic instability phenotypes and cancer



Spojení genotoxického stresu a genomové nestability.

Díky genetické nestabilitě dochází během času k akumulaci mutací buď v gametách nebo somatických buňkách. Somatické nebo dědičné genetické změny zahrnuté v genetické nestabilitě postihují funkce jako je reparace DNA a kontrolní body bun. cyklu a mitózy, což předchází zvýšenou telomerázovou aktivitu. Somatické buňky však vyžadují pro rozvoj nádoru ještě dysfunkci tzv. gatekeeper. Mutace umožňující genomovou nestabilitu jsou v gametách i somatických buňkách selektovány

Hypotéza mutovaného fenotypu předpokládá, že geny vyžadované pro udržení genetické stability jsou prvním cílem poškození DNA karcinogeny. Mutace těchto genů pak vyvolávají mutace dalších genů v genomu.

Sources of a Mutator Phenotype

Zdroj mutátorového fenotypu

