







Molekulární biologie nádorů

Prof. RNDr. Jana Šmardová, CSc.

Ústav patologie, FN Brno
Přírodovědecká fakulta MU Brno
Lékařská fakulta MU Brno
2011

5. Genetická nestabilita nádorů

Šest získaných vlastností maligního nádoru

získaná schopnost	příklad
 Soběstačnost v produkci růstových signálů	aktivace H-ras
 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-kadherinu

Nestabilita genomu jako podmínka akumulace všech nutných změn.

Bariéry chránící mnohobuněčný organismus před transformací/kancerogenezí

- Omezený replikační potenciál
- Neustálá připravenost ke vstupu do apoptózy...
- Nejspolehlivější zábranou proti vývoji nádoru je stabilita DNA: DNA je nejstabilnější molekula v buňce.

Co u organismu zvyšuje „šanci“ na vznik nádorů?

- celkový počet buněk v organismu
- doba života
- metabolická rychlost

Genetická nestabilita nádorů

- Nádory vznikají postupnou akumulací genetických (a epigenetických) změn genů, které řídí buněčné dělení, buněčnou smrt a další důležité procesy v buňce. Z výpočtu, který vycházel ze známé mutační rychlosti v somatických buňkách (10^{-6} na gen na generaci buněk), se zdálo, že k takové akumulaci mutací nemůže během lidského života dojít. Jakým mechanismem dochází k této akumulaci?
 - K akumulaci stačí normální rychlost mutací ve spojení s vlnami klonální expanze, které mohou být způsobeny pozitivní selekcí buněk "prenádorových".
 - Akumulace všech nutných mutací umožněna genetickou nestabilitou (tzv. „mutator hypothesis“). Nestabilita je záležitost **rychlosti**, s jakou k mutacím dochází, existence mutací sama o sobě neposkytuje žádnou informaci o tom, s jakou rychlostí se objevila.
- É **Většina nádorů je geneticky nestabilních.**

Typy genetických změn v nádorech

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

Míra genetické nestability

- Absence genetické nestability nedovolí dostatečnému množství buněk přejít přes první selekční bariéru na mnohostupňové cestě k malignímu fenotypu.
- Příliš velká míra nestability vede k rozsáhlým poškozením DNA a následně aktivuje apoptózu.
- Podobné závěry byly učiněny u bakterií při studiu **fitness** (reprodukční způsobilosti): musí být nastolena rovnováha mezi pozitivním a negativním dopadem genetické variability (zajištěné mutacemi): variabilita musí být dostatečná, aby bakterie byly schopny přežít v selektivním prostředí, ale nesmí ohrožovat životaschopnost buněk.
- Zřejmě platí model „**just-right instability**.“
Rozsah genetické nestability se v průběhu vývoje nádorů zvyšuje.

1. Nestabilita v sekvenci DNA

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

Nukleotidová excizní oprava - NER

X

Oprava špatného párování - MMR

Lynchův syndrom

- Mutace MMR jsou recesivní, tzn. jedna "funkční" alela je dostatečná k udržení normální hladiny MMR, teprve po inaktivaci druhé alely příslušného MMR genu se začnou kumulovat mutace.
- Nositelé jedné mutantní alely v zárodečných buňkách jsou disponováni k vývoji nádorů × heterozygoti v genech NER nenesou zvýšené riziko vývoje nádorů!! (to souvisí s tím, že ani mutace ve druhé alele genu NER nemusí způsobit zvýšení rychlosti akumulace mutací, k tomu je nezbytné ještě působení vnějšího mutagenu, např. UV)

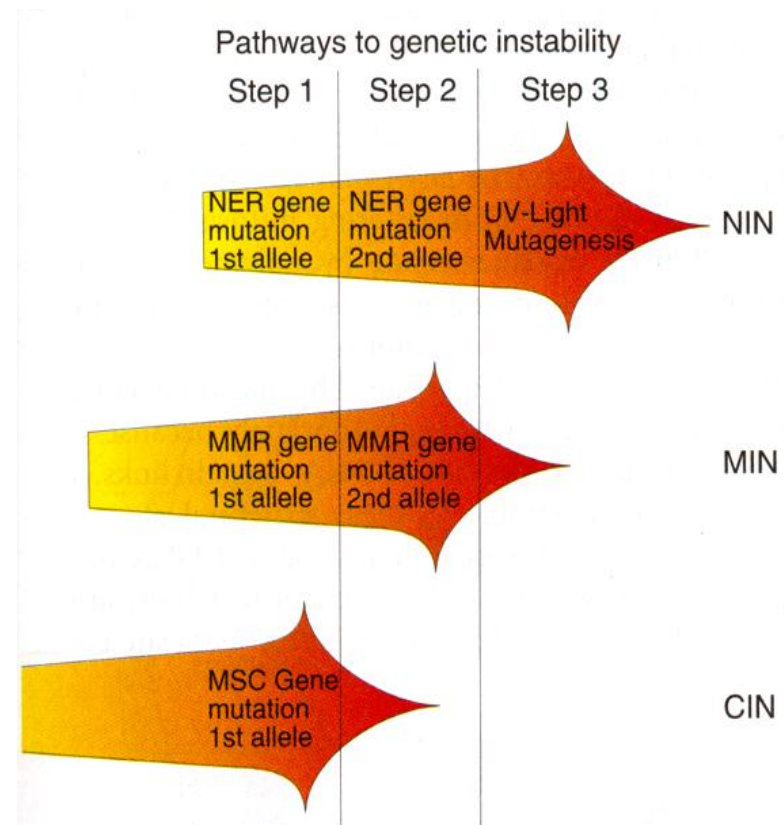
2. Nestabilita v počtu chromozomů - CIN

- Ve srovnání s NIN a MIN jsou ztráty nebo zmnožení celých chromozomů mnohem běžnější a vyskytují se téměř u většiny nádorů - např. 85% kolorektálních nádorů je vysoce aneuploidních. Běžná je ztráta chromozomu související s LOH, často je doprovázena získáním opačného chromozomu. ⇒ Ne vždy změny karyotypu souvisejí s CIN!
- U kolorektálních a endometriálních nádorů platí inverzní vztah mezi MIN a CIN: nádory, které vykazují defekty v MMR, jsou diploidní a mají také normální rychlost výskytu rozsáhlých chromozomálních změn, zatímco nádory bez MMR jsou často aneuploidní a vykazují zvýšenou rychlost hromadění těchto změn. ⇒ Alespoň u kolorektálních nádorů jsou MIN a CIN ekvivalentní mechanismy z hlediska navození genetické nestability.
- Oba typy nestability se objevují spíše v ranných fázích vývoje nádoru a během dalšího vývoje nádoru se hromadí genetické změny jako následek této nestability.

Vztah mezi MIN a CIN:

Fúzí buněk s CIN a MIN vznikají buňky vykazující CIN:

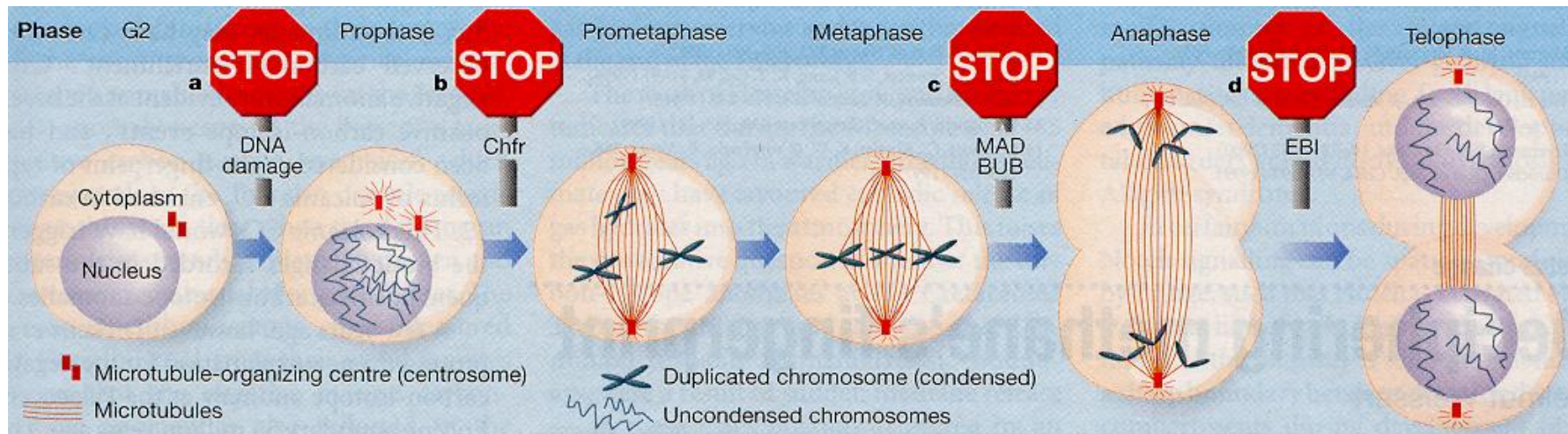
- Defekty **MIN** jsou zřejmě komplementovány aparátem „CIN buněk“
- Fenotyp **CIN** je dominantní: možná souvisí s „gain-of-function“ mutací; naznačuje to také, že možná stačí „single mutational hit“ k vývoji CIN fenotypu



Molekulární podstata CIN

- U kvasinek může CIN způsobit až 100 různých mutací: geny související s kondenzací chromozomů, s kohezí sesterských chromatid, se strukturou kinetochorů, se strukturou a funkcí centrozomů a mikrotubulů,...
- Během buněčného cyklu se vyskytuje několik **kontrolních bodů**, které monitorují správný postup buněčného dělení a zajišťují, aby před vstupem buněčného cyklu do další fáze byly předchozí fáze zcela a bezchybně skončeny.
- Zatím chybí jednoznačná kritéria k určení genů odpovědných za CIN a k určení jejich „míry zodpovědnosti“.

Některé kontrolní body mitózy (buněčného cyklu)



- A. Pozastavení vstupu do mitózy při poškození DNA
- B. Pozastavení kondenzace chromozomů při poškození mikrotubulů
- C. Pozastavení separace chromatid při nesprávném připevnění chromozomů
- D. Pozastavení vytvoření dceřinných buněk při nesprávné orientaci vřeténka

Bod restrikce vs. kontrolní body

- bod restrikce:
- proliferation
 - quiescence (resting state)
 - differentiation
 - senescence
 - cell death



bod restrikce vs. kontrolní bod

- V bodě restrikce se dá skutečně buněčný cyklus **zastavit**
- V kontrolním bodě se buněčný cyklus pouze **pozastaví**



Full repair vs. adaptation to DNA damage

Současné dogma: full repair

Nový model: timing and adaptation
(ubikvitinace vs. fosforylace)

Concept of treshold

Buňka má jakýsi timer (PLK?); pokud se poškození neopraví včas, buňka se adaptuje a jede dál → mitóza:

→ mitotická katastrofa

→ ...

Kontrola mitotického vřeténka

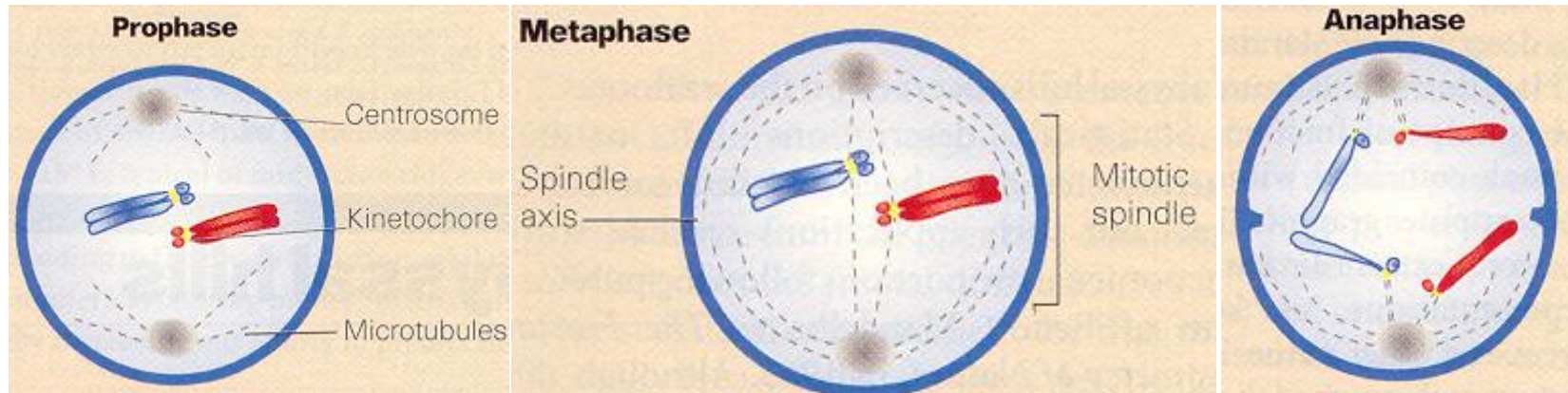
1902 (!!)
hypotéza Theodora Boveriho: „Aneuploidie vyvolává tvorbu nádorů“.

Nádory jsou často aneuploidní.

Kontrola mitotického vřeténka

- Tento kontrolní bod („mitotic checkpoint“ nebo „spindle checkpoint“ nebo „spindle assembly checkpoint“) zajišťuje **přesnou segregaci chromozomů**: tím, že zajišťuje, aby se sesterské chromatidy nerozcházely dříve, než jsou všechny chromozomy správně uspořádány kolem mitotického vřeténka.
- Zajištěno uspořádáním chromozomů/sesterských chromatid na bipolárním mitotickém vřeténku.
- Chromozomy jsou připojeny pomocí **kinetochorů**: proteinové struktury, které se sestavují a rozpadají při každé mitóze v místě centromerické DNA.
- Nepřipojené kinetochory vytvářejí komplex, který produkuje **signál „počkat s anafází!“** („wait anaphase signal“), který pozastavuje ireversibilní separaci chromatid, dokud nejsou připojeny všechny kinetochory.

Kontrola mitotického vřeténka

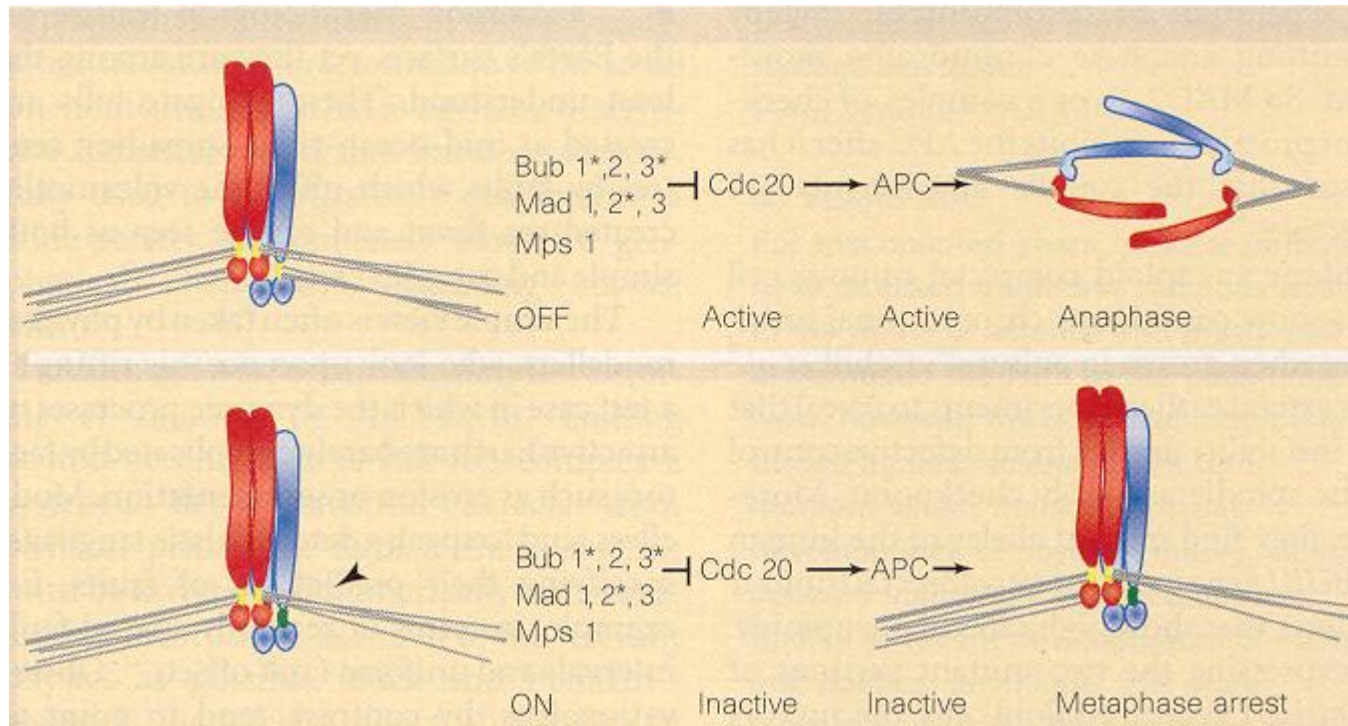


- Profáze: začíná se tvořit vřeténko ve formě mikrotubul organizovaných centrozomy na pólech buňky
- Metafáze: vřeténko je vytvořeno a chromozomy se začínají připevňovat k vřeténku v oblastech nazývaných kinetochory
- Anafáze: chromozomy se pohybují se zkracujícími se mikrotubuly směrem k pólům buňky, kinetochory napřed.

Kontrola mitotického vřeténka

- Buňky s poškozenou kontrolou vřeténka se chovají typicky při použití **vřeténkových jedů** (nocodazol poškozuje mikrotubuly; odlišným mechanismem blokuje mikrotubuly colcemid). Zatímco působení těchto látek vyvolá u nepoškozených buněk blok buněčného cyklu, poškozené buňky pokračují v mitóze.
- Při segregaci chromozomů před připojením obou sesterských chromatid k vřeténku může dojít buď ke ztrátě nepřipojené chromatidy (ztráta chromozomu 1:0) nebo k segregaci obou chromatid do jedné dceřinné buňky (nondisjunkce 2:0).

Kontrola mitotického vřeténka

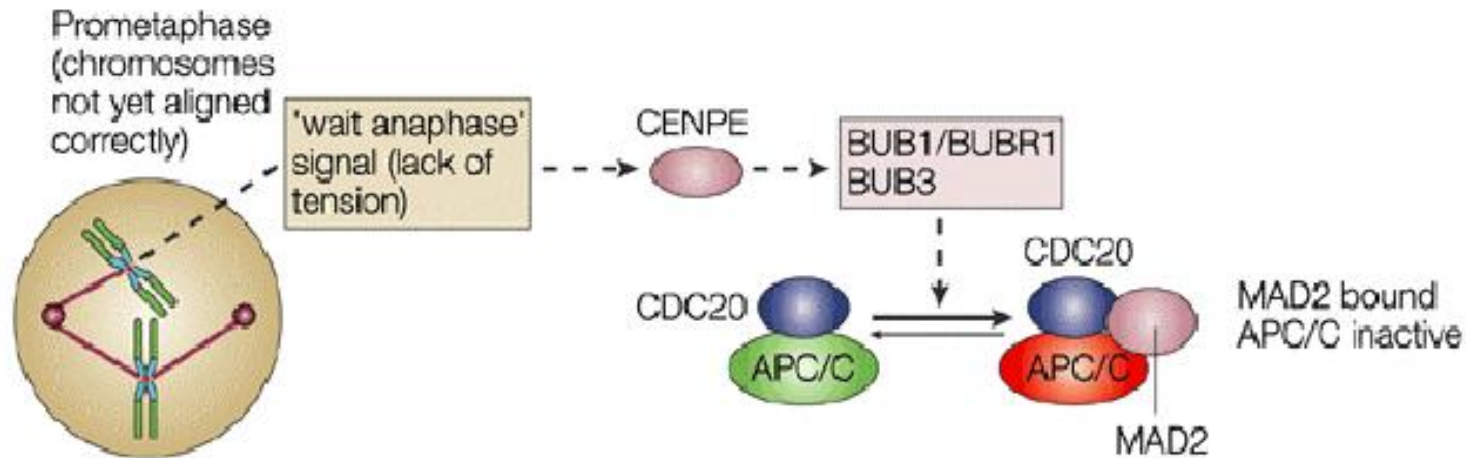


Jak je monitorováno sestavování vřeténka? Na nesprávné sestavení vřeténka reagují proteiny typu **Bub** a **Mad** a nedovolí aktivaci APC (APC/C).

Kontrola mitotického vřeténka

- Klíčovou roli při aktivaci „spindle check-point“ hraje inhibice ubikvitin-protein ligázového komplexu **APC/C** („anaphase-promoting complex/cyclosome“): veliký (20S) multiproteinový komplex, který je normálně aktivní při přechodu metafáze do anafáze; spouští degradaci proteinu **sekurin**, který je inhibítorem anafáze.
- **APC/C** je inhibován vazbou kontrolních proteinů **Bub1** („budding uninhibited by benomyl“), **BubR1**, **Bub3**, **Mad1** („mitotic arrest deficient“), **Mad2** na kinetochory nepřipevněné na mitotické vřeténko. Zde jsou konvertovány na inhibitory proteinu **CDC20**, který se podílí na aktivaci **APC/C**. Je nezbytný pro specifickou vazbu na sekurin a cyklin B.
- Po připojení všech kinetochorů je signál utlumen a **APC/C** ubikvitinuje a degraduje sekurin...

Kontrola mitotického vřeténka



Během prometafáze nepřipojené chromatidy vyvolávají signál, který zastavuje progresi do anafáze: tento signál je zprostředkován proteiny **CENPE** a **Mad/Bub** a způsobuje inhibici komplexu **APC/C - CDC20**.

Kontrola mitotického vřeténka

- **Sekurin** zabraňuje separaci sesterských chromatid, a to vazbou na **separin/separázu**, což je cysteinová proteáza, která katalyzuje štěpení multiproteinového komplexu **kohesin**. Kohesinové můstky se tvoří okamžitě po replikaci chromatid v S fázi, spojují sesterské chromatidy a zůstávají až do jejich separace v anafázi. Sekurin funguje jako inhibitor separinové proteázy.
- Aktivace APC/C při přechodu metafáze - anafáze spouští degradaci sekurinu a uvolnění separinu. Aktivní separin spouští degradaci kohesinu a umožní tak separaci sesterských chromatid.

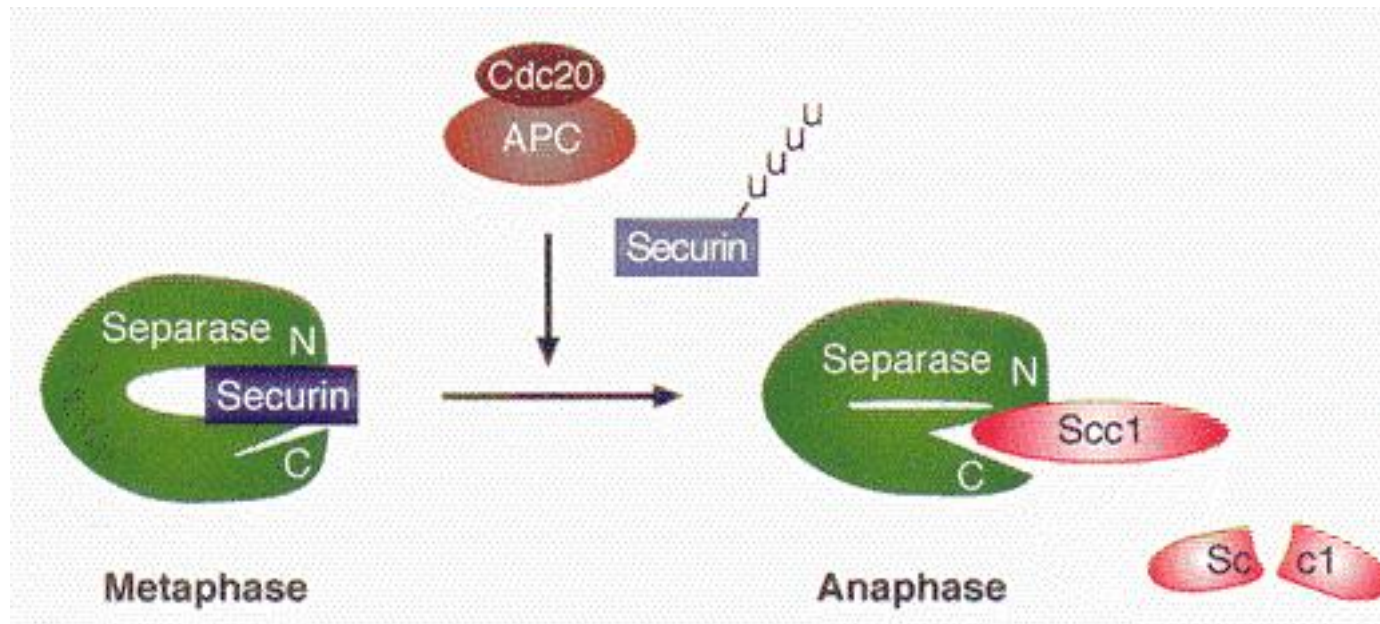
Kontrola mitotického vřeténka

- **Sekurin** má ještě další roli: mutace sekurinu má za následek, že vůbec nedojde k separaci chromatid! Sekurin je nezbytný ke správné lokalizaci a/nebo aktivaci separinu \Rightarrow dvojité spojení vazby sekurin:separin - sekurin je nutný k aktivaci separinu a zároveň funguje jako jeho **inhibitor** = dvojitě zabezpečení toho, že chromatidy nesegregují nesprávně!

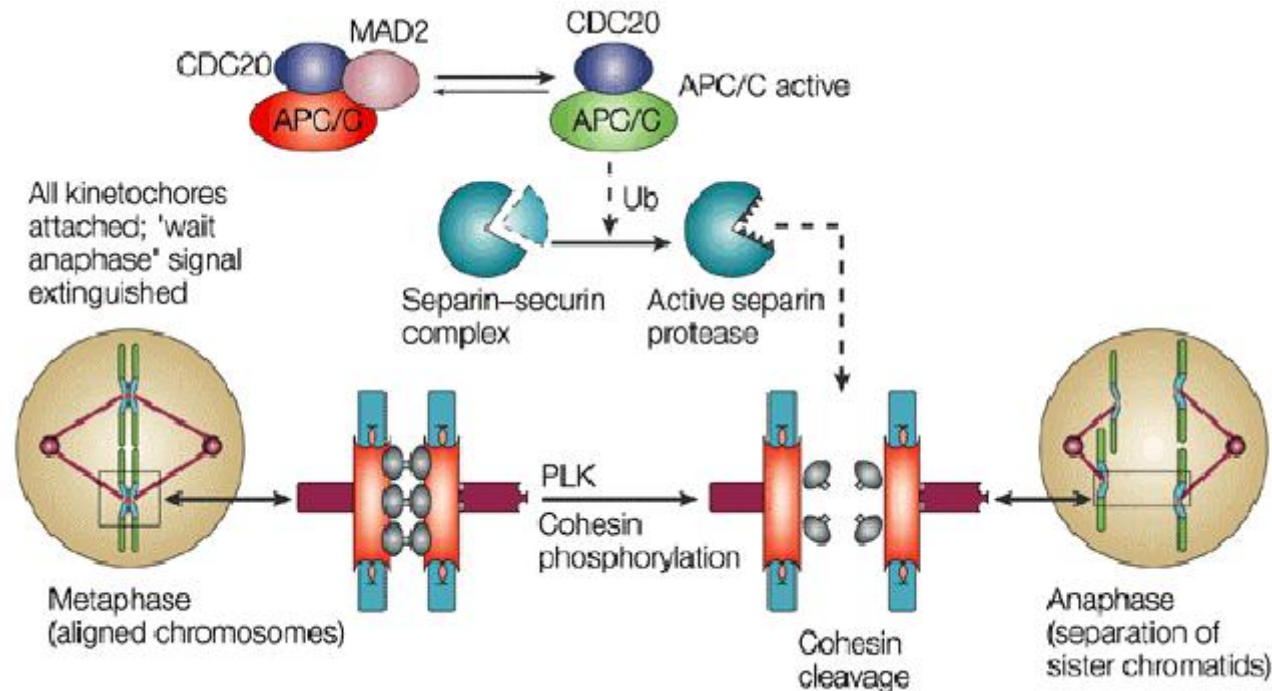
Model interakce separin - sekurin

Sekurin funguje pro separin jako chaperon - jen tak může separin dosáhnout aktivní konformace.

Pro proteázovou aktivitu separinu je nezbytná interakce jejího N-konce s proteázovou doménou: sekurin interaguje s oběma doménami, a tak zabraňuje jejich vzájemné interakci. Zabraňuje také interakci se substrátem (**Scc1** je podjednotka kohesinu).

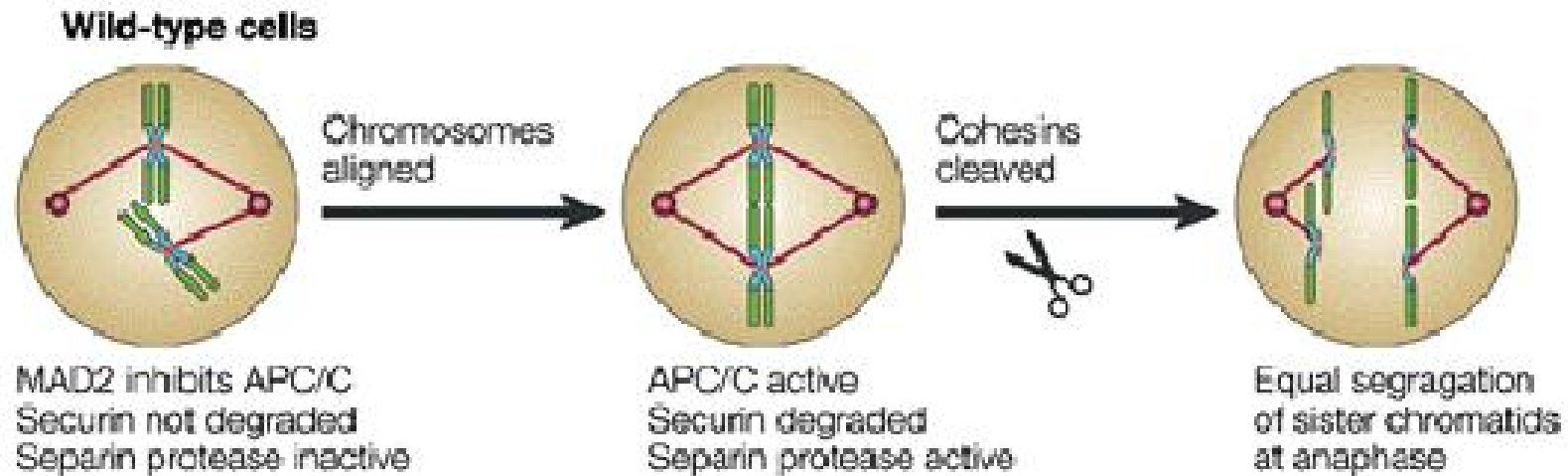


Kontrola mitotického vřeténka



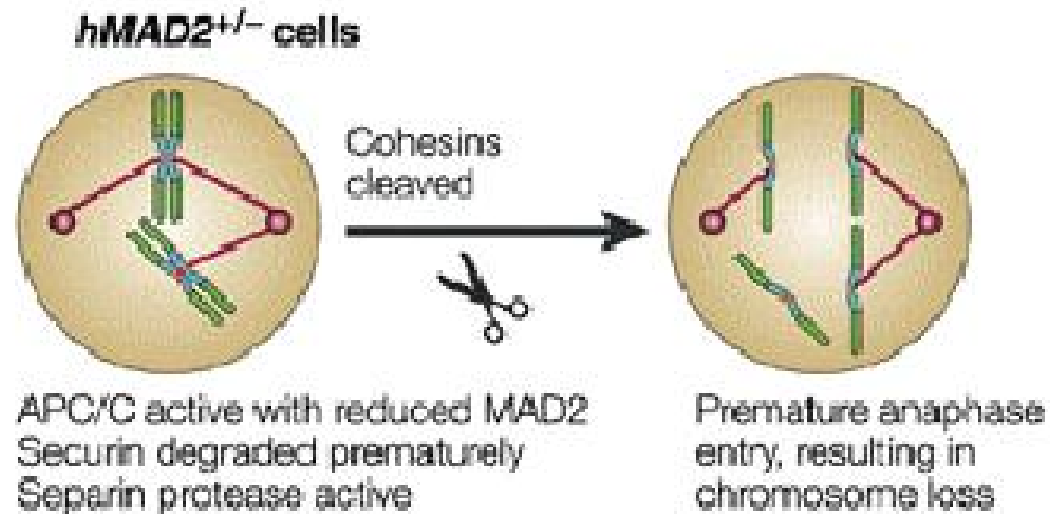
Po připojení posledního kinetochoru k vřeténku se APC/C - CDC20 stává aktivní, securin je degradován a uvolňuje proteázu separin. Ta rozštěpí kohesin, který spojoval sesterské chromatidy a ty se mohou začít pohybovat směrem k pólům.

Kontrola mitotického vřeténka



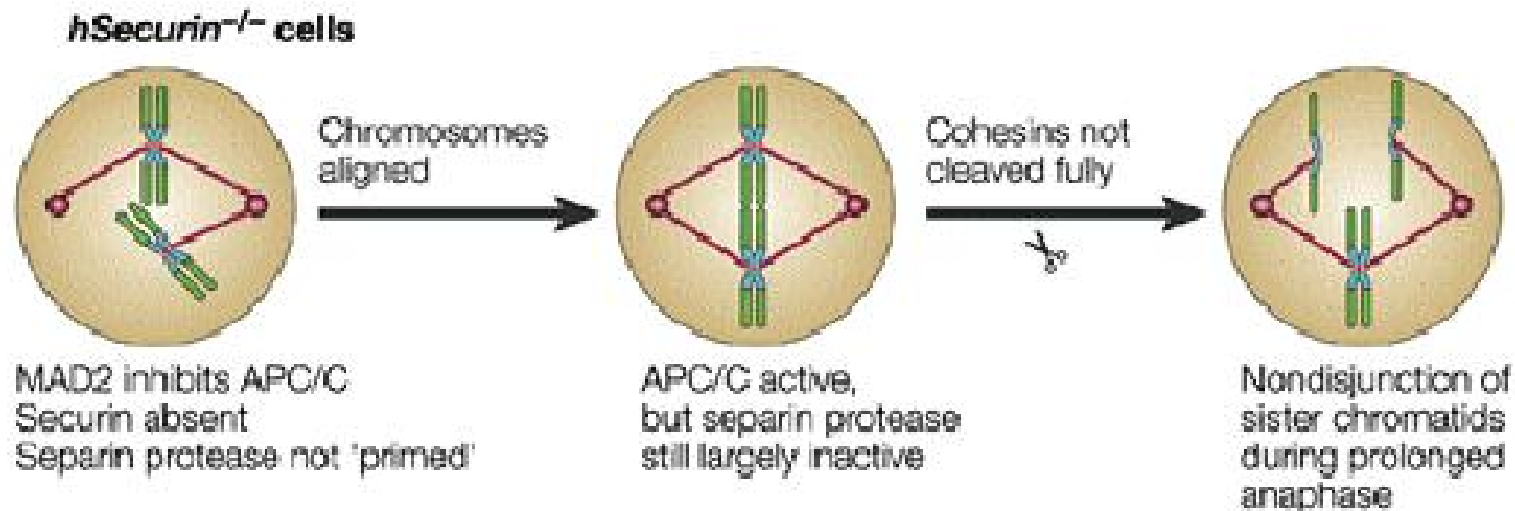
V nepoškozené buňce je normální segregace sesterských chromatid zajištěna regulací inhibice/aktivace komplexu APC/C .

Kontrola mitotického vřeténka



V buňce s oslabenou funkcí (**heterozygot!!**) proteinu Mad2 není dostatečná inhibice APC/C, a tak dochází k předčasné destrukci separinu a předčasné separaci sesterských chromatid.

Kontrola mitotického vřeténka



Buňky, které nemají sekurin, nemají aktivován separin. Nemůže u nich proto dojít k dostatečné degradaci kohesinu a k úspěšné segregaci sesterských chromatid.

Kontrola mitotického vřeténka

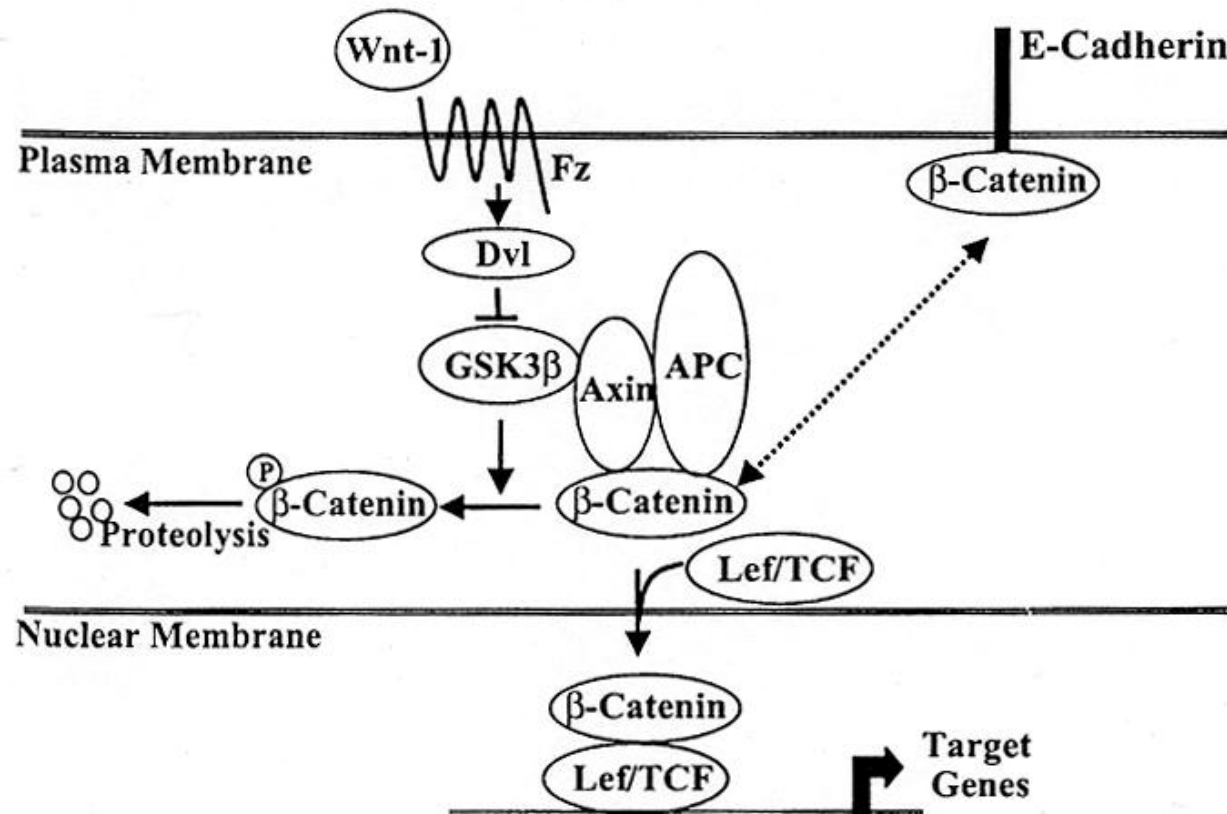
- Snížená exprese **hMad2** byla pozorována u některých nádorů prsu a uvažuje se, že souvisí s aneuploidií. U mutace Mad2 se pravděpodobně uplatňuje mechanismus **haploinsuficience**.
- Malá frakce kolorektálních nádorů má somatické mutace buď v genu **hBub1** nebo **hBubR1**. Mutace hBub1 mají dominantní charakter.
- Protein **hMad1** je napadán proteinem Tax, produktem T-cell leukaemia viru typu 1: tato vazba má za následek vyřazení „spindle checkpoint“ u indukovaných leukémií.
- Gen kódující **sekurin** byl poprvé popsán jako PTTG (“pituitary tumour-transforming gene”) a je zřejmě silně exprimován u některých nádorů (nadbytek sekurinu pravděpodobně inhibuje segregaci chromatid).

Vztah APC k CIN

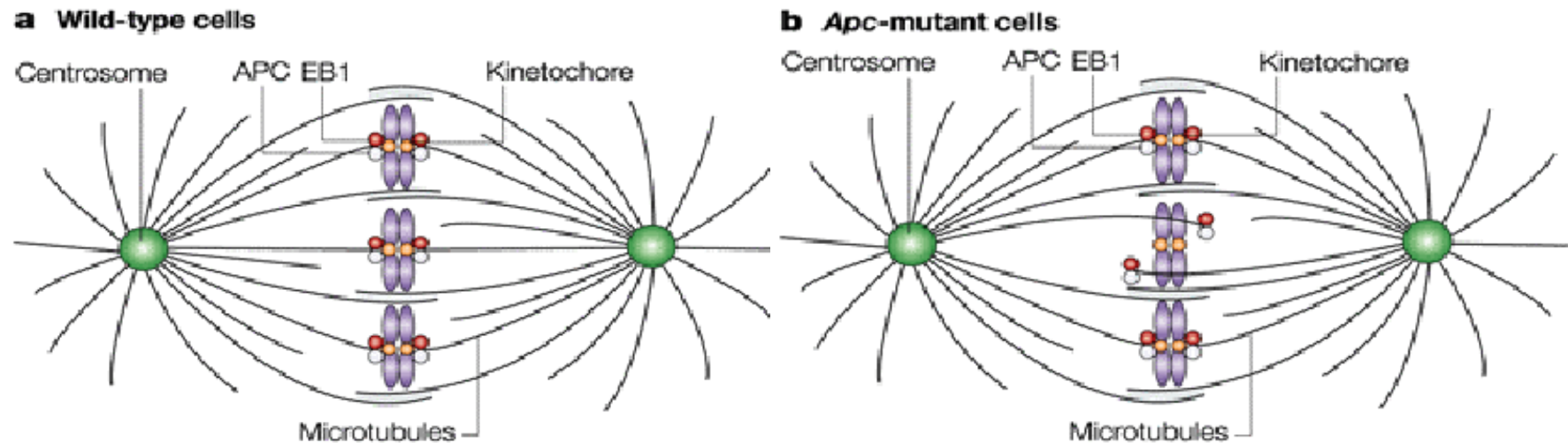
- Vrozené mutace **APC** („adenomatous polyposis coli“) způsobují FAP („familial adenomatous polyposis“), somatické mutace patří k nejčastějším a nejhranějším mutacím kolorektálních karcinomů.
- APC má dvě funkce:
 1. WNT signalizace zprostředkovaná vazbou na **β -katenin** - mezi cílové geny této dráhy patří Myc a Cyclin D1, které zřetelně souvisejí s tvorbou nádorů (\Rightarrow zvýšení proliferace)
 2. APC je lokalizován prostřednictvím vazby svým C-koncem na **EB1** - na kinetochorech metafazických chromozomů, kde zprostředkovává vazbu mikrotubulů vřeténka ke kinetochoru; mutanti APC (zkrácené proteiny) tuto vazbu nemohou zprostředkovat, a tak je vazba mezi vřeténkem a kinetochory poškozena (\Rightarrow zvýšení CIN)
[v buňkách *Apc*^{-/-} se navíc objevují násobné centromery, které způsobují zvýšený výskyt chromozomálních translokací]

Dvojitá úloha proteinu APC v buňce:

A. Regulace hladiny volného β -kateninu



B. Úloha APC při tvorbě mitotického vřeténka



a. U buněk s funkčním APC se APC akumuluje na kinetochorech, kde se účastní vazby mikrotubulů vřeténka ke kinetochoru prostřednictvím vazby s proteinem EB1, který asociuje s mikrotubuly; b. U buněk se zkráceným APC je vazba mezi kinetochorem a mikrotubuly vřeténka zničená, což navozuje CIN

Vztah APC k CIN

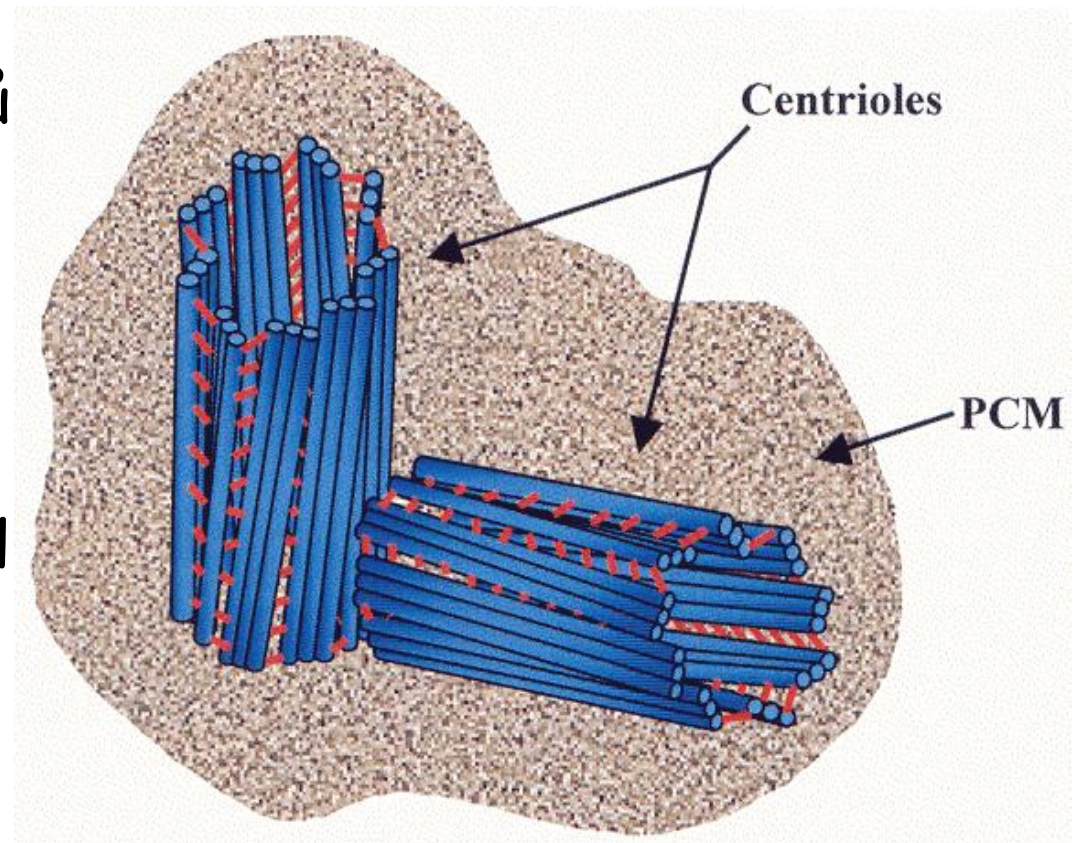
- Mutace APC tak dává nádorovým buňkám dvoji výhodu: zvýšenou proliferaci a zvýšenou genetickou nestabilitu
- Kolorektální karcinomy bez mutace APC, ale s mutací β -kateninu neprogredují zdaleka tak rychle jako nádory s mutací APC - mají výhodu zvýšené proliferace a s ní související klonální expanze („gatekeeper“), ale pomalou progresí do dalších stadií, protože postrádají genetickou variabilitu v důsledku snížené genetické stability („caretaker“)
- Selekce versus nestabilita: mutace APC se pravděpodobně nejdříve uplatňují při iniciaci nádoru, kdy ztráta regulace β -kateninu umožňuje klonální expanzi; až později během vývoje nádoru se uplatňuje ztráta C-konce APC a ta spolu se synergistickým účinkem dalších nádorových supresorů způsobuje CIN a aneuploidii

Násobné centrozomy

- Přítomnost více než dvou centrozomů v buňce vede k tvorbě defektního mitotického vřeténka (vytváří se více pólů), což způsobuje navýšení chyb v segregaci chromozomů
⇒ to vede ke zvýšení genetické nestability

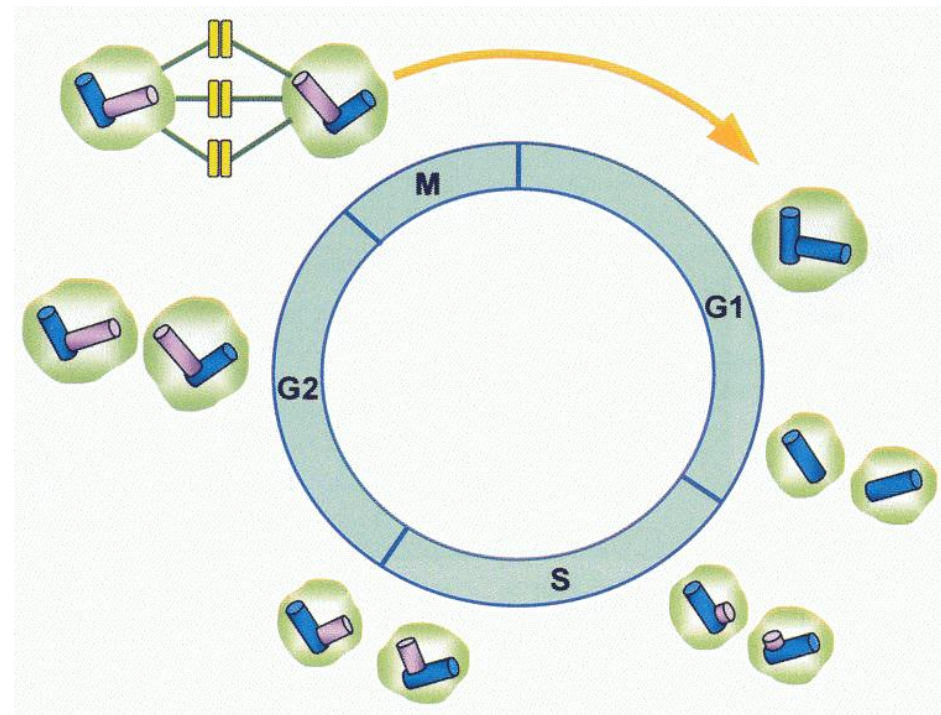
Centrozomy

- Malé nemembránové organely, složené ze dvou centriol (9 tripletů mikrotubul) a okolní denzní matrix proteinů, nazývané pericentriolární materiál (PCM).
- Fungují jako organizátory mikrotubul určují polaritu a orientaci mikrotubul během interfáze, řídí sestavení mitotického vřeténka.



Cyklus duplikace centrozom

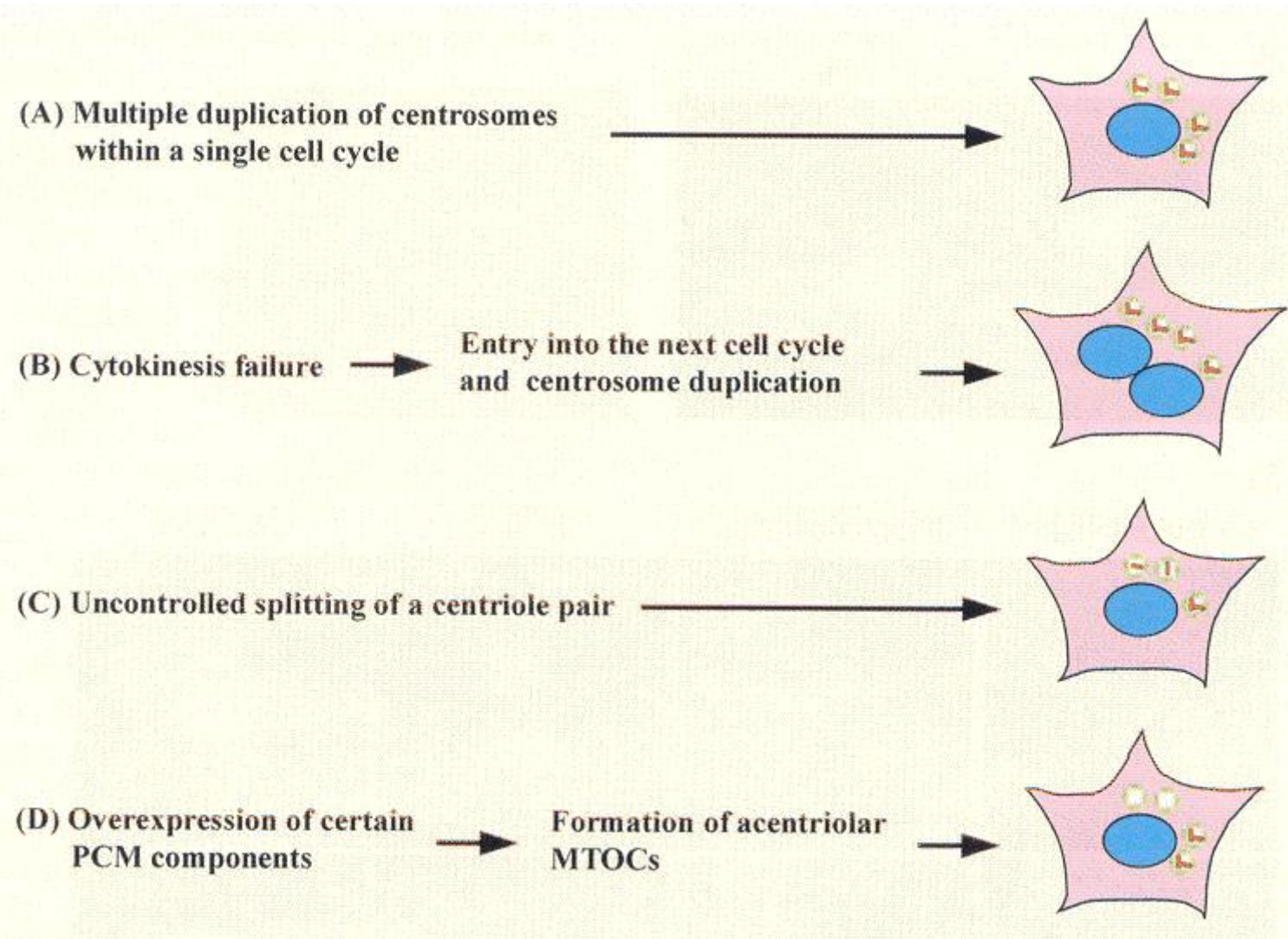
- Na konci mitózy každá dceřinná buňka zdědí jeden centrozom, během následujícího cyklu se musí centrozom duplikovat.
- Duplikace začíná v pozdní G1/časně S fázi (po přechodu bodem restrikce!)
- Dceřinné centrioly (procentrioly) se tvoří v blízkosti existující centrioly, dorůstají během S a G2 fáze.



Mechanismy vzniku násobných centrozomů

1. Deregulace kontrolních bodů duplikace centrozomů
 - kontrola iniciace duplikace centrozomů
 - suprese re-duplikace centrozomů
2. Neproběhnutí cytokineze
3. Nekontrolovaná separace centriolového páru
4. Zvýšená exprese některé složky PCM a vytvoření acentriolárního centrozomu

Mechanismy vzniku násobných centrozomů



Abnormální centrozomy u nádorů

- Násobné centrozomy jako příčina aneuploidie byly pozorovány u nádorů prsu, plic, prostaty, střeva, nádoru mozku a dalších.
- Co může být špatně: centrozomy větší než normál; centrozomy obsahují více než 4 centrioly; více než dva centrozomy v buňce; navýšení pericentriolárního materiálu; abnormální orientace centriol; změněná polarita umístění centrozomů v buňce.

Regulace duplikace centrozomů

- Při regulaci duplikace centrozomů je klíčová role **Cdk2/cyklinu E** - přes tento komplex je provázána regulace buněčného cyklu a duplikace centrozomů.
- Při separaci centriol je substrátem Cdk2/cyklin E **nucleophosmin**, který je asociován s neduplikovanými centrozomy a disociuje po fosforylaci Cdk2/cyklin E.
- U některých nádorů prsu, hlavy a krku a prostaty koreluje výskyt mutace **p53** s výskytem amplifikace centrozomů (možné spojení přes **p21^{Waf-1}** - inhibitor Cdk2/cyklinu E).

Regulace duplikace centrozomů

- Lidský homolog genu drozofily **aurora2/STK-15** (BTAK/STK-15) ovlivňuje sestavení centrozomů a segregaci chromozomů a je **vysoce exprimován**, případně **amplifikován** u některých nádorů.
- V některých nádorech je také **silně exprimována** kináza **PLK1 (Polo-like kinase)**, jejíž funkce je spojena s centrozomy a která je podobná proteinu aurora2/STK15.

3. Chromozomální translokace

A. komplexní typ

- Vyskytuje se často u solidních nádorů. Pozorované translokace jsou individuální, téměř nahodilé, nepodobné mezi nádory téhož histologického subtypu. Velké části chromozomů bývají deletovány, lze pozorovat "marker chromosomes" obsahující složitá přeskupení mnoha různých chromozomů.
- Mohou často vést ke ztrátám a získům chromozomů podobně jako CIN, ale navíc dochází také ke vzniku nových genových produktů.
- Molekulární podstata není známa, jedna z možností je, že translokace vznikají jako následek vstupu buňky do mitózy bez toho, že by byly odstraněny dvouřetězcové zlomy. Proto kandidátními geny jsou: **ATM**, **ATR**, **BRCA1**, **BRCA2**, **p53**.

B. Jednoduchý typ

- Je charakterizován jako specifická přestavba chromozomálního segmentu ve specifickém typu nádoru. Typicky se tento jednoduchý typ translokace vyskytuje u leukémií a lymfomů, u některých sarkomů a vzácněji u dalších typů nádorů. Většinou bývá tento typ translokace tak charakteristický, že ho lze použít ke klasifikaci onemocnění.
- Specifické translokace také mohou vzniknout jako následek ionizujícího záření. Např. v nádorech štítné žlázy u dětí z oblastí kolem Černobylu se často vyskytuje translokace na chromozomu 10, která vede k tvorbě fúzního genu zahrnujícího RET.
- Na molekulární úrovni bývá translokace zmapována a určena do relativně malé oblasti na DNA.
- Tyto specifické translokace ovšem nebývají spojeny s genetickou nestabilitou, spíše představují aberaci normálního procesu rekombinace, který se podílí na přeskupování subgenů při tvorbě protilátek.

4. Amplifikace genů

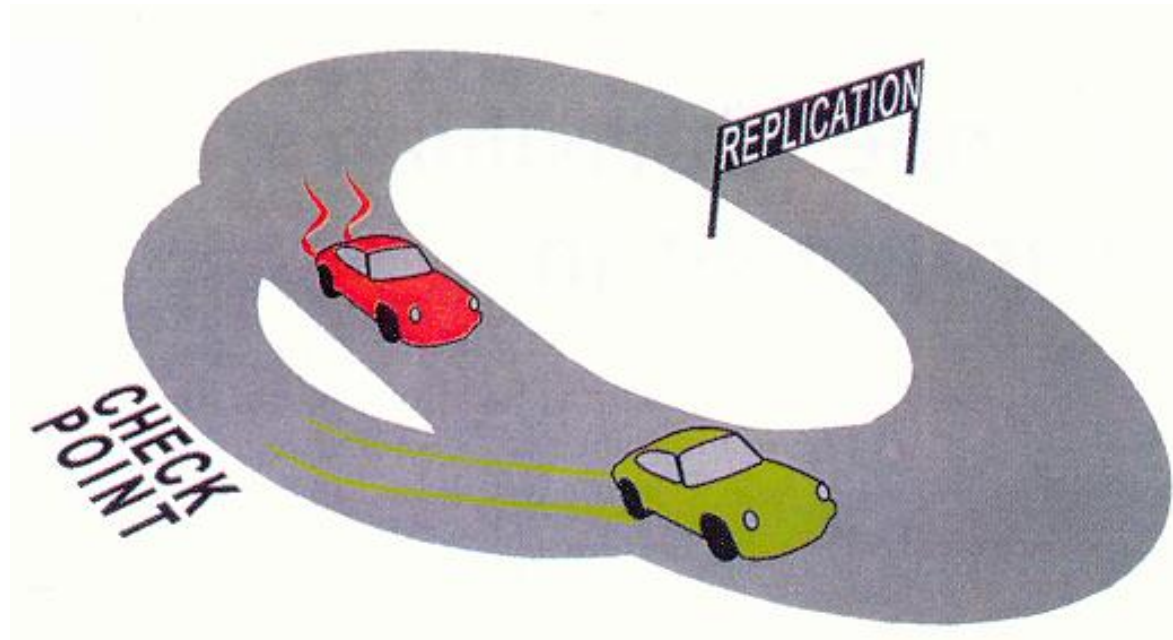
- Objevuje se u některých typů nádorů vyšších stádií a bývá podstatou rezistence k chemoterapeutikům.
- Nejčastěji amplifikované geny jsou *N-myc*, *erb* a *ras*, vzácněji *abl*, *myb*, *MET*, *GLI1*, *ets*, *hst*.
- Obecně se amplifikace objevují v pozdních stádiích maligní transformace, jsou spojeny s agresivně rostoucími nádory a signalizují nepříznivý prognostický vývoj.
- Kvantitativní hodnocení ukázalo, že amplifikace jsou častější u nádorových buněk než u buněk normálních, přesný mechanismus ale není znám.

Amplifikace genů

- Zdá se, že amplifikace se objevují snadněji u buněk s inaktivovaným **p53**. Podle jedné z možností není rozdíl ve frekvenci výskytu amplifikací, ale spíše ve schopnosti buněk **p53**^{-/-} amplifikace genů přežít. V normálních buňkách je přítomnost amplikonu signálem poškození DNA a navození **p53** dependentní apoptózy. Při poškození **p53** by tak buňka mohla přežít a akumulovat další typy amplifikací během další mitózy. Tento model definuje specifickou "amplifikační nestabilitu" odlišnou od CIN.
V této souvislosti představují specifickou skupinu amplifikace **MDM2**, které samy o sobě inaktivují **p53**.

Kriticky krátké telomery a genetická nestabilita

Souvislost genetické nestability a vnějšího prostředí



Souvislost genetické nestability a vnějšího prostředí

