



Molekulární základy nádorového onemocnění

Onkogeny
Nádorově supresorové geny
Imortalizace buněk
Epigenetické mechanismy

Molekulární podstata nádorového bujení

(klíč k porozumění procesů v základech lidské rakoviny)

Nádor vzniká ze společné buňky, ve které byl - většinou desítky let před vznikem viditelného nádoru - zahájen program neregulovaného dělení.

Maligní transformace buňky probíhá přes akumulaci mutací ve specifických třídách genů.

Existují **dvě třídy genů**, které dohromady tvoří jen malou část celé genetické výbavy, ale hrají hlavní úlohu v zahájení procesu tvorby nádoru.

Ve své normální konfiguraci **řídí životní cyklus buňky, tj. sled dějů, při kterých se buňka zvětšuje a dělí.**

Protoonkogeny

jsou normální buněčné geny mající základní význam ve fyziologii buňky. Hrají úlohu především v regulaci životního cyklu buněk:

- Buněčného cyklu
- Buněčné proliferace
- Diferenciace
- Apoptózy

V průběhu evoluce dobře konzervovány a jejich přítomnost v normálních buňkách všech vyšších organismů předpokládá, že mají základní význam v buněčné fyziologii.

Kódují proteiny, které hrají klíčovou na různých úrovních **integrace mitogenních signálů nesených růstovými faktory a hormony**. Jsou-li modifikovány, ať na strukturální nebo kontrolní úrovni, začnou se chovat jako **onkogeny a podporují vývoj nádoru**.

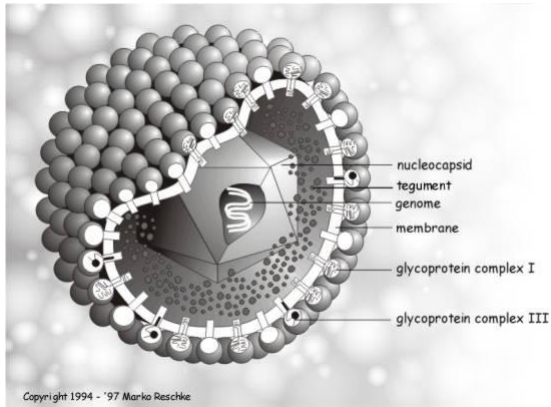
Onkogeny

mutované nebo aktivované protoonkogeny

Proces karcinogeneze zahrnuje změněné exprese nebo funkce protoonkogenů na různých stupních transdukce signálů.

Nádorově supresorové geny (antionkogeny)

zabraňují abnormální buněčné proliferaci



V posledních 30 letech byla objevena řada genů odpovědných za vývoj nádorů. Na porozumění maligní transformaci má zásluhu zejména široká škála dřívějších prací s onkogenními viry.

První tzv. **Onkogen s r c** (*sarcoma*) byl izolován v roce 1970 z viru Rousova sarkomu u kuřat. **Virus Rousova sarkomu** má dvě rozdílné části: část **kódující proteiny** odpovědné za replikaci viru a část **kódující s r c gen** umožňující vznik nádorů *in vivo* u kuřat. Normální kuřecí genom obsahuje příbuzný gen c-src.

Později se ukázalo, že řada retrovirů je onkogenních. Bylo též prokázáno, že src není jednoznačně retrovirový gen, ale spíše téměř přesná kopie genu nalezeného ve všech kuřecích buňkách.

Tento normální gen, tzv. **proto-onkogen** je v retroviru modifikován (aktivován) tak, že působí po přenesení do buněk nádor.

Objev s onkogeny příbuzných sekvencí v eukaryotickém genomu stimuloval úsilí **transformovat normální buňky DNA** stejným způsobem jaký užívají retroviry.

Mnoho protoonkogenů kóduje proteiny mající vztah k růstově stimulačním signálům přecházejících z vnějšího prostředí do nitra buňky.

Růst buňky je deregulovaný, jestliže mutace v protoonkogenu způsobí trvalou aktivaci růstově stimulační dráhy.

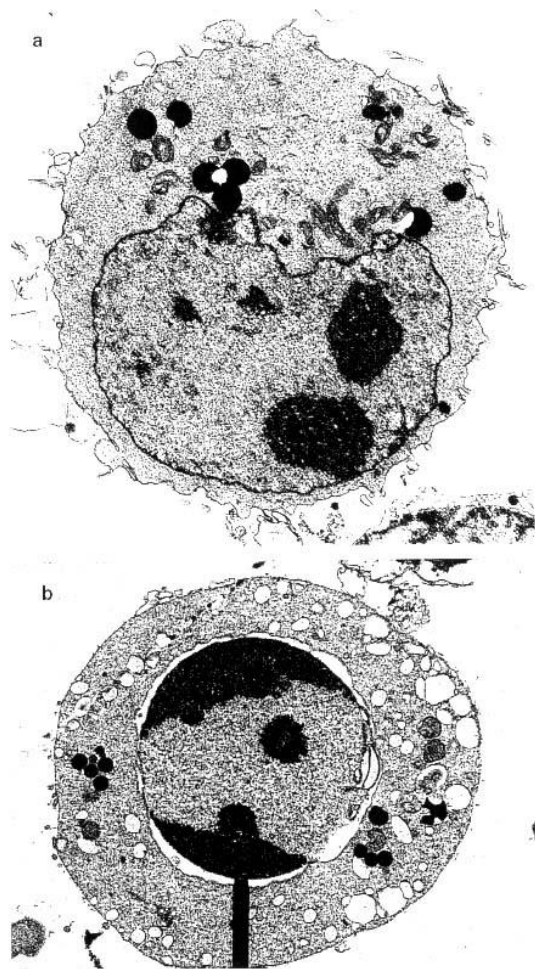
Toto souvisí se signály, které si navzájem předávají buňky v tkáních. Jedny buňky uvolňují růstové faktory, (glyko) proteiny, které se pohybují mezi buňkami a po vazbě na vhodný receptor na povrchu jiných buněk vyvolávají kaskádu dějů, které přenáší tento signál přes cytoplasmu až do jádra.

V jádře pak proteiny nazývané transkripční faktory odpovídají tím, že aktivují řadu genů, které pomáhají buňce procházet buněčným cyklem.

Podobně funguje i přenos růstově inhibičního signálu.

V normální buňce je rovnováha stimulačních a inhibičních signálů pečlivě regulována, protože to souvisí s regulací buněčného cyklu, který je rozhodující pro buněčnou proliferaci a diferenciaci.

V nádorové buňce je v důsledku změn v signálních drahách organizace buněčného cyklu narušena.



Buňka je vybavena také **zpětnovazebnými mechanismy**, které mohou působit proti neobvyklým změnám v procesu bun. dělení.

Apoptóza - schopnost buňky spáchat za určitých podmínek „sebevraždu“, tj. jestliže její základní komponenty jsou porušeny nebo jestliže je její kontrolní systém deregulován. Tak působí např. poškození chromozomální DNA.

V tomto procesu se účastní také **specifické geny** např. **p53** nebo **bcl-2**. Mutace těchto genů pak způsobují **poruchy apoptózy**. Bylo zjištěno, že neschopnost apoptózy přispívá ke vzniku nádorů a k jejich **rezistenci k terapii**.

Druhým obranným mechanismem proti neustálé proliferaci je **vestavěný buněčný mechanismus, který sčítá a limituje celkový počet dělení buňky, buňka stárne a hyne.**

Molekulárním nástrojem tohoto sčítání jsou segmenty DNA na koncích chromosomů tzv. **telomery**. Ty se při každém dělení zkracují a když dosáhnou kritické délky dochází k stárnutí a krizi. Jestliže tento sčítací systém funguje v nádorové buňce řádně, její nadměrná proliferace je přerušena předtím, než je nádor příliš velký.



Aktivací genu, který kóduje enzym **telomerázu**, který není v normálních buňkách, ale byl nalezen v nádorových buňkách, však dochází k obnově telomerických segmentů a to umožňuje buňce se nekonečně množit, tj. stát se nesmrtelnou.

Protoonkogeny lze dělit podle :

- lokalizace jejich produktu na ty, které kódují
 - 1) sekreční proteiny
 - 2) proteiny buněčného povrchu
 - 3) cytoplasmatické proteiny
 - 4) jaderné proteiny
- funkce jejich produktů na
 - 1) růstové faktory (např. sis, hst),
 - 2) receptory pro růst. faktory (např. fms, kit, erb B),
 - 3) cytoplasmatické proteiny - protein kinázy (např. raf) a G-proteiny (např. ras),
 - 4) jaderné proteiny (např. myc, myb, fos, jun)

Jaderné protoonkogeny jako jsou c-myc, c-fos, c-jun, c-myb - tzv. **geny rané odpovědi** (*immediate early genes*) a jejich produkty jsou proteiny vážící se na DNA a fungující jako tzv. **transkripční faktory**, které regulují transkripci pozdních genů.

Jsou většinou **aktivovány overexpresí**, která může být **indukována různými způsoby**:

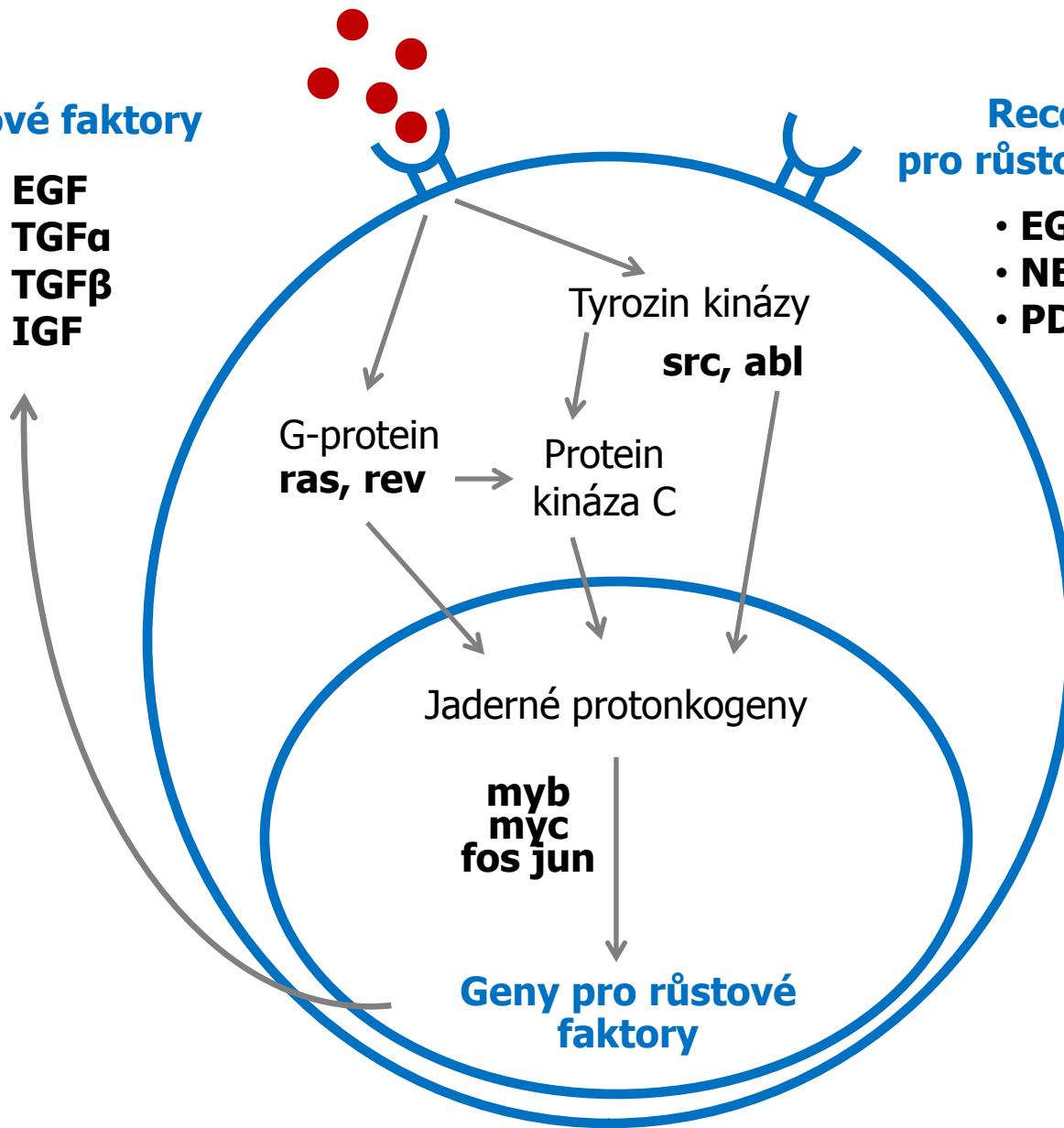
- **translokací** (Burkitt lymphoma)
- **insecí retroviru** (spíše v experimentálních systémech)
- **amplifikace genů** - to je obecný mechanismus aktivace jader protoonkogenů a byla pozorována u řady nádorů.

Růstové faktory

- EGF
- TGF α
- TGF β
- IGF

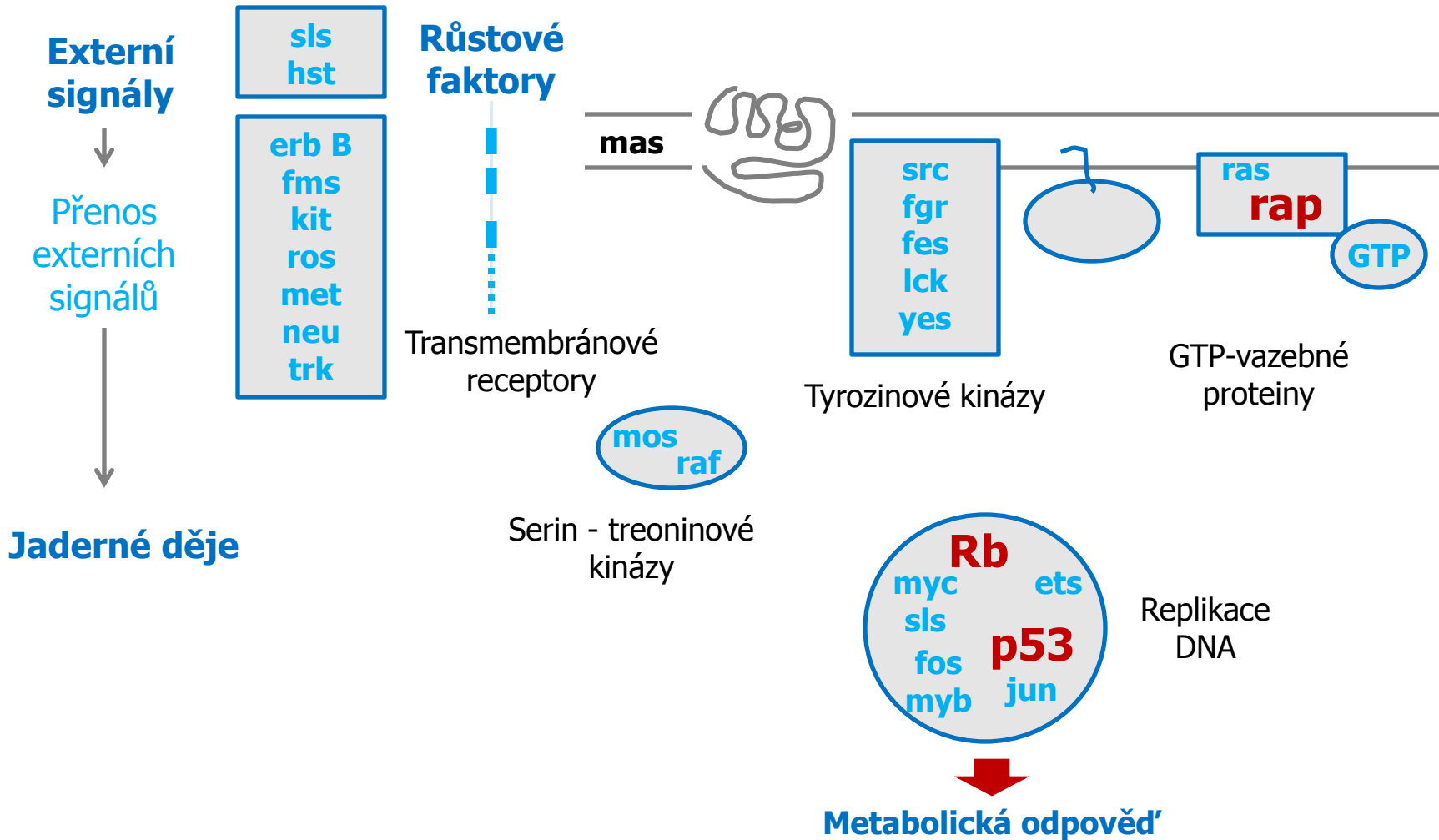
Receptory pro růstové faktory

- EGF-R
- NEU
- PDGF-R



Přenos signálů a růstová regulace v eukaryotických buňkách.
Jsou znázorněny reprezentativní protoonkogeny v signálních dráhách.

Onkogeny a nádorově supresorové geny



Hlavní funkční skupiny **onkogenních proteinů** a jejich pravděpodobná vnitrobuněčná lokalizace. **Nádorově supresorové geny** jsou označeny červeně.

Mutace protoonkogenu vedoucí k transformaci můžeme **funkčně** rozdělit do dvou tříd:

- **získání funkce (*gain-of-function*)**

aktivita protoonkogenu vzrůstá a má za následek abnormální nebo nadměrnou růstovou stimulaci

- **ztráta funkce (*loss-of-function*)**

vede k inaktivaci represorové složky, která normálně negativně ovlivňuje buněčnou proliferaci (nádorově supresorové geny - p53, RB, geny pro antiproliferační molekuly - TGF β , TNF α , interferon γ)

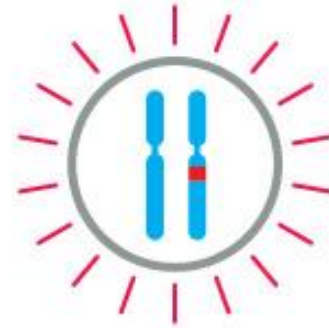
V obou případech je **výsledkem nadměrná stimulace růstu.**

Geny kritické pro vývoj nádorů spadají do dvou jasně rozlišitelných kategorií: dominantní a recesivní

(A) **overactivity mutation** (gain of function)



single mutation event
creates oncogene



activating mutation enables oncogene to stimulate cell proliferation

cells that proliferate abnormally

(B) **underactivity mutation** (loss of function)

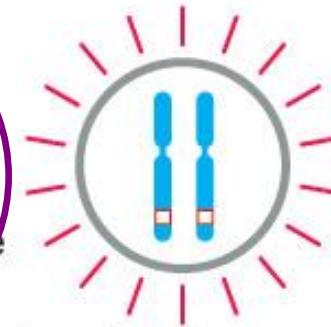


mutation event
inactivates tumor suppressor gene



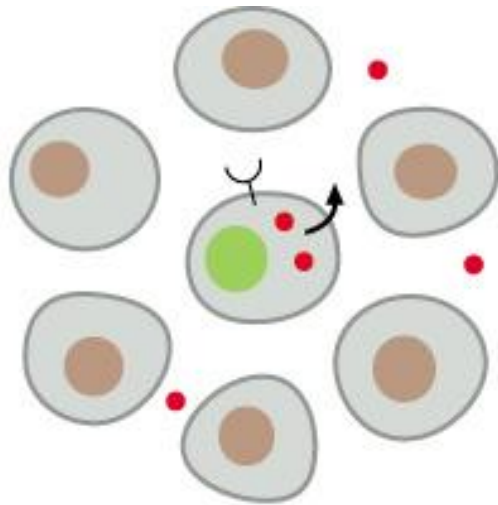
no effect of mutation in one gene copy

second mutation event
inactivates second gene copy

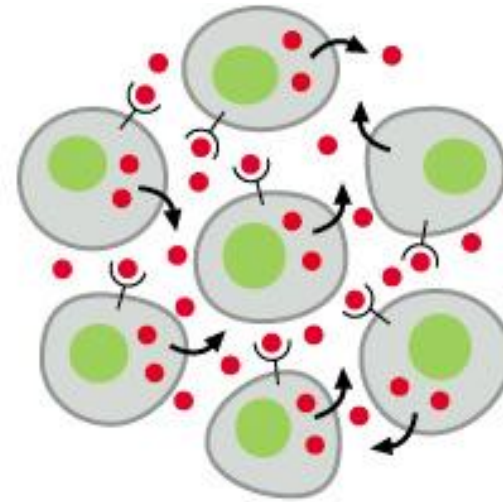


two inactivating mutations functionally eliminate the tumor suppressor gene, stimulating cell proliferation

Autokrinní signál



Signál pouze z jedné buňky –
buňka obdrží slabý autokrinní
signál



Ve skupině stejně signálujících buněk
dostává každá buňka silný autokrinní
signál

Figure 15–6. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.

Při buněčné transformaci a karcinogenezi se uplatňují **autokrinní mechanismy** (vznik autokrinní smyčky) - neplánovaná produkce růstových faktorů buňkami nesoucími odpovídající receptory nebo aberantní exprese receptorů.

Tři způsoby aktivace a změny protoonkogenu v onkogen

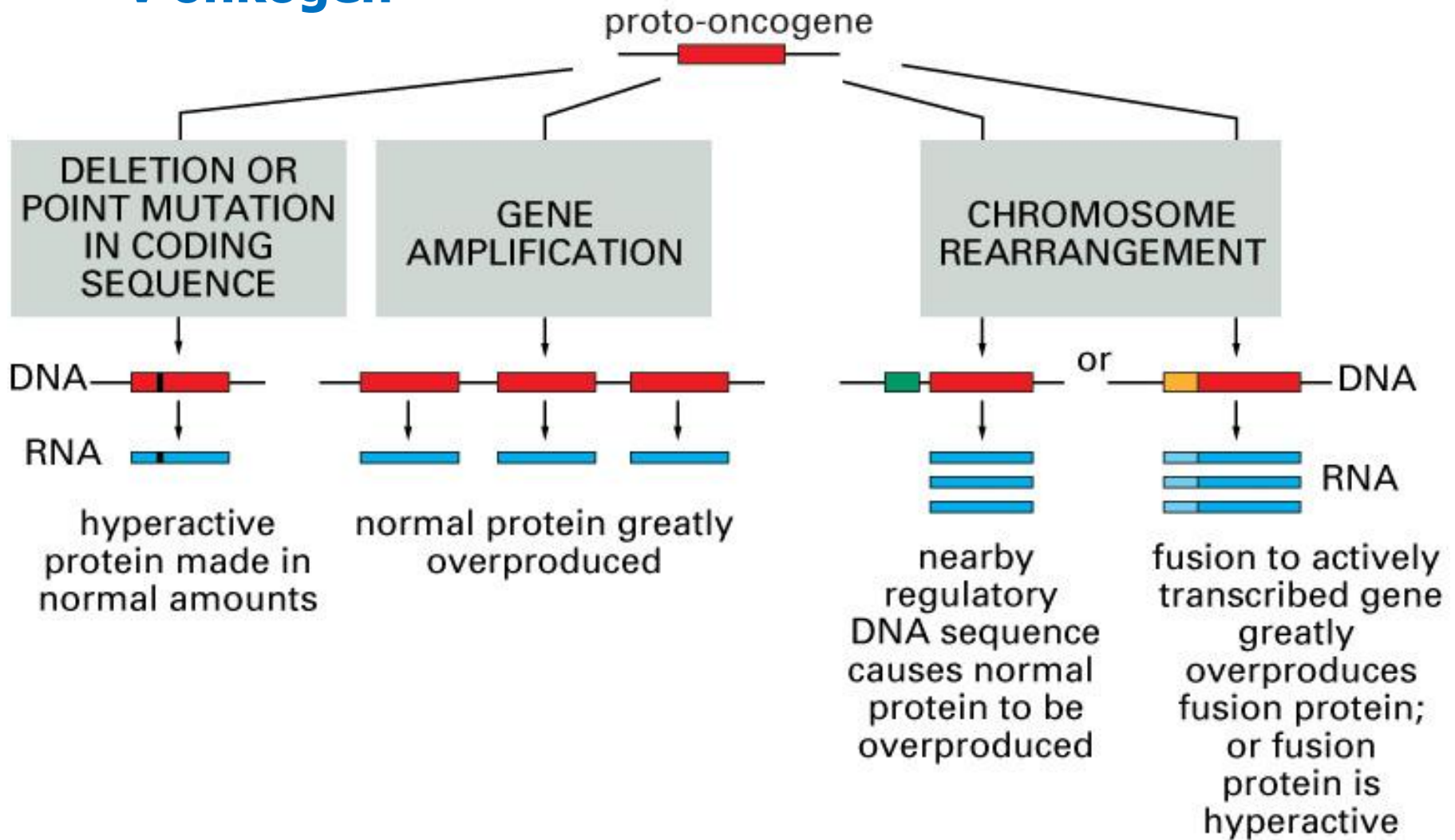
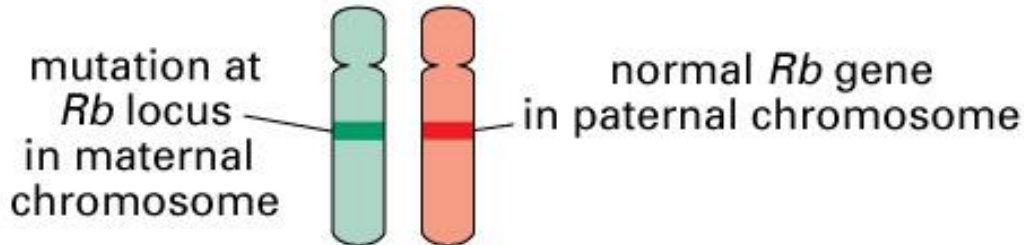


Figure 23–27. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.

Šest způsobů ztráty zbývající dobré kopie nádorově supresorového genu

HEALTHY CELL WITH ONLY 1 NORMAL *Rb* GENE COPY



POSSIBLE WAYS OF ELIMINATING NORMAL *Rb* GENE

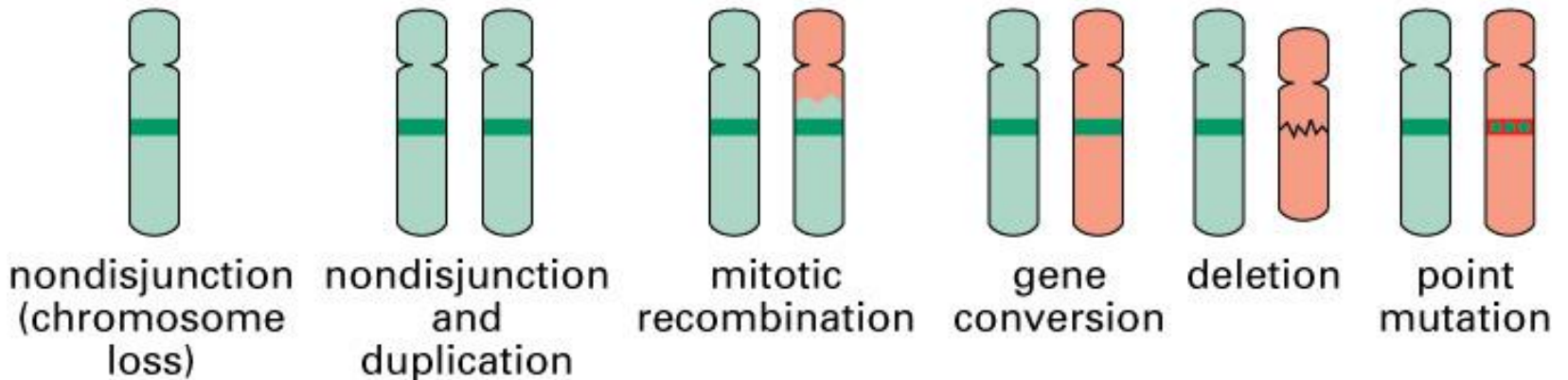


Figure 23–29. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.

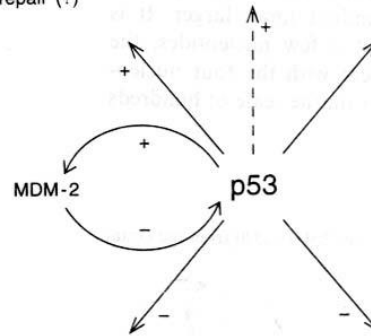
Spektrum účinků p53 v modulaci přežívání a frekvence změn genu p53 u lidských nádorů

Fig. 1 The spectrum of survival-modulation effects of p53

p21: promotes growth arrest
 bcl-x: blocks apoptosis
 gadd-45: DNA repair (?)

CD95 (?)
 Cyclin G (?)

p21: promotes growth arrest
 bax: promotes apoptosis
 IGF-BP3: inhibition of IGF signalling



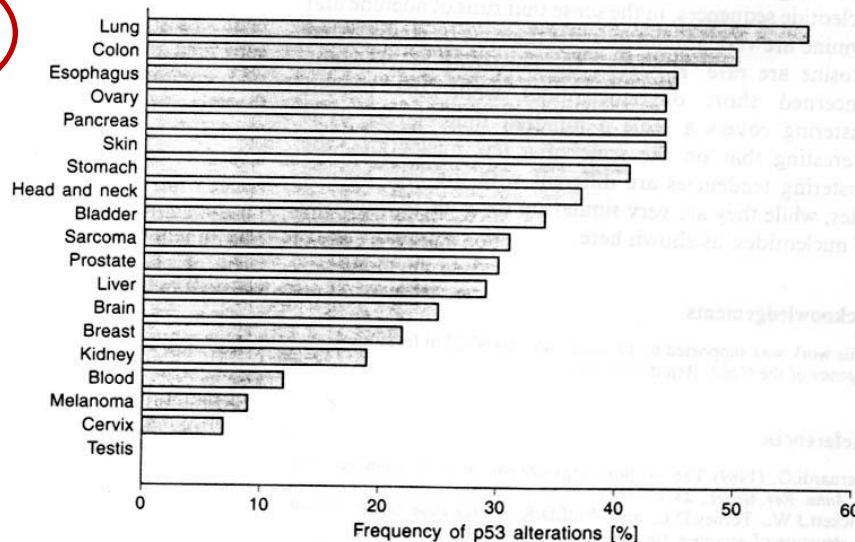
?

bcl-2: blocks apoptosis
 MDR: increases drug resistance

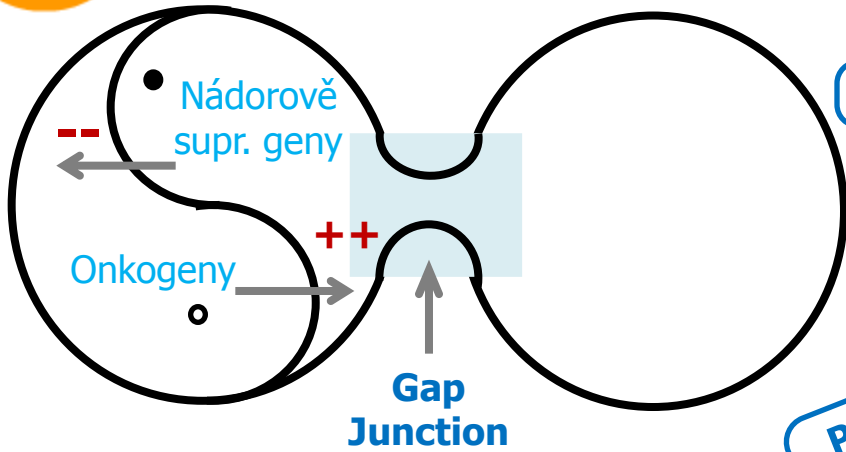
Survival

Death

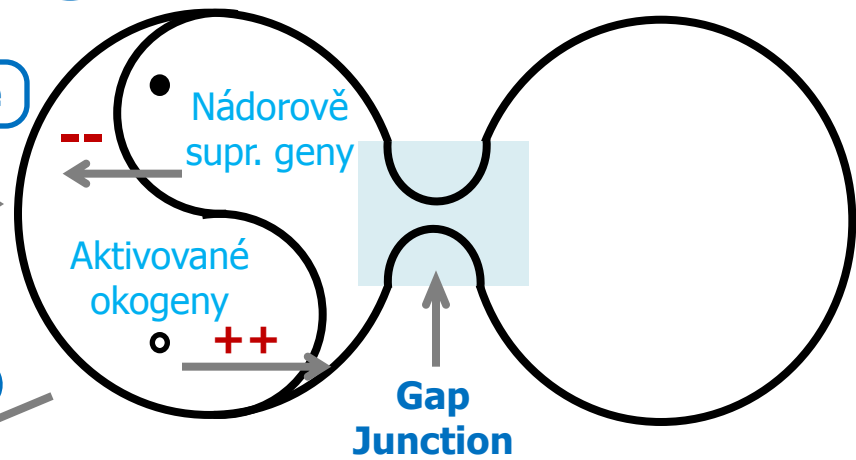
Fig. 2 Frequency of p53 gene alterations in human cancer (Greenblatt et al. 1994)



A Normální, kontrolovaný růst



B Abnormální růst, ale ještě nějak kontrolovaný

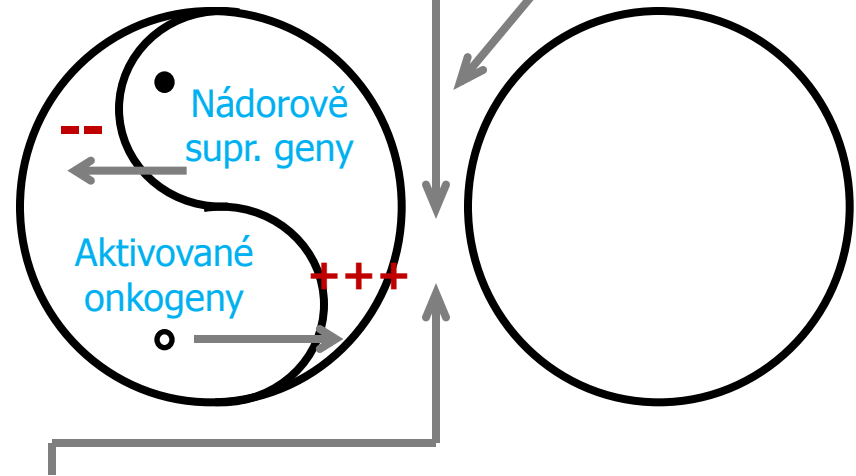
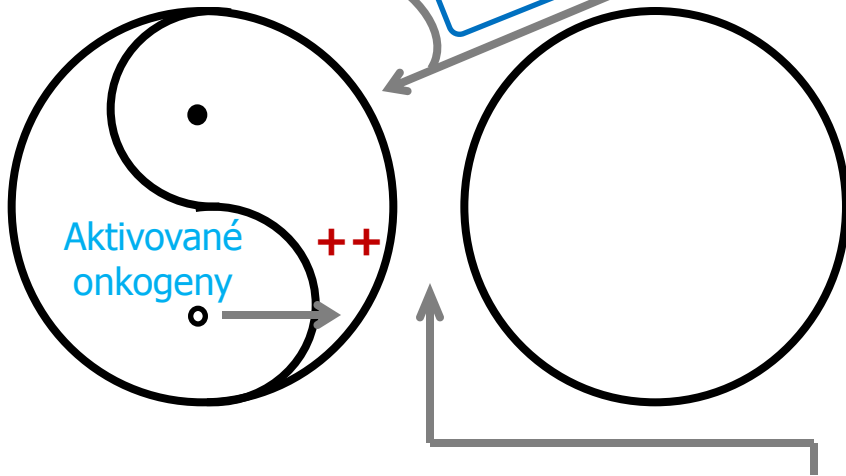


Ztráta nádorově supr. genů

Progrese

nebo

Aktivace více onkogenů



Nefunkční mezibuněčná komunikace

C Nekontrolovaný růst

D Nekontrolovaný růst

Poznatky o molekulárně genetické podstatě nádorového onemocnění lze shrnout takto:

- primární pro vznik nádoru jsou změny vyvolané jak **genetickými (mutace v DNA)** tak **negenetickými příčinami** (ovlivnění exprese genů)
- karcinogeneze je **několikastupňový proces založený na poruše genetické homeostázy** a pouze dílčí změna v kterémkoliv článku ke vzniku nádoru nevede
- ke vzniku nádoru může vést jen **kombinace poruchy několika různých mechanismů**, přičemž cesty, kterými se tak děje mohou být velmi rozdílné
- byly nalezeny velké **individuální a mezidruhové rozdíly i tkáňová a orgánová specifita** ve spojitosti se vznikem nádorů
- na vzniku nádoru se mohou významně podílet **látky z vnějšího prostředí**

Imortalizace buněk

Imortalizace zahrnuje inaktivaci specifických nádorově supresorových genů jako jsou RB a p53, které se účastní regulace přechodu G1-S fáze buněčného cyklu a indukce apoptózy i dalších genů spojených s buněčným cyklem a apoptózou.

Kromě toho existuje v buňkách mechanismus - buněčné hodiny. Ty odpočítávají počet dělení a regulují stárnutí buňky.

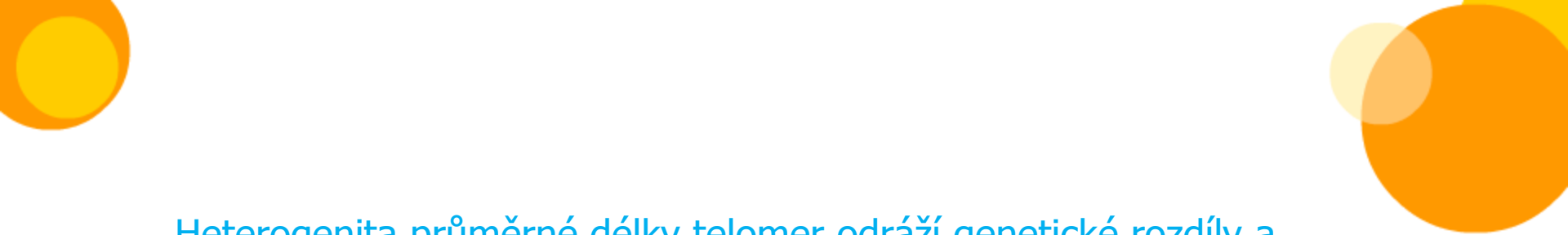
Normální somatická buňka má omezený počet dělení, tj. limitovanou schopnost proliferovat a nastává ireverzibilní zástava růstu, tzv. replikativní stárnutí (senescence)

Telomery

vysoce konzervované nukleoproteinové komplexy přítomné na koncích chromozómů a obsahují **tandemové opakující se sekvence DNA bohaté na guanin (TTAGGG)** obalené specifickými na DNA se vázajícími proteiny. Telomery tvoří **protektivní čepičku kolem genomové DNA** a zabraňují chromozomálním ztrátám a aberantním fúzím během mitotického cyklu. **Telomery se zkracují s dalšími buněčnými děleními**, což může způsobit genovou nestabilitu a změněnou genovou expresi.

Buňky procházejí **krizovým stadiem (Hayflickův limit) nebo umírají**. Zkracování telomer vybudí proliferativní stárnutí přes **aktivaci kontrolních bodů pRB a p53**, což vede u divokých typů p53 k zástavě proliferace. Dochází k bariéře v proliferaci charakterizované **dysfunkcí telomer, extrémní genomovou nestabilitou a rozsáhlou smrtí buněk mechanismy závislými i nezávislými na p53**.

Délka telomer koreluje s buněčným stárnutím, ale neexistují žádné důkazy pro jasnou korelaci na organizmální úrovni a korelace s délkou života člověka či jiných druhů.



Heterogenita průměrné délky telomer odráží genetické rozdíly a komplexní rovnováhu mezi procesy, které vedou k degradaci a těmi, které prodlužují telomery.

Např. buňky se sebeobnovnou kapacitou mají delší telomery než diferencované nebo telomery lab. myší jsou delší než u člověka.

Telomery jsou kratší u lidských somatických tkání ze starších lidí než u mladších jedinců nebo u zárodečných buněk.

Děti s genetickými nemocemi projevujícími se rychlým stárnutím tzv. **progerickým syndromem** (Down, Werner, At. telangiectasia) umírají v raném věku s tělem 90ti letých a jejich telomery jsou drasticky zkráceny.

Telomeráza

Imortalizované buňky vznikající z krizového stadia (inaktivací p53 a pRB, overexpresí cMyc a Ras a v důsledku vážné genové nestability) obnovují funkci telomer **aktivací telomerázy**, alternativním telomery udržujícím mechanismem (ALT) nebo jiným adaptivním mechanismem.

Ve skutečnosti mají **nádorové buňky kratší telomery než jejich odpovídající normální buněčné typy**. Tyto telomery se dále zkracují během progresu nádoru a u myších exp. modelů, jsou zkrácené telomery spojeny se zvýšenou genetickou nestabilitou a zvýšenou nebo redukovanou spontánní malignitou v závislosti na genetickém kontextu.

Mnoho faktorů (genetických, nutričních, hormonálních, environmentálních, farmakologických) může modulovat udržování telomer a potenciál buněčného života.

Telomery nejsou udržovány normálním replikačním procesem. U kmenových, nádorových a imortalizovaných buněk, je zkracování telomer zastaveno aktivací telomerázy - reverzní transkriptázy, která rozšiřuje telomerické TTAGGG opakované sekvence.

3 hlavní složky:

- s telomerázou spojený protein TLP1
- telomerázovou RNA -hTR
- telomerázovou katalytickou jednotku TP2 - lidská telomerázová reverzní transkriptáza.

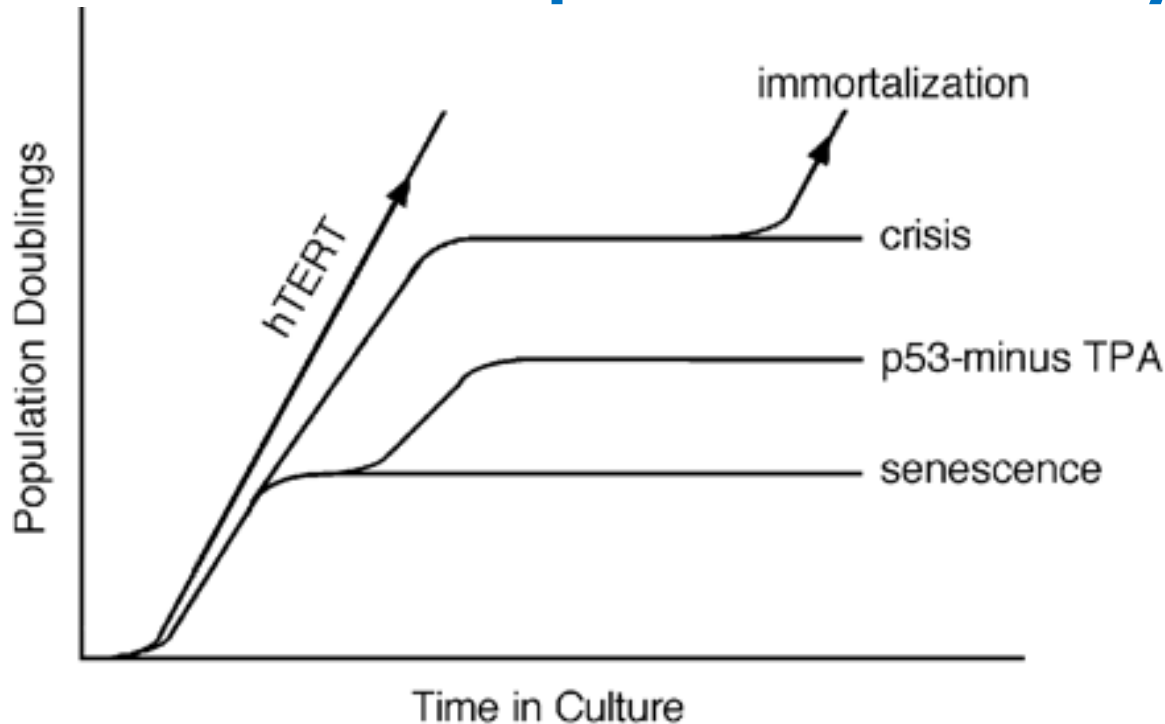
Telomeráza používá svou RNA k navázání na telomery, zatímco katalytická proteinová jednotka syntetizuje DNA přímo na koncích chromozómů reverzní transkripcí templátu RNA.

Rozšiřování na guanin (G) bohatých telomerových vláken telomerázou



Holoenzym **telomeráza** obsahuje proteinové subjednotky včetně katalytické subjednotky s aktivitou **reverzní transkriptázy** a molekulu RNA, která slouží jako templát pro přidání **opakujících se motivů TTAGGG**

Stadium terminální proliferační zástavy (TPA)



Normální buňky absolvují určitý počet dělení než navždy opustí buněčný cyklus a zůstanou ve viabilním neproliferujícím stavu – **senescence**. Při inaktivaci p53 se tyto buňky ještě nějakou dobu dělí a pak zastavují buněčný cyklus (p53-minus TPA). Při narušení jak p53 tak pRb/p16 (např. přítomností virových onkoproteinů), buňka obejde stav senescence a následně je zastavena ve stavu **krize**. Vyjíměčně (1 buňka z 10^7) může překonat krizi a stát se nesmrtelnou. Transdukce několika normálních buněk s expresním konstruktem hTERT může vyústit v **expresi telomerázy** a obejít stav senescence.

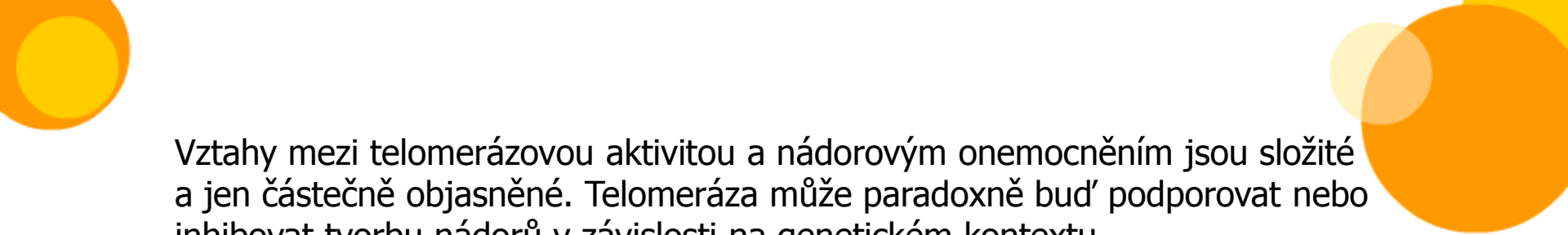
Telomeráza je vysoce exprimována ve většině nádorů a kmenových buněk, středně v hyperplastických a metaplastických buňkách a velmi nízká nebo žádná v normálních diferencovaných tkáních a postupně se snižuje s věkem.

Její exprese je spojena s vysokým proliferačním indexem a obnovným tkáňovým potenciálem, agresivitou nádorů, vysokým histopatologickým gradem a s proliferací cévního endotelu.

Telomerázová aktivace a overexprese je často nezbytným a raným dějem v mnohastupňové karcinogenezi: vzrůstá rychle při chemické karcinogenezi a po zkrácení telomer. Telomeráza není ani onkogen ani nádorově supresorový gen, ale je regulována nahoru nebo dolů mnoha faktory a stává se důležitým predisponujícím dějem u karcinogeneze nebo cílené nádorové terapie.

Homeostáza systému telomery – telomeráza je komplexní a je svázána s genetickými a environmentálními faktory.

Řada faktorů snižuje (diferenciační činidla, epigallocatechin gallate (z čaje), antineoplastické látky - cisplatina, doxorubicin, protein fosfatáza 2, MAPK, tamoxifen, androgeny, volné radikály, inhibitory reverz. transkriptázy) a řada zvyšuje (chemické karcinogeny, mutace telomerických sekvencí, gamma záření, PKC, EGF, estrogeny) telomerázovou aktivitu.



Vztahy mezi telomerázovou aktivitou a nádorovým onemocněním jsou složité a jen částečně objasněné. Telomeráza může paradoxně buď podporovat nebo inhibovat tvorbu nádorů v závislosti na genetickém kontextu.

U nádorových buněk jsou telomery kratší a telomerázová aktivita obvykle následuje po zkracování telomer.

Ztráta funkce telomer při raném dělení zahajuje genetickou nestabilitu, zatímco v pozdějším bodě progresu nádoru absence telomerázy inhibuje růst. Tak zatímco inhibice telomerázy u ustanovených nádorů může být cenným terapeutickým přístupem, na věku závislé zkracování telomer může být rizikovým faktorem pro nádory tím, že umožňuje obejít kontrolní bod mortality.

System telomery-telomeráza představuje komplexní skupinu molekul interagujících navzájem a modulujících věk buněk, genetickou stabilitu a nádorovou transformaci.

Vnější zásahy mohou modulovat žití zvyšováním nebo snižováním délky života, ale s tímto přístupem jsou spojeny také odpovídající problémy.

Udržování telomer by mohlo být důležité pro prodloužení života, ale vzhledem ke složitosti fyziologických mechanismů na buněčné a zejména organizmální úrovni, nelze tento problém zjednodušovat.

Z onkologického hlediska, může nadměrná rexpresa telomerázy zvyšovat riziko vzniku nádorů. Ačkoliv normální buňky s delší dobou života a udržovanými telomerami se nejeví jako neoplastické, zpoždění fyziologické smrti může zvyšovat pravděpodobnost kontaktu s karcinogeny. Telomeráza sama také zvyšuje onkogenní potenciál predisponovaných buněk a je cílem protinádorových terapií.

Zatím se pozornost soustřeďuje na zvýšení doby života několika cílových buněk nebo snížení proliferujících nádorových buněk. Málo pozornosti je věnováno organizmální úrovni, mikro- a makroprostředí, ve kterém tyto buňky rostou jako normální nebo imortalizované nádorové buňky: tj. angiogenezi, růstovým a diferenciacním faktorům, cytokinům, hormonům, imunitnímu systému a environmentálním faktorům.

Zbývá odpovědět na otázky:

- ? - Je bezpečné prodlužovat lidský život použitím terapeutických látek?
- ? - Je lepší prodlužovat lidský život nebo zlepšovat kvalitu života?

Zkracování telomer může vést k chromozomální nestabilitě a vzniku nádoru

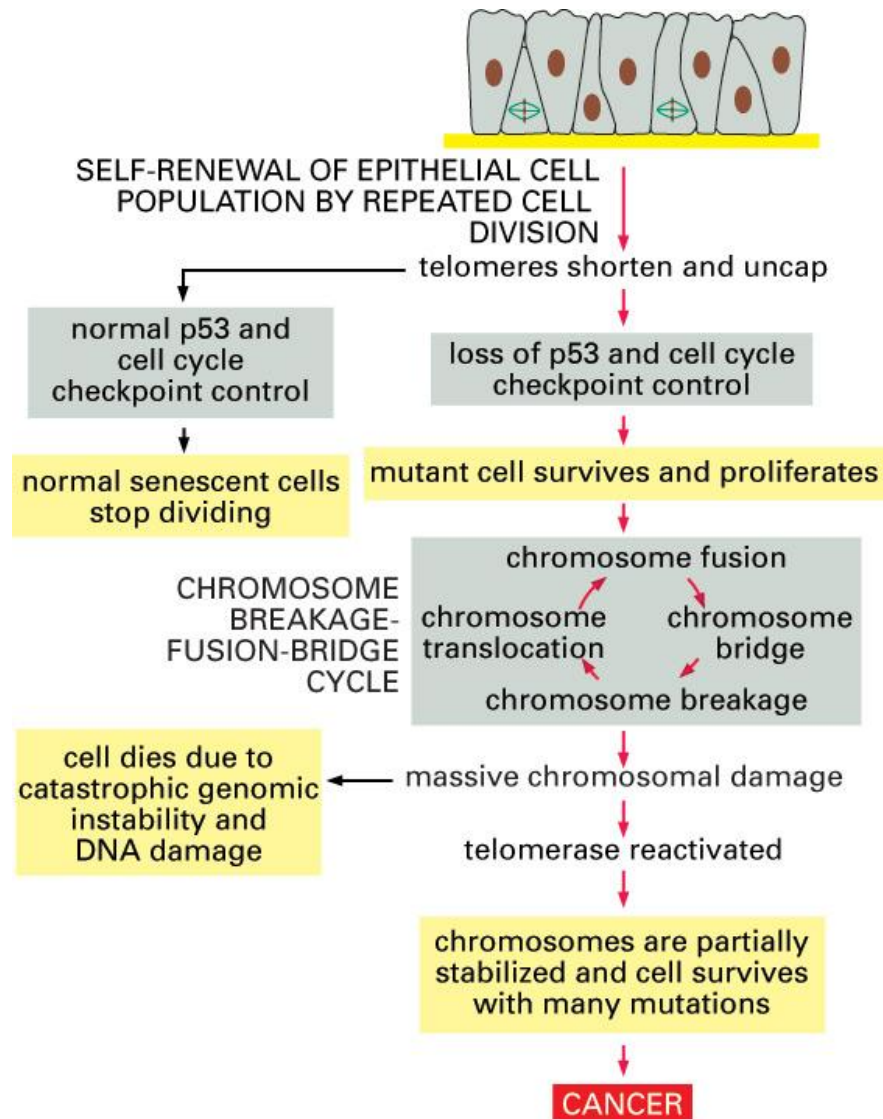
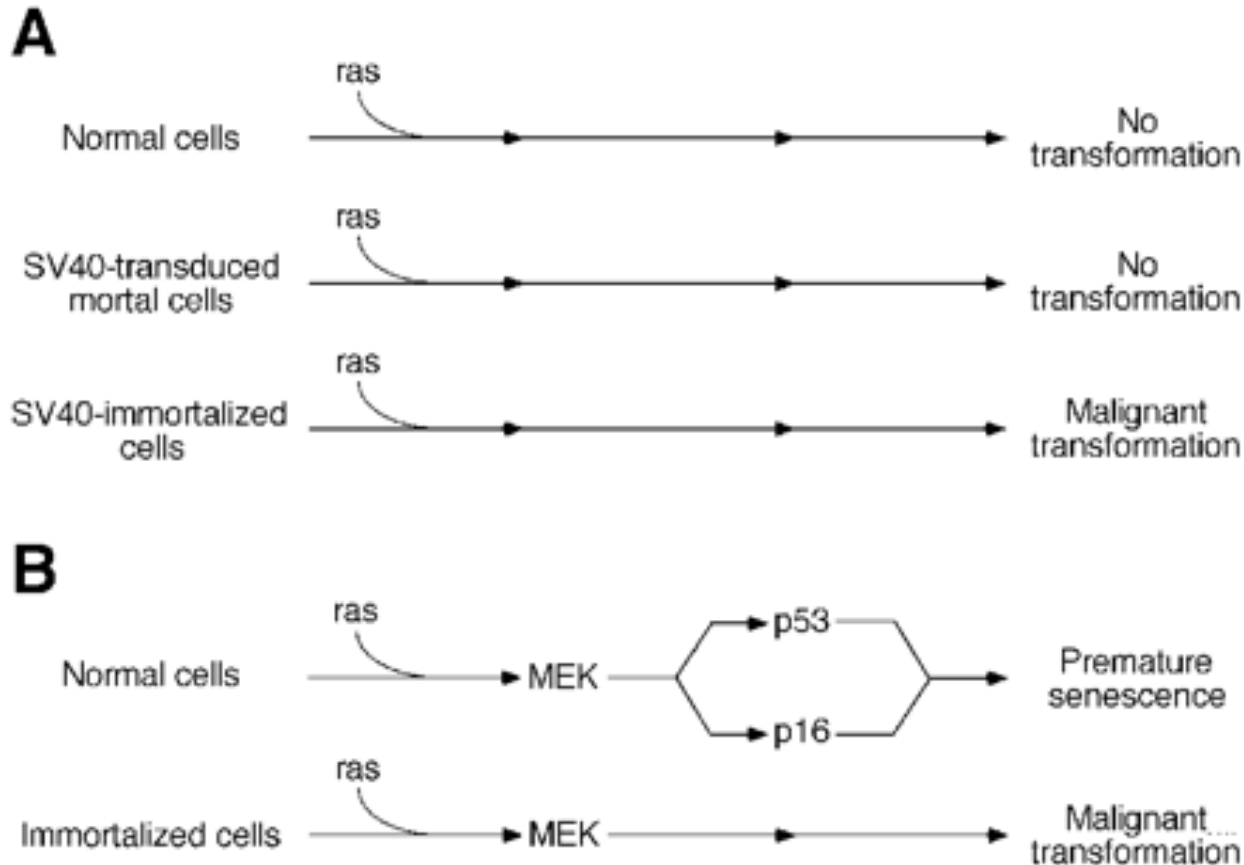


Figure 23–36. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.

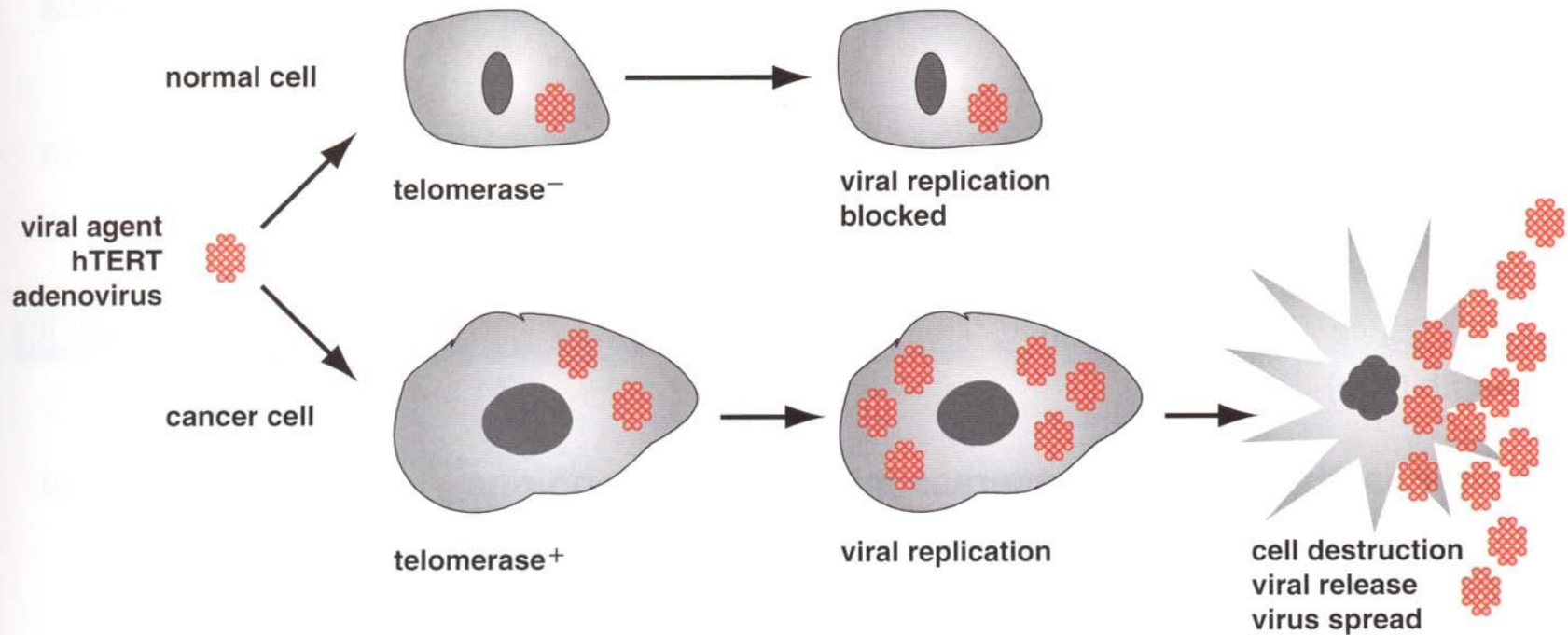
Imortalizace je nutná, ale ne dostačující pro maligní transformaci



A) U řady modelů *in vitro* se ukázalo, že onkogeny (např. aktivovaný *ras*) mohou způsobit maligní transformaci imortalizovaných, ale ne normálních buněk. Aktivovaný *ras* způsobuje maligní transformaci SV40-imortalizovaných fibroblastů, ne však normálních fibroblastů nebo SV40-transdukovaných fibroblastů, které nebyly imortalizovány.

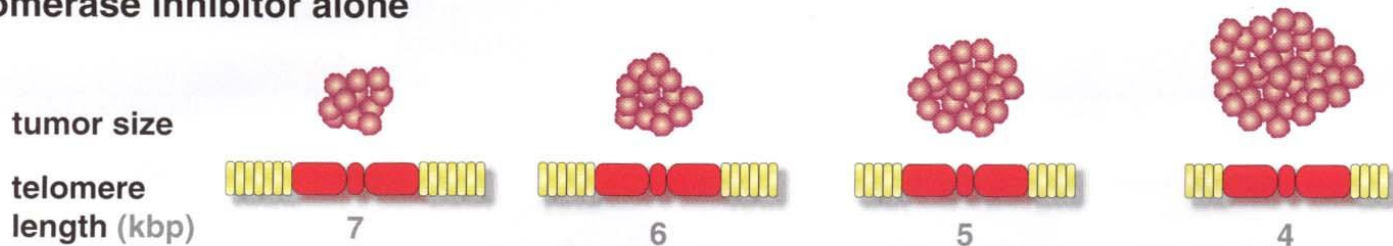
(B) Myší fibroblasty transdukované aktivovaným proteinem *ras* získávají konstitutivně aktivní signální dráhu MEK. U imortalizovaných buněk to může vyústit v maligní transformaci, kdežto u normálních buněk dochází k upregulaci p53 a p16^{INK4a} a předčasnému stárnutí (premature senescence).

Adenovirová terapie využívající promotoru pro telomerázu selektivně usmrcuje nádorové buňky

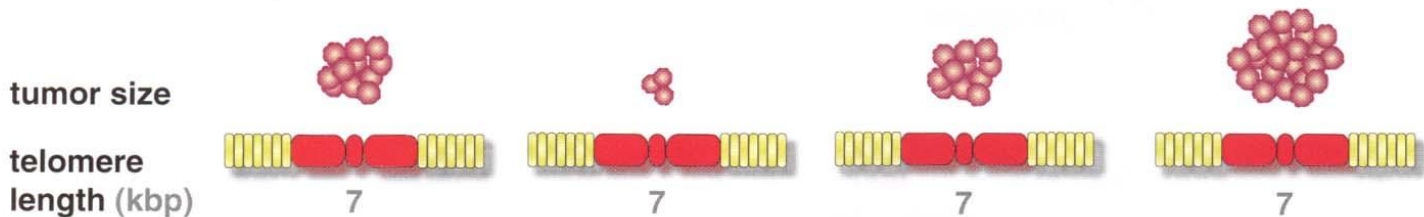


Inhibitory telomerázy a konvenční terapie

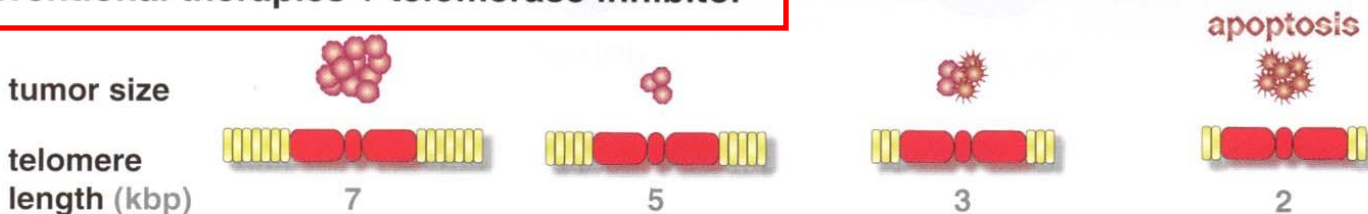
telomerase inhibitor alone



conventional therapies alone



conventional therapies + telomerase inhibitor



time of treatment

Nádorová epigenetika

Epigenetika – dědičné změny v genové expresi beze změn v sekvenci DNA
Epigenetické změny hrají významnou úlohu v karcinogenezi.

Savčí buňky mají schopnost epigeneticky modifikovat svůj genom prostřednictvím změn metylace DNA a acetylace histonů.

Metylace DNA

kovalentní přidávání metylových skupin do 5 pozice na cytosinovém kruhu v CpG dinukleotidu s účastí enzymu metyltransferázy.

Přibližně 70% CpG zbytků v savčím genomu je metylováno, ale většina genomu je chudá na CpG (2-5%). Distribuce je nerovnoměrná – nahromaděny buď v rozsáhlých repetitivních sekvencích (satelity, centromerické repetice) nebo v krátkých úsecích bohatých na CG, tzv. „CpG islands“ (především v promotorových úsecích genů, blízko místa startu transkripce).

Jsou normálně nemetylované a tak je umožněna transkripce genů za přítomnosti příslušného transkripčního faktoru.

Metylace cytosinových zbytků je spojena s

- navázáním specifických proteinů (methyl-binding domain proteins)
- aktivací histon deacetyláz (HDAC) a histon metyltransferáz
- modifikací histonů
- kondenzací chromatinu
- transkripční inaktivací příslušného genu.

Souhra metylace CpG ostrůvků pomocí metylačních a demetylačních enzymů je jednou z částí epigenetické kontroly zárodečné a tkáňově specifické genové exprese.

Repetitivní genomické sekvence roztroušené mezi zbytkem genomu jsou naopak silně metylovány a hrají asi roli ve vývoji nekódujících oblastí DNA a v utlumení endoparazitických a retrovirových transpozónů.

Metylace DNA tedy hraje zásadní úlohu v normálním vývoji, v inaktivaci chromozómu X a supresi tzv. parazitických sekvencí DNA.

Umožňuje „zapínat a vypínat“ geny na správném místě a ve správné době.

Úloha v karcinogenezi

Hypo- nebo hypermetylace DNA (obsah 5-metylcytosinu) patří mezi epigenetické (negenotoxické) mechanismy karcinogeneze.

Metylační struktura v nádorových buňkách se liší od normálních buněk. Globální hypometylace genomu je doprovázena místně specifickou hypermetylací.

- Hypermetylace promotorů pro nádorově supresorové geny v CpG „islands“ je doprovázena jejich utlumením a růstovou výhodou pro tyto buňky.
- Hypometylace DNA je naopak spojena se zvýšenou genovou expresí.
- Metylace DNA může usnadňovat mutagenezi (5MeC může spontánně deaminovat na thymin - hypermutabilita).

Inaktivace nádorově supresorových genů

Klíčovým mechanismem je **aberantní metylace DNA v promotorové oblasti**. Může způsobit zvýšení mutací a dědičně tlumí geny, jejichž promotory jsou asociovány s CpG „islands“ a které kontrolují buněčnou proliferaci.

Zatím neznámé mechanismy zabraňují *de novo* metylaci těchto promotorů u normálních buněk.

Metody využívané pro analýzu metylace

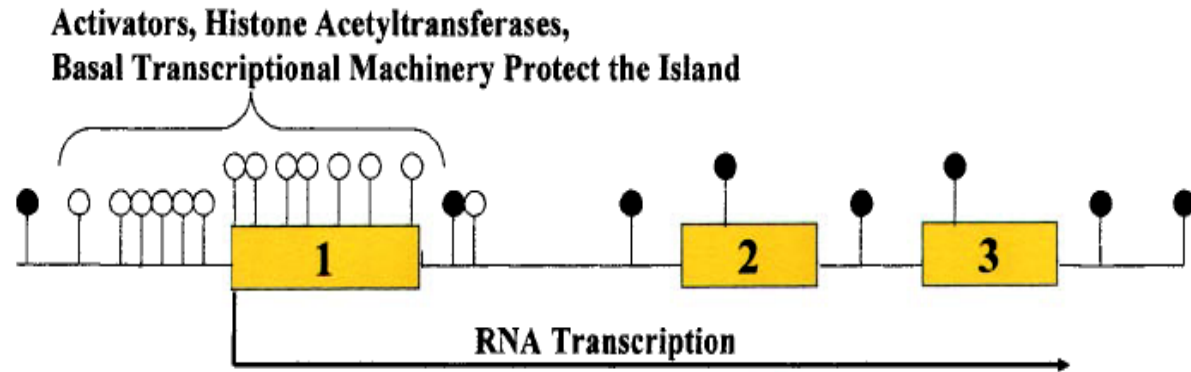
Důkazy spojitosti mezi metylací DNA a genovou expresí s využitím **inhibitoru metylace - 5-azacytidinu (5-AZA)** - mnoho genů může být reaktivováno – např. metylačně specifická PCR. Primery rozlišují metylovanou a nemetylovanou DNA v nádorových biopsiích nebo tekutině.

Další metodou je v současnosti imunoprecipitace purifikované metylované DNA, umožňující detekovat metylační profil DNA celého genomu – DNA methylom).

Typické CpG ostrůvky nádorově supresorového genu v normální a nádorové buňce

Unmethylated CpG Island

Normální buňka
normální transkripce
nemetylovaný promotor



Hypermethylated CpG Island

Nádorová buňka
potlačení transkripce
hypermetylace promotoru

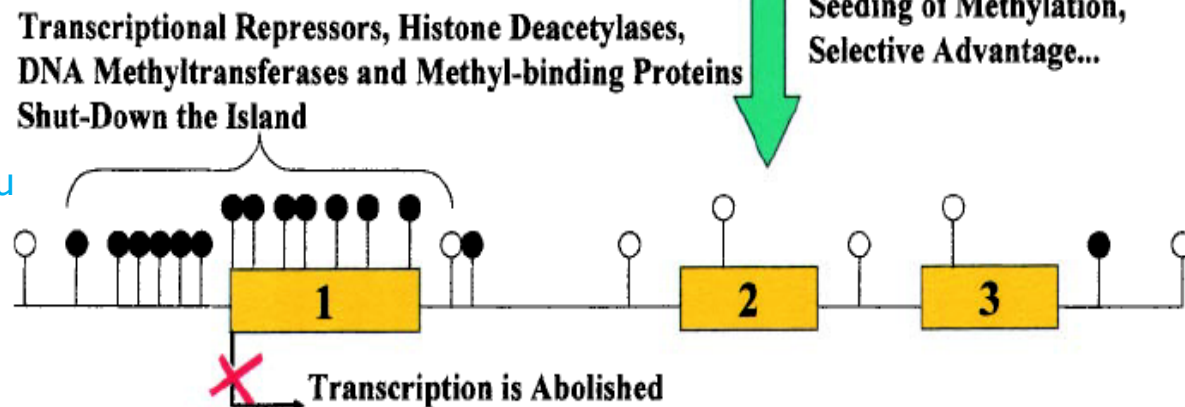
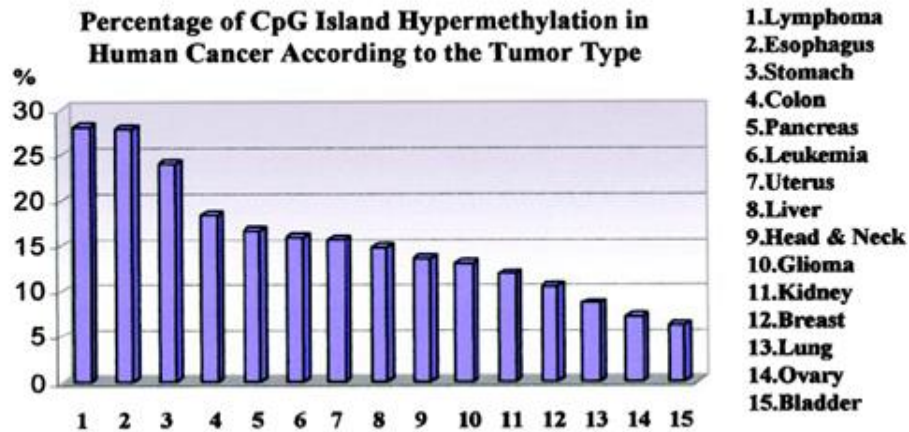


Figure 1 The typical CpG island of a tumor suppressor gene is represented in a normal and a tumor cell. The presence of a dense hypermethylation changes completely its molecular environment. White dots, unmethylated CpGs; Black dots, methylated CpGs

Procento hypermetylace CpG 11 nádorově supresorových genů u různých typů lidských nádorů (A) a u 10 různých nádorově supresorových genů (B)

A



B

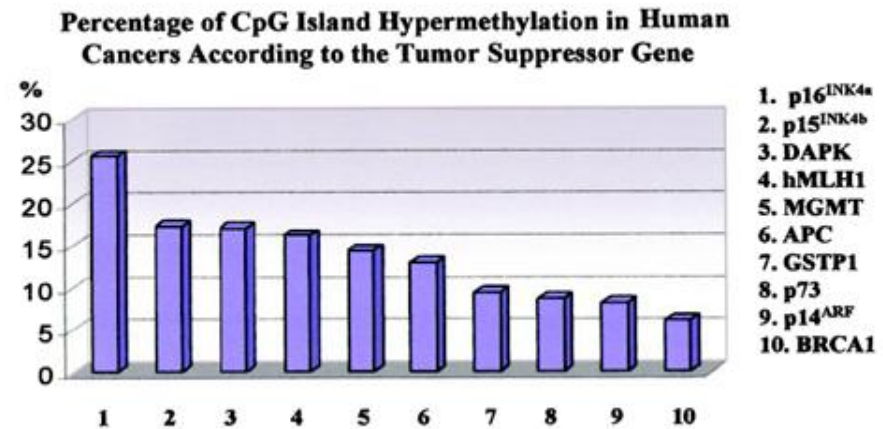


Figure 3 (a and b) are alternative ways to present our CpG island hypermethylation profile of human cancer (Esteller *et al.*, 2001a). (a) an average value of the frequency of hypermethylation of 11 tumor suppressor genes (p16^{INK4a}, p14^{ARF}, p15^{INK4b}, MGMT, hMLH1, BRCA1, GSTP1, DAPK, CDH1, p73 and APC) is shown according to the most common types of human tumors. (b) the other side of the coin: the frequency of CpG island hypermethylation of ten particular tumor suppressor genes in the tumor types described in a. In the cases of p15^{INK4b} and hMLH1 an overestimation exists due to the high number of leukemias and microsatellite unstable tumors included, respectively

Vlastnosti nádorů a různé typy genů umlčených aberantní metylací DNA

Table 1 Hallmarks of cancer and different types of genes silenced by aberrant DNA methylation

<i>Hallmark^a (acquired capability)</i>	<i>Gene silenced by DNA methylation</i>	<i>Gene function</i>	<i>References</i>
Insensitivity to antigrowth signals	p16CDKN2A	Cyclin-kinase inhibitor induce differentiation cell cycle arrest	Herman <i>et al.</i> (1995)
	RAR β Sigma 14-3-3		Coté <i>et al.</i> (1998) Umbricht <i>et al.</i> (2001)
Self-sufficiency in growth signals Evading apoptosis	RASSF1A	Regulation Ras pathway	Dammann <i>et al.</i> (2000)
	Capase-8	Initiate apoptosis	Teitz <i>et al.</i> (2000)
	TMS1	Proapoptosis	Stimson and Vertino (2002)
	DAP-kinase	Proapoptosis	Kissil <i>et al.</i> (1997)
	p14ARF	Proapoptosis	Robertson and Jones (1998)
Limitless replicative potential Sustained angiogenesis	Rb	Tumor suppressor gene	Ohtani-Fujita <i>et al.</i> (1993)
	Thrombospondin-1	Angiogenesis inhibitor stimulate angiogenesis	Li <i>et al.</i> (1999)
Increased invasion And metastasis	VHL		Herman <i>et al.</i> (1994)
	E-cadherin	Suppress metastasis	Graff <i>et al.</i> (1995)
	TIMP3	Inhibit metastasis	Bachman <i>et al.</i> (1999)
Genome instability (enabling characteristic)	hMLH1	DNA mismatch repair	Esteller (2000)
	MGMT	Repair alkylated guanine	Qian and Brent (1997)
	BRCA1	Repair DNA damage	Bianco <i>et al.</i> (2000)

DAP-kinase, death-associated protein kinase; MGMT, O₆-methylguanine DNA methyltransferase; RAR β , retinoic acid receptor- β 2; Rb, retinoblastoma; TIMP3, tissue inhibitor of metalloproteinase-3; VHL, von Hippel–Lindau tumor suppressor gene. The table is illustrative, but not comprehensive. For a list of many cancer-related genes silenced by aberrant methylation, see Tsou *et al.*, 2002. ^aanahan and Weinberg (2000).

Rovnováha metylace DNA

endogenní faktory

genetické
stárnutí

genetické

environmentální a dietní faktory

folát
cholin

ethanol
aromatické
uhlovodíky

chemoterapeutika

cisplatina
5-fluorouracil

5-aza-C
methotrexát



Hyper

Hypo

Interakce genetických a epigenetických faktorů

Metylace reguluje expresi genových produktů

Metylace podporuje vznik mutací deaminací

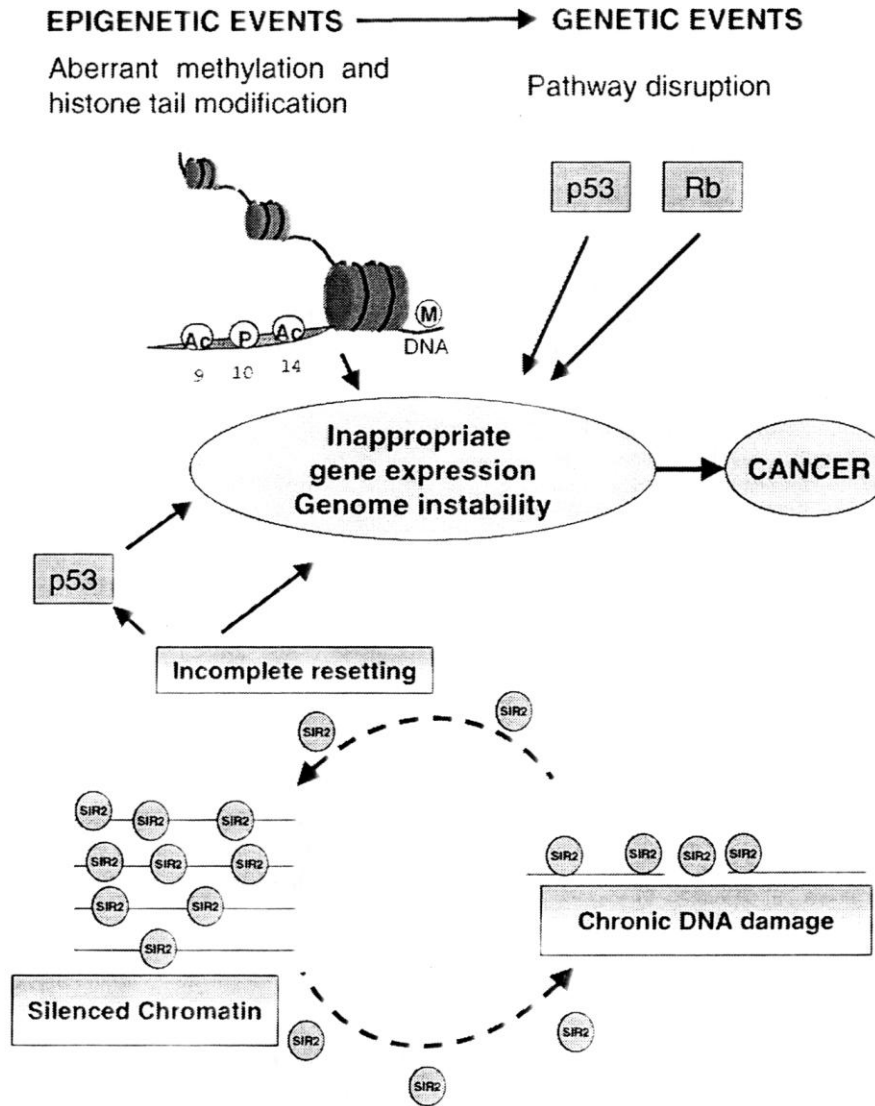
Epigenetické faktory

Genetické faktory

Genové produkty katalyzují a regulují metylaci

Nukleotidová sekvence určuje možná místa metylace

Aberantní epigenetické a genetické děje mohou vést prostřednictvím nesprávné genové exprese k tvorbě nádorů



Acetylace histonů

Genová exprese je regulována i strukturou chromatinu.

Histony jsou považovány za důležité „překladače“ mezi genotypem a fenotypem – mají dynamickou funkci v regulaci struktury chromatinu a genové aktivity. Mohou být modifikovány acetylací, metylací, fosforylací, ubiquitinací. Specifická modifikace konců histonů je přímo spojena s aktivní nebo utlumenou transkripcí – enzymy **histon transferázy**.

Chromatin obsahující **hypoacetylované lysiny v histonech** má kompaktní strukturu **represivní pro transkripci**.

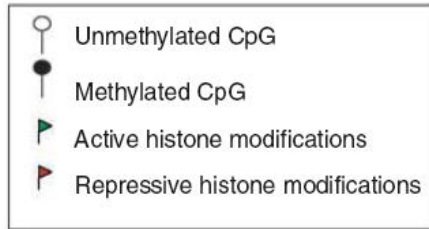
Inhibitory histonových deacetyláz (HDAC) mohou vytvářet otevřené struktury chromatinu a aktivovat určité geny inhibující nádorový růst využití v terapii (butyrát, trichostatin).

Histony se podílejí na tvorbě a udržování „**epigenetické paměti**“.

Existuje významný „**crosstalk**“ **mezi metylací DNA a acetylací histonů** při aktivaci i tlumení (silencing) genové exprese.

5AZA a HDAC inhibitory v kombinaci způsobují reaktivaci nádorově supresorových genů

Některé známé změny DNA a chromatinu v nádorových buňkách



HAT – histon acetyltransferázy

SWI/SNF – „switch/sucrose nonfermentable nucleosome remodelling complex“

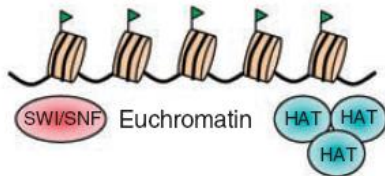
MeCP2 – „methyl CpG-binding protein 2“

HDAC – histon deacetyláza

Active transcription



- Normally expressed genes

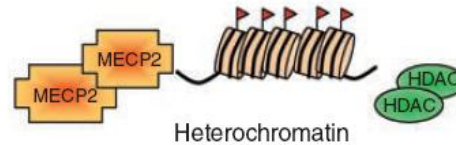


Normal cell

Repressed transcription



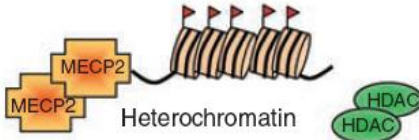
- Viral transposons
- Imprinted genes



Repressed transcription



- Silencing of tumour suppressor genes

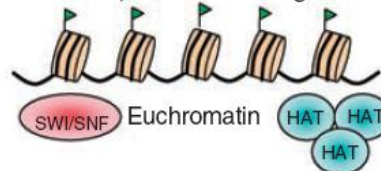


Cancer cell

Active transcription



- Expression of transposons and imprinted genes
- Expression of oncogenes



Normální buňky

promotory aktivně transkribující geny - nemetylované v

euchromatinu

potlačení exprese genů -

metylace promotorů a tvorba heterochromatinu

Nádorové buňky

deregulace – aberantní

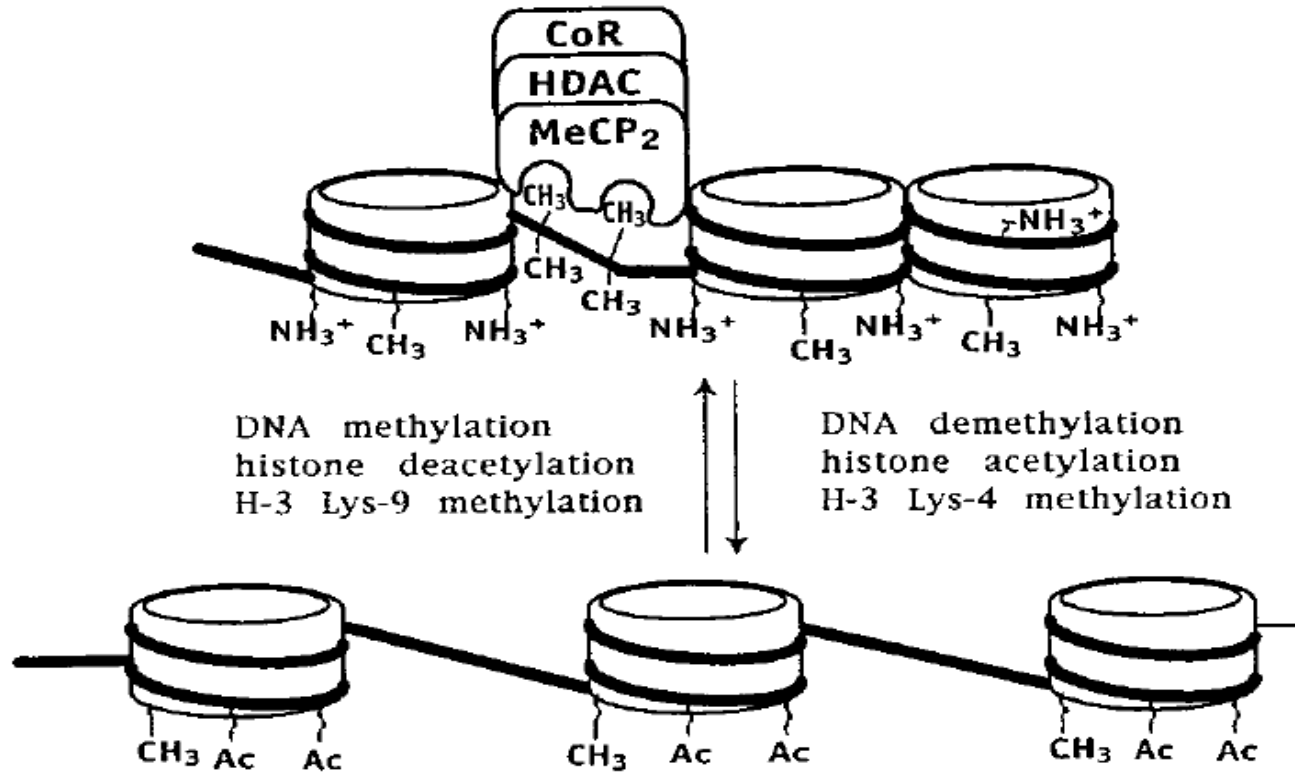
exprese normálně

umíčených genů a potlačení

exprese nádorově

supresorových genů

Utlumení genové exprese aberantní metylací DNA a modifikací histonů



Nukleozómy v promotorové oblasti. Proteiny vážící se k 5MeC (MeCP2) se váží k metylovaným CpG místům a způsobují tlumení genové exprese histon deacetylázou (HDAC). Přítomnost tohoto komplexu, deacetylace lysinu v histonech a metylace histon-3 lysin-9 histon metyltransferázou přeměňuje nukleozóm v kompaktní konfiguraci, která zabraňuje vazbě transkripčních faktorů. Demetylace a deacetylace způsobuje pak zase **uvolnění inhibičního proteinového komplexu** a tvorbu otevřené struktury nukleozómu, která **umožňuje transkripci**.

mikro RNAs

Důležitou součástí epigenetické regulace jsou tzv. **malé regulační RNA – mikroRNA (miRNA)**.

Jsou to vysoce konzervované malé molekuly RNA (19-30 nukleotidů) nekódující proteiny, ale regulující genovou expresi na translační úrovni. Tvoří asi 1% lidského genomu!!!

Hrají úlohu ve vývoji, buněčné proliferaci i apoptóze.

Genovou expresi regulují rovněž siRNA (short interfering RNA).

V tzv. RISC komplexu se miRNA vážou na částečně komplementární cílová místa genů a mohou řídit **bud' translační inhibici nebo degradaci mRNA**.

Tato represe prostřednictvím miRNA je další cestou jak může být modulována genová exprese.

miRNAs jsou deregulovány u řady nádorových typů a mohou fungovat jako onkogeny nebo nádorové supresory.

Hypermethylace CpG islands spojených se specifickými miRNAs může být jedním z mechanismů, kterým může být miRNA selektivně snižována. V případě, že je miRNA situována v kódující oblasti genu, methylace může zároveň tlumit expresi jak genu kódujícího protein tak příslušné miRNA.

Biosyntéza microRNA

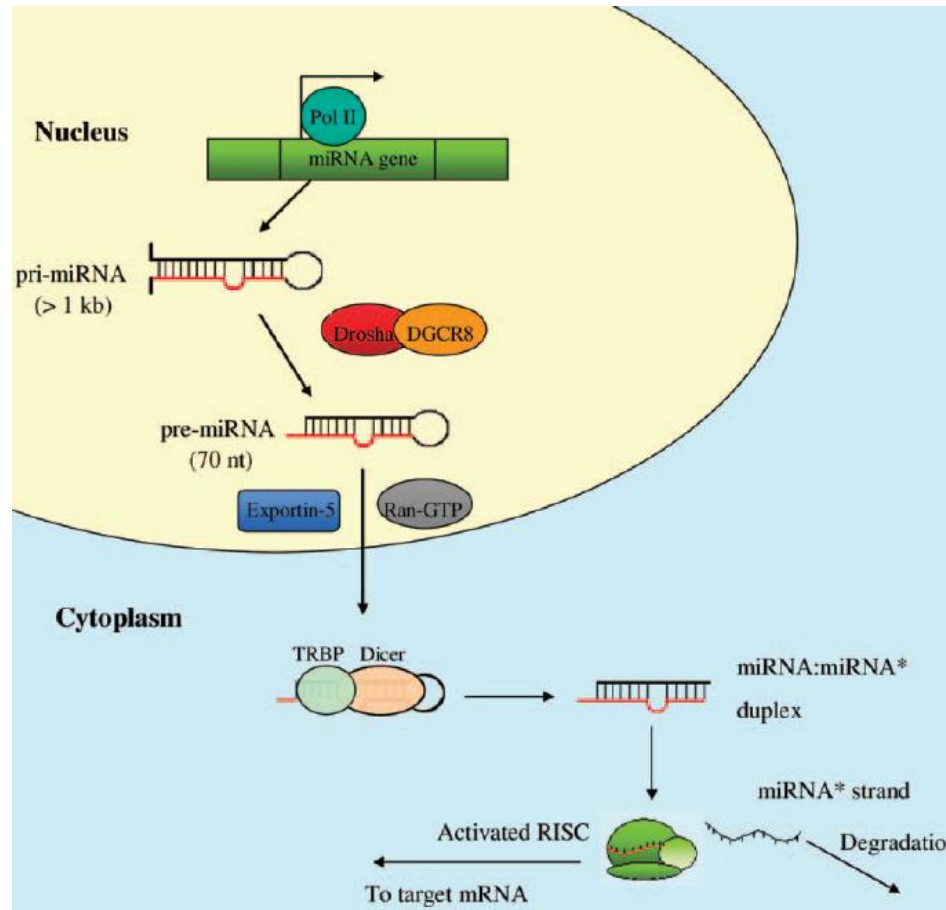


Fig. 1. Biosynthesis of microRNA. RNA polymerase II (Pol II) primarily facilitates transcription of the miRNA gene in the nucleus. The resulting primary transcript (pri-miRNA), is then cleaved by Drosha and DGCR8, producing a precursor molecule (pre-miRNA). The pre-miRNA is transported to the cytoplasm by Exportin-5 and Ran-GTP. Here, the pre-miRNA undergoes its final processing step, which involves cleavage by Dicer and TRBP below the stem-loop. This produces a duplex molecule, which contains the single-stranded mature miRNA molecule and a miRNA* fragment. The miRNA:miRNA* complex is then incorporated into the RNA-induced silencing complex (RISC), which is activated upon unwinding of the miRNA:miRNA* duplex. The miRNA* fragment is degraded, whilst the mature miRNA molecule guides the RISC to the target mRNA.

Regulace cílových genů microRNA

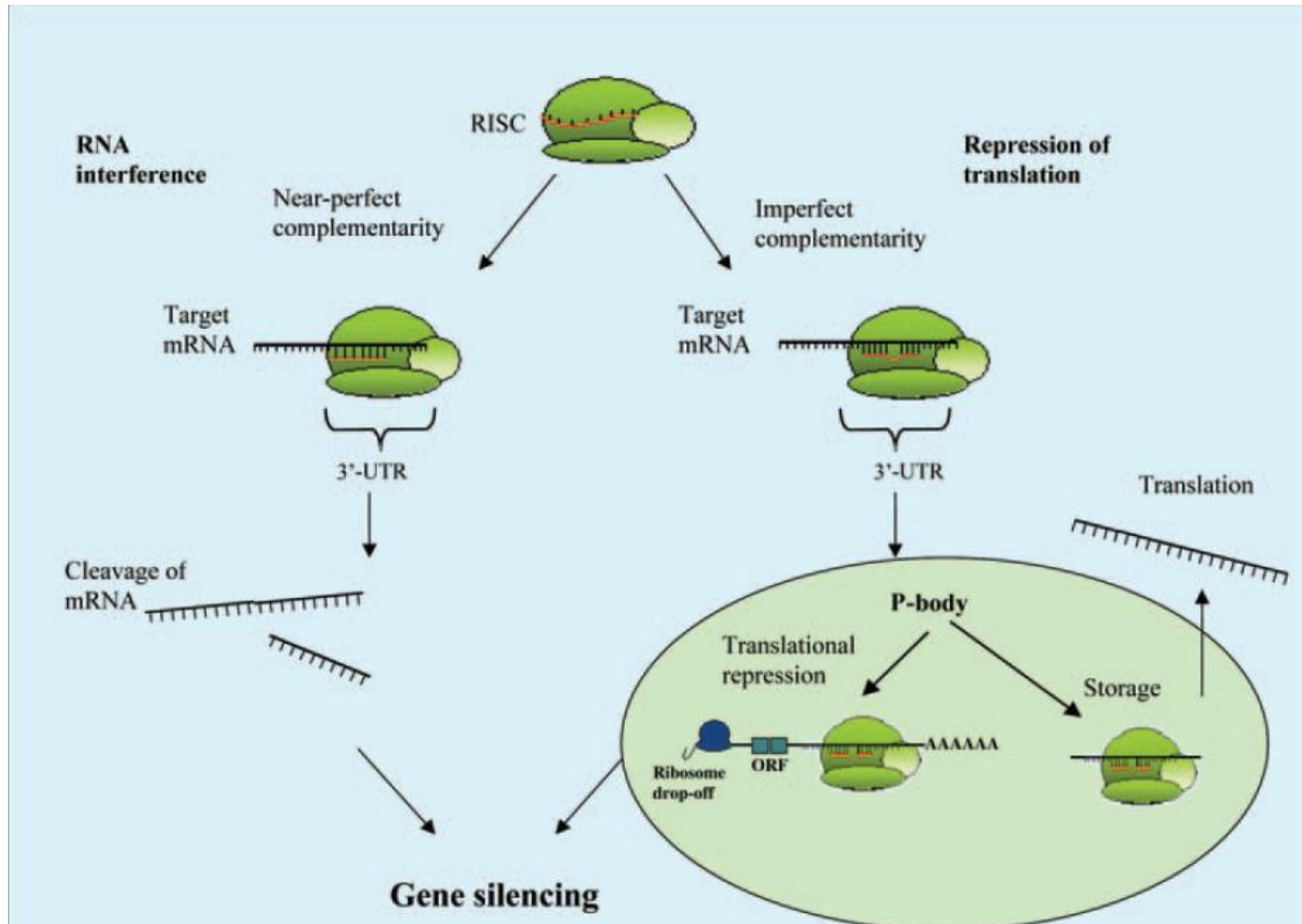


Fig. 2. microRNA regulation of target genes. The degree of complementarity between the 3'- untranslated region (UTR) of the target mRNA and the seed region of the miRNA determines the mechanism of regulation. If there is sufficient (near perfect) complementarity regulation is carried out by RNA interference. The RNA-induced silencing complex (RISC) is directed to cleave the target mRNA, and does so between the nucleotides pairing to residues 10 and 11 of the miRNA. If there is insufficient complementarity, regulation is carried out by repression of translation. This occurs pre-initiation and/or post-initiation of translation. Target mRNA can also be stored in P-bodies, and can re-enter polysomes for translation. ORF, open reading frame.

Výukovou pomůcku zpracovalo
Servisní středisko pro e-learning na MU

<http://is.muni.cz/stech/>

Technické řešení této výukové pomůcky je spolufinancováno Evropským sociálním fondem
a státním rozpočtem České republiky.



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ