

# Molekulární základy nádorového onemocnění

Protoonkogeny a Onkogeny  
Nádorově supresorové geny  
Imortalizace buněk

# Molekulární podstata nádorového bujení

Nádor vzniká ze společné buňky, ve které byl - mnohdy 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 (onkogeny a nádorově supresorové geny), 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, onkogeny, nádorové supresory

**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**.

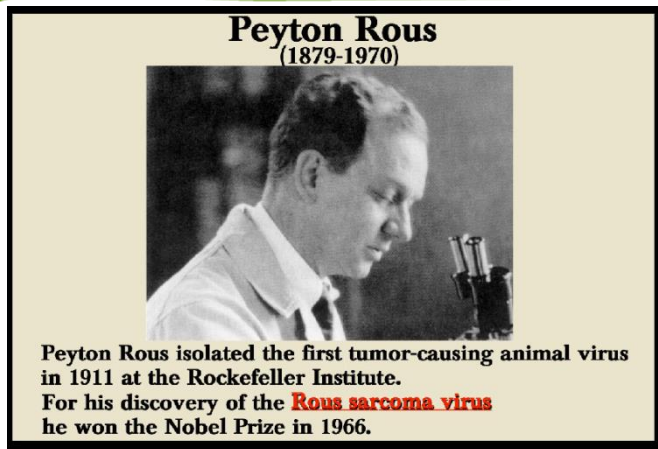
Jsou-li modifikovány, ať na strukturální nebo kontrolní úrovni, začnou se chovat jako **onkogeny a podporují vývoj nádoru**.

**Onkogeny** jsou mutované nebo aktivované protoonkogeny

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

**Nádorově supresorové geny** zabraňují abnormální buněčné proliferaci a ztráta jejich funkce podporuje růst nádorů (pRB, p53).

# Objev onkogenů, onkogenní viry



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

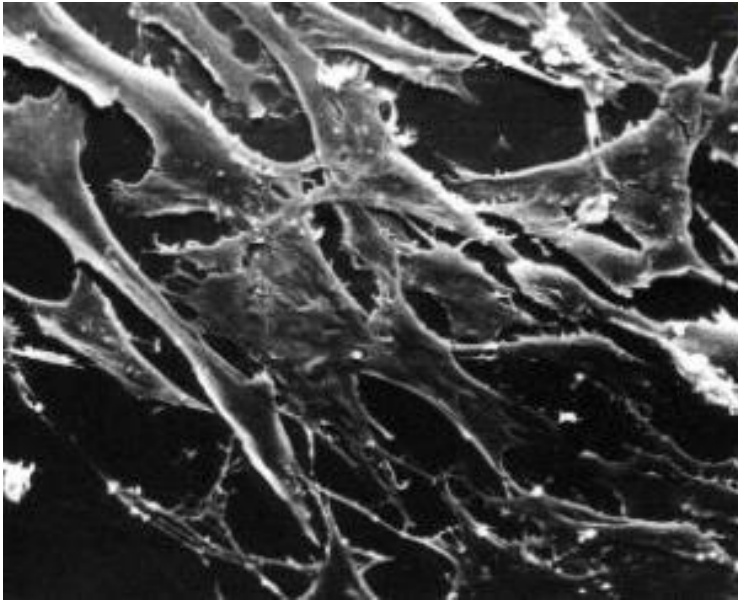
První tzv. **Onkogen s r c** (*sarcoma*) byl izolován z viru Rousova sarkomu u kuřat. Virus Rousova sarkomu patří mezi **retroviry** a má dvě rozdílné části: část kódující proteiny odpovědné za replikaci viru a část kódující **s r c** gen umožňující vznik nádorů *in vivo* u kuřat. Normální kuřecí genom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

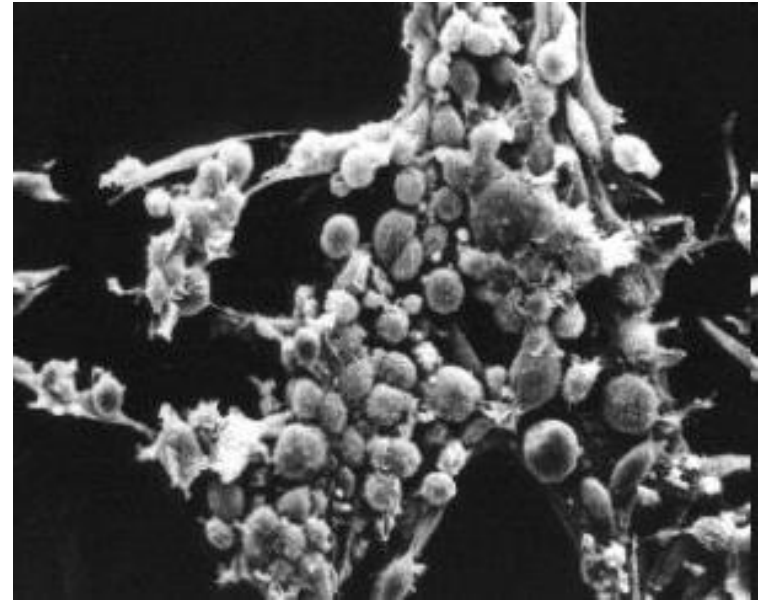
Tento normální gen, tzv. **protoonkogen** je v retroviru modifikován (aktivován) tak, že působí po přenesení do buněk nádor.

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

## Normální a transformované myší fibroblasty



buňky normální



buňky transformované virovou DNA

# Charakterizace (proto)onkogenů

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)

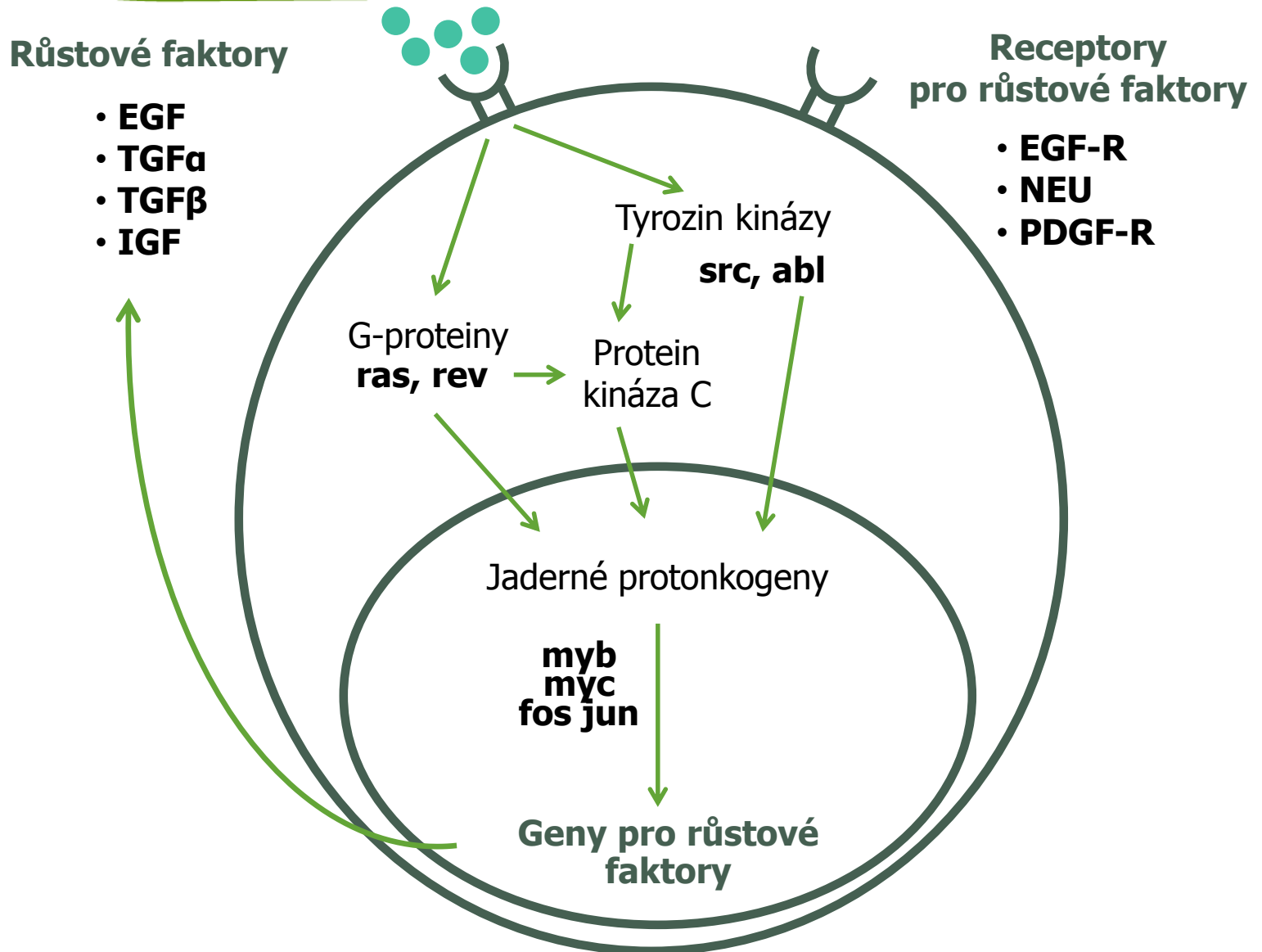
**Jaderné protoonkogeny** jako jsou c-myc, c-fos, c-jun, c-myb

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.

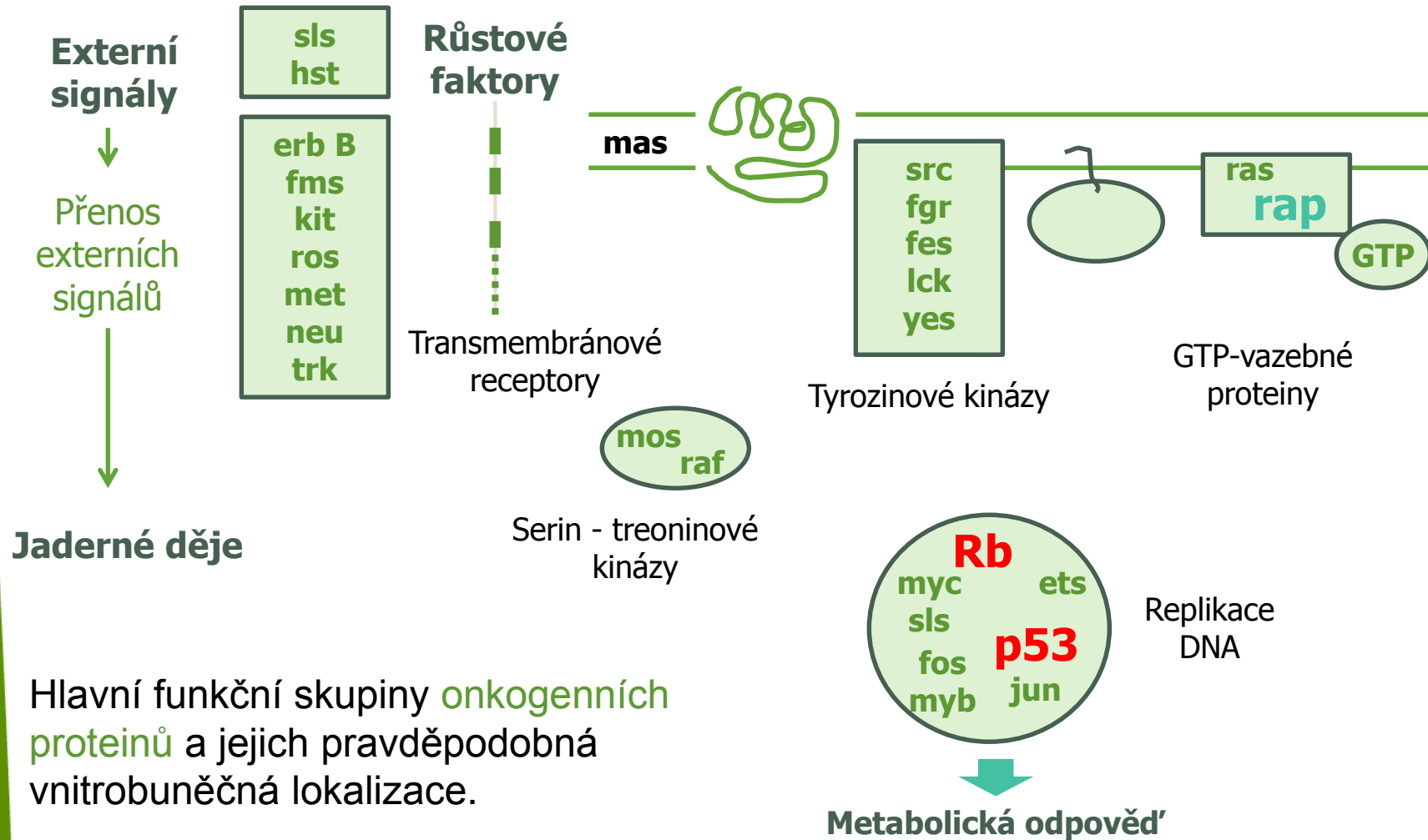
Jsou většinou **aktivovány overexpresí**, která může být **indukována různými způsoby**:

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

# Přenos signálů a růstová regulace v eukaryotických buňkách reprezentativní protoonkogeny v signálních drahách



# Onkogeny a nádorově supresorové geny



Hlavní funkční skupiny onkogenních proteinů a jejich pravděpodobná vnitrobuněčná lokalizace.

**Nádorově supresorové geny**



## Mutace podle funkce

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  $\beta$ , TNF $\alpha$ , interferon  $\gamma$ )

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

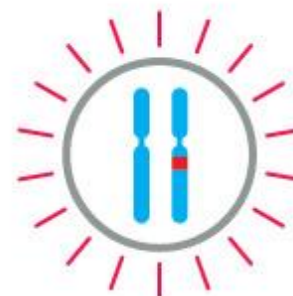
# Geny kritické pro vývoj nádorů spadají do dvou kategorií: dominantní a recesivní

(A) overactivity mutation (gain of function)



normal cell

single mutation event  
creates oncogene



activating mutation  
enables oncogene to  
stimulate cell  
proliferation

cells that  
proliferate  
abnormally

(B) underactivity mutation (loss of function)



normal cell

mutation event  
inactivates  
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

Figure 23–24. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.

# Tři způsoby aktivace a změny protoonkogenu v onkogen

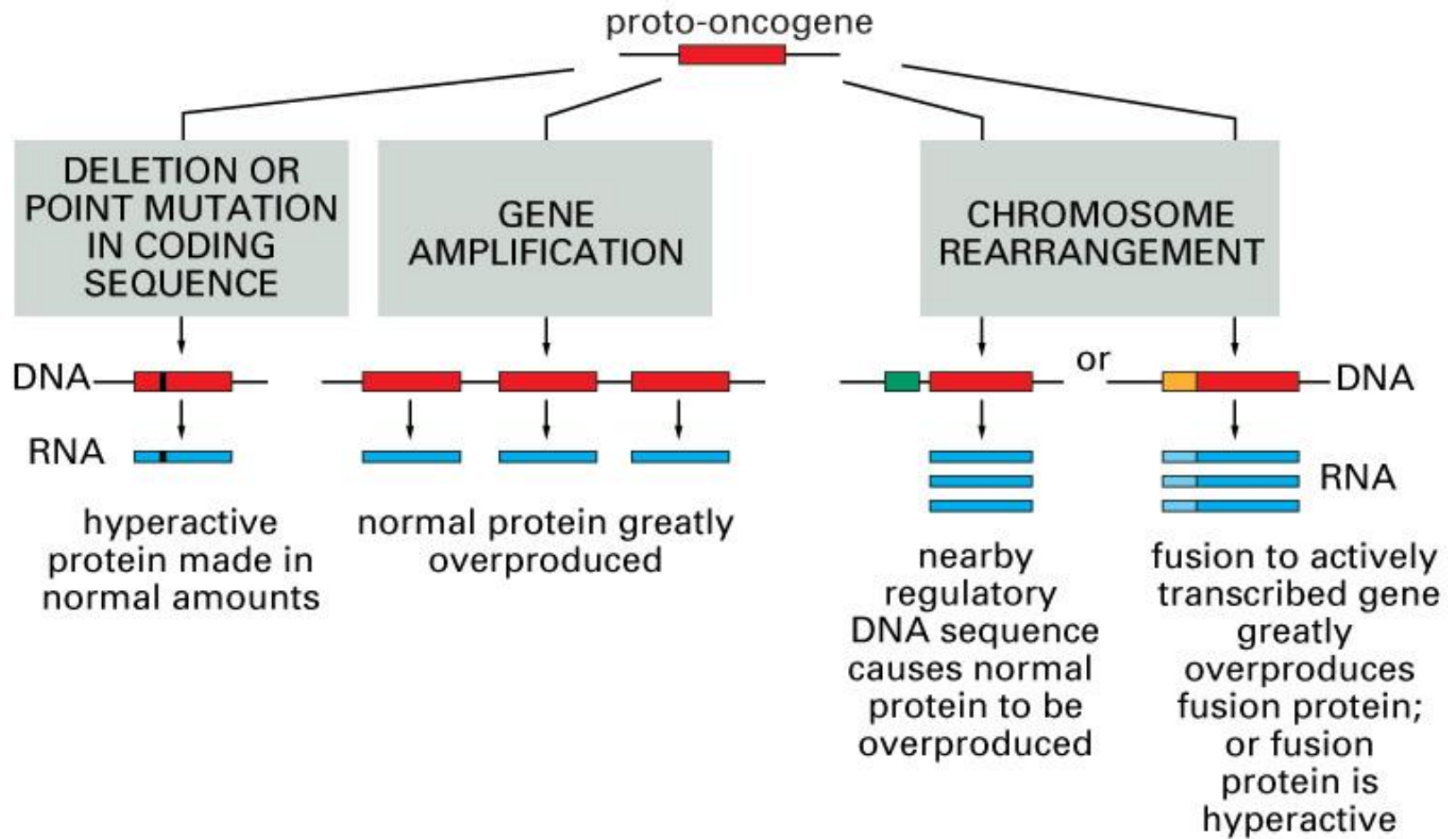
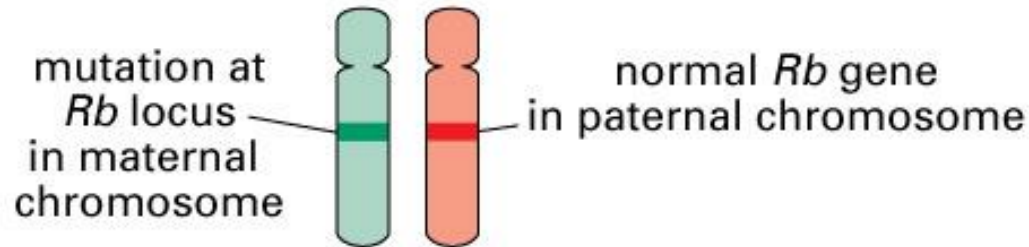


Figure 23–27. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.

# 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

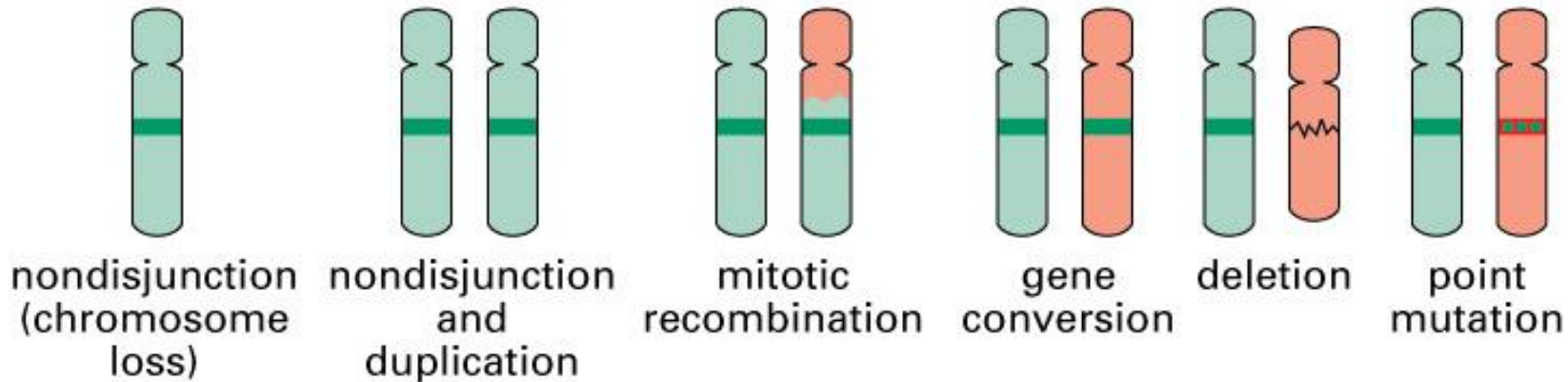


Figure 23–29. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.

## Růstová stimulace a inhibice

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 cytoplazmu až do jádra.

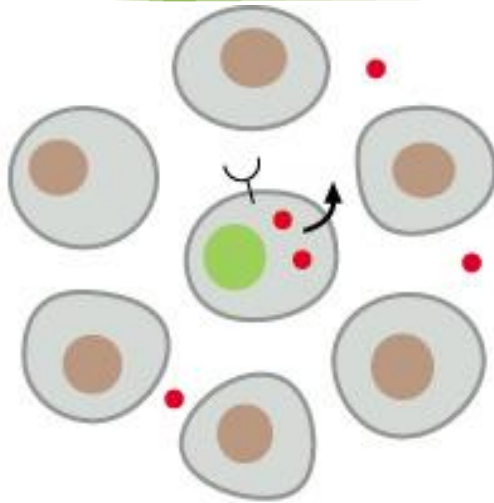
V jádře pak proteiny nazývané transkripční faktory odpovídají tím, že aktivují řadu genů, které pomáhají buňce procházet buněčným cyklem.

Podobně funguje i přenos růstově inhibičního signálu zprostředkovaného proteiny kódovanými nádorově supresorovými geny.

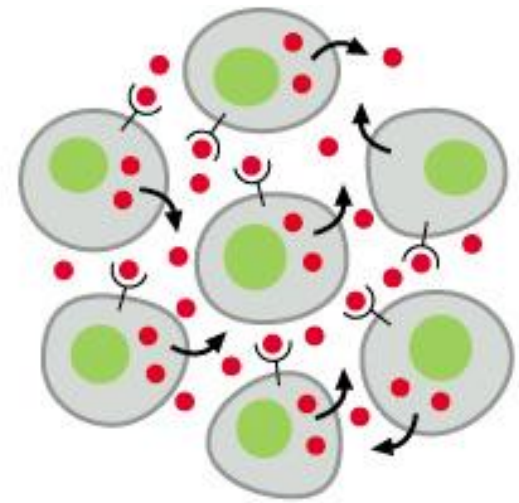
V normální buňce je rovnováha stimulačních a inhibičních signálů pečlivě regulována, protože to souvisí s regulací buněčného cyklu, který je rozhodující pro buněčnou proliferaci a diferenciaci.

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

## Autokrinní signál



Signál pouze z jedné buňky – buňka obdrží slabý autokrinní signál

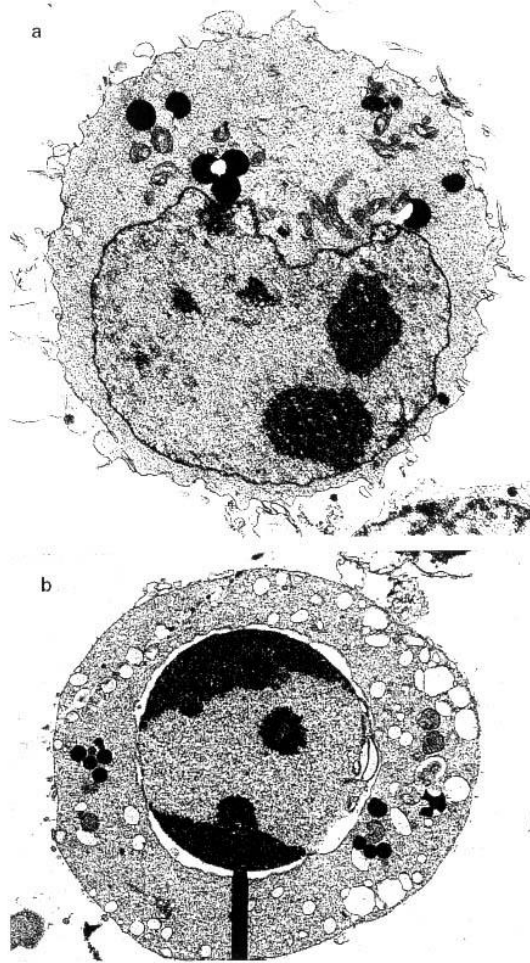


Ve skupině stejně signálujících buněk dostává každá buňka silný autokrinní signál

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.

# Zpětnovazebné mechanismy kontroly b. dělení



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**.

## Shrnutí molekulárně genetické podstaty nádorového onemocnění

- 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**



## Typy genů zásadní pro rozvoj nádorů

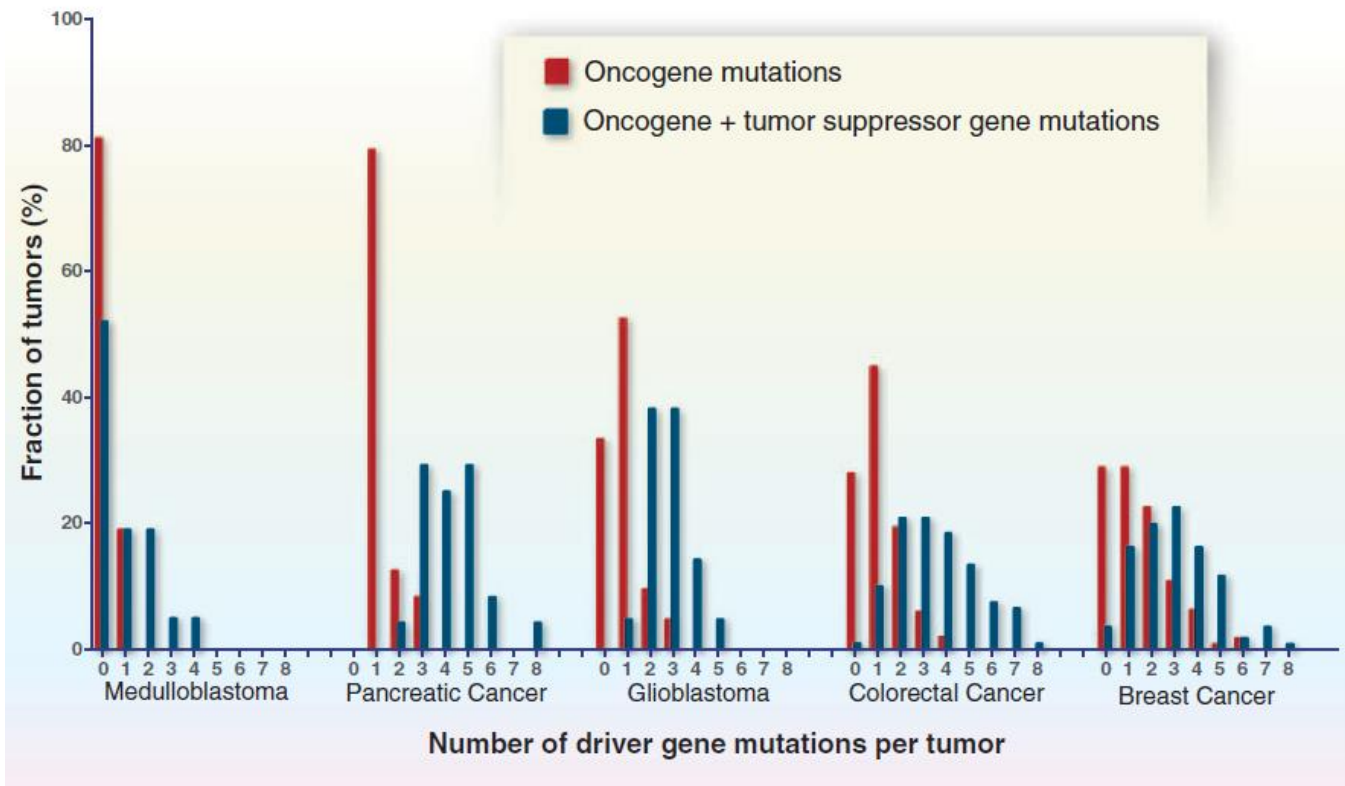
„**Gatekeepers**“ – **recesivní** geny, které **přímo** regulují (limitují) růst nádorů buď inhibicí jejich růstu nebo indukci jejich smrti.

„**Caretakers**“ - jejich inaktivace navozuje genetickou nestabilitu a ta pouze **nepřímo** indukuje růst nádorů zvyšováním mutační rychlosti.

APC, p53 - jsou zároveň „gatekeepers“ i „caretakers“

# Počet a distribuce „driver gene“ mutací

- „Driver“ versus „passanger“ genové mutace. „Driver geny“ příčinně souvisejí s rozvojem karcinogeneze (poskytují selektivní růstovou výhodu), kdežto „passanger“ geny ne a jsou pouze by-produktem genomové nestability. Jejich rozlišení genomovými analýzami je velmi důležité pro diagnostiku a terapii.



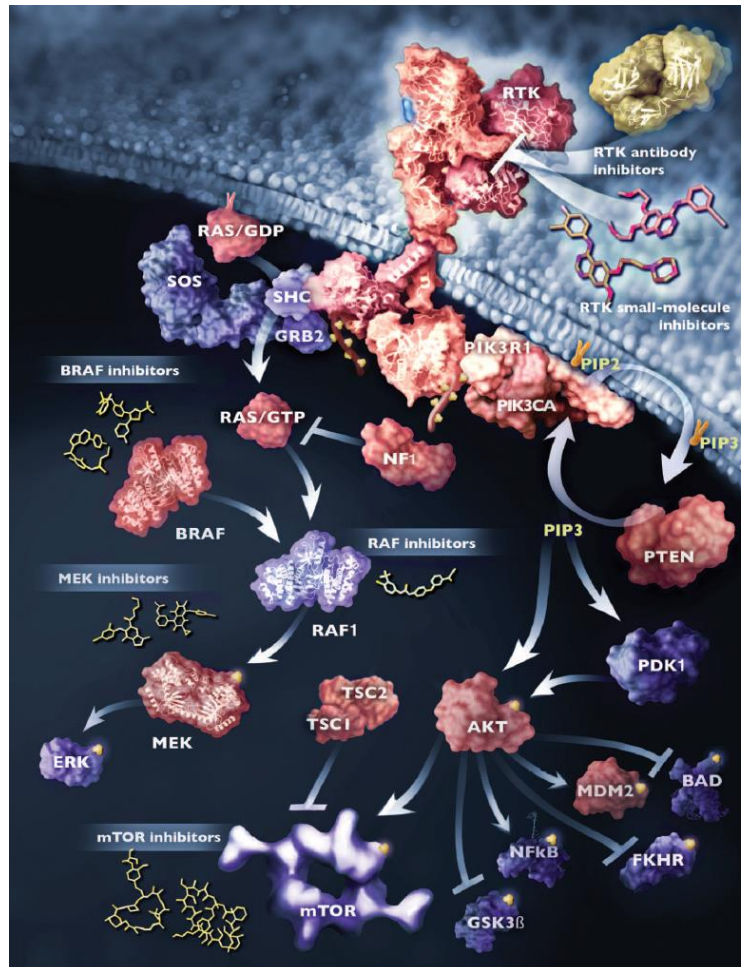
# Signální dráhy nádorových buněk a procesy, které regulují

- ▶ Driver geny mohou být klasifikovány do 1 či více z 12 drah, které přispívají k selektivní růstové výhodě a můžeme je přiřadit ke 3 základním buněčným procesům (kontrola a udržení genomu, buněčné přežití a osud buněk).



# Dráhy signální transdukce ovlivňované mutacemi u nádorových buněk

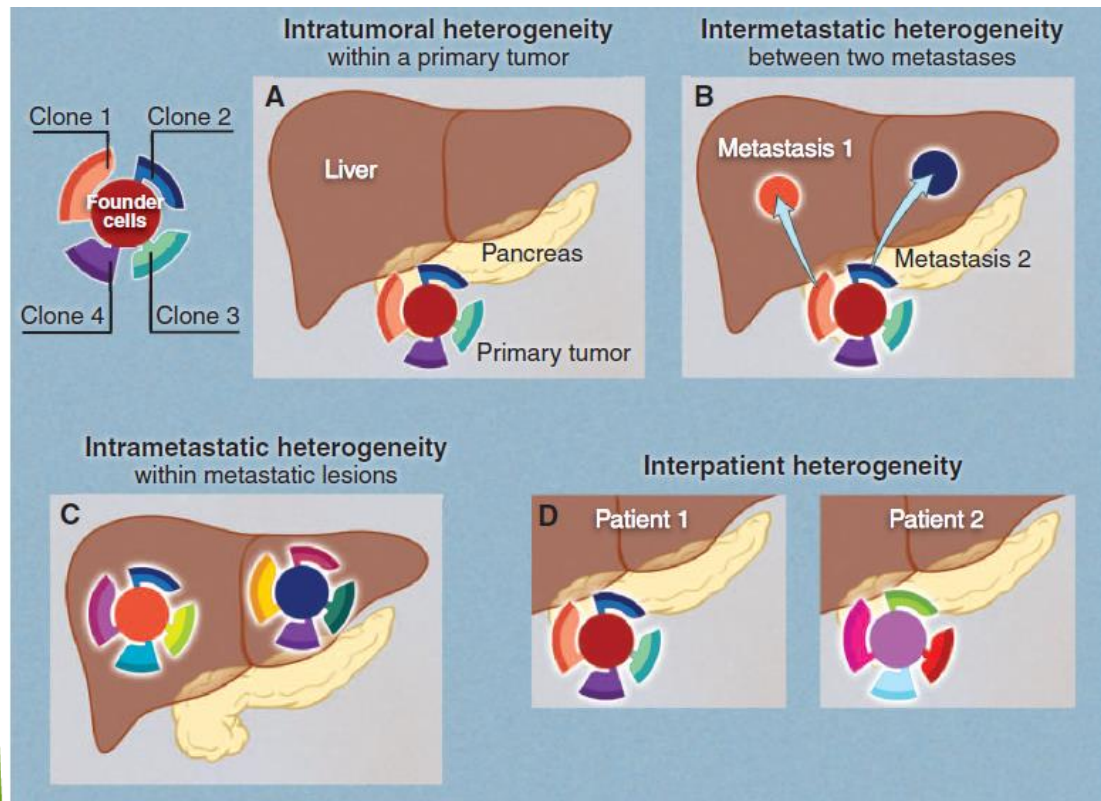
- ▶ Dvě reprezentativní dráhy (RAS a PI3K) – proteinové složky kódované driver geny – červeně, místa fosforylace – žlutě. Znázorněny terapeutické látky zasahující některé signální složky.



RTK – receptorové tyrosin kinázy, GDP – guanosin difosfát, MEK – MAPK kináza, ERK – extracellular signal regulated kinase, NFkB – nukleární faktor kB, mTOR – mammalian target of rapamycin

## 4 typy genetické heterogenity nádorů

Primární nádor pankreatu a jeho metastázy v játrech



Mutace primárního nádoru vytváří **klonální heterogenitu** (základní mutace a 4 subklony).

- A) **Intratumorální heterogenita** – mezi buňkami prim. nádoru
- B) **Intermetastatická heterogenita** – mezi různými metastázami téhož pacienta
- C) **Intrametastatická heterogenita** – mezi buňkami každé rostoucí metastázy
- D) **Heterogenita mezi nádory** různých pacientů. Mutace v základní buňce nádoru jsou zcela odlišné.

## „Oncogene addiction“

Nádorové buňky obsahují mnohonásobné genetické a epigenetické abnormality. Přesto je mnohdy jejich růst a přežití narušeno inaktivací jednoho či několika málo onkogenů (**oncogene addiction**). Identifikace této „Achilovy paty“ u specifických nádorů je základem **cílené molekulární terapie** (např. aktivace c-myc u hemopoetických buněk vede k T-buněčné či myeloidní leukémii).

Mnohastupňový proces karcinogeneze není jen prostým součtem účinků aktivace mnoha onkogenů a inaktivace mnoha nádorových supresorů. Proteiny kódované těmito geny hrají často **mnohonásobnou úlohu ve složitých a interagujících sítích signálové transdukce** v buňkách.

**Terapeutická účinnost léků zasahujících specifické onkogeny:**

Trastuzumab (Herceptin) – protilátka proti receptorové tyrosin kináze HER-2/NEU u pacientů s nádory prsu

Imatinib – proti bcl-abl onkogenu u CML

Gefitinib a erlotinib – proti receptoru pro EGF u nádorů plic (NSCLC), pankreatu a glioblastomu.

**Koncept syntetické letality** – při mutaci jednoho ze 2 genů buňka přežívá, ale mutace v obou genech způsobí buněčnou smrt.

# Příklady z exp. a klinických studií

**Table 1.** Oncogene addiction: studies in mice, studies in human cancer cell lines, and clinical evidence

Studies in mice\*

Targeted oncogene	Cancer type
c-myc	T cell and acute myeloid Leukemia
Bcr-Abl	Leukemia
H-ras	Melanoma
K-ras	Lung
c-myc	Pancreatic $\beta$ -cell
c-myc	Osteogenic sarcoma
Her-2/neu	Breast
c-myc	Breast
Wnt-1	Breast

Studies in human cancer cell lines<sup>†</sup>

Targeted oncogene	Cancer cell line
Her-2	Breast
Cyclin D1	Esophagus, colon, pancreatic, squamous, nasopharyngeal
K-ras <sup>mut</sup>	Pancreatic
K-rasv <sup>12</sup>	Pancreatic
$\beta$ -Catenin	Colon
Cyclin E	Liver
Mutant $\beta$ -Raf	Melanoma
MTF	Melanoma

Clinical evidence

Targeted oncogene (s)	Disease	Agent ‡
HER-2	Breast <sup>§,  </sup>	Trastuzumab (combination)
BCR/ABL	Chronic myeloid leukemia <sup>§</sup>	Imatinib (monotherapy)
C-KIT	Gastrointestinal stromal tumor <sup>§</sup>	Imatinib (monotherapy)
EGFR	NSCLC <sup>§</sup>	Gefitinib, erlotinib <sup>§</sup> (monotherapy)
EGFR	Head and neck, colorectal <sup>§</sup>	Cetuximab (combination)
EGFR	Pancreas <sup>§</sup>	Erlotinib (combination)
VEGF	Breast, colorectal <sup>§,  </sup> , kidney	Bevacizumab (combination)
VEGFR, RAF	Kidney <sup>§</sup>	Sorafenib (monotherapy)

NOTE: For specific references and further details, see ref. 6.

\*Switching off the indicated oncogene led to growth inhibition, differentiation, apoptosis and/or tumor regression.

<sup>†</sup> Treatment of these cell lines with an antisense oligonucleotide or a RNAi directed to the respective oncogene caused growth inhibition, and in some cases, decreased tumorigenicity and increased chemosensitivity.

<sup>‡</sup> Treatment regimen indicates agent alone (monotherapy) or in combination with cytotoxic agents (combination).

<sup>§</sup> Food and Drug Administration–approved.

<sup>||</sup> Phase III evidence shows improved disease-free or overall survival rates.

# Možné důsledky inaktivace onkogenu

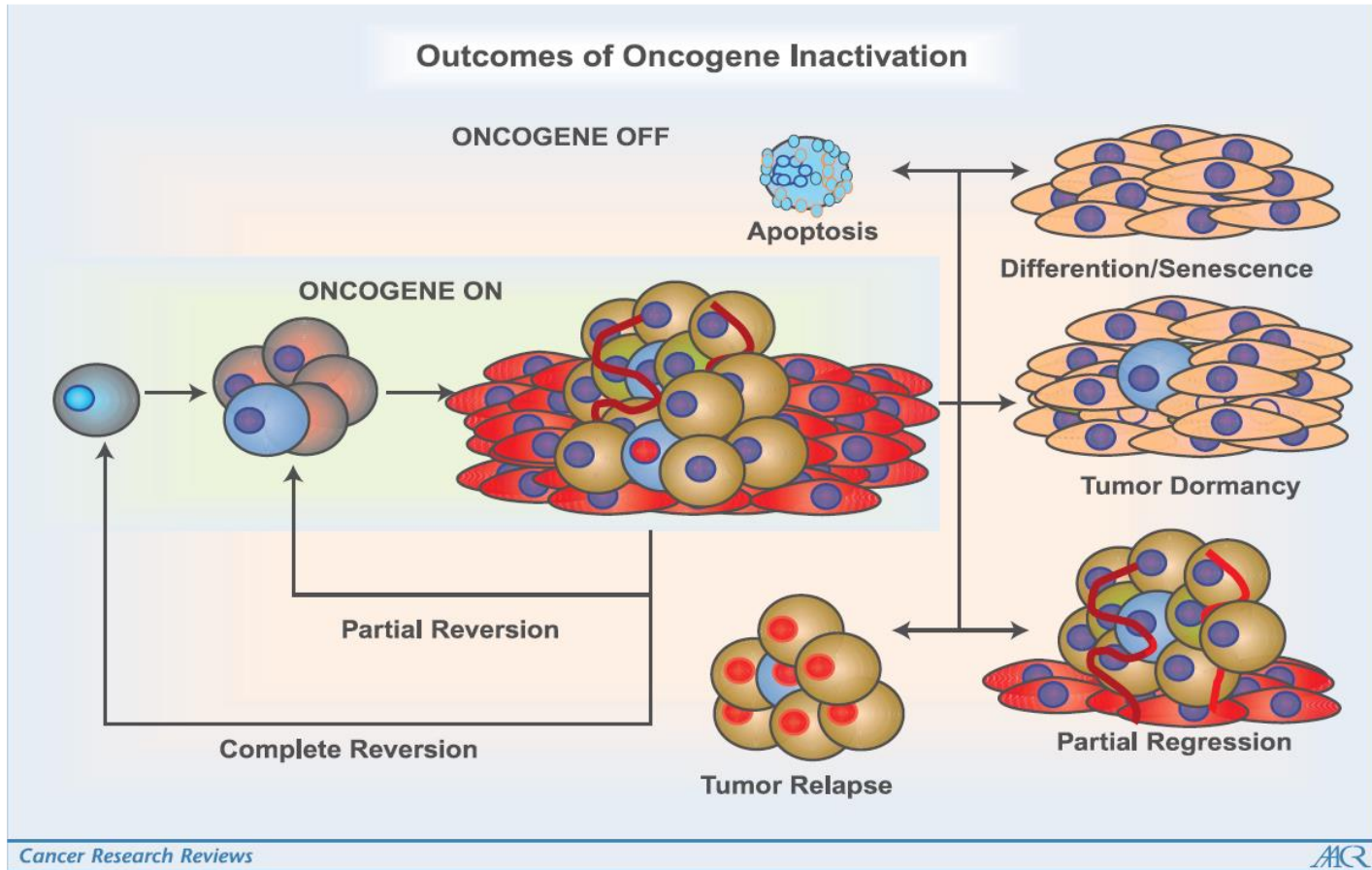


Figure 1. Many possible outcomes to oncogene inactivation: no effect, complete, or partial tumor reversion. Tumor death, dormancy, differentiation, or relapse.



# Důsledek inaktivace onkogenu u specifických nádorů

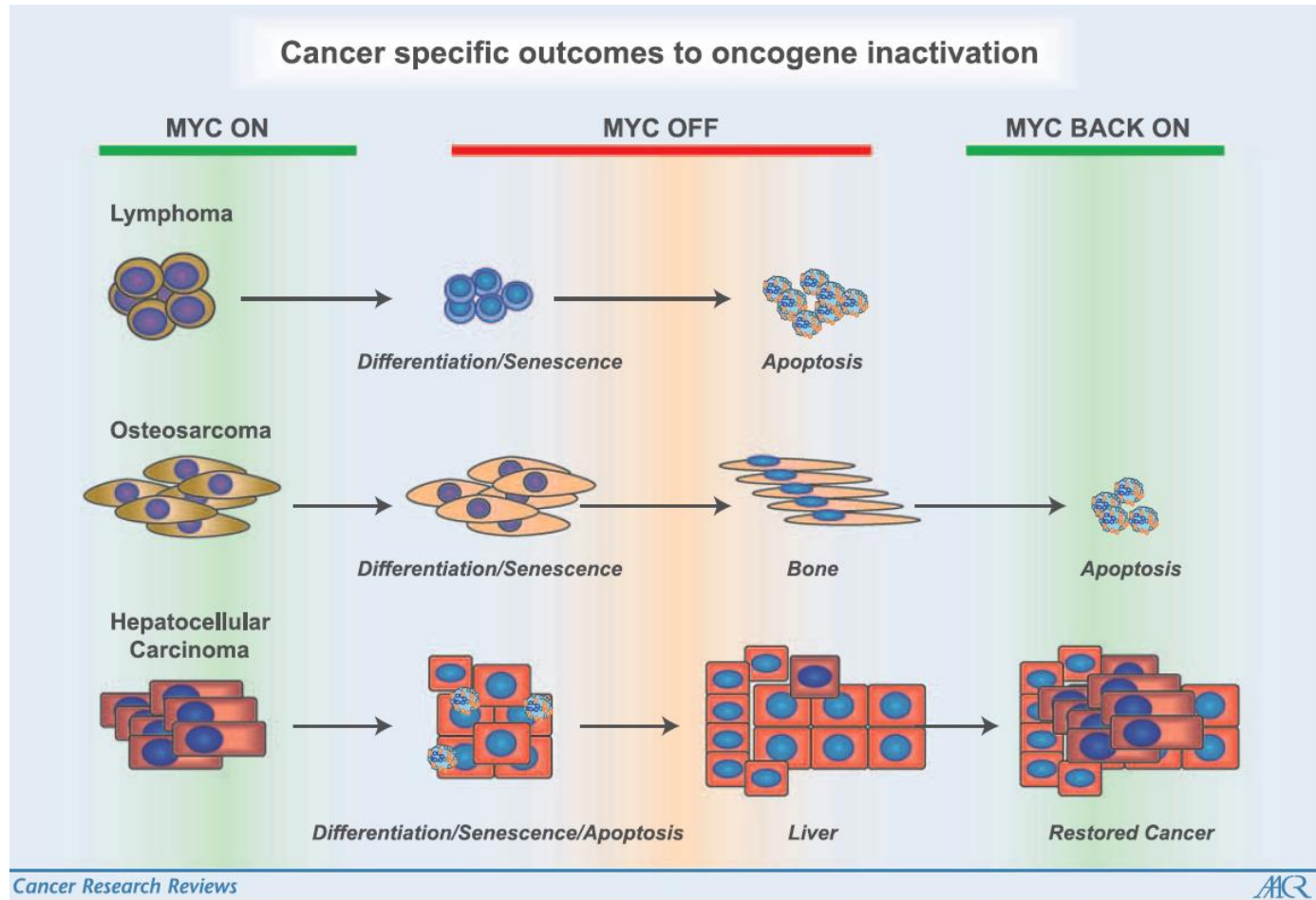


Figure 2. Oncogene inactivation has been observed to have different outcomes in different types of tumors including proliferative arrest, differentiation, apoptosis, and/or cellular senescence. Although the consequences are different for each type of tumor, cellular senescence seems to be a convergent common mechanism.

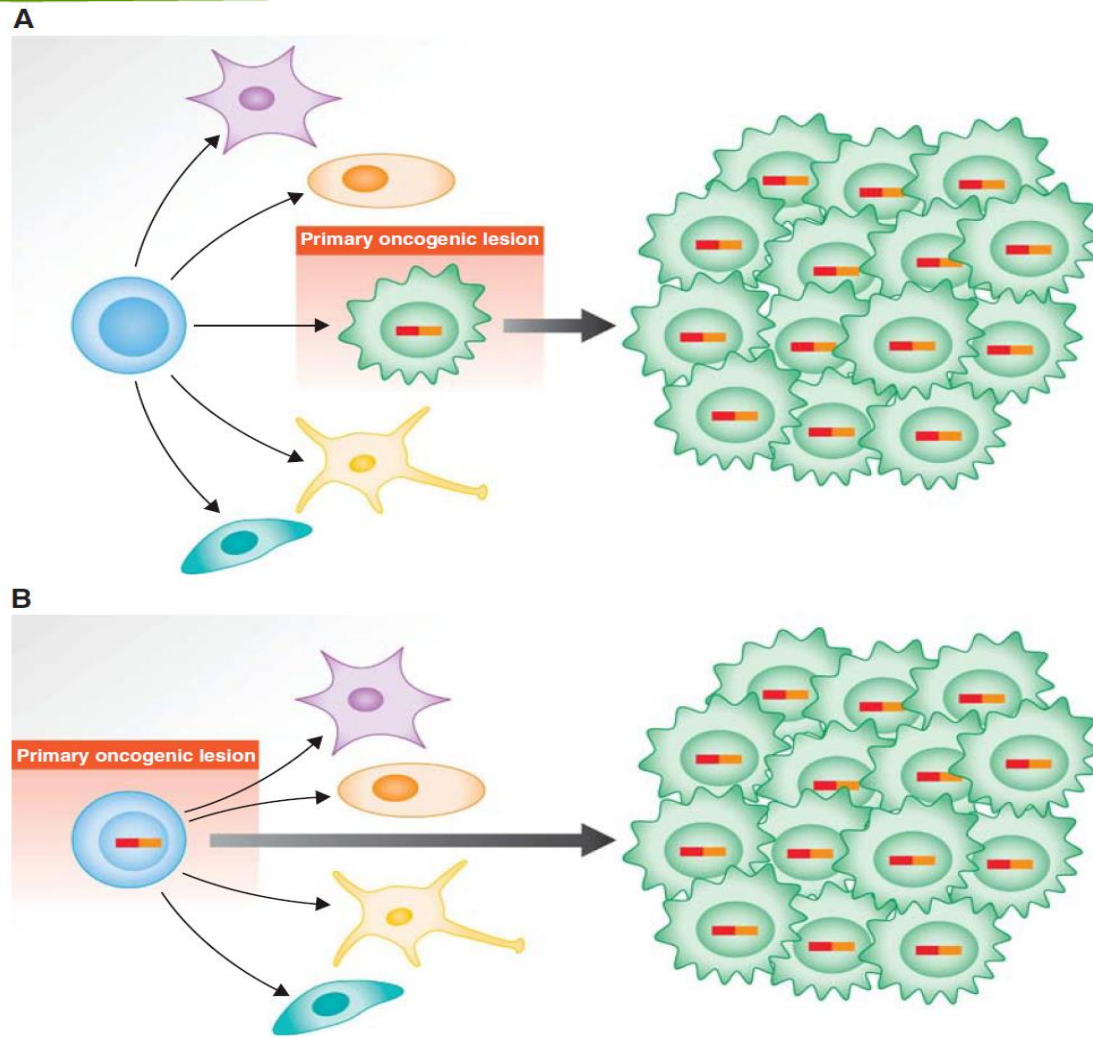
## Souhrn

- Většina lidských nádorů je způsobena 2-8 postupnými změnami , které se vyvíjejí v průběhu 20-30 let
- Každá z těchto změn přímo nebo nepřímo zvyšuje poměr mezi buněčným dělením a smrtí, tj. každá změna způsobuje selektivní růstovou výhodu v dané buňce
- Předpokládá se, že existuje asi 140 genů, jejichž mutace přispívají k vývoji nádorů (tzv. Mut-driver genes). Jsou pravděpodobně další geny (Epi-driver genes), které jsou změněny epigenetickými mechanismy a způsobují selektivní růstovou výhodu
- Známé driver geny fungují přes desítky signálních drah, které regulují 3 zásadní buněčné procesy: určení osudu buňky, buněčné přežití a udržení genomu
- Každý individuální nádor (dokonce stejného histopatologického subtypu) se liší s ohledem na své genetické změny, ale dráhy ovlivněné v různých nádorech jsou podobné
- Genetická heterogenita mezi buňkami jednotlivých nádorů vždy existuje a ovlivňuje odpověď na terapii
- V budoucnosti by příslušný plán terapie pro nádorového pacienta měl vycházet z odhadu složek jeho základního genomu a genomu jeho nádoru
- Informace ze studia nádorového genomu mohou také pomoci zlepšit metody pro prevenci a brzkou detekci nádorů, což je základní pro snížení úmrtnosti

## Doplňující články ke studiu

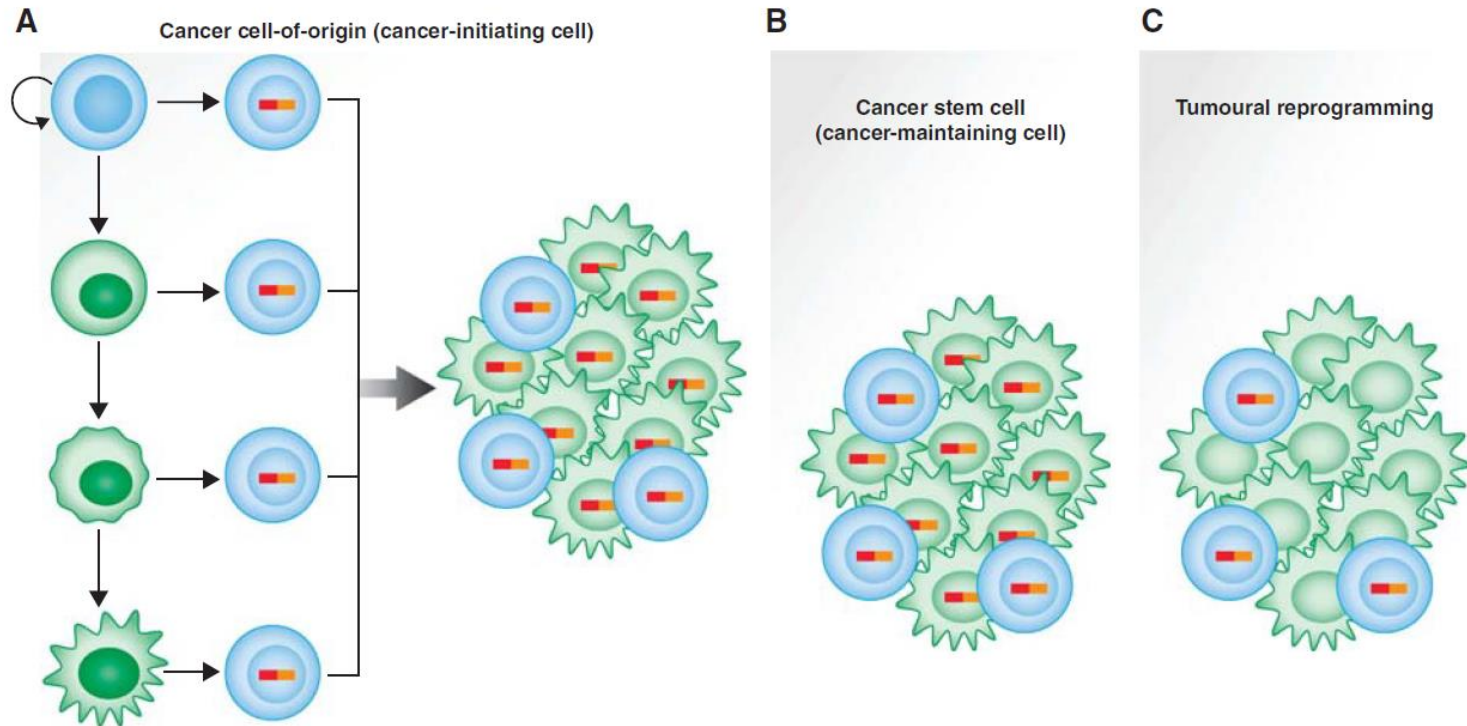
- ▶ Weinstein IB, Joe A., Oncogene addiction, Cancer Research 2008, 9, p. 3077
- ▶ Felsher DW, Oncogene addiction versus oncogene amnesia: perhaps more than just a bad habit? Cancer Research 2008 9, p. 3081
- ▶ Bodmer W., Genetic instability is not required for tumor development, Cancer Research 2008 10 p. 3558
- ▶ Loeb LA et al. Cancers exhibit a mutator phenotype: Clinical implications, Cancer Research 2008 10, p.3551
  
- ▶ Vicente-Dueñas C et al., EMBO J 2013, 32, 1502-1513 Function of oncogenes in cancer development: a changing paradigm
  
- ▶ a další

## Model úlohy genových defektů ve specifikaci osudu nádorových buněk



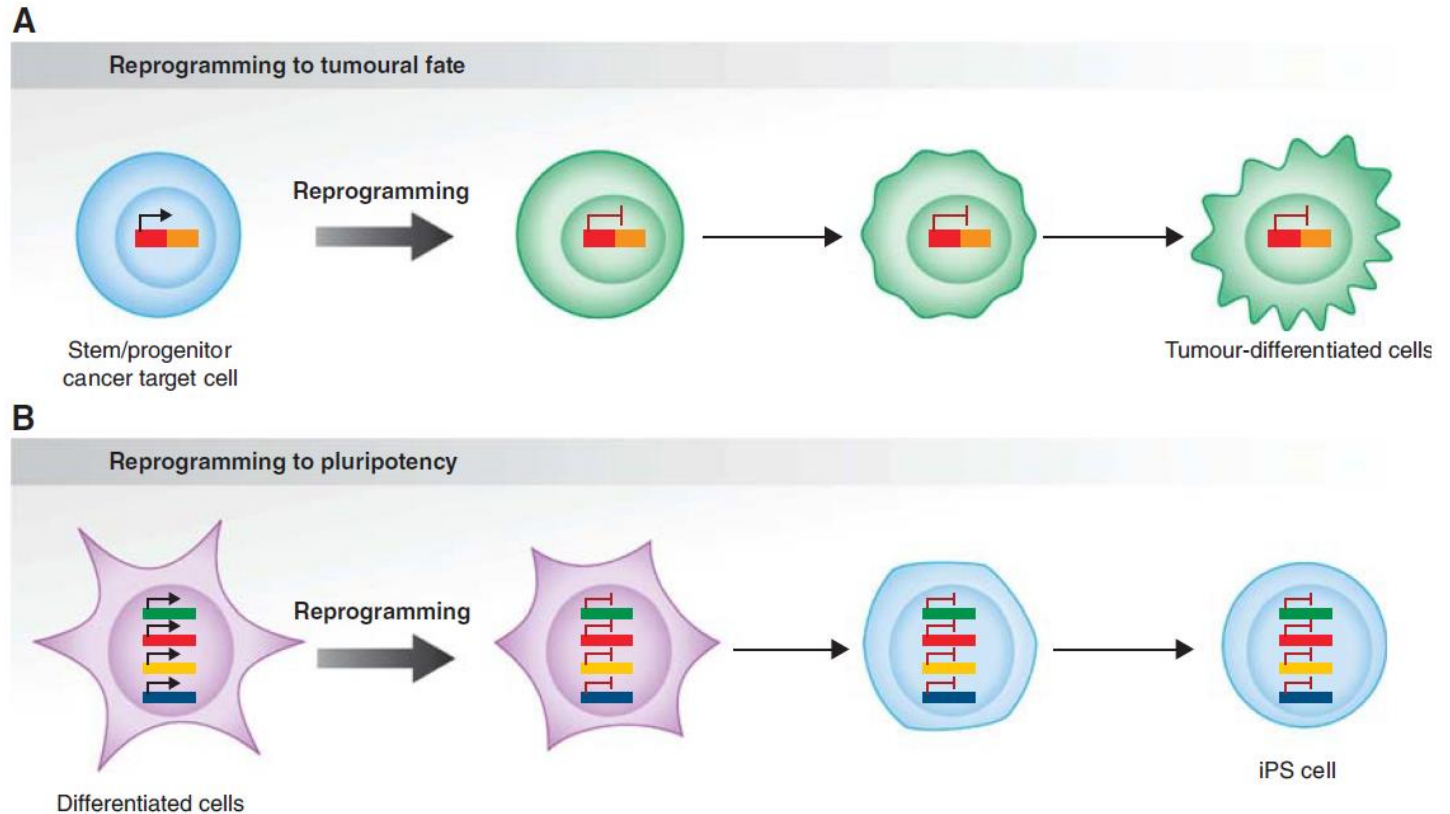
**Figure 2** Proposed model for the role of human cancer gene defects in tumour cell fate specification. (A) Traditionally, the human cancer genetic defects have been thought to act on cells already committed to a differentiation program, in such a way that the tumoural phenotype is derived from that of the initial differentiated target cell. (B) Alternatively, the latest findings support a view in which the oncogenic lesion acts on stem/progenitor cells by imposing a given, oncogene-specific, tumour-differentiated cell fate.

# Vývojová biologie nádorové buňky



**Figure 3** Developmental biology of cancer cells. (A) Cancer cell-of-origin (or cancer-initiating cell): the cell where the first genetic lesion linked to the development of the tumour takes place. It might be located anywhere within the physiological differentiation pathway. It does not need to have any phenotypic relationship with the final phenotype of the tumour cells (either stem or differentiated). (B) CSC (cancer-maintaining cell): those cells that have the capacity to regenerate all the cellular diversity of the tumour. They retain broad self-renewal potential and differentiation potential. They arise initially from the cancer cell-of-origin, and then they can self-propagate. (C) Tumoural reprogramming: the process by which the initial oncogenic lesion(s) can ‘reset’ the epigenetic and/or transcriptome status of an initially healthy cell (the cancer cell-of-origin), therefore establishing a new, pathological differentiation program ultimately leading to cancer development, where the oncogenic lesion(s) does not need to be present anymore once the initial cancer fate-inducing change has taken place.

# Reprogramování kmenové buňky vs. reprogramování k pluripotenci



**Figure 4** Tumour stem cell reprogramming versus reprogramming to pluripotency. (A) Recent *in vivo* genetic evidences have shown that human oncogenes are capable of reprogramming early stem/precursor cells towards specific differentiated tumour cell fates, but they are not required afterwards, within the malignant cells. (B) ‘Hit-and-run’ reprogramming has grounding in other contexts outside of cancer, such as during induced pluripotent stem (iPS) cell formation *in vitro*. However, unlike the tumour stem cell reprogramming, the iPS process initiates in a differentiated cell (see text for details).

# Kontrolní otázky k tématu

- Co jsou to protoonkogeny a jak z nich vznikají onkogeny?
- Jak fungují nádorově supresorové geny a jak mohou být inaktivovány?
- Jaké odvětví výzkumu přispělo k objevu onkogenů?
- Co jsou to retroviry?
- Dle jakých kritérií dělíme (proto)onkogeny?
- Jaká je funkce jaderných (proto)onkogenů, uveďte příklady?
- Jakými mechanismy mohou být protoonkogeny aktivovány na onkogeny?
- Jaké základní mutace protoonkogenů rozeznáváme a co je jejich výsledkem?
- Jakým způsobem může dojít ke ztrátě funkce nádorově supresorového genu?
- Dvě základní kategorie genů zásadních pro rozvoj nádorů
- Čím se vyznačují tzv. „driver“ geny a jejich mutace a jak fungují?
- Co chápeme pod pojmem „oncogene addiction“ a jaké je využití poznatků o takových onkogenech?
- V čem spočívá klonální heterogenita nádorů?
- Jaké jsou v souhrnu hlavní poznatky o molekulárně genetické podstatě nádorového onemocnění?

# Imortalizace buněk

**je nedílnou součástí karcinogeneze a zajišťuje neomezenou proliferaci buněk.**

Existuje obranný **vestavěný buněčný** mechanismus proti neustálé proliferaci, který **sčítá a limituje celkový počet dělení buňky.**

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

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.

Imortalizace zahrnuje také **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.



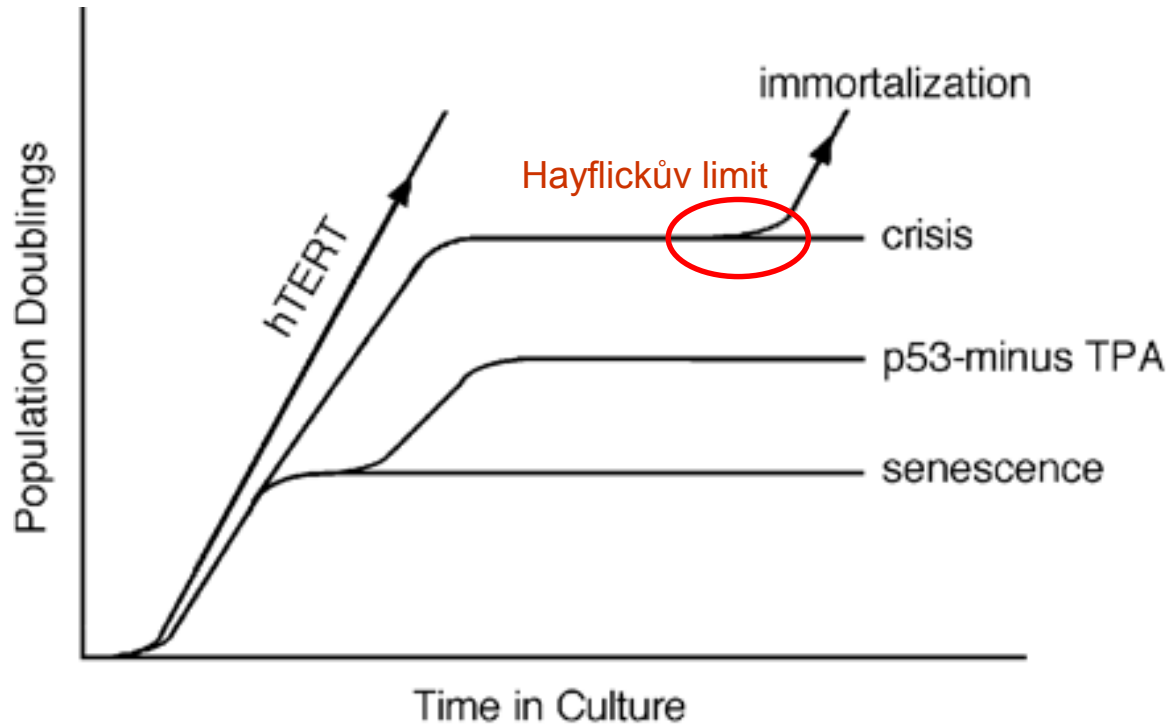
# Telomery

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 závislémi i nezávislémi na p53.

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

# 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.

## Heterogenita 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.

## Proces imortalizace buněk

**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.

# Telomeráza

Telomery nejsou udržovány normálním replikačním procesem. U kmenových, nádorových a imortalizovaných buněk, je zkracování telomer zastaveno aktivací

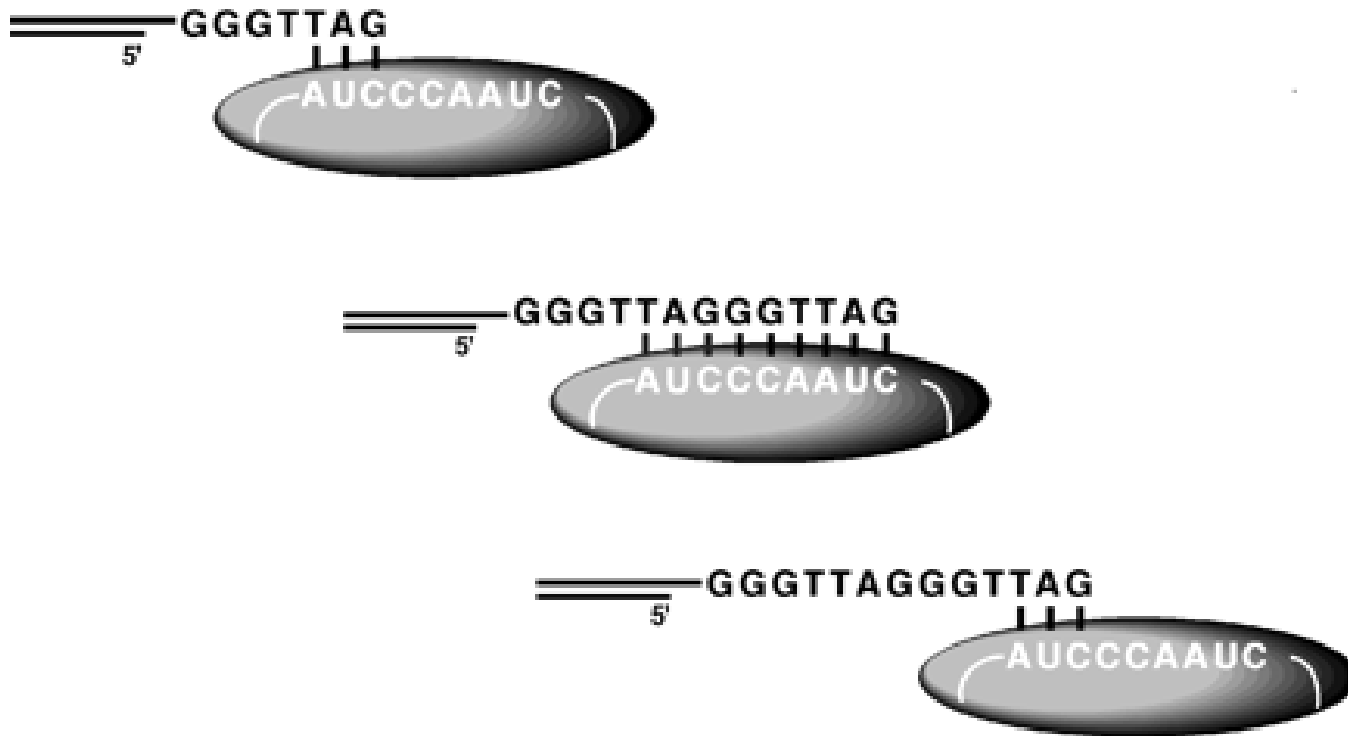
**Telomerázy - reverzní transkriptázy**, která rozšiřuje telomerické TTAGGG opakované sekvence.

### 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**

## Změny telomerázové exprese a aktivace

- ➔ Telomeráza je vysoce exprimována ve většině nádorů a kmenových buněk, středně v hyperplastických 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 telomerázovou aktivitu

➔ snižuje

např. diferenciační činidla, epigallocatechin gallate (z čaje), antineoplastické látky - cisplatina, doxorubicin, protein fosfatáza 2, MAPK, tamoxifen, androgeny, volné radikály, inhibitory reverz. transkriptázy

nebo

➔ zvyšuje

např. chemické karcinogeny, mutace telomerických sekvencí, gamma záření, PKC, EGF, estrogeny



# 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.

Systém 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.

## Význam poznatků - telomery a telomeráza

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 telomery 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 diferenciačním 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 ke chromozomální nestabilitě a vzniku nádoru

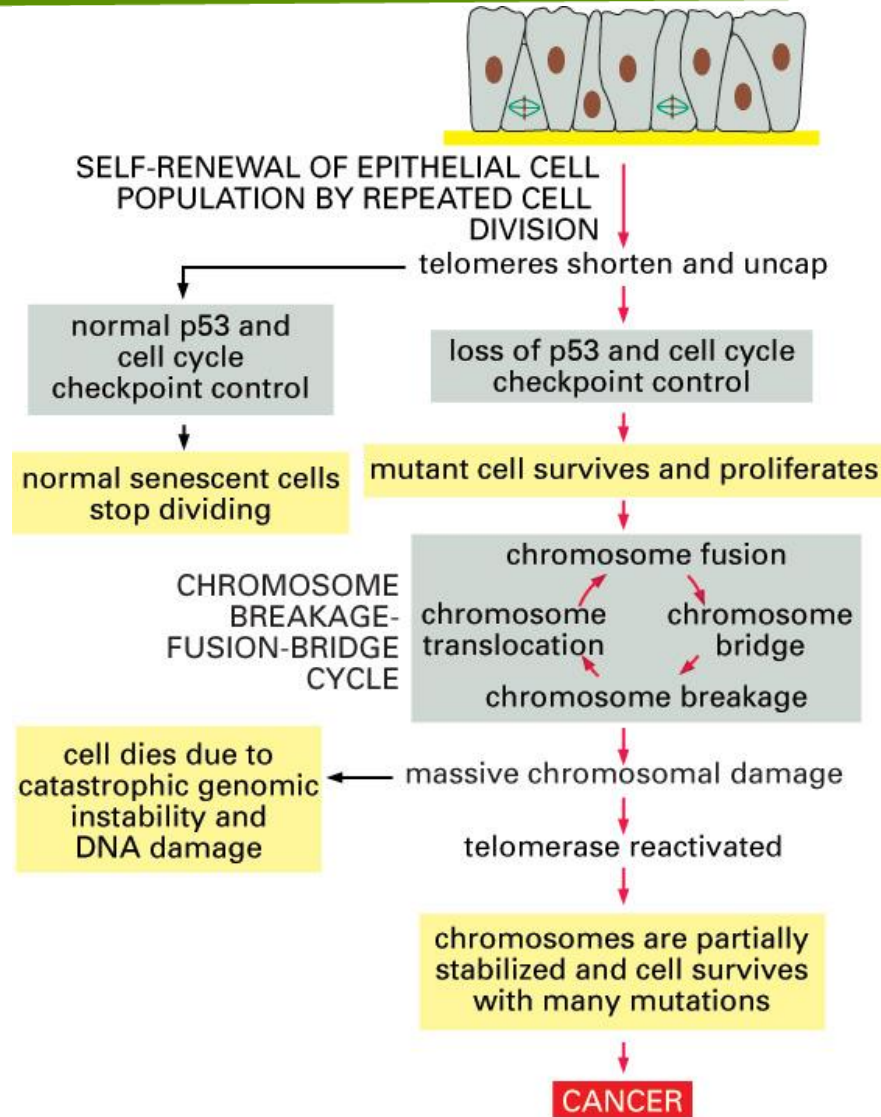
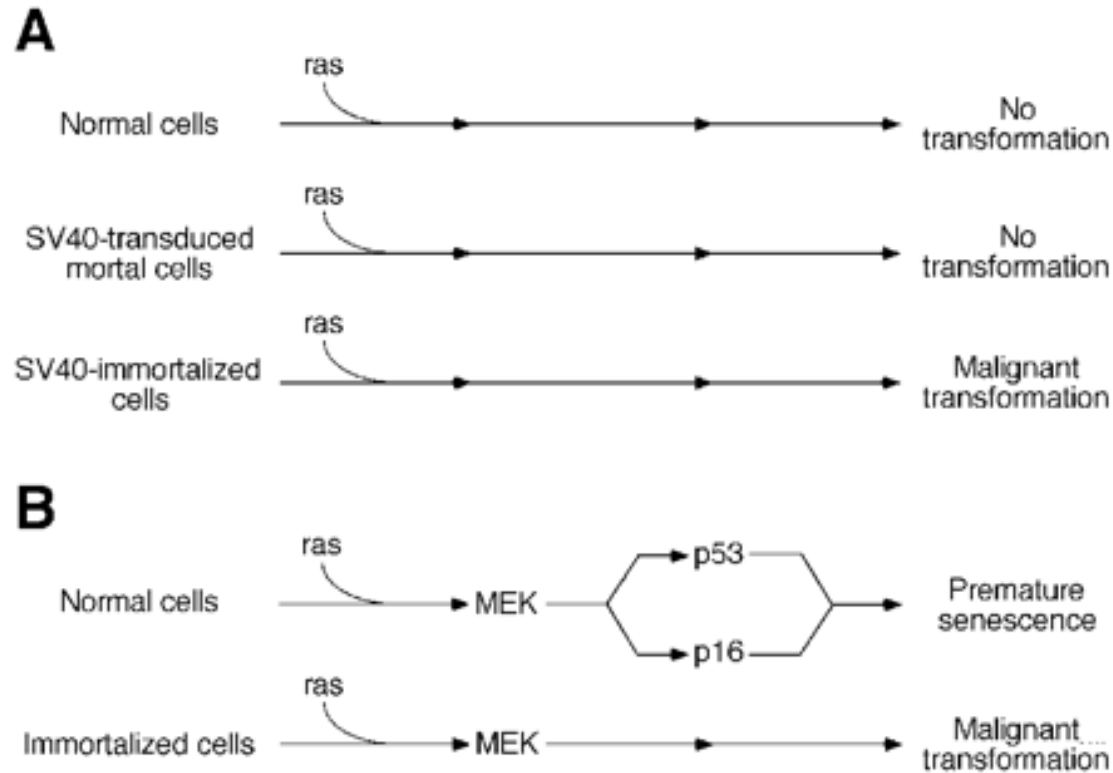


Figure 23–36. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.

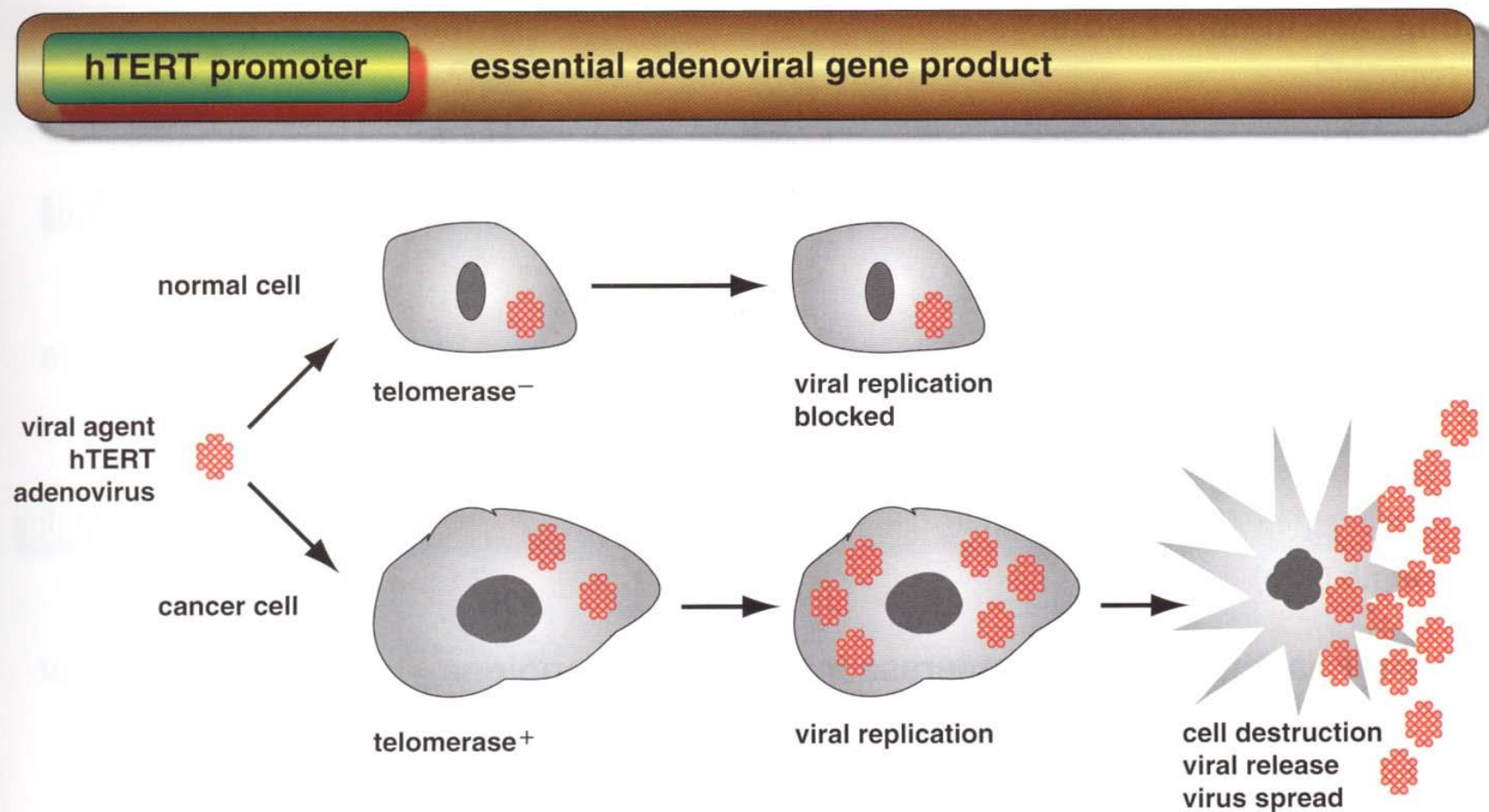
# Imortalizace je nutná, ale ne dostačující pro maligní transformaci



**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.

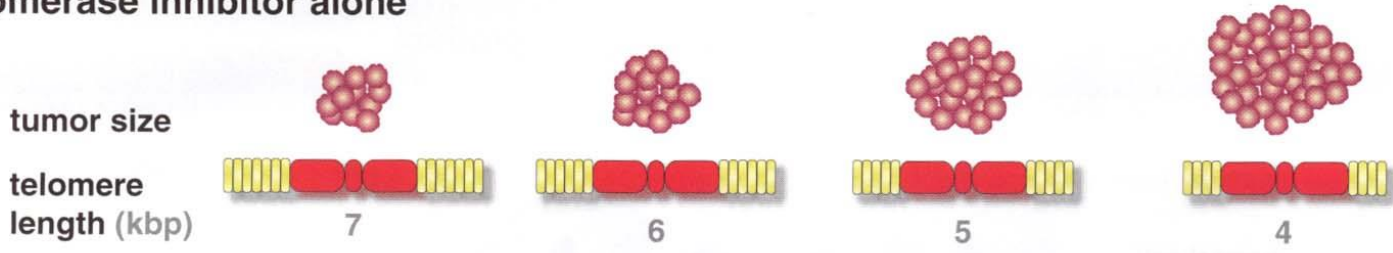
**(B)** Myší fibroblasty transdukované aktivovaným proteinem *ras* získávají konstitutivně aktivní signální dráhu MEK. U imortalizovaných buněk to může vyústit v maligní transformaci, kdežto u normálních buněk dochází k upregulaci p53 a p16<sup>INK4a</sup> a předčasnému stárnutí (premature senescence).

# Adenovirová terapie využívající promotoru pro telomerázu selektivně usmrcuje nádorové buňky

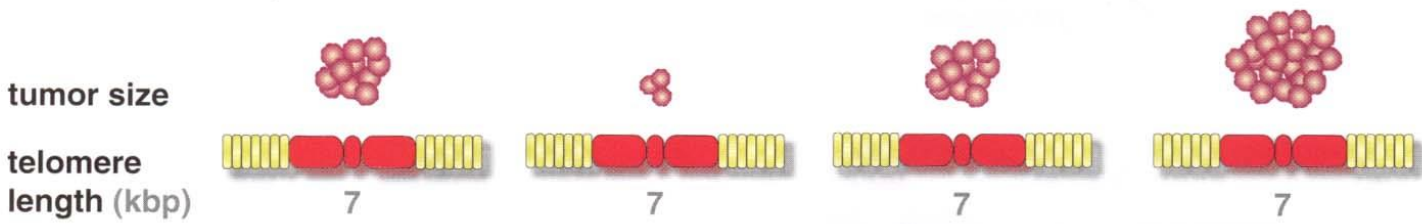


# Inhibitory telomerázy a konvenční terapie

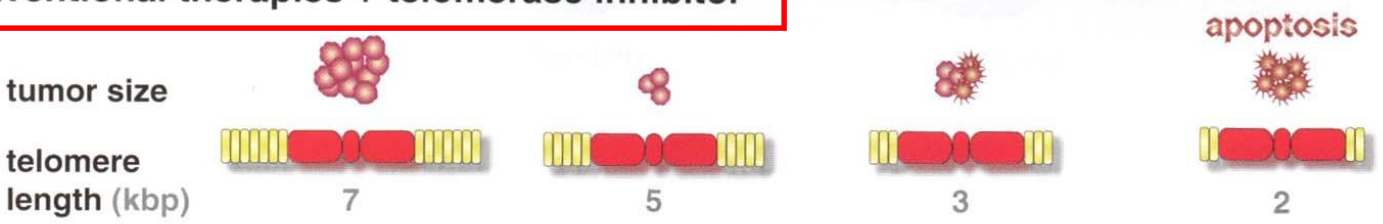
## telomerase inhibitor alone



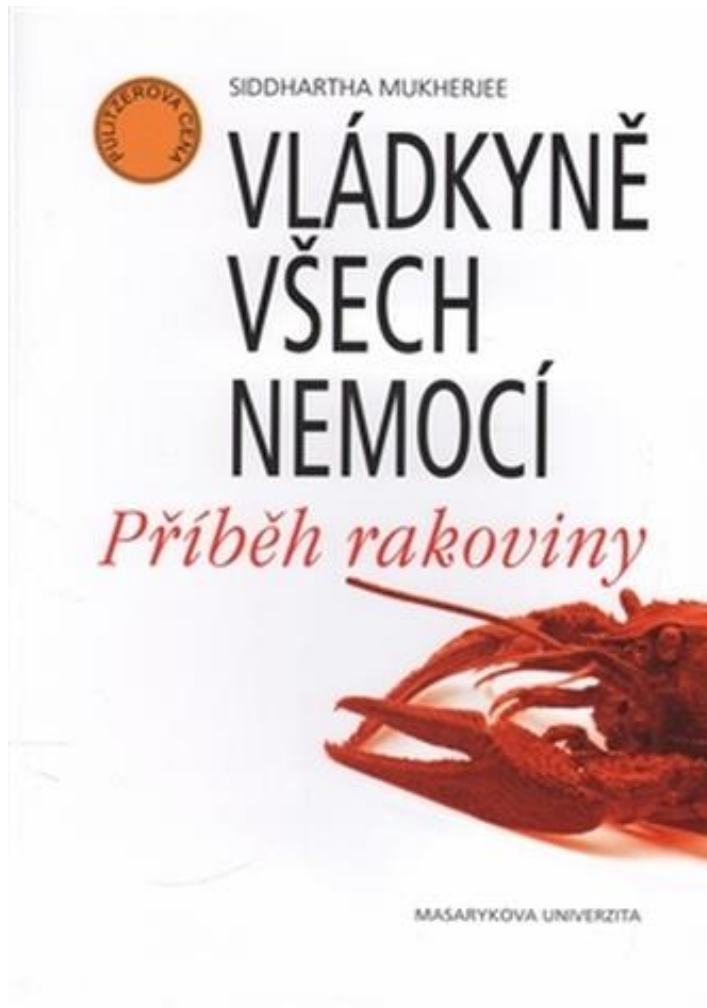
## conventional therapies alone



## conventional therapies + telomerase inhibitor



time of treatment



Přeložil prof. Jan Šmarda

Vědecký thriller o rakovině, „vládkyni všech nemocí“, udivuje čtenáře celého světa svým strhujícím tempem a hluboce lidským vyzněním. Jeho autor Siddhartha Mukherjee, lékař, vědec a oceňovaný spisovatel, se na nádorové onemocnění dívá s precizností buněčného biologa, s nadhledem historika a se zaujetím životopisce. Výsledkem je úžasně poutavá kronika nemoci, s níž lidé žijí a umírají více než pět tisíc let. Mukherjee byl za svou knihu oceněn Pulitzerovou cenou (2011) a cenou deníku Guardian. Časopis TIME dílo zařadil mezi sto nejvlivnějších anglicky psaných knih od roku 1923 a New York Times Magazine mezi sto nejlepších odborných knih všech dob.

## Kontrolní otázky k tématu

- V čem spočívá imortalizace buněk?
- Co jsou to telomery, telomeráza a jak fungují u nádorových buněk?
- Hlavní složky telomerázy a jejich funkce
- Které faktory mohou ovlivnit telomerázovou aktivitu a jaký význam má její snížení (zvýšení)?
- Jak přispívá zkracování telomer ke vzniku nádorů?
- Jak souvisí zkracování telomer s genetickou nestabilitou?
- S funkcí kterých genů je imortalizace buněk spojena?
- Charakterizujte proliferační krizi, Hayflickův limit, senescenci a imortalizaci
- Jak mohou být poznatky o mechanismech fungování systému telomery-telomeráza využívány v terapii?