

# Molekulární a buněčná biologie nádorů

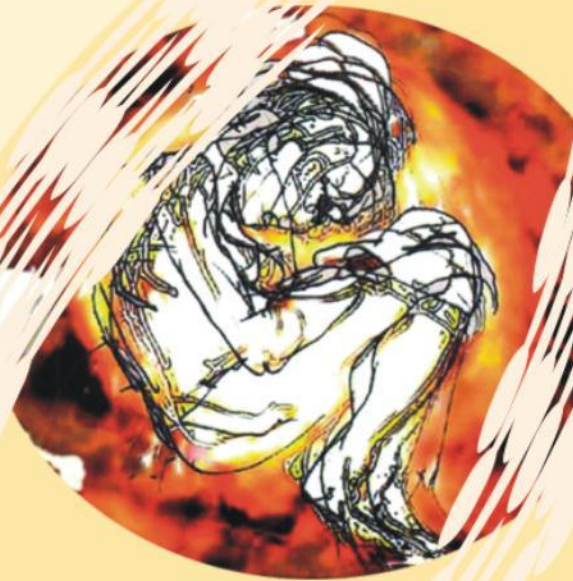
**Prof. RNDr. Jana Šmardová, CSc.**

Ústav experimentální biologie  
Přírodovědecká fakulta  
MU Brno

**Bi9910**

středa 14.00 – 16.00

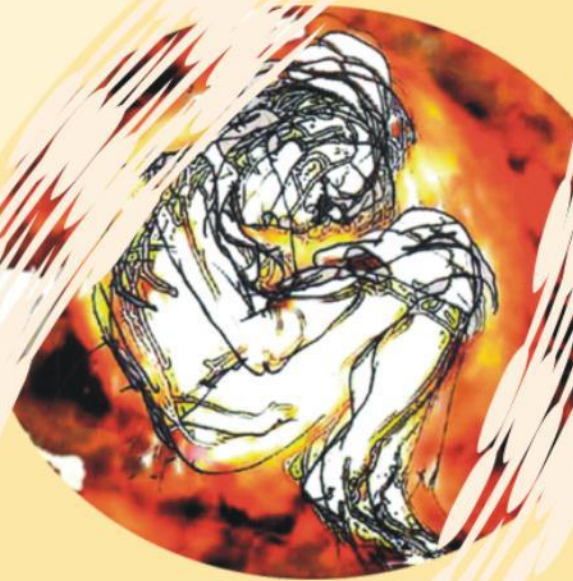
A11 – č. 306



**2020**

# Molekulární a buněčná biologie nádorů

## 6. Genetická nestabilita



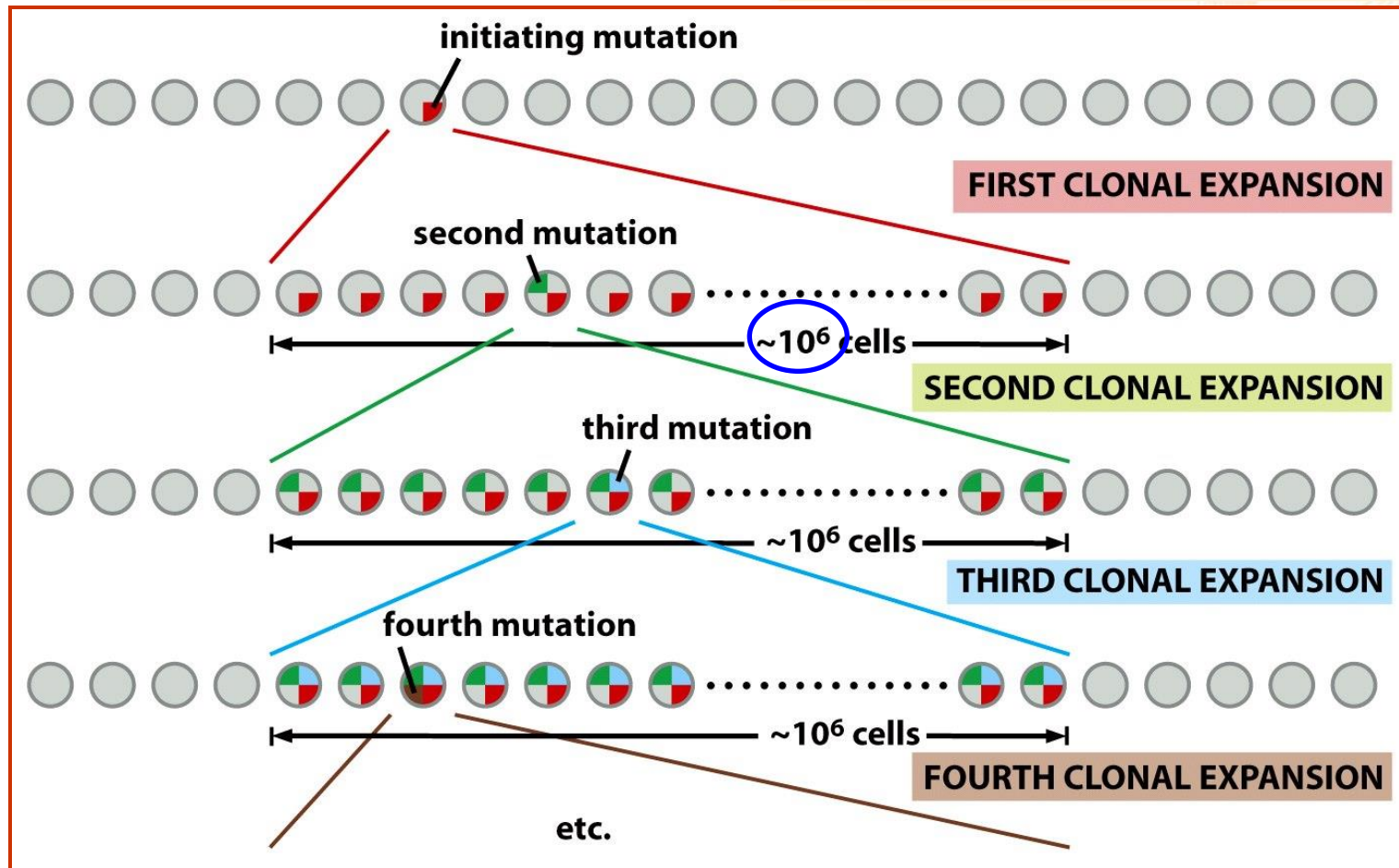
# Získané vlastnosti maligního nádoru



- (1) Produkce vlastních proliferačních signálů
- (2) Necitlivost k signálům zastavujícím buněčný cyklus
- (3) Odolnost k programované buněčné smrti
- (4) Neomezený replikační potenciál
- (5) Indukce angiogenese
- (6) Aktivace invazivity a metastazování
- (7) Genetická nestabilita a mutace
- (8) Přítomnost zánětu podporující nádor
- (9) Přeprogramování energetického metabolismu
- (10) Schopnost vyhnout se destrukci imunitním systémem
- (11) Změny mikroprostředí nádoru



# Vícestupňová kancerogeneze spojená s kroky klonální expanze





# 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.**
- 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 *TP53* 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.
- 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**)



# Nestabilita v sekvenci DNA



- **Nukleotidová excizní oprava** („nucleotide-excision repair“ - **NER**) - s ní spojená nestabilita („NER-associated instability“ - **NIN**)

## **Xeroderma pigmentosum**

- **Oprava chybného párování** („mismatch repair“ - **MMR**) - s ní spojená mikrosatelitová nestabilita (**MIN**)

## **Dědičný nepolypózní kolorektální karcinom - HNPCC = Lynchův syndrom**

# Nukleotidová excizní oprava – NER

*Xeroderma pigmentosum*

X

# Oprava špatného párování – MMR

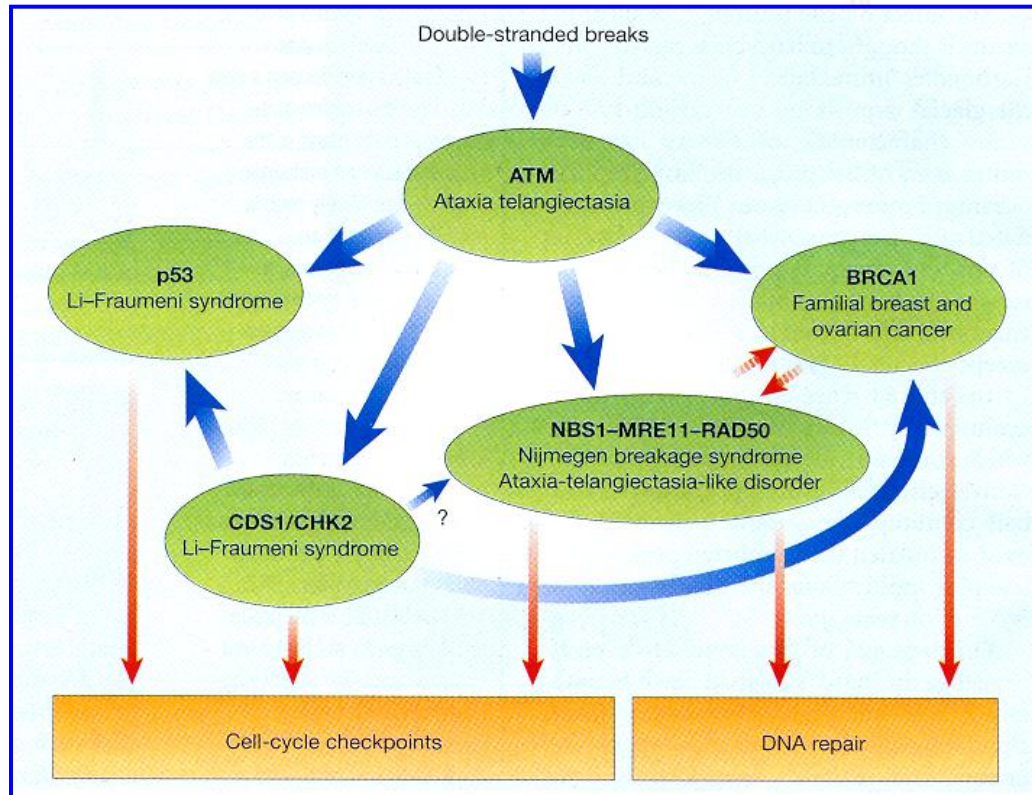
*Lynchův syndrom*

- Mutace **MMR** jsou recesivní (na úrovni buňky!), 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 – Lynchův syndrom je dominantní!
- × 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)

# Nestabilita v sekvenci DNA



- Oprava dvouřetězcových zlomů **DNA homologní rekombinací**



# Nestabilita v sekvenci DNA



- Oprava dvouřetězcových zlomů DNA homologní rekombinací

**Ataxia – Telangiectasia**

**Nijmegen breakage syndrome**

**AT-like disorder**

**Dědičná forma nádoru prsu a vaječníků (*BRCA1, BRCA2*)**



# Nestabilita v sekvenci DNA



**Bloomův syndrom**

**Wernerův syndrom**

**Rothmund-Thomsonův syndrom**

**Fanconiho anémie**

# Nestabilita v sekvenci DNA a



## Li-Fraumeniho syndrom (*TP53*)

- p53 zasahuje i do všech hlavních oprav DNA: NER, BER, MMR, HR a NHEJ
- model p53 jako buněčného reostatu: zajistí adekvátní buněčnou reakci:
  1. malé poškození: p53 přítomný v buňce aktivuje příslušné opravy
  2. větší míra poškození: dojde ke stabilizaci proteinu p53, který vedle aktivace oprav DNA vyvolá také zástavu buněčného dělení
  3. poškození DNA přetrvává nebo přesahuje kapacity opravných mechanismů buňky: p53 indukuje apoptózu nebo senescenci

Sengupta S., Harris C.C. p53: Traffic cop at the crossroads of DNA repair and recombination. Nat. Rev. Cancer 6: 44-55, 2005

## 2. Nestabilita v počtu chromozomů - CIN



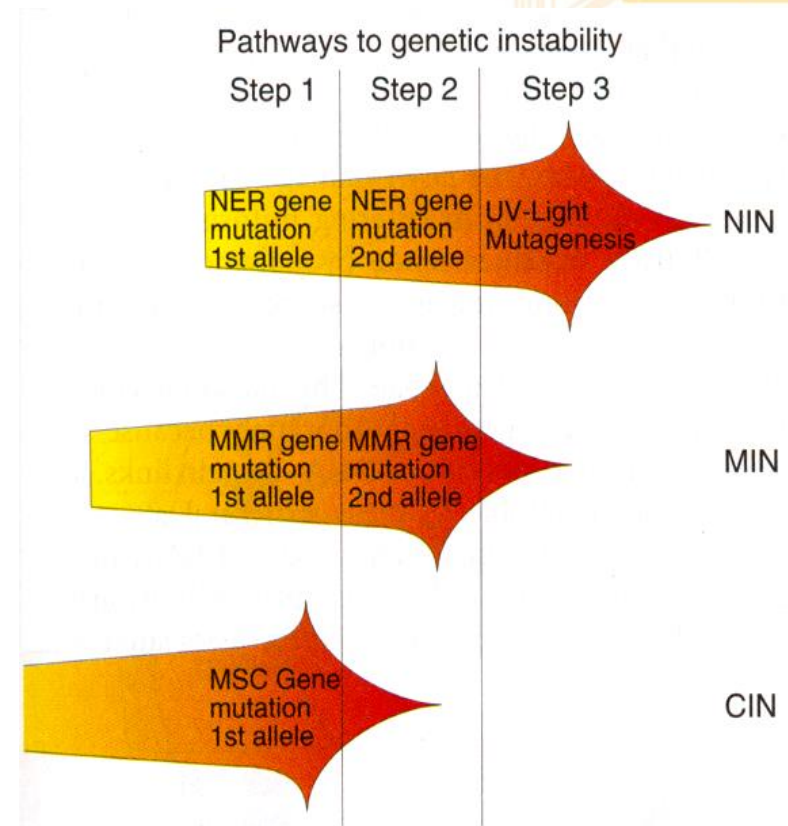
- Ve srovnání s NIN a MIN jsou ztráty nebo zmnožení celých chromozomů **mnohem běžnější** a vyskytují se téměř u většiny nádorů – až **85%** lidských nádorů (CRC) je vysoce aneuploidních.
- Běžná je ztráta chromozomu související s LOH, často je doprovázena získáním opačného chromozomu. ⇒ Ne vždy změny 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 raných 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: to naznačuje, že k vývoji fenotypu CIN může stačit jediný mutační zásah



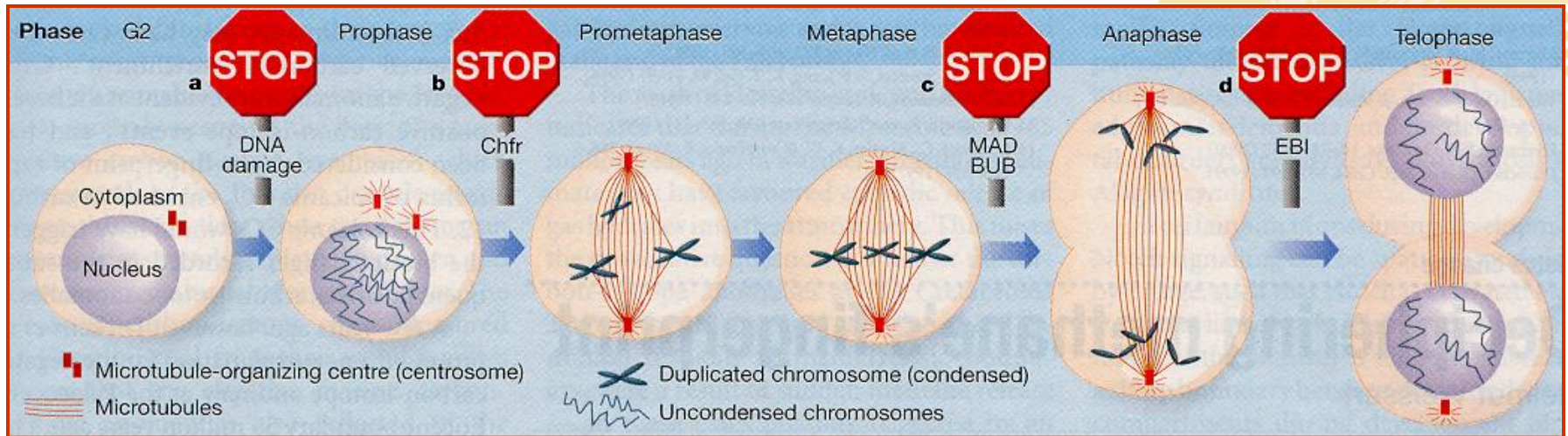


# Molekulární podstata CIN



- 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.

# 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 dceřiných buněk při nesprávné orientaci vřeténka

# Bod restrikce vs. kontrolní body

- bod restrikce:
- proliferace
  - klidový stav, (quiescence, resting state)
  - diferenciaci
  - stárnutí, senescence
  - buněčná smrt



## bod restrikce vs. kontrolní bod

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



# Plná oprava vs. adaptace na poškození DNA

Původní dogma: plná oprava (full repair)

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

## Koncept prahu (treshold)

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

→ mitotická katastrofa

→ ...

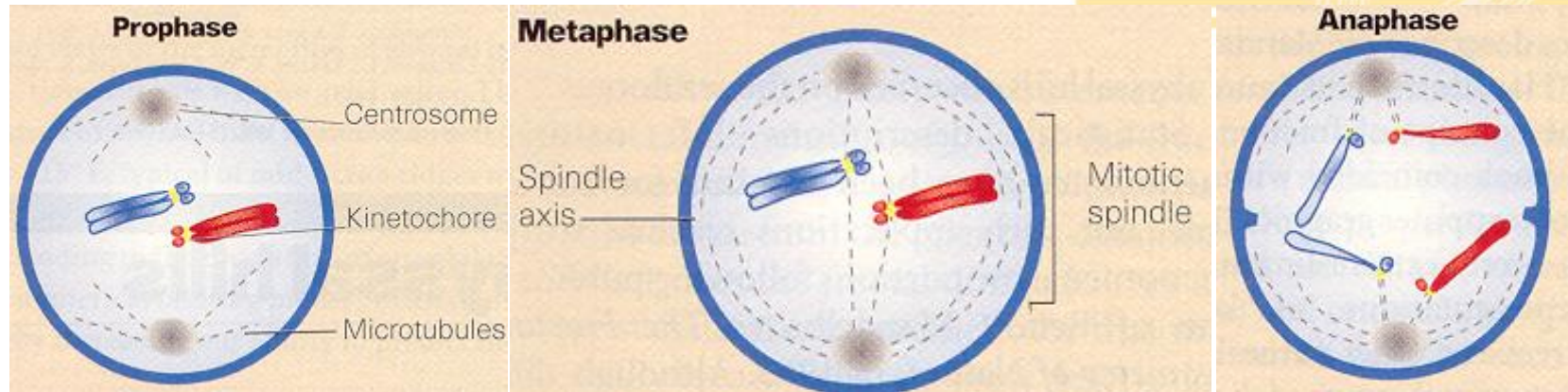


# Kontrola mitotického vřeténka



- 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.

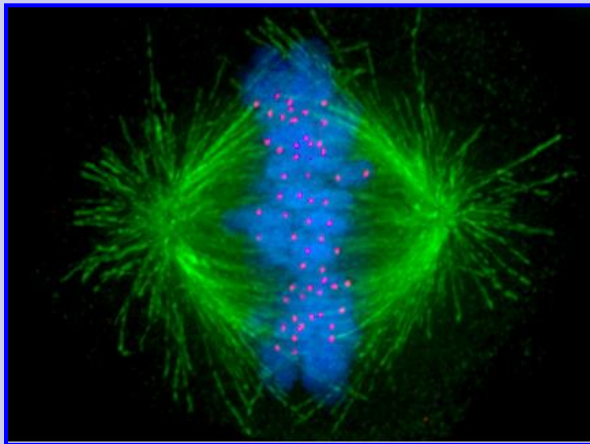
# Kontrola mitotického vřeténka



- 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.

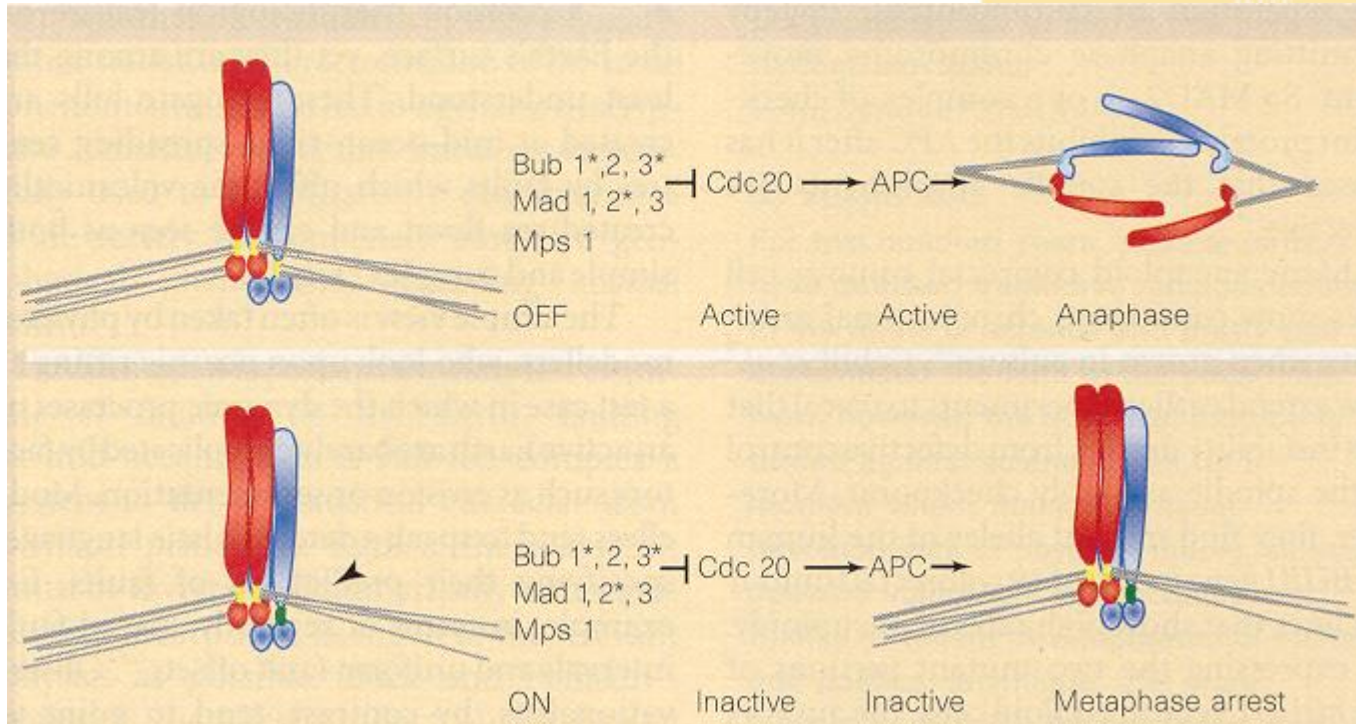
# Kinetochory

- **Kinetochory** jsou velké proteinové komplexy nacházející se zpravidla v oblasti centromery chromozomů během mitózy nebo meiózy. Umožňují napojení chromozomů na mikrotubuly dělicího vřeténka a jsou také z velké části zodpovědné za pohyb chromozomů k pólům vřeténka během anafáze.



znázornění kinetochor ve fluorescenčním mikroskopu: **kinetochory červeně**, **mikrotubuly zeleně**, **chromozomy modře**

# Kontrola mitotického vřeténka



Jak je monitorováno připevnění chromatid na vřeténko? To zajišťují proteiny typu **Bub** a **Mad** a při nedostatečném připevnění nedovolí aktivaci **APC** (**APC/C**).



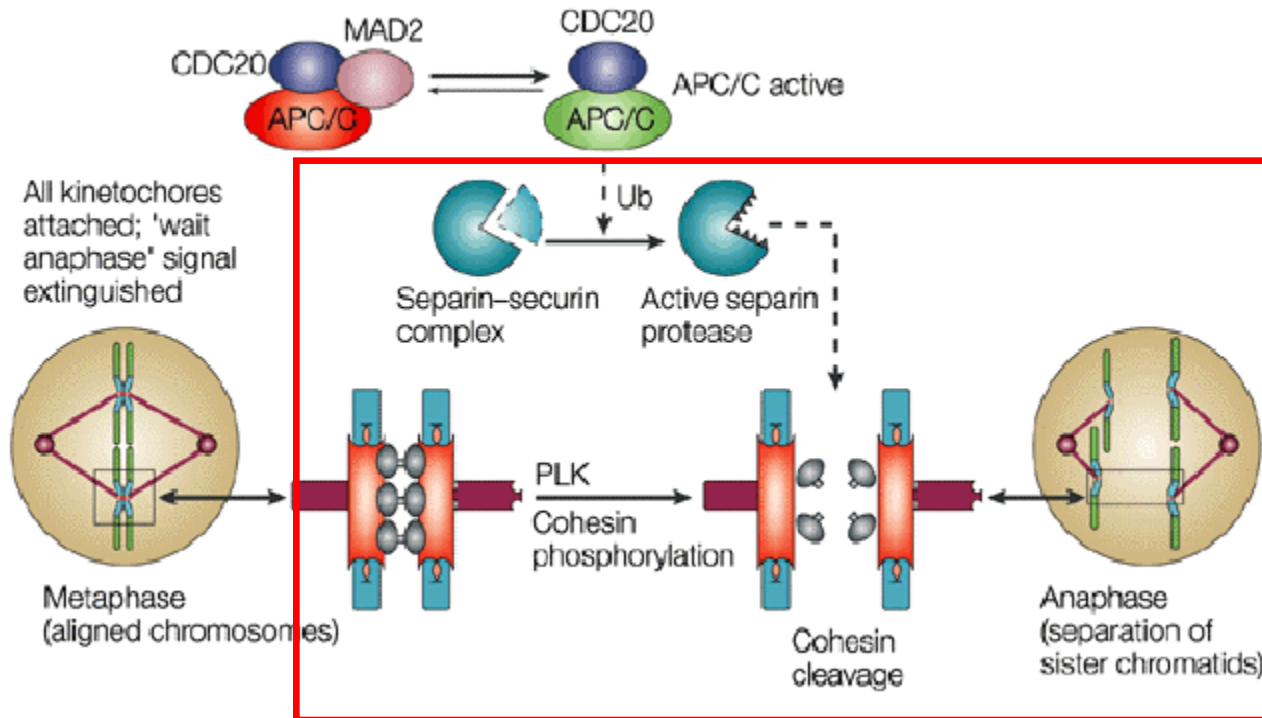
# Kontrola mitotického vřeténka



- 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 aktivní při přechodu metafáze do anafáze.
- Spouští degradaci proteinu **sekurin**, který je inhibítozem 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...

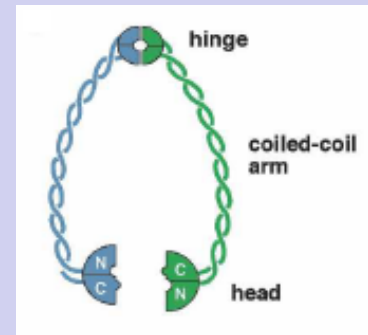


# Kontrola mitotického vřeténka



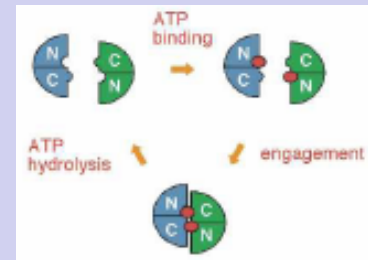
Po připojení posledního kinetochoru k vřeténku se APC/C – CDC20 stává aktivní, securin je degradován a uvolňuje proteázu **separin**. Ta rozštěpí **kohesin**, který spojoval sesterské chromatidy a ty se mohou začít pohybovat směrem k pólům.

# Vsuvka: Proteiny SMC

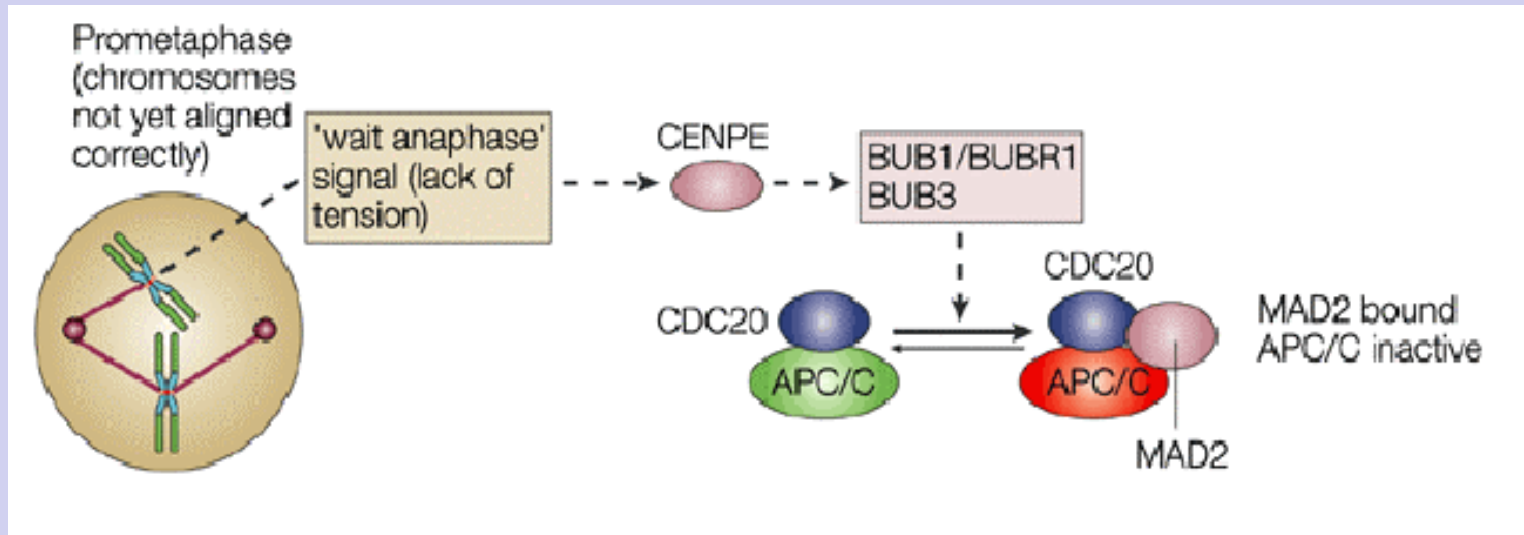


**SMC** – **S**tructural **M**aintenance of **C**hromosome

- chromozomální ATPázy
  - vysoce konzervované od bakterií po člověka
  - podílí se na vytváření a dynamice organizace chromozomů vyššího řádu
  - **SMC1** a **SMC3** tvoří jádro komplexu **kohezinu**, jsou odpovědné za kohezi sesterských chromatid
  - **SMC2** a **SMC4** jsou součástí komplexu **kondensinu**, podílí se na sestavení chromozomů a na segregaci
  - **SMC5** a **SMC6** se účastní oprav DNA a podílí se na reakci na kontrolní body
- ⇒ klíčové pro organizaci struktury genomu, pro jeho stabilitu a evoluci



# 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!!

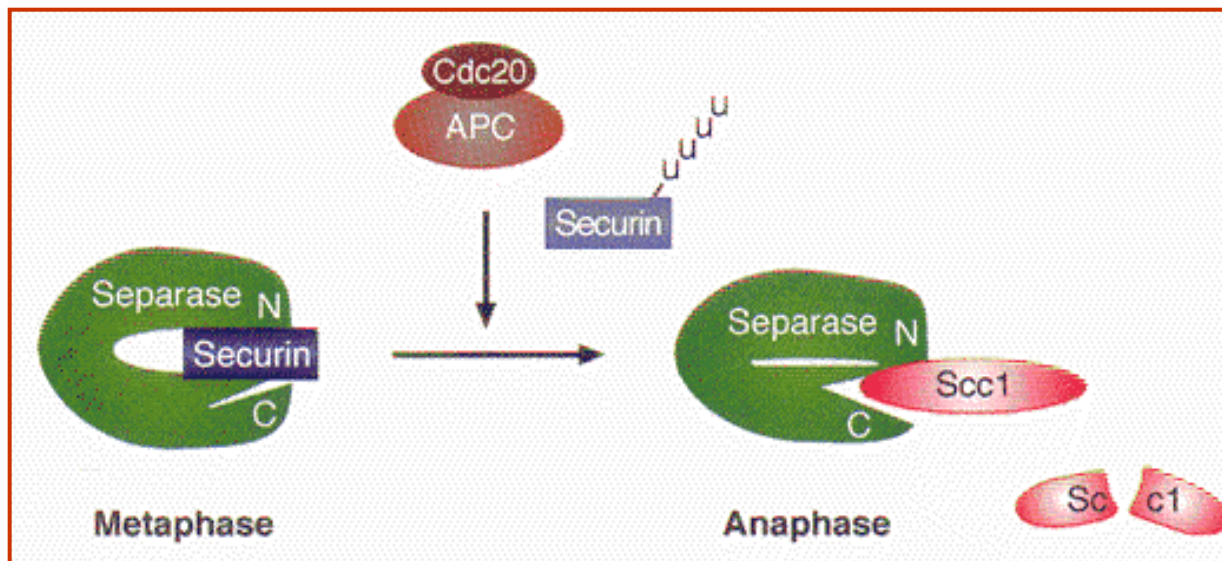


# Model interakce separin – sekurin

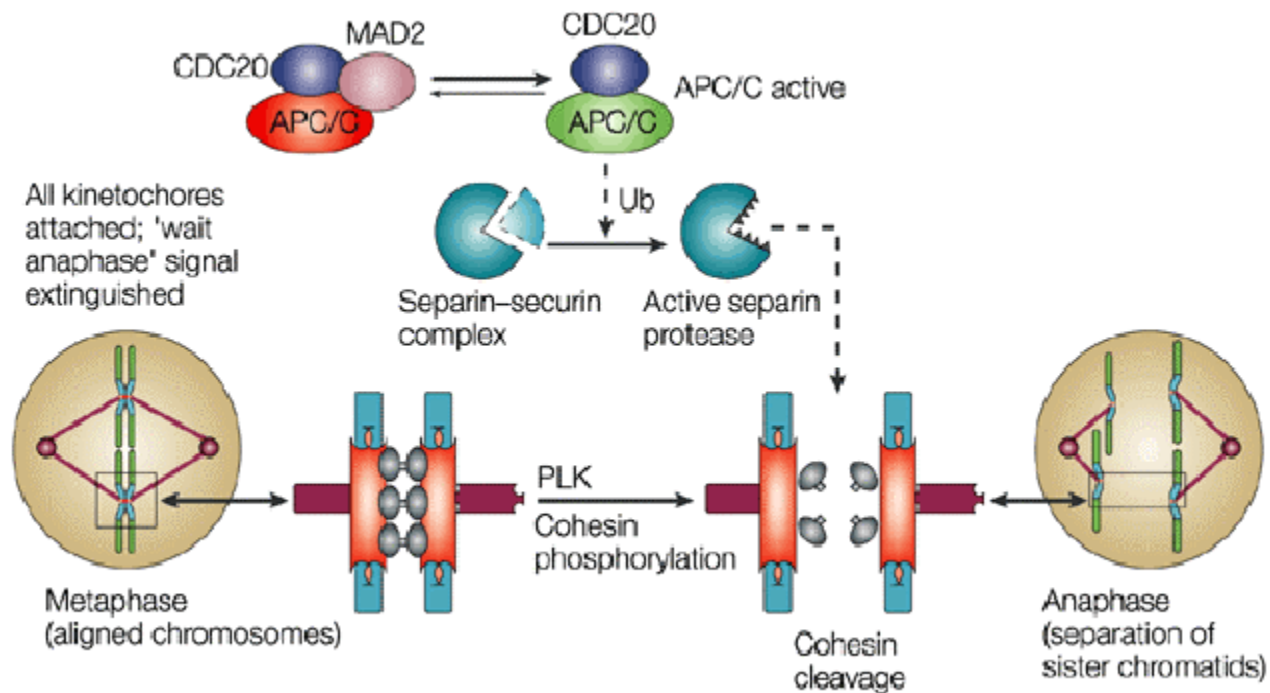


Sekurin funguje pro separin jako chaperon - jen tak může separin dosáhnout aktivní konformace.

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).

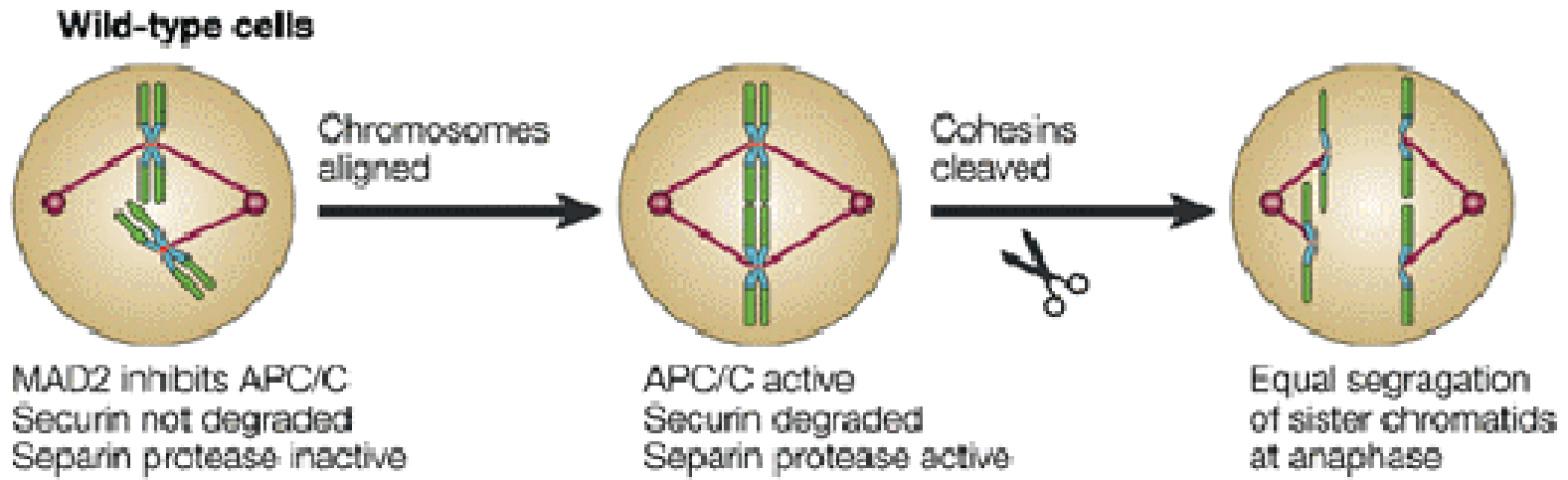


# Kontrola mitotického vřeténka



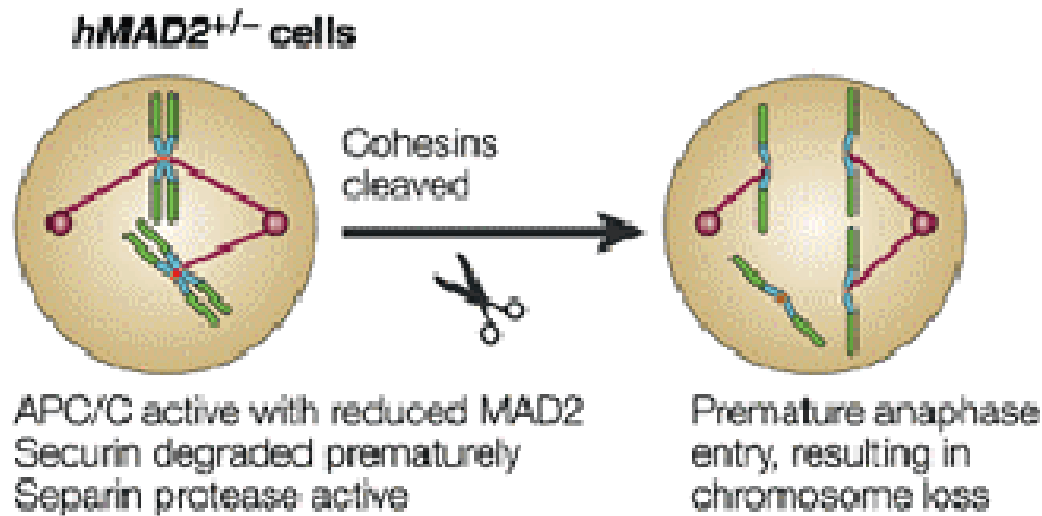
Po připojení posledního kinetochoru k vřeténku se APC/C – CDC20 stává aktivní, securin je degradován a uvolňuje proteázu separin. Ta rozštěpí kohesin, který spojoval sesterské chromatidy a ty se mohou začít pohybovat směrem k pólům.

# Kontrola mitotického vřeténka



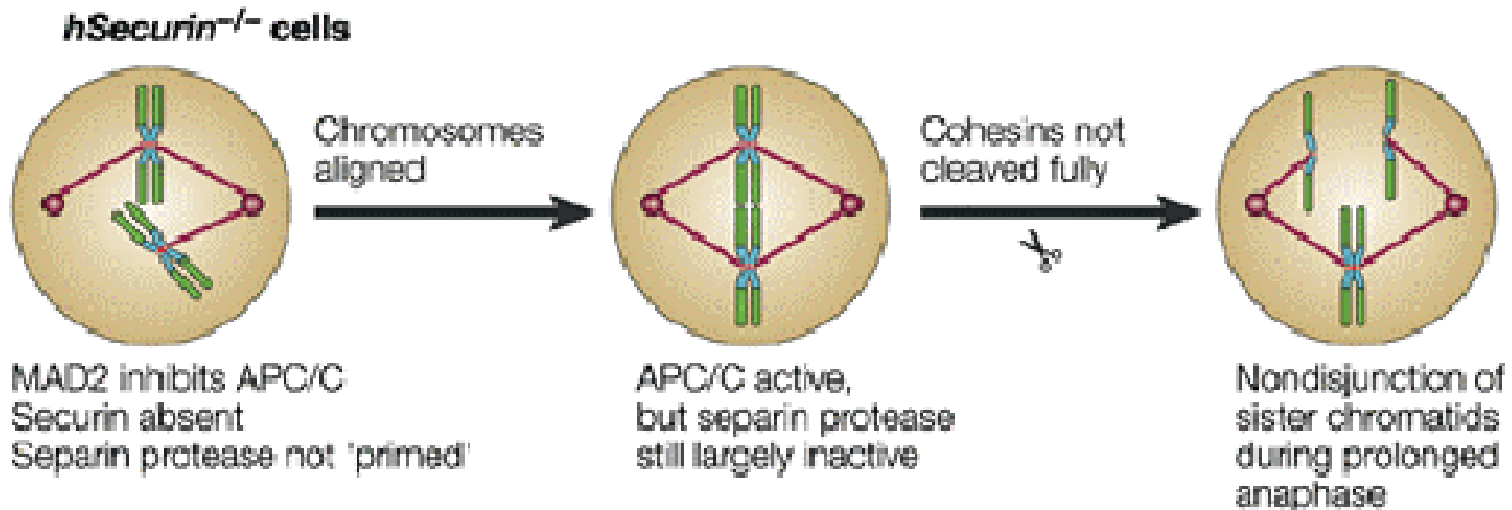
V nepoškozené buňce je normální segregace sesterských chromatid zajištěna regulací inhibice/aktivace komplexu APC/C.

# Kontrola mitotického vřeténka



V buňce s oslabenou funkcí (**heterozygot!!**) proteinu Mad2 není dostatečná inhibice APC/C, a tak dochází k předčasné destrukci **sekurinu** 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. 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.
- S proteinem **hMad1** interaguje protein Tax, produkt 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).

## Rb Loss Causes Cancer by Driving Mitosis Mad

Jan M. van Deursen<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Pediatric and Adolescent Medicine

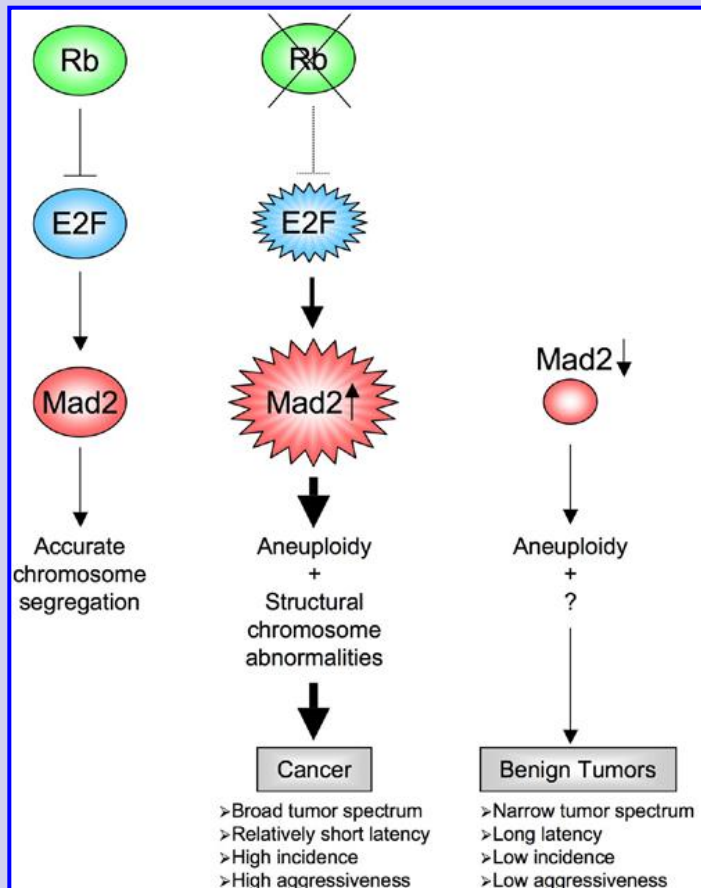
<sup>2</sup>Department of Biochemistry and Molecular Biology

Mayo Clinic College of Medicine, 200 First Street SW, Rochester, Minnesota 55905, USA

\*Correspondence: vandeursen.jan@mayo.edu

DOI 10.1016/j.ccr.2006.12.006

- Geny kódující klíčové složky kontrolního bodu mitotického vřeténka jsou u nádorů vzácněji mutované, ale často je změněná jejich exprese ( $\uparrow$  i  $\downarrow$ )
- Hladina **Mad2** musí být přesná,  $\uparrow$  i  $\downarrow$  vede k navýšení nádorů. U myši vyšší hladina Mad2 vede k širšímu spektru nádorů a k agresivnějším nádorům než nízká hladina Mad2. Vysoké hladiny Mad2 kromě samotných početních chromozomálních změn vedou i ke strukturním změnám: zlomy, end-to-end fúze,...
- Vysoké hladiny Mad2: (1) nedostatečná destrukce cyklinu B a sekurinu vede k nedostatečné aktivaci separinu, což vede k rozestupu chromatid bez dostatečného rozvolnění kohezinu  $\Rightarrow$  mechanické zlomy... (2) selhání cytokinéze a tedy tetraploidie



## Rb Loss Causes Cancer by Driving Mitosis Mad

Jan M. van Deursen<sup>1,2,\*</sup>

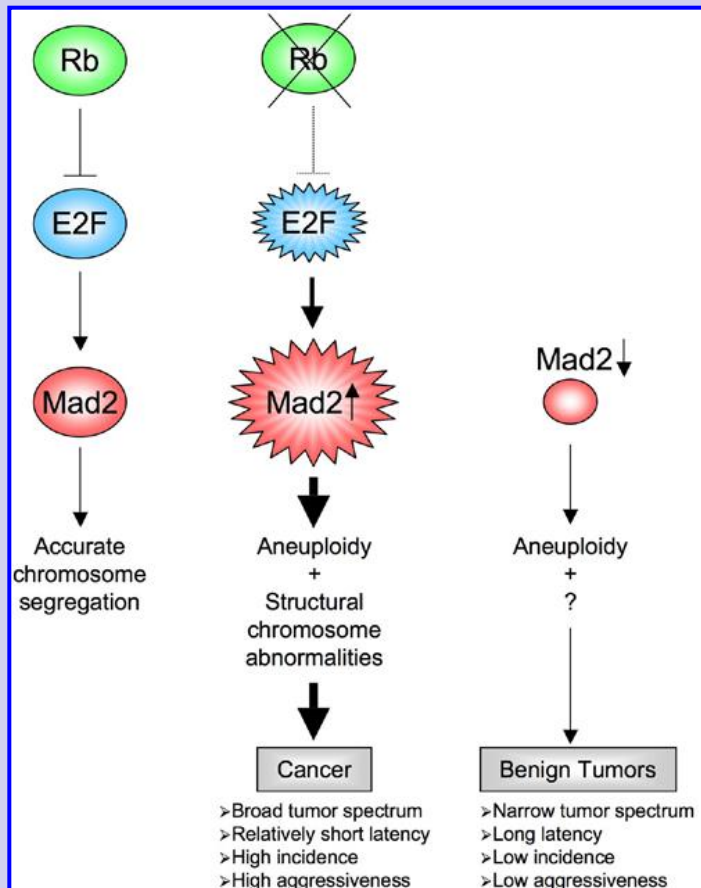
<sup>1</sup>Department of Pediatric and Adolescent Medicine

<sup>2</sup>Department of Biochemistry and Molecular Biology

Mayo Clinic College of Medicine, 200 First Street SW, Rochester, Minnesota 55905, USA

\*Correspondence: vandeursen.jan@mayo.edu

DOI 10.1016/j.ccr.2006.12.006



- Gen *mad2* je aktivován **E2F1** a je tak nefyziologicky silně exprimován u buněk s nefunkční dráhou RB.

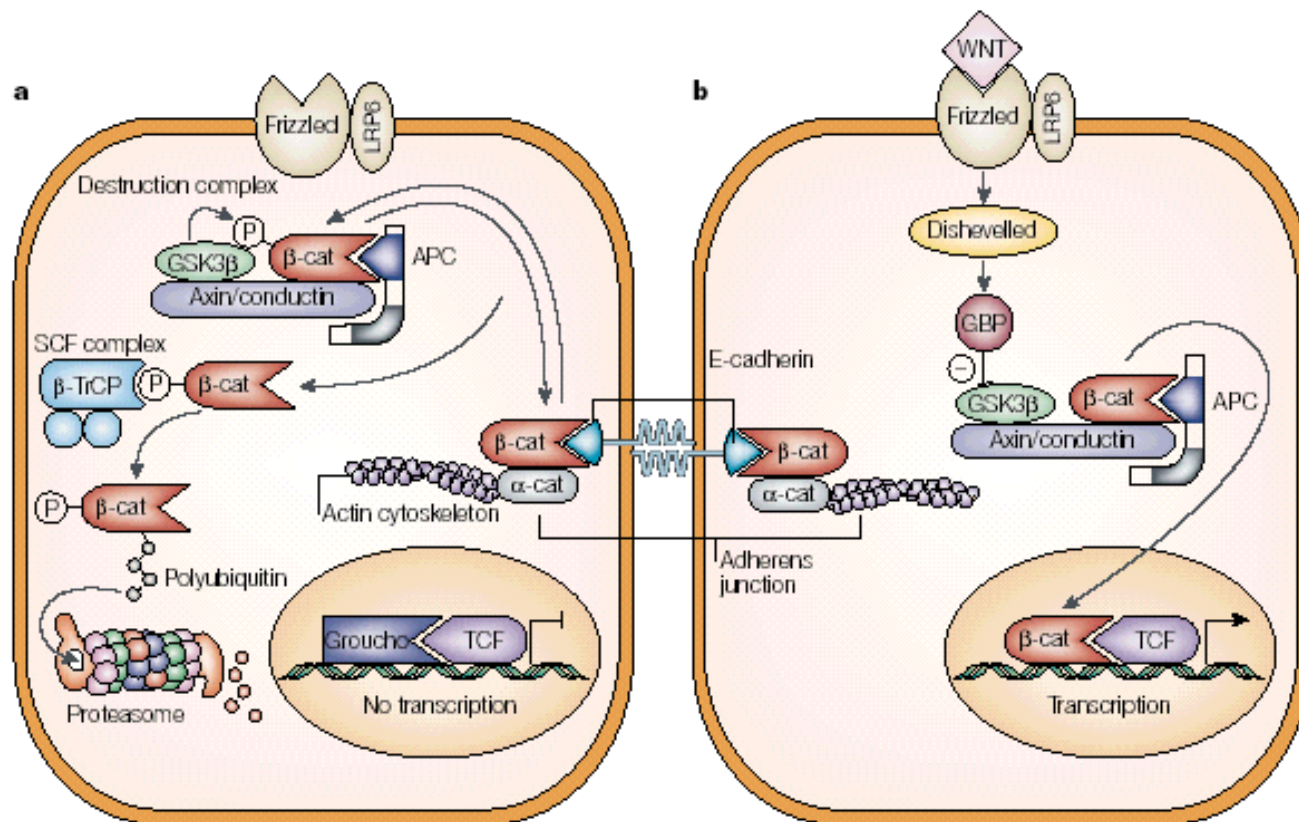
# Vztah APC k CIN



- Vrozené mutace **APC** („**adenomatózní polypóza coli**“) způsobují FAP („familial adenomatous polyposis“), somatické mutace patří k nejčastějším a nejranějším mutacím kolorektálních karcinomů.
- APC má dvě funkce:
  - 1.** WNT signalizace zprostředkovaná vazbou na **β-katenin** – mezi cílové geny této dráhy patří geny pro Myc a cyklin D1, které zřetelně souvisejí s tvorbou nádorů (⇒ 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 (⇒ zvýšení CIN)

# Dvojí úloha proteinu APC v buňce

## A. Regulace hladiny volného $\beta$ -kateninu

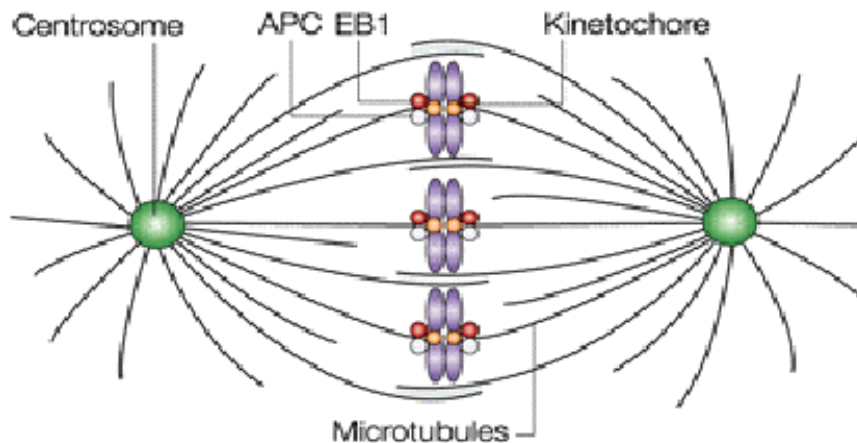




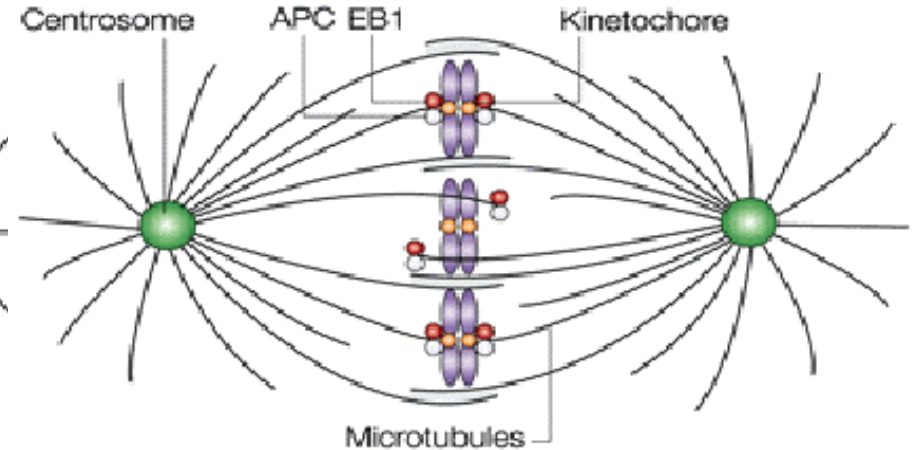
# B. Úloha APC při tvorbě mitotického vřeténka



**a Wild-type cells**



**b Apc-mutant cells**



- 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 dvojí výhodu: zvýšenou proliferaci a zvýšenou genetickou nestabilitu.
- Kolorektální karcinomy bez mutace *APC*, ale s mutací  $\beta$ -kateninu neprogredují zdaleka tak rychle jako nádory s mutací *APC* – mají výhodu zvýšené proliferace a s ní související klonální expanze („gatekeeper“), ale pomalou progresi do dalších stadií, protože postrádají genetickou variabilitu v důsledku snížené genetické stability („caretaker“).

# Násobné centrozomy

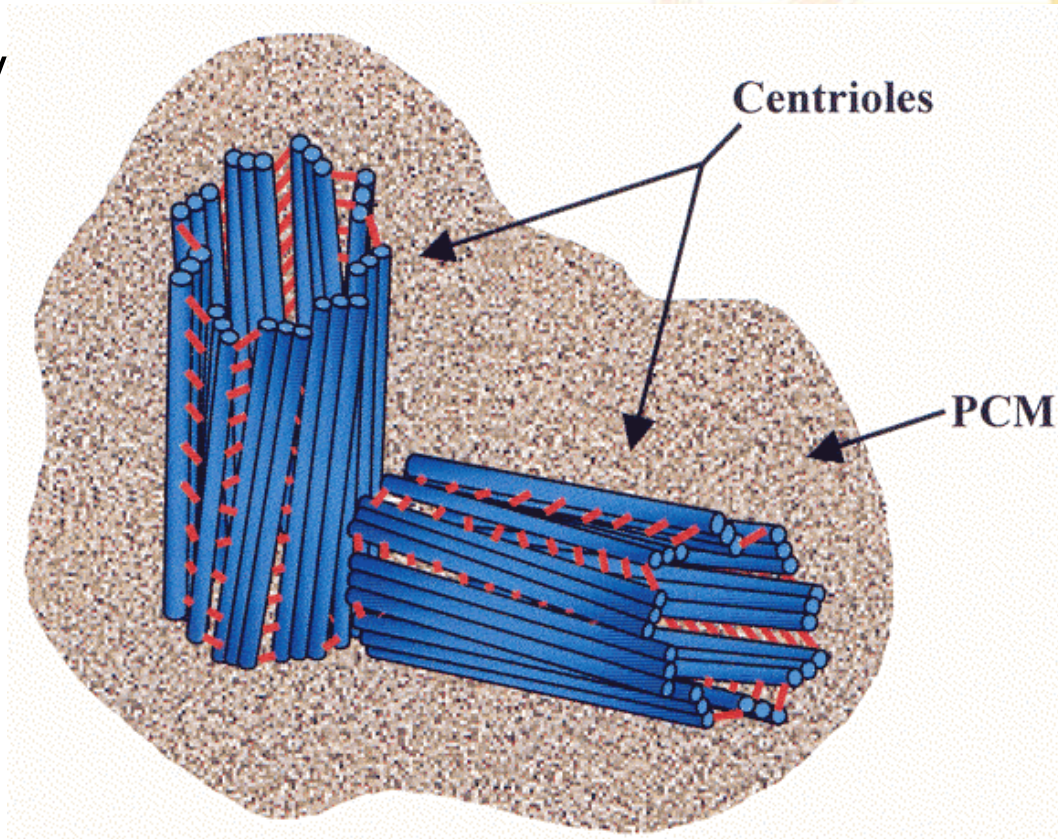


- Přítomnost více než dvou centrozomů v buňce vede k tvorbě defektního mitotického vřeténka (vytváří se více pólů), což způsobuje navýšení chyb v segregaci chromozomů  
⇒ to vede ke zvýšení genetické nestability CIN

# Centrozomy



- Malé nemembránové organelly 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.

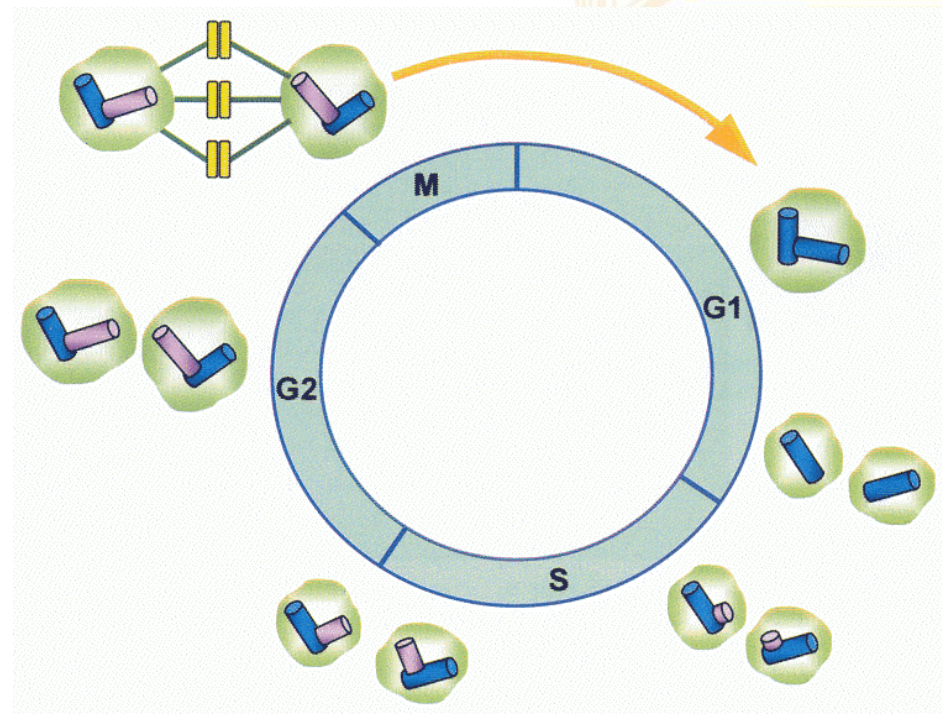




# Cyklus duplikace centrozomů



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





# Mechanismy vzniku násobných centrozomů

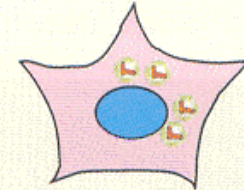


1. Deregulace kontrolních bodů duplikace centrozomů
    - kontrola iniciace duplikace centrozomů
    - suprese re-duplikace centrozomů
  2. Neproběhnutí cytokineze
  3. Nekontrolovaná separace centriolového páru
  4. Zvýšená exprese některé složky PCM a vytvoření acentriolárního centrozomu
- Násobné centrozomy jako příčina aneuploidie byly pozorovány u nádorů prsu, plic, prostaty, střeva, nádoru mozku a dalších.

# Mechanismy vzniku násobných centrozomů



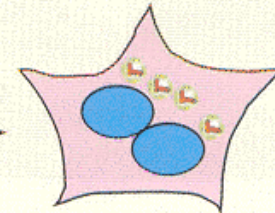
(A) Multiple duplication of centrosomes within a single cell cycle



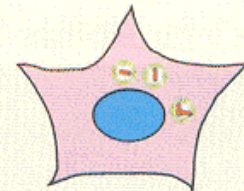
(B) Cytokinesis failure



Entry into the next cell cycle and centrosome duplication



(C) Uncontrolled splitting of a centriole pair



(D) Overexpression of certain PCM components



Formation of acentriolar MTOCs



# 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 **TP53** s výskytem amplifikace centrozomů (možné spojení přes **p21<sup>Waf-1</sup>** - inhibitor Cdk2/cyklinu E).
- 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 při 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, TP53**.



## 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 v některých případech může být mechanismem navození rezistence k chemoterapeutikům.
- Nejčastěji amplifikované geny jsou **N-myc**, **erbB** 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.

# 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<sup>-/-</sup> 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.

# Úroveň genetické nestability



exogenní  
poškození  
DNA  
kouření, alkohol,  
záření...

endogenní  
poškození  
DNA

rychlost  
dělení: DNA-  
replikační  
stres

rychlost vzniku mutací

úroveň  
genetické  
nestability

rychlost reparační mechanismy

reparační  
mechanismy

# Mutátorová hypotéza a vrozené dispozice k vývoji nádorů



## mutátorová hypotéza (tzv. „mutator hypothesis“)

- (rychlá) akumulace mutací umožněna zvýšenou genetickou nestabilitou, která je důsledkem (vrozeného nebo somatického) poškození **DNA opravných mechanismů** a kontrolních bodů buněčného cyklu
- O významu poškození opravných mechanismů a kontrolních bodů buněčného cyklu v kancerogenezi svědčí silná asociace mezi **vrozeným poškozením** těchto mechanismů a dispozicí k vývoji nádorů.

# Akumulace somatických mutací během vývoje nádorů



## mutátorová hypotéza (tzv. „mutator hypothesis“)

- (rychlá) akumulace mutací umožněna zvýšenou genetickou nestabilitou, která je důsledkem (vrozeného nebo somatického) poškození DNA opravných mechanismů a kontrolních bodů buněčného cyklu

## model DNA replikačního stresu způsobeného onkogeny

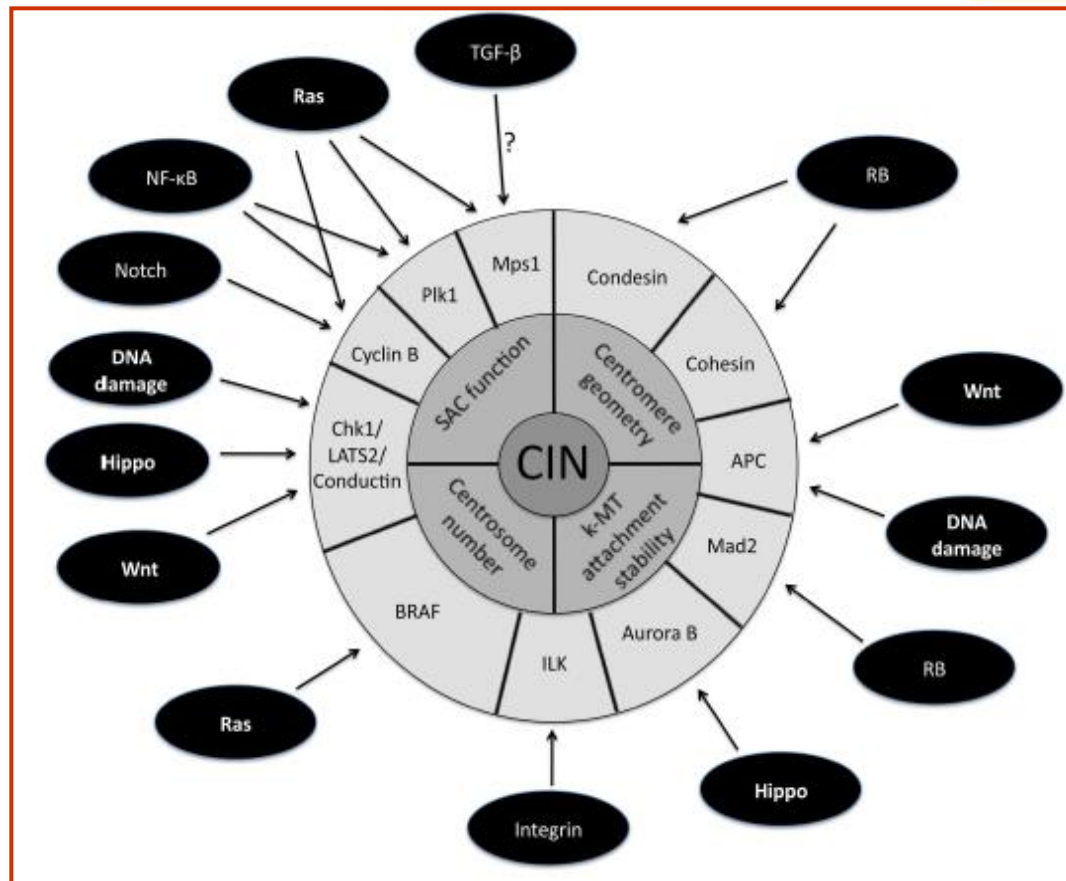
- onkogenní signální dráhy mají dvojí dopad:
  1. stimulují buněčné dělení a růst
  2. indukují genetickou nestabilitu, především CIN, tím, že narušují jemně vyladěné procesy vedoucí k přesné segregaci chromozomů během mitózy

Orr B., Compton D.A.: *Frontiers in Oncology* 3 (2013) 164

Negrini S et al.: *Nat Rev Mol Cell Biol* 11 (2010) 220-228



# Aktivované onkogeny (deregulované buněčné dělení) vyvolávají DNA replikační stres



# Kriticky krátké telomery a genetická nestabilita; chromotripse

