

Molekulární patologie

18.11.2005

PřF Mu



Patologická fyziologie

- je nauka o etiologii a patogeneze nemoci, založená na experimentálních výsledcích a klinickém pozorování.
- Etiologie pojednává o příčinách nemocí
- Patogeneze se zabývá rozvojem onemocnění (symptom, syndrom, patologický stav)
- Základní otázka: proč?



Všeobecná patofyziologie

- A. Zdraví a nemoc.
 - 1. Definice zdraví a nemoci
 - 2. Patogenní faktory (fyzikální chemické a biologické) a odpověď organismu na ně (adaptace, dysadaptace).
 - 3. Typy a stupně nemoci.
 - 4. Smrt.



Všeobecná patofyziologie

B: Buněčné mechanismy za patologických stavů

C. Reakce na poškození tkáňové integrity a infekce.

- 1. Nespecifická (vrozená) imunita: zánět
- 2. Specifická (získaná) imunita, získané imunitní nemoci (imunodefekty, hypersenzitivita a autoimunita)



Všeobecná patofyziologie

D: Růst a proliferace

1. Indukce proliferace a hojení ran

2. Maligní proliferace

3. Nádorový růst

4. Malignita a organismus

E: Vliv genetického základu na vznik nemoci

nemoci monogenní

nemoci polygenní (multifaktoriální)



Speciální patofyziologie

- Patofyziologie orgánových systémů
- Patofyziologie orgánů
- Patofyziologie buněk
- Molekulární patofyziologie



Maligní transformace buňky

- Množení buněk je velmi pečlivě řízeno tak, aby odpovídalo potřebám celého organismu.
- V časných fázích života jedince kapacita množení buněk převažuje nad jejich zanikáním, v dospělosti je v dynamické rovnováze, ve stáří začíná převažovat involuce.
- Některé buňky se však vyhnou kontrole replikace (neodpovídají na vnější signály, kontrolující jejich dělení, jsou autonomní) a mění se tak na *buňky nádorové*. Ty, které si alespoň přibližně zachovávají vzhled i funkci buněk normálních a především zůstávají stále na místě, kde vznikly, jsou buňky benigní a jejich proliferace dá vzniknout *benigním tumorům*. Buňky, které ztratily většinu vlastností buněk, od kterých jsou odvozeny a mají snahu pronikat do svého okolí (*invazivita*) i na vzdálená místa (*metastázy*), jsou buňky maligní a tvoří *maligní tumory*.



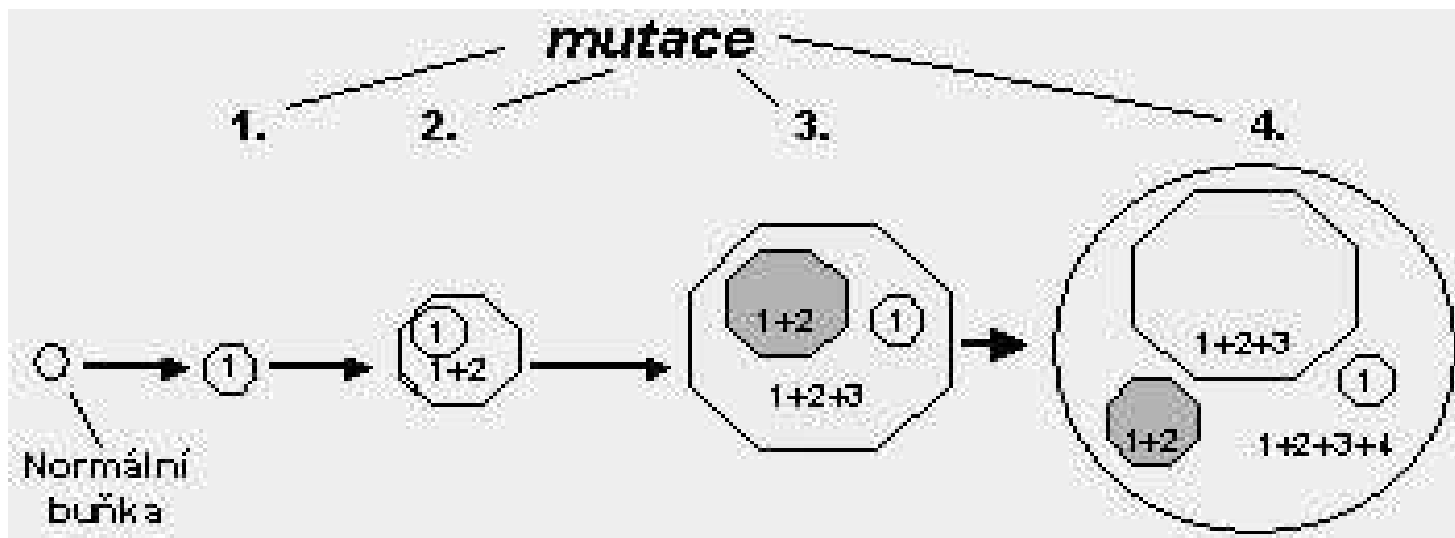
Maligní transformace buňky

- *Maligní nádor je genetické onemocnění, ale jeho exprese začíná v jednotlivé buňce (monoklonální teorie). Jde o několikastupňový proces, kdy na úrovni chromosomů dochází k postupnému *nahromadění mutací (alterací) genů, kontrolujících proliferaci (dělení), diferenciaci a zánik buněk.**



Klonální vývoj nádorových buněk

1. mutace znamená „proces vykopnutí“.
2. Buňky s 1. a 2. mutací postupně v nádorové tkáni přerůstají nebo nahrazují buňky s 1. mutací.
3. Další mutace podněcují buněčnou populaci k větší agresivitě.
4. Subklonální genetická heterogenita nádoru je odrazem postupujícího vývoje nádorové tkáně.



Maligně transformované buňky

- se vyznačují především pokračujícím dělením.
- Snižují se u nich požadavky na přítomnost hormonů a růstových faktorů.
- Některé transformované buňky produkují vlastní specifické růstové faktory (*autokrinní stimulace*).
- Dochází ke *ztrátě schopnosti zastavit růst*. U normálních buněk totiž snížení hladiny isoleucinu, fosfátu, epidermálního růstového faktoru a dalších látek, které regulují růst, pod určitou prahovou koncentrací, navodí přesun do klidového stavu (G0-fáze). Normální buňky začínají růst (dělit se) pouze, když jejich nutriční požadavky jsou řádně zajištěny. Nádorovým buňkám tato schopnost zastavit růst jako reakce na nedostatek živin a růstových faktorů schází; dokonce pokračují v proliferaci, i když přitom mohou zahynout.
- Předpokládá se, že *většina nádorů vzniká z jediné buňky* a nádorová progres je výsledkem získané genetické variability původního klonu, která umožňuje sekvenční selekci agresivních subklonů

Změny při maligní transformaci buňky

- *Maligní transformace buněk je nejčastější v tkáních, které mají rychlý obrat, zvláště těch, které jsou vystaveny působení kancerogenů a účinku hormonů.*
- *Faktory okolního prostředí mají mohutný vliv na genovou expresi cílové buňky. Velké množství signálů, které přijme určitá buňka, vede k aktivaci specifické sady transkripčních faktorů, které tak určují, zda buňka se bude dělit anebo diferencovat nebo zda zahyne.*

Proces kancerogeneze

- *je nejen vícestupňový, ale má též více příčin (multikauzální).* Existují negenetické příčiny maligní transformace. Jednou z nich je
- epigenetický přenos: změny ve specifické buňce se přenášejí při dělení i na buňky dceřinné, aniž by došlo k alteraci v zárodečné linii kódující sekvenci DNA. Jak se epigenetický stav udržuje, není úplně vysvětleno. Nepochybně mají na tom podíl proteiny regulující pochody v DNA; význam má i metylace DNA.
- Na příkladu maligního myšího teratokarcinomu bylo prokázáno, že epigenetické změny nádorové buňky nebrání úplné normální diferenciaci této velmi mladé embryonální buňky, je-li inkorporována do preimplantovaného myšího embrya. Na druhé straně, jsou-li teratokarcinomové buňky implantovány dospělé myši, vzniká teratokarcinom. Znamená to, že maligní stav je podmíněn okolím, v kterém se buňka s maligním potenciálem nalézá.

Průběh kancerogeneze

- Tři stádia:
- (1) Iniciační stádium, které představuje prvotní genetickou událost, tj. *mutaci určitého kritického genu*. Jde o období časově krátké, ale nevratné; iniciovaným buňkám přináší růstovou selekční výhodu. Buňka tak získává potenciál maligní transformace; v tomto stádiu se může proces zastavit.
- (2) Promoční stádium, které trvá léta, až desetiletí; postižené buňky (klon) jsou stimulovány ještě k intenzivnější proliferaci. Promoční faktory samy o sobě nejsou však schopny vyvolat maligní nádorovou transformaci, jen ji podpořit. Intenzita promočních mechanismů musí dosáhnout určitého stupně, aby byl iniciovaný klon stimulován, a naopak odstranění podpůrných faktorů může proces kancerogeneze zpomalit nebo i zastavit.



Průběh kancerogeneze

- (3) Stádium progrese je charakterizováno dalším postupným nahromaděním genetických změn jako je
 - ✓ (a) *nekontrolovaný růst* pro trvalou aktivaci signální transdukce růstového stimulu,
 - ✓ (b) *alterace kritických bodů buněčného cyklu*,
 - ✓ (c) *deregulace DNA- transkripčních faktorů*.
- Nádor zůstává nejprve v místě svého vzniku, ale aktivací dalších faktorů se začne šířit do nejbližšího okolí (*invaze*) a cestou krevního oběhu na místa vzdálená (*metastázy*). Velmi důležitou podmínkou pro růst nádoru je dostatečný přísun živin a kyslíku, který musí být zajištěn vytvořením cévního zásobení (*nádorová neoangiogeneze*).



Maligní nádorové bujení

- je způsobeno *abnormalitami v sekvenci DNA*.
- V průběhu života je DNA vystavena mutagenům, vznikají přitom omyly v replikaci, vyúsťující v progresivní subtilní změny v sekvenci řetězce DNA.
- Jedna z těchto somatických mutací může pozměnit funkci některého *kritického genu podporujícího růst určité buňky*.
- To má za následek vznik expandujícího klonu z této buňky.
- Další přídatné mutace v relevantních cílových genech a následné vlny *klonální expanze* dají vzniknout buňkám pronikajícím do okolní tkáně (*nádorová invaze*) a šířícím se na vzdálenější místa (*nádorové metastázy*).
- Klinicky se tento proces projevuje *nádorovým onemocněním*, které je nejčastějším genetickým onemocněním vůbec: Objevuje se (dříve nebo později) ve vyspělých zemích v průměru u každého třetího jedince.

Nádorový fenotyp

- ✓ Nádorový fenotyp je charakterizován **maligní transformací buňky**, která se projevuje:
 - **ztrátou kontroly buněčného dělení** (alterace buněčného cyklu, antiapoptóza – „nesmrtelnost“ nádorové buňky, alterace v transdukci signálů),
 - **ztrátou kontaktu buňka-buňka**, invazivitou,
 - **změnami v metabolismu** (podpora enzymů anaerobní glykolýzy a potlačení enzymů oxidace cestou Krebsova cyklu, „uchvacování“ dusíku nádorovými buňkami, zvýšená lipolýza, tvorba nádorových antigenů),
 - **podporou angiogeneze**.
- ✓ Maligně transformované buňky jsou pravděpodobně odolné vůči stresovým faktorům okolí jako je hypoxie, kyselé pH, nedostatek glukosy a živin, odloučení od bazální membrány, které normální buňky ničí.

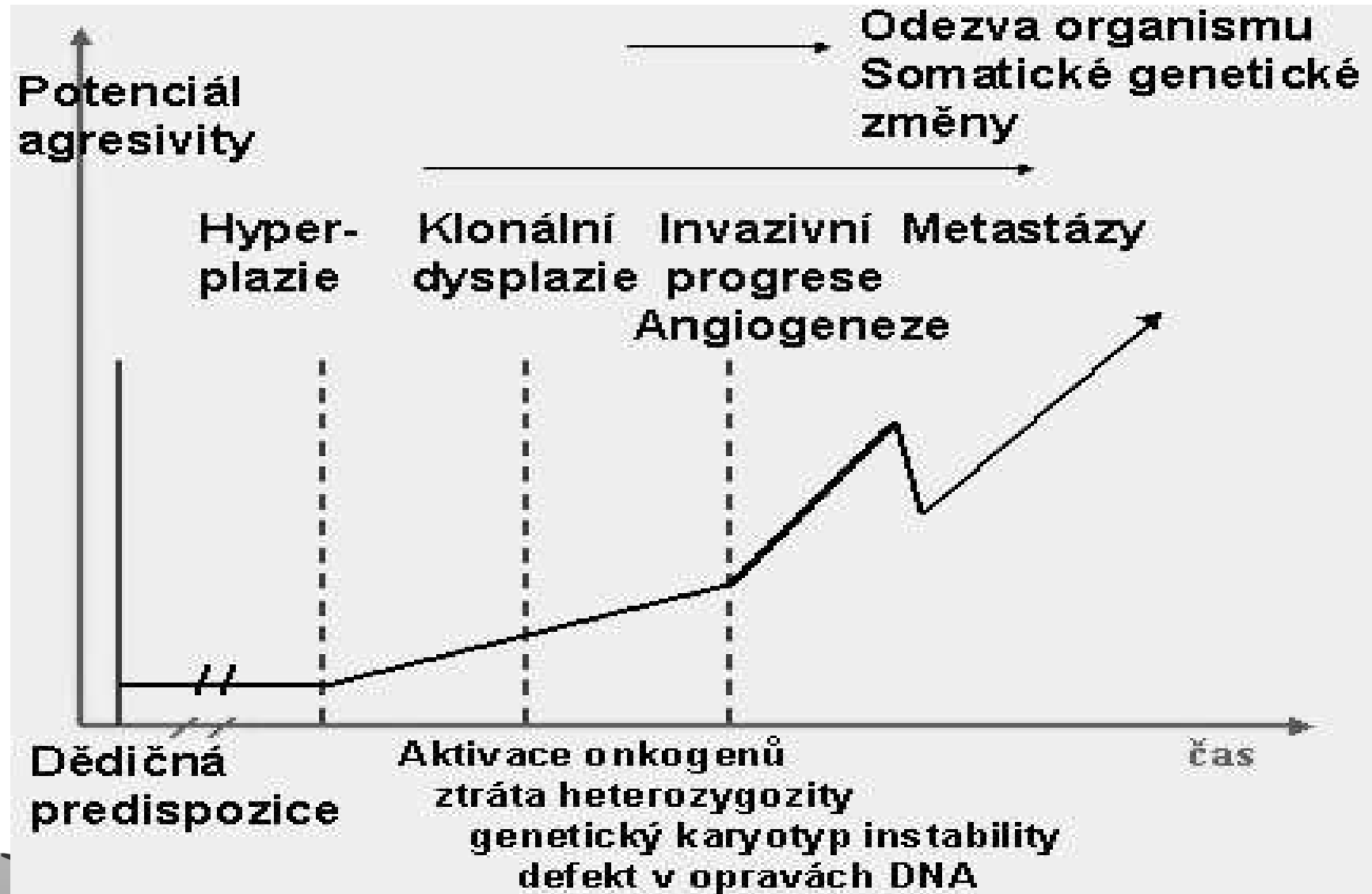
Metastatický fenotyp

- Dalším rysem maligně transformované buňky je *ztráta závislosti adherovat k podkladu (substrátům)*. V buněčné kultuře normální buňky, plovoucí volně v živném roztoku (gelu), mohou sice metabolizovat (žít), ale nikoliv se dělit; nádorové buňky ano.
- *Ztráta inhibice motility kontaktem se sousedními buňkami* je další charakteristika nádorových buněk. Znamená to, že mohou růst jedna přes druhou, mohou být na sobě i pod sebou a jen zřídka vytvářejí mezerové spoje (gap junction).
- *Změny na buněčné membráně*, jako je modifikace glykolipidů a glykoproteinů (snížení množství sialové kyseliny vázané na proteiny, redukce gangliosidů). To sice nemění strukturu transformované buňky, ale zvyšuje laterální mobilitu povrchových lipidů, respektive vazbu membránových proteinů na cytoskelet.

Metastatický fenotyp

- Maligní buňky mají zvýšenou *motilitu* a schopnost pronikat do okolí (*invazivitu*) a po průniku do krevní cirkulace se mohou usadit a množit na jiném místě (tvořit *metastázy*).
- K tomu jsou vybaveny schopností produkovat **receptory**, aby se mohly zachytit na proteinech bazální membrány (tvorba adhezních molekul), dále **tvorbou hydrolytických enzymů**, které pomohou rozrušit kolageny, proteoglykany a glykosaminoglykany bazální membrány a umožnit tak pronikat do okolí, natrávit stěnu cév, zachytit se v cirkulaci na shlucích trombocytů a vytvořit tak nádorové emboly, odolávat účinkům protinádorového imunitního mechanismu, zachytit se na stěně cév vzdáleného místa, proniknout do intersticiální tkáně, založit metastázu, proliferovat, podporovat angiogenezi a případně vytvářet metastázy metastáz.
- To je tzv. metastázový fenotyp.

Schéma vývoje tumorigeneze



Vznik metastáz


- Při vzniku metastáz hrají důležitou úlohu *chemokiny*.
- Úloha chemokinů u nádorového bujení je složitá:
- podporují vrozenou nebo specifickou protinádorovou imunitu,
- mohou podporovat nádorový růst a tvorbu metastáz tím, že posilují proliferaci nádorových buněk, migraci a neovaskularizaci.
- Chemokiny tvořené nádorovými buňkami mohou působit **inhibici protinádorové imunitní odpovědi**, stejně jako autokrinním mechanismem působí jako **růstové faktory**.



Fenomén tumorové podpory

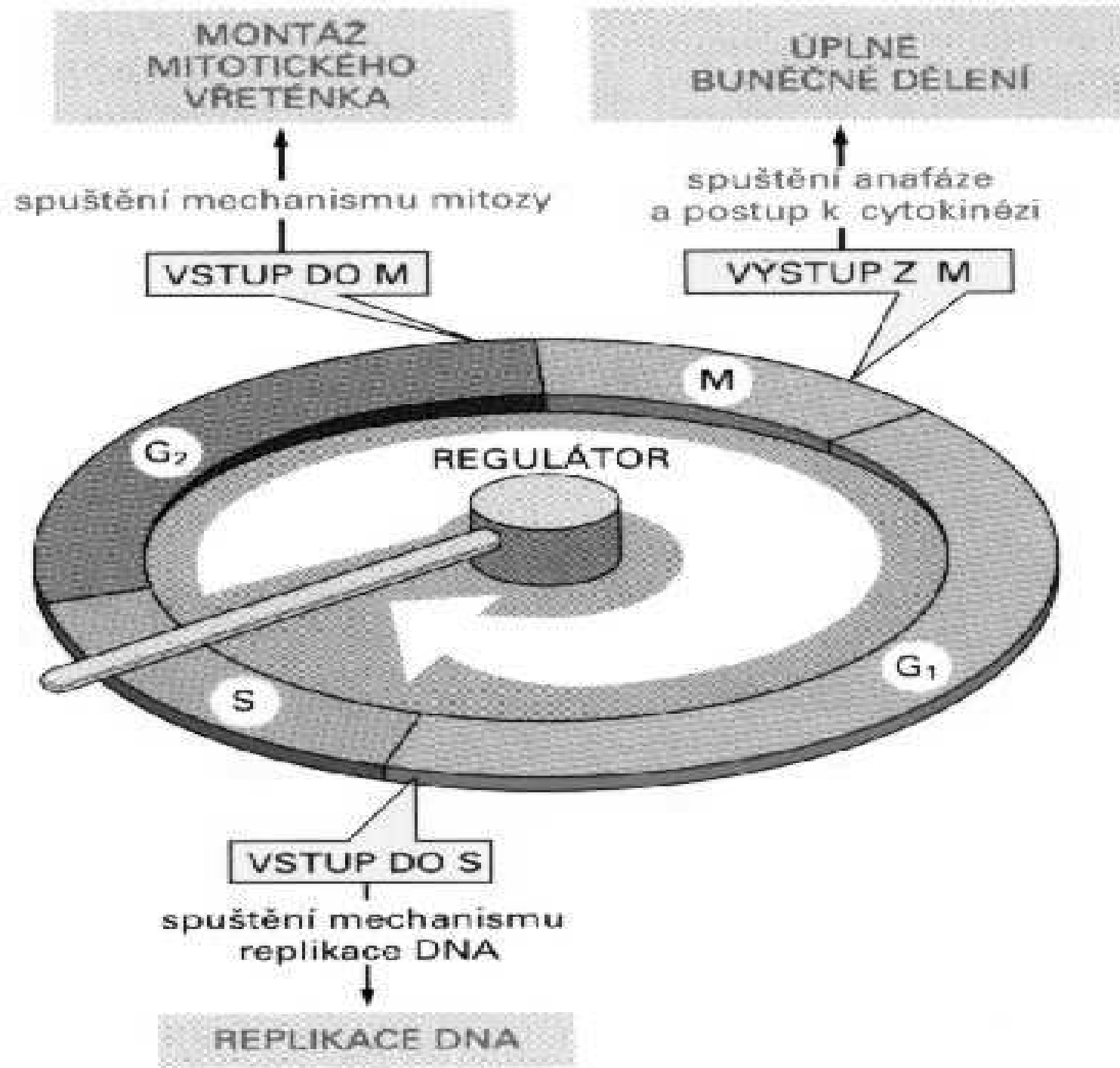
- patří také mezi negenetické mechanismy indukce karcinomu.
- Chemické kancerogeny lze rozdělit na dvě skupiny:
- *iniciátoři*; jde o látky, které mají kancerogenní účinek až po metabolizaci (kupř. účinkem jaterního mikrosomálního oxidačního systému s cytochromem P-450) na *elektrofilní metabolity*.
- *promotoři*. Sami o sobě nejsou kancerogenní, ale maligní transformaci navozují až po předchozím působení iniciátorů. Příkladem promotoru je *forbolester*, který může vytvářet fenokopie transformovaných buněk (nemění ale genotyp). Účinek forbolesteru se uskutečňuje prostřednictvím proteinkinasy C. Její aktivace vyžaduje přítomnosti několika kofaktorů: Ca^{2+} , fosfolipidů, diacylglycerolu. Forbolester může nahradit diacylglyceroly v kaskádě přenosu signálu. (Usnadňuje vazbu s Ca -ionty). *Model iniciátor-promotor je relativně častým mechanismem kancerogeneze.*

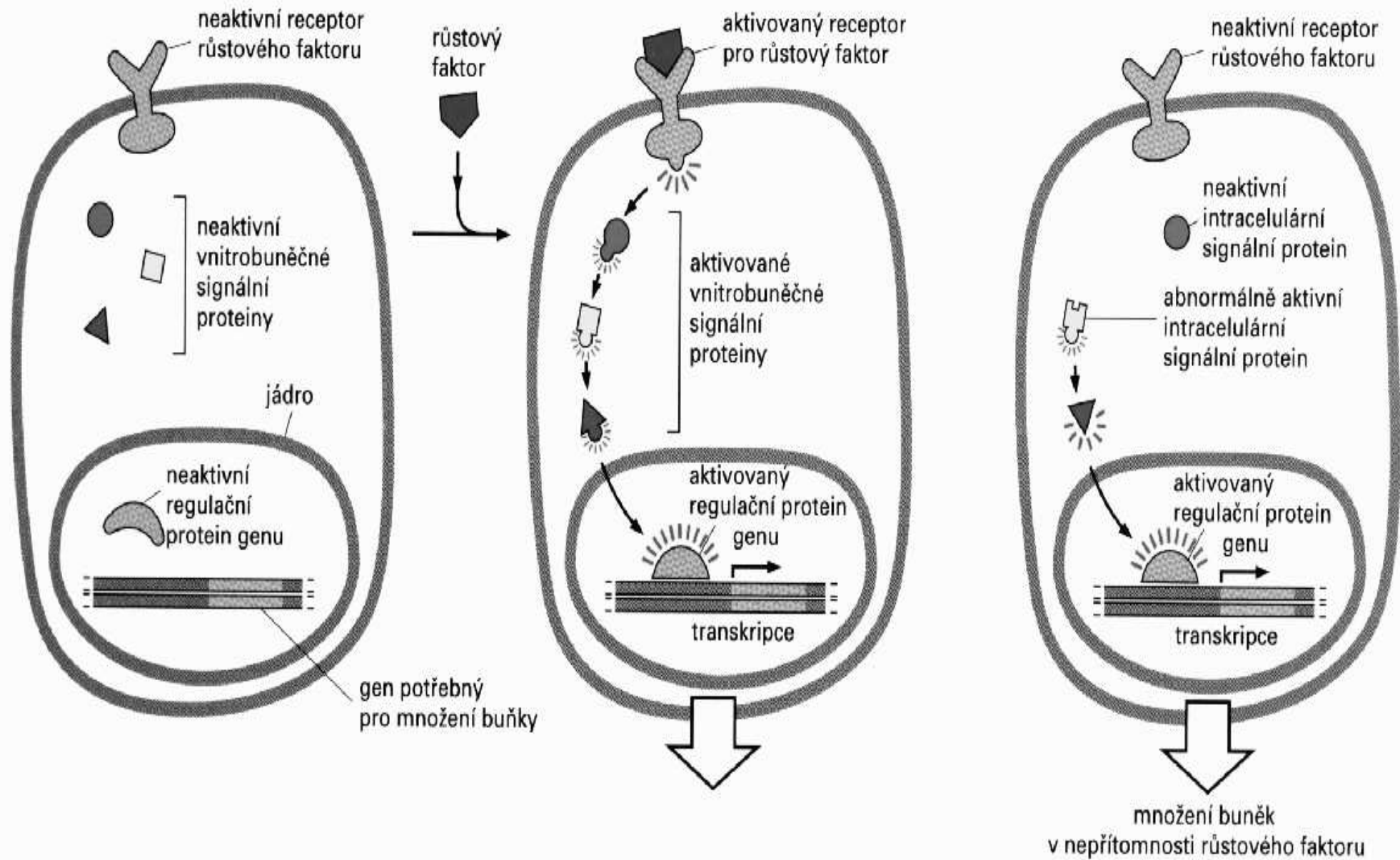
Buněčný cyklus a nádorové bujení

- *U nádorového bujení je postižena především regulace přechodu G1-fáze do S-fáze. Mechanismus regulace je velmi složitý. Tři komplexy cyklindependentních kinas, cyklin D/cdk4, cyklin D/cdk6 a cyklin E/cdk2 fosforylují produkt retinoblastomového genu – Rb, a to na 10ti různých místech a mění tak schopnost Rb asociovat s buněčnými proteiny. Jeden takový protein – E2F – je transkripční faktor, který tvoří heterodimer s jiným transkripčním faktorem DP1, čímž se aktivuje několik genů nutných pro rozvoj S-fáze. Znamená to indukci aktivace dihydrofolátreduktasy, thymidinkinasy, DNA-polymerasy α , c-myc, c-myb a cdc2. Kromě této podpory růstových faktorů podporuje Rb také diferenciaci prostřednictvím své asociace s transkripčními faktory jako je MyoD (myogenní regulační faktor) a aktivovaný transkripční faktor (ATF). Rb je také místem zásahu pro transformující viry jako SV40 large T-antigen, adenovirový E1A a antigen E7 lidského papillomaviru (human papilloma virus E7).*
- 

Buněčný cyklus a nádorové bujení

- *Aktivita cdk* je také *regulována inhibitory cdk (cdki)*, což jsou nízkomolekulové proteiny s obecným inhibičním účinkem na řadu cyklin-dependentních kinas. První člen této rodiny byl identifikován jako **p21**, který inhibuje jak cdk, tak proliferační antigen buněčného jádra (PCNA), což je podjednotka DNA-polymerasy δ .
- Indukce tvorby p21, vzniklá aktivací jeho transkripce prostřednictvím p53 při poškození DNA, zastaví rozvoj cyklu buněčného dělení na několika místech, včetně G1 a S-fáze, což umožní nástup opravného mechanismu DNA. Je-li poškození DNA příliš rozsáhlé a tedy neopravitelné, buňka se stává nenormální a je eliminována apoptózou. Nedojde-li však k apoptóze, vzniklá mutace přetrvává a může být při dělení takto mutované buňky přenesena na buňky dceřiné. Vzniká tak fenomén *genové nestability*, který podporuje maligní transformaci. Stává se to častěji kupř. u nosičů genu HNPCC (hereditární nepolypózní kolorektální karcinom). Je zde defekt v „opravném čtení“, takže chyba v replikaci DNA není zjištěna a opravný mechanismus není nastartován.






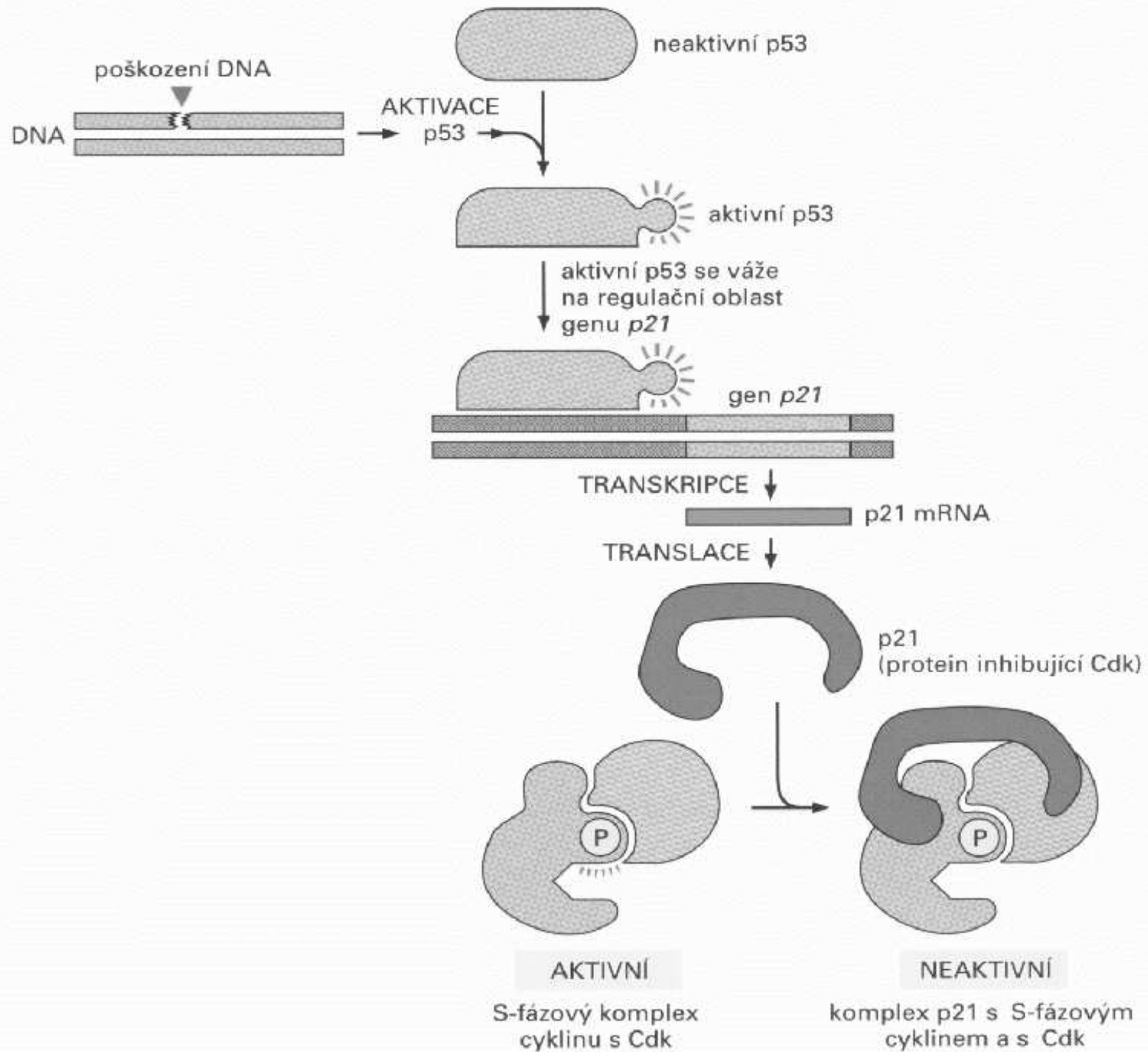
(A) NORMÁLNÍ KLIDOVÁ BUŇKA

(B) NORMÁLNÍ MNOŽÍCÍ SE BUŇKA

(C) MNOŽÍCÍ SE RAKOVINNÁ BUŇKA

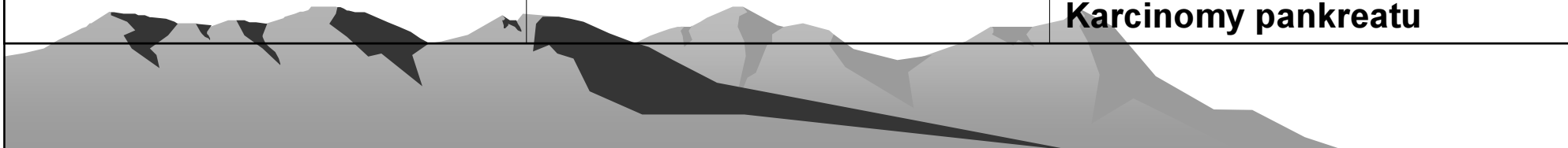
Tumor-supresorový protein p53 (TP53)

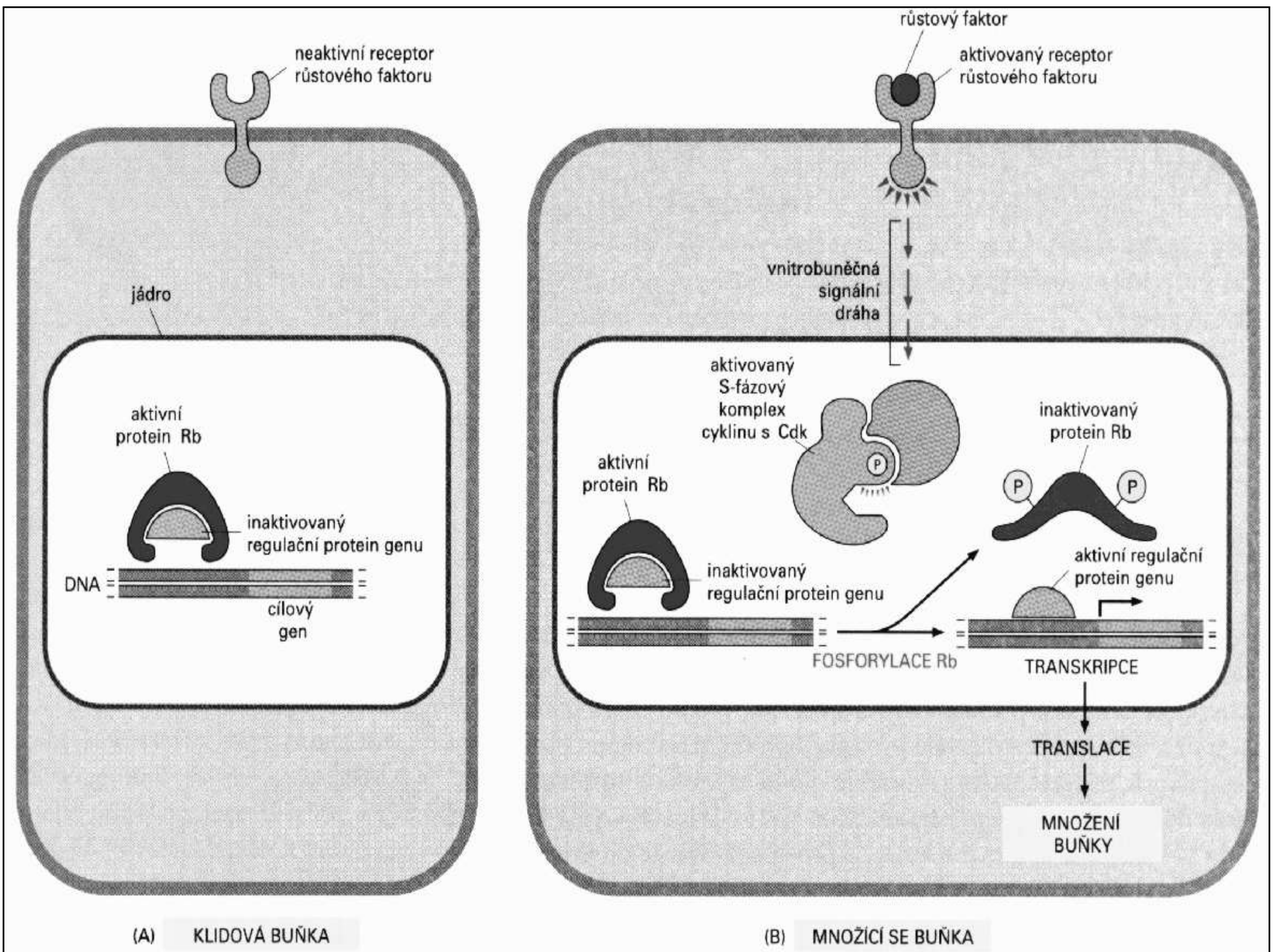
- je jeden z nukleárních proteinů, který má klíčovou úlohu v regulaci cyklu buněčného dělení při přechodu z G0 do G1-fáze. Obsahuje domény pro vazbu na specifický úsek DNA, dále oligomerizující a transkripci aktivující domény. Váže se jako tetramer na vazebné místo na určitém úseku DNA a tím aktivuje expresi genů, kódujících faktory inhibující proliferaci a podporující invazivitu buněk.
 - *Mutanty genu p53* byly prokázány u řady maligních tumorů. Pozměněný TP53 ztrácí schopnost vazby na příslušný lokus DNA, což vede k nedostatečné produkci faktorů potlačujících nádorový růst. Alterace genu p53 se objevuje nejen jako somatická mutace, ale též jako mutace v zárodečných buňkách u některých nádorových onemocnění s familiárním výskytem (*syndrom Li-Fraumeni*).
- 



Regulátory buněčného cyklu u maligních nádorů

GEN	Alterace genu	TUMOR
Retinoblastoma gen (Rb)	Delece Bodová mutace	Retinoblastomy, Osteosarkomy Sarkomy měkkých tkání, Malobuněčné karcinomy plic, Karcinomy močového měchýře a prsu
Cyklin D	Translokace chromosomů, Genová amplifikace	Adenom parathyreoidey, Některé lymfomy, Karcinomy mléčné žlázy, Ca hlavy a krku, jater (primární), Ca jícnu
cdk4	Amplifikace, Bodová mutace	Glioblastom, Sarkom, Melanoblastom
p16 ^{INK4a} (p15 ^{INK4b})	Delece, Bodová mutace, Methylace	Karcinomy pankreatu, ezofagu, plic (malobuněčné) Glioblastomy, Sarkomy, Familiární melanomy Karcinomy pankreatu





(A) KLIDOVÁ BUŇKA

(B) MNOŽÍCÍ SE BUŇKA

Charakteristika nádorově transformovaných buněk

- *Transformované buňky* vykazují *zvýšené vychytávání glukózy* pro vyšší afinitu glukosového transporteru v membráně, podobně jako je tomu normálně pouze u erytrocytů nebo buněk v mozku. Koreluje to s vysokou glykolytickou aktivitou.
- Chybí u nich dále *povrchový fibronektin*, který mají klidové buňky a který udržuje jejich tvar.
- *Změny cytoskeletových elementů* (aktinová mikrofilamenta nejsou difuzně rozptýlena, ale koncentrují se blíže povrchu) jsou příčinou zvýšené mobility povrchových proteinů.
- *Nepřiměřená sekrece transformujícího růstového faktoru a a b* a dalších růstových faktorů, které řídí normálně vývoj embryonálních buněk.
- Produkují též *plasminogenný aktivator*, což je proteáza přeměňující plasminogen na plasmin. Vysoká tvorba plasminu nádorovou buňkou pomáhá penetraci skrz lamina basalis.
- *Mikroprostředí* nebo stroma, v kterém se nádorové buňky nalézají, mají rovněž vliv na progresi (teorie semene a půdy"). Bylo prokázáno, že *metaloproteinasy stromální proteinové matrix (MMP 9)* hrají významnou úlohu v časných stádiích vývoje tumoru a při angiogenezi. U metastáz karcinomu prostaty do kostí se předpokládá jakýsi „osteomimetický“ účinek (chemoatrakce a podpora adherence ke kostnímu endotelu) a ovlivňování vlastností a chování osteoblastů a osteoklastů.

Heritabilita nádorů

- Zatím se předpokládá, že ačkoli některé formy nádorů jsou dědičné, většina vzniká na podkladě **mutace somatických buněk** a je způsobena **endogenními chybami v replikaci DNA** nebo jsou změny vedoucí k maligní transformaci navozeny **účinkem kancerogenů**. UV-záření příslušné vlnové délky může být absorbováno bazemi DNA, která je tak poškozena za vzniku dimerů dvou sousedících pyrimidinů. Tato změna překáží normální transkripci i replikaci DNA. Účinek X-paprsků (ionizující záření) je odlišný: dochází k rozštěpení (přerušení) DNA-řetězce; vznikají tak volné řetězce DNA, které musí být beze zbytku opět navázány opravným mechanismem. Nestane-li se tak (buňka netoreluje volné konce DNA), může dojít k translokaci určitých úseků chromosomů, což bývá příčinou aktivace proto-onkogenů.
- Jedna genetická změna však nestačí navodit maligní transformaci buňky; ta obvykle vzniká až po několika (5ti až 10ti) genových mutacích v průběhu řady let.
- *Genová alterace navodí vznik nádorového fenotypu, např.:*
- *proliferace epitelové buňky - hyperplazie - adenom - dysplazie - karcinom „in situ“ - karcinom invazivní.*
- Přeměna normální tkáně organismu do stavu invazivní nádorové choroby trvá v průměru 5 – 10 let. Ovlivňují to hereditární genetické faktory a somatické faktory epigenetické.

Nádorový genotyp

➤ Současná koncepce modelu vícestupňového vývoje maligního nádoru předpokládá, jak bylo řečeno, nejprve *postupné hromadění genetických změn*. Ty se odehrávají v určitých skupinách genů jako jsou:

- ✓ ***proto-onkogeny***
- ✓ ***tumor-supresorové geny***
- ✓ ***geny udržující stabilitu genomu***
- ✓ ***modifikující geny.***




Protoonkogeny a onkogeny

- *Protoonkogeny* tvoří normální vybavení genomu;
- *kódují proteiny, které řídí proliferaci, diferenciaci a přežívání buněk.*
- 100 různých lidských proto-onkogenů v každé somatické buňce.
- Jsou cílem extra- a intracelulárních cest transdukce signálů (zejména mitogenních), kterými se reguluje jejich exprese.



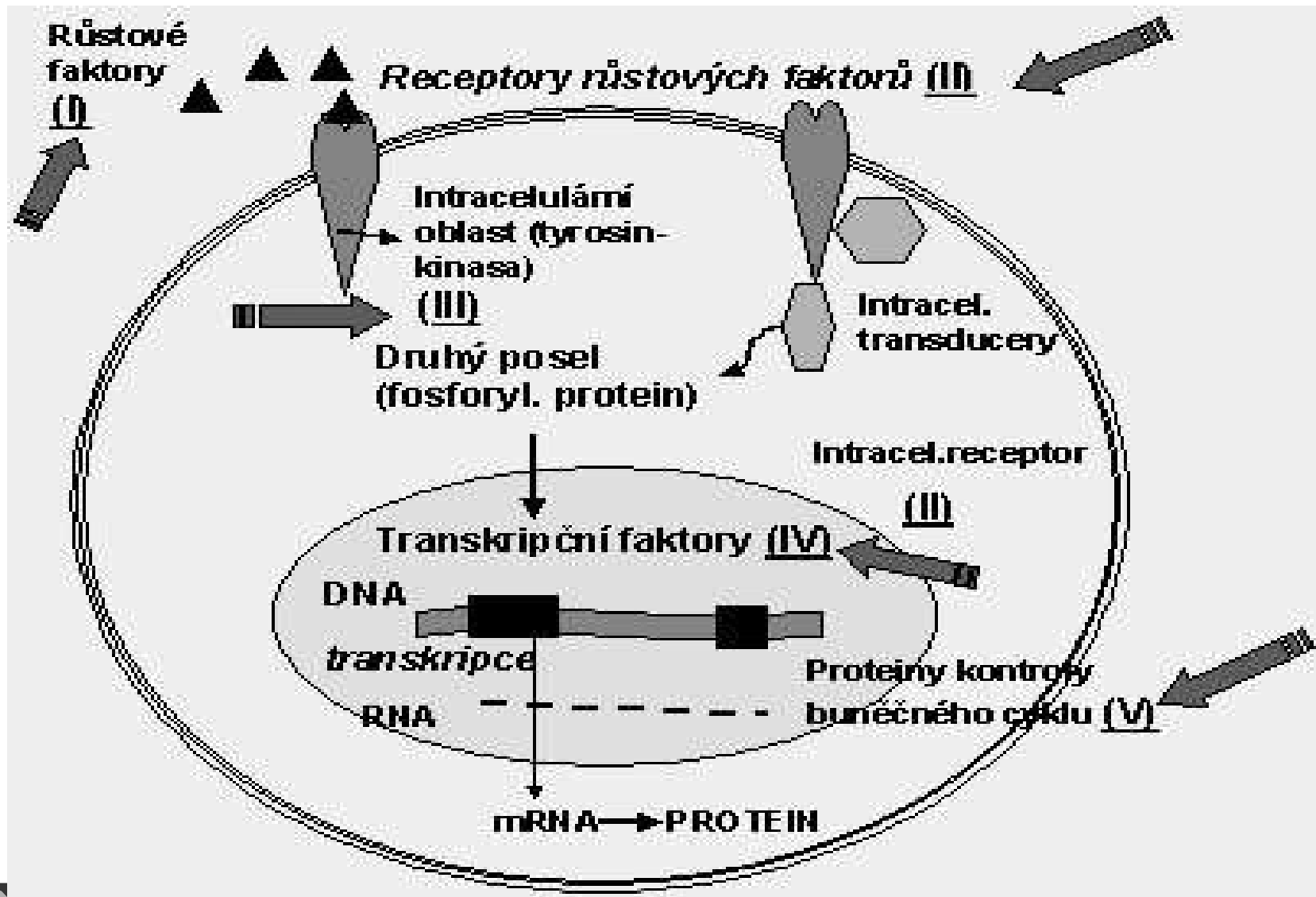
Proto-onkogeny a onkogeny

- Dojde-li k mutaci proto-onkogenů, mění se na onkogeny a jejich aktivita získává tumorigenní charakter.
 - K přeměně proto-onkogenu na onkogen stačí alterace pouze jedné alely genu – tzv. *dominantní mutace* a gen má charakter *dominantního onkogenu*.
 - Mechanismy aktivace mají různé cesty:
 - (a) virová transdukce (kupř. onkogen *src*)
 - (b) genová amplifikace (*myc, abl*),
 - (c) virová inzerce (*myc*)
 - (d) chromosomální přestavba (*myc, abl*)
 - (e) mutace (*ras*)
- 

Protoonkogeny a onkogeny

- Onkogen může vzniknout mutací genů kódujících proteiny signálních drah, které realizují přenos růstového stimulu (růstového faktoru), dojde-li k jeho abnormální aktivitě.
- To může být způsobeno tím, že
- se tvoří v buňce, kde se normálně netvoří nebo
- se tvoří v nadměrném množství anebo v tak pozměněné formě, která se vymyká normální regulaci.
- Takovéto mutované geny jsou tumorigenní, protože umožňují buňce proliferovat i v nepřítomnosti extracelulárního signálu.

Základní skupiny proteinů regulujících buněčný růst



Typy onkogenů

- Navození *transkripce onkogenů*, kódujících syntézu *onkoproteinů*, transkripčními faktory zahajuje maligní transformaci buňky.
- Onkoproteiny jsou velmi podobné (někdy i shodné) s proteiny kódované proto-onkogeny normálních buněk, jejichž úkolem je řídit a kontrolovat růst, proliferaci, diferenciaci a zánik buněk. Klasifikují se do pěti tříd:
 - (1) *růstové faktory*
 - (2) *receptory růstových faktorů*
 - (3) *intracelulární transducery signálu*
 - (4) *nukleární transkripční faktory*
 - (5) *proteiny kontrolující buněčný cyklus.*

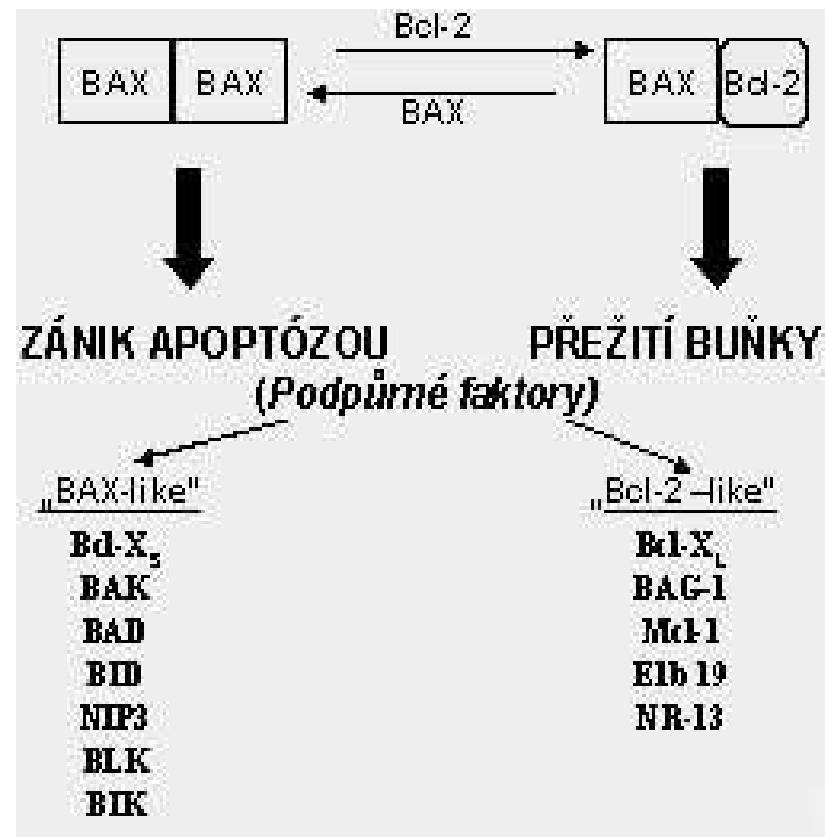
Tumor-supresorové geny (antionkogeny, také recesivní onkogeny)

- Kromě mutací v protoonkogenech mohou vznikat mutační změny v anti-onkogenech (tumor supresorové geny).
- Na rozdíl od onkogenů jimi kódované proteiny *mají antiproliferační účinek, podporují diferenciaci a apoptózu*. V každé somatické buňce je asi 40 tumor supresorových genů. Aby se staly tumorigenními, musí být mutovány obě jejich alely – proto název *recesivní onkogeny*. S tím souvisí tzv. *dvouzásahová teorie*, kterou po prvé formuloval Knudson, když vysvětloval vznik vzácného *hereditárního retinoblastomu*. Na rozdíl od mnohem častějšího *sporadického retinoblastomu*, kde se jedná o náhodné mutace jedné a posléze druhé alely v buňce sítnice, je u hereditární formy jedna mutovaná alela zděděna, příslušný jedinec je heterozygot, u něhož se zděděná nádorová predispozice zatím neprojevuje. Dojde-li však k mutaci/eliminaci druhé alely, iniciuje se rozvoj nádorového klonu buněk sítnice. Tomuto procesu se říká *ztráta heterozygozity (LOH=loss of heterozygozity)*. Prvně objevený tumor-supresorový gen byl nazván *retinoblastomový gen = Rb-gen* a jeho produkt RB-protein. Vyskytuje se v každé buňce, kde reguluje buněčný cyklus dělení.

Vliv apoptózy na přežití nádorových buněk (pro- a anti-apoptózoové faktory)

Nadměrná exprese Bcl-2 inhibuje zánik buněk apoptózou.

Je to způsobeno vazbou Bcl-2 proteinu na BAX-protein, což zabrání jeho homodimerizaci, která podporuje apoptózu.



Tumor supresorový gen p53

- je klíčovým regulačním faktorem, který monitoruje poškození DNA. I
- inaktivace *p53* bývá jedním z prvních kroků, který vede k maligní transformaci při vývoji řady nádorových onemocnění.
- Pacienti s *Li-Fraumeniho syndromem* mají obvykle jednu mutantní alelu v zárodečných buňkách a tím i riziko vzniku sarkomů, leukemie a karcinomu mléčné žlázy. Vzácně pacienti s *Li-Fraumeniho syndromem* nemají v zárodečných buňkách tuto mutaci, ale mutaci genu *CHK 2*, kódující proteinkinasu, která fosforyluje protein *p53*, čímž dochází k jeho aktivaci. Tito pacienti však mívají alteraci v jiných genech – *MDM 2* a *p14ARF*, které regulují expresi *p53*.



Přehled některých recesivních onkogenů podmiňujících nádorová onemocnění

Symbol	Název	Nádorové onemocnění
<i>APC</i>	Gen adematózní polypózy tlustého střeva	Kolorektální karcinom Karcinom pankreatu Desmoidy Hepatoblastom
<i>BRCA1</i>	Gen 1 pro familiární karcinom prsu/vaječníku	Hereditární karcinom prsu/ ovaria
<i>BRCA2</i>	Gen 2 pro familiární karcinom prsu/vaječníku	Hereditární karcinom prsu/ ovaria
<i>CDH1</i>	Gen pro kadherin 1	Familiární karcinom žaludku Lobulární karcinom prsu
<i>CDNK2A</i>	Gen inhibitoru cyklin-dependentní kinasy 2A (p16)	Maligní melanom kůže
<i>CYLD</i>	Gen familiární cylindromatózy	Cylindromy
<i>EP300</i>	Gen vazebného proteinu 300 kD-E1A	Karcinomy kolorektální, pankreatu, prsu

Geny udržující stabilitu genomu

- Označují se někdy jako *mutatorní geny* a bývají i řazeny k *tumor supresorovým genům*. Produkty těchto genů se uplatňují v opravných mechanismech poškozené DNA. Ale mutatorní geny, na rozdíl od onkogenů a tumor-supresorových genů neposkytují buňce schopnost nekontrolované proliferace samy o sobě.
- Jejich mutace vede ke zvýšené frekvenci mutovaných onkogenů a tumor supresorových genů, někdy až 1000krát.
Patří sem geny, jejichž produkty zajišťují vystřížení poškozeného úseku DNA a umožňují excizní opravný proces. Jejich recesivní mutace způsobuje onemocnění zvané *xeroderma pigmentosum* a *Cockayenův syndrom*, což jsou prekancerózy se zvýšenou náchylností ke karcinomům kůže navozeným expozicí UV-záření.

Geny udržující stabilitu genomu

- Další skupinou mutatorních genů jsou „*mismatch*“ *opravné geny*; kódované proteiny opravují chybné zařazení baze při replikaci DNA. Projevem mutací těchto genů je instabilita na nukleotidové úrovni – *mikrosatelitová instabilita*. Zárodečné mutace zejména MSH2 a MLH1 genů jsou podkladem *hereditárního nepolypózního kolorektálního karcinomu (HNPCC)*.
- Mutace genů, jejichž produkty zajišťují „opravné čtení“, jehož úkolem je identifikace chybných úseků DNA při replikaci, byly prokázány u karcinomu žaludku a tlustého střeva. Jedná se především o mutaci genu pro *polymerasu d*.



Geny udržující stabilitu genomu

- Rozpoznání poškozené DNA a aktivace p53 vyžaduje přítomnost ATK. Tento gen kóduje kinasu, která aktivuje jak CHK2 („checkpoint“ kinázu), tak p53 při poškození DNA. Děti trpící *ataxií-teleangiectazií* mají inaktivující mutaci obou alel.
- V klinickém obraze je pak imunodeficience, mozečkové příznaky a zvýšené riziko vzniku maligního nádorového onemocnění, především lymfomů. Buňky těchto pacientů nemohou aktivovat p53 jako odpověď na poškození DNA.

Geny udržující stabilitu genomu

- Jiný syndrom označovaný jako *NBS (Nijmegen breakage syndrom)* je způsoben homozygotní inaktivací genu *NBS (nibrin)*, který se podílí přímo na opravách poškozené DNA (poškození obou vláken). Do tohoto mechanismu rozpoznávajícího a opravujícího poškozenou DNA vstupuje též *gen BRCA1 ("breast cancer susceptibility gene")*. Mutace v jedné alele zárodečných buněk nesoucích tento gen je odpovědná asi za polovinu případů karcinomu mléčné lázy s familiárním výskytem. Při účinku proteinu BRCA1 hraje důležitou funkci jak ATM, tak CHK2, které umožňují jeho fosforylaci, když dojde k poškození DNA. ATM také fosforyluje kofaktor BRCA1 - CtIP, který reguluje transkripci *genu BRCA1*. Defekty DNA-opravného mechanismu přispívají k akumulaci genetických defektů (viz *genová nestabilita navozená genem HNPCC = gen pro hereditární nepolypózní kolorektální karcinom*) a podporují progresi maligně transformovaných buněk.

Modifikující geny

- Jde o geny, jejichž mutace může ovlivnit vznik a rozvoj nádorového procesu.
- Jejich produkty mohou pozitivně nebo negativně působit na průběh kancerogeneze, a to s interindividuální nebo interfamiliární variabilitou.
- Na jejich prozkoumání se teprve čeká; bude umožněno nejnovějšími technikami molekulové biologie v oblasti genomiky a proteomiky.



Apoptóza a tumorigeneze

- Růst nádorových buněk je podmíněn nejen nekontrolovaným buněčným dělením, ale také snížením jejich opotřebovatelnosti a naopak zvýšenou schopností přežít.
- Většina nádorových buněk, ne-li všechny, získala rezistenci vůči mechanismům vedoucím k jejich programovanému zániku – apoptóze.
- Existují experimentální důkazy, že narušení signalizace apoptózy je obecným předpokladem existence a rozvoje nádorových buněk. Velmi důležitou úlohu přitom má pravděpodobně *onkogenní potenciál faktoru rodiny Bcl2*.

Apoptóza a tumorigeneze

- *Bcl2* (B-cell lymphoma 2) gen byl původně objeven jako gen napojený na imunoglobulinový lokus v průběhu chromosomové translokace u folikulárního lymfomu.
- Přitom se též zjistilo, že jeho nadměrná exprese má spíše než na proliferaci vliv na apoptózu, respektive na její narušení. Znamená to, že nascentní neoplastické buňky získávají touto inhibicí programovaného zániku selekční výhodu. Mohou setrvávat zahnízděny jako ložiska v hostitelské tkáni, zejména v místech, kam se nedostanou cytokiny a kyslík. Tento únik před apoptózou je pak podpořen dalšími onkogenními sebezáchovnými mechanismy, které vedou ke vzniku agresivnějších klonů; defektní apoptóza též usnadňuje metastázování, protože buňky mohou ignorovat restriční signály přicházející z okolí a přežívat odděleně od extracelulární matrix. Mutace, které favorizují rozvoj nádoru, odvracejí odpověď na cytotoxickou terapii a vznikají tak refrakterní klony.
- Úloha *Bcl2* (a jeho homologů – *Bcl-xL* a *Bcl-w*) v mechanismu inhibice apoptózy spočívá pravděpodobně v ochranném účinku na integritu mitochondrií tím, že brání výstupu *cytochromu c* do cytoplasmy, což znemožní aktivaci kaspasové kaskády.



Nádory a „nesmrtelnost“ buněk

- Nádorová buňka se stává „*nesmrtelnou*“. Je to způsobeno zvýšenou aktivitou enzymu *telomerasy*. Opakované dělení buněk je omezeno - *zkracováním telomer*.
- Telomery jsou klíčovým stabilizačním faktorem terminální části chromosomu a ukotvují je k nukleární matrix.
- Telomery mají opakující se sekvenci nukleotidů TTAGGG.
- Délka telomer se zmenšuje po mnohonásobných pasážích (1 buněčný cyklus = zkrácení o 1 telomer) a dále v buněčných kulturách od pacientů v pokročilém věku.
- Jejich obnovování je katalyzováno *telomerasou*; délka telomer koreluje s obsahem telomeras. Z toho důvodu se předpokládá, že úbytek DNA od konce chromosomů zkracováním telomer vede k delecí nezbytných genů, což má za následek omezení života buněk.




Nádory a „nesmrtelnost“ buněk

Počet telomer slouží jako *generační hodiny*, které odpočítávají jednotlivé cykly buněčného dělení a určují tak životnost buněk a replikační potenciál. *Nádorové buňky mají replikační potenciál vysoký*; umožňují jim to nejméně dva mechanismy, kterými si udržují dostatečný počet telomer, respektive jejich obnovování. Nejběžnější (aktivita prokázána u 85-90% nádorových buněk) je

mechanismus TERT („telomerase reverse transcriptase“)

tzv. alternativní prodlužování telomer („alternative lengthening of telomere (ALT) pathway“), které umožňuje udržování počtu telomer bez vlivu telomerázy



„NESMRTELNOST BUŇKY“

Normální somatická buňka má omezenou kapacitu proliferace danou určitým počtem možných dělení a řízenou opakovanou sekvencí konce DNA

- TTAGGG tzv. telomery

1 cyklus = zkrácení o 1 telomer

Nové nastavení umožňuje **TELOMERASA**

Zvýšená aktivita telomerasy u nádorových buněk



Význam angiogeneze v rozvoji nádorového onemocnění

- Angiogeneze má klíčový význam pro růst nádoru. Rostoucí nádorové ložisko může bez cévního zásobení dosáhnout velikosti pouze 1 – 2 mm³, kdy přívod kyslíku a živin je možný ještě difuzí z okolní tkáně. Nádor pro další růst potřebuje vlastní cévní zásobení. Popud je tomu dán vzniklou *hypoxií* nádorových buněk. Ta navodí *genetickou nestálost*, dochází ke vzniku mutací; *mutace genu p53*, který je ochráncem genomu, neumožní opravu chyby v záměně bazí.

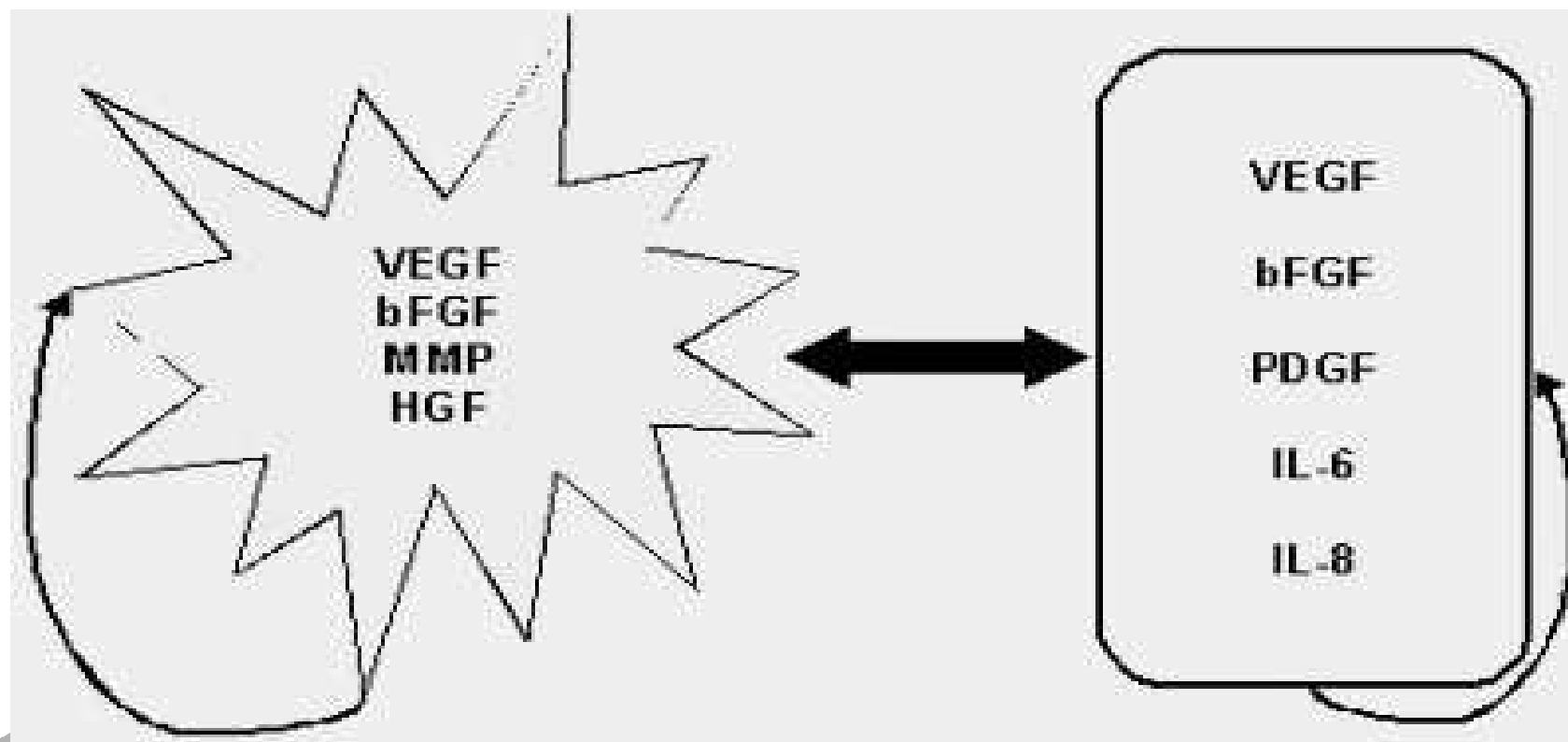


Význam angiogeneze v rozvoji nádorového onemocnění

- Dochází dále k nerovnováze mezi antiangiogenními a proangiogenními faktory. Tato změna, kterou se zahájí proces nádorové angiogeneze, se nazývá „*angiogenní switch*“.
- Objevuje se nový fenotyp nádorových buněk, vyznačující se ***potlačením antiangiogenních faktorů – thrombospondinu – a zvýšenou tvorbou angiogenních působků.***
- Buňky nádoru a sousední endoteliální buňky se v tomto směru vzájemně ovlivňují parakrinní, ale i autokrinní sekrecí angiogenetických faktorů

Vzájemné ovlivnění nádorových buněk a endotelií při angiogenezi

VEGF=vaskulární endotelový růstový faktor; EGF=epidermální růstový faktor; PDGF=růstový faktor odvozený od destiček; bFGF= fibroblastový růstový faktor bazický; HGF=hepatální růstový faktor; MMP=matrixové metaloproteinasy; IL-6=interleukin 6; IL-8=interleukin 8



Tumorová neovaskularizace

- Novotvorbu cév v nádorovém ložisku předchází
- vazodilace cév v nejbližším okolí navozená především zvýšenou aktivitou NO-syntasy a tím produkcí NO-radikálu. Ten také potencuje mitogenní účinek VEGF.
- produkce metaloproteinás rozrušuje bazální membránu, čímž se usnadňuje nejen migrace endotelových buněk po vláknech tvořených stimulovanými fibroblasty, ale i migrace tumorových buněk.
- migrující endotelie jsou zdrojem integrinů zajišťujících jejich životnost.
- Kapilární morfogenezi podporují ještě další působky – (např. E-selektin). Vaskularizace nádorového ložiska umožní jeho prokrvení (perfuzi), a tím jeho další růst.

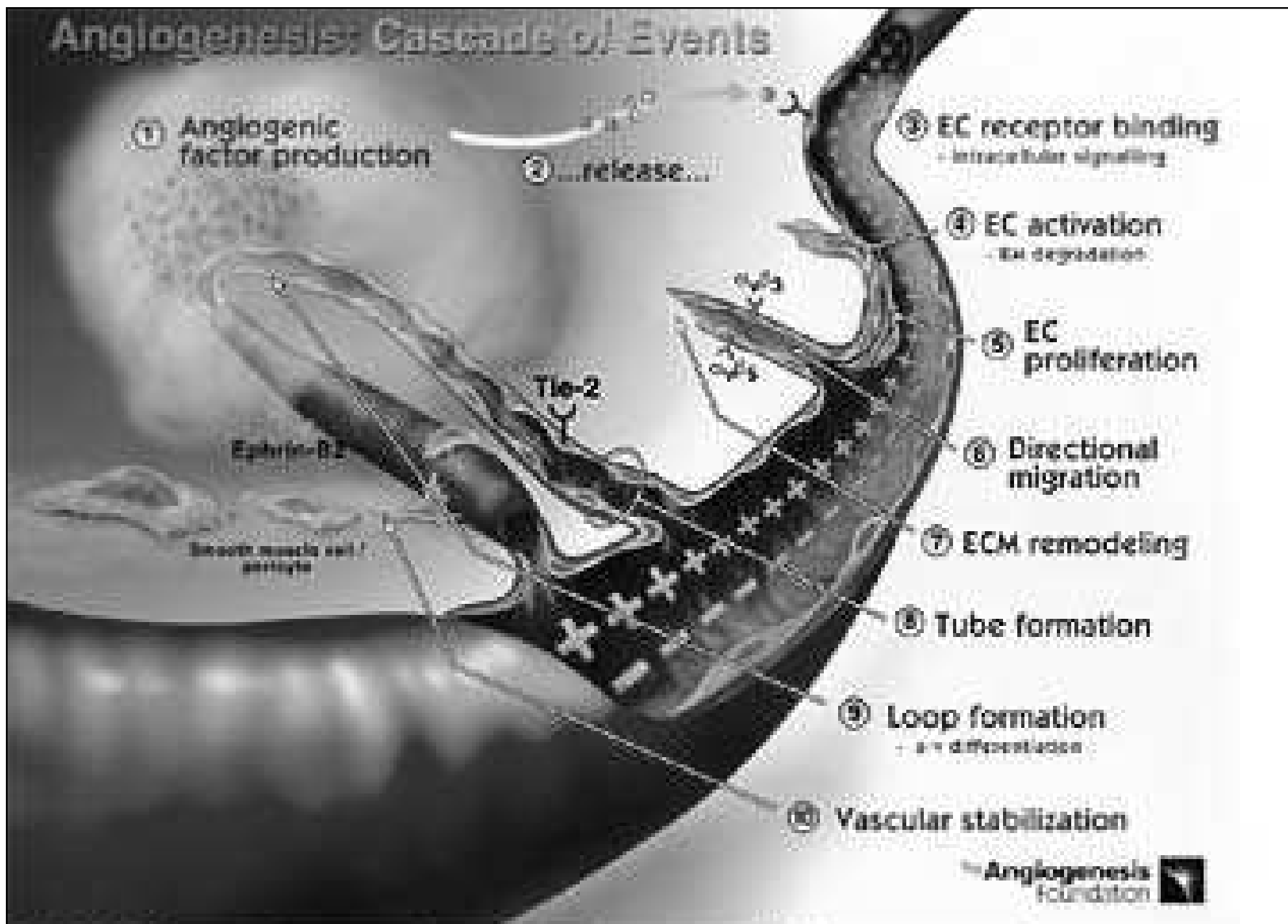


Tumorová neovaskularizace

- Čím je angiogeneze intenzivnější, tím je prognóza nádorového onemocnění nepříznivější; zvyšuje se riziko metastáz.
- Stupeň angiogeneze může sloužit jako prognostický faktor.
- Nejintenzivnější angiogeneze bývá na okraji nádorového ložiska, kde lze její intenzitu posoudit histologicky. Používá se také *zviditelnění tzv. horkých ložisek* (hot spots) pomocí monoklonálních protilátek proti cévním endoteliím nebo proti adhezním molekulám (CD31, CD34), event. proti von Willebrandovu faktoru.
- Citlivým ukazatelem hustoty kapilárního řečiště je *stanovení akvaporinu-1 (AqP-1)*; jde o faktor působící synergicky s VEGF a významně zvyšující cévní propustnost.



Angiogenesis: Cascades of Events

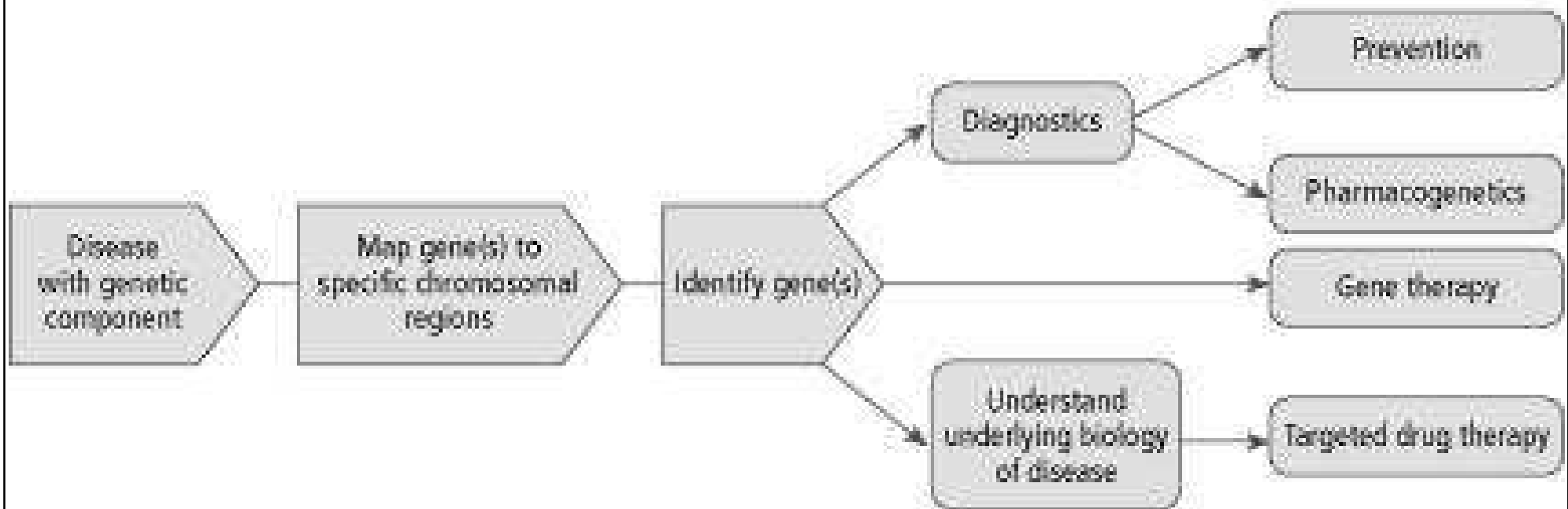


Patologie

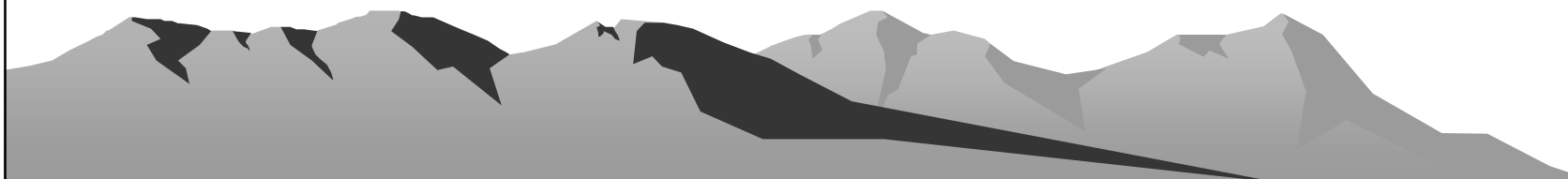
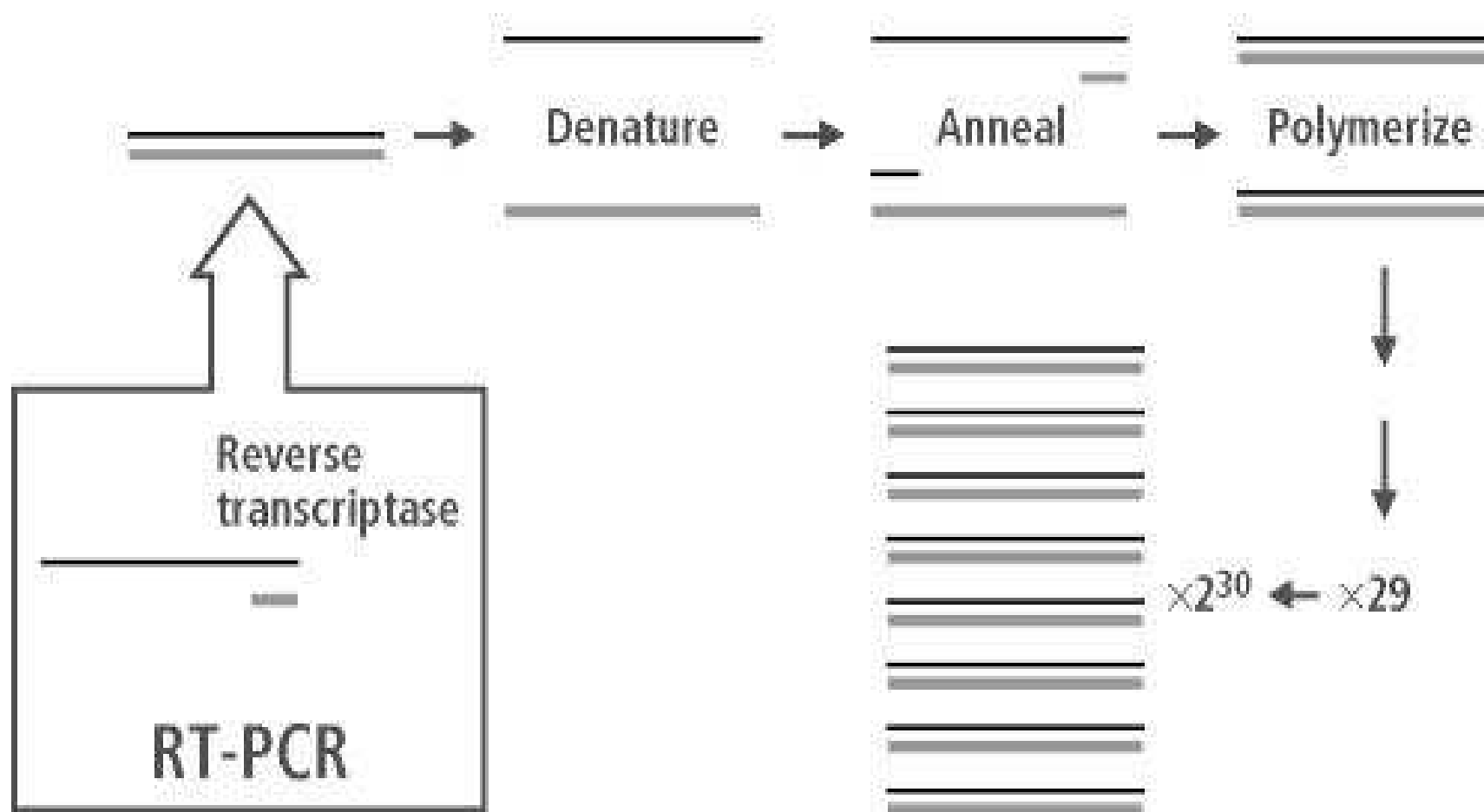
- Obecná
- Speciální
- Orgánových systémů
- Orgánů
- Buněk
- Molekulární



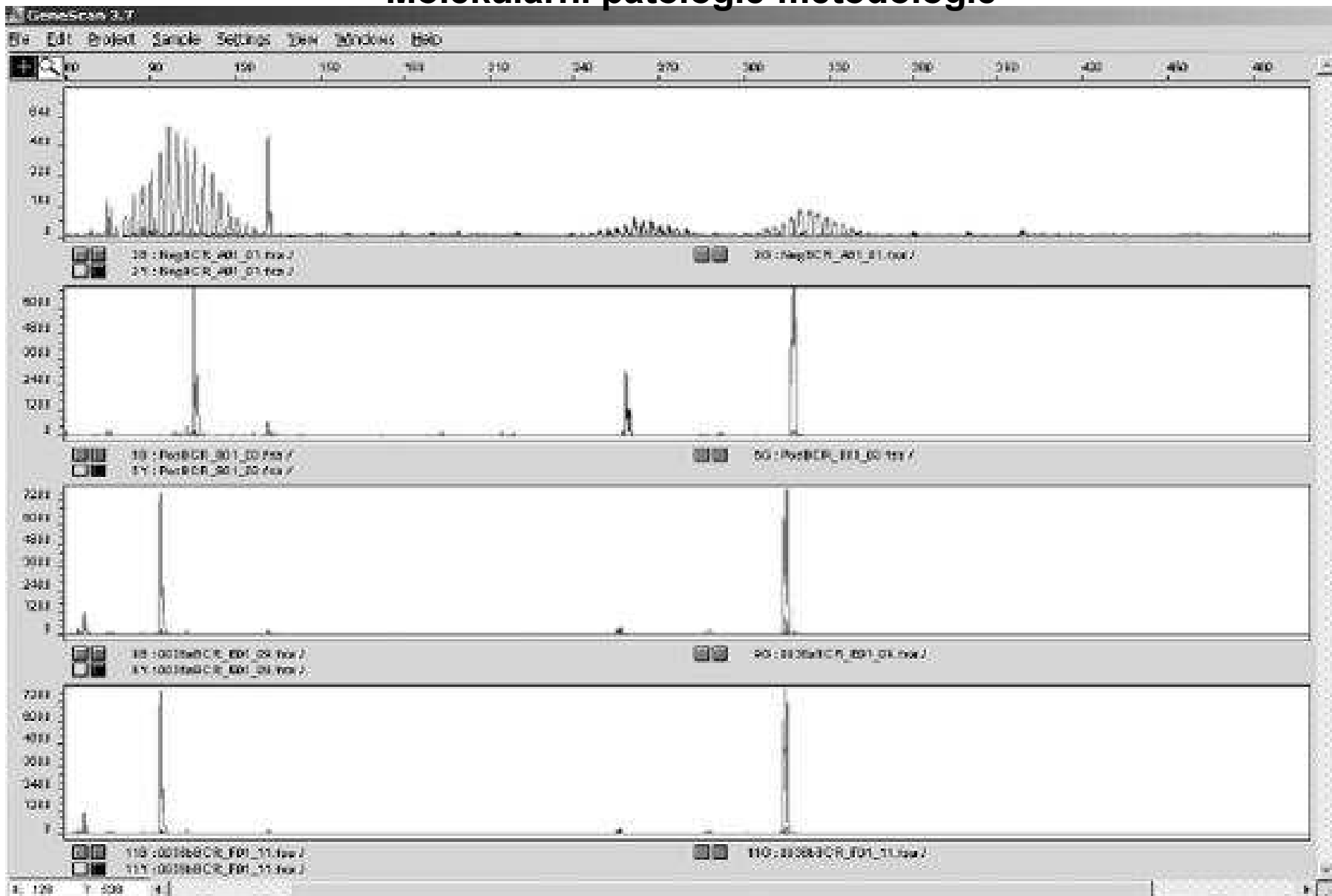
Molekulární patologie- cíle



Molekulární patologie-metodologie

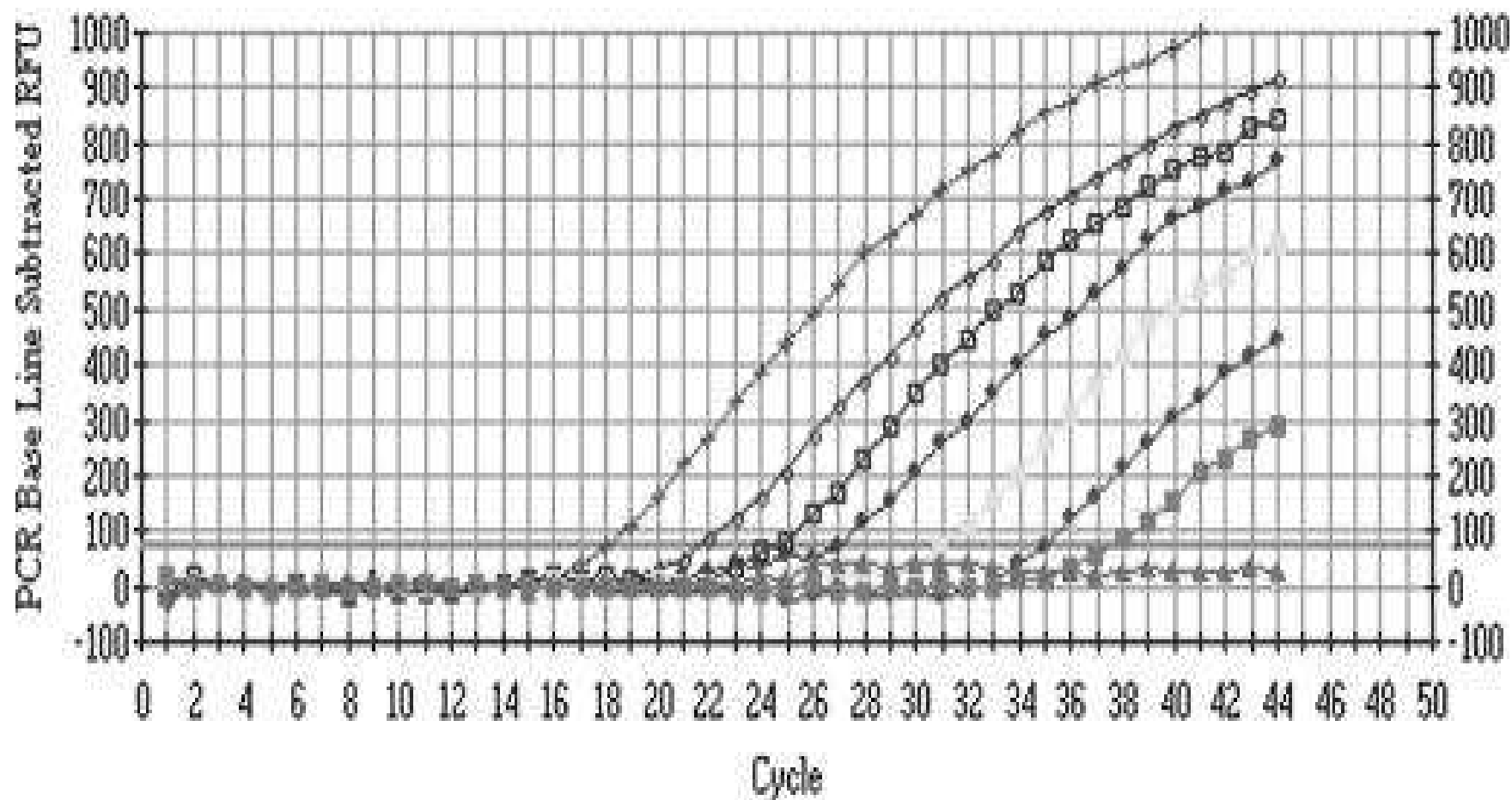


Molekulární patologie-metodologie



Kapilární sekvenace

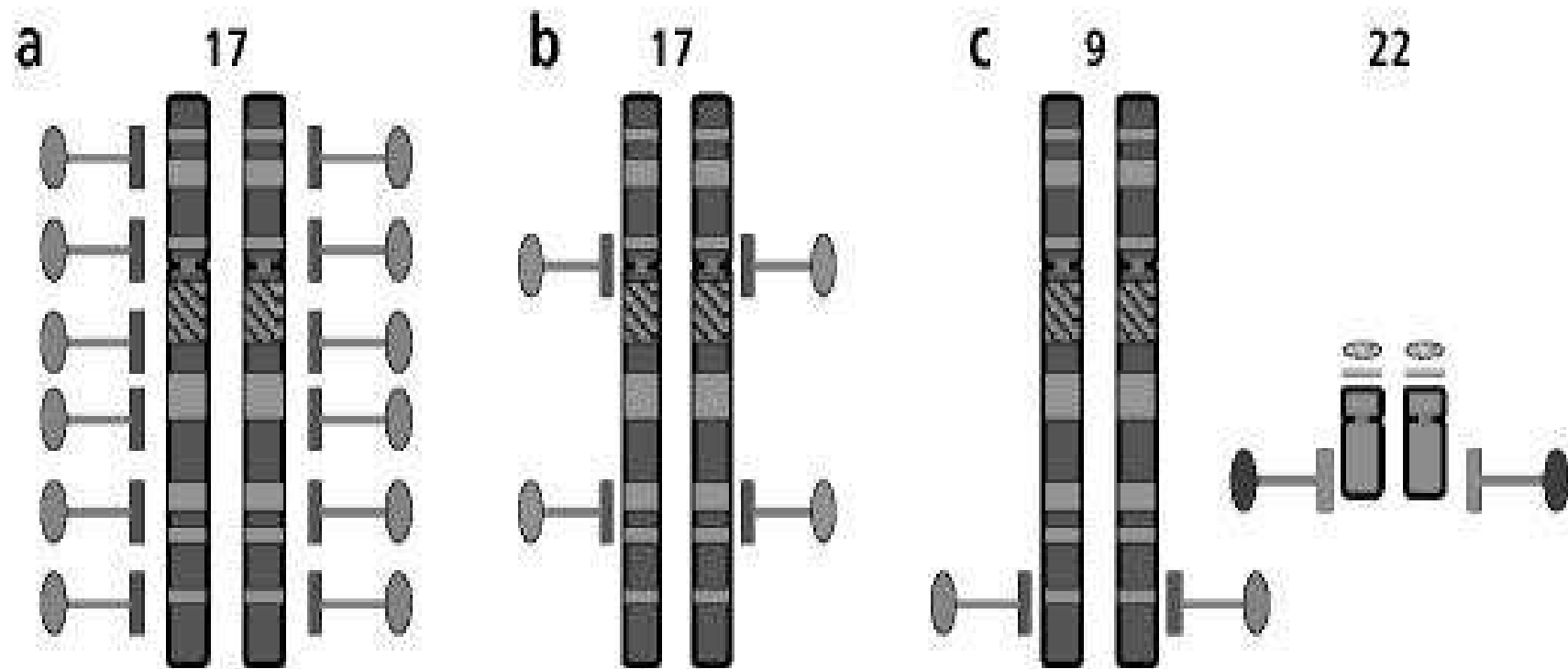
Molekulární patologie-metodologie



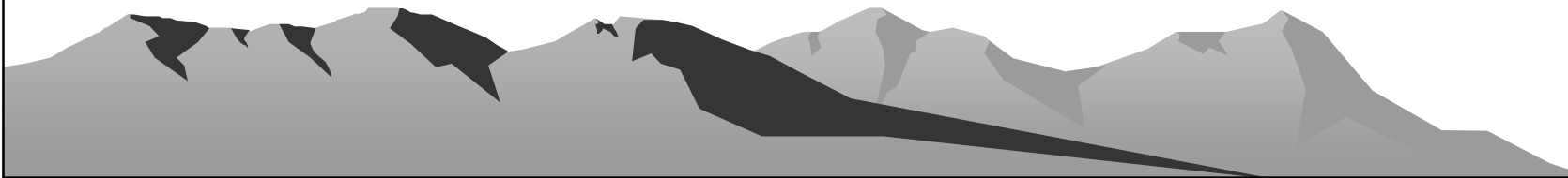
Q-PCR (real time PCR)



Molekulární patologie-metodologie



Fluorescentní hybridizace in situ

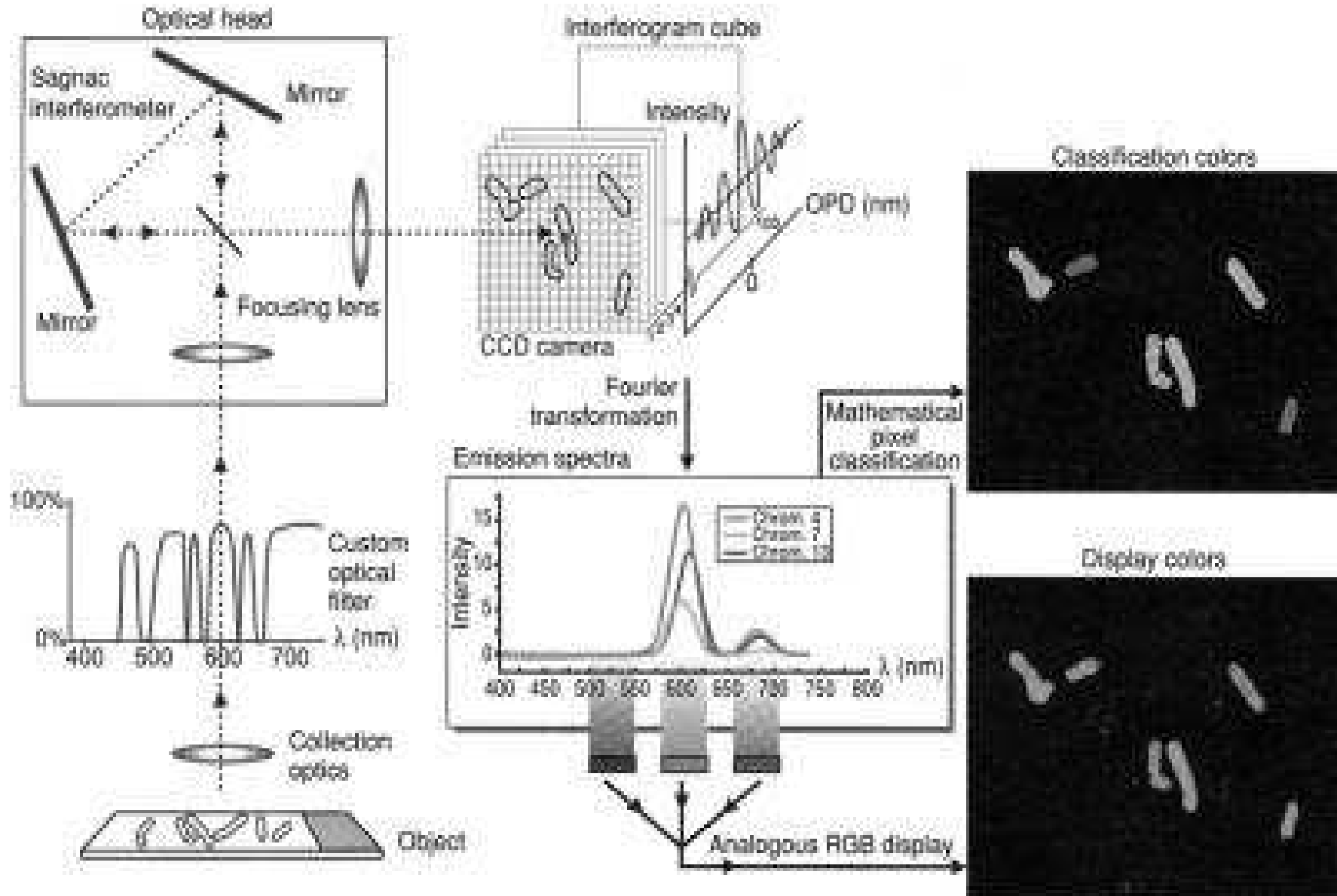


Fluorescence in situ

- Barevné sondy, které jsou schopny identifikovat celý chromosom navázáním na sekvence na povrchu (např. chromosomu 17) a tak nabarvit chromosom vybranou fluorescenční barvou (*Obrázek 5a*)
- Centromerické sondy, které identifikují centromerickou oblast specifického chromosomu a umožňují tak spočítat počet kopií tohoto chromosomu dokonce i v interfázi nedělících se buněk (*Obrázek 5b*)
- Alelicky specifické sondy, které adherují na specifickou sekvenci cílové alely, jako např. *p53* nebo onkogenu *HER2/neu* (*Obr. 5b*)
- Normální buňka by měla mít 2 kopie onkogenu *HER2/neu*, 1 na každém chromosomu 17. Použitím centromerické sondy pro chromosom 17 (zelená) v kombinaci s alelicky specifickou sondou pro *HER2/neu* oncogen (oranžová) se dá očekávat vizualizace 2 zelených a dvou oranžových signálů v každé buňce (*Obr. 5b*). V buňkách karcinomu prsu, ve které dochází k amplifikaci tohoto onkogenu, se v jádře vizualizuje 4 a více oranžových signálů a pouze 2 zelené.
- Podobně kombinace 2 alelicky specifických sond na zlomovou oblast na dlouhém raménku chromosomu 9 (zelený signál) a 22 (červený signál) je schopna detekovat *t(9;22)* Philadelphský chromosom (*Obr. 5c*).

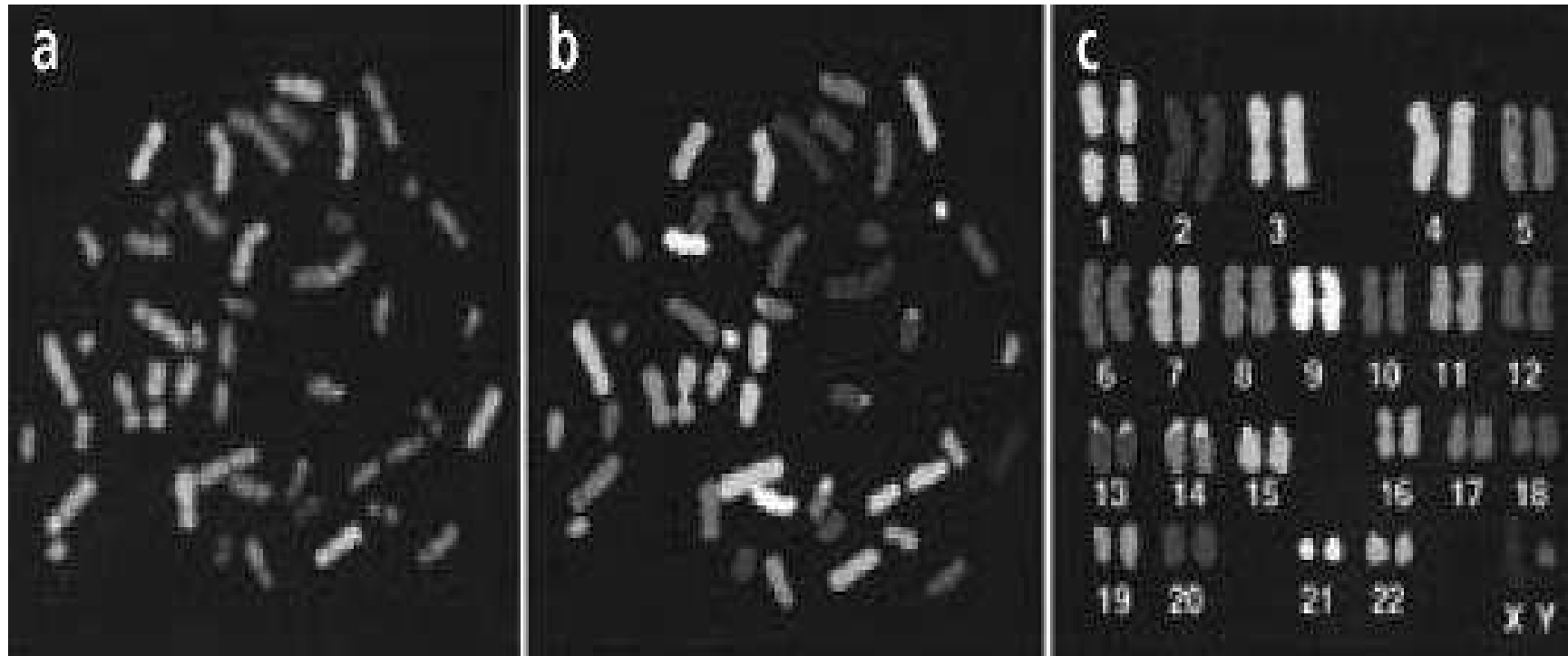


Molekulární patologie-metodologie



Spectral karyotype imaging

Molekulární patologie-metodologie



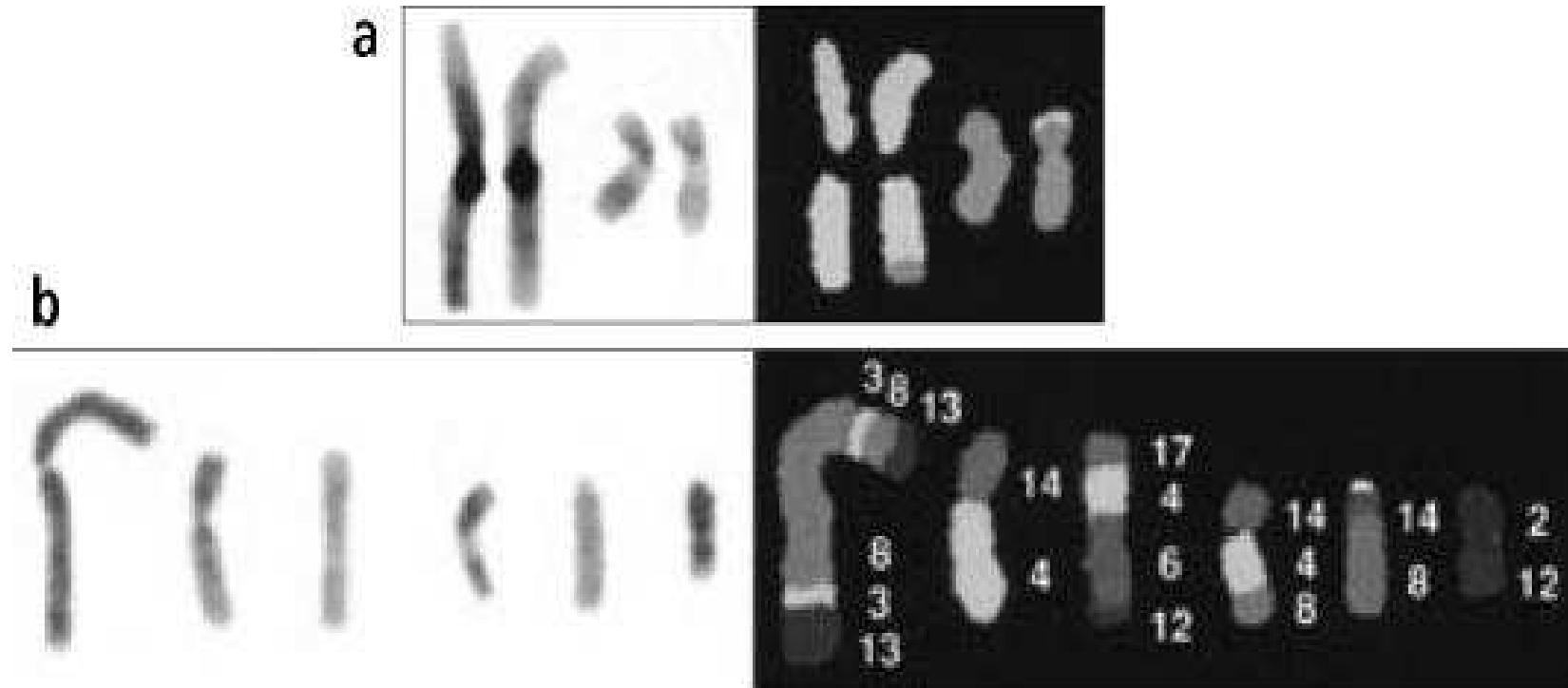
Spectral karyotype imaging (SKI)

(a) Displayové barvy

(b) Klasifikační barvy

(c) Konečný karyotyp se všemi 23 chromosomovými sadami v numerickém pořadí

Molekulární patologie-metodologie

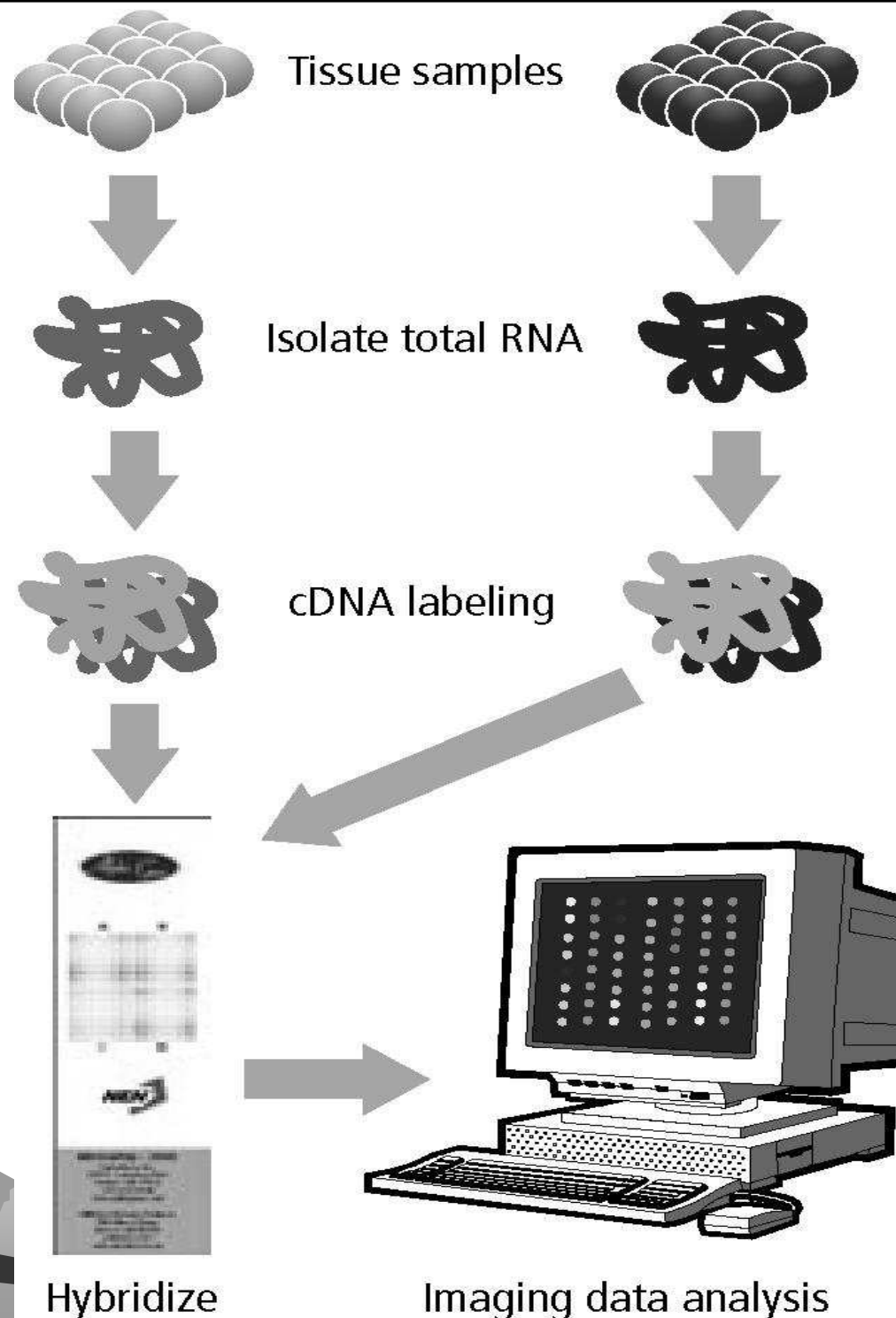


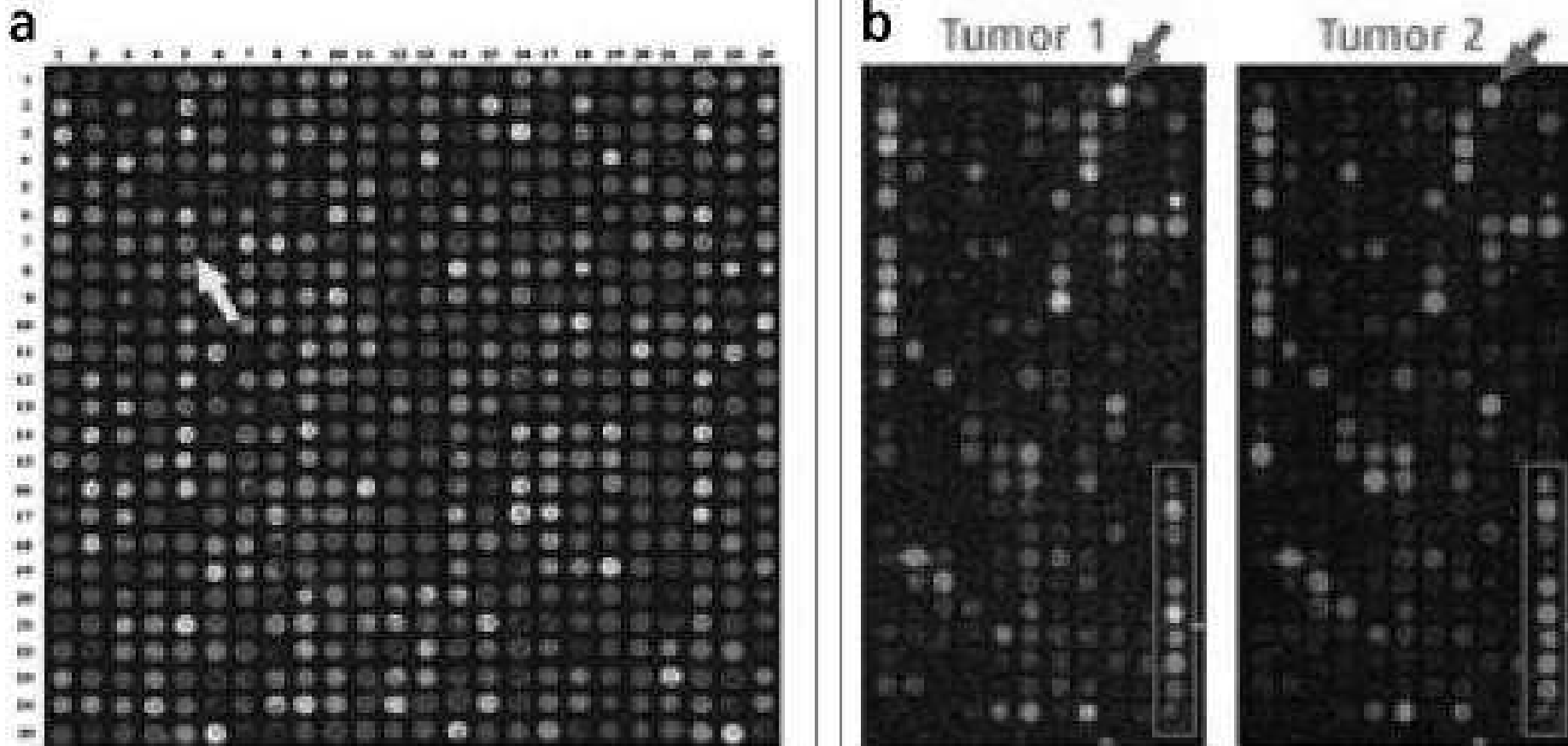
Spectral karyotype imaging:

(a) Translocation (1;11)

(b) Komplexní markerové chromosomy u karcinomu prsu

DNA microarray.
Každý čtvereček na
skleněném sklíčku obsahuje
1200 cDNA loci pro celkem
4800 genů.





(a) DNA microarray reader ukazuje fluorescenční intenzity různých cDNA. V tomto případě gen indikovaný žlutě zjevně zvýšeně exprimován oproti „modrým“ genům

(b) Rozdíly v expresi genů mohou pomoci identifikovat „vzorce“ k predikci prognózy nebo terapie. Červeně označená skupina indikuje funkční cestu.