

# Molekulární genetiky člověka

## Somatické mutace a rakovina

Jana Šmardová

Patologicko-anatomický ústav, FN Brno -  
Bohunice

# Nádor, tumor, neoplazma, novotvar

- je nová a abnormální tkáň v mnohobuněčném organismu, která v tomto organismu nemá fyziologickou funkci a roste neregulovaným způsobem.

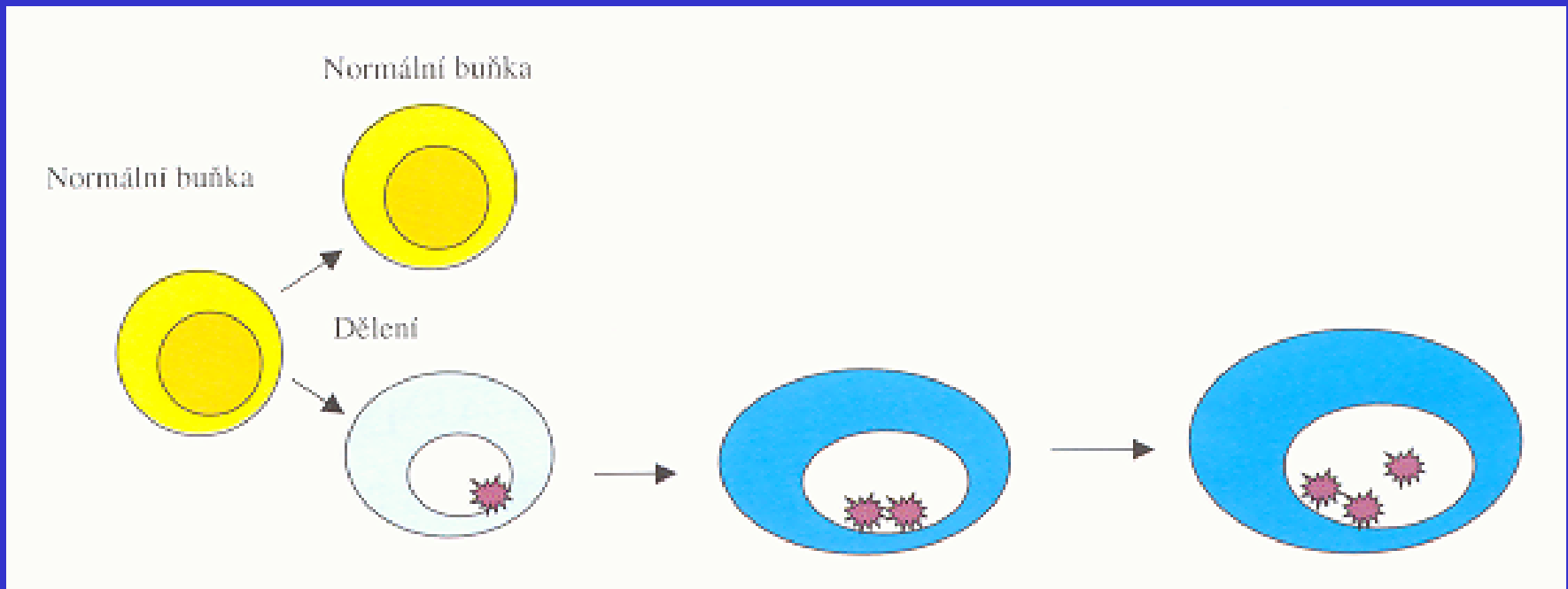
- je geneticky podmíněný abnormální přírůstek buněčné tkáňové hmoty klonálního charakteru. Jeho růst není v koordinaci s růstem okolních tkání a rovnovážným stavem organismu.

# Kancerogeneze

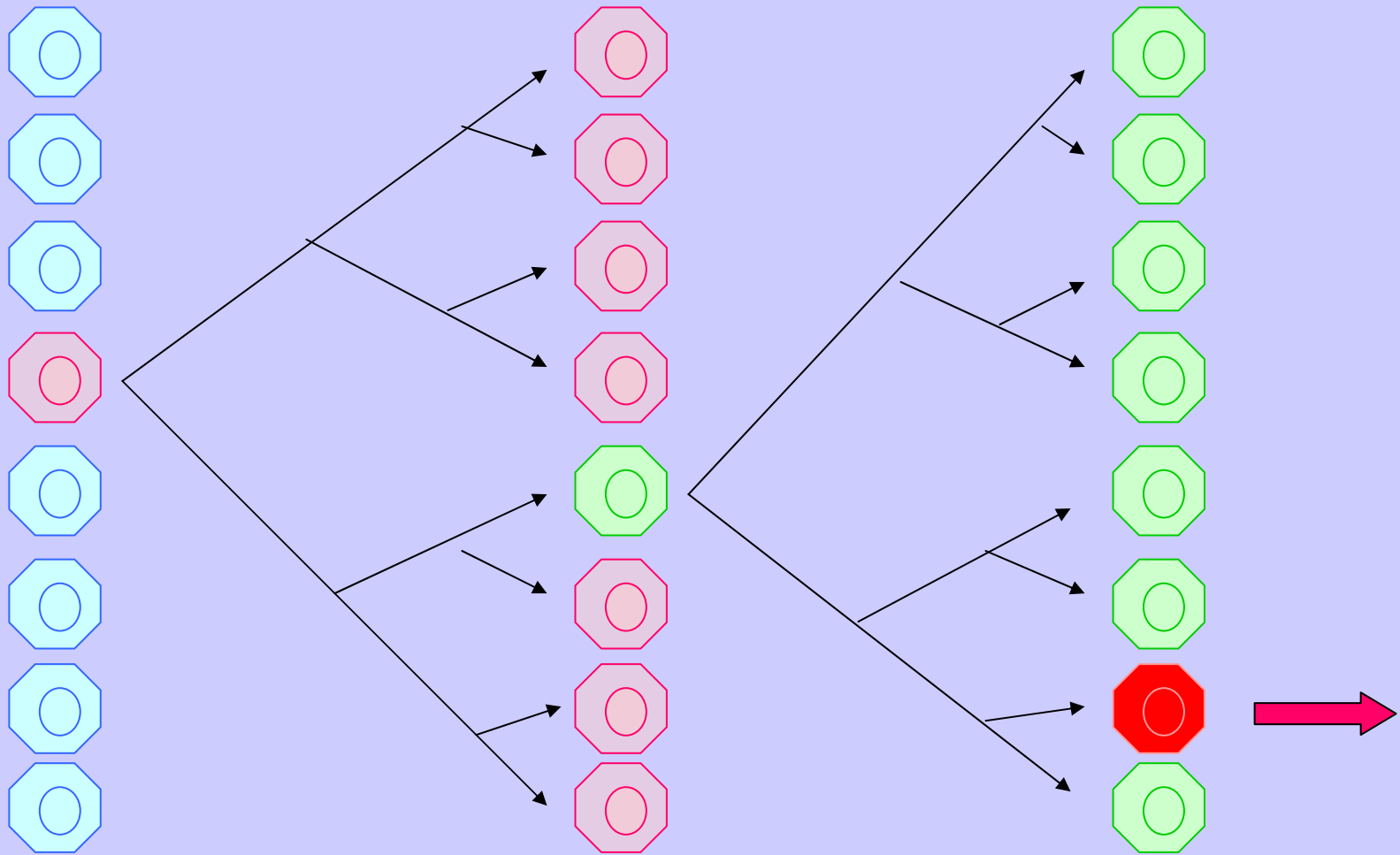
- je proces vzniku a vývoje nádoru
- je vícestupňový proces
- podstatou kancerogeneze je postupné hromadění genetických (a epigenetických) změn

**Neoplastická transformace** - je přeměna somatické buňky v buňku nádorovou

# Podstatou kancerogeneze je postupné hromadění genetických změn



# Vícestupňová kancerogeneze spojená s kroky klonální expanze (selekce)



# Kolik a které geny jsou změněny během kancerogeneze?

- Nádor není **monogenní** onemocnění.
- Odhaduje se, že pro vývoj nádoru je nezbytných 4-7 událostí (zásahů).
- Konkrétních genů, které mohou být během kancerogeneze změněny, jsou desítky.
- Obecně existuje šest (sedm?) základních vlastností plně maligního nádoru:

# Šest získaných vlastností maligního nádoru



## získaná schopnost

Soběstačnost v produkci růstových signálů

Necitlivost k signálům zastavujícím b.c.

Poškození apoptózy

Neomezený replikační potenciál

Posílení angiogeneze

Tvorba metastáz

## příklad

aktivace H-ras

ztráta RB

produkce IGF

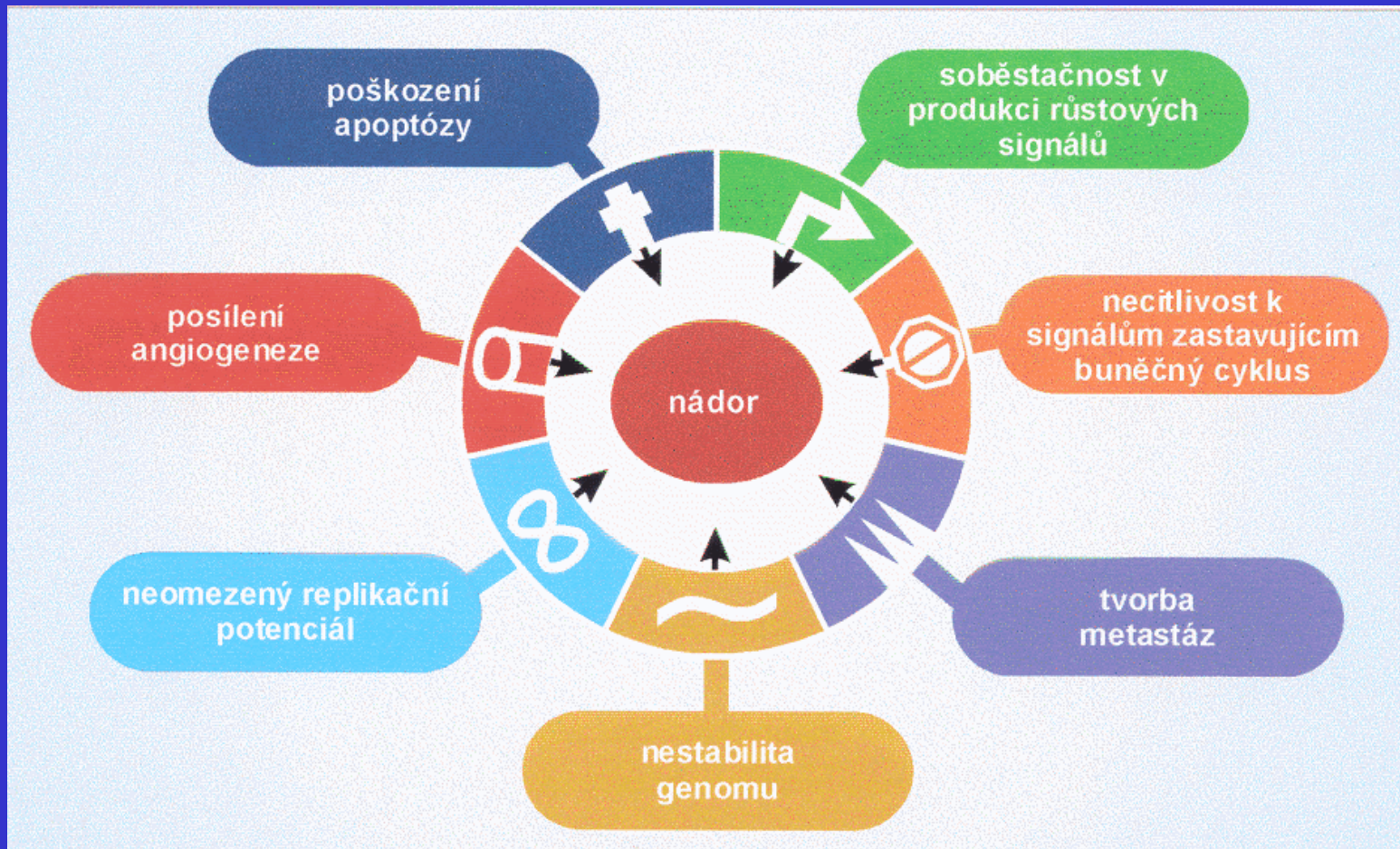
aktivace telomerázy

produkce VEGF

inaktivace E-cadherinu

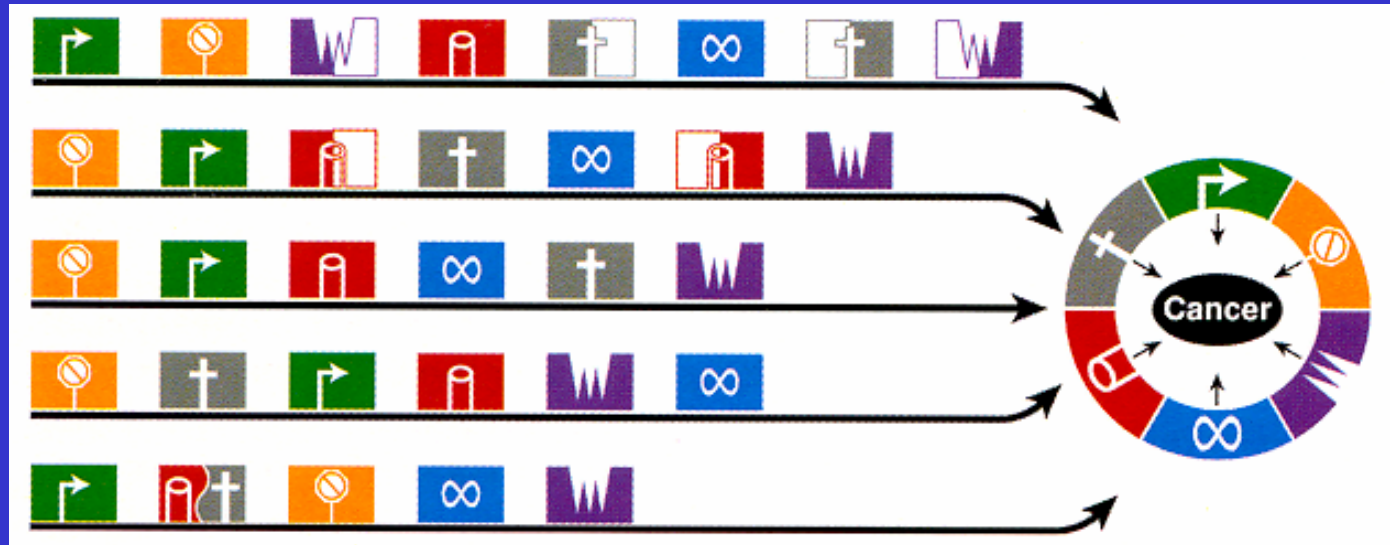
**Nestabilita genomu** jako podmínka akumulace všech nutných změn?

# Kancerogeneze má obecné rysy





# Kancerogeneze má individuální průběh



Individuální je: pořadí zásahů

počet zásahů

konkrétní zasažené geny

# Onkogeny

**Protoonkogen** je strukturní gen eukaryotické buňky, který se svým translačním produktem podílí do značné míry na regulaci dělení buněk a jejich diferenciaci.

**Onkogen** je protoonkogen pozměněný/aktivovaný tak, že vyvolává neoplastickou transformaci buňky.

**Aktivace protoonkogenu** je přeměna protoonkogenu na onkogen.

**Mutace protoonkogenů** jsou:

- aktivující
- dominantní
- vyskytují se v somatických buňkách a jen výjimečně v zárodečných buňkách

# Nádorové supresory

Produkty genů pro nádorové supresory (**antionkogeny**) v normálních buňkách nevyvolávají proliferaci, ale naopak ji potlačují a udržují buňky ve stadiu klidu ( $G_0$ ). Jejich ztráta se projevuje neregulovanou proliferací.

**Mutace nádorových supresorů** jsou:

- inaktivující
- recesivní („**recesivní onkogeny**“) - spojeno s **LOH**
- vyskytují se v somatických a také v zárodečných buňkách

# Onkogenní (nádorové) RNA viry

**Retroviry** - obsahují ve svém genomu onkogen (akutně transformující viry) nebo aktivují protoonkogen, vedle kterého se integrovaly (pomalu transformující)

RNA viry a lidské nádory:

- lidský lymfotropní virus typu I (HTLV-1) - T-leukémie (lymfom) dospělých (ATTL)

# Onkogenní (nádorové) DNA viry

Používají jinou strategii transformace: neobsahují onkogeny, ale kódují proteiny, které interagují s nádorovými supresory (RB, p53, p300/CBP) hostitelské buňky, a tak hostitelskou buňku tlačí do S fáze:

**SV40:** velký T antigen různými doménami interaguje s p53, RB, p300/CBP

**adenoviry:** E1A interaguje s RB a p300/CBP; E1B interaguje s p53

**papilomaviry HPV-16, HPV-18:** E6 interaguje s p53, p300/CBP; E7 interaguje s RB

# Onkogenní (nádorové) DNA viry

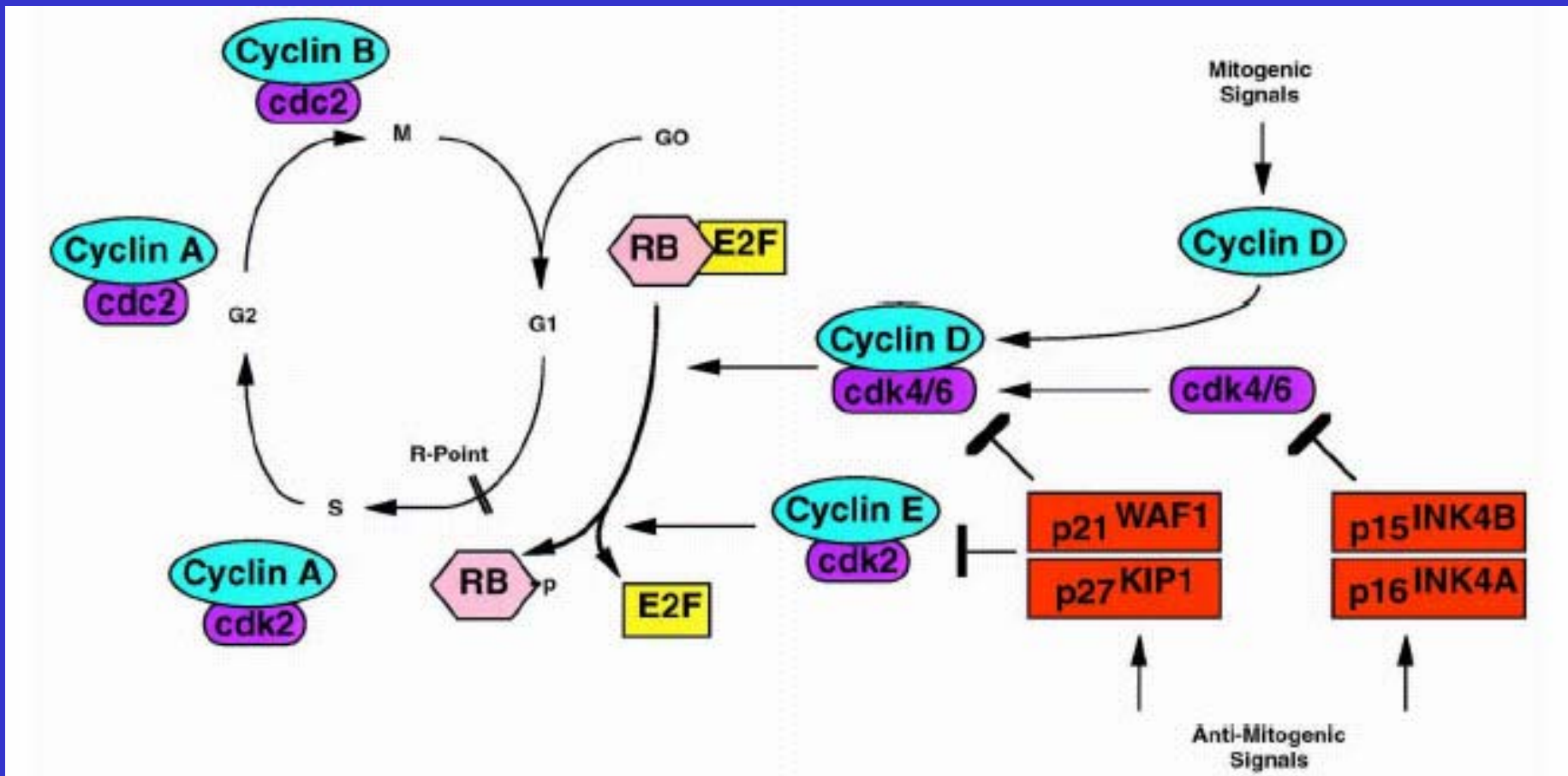
## DNA viry a lidské nádory:

- **Virus Epstein-Barrové (EBV)** - Burkittův lymfom (BL), Hodgkinův lymfom (HD), lymfomy, nazofaryngální karcinomy (NPC)
- **Virus hepatitidy B (HBV)** - hepatocelulární karcinom (HCC)
- **Lidské papilomaviry (HPV 16, 18,..)** - anogenitální nádory, nádory ústní dutiny, bradavice
- **Lidský herpesvirus typu 8 (HHV8)** - Kaposiho sarkom (KS)

# Onkogeny

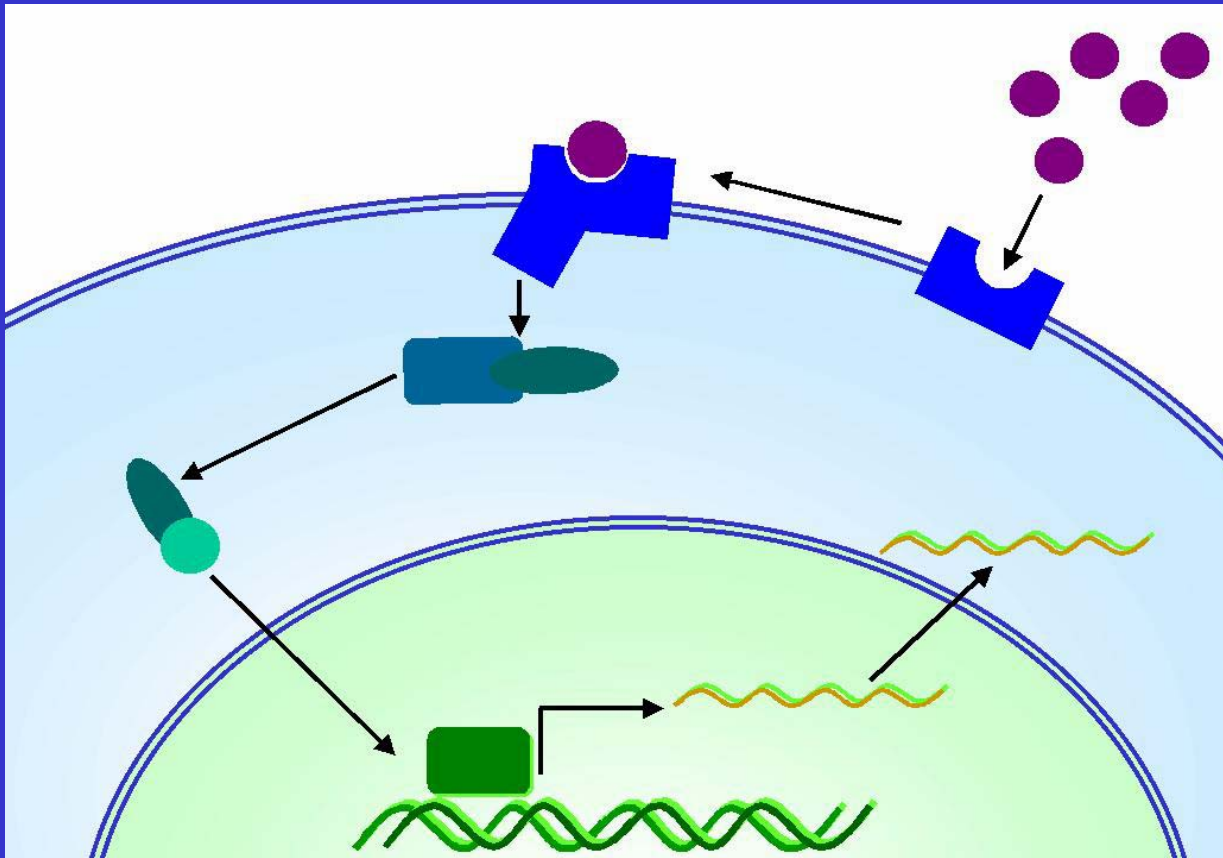
# Je rakovina nemocí buněčného cyklu?

## Regulace buněčného cyklu - bod restrikce - regulace fosforylace RB





# Struktura signální dráhy: klasifikace protoonkogenů



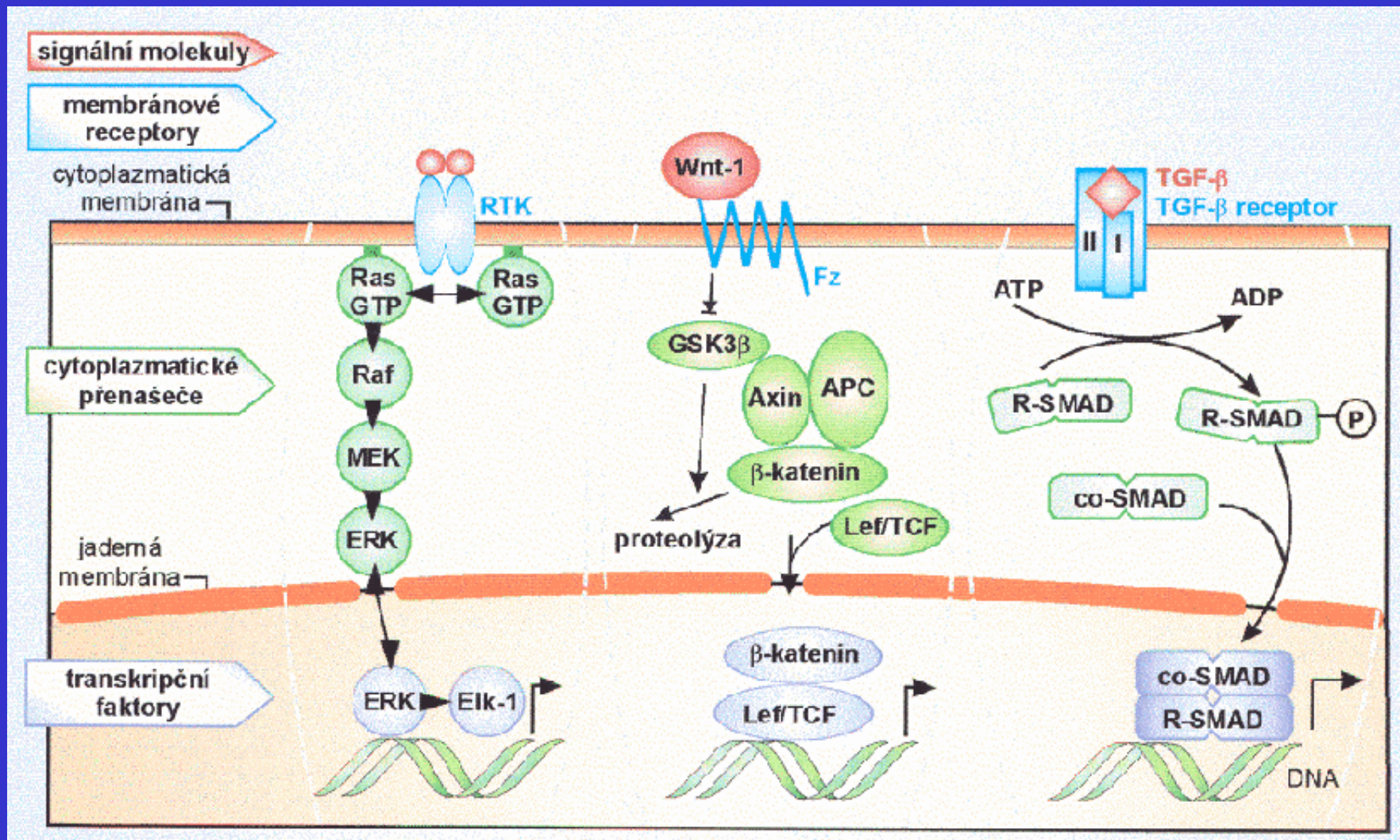
- Růstové faktory

- Receptory  
růstových faktorů  
a Ras-proteiny

- Cytoplazmatické  
přenašeče

- Transkripční  
faktory

# Příklady signálních drah



# Růstové faktory a RTK receptory

- po vazbě svých specifických ligandů receptory dimerizují a dochází k autofosforylaci a také k fosforylaci dalších signálních molekul; tak může být zahájena řada vnitrobuněčných signálních kaskád
- autofosforylací se změní konformace - zpřístupní se katalytická doména a vazebná doména pro substráty
- substráty interagují především prostřednictvím svých SH2 a SH3 (Src-homology) domén

# Typy mutací postihující růstové faktory a RTK receptory

- Produkce/nadprodukce (vlastních) růstových signálů
- Amplifikace receptoru: neadekvátně efektivní „vychytávání“ extracelulárního signálu - buňky s koncentrovaným receptorem jsou pozitivně stimulovány k proliferaci, i když hladina extracelulárního signálu je nízká a za normálních okolností by mitogenní dráhu neaktivovala
- Změna struktury receptoru: jeho aktivace je nezávislá na vazbě ligandu

# Příklad růstového faktoru: PDGF

PDGF („platelet-derived growth factor“) - účinný mitogen epiteliálních buněk - stimuluje endoteliální a epiteliální buňky k proliferaci v místě poranění

- homodimer (AA, BB) nebo heterodimer (AB) dvou příbuzných řetězců A a B: B je kódován *c-sis* (*v-sis* přenášen virem opičího sarkomu: pozměněný B řetězec je konstitutivně exprimován a konstantně stimuluje k proliferaci buňky s příslušným receptorem)
- exprese PDGF A nebo B nebo obou často detekována u sarkomů, gliomů, karcinomů plic, prsu, jícnu, žaludku, střeva



# Příklad membránového receptoru - HER2/neu

HER2/neu kódován genem *c-erbB2*

- receptor homologní s EGFR, ale neváže ani EGF ani TGF- $\alpha$  a zřejmě ani neu
- amplifikace c-erbB2 detekována u adenokarcinomů slinných žláz, prsu, vaječnicků, střeva a žaludku; u karcinomu prsu a vaječnicků amplifikace a zvýšená exprese *c-erbB2* koreluje s horší prognózou a rezistencí k terapii \*
- amplifikace *c-erbB2* detekována častěji ve vzdálených metastatických místech než u primárních nádorů

# Příklad membránového receptoru - HER2/neu

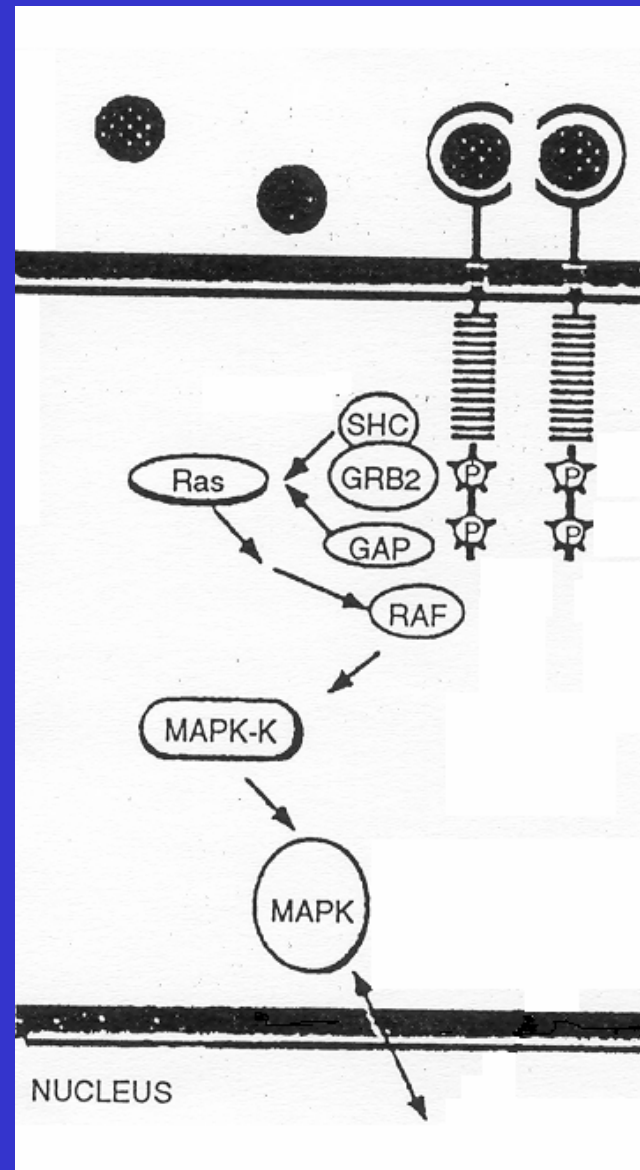
\* Amplifikace HER2/neu je uznávaným prognostickým a prediktivním faktorem u nádoru prsu; pacientky s amplifikací HER2/neu podstupují radikálnější terapii a mohou být léčeny **Herceptinem** - monoklonální protilátkou rozpoznávající protein HER2/neu

- asi u 33% primárních nádorů prsu a vaječníků detekována mutace v transmembránové doméně V664E dávající vznik variantě p185erbB2, která je konstitutivně dimerizovaná - konstitutivně aktivní a konstitutivně stimulující MAPK

# Proteiny Ras

Po aktivaci RTK receptoru zprostředkovávají vazbu Raf-1 k cytoplazmatické membráně, kde jsou přítomny další faktory účastníci se aktivace Raf-1, a spoluaktivují Raf-1

Fosforylované zbytky RTK jsou vazebným místem pro proteiny s SH2-doménami (GRB2). Tyto proteiny jsou fosforylovány a signál potom přenáší dále prostřednictvím Ras proteinů.



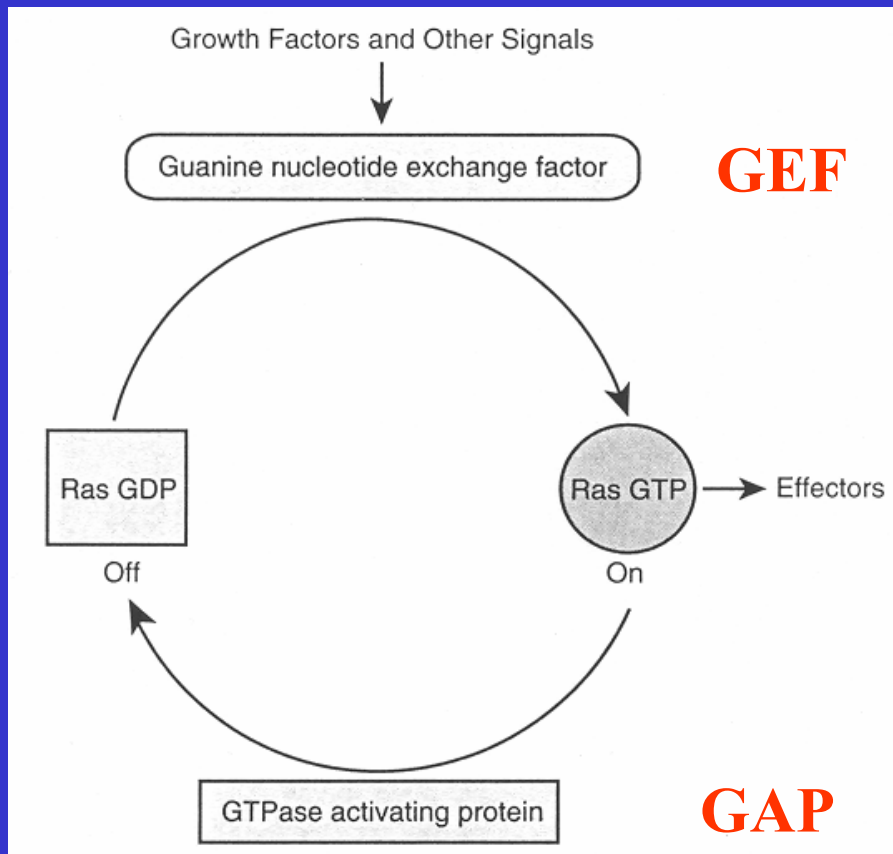


# Proteiny Ras

Proteiny **H-Ras**, **N-Ras** a **K-Ras4A** a **K-Ras4B** (189 AA) mají 188 aminokyselin (**p21<sup>Ras</sup>**). Jsou lokalizovány na vnitřní straně cytoplazmatické membrány, kde fungují jako přepínače při přenosu extracelulárních signálů do cytolazmy. Účastní se řízení buněčného cyklu, diferenciace a apoptózy.

Ras-proteiny mají GTPázovou aktivitu: jsou inaktivní, váže-li se na ně GDP, a aktivní, váže-li se na ně GTP. Vlastní schopnost Ras-proteinů vyměňovat GTP/GDP a hydrolyzovat GTP je nízká, proto nutná účast dvou typů proteinů:

# GTPázový cyklus proteinu Ras



**GEFs** posilují tvorbu aktivního Ras, který váže GTP

**GAPs** aktivují GTPázu, posilují tvorbu inaktivního stavu Ras, který váže GDP

# Onkogenní aktivace *ras*

Přítomnost onkogenní mutace *ras* detekována téměř u 35% nádorů.

- Mutace **H-*ras*** hlavně u nádorů kůže a dlaždicobuněčných nádorů hlavy a krku.
- Mutace **K-*ras*** hlavně u adenokarcinomů, karcinomů chrupavek, kolorektálních nádorů a nádorů pankreatu.
- Mutace **N-*ras*** jsou běžné u hematopoietických malignit, hlavně u AML a MDS.

# Onkogenní aktivace *ras*

Onkogenní mutace posilují aktivitu Ras:

- V kodónech: **12, 13, 59, 61, 63** - vzniklé proteiny mají poškozenou GTPázovou aktivitu a jsou rezistentní k působení GAP proteinů
- V kodónech **16, 19, 116, 117, 119, 144, 146** - vzniklé proteiny mají usnadněnou výměnu GDP/GTP
- U některých nádorů je zvýšená exprese *ras*

# Protoonkoprotein Myc

Do rodiny proteinů Myc patří tři odlišné proteiny, které se uplatňují v kancerogenezi: **c-Myc**, **N-Myc** a **L-Myc**.

Myc je jaderný fosfoprotein s mnoha znaky transkripčního faktoru. Myc tvoří heterodimery s proteinem **Max**.

- Dimer Myc/Max transaktivuje několik genů, které se podílejí na řízení buněčné proliferace.
- Myc upreguluje aktivitu telomerázy transaktivací katalytické podjednotky hTERT.
- Řada genů regulovaných Myc není transaktivována, ale naopak jejich transkripce je reprimována.

# c-Myc, N-Myc, L-Myc

Jsou si podobné svou strukturou a mechanismem účinku.

Výrazně se liší expresí během vývoje a také se zdá, že ovlivňují - i ve stejném buněčném kontextu - jiné sady genů, participují - i ve stejných buněčných typech - na jiných buněčných programech.

Liší se významně také svou úlohou ve vývoji jednotlivých typů neoplastických onemocnění.

# *c-myc* a nádory - 1

## Burkitův lymfom:

Téměř všechny případy Burkítova lymfomu souvisí s **translokací** genu *c-myc* (na chromozómu 8) buď s těžkým řetězcem  $\mu$  nebo  $\lambda$  nebo lehkým řetězcem  $\kappa$  imunoglobulinů (na chromozomech 14, 22 a 2).

Někdy bývá translokace doprovázena i výskytem somatických **mutací** v genu *c-myc*, a to především v oblasti fosforylačních míst Thr58 a Ser62. Tyto mutace přispívají významně k fenotypu a progresi onemocnění.

# *c-myc* a nádory - 2

Ostatní lymfomy:

- Low-grade folikulární lymfom je většinou spojen s translokací Ig/Bcl-2, jen vzácně lze detekovat přestavby *c-myc*. 60-80% těchto lymfomů transformuje v agresivnější formu a u těch už jsou detekovány i přestavby Ig/*c-myc*.
- Difúzní velkobuněčné lymfomy B-buněk jsou heterogenní a asi u 50% lze detekovat translokaci Ig buď s BCL2, BCL6 nebo *c-myc*.



# *c-myc* a nádory - 3

## Solidní nádory:

**Amplifikace** a/nebo **zvýšená exprese** *c-myc* se vyskytuje u významného podílu invazivních duktálních karcinomů prsu (spojeno s horší prognózou), u některých nádorů prostaty, u gastrointestinálních nádorů (souvislost *c-myc*:APC:β-katenin: jaderný β-katenin slouží jako koaktivátor TF Tcf-4, který transaktivuje *c-myc*), u některých melanomů a u mnohočetného myelomu (koreluje s agresivitou onemocnění).

# *N-myc* a nádory

**Amplifikace** *N-myc* se vyskytuje asi u 1/3 případů neuroblastomu a je spojena s horší prognózou onemocnění.

**Zvýšená exprese** *N-myc* byla popsána u významného podílu případů malobuněčného nádoru plic a u menšího počtu případů medulárního tyroidního nádoru, retinoblastomu, rhabdomyosarkomu a nádoru prsu.

# *L-myc* a nádory

**Amplifikace** a **zvýšená exprese** *L-myc* (a také *c-myc* a *N-myc*) byla pozorována u některých případů malobuněčného karcinomu plic.

# Nádorové supresory

# Individuální dispozice k nádorům

## 1. Rozdíly v metabolismu kancerogenů

např. cytochrom P-450, CYP2D6, CYP1A1, N-acetyltransferáza,...

## 2.-3. Rozdíly v DNA repair

**Mutace nádorových supresorů (a onkogenů)**

- p53, RB, WT1, BRCA1 a BRCA2,...

- RET

**Penetrance**: podíl jedinců určitého genotypu, u nichž se daný specifický genotyp fenotypicky projeví (pravděpodobnost výskytu daného nádoru v určitém věku).

# Retinoblastom

Je vzácné, ale velmi dobře známé nádorové onemocnění dětí.  
Incidence - 1 na 13.500 - 25.000 narozených dětí.

Je prototypickým příkladem vrozené dispozice k nádorům:  
Na základě studia epidemiologie retinoblastomu byla vytvořena Knudsonova hypotéza → Knudsonův model.

RB byl prvním příkladem nádorového supresoru a první klonovaný gen pro nádorový supresor.

Vrozená mutace **RB** (13q14) predisponuje nositele k vývoji **retinoblastomu** (maligní tumor, který vzniká ve vyvíjející se retině) v nízkém věku a přináší zvýšené riziko vývoje **osteosarkomu**.

# Knudsonův model dvou zásahů

## 40% případů:

- průměrný věk při diagnóze - 14 měsíců
- bilaterálně v obou očích - v průměru 3 nezávislé nádory
- v případě časného odstranění retinoblastomu vysoký výskyt osteosarkomů mezi 20. a 30. rokem života
- často rodinná anamnéza

## 60% případů:

- bez rodinné anamnézy
- průměrný věk při diagnóze - 30 měsíců
- unilaterální výskyt

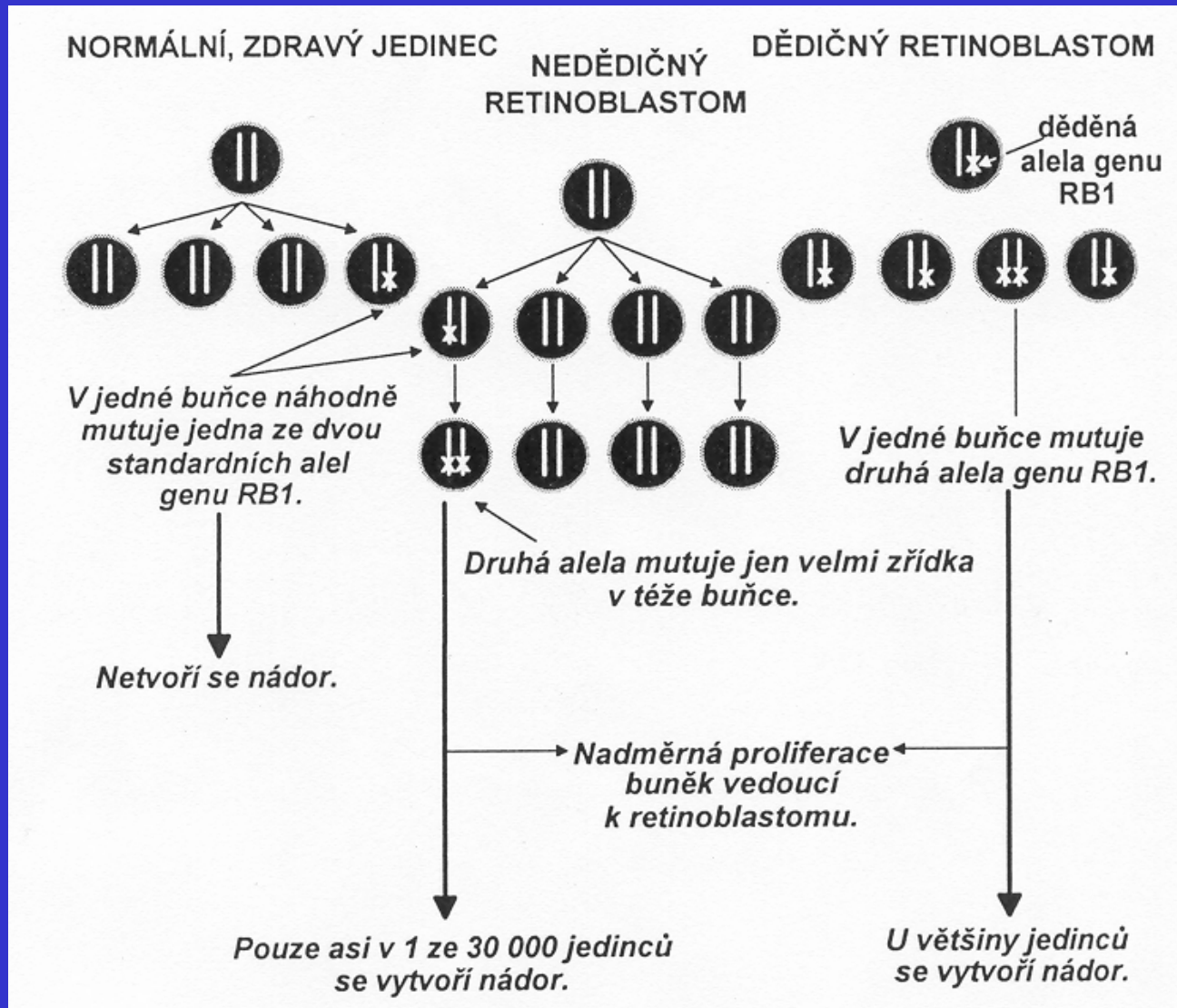
# Knudsonův model dvou zásahů

**Knudson (1971):**

1. skupina: 1 mutovaná alela genu RB je zděděná (v zárodečné linii), druhá mutace somatická
2. skupina: nezbytnost dvou nezávislých mutací obou alel RB

⇒ jedna hypotéza vysvětlila dva epidemiologicky odlišné typy onemocnění

# Knudsonův model dvou zásahů



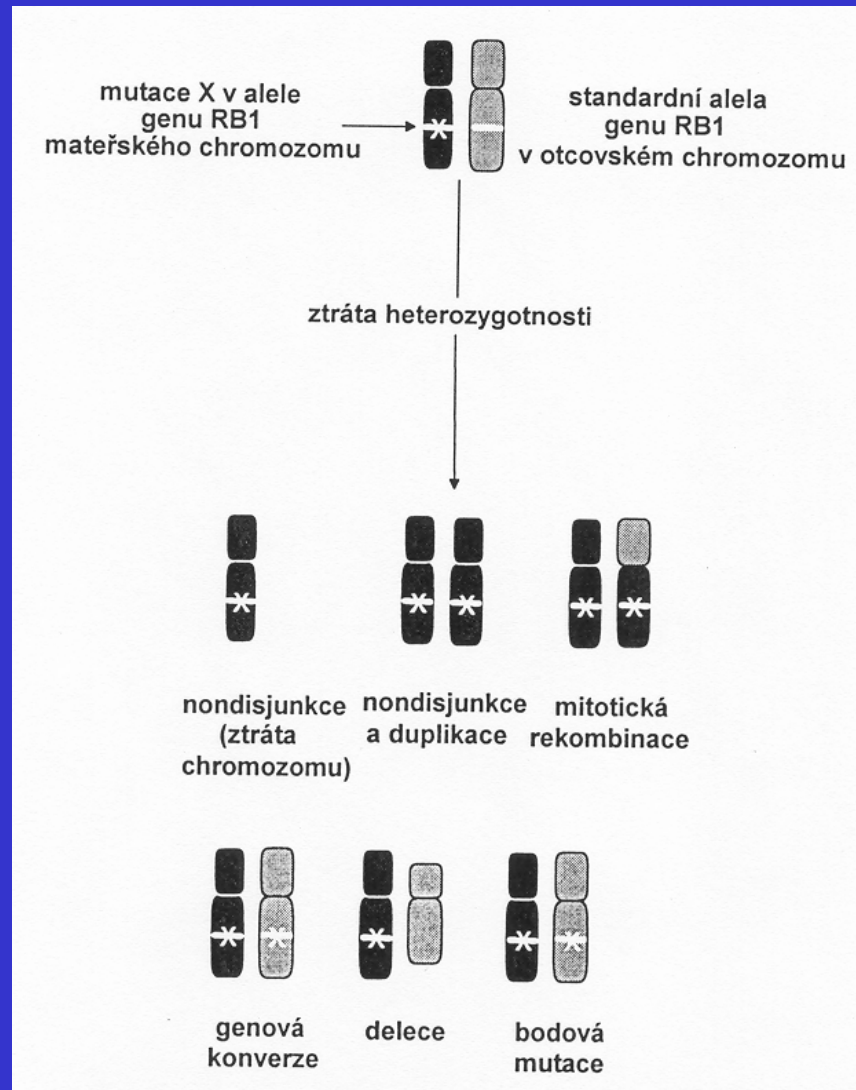


# Ztráta heterozygotnosti

Ztráta heterozygotnosti = **LOH** („lost of heterozygosity“)

- Buňky, které nesou jednu mutovanou alelu nádorového supresoru, ztrácejí velkou část (delece) chromozomu, který nese funkční alelu. Předpokládá se, že v oblastech s vysokou frekvencí LOH leží geny nádorových supresorů.
- Buňky, které nesou jednu mutovanou alelu nádorového supresoru, ztrácejí jedním z více možných způsobů funkční alelu.

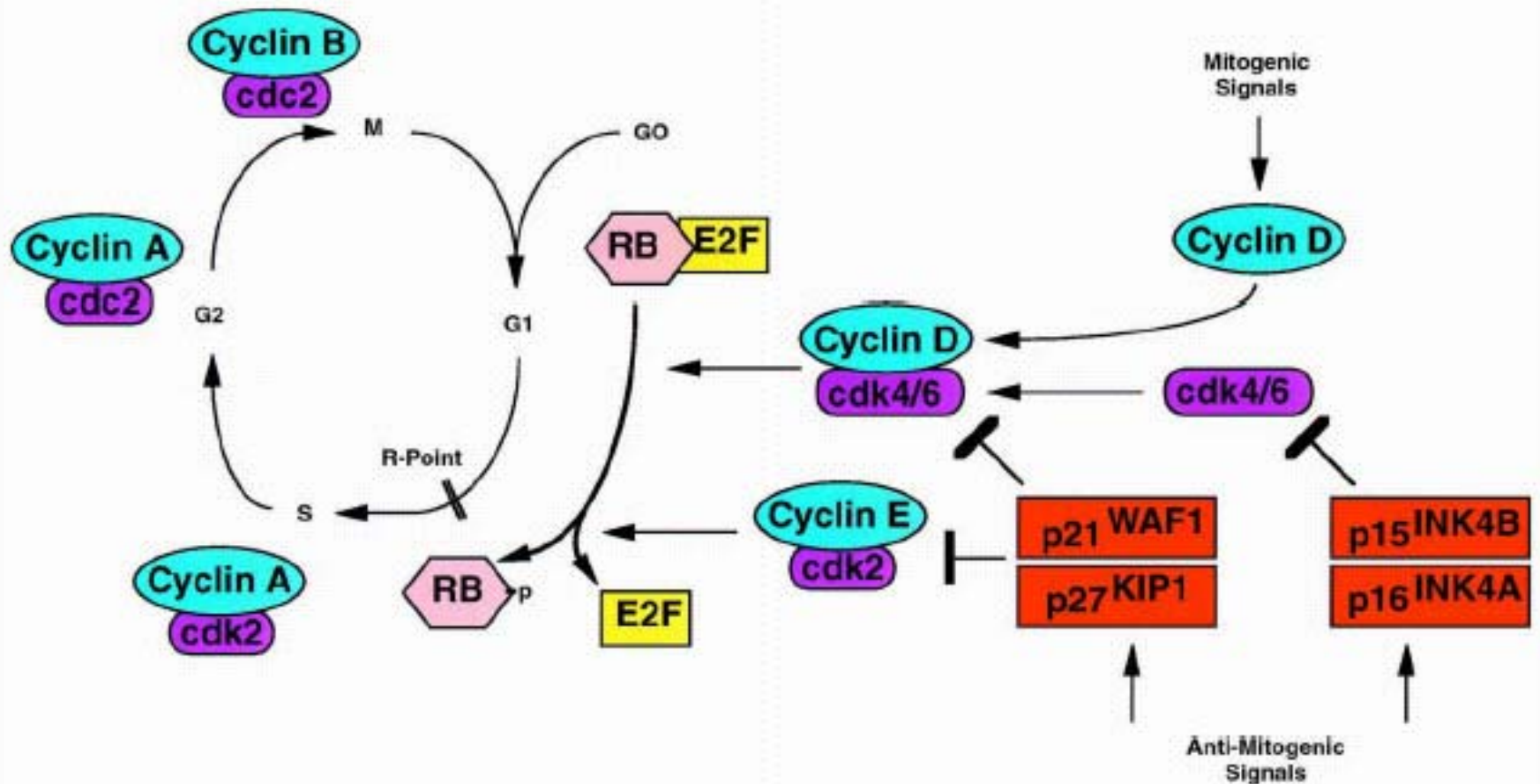
# Ztráta heterozygotnosti



# RB: gen a protein

- gen je lokalizován na chromozómu 13
- jaderný (85%) protein pp110<sup>RB</sup> (velikost 112 až 114 v proliferujících buňkách)
- V nedělících se buňkách je RB v komplexu s TF **E2F**. E2F transaktivuje sadu genů, které jsou nutné k S fázi buněčného cyklu. RB blokuje E2F a tím blokuje buněčný cyklus („brzda buněčného cyklu“).
- Hladina proteinu RB se v buňkách nemění během b.c., ale mění se **stupeň fosforylace** RB. Na molekule RB je asi 10 až 12 různých fosforylačních míst (Thr, Ser). Hyposforylovaný RB je aktivní a váže E2F, fosforylovaný RB je neaktivní.

# RB a regulace buněčného cyklu



# Způsoby inaktivace RB v nádorech

- Samotný gen *RB* může být mutován, deletován, může být metylován jeho promotor (retinoblastom, malobuněčný karcinom plic, sarkomy, karcinomy močového měchýře).
- Vazbou virových proteinů E1A, LT SV40, E7 (karcinom děložního čípku).
- Amplifikací cyklinu D1 (nádory jícnu, prsu, dlaždicobuněčné karcinomy) nebo zvýšenou expresí cyklinu D1 díky chromozomální translokaci (lymfomy B buněk). Potenciálně onkogenní virus *Herpesvirus saimiri* kóduje svůj vlastní cyklin D.

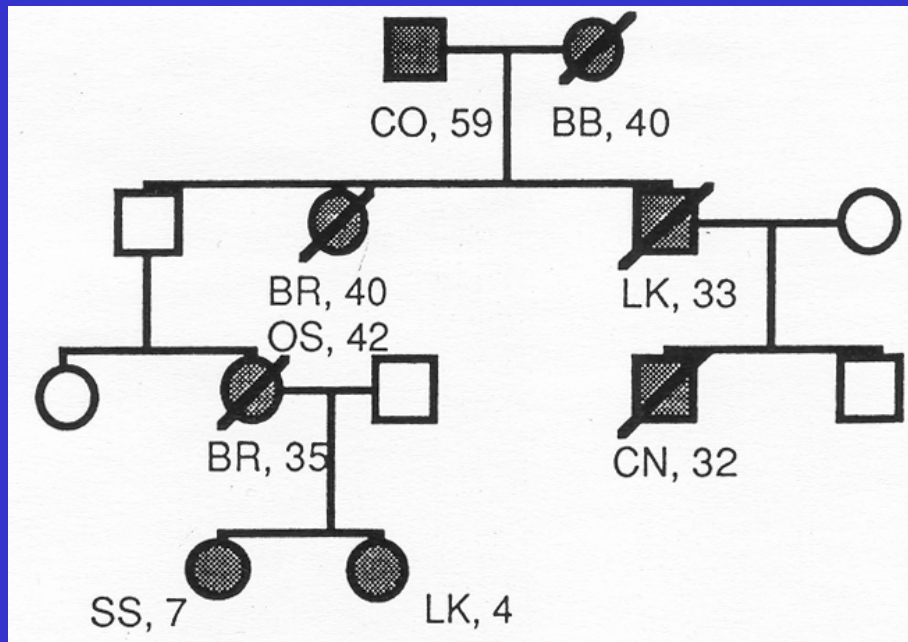
# Způsoby inaktivace RB v nádorech

- Amplifikací Cdk4 (glioblastomy, gliomy).
- Delečí p15, p16 nebo obou (dlaždicobuněčné karcinomy jícnu, glioblastomy, karcinomy plic, močového měchýře a pankreatu).
- Ektopická exprese „wild-type“ RB není inhibující pro proliferaci, protože RB je fosforylován a inaktivován endogenní aktivitou komplexů cyklin/cdk.

# Li-Fraumeniho syndrom

- Vzácné autozomálně dominantní dědičné onemocnění.
- Rodinný syndrom charakteristický častým a časným výskytem malignit různého typu včetně sarkomu, nádoru prsu, nádoru mozku, leukémií, adrenokortikálního nádoru.
- Nádory u LFS mají tendenci se objevovat u dětí a mladých dospělých, často jako násobné primární nádory.
- Syndrom spojen s mutací genu pro nádorový supresor p53 (17p13).

# Rodokmen rodiny s LFS



**CO** - colon cancer

**BB** - bilateral breast cancer

**BR** - breast cancer

**SS** - soft tissue sarcoma

**OS** - osteosarcoma

**CN** - brain tumor

**LK** - leukemia



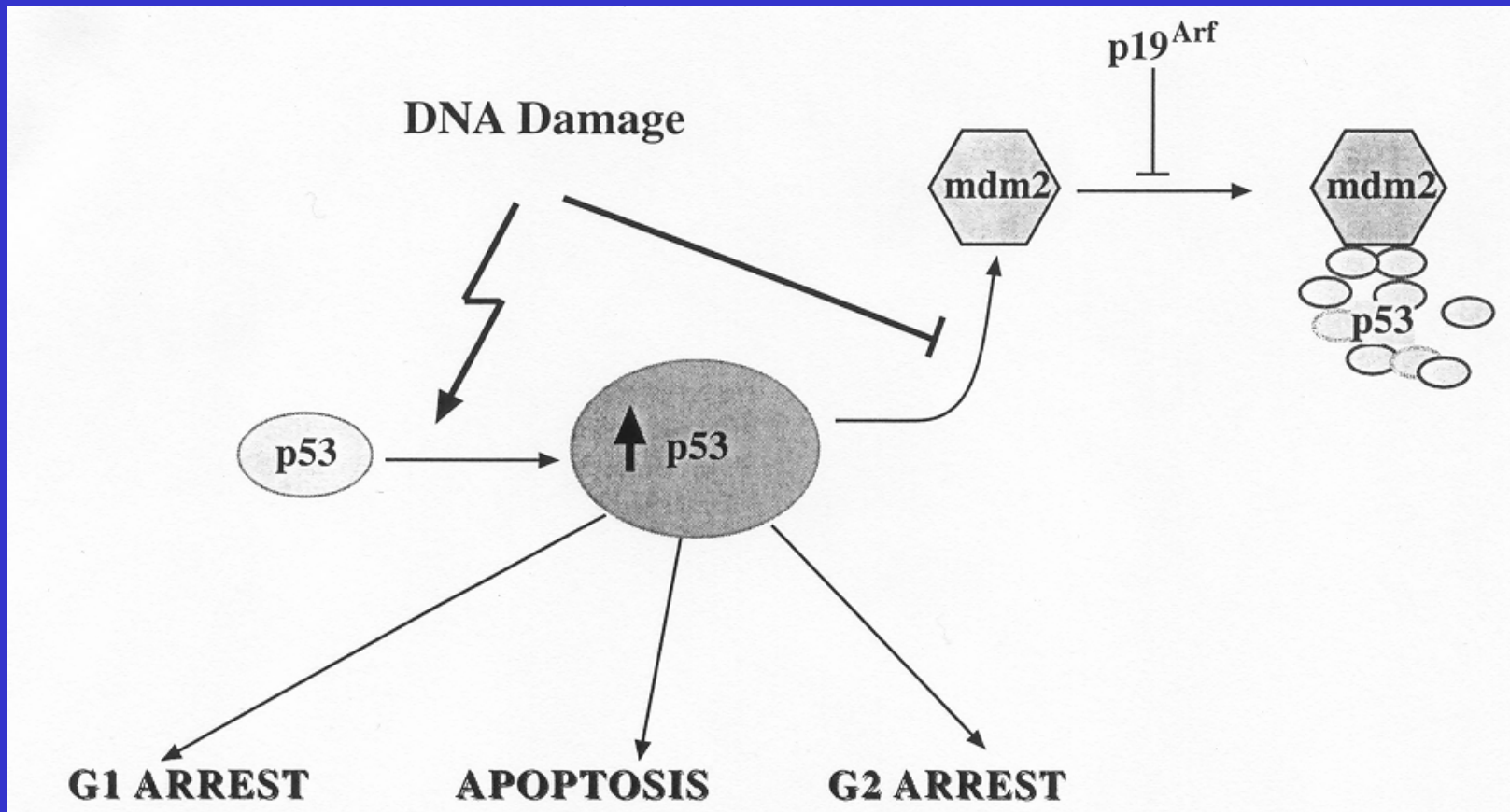
# Gen a protein p53

**Gen** leží na chromozómu 17 (17p13) a má 11 exonů (z nichž první se neexprimuje).

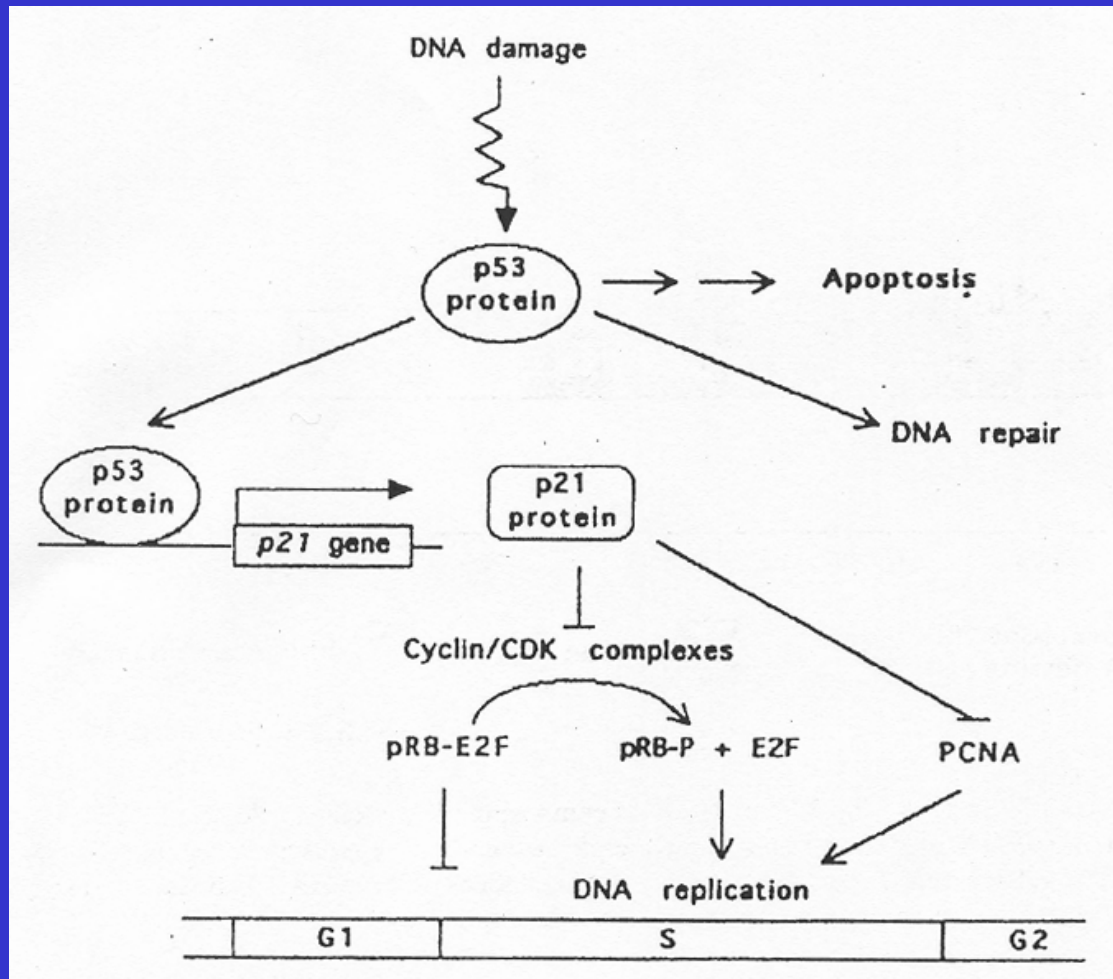
**Protein** je jaderný fosfoprotein, 393 AA, 53 kDa;  
funguje jako transkripční faktor.

Cílové geny: *mdm2* - zpětnovazební inhibiční klička  
*p21*<sup>CIP1/WAF1</sup> - blok G1  
*bax* - apoptóza  
*GADD45* - oprava DNA

# Signalizace p53

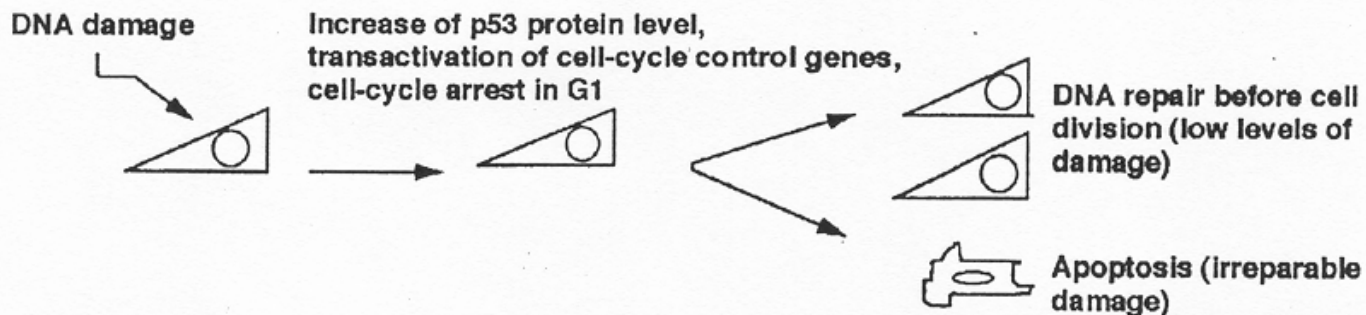


# p53-dependentní blok v G1 - p21<sup>CIP1/WAF1</sup>

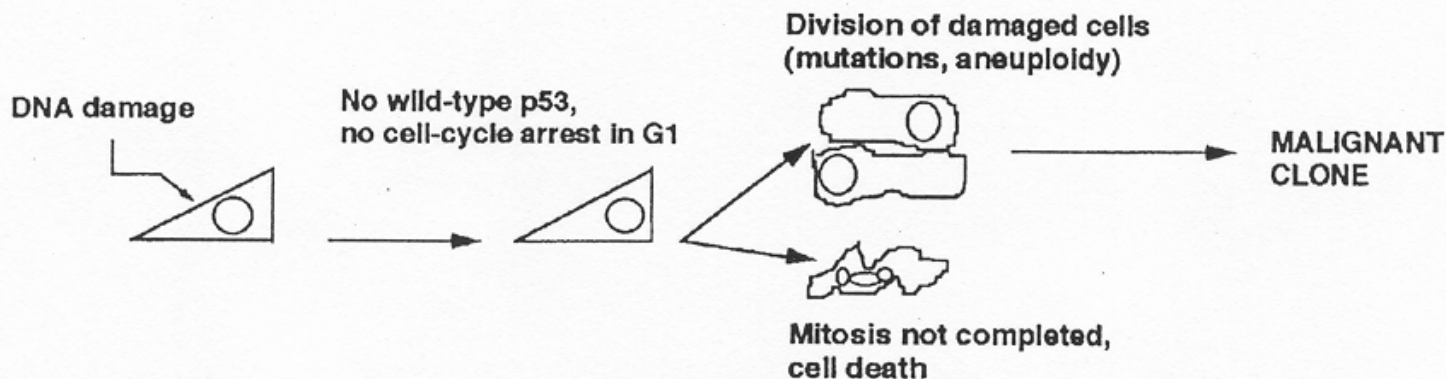


# p53 - ochráníce genomu

A)



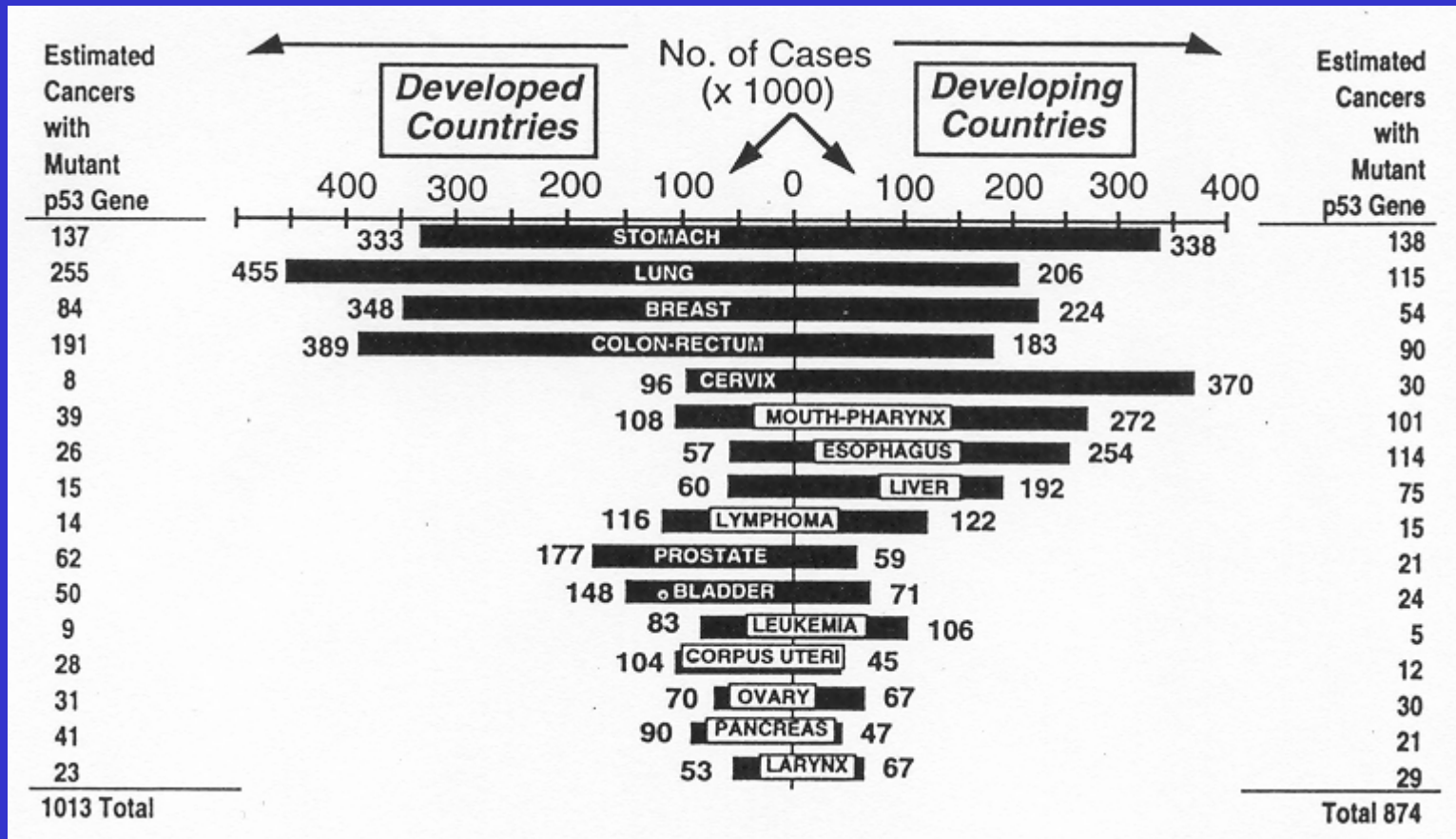
B)



# Inaktivace p53 v nádorech

- Mutace
- Jaderná exkluze (37% zánětlivých karcinomů prsu, více než 90% nediferencovaných neuroblastomů)
- Interakce s virovými onkoproteiny (LT SV40, E1B, E6)
- Amplifikace *mdm2* (neuroblastomy), případně *mdmX* (gliomy)

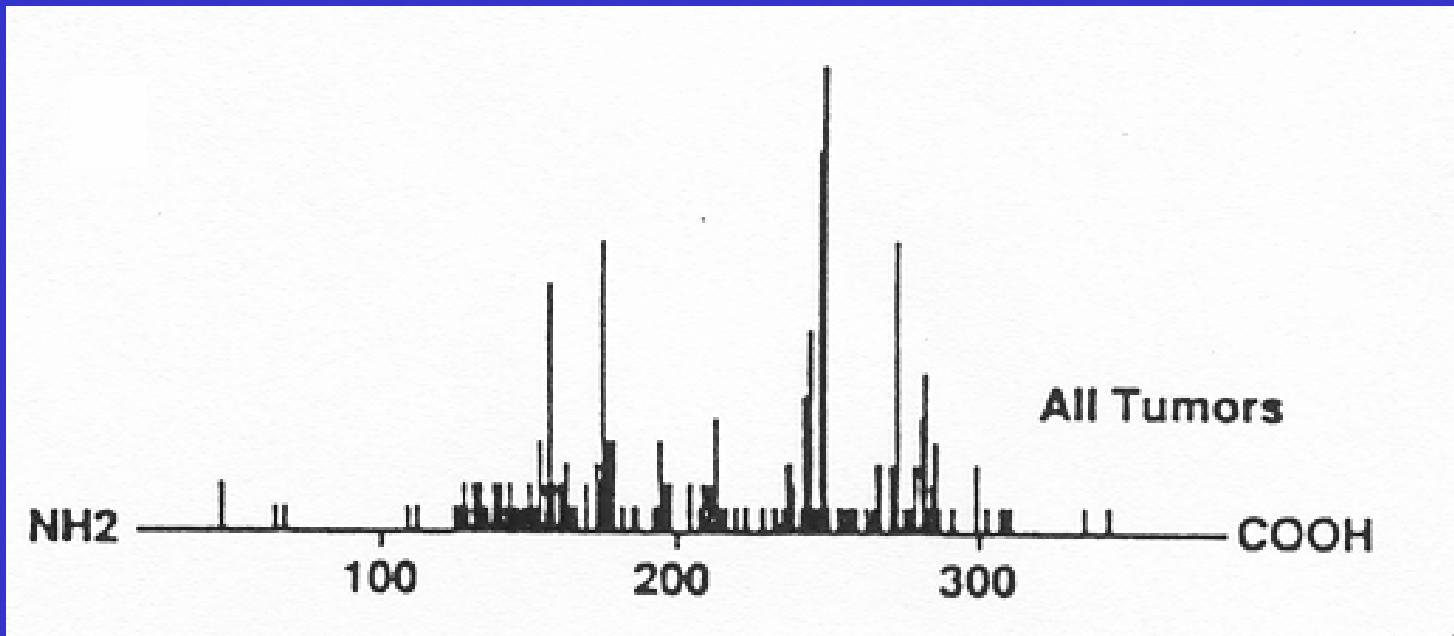
# Frekvence mutací p53 v nádorech



# Typy mutací p53

- především bodové missense mutace
- krátké delece a inserce (více v okrajových částech genu)
- distribuce není pravidelná
  - především centrální DNA vazebná doména - „hot spots“
  - oligomerizační doména
  - introny (v místech sestřihu)

# Distribuce „missense“ mutací v molekule p53



Nejčastěji mutované kodóny p53: 175, 245, 248, 249, 273, 282.



# Mutace p53 v nádorech

- typické spektrum mutací u určitých nádorů
- typická spektra pro určité kancerogeny („fingerprints“)
- některé mutace typické pro určitý genetický background (BRCA1, BRCA2)
- různé mutace mohou mít různý dopad na vlastnosti nádoru (částečná inaktivace, konformační mutace, korelace genotypu a fenotypu)
- zřejmě se liší mutační spektra somatických a vrozených mutací

# 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 ( $10^{-7}$  na gen na generaci buněk), se zdálo, že k takové akumulaci mutací nemůže během lidského života dojít. Jakým mechanismem dochází k této akumulaci?

# Genetická nestabilita nádorů

- 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 p53 u téměř poloviny všech nádorů,..)
2. Změny v počtu chromozómů - ztráty případně zisky celých chromozómů (ztráta chromozómu 10 u glioblastomů spojena se ztrátou nádorového supresoru PTEN; získání chromozómu 7 u papillary renal karcinomů spojeno s duplikací mutantního onkogenu MET)
3. Chromozomální translokace - fúze částí odlišných chromozómů nebo normálně nesouvisejících částí téhož chromozómu (na molekulární úrovni může být doprovázeno fúzemi mezi dvěma odlišnými geny) (Philadelphský chromozóm a další translokace typické pro řadu leukemií)
4. Amplifikace genů (amplifikace genu *N-myc* u 30% neuroblastomů)

**Ke genetické nestabilitě dochází na více úrovních.**

# 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 DNA repair systémech. U nádorů nebyly prokázány defekty v DNA polymerázách, ale byly prokázány defekty ve dvou hlavních systémech DNA repair.

1. Nukleotidová excizní oprava („nucleotide-excision repair“ - **NER**) - s ní spojená nestabilita („NER-associated instability“ - **MIN**)
2. Oprava špatného párování („mismatch repair“ - **MMR**) - s ní spojená mikrosatelitová nestabilita (**MIN**)

# Oprava špatného párování - MMR

- enzymatické odstranění chybně zařazených nukleotidů při replikaci
- MMR studován v souvislosti s nádory po objevení skupiny sporadických kolorektálních nádorů, u kterých byly v genomu nalezeny rozsáhlé změny v oblastech poly(A). Později byly nalezeny obdobné změny také v poly(CA) opakováních a tento jev dostal označení mikrosatelitová nestabilita – **MIN**.
- MIN se vyskytuje u většiny dědičných non-polyposních kolorektálních nádorů (HNPCC).

# Oprava špatného párování - MMR

- Mutace MMR jsou recesivní, tzn. jedna “funkční” alela je dostatečná k udržení normální hladiny MMR, teprve po inaktivaci druhé alely příslušného MMR genu se začnou kumulovat mutace.
- Nositelé jedné mutantní alely v zárodečných buňkách jsou disponováni k vývoji nádorů.
- Mutace v genech MMR se nejčastěji vyskytují u kolorektálních nádorů, u nádorů endometria, a u nádorů žaludku (asi 13-15%), u jiných typů nádorů jsou vzácné (asi 2%)

# Dědičný nepolypózní kolorektální karcinom - HNPCC = Lynchův syndrom

- HNPCC představují asi 2-4% kolorektálních nádorů v západních zemích.
- Průměrný věk detekce nádoru u HNPCC pacientů je 40 let.
- Pacienti nemají zvýšený počet prekurzorových adenomů.
- Celoživotní riziko vývoje CRC je pro ženy 50%, pro muže 80% a celoživotní riziko vývoje nádoru dělohy je 60%.
- Pacienti s HNPCC ohroženi dále nádory vaječníků, žaludku, pankreatu a mozku.
- Vývoj nádorů souvisí s mutacemi genů MMR, nádory jsou geneticky nestabilní a progredují rychle, jsou ale méně agresivní než FAP (jsou diploidní).



# Dědičný nepolypózní kolorektální karcinom

- Syndrom je spojen s vrozenými mutacemi genů pro „mismatch repair“, je pro ně typický mutátorový fenotyp RER+:
- *MSH2* (první detekovaný; 2p15-16, 106 kDa)
- *MLH1* (3p21; 85 kDa)
  - tyto dva odpovídají za více než 90% všech vrozených mutací
- *PMS1* (2q31)
- *PMS2* (7p22; 96 kDa)
- *MSH6* - odpovídá za odlišný fenotyp

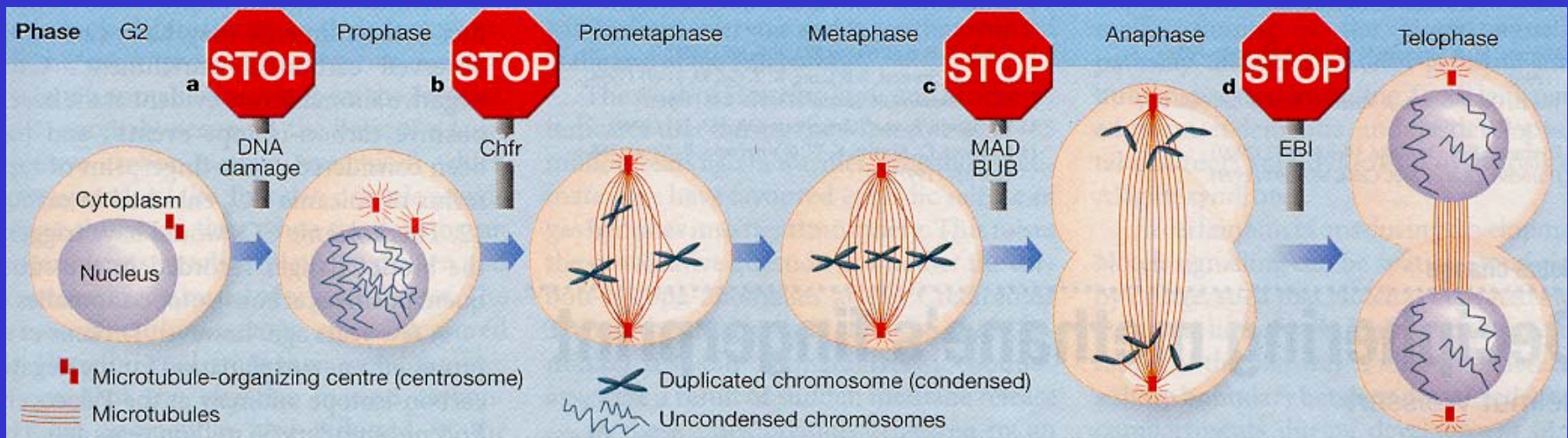
# Nestabilita v počtu chromozomů - CIN

- Ve srovnání s NIN a MIN jsou ztráty nebo zmnožení celých chromozomů mnohem běžnější a vyskytují se téměř u většiny nádorů – např. 85% kolorektálních nádorů je vysoce aneuploidních.
- Běžná je ztráta chromozomu související s LOH, často je doprovázena získáním opačného chromozomu.  $\Rightarrow$  Ne vždy změny karyotypu souvisejí s CIN!
- Oba typy nestability se objevují spíše v ranných fázích vývoje nádoru a během dalšího vývoje nádoru se hromadí genetické změny jako následek této nestability.

# Molekulární podstata CIN

- 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.

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

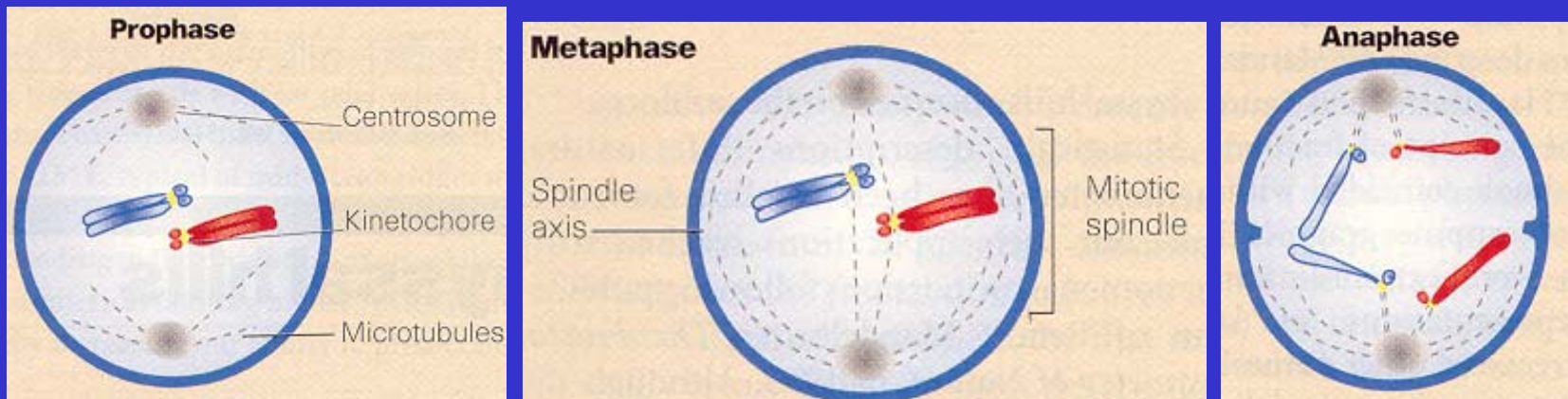


# Kontrola poškození DNA

- Chromozomy obsahující poškozenou DNA mohou nesprávně segregovat, protože sesterské chromatidy mohou být spojeny (DNA-DNA, DNA-proteiny); chromozómy obsahující jednořetězcové “gaps” nebo zlomy v obou řetězcích jsou náchylnější k rozsáhlým přestavbám ⇒ nestabilita související s defekty v kontrole poškození DNA jsou často spojeny s posílenou mitotickou rekombinací a s aberantní segregací chromozómů. Kandidátní geny: **ATM** („ataxia telangiectasia mutated“), **ATR** („ATM-related gene“), **BRCA1**, **BRCA2**, **p53**.

# Kontrola mitotického vřeténka

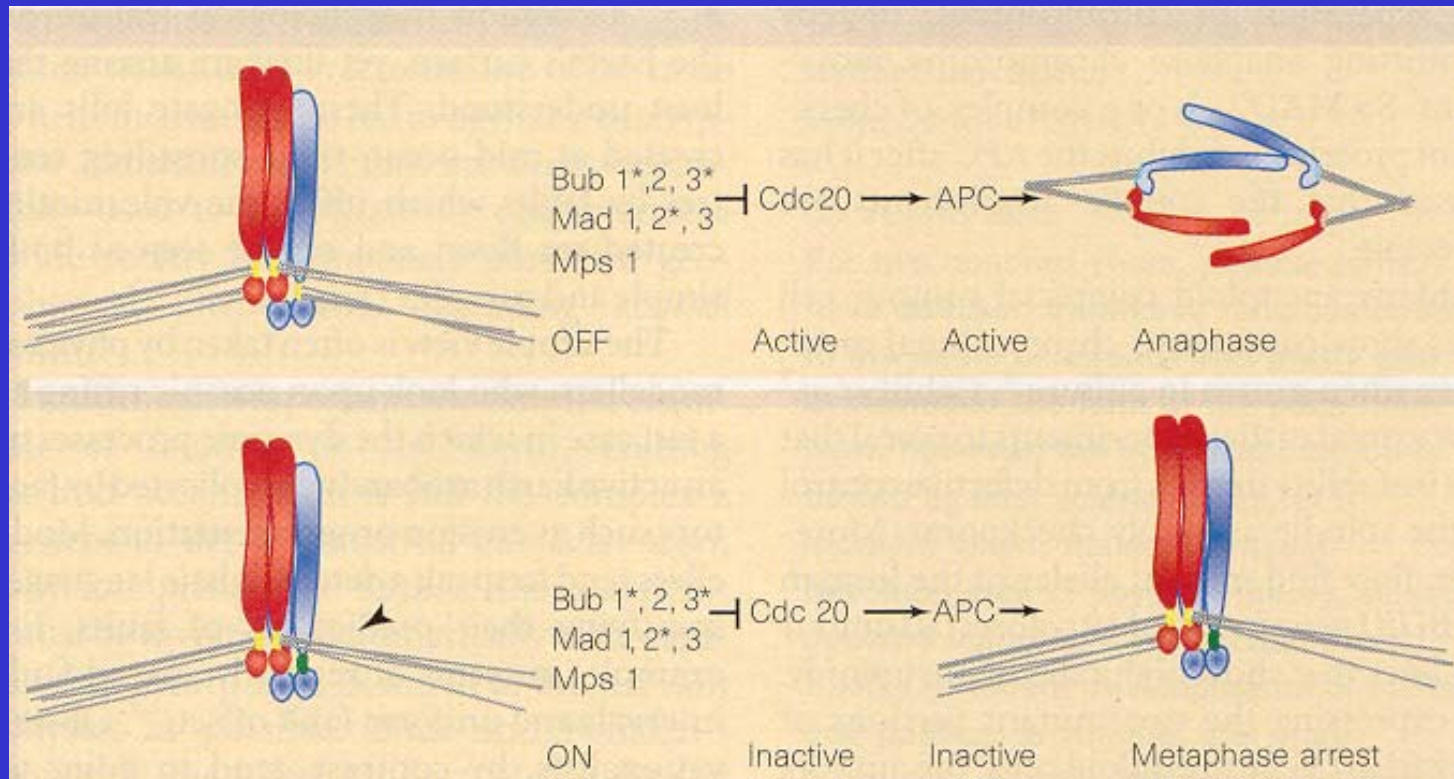
- Tento kontrolní bod („spindle check-point“) zajišťuje, aby se sestreské chromatidy nerozcházely dříve, než jsou všechny chromozómy správně uspořádány kolem mitotického vřeténka.



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



# Kontrola mitotického vřeténka 1



- Jak je monitorováno sestavování vřeténka? Na nesprávné sestavení vřeténka reagují proteiny typu **Bub** a **Mad** a nedovolí aktivaci APC

# Familiální adenomatózní polypoza - FAP

- Autosomálně dominantní dědičné onemocnění.
- U pacientů s FAP se vyvíjejí stovky až tisíce benigních kolorektálních nádorů, z nichž některé progredují do karcinomů, nejčastěji během druhé a třetí dekády života. Průměrný věk detekce nádoru u FAP pacientů je 40 let.
- Polypy, které se objevují u pacientů s FAP jsou totožné s polypy sporadickými a také nemají větší riziko maligní progrese než sporadické polypy. Ale jejich velký počet „zajišťuje“, že některé se s jistotou v maligní vyvinou.
- Pacienti s FAP mají zvýšené riziko thyroidních nádorů, nádorů tenkého střeva, žaludku a mozku.

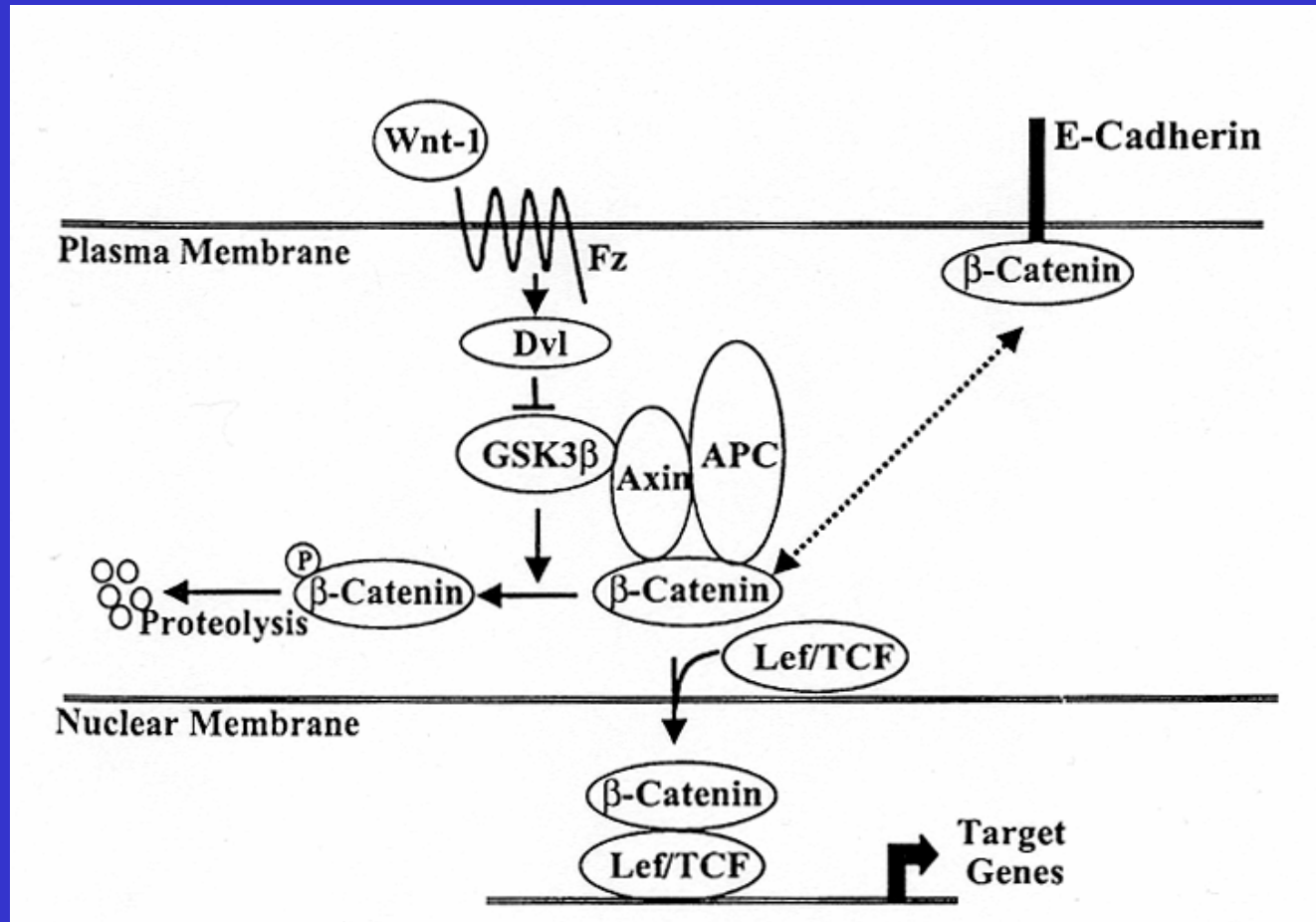
# Familiální adenomatózní polypoza

- FAP je spojena s vrozenými mutacemi genu APC.
- Ten je lokalizován v oblasti **5q21**.
- Během kancerogeneze musí být inaktivovány obě kopie genu *APC* ( $\Leftrightarrow$  častý LOH 5q).
- Somatické mutace APC také hrají klíčovou úlohu při vývoji sporadických kolorektálních karcinomů, jsou detekovány alespoň u 80% všech CRC.
- Vysoký podíl mutací, které vedou ke zkráceným proteinům.
- Relativní vztah mezi typem mutace a průběhem onemocnění.



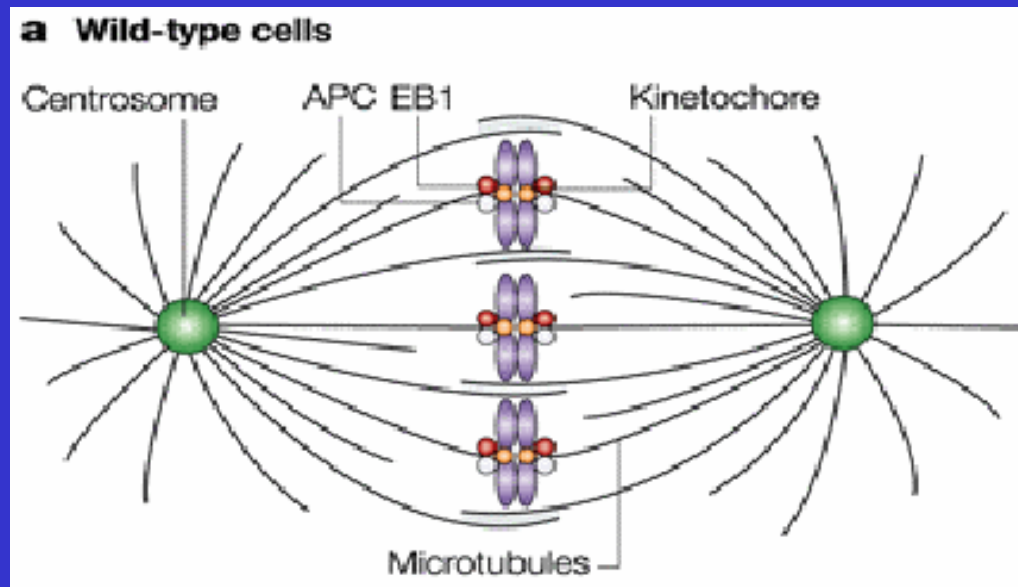
# Dvojitá úloha proteinu APC v buňce:

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



# Dvojitá úloha proteinu APC v buňce:

## B. účast na tvorbě mitotického vřeténka



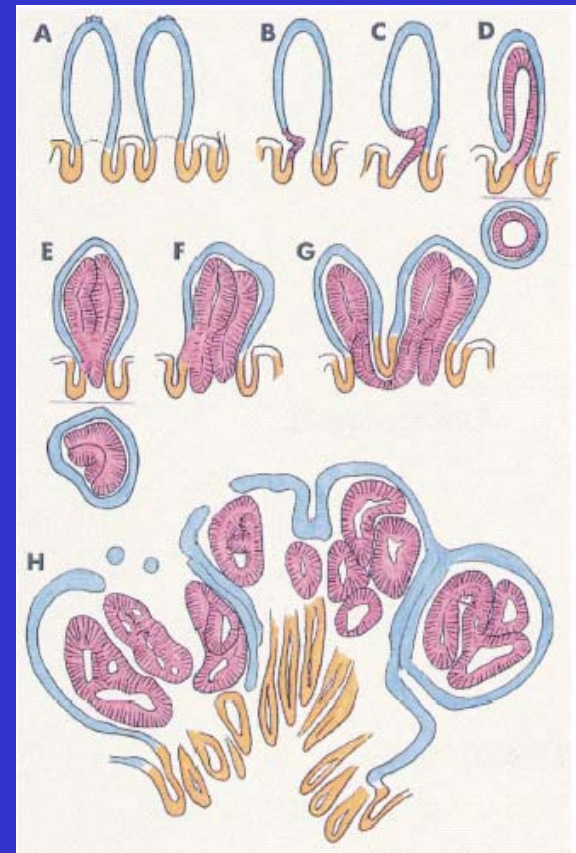
APC je lokalizováno na kinetochorech metafazických chromozomů. Důsledkem mutace APC je poškození mitotického vřeténka a tím zvýšení chromozomální genetické nestability.

# Dvojitá úloha APC při vývoji CRC

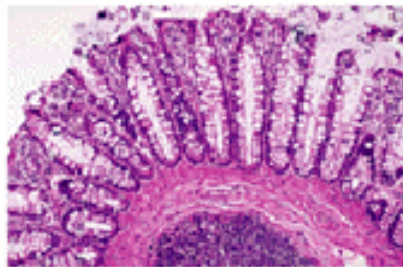
- APC se zřejmě uplatňuje jak při iniciaci vývoje nádoru (v důsledku selektivní výhody získané aktivací Wnt/ $\beta$ -katenin dráhy), tak také v pozdějších fázích vývoje nádoru tím, že je příčinou chromozomální nestability.
- Mutace *APC* představuje nejčastější první krok v kancerogenezi kolorektálního karcinomu

# Vývoj kolorektálního karcinomu

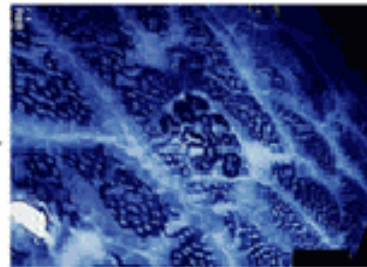
relativně „standardní“ průběh od malých adenomů (do 1 cm), přes středně pokročilé (více než 1 cm bez známek transformace) a velké adenomy až po plně rozvinutý maligní CRC



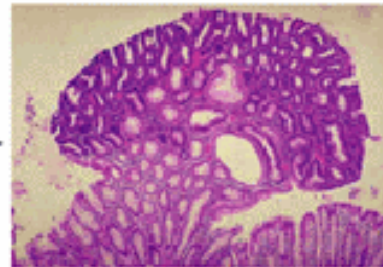
Intestinal epithelial crypts



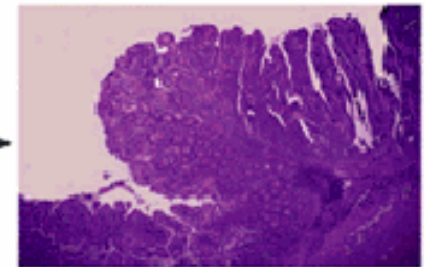
Aberrant crypt focus



Adenoma



Carcinoma



# Vývoj kolorektálního karcinomu

Kolorektální karcinomy představují výborný **model pro studium kancerogeneze**:

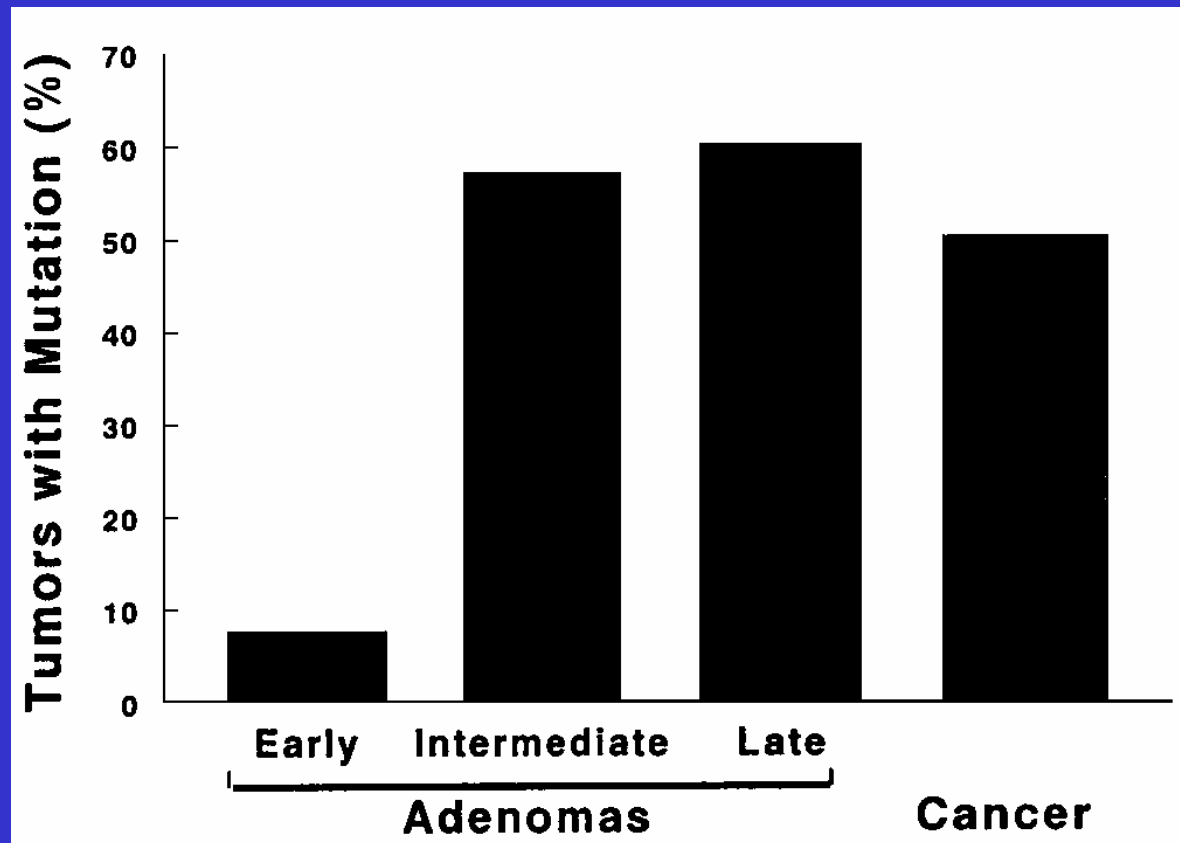
- relativně „standardní“ průběh od malých adenomů (do 1 cm), přes středně pokročilé (více než 1 cm bez známek transformace) a velké adenomy až po plně rozvinutý maligní CRC
- souvislost mezi morfologií jednotlivých stadií a genetickými změnami, které se odehrály
- model kooperace onkogenů a nádorových supresorů během kancerogeneze

# Další stadia vývoje kolorektálního karcinomu - aktivace ras

- Specifické bodové mutace protoonkogenu K-*ras* nebo N-*ras* jsou detekovány alespoň u 50% kolorektálních adenomů větších než 1 cm a asi u 50% karcinomů.
- Mutace *ras* jsou jen vzácně (do 10%) detekovány u adenomů menších než 1cm.

⇒ mutace *ras* se typicky objevují při progresi adenomů

# Frekvence mutací ras u kolorektálních karcinomů

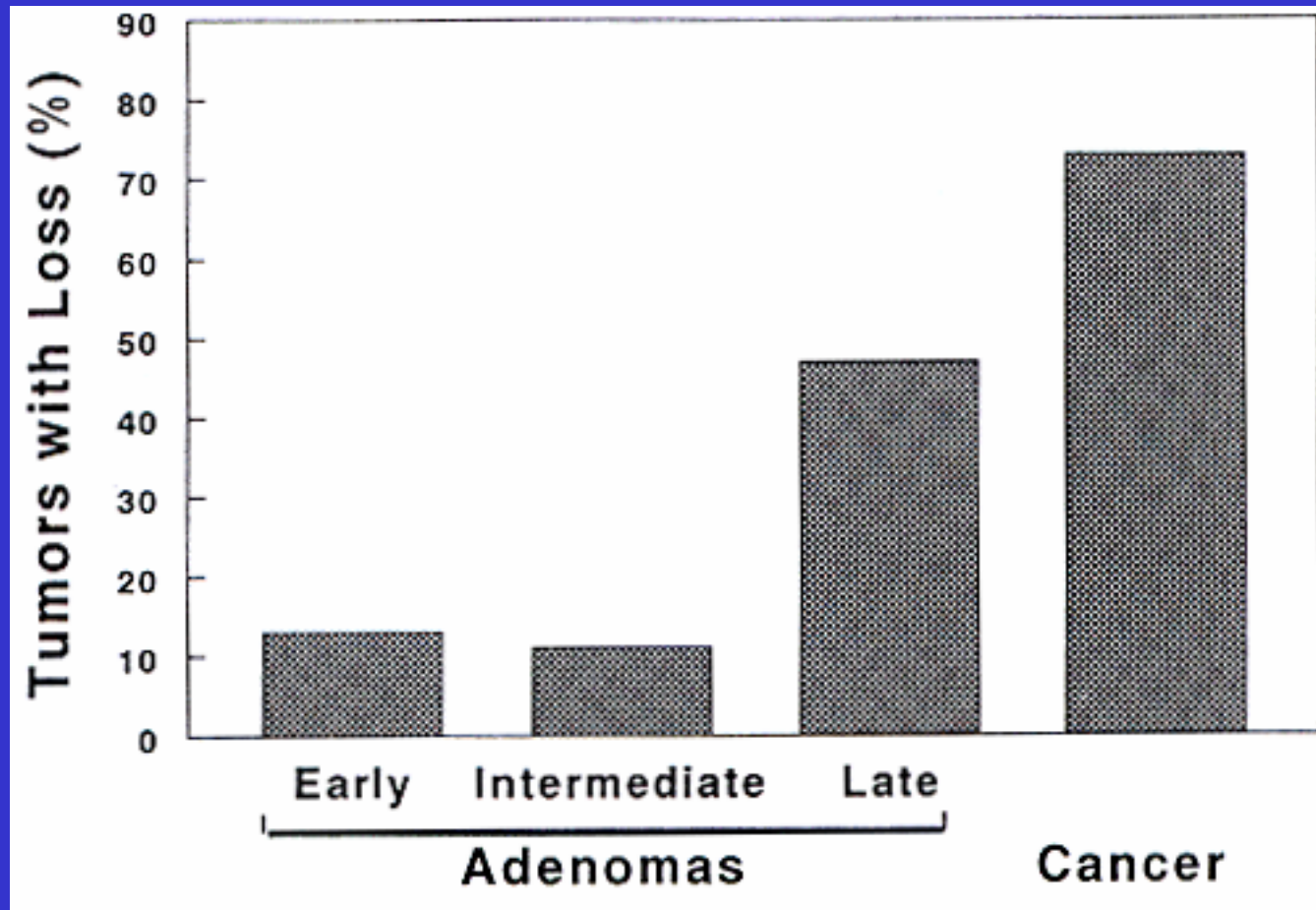


# Další stadia vývoje kolorektálního karcinomu - „LOH“ 18q

- Delece oblasti 18q detekovány u 50% velkých adenomů a 70% karcinomů.
- Na chromosomu 18q detekován gen pro SMAD4, někdy označovaný jako *DPC4* („deleted in pancreatic cancer“).
- SMAD4 je součástí signální dráhy TGF- $\beta$ .



# Frekvence delecí oblasti 18q u kolorektálních karcinomů

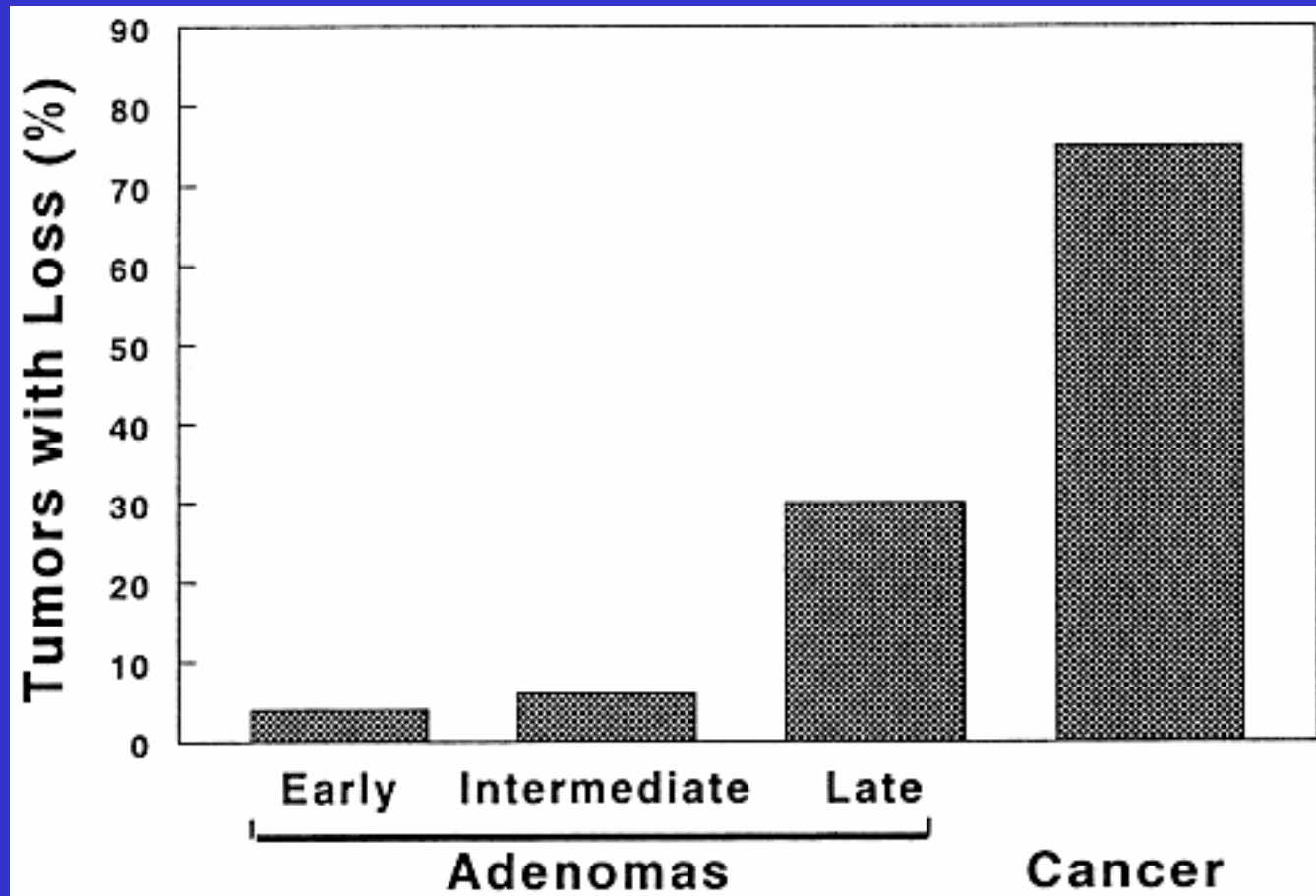


# Další stadia vývoje kolorektálního karcinomu - inaktivace p53

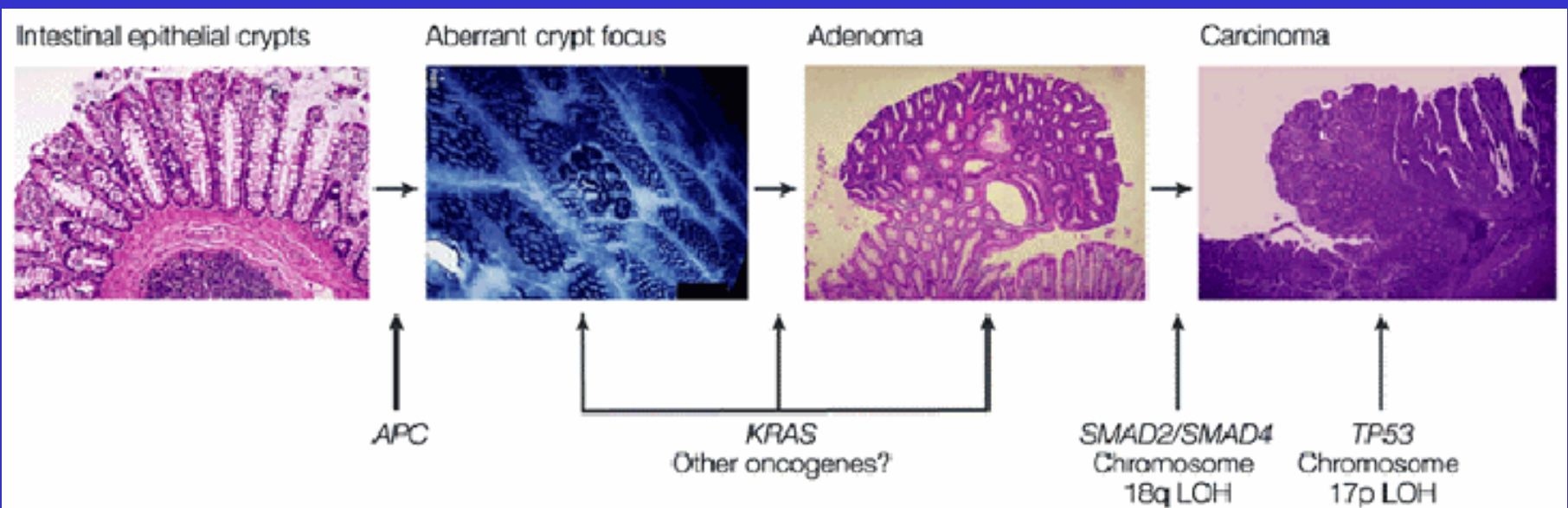
- Ztráta 17p je detekována u 75% kolorektálních karcinomů.
- Ztráta 17p je jen vzácně detekována u kolorektálních adenomů.

⇒ inaktivace nádorového supresoru p53 je typicky pozdní událost během vývoje kolorektálních karcinomů

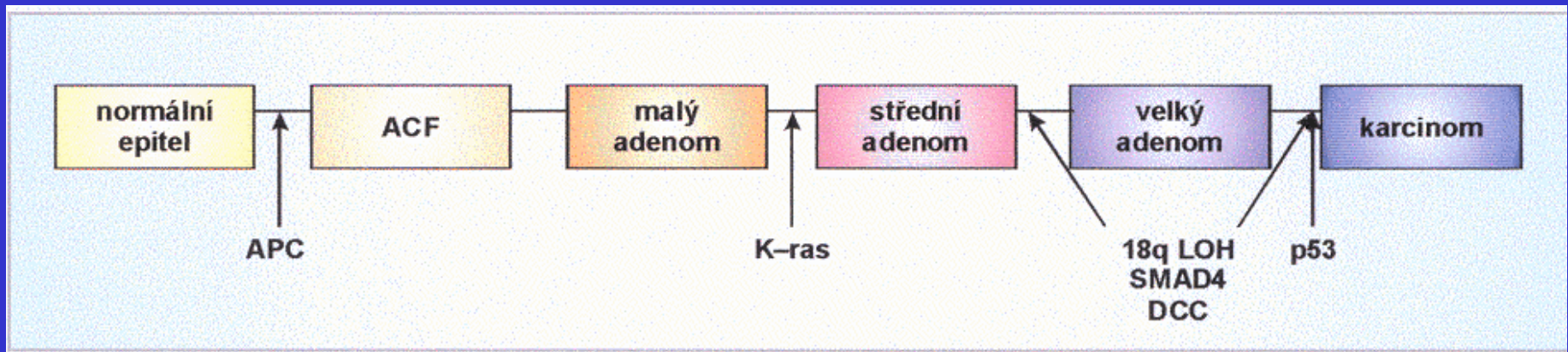
# Frekvence mutací p53 u kolorektálních karcinomů



# Vývoj kolorektálního karcinomu: model mnohostupňové kancerogeneze



# Vývoj kolorektálního karcinomu: model mnohostupňové kancerogeneze



**KONEC**