

Úvod do molekulární medicíny

C7188



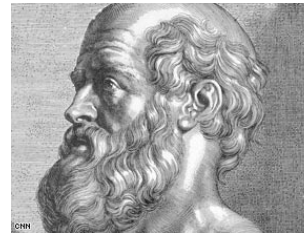
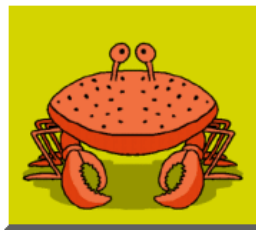
2. Molekulární patologie nádorových onemocnění

doc. Mgr. Jiří Šána, Ph.D.

podzim 2024

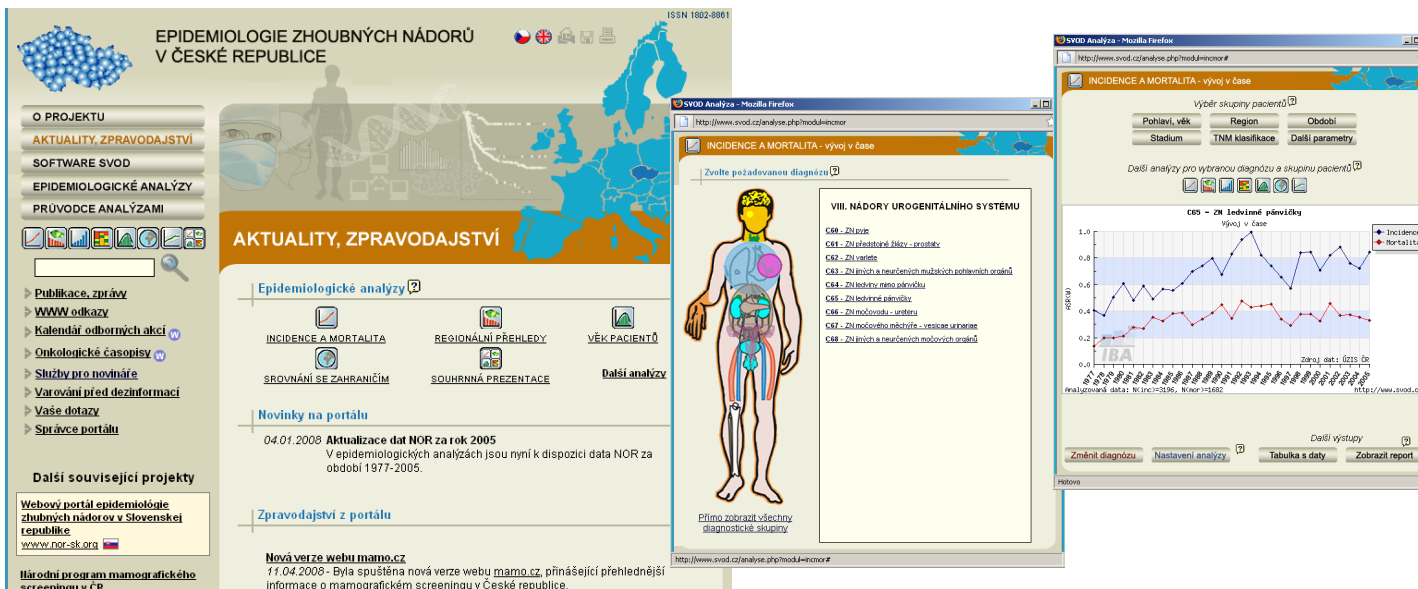
Historie poznávání nádorových onemocnění

- Nejstarší popis rakoviny 1600 p.n.l. pochází z Egypta **Papyrus Edwina Smithe** popisuje 8 tumorů nebo ulcerací prsu ošetřovaných kauterizací nástrojem označovaným „the fire drill“. Tato nemoc není léčitelná (termín rakovina nebyl použit)
- 400 p.n.l. **Hippocrates** popsal rakovinu jako dlouhé výběžky (podobné račím nohám) vybíhajícím do zdravých tkání:
 - řeč: karkinos = rak; onkos = krab
 - lat: cancer = rak
 - popisné (**epidemiologické**) poznatky:
 - 1848 - zvýšený výskyt rakoviny prsu u jeptišek (souvislost s bezdětností a nekojením)
 - 1775 - rakovina šourku u kominíků (souvislost s výskytem škodlivin v sazích; souvislost s hygienickými návyky)
 - 1902 - souvislost RTG paprsků a vzniku rakoviny
 - poč. 20. stol. - **rodinný výskyt** nádorů



Epidemiologie zhoubných nádorů v České republice

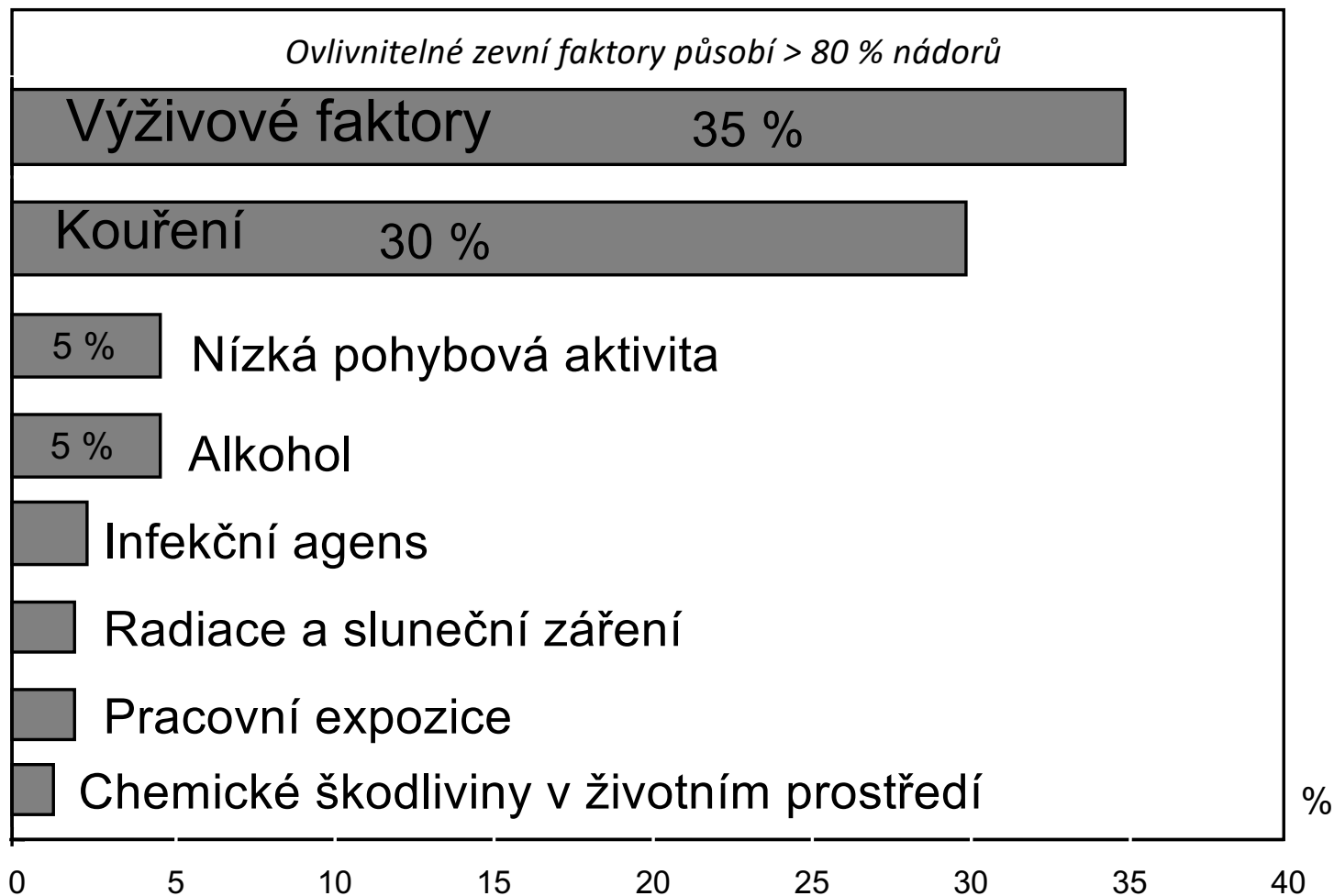
Systém pro Vizualizaci Onkologických Dat – SVOD verze 7.0 (www.svod.cz)
Pracuje s validovanými epidemiologickými daty Národního onkologického registru NOR za období 1977-2005 (databáze obsahující přibližně 1,5 mil. záznamů), spravovaných Ústavem zdravotnických informací a statistiky ČR (ÚZIS ČR)



incidence – nová onem/počet obyvatel
prevalence – celkový počet onem/počet obyvatel
mortalita – počet úmrtí/počet obyvatel
letalita – počet zemřelých na onem/počet nem (%)

DUŠEK Ladislav, MUŽÍK Jan, KUBÁSEK Miroslav, KOPTÍKOVÁ Jana, ŽALOUĐÍK Jan, VYZULA Rostislav. Epidemiologie zhoubných nádorů v České republice [online]. Masarykova univerzita, [2005], [cit. 2009-10-04]. Dostupný z WWW: <http://www.svod.cz>. Verze 7.0 [2007], ISSN 1802 – 8861.

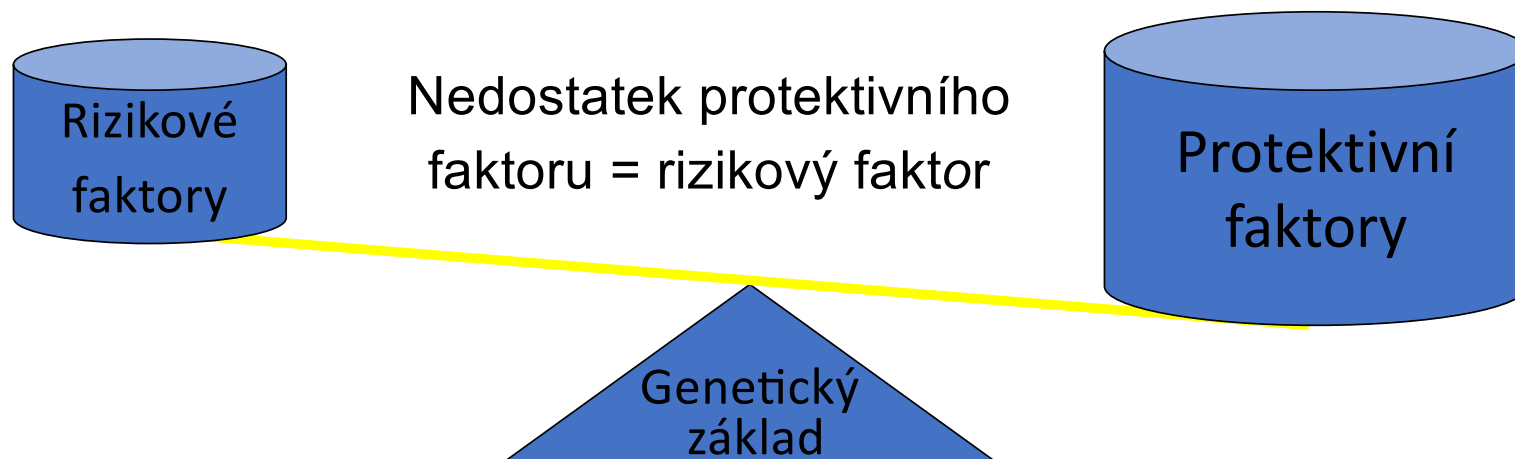
Nádorová onemocnění – etiologie (Atributivní příspěvní k celk. úmrtnosti na nádory)



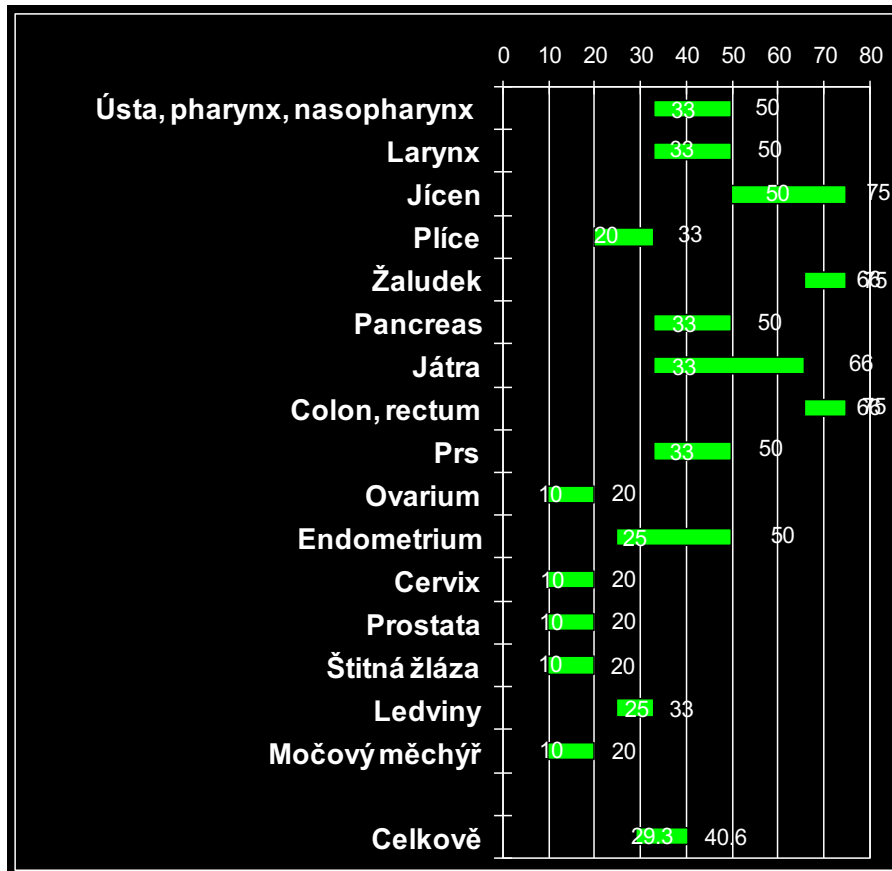
Nádorová onemocnění – etiologie (Atributivní příspěvní k celk. úmrtnosti na nádory)

Faktory prostředí:

- chemické - karcinogeny
- fyzikální - UV, ionizující záření
- biologické - DNA nádorové viry
- RNA nádorové viry - retroviry



Nádorová onemocnění – etiologie



Příklady

Japonci přestěhovaní do Ameriky: Japonsko 6-8x vyšší incidence nádorů žaludku, příští generace již srovnatelná incidence.

-Adventisté sedmého dne: asi poloviční výskyt nádorů oproti ostatní americké populaci (← zákaz kouření, alkoholu, masa).

⇒ Pouze změnou životního stylu by bylo možné snížit výrazně incidenci nádorů

Míra preventability nádorů výživovými faktory

Nádorová onemocnění – prevence

Primární prevence - zábránění vzniku nemoci odstraněním rizik. faktorů

Sekundární prevence - časná detekce nemoci (často v preklin. stadiu), kdy je dostupná léčba efektivní

Terciární prevence - zabránění rozvoje komplikací při manifestním onemocnění efektivní léčbou

Dosud převážně omezena pouze na prevenci sekundární – časný záchyt

Karcinom prsu

Palpační vyšetření

Mamografie, sonografie

Nádory děložního čípku

Pap test (Papanicolaouův test)

Kolorektální karcinom

Palpační vyšetření per rectum

Test stolice na okultní krvácení

Kolonoskopické vyšetření



Evropský kodex proti rakovině

1. Nekuřte
2. Mírněte se v konzumaci alkoholu
3. Vyhývejte se nadměrnému slunění
4. Dodržujte zdravotní a bezpečnostní pokyny při práci
5. Často jezte zeleninu a ovoce
6. Vyvarujte se vzniku nadvázy
7. Navštivte lékaře, jestliže objevíte ...
8. Navštivte lékaře, jestliže máte přetrvávající potíže

Základní pojmy

Hyperplasie – buňky nezměněné, ale zmnožené

Metaplasie – přechodná změna fenotypu buněk, buňky lokalizované na nesprávném místě, často v místě, kde se setkávají dva typy epitelu: děložní čípek – děloha; jícen – žaludek - tzv. Barrettův jícen

Dysplasie – obsahují již cytologicky abnormální buňky (velikost, tvar, barvitelnost jádra, poměr jádro/cytoplazma, změněná mitotická aktivita) a abnormální poměr buněčných typů

Nádor, tumor, neoplazma, novotvar je geneticky podmíněný abnormální přírůstek buněčné tkáňové hmoty klonálního charakteru. Jeho růst není v koordinaci s růstem okolních tkání a rovnovážným stavem organismu. (Rejthar)

Základní klasifikace nádorových onemocnění

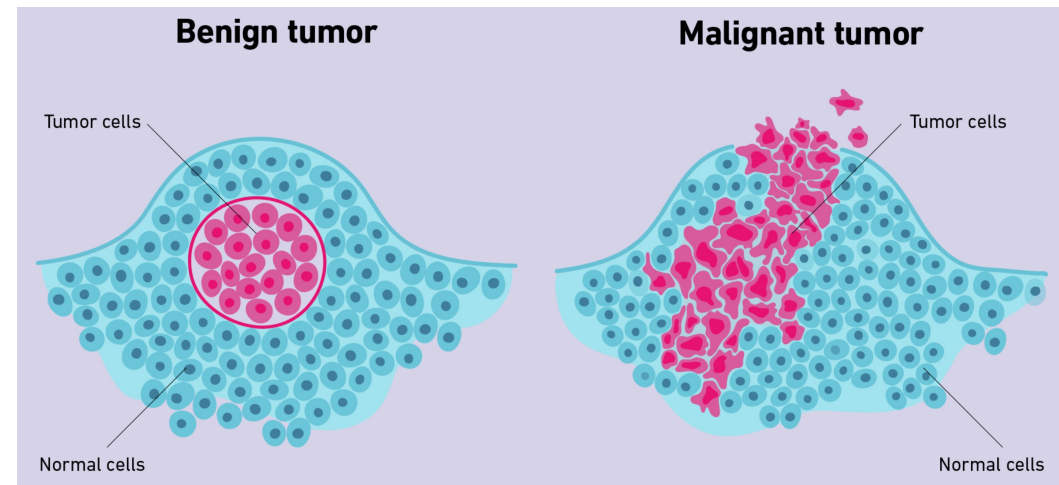
1. Podle schopnosti infiltrovat se do jiné tkáně

Benigní (nezhoubné) nádory

- zůstávají v místě svého vzniku, jsou ohraničené, neinvadují jiné tkáně, nemigrují a nezakládají metastázy (polypy, lipomy, chondromy, leiomyom, fibrom,...)

Maligní (zhoubné) nádory

- infiltrují a destrukují okolní tkáně a prostřednictvím krevního a lymfatického systému se šíří do celého těla, v nových tkáních vyvolávají tvorbu sekundárních nádorů (metastáz) X *sekundární nádory (therapy-related)*



Základní klasifikace nádorových onemocnění

2. Podle typu buněk (tkání), ze kterých nádorová buňka vznikla

Karcinomy – nádory epiteliálních buněk (asi 80-90 % lidských nádorů)

Sarkomy – pevné nádory pojivových tkání – svalů, kostí, chrupavky, tvoří asi 1 % nádorů, z mezenchymálních buněk

Leukémie a lymfomy – odvozené od hematopoetických buněk a buněk imunitního systému

Neuroektodermální – nádory odvozené z nervové tkáně (gliomy, neuroblastomy, medulloblastomy,...)

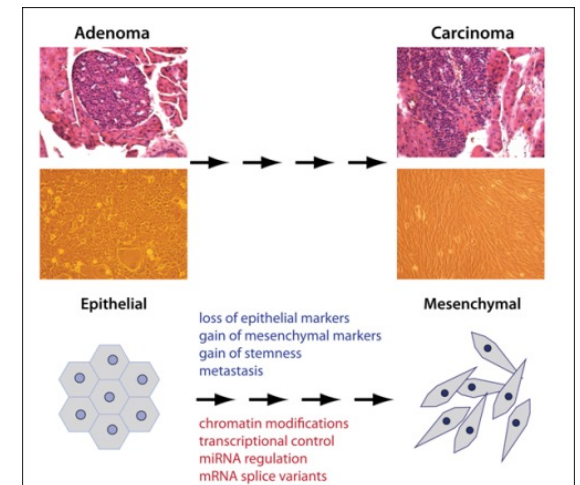
Germinální nádory – odvozené z totipotentní zárodečné buňky

Smíšené nádory

Anaplastické nádory, nádory neznámého původu

(1 až 2 % nádorů) není možné určit z jaké tkáně je nádor odvozen – **dediferenciace**

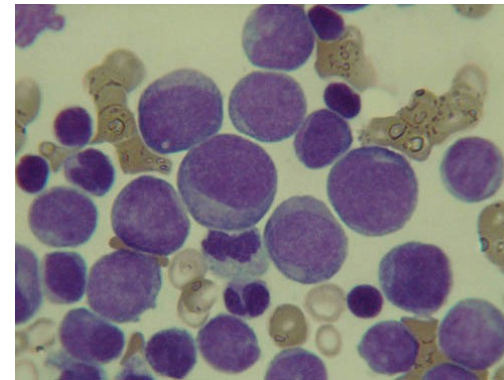
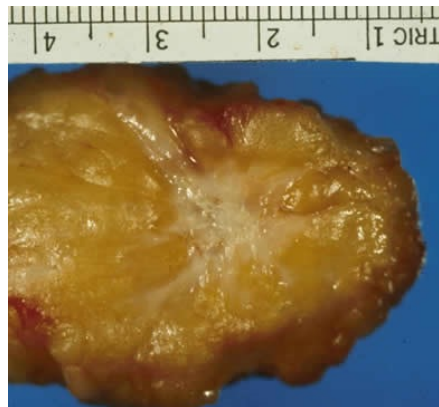
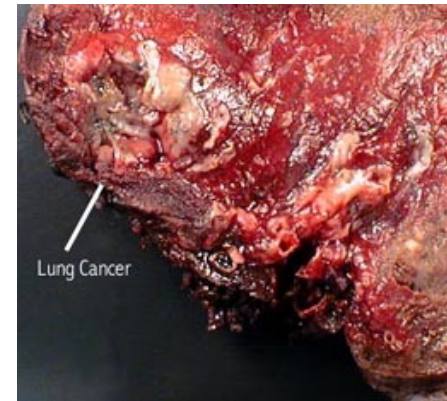
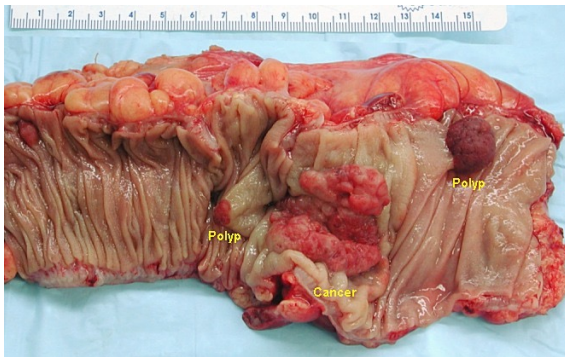
Transdiferenciace – EMT (Epitelo-mezenchymální tranzice)



Základní klasifikace nádorových onemocnění

3. Podle postiženého orgánu

karcinom plic, kolorektální karcinom, nádor prsu, akutní myeloidní leukémie...



Histopatologická klasifikace nádorových onemocnění

1. Staging - určení rozsahu nádoru neboli klinické pokročilosti onemocnění

TNM SYSTÉM

T - rozsah primárního nádoru

N - nepřítomnost či přítomnost a rozsah metastáz v regionálních mízních uzlinách

M - nepřítomnost či přítomnost vzdálených metastáz

T0, Tis – tumor *in situ*, T1 – nádor ≤ 2 cm, T2 - >2 cm ≤ 4 cm, T3 - >4 cm,

T4 – tumor prorůstá do okolní tkáně;

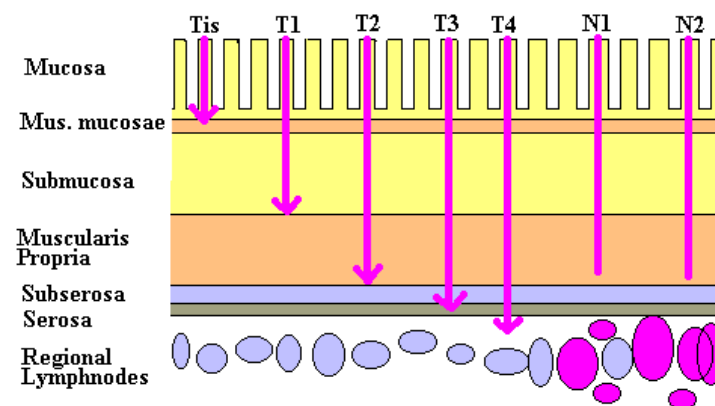
N0, N1 – 1 uzlina ≤ 3 cm, N2 - ≤ 6 cm, N3 - > 6 cm

M0, M1

System je v podstatě „těsnopisem“ pro popis rozsahu určitého zhoubného nádoru.

T1: malý lokalizovaný nádor, **T2**: větší, ale ohraničený uvnitř orgánu

T3: nádor na hranici orgánu, **T4**: nádor, který se lokálně rozšířil do dalších orgánů



Histopatologická klasifikace nádorových onemocnění

2. **Grading - mikroskopické určení stupně diferencovanosti nádoru**
stanovení stupně ztráty podobnosti nádoru s původní tkání
(jak moc se nádorové buňky podobají normálním buňkám)

G1: dobře diferencovaný nádor s dobrou prognózou

G2: středně diferencovaný nádor s prostřední prognózou

G3: málo diferencovaný nádor se špatnou prognózou

3. **Typing – morfologická diagnostika**
stanovení histologického typu nádoru

Vychází ze závazných klasifikací, obvykle doporučených WHO. Každá jednotka má přidělen svůj číselný kód **ICDO** (International Classification of Diseases for Oncology)

Např. kód 8850/0 je lipom.

Např. kód 8850/6 je metastáza liposarkomu.

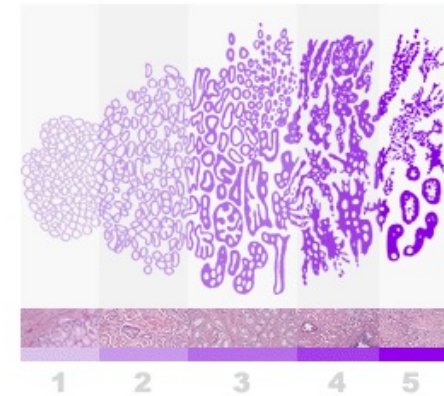
První číslo za lomítkem označuje biologické vlastnosti: **0:** benigní

1: nejisté chování

2: carcinoma in situ

3: maligní

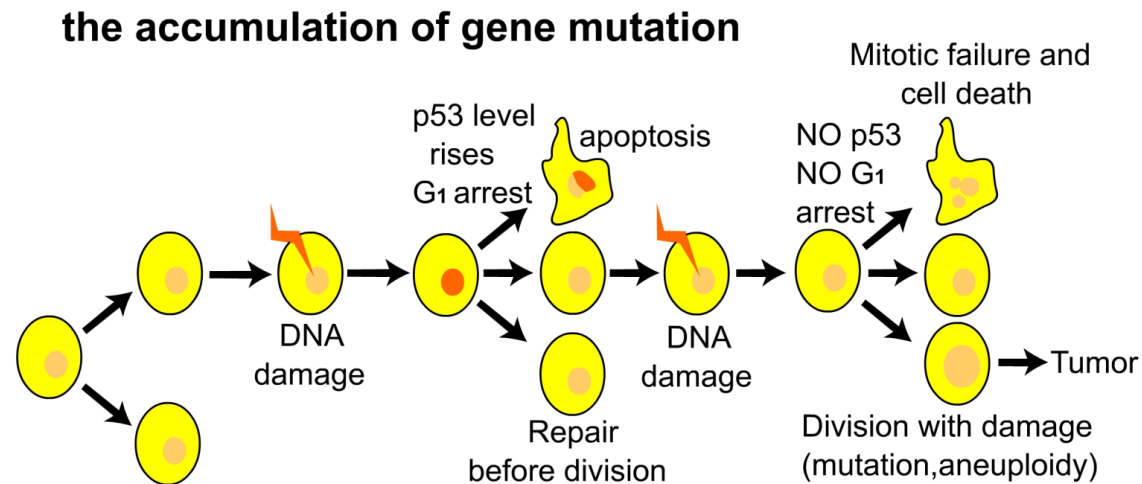
6: metastáza



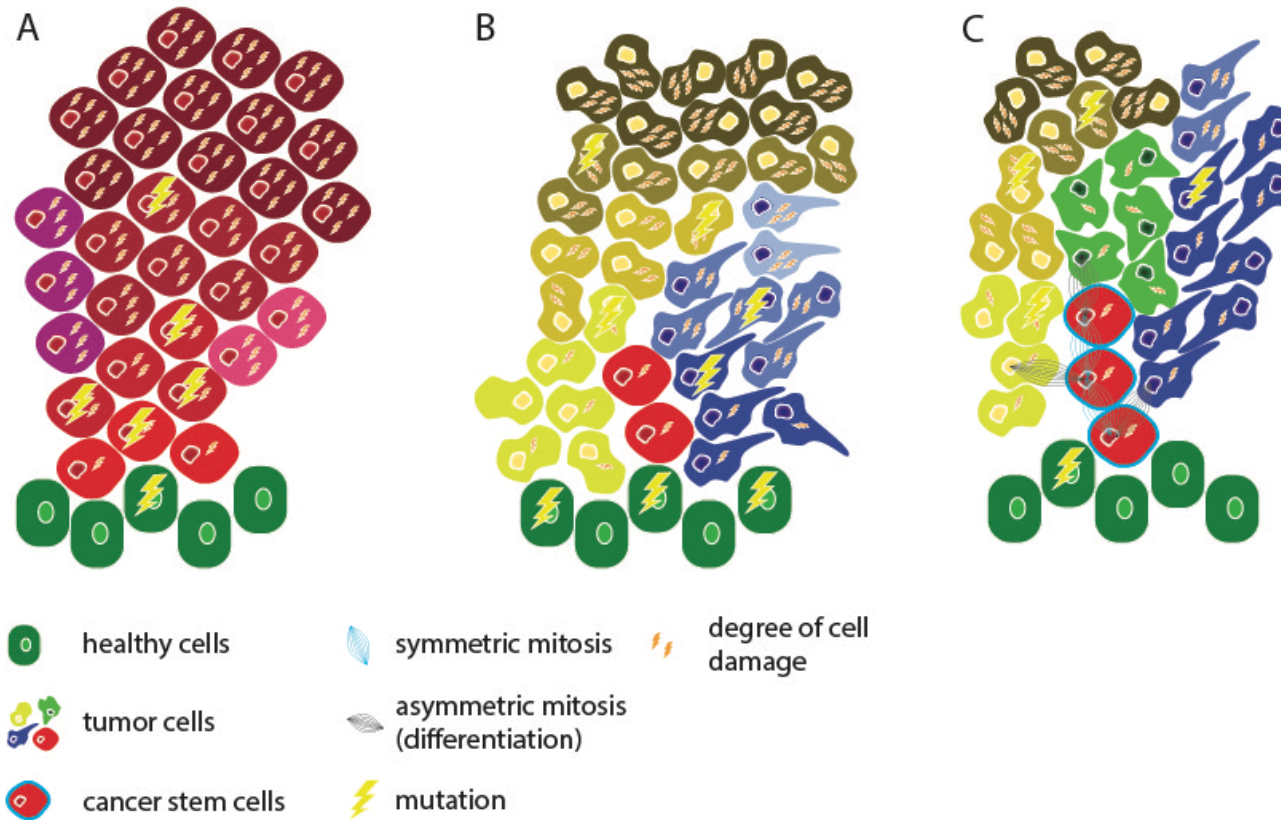
Proces kancerogeneze

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

Neoplastická transformace - je přeměna somatické buňky v buňku nádorovou

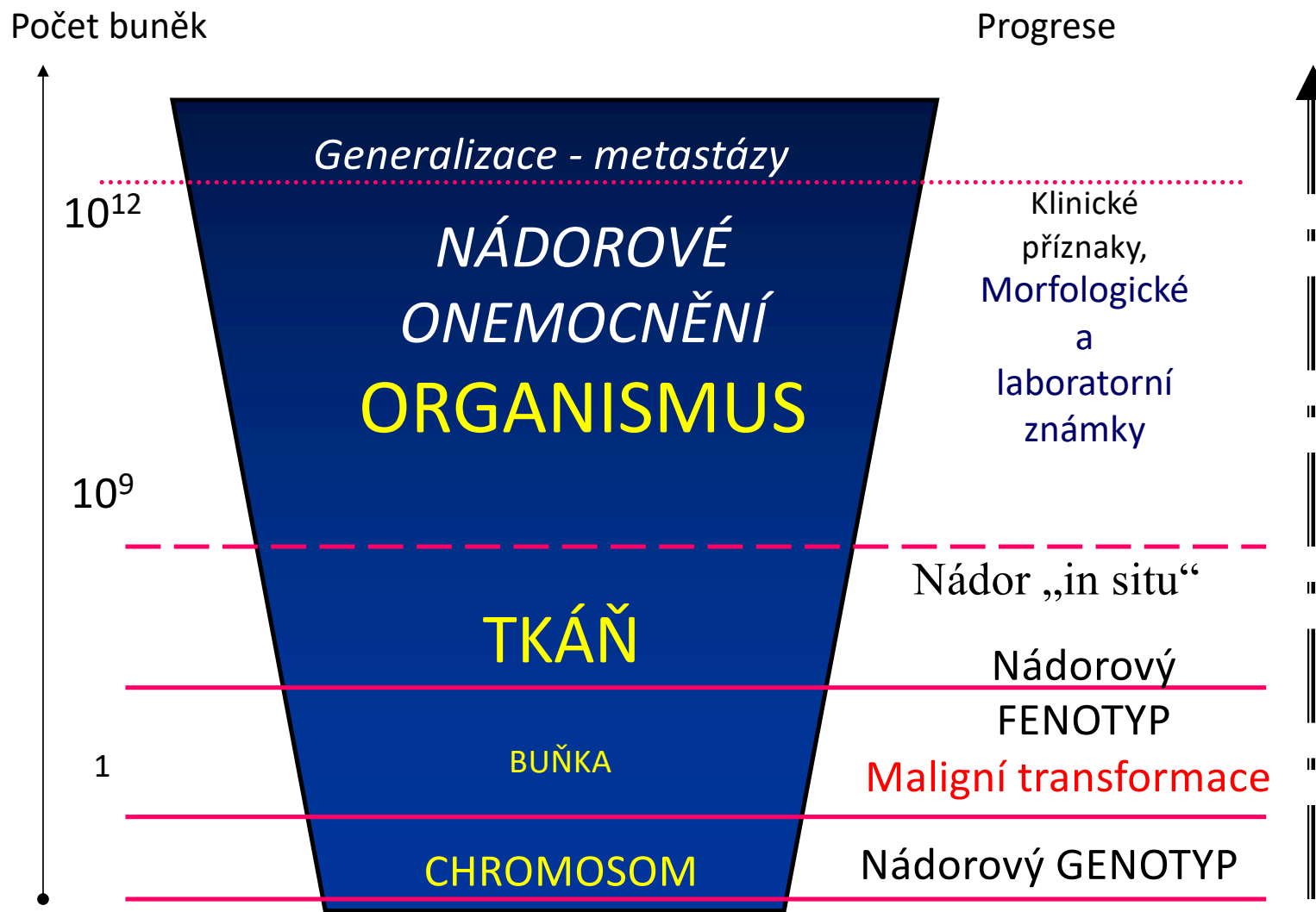


Klonální model vývoje nádoru: selekce, klonální expanze

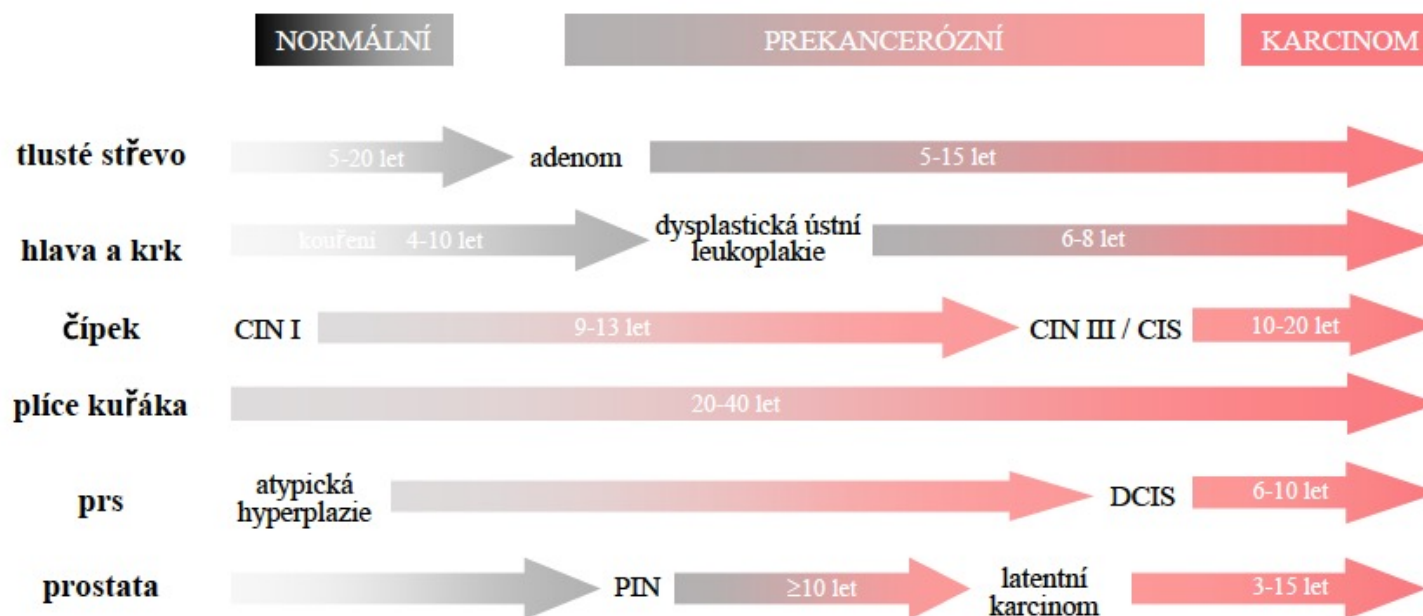
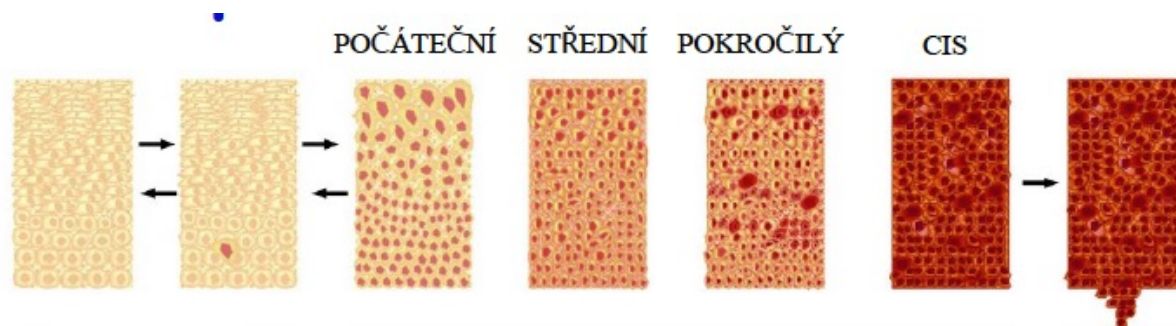


Jsou nádory monoklonální nebo polyklonální?

Postupný vývoj nádoru

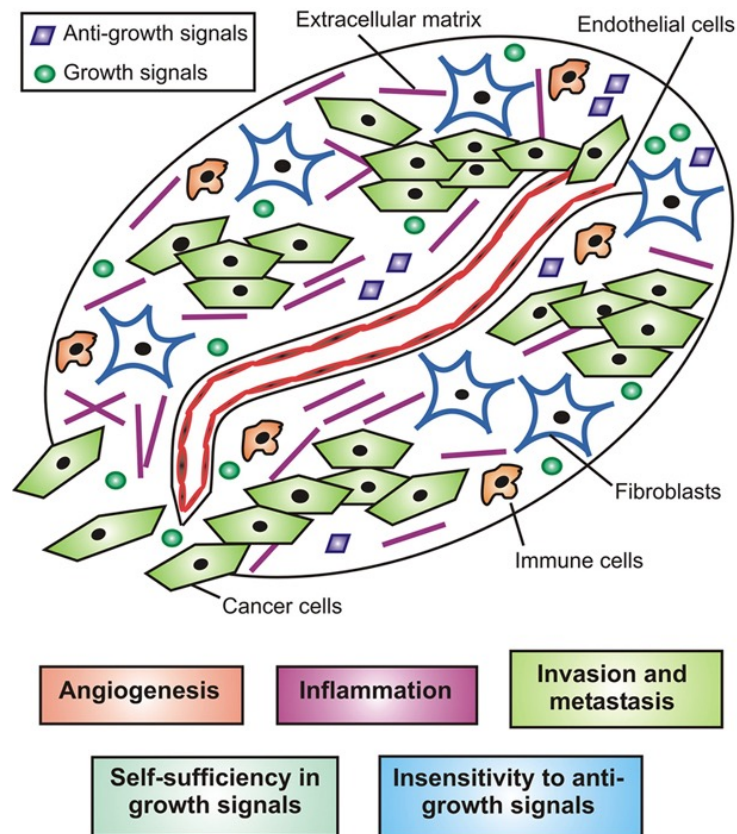


Postupný vývoj nnádoru



Pokud je postižena pouze svrchní vrstva tkáně, jsou tyto změny odborně označovány jako prekancerózní léze děložního hrdla, **cervikální intraepiteliální neoplazie (CIN)** nebo též skvamózní intraepiteliální léze (SIL).

Histologická skladba nádoru – nádor je komplexní tkáň



Nádorové stroma

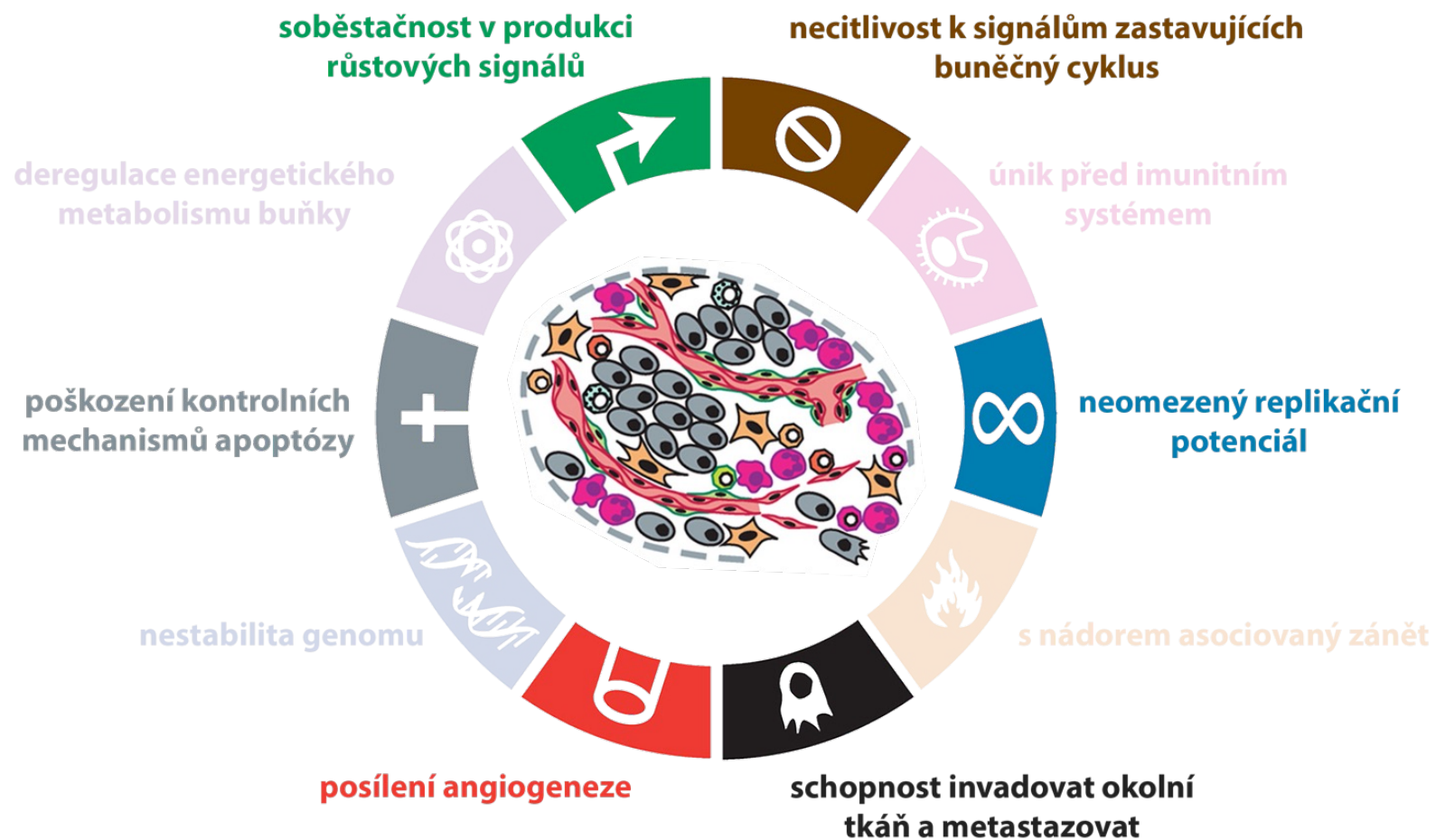
- mezenchymální tkáňové složky: cévní komponenty, podpůrné mezenchymální tkáň, lymfocyty, makrofágy,...
- slouží hlavně k výživě parenchymu a jako kostra pro uspořádání parenchymu
- transportní úloha (přenos signálů, rezervoár růstových faktorů...)
- klíčová úloha při nádorové angiogenezi a metastázování

Nádorový parenchym

- vlastní nádorově transformovaný parenchym

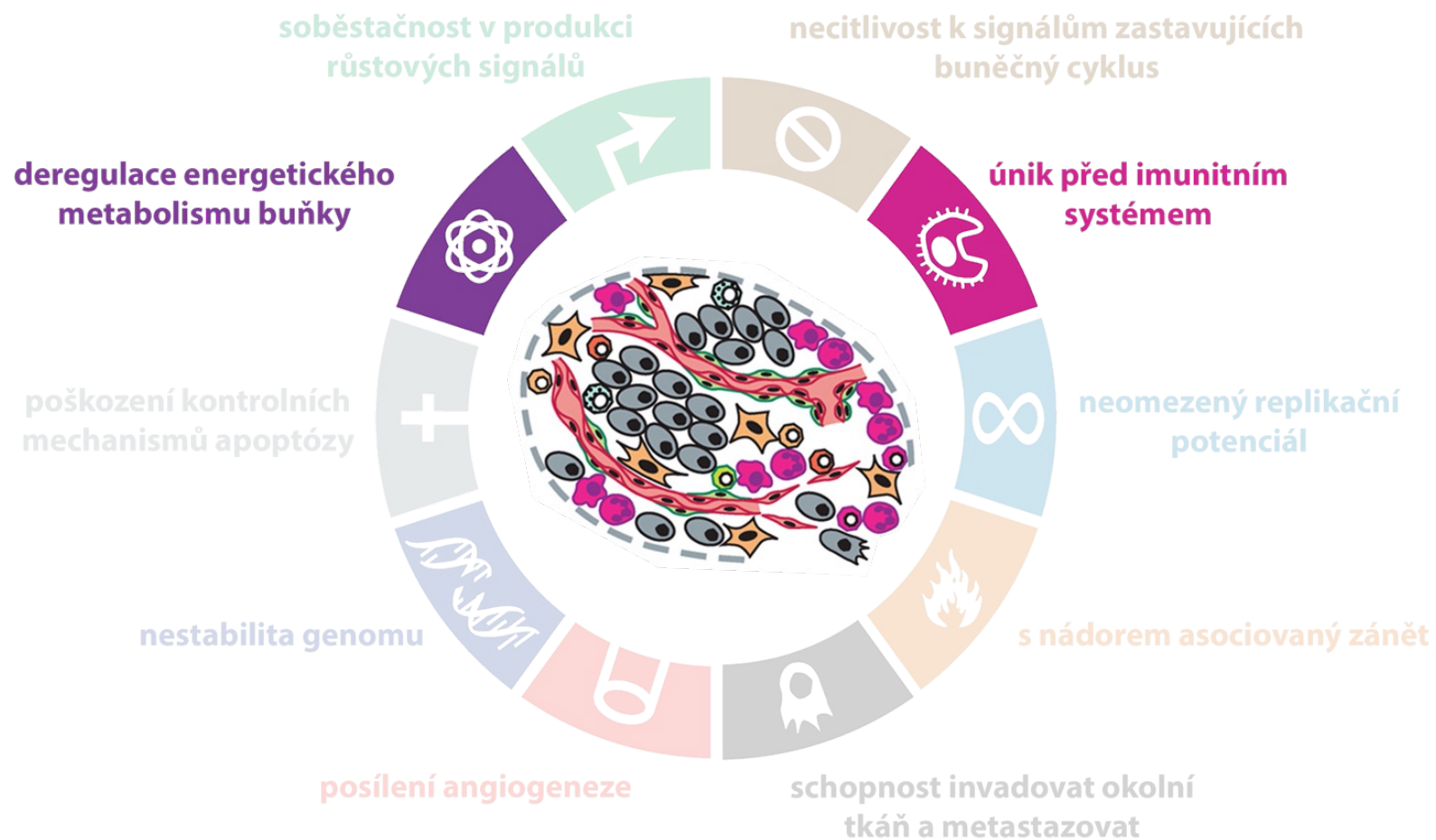
Nádory organoidní, nádory histoidní

Získané vlastnosti maligního nádoru



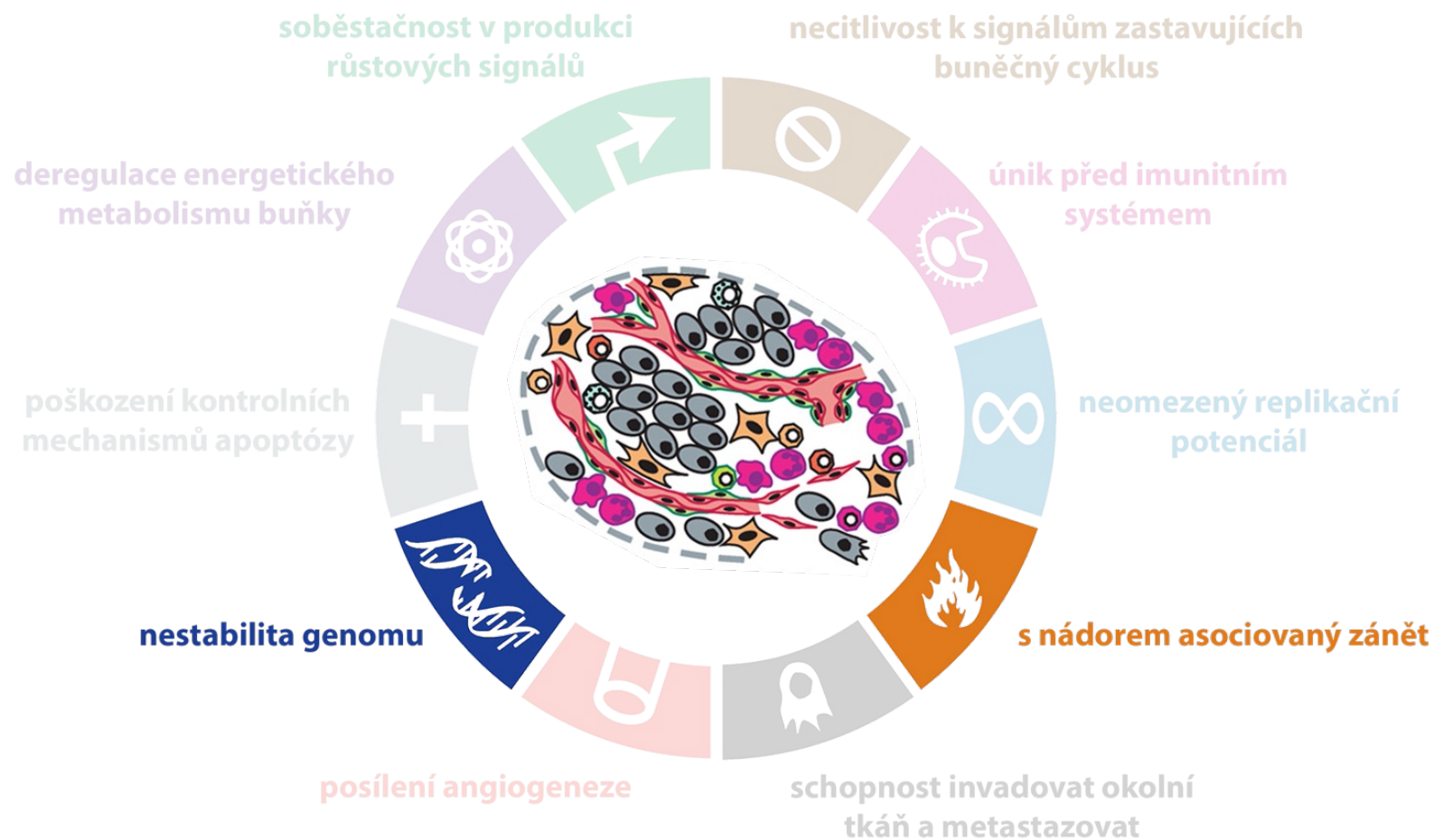
Hanahan & Weinberg, 2011 Cell, modified

Získané vlastnosti maligního nádoru



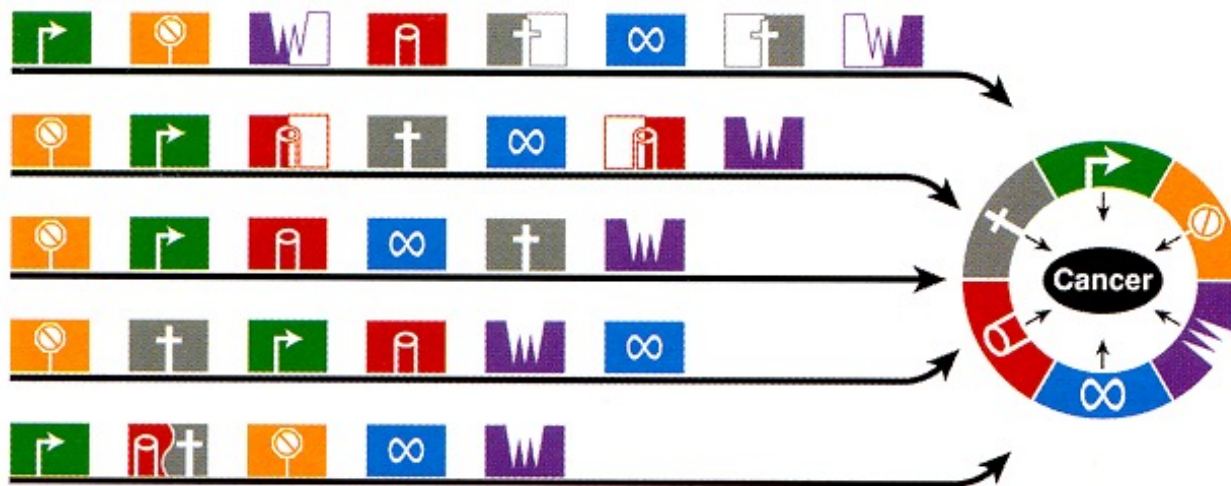
Hanahan & Weinberg, 2011 Cell, modified

Získané vlastnosti maligního nádoru



Hanahan & Weinberg, 2011 Cell, modified

Kancerogeneze má individuální průběh



Individuální je

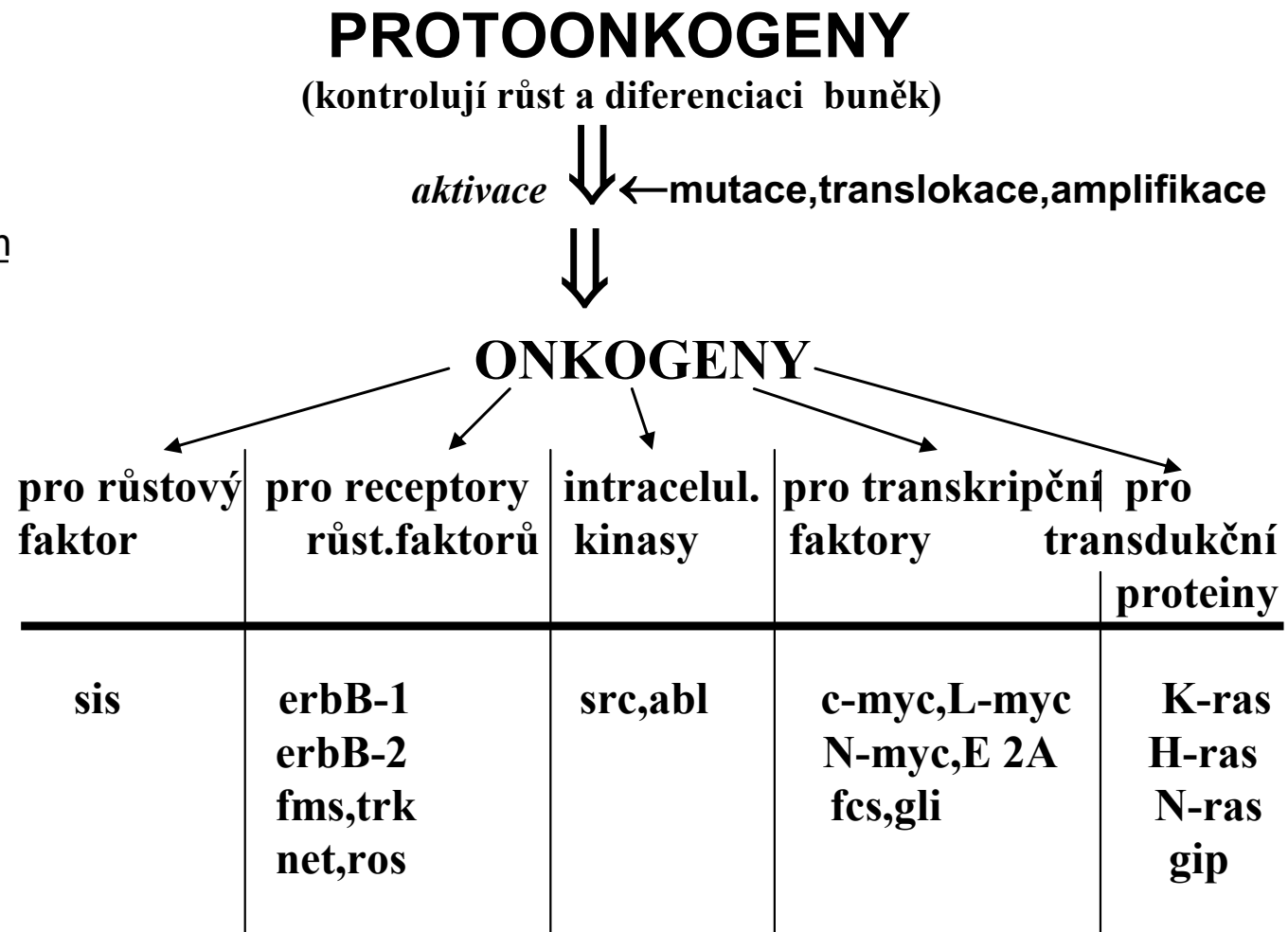
- pořadí zásahů
- počet zásahů
- konkrétní zasažené geny

Onkogeny

Mutace protoonkogenů

jsou:

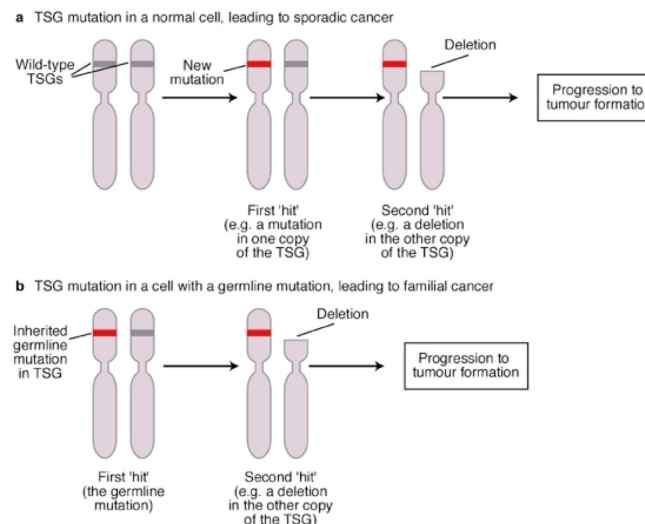
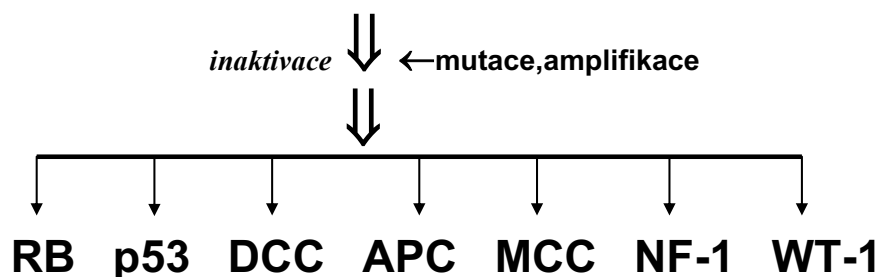
- aktivující
- dominantní
- vyskytují se v somatických buňkách a jen výjimečně v zárodečných buňkách



Nádorové supresory

TUMOROVÉ SUPRESOROVÉ GENY (= ANTIONKOGENY)

(účastní se na přenosu signálu mezi buňkami a kontrolují programovaný zánik buněk)



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.

Knudsonova „two hits hypothesis“ (RB)

Mutace nádorových supresorů jsou:

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

Onkogenní (nádorové) viry

- **Retroviry** (RNA viry): obsahují ve svém genomu onkogen (akutně transformující viry) nebo aktivují protoonkogen, vedle kterého se integrovaly (pomalu transformující=inzerční mutageneze)
v-onc (virový onkogen)= gen akutně transformujícího retroviru
c-onc (celulární onkogen)= gen vznikající aktivací protoonkogenu, genu normálních buněk eukaryontů
myc - v. ptačí myelocytomatózy, Ki-Ras – Kirstenův myší sark. v.
erbA – v. ptačí erytroblastózy, kit – kočičí sarkomový v.
- **DNA nádorové 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 dom

(Reprinted from Nature, Vol. 278, No. 5701, pp. 261-263, March 15, 1979)
© Macmillan Journals Ltd., 1979

interaguje s p53, RB, p300/CBP (objev p53)

adenoviry (EBV, HBV): E1A interaguje s RB a p300/CBP;

E1B interaguje s p53

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

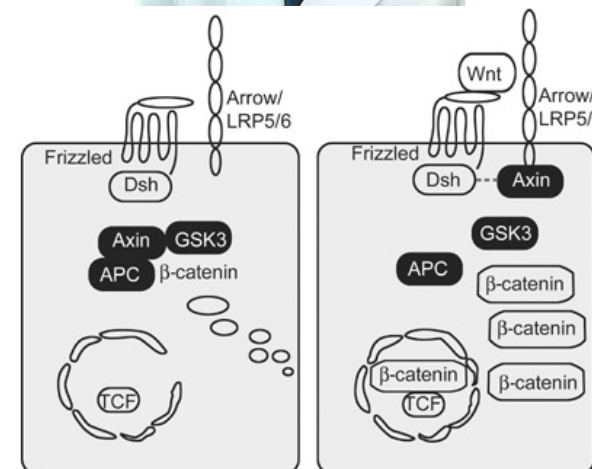
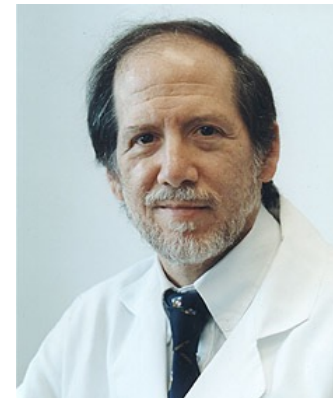
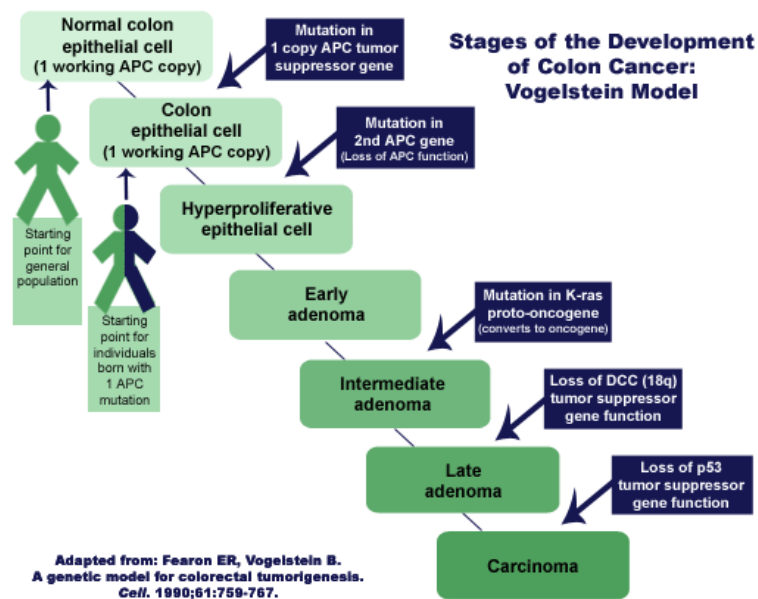
E7 interaguje s RB

T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells

THE early region of the small DNA tumour virus, simian virus 40 (SV40), is known to code for at least two polypeptides, the t and T antigens ('small t' and 'large T'). Both these polypeptides are expressed in cells transformed by the virus¹⁻⁴, and the T antigen is essential for both the initiation and maintenance of the transformed state⁵⁻⁹. We therefore need to determine the mechanism of SV40-induced transformation. Here we show that the T antigen in a line of SV40-transformed mouse cells forms an oligomeric complex with the p53 protein. This complex is as stable as that of the SV40-transformed mouse cell line established by as little as 1 cell of a rabbit



Vogelsteinuv model vzniku nádorů tlustého střeva



FAP (familiární adenomatózní polypóza) je podmíněna celou řadou bodových mutací v genu APC, společným rysem těchto mutací je to, že vedou ke zkrácení proteinu. APC je spoluzodpovědný za správné dělení buněk.

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 k takové akumulaci mutací nemůže během lidského života dojít.

Co umožňuje nádorovou transformaci?

- Akumulace všech nutných mutací umožněna **genetickou nestabilitou** (tzv. „mutator hypothesis“). Nestabilita je záležitost **rychlosti**, s jakou k mutacím dochází
 - **K akumulaci stačí normální rychlost mutací ve spojení s vlnami klonální expanze, které mohou být způsobeny pozitivní selekcí buněk „prenádorových“.**
- **Většina nádorů je geneticky nestabilních**

Genetická nestabilita nádorů

1. Nestabilita v sekvenci DNA – NIN a MIN

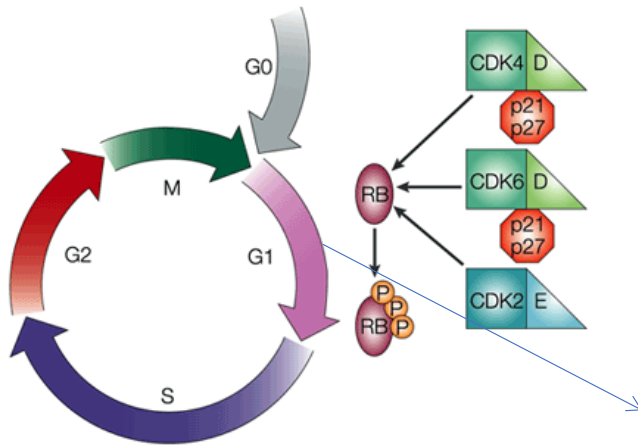
- Tento typ nestability je u lidských nádorů vzácnější, ale když se vyskytne, má dramatické následky. Zdrojem nepřesností při replikaci DNA jsou chyby vzniklé při DNA polymeraci (tj. kvalita DNA polymeráz a souvisejících „proofreadingových“ procesů) a chyby v systémech oprav DNA.
- 1. Nukleotidová excizní oprava („nucleotide-excision repair“ - **NER**) - s ní spojená nestabilita („NER-associated instability“ - **NIN**)
- 2. Oprava špatného párování („mismatch repair“ - **MMR**) - s ní spojená mikrosatelitová nestabilita (**MIN**)

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 – např. 85% kolorektálních nádorů je vysoce aneuploidních. Běžná je ztráta chromozomu související s LOH, často je doprovázena získáním opačného chromozomu. ⇒ Ne vždy změny karyotypu souvisejí s CIN! Během buněčného cyklu se vyskytuje několik **kontrolních bodů**, které monitorují správný postup buněčného dělení. Zatím chybí jednoznačná kritéria k určení genů odpovědných za CIN a k určení jejich „míry zodpovědnosti“.

Poruchy regulace buněčného cyklu

Ztráta regulace buněčného cyklu je kritická součást transformace



Nature Reviews | Molecular Cell Biology

M - kopie DNA jsou separovány;
kondenzované chromozomy

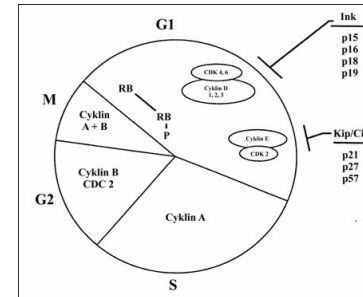
G1 - obsah DNA: 2N

S - replikace DNA; inkorporace značených nukleotidů

G2 - obsah DNA: 4N

G0 - stárnoucí nebo dlouhodobě se nedělící buňky

bod restrikce: klíčový regulační / rozhodovací bod buněčného cyklu



Každá fáze cyklu je katalyzovaná specifickými **komplexy cyklin-dependentní kinázy a cyklinu**.

cyklin-dependentní kinázy (CDK, CDC) – aktivita je závislá na vazbě cyklinu

cykliny - jejich hladina kolísá v závislosti na fázi buněčného cyklu

RB- retinoblastomový gen, nefosforylovaná forma pRB blokuje přestup z G1 do S fáze (E2F)

Fosforylovaná nebo **hyperfosforylovaná forma pRB – neaktivní – proliferace**

Retinoblastom – maligní nádor retiny, obě alely pRB mutovány nebo deletovány

Nekróza vs. apoptóza

Nekróza:

týká se skupiny postižených buněk
vyvolána nefyziologickým poškozením
(virová infekce, hypotermie, hypoxie,
metabolické jedy, ..)

fagocytóza makrofágy

významná **zánětlivá reakce**

Apoptóza –

programovaná buněčná smrt:

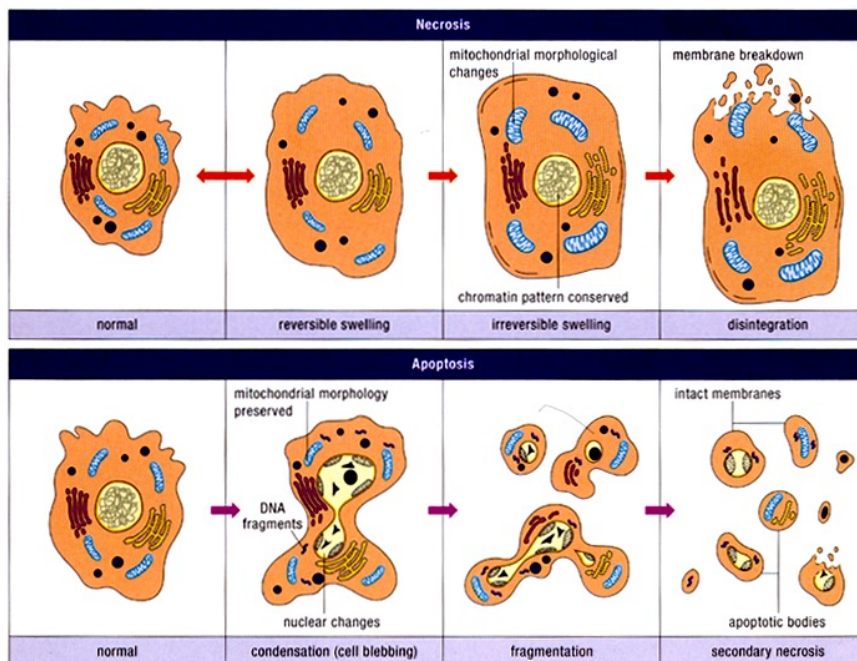
postihuje jednotlivé buňky

indukována fyziologickými stimuly
(nedostatek růstových faktorů, změny
hormonálních hladin, ..)

fagocytóza okolních buněk nebo
makrofágy žádná zánětlivá reakce

na rozdíl od nekrózy je popsáno

mnoho příkladů **fyziologické** apoptózy.



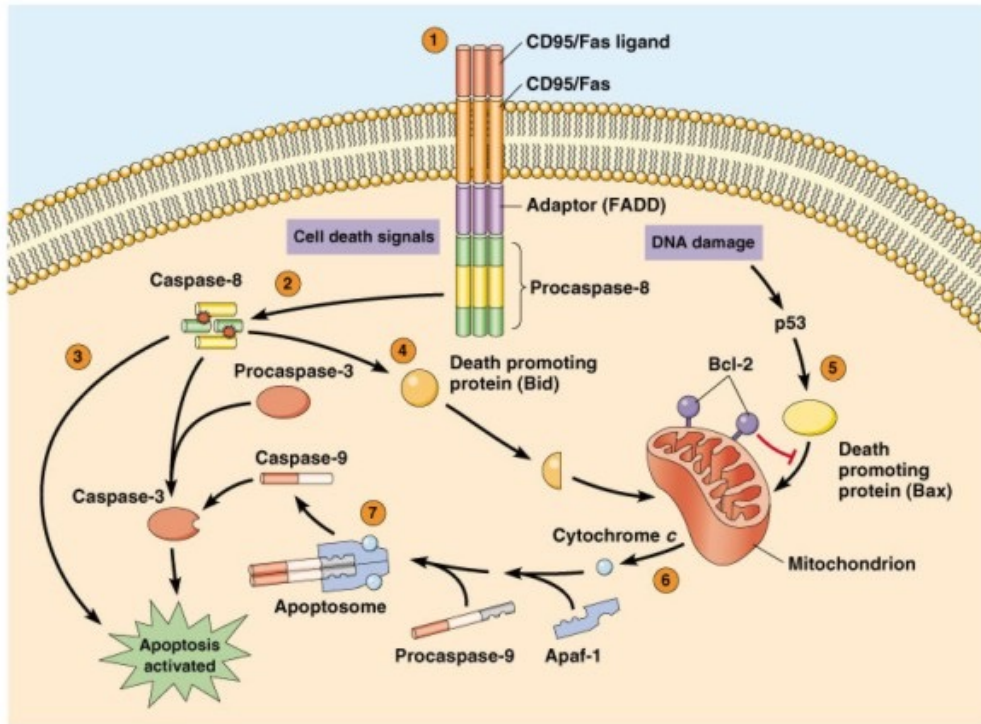
Zvýšená apoptóza

syndrom získané imunodeficiency AIDS (CD4+ T-buňky),
neurodegenerativní nemoci (Alzheimerova, Parkinsonova nemoc)
myelodysplastický syndrom (hypercelulární dřev, periferní cytopenie)
některé autoimunitní nemoci

Suprese apoptózy

Nádory, některá autoimunitní onemocnění, virové infekce

Regulace a průběh apoptózy



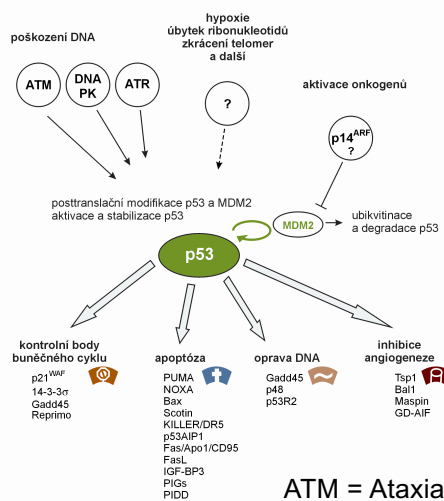
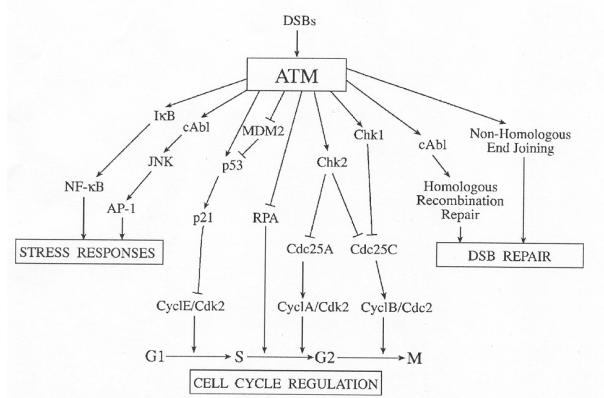
Vnější cesta receptorová:

vazbou ligandu na příslušný **receptor smrti** vzniká proapoptotický signál. Ten vede k aktivaci domény smrti za kooperace dalších proteinů. Cílem je aktivace **prokaspázy 8**.

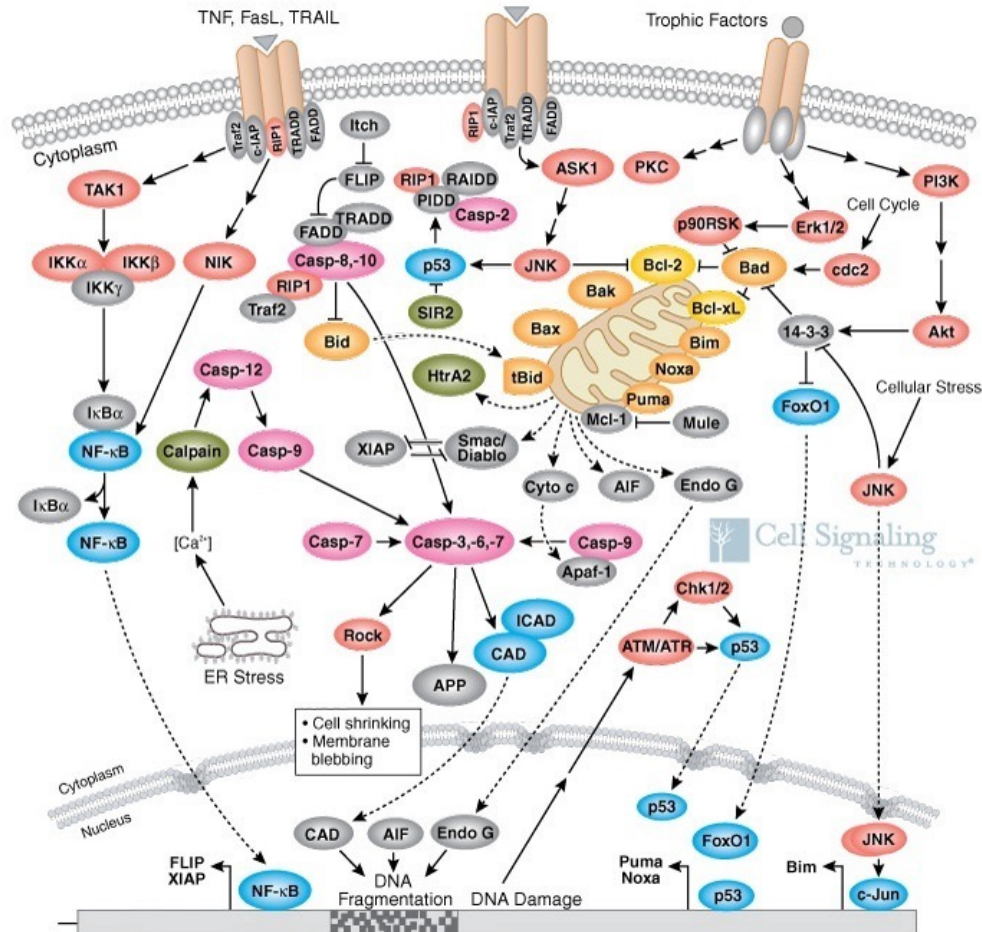
3 geny Ced3,4,9 kontrolující apoptózu u *C. elegans*
13 kaspáz homologů Ced3
Apaf1 homolog Ced4
Bcl2 rodina-17 homologů Ced9
supresory apoptózy brání uvolnění cyt-c z mitochondrií

Vnitřní cesta: signalizací např. přes p53 je zahájen apoptotický děj, jehož složkou je systém **Bcl-2/Bax**, signalizace přes **mitochondrie**, tvorba komplexu nazývaného **apoptozóm** a cílem je aktivace **prokaspázy 9**.

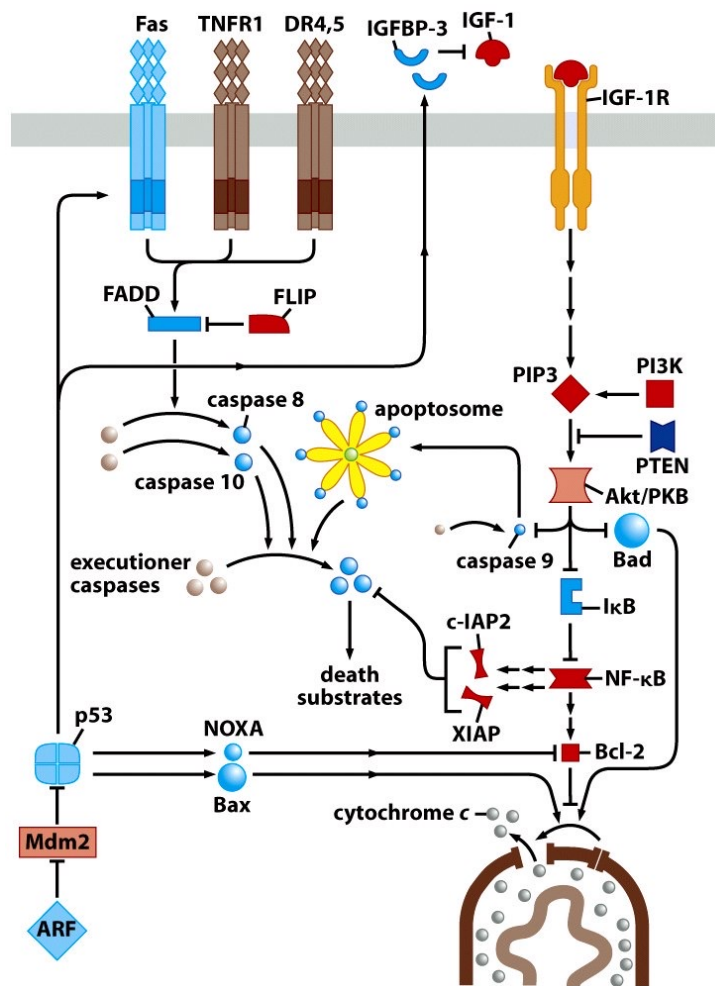
Regulace a průběh apoptózy – signalizace ATM, p53



ATM = Ataxia telangiectasia mutated



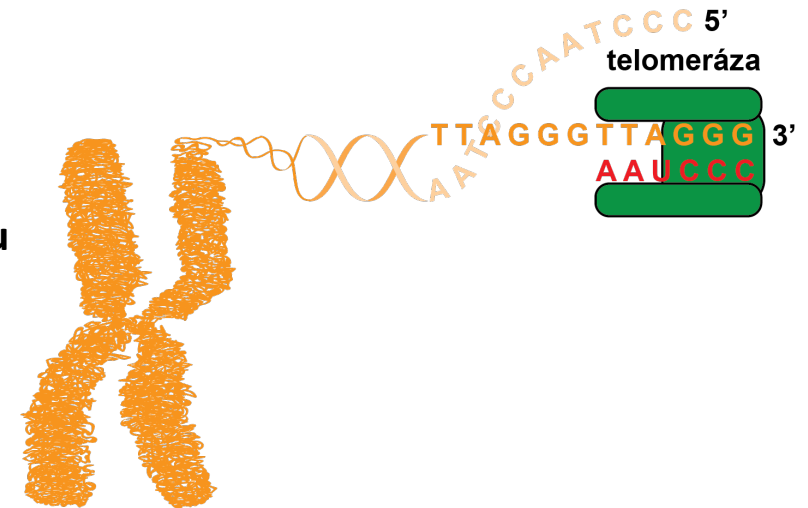
Anti-apoptotické strategie nádorů



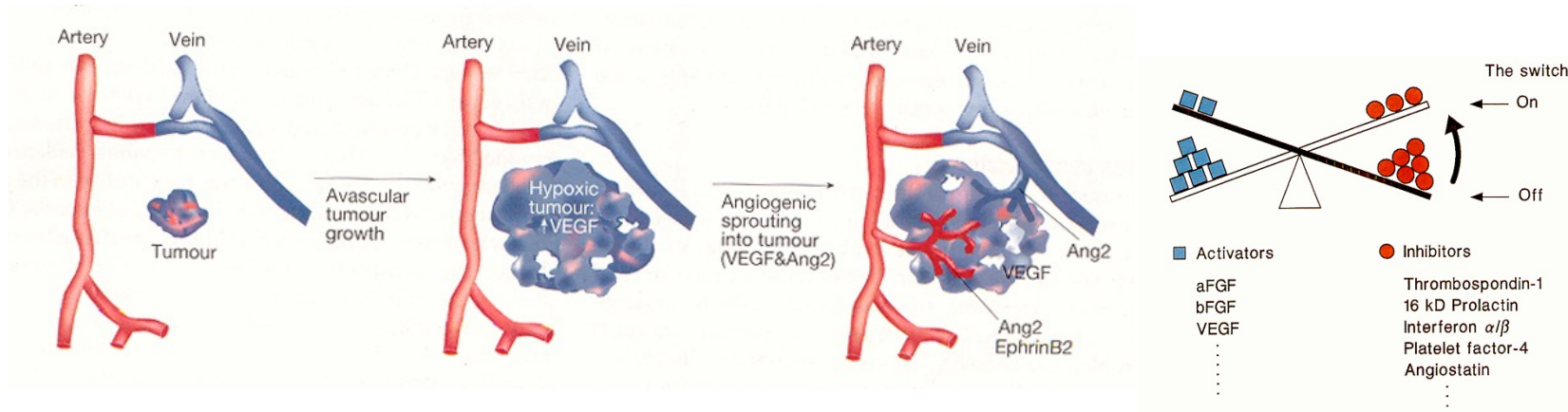
Nádory používají nejrůznější strategie, jak zmenšit šanci na vstup do apoptózy. Buď snižují hladinu/aktivitu **proapoptotických** (modře) proteinů, nebo zvyšují hladinu/aktivitu **antiapoptotických** (červenohnědě) proteinů.

Nádory a „nesmrtelnost“ buněk, neomezený replikační potenciál

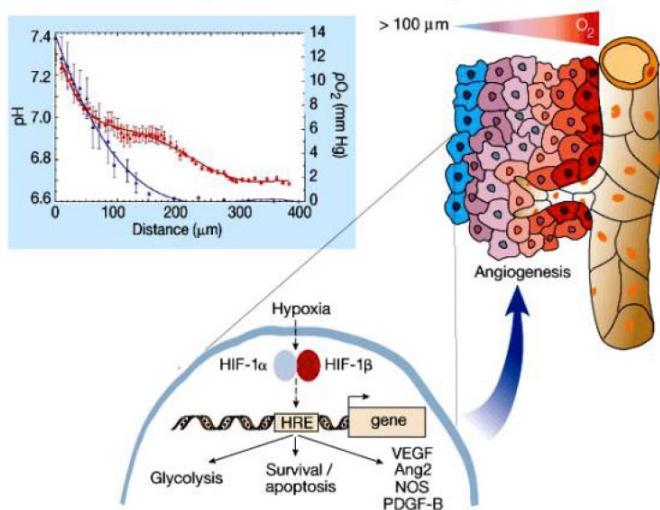
- Telomery – repetitivní sekvence TTAGGG na koncových částech chromozomů
 - chrání integritu DNA a stabilitu chromozomů
- Hayflickův limit - maximální počet dělení buňky před jejím zánikem
- Telomeráza
 - telomerázová reverzní transkriptáza (TERT)
 - telomerázová RNA (TERC)
- 85 – 90 % nádorů má aktivní telomerázu
- K aktivaci telomerázy dochází v pozdních stádiích vývoje nádoru



Význam angiogeneze v rozvoji nádorového onemocnění



Role of hypoxia in Tumor angiogenesis

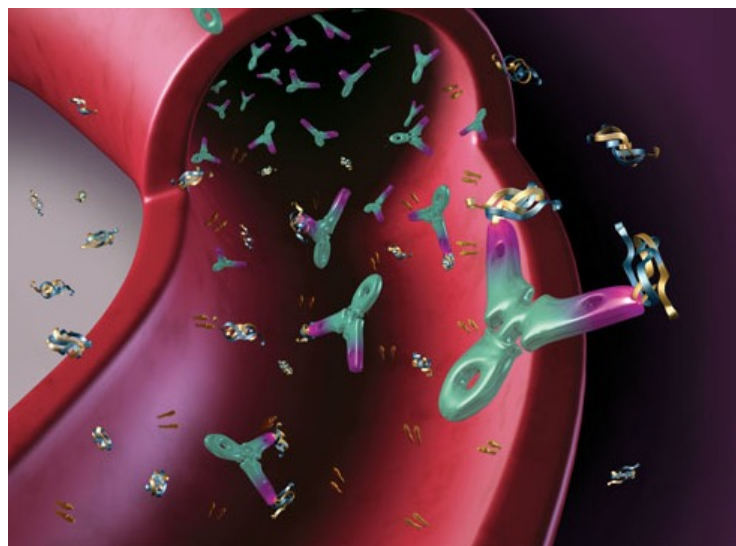
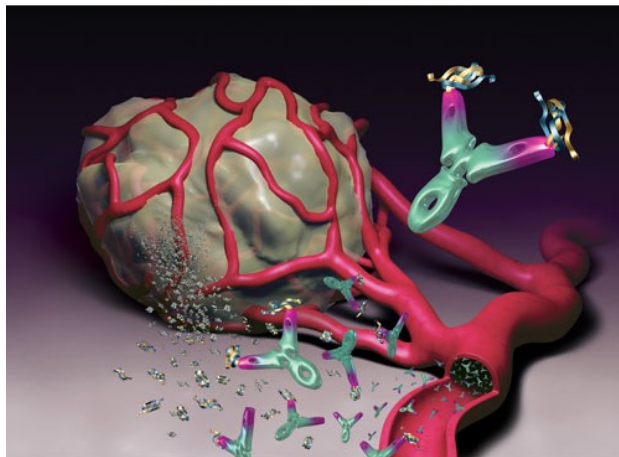


Angiogeneze má klíčový význam pro nádorový růst
 Rostoucí nádorové ložisko může bez cévního zásobení
 dosáhnout pouze velikosti 1-2 mm³
 Neoangiogenezi indukuje vzniklá hypoxie
 Nerovnováha mezi proangienními a
 antiangienními faktory = „angienní switch“

Cílená antiangiogenní léčba

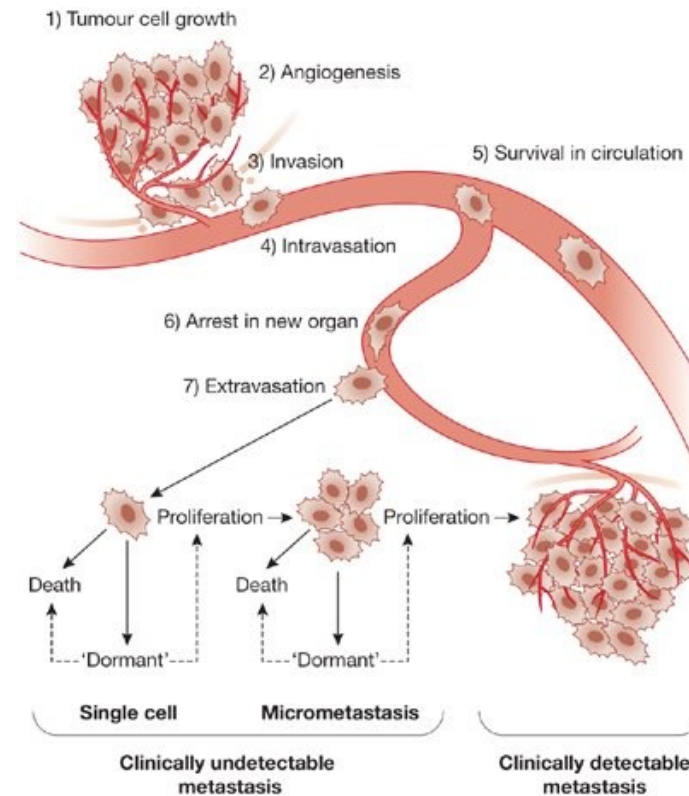


**VYPNĚTE ANGIOGENEZI
PRODLUŽTE ŽIVOT**



Metastatická kaskáda

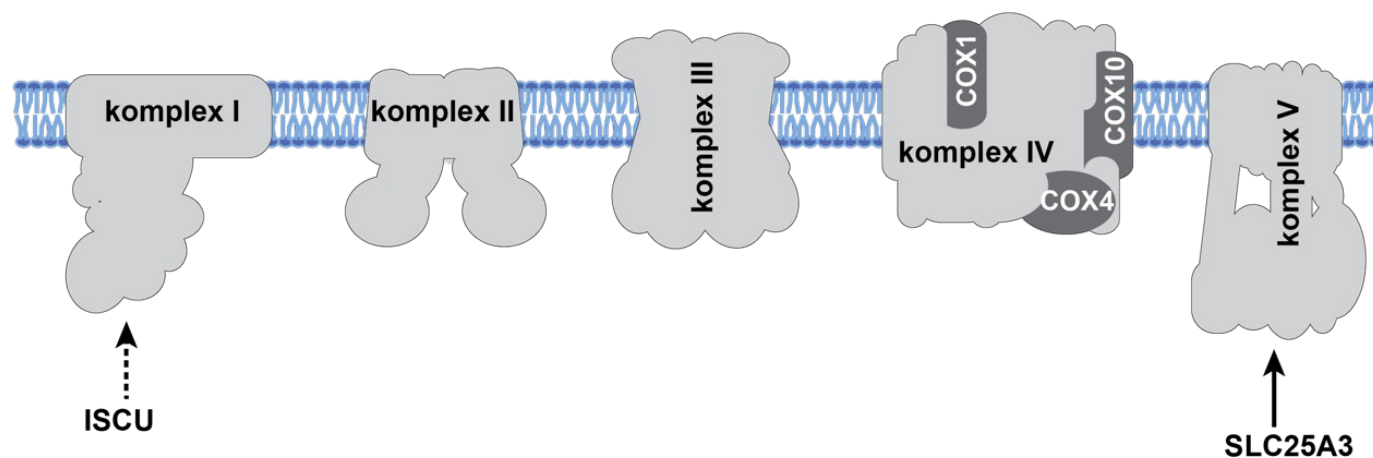
- **Zvýšení motility (invazivita)**
(průnik do stromatu a přes cévní stěnu)
- **Vytváření embolů v cirkulaci**
- **Adherence** ke stěně cévy
- **Průnik do parenchymu**
- **Vytvoření metastázy** (proliferace v místě, angiogeneze, odpověď na mikroprostředí)
- **Metastázy metastáz**
- **Nádorová generalizace**



Metastasis –related genes (adhezivní molekuly, MMP, proteázové inhibitory, růstové faktory,...)

Deregulace energetického metabolismu buňky

- Warburgův efekt - glykolýza v aerobních podmínkách
 - přeměna pyruvátu na kyselinu mléčnou
 - zvýšení acidity mikroprostředí
- Energeticky nevýhodné - výrazný nárůst spotřeby glukózy
 - 18-fluorodeoxyglukóza – pozitronová emisní tomografie (PET)



Únik před imunitním systémem

- Teorie 3E – “elimination, equilibrium, escape”

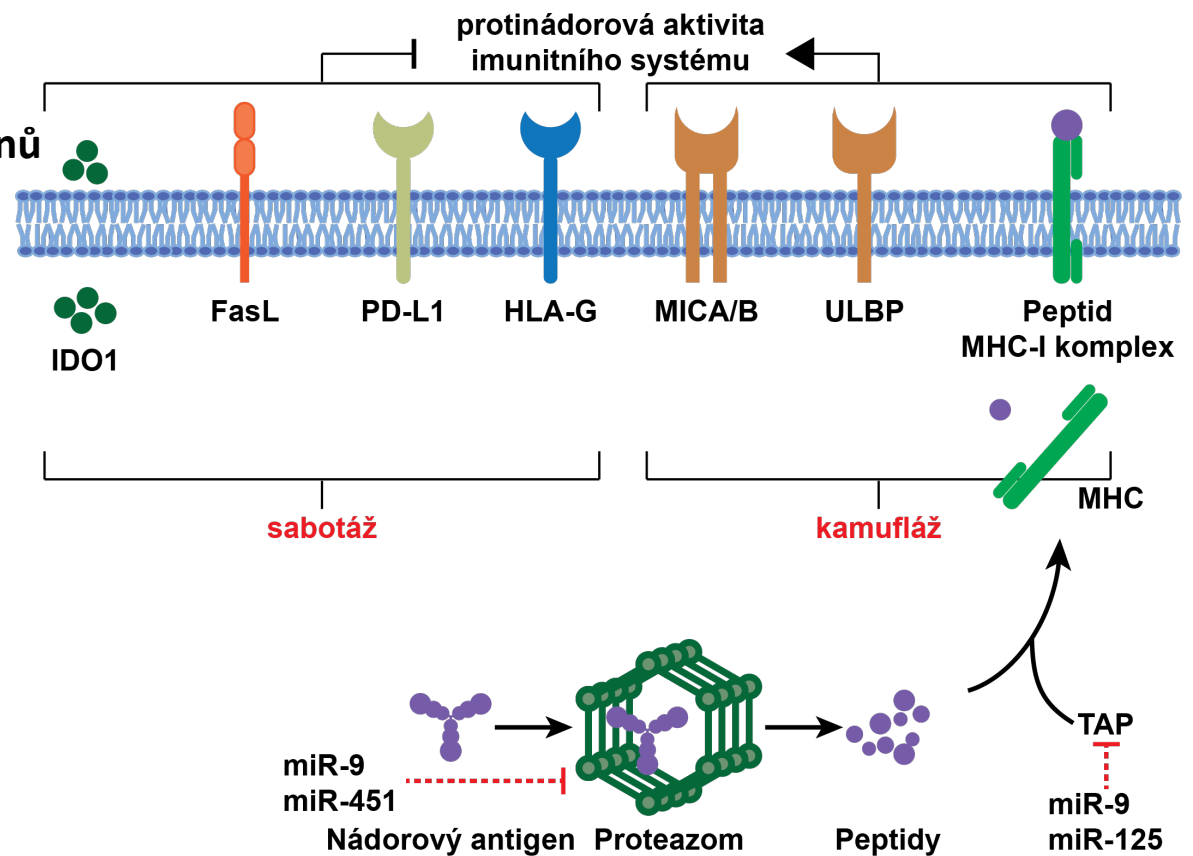
- Kamufláž

- inhibice prezentace nádorových antigenů

- Sabotáž

- sekrece imunosupresivních faktorů

- prezentace imunosupresivních ligandů



S nádorem asociovaný zánět

- Buňky imunitního systému produkují růstové faktory, interleukiny, interferony
 - podpora nádorového růstu
- Zánět ovlivňuje hladiny ROS a NOS
 - poškození DNA
- Zánětlivá onemocnění jako prekancerózy

Ulcerózní kolitida		Crohnova choroba	
IL-1	IL-22	IL-1	IL-18
IL-5	IL-33	IL-2	IL-21
IL-6	IL-37	IL-6	IL-22
IL-9	TNF	IL-12	IL-23
IL-13		IL-13	IL-26
IL-17		IL-17	IFN- γ

