



Potenciální cíle pro precizní onkologii - receptory, signální dráhy apod.

Libor Staněk

Nemocnice Hořovice

3. Lékařská fakulta UK v Praze



Srovnání normální a rakovinné buňky

Normální buňka:

Má omezený počet dělení

Je zde kontaktní inhibice

Výrazná závislost na ostatních buňkách

Rakovinná buňka:

Nesmrtelnost

Ztráta kontaktní inhibice

Nezávislost na okolí

Změny v povrchových molekulách a chromozomech

Rezistence k apoptóze!!!

Rakovinná buňka se nedělí rychleji než normální buňky, ale neustále v čase i prostoru !!!

Nádorová buňka a pohled na její vznik

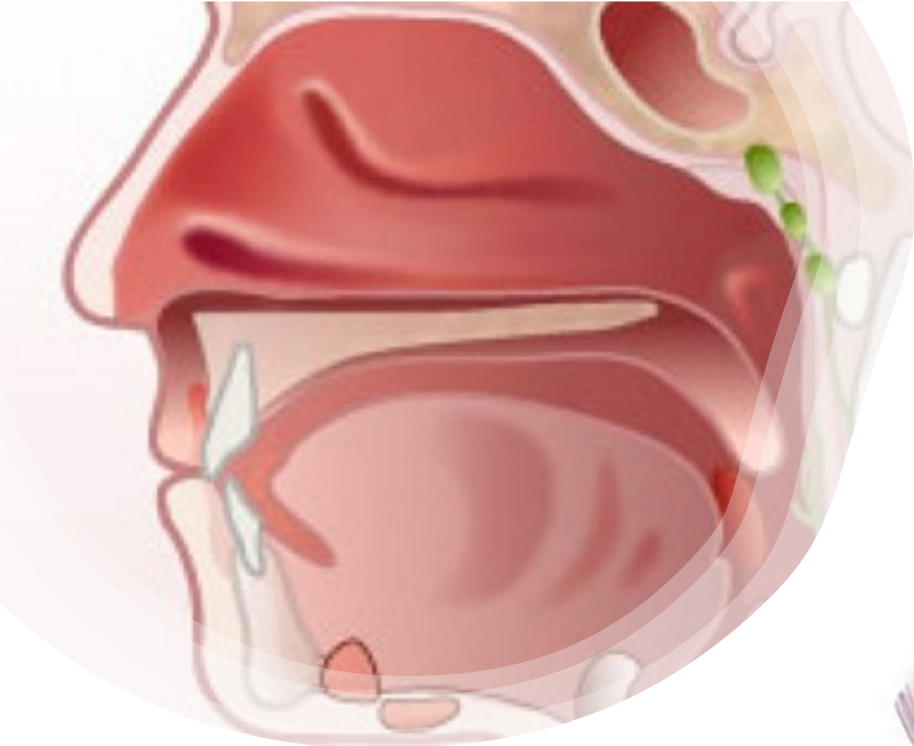
- Nádory hereditární a dědičné
- Spontánně vzniklé nádory
- V důsledku virové infekce (jiná forma spontánního vzniku)

Spontánně vzniklé nádory

Onkogeny/Onkosupresory

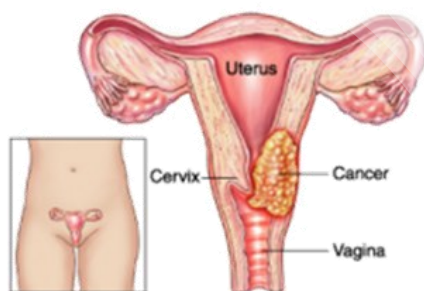
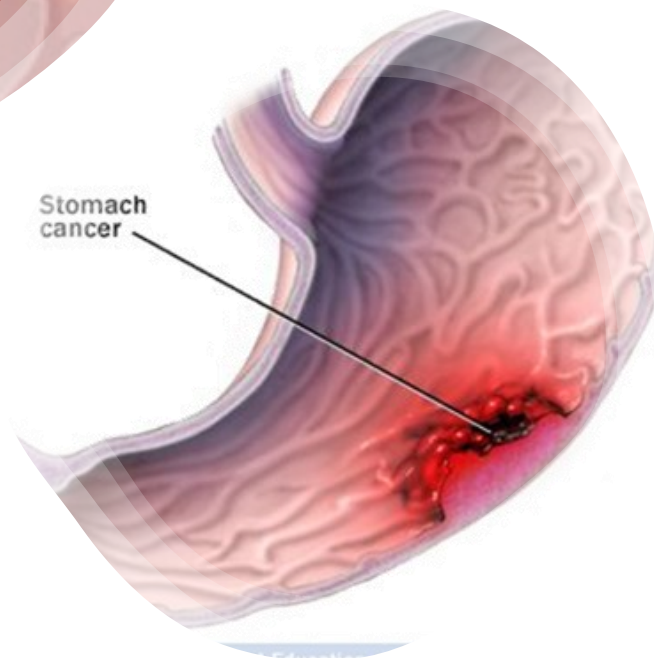
Onkogen – protein s alternativní funkcí nebo hladiny exprese, platí pro něj dominantní dědičnost – jedna alela dostačuje pro začátek změn

Onkosupresor (antionkogene; tumorsupresor) – protein, který brání buněčné transformaci, je recesivní, obě alely musí být poškozené, aby došlo k transformaci



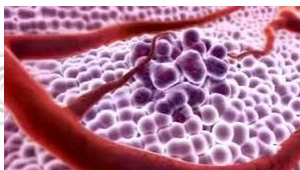
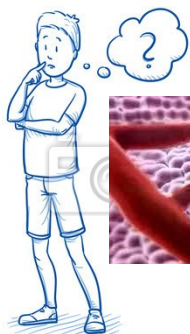
Nádory asociované s virovou infekcí

- Nádory děložního čípku (HPV)
- Nádory hlavy a krku (HPV)
- Nádory žaludku (EBV)
- Lymfomy (CMV, HIV)
- Hepatocelulární karcinom (HCV)
- ...?



Molekulární aspekty karcinogenéze

Jak vzniká nádor?Vždy multifaktoriální a vždy kaskádovitá kumulace změn vedoucí k narušení nádorových genů



Základní typy nádorových genů:

onkogeny

tumor supresorové geny

geny DNA reparace

Primární úloha genetických změn v buněčné transformaci

aktivace onkogenů (geneticky dominantní)

inaktivace tumor supresorových genů (geneticky recesivní)

inaktivace genů DNA reparace (geneticky recesivní)

Buněčné onkogeny:

vznik z protoonkogenů v buňce na základě změny samotného protoonkogenu (mutace) a nebo změny exprese protoonkogenu

Genetické změny aktivující protoonkogeny na onkogeny:

1. změny vedoucí k produkci proteinu se zvýšenou aktivitou, ale v normálním množství
 2. změny vedoucí ke zvýšené produkci proteinu s normální aktivitou
- bodové mutace
 - delece
 - genové amplifikace
 - translokace
 - vznik fúzních genů

Onkogeny DNA virů:

původní virové geny, jiný mechanismus působení než u onkogenů retrovirů
onkogenní DNA viry: **papovaviry HPV**, herpesviry, adenoviry, hepadnaviry

Mechanismus působení:

inhibice proteinů kódovaných tumor supresorovými geny (p53, Rb protein)

Geny kódující protein E6 a E7 papilomavirů

E6 a E7???

Tumor supresorové geny:

geny, které prostřednictvím svých proteinových produktů zamezují transformaci buňky

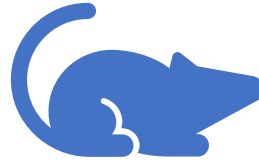
Funkce tumor supresorových genů vs. onkogenů:

- Buněčná transformace (vznik nádoru): důsledek fungování proteinů (onkoproteinů) kódovaných onkogeny
- Buněčná transformace (vznik nádoru): důsledek ztráty funkce proteinů kódovaných tumor supresorovými geny

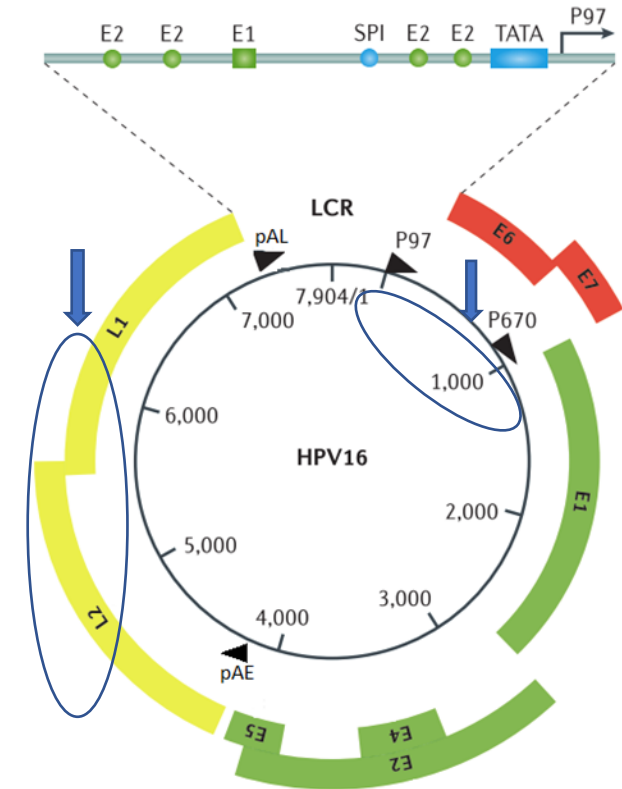
Molekulární aspekty karcinogenéze



Onkoprotein E6 stimuluje degradaci tumor supresorového proteinu p53. Tumor supresorový protein p53 řídí růst buněk regulací progresu buněčného cyklu a reakcí na stres přes apoptózu.



Onkoprotein E7 se váže na tumor supresorový genový produkt protein pRb, čímž reguluje progresi buněčného cyklu. Vazbou E7 na pRb se uvolní transkripční faktor E2F, dochází k proliferaci a zároveň ke zvýšené expresi tumor supresorového proteinu p16^{INK4A}, který je proteinem pRb negativně regulován. Protein p16^{INK4A} je inhibitor cyklin dependentních kináz a je nezbytný v regulaci buněčného cyklu, konkrétně přechodu z G1 do S fáze.



CLINICAL STUDY

Monitoring EBV infection, MSI, PDL-1 expression, Her-2/neu amplification as a biomarker for PD-1 inhibition in gastric cancer

Stanek L¹, Gurlich R¹, Musil Z², Havluj L¹, Whitley A¹

Third Faculty of Medicine, Charles University in Prague, Department of Surgery, Prague, Czech Republic.
stanek.libor@seznam.cz

Tab. 1. The results of the immunochemical staining and EBV status.

Sample	CMV	EBV	HER-2	PDL-1	MLH-1	Note
1	neg	neg	neg	neg	positive	instability only
2	neg	positive	neg	positive	positive	
3	neg	neg	neg	neg	neg	
4	neg	neg	neg	neg	positive	instability only
5	neg	neg	neg	neg	neg	
6	neg	neg	neg	neg	neg	
7	neg	neg	neg	neg	neg	
8	neg	neg	neg	neg	positive	instability only
9	neg	positive	neg	positive	positive	
10	neg	positive	neg	positive	positive	
11	neg	neg	neg	neg	neg	
12	neg	neg	neg	neg	positive	instability only
13	neg	neg	neg	neg	neg	
14	neg	neg	neg	neg	neg	
15	neg	neg	neg	neg	neg	
16	neg	positive	neg	positive	positive	
17	neg	neg	neg	neg	neg	
18	neg	positive	neg	positive	positive	
19	neg	neg	neg	positive	positive	mild positivity
20	neg	neg	neg	neg	neg	
21	neg	neg	neg	neg	neg	
22	neg	neg	neg	neg	neg	
23	neg	neg	neg	neg	neg	
24	neg	neg	neg	neg	neg	
25	neg	positive	neg	positive	positive	
26	neg	neg	neg	neg	neg	
27	neg	neg	neg	neg	neg	
28	neg	neg	neg	neg	neg	
29	neg	positive	neg	positive	positive	
30	neg	positive	neg	positive	positive	
31	neg	neg	neg	neg	neg	
32	neg	neg	neg	neg	neg	
33	neg	neg	neg	neg	neg	
34	neg	neg	neg	neg	positive	instability only
35	neg	neg	neg	neg	neg	
36	neg	neg	neg	neg	neg	
37	neg	neg	neg	neg	neg	
38	neg	positive	neg	positive	positive	
39	neg	neg	neg	neg	neg	
40	neg	neg	neg	positive	positive	mild positivity

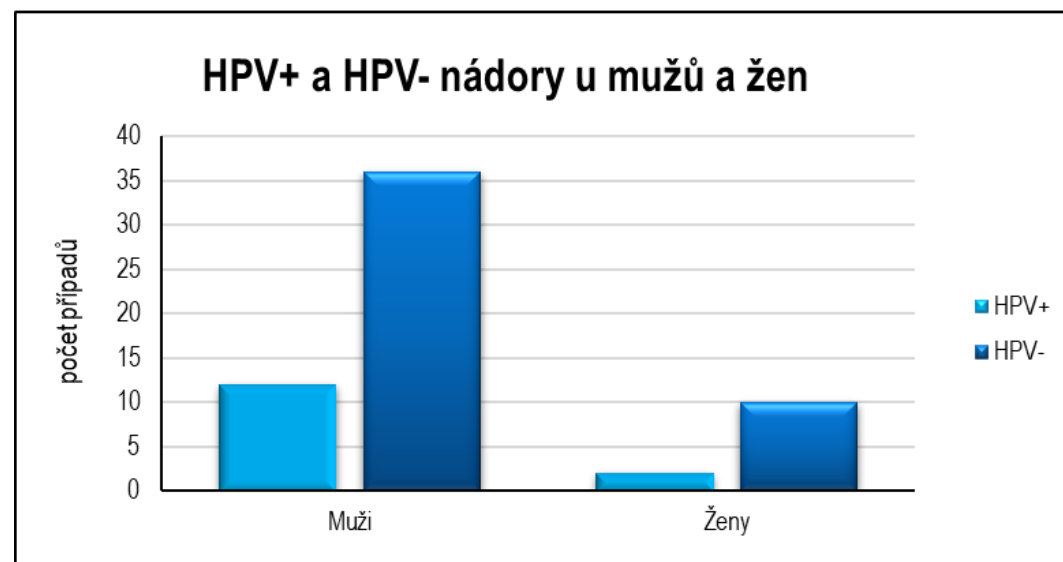
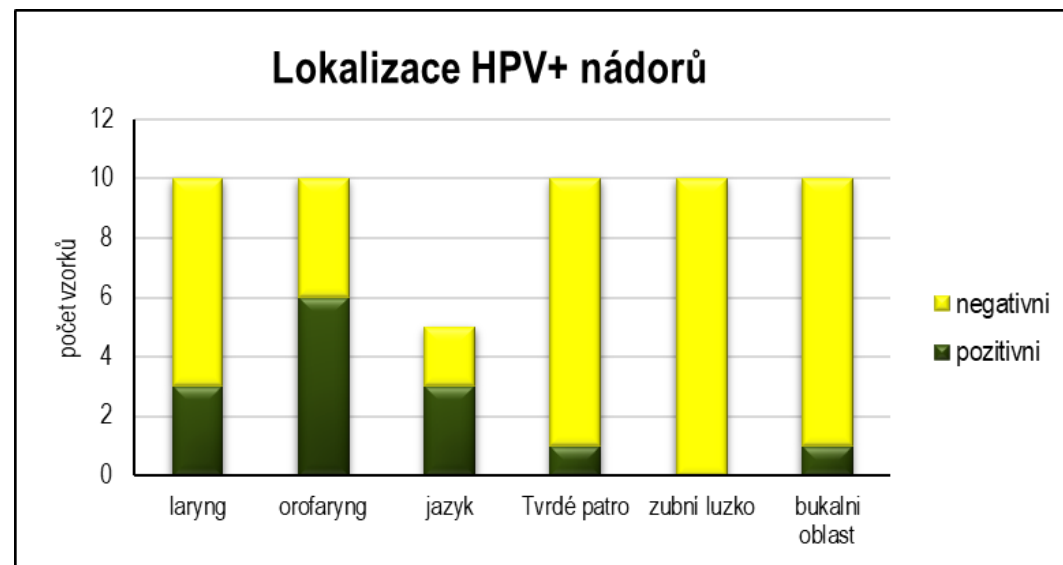
Molecular and IHC analysis of head and neck carcinomas associated with HPV infection

Stanek L^{1,2,3,4*}, Glendova K^{4*}, Tesarova P¹, Gurlich R², Holecckova P⁵, Musil Z⁶, Hrudka J⁷, Pala M⁵, Mateicka F³, Chovanec M⁸

Department of Oncology, First Faculty of Medicine, Charles University and General University Hospital, Prague, Czech Republic. stanek.libor@seznam.cz

- 23,34 % HPV+ HNSCC

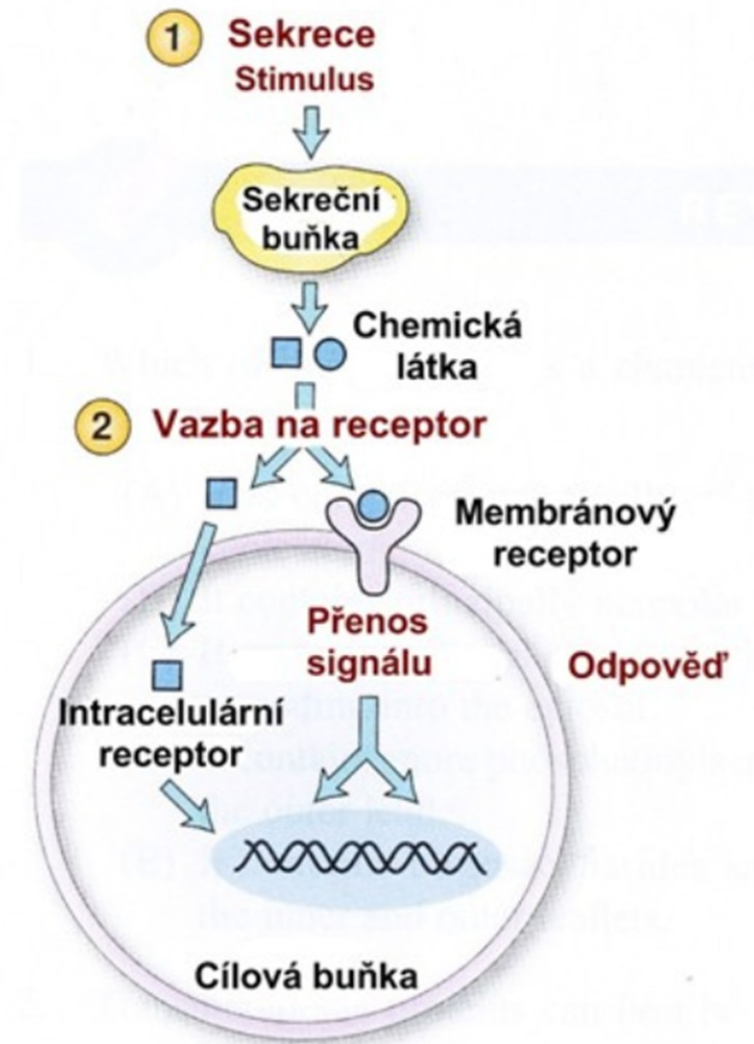
- HPV-
 - Muži - 36
 - Ženy - 10
- HPV+
 - Muži - 12
 - Ženy - 2



Nové cíle vývoje protinádorové léčby

Cílem je přímo a cíleně zasáhnout do klíčových mechanismů karcinogeneze na buněčné úrovni (targeted therapy). Často v kombinaci s konvenčními léčebnými postupy.

- **Anti-EFGR terapie** – monoklonální protilátky s vazbou na receptor epidermálního růstového faktoru (EGF), inhibitory tyrozinových kináz, „antisense“ nukleotidy, vakcína proti receptoru nebo ligandu
- **Diferenciační terapie** (kyselina *all-trans* retinová, vitamin D3)
- **Inhibitory přenosu signálů**
 - Inhibitory tyrozinových kináz
 - Inhibitory cyklin-dependentních kináz – ovlivnění buněčného cyklu
 - Inhibitory jiných kináz – např. MAP kinázy, JNK
 - Inhibitory farnesyltransferázy – inhibují onkoprotein ras – spojen s vnitřní stranou plazmatické membrány izoprenoidní lipidovou skupinou – farnesylem

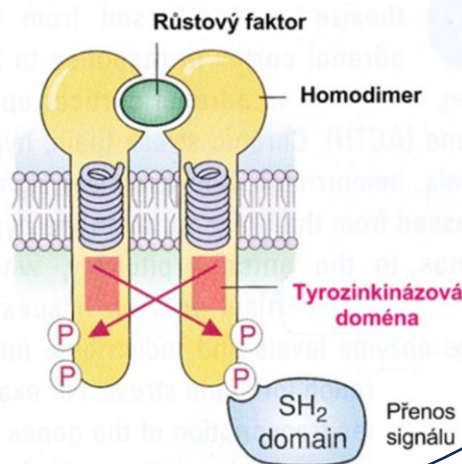


Jak to nejlépe pochopit.....



Tyrozín kináza

. Receptor s kinázovou aktivitou



Kinázová doména je specifická oblast proteinu, která katalyzuje přenos fosfátové skupiny z ATP na jiné molekuly,

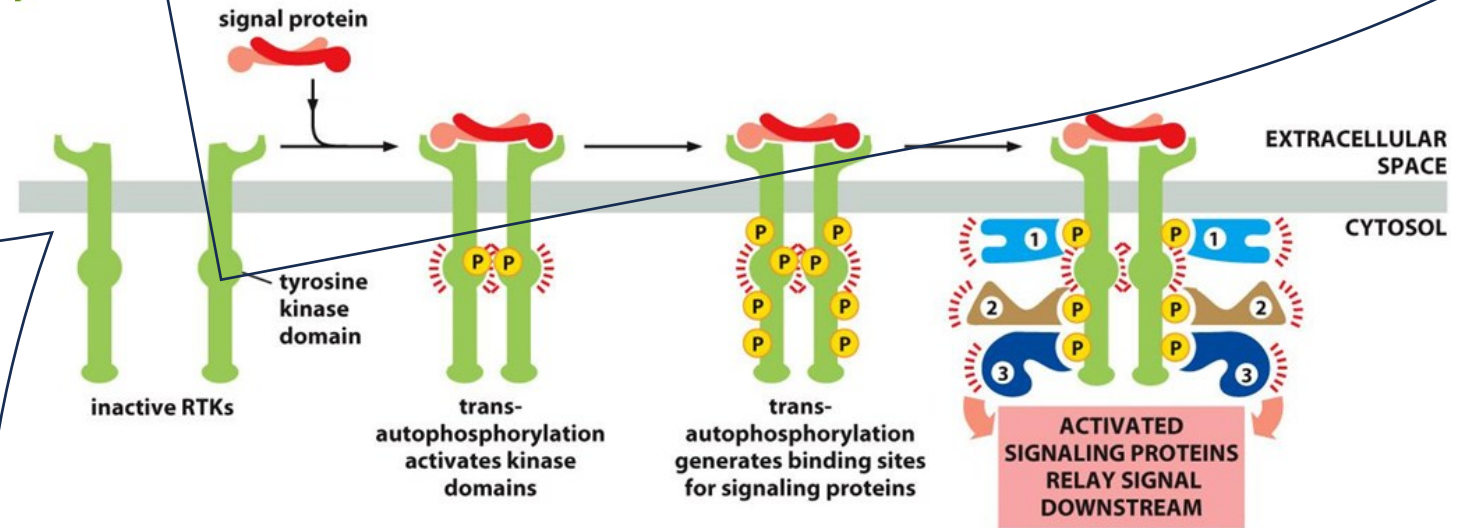
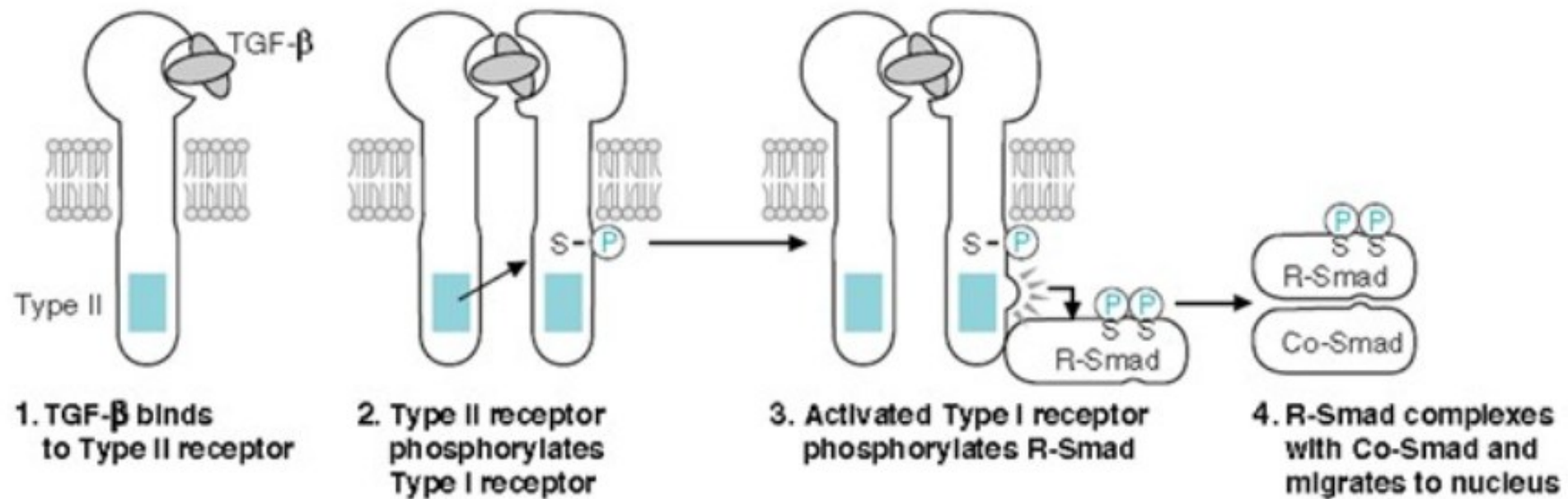


Figure 15-44 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

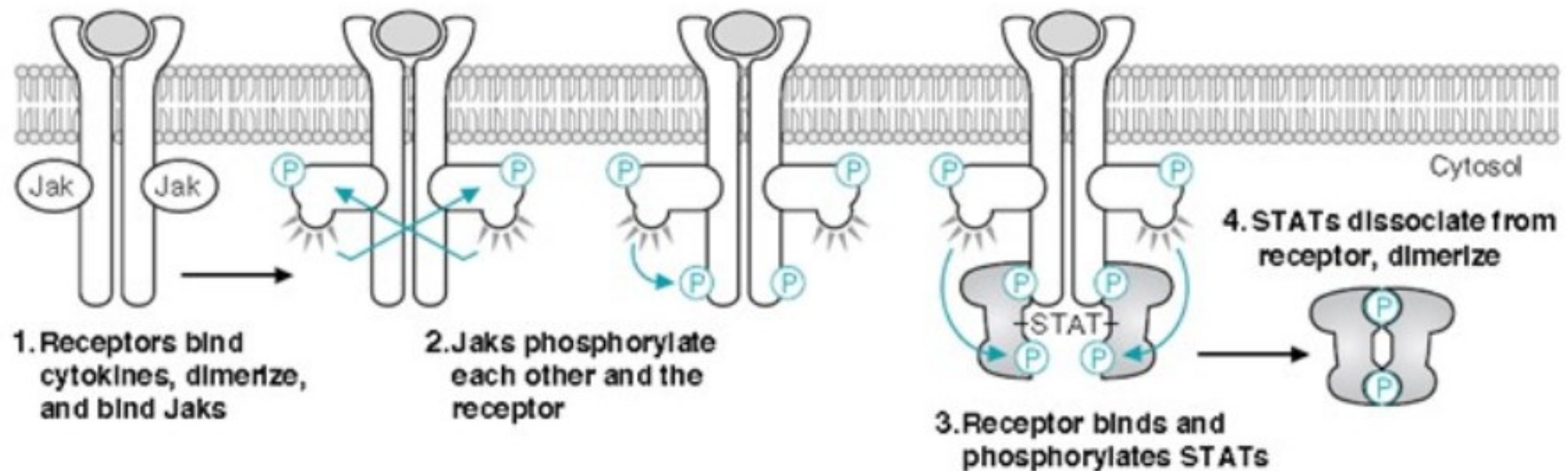
1. ligand se specificky váže na receptor
2. receptor dimerizuje
3. tyrosin-kinázové domény se navzájem fosforylují
4. autofosforylace vede k navázání (recruitment) adaptérových proteinů
5. V závislosti na receptoru se aktivují „downstream“ signální dráhy –např. Ras/Raf1/MEK/MAPK kinázová dráha,
6. která vede k buněčné odpovědi

Receptory Serino–Threoninových Kináz



Převážně cytokiny

JAK-STAT receptor

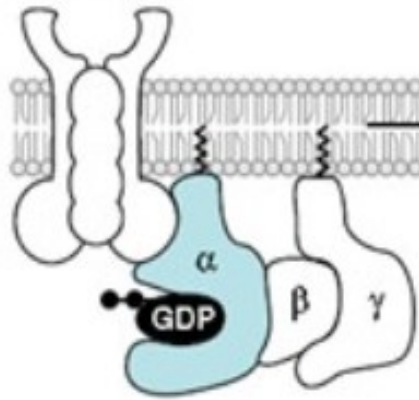


JAK – Janus Kinase

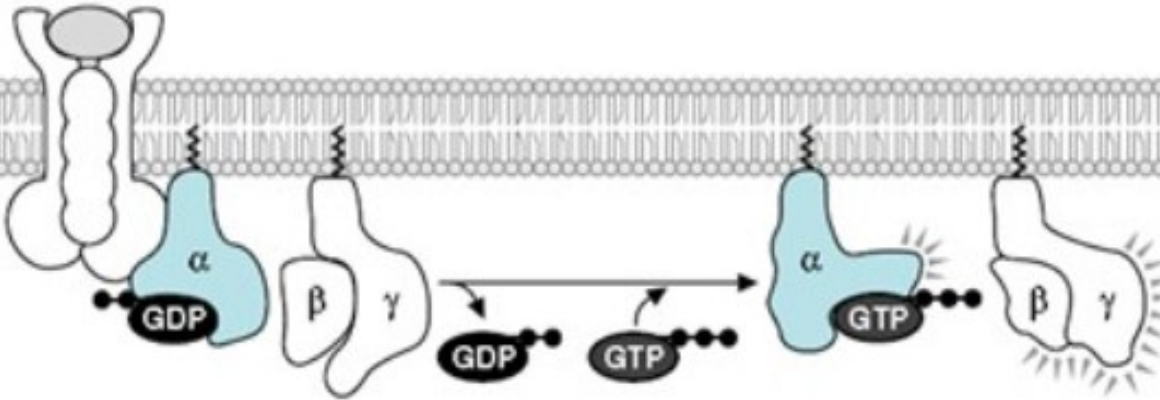
STAT – Signal Transducer and Activator of Transcription

Heterotrimerické G-proteiny

1. Receptor binds hormone

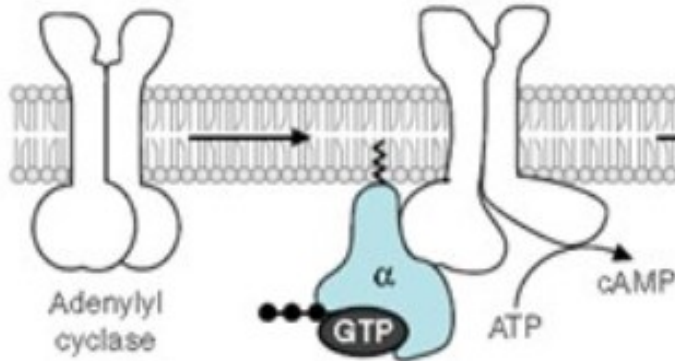


2. G protein exchanges GTP for GDP and dissociates

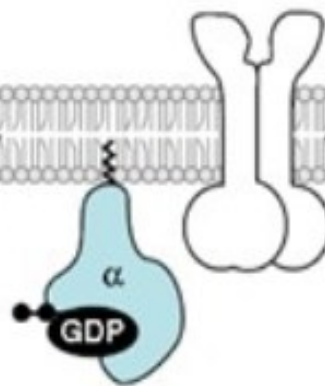


. Receptory spřažené s G-proteiny

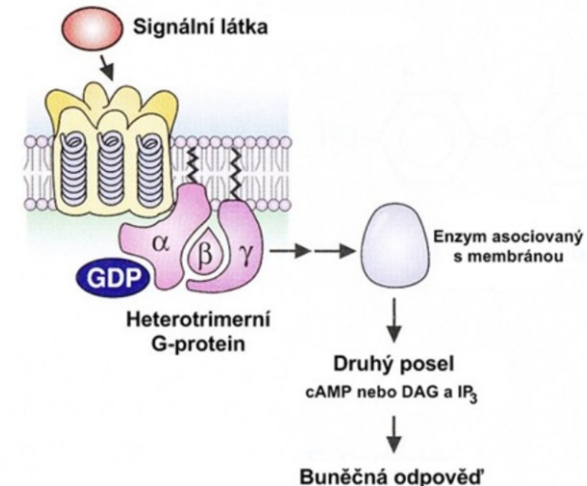
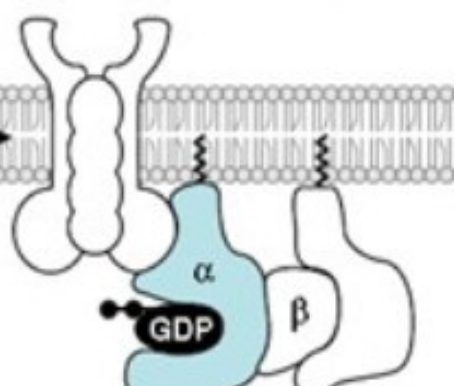
3. Target protein binds GTP- $G_{\alpha s}$



4. GTP is hydrolyzed and $G_{\alpha s}$ dissociates

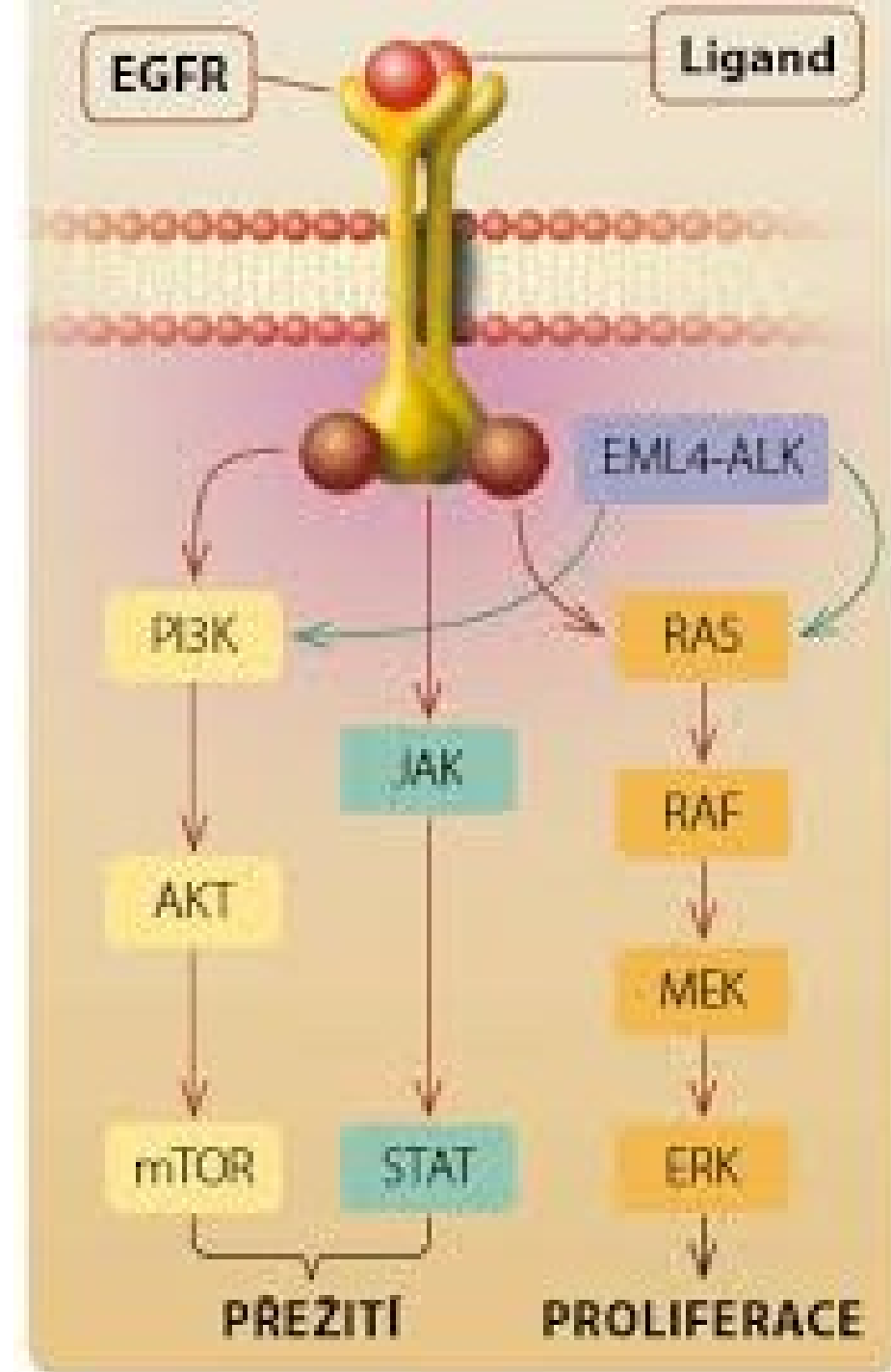


5. $G_{\alpha s}$ reassociates with $\beta\gamma$ subunits and receptor



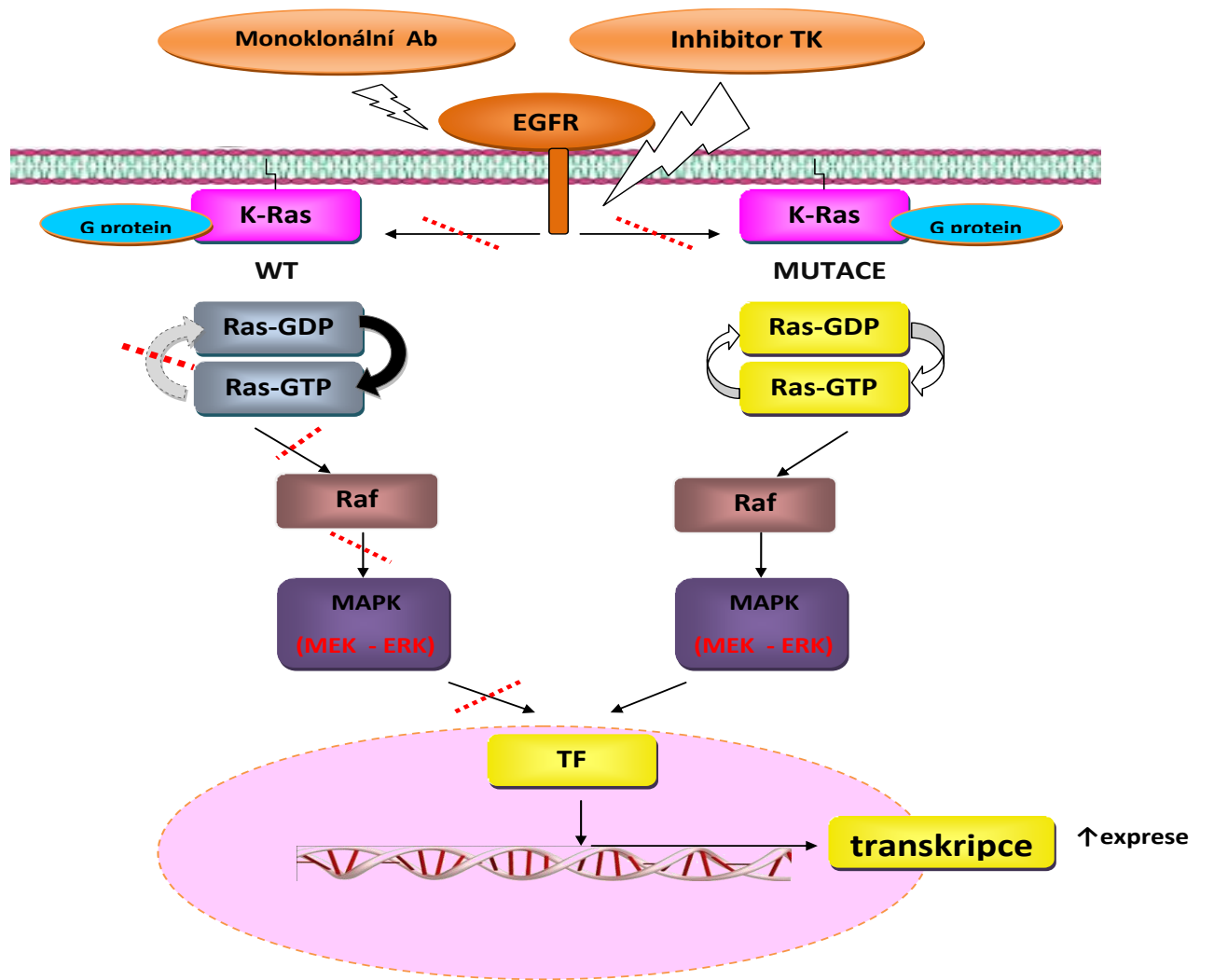
EGFR - Aktivující mutace

- EGFR, neboli receptor epidermálního růstového faktoru, je gen, jehož mutace hrají roli v patogenezi nemalobuněčného karcinomu plic (NSCLC).
- Detekce těchto mutací je důležitá pro cílenou léčbu inhibitory tyrozinkinázy (TKI), jako jsou gefitinib a erlotinib, které blokují signální dráhy v nádorových buňkách.



mCRC – KRAS

Inhibující mutace

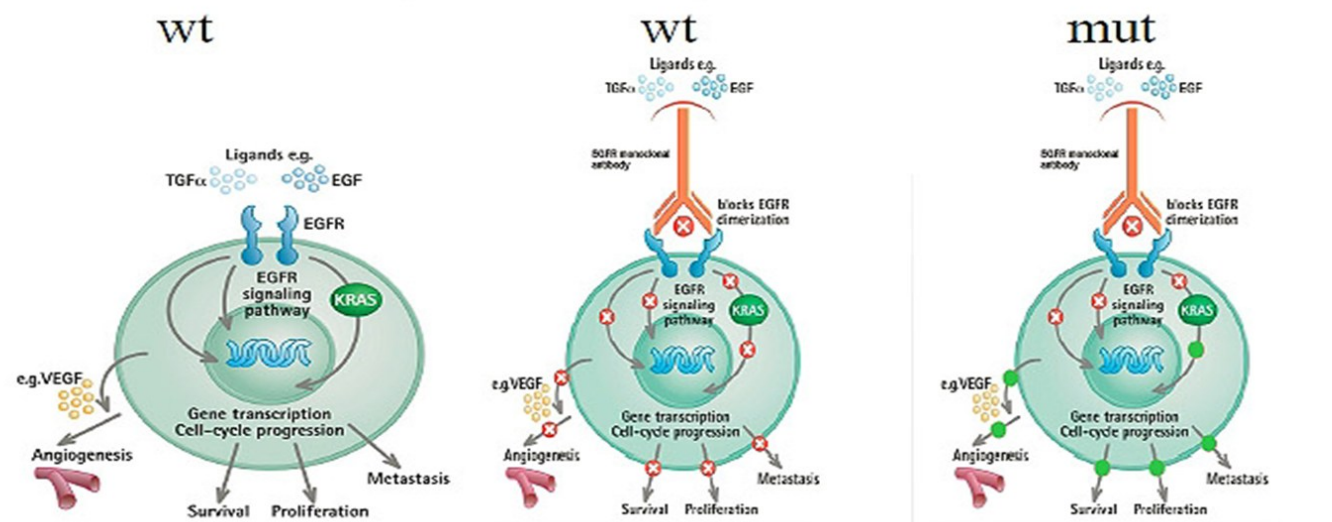


mCRC - KRAS

anti-EGFR terapie (Erbitux)

léčba monoklonální protilátkou - blokáce dimerizace receptoru - signální dráha je přerušena

naznačení nádorových buněk – cílený útok NK buněk



Bodová mutace proteinu Ras

- **Bodová mutace proteinu Ras může způsobit jeho nepřetržitou aktivaci**

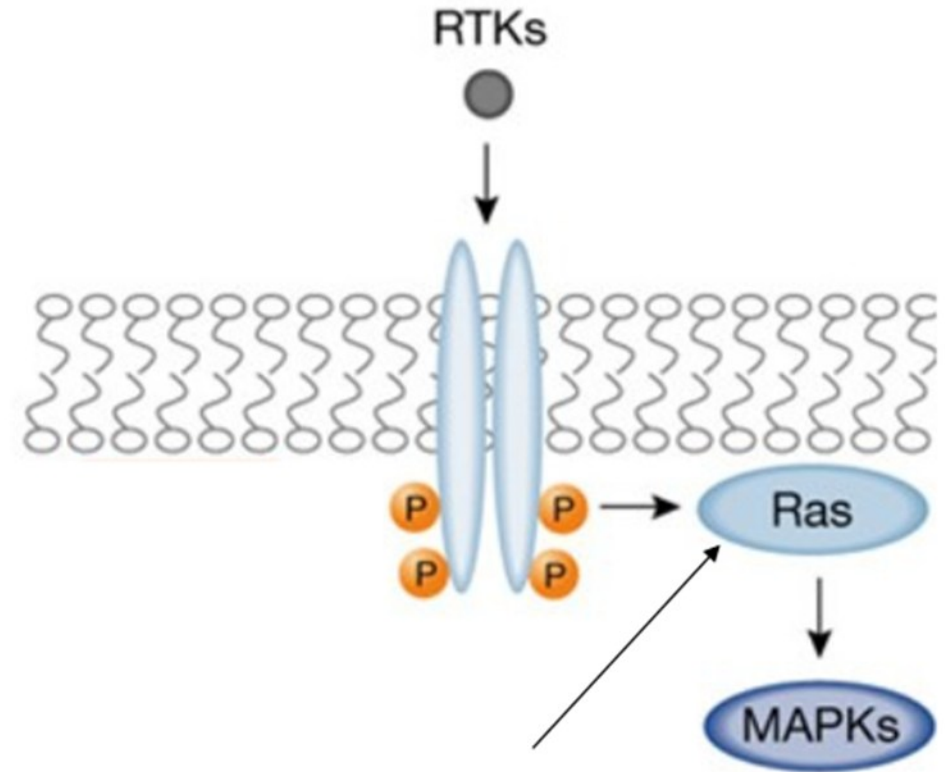
Pokud je v extracelulární doméně regulační místo, způsobí jejich ztráta nepřetržitou aktivitu receptorové tyrosin kinázy

Bodová mutace proteinu Ras může způsobit jeho nepřetržitou aktivaci

Aktivní místo enzymu je deaktivováno a G – Ras není schopen štěpit GTP

Další je nemožnost inhibice v důsledku nepřítomnosti fosforylovatelné aminokyseliny

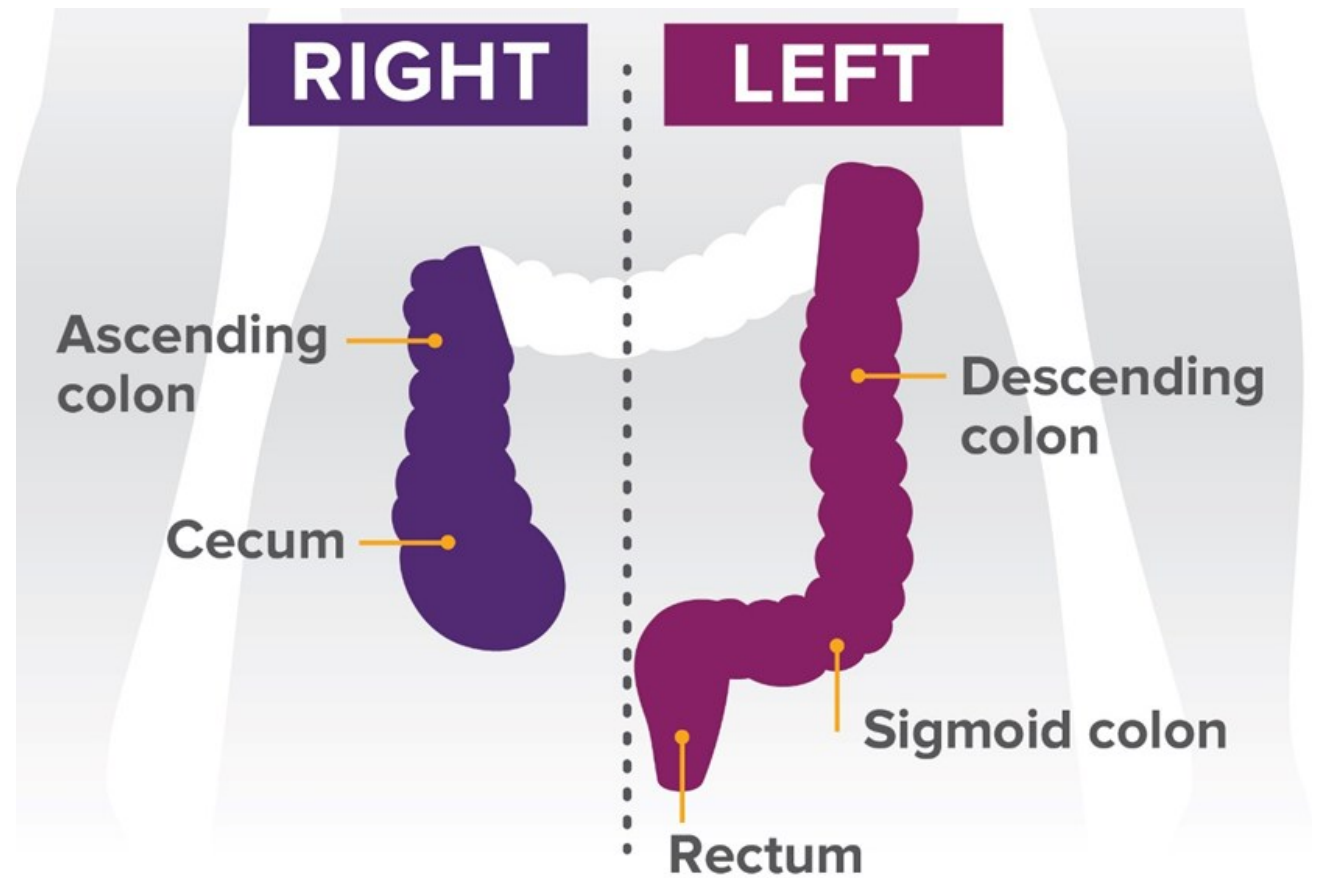
Bodová mutace proteinu **Ras** může způsobit jeho nepřetržitou aktivaci



Aktivní místo enzymu je deaktivováno a G – Ras není schopen štěpit GTP

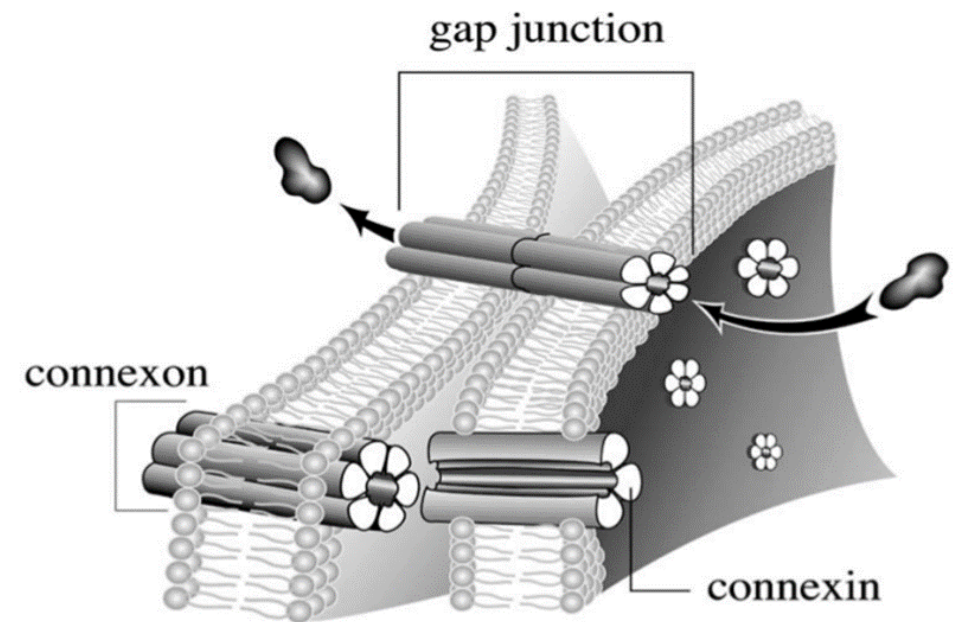
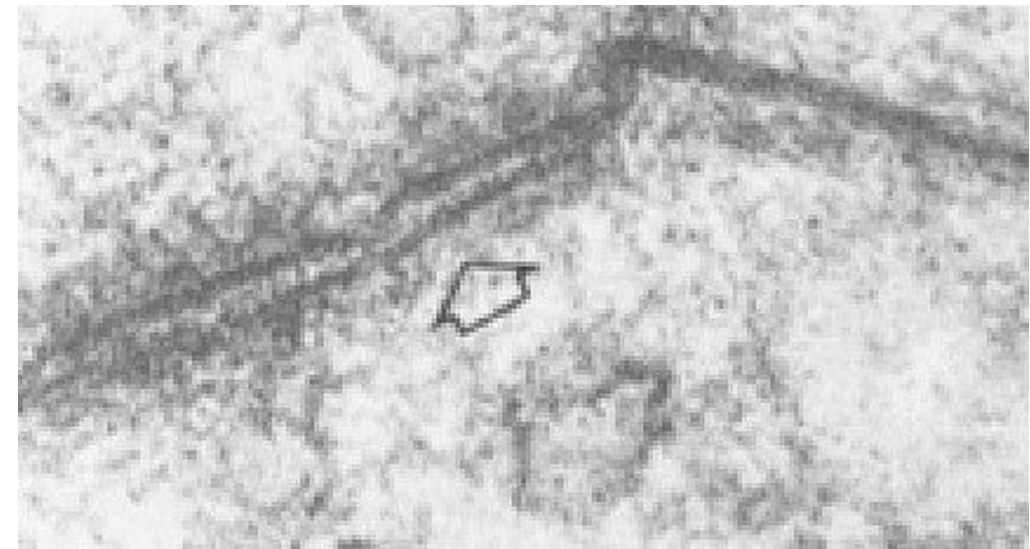
Lokalizace

- Pravostranné lokalizace karcinomu vykazují určitá specifika, která mají řadu příčin zasahující do anatomie, histologie i molekulární biologie
- U nádorových buněk obecně je postrádána funkční mezibuněčná komunikace prostřednictvím **gap junctions**.
- Jejich proliferaci tedy neomezuje kontaktní inhibice.
- U řady nádorových buněk k produkci proteinu dochází, ale může být posttranslačně modifikován, a neplnit tak správně svoji funkci.
- Tyto změny jsou častěji nalézány u pravostranně lokalizovaných karcinomů.



Histologie a genetika

- Podle dostupných studií je rozdílná citlivost pravostranných a levostranných karcinomů vysvětlována právě působením faktorů, které ovlivňují schopnost kmenových buněk ve fázi iniciace nádoru v pravé části kolonu dělit se symetricky a vytvořit léze exprimující geny *Oct4A* a *ABCG2*, ale neexprimující konexiny.
- Pokud jsou iniciované kmenové buňky na levé straně kolonu stimulovány k tomu, aby se dělily asymetricky, vzniknou částečně diferencované léze či léze polypózní, u kterých nedochází k expresi genů *Oct4A* či *ABCG2* jako v pravé části, ale naopak exprimují některý gen pro konexin.



Výsledky

- V jednotlivých klinických studiích se podařilo s jistotou určit lokalizaci primárního nádoru u více než 80 % pacientů (83–88 % pro jednotlivé studie).
- Pacienti s wt-*RAS* levostrannými nádory, kteří byli léčeni panitumumabem v kombinaci s chemoterapií nebo podpůrnou léčbou, dosahovali lepších výsledků léčby než pacienti z kontrolních skupin.
- Pacienti s wt-*RAS* a pravostrannou lokalizací primárního nádoru dosahovali ve srovnání s pacienty s levostrannými nádory horších výsledků ve všech hodnoceních účinnosti.

Léčebný režim	OS (měsíce, 95% CI)		PFS (měsíce, 95% CI)	
	<i>levostranný</i>	<i>pravostranný</i>	<i>levostranný</i>	<i>pravostranný</i>
panitumumab + FOLFIRI	20,1 (16,5–21,7)	10,3 (5,2–13,7)	8,0 (7,3–9,1)	4,8 (3,5–7,4)
FOLFIRI	16,6 (14,8–21,2)	8,1 (6,3–12,1)	5,8 (5,2–7,3)	2,4 (1,8–5,7)
panitumumab + podpůrná léčba	9,4 (7,3–11,7)	3,1 (2,0–12,0)	5,5 (2,6–5,7)	1,7 (1,0–2,8)
podpůrná léčba	8,8 (6,4–10,4)	4,6 (0,9–6,0)	1,6 (1,2–1,8)	1,5 (0,7–1,8)

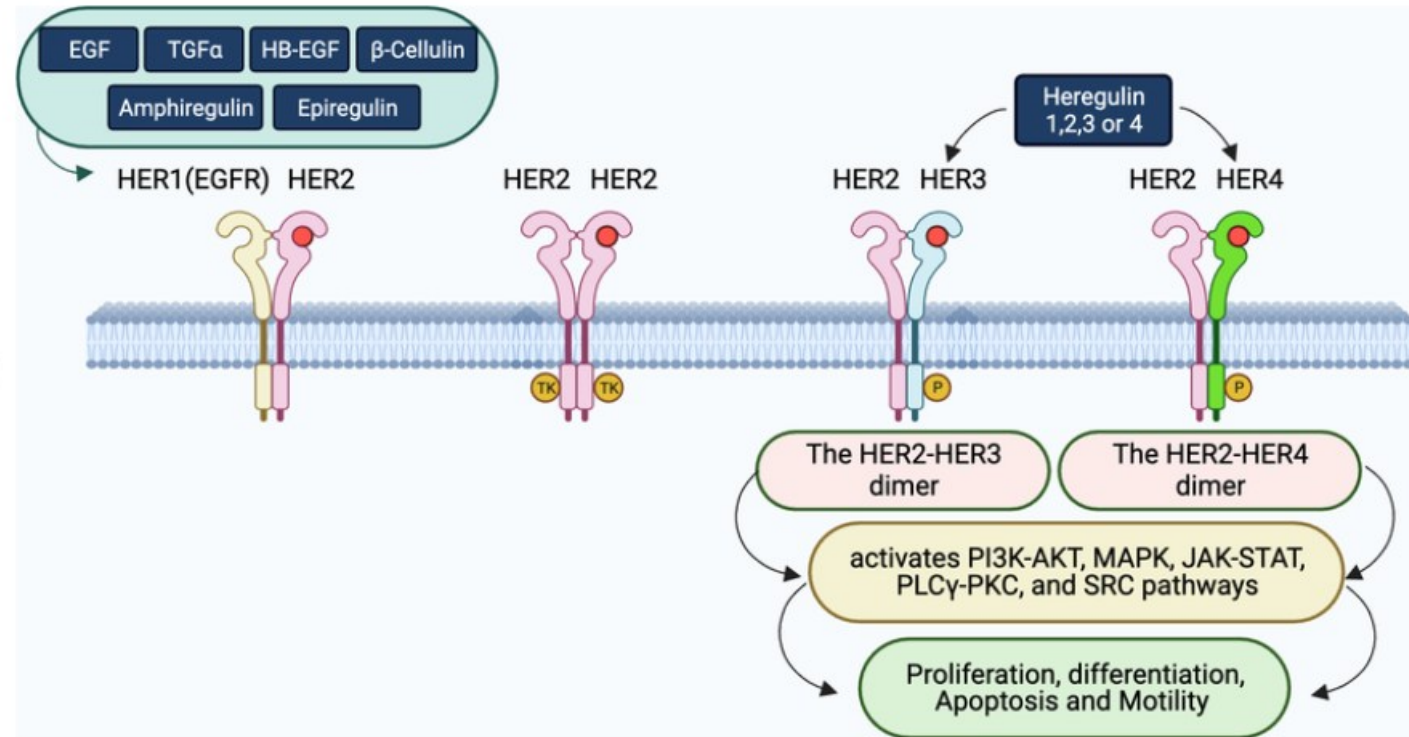
Možnosti ovlivnění (další cíle)

- Z výše uvedeného vyplývá, že pokud bychom chtěli buňky, které neexprimují konexin, a mají tak nefunkční mezibuněčnou komunikaci, přeměnit v kontaktně inhibovanou a diferencovanou buňku, která může podléhat apoptóze, je třeba aktivovat transkripci genu pro konexin.
- Jako vhodné se tak jeví inhibitory histon-deacetyláz, které jsou aktivátory transkripce a mohly by být v budoucnu vhodným doplněním léčebné strategie u méně diferencovaných kolorektálních karcinomů pravostranně lokalizovaných.
- V případě nádorů, u kterých dochází k expresi konexinu, ale s nefunkční mezibuněčnou komunikací vlivem posttranslačních modifikací, by se naopak mohly uplatňovat nejrozumnější inhibitory onkogenů, jak je tomu v případě levostranné lokalizace.

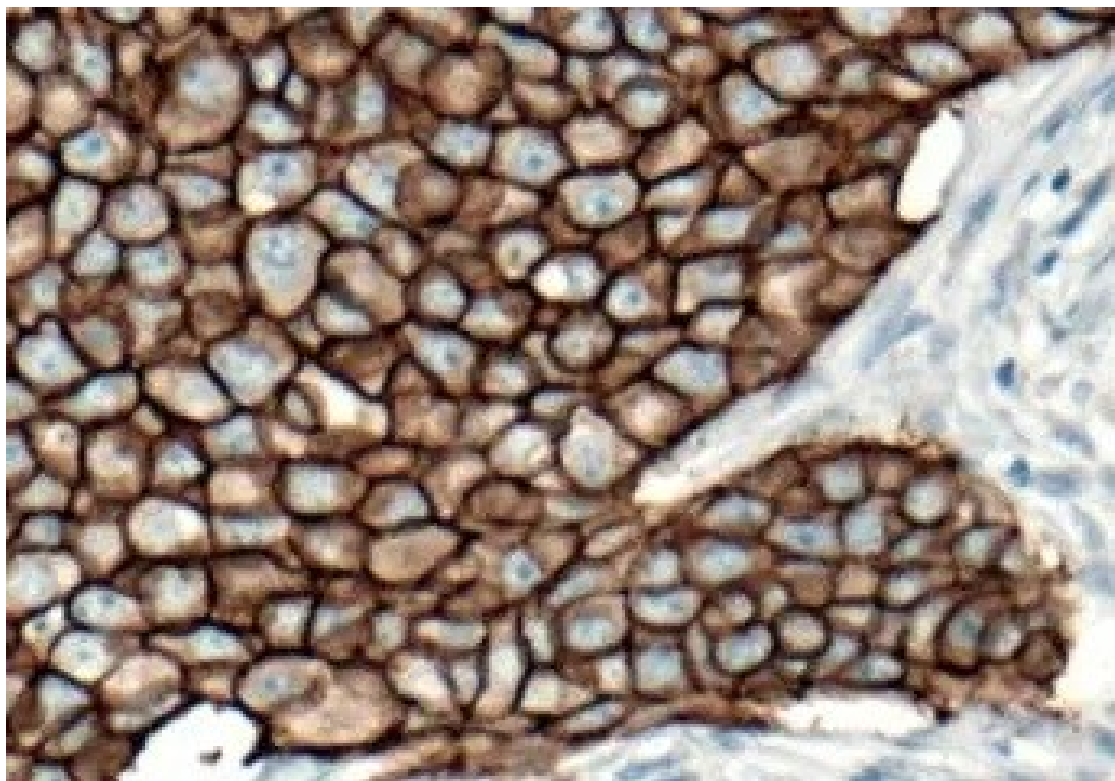
Jak to nejlépe pochopit.....



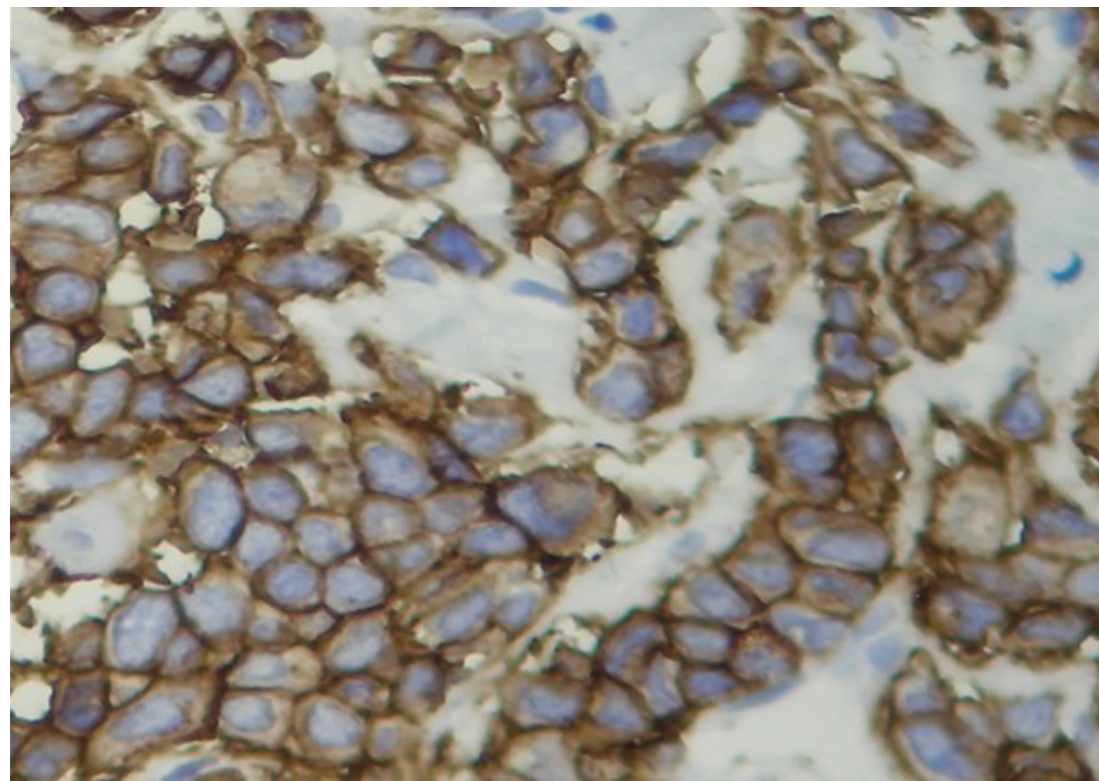
Monoklonální protilátky a HER-2



Imunohistochemický průkaz (IHC) zvýšené exprese HER-2 receptoru a HER-3 receptoru (zvětšeno 200x)

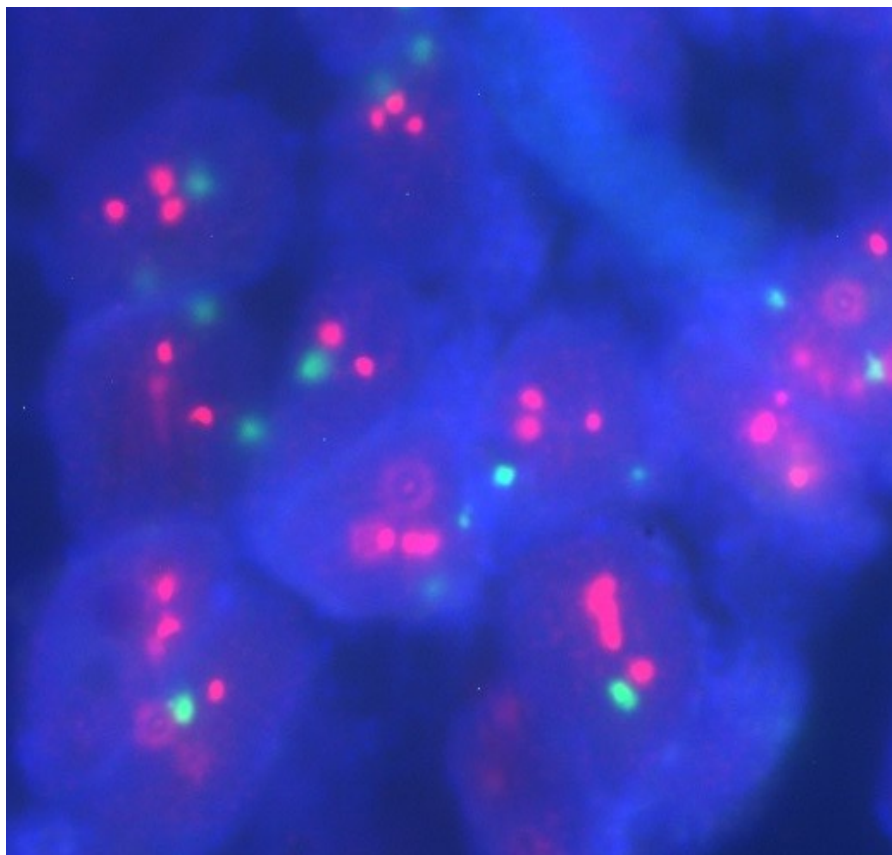


HER-2

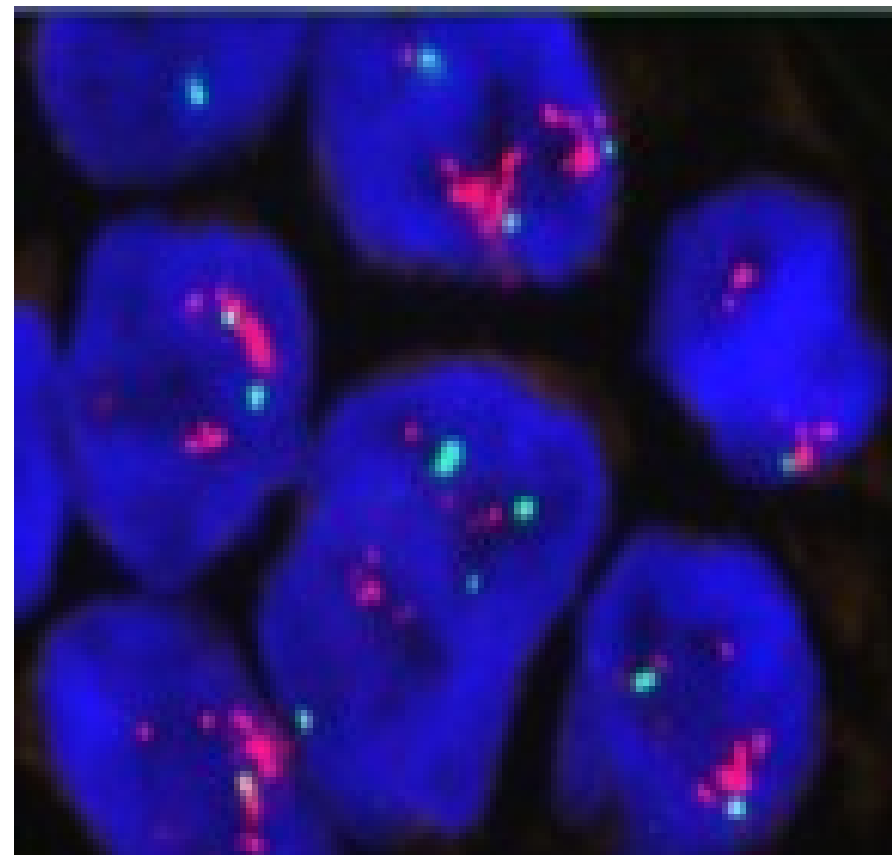


HER-3

Cytogenetický průkaz numerických změn genu *Her2/neu* a genu *ErbB3* metodou FISH – amplifikovaný stav



Her-2/neu



ErbB3

HER-3 molecular classification, expression of PD-L1 and clinical importance in breast cancer

STANEK Libor^{1,2}, GURLICH Robert¹, WHITLEY Adam¹, TESAROVA Petra³, MUSIL Zdenek⁴, NOVAKOVA Lucie²

Third faculty of Medicine, Charles university in Prague, Department of Surgery, Prague, Czech Republic.
stanek.libor@seznam.cz

Tab. 1. The results of the immunochemical staining and cytogenetics analysis status of the breast cancer patients.

Sample of HER-2 positive	HER-2/neu gene	HER-2	ERBB3 gene	HER-3	PD-L1
1	positive	positive			
2	positive	positive	positive	positive	
3	positive	positive	positive	positive	positive
4	positive	positive	positive	positive	
5	positive	positive	positive	positive	positive
6	positive	positive	positive	positive	
7	positive	positive	positive	positive	
8	positive	positive			
9	positive	positive	positive	positive	
10	positive	positive	positive	positive	
11	positive	positive	positive	positive	
12	positive	positive	positive	positive	
13	positive	positive			
14	positive	positive			
15	positive	positive	positive	positive	
16	positive	positive	positive	positive	positive
17	positive	positive			
18	positive	positive	positive	positive	
19	positive	positive			
20	positive	positive			

Sample of TNBC	HER-2/neu gene	HER-2	ERBB3 gene	HER-3	PD-L1
1	negative	negative			
2	negative	negative			
3	negative	negative			positive
4	negative	negative			
5	negative	negative			positive
6	negative	negative			
7	negative	negative	positive	positive	positive
8	negative	negative			
9	negative	negative			
10	negative	negative			
11	negative	negative			
12	negative	negative			
13	negative	negative			
14	negative	negative	positive	positive	positive
15	negative	negative			
16	negative	negative			
17	negative	negative			
18	negative	negative			positive
19	negative	negative			
20	negative	negative			

Děkuji za pozornost