

VÝZNAM GENETICKÝCH MUTACÍ A PODSTATA PORUCHY ANGIOGENEZE U SVĚTLOBUNĚČNÉHO KARCINOMU LEDVINY

SIGNIFICANCE OF GENETIC MUTATIONS AND PRINCIPLE OF DISTURBANCE OF ANGIOGENESIS IN RENAL CELL CARCINOMA

LUKEŠOVÁ Š.¹, KOPECKÝ O.¹, DVOŘÁK J.², MORÁVEK P.³, ŠAFRÁNEK H.³, FRIDRICHOVÁ P.⁴, HLÁVKOVÁ D.¹

¹ ÚSTAV KLINICKÉ IMUNOLOGIE A ALERGOLOGIE

² KLINIKA ONKOLOGIE A RADIOTERAPIE

³ UROLOGICKÁ KLINIKA

⁴ ODDĚLENÍ LÉKAŘSKÉ GENETIKY UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE, LÉKAŘSKÁ FAKULTA A FN V HRADCI KRÁLOVÉ

Souhrn

Většina nádorů vzniká primární mutací v jedné somatické buňce. Vývoj maligního klonu je charakterizován třemi základními stadii: iniciačním, promočním a stadiem progresu. Mutace určitého genu vede k chybění nebo vzniku mutovaného produktu, což podmiňuje deregulaci buněčné proliferace, diferenciace a buněčné smrti. Mezi známé hereditární formy nádorů patří i von-Hippel Lindau nemoc, podmíněná mutací tumor-suprimujícího genu, lokalizovaného na chromozomu 3p25-26. Ztráta degradace HIF (hypoxia-inducible factor) a zvýšení transkripce VEGF (vascular endothelial growth factor), PDGF (platelet-derived growth factor), TGF- β (transforming growth factor- β) jsou hlavními příčinami akcelerovaného růstu renálního karcinomu, hemangioblastomu a dalších nádorů spojených s VHL nemocí. V článku jsou shrnuty hlavní poznatky o patogenezi VHL choroby.

Klíčová slova: mutace; von Hippel-Lindau nemoc; angiogeneze; renální karcinom; HIF

Summary

Primary mutation in a single somatic cell is the reason of tumor formation in a majority of malignancies. The malignant cells undergo three stages of development: initial stage, stage of promotion, and stage of progression. Mutation of a certain gene results in a loss or in formation of a mutated product, which cause deregulation in the process of cell proliferation, differentiation, and apoptosis. Von Hippel-Lindau disease is an autosomal dominant disorder conditioned by mutation of a tumor-suppressor gene located on chromosome 3p25-26. Failure in the degradation of HIFs and increase of transcription VEGF (vascular endothelial growth factor), PDGF (platelet-derived growth factor- β), and TGF (transforming growth factor- β), are main reasons for accelerated growth in renal cell carcinoma, hemangioblastoma, and other VHL-related tumors. We review recent observations in the field of VHL disease pathogenesis.

Key words: mutation; von Hippel-Lindau disease; angiogenesis; renal cell carcinoma; hypoxia inducible factor

Kancerogeneze obecně

Většina nádorů vzniká primární genetickou událostí (mutace) v jedné, kterékoliv somatické buňce, která je zakládající buňkou nádorového klonu. Každá lidská buňka nese velmi složitý a přesně regulovaný genetický program kontrolující buněčný růst, proliferaci, diferenciaci a buněčnou smrt (apoptózu). Nádorový buněčný klon vzniká a vyvíjí se porušením těchto regulačních mechanismů.

Vznik a vývoj klonu je obvykle charakterizován několika stadii (1):

1. Iniciační stadium - představuje mutaci určitého kritického genu. Je časově krátká, nevratná, buňkám přináší růstovou selekční výhodu.
2. Promoční stadium - charakterizováno stimulací latentního iniciovaného buněčného klonu promočními faktory k inten-

zivnějšímu buněčnému dělení. Promoční faktory samy o sobě nejsou kancerogenní a nejsou schopny vznik nádorového klonu vyvolat. Působení promočních faktorů se v řadě případů překrývá s mutagenní aktivitou, některé podporují přenos mitogenního signálu buňce. Intenzita promočních mechanismů musí dosáhnout určitého stupně, aby byl iniciovaný klon účinně stimulován, a naopak jejich odstranění může zpomalit až zabránit dalšímu vývoji klonu.

3. Stadium progresu - v něm dochází k nahromadění mutací dalších genů v buňkách klonu vedoucích ke změně jejich fenotypu, což podmiňuje invazivní růst a metastatickou aktivitu.

Na vzniku a rozvoji nádorového klonu se podílí několik skupin genů, jejichž mutované nebo chybějící produkty podmiňují deregulaci buněčné proliferace, diferenciace a buněčné smrti.

Lidský genom obsahuje konstantně asi 100 různých protoonkogenů v každé somatické buňce. Obecný, vitální význam jejich produktů spočívá v normální, regulované stimulaci buněčné proliferace a potlačování buněčné diferenciaci, některé se podílejí na regulaci apoptózy. Jsou to komponenty extra- a intracelulárních cest přenosů signálů.

Fyziologické regulační schopnosti produktů protoonkogenů, tj. stimulace buněčné proliferace a potlačování buněčné diferenciaci, se mohou změnit v kancerogenní potenciál, změnili se buněčný protoonkogen v onkogen. Následkem je produkce genového produktu v nadbytku nebo v hyperaktivní formě, a tedy hyperstimulace buněčné proliferace a hyperinhibice buněčné diferenciaci. K aktivaci protoonkogenů stačí alterace pouze jedné alely genu, tzv. dominantní mutace, proto se tyto geny označují jako dominantní onkogeny.

Dále obsahuje lidský genom kolem 30 tumor supresorových genů v každé somatické buňce. Nazývají se recesivní onkogeny, protože musí být mutovány (eliminovány) obě alely, aby se nevytvořil buď žádný, nebo vznikl nefunkční produkt. Produkty tumor supresorových genů potlačují buněčnou proliferaci a podporují buněčnou diferenciaci a apoptózu.

K tumor supresorovým genům jsou řazeny geny udržující stabilitu genomu, někdy označované také jako mutátorové geny. Produkty těchto genů se uplatňují v DNA hojivých procesech - reparaci mutací. Korigují chyby v procesu replikace DNA a stabilizují DNA. K jejich inaktivaci v nádorových buňkách je nutná mutace obou alel - jde o recesivní mutaci. Na rozdíl od onkogenů a tumor supresorových genů neposkytují jejich mutace žádnou růstovou výhodu klonu. Jejich mutace mají v tumorigenezi efekt opožděný, nepřímý, spočívající ve zvýšení frekvence mutací onkogenů a tumor supresorových genů (nejsou hojny). Vyřazení některých mutátorových genů zvyšuje frekvenci mutací až 1000x.

Hereditární formy nádorů

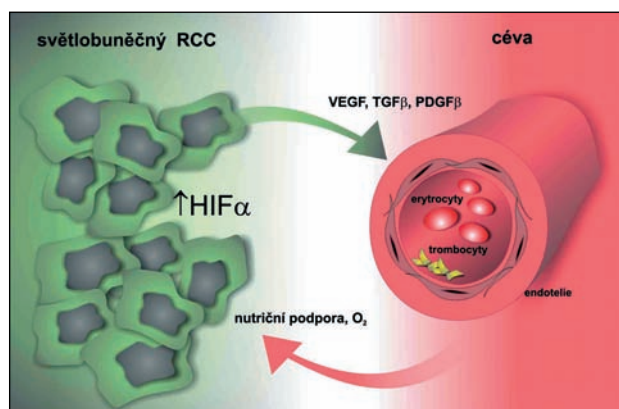
V současné době jsou známé hereditární formy nádorů prsu a ovarii (mutace v genu BRCA 1 a BRCA 2), kolorektálního karcinomu (testují se mutace v genech MHL 1 a MHL 2, které jsou zodpovědné za většinu geneticky prokázaných hereditárních nepolypózních kolorektálních karcinomů), (2). Testovat lze mutaci v p53 genu, u níž je prokázano zvýšené riziko leukemií, nádorů CNS, sarkomů, adrenogenitálních nádorů a nádorů prsu, nebo VHL gen, jehož mutace je zodpovědná za vznik hemangioblastomů retiny, CNS a vysoké riziko vzniku nádoru ledvin, pheochromocytomů a nádorů slinivky (3).

Von Hippel-Lindau (VHL) nemoc

Je autosomálně dominantní onemocnění, které je asociováno s různými tumory a cystami v CNS a viscerálních orgánech (hemangioblastomy retiny a CNS, pheochromocytom, renální karcinom, renální cysty a pankreatický cystadenom), (4, 5). Hlavní příčinou rozvoje onemocnění je inaktivace VHL tumor - suprimujícího proteinu a ztráta funkce VHL a Elongin BC (VBC) komplexu, z čehož vyplývá ztráta odbourávání HIF (hypoxia-inducible factor). Hromadění HIF je důležitým krokem v rozvoji angiogenních tumorů.

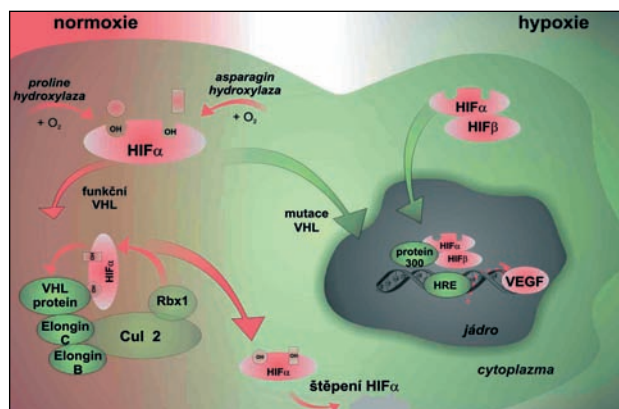
Jméno, VHL nemoc, je odvozeno od autorů dvou článků. První byl publikován v r. 1911 (autor Hippel), druhý v roce 1926 (autor Lindau). Melmon a Rosen vyslovili myšlenku o VHL nemoci v roce 1964. Genetický výzkum provedl Latif a kol. Odpovědný gen byl identifikován jako VHL tumor - suprimující gen v roce 1993. Je lokalizován na 3p25-26 chromozomu. U 84-98% sporadických renálních karcinomů byla prokázána delece alely VHL genu (6). Mnozí autoři prokázali mutaci zbývající alely (pozorována u 34 až 57% světlobuněčných renálních karcinomů), (7, 8, 9, 10). Inaktivace genu VHL může být způsobena metylací cytosinu a guaninu v DNA. U 5 až 19% světlobuněčných renálních karcinomů je metylován VHL gen. VHL tumor - suprimující gen má tři exony a 639 nukleotidů (5). To kóduje 213 aminokyselin. Obě alely VHL mohou být

inaktivovány mutací a delece VHL genu vede ke ztrátě funkce tohoto tumor - suprimujícího genu. Tím nevzniká funkční protein VHL ani komplex VHL protein - ElonginBC (VBC komplex). VHL protein váže HIF-1 α a HIF-2 α přímo a destabilizuje je. Navíc VHL protein podporuje odbourávání a destrukci HIF- α . Ztráta funkčního VHL proteinu vede ve svém důsledku k hromadění HIF, především HIF-1 α a HIF-2 α (11, 12). HIF jsou transkripční faktory, které přepisují důležité proteiny za hypoxických podmínek. HIF jsou většinou všudypřítomné, jsou degradovány VBC komplexem za normálního tlaku kyslíku, ale ne v hypoxických podmínkách. Když tento mechanismus z důvodu ztráty funkce VHL komplexu nefunguje, vysoká hladina neodbouraného HIF je příčinou zvyšování transkripce VEGF, PDGF, TGF β (obr.1). Tím se vysvětluje bohatá mikrovaskulární síť a akcelerovaný růst hemangioblastomu, renálního karcinomu a dalších nádorů spojených s VHL. Vysoká hladina HIF způsobuje zvýšení produkce tyrozin hydroxylázy a zvýšení produkce katecholaminů u pheochromocytomu spojeného s VHL.



Obrázek 1: Buňky rostoucího renálního karcinomu vystavené hypoxii produkují HIF- α (hypoxia inducible factor- α) tvořící heterodimer s HIF- β (hypoxia inducible factor- β), který zesiluje přepis genů kódujících angiogenní faktory TGF- β (transforming growth factor- β), VEGF (vascular endothelial growth factor), PDGF- β (platelet-derived growth factor). Novotvořené kapiláry zajišťují proliferujícím nádorovým buňkám přísun živin a kyslíku, a podílejí se tak na dalším růstu nádoru.

HIF je klíčovým regulátorem hypoxické odpovědi mnohobuněčných organismů. VHL protein má centrální roli v detekci kyslíku. K vazbě HIF- α na VHL protein musí proběhnout hydroxylace prolinového konce HIF- α , což je neobvyklá proteinová modifikace. Účastní se jí prolinové hydroxylázy. Rozsah závisí na tenzi kyslíku. Hydroxylace asparaginových zbytků blokuje interakce HIF- α s transkripčním koaktivátorem p300. Tato mnohočetná hydroxylace vede k inhibici HIF- α aktivity (13). Podrobně je celý proces znázorněn graficky na obr. 2.



Obrázek 2: Za normoxických podmínek je HIF- α (hypoxia inducible factor- α) hydroxylován prolinovou a asparaginovou hydroxylázou. Hydroxylací prolinových konců je zajištěna vazba HIF- α k VHL proteinu. Funkč-

ní protein VHL (Von Hippel-Lindau protein) se prostřednictvím proteinu Elongin B a C váže na Cul 2 protein (hydroláza z rodiny cullinových molekul) a následně na transferázu Rbx1 (ring-box protein 1). Po vytvoření tohoto komplexu dochází k degradaci HIF- α působením proteináz. Pokud dochází ke hromadění HIF- α v důsledku hypoxie či v důsledku chybní funkční VHL proteinu, vytváří se heterodimer HIF- α /HIF- β , na který se váže protein p300. Tento komplex aktivuje transkripci v místě HRE (hypoxia response elements), které jsou součástí genů kódujících angiogenní faktory, např. VEGF.

Za normoxických podmínek je HIF- α hydroxylován na dvou prolinových koncích prolinovou hydroxylázou a na asparaginovém konci asparaginovou hydroxylázou. Hydroxylace (OH) prolinovou hydroxylázou zajistí vazbu HIF- α s VHL proteinem, což podpoří odbourání HIF- α proteasomovou cestou. Hydroxylace asparaginovou hydroxylázou blokuje vazbu HIF- α s transkripčním koaktivátorem p300. VHL protein se váže prostřednictvím Elongin B a C na Cul 2 protein (protein z rodiny cullinových ligáz). RING-box protein Rbx1 slouží jako ubiquitin transferáza pro VHL skp-cullin-F-box protein (SCF komplex), (11).

1. V případě chybění VHL proteinu se hromadí HIF- α , vytváří heterodimery s HIF- β a aktivuje transkripci HERs (hypoxia-response elements), které jsou součástí genů kódujících např. VEGF.
2. Za hypoxických podmínek není HIF- α hydroxylován, a tak nemůže být vázán VHL protein.

Obě tyto cesty (chybní VHL proteinu a hypoxie) vedou ve svém důsledku ke stejnému efektu - zvýšení VEGF.

Klinicky se rozlišuje typ bez (typ-1) a s přítomností pheochromocytomu (typ-2) (5). Typ-2 se dělí ještě do 3 kate-

gorií: typ 2A s přítomností pheochromocytomu a dalších CNS hemangioblastomů, bez přítomnosti renálního karcinomu a typ 2B, u kterého jsou přítomny hemangioblastom, renální karcinom a jiné CNS tumory. Nedávná myšlenka je typ 2C, který představuje přítomnost pouze pheochromocytomu.

Závěr

Rozvoj onkogenetiky spolu s výzkumem angiogeneze přenesené do klinické praxe představují jeden z největších současných přínosů těchto oborů pro medicínu a společnost. Světlobuněčný karcinom ledviny se vzhledem k základnímu faktu, že jde o vysoce vaskularizovaný tumor, charakterizovaný deregulací HIF- α , VEGF a dalších různých angiogenních faktorů, stává důležitým terčem antiangiogenní léčby. V klinických studiích jsou zkoušeny v případě renálních karcinomů různé antiangiogenní léky, jako např. Thalidomid, Neovastat (AE-941), Bevacizumab, inhibitor receptoru tyrozinové kinázy SU11248 a další (14, 15, 16, 17). Antiangiogenní efekt vykazuje rovněž IFN- α , běžně užívaný v léčbě metastazujícího renálního karcinomu (18, 19).

Důležitá je dokonalá multidisciplinární spolupráce příslušných specialistů a rozvoj další výzkumné činnosti, který umožní vytypovat vhodné pacienty ke zvažované antiangiogenní léčbě. Stanovení hladin proangiogenních faktorů přesnými, senzitivními testy a jejich korelace s klinickým vývojem onemocnění je součástí našeho výzkumného záměru.

Tento příspěvek vznikl s podporou grantu IGA MZ ČR: NR/8914-4.

Literatura

1. Goetz, P., Krutílková, V.: Kancerogeneze. Postgraduální medicína, www.postgradmed.cz.
2. Klener, P.: Genetické změny. In: Klener, P.: Klinická onkologie, Galén, 2002, s. 51-58.
3. Foretová, L., Hrubá, M., Navrátilová, M.: Dědičnost jako rizikový faktor pro vznik nádorových onemocnění. In: Beňa, F., Brázdová, Z., Čadová, L., et al.: Onkologická rizika, 2001, 1. vyd. Brno, s. 45-54. ISBN 80-238-7620-1.
4. Martel, C.L., Lara, P.N.: Renal cell carcinoma: current status and future directions. Crit. Rev. Oncol. Hematol., 2003; 45: 177-190.
5. Shuin, T., Yamazaki, I., Tamura, K., et al.: Recent advances in ideas on the molecular pathology and clinical aspects of von Hippel-Lindau disease. Int. J. Clin. Oncol., 2004; 9: 283-287.
6. Rini, B.I., Small, E.J.: Biology and clinical development of vascular endothelial growth factor-targeted therapy in renal cell carcinoma. J. Clin. Oncol., 2005; 23:1028-1043.
7. Brauch, H., Weirich, G., Brieger, J., et al.: VHL alterations in human clear cell renal cell carcinoma: Association with advanced tumor stage and a novel hot spot mutation. Cancer Res., 2000; 60: 1942-1948.
8. Gallou, C., Joly, D., Mejean, A., et al.: Mutations of the VHL gene in sporadic renal cell carcinoma: definition of a risk factor for VHL patients to develop an RCC. Hum. Mutat., 1999; 13: 464-475.
9. Kondo, K., Yao, M., Yoshida, M., et al.: Comprehensive mutational analysis of the VHL gene in sporadic renal cell carcinoma: Relationship to clinicopathological parameters. Genes Chromosomes Cancer, 2002; 34: 58-68.
10. Schrami, P., Struckmann, K., Hatz, F., et al.: VHL mutations and their correlation with tumour cell proliferation, microvessel density, and patient prognosis in clear cell renal cell carcinoma. J. Pathol., 2002; 196: 186-193.
11. Kamura, T., Maenaka, K., Kotoshiba, S., et al.: VHL-box and SOCS-box domains determine binding specificity for Cul2-Rbx1 and Cul5-Rbx2 modules of ubiquitin ligases. Genes Develop., 2004; 18: 3055-3065.
12. Kim, W., Kaelin, W.G.: The von Hippel-Lindau tumor suppressor protein: new insights into oxygen sensing and cancer. Curr. Opin. Genetics Develop., 2003; 13: 55-60.
13. Cohen, H.T., McGovern, F.J.: Renal-cell carcinoma. N. Engl. J. Med., 2005; 353: 2477-90.
14. Klener, P.: Angiogeneze a nádorová onemocnění. Remedia, 2002; 12(1): 2-8.
15. Koza, I.: Perspektivy internistickej terapie solidných nádorov. Vnitřní lékařství, 2001; 47(8): 510-515.
16. Ryška, A., Hovorková, E., Ludvíková, M.: Angiogeneze v nádorech. Část II. Metody a význam kvantifikace; angiogeneze jako prognostický ukazatel a cíl možných léčebných postupů. Čes.-slov. Patol., 2000; 36(2): 71-80.
17. Žaloudík, J.: Bioterapie nádorů: od poznávání podstaty nádorových onemocnění k cílené léčbě ... a zpět. Klinická onkologie, 2004; 17(1): 37-38.
18. Pour, L., Hájek, R., Buchler, T., et al.: Angiogeneze a antiangiogenní terapie u nádorů. Vnitřní lékařství, 2004; 50(12): 930-938.
19. Talač, R., Žaloudík, J., Pačovský, Z., Fait, V.: Neovaskularizace u solidních nádorů. Klin. onkologie, 1995; 6: 165-167.

Došlo: 22. 2. 2006
Přijato: 15. 6. 2006