

Molekulární biologie nádorů

Prof. RNDr. Jana Šmardová, CSc.

Ústav patologie, FN Brno
Přírodovědecká fakulta MU Brno
Lékařská fakulta MU Brno
2011

10. Epigenetika nádorů

Epigenetika

- Kauzální interakce mezi geny a jejich produkty, které ovlivňují fenotyp.
- Studuje dědičné změny v genové expresi, ke kterým dochází nezávisle na primární sekvenci DNA. Většina těchto dědičných změn se ustavuje během diferenciacce a je stabilně udržována po několik generací buněčného dělení, což umožňuje buňkám mít odlišné vlastnosti, i když nesou identickou genetickou informaci.
- Soubor mechanismů, které dědičně ovlivňují genovou expresi beze změny primární genetické informace, tedy sekvence nukleotidů v DNA.

Epigenetické mechanismy

1. metylace DNA
 2. posttranslační kovalentní modifikace histonů
 3. nekovalentní mechanismy: remodelace nukleozomů a inkorporace histonových variant
 4. nekódující RNA (miRNAs)
- Regulují fungování genomu změnou lokální struktury chromatinu - primárně regulací dostupnosti a kompaktnosti.

1. Metylace DNA

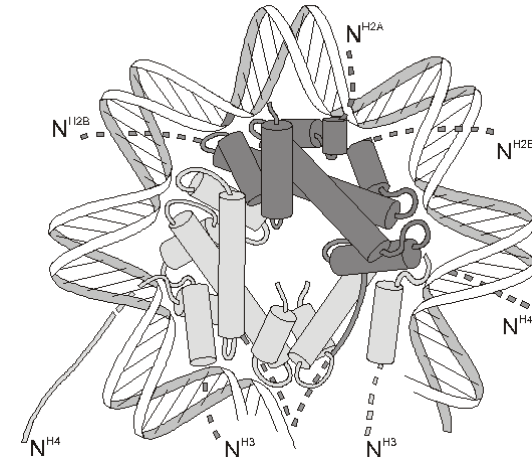


- Kovalentní modifikace cytozinu v pozici 5' v dinukleotidu CpG
- Metylace cytosinu se děje přenosem metylové skupiny z donoru: S-adenosylmethioninu za účasti DNA metyltransferáz
- DNMT1 - „maintenance“ - 10x vyšší afinita k semimetylované DNA, mnohem aktivnější než DNMT3a a 3b
- DNMT3a a DNMT3b - *de novo* - metylují nemetylovanou DNA
- Delece DNMT u myši je embryonálně letální!
- Vzorec metylace DNA je u dospělých buněk relativně stabilní, významné změny jsou popisovány v souvislosti se **stárnutím**.

Ostrůvky 5' - CpG - 3'

- CpG se vyskytující relativně vzácně v genomu (oproti prosté pravděpodobnosti)
- Jako „ostrůvky CpG“ (CGIs) definovány oblasti genomu dlouhé asi 500-1000 pb, ve kterých je obsah GC alespoň 55% a poměr frekvence pozorovaných vs. očekávaných CpG dinukleotidů alespoň 0.65
- CGIs se nacházejí v promotorech asi 50% genův genomu
- V normálně diferencovaných buňkách jsou CGIs roztroušené v genomu vysoce metylované, zatímco většina promotorů je nemetylovaných
- V savčím genomu je metylováno asi 70% dinukleotidů CpG

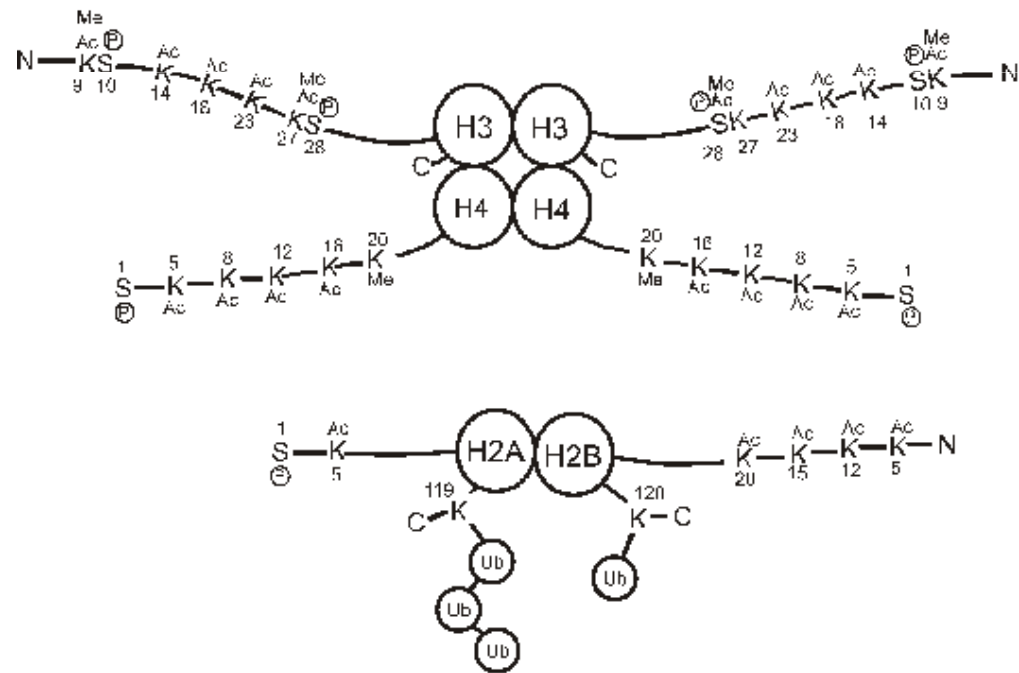
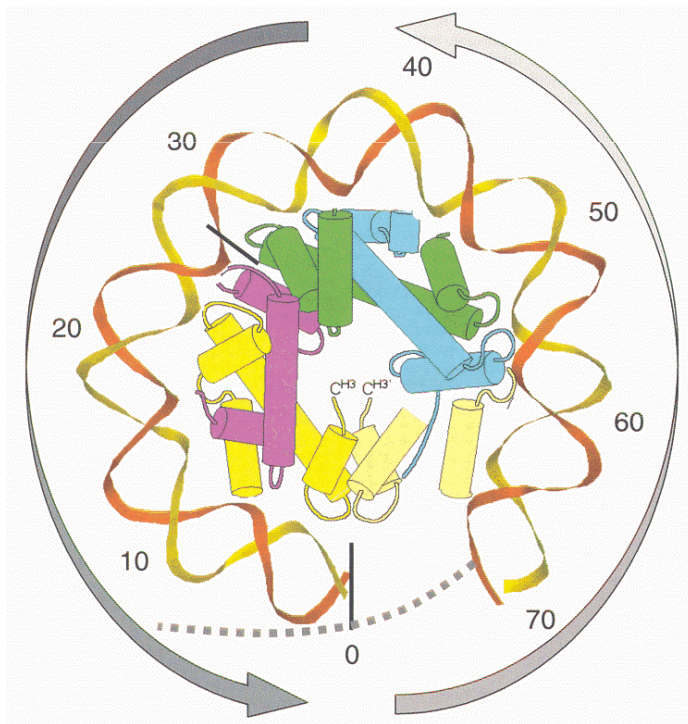
2. Posttranslační kovalentní modifikace histonů



- DNA je uspořádána do chromatinu. Základními jednotkami jsou nukleozomy.
- Chromatin je velmi stabilní a odolná struktura. (1) Ochrana DNA, ale (2) snížená dostupnost pro DNA vazebné proteiny (transkripce, replikace, opravy DNA, rekombinace)
- **DNA**: 146 pb
- oktamer **histonů**: tetramer (H2A/H2B)₂ a dva dimery H3/H4
- úseky DNA mezi nukleozomy (**linker DNA**) různě dlouhé, interagují s histonem H1 a podílejí se na vytváření vyšších struktur chromatinu

Uspořádání histonů v nukleozomu

- C-koncové části histonů tvoří **jádro** nukleozomu.
- N-části vybíhají do stran, tvoří tzv. **N-tails** a jsou volněji přístupné různým modifikacím.



Mechanismy přestavby chromatinu

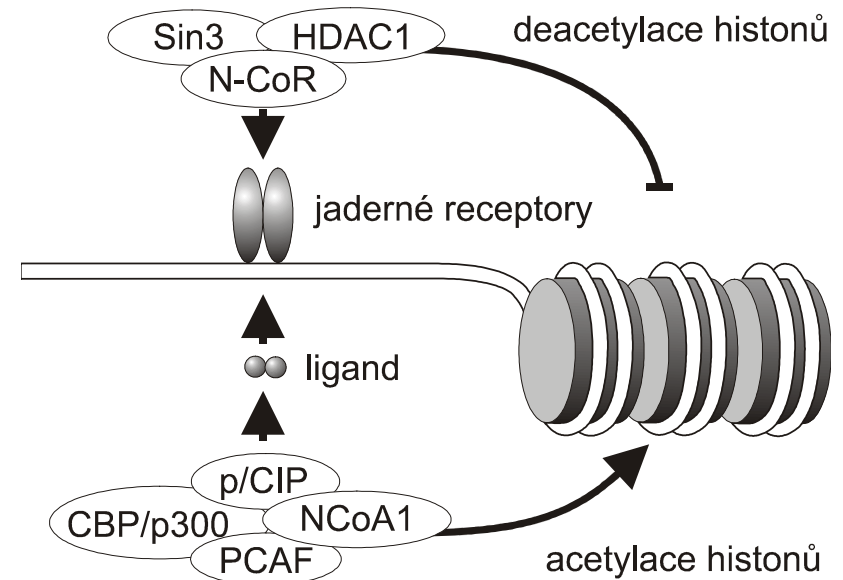
- Kovalentní modifikace histonů:
 - acetylace (\leftrightarrow metylace DNA)
 - metylace
 - fosforylace
 - ubikvitinace
 - sumoylace
 - ADP ribozylace
- ATP-dependentní chromatin remodelující komplexy
- Inkorporace histonových variant

Acetylace histonů

- Acetylace zbytků **lysinu**: celkem 26 různých možností na 1 nukleozom.
- Rovnováha histon acetyl transferáz (HATs) a histon deacetyláz (HDACs).
- Acetylace/deacetylace histonů i nehistonových proteinů, v jádře i cytoplasmě
- **HATs**: (1) GNAT (Gcn5-related N-acetyltransferázy); (2) MYST (MOZ, Tip60, Ybf2/Sas3,..); (3) CBP/p300
- **HDACs**: HDAC1 až 3 - homologní s RPD3, HDAC4 až 8 - homologní s HDA1; celkem 18 hHDACs

Acetylace histonů a regulace transkripce

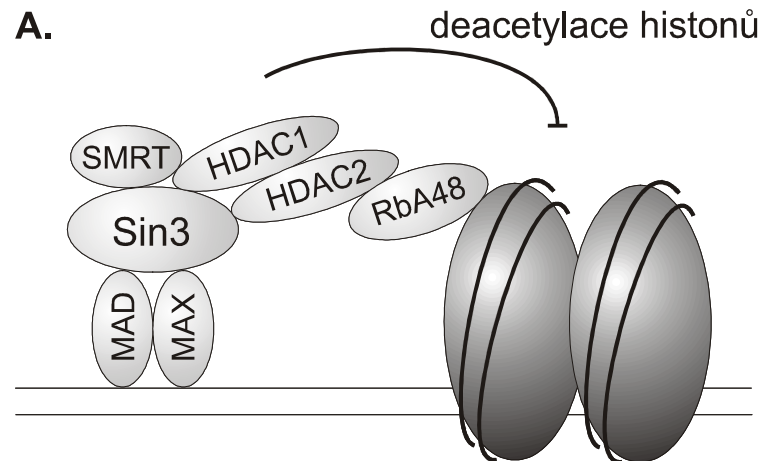
- **Acetylace** histonů je spojena se vznikem tzv. otevřené struktury chromatinu a s **aktivací** transkripce.
- **Deacetylce** histonů spojena s uzavíráním struktury chromatinu a s **represí** transkripce.
- HATs a HDACs jsou přiváděny k cílovým sekvencím prostřednictvím sekvencně specifických transkripčních faktorů



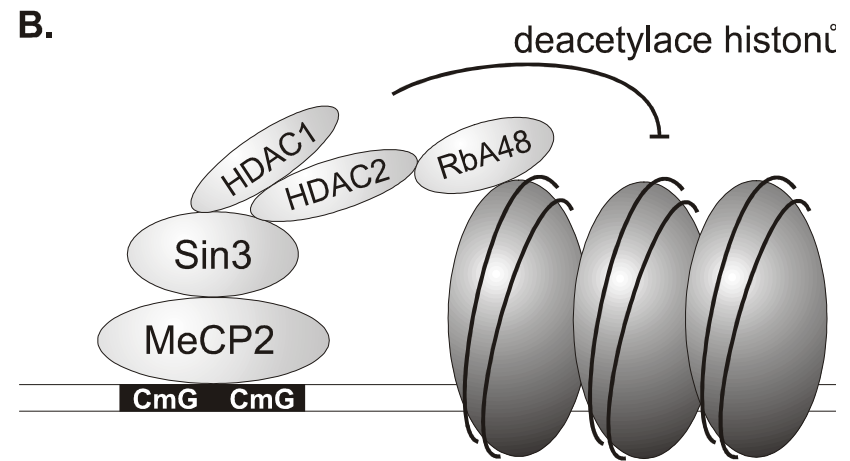
Metylace DNA a deacetylace histonů

CpG metylace DNA souvisí s **represí** transkripce - s udržováním stabilnějšího stavu chromatinu.

Metylované oblasti DNA jsou rozpoznávány proteinem **MeCP2** (jeho doménou MBD - „methyl-DNA binding domain“) a dále specificky interagují (doménou TRD - „transcriptional repressor domain“) s korepresorem **Sin3**, který přivádí k metylovaným oblastem **HDACs**.



A. přechodná represe



B. stabilní represe

Fosforylace histonů

- Fosforylovány mohou být serinové zbytky.
- Mitogenní signály spouštějí kaskádu MAP kináz:
Rsk-2 fosforyluje H3 na serinu 10 - tato fosforylace „otevívá“ strukturu chromatinu a umožňuje **aktivaci** genů spojených s buněčným dělením.
Podle typu stimulace další histon kináza - **MSK1**.
- Fosforylace histonů je funkčně provázaná s acetylací.

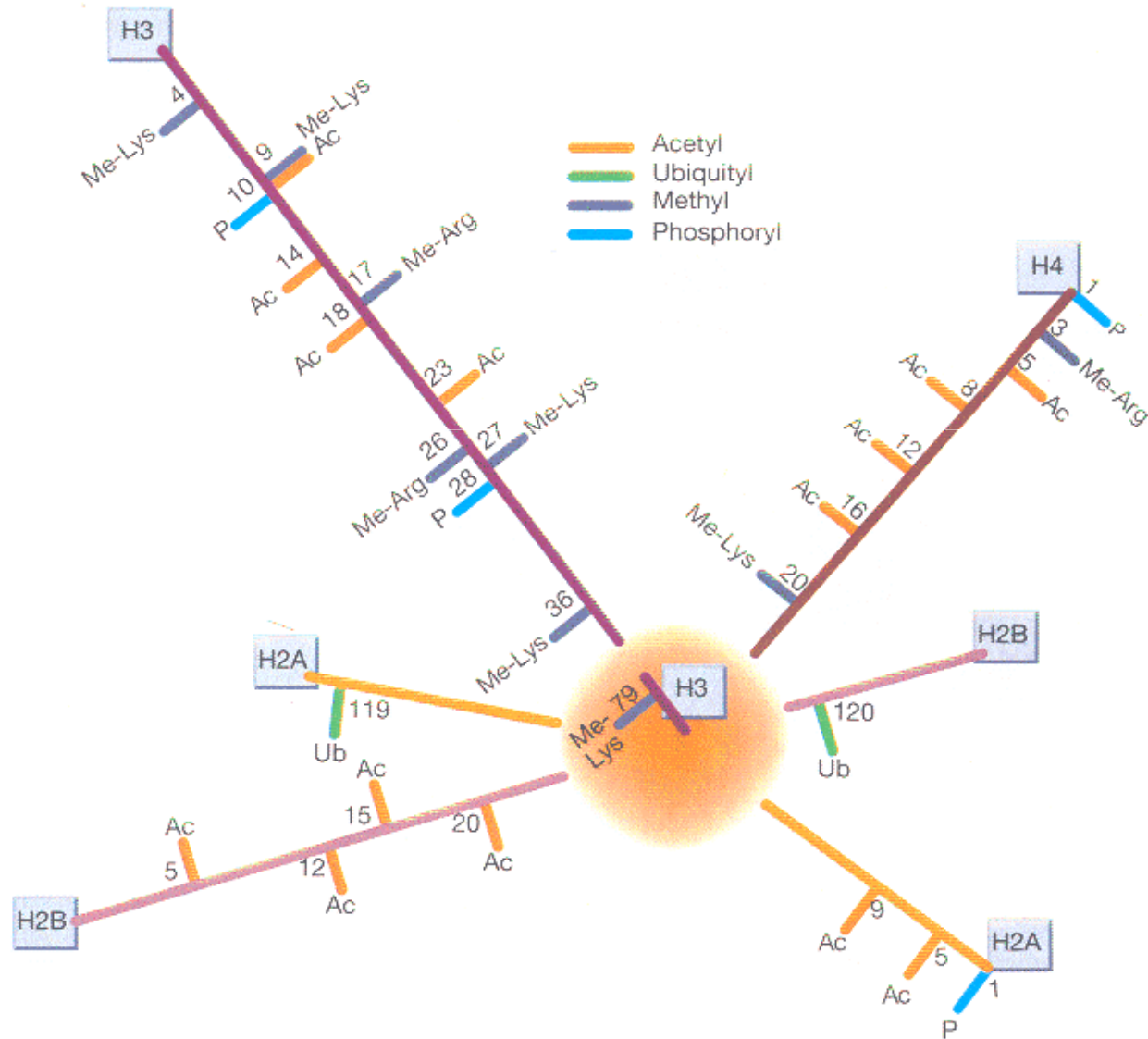
Metylace histonů

- Metylovány mohou být lysiny a argininy; H2B, H3 (lys 4, 9, 27, 36) a H4 (lys 20).
- Metylace **lysínu** může souviset s aktivací nebo represí transkripce - v závislosti na **pozici** metylovaného lyzinu a na **stupni metylace**: např. trimetylace lysinu 4 na histonu H3 (**H3K4me3**) je navýšena na transkripčně **aktivních** promotorech, zatímco trimetylace **H3K9me3** a **H3K27me3** je na transkripčně **reprimovaných** promotorech.
- **Suv39H1** metyluje lysin 9 histonu H3 - spojeno s represí.
- Jaderné receptory aktivují transkripci za účasti koaktivátorů z rodiny proteinů p160: s nimi interaguje také metyltransferáza **CARM1** („coactivator-associated arginine methyltransferase 1“) - metyluje zbytky **argininu** na H3 a potencuje transaktivaci jadernými receptory.
- Příbuzná metyltransferáza **PRMT1** metyluje H4.

Ubikvitinace histonů

- Na C-konci histonů: lysin 119 histonu H2A a lysin 120 histonu H2B.
- Spojeno s transkripčně **aktivním** chromatinem - závislé na probíhající transkripci.
- Ubikvitinace H2B důležitá pro průchod buněčným cyklem.

Hypotéza „histonového kódu“



3. Remodelace nukleozomů a inkorporace histonových variant

ATP-dependentní chromatin remodelující komplexy

- Multiproteinové komplexy, které mění konformaci histonů a DNA (v promotorových oblastech), využívají k tomu energii z hydrolýzy ATP.
- Substrátem není mononukleozom, spíše řetězec nukleozomů - mění pozici nukleozomů na DNA a tvoří „nucleosome-free“ oblasti.
- **SWI/SNF, RSC, NURF, CHRAC, ACF, FACT.**
- Klasifikace podle ATPázové podjednotky:
 - SWI2/SNF2
 - ISWI
 - Mi-2 (+ deacetylázová podjednotka) (CHD komplexy)
- Jejich součinnost nutná pro aktivátory i represory.

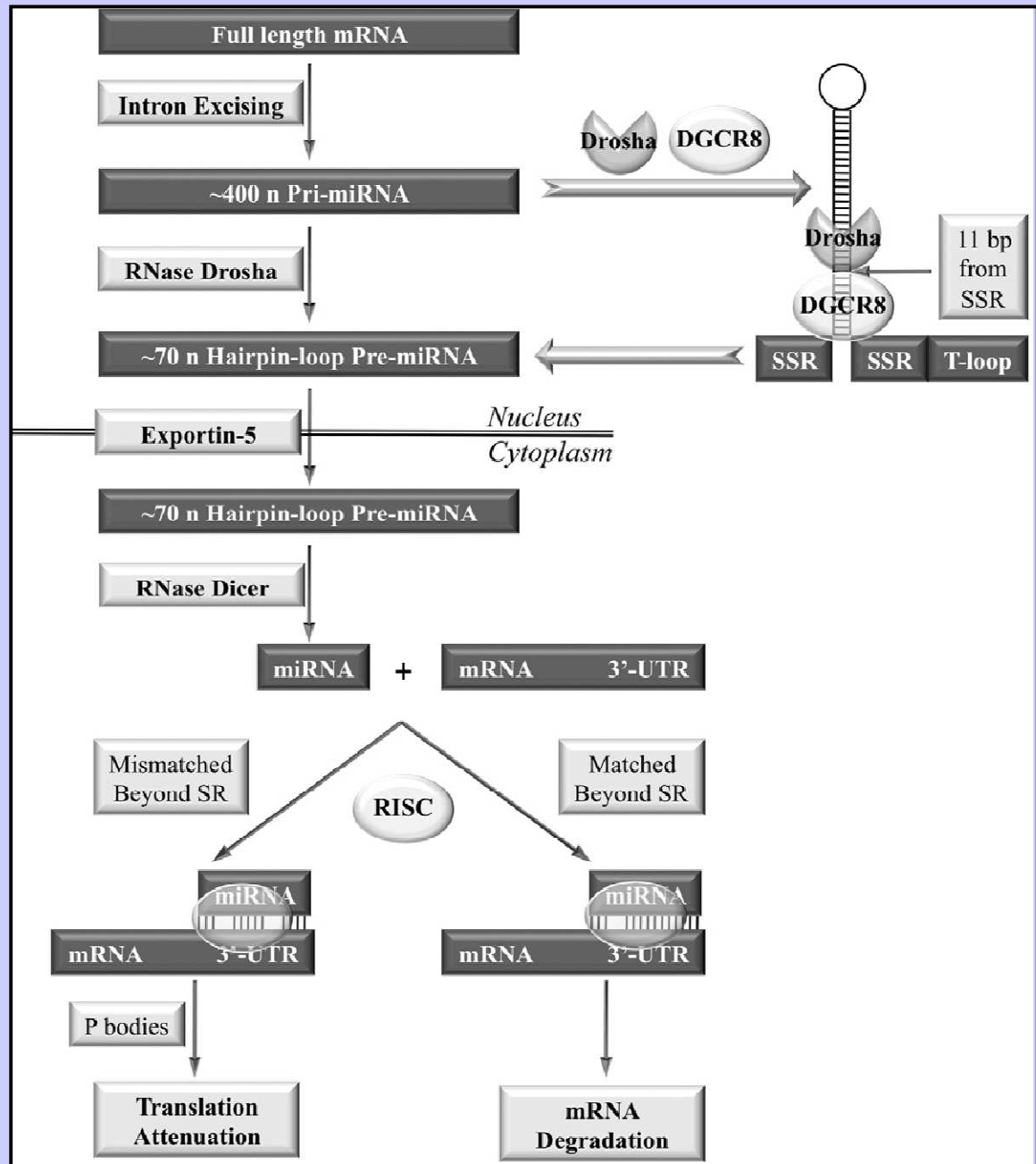
Inkorporace histonových variant

- Inkorporace histonových variant (např. H3.3 a H2A.Z) ovlivňuje stav nukleozomů a tím transkripční aktivitu v oblasti, kde se takto modifikované nukleozomy nacházejí.
- Jejich syntéza a inkorporace do chromatinu spojena s průběhem buněčného cyklu (ne s replikací jako většinové histony).
- **H3.3** a **H2A.Z** jsou preferenčně v promotorech **aktivních** genů.

4. Nekódující RNA (miRNAs)

- **miRNAs**: malé (~22 nt), nekódující RNA, které regulují genovou expresi posttranskripčním umlčováním cílových genů vazbou do 3' netranslatované oblasti cílových mRNAs,
- syntetizovány jako dlouhé, nekódující RNA, štěpeny enzymem DROSHA, transportovány do cytoplazmy a dále štěpeny enzymem DICER do finální konfigurace dvouřetězcových miRNAs; jsou začleněny do RNA-induced silencing komplexů a transportovány zpět do jádra
- miRNAs jsou exprimovány tkáňově specificky
- jedna miRNA může mít stovky cílových mRNAs (!)

Biogenesis miRNAs

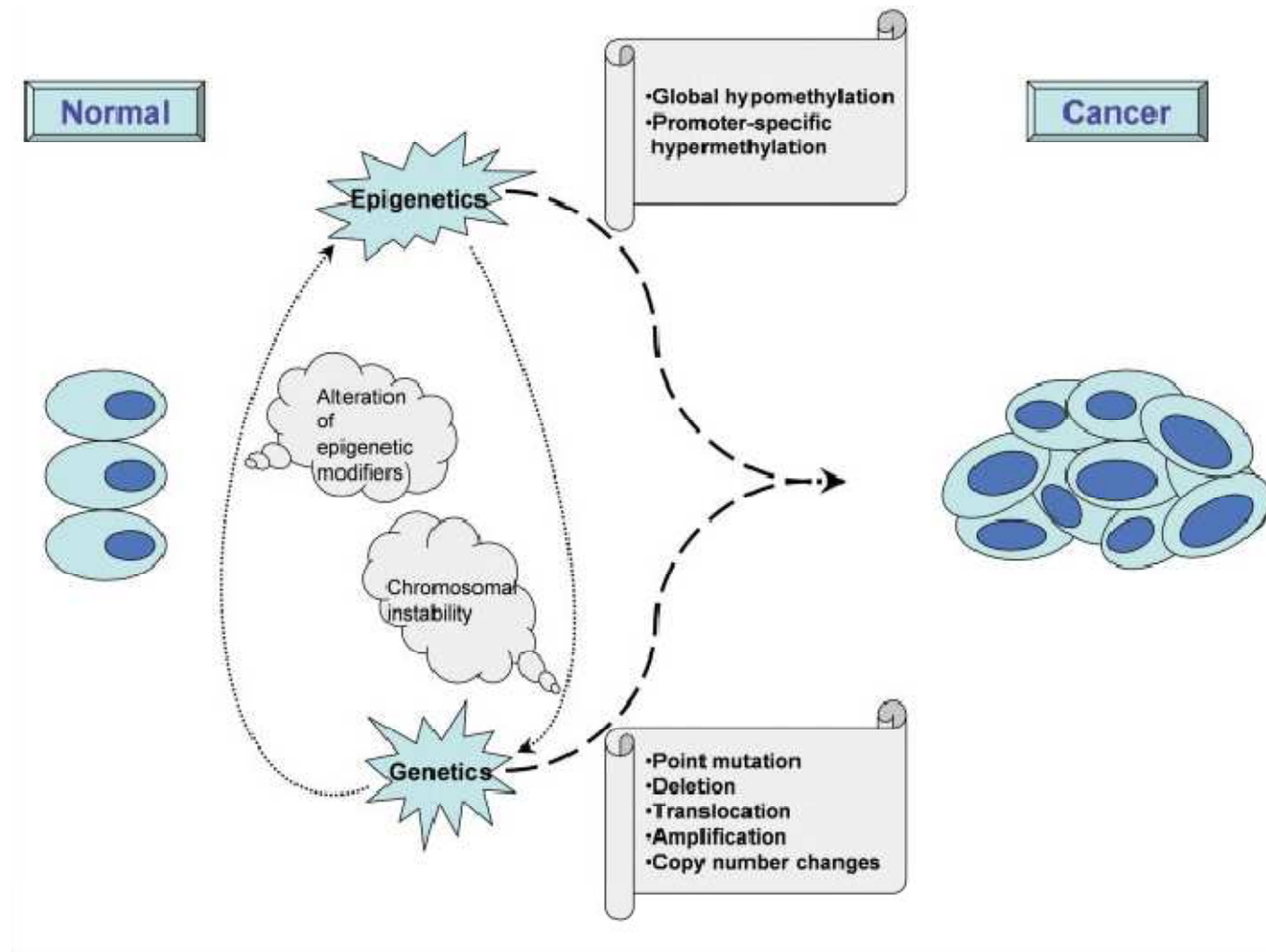


Epigenetické změny u nádorů

Rozsáhlá proměna epigenomu u nádorových buněk:

- globální hypometylace DNA, hypermetylace specifických promotorů
- změněné expresní profily chromatin modifikujících enzymů
- globální snížení exprese miRNA
- Zvýšená exprese některých faktorů epigenetické mašinerie (EZH2)

Na nádorové transformaci se podílejí jak genetické, tak epigenetické aberace



1. Metylace DNA a nádory

- Původní funkcí metylace DNA byla ochrana genomu: metylace měla zabránit šíření parazitických elementů (transpozonů); tento obranný systém se začal až později využívat i jako metoda regulace genové exprese.
- Distribuce („pattern“) metylace genomu se ustavuje během embryogeneze.
- Metylovány především parazitické (např. LTR) a repetitivní sekvence, konstitutivní heterochromatin v pericentrických oblastech některých chromozomů.

Metylace DNA a nádory

Distribuce metylace je v genomu nádorových buněk často pozměněna:

- rozsáhlé hypometylované oblasti
- hypermetylace ve specifických oblastech

Hypometylace DNA u nádorů

- Metylace DNA transkripčně inaktivuje, zabraňuje transpozicím a homologní rekombinaci, a tak přispívá ke genomové stabilitě.
- Hypometylace genomu byla první epigenetickou alterací zaznamenanou u nádorů.
U různých nádorů je obsah 5'-metylcytozinu snížen v průměru o 10%.
- V nádorových buňkách dochází k rozsáhlým **demetylacím repetitivních sekvencí** a stupeň hypometylace koreluje s progresí onemocnění.
- Hypometylace repetitivních sekvencí může být **časnou událostí** kancerogeneze a může predisponovat buňku k přestavbám genomu mechanismem rekombinace.

Hypometylace DNA u nádorů

- Dopad i na specifickou genovou expresi, vedoucí k aktivaci genů, které stimulují proliferaci: *R-ras* a *MAP2K1* (nádory žaludku), *MAGE* („melanoma-associated antigen“; melanomy), *IGF2* (Wilmsovy nádory).
- Mechanismus i nepřímý - umlčením inhibitorů.
- Reaktivace normálně umlčených genů (růst stimulujících, apoptotických).
- Hypometylace promotorů může vést k reaktivaci miRNAs ukotvených v kódujících oblastech některých genů...

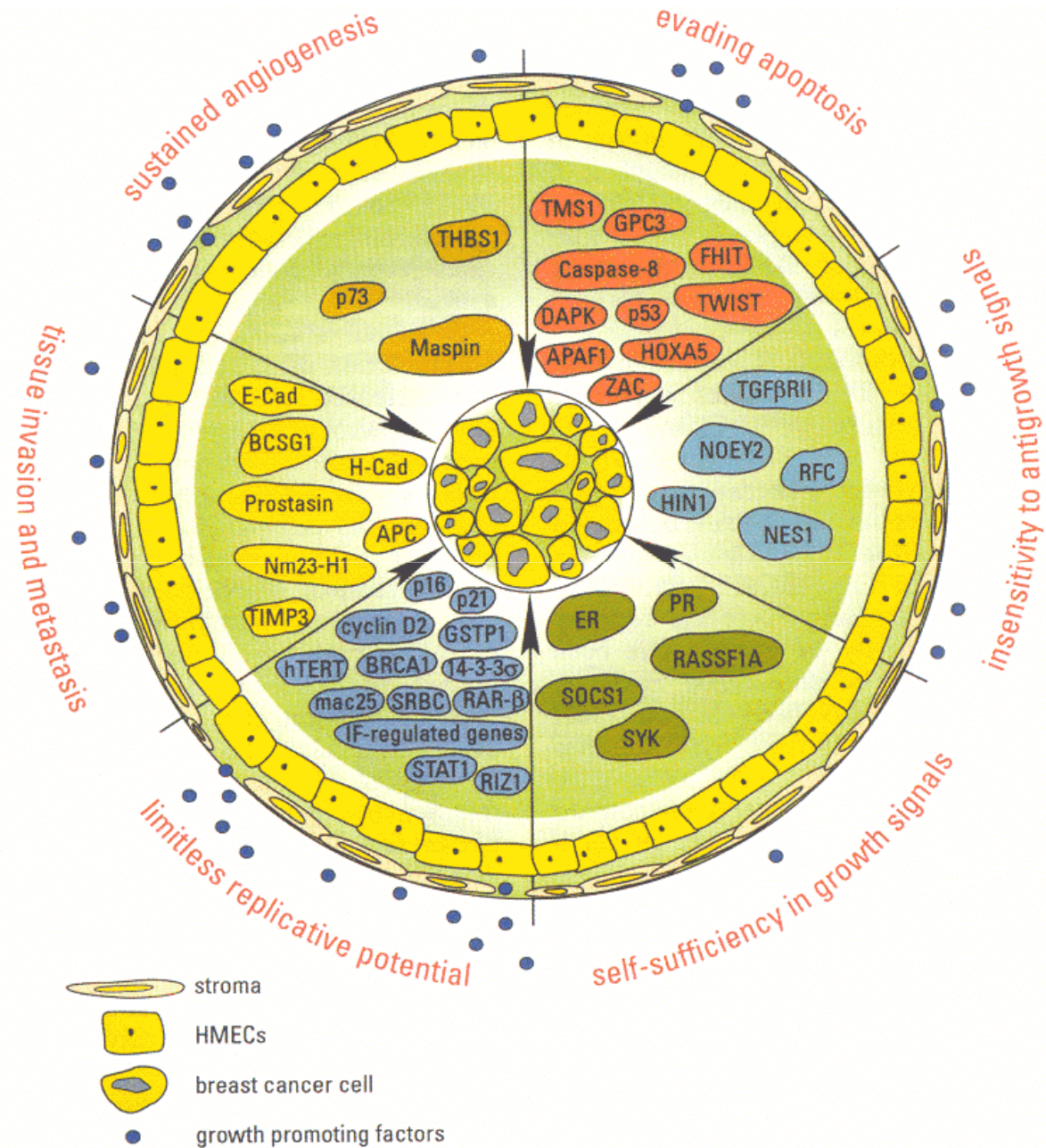
Hypermethylace DNA u nádorů

- CpG ostrůvky jsou obvykle v promotorových oblastech na 5' - konci genů.
- Odhaduje se, že v lidském genomu je asi 45.000 CpG oblastí.
- Metylace CpG oblastí hraje roli při inaktivaci chromozomu X a při imprintingu - vtiskování (vývojově specifická inaktivace genů), vzrůstá s věkem a v tkáňových kulturách.
- **V nádorových buňkách hypermethylace v promotorech genů pro nádorové supresory, genů účastnících se mezibuněčných adhezí, oprav DNA, ..**

Geny inaktivované během kancerogeneze metylací DNA

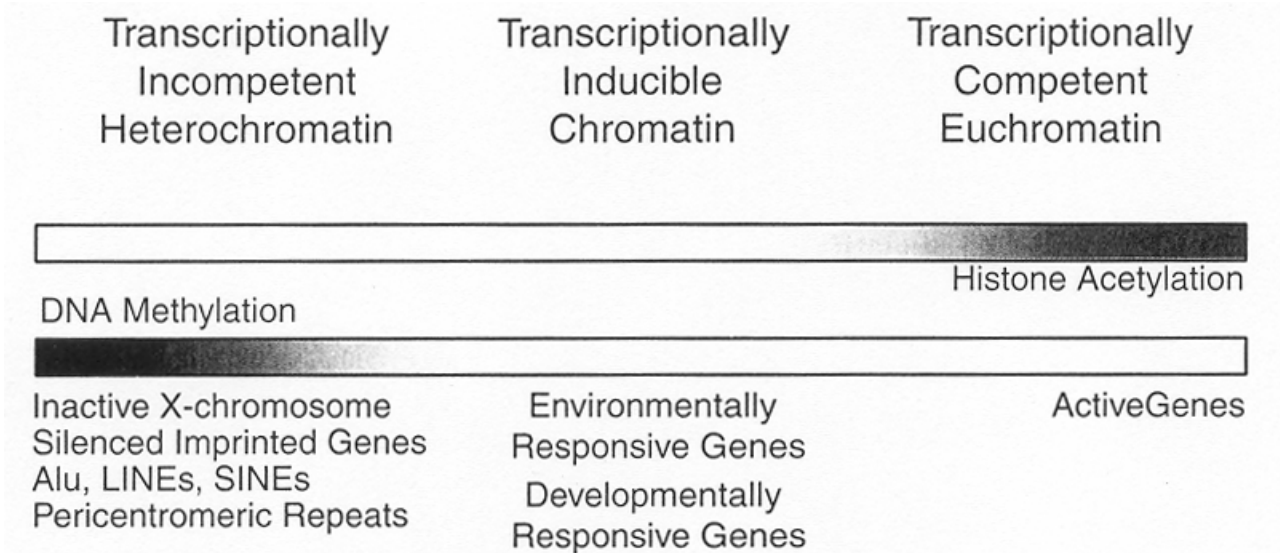
- Geny účastníci se regulace buněčného cyklu:
RB, p16^{INK4A}, p15, p14^{ARF}, p73
- Geny účastníci se oprav DNA:
MLH1, O⁶MGMT, GST π , BRCA1
- Inhibice apoptózy:
DAP-kináza, prokaspáza-8, TMS1
- Invaze nádorů a angiogeneze:
E-kadherin, VHL, APC, LKB1, TIMP3, thrombospondin 1
- Členy signálních drah:
ER, RAR β , Androgen receptor, Endothelin B receptor, RASSF1A

Geny inaktivované během kancerogeneze metylací DNA



Hypermethylace DNA u nádorů

- Na rozdíl od genetických změn, které se dějí po skocích, epigenetické změny mohou být postupné: DNA metylace a acetylace histonů fungují jako tzv. „transkripční reostat“



Hypermethylace DNA u nádorů

- Na rozdíl od mutací, hypermethylace promotorů je potenciálně reverzibilní: taková epigenetická plasticita může odrážet dynamiku některých procesů během kancerogeneze, např. během tvorby metastáz:
- Např. ztráta **E-kadherinu** se uplatňuje v počáteční fázi tvorby metastáz při uvolňování buněk z primárního nádoru X schopnost invadujících buněk tvořit metastatická ohniska může být podmíněna re-expresí E-kadherinu.
- Mutace **CDH1**, které zcela vyřazují funkci E-kadherinu, jsou vzácné, s výjimkou pacientů s familiálním nádorem žaludku s vrozenou mutací **CDH1** a pacientů s poměrně vzácným lobulárním karcinomem prsu; tyto nádory jsou silně invazivní, ale výsledné metastázy se tvoří spíše podél bazálních membrán, neprorůstají do orgánů.

LOI - ztráta imprintingu

- **Imprinting:** proces, kterým jsou geny selektivně exprimovány homologně s maternální nebo paternální linií
- Imprinting: komplexnost variability v distribuci metylovaných cytosinů (asi 50 milionů dinukleotidů CpG v savčím genomu!) je „diagnostickým snem, ale analytickou noční můrou“
- **LOI** („loss of imprinting“) je typickým projevem nádorů
- Je LOI příčinou nebo následkem při vývoji nádorů?
- U některých nádorů LOI pravděpodobně předchází a možná „způsobuje“ vznik nádorů (Wilmsův tumor, embryonální nádory u Beckwith-Wiedemannova syndromu).
- Experimentální data na myších modelech:
 - Kombinace mutace APC a navozené LOI (inaktivace DNMT1) vedla k asi 2 až 2.5 navýšení rizika vývoje CRC oproti samotné mutaci APC.
 - Ovlivněny byly především kmenové buňky
 - V tomto uspořádání se projevila více hypometylace než hypermetylace (aktivace onkogenů?)
 - Indukce iniciace kancerogeneze, ale retardace pozdních stádií

2. Posttranslační kovalentní modifikace histonů

- globální ztráta acetylace lyzinu 16 histonu H4 (H4K16ac) a trimetylace lyzinu 20 histonu H4 (H4K20me3), pravděpodobně zprostředkována HDACs a vede k transkripční represi
- exprese HDACs často u nádorů zvýšena
- specifická ztráta acetylace lyzinu 9 a dimetylace nebo trimetylace lyzinu 4 histonu H3 a navýšení dimetylace nebo trimetylace lyzinu 9 a trimetylace lyzinu 27 histonu H3 jsou nalézány v promotorech některých genů a mohou stimulovat kancerogenezi umlčováním kritických nádorových supresorů

Kovalentní modifikace histonů

EZH2

- histon metyltransferáza odpovědná za trimetylací lyzinu 27 histonu H3 (H3K27met3)
- jeho zvýšená exprese stimuluje kancerogenezi in vitro i in vivo a byla detekována u melanomů, lymfomů, nádorů prostaty a prsu
- potenciální marker odlišující agresivní nádorů prsu a prostaty od indolentnějších
- aberantní metylace H3K27 může být také důsledkem inaktivace **UTX**, specifické H3K27 demetylázy: somaticky mutována např. u mnohočetného myelomu, u dlaždicobuněčných karcinomů jícnu a dalších.

Rubinstein-Taybiho syndrom

- Vrozené vývojové onemocnění spojené s mentální a růstovou retardací, typickými obličejovými malformacemi, širokými palci u nohou a rukou.
- Příčinou je zárodečná mutace jedné alely genu pro histon acetyl transferázu **CBP** (chromozom 16 p13.3) a následná snížená dávka (haploinsuficience) genu.
- Onemocnění spojeno se **zvýšeným rizikem vzniku nádorů** (především nádory nervové soustavy a hlavy - ne leukémií).
- Gen CBP se nachází ve dvou translokacích spojených s vývojem leukémií: **t(8;16)** → **MOZ/CBP** a **t(11;16)** → **MLL/CBP**.

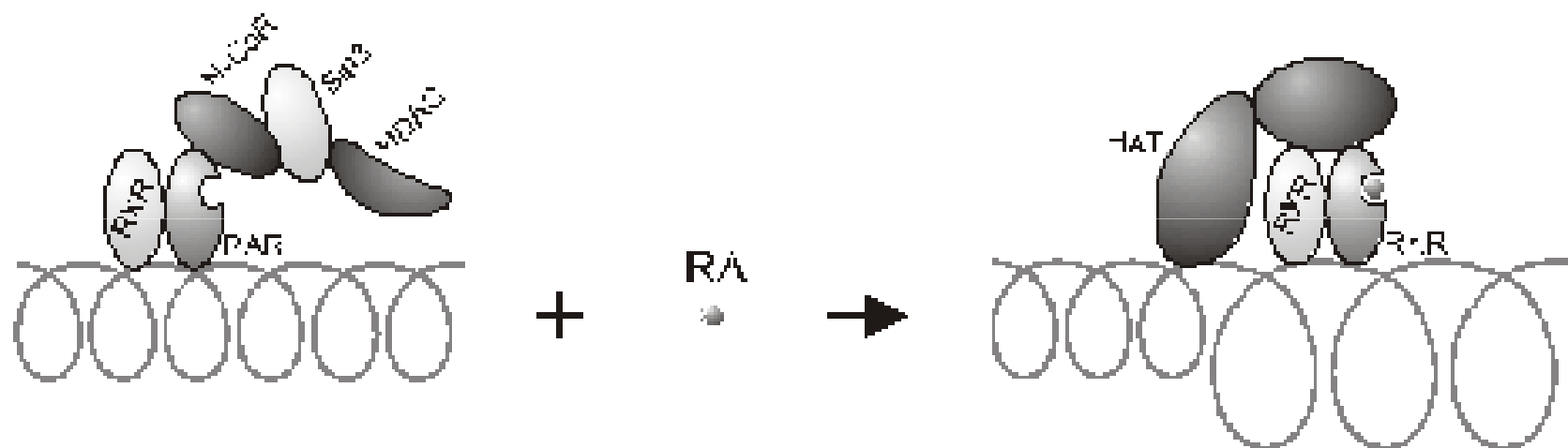
Chromatin a leukémie

- Diferenciace pluripotentní hematopoietické buňky regulována koordinovanou expresí celých skupin genů.
- Klíčovou roli hrají sekvenčně specifické TF.
- Pro úspěšný průběh jsou nezbytné faktory remodelující chromatin: celá řada z nich může být během leukemogeneze poškozená.

Akutní promyelocytární leukémie - APL

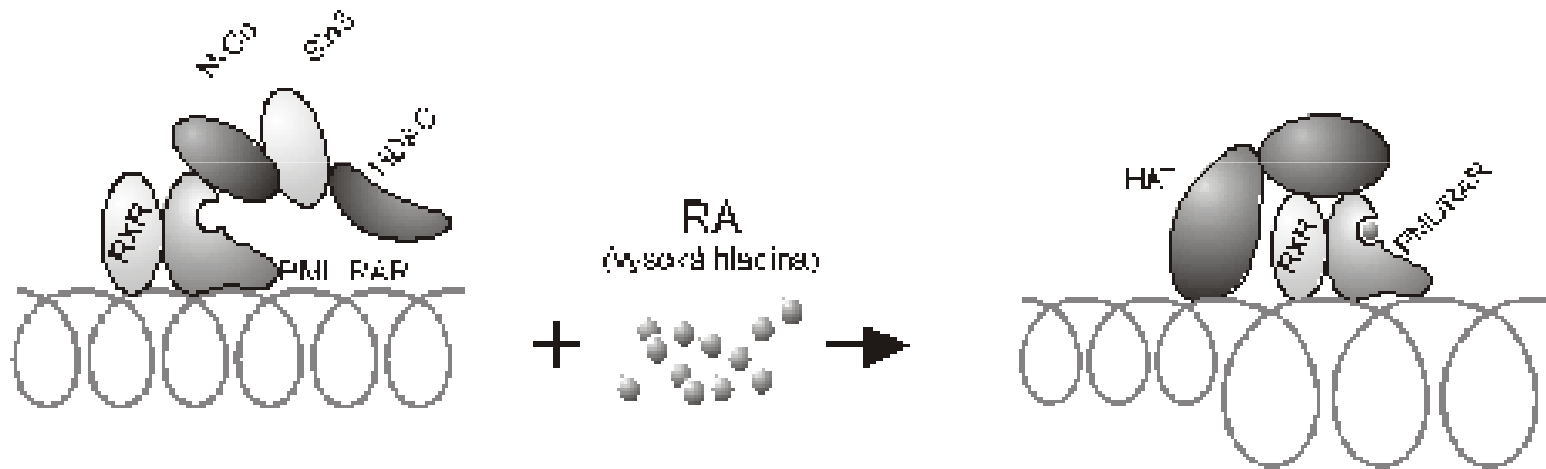
- Jediný typ leukémie, který odpovídá na diferenciační terapii, a to ATRA.
- Všichni pacienti s APL mají translokaci v genu **RAR α** :
 - t(15;17) \Rightarrow PML-RAR
 - t(11;17) \Rightarrow PLZF-RAR
 - t(5;17) \Rightarrow NPM-RAR
 - t(11;17) \Rightarrow NuMA-RAR
- Všechny chiméry mají zachovanou tu část molekuly RAR α , která zajišťuje vazbu na DNA, vazbu ligandu, korepresoru, koaktivátoru \Leftrightarrow **vazba RAR α na chiméru ji neaktivuje!!**

APL: normální funkce RAR/RXR



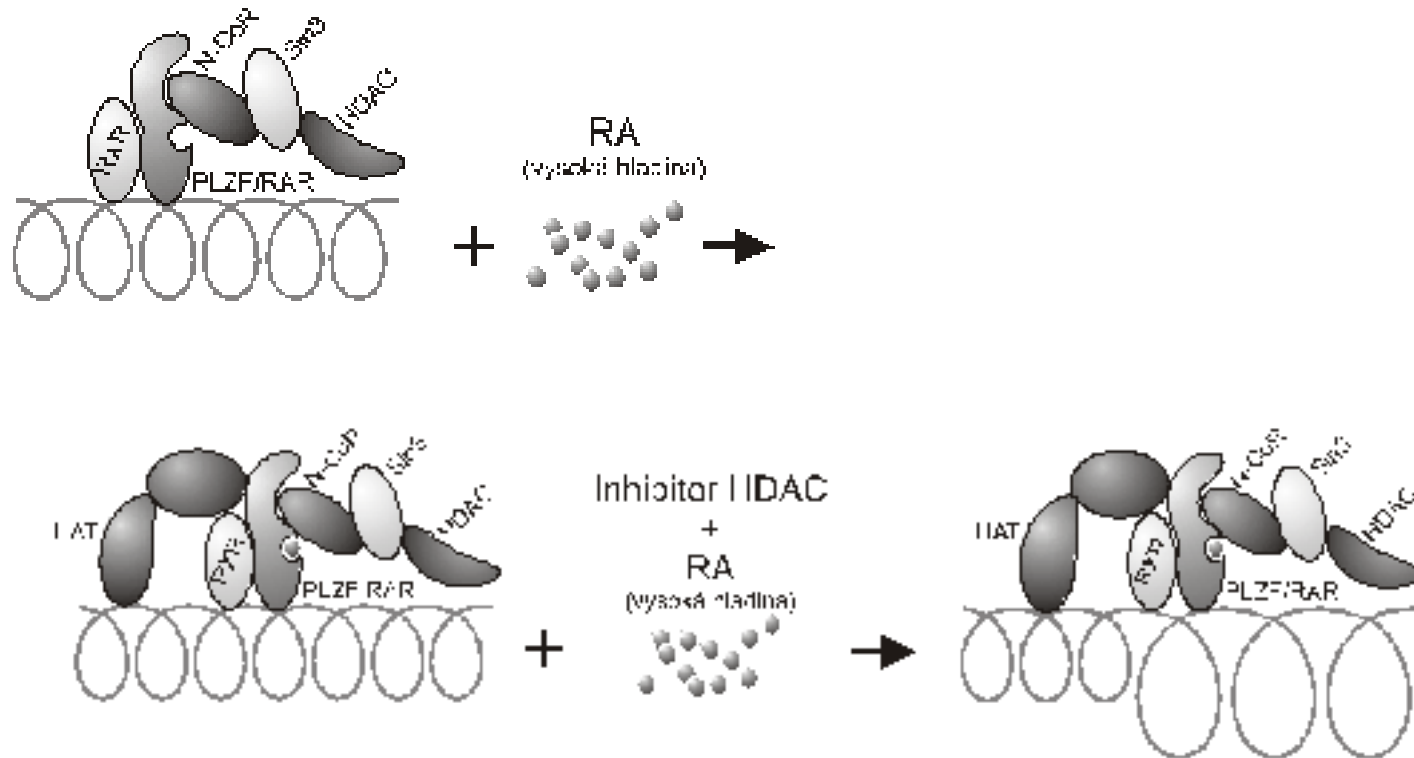
Represivní komplex heterodimeru RXR/RAR α
aktivovaný nízkými dávkami RA.

APL



Represivní komplex RXR/PML-RAR α aktivovaný farmakologickými dávkami RA.

APL

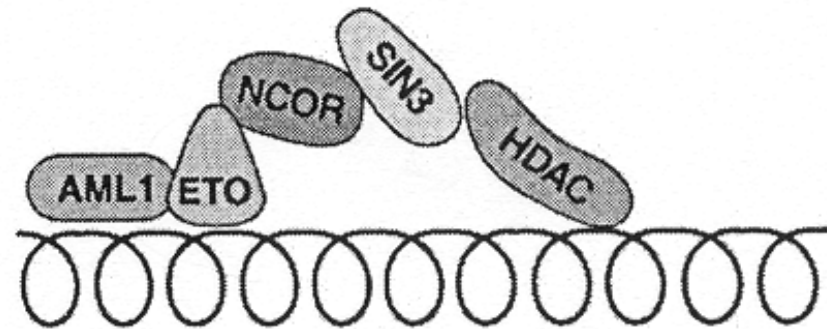
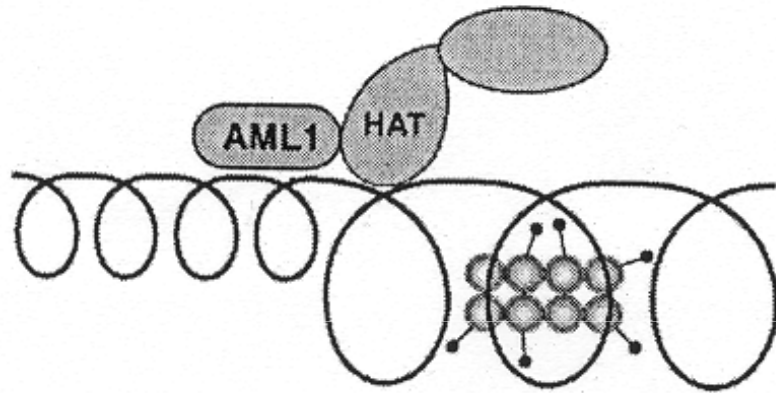


Represivní komplex heterodimeru RXR/PLZF-RAR α nelze aktivovat ani farmakologickými dávkami RA; lze jej aktivovat kombinací vysoké hladiny RA a inhibitorů histon deacetyláz.

AML-ETO

- Následek translokace t(8;21), vyskytuje se u 10% pacientů s AML.
 - **AML1** je sekvenčně specifický TF nutný pro myeloidní zrání; interaguje s koaktivátorovým komplexem p300/PCAF.
 - **ETO** reprimuje transkripci interakcí s komplexem N-CoR-Sin3-HDAC1.
- ⇒ AML/ETO se váže na cílové sekvence AML1, ale místo aktivujícího komplexu váže komplex represivní.

AML-ETO



AML/ETO se váže na cílové sekvence AML1, ale místo aktivujícího komplexu váže komplex represivní.

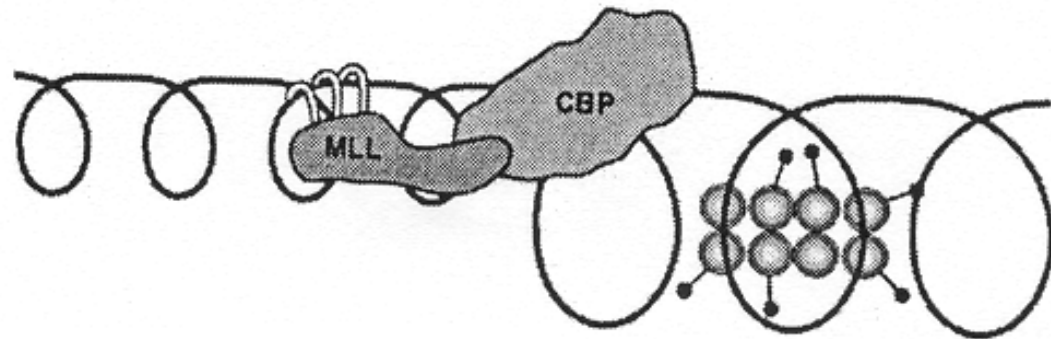
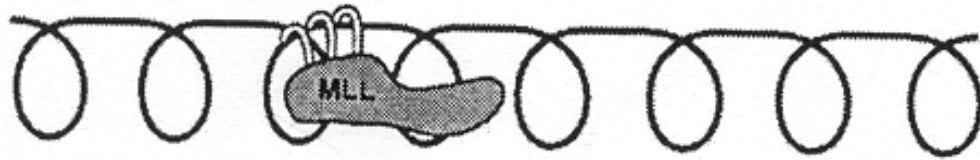
MLL-CBP (p300, MOZ, TIF2 t(11;16)

- **MLL** může být postižen mnoha různými translokacemi - tvoří reciproké translokace až se **40 partnerskými geny** (mezi nimi CBP a p300).
- MLL reguluje expresi genů HOX (homeobox geny), mimo jiné v součinnosti s ATP-dependentními chromatin remodelujícími komplexy.
- Translokace vedou ke vzniku chimér, které ztratily schopnost správné součinnosti s faktory, které mění strukturu chromatinu ⇒ deregulace genové exprese během krvetvorby ⇒ maligní transformace.

MLL

- lokalizován na 11q23
- TF a H3K4 histon metyltransferáza
- H3K4 trimetylace je znakem aktivně transkribovaného chromatinu; H3K4 trimetylace zprostředkovaná MLL je nutná pro epigenetické udržování aktivace genů HOX
- translokace MLL (V chiméře N-konec MLL a C-konec partnerského proteinu) typické pro mnoho forem agresivních *de novo* a sekundárních TR leukémií dětí i dospělých)

MLL-CBP t(8;16)



Chiméra nemá schopnost správné součinnosti s faktory, které mění strukturu chromatinu \Rightarrow deregulace genové exprese během krvetvorby.

Inhibitory histon deacetyláz - **HDACIs** - potenciální nádorová („chromatinová“) terapie?

TSA - trichostatin A

SPB - sodium phenylbutyrát

SAHA - suberanilohydroxamic acid

depsipeptidy

a další - **trapoxin, oxamflatin**,...

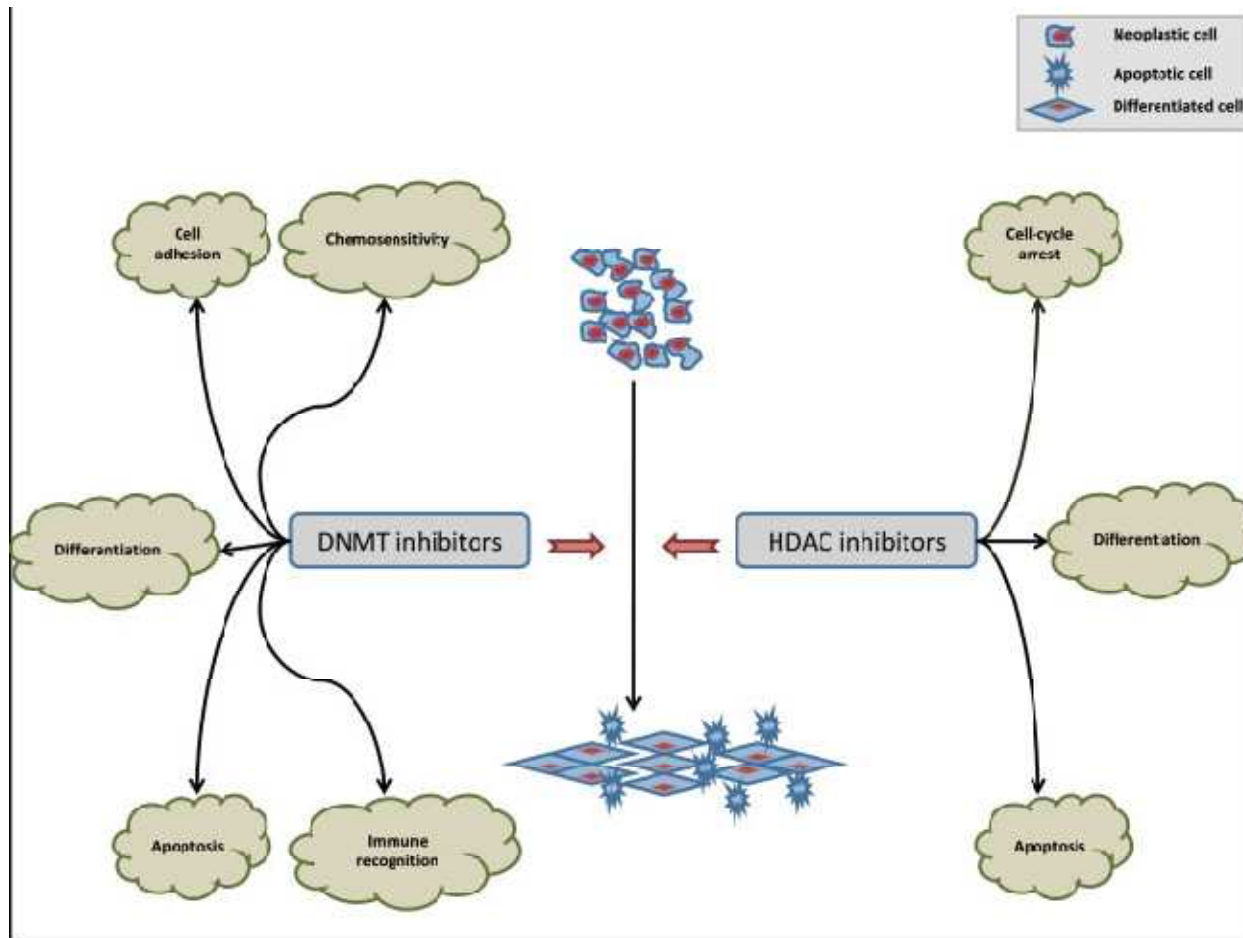
Inhibitory histon deacetyláz

- Účinek HDACIs je obecný, tj. globálně inhibují represivní aktivitu TF, které využívají jako korepresory HDACs k remodelaci chromatinu ⇒ jejich biologický efekt bude tkáňově specifický.
- × HDACIs inhibují růst, indukují apoptózu a diferenciaci u různých nádorových linií bez souvislosti s histologickým typem!!??
- Zřetelný a výrazný protinádorový efekt a zároveň nepatrná toxicita u netransformovaných buněk (v koncentracích, které vedou k akumulaci acetylovaných histonů)
- × obecně ale neplatí, že podávání HDACI zvrátí maligní fenotyp!!

Inhibitory histon deacetyláz

- Počet genů ovlivněných těmito inhibitory je konečný a některé z „up-regulovaných“ genů kódují růstové (nádorové) supresory.
- Pokud je inhibice transkripce zprostředkovaná HDACs spojena s metylací DNA, pak samotné použití HDACIs nefunguje, ale může být úspěšné v kombinaci s **5-aza-2'-deoxycytidinem** (inhibitor DNA metyltransferáz).

Dva hlavní typy epigenetické terapie: inhibitory DNA metyltransferáz a histon deacetyláz



Inhibitory histon deacetyláz

- U některých leukémií a solidních nádorů fungují v kombinaci s diferenciacními činidly:
 - **SAHA** je účinný při supresi růstu buněk nádoru prostaty (*in vitro* i *in vivo*)
 - kombinace **HDACIs** a **ATRA** při terapii APL
 - **SAHA** v kombinaci s **ATRA** účinný při supresi růstu neuroblastových buněk
 - **HDACIs** zcitlivují AML blasty s translokací AML1-ETO k účinku **ATRA**

Inhibitory histon deacetyláz

? prevence ?

- Nízké dávky SAHA v dietě snižovaly incidenci a velikost nádorů u krys, u kterých byla indukována tvorba nádorů mléčné žlázy N-metyl-nitroso-ureou.
- Vysoký obsah vlákniny v potravě představuje snížené riziko vývoje kolorektálního karcinomu \Leftrightarrow při trávení vlákniny střevní mikroflorou vzniká ve vysokých koncentracích sodium butyrát.

Chromatinová/epigenetická terapie

2004: US Food and Drug Administration (FDA) potvrdila **5-azacytidine** jako léčbu pro MDS:

- první terapeutikum pro MDS
- první hypometylační terapeutikum
- první „epigenetické“ terapeutikum

Druhým epigenetickým terapeutikem: **decitabine** (5aza-2'-deoxycytidine)

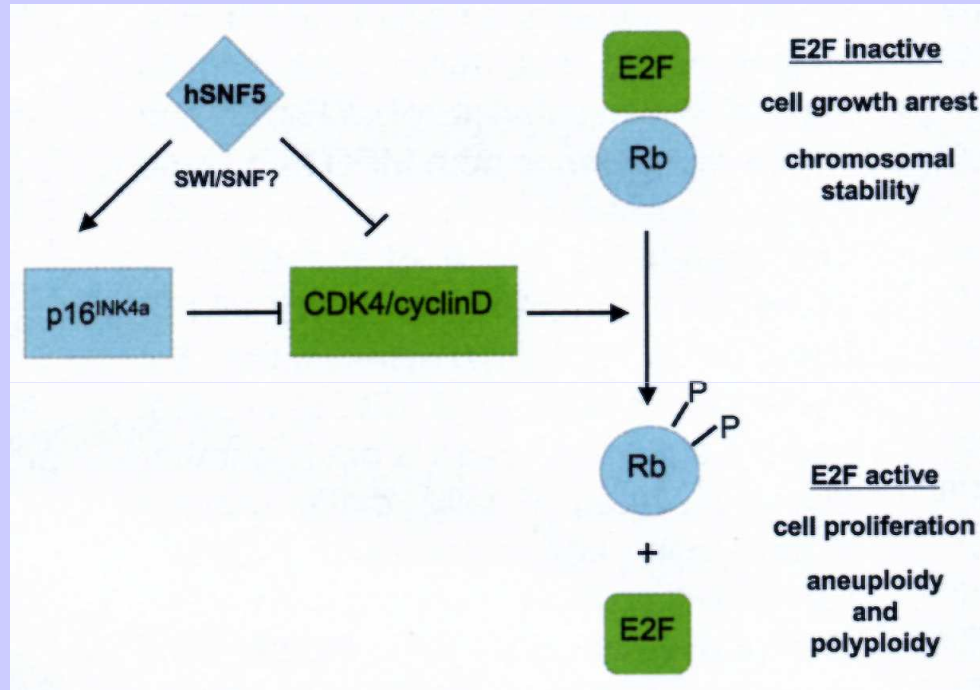
- potenciálně léčba MDS, AML, CML

3. Remodelace nukleozomů a inkorporace histonových variant

Maligní rhabdoidní nádory MRT

- Gen **hSNF5** (**INI1** nebo **BAF47**) kóduje jednu z podjednotek ATP-dependentního chromatin remodelujícího komplexu SWI/SNF.
- Mutace tohoto genu spojovány s velmi agresivními maligními rhabdoidními nádory (MRT) u dětí
- Zárodečné mutace hSNF5/INI1 predisponují k MRT ledvin a mozku
- Somatické mutace hSNF5 se vyskytují u renálních rhabdoidních nádorů, centrálních primitivních neuroektodermálních nádorů, meduloblastomů a leukémií .
- Mutace jsou bialelické, jejich výsledkem je kompletní delece genu, zkrácený protein nebo posun čtecího rámce.
- hSNF5 je nádorový supresor

Funkce hSNF5



Ztráta hSNF5 vede k redukci p16^{INK4A} a tím ke zvýšení míry fosforylace RB a tedy ke zvýšení funkce E2F

Snf5 null myši: umírají během časně embryogeneze

Snf5 haploinsuficientní myši: normální vývoj, ale u 5-35% se vyvine rhabdoidní nebo jiný nádor (obvykle velmi agresivní a silně metastatický)

Ztráta funkce hSNF5:

→ indukce proliferace

→ navýšení chromozomální nestability

ATP-dependentní chromatin remodelující komplexy a nádory

- **BRG1** je součástí ATP-dependentního chromatin remodelujícího komplexu SWI/SNF*, který funguje mimo jiné v součinnosti s RB. Bez funkčního BRG1 není RB schopen suprimovat růst. Inaktivující mutace BRG1 byly detekovány v některých nádorových buněčných liniích, které měly zároveň funkční RB.
- BRG1 a **BRM** (katalytické podjednotky SWI/SNF) jsou umlčeny asi u 15 až 20% nemalobuněčných karcinomů plic
- * Komplex SWI/SNF obsahuje asi 10 podjednotek: např. SNF5, BRM (Brahma), BRG1 („Brahma related gene 1“)

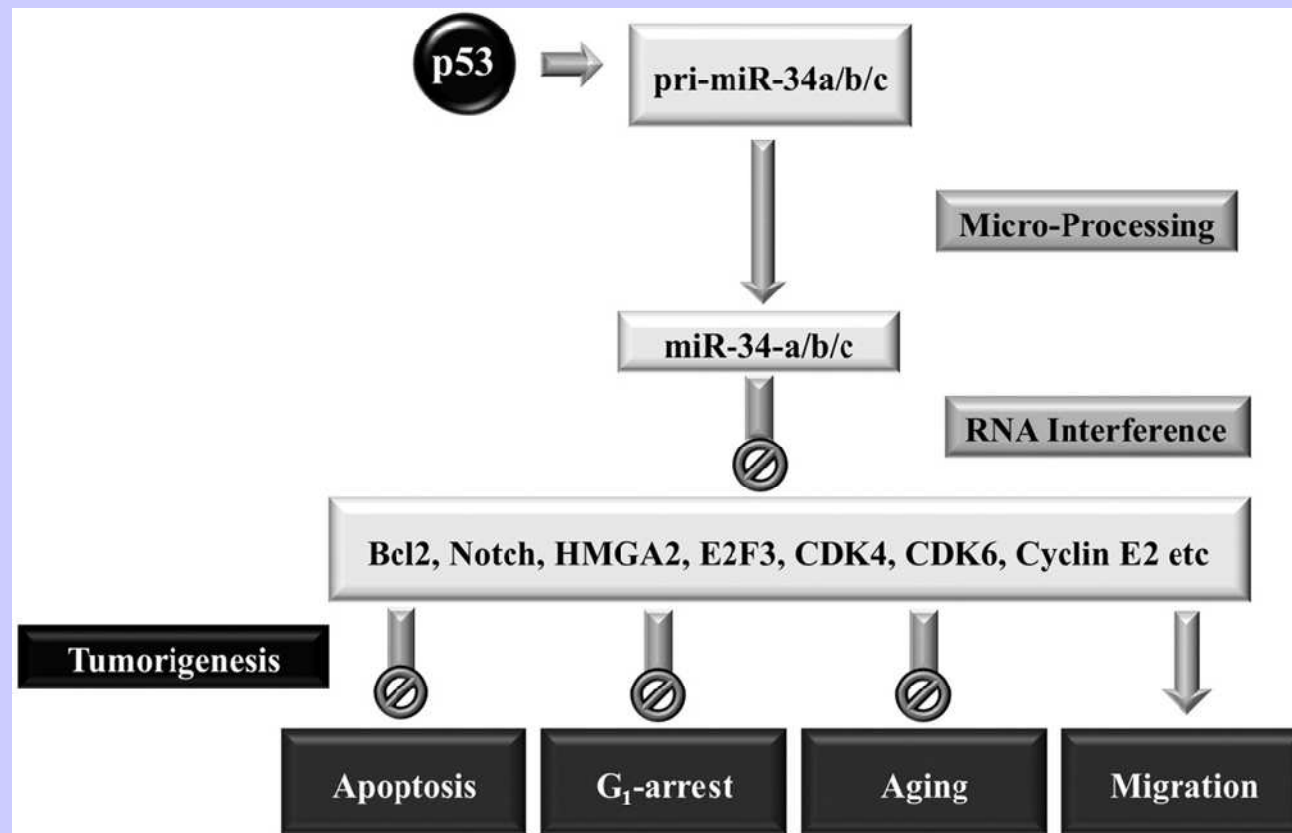
Histonové varianty a nádory

- exprese histonové varianty H2A.Z zvýšena u některých typů nádorů a je spojována se stimulací buněčného cyklu
- na druhé straně, také ztráta H2A.Z u nádorů je spojována s progresí nádorů

4. Nekódující RNA (miRNAs)

- Některé miRNAs v normálních buňkách negativně regulují expresi řady onkogenů. Proto by jejich deregulace mohla být důležitým mechanismem, který se uplatňuje při kancerogenezi.
- Expresní profily miRNA jsou specificky deregulovány u širokého spektra lidských patologií, včetně nádorů.
- Jednotlivé typy nádorů mohou vykazovat specifický „miR podpis“, který může být zachycen metodami založenými na PCR.
- Na rozdíl od jiných markerů jsou miRs v cirkulaci (a podobně také ve formol-parafinových blocích) značně stabilní, proto jsou robustní a spolehlivé.

miR-34: nádorový supresor fungující „downstream of p53“



miRNAs a nádory

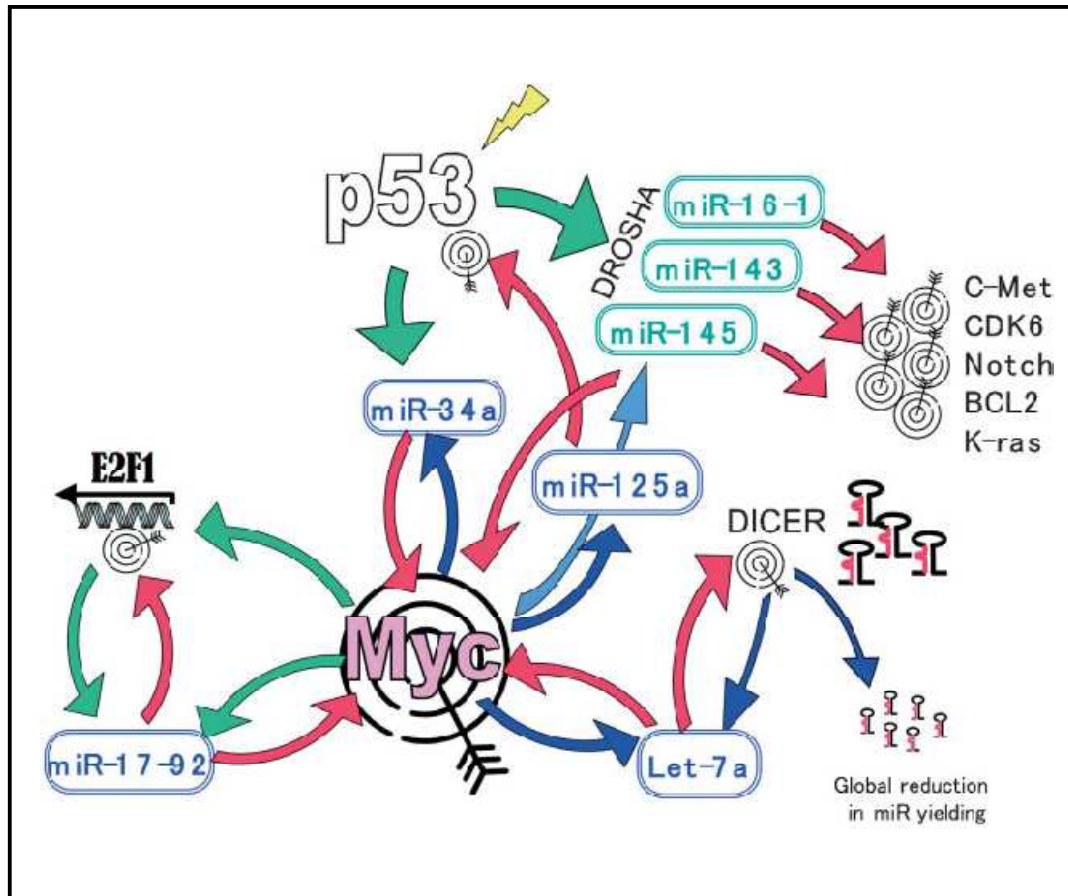
Dva typy změn v expresi miRNA u nádorů

- **Globální** míra exprese miRNA v nádorech je buď snížena (nejčastěji) nebo zvýšena.
- Mezi suprimované miRNAs patří: **let-7**, k jejímž cílům patří *ras*, *c-myc*, *CDK6*, a **miR-24**, který cílí na *c-myc* a *E2F2*.
- Zvýšená exprese detekována např. u **miR-21**, která inhibuje *bcl2*, *PTEN*, *EGFR*, a **miR-196a**, **miR-373** a **miR-125b**, které inhibují *annexin A1*, *p53* a další.
- Vytipován soubor miRs, jejichž exprese změněna během kancerogeneze, ale zatím ještě mnoho nejasností....

miRNAs a nádory

- Některé transkripty ovlivněny více miRs: např. exprese *c-myc* ovlivněna miR-22, -24, -145, -17-19b a let-7; exprese *ras* regulována let-ý, miR-372 a -373; exprese *BRCA1* regulována miR-24 a -545.
 - Některé onkoproteiny - transkripční faktory - regulují expresi mnoha miRs: např. *p53* aktivuje expresi miR-34a, ale za jiných okolností - např. při poškození DNA - aktivuje expresi miR-143, -145 a -16-1; *Myc* aktivuje expresi miRs v clusteru miR-17-92, ale reprimuje expresi nejméně 12 jiných miRs.
- ⇒ složitá, komplexní, zamotaná síť vztahů mezi miRs a některými onkoproteiny, plná zpětnovazebných klíčků...
- Např. *Myc* indukuje expresi miRs v clusteru miR-17-92, ale nejméně dvě miRs z tohoto polycistronu (17-5b a 20a) suprimují expresi *myc*. Zároveň *c-Myc* zvyšuje svou vlastní expresi represí miR-34a a let-7

Komplikovaná funkční síť vztahů mezi miRNAs a některými onkoproteiny



Např. Myc indukuje expresi miRs v clusteru miR-17-92, ale nejméně dvě miRs z tohoto polycistronu (17-5b a 20a) suprimují expresi myc. Zároveň c-Myc zvyšuje svou vlastní expresi represí miR-34a a let-7. Avšak simultánní represí miR125b c-Myc upreguluje p53, která následně zvyšuje expresi inhibitorů c-myc Mir-34a a -145.

Potenciální praktické využití miRNAs

- v diagnostice (detekce sérových markerů? korelace s progresí? markery metastatického potenciálu?)
- prognostické markery?
- cíl terapie
- terapeutikum