

Molekulární a buněčná biologie nádorů

Prof. RNDr. Jana Šmardová, CSc.

Ústav experimentální biologie
Přírodovědecká fakulta
MU Brno

Bi9910

středa 14.00 – 16.00

A11 – č. 306



2020

Molekulární a buněčná biologie nádorů

12. Epigenetika nádorů



- nádory byly tradičně vnímány jako **genetická** nemoc, ale je jasné, že součástí procesu jejich vývoje jsou i změny **epigenetické**
- **epigenetika** studuje dědičné změny v genové expresi, ke kterým dochází nezávisle na **primární sekvenci DNA**

Profesor Andrew Feinberg

(ředitel Centra pro epigenetiku v lékařském ústavu Johna Hopkinse)



„Ke genetickým mutacím u rakovinou zvrhlých buněk samozřejmě dochází, ale epigenetické změny je předcházejí.“

Tři fáze vývoje nádoru:

1. epigenetické rozvracení buněk
2. nastartování mutací uvnitř této populace buněk
3. genetická a epigenetická nestabilita

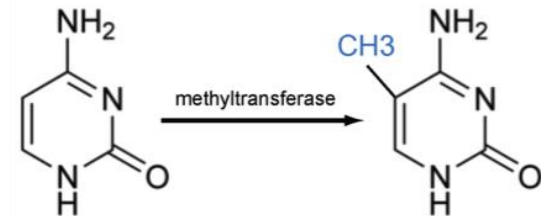
Epigenetické mechanismy

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



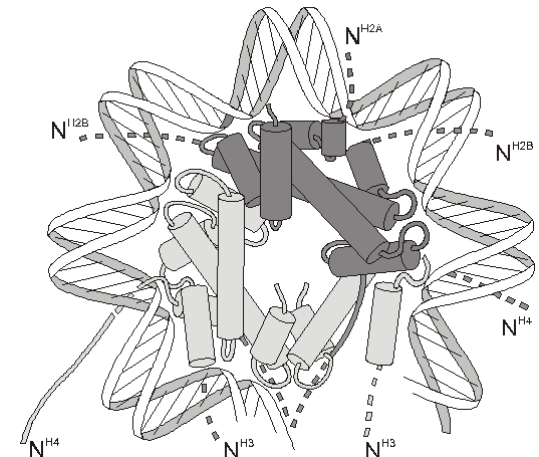
- kovalentní modifikace cytosinu v pozici 5' v dinukleotidu CpG
- metylace cytosinu se děje přenosem metylové skupiny z donoru: S-adenosylmethioninu za účasti **DNA metyltransferáz**
- DNMT1 – „maintenance“ – 10x vyšší afinita k semimetylované DNA, mnohem aktivnější než DNMT3a a 3b
- DNMT3a a DNMT3b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



2. Posttranslační kovalentní modifikace histonů



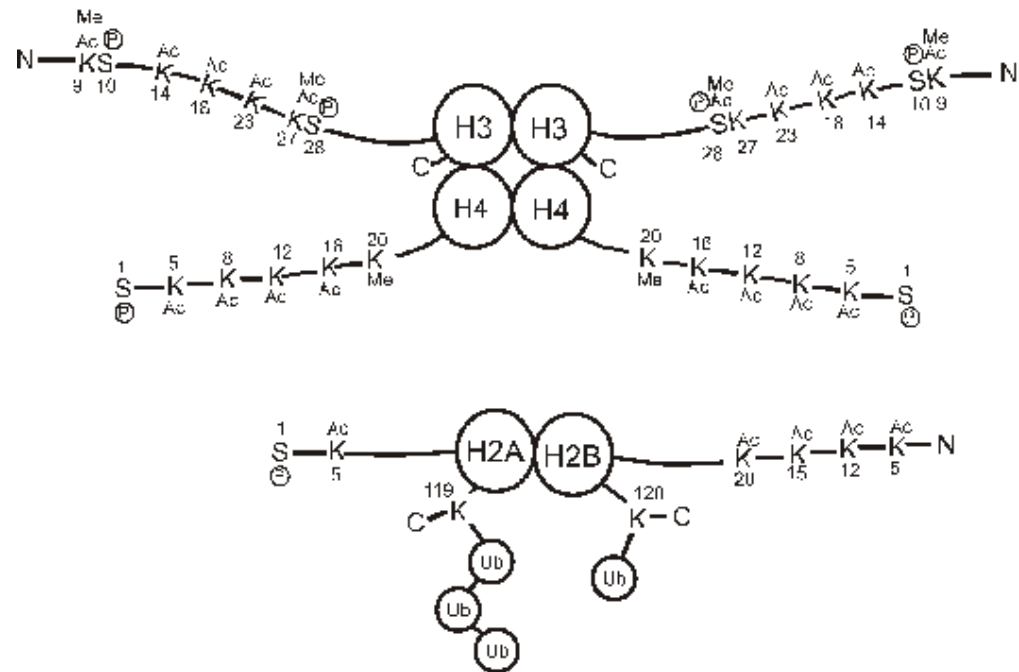
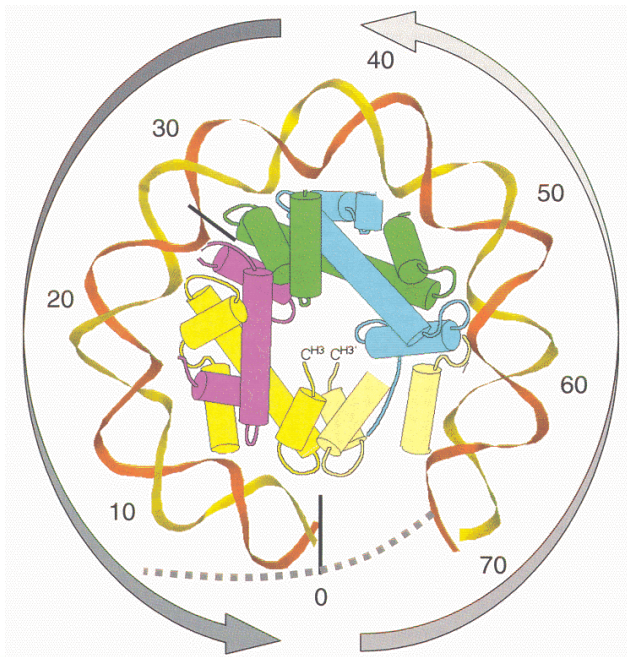
- DNA je uspořádána do chromatinu; základními jednotkami jsou **nukleozomy**
- chromatin je velmi **stabilní** a odolná struktura; (1) ochrana DNA, ale (2) snížená dostupnost pro DNA vazebné proteiny (transkripce, replikace, opravy DNA, rekombinace)
- **DNA**: 146 pb
- oktamer **histonů**: tetramer (**H2A/H2B**)₂ 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 cytoplazmě
- **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

Onkogenní (nádorové) viry

- **retroviry** (RNA viry): obsahují ve svém genomu **onkogen** (akutně transformující viry) nebo aktivují **protoonkogen**, vedle kterého se integrovaly (inserční mutageneze; pomalu transformující)
- **DNA nádorové viry** používají jinou strategii transformace: kódují proteiny (**virové onkoproteiny**), 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

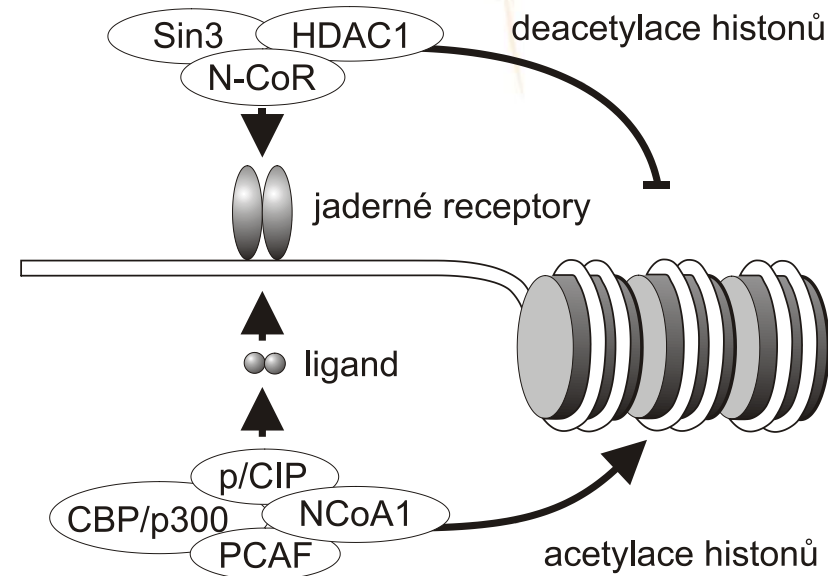
adenoviry: **E1A** interaguje s RB a p300/CBP; **E1B** interaguje s p53

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

Acetylace histonů a regulace transkripce



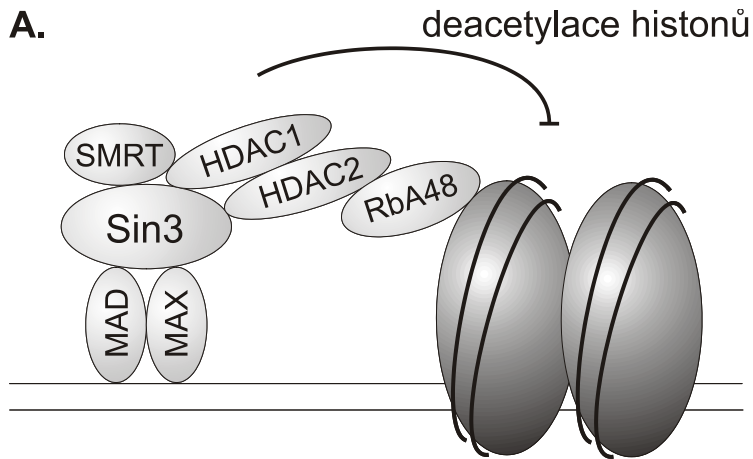
- **acetylace** histonů je spojena se vznikem tzv. otevřené struktury chromatinu a s **aktivací** transkripce
- **deacetylce** histonů spojena s uzavíráním struktury chromatinu a s **represí** transkripce
- HATs a HDACs jsou přiváděny k cílovým sekvencím prostřednictvím sekvencně specifických transkripčních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



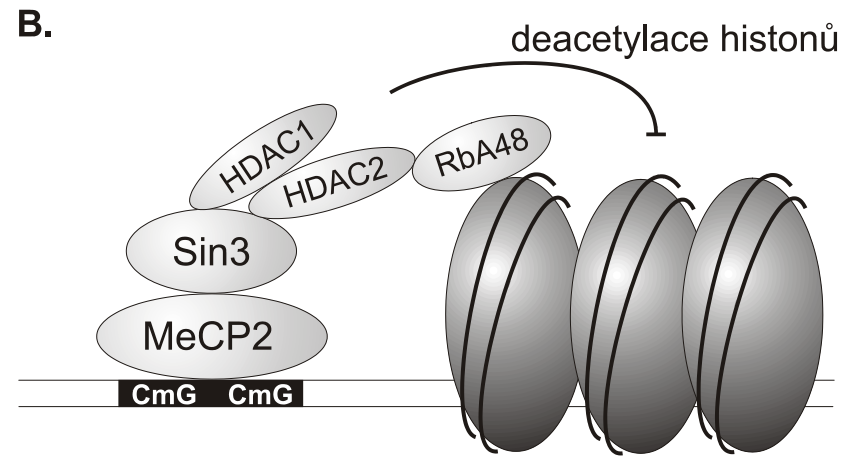
Metylace DNA a deacetylace histonů



- 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



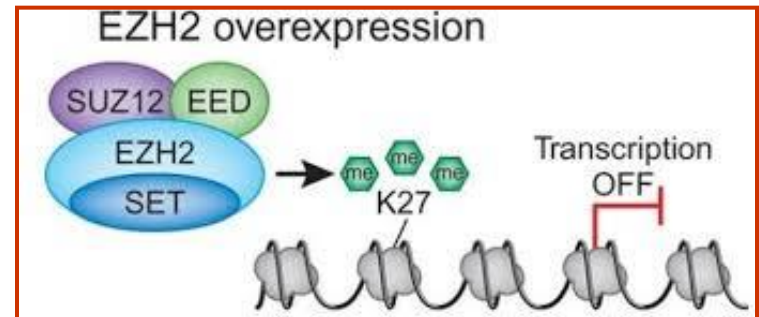
- metylovány mohou být lysiny a argininy; H2B, H3 (lys 4, 9, 27, 36) a H4 (lys 20)
- jaderné receptory aktivují transkripci za účasti koaktivátorů z rodiny proteinů p160: s nimi interaguje také metyltransferáza **CARM1** („coactivator-associated arginine methyltransferase 1“) - metyluje zbytky **argininu** na H3 a potencuje transaktivaci jadernými receptory
- příbuzná metyltransferáza **PRMT1** metyluje H4
- metylace **lysinu** může souviset s aktivací nebo represí transkripce – v závislosti na **pozici** metylovaného lysinu a na **stupni metylace**: např. trimetylace lysinu 4 na histonu H3 (**H3K4met3**) je navýšena na transkripčně **aktivních** promotorech, zatímco trimetylace **H3K9met3** a **H3K27met3** je na transkripčně **reprimovaných** promotorech
- **Suv39H1** metyluje lysin 9 histonu H3 – spojeno s **represí**

Metylace histonů: EZH2



EZH2 (enhancer of zeste homolog 2)

- histon–lysin–N–metyltransferáza
- účastní se metylace DNA a **represe transkripce**
- katalyzuje metylaci lysinu (**met3**) v pozici **K27** histonu **H3**
- je funkční, enzymatickou součástí komplexu **PRC2** (polycomb repressive complex 2), který je odpovědný za zdravý embryonální vývoj, tím, že epigeneticky ovlivňuje geny odpovědné za regulaci vývoje a diferenciaci



Metylace histonů: EZH2

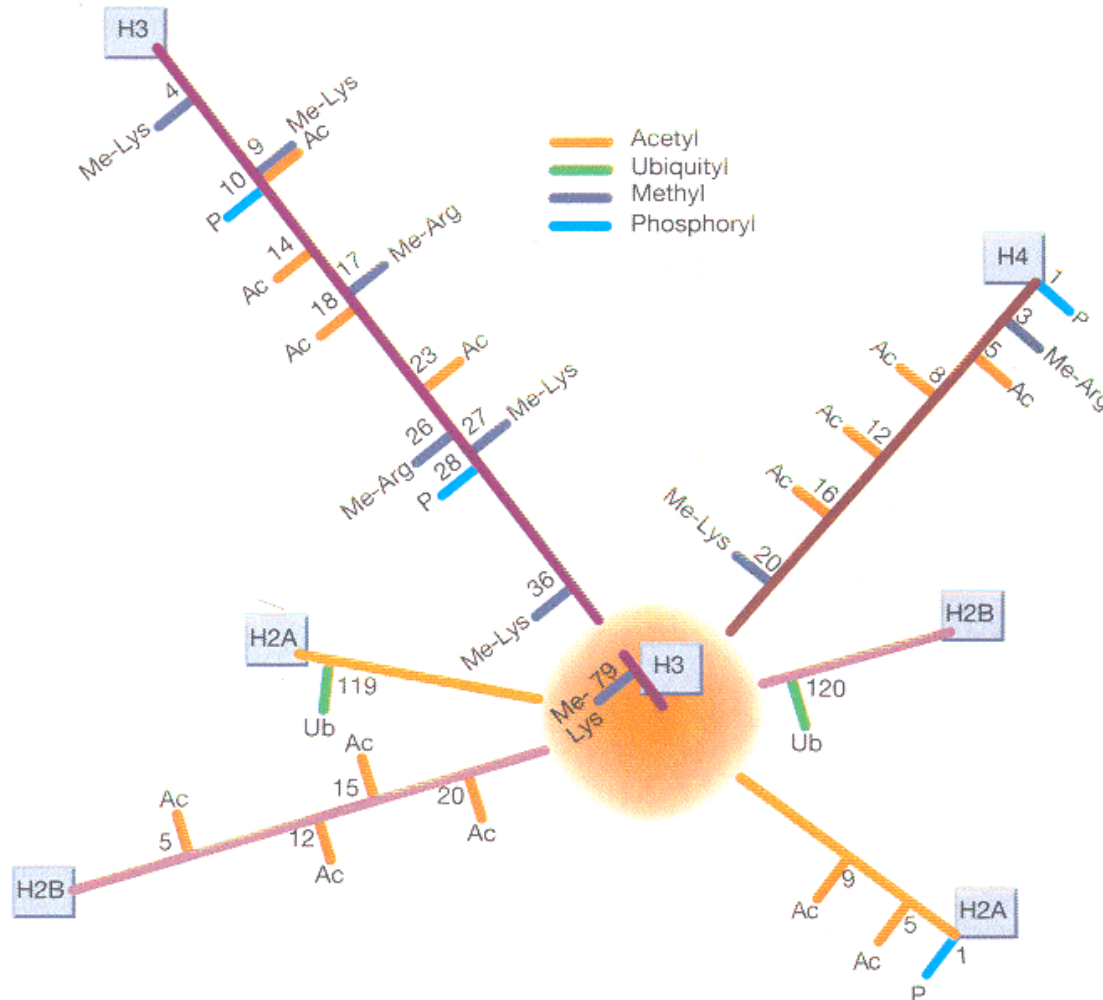
- **EZH2** je integrální součástí **PRC2** (polycombe repressive complex 2)
- PRC2 prostřednictvím EZH2 katalyzuje **H3K27met3**
- **PRC1** rozpoznává H3K27met3 a zprostředkuje ubikvitinaci **H2AK119Ub**, která pravděpodobně přivádí do oblasti **DNMTs** a vede k metylaci DNA a transkripčnímu umlčení

Ubikvitinace histonů



- **mono**ubikvitinace, a to na C-konci histonů: **lysin 119** histonu **H2A** a **lysin 123** histonu **H2B**
- spojeno s **transkripčně aktivním** nebo naopak **reprimovaným** (**H2A K119**) stavem chromatinu
- **poly**ubikvitinace histonů je také integrální součástí **oprav DNA**

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; H2A.1, H2A.2, H2A.X,...) ovlivňuje stav nukleozomů a tím transkripční aktivitu (a další aktivity) v oblasti, kde se takto modifikované nukleozomy nacházejí
- například **H3.3** a **H2A.Z** jsou preferenčně v promotorech **aktivních** a **reprimovaných** genů

4. Nekódující RNA (miRNAs)



- **miRNAs**: malé (~22 nt; 18-25 nt), nekódující RNA, které regulují genovou expresi **posttranskripčním umlčováním** cílových genů vazbou do 3' netranslatované oblasti cílových **mRNAs**
- miRNAs jsou exprimovány tkáňově specificky
- jedna miRNA může mít stovky cílových mRNAs

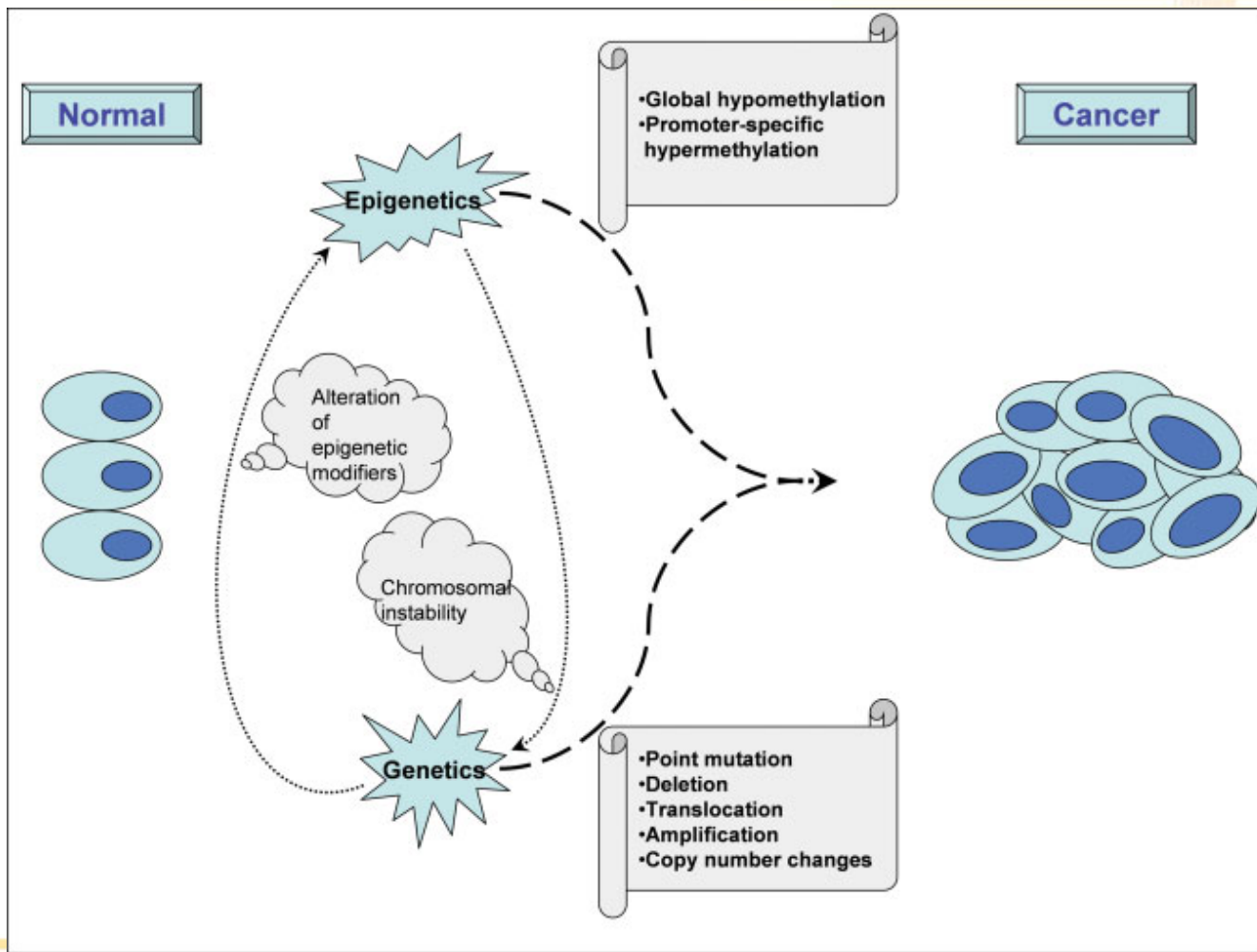
Epigenetické změny u nádorů



rozsáhlá proměna epigenomu u nádorových buněk:

- globální hypometylace DNA, hypermetylace specifických promotorů
- změněné expresní profily chromatin modifikujících faktorů
- mutace v genech, které kódují chromatin modifikující faktory, a v genech kódujících histonové varianty
- globální snížení exprese miRNA
- ...
- ... atd.

Na nádorové transformaci se podílejí jak genetické, tak epigenetické aberace



1. Metylace DNA a nádory



- původní funkce metylace DNA - ochrana genomu: metylace zabraňuje 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 aberací zaznamenanou u nádorů
u různých nádorů je obsah 5'-metylcytosinu snížen v průměru o 10%
- v nádorových buňkách dochází k rozsáhlým **demetylacím repetitivních sekvencí**; 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 **MASPIN** (nádory žaludku), **MAGE** („melanoma-associated antigen“; melanomy), **IGF2** (Wilmsovy nádory)
- reaktivace normálně umlčených genů (růst stimulujících, regulujících apoptózu,...)
- reaktivace **miRNAs** ukotvených v kódujících oblastech některých genů...

Hypometylace DNA u nádorů

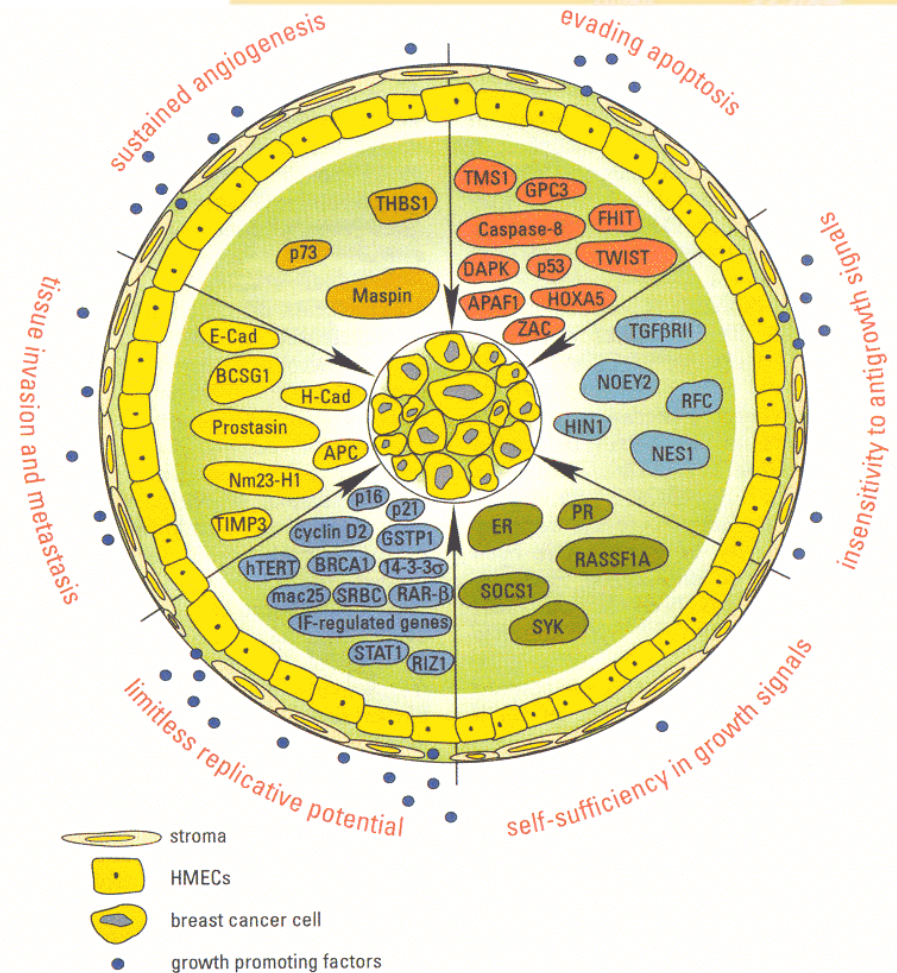


- například až u 20% pacientů s AML má heterozygotní bodové mutace v genu **DNMT3A** (měnící AA R882), které snižují **metyltransferázovou** aktivitu a způsobují lokální hypometylace
 - mutace R882 spojeny s horší prognózou pacientů s AML
- u asi 25% AML nalézány somatické mutace **demetyláz**, například **TET2** (metylcytozin dioxygenáza 2)
 - spojeno s horší prognózou

Hypermetylace DNA u nádorů



- CpG ostrůvky jsou obvykle v promotorových oblastech na 5'-konci genů...
- v nádorových buňkách hypermetylace v promotorech genů pro nádorové supresory, genů účastnících se mezibuněčných adhezí, oprav DNA, ...



Geny inaktivované během kancerogeneze metylací DNA

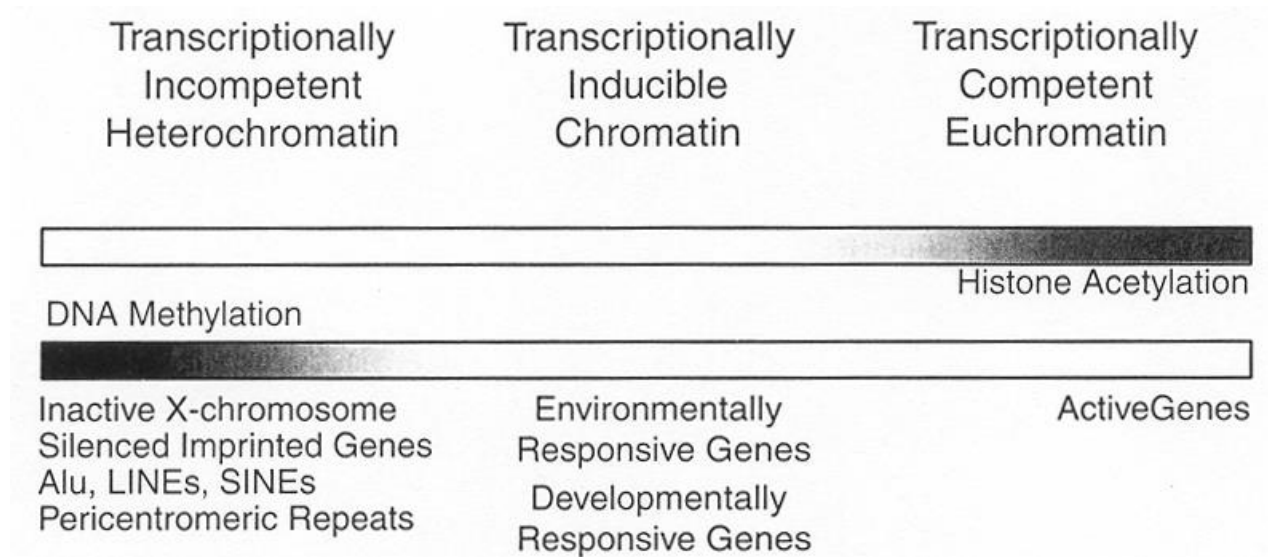


- geny účastnící se regulace buněčného cyklu:
RB, p16^{INK4A}, p15, p14^{ARF}, p73
- geny účastnící se oprav DNA:
MLH1, O⁶MGMT, GST π , BRCA1
- geny účastnící se apoptózy:
DAP-kináza, prokaspáza-8, TMS1
- invaze nádorů a angiogeneze:
E-kadherin, VHL, APC, LKB1, TIMP3, thrombospondin 1
- členové signálních drah:
ER, RAR β , androgen receptor, endothelin B receptor, RASSF1A

Hypermetylace 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**“



- souvislost s principem „**tak akorát**“ ...

Hypermetylace DNA u nádorů



- na rozdíl od mutací, hypermetylace 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 dědičným 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

➤ obecně jsou mutace v genech kódujících chromatin regulující faktory docela časté, ale mutace v každém jednom konkrétním genu spíše vzácné

Kovalentní modifikace histonů



IDH1 - izocitrát dehydrogenáza 1

- u mnoha různých nádorů, především glioblastomů a gliomů (včetně mutací *IDH2*) **mutace** pozměňující aktivní katalytické místo IDH1:
 - vedou ke změně v produkci metabolitů: přednostně vzniká 2-hydroxyglutarát namísto α -ketoglutarátu
 - to následně blokuje α -ketoglutarát–dependentní demetylázu a zvyšuje metylaci H3K9 a H3K27 (a také DNA metylaci) a blokuje buněčnou diferenciaci nádorových buněk

Kovalentní modifikace histonů



EZH2

- histon **metyltransferáza** odpovědná za trimetylaci lyzinu 27 histonu H3 (H3K27met3)
- zvýšená exprese stimuluje kancerogenezi *in vitro* i *in vivo*: detekována u melanomů, lymfomů, nádorů prostaty a prsu
- potenciální marker odlišující agresivní nádory prsu a prostaty od indolentních variant
- aberantní metylace H3K27 může být také důsledkem inaktivace **UTX**, specifické **H3K27 demetylázy**: somaticky mutována např. u mnohočetného myelomu (spojeno s horší prognózou), u dlaždicobuněčných karcinomů jícnu a dalších
- u AML mutace *EZH2* spojeny s vyšším rizikem progresu a recidivy

Kovalentní modifikace histonů



EZH2

- obecně funkce EZH2 (a funkční dopad a typ mutací EZH2) charakter protoonkogenu nebo nádorového supresoru: záleží na nádorově-buněčném kontextu
- EZH2 zvažována jako terapeutický cíl

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)** (AML) → **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

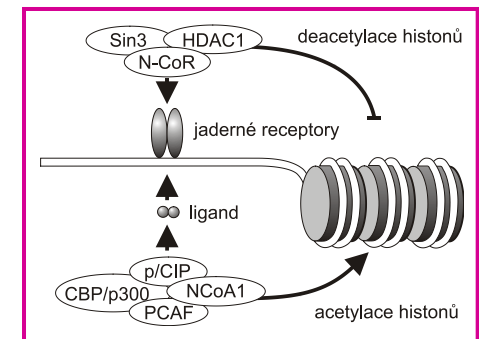
➤ paradigma PU.1-GATA1 (myeloidní vs. erytroidní)

Akutní promyelocytární leukémie - APL



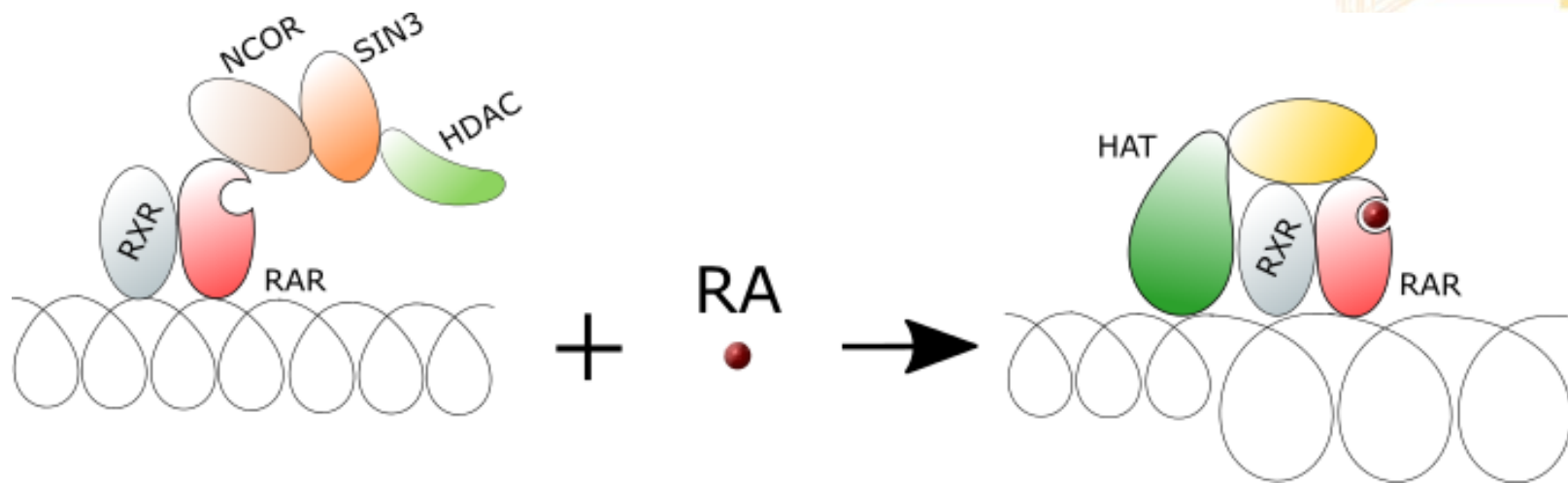
- jediný typ leukémie, který odpovídá na diferenciační terapii, a to ATRA
- všichni pacienti s APL mají translokaci v genu **RAR α** :

t(15;17) \Rightarrow	PML-RAR
t(11;17) \Rightarrow	PLZF-RAR
t(5;17) \Rightarrow	NPM-RAR
t(11;17) \Rightarrow	NuMA-RAR



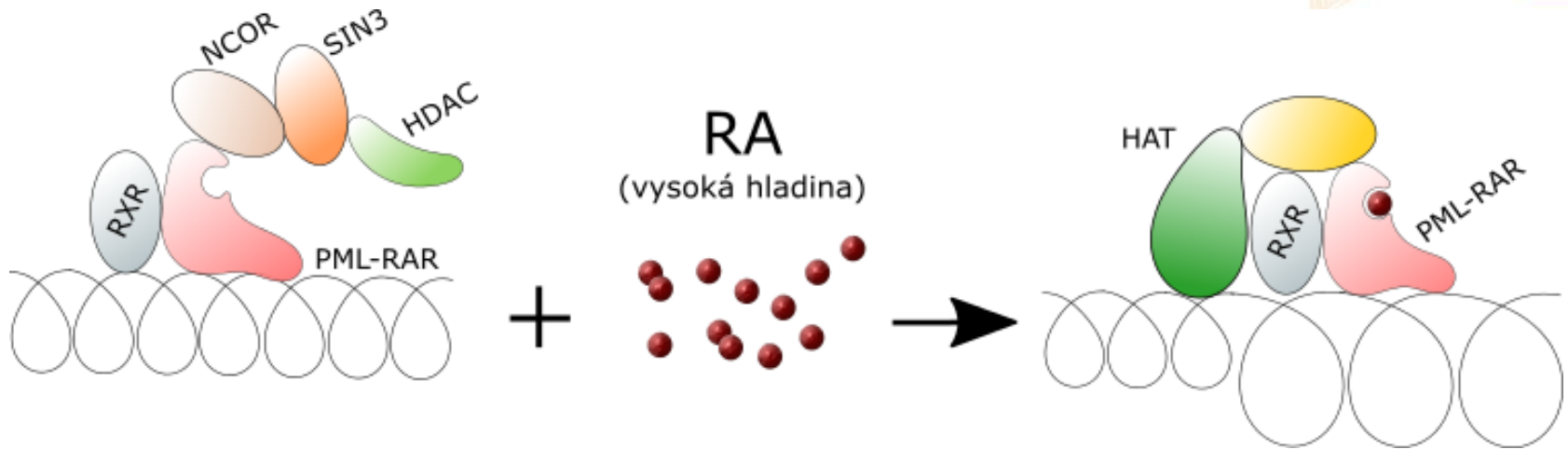
- všechny chiméry mají zachovanou tu část molekuly RAR α , která zajišťuje vazbu na DNA, vazbu ligandu, korepresoru, koaktivátoru
 \Leftrightarrow **vazba RA na chiméru ji neaktivuje!!**

APL: normální funkce RAR/RXR



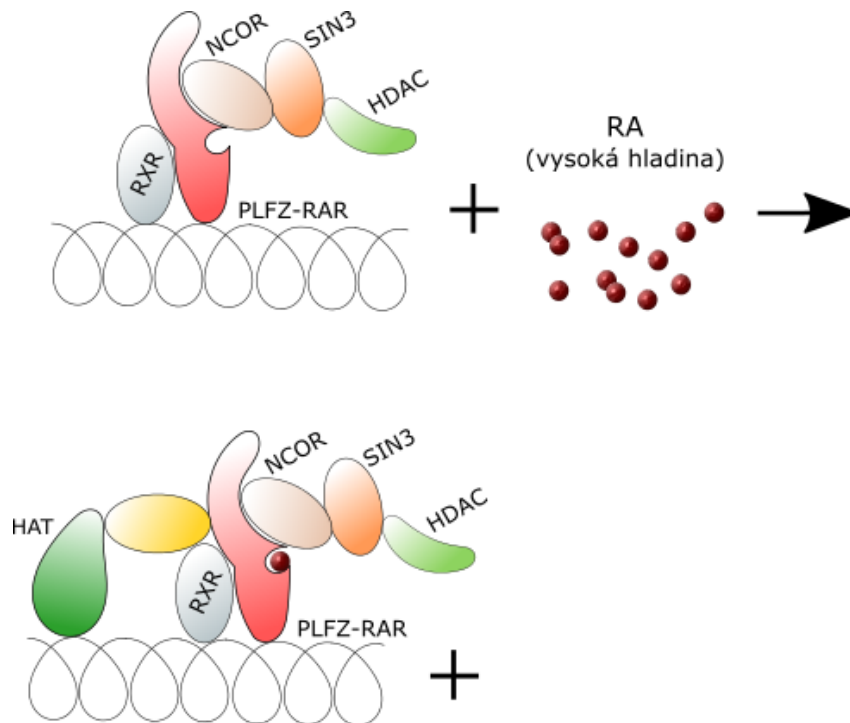
- represivní komplex heterodimeru RXR/**RAR α** aktivovaný nízkými dávkami RA

APL



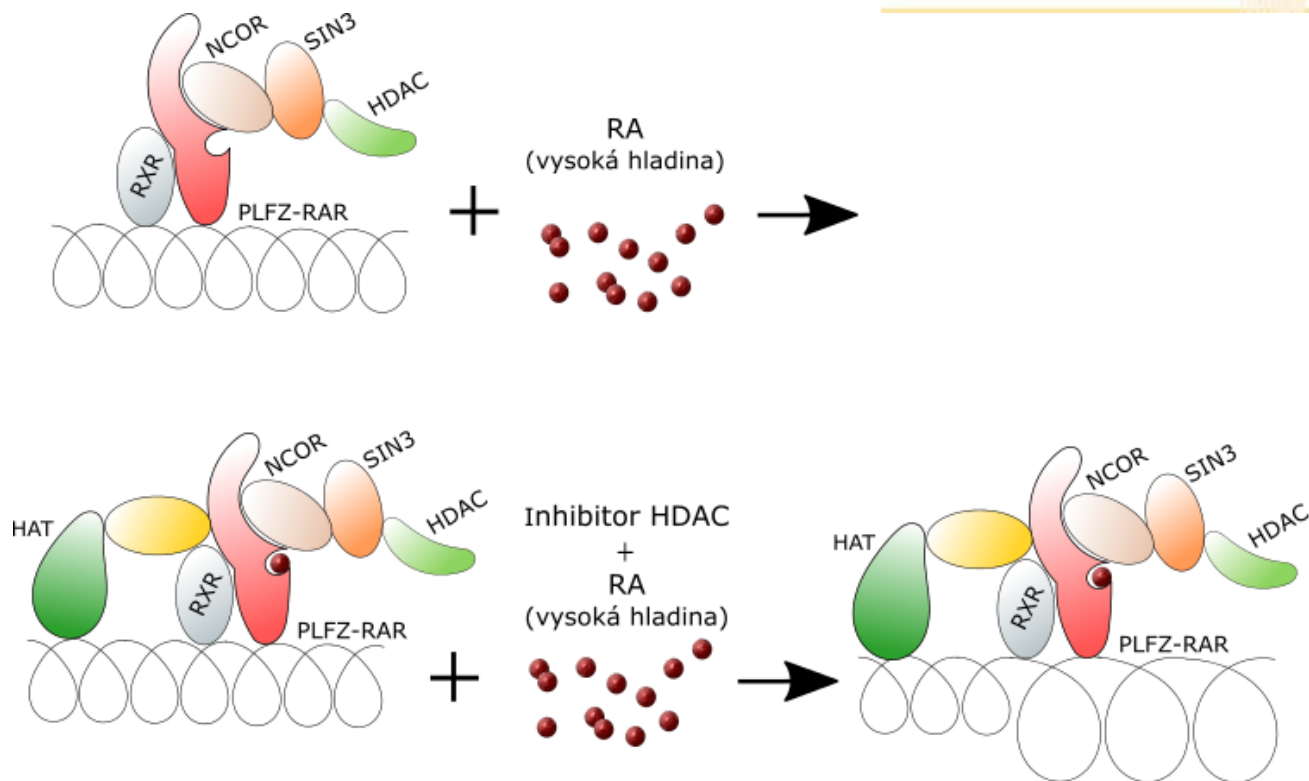
- represivní komplex RXR/**PML-RAR α** - t(15;17) - aktivovaný farmakologickými dávkami RA

APL



- represivní komplex heterodimeru RXR/**PLZF-RAR α** - t(11;17) - nelze aktivovat ani farmakologickými dávkami RA

APL



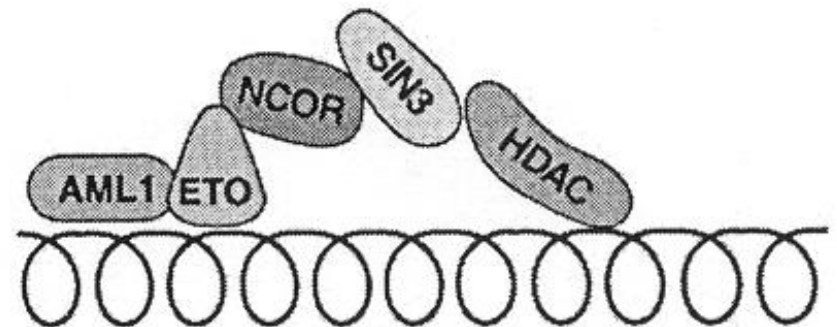
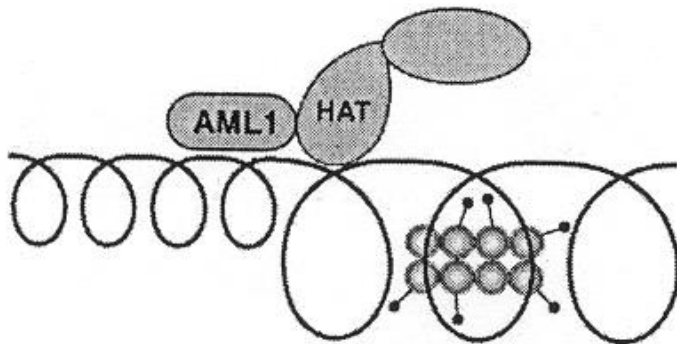
- represivní komplex heterodimeru RXR/**PLZF-RAR α** - t(11;17) - nelze aktivovat ani farmakologickými dávkami RA; lze jej aktivovat kombinací vysoké hladiny RA a inhibitorů histon deacetyláz

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



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**: **M**yeloid/**L**ymphoid Or **M**ixed-**L**ineage **L**eukemia

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
- mutace se vyskytují u 70% ALL a 35% AML kojenců
- 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)
- prognóza závisí na typu partnerského genu v translokaci
- mutace **MLL2** (12q13.12) a **MLL3** (7q36.1) se vyskytují u dětských meduloblastomů

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 (⇒ mimo jiné bude jejich biologický efekt tkáňově specifický)
- × HDACIs inhibují růst, indukují apoptózu a diferenciaci u různých nádorových linií bez souvislosti s histologickým typem
- experimentálně: zřetelný a výrazný **protinádorový** efekt a zároveň relativně nízká toxicita u netransformovaných buněk (v koncentracích, které vedou k akumulaci acetylovaných histonů)
 - × obecně ale **ne**platí, že podávání HDACI zvrátí maligní fenotyp!

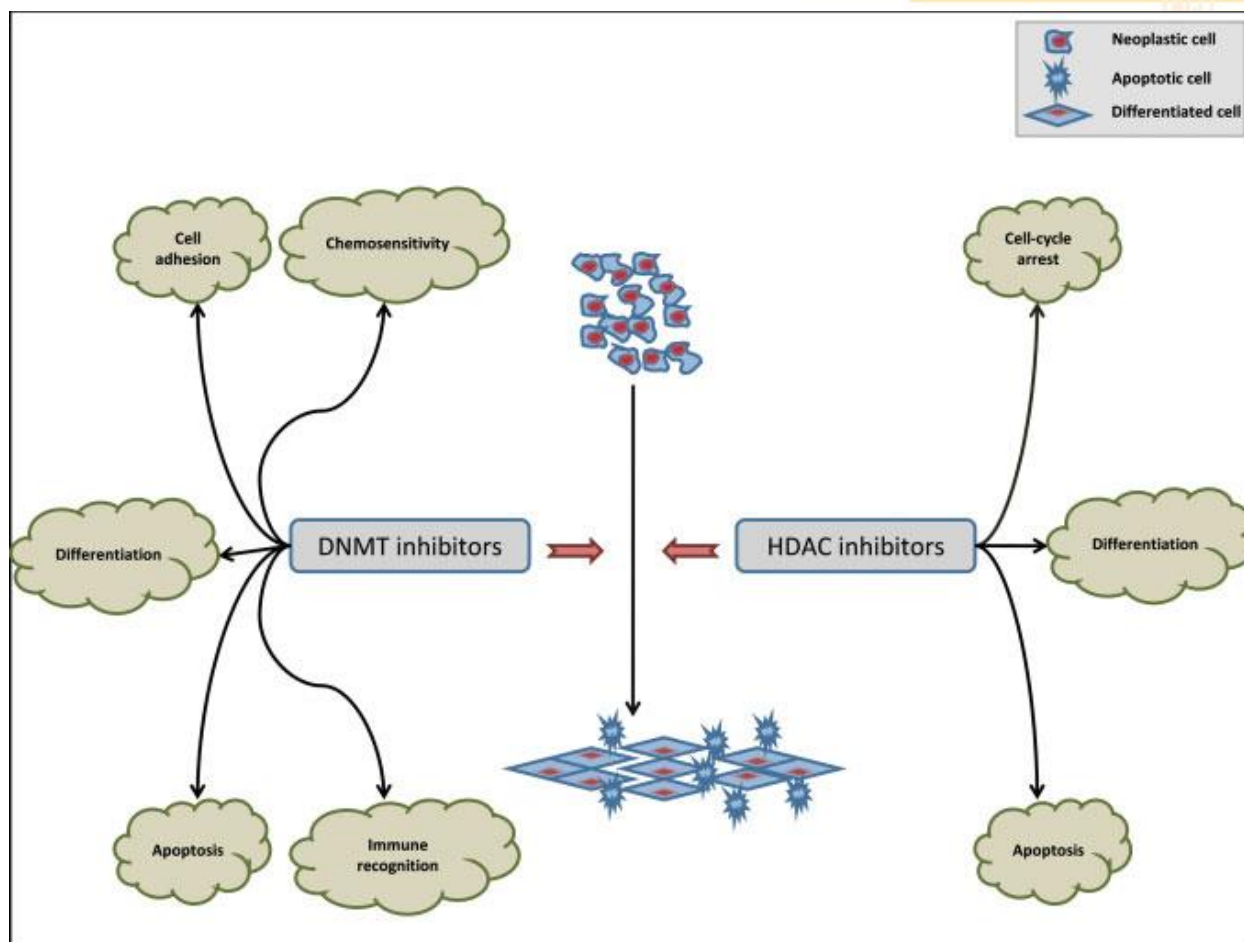
Inhibitory histon deacetyláz



- 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 inhibitory histon deacetyláz



Inhibitory histon deacetyláz



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

Inhibitory histon deacetyláz

➤ rizika a komplikace

- dopad na mnoho dalších proteinů v buňce
- velmi závislé na dávce
- ve vysokých dávkách silně toxické (při nízkých dávkách v monoterapii malá účinnost)

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** (5-aza-2'-deoxycytidine)

- potenciálně léčba MDS, AML, CML

3. Remodelace nukleozomů a inkorporace histonových variant



ATP-dependentní chromatin remodelující komplexy



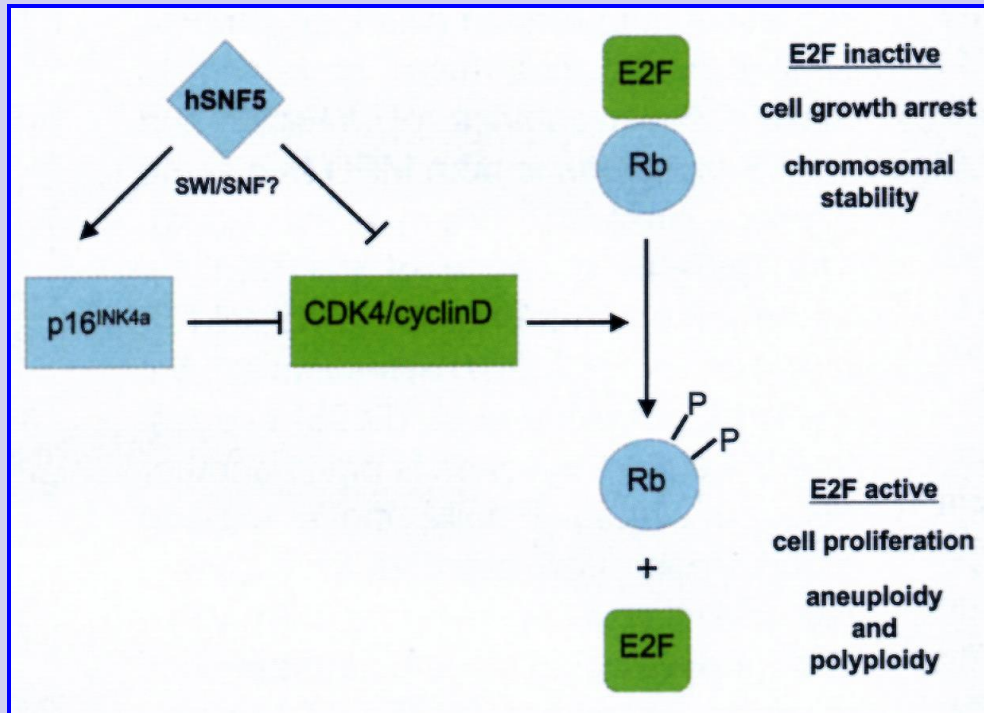
- některý ze členů komplexu **SWI/SNF** je mutován u více než 30% lidských nádorů

Maligní rhabdoidní nádory - MRT



- gen *hSNF5* (*INI1* nebo *BAF47*) (22q11.2) 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

Funkce hSNF5 II

- ztráta funkce SNF5 vede ke zvýšené expresi *EZH2* a tedy k následnému zvýšení H3K27me3 a následně ke zvýšené buněčné proliferaci

ATP-dependentní chromatin remodelující komplexy a nádory

- **BRG1** je součástí ATP-dependentního chromatin remodelujícího komplexu SWI/SNF*, který funguje mimo jiné v součinnosti s pRB; bez funkčního BRG1 není pRB schopen inhibovat růst; inaktivující mutace *BRG1* byly detekovány v některých nádorových buněčných liniích, které měly zároveň funkční pRB
- 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“) a další

ATP-dependentní chromatin remodelující komplexy a nádory

ATRX kóduje **SWI/SNF-like protein**

- odpovědný za depozici histonové varianty H3.3 do pericentrických a telomerických oblastí heterochromatinu
- loss-of-function mutace detekovány u neuroendokrinních tumorů pankreatu (PanNETs), dětských glioblastomů, dospělých low-grade gliomů a u dalších nádorů
- mutace *ATRX* vysoce korelují s aktivací ALT mechanismů prodlužování délky telomer a u gliomů se navzájem vylučují s aktivní telomerázou
- spojeny i s navýšenou genomickou nestabilitou

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

Histonové varianty a nádory



HIST1H3A (H3.1) a H3F3A (H3.3)

- bodové **mutace** v genech pro tyto histonové varianty se vyskytují u dětských glioblastomů, chondroblastomů a nediferencovaných sarkomů
- vedou k následným epigenetickým aberacím, které stimulují růst nádorů

4. Nekódující RNA (miRNAs)



- některé miRNAs v normálních buňkách negativně regulují expresi řady onkogenů a nádorových supresorů; proto je jejich deregulace 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“
- na rozdíl od jiných markerů jsou miRs v cévním systému (a podobně také ve formol-parafinových blocích) značně **stabilní**, proto jsou robustní a spolehlivé při analýze

miRNAs a nádory



dva typy změn v expresi miRNA u nádorů:

1. globální míra exprese miRNA v nádorech je buď snížena (nejčastěji) nebo zvýšena

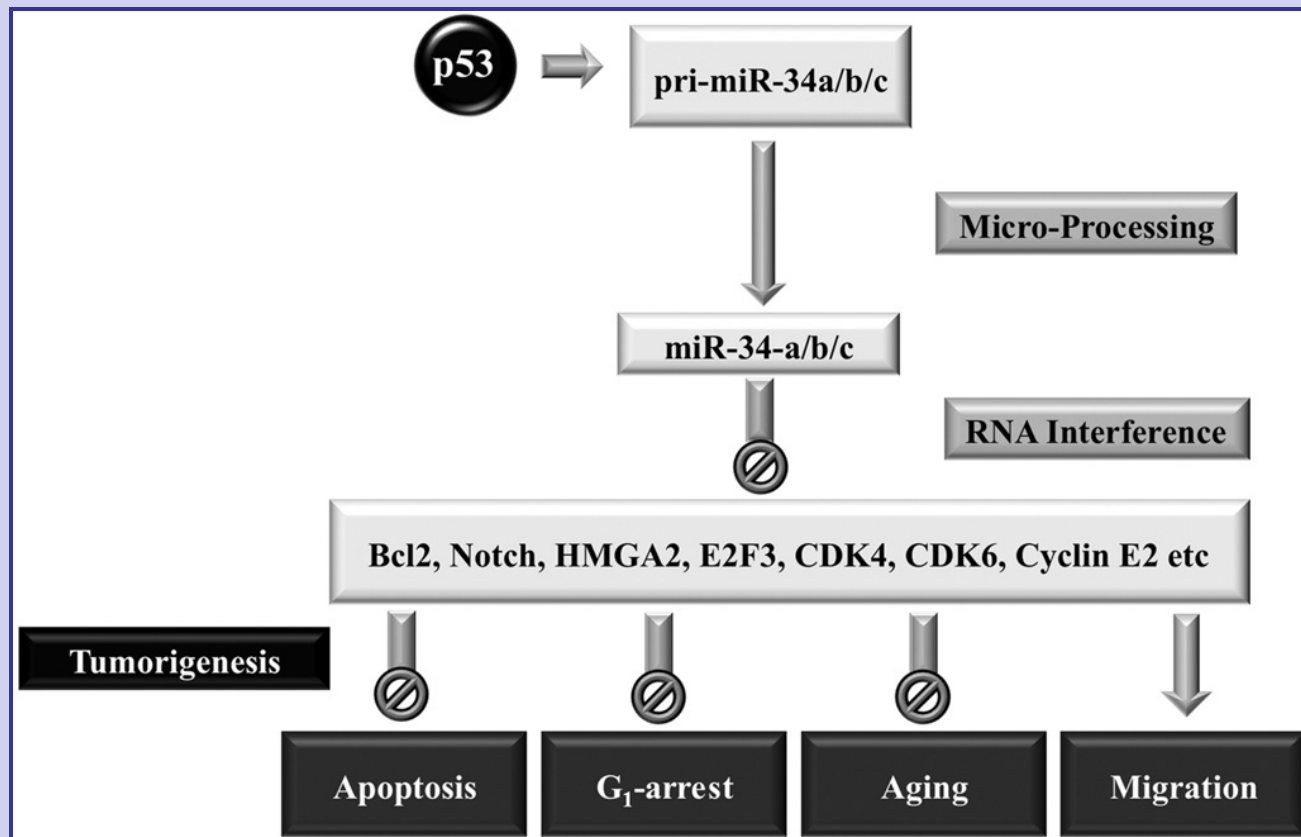
2. specifická:

- mezi suprimované miRNAs patří: **let-7**, k jejímž cílům patří *ras*, *c-myc*, *CDK6*, a **miR-24**, která 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

miRNAs a nádory

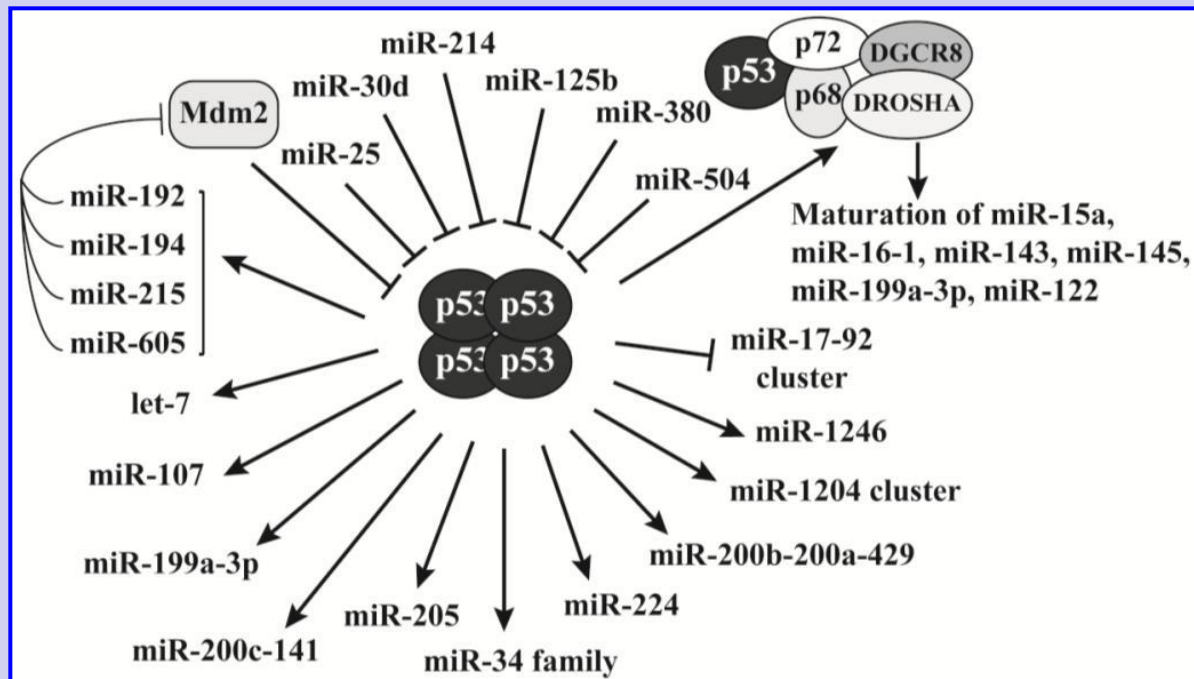
- některé transkripty ovlivněny více miRs: např. exprese **c-myc** ovlivněna miR-22, -24, -145, -17-19b a let-7; exprese **ras** regulována let-7, miR-372 a -373; exprese **BRCA1** regulována miR-24 a -545
 - některé onkoproteiny – transkripční faktory - regulují expresi mnoha miRs: např. **p53** aktivuje 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...

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

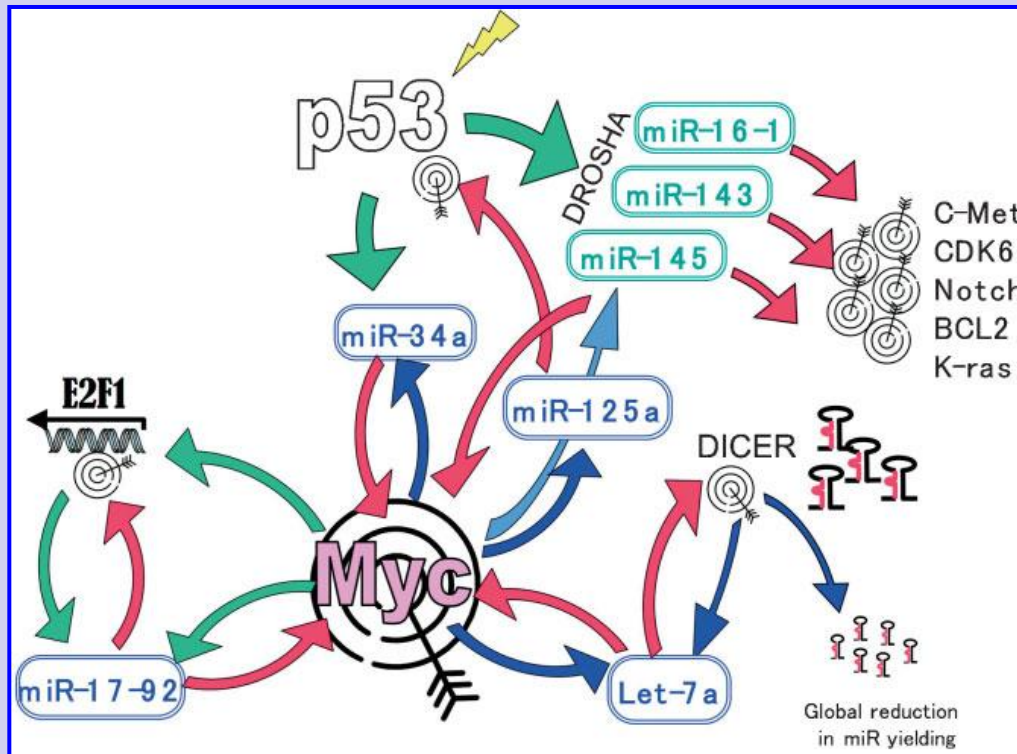


Integrální součástí funkční sítě p53 jsou miRNAs

- p53 reguluje expresi (**transkripci**) a **zrání** mnoha miRNAs
- exprese p53 je inhibována řadou miRNAs



Komplikovaná funkční síť vztahů mezi miRNAs a některými onkoproteiny

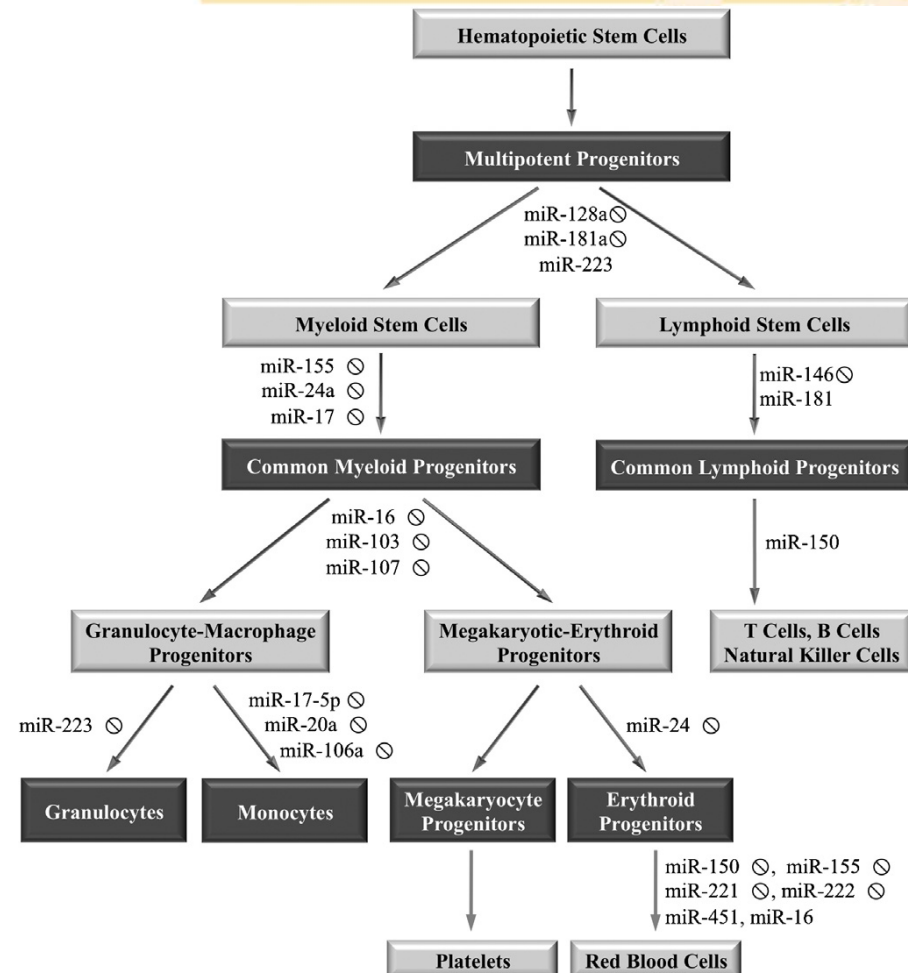


např. **Myc** indukuje expresi miRs v clusteru miR-17-92, ale nejméně dvě miRs z tohoto polycistronu (17-5b a 20a) suprimují expresi *myc*; zároveň c-Myc zvyšuje svou vlastní expresi represí miR-34a a let-7; avšak simultánní represí miR125b c-Myc upreguluje p53, která následně zvyšuje expresi inhibitorů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

miRNAs a leukémie



- jednotlivé kroky normální hematopoézy jsou aktivovány některými miRNAs a inhibovány jinými miRNAs (označeno ∅)
- deregulace kterékoliv této miRNA může pravděpodobně vést k vývoji nádoru



Klasifikace protoonkogenů

- I. růstové faktory
- II. receptory růstových faktorů
- III. Ras-proteiny
- IV. nereceptorové tyrozin-proteinkinázy
- V. transkripční faktory
- VI. remodelace chromatinu, miRNAs,... → epigenetika

toto rozdělení souvisí se strukturou signální dráhy:

- 1. vazba růstového faktoru na receptor
- 2. aktivace receptorové proteinkinázy
- 3. přenos signálu do jádra kaskádou proteinkináz
- 4. aktivace transkripčního faktoru
- 5. spoluúčast dalších faktorů...

Potenciální praktické využití miRNAs



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



Stochastický epigenetický model vývoje nádorů

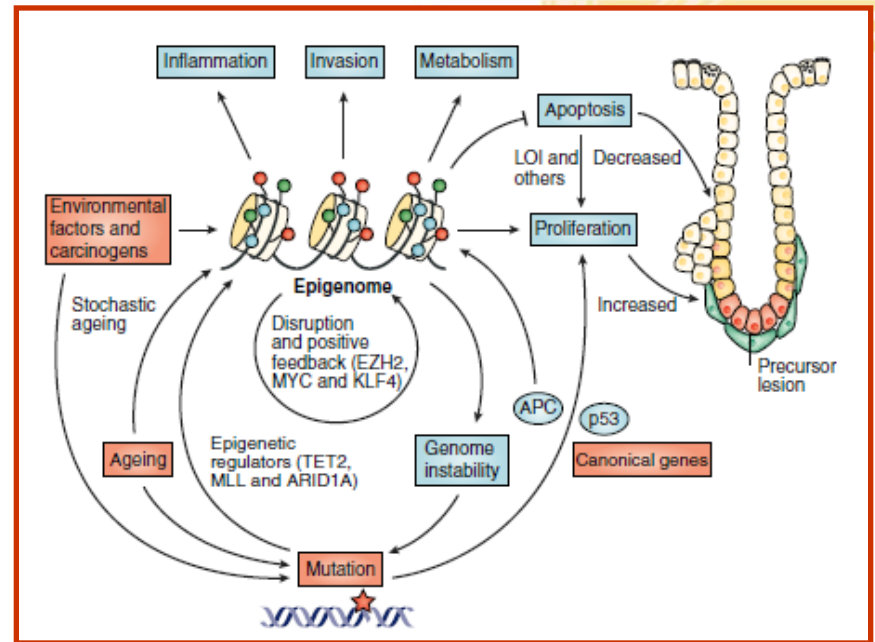


- na počátku vývoje nádoru stojí **epigenetické** změny, především změny **imprintingu** – **metylace DNA** spojené s **kovalentními modifikacemi histonů**
- určitá míra spontánní **stochastické heterogenity epigenomu** je **přirozená** a vlastní všem, tedy i zdravým buňkám a je pravděpodobně zdrojem adaptability a evoluce
- k výraznému **navýšení heterogenity epigenomu** může docházet v důsledku **stresu**, například opakovanými cykly poranění a hojení, tedy vlivem a působením mikroprostředí nebo i širšího okolí nádoru

Model spolupráce epigenetických modifikací a mutací při vývoji typických znaků nádorů



- epigenom funguje na **křížovatce prostředí – genetických mutací – růstu nádoru** ⇒ faktory prostředí (karcinogeny, dieta, zranění, zánět,...) způsobují epigenetické přeprogramování
- důsledkem navýšených epigenetických změn může být **variabilita genové exprese**, včetně změn v expresi genů, jejichž produkty se podílejí na regulaci klíčových buněčných vlastností a funkcí, které si spojujeme s vývojem nádorů...



Epigenetic dysregulation as a hallmark of cancer

