

Molekulární a buněčná biologie nádorů

Prof. RNDr. Jana Šmardová, CSc.

Ústav experimentální biologie
Přírodovědecká fakulta
MU Brno

Mgr. Jana Koptíková, Ph.D.

Institut biostatistiky a analýz
LF MU Brno



2020

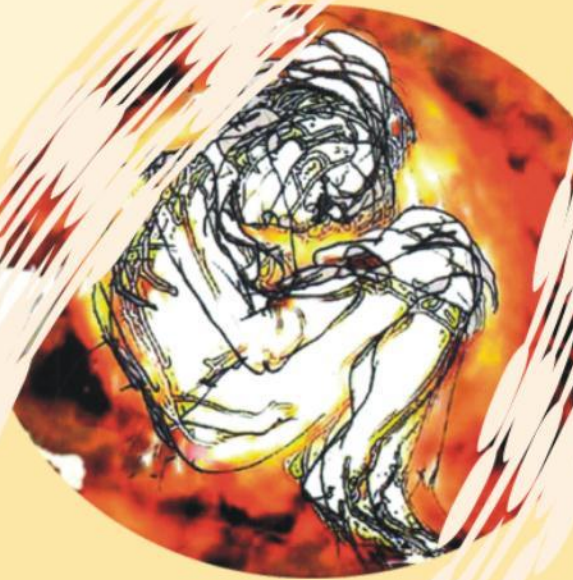
Molekulární a buněčná biologie nádorů

5. Individuální dispozice k nádorům II

Bi9910

pondělí 16.00 – 18.00

A11 – č. 305



2020

Kolorektální nádory - CRC



Sporadické:

Dědičné:

- **Nepolypózní**

Lynchův syndrom

- **Polypózní**

Familiální adenomatózní polypóza coli FAP

Peutz-Jeghersův syndrom

Familiální juvenilní polypóza

Hyperplastická polypóza

Kolorektální nádory



- Pouze asi u 5-10 % pacientů s kolorektálním nádorem je zřejmá vrozená genetická příčina dispozice k tomuto nádoru, ale z epidemiologických dat se odhaduje, že vrozené dispozice odpovídají možná za 15 a více % všech kolorektálních nádorů („clusterování“ CRC nádorů v rodinách).
- Zřejmý je vliv vnějších faktorů, především **diety** (živočišné tuky, červené maso, nedostatek vlákniny).

Historický příklad: V Japonsku bývala nízká incidence nádorů střeva a vysoká incidence nádorů žaludku. Emigranti do USA vykazovali výrazné zvyšování incidence nádorů střeva. V současnosti postupné zvyšování incidence nádorů střeva s tím jak postupuje „westernizace“ Japonska.

Phakomatosy

„phakos“ (řec.) - mateřské znaménko

1932 - takto označena kategorie syndromů, které se vyznačují velkým množstvím benigních lézí, které tak představují znamení, předzvěst možného vývoje nádoru

- původně zařazeny: **neurofibromatóza, syndrom von Hippel-Lindau**

- dnes asi 10 onemocnění: **FAP, juvenilní polypóza, Peutz-Jeghersův syndrom, Gorlinův syndrom, Cowdenův syndrom, syndrom dysplastických névů,...**

Familiální adenomatózní polypóza - FAP



- autozomálně dominantní dědičné onemocnění
- U pacientů s FAP se vyvíjejí stovky až tisíce benigních kolorektálních nádorů, z nichž některé progredují do karcinomů, nejčastěji během druhé a třetí dekády života. Průměrný věk detekce nádoru u FAP pacientů je 40 let.



Polypy, které se objevují u pacientů s FAP, jsou totožné s polypy sporadickými a také nemají větší riziko maligní progrese než sporadické polypy. Ale jejich velký počet „zajišťuje“, že některé se s jistotou v maligní vyvinou.

Familiální adenomatózní polypóza

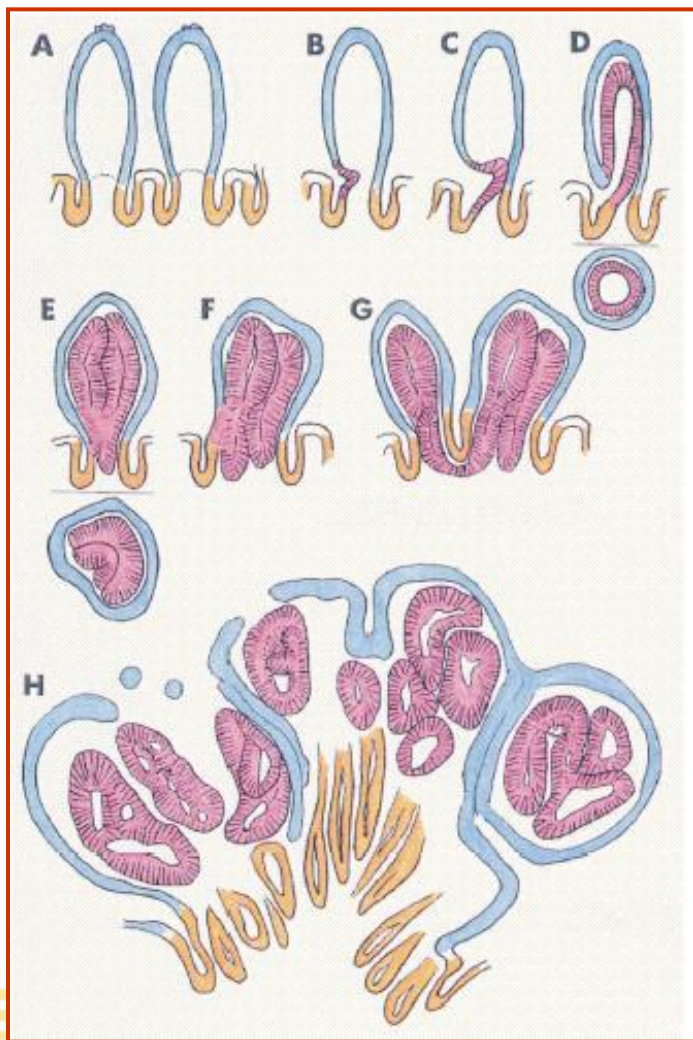


- zvýšené riziko vývoje thyroidních nádorů, nádorů tenkého střeva, žaludku a mozku
- často i mimostřevní projevy, včetně poškození sítnice, osteomy, desmoidy kůže,...

Mezi pacienty s FAP je pozorována velká variabilita, byly popsány varianty FAP:

- **Gardnerův syndrom** - charakteristické jsou nádory měkkých tkání, osteomy, abnormality zubů, ...
- Některé formy FAP s nižším počtem střevních polypů (10 až 100)
- **Turcotův syndrom** - typická je kombinace nádorů nervového systému a nádorů střeva (ne všechny případy Turcotova syndromu jsou „FAP“ - nesouvisí s mutacemi APC)

Tvorba adenomatózních polypů u FAP



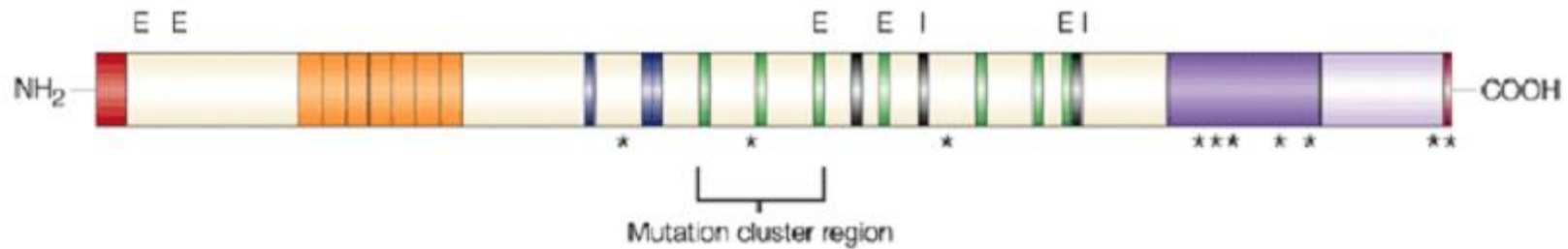
- A. Normální střevní epitel:
zárodečné buňky krypt,
diferencované buňky klků
- B. - C. vývoj polypu:
adenomatózní tkáň
- D. - F. mikroadenomy









Familiální adenomatózní polypóza



- FAP je spojena s vrozenými mutacemi genu **APC**.
- Ten je lokalizován v oblasti **5q21**.
- Během kancerogeneze musí být inaktivovány obě kopie genu *APC* (\Leftrightarrow častý „LOH“ 5q).
- Somatické mutace *APC* také hrají klíčovou úlohu při vývoji sporadických kolorektálních karcinomů, jsou detekovány alespoň u 80% všech CRC.
- Vysoký podíl mutací, které vedou ke zkráceným proteinům.
- Relativní vztah mezi typem mutace a průběhem onemocnění.

Struktura proteinu APC

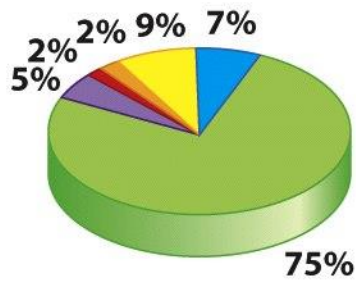


	Oligomerization		DLG/PTP-BL binding		β-catenin binding (15-amino-acid repeat)
	Armadillo repeat	E	Nuclear export signal		β-catenin downregulation (20-amino-acid repeat)
	Microtubule binding	I	Nuclear import signal		SAMP (axin/conductin binding)
	EB1/RP1 binding	*	CDK consensus phosphorylation site (p34 ^{cdc2} binding?)		

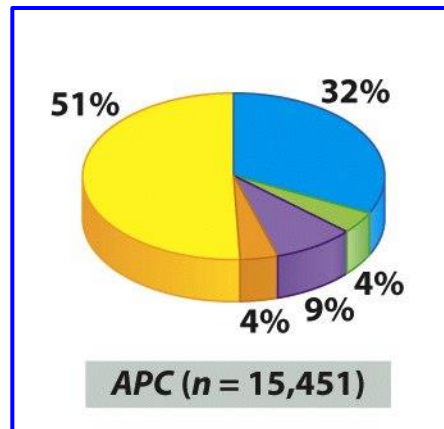
Mutace APC



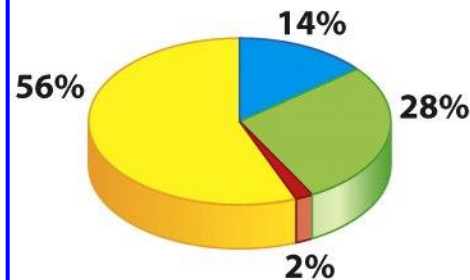
- Většina mutací APC vede ke zkráceným proteinům, které postrádají různý počet sekvencí nutných k regulaci β -kateninu.
- Vrozené mutace se nacházejí v 5' polovině genu *APC*, somatické mutace potom především mezi kodóny 1286 a 1513.



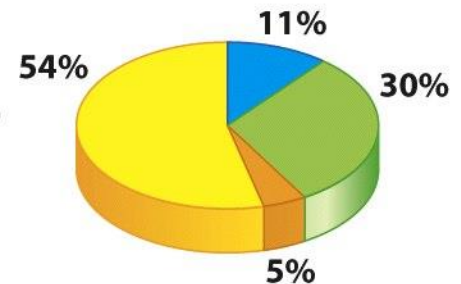
p53 (n = 15,122)



APC (n = 15,451)



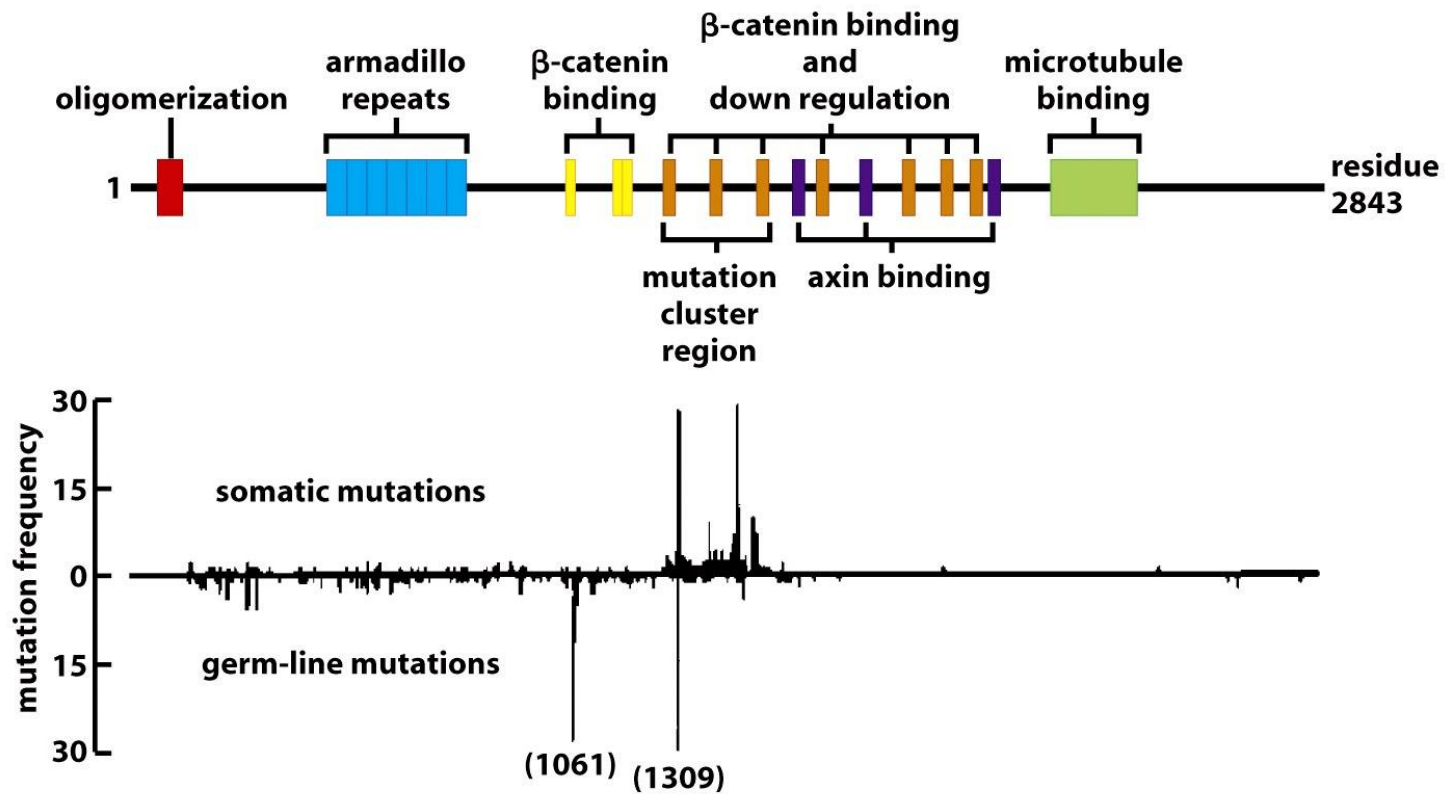
ATM (n = 617)



BRCA1 (n = 3,703)



Struktura APC a mutační spektrum

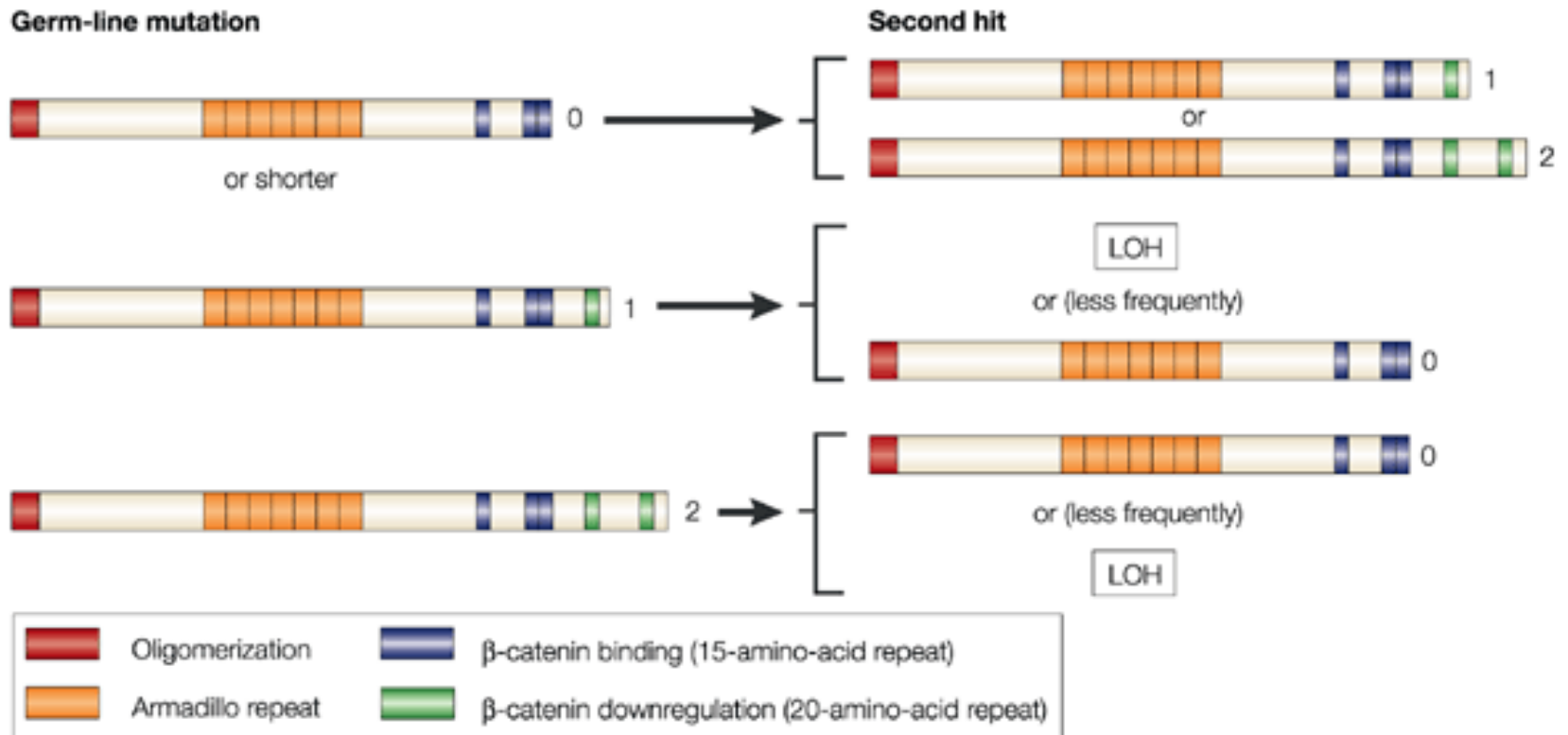


Mutace APC



- **Pozice a typ druhé mutace u FAP závisí na místě první mutace!**
Specifické genotypy jsou selektovány během časně fáze kancerogeneze CRC tak, aby zbytková hladina β -kateninu byla „optimální“, nikoli maximální (apoptóza).
(princip „**tak akorát**“)
⇒ Alespoň jedna mutace zachovává ve výsledné molekule alespoň jednu (20 AA) sekvenci nutnou k regulaci β -kateninu.

Závislost vrozených a somatických mutací APC



Nature Reviews | Cancer

Dvojitá úloha proteinu APC v buňce: Dvojitá úloha APC při vývoji CRC

APC se zřejmě uplatňuje jak při iniciaci vývoje nádoru (v důsledku selektivní výhody získané aktivací Wnt-1/ β -katenin dráhy), tak také v pozdějších fázích vývoje nádoru tím, že je příčinou chromozomální nestability.

APC je „caretaker“ i „gatekeeper“.

Další stadia vývoje kolorektálního karcinomu



Kolorektální karcinomy představují výborný **model pro studium kancerogeneze**:

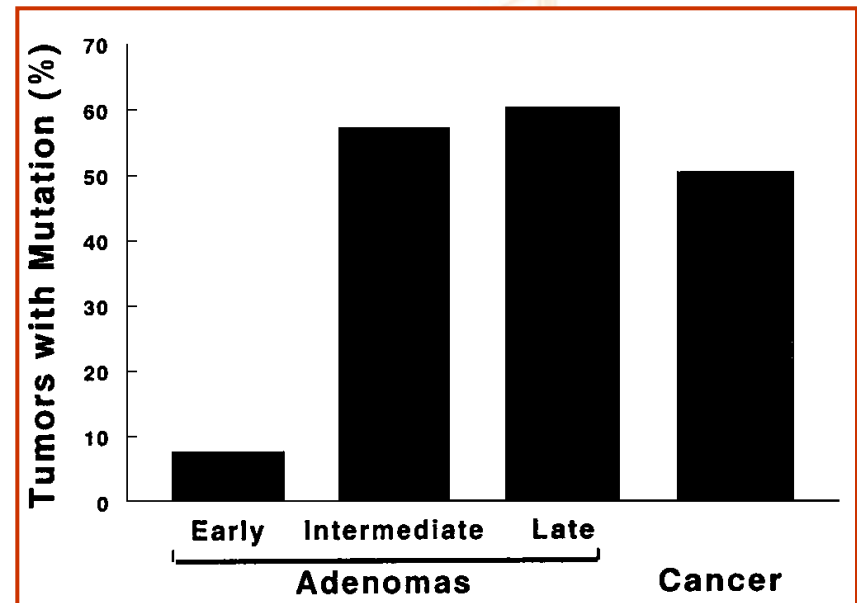
- relativně „standardní“ průběh od malých adenomů (do 1 cm), přes středně pokročilé (více než 1 cm bez známek transformace) a velké adenomy až po plně rozvinutý maligní CRC
- souvislost mezi „anatomii“, morfologií jednotlivých stadií a molekulárními změnami, které se odehrály
- model kooperace onkogenů a nádorových supresorů během kancerogeneze

Další stadia vývoje kolorektálního karcinomu - aktivace *K-ras*



- Specifické bodové mutace protoonkogenu *K-ras* nebo *N-ras* jsou detekovány alespoň u 50% kolorektálních adenomů větších než 1 cm a asi u 50% karcinomů.
- Mutace *ras* jsou jen vzácně (do 10%) detekovány u adenomů menších než 1cm.

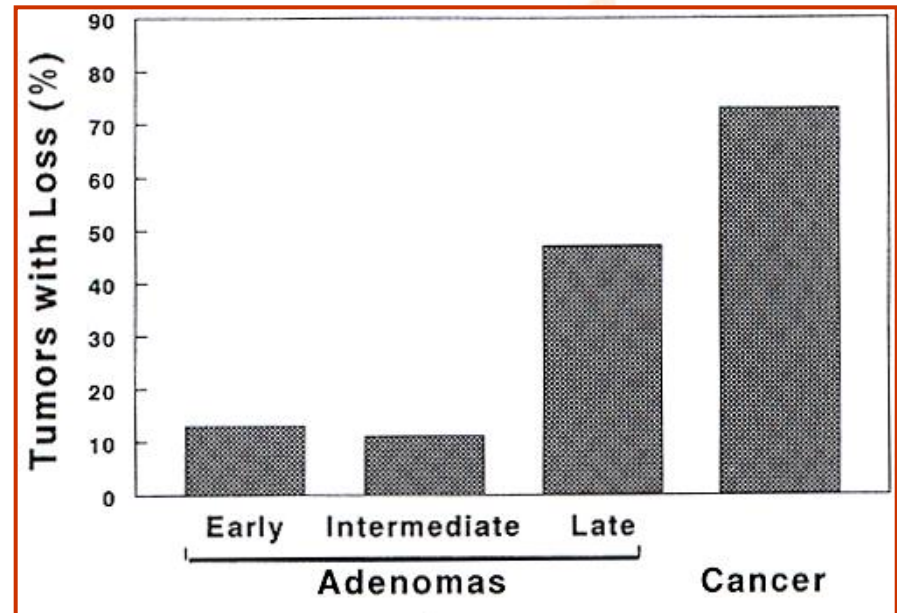
⇒ mutace *ras* se typicky objevují při progresi adenomů



Další stadia vývoje kolorektálního karcinomu - „LOH“ 18q



- Delece oblasti 18q detekovány u 50% velkých adenomů a 70% karcinomů.
- Na chromosomu 18q detekován gen pro **SMAD4**, někdy označovaný jako **DPC4** („deleted in pancreatic cancer“).
- SMAD4 je součástí signální dráhy TGF- β .

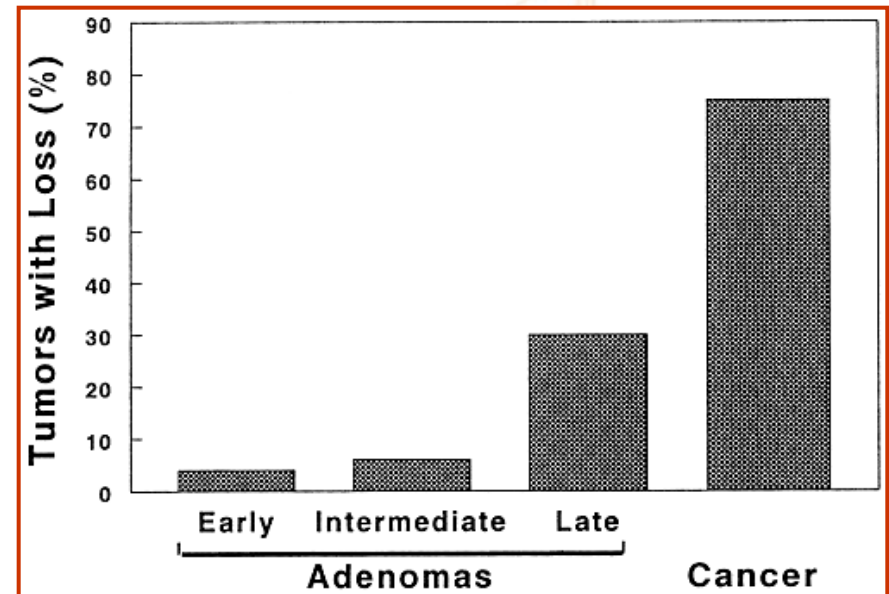


Další stadia vývoje kolorektálního karcinomu - inaktivace p53

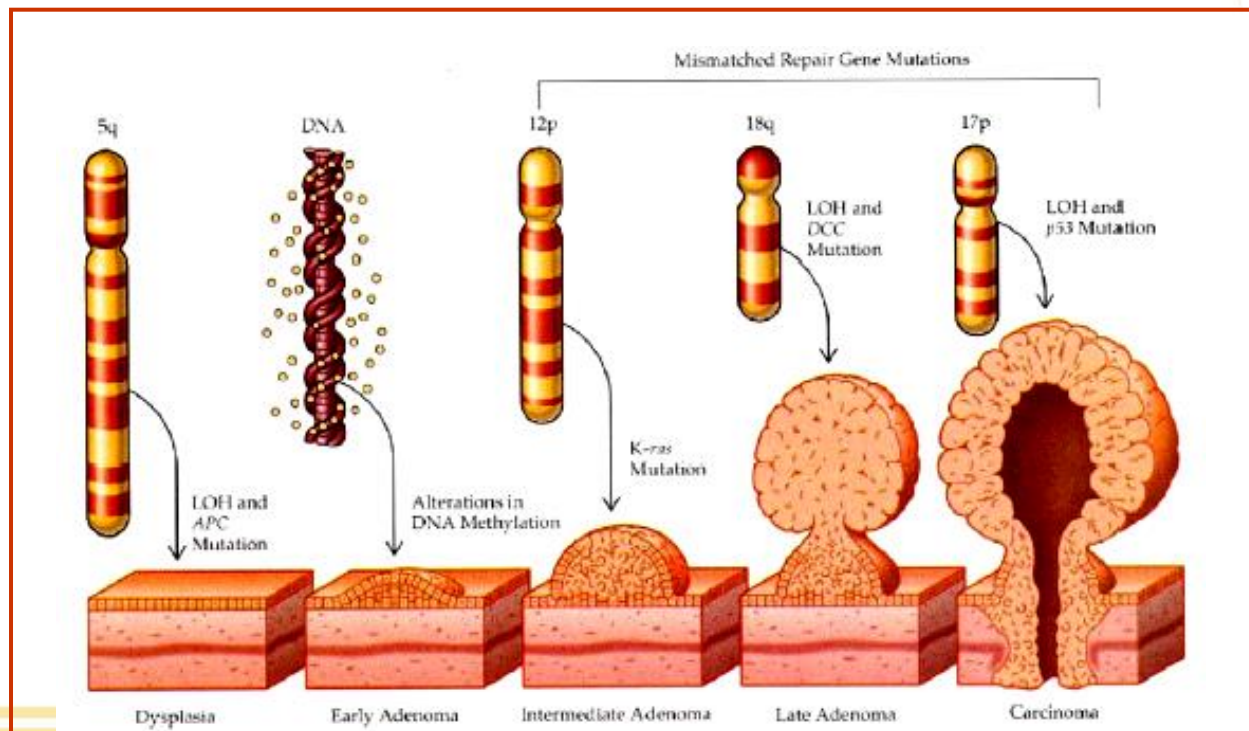
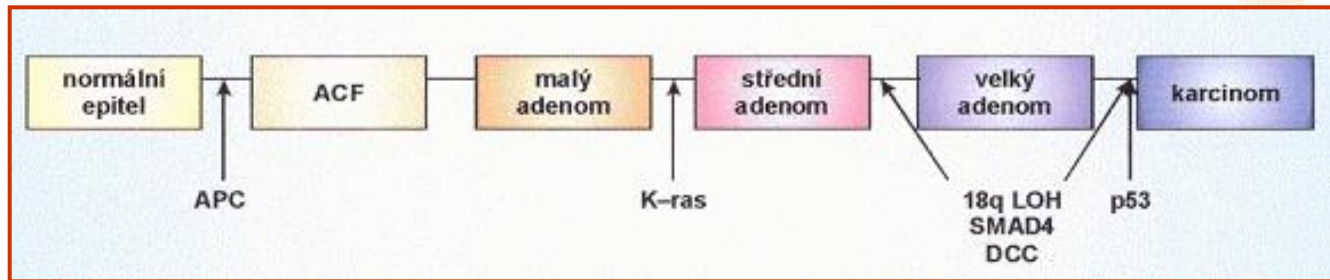


- Ztráta **17p** je detekována u 75% kolorektálních karcinomů.
- Ztráta 17p je jen vzácně detekována u kolorektálních adenomů.

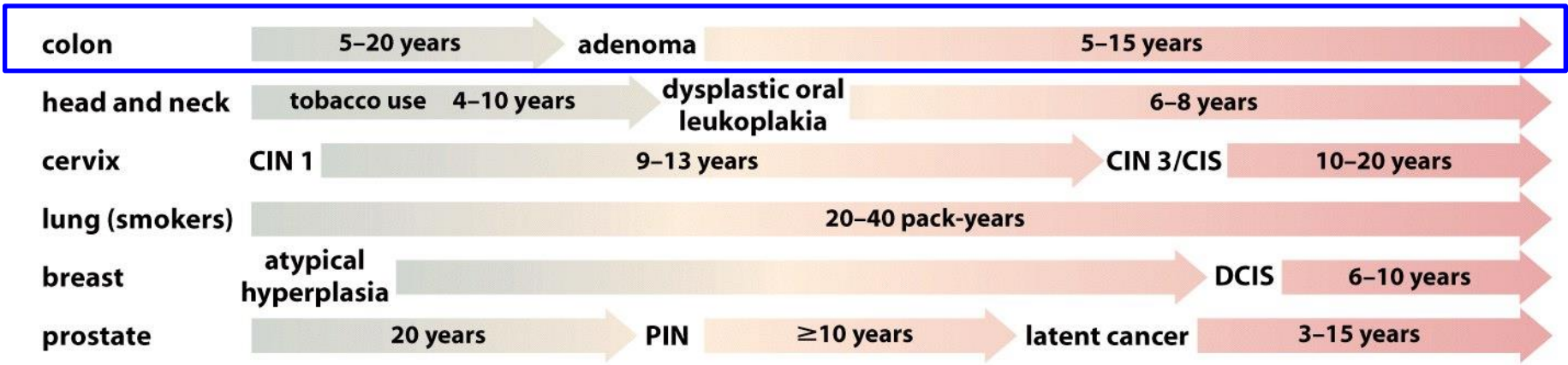
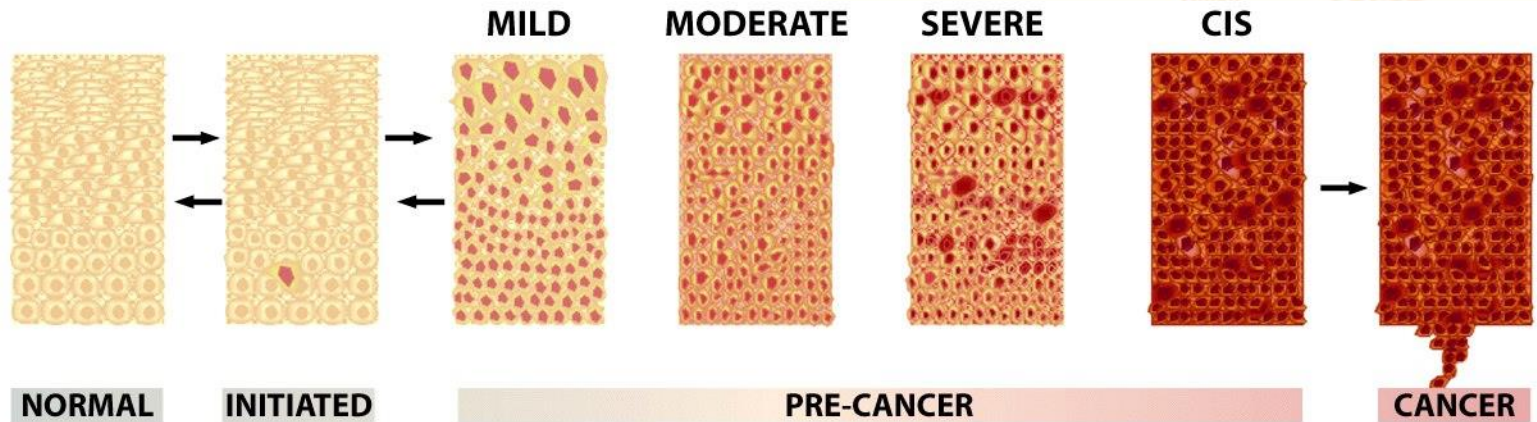
⇒ Inaktivace nádorového supresoru p53 je typicky pozdní událost během vývoje kolorektálních karcinomů.



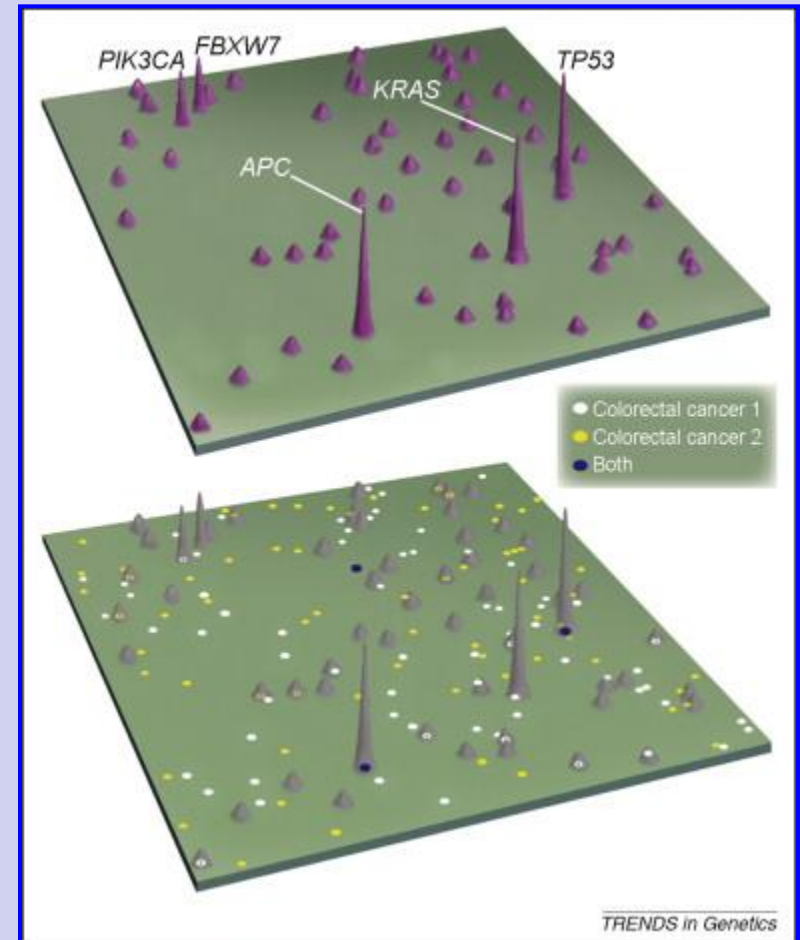
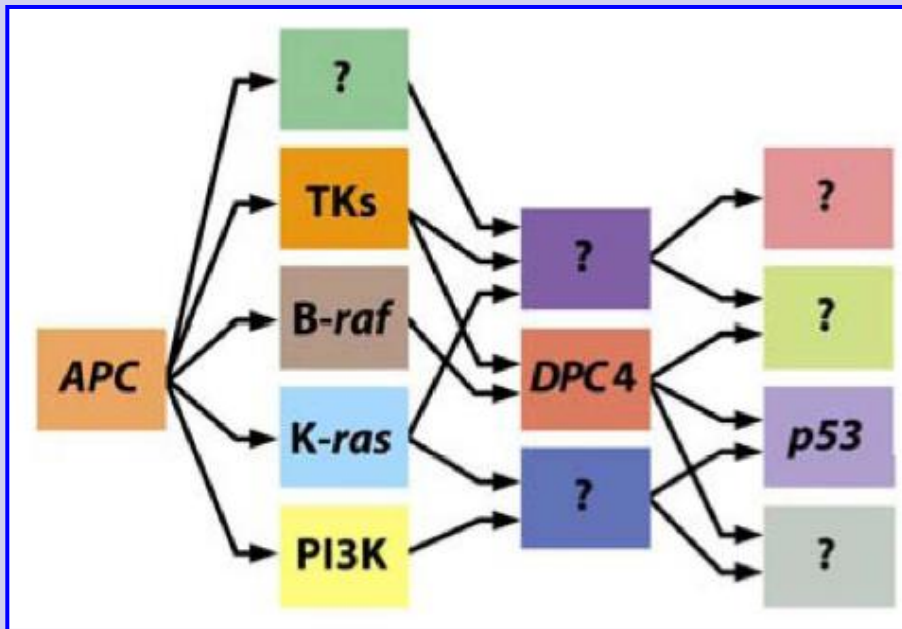
Genetický model kancerogeneze CRC



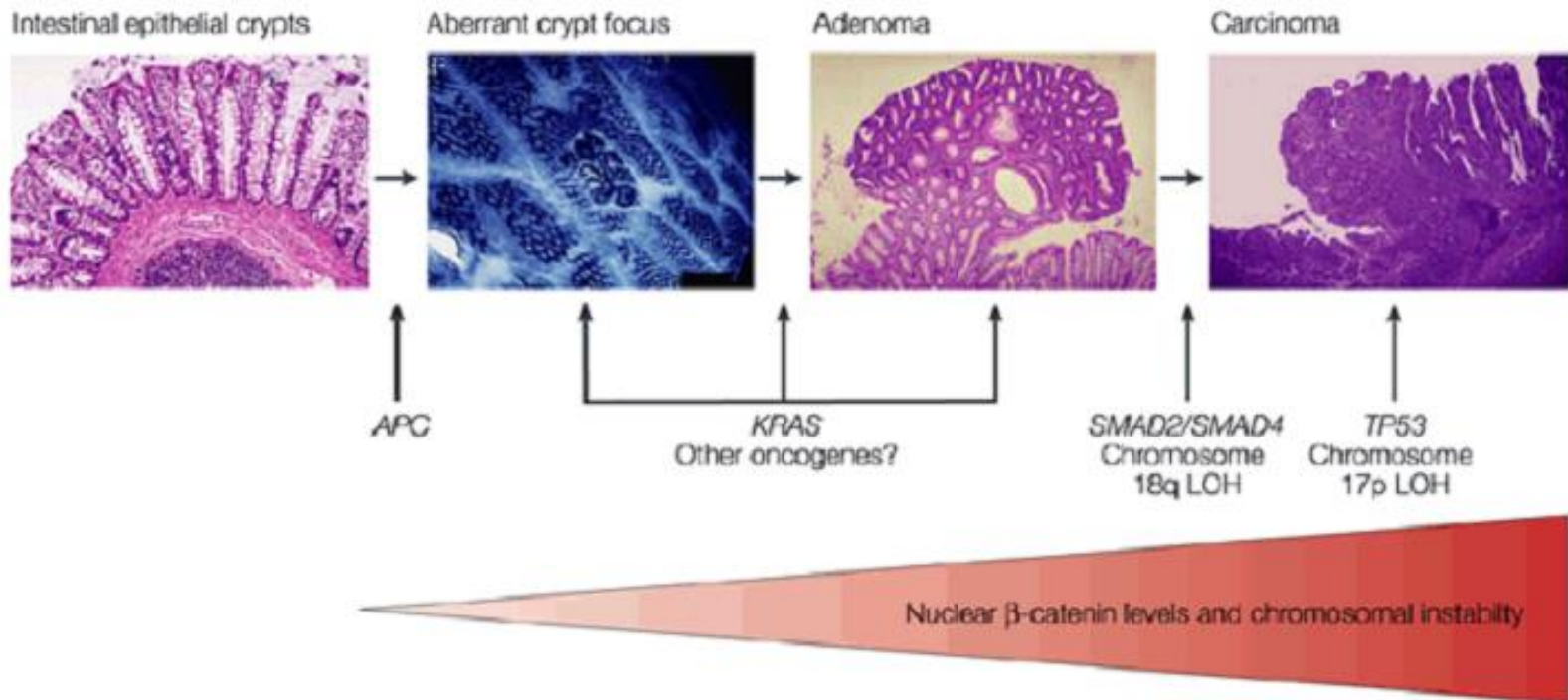
Vývoj nádorů trvá roky



Alternativní genetické změny při vývoji CRC

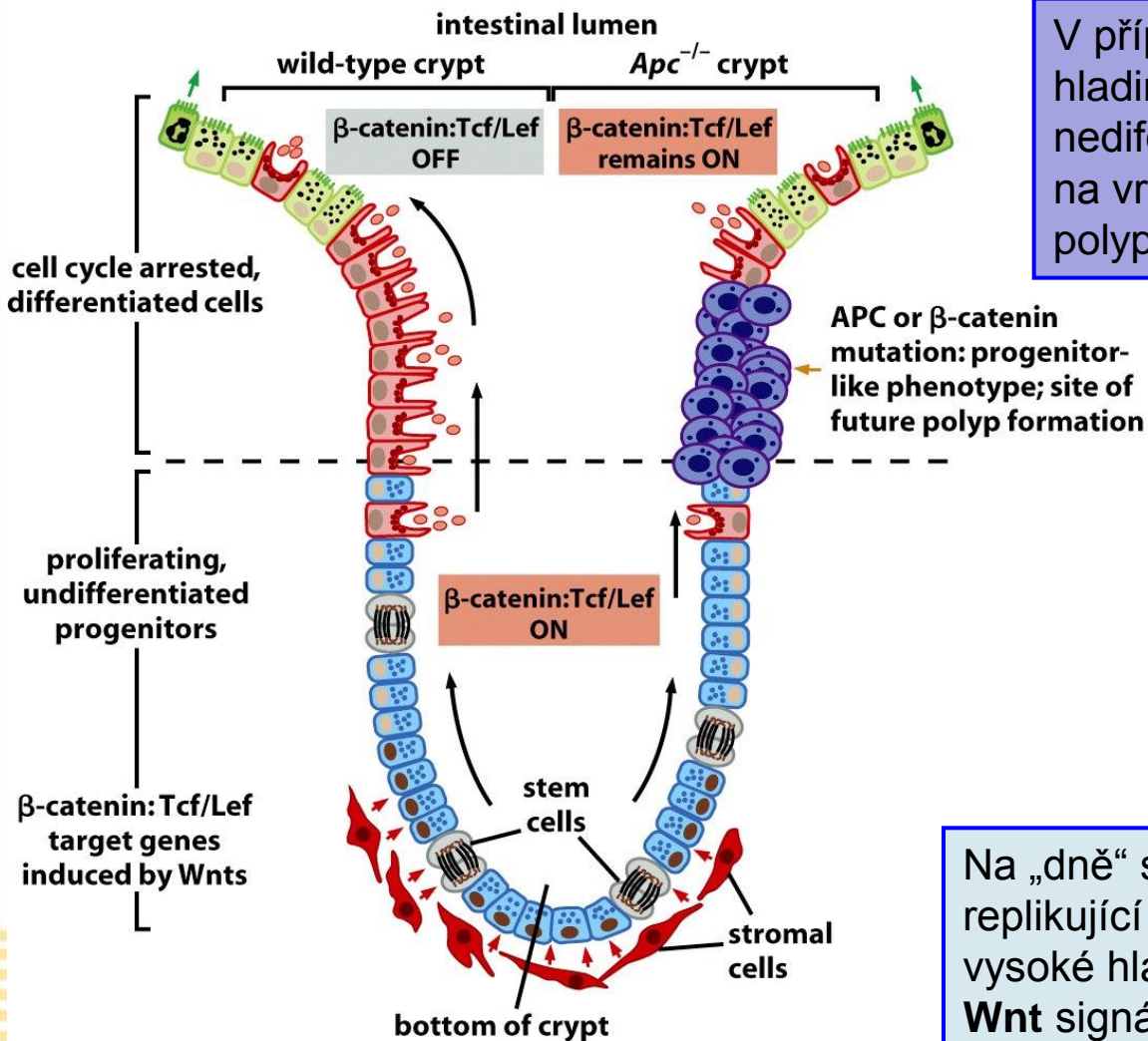


Genetický model kancerogeneze CRC



**Rostoucí tolerance ke zvyšující se hladině β -
kateninu!**

β -katenin a biologie střevních krypt



V případě **mutace APC** jsou vysoké hladiny β -kateninu i bez signálu Wnt, nediferencované proliferující buňky putují na vrcholk střevní krypty a vytvářejí polyp.

Proliferující nediferencující progenitorové buňky putují vzhůru: snižuje se stimulace Wnt signálem a zvyšuje se tak degradace β -kateninu. Snižuje se proliferace a postupuje diferenciace. Diferencované buňky odumírají apoptózou po 3 až 4 dnech.

Na „dně“ střevních krypt se nacházejí replikující se kmenové buňky, které obsahují vysoké hladiny β -kateninu, protože dostávají **Wnt** signály z okolních stromálních buněk.

Adenokarcinom žaludku a polypóza proximální části žaludku (GAPPS)

- *gastric adenocarcinome and proximal polyposis of the stomach*

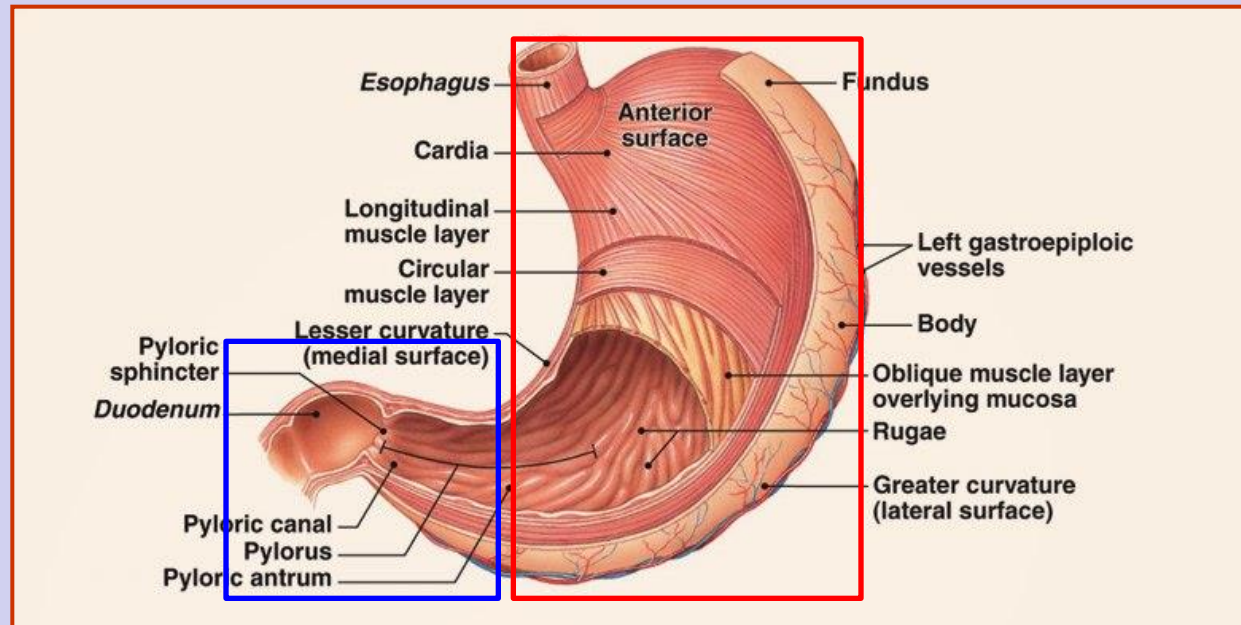
klíčový znak **GAPPS**:

- kobercovité (více než 100) polypy z fundických žlázek (FGPs) v přední části žaludku, některé z nich jsou dysplastické;
- vrátník, přední část střeva, tenké i tlusté střevo jsou zcela bez polypů, na rozdíl od FAP
- zhruba u 12-84 % pacientů s **FAP** se objeví FGPs, z toho u asi poloviny postižených pacientů je těchto polypů více než 100, ale nejsou dysplastické
- **sporadické** FGPs jsou méně četné a jen vzácně dysplastické

GAPPS

klíčový znak GAPPS:

- kobercovité (více než 100) polypy z fundických žlázek (FGPs) v **přední části žaludku**, některé z nich jsou dysplastické;
- **vrátník, přední část střeva, tenké i tlusté střevo** jsou zcela bez polypů, na rozdíl od FAP



GAPPS

- autozomálně dominantní syndrom
- příčinný gen lokalizován 5q22 včetně LOH
- celoexomové a celogenomové sekvenování neodhalilo příčinné mutace
- Li et al. 2016: analýzou 6 rodin s GAPPS (27 postižených zástupců) byly odhaleny 3 bodové **mutace v promotoru 1B genu APC**, které kosegregovaly s výskytem onemocnění
- mutace snižovaly vazbu transkripčního faktoru YY1 a následně expresi genu *APC* (nebo reportérského genu)
- tyto mutace se nevyskytují u FAP!
- promotor 1A je metylovaný u GAPPS a sporadických FGPs a také v normální žaludeční mukóze ⇒ transkripty 1B jsou v žaludeční mukóze významnější! střevní buňky jsou „chráněny“ expresí isoformem 1A

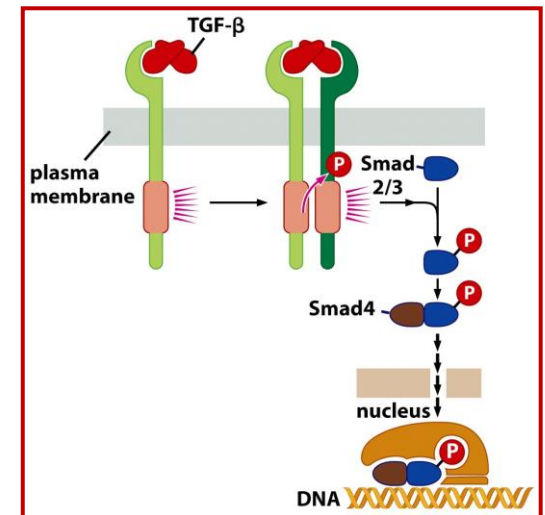
GAPPS

- *APC* haploinsuficience je zodpovědná za vývoj polypů z fundických žlázek (FGPs), ztráta druhé alely *APC* vede k rozvoji dysplasie
- isoformy 1A a 1B jsou *in frame*, ale liší se na N konci (1B má navíc exon 1B a chybí mu exony 2 a 7)
- **Specifické bodové mutace ve vazebném místě TF YY1 v promotoru genu 1B genu *APC* jsou příčinou GAPPS, nové a potenciálně závažné varianty FAP.**

Juvenilní polypóza coli



- autozomálně dominantní syndrom
- Název „**juvenilní**“ u JPS ani tak neodráží věk postižených, jako spíš histologii polypů, která se podobá juvenilním polypům.
- 34x zvýšená pravděpodobnost CRC; celoživotní riziko CRC asi 40%; průměrný věk dg. CRC 44 let.
- Některé případy JPS (asi 20%) jsou spojeny s vrozenými mutacemi **SMAD4** (*DPC4*) (**18q21.1**).



Dědičný nepolypózní kolorektální karcinom - HNPCC = Lynchův syndrom

- HNPCC představují asi 2-4% všech kolorektálních nádorů v západních zemích.
- Průměrný věk detekce nádoru u HNPCC pacientů je 40 let.
- Pacienti nemají zvýšený počet prekurzorových adenomů.
- Celoživotní riziko vývoje CRC je pro ženy 50%, pro muže 80% a celoživotní riziko vývoje nádoru dělohy je 60%.
- Pacienti s HNPCC ohroženi dále nádory vaječníků, žaludku, pankreatu a močových cest.
- Vývoj nádorů souvisí s mutacemi genů MMR, nádory jsou geneticky nestabilní a progredují rychle, jsou ale méně agresivní než FAP (jsou diploidní).
- **Somatické** mutace v genech MMR (nejčastěji metylace *MLH1*) se nejčastěji vyskytují u kolorektálních nádorů, u nádorů dělohy, a u nádorů žaludku (asi 13-15%), u jiných typů nádorů jsou vzácné (asi 2%).

Dědičný nepolypózní kolorektální karcinom



- autozomálně dominantní syndrom
- syndrom je spojen s vrozenými mutacemi genů pro opravu chybného párování („mismatch repair“):
- **MSH2** (první detekovaný; 2p15-16, 106 kDa)
- **MLH1** (3p21; 85 kDa)
 - tyto dva odpovídají za více než **90%** HNPCC
- **PMS2** (7p22; 96 kDa)
- **MSH6** (2p16) - odpovídá za odlišný fenotyp
 - tyto dva odpovídají jen za malý podíl HNPCC
- **PMS1** (2q31)
- **MSH3** (5q11-q12)
 - jejich význam v MMR je stejně velký, ale jejich mutace jsou jen vzácně předávány v zárodečné linii
- **MLH3** (14q24.3)

Oprava chybného párování



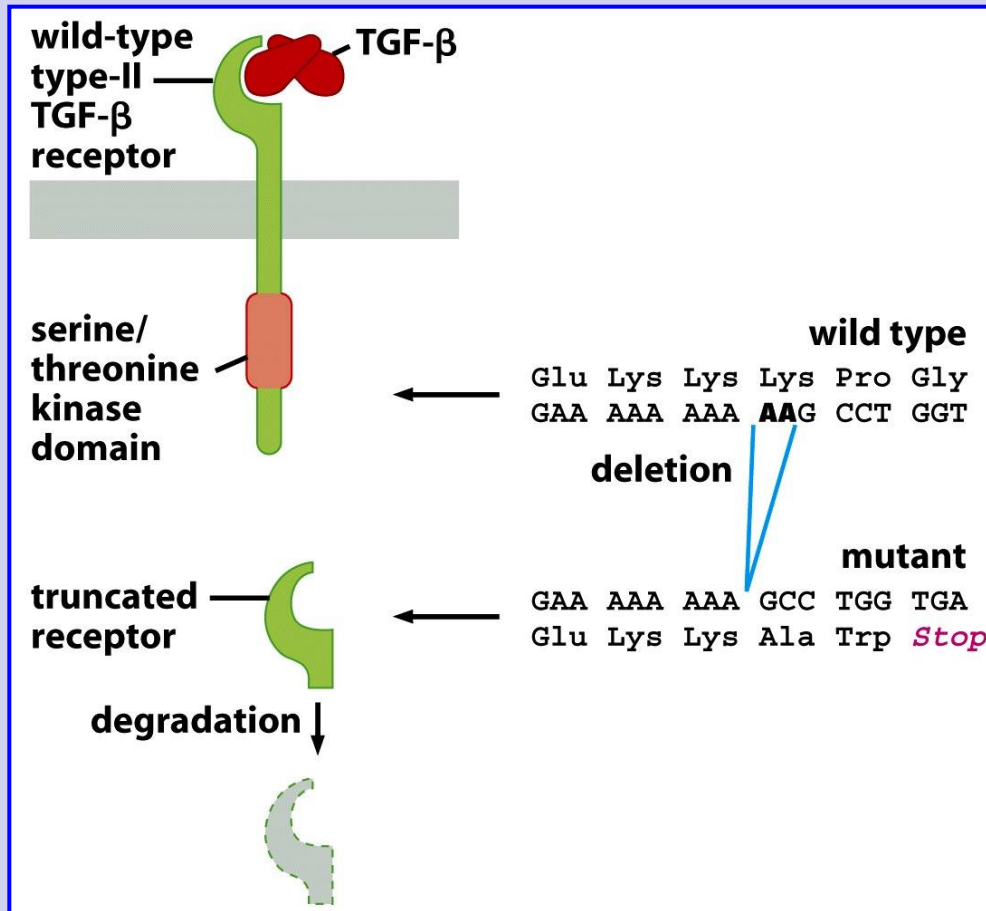
- MMR studován v souvislosti s nádory po objevení skupiny sporadických kolorektálních nádorů, u kterých byly v genomu nalezeny rozsáhlé změny v oblastech poly(A). Později byly nalezeny obdobné změny také v poly(CA) opakováních a tento jev dostal označení **mikrosatelitová nestabilita**.
- Mikrosatelitová DNA se zdá být zvláště náchylná k chybnému párování, protože při syntéze krátkých tandemových repetitivních DNA může snadněji dojít ke **sklouznutí syntetizovaného řetězce vůči templátu**:
např. A7 → A6 nebo A8

Důsledky defektů v opravě chybného párování



„Onkogenní“ mutace vznikající sekundárně v důsledku nestability repetitiv (mikrosatelitů) se mohou objevit v kterémkoliv genu. Popsáno např. u **APC**, genu pro **receptor pro TGFβII** (sekvence 10A kódujících 3 lyziny), gen pro **BAX** (obsahuje sekvenci 8G - kodóny 38-41: u MMR⁺ nádorů se v této sekvenci vyskytují časté inserce nebo delece jedné báze – to typicky spojeno s nepřítomností mutace *TP53*).

Příklad důsledku chyb v MMR: mutace TGF-βRII



Tento gen často mutován u CRC s mikrosatelitovou nestabilitou.

V genu se nachází mikrosatelit 10A. Často deletován 1 nebo 2 A → non-sense mutace → předčasně ukončená translace → ztráta C-terminální signální domény ⇒ rezistence k signalizaci TGFβ.

(výsledný protein má 129 nebo 161 namísto 565 AA)

Table 12.2 Genes and proteins that have been inactivated in human cancer cell genomes because of mismatch repair defects

Gene	Function of encoded protein	Wild-type coding sequence	Colon	Stomach	Endometrium
<i>ACTR11</i>	GF receptor	A ₈	X		
<i>AIM2</i>	interferon-inducible	A ₁₀	X		
<i>APAF1</i>	pro-apoptotic factor	A ₈	X	X	
<i>AXIN-2</i>	Wnt signaling	A ₆ , G ₇ , C ₆	X		
<i>BAX</i>	pro-apoptotic factor	G ₈	X	X	X
<i>BCL-10</i>	pro-apoptotic factor	A ₈	X	X	X
<i>BLM</i>	DNA damage response	A ₉	X	X	X
<i>Caspase-5</i>	pro-apoptotic factor	A ₁₀	X	X	X
<i>CDX2</i>	homeobox TF	G ₇	X		
<i>CHK1</i>	DNA damage response	A ₉	X		X
<i>FAS</i>	pro-apoptotic factor	T ₇	X		X
<i>GRB-14</i>	signal transduction	A ₉	X	X	
<i>hG4-1</i>	cell cycle	A ₈	X		
<i>IFRIIR</i>	decoy GF receptor	G ₈	X	X	X
<i>KIAA097</i>	unknown	T ₉	X		
<i>MLH3</i>	MMR	A ₉	X		X
<i>MSH3</i>	MMR	A ₈	X	X	X
<i>MSH6</i>	MMR	C ₈	X	X	X
<i>NADH-UO8</i>	electron transport	T ₉	X		
<i>OGT</i>	glycosylation	T ₁₀	X		
<i>PTEN</i>	pro-apoptotic	A ₆	X		X
<i>RAD50</i>	DNA damage response	A ₉	X	X	
<i>RHAMM</i>	cell motility	A ₉	X		
<i>RIZ</i>	pro-apoptotic factor	A ₈ , A ₉	X	X	X
<i>SEC63</i>	protein translocation into endoplasmic reticulum	A ₁₀ , A ₉	X		
<i>SLC23A1</i>	transporter	C ₉	X		
<i>TCF-4</i>	transcription factor	A ₁₀	X	X	X
<i>TGF-βRII</i>	TGF-β receptor	A ₁₀	X	X	X
<i>WISP-3</i>	growth factor	A ₉	X		

From A. Duval and R. Hamelin, *Cancer Res.* 62:2447–2454, 2002.

Peutz-Jeghersův syndrom - PJS



- autozomálně dominantní dědičné onemocnění (Peutz 1921; Jeghers 1949)
- Spojeno s výskytem typických **pigmentových lézí** okolo rtů a na sliznicích (nepodléhají maligní transformaci) a s tvorbou **hamartomatózních polypů**, především v **tenkém střevu**, ale i v tlustém střevu a žaludku. Tyto polypy obvykle zůstávají benigní, ale mohou malignizovat (pravděpodobně přes adenomy a dále karcinomy; phakomatosa).
- Zvýšené riziko různých typů nádorů, především nádorů **pankreatu**, **gastrointestinálního traktu**, bilaterálních nádorů **prsu**, vzácněji gynekologických nádorů.

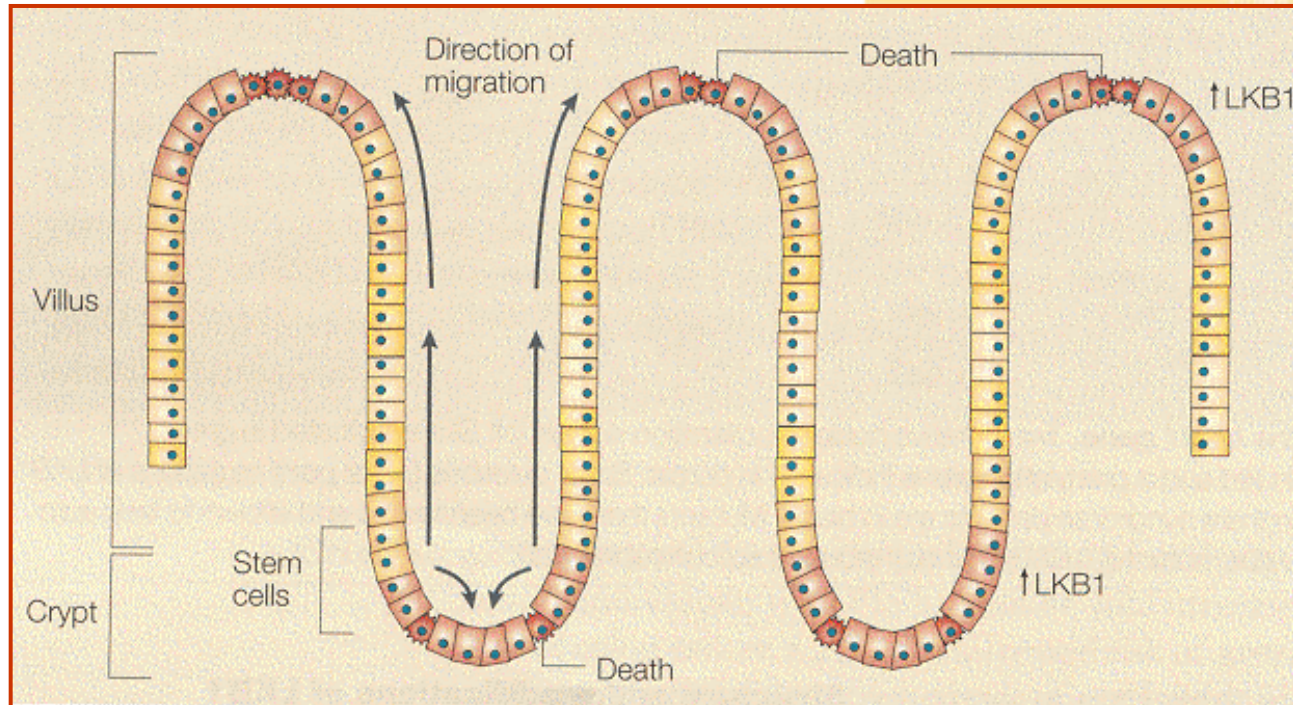


Peutz-Jeghersův syndrom



- PJS spojen s mutacemi genu **LKB1** (**STK11**) na chromozomu **19p13.3**.
- LOH pozorována u menšího podílu hamartomatózních polypů a u 70% maligních nádorů PJS pacientů → haploinsuficience *LKB1* iniciuje tvorbu hamartomů.
- Mutace *LKB1* jsou vzácné u sporadických nádorů.
- Zárodečné mutace *LKB1* asi u 70% postižených rodin, penetrance téměř úplná (93%). Průměrný věk detekce maligního nádoru je 43 let. Předpokládá se existence dalšího genu zodpovědného za PJS.
- Produktem genu je serine-threoninová protein kináza vyskytující se v jádře i cytoplasmě.
- Většina mutací vede k úplné ztrátě proteinu LKB1, bodové mutace inaktivují kinázovou aktivitu.
- Aktivita LKB1 je regulována fosforylací.

Exprese *LKB* v tenkém střevu



Kmenové epiteliální buňky jsou v kryptách, diferencují a během 3-5 dnů migrují na vrchol klků; frakce buněk migruje do bází krypt.

Na vrcholku klků i v bázi krypt buňky prodělávají apoptózu.

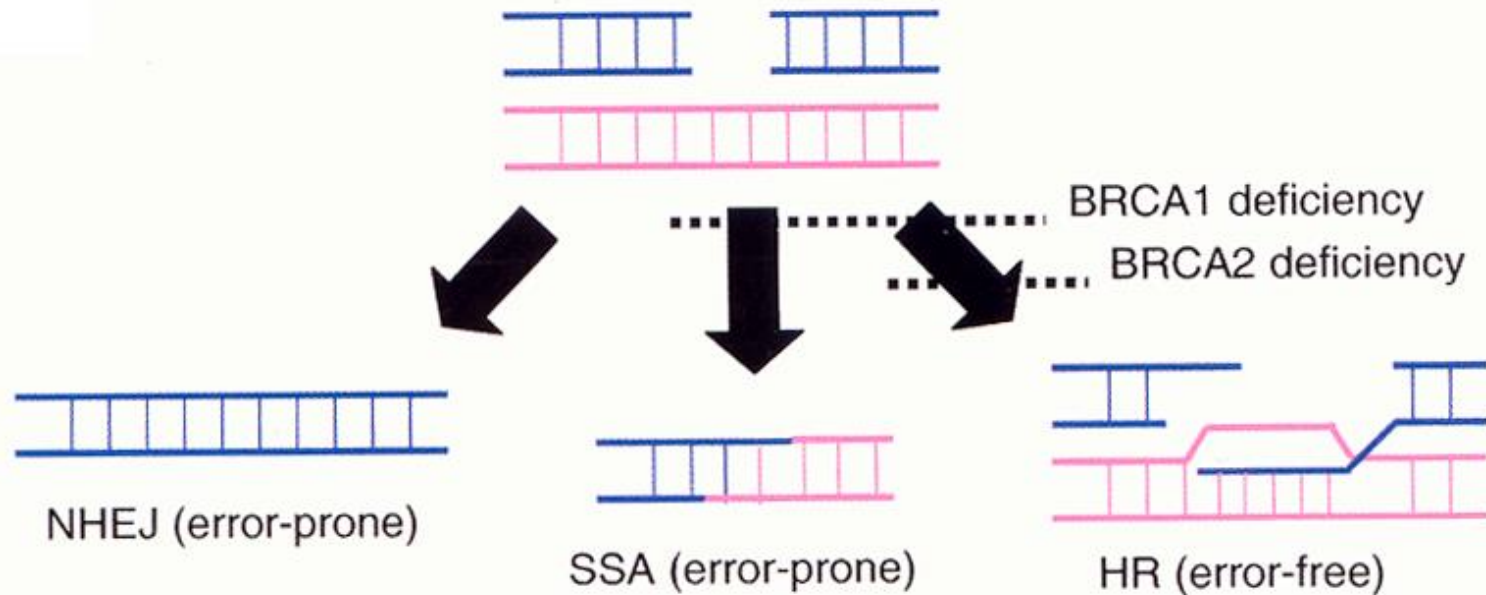
Vysoká exprese *LKB1* je na vrcholcích klků a na bázi krypt – především v buňkách procházejících apoptózou.

Funkce LKB1



- *LKB1* je exprimován v buňkách procházejících apoptózou.
 - Vysoká exprese *LKB1* indukuje apoptózu.
 - V apoptotických buňkách je protein *LKB1* translokován do mitochondrií.
- Protein *LKB1* hraje pravděpodobně roli v regulaci apoptózy.
- Podle některých studií jsou v nádorech s mutacemi *LKB1* vzácné mutace *TP53* – to naznačuje funkční souvislost *LKB1* a **p53** (apoptóza?).
 - *LKB1* pravděpodobně také indukuje blok buněčného cyklu, pravděpodobně indukci **p21^{WAF1/Cip1}**.

Důsledek špatných oprav DSBs pro genetickou stabilitu



NHEJ - nonhomologous end joining

SSA - single-strand annealing

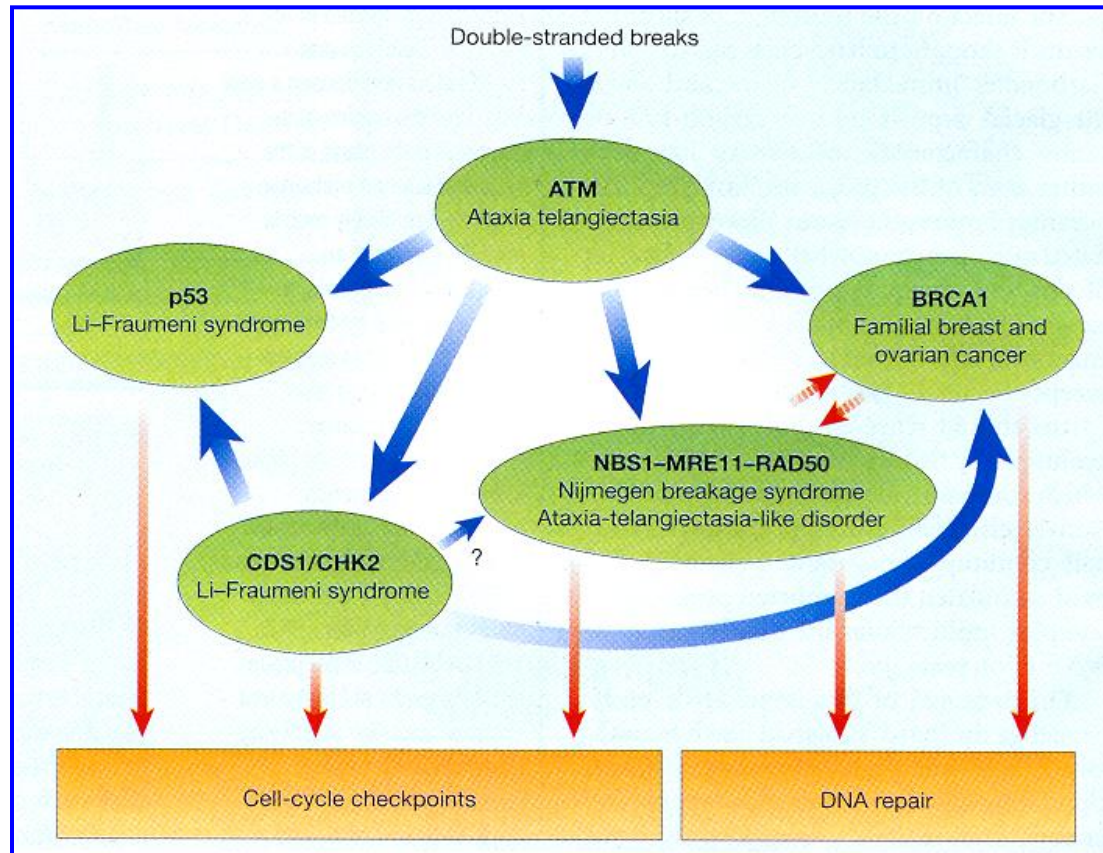
HR - homologní rekombinace

Fyziologický výskyt DSBs



- meiotická rekombinace
- přestavba genů pro imunoglobuliny a receptory B buněk a T buněk (V(D)J)

Sít' proteinů, které opravují dvouřetězcové zlomy DNA homologní rekombinací



- tyto proteiny udržují integritu genomu
- jejich mutace v zárodečné linii predisponují k vývoji nádorů

modré šipky:
fosforylace

Ataxia – Telangiectasia (A-T)



- autozomální recesivní onemocnění
- frekvence výskytu asi 1:40.000 narozených lidí (USA); frekvence nositelů (tj. heterozygotů) asi 1%
- progresivní neuromotorické dysfunkce související s postupnou degenerací (ataxií) některých oblastí mozku (cerebellum)
- endokrinní dysfunkce
- dysfunkce imunitního systému
- sterilita, předčasné stárnutí
- citlivost k ionizujícímu záření, inhibitorům topoizomeráz,...
- zvýšené riziko vývoje nádoru

Ataxia telangiectasia



zvýšené riziko vývoje nádoru:

- asi u 38 (25) % pacientů s AT se vyvine během (zkráceného) života nádor - především (85%) **T-lymfomy** a **CLL** - chronická lymfocytární leukémie, ale také zvýšený výskyt **nádorů žaludku, medulloblastomů, gliomů, nádorů močovodů**

Tumor type	Approximate incidence in A-T syndrome
Non-Hodgkin's lymphoma	13%
Leukemia	2%-8%
Hodgkin's lymphoma	4%
Breast cancer	2%-3%
Adenocarcinoma of stomach	<1%
Dysgerminoma	<1%
Gonadoblastoma	<1%
Medulloblastoma	<1%
Pancreatic carcinoma	<1%
Thyroid carcinoma	<1%
Total (All types)	25%

Ataxia telangiectasia

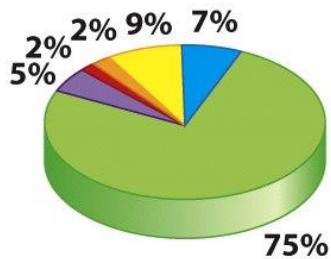


- heterozygoti (nositelé) ATM mají asi 2-3x zvýšené riziko nádoru prsu a CLL
heterozygoti mají částečně zvýšenou citlivost k ionizujícímu záření (→ haploinsuficience)
(USA - 1995: nositelé mutací ATM představují asi 1% populace a mají asi 5% všech nádorů)

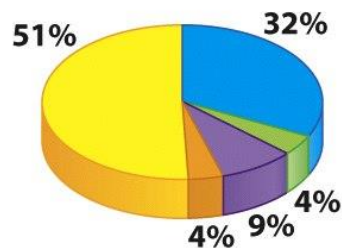
Ataxia telangiectasia: gen



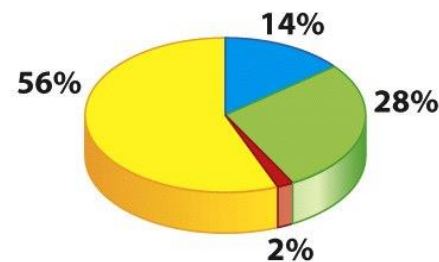
- lokalizován na chromozomu 11 (11q22.3), 66 exonů
- exprimován ve všech tkáních
- popsáno více než 250 (167) různých **mutací ATM**, časté je zkrácení proteinu
- zdá se, že existuje vztah genotyp - fenotyp



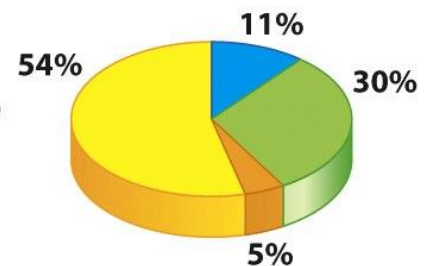
p53 (n = 15,122)



APC (n = 15,451)



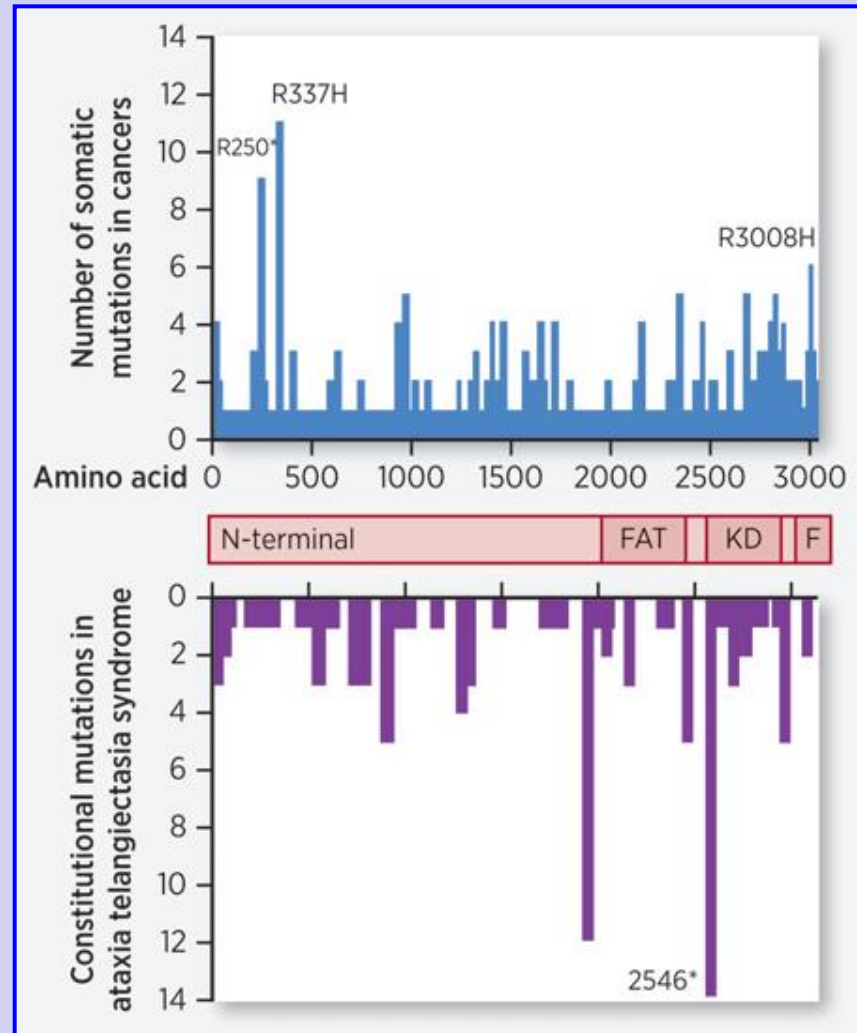
ATM (n = 617)



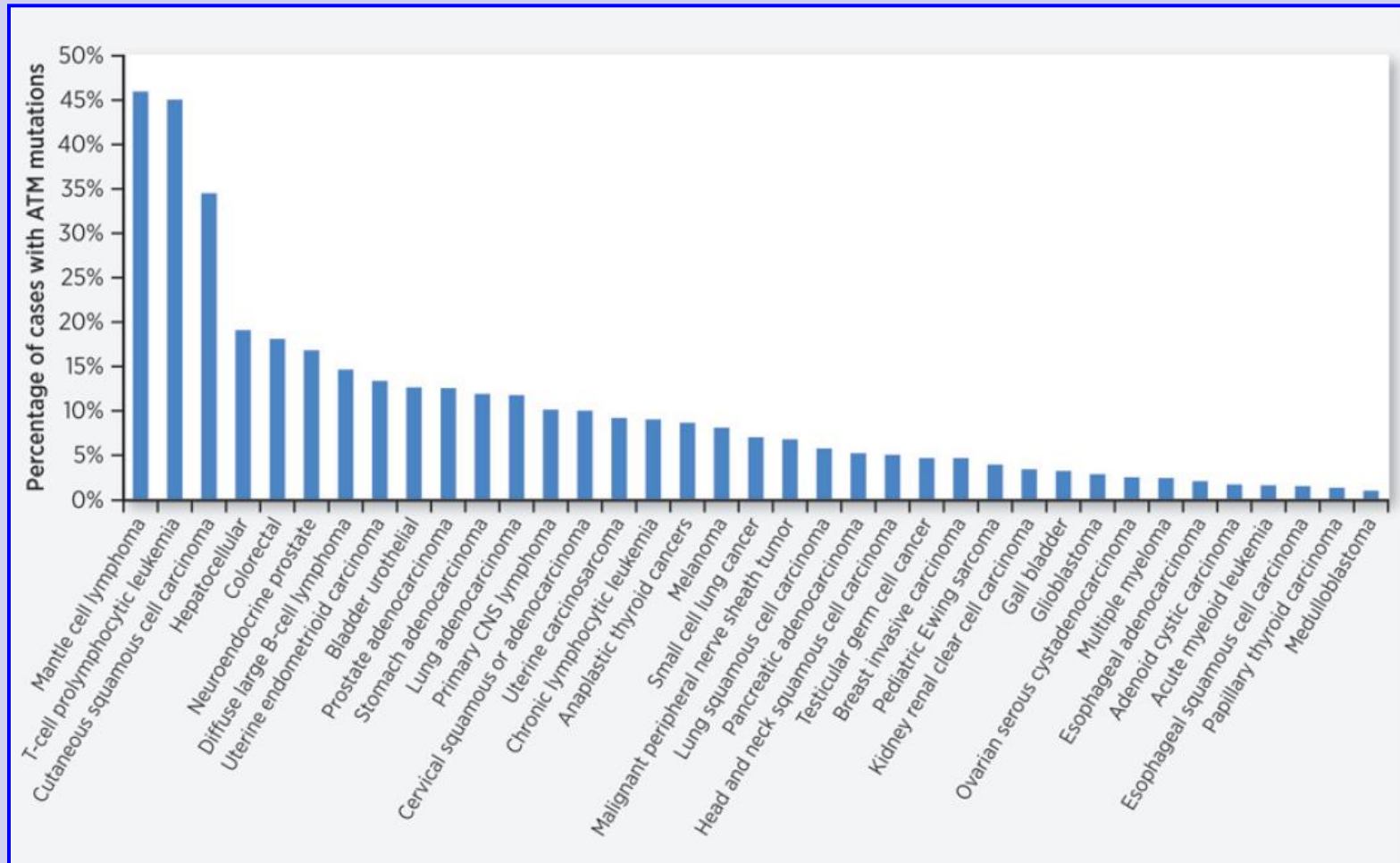
BRCA1 (n = 3,703)



Spektrum mutací ATM



Frekvence somatických mutací ATM u různých typů nádorů



Ataxia telangiectasia: protein

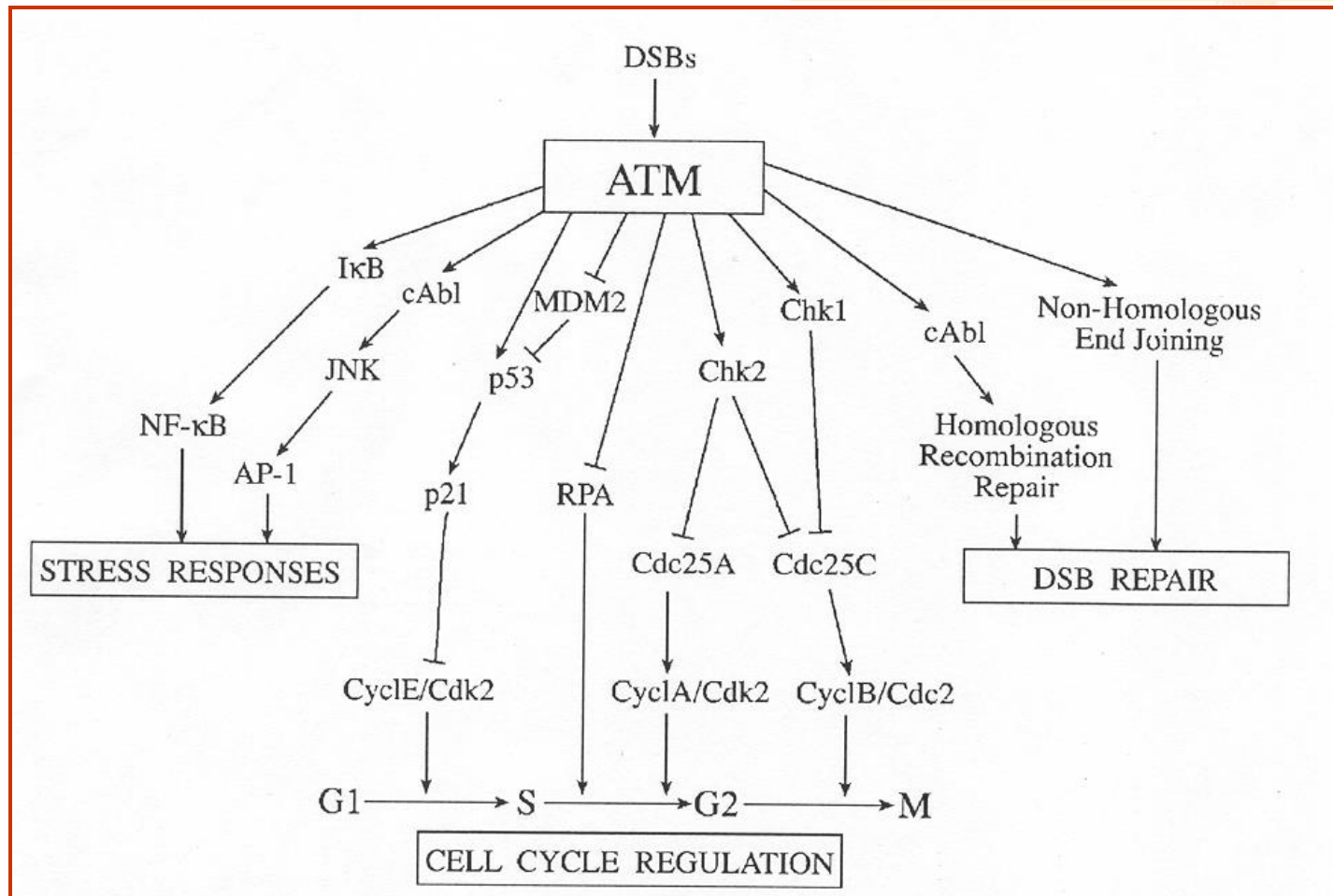


- 3506 AA, 370 kDa
- serin/threonin protein kináza, C-konec výrazně homologní s kinázou PI3K (**PIKK** rodina „PI3K-like protein kinases“: PIRK, ATM, ATR, DNA-PKs, TRRAP,..)
- Je aktivován dvouřetězcovými zlomy DNA (DSBs) vyvolanými např. ionizujícím zářením (ne UV!), inhibitory topoisomeráz.
- Aktivace ATM představuje **bezprostřední a primární** reakci na DSBs (ne jedinou). Později jsou aktivovány další ATM-nezávislé signální dráhy.

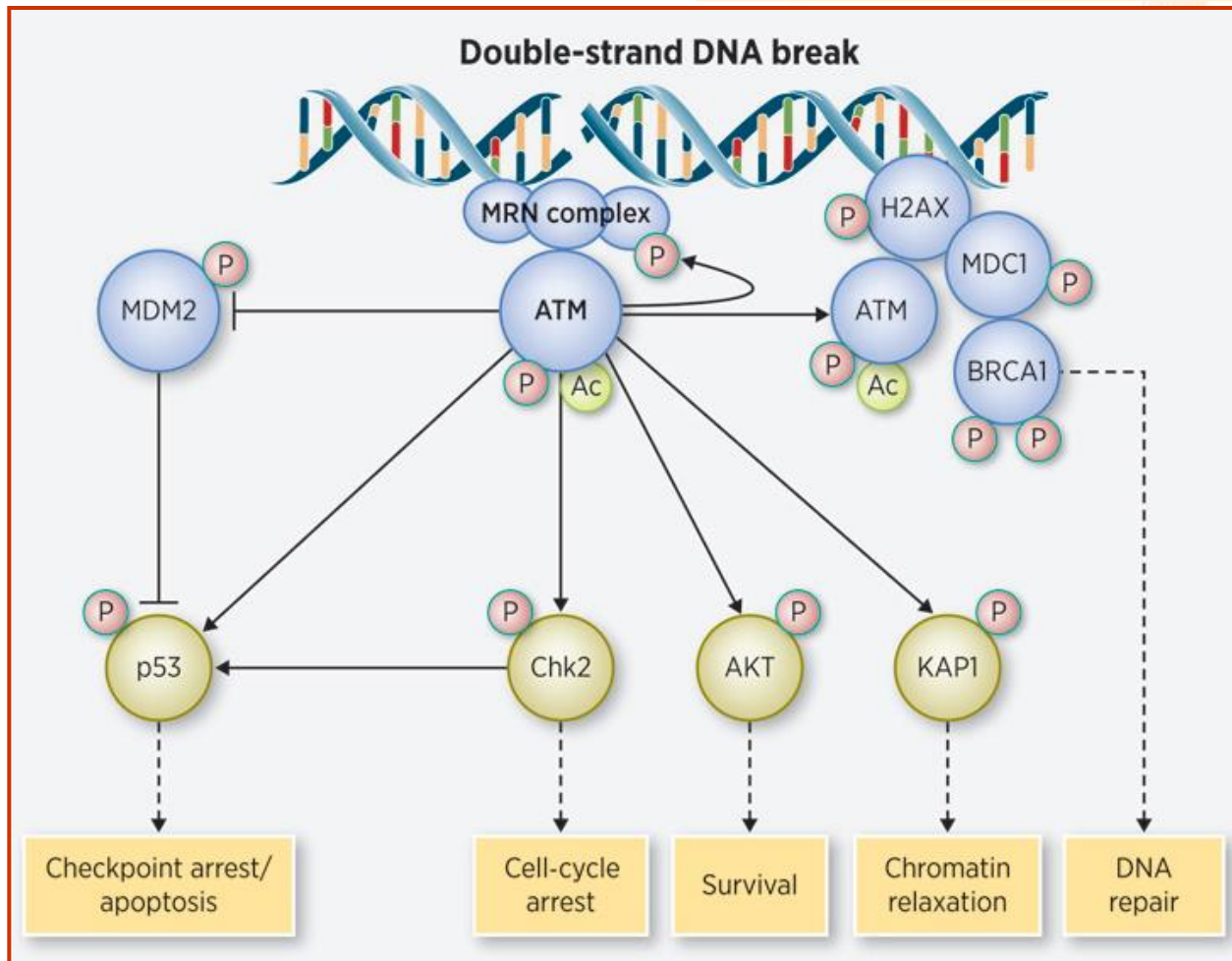
Cílové proteiny

- fosforyluje **p53** na ser15 → stabilizace a aktivace
- fosforyluje **MDM2** alespoň na dvou místech → uvolnění komplexu MDM2-p53
- fosforylace a aktivace dalších substrátů: např. **Chk2**, **c-Abl**, **BRCA1**, **NBS1**, **FANCD2** a dalších

Cílové signální dráhy ATM



Funkce ATM při opravě DSBs



Úloha proteinu ATM



Jako odpověď na dvouřetězcové zlomy DNA:

- zastavit buněčný cyklus
- indukovat reparaci DBS: mimo jiné přímou interakcí s proteinem **RAD51** (RAD51 interaguje také s **BRCA1** a **BRCA2**)

Této funkci odpovídají klinické symptomy typické pro A-T: pohlavní buňky, které procházejí meiozou a meiotickou rekombinací, a zrající lymfocyty, ve kterých dochází k V(D)J rekombinaci, jsou citlivější k nepřítomnosti funkce ATM (\Rightarrow sterilita, imunodeficience,..)

Nijmegen breakage syndrome - NBS

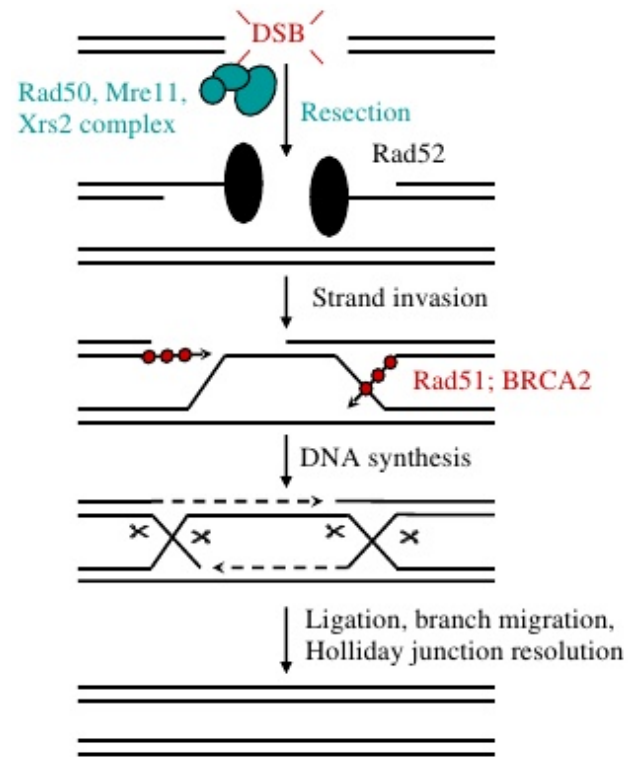


- Velice podobné symptomy jako u pacientů s A-T, i když klinicky rozlišitelné onemocnění: mikrocefalie, mentální retardace (tyto dva znaky specifické pro NBS), růstová retardace, endokrinní dysfunkce, imunodeficience, citlivost k záření, zvýšené riziko vývoje nádorů, především **B-lymfomů** (asi u 40% pacientů se vyvine lymfom do 20 let).
- Také na úrovni buněk silné podobnosti: zvýšená „lámavost“ chromozomů - souvisí s neschopností opravovat dvouřetězcové zlomy (DSB).
- Spojeno s mutací genu **NBS1** (8q21).
- autozomálně recesivní dědičnost

Nijmegen breakage syndrome - NBS



- **Protein NBS1** (**nibrin**: „bratranec ATM“) je součástí trimeru (**MRE11** a **RAD50**), který interaguje s místy dvouřetězcových zlomů DNA a připravuje je na jejich opravu.
- NBS1 v komplexu funguje jako „**senzor**“ – bez jeho přítomnosti MRE11-RAD50 není lokalizován v místech DSB – i jako **efektor** – podílí se i na samotné opravě.
- **MRE11** je mutován ve vzácném onemocnění **ATLD** („AT-like-disorder“).
- MRE11 má nukleázovou aktivitu, v místech DSB odštěpuje nukleotidy a tvoří jednořetězce DNA.

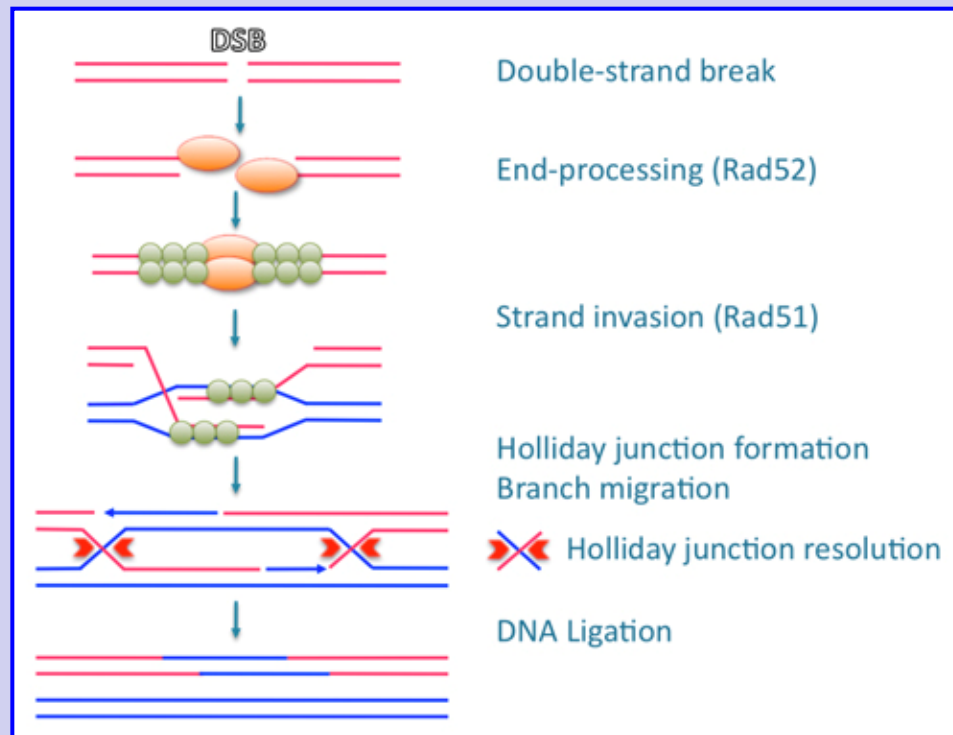


RAD51

- polymerizuje, obtáčí se kolem ssDNA a vytváří pravotočivé vlákno, které umožňuje udržet ssDNA v nataženém stavu.

RAD52

- zprostředkovává vazbu Rad51 na ssDNA; preferenčně váže ssDNA, a tím podporuje annealing komplementárních sekvencí DNA





Dědičná forma nádoru prsu

- Asi 10% nádorů prsu je dědičných, z nich asi 50% souvisí s mutacemi *BRCA1* a *BRCA2*.
- Podíl vrozeného zvýšeného rizika nádoru prsu způsobena jinými zárodečnými mutacemi: ***TP53***, ***PTEN***, ***LKB1*** (5-10%) a zřejmě ještě dalších, neznámých genů (40%).

➤ Somatické mutace genů *BRCA* jsou u sporadických nádorů vzácnější!

BRCA1, BRCA2



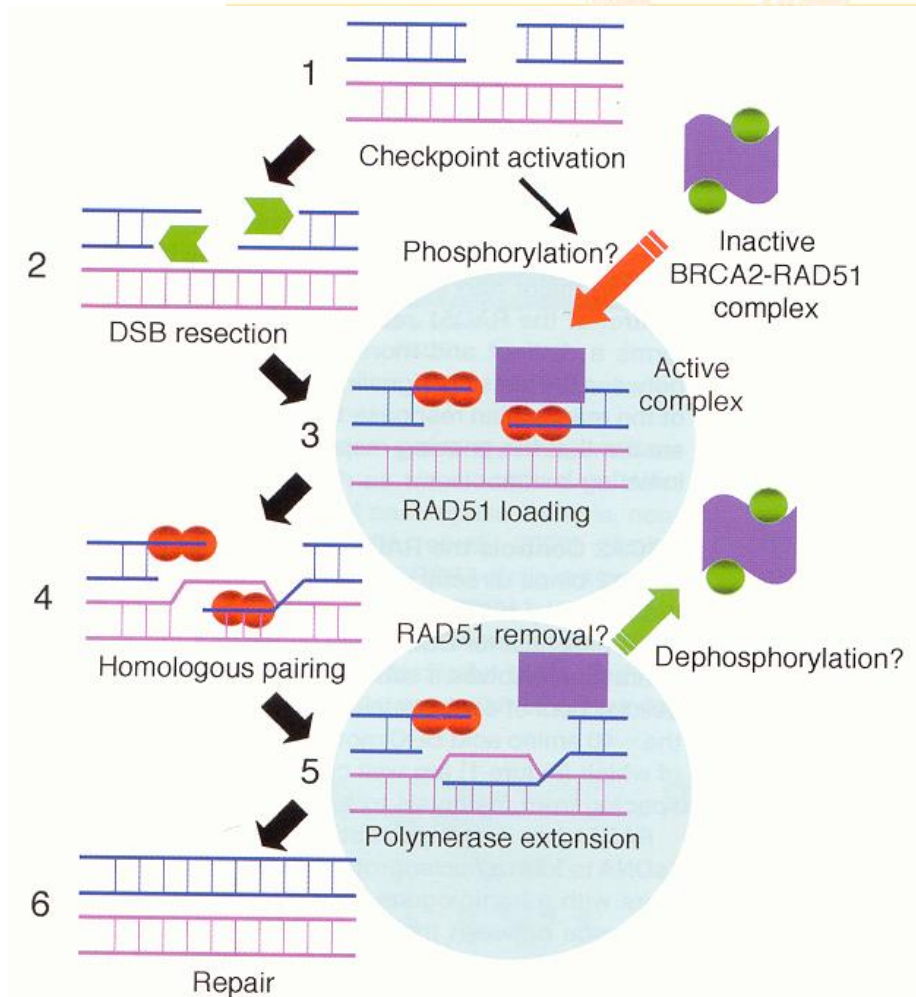
- nemají homology u kvasinek nebo drozofily - jsou to poměrně „mladé“ geny (obratlovci)
- *BRCA1*: objeven 1994; lokalizován 17q21.31; 22 exonů
- *BRCA2*: objeven 1994/1995; 13q12.3; 27 exonů
- kódují velké proteiny, které jsou exprimovány v řadě tkání a jsou lokalizovány hlavně v jádře
- hrají významnou roli při ochraně struktury chromozomů, jejich funkce ale není totožná, nejsou to homology!!
- fungují jako „caretakers“, udržují genetickou stabilitu

Model funkce BRCA2



Interaguje s **RAD51** a reguluje jeho dostupnost a aktivitu.

- DSBs aktivují ATM nebo ATR
- ATM/ATR fosforyluje a tím aktivuje komplex BRCA2-RAD51
- aktivovaný RAD51 nasedá na poškozené jednořetězcové úseky DNA a aktivuje homologní rekombinaci; uvolnění z opravených částí DNA je spojeno s defosforylací komplexu



Funkce BRCA1



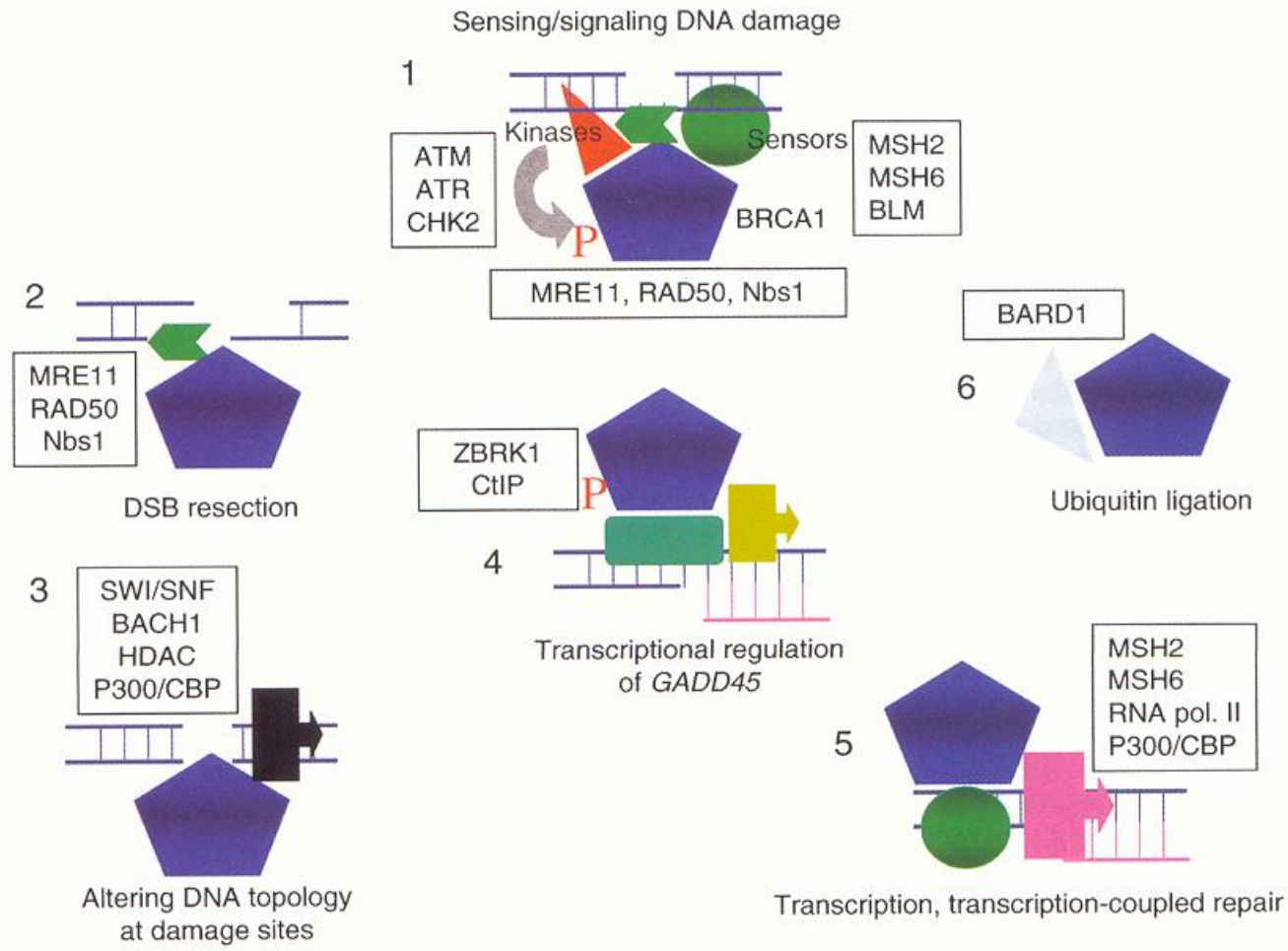
- popsat přesnou funkci BRCA1 je mnohem komplikovanější
 - v oblastech DSB je rychle modifikován **chromatin**: fosforylace, acetylace histonů, přestavba chromatinu,...
 - BRCA1 se objevuje v místech DSB velmi rychle: je fosforylován kinázami **ATM**, **ATR**, **ChK2**,..., interaguje se SWI/SNF, HDAC/HATs,...
- BRCA1 interaguje s komplexem MRE11/RAD50/NBS1, inhibuje nukleázu **MRE11** a tak reguluje délku jednořetězců
- BRCA1 interaguje s DNA helikázou **BLM**

Funkce BRCA1



- BRCA1 interaguje s proteiny **MSH2** a **MSH6**, které se podílejí na opravě chybného párování
- Při signalizování poškození DNA je zastaven procesing mRNA, mimo jiné působením proteinu **BARD1**; BRCA1 tvoří komplex BARD1-BRCA1
- v oblastech poškození DNA je s BRCA1 kolokalizován protein kódovaný genem **FANCD2** (mutovaný u Fanconiho anémie)
- odpovídá za správné sestavení reparačních komplexů, které se seskupují v místech dvouřetězcových zlomů DNA – má funkci **lešení**

Model funkce BRCA1



Souvislost mutací *BRCA1* s mutacemi dalších genů

- Mutace obou alel *BRCA1* nebo *BRCA2* je pro buňku **letální** a přežití je zřejmě spojeno s mutacemi v některých kontrolních bodech buněčného cyklu, např. **p53** („úzké okno přežití“).

Chronologicky: vrozená mutace *BRCA* → inaktivace *p53* → mutace druhé alely *BRCA* (mutace druhé alely *BRCA* se skutečně během kancerogeneze objevuje poměrně pozdě).

Frekvence mutací *p53* vyšší u nádorů s mutacemi *BRCA* než u sporadických nádorů (plus jiné spektrum mutací).

- Podobnou roli jako mutace *p53* mohou hrát mutace genů spojených s kontrolním bodem sestavení mitotického vřeténka: **Bub1**, **BubR1**.
- Mutace *BRCA1* a *2* přežívají pouze buňky prsu a vaječnicků, a to díky anti-apoptotickému působení **estrogenů**.

Dědičný syndrom nádoru prsu a ovaria

- frekvence mutací *BRCA1* a *2* v populaci v ČR není známa, ve světě 1 : 300-800
- polovina pacientek může zdědit mutaci od svého otce
- profylaktická mastektomie (odstranění prsních žláz) snižuje riziko nádoru prsu z celoživotních 85% na 1-5% (zbývající riziko může souviset s problematikou odstranění celé tkáně mléčné žlázy)
- profylaktická adnexektomie (odstranění vaječníků a vejcovodů) snižuje riziko nádoru ovaria z předpokládaných 60% (u nosiček mutace *BRCA1*) nebo 20% (*BRCA2*) na 1-5%
- operace se doporučuje ve věku 35-40 let
- odstranění ovarií může sekundárně snížit riziko onemocnění nádorem prsu o 50% díky estrogenní depleci

Jak zlomit Damoklův meč BRCA mutace

TABULKA 1

Celoživotní riziko vzniku nádoru

Mutace BRCA1

- až 85 % pro nádor prsu
- až 60 % pro nádor vaječníků.
- 4x zvýšené pro nádor kolorekta
- 3x vyšší pro nádor prostaty

Mutace BRCA2

- až 85 % pro nádor prsu
- až 20 % pro nádor vaječníků.
- 4x zvýšené pro nádor kolorekta
- 2,5x vyšší pro nádor prostaty
- 5x vyšší pro nádor žlučníku a žlučových cest
- 3,5x pro nádor slinivky
- 2,5x pro nádor žaludku
- 2,5x pro maligní melanom
- 6% riziko pro nádor prsu u mužů

TABULKA 2

U koho indikovat vyšetření

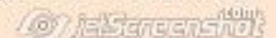
Famillární výskyt:

- Tři příbuzní s karcinomem prsu nebo vaječniku v jakémkoliv věku
- Případně dva příbuzní s karcinomem prsu nebo vaječniku, pokud alespoň jeden pod 50 let (u nádoru ovaria bez věkové limitace)

Sporadický výskyt:

- Unilaterální nádor prsu pod 40 let
- Bilaterální nádor prsu pod 50 let
- Nově doporučuje Společnost lékařské genetiky testování všech pacientek s epitelovými karcinomy vaječníků bez věkové limitace (dle NCCN)
- Všichni muži s nádorem prsu
- Duplicita nádoru prsu a ovaria v jakémkoli věku
- Medulární karcinom prsu nebo triple negativní karcinom do 50 let (nově do 60 let)

V suplementu Klinické onkologie 2012 vyšel přehled všech onkologických pracovišť, která poskytují v ČR preventivní péči o nosičky BRCA1/BRCA2 genů i o další osoby s jinými dědičnými nádorovými syndromy. Dále vyšel přehled všech pracovišť plastické chirurgie, která poskytují profylaktické operace prsou, včetně nabízených typů operací a čekacích dob.



Hereditární malignity si zaslouží více pozornosti než dosud

- Mutace BRCA1 či BRCA2 se nacházejí u více než pětiny (22 %) high grade serózních ovariálních karcinomů. Nejsou omezeny jen na tento typ nádoru, vyskytují se, i když vzácněji, i u endometriodních karcinomů. U světlobuněčných či mucinózních karcinomů je výskyt BRCA1/2 mutace ojedinělý.

➤ BRCA mutace může být germinální, to se týká dvou třetin pacientek s BRCA pozitivním ovariálním karcinomem. Další třetina nemocných má mutaci **somatickou**.

Jak vyrovnat dluh vůči BRCA pozitivním ženám

- Bylo popsáno již více než **200** hereditárních nádorových syndromů...
- Díky NGS (testováno 60 pacientů, u nichž nebyla detekována mutace ve vysoce rizikových genech *BRCA*, *TP53* a *HNPCC*) byly odhaleny rizikové patogenní mutace např. v genech *BAP1*, *ATM*, *ERCC2*, *PALB2*, *RAD51C*, *BRIP1*, *FANCA*, *FANCI*, *SDBH* či *PMS2*.
- Nejčastěji se vyskytovaly mutace v genu *ATM*, u mnoha nemocných byla poškozena také dráha Fanconiho anémie.
- Příklad: žena s nádorem prsu, s výraznou rodinnou anamnézou (matka, sestra), *TP53* a *BRCA* negativní: pozitivní **kombinace mutací *ATM* a *FANC***.

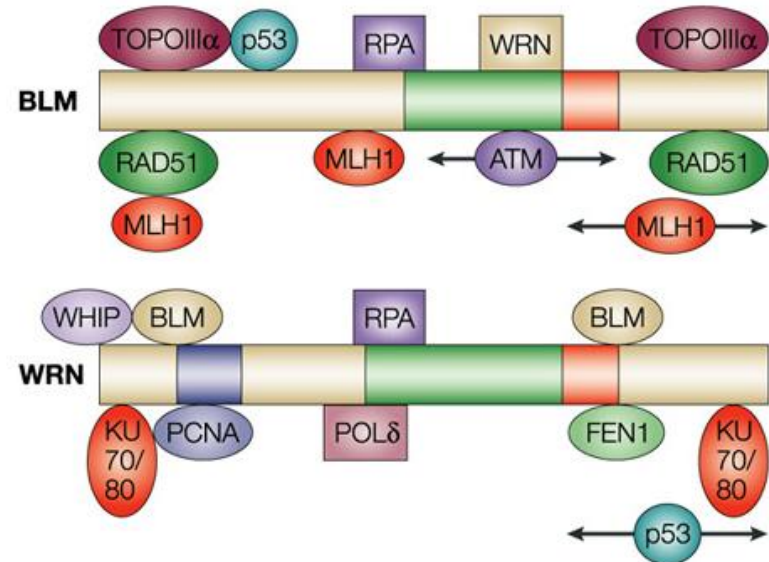
Karcinom prsu u mužů

- analýza 823 mužů s karcinomem prsu (a 2 795 kontrol)
- (každoročně je ve Velké Británii diagnostikováno asi 350 případů ca prsu u mužů)
- změny v **RAD51B** (SNP 17q24.1) zvyšují riziko karcinomu prsu u mužů o 50%
- významná asociace také s **TOX3** (16q12.1)
- asi 10% pacientů má mutaci **BRCA2**, mutace **BRCA1** se u karcinomu prsu mužů pravděpodobně neuplatňují
- karcinom prsu mužů a žen je pravděpodobně velmi rozdílné onemocnění

RecQ helikázy



- rodina RecQ helikáz (u člověka je jich 5) se podílí na udržování stability genomu: separují komplementární řetězce DNA s použitím energie z hydrolýzy ATP
- do rodiny RecQ helikáz patří:
 - BLM** (RECQ2) (**Bloomův syndrom**)
 - WRN** (RECQ3) (**Wernerův syndrom**)
 - RECQ4** (**Rothmund-Thompsonův syndrom** - RTS)
- všechny syndromy jsou spojeny s vyšším rizikem vývoje nádorů



Bloomův syndrom - BS



- nesmírně vzácné autozomálně recesivní onemocnění
- malý růst (proporční) (zvýšená apoptóza v důsledku vysoké mutability?)
- **výrazná predispozice k vývoji nádorů**
- typický (ptačí) obličej, typický vysoký hlas
- přecitlivělost ke slunečnímu záření
- častý *Diabetes mellitus*
- sterilita mužů (ztráta spermatogeneze), snížená fertilita žen (předčasný nástup menopauzy)
- imunodeficience



Bloomův syndrom



- příčinou mutace genu **BLM** lokalizovaného na chromozomu 15q26.1
- heterozygoti jsou zcela zdraví
- mutace *BLM* jsou obecně v populaci velmi vzácné (mezi lety 1975 a 2003 nahlášeno celosvětově asi 220 případů), vyšší frekvence výskytu pouze u Ashkenazi židů (nositelem je 1 ze 110 lidí, a to mutace **blm^{Ash}**: 6-pb delece a 7-pb inzerce v exonu 10; v jiných populacích nebyly detekovány specifické mutace).
- mutace *BLM* všech typů: missense, frameshift, nonsense, splice-site

Nádory u BS pacientů



- vysoká frekvence (benigních i maligních)
 - široké spektrum nádorů (akutní leukémie, lymfomy, nádory jazyka, hrtanu, plic, jícnu, střev, kůže, prsu, děložního čípku,...)
 - velice nízký věk (průměrný věk diagnózy 24.7 roku)
 - vysoká frekvence mnohočetných primárních nádorů
- nádorové onemocnění je nejčastější příčinou úmrtí

Wernerův syndrom - WS



- vzácné **autozomálně recesivní** onemocnění, frekvence výskytu je asi 1:220.000 - 1.000.000
- až do dospělosti normální fenotyp. Pak nastupuje **předčasné stárnutí**: ztráta elasticity kůže, šedivění vlasů, řídnutí vlasů, ztráta podkožního tuku (postižení vypadají asi o 20 až 30 let starší). Průměrný věk 47 let
- **zvýšené riziko vývoje nádoru** (asi 30x): oproti normální populaci (10:1), především zvýšené riziko vývoje **neepiteliálních** nádorů (1:1): sarkomy měkkých tkání, osteosarkomy, melanomy, thyroideální nádory...
- příčinou mutace genu **WRN**, který je lokalizován na chromozomu 8p12
- mutace **WRN** převážně non-sense a frameshift ⇒ zkrácený protein
- mnoho postižených je mezi Japonci



WS patient age 15 yrs



WS patient age 48 yrs

Rothmund-Thompsonův syndrom - RTS



- autozomálně recesivní dědičnost
- u některých postižených je mutován gen **RECQ4**, lokalizovaný na 8q24.3
- popsán původně jako onemocnění spojené s abnormalitami pigmentace kůže a ztrátou vlasů, postižením skeletu
- spojeno se zvýšeným rizikem vývoje nádorů, často detekovaných před 25. rokem života; spektrum nádorů širší, ale hlavně osteogenní sarkomy



Fanconiho anémie - FA



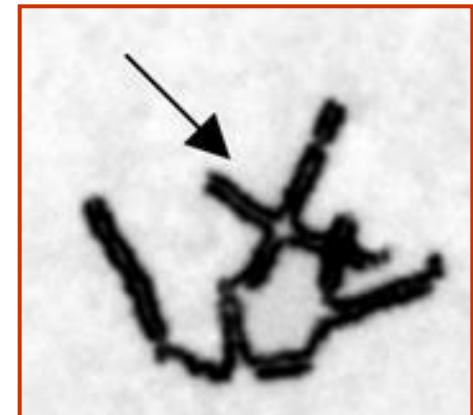
- autozomálně recesivní onemocnění, velmi vzácné: často menší vzrůst, změny pigmentace, mikrocefalie,.. (heterogenní onemocnění)
- spojeno se selháním kostní dřeně, což vede k různým vrozeným hematologickým abnormalitám (pravděpodobnost hematologických abnormalit 81% ve věku 40 let)
- predispozice k vývoji nádorů, především: leukémie (AML), hepatocelulární karcinom, dlaždicobuněčné karcinomy
- FA je vzácná, somatické mutace dráhy FA byly popsány u některých sporadických nádorů



Fanconiho anémie



- popsáno **11** (*FANCA* až *FANCL*) genů způsobujících FA (komplementační skupiny): nemají sekvenční homologii, spojuje je funkční souvislost
- kódují komponenty jediné nádorové supresorové dráhy a tvoří **jaderný komplex FA**, který je nezbytný pro aktivaci klíčového proteinu **FANCD2**
- FANCD2 je monoubikvitinován jako odpověď na poškození DNA, společně s dalšími proteiny (BRCA1 a BRCA2) je lokalizován v oblastech DBSs, podílí se na homologní rekombinaci
- na buněčné úrovni je pro FA buňky charakteristická citlivost na činnidla způsobující crosslink DNA (používá se i při **diagnostice**).



Nádory kůže



- **Melanomy:** vyvíjejí se transformací melanocytů - buněk kůže, které produkují melanin
- **Nemelanomové nádory:**
 - asi 80% představují karcinomy bazálních buněk
 - většinu ze zbylých 20% karcinomy dlaždicových buněk
 - nádory z kožních adnex (kožní „přívěsky“, drobné žlásky, vlasové folikuly,...)

Xeroderma pigmentosum - XP

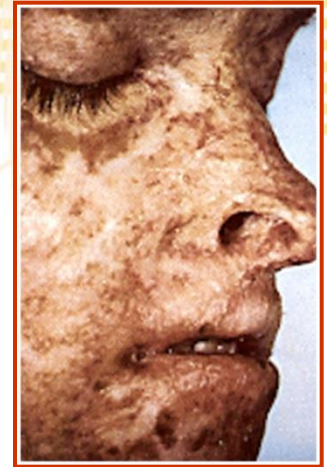


- vzácné autozomálně recesivní onemocnění
 - frekvence výskytu asi 1:1.000.000 v USA a Evropě a asi 1:100.000 v Japonsku a severní Africe
 - vysoká citlivost k UV: extenzivní léze na kůži exponované slunečnímu záření, asi **1000x** zvýšené riziko „sunlight-induced“ nádorů kůže*, dále zvýšené riziko leukémií a nádorů žaludku, mozku, plic
 - U některých pacientů (18%) spojeno s neurologickými abnormalitami.
- * XP je spojena se zvýšeným výskytem jak melanomů (5%) tak nemelanomových (odvozených z dlaždicových a bazálních buněk) nádorů kůže (95%)

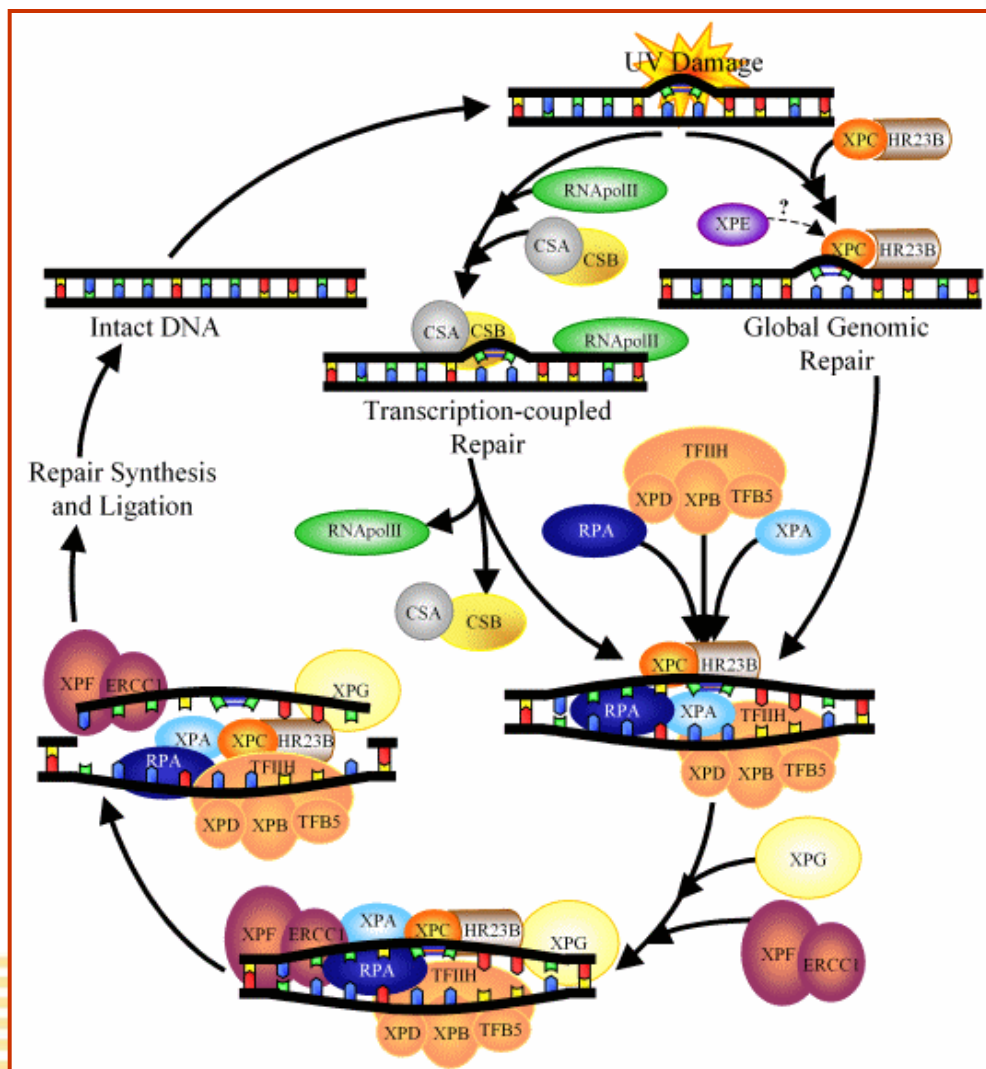
Xeroderma pigmentosum



- 90% nádorů kůže se objevuje na obličeji, krku, a hlavě - místech nejvíce vystavených slunci.
- Průměrný věk výskytu nádorů kůže je **8 let** (sporadicky průměrně v 60ti letech).
- Spojeno se zárodečnými mutacemi v některém genu ze sedmi komplementačních skupin **XP-A** až **XP-G**. Proteiny kódované těmito geny se podílí na nukleotidové excizní opravě (**NER**) jako součást multiproteinového komplexu. **XP-V** kóduje (error-prone) DNA polymerázu pol- η (\rightarrow celkem 8 komplementačních skupin).



Model mechanismů NER



NER je proces, kterým se UV-světlem (nebo dalšími exogenními mutageny) poškozené báze enzymaticky vyštěpují z DNA a následně se nahrazují správnými nukleotidy.

NER zajištěna multiproteinovým komplexem asi o 24 podjednotkách.

Z toho sedm proteinů kódováno geny, které tvoří 7 komplementačních skupin XPA – XPG, vyskytujících se u XP.

Osmou skupinu tvoří XPV kódující tzv. „by-pass (error-prone) polymerase“ pol- η .

Sekundární maligní neoplasie (SMN) indukované terapií

- Tato problematika se rozvíjí s tím, jak přibývá především pediatrických pacientů dlouhodobě přežívajících po léčbě cytotoxickými terapeutiky.
- Nejčastějšími nádory SMN jsou sarkomy kostí a měkkých tkání.
- RAD (záření) je nejčastější příčinou SMNs.
- Existuje korelace s dávkou RAD.
- Mladý věk a nízká dávka RAD zvyšuje riziko thyroidních nádorů.
- U žen léčených RAD pro Hodgkinův lymfom s věkem kontinuálně přibývá nádorů prsu.
- U pacientů léčených alkylačními činidly a inhibitory topoizomerázy II se zvyšuje riziko vývoje sekundárních leukémií.

Sekundární maligní neoplasie (SMN) indukované terapií

Ukazuje se, že zvláště interakce terapie s genetickými predispozicemi je zásadní:

- RB (retinoblastom): sarkomy, melanomy
- NF1 (neurofibromy): neurofibrosarkomy, AML, JMML, gliomy
- Gorlinův syndrom: RAD
- přecitlivělost k ionizujícímu záření: AT, NBS, BS, WS
- přecitlivělost k UV záření: XP, BS
- přecitlivělost k alkylačním činidlům: FA

⇒ Terapie u pacientů s vrozenými dispozicemi musí být pečlivě zvažována!!!