

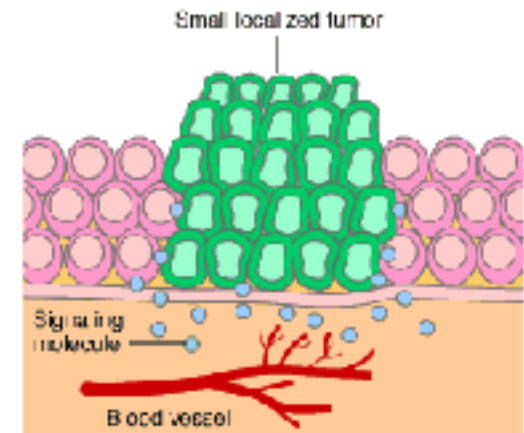
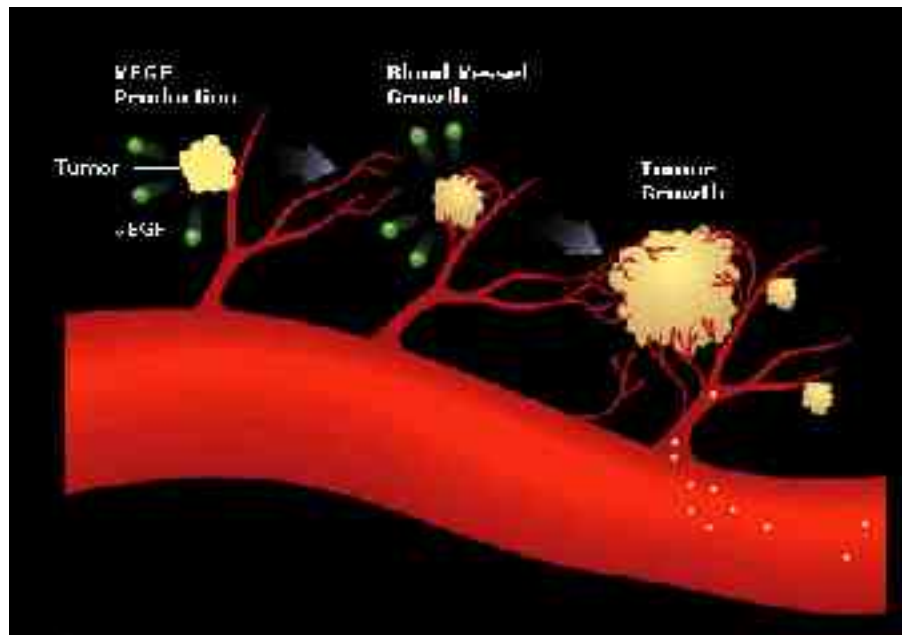
Nádorová onemocnění

NÁDORY BENIGNÍ

- rostou v původním ložisku, zachovávají charakter tkáně, ze které vznikly

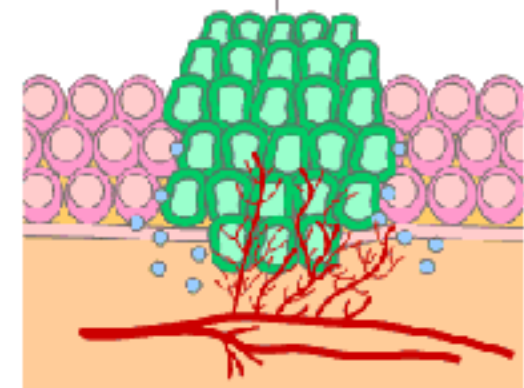
NÁDORY MALIGNÍ

- invazivní růst, poškozují strukturu a funkci tkáně, indukují vlastní angiogenezu, metastázuji



Angiogenesis

tumor that can grow and spread



Maligní nádorová onemocnění

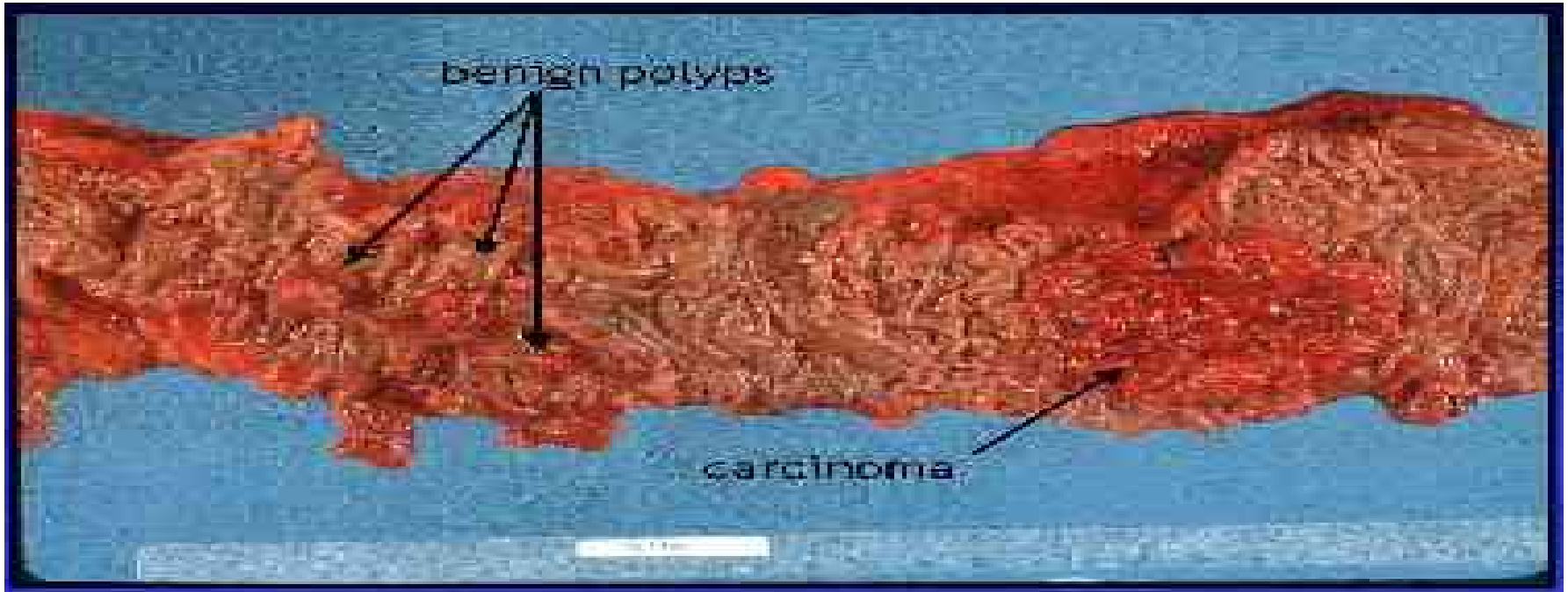
MALIGNÍ PROCES – VÍCESTUPŇOVÝ

- **několik na sobě nezávislých změn v genomu jedné buňky**
- **pre maligní stádium / maligní stádium**
- **mutace v protoonkogenech, tumor-supresorových genech, mutátorových genech**

EPIGENETICKÉ FAKTORY

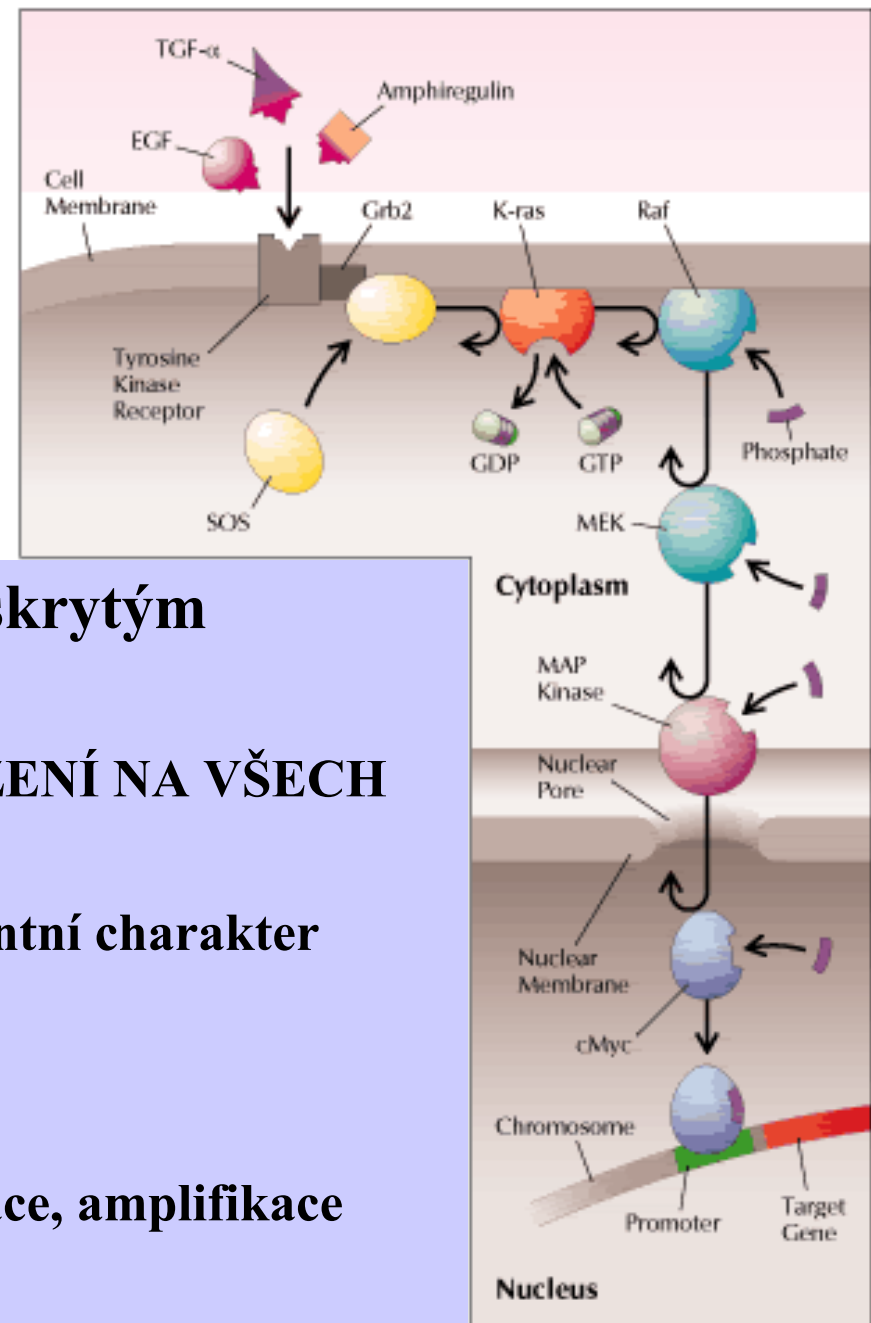
- **genomický imprinting - souvislost s metylací bazí genů**
(př. Wilmsův tumor)

FAP – VÍCESTUPŇOVÝ MALIGNÍ PROCES



- Mutace *APC* (5q21) – hyperplastický střevní epitel
- *Hypometylace DNA* – časně adenomy
- Mutace onkogenu *K-ras* (12p) – střední adenomatozní stádium
- *DCC* gen (18q) – pozdní stádium polypů
- Gen *TP53* (17p) – karcinom
- Další změny – metastazování

Protoonkogeny



PROTOONKOGENY – geny se skrytým onkogenním potenciálem

- **REGULACE BUNĚČNÉHO MNOŽENÍ NA VŠECH ÚROVNÍCH SIGNÁLNÍCH DRAH**
- většinou *somatické mutace* – dominantní charakter

MUTACE - typy

- *bodové* – substituce, delece, adice
- *chromosomální přestavby* – translokace, amplifikace
- *inserce virového genomu*

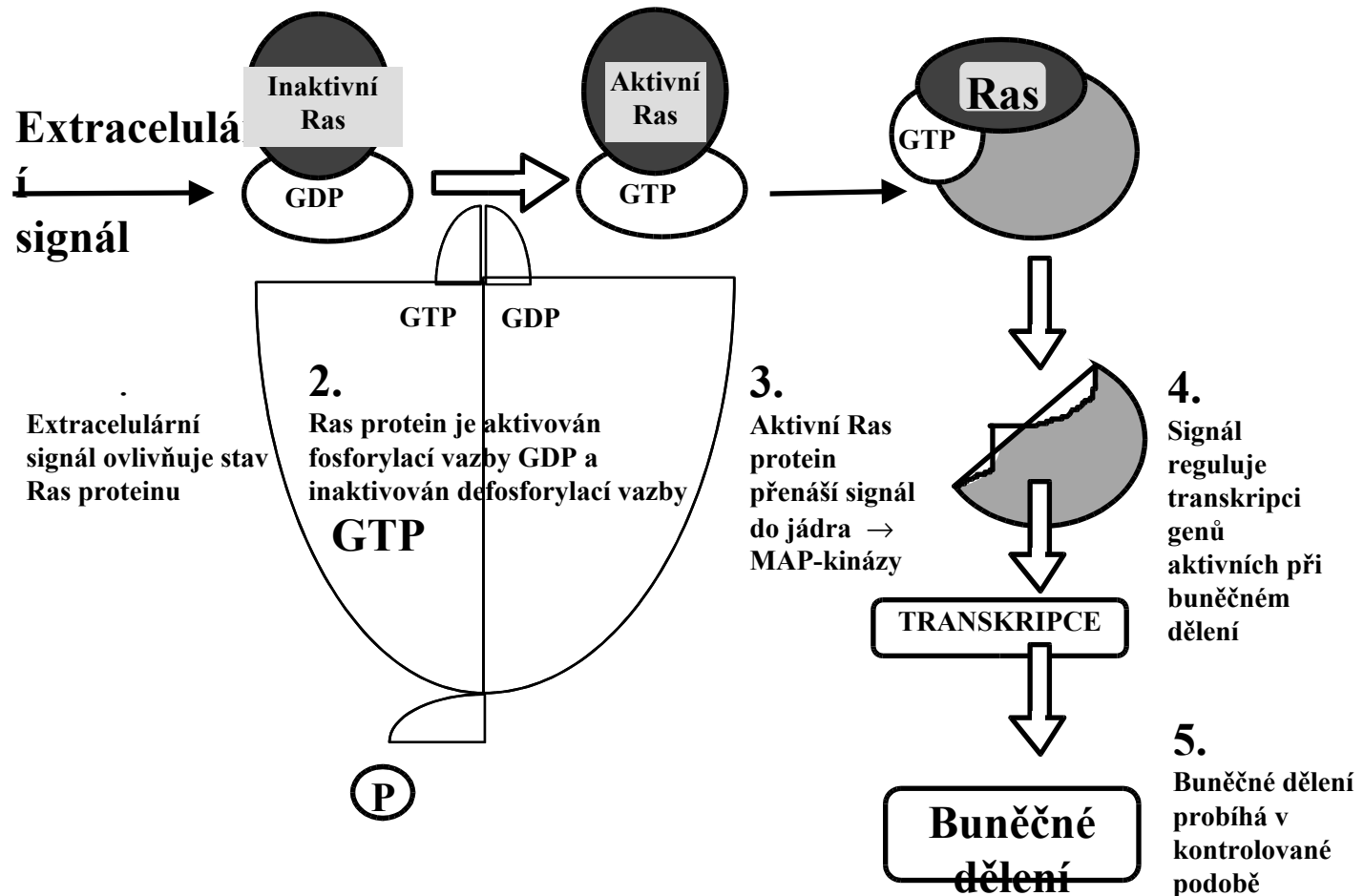
Protoonkogeny – úloha v regulaci buněčného dělení

- **Růstové faktory:** *sis* - PDGF, *hst* – FGF
- **Receptory růstových faktorů:** proteiny s tyrosinkinázovou aktivitou - *erb-B* – receptor pro EGF
- **Proteiny vázající GTP (G-proteiny):** genová rodina *ras*
- **Tyrosinkinázy plasmatické membrány:** fosforylace tyrosinu – *abl*, *src*
- **Cytoplasmatické proteiny:** MAP-kinázy Raf, MEK, MAP (signál cytoplasma → jádro)
- **Transkripční faktory:** protoonkogen *fos*, *jun*, *erb-A*
- **Kontrola buněčného cyklu:** protoonkogen *myc*, *myb* stimulují přechod z G1 do S fáze

Protoonkogen c-ras - signální dráha

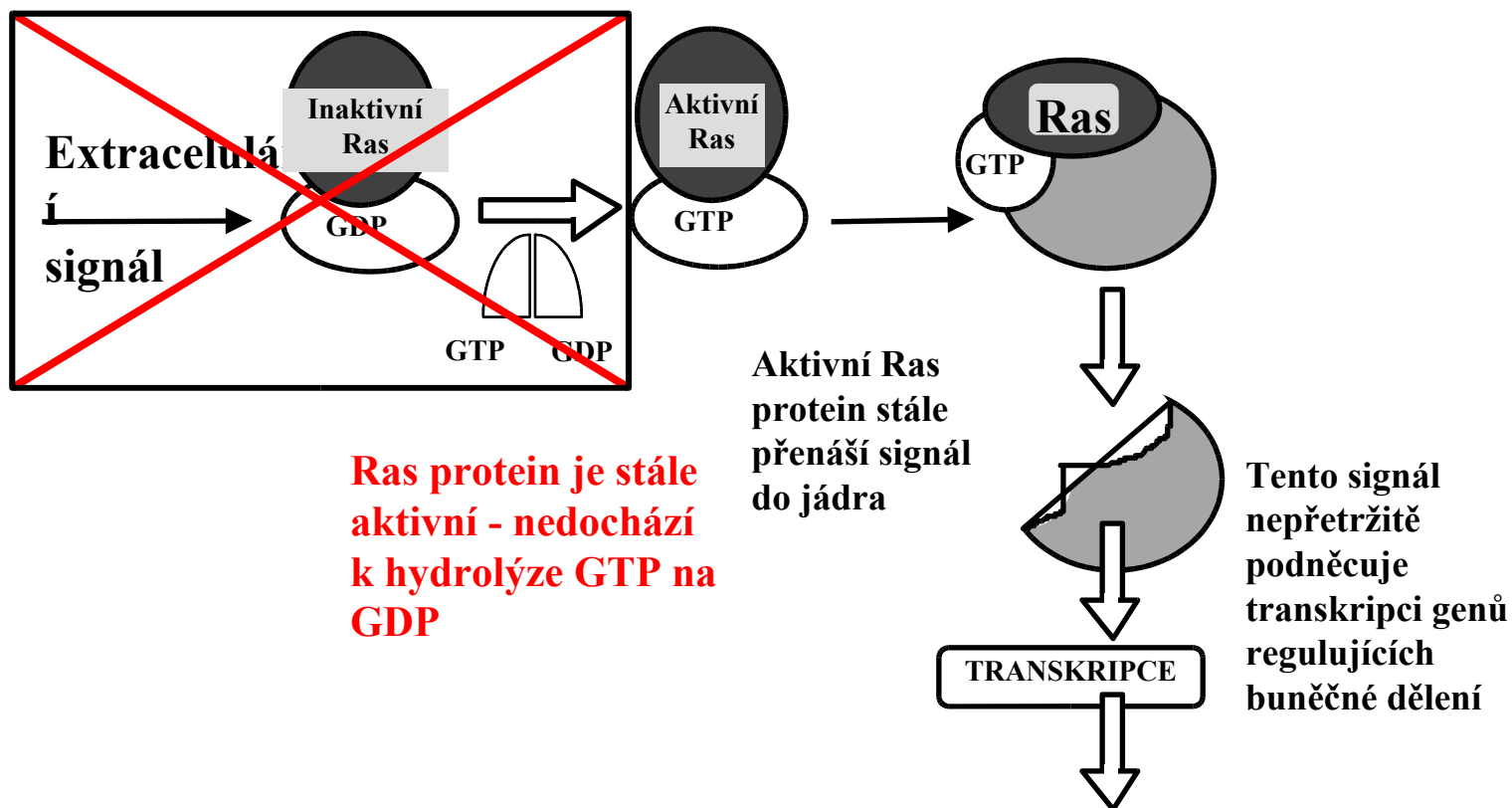
Příklad str. 145

- Definujte typ mutace v protoonkogenu c-ras.
- Jak ovlivní tato mutace přenos signálu?



Protoonkogen c-ras – str. 145 (výsledek)

Bodová mutace – substituce U→G (viz genetický kód, str. 83)



Buněčné dělení probíhá v nekontrolované podobě

Protoonkogen *c-ras*

– komentář

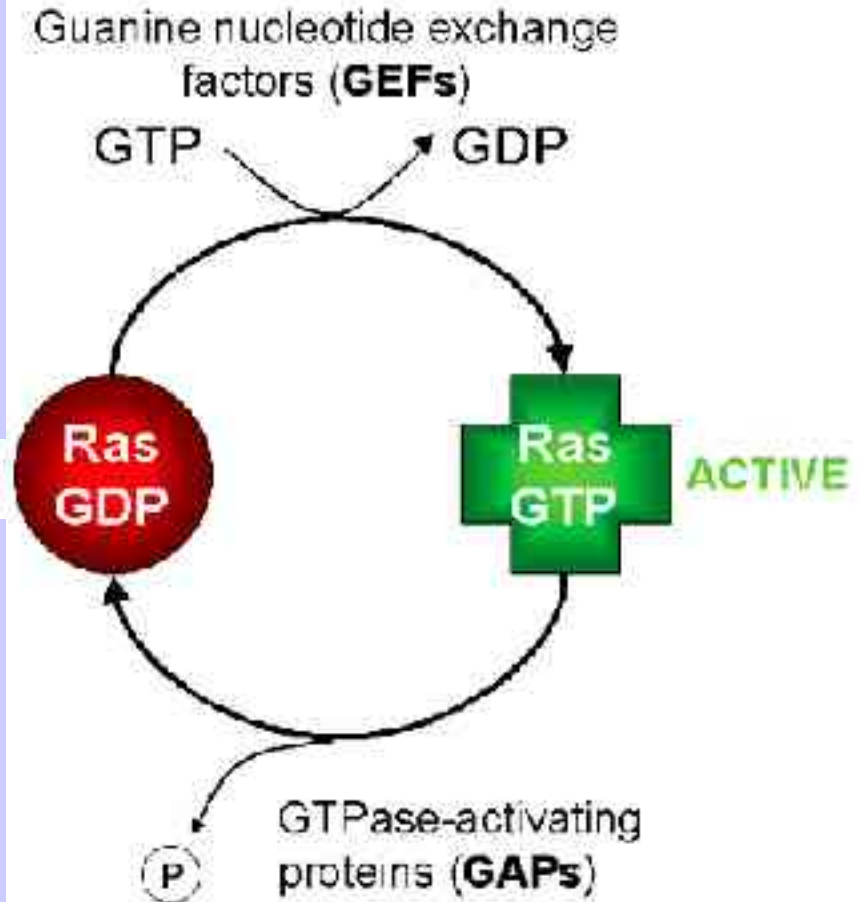
- Produkt je protein, který váže nukleotid nesoucí guanin
- Asociace s receptorem, který se váže s různými růstovými faktory
- Po aktivaci receptoru je uvolněn GDP vázaný k *c-ras* a naváže se GTP
- GTP aktivuje *c-ras*, ten předá signál fosforylací Raf – první v kaskádě MAP-kináz
- Tato signální dráha vede v jádře k aktivaci transkripčních faktorů nebo genů časně odpovědi jako např. *c-myc*

INACTIVE

Řešení:

c-ras se normálně inaktivuje hydrolyzou GTP na GDP

Některé mutace v *c-ras* znemožní inaktivaci nebo vedou k aktivitě *c-ras* bez vazby k GTP



Tumor-supresorové geny

MUTACE V TUMOR-SUPRESOROVÝCH GENECH RECESIVNÍ CHARAKTER

JEDNA MUTOVANÁ ALELA MŮŽE BÝT ZDĚDĚNA
AUTOSOMÁLNĚ DOMINATNÍ TYP DĚDIČNOSTI
DĚDÍ SE PREDISPOSICE

- *Sporadický výskyt* nádorového onemocnění: dvě somatické mutace, výskyt odpovídá frekvenci onemocnění v populaci
- *Familiární výskyt*: 1. mutace zárodečná, 2. somatická
- predisposice, časný vznik nádorů, multifokální nebo bilaterální výskyt, více členů rodiny má stejný typ nádoru
- Hypotéza dvou zásahů (Knudson)
- Ztráta vrozené heterozygosity (LOH) – vazebná analýza
- např. gen pro esterázu D (marker) je ve vazbě s genem *Rb1*

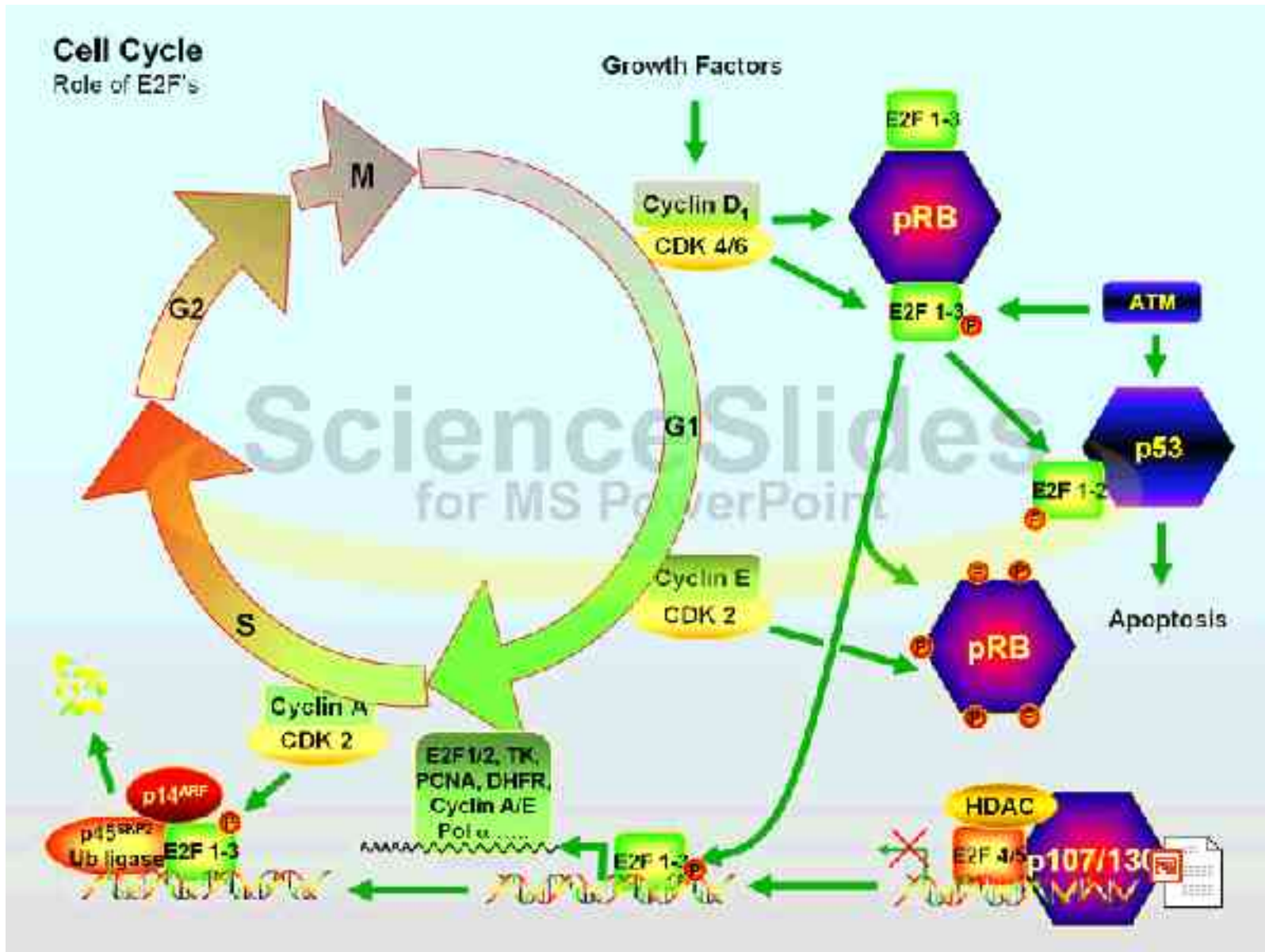
Tumor-supresorové geny – příčiny ztráty funkce

- **Delece** – mohou postihnout různé části genu
- **Mitotická nondisjunkce**
- **Mitotická rekombinace**
- **Uniparentální disomie** (oba chromosomy jsou původem od jednoho z rodičů)
- **Bodová mutace**
- **Inaktivace produktu** (vyvázání virovým antigenem)

Tumor-supresorové geny – vybrané příklady

Lokalizace nádoru	Gen	Chromosom	Mechanismus působení
oči (retinoblastom), kosti, prsa, plíce, močový měchýř, prostata	<i>Rb1</i>	13q14	Regulace buněčného cyklu
ledviny a další orgány (WAGR syndrom)	<i>WT1/WT2</i>	11p13	Regulace buněčného cyklu
různé typy nádorů (cca 50% všech nádorů mutace <i>TP53</i>)	<i>TP53</i>	17p13	Pozastavení cyklu v G ₁ - transkripční faktor
tlusté střevo (familiární adenoma-tózní polypóza), žaludek, nedě-dičné kolorektální karcinomy	<i>APC</i>	5q21	Regulace hladiny β -kateninu, buněčné proliferace a adheze
prsa, ovaria, prostata, larynx, zažívací trakt, pankreas	<i>BRCA1</i> <i>BRCA2</i>	17p21 13q12-q13	Chybný repair dvouvláknových zlomů DNA

ŘÍZENÍ BUNĚČNÉHO CYKLU



Tumor-supresorové geny – vybrané příklady: *RB1*

Retinoblastom – nádor očí

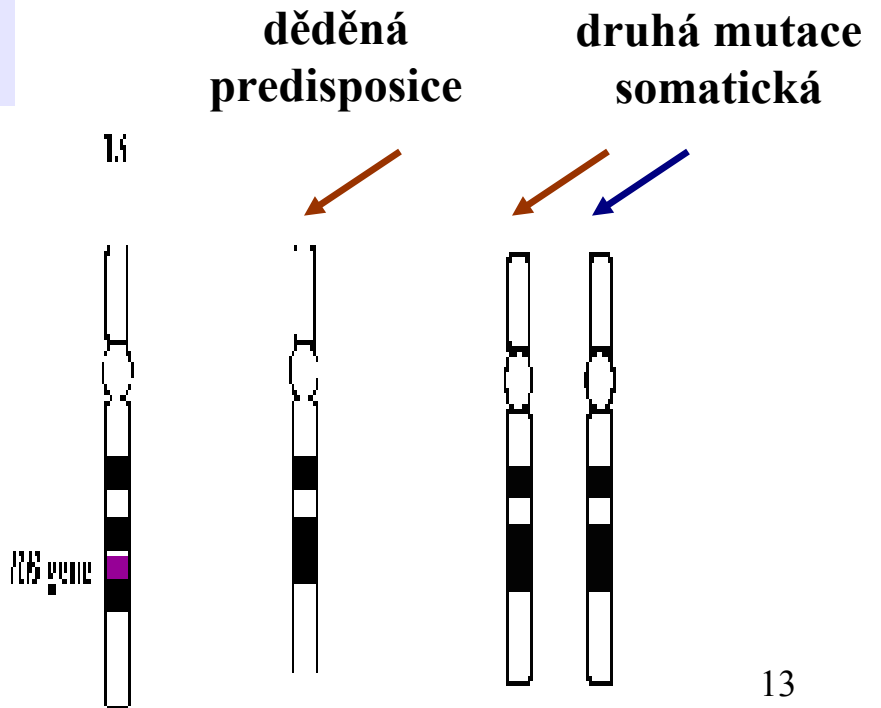
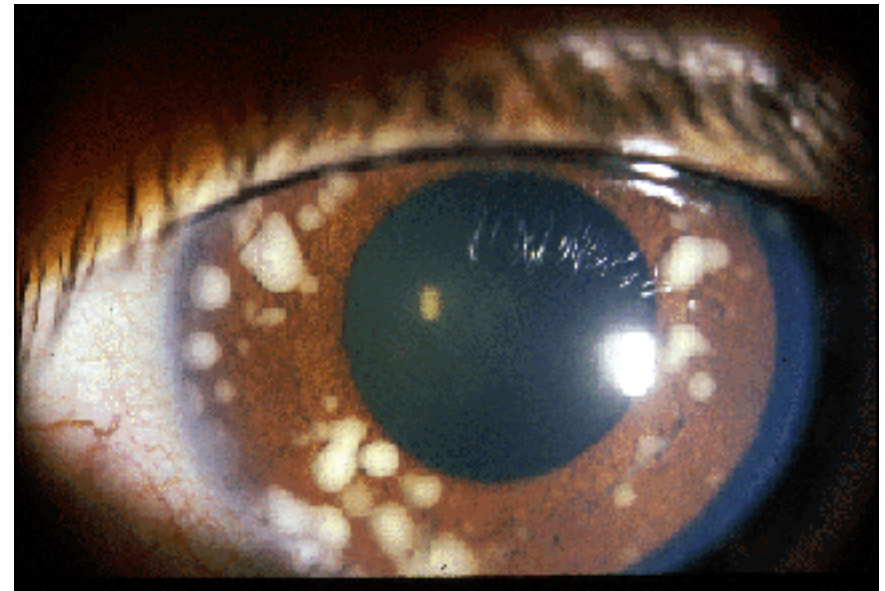
Většinou výskyt u dětí

Výskyt sporadický – 2
somatické mutace; unilaterální,
60% pacientů

Familiární výskyt –

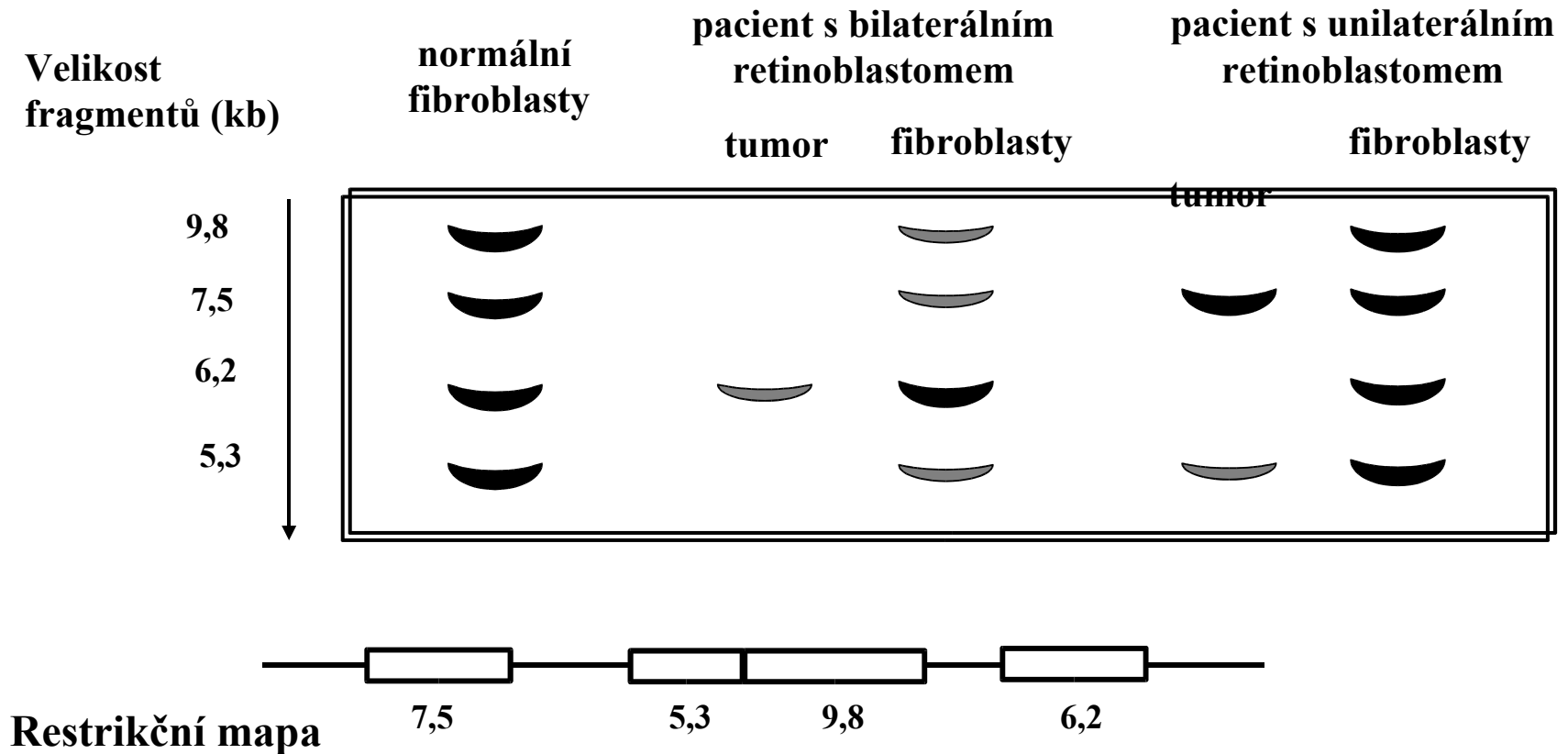
40% pacientů - 1. mutace
zárodečná, 2. somatická;
bilaterální onemocnění

Mutace obou genů na homologních
chromosomech jsou nezbytné
pro manifestaci nádorové
choroby



Retinoblastom – str. 142

Hybridizace (Southern blot) s DNA normálních jedinců a s DNA pacientů s jednostranným nebo oboustranným retinoblastomem



Velikost fragmentů (kb)

normální fibroblasty

tumor pacient s bilaterálním retinoblastomem

tumor pacient s unilaterálním retinoblastomem

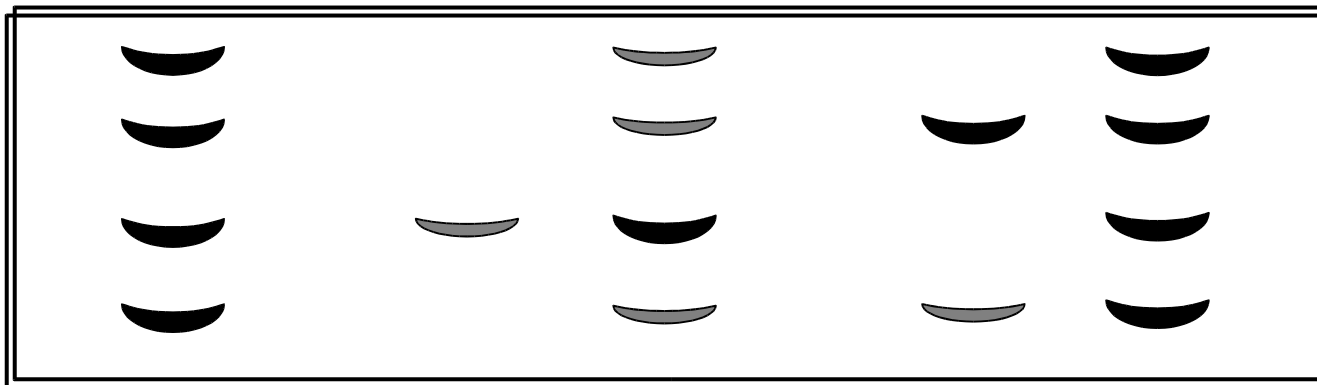
fibroblasty

9,8

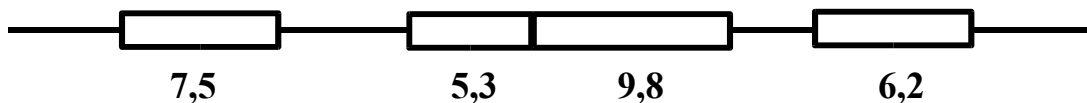
7,5

6,2

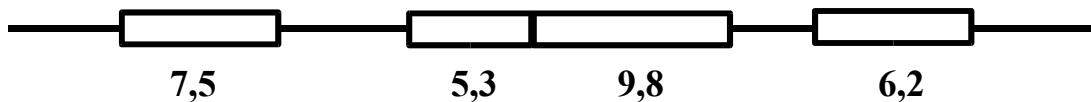
5,3



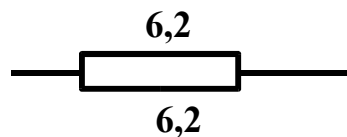
Restrikční mapa



FIBROBLASTY

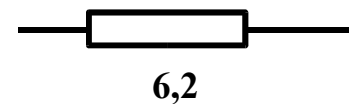


Zárodečná mutace

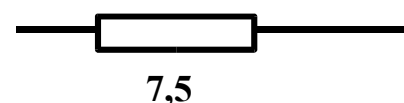
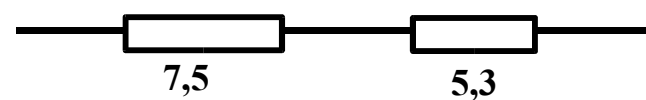
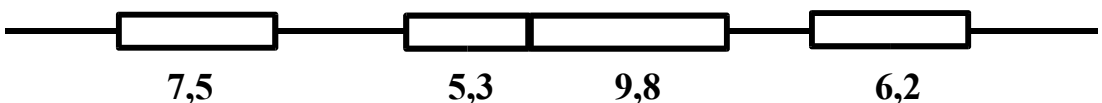
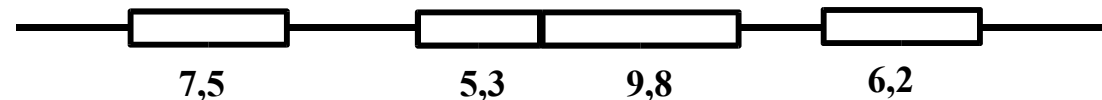


RETINOBLASTOM

Somatická mutace



Dvě somatické mutace

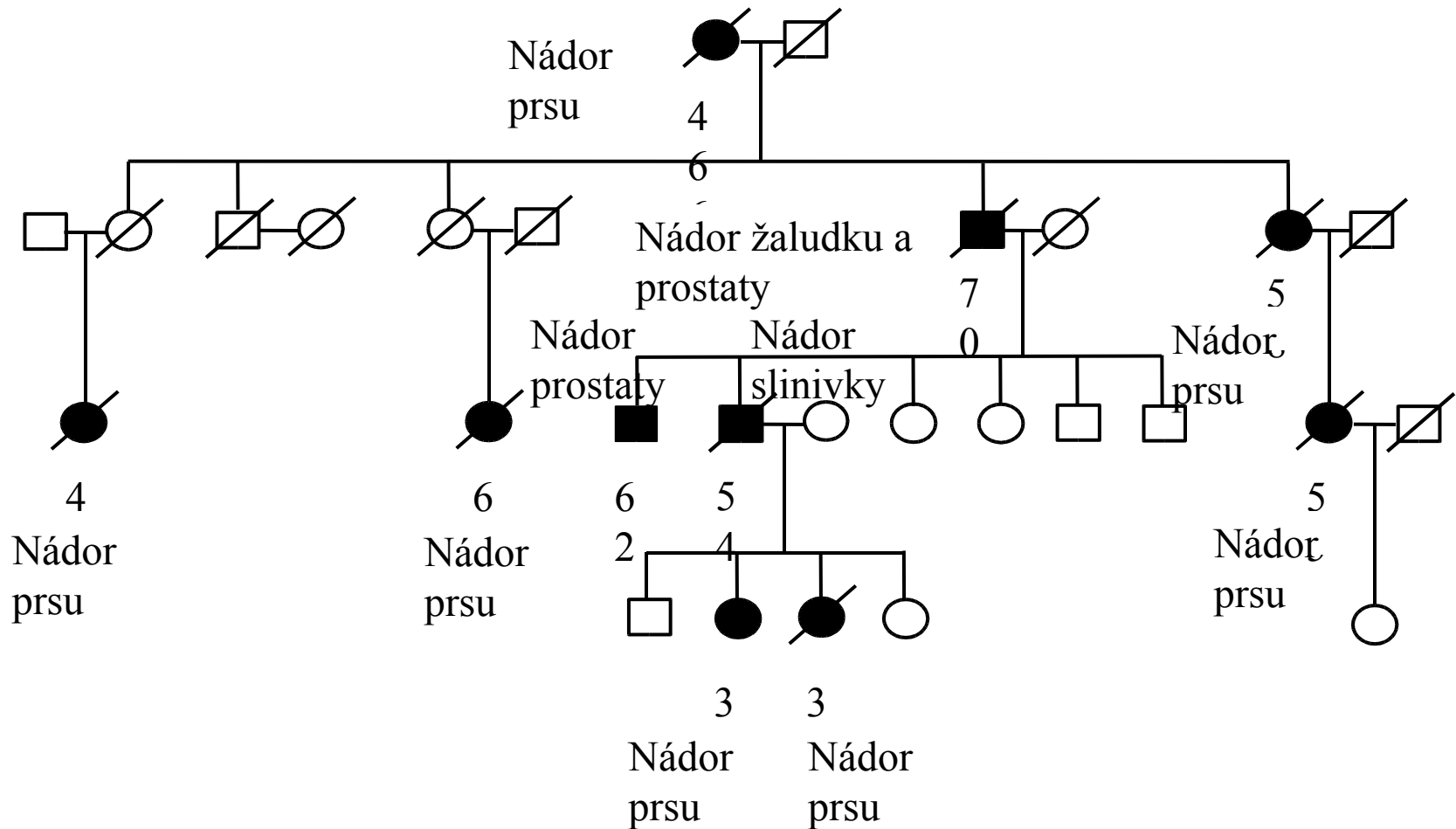


Tumor-supresorové geny *BRCA1*, *BRCA2*

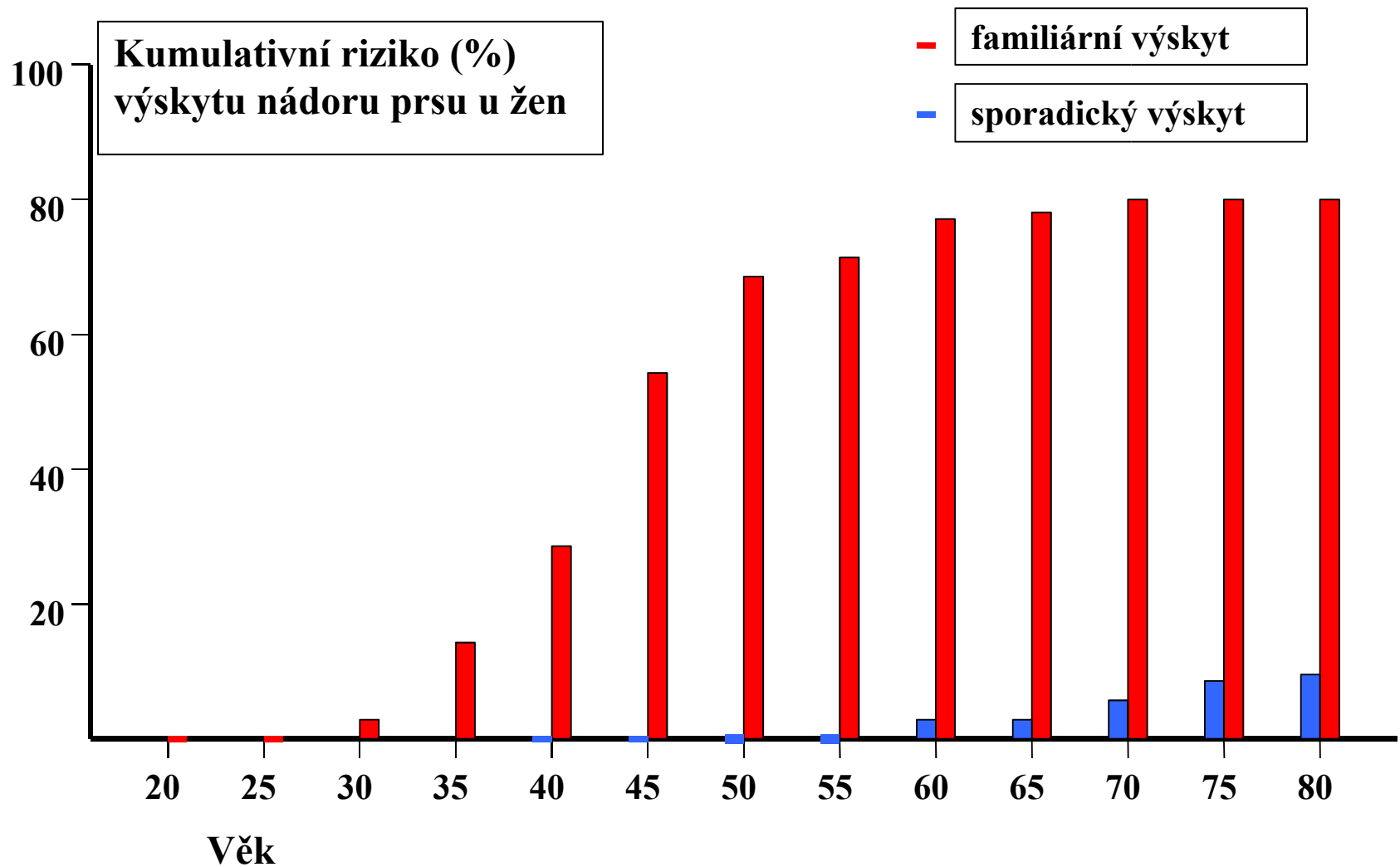
*Při familiárním výskytu nádoru prsu nebo prsu a ovarií jsou v genetickém poradenství využívány dva tumor-supresorové geny **BRCA1** (breast cancer 1) a **BRCA2** (breast cancer 2)*

- Produkty obou genů *BRCA* tvoří komplexy s produkty dalších genů a podílejí se tak na regulaci průběhu buněčného cyklu a při repairu DNA
- Děděná mutace *BRCA1* se vyskytuje u žen v rodinách s familiárním výskytem nádoru prsu, ovarií anebo prsu a ovarií
- Zárodečná mutace genu *BRCA2* je asociována s výskytem nádoru prsu u žen i mužů; u mužů také se vznikem nádoru prostaty, pankreatu a s Fanconiho anémií

Příklad familiárního výskytu nádorů asociovaných s mutací genu *BRCA2*

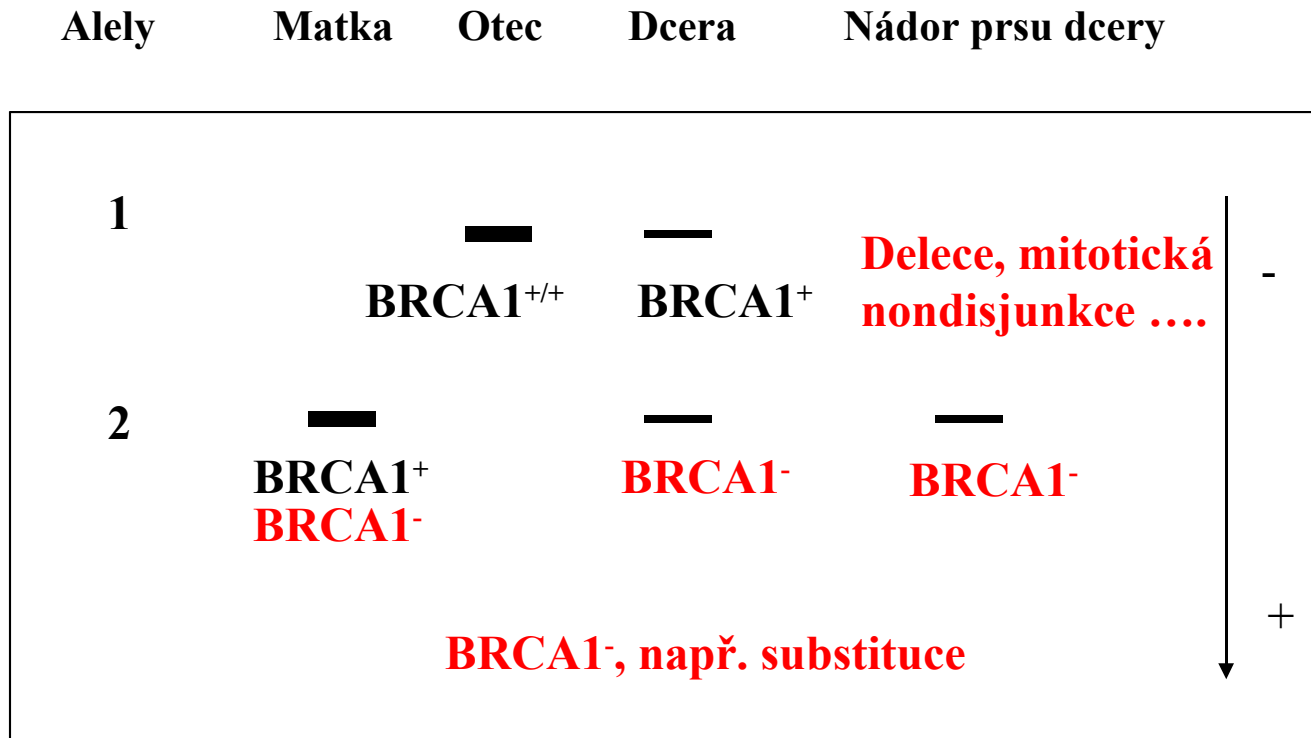


Sporadický a familiární výskyt nádoru prsu v populaci žen



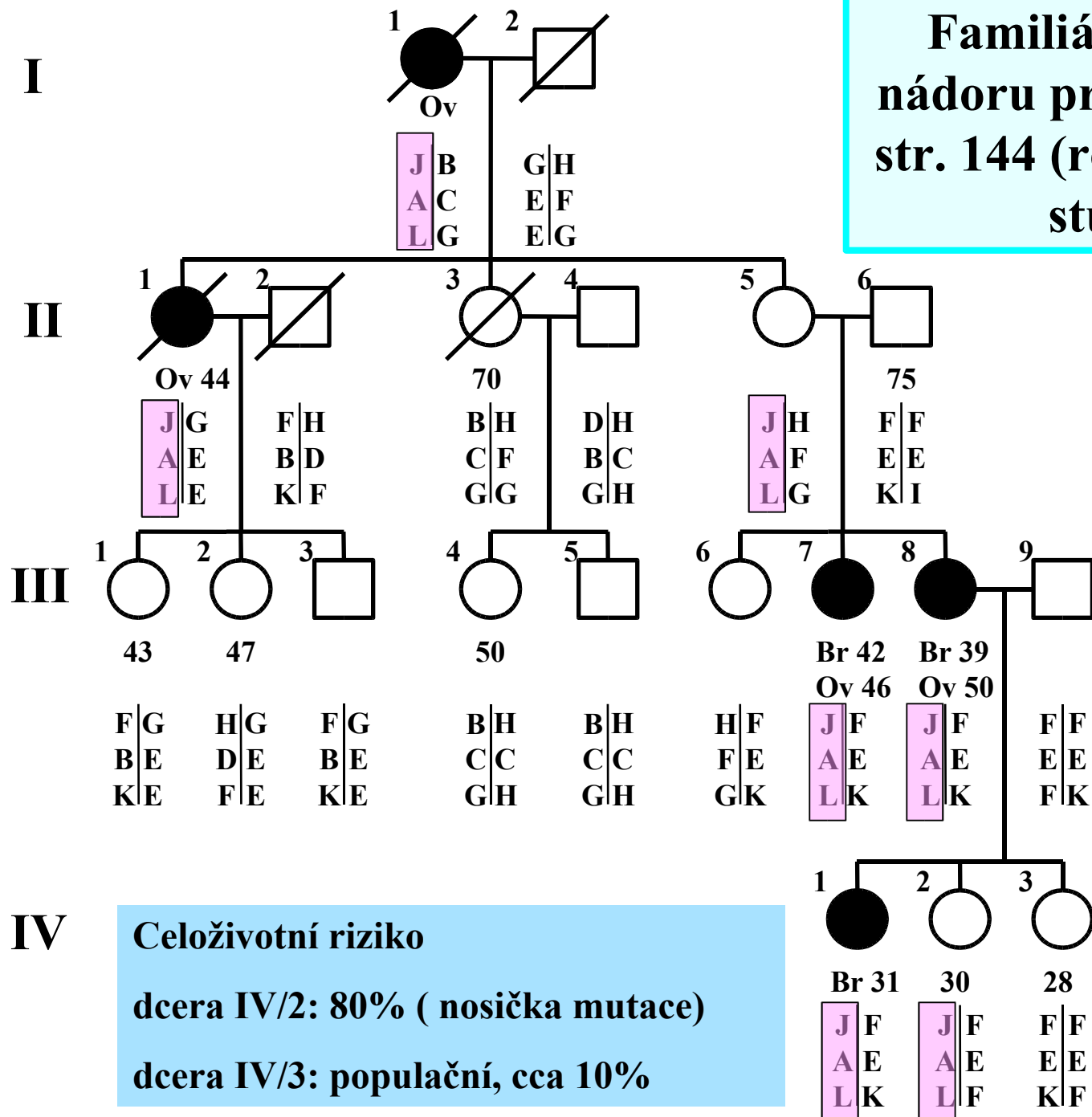
Vazebná analýza marker genu s genem *BRCA1*

- str. 143-144



Vyšetřované buňky matky, otce, dcery: fibroblasty nebo leukocyty₁₉
 Ztráta heterozygosity (LOH)

Familiární výskyt nádoru prsu a ovárií – str. 144 (rodokmenová studie)

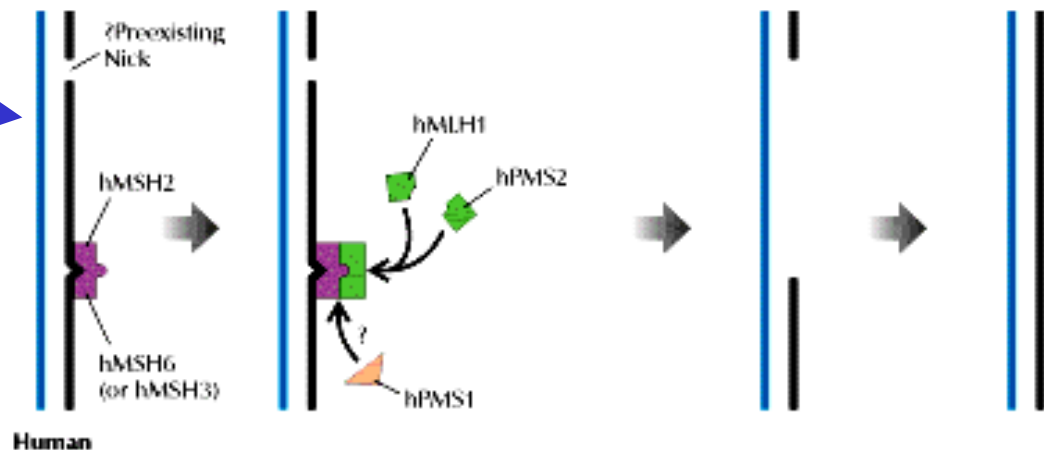


IV Celoživotní riziko
dcera IV/2: 80% (nosička mutace)
dcera IV/3: populační, cca 10%

Mutátorové geny (geny mismatch repairu)

- hMSH2, hMLH1, hPMS1, hPMS2, hMSH6, hMSH3
- Kontrola stability buněčného genomu
- Opravy chybného párování bází (při replikaci)
- Mutace MMR genů se ve fenotypu projevují nestabilitou délky mikrosatelitních lokusů (př. CA_n)
- Mutace MMR zvyšují frekvenci mutací v genomu 100 –1000x
- Mutace MMR mají recesivní charakter
- AD dědičnost nádorového onemocnění
- Lynchův syndrom I –nádory tlustého střeva a rektu
- Lynchův syndrom II - kolorektální karcinomy, a u 30% pacientů nádory endometria, žaludku, slinivky, močového traktu

MMR geny rozpoznají **původní vlákno** DNA, které má methylované některé báze – oprava na novém vláknu



Chromosomální nálezy v nádorových buňkách

Nenáhodné (primární)

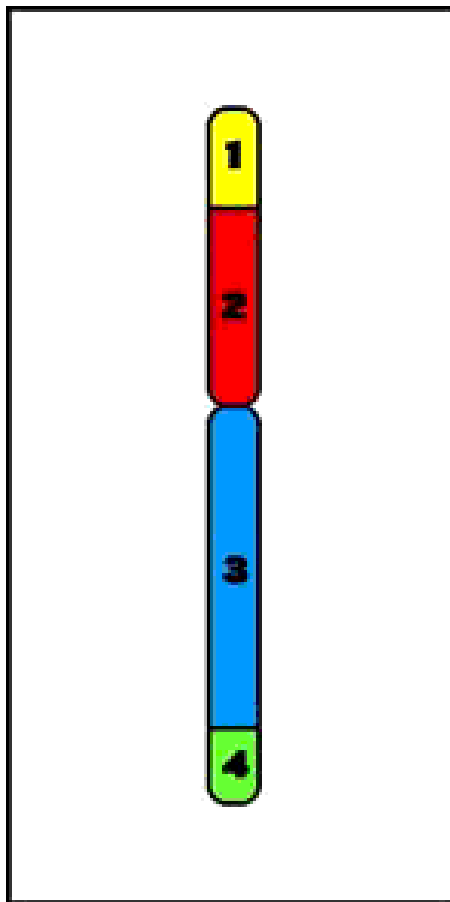
- **Filadelfský chromosom (Ph1)**
- **Translokace – Burkittův lymfom**
- **Amplifikace, double-minutes**

Náhodné (sekundární)

- **Nepravidelně se vyskytující chromosomální přestavby (náhodné delece, translokace, dicentrické chromosomy, prstencové chromosomy, isochromosomy)**
- **Heterogenní počet chromosomů, např. pseudodiploidní**

Náhodné chromosomální nálezy v nádorových buňkách

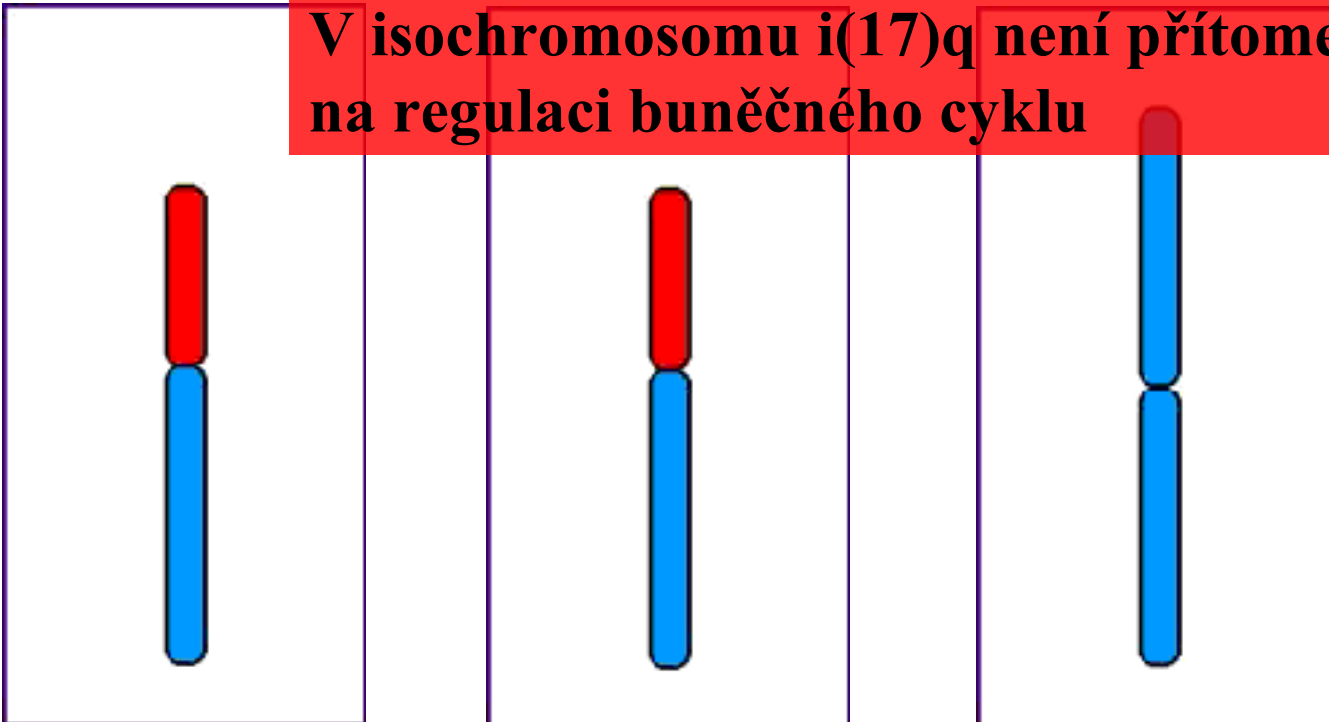
Prstencový (ring) chromosom



Náhodné chromosomální nálezy v nádorových buňkách *isochromosom* – příklad str. 146

Na p raménku chromosomu 17 je lokalizovaný tumor-supresorový gen *TP53*

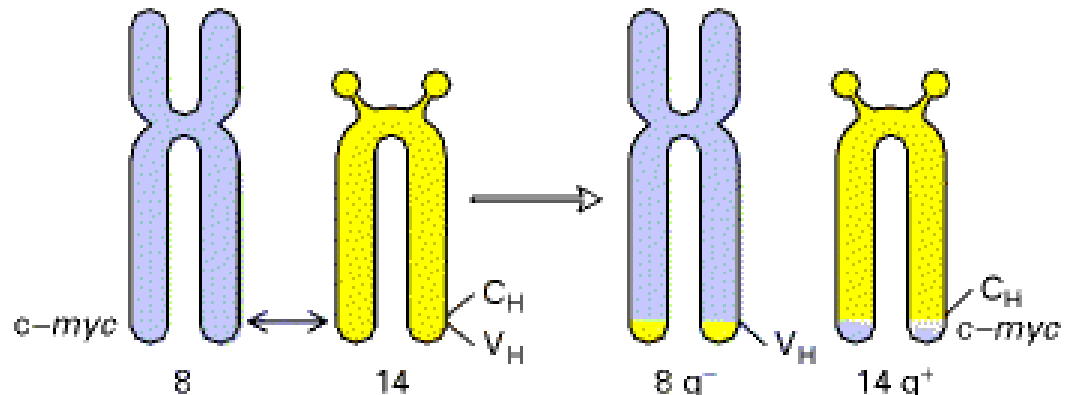
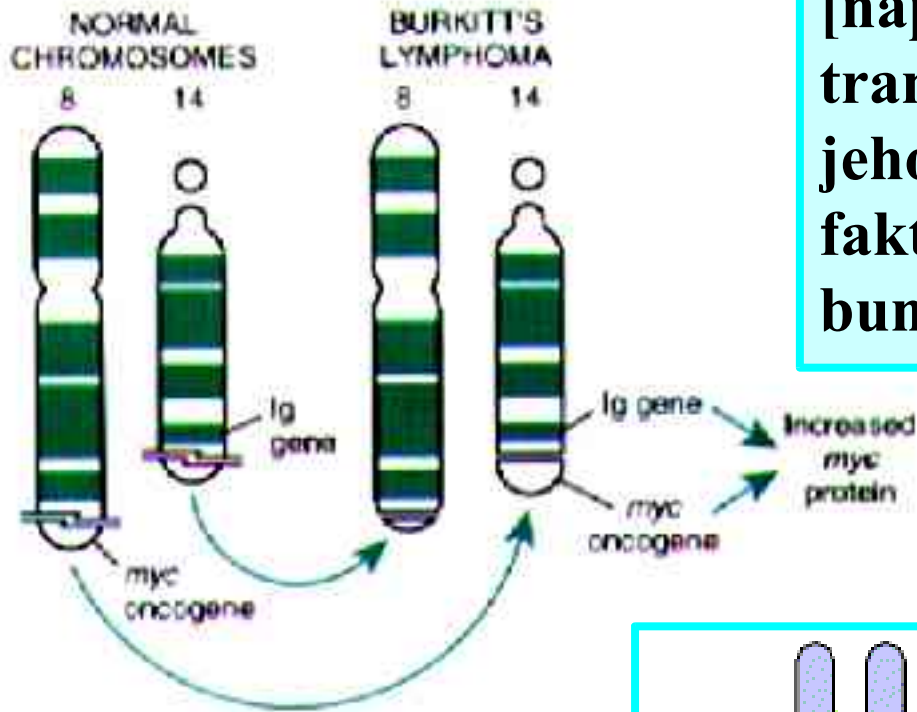
V isochromosomu $i(17)q$ není přítomen → vliv na regulaci buněčného cyklu



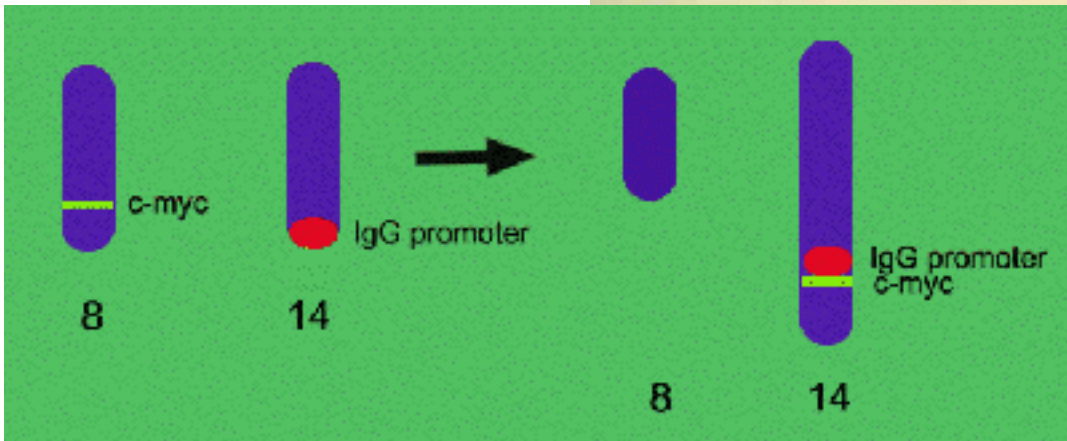
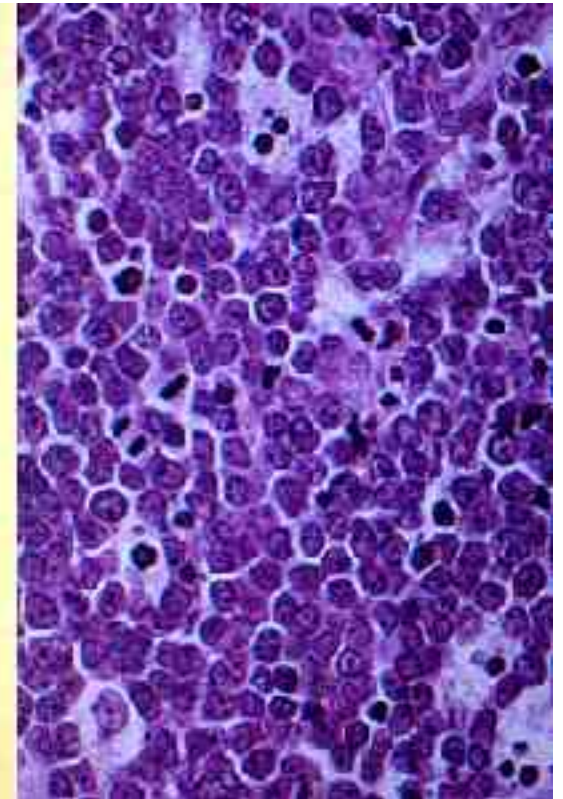
Protoonkogen *erbA* je lokalizovaný na chromosomu 17q
Kóduje vazebnou doménu receptoru glukokortikoidu a estrogenu → navýšení

Nenáhodné chromosomální nálezy Burkittův lymfom

Translokace protoonkogenu *c-myc* [např. $t(8;14)$] vede ke zvýšené transkripci genu; jeho produkt je transkripční faktor pro geny, které kontrolují buněčnou proliferaci



Nenáhodné chromosomální nálezy – Burkittův lymfom



Nejčastěji translokace
 $t(8;14)$,
ale i $t(2;8)$, $t(8;22)$

Chronická myeloidní leukemie (CML)

Filadelfský chromosom (Ph)

Filadelfský (Ph) chromosom - reciproká translokace mezi chromosomem 9 a 22 - { t(9;22)(q34;q11) }

Cytogenetický prognostický marker u 90% případů chronické myeloidní leukemie (CML)

Cytogenetický marker u 5 -20% případů akutní lymfocytární leukemie (ALL)

Translokace → fuzní gen BCR-ABL, zlom v BCR ("breakpoint cluster region") genu na chromosomu 22 a ABL protoonkogenu (Abelsonova leukemie – v-onc) na chromosomu 9

Produkt fuzního genu je onkoprotein 210 kD, má transformační schopnosti

Fuzní gen BCR-ABL → výsledek fuze buď exonu 1-2 BCR genu nebo exonu 1-3 BCR genu s exonem 2 genu ABL

Nenáhodná chromosomální aberace

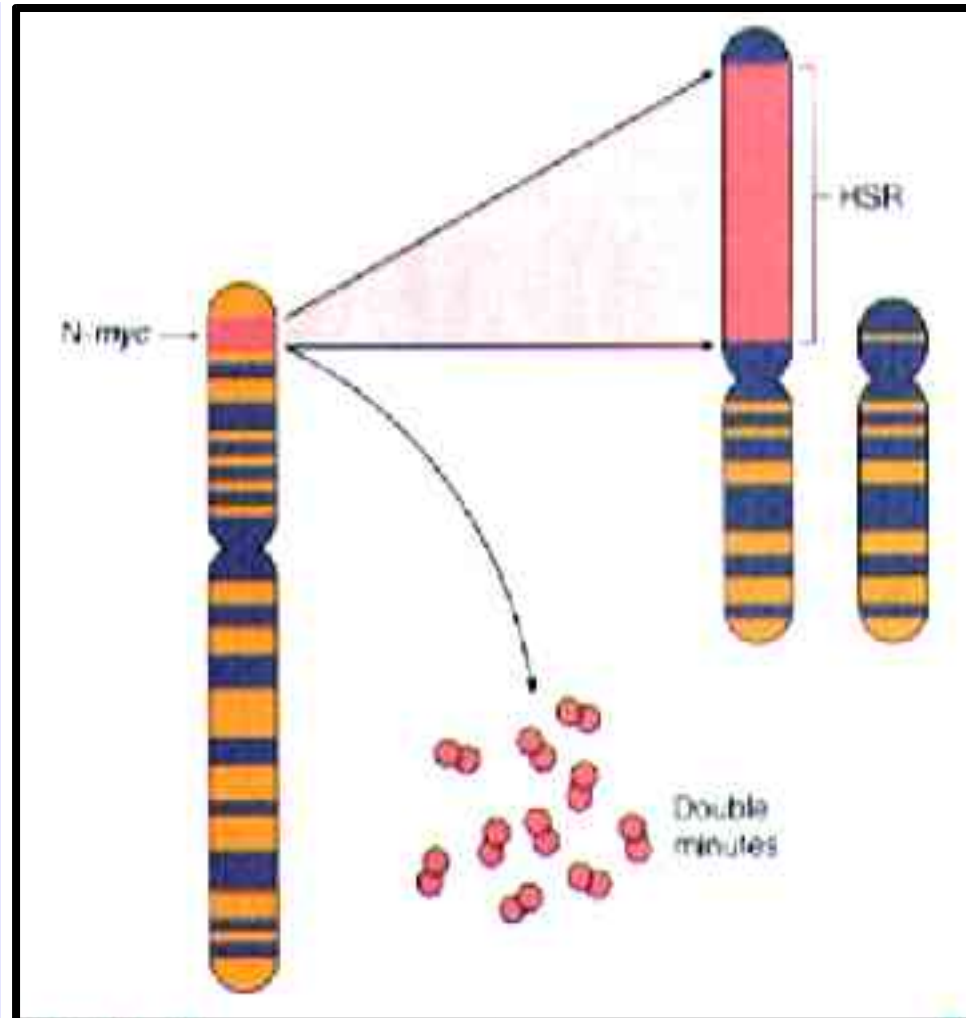
Amplifikace - protoonkogen *N-myc*

Amplifikace sekvence DNA

A) homogenně zbarvené oblasti (HSR)

B) samostatné útvary - double minutes

- diagnostický a prognostický marker
- rodina protoonkogenů myc (virus myeloblastózy kuřat) regulace buněčného cyklu
- N-myc – neuroblastom
- L-myc – malobuněčné karcinomy plic



Metoda FISH

Spojení postupů klasické cytogenetiky a technologie molekulární genetiky

Založena na schopnosti jednovláknové (denaturované) sondy DNA vázat se k cílové sekvenci (princip komplementarity)

Použití pro vyšetření chromosomů v mitoze nebo v interfázi

DNA sonda je předem označena některým fluorochromem (př. Texas Red, FITC, atd.)

Je možné použít několik typů sond – konkrétní sondu volíme podle indikace vyšetření

- ***Centromerické sondy***: tvořeny α -satelitními sekvencemi repetitivní DNA přítomné v oblasti centromery → rychlá detekce numerických aberací, zejména v nedělicích se buňkách
- ***Lokus-specifické sondy***: váží se specificky na vybrané místo (lokus) na chromosomu → stanovení některých strukturálních změn (mikrodeleční syndromy, specifické³⁰ translokace u některých malignit atp.)

Metoda FISH

- *Celochromosomové sondy (malovací)*

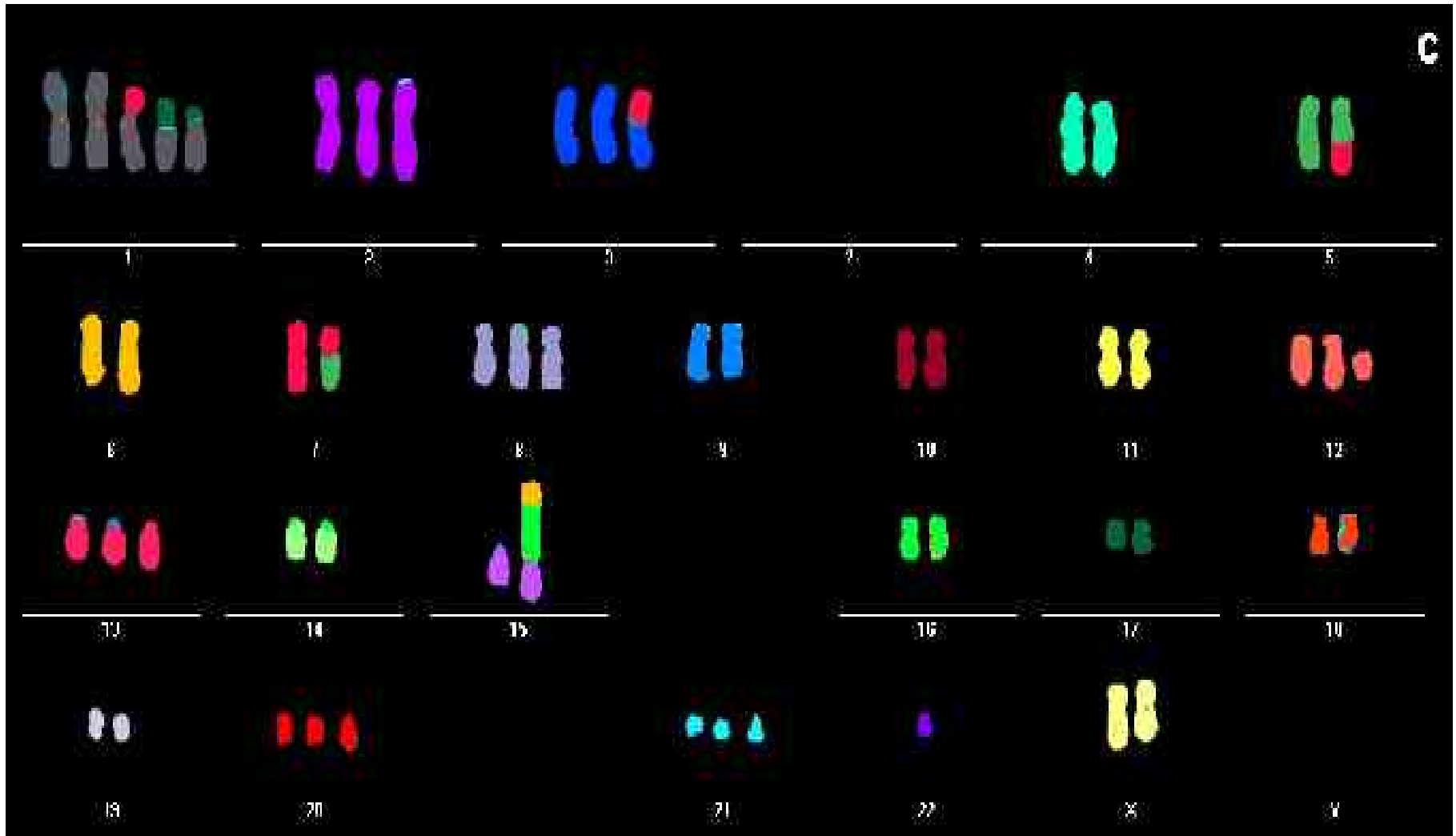
Připraveny jako směs fragmentů DNA konkrétního chromosomu

Po jejich aplikaci dojde k “obarvení” celého chromosomu

Používají se pro určení některých strukturálních aberací, jako jsou translokace, inserce nebo komplexní přestavby (hlavně v buňkách nádorů), a dále pro stanovení původu nadpočetných marker- nebo ring-chromosomů

Tyto sondy vyžadují chromosomy v metafázi, pro interfázní jádra je nelze použít

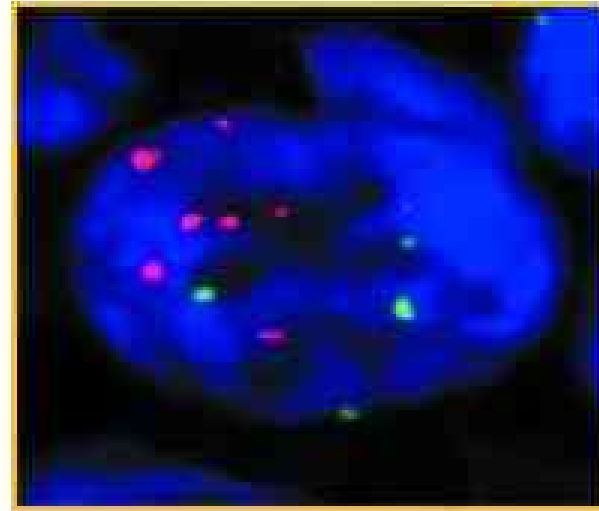
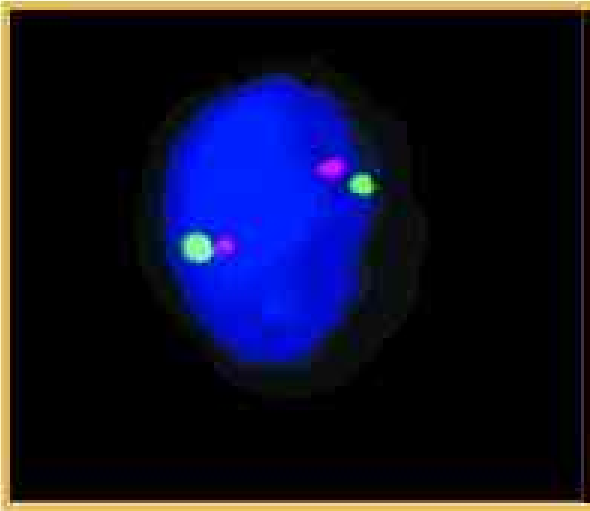
Mnohobarevná malovací sonda – karyotyp nádor (hyperdiploidní počet chromosomů + přestavby)



Lokus-specifická interfázní sonda – nádor prsu

Charakterizujte rozdílnost signálů v buňkách.
Jaký typ metody FISH byl použit?

Protoonkogen Her-2/neu kóduje receptor pro epidermální růstový faktor s tyrosinkinázovou aktivitou
Centromera – zelený signál Her-2/neu – červený signál)



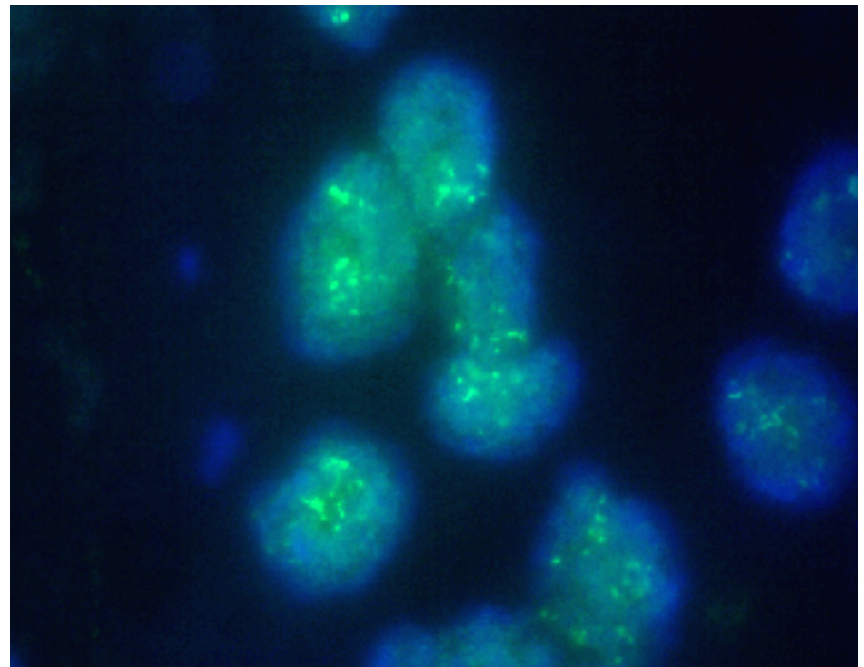
2x zelený signál v obou interfázních jádrech = přítomnost páru homologních chromosomů (na obou snímcích)

Her-2/neu – červený signál: **2x ve zdravé tkáni** (na každém chromosomu 1x), ale **7x v buňce nádoru**, tzn. 6x amplifikovaný gen na jenom chromosomu)

Amplifikace genu Her-2/neu - prognostický a diagnostický marker u karcinomů prsu i dalších nádorů (např. nádory močového měchýře)

Amplifikace protoonkogenu *L-myc* malobuněčný karcinom plic

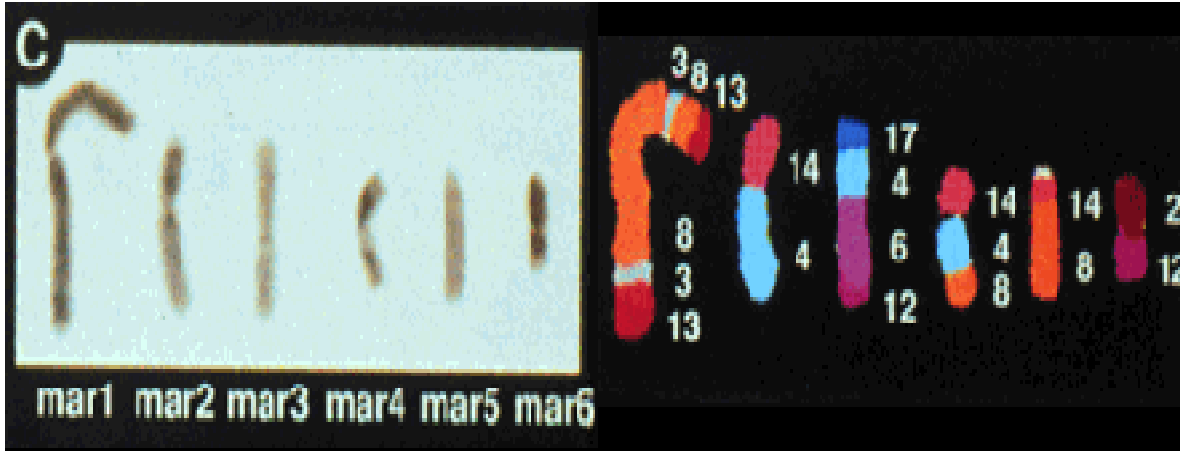
- metoda FISH
- mnohočetné kopie protoonkogenu L- myc
- nepříznivá prognóza
- mnohonásobná amplifikace tvoří „oblak“, jednotlivé signály jsou nesnadno detekovatelné



Chromosomální přestavby v buňkách nádoru prsu

Stanovte, který vzorek představuje náhodné, který nenáhodné chromosomální aberace.

Multicolor FISH



Chromosomy buněk nádoru prsu

Mnohočetné náhodné strukturální přestavby

Detekce Her-2/neu metodou FISH



Nádor prsu – amplifikace protoonkogenu Her-2/neu
Ve většině nádorových buněk (mnoho signálů tvoří “oblak”)

Nenáhodná chromosomální přestavba

Karyotyp charakterizuje závažnost onemocnění, naznačuje prognózu, je vodítkem pro volbu terapie

Komparativní genomická hybridizace (CGH)

CGH - molekulární cytogenetická metoda

Identifikuje mnohočetné chromosomální nebalancované přestavby v nádorových buňkách, nedetekuje balancované přestavby

Patologická změna musí být nejméně v 50% buněk

Genomická DNA zdravé a DNA nádorové tkáně - simultánní *in situ* hybridizace s normálními chromosomy v metafázi

Detekce probami – pro DNA nádoru zelená fluorescence, DNA zdravé tkáně (kontrolní DNA) červená fluorescence

Poměr intensity těchto dvou fluorescenčních signálů udává míru rozdílu mezi vzorkem DNA izolované ze zdravých a nádorových buněk

Hodnocení fluorescenčních signálů vyžaduje zařízení pro

Komparativní genomická hybridizace (CGH)

