

Jak vznikají lymfomy

Prof. RNDr. Jana Šmardová, CSc.

Ústav patologie FN Brno
PřF a LF MU Brno

XVII. Ročník kurzu genetiky a
molekulární biologie pro učitele
středních škol



8.9.2015, Brno

Jak vznikají lymfomy

Prof. RNDr. Jana Šmardová, CSc.

Ústav patologie FN Brno
PřF a LF MU Brno

Mgr. Jana Koptíková, Ph.D.

Institut biostatistiky a analýz LF MU
Brno



8.9.2015, Brno

Jak vznikají lymfomy

Osnova



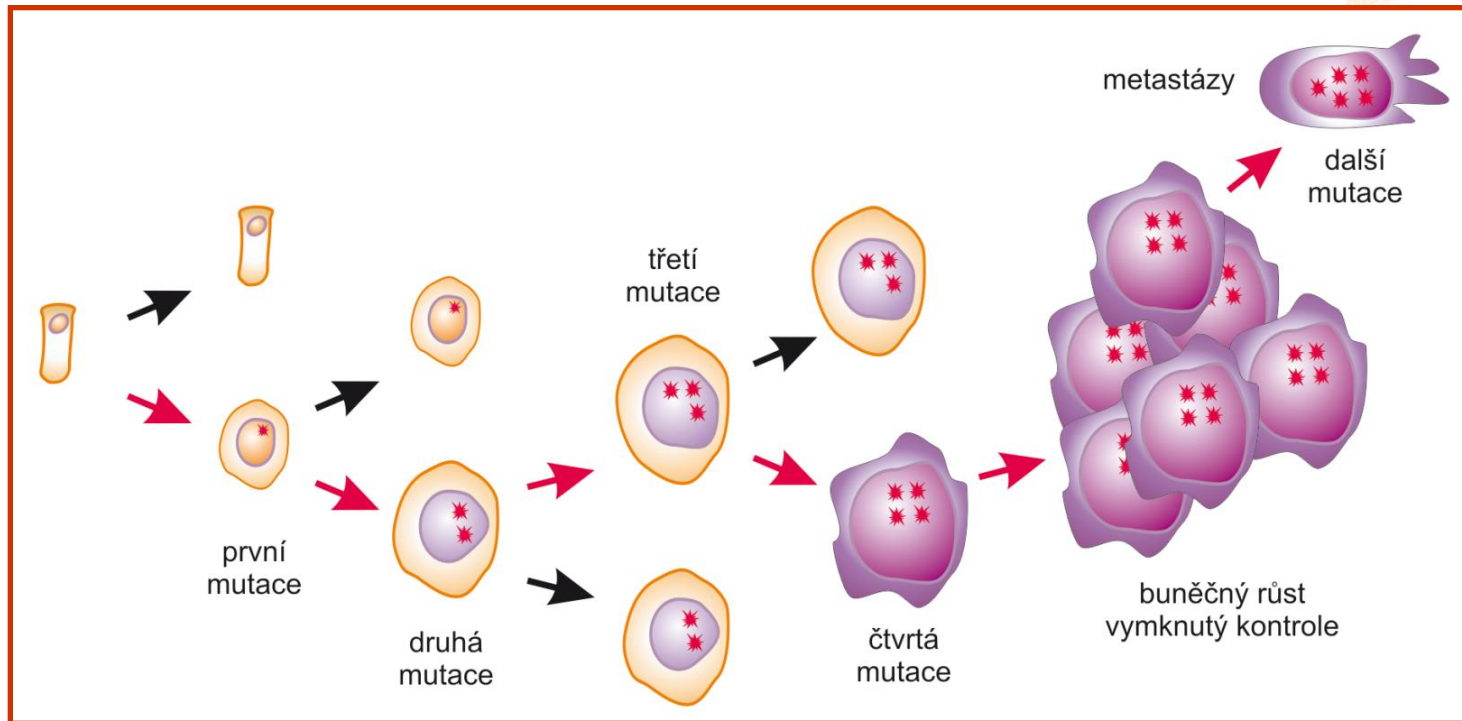
- Jak vznikají nádory
- Kterými vlastnostmi se liší nádorová buňka od zdravé?
 - poškození regulace buněčného dělení
 - poškození programované buněčné smrti
 - získání neomezeného replikačního potenciálu
 - indukce angiogeneze
 - tvorba metastáz
 - navýšená genetická nestabilita
- Lymfomy, lymfocyty, protilátky
- Vývoj B lymfocytů
- Vznik lymfomů
- Závěr

Jediná odrodilá buňka

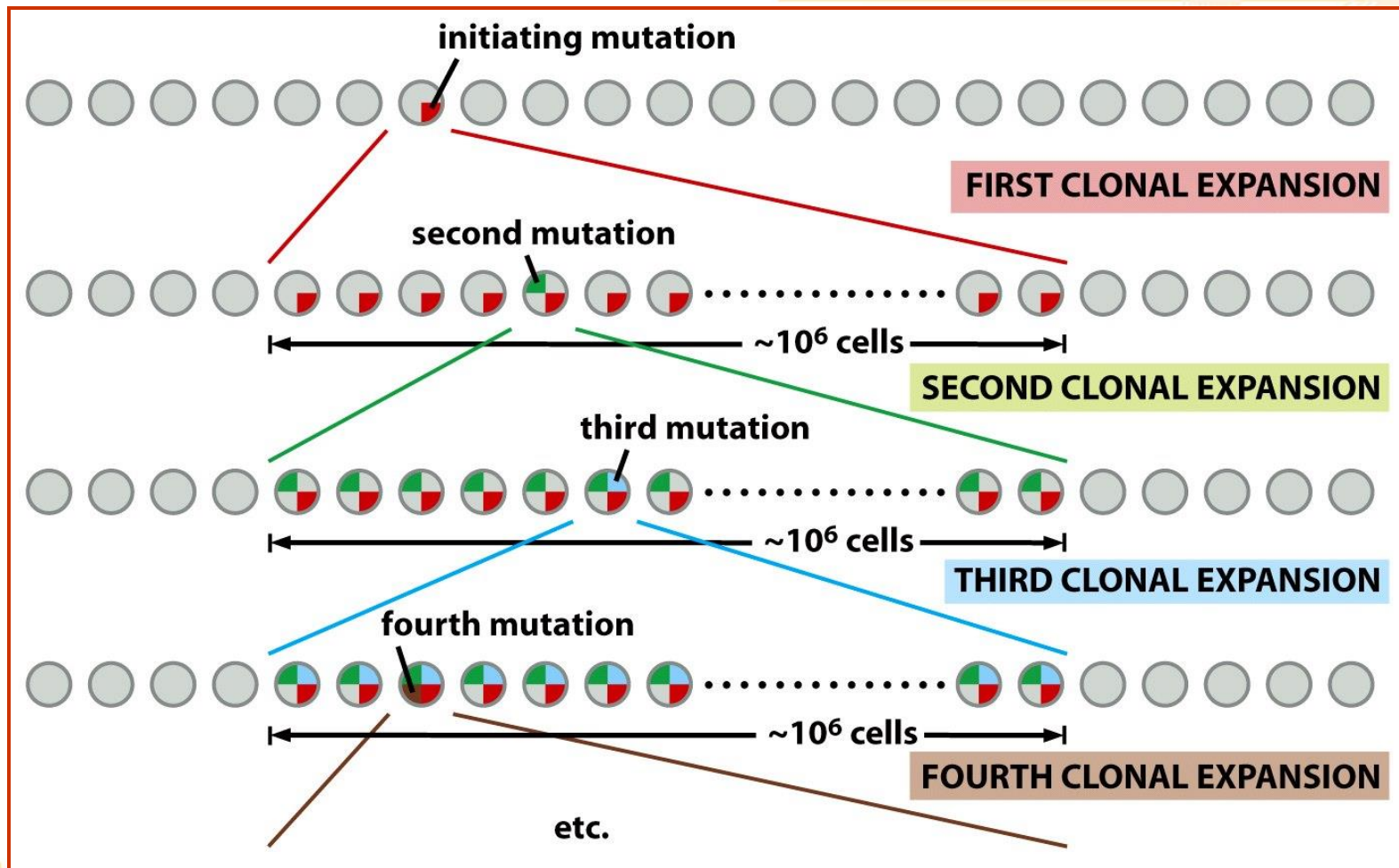


- Nádory vznikají porušením základních pravidel sociálního chování.
- Pro organismus nepředstavuje vážné riziko, pokud se jednotlivá buňka nahodile nezachová správně. Potenciálně nebezpečná situace nastává tehdy, pokud dojde v jedné buňce ke genetické (nebo epigenetické) změně, která buňce dovolí přežít, rozdělit se a tak produkovat dceřiné buňky s podobně asociálním chováním.
- Organizace tkáně nebo i celého organismu tak může být rozvrácena postupně expandujícím klonem abnormálních buněk.

Nádorová buňka se vyvíjí postupným hromaděním genetických (a epigenetických) změn



Vícestupňová kancerogeneze spojená s kroky klonální expanze (selekce)



Onkogeny a nádorové supresory



Protoonkogen je strukturní gen, jehož produkt se podílí na **stimulaci** dělení buněk a jejich diferenciace.

Onkogen je protoonkogen aktivovaný tak, že vyvolává neoplastickou transformaci buňky.

- aktivace protoonkogenu je přeměna protoonkogenu na onkogen
- mutace protoonkogenů jsou aktivující, dominantní

Produkty genů pro **nádorové supresory** (**antionkogeny**) v normálních buňkách nevyvolávají proliferaci, ale naopak ji **potlačují** a udržují buňky ve stadiu klidu.

- mutace nádorových supresorů jsou inaktivující, recesivní (spojeno s inaktivací/ztrátou druhé alely)

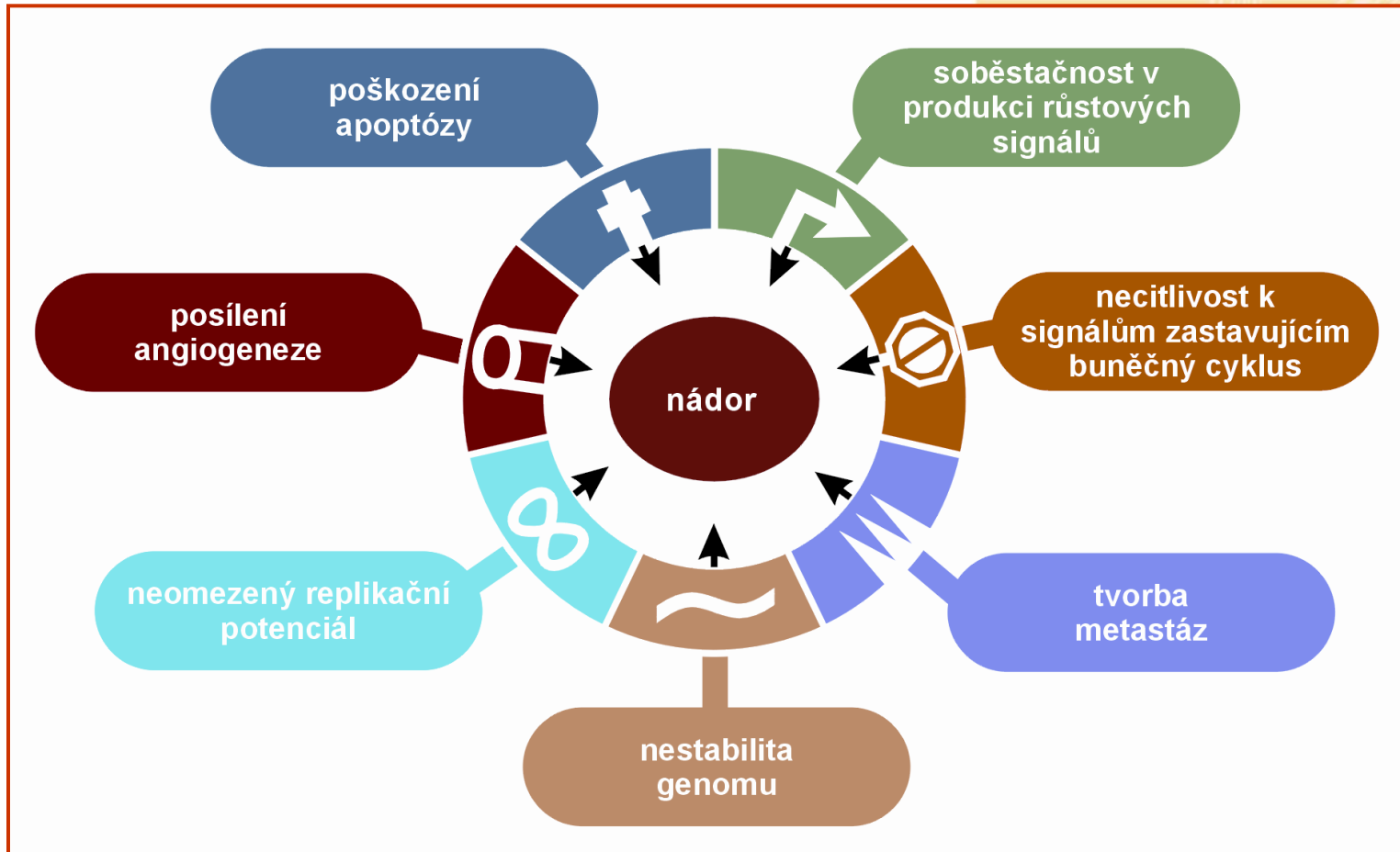
Jak vznikají lymfomy

Osnova

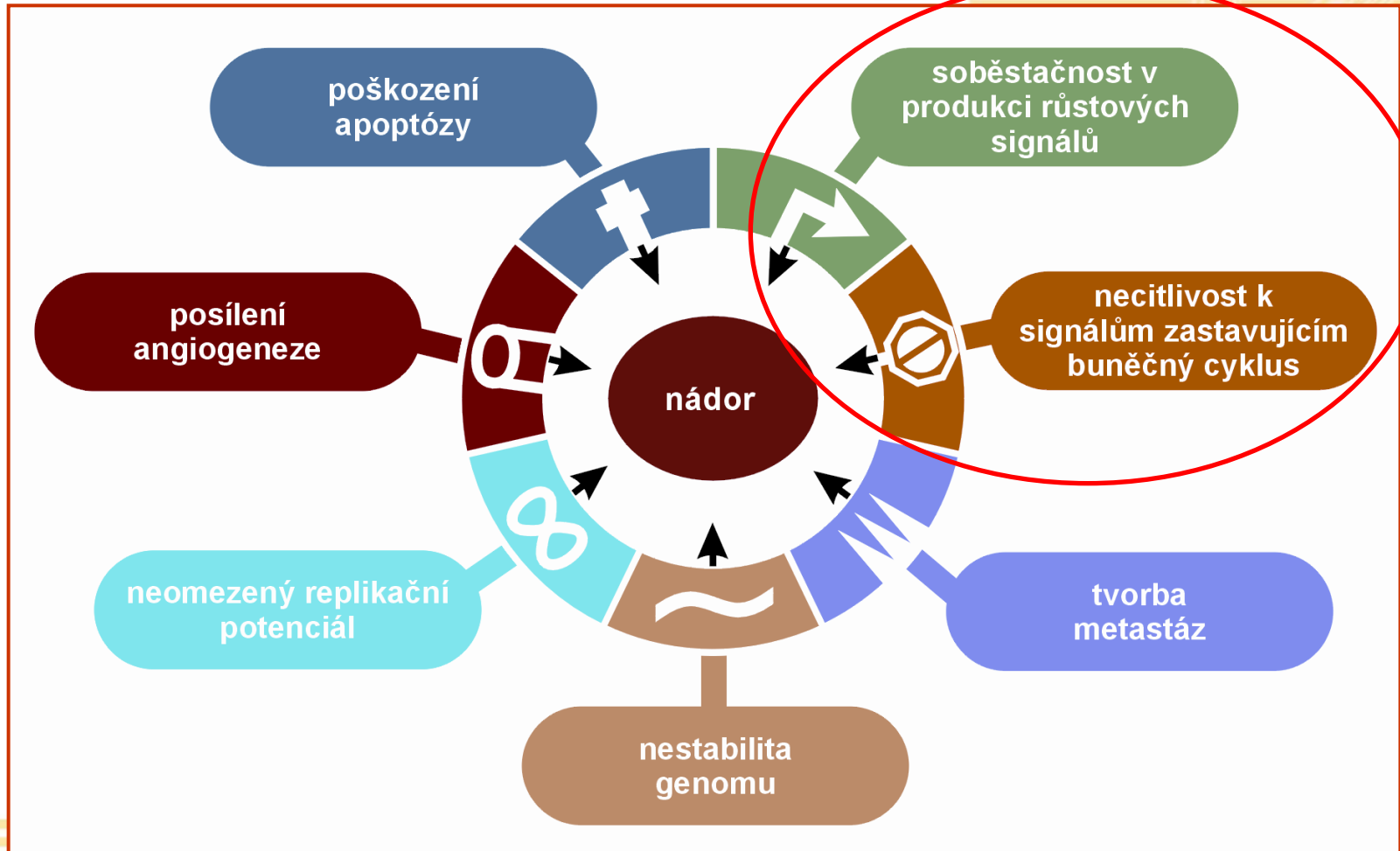


- Jak vznikají nádory
- Kterými vlastnostmi se liší nádorová buňka od zdravé?
 - poškození regulace buněčného dělení
 - poškození programované buněčné smrti
 - získání neomezeného replikačního potenciálu
 - indukce angiogeneze
 - tvorba metastáz
 - navýšená genetická nestabilita
- Lymfomy, lymfocyty, protilátky
- Vývoj B lymfocytů
- Vznik lymfomů
- Závěr

Sedm typických znaků nádorových buněk



Sedm typických znaků nádorových buněk



Poškození regulace buněčného dělení



1, 2



soběstačnost v
produkci růstových
signálů



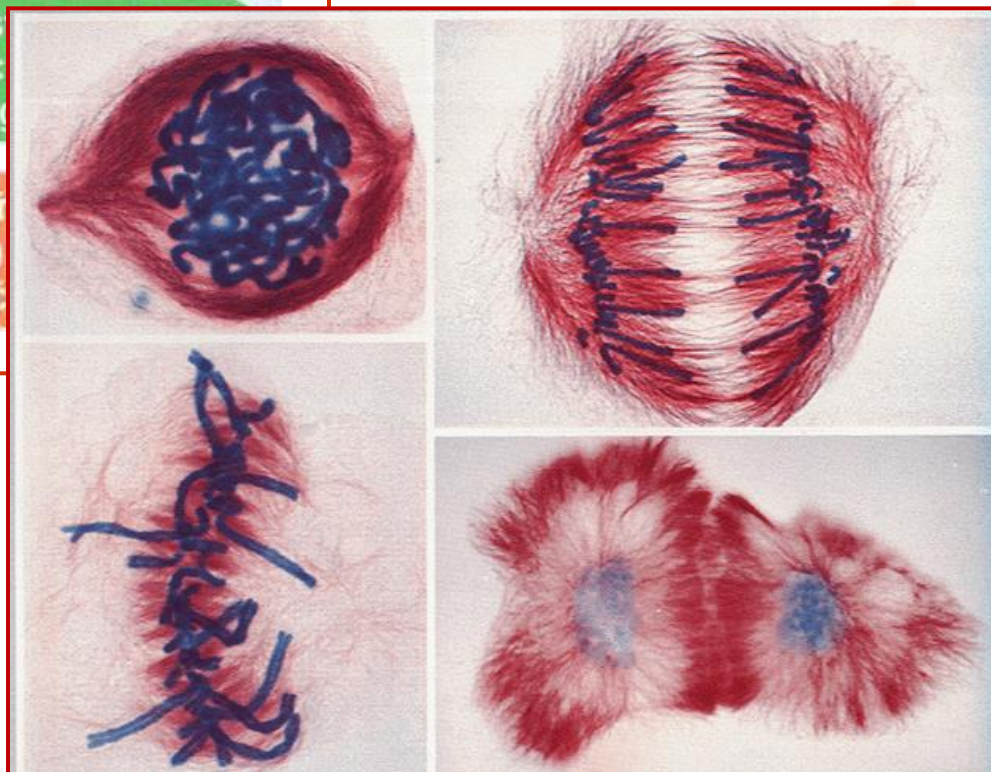
necitlivost k
signálům zastavujícím
buněčný cyklus

Poškození regulace buněčného dělení

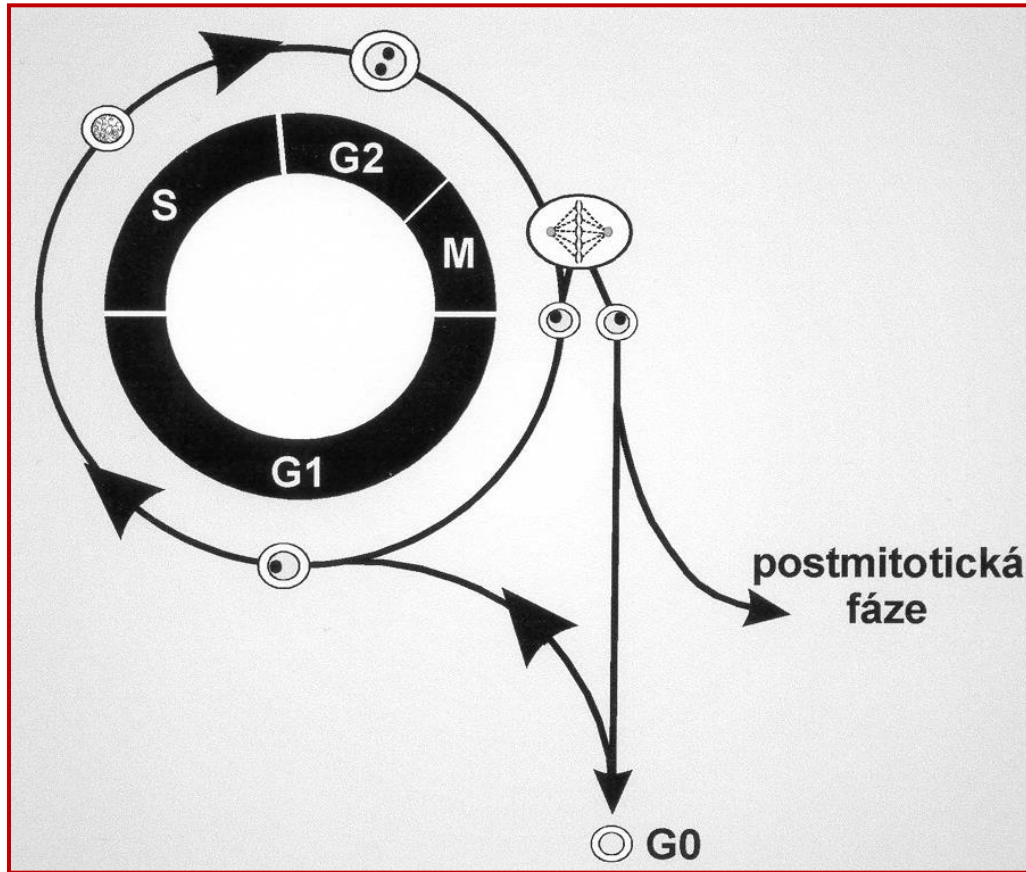


1, 2

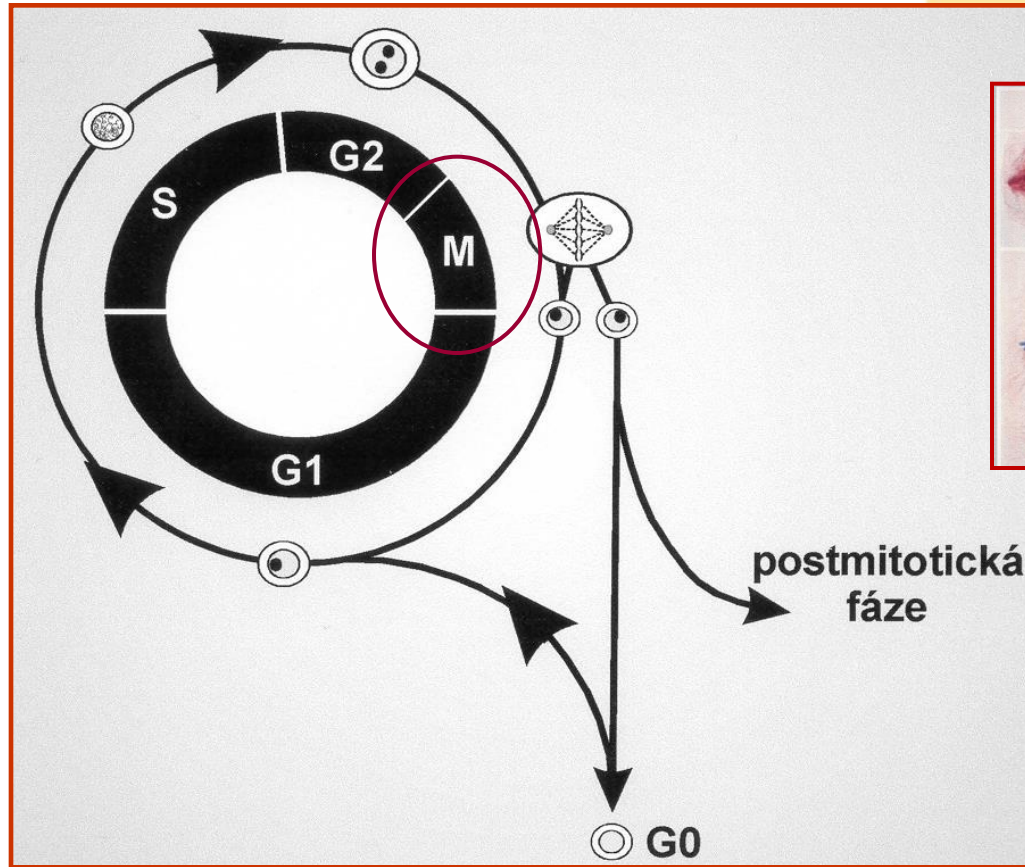
mitóza



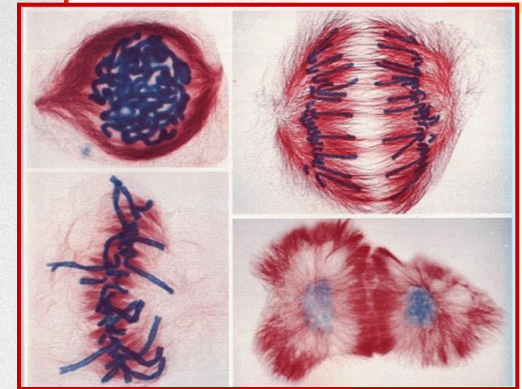
Průběh buněčného cyklu a jeho regulace



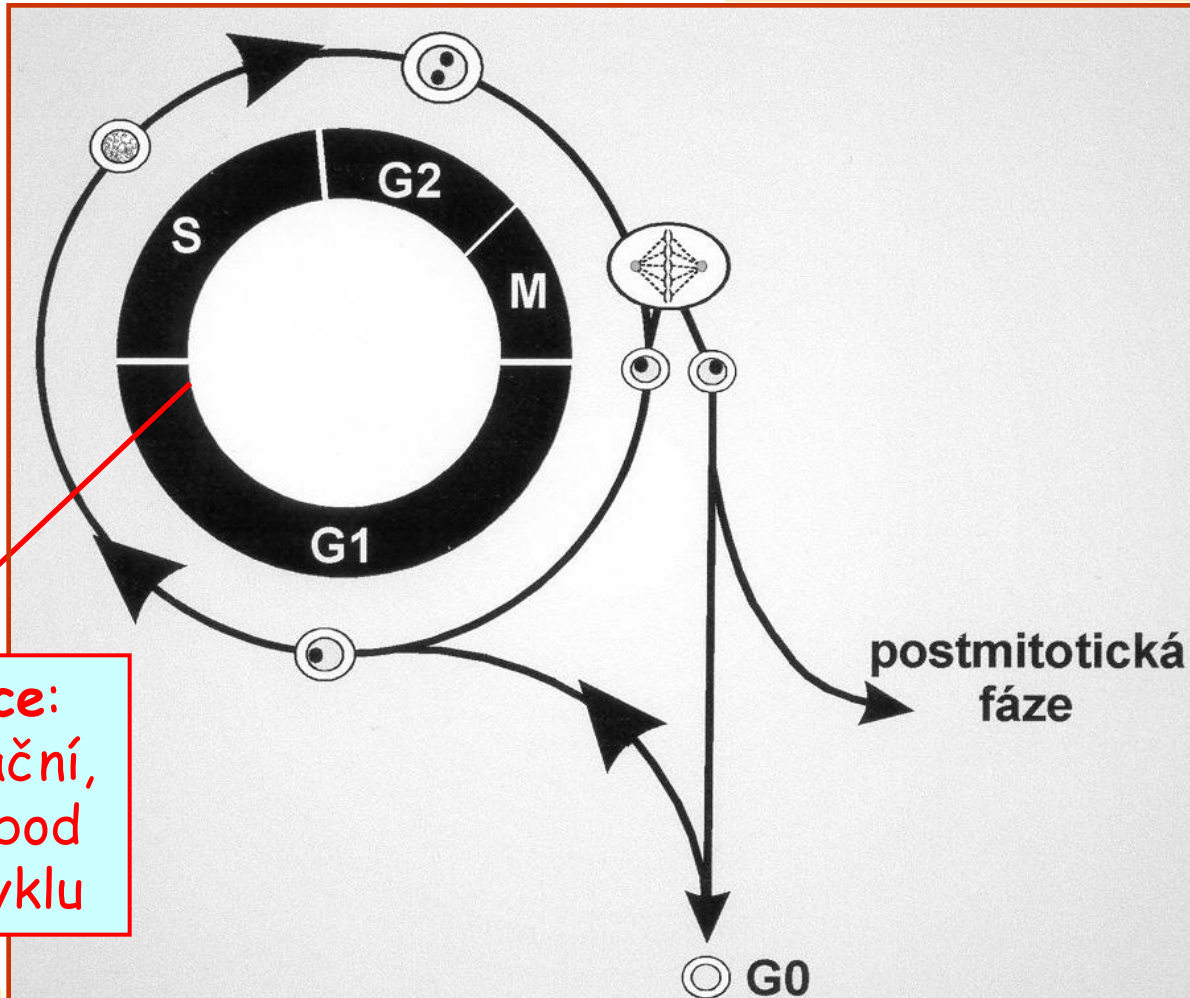
Poškození regulace buněčného dělení



mitóza

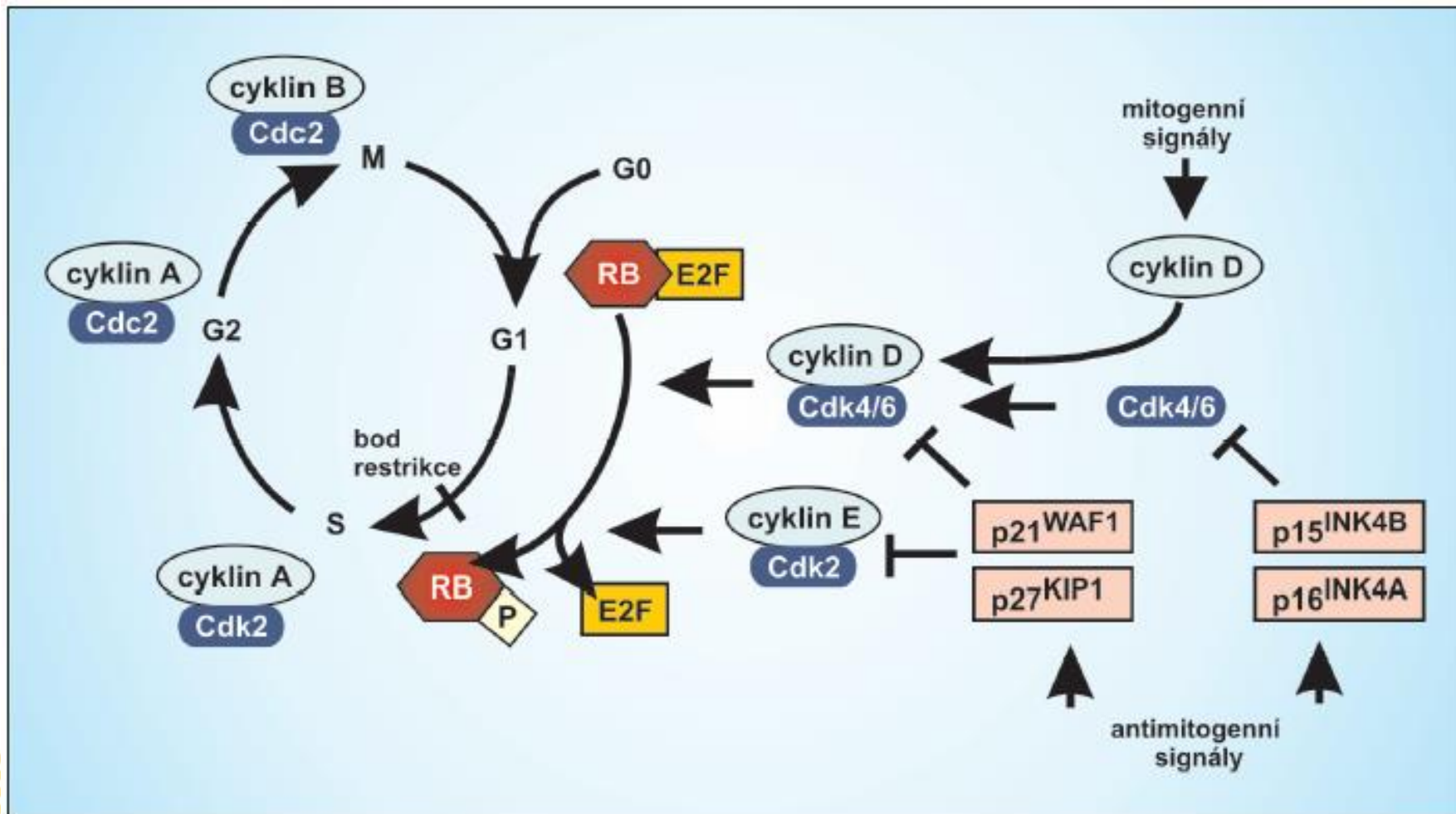


Průběh buněčného cyklu a jeho regulace: bod restrikce



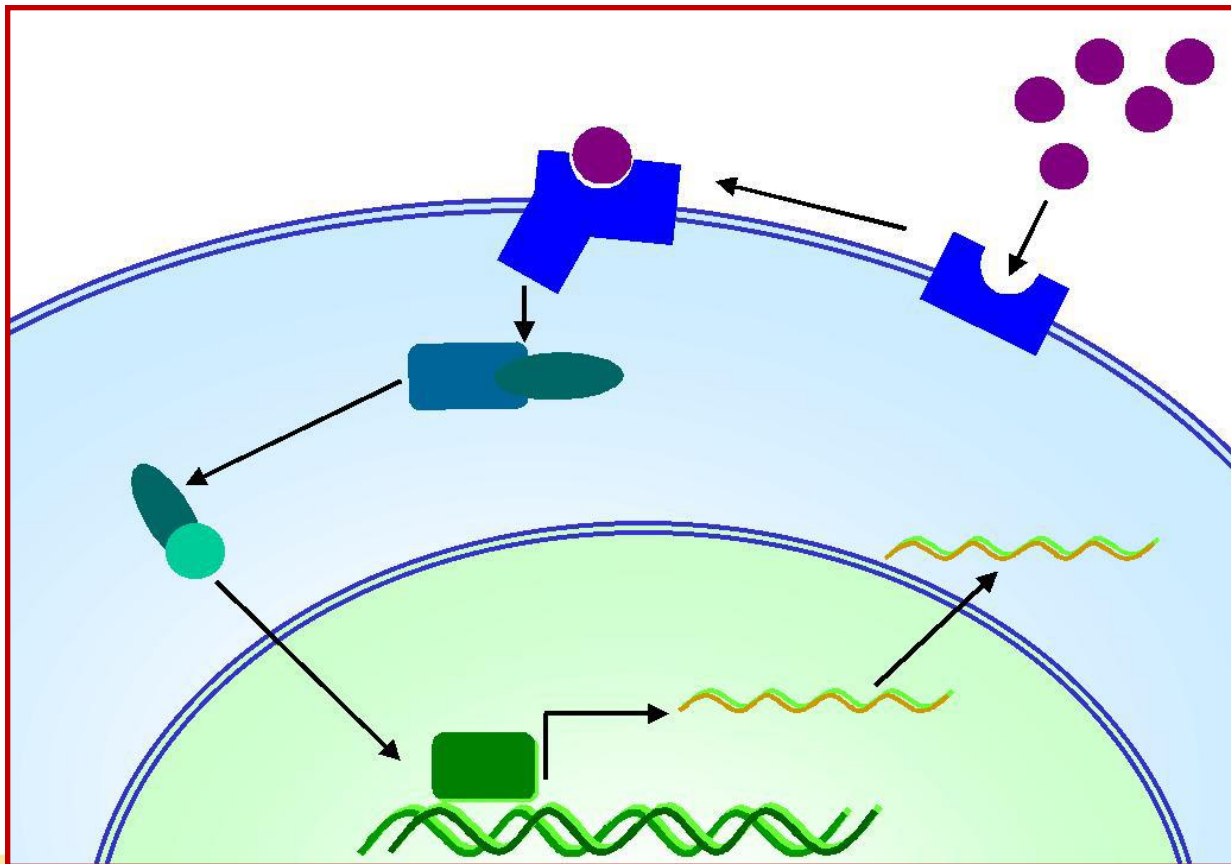
bod restrikce:
klíčový regulační,
rozhodovací bod
buněčného cyklu

Regulace buněčného cyklu



Jak buňky komunikují

Obecná struktura signální dráhy



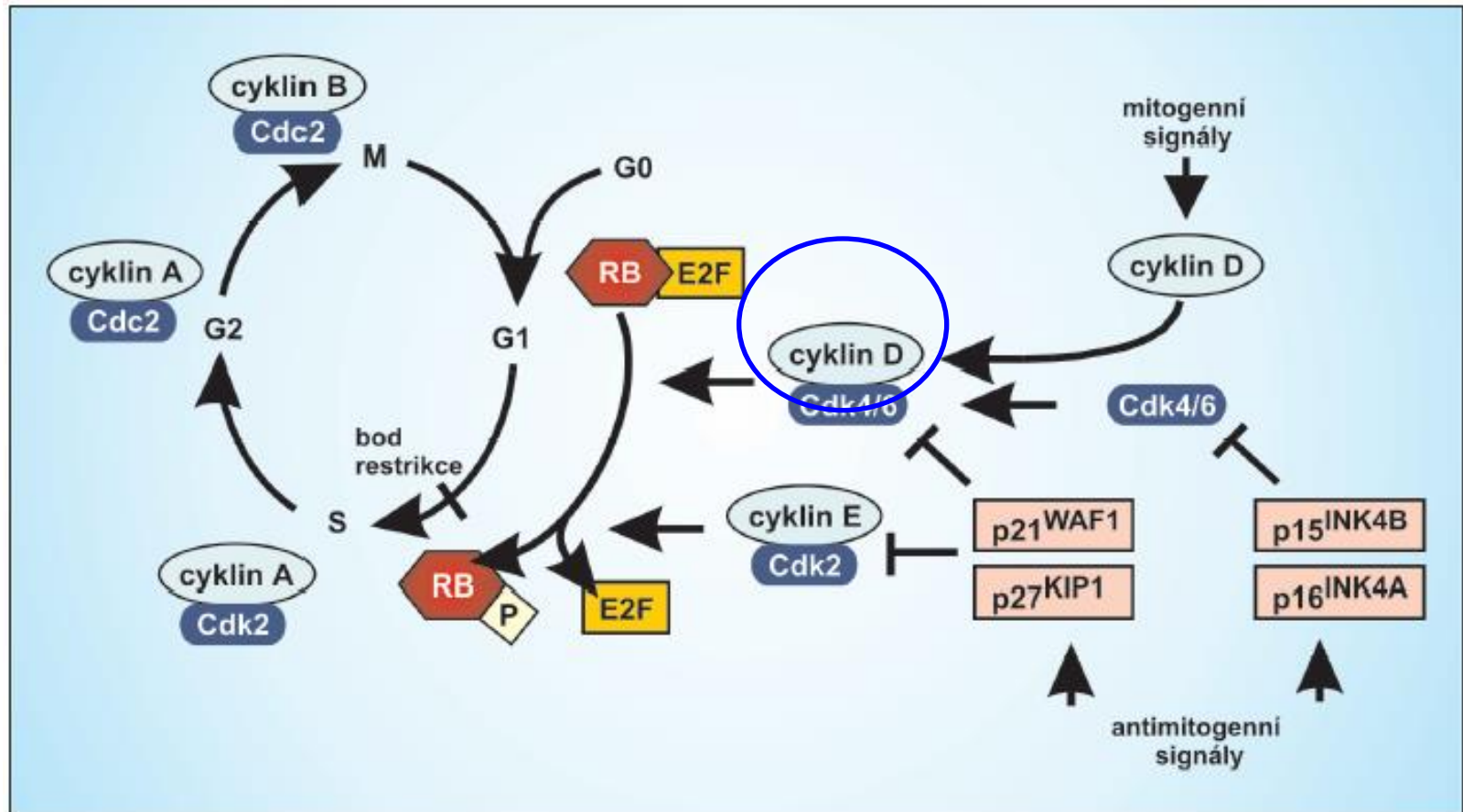
- signální molekuly/
růstové faktory

- receptory
růstových faktorů

- cytoplazmatické
přenašeče

- transkripční
faktory

Regulace buněčného cyklu

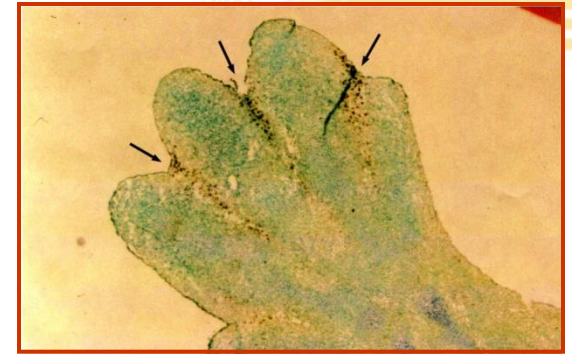
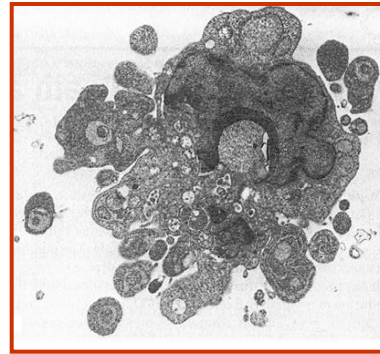


cykliny D - protoonkoproteiny stimulující b.c.

Poškození apoptózy (programované buněčné smrti)



3

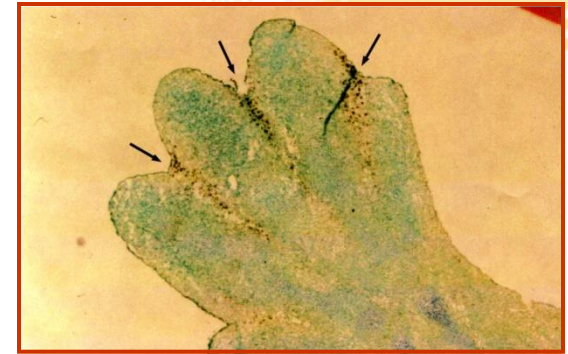
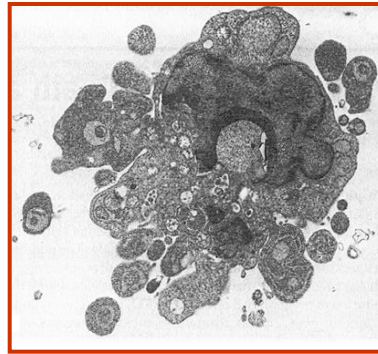


- Apoptotický program je latentně přítomen ve všech buňkách.
- Buňky jsou neustále připraveny odumřít apoptózou, je-li to v zájmu celého organismu.

Poškození apoptózy (programované buněčné smrti)

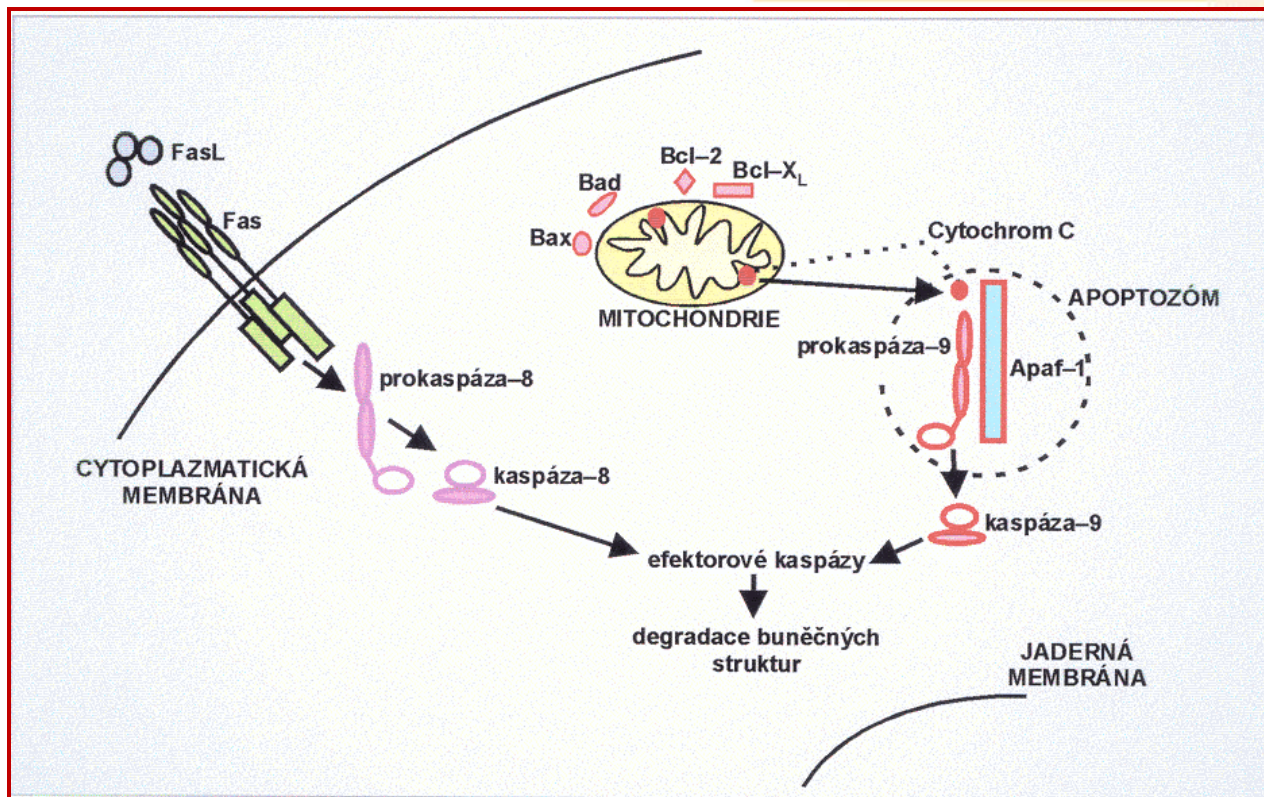


3



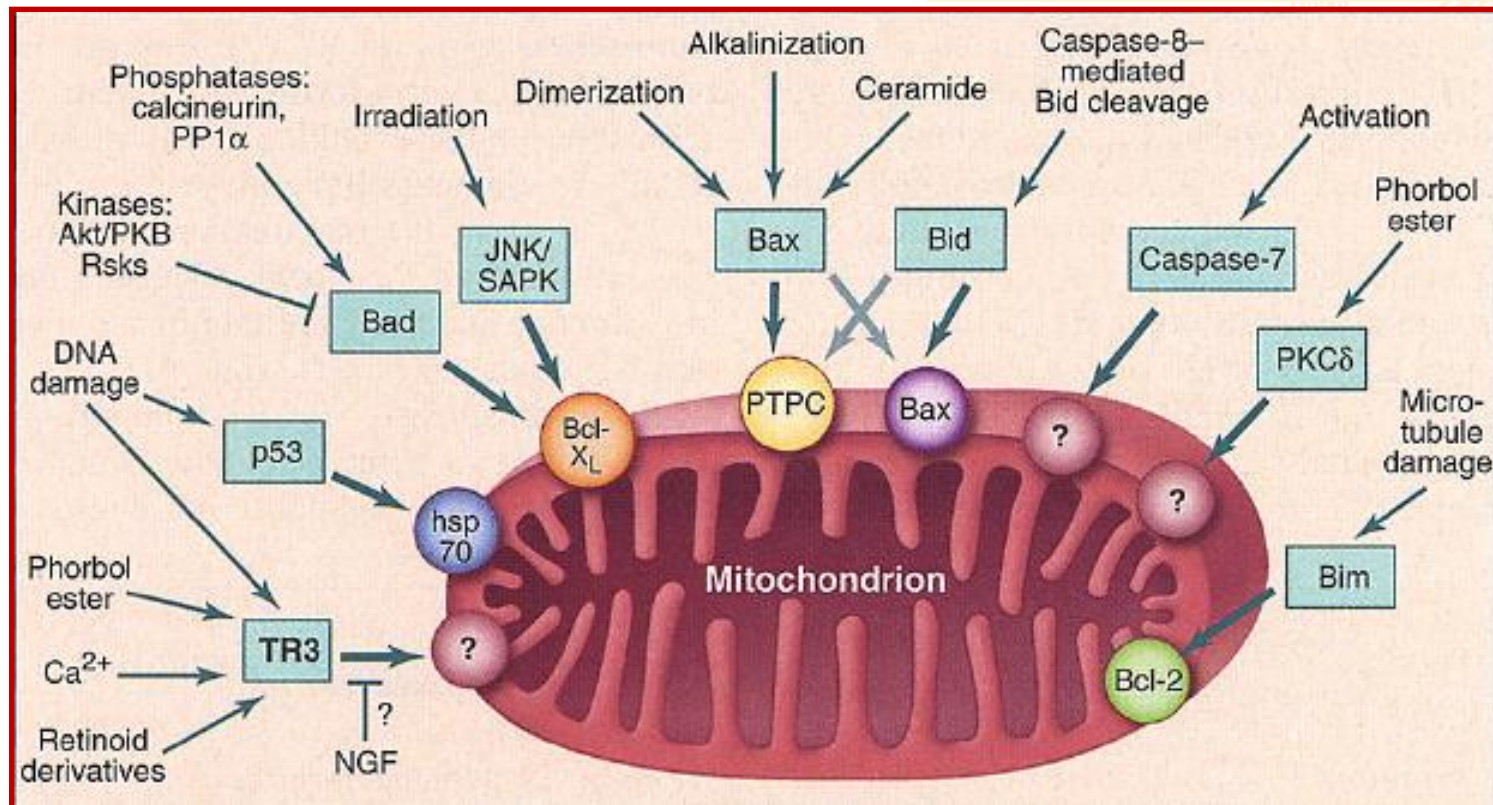
- Apoptotický program je latentně přítomen ve všech buňkách.
- Buňky jsou neustále připraveny odumřít apoptózou, je-li to v zájmu celého organismu.
- Signály indukující apoptózu: poškození DNA, aktivace onkogenů, hypoxie, ztráta kontaktu s okolními strukturami (buňkami, ECM), nepřítomnost signálů přežití, signály smrti,...

Regulace a průběh apoptózy



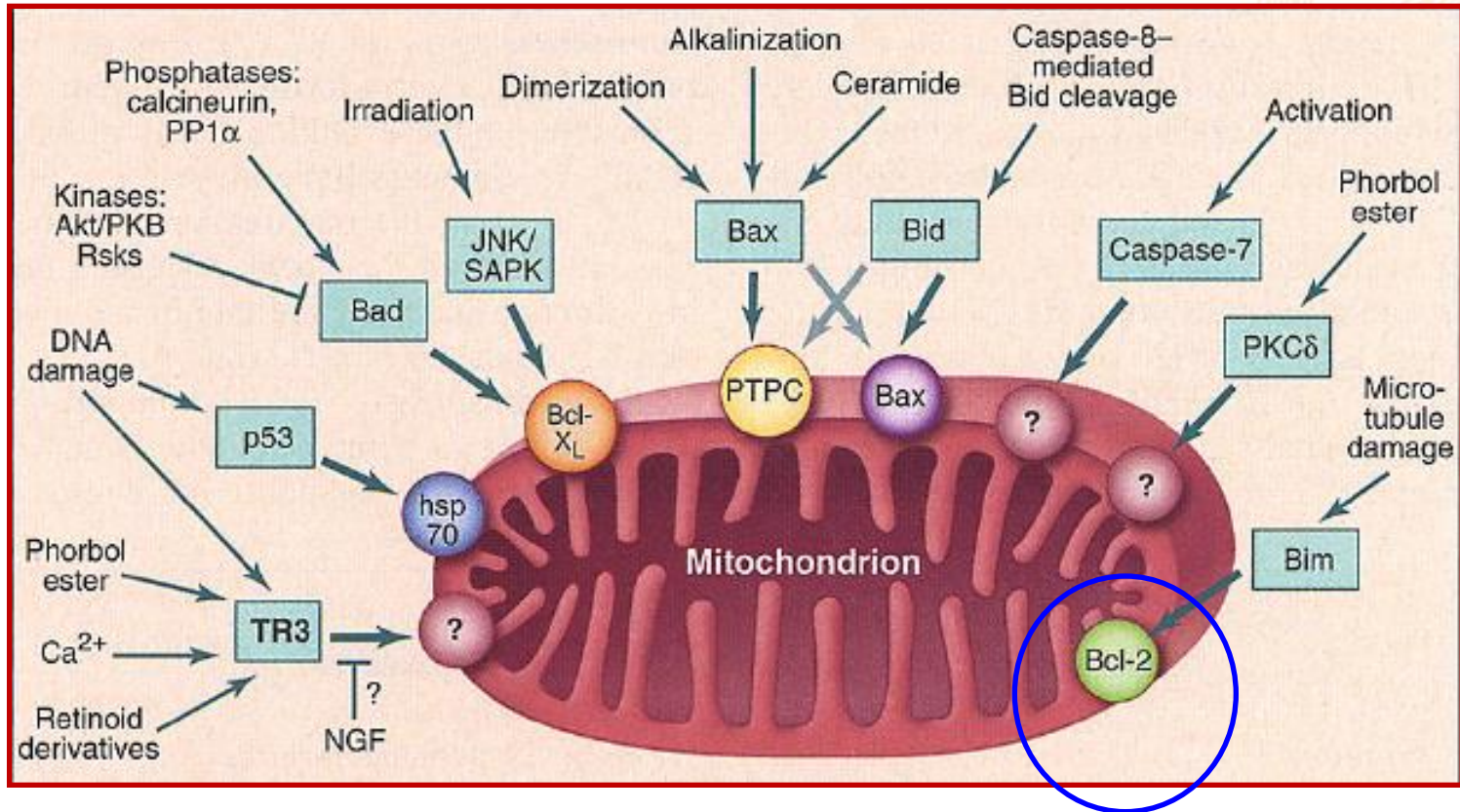
1. Signalizace přes receptory
2. Vnitřní signalizace (mitochondrie)
3. Efektory apoptózy

Mitochondrie jako integrátory apoptotických signálů



proteinová rodina Bcl-2

Mitochondrie jako integrátory apoptotických signálů



anti-apoptotický protein Bcl-2

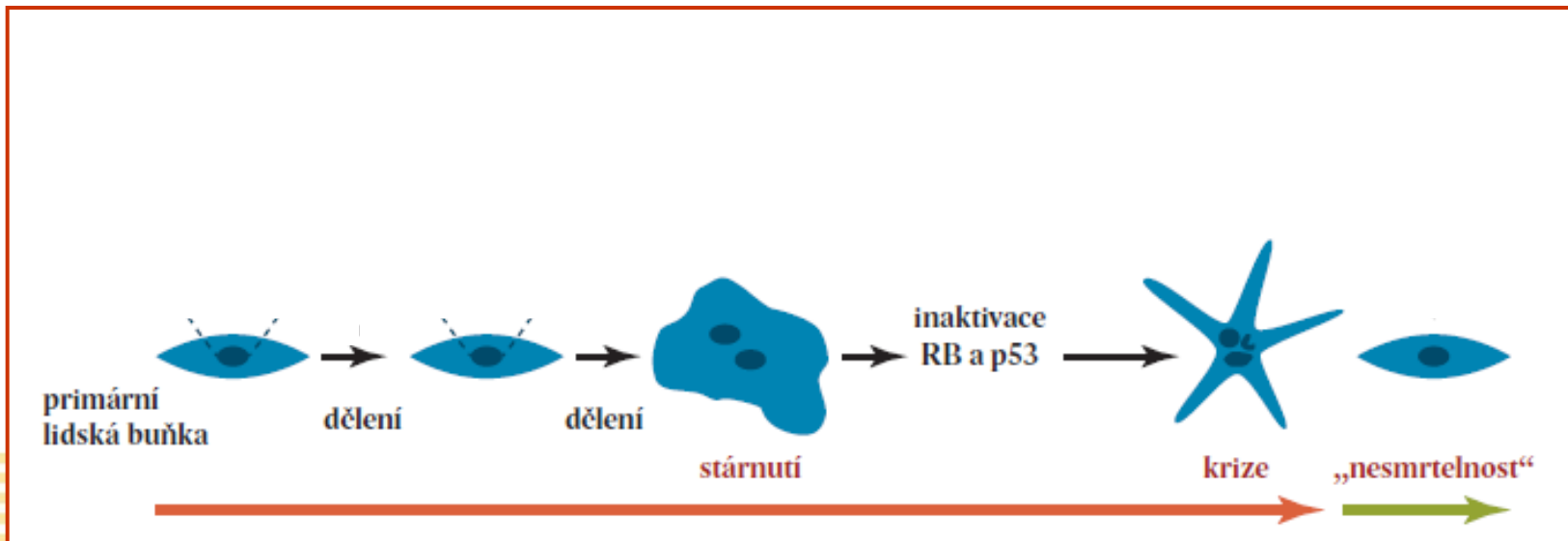
Získání neomezeného replikačního potenciálu



4



Většina buněk lidského těla se nemůže dělit do nekonečna, ale naopak má naprogramovaný (tzn. určený vnitřními faktory) **konečný počet buněčných dělení**, kterými může projít.



Získání neomezeného replikačního potenciálu

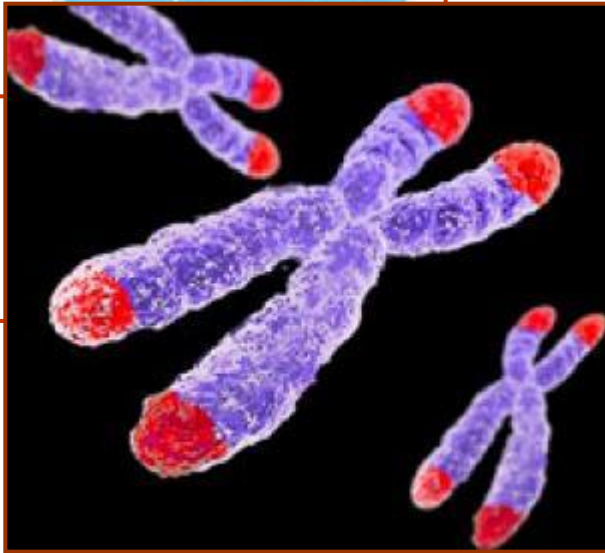


4

Většina buněk lidského těla se nemůže dělit do nekonečna, ale naopak má naprogramovaný (tzn. určený vnitřními faktory) **konečný počet buněčných dělení**, kterými může projít.



neomezený replikační potenciál



primární lidská buňka



dělení



dělení



stárnutí

inaktivace RB a p53



krize



„nesmrtelnost“

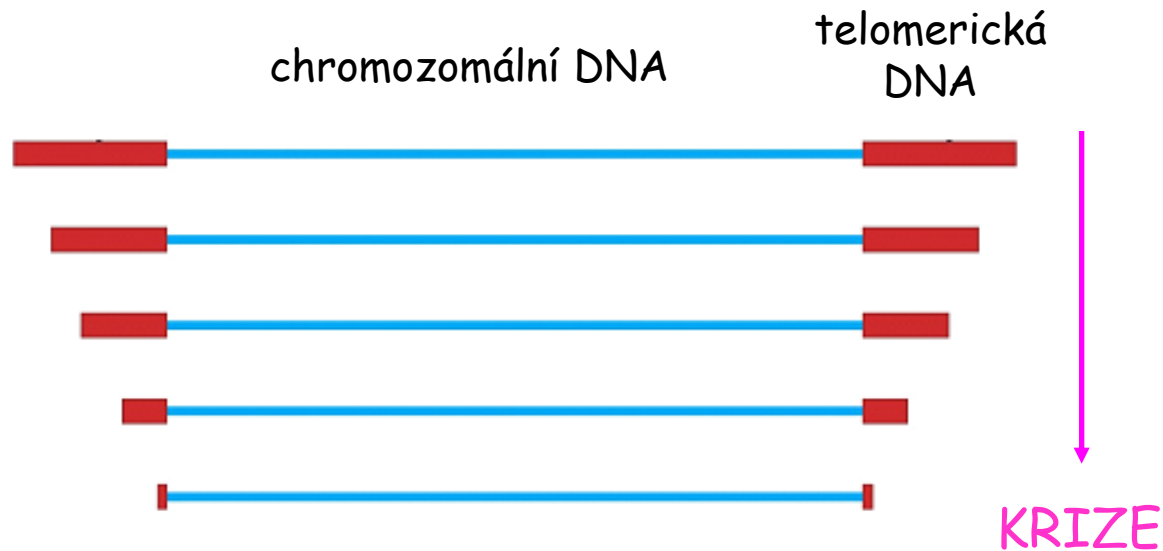


Funkce telomer a telomerázy



Telomery jsou sekvence na koncích chromozomů. Jejich hlavní funkcí je ochrana konců chromozomů.

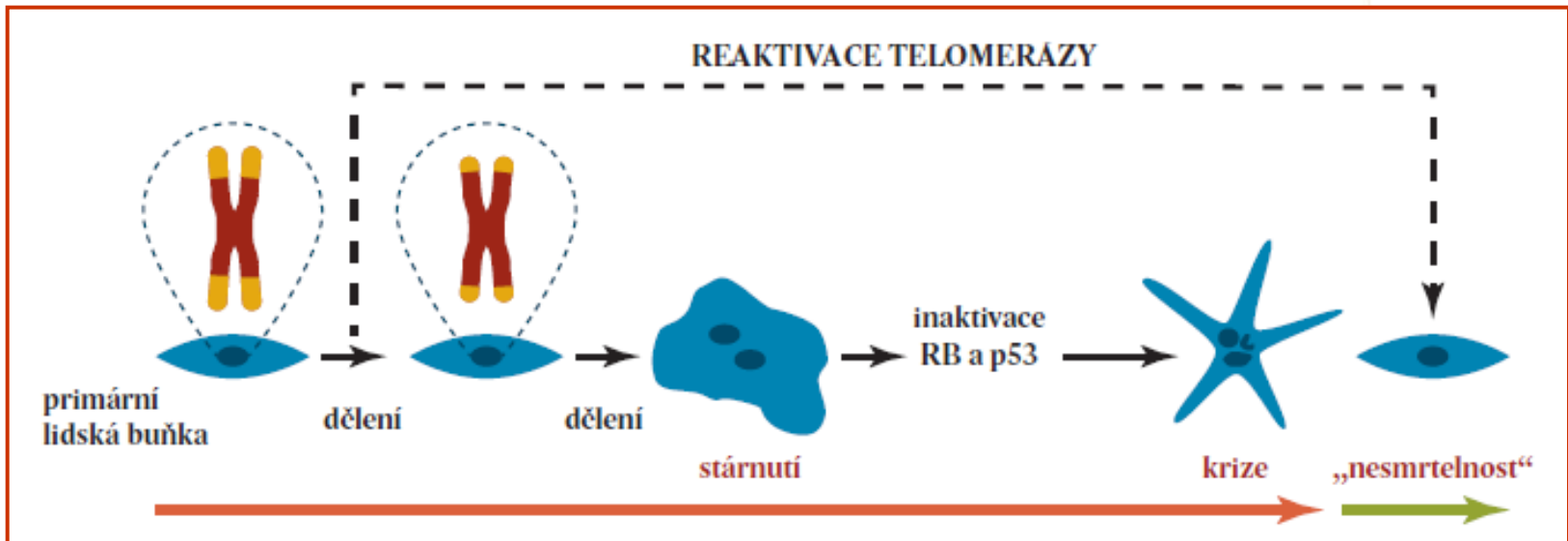
Telomeráza je enzym, který je nutný pro udržování stabilní délky telomer. Většina buněk neexprimuje telomerázu a telomery se proto progresivně zkracují při každém buněčném dělení.



Získání neomezeného replikačního potenciálu



4



85 až 90% nádorů má aktivní telomerázu.

Indukce angiogeneze

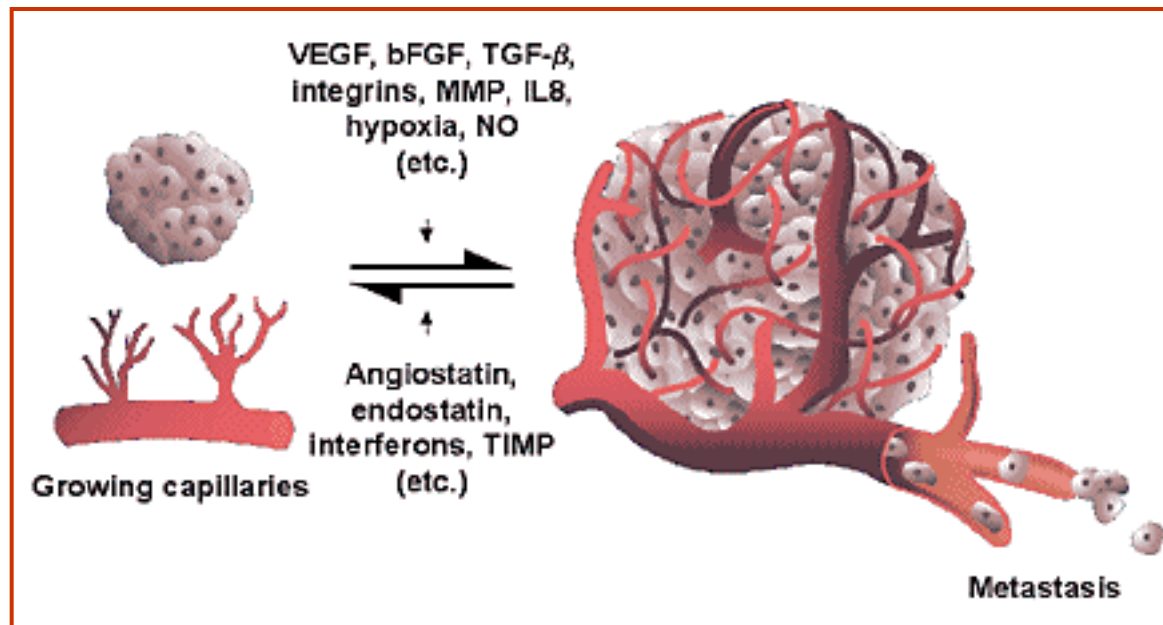


5



posílení
angiogeneze

Schopnost nádorů přesáhnout svou velikostí masu o průměru větší než **1 mm** závisí na jejich schopnosti zajistit přístup ke krevnímu systému.



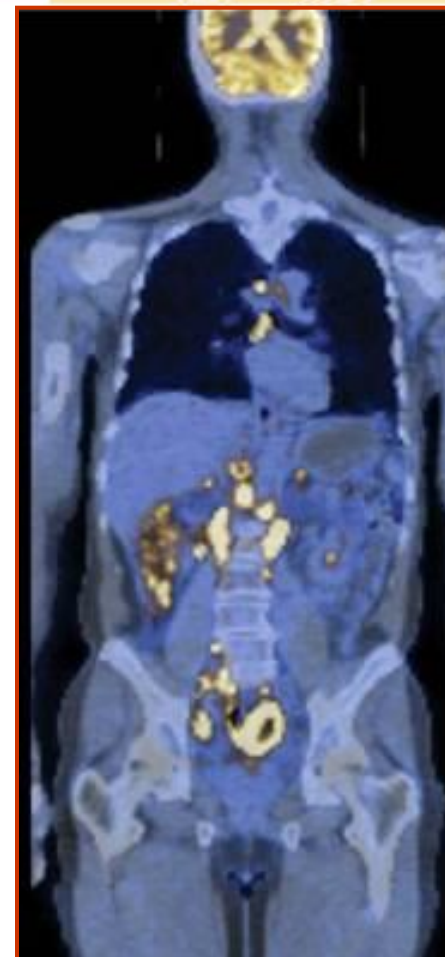
Tvorba metastáz



6



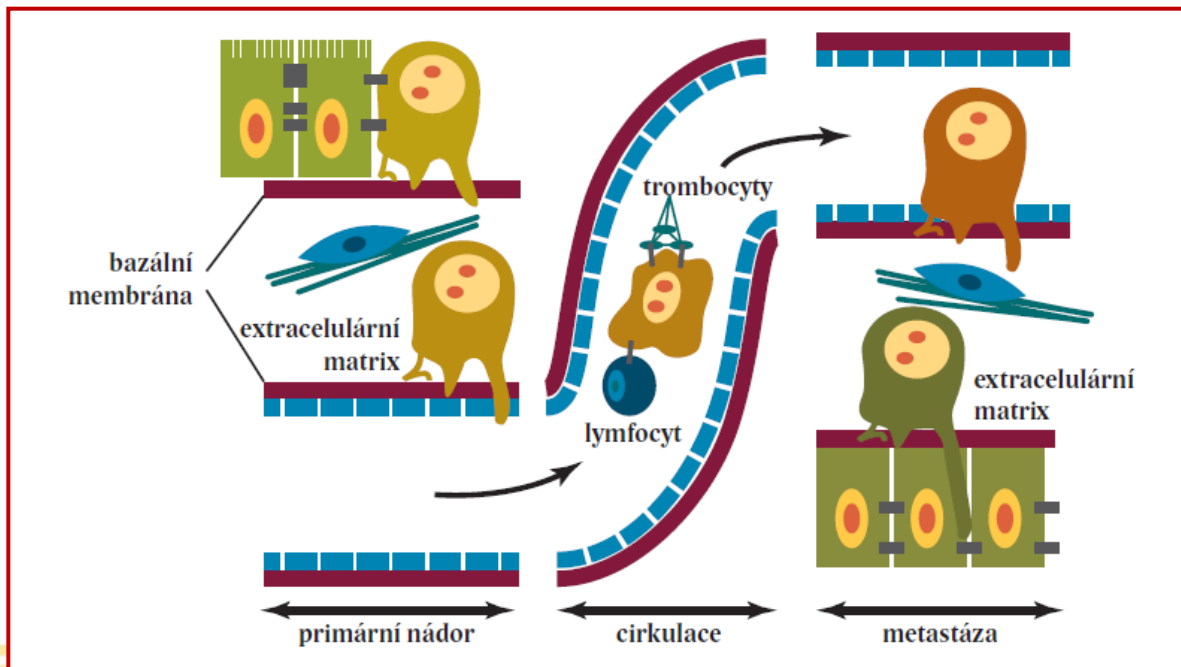
- Metastázy jsou **nejzhoubnějším** jevem při nádorovém onemocnění a jsou příčinou asi 90 % úmrtí pacientů s nádorovým onemocněním.
- Méně častou příčinou je bezprostřední působení primárního nádoru: nádory mozku, nádory žlaznatých buněk, leukémie, lymfomy



Metastatická kaskáda

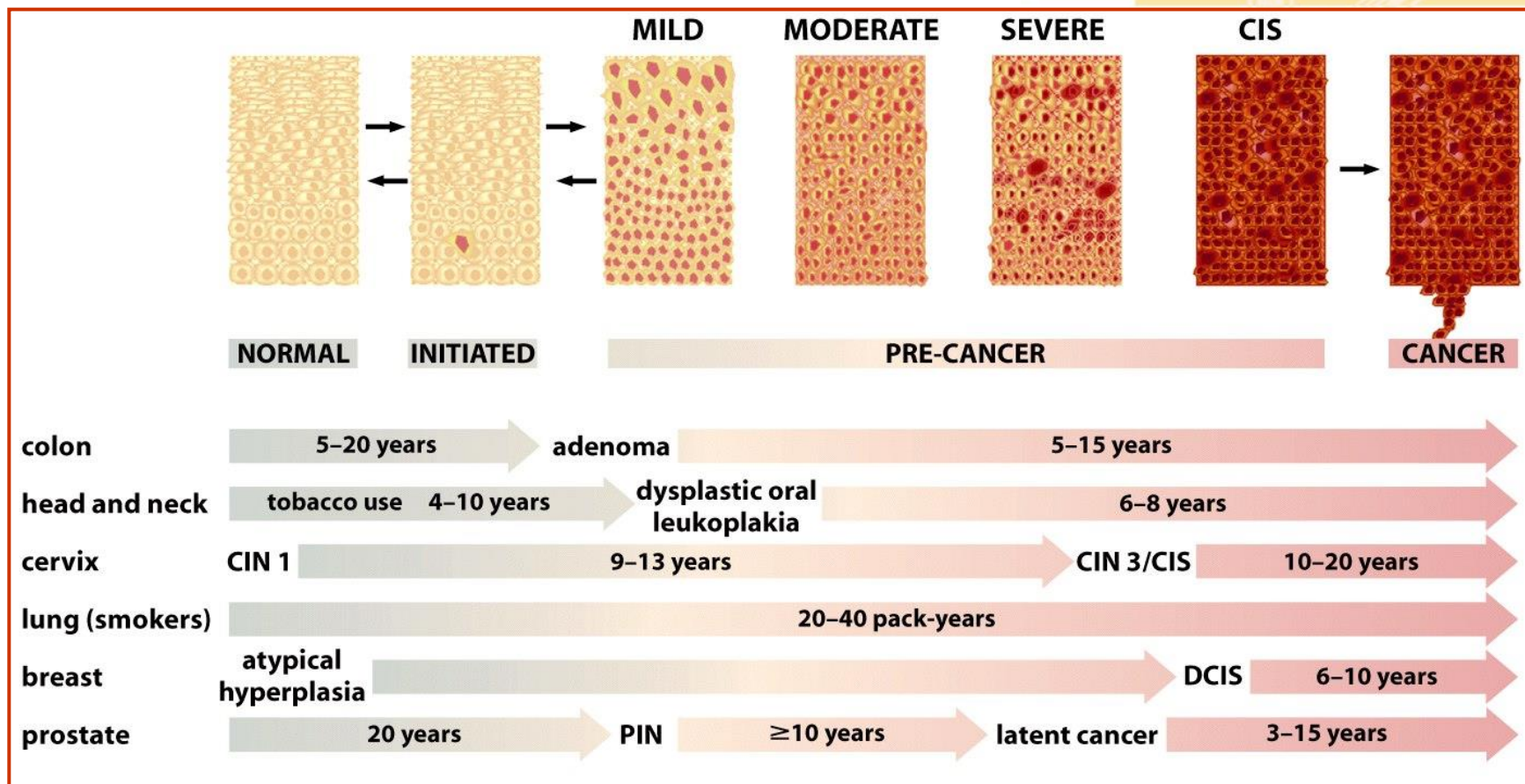


1. Uvolnění nádorové buňky z primárního nádoru.
2. Prostoupení ECM a bazální membrány, vstup do cirkulačního systému.
3. Migrace cirkulačním systémem.
4. Vystoupení z cirkulačního systému, prostoupení bazální membrány a ECM.
5. Tvorba sekundárního nádoru (metastázy).



Invazi nádorových buněk lze chápat jako **pohyb** buněk spojený s regulovanou **adhezí** a uvolňováním adheze (od ECM, mezi buňkami navzájem) a **proteolýzou ECM**.

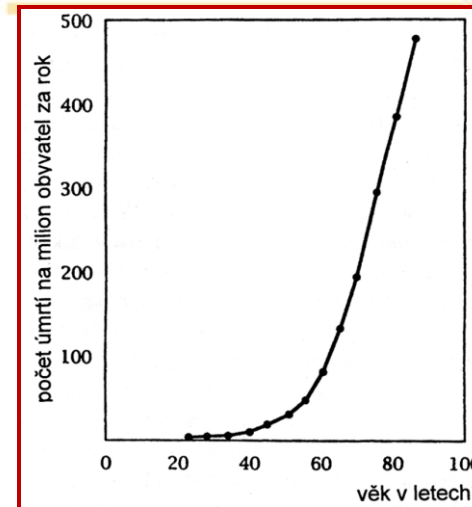
Vývoj nádorů trvá roky



Navýšení genetické nestability



7

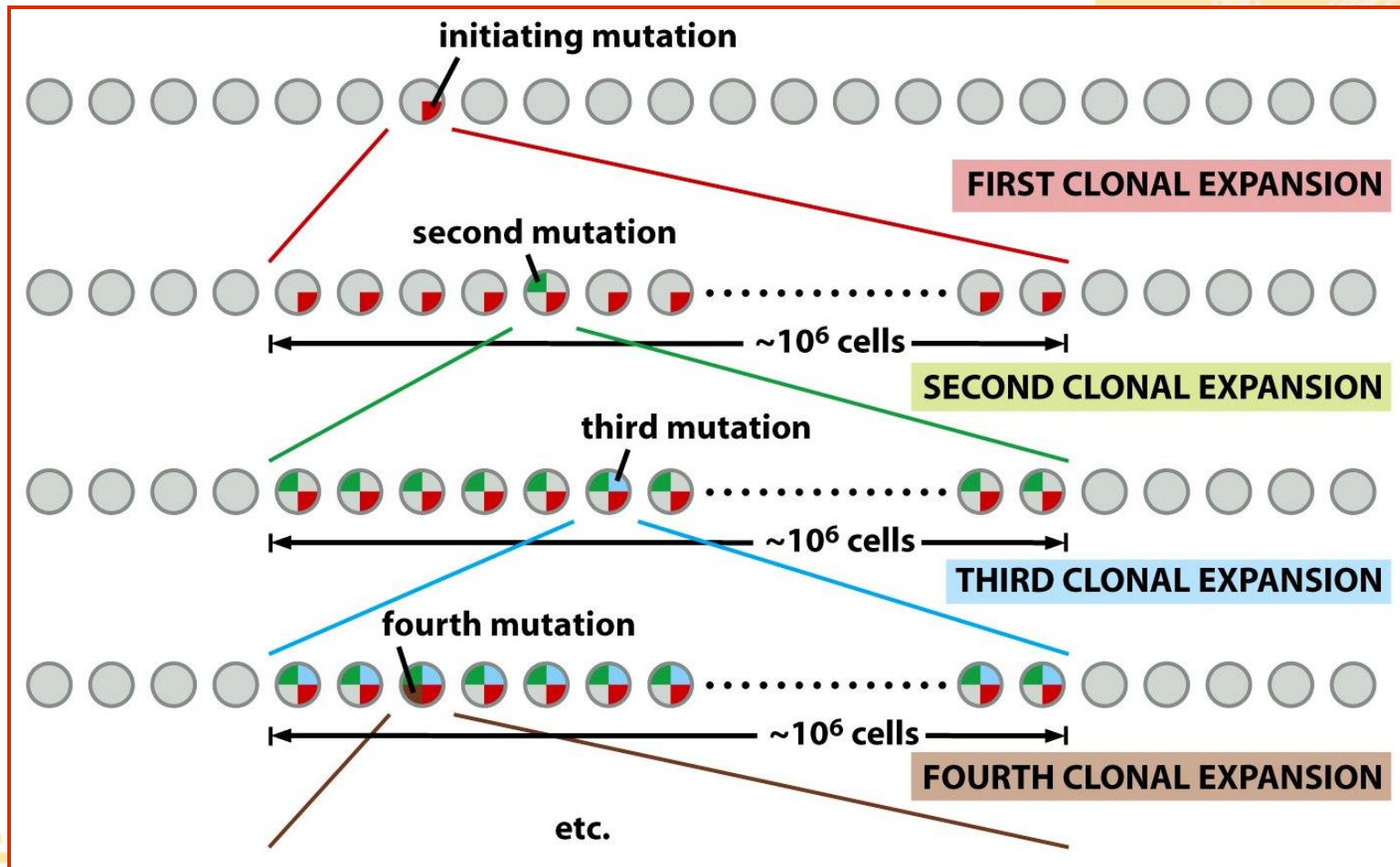


Z výpočtu, který vycházel ze známé mutační rychlosti v somatických buňkách (10^{-6} na gen na generaci buněk), se zdálo, že k takové akumulaci mutací nemůže během lidského života dojít.

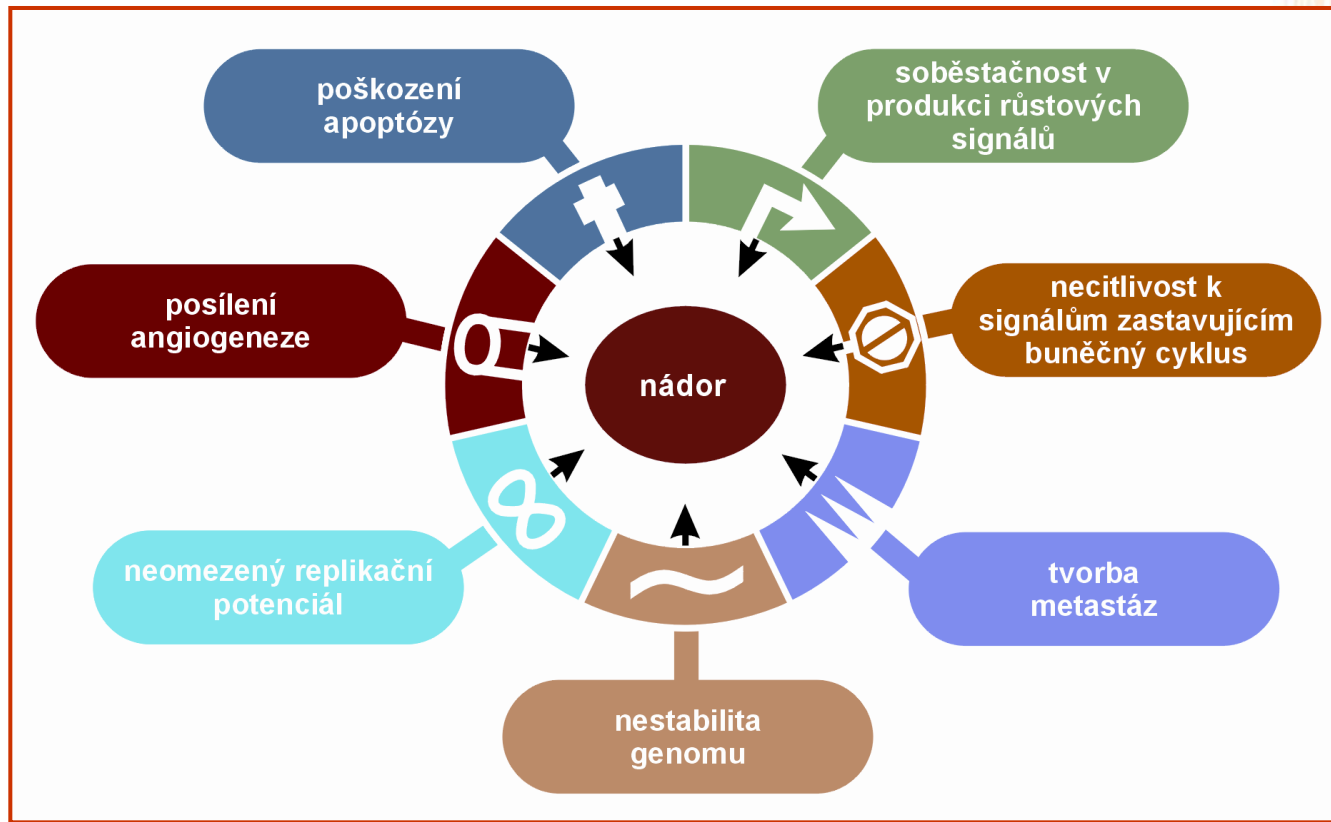
Jakým mechanismem dochází k této akumulaci?

Nádory jsou geneticky nestabilní, tj. je u nich vyšší **rychlost**, s jakou dochází k mutacím.

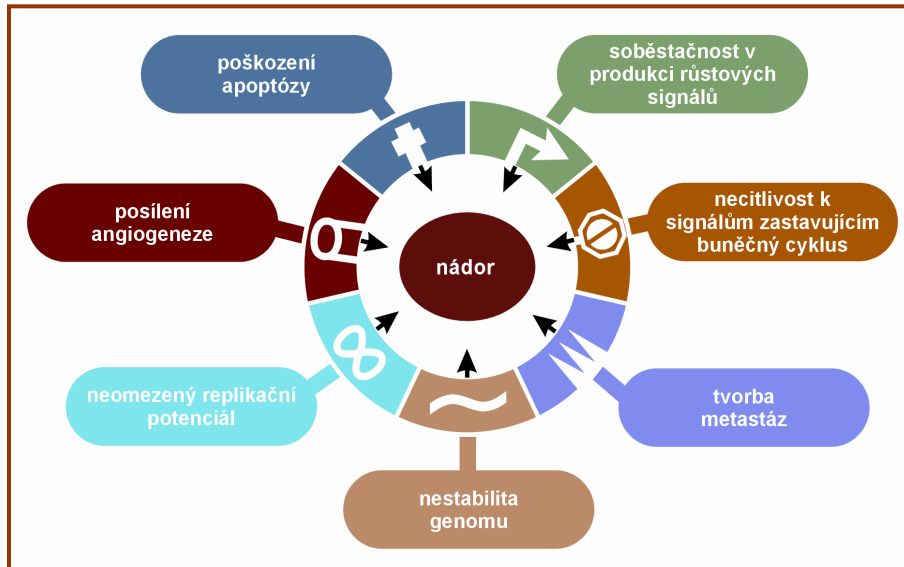
Vývoj nádorů trvá roky



Sedm typických znaků nádorových buněk (2000)



Jedenáct typických znaků nádorových buněk (2011)



Hanahan D. and Weinberg R.A., *Cell* 100 (2000) 57-70

- zánět podporující nádor (8)
- přeprogramování energetického metabolismu (9)
- únik imunitní odpovědi (10)
- vliv mikroprostředí nádoru (11)

Hanahan D. and Weinberg R.A., *Cell* 144 (2011) 646-674

Jak vznikají lymfomy

Osnova



- Jak vznikají nádory
 - Kterými vlastnostmi se liší nádorová buňka od zdravé?
 - poškození regulace buněčného dělení
 - poškození programované buněčné smrti
 - získání neomezeného replikačního potenciálu
 - indukce angiogeneze
 - tvorba metastáz
 - navýšená genetická nestabilita
- Lymfomy, lymfocyty, protilátky
 - Vývoj B lymfocytů
 - Vznik lymfomů
 - Závěr

Co jsou lymfomy



- nádorové onemocnění lymfatického systému
- nádory, které pocházejí z **lymfocytů**, jednoho druhu bílých krvinek

různé typy lymfomů

- liší se agresivitou, prognózou, způsobem léčby
- diagnostikovány na základě:
 - morfologie
 - imunofenotypických znaků
 - cytogenetických a molekulárně-biologických znaků (např. podle výskytu typických **chromozomových translokací**)

Nejčastější B lymfomy

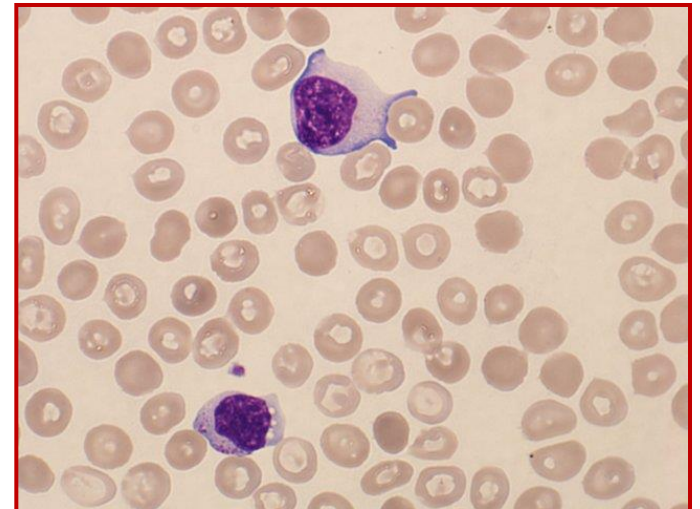
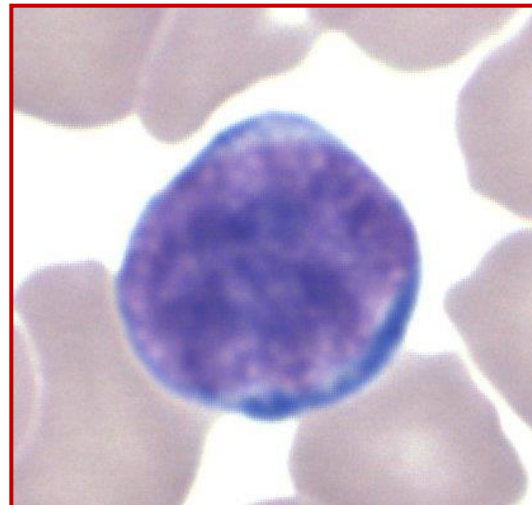


- difúzní velkobuněčný B-lymfom - DLBCL (30 %)
- folikulární lymfom - FL (22 %)
- MALT lymfom (8 %)
- chronická B-lymfatická leukémie/lymfocytární lymfom - B-CLL (7 %)
- lymfom z buněk pláštěvé zóny - MCL (6 %)

Co jsou B lymfocyty



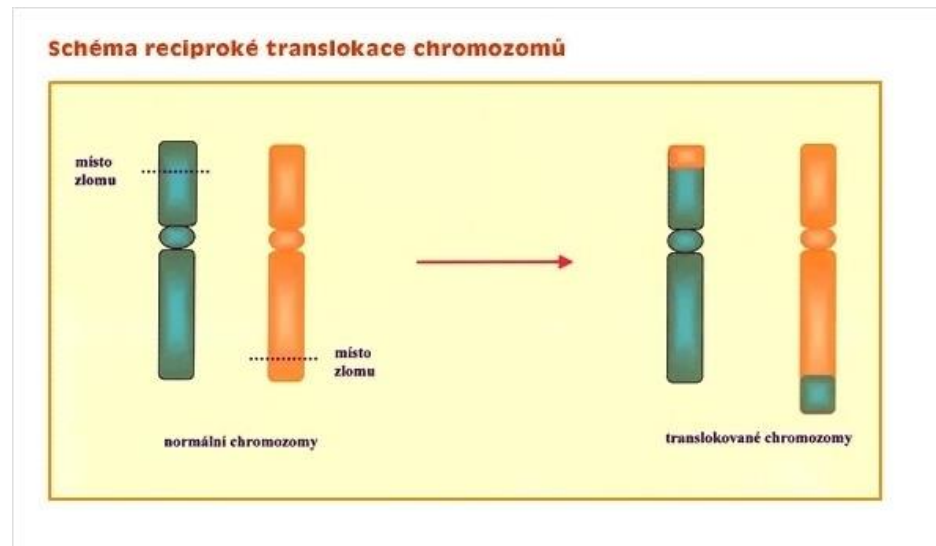
- buňky imunitního systému zodpovědné především za specifickou imunitní odpověď zprostředkovanou **protilátkami**
- někdy označovány jako **B buňky**
- morfologicky jsou to kulaté mononukleární buňky s malým množstvím cytoplazmy



Chromozomové translokace



- **reciproké translokace** jsou vzájemné, reciproké výměny segmentů mezi dvěma nehomologními chromozomy
- počet chromozomů zůstává stejný

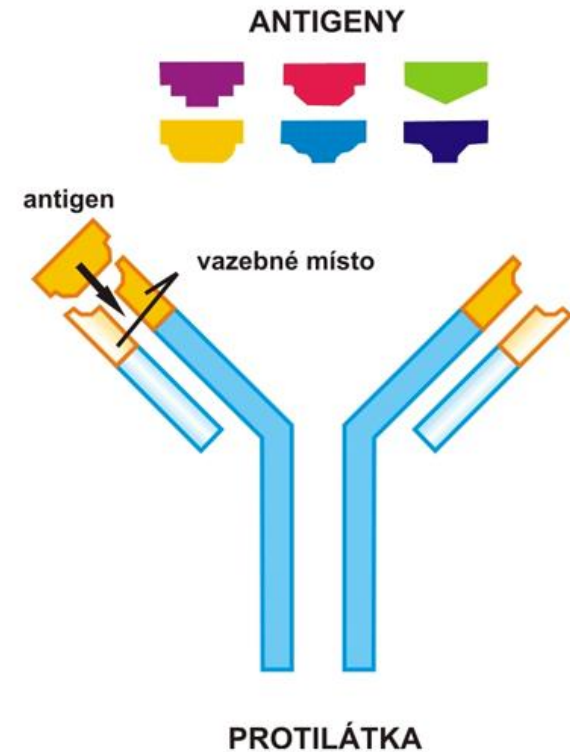


- důsledkem translokací: (1) chimerické proteiny, (2) změněná exprese intaktního proteinu, (3)... žádný (?)

Co jsou protilátky



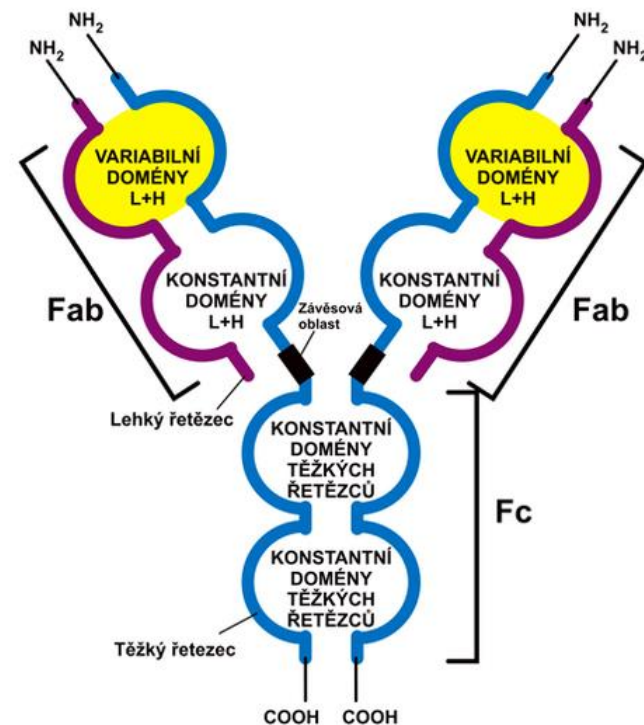
- látky bílkovinné povahy, patřící do rodiny imunoglobulinů
- specificky se váží na antigen
- v průběhu specifické imunitní odpovědi jsou tvořeny B lymfocyty a **plazmatickými buňkami**, které vznikají z B lymfocytů v rámci terminální diferenciace



Struktura protilátky



- složena ze **dvou** totožných **těžkých** (H - heavy) a **dvou** totožných **lehkých** řetězců (L - light)
- řetězce jsou vzájemně svázány kovalentními disulfidickými můstky
- sestávají z **variabilní** a **konstantní** domény
- variabilní domény lehkého i těžkého řetězce vytvářejí **vazebné místo**



STRUKTURA MONOMERU IMUNOGLOBULINU

Kolik má člověk v těle různých
protilátek?



10^{11} různých protilátek !!

tj.

100 000 000 000

Kolik má člověk genů ve svém
genomu?



~ 20 000

Kolik má člověk genů ve svém genomu?



~ 20 000

vs.

100 000 000 000

Kolik má člověk genů pro
protilátky?



3 geny

Kolik má člověk genů pro protilátky?



- jednotlivé řetězce jsou kódovány **3 geny** (genovými komplexy) ležícími na různých chromozomech: **IgH** pro těžký řetězec **μ** na lidském chromozomu **14**, **IgL** a **IgK** pro lehký řetězec **λ** a **κ** na chromozomech **2** a **22**
- geny kódující těžké a lehké řetězce imunoglobulinů se skládají z několika segmentů odpovídajících příslušným oblastem molekuly receptoru: **V** (*variable*), **D** (*diversity*, u lehkých řetězců chybí), **J** (*joining*) a **C** (*constant*)
- segmenty V, D a J jsou zodpovědné za strukturu variabilní oblasti imunoglobulinu rozpoznávající antigen, každý z nich obsahuje několik variant

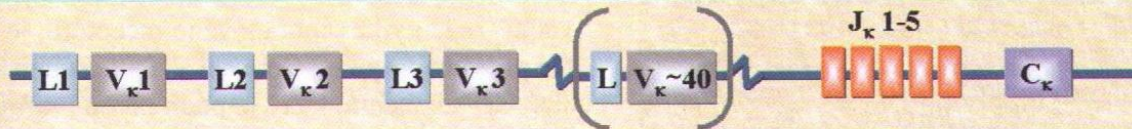
Organizace genů pro protilátky



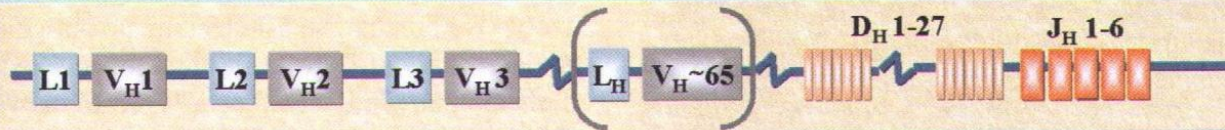
2. chromosom – genové segmenty kódující lehký řetězec λ



22. chromosom – genové segmenty kódující lehký řetězec κ



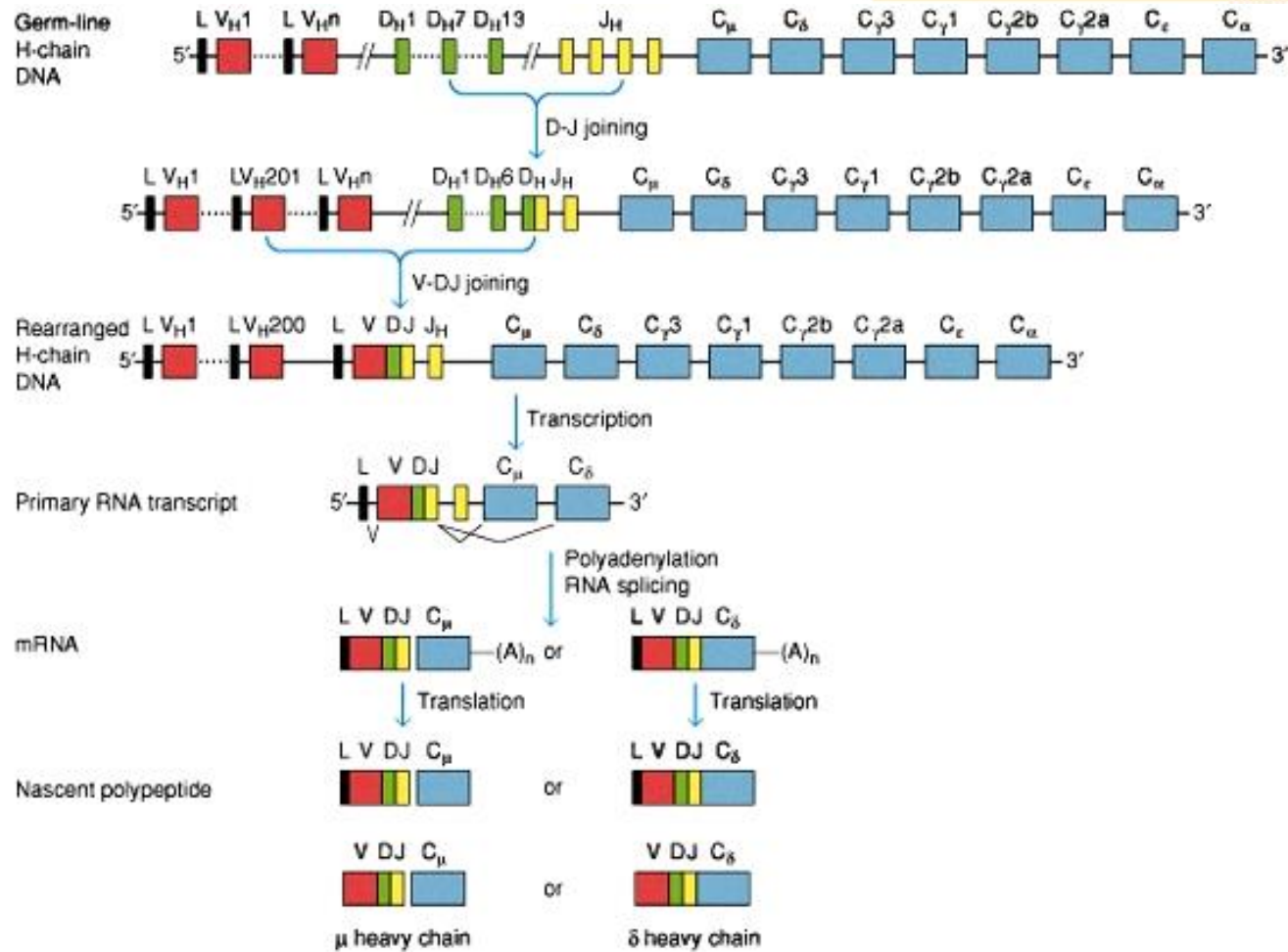
14. chromosom – genové segmenty kódující variabilní část těžkých řetězců



14. chromosom – genové segmenty kódující konstantní část těžkých řetězců



Organizace genů pro protilátky



Organizace genů pro protilátky



- V průběhu zrání B lymfocytů dochází v jejich DNA k tzv. **přeskupování** neboli **V(D)J rekombinaci**.
- Během tohoto procesu je z každého segmentu náhodně vybrána jedna varianta, která v genomu zůstane, ostatní jsou nenávratně odstraněny. Imunoglobuliny, které zralý B-lymfocyt produkuje, pak u dané buňky (včetně jejího potomstva) mají zcela konkrétní a neměnnou strukturu.
- V(D)J rekombinace je náhodný proces, který probíhá nezávisle v každém dozrávajícím B-lymfocytu. Jen pro těžký řetězec imunoglobulinu (IgH) existuje **45 000** variant, pro lehký (Igk a Igλ) $70 \times 5 + 30 \times 9 = 620$ variant; ty lze mezi sebou libovolně kombinovat, výsledný počet možných struktur molekuly imunoglobulinu je $45\,000 \times 620 =$ **27 900 000**.
- Toto množství je ještě umocněno aktivními **somatickými hypermutacemi**, ke kterým dochází v poslední fázi dozrávání B-lymfocytů.

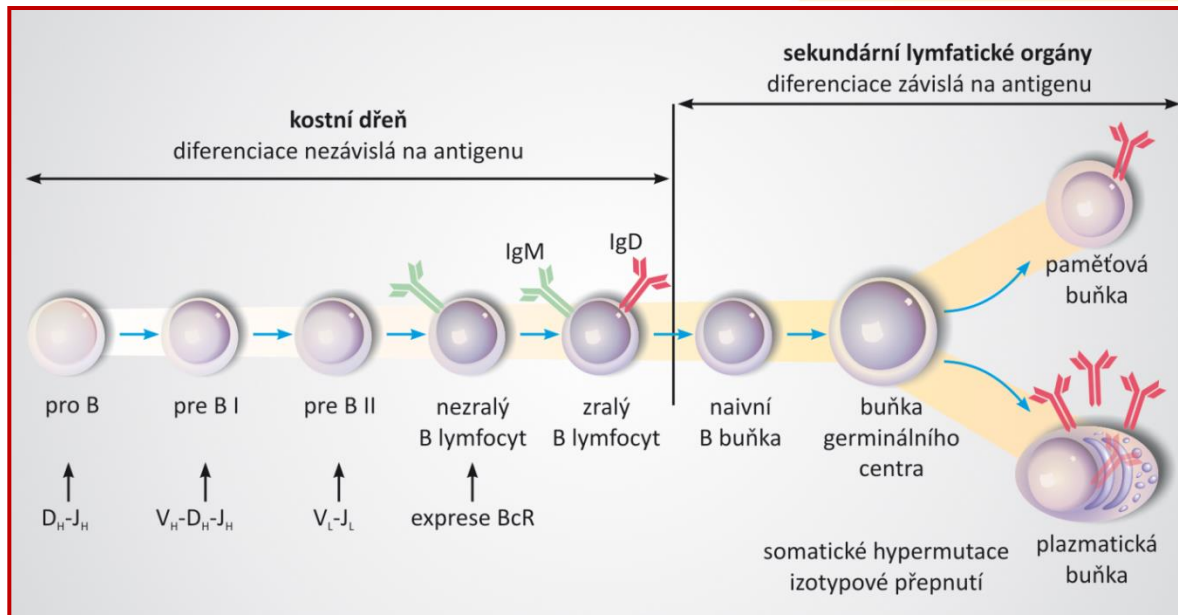
Jak vznikají lymfomy

Osnova



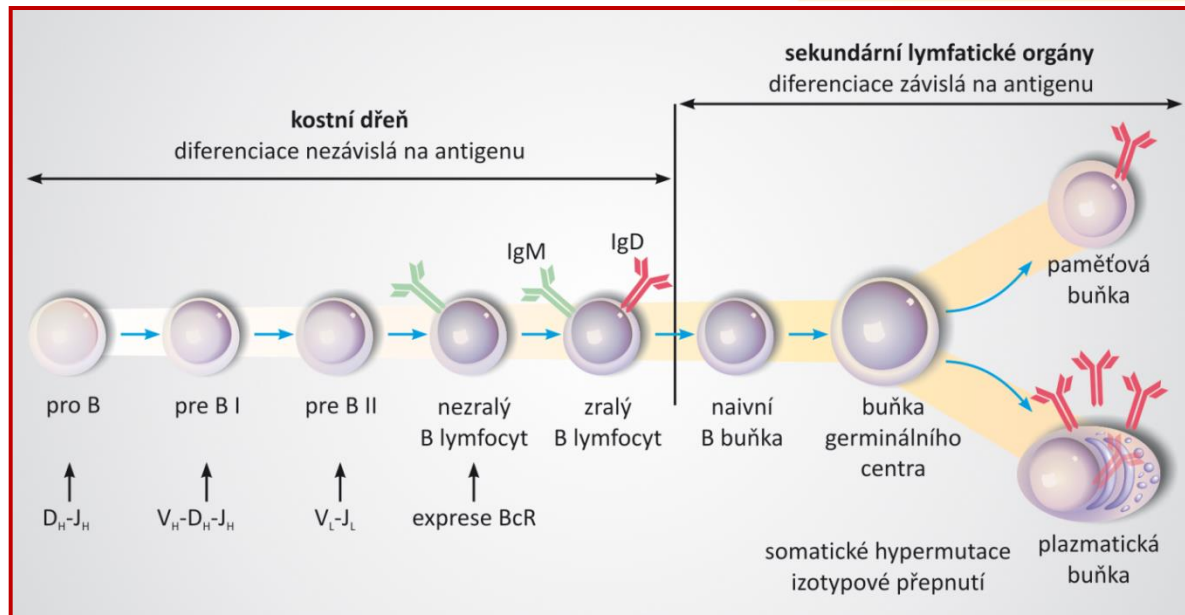
- Jak vznikají nádory
- Kterými vlastnostmi se liší nádorová buňka od zdravé?
 - poškození regulace buněčného dělení
 - poškození programované buněčné smrti
 - získání neomezeného replikačního potenciálu
 - indukce angiogeneze
 - tvorba metastáz
 - navýšená genetická nestabilita
- Lymfomy, lymfocyty, protilátky
- Vývoj B lymfocytů
- Vznik lymfomů
- Závěr

Vývoj B lymfocytů



(1) Prekurzory B lymfocytů vznikají dělením pluripotentní hematopoietické kmenové buňky v **kostní dřev**, kde - bez přítomnosti antigenu - probíhá první část vyžívání B lymfocytů. Dochází k přeskupování genových segmentů - V(D)J rekombinaci - nejdříve těžkých a pak lehkých řetězců. Nezralé B lymfocyty pak exprimují na svém povrchu přeskupený receptor a prodělávají selekční procesy: testována je autoimunita a schopnost přežít v periferních lymfatických tkáních.

Vývoj B lymfocytů



(2) Naivní B buňky jsou vyplavovány do krve a následně do **periferních lymfatických orgánů** (slezina, lymfatické uzliny, tonzily,...), kde se setkávají s **antigeny**. Po aktivaci intenzivně proliferují a tvoří **zárodečná centra (GC)**. V GC probíhají dva klíčové procesy: **somatické hypermutace (SHM)** a **izotypové přepnutí (CSR)**.

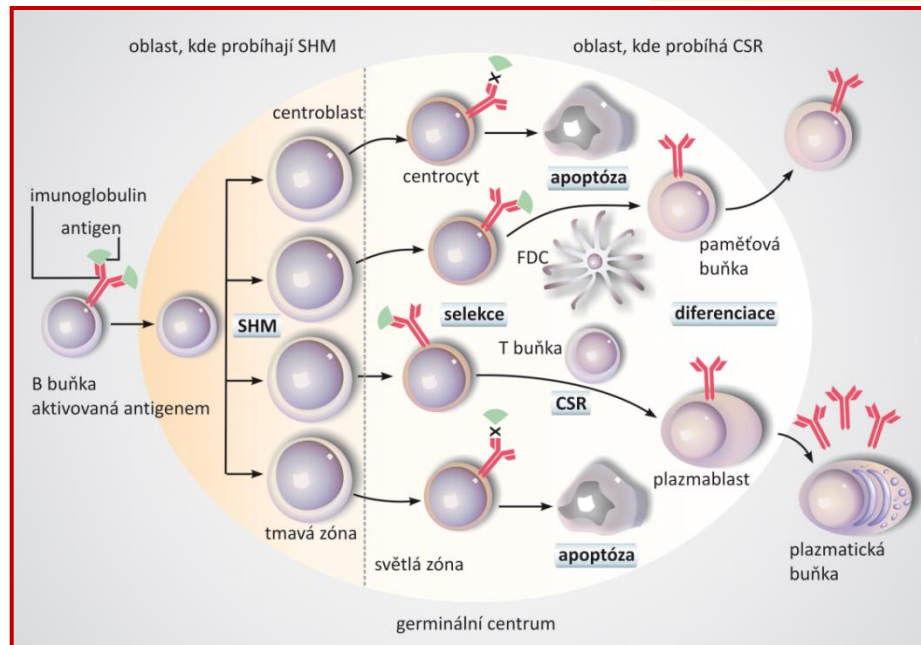
(3) Přeměna na plazmatickou buňku (opět v **kostní dřeni**) produkující protilátku a paměťovou buňku.

Úloha zárodečného centra (GC) v diferenciaci B lymfocytů



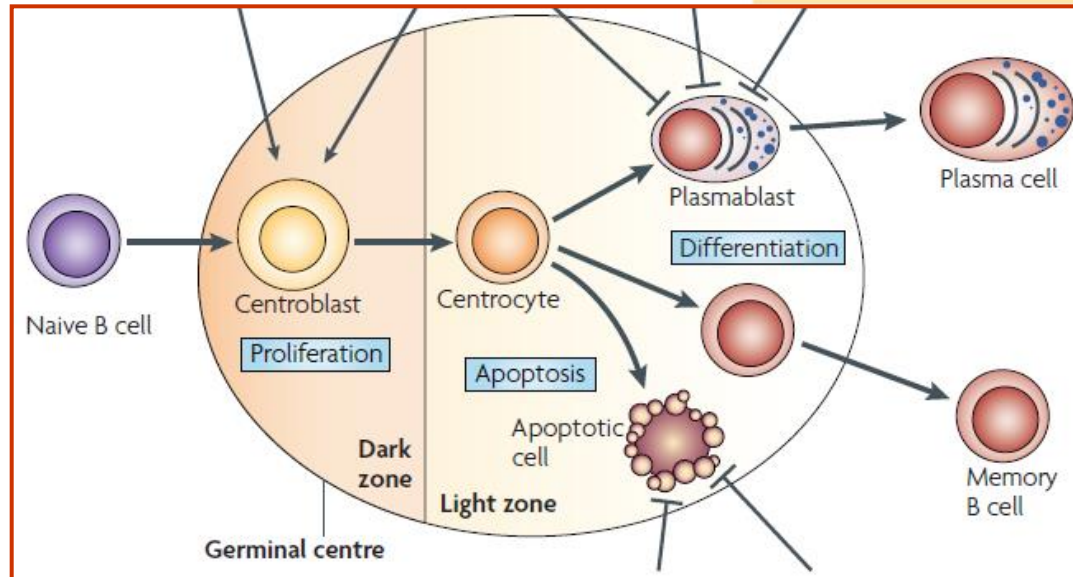
- Zárodečná centra (germinální centra - GC) jsou místa v sekundárních lymfatických orgánech, kde zralé B lymfocyty proliferují, diferencují a kde probíhají somatické hypermutace a izotypové přepnutí (například z IgM na IgG) během normální imunitní odpovědi na infekci.

Úloha zárodečného centra v diferenciaci B lymfocytu



- Tmavá zóna GC je tvořena rychle se dělicími centroblasty, u kterých dochází k **somatickým hypermutacím**. Spojeno s intenzivní **proliferací**.
- Proliferující B lymfocyty vytlačují **klidové** buňky na periferii foliklu, kde tvoří tzv. plášťovou zónu.
- Světlá zóna je tvořena nedělicími se centrocyty, u kterých dochází k izotypovému přepnutí. Vznikají paměťové a plazmatické buňky. Spojeno s masivní **apoptózou** a **diferenciací**.

Úloha zárodečného centra v diferenciaci B lymfocytu



Pro diferenciaci antigenem aktivovaných B buněk jsou typické:

- výrazná proliferace
- snížená citlivost na poškození DNA (SHM, CSR)
- aktivní telomeráza
- silná vnímavost k apoptóze

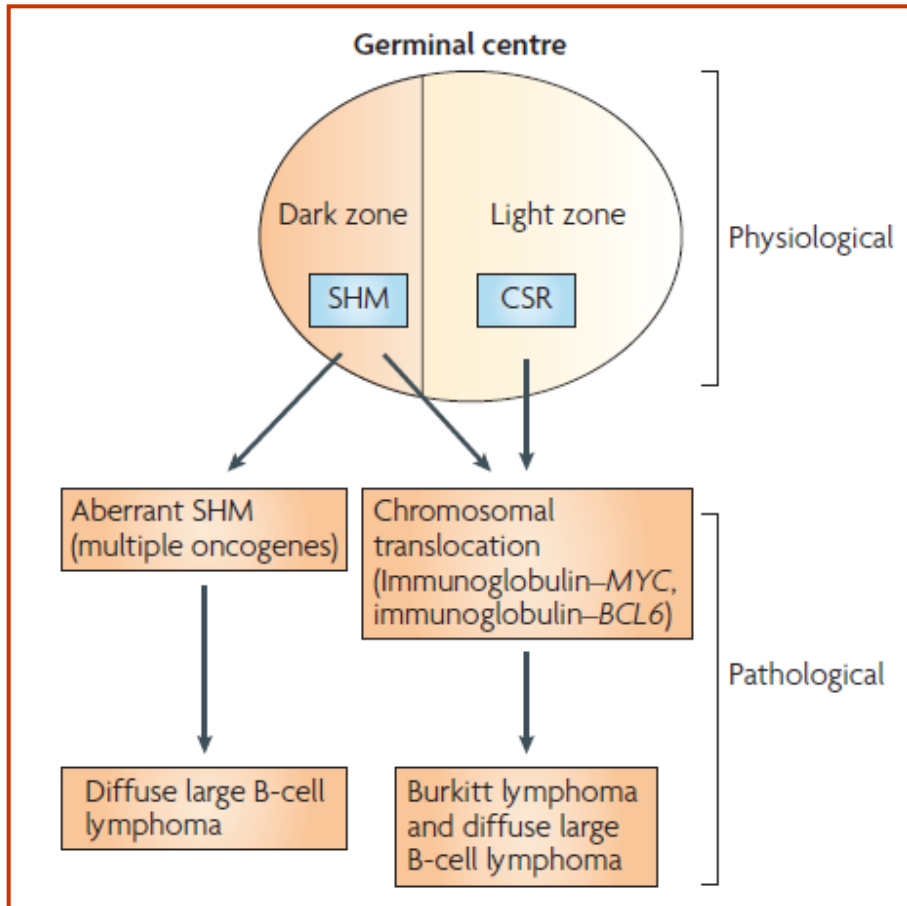
Jak vznikají lymfomy

Osnova



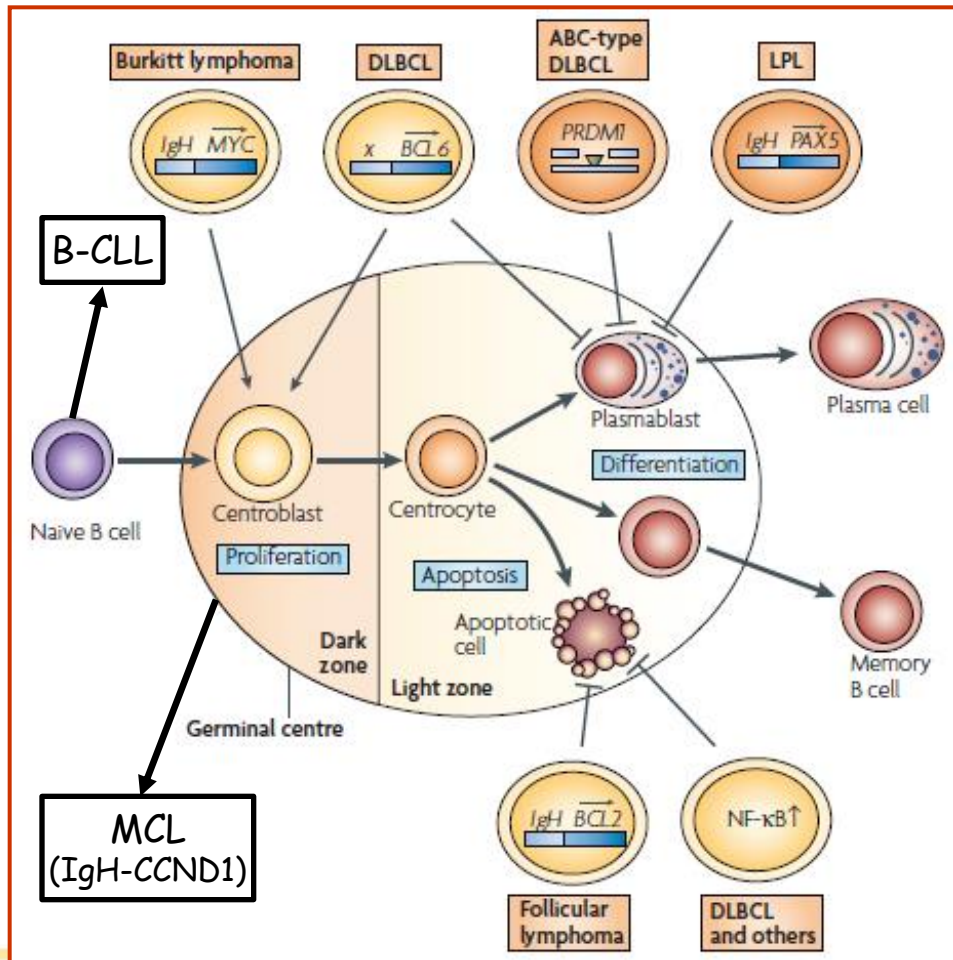
- Jak vznikají nádory
- Kterými vlastnostmi se liší nádorová buňka od zdravé?
 - poškození regulace buněčného dělení
 - poškození programované buněčné smrti
 - získání neomezeného replikačního potenciálu
 - indukce angiogeneze
 - tvorba metastáz
 - navýšená genetická nestabilita
- Lymfomy, lymfocyty, protilátky
- Vývoj B lymfocytů
- Vznik lymfomů
- Závěr

Poškození DNA vznikající v zárodečných centrech



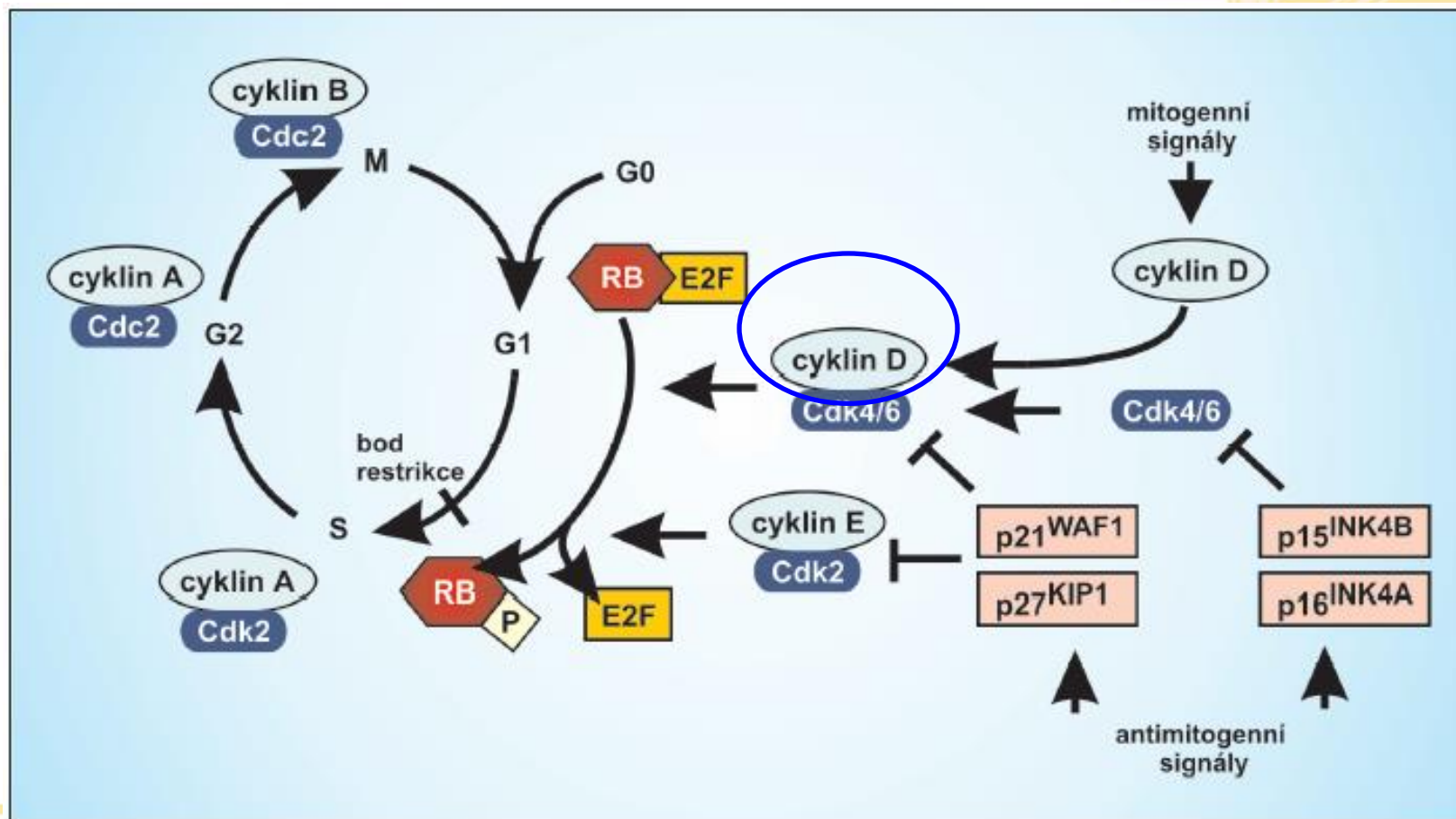
- **Chyby** v procesech somatických hypermutací (SHM) a izotypového přepnutí (CSR), které jsou fyziologicky cíleny na imunoglobulinové řetězce, mohou:
- způsobit hypermutace nebo translokace některých protoonkogenů (*BCL6*, *c-myc*, *BCL2*, *CCND1*, *NF-κB* a dalších) a
- být **příčinou vývoje některých ne Hodgkinových lymfomů.**

Chyby v SHM a CSR vedou k vývoji lymfomů



- Burkittův lymfom: $t(8;14) \Rightarrow \uparrow c\text{-myc}$
- Folikulární lymfom: $t(14;18) \Rightarrow \uparrow BCL2$
- Lymfom z buněk pláštěvé zóny: $t(11;14) \Rightarrow \uparrow \text{cyklin D1}$
- Difúzní velkobuněčný lymfom B buněk: aberace *BCL6*, *NF-κB*, *PRDM1*, *c-myc*, ...
- Lymfoplasmacytoidní lymfom: $t(9;14) \Rightarrow \uparrow PAX5$

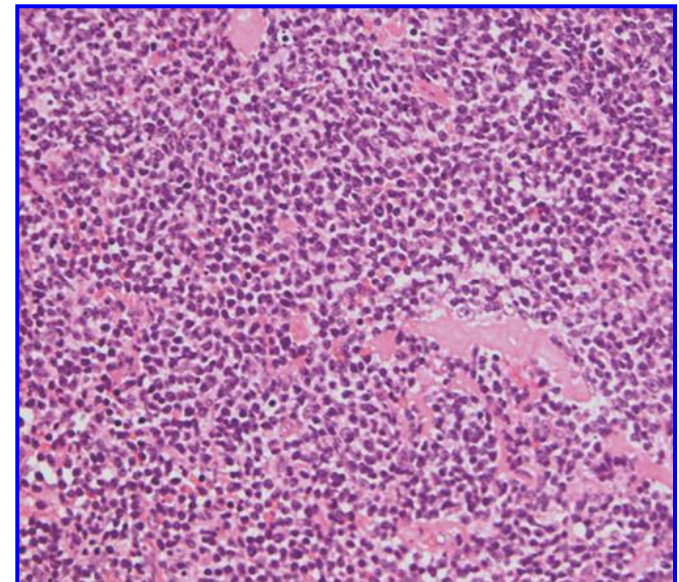
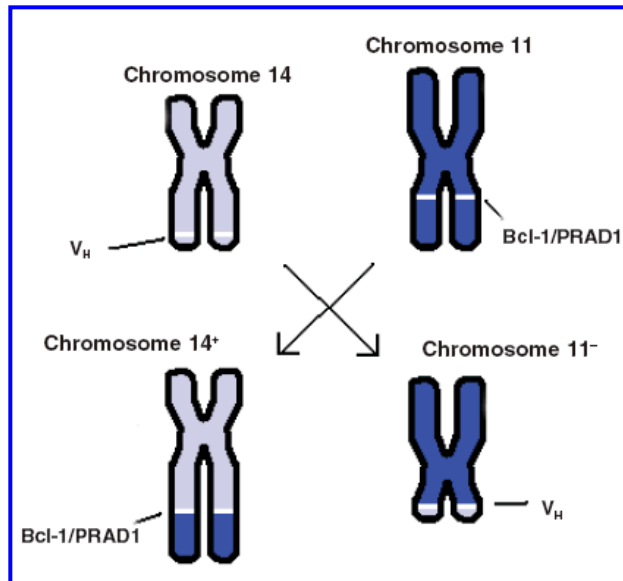
Regulace buněčného cyklu



Cyklin D1 a lymfom z buněk plášt'ové zóny (MCL)

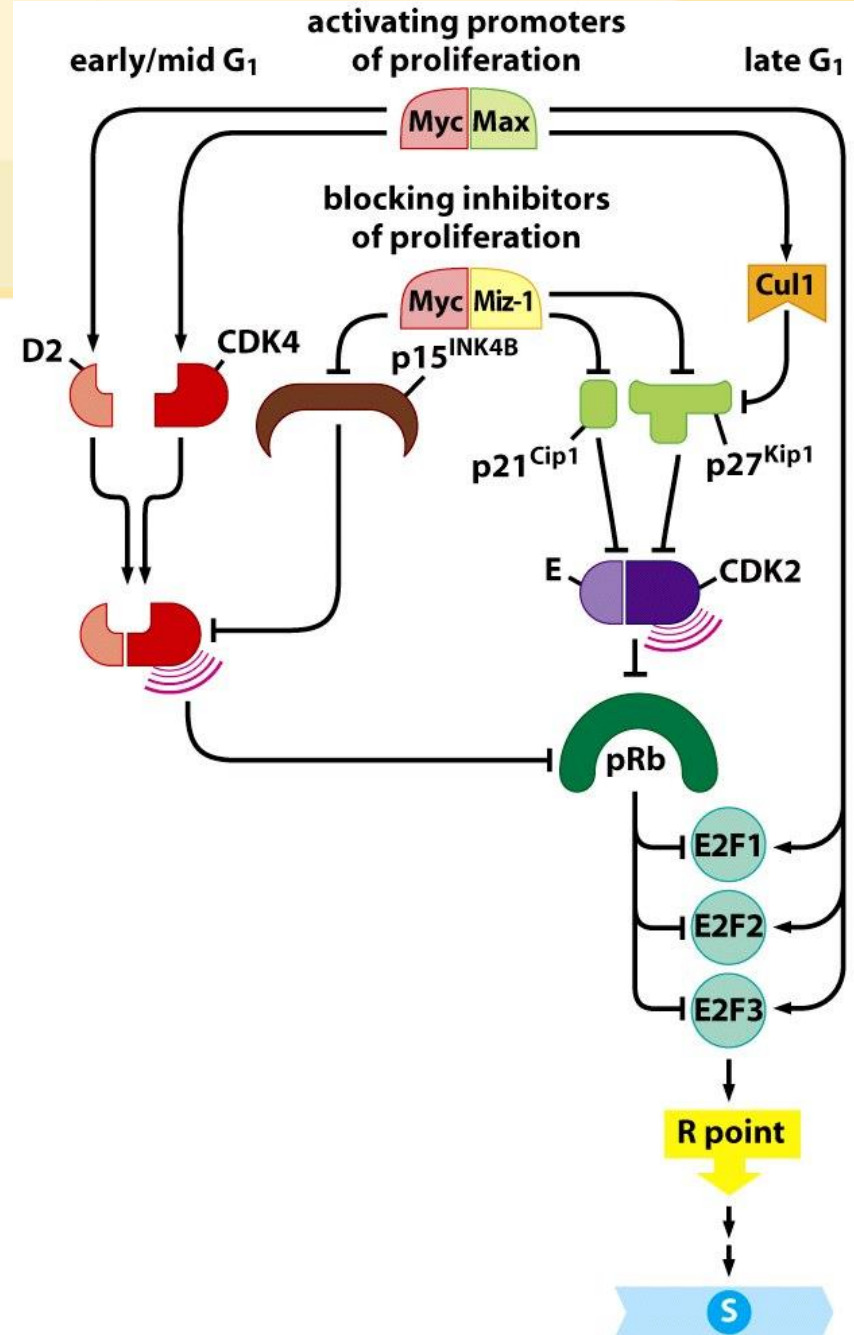


Typickým znakem MCL je translokace t(11;14)(q13;q32). Jejím důsledkem je fúze transkripčního zesilovače genu *IgH* pro těžký imunoglobulinový řetězec μ na chromozomu 14q32 a genu *CCND1* (*BCL1*) kódujícího **cyklin D1** na chromozomu 11q13, a následně vyšoká exprese cyklinu D1.

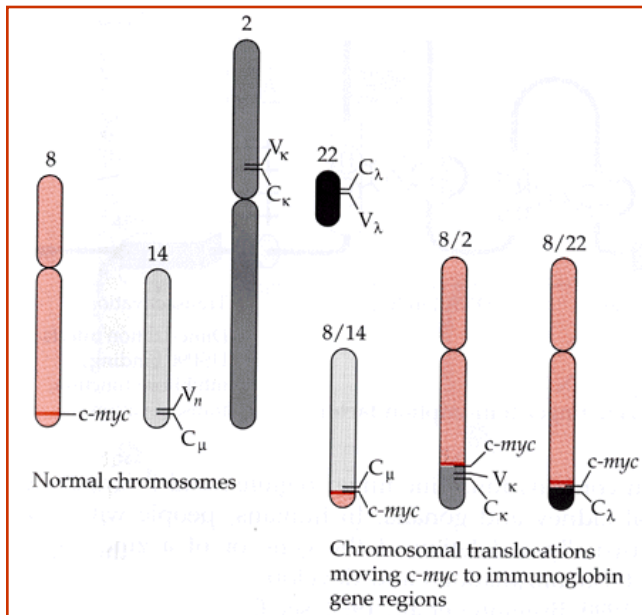


Onkoprotein Myc a buněčný cyklus

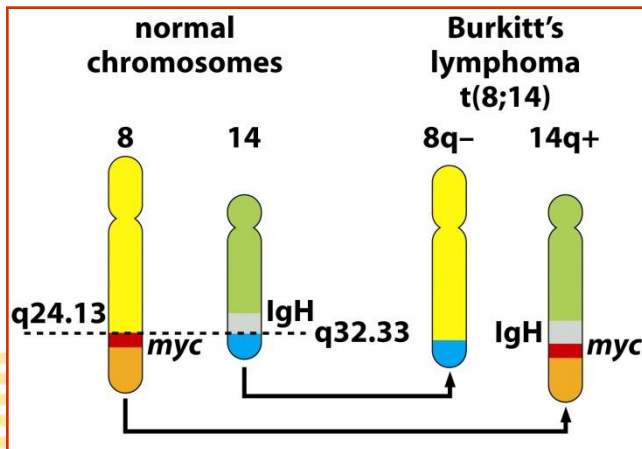
- Dimer Myc-Max indukuje expresi **cyklinu D2** a **CDK4** → ↑**BC** (G1)
- Dimer Myc-Mac indukuje expresi Cul1, který zprostředkovává degradaci **p27** → ↑**BC** (G1)
- Dimer Myc-Max indukuje expresi **E2Fs** → ↑**BC** (S)
- Dimer Myc-Miz-1 reprimuje expresi **p15**, **p21** a **p27** → ↑**BC** (G1)



c-myc a Burkittův lymfom

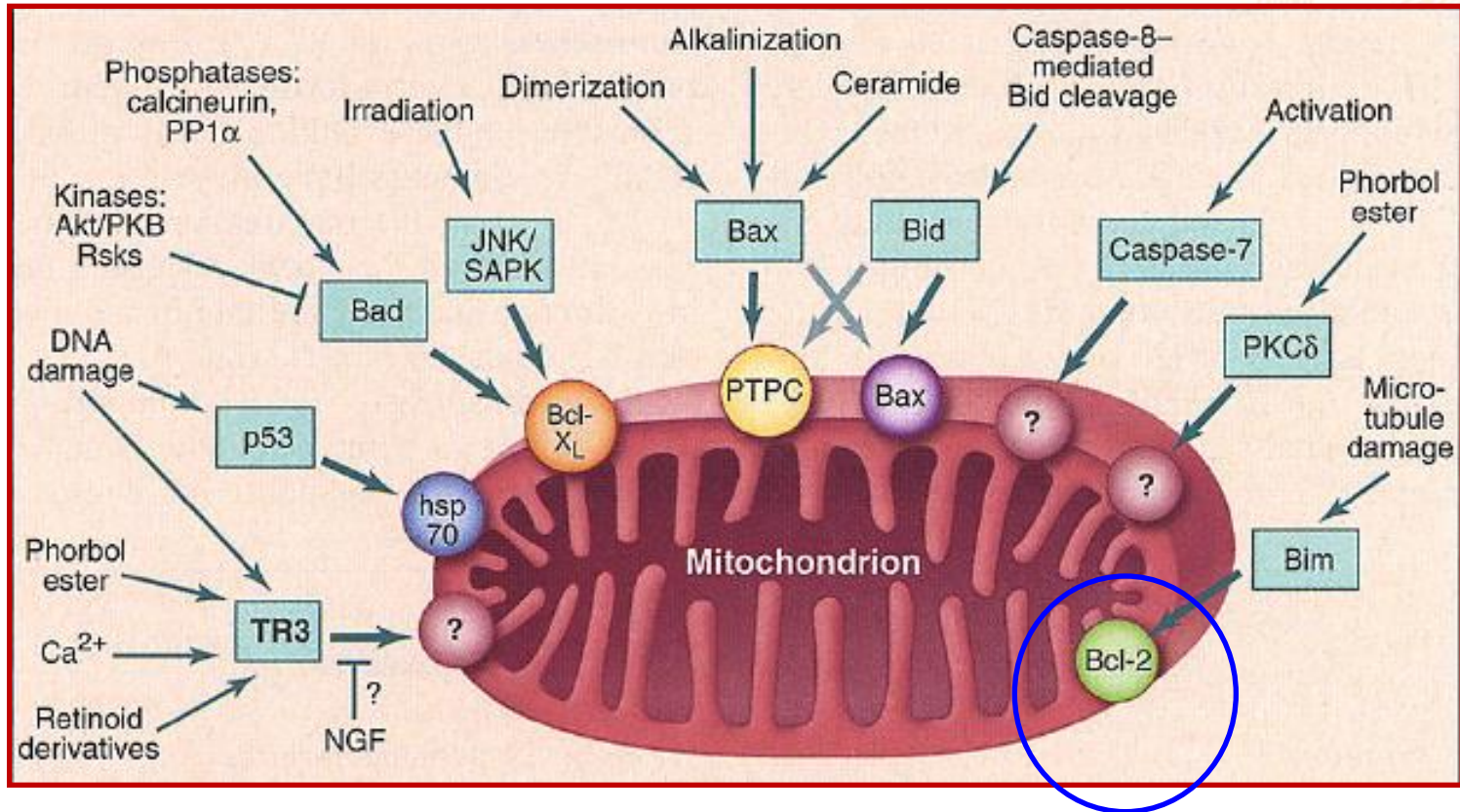


- Téměř všechny případy BL souvisí s translokací genu **c-myc** (chromozom 8) buď s genem pro těžký imunoglobulinový řetězec μ (chromozom 14) nebo lehký řetězec κ nebo λ (chromozomy 2 a 22).



- 80% případů BL má translokaci **t(8;14)(q24;q32)**.
- Případů s translokacemi **t(2;8)(p11;q24)** a **t(8;22)(q24;q11)** je asi po 10%.

Mitochondrie jako integrátory apoptotických signálů

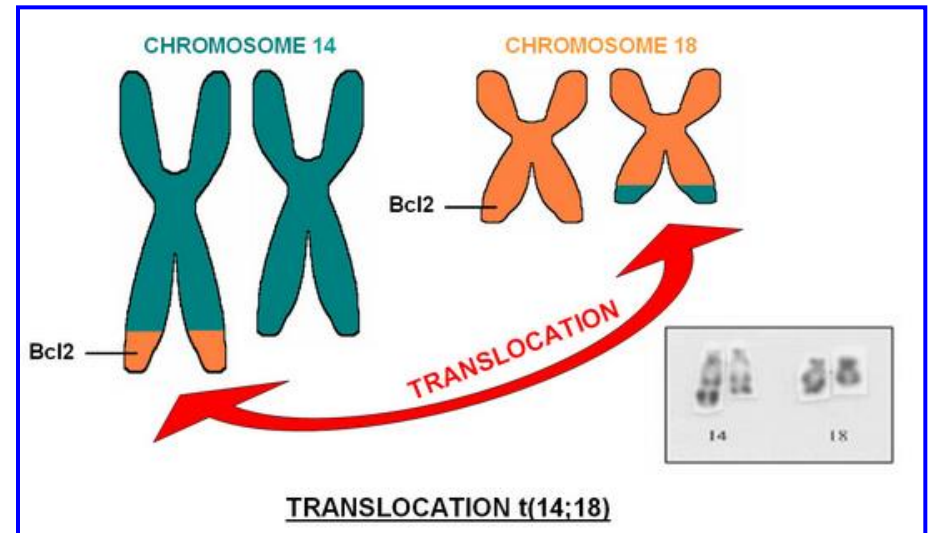
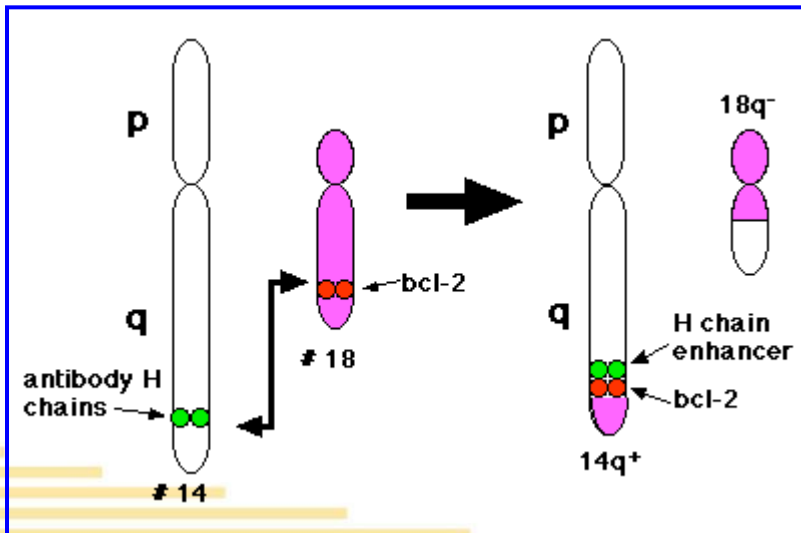


anti-apoptotický protein Bcl-2

BCL2: B-cell leukemia/lymphoma 2



- první apoptotický gen objevený v savčích buňkách díky své roli v maligní přeměně B-buněk. Objeven v r. 1984 (*Tsujimoto*) jako produkt translokace **t(14;18)** u buněčné linie B-ALL
- poprvé popsána nová třída proto-onkogenů: ne aktivátory buněčné proliferace, ale **represory buněčné smrti**
- Folikulární lymfomy (+cca 30% DLBCL) často nesou translokaci **t(14;18)**, ta vede k vysoké expresi *bcl-2*



Další onkogeny zapojené do vývoje lymfomů



MYC, BCL2, CCND1 (BCL1)

BCL6

- lokalizován v pozici 3q27
- nutný pro vytvoření GC
- transkripční represor mnoha genů účastnících se apoptózy, odpovědi na poškození DNA, regulace buněčného cyklu, proliferace a diferenciace; cílové geny např. *BCL2, p53, IRF4*
- „vypnutím p53“ umožňuje somatické hypermutace a izotypové přepnutí (tj. rekombinace)
- aberrace *BCL6*: hypermutace, translokace - 50% s Ig lokusem, 50% jiní partneři
- translokace *BCL6* u asi 30-40% DLBCL, některých FL, MALT

Další onkogeny zapojené do vývoje lymfomů

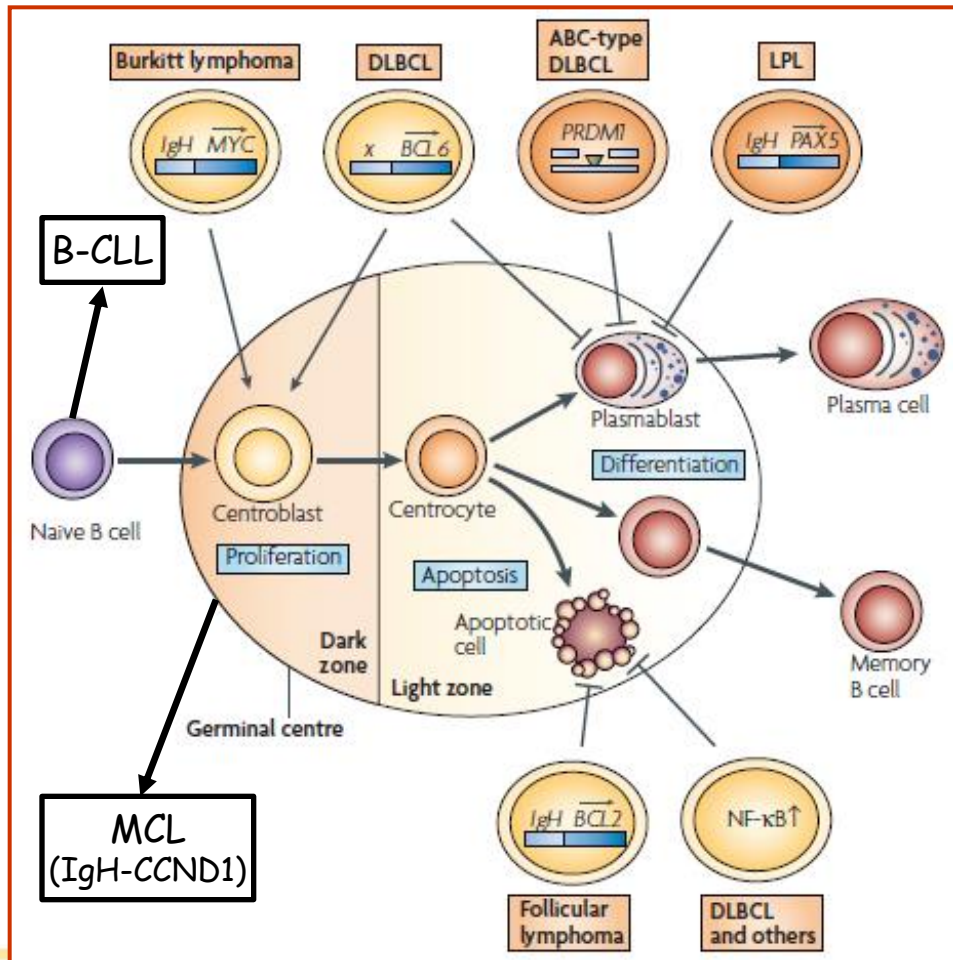


MYC, BCL2, CCND1 (BCL1), BCL6

BCL3

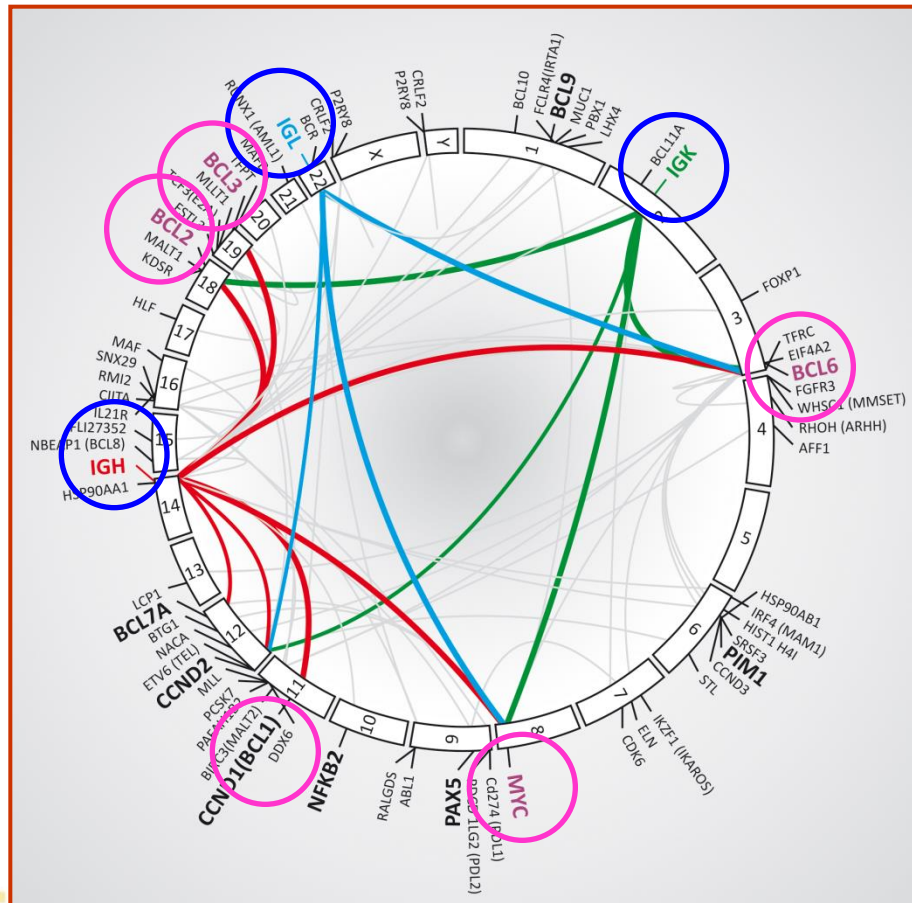
- lokalizován v pozici 19q13
- člen rodiny I κ B
- účastní se vytváření GC
- translokace t(14;19) se vyskytuje u řady leukémií a lymfomů

Chyby v SHM a CSR vedou k vývoji lymfomů



- Burkittův lymfom: $t(8;14) \Rightarrow \uparrow c\text{-myc}$
- Folikulární lymfom: $t(14;18) \Rightarrow \uparrow BCL2$
- Lymfom z buněk pláštěvé zóny: $t(11;14) \Rightarrow \uparrow \text{cyklin D1}$
- Difúzní velkobuněčný lymfom B buněk: aberace *BCL6*, *NF-κB*, *PRDM1*, *c-myc*, ...
- Lymfoplasmacytoidní lymfom: $t(9;14) \Rightarrow \uparrow PAX5$

Chromozomální translokace vyskytující se u lymfomů



- tyto typické chromozomální přestavby (a hypermutace) jsou nejenom charakteristické pro určité typy lymfomů, ale považují se také za změny primární, iniciující vývoj nádoru

Jak vznikají lymfomy

Osnova



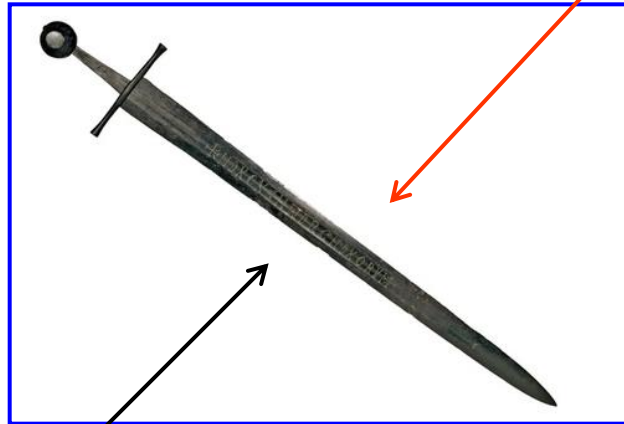
- Jak vznikají nádory
- Kterými vlastnostmi se liší nádorová buňka od zdravé?
 - poškození regulace buněčného dělení
 - poškození programované buněčné smrti
 - získání neomezeného replikačního potenciálu
 - indukce angiogeneze
 - tvorba metastáz
 - navýšená genetická nestabilita
- Lymfomy, lymfocyty, protilátky
- Vývoj B lymfocytů
- Vznik lymfomů
- Závěr

Místo závěru: double-edged sword



Výhoda

10^{11} různých protilátek



Nevýhoda
riziko lymfomů

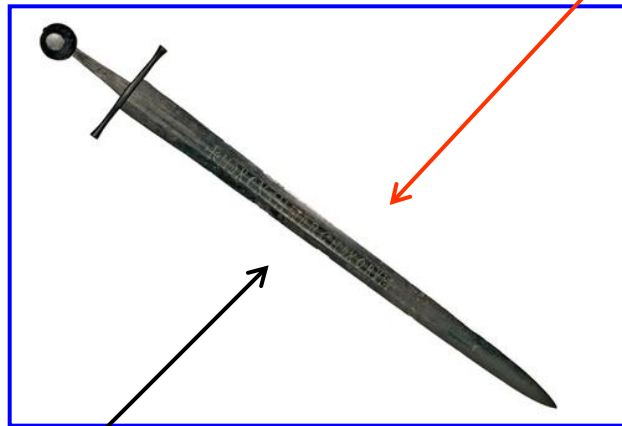
Místo závěru: double-edged sword



~ **advanatge** with liability

Výhoda

10¹¹ různých protilátek



Nevýhoda
riziko lymfomů

liability: přítěž, břímě,
překážka, odpovědnost, závazek,
náchylnost, povinnost,...

Děkuji za pozornost!

