

ONKOGENETIKA

„Původ, evoluce a léčba nádorů“

Doc. Mgr. Martin Trbušek, Ph.D.

Interní hematologická a onkologická klinika, FN Brno
Lékařská fakulta MU



RAKOVINA: definice a základní klasifikace

RAKOVINA představuje abnormální růst buněk ve tkáni s následným šířením po těle při vytváření metastáz

Základní dělení je odvozeno od buňky (resp. tkáně) původu:

Karcinomy jsou odvozeny z epiteliální tkáně – např. nádory prsu, plic, střeva nebo pankreatu

Sarkomy mají svůj původ v mezenchymálních buňkách (pojivová tkáň) – např. nádory kostí (osteosarkomy)

Nádory krevních buněk a hematopoietického systému – leukémie a lymfomy

Nádory zárodečných buněk – např. ovariální karcinom nebo seminom

Původ nádorů: koncepční teorie

Somatic mutation theory (SMT)

VS.

Tissue organization field theory (TOFT)

SMT:

Základní nastavení buňky je klidové stádium a rakovina představuje „únik“ z tohoto stavu.

Maligní buňka vykazuje – díky svým genetickým změnám - selektivní výhodu růstu oproti zdravému protějšku.

TOFT:

Základní nastavení buňky je nekonečná proliferace (blbost?...možná ne.....)

Jsou to naše tkáně, kdo drží buňky pod kontrolou (v klidu) a jejich dezorganizace vede k „obnově“ buněčného dělení

Původ rakoviny: role přímé dědičnosti

Dědičné nádory (včetně zárodečných nádorových syndromů)
5-10% všech případů rakoviny

Např. syndrom *Li-Fraumeni* asociovaný s mutacemi v TP53
nebo *xeroderma pigmentosum* zahrnující mutace v genech
pro opravu DNA

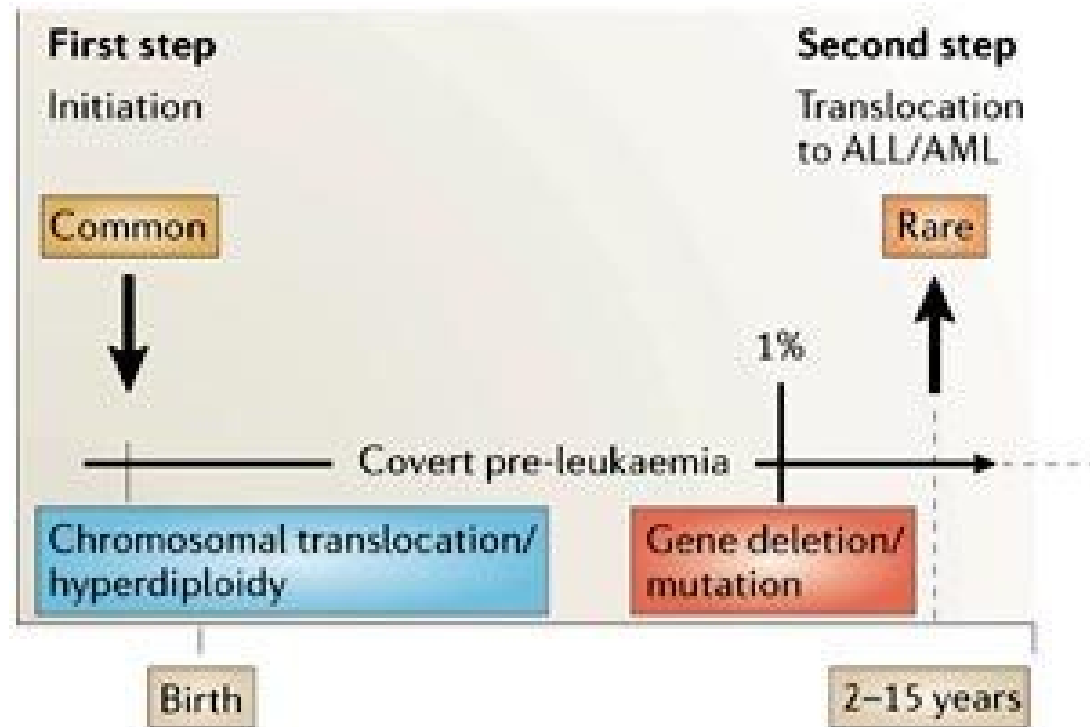
Sporadické nádory – zbytek, původ v somatické tkáni

Genetické defekty jsou příčinou v obou případech;

Navíc, 15-20% nádorových onemocnění zahrnuje infekční *agens*

např. vysoce rizikové HPVs u karcinomu děložního čípku

(Specifická) etiologie dětských leukémií



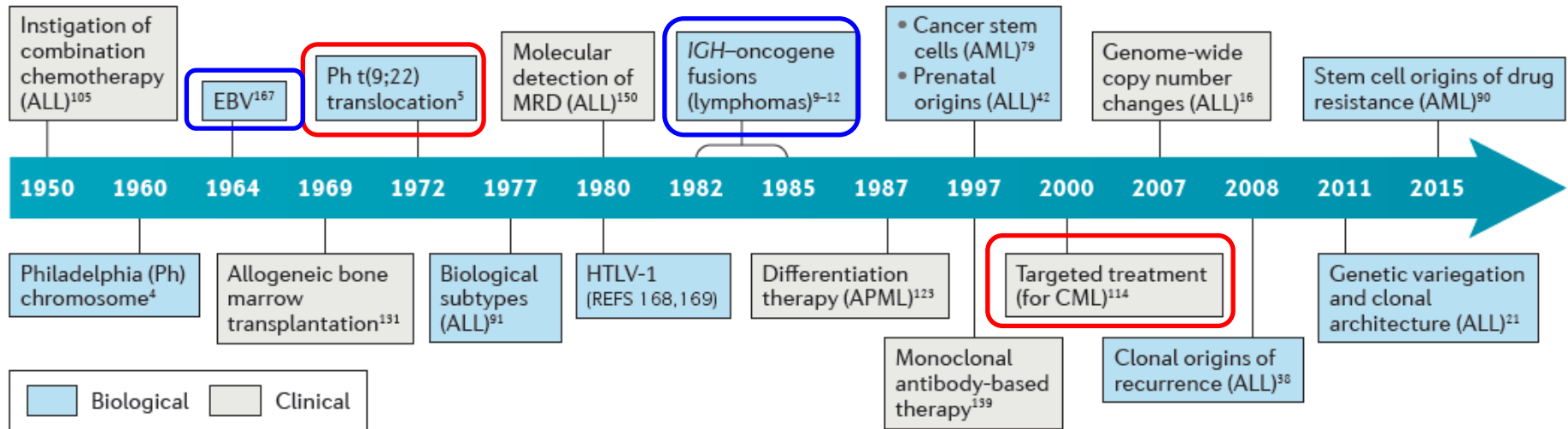
Analýza „Guthriho kartiček“
nebo pupečnickové krve

Copyright © 2006 Nature Publishing Group
Nature Reviews | Cancer

...u jednovaječných dvojčat

Greaves, *Nat Rev Cancer* 2016

Příspěvek leukémií a lymfomů k SMT



Leukémie a lymfomy představují < 10% všech nádorových onemocnění

L a L: typické aberace umožňují molekulární klasifikaci

Nádory krve mají povětšinou své jasné „spolupachatele“

Typické translokace

Chronická myeloidní leukémie; t(9;22) BCR-ABL

Lymfom z buněk plášťové zóny; t(11;14) Cyclin D1/IgH

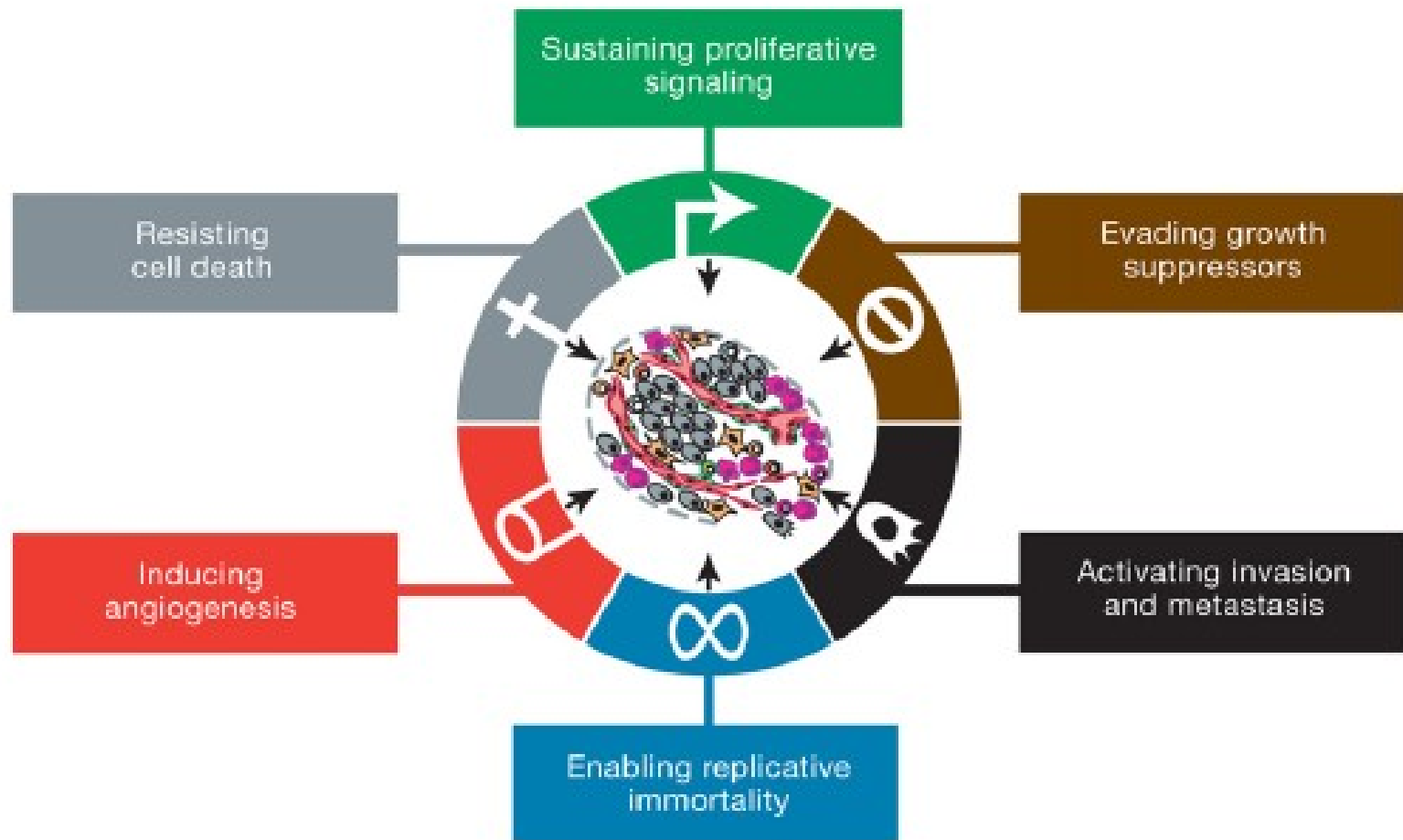
Folikulární lymfom; t(14;18) Bcl-2/IgH

Burkittův lymfom; t(8;14) c-Myc/IgH

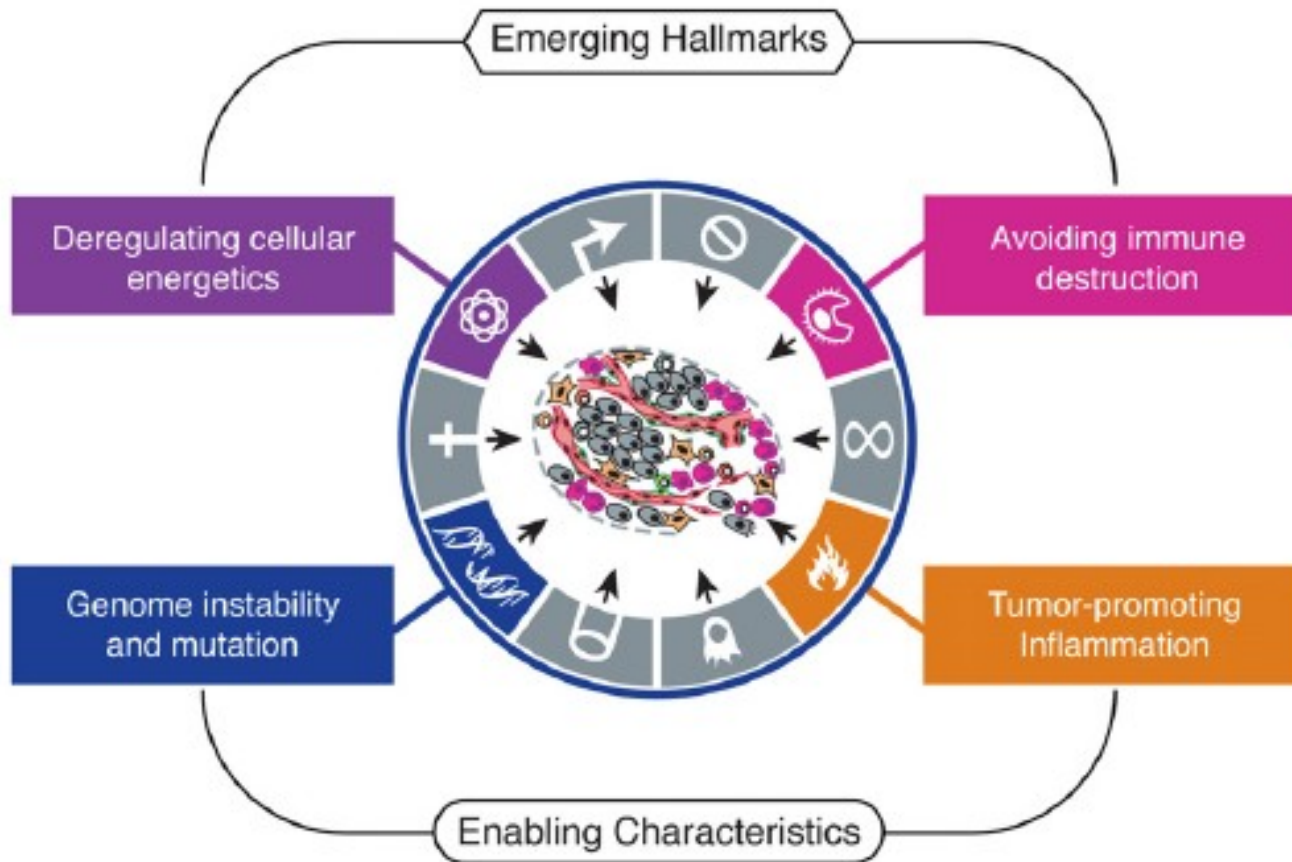
... nebo jiné charakteristické aberace

Chronická lymfocytární leukémie; del 13q, del 11q, del 17p, +12

Základní „schopnosti“ nádorových buněk

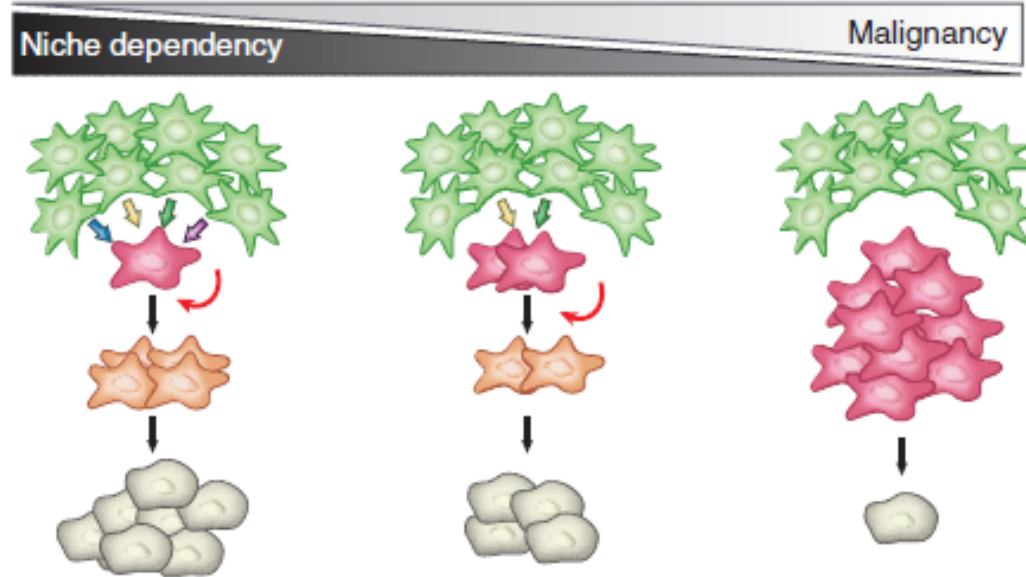
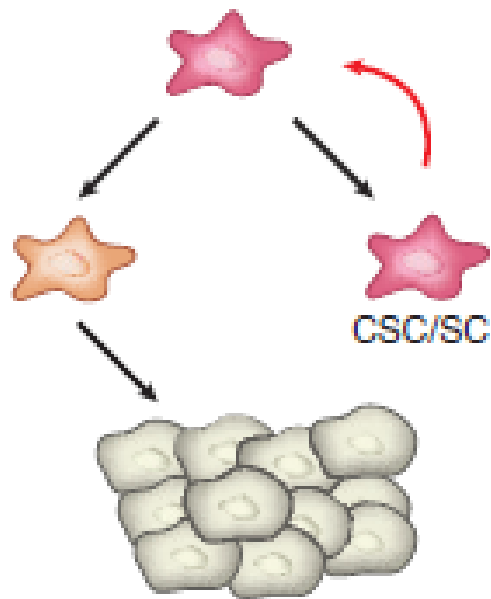


Další definované znaky nádorových buněk



Role nádorových kmenových buněk (CSC) při vzniku tumoru a jeho progresi

Classical SC/CSC view



Lidské tělo obsahuje **$\sim 10^{14}$ buněk**
 $\sim 10^{11}$ buněk je každý den obnoveno (SC)

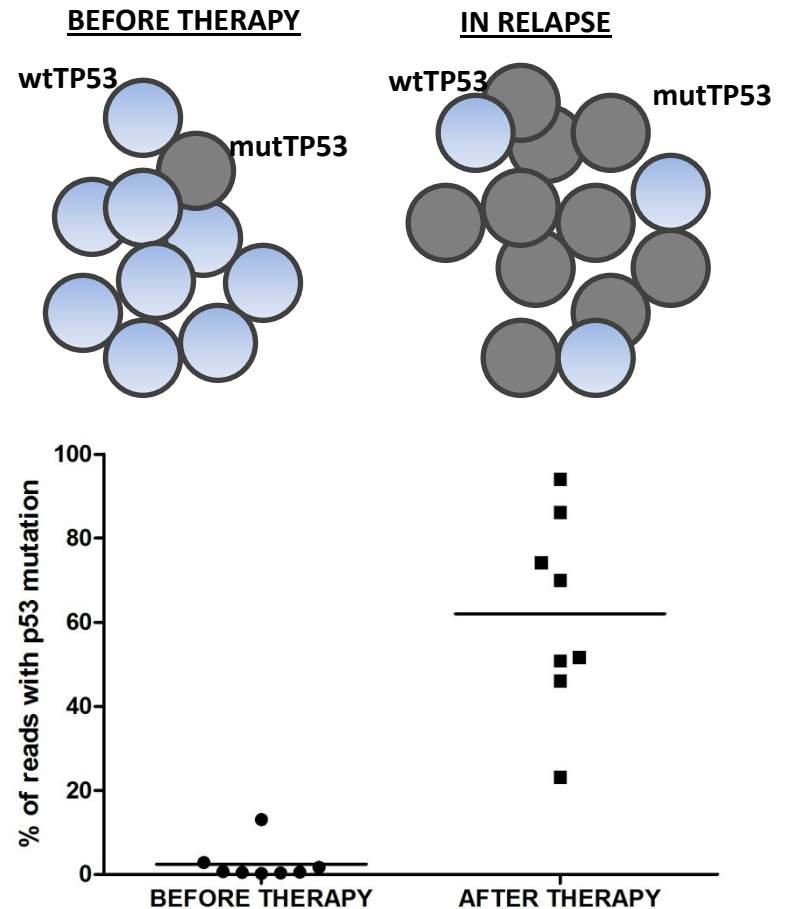
Pouze část nádorových buněk (CSC) je schopna vytvořit autonomní nádor, tedy „nekonečně“ proliferovat

Adopted from Batlle and Clevers
Nature Med, 2017

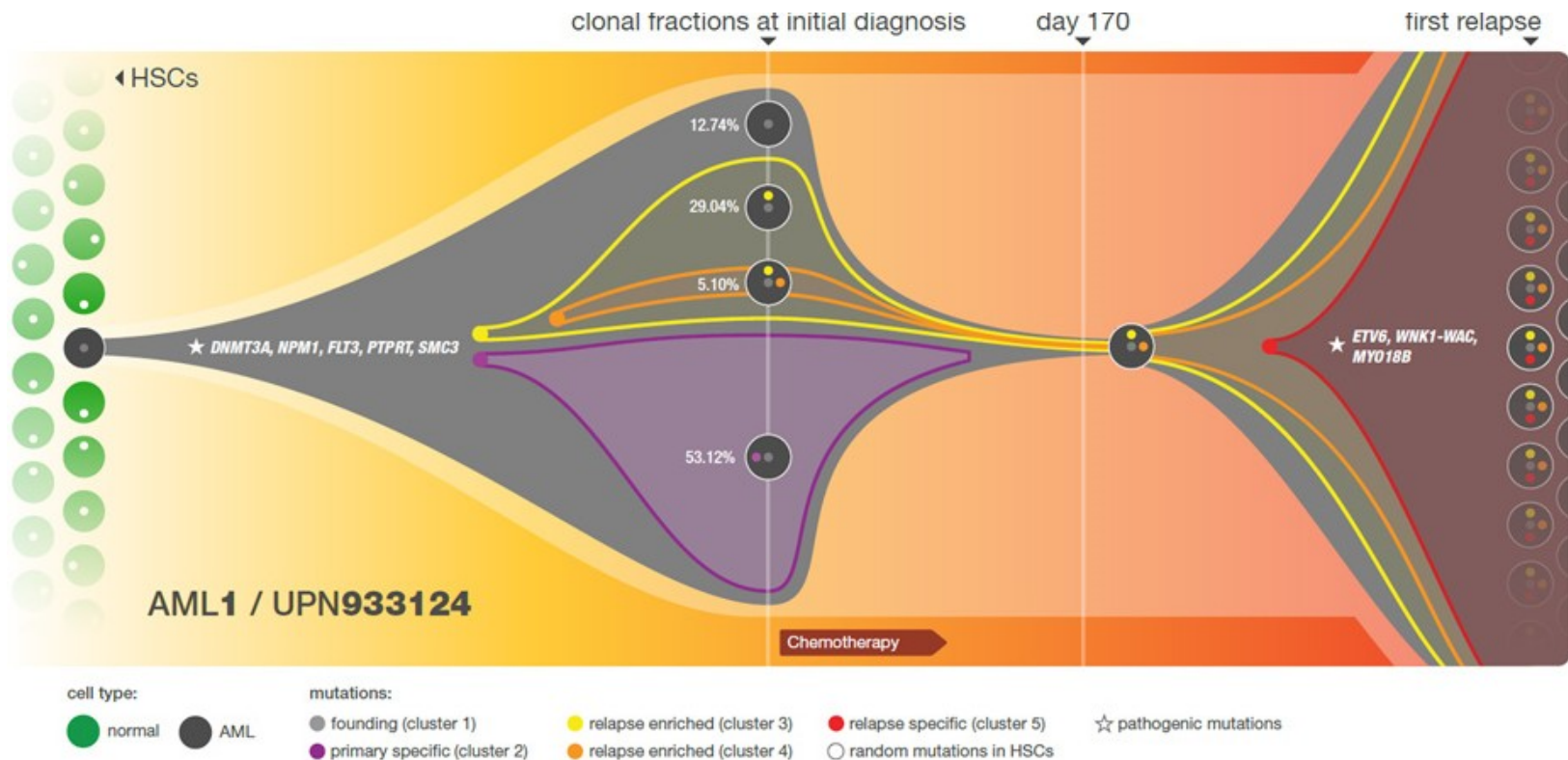
Buněčný původ nádorů vs. terapie

Nádory pocházejí z **kmenových** nebo **progenitorových buněk**, jejichž vývoj je pozměněn směrem od terminální diferenciace k jejich prosté sebeobnově

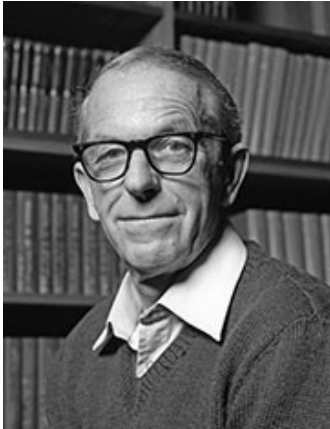
Tento fenomén výrazně narušuje úspěšnost terapie skrze přítomnost tzv. **minimální zbytkové choroby**, která je příčinou následného **relapsu** s proliferací rezistentních klonů.



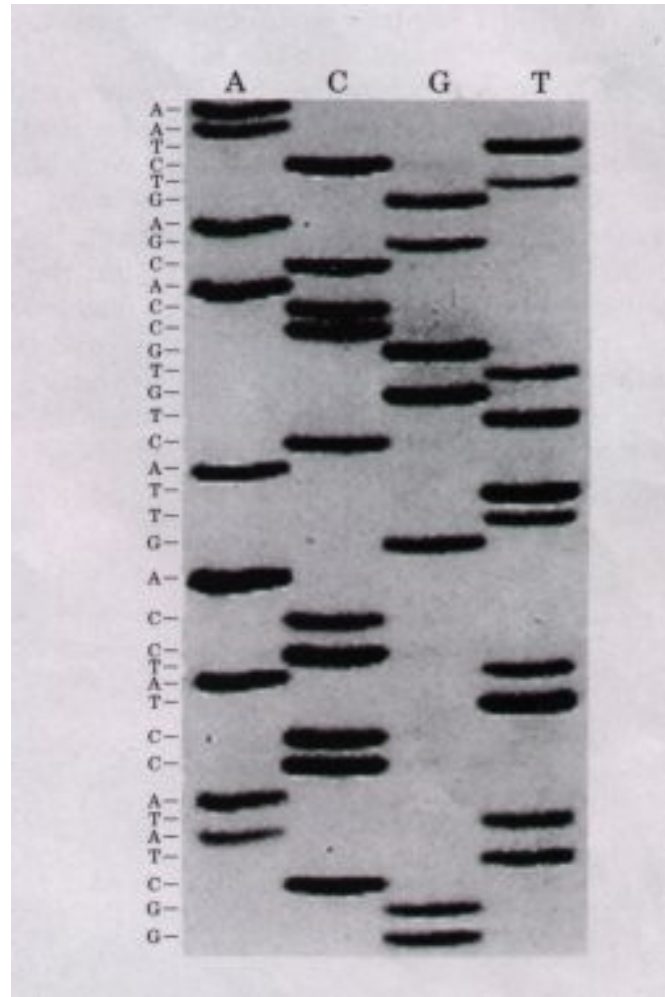
Klonální evoluce a „úzké hrdlo“ terapie: případ AML



Genové mutace jako základní rys rakoviny

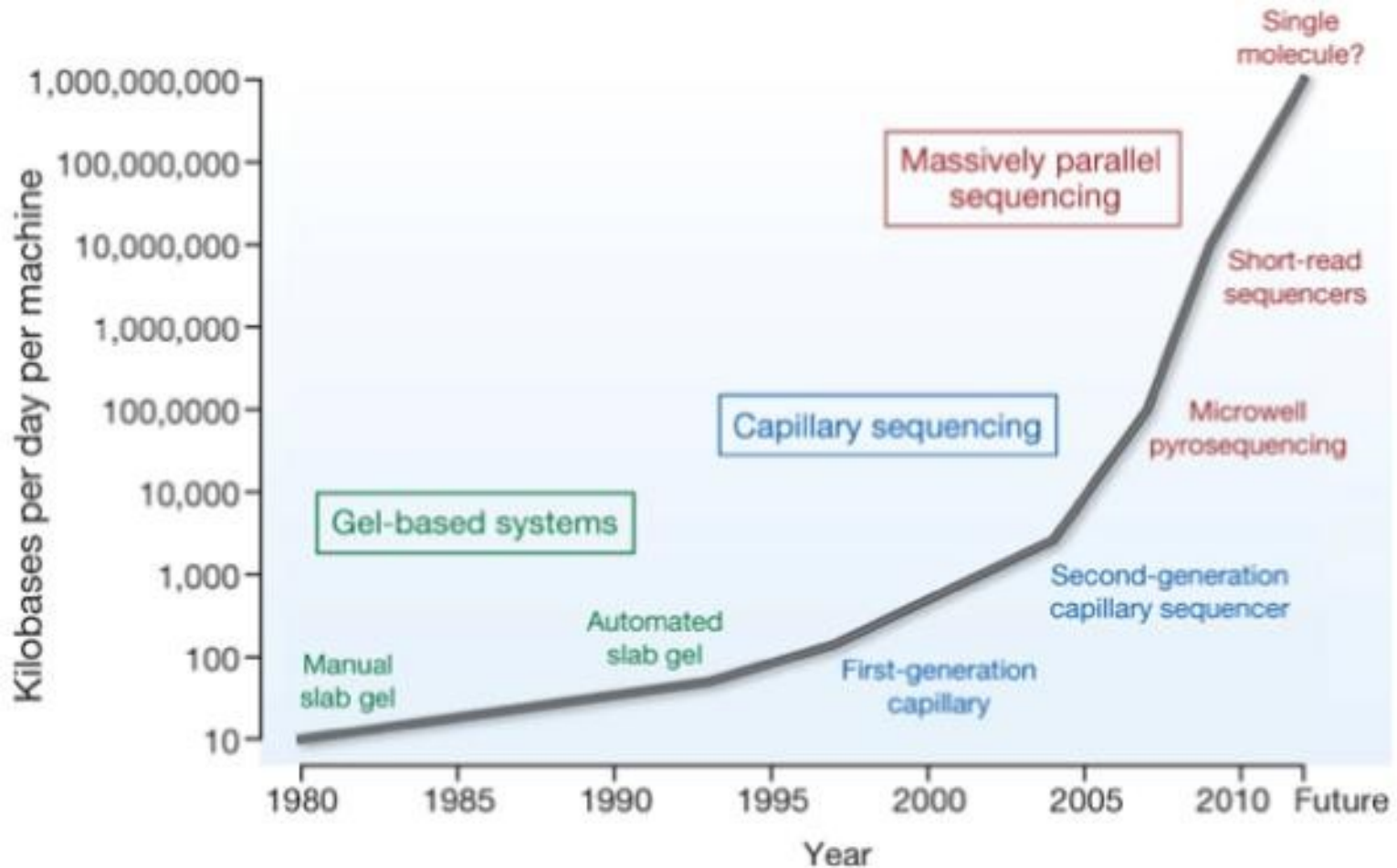


Frederick Sanger
University of Cambridge

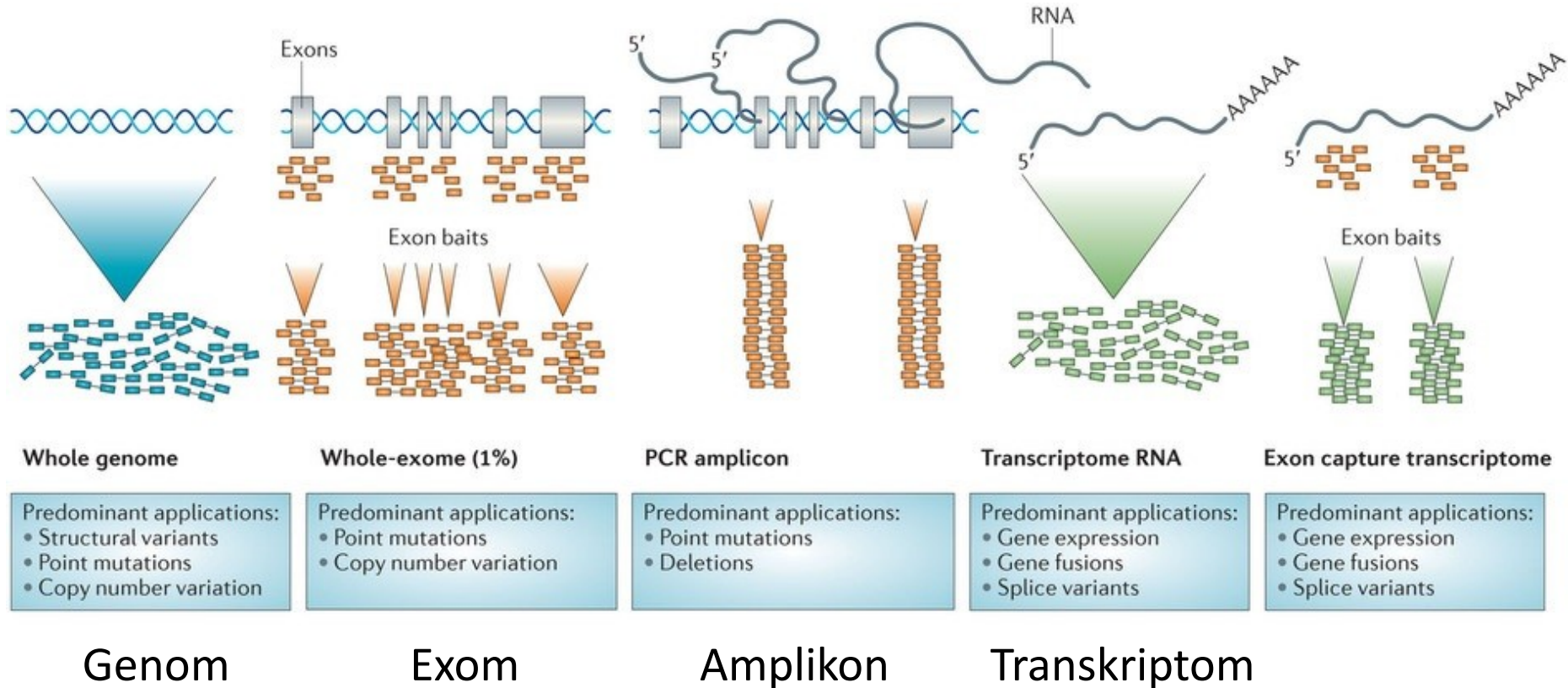


Klasická PAGE
Značení ^{35}S

(Dech beroucí) technologický pokrok v sekvenování DNA



Současnost: „uživatelsky-orientované“ NGS



Využití NGS mimo přímé sekvenování

- SNV = single nucleotide variants (mutace/SNP)
- CNV = copy number variation (inzerce/delece)
- strukturní aberace (translokace/inverze)
- genová exprese (mRNA)
- epigenetika (metylované oblasti)
- interakce DNA-protein
- analýza technologie CRISPR



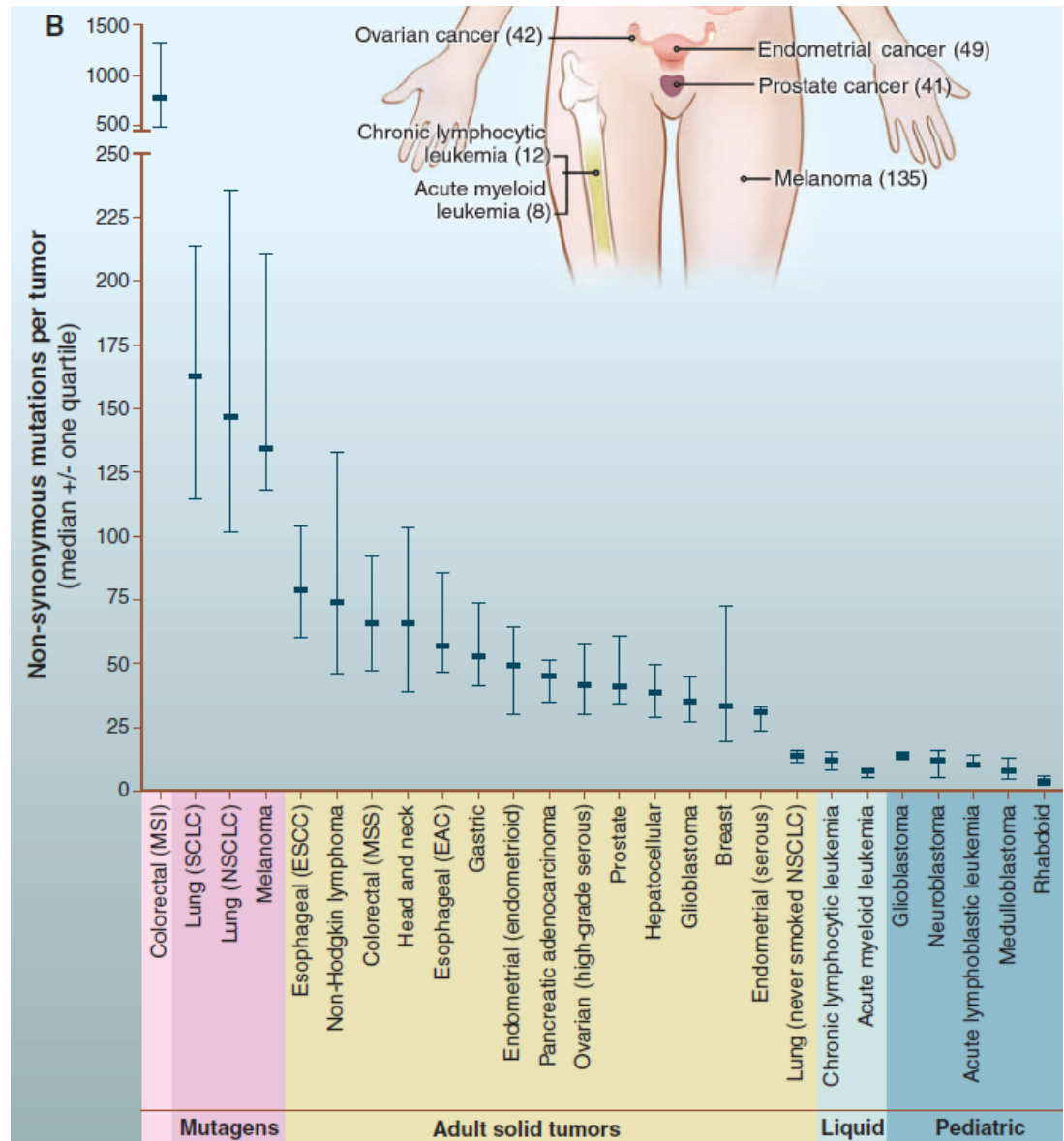
Celogenomová analýza (WGS) nádorů z různých tkání

Vysoce variabilní počet mutací

„Driver“ mutace
vs.
„Passenger“ mutace

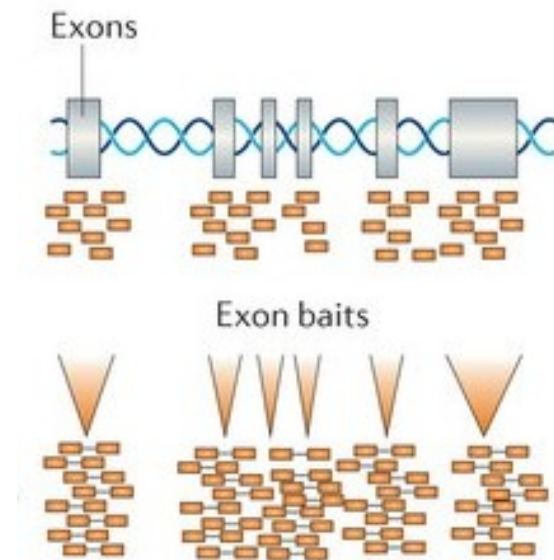
„Driver“ geny: ~125
71 TS/54 ONC

PRINCIPY
DARWINOVSKÉ SELEKCE

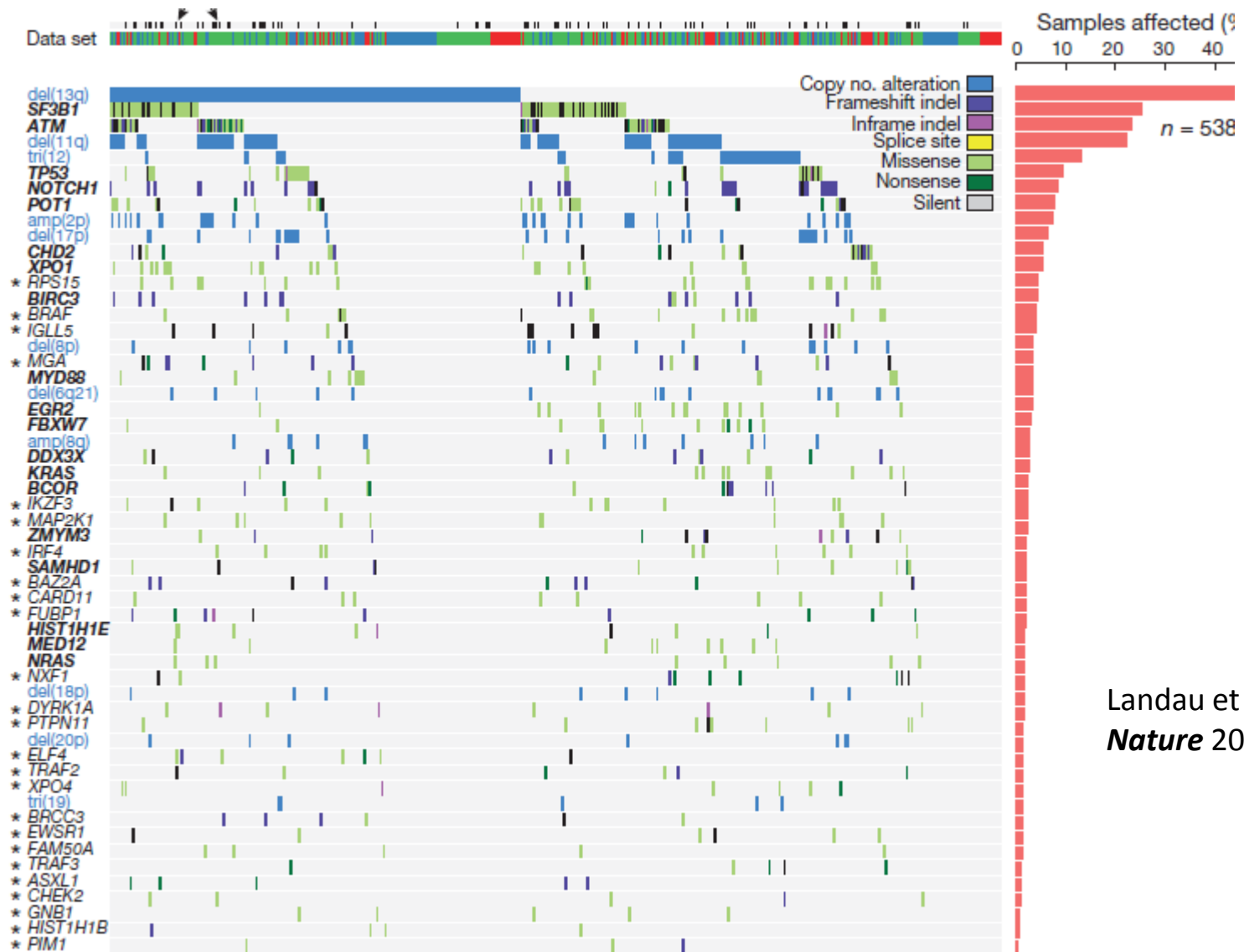


Exomové sekvenování

- WES = *whole exome sequencing*
- Sekvenování kódujících oblastí = **exom** (asi 1 % genomu)
- **Efektivnější než WGS**: rychlost, cena, vyšší pokrytí



Celoexomové sekvenování a mutace: příklad CLL



Landau et al.,
Nature 2015

Nejčastěji mutované geny: SF3B1, ATM, TP53

Cílené sekvenování

- *Targeted sequencing*
- Princip: PCR amplifikace nebo využití cílených sond
- Identifikace mutačních variant pod detekčním limitem Sangerova sekv.
- (až 1% při vysokém pokrytí – tzv. *ultra-deep NGS*)
- Výhodné pro sledování **klonální evoluce nádorů**
- **Výhody oproti WGS / WES:** rychlost, cena, méně prostoru pro skladování dat
- Pro sekvenování velkého počtu vzorků (screening) nebo validaci genetických variant v populaci



Cílené NGS: intraklonální heterogenita nádorové populace

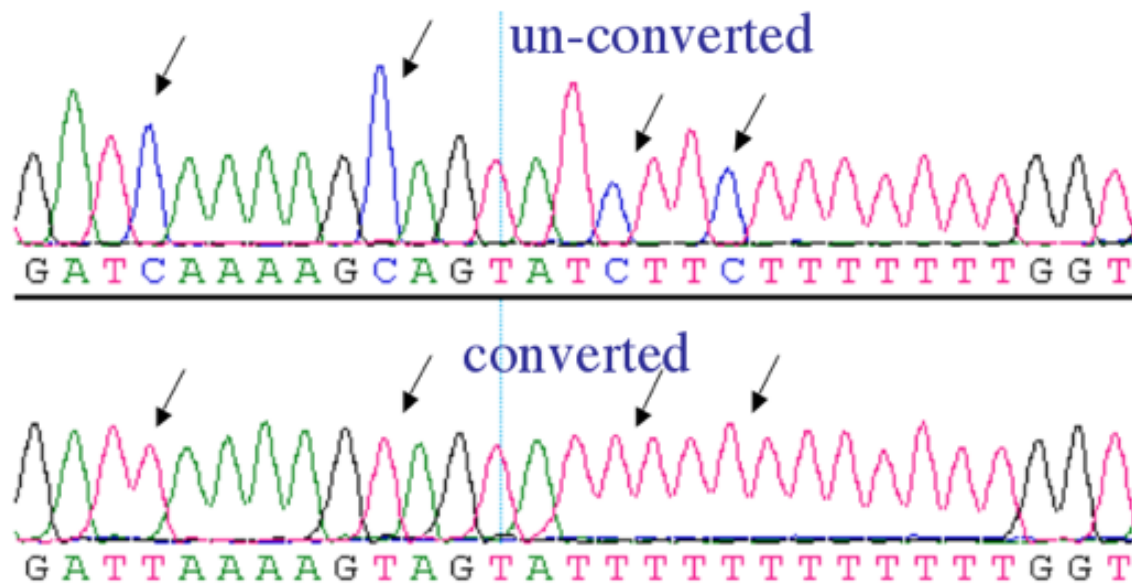
Count	Coverage	Frequency	Gene_function	RefGene	Exon_number	cDNA	Codon
1752	1752	100	exonic	ATM	exon40	c.5948A>G	p.N1983S
2261	2452	92,21	exonic	ATM	exon22	c.3161C>G	p.P1054R
690	2962	23,3	exonic	ATM	exon50	c.7311C>A	p.Y2437X
100	1203	8,31	exonic	ATM	exon24	c.3433_3435del	p.1145_1145del
74	1433	5,16	exonic	ATM	exon30	c.4578C>T	p.P1526P
46	1281	3,59	exonic	ATM	exon43	c.6258T>A	p.Y2086X
243	8231	2,95	splicing	ATM	exon19	c.2921+1G>A	p.P962Q
19	699	2,72	exonic	ATM	exon25	c.3705_3709del	p.P1235fs
25	1087	2,3	exonic	ATM	exon5	c.480delT	p.S160fs
24	1046	2,29	exonic	ATM	exon5	c.483G>C	p.Q161H
67	3357	2	exonic	ATM	exon26	c.3837G>A	p.W1279X
73	5626	1,3	exonic	ATM	exon26	c.3952_3960del	p.1318_1320del
64	5151	1,24	exonic	ATM	exon49	c.7181C>T	p.S2394L
11	904	1,22	exonic	ATM	exon63	c.9022C>T	p.R3008C
42	3514	1,2	exonic	ATM	exon10	c.1402_1403del	p.K468fs

Další modifikace nádorového genomu

- Epigenetické umlčení tumor-supresorových genů (metylace promotorů)
- Globální (celogenomová) hypometylace

Bisulfitová konverze + NGS:

- konverze C → U, Met-C se nemění
- přesná identifikace jednotlivých metylovaných bazí

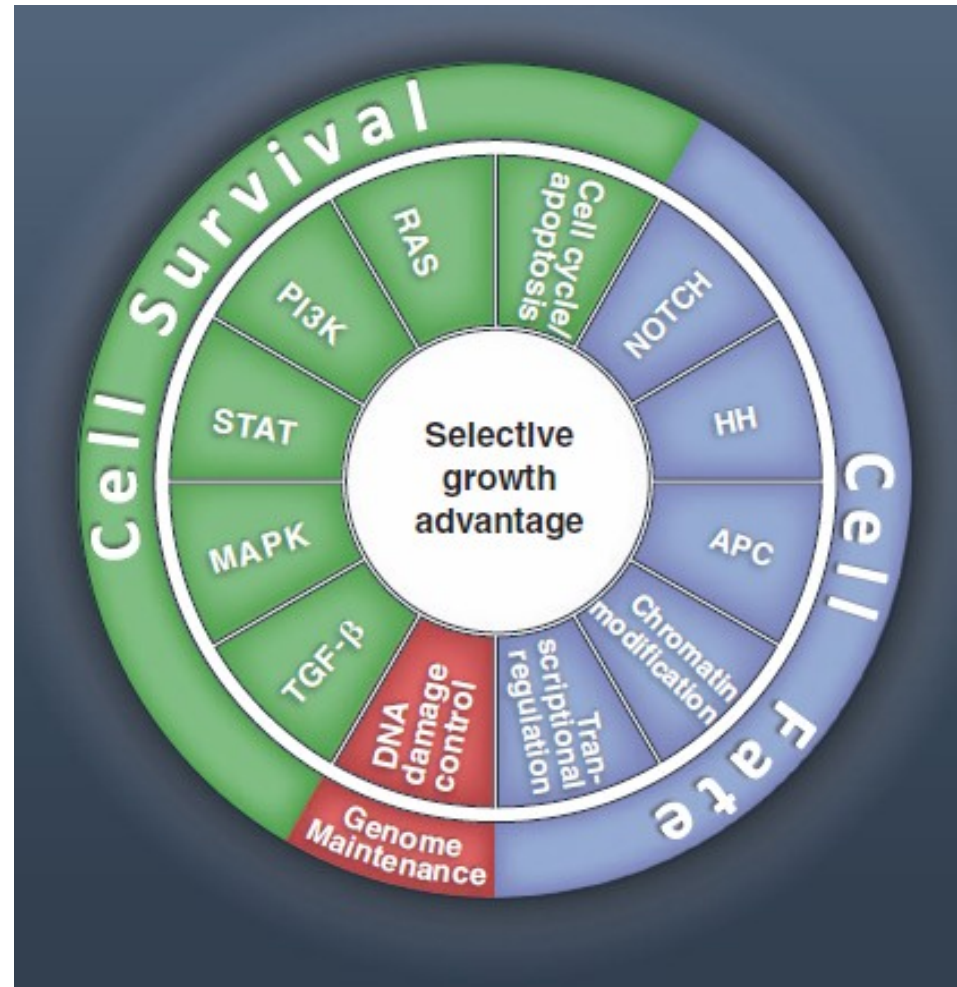


12 biochemických drah narušených u nádorových buněk

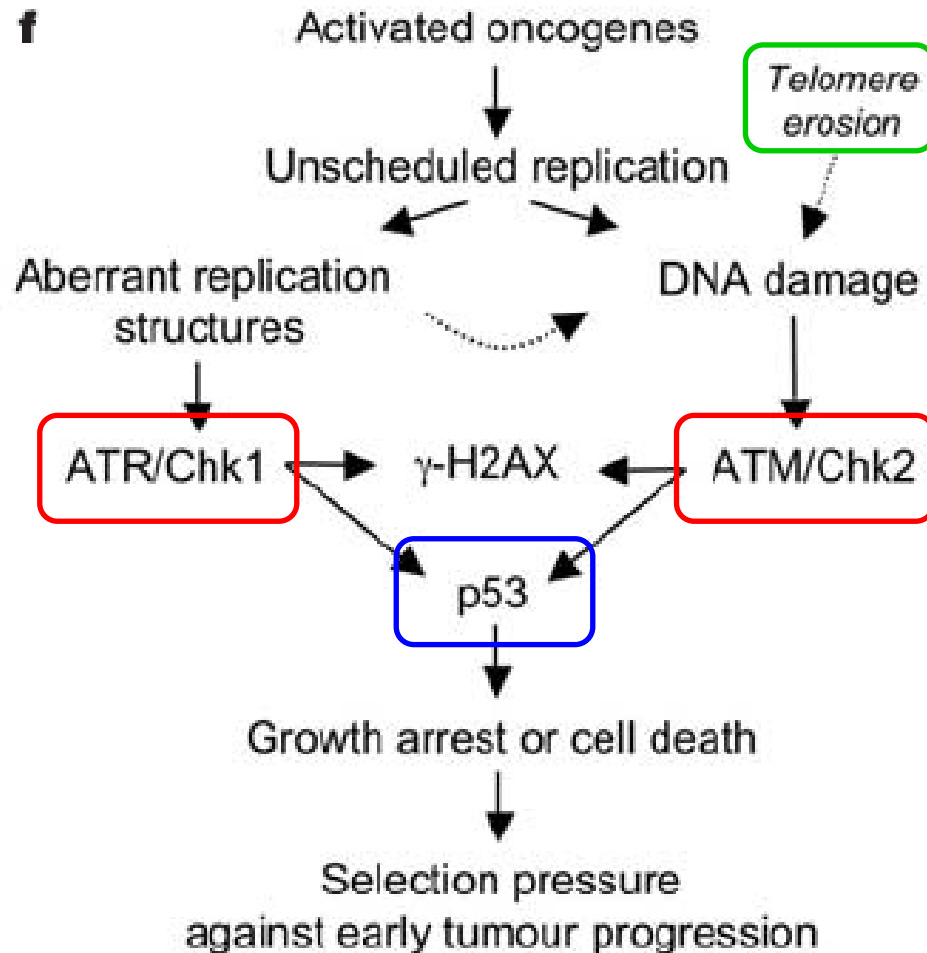
Interpretace WGS

99.9% všech identifikovaných změn neposkytuje **žádnou selekční výhodu**

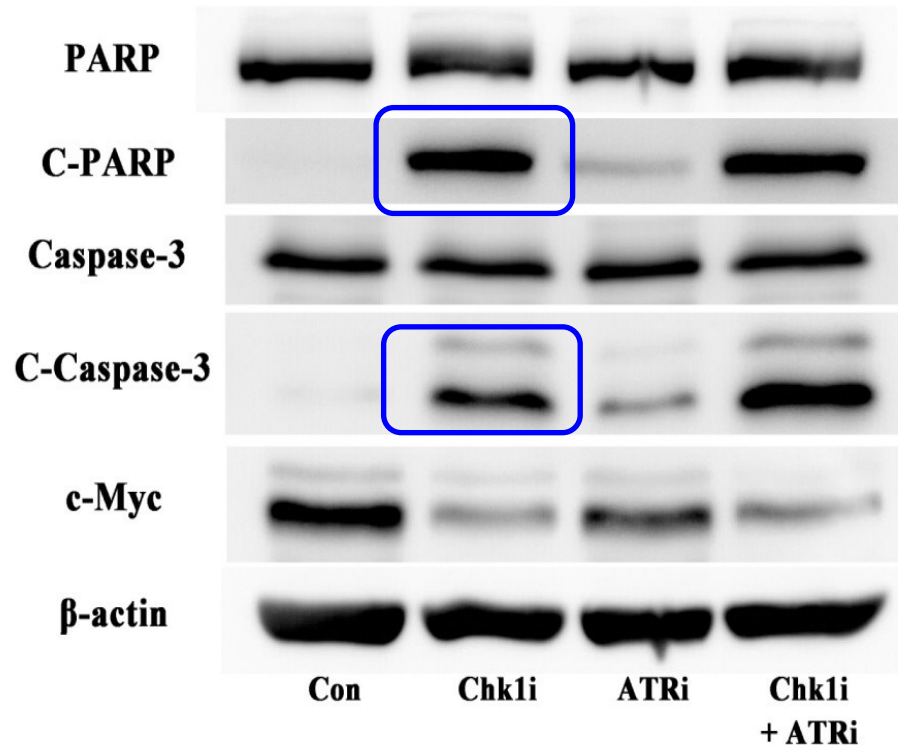
Mutabilita lidského genomu je **normální**. Nicméně normální je také to, že se tělo dokáže zbavit narušených buněk pomocí kontinuálně probíhající apoptózy....



Model vzniku a progresu nádorů



Interference s replikací DNA rezultuje v indukci apoptózy nádorových buněk



Štěpené proteiny PARP a Kaspáza-3 dokládají přítomnost pokročilé apoptózy, vzniklé jako následek inhibice proteinu Chk1; buňky: MEC-1, CLL s TP53-mutací

Apoptóza: „optimální buněčná smrt“ v protinádorové terapii

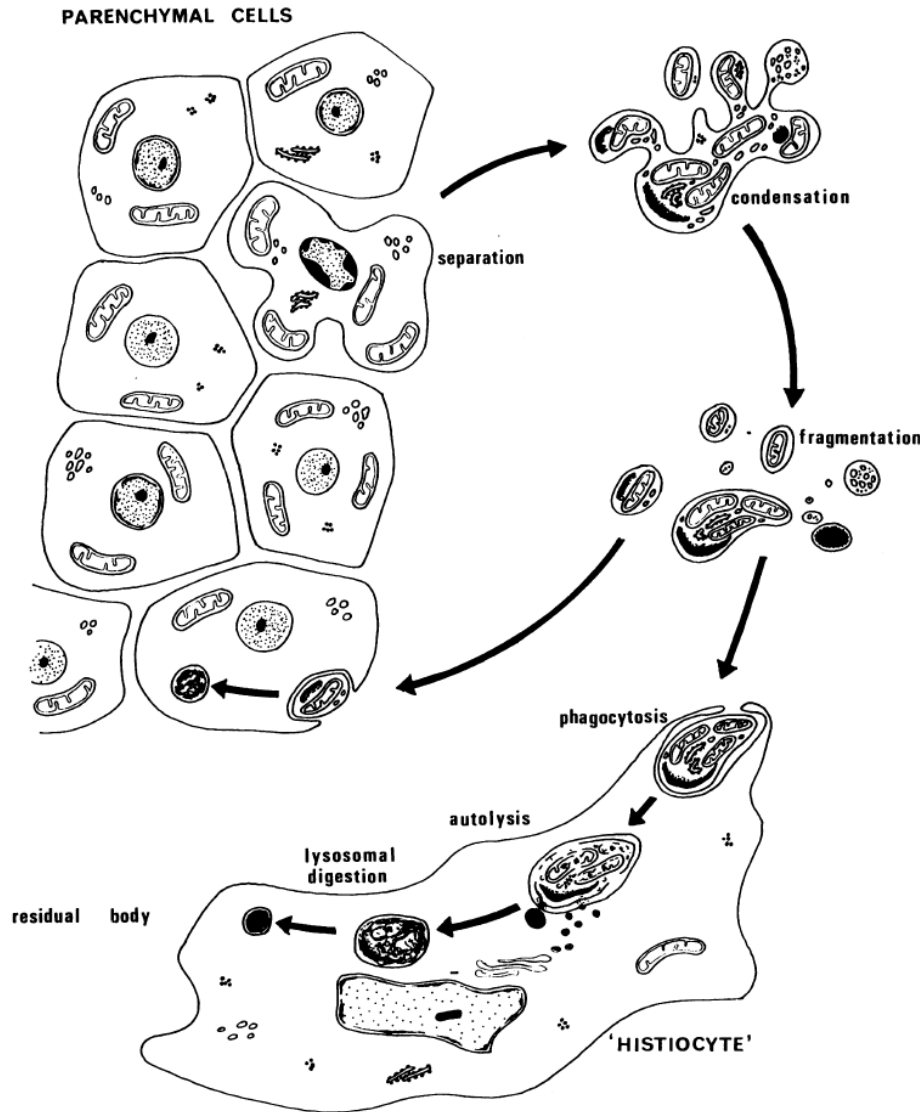


FIG 5—Diagram to illustrate the morphological features of apoptosis.

- Fyzická destrukce buňky
- Eliminace „odpadu“ (recyklace)

Objevení proteinu p53: milník onkologického výzkumu

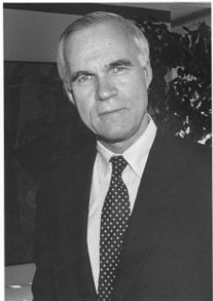
Oznámeno v roce 1979, interakce s T-antigenem viru SV40



David P. Lane
Imperial Cancer Research Fund, London



Arnold J. Levine
Princeton University, New Jersey



Lloyd John Old
Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, New York

Výzkum p53 z historické perspektivy

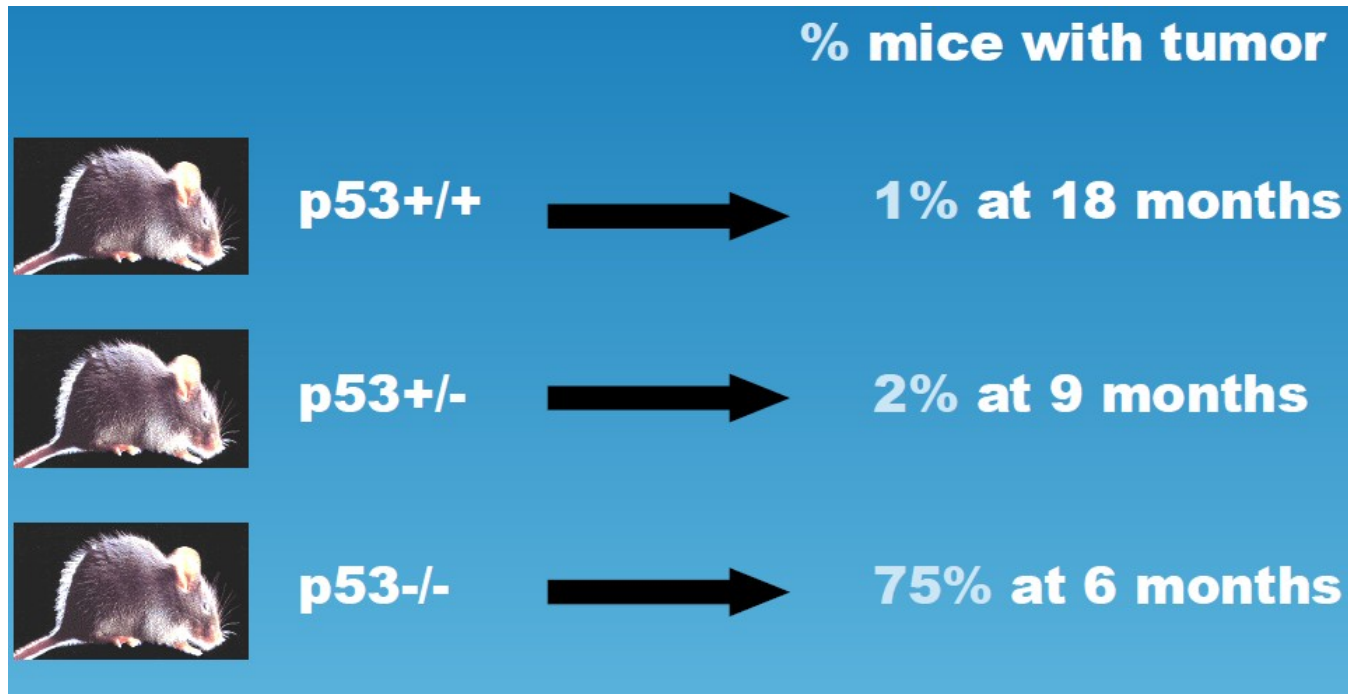
Onkogen nebo nádorový-supresor?

Eliyahu D et al. **Participation of p53 cellular tumour antigen in transformation of normal embryonic cells.** Nature 1984; 312: 646-9.

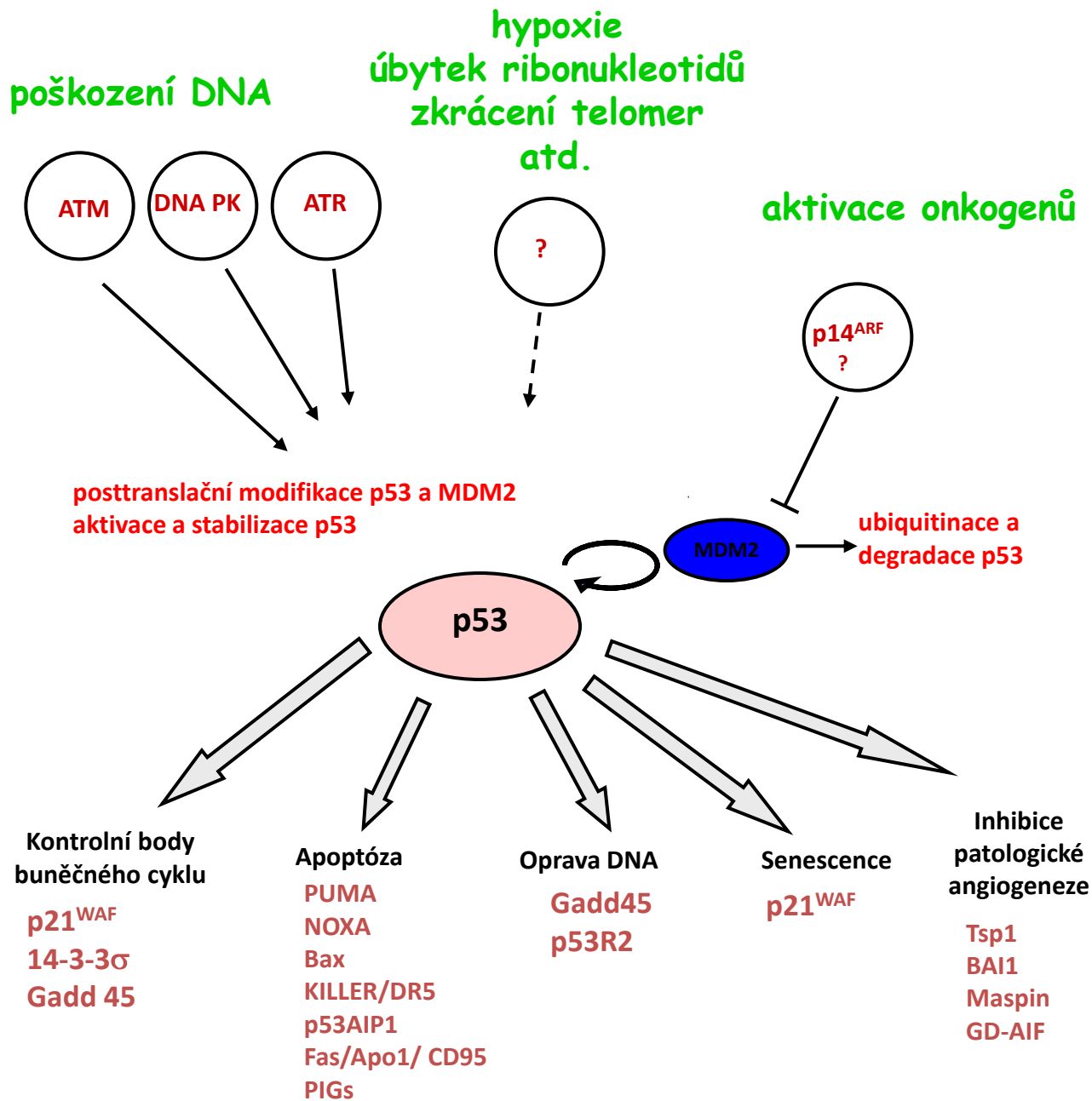
Parada LF et al. **Cooperation between gene encoding p53 tumour antigen and ras in cellular transformation.** Nature 1984; 312: 649-51.

Jenkins JR et al. **Cellular immortalization by a cDNA clone encoding the transformation-associated phosphoprotein p53.** Nature 1984; 312: 651-4.

Dopad narušení genu TP53 na rozvoj nádorů



- Sloni mají velmi nízkou incidenci rakoviny (paradox „Peto“)
- A to (mimo jiné) díky ~20 kopiím genu TP53



Rakovina z pohledu buněčného cyklu

G1 → S → G2 → M

Kontrolní body
(checkpoints)

G1/S

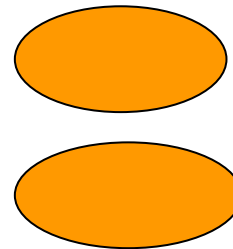
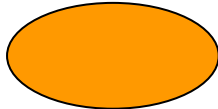
S

G2/M

Univerzální inaktivace
Ztráta p53, Rb, p16
a jiné.

Schopnost pokračovat
v buněčném dělení

DNA

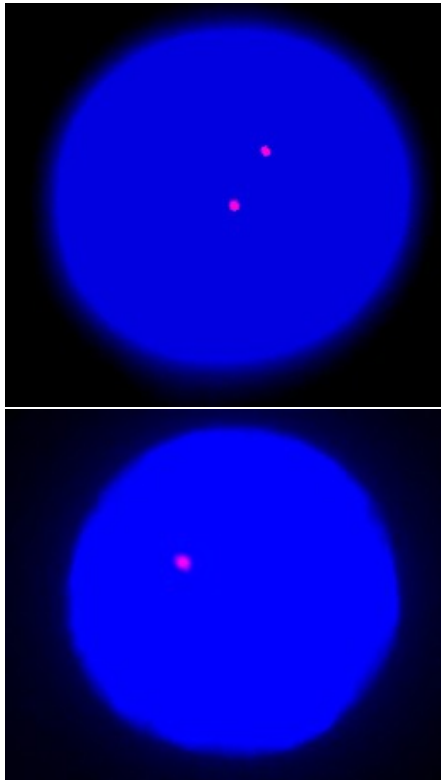


Analýza genu *TP53* u pacientů s CLL ve FN Brno

Del(17p): I-FISH

Mutace *TP53*: kvasinková funkční analýza FASAY

17p-



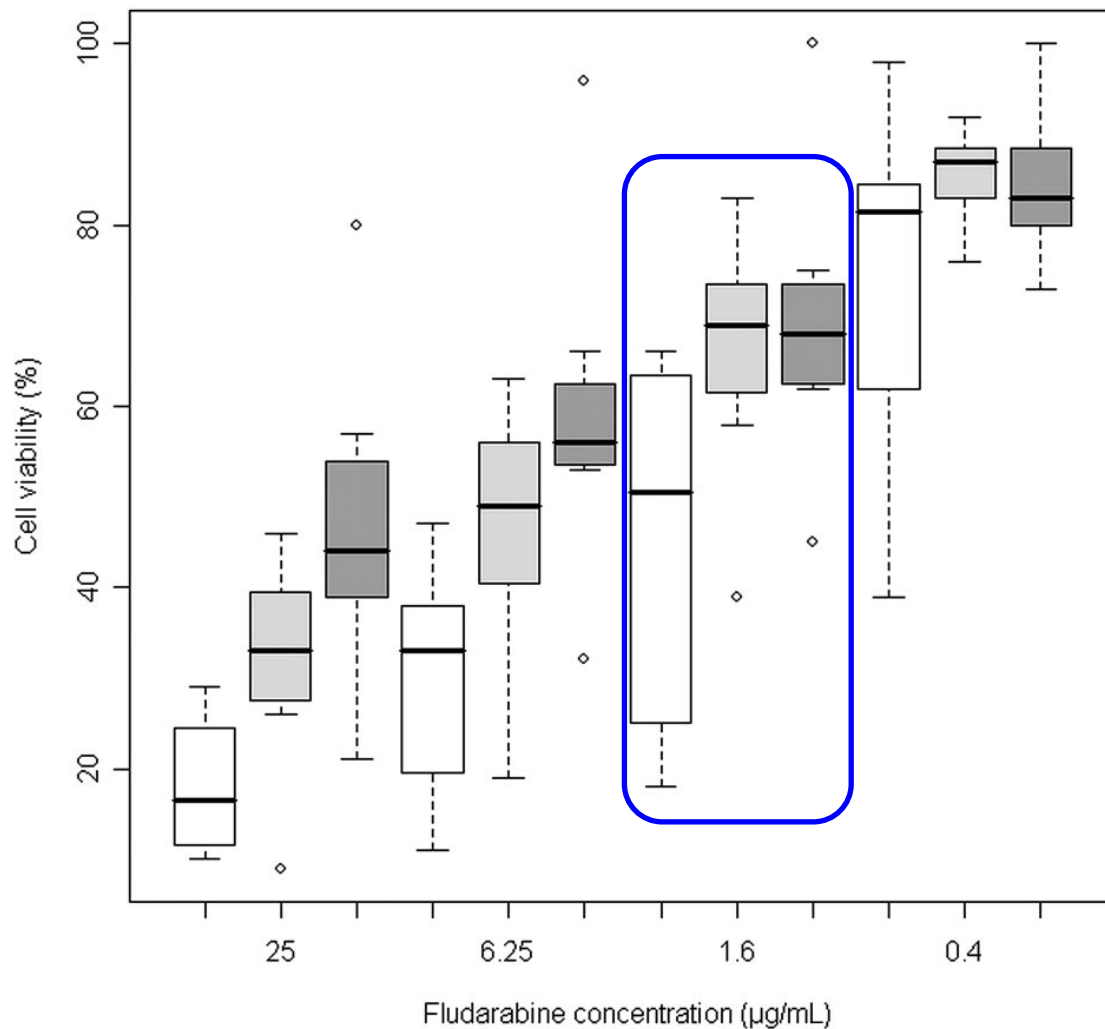
Wt



Mut



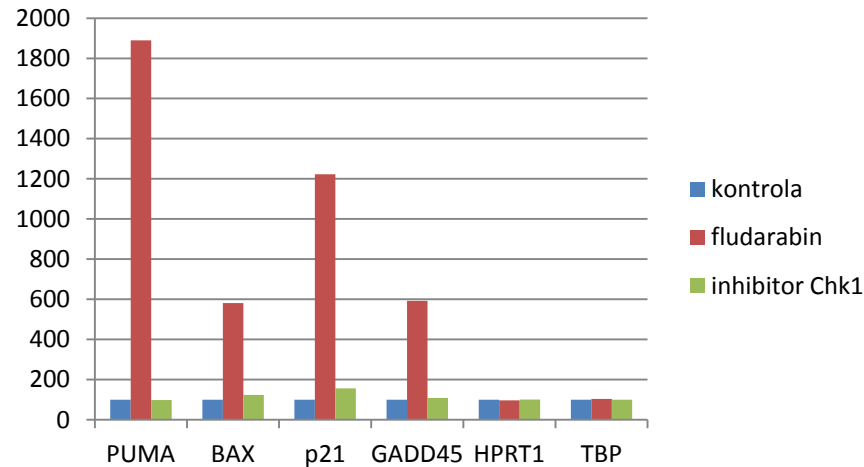
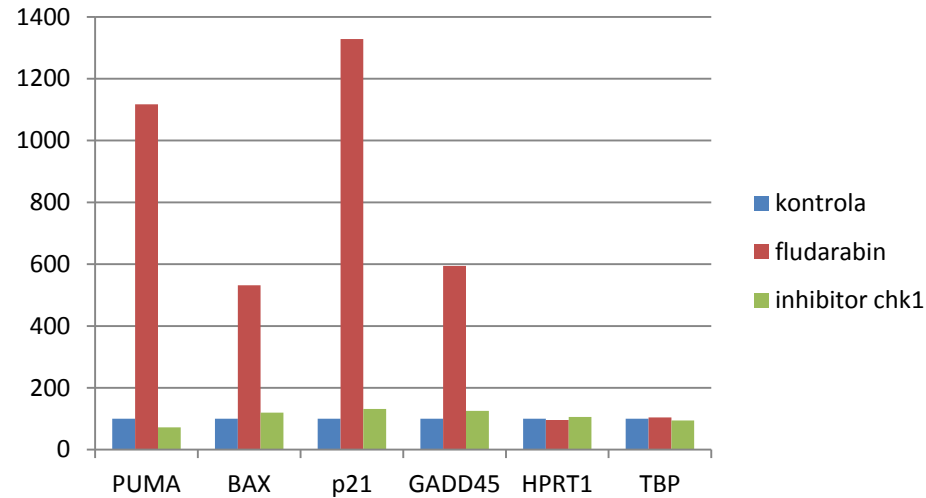
Defekty *TP53* narušují léčebnou odpověď



Test buněčné
viability *in vitro*

Ošetření FLU 48 h

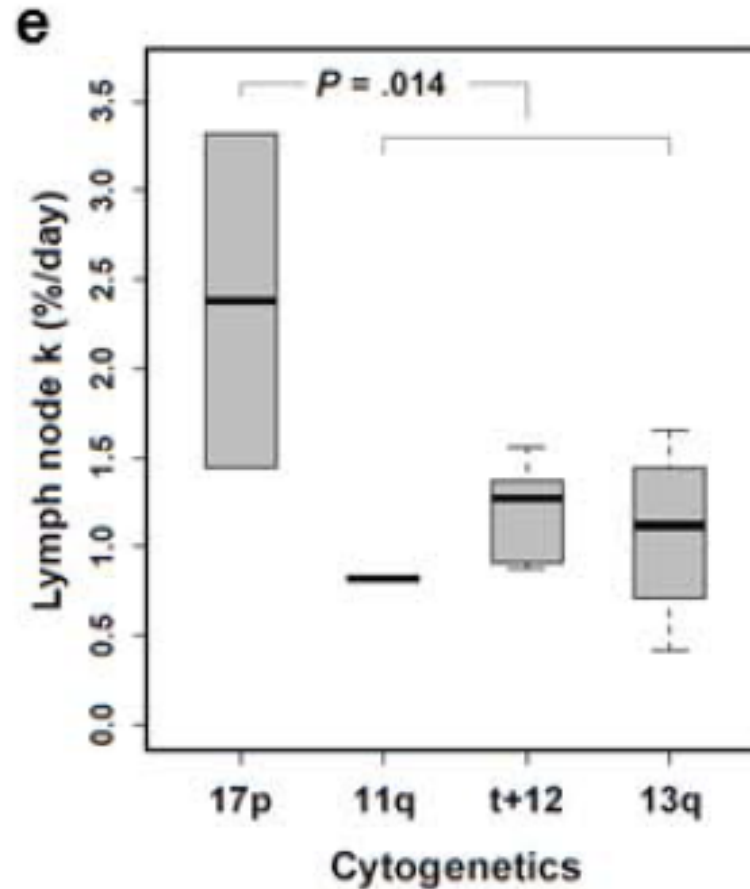
Poškození DNA navozuje p53-závislou odpověď



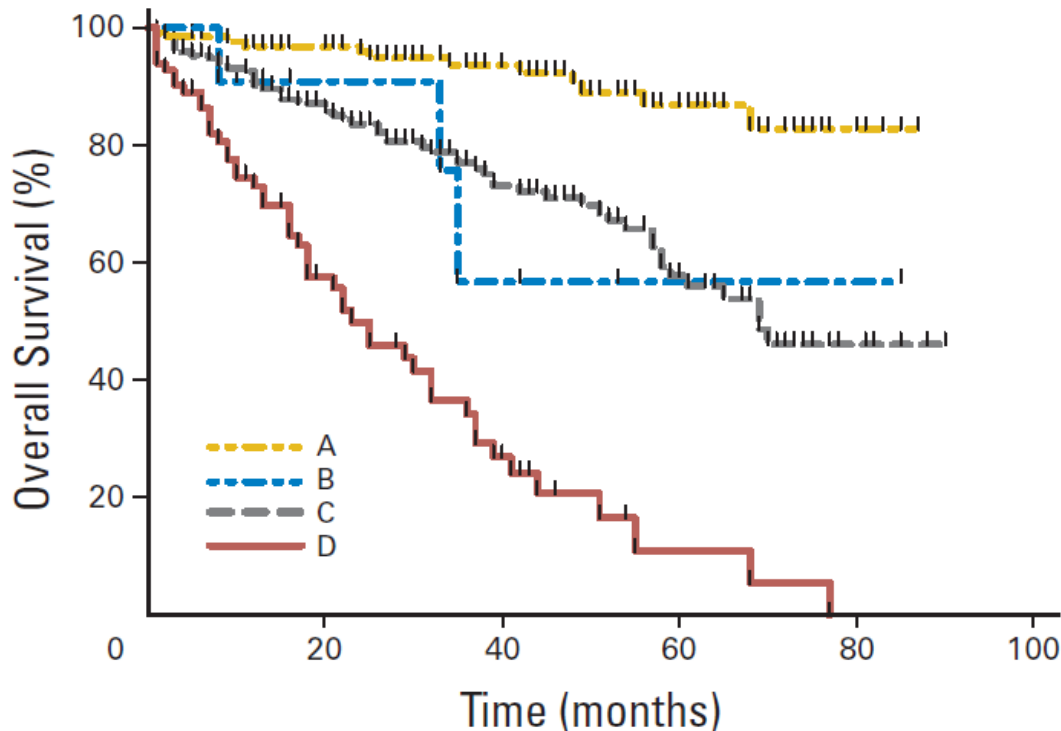
Real time PCR, ošetření 24 h

Defekty *TP53* podporují buněčnou proliferaci

akumulace $^2\text{H}_2\text{O}$
v leukemických buňkách
lokalizovaných v LU



Mutace p53 asociují s horším přežitím pacientů s CLL



A: wt-p53/mut-IgVH

MS: not reached

B: mut-p53/mut-IgVH

MS: not reached

C: wt-p53/unmut-IgVH

MS: 69 months

D: mut-p53/unmut IgVH

MS: 23 months

(A) vs. (B) $P=0.016$

(B) vs. (D) $P=0.018$

(C) vs. (D) $P<0.001$

(A) vs. (C) $P<0.001$

Note: survival assessed from time of p53 defect identification / investigation showing wt-p53

Individuální mutace p53 se liší ve svém dopadu

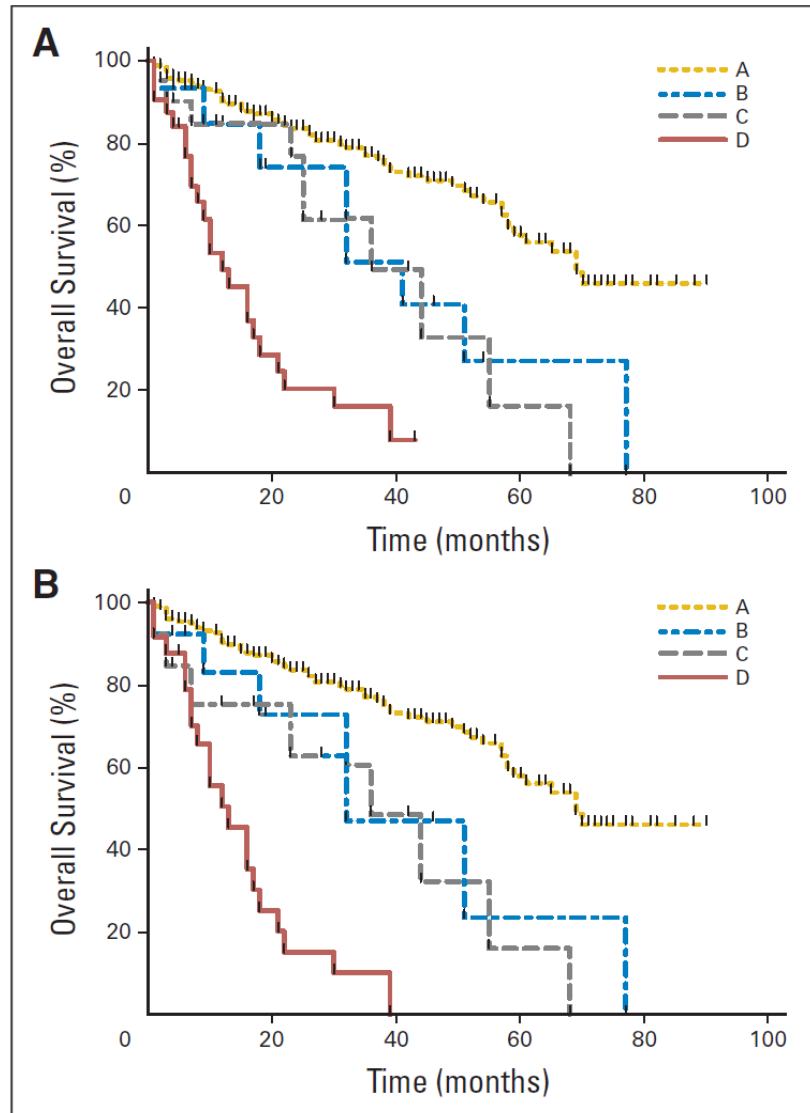


Fig. A: all mutations

Fig. B: mutation + del(17p)

A: wt-p53

MS: 69 months

B: nonmissense p53 mutations

MS: 36 months

C: p53 missense out of DBMs

MS: 41 months

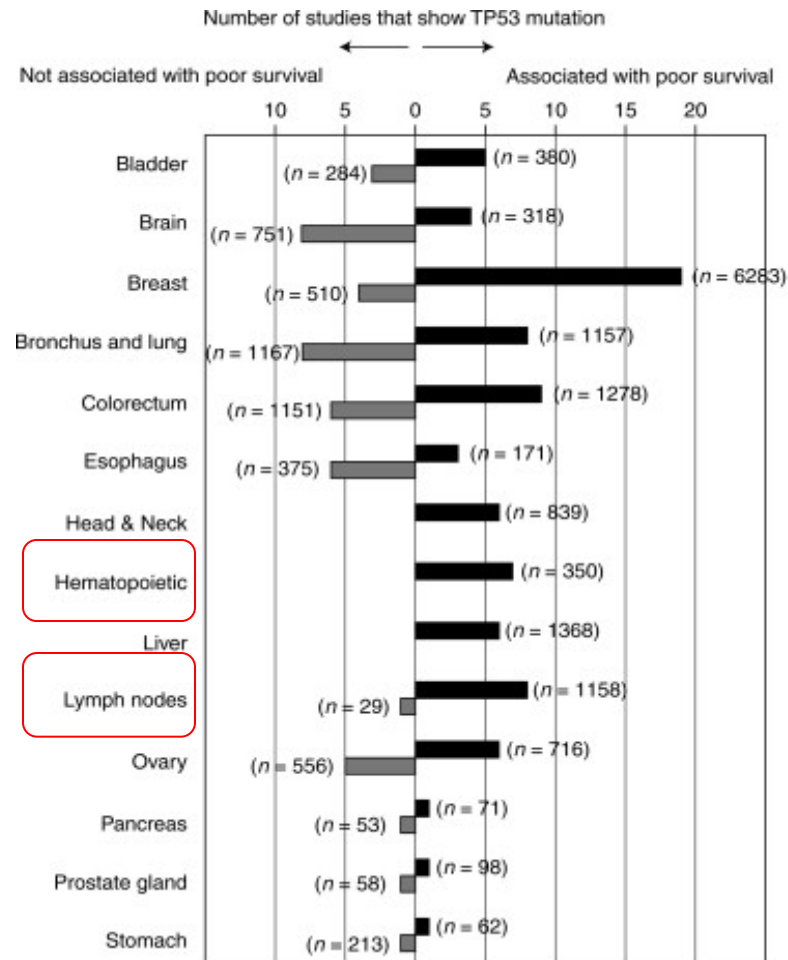
D: p53 missense in DBMs

MS: 12 months

(D) vs. (C) P=0.009

(D) vs. (B) P=0.002

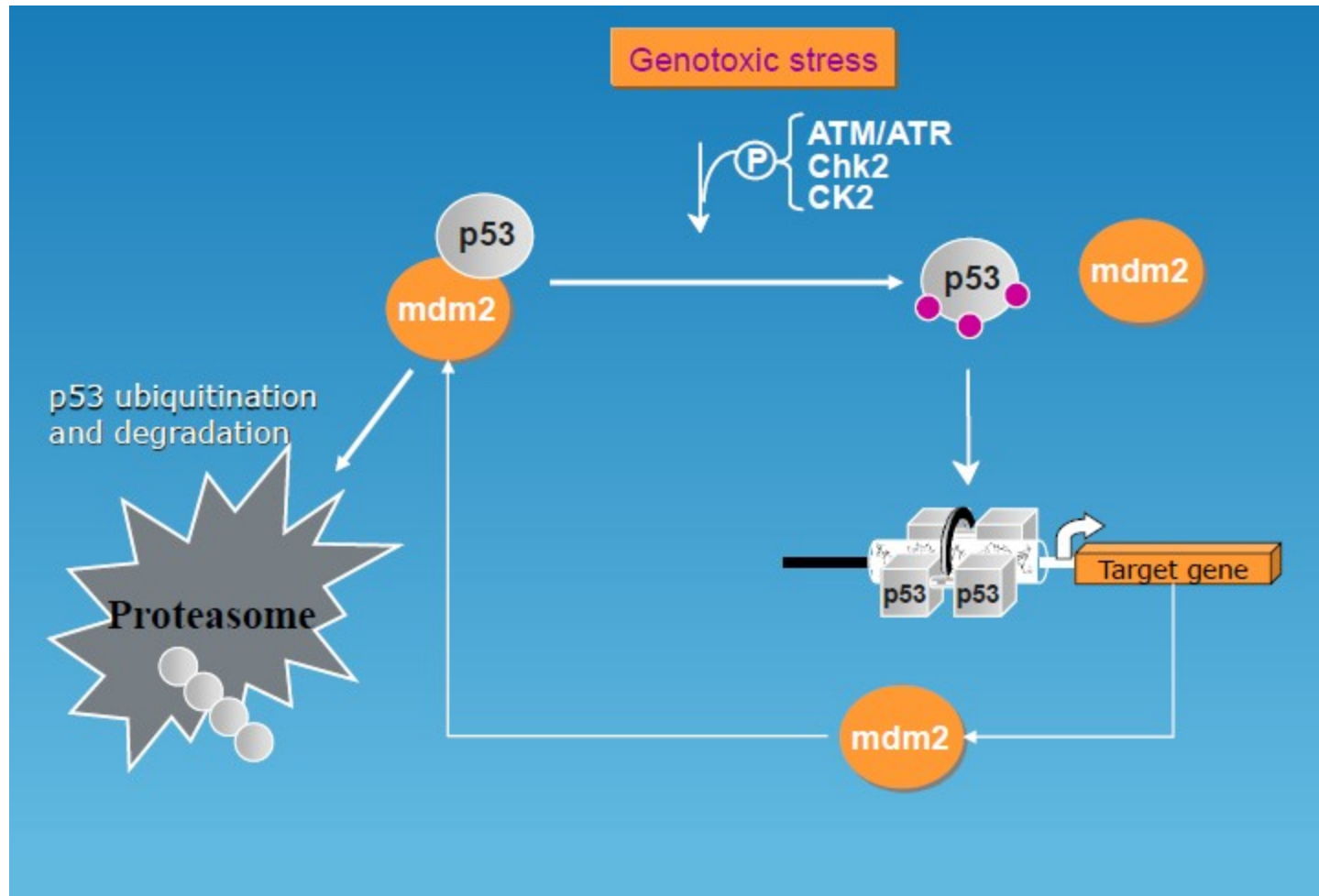
Prognostický význam mutací TP53 dle typu nádoru



Adopted from:

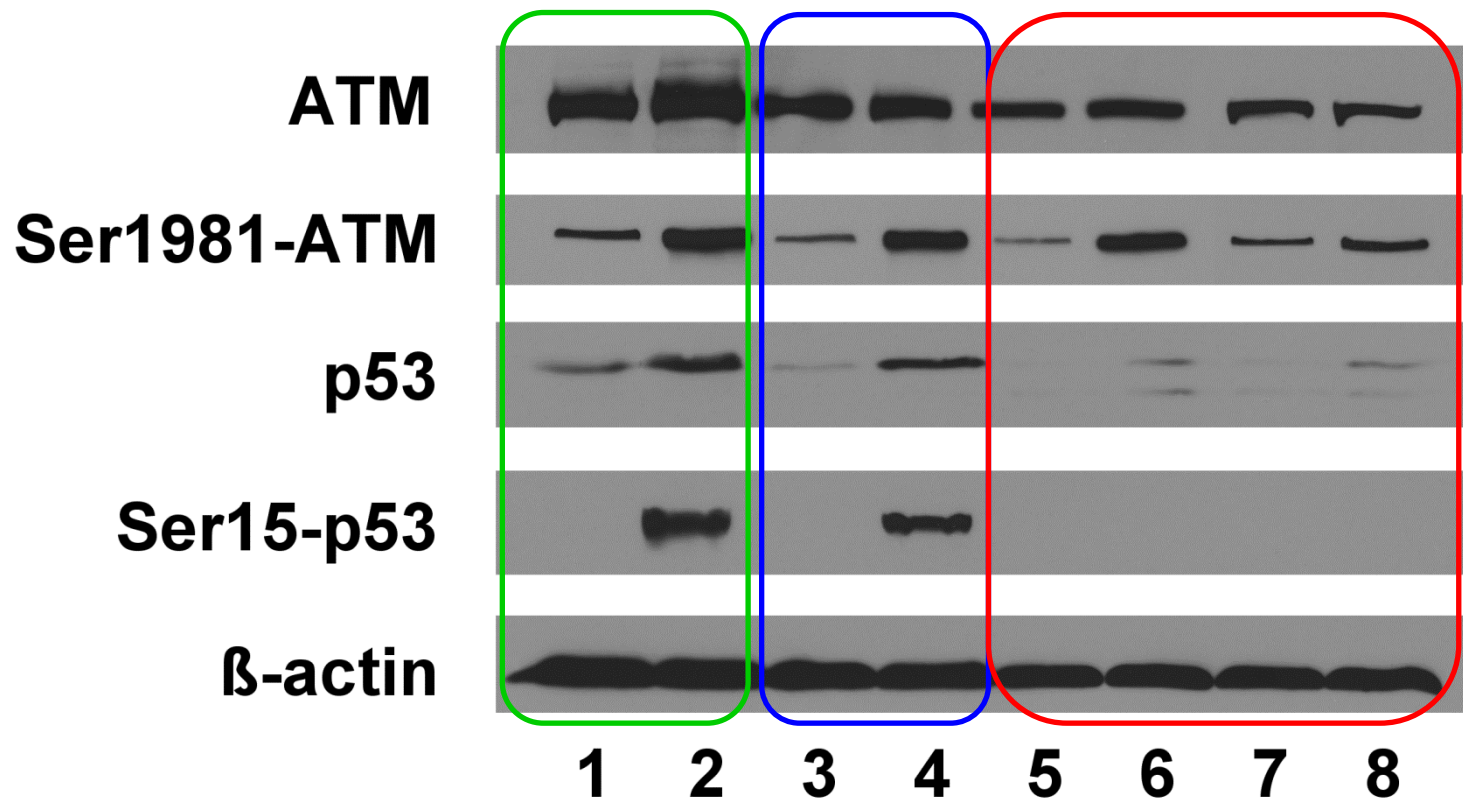
Robles AI, Harris CC: Clinical outcomes and correlates of TP53 mutations and cancer. Cold Spring Harb Perspect Biol 2010; 2: a001016

Aktivace p53: přerušení interakce s MDM2



Adopted from: IARC TP53 database

Dopad defektů ATM na aktivaci p53



1,2 – wt

3,4 – sole 11q-

5,6 – ATM-mut-1

7,8 – ATM-mut-2

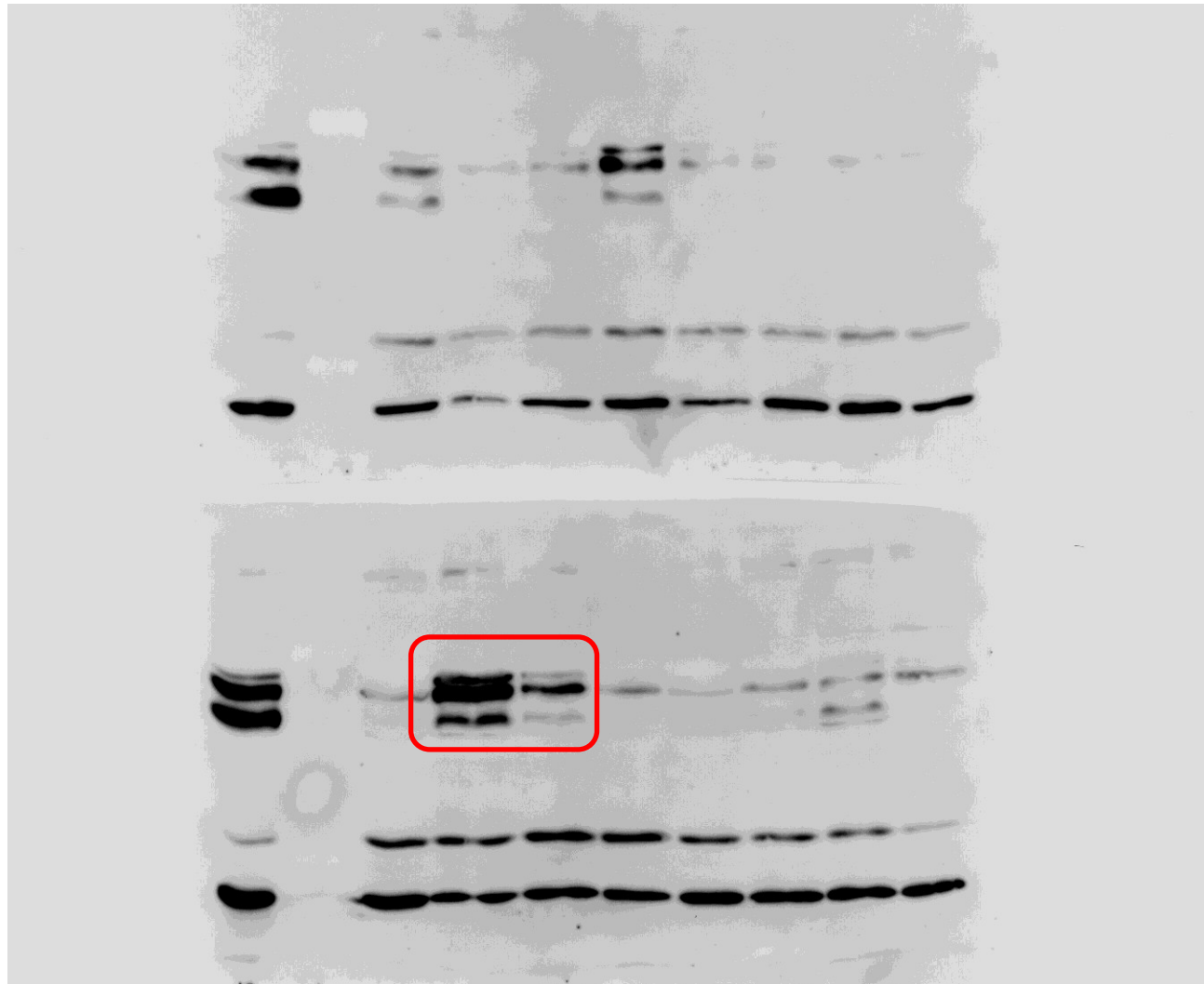
Liché sloupce: kontrola

Sudé sloupce: IR (5Gy)

Onkogeny: stimulace buněčné proliferace

CLL patienti
WB c-Myc

Typicky TFs
Kooperace ONK/TS



Léčba rakoviny

- Chirurgie (primární místo, lokalizované metastázy)
- Lokální radioterapie

Systémové terapie

- (Kombinovaná) chemoterapie; celotělové ozáření
- Transplantace kmenových buněk (hematopoi. i solidní nádory)
- Imunoterapie , včetně „CAR T-lymfocytů“
- „Diferenciační“ terapie (např. ATRA u A-PML)
- Použití monoklonálních protilátek
- Cílená terapie (nízkomolekulární inhibitory)

Pokroky v léčbě nádorů

- Uspokojivé výsledky
- Chronická myeloidní leukémie
- Některé dětské leukémie (e.g. ALL, ETV6-RUNX1-positive)
- Hodgkinův lymfom
- Testikulární nádor u mladých mužů

Příznivé genetické aspekty:

- „Hallmark“ abnormalita, nízká genomická instabilita
- Nízký tlak na inaktivaci tumor-supresorového genu TP53

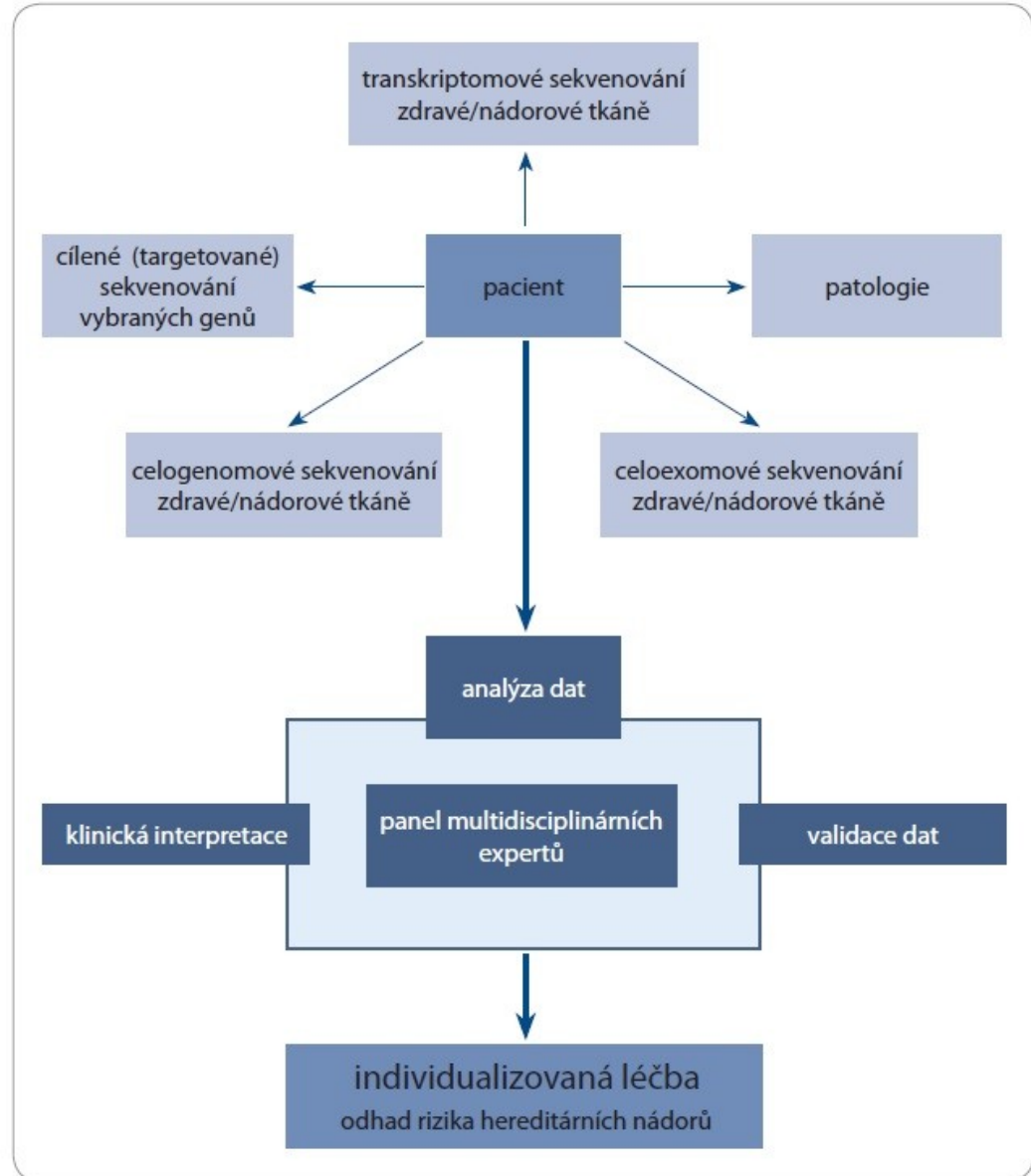
Pokroky v léčbě nádorů

- Neuspokojivé výsledky
- Maligní melanom (metastatická varianta, OS <10% po 5 letech)
- TP53-mut chronická lymfocytární leukémie (medián OS ~3 roky)
- Cervikální karcinom (vysoce-rizikové HPVs, přímá inaktivace p53)

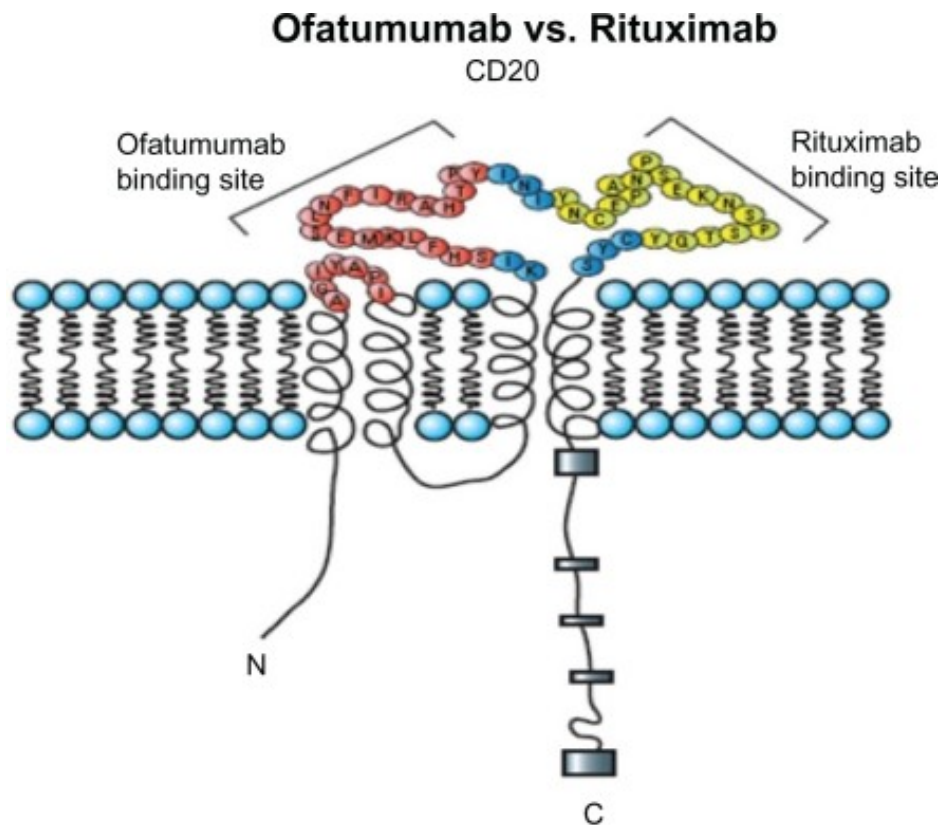
Nepříznivé genetické aspekty:

- Genetická heterogenita nádorové populace
- Inaktivace genů reagujících na terapeutickou intervenci v rámci dráhy „DNA-damage response“ (DDR)

Ideální cíl (s využitím NGS): personalizovaná léčba



Terapie využívající monoklonální protilátky



J Clin Oncol. 2010;28:3525.

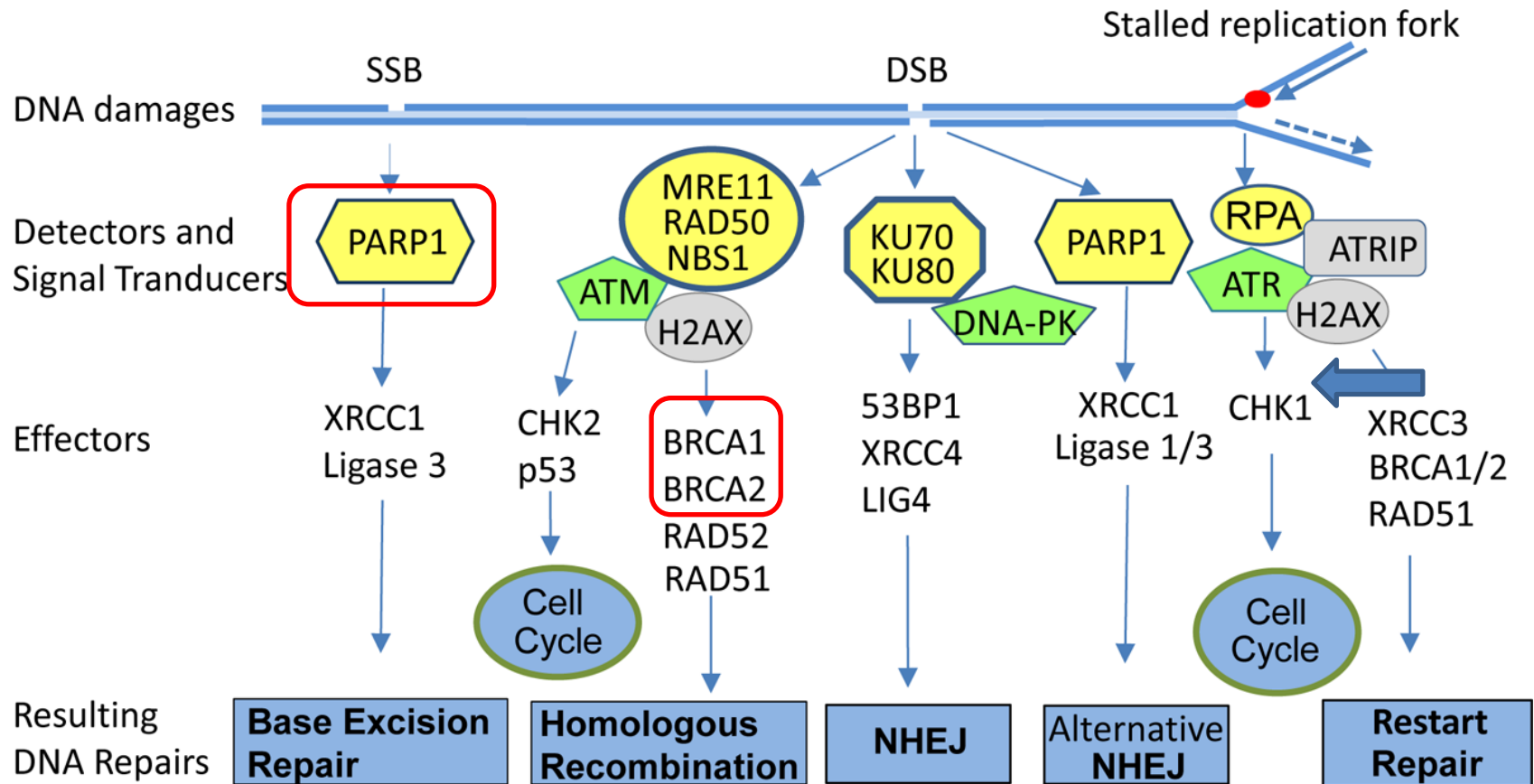
- Cílí na povrchový epitop nád. buňky (specifita vs. efektivita)
- 1. mAb v klinice: rituximab, 1997
- Dostupné také pro solidní nádory (např. trastuzumab u c. prsu)
- Komplexní mechanismy účinku (CDC, ADCC, apoptóza)

Eliminace nádorových buněk pomocí malých molekul

Co lze ovlivnit prostřednictvím nízkomolekulárních látek:

- **Kinázy:** “snadná“ inhibice enzymatické aktivity
Většina klinicky schválených molekul blokuje kinázy
- **Onkogeny:** pouze malá část z nich vykazuje enzymatickou aktivitu
Většina onkogenů má mnohočetné interakce
- **Nádorové supresory:** jejich náhrada je velmi obtížná
Možností je zacílit komplementární dráhu a defekt prohloubit
(ztráta BRCA → závislost na aktivitě PARP-1). Olaparib.

Syntetická letalita v rámci „DNA-damage response“



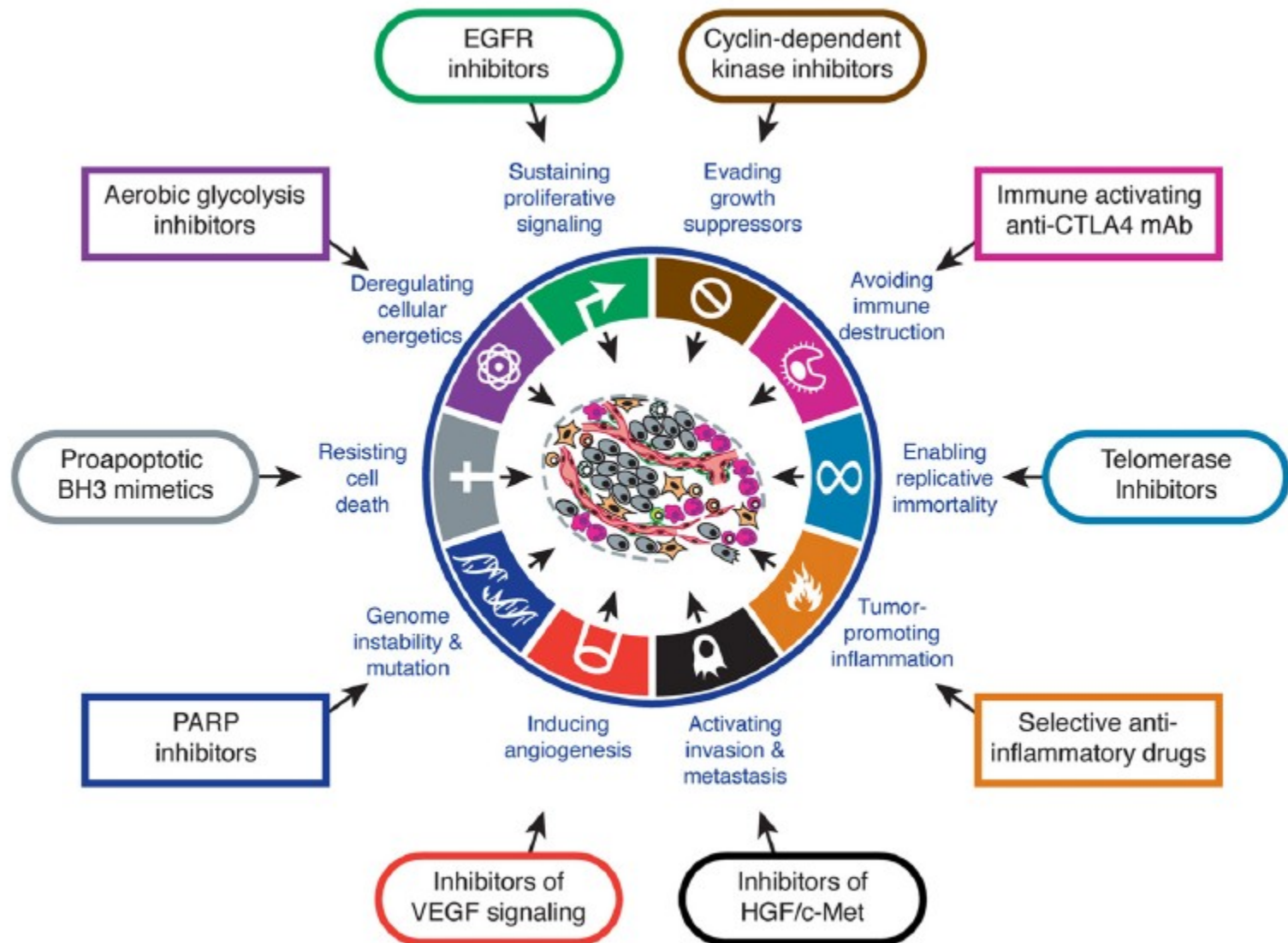
Specifické cílení (inhibice) může vést k diametrálně odlišným výsledkům

Mutace **V600E** v **proteinu BRAF** je přítomna u **maligního melanomu** (MM) stejně jako u metastatického **kolorektálního karcinomu** (CRC)

Nicméně, specifický inhibitor BRAF-signalizace (Vemurafenib) je vysoce účinný u MM, ale nikoli u CRC

Důvodem je aktivace dráhy PI3K/AKT u CRC, která eliminuje efekt inhibice

Současné možnosti cílené léčby



Souhrn

- Rakovina je „**onemocnění genů**“, bez ohledu na přítomnost či absenci dědičné predispozice
- Genetické pozadí různých typů nádorů vykazuje některé společné znaky, ale **celková variabilita je obrovská** a vyžaduje „the cancer-specific approach“
- Hlavní překážkou efektivní terapie představují u mnoha nádorových onemocnění defekty v **genu TP53** (nebo obecně p53 dráhy)
- Technologické pokroky v analýze nádorových buněk jsou enormní (**např. NGS**), nicméně interpretace dat je někdy (často?) obtížná a nejasná
- Molekulární terapie pravděpodobně směřuje k „patient-specifickému koktailu“ několika léků s **doplňujícími se mechanismy účinky** (žádná „jedna pilulka“ na obzoru.....)

DÍKY ZA POZORNOST!

m.trbusek@volny.cz