

Molekulární biologie nádorů

Prof. RNDr. Jana Šmardová, CSc.

Ústav patologie, FN Brno
Přírodovědecká fakulta MU Brno
Lékařská fakulta MU Brno
2011

3. Individuální dispozice k nádorům I

Hereditární papilární karcinom ledviny
(*c-met*)

Mnohočetná endokrinní neoplazie typ2
(MEN2) (*RET*)

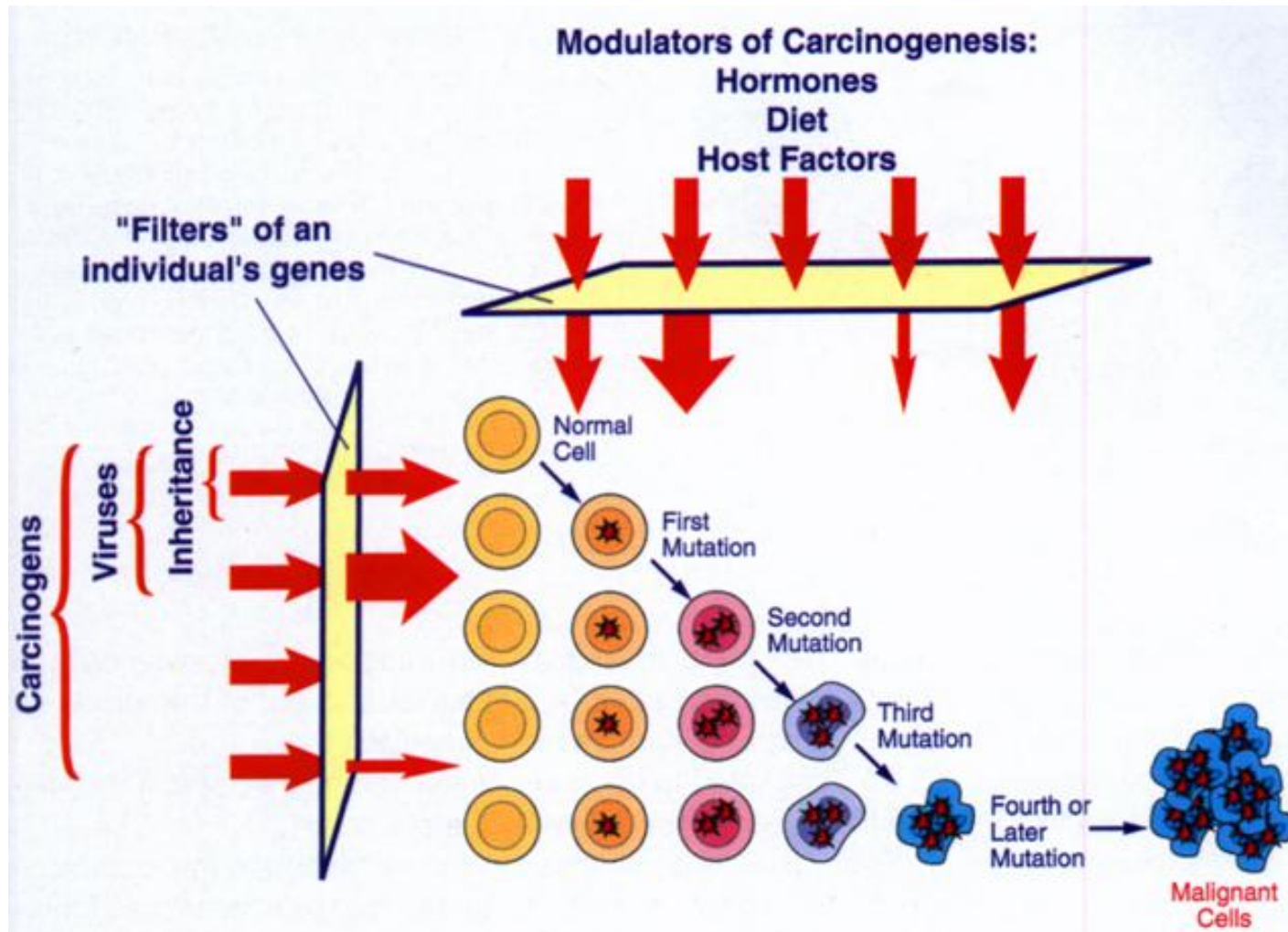
Familiální medulární karcinom štítné
žlázy - FMTC (*RET*)

Familiální gastrointestinální stromální
nádory (GISTs) (*c-kit*)

Komplexní proces kancerogeneze

- Nádor vzniká akumulací genetických změn. Některé mohou být vrozené, jiné mohou vznikat jako výsledek expozice kancerogenům nebo onkogenním virům.
- Častá expozice kancerogenům nemusí okamžitě vést k vývoji nádoru.
- **Modulátory** kancerogeneze zahrnují hormony, dietu, a další faktory hostitele. Dopad expozice kancerogenům stejně jako vliv modulátorů (geneticky) „**filtrovány**“ individuálními variantami genů, které eliminují, redukují nebo posilují dopad přispěvatelů tohoto procesu.
- Přesné pochopení těchto okolností vývoje nádoru bude vyžadovat podrobnější pochopení interakcí genů a prostředí.

Komplexní proces kancerogeneze



Individuální dispozice k nádorům

1. Rozdíly v metabolismu kancerogenů

(např. cytochrom P-450, CYP2D6, CYP1A1, N-acetyltransferáza - NAT, glutathion-S-transferáza M1 - GSTM1,...)

Normální energetický metabolismus buněk uvolňuje jako vedlejší produkty značné množství reaktivních molekul včetně mutagenů / kancerogenů - ty jsou okamžitě neutralizovány a detoxikovány působením detoxikačních enzymů:

- kuřáci s nízkou hladinou NAT mají 2,5x vyšší riziko nádoru než kuřáci s vysokou hladinou NAT
- nízká hladina GSTM1 3x zvyšuje riziko nádoru plic

Individuální dispozice k nádorům

2.-3. Rozdíly v procesech oprav DNA

Mutace nádorových supresorů (a onkogenů)

- p53, RB, WT1, BRCA1 a BRCA2, ...
- RET, c-met, ...

Penetrance: podíl jedinců určitého genotypu, u nichž se daný specifický genotyp fenotypicky projeví (pravděpodobnost výskytu daného nádoru v určitém věku).

Dědičné formy nádorů

Příklady: Li-Fraumeniho syndrom, retinoblastom, medulární nádor štítné žlázy, Wilmsův tumor, dědičná forma nádoru prsu a vaječníků, ...

- 5-10% nádorů tohoto typu většinou představuje **dědičnou formu** (vrozená mutace jedné alely + ztráta heterozygotnosti - LOH), ostatní jsou **sporadické**
- **dědičné formy** nádorů se objevují spíše v mladším věku než sporadické, často oboustranně nebo jako vícečetná ložiska
- **sporadické** nádory spíše ve vyšším věku a jednostranně

Indikace ke genetickému vyšetření

1. Výskyt nádoru v neobvykle časném věku.
2. Multifokální vývoj nádoru v jednom orgánu nebo bilaterální výskyt u párových orgánů.
3. Více primárních nádorů u jednoho jedince.
4. Pozitivní rodinná anamnéza stejného nádoru u blízkých příbuzných.
5. Vysoká incidence nádorů v rodině.
6. Výskyt nádorového onemocnění u jedince z rodiny s kongenitálními anomáliemi.

Genetické poradenství

1. Co nejpřesnější rodinná anamnéza (alespoň tři generace, kompletní rodokmen včetně zdravých, ověření diagnóz).
 2. Hledání postiženého genu (mutace) u probanda (pacienta s nádorem) (informovaný souhlas).
 3. Genetická analýza rodiny, včetně zdravých příbuzných - od 18 let, s informovaným souhlasem.
 4. Pozitivní výsledek: lékařský dohled, změna životního stylu, preventivní sledování, preventivní zásahy (profylaktické zákroky, chemoprevence,...).
- Psychologické a etické aspekty genetického vyšetření.

„gatekeepers“ a „caretakers“

„**Gatekeepers**“ - geny, které přímo regulují (limitují) růst nádorů buď inhibicí jejich růstu nebo indukci jejich smrti. Jsou recesivní.

„**Caretakers**“ - jejich inaktivace navozuje genetickou nestabilitu a ta pouze nepřímo indukuje růst nádorů zvyšováním mutační rychlosti. Proto somatické mutace těchto genů jsou jen vzácně iniciátory kancerogeneze.

APC, p53 - jsou zároveň „gatekeepers“ i „caretakers“

„gatekeepers“ a „caretakers“ u familiálních nádorů

šCaretakersõ

- NER, *xeroderma pigmentosa*, cockayne syndrom, trichothiodystrofie
- ataxia telangiectasia
- Bloomův syndrom
- Fanconiho anemie
- Dědičný nepolypozní kolorektální nádor
- Wernerův syndrom
- Li-Fraumeniho syndrom
- nádory prsu

šGatekeepersõ

- retinoblastom
- Li-Fraumeniho syndrom
- Wilmsům tumor
- neurofibromatóza typu 1 a 2
- renální karcinom
- MEN typu 1 a 2
- maligní melanom
- Cowdenův syndrom
- Gorlinův syndrom
- nádor prsu
- kolorektální nádor

Retinoblastom

Je vzácné, ale velmi dobře známé nádorové onemocnění dětí.
Incidence - 1 na 13.500 - 25.000 narozených dětí.

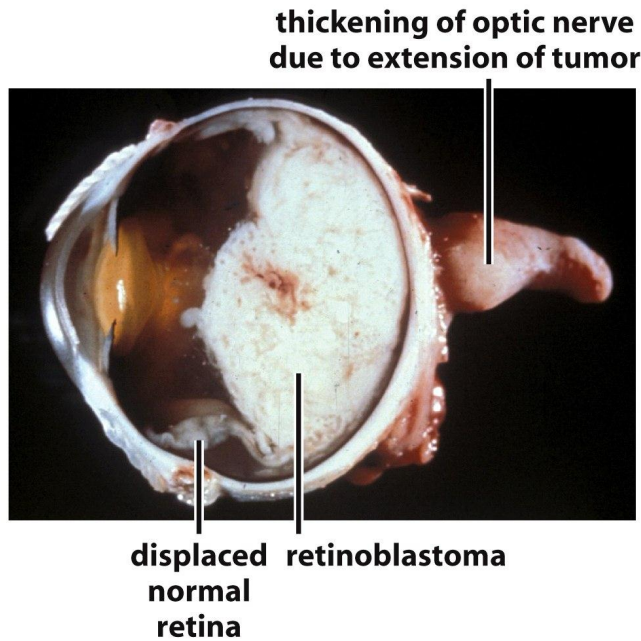
Je **prototypickým** příkladem vrozené dispozice k nádorům: Na základě studia epidemiologie retinoblastomu byla vytvořena Knudsonova hypotéza → Knudsonův model.

RB byl prvním příkladem nádorového supresoru a první naklonovaný gen pro nádorový supresor.

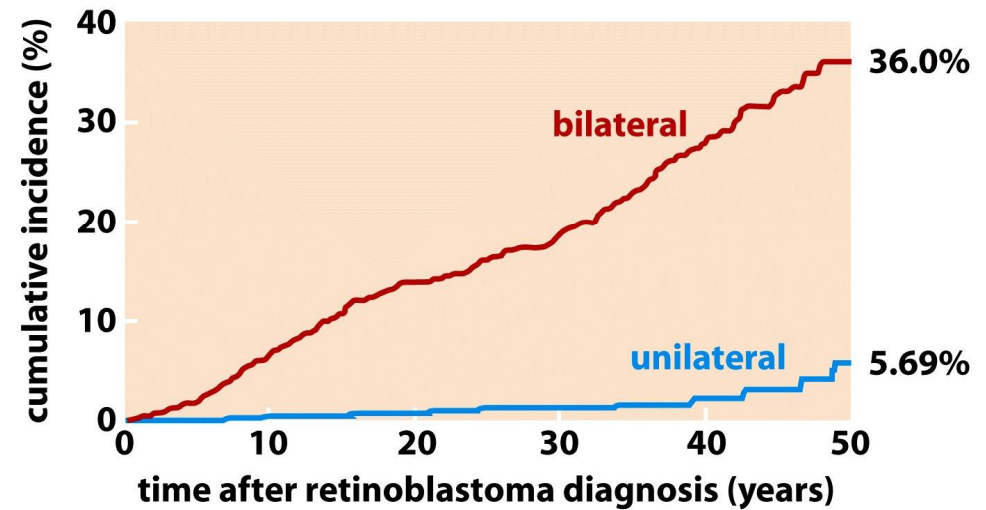
Mutace RB jsou **recesivní** (na úrovni buňky) a zároveň **dominantní** (na úrovni celého organismu)!!!

Vrozená mutace **RB** (13q14) predisponuje nositele k vývoji **retinoblastomu** (maligní tumor, který vzniká ve vyvíjející se retině) v nízkém věku a přináší 500x zvýšené riziko vývoje **osteosarkomu** během adolescence.

Retinoblastom



non-retinal tumors of retinoblastoma patients



Pravděpodobnost vývoje dalšího nádoru u člověka v dětství postiženého retinoblastomem:

- u unilaterálního onemocnění je zvýšený výskyt dalších nádorů důsledkem léčby zářením
- u bilaterálního onemocnění vrozená dispozice

Knudsonův model dvou zásahů

40% případů:

- průměrný věk při diagnóze - 14 měsíců
- bilaterálně v obou očích - v průměru 3 nezávislé nádory
- v případě časného odstranění retinoblastomu vysoký výskyt osteosarkomů mezi 20. a 30. rokem života
- často rodinná anamnéza

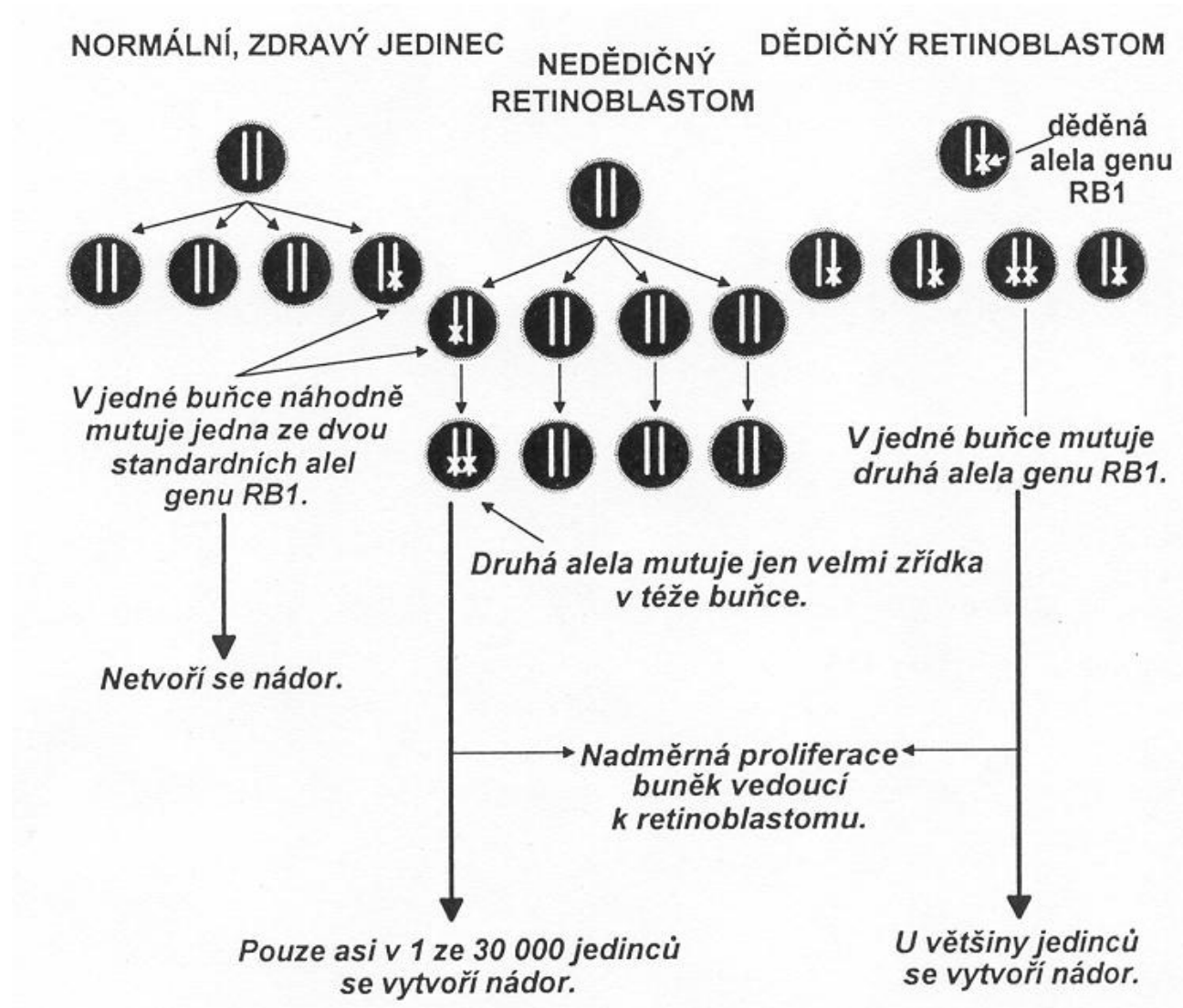
60% případů:

- bez rodinné anamnézy
- průměrný věk při diagnóze - 30 měsíců
- unilaterální výskyt

Knudson (1971):

1. skupina: 1 mutovaná alela genu *RB* je zděděná (v zárodečné linii), druhá mutace somatická
 2. skupina: nezbytnost dvou nezávislých mutací obou alel *RB*
- ⇒ jedna hypotéza vysvětlila dva epidemiologicky odlišné typy onemocnění

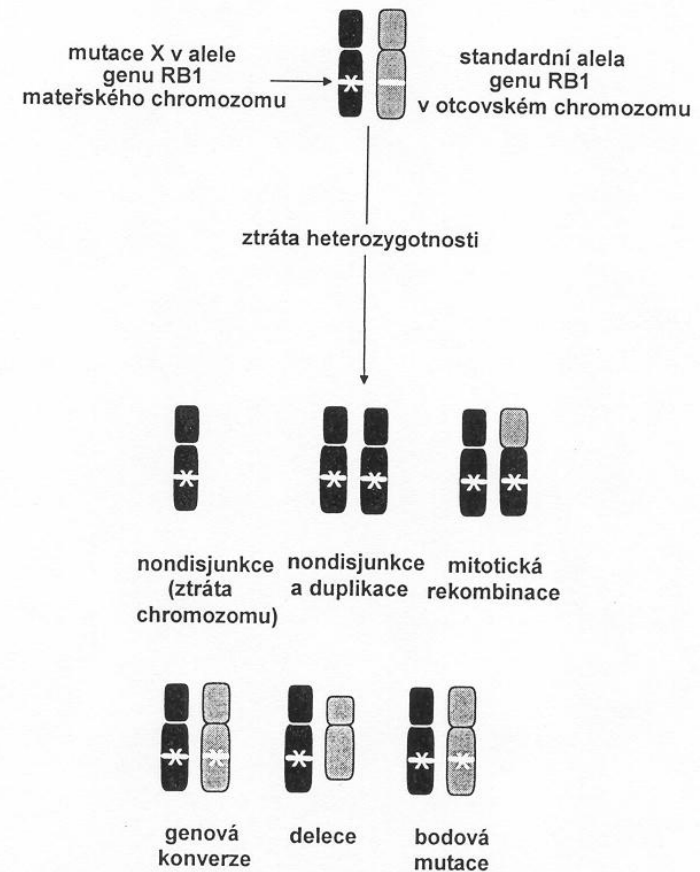
Knudsonův model dvou zásahů



Ztráta heterozygotnosti

Ztráta heterozygotnosti = **LOH**
(„loss of heterozygosity“)

1. Buňky, které nesou jednu mutovanou alelu nádorového supresoru, ztrácejí velkou část (delece) chromozomu, který nese funkční alelu. Předpokládá se, že v oblastech s vysokou frekvencí LOH leží geny nádorových supresorů.
2. Buňky, které nesou jednu mutovanou alelu nádorového supresoru (jsou pro tento gen heterozygotní), ztrácejí jedním z více možných způsobů funkční alelu (ztrácejí heterozygotnost).



Retinoblastom

60% - jednostranné nedědičné

10% - jednostranné dědičné (s anamnézou nebo bez)

5% - oboustranné s anamnézou

25% - oboustranné - nové „germ-line“

60% - jednostranné nedědičné

15% - jednostranné dědičné

25% - oboustranné a dědičné

- Podle matematického modelu se asi u **5%** nositelů s vrozenou mutací *RB* **nevyvine** retinoblastom (rezistence hostitele?)
- Téměř úplná penetrance * (**95%**).
- Mnoho - možná většina - lidí má v retině „one-hit“ klony.

RB: gen a protein

- jaderný (85%) protein p110^{RB} (velikost 112 až 114 v proliferujících buňkách)
- V nedělících se buňkách je pRB v komplexu s TF E2F. E2F transaktivuje sadu genů, které jsou nutné k S fázi buněčného cyklu. pRB blokuje E2F a tím blokuje buněčný cyklus („brzda buněčného cyklu“)
- Hladina proteinu pRB se v buňkách nemění během b.c., ale mění se **stupeň fosforylace** pRB. Na molekule pRB je asi 10 až 12 různých fosforylačních míst (Thr, Ser). Hypofosforylovaný RB je aktivní a váže E2F, fosforylovaný pRB je neaktivní.

pRB jako integrátor signálů

- pozitivní signály - podporující fosforylaci pRB: všechny mitogeny
- negativní signály - působící proti fosforylaci pRB: TGFβ, cAMP, kontaktní inhibice (zřejmě prostřednictvím Cdks), záření a jiné formy poškození DNA (prostřednictvím p53 a p21)

Způsoby inaktivace (dráhy) pRB v nádorech

- Samotný gen *RB* může být mutován, deletován, může být metylován jeho promotor (retinoblastom, malobuněčný karcinom plic, sarkomy, karcinomy močového měchýře).
- Vazbou virových proteinů E1A, LT SV40, E7 (karcinom děložního čípku).
- Amplifikací cyklinu D1 (nádory jícnu, prsu, dlaždicobuněčné karcinomy) nebo zvýšenou expresí cyklinu D1 díky chromozomální translokaci (MCL). Potenciálně onkogenní virus *Herpesvirus saimiri* kóduje svůj vlastní cyklin D.
- Amplifikací Cdk4 (glioblastomy, gliomy).
- Delecí p15, p16 nebo obou (dlaždicobuněčné karcinomy jícnu, glioblastomy, karcinomy plic, močového měchýře a pankreatu).
- Ektopická exprese „wild-type“ *RB* není inhibující pro proliferaci, protože pRB je fosforylován a inaktivován endogenní aktivitou komplexů cyklin/cdk.

Úloha pRB v diferenciaci

Proces diferenciacie nepřímo koreluje s proliferací.

Úloha proteinu pRB je tradičně spojována pouze s regulací/inhibicí proteinů rodiny E2F, ale podle novějších poznatků: pRB je klíčovým hráčem přepnutí **proliferace - diferenciacie**:

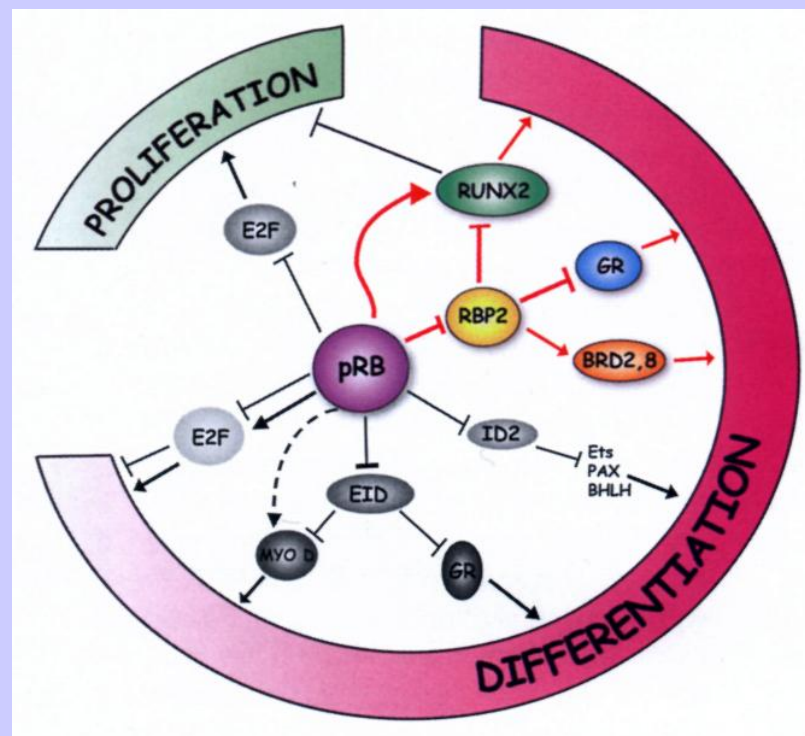
- V osteoblastech pRB váže „bone master“ TF **Cbfa1/Runx2** a funguje jako koaktivátor nezbytný pro terminální diferenciaci (2001).
- Diferenciaci dokáže vyvolat i pRB s mutací ($\Delta 663$), která znemožňuje jeho vazbu na E2F (1998).

Úloha pRB v diferenciaci

- Protein **RBP2** váže pRB. Je všeobecně exprimován. V osteoblastech jeho odstranění blokuje proliferaci a navodí expresi diferenciacních markerů. Protein pRB váže RBP2 a tím blokuje jím způsobenou represi diferenciacce a navíc takto uvolněný komplex RBP2 funguje jako koaktivátor genů, které indukují stabilní terminální diferenciaci (2005).
- pRB podobně „vyvolává“ diferenciaci i v myoblastech a adipocytech (2002, 2005).
- Proteiny rodiny Id blokují diferenciaci a potencují proliferaci. Proteiny pRB se váží na protein **Id2** a blokují jeho antidiferenciacní funkci (2001).

Úloha pRB v diferenciaci

- Vysoká exprese **EID-1** („E1A-like inhibitor of differentiation“) ve svalech inhibuje diferenciaci. pRB váže EID-1 a tvorba komplexu pRB/EID-1 je nezbytná k transkripční aktivaci diferenciačních markerů (2005).
- Dokonce i proteiny rodiny **E2F** mají vedle regulace proliferace i přímou roli v regulaci diferenciaci. To prokázaly „knockout“ pokusy, ale i přímé průkazy v adipocytech a keratinocytech, kdy represe E2F byla nezbytná pro diferenciaci (2002, 2005).



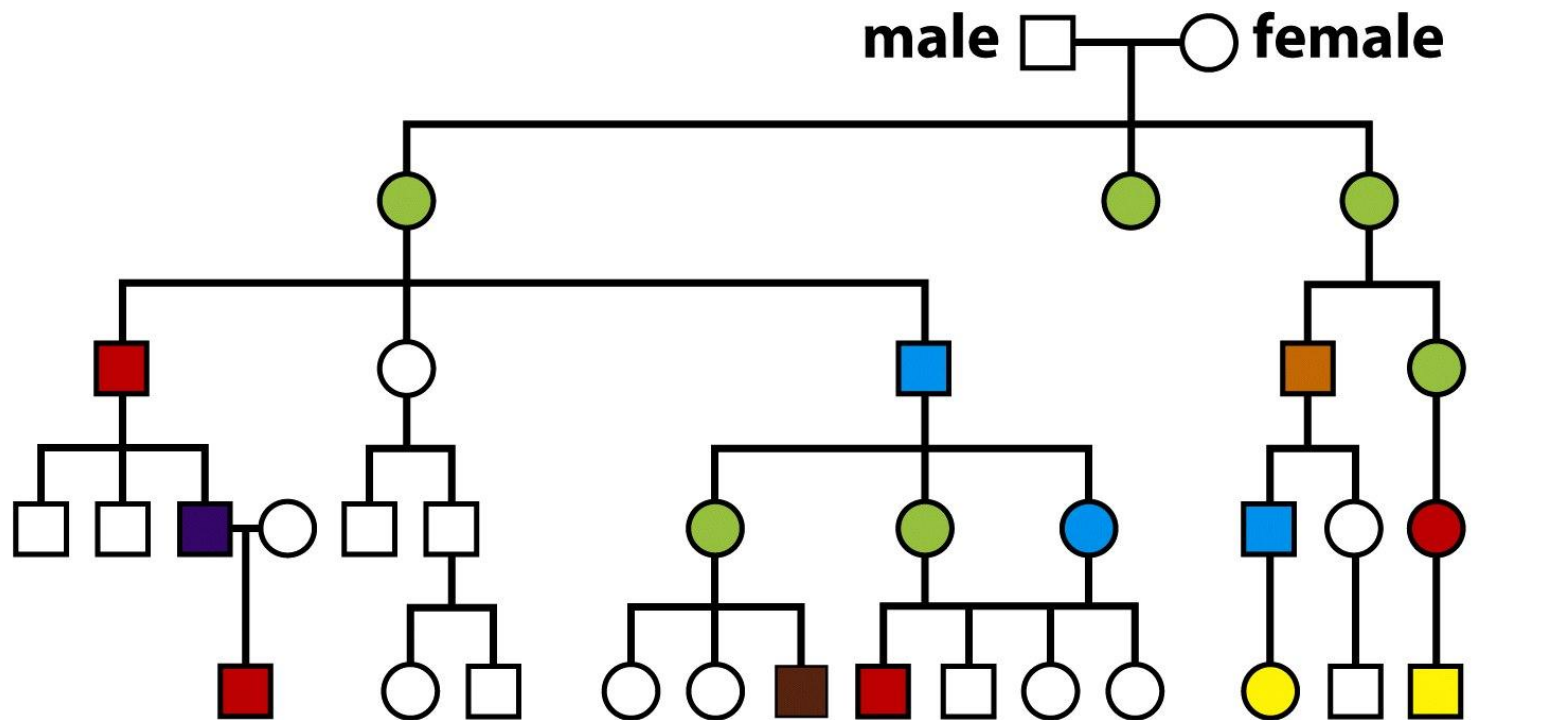
Li-Fraumeniho syndrom

- Vzácné autozomálně dominantní dědičné onemocnění (opět: dominantní na úrovni celého organismu, recesivní na úrovni buňky).
- Rodinný syndrom charakteristický častým a časným výskytem malignit různého typu včetně **sarkomu, nádoru prsu, nádoru mozku, leukémií, adrenokortikálního nádoru** (kůra nadledvin).
- Nádory u LFS mají tendenci se objevovat u dětí a mladých dospělých, často jako násobné primární nádory.
- Syndrom spojen s mutací genu pro nádorový supresor **p53** (17p13).

Li-Fraumeniho syndrom

- Proband se sarkomem do 45. roku života, příbuzný 1. stupně s nádorem do 45. roku života, příbuzný 1. nebo 2. stupně s jakýmkoliv nádorem do 45. roku života nebo se sarkomem v kterémkoliv věku.
- Až **80%** případů spojeno s vrozenou mutací **p53**.

Spektrum nádorů v rodině s mutací p53 v zárodečné linii



nádory prsu
glioblastomy

nádor plic
sarkom
karcinom pankreatu

leukémie
Wilmsův tumor

Li-Fraumeniho-like syndrom

- Proband s jakýmkoliv nádorem v dětství nebo sarkomem, nádorem mozku nebo adrenokortikálním nádorem do 45. roku života, příbuzný 1. nebo 2. stupně s kterýmkoliv typickým LFS nádorem v jakémkoliv věku, další příbuzný 1. nebo 2. stupně s jakýmkoliv nádorem do 60. roku života.
- Asi **50%** případů spojeno s vrozenou mutací **p53**. (U některých LFS / LFLS rodin popsány zárodečné mutace genu *chk2*, ale úloha genu *chk2* v etiologii LFS nejasná.)

Historie LFS

1969: Li a Fraumeni retrospektivně porovnávali data a anamnézy dětských pacientů, kteří zemřeli na sarkom. Našli několik rodin, kde onemocněním byli postiženi sourozenci nebo bratřenci/sestřenice a v jejich anamnéze zjistili, že v jedné rodičovské linii je vysoký výskyt nádorů širokého spektra, především sarkomů a nádorů prsu v mladém věku, a dalších.

SBLA syndrom: Sarcoma, Breast and Brain cancer, Leukemia, Lung and Laryngeal cancer, Adrenocortical carcinoma (1978).

1988: první verze definice LFS

1995: vedle „klasického“ LFS volněji definován LFLS (LFS-L)

Epidemiologie LFS

- Frekvence výskytu 1 : 50.000.
- Penetrance 50% ve 30 letech, 90% v 60 letech.
Penetrance trochu vyšší u žen - zřejmě spojeno s výskytem nádoru prsu.
- Mutace v genu p53 patří k nejčastějším genetickým (somatickým) změnám detekovaným v solidních nádorech X extrémně vzácný syndrom LFS.
- **Anticipace** - stále časnější a závažnější výskyt onemocnění (? v důsledku navyšování genetických změn?)

Cílové orgány maligní transformace u pacientů s LFS

- Nádory prsu: 25.2 %
- Nádory mozku: 14 %
- Sarkomy kostí: 10.9 %
- Sarkomy měkkých tkání: 10.7 %
- G.I.T.: 7.0 %
- Nádory plic: 5.2 %
- Gynekologické nádory: 5.2 %
- Hematologické malignity: 4.3 %
- Adrenokortikální nádory: 3.1 %
- Ostatní: 14.4%

Nádorový supresor p53

není nezbytný pro normální růst a vývoj
ve většině buněk je přítomen v nedetekovatelném
množství

X

výrazná nádorová suprese
ztráta funkce p53 téměř u poloviny nádorů
extrémní inhibitor buněčného růstu
(blok buněčného cyklu nebo apoptóza)

Gen a protein p53

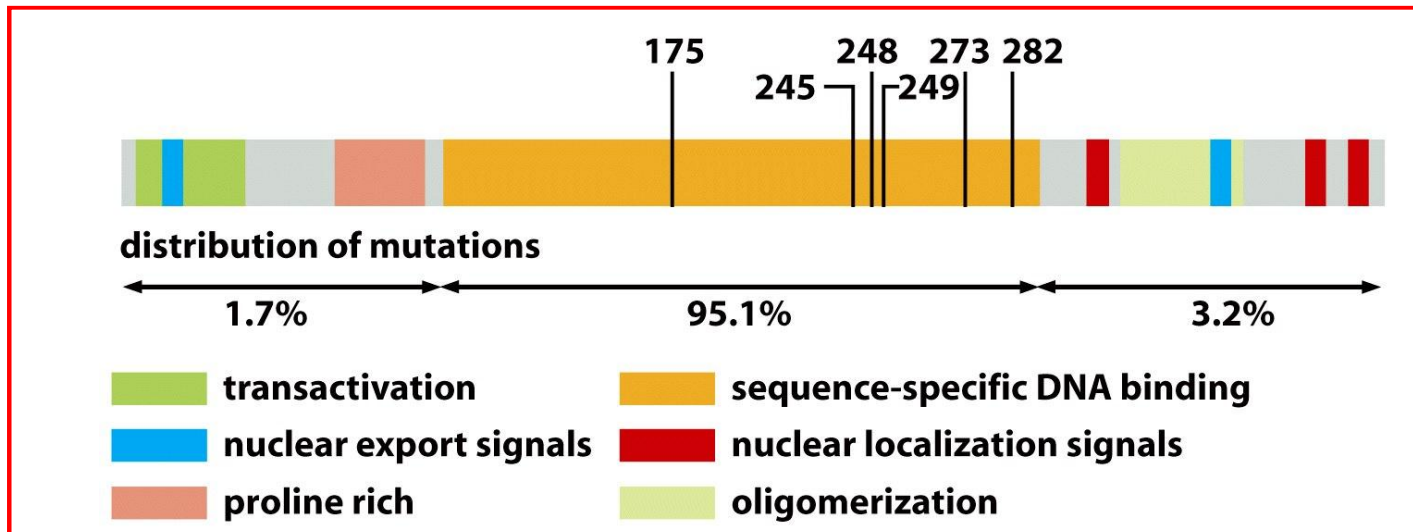
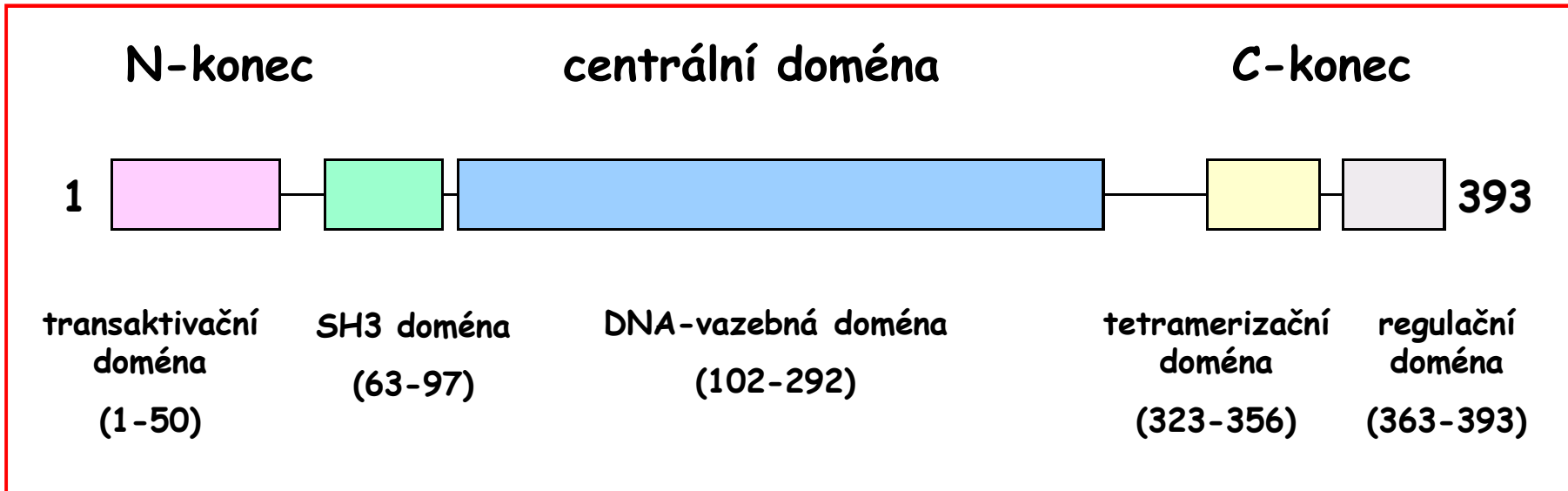
Gen leží na chromozomu 17 (17p13) a má 11 exonů (z nichž první se neexprimuje).

Protein je jaderný fosfoprotein, 393 AA, 53 kDa.

- poprvé popsán jako protein interagující s LT SV40
- funguje jako transkripční faktor
- funguje jako tetramer
- konsensus sekvence: 5' - Pu-C(A/T)(A/T)G-Py - 3'

Struktura proteinu: DNA vazebná doména, transaktivační doména, oligomerizační doména, NLS, C-koncová regulační doména

Struktura proteinu p53



Funkce p53

p53 funguje jako transkripční faktor.

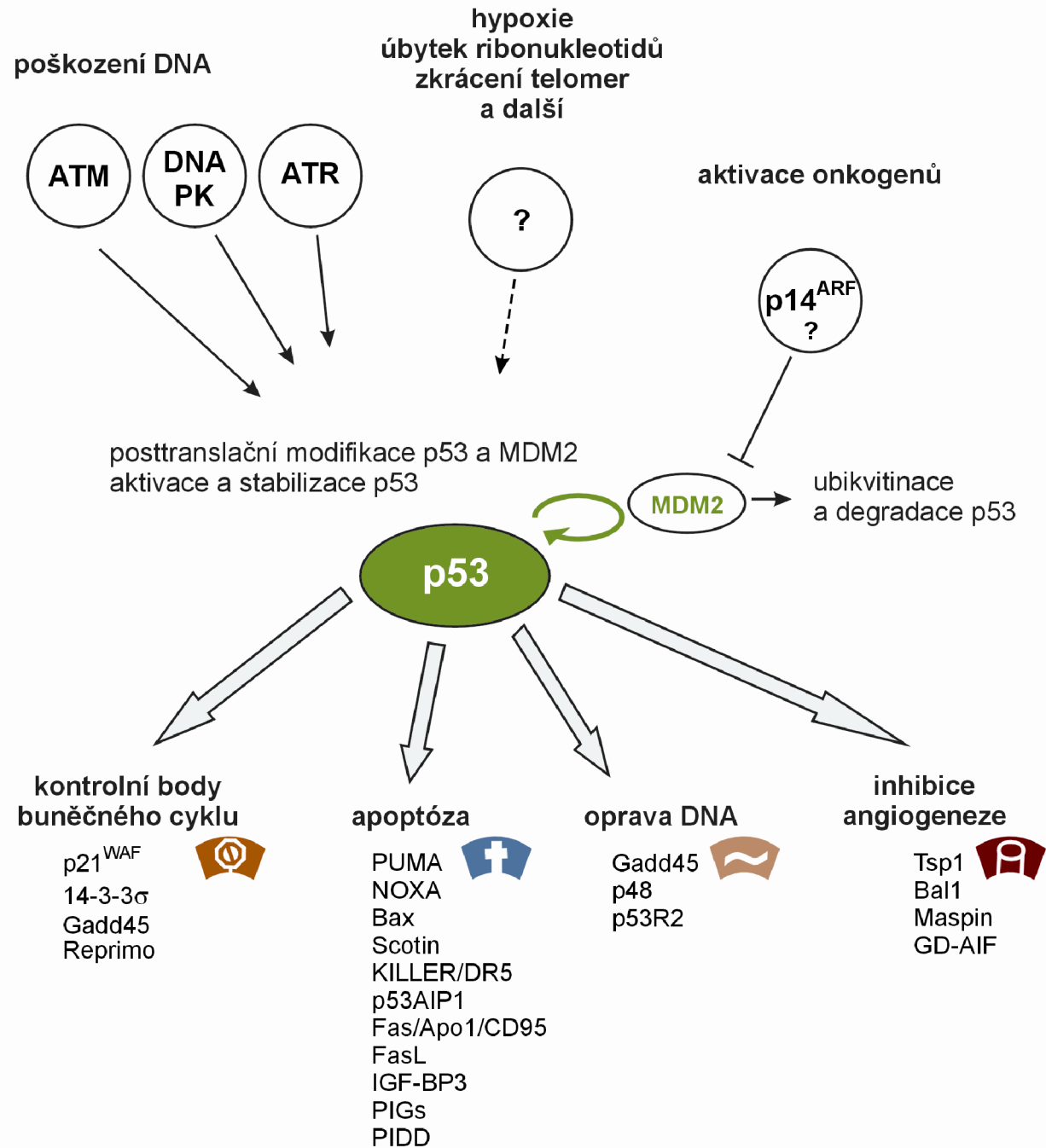
Cílové geny: *mdm2* - zpětnovazební inhibiční klička

p21^{CIP1/WAF1} - blok G1

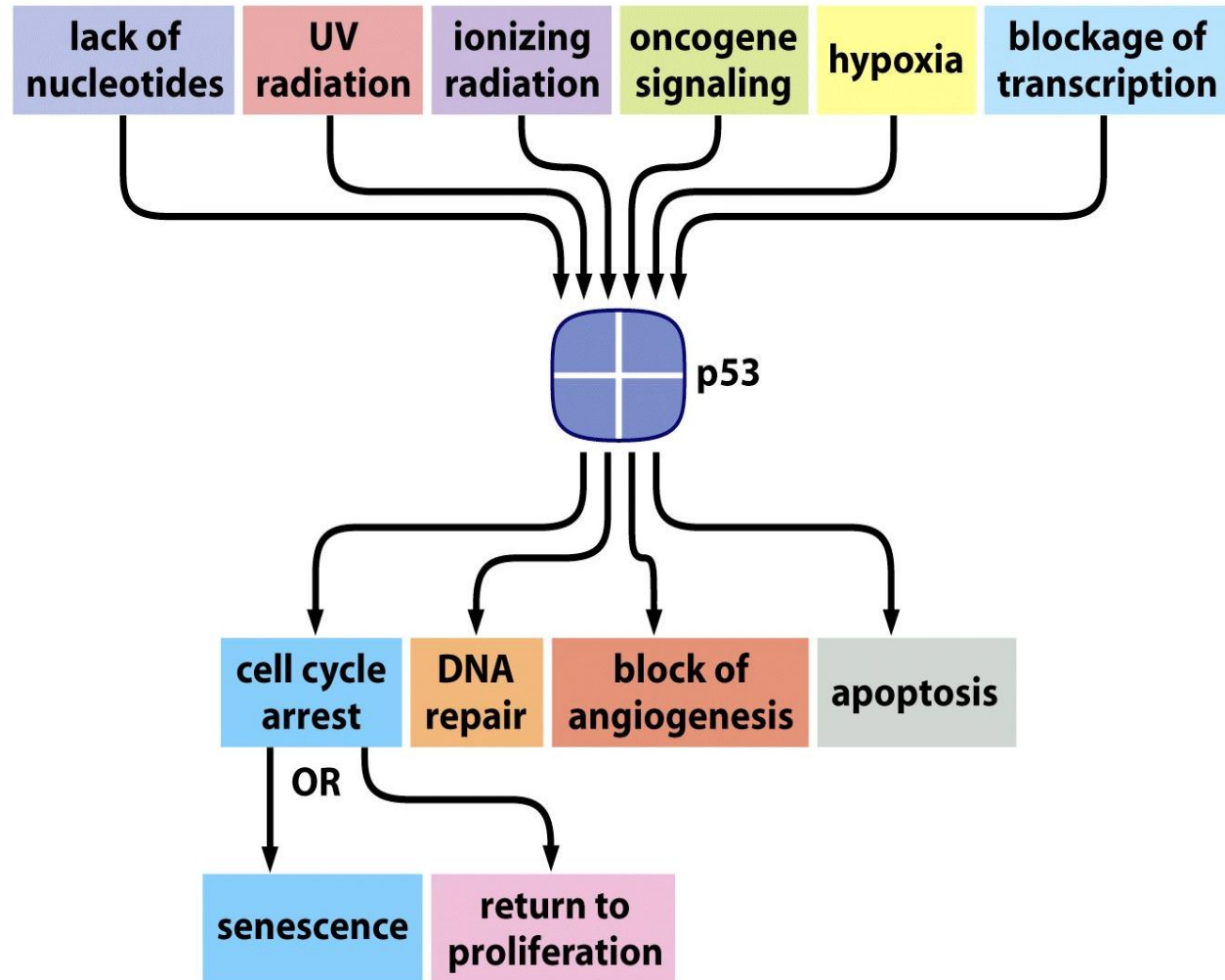
bax - apoptóza

GADD45 - oprava DNA

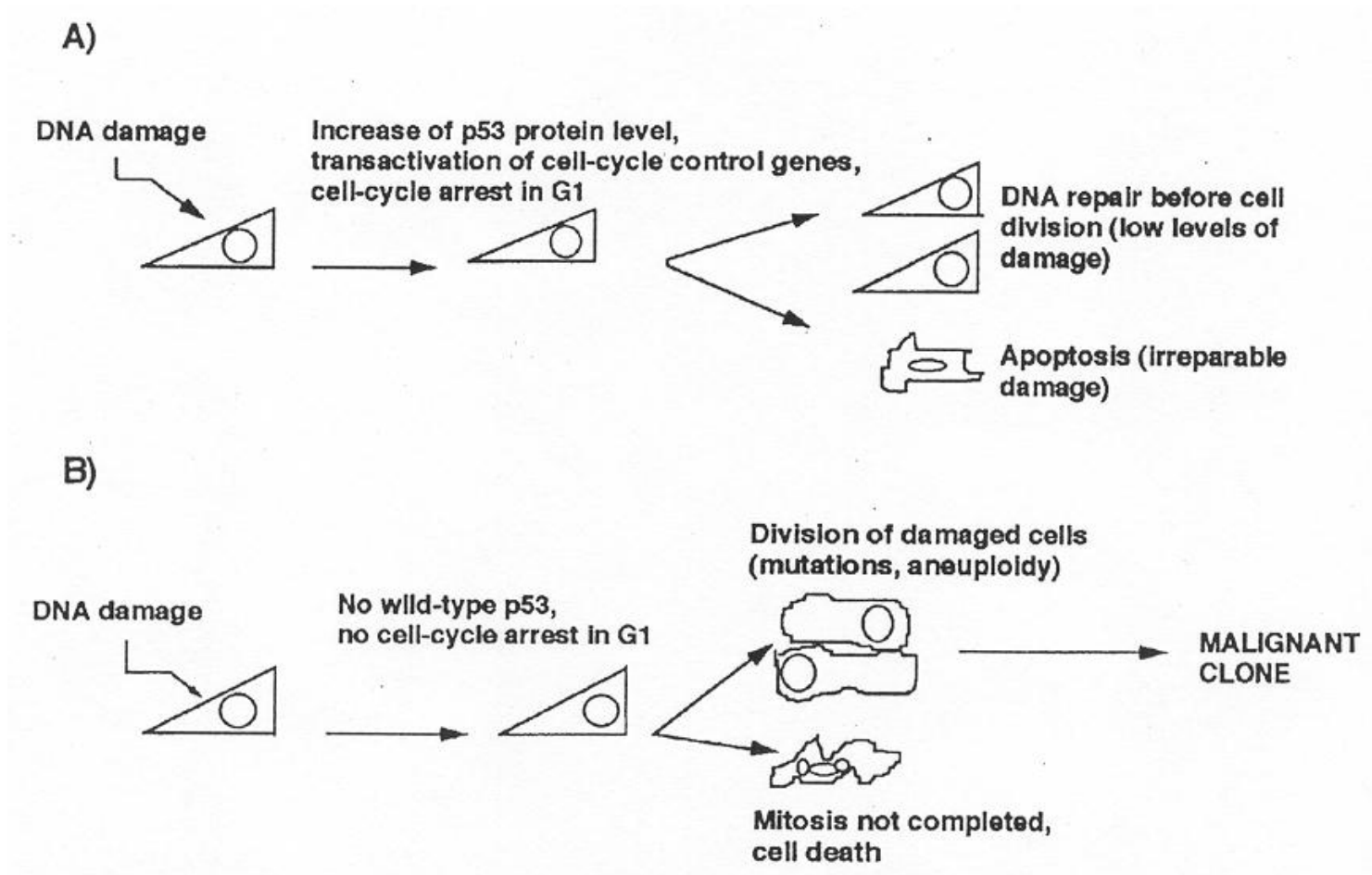
Signální síť p53



Funkční síť p53



p53 - ochráníce genomu



Regulace p53

- regulace transkripce a translace
- regulace hladiny/stability proteinu
- regulace buněčné lokalizace
- regulace aktivity

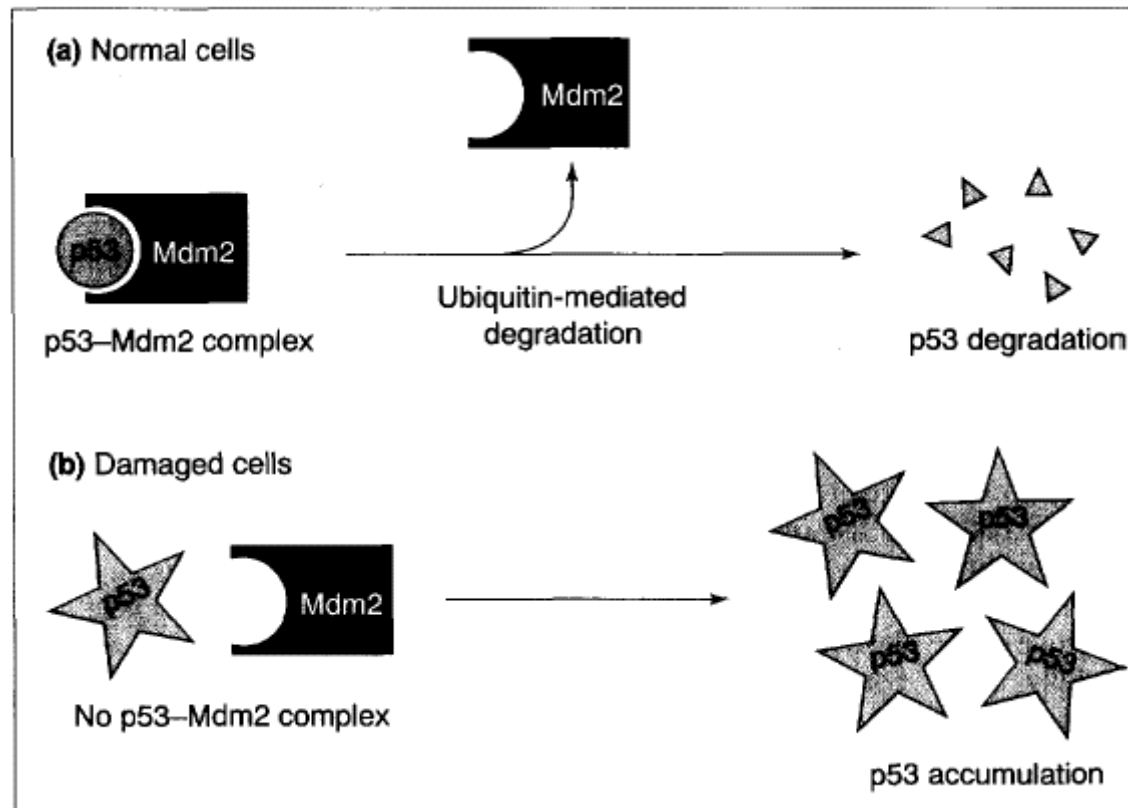
Regulace stability p53

V normálně proliferujících buňkách je hladina proteinu p53 udržována velmi nizká rychlým odbouráváním.

Klíčovou roli v regulaci stability p53 hraje protein **MDM2** (knock-out myši *mdm2*^{-/-}).

- MDM2 funguje pro p53 jako ubikvitin ligáza E3: po interakci s p53 zprostředkovává ubikvitinaci p53 a jeho odbourání proteazomem.
- *mdm2* je cílovým genem p53
- Popsána modulace exprese MDM2 **SNP 309** („single nucleotide polymorphism“) v promotorové oblasti, která zvyšuje expresi MDM2 a tím potencuje účinek vrozené mutace p53 (vývoj nádorů v mladším věku) (2004).
- Popsán protein **MDMX**, který je také regulátorem p53: nezprostředkovává jeho degradaci, ale inhibuje jeho schopnost aktivovat transkripci cílových genů.

Úloha proteinu **MDM2** v regulaci p53: v normální a poškozené buňce



V poškozené buňce je znemožněna vazba MDM2 k p53 a p53 je stabilizován.

Regulace vazby p53 - MDM2

- p53 interaguje s MDM2 malou doménou na N-konci.
- Interakce může být znemožněna fosforylací p53 v této oblasti.
- p53 je fosforylován jako odpověď na buněčný stres (poškození DNA, hypoxie, ...) kinázami: **Chk1**, **Chk2**, **ATM** a **ATR**, JNK, Polo-like kinase,...

Buňky s mutacemi v ATM a Chk2 mají poškozenou schopnost stabilizovat p53!

Vrozená heterozygotní mutace v genu **chk2** („G2 checkpoint kinase“) byla detekována u LFS!!

(Mutace **chk2** v zárodečné linii se vyskytují asi u 1,1 až 1,4% západní populace a až u 5% pacientek s nádorem prsu (tj. vrozená mutace **chk2** je spojena s vyšším rizikem vývoje tohoto nádoru).

- Různé stresy vedou k různým spektrům fosforylací na p53.

Kdo např. přispívá ke stabilizaci p53?

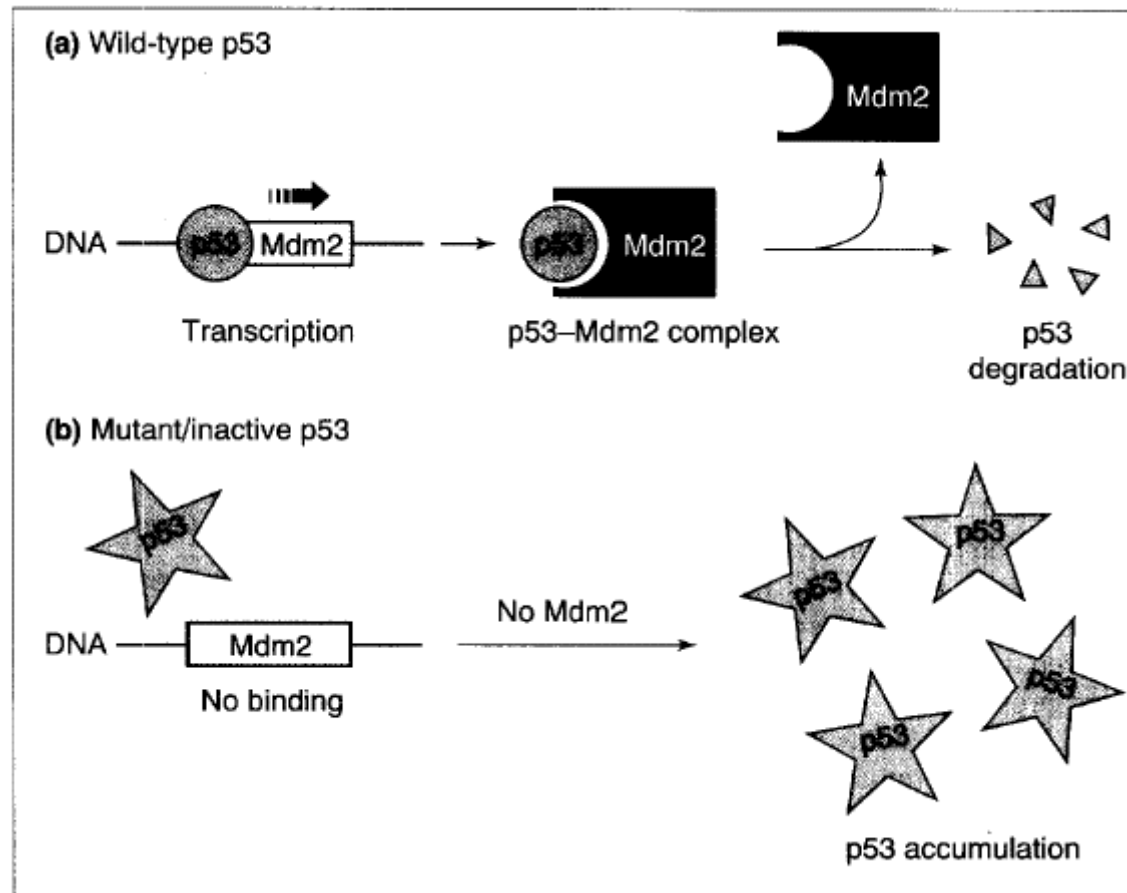
c-Abl: podílí se na stabilizaci - váže se na p53 a znemožňuje ubikvitinaci

HIF1 α („hypoxia-inducible factor 1 α “): stabilizuje a aktivuje p53 - souvislost s vývojem nádorů!

ARF (p14^{ARF}) - inhibuje MDM2 - stabilizuje p53 - jako odpověď na deregulovanou aktivitu řady onkogenů

- (např. vysoká hladina volného β -kateninu vede ke stabilizaci p53 přes ARF: v počátečních stádiích vývoje kolorektálních karcinomů bývá ještě funkční p53, ale hypermetylovaný promotor genu pro ARF;
- dvojitý vztah p53- β -katenin: volný β -katenin stabilizuje p53 - p53 transaktivuje Siah-1, který odbourává β -katenin)

Úloha proteinu MDM2 v regulaci p53: funkční a nefunkční p53



Regulace buněčné lokalizace p53

p53 má na C-konci několik signálů jaderné lokalizace - **NLS**, je po syntéze transportován do **jádra**.

p53 má dvě sekvence pro export z **jádra** - **NES**: v oligomerizační doméně (ve funkčním tetrameru odstíněno) a na N-konci v MDM2 vazebné doméně. Export z jádra je výrazně potencován vazbou MDM2 (i když vazba MDM2 není podmínkou) a také ovlivněn fosforylací v dané oblasti: fosforylace vyvolaná stresem inhibuje transport z jádra (vedle toho, že znemožňuje vazbu MDM2)

Popsána kináza **Parc**, která zadržuje p53 v cytoplasmě.

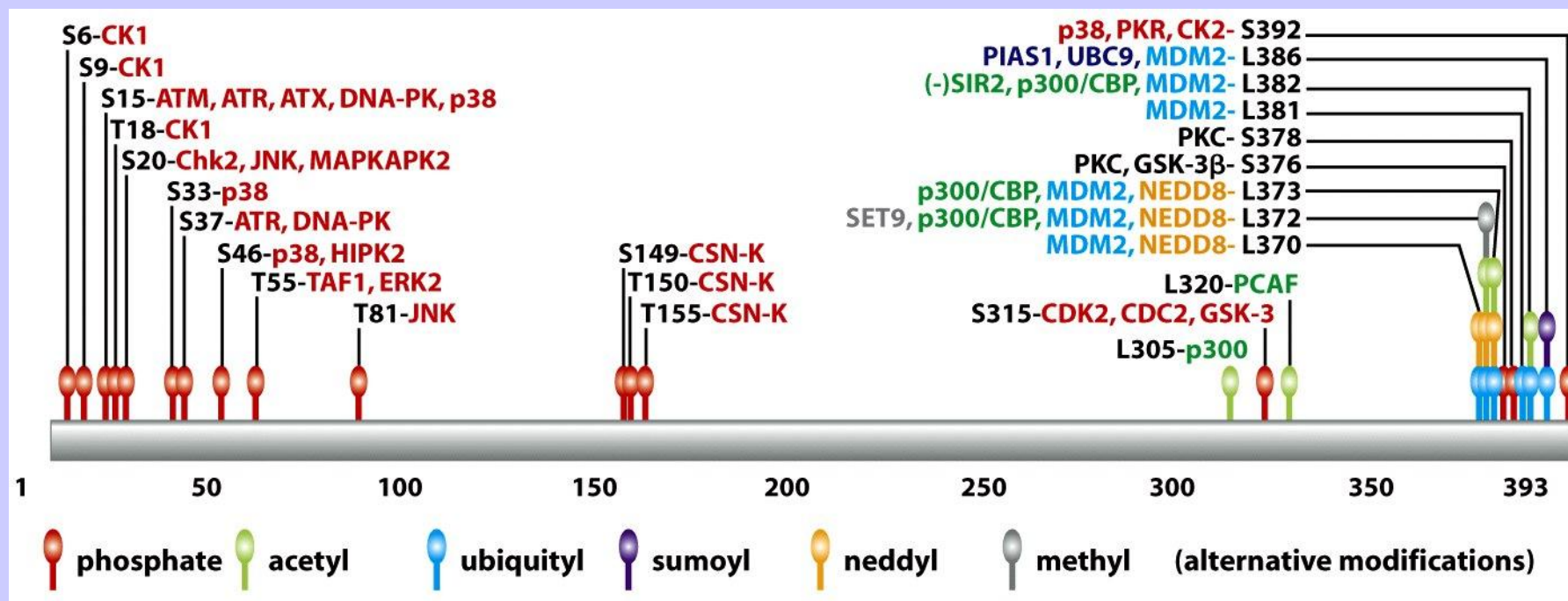
Regulace aktivity p53

Regulace schopnosti p53 vázat se na DNA a interagovat s dalšími komponentami transkripčního aparátu - regulováno posttranslačními modifikacemi.

Především různé kovalentní a nekovalentní modifikace (fosforylace, Sumoylace, glykosylace, acetylace, *ubiquitinace*, *neddylace*) **C-konce** p53 ovlivňují schopnost p53 vázat se na DNA: p53 je např. aktivována fosforylací ser392 (indukováno UV), Sumoylací Lys386, acetylací C-konce...

N-konec? Stresem indukovaná fosforylace N-konce potencuje interakce s acetyltransferázami, které acetylují C-konec (a také acetylují histony v nukleozomech v cílových promotorech)

Posttranslační modifikace p53

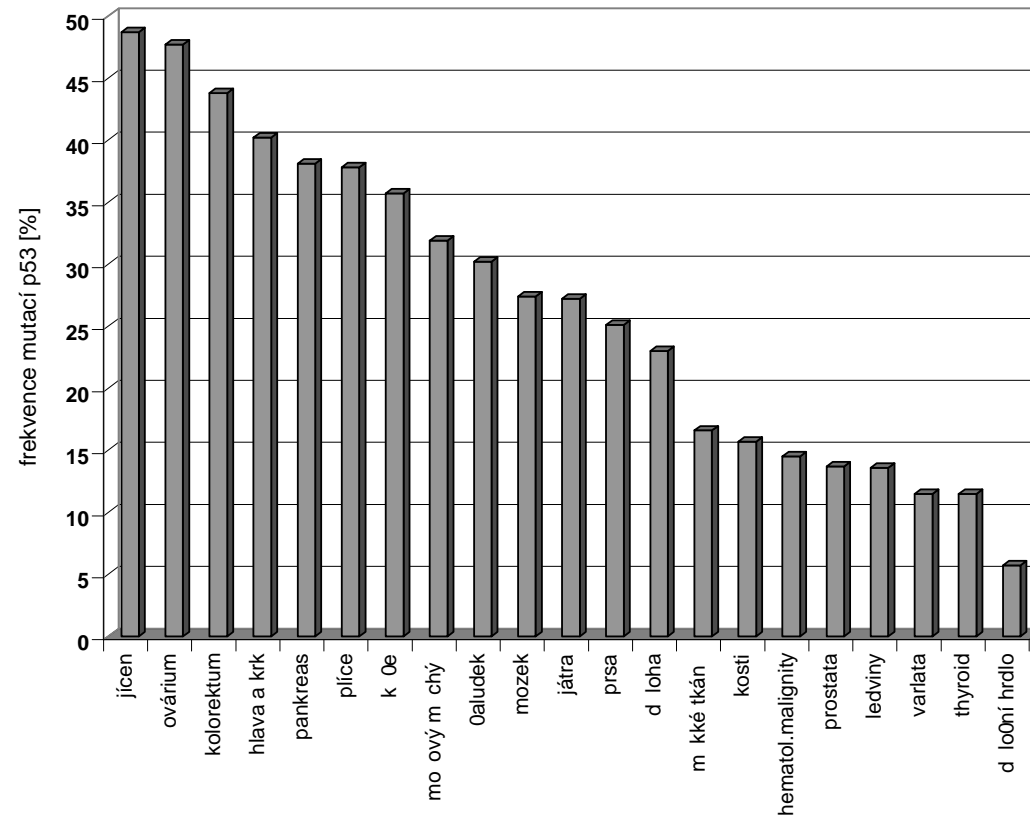


Posttranslační modifikace souvisejí s regulací aktivity a také stability p53.

Inaktivace p53 v nádorech

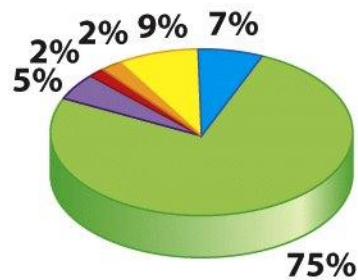
- **Mutace**
- **Jaderná exkluze** (37% zánětlivých karcinomů prsu, více než 90% nediferencovaných neuroblastomů)
- **Interakce s virovými onkoproteiny** (LT SV40, E1B, E6)
- **Amplifikace *mdm2*** (neuroblastomy), případně *mdmX* (gliomy)

Frekvence mutací p53 v nádorech

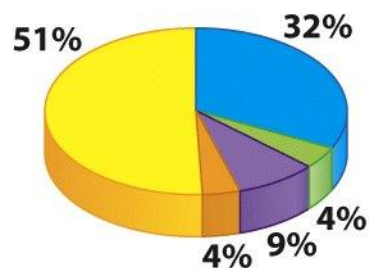


Typy mutací p53

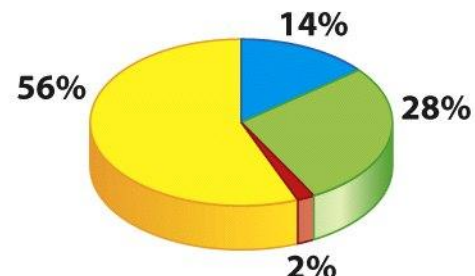
- především bodové missense mutace
- krátké delece a inserce (více v okrajových částech genu)



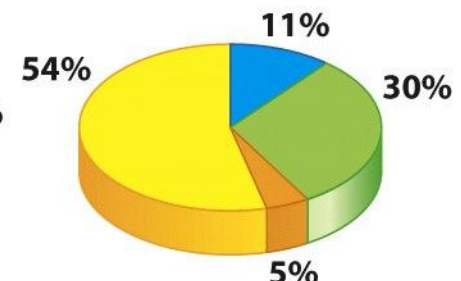
p53 (n = 15,122)



APC (n = 15,451)



ATM (n = 617)



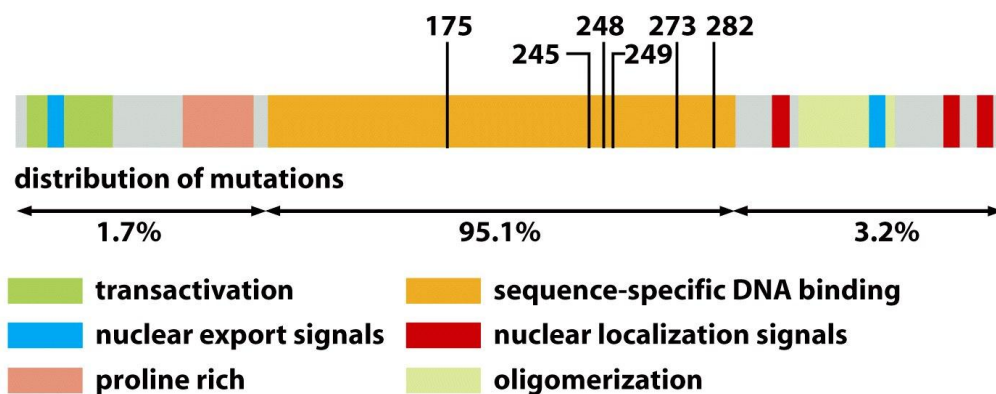
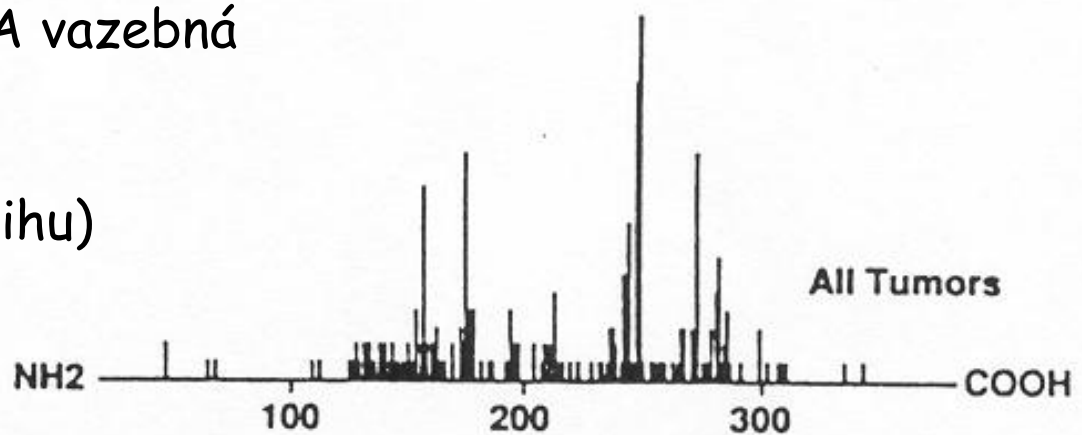
BRCA1 (n = 3,703)



Distribuce mutací v molekule p53

Distribuce není pravidelná:

- především centrální DNA vazebná doména - „hot spots“
- oligomerizační doména
- introny (v místech sestřihu)

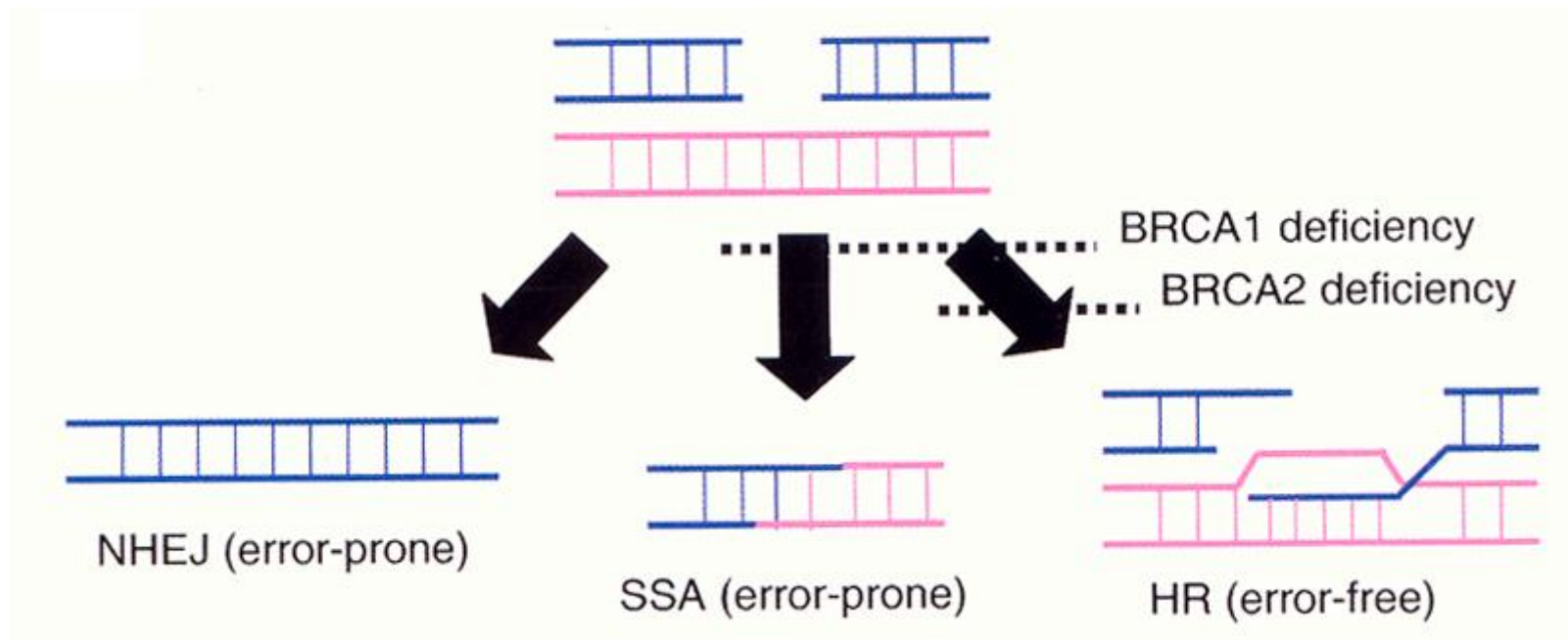


Nejčastěji mutované kodóny p53: **175, 245, 248, 249, 273, 282.**

Mutace p53 v nádorech

- typické spektrum mutací u určitých nádorů
- typická spektra pro určité kancerogeny („fingerprints“)
- některé mutace typické pro určitý genetický background (BRCA1, BRCA2)
- různé mutace mohou mít různý dopad na vlastnosti nádoru (částečná inaktivace, konformační mutace, korelace genotypu a fenotypu)
- liší se mutační spektra somatických a vrozených mutací

Důsledek špatných oprav DSBs pro genetickou stabilitu

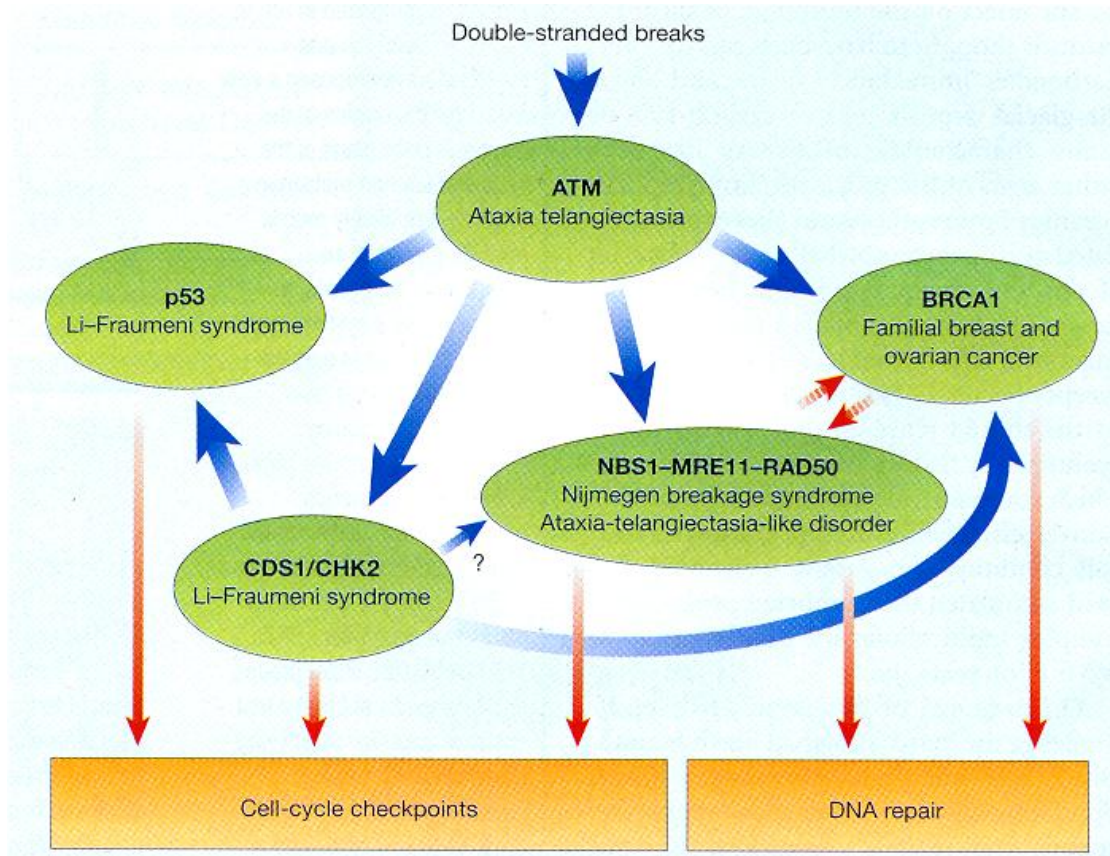


NHEJ - nonhomologous end joining

SSA - single-strand annealing

HR - homologní rekombinace

Sít' proteinů, které opravují dvouřetězcové zlomy DNA homologní rekombinací



modré šipky:
fosforylace

Tyto proteiny udržují integritu genomu, jejich mutace predisponují k vývoji nádorů.

Fyziologický výskyt DSBs

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

Ataxia - Telangiectasia (A-T)

Autozomální recesivní onemocnění, frekvence výskytu asi 1:40.000 narozených lidí (USA); frekvence nositelů 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:

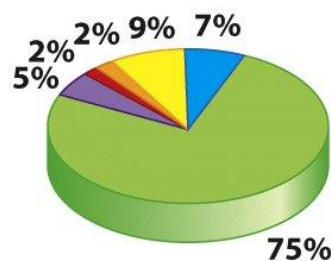
- u 38% pacientů s AT se vyvine během (zkráceného) života nádor - především (85%) **T-lymfomy** a **CLL** - chronická lymfocytární leukémie, ale také zvýšený výskyt **nádorů žaludku, meduloblastomů, gliomů, nádorů močových**
- heterozygoti (nositelé) ATM mají asi 2-3x zvýšené riziko nádoru prsu a CLL

heterozygoti mají částečně zvýšenou citlivost k ionizujícímu záření (→ **haploinsuficience**)

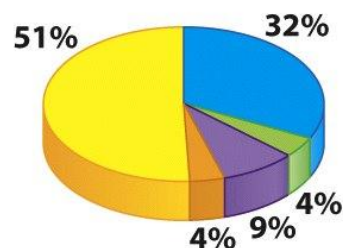
(USA - 1995: nositelé mutací ATM představují asi 1% populace a mají asi 5% všech nádorů)

Ataxia telangiectasia: gen

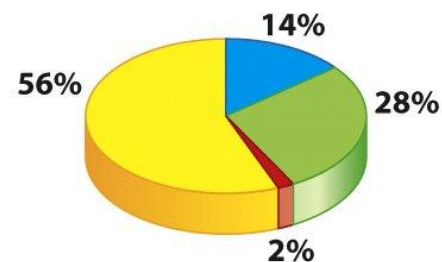
- lokalizován na chromozomu 11 (11q22,3), 66 exonů
- exprimován ve všech tkáních
- popsáno více než 250 různých mutací *ATM*, některé jsou frekventnější, časté je zkrácení proteinu
- zdá se, že existuje vztah genotyp - fenotyp



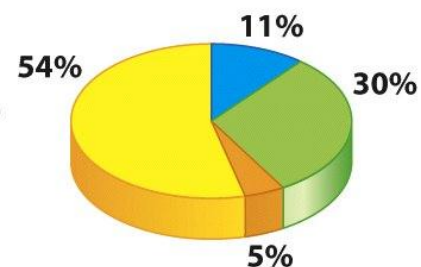
p53 (n = 15,122)



APC (n = 15,451)



ATM (n = 617)



BRCA1 (n = 3,703)



Ataxia telangiectasia: protein

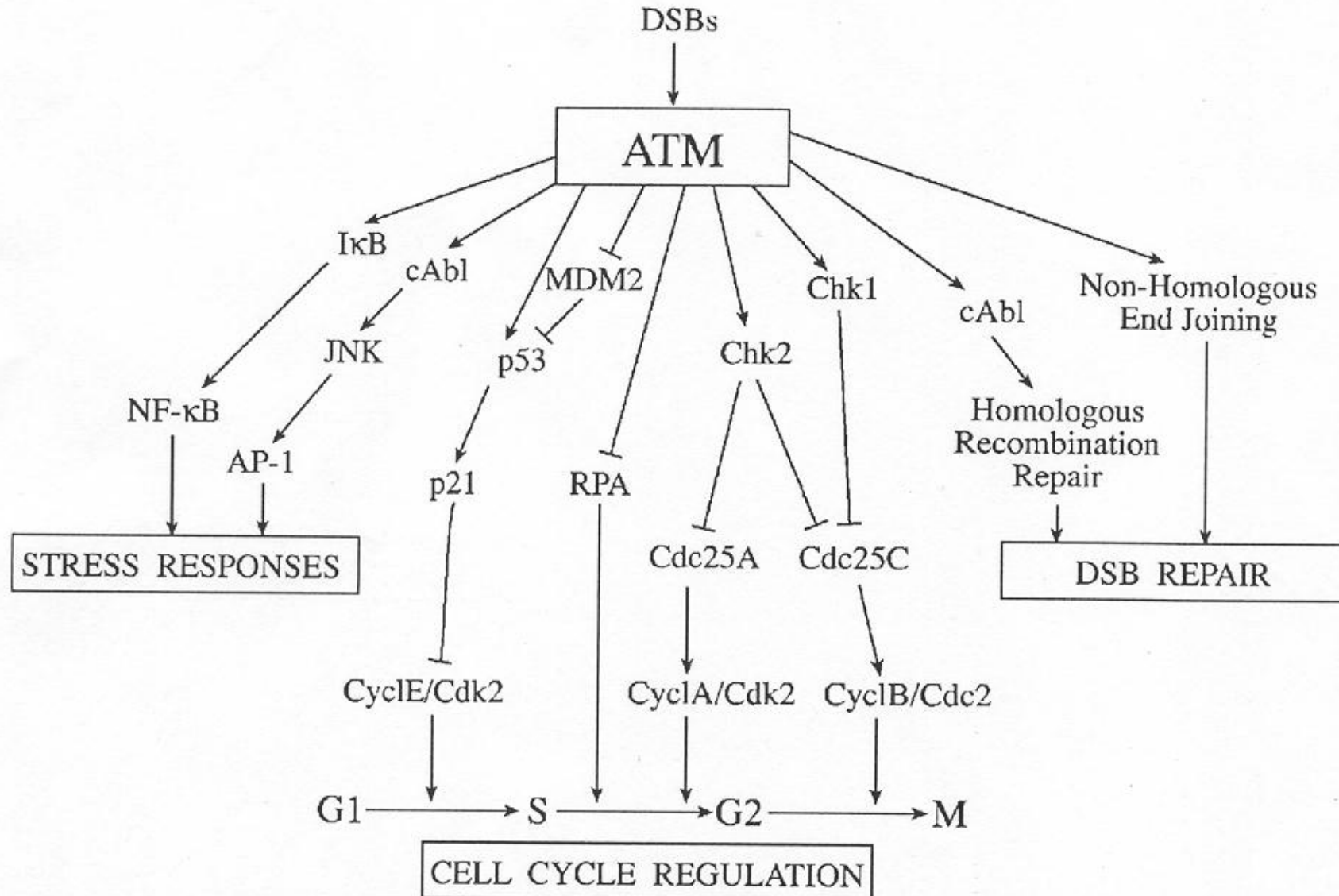
- 3506 AA, 370 kDa, převážně jaderný fosfoprotein
- serin/threonin protein kináza, C-konec výrazně homologní s kinázou PI3K (**PIKK** rodina „PI3K-like protein kinases“: PIRK, ATM, ATR, DNA-PKs, TRRAP,..)
- Je aktivován dvouřetězcovými zlomy DNA (DSBs) vyvolanými např. ionizujícím zářením (ne UV!), inhibitory topoisomeráz.
- Aktivace ATM představuje **bezprostřední a primární** reakci na DSBs, ne jedinou. Později jsou aktivovány další ATM-nezávislé signální dráhy.
- V nepoškozených buňkách jsou v neaktivní formě - tvoří neaktivní dimery.
- Signálem aktivace ATM zřejmě není přímo dvouřetězcový zlom, ale změněná struktura chromatinu v místě zlomu.
- Aktivace: vzájemná (auto)fosforylace (ser198) a uvolnění z dimeru; silná adherence v poškozeném místě - zřejmě platforma pro přisedání dalších enzymů.

Cílové proteiny ATM

ATM po aktivaci DSBs:

- interaguje s **p53**
- fosforyluje p53 na ser15 (→ stabilizace a aktivace p53, indukce interakce s CBP/p300 a následné acetylace p53 na Lys-382)
- defosforyluje ser376 na p53 (→ aktivace p53: indukce interakce s proteinem 14-3-3 a tím posílení DNA vazebné schopnosti p53)
- 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



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.

šNijmegen breakage syndrome“ - NBS

- DSB stimulují ATM a ATM fosforyluje (vedle dalších proteinů) NBS1 (a MRE11).
- Tato fosforylace je nutná pro správnou buněčnou odpověď na DSB. Je nutná pro zastavení syntézy DNA v případě, že se na DNA vyskytují DSB.
- ⇒ ATM nejenom zastavuje buněčné dělení v případě poškození DNA, ale také (prostřednictvím NBS1 - funguje i jako **transduktor**) startuje opravy DNA.
- Souvislost funkce ATM a NBS1 vysvětluje podobnost syndromů AT a NBS.

Dědičná forma nádoru prsu

Příčinou dominantně dědičné formy nádoru prsu jsou vrozené mutace v genech **BRCA1** a **BRCA2**.

BRCA1 (17q21): 85 (80)% pravděpodobnost vývoje nádoru prsu do 70 let věku a 63 (55)% pravděpodobnost vývoje nádoru vaječníků. 3-4x zvýšené riziko vývoje nádoru žaludku, ledvin, střeva a prostaty.

BRCA2 (13q12-13): je spojena s 80% pravděpodobností vývoje nádoru prsu jako u *BRCA1* a 25-27% pravděpodobností vývoje nádoru vaječníků. (Nádory se objevují v průměru v o něco vyšším věku než u *BRCA1*.) Zvýšené riziko dalších typů nádorů: nádory střeva, pankreatu, prostaty, leukémií a thyroideálního nádoru.

Somatické mutace genů *BRCA* jsou vzácné u sporadických nádorů!

BRCA1, BRCA2

Nemají homology u kvasinek nebo drozofily - jsou to poměrně „mladé“ geny.

Oba geny kódují velké proteiny, které jsou exprimovány v řadě tkání a jsou lokalizovány hlavně v jádře.

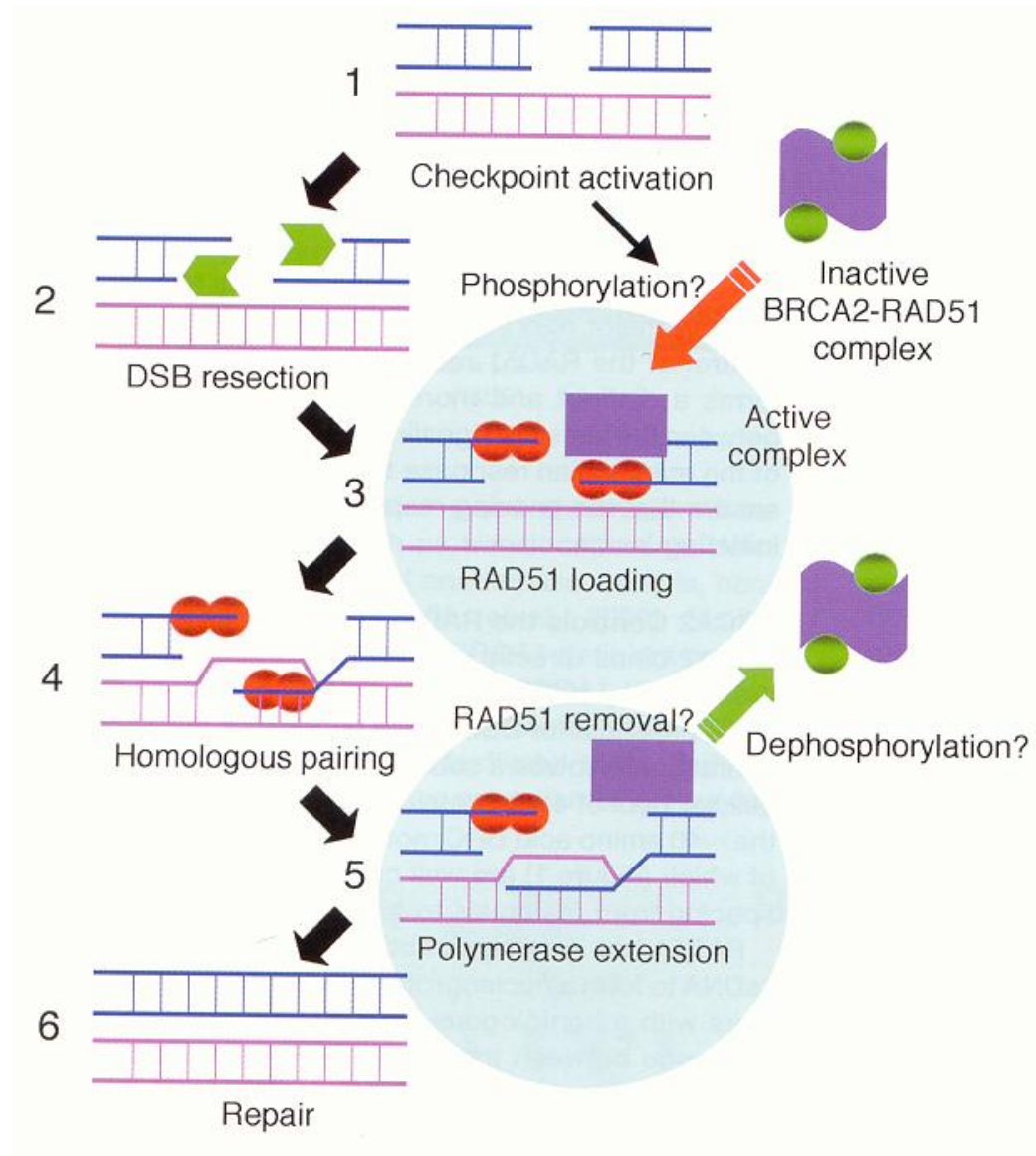
Oba proteiny hrají významnou roli při ochraně struktury chromozomů, jejich funkce ale není totožná. Fungují jako „caretakers“, udržují genetickou stabilitu.

Funkce BRCA2

Interaguje přímo s **RAD51** a reguluje jeho dostupnost a aktivitu. RAD51 (homolog bakteriálního proteinu RecA) je naprosto nezbytný pro opravu DSB, a to mechanismem rekombinace mezi homologními sekvencemi DNA (HR).

Možný mechanismus: Poškození DNA aktivuje ATM nebo ATR („DNA damage-signaling kinases“), které fosforylují a tím aktivují 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.

Hypotetický model funkce BRCA2



Funkce BRCA1

BRCA1 je také nutný pro efektivní HR, ale jeho přesná funkce je mnohem méně známá. (Určitě ne přímou regulací RAD51.) Zřejmě se uplatňuje více mechanismy a také jak při detekci DSB (sensor) tak jako efektor při buněčné odpovědi na DSB.

BRCA1 hraje roli při detekci DSB, objevuje se v místech DSB velmi rychle. Je fosforylován kinázami **ATM**, **ATR**, **Chk2** a fosforylace ovlivňuje jeho funkci.

Zřejmě různé kinázy způsobují různou konfiguraci fosforylací BRCA1: to může odrážet různé okolnosti poškozených míst a indukovat odlišné odpovědi - konfigurace opravných mechanismů.

Funkce BRCA1

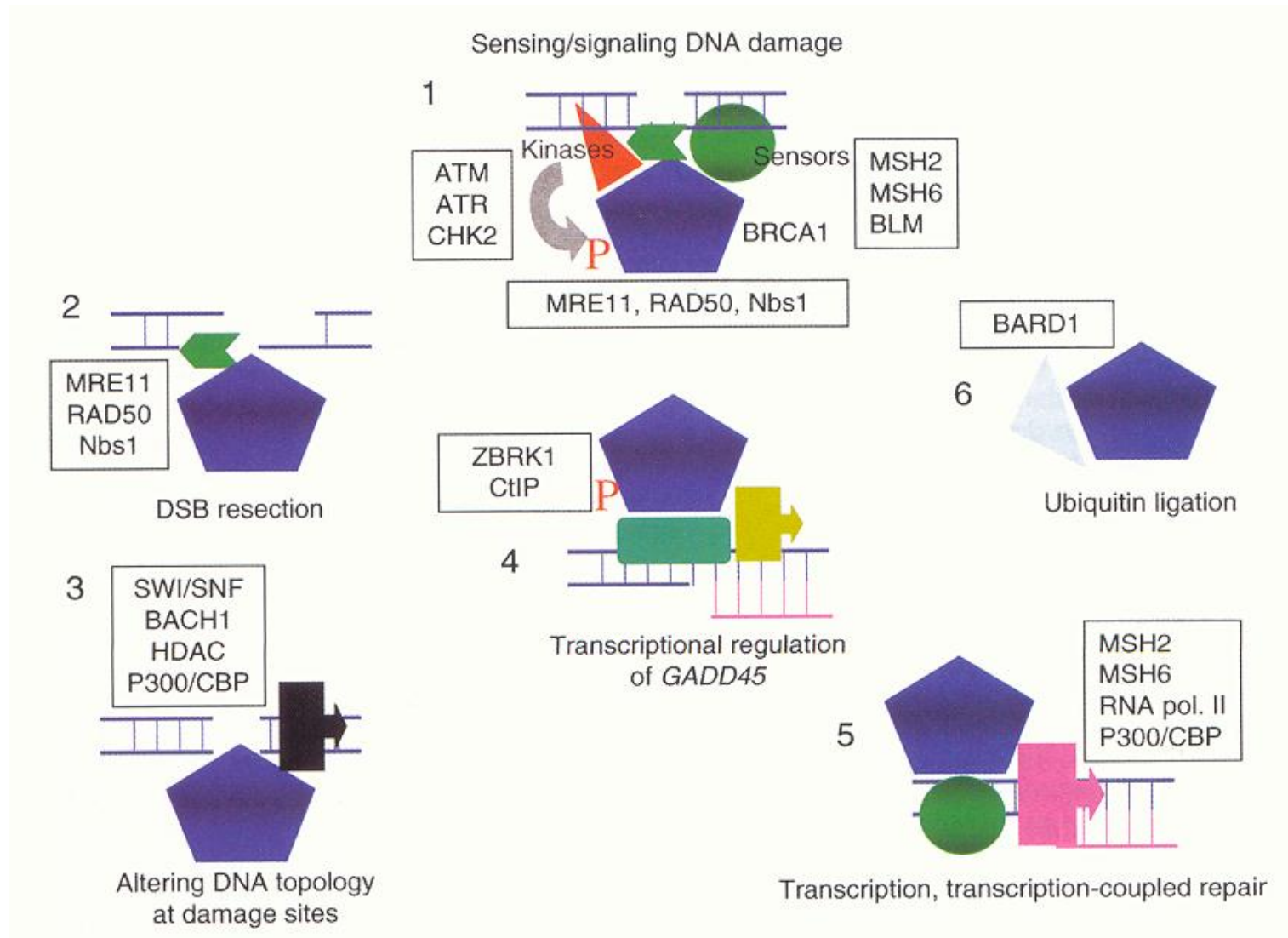
- V oblastech DSB je rychle modifikován **chromatin** (fosforylace, acetylace histonů, přestavba chromatinu - přístup pro reparační mechanismy), BRCA1 interaguje se SWI/SNF, HDAC/HATs,...
- BRCA1 interaguje s komplexem MRE11/RAD50/NBS1, inhibuje nukleázu **MRE11** a tak reguluje délku jednořetězců.
- BRCA1 interaguje s **DNA helikázou**, **BLM** (mutovaný u Bloomova syndromu; homolog RecQ),...
- Za normálních okolností se BRCA1 podílí na transkripční represi **GADD45** (mimo jiné cílový gen p53). Po fosforylaci BRCA1 uvolnění represe.

Funkce BRCA1

- BRCA1 se podílí na „transcription-coupled repair“:
- 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**. Komplex BARD1-BRCA1 má ubikvitin ligázovou aktivitu - možná degraduje enzymy nutné k procesingu RNA (mutace BARD1 detekovány u nádorů - postrádají tuto funkci!).
- Protein kódovaný genem **FANCD2** (mutovaný u Fanconiho anémie) je kolokalizován s BRCA1 do oblastí poškození DNA.

⇒ Hypotetické: Nemá BRCA1 funkci lešení?

Hypotetický 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**.
- Jiné vysvětlení: mutace *BRCA1* a *2* přežívají pouze buňky prsu a vaječníků, a to díky anti-apoptotickému působení **estrogenů**.

Gen *BRCA1*

- 22 kódujících exonů
- Více než 2000 unikátních mutací, význam některých zatím nejasný (tzv. UCVs - „unclassified variants“).
- U některých populací specifická mutační spektra.
- Histopatologické znaky nádorů prsu spojených s mutacemi v *BRCA1*: často medulární typ, infiltrace lymfocyty; často negativní na hormonální receptory, HER2/neu negativní, málo diferencované.
- Často odlišná chemocitlivost oproti sporadickým nádorům (odpovídají dobře na platinové deriváty).

Gen *BRCA2*

- 26 kódujících exonů
- Více než 1000 patogeních mutací a ještě více UCVs než u *BRCA1*.

RecQ helikázy

- Rodina RecQ helikáz se podílí na udržování stability genomu: separují komplementární řetězce DNA s použitím energie z hydrolýzy ATP.
- Do rodiny RecQ helikáz patří:
 - BLM** (Bloomův syndrom)
 - WRN** (Wernerův syndrom)
 - RECQL4** (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 klinického fenotypu je získání mutované alely genu **BLM** od obou rodičů.
- Heterozygoti jsou zcela zdraví.
- Gen *BLM* je lokalizován na chromozomu 15q26.1.
- Mutace *BLM* je obecně v populaci velmi nízká (2003: od roku 1975 nahlášeno po celém světě asi 220 případů), pouze u Ashkenazi židů je vyšší frekvence výskytu (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

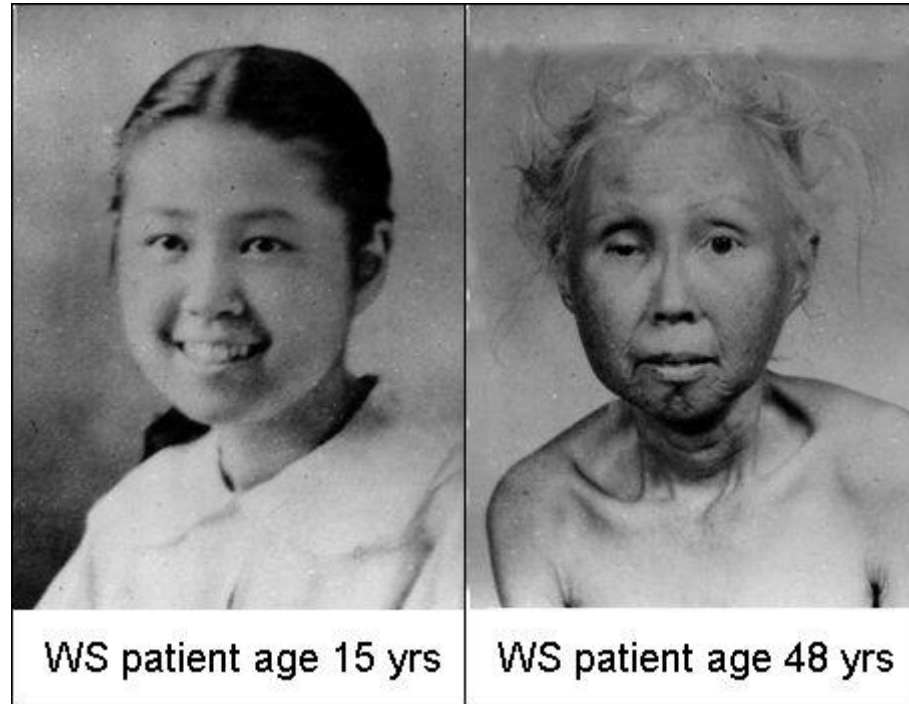
- Na buněčné úrovni onemocnění spojeno s extrémně vysokou mutabilitou → „*somatic mutational disorder*“. Lze pozorovat velmi komplexní přestavby na chromozomech všech buněk pacientů.

Wernerův syndrom - WS

Vzácné autozomálně recesivní onemocnění, frekvence výskytu je asi 1:22.000 - 1.000.000.

- Až do dospělosti normální fenotyp. 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). Především sarkomy měkkých tkání, osteosarkomy, melanomy, thyroideální nádory...

Wernerův syndrom



Onemocnění způsobeno mutací genu *WRN*, který je na chromozomu 8p12.

Protein WRN má 1432 AA, je to DNA helikáza z rodiny RecQ helikáz, blízce příbuzná BLM.

Mutace *WRN* převážně non-sense a frameshift \Rightarrow zkrácený protein.

Mnoho postižených je mezi Japonci.

Rothmund-Thompsonův syndrom - RTS

- Popsán původně jako onemocnění spojené s abnormalitami pigmentace kůže a ztrátou vlasů, postižení skeletu.
- Onemocnění spojeno se zvýšeným rizikem vývoje nádorů, často detekovaných před 25. rokem života. Spektrum nádorů širší, ale hlavně **osteogenní sarkomy**.
- U některých postižených je mutován gen **RECQ4** (příbuzný *BLM* a *WRN*), který se nachází v lokusu 8q24.3. Zatím se neví, zda za RTS odpovídá mutace i jiného genu nebo zda epigenetické změny *RECQ4*.
- **BLM, WS, RTS** mají společné: zvýšená genetická nestabilita.
- Autozomálně recesivní dědičnost.

Rothmund-Thompsonův syndrom



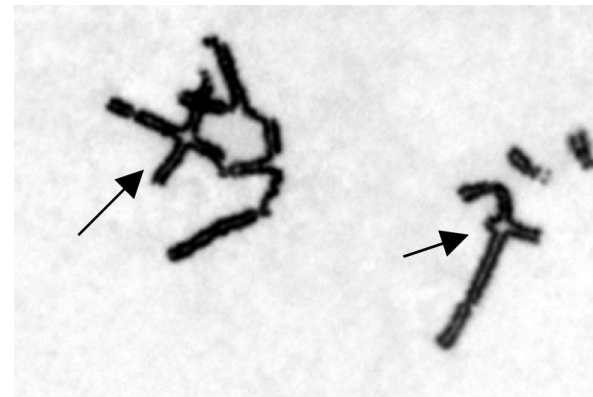
Fanconiho anémie - FA

- 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



Na buněčné úrovni pro FA buňky charakteristická citlivost na činnidla způsobující crosslink DNA (používá se i při diagnostice).



Předpokládá se, že je více (11 - *FANCA* až *FANCL*) genů způsobujících FA (komplementační skupiny). Všechny kódují komponenty jediné nádorové supresorové dráhy a tvoří **jaderný komplex FA**.