

Speciální seminář z biologie nádorů

Prof. RNDr. Jana Šmardová, CSc.

FN Brno, PřF a LF MU Brno

MUDr. Pavel Fabian, Ph.D.

MOÚ Brno, LF a PřF Brno

2013

Tento projekt je spolufinancován Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky.



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Seminář 4

Buněčná proliferace

Prof. RNDr. Jana Šmardová, CSc.

FN Brno, PŘF a LF MU Brno

MUDr. Pavel Fabian, Ph.D.

MOÚ Brno, LF a PŘF Brno

RNDr. Jitka Berkovcová, Ph.D.







MOÚ Brno

Tento projekt je spolufinancován Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky.



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Sedm získaných vlastností maligního nádoru

	získaná schopnost	příklad
	Soběstačnost v produkci růstových signálů	aktivace <i>H-ras</i>
	Necitlivost k signálům zastavujícím b.c.	ztráta RB
	Poškození apoptózy	produkce IGF
	Neomezený replikační potenciál	aktivace telomerázy
	Posílení angiogeneze	produkce VEGF
	Tvorba metastáz	inaktivace E-kadherinu

Nestabilita genomu jako podmínka akumulace všech nutných změn

Z Úvodní přednášky kurzu Molekulární biologie nádoru:

Průběh buněčného cyklu

M - G1 - S - G2

M - kopie DNA jsou separovány;
kondenzované chromozomy

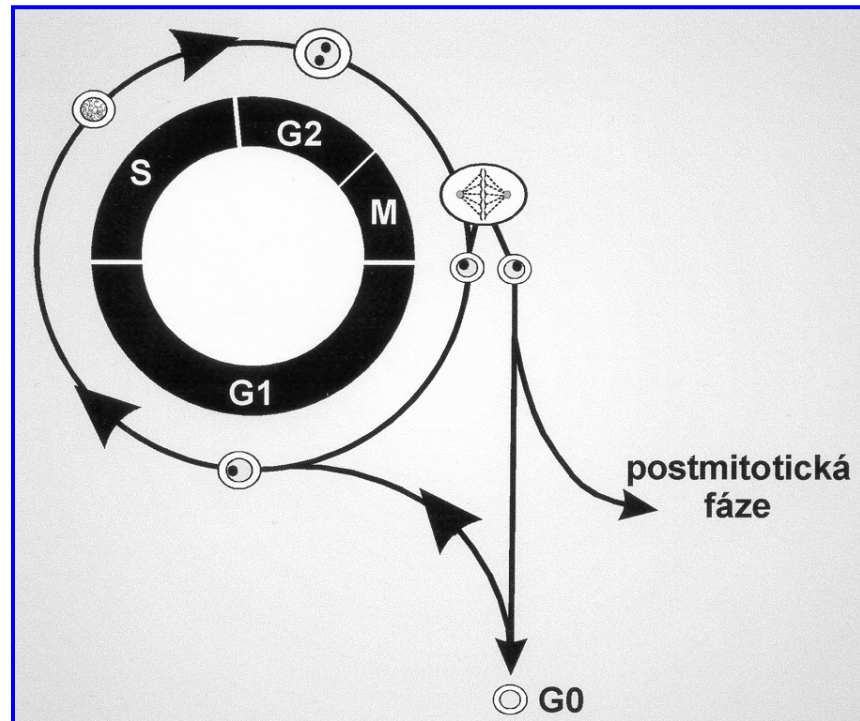
G1 - obsah DNA: 2N

S - replikace DNA; inkorporace
značených nukleotidů

G2 - obsah DNA: 4N

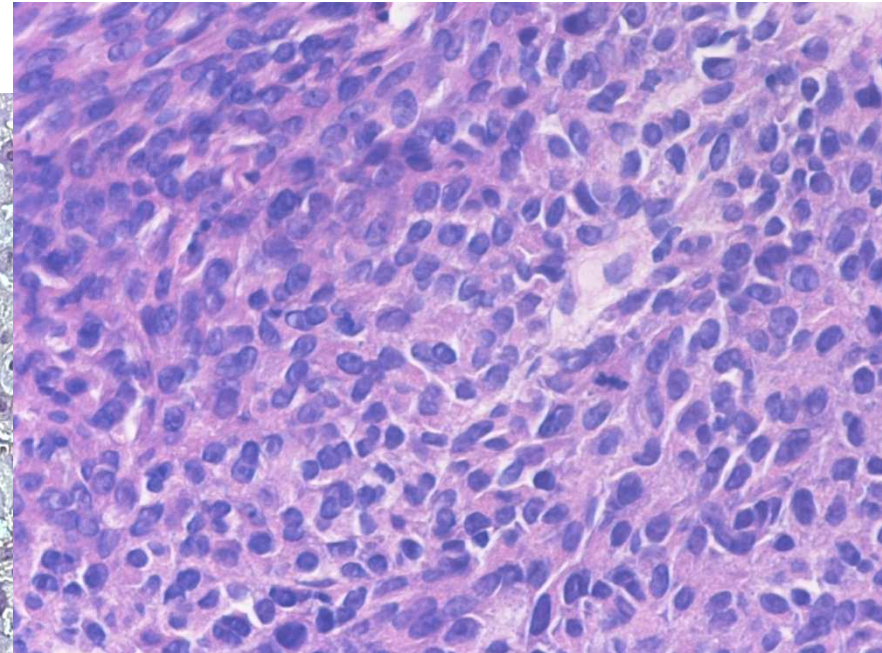
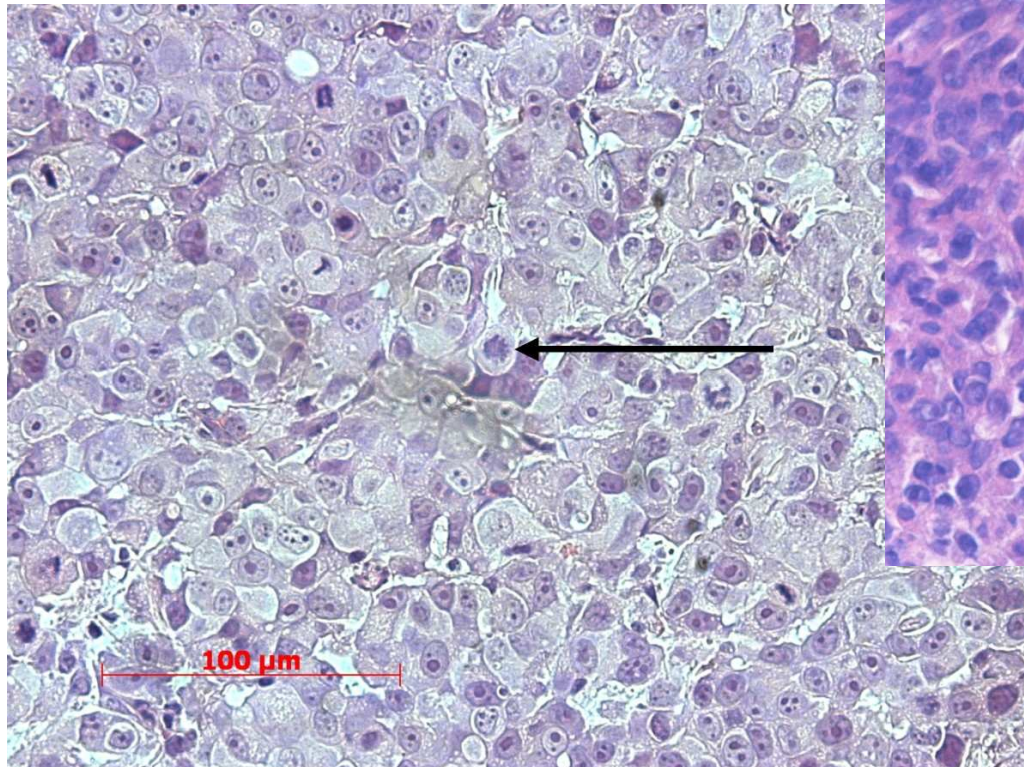
G0 - stárnoucí nebo dlouhodobě
se nedělící buňky

postmitotický stav - bez
možnosti návratu do cyklu,
spojen s terminální
diferenciací



Mitotický index

- MI je poměr počtu buněk v mitóze k celkovému počtu buněk.
- Čím je mitotický index vyšší, tím více buněk se nachází v mitotické fázi buněčného cyklu.



Rutinní stanovení mitotického indexu

- Stanovení počtu mitotických figur na jednotku plochy
- 1mm² nebo 1HPF (high power field = zorné pole při velkém zvětšení - může se lišit podle použitého objektivu a okuláru)
- Měří se v místech s nejvyšší mitotickou aktivitou (hot spots), obvykle jde o periferii nádoru
- Nejpoužívanější vyjádření mitotické aktivity je počet mitóz na 10HPF
- Klinická relevance - součást některých gradingových systémů
 - Neuroendokrinní tumory
 - Karcinomy mléčné žlázy
 - Sarkomy měkkých tkání
 - GISTy

Žádoucí vlastnosti ideálních proliferčních markerů

- (1) Antigen by měl být neustále přítomen během všech aktivních fází buněčného cyklu všech buněk.
- (2) Každé ukončení nebo přerušení buněčného cyklu by mělo být spojeno s rychlou degradací antigenu.

PCNA - „proliferating cell nuclear antigen“; protilátka **PC10** vhodná pro IHC. **Ale:** PCNA se účastní nejenom replikace DNA, ale také oprav DNA \Rightarrow detekován také u buněk v klidové fázi.

Ki-67

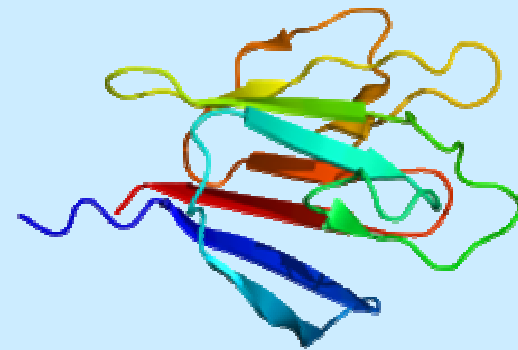
- Původně označení prototypové monoklonální protilátky, která byla připravena imunizací myši jádry buněčné linie L428 odvozené z Hodgkinova lymfomu (1983).
- Název odvozen od místa vzniku (**Kiel**, Německo) a čísla klonu na 96jamkové destičce (**67**).
- Antigen nebyl dlouho znám, proto označován jako „protein Ki-67“.

Specifický vzorec barvení

- Reaktivní struktury přítomny v buněčných jádrech ve fázích G_1 , S, G_2 a M. Buňky v quiescenci a ve fázi G_0 protein Ki-67 neexprimují.
- ⇒ Ki-67 je excelentní marker k detekci frakce proliferujících buněk nejrůznějšího (nádorových i nenádorových) typu!

MIB-1 - první antigen Ki-67 protilátka použitelná na [řezy z FPB](#)

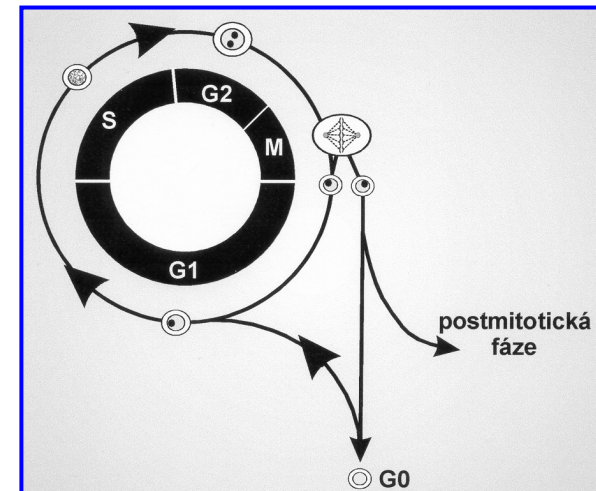
Protein Ki-67



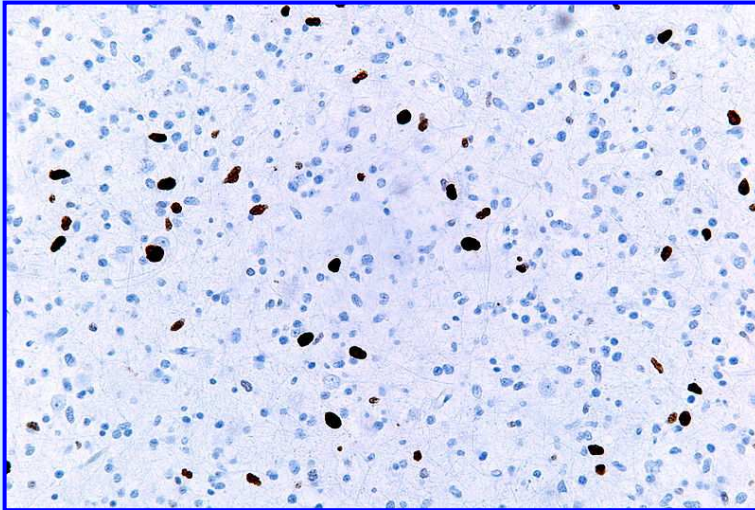
- cDNA kódující antigen Ki-67 publikována 1993:
2 isoformy proteinu 320 a 359 kDa (alternativně sestřižené mRNA)
- pravděpodobně více isoforem
- protein Ki-67 je jaderný protein, který je spojen s buněčnou proliferací; pravděpodobně je pro ni nezbytný
- prokázáno spojení s transkripcí rRNA (inaktivace Ki-67 vede k inhibici syntézy rRNA).

Stanovení mitotického indexu vs. Ki-67

- obecně (statisticky) přímá úměra, ale velký rozptyl
- v daném případě nemusí být Ki-67 index informativní
- porovnání absolutních hodnot mezi jednotlivými typy nádorů není relevantní
 - NET >2/10HPF G1/2
 - BC.....<7/10HPF - G1, >16/10HPF - G3
 - GIST.....2 - 5/50HPF (risk group)



Příklady imunobarvení Ki-67

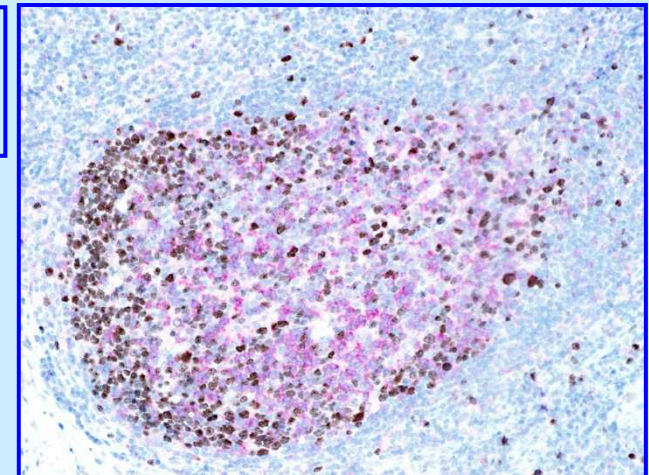


anaplastický astrocytom:
nádor mozku s vysokou
proliferační rychlostí



stěna tlustého
střeva

lymfatická
uzlina



Praktické využití indexu Ki-67

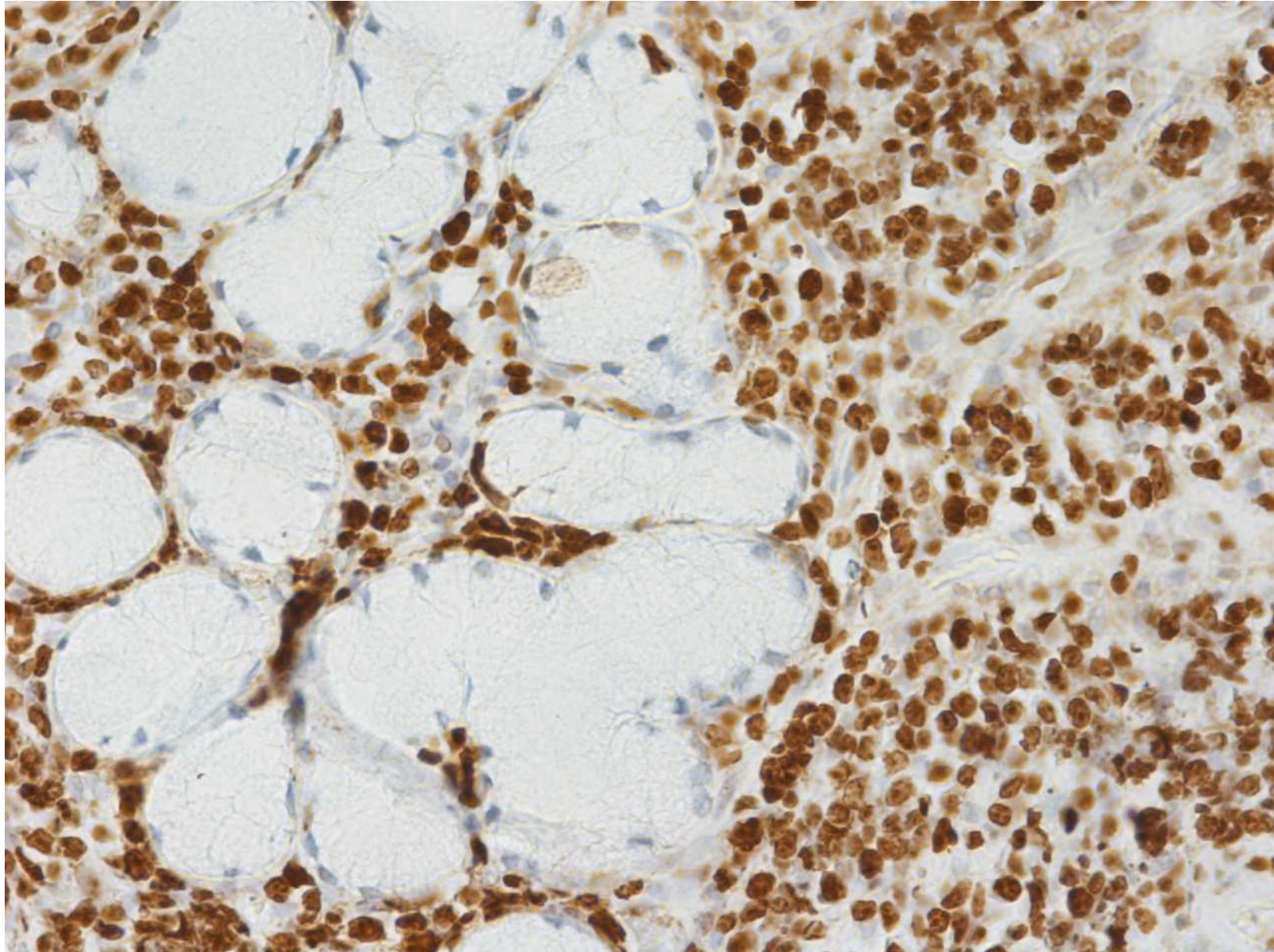
Rutinně:

- Nezávislý prognostický marker karcinomu prsu - nově přímá souvislost s indikací chemoterapie (St. Gallen 2011)
- Pomůcka v diff dg diagnostice preneoplázií (abs. hodnota a zejména lokalizace v rámci epitelu)
- Součást gradingu u neuroendokrinních nádorů (spolu s MI)
- Pomocný znak při dg. Burkittova lymfomu
- Nádory mozku - pomocný znak gradingu (G 1-4)

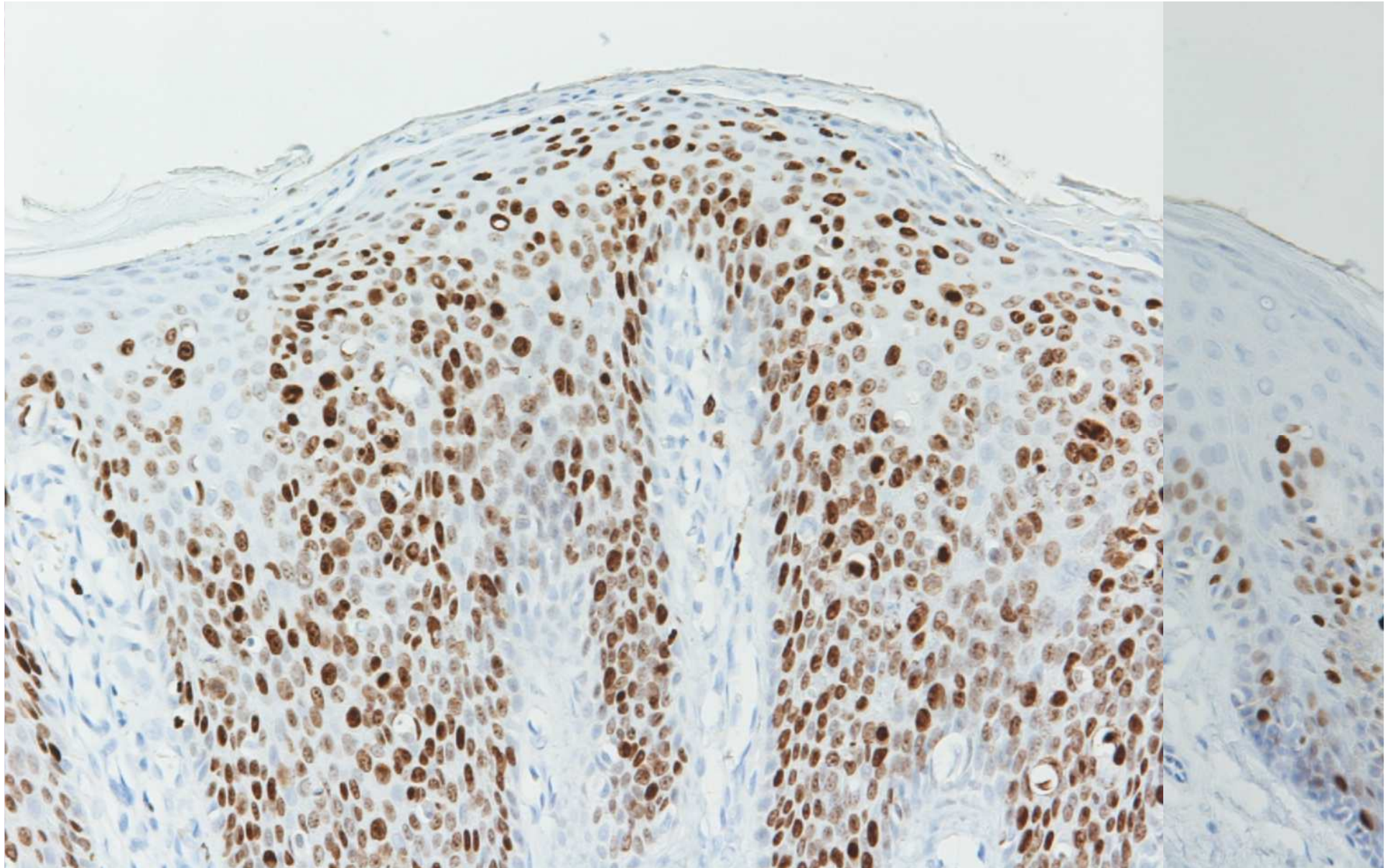
Prokázané další souvislosti:

- Nezávislý prognostický marker karcinomu prostaty
- Statisticky prokazatelný vztah k prognóze u většiny tumorů, většinou není nezávislý.

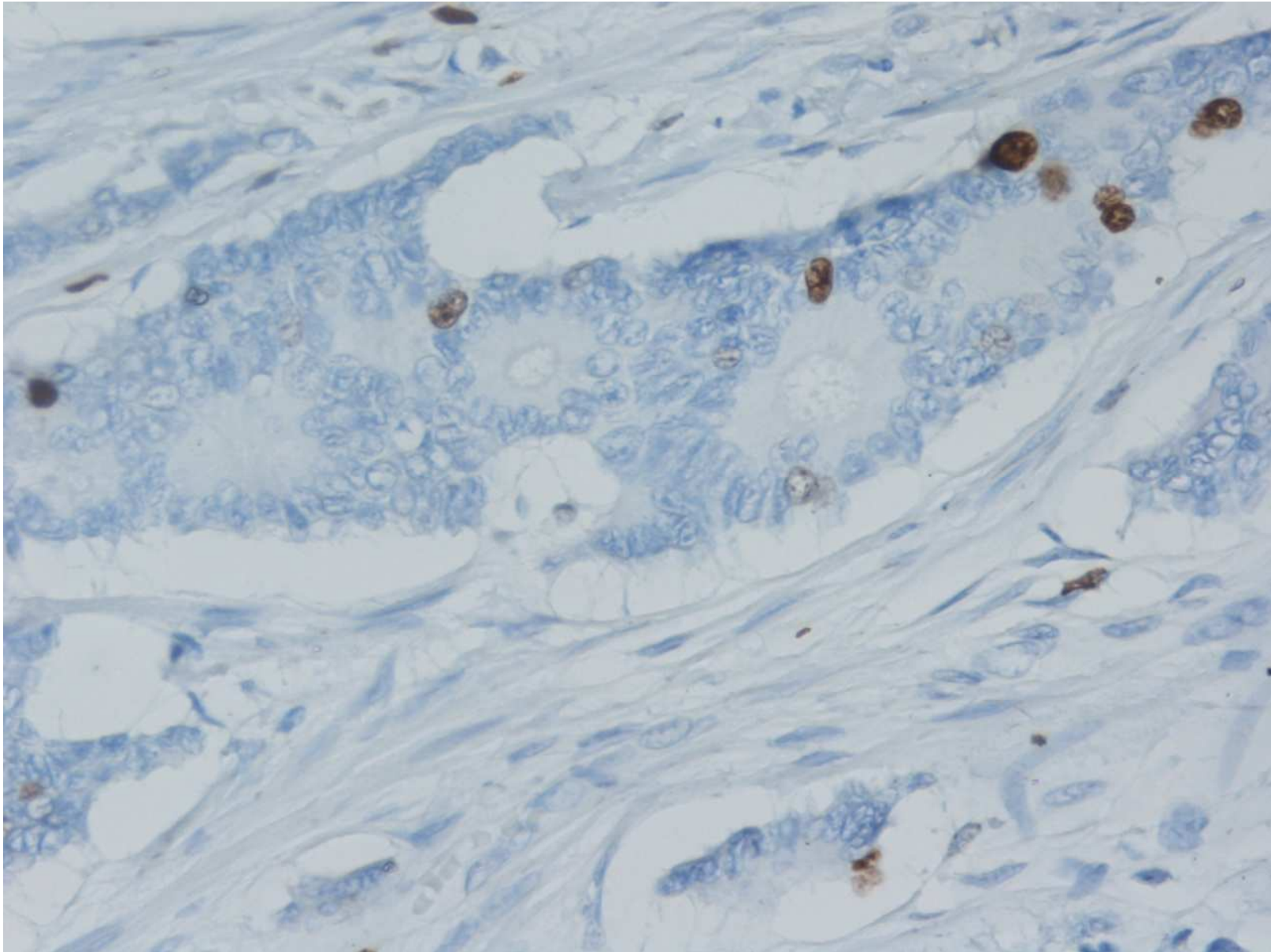
Ki-67: Burkittův lymfom



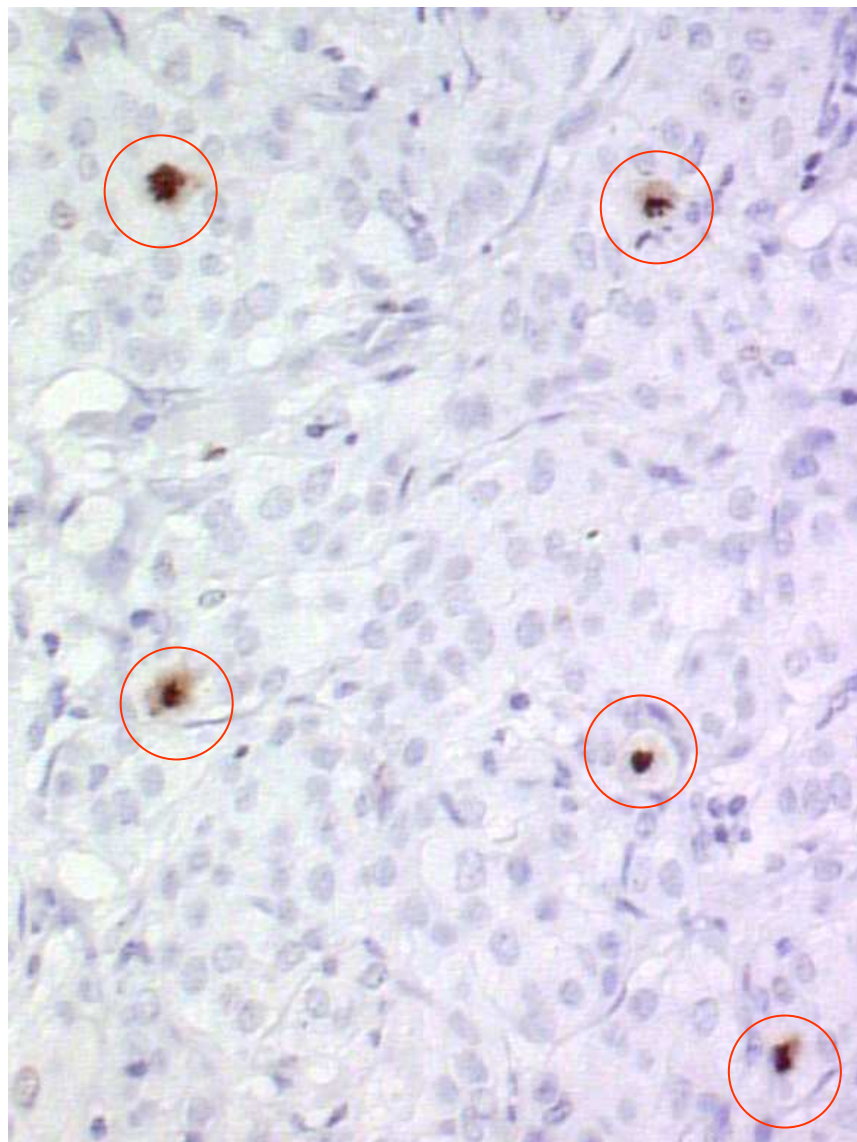
Ki-67: prekanceróza kůže



Ki-67: NET GIT

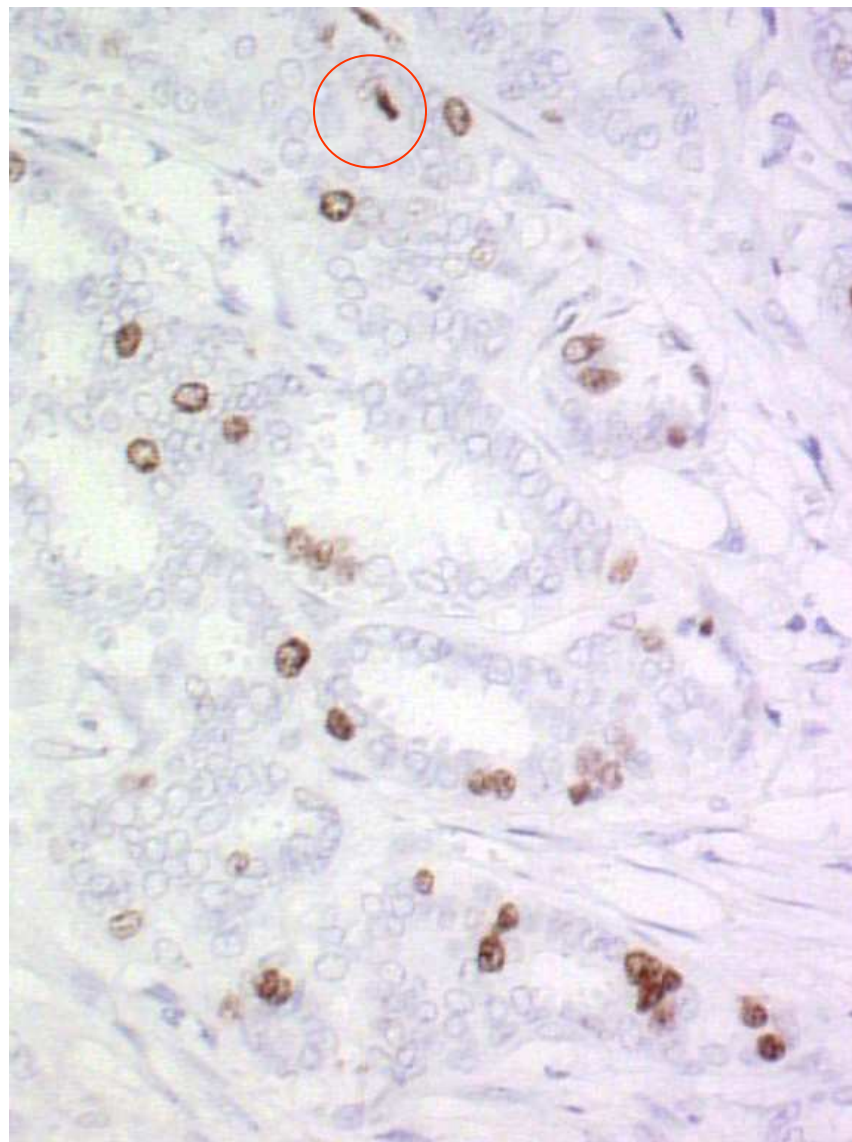


Vysoký mitotický index



Nízký Ki67

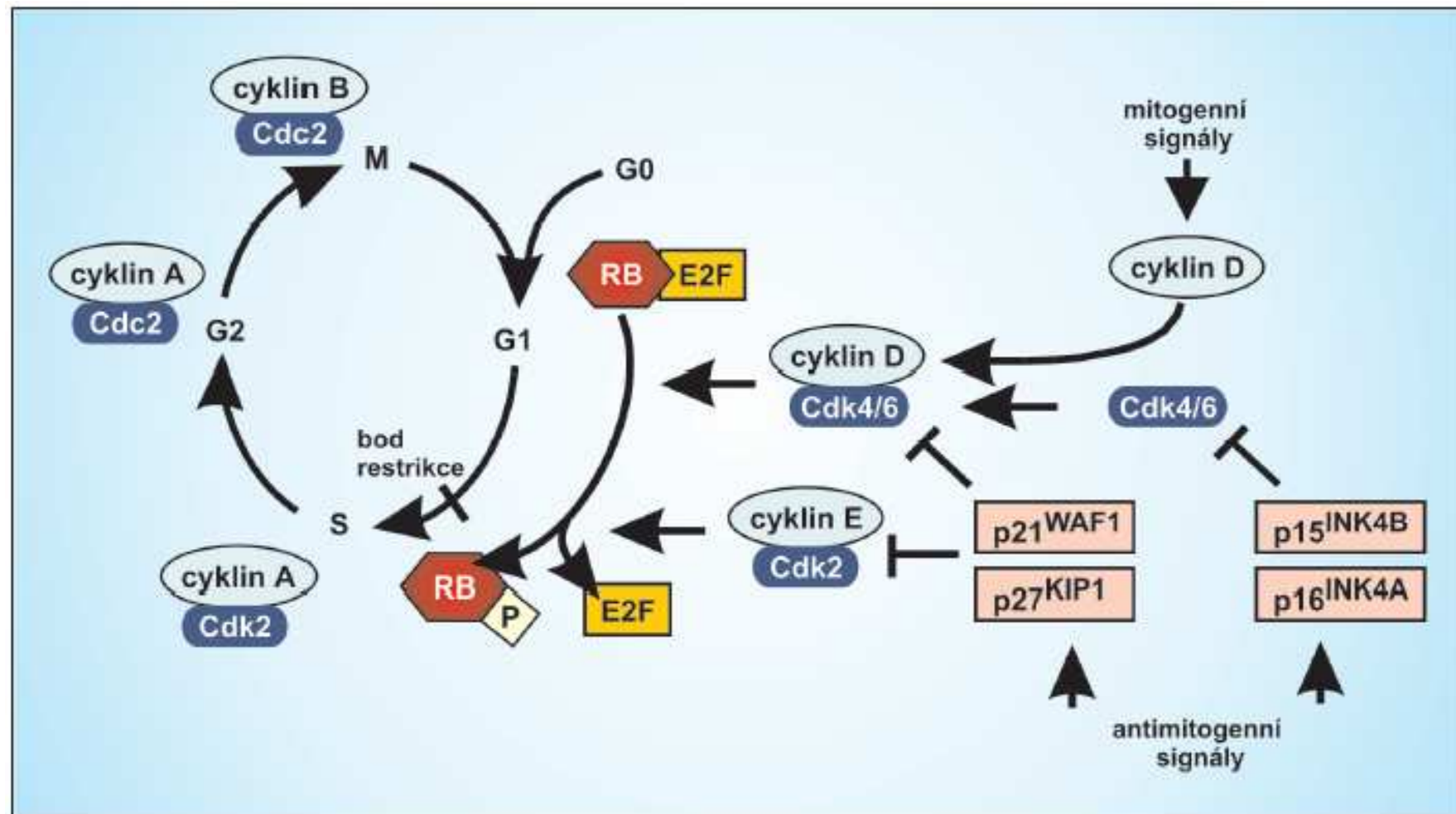
Nízký mitotický index



Vysoký Ki67

Z Úvodní přednášky kurzu Molekulární biologie nádoru:

Regulace buněčného cyklu



Co je poškozeno při transformaci?

- nádorový supresor **pRB** (retinoblastom, ..)
- nádorový supresor **p16^{INK4A}** (melanom, ..)
- **cykliny D**

- „**periferní hráči**“ - součásti mitogenních a antimitogenních drah

Co je poškozeno při transformaci?

- nádorový supresor **pRB** (retinoblastom, ..)
- nádorový supresor **p16^{INK4A}** (melanom, ..)
- **cykliny D**

- „**periferní hráči**“ - součásti mitogenních a antimitogenních drah

Co je poškozeno při transformaci?

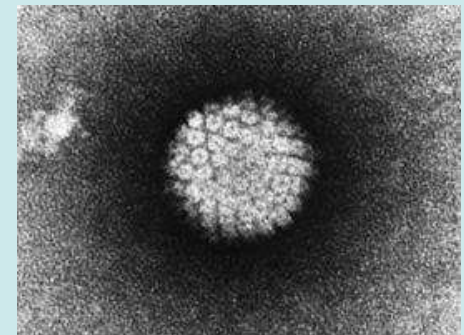
- nádorový supresor **pRB** (retinoblastom, ..)
- nádorový supresor **p16^{INK4A}** (melanom, ..)
- **cykliny D**

- „**periferní hráči**“ - součásti mitogenních a antimitogenních drah

IHC analýza p16: detekce HPV viru

Možnosti detekce HPV viru

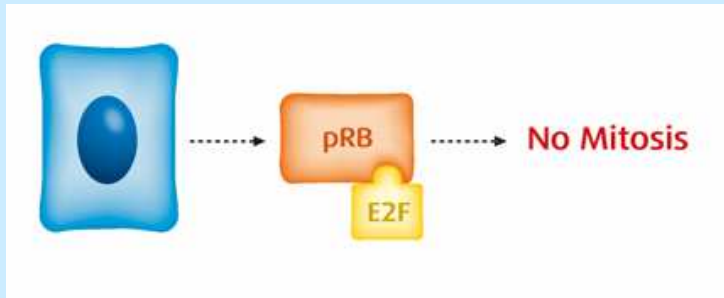
- **NucliSENS EasyQ** amplifikuje a detekuje nukleové kyseliny v reálném čase, je určen ke kvalitativnímu stanovení E6/E7 mRNA 5 HPV ve stěrech hrdla děložního.
- Test **Aptima HPV** cílí HPV E6/E7 mRNA transkripty. Multiplex PCR, kvalitativně detekuje 14 HPV typů v jedné reakční zkumavce.
- **Hybrid Capture II systém (Digene)** je založená na přímé hybridizaci HPV DNA. Buňky cervikálního stěru se převedou do formy buněčné suspenze, narušením buněčných stěn se zpřístupní v buňkách potenciálně přítomná HPV DNA pro hybridizaci specifické skupiny sond a vzniklé hybridy se detekují pomocí specifických protilátek konjugovaných s detekčním enzymem (chemiluminiscenční substrát).
- **FISH**
- **IHC analýza p16**



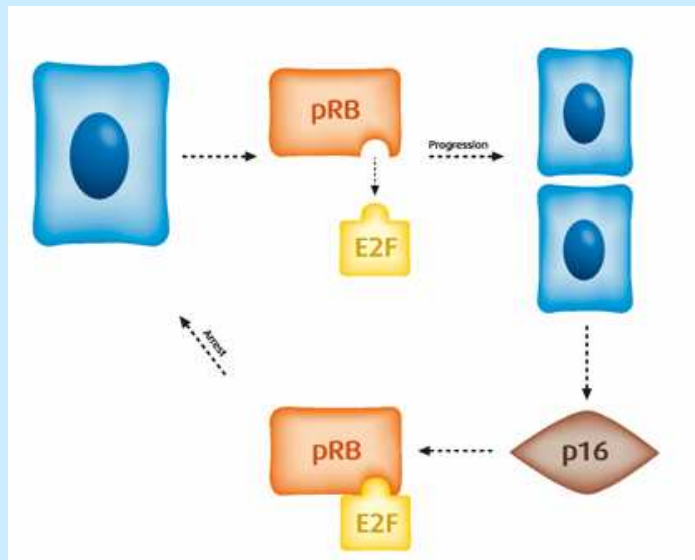
Podíl proteinů E6 a E7 papilomavirů na transformaci buňky

- E6** - inaktivuje p53 (blok G_1 , dep. apoptóza, gen. stabilita)
- interaguje s p300/CBP (narušení homeostáze)
 - aktivuje expresi hTERT (aktivace telomerázy)
 - inaktivuje p16^{ink} (narušení udržování klidového stádia)
 - interaguje s Bak (inhibice apoptózy)
 - interaguje s E6BP/ERC-55 (inhibice terminální diferenciace)
 - indukuje degradaci hDlg (a další interakce s proteiny obsahujícími vazebný motiv PDZ) (změna morfologie, získání invazivního charakteru)
- E7** - váže se na RB (uvolnění TF E2F)
- inaktivace p21^{Cip} a p27^{Kip} (rozpojení: diferenciace - proliferace)
 - ruší inhibiční působení TGF- β na růst buněk
 - způsobuje tvorbu násobných centrozómů

Úloha p16 v regulaci buněčného cyklu

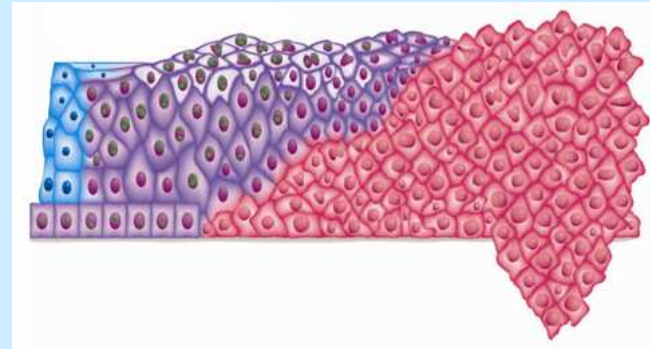
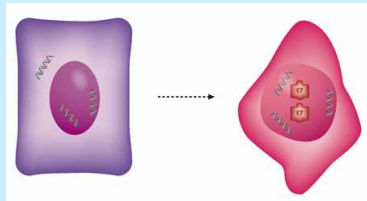


Normální regulace zastavení buněčného cyklu: vazbou pRB s E2F je znemožněna transkripce genů nutných pro progresi b.c. a proliferaci, včetně genu pro p16.

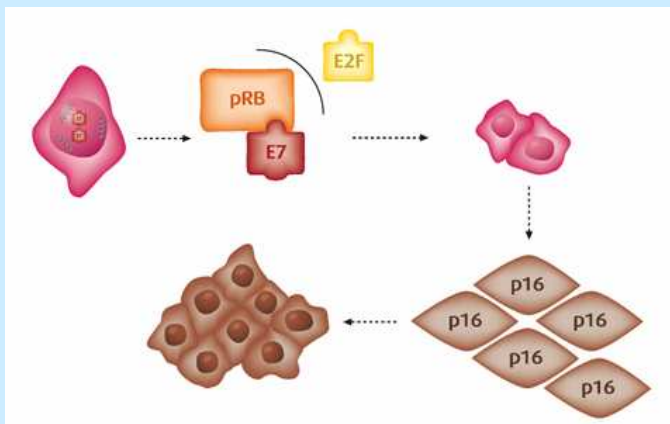


Normální regulace progrese buněčného cyklu: uvolnění E2F zahajuje transkripci mnoha cílových genů včetně genu pro p16, který stimuluje interakci E2F a pRB, což navodí zastavení buněčného cyklu (= zpětnovazební klička)

Úloha E7/p16 v buněčné transformaci



Proteiny E6 a E7 viru HPV zprostředkovávají buněčnou transformaci; transformované buňky rychle proliferují, mají porušenou diferenciaci a jsou schopné invadovat okolní tkáň.

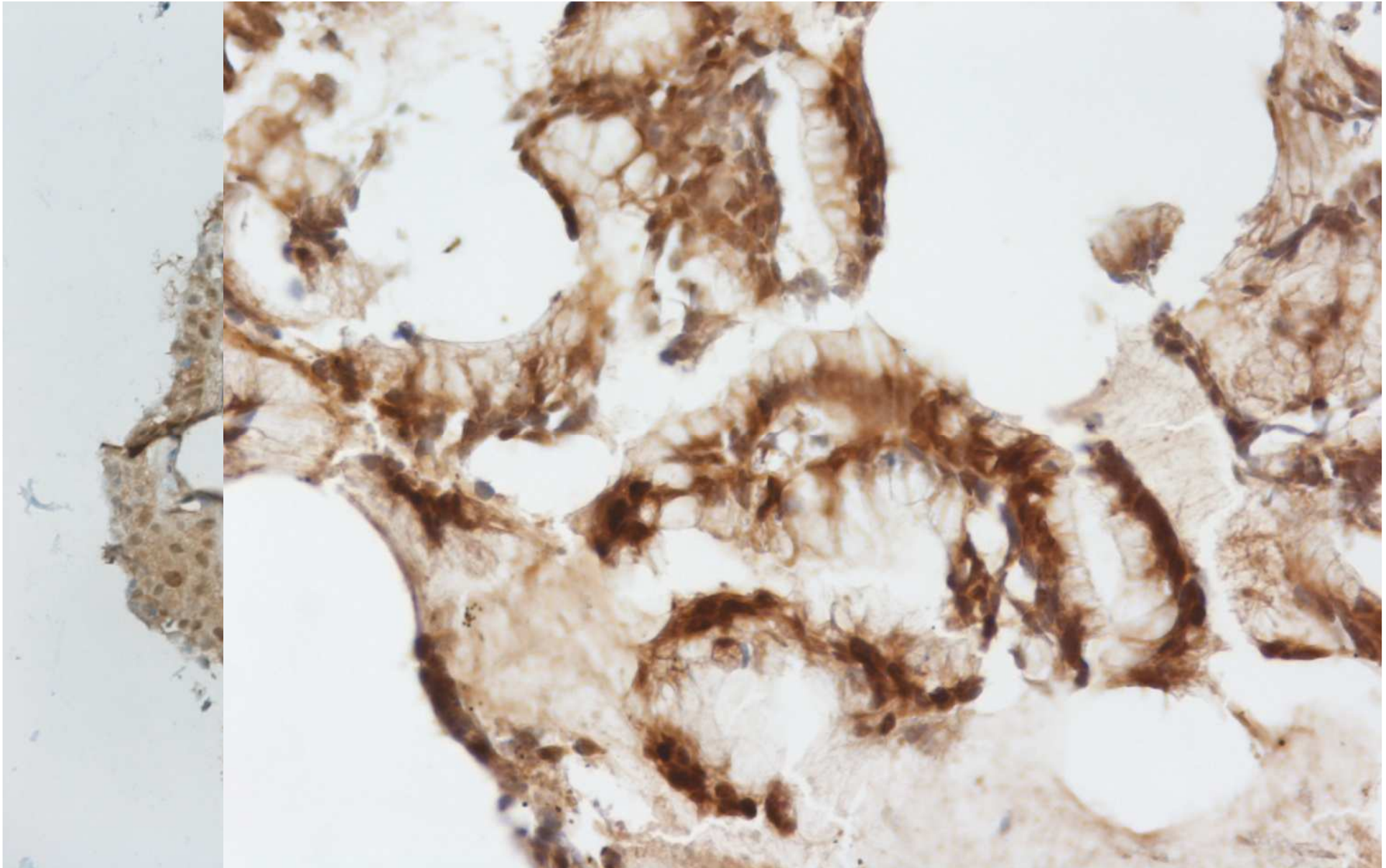


V transformovaných buňkách protein E7 poškozuje vazbu pRB a E2F. To způsobuje deregulaci buněčného cyklu a vysokou expresi proteinu p16, který je detekovatelný imunohistochemicky.

Výhody IHC stanovení p16

- Nádory čípku jsou způsobeny trvalou infekcí vysoce rizikových HPV virů (HR-HPV).
- Většina infekcí HR-HPV je přechodných a mizí typicky během 6 až 12 měsíců. Jen některé infekce přetrvávají a mohou způsobit onkogenní transformaci a podílet se na vývoji karcinomu děložního čípku.
- Vysoká expresie p16 je spojena s transformací a tedy s trvalou infekcí HR-HPV. IHC detekce p16 tak poukazuje na trvalou infekci HR-HPV, zatímco přímá detekce HR-HPV nerozliší přechodnou infekci od infekce přetrvávající.

Průkaz p16- CIN II a adenoca



Co je poškozeno při transformaci?

- nádorový supresor **pRB** (retinoblastom, ..)
 - nádorový supresor **p16^{INK4A}** (melanom, ..)
 - **cykliny D**
-
- „**periferní hráči**“ - součásti mitogenních a antimitogenních drah

Cyklin D1

Amplifikace a/nebo zvýšená exprese cyklinu D1

- téměř 50% nádorů prsu
- asi 1/3 případů dlaždicobuněčného karcinomu hlavy a krku (HNSCC) a jícnu
- karcinomy plic

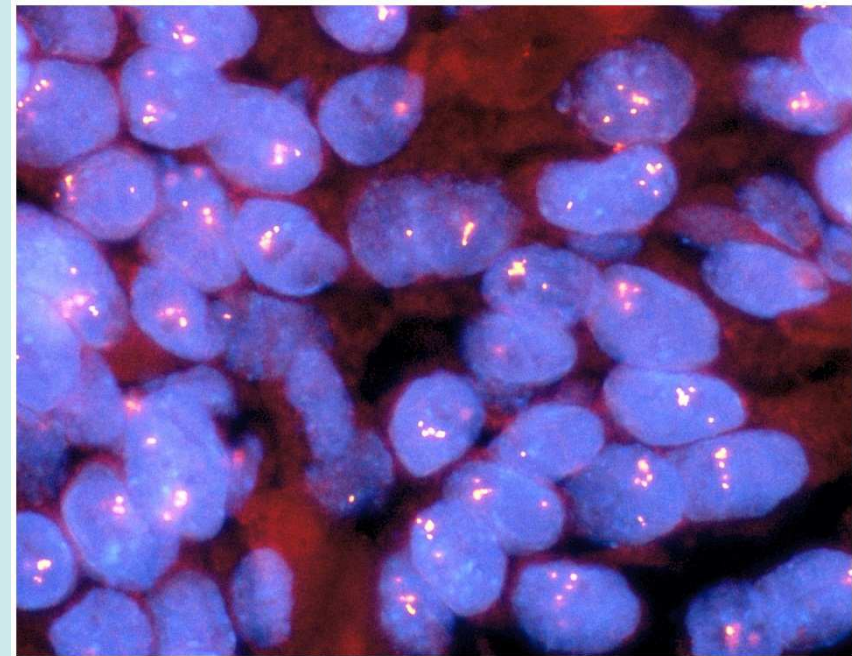
Chromozomální translokace zahrnující cyklin D

- u parathyroidních adenomů
- lymfomů, např. MCL: t(11;14)

Amplifikace genu pro cyklin D1

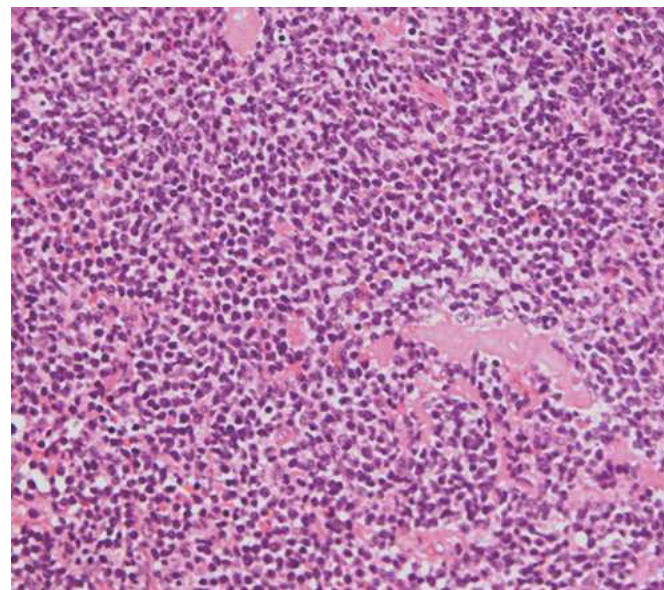
- Asi 1/3 případů dlaždicobuněčného karcinomu hlavy a krku (HNSCC) má amplifikaci *CCND1*, tomu odpovídající zvýšenou expresi cyklinu D1 a tím rozvrácenou regulaci fosforylace pRB.
- Příklad detekce amplifikace genu *CCND1* těchto nádorů metodou **FISH**. Zde 3 až 5 kopií na buňku.

- Amplifikace nebo zvýšená exprese cyklinu D1 u téměř 50% karcinomů prsu (cyklin D1 v této tkáni má i funkci nesouvisející s CDK: váže se na estrogenový receptor a způsobuje jeho aktivaci nezávisle na hormonu)

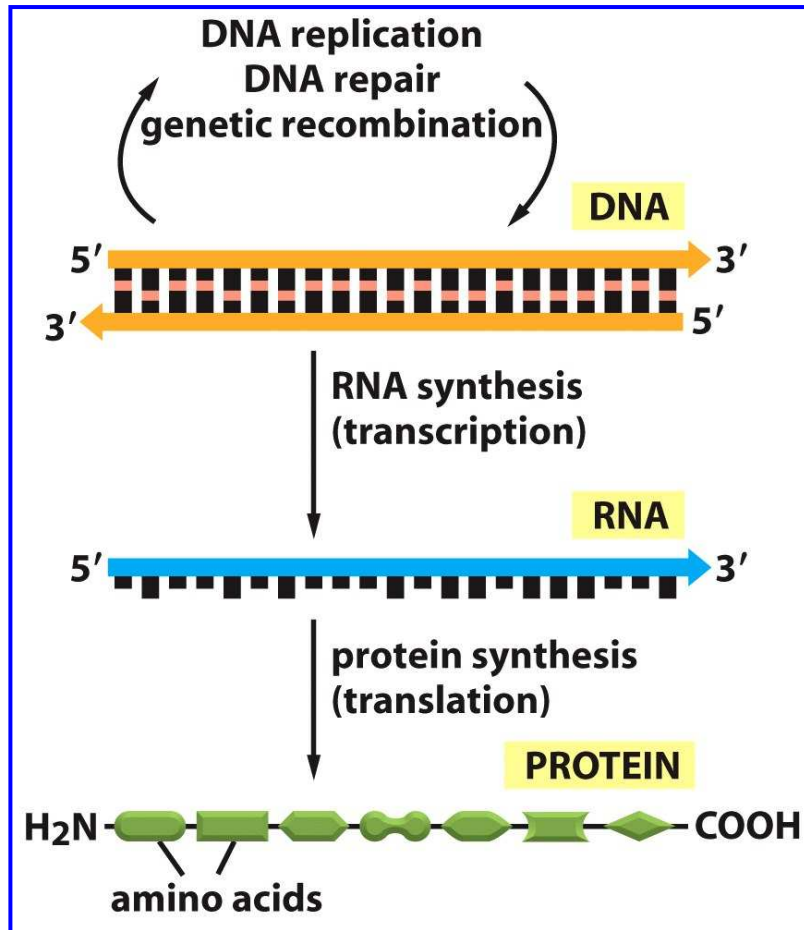


Cyklin D1 a lymfom z buněk plášťové zóny (MCL)

Typickým znakem 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 vysoká exprese cyklinu D1.



Metody užívané k analýze statutu cyklinu D1 u MCL



Detekce translokace
t(11;14) (DNA)
FISH, (PCR)

Detekce vysoké hladiny
mRNA cyklinu D1
kompetitivní RT-PCR,
(kvantitativní RT-PCR v
reálném čase)

Detekce vysoké hladiny
proteinu cyklinu D1
IHC, imunobloting

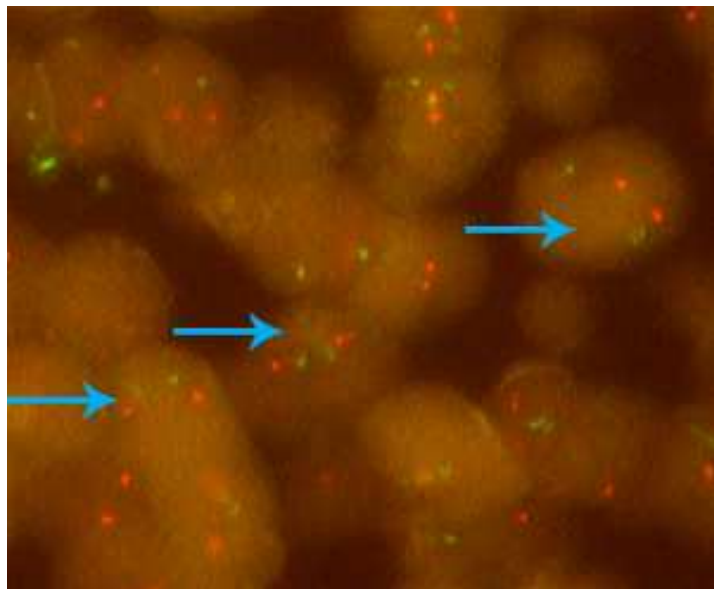
1. Detekce translokace t(11;14) metodou FISH

Způsob hodnocení dle *Remstein et al. 2000*.

negativní: 2R2G, 1F1R1G

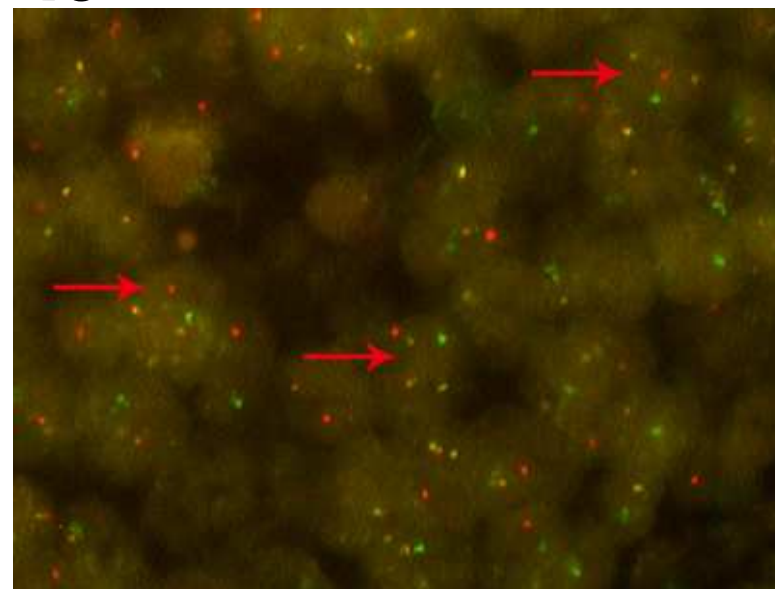
pozitivní: 2F1R1G, 1F2R2G, 1F1R2G, 1F2R1G

25B



—→ negativní jádra

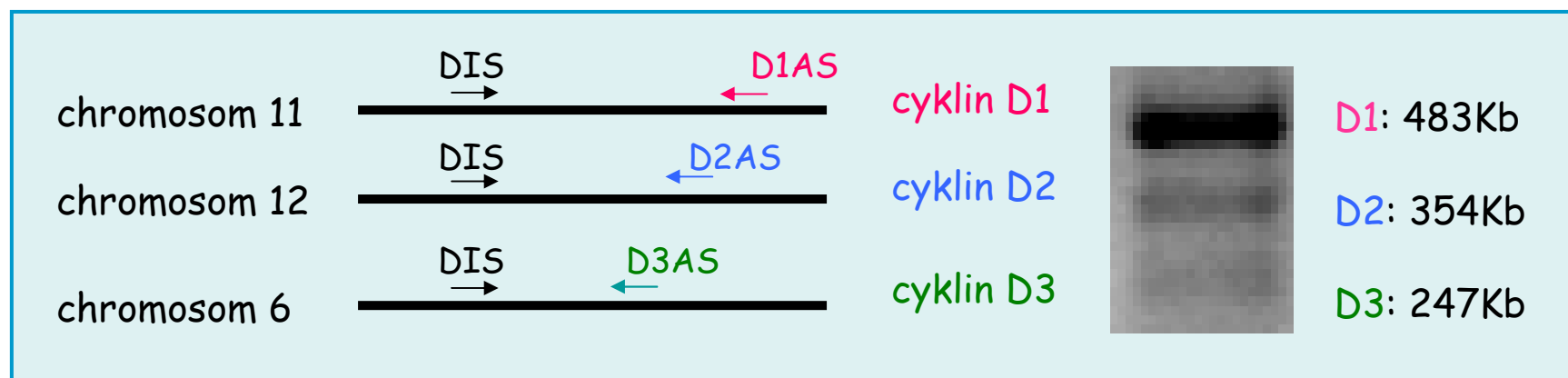
18



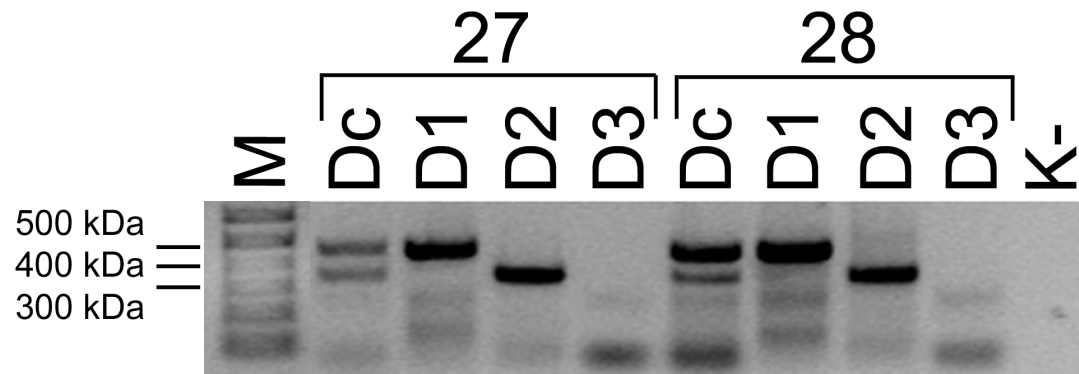
—→ pozitivní jádra

2. Analýza hladiny mRNA cyklinu D1 metodou kompetitivní RT-PCR

- kompetice mezi geny pro cyklin D1 (CH 11), D2 (CH 12) a D3 (CH 6)
- jeden společný primer, druhý primer vždy genově specifický
- odlišná velikost produktů

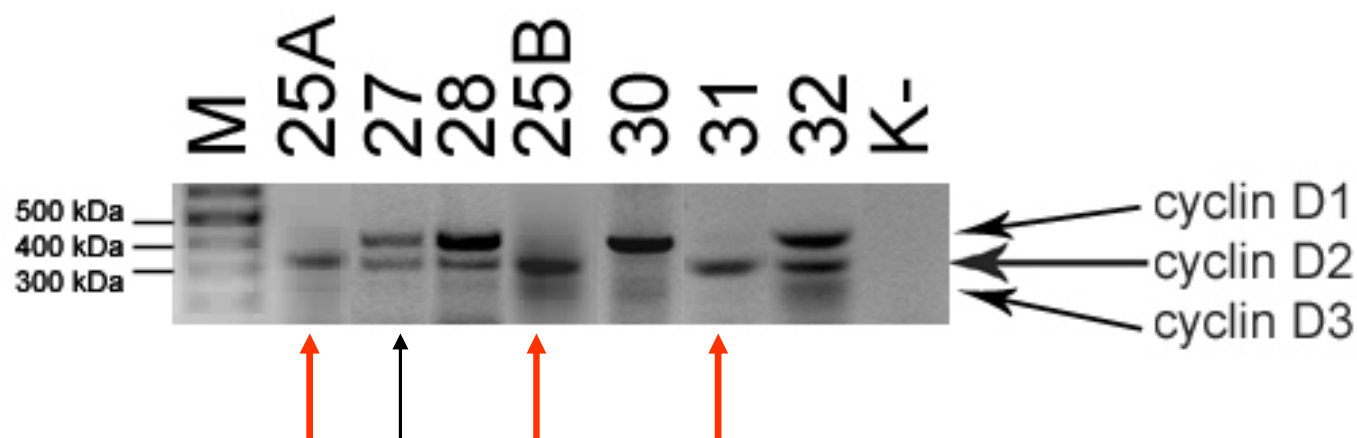


Analýza hladiny mRNA cyklinu D1 metodou kompetitivní RT-PCR



- **M:** standardy molekulových hmotností
- **D1, D2, D3:** PCR s jednotlivými primery specifickými pro označený cyklin D
- **Dc:** kompetitivní PCR se všemi 3 primery
- **K-:** negativní kontrola (bez templátu)

Analýza hladiny mRNA cyklinu D1 metodou kompetitivní RT-PCR



- **M**: standardy molekulových hmotností
- **K-**: negativní kontrola (bez templátu)

3. Analýza hladiny mRNA cyklinu D1 metodou real-time PCR

- Obecně význam sledování molekulárních markerů z důvodů: diagnostických, prognostických a prediktivních. Plus: sledování chování, průběhu, dynamiky onemocnění.

Sledování hladiny mRNA cyklinu D1 v kostní dřeni (BM) pacientů s MCL (ÚPA 2. LF UK a FN Motol; Břízová a Kodet):

- sledování zbytkové nemoci (RD)
- PCR negativita v BM je spojena s dlouhodobější klinickou remisí a naopak molekulární relaps (tj. PCR pozitivita) je následován klinickým relapsem
- Molekulární monitorování po transplantaci BM vypovídá o klinickém výsledku (outcome)
- Hladina mRNA koreluje se statutem onemocnění (stanovení dg, remise, parciální remise, relaps)

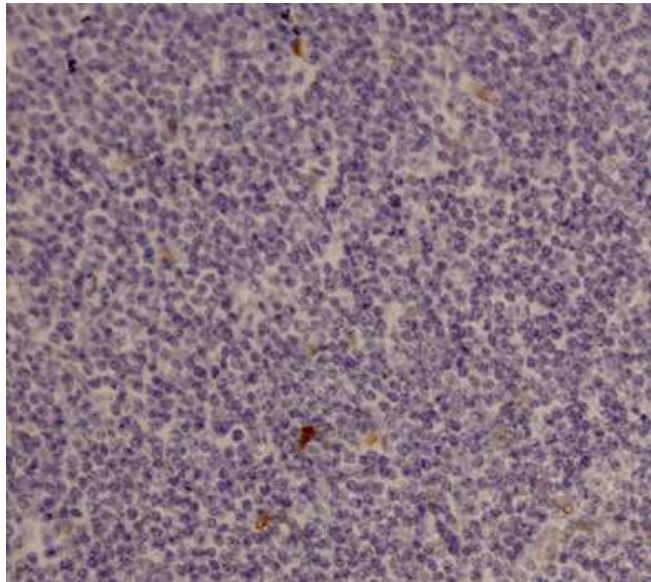
Analýza hladiny mRNA cyklinu D1 metodou real-time PCR

- Zatím spíše experimentální uspořádání: neexistuje standardní protokol pro „timing“ odebrání aspirátu BM, specifických intervalů během léčby.
- Limitace pro odebrání aspirátů BM v době remise z etických důvodů...
- Lze odebrat vzorky po zahájení léčby - jako kontrola odezvy na léčbu a v době relapsu.

3. Analýza hladiny **proteinu** cyklinu D1

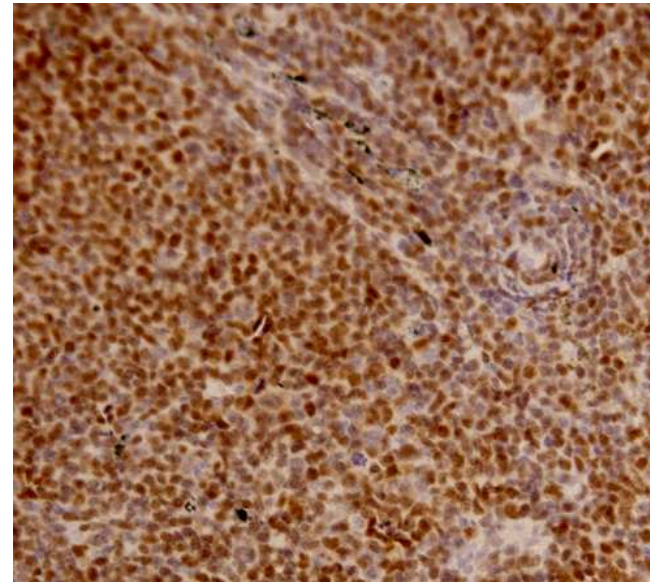
Imunohistochemická detekce cyklinu
D1 s využitím protilátky **SP4**

25B



negativní 0

30



pozitivní 3+

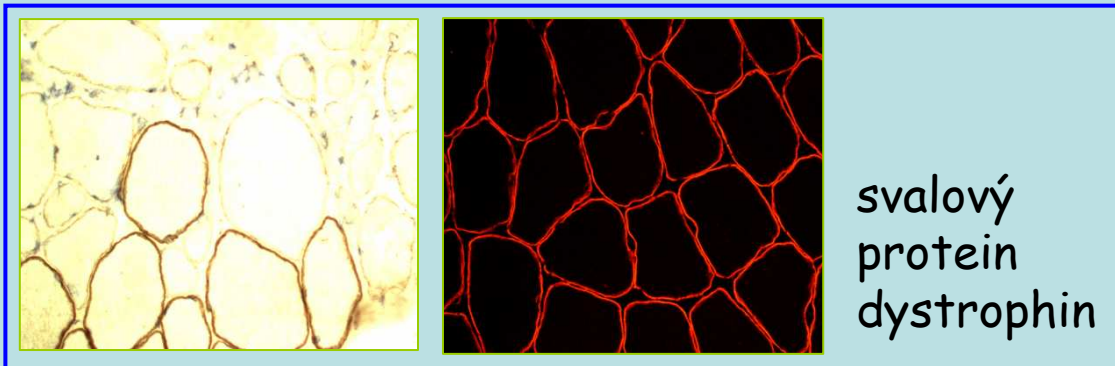
Porovnání IHC a IB

Imunobloting

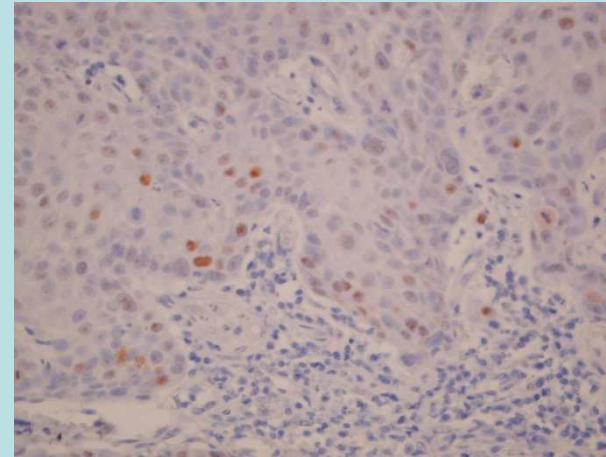
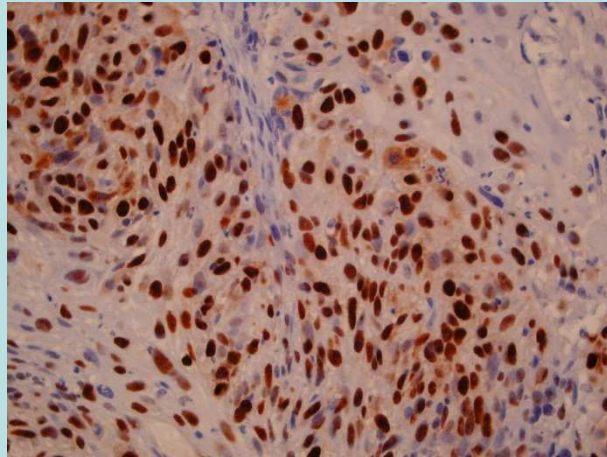
- detekce aberantních (např. zkrácených) forem proteinů / hladiny proteinů
- výchozí materiál: čerstvě odebraná/zamražená tkáň

Imunohistochemická analýza

- přítomnost /a hladina proteinu
- lokalizace proteinu v buňce (jádro, cytoplasma, vazba na membránu)
- počet/podíl pozitivních buněk, případně semikvantitativní stanovení
- výchozí materiál: formol-parafinový bloček

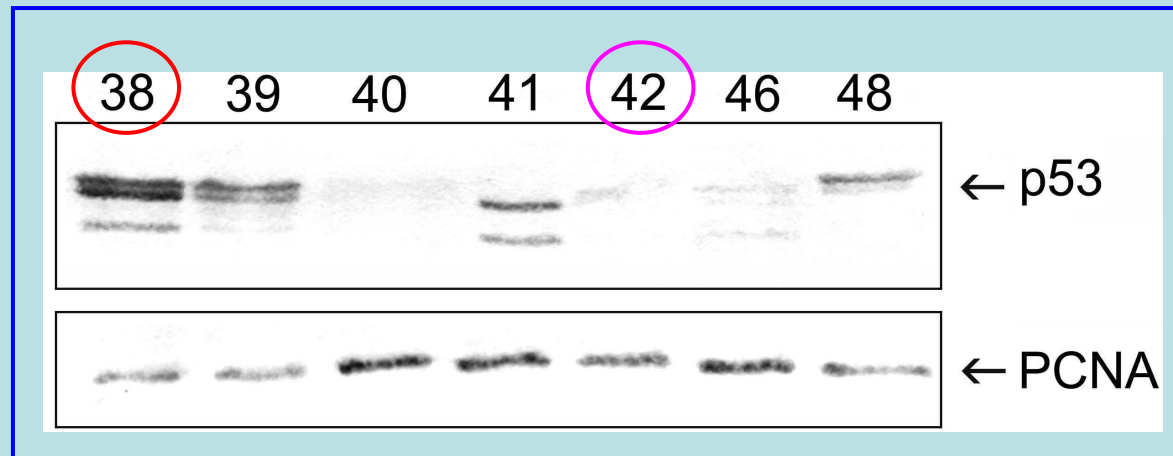


Porovnání IHC a IB

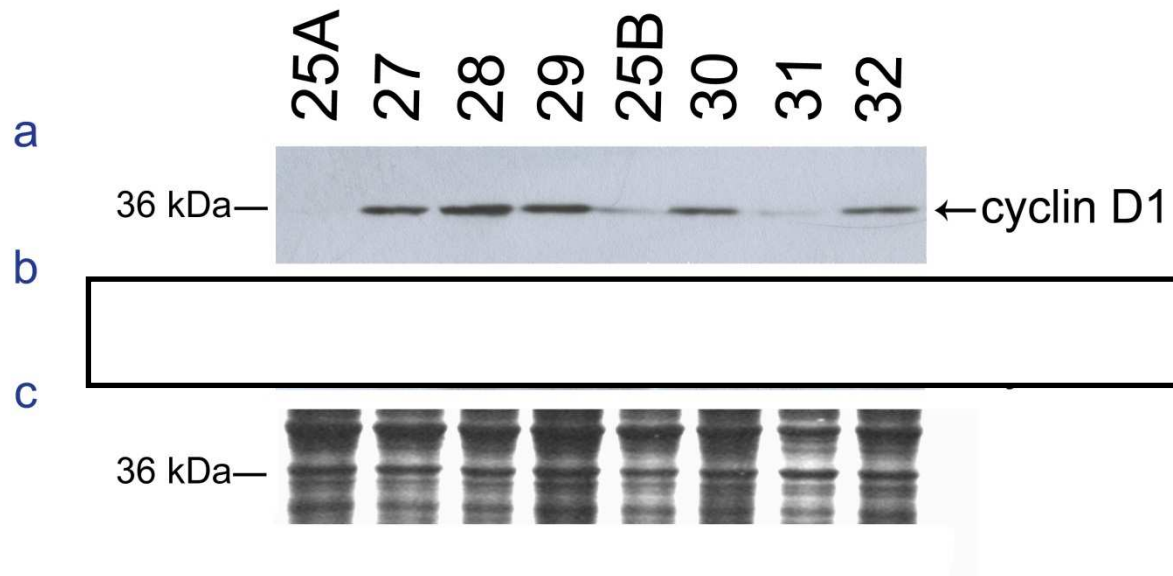


#38: 85% pozitivních jader

#42: 30% pozitivních jader



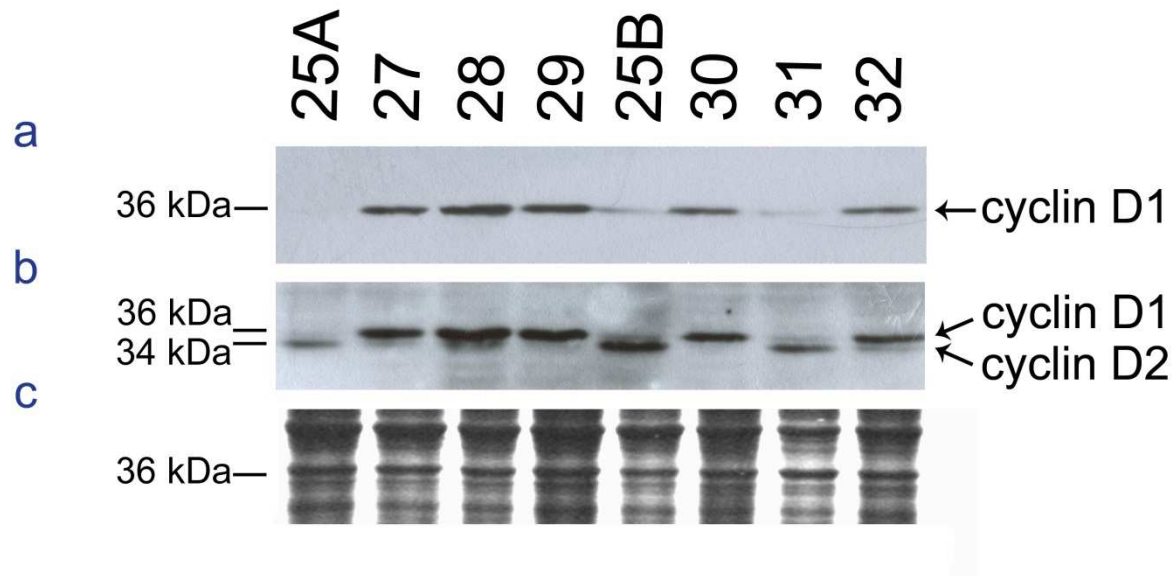
Detekce cyklinu D1 imunoblotingem s využitím protilátky SP4 a



(a) SP4

(c) celková frakce proteinů - obarveno Coomassie Brilliant Blue

Detekce cyklinu D1 imunoblotingem s využitím protilátky SP4 a CD1.1



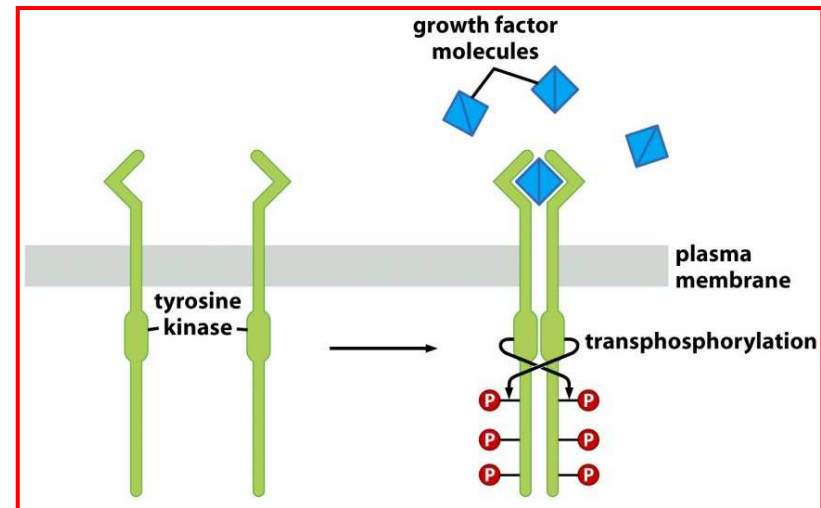
- (a) SP4
- (b) CD1.1
- (c) celková frakce proteinů - obarveno Coomassie Brilliant Blue

Co je poškozeno při transformaci?

- nádorový supresor **pRB** (retinoblastom, ..)
- nádorový supresor **p16^{INK4A}** (melanom, ..)
- **cykliny D**

- **„periferní hráči“** - součásti mitogenních a antimitogenních drah

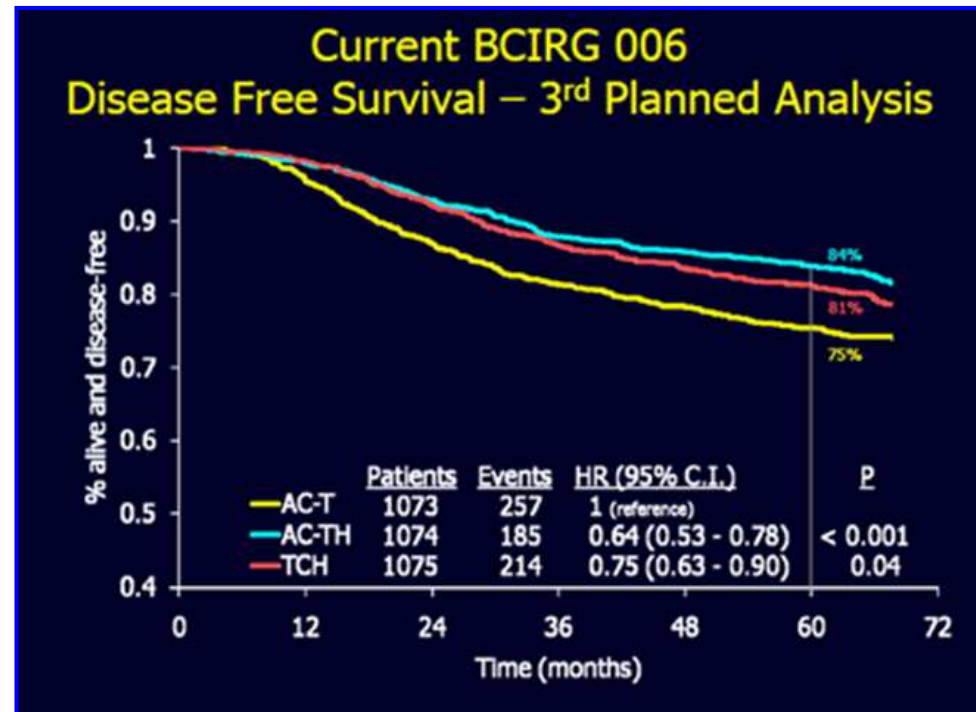
c-erbB2/HER2/neu

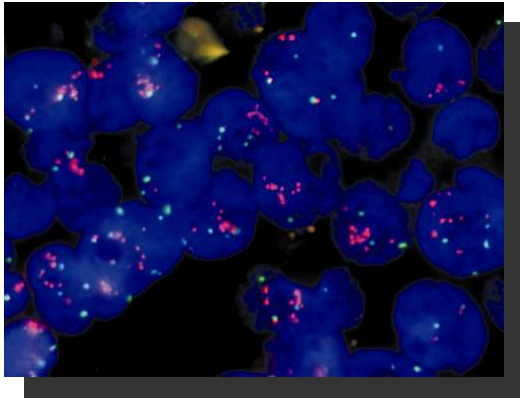


- transmembránový tyrozinkinázový receptor z rodiny EGFR (HER 1 - 4)
- aktivuje buněčnou proliferaci (i přežití a diferenciaci)
- amplifikace *c-erbB2* detekována u adenokarcinomů [prsu](#), [žaludku](#), střeva, vaječníků, slinných žláz

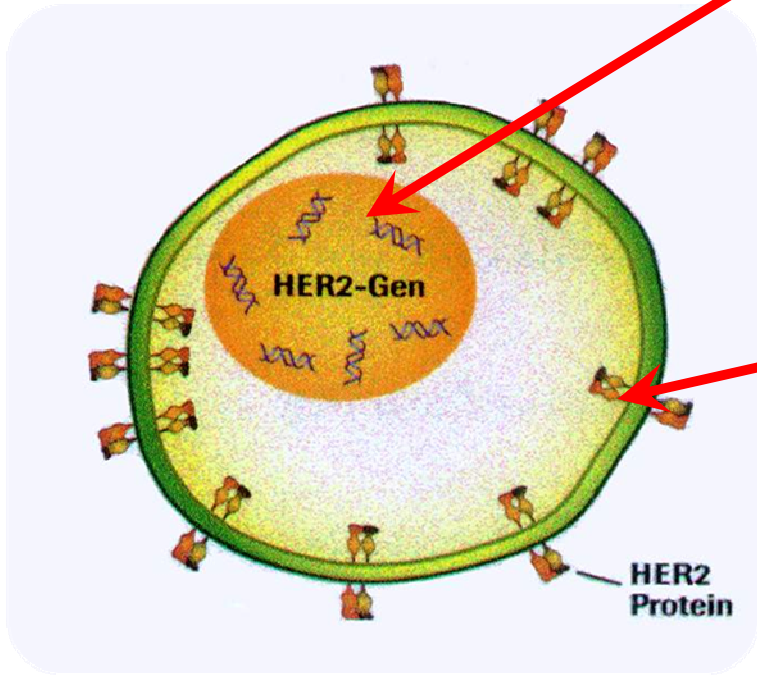
c-erbB2/HER2/neu a karcinomy prsu a vaječníků

- amplifikace c-erbB2 a zvýšená exprese c-erbB2 (**prognostický faktor**) koreluje s horší prognózou a rezistencí k terapii
- amplifikace HER2/neu též **prediktivním faktorem**: pacientky s amplifikací HER2/neu podstupují radikálnější terapii a mohou být léčeny **Herceptinem** - monoklonální protilátkou rozpoznávající protein HER2/neu

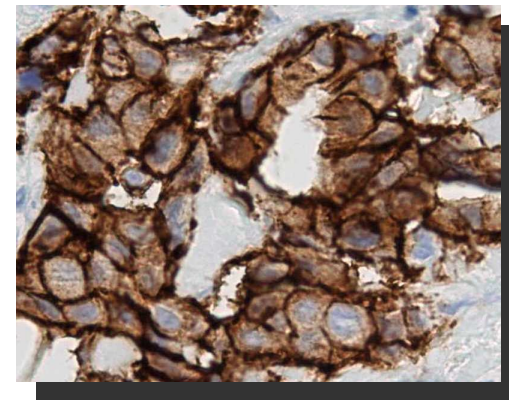




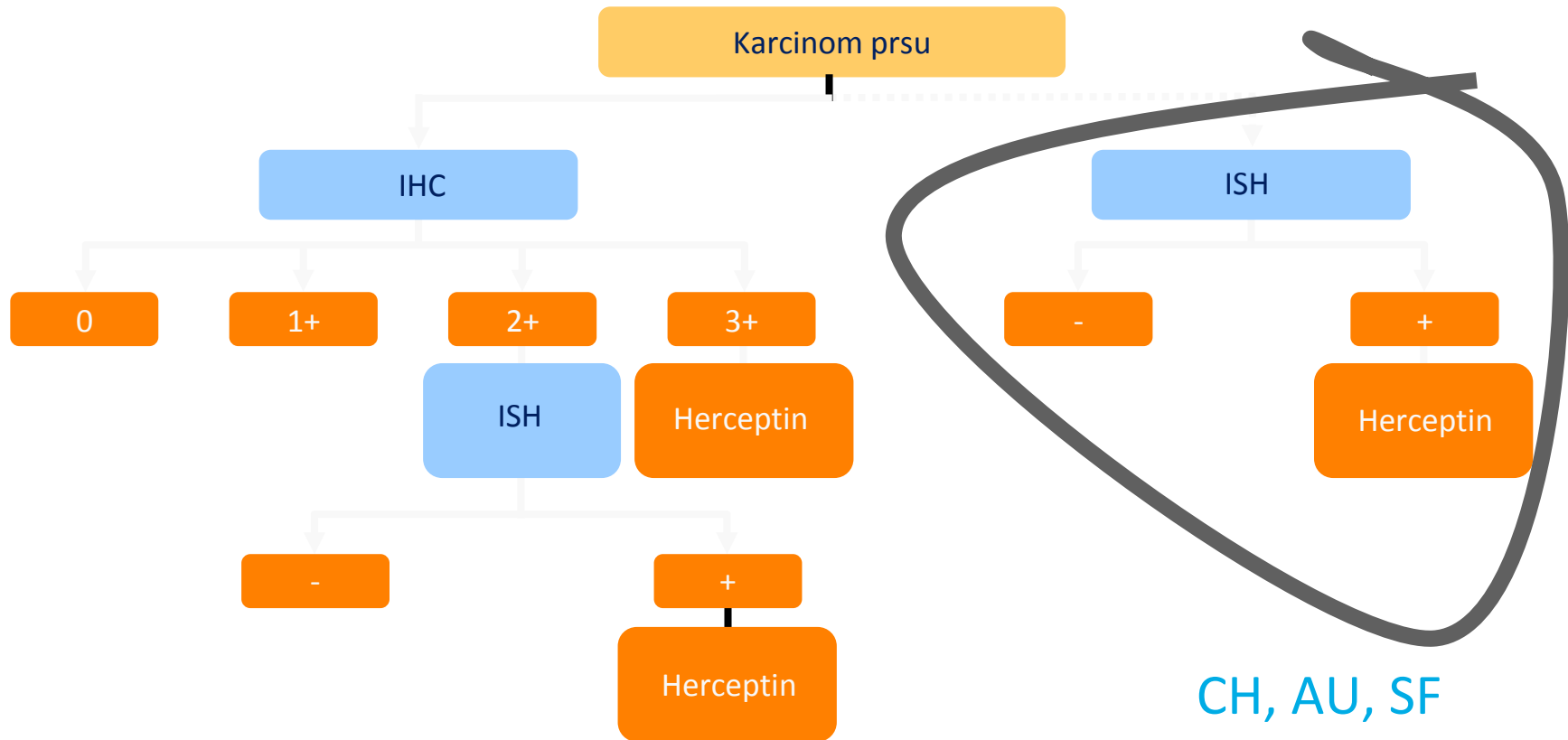
ISH (in-situ hybridizace)



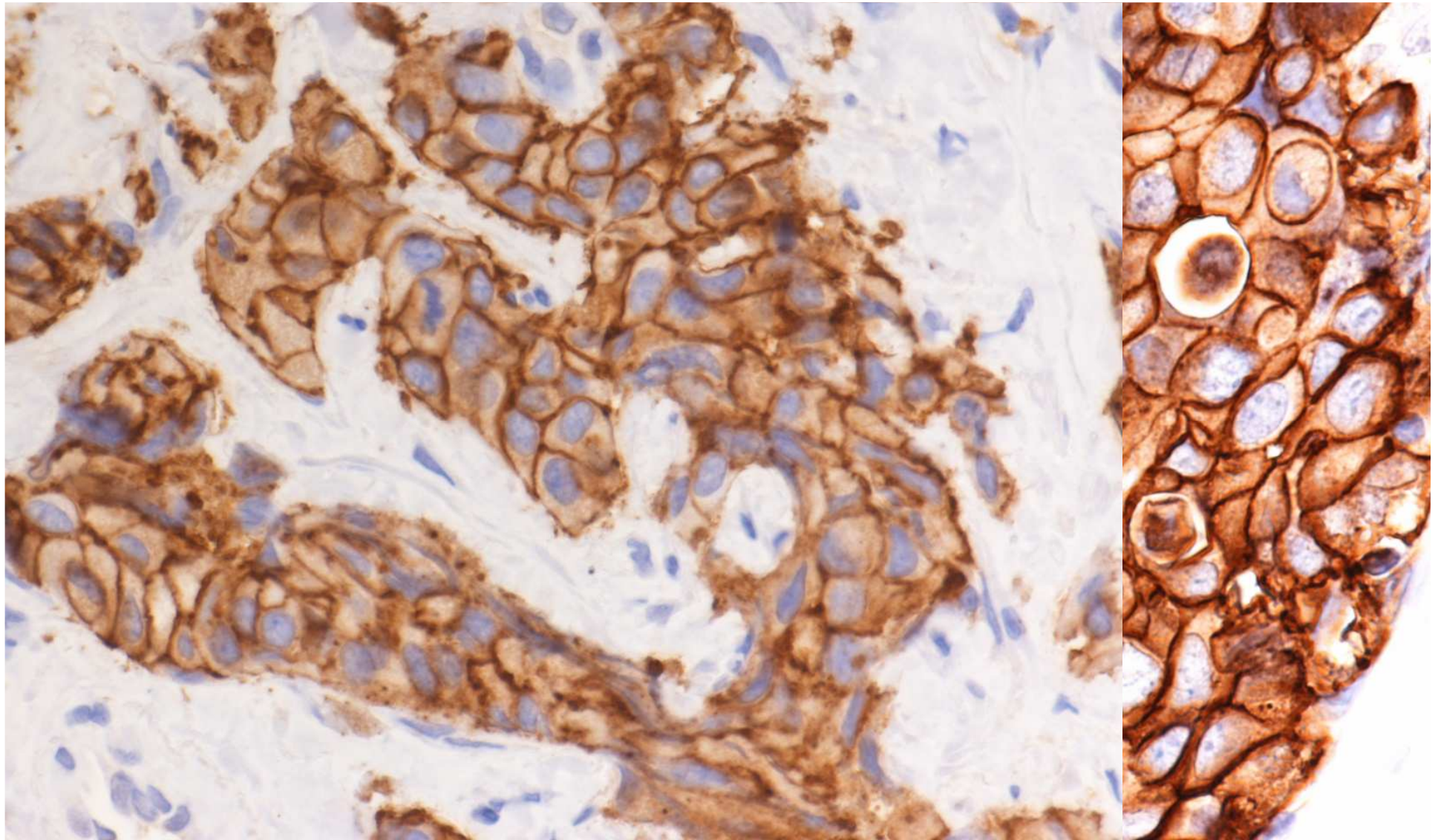
IHC (imunohistochemie)



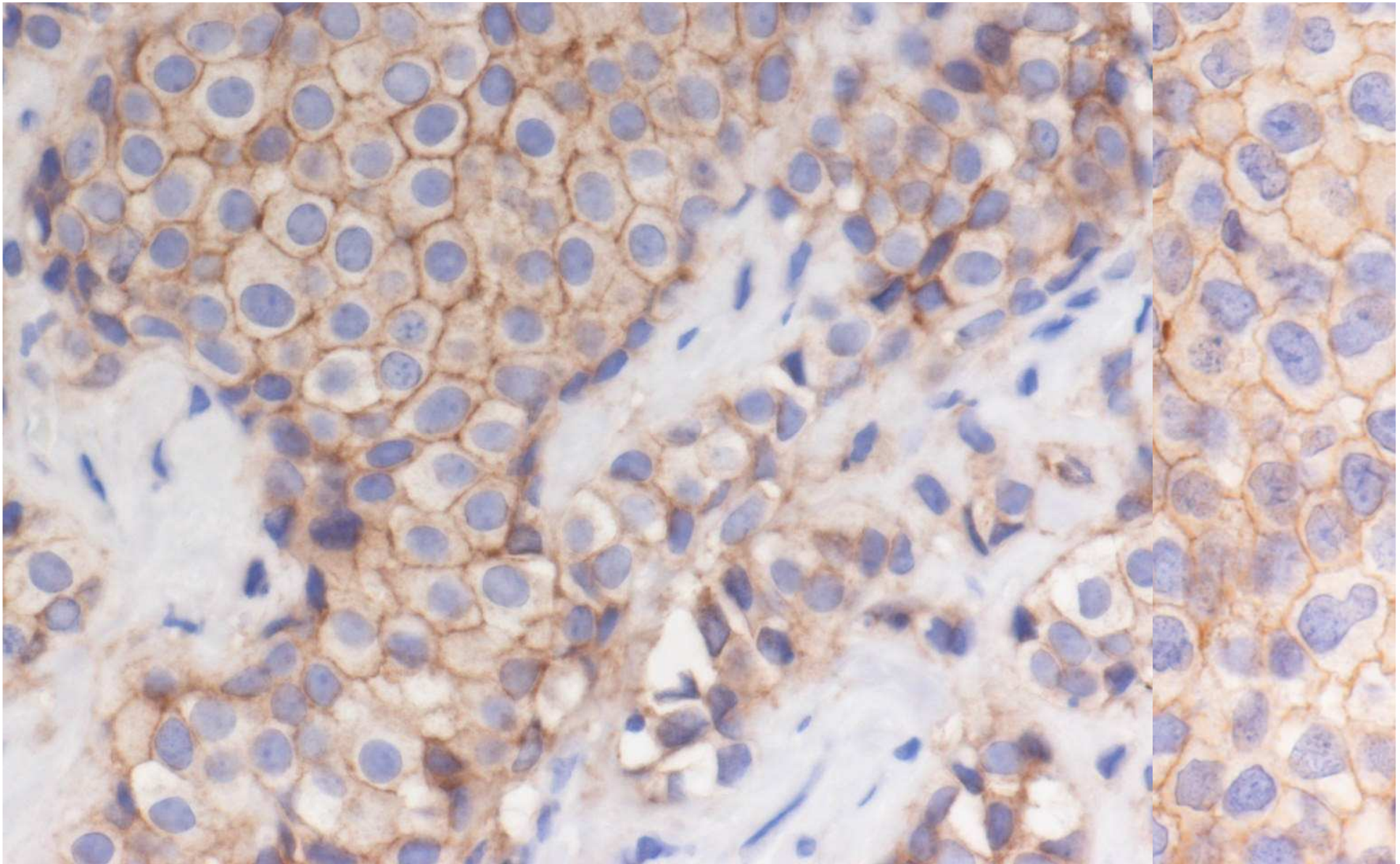
Algoritmus testování HER2



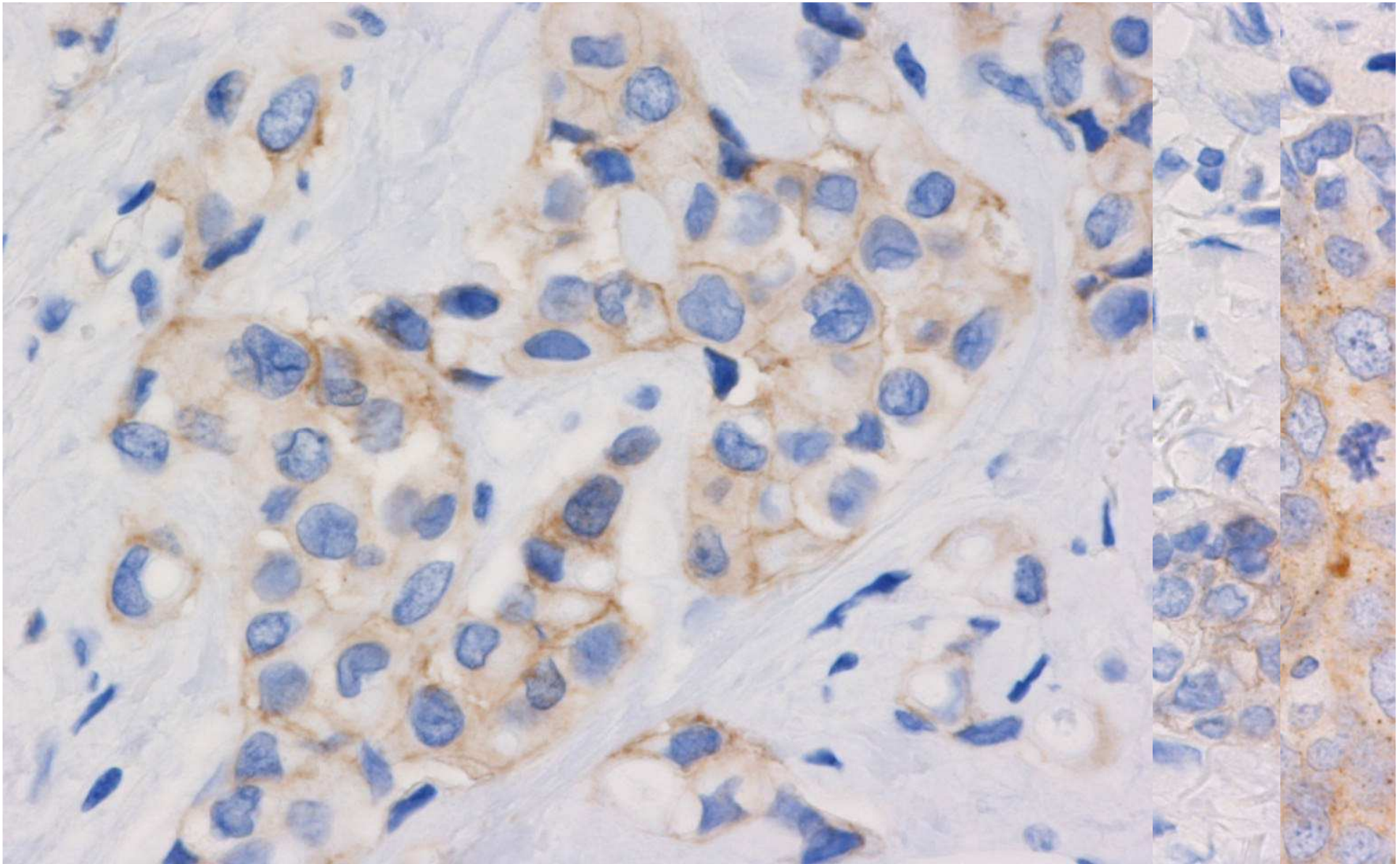
- IHC3+ a/nebo ISH+ stanovené validní certifikovanou metodou v RL
- ISH - FISH, SISH, nebo CISH



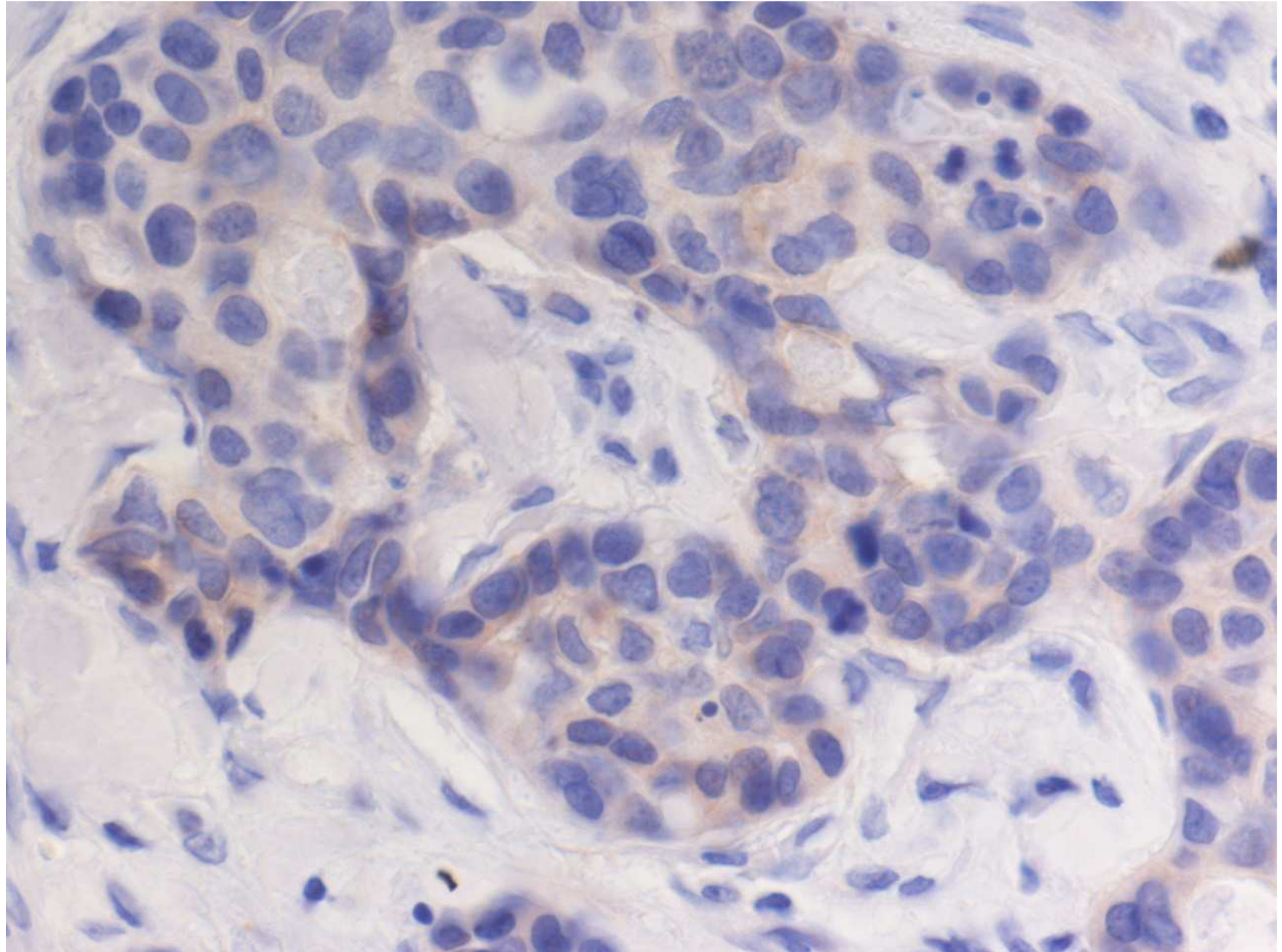
- **3+ (vysoce pozitivní) u případů, kde více než 30% buněk vykazuje silnou kompletní (kontinuální) membránovou pozitivitu,**



- **2+ (pozitivní) u případů, kde více než 30% buněk vykazuje slabou nebo střední kompletní (kontinuální) membránovou pozitivitu,**



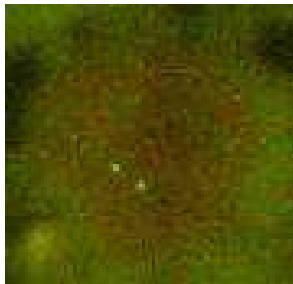
- **1+ (negativní) u případů, kde více než 10% buněk vykazuje nekompletní (diskontinuální) membránovou pozitivitu,**



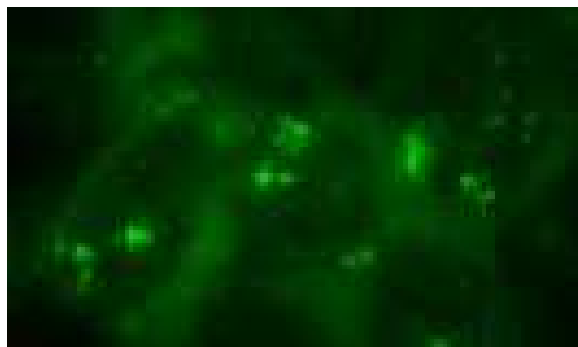
0 (negativní) u případů, kde méně než 10% buněk vykazuje jakoukoliv membránovou pozitivitu, nebo více než 10% buněk vykazuje aberantní cytoplasmatickou, většinou granulární pozitivitu.

Detekce amplifikace HER2/neu metodou FISH

HER2/neu

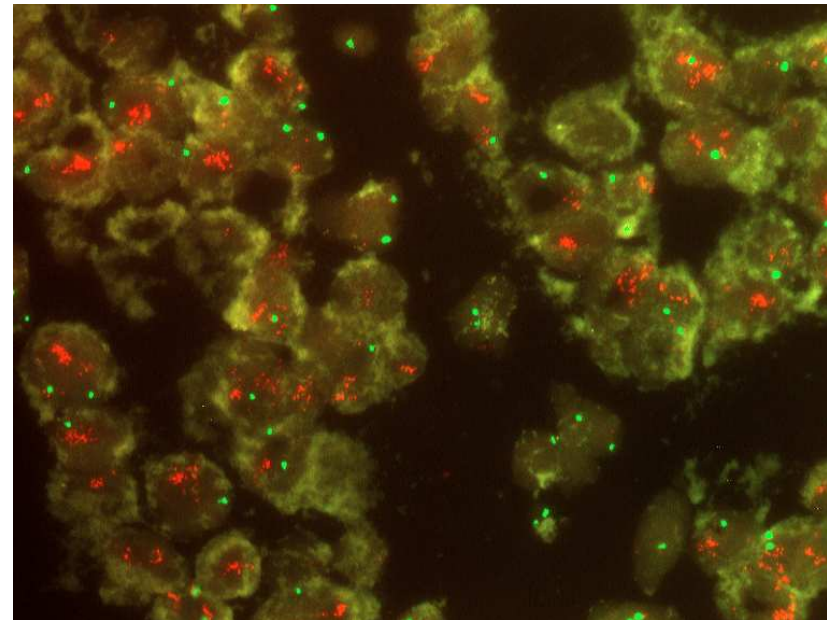


bez amplifikace



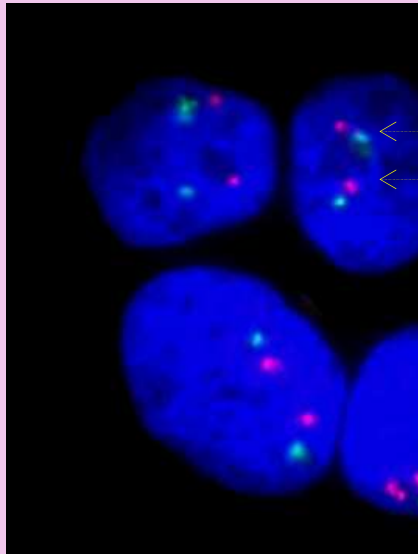
amplifikace

HER2/neu + CEP17

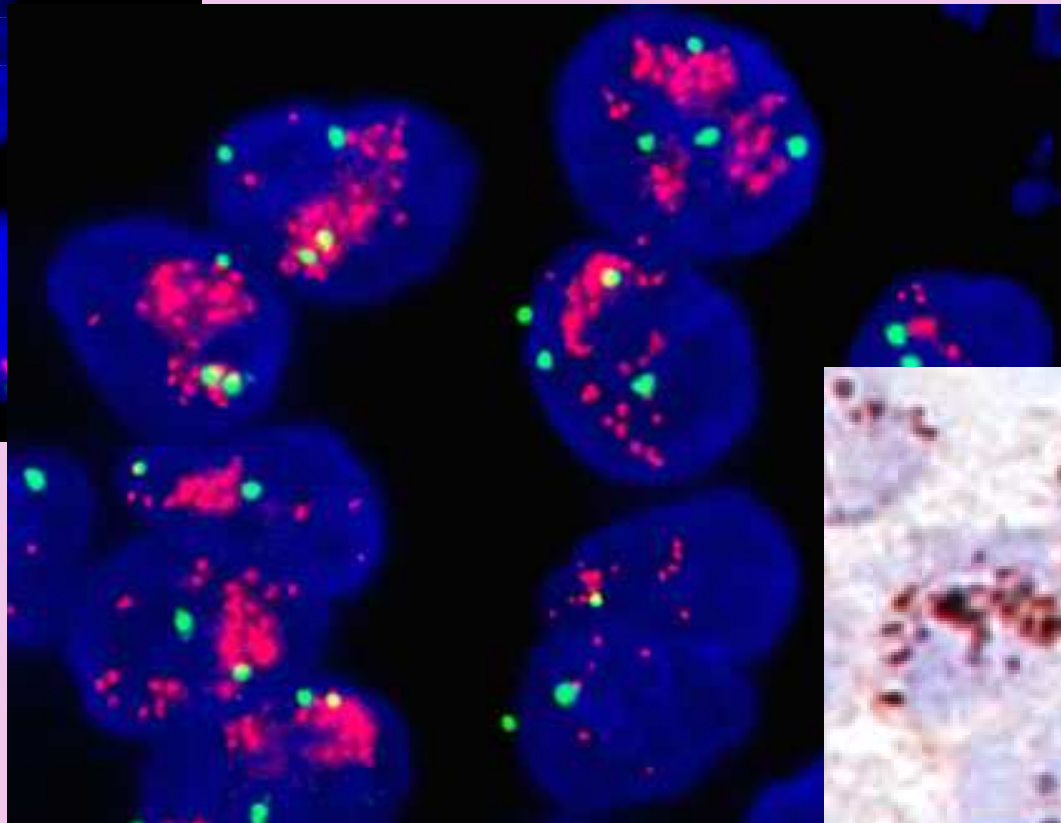


amplifikace

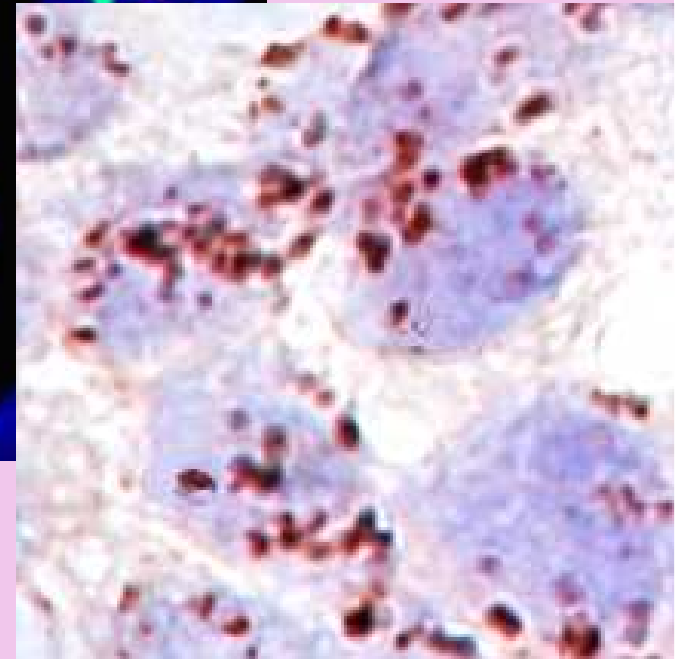
Amplifikace HER2/neu u nádoru prsu



diploidní stav



amplifikace



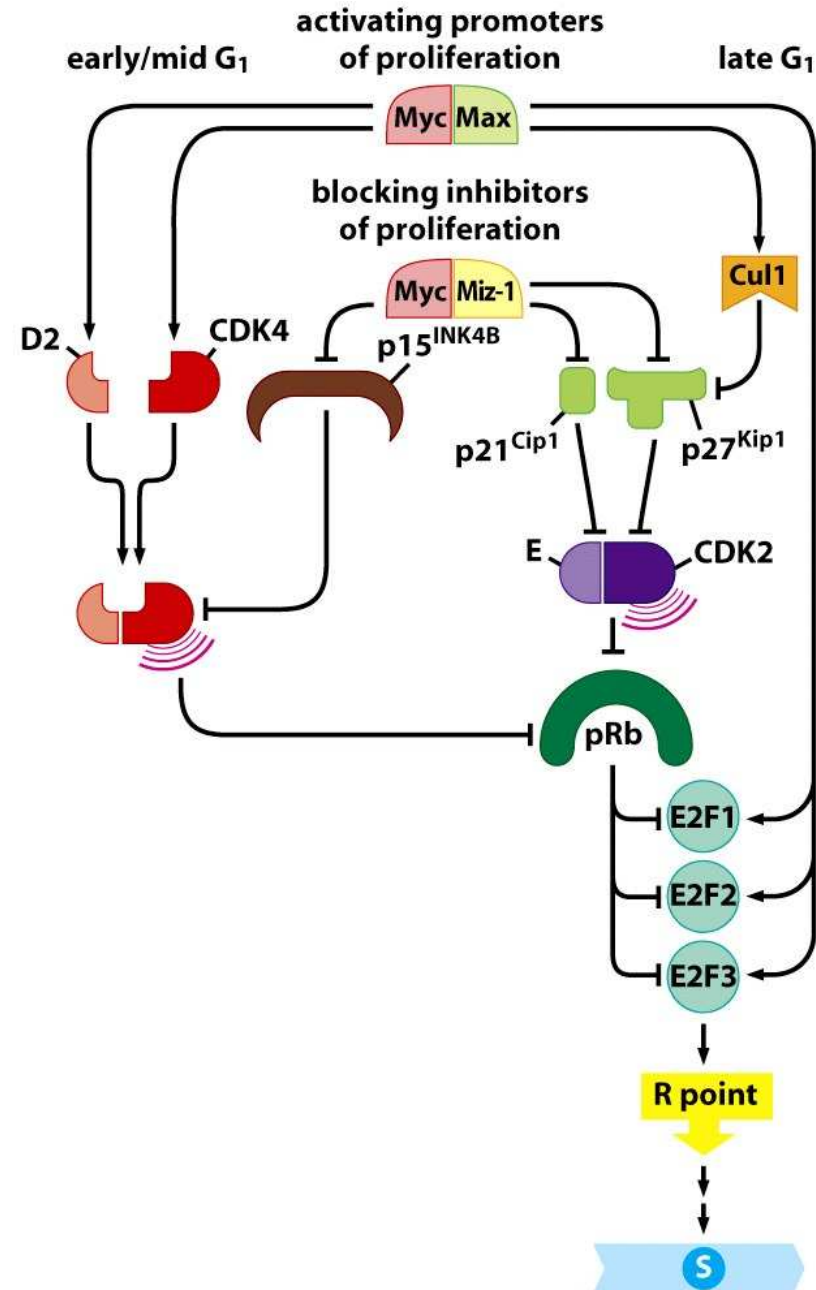
Fotografie FISH byly získány ve spolupráci s cytogenetickou laboratoří LEM v Olomouci

EGFR1, Ras

Myc

Vliv Myc na buněčný cyklus

- Dimer Myc-Max indukuje expresi cyklinu D2 a CDK4 → ↑BC (G1)
- Dimer Myc-Max 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)



Myc a nádory

Do rodiny proteinů Myc patří tři odlišné proteiny:
c-Myc, N-Myc a L-Myc.

Jsou si podobné svou strukturou a mechanismem účinku.

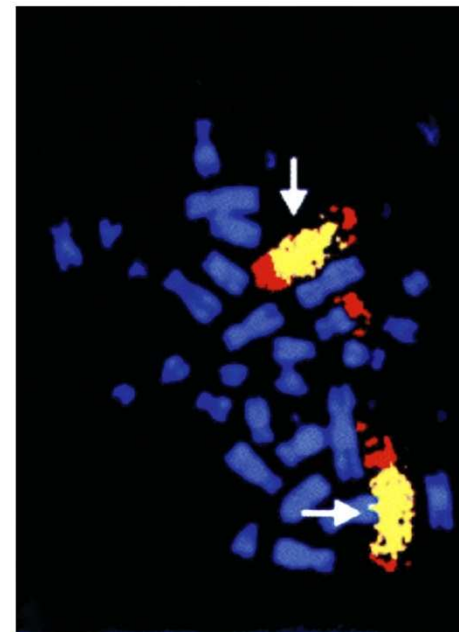
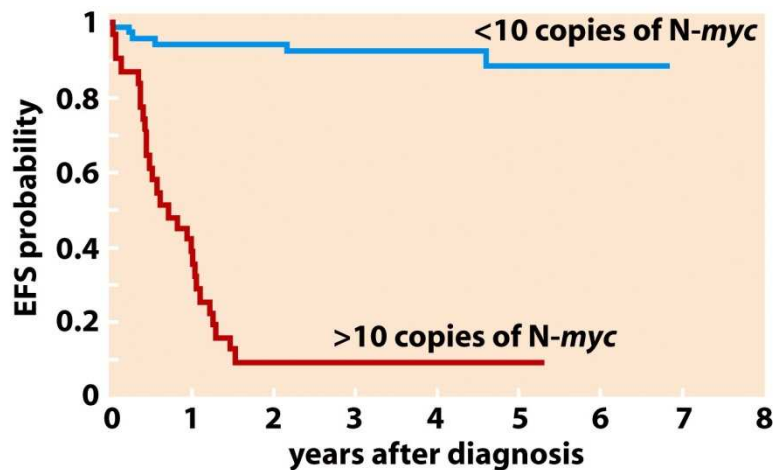
Výrazně se liší expresí během vývoje a také se zdá, že ovlivňují
- i ve stejném buněčném kontextu - jiné sady genů,
participují - i ve stejných buněčných typech - na jiných
buněčných programech.

Liší se významně také svou úlohou ve vývoji jednotlivých typů
neoplastických onemocnění.

N-*myc* a neuroblastomy

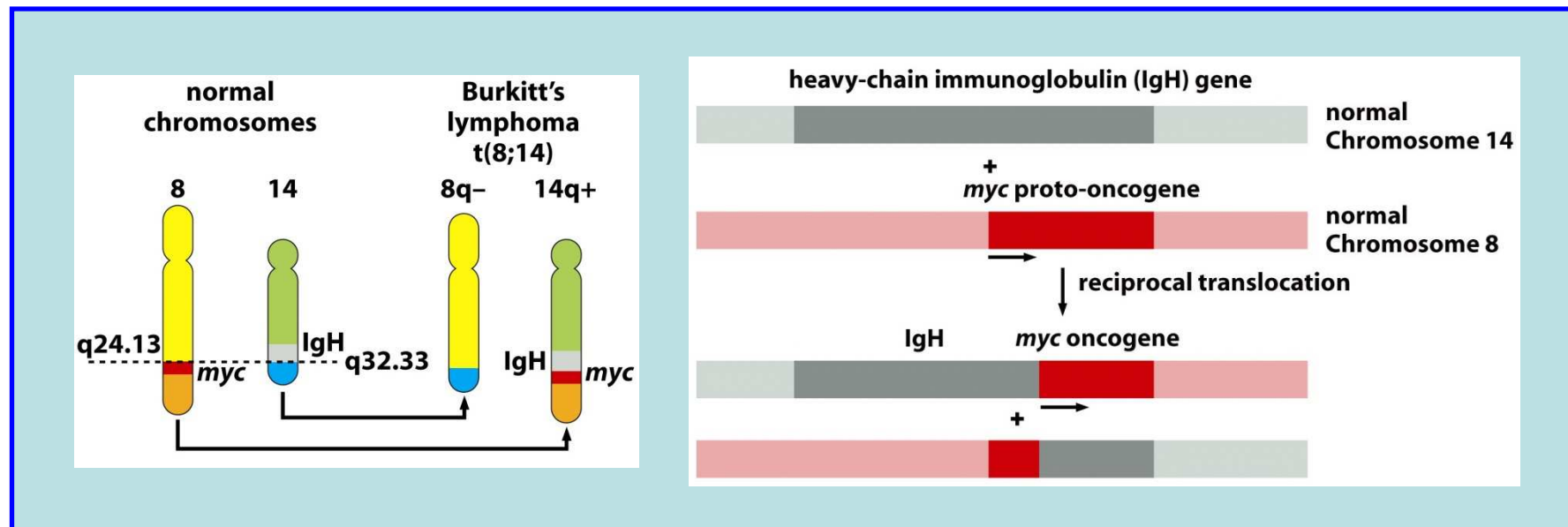
Amplifikace N-*myc* se vyskytuje asi u 30% (až 40% pokročilých) případů **neuroblastomu** (tumor periferního NS) a je spojena s horší prognózou onemocnění. Některé nádory mají 10 až 30 kopií genu N-*myc*, jiné až 100-150 kopií (**žlutě značená sonda FISH**).

Zvýšená exprese N-*myc* byla popsána u významného podílu případů malobuněčného nádoru plic a u menšího počtu případů medulárního tyroidního nádoru, retinoblastomu, rhabdomyosarkomu a astrocytomů.



c-myc a Burkittův lymfom

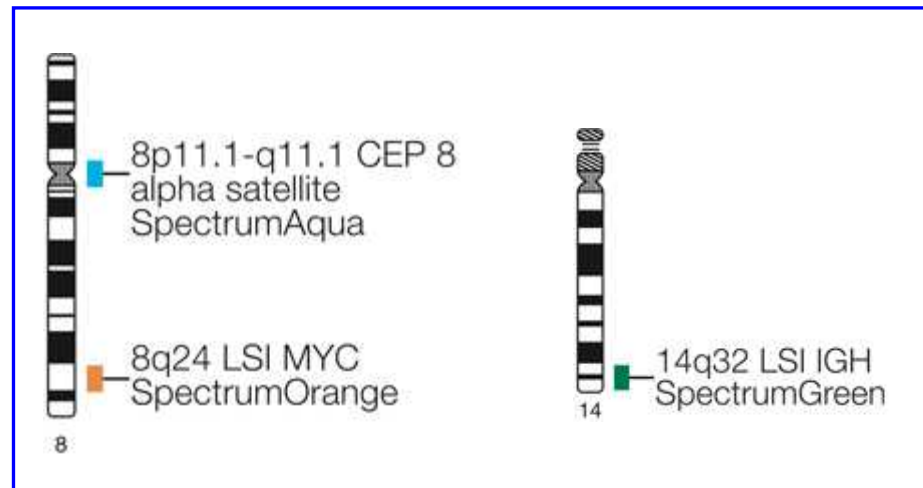
- téměř všechny případy BL souvisí s translokací genu *c-myc*
- **80%** případů BL má translokaci t(8;14)(q24;q32).



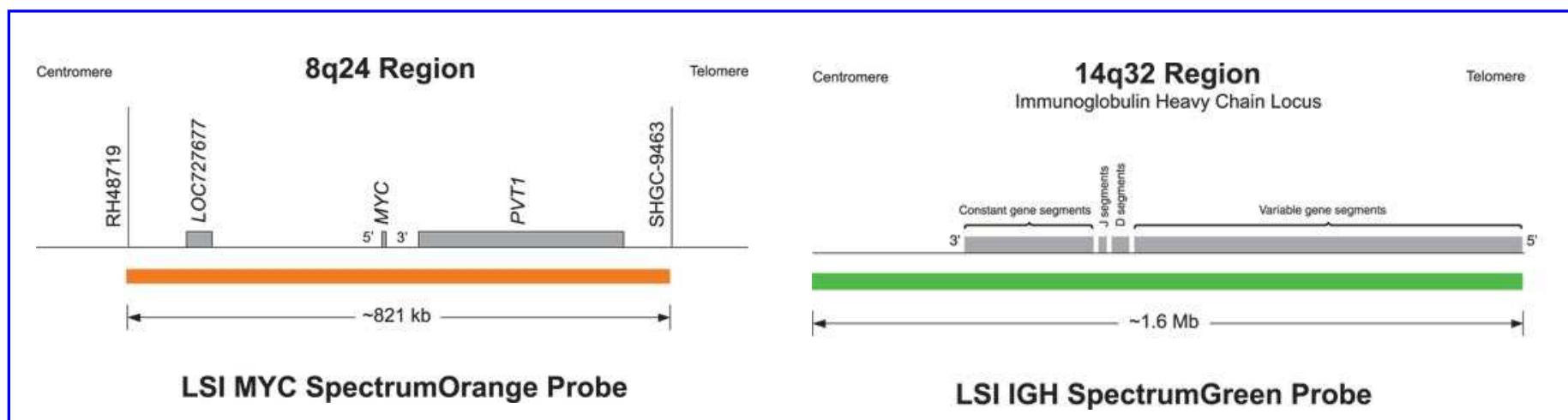
- případů s translokacemi t(2;8)(p11;q24) a t(8;22)(q24;q11) je asi po **10%**

Detekce přestavby t(8;14)

Tri-color, Dual Fusion Translocation Probe Set



- zelená: gen IGH
- oranžová: gen *c-myc*
- modrá: CEP8

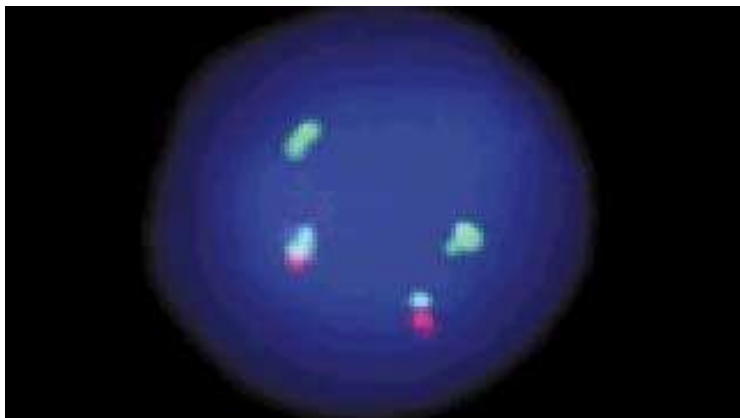


Detekce přestavby t(8;14)

Tri-color, Dual Fusion Translocation Probe Set

Výsledek hybridizace:

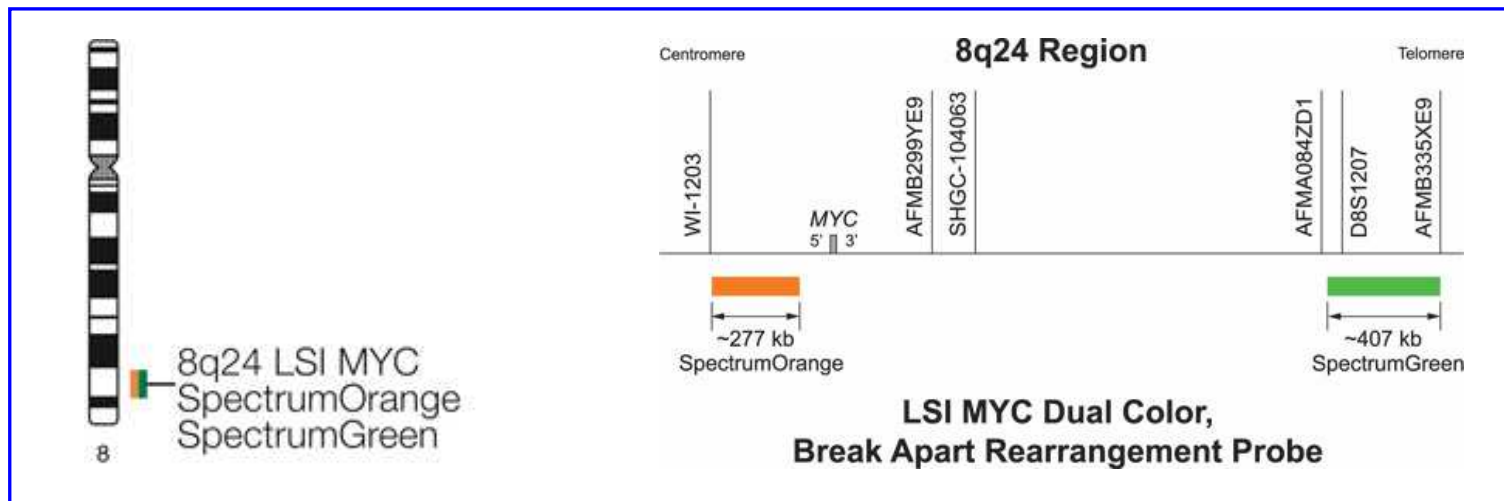
- Negativní buňky: dva modré, dva zelené a dva oranžové signály (2B + 2G + 2O)
- Pozitivní buňky s reciprokou translokací t(8;14): jeden oranžový, jeden zelený, dva fúzní a dva modré signály (1O + 1G + 2F + 2B)



Detekce přestavby genu *c-myc*

Dual Color, Break Apart Rearrangement Probe

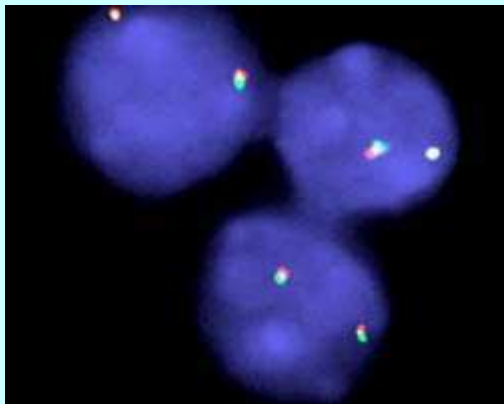
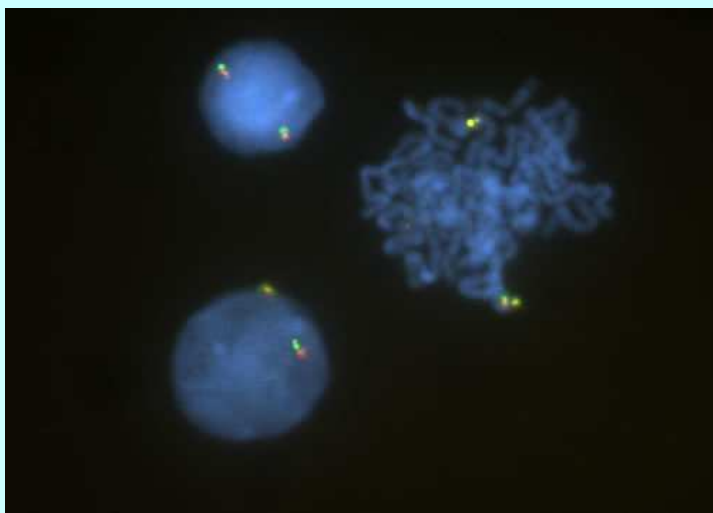
- dvě sondy (**oranžová** a **zelená**), které hybridizují na opačných stranách 3' oblasti genu *c-myc* - oblasti, která bývá zahrnuta ve všech typech translokací
- Normální jádra: dva fúzní signály (**2F**)
- Pozitivní jádra s translokací t(2;8), t(8;14), t(8;22) - jeden fúzní, jeden zelený a jeden oranžový signál (**1F + 1Z + 1O**)



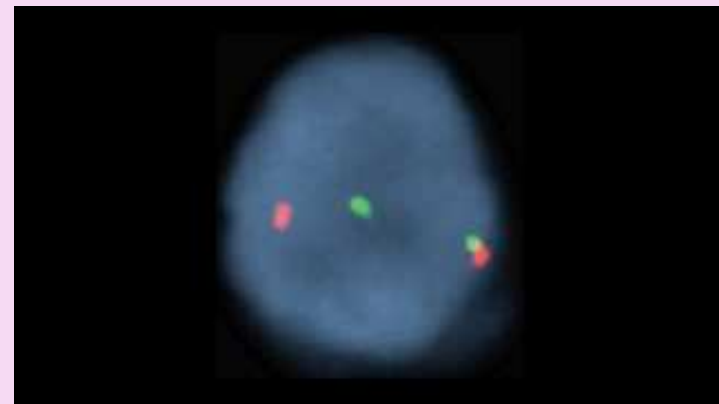
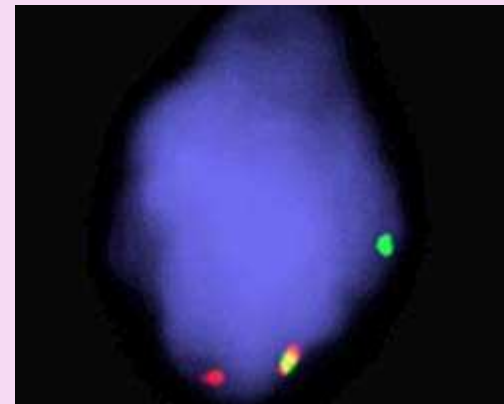
Detekce přestavby genu *c-myc*

Dual Color, Break Apart Rearrangement Probe

negativní jádra: bez přestavby *c-myc*



pozitivní jádra: detekce přestavby *c-myc*



Děkujeme za pozornost

Tento projekt je spolufinancován Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky.



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ