

Seminář 4

Monoklonální původ nádorů

Prof. RNDr. Jana Šmardová, CSc.
Mgr. Lucia Knopfová, PhD

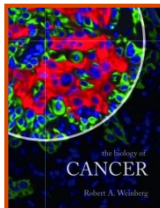
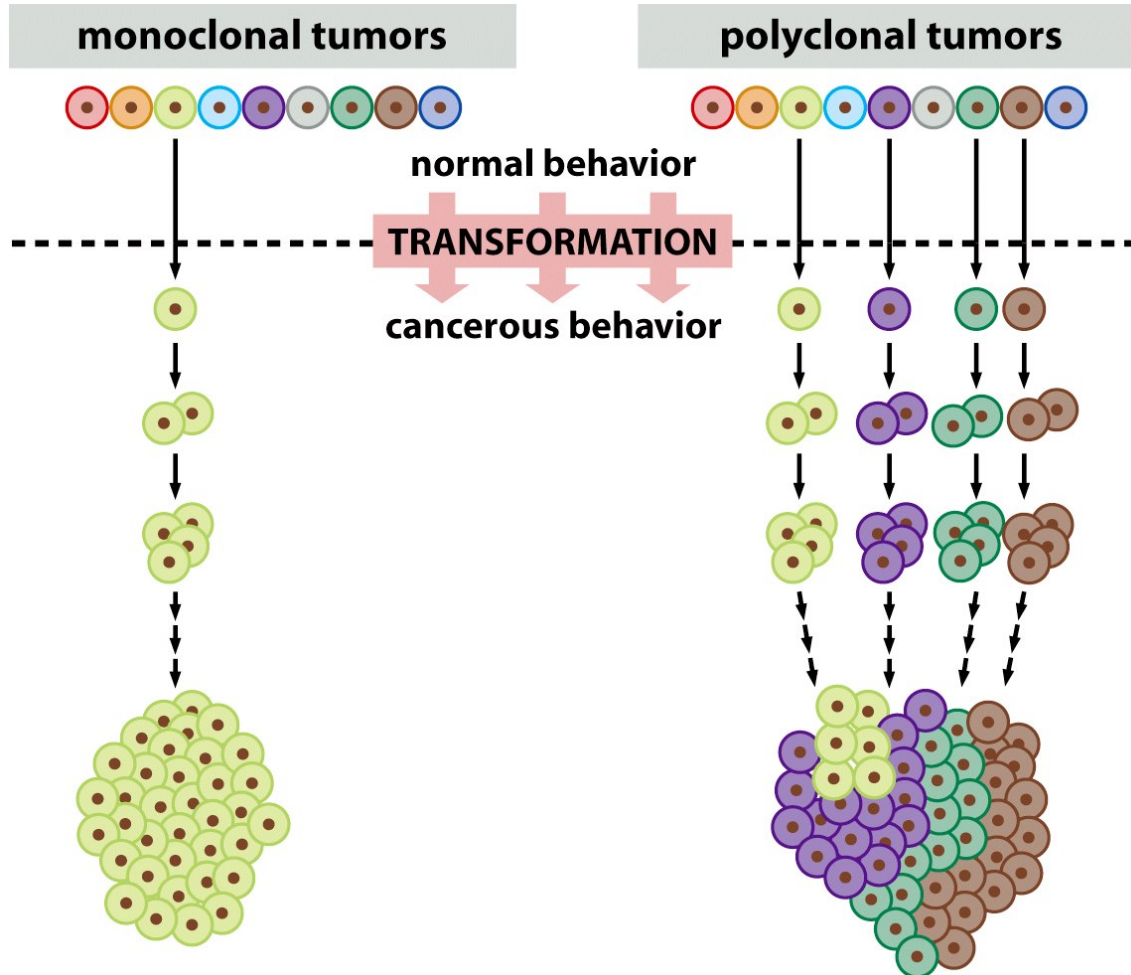
Ústav experimentální biologie
PřF MU Brno

Bi9915

Speciální seminář z
biologie nádorů



Jsou nádory monoklonální nebo polyklonální?



Jsou nádory monoklonální nebo polyklonální?



- Klonalitu lze studovat na základě sledování nějakého unikátního genetického/epigenetického markeru (např. Barrovo tělísko) ⇒ tak lze prokázat, že buněčná populace v nádoru je monoklonální
- obecný konsensus říká, že nádory jsou většinou **monoklonální** a jejich vývoj začíná **jedinou odrodilou buňkou**.

Jak studovat monoklonalitu/ polyklonalitu nádorů?



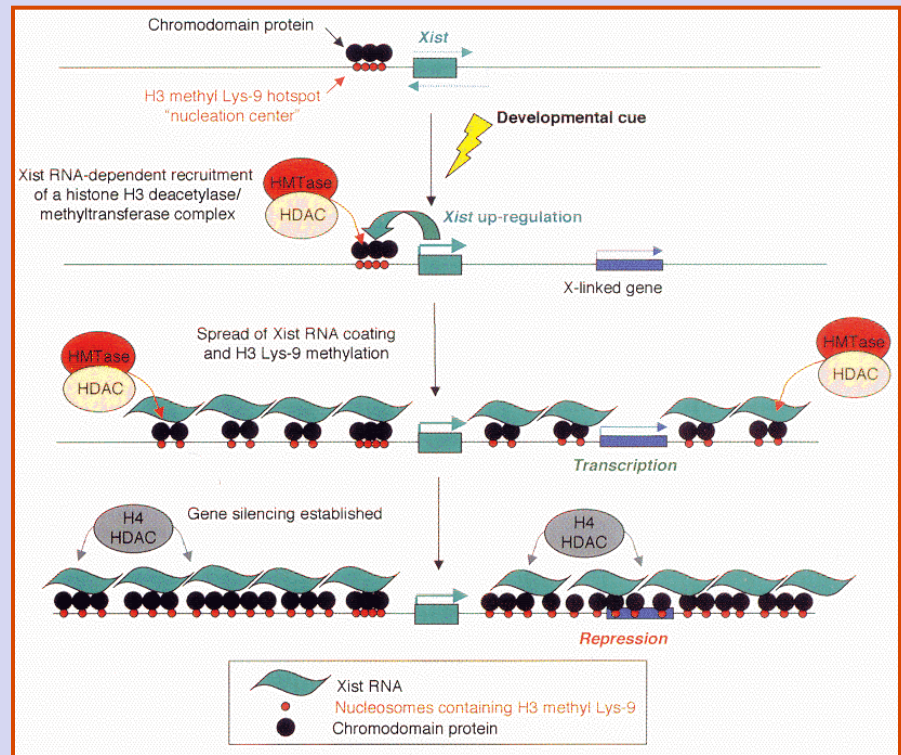
- Na základě sledování nějakého unikátního genetického/epigenetického/biochemického markeru.
- například **Barrovo tělísko**
- V somatických buňkách samičího embrya dochází k nahodilé inaktivaci chromozomu X. Karyotypicky se projeví umlčený kondenzovaný chromozom jako malé, tzv. Barrovo tělísko.

Inaktivace chromozomu X



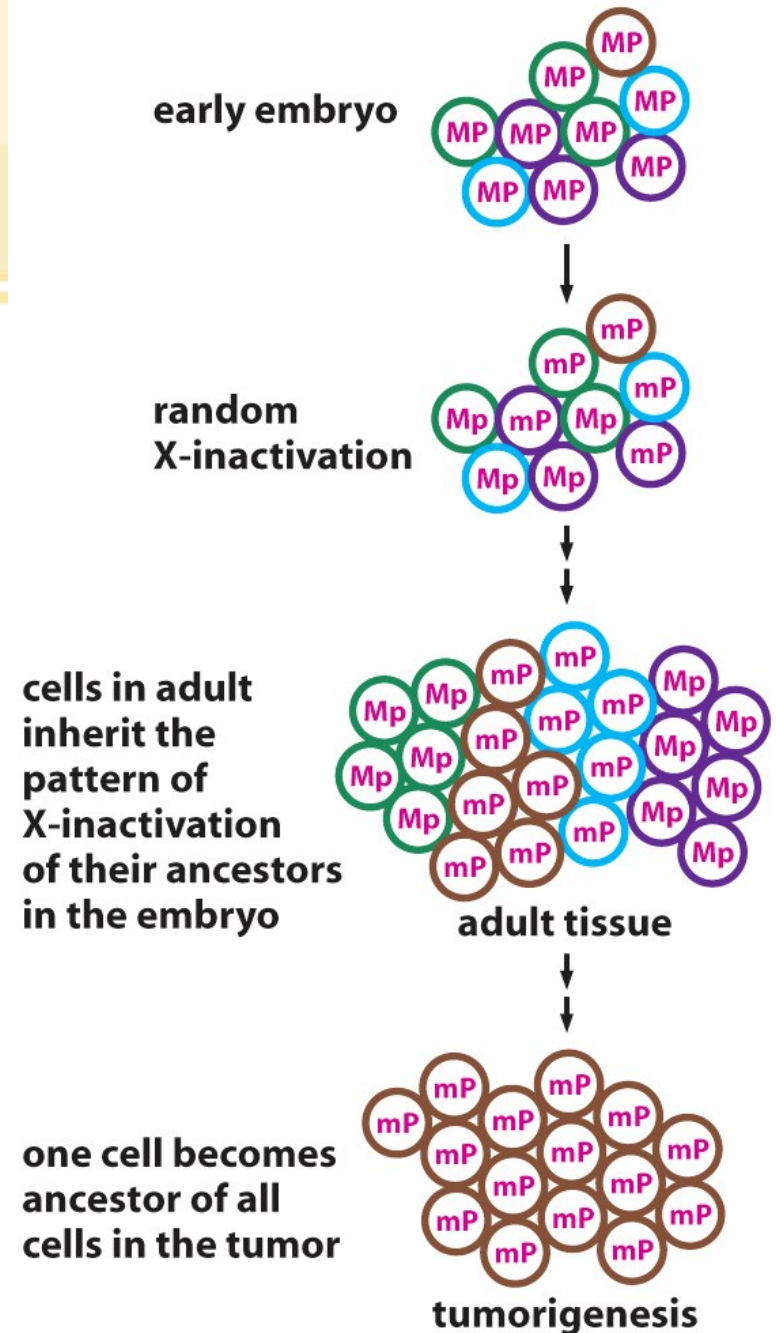
Průběh inaktivace chromozomu X:

1. upregulace *xist* a následný Xist RNA coating - netranslatovaná RNA pokryje povrch inaktivovaného chromozomu X
2. metylace H3K9 + hypoacetylace H3K9 + hypometylace H3K4
3. metylace ostrůvků CpG; H4 hypoacetylace; zvýšení obsahu histonu macroH2A



Inaktivace chromozomu X

- Na počátku vývoje samičího embrya jsou oba chromozomy X (mateřský i otcovský) stejně aktivní.
- Brzy během vývoje dochází k nahodilé inaktivaci jednoho z nich, což způsobí umlčení téměř všech jeho genů. Všichni „potomci“ (celá následná linie) těchto buněk dědí tento znak.
- Dospělé samičí tělo je tvořeno klony buněk, které jsou buď **Mp** (inaktivace paternálního X) nebo **mP** (inaktivace maternálního X).

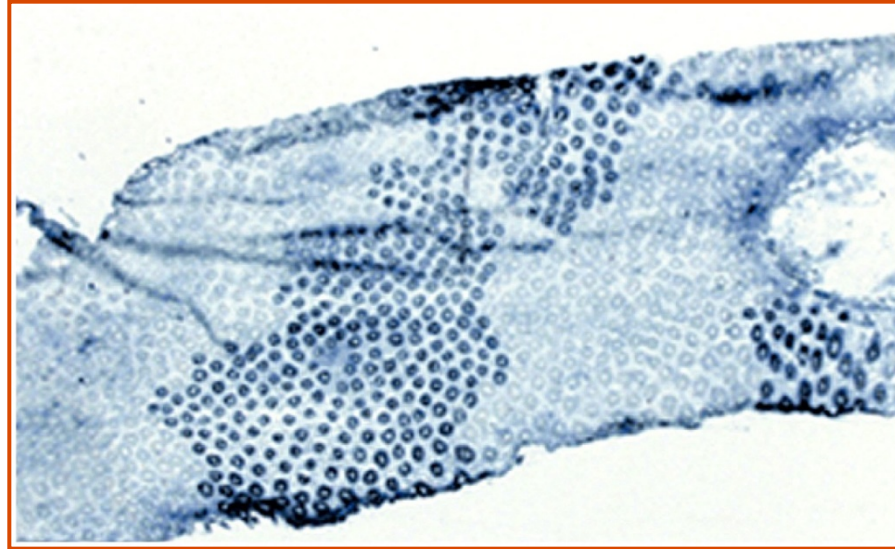


Studium klonality nádorů pomocí Barrova tělíska



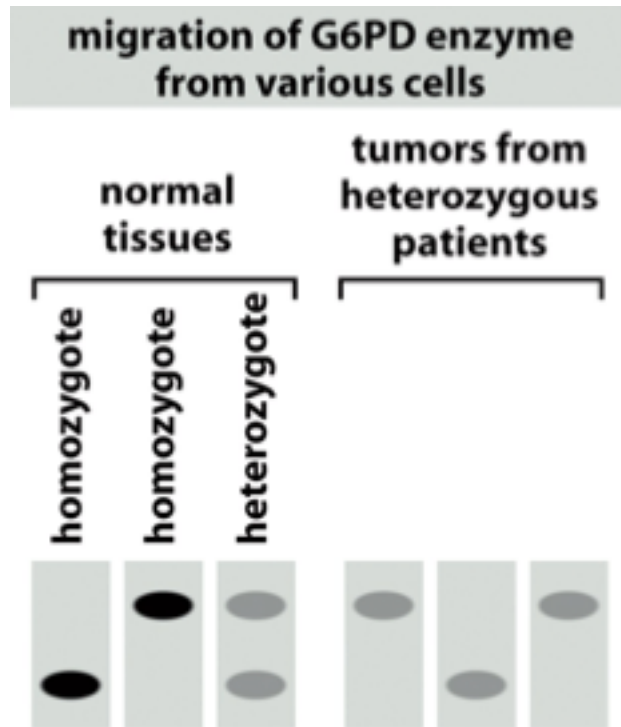
- Téměř všechny geny na inaktivovaném chromozomu jsou transkripčně reprimované.
- Na chromozomu X je lokalizován gen pro **glukoso-6-fosfát dehydrogenázu (G6PD)**. Více než 30% afro-amerických žen je v tomto lokusu heterozygotních – mají dvě různé alely tohoto genu. Dvě formy enzymu jsou rozlišitelné buď pomocí škrobové gelové elektroforézy nebo díky tomu, že jedna forma je odolnější vůči teplotní inaktivaci.
- Díky inaktivaci X exprimuje každá buňka žen – heterozygotek jen jednu alelu genu G6PD.

Rozlišení dvou variant glukoso-6-fosfát dehydrogenázy



- Opatrné zahřátí tkáně odliší oblasti (klony) buněk, které exprimují teplotně rezistentní, stále aktivní formu enzymu G6PD (tmavě modré tečky), od oblastí buněk exprimujících teplem inaktivovaný enzym.
- Buňky jednotlivých oblastí jsou potomstvem embryonální buňky, ve které došlo k inaktivaci jednoho chromozomu X.

Rozlišení dvou variant glukoso-6-fosfát dehydrogenázy



- Varianty G6PD mají různou elektroforetickou pohyblivost ve škrobovém gelu.
- **1965** - analýza leiomyomů (benigní nádory děložní stěny) afro-amerických žen/ heterozygotek: každý nádor nesl buď jednu nebo druhou variantu G6PD.
⇒ Každý nádor je velmi pravděpodobně klonem buněk pocházejících z **jediné** („odrodilé“) buňky!

Jak studovat monoklonalitu/ polyklonalitu nádorů?



Mixed Epithelial and Stromal Tumors of the Kidney: Evidence for a Single Cell of Origin With Capacity for Epithelial and Stromal Differentiation

Jennifer Bup-Jong Kum, MD, David J. Grignon, MD,* Mingsheng Wang, MD,*
Ming Zhou, MD, PhD,† Rodolfo Montironi, MD,‡ Steven S. Shen, MD, PhD,§
Shaobo Zhang, MD,* Antonio Lopez-Beltran, MD,|| John N. Eble, MD,*
and Liang Cheng, MD**

Smíšený epiteliální a stromální nádor ledvin (MEST)



- vzácný nádor ledvin, s výraznou převahou výskytu u žen (pravděpodobně souvislost s hladinou hormonů)
- nádory převážně benigní, jen vzácně maligní
- Nádor tvořen jak epiteliálními tak mesenchymálními buňkami. Obecně je přijímáno, že stromální buňky v MEST jsou neoplastické, ale není jednoznačné, zda (1) epiteliální buňky jsou také neoplastické nebo (2) nejsou a jsou ovlivněny stromálními buňkami a hormony.
- Pokud by byly skutečně neoplastické jak stromální tak epiteliální buňky, předpokládalo by to existenci (jediné „odrodilé“) progenitorové buňky s kapacitou duální (mesenchymální a epiteliální) diferenciaci.

⇒ **analýza monoklonality původu**

Mixed Epithelial and Stromal Tumors of the Kidney: Evidence for a Single Cell of Origin With Capacity for Epithelial and Stromal Differentiation

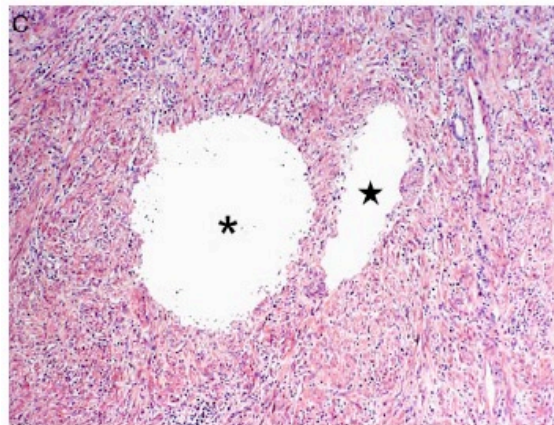
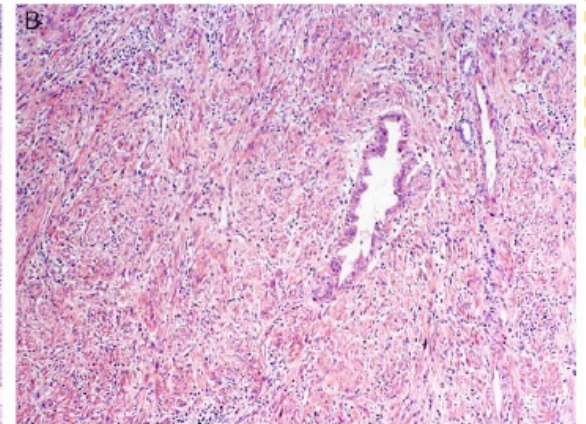
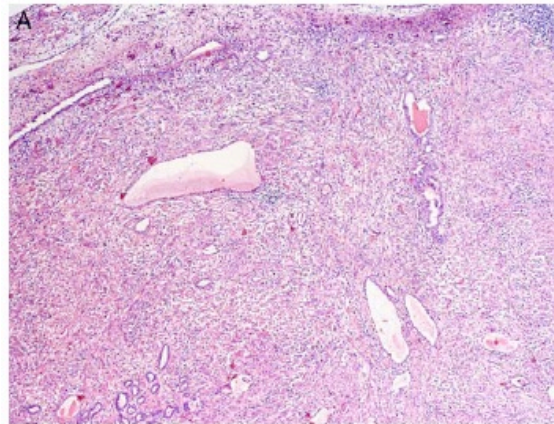
Jennifer Bup-Jong Kum, MD, David J. Grignon, MD,* Mingsheng Wang, MD,*
Ming Zhou, MD, PhD,† Rodolfo Montironi, MD,‡ Steven S. Shen, MD, PhD,§
Shaobo Zhang, MD,* Antonio Lopez-Beltran, MD,|| John N. Eble, MD,*
and Liang Cheng, MD**

- 21 žen s MEST, které prodělaly částečnou nebo radikální nefrektomii
- tkáňové řezy připravené s formol-parafinových bloků
- vyšetření inaktivace chromozomu X a genu *HUMARA* pro lidský androgenní receptor (*human androgen receptor*) v lokusu Xq11-12

Příprava vyšetřovaného materiálu



1. Laserová mikrodisekce epiteliální (**E**) a stromální (**S**) komponenty MEST a normální (**N**) tkáně z tkáňových řezů připravených z formol-parafinových bloků a obarvených hematoxylinem a eosinem.



Příprava vyšetřovaného materiálu

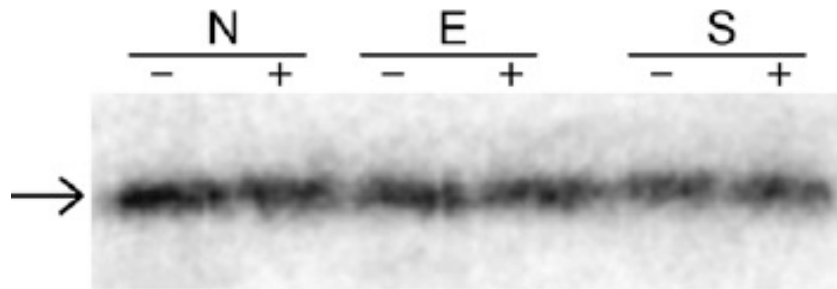


1. Mikrodisekce E, S a N tkání
2. Izolace DNA
3. Štěpení restriční endonukleázou *HhaI*, citlivou na metylaci DNA
4. Amplifikace úseku DNA (STR)
5. Elektroforéza DNA

Interpretace výsledků

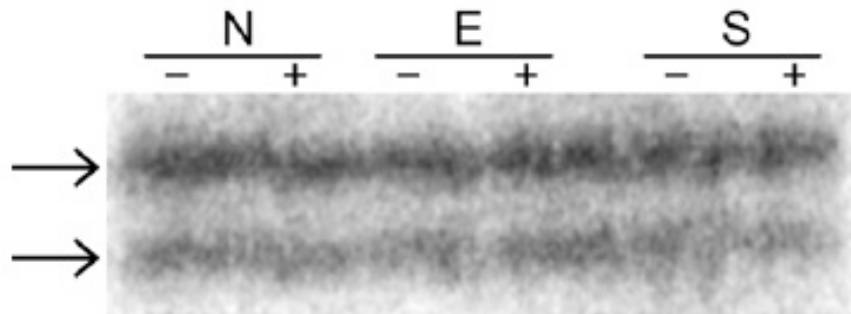
1. Informativní byly vzorky, u kterých v neštěpené kontrole byly dva bandy pro dvě alely genu *HUMARA*
2. V nádorové tkáni byla nenahodilá (tedy klonální) inaktivace chromozomu X prokázána vymizením jednoho bandu ve vzorku štěpeném *HhaI*)
3. Společný progenitor E a S komponenty byl předpokládán tam, kde u E i S komponenty chyběla stejná alela *HUMARA*

Interpretace výsledků



Case 12

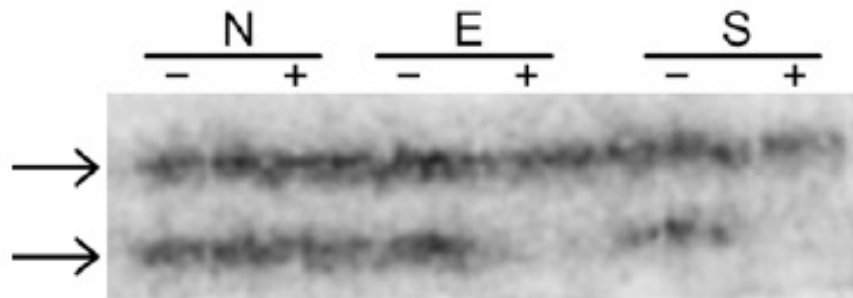
← neinformativní vzorek,
pouze 1 alela genu
HUMARA v normální
tkáni



Case 16

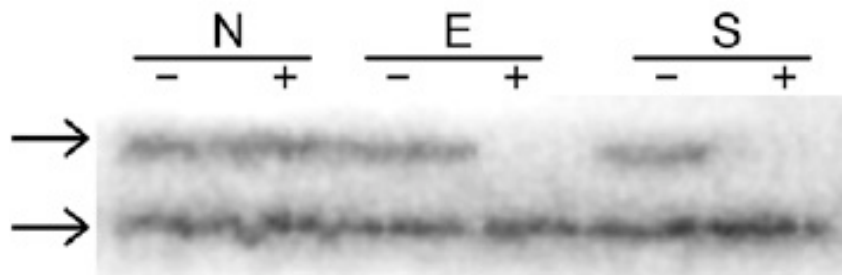
← informativní vzorek,
neklonální, dvě alely
genu HUMARA ve
všech typech tkáně -
heterotyp

Interpretace výsledků



Case 2

← převaha „vrchní“ alely genu HUMARA v epiteliální i stromální složce nádoru – monotyp, klonální změna, společný progenitor



Case 8

← převaha „spodní“ alely genu HUMARA v epiteliální i stromální složce nádoru – monotyp, klonální změna, společný progenitor

Výsledky



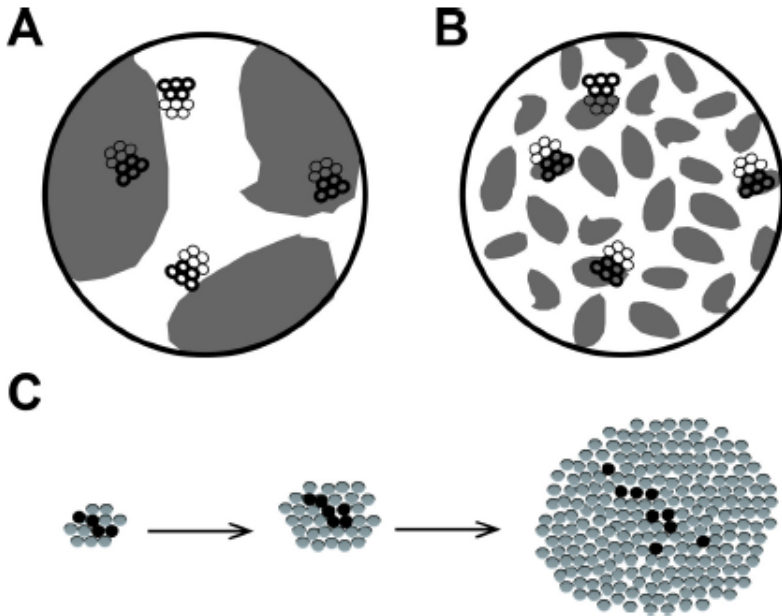
- z 21 případů, **19** bylo informativních
- v **7** případech byla neklonální inaktivace chromozomu X (nekompletní štěpení *Hha1*? kontaminace nenádorovou tkání? Nestabilní/variabilní inaktivace X)
- ve **12** případech byla detekována klonální inaktivace chromozomu X (tj. přítomnost jen jednoho alelického bandu genu *FUMARA*)
- ve **všech 12 případech** byla shodná inaktivace chromozomu X v epiteliální a stromální složce MEST

Závěry



1. Silná podpora toho, že neoplastické jsou jak buňky mesenchymální složky, tak buňky epiteliální složky MEST.
2. Silná podpora teorie, že obě složky nádoru – epiteliální i stromální – se vyvinuly ze společné progenitorové („**jediné** odrodilé“) buňky, která měla kapacitu k duální diferenciaci.

Ale!



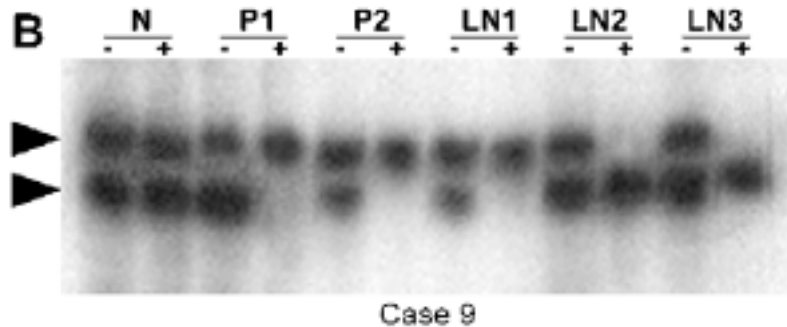
Velikost “skvrn” – čím větší, tím spíše uvidíme monoklonalitu

Dominantní klon během progresu nádoru (pseudomonoklonalita)

Senzitivita testu (nenádorové buňky) – korekce proti heterotypům – pokud poměr alel 4:1 a více – monotyp

→ monotyp není důkaz monoklonálního původu nádoru, Ale heterotyp (pokud vyloučíme technické problémy) prokazuje multiklonalitu

Metastázy - nezávislé klony?



Inaktivace X chromozomu (HhaI-treated AR alely)
- Primární melanom a metastázy v lymfatických uzlinách

Metastázy a primární nádory byly ve většině případů klonální (se stejnou inaktivací X chr)

Ale v některých případech se u pacienta objevila nezávislá metastatická ložiska s inaktivací druhé alely (jiné než u primárního melanomu) – přítomnost více nezávislých klonů transformovaných melanocytů

Laserová mikrodisekce - nezávislé klony?

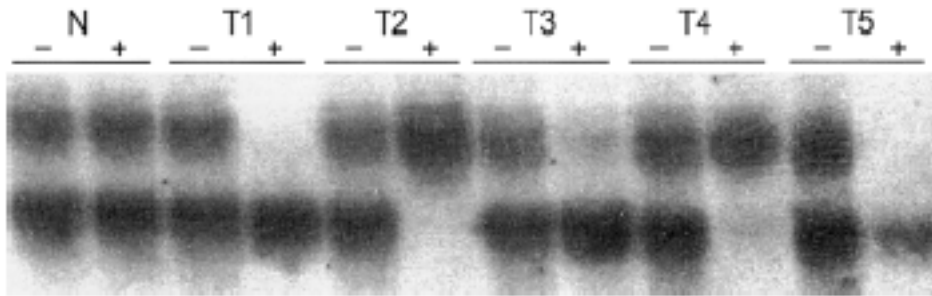


FIGURE 2. Analysis of X chromosome inactivation in urothelial carcinoma of the bladder at the androgen receptor locus. Tumors with the same allelic inactivation pattern were considered compatible with monoclonal origin; tumors with different allelic inactivation patterns were consistent with polyclonal origin. An alternative nonrandom pattern of X chromosome inactivation was shown in four tumor samples obtained from different areas of the same tumor (Patient 8). N is DNA from normal tissue as control sample; T1, T2, T3, T4 are tumors from different compartments of the same urothelial carcinoma; DNA was digested (+) or not digested (–) with Hha I prior to polymerase chain reaction. The amplified DNA fragments harbor HhaI sites and CAG polymorphic repeats.

Inaktivace X chromozomu (HhaI-treated AR alely)

-(Mikro)sekce (T1-T5)
karcinomu močového měchýře

9 pacientů informativních, u 7 z nich neklonální inaktivace X, u 2 stejný pattern nenáhodné inaktivace ve všech oblastech nádoru

Genomic mutational landscapes

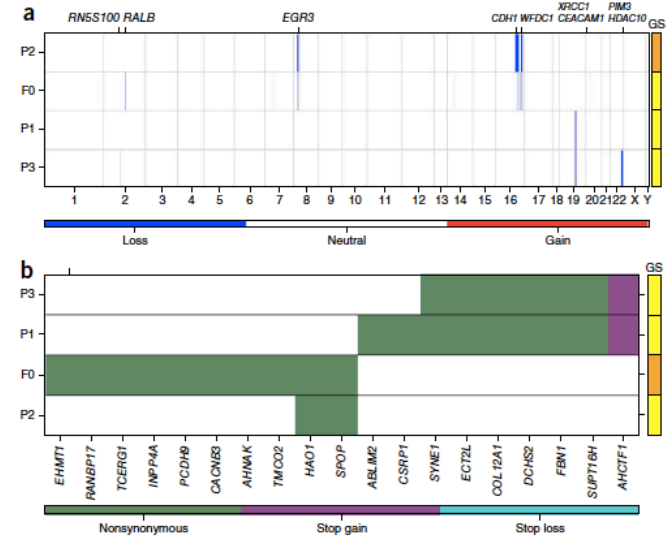


nature
genetics

Spatial genomic heterogeneity within localized, multifocal prostate cancer

Paul C Boutros¹⁻³, Michael Fraser^{4,23}, Nicholas J Harding^{1,23}, Richard de Borja^{1,23}, Dominique Trudel^{5,23}, Emilie Lalonde^{1,2}, Alice Meng³, Pablo H Hennings-Yeomans¹, Andrew McPherson⁶, Veronica Y Sabelnykova¹, Amin Zia¹, Natalie S Fox^{1,2}, Julie Livingstone¹, Yu-Jia Shiah¹, Jianxin Wang¹, Timothy A Beck¹, Cherry L Have⁵, Taryne Chong¹, Michelle Sam¹, Jeremy Johns¹, Lee Timms¹, Nicholas Buchner¹, Ada Wong¹, John D Watson¹, Trent T Simmons¹, Christine P'ng¹, Gaetano Zafarana⁴, Francis Nguyen¹, Xuemei Luo¹, Kenneth C Chu¹, Stephenie D Prokopec¹, Jenna Sykes⁷, Alan Dal Pra⁸, Alejandro Berlin⁸, Andrew Brown¹, Michelle A Chan-Seng-Yue¹, Fouad Yousif¹, Robert E Denroche¹, Lauren C Chong¹, Gregory M Chen¹, Esther Jung¹, Clement Fung¹, Maud H W Starmans¹, Hanbo Chen¹, Shaylan K Govind¹, James Hawley¹, Alister D'Costa¹, Melania Pintilie⁷, Daryl Waggott¹, Faraz Hach⁶, Philippe Lambin⁹, Lakshmi B Muthuswamy¹, Colin Cooper¹⁰⁻¹², Rosalind Eeles^{10,13}, David Neal^{14,15}, Bernard Tetu¹⁶, Cenk Sahinalp⁶, Lincoln D Stein¹, Neil Fleshner¹⁷, Sohrab P Shah¹⁸⁻²⁰, Colin C Collins^{21,22}, Thomas J Hudson¹, John D McPherson¹, Theodorus van der Kwast⁵ & Robert G Bristow^{2,4,8}

Herein we provide a detailed molecular analysis of the spatial heterogeneity of clinically localized, multifocal prostate cancer to delineate new oncogenes or tumor suppressors. We initially determined the copy number aberration (CNA) profiles of 74 patients with index tumors of Gleason score 7. Of these, 5 patients were subjected to whole-genome sequencing using DNA quantities achievable in diagnostic biopsies, with detailed spatial sampling of 23 distinct tumor regions to assess intraprostatic heterogeneity in focal genomics. Multifocal tumors are highly heterogeneous for single-nucleotide variants (SNVs), CNAs and genomic rearrangements. We identified and validated a new recurrent amplification of *MYCL*, which is associated with *TP53* deletion and unique profiles of DNA damage and transcriptional dysregulation. Moreover, we demonstrate divergent tumor evolution in multifocal cancer and, in some cases, tumors of independent clonal origin. These data represent the first systematic relation of intraprostatic genomic heterogeneity to predicted clinical outcome and inform the development of novel biomarkers that reflect individual prognosis.



Evidence of multiclonal prostate cancer.

CPCG0183 exhibits two regions sharing no genomic aberrations at either the CNA (copy number aberrations) (a) or SNV (single nucleotide variants) (b) level, suggestive of multiclonality.

Table 1
XCI studies reporting evidence of multiclonality.^a

Lesion or Tumor Type ^b	Method and X-linked Marker Examined ^c	# Heterotypic Samples/# Informative Samples Analyzed (percentage)	Author Conclusion ^d	Reference
Non-neoplastic lesions				
Erdheim-Chester disease	RFLP/methylation of AR and PGK	1/1 (100%)	Multi	[125]
Acquired aplastic anemia	RFLP/methylation of AR	6/7 (85.7%)	Multi & Mono	[126]
Pre-neoplastic lesions				
Bone marrow				
Myeloproliferative neoplasms	cDNA sequencing of X-linked SNPs from individually cultured colonies	2/6 (33.3%)	Multi	[127]
Breast				
Usual ductal hyperplasia	RFLP/methylation of AR	34/35 (97.1%)	Multi & Mono	[45]
Atypical ductal hyperplasia		26/39 (66.6%)	Multi & Mono	
Flat epithelial hyperplasia		23/26 (88.4%)	Multi & Mono	
Usual ductal hyperplasia	RFLP/methylation of AR	9/12 (75%)	Multi	[41]
Ductal intraepithelial hyperplasia 1A		5/18 (27.8%)		
Liver				
Focal nodular hyperplasia	RFLP/methylation of AR	9/13 (69.2%)	Mono	[44]
Focal nodular hyperplasia	RFLP/methylation of AR	9/9 (100%)	Multi	[46]
Low grade dysplastic nodules	RFLP/methylation of AR	38/57 (66.7%)	N	[42]
Uterus				
Cervical intraepithelial neoplasia w/ glandular dysplasia	RFLP/methylation of AR	4/4 (100.0%)	Multi & Mono	[43]
Lobular endocervical glandular hyperplasia (LEGH)	RFLP/methylation of AR	4/9 (44.4%)	Multi & Mono	[128]
Benign tumors				
Adrenal Gland				
Adrenal myeloidipoma	RFLP/methylation of AR	4/4 (100%)	Multi	[129]
Blood				
Essential thrombocythemia	RFLP/methylation of AR	22/61 (36.1%)	Multi & Mono	[130]
Kidney				
Mixed epithelial and stromal tumors	RFLP/methylation of AR	7/19 (36.8%)	N	[131]
Lung				
Atypical carcinoid	RFLP/methylation of AR	1/2 (50.0%)	N	[132]
Mesothelial tumors				
Adenomatoid tumor	RFLP/methylation of AR	1/10 (10.0%)	Mono	[133]
Odonogenic tumors				
Mixoma	RFLP/methylation of AR	1/2 (50.0%)	Multi	[134]
Odontogenic keratocyst		2/5 (40.0%)		
Ovary				
Sertoli-Leydig cell tumor	RFLP/methylation of AR	7/10 (70.0%)	N	[135]
Pancreas				
Acinar cell cystadenoma	RFLP/methylation of AR	5/5 (100%)	Multi	[136]
Pancreatic islet				



For tumors of myeloid cell lineages, most (but not all) evidence supports monoclonal tumor origin. Studies summarized here support multiclonal origin for at least some portion of 53 different tumors that develop across 24 different anatomical sites

When these data are extrapolated, taking into account the technical biases against detecting multiclonality and the potential for pseudomonoclonality in fully-developed tumors, it seems likely that most tumors are multiclonal.

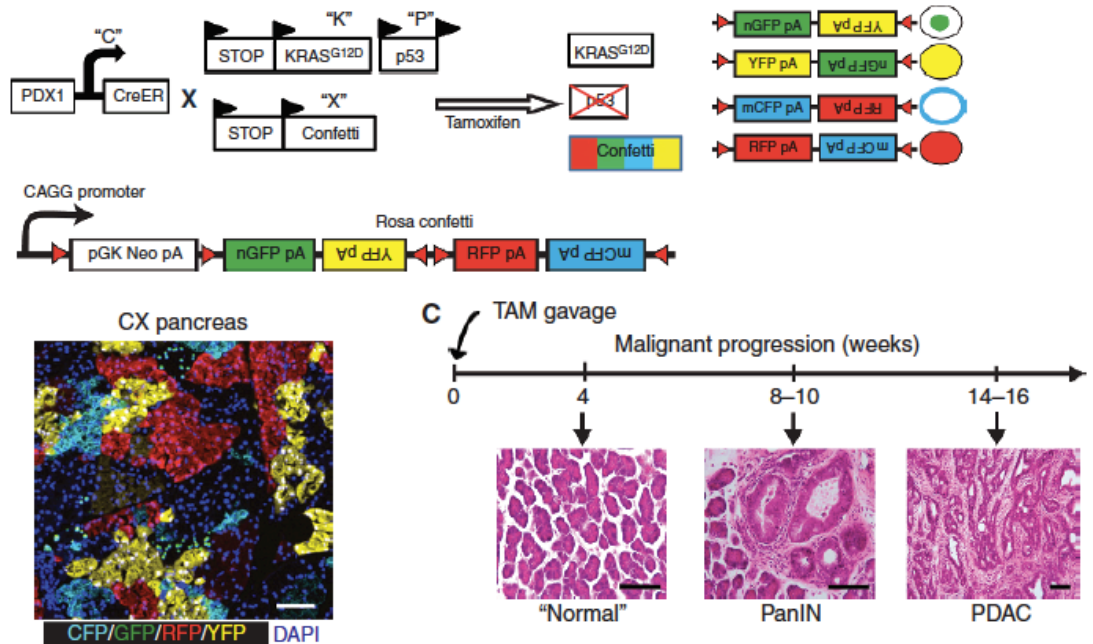
Multiklonalita nádorů



Sledování osudu jednotlivých buněk tkáně pomocí “lineage tracing” – Rosa^{Confetti} allele (“Confetti mice”)

Rekombinace pomocí Cre rekombinázy (exprimované v buňkách slinivky – PDX – pancreatic and duodenal homeobox 1 promotor) – vede k náhodné expresi jedné ze 4 fluorescenčních značek – stabilní, přenášené na dceřinné buňky

CX mice



Multiklonalita nádorů

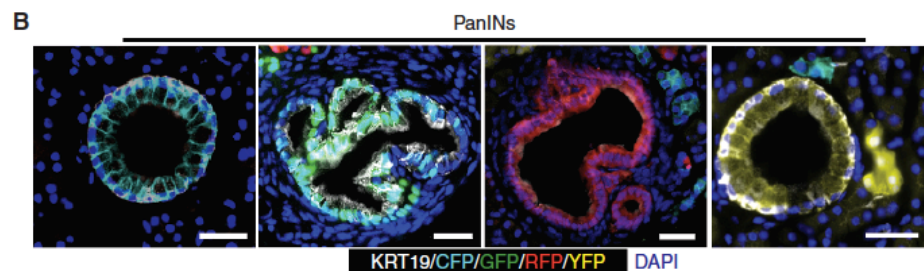
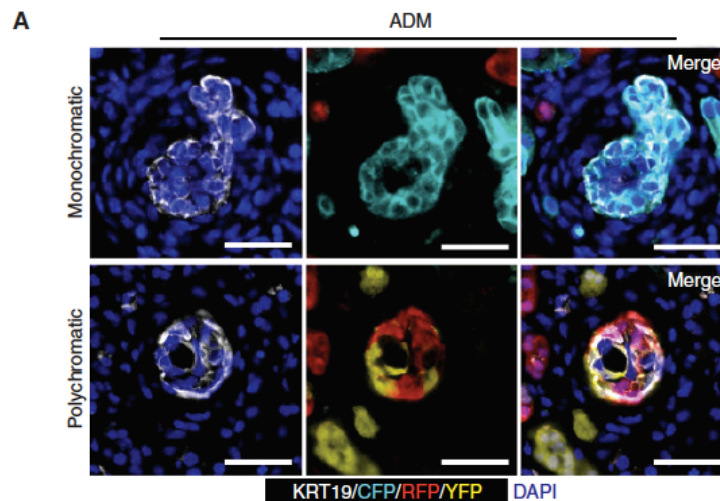


Sledování osudu jednotlivých buněk tkáně pomocí “lineage tracing” – Rosa^{Confetti} allele (“Confetti mice”)

Rekombinace pomocí Cre rekombinázy (exprimované v buňkách slinivky – PDX – pancreatic and duodenal homeobox 1 promotor) – vede k náhodné expresi jedné ze 4 fluorescenčních značek a současné expresi onkogenního Kras a depleci p53

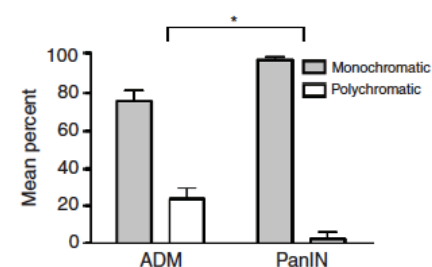
KPCX mice – rozvoj pankreatických nádorů
Sekvence: ADM – PanIN – PDAC

24% ADM je polychromatických – vzniká z různých acinárních buněk a klonální diverzita se ztrácí s další progresí



C ADM and PanIN counts

Lesion	Monochromatic	Polychromatic	Total
ADM	149 (76%)	46 (24%)	195
PanIN	141 (97%)	4 (3%)	145

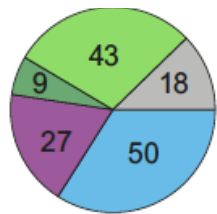


Multiklonalita nádorů?

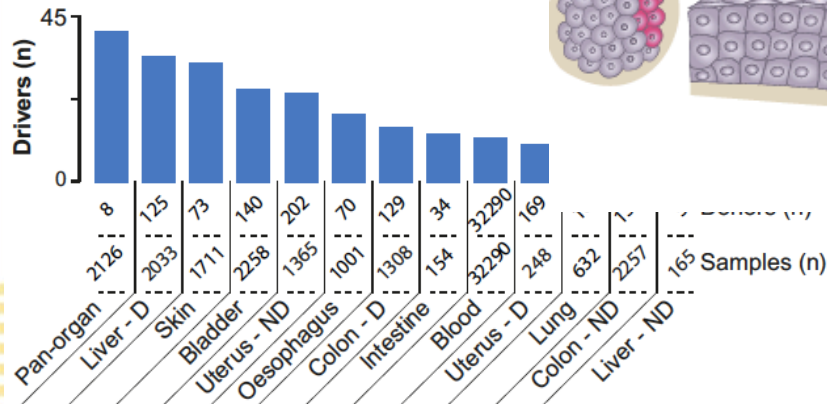
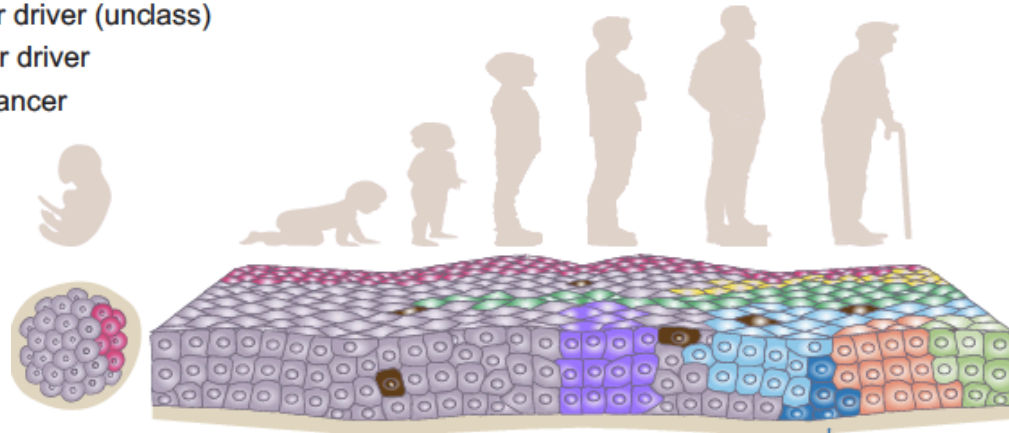


Velká četnost potenciálních cancer-driving mutací v histologicky normálních tkáních

- Zvyšuje se s věkem, chronickým zánětem a expozicí mutagenům

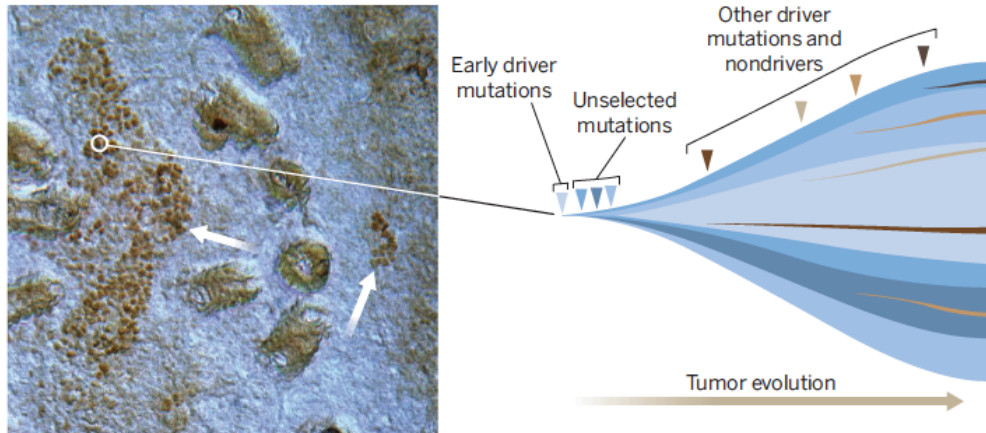


- Canonical tumour suppressor
- Canonical oncogene
- Canonical cancer driver (unclassified)
- Candidate cancer driver
- Not involved in cancer



Somatic mutations in normal tissues

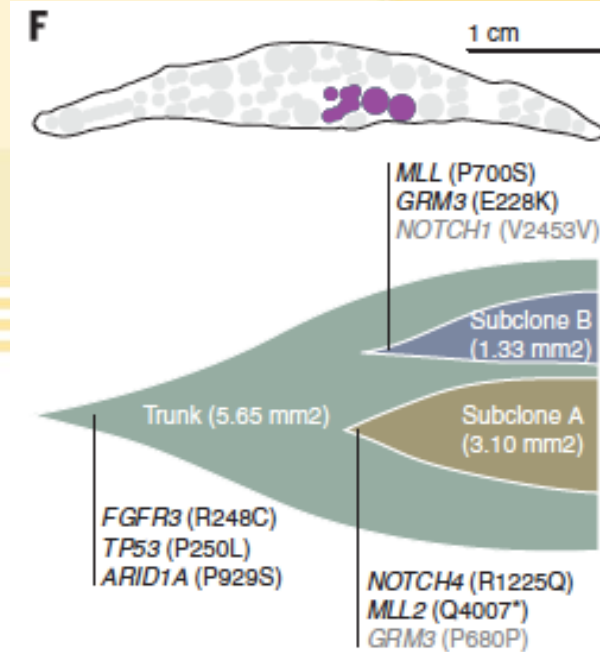
Thus, aged sun-exposed skin is a patchwork of thousands of evolving clones with over a quarter of cells carrying cancer-causing mutations while maintaining the physiological functions of epidermis.



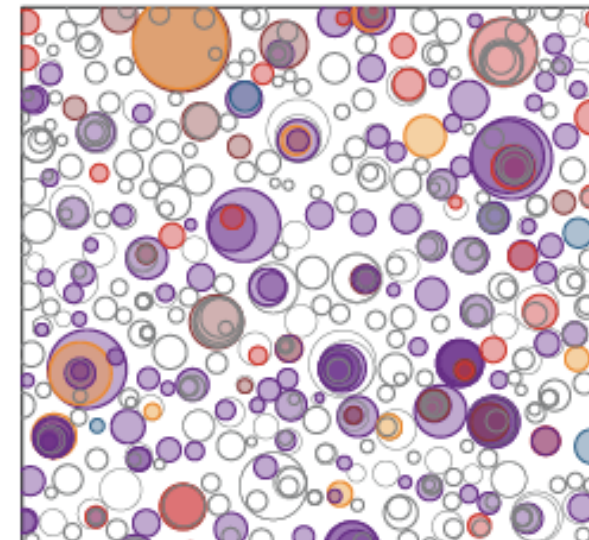
Cancer twists. (Left) Ultraviolet light-exposed normal skin is shown, containing a large and small clone of P53-mutant keratinocytes (dark brown) and a clone of cells that have accumulated multiple driver mutations (darker blue arrows), independently (brown arrows).



- NOTCH1-3 ■ TP53 ■ FGFR3
- FAT1 ■ RBM10 □ Other genes



- G**
- *NOTCH1-3* ■ *TP53* ■ *FGFR3*
 - *FAT1* ■ *RBM10* □ Other

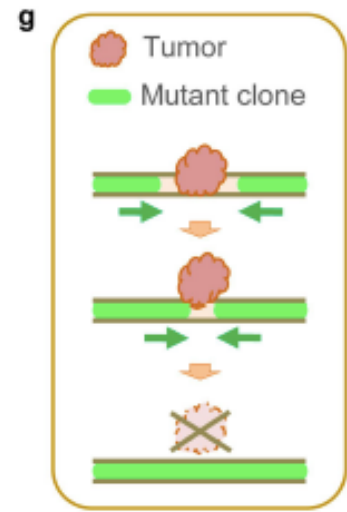
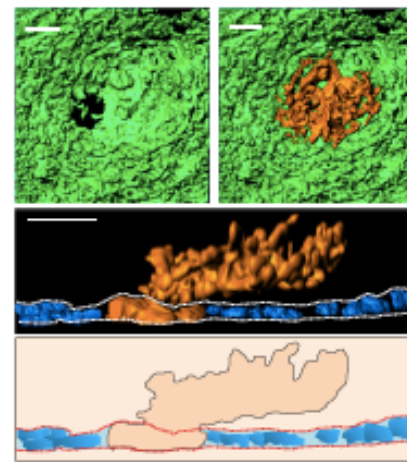
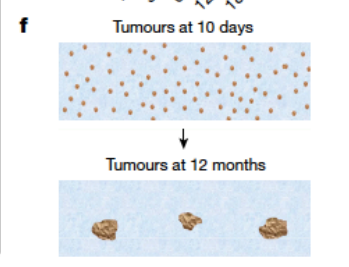
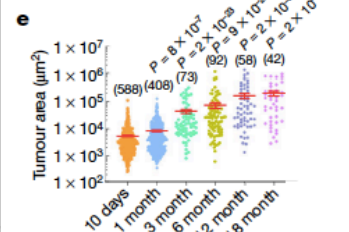
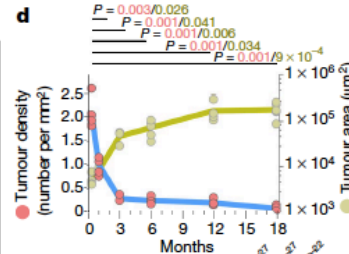
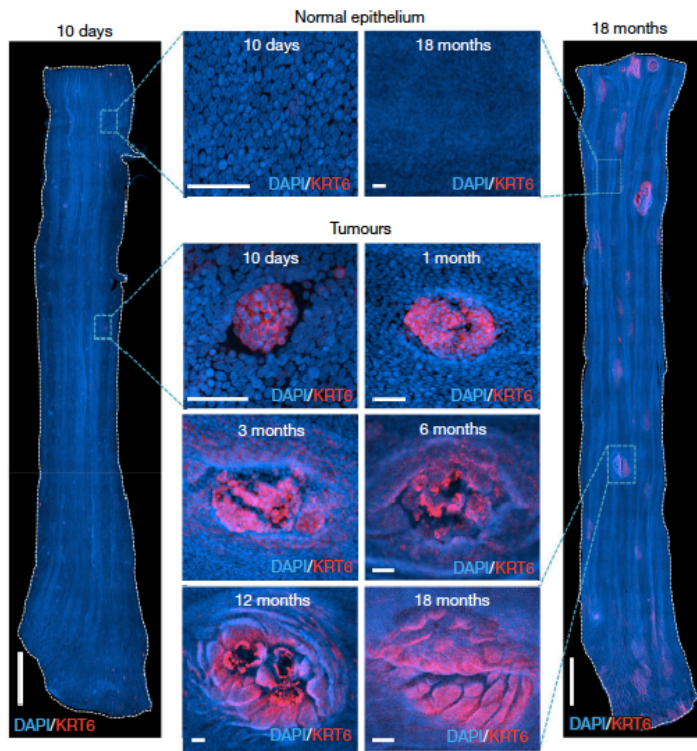
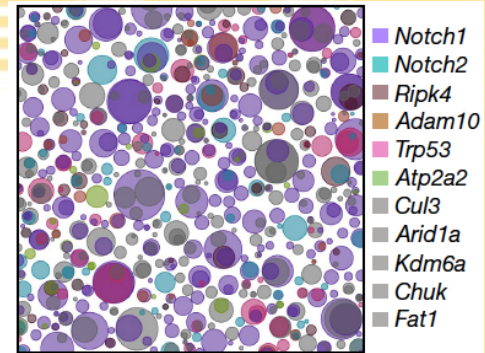


Somatic mutations in normal tissues – friend or foe?

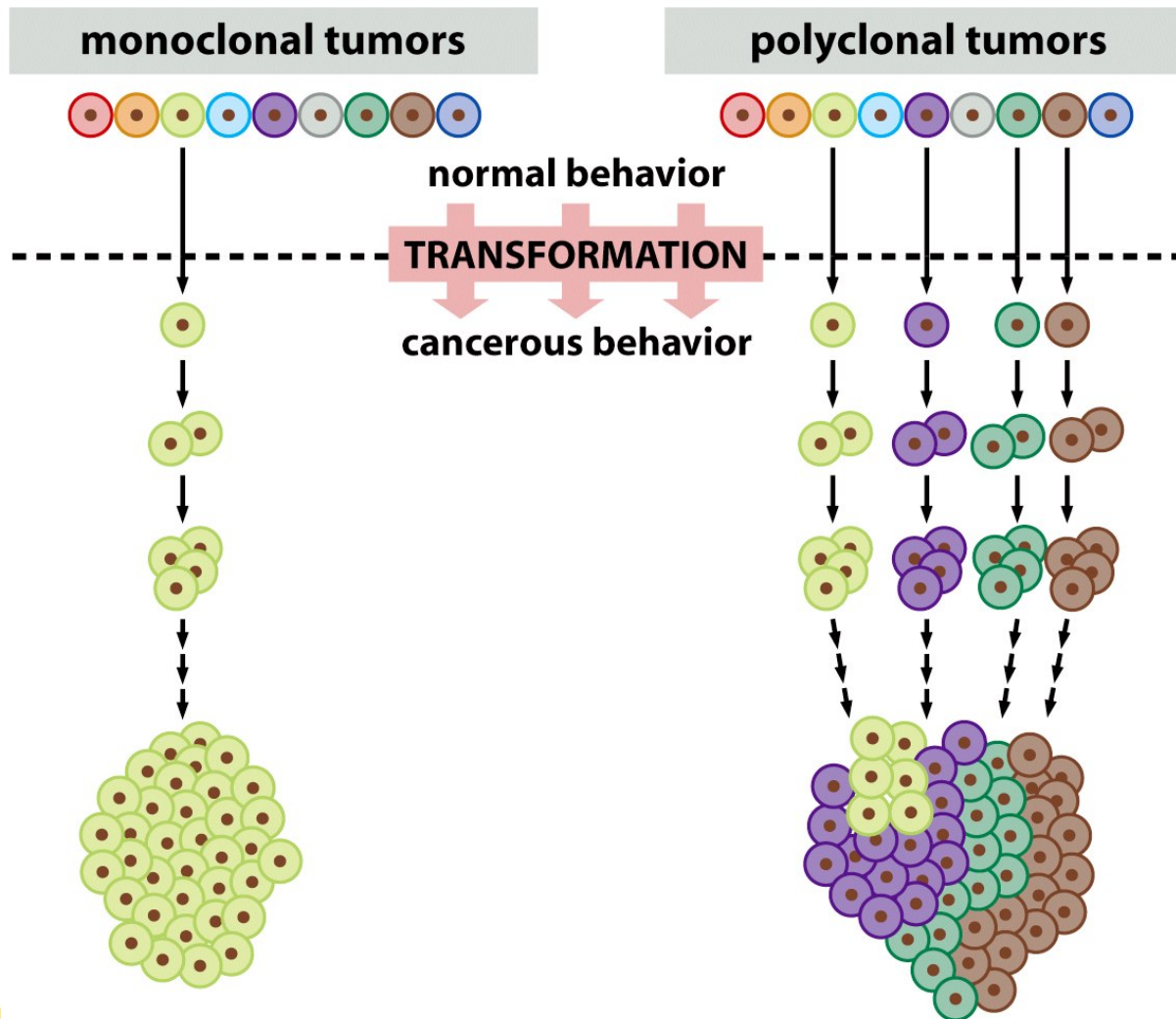


Mutant clones in normal epithelium outcompete and eliminate emerging tumours

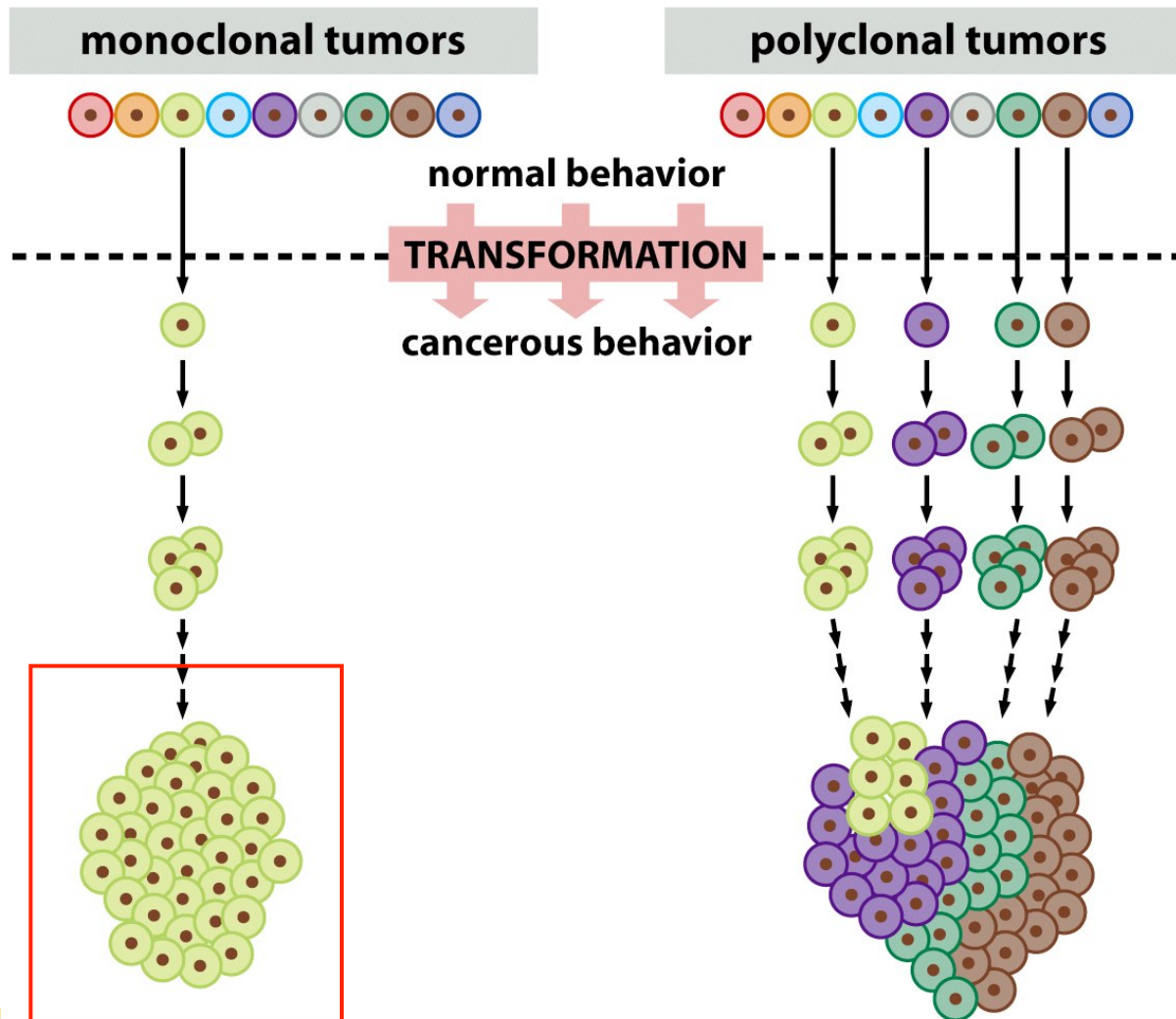
Nádory jícnu myši po expozici mutagenem - většina z nich časem zmizí



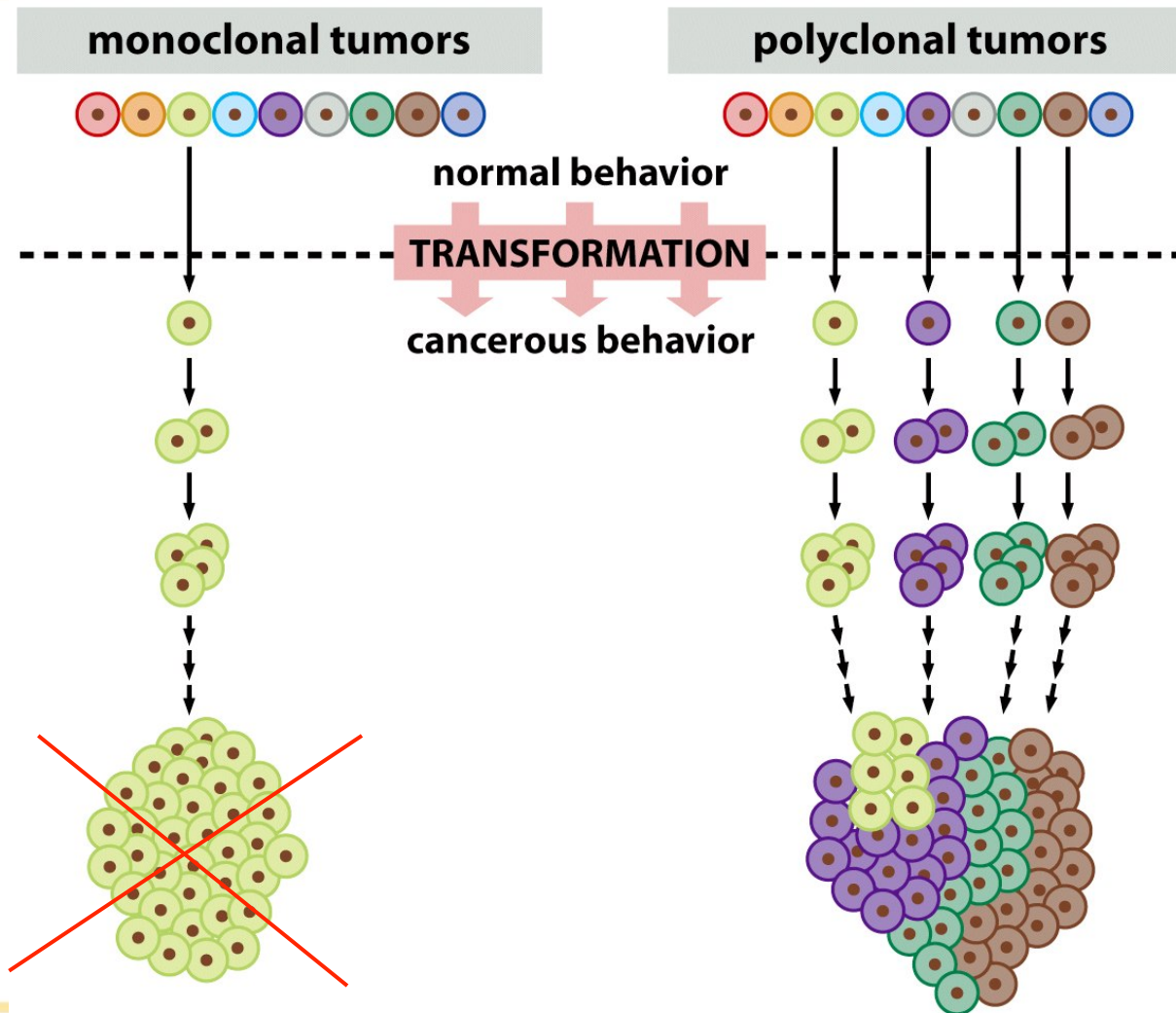
Nádorová heterogenita



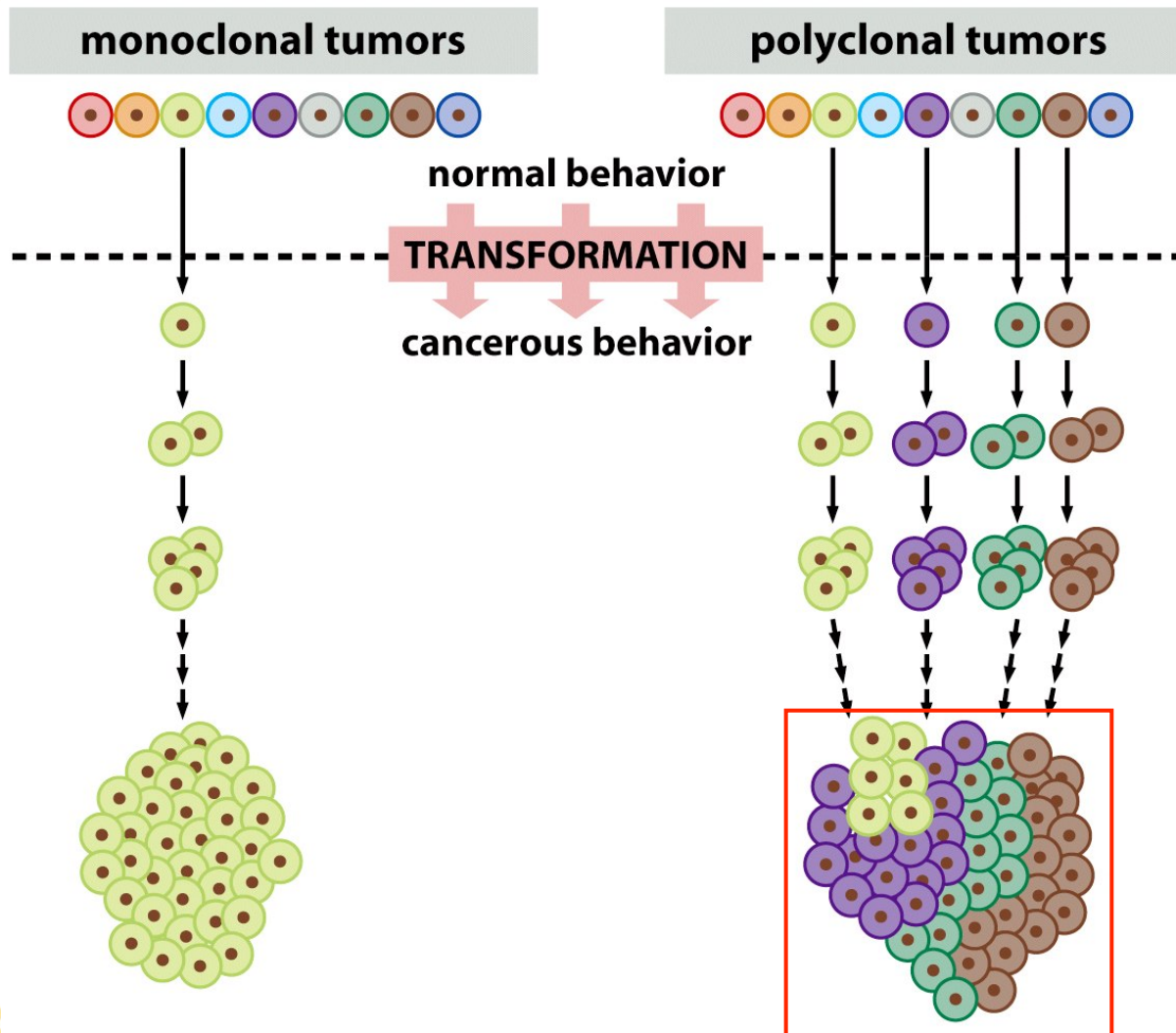
Nádorová heterogenita



Nádorová heterogenita



Nádorová heterogenita



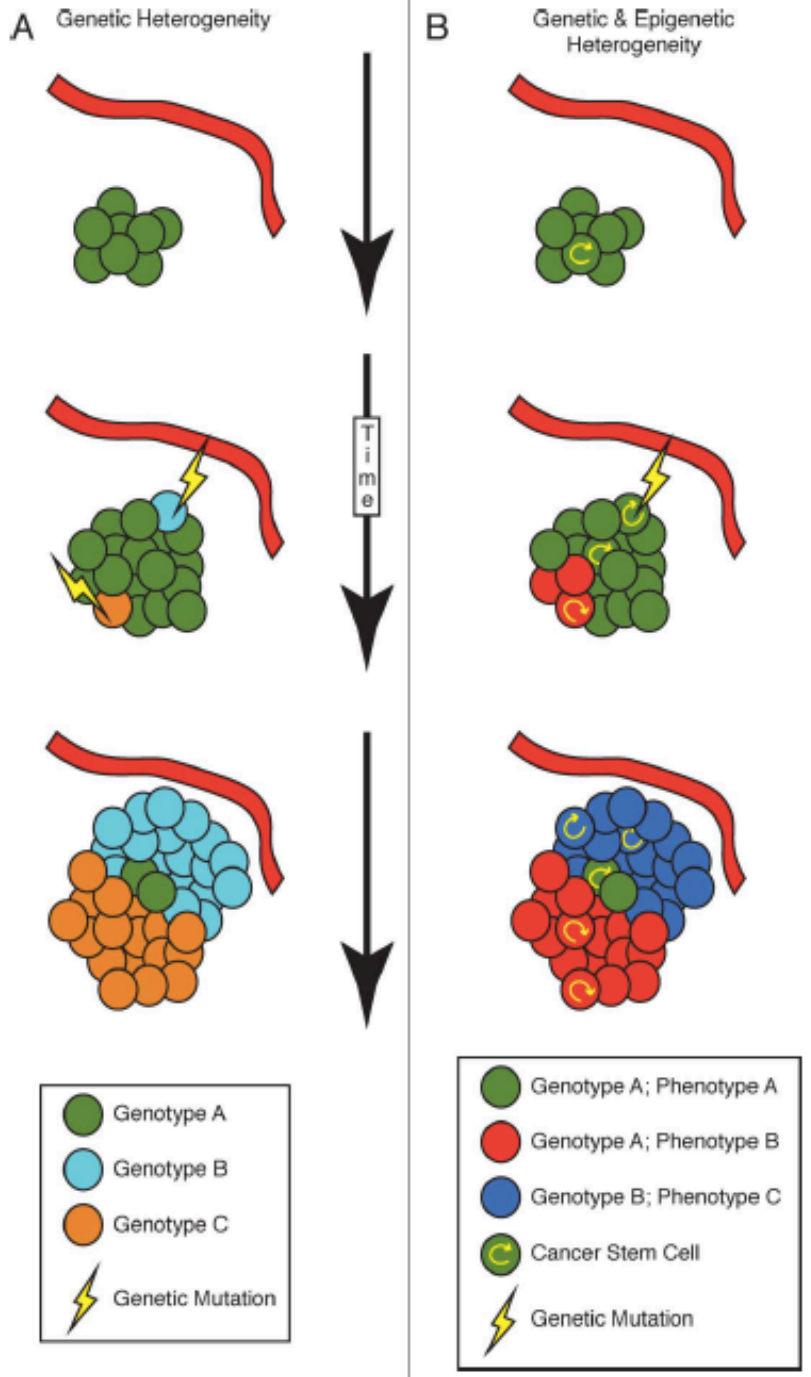
Nádorová heterogenita



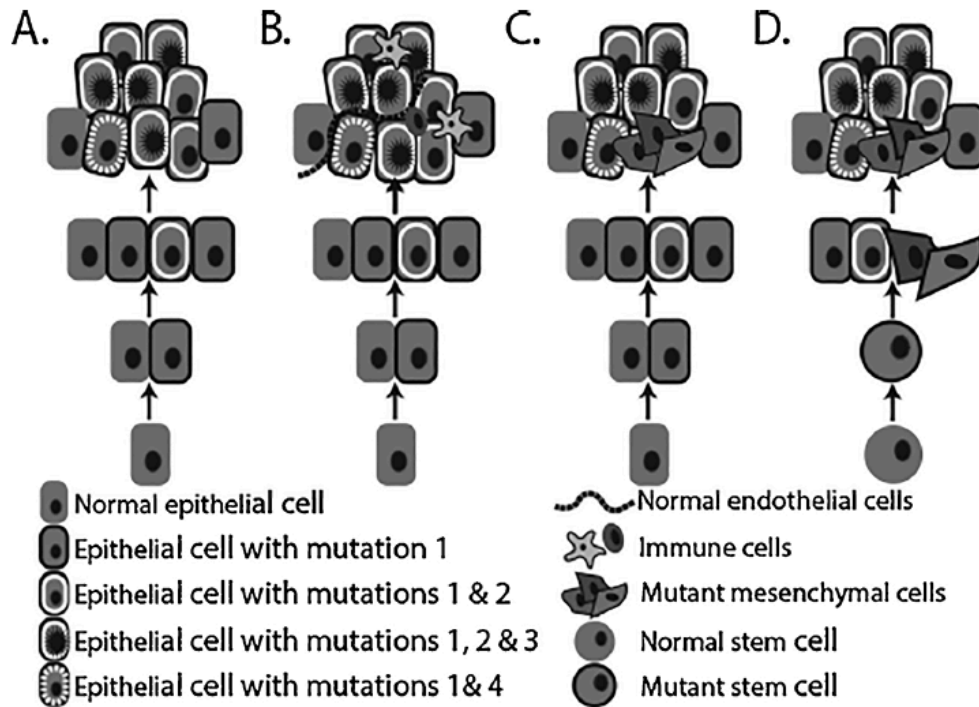
Heterogeneity can arise from both genetic and non-genetic mechanisms. Intratumoral heterogeneity can arise through a variety of mechanisms.

(A) A strictly genetic mechanism can involve genetic mutations (lightening bolt), some of which may give a clone a fitness advantage over nearby tumor cells (light blue and orange genotype is more fit than green genotype). This model can involve genetic fitness being selected for by the local microenvironment.

(B) An alternative model involves cancer stem cells (CSCs), which arise due to differentiation hierarchies that may not involve genetic alterations, but may act in combination with mutations. A self-renewing tumor cell, the CSC, can undergo asymmetric division, increasing the overall number of CSC and non-CSC tumor cells. Genetic mutation of a CSC can lead to the outgrowth of a more fit genetic clone (dark blue), that may or may not be affected by the local microenvironment. Additionally, the microenvironment can trigger phenotypic changes, such as what occurs in a hypoxic environment (red cells). Importantly, if the original clone is outcompeted over time, it would not be detectable in patient biopsies.



Nádorová heterogenita



Four common explanations for how monoclonal tumor origin results in phenotypically and genetically heterogeneous tumors.

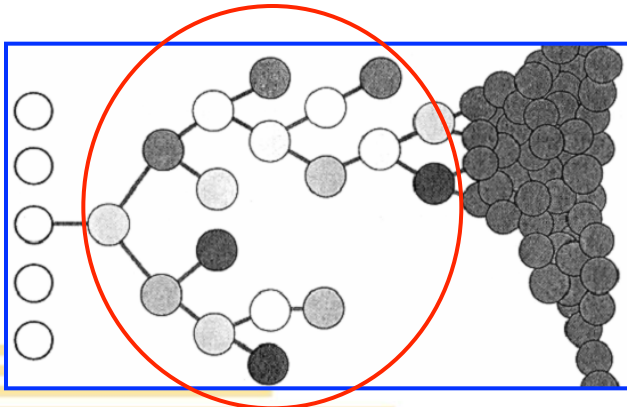
Heterogeneity of monoclonal tumors arises through **mutation accumulation and clonal selection** (A), through **cooperation between malignant and non-malignant cell types** (B), through **epithelial to mesenchymal or mesenchymal to epithelial transitions** (C), and through proliferation and subsequent **differentiation of a mutant stem cell** (D).

Nádorová heterogenita



Genetická heterogenita

- Na počátku vývoje nádorů stojí několik mutací aktivujících protoonkogeny a inaktivujících nádorové supresory (monoklonální původ nádorů).
- Nicméně vývoj nádorů je mnohem komplexnější proces připomínající Darwinovskou evoluci.
- Kombinace mnoha buněčných cyklů nutných k vývoji makroskopického nádoru a zvýšené genetické nestability umožňují značnou genetickou diverzifikaci populace nádorových buněk.



Typy nádorů z hlediska genetické nádorové heterogenity



- Jednoduché klonální nádory
mají minimální úroveň genetické nestability; jsou často řízeny balancovanou translokací; jsou málo geneticky heterogenní.
- Nádory s komplexními klony
nesou stejné řídicí mutace, ale rozdílné subpopulace v nádoru mají privátní genetické anomálie; ty jsou „běžně“ neutrální, ale mají potenciál stát se řídicími mutacemi rezistence k cílené léčbě.
- Mozaikové nádory
složeny z buněk, které sdílejí některé prvotní genetické události, ale klonální heterogenita je značná.

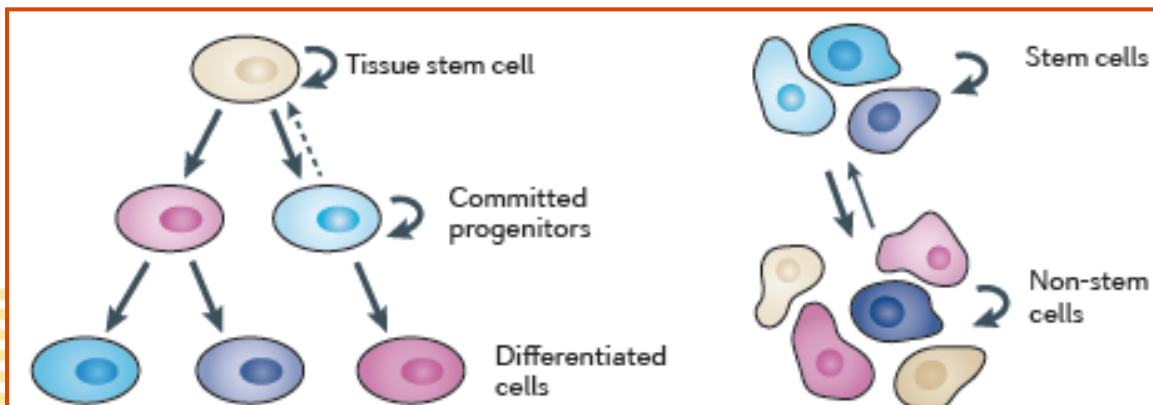
Nádorová heterogenita



Negenetická heterogenita

- Je vlastní **normálním** tkáním: téměř všechny buňky mají stejný genotyp, ale výrazně se fenotypově liší.
- Je dvou typů: (1) **deterministická**: související s tkáňově specifickou diferenciační hierarchií; a (2) **stochastická**, která je odrazem přechodných rozdílů mezi jednotlivými buňkami v důsledku fluktuace biochemických procesů, genové exprese a organizace chromatinu.
- Diferenciační hierarchie **nádorových** tkání (i) odráží to, co je shrnuto v konceptu CSC (*Cancer Stem Cell*): do určité míry kopíruje normální diferenciaci v normálních tkáních plus navýšená ochota k dediferenciaci v důsledku onkogenních mutací;

(ii) míra diferenciace je významným prognostickým faktorem.

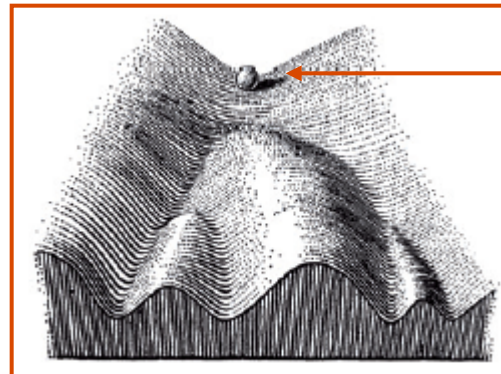
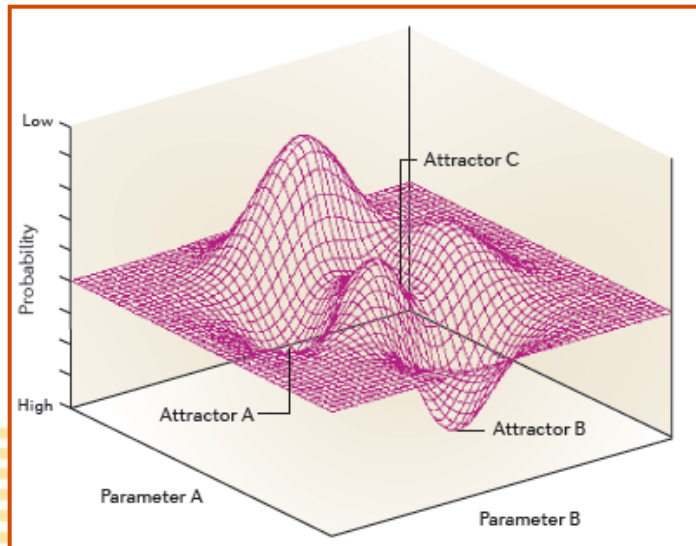


Nádorová heterogenita



Negenetická heterogenita nádorových tkání

- Epigenetická krajina a síť genové regulace: (a) vrcholy a údolí znázorňují přechodné a stabilní fenotypové stavy; (b) na osách hladiny některých určujících faktorů: (i) např. transkripčních faktorů spojených s diferenciací, tj. vnitřní stav buněk; (ii) růstových faktorů v okolí buňky, tj. vliv nádorového mikroprostředí (komplexní: angiogeneze, přestavba ECM, zánět, ...)
- Dynamika evoluce populace nádorových buněk vede ke koexistenci klonálních variant s genetickými a epigenetickými rozdíly – a to vše s mnoha biologickými a klinickými důsledky.



buňka

Marusyk A. et al., *Nature Rev.* 2012

Co ovlivňuje buněčný fenotyp: normální vs. nádorová tkáň



- Onkogenní mutace v nádorových buňkách navyšují stochastickou fluktuaci (noise) buněčných procesů, což může navyšovat šanci na překonání „hřebene“ epigenetické krajiny a k fenotypovému „přepnutí“.
 - Genotyp je homogennější v normální tkáni než v nádorové tkáni (genetická nestabilita).
 - Mikroprostředí je v normální tkáni mnohem strukturovanější a má jen omezený a organizovaný počet niches. Nádorová tkáň je dezorganizovaná, má mnohem více a méně vyhraněných niches.
 - V normální tkáni je stabilnější regulační síť s nižším počtem signálů ovlivňujících genovou expresi.
- ⇒ Integrace všech těchto vlivů vede k **vyšší variabilitě méně stabilních buněčných fenotypů** u nádorů ve srovnání s normální tkání.

Co ovlivňuje buněčný fenotyp: normální vs. nádorová tkáň



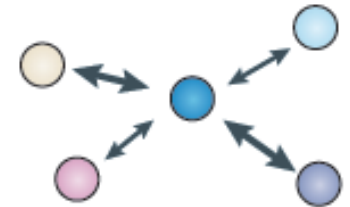
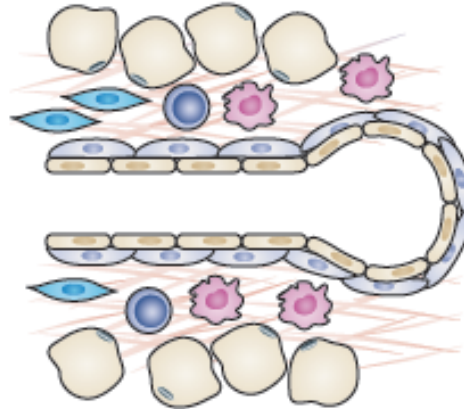
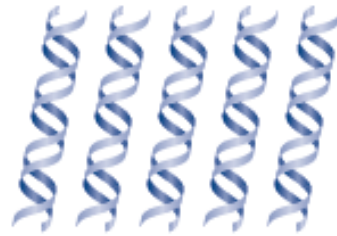
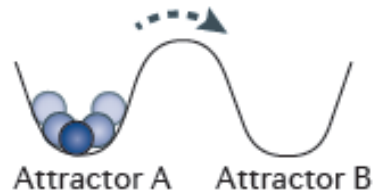
Normal tissue: low phenotypic heterogeneity

Noise: low

Genotypes: homogeneous

Microenvironment: structured

Network architecture: robust



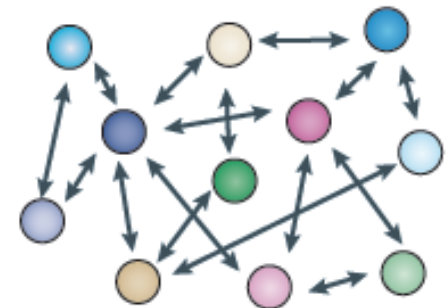
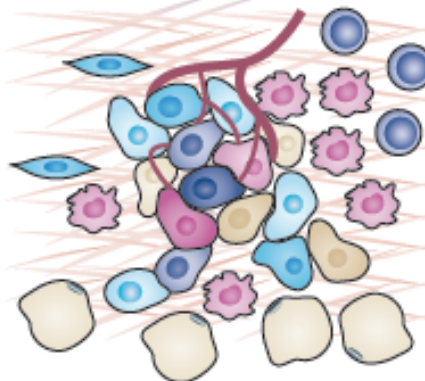
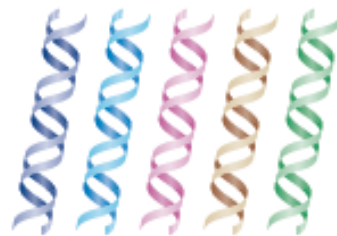
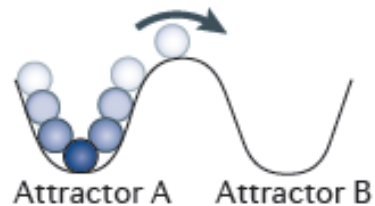
Tumour: high phenotypic heterogeneity

Noise: high

Genotypes: heterogeneous

Microenvironment: disorganized

Network architecture: noisy

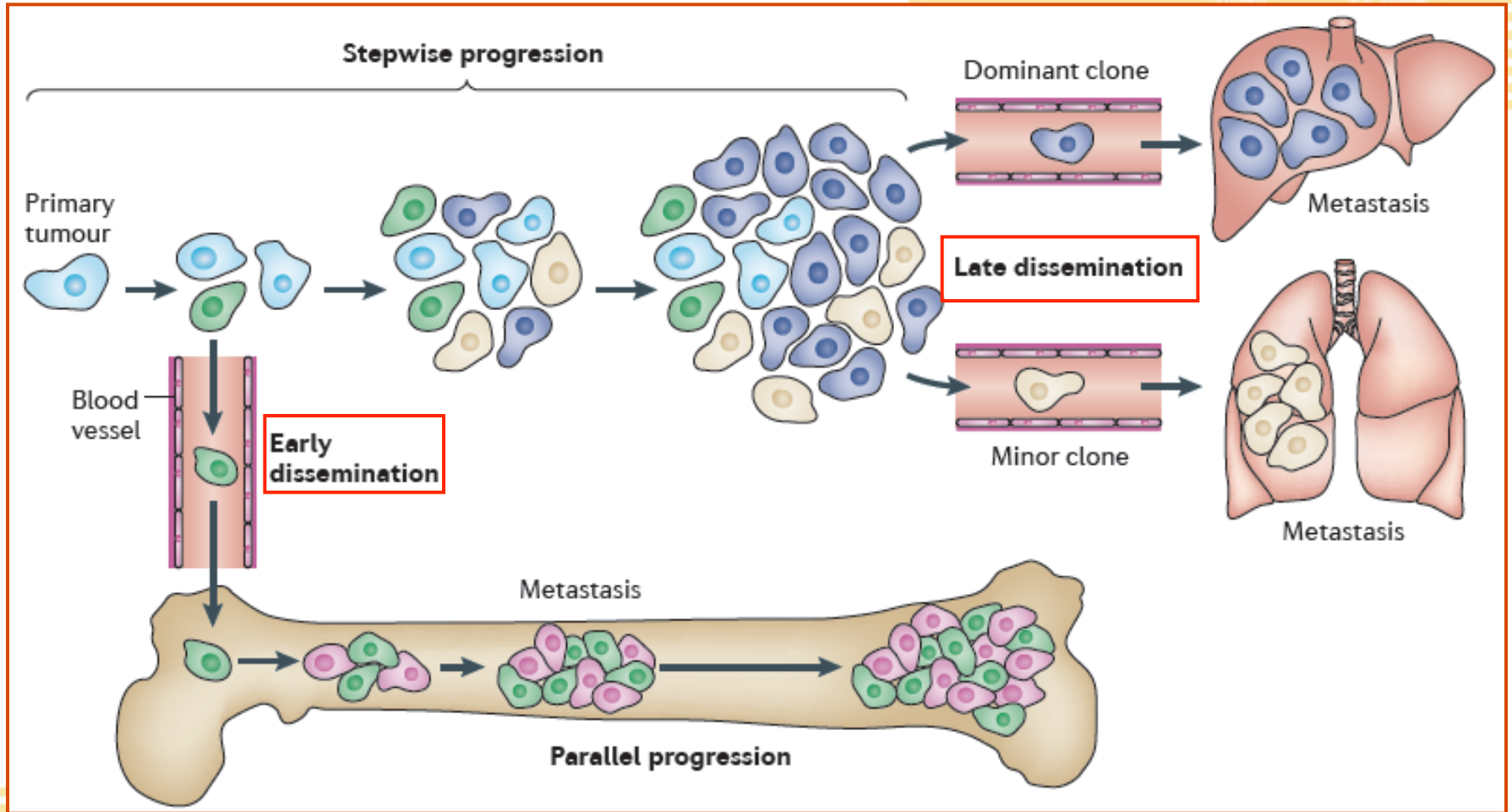


Heterogenita v metastázách

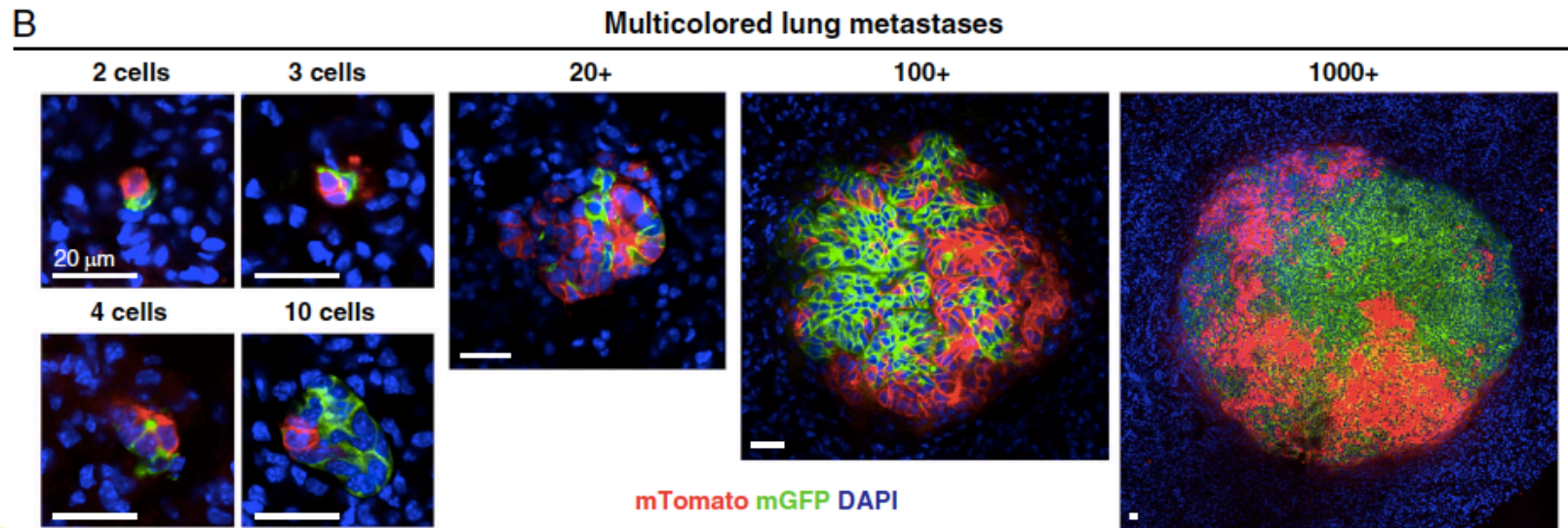
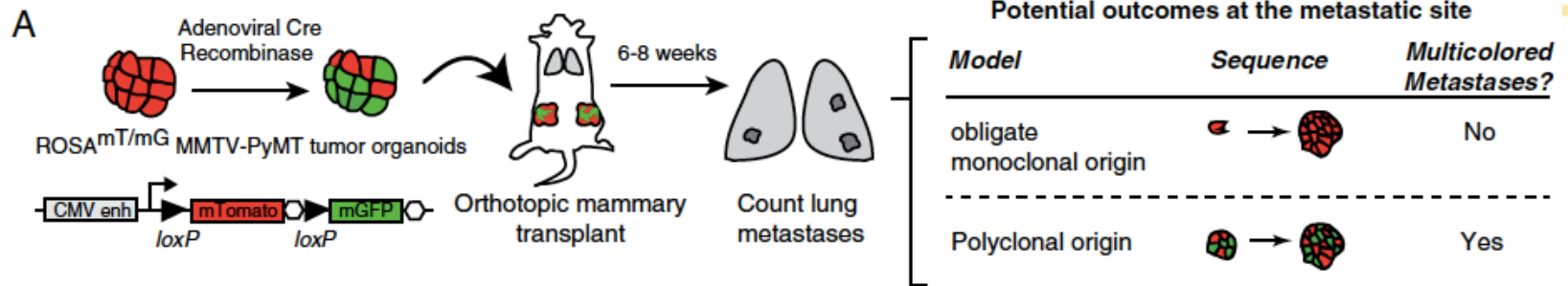


- Otázka intranádorové – včetně „intra- i inter-metastázové“ – heterogenity je nesmírně důležitá i v souvislosti s tím, že terapeutická rozhodnutí se nejvíce dělají na základě analýzy primárních nádorů, ale nejčastější příčinou smrti bývají vzdálené metastázy...
- Dva krajní modely: (1) získání metastatického potenciálu jako finální krok v progresi nádoru z nejagresivnějšího klonu primárního nádoru → pak značná podobnost primárního nádoru a metastáz; (2) raný rozsev nádoru a spíše paralelní progrese nádoru primárního a metastáz → může vést ke značným rozdílům...
- Experimentálně lze doložit oba modely a samozřejmě mnoho možných variant mezi nimi..
- Obecně: nelze zobecňovat - ani jeden ze dvou uvedených modelů...

Heterogenita v metastázách



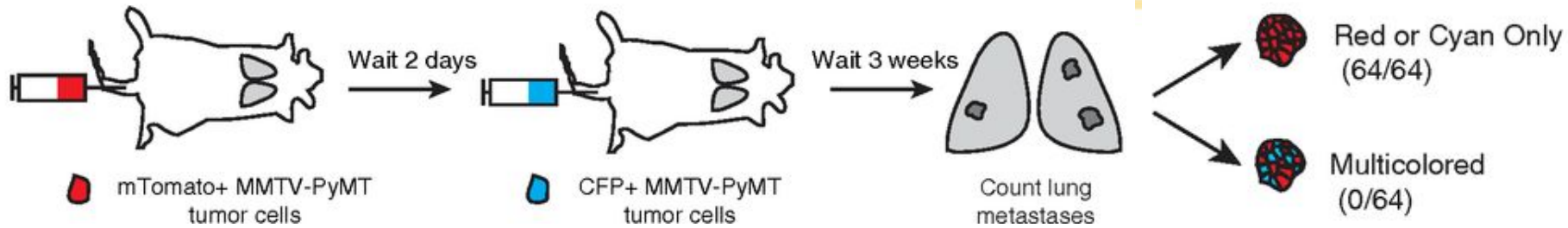
Heterogenita v metastázách – polyklonální původ



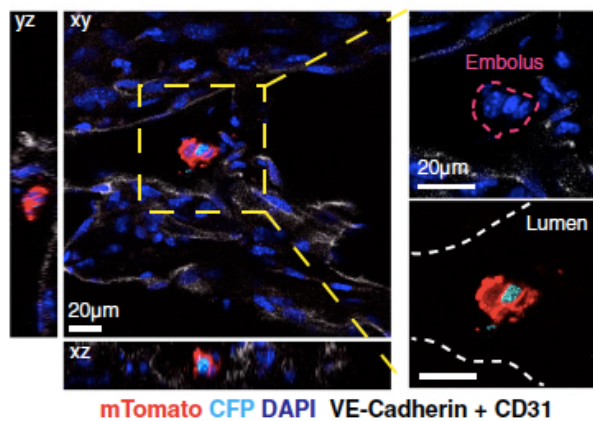
Heterogenita v metastázách – polyklonální původ



Serial seeding?

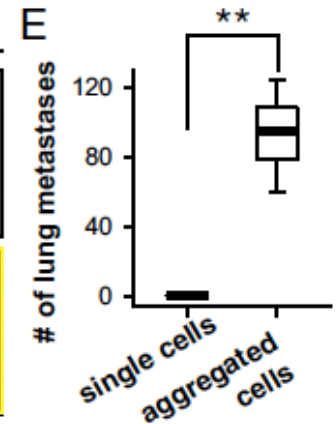
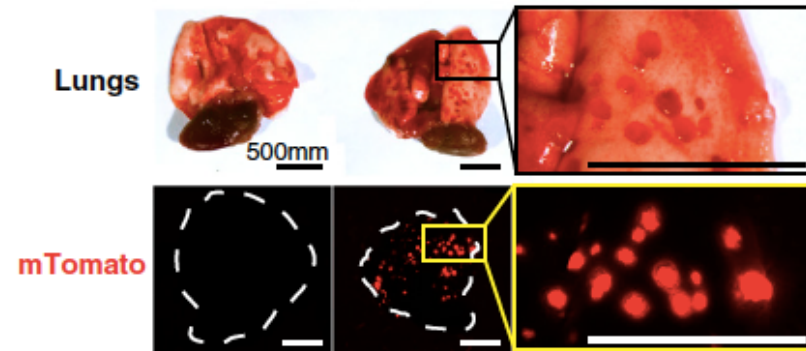


D Multicolored intravascular emboli

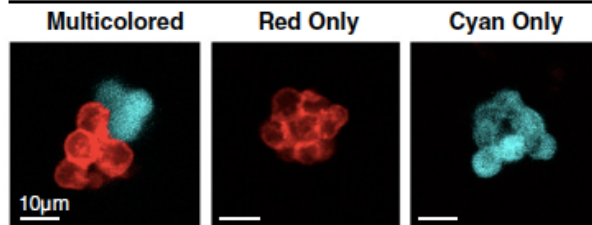


Výhoda polyklonálního seedingu?

D Input: single cells aggregated cells inset (lung metastases)



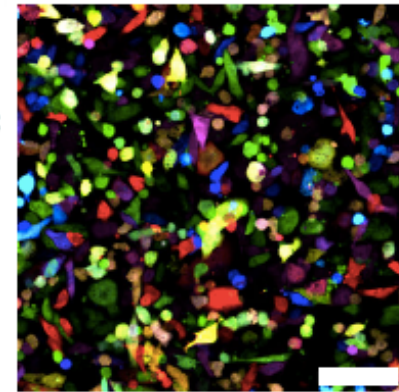
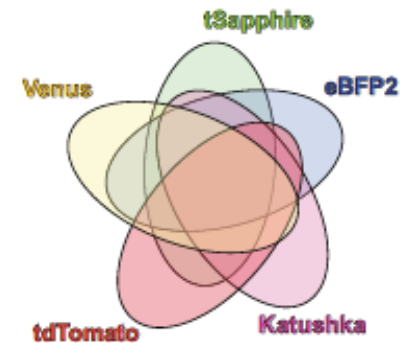
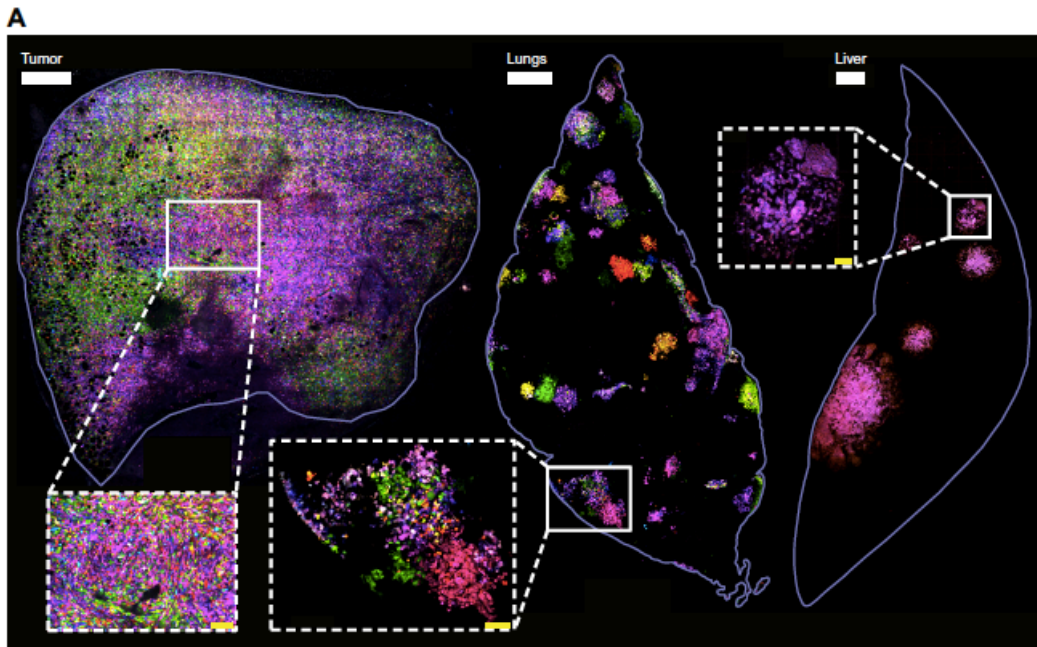
F Circulating tumor cell clusters



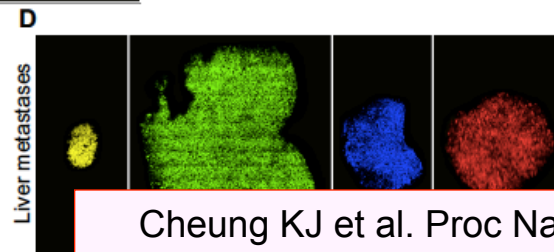
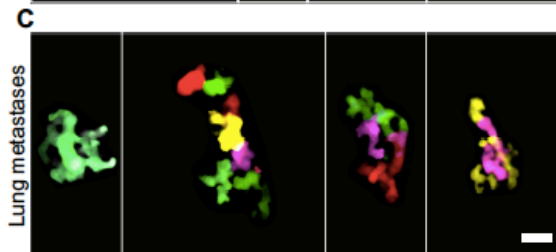
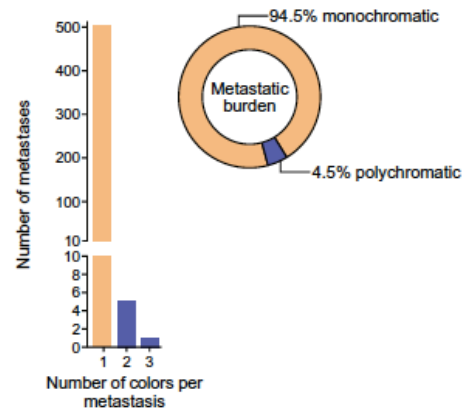
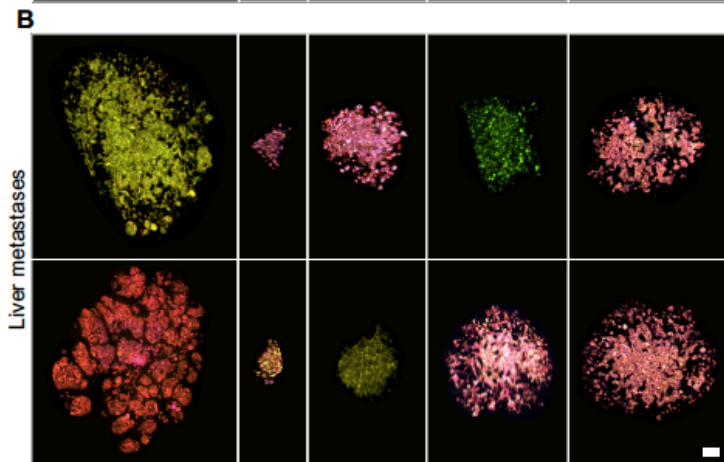
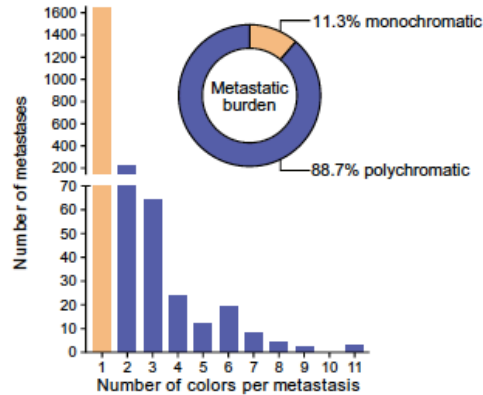
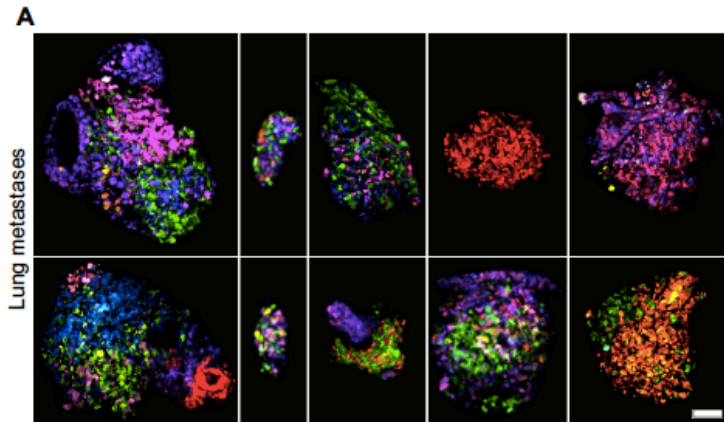
Heterogenita v metastázách – polyklonální původ



optical barcoding approach based on a multicolor panel of Lentiviral Gene Ontology (LeGO) vectors



Heterogenita v metastázách – polyklonální původ



Intrametastatická heterogenita metastáz v plicích a játrech

Většina metastáz monochromatická, ale více polychromatických mets v plicích (17 %) než v játrech (1.2 %)

Ale těchto 17 % tvoří téměř 90 % celkového objemu metastáz v plicích

Některé klony častěji spolu v polychromatických ložiscích

Důsledky nádorové heterogenity

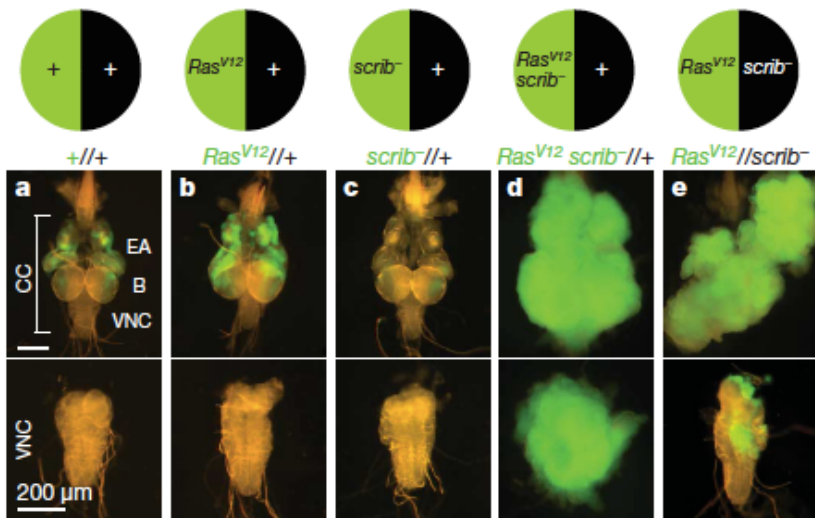


Biologické

- Klonální heterogenita jako pohon evoluce nádoru
- Biologické interakce mezi odlišnými nádorovými klony

Kooperace mezi různými klony – v očních discích *Drosophily*:

1. klon s overexpresí mutantní formy Ras onkogenu – mírný růst
2. Klon deficientní pro TS Scribble – buněčná smrt
3. Oba klony v blízkosti – velké metastatické tumory



Důsledky nádorové heterogenity

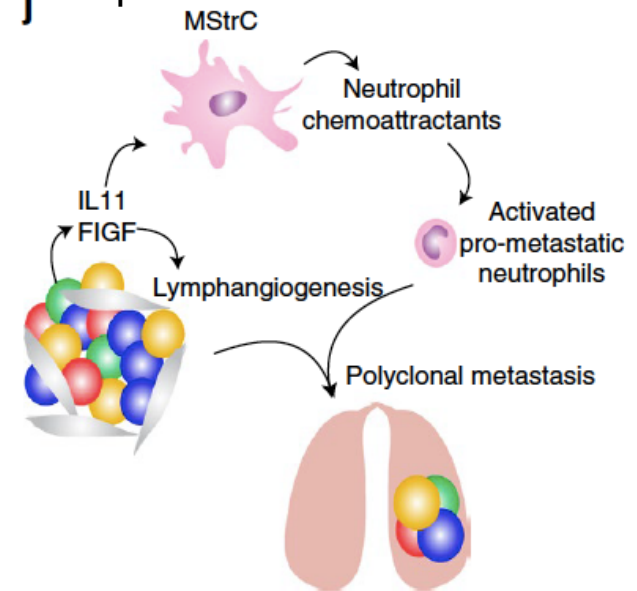
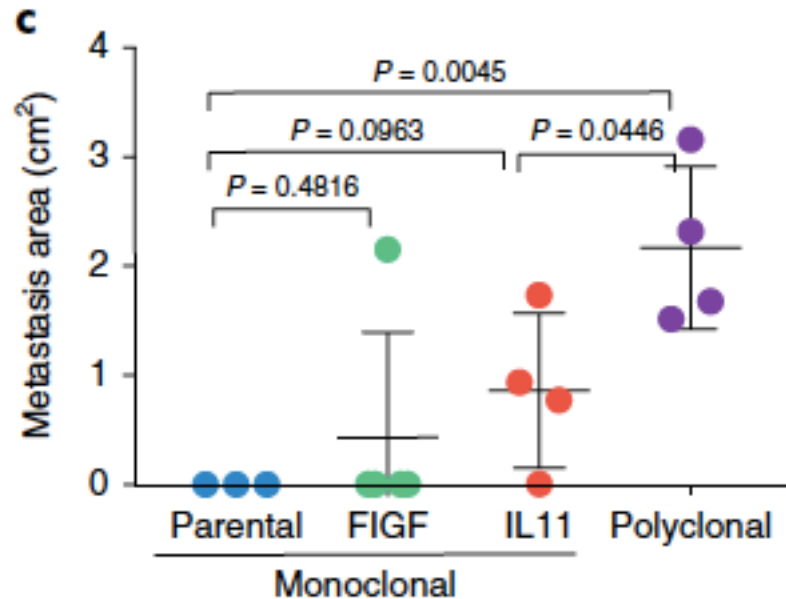


Biologické

- Klonální heterogenita jako pohon evoluce nádoru
- Biologické interakce mezi odlišnými nádorovými klony

Subclonal cooperation drives metastasis by modulating local and systemic immune microenvironments

Polyclonal tumours initiated from 5% IL11+ and 5% FIGF+RFP+ cells with 90% GFP+ parental cells grew faster and were more metastatic than monoclonal, and parental tumours



Důsledky nádorové heterogenity

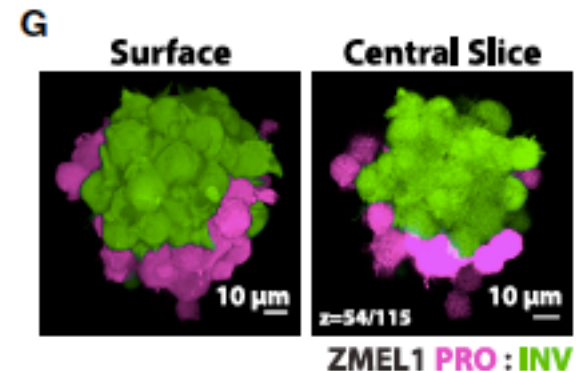
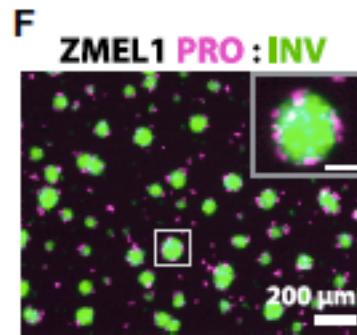
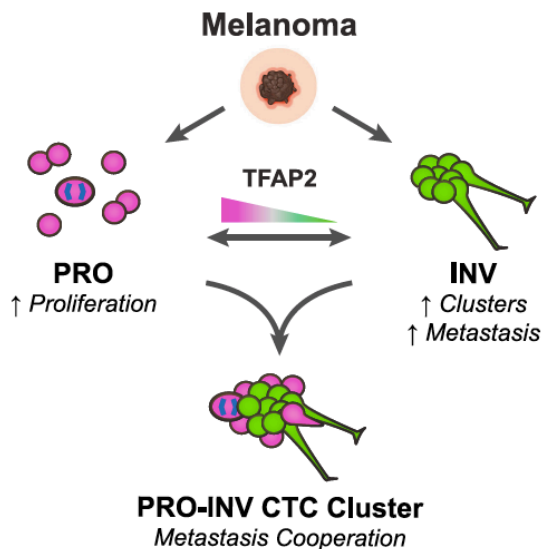


Biologické

- Klonální heterogenita jako pohon evoluce nádoru
- Biologické interakce mezi odlišnými nádorovými klony

Cooperation between melanoma cell states promotes metastasis through heterotypic cluster formation

Melanomas can have multiple coexisting cell states, including proliferative (PRO) versus invasive (INV) subpopulations that represent a “go or grow” trade-off; INV and PRO cells form spatially structured heterotypic clusters and cooperate in the seeding of metastasis, maintaining cell state heterogeneity. INV cells adhere tightly to each other and form clusters with a rim of PRO cells.



Důsledky nádorové heterogenity



Biologické

- Klonální heterogenita jako pohon evoluce nádoru
- Biologické interakce mezi odlišnými nádorovými klony

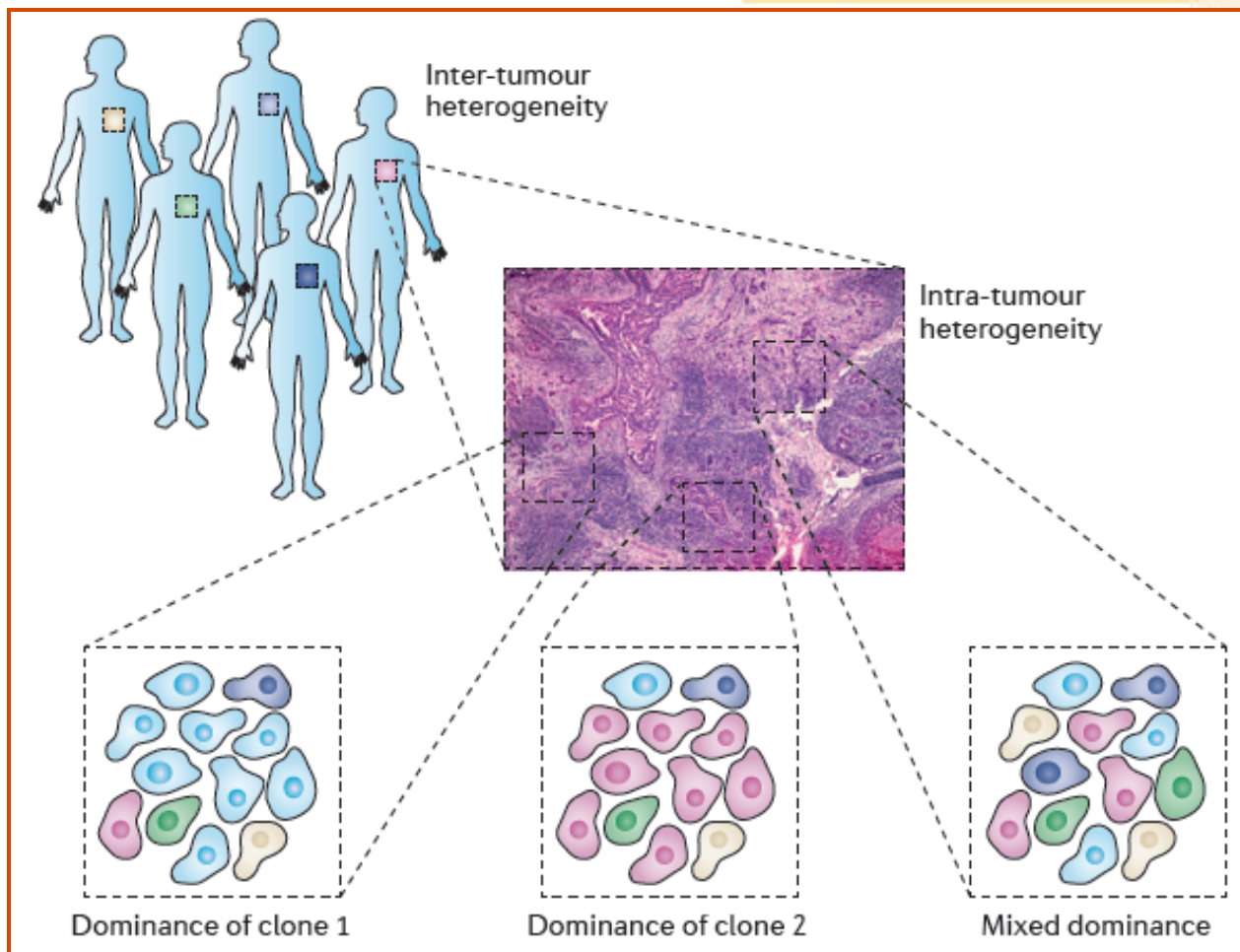
Klinické

- „**Sampling**“ (výběr vzorku k analýze) a heterogenita v klinické diagnóze
- ...

Marusyk A. and Polyak K., *Biochim Biophys Acta* 2010

Marusyk A. et al., *Nature Rev.* 2012

Heterogenita v klinické diagnóze



Důsledky nádorové heterogenity



Biologické

- Klonální heterogenita jako pohon evoluce nádoru
- Biologické interakce mezi odlišnými nádorovými klony

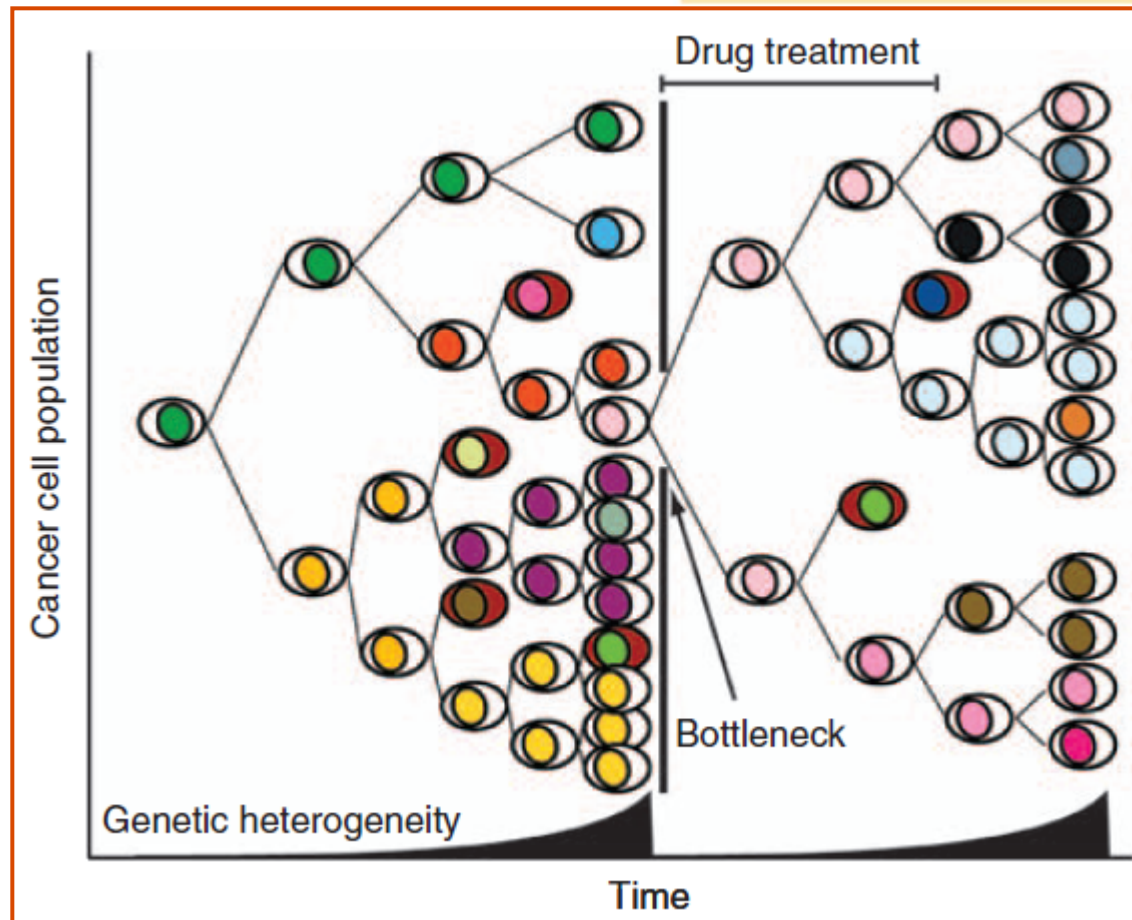
Klinické

- „Sampling“ (výběr vzorku k analýze) a heterogenita v klinické diagnóze
- Heterogenita v odpovědi na **terapii** (→ selekce: „bottleneck“ a dočasná redukce heterogenity → další evoluce, progresse rezistentních klonů...)

Marusyk A. and Polyak K., *Biochim Biophys Acta* **2010**

Marusyk A. et al., *Nature Rev.* **2012**

Heterogenita v odpovědi na terapii



„Získaná“ rezistence k terapii



- Podle současných znalostí je klinický obraz tzv. získané rezistence k terapii spíše následkem přítomnosti již existujících odolných klonů, které jsou „pouze“ vyselektovány léčbou. Např. v komplexních klonálních GIST s mutací *KIT* nesou všechny buňky aktivační mutaci *KIT*, ale mnohočetné sekundární mutace *KIT* lze nalézt u subklonů daného nádoru a mají schopnost způsobit rezistenci k léčbě.
- obecně: Nádory s vysokou mírou genetické nestability a s vysokým stupněm genetické heterogenity jsou spojeny se špatnou prognózou.

Děkuji za pozornost!

