1. Molekulární podstata vzniku a vývoje nádorů. Molekulární patologie nádorů.
2. Metody molekulární patologie

Doc. RNDr. Jana Šmardová, CSc.

Ústav patologie FN Brno
PřF a LF MU v Brně

14.10.2010

Osnova přednášky 1.

- obecné rysy kancerogeneze
- regulace buněčného cyklu: vybrané onkogeny a nádorové supresory: HER2/neu, TGF-ß, Ras, Myc, APC/ ß-katenin
- genetická nestabilita
- p53
- vývoj kolorektálního karcinomu: model kancerogeneze

Doporučená literatura

- Zdeněk Adam, Jiří Vorlíček, Jana Koptíková:
  „Obecná onkologie a podpůrná léčba"
  Kapitola 2: Jana Šmardová, Jitka Pacholíková:
  Molekulární podstata kancerogeneze

- Robert A. Weinberg:
  „Jediná odrodilá buňka"

- Robert A. Weinberg:
  „The Biology of Cancer" (Garland Science 2007)

Nádor, tumor, neoplazma, novotvar

- geneticky podmíněný abnormální přírůstek buněčné tkáňové hmoty klonálního charakteru. Jeho růst není v koordinaci s růstem okolních tkání a rovnovážným stavem organismu

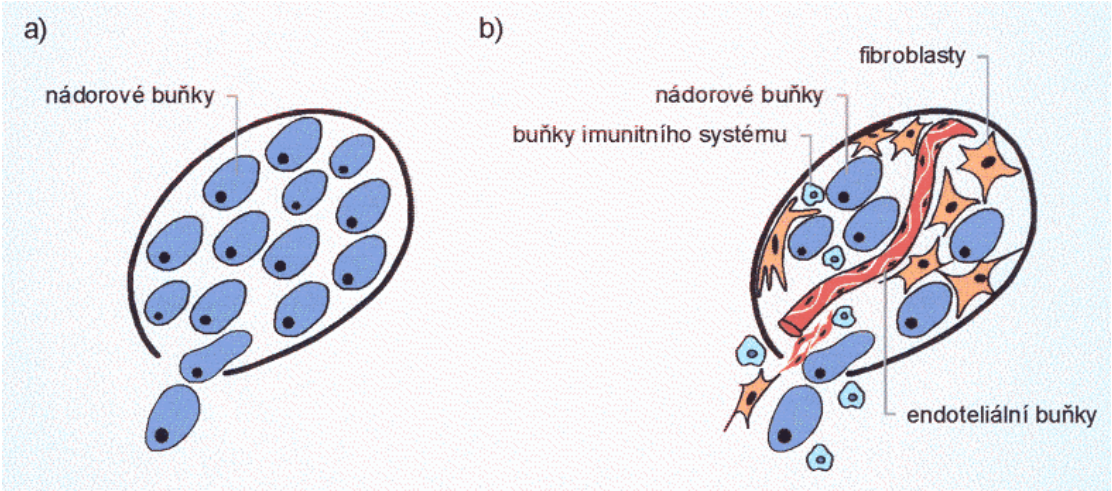
Kancerogeneze

- proces vzniku a vývoje nádoru
- vícestupňový proces
- podstatou kancerogeneze je postupné hromadění genetických (a epigenetických) změn

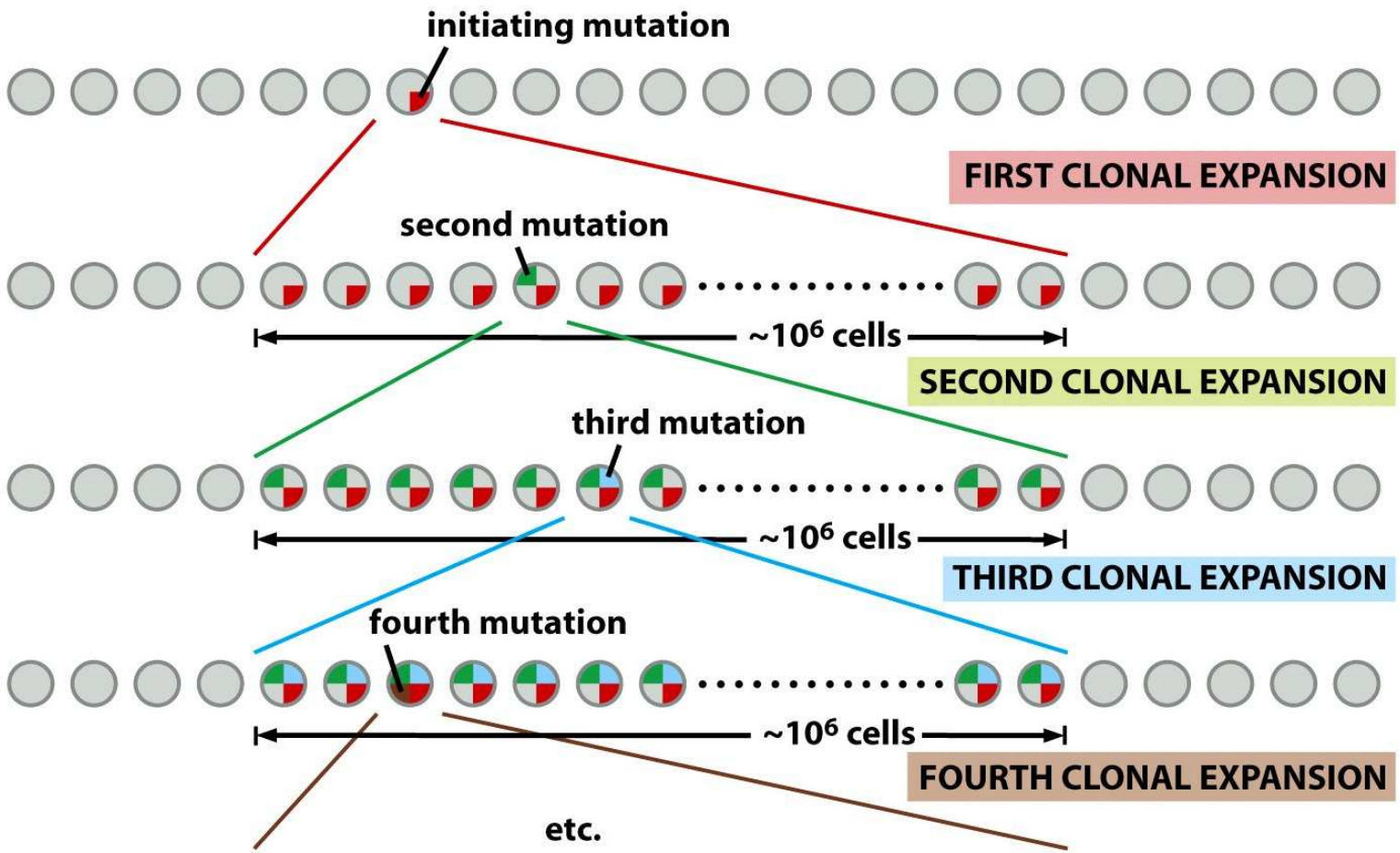
Neoplastická transformace

- přeměna somatické buňky v buňku nádorovou

Nádor je komplexní tkáň



Vícestupňová kancerogeneze: postupné hromadění genetických změn spojené s kroky klonální expanze

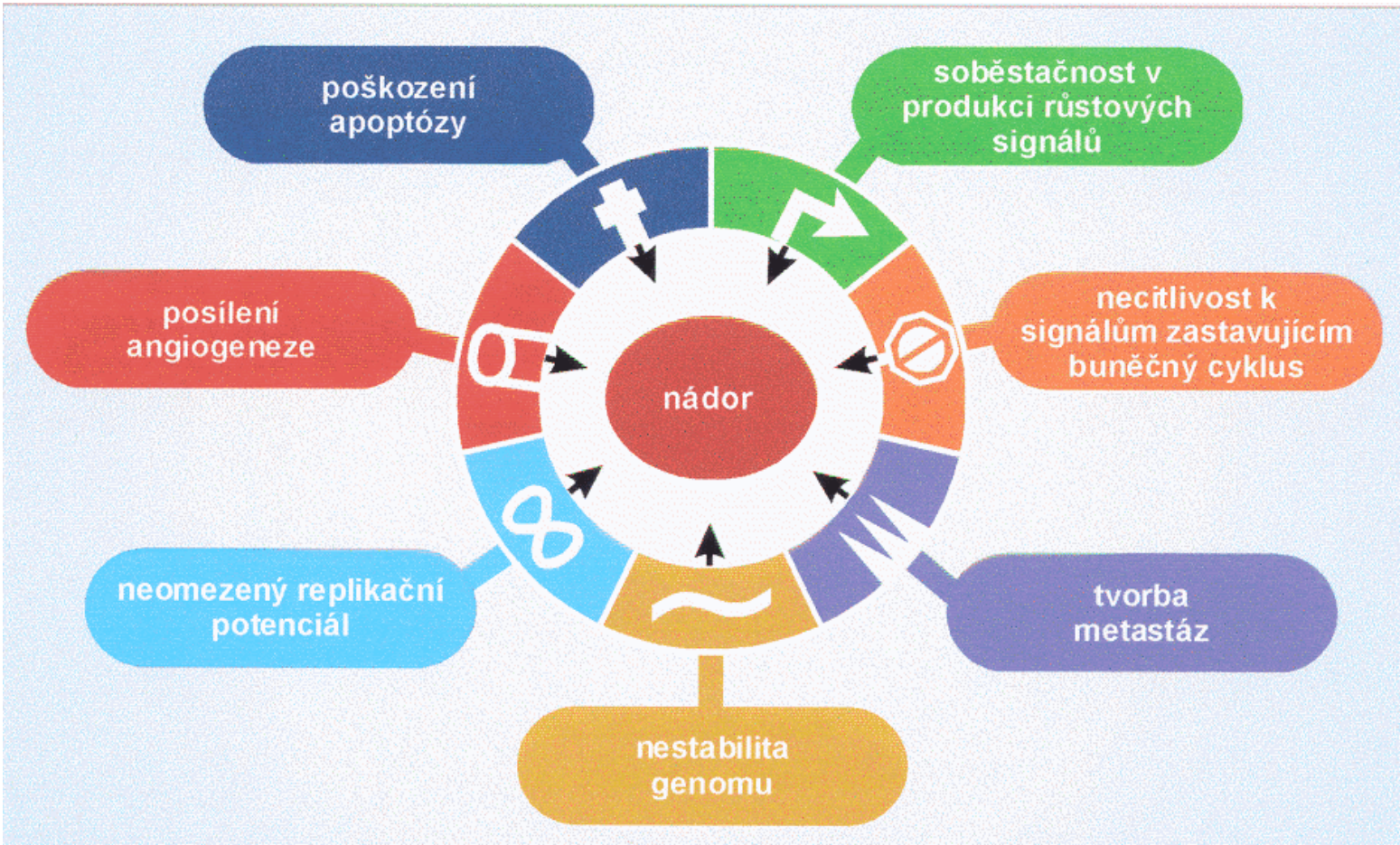


Šest získaných vlastností maligního nádoru

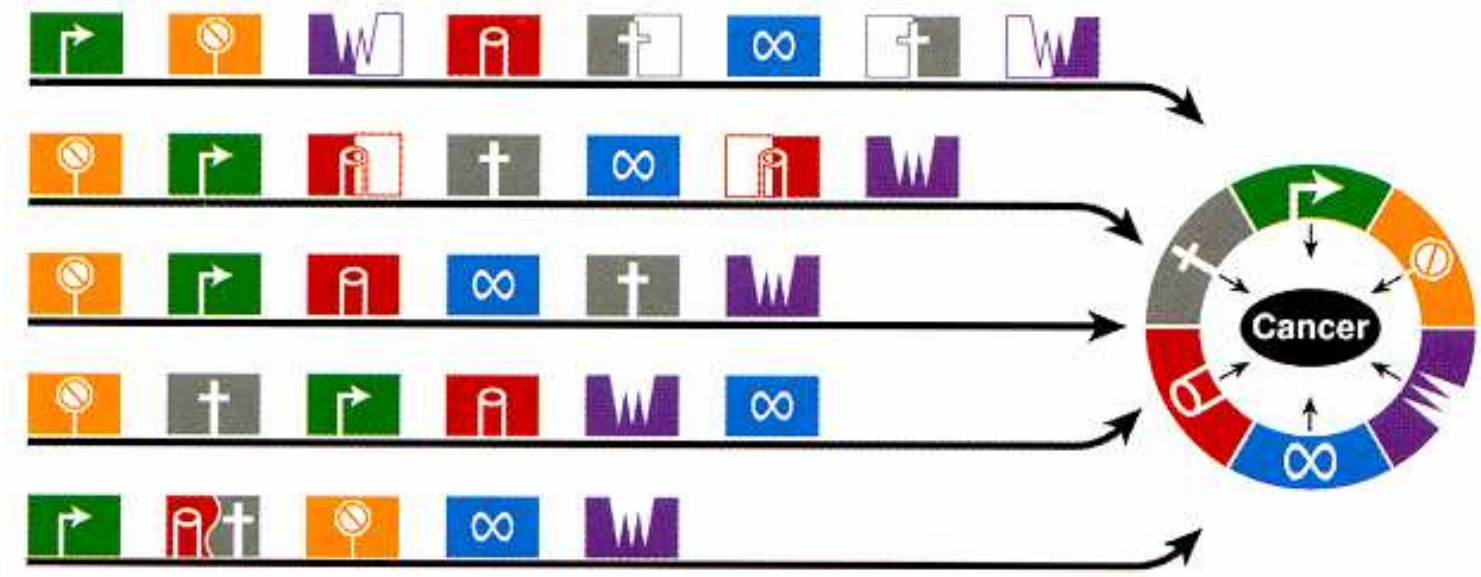
získaná schopnost	příklad
soběstačnost v produkci růstových signálů	aktivace H-*ras*
necitlivost k signálům zastavujícím b.c.	ztráta RB
poškození apoptózy	produkce IGF
neomezený replikační potenciál	aktivace telomerázy
posílení angiogeneze	produkce VEGF
tvorba metastáz	inaktivace E-Kadherinu

nestabilita genomu jako podmínka akumulace všech nutných změn

Kancerogeneze má obecné rysy



Kancerogeneze má <u>individuální průběh</u>



Individuální je - pořadí zásahů

- počet zásahů

- <u>konkrétní zasažené geny</u>

Onkogeny

Protoonkogen je strukturní gen eukaryotické buňky, který se svým translačním produktem podílí do značné míry na regulaci dělení buněk a jejich diferenciace.

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

Mutace protoonkogenů jsou:

- aktivující
- dominantní
- vyskytují se v somatických buňkách a jen výjimečně v zárodečných buňkách

Nádorové supresory

Produkty genů pro nádorové supresory (**antionkogeny**) v normálních buňkách nevyvolávají proliferaci, ale naopak ji potlačují a udržují buňky ve stadiu klidu (G_0). Jejich ztráta se projevuje neregulovanou proliferací.

Mutace nádorových supresorů jsou:

- inaktivující
- recesivní (spojeno s LOH)
- vyskytují se v somatických a také v zárodečných buňkách

Šest získaných vlastností maligního nádoru

získaná schopnost	příklad
soběstačnost v produkci růstových signálů	aktivace H-*ras*
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

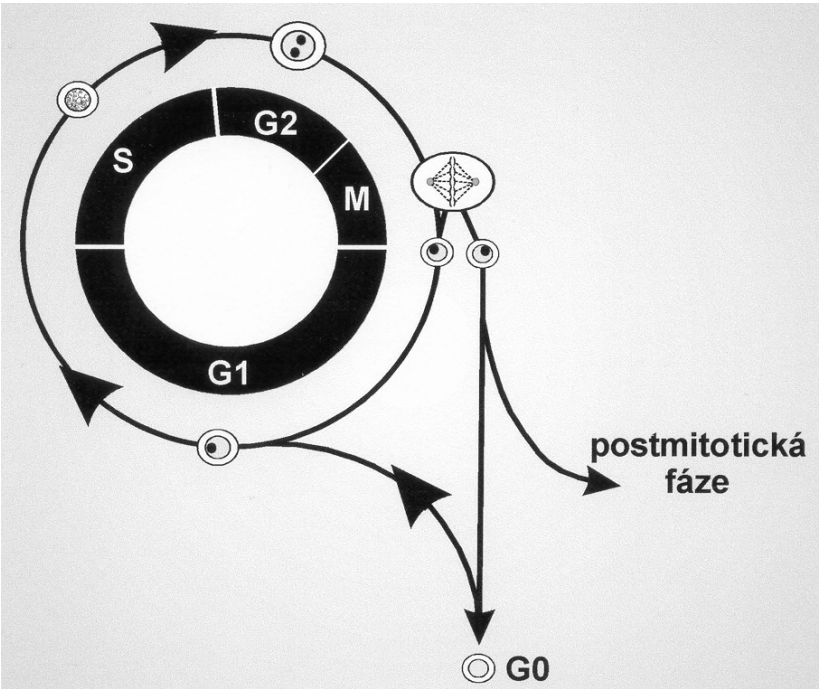
nestabilita genomu jako podmínka akumulace všech nutných změn

Šest získaných vlastností maligního nádoru

získaná schopnost	příklad
soběstačnost v produkci růstových signálů	aktivace H-*ras*
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

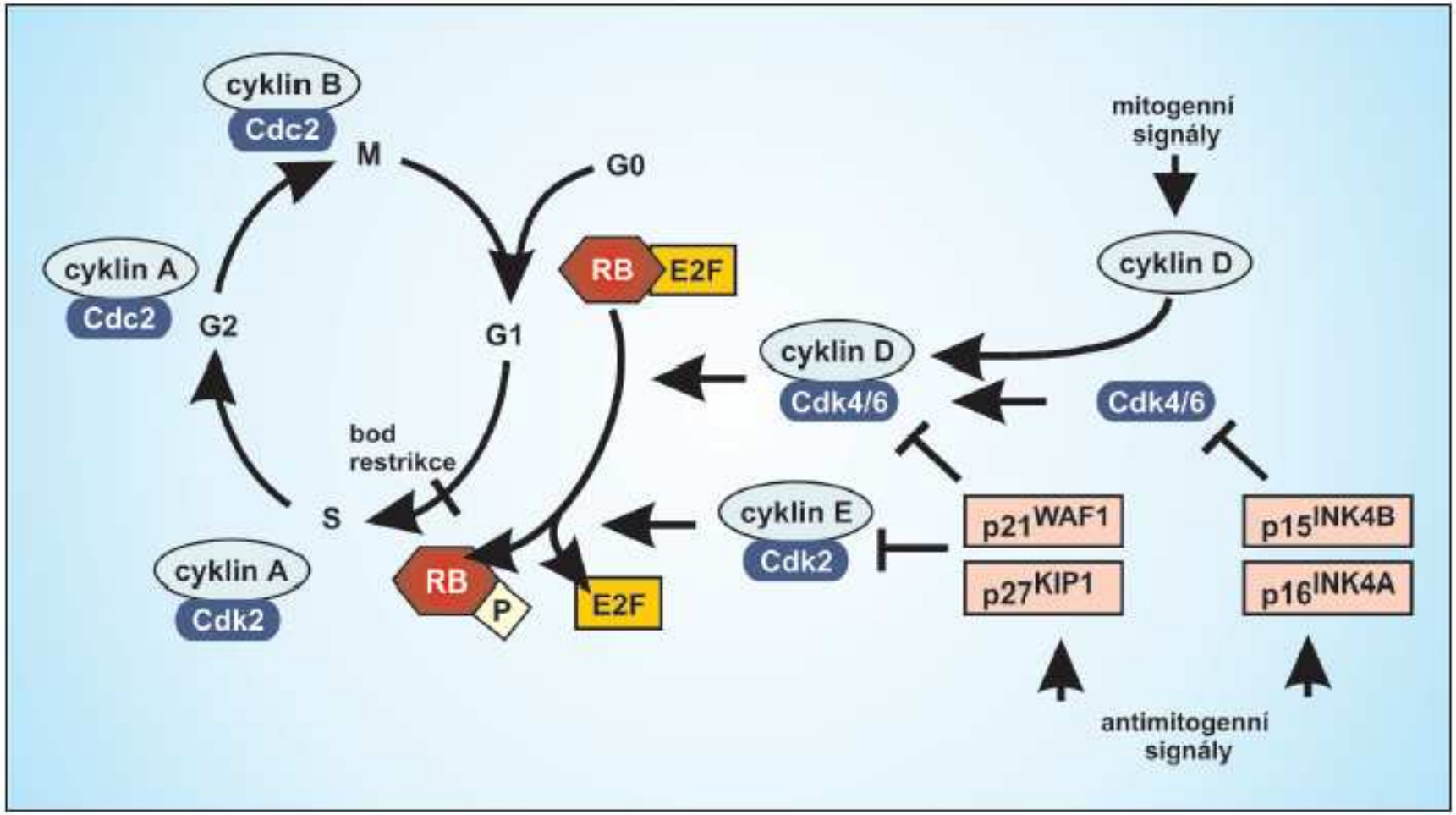
nestabilita genomu jako podmínka akumulace všech nutných změn

Je rakovina nemoc buněčného cyklu?



- Ztráta regulace buněčného cyklu je **kritická** součást buněčné transformace.
- Ztráta regulace buněčného cyklu není jedinou součástí kancerogeneze, většinou sama o sobě není plně transformující.

Regulace buněčného cyklu - bod restrikce - regulace fosforylace RB

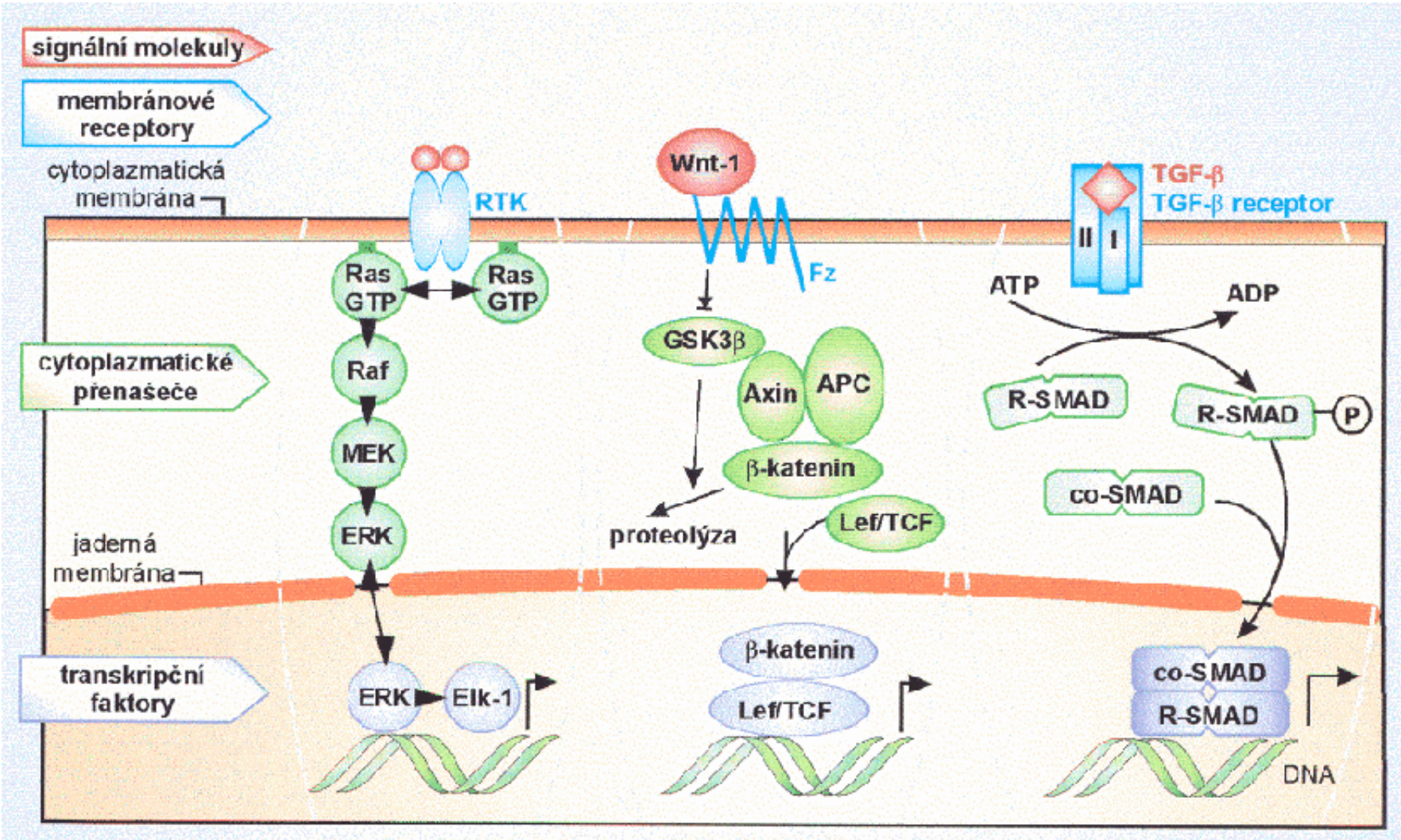


Co je poškozeno při transformaci?

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

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

Příklady signálních drah



Růstové faktory a RTK receptory

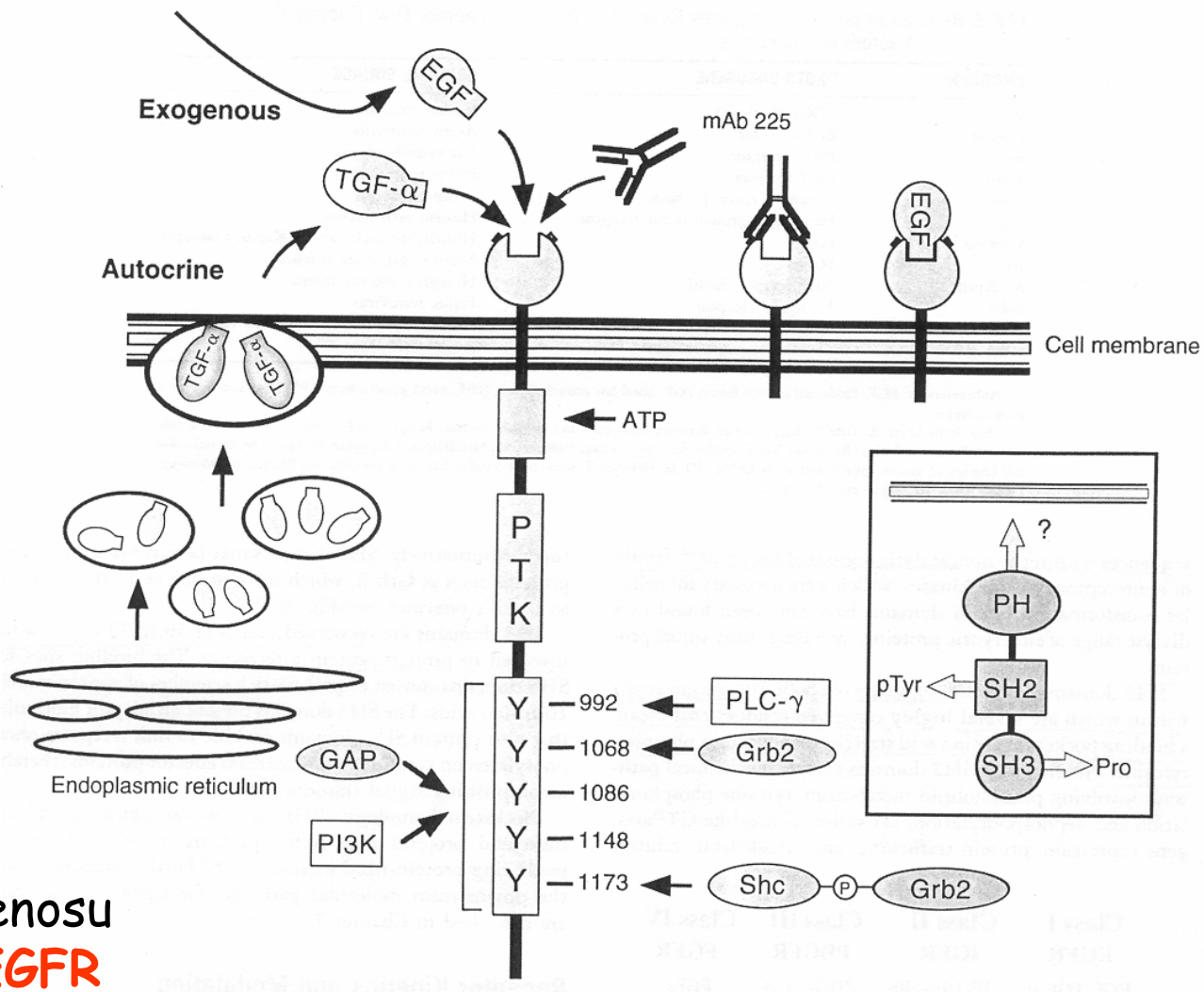


Schéma přenosu signálu na EGFR

Typy mutací postihující růstové faktory a RTK receptory

- Produkce/nadprodukce (vlastních) růstových signálů (→ autokrinní stimulace).
- Amplifikace receptoru: (1) neadekvátně efektivní „vychytávání" extracelulárního signálu - buňky s koncentrovaným receptorem jsou pozitivně stimulovány k buněčnému cyklu, i když hladina extracelulárního signálu je nízká a za normálních okolností by mitogenní dráhu neaktivovala; (2) koncentrace receptorových proteinů na povrchu buňky tak vysoká, že se molekuly nahodile setkávají a dimerizují i bez vazby ligandu.
- Změna struktury receptoru: jeho aktivace nezávislá na vazbě ligandu (bodovými mutacemi, krátkými delecemi, zkrácené formy, v důsledku fúze s jinými geny,…).

Příklad membránového receptoru: HER2/neu

HER2/neu kódován genem c-*erb*B2

- vysoká hladina proteinu HER2/neu nebo amplifikace genu c-*erb*B2 detekována u adenokarcinomů slinných žláz, prsu, vaječníků, střeva a žaludku

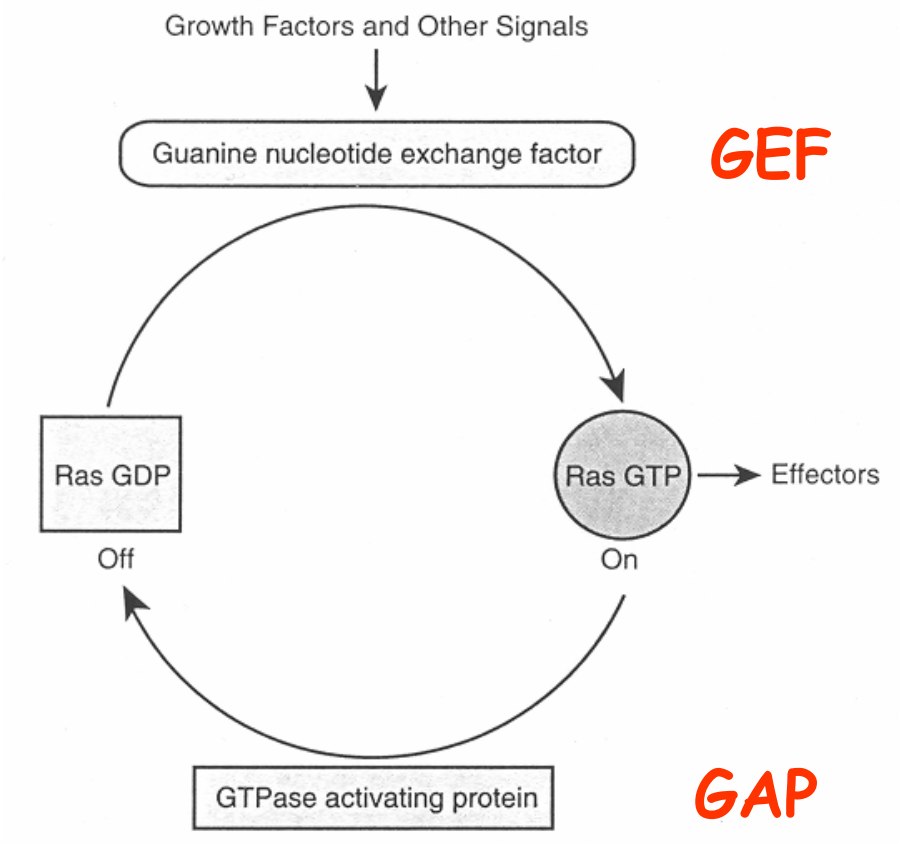
- amplifikace *HER2/neu* je uznávaným prognostickým a prediktivním faktorem u nádoru prsu; pacientky s amplifikací *HER2/neu* podstupují radikálnější terapii a mohou být léčeny **Herceptinem** (trastuzumab)- monoklonální protilátkou rozpoznávající protein HER2/neu

Příklad cytoplazmatického proteinu: Ras

Proteiny **H-Ras, N-Ras** a **K-Ras4A** a **K-Ras4B** (**$p21^{Ras}$**) jsou lokalizovány na vnitřní straně cytoplazmatické membrány, kde fungují jako přepínače při přenosu extracelulárních signálů do cytoplazmy. Účastní se řízení buněčného cyklu, diferenciace a apoptózy.

Proteiny Ras mají GTPázovou aktivitu: jsou inaktivní, váže-li se na ně GDP, a aktivní, váže-li se na ně GTP. Vlastní schopnost Ras-proteinů vyměňovat GTP/GDP a hydrolyzovat GTP je nízká, proto nutná účast dvou typů proteinů:

GTPázový cyklus proteinu Ras



GEFs posilují tvorbu aktivního Ras, který váže GTP

GAPs aktivují GTPázu, posilují tvorbu inaktivního stavu Ras, který váže GDP

Onkogenní aktivace *ras*

Onkogenní mutace posilují aktivitu Ras (např. v kodónu **12** poškozuje GTPázovou aktivitu, výsledný Ras je rezistentní k působení proteinů GAP); u některých nádorů je zvýšená exprese *ras*.

Přítomnost onkogenní mutace *ras* detekována téměř u 35% nádorů.

- **M**utace **H-*ras*** hlavně u nádorů kůže a dlaždicobuněčných nádorů hlavy a krku.
- **M**utace **K-*ras*** hlavně u adenokarcinomů, karcinomů chrupavek, kolorektálních nádorů a nádorů pankreatu.
- Mutace **N-*ras*** jsou běžné u hematopoietických malignit, hlavně u AML a MDS.

Protoonkoprotein Myc

Do rodiny proteinů Myc patří proteiny: **c-Myc**, **N-Myc** a **L-Myc**; podobné svou strukturou a mechanismem účinku, výrazně se liší expresí během vývoje; liší se také svou úlohou ve vývoji jednotlivých typů nádorů.

Myc je jaderný fosfoprotein s mnoha znaky transkripčního faktoru:

- transaktivuje např. geny pro **cyklin D2** a **CDK4** a **Cul1**, jehož produkt aktivuje degradaci **$p27^{Kip1}$**
- reprimuje **p15** a **p21**
- zvyšuje aktivitu telomerázy transaktivací katalytické podjednotky hTERT

c-*myc* a nádory

Burkittův lymfom:

Téměř všechny případy Burkittova lymfomu souvisí s **translokací** genu c-*myc* (na chromozomu 8) buď s těžkým řetězcem μ nebo λ nebo lehkým řetězcem κ imunoglobulinů (na chromozomech 14, 22 a 2).

Někdy bývá translokace doprovázena i výskytem somatických **mutací** v genu c-*myc*. Tyto mutace přispívají významně k fenotypu a progresi onemocnění.

N-*myc* a nádory

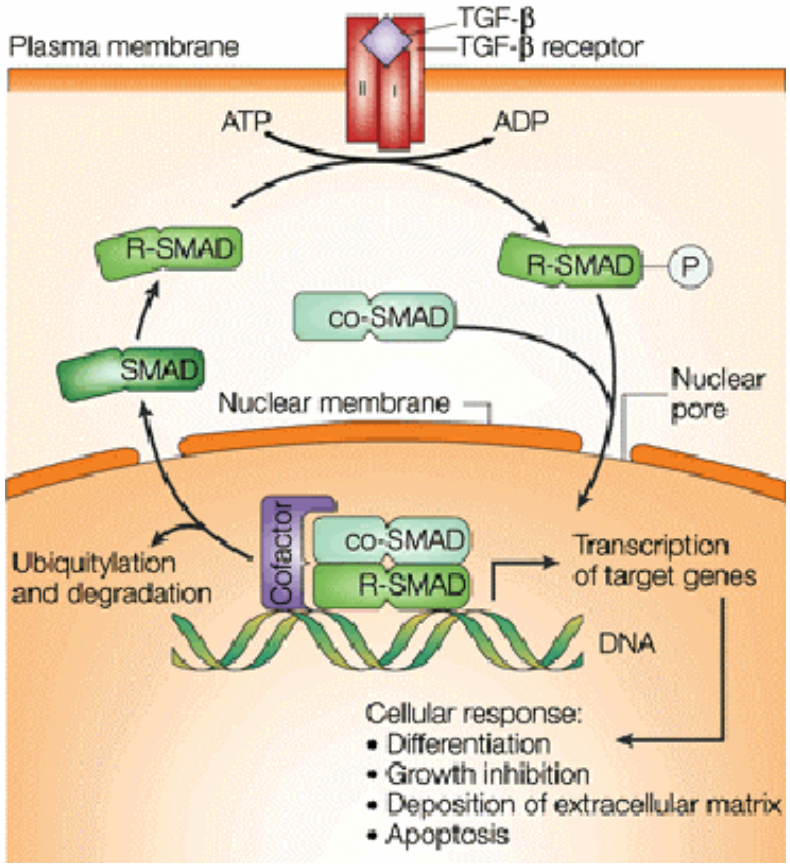
Amplifikace N-*myc* se vyskytuje asi u 1/3 případů neuroblastomu a je spojena s horší prognózou onemocnění.

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

L-*myc* a nádory

Amplifikace a **zvýšená exprese** L-*myc* (a také c-*myc* a N-*myc*) byla pozorována u některých případů malobuněčného karcinomu plic.

Signální dráha TGF-β



Vazba TGF-β k příslušnému receptoru vede k fosforylaci **R-SMAD**, ten potom tvoří komplex s **co-SMAD** a tento komplex migruje do jádra, kde ve spolupráci s dalšími TF spouští transkripci TGF-β-cílových genů (např. **$p21^{CIP1}$**, **$p15^{INK4B}$**, a další).

⇒ <u>antimitogenní</u> signalizace

Signální dráha Wnt-1/β-katenin

β-kateniny hrají v buňkách dvě odlišné role a obě tyto role se mohou podílet na kancerogenezi:

1. Molekuly β-kateninu jsou strukturální součástí cytoskeletonu a **adhezívních komplexů** (zprostředkovávají vztah mezi kadheriny a aktinovými složkami cytoskeletonu). Ztráta/změna buněčné adheze se uplatňuje při metastázování nádoru.

2. **Volný** β-katenin funguje jako signální molekula dráhy Wnt-1/β-katenin účastnící se regulace transkripce. Transkripce genů zprostředkovaná β-kateniny může zapnout geny nutné k buněčné proliferaci nebo geny s antiapoptotickou funkcí.

Regulace β-kateninů

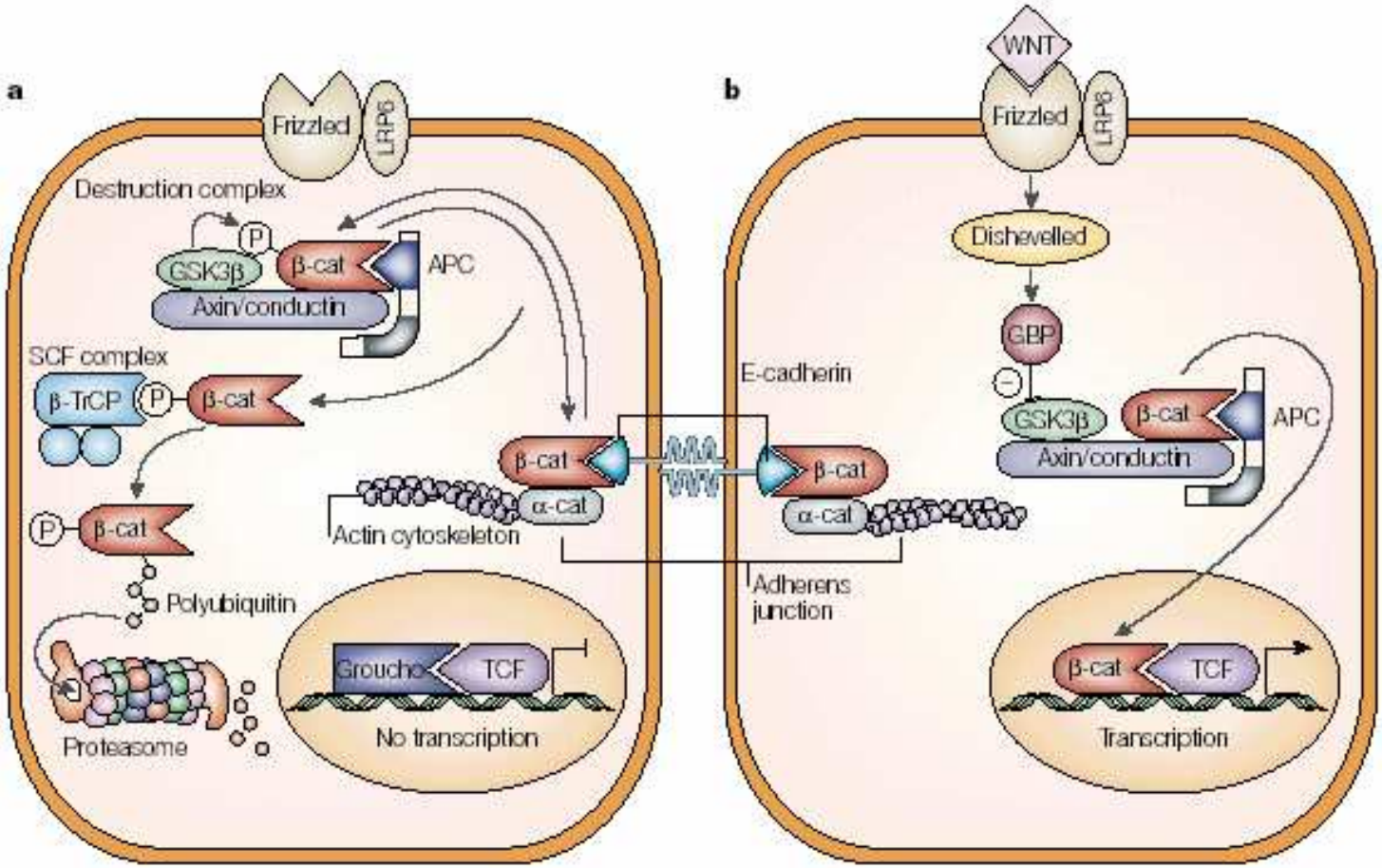
Hladina **volného** β-kateninu je udržována pomocí tzv. **destrukčního komplexu**. Ten je tvořen proteiny: GSK-3, Axin, APC a β-TrCP/Slimb.

GSK-3 serin/threoninová kináza, která fosforyluje β-katenin (S33, S37, T47 a S45). Tato fosforylace funguje jako signál k následné ubikvitinaci a degradaci β-kateninu.

Axin a **APC** fungují jako"lešení" celého komplexu a podmiňují jeho fungování. Axin obsahuje vazebná místa pro všechny součásti destrukčního komplexu.

Pokud se zvýší hladina volného β-kateninu, váže se na DNA vazebné proteiny Tcf („T cell factor") a/nebo Lef („lymphoid enhancer factor") a společně aktivují transkripci cílových genů. K nim patří např. ***c-myc*** a gen pro **cyklin D1**, což vede ke zvýšení buněčné proliferace.

Signální dráha Wnt/β-katenin



Přebytek volného β-kateninu je degradován, což je zprostředkováno destrukčním komplexem.

Signální dráha Wnt-1/β-katenin a **nádory**

- Mutace **APC** znemožňující vazbu APC na β-katenin nebo vazbu APC na axin způsobují konstitutivní aktivaci β-kateninu.

  Mutace APC patří k časným genetickým změnám při vývoji kolorektálního karcinomu (i vrozené mutace), dávají buňkám růstovou výhodu.

- Mutace **axinu**, které znemožňují vazbu axinu na β-katenin, byly nalezeny u některých hepatocelulárních nádorů.

- Mutace **β-kateninu** buď odstraňují serin nebo mění serin na jinou aminokyselinu, což vede ke zvýšení transkripční aktivity a k necitlivosti k APC zprostředkovanému odbourávání β-kateninu.

  Mutace β-kateninu se vyskytují u kolorektálního nádoru, nikdy ne zároveň s mutacemi APC (princip exkluzivity).

Šest získaných vlastností maligního nádoru

získaná schopnost	příklad
soběstačnost v produkci růstových signálů	aktivace H-*ras*
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

Genetická nestabilita nádorů

- Nádory vznikají postupnou akumulací genetických změn.
- Z výpočtu, který vycházel ze známé mutační rychlosti v somatických buňkách (10^{-7} na gen na generaci buněk), se zdálo, že k takové akumulaci mutací nemůže během lidského života dojít. Jakým mechanismem dochází k této akumulaci?

1. K akumulaci stačí <u>normální rychlost</u> mutací ve spojení s vlnami <u>klonální expanze</u>, které mohou být způsobeny <u>pozitivní selekcí</u> buněk "prenádorových".
2. Akumulace všech nutných mutací umožněna <u>genetickou nestabilitou</u>. Nestabilita je záležitost **rychlosti**, s jakou k mutacím dochází, existence mutací sama o sobě neposkytuje žádnou informaci o tom, s jakou rychlostí se objevila.

Většina nádorů <u>je</u> geneticky nestabilních.

Typy genetických změn v nádorech

1. Menší změny v sekvenci DNA - missense mutace, menší delece a inzerce (např. missense mutace K-*ras* se vyskytuje u 80% nádorů pankreatu, převážně missense mutace p53 u téměř poloviny všech nádorů,..)
2. Změny v počtu chromozomů - ztráty případně zisky celých chromozomů (ztráta chromozomu 10 u glioblastomů spojena se ztrátou nádorového supresoru PTEN; získání chromozomu 7 u papillary renal karcinomů spojeno s duplikací mutantního onkogenu MET)
3. Chromozomální translokace - fúze částí odlišných chromozomů nebo normálně nesouvisejících částí téhož chromozomu (na molekulární úrovni může být doprovázeno fúzemi mezi dvěma odlišnými geny) (Philadelphský chromozom a další translokace typické pro řadu leukemií)
4. Amplifikace genů (amplifikace genu N-*myc* u 30% neuroblastomů)

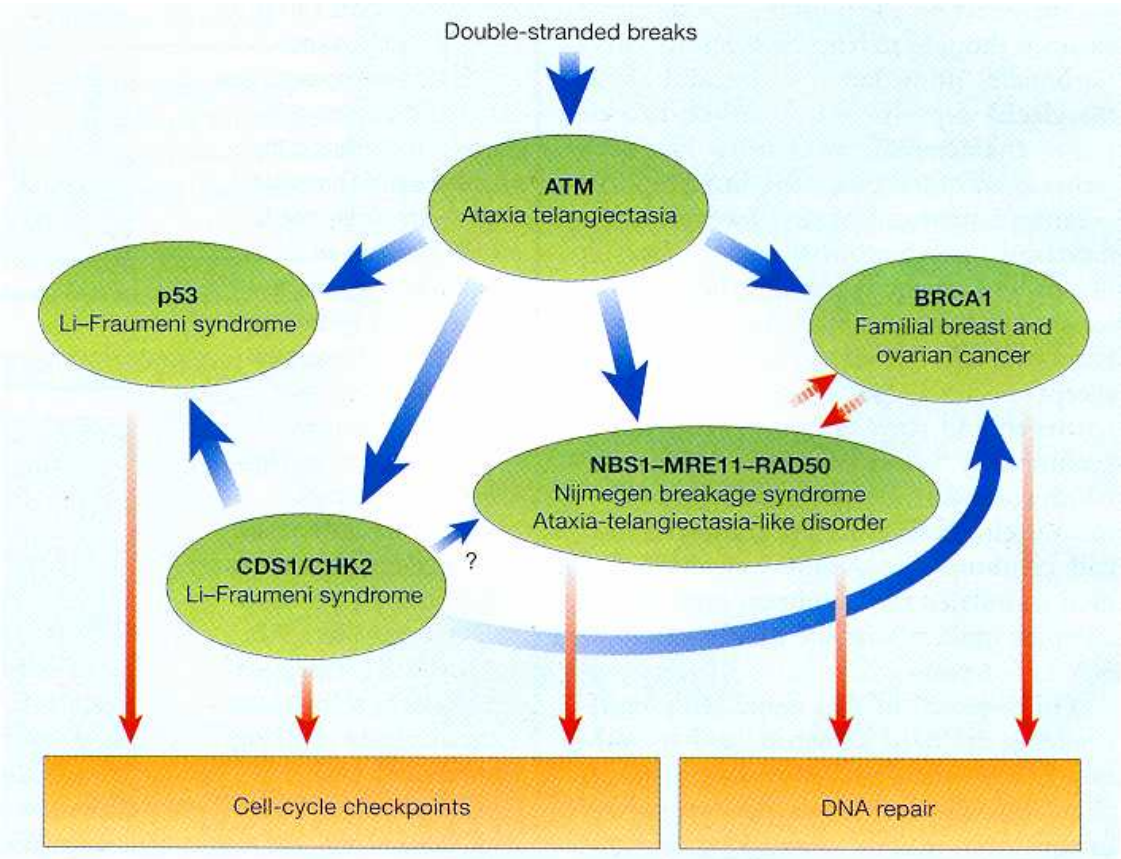
Ke genetické nestabilitě dochází na více úrovních.

Nestabilita v sekvenci DNA

1. Např. poškození **nukleotidové excizní opravy** („nucleotide-excision repair"). Vrozený (recesivní) nádorový syndrom *Xeroderma pigmentosum* (některý ze 7 genů: *XP-A* až *XP-G*).

2. Nebo poškození **opravy špatného párování** („mismatch repair") - s tím spojená mikrosatelitová nestabilita. Dědičný nepolypózní kolorektální karcinom - HNPCC - *Lynchův syndrom* (některý z genů *MSH2*, *MLH1*, *PMS1*, *PMS2*, *MSH6*).

Nestabilita v důsledku nedostatečných oprav dvouřetězcových zlomů DNA



modré šipky: fosforylace

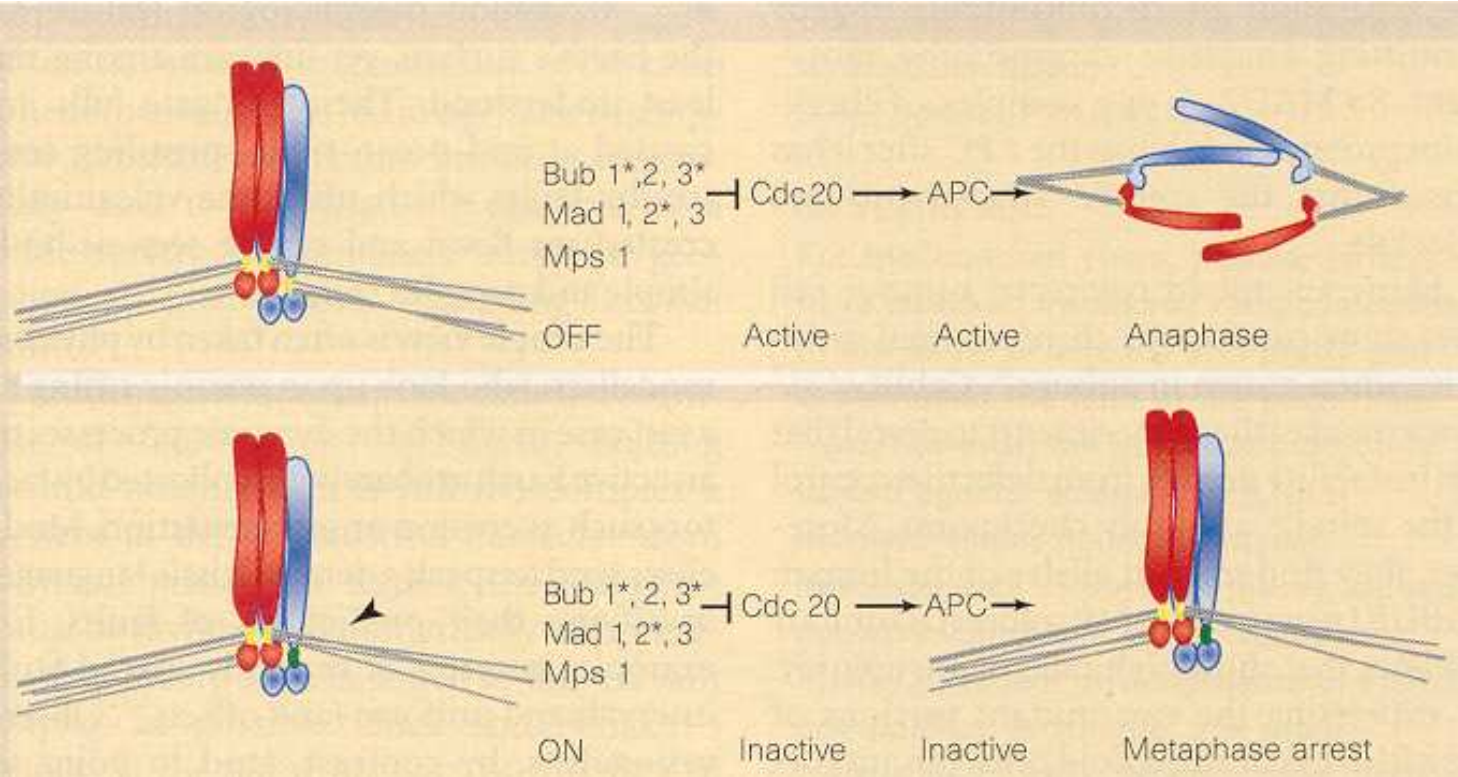
Tyto proteiny udržují integritu genomu, jejich mutace predisponují k vývoji nádorů.

Nestabilita v počtu chromozomů

- Ztráty nebo zmnožení celých chromozomů (aneuploidie) jsou mnohem běžnější a vyskytují se téměř u většiny nádorů: např. 85% kolorektálních nádorů je vysoce aneuploidních.

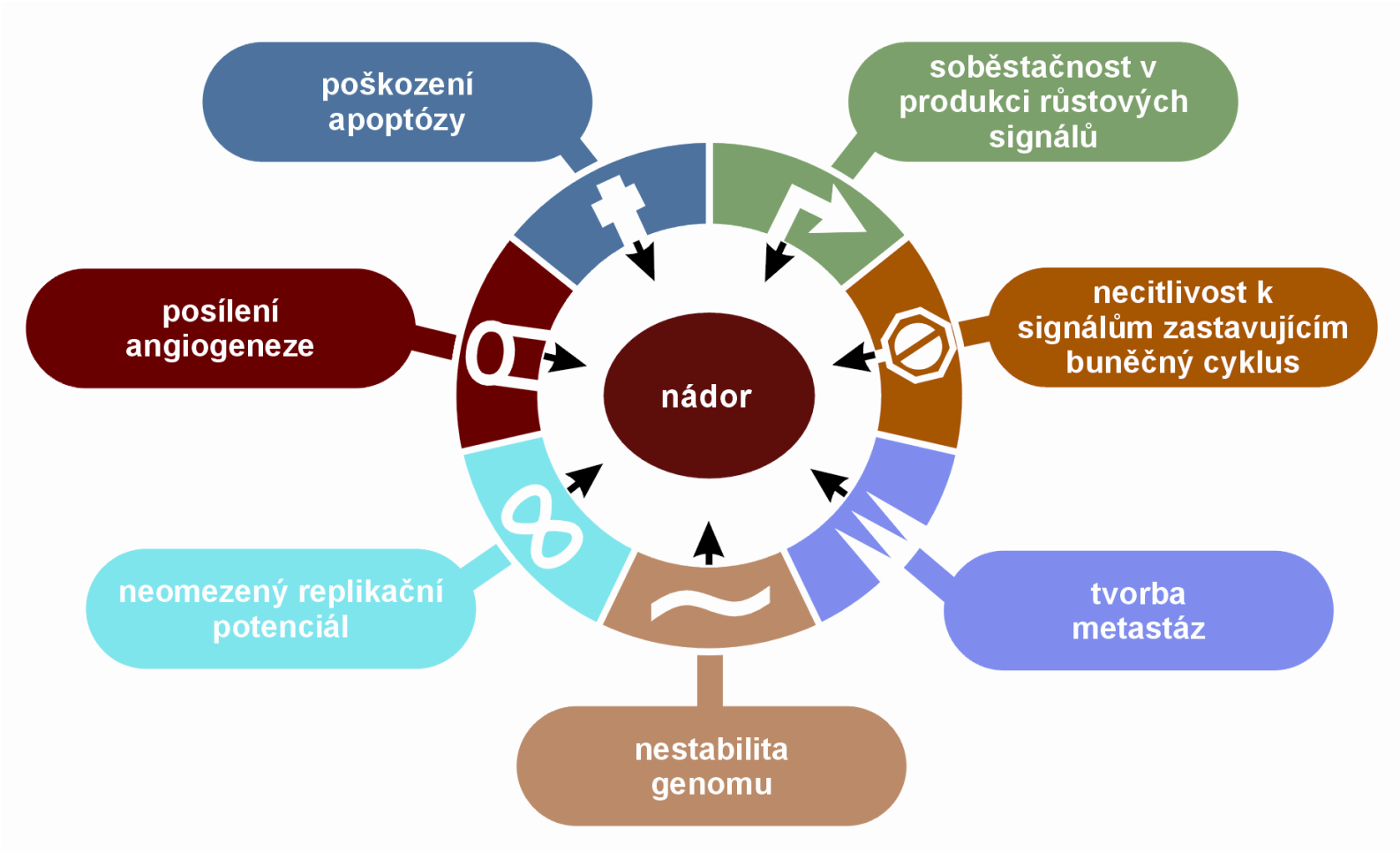
- Souvisí s poruchami kontrolního bodu buněčného cyklu/mitózy: **kontrola mitotického vřeténka** („spindle check-point") zajišťuje, aby se sesterské chromatidy nerozcházely dříve, než jsou všechny chromozomy správně uspořádány kolem mitotického vřeténka.

Kontrola mitotického vřeténka

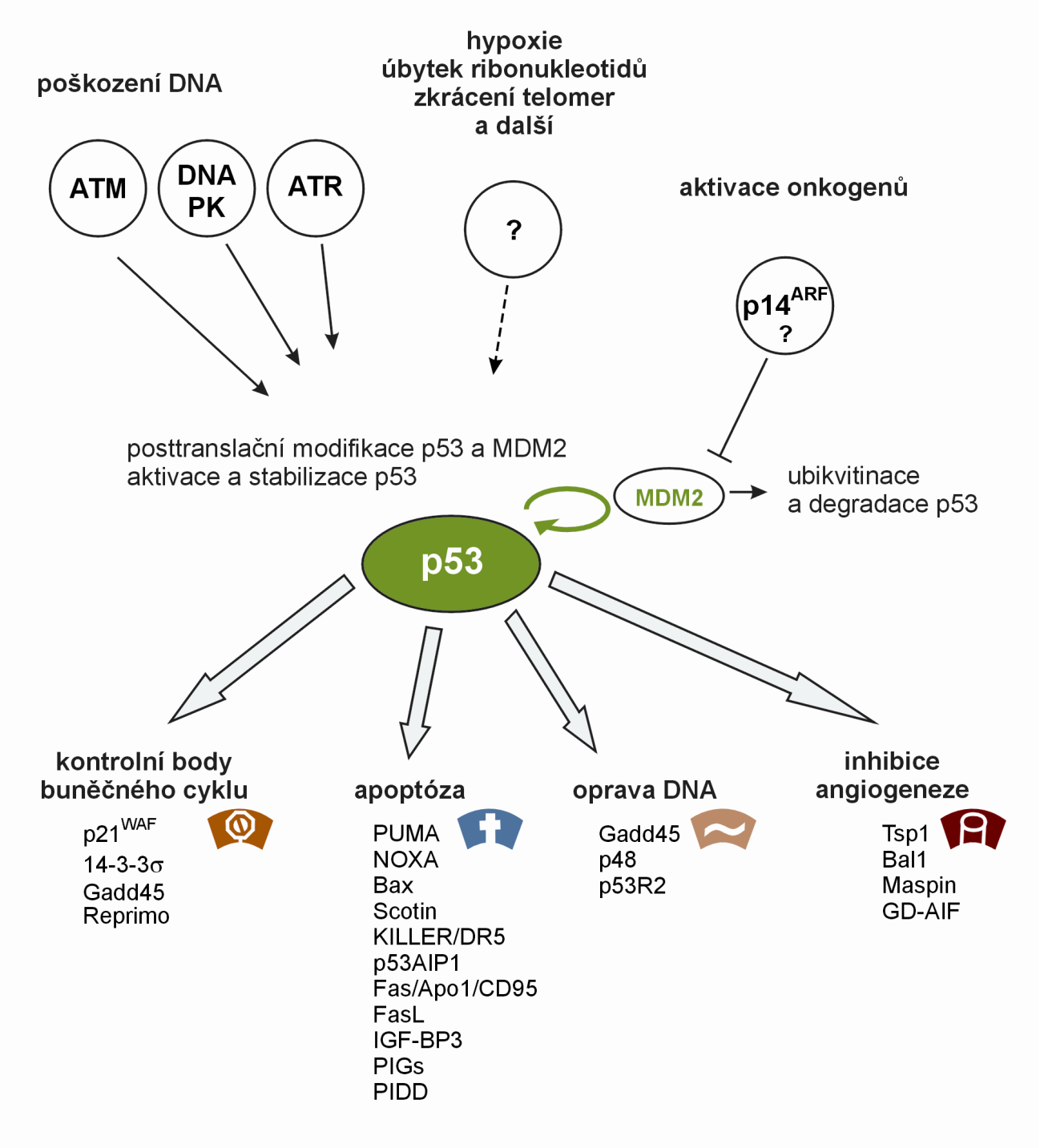


- Jak je monitorováno sestavování vřeténka? Na nesprávné sestavení vřeténka reagují proteiny typu **Bub** a **Mad** a nedovolí aktivaci **APC/C** (**kohesin**, **sekurin**, **separin**).

Sedm typických znaků nádorových buněk

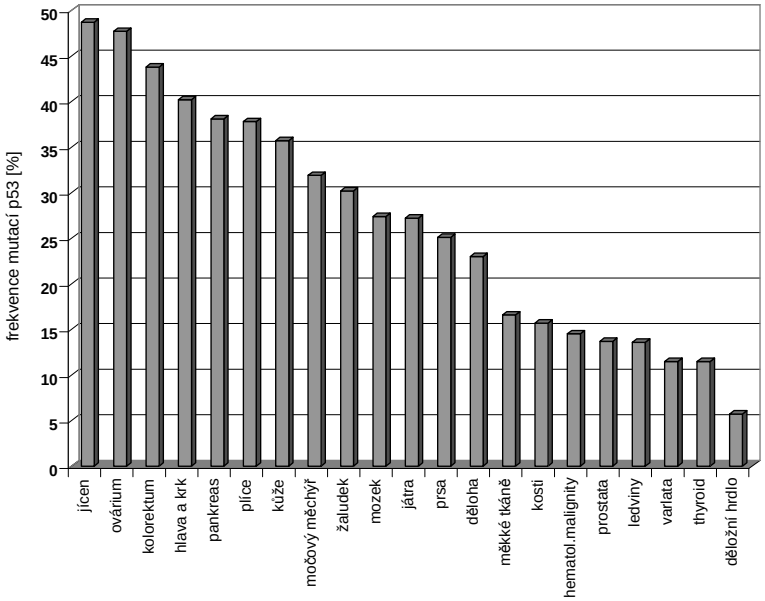


Funkce p53: signální síť



Mutace p53 a nádory

- Asi u 50% všech lidských nádorů lze detekovat <u>somatickou</u> mutaci/aberaci nádorového supresoru p53.



- <u>Vrozené</u> mutace nádorového supresoru p53 jsou příčinou asi 80% případů Li-Fraumeniho syndromu (LFS) a asi 50% případů Li-Fraumeni-like syndromu (LFLS).

Vývoj kolorektálního karcinomu: model kancerogeneze

Familiální adenomatózní polypóza – FAP

- Autosomálně dominantní dědičné onemocnění.
- U pacientů s FAP se vyvíjejí stovky až tisíce benigních kolorektálních nádorů, z nichž některé progredují do karcinomů, nejčastěji během druhé a třetí dekády života. Průměrný věk detekce nádoru u FAP pacientů je 40 let.
- Polypy, které se objevují u pacientů s FAP jsou totožné s polypy sporadickými a také nemají větší riziko maligní progrese než sporadické polypy. Ale jejich velký počet „zajišťuje", že některé se s jistotou v maligní vyvinou.
- Pacienti s FAP mají zvýšené riziko thyroidních nádorů, nádorů tenkého střeva, žaludku a mozku.

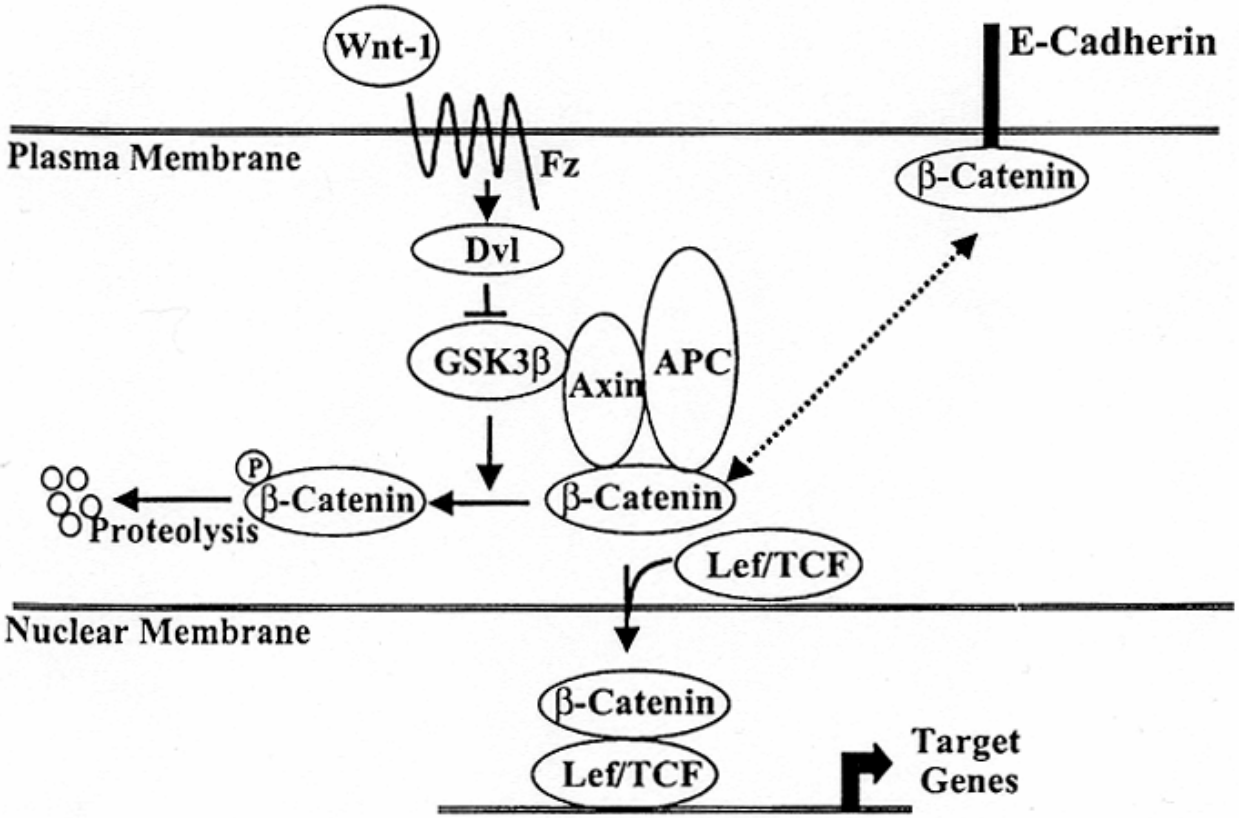
Familiální adenomatózní polypoza

- FAP je spojena s vrozenými mutacemi genu ***APC***.

- Somatické mutace *APC* také hrají klíčovou úlohu při vývoji sporadických kolorektálních karcinomů, jsou detekovány alespoň u 80% všech CRC.

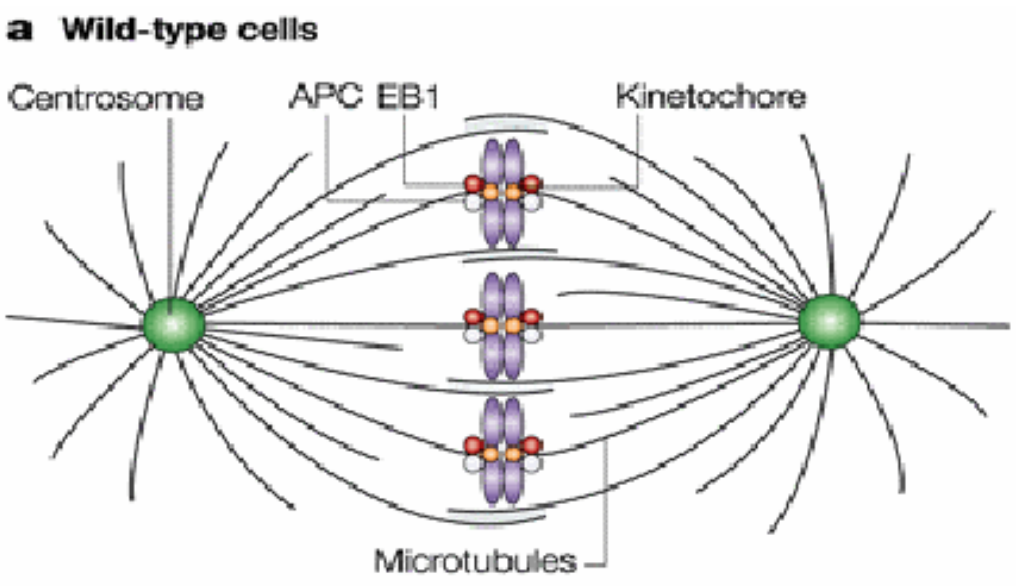
Dvojí úloha proteinu APC v buňce:

A. Regulace hladiny volného β-kateninu



Dvojí úloha proteinu APC v buňce:

B. účast na tvorbě mitotického vřeténka



APC je lokalizováno na kinetochorech metafazických chromozomů. Důsledkem mutace APC je poškození mitotického vřeténka a tím zvýšení chromozomální genetické nestability.

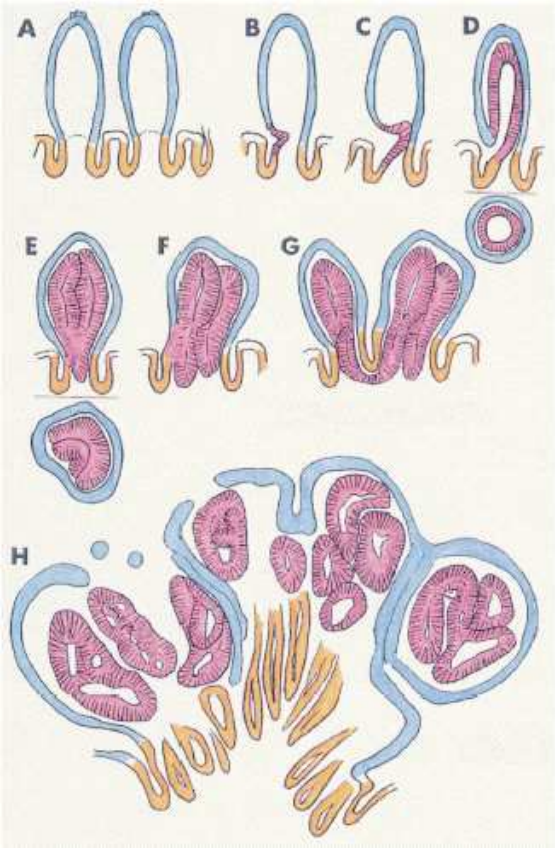
Dvojí úloha APC při vývoji CRC

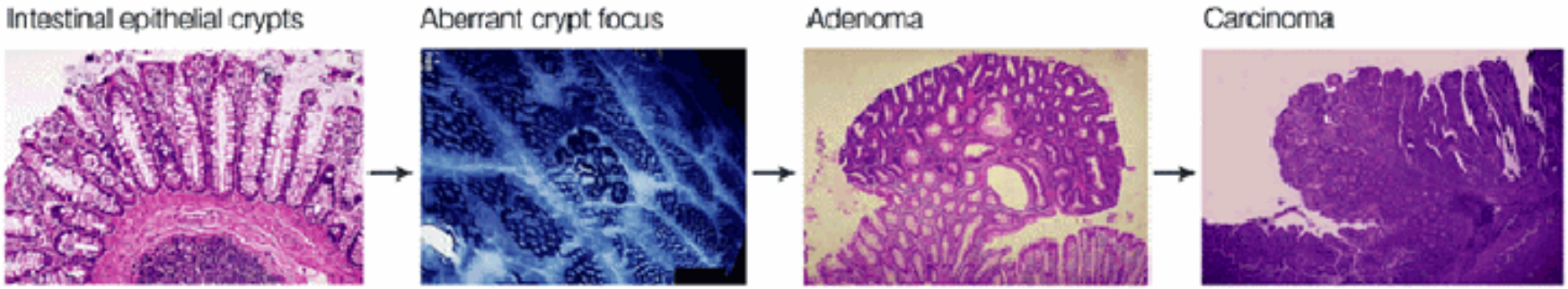
- APC se zřejmě uplatňuje jak při iniciaci vývoje nádoru (v důsledku selektivní výhody získané aktivací Wnt-1/β-katenin dráhy), tak také v pozdějších fázích vývoje nádoru tím, že je příčinou chromozomální nestability.

- Mutace *APC* představuje nejčastější první krok v kancerogenezi kolorektálního karcinomu

Vývoj kolorektálního karcinomu

: relativně „standardní" průběh od malých adenomů (do 1 cm), přes středně pokročilé (více než 1 cm bez známek transformace) a velké adenomy až po plně rozvinutý maligní CRC





Vývoj kolorektálního karcinomu

Kolorektální karcinomy představují výborný **model pro studium kancerogeneze**:

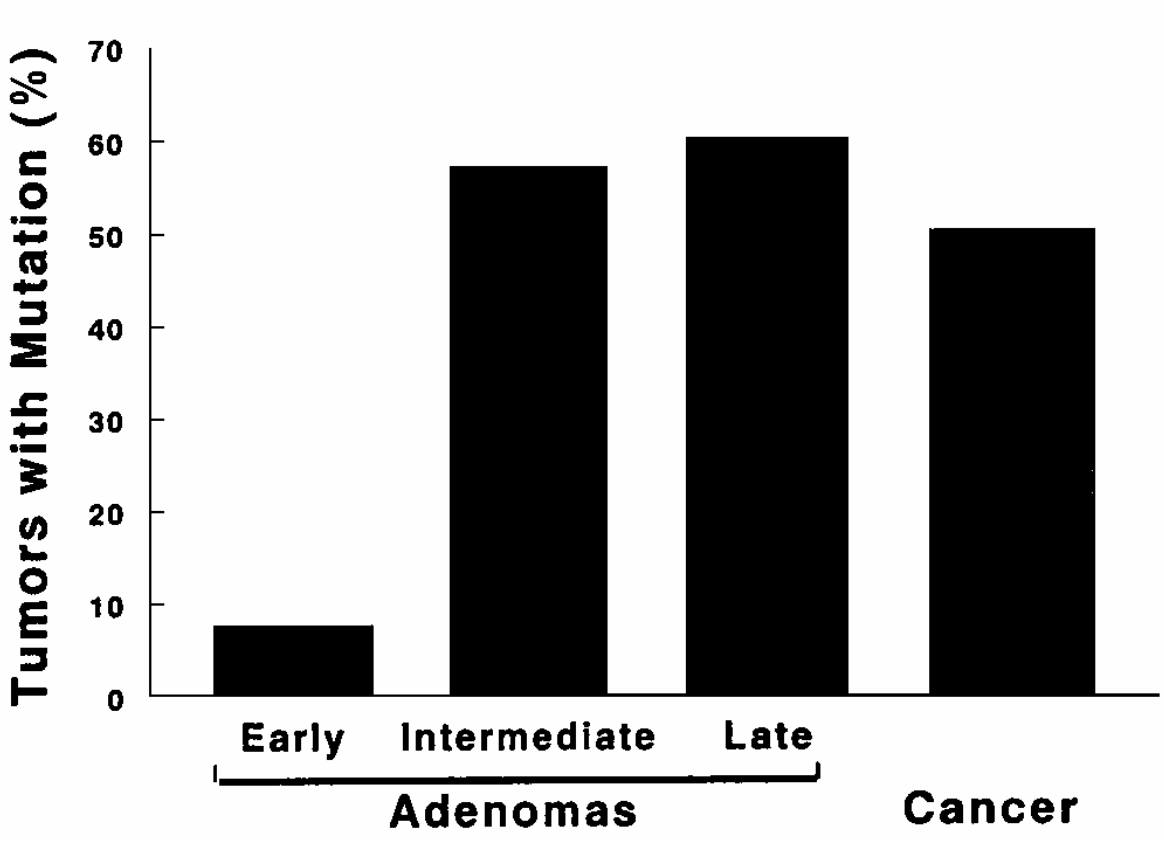
- relativně „standardní" průběh od malých adenomů (do 1 cm), přes středně pokročilé (více než 1 cm bez známek transformace) a velké adenomy až po plně rozvinutý maligní CRC
- souvislost mezi morfologií jednotlivých stadií a genetickými změnami
- model kooperace onkogenů a nádorových supresorů během kancerogeneze

Další stadia vývoje kolorektálního karcinomu - aktivace *ras*

- Specifické bodové mutace protoonkogenu K-*ras* nebo N-*ras* jsou detekovány alespoň u 50% kolorektálních adenomů větších než 1 cm a asi u 50% karcinomů.
- Mutace *ras* jsou jen vzácně (do 10%) detekovány u adenomů menších než 1cm.

⇒ mutace *ras* se typicky objevují při progresi adenomů

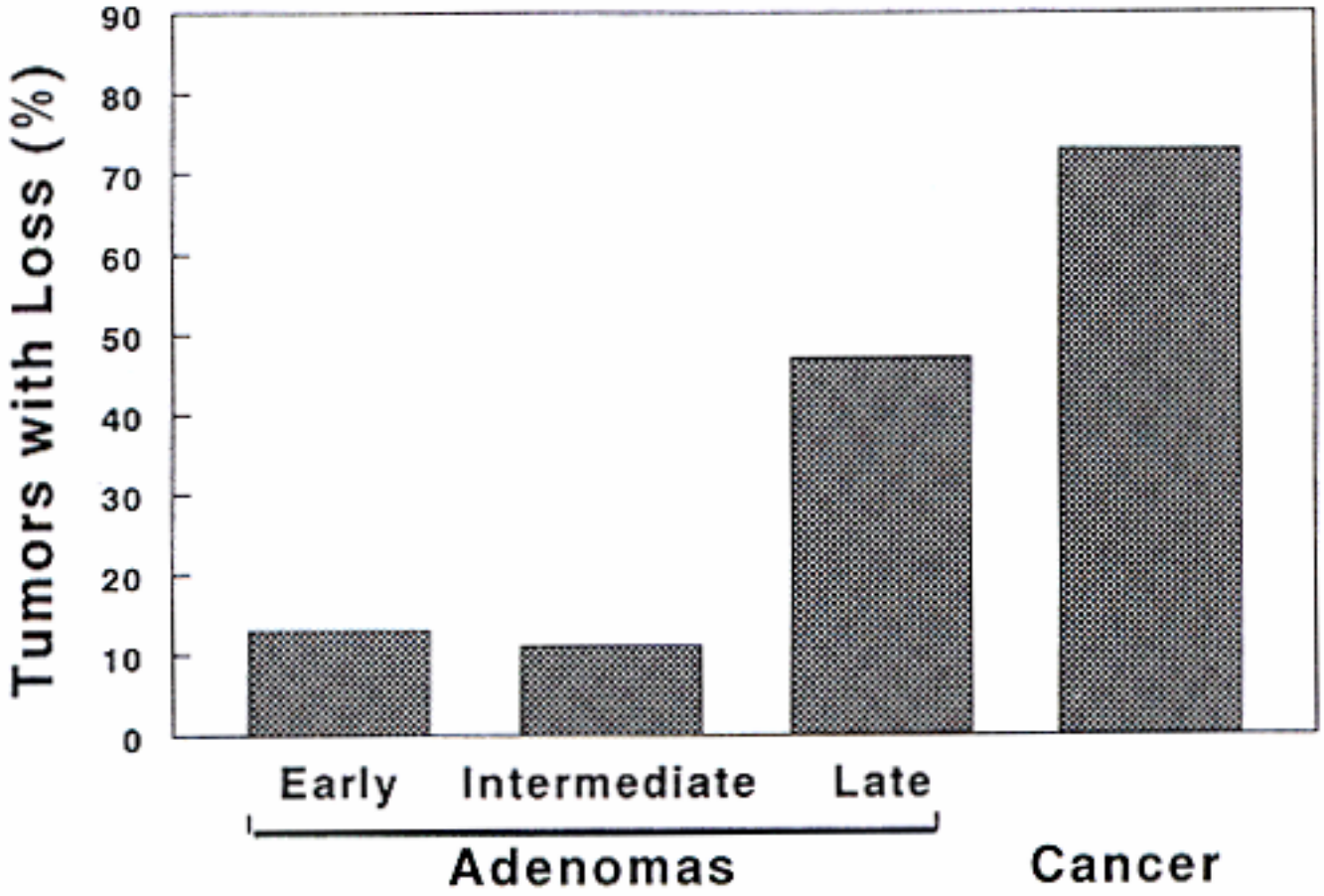
Frekvence mutací *ras* u kolorektálních karcinomů



Další stadia vývoje kolorektálního karcinomu - „LOH“ 18q

- Delece oblasti 18q detekovány u 50% velkých adenomů a 70% karcinomů.
- Na chromosomu 18q detekován gen pro ***co-SMAD***, někdy označovaný jako *DPC4* („deleted in pancreatic cancer“).
- co-SMAD je součástí signální dráhy TGF-β.

Frekvence delecí oblasti 18q u kolorektálních karcinomů

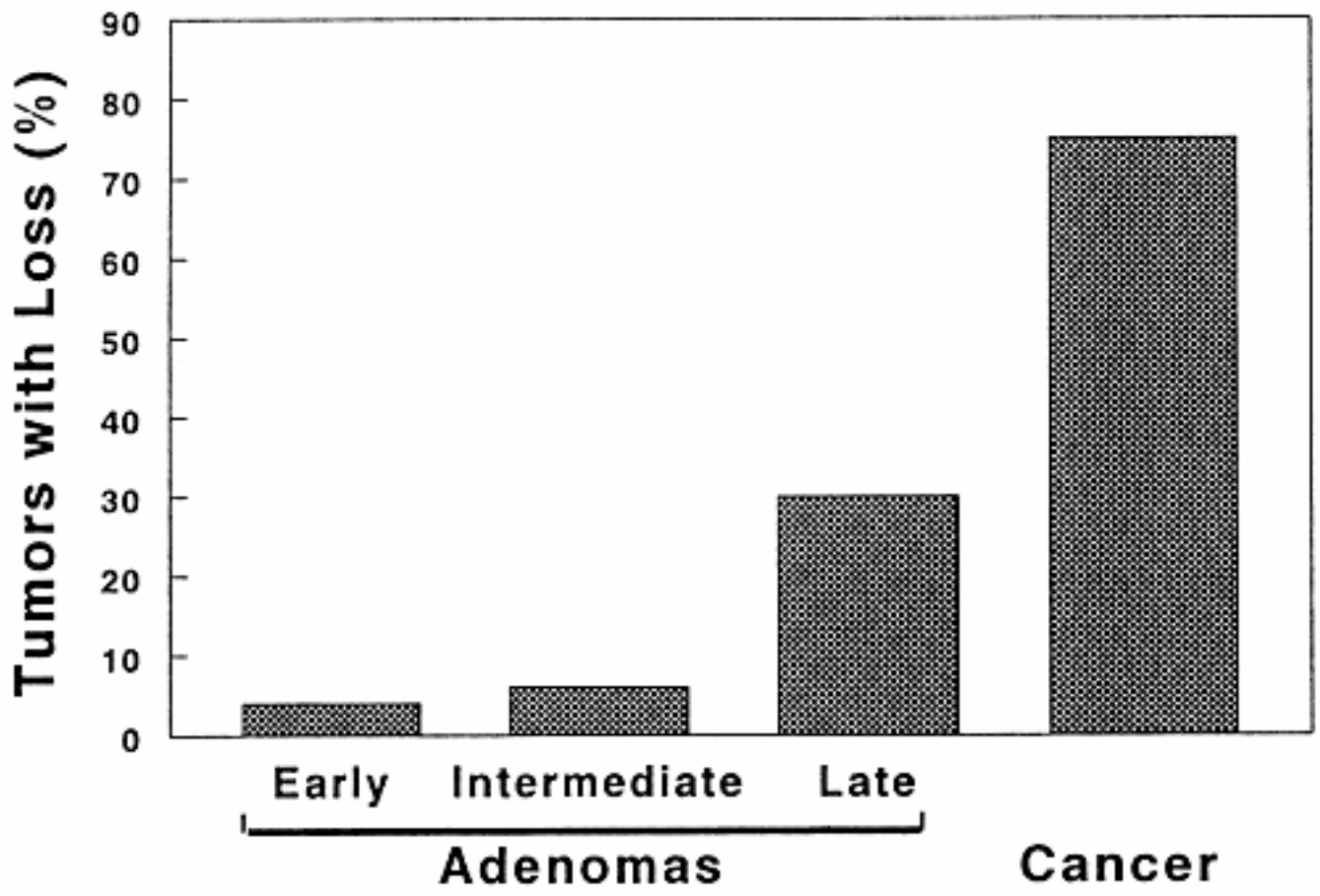


Další stadia vývoje kolorektálního karcinomu - inaktivace p53

- Ztráta 17p je detekována u 75% kolorektálních karcinomů.
- Ztráta 17p je jen vzácně detekována u kolorektálních adenomů.

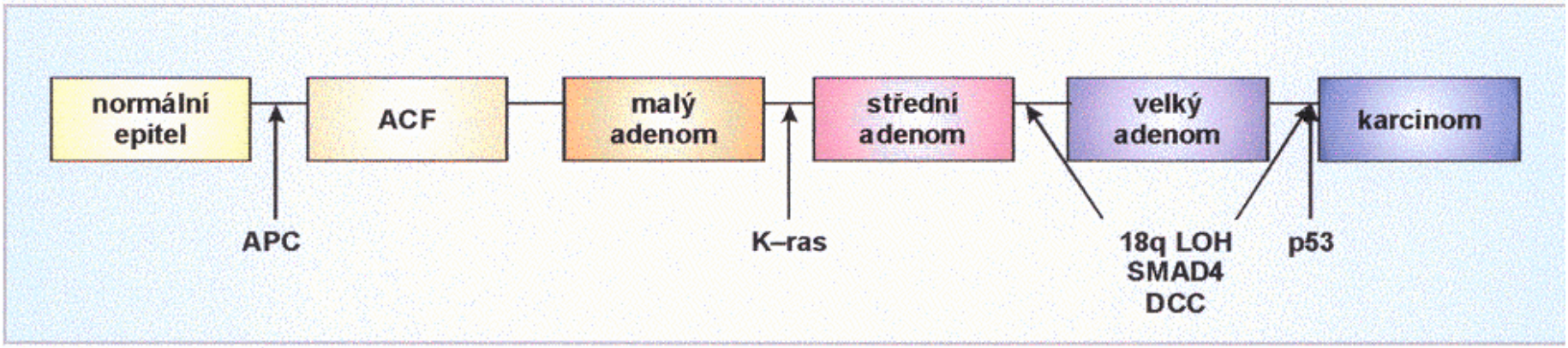
⇒ inaktivace nádorového supresoru p53 je typicky pozdní událost během vývoje kolorektálních karcinomů

Frekvence mutací p53 u kolorektálních karcinomů



Vývoj kolorektálního karcinomu:

model mnohostupňové kancerogeneze



Osnova přednášky 2.

- Imunobloting
- Fluorescenční hybridizace *in situ*
- PCR
- Analýza nádorového supresoru p53
- Stanovení chemorezistence *in vitro*

Místo molekulárně biologických metod v patologii:

Schéma diagnostického postupu

Tab. 3.4 Schématické znázornění diagnostického postupu

1. Diagnostický krok			
Panleukocytární marker CD45	+	-	-
Cytokeratiny AE1/AE3,CAM5.2	-	+	-
Vimentin	-/+	-/+	+/-
Závěr 1. Kroku	Lymfom	Karcinom	Sarkom
2. Diagnostický krok u lymfomů Bližší určení lymfomu, znázorněno základní odlišení, po něm pak následuje klasifikační postup dle WHO doporučení			
B-lymfom	CD20,CD79a, imunoglobuliny (CD21,CD22, CD23 a další markery k jednotkovému zařazení)		
T-lymfom	CD3, CD45RO, CD7,CD8 (další markery k jednotkovému zařazení)		
Velkobuněčný T/null cell anaplastický lymfom, Hodgkinova choroba, Lymfomatoidní papulóza	CD30 (k rozlišení slouží další upřesňující markery)		
Proliferační frakce	Ki-67		
2. Diagnostický krok u karcinomů Po následují další cytochemické reakce s cílem určit výchozí tkáň			
Karcinom s pozitivitou CAM5.2,AE1/AE3 (neplatí pro adrenokortikální a hepatocelulární karcinom)	průkaz jednoduchých se žlaznatým epitelem asociovaných keratinů 8 + 18 a nebo keratinů asociovaných s dlaždicobuněčným karcinomem, další cytokeratiny		
2. Diagnostický krok u sarkomů Po něm následují také případné další reakce.			
S-100+	melanom, Schwannom, liposarkom, chondrosarkom,		
desmin+	leiomyosarkom, rabdomyosarkom,		
Neurofilamenta+ synaptofysin +	neuroblastom, paragangliom, gangliocytom		
další markery	další sarkomy		

Imunobloting

Imunohistochemická analýza

- přítomnost /a hladina proteinu
- lokalizace proteinu v buňce (jádro, cytoplasma, vazba na membránu, …)
- počet/podíl pozitivních buněk
- <u>výchozí materiál</u>: formol-parafinový bloček

Imunobloting

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

Provedení imunoblotingu

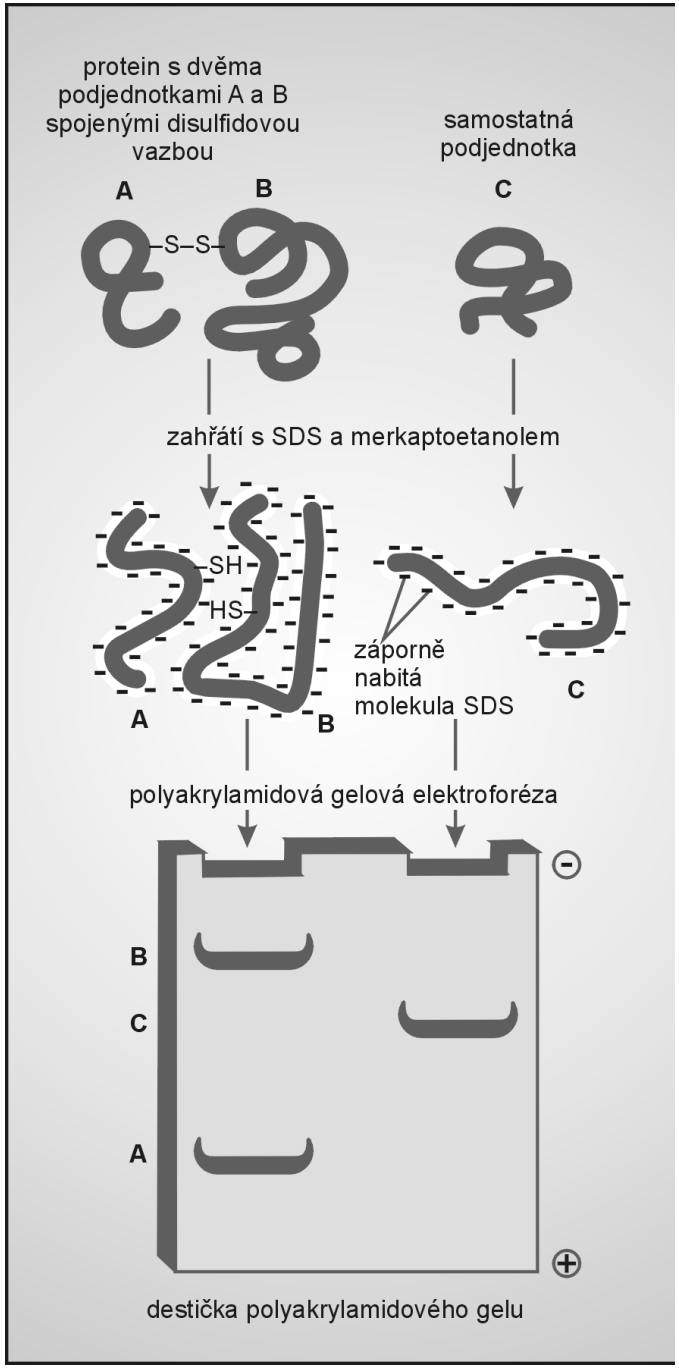
- příprava proteinových lyzátů z vyšetřované tkáně
- změření koncentrace proteinů (standardizace) metodou Bradfordové, barvením CBB
- elektroforetické rozdělení proteinů metodou SDS-PAGE
- westernový přenos
- detekce specifických proteinů pomocí protilátek

Princip SDS-PAGE

Elektroforetické rozdělení proteinů dle Laemmliho

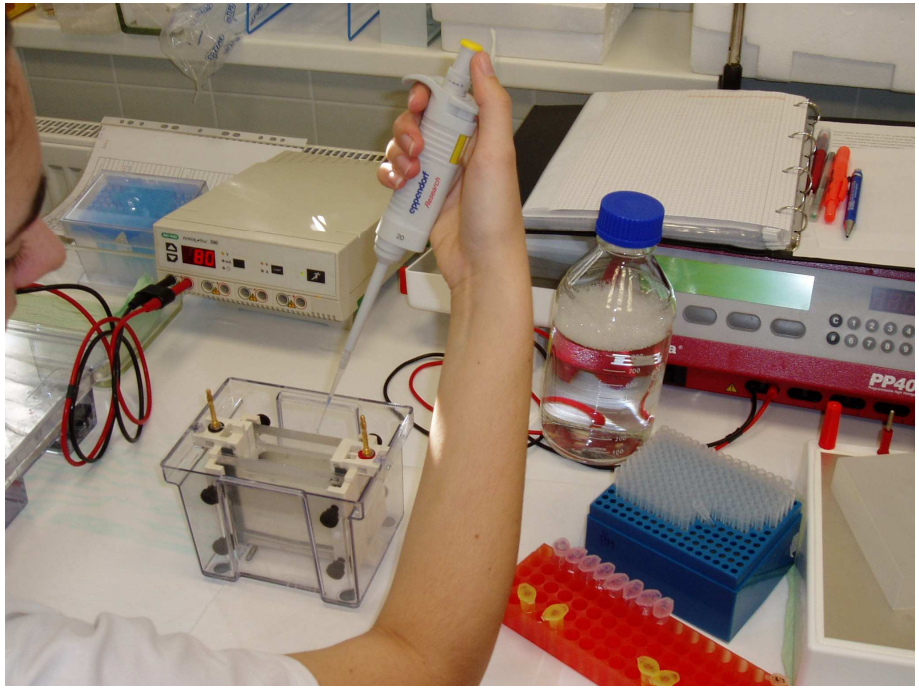
- narušení kvartérní struktury proteinů (→ samostatné podjednotky)
- narušení terciární a sekundární struktury proteinů
- „neutralizace“ náboje proteinů

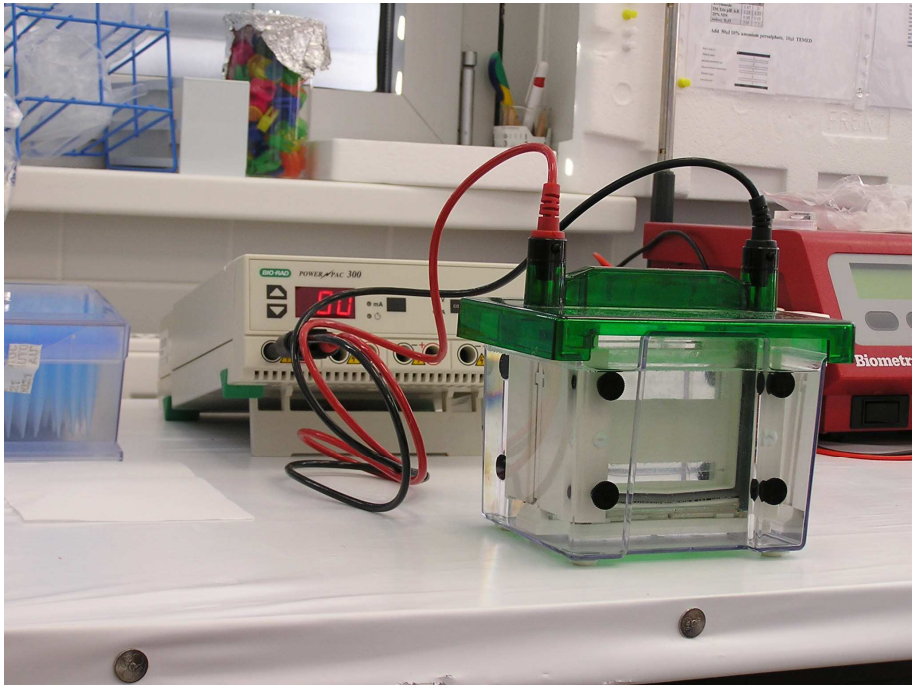
⇒ **proteiny se dělí <u>pouze</u> podle své velikosti**



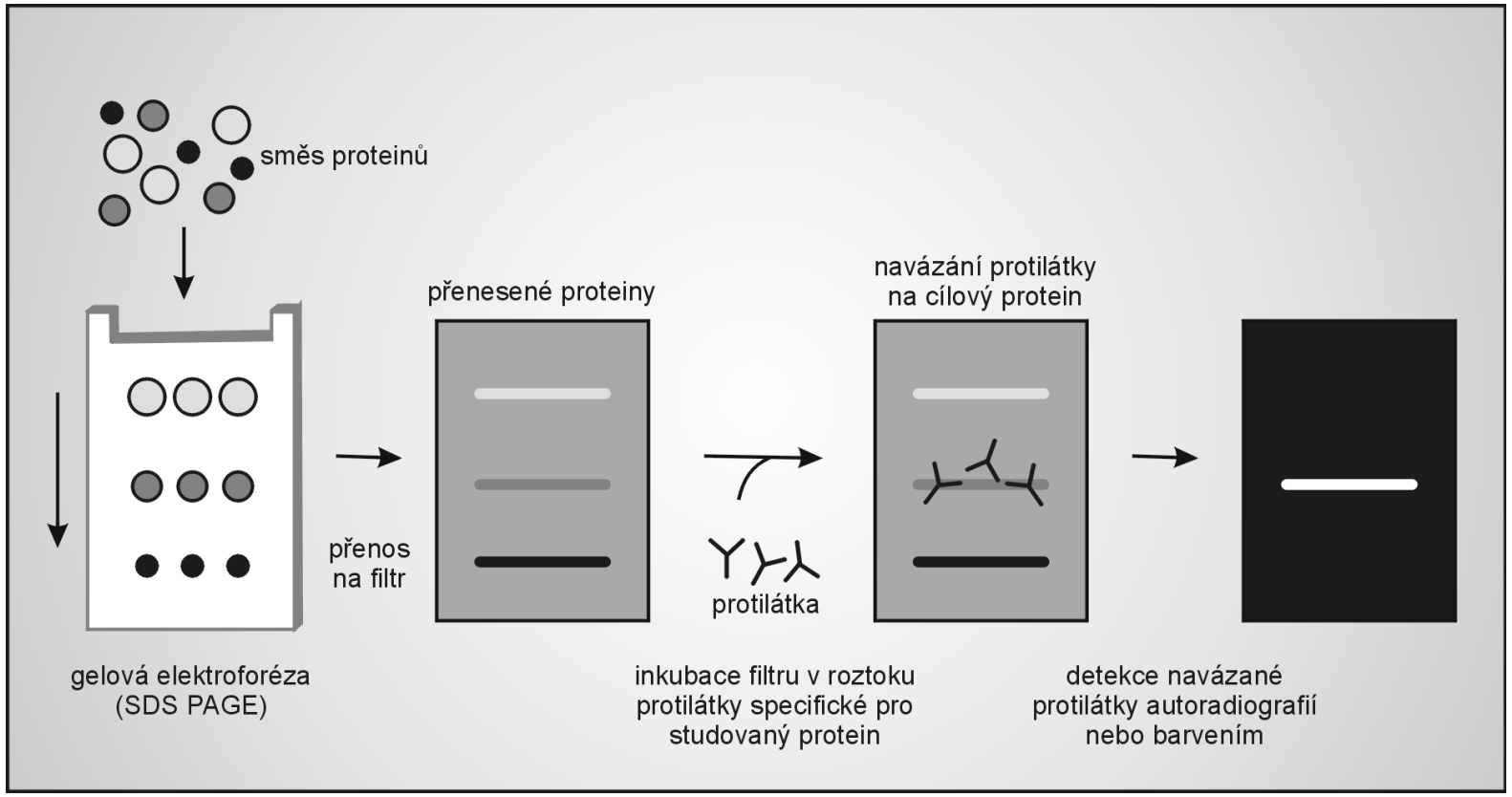
Elektroforetické rozdělení proteinů dle Laemmliho

1. nanášení vzorků
2. separace proteinů

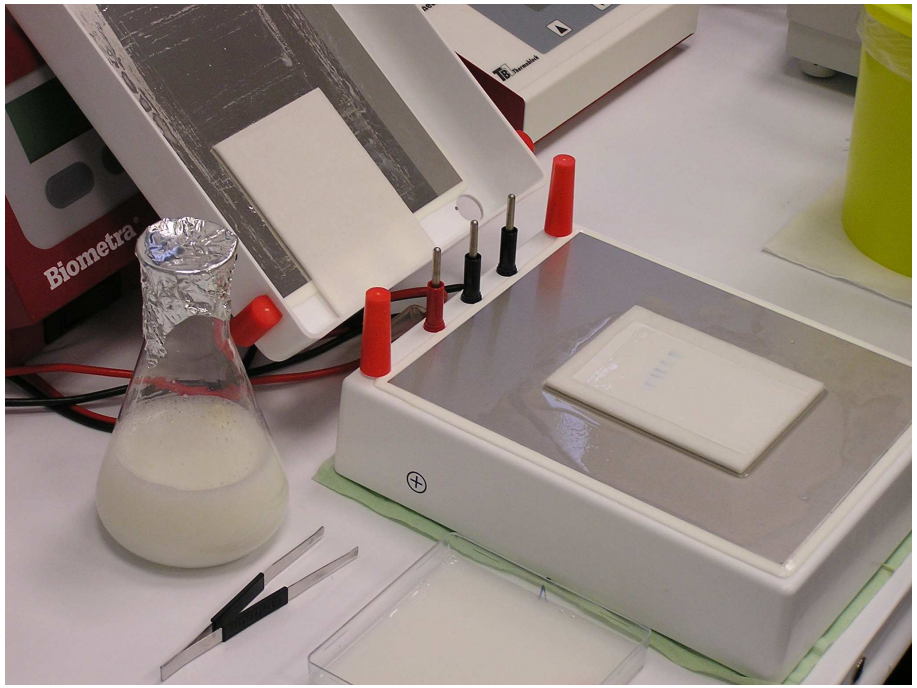


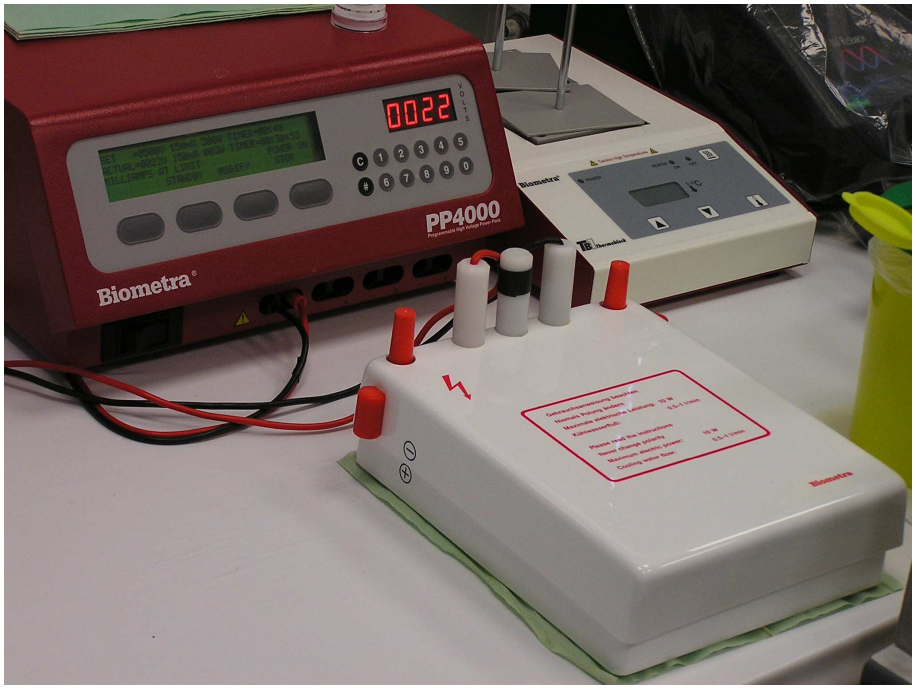


Westernový přenos a detekce proteinu pomocí protilátky

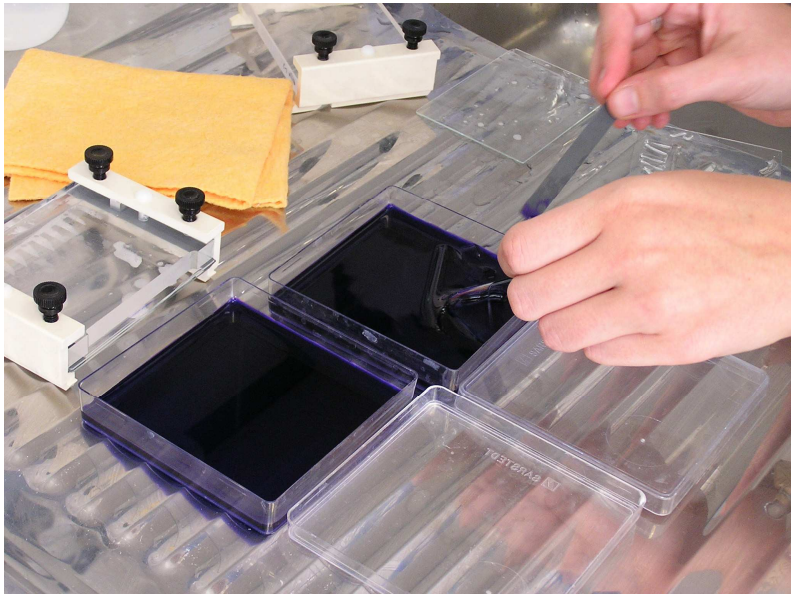


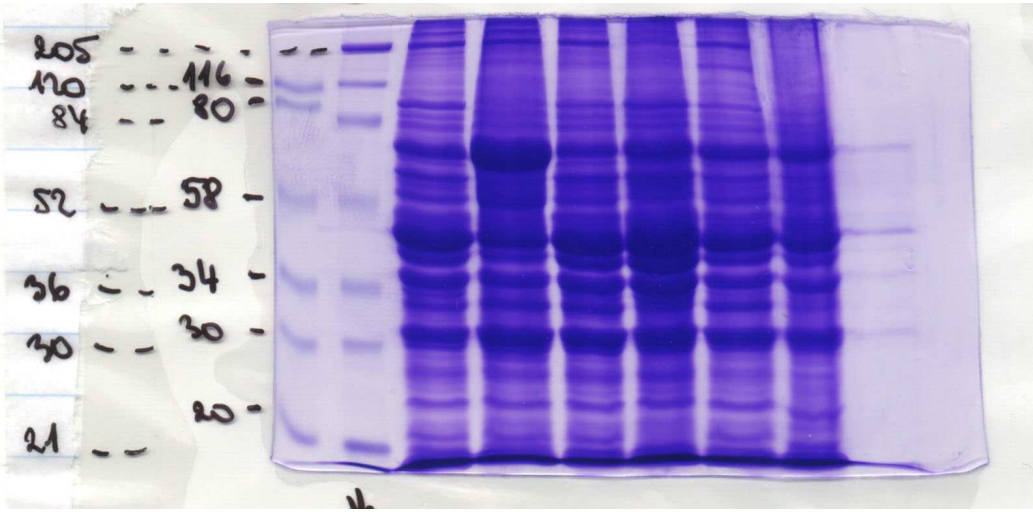
Westernový přenos





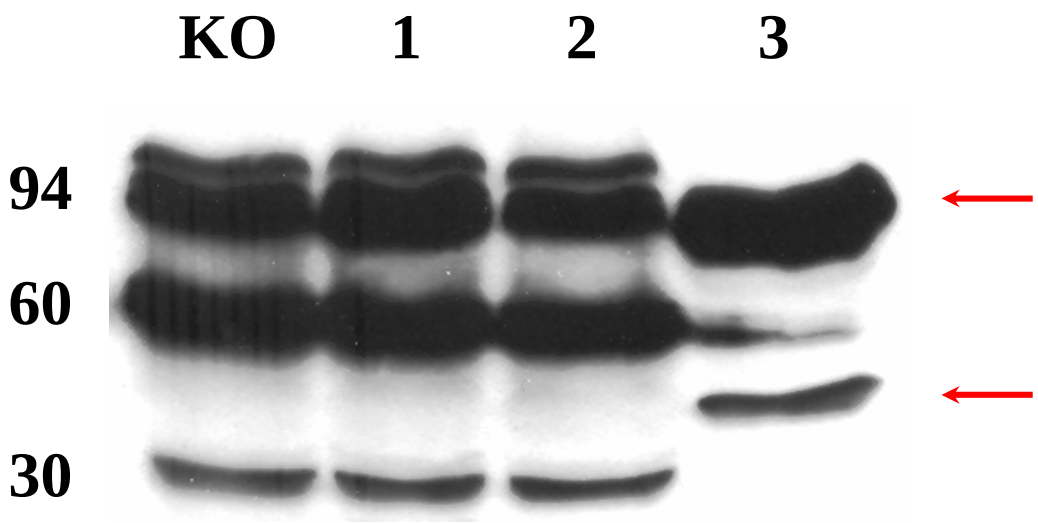
Barvení proteinů Comassie Brilliant Blue





Imunobloting calpainu

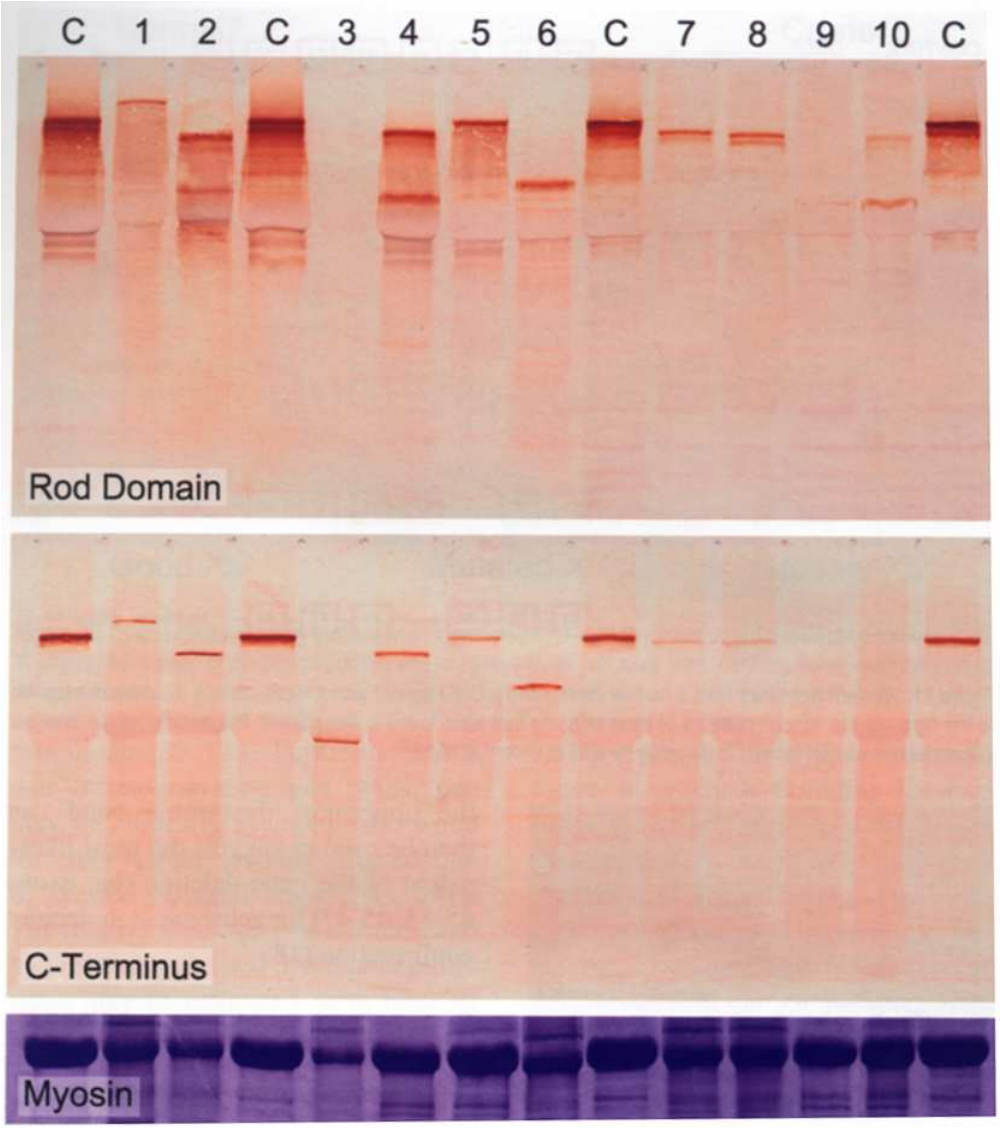
Analýza aberantní exprese/exprese aberantních forem svalových proteinů



KO: kontrola

1, 2, 3: vzorky pacientů

Imunobloting dystrofinu



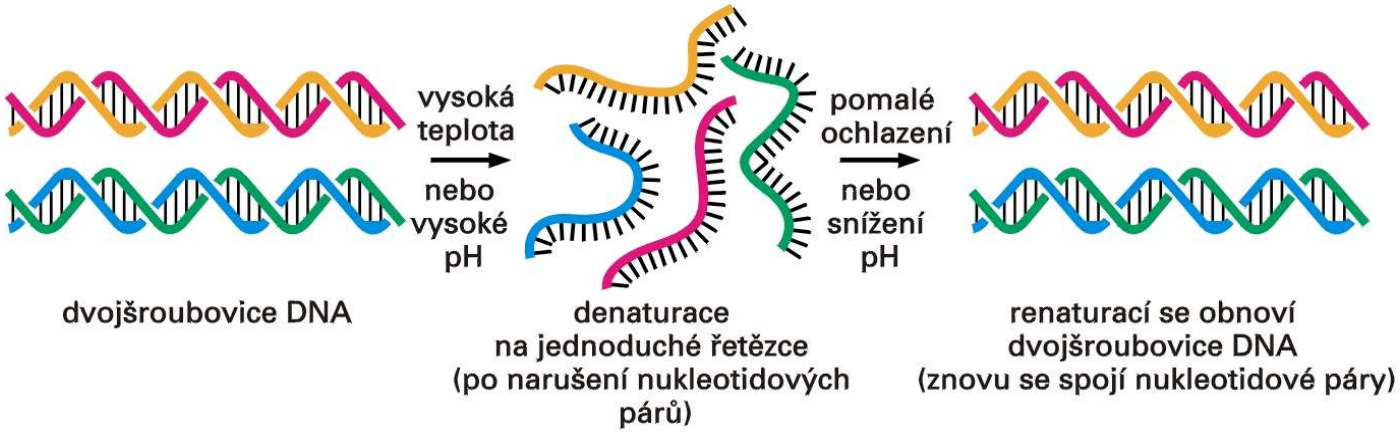
C: kontrola

1-10: různé typy mutací dystrofinu

Fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH)

Hybridizace

- tvorba dvouřetězcových hybridů ze dvou jednořetězcových a komplementárních molekul nukleových kyselin
- založena na schopnosti **denaturace a renaturace** DNA



Fluorescenční hybridizace *in situ*
FISH

Detekce DNA nebo RNA v intaktních buňkách radioaktivními nebo fluorescenčními sondami.

Postup FISH

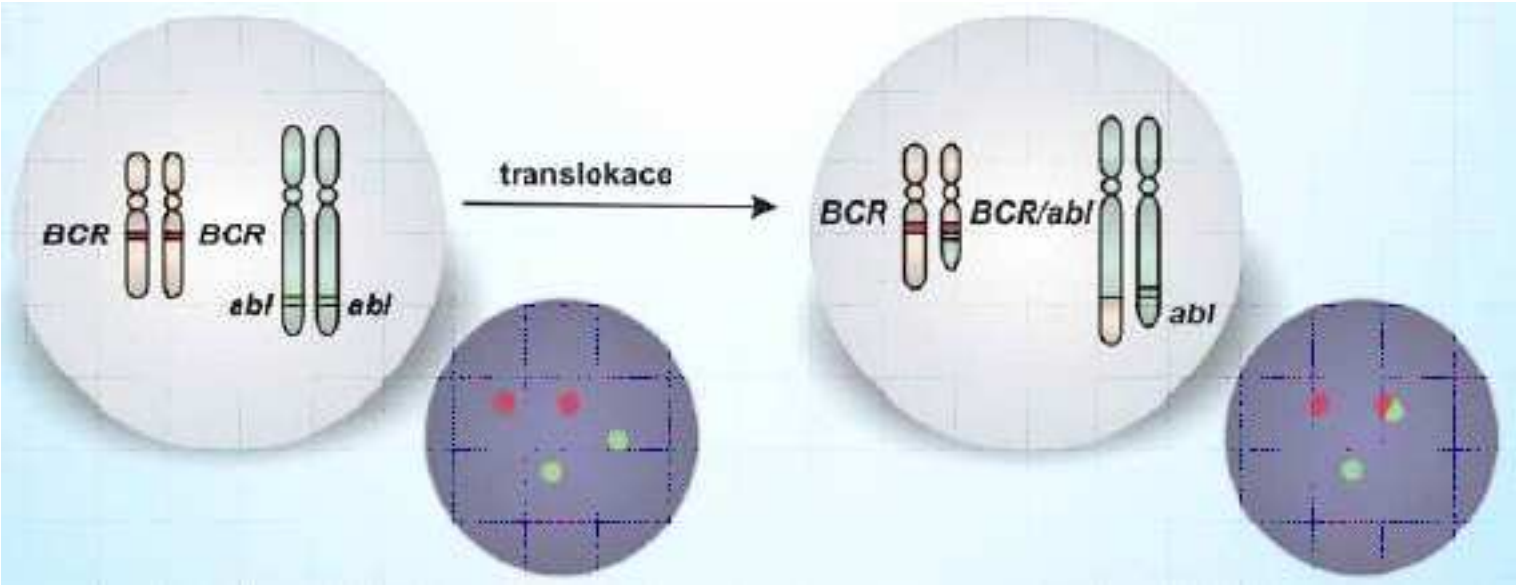
- příprava cytologického preparátu:
  1. tkáňové řezy připravené z formol-parafinových bločků
  2. fixované buňky izolované z krve nebo moče
- (deparafinizace xylenem)
- natrávení proteázou, fixace, dehydratace
- hybridizace se značenou sondou
- barvení preparátu (DAPI)
- fluorescenční mikroskopie

fluorescenční mikroskop Nikon

Využití FISH

- [Detekce přítomnosti cizorodé, např. virové, DNA v lidských buňkách]
- Detekce translokace chromozomů
- Detekce amplifikace genů
- Detekce změn v počtu celých chromozomů

FISH 1: Detekce translokace chromozomů

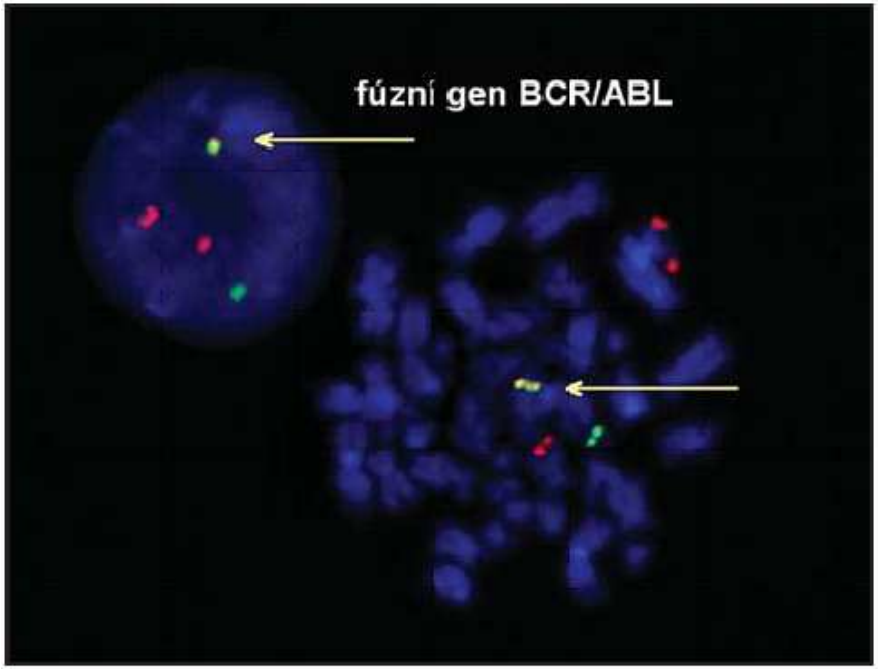


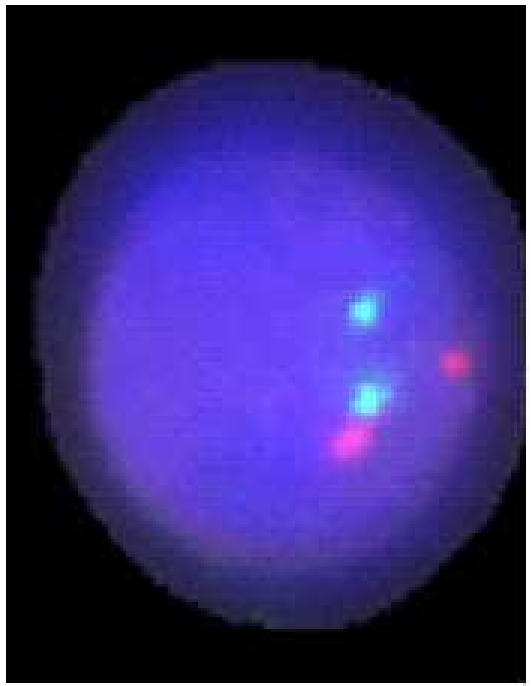
- Pro detekci se použijí dvě sondy značené odlišnými fluorescenčními barvami. Každá sonda se váže k sekvenci jednoho z genů.
- Pokud je přítomný fúzní gen, vznikne směsný signál v důsledku fluorescence sond navázaných v těsném sousedství.
- Většinou je translokována pouze jedna alela, proto lze vedle pozitivního signálu zachytit i samostatné signály obou sond.

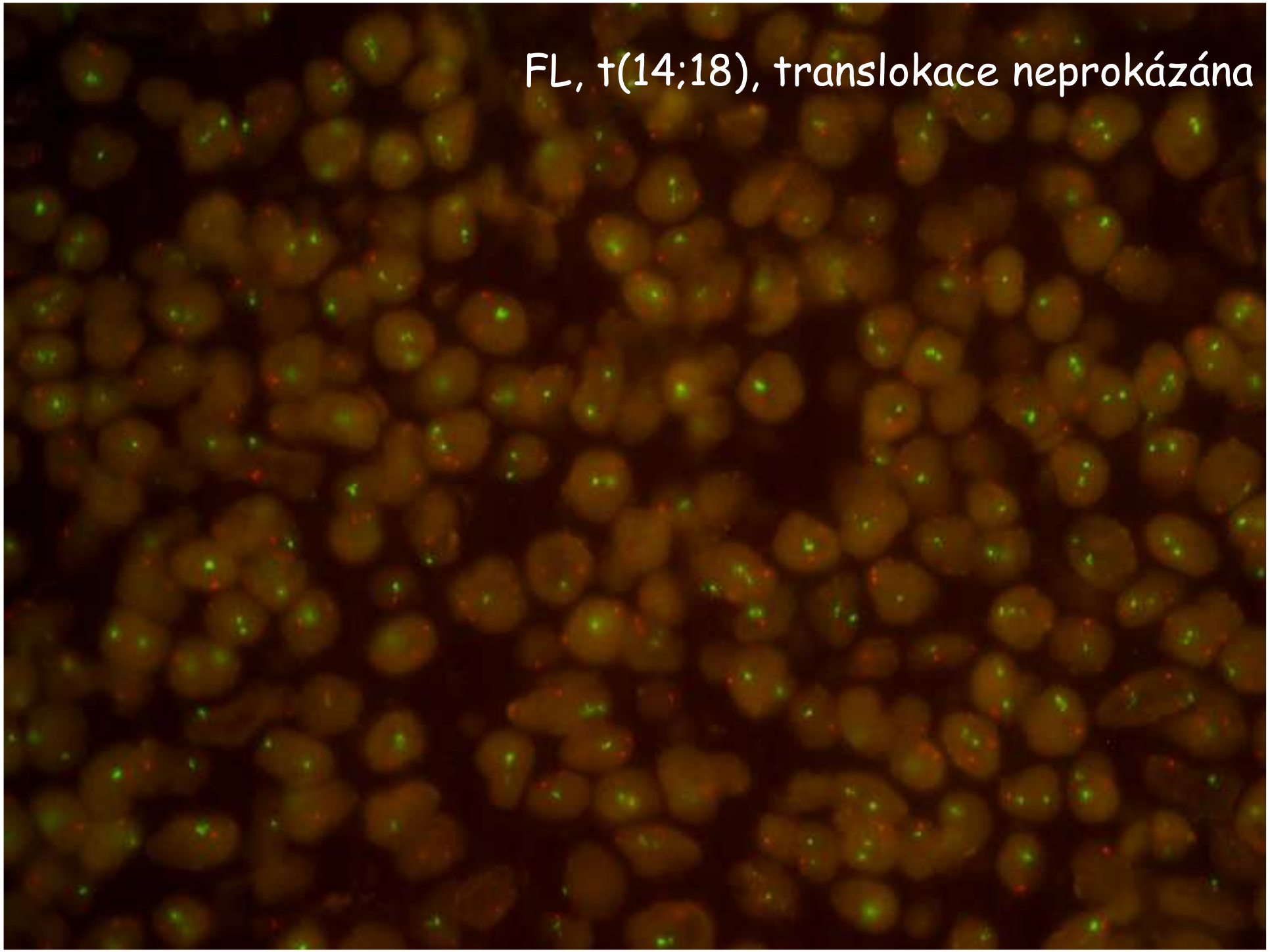
Detekce translokace chromozomů

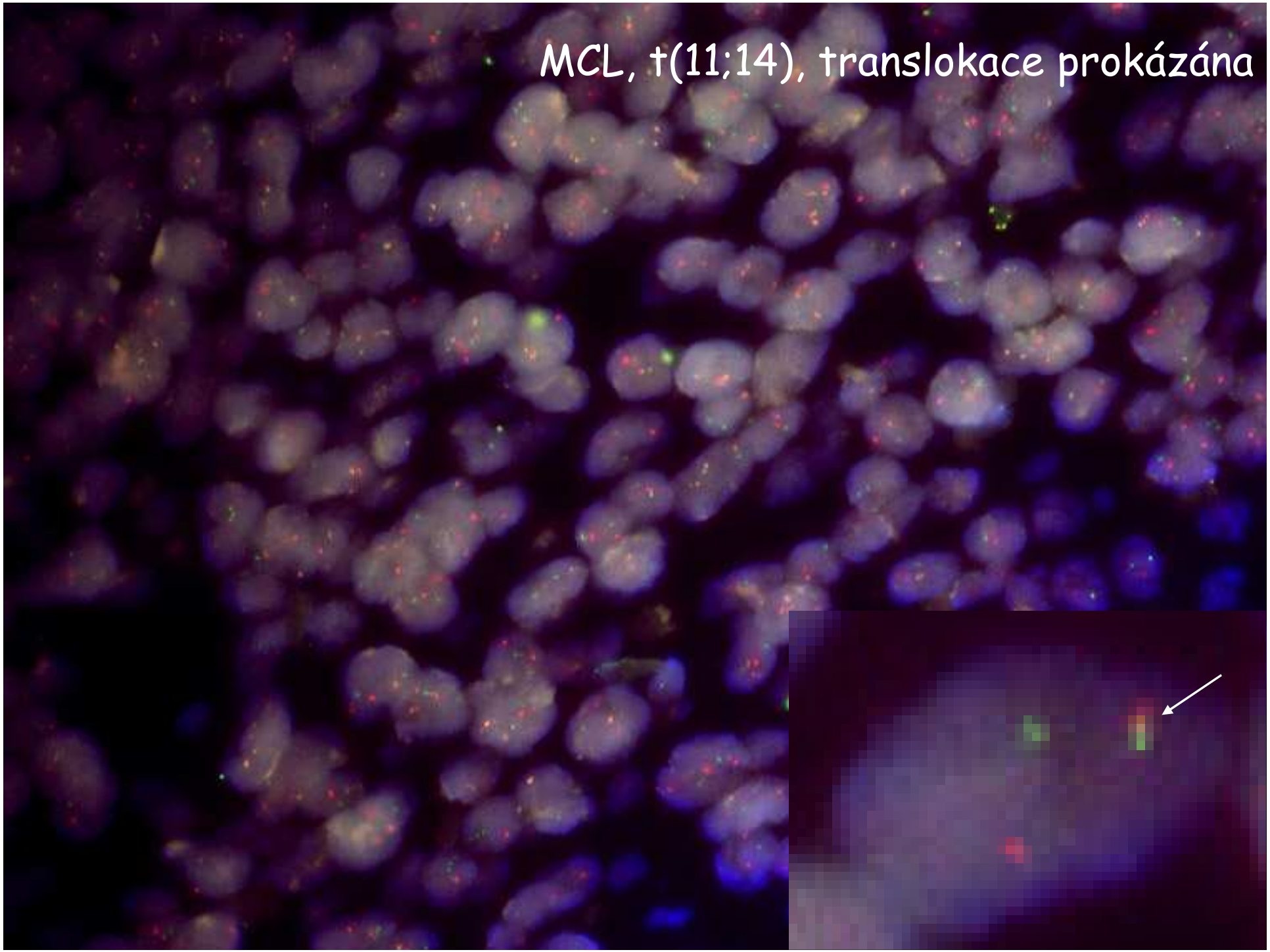
Translokace

- [t(9;22) u chronické lymfoidní leukémie]
- t(14;18) u folikulárního lymfomu
- t(8;14) u Burkittova lymfomu
- t(11;14) u lymfomu z buněk plášťové zóny






FL, t(14;18), translokace neprokázána


MCL, t(11;14), translokace prokázána

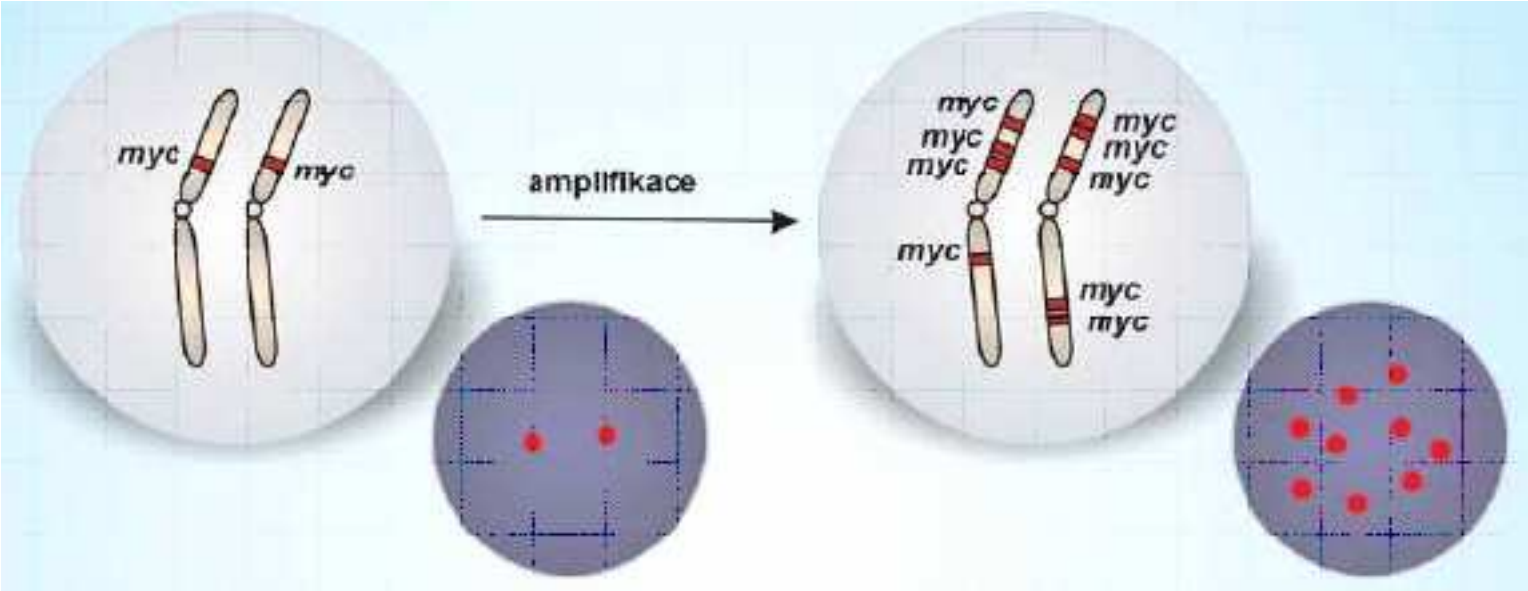
FISH 2: Detekce amplifikace genu

- Sonda specifická pro sledovaný gen (nebo pro sledovaný gen spolu s centromerickou sondou daného chromozomu).

- Určuje se počet signálů (nebo poměr signálů sledovaného genu a signálů odpovídajících počtu centromer = chromozomů).

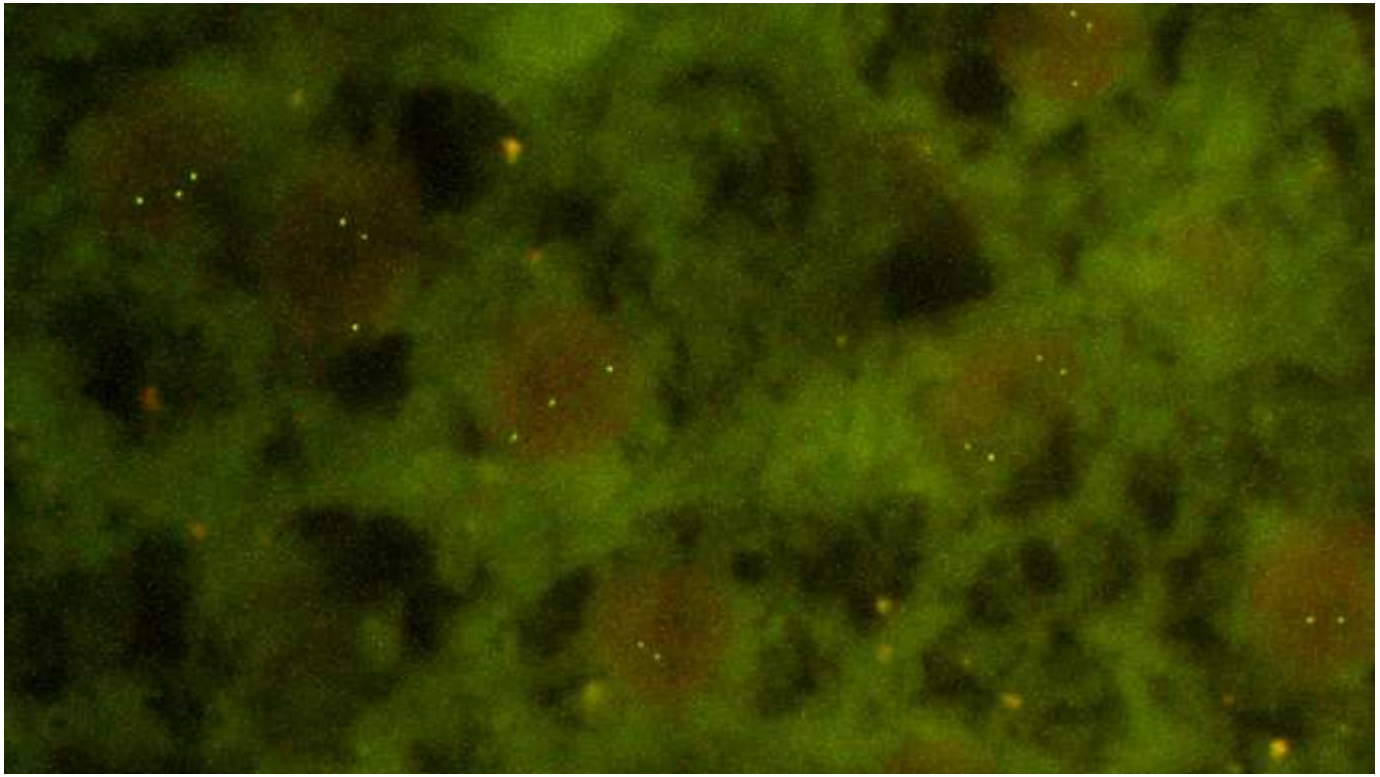
- Např. amplifikace genu *myc* u neuroblastomů nebo genu c-*erb*B2 u nádorů prsu.

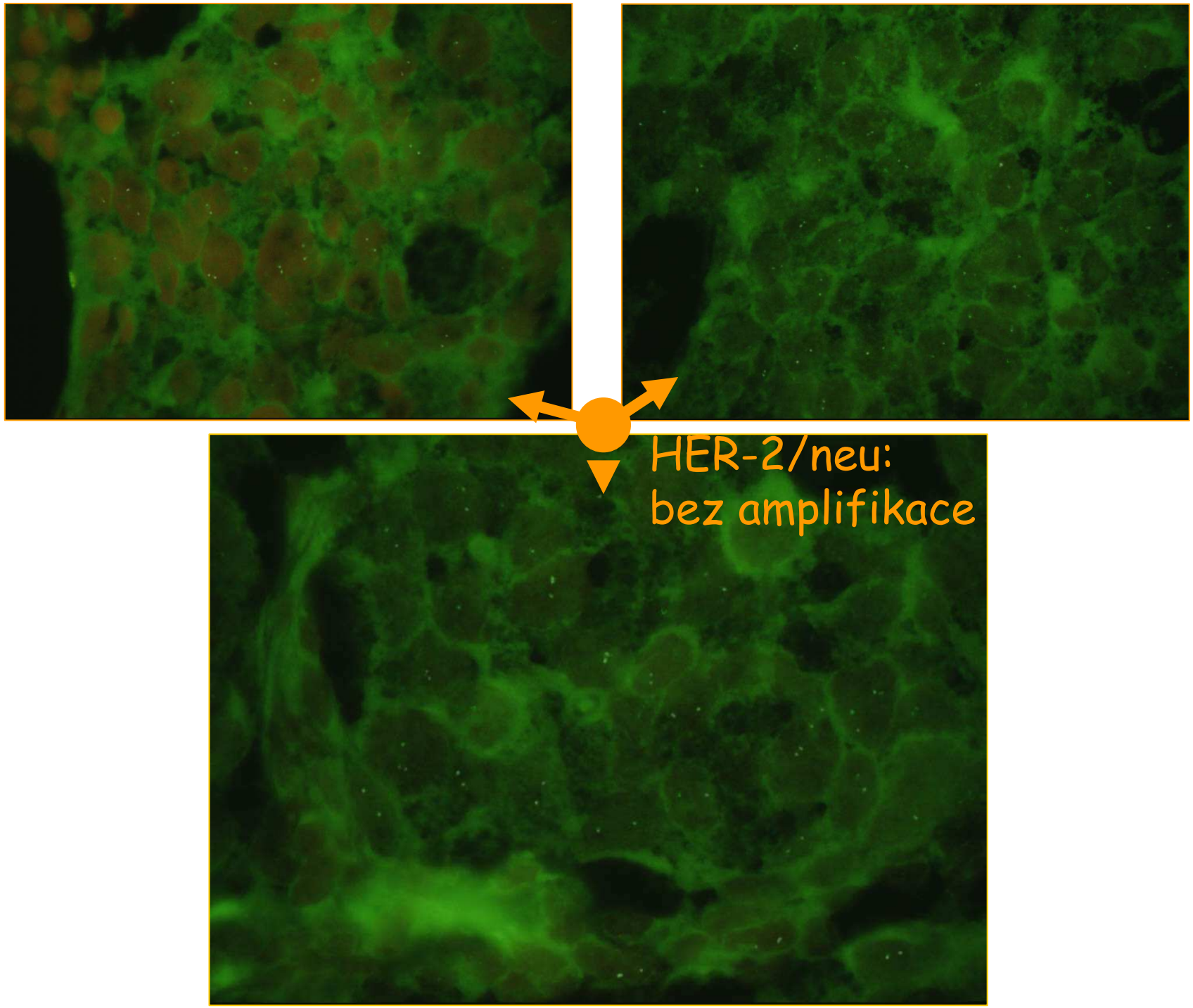
FISH 2: Detekce amplifikace genu

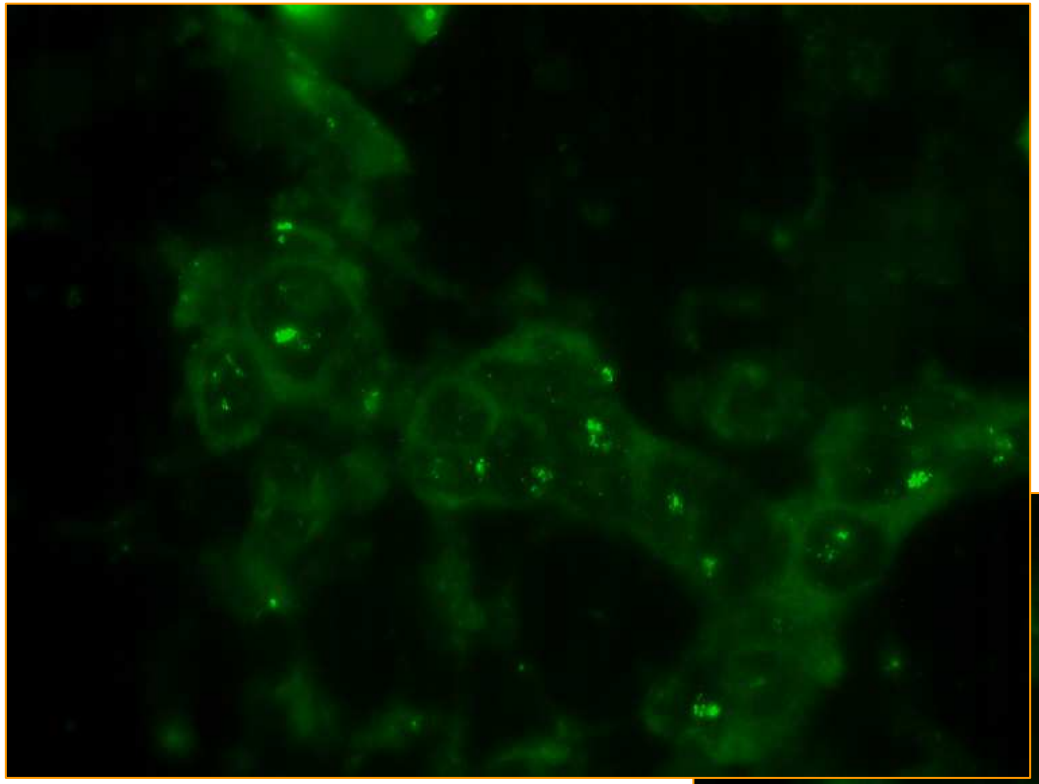


- Sonda specifická pro sledovaný gen a centromeru daného chromozomu.
- Určuje se počet / poměr signálů sledovaného genu a signálů odpovídajících počtu centromer = chromozomů.
- Např. amplifikace genu ***myc*** u neuroblastomů nebo genu **c-*erb*B2** (***HER2/neu***) u nádorů prsu.

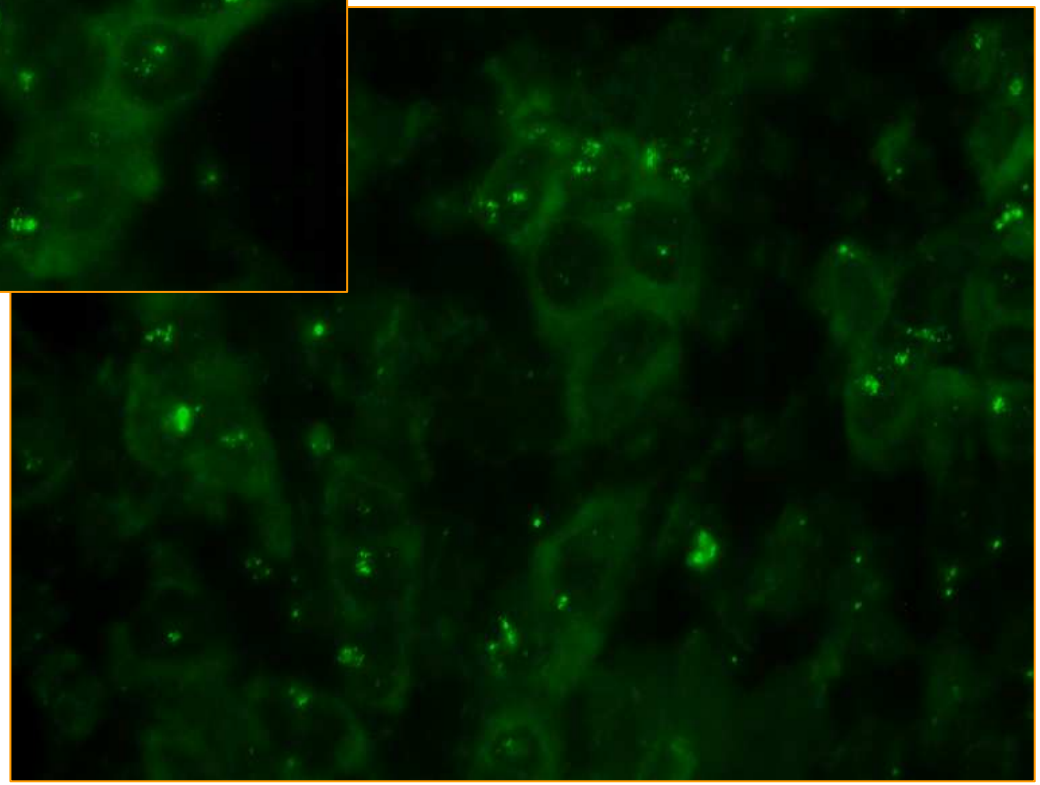
Detekce amplifikace genu HER2/neu



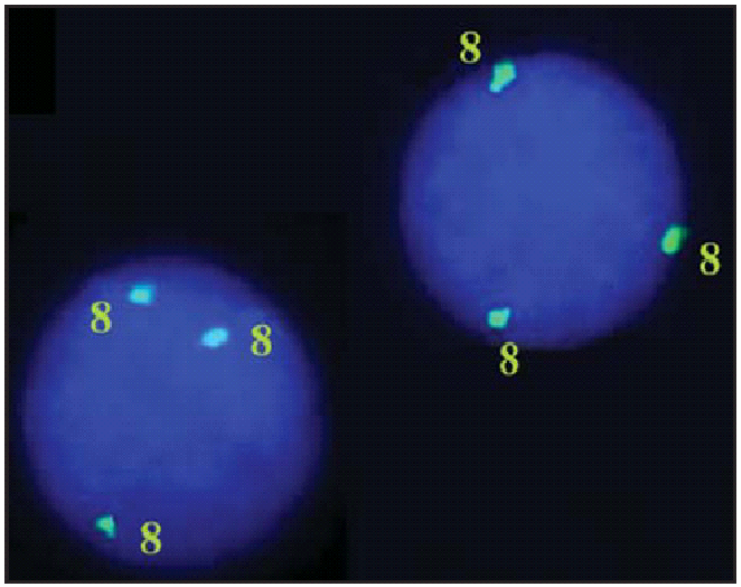

HER-2/neu:
bez amplifikace



HER-2/neu: amplifikace

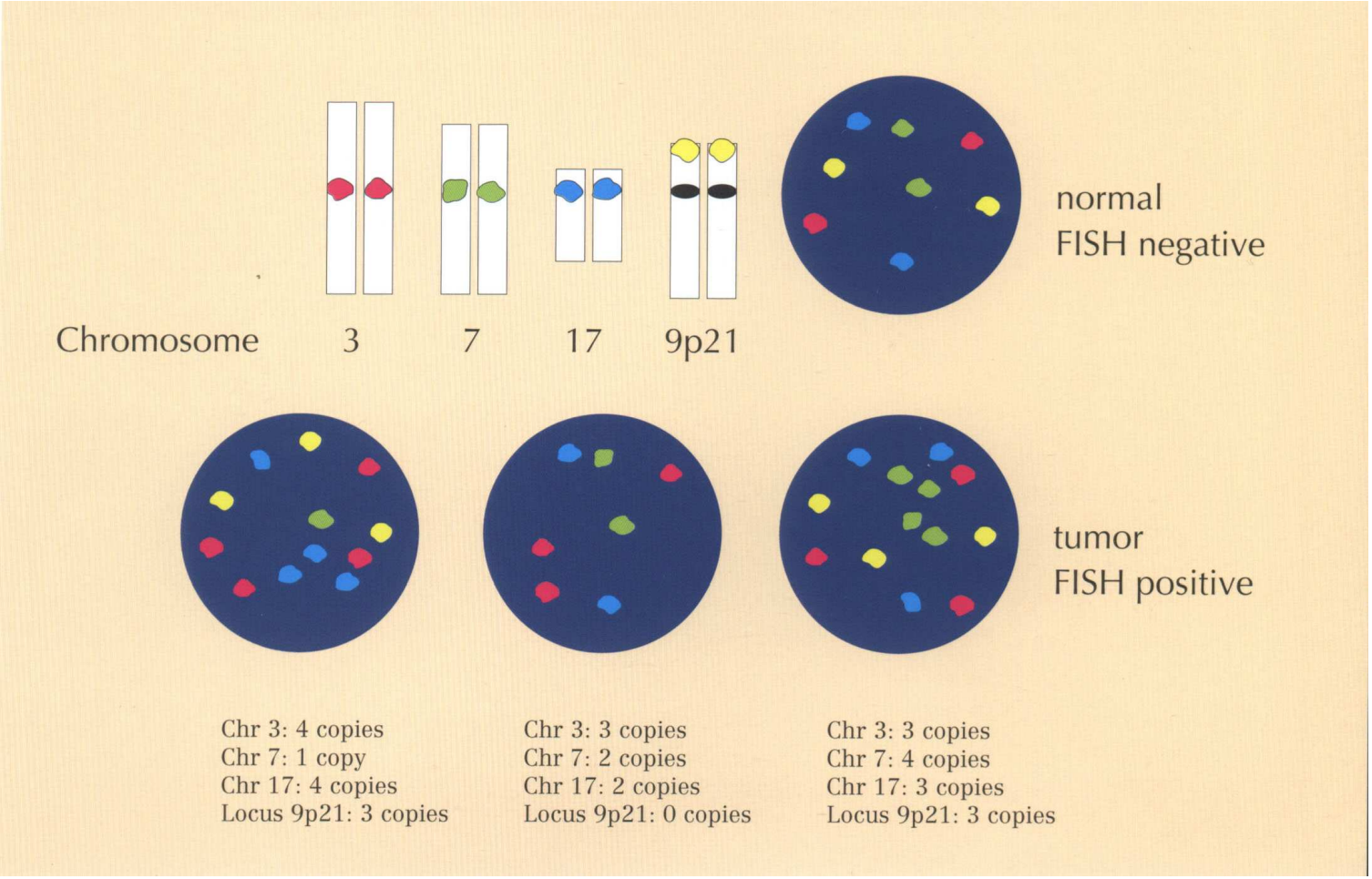


FISH 3: Detekce změn v počtu celých chromozomů

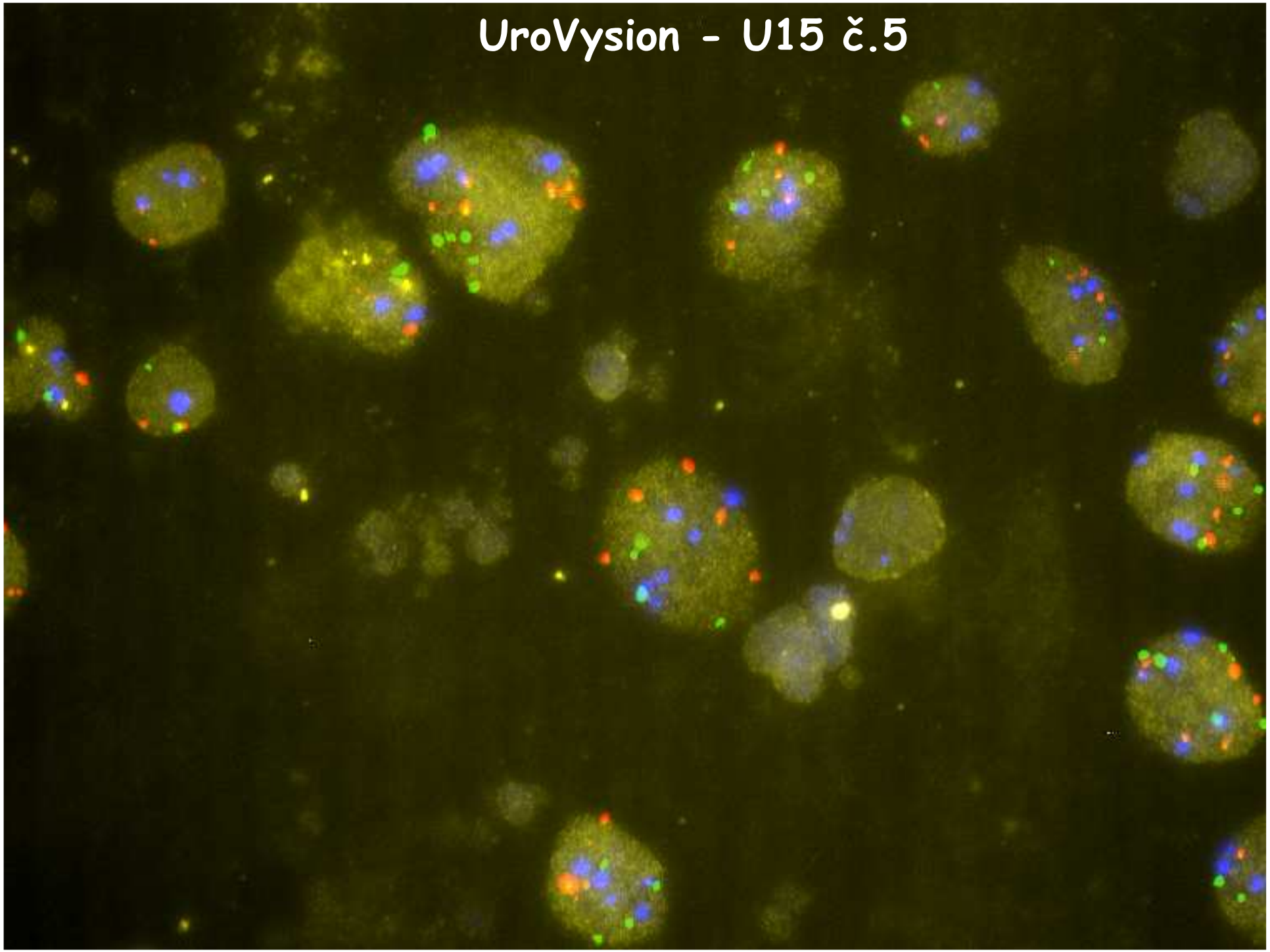


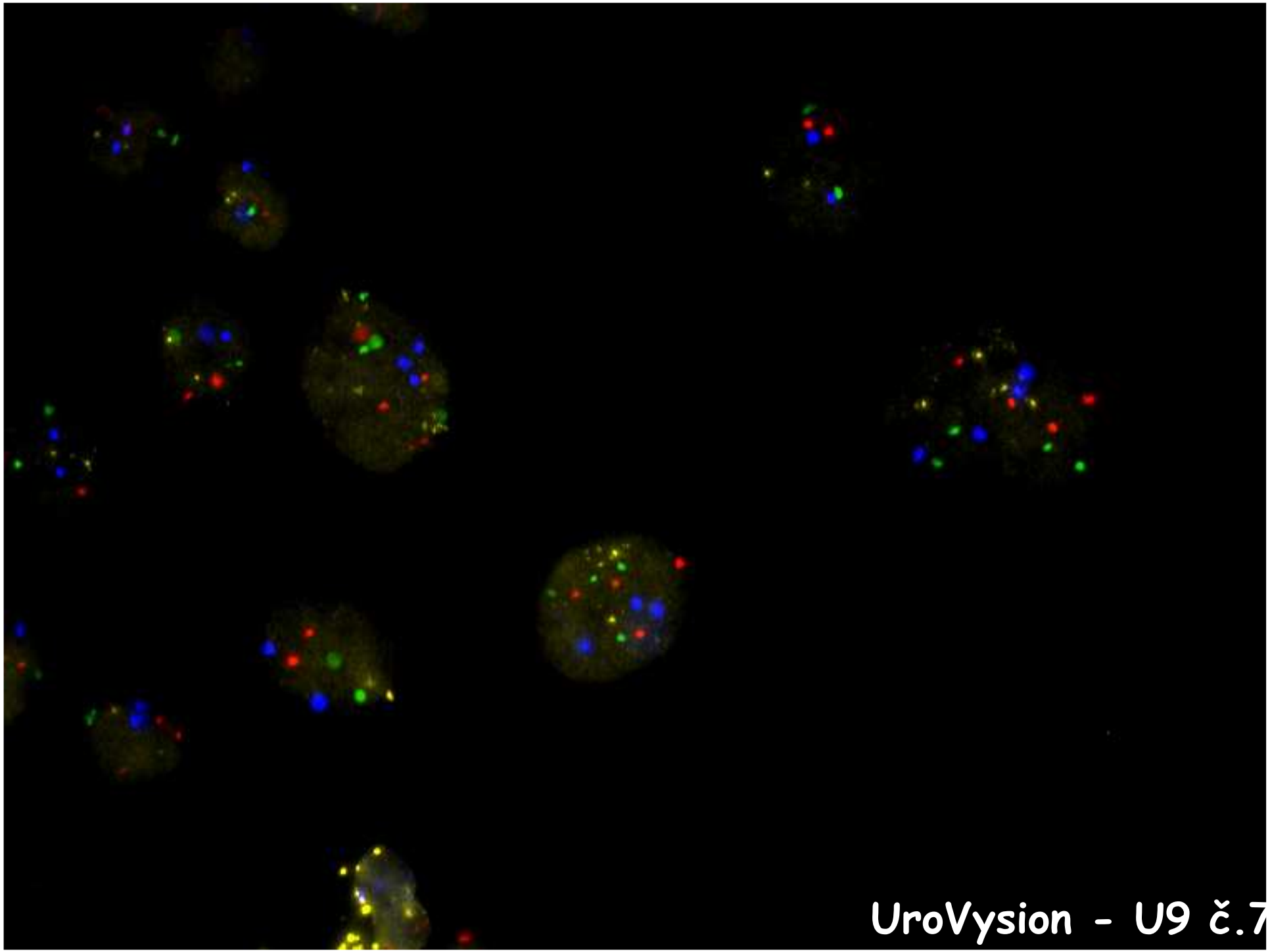
- Jako sondy se používají směsi krátkých fragmentů pokrývajících celé chromozomy nebo fragmenty specifické pro dané chromozomy, například centromerické sondy.
- Podle počtu signálů stanovených mikroskopií lze určit, kolik kopií daného chromozomu se v buňkách nachází.

UroVysion: detekce polyploidie chromozomů 3 •, 7 • a 17 • a delece lokusu 9p21 • v nádorových urotelíích izolovaných z moči



UroVysion - U15 č.5




UroVysion - U9 č.7

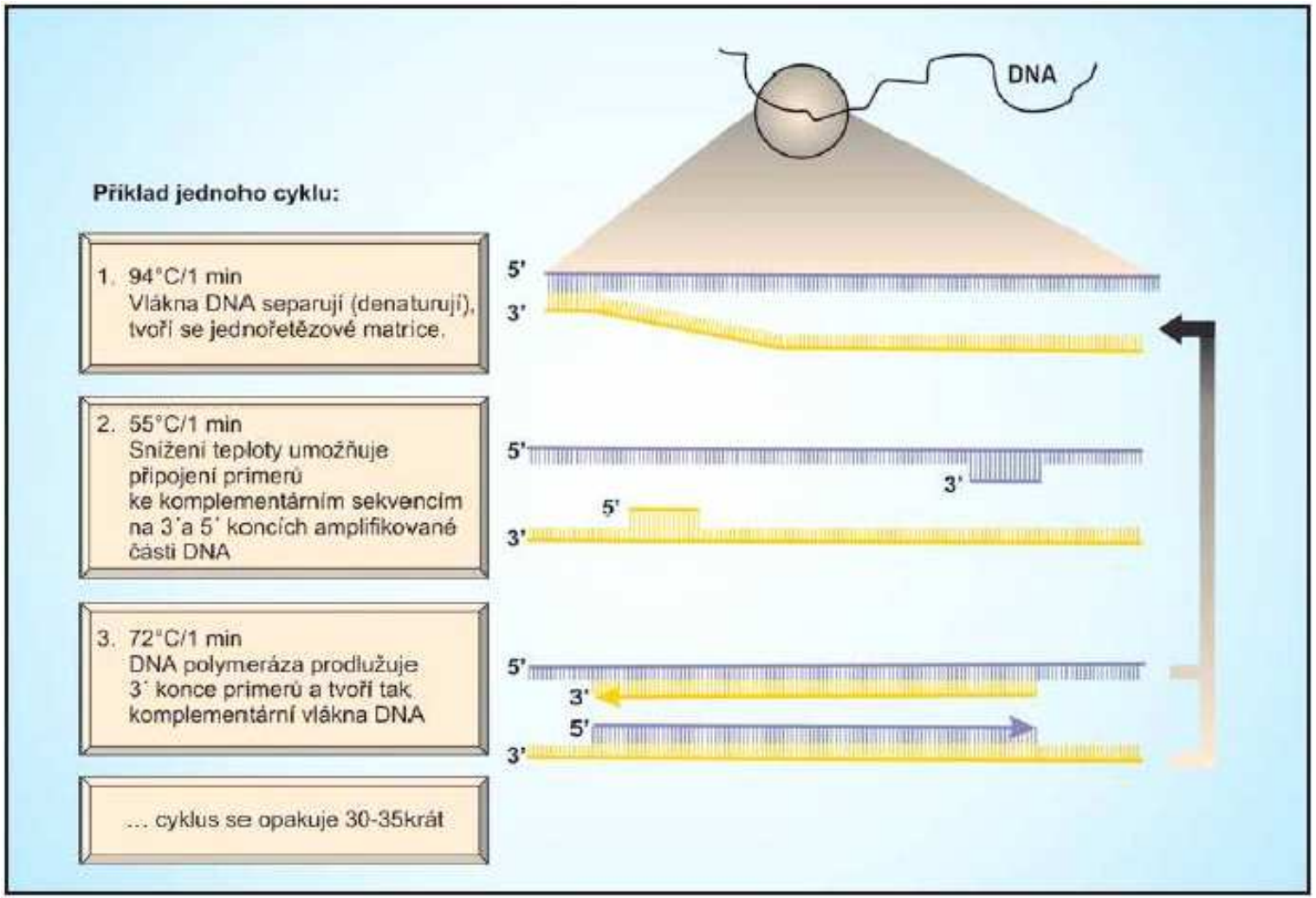
Polymerázová řetězová reakce - PCR

- Podstatou je amplifikace krátkého úseku DNA (řádově stovky až tisíce bází) ohraničeného syntetickými oligonukleotidy (primery) **specifickými** pouze pro analyzovaný úsek genu.
- Používají se termostabilní DNA polymerázy, které odolávají teplotám, při nichž DNA denaturuje.

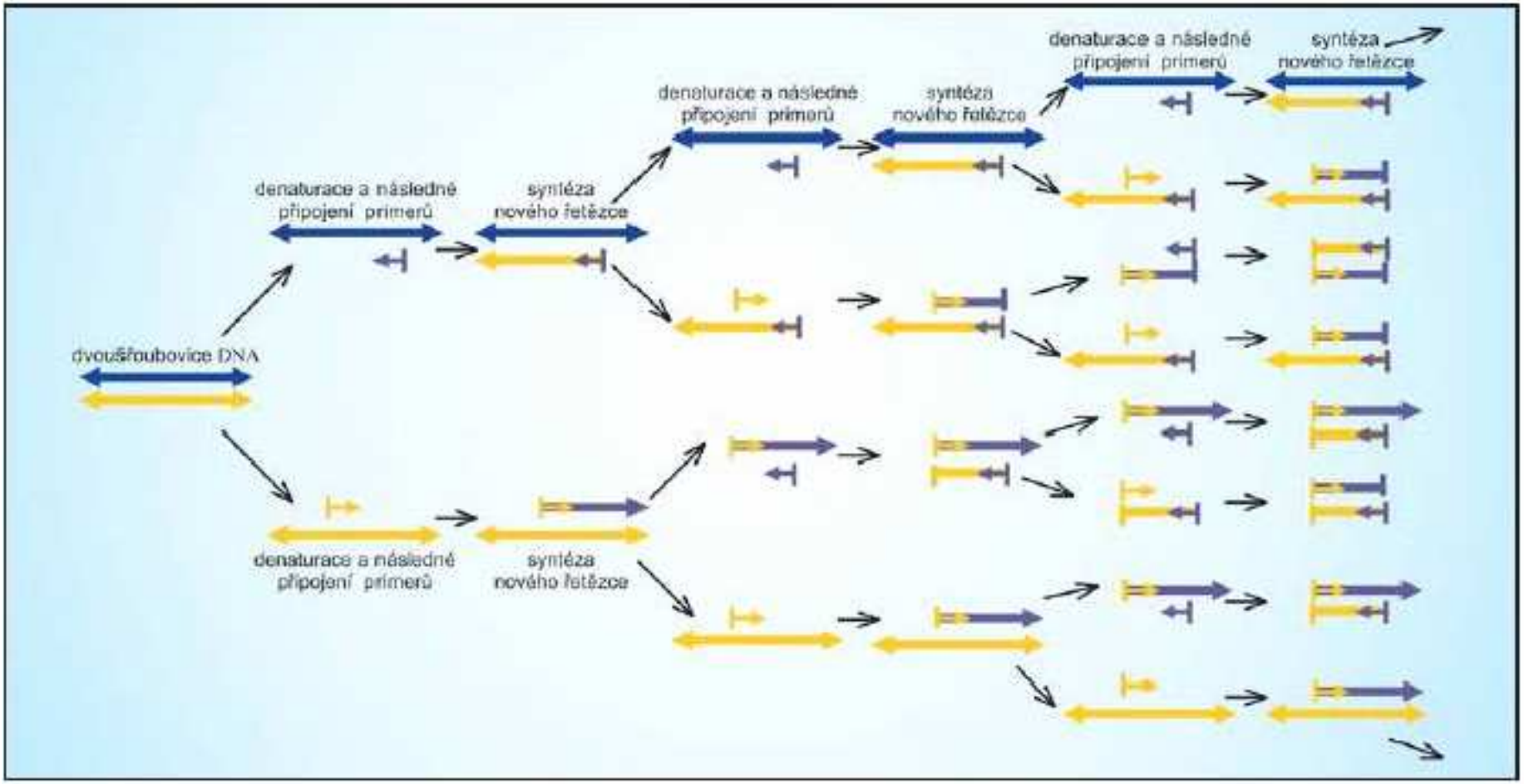
- Syntéza DNA probíhá formou cyklů (v termocyklerech), při nichž se v závislosti na teplotě reakční směsi pravidelně střídají tři kroky:

1. denaturace dvouřetězcových molekul DNA (94 – 98°C)
2. připojení primerů k odděleným DNA řetězcům (30 – 65°C)
3. polymerační reakce (65 – 75°C)

Příklad jednoho cyklu PCR



Exponenciální nárůst produktu PCR



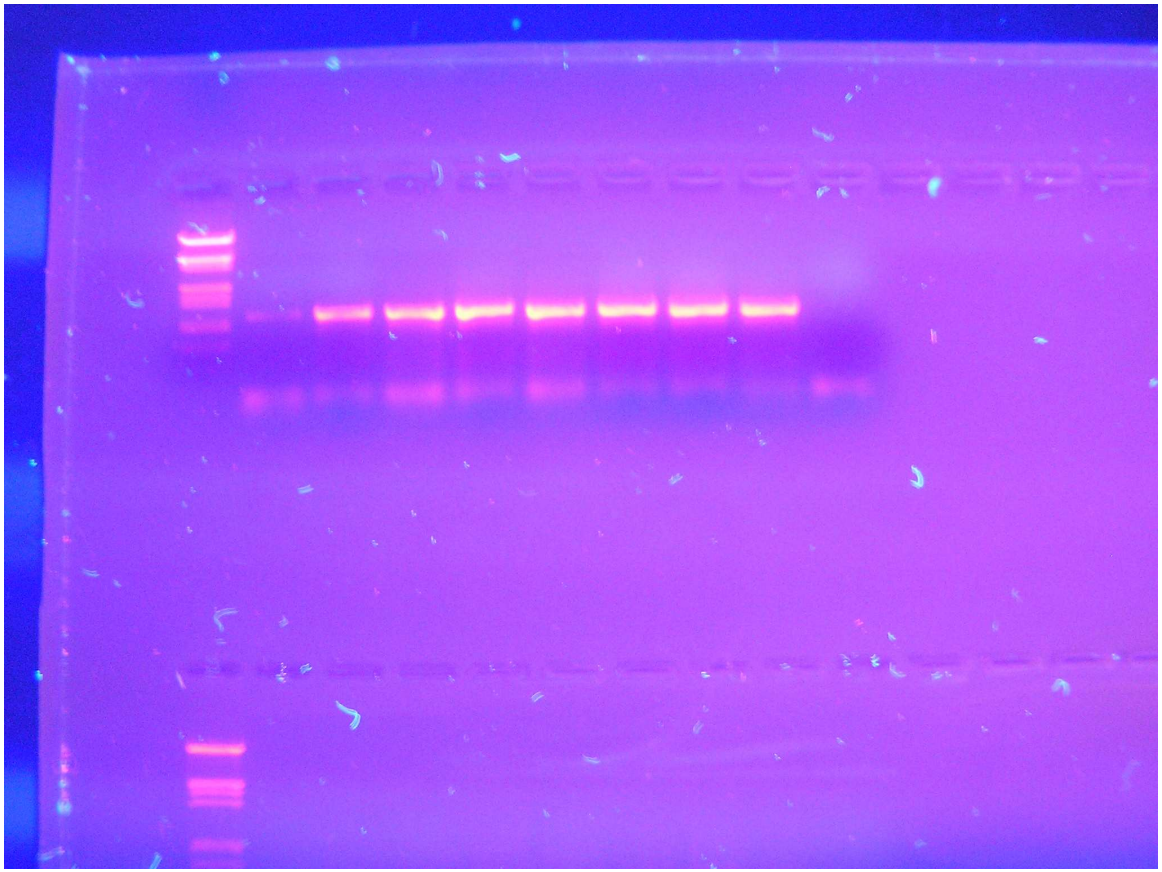
Varianty PCR

- **RT-PCR**: zpětná (reverzní) PCR – je určena k amplifikaci mRNA, která se nejdříve přepíše reverzní transkriptázou do komplementární DNA (cDNA)
- **Kvantitativní PCR** – umožňuje přímou kvantifikaci produktu PCR (např. při detekci minimální zbytkové nemoci)

  - kompetitivní PCR

  - PCR sledovaná v reálném čase
- **PCR *in situ*** - lze následně kombinovat s FISH
- **Nested PCR** – dvě kola PCR s dvěma sadami primerů (zvýšení specifity, případně účinnosti reakce)
- **Multiplex PCR** – v jediném kroku více sad primerů (např. současná analýza více exonů téhož genu nebo současná analýza více možných typů fúzních partnerů jednoho genu – např. gen MLL) – podmínkou je podobná teplota připojení primerů k jejich specifickým sekvencím

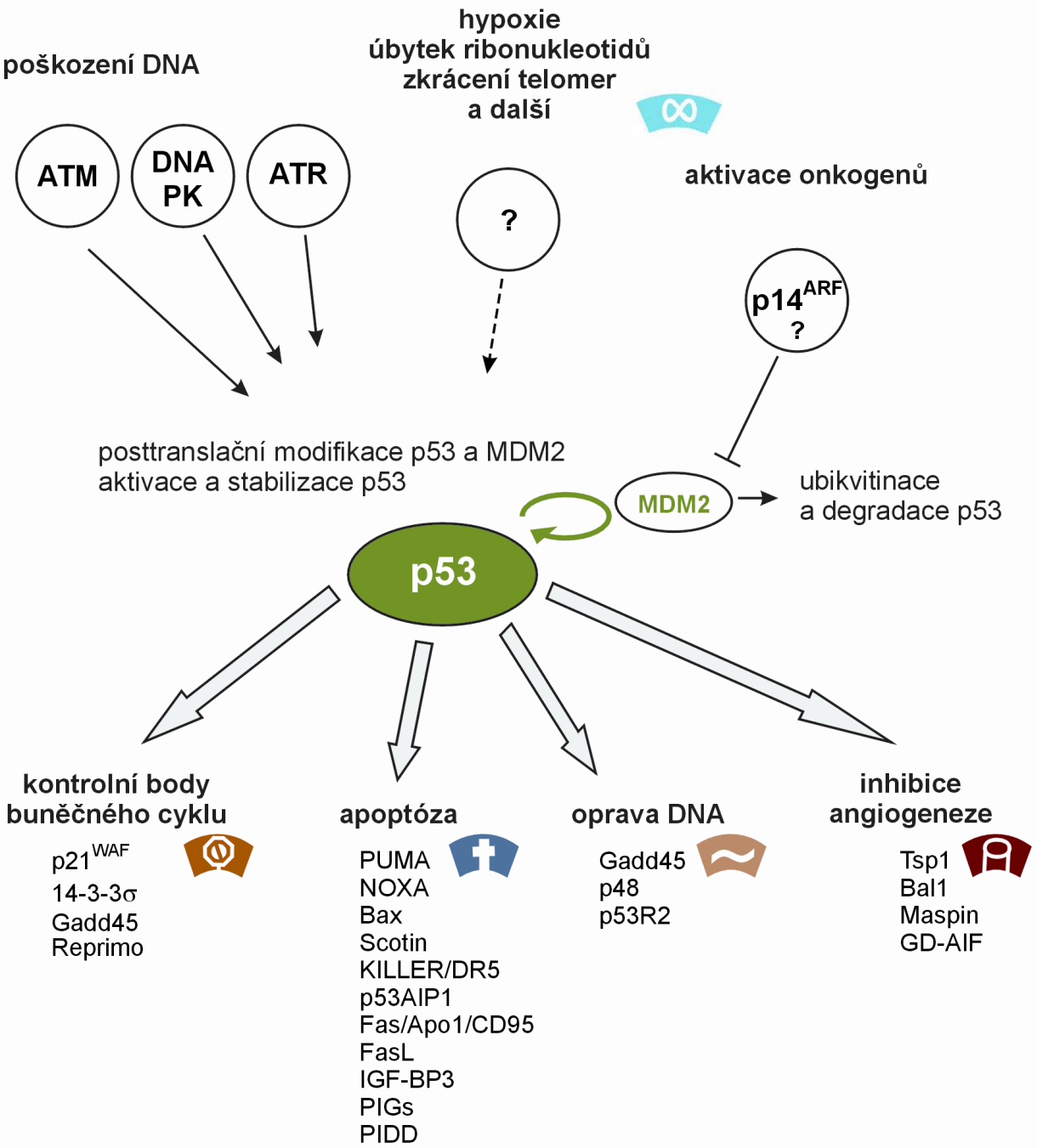
Detekce DNA po elektroforéze
(EtBr – UV světlo)



(Komplexní) analýza nádorového supresoru p53

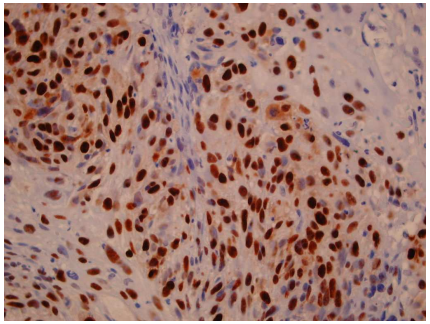
- Vrozené mutace p53 jsou velmi vzácné, ale spojeny s vysokým rizikem vývoje nádorů.
- Asi 50% všech nádorů má (somatickou) mutaci v genu pro p53.
- Mutace genu p53 je prognostickým / prediktivním markerem u některých diagnóz (CLL).

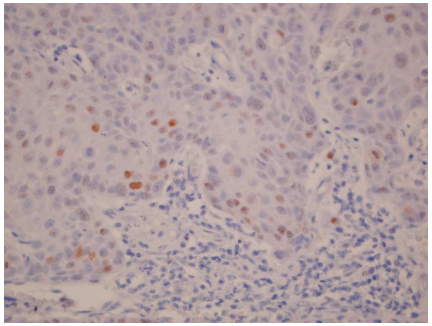
Funkce p53: signální síť

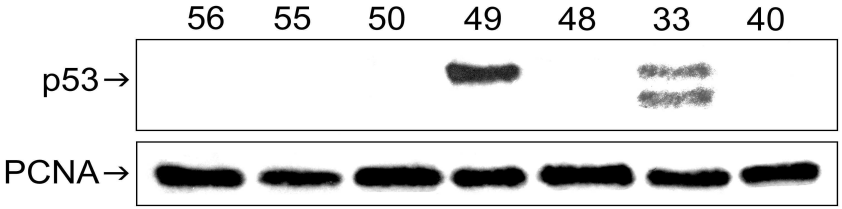


Metody užívané k analýze statutu p53

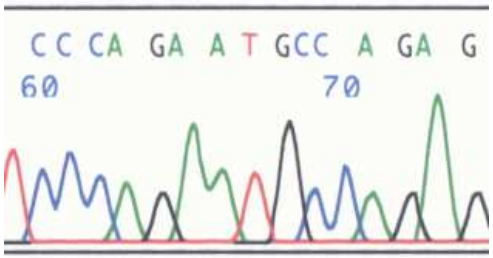
1. Imunochemické metody
- detekce hladiny proteinu p53 (IHC, WB)



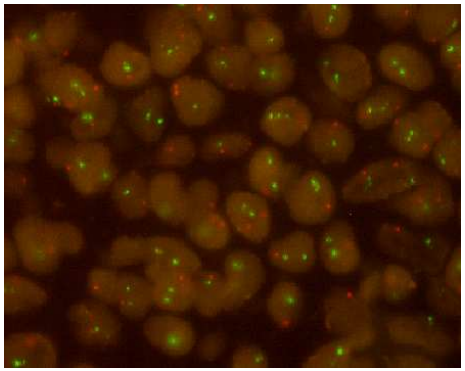




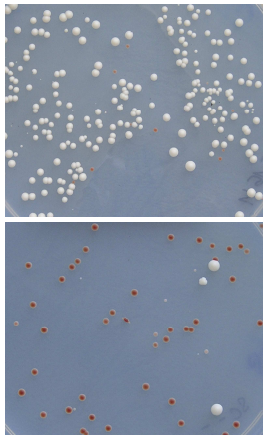
2. Molekulární analýzy
- SSCP, sekvenování DNA



3. FISH - del 17p13.3



4. Funkční testy
(FASAY)



Testování chemorezistencí nádorů *in vitro*

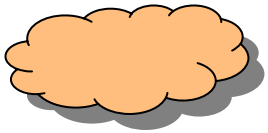
- **Individualizace** terapie se v medicíně již uplatňuje (baktérie – antibiotikum).

- Pozitivní odpověď i na statisticky nejefektivnější léčbu nádorů vykazuje **pouze část** nemocných.

- Možnost testování citlivosti/<u>rezistence</u> nádorových explantátů k cytostatikům *in vitro*. Smyslem je eliminace neúčinných preparátů.

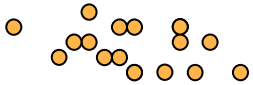
Testování chemorezistencí *in vitro*

čerstvě odebraný nádor

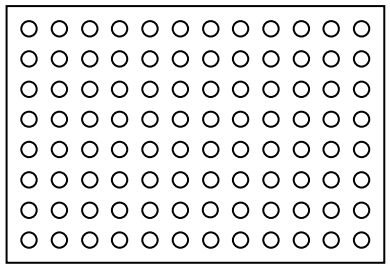


mechanické rozrušení tkáně

jednotlivé buňky a agregáty



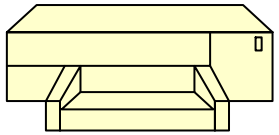
buněčné kultury s příslušnými cytostatiky



inkubace 2 až 3 dny

přidání WST-1 /MTT

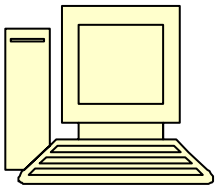
ELISA reader



měření absorbance při 420-480 nm

počítač

program: Chemorezist



vyhodnocení výsledků

„MTT test“ – vyhodnocení viability kultivovaných buněk

- Podstatou je měření celkové aktivity **mitochondriálních dehydrogenáz**. Ta koreluje s počtem metabolicky aktivních buněk v kultuře.
- Ke kultuře se přidá některý typ **tetrazoliových solí** (např. MTT, WST-1), které jsou dehydrogenázami štěpeny na barevný **formazan**.
- Množství formazanu lze vyhodnotit spektrofotometricky.

- Koncentrace formazanu je nepřímo úměrná účinnosti cytostatika.

„MTT test“ – vyhodnocení viability kultivovaných buněk

Přežití se počítá v procentech – oproti kontrole rostoucí bez cytostatika, s korekcí na čisté růstové médium.

Na 96 jamkové destičce je

- čisté médium
- negativní kontrola
- pro každé cytostatikum dvě sestupné řady koncentrací od toxické pro zdravou tkáň až po koncentraci pro zdravou tkáň víceméně neškodnou
- případně barevná kontrola pro dané cytostatikum

„MTT test“ – vyhodnocení viability kultivovaných buněk

Přežití se počítá v procentech – oproti kontrole rostoucí bez cytostatika, s korekcí na čisté růstové médium.

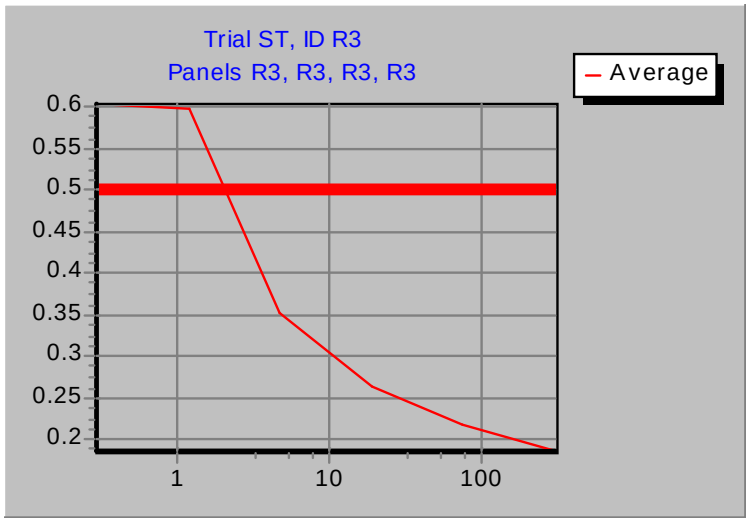
Na 96 jamkové destičce je

- čisté médium
- negativní kontrola
- pro každé cytostatikum dvě sestupné řady koncentrací od toxické pro zdravou tkáň až po koncentraci pro zdravou tkáň víceméně neškodnou
- případně barevná kontrola pro dané cytostatikum

Chemorezistence *in vitro*: výsledky

5-FLUOROURACIL

GEMCITABIN



Děkuji za pozornost!