



VFN PRAHA

Základní terminologie genomových alterací

Nikola Hájková
Laboratoř molekulární patologie
Všeobecná fakultní nemocnice v Praze a 1. LF UK

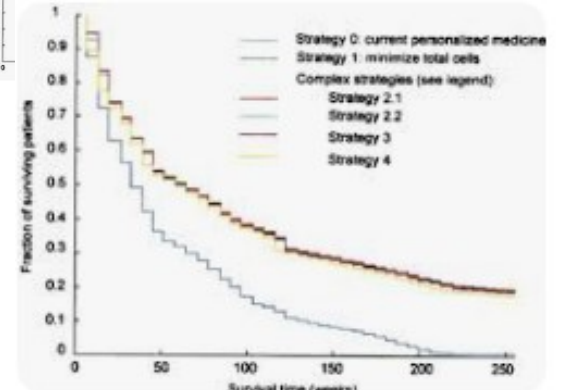
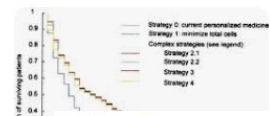
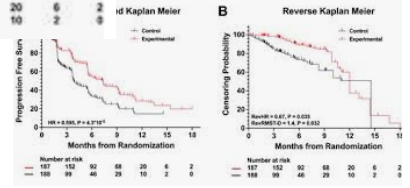
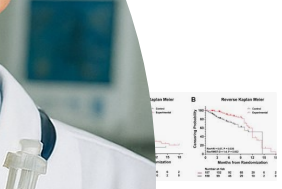
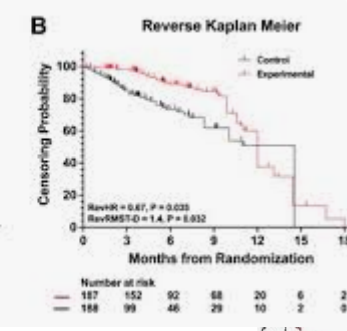
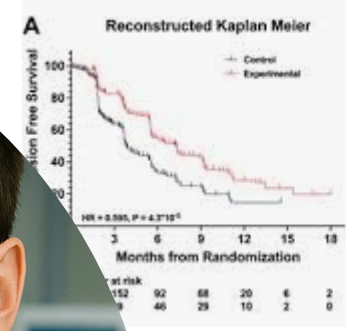
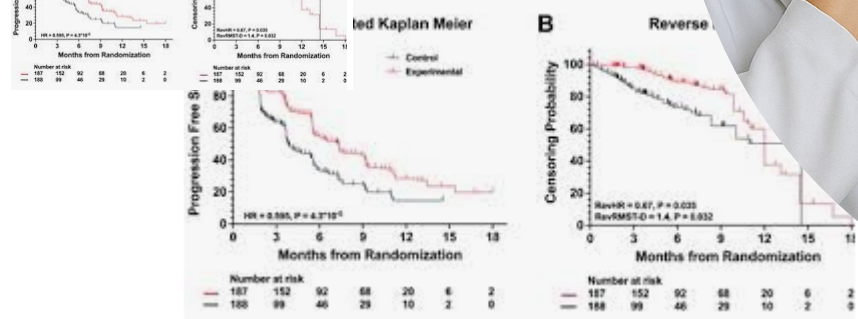
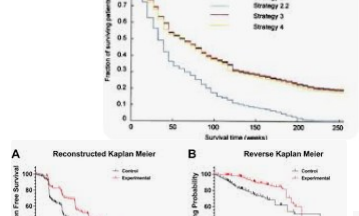
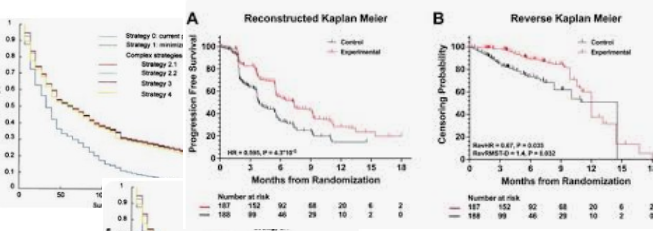
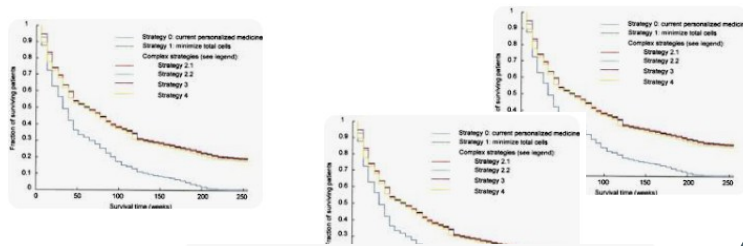
Molekulární biolog a patolog

- Růžovou vnímá jako růžovou a fialovou jako fialovou (**versus patolog** který vnímá 50 odstínů růžové a fialové, někteří ještě 25 odstínů hnědé)
- Vůbec nevidí s čím pracuje (spoléhá se na technologie – zviditelnění DNA/RNA/proteinu)
- Má rád abecedu o čtyřech písmenech (+1) **versus patolog**

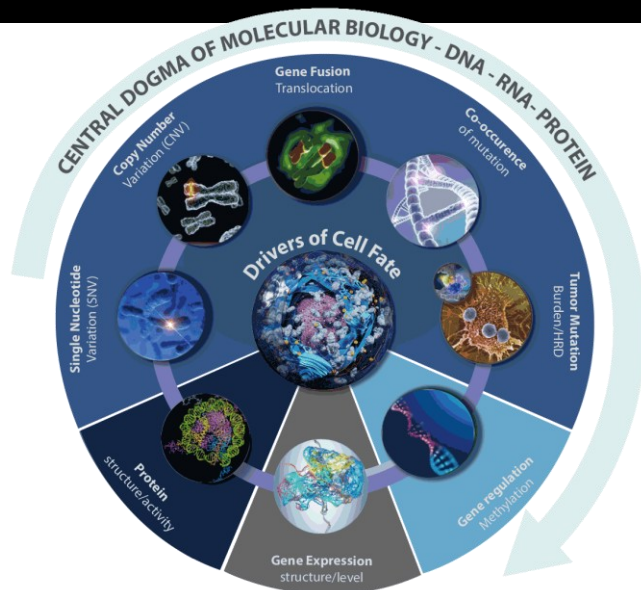
起来！不愿做奴隶的人们！把我们的血肉，筑成我们新的长城！中华民族到了最危险的时候，每个人被迫着发出最后的吼声。起来！起来！起来！我们万众一心，冒着敌人的炮火，前进！冒着敌人的炮火，前进！前进！前进！进！ **ethylické při několika měsíční abstinenci.**



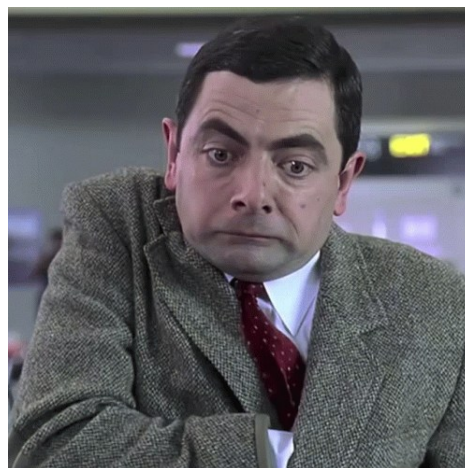
....“Fokální makrovezikulární steatóza a perisinusoidální až pericelulární kolagenizace retikula společně s perivenulární fibrózou svědčí pro toxinutritivní etiologii vč. etiologie **ethylické při několika měsíční abstinenci.**



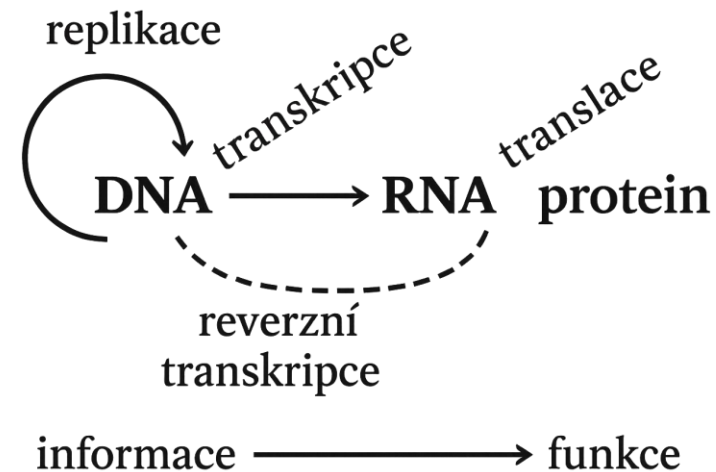
Centrální dogma



Mutace
Delece
Amplifikace
Fúze
Methylace DNA
Methylace a acetylace histonů
Struktura chromatinu
Transkripční faktory
Polymorfismy
lncRNA



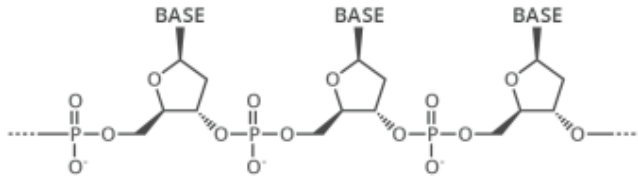
Alternativní splicing (sestřih) RNA – izoformy proteinu
miRNA
Interference RNA (siRNA)
RNA binding proteins
lncRNA



Stabilita proteinu (ubikvitinace)
Postranlační modifikace (fosforylace, acetylace, glykozylace)

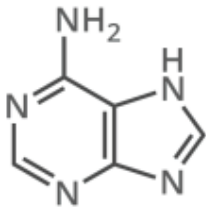
DNA

The sugar-phosphate backbone

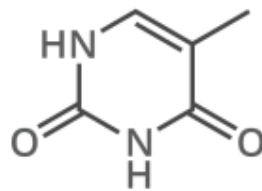


DNA is a polymer made up of units called nucleotides. The nucleotides are made of three different components: a sugar group, a phosphate group, and a base. There are four different bases: adenine, thymine, guanine and cytosine.

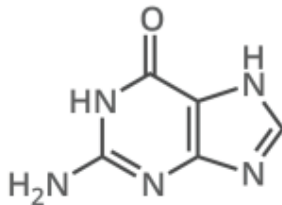
A Adenine



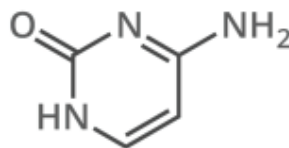
T Thymine



G Guanine

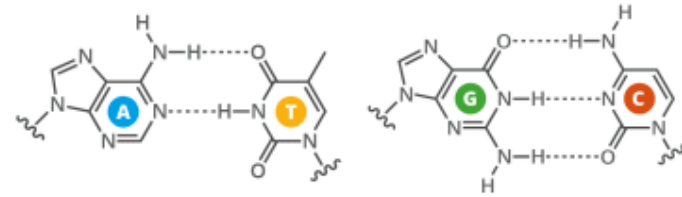


C Cytosine



What holds DNA strands together?

DNA strands are held together by hydrogen bonds between bases on adjacent strands. Adenine (A) always pairs with thymine (T), while guanine (G) always pairs with cytosine (C). Adenine pairs with uracil (U) in RNA.



From DNA to proteins

The bases on a single strand of DNA act as a code. The letters form three letter codons, which code for amino acids - the building blocks of proteins.

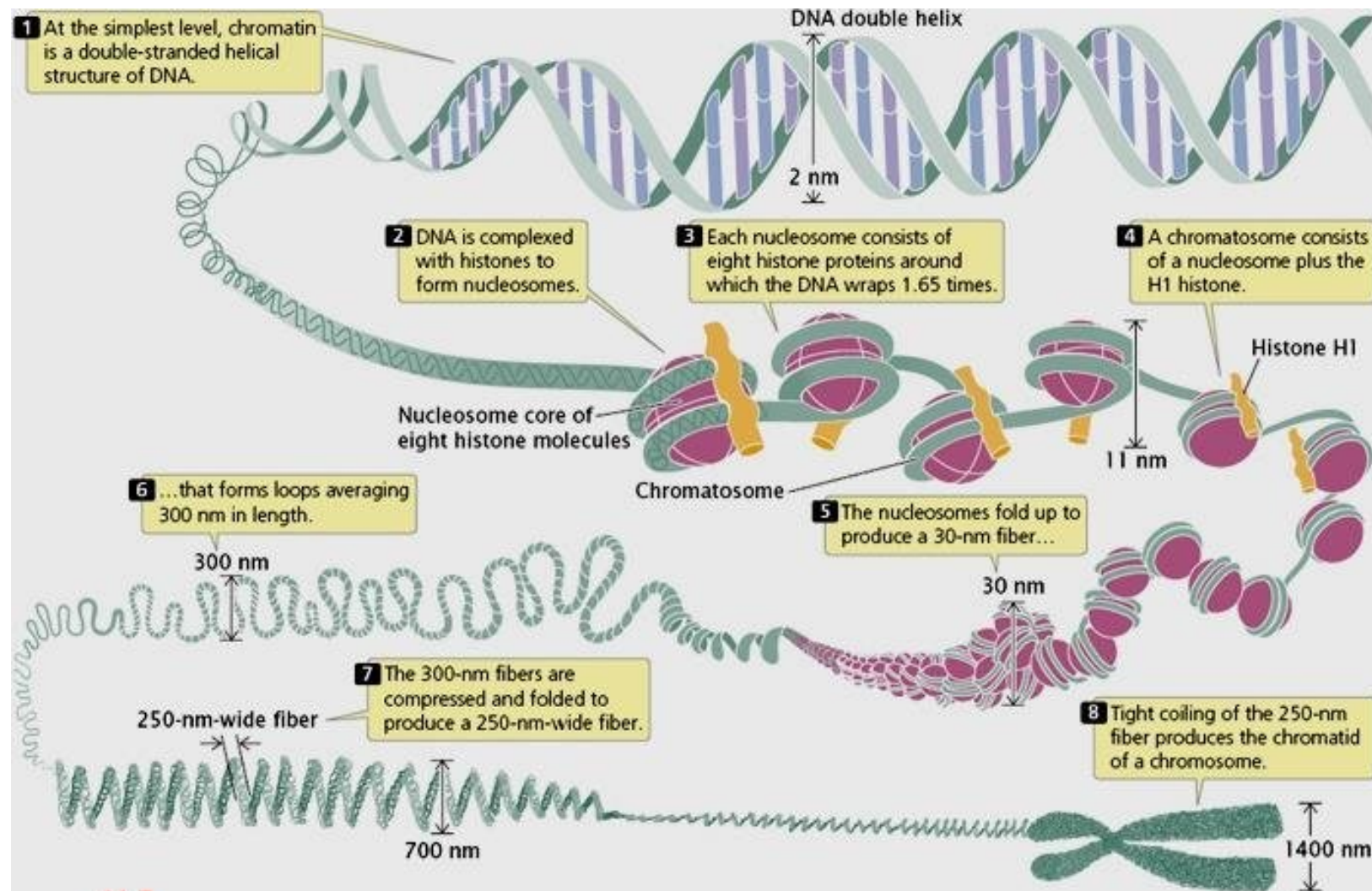


An enzyme, RNA polymerase, transcribes DNA into mRNA (messenger ribonucleic acid). It splits apart the two strands that form the double helix, then reads a strand and copies the sequence of nucleotides. The only difference between the RNA and the original DNA is that in the place of thymine (T), another base with a similar structure is used: uracil (U).

DNA sequence	T	T	C	C	T	G	A	A	C	C	C	G	T	T	A
mRNA sequence	U	U	C	C	U	G	A	A	C	C	C	G	U	U	A
Amino acid	Phenylalanine			Leucine		Asparagine		Proline		Leucine					

In multicellular organisms, the mRNA carries genetic code out of the cell nucleus, to the cytoplasm. Here, protein synthesis takes place. 'Translation' is the process of turning the mRNA's 'code' into proteins. Molecules called ribosomes carry out this process, building up proteins from the amino acids coded for.

DNA



Referenční genom

The image displays a highly structured grid of nucleotide sequences (A, C, G, T) arranged in approximately 20 rows and many columns. Each row contains a long string of these letters, representing a specific DNA sequence. The sequences are densely packed, with minimal spacing between them. In several rows, there are small numerical labels (1-22) placed at regular intervals, possibly indicating specific genomic regions or features of interest. The overall appearance is that of a complex biological dataset, such as a genome assembly or a collection of related DNA fragments.

mutace

- Mutace je odchylka od referenčního genomu, která je spojována s onemocněním
- **Somatická** – typická pro nádor, ve zdravých buňkách nepřítomna
- **Germinální** – ve všech buňkách v těle (případně mosaicismus); nádorové syndromy – BRCA1/2, Lynchův syndrom
- Varianta – odchylka od referenčního, ale bez zjevné asociace s onemocněním
- Existuje několik typů mutací dle změny genetické informace vedoucí k odlišným změnám na **úrovni proteinu**
- Single nukleotide polymorfismus – **SNP** (zpravidla nejsou patogenní, ale spíše benigní ale mohou být asociační)

SNP – single nucleotide polymorfismus

[illegible]

tgatgggggtgcggggcagagtgtgcggggaaggcctggccgggggtgagggggtagggggcgctgggggctcaggttaggagtgtaggcagtgtaggagcccgaggagtgaatgaacgtttcttctcacctgcgctcctctcgtccccggccttctctgggccgcccccatctgtgcttcaaagagggcccttagagctcgaggggaacctgaggggaggcgaggggactgttgggagctgctagaggccggctgcggttcacctagggcagcccggtccatctcgtcttaggtccgcgggcccgtagggcctggctgcttccctggaagtctggttaaacagctgagtgattggagtagtaagtgcagattcttggttgggattgaattaggaggtaaaatcttctgtaaaggccaggagacagttggcttaggtgacatctcatctgtgatctgattggctccccatctcctcttggccattataattgcctctgatgaatgta

[illegible]

ctcccttggtcccttcgaactccaggggctctgatgggggtcgggggcagagtgctcggggaagggcctcgccgggggtgagggggtgaggggggcctgggggctcaggttaggagtgtaggcagtgtaggagagccaggagttgaatgaacgtttcttctgctacctccgctctctcctgctccccggccttctctggccgcggccgcctatctgctcttcaagaggggccctagagctcgaggggacctcgaggggagggc

[illegible][illegible]

cagttggtccttagttgacatcctactctgtgactcgttggtgccccatcctcgtcttggccattataattgctctgagtaatggtaacaacatcctgatgacctaataaacttttacatcagaccatgggtggcgcgtgcggtgagcgggcacagccttgggctccccctcagtcacggggccccactctccttccctccttcagcctttgttggtgttttcagaggtgtctcctctcttttctctccctggtcccttcgaact

[illegible]

onkogen

- **gen**, který má potenciál **podílet se na tumorigenezi**, pokud dojde k jeho **aktivaci**
- Protoonkogen - zpravidla významná role v regulaci buněčného růstu a diferenciace, pod přísnou regulací
- Aktivace onkogenu je způsobena „aktivačními“ mutacemi či alteracemi
- Stačí aberace v jedné alele „jeden zásah“ k aktivaci – **deregulace onkogenu**

Onkogen	Normální funkce (protoonkogen)	Důsledek aktivace	nádory
RAS (<i>HRAS, KRAS, NRAS</i>)	GTPáza – přepínáč	Trvale aktivní signalizace →	Kolorektální, pankreas, plicní adenokarcinom
MYC (<i>c-MYC, N-MYC, L-MYC</i>)	Transkripční faktor	nečinná	Burkittův lymfom, neuroblastom
HER2	Receptor tyrosinkinázy	aktivita	Karcinom prsu, žaludku
ABL1	Tyrosinkináza	činná	Chronická myeloidní leukémie (CML)
BRAF	Kináza v MAPK dráze	činná	Melanom, papilární ca štítné žlázy
ALK	Receptor tyrosinkinázy	činná	NSCLC, anaplastický velkobuněčný lymfom
RET	Receptor tyrosinkinázy	činná	Medulární karcinom štítné žlázy, NSCLC
MET	Receptor tyrosinkinázy	činná, růst	Karcinom ledviny, NSCLC

tumorsupresor

- Zajišťuje, že buňka **neprojde buněčným cyklem**, pokud není vše v pořádku.
- Pokud je DNA poškozená, zastaví cyklus a umožní **opravu DNA**.
- Pokud je poškození nenapravitelné, aktivuje **apoptózu**, čímž zabrání dalšímu dělení potenciálně nebezpečné buňky
- U tumorsupresorů často platí tzv. Knudsonova dvouhitová teorie: aby došlo k rozvoji nádoru, musí být poškozeny obě kopie genu (např. jedna mutací, druhá delecí nebo metylací)
- Vypnutí tumorsupresoru – buňka projde přes kontrolní body bez opravy chyb, přežívá i s mutacemi v DNA – nekontrolovatelná replikace a proliferace - tumorigeneze

Tumorsupresor	Normální funkce	Důsledek	nádor
TP53	Transkripční faktor – spouští opravu DNA,	Buňka s poškozenou DNA přežívá a dělí se	Karcinomy různých typů (mutace v >50 %
RB1			om, SCLC
BRCA1/2			(zejména
PTEN			dometria,
CDKN2A (p16INK4a)			, NSCLC
NF1			gliomy
SMAD4			lní ca
VHL	Reguluje degradaci HIF1α – tlumí hypoxickou odpověď	Stabilizace HIF1α → angiogeneze, růst	Renální karcinom (clear cell), VHL syndrom

Missense mutace

- Bodová mutace – dochází k záměně nejčastěji jednoho nukleotidu (může být změněno více nukleotidů)
- Záměna aminokyseliny za jinou

PIK3CA c.1624G>A, p.Glu542Lys

E542K

KRAS c.34G>T, p.Gly12Cys

G12C



Onkogen

KRAS
NRAS
BRAF
EGFR
PIK3CA
RET
HER2

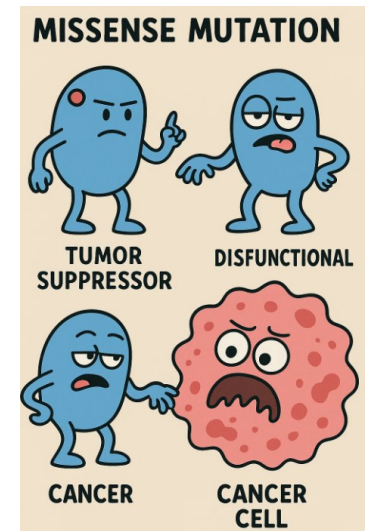
....

Tumor supressor

POLE – protein je zachován (jeho polymerázová funkce), ale missense mutace vede k nefunkční opravné funkci a dochází k hromadění chyb
TP53 – missense mutace také patogenní – narušení DNA-vazebné domény – vytvoření nefunkčního tetrameru na úrovni proteinu

Známé popsané varianty (funkční analýzy, segreganční analýzy germinálních variant) v **TSG** (BRCA1/)

....



Frameshift a nonsense mutace

- Mutace vedoucí k **posunu čtecího rámce** ke ztrátě funkčnosti proteinu = Lost of function mutace = truncační (zkracující) mutace
- V nádorovém kontextu většinou patogenní pro **Tumor supresory**

➤ Frameshift

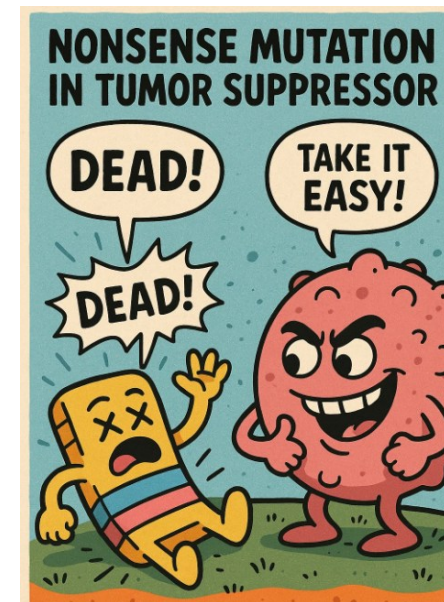
- delece/inserce nukleotidů, které nejsou násobkem 3 (1 aminokyselina = 3 nukleotidy)
- posun čtecího (následuje úplně jiné sekvence aminokyselin) a tvorba nového stop codonu

TP53 c.216dupC → p.Val73fs

BRCA1 c.4065_4068del p.Asn1355fs

➤ Nonsense – záměna nukleotidu a vytvoření nového **stop codonu** (TAA, TAG, TGA)

TP53 c.586C>T → p.Arg196* = p.Arg196Ter



+ second hit – vyřazení funkce alely bez mutace

In-frame delece či inserce

- **In-frame delece** – delece nukleotidů v násobku 3 (3,9,12,15,.....) – protein zachován, ale vypadne pár aminokyselin ve významné doméně proteinu (např. regulační oblast)

EGFR in-frame delece v exonu 19 (kinázová doména)

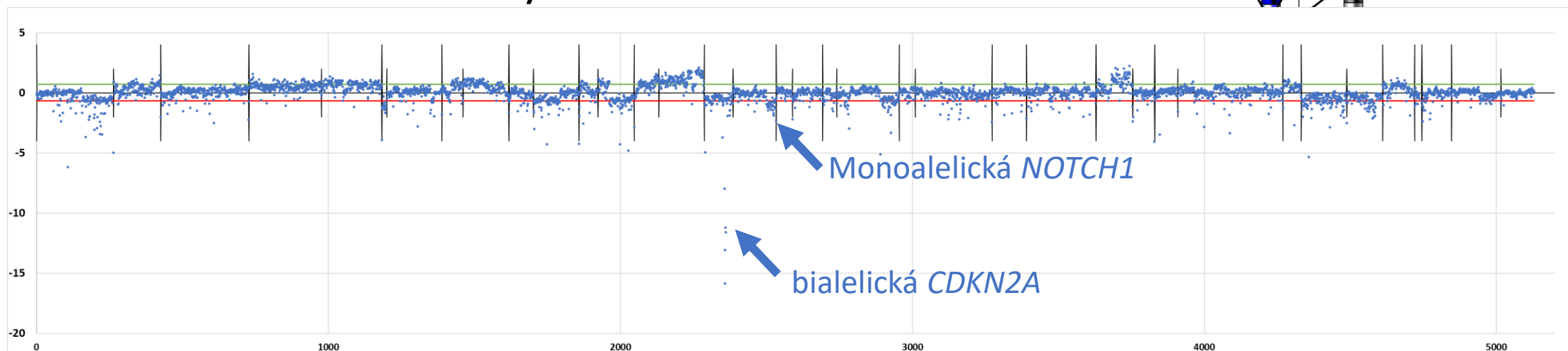
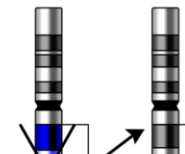
- **In-frame duplikace/ inserce** – inserce nukleotidů v násobku 3 (3,9,12,15,.....)

HER2 G776_V777insYVMA



delece

- Delece velkého rozsahu zasahující celé exony, geny, části chromozomů či celých chromozomů



CDKN2A (často delece 9p21)

SMARCA4 deficientní nádory

PTEN

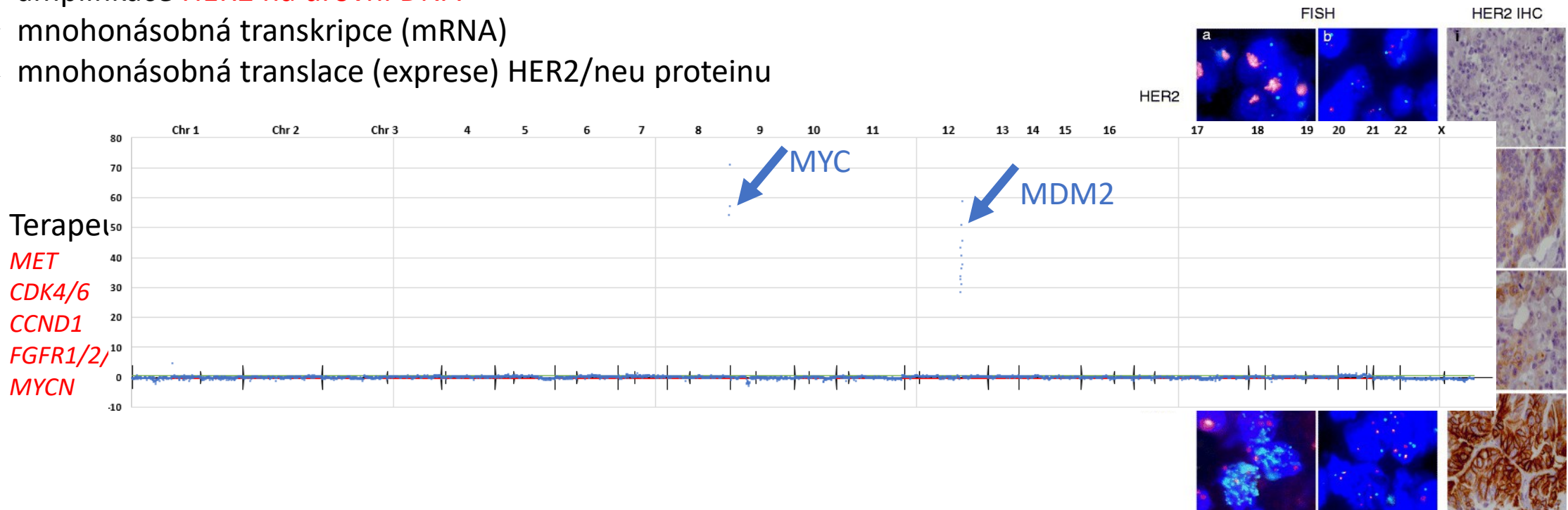


amplifikace

- nárůst počtu kopií určitého genu v genomu nádorové buňky
- patogenní u **onkogenů**

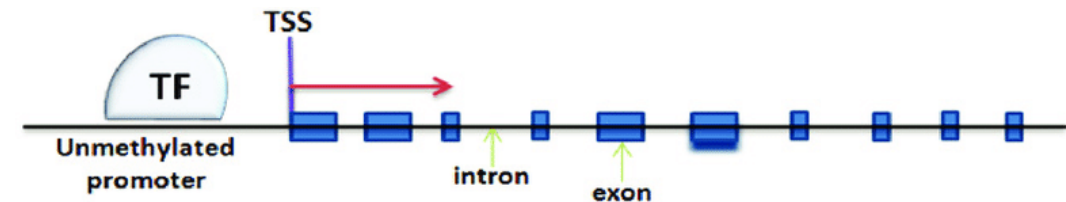
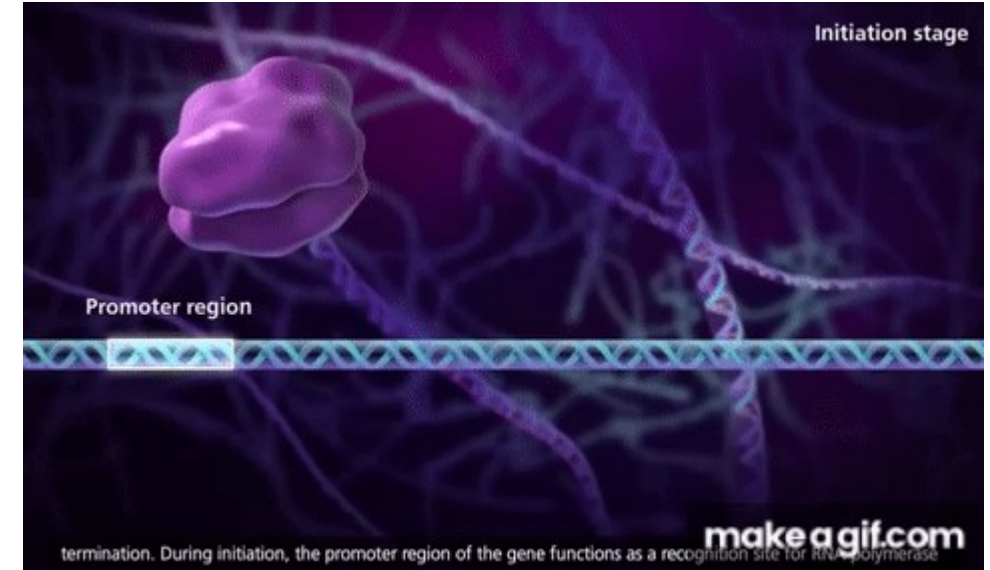
amplifikace **HER2** na úrovni DNA

- ➡ mnohonásobná transkripce (mRNA)
- ➡ mnohonásobná translace (exprese) HER2/neu proteinu



promotor

- Zahájení transkripce – Promotor váže se zde RNA polymeráza, což je enzym, který přepisuje DNA do mRNA
- Bez promotoru se gen nemůže "přečíst"
- Vazba **regulačních proteinů**– Promotor obsahuje specifické sekvence (např. TATA box), na které se vážou transkripční faktory – ty buď transkripci spouští, nebo blokují.
- **Regulace genové exprese** (reverzibilní) – Pomocí metylace nebo jiných modifikací lze promotor zablokovat, takže gen zůstane vypnutý



metylace

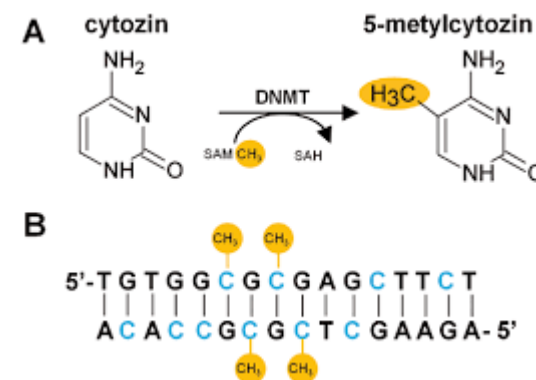
- Methylace DNA hraje klíčovou roli v regulaci genové exprese
- některé změny v metylačních vzorcích jsou diagnostické, prognostické, terapeuticky ovlivnitelné
- **Globální hypomethylace genomu** přispívá k chromozomální nestabilitě, reaktivaci transpozónů a onkogenů (hepatocelulárního karcinomu)
- Hypermethylace promotorů především tumorsupresorů - umlčení bez nutnosti mutace

MGMT

- O6-methylguanine-DNA methyltransferase)
- opravuje DNA poškozenou alkylačními činidly, což jsou látky, které přidávají metylové skupiny do DNA
- Hypermethylace -> snížená exprese -> snížena míra odbourávání alkylových skupin
- lepší prognostika u pacientů s gliomem
- prediktivní faktor u Pacienti s metylací promotoru genu MGMT po radioterapii (RT) lépe odpovídají na chemoterapii alkylačními cytostatiky (temozolomid)

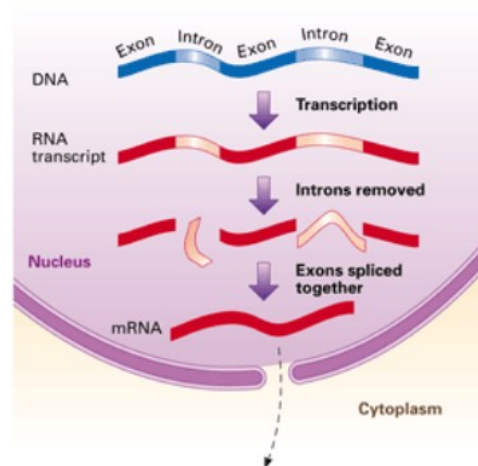
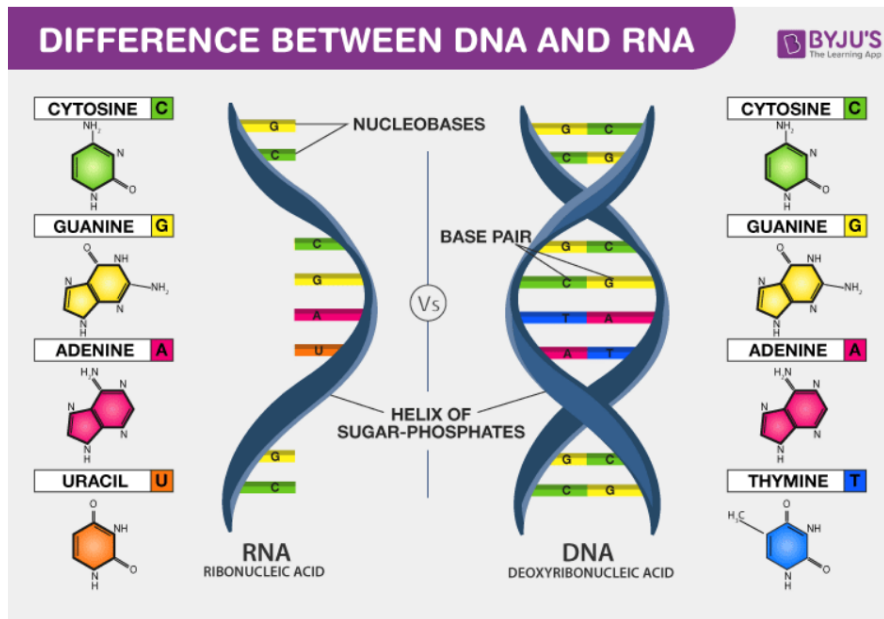
MLH1

- Často hypermetylován u sporadických MSI-High nádorů
- Hypermethylace vedoucí ke ztrátě exprese
- Somatická událost – nízká pravděpodobnost asociace s Lynchovým syndromem
- 90% případů se ztrátou MLH1 proteinu (IHC)

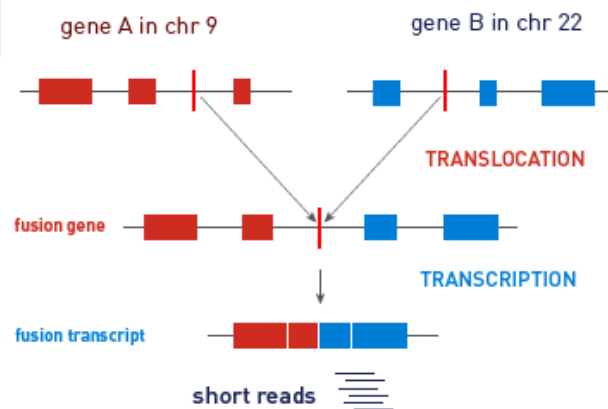


- **Metylační klasifikátory** – využívá se např. v diagnostice gliomů metylační panely (např. Epi proLung pro screening plicního karcinomu z krve)

RNA



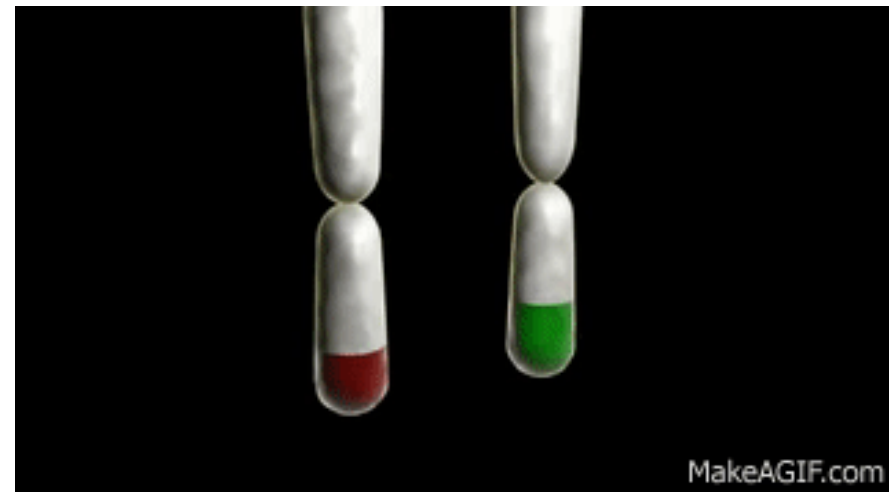
- Oproti DNA je zbavená o nekódující sekvence (hlavně introny)
- Z pohledu prediktivní diagnostiky využití především pro **detekci fúzních genů** a to z důvodů technických
- Kvantifikace míry **exprese** jednotlivých genů



fúze

Jak vzniká fúzní gen

- **Chromozomálních translokacích**
 - typicky **reciprokých** (např. t(9;22) u CML).
 - část jednoho chromozomu se přemístí na jiný → spojí se geny z různých lokalit.
- **Inverzí nebo delecích**
 - části jednoho chromozomu se otočí nebo chybí → vznikne nové spojení genů
- **Aberantní transkripce (trans-splicing)**
 - vzácnější, funkční spojení dvou mRNA



fúze



Proč jsou fúzní geny důležité?

Diagnostika

- Jsou vysoce specifické pro některé nádory → **pomáhají určit typ a subtyp nádoru.**
- EWSR1-FLI1* Ewingův sarkom, *PAX8-PPARG* folikulární karcinom štítné žlázy, uterinní sarkomy – celá řada specifických fúzí



Cílená léčba

- Některé fúzní geny jsou **aktivní onkogeny** → jejich produkty lze cílit terapií:
 - BCR-ABL* (CML) → léčba imatinibem.
 - ALK fúze* (např. NSCLC) → crizotinib, lorlatinib.
 - NTRK fúze* → larotrectinib, entrectinib (histologicky agnostická indikace).

General Category ^a	Aberration	No. of Cases	Diagnosis					Sarcoma NS and Other Diagnoses
			ESN	LG-ESS	ESS (NOS)	HG-ESS	LG/HG ESS	
LG-ESS/ESN	JAZF1 rearrangement	32	6	25	1			4 ^b
LG-ESS/ESN	JAZF1::SUZ12	97	18	66		3	6	
LG-ESS	JAZF1::PHF1	16		10	2		4	
LG-ESS	PHF1 rearrangement	12		7	5			
LG-ESS	CDKN1A::JAZF1	1		1				
LG-ESS	SYNGAP1::JAZF1	1			1			
LG-ESS	PHF1::BRD8	4		2		1	1	
LG-ESS	EPC1::PHF1	10		5	3		2	
LG-ESS	EPC2::PHF1	2		1	1			
LG-ESS	ING3::PHF1	1					1	
LG-ESS	MEAF6::PHF1	7		5	2			
LG-ESS	MBTD1::PHF1	1		1				
LG-ESS	MBTD1::Cxor67	2		2				
LG-ESS	MEAF6::SUZ12	1		1				
HG-ESS	EPC1::SUZ12	1				1		
LG+HG	EPC1::EED	3						3
LG+HG	EPC1::EZH2	1						1
HG-ESS BCOR	BCOR rearrangement	2				2		
HG-ESS BCOR	ZC3H7B::BCOR	61		1	2	58		
HG-ESS BCOR	EPC1::BCOR	1				1		
HG-ESS BCOR	BCOR::EP300	2				2		
HG-ESS BCOR	BCOR::LPP	1				1		
HG-ESS BCOR	BCOR::NUTM2G	1				1		
HG-ESS BCOR	BCOR::MAP7D2	1				1		
HG-ESS BCOR	BCOR::RALGAP1	1				1		
HG-ESS BCOR	BCOR::RGAG1	1				1		
HG-ESS BCOR	BCOR::ING3 and NUGCC	1				1		
HG-ESS BCOR	BCOR::KMTD2	1				1		
HG-ESS BCOR	BCOR::MAP7D2	1				1		
HG-ESS BCOR	CREBP::BCOR	2			1	1		
HG-ESS BCORL1	JAZF1::BCORL1	10		1		7		2 ^c
HG-ESS BCORL1	EPC1::BCORL1	1				1		
HG-ESS BCORL1	EP300::BCORL1	1				1		
HG-ESS YWHAE	YWHAE rearrangement	13		1		11		1 ^d
HG-ESS YWHAE	YWHAE::NUTM2	63				58		5 ^e
HG-ESS YWHAE	YWHAE::NUTM2A/B	20			1	19		
HG-ESS YWHAE	YWHAE::NUTM2E	4			4			
KAT6A/B	KAT6B::KANSL1	24			1			23 ^f
KAT6A/B	KAT6A::KANSL1	2						2

Abbreviations: ESN, endometrial stromal tumor; ESS (NOS), endometrial stromal sarcoma not otherwise specified; HG-ESS, high-grade endometrial stromal sarcoma; LG-ESS, low-grade endometrial stromal sarcoma; LG/HG ESS, endometrial stromal sarcoma with both low-grade and high-grade component; NS, not specified; UTROSCT, uterine tumor resembling ovarian sex cord tumor.

^a General category was assessed based on the predominant literature data concerning the particular molecular aberration and its association with entity/diagnosis. A precise association with a particular entity reported in the literature is provided in the columns designated as Diagnosis.

^b Cases with hybrid features of LG-ESS and perivascular epithelioid cell tumor.

^c One case was a benign tumor with overlapping features between ESN and leiomyoma, and 1 case was an LG tumor resembling uterine tumor resembling ovarian sex cord tumor.

^d Undifferentiated uterine sarcoma.

^e Four cases showed morphology of an LG-ESS with diffuse cyclin D1 staining, and 1 case had morphology of an ESN with diffuse cyclin D1 staining.

^f Twelve of these tumors suggested a distinct entity.

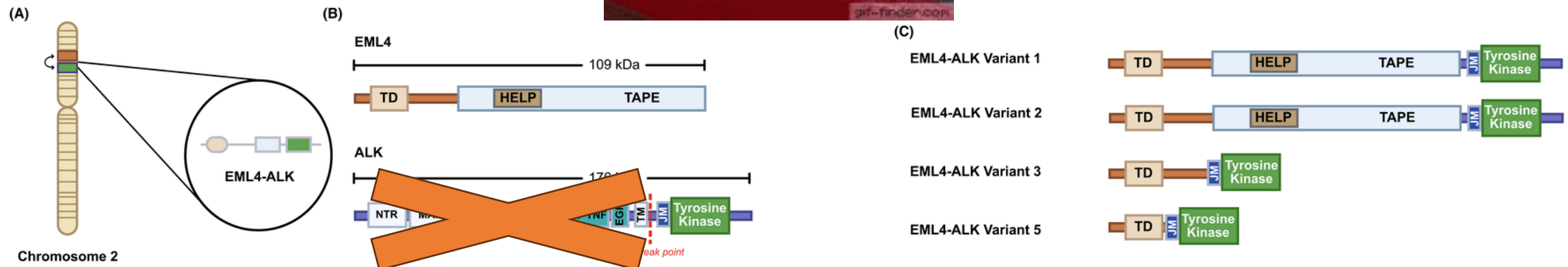
Dundr et al., 2024

EML4-ALK

onkogen

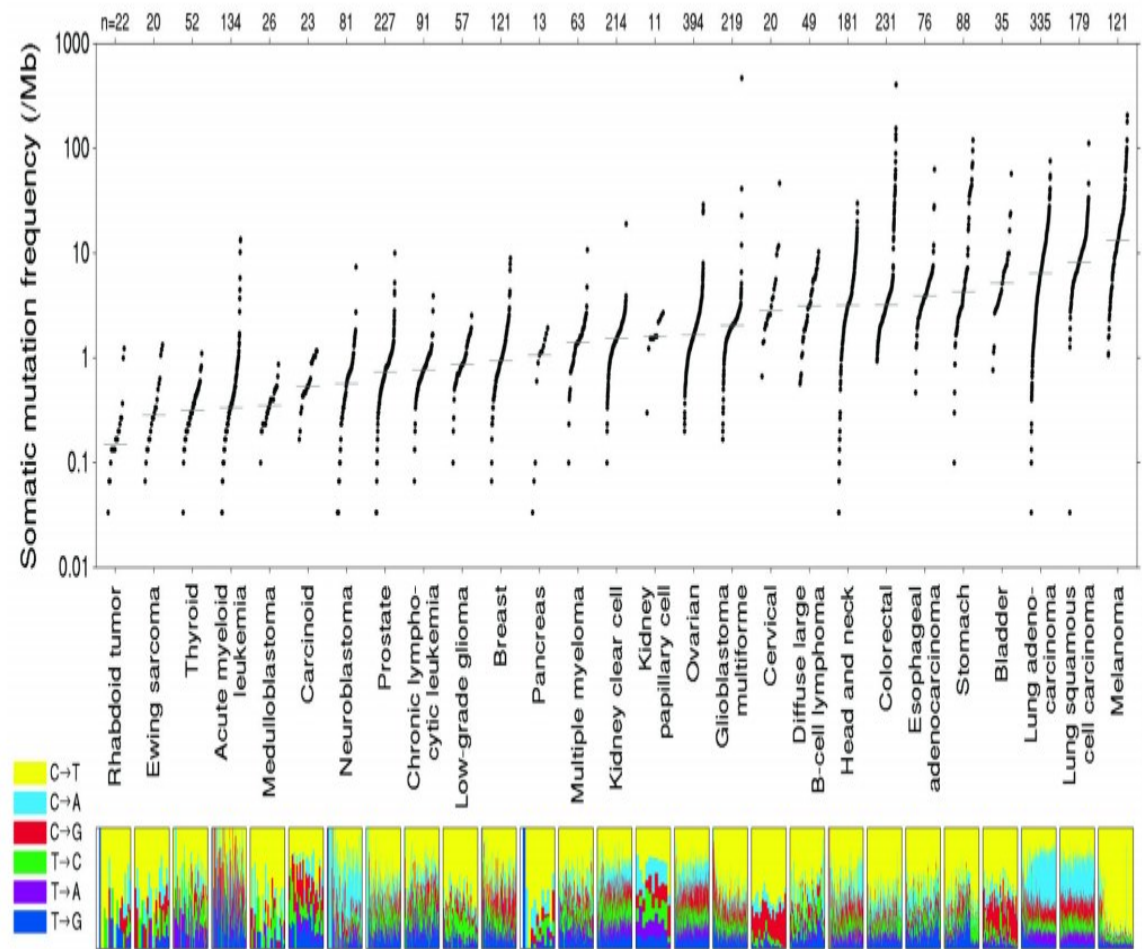
🔥 Co se děje s regulací

- Ve fúzní podobě chybí extracelulární i transmembránová doména → **ALK není závislý na vnějších signálech**
- **Konstitutivní aktivace** tyrosinkinázové cesty
- Fúzní protein EML4-ALK vzniká pod **kontrolou** který je **exprimován** a aktivní v epiteliálních buňkách plic



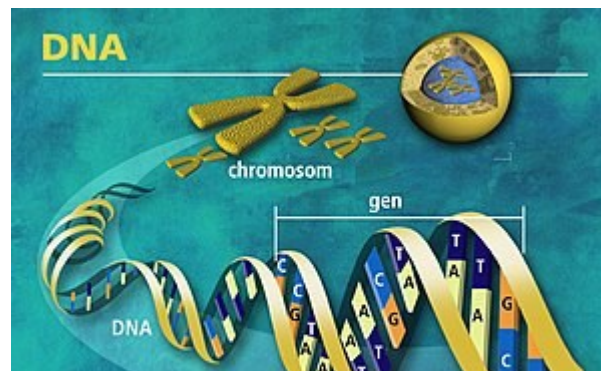
Tumor mutační nálož = TMB

- Kvantitativní **genomický prediktivní biomarker** s potenciálním dopadem na nádorovou imunoterapii
- Vyšší mutační zátěž → větší pravděpodobnost vzniku neoantigenů → aktivace CD8+ T-buněk → lepší cílená odpověď imunitního systému na imunoterapii
- TMB-high je spojen s lepším PFS – může být považován za prediktivní marker u pacientů s léčbou ICIs u mnoha typů onemocnění (NSCLC, melanoma, CRC) ale **napříč diagnózami neexistuje jednotná definice vysokého TMB!!**
- TMB- high u pacientů s NSCLC je spojen také s delším OS



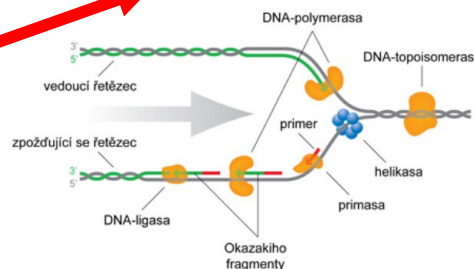
Mikrosatelitová nestabilita

mikrosatelity



.....GCTGGGTCGATCGATCAGCTGGGTCGATCGATCGAAAAAATTTGAGCGAGAGCGACGACGGCTGGGTCGATCGATCGC.....

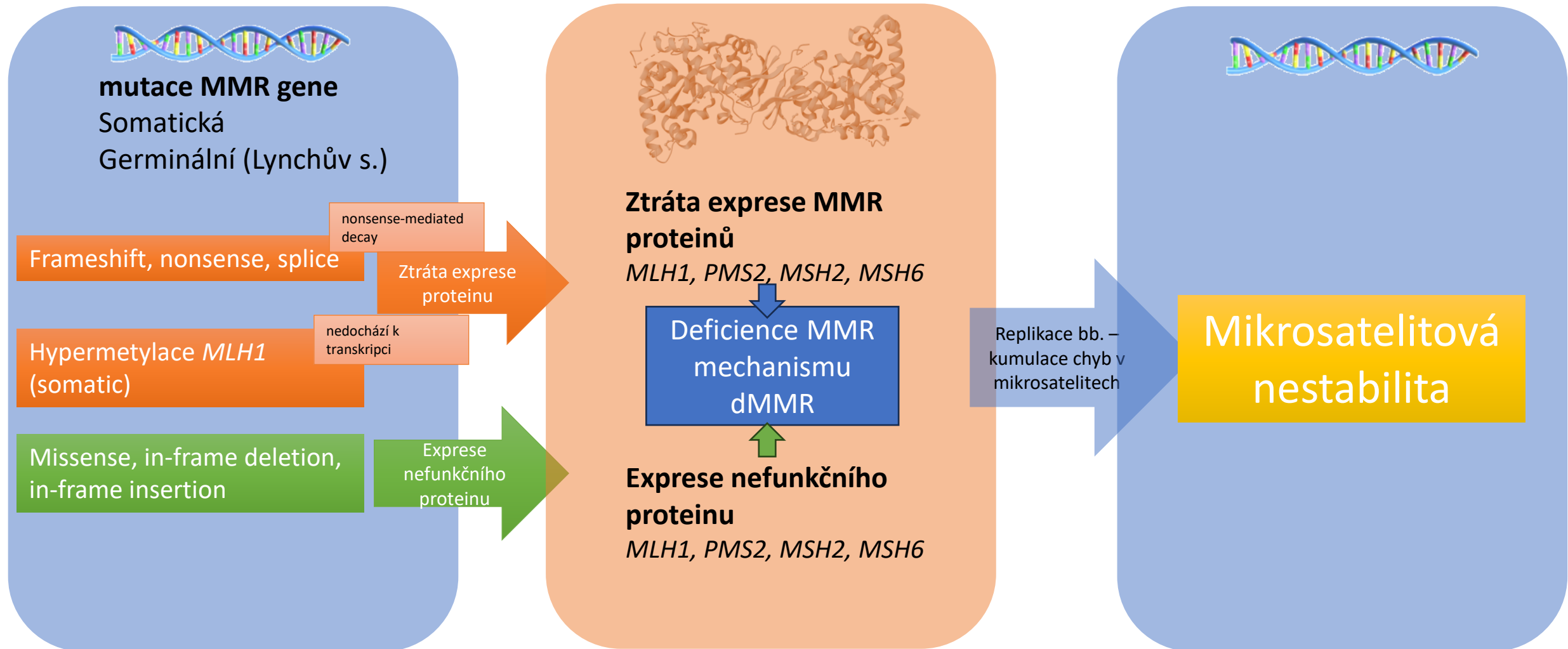
Mikrosatelit



.....GCTGGGTCGATCGATCAGCTGGGTCGATCGATCGAA...AAAAAATTTGAGCGAGAGCGACGACGGCTGGGTCGATCGATCGC.....

MMR mechanismus
rozpozná a opraví

Mikrosatelitová nestabilita



Mikrosatelitová nestabilita

Table 1 | Tumour samples utilized to profile MSI

Tumour type	Abbreviation	Samples	MSI-Hs (frequency)
Uterine corpus endometrial carcinoma	UCEC	265	75 (28.3%)
Stomach adenocarcinoma	STAD	292	64 (21.9%)
Colon adenocarcinoma	COAD	271	45 (16.6%)
Rectal adenocarcinoma	READ	76	3; 4* (9.2%)
Adrenal cortical carcinoma	ACC	92	5* (5.4%)
Oesophageal carcinoma	ESCA	183	3; 3* (3.3%)
Ovarian cancer	OV	436	14* (3.2%)
Liver hepatocellular carcinoma	LIHC	375	11* (2.9%)
Cervical squamous cell carcinoma	CESC	305	7* (2.3%)
Breast cancer	BRCA	922	16* (1.7%)
Glioblastoma multiforme	GBM	316	4* (1.3%)
Head and neck squamous cell carcinoma	HNSC	505	6* (1.2%)
Lung squamous cell carcinoma	LUSC	407	5* (1.2%)
Kidney renal clear cell carcinoma	KIRC	377	4* (1.1%)
Pancreatic cancer	PAC	171	2* (1.1%)
Urothelial bladder cancer	BLCA	368	2* (0.8%)
Papillary kidney carcinoma	KIRP	286	2* (0.7%)
Low grade glioma	LGG	514	3* (0.6%)
Prostate adenocarcinoma	PRAD	497	3* (0.6%)
Lung adenocarcinoma	LUAD	482	1* (0.2%)
Cutaneous melanoma	SKCM	109	0* (0%)
Pheochromocytoma and paraganglioma	PHCA	176	0* (0%)
Thyroid cancer	THCA	493	0* (0%)
Total		7,919	281

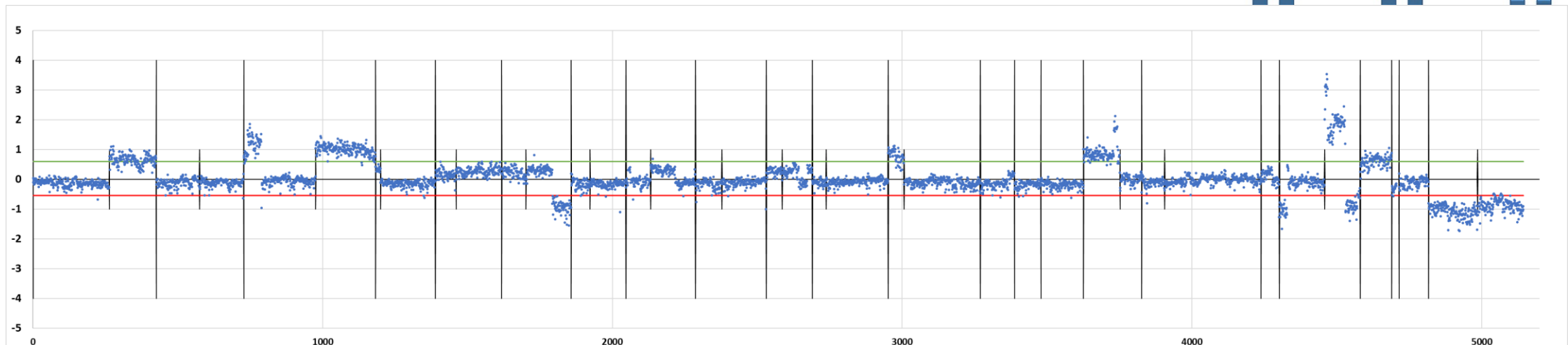
The Abbreviation column indicates the cancer type abbreviations used throughout the manuscript. The number of cases predicted as MSI-H at a confidence level of 0.75 is indicated with '*' (see subsection 'Prediction of MSI status from exome-sequencing data').

HRD

Deficiency homologní rekombinace

- Homologní rekombinace (HR) je přirozený „opravný mechanismus“ DNA, který buňky používají, když dojde k vážnému poškození DNA, např. zlomení obou vláken DNA (double-strand break).
- Některé nádory mají narušenou schopnost homologní rekombinace – **HRD** + (nejčastěji high-grade serózní karcinomy ovarií) nejčastěji mutace v BRCA1/BRCA2 (*PALB2*, *CHEK2*, *RAD51C*, *RAD51D* ale řada dalších)

➔ Zvýšení genomické nestability



Frekvence mutované alely

Somatické varianty se vyskytují v určitém **procentu alel** v analyzované DNA

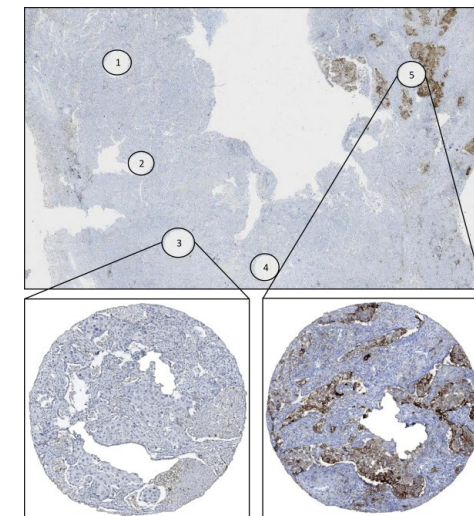
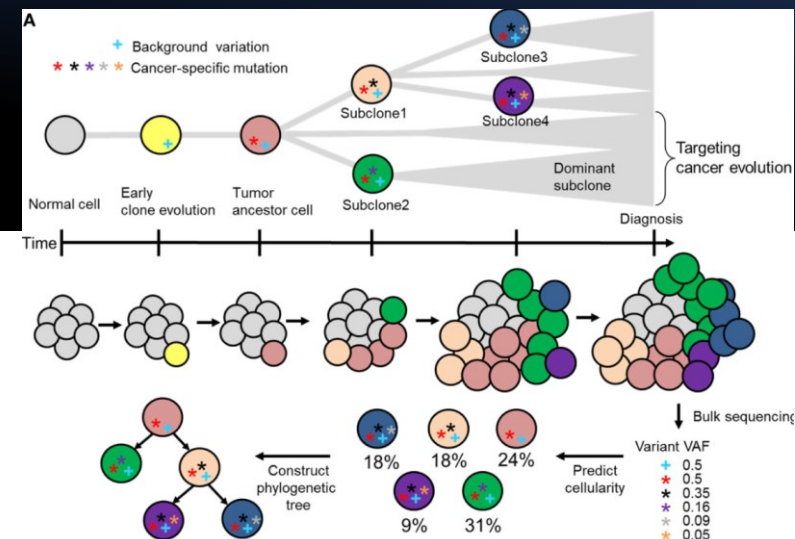
- MAF = mutation allele frequency

Čím je ovlivněna MAF:

- Nekvalitní DNA a to hlavně u FFPE vzorků (odlišná hybridizace a amplifikace templátové DNA)
- vlastní nádorová heterogenita (různé klony nesoucí různé mutace)
- Časté chromozomální zisky a ztráty (CNV), ztráta heterozygotnosti (LOH)
 - pro HGSC typické
- **podíl nádorových jader (DNA) v testované tkáni**

oncdriver většinou vysoké MAF

Passenger mutace oproti driverům snížené MAF



Lan C, Heindl A, Huang X, et al. Quantitative histology analysis of the ovarian tumour microenvironment. *Sci Rep.* 2015



VFN PRAHA

Díky za pozornost

