

# INVAZIVITA - VZNIK METASTÁZ

**Metastázy** - tvorba progresívně rostoucích sekundárních nádorových fokusů v místech nespojených s primárním nádorem.

Série definovaných kroků - **metastatická kaskáda**:

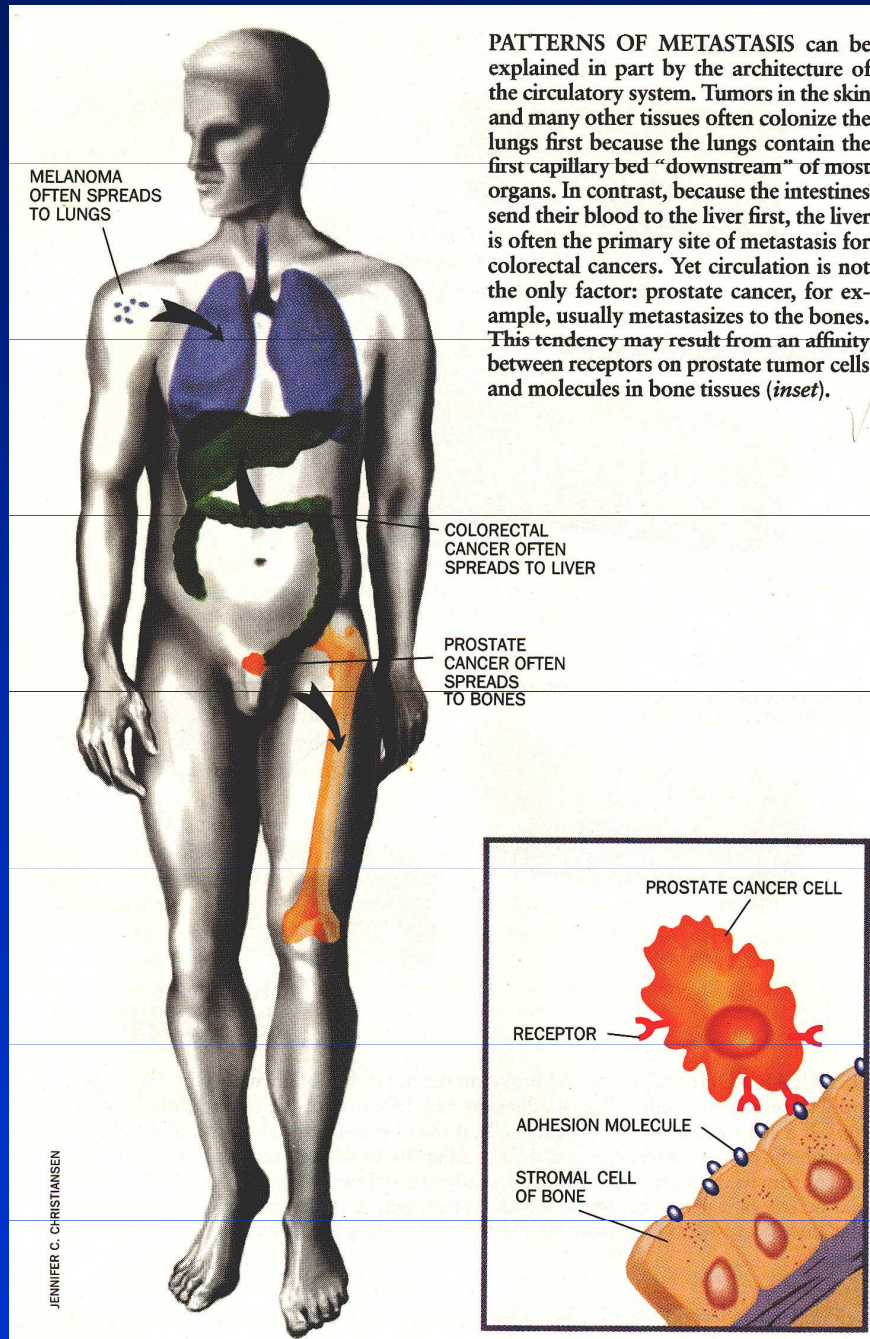
- ▶ uvolnění buňky (od okolních buněk, ECM)
- ▶ překonání bazální membrány v epitelech (metalloproteinázy)
- ▶ překonání bazální membrány a endotelu cév
- ▶ přenos krevním (lymfatickým) řečištěm
- ▶ překonání endotelu, bazálních membrán v jiné lokalitě
- ▶ uchycení v nové tkáni (hyaluronan a jeho receptory - CD44, integriny)
- ▶ přežívání, proliferace
- ▶ vznik mikro- a makrometastáz - letalita onemocnění

Existuje řada genů a proteinů, které regulují metastatickou schopnost buněk a které musí být koordinovaně exprimovány.

Ztráta funkce tzv. **supresorových genů pro metastázy**, které zabraňují tvorbě spontánních, makroskopických metastáz, aniž by ovlivňovaly růst primárního nádoru (prvním z objevených genů je nm23).

**Význam dostupnosti cév, angiogeneze - tvorba cév v nádoru**

# Struktura metastáz



## Benigní versus maligní nádory

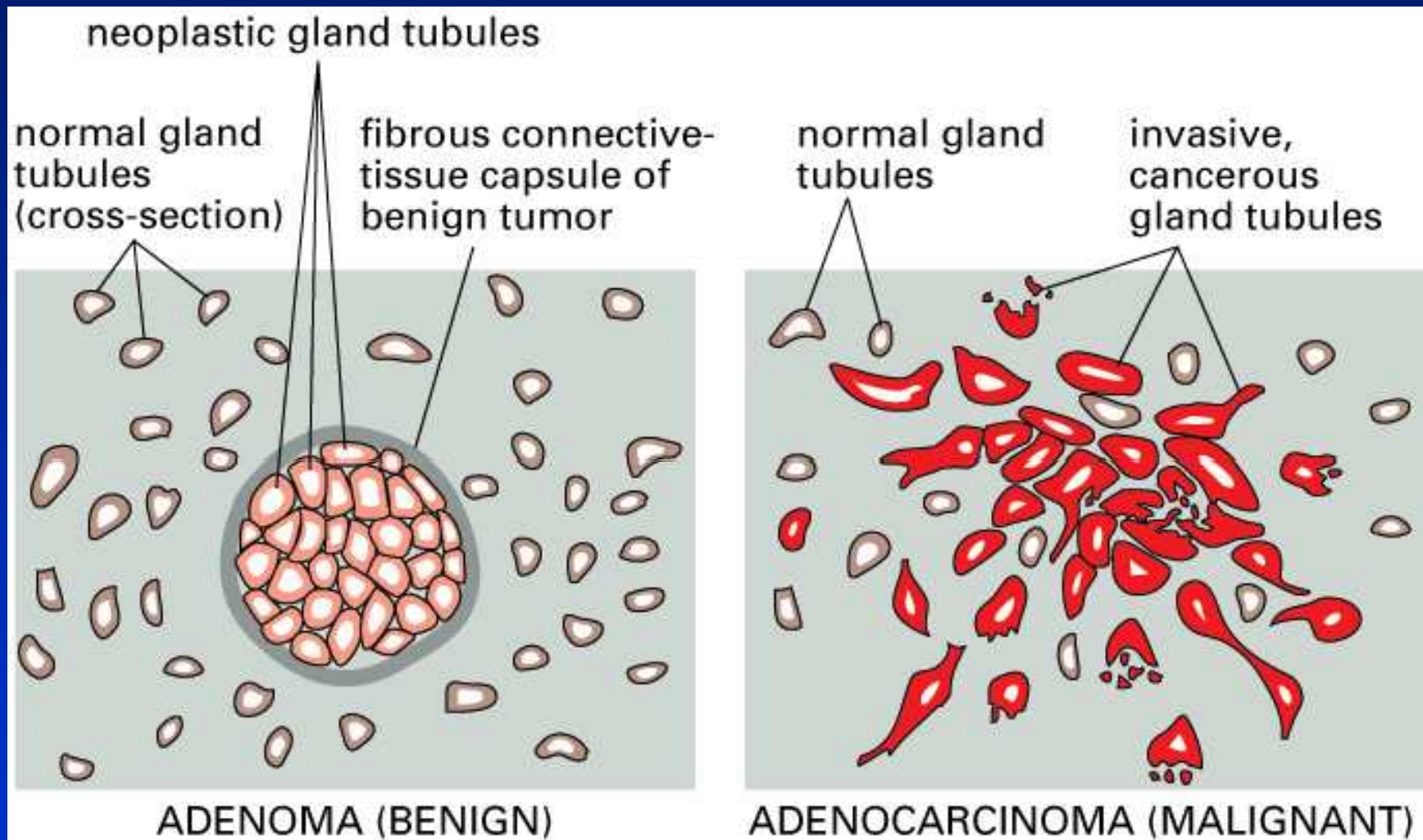


Figure 23-3. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.

## Proces vzniku metastáz

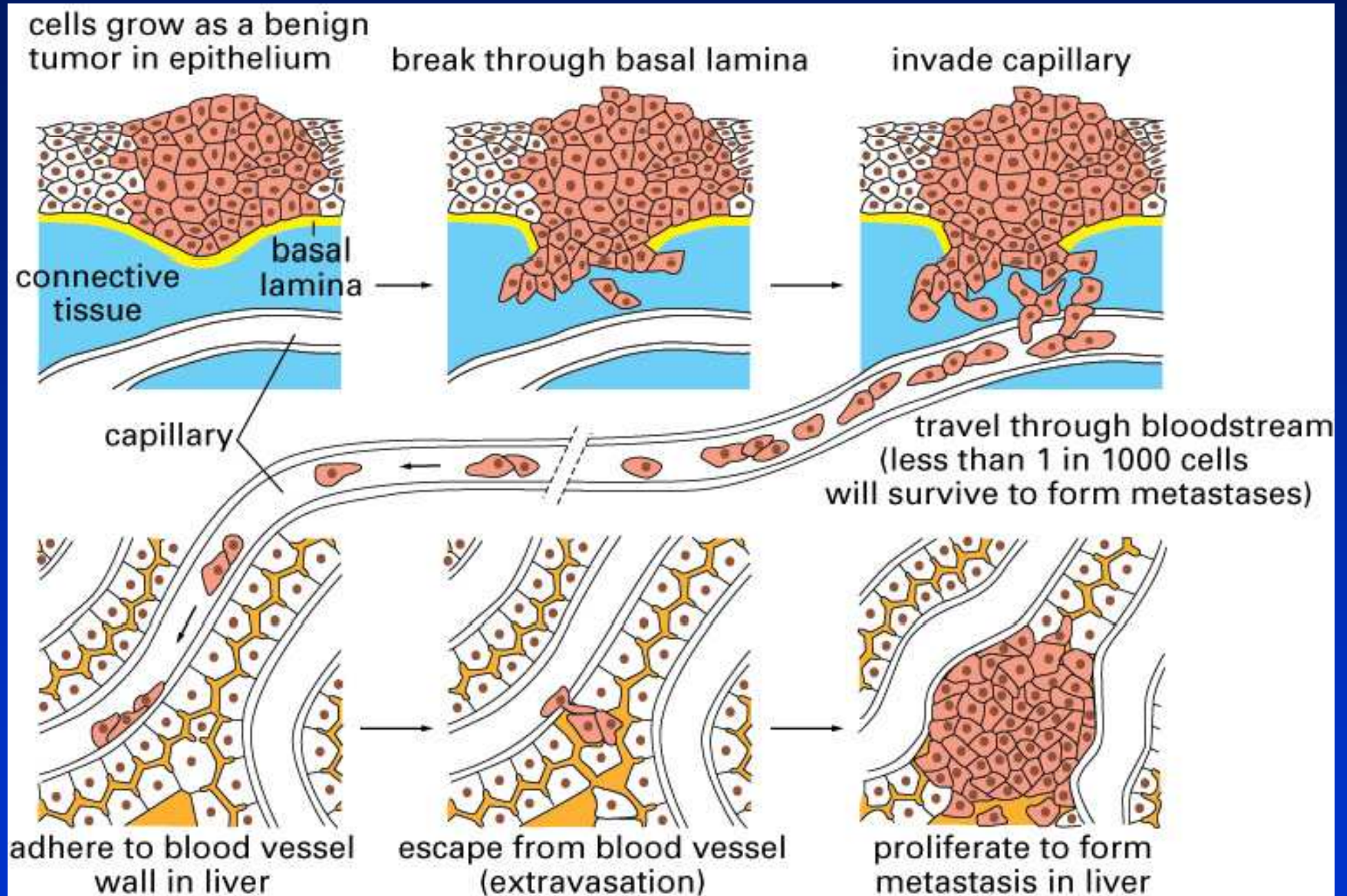


Figure 23-15. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.

# Metody výzkumu

Metodickým základem současného výzkumu je úspěšné klonování předpokládaných metastatických genů a manipulace s jejich expresí nebo funkcí genových produktů.

3 nejobecněji používané testy metastatického procesu.

1) test na spontánní metastázy - nádorové buňky jsou subkutánně injikovány do syngenních nebo imunodeficientních zvířat. Test napodobuje přirozenou situaci.

2) test na experimentální metastázy - nádorové buňky jsou injikovány intravenózně. Test odhaduje schopnost buněk opustit krevní řečiště a kolonizovat specifické tkáně.

3) test invazivity - nádorové buňky jsou umístěny na povrch matrix (tvořené např. z kuřecí srdeční nebo chorioalantoidní membrány či umělé membrány) a sleduje se migrace tímto materiálem.

Poznatky o povrchových a intracelulárních regulačních molekulách účastnících se metastatického procesu jsou vodítkem pro **nové terapeutické přístupy** - využití specifických monoklonálních protilátek nebo „antisense“ techniky.

# Význam buněčné adheze

Pro vznik metastáz jsou důležité zejména **změny v buněčné adhezi a komunikaci**

Buňky se pro předání signálu musí dotýkat - “juxtacrine signaling”

**Kontakt buňka-buňka** - kadheriny (E-kadherin) na povrchu jsou propojeny přes katenin, vinkulin, plakoglobin s cytoskeletem - geny kódující tyto proteiny označeny jako **supresorové geny pro metastázy**

**Kontakt buňka - extracelulární matrix (ECM)** - integriny

Anchorage dependence - závislost na podkladu

Area code - specifická oblast bazální membrány

**„Junctional“ a „nonjunctional“ adhezivní mechanizmy živočišných buněk pro vzájemnou vazbu a pro vazbu k extracelulární matrix**

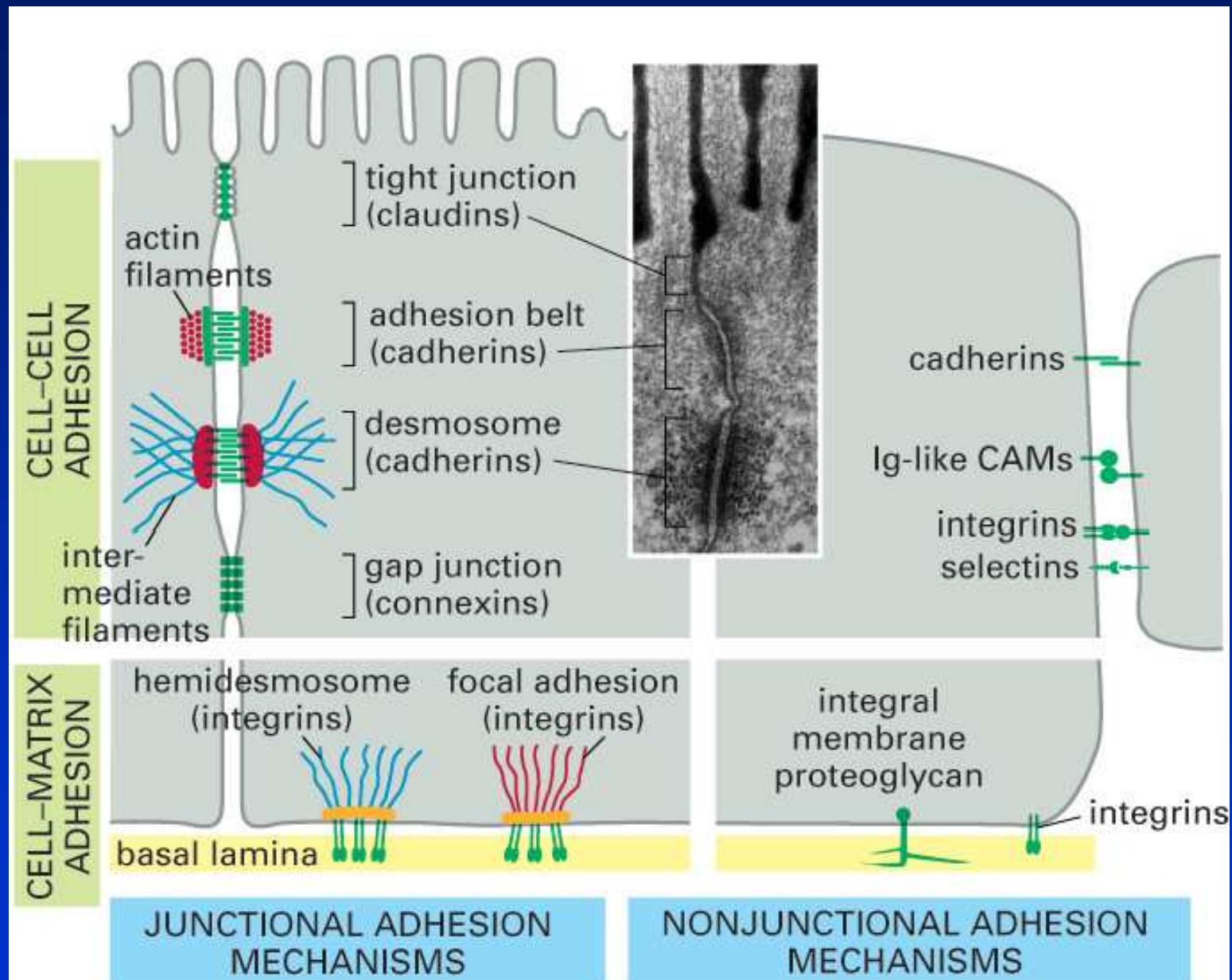
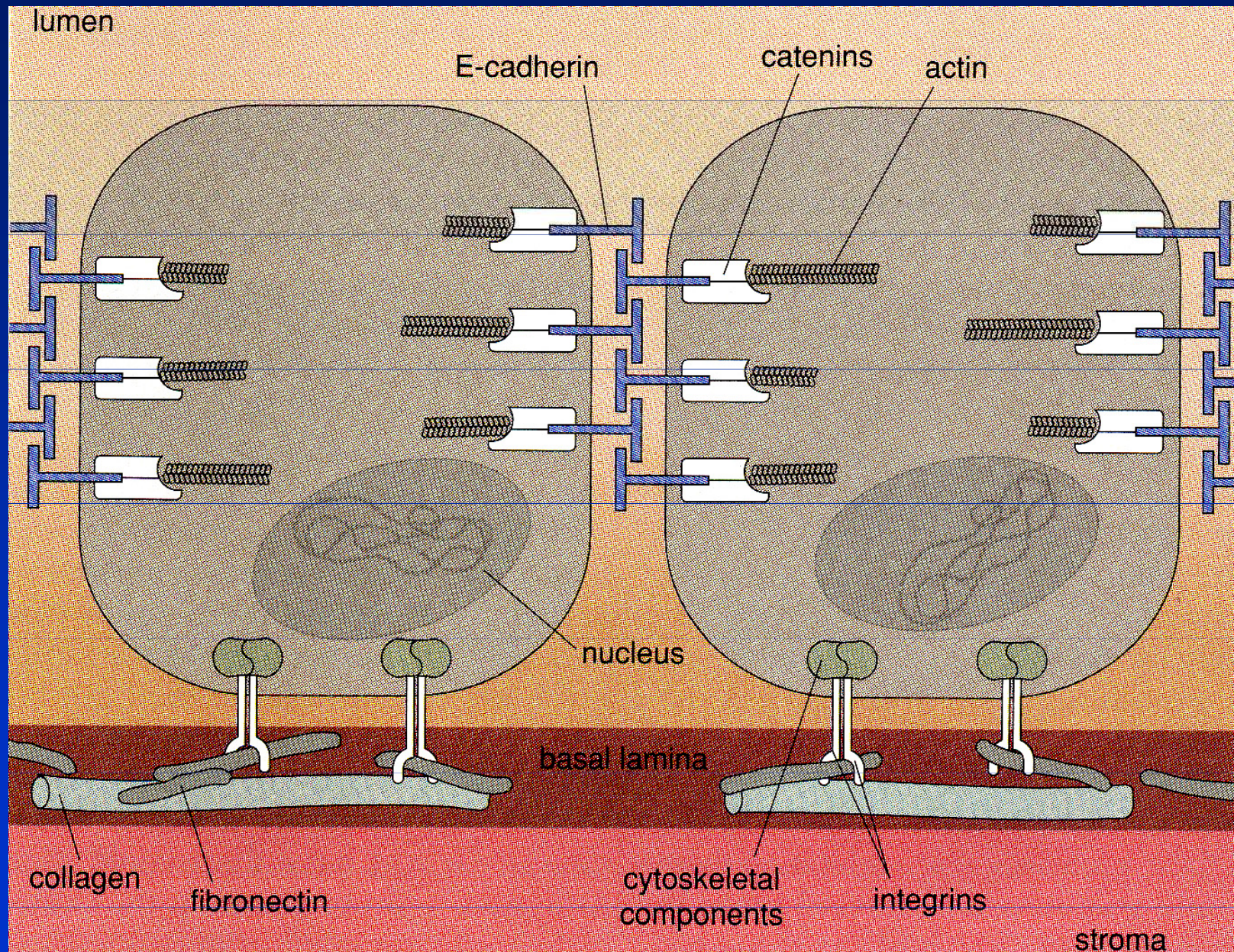


Figure 19–32. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.

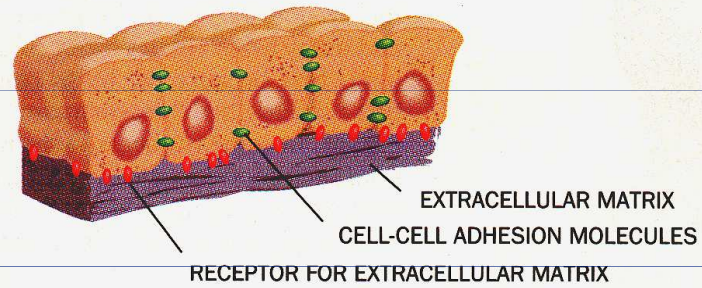
# Sít' proteinových spojů u normálních epiteliálních buněk



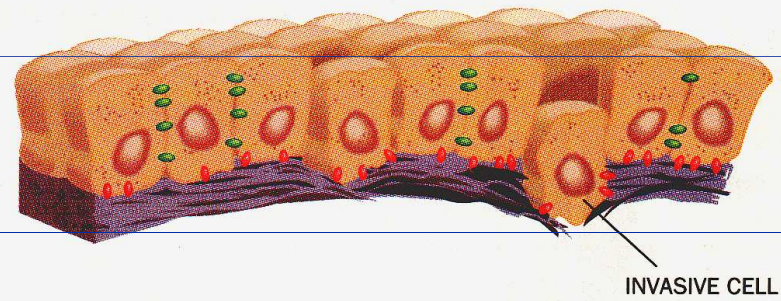


# Adheze buněk

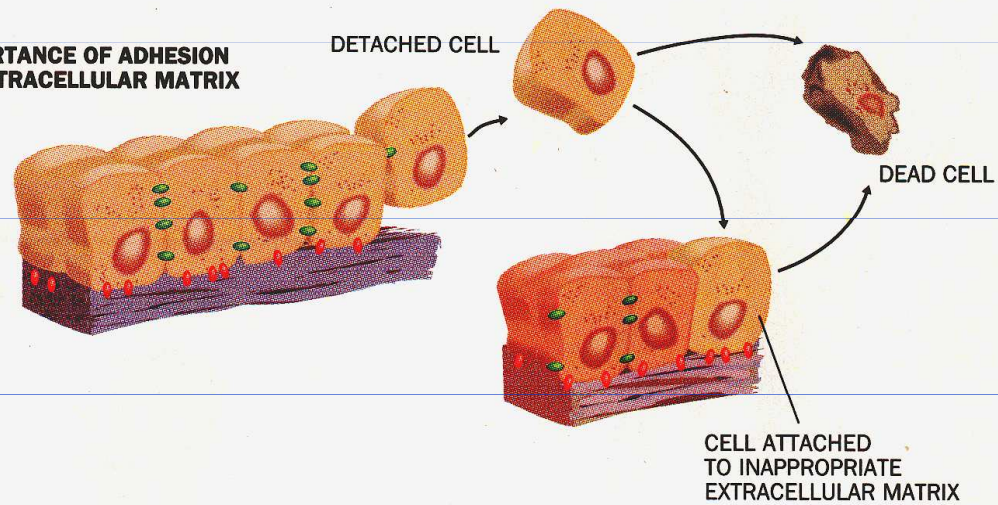
## CELLULAR ADHESION



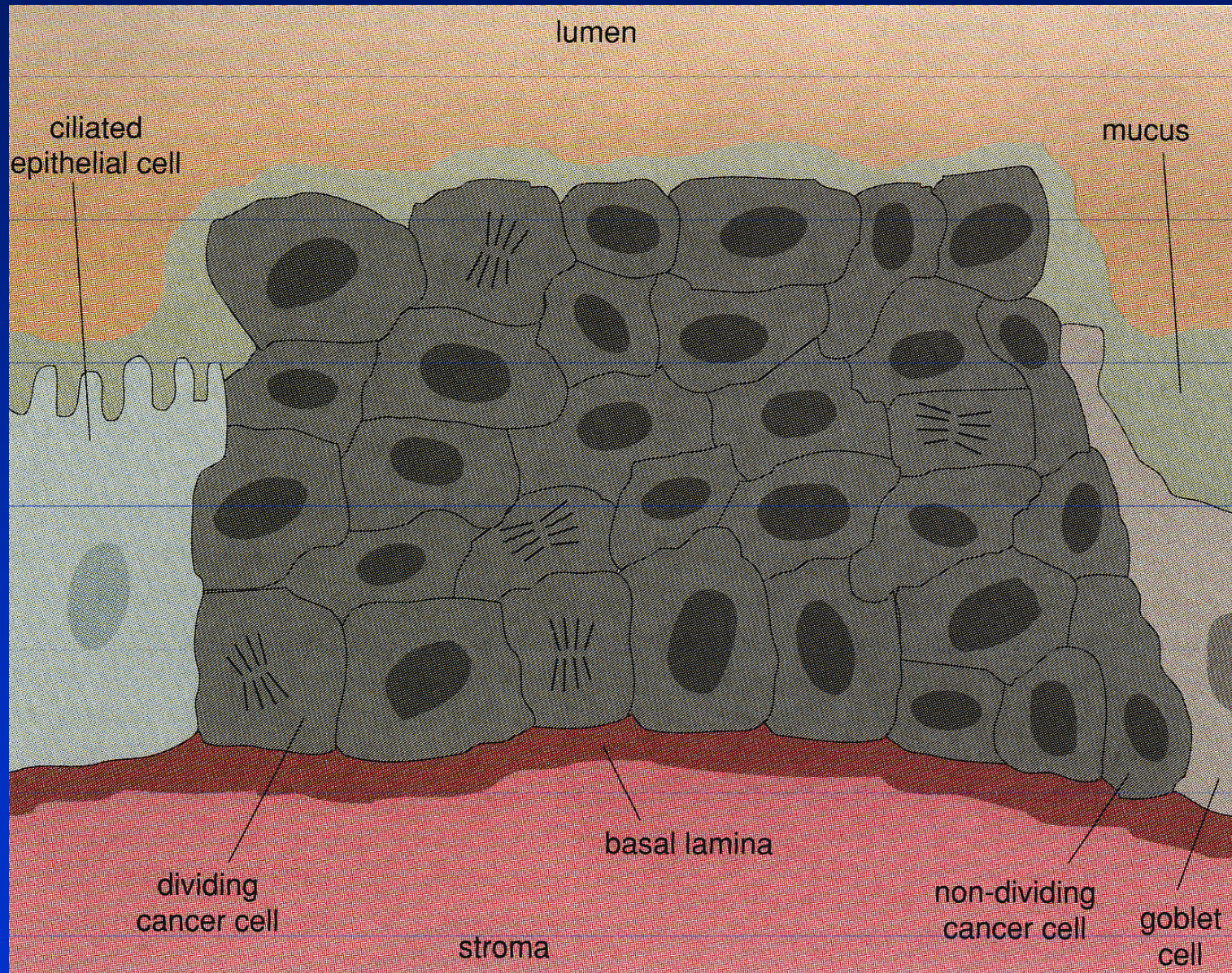
## IMPORTANCE OF CELL-CELL ADHESION



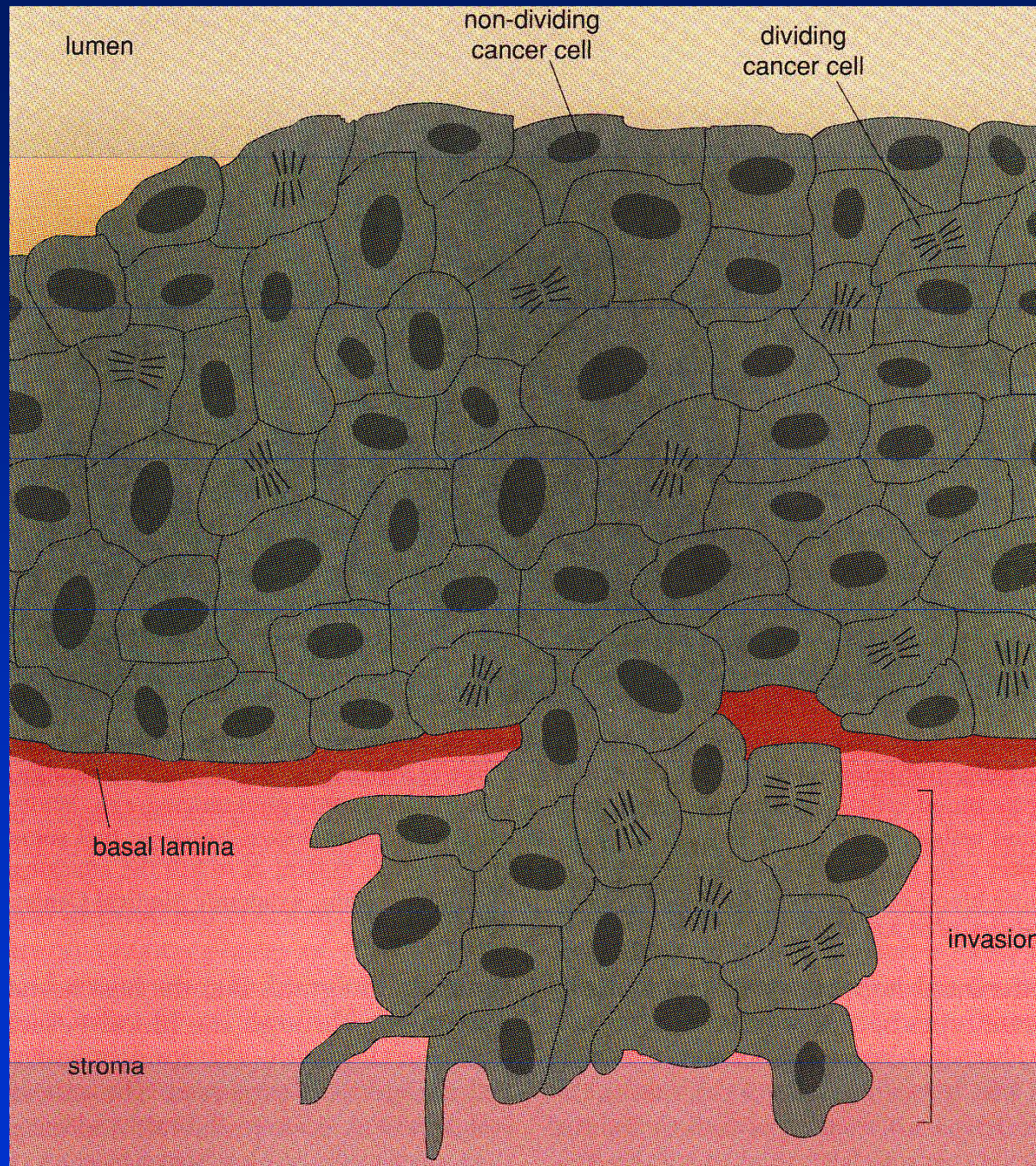
## IMPORTANCE OF ADHESION TO EXTRACELLULAR MATRIX



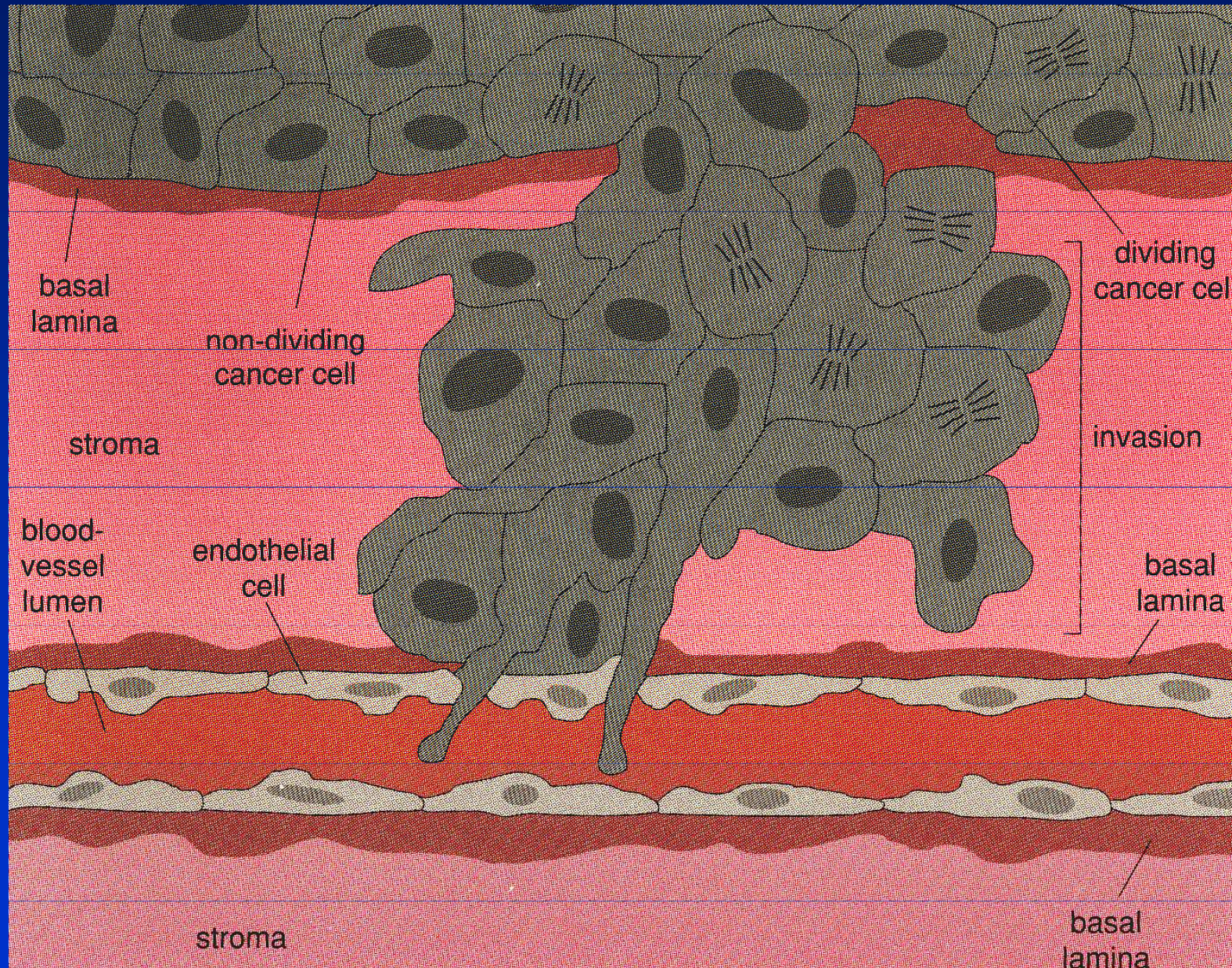
# Carcinoma *in situ*



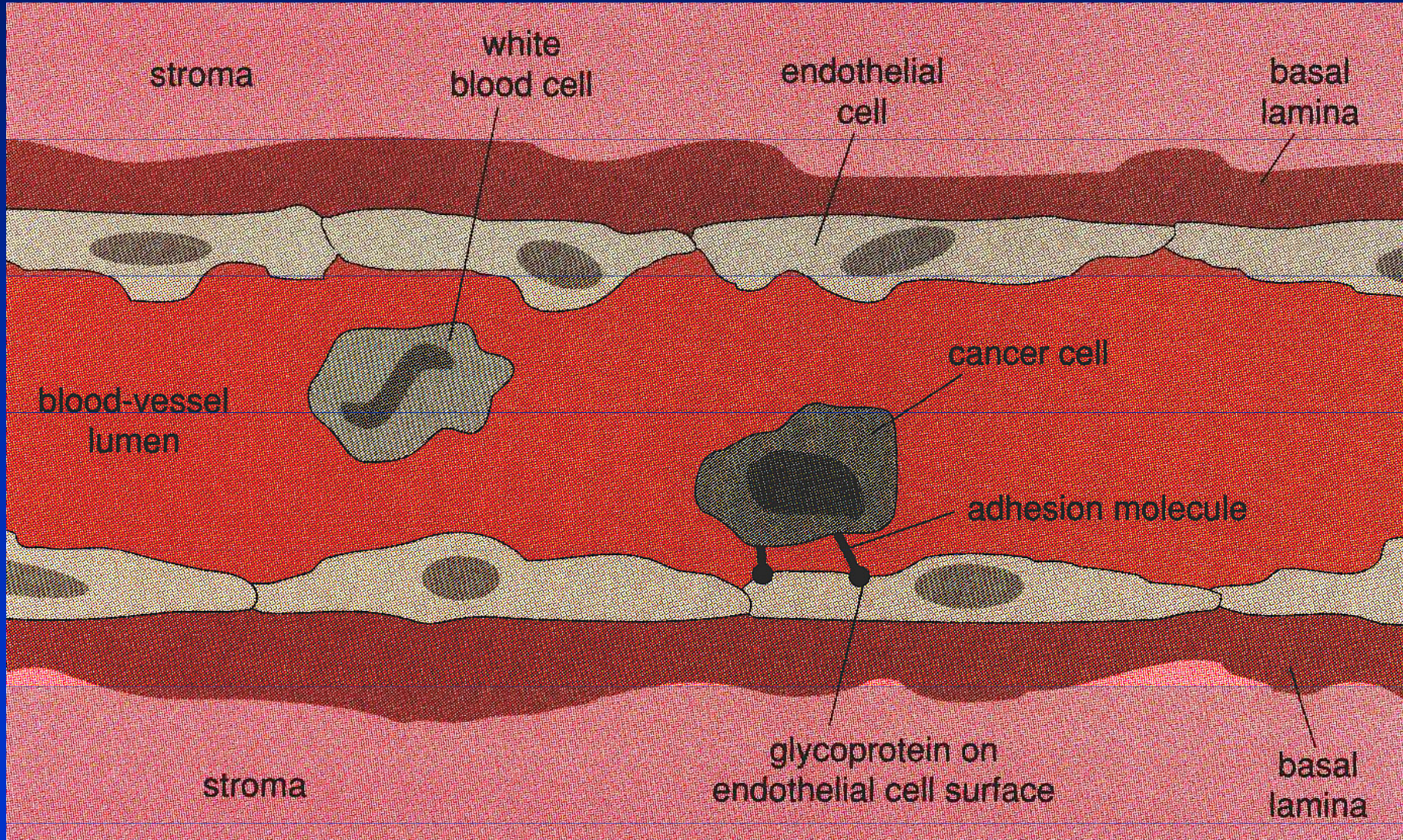
# Malignita – buňky pronikají přes bazální laminu



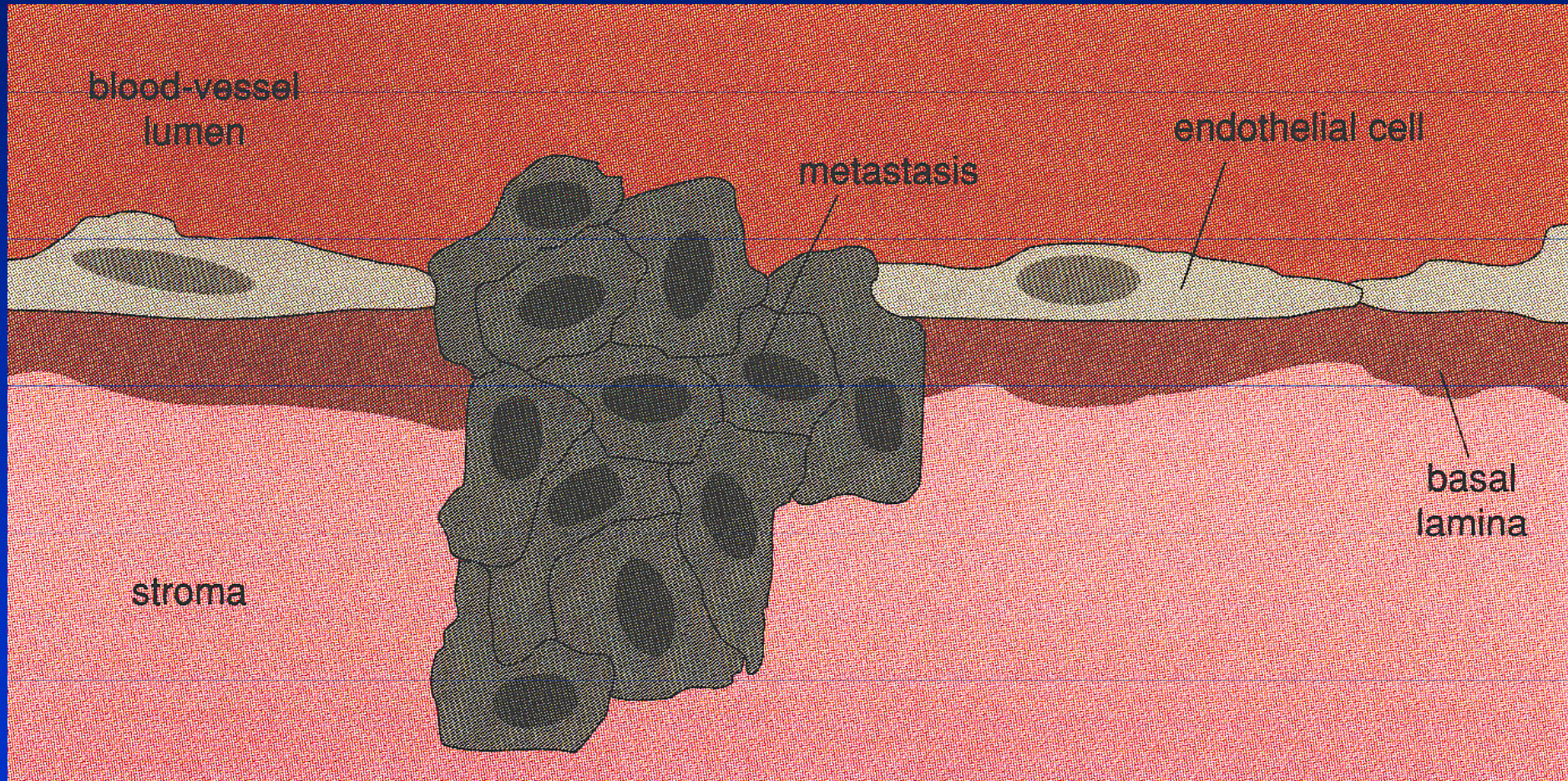
# Invaze do krevních a lymfatických cév – počátek metastáz



# Adheze nádorových buněk na cévní stěny ve vzdálených orgánech



## Metastatic tumor cell divides and forms secondary tumor



# MUCINY

Velké glykosylované proteiny syntetizované buňkami gastrointestinálního, dýchacího a močopohlavního ústrojí. Chrání epitel proti mechanickému, chemickému, enzymatickému a mikrobiálnímu poškození.

Kódovány řadou genů, tkáňově specifické

Hlavní mucin sekretovaný gobletovými buňkami ve střevě – MUC2.

**Poruchy povrchových mucinů** jsou obecnou charakteristikou maligní transformace. Jsou odpovědné za abnormální chování buněk: změny adheze nebo metastázování a uniknutí z imunologického dozoru.

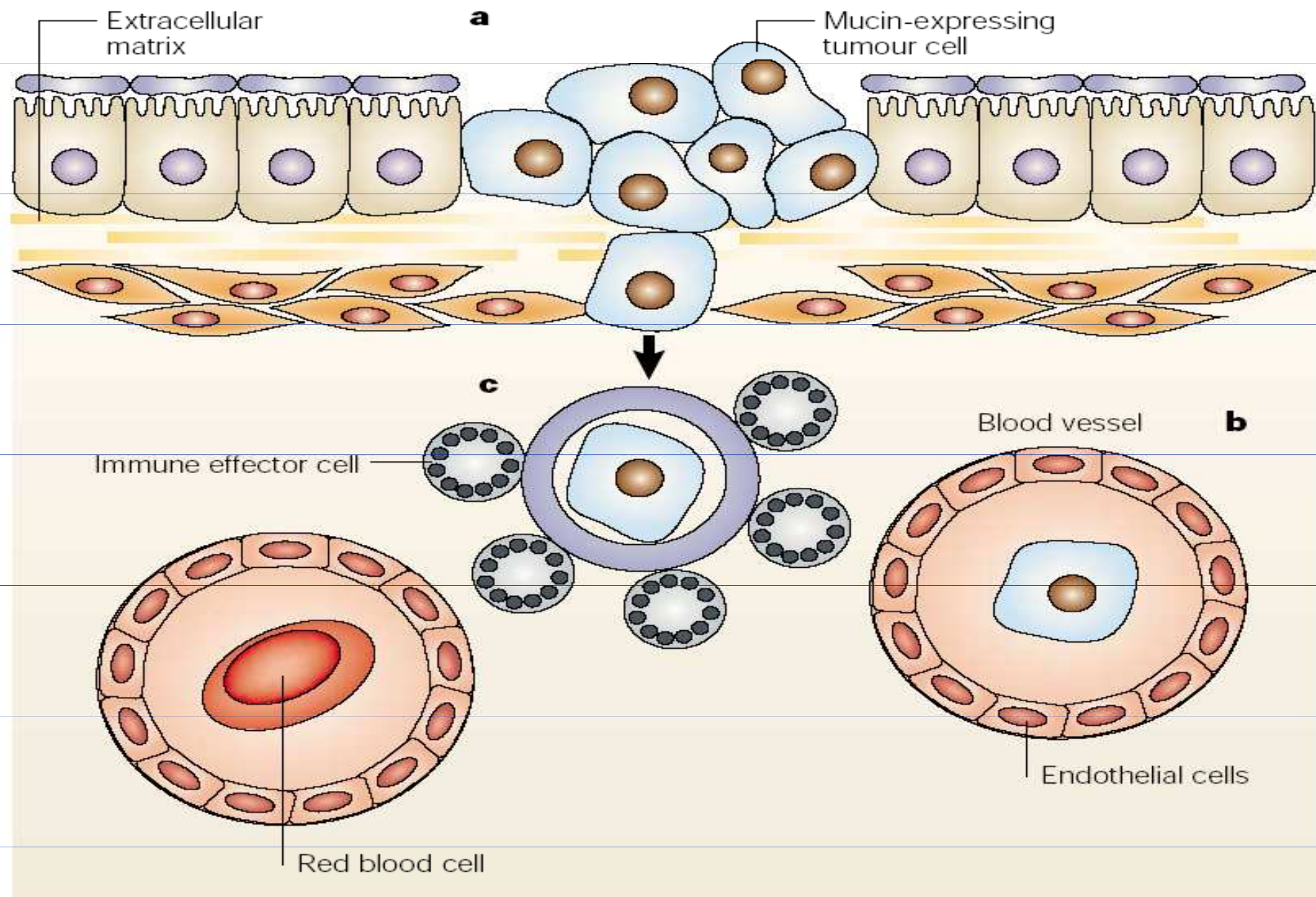


Figure 4 | **Tumours use mucins for invasion, metastasis and protection.** **a** | Tumours use the anti-adhesive effect of mucins to detach from the tumour mass and surrounding stroma and invade (see FIG. 5). **b** | Tumours use the adhesive effect of mucins to attach to endothelia and invade (see FIG. 6). **c** | Tumours also use mucins to escape immune surveillance (see FIG. 7).



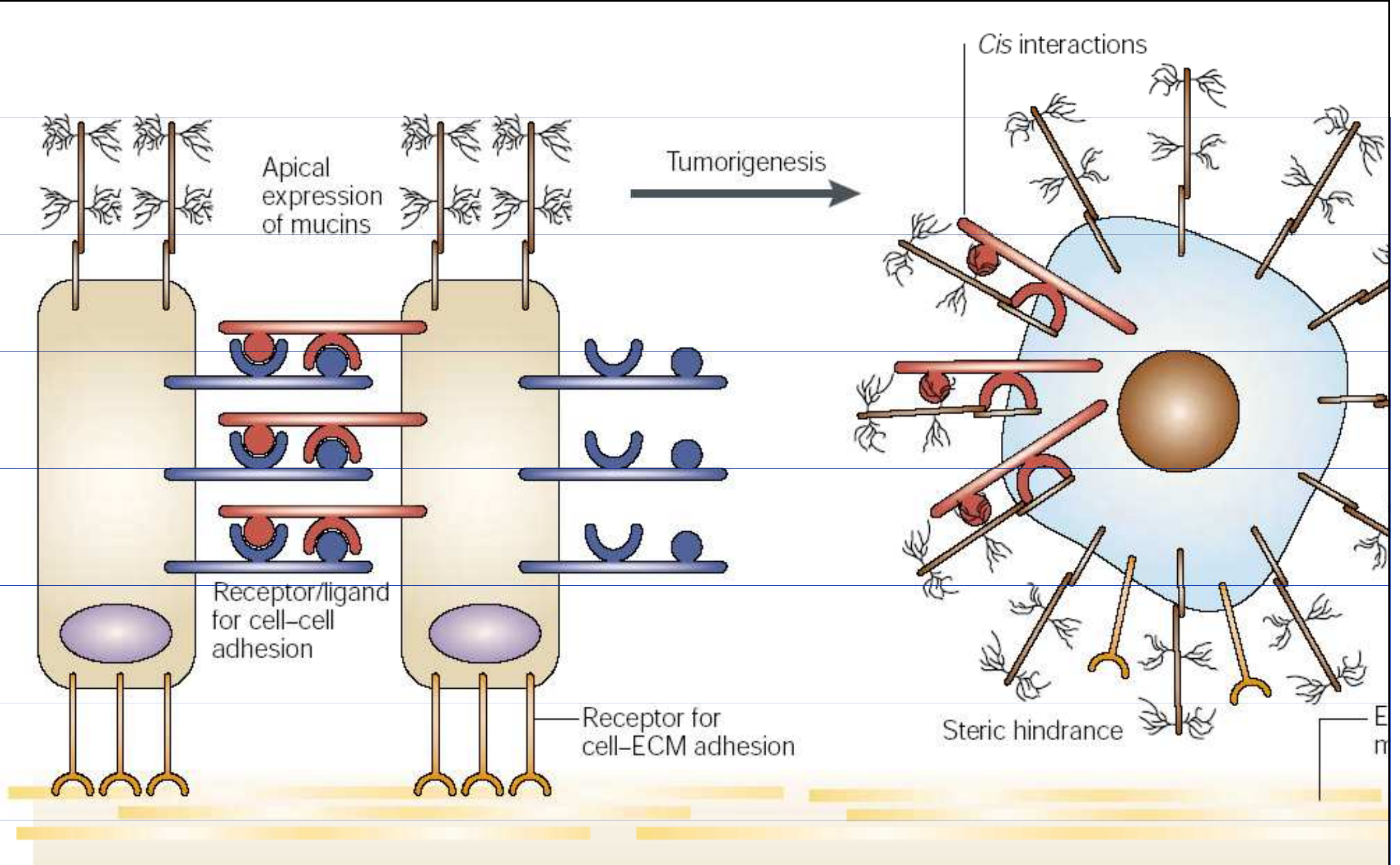
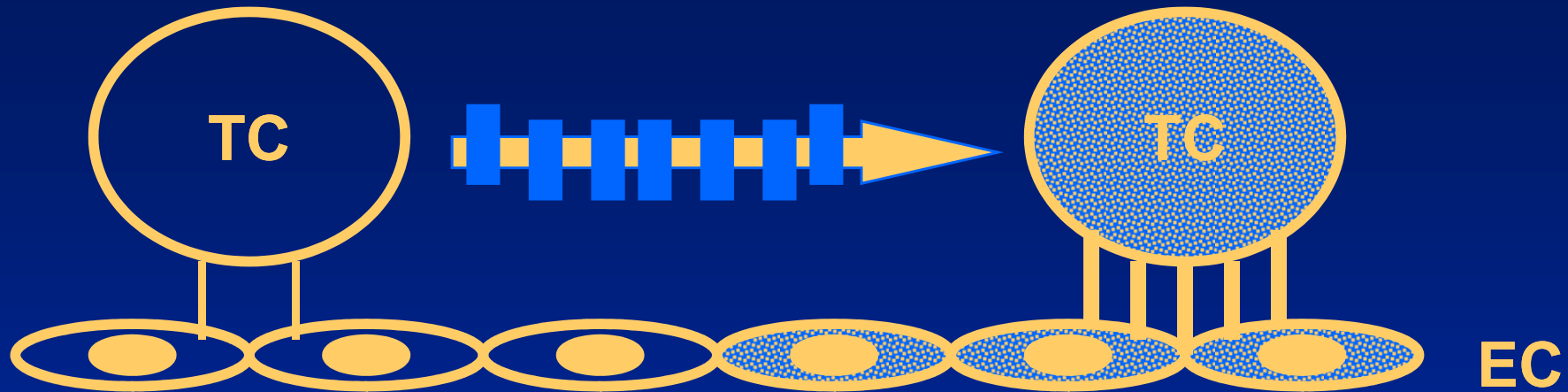


Figure 5 | **Anti-adhesion by membrane-associated mucins in cancer.** Normal epithelial cells express membrane-associated mucins on the apical surface, thereby allowing cell-cell and cell-substratum adhesion. Tumour cells aberrantly express membrane-associated mucins that are not apically restricted, which block cell-cell and cell-substratum adhesion in two ways. *Cis* interactions between membrane-associated mucins and receptors on the same cell could prevent the receptors from interacting with ligands to mediate adhesion. Through steric hindrance, membrane-associated mucins can non-specifically block adhesion via the

„Docking“

Transition

„Locking“



\* slabé a přechodné vazby

\* zprostředkované zejména rozpoznáním uhlovodík - uhlovodík

\* Aktivace nádorových a hostitelských buněk (platelety, leukocyty, endoteliální buňky atd.)

\* tvorba zánětlivých cytokinů, chemokinů a bioaktivních lipidů

\* Exprese indukibilních adhezivních molekul (selektiny, ICAM, VCAM)

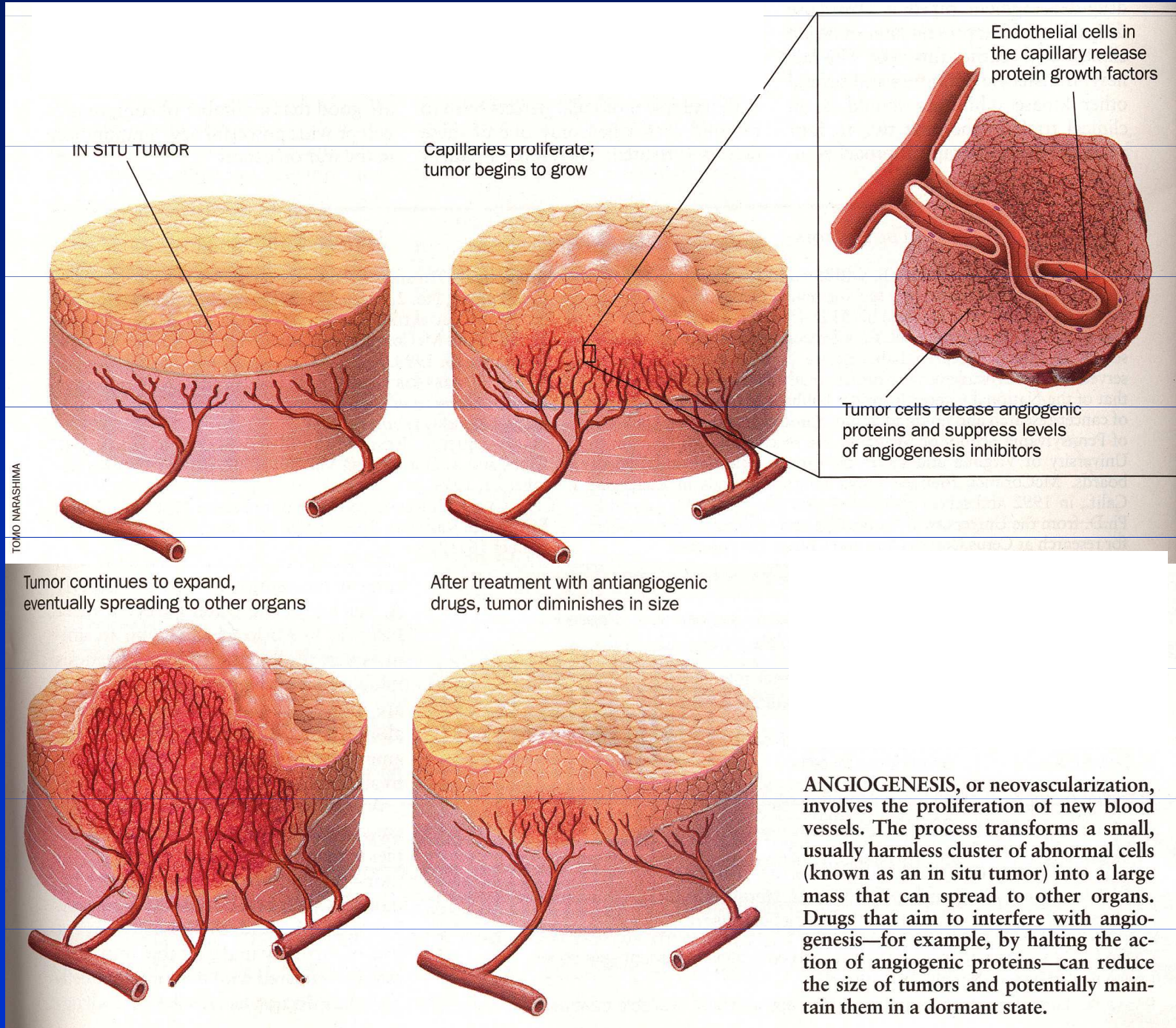
\* pevnější adheze nádorových buněk k endoteliálním b.

\* zprostředkované v základu integrinovými receptory

\* Integriny jsou hlavními přenašeči signálu pro následné molekulární děje (uvolnění od endoteliálních b., interakce s ECM, proteolýza, pohyb buněk a invaze)

Hypotéza „docking a locking“. Interakce nádorových buněk s cévními endoteliálními buňkami může být rozdělena do počáteční fáze slabé adheze („docking“) a pozdější fáze pevné adheze („locking“). Je znázorněna účast specifických skupin adhezivních molekul v těchto dvou fázích. Přechod je zprostředkován širokou škálou bioaktivních mediátorů jako jsou 12(S)-HETE. TC = Tumor cell; EC = endothelial cells; ECM = extracellular matrix.

# Angiogeneze



# ANGIOGENEZE

**Angiogeneze je proces tvorby nových krevních kapilár.**

U dospělého jedince je proliferace endoteliálních buněk velmi nízká.

Fyziologickou vyjímkou, kde je ale angiogeneze přísně regulována, tvoří ženský reprodukční systém a hojení ran.

Neregulovaná angiogeneze je spojena s řadou patologických stavů jako je revmatická artritida, psoriasis, diabetická retinopatie a **nádorová onemocnění**.

**Nádorový růst a tvorba metastáz jsou závislé právě na angiogenezi.**

## **Úloha:**

- ▶ zásobování živinami a kyslíkem.
- ▶ cesta, kudy se nádorové buňky dostávají do oběhu a mohou tak metastázovat v různých vzdálených orgánech.

Angiogeneze je komplexní proces zahrnující širokou souhru mezi buňkami, rozpustnými faktory a složkami extracelulární (mimobuněčné) matrix (ECM).

# Poruchy proteolytické – antiproteolytické rovnováhy

Kooperativní aktivita systému proteolytických enzymů:

- ▶ Lyzozomální proteázy (aspartyl a cystein proteázy – katepsiny)
- ▶ Serinové proteázy – plasminogen, plasminogenové aktivátory (PA)
- ▶ Metalloproteínázy

**Plasminogenové aktivátory** - přeměňují plasminogen na plasmin.

Plasmin degraduje různé složky ECM včetně fibrinu, fibronektinu, lamininu atd. Plasmin také aktivuje několik typů metalloproteínáz.

**Rodina metalloproteínáz (MMP)** - asi 16 členů, většina jsou rozpustné sekretované enzymy nebo transmembránové proteiny schopné digesce ECM nebo komponent bazální membrány. Různé typy podle struktury a substrátové specifity (kolagenázy, gelatinázy, stromelysiny). **PA a MMPs jsou sekretovány spolu se svými inhibitory** (za normálních podmínek nízká hladina), což zajišťuje přísnou kontrolu lokální proteolytické aktivity a je tak zachována normální struktura tkání.

Aktivita PA i MMP je kontrolována na několika úrovních:

- ▶ exprese se zvyšuje působením angiogenních růstových faktorů a cytokinů
- ▶ pro-MMP a pro-PA mohou být proteolyticky aktivovány
- ▶ MMP, plasmin a PA jsou regulovány tkáňovými inhibitory MMP (TIMP).

Během nádorového růstu a tvorby metastáz je kontrola proteolytické aktivity narušena.

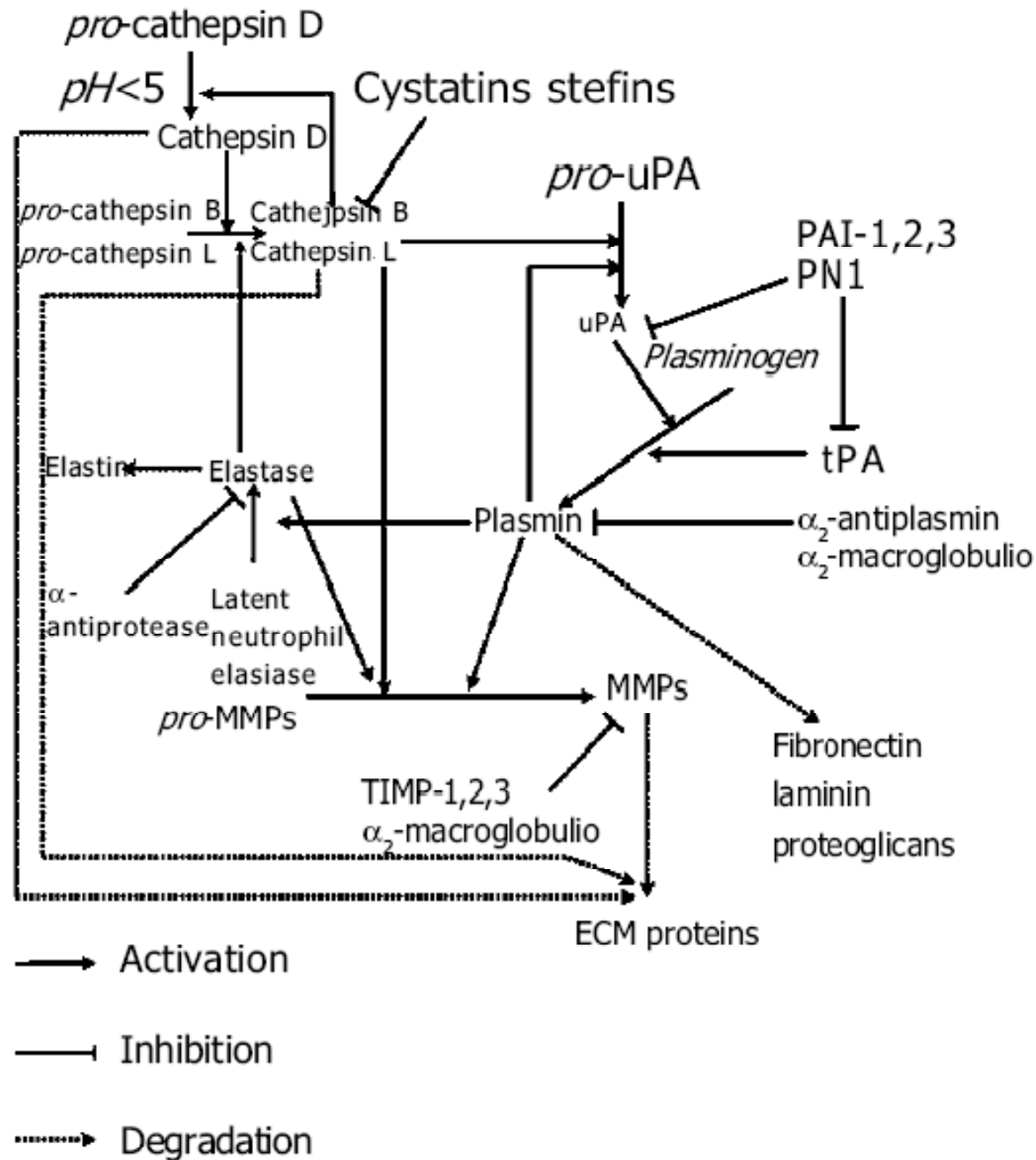
U mnoha typů nádorů (kolorekta, prsu, žaludku, moč. měchýře, prostaty) byla detekována vysoká aktivita MMPs.

Byla také nalezena dobrá korelace mezi množstvím MMPs a agresivitou a invazivitou nádoru.

Po proteolytické degradaci zahajují "vedoucí" endoteliální buňky migraci přes degradovanou matrix.

Jsou následovány proliferujícími endoteliálními buňkami, které jsou stimulovány řadou faktorů, z nichž některé jsou uvolňovány z degradované ECM.

# Regulace proteolýzy ECM



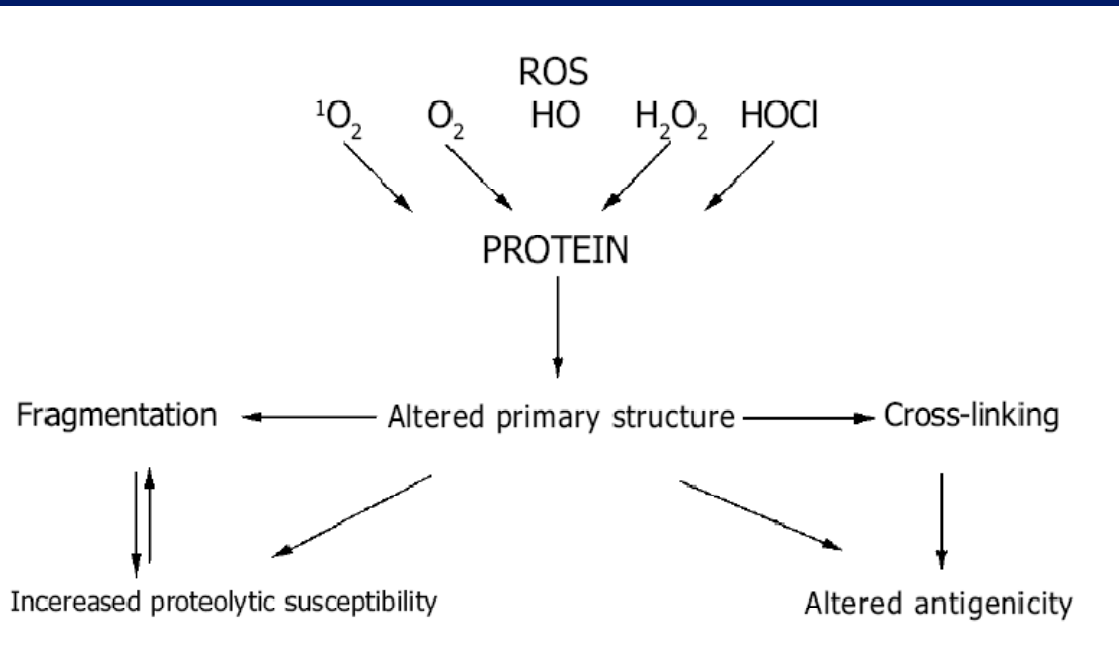
**Table 1** Proteases participating in degradation of ECM components

Protease family	Protease	Protease function	Protease inhibitors
Aspartyl protease	Cathepsin D	Degradation of ECM components Conversion of cysteine procathepsins into cathepsins	
Cysteine proteases	Cathepsins B, L, H, K	Degradation of ECM components Conversion of pro-MMPs into MMPs	Cystatins, stefins, kininogen
Serine proteases	Plasmin	Degradation of ECM components Activation of uPA	$\alpha_2$ -antiplasmin, $\alpha_2$ -macroglobulin
	Urokinase-type plasminogen activator (uPA)	Conversion of inactive elastase into elastase Conversion of plasminogen into plasmin	PAI-1, 2, 3
	Tissue-type plasminogen activator (tPA)	Conversion of plasminogen into plasmin	
Neutrophil serine proteases	Elastase	Degradation of ECM components	$\alpha_2$ -antiplasmin
	Cathepsin G		$\alpha_2$ -macroglobulin secretory leukoprotease inhibitor
Matrix metalloproteinases		Degradation of collagens and other ECM proteins Activation another pro-MMPs into MMPs	TIMP-1, 2, 3, 4 $\alpha_2$ -macroglobulin
	Collagenases [MMP-1, 8, 13]	Degradation of collagens: I, II, III, VII, X and gelatins	
	Stromelysins [MMP-3, 10]	Degradation of proteoglycans, laminin, gelatins, collagens III, IV, V, IX, fibronectin, entactin, SPARC, collagenases-1	
	Gelatinases [MMP-2, 9]	Degradation of gelatins, collagens: I, IV, V, VII, X, fibronectin, elastin, procollagenase-3	
	Membrane-type [MMP-14, 15, 16, 17, 24, 25]	Degradation of collagen I, II, III, gelatins, aggrecan, fibronectin, laminin, vitronectin, MMP-2,13, tenascin, nidogen	
	Others [MMP-7, 11, 12, 19, 20, 23]	Degradation of proteoglycans, laminin, fibronectin, gelatins, collagens IV, elastin, entactin, tenascin, $\alpha_1$ -antiproteinase, amelogenin	

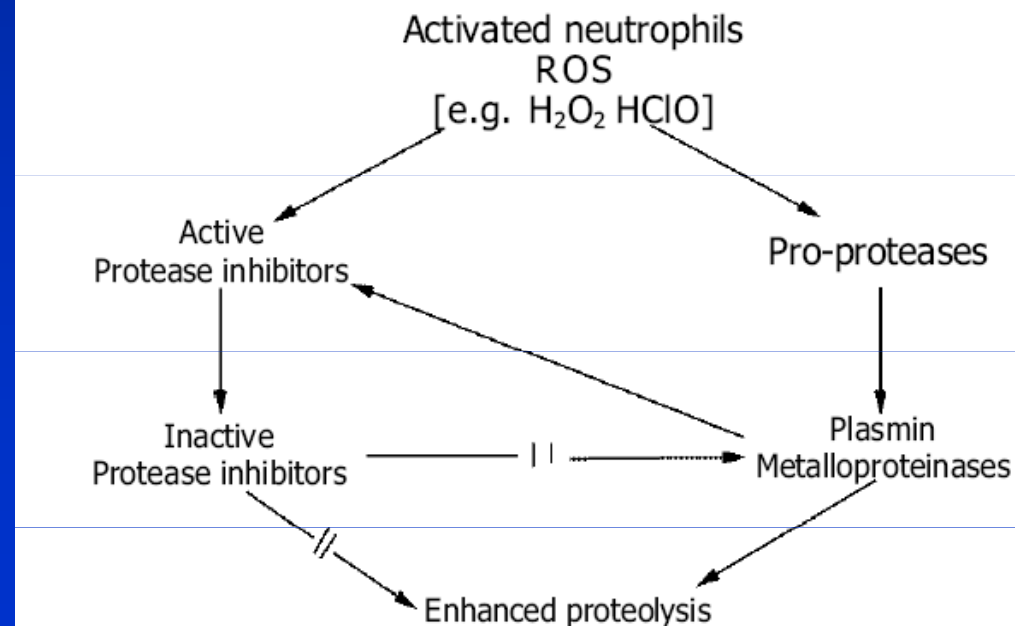


# Úloha ROS v proteolytické – antiproteolytické rovnováze

Oxidativní změny biologicky aktivních proteinů závislé na typu a koncentraci ROS



Modifikace struktury proteolytických enzymů a jejich inhibitorů vede k porušení rovnováhy. Tyto změny zpětně podporují další produkci ROS granulocyty a makrofágy. Zvýšená proteolýza a destrukce ECM – invaze - metastázy



## Hlavní endogenní induktory angiogeneze

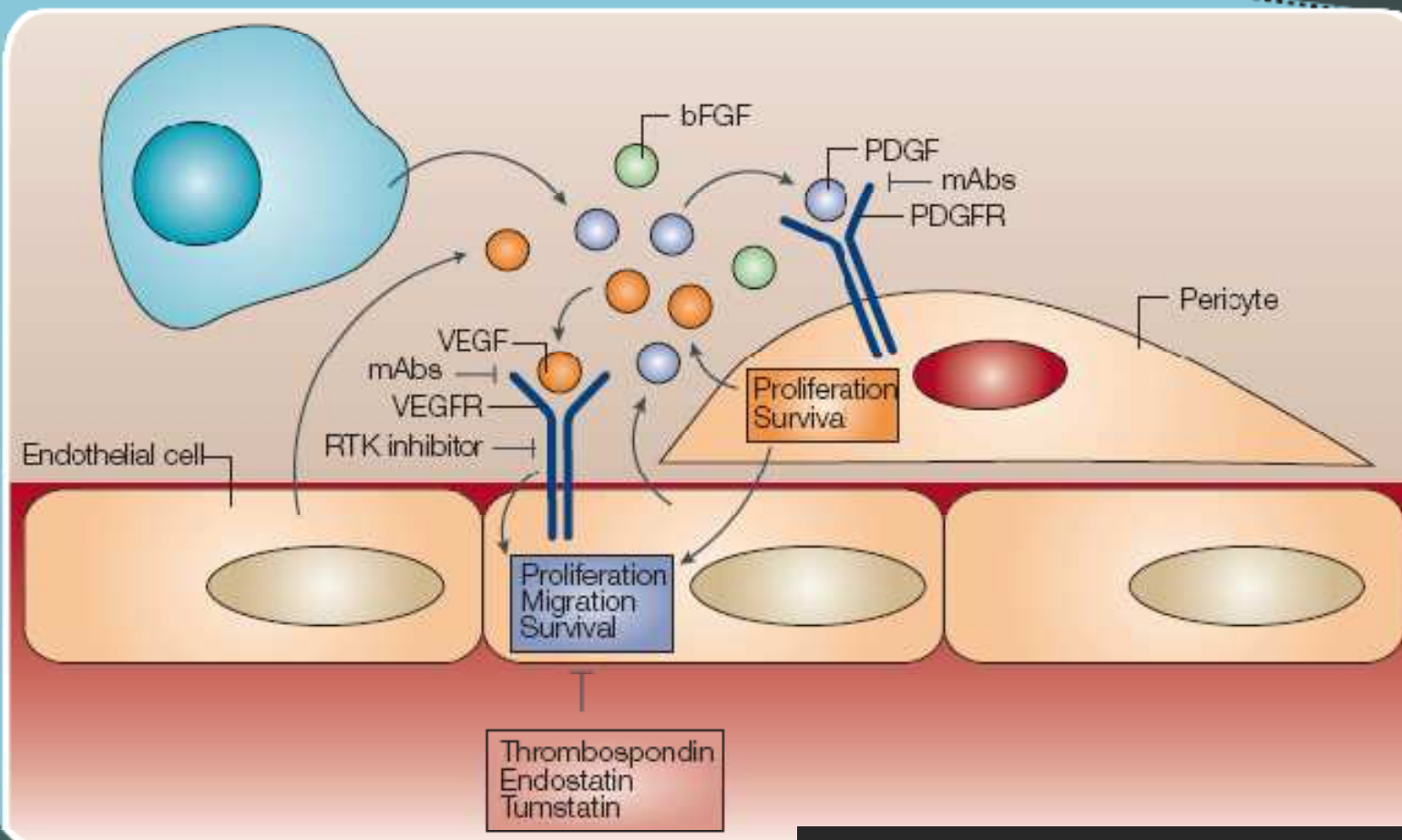
### Peptidové růstové faktory a prozánětlivé mediátory

- ▶ vascular endothelial growth factor family (VEGF) a angiopoetiny působí specificky na endot. buňky. Působí přes tyrosin kinázové receptory a fungují protiapopticky
- ▶ cytokiny a chemokiny přímo působící - aktivují řadu dalších bun. typů. Prototypem je bFGF (basic fibroblast growth factor) a PDGF (platelet growth factor), IL-8, IL-3
- ▶ nepřímo působící faktory (TNF alpha a TGF beta), které působí uvolňování dalších faktorů z makrofágů, endoteliálních nebo nádorových buněk. Např. TNF alpha stimuluje uvolňování VEGF, IL-8 a FGF-2 z endotel. buněk.
- ▶ Enzymy (COX-2, angiogenin), hormony (estrogeny), oligosacharidy (hyaluronan), hemopoetické faktory (EPO, G-CSF, GM-CSF), adhezivní molekuly (VCAM-1, E-selektin), oxid dusíku atd.

Geny MMP transkripčně regulovány AP-1 – indukovány cytokiny (IL-4, -10, TGF, bFGF – aktivace MAPKs.

**Endogenní inhibitory angiogeneze:** trombospodin-1, interferon  $\alpha/\beta$ , prolactin, angiostatin, endostatin, vasostatin atd.

**Zahájení nádorové angiogeneze je výsledkem posunu v rovnováze stimulátorů a inhibitorů.**



The development of tumour vasculature — angiogenesis — is important for progression of many tumour types, although tumours frequently form abnormal leaky vessels. Angiogenesis is induced by factors such as vascular endothelial growth factor (VEGF), basic fibroblast growth factor (bFGF) and platelet-derived growth factor (PDGF). VEGF receptors (VEGFRs) are expressed on the endothelial cells of the tumour vessels, whereas PDGF receptors (PDGFRs) are expressed by the pericytes that support blood-vessel growth. VEGF is produced by both pericytes and endothelial cells, and PDGF is produced by endothelial cells, so each cell type produces the growth factor that promotes proliferation and survival of the other cell type.

A number of mAbs and receptor tyrosine kinase (RTK) inhibitors have been developed to block these signalling pathways, and have been shown to slow tumour growth in preclinical and clinical studies. Endothelial cells also produce endogenous inhibitors of angiogenesis, such as thrombospondin, endostatin and tumstatin. These are also being developed as anticancer agents.

# Úloha buněčné adheze

Proces buněčné invaze, migrace a proliferace je zprostředkován také adhezivními molekulami.

## **Interakce buňka-buňka a buňka-ECM**

CAM jsou děleny do 4 základních skupin v závislosti na jejich biochemických a strukturálních vlastnostech: selektiny, imunoglobulinová supergenová rodina, kadheriny a integriny.

Členové každé z nich se uplatňují v angiogenezi.

K zahájení angiogenního procesu se musí endotel. buňky uvolnit od sousedních buněk.

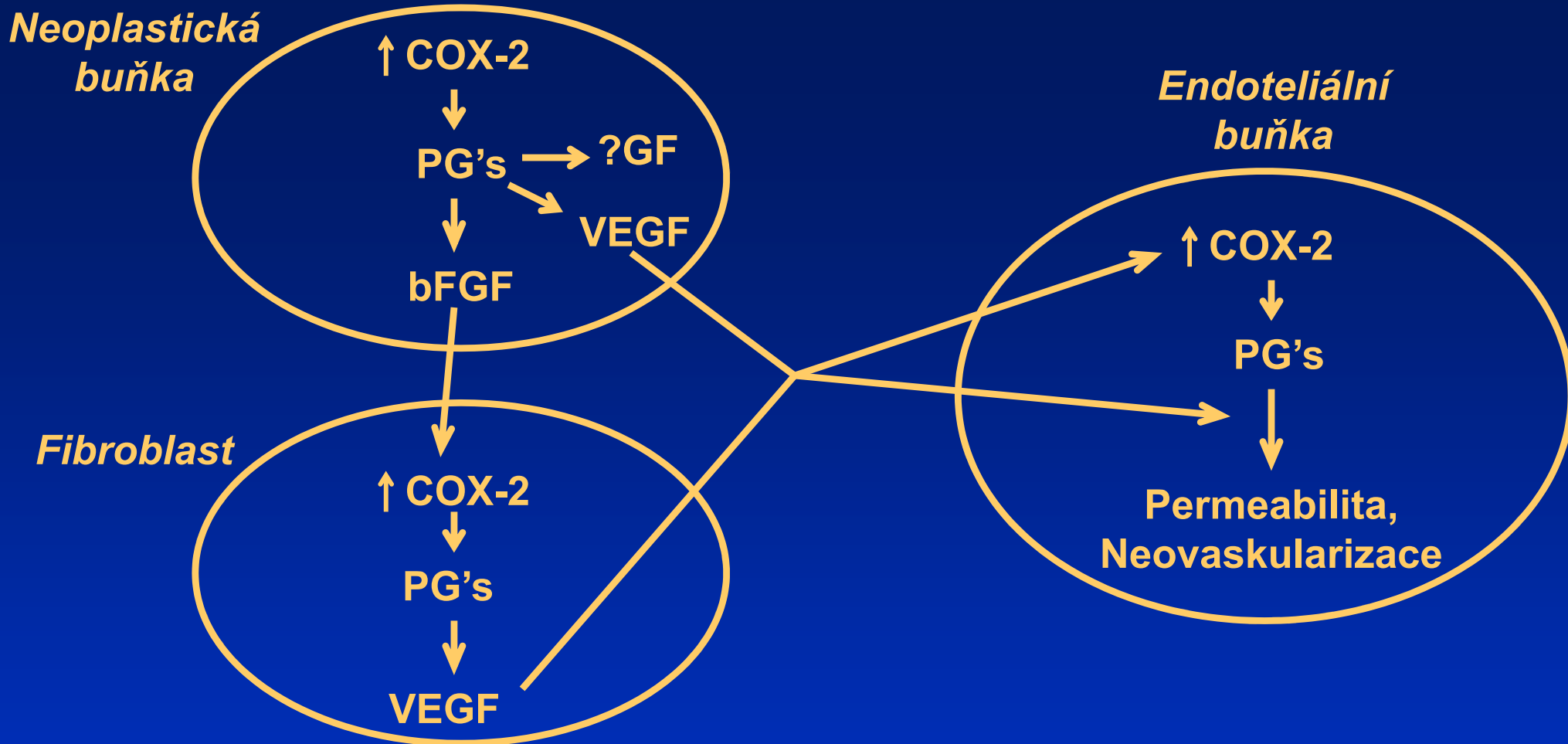
.

Během invaze a migrace je interakce endotel. buněk s ECM zprostředkována integriny. Také konečná fáze angiogenního procesu, včetně konstrukce kapilárních smyček a určení polarity endoteliálních buněk vyžaduje buněčné kontakty a kontakty s ECM.

Integriny (2 nekovalentně spojené jednotka alfa a beta) - heterodimerizují ve více než 20 kombinacích. Endotel. buňky tak exprimují několik různých integrinů - napojení na široké spektrum proteinů ECM. V aktivovaném endotelu mohou suprimovat aktivitu p-53 a p21 a zvyšovat poměr Bcl2:Bax, což má antiapoptické účinky

#### Další molekuly:

- ▶ vaskulární endoteliální kadherin zprostředkovává na  $Ca^{2+}$  závislé homofilní interakce mezi endotel. buňkami.
- ▶ členové ICAM zprostředkovávají heterofilní adheze. Jsou zvyšovány TNFalfa, IL-1 nebo INF-gamma.
- ▶ P- nebo E-selektin - podporují adhezi leukocytů k cytokiny aktivovanému endotelu



### Model angiogeneze - interakce buněčných typů.

V nádorových buňkách prostaglandiny (PGs) tvořené přes cyklooxygenázu-2 (COX-2) zvyšují produkci růstových faktorů jako je VEGF, které působí přímo na endoteliální buňky a bFGF, který stimuluje produkci COX-2 u fibroblastů. PGs tvořené ve fibroblastech stimuluje produkci VEGF, který působí parakrinním způsobem na endoteliální b. a opět zvyšuje aktivitu COX-2 a usnadňuje permeabilitu cév a angiogenezi. Inhibitory COX-2 blokuje produkci PGs a tak zabraňuje angiogenezi indukované růstovými faktory.

# Stupeň angiogeneze jako prognostický faktor

Úzký vztah mezi angiogenezí a tvorbou metastáz.

Čím intenzivnější angiogeneze, tím větší riziko metastáz a horší prognóza nádorového onemocnění.

Histologické řezy a detekce fokálních oblastí tzv. „hot spots“ pomocí monoklonálních protilátek proti cévnímu endotelu nebo adhezivním molekulám CD31 a CD34.

Kvantitativní hodnocení je prognostickým faktorem např. u rakoviny prsu, děložního čípku, močového měchýře a melanomu.

Zvýšená vaskularizace kostní dřeně – horší prognóza u akutní leukémie.

Inhibice angiogeneze – léčebná metoda

**Antiangiogenní terapie** - výhody proti terapii mířené přímo proti nádorovým buňkám. Endoteliální buňky jsou geneticky stabilní, diploidní a homogenní cíl a zřídka zde dochází k mutacím. Také jejich obnova je 50 krát vyšší než v normální klidové tkáni a aktivované krevní cévy vykazují specifické markery jako jsou integriny a selektiny nebo VEGF receptory. Hustota cév uvnitř nádoru má také prognostickou hodnotu.

Byla nalezena pozitivní korelace mezi nádorovou angiogenezí a rizikem vzniku metastáz, znovuoobnovení nádoru a smrtí.

- ◆ **inhibitory buněčné invaze, motility a adheze** (inhibitory MMP aktivity, inhibice buněčných adhezivních molekul)
- ◆ **inhibitory aktivovaných endoteliálních buněk** (trombospodin-1 - fyziologický inhibitor angiogeneze, který je snížen během aktivace angiogeneze a jeho produkce je regulována p53, angiostatin a endostatin - zdrojem jsou samotné nádorové buňky, uměle syntetizované látky (talidomid)
- ◆ **látky, které interferují s angiogenními růstovými faktory a jejich receptory** (specifické protilátky, INF-alfa)
- ◆ **inhibitory enzymů** jako je COX-2 (NSAIDs)
- ◆ tzv. "vascular targeting" - inhibice růstu nádoru destrukcí nádorových cév.



# Endogenní inhibitory angiogeneze

**Table I.** Some endogenous inhibitors of angiogenesis

Name	Description
Thrombospondin-1 and internal fragments of thrombospondin-1	Thrombospondin is a 180 kDa, large, modular extracellular matrix protein (53)
Angiostatin	A 38 kDa fragment of plasminogen involving either kringle domains 1–3, or smaller kringle 5 fragments (58,163,164)
Endostatin	A 20 kDa zinc-binding fragment of type XVIII collagen (59)
Vasostatin	An N-terminal fragment (amino acids 1–80) of calreticulin (61)
Vascular endothelial growth factor inhibitor (VEGI)	A 174 amino acid protein with 20–30% homology to tumor necrosis factor superfamily (60)
Fragment of platelet factor 4 (PP4)	An N-terminal fragment of PP4 (63)
Derivative of prolactin	16 kDa fragment of the hormone (57)
Restin	NC10 domain of human collagen XV (165)
Proliferin-related protein (PRP)	A protein related to the pro-angiogenic proliferin molecule (166)
SPARC cleavage product	Fragments of secreted protein, acid and rich in cysteine (62)
Osteopontin cleavage product	Thrombin-generated fragment containing an RGD sequence (65)
Interferon $\alpha/\beta$	Well known anti-viral proteins (56)
Meth 1 and Meth 1	Proteins containing metalloprotease and thrombospondin domains, and disintegrin domains in NH <sub>2</sub> termini (65)
Angiopoietin-2	Antagonist of angiopoietin-1 which binds to tie-2 receptors (39,44)
Anti-thrombin III fragment	A fragment missing C-terminal loop of anti-thrombin III (a member of the serpin family) (64)

## Inhibitory angiogeneze v klinických zkouškách

Phase I			Phase II		
Drug	Sponsor	Mechanism			
COL-3	Collagenex, NCI	Synthetic MMP inhibitor; tetracycline derivative	CGS-27023A	Novartis	Synthetic MMP inhibitor
Squalamine	Magainin	Inhibits Na/H exchanger	TNP-470	TAP Pharm.	Fumagillin analogue; inhibits endothelial proliferation
Combretastatin	Oxigene	Apoptosis in proliferating endothelium	Thalidomide	Celgene	Unknown
PTK787/ZK2284	Novartis	Blocks VEGF receptor signaling	SU5416	Sugen	Blocks VEGF receptor signaling
Endostatin	NCI/EntreMed	Induction endothelial cell apoptosis <i>in vivo</i>	Vitaxin	Iceys	Antibody to integrin on endothelial surface
CAI	NCI	Inhibitor of calcium influx	Interleukin-12	Genetics Inst.	Induces IFN-gamma and IP-10
PTK787/2K22584	Novartis	Small molecule inhibitor of VEGF receptor	EMD121974	Merck, Germany	small molecule integrin antagonist
Phase III					
Marimastat	British Biotech	Synthetic MMP inhibitor			
AG3340	Agouron	Synthetic MMP inhibitor			
Neovastat/AE941	Aeterna	Natural MMP and VEGFR inhibitor			
Anti-VEGF Ab	NCI	Monoclonal antibody to VEGF			
Interferon-alfa	Commercially available	Inhibition of bFGF production			
IM862	Cytran	unknown mechanism			

From National Cancer Institute Database (updated August 1999).