

Molekulární biologie nádorů

Prof. RNDr. Jana Šmardová, CSc.

Ústav patologie, FN Brno
Přírodovědecká fakulta MU Brno
Lékařská fakulta MU Brno
2011

9. Tvorba

metastáz

Sedm 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

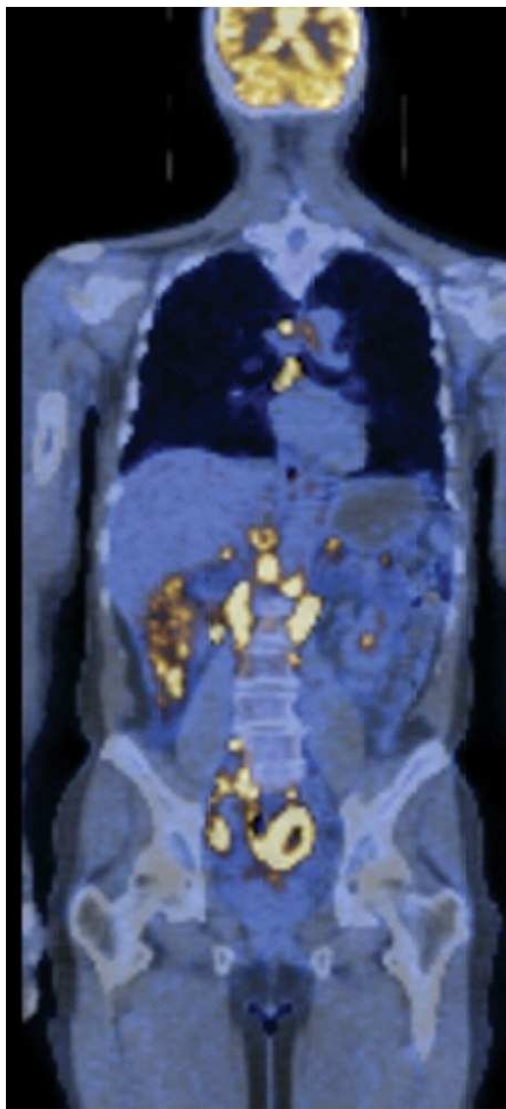
inaktivace E-kadherinu

Nestabilita genomu jako podmínka akumulace všech nutných změn

Metastázy - nejčastější příčina smrti

- Metastázy jsou **nejzhoubnějším** jevem při nádorovém onemocnění a jsou příčinou asi 90 % úmrtí pacientů s nádorovým onemocněním.
- Méně častou příčinou je **bezprostřední působení primárního nádoru**. Většina primárních nádorů vzniká jako benigní a jsou relativně neškodné. Leda, že narůstající masa utlačuje vitální orgány (**nádory mozku**) nebo uvolňuje nebezpečné množství hormonů.
- **Langerhansovy ostrůvky** - nadprodukce inzulínu - hypoglykemie - smrt
- **Thyroidní adenomy** (premaligní epiteliální růst) mohou způsobit uvolnění nadměrného množství thyroideálního hormonu, což vede k hyperthyroidismu.
- **Adenomy hypofýzy** mohou uvolňovat do oběhu nadměrné množství růstového hormonu → akromegalismus
- **Leukémie, lymfomy**

Metastázy - nejčastější příčina smrti



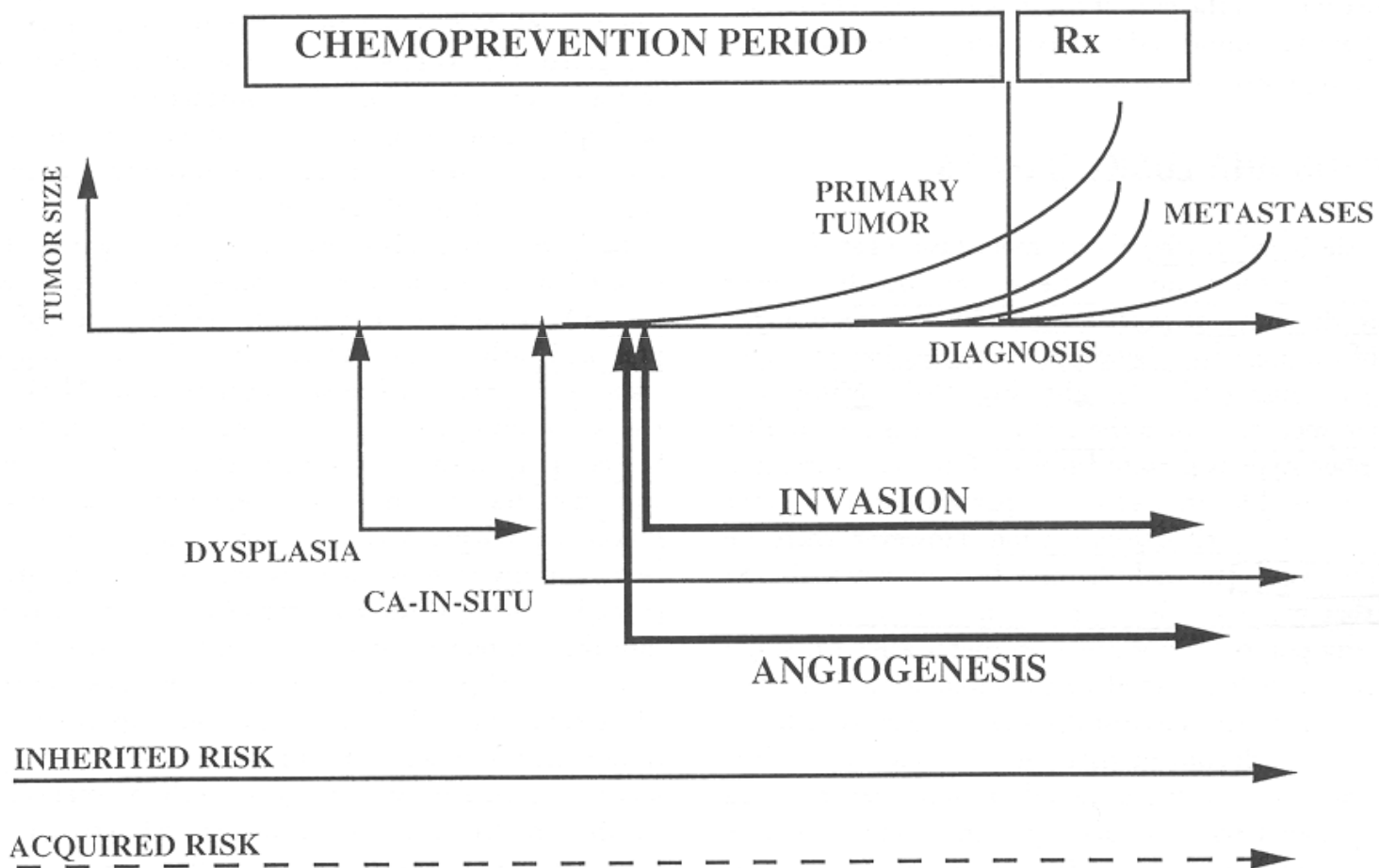
Pacientka s nehodgkinským lymfomem: kombinace zobrazení CT a PET

- CT (computed X-ray tomography) - modrá/šedá
- PET (positron-emission tomography) - žlutá; měří příjem radioaktivně značené fluorodeoxyglukosy → zobrazí buňky/tkáně s vysokou metabolickou aktivitou:
- fyziologicky: např. mozek
- patologicky: nádory, metastázy

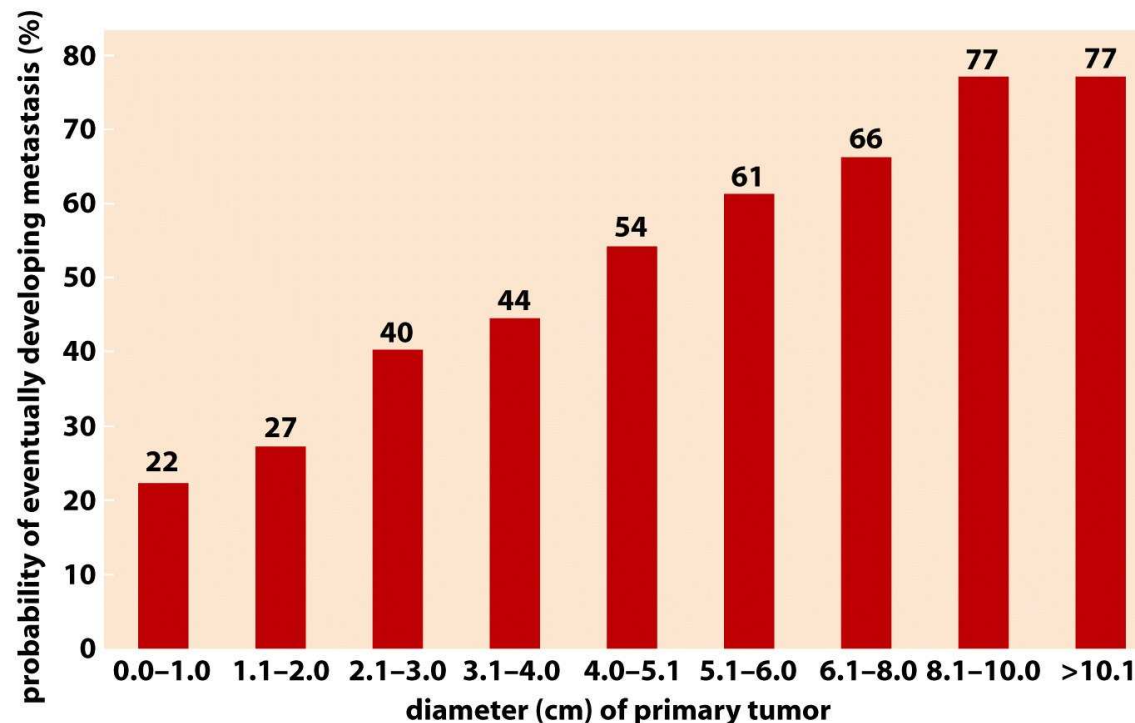
Špatné zprávy o metastázách

- **Více než 70 %** pacientů s invazivním nádorem má zjevné nebo skryté metastázy v době stanovení diagnózy.
- Získání invazivního a metastatického charakteru je časná událost během progresu nádoru.
- **Milióny** nádorových buněk se denně dostávají do krevního řečiště.
- **Angiogeneze** je obecným znakem kancerogeneze, je také časnou událostí a potencuje metastatickou diseminaci nádoru.

Tvorba metastáz je časná událost ve vývoji nádoru



Velikost primárního nádoru a riziko metastáz



Čím je velikost diagnostikovaného primárního nádoru prsu větší, tím je vyšší pravděpodobnost výskytu metastáz:

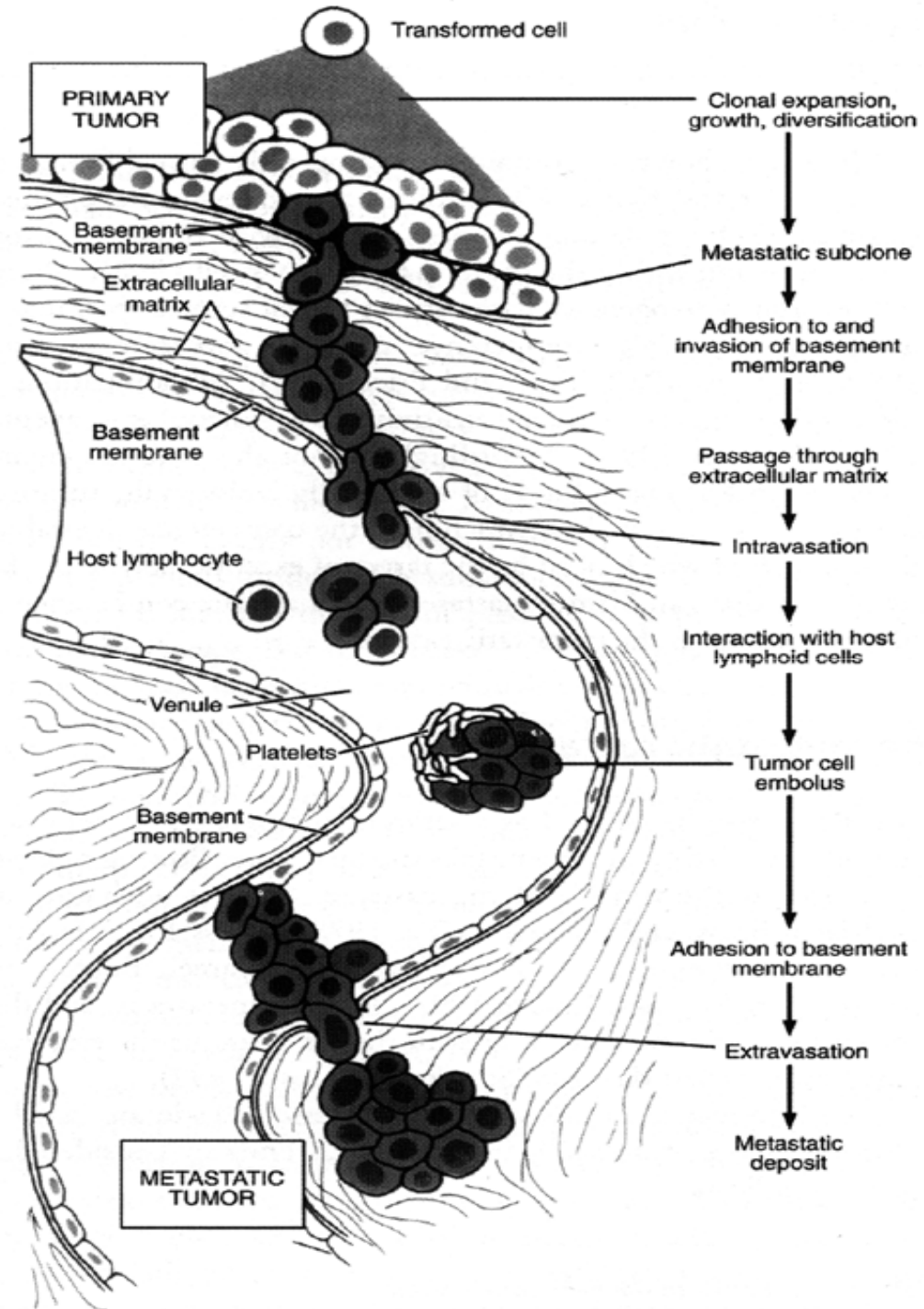
% žen s primárním nádorem dané velikosti, u kterých se vytvořily metastázy

Dobré zprávy o metastázách

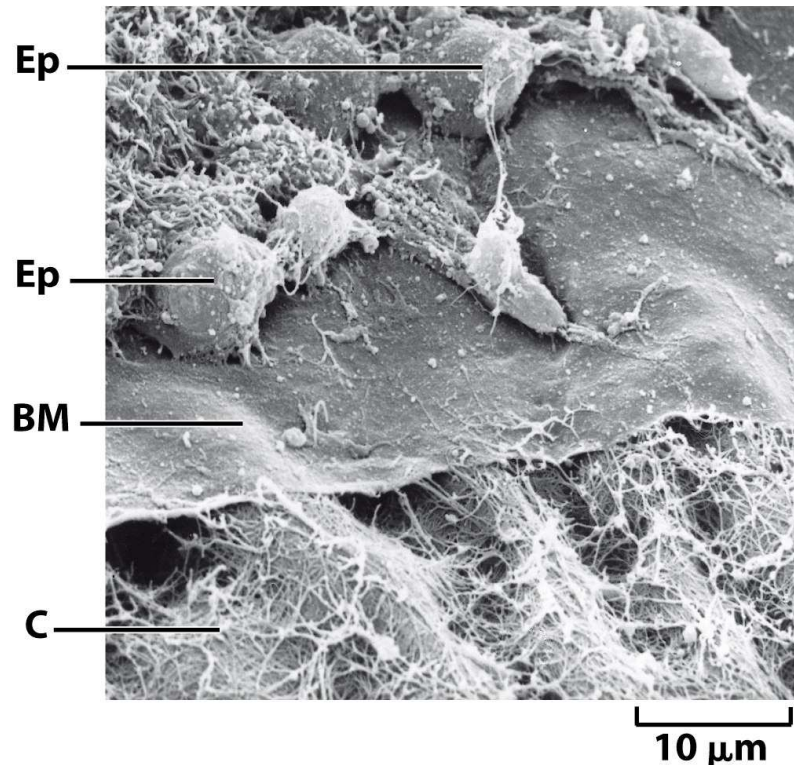
- Metastázování je málo efektivní: **méně než 0.01 %** cirkulujících nádorových buněk úspěšně založí metastatické ohnisko.
- Cirkulující nádorové buňky jsou **zachytitelné dříve** než se u pacienta vyvine zjevná metastáza.
- K potírání metastáz může být použito **stejně terapie** jako k léčbě primárního nádoru, ze kterého jsou odvozené: chirurgické odstranění, radioterapie, chemoterapie, imunoterapie, hormonální terapie nebo jejich kombinace.
- Výsledky DNA čipů: podobnost primárních nádorů a metastáz na úrovni exprese genů!! (Naopak mohou být velké rozdíly v expresních profilech mezi různými nádory téhož typu.)

Metastatická kaskáda

1. Uvolnění nádorové buňky z primárního nádoru (*lokální invaze*).
2. Prostoupení ECM a bazální membrány, vstup do cirkulačního systému (*intravazace*).
3. Migrace cirkulačním systémem.
4. = 2 (*extravazace*).
5. Tvorba sekundárního nádoru (*kolonizace*).



Karcinomy a bazální membrána



- **Karcinomy *in situ***: jsou na „epiteliální“ straně bazální membrány. I tak mohou stimulovat angiogenezi na „stromální“ straně - uvolňováním angiogenních faktorů přes (porézní/propustnou) bazální membránu.
- Ovšem porušení bazální membrány (**invaze**) je pro nádor obrovská výhoda pro následující kroky metastázování: přímý přístup ke krevním/lymfatickým kapilárám, které jsou normálně pouze na stromální straně BM.

Má tvorba metastáz fyziologickou podstatu?

- Nádorová invaze může být **deregulovanou** formou fyziologických invazivních procesů, které se uplatňují např.:
 - při prorůstání neurálních výběžků během vývoje mozku
 - při remodelaci tkání
 - při tvorbě cévního systému (a také při nádorové angiogenezi)
 - při hojení

Mechanismus invaze nádorových buněk

Invazi lze chápat jako **pohyb** buněk spojený s regulovanou **adhezí** a uvolňováním adheze (od ECM, mezi buňkami navzájem) a **proteolýzou ECM**. Průnik buněčných pseudopodií (výběžků) - související s tvorbou aktinových polymerů, složek cytoskeletonu - zřejmě vyžaduje souhru enzymů degradujících povrchové proteiny buněk a dalších enzymů - receptorů a aktivátorů.

Při remodelaci ECM musí existovat souhra mezi degradací (ECM) a procesem, který inhibuje proteolytické enzymy, aby byla umožněna postupná adheze.

Epiteliální mezenchymální tranzice EMT

- Vývojový program, biologický proces, který umožňuje polarizovaným epiteliálním buňkám, které normálně interagují s bazální membránou, prodělat četné biochemické změny, které jim umožní získat fenotyp mezenchymálních buněk, jako zvýšenou migrační kapacitu, invazivitu, zvýšenou rezistenci k apoptóze a zvýšenou produkci komponent ECM.
- Dokončení EMT se projevuje degradací bazální membrány a vznikem mezenchymálních buněk, které migrují z epiteliální vrstvy, kde vznikly.
- Tento program transdiferenciace může být aktivován během vývoje, ale i v dospělosti, například v souvislosti s reparací tkání, patologickým stresem (zánět, high-grade karcinomy).

Typické epitelium

- vrstva, plocha („sheet“) buněk, často o tloušťce právě jedné buňky s jednotlivými buňkami sousedícími jedna s druhou **uniformním** způsobem
- uniformní vzdálenosti mezi sousedními buňkami a mezi nimi buněčné spoje („cell junctions“) a adheze, které je drží **pevně** pohromadě a **inhibují pohyb** jednotlivých buněk mimo vrstvu
- vnitřní adhezivita umožňuje buněčné ploše vytvářet trojrozměrné prostorové struktury, které mají velkou mechanickou pevnost
- plocha buněk je **polarizovaná** ve směru **apikální - bazální**, což je někdy vizuálně patrné
- vrstva buněk může adherovat k různým substrátům a má různé funkce

Typické mezenchymální buňky

- obecně nevytváří přesně uspořádané („regimented“) struktury a nemají pevné mezibuněčné adheze
- tvoří struktury **nepravidelných** tvarů a bez pravidelné struktury a hustoty
- adheze mezi mezenchymálními buňkami jsou mnohem méně pevné a umožňují mnohem větší migraci buněk
- mezenchymální buňky mají více protažené podlouhlé tvary a mají **předo-zadní polaritu**
- nepravidelná struktura neumožňuje rigidní topologickou specializaci
- **migrace** mezenchymálních buněk je mechanisticky odlišná od migrace epiteliálních buněk: EB se pohybují jako celek, MB se pohybují individuálně, mohou opustit oblast ostatních MB

Epiteliální-Mezenchymální Transice (EMT)

- Transice/přepnutí epiteliální buňky v buňku mezenchymální vyžaduje změnu morfologie, buněčné architektury, adheze a migrační kapacity.

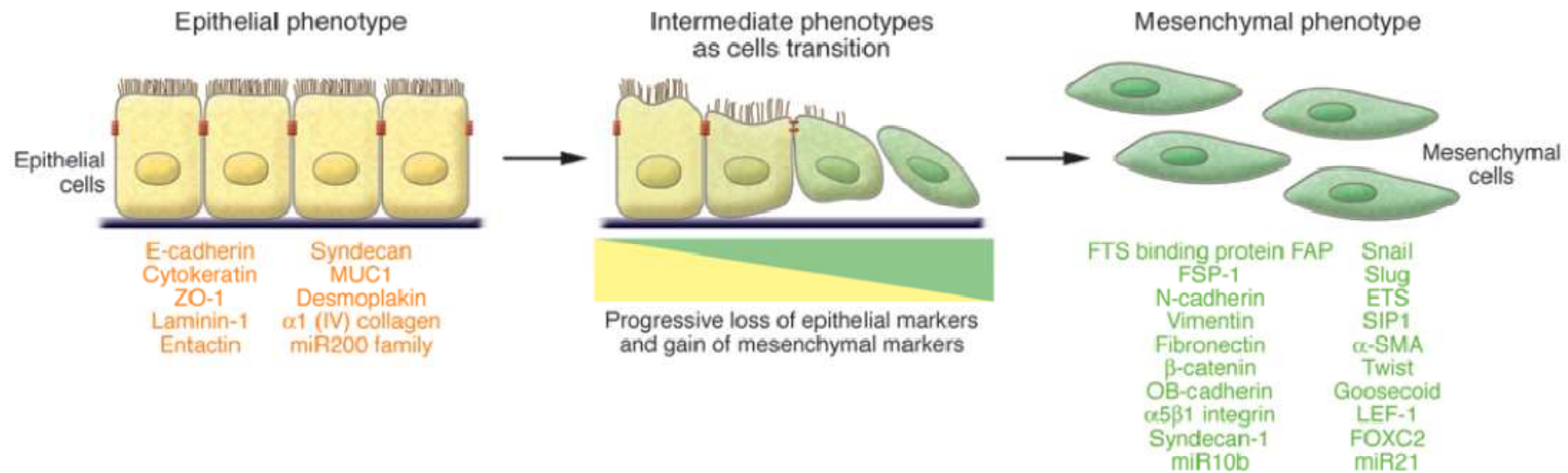
Fenotypické znaky

- zvýšená migrační kapacita
- trojrozměrná invaze
- rezistence k anoikis, k apoptóze

Molekulární znaky

- zvýšená exprese **N-kadherinu** a **vimentinu**
- jaderná lokalizace **β -katenuinu**
- zvýšená produkce transkripčních faktorů jako **Snail 1**, **Snail2**, **Twist**, **EF1/ZEB1**, **SIP1/ZEB2**
- inhibice exprese **E-kadherinu**

Epiteliální-Mezenchymální Transice



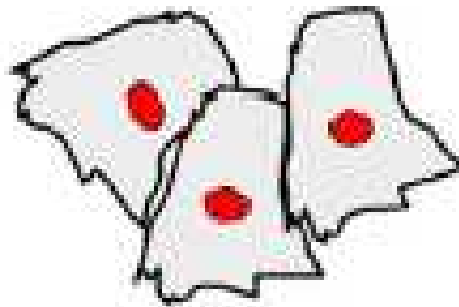
- EMT zahrnuje funkční tranzici polarizovaných epiteliálních buněk v pohyblivé mezenchymální buňky, které produkují komponenty ECM

EMT: metastatický fenotyp



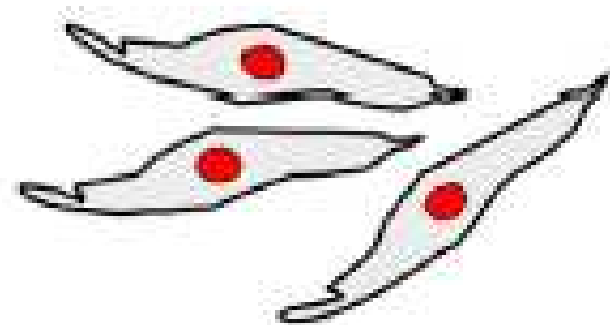
epiteliální buňky

- adherentní spoje
- pevné spoje
- apiko-bazální polarita
- **stacionární**
- cytokeratiny
- E-kadherin



metastatické buňky

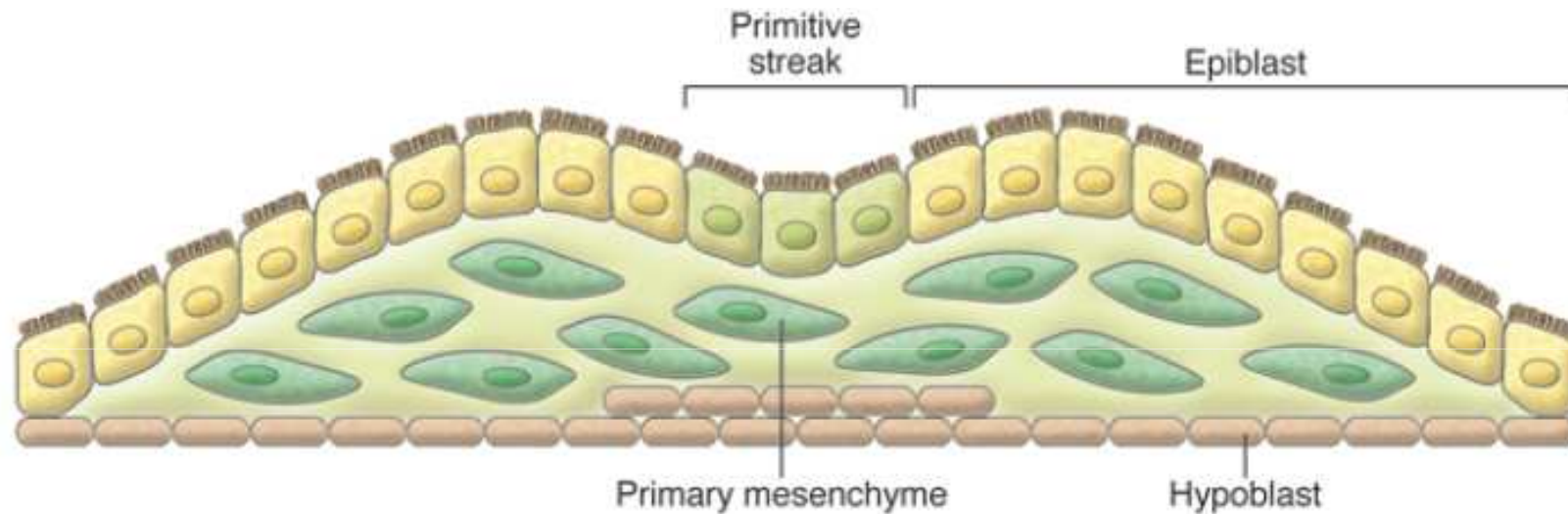
- zbytkový kadherin
- polarita?
- **pohyb vrstev?**
- N-kadherin?
- jaderný β -katenin
- cytokeratiny a vimentin



mezenchymální buňky

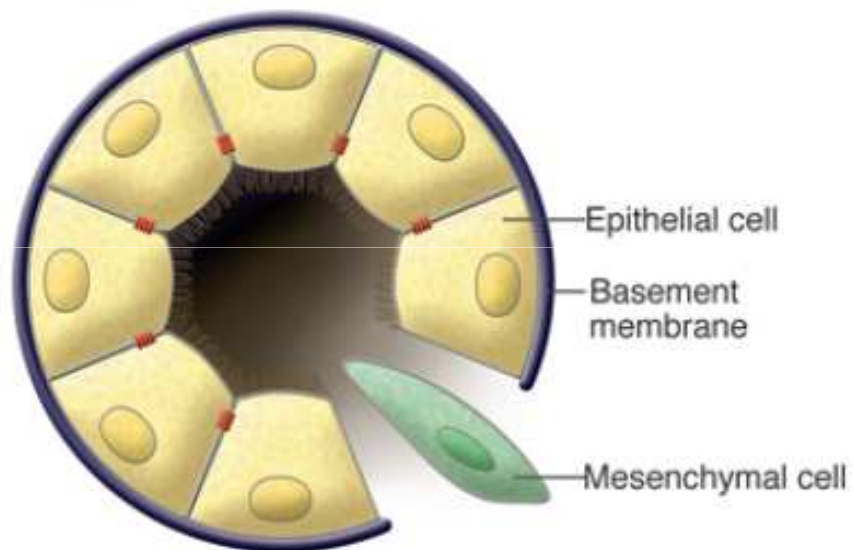
- žádné spoje
- fokální adheze
- rezistence k anoikis
- **pohyblivé a invazivní**
- předo-zadní polarita
- vimentin

EMT typu 1



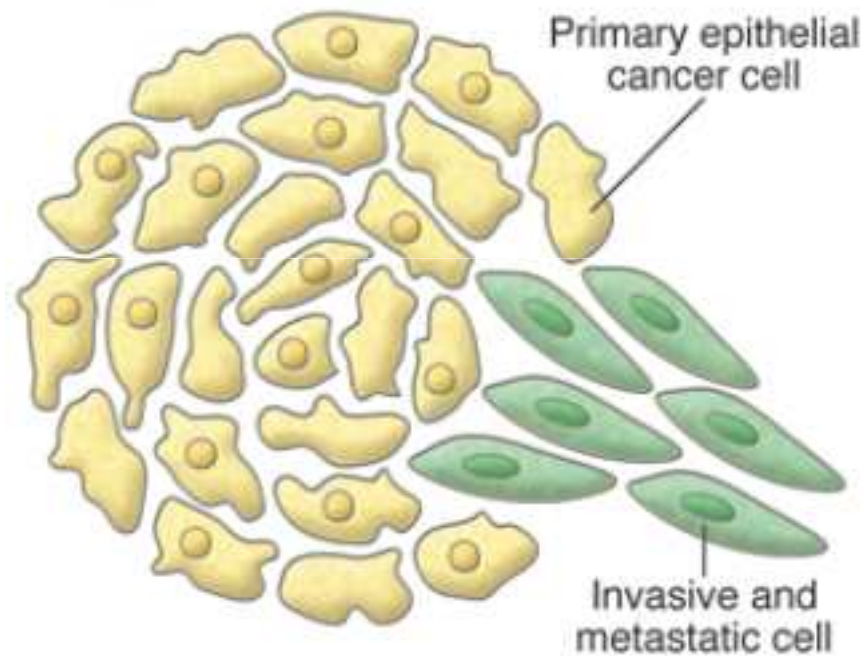
- souvisí s implantací embrya a gastrulací; vede ke vzniku mezodermu a endodermu a k pohyblivým buňkám neurální lišty
- nezpůsobuje fibrózu (zmnožení vaziva), neindukuje invazivní fenotyp
- generuje mezenchymální buňky, které mohou následně prodělat MET a vytvářet sekundární epitel

EMT typu 2



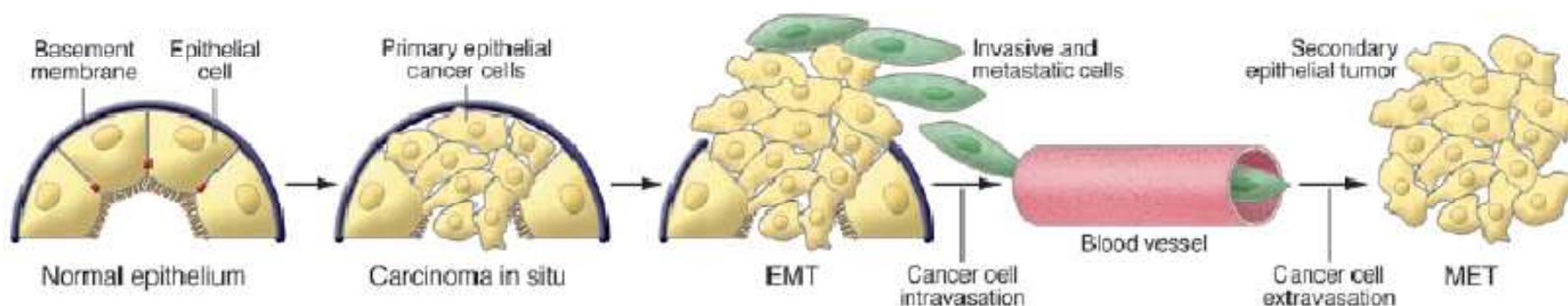
- souvisí s hojením ran, regenerací tkání a fibrózou
- program EMT začíná jako součást reparace tkání, generuje fibroblasty, které jsou nutné k rekonstrukci tkání
- fibróza je důsledkem přetrvávajícího zánětu, je to vlastně neustálý, nekončící proces hojení

EMT typu 3



- objevuje se u neoplastických buněk, které prodělaly genetické a epigenetické změny, a to hlavně v genech, které upřednostňují klonální růst a vývoj lokalizovaných nádorů
- buňky karcinomů prodávajících EMT typu 3 mohou invadovat a metastázovat
- stále není jasné, které přesné signály indukují EMT typu 3

Přínos EMT k progresi nádorů



epiteliální buňky ztrácejí polaritu, uvolňuje se jejich vazba na bazální membránu → EMT a angiogenní zapnutí → vstup nádorových buněk do cirkulace → opuštění krevního řečiště a vytvoření (mikro- nebo makro-) metastázy, což může zahrnovat MET a návrat k epiteliálnímu fenotypu

Degradace ECM

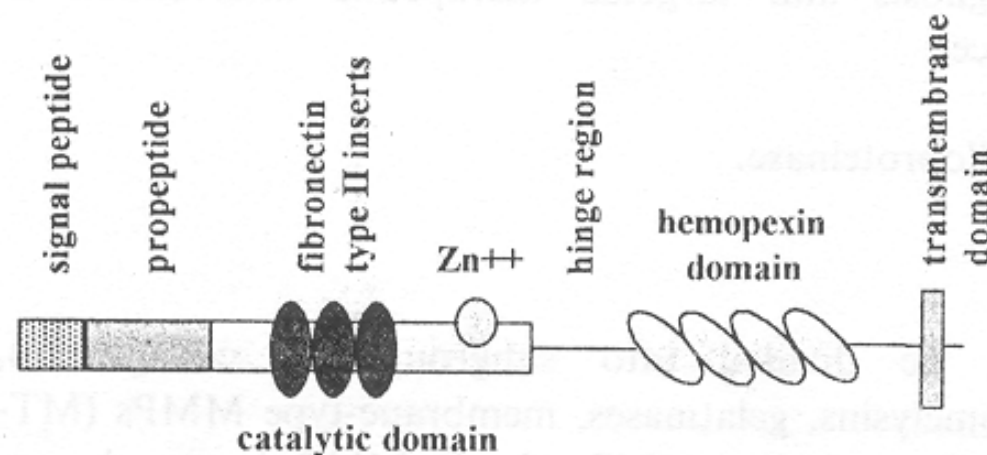
- Na degradaci ECM (a bazální membrány) se mohou podílet čtyři třídy proteolytických enzymů: **cysteinové proteázy, aspartátové proteázy, serinové proteázy a metaloproteinázy.**
- Ukazuje se, že především **metaloproteinázy ECM (MMPs)** hrají klíčovou roli při remodelaci ECM za fyziologických podmínek (při vývoji tkání plodu, postnatálně při opravách tkání). Jejich deregulovaná aktivita je podstatou mnoha patologií (artritida, astma, atheroskleróza, chronická tvorba vředů,...) a je také součástí procesu tvorby metastáz.

Metaloproteinázy ECM

- Podle struktury a substrátové specifity se dělí na podtřídy: **kolagenázy, stromelyziny, gelatinázy, membránové typy MMPs a ostatní MMPs**. Štěpí součásti ECM: kolageny, elastiny, proteoglykany, glykoproteiny,...
- Všechny MMPs mají charakteristickou multidoménovou strukturu a obsahují tyto domény: **signální peptid, propeptid** (který udržuje proMMP v latentní formě), **katalytickou doménu** (obsahuje vysoce konzervované vazebné místo pro **Zn²⁺**), tzv. **závěs** („hinge region“) bohatý na proliny, který spojuje katalytickou doménu a **hemopexin-like** doménu, která určuje substrátovou specifitu MMP.
- Katalytická doména gelatináz navíc obsahuje tři opakování **fibronectin-like** domény, která umožňuje vazbu na gelatin.

Metaloproteinázy ECM

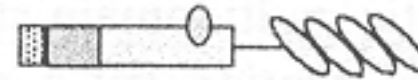
- MT-MMPs obsahují ještě **transmembránovou doménu**, která má 20AA hydrofobní část a 24AA intracelulární část. MMPs mohou být **spojeny s buněčným povrchem** také vazbou na specifické proteinázové receptory nebo mohou být **asociovány s integriny**.



Struktura MMPs

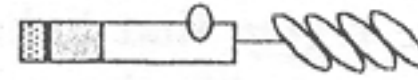
Collagenases

Collagenase-1	(MMP-1)
Collagenase-2	(MMP-8)
Collagenase-3	(MMP-13)

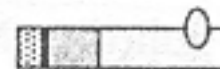


Stromelysins

Stromelysin-1	(MMP-3)
Stromelysin-2	(MMP-10)
Stromelysin-3	(MMP-11)
Metalloelastase	(MMP-12)



Matrilysin	(MMP-7)
------------	---------

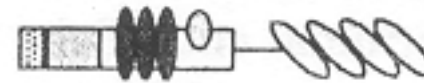


Struktura MMPs

Gelatinases

Gelatinase-A (72 kDa) (MMP-2)

Gelatinase-B (92 kDa) (MMP-9)



Membrane-type MMPs

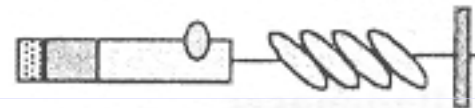
MT1-MMP (MMP-14)

MT2-MMP (MMP-15)

MT3-MMP (MMP-16)

MT4-MMP (MMP-17)

MT5-MMP (MMP-24)

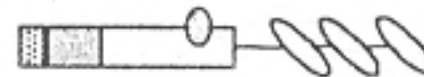
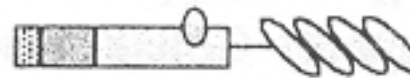


Other MMPs

MMP-19

Enamelysin (MMP-20)

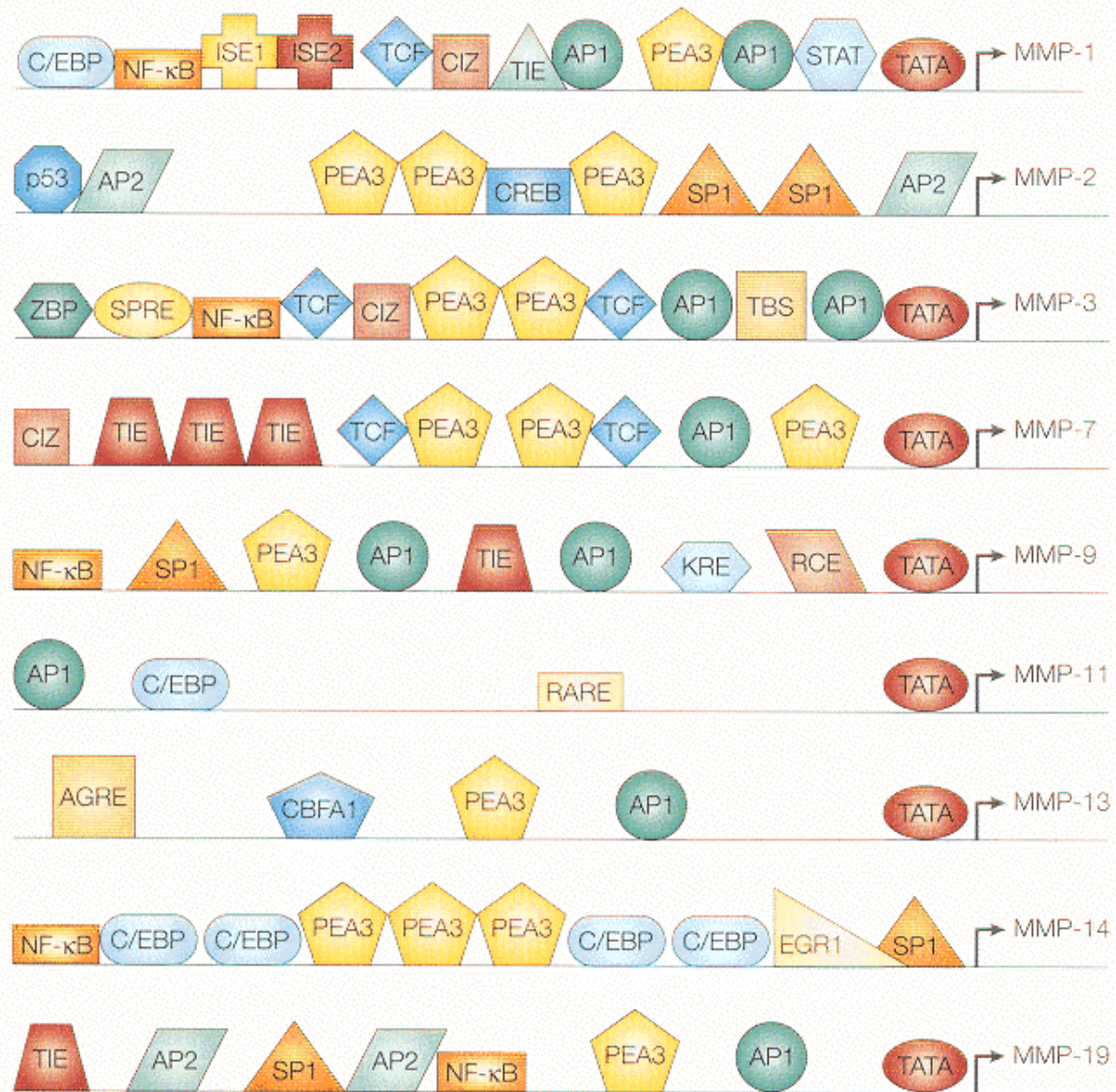
MMP-23



Regulace aktivity MMPs

- Většina MMPs není *in vivo* konstitutivně v buňkách exprimována.
- Exprese MMPs je regulována především **na úrovni transkripce**. Exprese většiny MMPs (-1, -3, -7, -9, -10, -12, -13 a -19) je indukována **růstovými faktory, cytokiny, onkogeny, hormony a kontaktem s ECM**. Promotory genů pro MMPs obsahují vazebná místa pro **AP-1**, pro transkripční faktory z rodiny **ETS** (kooperace AP-1 a ETS: MMP-1, -3 a -0), pro expresi především MMP-9 ve fibroblastech a vaskulárním hladkém svalstvu je klíčový **NF-κB**. Byla pozorována také regulace poločasu mRNAs růstovými faktory a cytokiny.

Regulace exprese MMPs na úrovni transkripce



Regulace aktivity MMPs

- Většinou jsou MMPs sekretovány jako latentní prekurzory (zymogeny). **Proteolytická aktivita** MMPs je uvolněna proteolytickým štěpením v extracelulárním prostoru.
- Aktivita MMPs v pericelulárním prostředí je přísně regulována **nespecifickými** proteínázovými inhibitory, např. **α 1-proteínázovým** inhibitem a **α 2-makroglobulinem** a
- **specifickými** tkáňovými inhibitory **TIMPs** („tissue inhibitors of metalloproteinases“). Popsány nejméně 4 TIMP-1, -2, -3 a -4 s podobnou strukturou. Váží se do katalytické domény v místě vazby Zn^{2+} v poměru 1:1. Jsou exprimovány různými buněčnými typy. TIMP-1, -2 a -4 jsou solubilní, TIMP-3 je asociován s ECM.

MMPs a tvorba metastáz

- Existuje pozitivní korelace mezi expresí MMP a metastatickým potenciálem maligních nádorů.

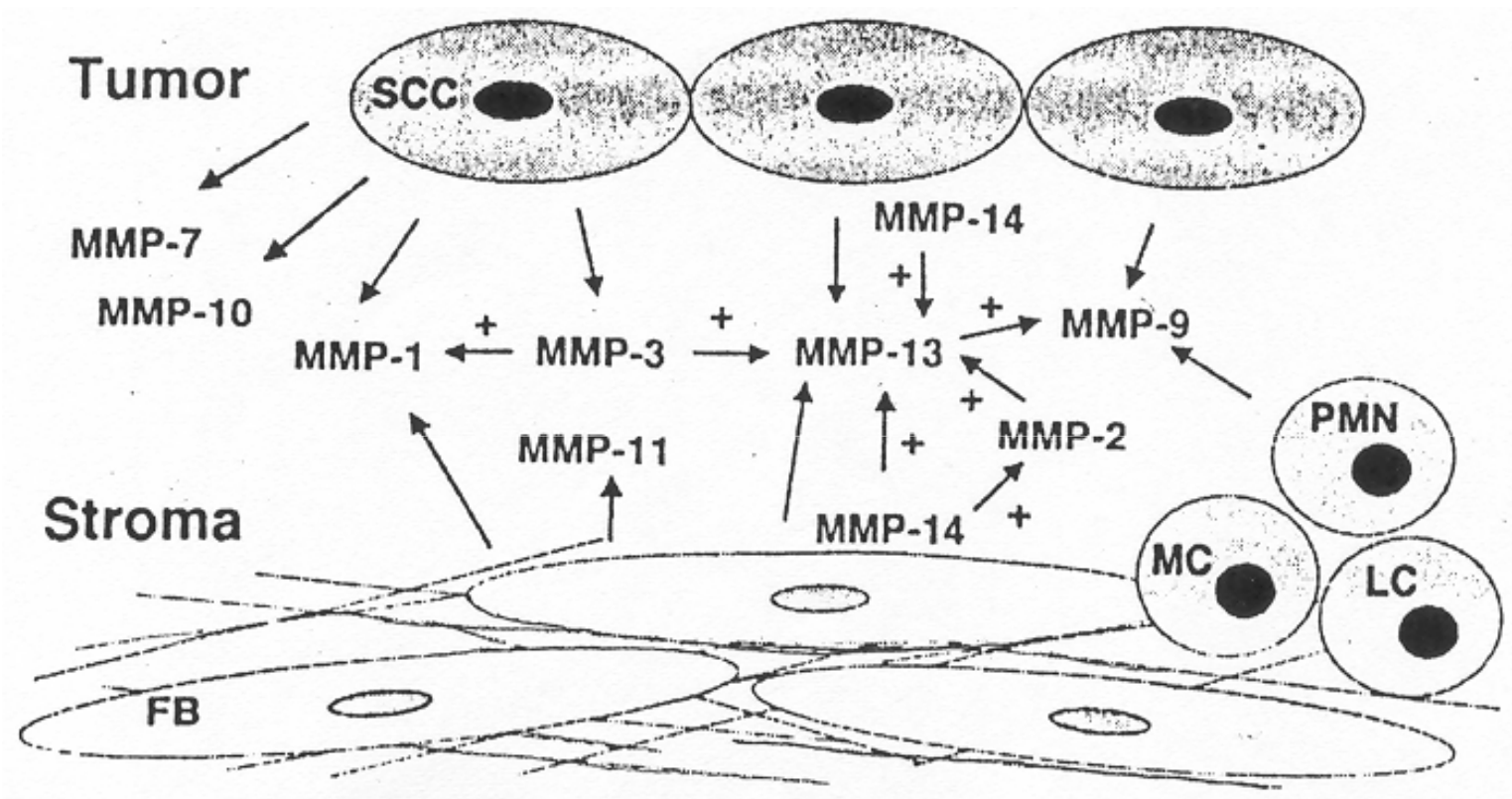
Příklady:

- Exprese MMP-1 asociuje se špatnou prognózou u kolorektálních nádorů a nádorů jícnu.
- MMP-13, MMP-7 a MTI-MMP jsou specifické pro metastazující nádory odvozené z keratinocytů.
- MMP-2 je markerem maligní transformace epiteliálních buněk děložního čípku.

MMPs a tvorba metastáz

- U maligních nádorů je většina MMPs produkována **stromálními** buňkami spíše než samotnými nádorovými buňkami.
 - Nádorové buňky mohou sekretovat faktory (např. MMP induktor EMMPRIN), které potencují expresi MMP-1, -2 a -3 fibroblastů. Také další cytokiny a růstové faktory sekretované zánětovými buňkami, které infiltrují nádor, ale i nádorovými a stromálními buňkami, mohou modulovat expresi MMPs.
- ⇒ Při invazi maligního nádoru kooperují nádorové buňky, stromální buňky a zánětové buňky.

Různé buňky produkují různé MMPs



+ - aktivace latentní MMP

LC - lymphocyte

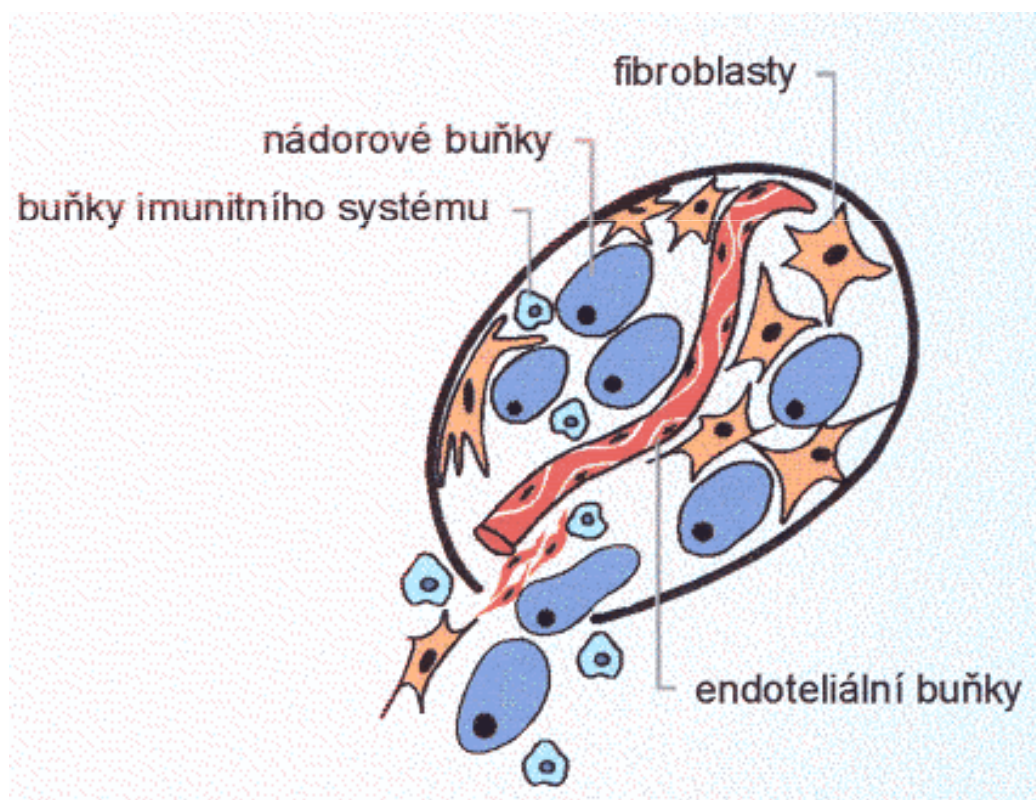
PMN - polymorphonuclear leukocyte

MC - monocyte

Při remodelaci ECM kooperují různé buňky

* * *

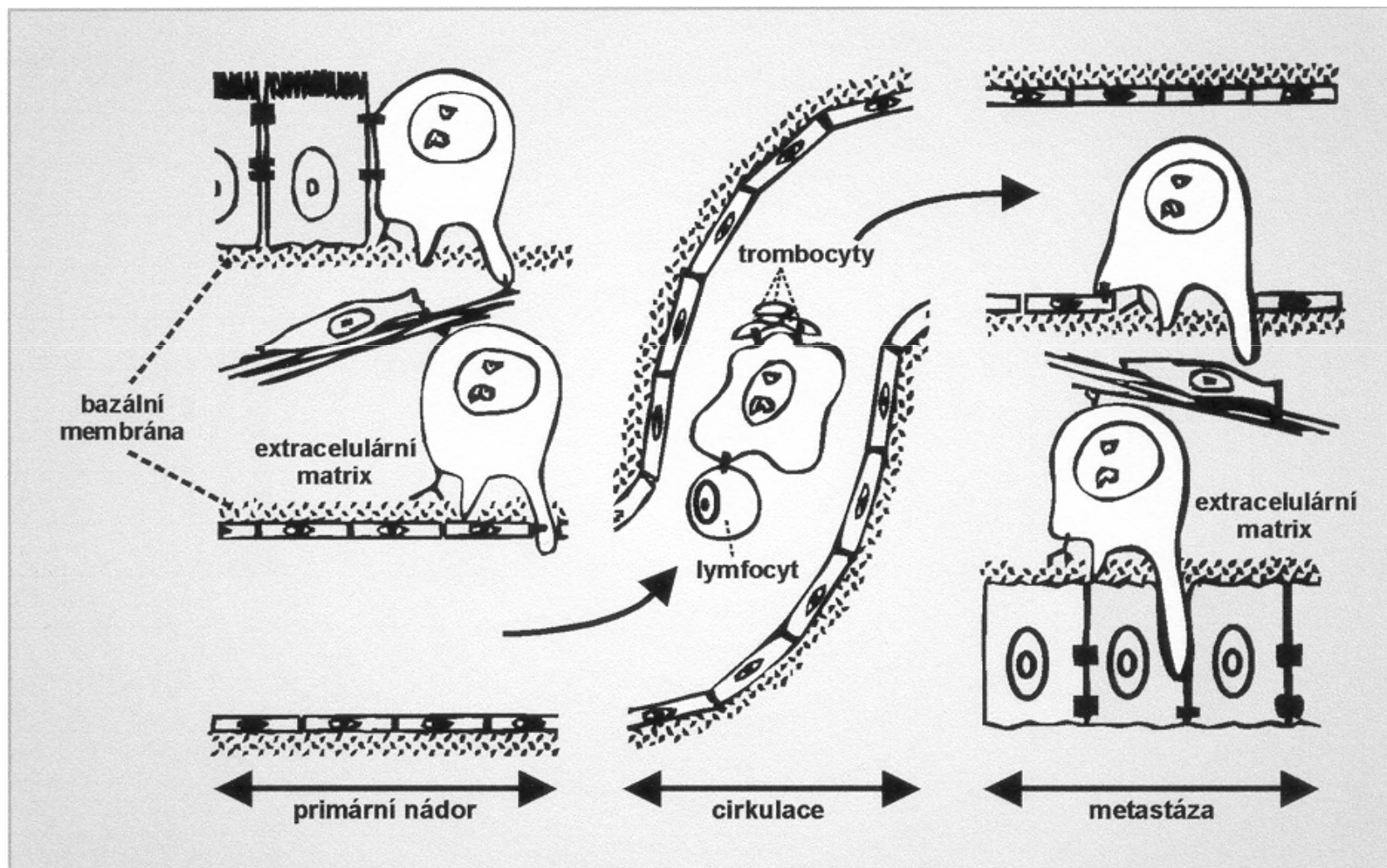
Nádor je komplexní tkáň



Úloha adhezivních komplexů při tvorbě metastáz

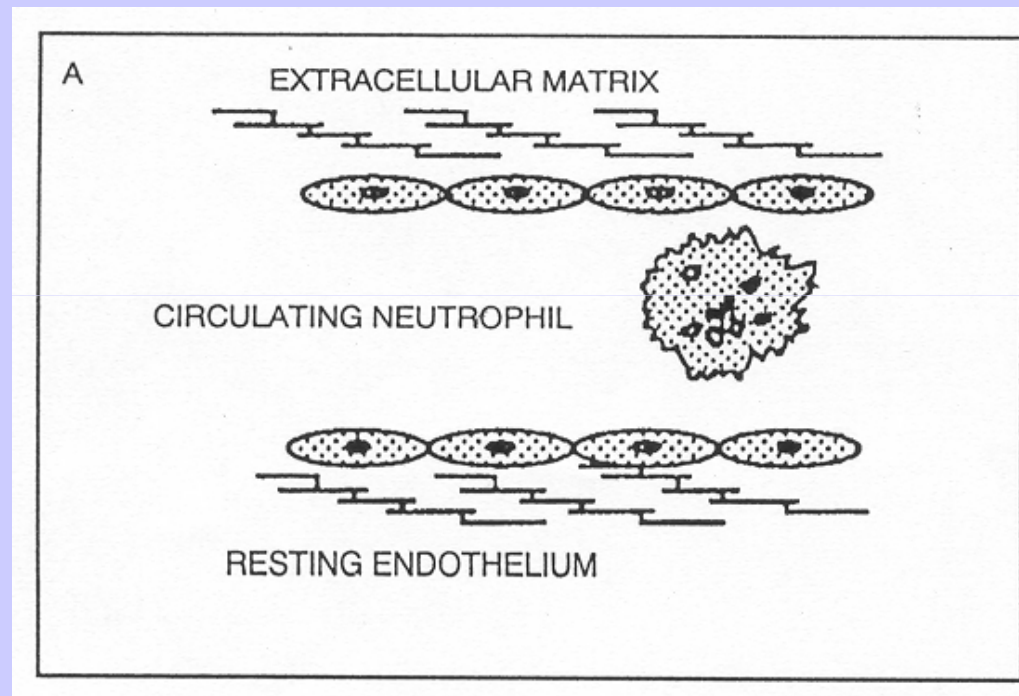
- Každý krok při tvorbě metastáz zahrnuje zrušení stávajících a ustavení nových adhezivních interakcí.
- Adhezivní interakce jsou funkcí buněčných receptorů, jejichž exprese a funkce je přísně regulována.
- Nádorové buňky jsou obecně méně adhezivní než buňky normální a vytvářejí méně extracelulární matrix.

Metastatická kaskáda



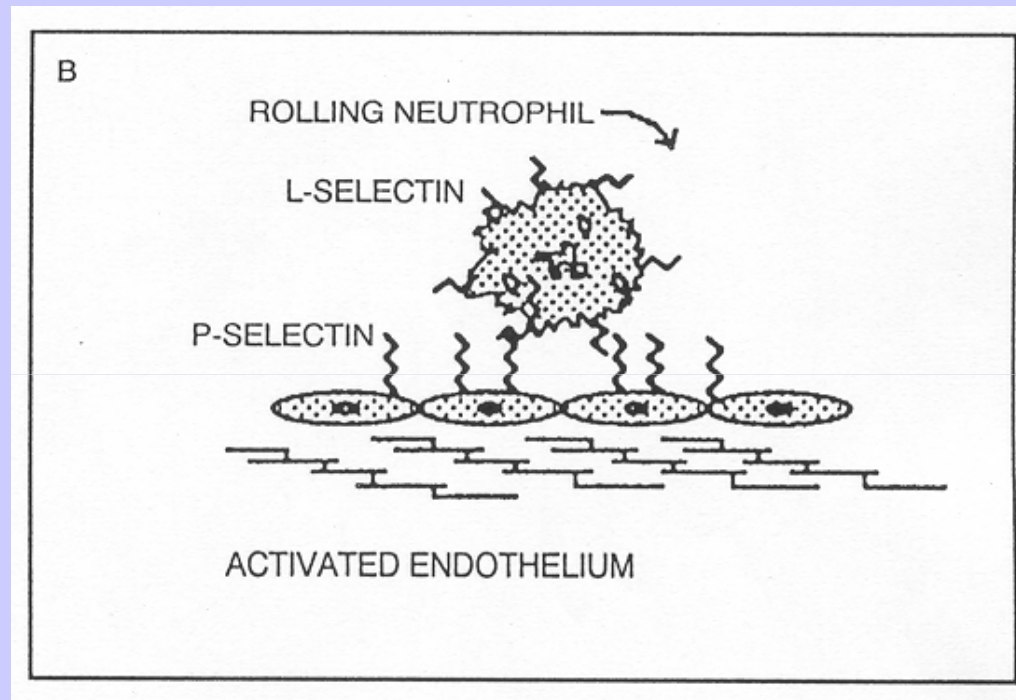
Zánětová kaskáda - A

Může sloužit jako **mechanistické paradigma** pro model metastatické kaskády.



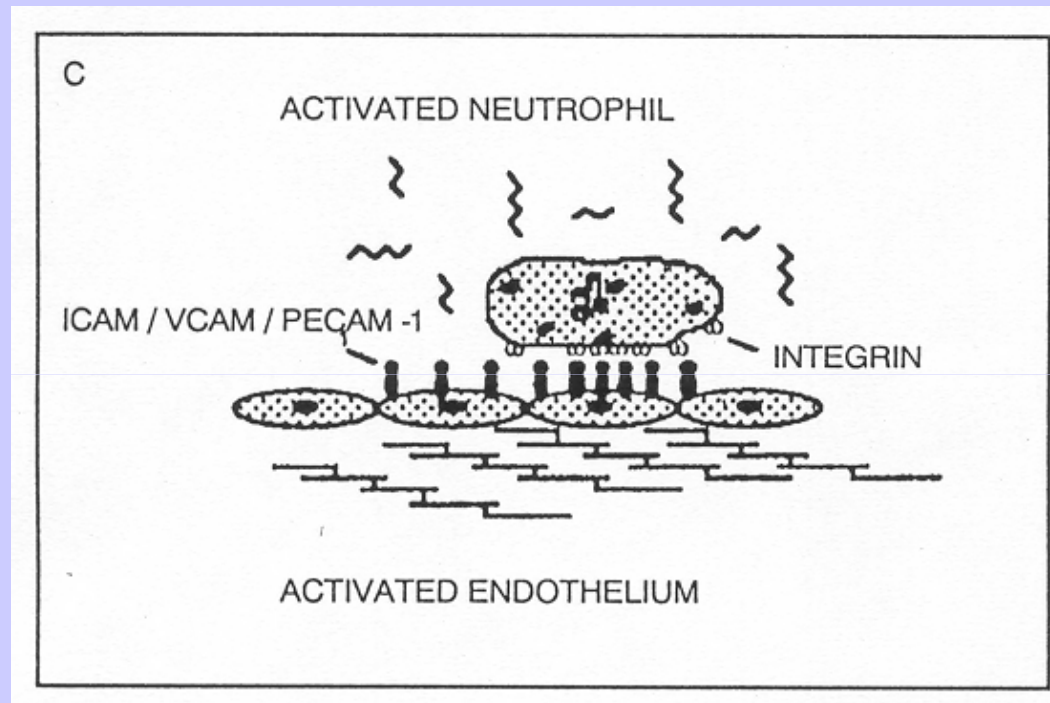
Volně cirkulující neutrofil, žádná interakce s endoteliálními buňkami.

Záněťová kaskáda - B



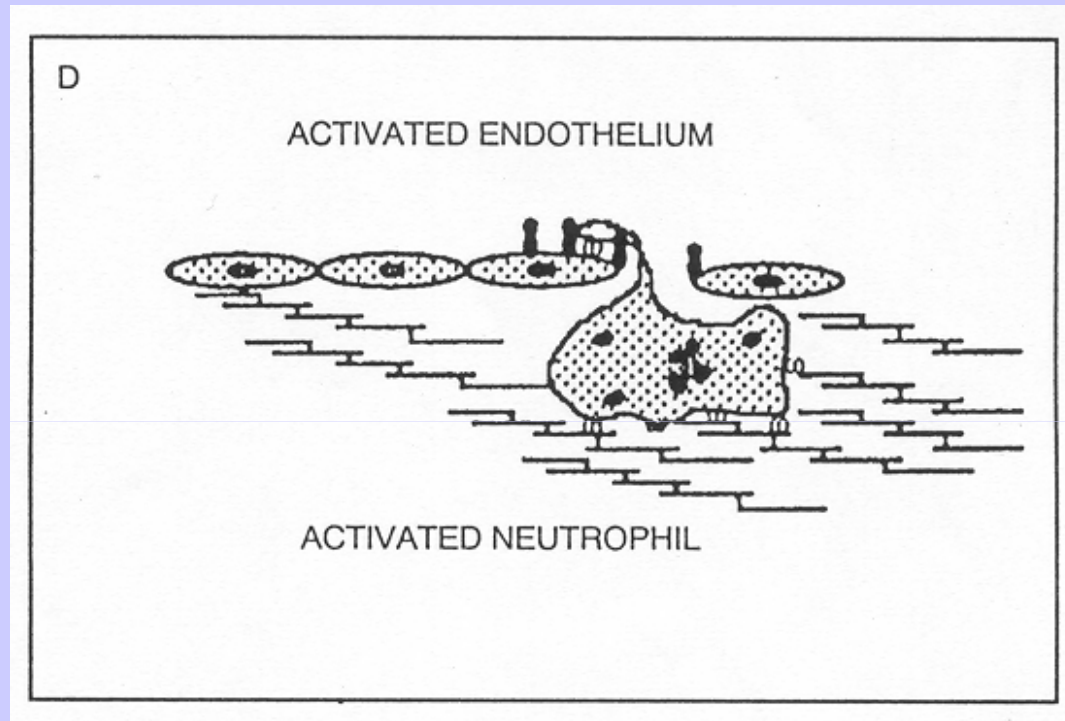
Následkem infekce nebo poranění, působením histaminů, cytokinů,... začnou endoteliální buňky exprimovat specifické receptory - **selektiny** - ty interagují se specifickými receptory na povrchu neutrofila a zpomalují ho.

Záněťová kaskáda - C



Dochází k expresi specifických receptorů - **integrinů** - na povrchu neutrofila, a také specifických receptorů - členů **imunoglobulinové nadrodiny** - na povrchu endoteliálních buněk, dojde k vzájemné adhezi. Přestávají se exprimovat **selektiny**.

Záněťová kaskáda - D



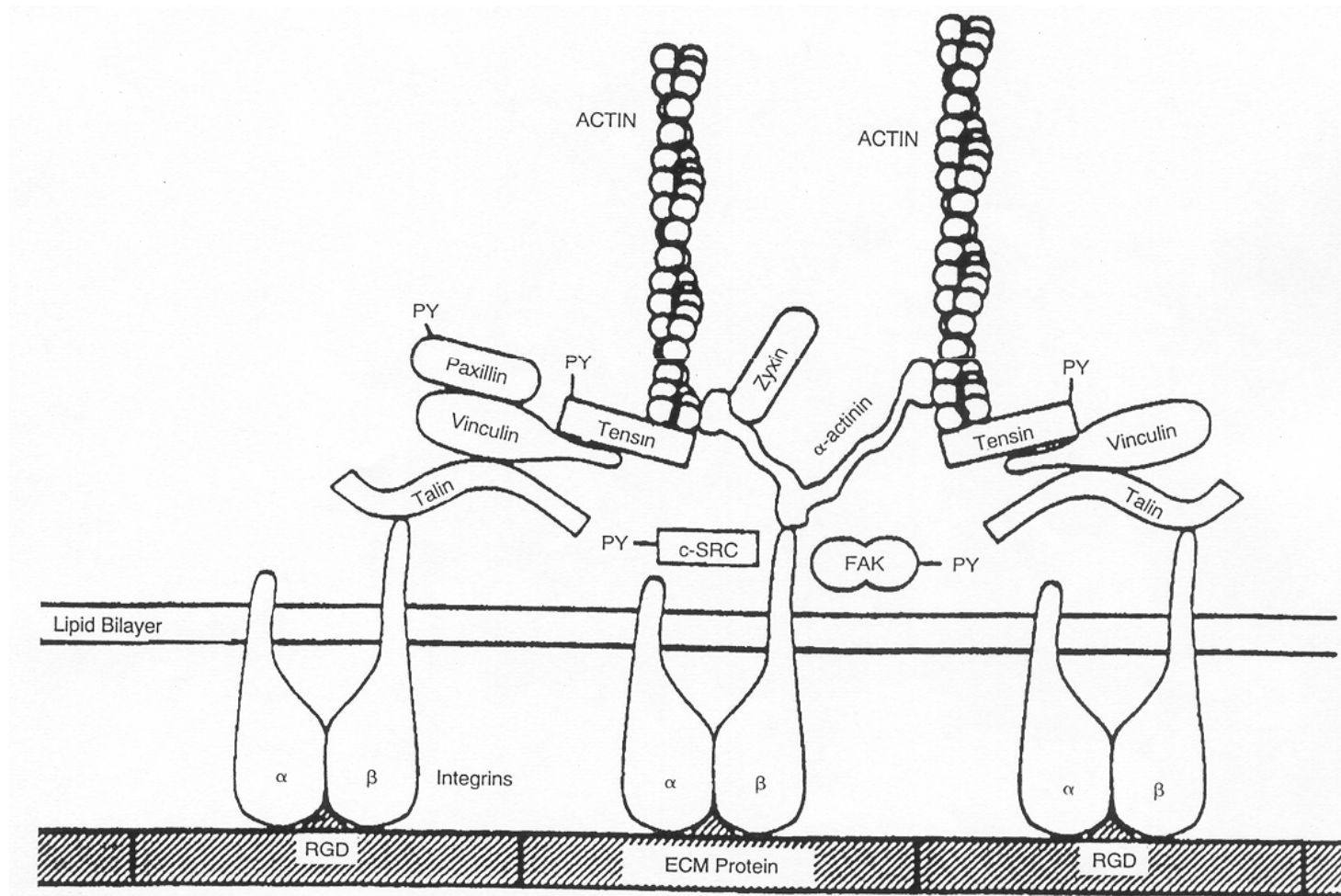
Pohyb neutrofila skrz endoteliální buňky je spojen s expresí další sady specifických receptorů - např. **CD44**.

Obecná struktura adhezivního komplexu

Klíčovou strukturou adhezivního komplexu je **receptor**.

- **Extracelulární doména** interaguje s příslušným ligandem: signální molekulou nebo specifickou strukturou ECM nebo sousední buňky.
- **Hydrofobní transmembránová doména**.
- **Cytoplazmatická doména** má regulační elementy zajišťující transdukcí signálu z extracelulárního prostředí do buňky (proteinkinázy, fosfatázy, proteiny G, fosfolipázy) a interaguje s některými složkami cytoskeletonu.

Obecná struktura adhezivního komplexu



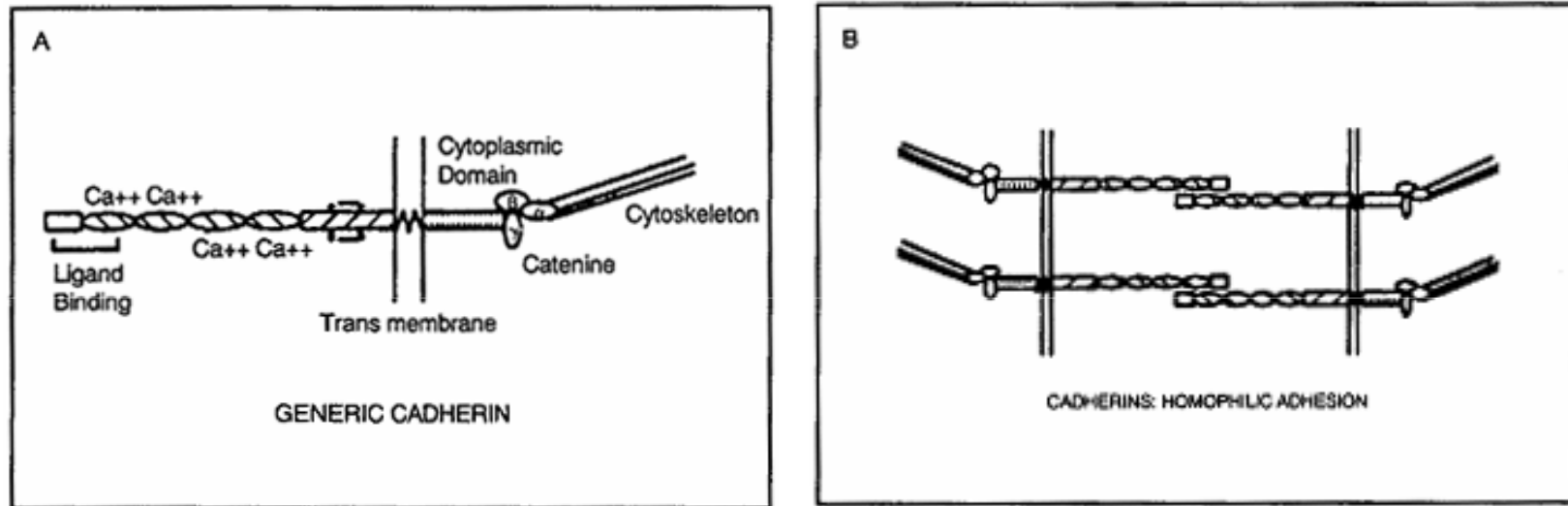
Hlavní skupiny adhezivních receptorů

- Kadheriny
- Integriny
- Immunoglobulinová nadrodina
- Selektiny
- Další adhezivní receptory (CD44)

Kadheriny

- Nadrodina jednořetězcových transmembránových glykoproteinů, které zprostředkovávají **homotypické** adherence **buňka-buňka**, a to svými N-koncovými extracelulárními doménami a kalcium dependentně.
- Hrají klíčovou roli v rozpoznávání buněk a jejich třídění během vývoje.
- Jsou exprimovány ve vysokých hladinách ve všech pevných tkáních.
- Existuje mnoho různých kadherinů, nejlépe prostudovány a popsány jsou **E-kadheriny**.

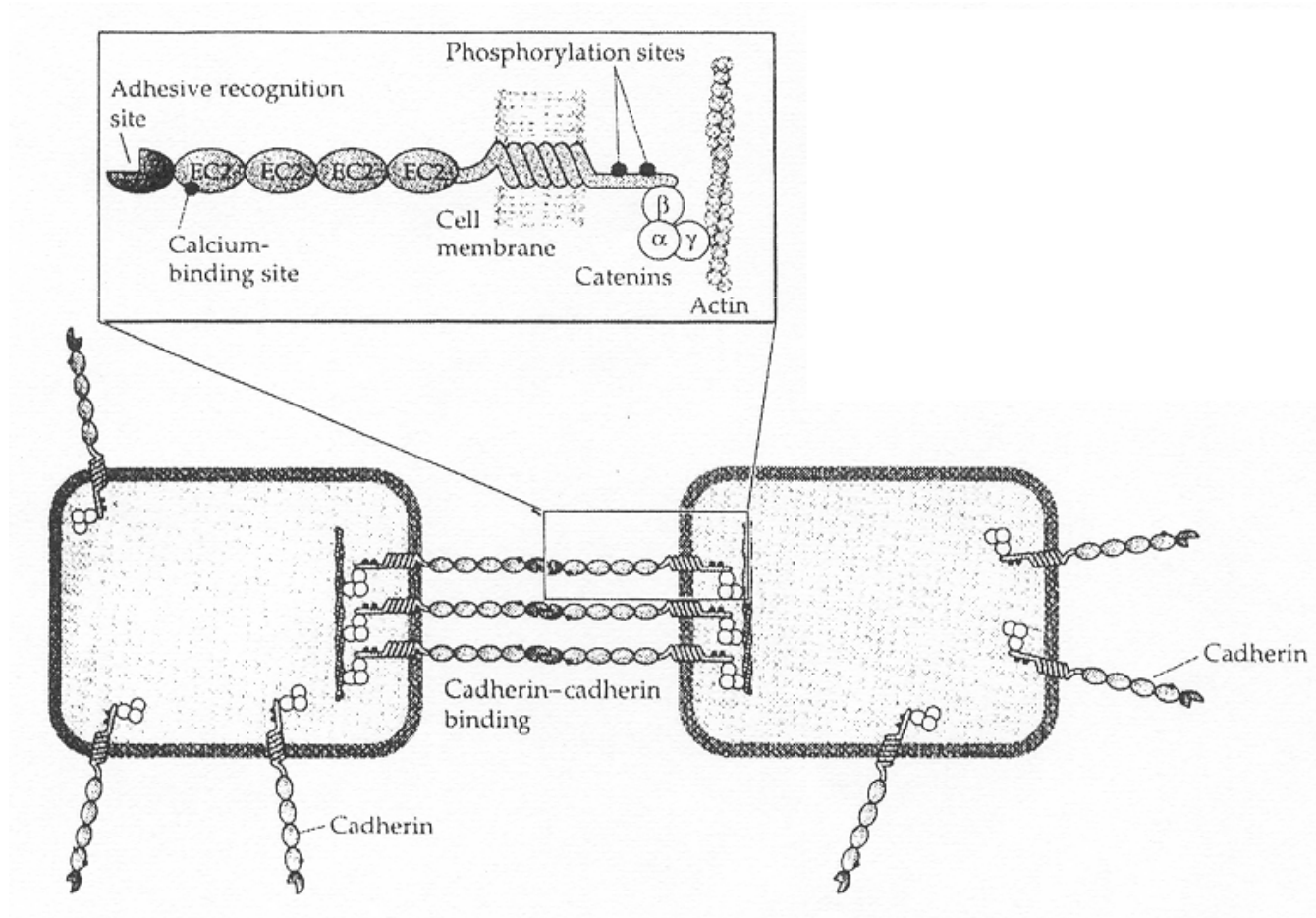
Obecná struktura kadherinů



N-koncová část kadherinů zprostředkovává homofilní interakce.

Intracelulární C-koncová část interaguje s β -kateniny a γ -kateniny, ty asociují s α -kateniny a společně zprostředkovávají vazbu kadherinů na aktinové složky cytoskeletonu.

Struktura a funkce kadherinů při mezibuněčných interakcích



E-kadherin a nádory

- Hlavní adhezivní molekula **epiteliálních (E)** buněk.
- Během **morfogeneze** je exprese kadherinů modulována: buňky se pohybují z jedné buněčné vrstvy do druhé, a to je vždy spojeno se ztrátou exprese původního kadherinu a s indukcí exprese jiného kadherinu.
- Ztráta exprese E-kadherinu je často detekována u epiteliálních nádorů. Ztráta exprese nebo funkce E-kadherinu výrazně koreluje s invazivitou a tvorbou metastáz nádorů - často koinciduje s „přepnutím“ benigního nádoru na invazivní typ.

Dědičný difúzní nádor žaludku - HDGC

- „Hereditary diffuse gastric cancer“
- Autozomálně dominantní syndrom související s vrozenými mutacemi genu **CDH1**, který kóduje E-kadherin.
- Především histologicky difúzní, málo diferencované nádory žaludku, ale také zvýšené riziko kolorektálních nádorů a nádorů prsu.
- Mutace *CDH1* časté (9/16) také u sporadických difúzních nádorů žaludku.
- Poměrně vzácně (1/9/16) se vyskytuje „LOH“ *CDH1* - častá (9/16) metylace promotoru *CDH1* jako „druhý zásah“.

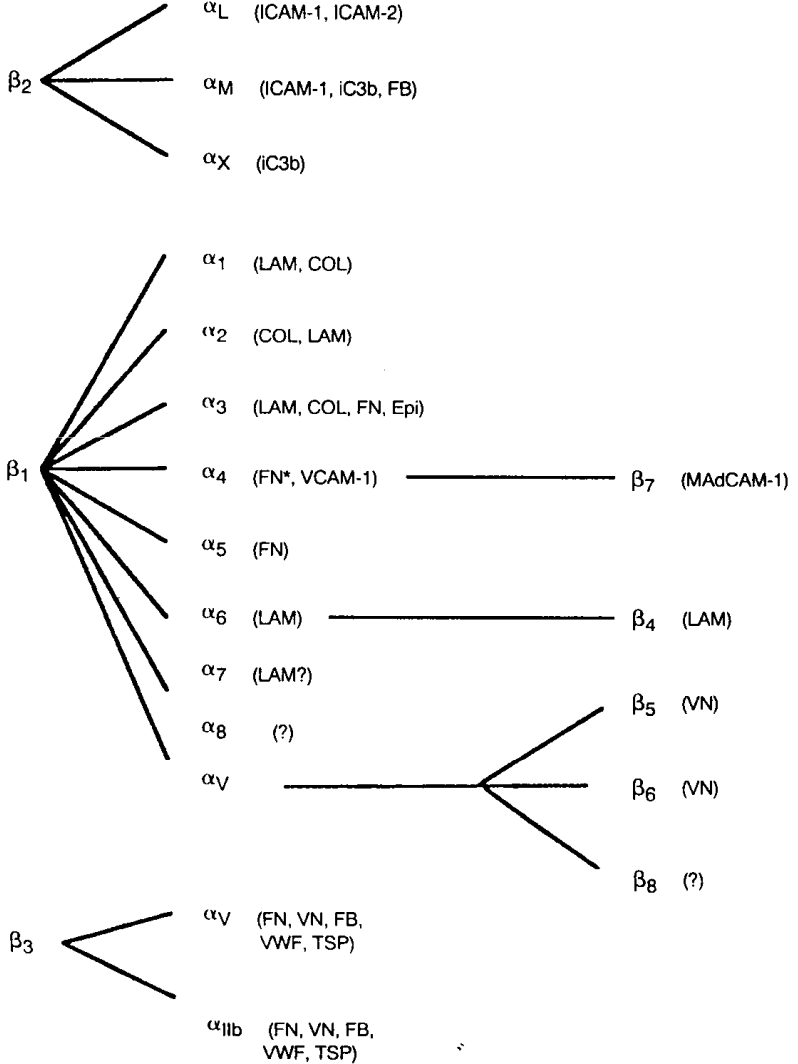
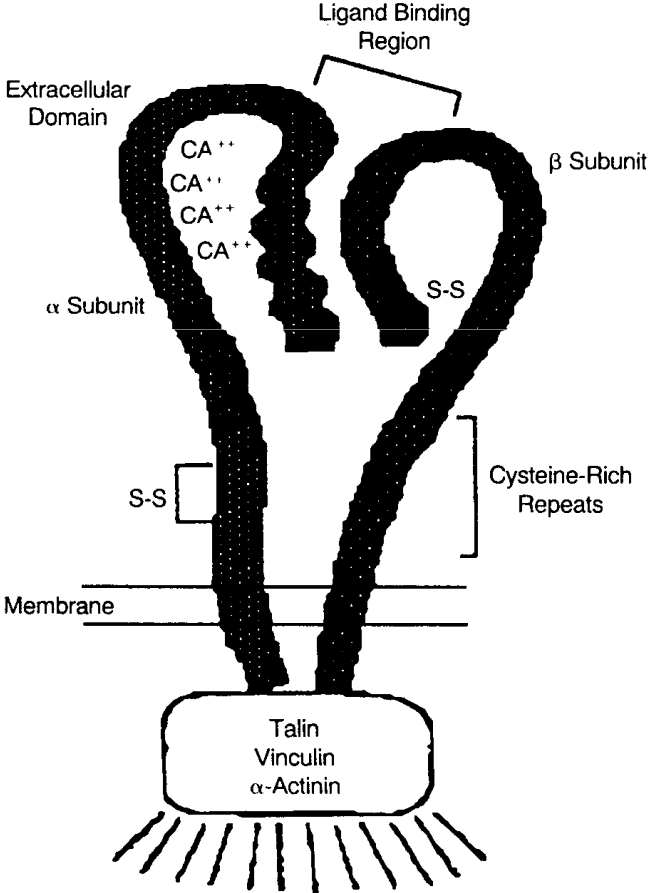
Dědičný difúzní nádor žaludku - HDGC

- Agresivní nádory - zřejmě souvisí se zvýšenou ochotou metastázovat.
- Mutace *CDH1* se ale zřejmě uplatňuje i v iniciačních stádiích kancerogeneze - zřejmě souvislost s regulací dráhy **WNT/ β -katenin**:
 - funkční E-kadherin inhibuje progresi buněčného cyklu - pravděpodobně downregulací cytoplazmatického β -kateninu, a to nezávisle na zprostředkování buněčných adhezí

Integriny

- Velká skupina heterodimerických receptorů složených z větších a menších řetězců. Řetězce nekovalentně asociují a tvoří nejméně 24 integrinů.
- Popsáno 18 různých α a 8 různých β řetězců.
- Mají velkou extracelulární doménu, krátkou transmembránovou a relativně malou intracelulární doménu.
- Nejvýznamnější skupina molekul odpovědná za adhezi **buňka-ECM**, ale také **buňka-buňka**. 18 různých integrinů se váže na proteiny ECM, další integriny na proteiny na povrchu jiných buněk. Některé integriny zprostředkovávají oba typy interakcí.

Struktura integrinů



Specifita integrinů

- Řada integrinů má stejné ligandy a většina integrinů je označována za „promiskuitní“ - mají několik ligandů, které rozpoznávají.
- Historicky první specifické místo rozpoznávané integriny byla sekvence **RGD** nalezená u fibronektinu, postupně nalezená i u dalších proteinů ECM, virových proteinů, toxinů a růstových faktorů. Většina integrinů ale tuto sekvenci nerozpoznává!
- Většina sekvencí rozpoznávaných integriny jsou krátké lineární sekvence často obsahující acidické aminokyseliny.

Funkce integrinů

Integriny jsou velmi **universální receptory**: transdukuje signály:

- z vnějšku buňky dovnitř - regulují pohyb, morfologii, proliferaci a genovou expresi
- z vnitřku buňky směrem ven - podle vnitřních okolností může být měněna vazebná specifita integrinů

Proteiny interagující s integriny:

- komponenty cytoskeletonu: **tensin, α -actinin, talin, vinculin, F-aktin, paxillin, FAK**
- molekuly různých signálních drah: **FAK, Src-like kinázy, Ras, MAP kinázy**

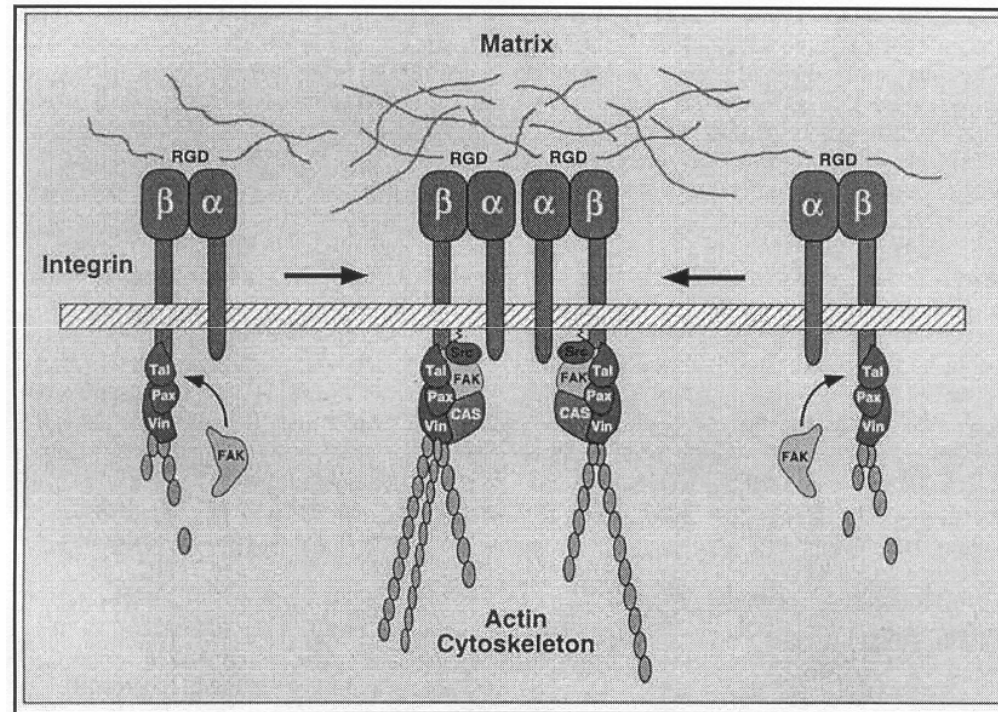
Funkce integrinů

Existuje funkční vztah mezi integriny a **metaloproteinázami**:

- Některé integriny ovlivňují expresi některých MMP genů.
- Některé integriny ovlivňují sekreci některých MMPs.
- Některé integriny ovlivňují aktivitu MMPs.

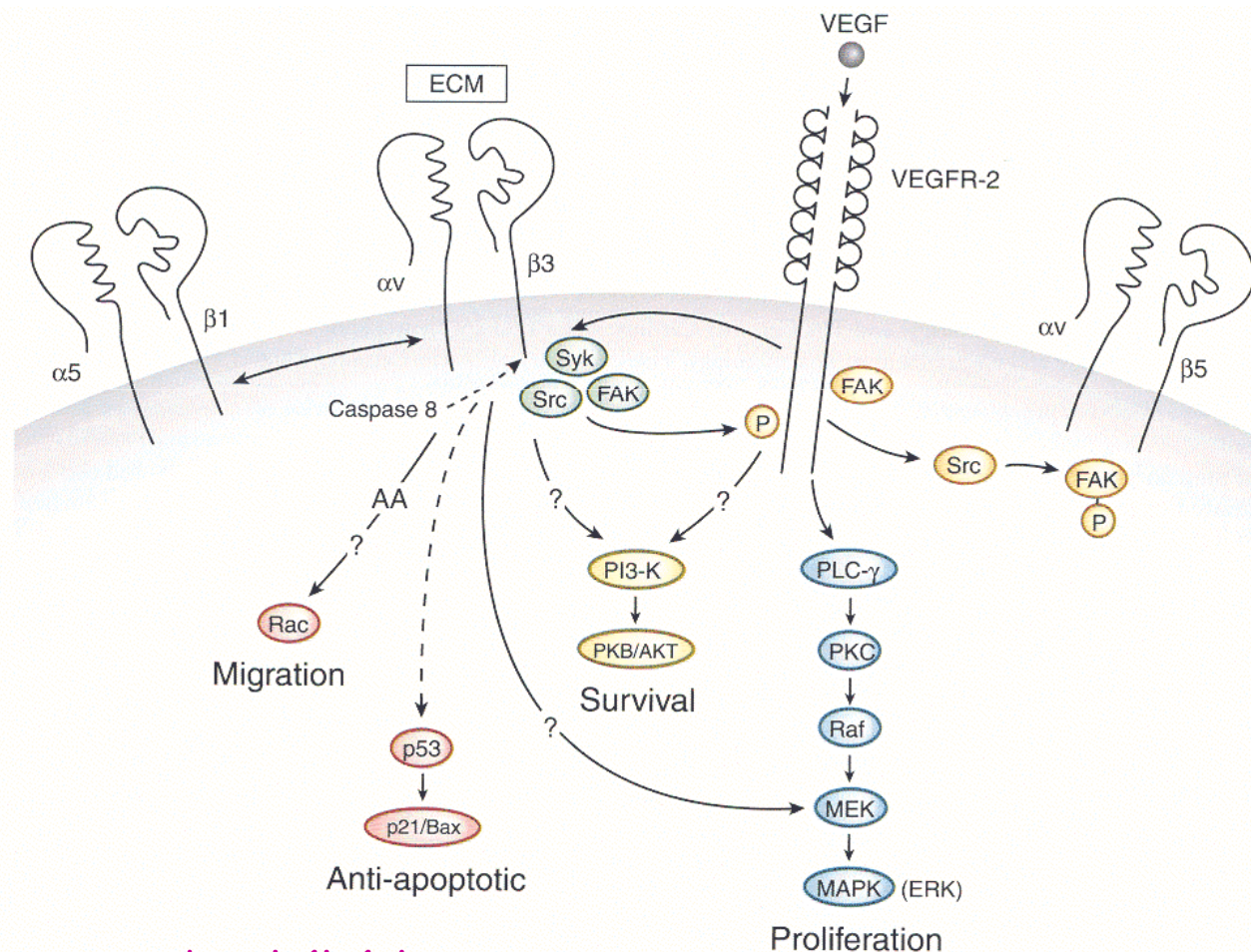
Některé komponenty ECM aktivují integriny a následkem je specifická degradace ECM: „**integrin-guided proteolysis**“

Po aktivaci vazbou ligandu integriny „clusterují“ a tvoří fokální adhezní místa



To vede k akumulaci cytoskeletálních součástí do fokálních adhezních míst (což dále potencuje „clusterování“ integrinů). Následuje fosforylace tyrozinů na substrátech a dále lokalizace signálních molekul do těchto oblastí.

Signalizace integriny funguje v synergii se signalizací dalšími receptory

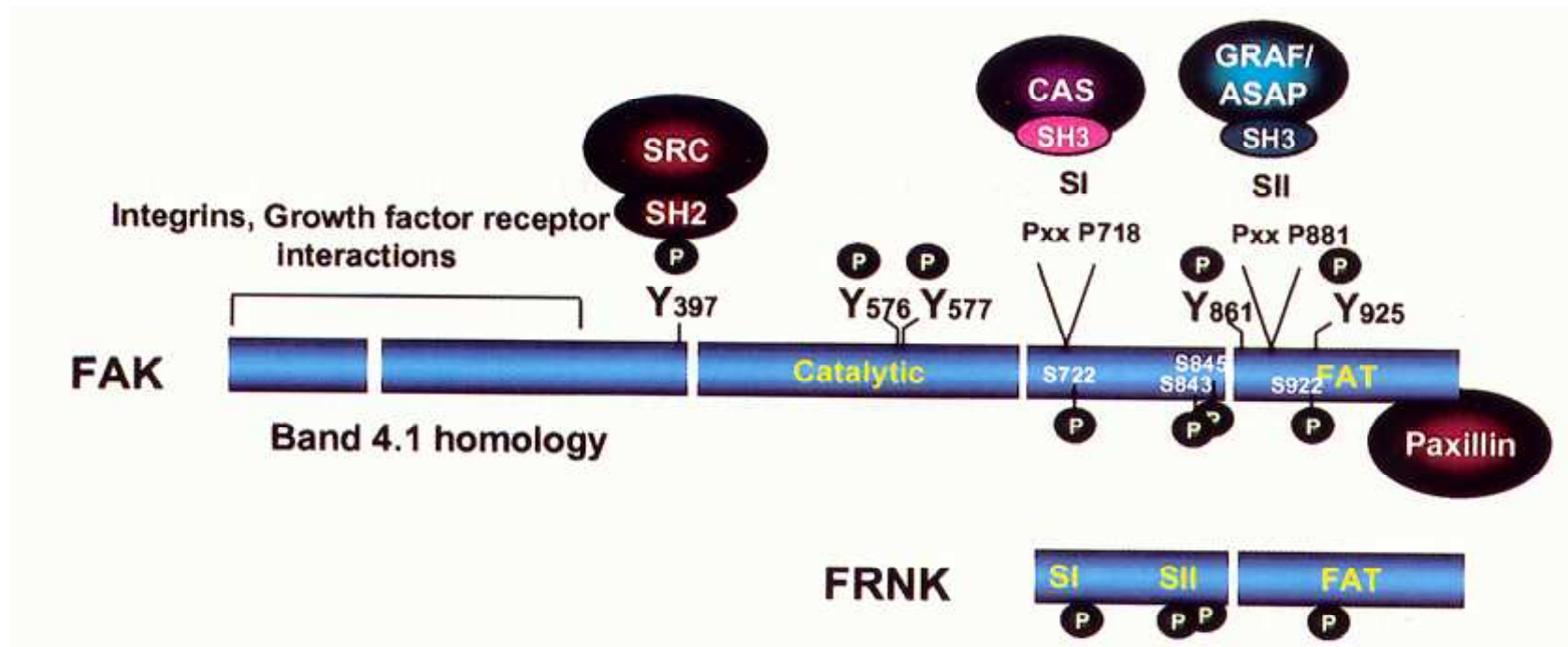


Synergie mezi integriny endoteliálních buněk a VEGFR během angiogeneze.

FAK - „focal adhesion kinase“

- Nereceptorová tyrozin protein kináza. První, o které se zjistilo, že je aktivovaná po aktivaci integrinů.
- Po aktivaci se FAK autofosforyluje na **Tyr397** a tím se vytvoří vazebné místo pro SH2 doménu **Src** nebo **Fyn**.
- Src potom fosforyluje další substráty včetně cytoskeletálních komponent, především **paxillinu** a **tensinu**.
- FAK hraje klíčovou roli při přenosu **signálů přežití** z ECM (anoikis) - pravděpodobně inaktivací proapoptotických proteinů **Bad** a **prokaspázy-9**.

Struktura FAK kinázy



N-koncová doména: interakce s integriny, růstovými faktory

centrální doména: katalytická

C-koncová doména: interakce protein-protein

Integriny a nádory

- Změny exprese nebo funkce integrinů popsány během proměny nádorů v metastazující invazivní formy.
- Změny exprese nebo funkce integrinů způsobují „anchorage-independence“: za normálních okolností právě integriny spouštějí anoikis (apoptózu v důsledku ztráty adheze).
- Vztah ECM-integriny se výrazně uplatňuje také během angiogeneze nádorů: přežití angiogenních endoteliálních buněk nádorových cévek je závislé na integrinech α_v .

Pohyb nádorových buněk vaskulárním systémem

- Během tvorby metastáz nádorové buňky nejdříve uvolní své vazby s ostatními buňkami v nádoru (**kadheriny**) a prostoupí ECM směrem ke krevnímu systému (**integriny**).
- Pro vstup do vaskulatury („intravasation“) musí prostoupit také vaskulárním endoteliem a v této fázi se uplatňují především **selektiny** a členové **imunoglobulinové nadrodiny** (včetně VCAM-1, ICAM-1, -2 a -3 a dalších), integriny, CD44, glykoproteiny nalezené u lymfocytů a orgánově specifické endoteliální adhezivní molekuly jako např. **Lu-ECAM-1** („lung-endotelial cell adhesion molecule“).

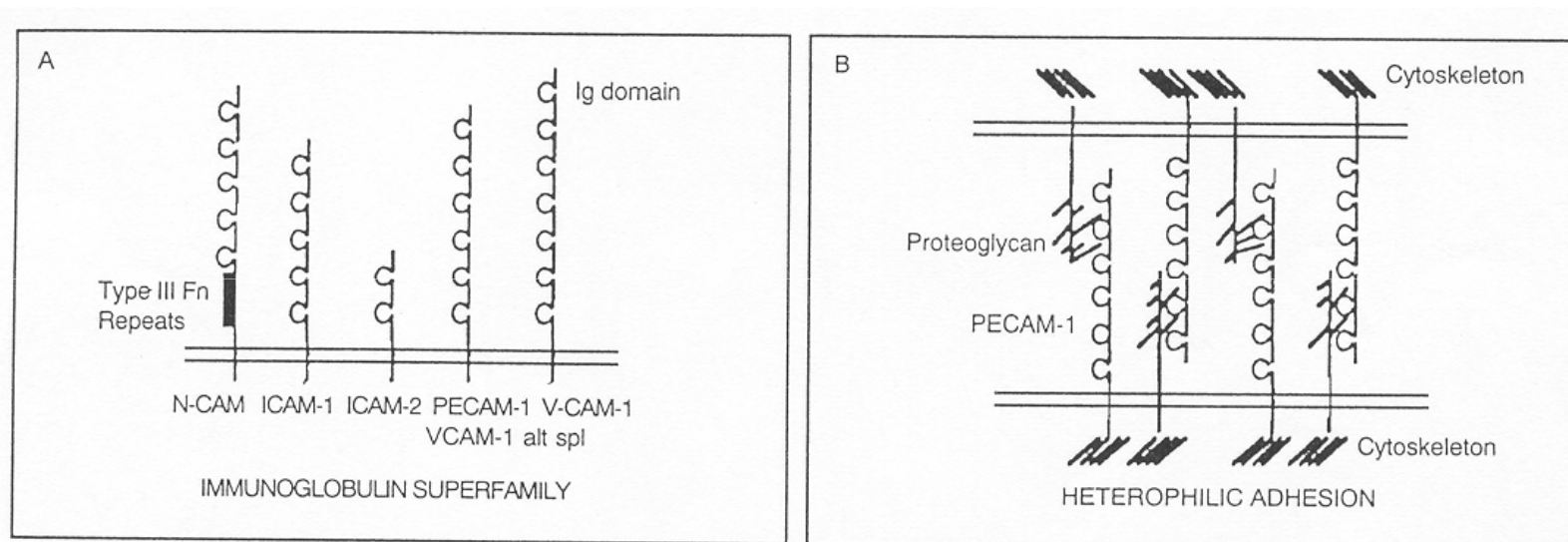
Selektiny

- Fungují prostřednictvím terminální kalcium-dependentní lektinové domény a jsou především zodpovědné za heterotypické adheze buňka-buňka, a to především mezi endoteliálními a krevními buňkami.
 - V klidu jsou buňky schopny adherovat prostřednictvím celé řady ligandů. Ale **cirkulující** buňka může být zpomalena (a získat tak možnost interagovat s dalšími ligandy) pouze interakcí selektinů s endoteliem.
- ⇒ Selektiny hrají roli v adhezi metastatických buněk k endoteliu.

Receptory imunoglobulinové nadrodiny

- Zprostředkovávají **homotypické** a **heterotypické** adheze **buňka-buňka**.
- Po zpomalení nádorových buněk selektiny a CD44 nádorové buňky pravděpodobně pevněji interagují s endoteliálními buňkami a následně vstupují do stroma cílového orgánu. V této fázi se zřejmě výrazněji uplatňují právě receptory imunoglobulinové nadrodiny.

Obecná struktura proteinů imunoglobulinové nadrodiny



Receptory tvořeny několika „immunoglobulin-like“ repeaty, pospojovanými disulfidickými můstky.

Některé členové imunoglobulinové nadrodiny

Velmi divergentní skupina receptorů:

- imunoglobuliny
- hlavní histokompatibilní receptory
- receptory T-buněk
- receptory spojené s různými neoplasiemi:
 - CEA** - onkofetální protein („carcinoembryonic antigen“)
 - DCC** - „deleted in colorectal carcinoma“
- receptory odpovědné za „cell-cell recognition“:
 - NCAM** - „neural cell adhesion molecule“

Některé členové imunoglobulinové nadrodiny

- Receptory spojené s pohybem buněk:
 - ICAM-1**, -2, 3 - „intercellular adhesion molecule“
 - VCAM-1** - „vascular cell adhesion molecule“
 - PECAM-1**
- a další“
 - MAdCAM-1** - „mucosal addressin cell adhesion molecule“

Imunoglobulinové receptory a nádory

- Při metastázování nádorů se nejvíce uplatňují receptory odpovědné za interakce s endoteliálními buňkami - např. **ICAMs** (např. melanomy: korelace exprese ICAM-1 s metastatickým potenciálem) a **VCAM-1**.
- **CEA** - historicky prominentní receptor - spojen s progresí kolorektálních karcinomů.
- **NCAM** - spojen s progresí některých neuroendokrinních nádorů, Wilmsova nádoru, malobuněčných nádorů plic, feochromocytomů,...
- **EpCAM** - marker epiteliálních buněk

Další adhezivní receptory

CD44

- Vedle selektinů druhá skupina receptorů, které zprostředkovávají interakce s endoteliem.
- Má schopnost vázat hyaluronovou kyselinu.
- Existuje mnoho různých isoform s různou velikostí (od 80 do 200 kDa): způsobeno alternativním sestřihem a různou mírou glykosylace. Různé isoformy mají zřejmě různý adhezivní potenciál.
- Byla pozorována korelace mezi expresí některých isoform CD44 a metastatickým potenciálem některých nádorů.

Orgánově specifické metastázování

- Nádory prsu často metastázuji do kostí a plic a méně často do jater a mozku.
- Nádory prostaty preferenčně metastázuji do kostí.
- Pacienti s kolorektálními nádory mají často metastázy v játrech.
- Melanomy mají tendenci metastázovat do jater.
- Neuroblastomy, karcinomy štítné žlázy, prostaty, ledvin metastázuji nejčastěji do kostí.
- Nádory ledvin, trávicího traktu a plic často metastázuji do mozku.

1. Tok krve ovlivňuje metastázování

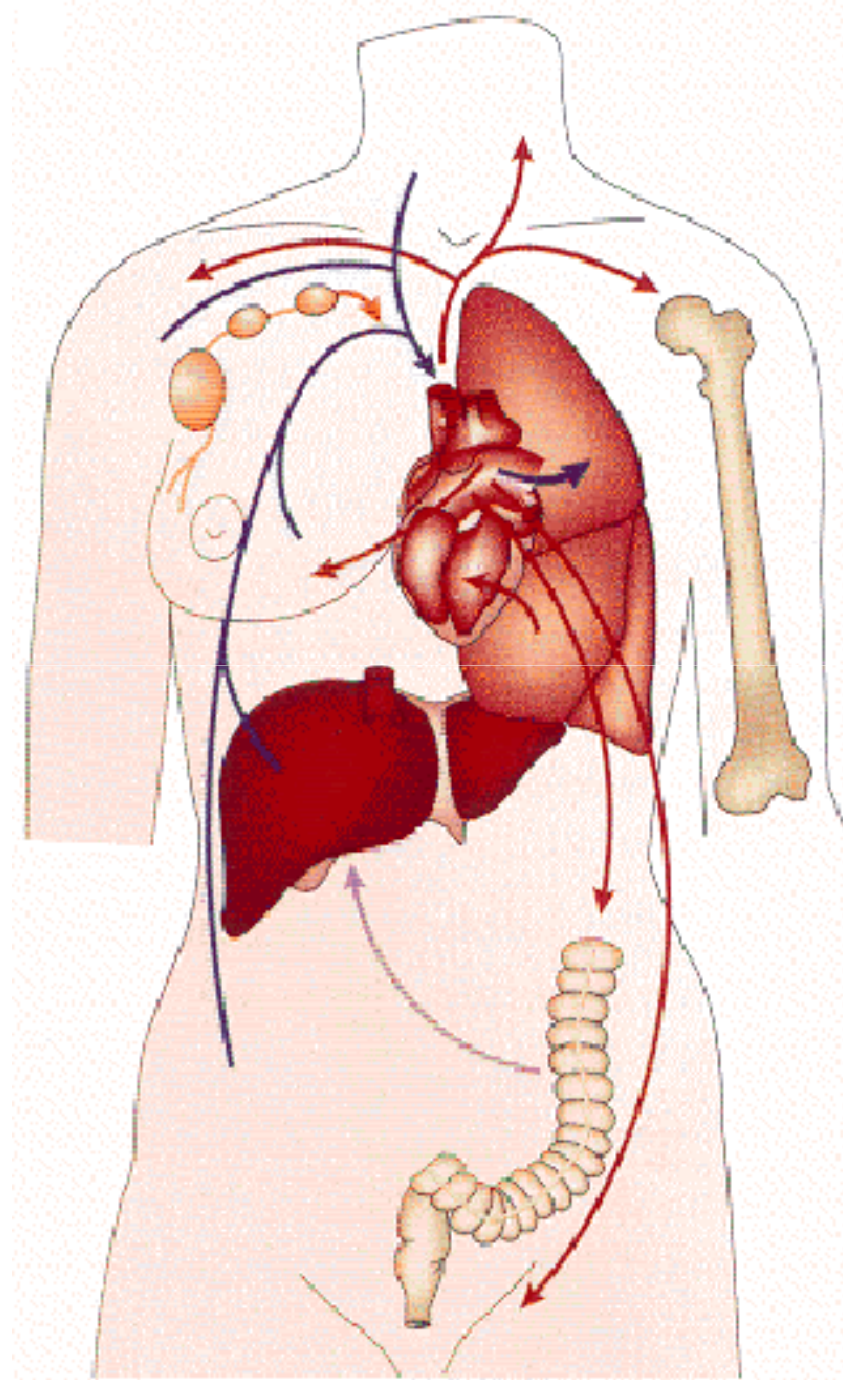
- Mechanické faktory ovlivňují počáteční osud nádorových buněk uvolněných z primárního nádoru..
- Tok krve ovlivní, do kterého orgánu jako prvního dorazí nádorové buňky uvolněné z primárního nádoru.
- Krev z většiny orgánů je vedena žilním systémem (B) přímo do srdce a míří do plic. Potom se vrací do srdce a je rozváděna tepnami (Č) do celého těla.
- Ale například krev ze střev vede nejdříve do jater (R) než vstoupí do žilního systému.
- V celém těle je nadbytek extrabuněčné tekutiny veden do lymfatických cév (Ž) a přes lymfatické uzliny do žilního systému. (*)

Způsoby šíření nádoru

(*)

- hematogenní - šíření cévním systémem
- lymfogenní - šíření lymfatickým systémem
(posléze může vstoupit do žilního systému)
- porogenní - šíření tělními dutinami

**Tok krve
ovlivňuje
metastá-
zování**



Tok krve ovlivňuje metastázování

- Například nádorové buňky uvolněné z primárního nádoru prsu jsou vedeny do srdce, a dále do kapilárního systému plic. Některé buňky projdou tímto systémem a jsou dále transportovány cévním systémem do vzdálených orgánů, jako například do kostí. Jiné buňky mohou tvořit metastázy v plicích.
- Naproti tomu nádorové buňky uvolněné z nádoru střeva jsou vedeny nejdříve do jater.

Tok krve ovlivňuje metastázování

- Relativní velikost nádorových buněk a kapilár ovlivní efektivitu, s jakou budou buňky zachycovány na daném místě.
- Jsou-li buňky zachyceny v orgánu, rozhodnou o schopnosti v daném místě přežít /a proliferovat molekulární interakce mezi buňkami a mikroprostředím.

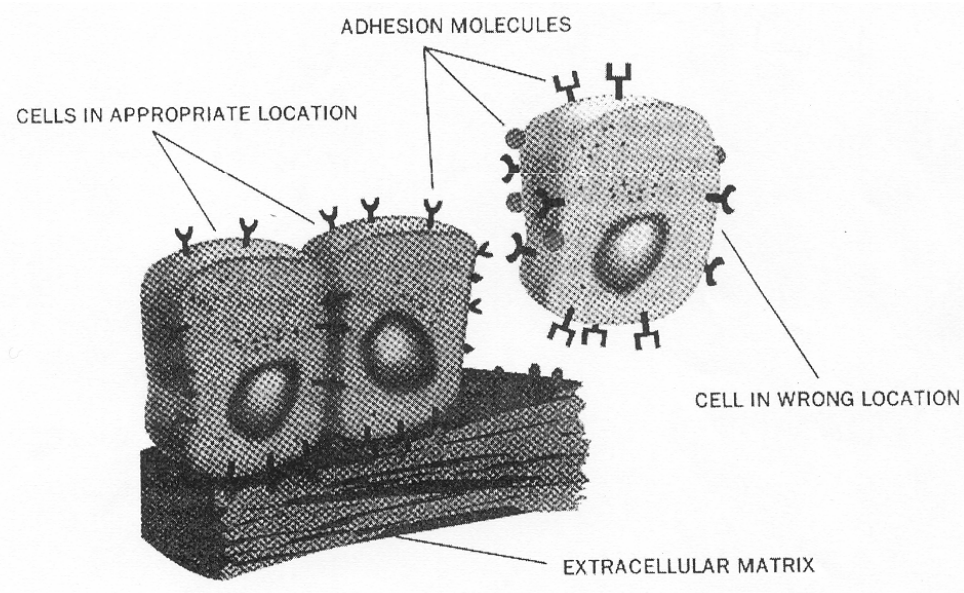
→ 2.

2. Hypotéza „seed and soil“

- 1889 - Stephen Paget (anglický chirurg):
Záleží na kompatibilitě „semen“ (nádorových buněk) a správné „půdy“ (faktory v potenciálním místě nové metastázy).
- Molekulární faktory přítomné ve specifickém orgánu významně ovlivní to, zda v tomto orgánu porostou nádorové buňky určitého typu. Tak jsou například nádorové buňky uvolněné z nádoru prsu nebo prostaty, které se dostanou do kostí, zde adekvátně stimulovány k růstu, zatímco buňky jiného typu zde nemohou růst, protože nemají adekvátní stimulaci k růstu.

3. Hypotéza pozičního kódu

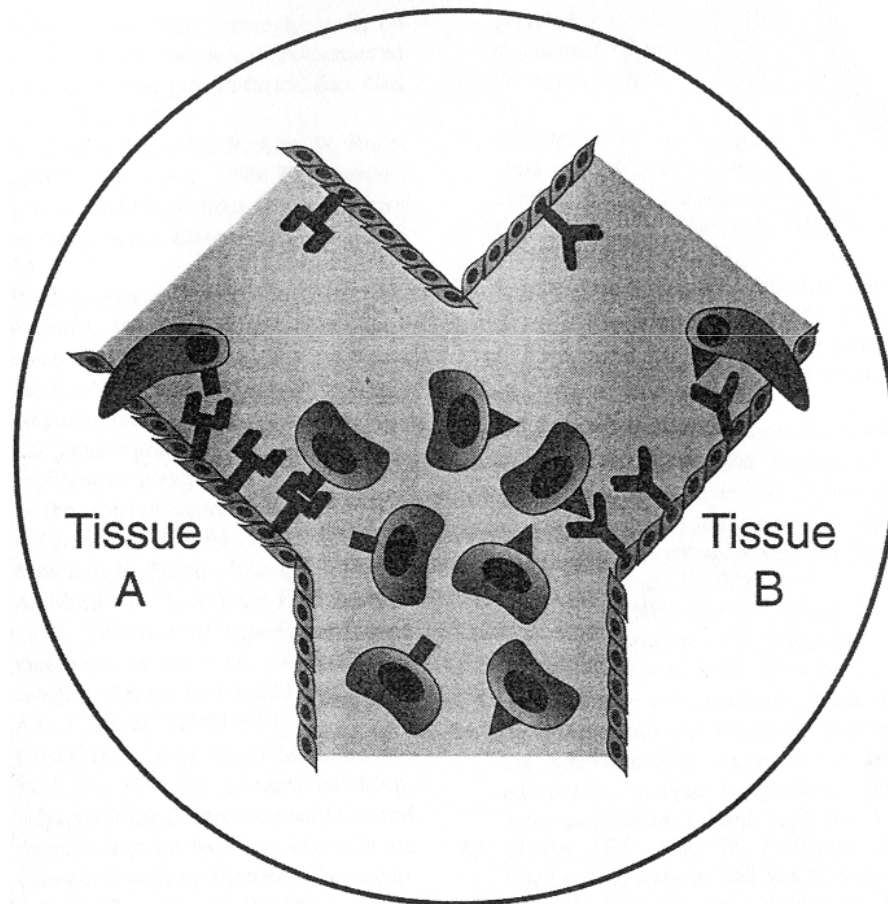
- Podle této představy nese buňka na svém povrchu jakýsi systém adres (soubor molekul, který může být rozpoznán molekulami jiných buněk), který určuje, kam která buňka patří („**homing**“).
- Tyto adresy jsou „zapsány“ formou konfigurace exprimovaných adhezivních receptorů.



Hypotéza pozičního kódu

Vaskulatura

jednotlivých tkání je vysoce specializovaná - tkáňově specifická. Endoteliální buňky nesou „homing peptides“ specifické pro dané tkáně - potenciálně využitelné pro „adresnost“ terapie!



Orgánově specifické metastázování

- Orgánově specifického metastázování se nějak účastní **vaskulární endotelium**: metastatické buňky adherují ke kapilárním endoteliálním buňkám, ale ne k endoteliu velkých cév (\Leftrightarrow mikrometastázy se vždy nacházejí v kapilárních stěnách!).
- Zdá se, že neexistují přímo konkrétní receptory restriktivně exprimované na endoteliu konkrétní tkáně. Spíš je to záležitost kvantitativní: různá množství různých kombinací (konfigurace) více receptorů exprimovaných v endoteliálních buňkách.

Efektivita metastázování

- Celý proces tvorby metastáz je málo efektivní. První fáze metastatické kaskády jsou efektivnější, pozdnější fáze extrémně málo efektivní:
- Metastázy se mohou objevit roky po „vyléčení“ primárního nádoru. Dormance může být výsledek neangiogenní mikrometastázy, která se dlouho nedělí v místě sekundárního nádoru a až po letech se stane angiogenní. Uniká terapii, protože ta je často namířena na dělící se buňky.

Dormantní mikrometastázy

1. Mikrometastázy, kterým chybí některá klíčová vlastnost, např. schopnost indukovat **angiogenezi**.
2. Výživová deprivace může indukovat intenzivní **autofagii**, která způsobí, že se nádorové buňky zmenší, stáhnou a přetrvávají ve stavu reverzibilní dormance.
3. Dormance vyvolaná anti-růstovými signály normálního **ECM** v novém prostředí, případně suprimující vliv **imunitního systému**.