

Kontrola buněčného cyklu.

Nádorová transformace buňky.

Interakce nádoru a organismu.

Metastazování.

Nádory (tumory)

§ Nádor je patologický stav (nemoc) v důsledku porušené kontroly buněčného dělení

- příčinou porušené regulace je genetická změna nejčastěji 1 somatické (ale i germinativní) buňky
- buňky vycházející z patologického klonu se nekontrolovaně množí (různě rychle) a posléze event. šíří i na další sekundární místa (metastázy)

§ podle rychlosti proliferace rozlišujeme nádory

E benigní - většinou rostou jen v místě vzniku, nejsou agresivní, zachovávají si diferenciaci

E maligní - rostou rychle, invazivně a šíří se na další místa, nediferencované

§ Všechny nádory jsou důsledkem genetické poruchy, a to klíčových genů kontroly buněčného cyklu

§ (proto)onkogenů - normálně podporují dělení a růst buněk, pokud mutovány dělení je nekontrolované

§ supresorových genů - normálně kontrolovaně potlačují dělení, pokud mutovány, umožňují nekontrolované dělení

§ DNA reparačních genů - normálně opravují DNA opravitelné změny, pokud mutovány neopravená změna může být přenesena do dceřinných bb.

- pouze některé jsou ovšem zároveň dědičné (tzv. familiární) = mutace v germinativní buňce
- většina nádorů jsou náhodné, tzv. sporadické = mutace v somatické buňce

Nádory

§ Genetická změna může vzniknout

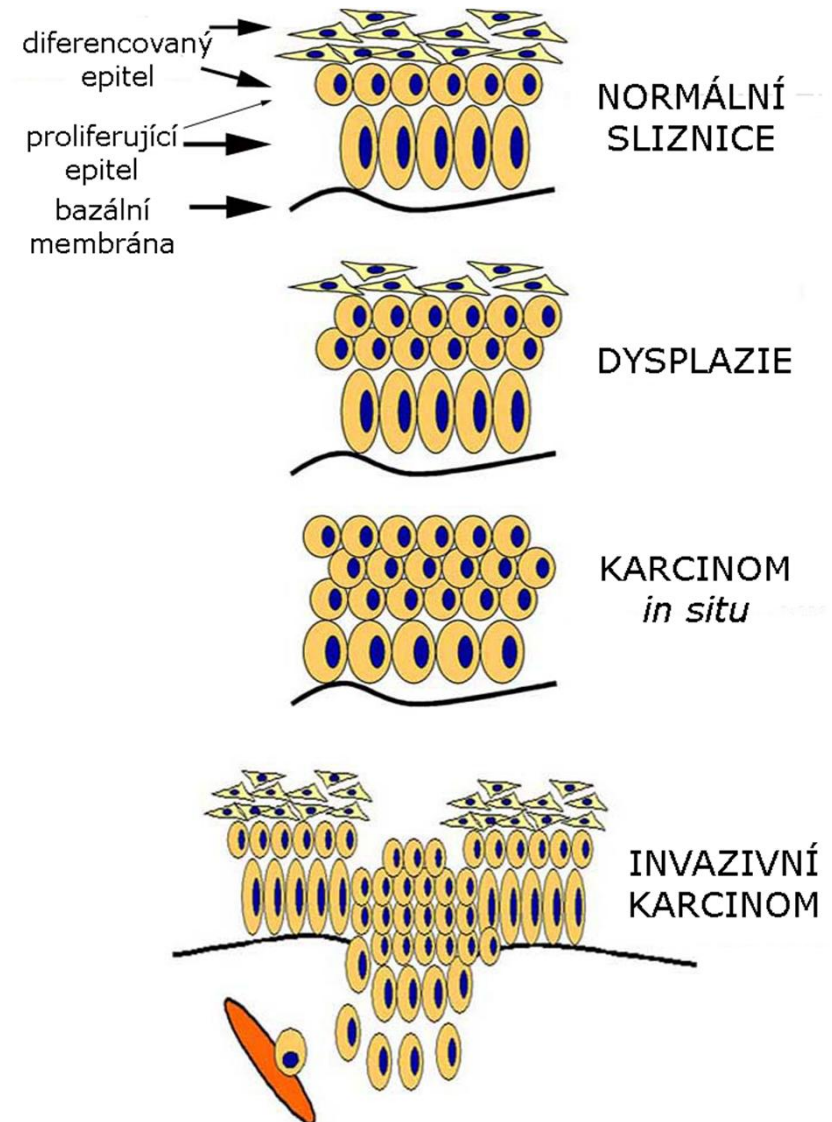
- chybou při DNA replikaci a dělení buňky
- působením zevních faktorů (karcinogenů)
 - § fyzikálních - např. UV a ionizující záření
 - § chemických - organické látky, toxiny, těžké kovy
 - § biologických - některé RNA a DNA viry

§ Nádor zpravidla původně vychází z mutací 1 buňky (monoklonální)

- proces nádorové transformace je ovšem vícestupňový (tj. postupná kumulace několika mutací), takže se postupně stává geneticky heterogenní
 - § nádor přechází ze stadia prekancerózy, přes benigní až k malignímu

§ Histologicky - tj. podle toho z jaké tkáně pochází - rozlišujeme 3 sk.

- epiteliální
 - § kůže, sliznice, výstelky vývodů
 - E papilom, adenom (b.), karcinom (m.)
- mesenchymální
 - § pojivo, endotel, sval. tkáň, hematopoetická a lymfatická tkáň, kosti
 - E fibrom, hemangiom, myom (b.), sarkom, lymfom, leukemie (m.),
- neuroektodermové
 - § CNS a periferní nervy, pigmentové névy
 - E astrocytom, gliom, blastom, neurinom, melanom



Které geny jsou změněny během kancerogeneze?

- § Nádor není monogenní onemocnění.
- § Odhaduje se, že pro vývoj nádoru je nezbytných 4-7 událostí (zásahů).
- § Konkrétních genů, které mohou být během kancerogeneze změněny, jsou desítky.
- § Obecně existuje šest základních vlastností plně maligního nádoru:

Šest získaných vlastností maligního nádoru

Získaná schopnost

1. Soběstačnost v produkci růstových signálů
2. Necitlivost k signálům zastavujícím b.c.
3. Poškození apoptózy
4. Neomezený replikační potenciál
5. Posílení angiogeneze
6. Tvorba metastáz

Příklad

aktivace H-*ras*

ztráta RB

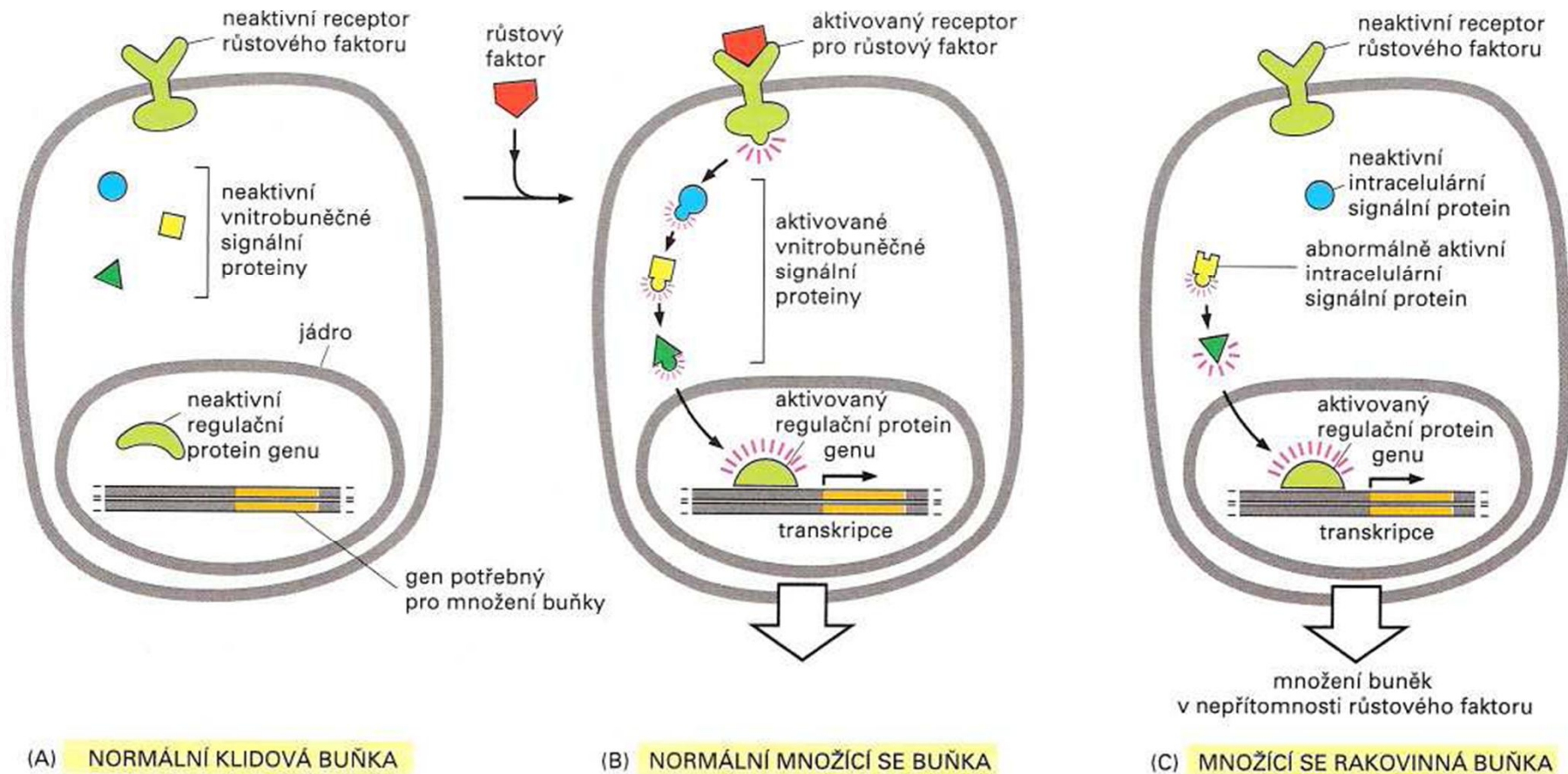
produkce IGF

aktivace telomerázy

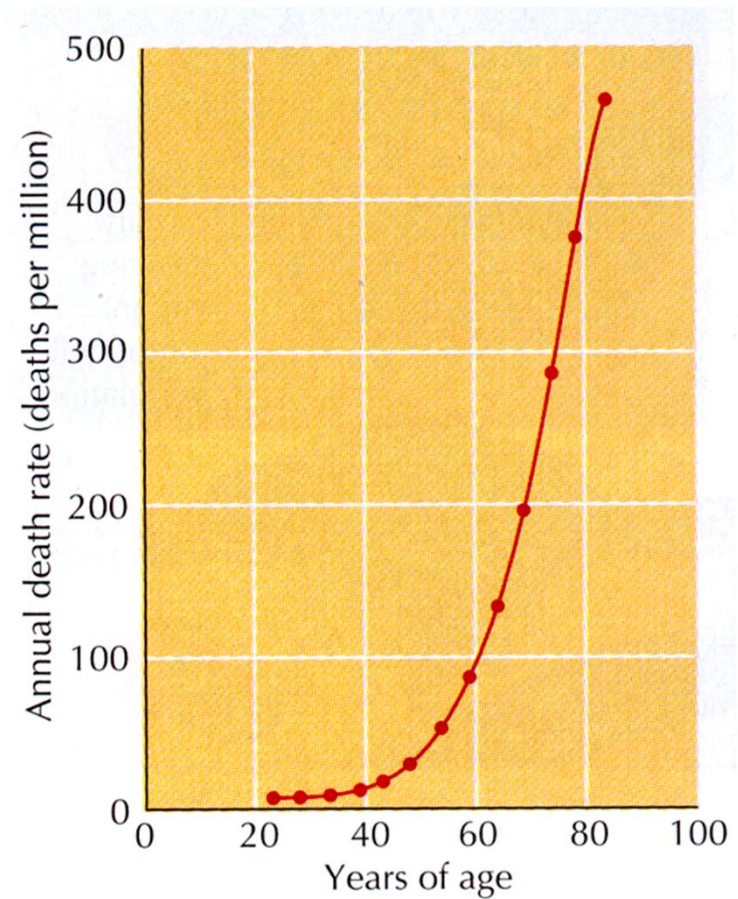
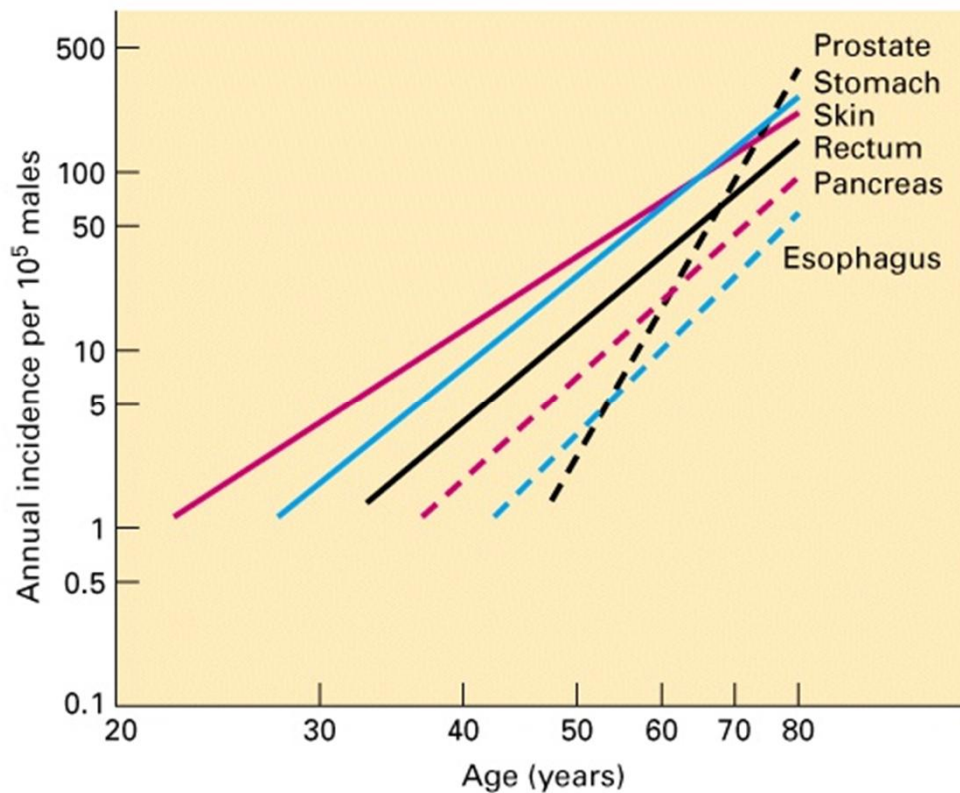
produkce VEGF

inaktivace E-cadherinu

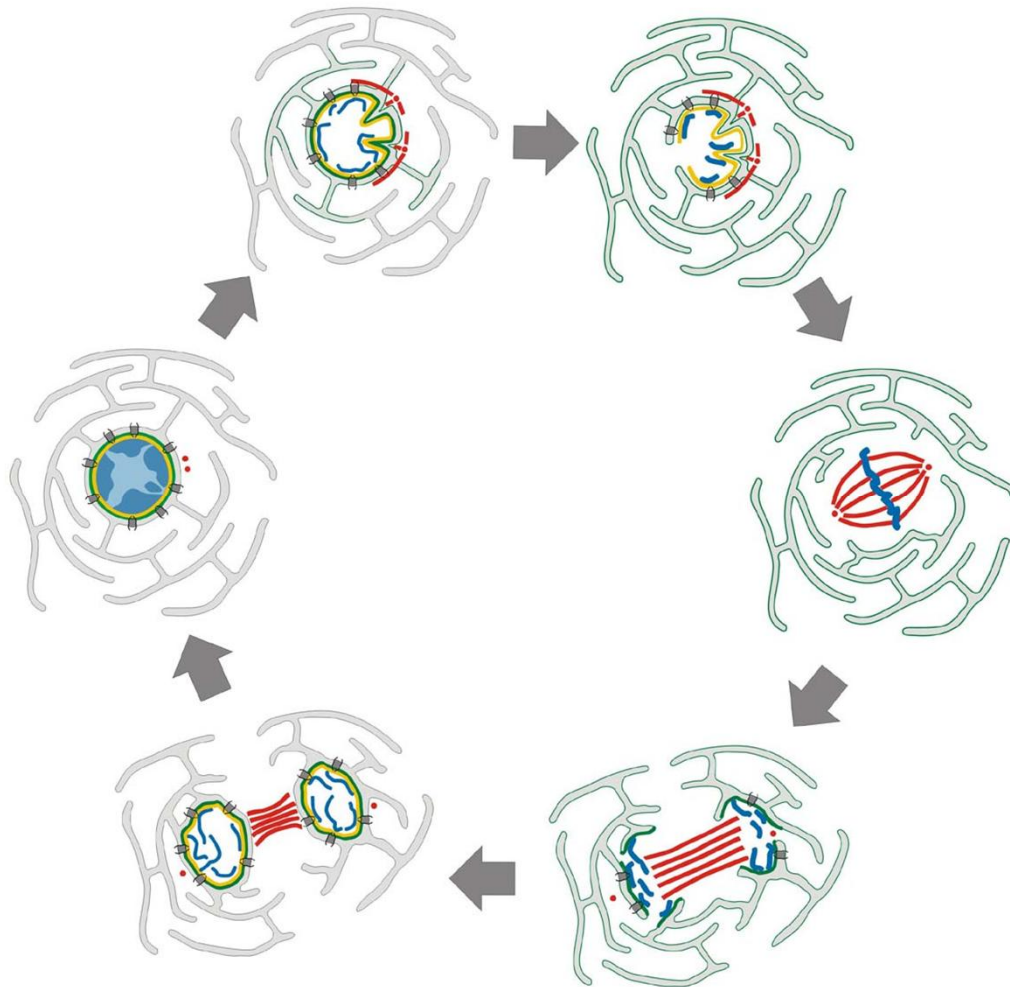
Normální vs. rakovinná buňka



Vývoj rakoviny je postupný proces kumulace změn



Buněčný cyklus



§ buněčný cyklus (4 fáze)

- cyklická souhra reakcí zajišťujících růst buňky (G1-fáze), DNA replikaci (S-fáze), G2 a mitózu (M-fáze)

§ b. cyklus probíhá při

- bezchybném provedení jednotlivých kroků

§ správnost reakcí je kontrolována ve 3 kontrolních bodech

E v G1-fázi - po skončení předcházející M-fáze

E v G2-fázi - po skončení replikace

E v M-fázi - metafáze

- dostatku energetických substrátů
- dostatku zevních (mitogenních) stimulů

§ růstové faktory

§ přirozeně je inhibován (bb. v G₀-fázi)

- kontaktní inhibicí
- produkty supresorových genů
 - § inhibitory cdc (např. p21)
- nedostatkem růstových faktorů

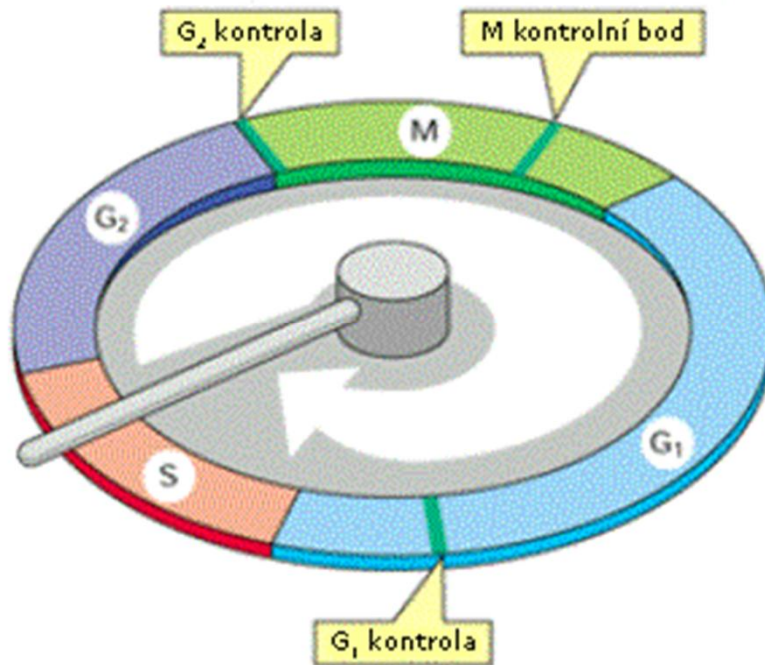
§ porucha regulace → **nádorové bujení**

Jednotlivé fáze buněčného cyklu

| | |
|---------|--|
| GO-fáze | klidová fáze buněčného cyklu, ve které buňka plní své základní funkce a udržuje bazální metabolismus |
| G1-fáze | interval mezi ukončením mitózy a začátkem syntézy DNA - intenzivní syntéza všech typů RNA v jádře, v cytoplazmě probíhá proteosyntéza a buňka roste (délka G1-fáze obvykle určuje délku celého b. cyklu) |
| S-fáze | v jádře probíhá replikace DNA a v cytoplazmě jsou syntetizovány histony; po ukončení S-fáze buněčné jádro obsahuje dvojnásobné množství DNA |
| G2-fáze | interval mezi koncem syntézy DNA a začátkem mitózy, je typický dalším růstem buňky, proteosyntézou, přičemž ve zvýšené míře je syntetizován tubulin a další proteiny sloužící k výstavbě mitotického aparátu; v G2-fázi cyklu probíhá kontrola ukončení DNA replikace před vstupem do mitózy |
| M-fáze | proces mitotického dělení sestává z řady na sebe navazujících změn (6 fází), z nichž prvních pět (profáze, prometafáze, metafáze, anafáze, telofáze) představuje dělení jádra; šestou fází je vlastní rozdělení buňky (cytokineze) |

Kontrolní body b. cyklu / mitóza

- je veškerá DNA replikována?
- je příznivé prostředí?
- je buňka dostatečně velká?



- jsou všechny chromozomy spojeny ve vřeténku?

- je buňka dostatečně velká?
- je prostředí příznivé?

Interphase



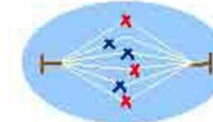
46 Chromosomes

Prophase



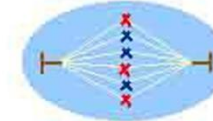
Chromosomes doubled to 92

Prometaphase



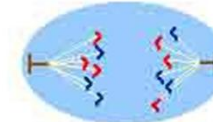
Nucleus dissolves and microtubules attach to centromeres

Metaphase



Chromosomes align at middle of cell

Anaphase



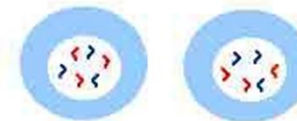
Separated chromosomes pulled apart

Telophase



Micro tubules disappear cell division begins

Cytokinesis



Two daughter cells formed each with 46 chromosomes

Regulační proteiny b. cyklu

- § (A) produkty (proto)onkogenů
 - cykliny
 - cyklin-dependentní proteinkinázy (cdk)
 - růstové faktory
 - receptory růstových faktorů
 - G-proteiny
 - membránové tyrozin-kinázy (např. abl)
 - cytoplasmatické signální proteiny (např. Raf)
 - transkripční faktory (např. jun, fos, myc)

- § (B) produkty supresorových genů
 - Rb
 - p53
 - p21

- § (C) produkty genů kódujících DNA reparační enzymy
 - mismatch reparace
 - excisní reparace
 - homologní rekombinace

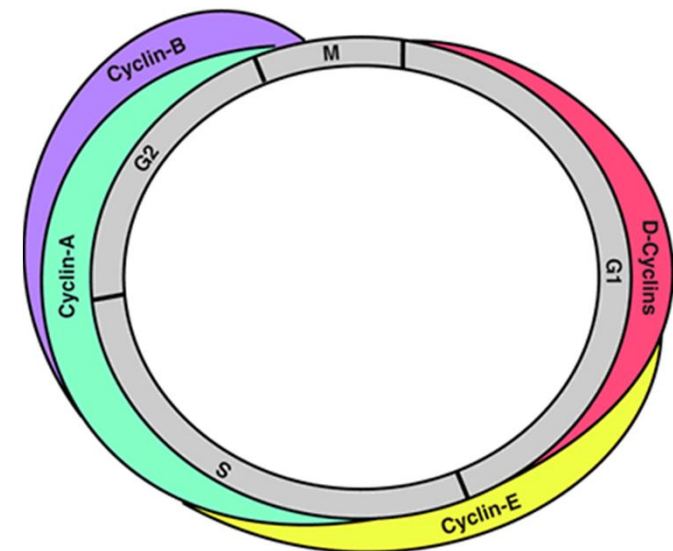
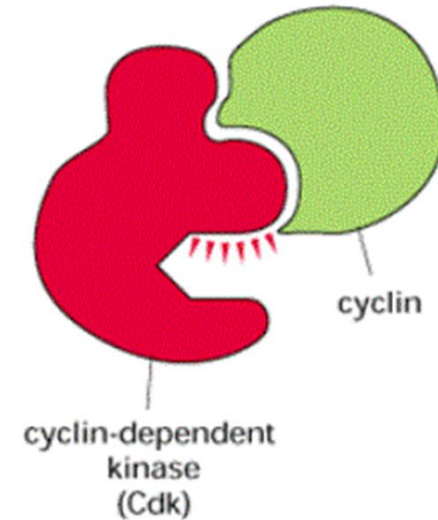
Protoonkogeny

§ (1) cykliny

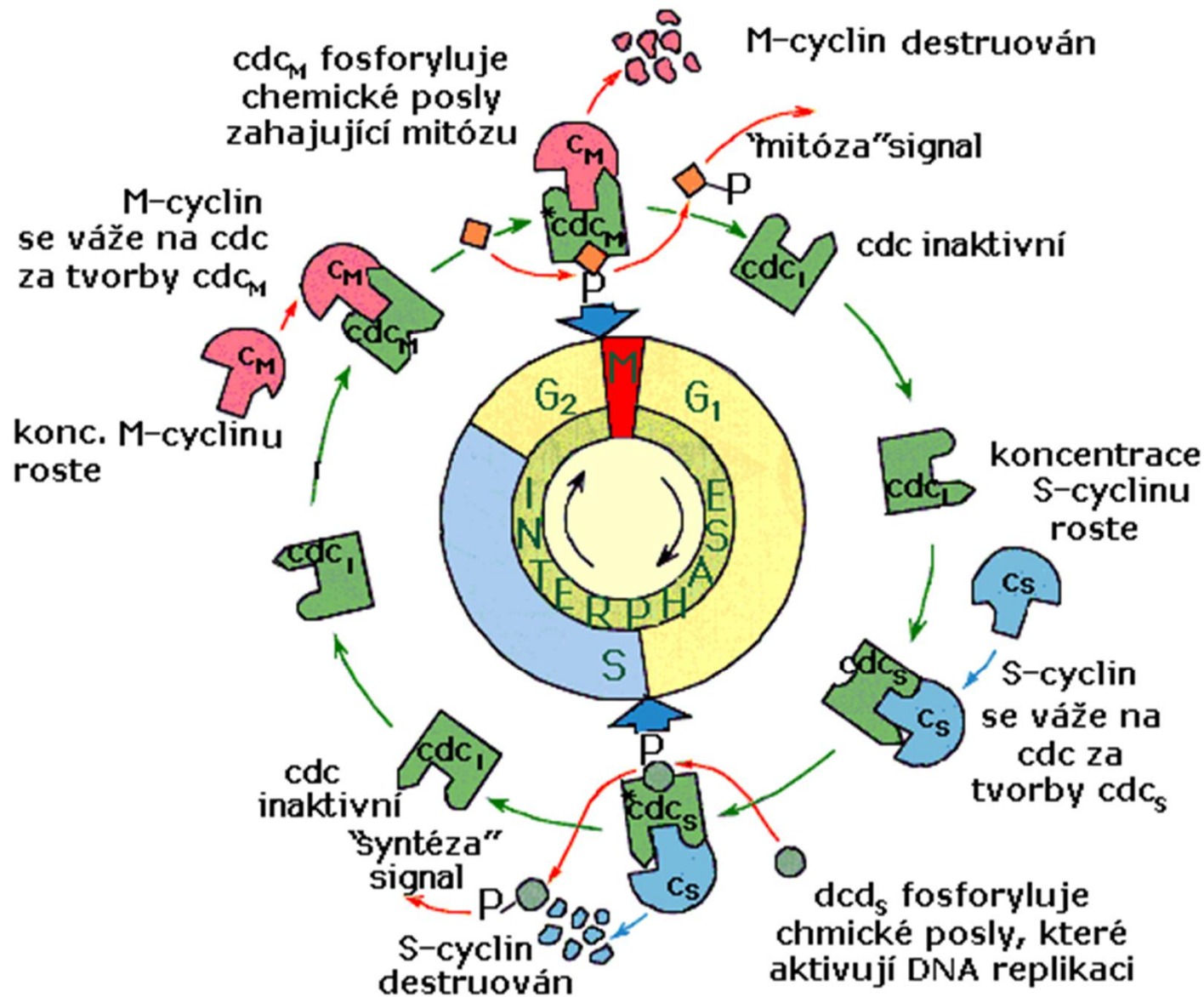
- 8 typů - A, B, C, D, E, F, G, H
- specifické pro jednotlivé fáze cyklu
 - § např. Cdk2 + cyklin E v G1 fázi

§ (2) cdk (cyclin-dependent kinases)

- 9 typů - cdk1 - cdk9
 - § pouze komplex cdk s cyklinem je aktivní
 - § fosforylují seriny a threoniny cílových proteinů a aktivují je
 - E např. Rb-protein → iniciace DNA replikace
 - § součástí komplexů cyklin/cdk jsou inhibitory cdk (např. p21), teprve jejich proteolýza umožňuje aktivitu komplexu
- zatímco hladina cdk zůstává během cyklu v podstatě konstantní, exprese cyklinů se liší
 - § je striktně kontrolována podle potřeb okolní tkáně!!!



Souhra cyklínů - cdk



Protoonkogeny

§ (3) růstové faktory

- působí ve velmi malých koncentracích, většinou parakrinně, tkáňově specificky
§ např. TGF- β , PDGF, EGF, VEGF, ...

§ (4) receptory růstových faktorů

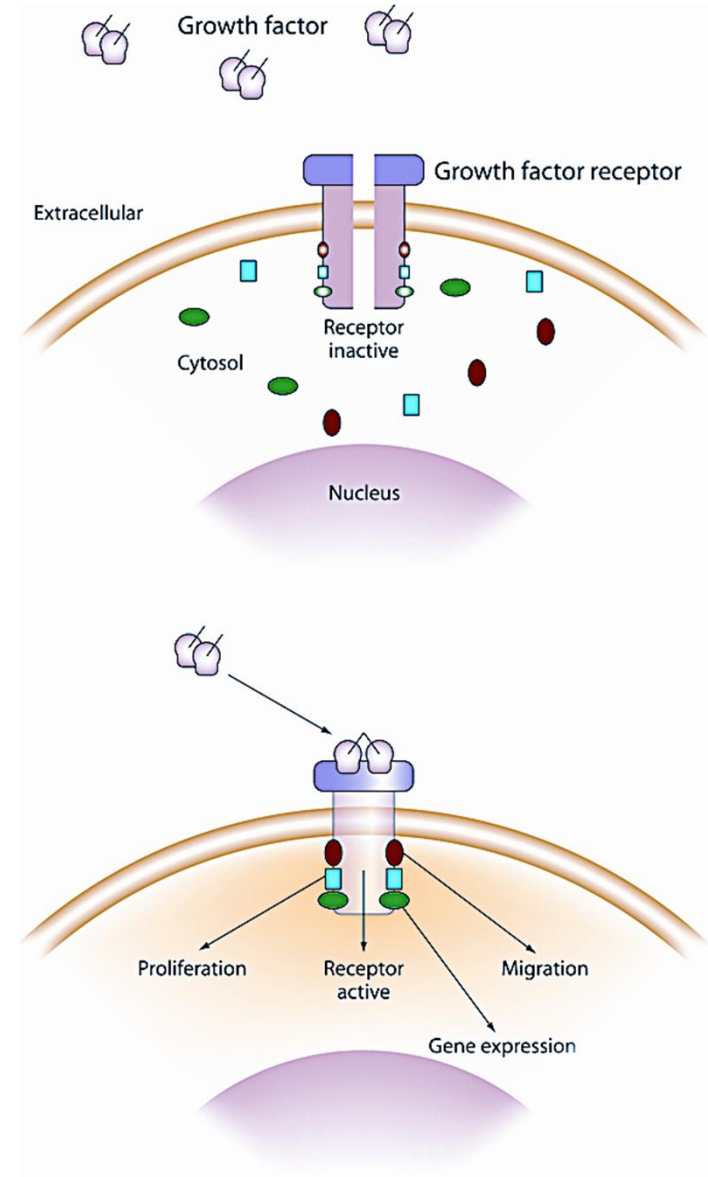
- tyrosinkinázová aktivita \rightarrow aktivace dalších kináz (MAPK - Mitogen Activated Protein Kinase) a transkripce genů

§ geny "časné" odpovědi (cca 15 min) =
(5) transkripční faktory

E např. proteiny fos, jun a myc (produkty protoonkogenů *fos*, *jun* a *myc*)

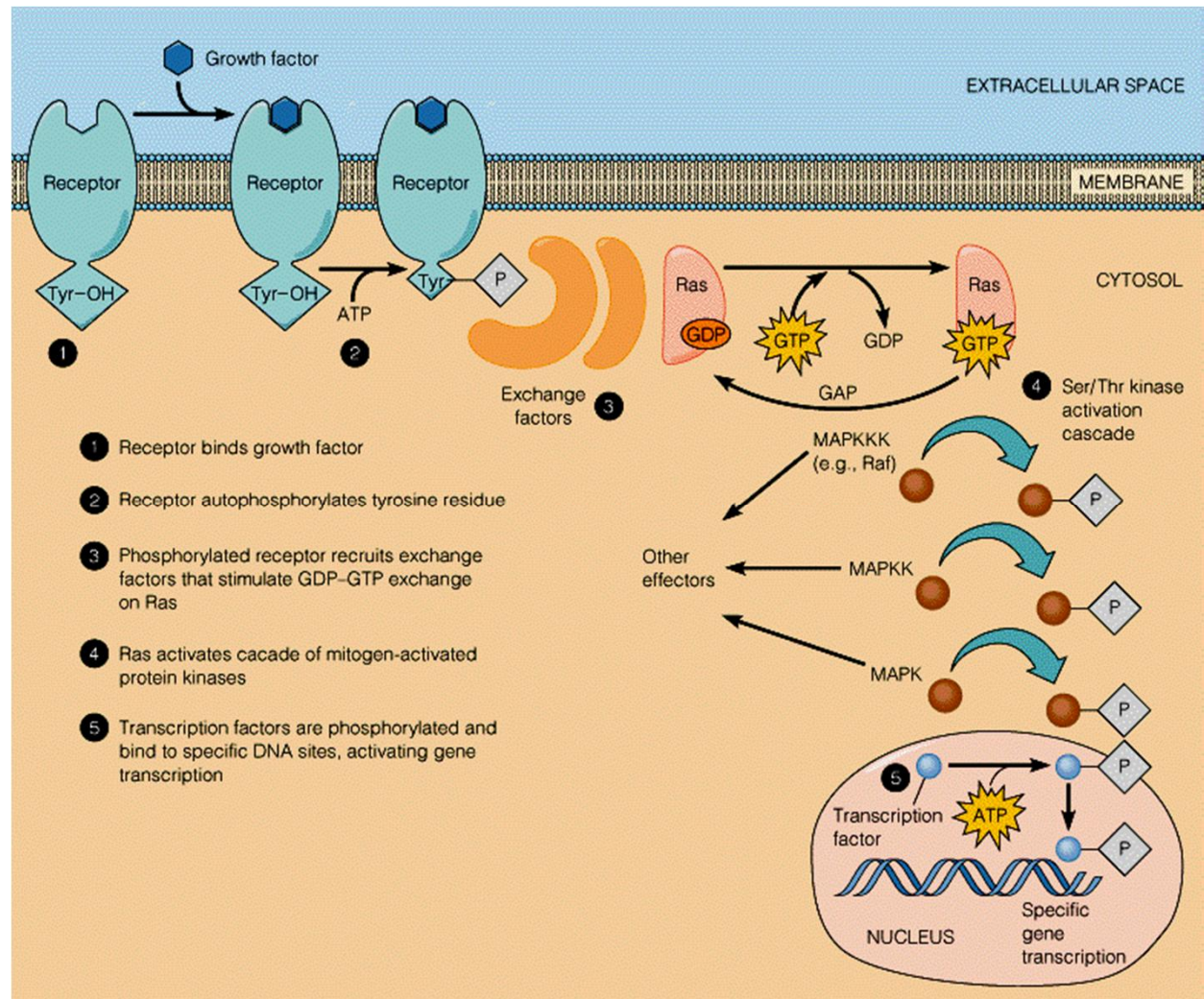
§ geny "pozdní" odpovědi (cca 1 hod) -
cykliny (cyklin D)

E jejich exprese stimulována pomocí
"časných" proteinů fos, jun, myc aj.

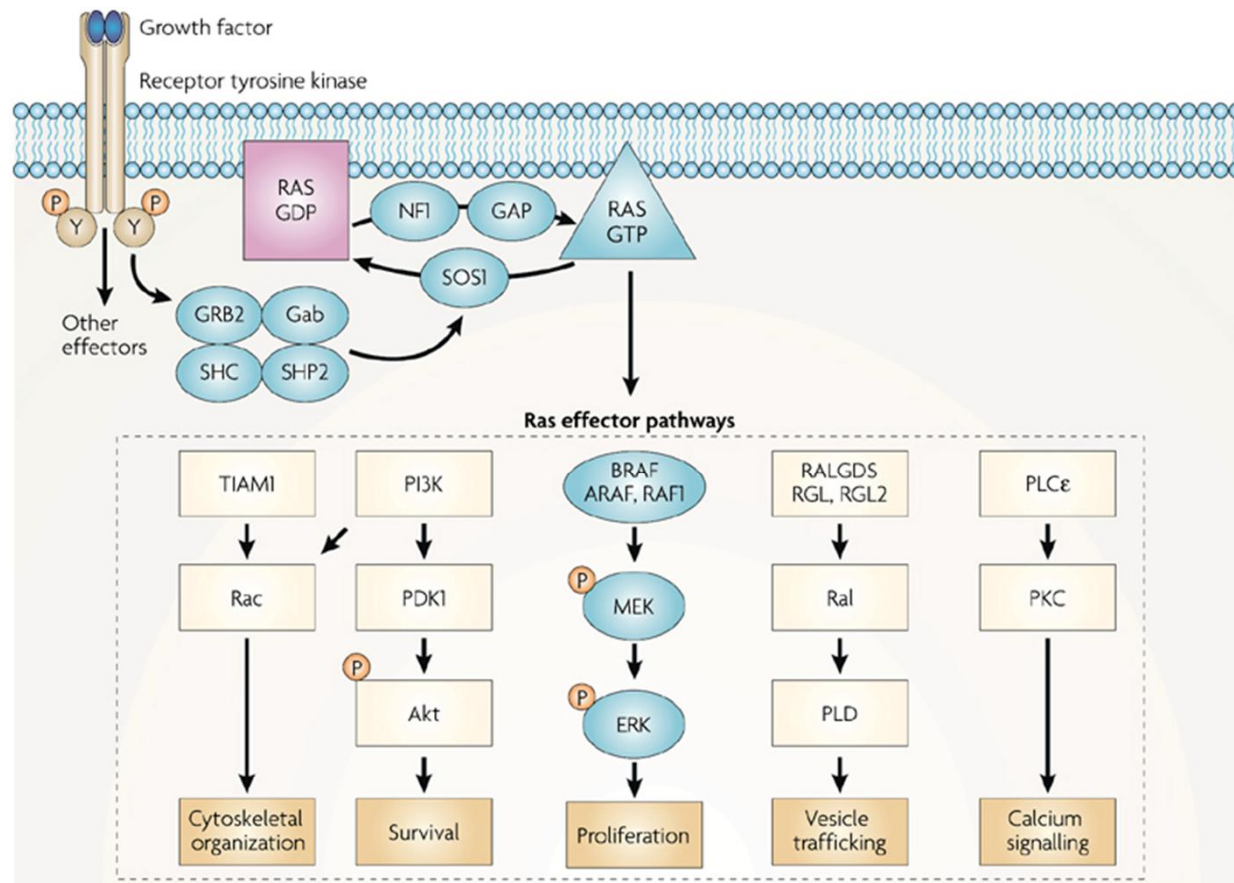


Protoonkogeny

§ (6) cytoplasmatické Tyr- (Src, Abl, ...) a Ser/Thr-kinázy (Raf) a GTP-ázy (Ras)



Ras signalizace



Supresorové geny

§ kódují inhibiční proteiny zastavující b. cyklus

- (1) **Rb protein** (ch. 13q14)

§ hl. negativní regulátor b. cyklu, řídí přechod z G1- do S-fáze, aktivita řízena de-/fosforylací (pomocí cdk4/6 + cyklin D)

§ mutace Rb (nejč. mikrolece) vedou ke vzniku retinoblastomu (nádor sítnice)

- (2) **p53 protein** (ch. 17p13)

§ "strážce genomu" - kontrola cyklu v G1 a G2 kontrolních bodech

§ při poškození DNA se zvyšuje exprese p53

§ funguje jako transkripční faktor genů reparaace DNA a apoptózy

- (3) **p21**

§ hl. cílový gen p53 = inhibitor Cdk - zastavení cyklu v G1 fázi inhibicí Cdk2/cyklin E komplexu

- (4) **BRCA1 a BRCA2**

§ součást detekčního systému DNA poškození

§ mutace v supresorových genech jsou podkladem dědičných typů rakovin

- často názvy podle typu nádoru, který vzniká při jejich mutacích, např.

§ Rb (retinoblastom)

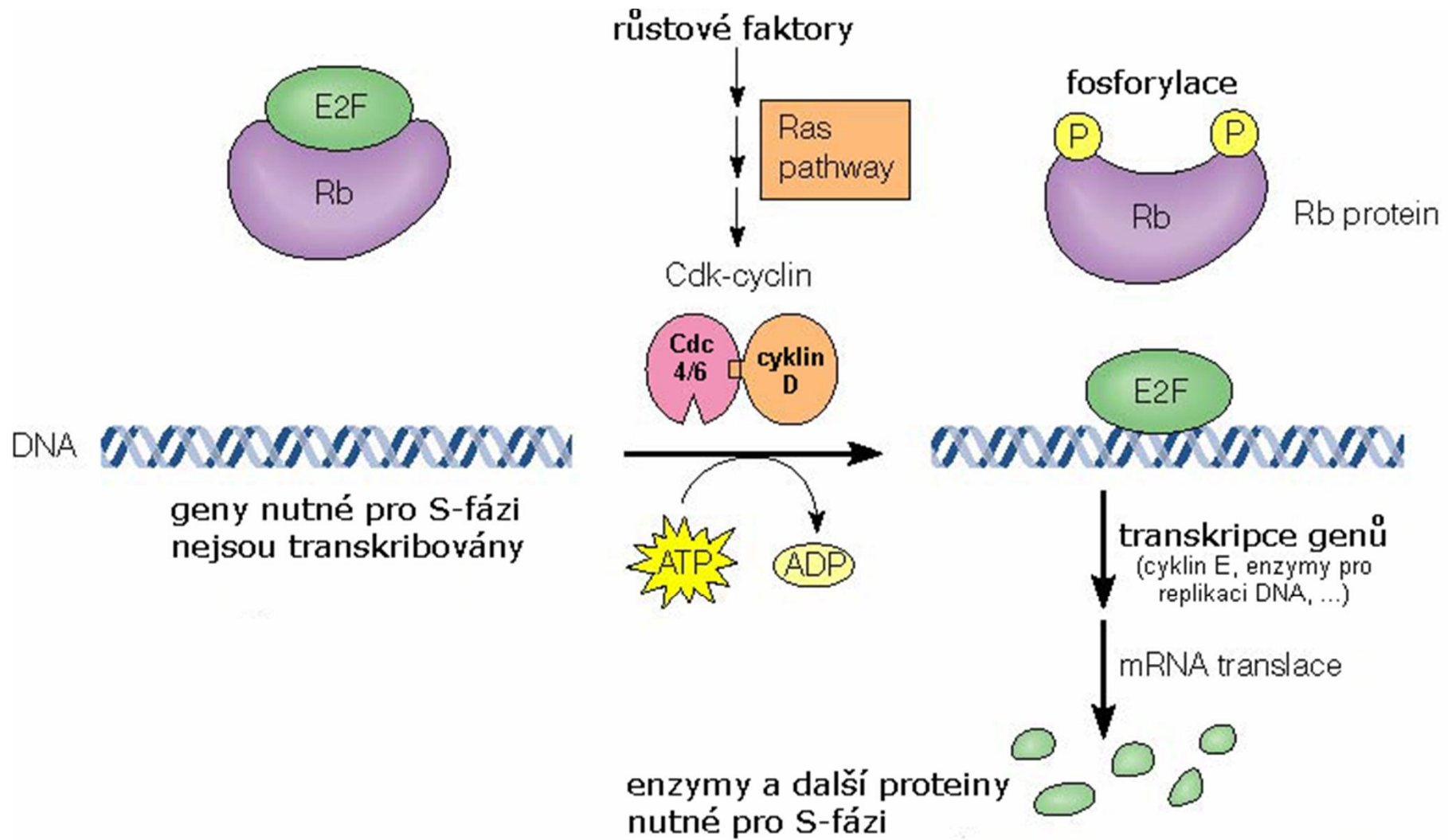
§ WT (Wilmsův tumor)

§ NF1 a NF2 (neurofibromatóza)

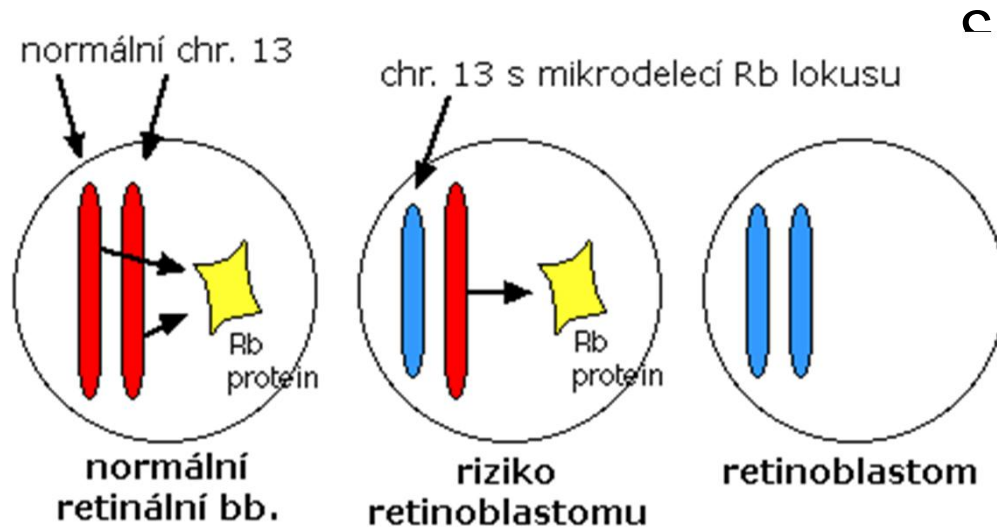
§ APC (adenomatózní polypóza coli)

§ VHL (von Hippel-Lindau syndrom)

Rb protein (Rb/E2F G₁ checkpoint)



Rb protein - retinoblastom



^c mikrodelece v oblasti chr. 13q14 vedou k poruše Rb

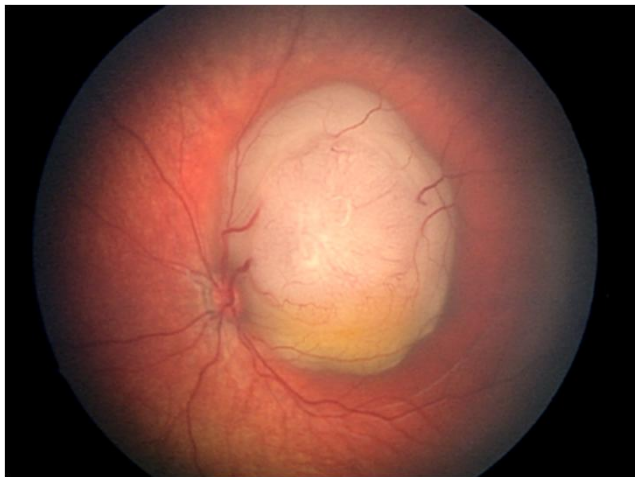
- vrozené - familiární retinoblastom

§ pacient zdědil jednu mutovanou alelu, druhá mutace brzy v průběhu života

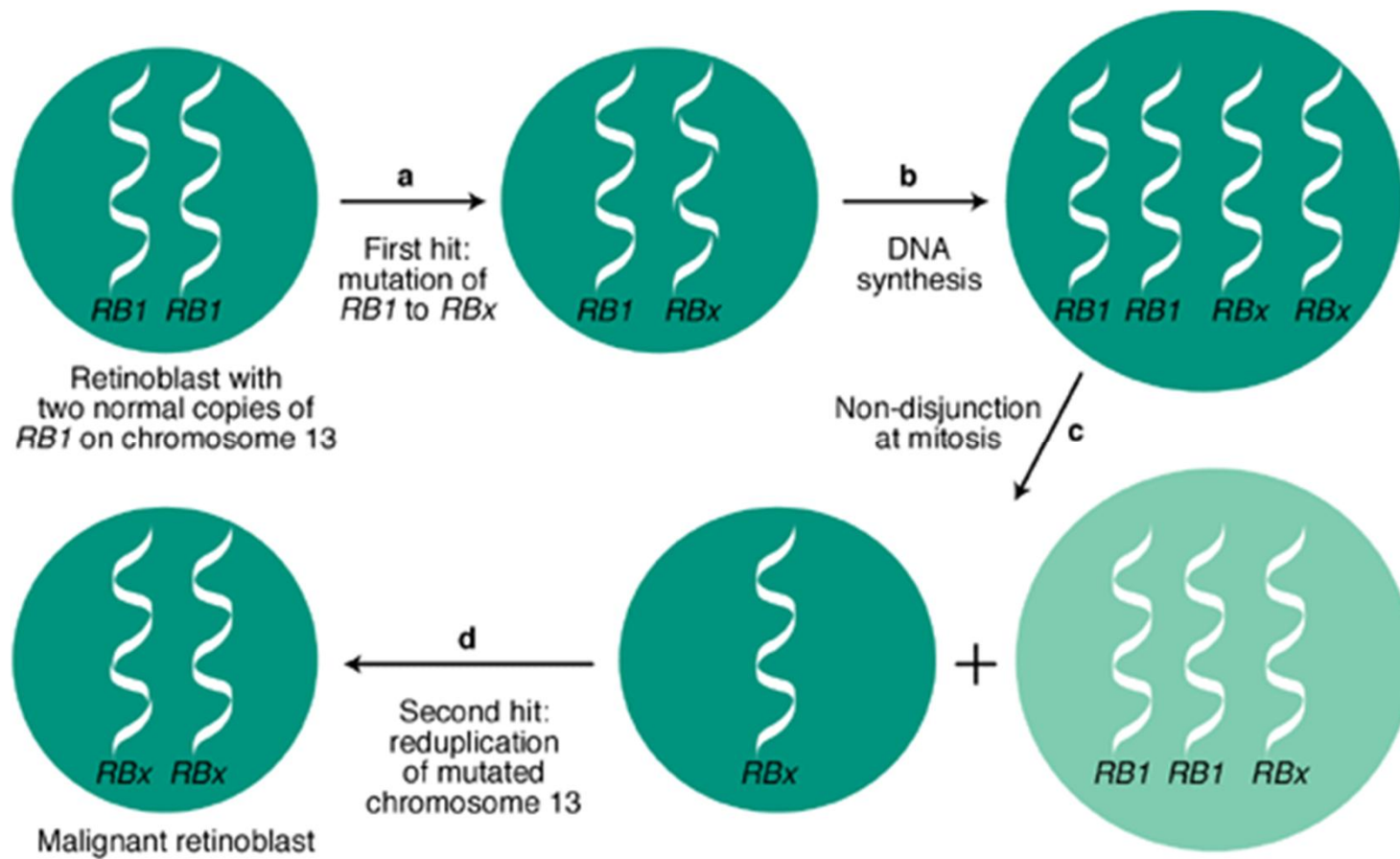
↳ ztráta vrozené heterozygosity (LOH)

- získané - sporadický retinoblastom

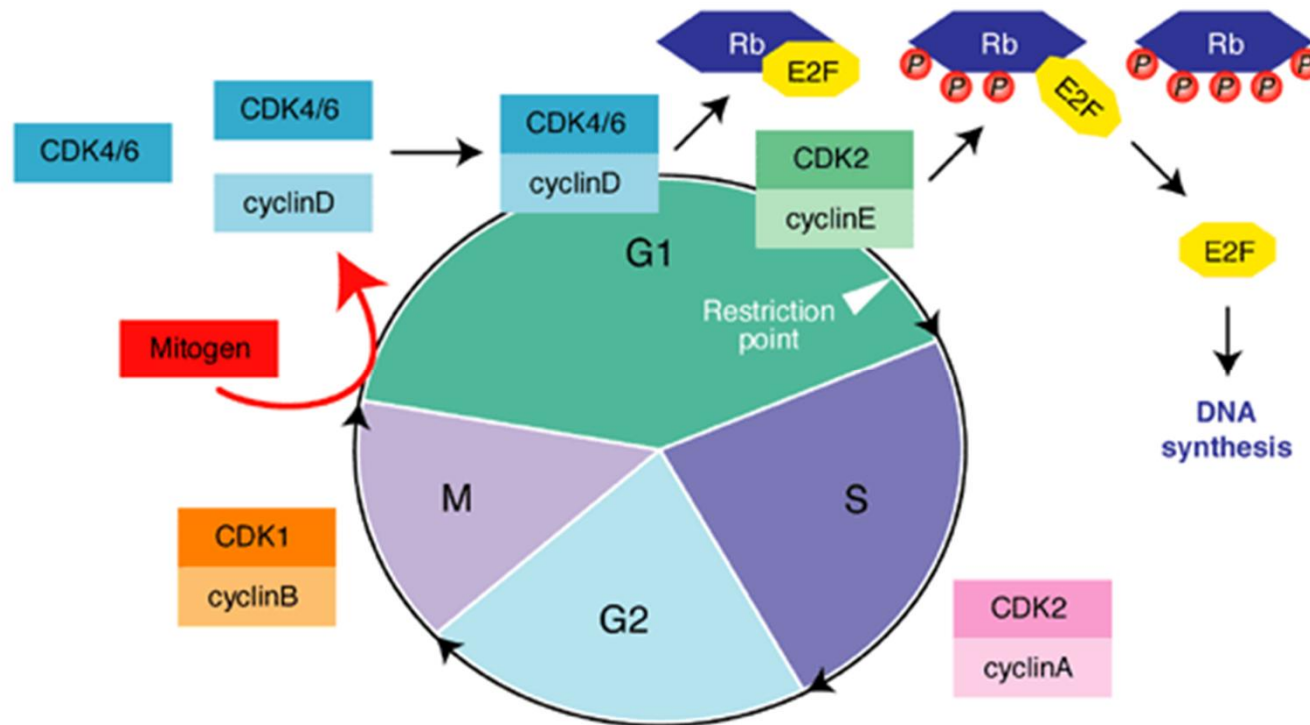
§ inaktivace Rb mutacemi obou alel v průběhu života



Vznik sporadického retinoblastomu mechanizmem LOH



Shrnutí - nastartování b. cyklu



- § mitogeny startují b. cyklus indukci cyklinu D a inaktivací Rb proteinu
- průběh cyklu je koordinován postupnou aktivací jednotl. CDKs a jejich podjednotek – cyklinů (oscilujících mezi rychlou syntézou a degradací)
 - exprese cyklinu D (a do jisté míry cyklinu E) indukovaná mitogeny představuje začátek cyklu
 - § cyclin D- a cyclin E-dependentní kinázy fosforylují a tak blokují Rb protein, hl. kontrolní bod přechodu G1 do S fáze
 - inaktivace Rb proteinu představuje moment, kdy b. cyklus přestává být závislý na mitogenech
 - § inaktivací Rb se uvolní E2F transkripční faktory, které stimulují expresi dalších cyklinů a ostatních genů nutných pro DNA syntézu

Protein p53 (ch. 17p13)

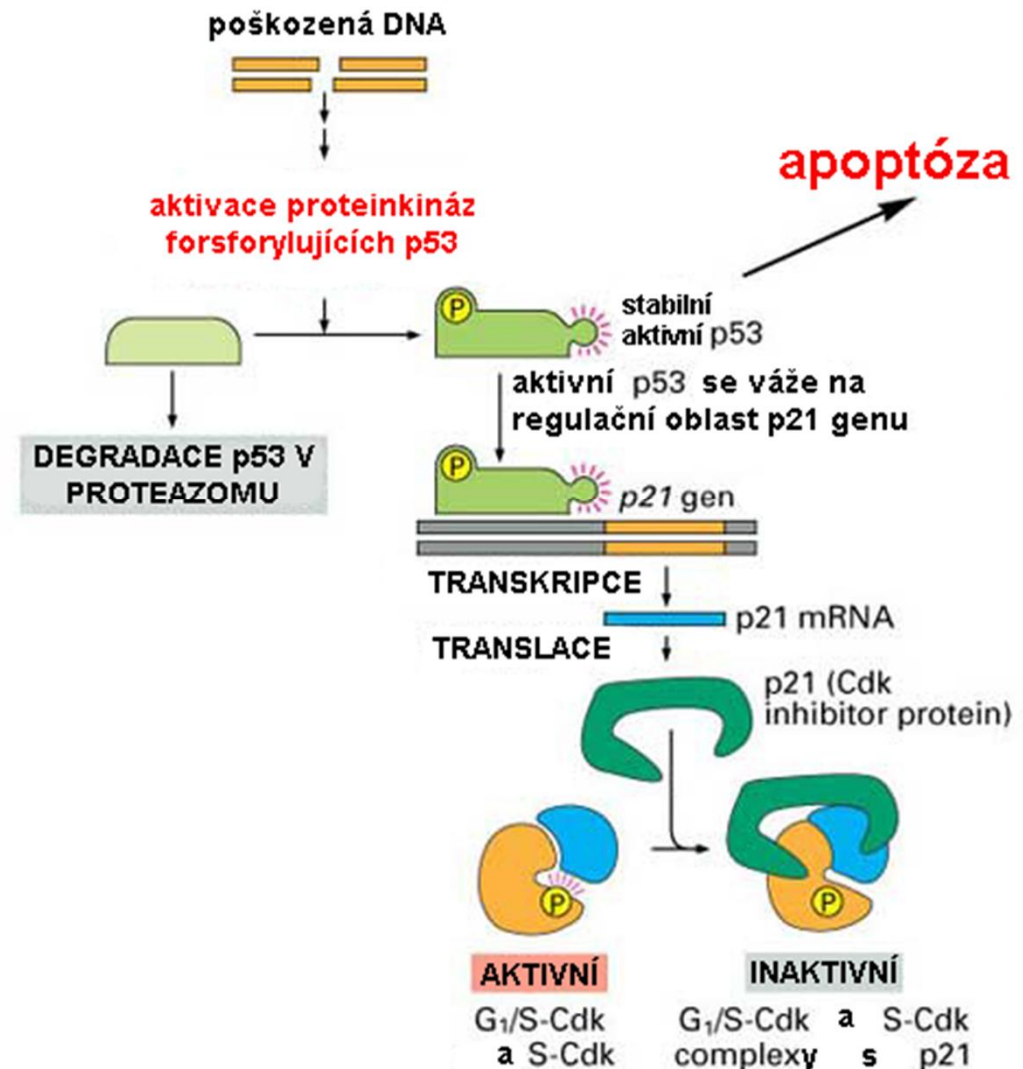
§ při poškození DNA se aktivuje p53

- stabilizací (↓ ubiquitin ligázy MDM2)
- fosforylací prostřednictvím ATM (ataxia telangiectasia mutated)

§ p53 dále zprostředkuje:

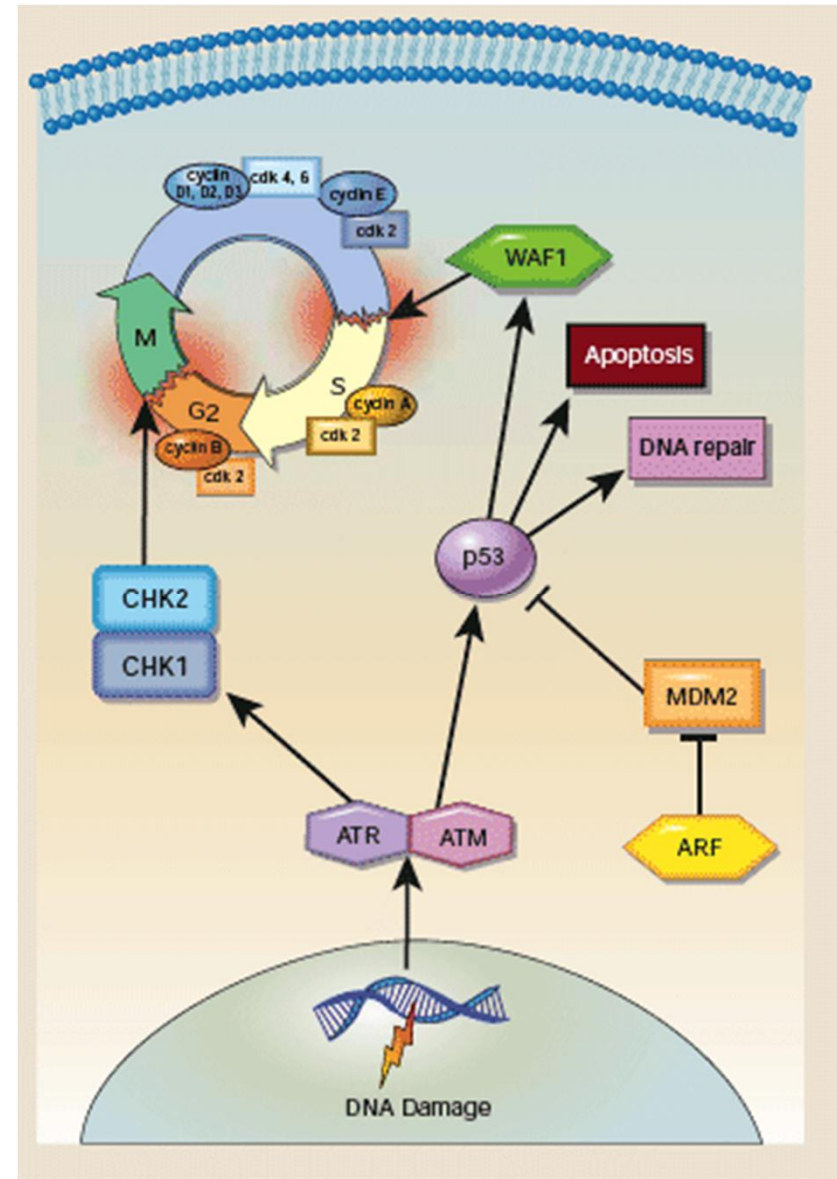
- (1) expresi inhibitorů b. cyklu (p21) → dočasné zastavení b. cyklu v G1/S kontrolním bodě, které umožní reparaci DNA
- (2) zvyšuje expresi GADD 45 (Growth Arrest and DNA Damage) → excizní reparace DNA
- (3) pokud není oprava úspěšná, zvyšuje expresi Bax → apoptóza

§ mutace p53 jsou přítomny cca u 50% všech nádorů!!!



DNA reparační geny

- § (1) geny reparace chybného párování ("mismatch repair")
 - → nestabilita délky mikrosatelitových lokusů (např. HNPCC = Hereditary Non-Polypous Colon Cancer)
- § (2) geny excizní reparace
- § (3) geny homologní rekombinace
 - hlavní dráha aktivovaná při poškození DNA (double strand break) zahrnuje: ATM (ATR)/CHK2 (CHK1) → p53/MDM2 → p21 → "growth arrest"
- § vrozená porucha reparačních genů je podkladem několika dědičných typů nádorových onemocnění
 - § ataxia telangiectatica
 - § Bloomův syndrom
 - § Fanconiho anemie
 - § xeroderma pigmentosum
 - § Syndrom fragilního X



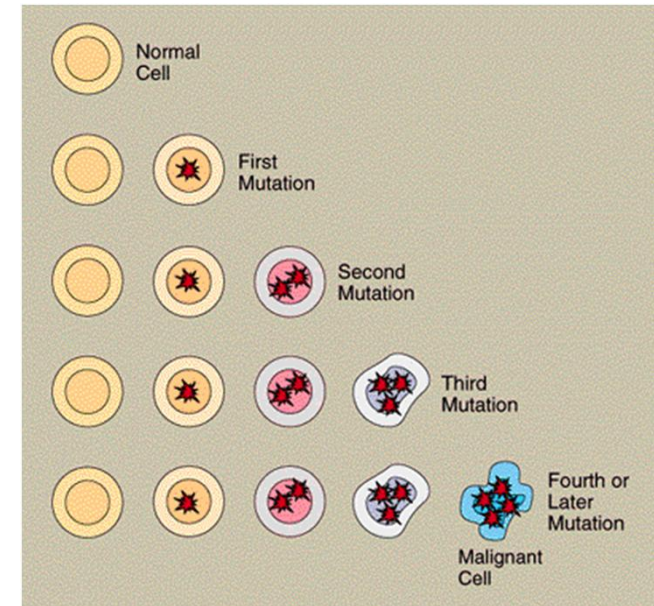
Proces nádorové transformace

§ jakákoliv mutace v kritickém místě DNA
E tj. protoonkogen, supresor, reparační gen

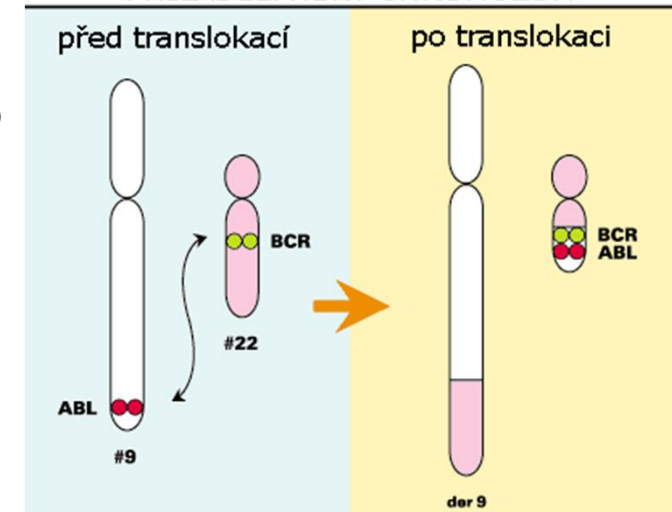
- chromozomové aberace
 - § translokace, inserce, delece, duplikace
- genové mutace
 - § bodové mutace, délkové (ins/del)

§ mutageny/karcinogeny

- fyzikální
 - § UV (karcinom a basalion kůže, melanom)
 - § ionizující záření a RTG záření (leukemie, št. žláza, kosti, ...)
- chemické
 - § polycyklické aromatické a chlorované uhlovodíky, aromatické aminy, nitrosaminy, těžké kovy, mykotoxiny
 - § některé toxické až po metabolické transformaci v organismu, popř. při tepelném zpracování (potrava)
 - E nádory GIT jako důsledek expozice karcinogenům v dietě
 - E nádory plic jako důsledek kouření
 - E alkoholická cirhóza
- biologické = inkorporace virového genomu do hostitelského, opět v kritických místech
 - § DNA viry
 - E herpes (EBV - lymfomy)
 - E hepdnaviry (HBV – hepatocelulární ca)
 - E papovaviry (papilomaviry – ca děložního čípku, hrtanu, ústní dutiny)
 - E adnoviry
 - § RNA viry – retroviry
 - E HIV - Kaposiho sarkom, B-lymfom
 - E HTLV – T-buněčná leukemie
- prekancerózy = chronická iritace tkáně zánětem
 - § Baretův jícen při GER
 - § ulcerózní kolitida a Crohnova nemoc
 - § divertikulitida



PHILADELFSKÝ CHROMOZOM



Růst tumoru

§ dělení v klonu nádorových buněk: $N=2^n$

- 2, 4, 8, 16, 32,

§ 10 dělení = ~1 000 bb.

§ 20 dělení = ~1 000 000 bb. (m=1mg)

§ 30 dělení = ~1 000 000 000 bb. (m=1g)

§ 40 dělení = m=1kg

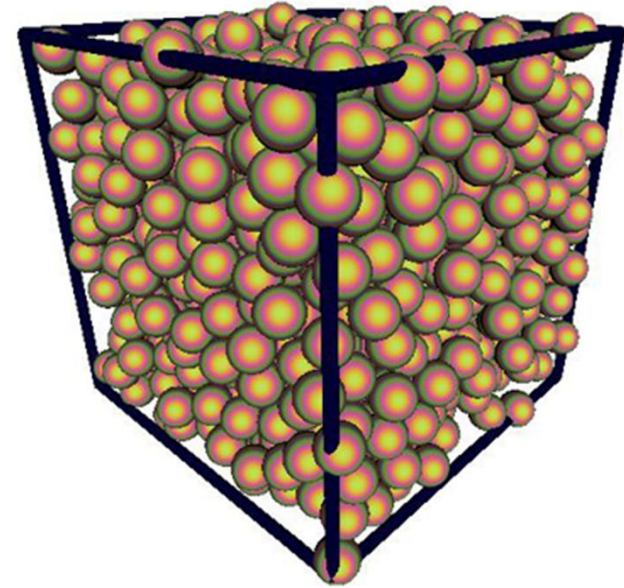
E při 12-ti hodinovém b. cyklu za zhruba 20 dní

§ ve skutečnosti je ovšem růst nádoru mnohem pomalejší - dělení × zánik buněk

- prodlužování trvání b. cyklu
- neproliferující frakce bb. (diferencované)
- zánik bb. (malnutrice, cytotox. lymfocyty)
- mechanické ztráty bb. (odlupování např. ve střevě)

§ podmínkou růstu je vytvoření nádorového stromatu a kapilární sítě (angiogeneze)

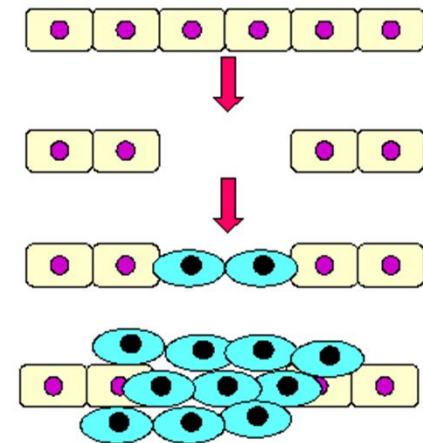
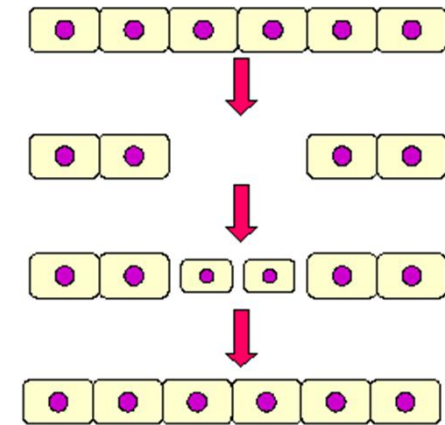
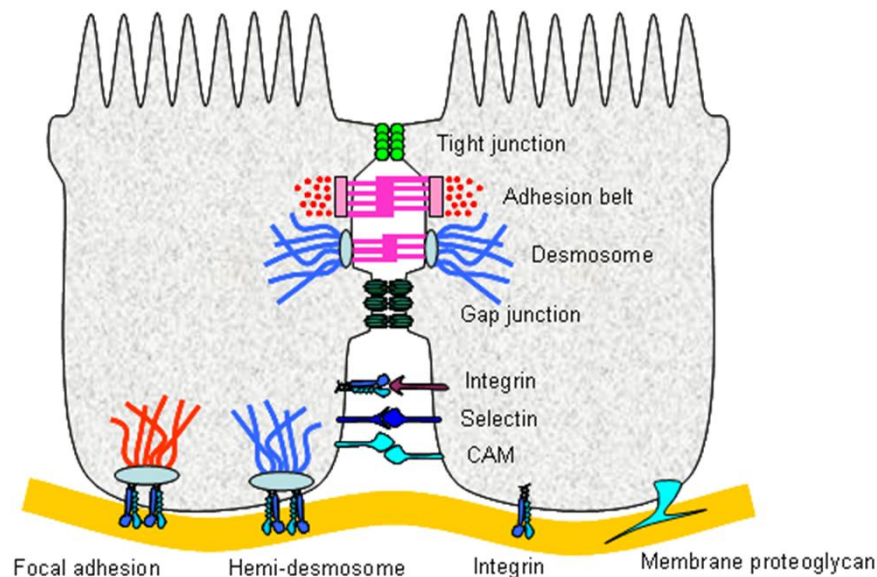
- pak převažuje proliferace nad zánikem buněk



Růst tumoru: další faktory ovlivňující b. cyklus

§ mezibuněčná komunikace (~kontaktní inhibice)

- integriny - spojení s ECM
- cadheriny - spojení bb. mezi sebou



Růst tumoru: další faktory ovlivňující b. cyklus

§ metabolismus = potřeba energie (kyslík a substráty)

- buněčná masa velikosti okolo 1mm^3 (cca 1×10^6 buněk) není bez vaskularizace schopna dále růst (proliferace je v rovnováze s apoptózou)
- v odpovědi na hypoxii je regulován hypoxia-1a (HIF-1a), který po translokaci do jádra ovlivňuje transkripci řady genů, mimo jiné

§ represe E-cadherinu

§ \uparrow exprese GLUT1 a 3 = \uparrow substráty

E také efekt hormonů a růst. faktorů

§ vascular endothelial growth factor (VEGF) a angiopoetin

E tento stimuluje novotvorbu cév (angiogeneze) nutných pro další růst nádoru

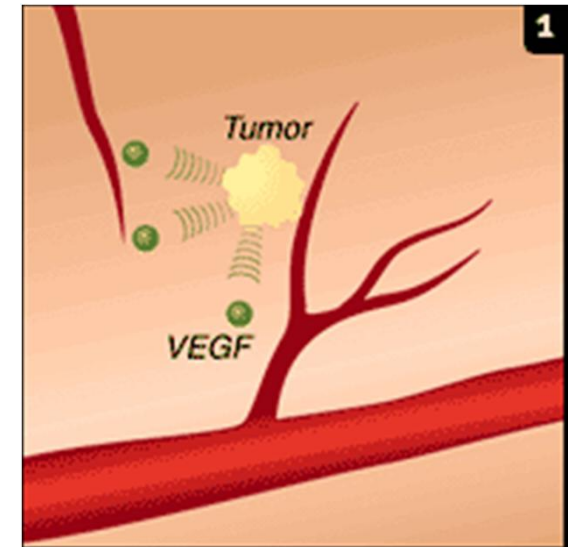
§ chemotaxe makrofágů do tumoru a produkce dalších angiogenních a růstových faktorů

E VEGF

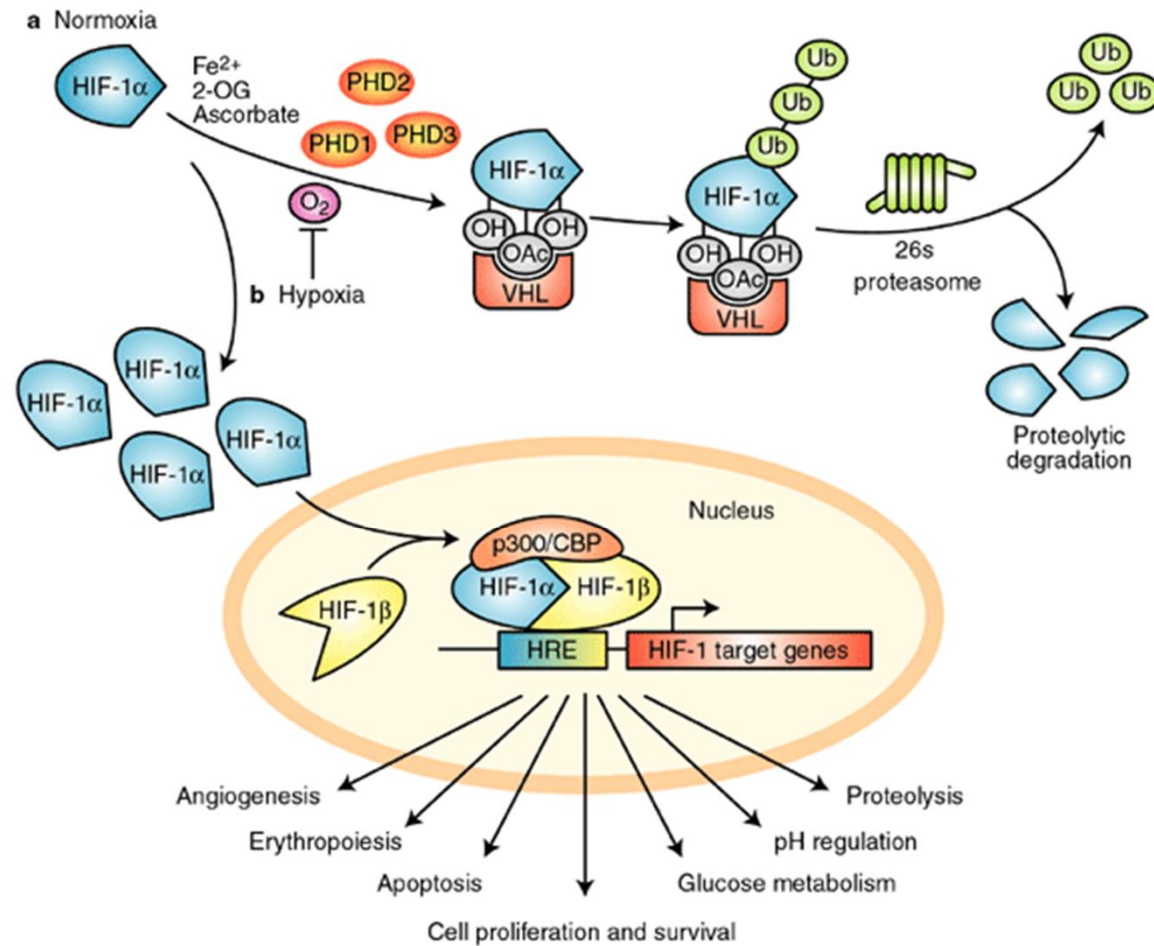
E basic fibroblast growth factor (bFGF)

E transforming growth factor-b (TGF-b)

E platelet-derived growth factor (PDGF)

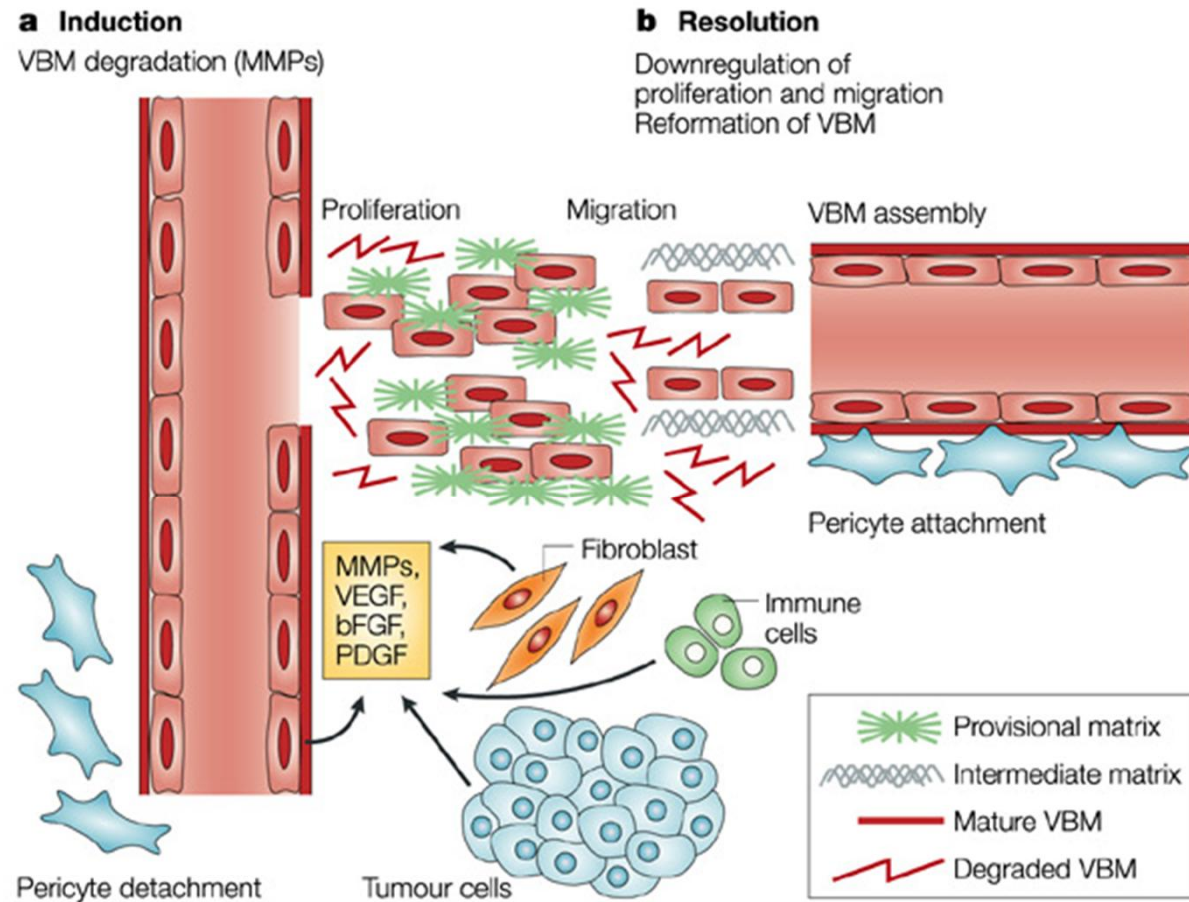


Hypoxií-indukovaná transkripce genů

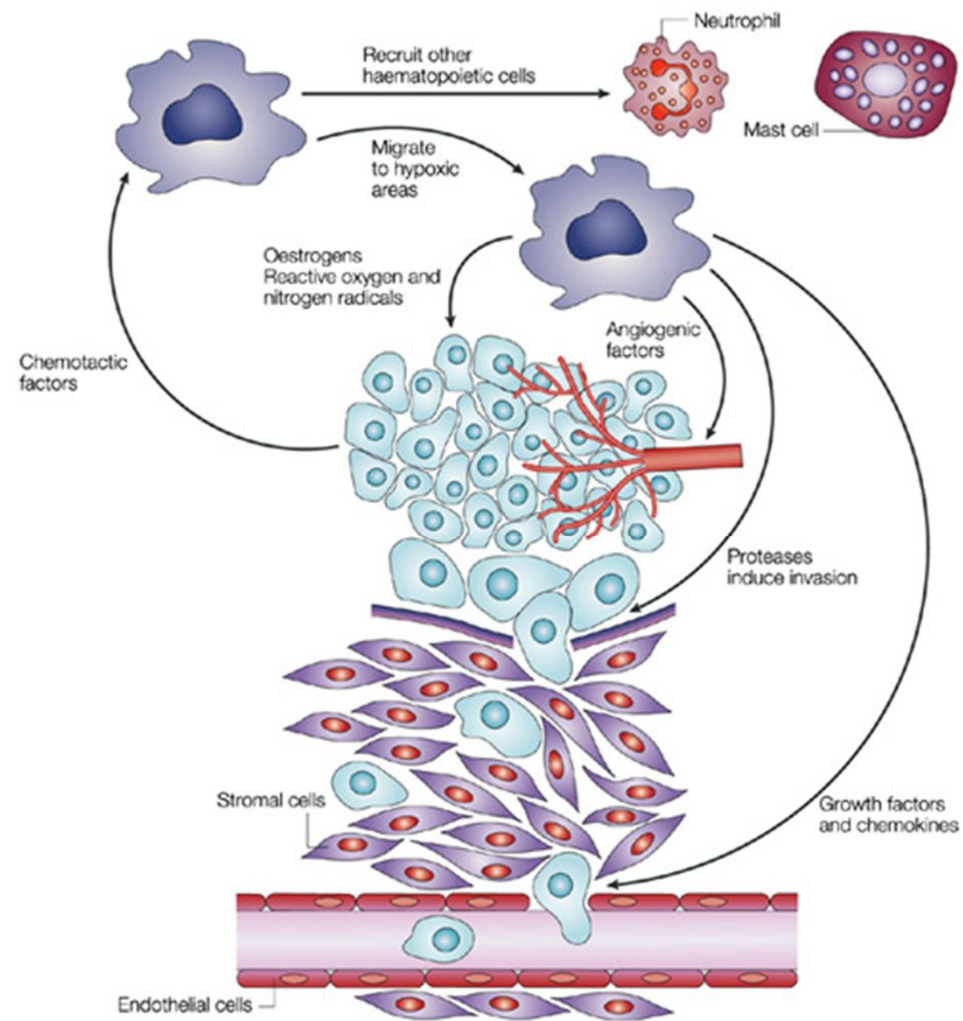


HIF-1 α regulation by proline hydroxylation

Angiogeneze



Infiltrate tumoru makrofágy



Imunitní systém vs. nádor

§ nádorové bb. mají některé imunologické odlišnosti

- změny přirozených povrchových antigenů (např. ztráta MHC)

§ unikají imunitnímu rozeznání a likvidaci

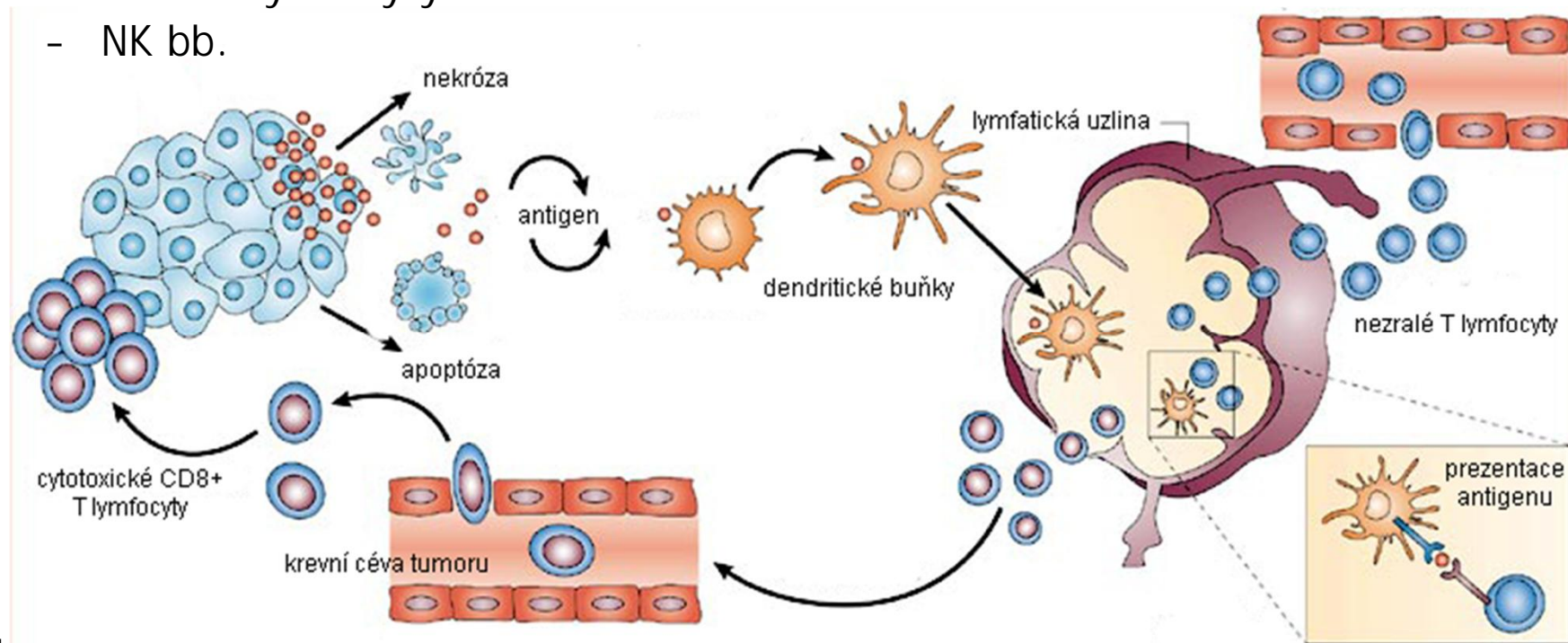
- exprese nových (tzv. onkofetálních) antigenů

§ diagnostické markery (např. CEA, α -fetoprotein aj.)

§ v protinádorové imunitě se uplatňují cytotoxické mechanismy

- CD8+ T-lymfocyty

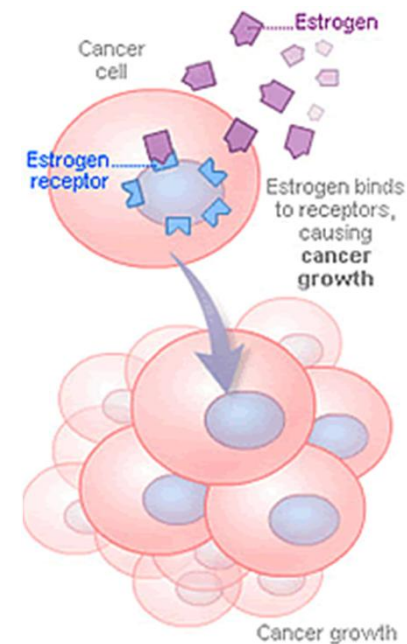
- NK bb.



Hormonální stimulace

§ růst některých tumorů
je výrazně potencován
hormony (nejč.
pohlavními)

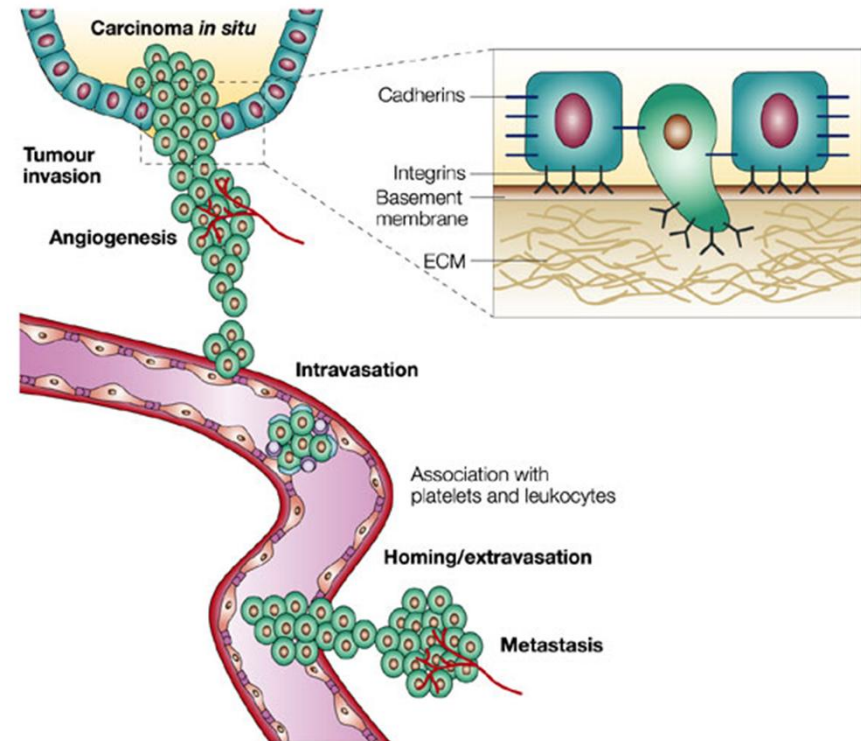
§ ca prsu, dělohy,
vaječníků, prostaty



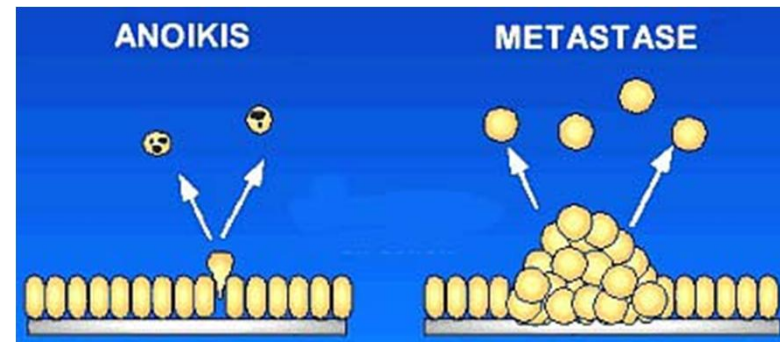
Invazivita tumoru

§ nádorové bb. získávají ztrátou adhezivních proteinů (E-cadherinu) "motility" fenotyp (epithelial-mesenchymal transition, EMT)

- ztráta apikobazální polarizace bb.
 - § epitelové nádory (karcinomy) tvoří 2/3 všech nádorů
- produkce proteolytických enzymů nádor. bb.
 - § matrix metalloproteinázy (MMP) a uPA
 - E degradují extracelulární matrix a umožňuje "pučení" nových cév a extravasaci nádor. bb.
- rezistence k anoikis
 - § forma apoptózy iniciovaná "odloupnutím" epitel. b. od ECM



Nature Reviews | Molecular Cell Biology



Metastazování

§ vytváření dceřinných nádorů vzdálených od primárního ložiska

- krví

§ často po směru toku

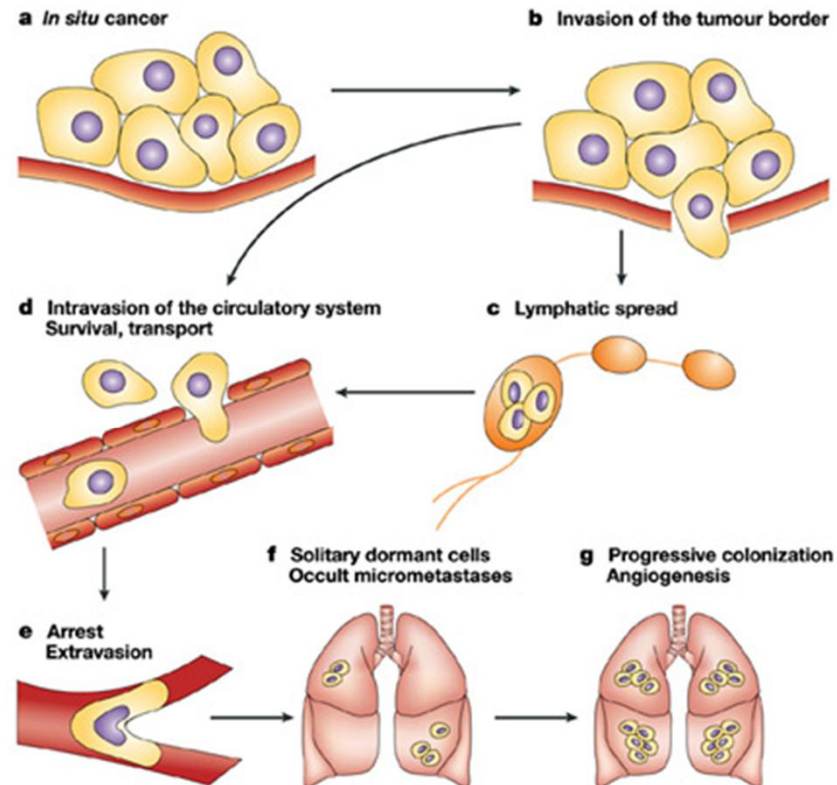
E např. z GIT do jater

E např. venózní krví do plic

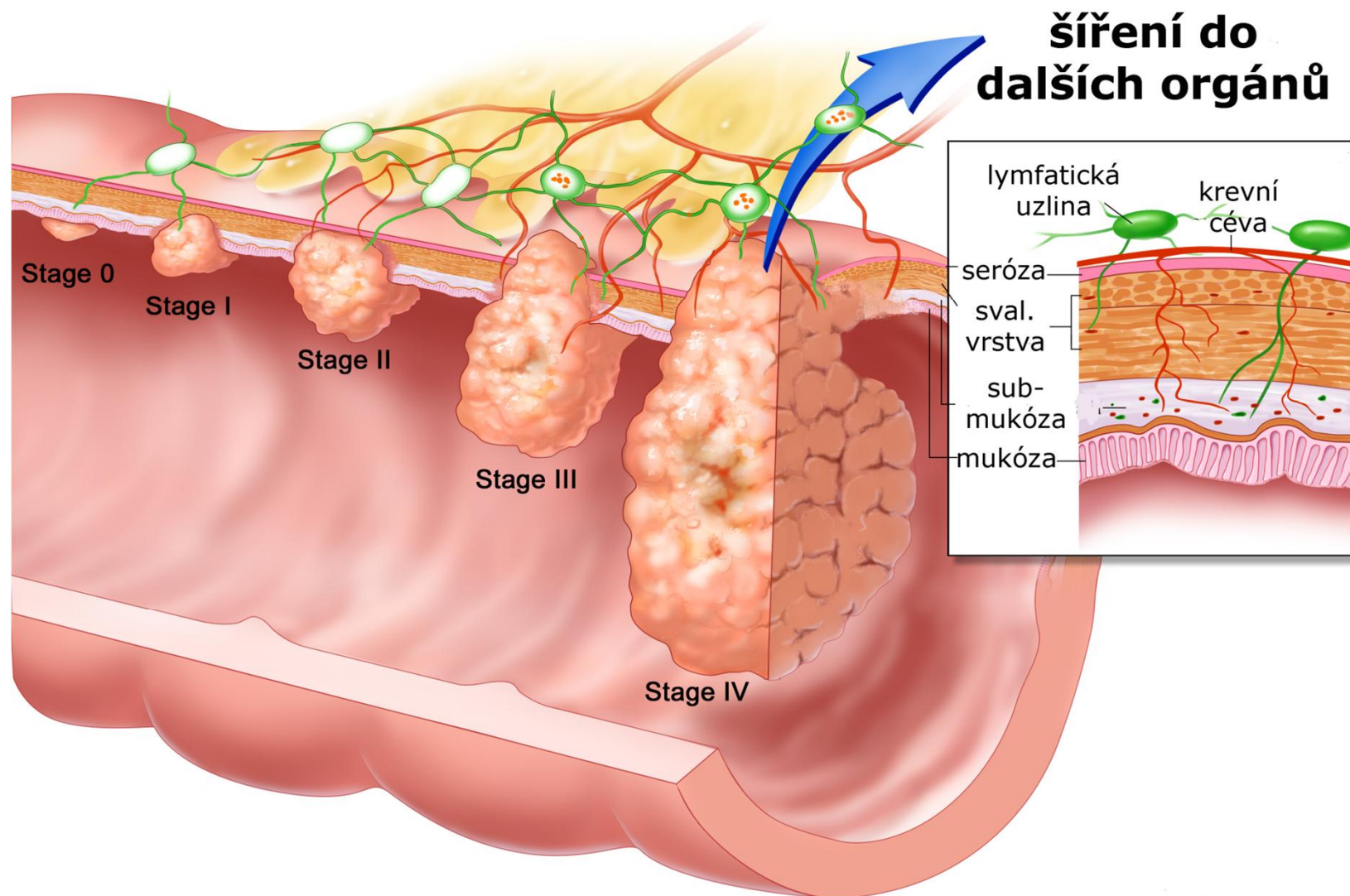
E např. z plic tepennou krví do kostí a mozku

- lymfou

§ nejprve nejbližší lymf. uzliny, poté vzdálenější



Příklad - kolorektální karcinom



Interakce nádoru a hostitele

§ místní působení nádoru

- mechanický útlak (např. nádory mozku)
- obstrukci (např. nádory žl. cest)
- krvácení, snadná tvorba modřin (leukemie)
- krvácení do GIT (nádory střeva a žaludku)
- edém (např. lymfomy)
- trombózy (DIC)
- porucha zraku (útlak zrak. nervu adenomem hypofýzy)
- porucha hlasu (ca hrtanu)
- kašel (ca plic)
- porucha polykání (ca jícnu)
- zlomenina kosti (myelom)

§ celkové působení

- zvýšení teploty
 - § produkce cytokinů (pyrogenů) nádorem (např. IL1, TNF α)
- nádorová anorexie/kachexie
 - § kombinovaný důsledek
- paraneoplastické syndromy
 - § některé tumory produkují hormony (adenomy)- důležitý diagnostický znak!
 - E pigmentace, endokrinopatie (např. Cushing), hyperkalcemie, atd.

Klasifikace nádorů

§ morfologická diagnostika = typing

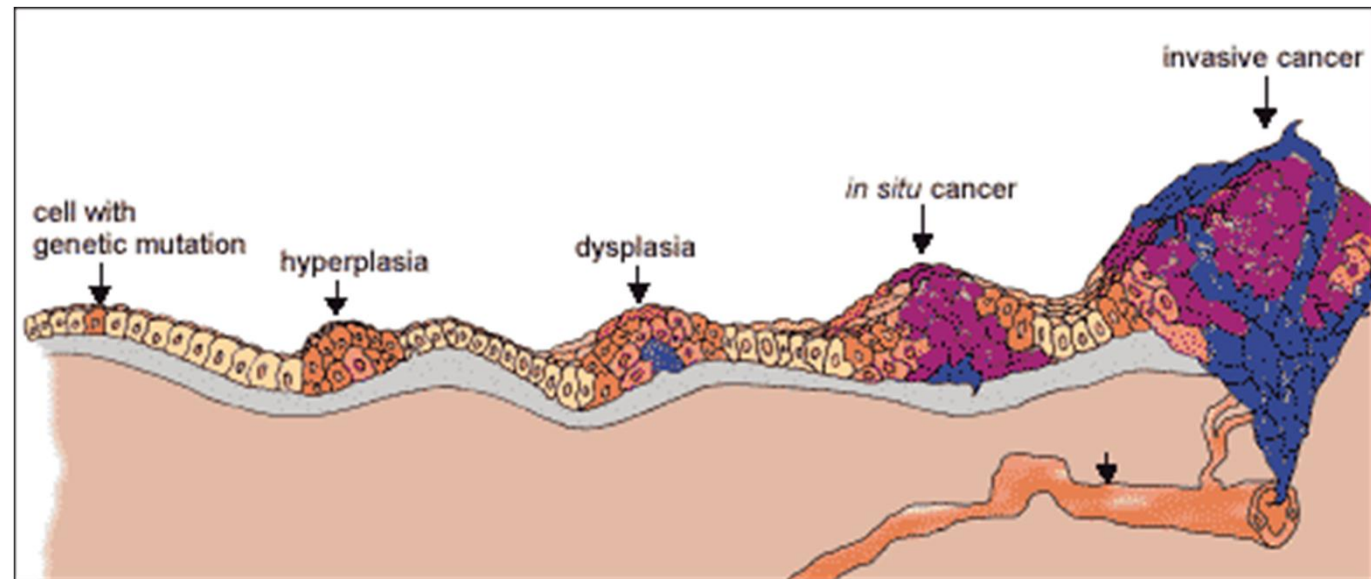
- určení histologického typu

§ hodnocení invazivity = grading

- stupeň benignity × malignity

§ určení iniciálního rozsahu = staging

- TNM klasifikace (T = tumor, N = node (uzliny), M = metastasis)



Některé následky nádorů

- § Hyperkalemie
- § Hypoglykemie
- § Anémie
- § Acidóza
- § Hormonální poruchy
- § Nádorová kachexie

Nádorové markery

- § Zhoubné novotvary patří k nejčastějším příčinám úmrtí
- § Růst incidence jakých typů tumorů?
- § Dochází k posunu do mladších věkových kategorií
- § Cílem je co nejčasnější diagnostika
- § Zobrazovací metody vs. imunochemické metody
- § Metodické zdokonalování

Co to jsou nádorové markery ?

§ Molekuly proteinového charakteru

- Celulární tumorové markery
- Humorální nádorové markery

§ Produkce nádorových markerů

- Přímou nádorové buňky (s nádorem asociované antigeny)
- Jiné tkáně jako odpověď na maligní proces (indukované nádorové markery)

Vlastnosti „ideálního“ nádorového markeru

§ Vysoká specifická vzhledem k malignímu onemocnění

- Pacienti bez zhoubného nádoru by měli poskytovat negativní výsledek testu
- Zdaleka to neplatí
- Falešně pozitivní výsledky u řady nenádorových onemocnění (záněty)

Vlastnosti „ideálního“ nádorového markeru

- Vysoká orgánová specifická
- Pozitivní hodnota by měla cíleně vypovídat o postižení konkrétního orgánu

| Tumorový marker | Onemocnění či jiná příčina |
|-----------------|--|
| CEA | Záněty jater, cirhóza, pankreatitida, kouření |
| AFP | Jaterní cirhóza, hepatitida |
| CA 15-3 | Jaterní cirhóza, hepatitida, snížení GFR |
| PSA | Benigní hyperplazie prostaty, vyšetření per rectum, katetrizace močového měchýře |
| hCG | Mola hydatidosa, těhotenství |
| | |

Vlastnosti „ideálního“ nádorového markeru

- Vysoká citlivost
 - Schopnost laboratorního ukazatele prokázat přítomnost zhoubného nádoru v počátečním stádiu
 - Mnoho tum. markerů tuto podmínku nesplňuje - zvýšení až u velkých generalizovaných tumorů
 - Citlivost můžeme zvýšit kombinací několika tumorových markerů

Vlastnosti „ideálního“ nádorového markeru

- Korelace mezi výší lab parametru a velikostí nádoru
 - Koncentrace závisí nejen na rozsahu nádoru (staging), ale i na stupni zralosti (grading) jeho buněk, ale také na schopnosti produkovat určitý marker a vyplavovat ho do krve

Oblasti užití tumorových markerů

- Screening zhoubných nádorů
- Diagnostika zhoubného novotvaru
- Určení stádia nádoru a jeho prognózy
- Sledování průběhu choroby a efektu terapie (remise vs. relaps)

Konkrétní příklady nádorových markerů

§ Onkofetální a onkoplacentární antigeny

– Alfa1 fetoprotein (AFP)

§ Produkuje buňky žloutkového vaku a jater plodu

§ U dospělých je koncentrace minimální

§ Koncentrace se zvyšuje u primárního karcinomu jater

– CA 15-3

§ Používá se pro stanovení posouzení úspěšnosti léčby a včasné předpovědi recidivy u karcinomu prsu

– hCG

§ Diagnostika gravidity

§ Vysoké hodnoty při mola hydatidosa – přechod v choriokarcinom

§ U mužů v případě germinativních nádorů

- Enzymy

- PSA

- Produkován buňkami prostaty
 - Není úplně zřejmá fce

- PACP (prostatická kyselá fosfatáza)

- Podobné indikace k vyšetření jako u PSA

- ALP

- Je zvýšený u osteosarkomu

- LDH

- Katepsin D

- Intracelulární proteáza
 - Degraduje bazální membránu – umožňuje invazivní růst a metastázování nádoru
 - Ca prsu

- Nové nádorové markery

- MT

- MMP

- ??