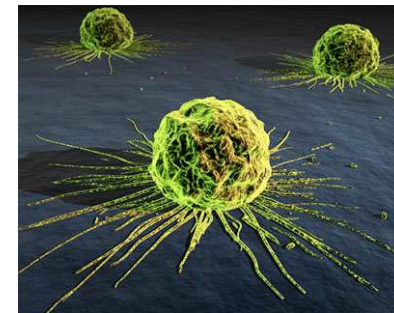


Buněčná signalizace a karcinogeneze

Jan Šmarda

Ústav experimentální biologie PŘF MU



Signalizace

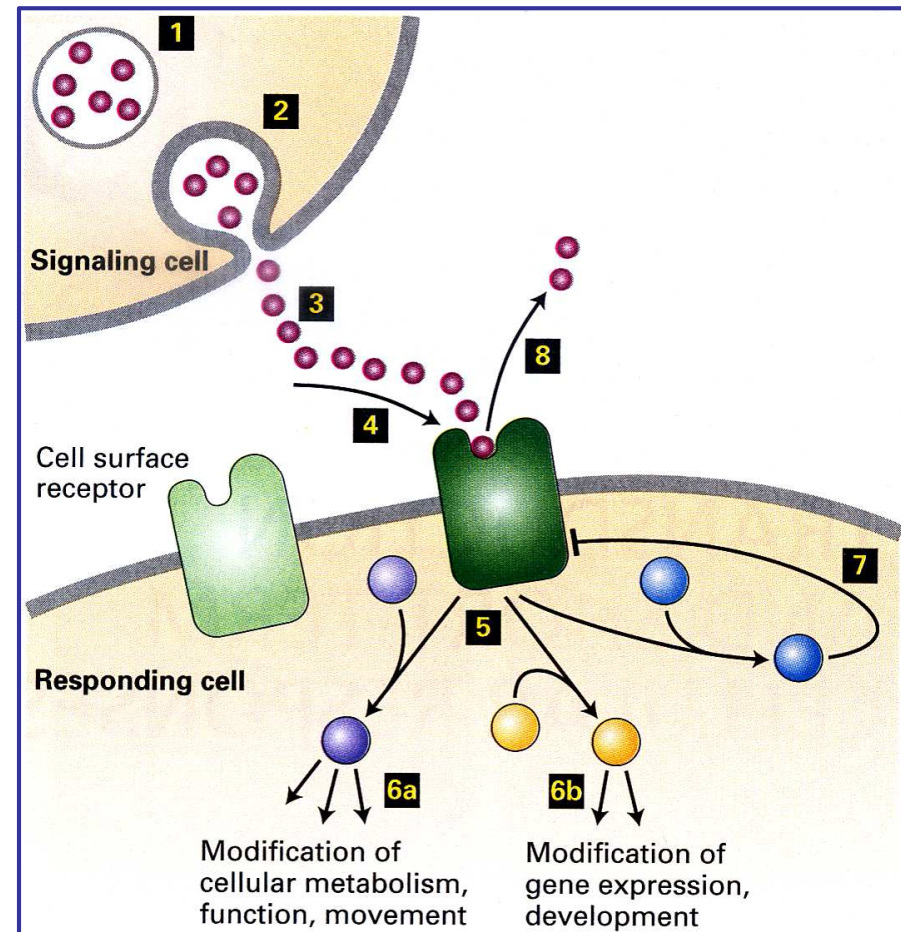
je nástrojem komunikace

- buňky vzájemně komunikují a koordinují své aktivity
- základem buněčné komunikace je tvorba/detekce signálů, jejich zpracování a zajištění adekvátní odezvy
- Zásadně ovlivňuje chování buněk (metabolismus, růst, diferenciaci, pohyb, sekreci proteinů, atd.)



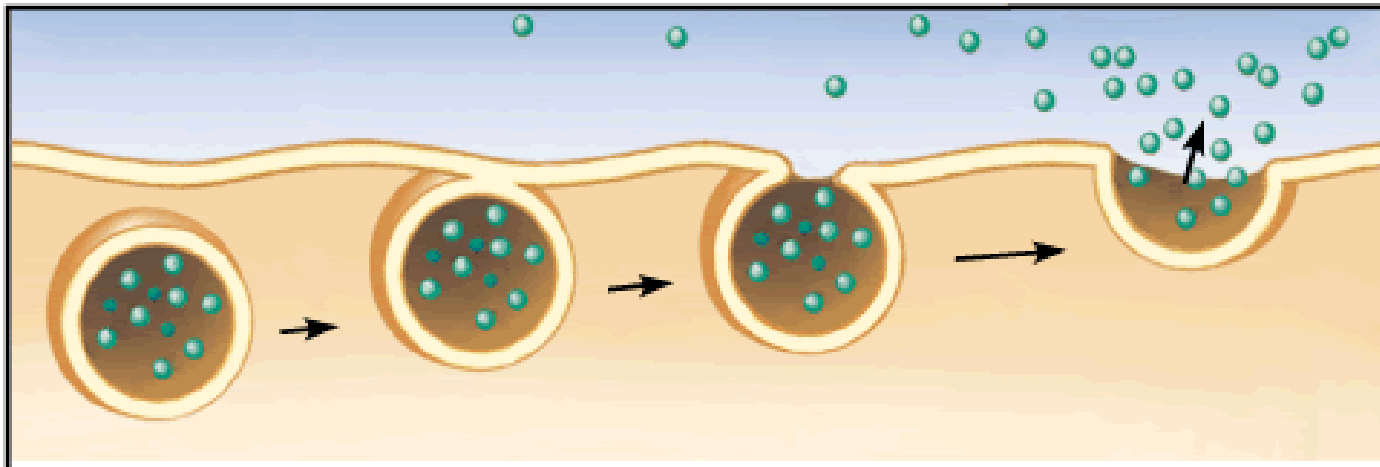
Princip signalizace

- tvorba signálu
- registrace signálu receptorem
- přenos signálu z receptoru k efektorům („signal transduction“)
- efektem může být transkripční faktor, enzym, složka cytoskeletu, atd...
- schopnost buňky reagovat na podněty je geneticky určena - spektrem receptorů, které je schopna vytvořit



Tvorba signální molekuly

- specializované produkční buňky seskupeny do žláz
- signální molekuly se po své syntéze dostávají do měchýřků pod plazmatickou membránou, fúzí membrán dojde k sekreci do mimobuněčného prostoru (exocytóze)



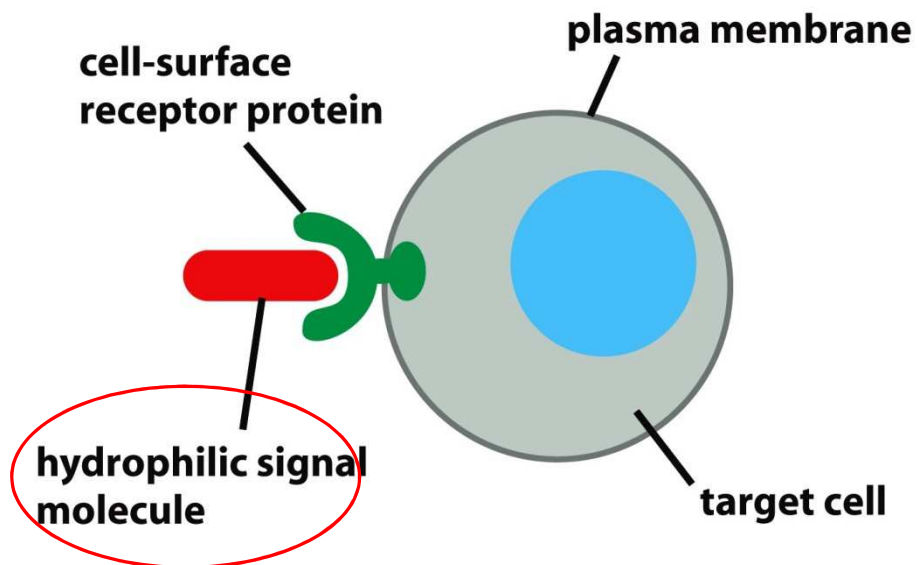


Chemická povaha signálů

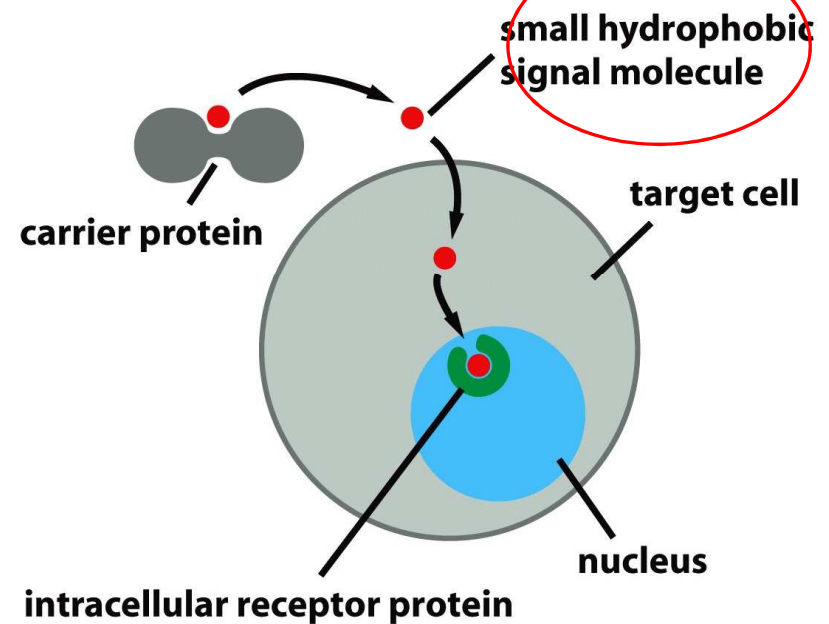
- proteiny
- krátké peptidy
- aminokyseliny
- nukleotidy
- steroidy
- retinoidy
- mastné kyseliny a jejich deriváty
- plyny

Význam rozpustnosti signální molekuly

CELL-SURFACE RECEPTORS

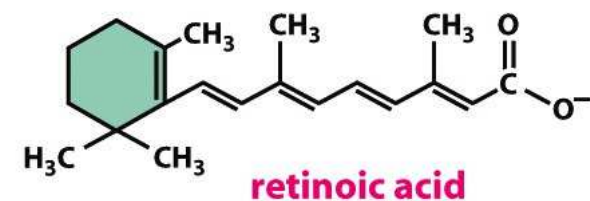
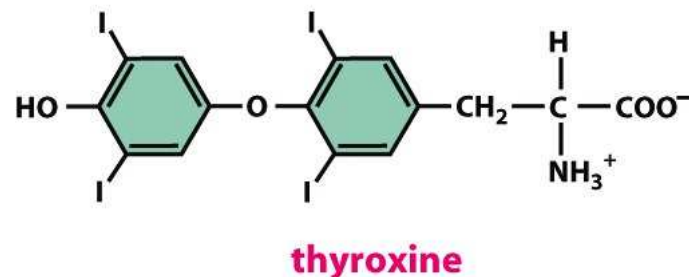
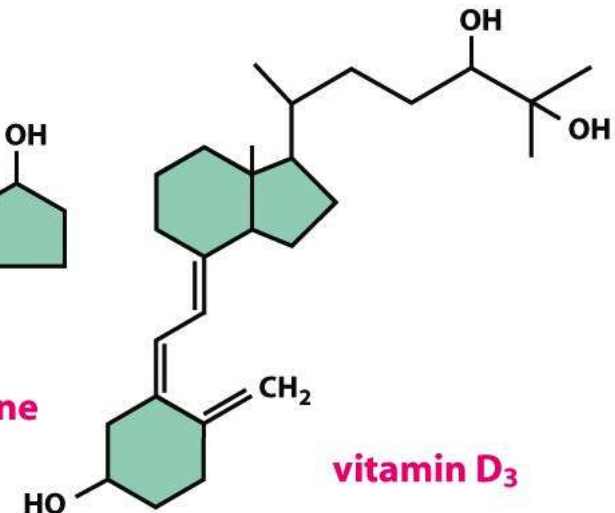
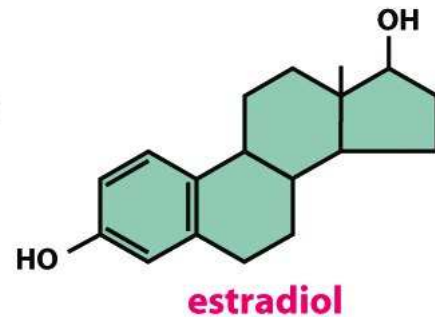
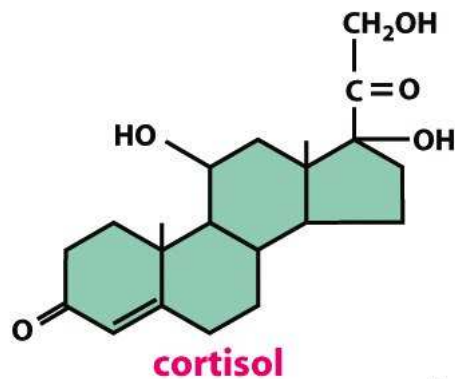


INTRACELLULAR RECEPTORS



Signalizace zprostředkovaná nitrobuněčnými receptory

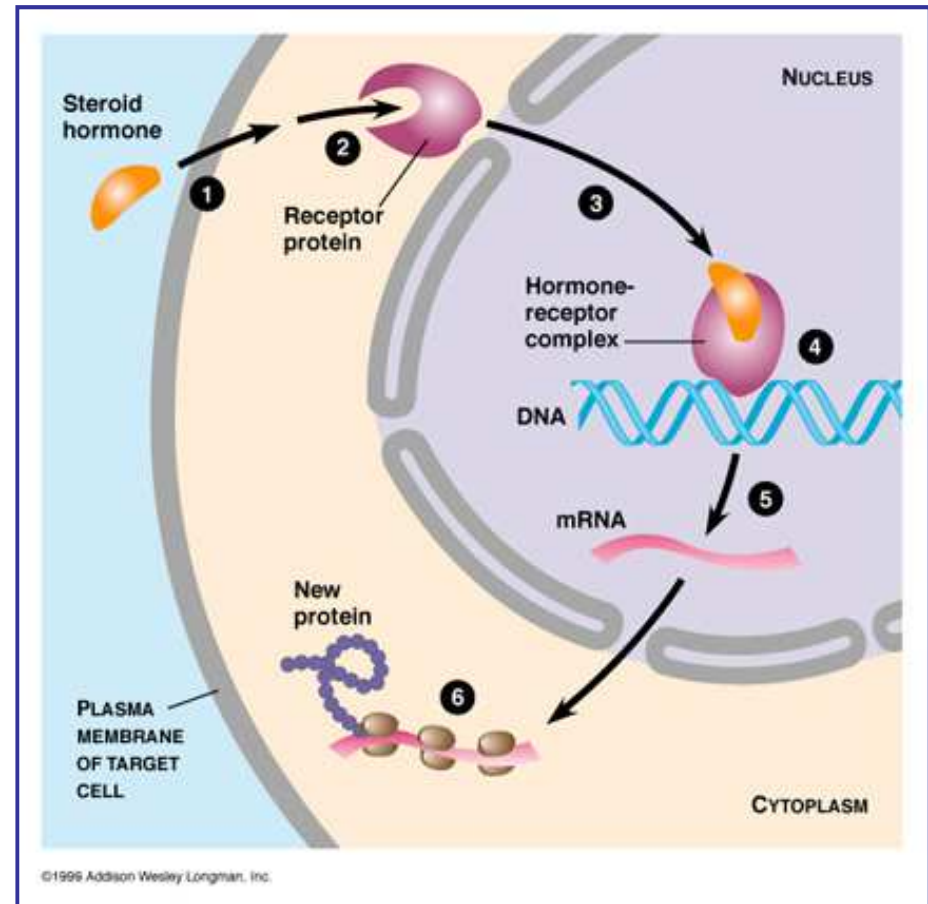
- typickými ligandy jsou **steroidní / tyroidní hormony**
- nízká molekulová hmotnost, hydrofobicita



Signalizace zprostředkovaná nitrobuněčnými receptory

Mechanismus účinku:

Malá velikost/lipofilní povaha hormonů - difúze membránou - pevná vazba na nitrobuněčné receptory - konformační změna receptorů - zvýšená afinita ke specifickým sekvencím DNA - regulace transkripce cílových genů

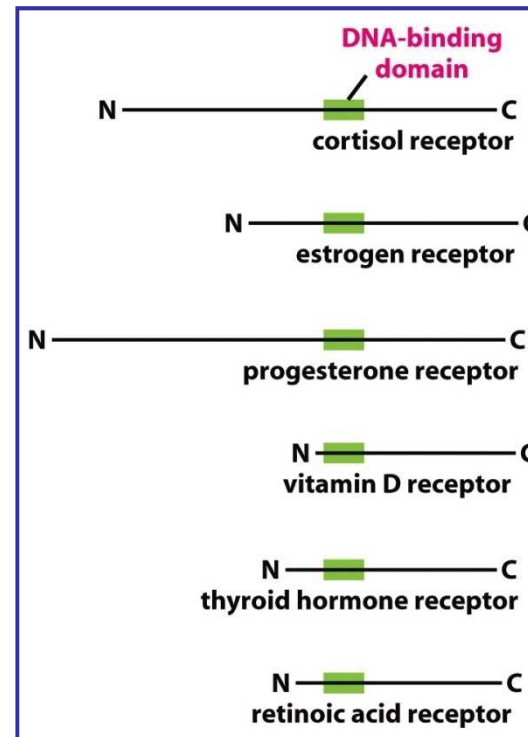
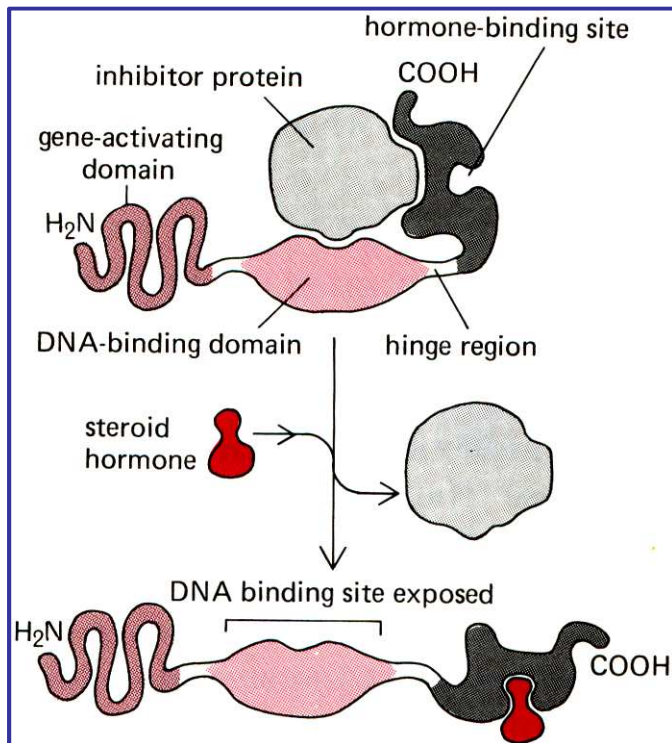


Struktura nitrobuněčných receptorů

C-konec: doména pro vazbu hormonu

N-konec: doména pro řízení transkripce

Střed molekuly: doména pro vazbu DNA



Signalizace zprostředkovaná povrchovými receptory

1. Hydrofilní mimobuněčný signál

(ligand, „primary messenger“):

- růstový faktor, cytokin, hormon, atd.

2. Povrchový receptor:

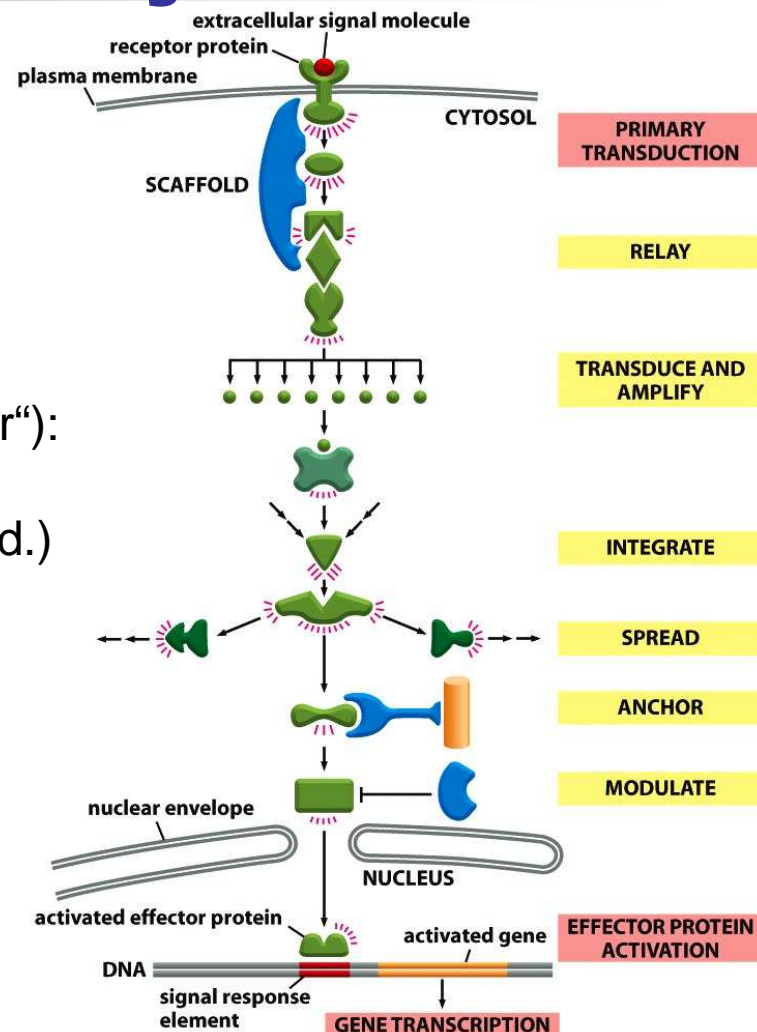
- převod mimobuněčného ligandu do podoby nitrobuněčného signálu

3. Sekundární přenašeč („secondary messenger“):

- nízkomolekulární struktury (cAMP, Ca^{2+} , diacylglycerol, zbytek kyseliny fosforečné, atd.)
- produkt enzymově katalyzované reakce
- přenos signálu od povrchových receptorů k efektorům

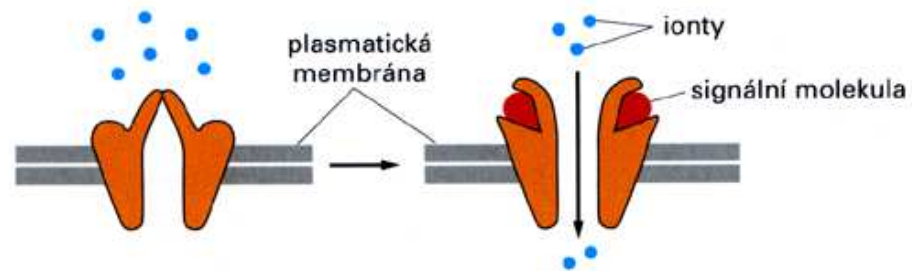
4. Cílová molekula (efektor):

- enzym
- složka replikačního aparátu
- složka aparátu pro genovou expresi
- složka cytoskeletu

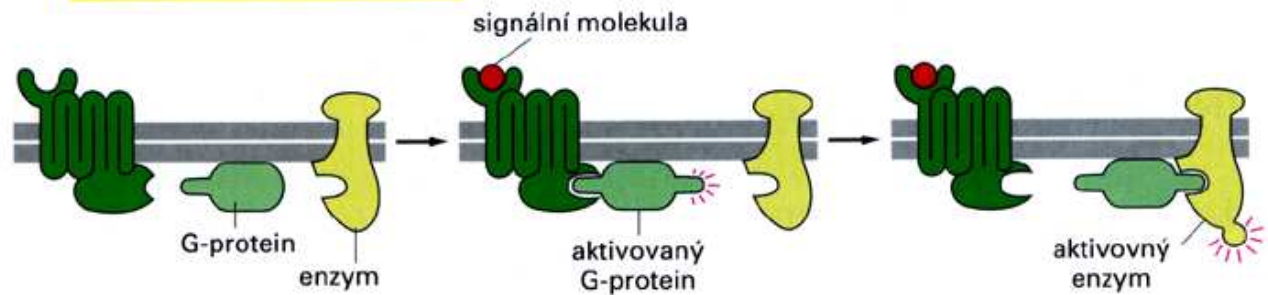


Hlavní třídy povrchových receptorů

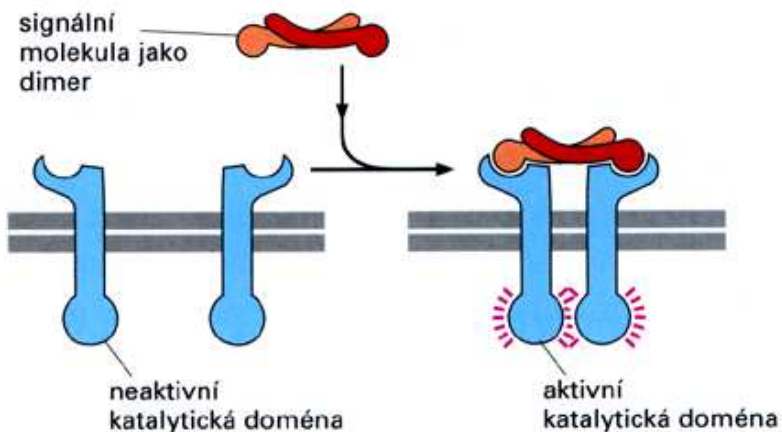
(A) receptory spojené s iontovým kanálem



(B) receptory vázané na G-protein



(C) receptory vázané na enzym





Jak receptory přenášejí signál přes plazmatickou membránu?

1. Konformační změnou

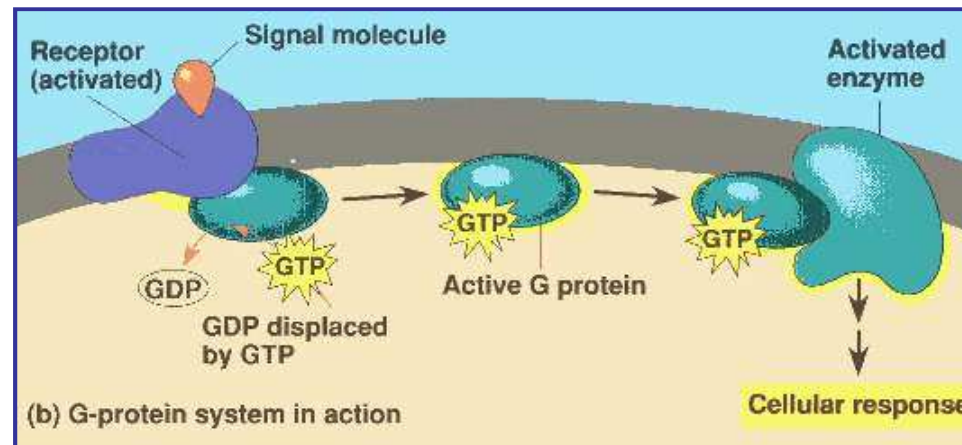
- vyvolanou vazbou ligandu, která se projeví v nitrobuněčné doméně receptoru
- typické pro receptory se sedminásobným vinutím membránou

2. Dimerizací

- ligand seskupí inaktivní podjednotky receptorů, které jsou schopny laterálního pohybu membránou
- dimerizace receptoru umožní přiblížení jejich tyrozinkinázových cytoplazmatických domén
- následkem je vzájemná fosforylace a aktivace receptoru

Receptory se sedminásobným vinutím membránou

- aktivace ligandem vede k vytvoření vazebného místa pro protein G (v cytoplazmatické části receptoru)
- aktivní receptor může interagovat s proteinem G: vazba vyvolá disociaci **GDP** z G proteinu a jeho nahrazení **GTP**
- **aktivované receptory katalyzují výměnu nukleotidu vázaného k proteinu G**
- aktivní G-protein s navázaným GTP reguluje několik důležitých enzymů zodpovědných za tvorbu sekundárních přenašečů

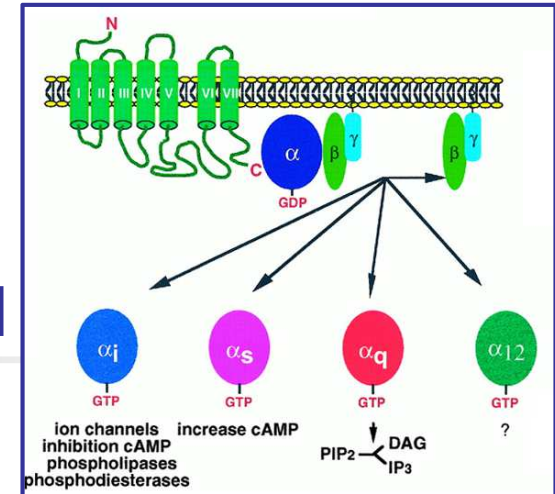




Dva typy proteinů G

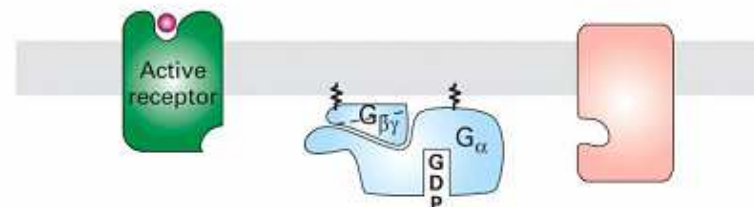
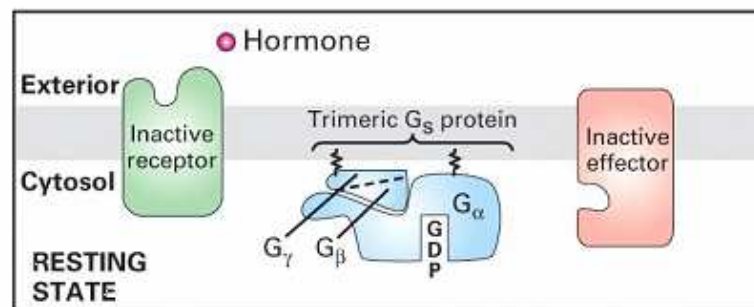
- **trimerní (velké) G proteiny**, které se indukují přímou vazbou s receptory
- **monomerní (malé) G proteiny** typu Ras, které interagují s receptory nepřímo prostřednictvím adaptérů
- všechny stimulované G proteiny obsahují oblasti, které interagují s jinými proteiny a tak ovlivňují jejich aktivitu
- všechny G proteiny mohou vázat GTP/GDP a disponují GTPázovou aktivitou

Funkce trimerních G-proteinů

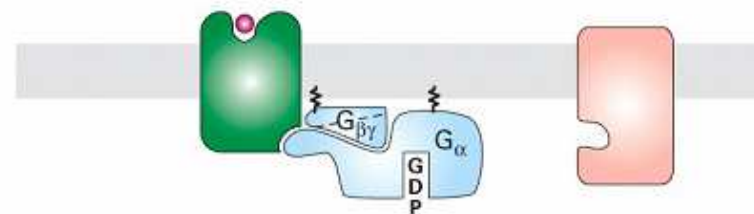


- spojovací články mezi povrchovými receptory a sekundárními přenašeči
- interagují pouze s aktivovanými receptory
- interakce s aktivovaným receptorem vede k **výměně GDP** na podjednotce α proteinu G za **GTP**
- **podjednotka α** s navázaným GTP se aktivuje a **odděluje se** od podjednotek β a γ
- uvolněná podjednotka α s navázaným GTP (podobně jako uvolněné podjednotky β a γ) může interagovat se svou **cílovou molekulou** v plazmatické membráně (efektorem), který signál předává dál
- značná rozmanitost efektorů G proteinů (adenylát cykláza, fosfolipáza C, cGMP fosfodiesteráza, různé typy iontových kanálků)

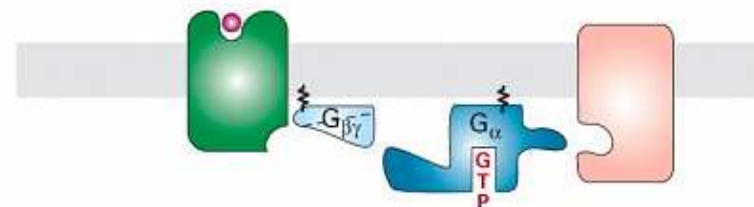
Funkce trimerních G-proteinů



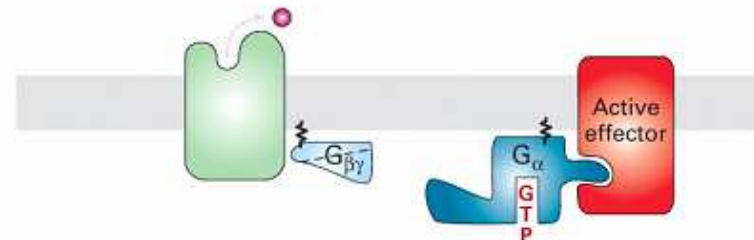
1 Binding of hormone induces a conformational change in receptor



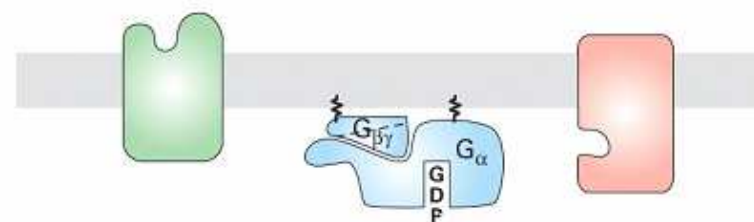
2 Activated receptor binds to G_α subunit



3 Binding induces conformational change in G_α ; bound GDP dissociates and is replaced by GTP; G_α dissociates from $G_{\beta\gamma}$



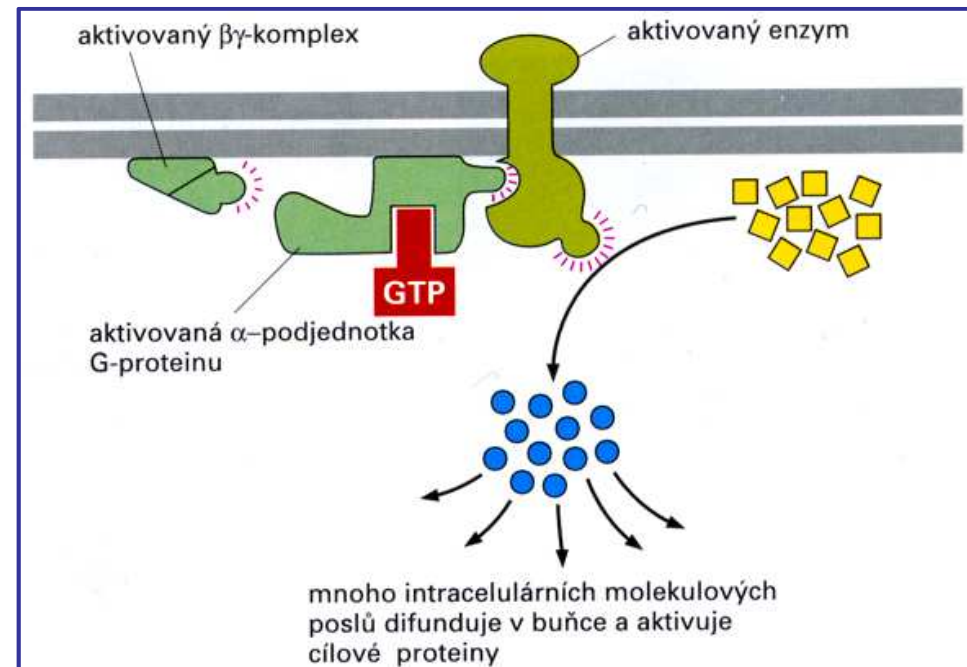
4 Hormone dissociates from receptor; G_α binds to effector, activating it



5 Hydrolysis of GTP to GDP causes G_α to dissociate from effector and reassociate with $G_{\beta\gamma}$

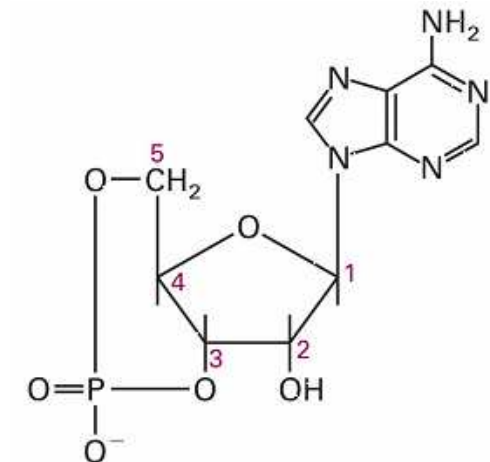
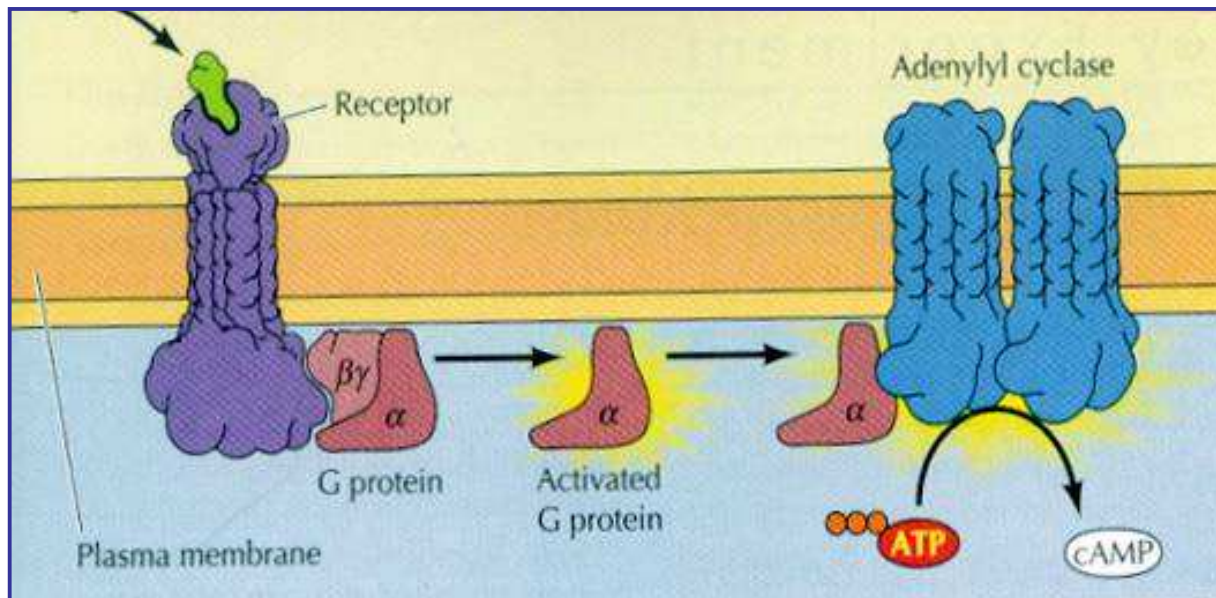
G-proteiny mohou aktivovat enzymy vázané v membráně

- následná tvorba dalších signálních molekul
- nejčastějšími cílovými enzymy jsou **adenylátcykláza** (tvorba **cAMP**) a **fosfolipáza C** (tvorba **inositoltrifosfátu** a **diacylglycerolu**)
- spřažení mezi G-proteinem a tvorbou sekundárních přenašečů může být stimulační (**Gs**) nebo inhibiční (**Gi**)



G-protein: aktivace adenylátcyklázy

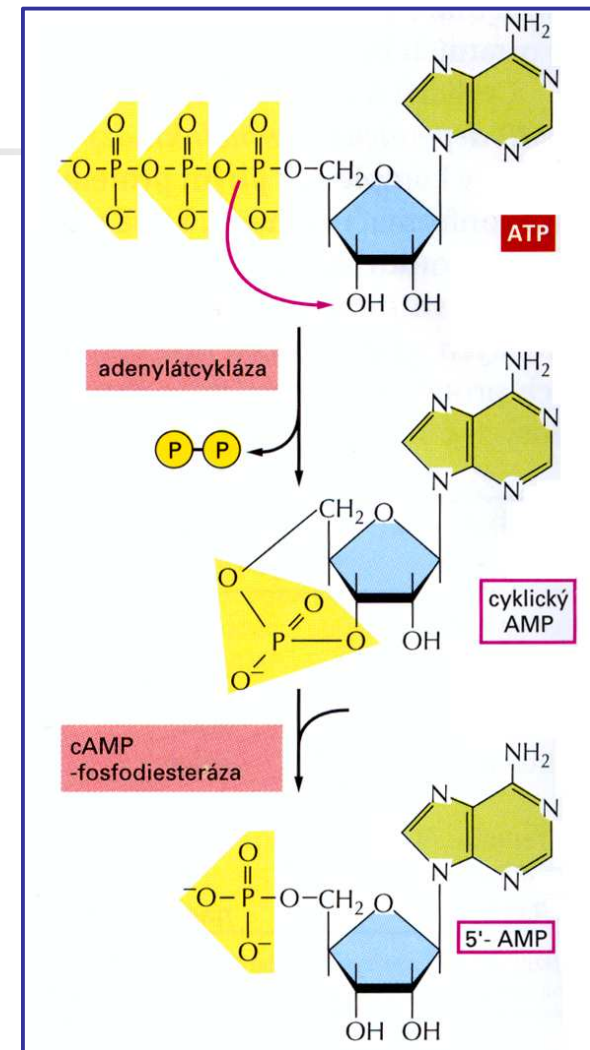
Regulace tvorby **cyklického adenzimnonofosfátu (cAMP)**
(cAMP objeven při studiu metabolismu glykogenu, Sutherland, 1958)



**3',5'-Cyclic AMP
(cAMP)**
Activates protein
kinase A (PKA)

cyklický AMP

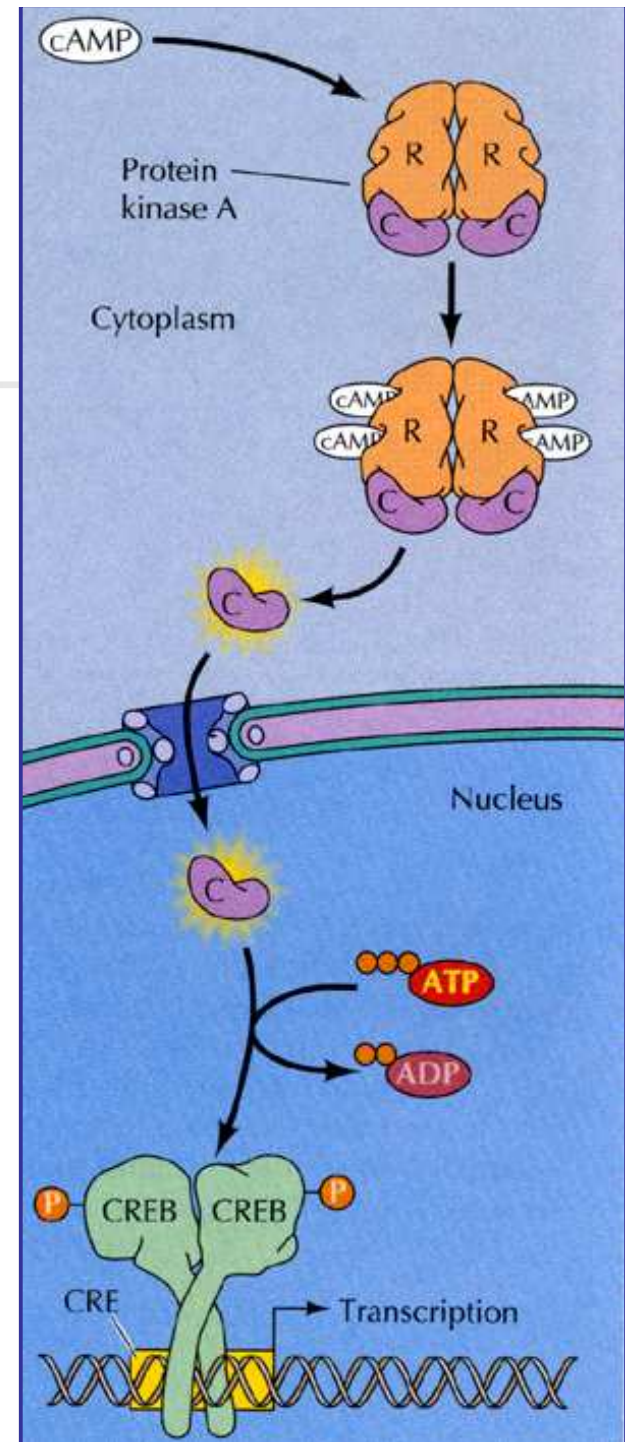
- koncentrace cAMP uvnitř buňky závisí na rovnováze aktivit **adenylátcyklázy** a **cAMP-fosfodiesterázy**
- adenylát cyklázy regulována proteinem G, aktivita cAMP-fosfodiesterázy nepodléhá kontrole (je konstitutivní)
- rozpustnost ve vodě umožňuje přenos cAMP od membrány k proteinům cytozolu nebo jádra
- **aktivuje cAMP-dependentní protein kinázu (kinázu A)**



Efektory cAMP

Protein kináza A

- aktivována cAMP
- fosforyluje transkripční faktor **CREB** (zodpovídající za transkripci genů vybavených sekvencí CRE – „cAMP-response element“)
- v metabolismu glykogenu fosforyluje **fosforylázovou kinázu** (aktivace štěpení glykogenu) a **glykogensyntázu** (inaktivace syntézy glykogenu)



Struktura protein kinázy A

Inaktivní stav:

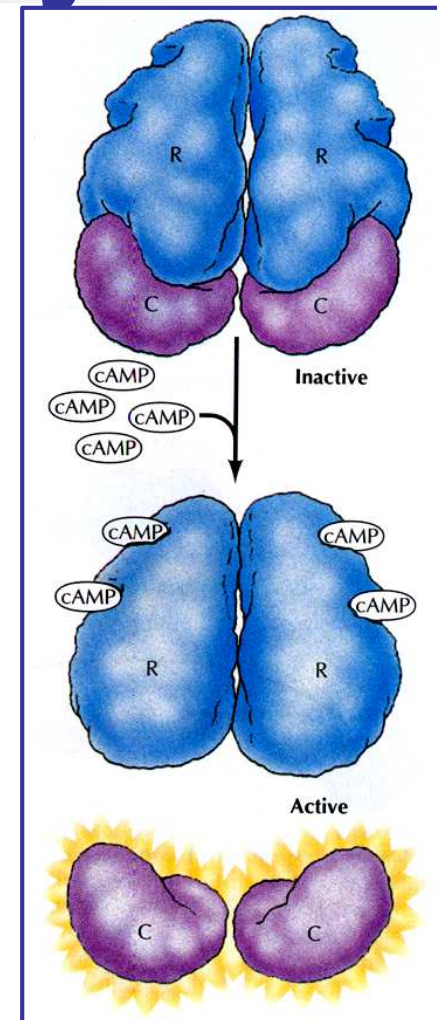
- dvě regulační podjednotky (vazba cAMP)
- dvě katalytické podjednotky

Aktivní stav:

vazba cAMP – změna konformace regulačních podjednotek – disociace regulačních podjednotek z komplexu – uvolněné katalytické podjednotky mohou fosforylovat své substráty

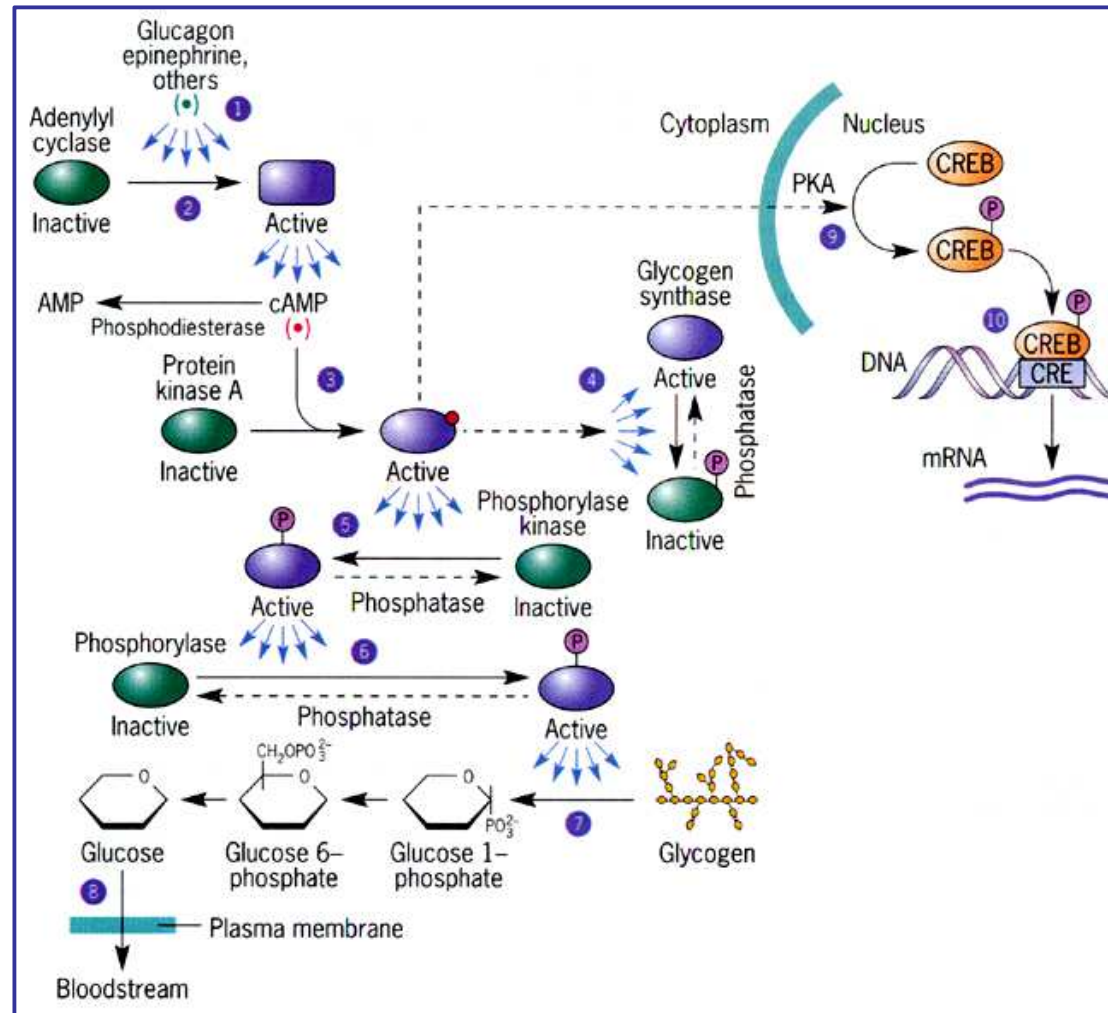
PKA:

- výskyt ve všech živočišných buňkách
- zprostředkovává většinu účinků cAMP



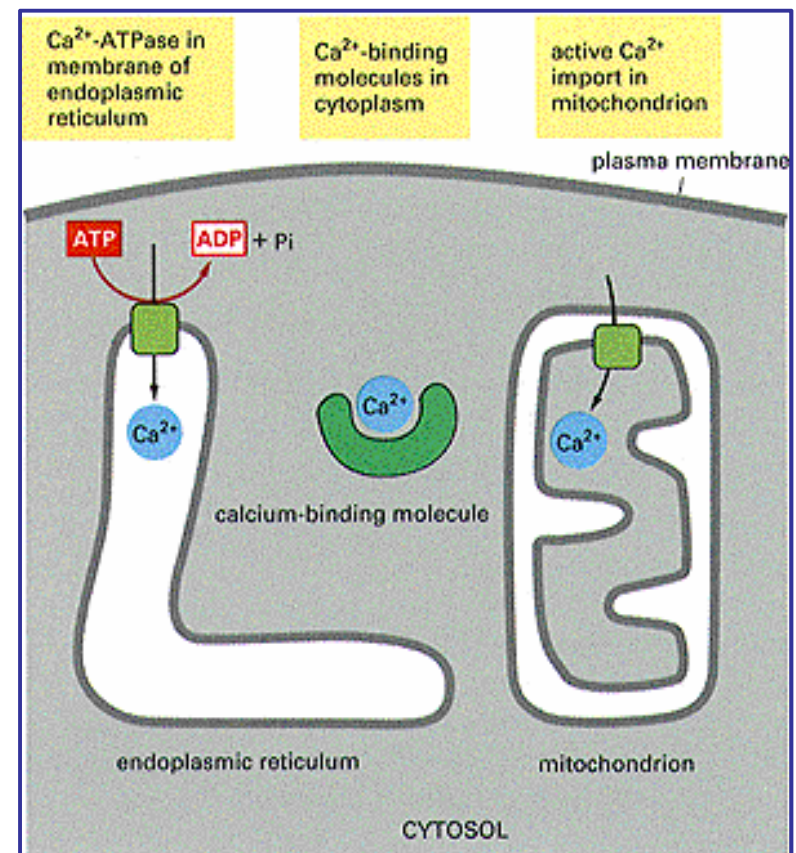
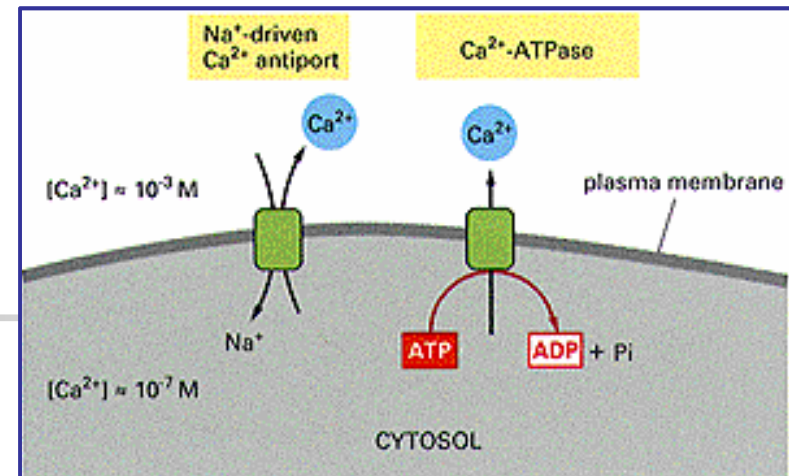
cAMP

a metabolismus glykogenu



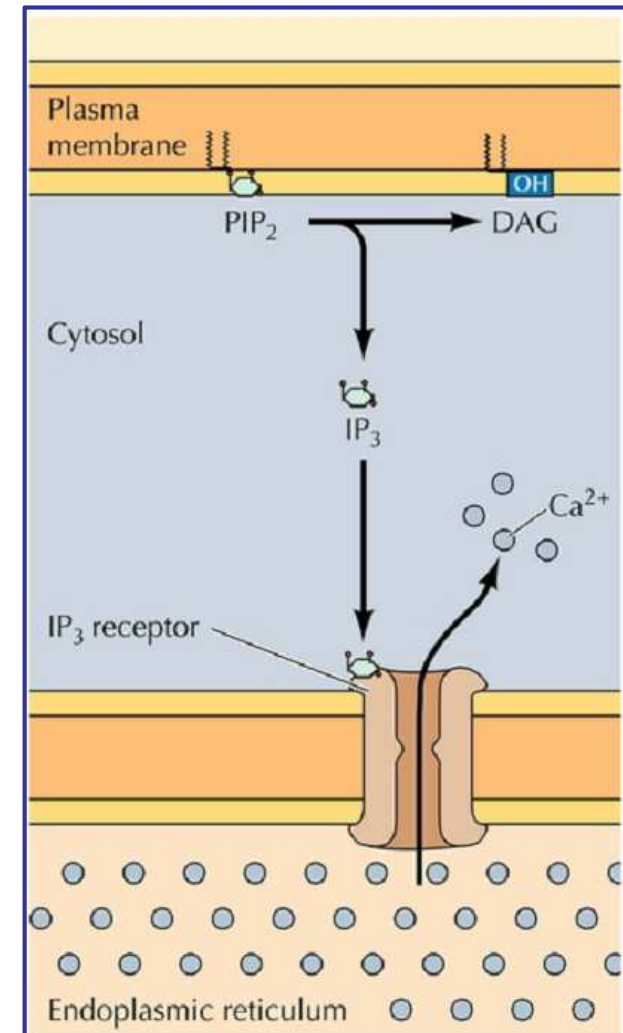
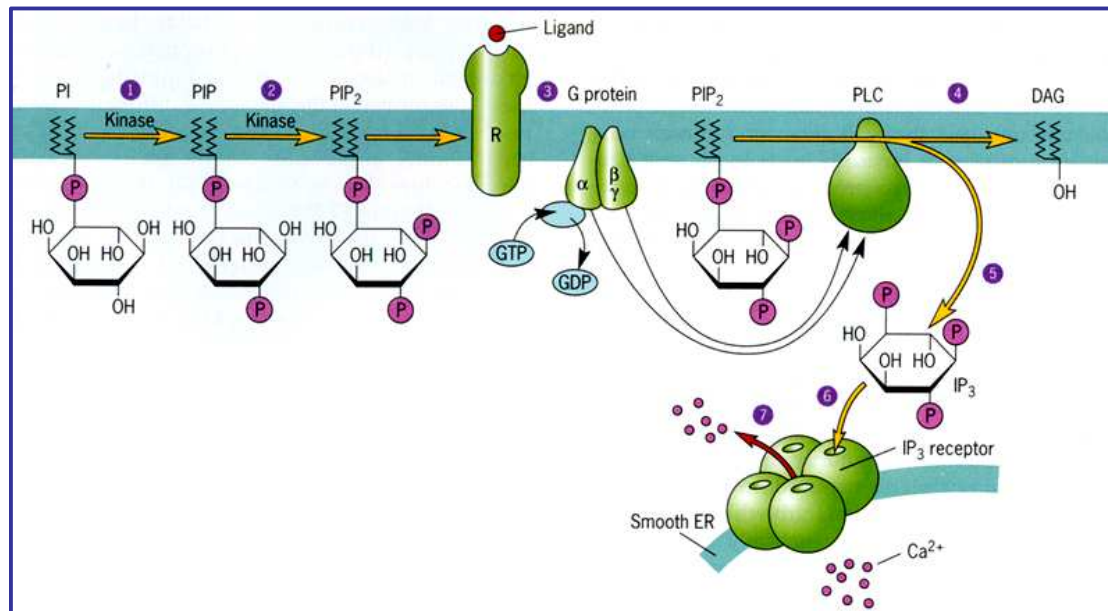
G-proteiny a ionty Ca^{2+}

- G-protein ovlivňuje hladinu iontů Ca^{2+} v cytozolu
- koncentrace Ca^{2+} v cytozolu a mimobuněčném prostoru není stejná: cytozol: 10^{-7}M , mimobuněčný prostor: 10^{-3}M
- důsledek aktivní činnosti iontových pump na membránách
- koncentrační gradient tlačí ionty Ca^{2+} do cytozolu
- zvýšená permeabilita membrány – vyšší koncentrace Ca^{2+} v cytozolu – aktivace nitrobuněčného signálního mechanismu

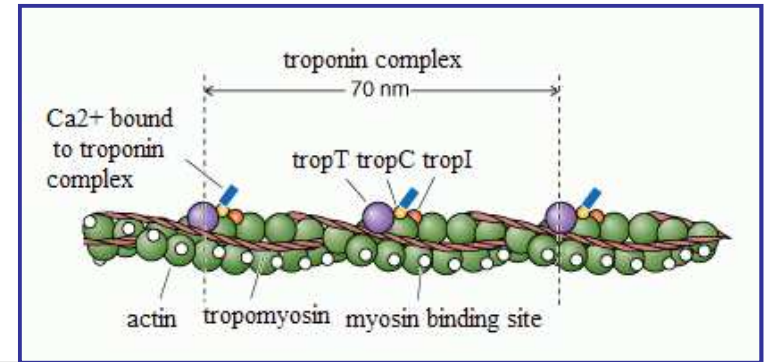


G protein otvírá kanálky Ca^{2+}

- vazba ligandu k receptoru – aktivace proteinu G – aktivace fosfolipázy C – tvorba inozitol trifosfátu a diacylglycerolu
- IP_3 opouští plazmatickou membránu a difunduje cytozolem – otevře kanálky Ca^{2+} v ER – uvolnění Ca^{2+}

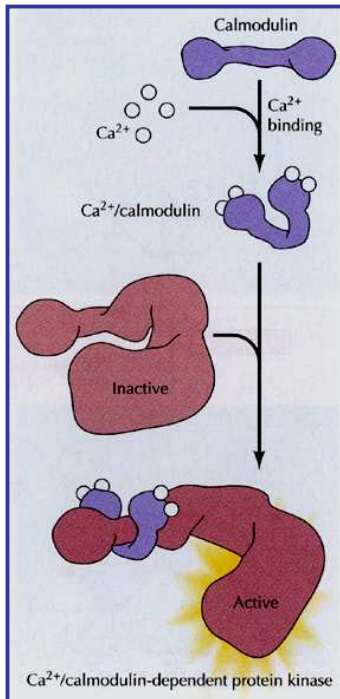
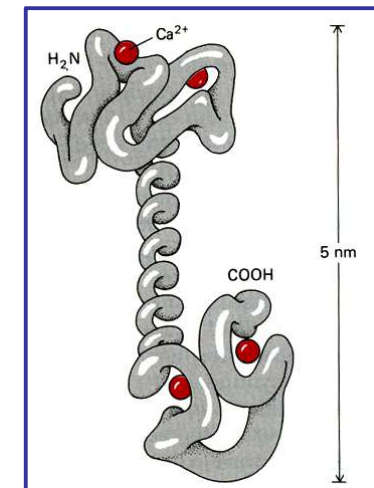


Efektory Ca^{2+}



Troponin C – přítomen v buňkách kosterního svalstva
- úloha při svalové kontrakci

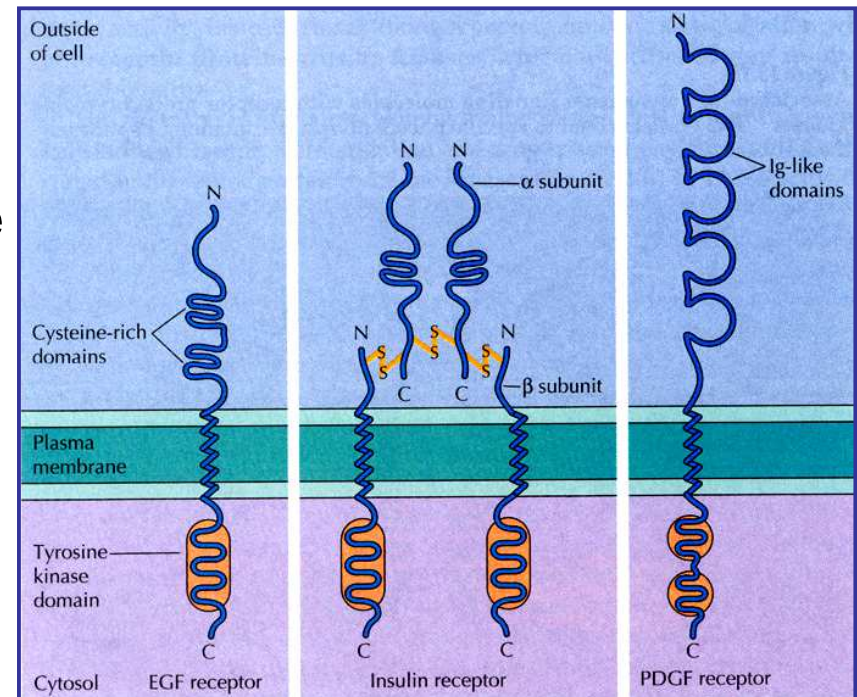
Kalmodulin – protein zprostředkující většinu reakcí na Ca^{2+}



- vazba Ca^{2+} na kalmodulin – změna konformace - zvýšení afinity pro jiné proteiny – změna jejich aktivity
- kalmodulin bývá stálou regulační složkou enzymových komplexů
- důležitou cílovou molekulou řízenou komplexem kalmodulin/ Ca^{2+} je Ca^{2+} -dependentní protein kináza (**Ca-kináza**), která fosforyluje Ser/Thr cílových proteinů

Katalytické receptory

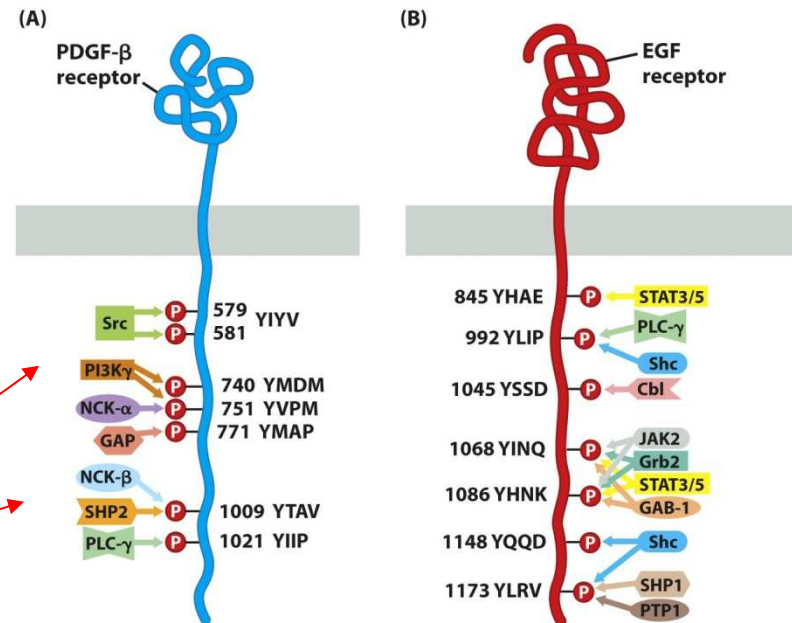
- proteinkinázová aktivita vázaná na přítomnost ligandu
- zajištění odpovědi buňky na růstové faktory
- receptorovou úlohu má glykozylovaná N-koncová doména
- středová hydrofobní doména prochází membránou
- C-koncová doména má kinázovou aktivitu nebo je schopna asociovat s nitrobuněčnými kinázami – určuje typ signální dráhy a charakter buněčné odpovědi



Receptorové tyrozinové kinázy

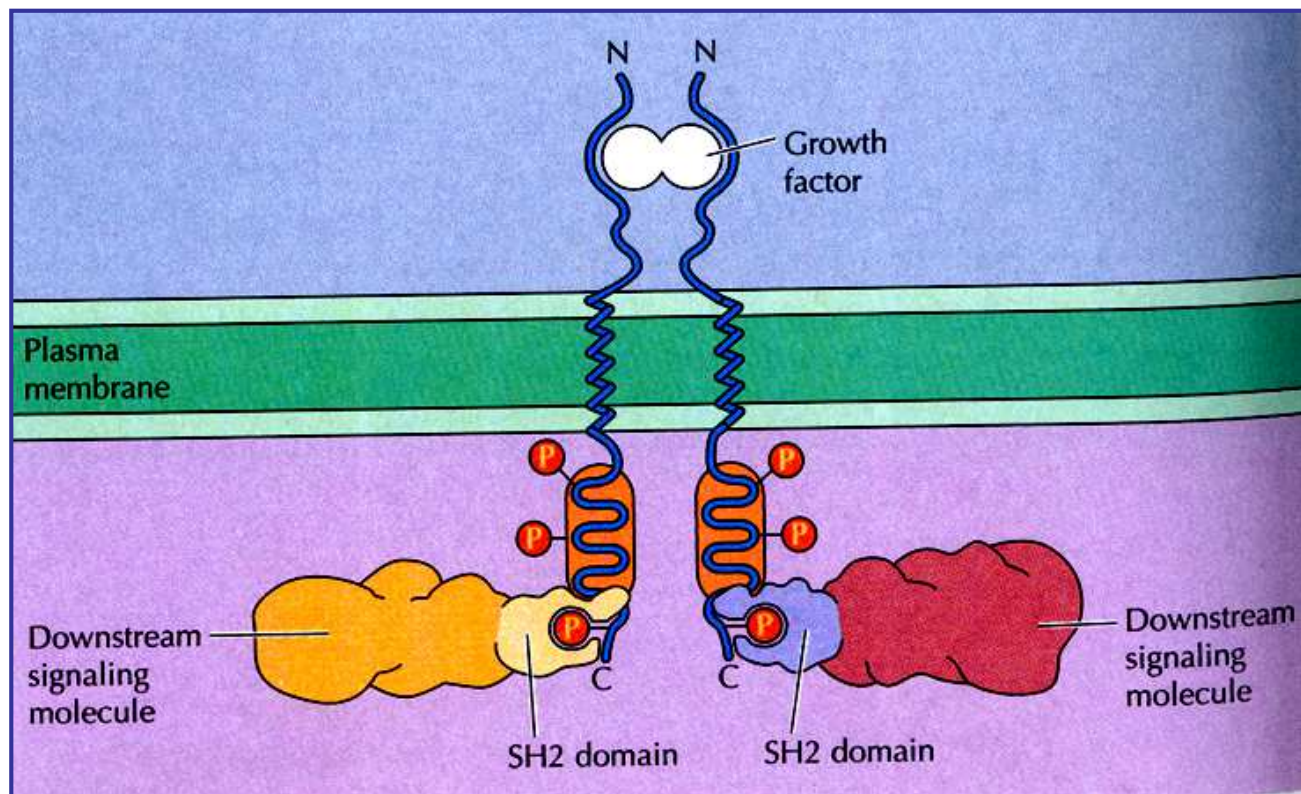
- cytoplazmatická doména má tyrozinokinázovou aktivitu závislou na vazbě ligandu k mimobuněčné doméně
- většinou jediný polypeptidový řetězec, který prochází membránou šroubovicovou doménou (možnost laterální difúze membránou)
- vazba ligandu vyvolá dimerizaci podjednotek receptoru, což vede k transfosforylaci partnerské podjednotky: následkem je aktivace receptorové kinázy

K fosforylovaným AK zbytkům se doménami SH2 váže řada různých proteinů



Doména SH2

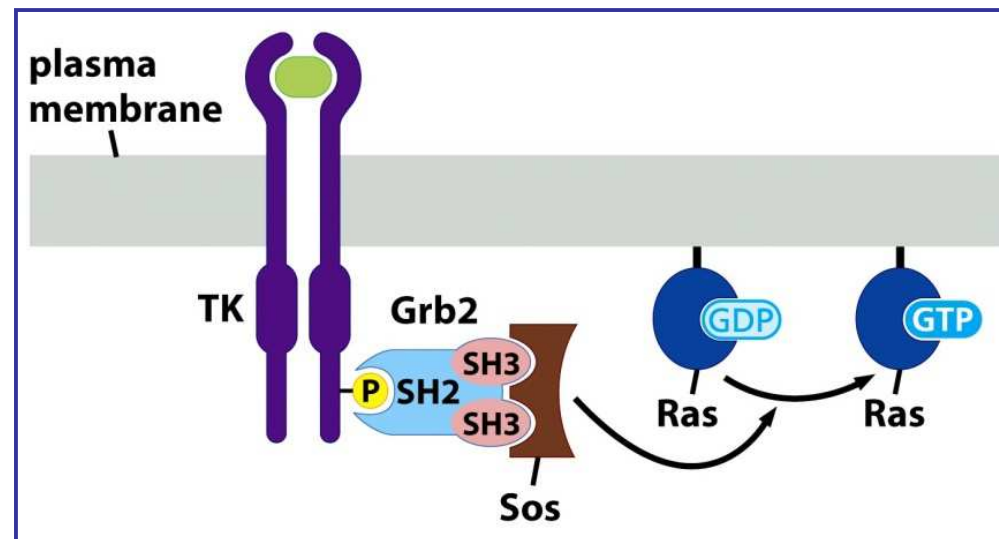
spojuje receptorové PTK s nitrobuňčnými přenašeči



Signální dráha Ras

první část: **receptor-Grb2-Sos-Ras**

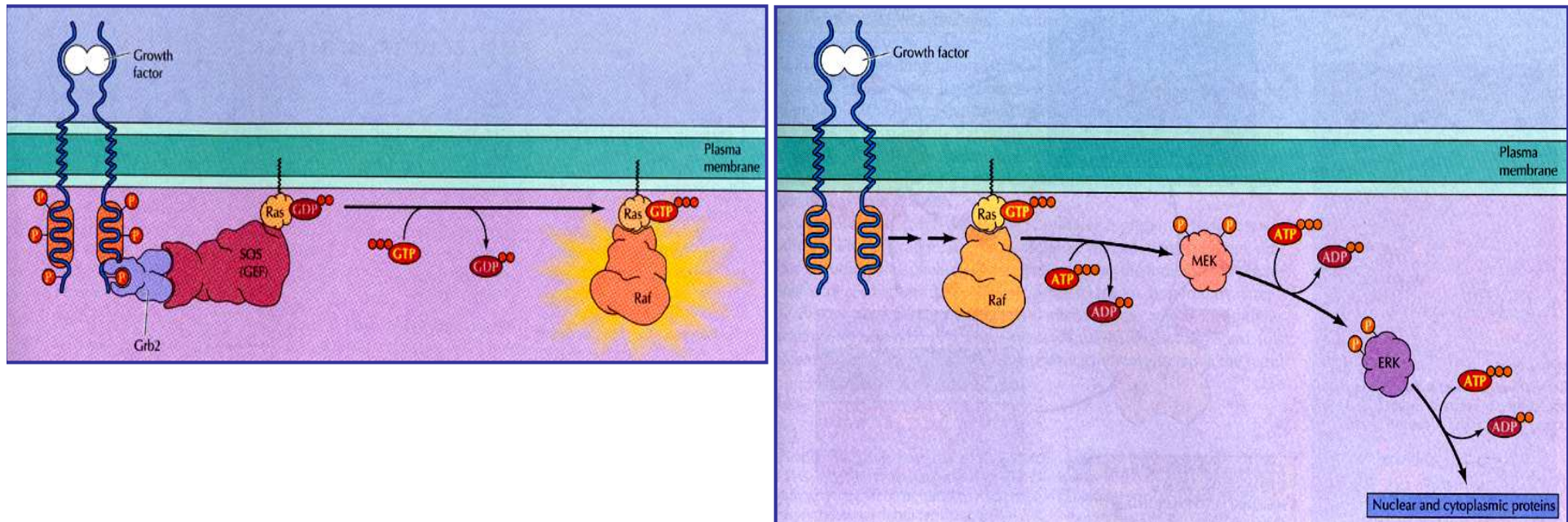
- **Grb2** je adaptérový protein s doménami SH2 a SH3
- doména SH2 proteinu Grb2 se spojuje s aktivovanou receptorovou PTK
- doména SH3 spojuje Grb2 s proteinem Sos
- **Sos** je GEF protein - zajišťuje výměnu GDP za GTP na proteinu **Ras** (aktivace Ras)



Ras aktivuje dráhu MAPK

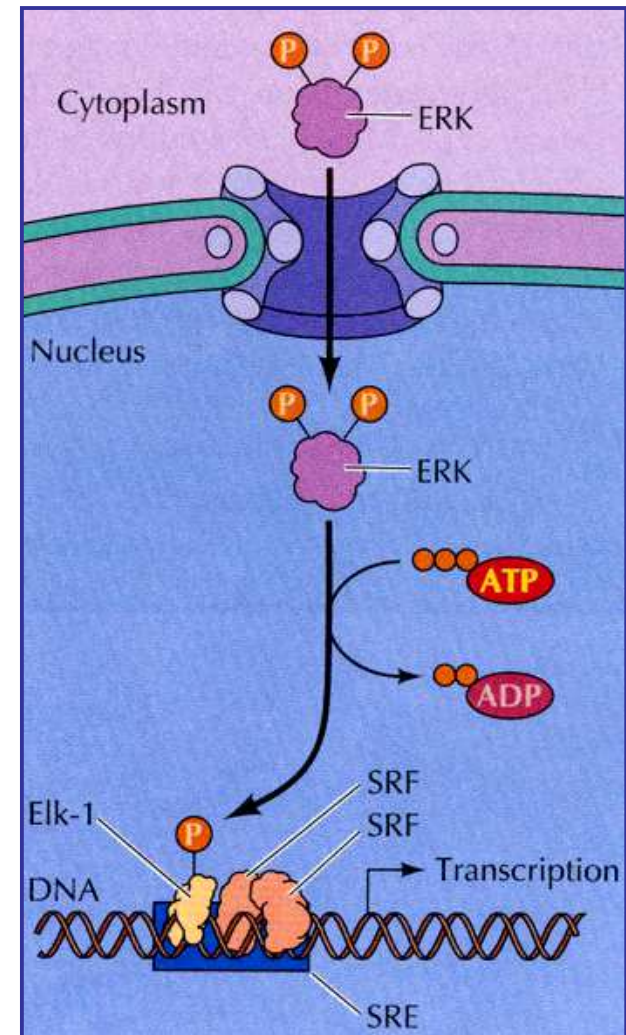
druhá část: **Ras-Raf-MEK-ERK-ELK1**

- aktivovaný Ras váže a aktivuje své efektory, např. **Raf**
- Raf je serin-treonin kináza, která spouští kaskádu **kináz MAP (mitogen-activated protein kinases)**: Raf aktivuje **MEK**, MEK aktivuje **ERK**
- ERK přechází do jádra, kde aktivuje **Elk-1**
- Elk-1 je transkripční faktor indukující transkripci proliferačních genů



Ras aktivuje dráhu MAPK

Růstové faktory prostřednictvím dráhy Ras/MAPK zapínají expresi genů nutných pro růst a dělení





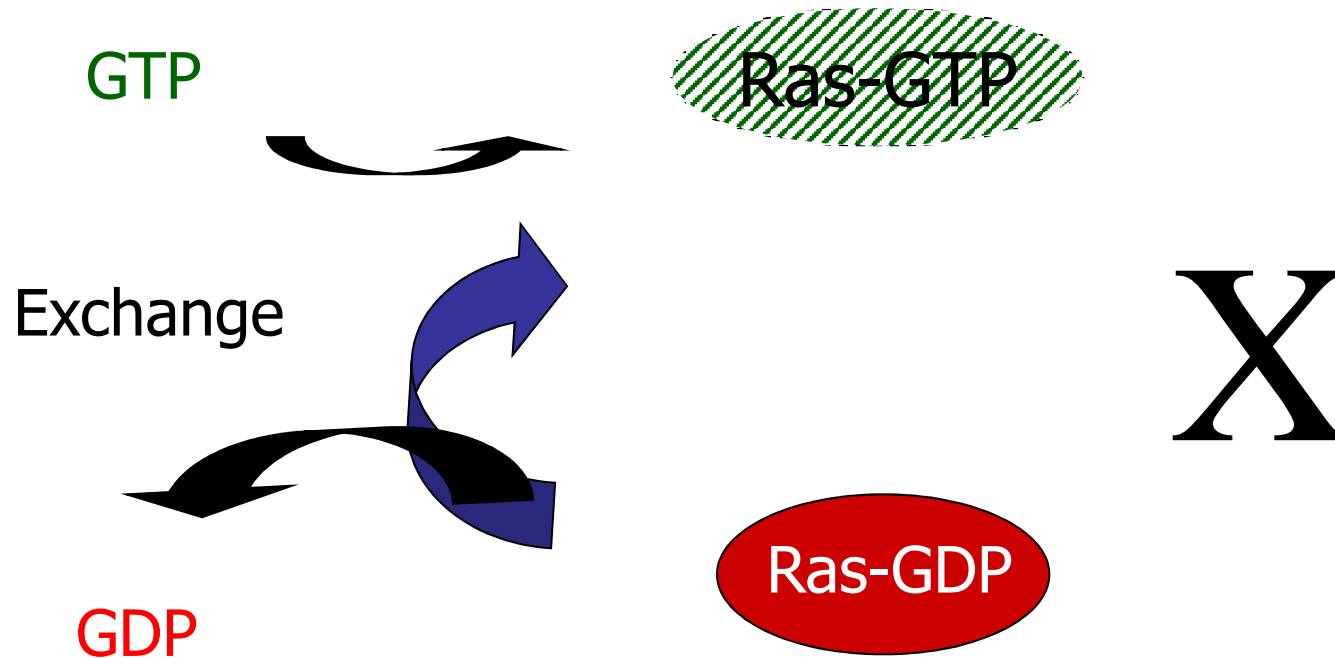
MAPK („mitogen-activated protein kinases“)

- rodina serin/treonin PTK
- vysoká konzervativnost v eukaryontních buňkách
- účast na procesech proliferace, diferenciace, pohybu a buněčné smrti
- **MAPK** (ERK) jsou fosforylovány a aktivovány **MAPK-kinázami** (MAPKK)
- **MAPKK** (MEK) jsou fosforylovány a aktivovány **MAPKK-kinázami** (MAPKKK)
- **MAPKKK** (RAF) jsou aktivovány interakcí s malými G proteiny (např. Ras) nebo jinými kinázami, které jsou napojeny na povrchové receptory



Ras a nádory

Mutantní Ras v nádorových buňkách nemůže hydrolyzovat GTP a hromadí se v aktivním stavu





Souhrn

- buňky komunikují prostřednictvím signálních molekul
- signály buňky zachycují signály specifickými receptory na povrchu nebo uvnitř buněk
- rozmanitými nitrobuněčnými signálními drahami se signál o interakci ligandu s receptorem dostává k buněčným efektorům, který zajistí adekvátní reakci buňky
- schopnost produkovat a/nebo detekovat signály a adekvátně na ně reagovat je podmínkou řádného vývoje embrya i udržování homeostáze dospělého organismu v proměnlivém prostředí



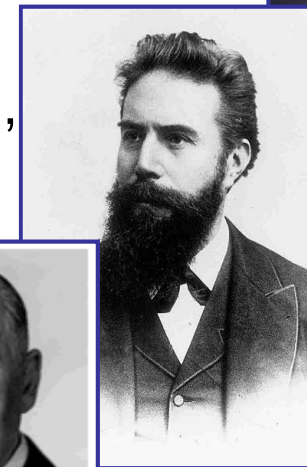
Rakovina - definice



- název **rakovina** („cancer“) odvozen od latinského slova označujícího kraba (řecky: karkinos = krab, onkos = náklad, břemeno)
- choroba způsobená **maligním nádorem**
- nádor („tumor“) - neoplazie, novotvar - patologický útvar vytvořený v tkáni mnohobuněčného organismu, jehož růst se vymkl kontrole
- postihuje rostliny, živočichy, člověka (není to nemoc moderní doby)

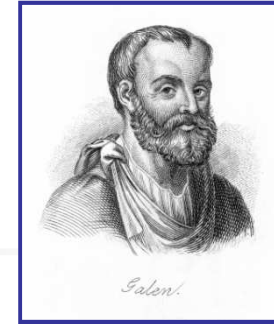
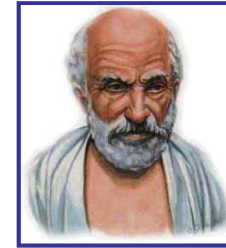
Rakovina - milníky

- nejstarší zmínky: starý Egypt, 3000 – 1500 let před naším letopočtem (papyrus, popis nádoru prsu)
- Hippokrates: staré Řecko, 400 před naším letopočtem (zavedení termínu karkinos)
- Dr. Percivall Pott: Anglie, 1775 (vyšší výskyt rakoviny u kominíků, karcinogenní látka v sazích identifikována o sto let později)
- Wilhelm Röntgen, Německo, 1895 (objev paprsků, které se začaly používat pro radioterapii rakoviny)
- Sidney Farber - 40. a 50. léta 20. století začátek chemoterapie rakoviny





Hippokrates a Galén



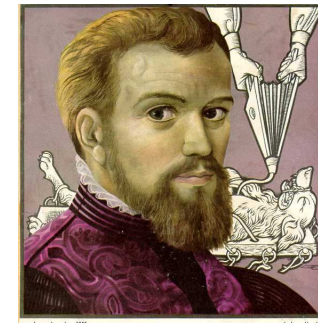
Hippokrates (400 př.n.l.) – aplikoval poznatky o mechanice tekutin na lidské tělo a jeho nemoci - 4 hlavní tekutiny: krev, černá žluč, žlutá žluč a hlen

Galén (160 n.l.)

- záněty: horký a bolestivý otok = nadbytek krve
- chladné a vlhké vředy, puchýře, katary = nadbytek hlenu
- žloutenka = nadbytek žluté žluče
- rakovina a deprese = nadbytek černé žluče

- univerzální lék – pouštění žilou

- **Vesalius** (16. století) – studiem anatomie vyvrátil domněnku o existenci černé žluče





Rakovina

- základní charakteristika

- na buněčné úrovni genetická nemoc (důsledek mutací, které se přenášejí do dceřiných buněk)
- fenotyp nádorových buněk je dědičný (přenáší se do dalších buněčných generací)
- projevuje se změnou růstových a diferenciacních vlastností buněk a změnou jejich životaschopnosti
- začíná na úrovni jediné buňky

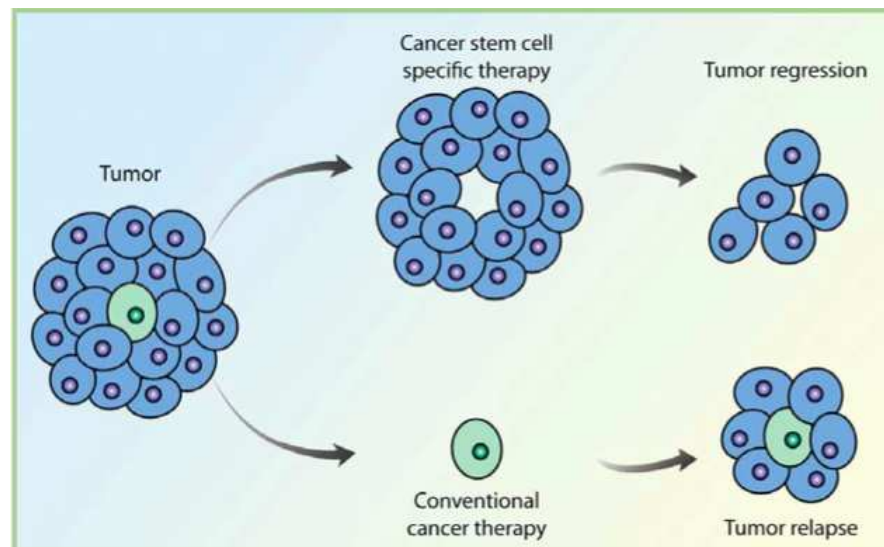


Proč jsou rakovinné buňky nebezpečné?

- reprodukují se bez ohledu na potřeby organismu (nereagují na běžné buněčné signály)
- kolonizují tělní oblasti, které jsou vyhrazeny jiným buněčným typům
- narušují funkci postižených orgánů
- vyčerpávají organismus
- imunitní systém je obtížně odlišuje od buněk zdravých
- nádor je tvořen heterogenní a průběžně se dále vyvíjející populací buněk, které vykazují různou (a proměnlivou) citlivost k léčivům

Nádorové kmenové buňky

- malá populace buněk uvnitř nádoru nesoucí znaky „kmenovosti“
 - schopnost diferenciacce do různých buněčných variant, které jsou v nádoru přítomny, nízká proliferační schopnost (běžné terapie jsou zaměřeny na rychle rostoucí buňky)
- často zodpovídají za znovuobjevení nádoru po léčbě
- zodpovídají za indukci nádoru po přenosu do zdravého organismu



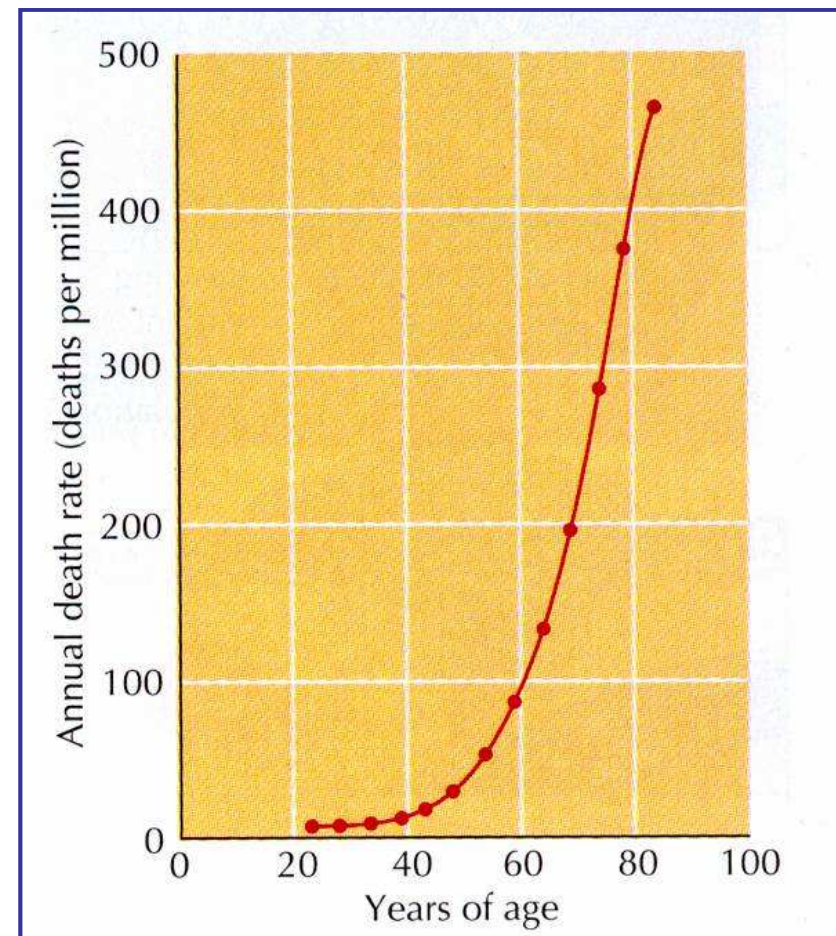
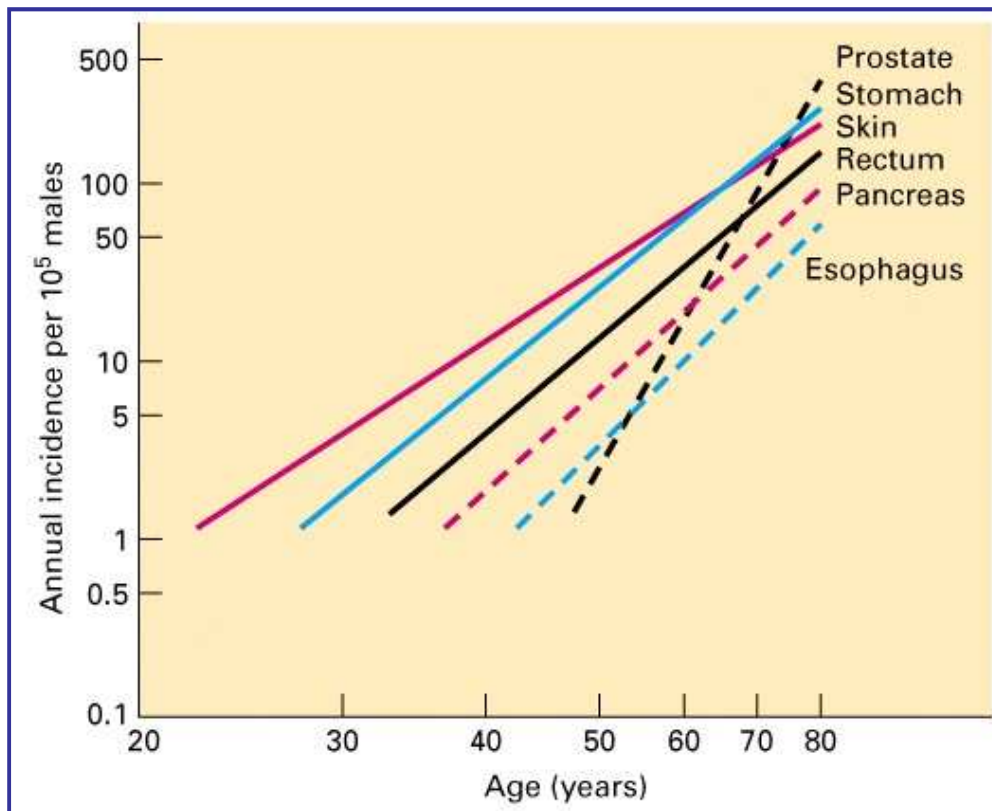


Je rakovina dědičná nemoc?

- **predispozice** k tvorbě nádorů **lze dědit**: u vzácných familiálních rakovinných syndromů jsou zaznamenány zděděné zárodečné mutace
- běžné jsou nádory odvozené ze somatických buněk, ve kterých došlo k nežádoucí kombinaci nádorotvorných mutací
- zvýšená frekvence mutací/genomová nestabilita zvyšují riziko rakoviny

Vývoj rakoviny: postupné hromadění genetických změn

většina nádorů se objevuje v pokročilejším věku





Nádory benigní (nezhoubné)

- pomalý růst
- podobnost s původní tkání (dobrá organizace buněk, vysoký stupeň diferenciacce)
- ohraničenost, beze změny lokalizace
- většinou neohrožují život

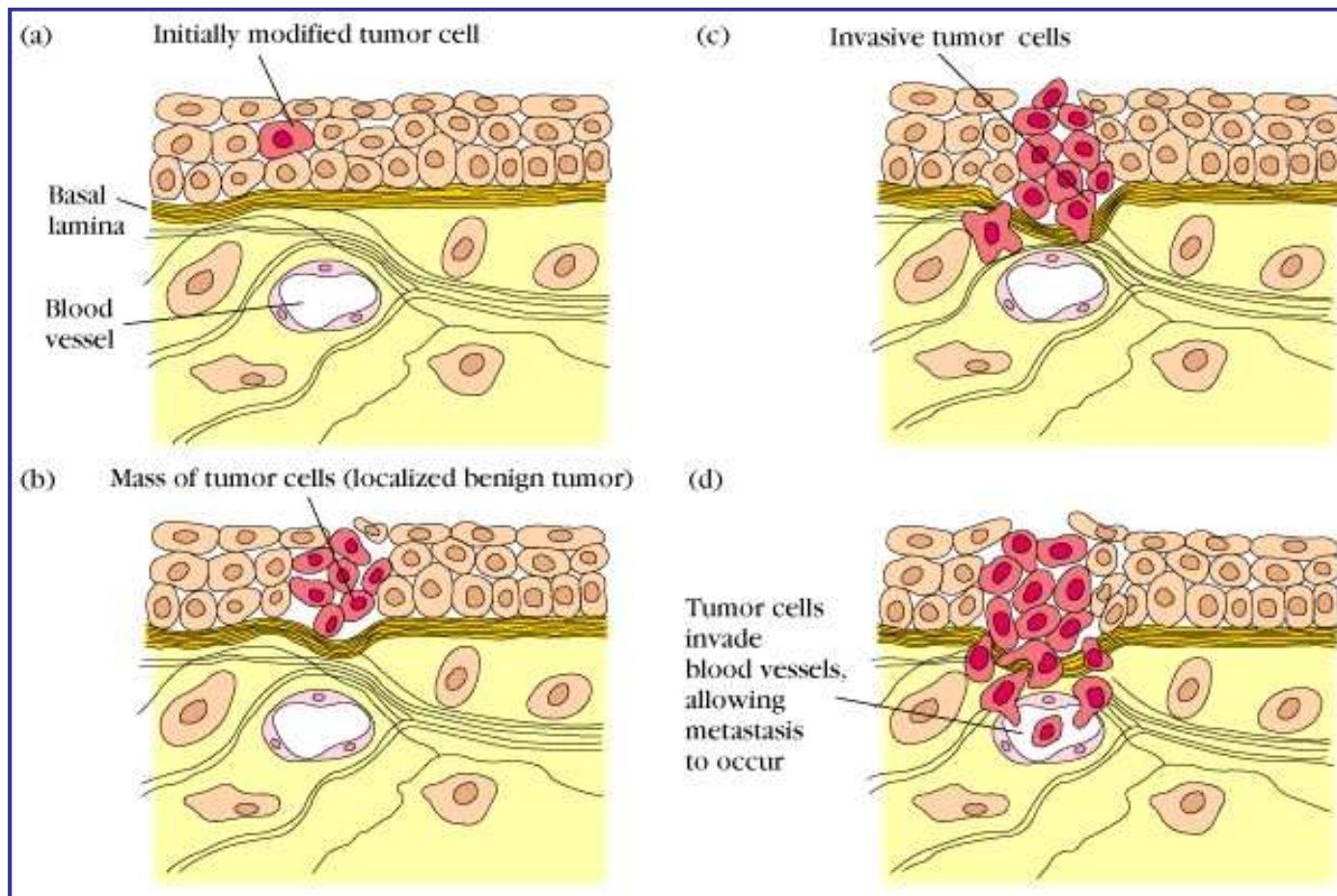


Nádory maligní (zhoubné)

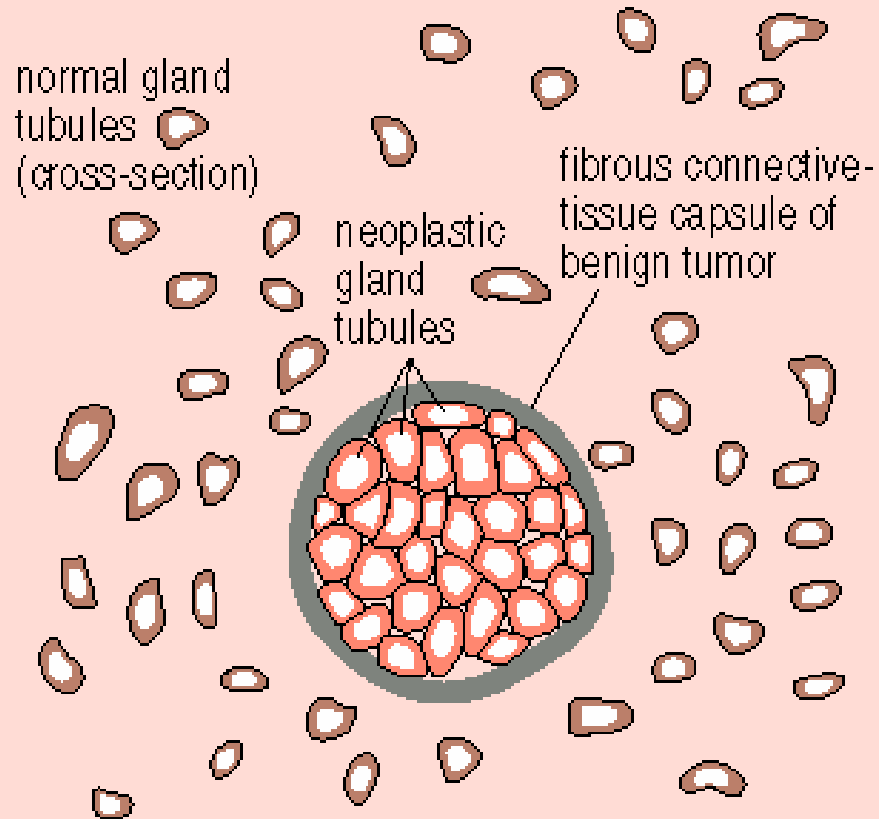
- vysoká proliferace (velká jádra, jadérka - tvorba ribozomů, polyzomy - tvorba proteinů potřebných pro buněčné dělení)
- změny v morfologii, velikosti a tvaru buněk
- nižší stupeň diferenciacce
- metastázuji

Benigní

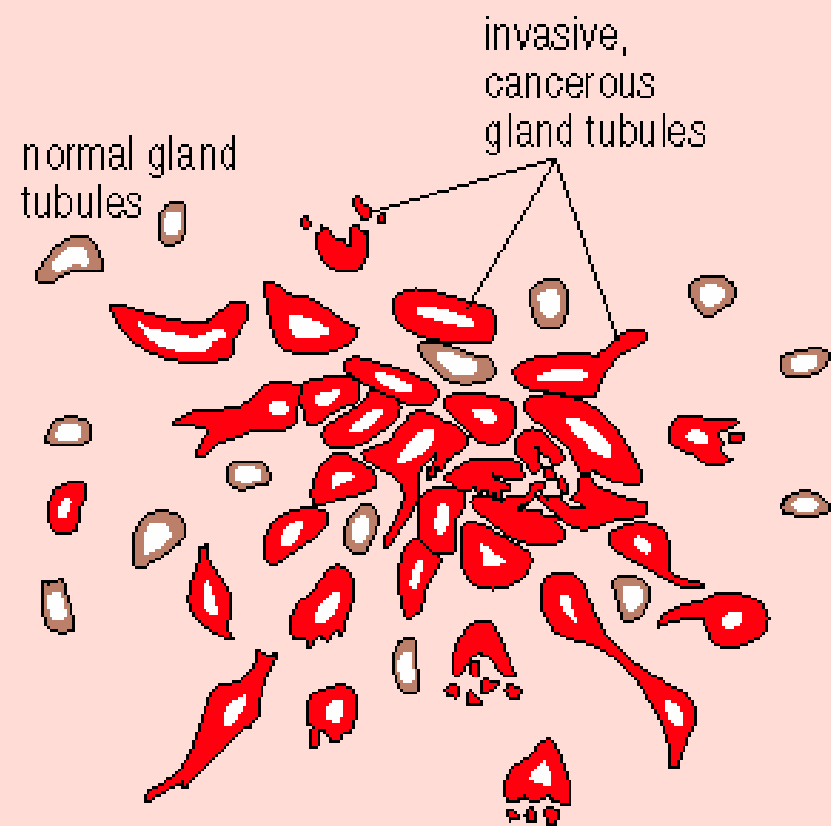
Malignní



Adenoma (benign)



Adenocarcinoma (malignant)





I benigní nádory mohou být smrtelné!

- **nadprodukce důležitých biologicky aktivních molekul (např. hormonů)**

Příklad: nádor žlaznatých buněk - Langerhansovy ostrůvky - přílišná sekrece inzulínu - hypoglykemie - smrt

- **poloha nádoru narušuje nějakou životní funkci**

Příklad: mozkové výstelka - narušení funkce vitálních center mozku - smrt



Klasifikace a nomenklatura nádorů

- název odráží původní tkáň, kde nádor vznikl
- přípona určuje, zda se jedná o nádor benigní nebo maligní
 - om** (benigní)
 - karcinom** (maligní epiteliální tkáň)
 - sarkom** (maligní konektivní tkáň nebo sval)

Typizace nádorů - příklady

Původ	Benigní	Maligní
Epiteliální/Endoteliální	Adenom jater, slinivky, tlustého střeva, ledvin, atd.	Adenokarcinom jater slinivky,tlustého střeva, ledvin, atd.
Mezenchymální pojivová tkáň	Lipom	Liposarkom
	Fibrom	Fibrosarkom
	Chondrom	Chondrosarkom
		Neuroblastom
		Retinoblastom
Zárodek	Teratom	Teratokarcinom
		Embryonální karcinom
Jiný		Melanom
		Leukemie

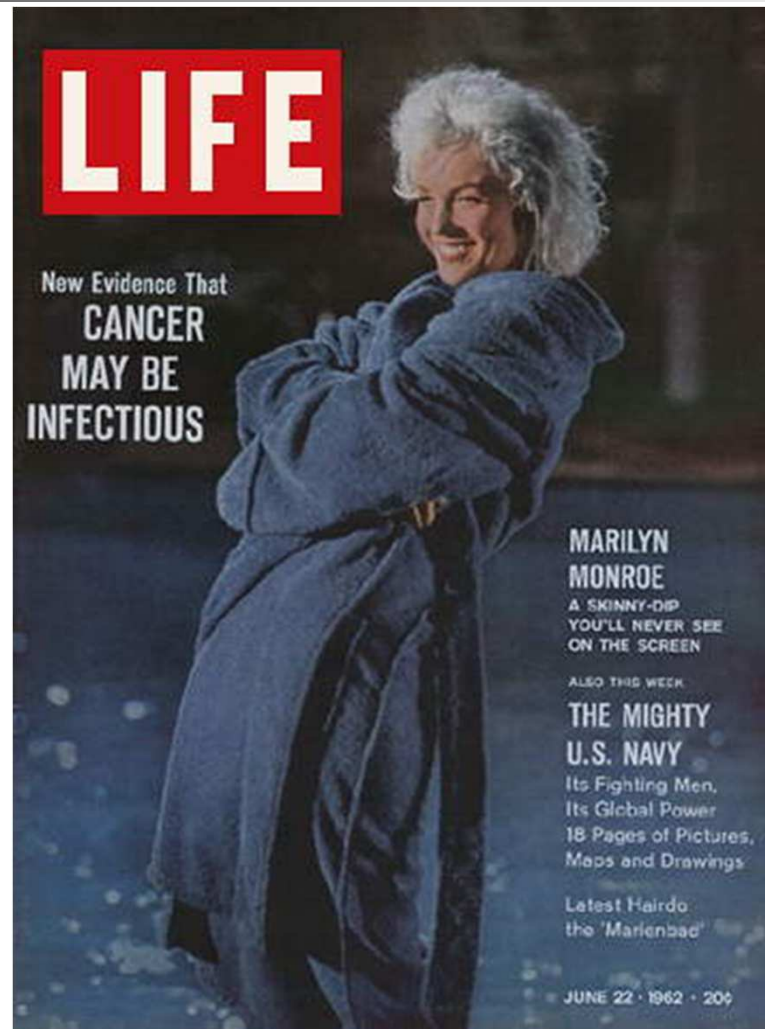


Většina lidských nádorů je odvozena z epitelů

- epitely jsou povlaky buněk, které vystylají tělní dutiny a pokrývají tělní povrch
- nádory epiteliálních buněk (karcinomy) tvoří největší skupinu lidských nádorů (více než 80% úmrtí na rakovinná onemocnění v západním světě)
- zahrnují nádory ústní dutiny, jícnu, žaludku, malého a velkého střeva, konečníku, kůže, prsu, slinivky, plic, jater, vaječníku, žlučníku a močového měchýře

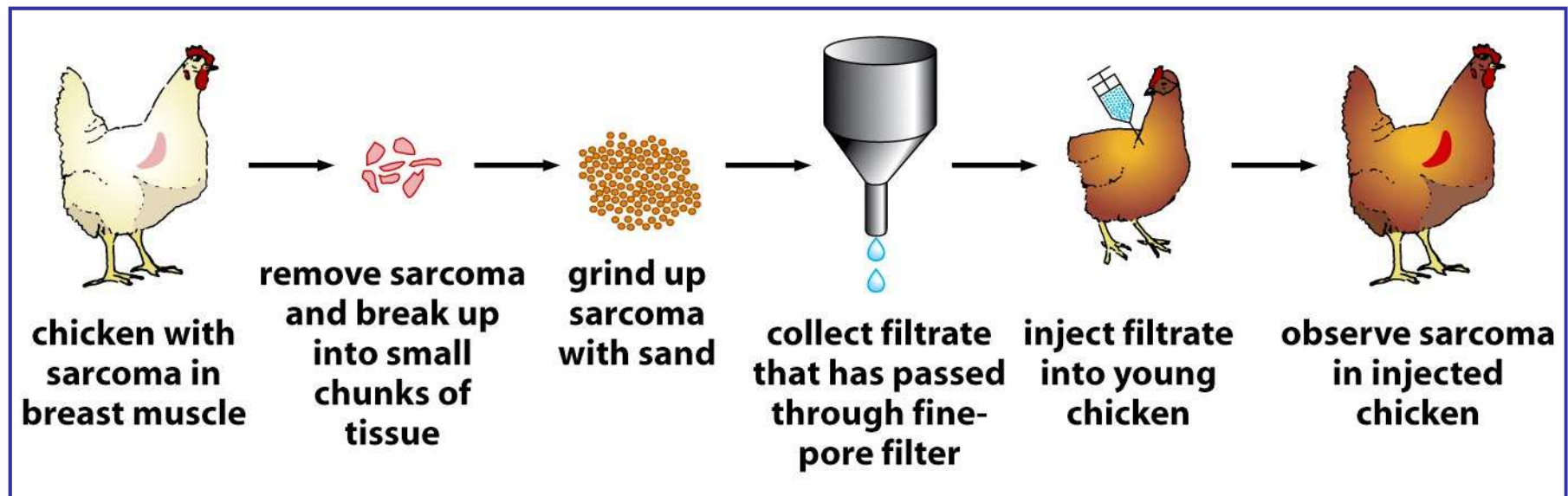
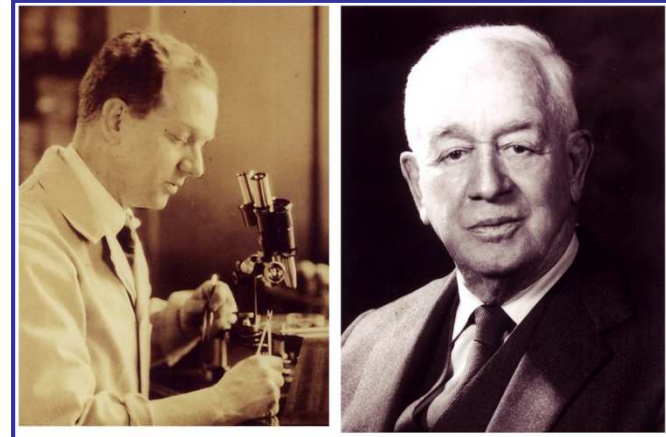


Rakovina a viry?

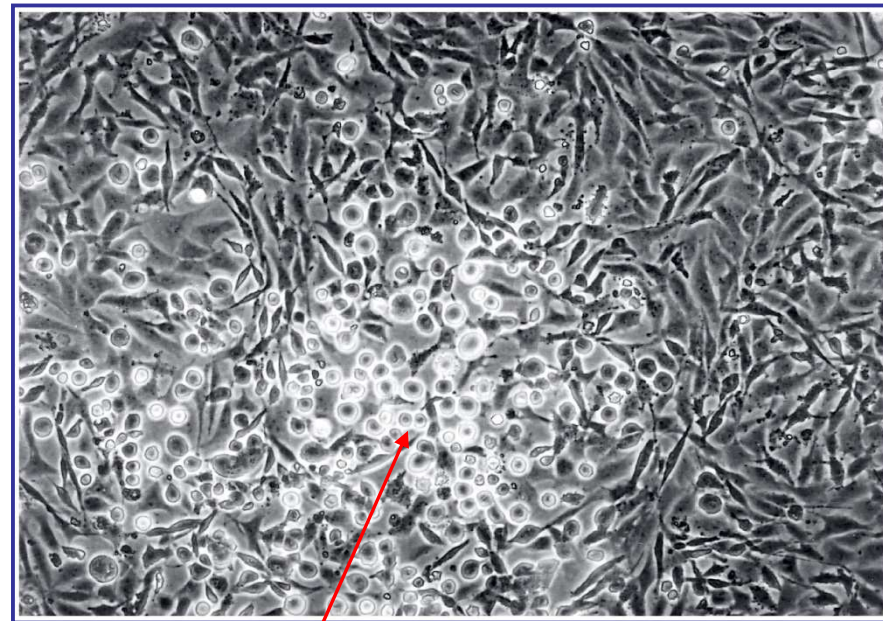
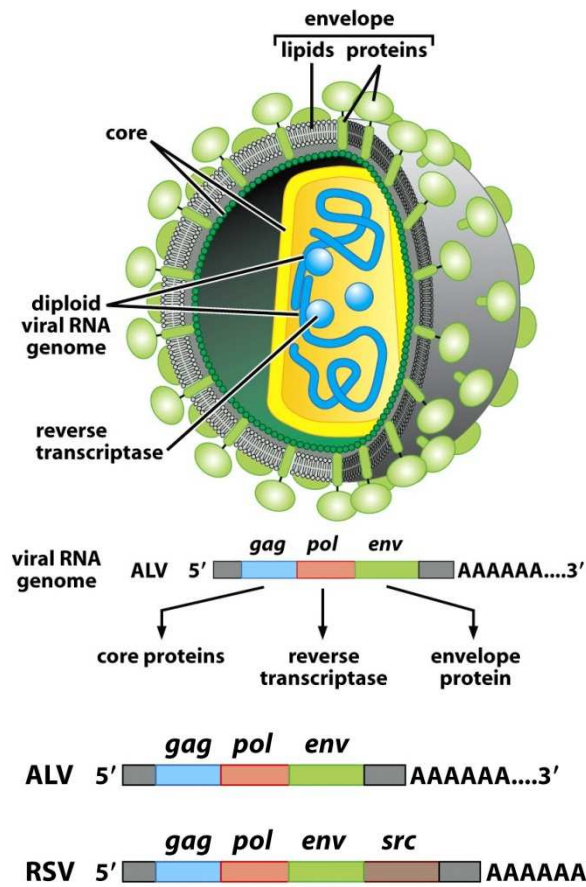


Indukce sarkomů u kuřat

- Peyton Rous – Nobelova cena 1966
- důkaz účasti virů u některých typů rakoviny



RSV je retrovirus odvozený od viru ptačí leukózy ALV



Ohnisko „focus“ nádorových buněk



Akutně transformující retroviry transdukují onkogeny

- virus Rousova sarkomu (RSV) obsahuje gen (**src**), který se uplatňuje při vzniku rakoviny, ale nezajišťuje žádnou virovou funkci
- normální buňky obsahují příbuzný gen, který kóduje tyrosin kinázu Src
- normální gen (**c-src**) je protoonkogen, virový gen (**v-src**) je onkogen, kódující konstitutivně aktivní mutantní formu tyrosin kinázy

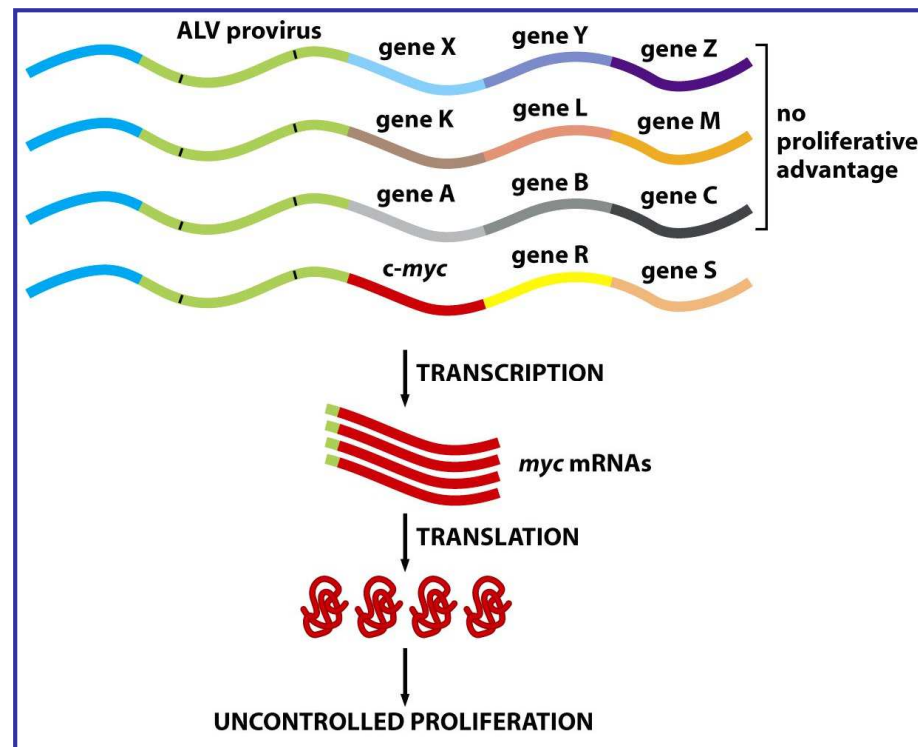
Akutně transformující retroviry běžně neinfikují člověka

Table 3.3 Acutely transforming retroviruses and the oncogenes that they have acquired^a

Name of virus	Viral oncogene	Species	Major disease	Nature of oncoprotein
Rous sarcoma	<i>src</i>	chicken	sarcoma	non-receptor TK
Y73/Esh sarcoma	<i>yes</i>	chicken	sarcoma	non-receptor TK
Fujinami sarcoma	<i>fps^b</i>	chicken	sarcoma	non-receptor TK
UR2	<i>ros</i>	chicken	sarcoma	RTK; unknown ligand
Myelocytomatosis 29	<i>myc</i>	chicken	myeloid leukemia ^c	transcription factor
Mill Hill virus 2	<i>mil^d</i>	chicken	myeloid leukemia	ser/thr kinase
Avian myeloblastosis E26	<i>myb</i>	chicken	myeloid leukemia	transcription factor
Avian myeloblastosis E26	<i>ets</i>	chicken	myeloid leukemia	transcription factor
Avian erythroblastosis ES4	<i>erbA</i>	chicken	erythroleukemia	thyroid hormone receptor
Avian erythroblastosis ES4	<i>erbB</i>	chicken	erythroleukemia	EGF RTK
3611 murine sarcoma	<i>raf^e</i>	mouse	sarcoma	ser/thr kinase
SKV770	<i>ski</i>	chicken	endothelioma (?)	transcription factor
Reticuloendotheliosis	<i>rel</i>	turkey	immature B-cell lymphoma	transcription factor
Abelson murine leukemia	<i>abl</i>	mouse	pre-B-cell lymphoma	non-receptor TK
Moloney murine sarcoma	<i>mos</i>	mouse	sarcoma, erythroleukemia	ser/thr kinase
Harvey murine sarcoma	<i>H-ras</i>	rat, mouse	sarcoma	small G protein
Kirsten murine sarcoma	<i>K-ras</i>	mouse	sarcoma	small G protein
FBJ murine sarcoma	<i>fos</i>	mouse	osteosarcoma	transcription factor
Snyder–Theilen feline sarcoma	<i>fes^f</i>	cat	sarcoma	non-receptor TK
McDonough feline sarcoma	<i>fms</i>	cat	sarcoma	CSF-1 RTK
Gardner–Rasheed feline sarcoma	<i>fgr</i>	cat	sarcoma	non-receptor TK
Hardy–Zuckerman feline sarcoma	<i>kit</i>	cat	sarcoma	steel factor RTK
Simian sarcoma	<i>sis</i>	woolly monkey	sarcoma	PDGF
AKT8	<i>akt</i>	mouse	lymphoma	ser/thr kinase
Avian virus S13	<i>sea</i>	chicken	erythroblastic leukemia ^g	RTK; unknown ligand
Myeloproliferative leukemia	<i>mpl</i>	mouse	myeloproliferation	TPO receptor
Regional Poultry Lab v. 30	<i>eyk</i>	chicken	sarcoma	RTK; unknown ligand
Avian sarcoma virus CT10	<i>crk</i>	chicken	sarcoma	SH2/SH3 adaptor
Avian sarcoma virus 17	<i>jun</i>	chicken	sarcoma	transcription factor
Avian sarcoma virus 31	<i>qin</i>	chicken	sarcoma	transcription factor ^h
AS42 sarcoma virus	<i>maf</i>	chicken	sarcoma	transcription factor
Cas NS-1 virus	<i>cbl</i>	mouse	lymphoma	SH2-dependent ubiquitylation factor

Pomalu transformující retroviry

- netransdukuje onkogeny
- integrují se do blízkosti buněčného protoonkogenu a podřídí jeho expresi svému promotoru: tím jej aktivují na onkogen



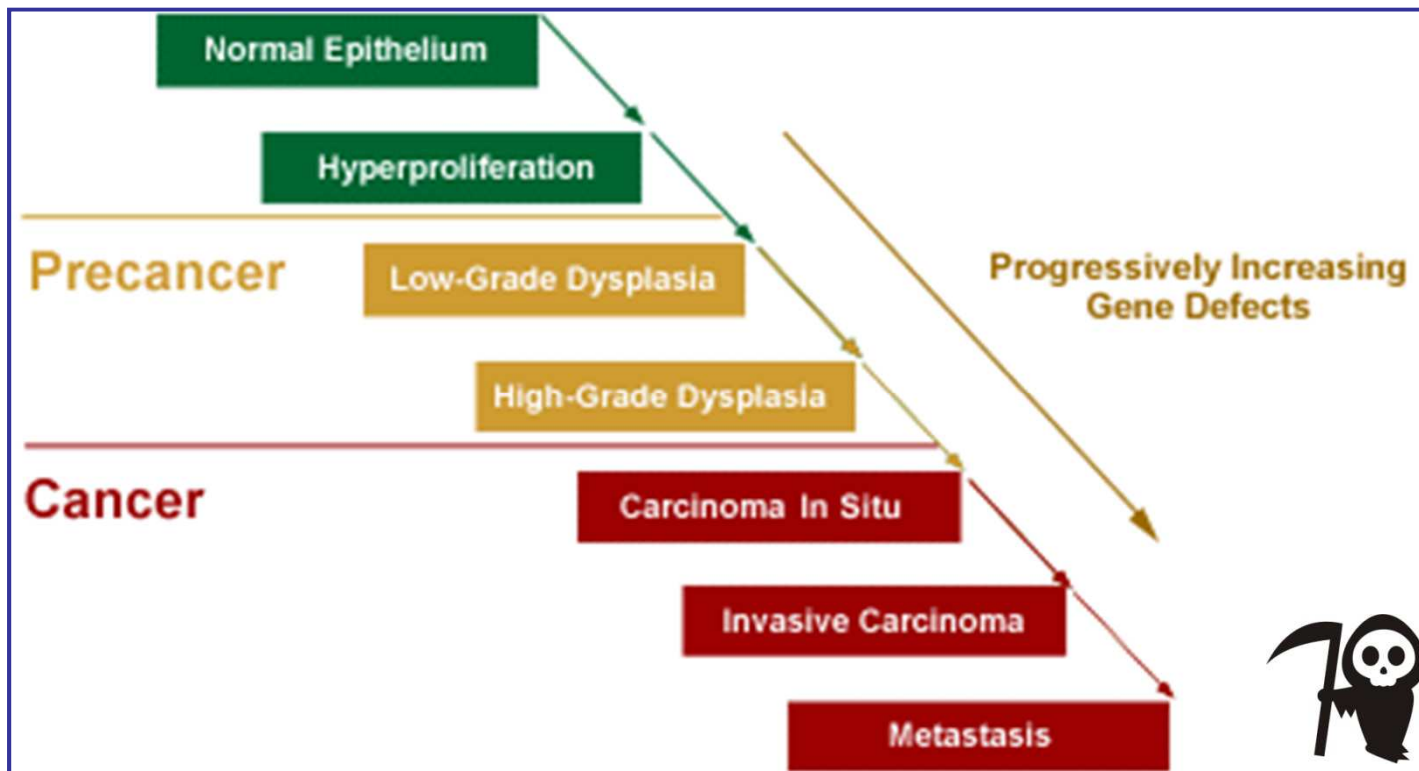


DNA-nádorové viry

- také obsahují onkogeny, ale ty se uplatňují jako přirozené regulátory virové replikace (nemají buněčné protějšky)
- SV40, Adeno, Papiloma
 - rostou v klidových buňkách
 - používají hostitelský aparát pro replikaci vlastní DNA
 - stimulují přechod hostitelské buňky do S fáze
- “rané” virové proteiny fungují jako onkoproteiny nebo inhibitory nádorových supresorů

Nádor vzniká postupnou přeměnou zdravých buněk

Mezi zcela normálním a vysoce maligním fenotypem je široké spektrum přechodných stádií. To signalizuje, že vývoj nádoru je složitý a vícestupňový proces.



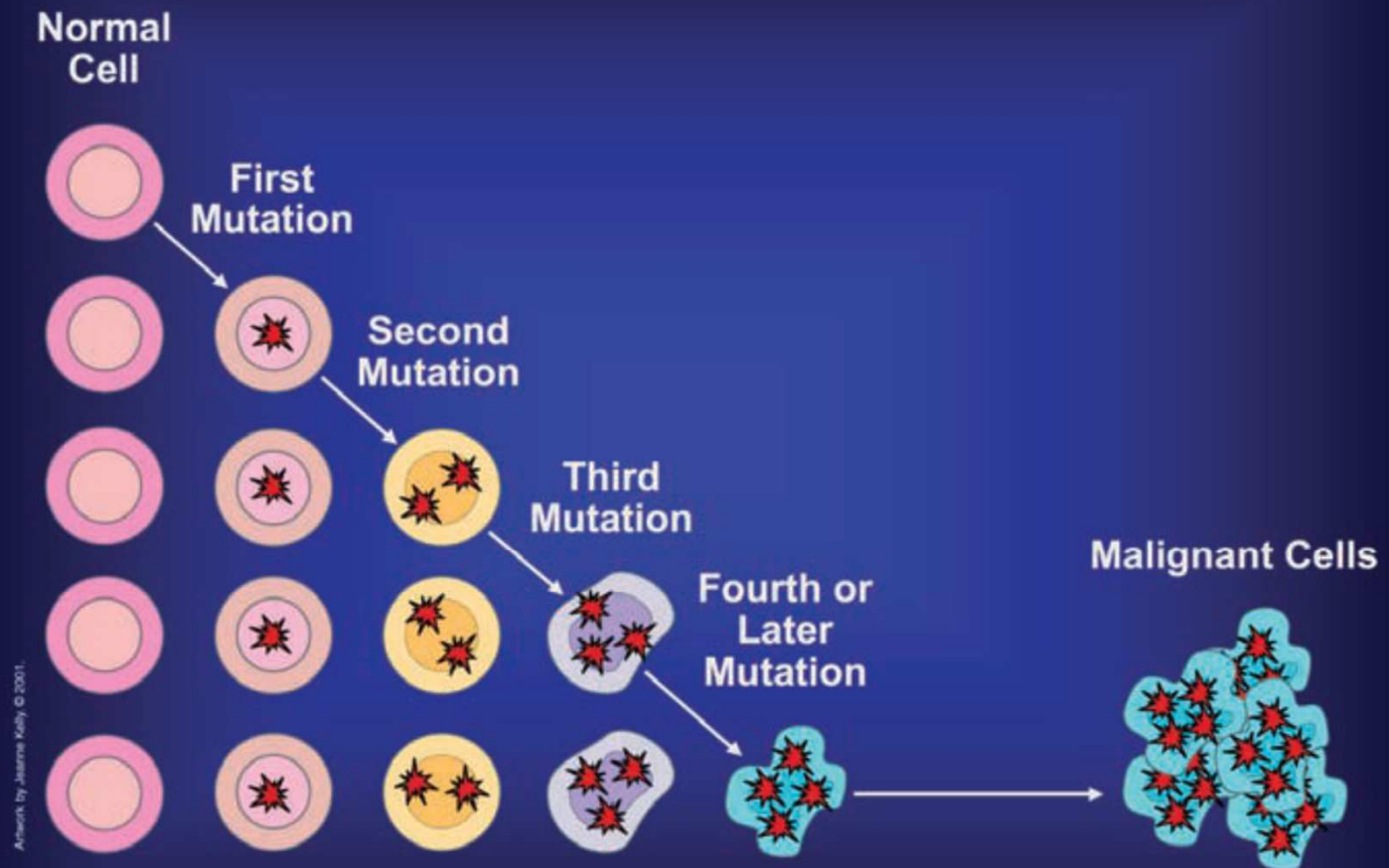


Postupnost kancerogeneze spočívá v hromadění mutací

Podmínkou přeměny zdravé buňky na nádorovou je kombinace následujících mutací v jedné buňce:

- mutace umožňující **přežití a růst bez ohledu na vnější a vnitřní signály** řídící růst, diferenciaci a apoptózu
- mutace umožňující **únik z rodné tkáně**
- mutace umožňující **přežití a proliferaci v cizích tkáních**
- mutace stimuluje **genetickou nestabilitu** ("but not too much"!)

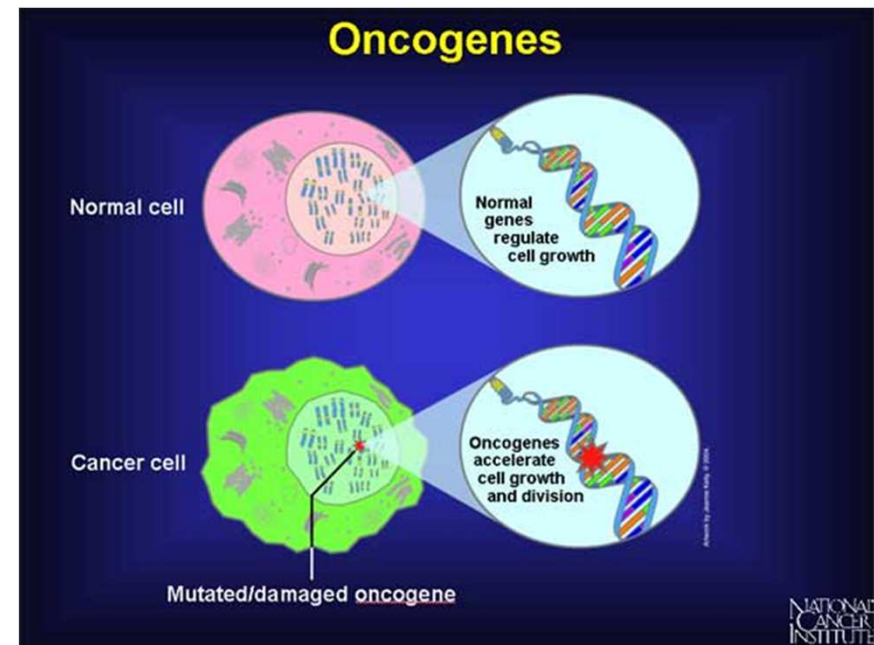
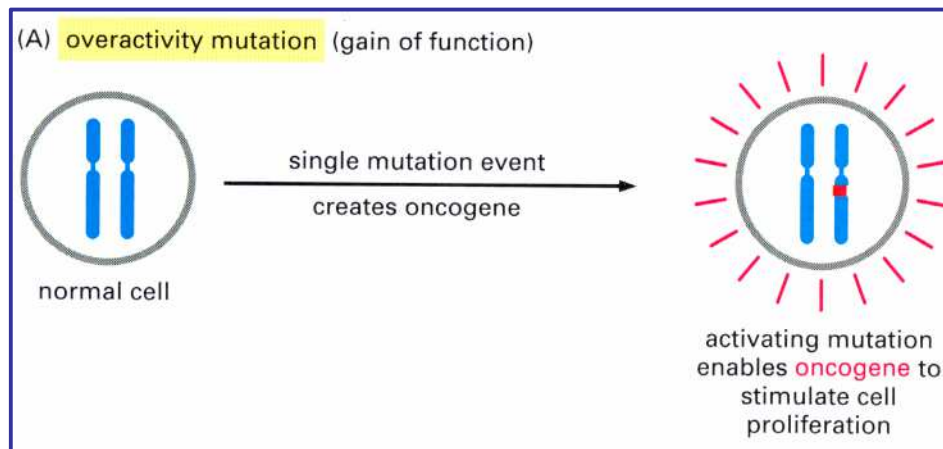
Many Mutations Lead to Cancer



Které typy genů jsou při kancerogenezi mutovány?

(A) protoonkogeny

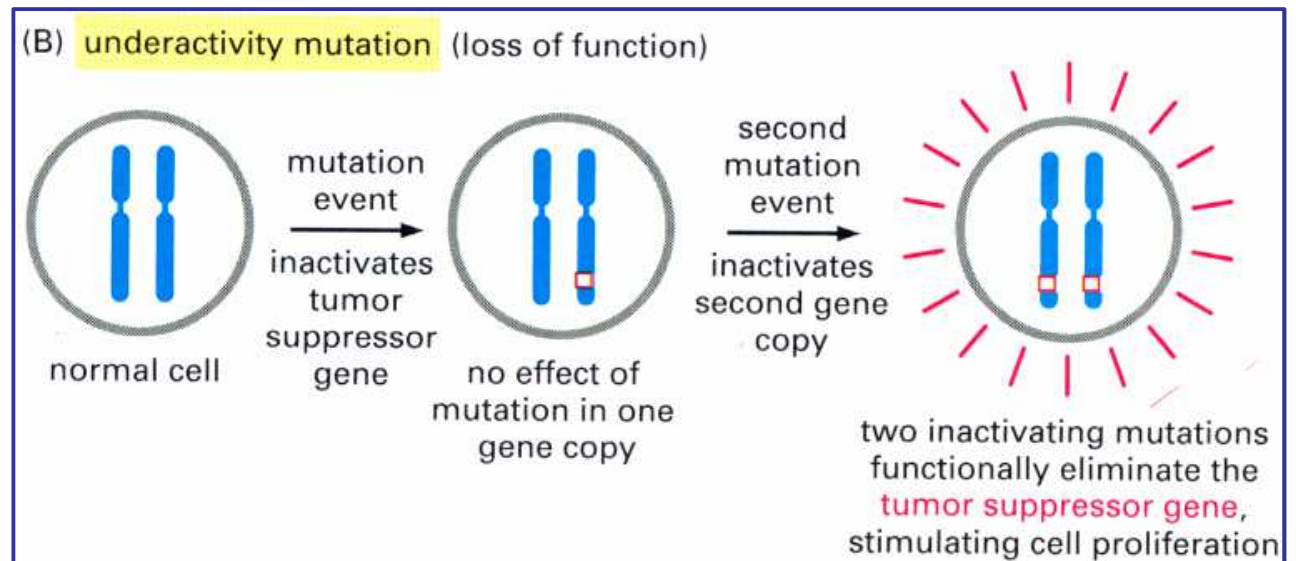
- pozitivně ovlivňují buněčný cyklus (urychlují jej)
- kancerogenní jsou mutace způsobující hyperaktivitu jejich produktů („gain-of-function mutation“)
- dominantní charakter mutací



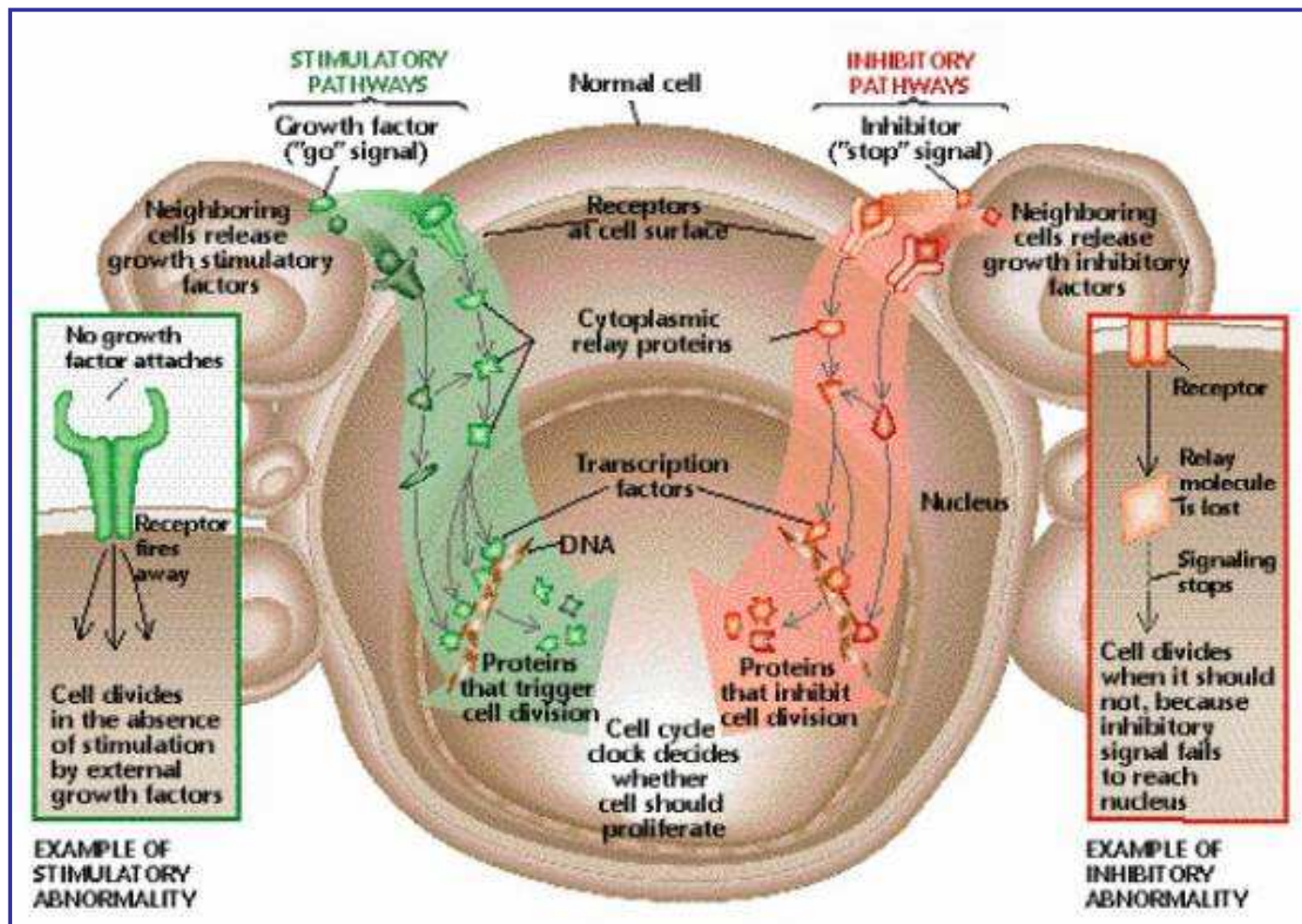
Které typy genů jsou při kancerogenezi mutovány?

(B) nádorové supresory

- negativně ovlivňují buněčný cyklus (zpomalují jej)
- v případě poškození DNA umožňují její opravu
- kancerogenní jsou mutace eliminující jejich funkci („loss-of-function mutation“)
- recesivní charakter mutací



Selhání kontroly buněčného dělení souvisí s poruchou signalizace



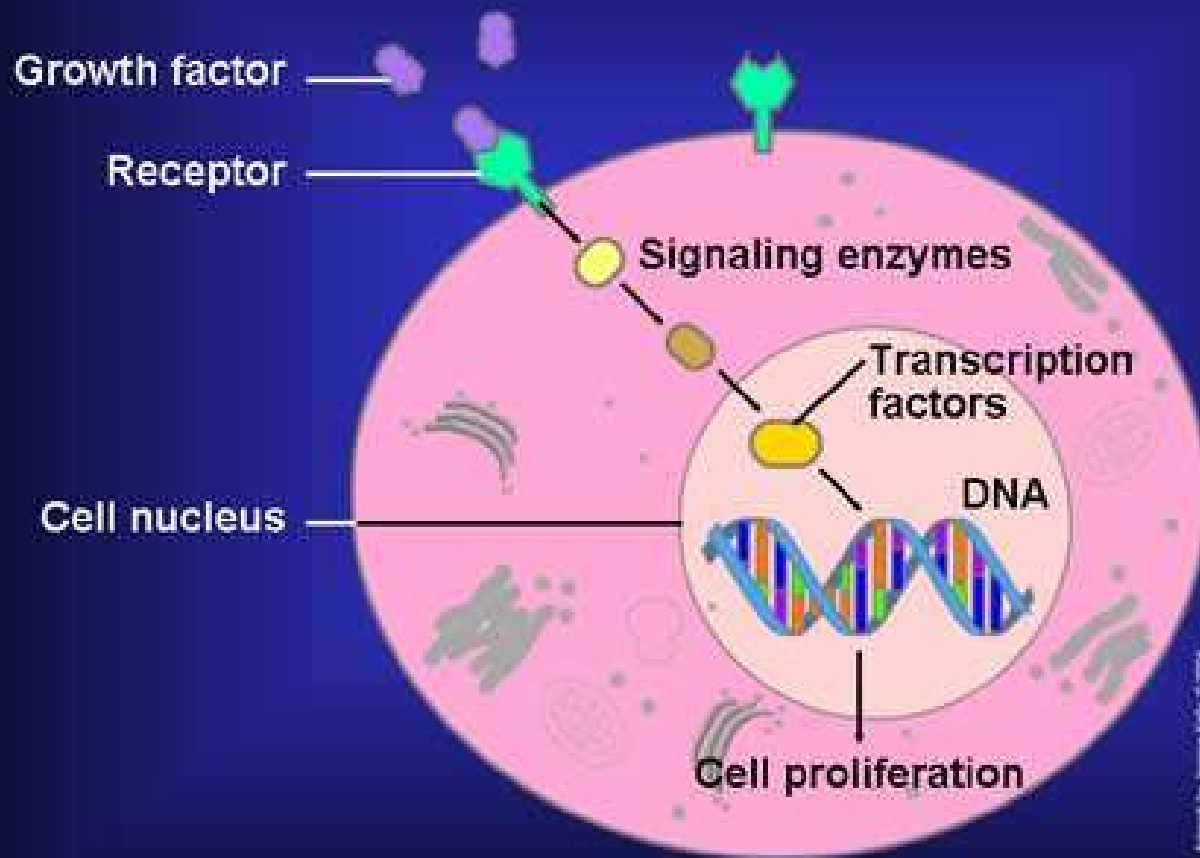


Protoonkogeny a onkogeny

- **protoonkogeny** - přirozená součást genomu, plní fyziologické funkce, obvykle spojené s růstem a proliferací
- mutací nebo aktivací virem se protoonkogeny mění na transformující **onkogeny**
- onkogeny kódují **onkoproteiny**
- onkoproteiny se zapojují do mitogenních **signálních drah** a signalizací spojených s diferenciací nebo apoptózou
- na úrovni buňky se chovají dominantně, porucha v jedné kopii již vyvolává účinek (účinek jednoho onkogenu ale k vyvolání nádoru většinou nestačí)
- až na malé výjimky (např . onkogen *ret*) **onkogeny nejsou dědičné** (z rodičů na potomstvo)

Proto-Oncogenes and Normal Cell Growth

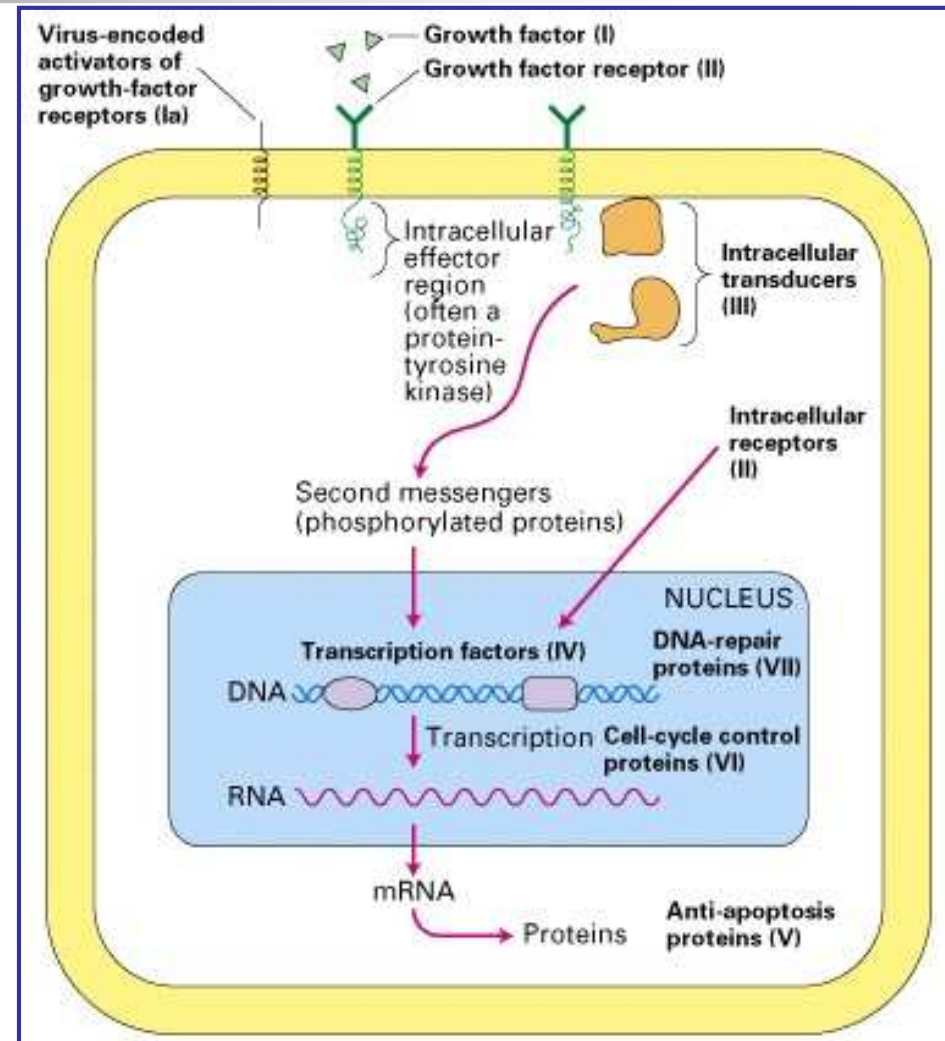
Normal Growth-Control Pathway



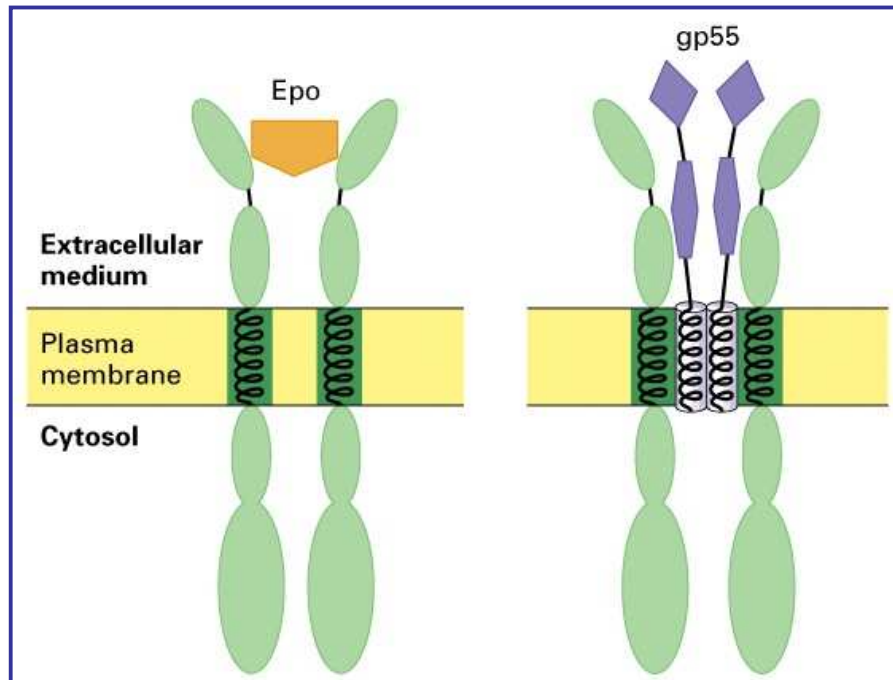
Approved by American Family 8/2004

Funkce onkoproteinů jsou rozmanité

- růstové faktory
- receptory pro růstové faktory
- nitrobuněčné přenašeče
- transkripční faktory
- regulátory apoptózy
- proteiny řídící buněčný cyklus
- proteiny zapojené do oprav DNA



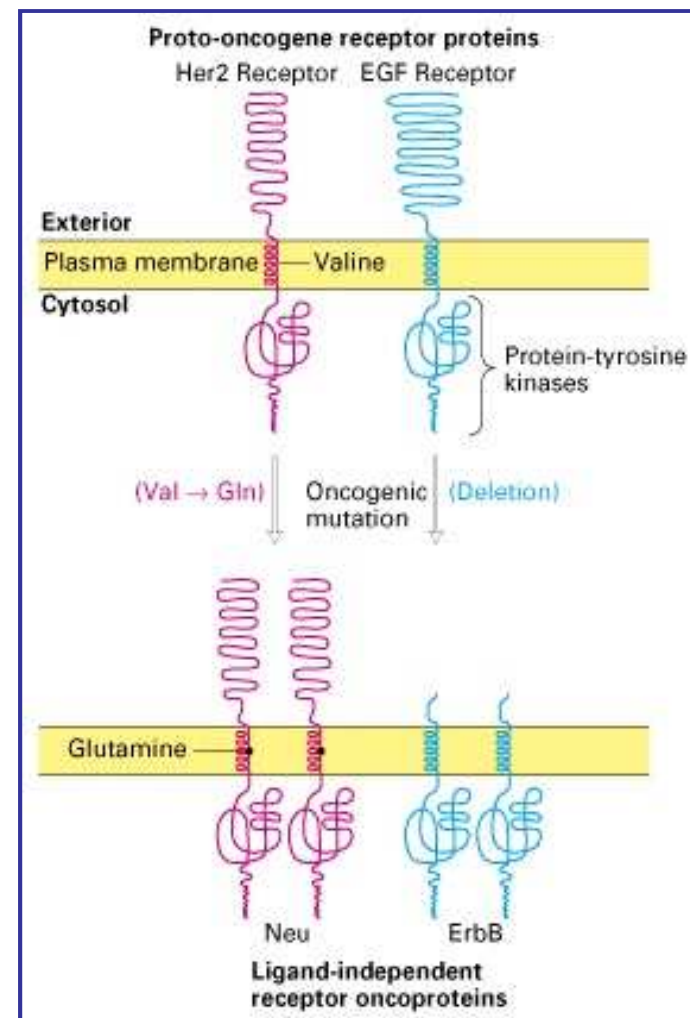
Onkoproteiny mohou být kódovány viry



- glykoprotein gp55 retroviru SFFV („spleen focus-forming virus“) indukuje erytroleukémii u myší
- gp55 je transmembránový protein schopný vyvolat dimerizaci a aktivaci receptoru EPO za nepřítomnosti jeho přirozeného ligandu
- vznik nadměrného množství erytrocytů

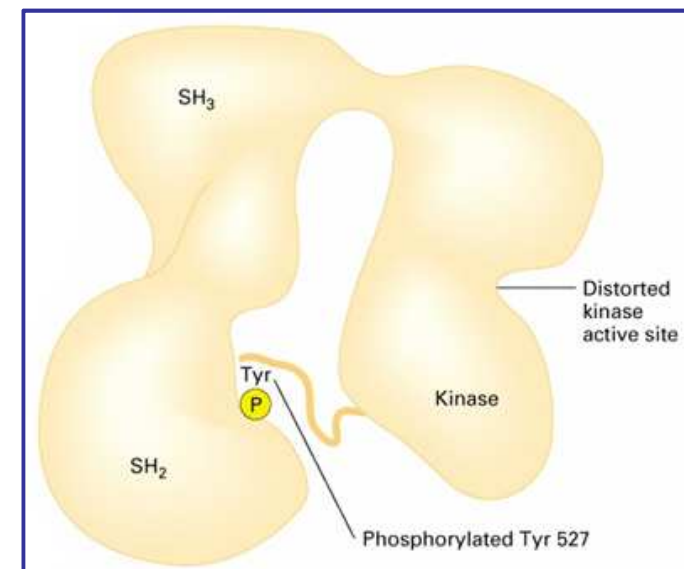
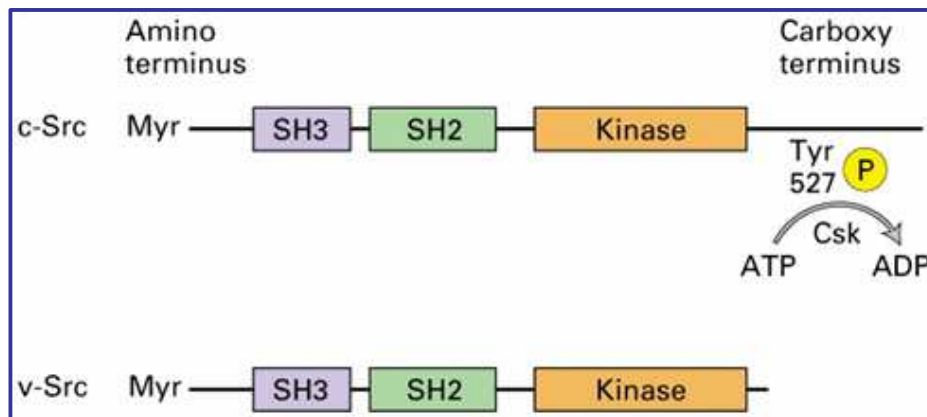
Aktivující mutace receptorových kináz napomáhají karcinogenezi

- aktivující mutace nebo silná exprese receptorů pro růstové faktory mohou vyvolat transformaci buňky
- specifická bodová mutace mění normální receptor **Her2** na onkoprotein **Neu**, který vytváří dimery a vykazuje kinázovou aktivitu i za nepřítomnosti ligandu
- delece domény pro vazbu ligandu receptoru pro **EGF** způsobuje vznik konstitutivně aktivní dimerizující formy (**ErbB**)
- v obou případech ztráta kontroly aktivity receptoru

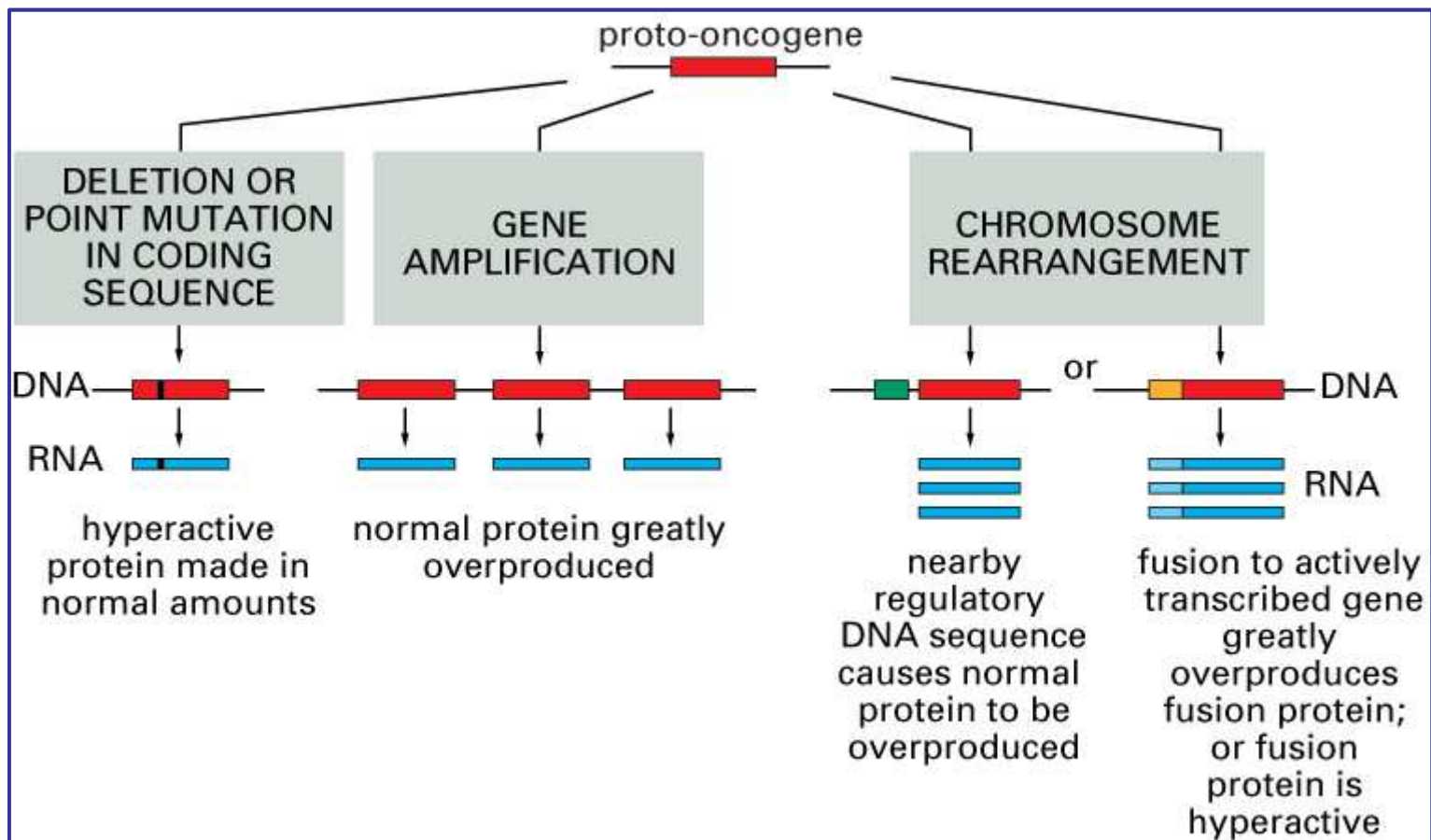


Onkogeny často kódují konstitutivně aktivní proteiny zapojené do signalizací

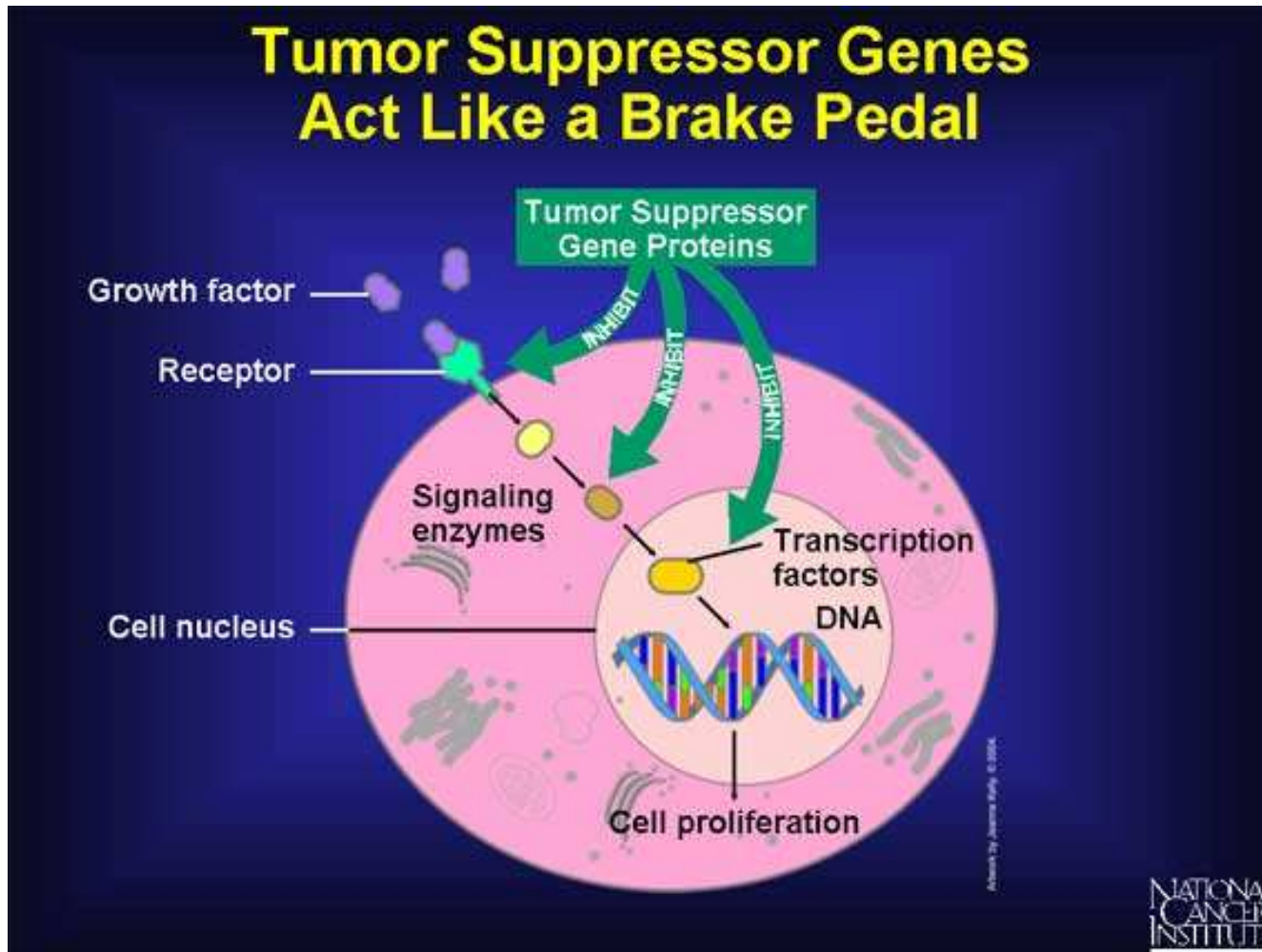
- kinázová aktivita c-Src je inhibována fosforylací Tyr 527
- tyrosin 527 často chybí u onkoproteinů Src, které vykazují konstitutivní aktivitu (tj. nemusí být aktivovány fosfatázou)
- např. v-Src RSV postrádá 18 C-koncových AA, včetně Tyr 527



Přeměna protoonkogenů na onkogeny

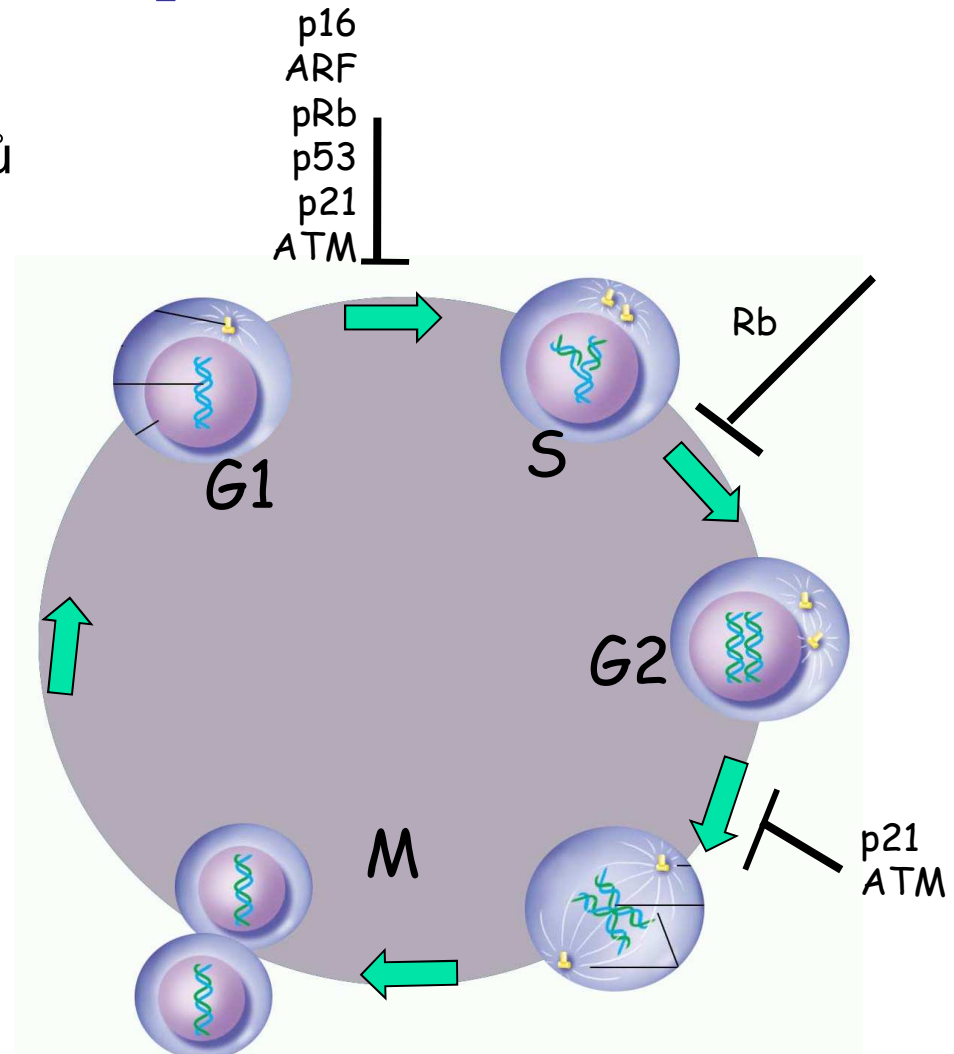


Nádorové supresory



Inaktivující mutace nádorových supresorů

Většina nádorových supresorů funguje jako negativní regulátory buněčného cyklu



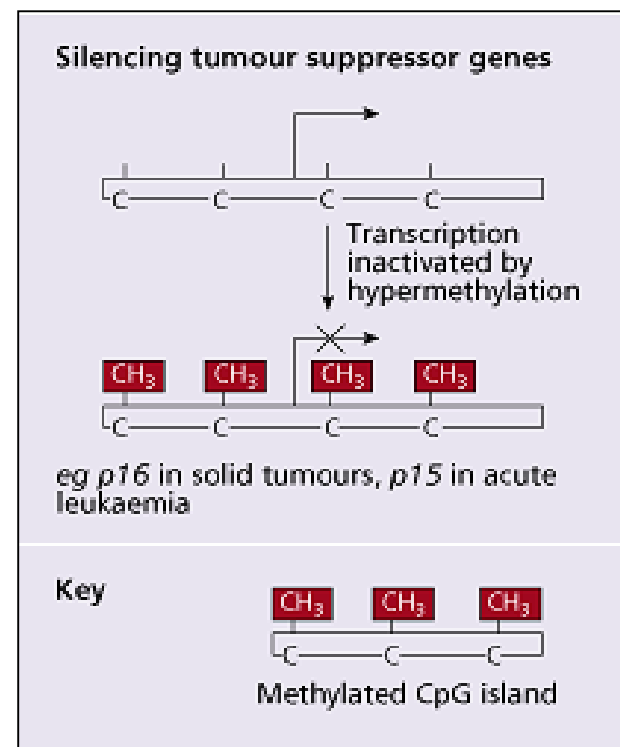
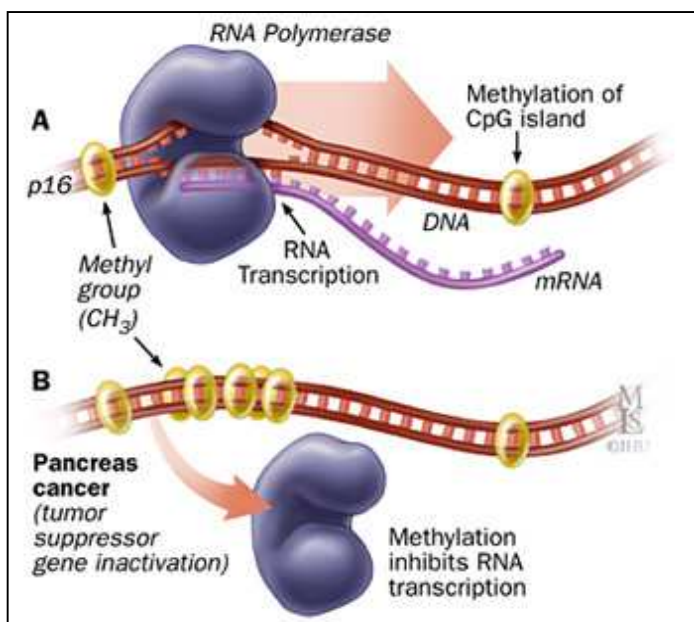


Funkce nádorových supresorů

- negativní regulátory buněčného cyklu (Rb, p16)
- negativní regulátory prorůstových buněčných signalizací (WT-1 inhibuje EGR-1; NF-1 inhibuje RAS)
- pozitivní regulátory mezibuněčné adheze (APC, DCC)
- složky aparátu rozeznávajícího poškození DNA a reparačního aparátu (p53, MSH2, MLH1)

Způsoby inaktivace nádorových supresorů

- mutace
- metylace DNA
- zablokování genové exprese





Mutace nádorových supresorů jsou u nádorů velmi časté

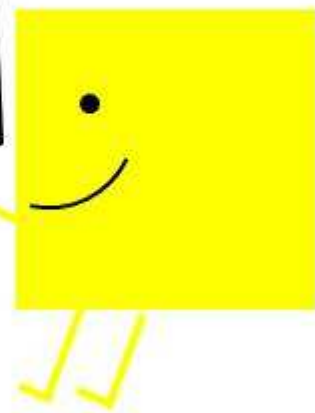
- postihují i sporadické (nedědičné) formy nádorů
- příklady mutací nádorových supresorů u nádorů tlustého střeva
 - mutace *p53* nalezeny v 70% sporadických nádorů tlustého střeva
 - mutace *APC* nalezeny v 70% sporadických nádorů tlustého střeva
 - mutace *MSH2* nalezeny v 15% sporadických nádorů tlustého střeva

At stop signal

Let's go!



NO!

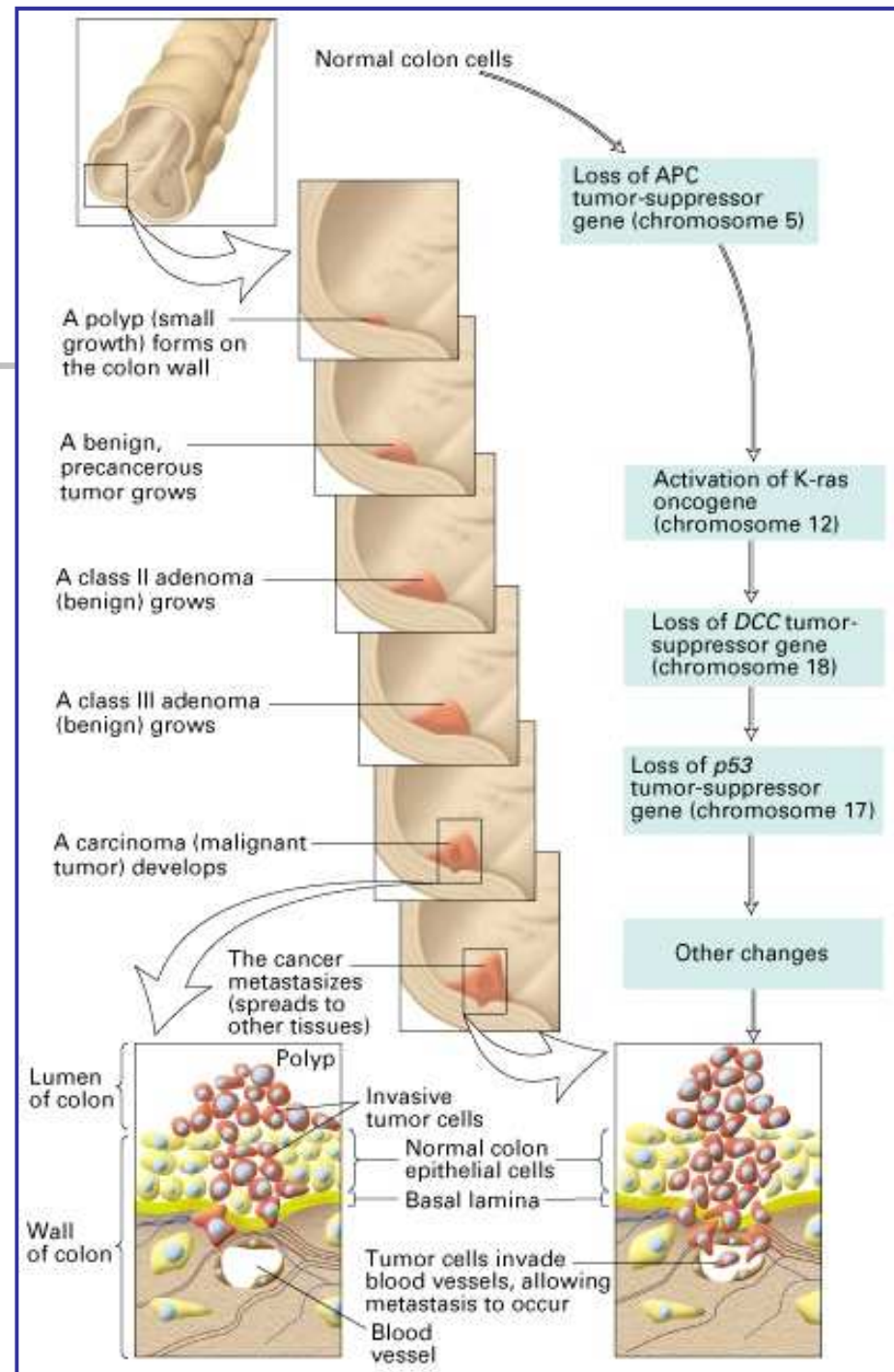


Oncogene

Tumour suppressor gene

Postupná přeměna zdravé střevní buňky na nádorovou

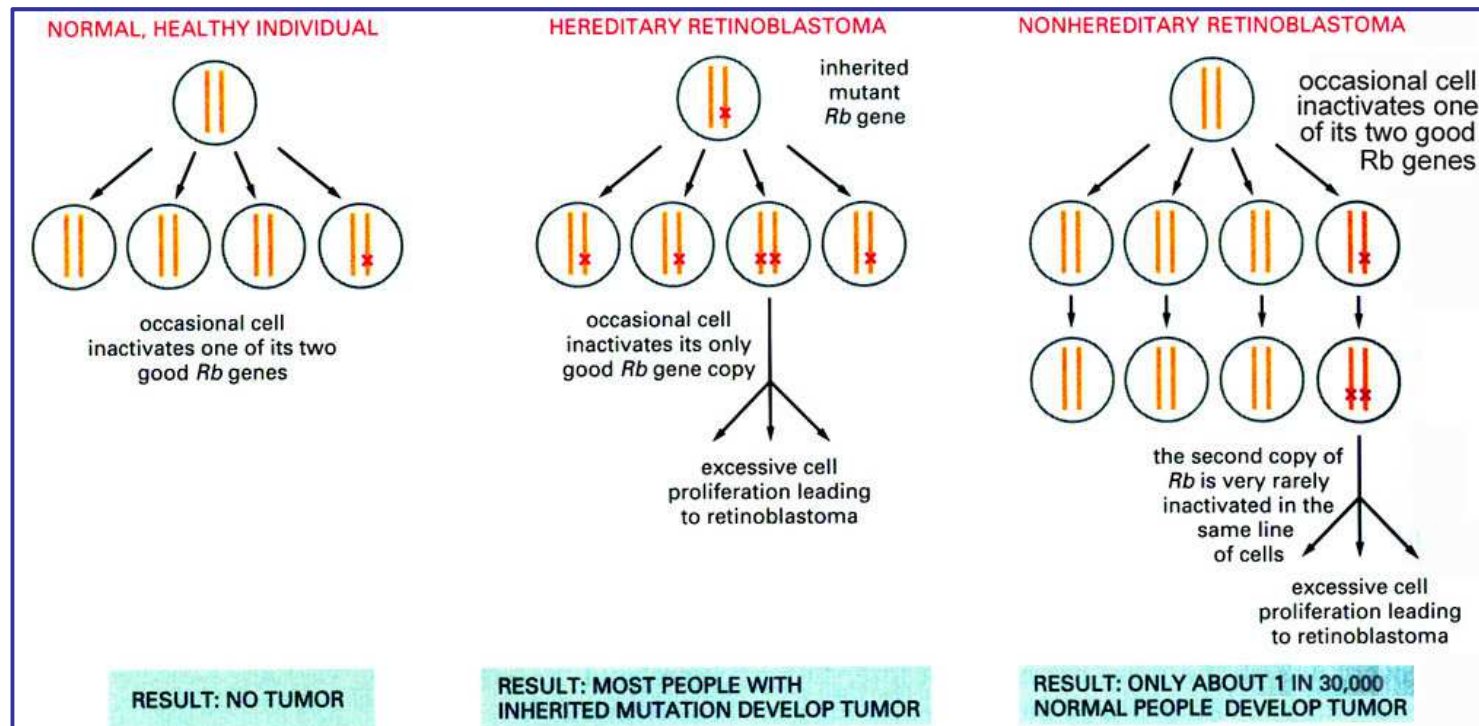
- ztráta nádorového supresoru **APC** s následkem stabilizace **β -kateninu** a ovlivnění mezibuněčné adheze: vzniká malý výrůstek - **polyp**
- stimulující mutace **ras**: **benigní adenom**
- oslabující mutace nádorových supresorů **DCC** a **p53**; DCC se účastní regulace mezibuněčných kontaktů; p53 je součástí kontrolního bodu monitorujícího stupeň poškození DNA v buněčném cyklu: **“late” adenom a karcinom**





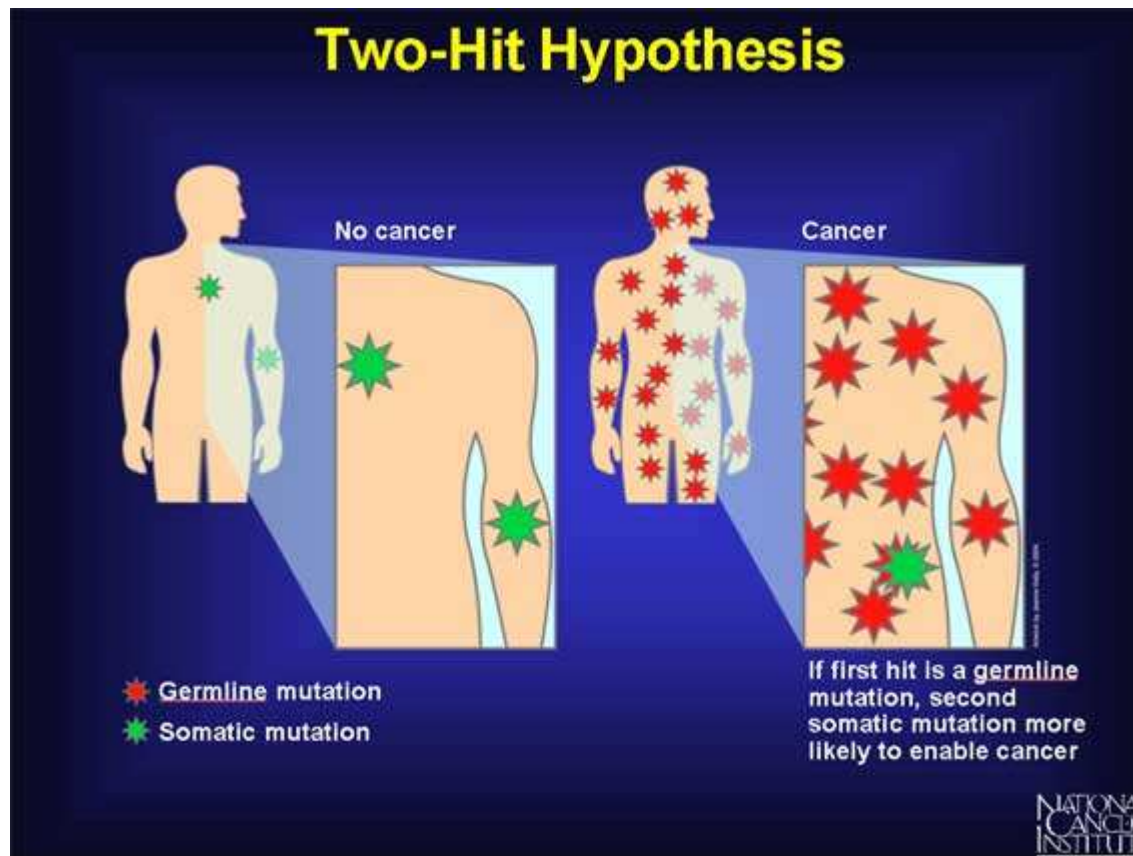
Nádorový supresor Rb

- dědičná (familiální) forma: predispozice k rakovině (nádor **retinoblastom, zhoubný nádor sítnice**, je častý v dětském věku)
- sporadická forma: postupná inaktivace obou alel Rb



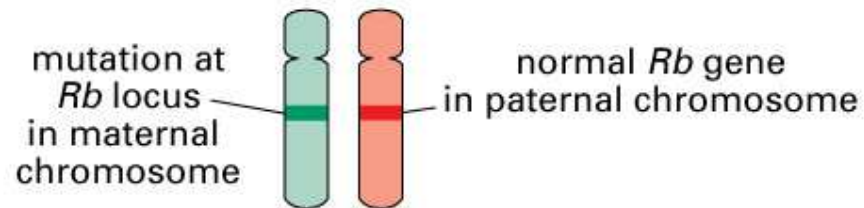
Alfred Knudson: teorie dvou zásahů

- model vzniku rakoviny u osob se zděděnou predispozicí a osob bez dědičné zátěže

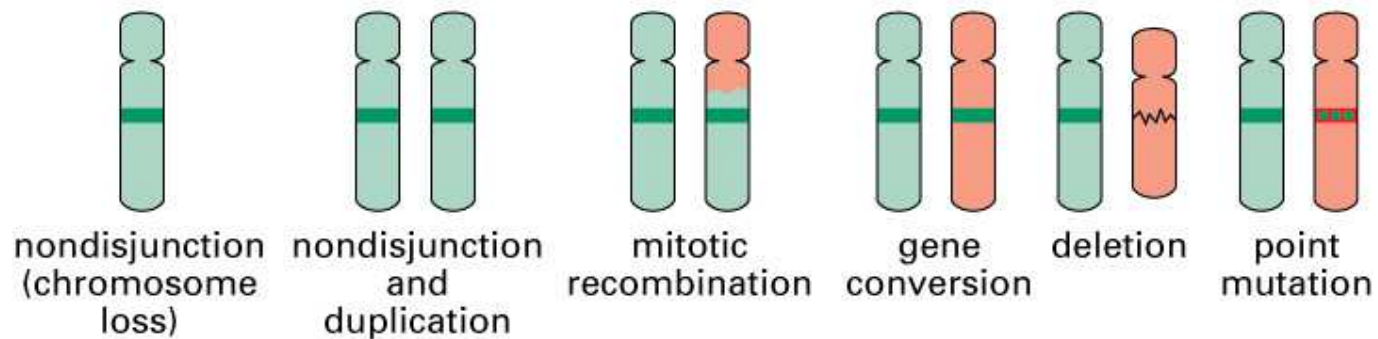


Mechanismy ztráty heterozygotnosti

HEALTHY CELL WITH ONLY 1 NORMAL *Rb* GENE COPY



POSSIBLE WAYS OF ELIMINATING NORMAL *Rb* GENE



Ztráta heterozygotnosti (LOH)

Druhá mutace

Transformace a translokace

- translokace t(9; 22) vedoucí ke vzniku onkogenu *bcr-abl* je spojena s chronickou myeloidní leukémií (CML)
- markerem je přítomnost “**Filadelfského**” chromozomu

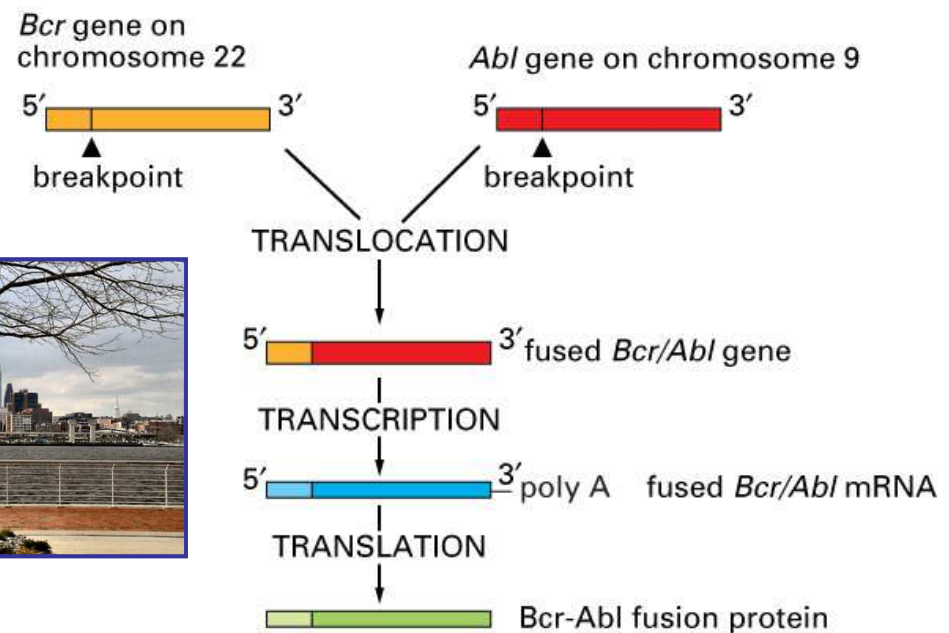
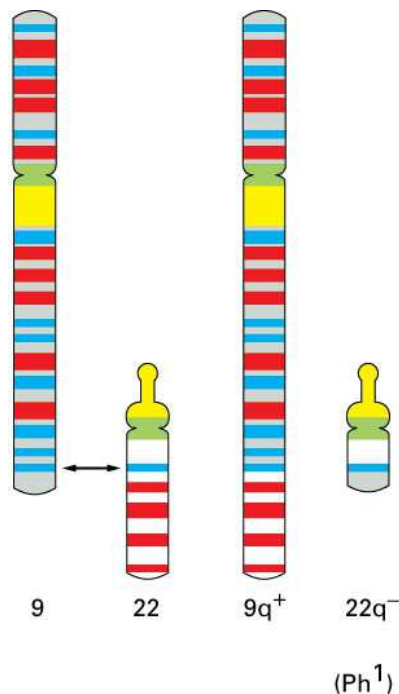


Figure 23–5. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.

Figure 23–44. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.

Příčinou CML

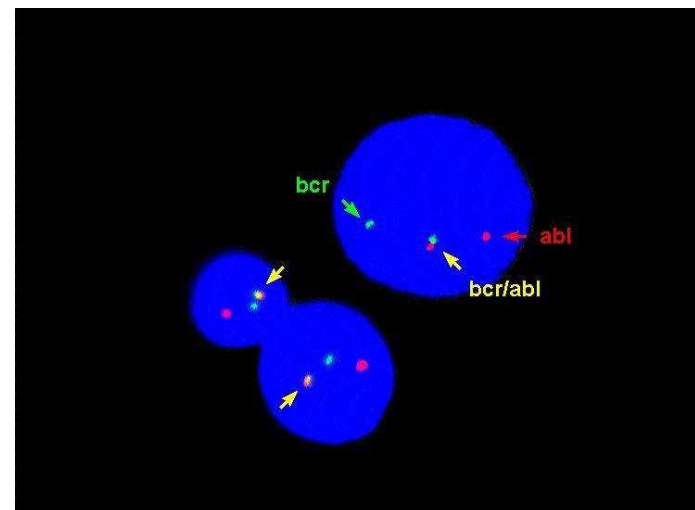
je selhání regulace c-Abl

c-Abl je tyrozin kináza

- napomáhá transkripci genů zapojených do buněčného cyklu

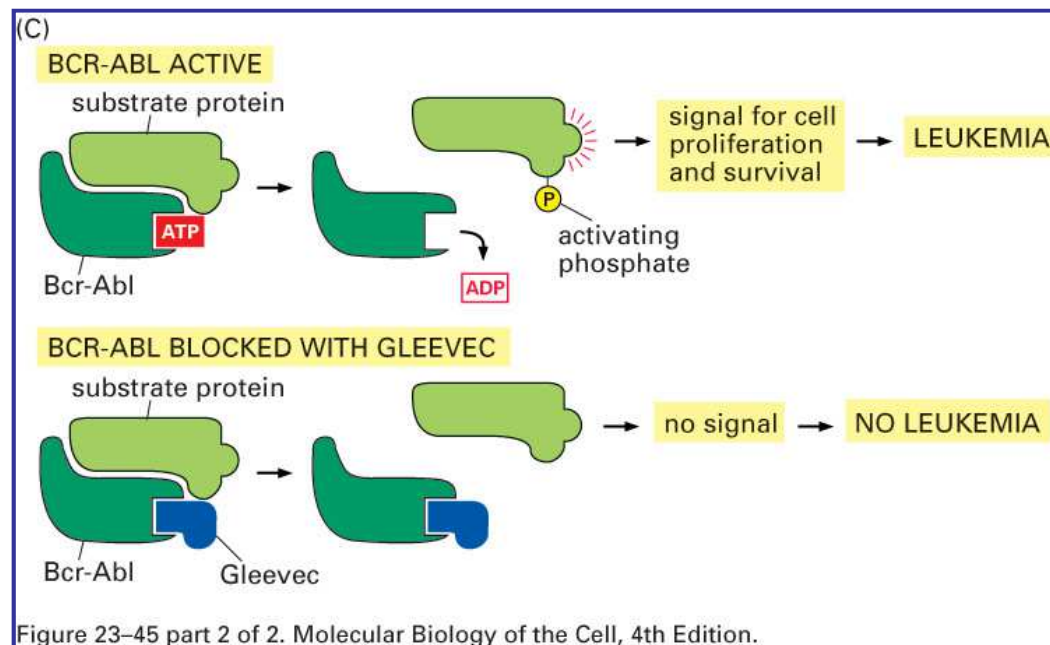
Proteinová chiméra Bcr-Abl

- má vysokou konstitutivní tyrozin kinázovou aktivitu



Úspěch protinádorové terapie: Gleevec/Imatinib

- Gleevec inhibuje aktivitu chimérické kinázy blokováním jejího aktivního místa
- vysoce specifická a netoxická terapie CML





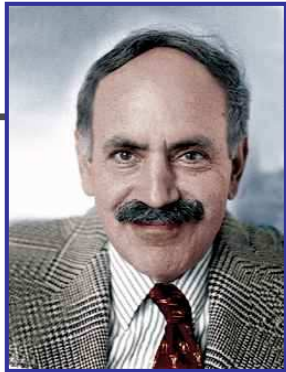
Vlastnosti nádorových buněk

- **klonální původ** – nádory jsou obvykle odvozeny od jediné deregulované neoplastické buňky
- **neregulovaný růst** – nádorové buňky nereagují na normální regulační mechanismy ovlivňující růst, ale neomezeně proliferují
- **změněná tkáňově specifická afinita** – nádorové buňky prorůstají za hranice původní tkáně – metastázy









Vlastnosti nádorových buněk

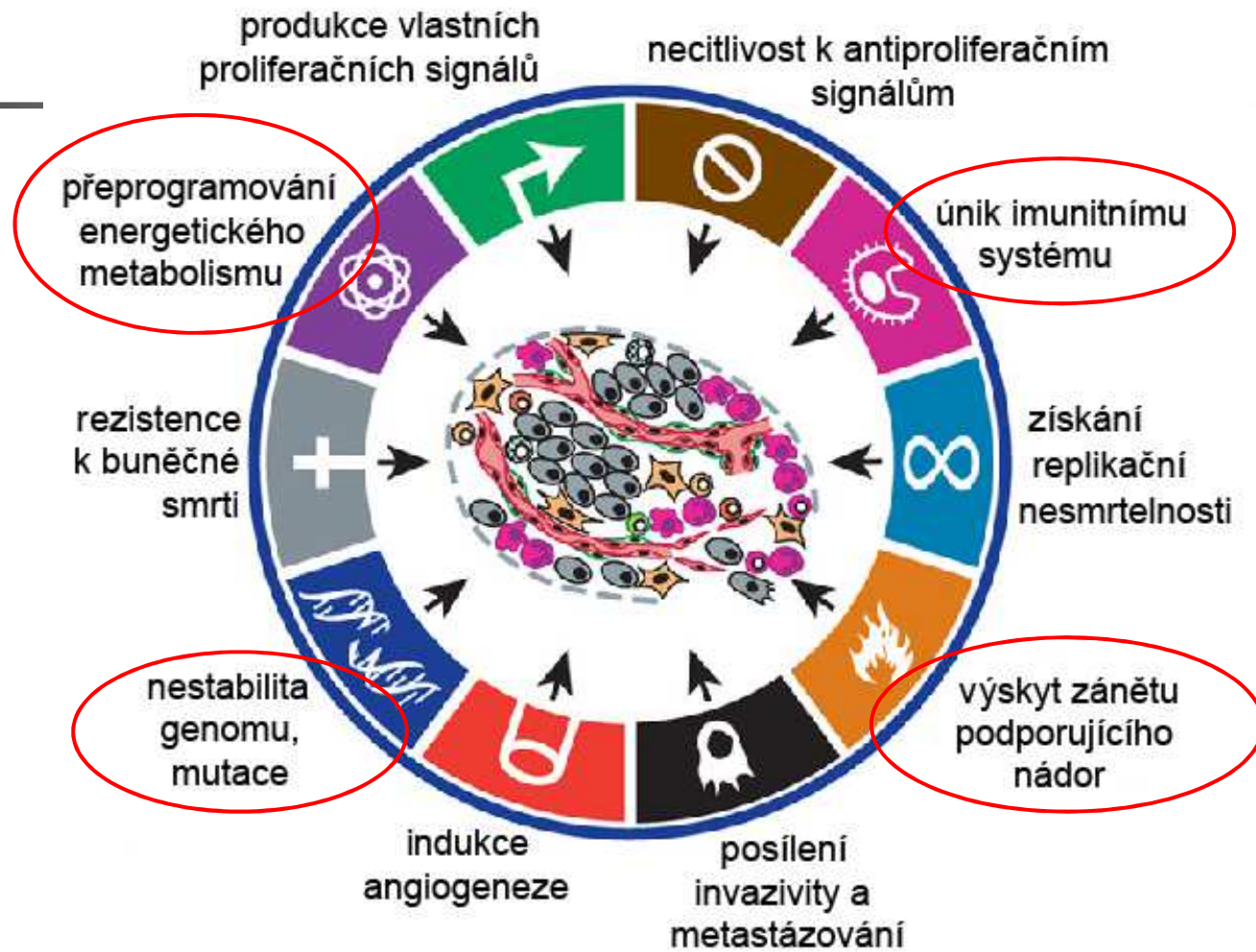
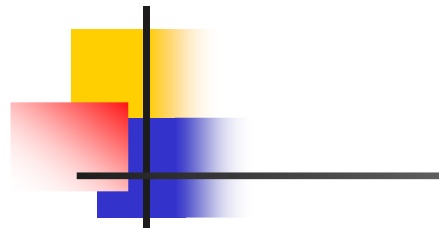
- **změněné biochemické vlastnosti**, které zvyšují růstový potenciál:
 - **zvýšená glykolytická aktivita** umožňující růst i za snížených koncentrací kyslíku
 - **sekrece hydrolytických enzymů** umožňujících degradaci bazálních membrán a dalších struktur mimobuněčné matrix
 - **tvorba angiogenních faktorů**
- **pozměněný cytoskelet** – chybná organizace cytoskeletu a změněná buněčná morfolgie
- **chromozomové abnormality** – změny v počtu chromozomů, časté delece, translokace a genové duplikace
- **neomezený růst v tkáňové kultuře** – nádorové buňky jsou obvykle nesmrtelné a mohou být neomezeně kultivovány *in vitro*



Cesty k rakovině

Component	Acquired Capability	Example of Mechanism
	Self-sufficiency in growth signals	Activate H-Ras oncogene
	Insensitivity to anti-growth signals	Lose retinoblastoma suppressor
	Evading apoptosis	Produce IGF survival factors
	Limitless replicative potential	Turn on telomerase
	Sustained angiogenesis	Produce VEGF inducer
	Tissue invasion & metastasis	Inactivate E-cadherin





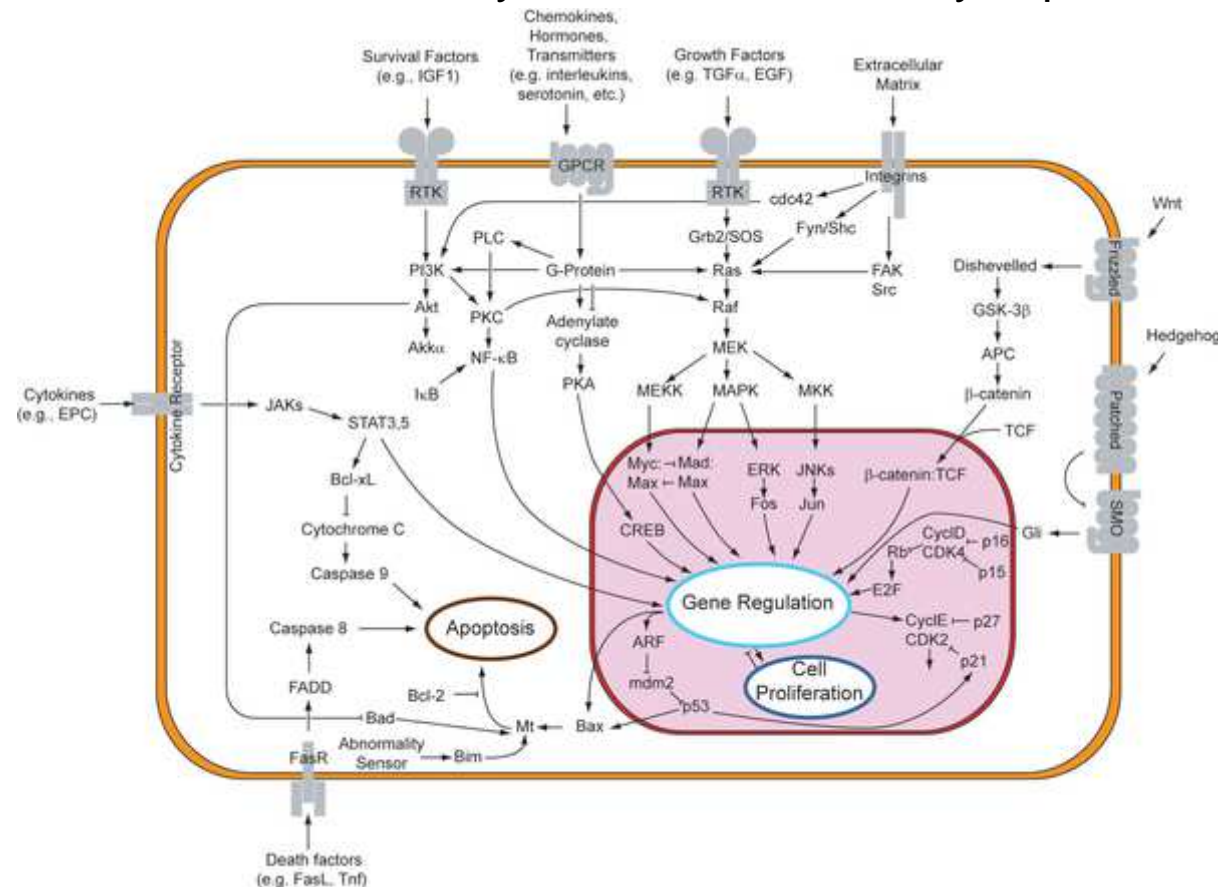


(A) Nezávislost na růstových faktorech

- zdravé buňky nemohou proliferovat bez růstových signálů
- mnohé onkogeny v buňkách stimulují signální dráhy, které jsou ve zdravých buňkách aktivní pouze za přítomnosti růstových faktorů
- snížená závislost na růstových faktorech je zřejmá u nádorových buněk pěstovaných *in vitro*

Strategie buněk pro získání nezávislosti na růstových faktorech

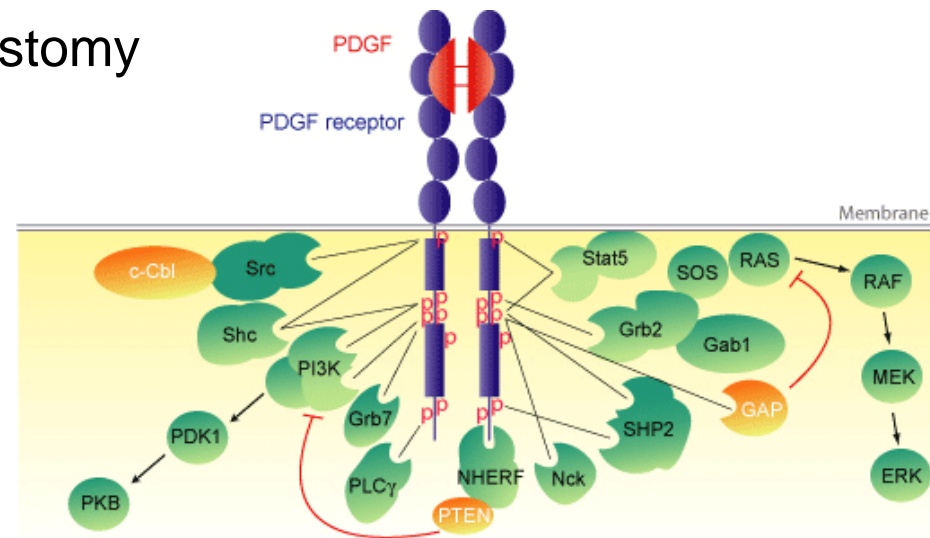
- změna charakteru růstových faktorů nebo způsobu jejich tvorby
- změna transmembránových nebo nitrobuněčných přenašečů signálů



Změna charakteru růstových faktorů nebo způsobu jejich tvorby

- zdravé buňky obvykle produkují růstové faktory pro jiné buňky (**heterotypická signalizace**)
- nádorové buňky získávají schopnost syntetizovat růstové faktory, na které jsou citlivé (**autokrinní stimulace**)

např. PDGF - produkován glioblastomy



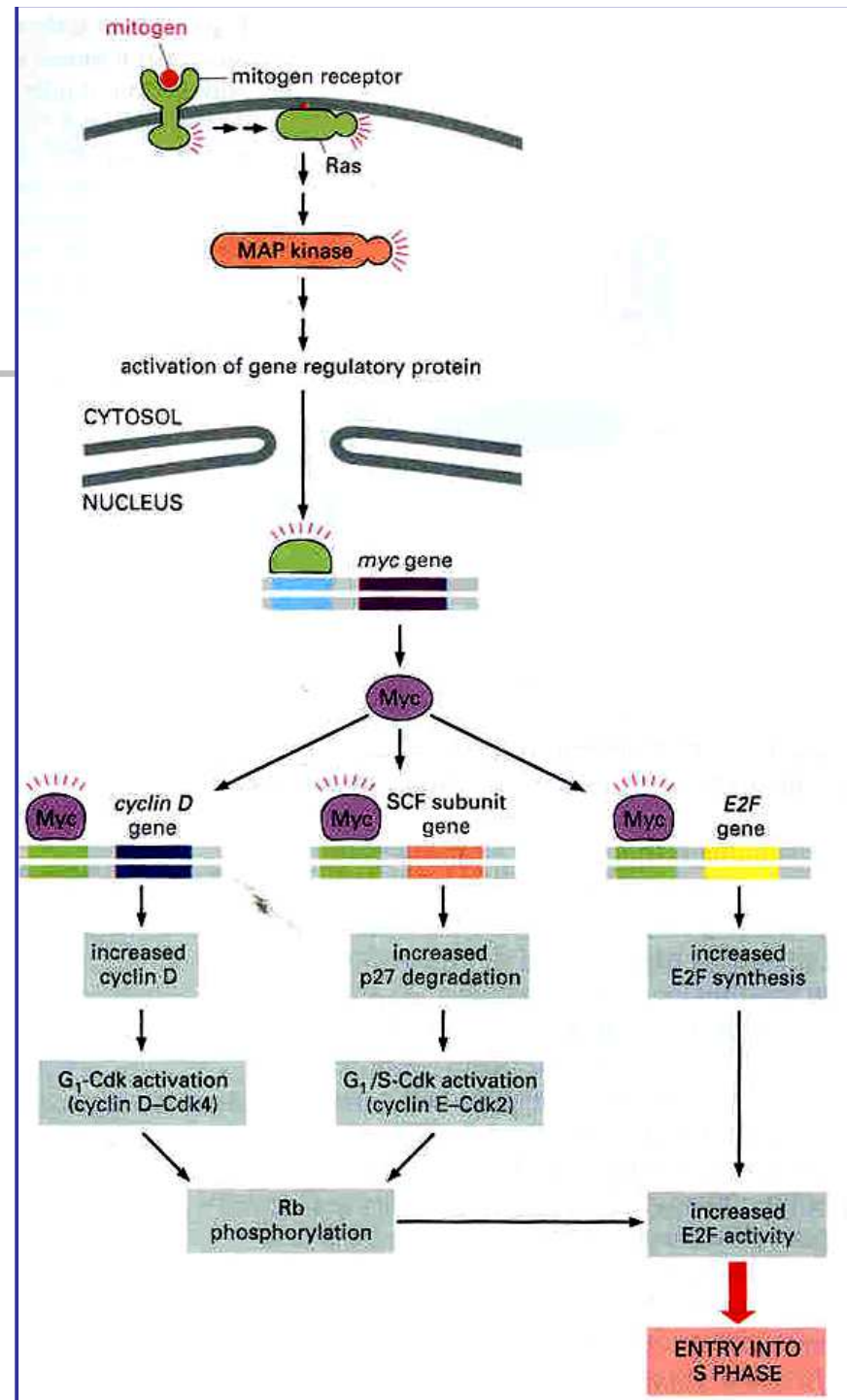


Změna transmembránových přenašečů signálu

- **zvýšená exprese** genů kódujících povrchové receptory pro růstové faktory: zvýšení citlivosti buňky k běžným koncentracím růstových faktorů (např. exprese EGF receptoru je zvýšena u nádorů žaludku, mozku a prsu)
- **změna struktury** receptoru: konstitutivní aktivita

Změna signálních drah

- hlavní úlohu má kaskáda Ras-MAPK
- proteiny Ras jsou pozměněny u 25% lidských nádorů
- je pravděpodobné, že růstové signální dráhy jsou deregulovány u všech lidských nádorů





(B) Necitlivost na protirůstové signály

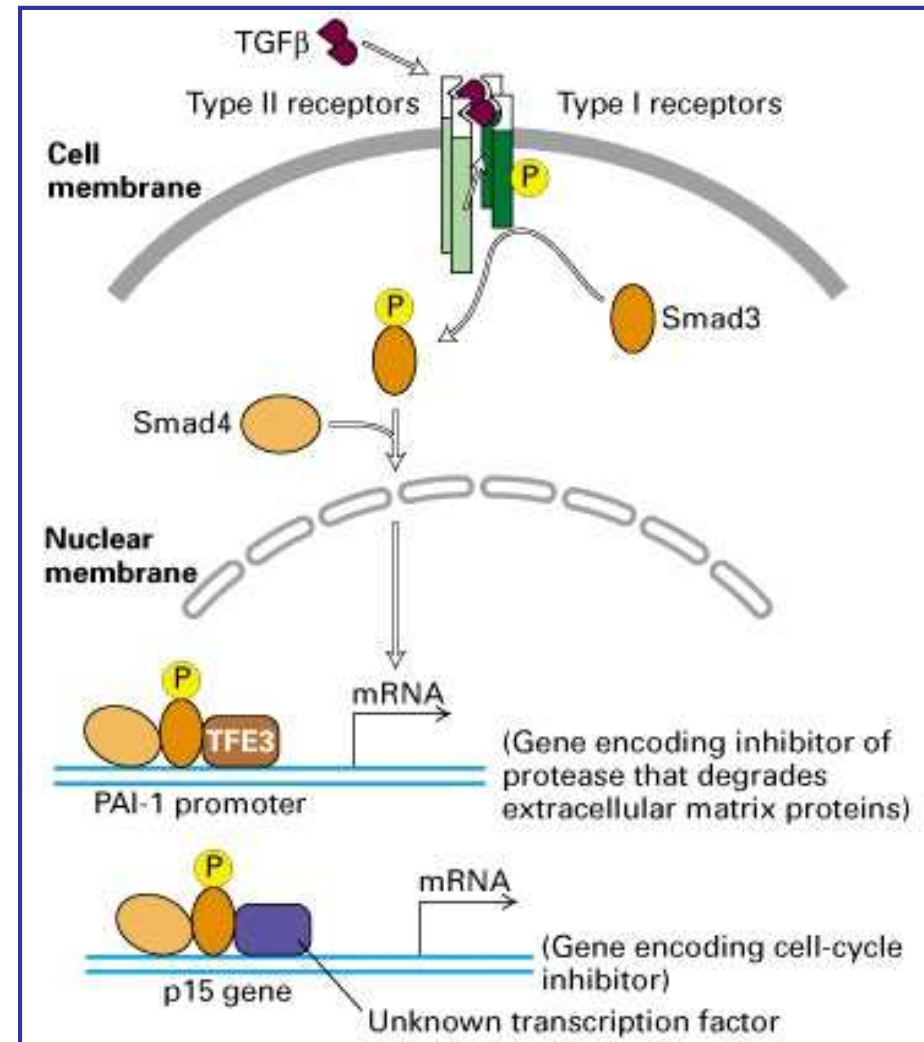
Zdravá tkáň

- existence protirůstových signálů v podobě rozpustných faktorů a inhibitorů imobilizovaných v matrix a na povrchu buněk
- na protirůstové signály buňka (např. TGF β) reaguje stejně jako na růstové faktory (prostřednictvím receptorů a nitrobuněčných signálních kaskád)

Ztráta signalizace TGF β

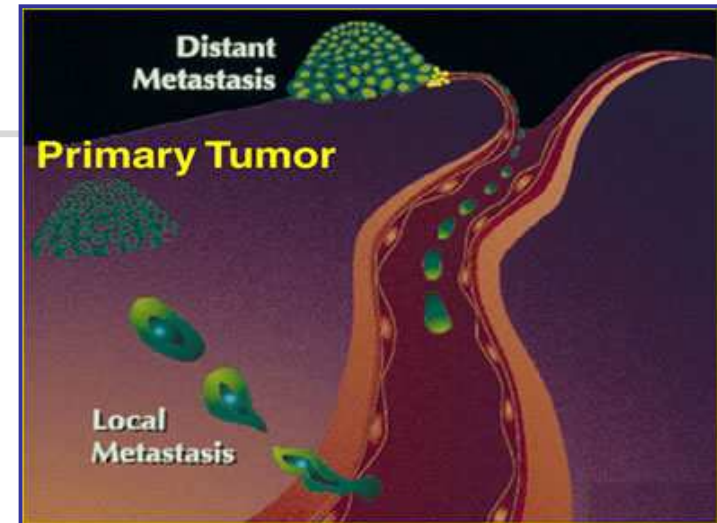
Nádorová buňka může ztratit citlivost na TGF β :

- snížením exprese receptorů
- mutací v genu kódujícím receptor
- mutací v genu kódujícím některý z dalších nitrobuněčných přenašečů (proteiny SMAD)

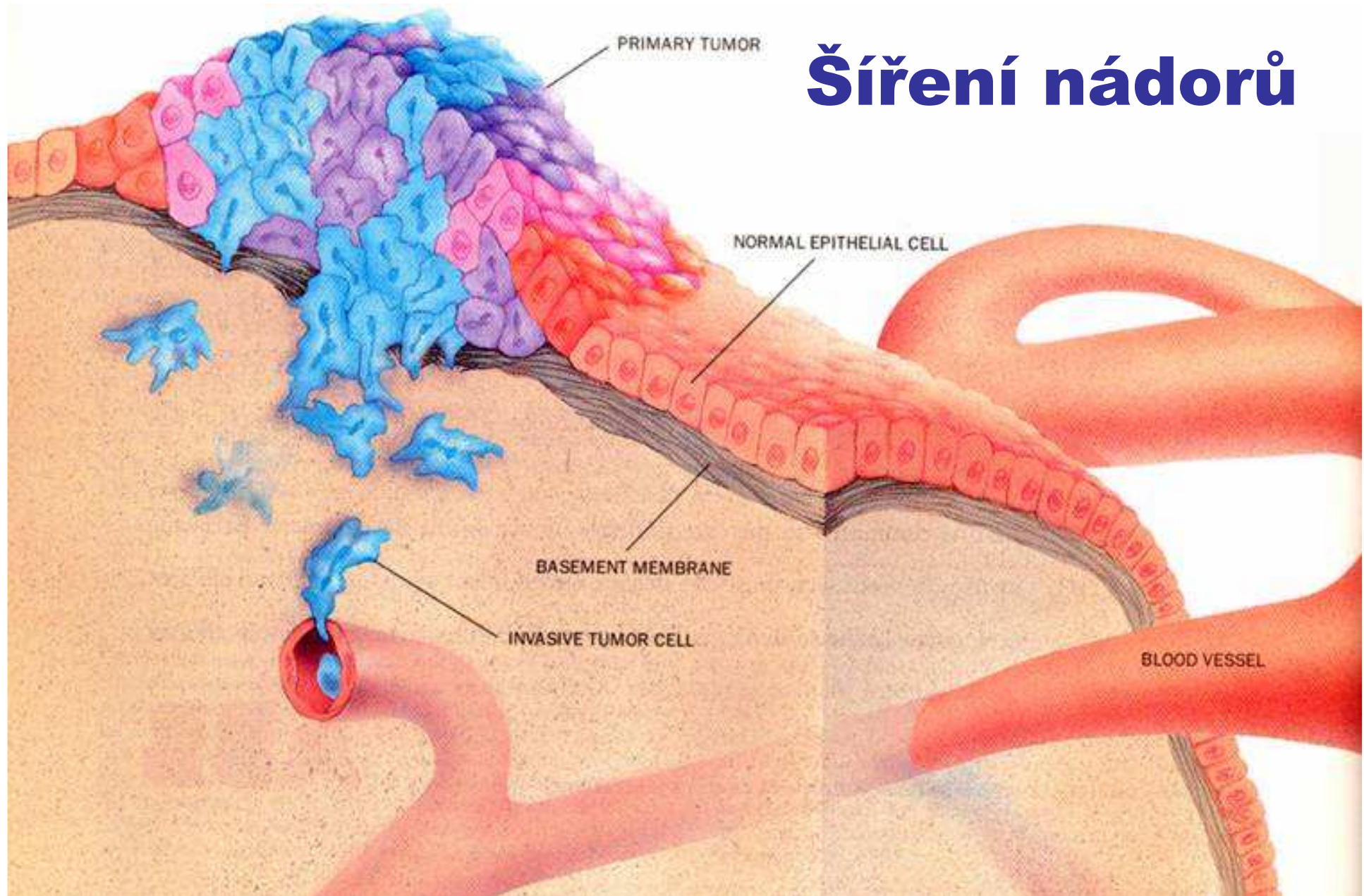


(C) Metastázy

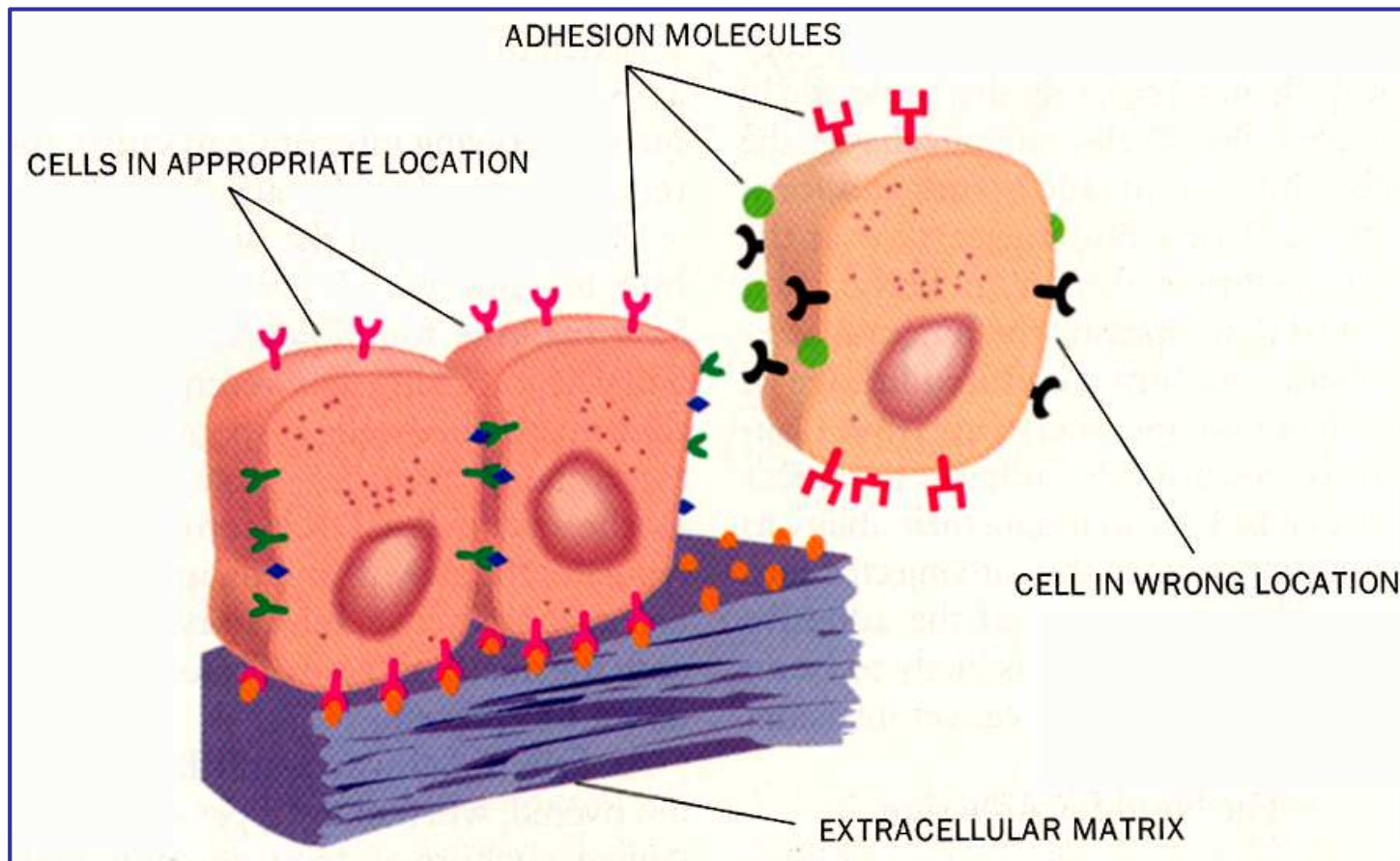
- přechod nádorových buněk z primárního nádoru do nové tělní lokalizace, ve které je dostatek prostoru a výživy
- umožněno změnami dvou typů proteinů:
 - proteinů, které zajišťují upevnění buněk k okolním buňkám (**CAM**) a matrix (**integriny**)
 - **mimobuněčných proteáz** (zvýšená exprese genů kódujících proteázy, snížená exprese genů kódující inhibitory proteáz)

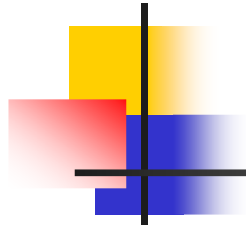


Šíření nádorů



Lokalizaci buněk ve tkáních určují adhezivní molekuly a receptory

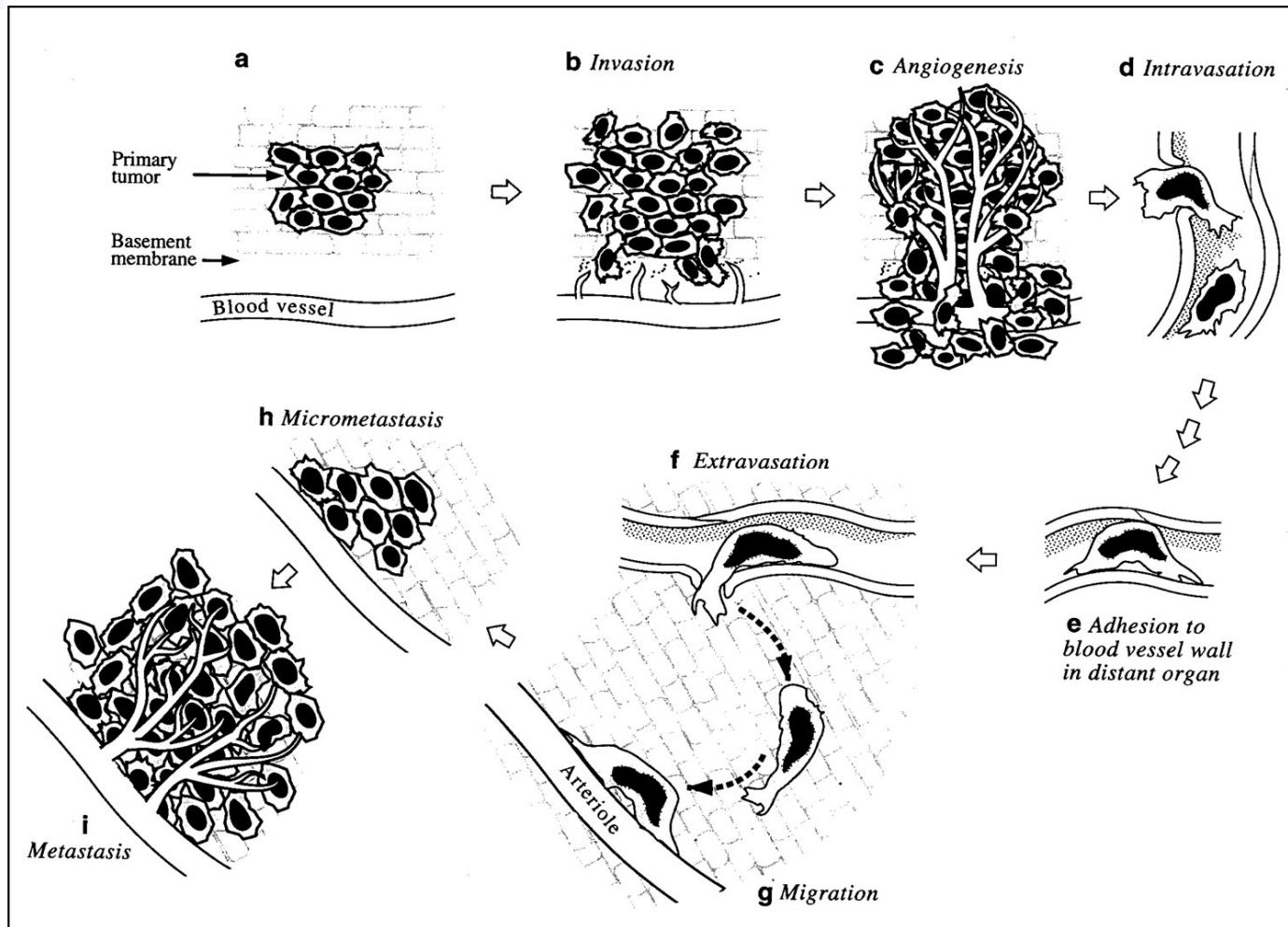




Metastázová kaskáda

- rozrušení bazální membrány
- oddělení buněk
- pohyb buněk
- invaze
- penetrace vaskulárního systému
- cirkulace rakovinných buněk
- opuštění krevního řečiště

Tvorba metastáz



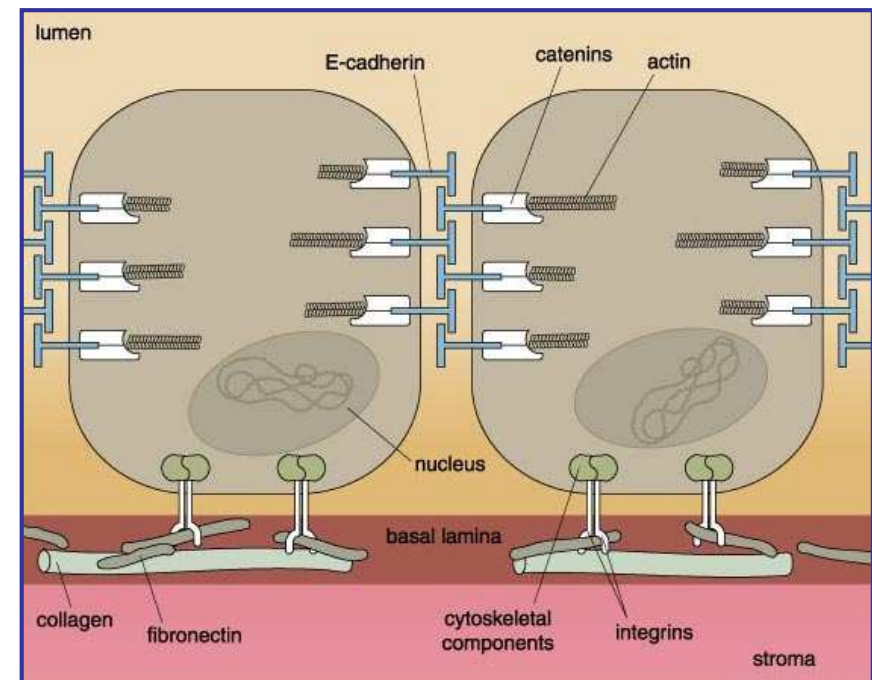


Složky bazální membrány

- bazální membrána je tenká vrstva mimobuněčné matrix
- odděluje epiteliální buňky od prokrvených konektivních tkání
- bazální membrána musí být rozrušena, aby nádorové buňky získaly přístup ke krevnímu toku
- rozklad membrány zajišťují enzymy (proteázy)
- **katepsin B** je proteolytický enzym rozkládající složky bazální membrány: jeho hladina stoupá v krvi pacientů s nádory gastrointestinálního traktu a především u metastázujících nádorů plic a jater (marker metastázování)

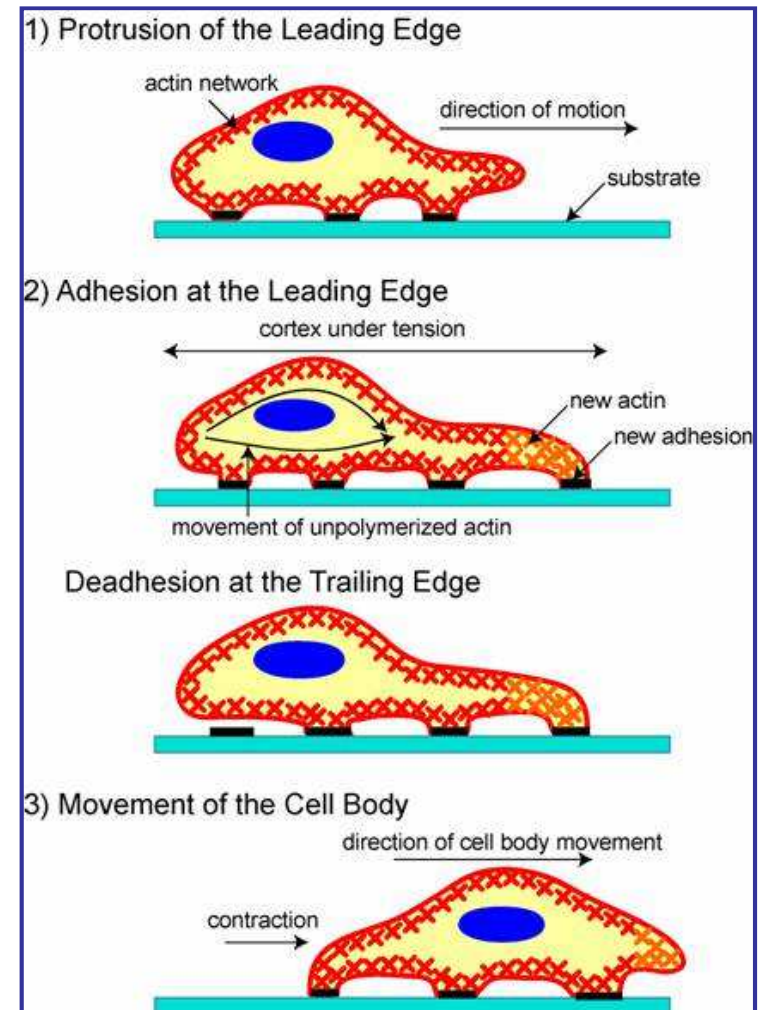
Oddělení buněk

- nádorové buňky mají sníženou vzájemnou přilnavost
- důsledek redukce exprese genů pro adhezivní povrchové molekuly (**kadheriny, kateniny**)
- normální buňky téhož typu se od sebe v tkáni neoddělují
- transfekce invazivních buněk cDNA kódující kadherin E snižuje jejich invazivitu



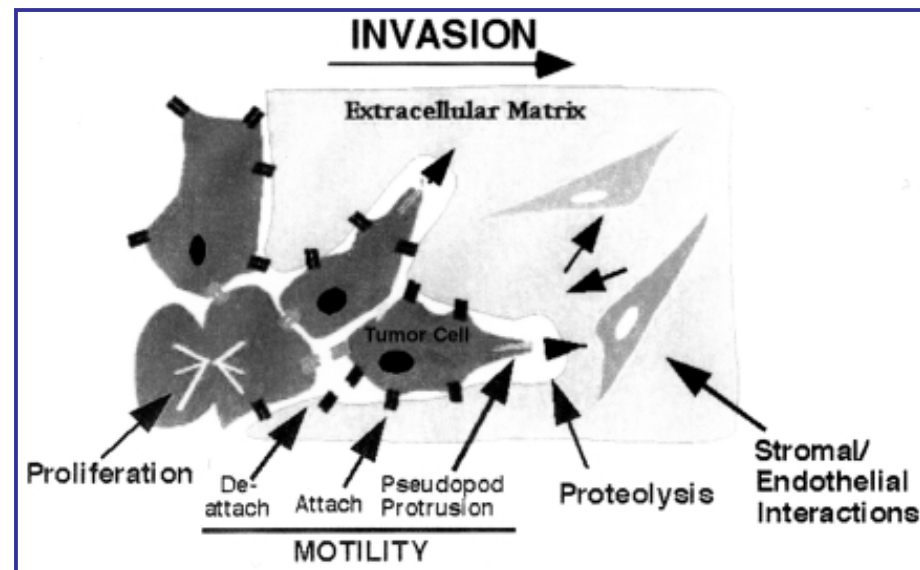
Pohyblivost buněk

- nádorové buňky mají zvýšenou pohyblivost
- existují enzymy, jejichž přítomnost koreluje s pohyblivostí a metastatickým potenciálem buněk (např. glycerinaldehyd-3-fosfát dehydrogenáza)
- **cytokin AMF** („autocrine motility factor“) stimuluje pohyb buněk:
 - produkován nádorovými liniemi
 - indukuje tvorbu pseudopodií



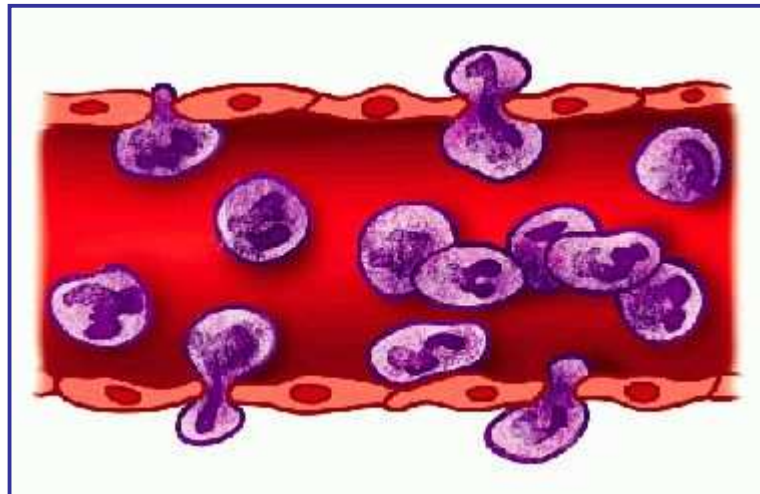
Invaze buněk

- průnik buněk konektivní tkáně ke kapilárám
- obdoba překonání bazální membrány
- syntéza kolagenázy I a dalších rozkladných enzymů



Penetrace vaskulárního systému

- nádorové buňky se šíří krevními nebo lymfatickými kapilárami
- tlusté stěny kapilár se překonávají obtížně, zřejmě využívány drobné strukturní poruchy v nově tvořených kapilárách
- drobnými mezerami se buňky dostávají do kapiláry (diapedeza)





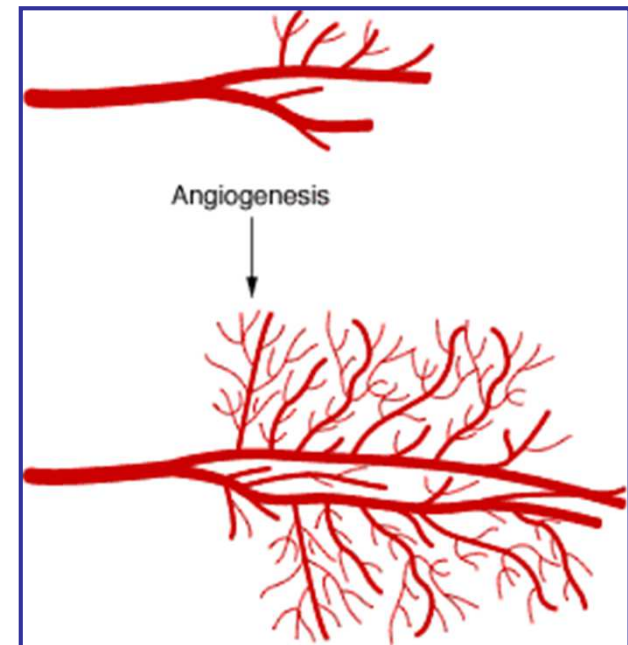
(D) Podpora angiogeneze

- angiogeneze = růst nových krevních vlásečnic
- život všech buněk je závislý na přísunu živin a kyslíku
- tvorba kapilár závisí na rovnováze mezi **induktory angiogeneze** (např. **FGF, VEGF**) a **inhibitory angiogeneze** (např. **trombospondin-1**)
- růst nádoru je omezen stupněm prokrvení; za nepřítomnosti živin a kyslíku nádor nemůže dosáhnout větší velikosti než průměru 1 mm³ (nekróza buněk ve středu kolonie nádorových buněk)
- nádorové buňky ve zvýšené míře tvoří induktory angiogeneze a méně inhibitorů angiogeneze

Vývoj nových cév za fyziologických podmínek

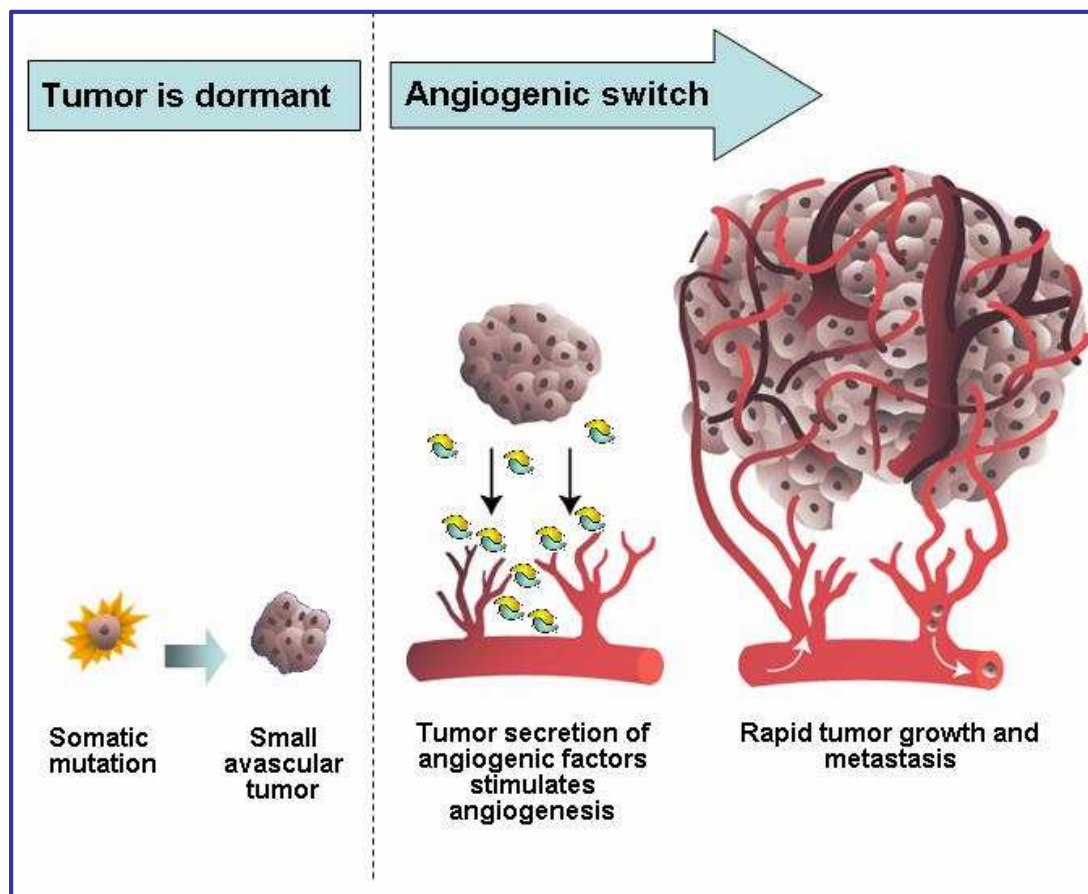
Při růstu cév se uplatňují 2 mechanismy:

- **angiogeneze** – růst nových cév ze starých
 - **vaskulogeneze** – tvorba cév „z ničeho“ – tj. sestavením a diferenciací endoteliálních prekurzorů u embrya
-
- kyslík ve tkáních difunduje do vzdálenosti 100 mikronů (0,1 mm)



Zapnutí angiogeneze je podmínkou růstu nádoru

nádorové buňky produkují angiogenní faktory



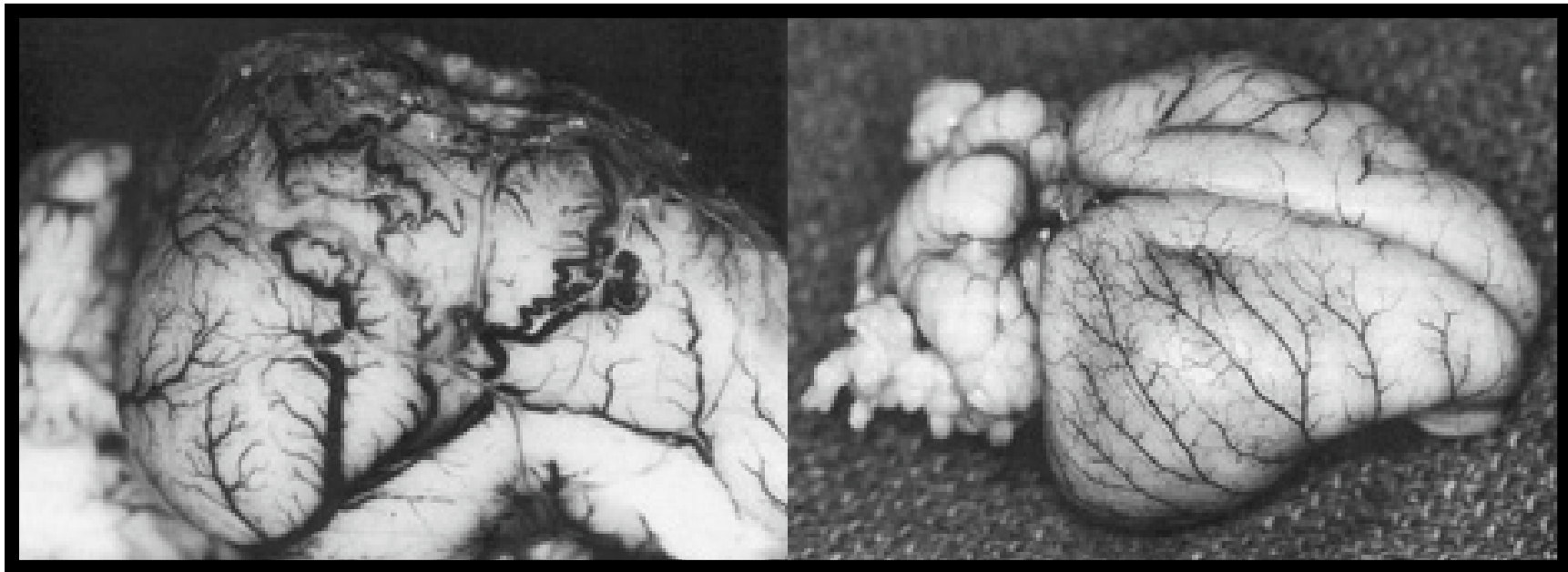


Ovlivňováním angiogeneze lze s nádorem manipulovat

- angiogeneze je výsledkem **dynamické rovnováhy** mezi pro- a antiangiogenními faktory; pro terapii je vhodné odstranit proangiogenní faktory a přidat antiangiogenní
- cévy v nádorech jsou podobné běžným cévám, ale mají nižší stupeň organizace, mění se jejich průměr, mají heterogenní vzhled
- u různých nádorů vypadají cévy různě, protože vznikly působením různých kombinací pro- a antiangiogenních faktorů

Vaskulatura nádoru je nedokonalá (ale stačí...)

Normální vaskulatura (vpravo) je velmi uspořádaná ve srovnání s vaskulaturou nádoru (vlevo)



Nádorová vaskulatura

Časté jsou ohyby,
nepravidelnosti,
rozdíly ve velikosti





Látky s anti-angiogenním účinkem: potenciální léčiva

- protilátky proti pozitivním regulátorům -VEGF or FGF-2 nebo jejich receptorům (zatím neúspěšnější)
- inhibitory matrixových metaloproteináz

Angiostatin: vnitřní doména plasminogenu, 38 kDa, přímo snižuje proliferaci endoteliálních buněk, zvyšuje apoptózu

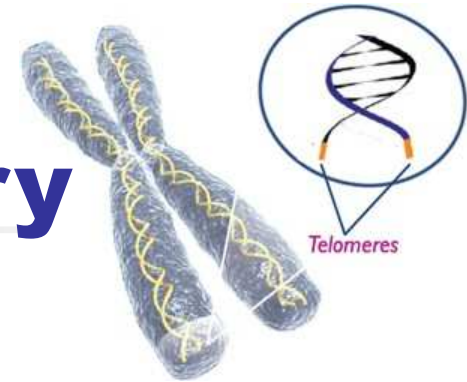
Endostatin: C-koncový peptidový fragment kolagenu 18 , 20kDa, neovlivňuje proliferaci, ale zvyšuje apoptózu a tím snižuje počet krevních cév vyživujících nádory



(E) Neomezený replikační potenciál

- buňky pěstované v kultuře procházejí omezeným počtem dělení, pak se dělit přestávají, stárnou a odumírají
- inaktivací proteinů Rb a p53 buňky získávají schopnost dělení po další generace až do nástupu „krize“
- buňky ve stadiu „krize“ jsou charakterizovány častými změnami karyotypu (vznik fúzních chromozomů) a masivně odumírají
- vzácně dojde k vzniku nesmrtelné buňky (frekvence $1:10^7$)
- většinu nádorových buněk lze úspěšně pěstovat *in vitro*

Immortalizace a telomery



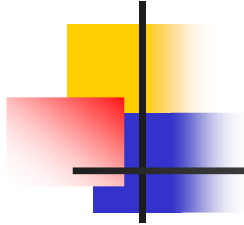
Telomery:

- zajišťují počítání dělení buněk
- konce chromozomů složené z několika tisíců opakování krátké nukleotidové sekvence
- během každého buněčného cyklu dochází ke ztrátě 50-100 pb z konce každého chromozomu
- postupná eroze telomer vede ke ztrátě schopnosti chránit konce chromozomové DNA před chromozomovými fúzemi, které ve zdravém těle nejsou tolerovány a vedou k smrti buňky
- udržování telomer je běžné u všech typů maligních buněk (následek vysoké exprese telomerázy)
- zvýšení exprese telomerázy v buňkách *in vitro* prodlužuje počet pasáží, kterými buňka může projít



(F) Únik apoptóze

- rakovinné buňky se neřídí regulačními signály pro buněčnou smrt
- zdravé buňky mohou žít jen za přítomnosti růstových faktorů, jinak odumírají apoptózou x nádorové buňky přežívají i bez růstových faktorů
- zdravé buňky s poškozenou DNA odumírají apoptózou x nádorové buňky nikoliv
- rezistence k apoptóze je jedním z důvodů zvýšené životaschopnosti nádorových buněk



Frost and Levin (1992):

„There is nothing that a metastatic cell can do that is not a routine task for normal cells“.

Neadekvátní chování nádorových buněk nevzniká *de novo*, ale souvisí s vyjádřením jinak normálních vlastností buněk v nesprávném místě a čase.

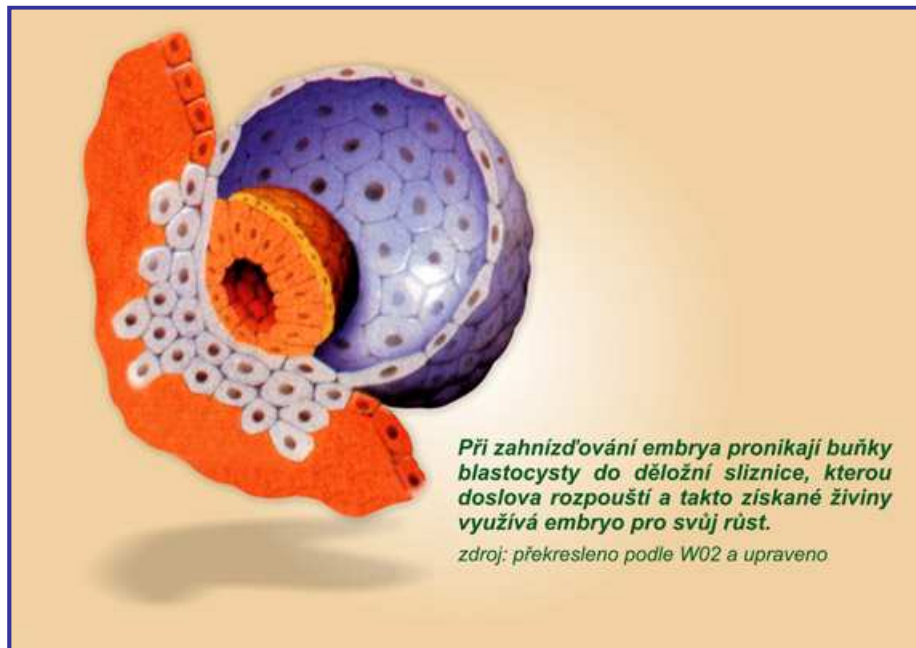


Mobilita je vlastností mnoha normálních buněk

- např. granulocytů, lymfocytů, monocytů a makrofágů, myogenních kmenových buněk somitů, primordiálních zárodečných buněk

Agresivní chování nádorových buněk vůči okolním tkáním má rovněž fyziologickou obdobu

- např. proces oplodnění:
 - probíhá mimo dělohu
 - vyvíjející se embryo se dostává do dělohy až v okamžiku, kdy je schopné implantace děložní výstelky
 - implantaci embrya zajišťují agresivní trofoblastové buňky, které mají schopnost rozložit děložní výstelku, včetně matrix konektivní tkáně a mateřských krevních kapilár (účast proteáz)
 - obdobnou vlastnost mají buňky nádorové





Stádia vývoje nádoru dle patologů: „grading / staging“

GRADE vyjadřuje stupeň diferenciaci nádorových buněk, míru jejich cytologické odlišnosti od buněk zdravých a frekvenci mitotických buněk uvnitř nádoru

- **nízký „grade“** charakterizuje dobře diferencované nádory s minimálním počtem cytologických abnormalit a nízkou frekvencí mitotických buněk
- **vysoký „grade“** signalizuje, že nádory jsou složeny z málo diferencovaných buněk se zřetelnými cytologickými změnami a vysokou frekvencí mitóz



Stádia vývoje nádoru dle patologů: „grading / staging“

STAGE vyjadřuje velikost nádoru, rozsah jeho přechodu do okolní tkáně, rozšíření do lymfatických uzlin a přítomnost nebo nepřítomnost kostních metastáz

Podle amerického systému AJC se rozlišuje **T stage** udávající velikost nádoru a stupeň penetrace do okolní tkáně, **N stage** udávající přítomnost nádoru v uzlinách a **M stage** udávající existenci metastáz v kostech.

GRADE THE TUMOR!
STAGE THE PATIENT!