

Molekulární a buněčná biologie nádorů

Prof. RNDr. Jana Šmardová, CSc.

Ústav experimentální biologie
Přírodovědecká fakulta
MU Brno

Bi9910

středa 14.00 – 16.00

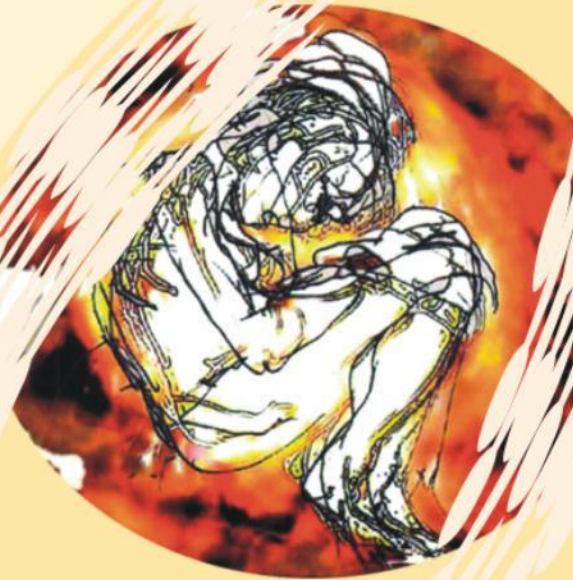
A11 – č. 306



2020

Molekulární a buněčná biologie nádorů

9. Nádorová angiogeneze



Nádorová angiogeneze, neovaskularizace



- Schopnost nádoru indukovat proliferaci nových krevních vlásečnic.
- Má vliv na růst primárního nádoru, schopnost tvořit metastázy a na růst sekundárního nádoru (⇒ pro tvorbu metastáz má angiogeneze význam 2x!!).
- Nádor bez angiogeneze doroste maximálně do několika miliónů buněk (100 až 200 μ m je difúzní limit pro kyslík), tj. do velikosti několika kubických milimetrů - nedoroste do klinicky detekovatelné velikosti - tím je schopnost tvořit metastázy omezena (nikoli vyloučena! - dormantní mikrometastázy - např. nádoru prsu do plic).

Historický pohled na angiogenezi nádorů



- 1865 – histopatologický důkaz, že nádory jsou zásobeny proměněnou, nově vytvořenou vaskulaturou...
- **1.** Nejsou to nové vlásečnice, ale využití stávající.
- **2.** Jsou to nové vlásečnice a jsou výrazem boje organismu s nádorem.
- **3.** 1971 (Judah Folkman) - pokus: prevence neovaskularizace → restrikce růstu nádoru ⇒ nádory jsou dependentní na angiogenezi.

Nádorová angiogeneze, neovaskularizace



- Bez angiogeneze roste nádor pomalu a lineárně, po neovaskularizaci rychle a exponenciálně: krevní cévy přivádějí nejenom **živiny** a **kyslík** (a odvádějí odpady), ale také **růstové faktory**.

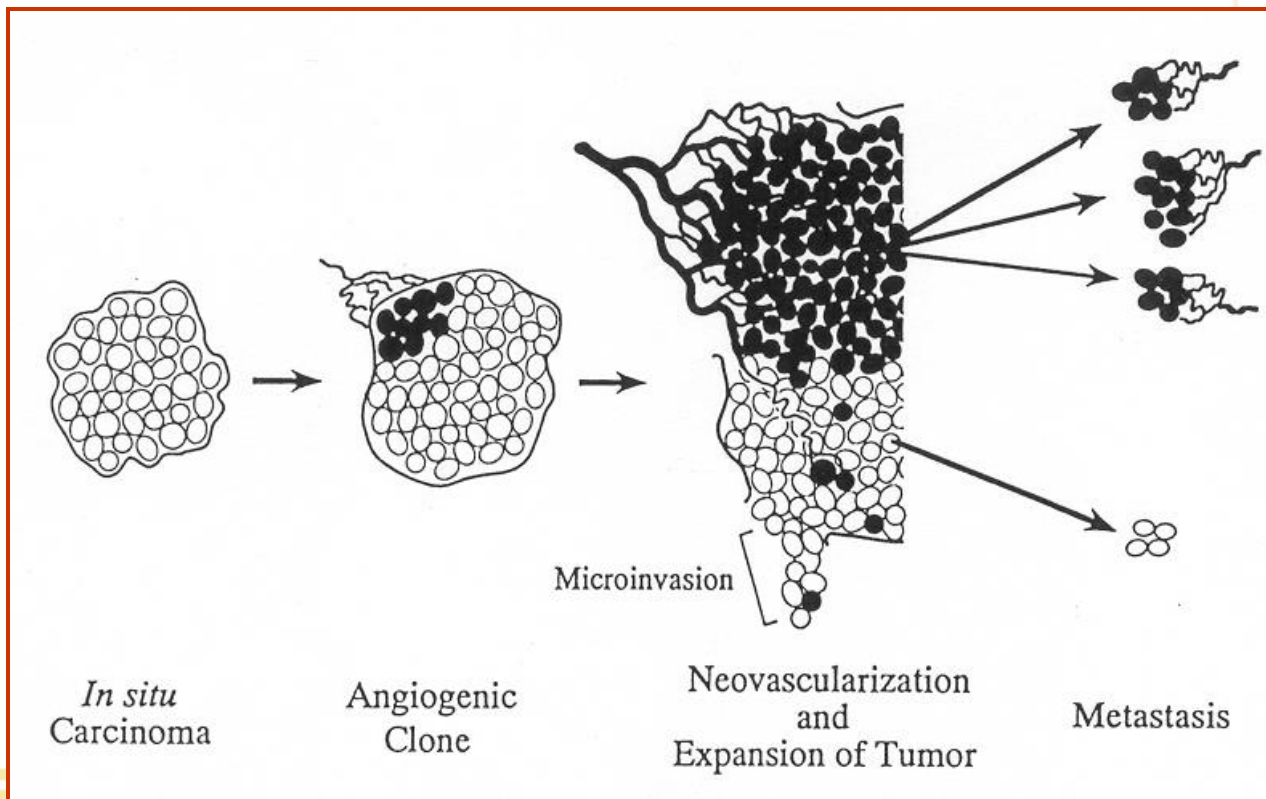
Pomalost a malá velikost nádoru před angiogenezí není dána jen pomalou proliferací, ale i tím, že je vyrovnaná rychlost proliferace a odumírání buněk.

- Angiogeneze je nutná pro maligní fenotyp nádoru, ale není dostatečná - tj. i benigní nádory mohou být angiogenní.

Souvislost angiogeneze a metastázování



S neovaskularizací se zvyšuje šance na infiltraci nádoru (buňky mají kudy infiltrovat) a navíc už mohou mít angiogenní potenciál, což zvyšuje jejich šanci na uchycení a vytvoření sekundárního nádoru.



Průběh neovaskularizace



Vaskulogeneze - endoteliální buňky *de novo* diferencují z mezodermálních progenitorů (angioblastů a hemangioblastů) a prolifерují *in situ* v původně avaskulární tkáni. Proces je nezávislý na stávajících cévách. Uplatňuje se zejména při tvorbě primitivních embryonálních cév.

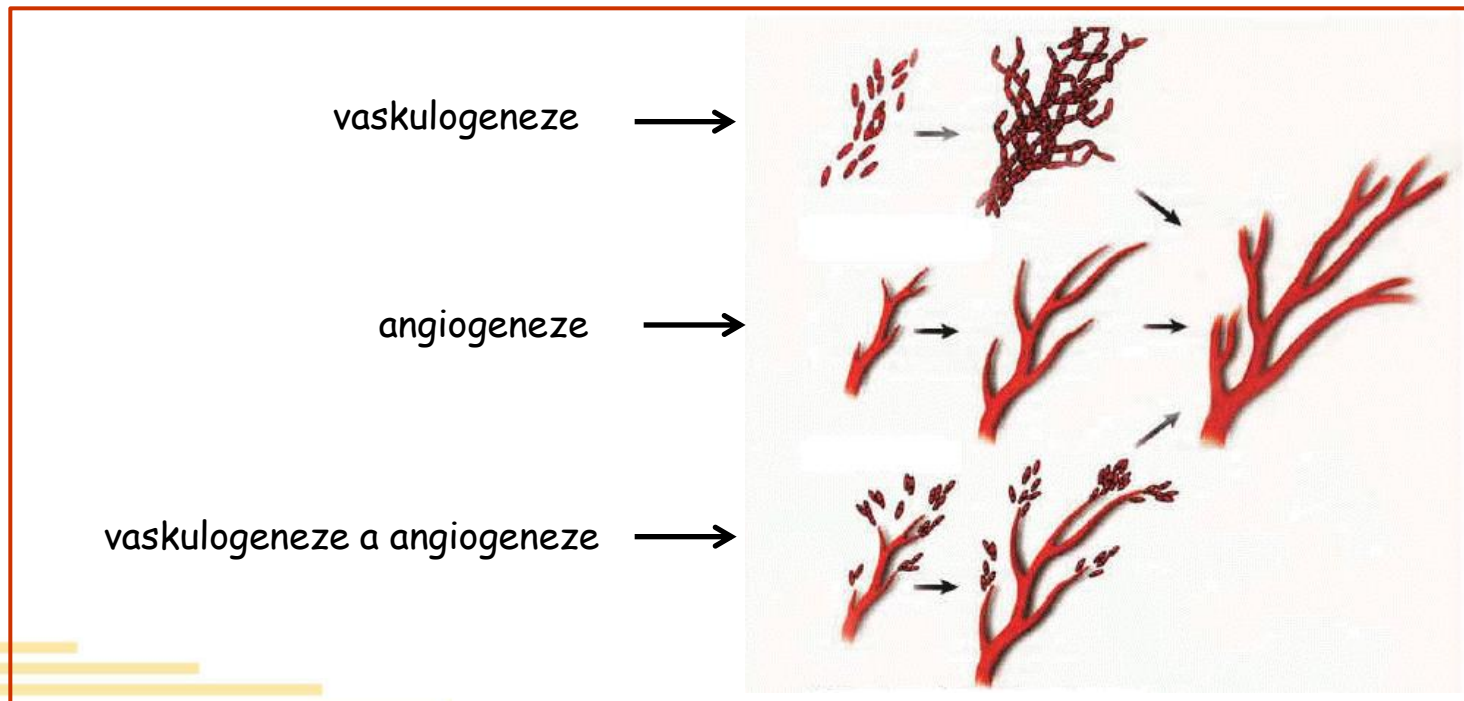
Angiogeneze - následuje vaskulogenezi, uplatňuje se v embryogenezi, hojení ran, ovulaci,..

Remodelace a větvení - modifikace iniciální sítě větvením do avaskulární tkáně a zvětšováním kapilár, vznik složité rozvětvené sítě charakteristické pro zralou vaskulaturu. Zároveň dozrávají také stěny vlásečnic, jak se zpevňují interakce mezi endoteliálními a podpůrnými (hladké svalstvo) buňkami.

Nádorová angiogeneze, neovaskularizace



- **neovaskularizace**: **vaskulogeneze** (vznik *de novo* z progenitorů) a **angiogeneze** (vývoj vycházející ze stávající vaskulatury)
- **nádorová angiogeneze**: schopnost nádoru indukovat proliferaci nových krevních vlásečnic

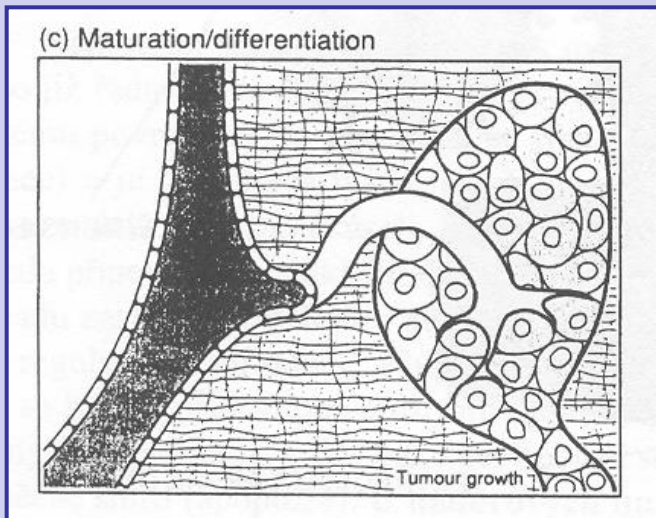
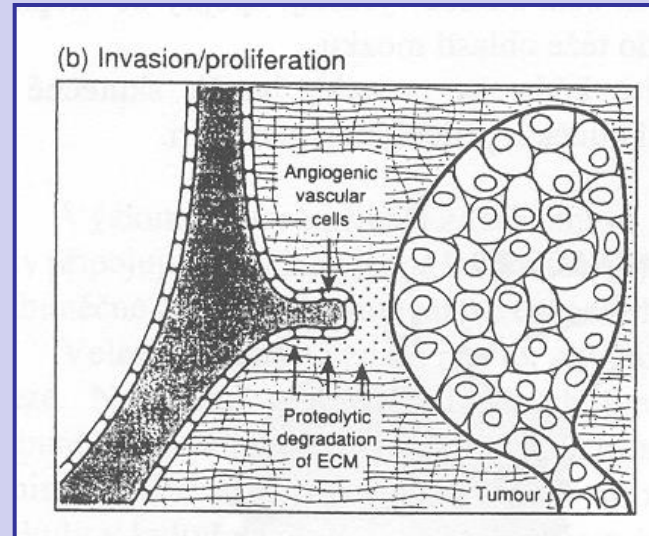
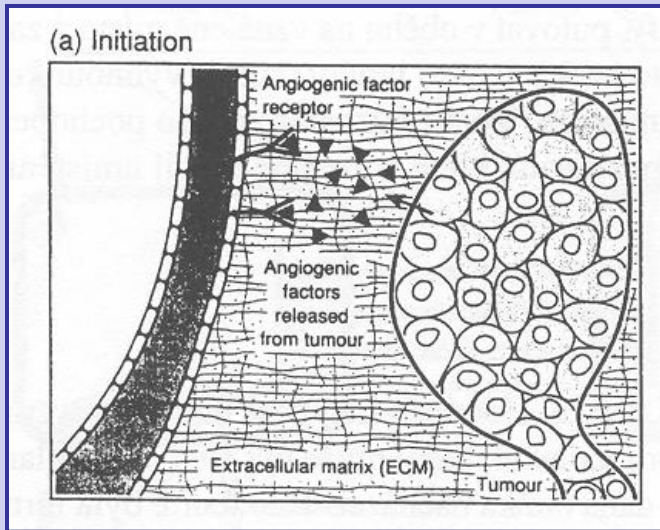


Průběh neovaskularizace



- U dospělého jedince se uplatňuje převážně angiogeneze. Vaskulatura je velmi „klidová“ tkáň (s výjimkou např. přísně řízeného reprodukčního cyklu u žen: ovulace, menstruace, implantace, těhotenství) - endoteliální buňky patří k nejdéle žijícím buňkám (mimo CNS) v těle (v aktivní fázi buněčného cyklu je asi 1 z 10.000 endoteliálních buněk - 0.01%).
- Při působení odpovídajících (růstových) faktorů mohou klidové vaskulární buňky přejít z klidového stádia a začít invadovat okolní tkáň.

Model průběhu nádorové neovaskularizace



Iniciace začíná uvolňováním angiogenních stimulátorů nádorovými buňkami. Tyto faktory stimulují proliferaci a invazivní chování vaskulárních buněk.

Invaze/proliferace: Vaskulární buňky sekretují proteolytické enzymy a zároveň proteiny ECM. Dochází k remodelaci ECM, tvoří se prostor pro nové cévy.

Maturace/diferenciace: Vznikající céva produkuje komponenty bazální membrány, které udržují endoteliální b. v klidovém stavu. Nové výběžky fúzíjí a nový cévní systém se uzavírá.

Nádorová vaskulatura je funkčně i strukturně abnormální

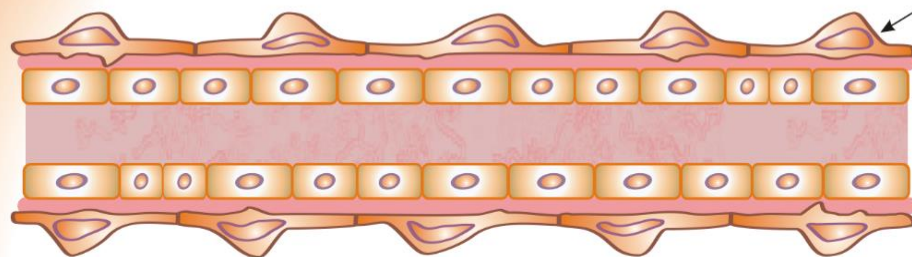


- **normální vaskulatura**, ve které jsou perfektně vybalancovány pro- a anti-angiogenní faktory, je tvořena zralými cévami, které jsou hierarchicky uspořádány: cévy – kapiláry – mikrovlásečnice - ...
- **abnormální nádorová vaskulatura** typicky postrádá hierarchické uspořádání, je tvořena nezralými diferencovanými i nediferencovanými cévami se zvýšenou propustností *, kapiláry se nepravidelně kroutí, jsou roztažené, s nepravidelným průměrem (chybějícím nebo poškozeným lumen), s nadměrným větvením, přerušované, nezralé, bez souvislé bazální membrány, téměř bez podpůrných buněk pericytů,.... ← to může vznikat v důsledku nerovnoměrného uvolňování angiogenních regulátorů *
- * nerovnovážně vysoká hladina **VEGF** oproti dalším faktorům (⇒ původní označení **VPF**!!)

Nádorová vaskulatura je funkčně i strukturně abnormální



NORMÁLNÍ CÉVA

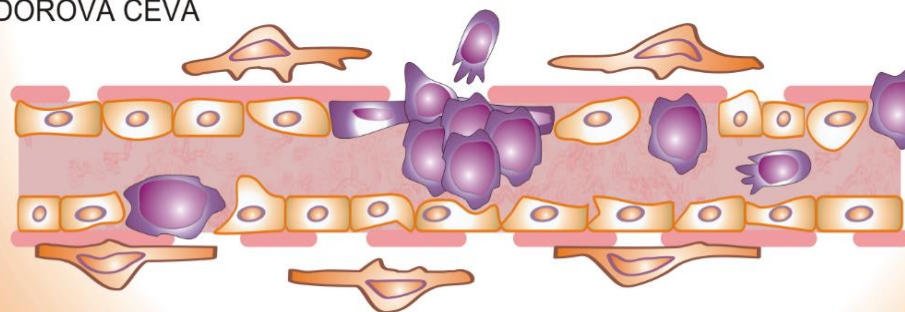


pericyty

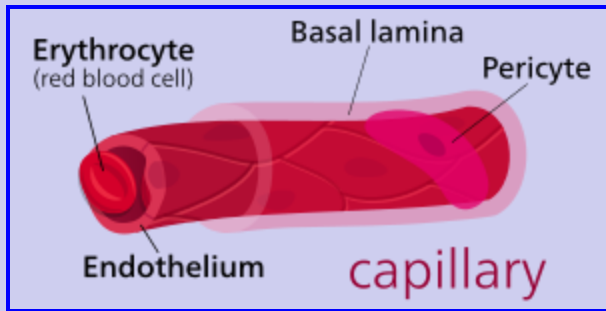
bazální
membrána

endoteliální
buňky

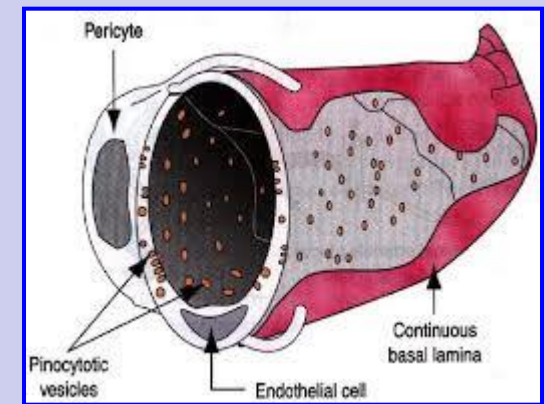
NÁDOROVÁ CÉVA



nádorové
buňky

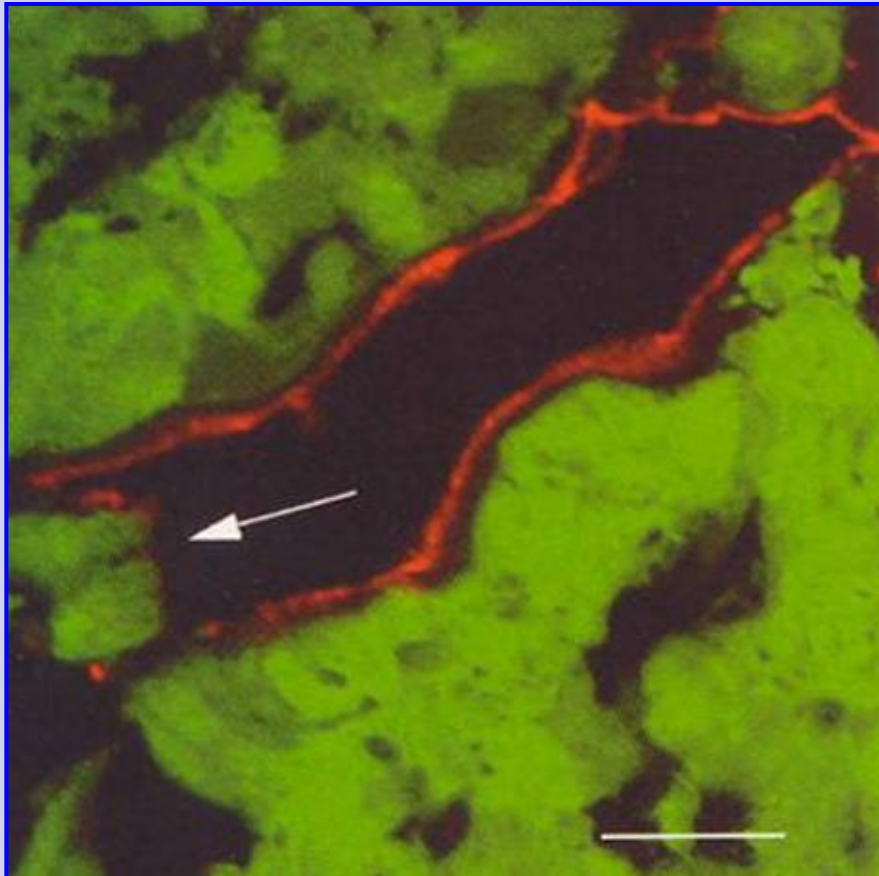


Pericyty



- specializované buňky mesenchymálního původu, příbuzné buňkám hladkého svalstva
- těsně přiléhají na vnější stranu endoteliálních buněk, které tvoří základní strukturu cév
- podporují endoteliální buňky mechanicky i fyziologicky: poskytují parakrinní stimulaci (např. uvolňují Ang-1; podílejí se – s endoteliálními b. – na tvorbě cévní bazální membrány)
- mělo se za to, že zcela chybí v nádorové vaskulatuře; jejich přítomnost ale byla prokázána, i když ve značně nižší úrovni, jsou pro funkční vaskulaturu nezbytné
- exprimují na svém povrchu receptory pro PDGF: farmakologická inhibice tohoto receptoru vede ke snížení hladiny pericytů, což nádorovou (nikoli nenádorovou!!) vaskulaturu destabilizuje

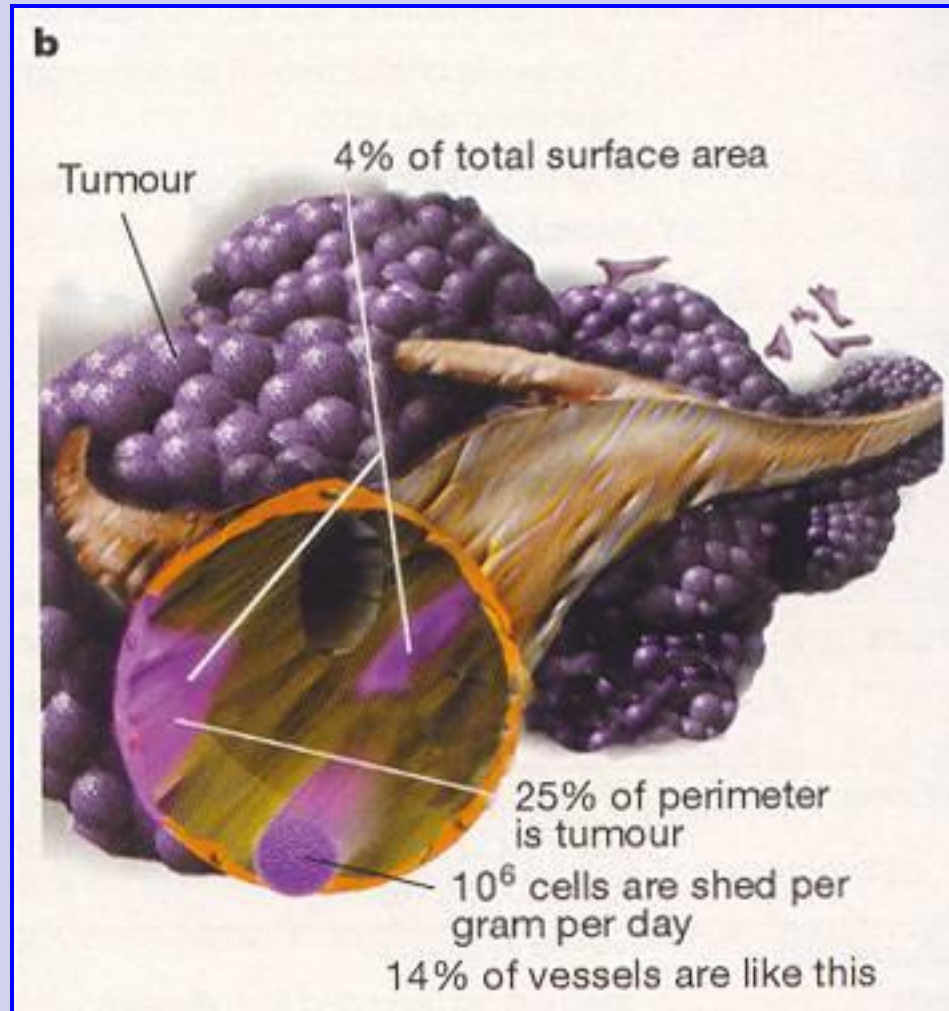
Struktura nádorové vaskulatury



struktura krevní kapiláry
v kolorektálním
karcinomu:

umístění **nádorové
buňky** (zelená
fluorescence) uvnitř
krevní kapiláry
(**endoteliální buňky** -
červená fluorescence) -
tzv. mozaikovitá
struktura

Struktura nádorové vaskulatury

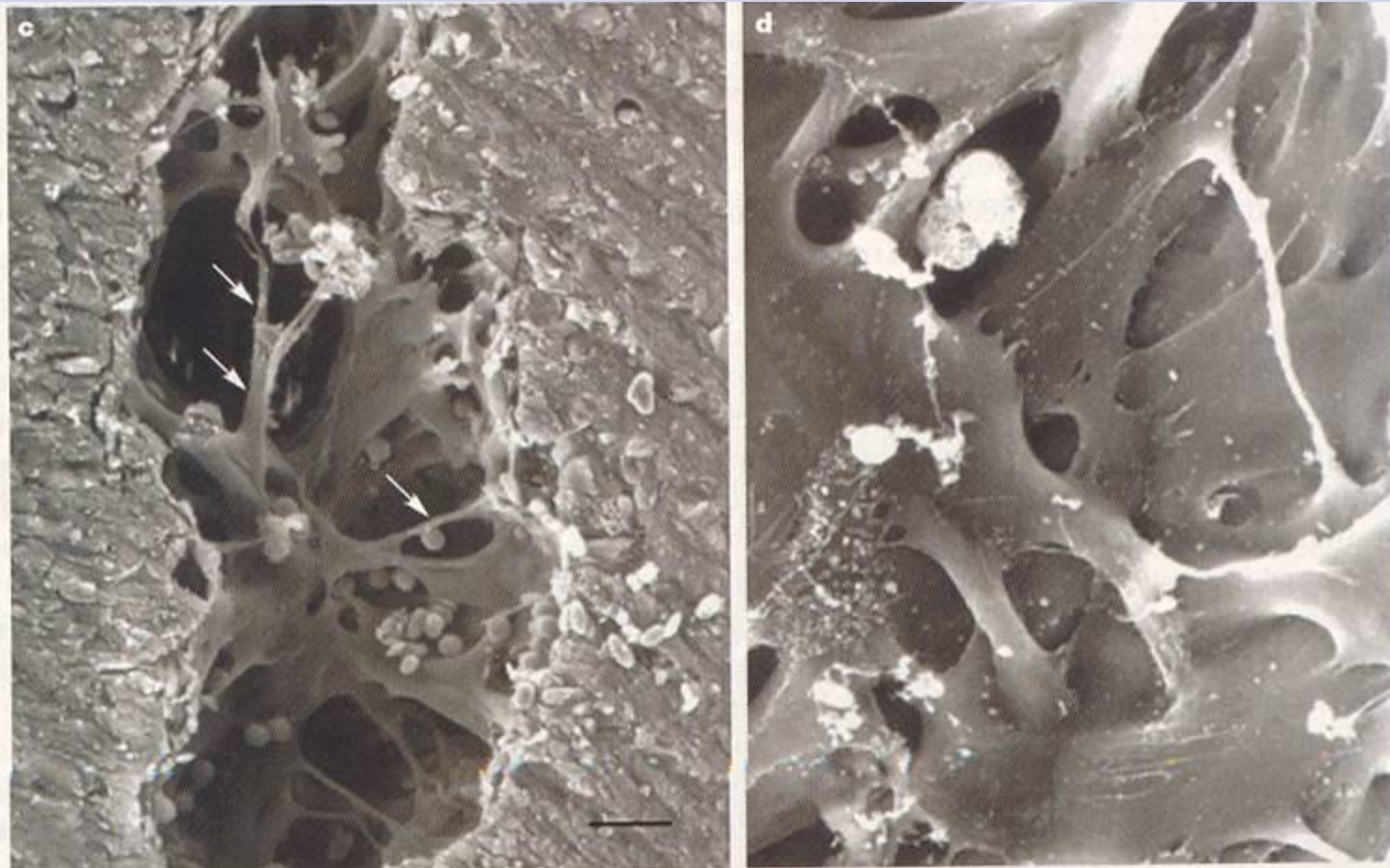


kvantifikace
mozaikové struktury
vlásečnic u
kolorektálního
karcinomu:

- asi 15% vlásečnic je mozaikovitých
- nádorové buňky zaujímají asi 4% povrchu vlásečnic

Struktura nádorové vaskulatury

- abnormální endoteliální buňky umístěné v lumen krevních vlásečnic
- násobné intercelulární otvory

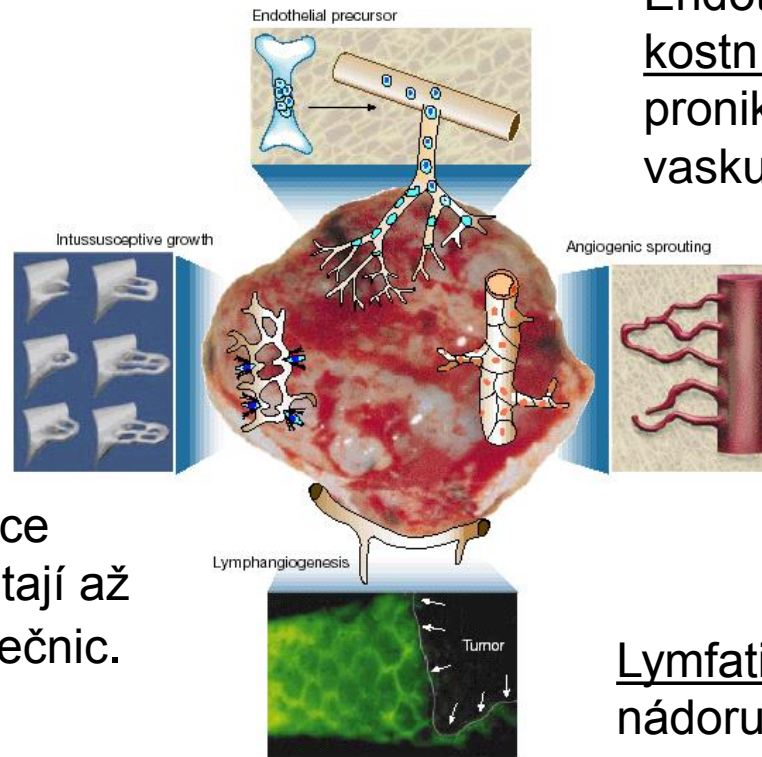


Nádorová vaskulatura je funkčně i strukturně abnormální



- Tok krve je chaotický a velice různý v různých částech systému. Proto vznikají v nádoru místa s hypoxií a nadměrnou kyselostí.
- ⇒ Tato okolnost může ovlivňovat efekt terapie; vytváří se prostor, ve kterém může např. dojít k selekci a klonální expanzi buněk, které neodpovídají na hypoxii apoptózou, ..
- ⇒ Tato okolnost ovlivňuje další vývoj nádoru...

Buněčné mechanismy neovaskularizace nádorů



Endoteliální prekurzory z kostní dřeně a periferní krve pronikají do nádoru a začínají vaskulogenezi.

Hostitelská síť prorůstá do nádoru.

Nádorové vlásečnice expandují a prorůstají až do stávajících vlásečnic.

Lymfatické vlásečnice kolem nádoru „omývají“ nádor, jsou příležitostí pro metastázování, přinášejí růstové faktory....

Kdo se podílí na neovaskularizaci?



Které buňky?

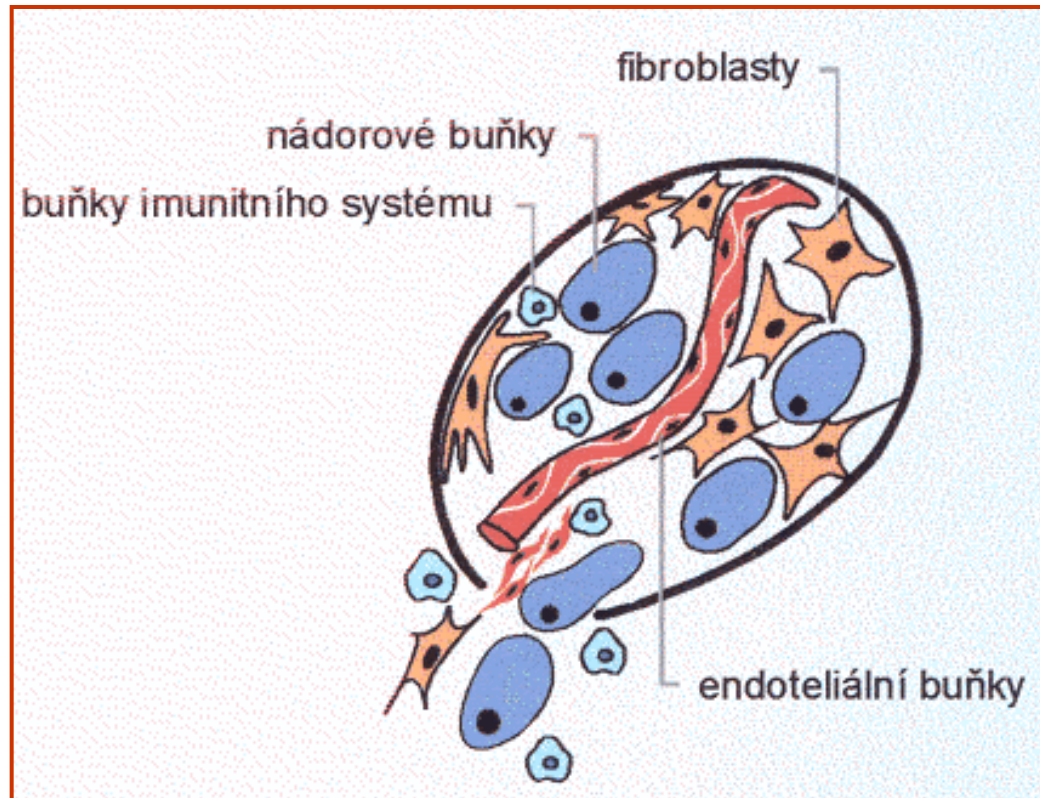
- Nádorové buňky
- Endoteliální buňky
- Stromální buňky
- Krevní buňky
- Extracelulární matrix

Jejich podíl je různý u různých typů nádorů a mění se i během vývoje nádoru.

Při nádorové neovaskularizaci kooperují různé buňky

* * *

Nádor je komplexní tkáň



Kdo se podílí na neovaskularizaci?



Které faktory?

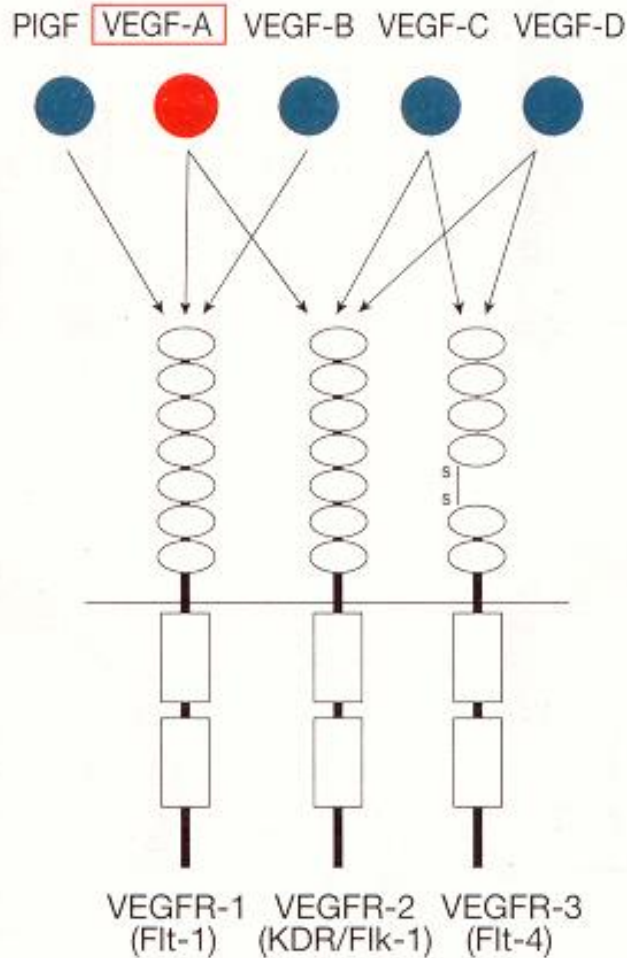
Specifické:

- **VEGF** a receptory **VEGFR**
- **Angiopoietiny** a receptory **Tie**
- **Ephriny** a receptory **EphB**

Nespecifické:

- růstové faktory, které nejsou specifické pro endoteliální buňky (PDGF, FGF, TGF β).
- další proteiny různých signálních drah

VEGFs a receptory VEGFR



- **VEGF** byl první charakterizovaný faktor specifický pro vaskularizaci - **vaskulární endoteliální růstový faktor** (původní název - **vaskulární permeabilní faktor** - **VPF ***)
- **kritický pro iniciaci vaskulogeneze i pro angiogenní větvení**
- popsáno **6** různých VEGF faktorů a **4** různé receptory
- patří do rodiny PDGF

VEGFs a receptory VEGFR



- Všechny faktory mají podobnou strukturu a překrývající se specificitu - všechny jsou schopny interagovat s receptory a indukovat je. Jsou označeny jako **VEGF-A** až **E** a dále byl rozpoznán jako příbuzný faktor **PLGF** („placental growth factor“).

- tyrozin protein kinázové receptory **VEGFR-1 (Flt-1)**, **VEGFR-2 (KDR, Flk-1)** a **VEGFR-3 (Flt-4)** zprostředkovávají signalizaci faktory VEGF

VEGFR-2 zprostředkovává hlavní signalizace týkající se růstu a permeability cév

VEGFR-1 stimuluje změny v ECM (mohl by mít i negativní roli (možná funguje jako „decoy“ a suprimuje tak funkci VEGFR-2)

VEGFR-3 je specifický pro lymfatické tkáně

VEGFs a receptory VEGFR



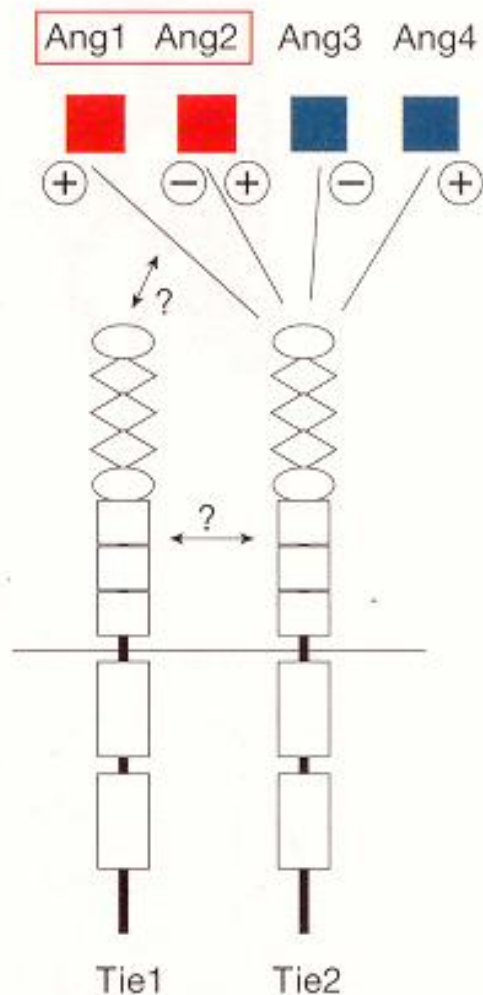
- VEGF je tak potentní a kritický vaskulární regulátor, že jeho hladina musí být perfektně **regulována** (exprese stimulována hypoxií a signalizací onkogeny; VEGFs mohou být zadržovány v ECM v latentní formě a aktivovány a uvolněny proteázami ECM)
- poškození i jediné alely VEGF je u myši letální během embryonálního vývoje; naopak zřejmě postradatelný v dospělosti
- nadměrná exprese VEGF (nebo samotné podání VEGF) v dospělých tkáních vede k tvorbě propustných vlásečnic, které vedou ke krvácení, a to vyvolává zánětlivou reakci a otoky (vaskulární permeabilní faktor)

Angiopoietiny a receptory Tie



- **Angiopoetiny** tvoří nejvýznamnější partnery faktorů VEGF při tvorbě vaskulatury
- Angiopoietiny byly popsány jako ligandy tyrozin protein kinázových receptorů **Tie**, které byly nalezeny jako receptory **specificky** exprimované v endoteliálních buňkách, podobně jako VEGFRs

Angiopoietiny a receptory Tie



- popsány alespoň čtyři typy angiopoetinů **Ang1** až **4** a dva typy receptorů **Tie1** a **Tie2**

- **Ang1 je nezbytný k udržování klidového stádia a stability již zralé vaskulatury**

- **naopak porušení této stability je nezbytné pro reiniciaci přestavby vaskulatury v dospělosti** (např. reprodukční systém žen), která je zajištěna působením antagonisty Ang1 - **Ang2**

Působení angiopoietinu 1



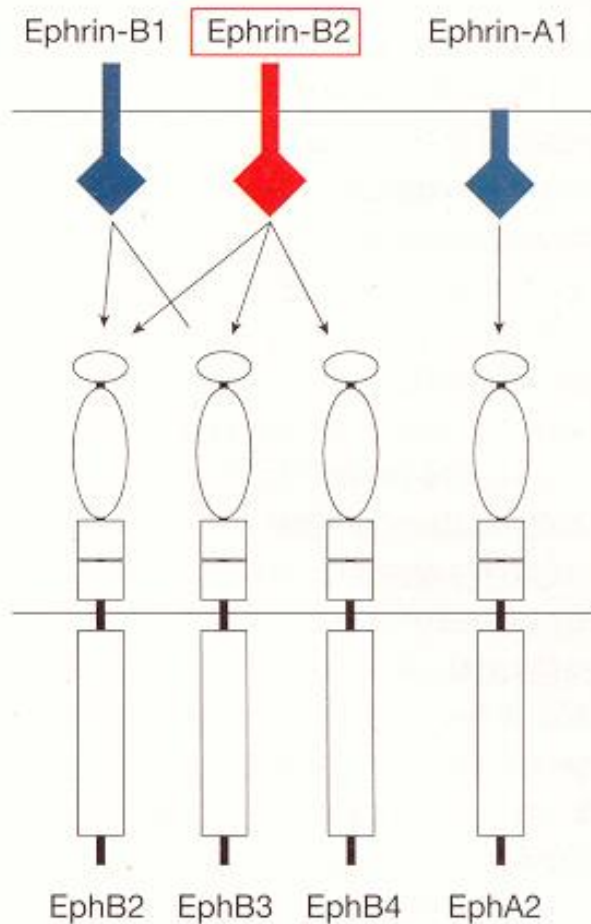
- **Ang1** samotný optimalizuje interakci endoteliálních buněk s podpůrnými buňkami, která umožňuje získávání dalších kritických signálů z prostředí
- produkován hlavně hladkými svalovými buňkami
- transgenní overexprese Ang1 spíše zvyšuje velikost vlásečnic (VEGF jejich počet)
- samotné podání Ang1 spíše stabilizuje a chrání dospělou vaskulaturu, činí ji rezistentní k poškození a propustnosti vyvolanými působením VEGF nebo zánětlivou reakcí

Působení angiopoietinu 2



- **Ang2** byl popsán na základě své homologie s Ang1 a na základě schopnosti interagovat s Tie2
- je produkován endoteliemi
- u dospělých je indukována exprese Ang2 v iniciační fázi remodelace vaskulatury; zřejmě destabilizuje a činí více plastickými stávající cévy, které tak připomínají primitivní cévy během vývoje; tato destabilizace je nutná k následné remodelaci

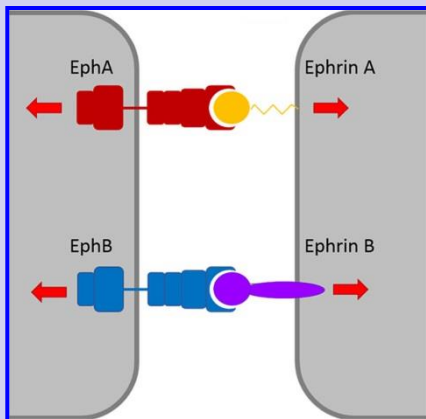
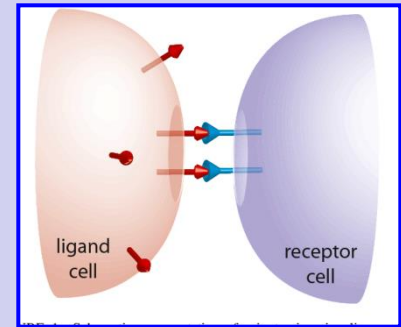
Ephriny a receptory EphB



- receptory Eph jsou tyrozin protein kinázy, ephriny jsou jejich ligandy
- Ephriny - na rozdíl od většiny ligandů - musí být pevně přichyceny k povrchu buňky, aby mohly aktivovat své receptory
- ve vývoji vaskulatury se uplatňují především **Ephrin-B2** a receptor **EphB4**

Juxtakrinní signalizace

- signalizace mezi sousedními buňkami:
„**contact-dependent**“

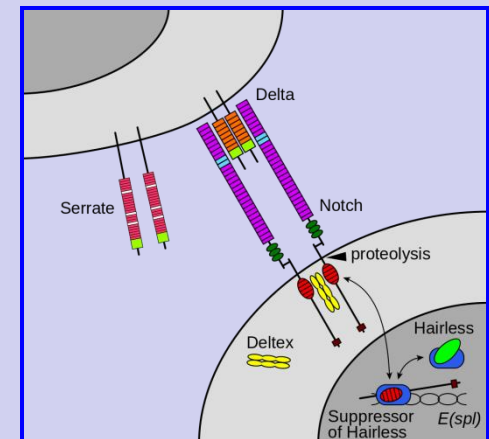


➤ Ephriny a receptory EphB

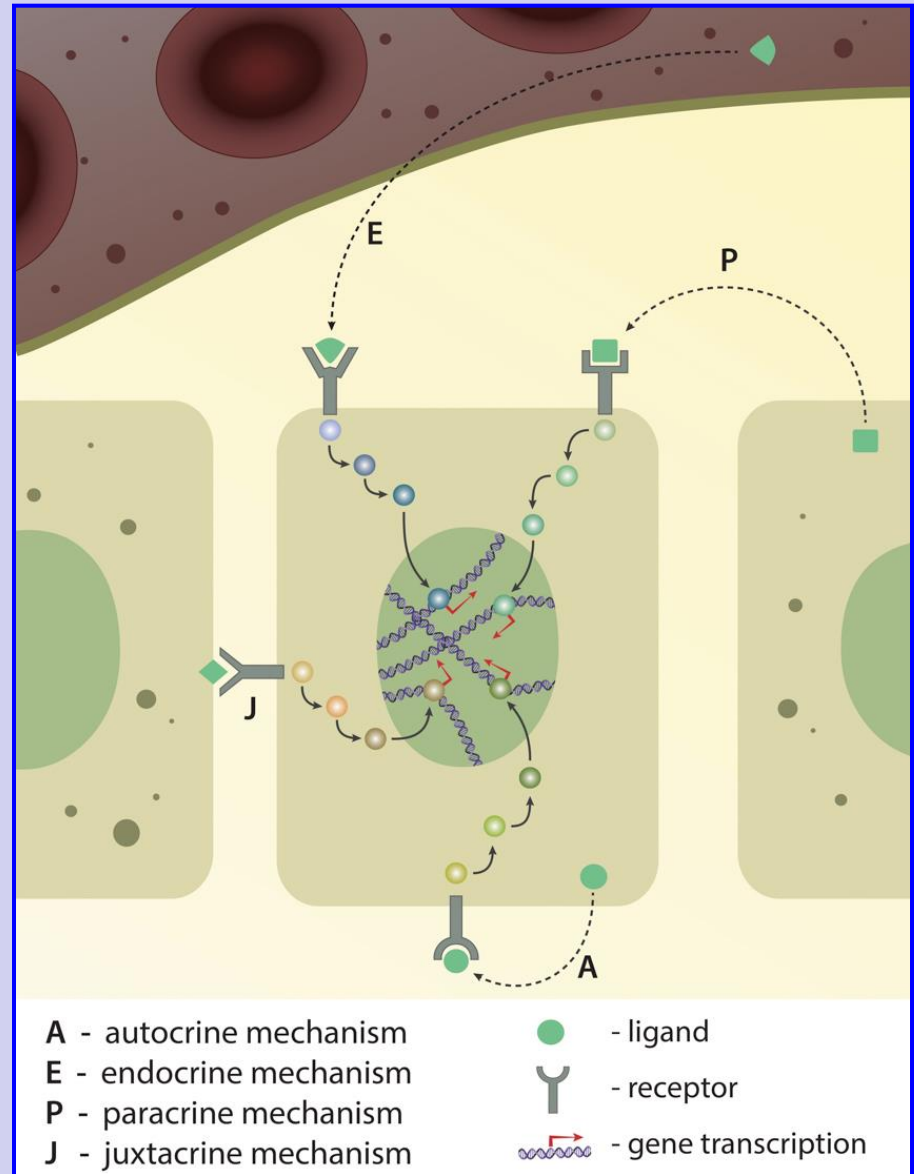
- Ephriny - na rozdíl od většiny ligandů - musí být pevně přichyceny k povrchu buňky, aby mohly aktivovat své receptory

➤ signální dráha NOTCH

- signál začíná interakcí proteinů Notch L a Notch **sousedních buněk** (např. endoteliální buňka – nádorová buňka – stromální buňka)



Čtyři typy signalizace



Ephrin-B2 a receptor EphB4



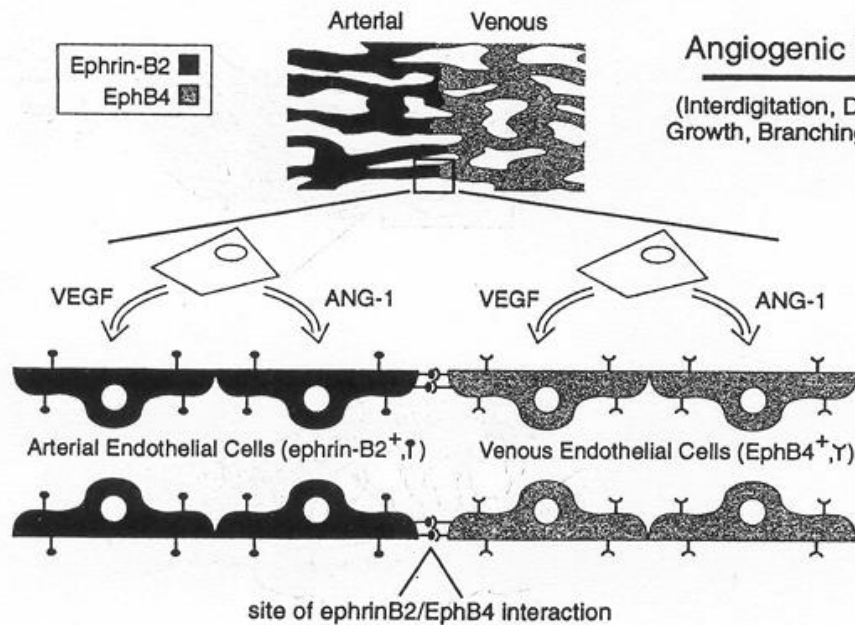
- Ephrin-B2 a receptor EphB4 se vyznačují výrazně **reciprokou expresí** během vývoje vaskulatury
Ephrin-B2 označuje endotelium primordiálních tepenných cév
a receptor EphB4 označuje primitivní žilné cévy
- Ephrin-B2 i v dalším vývoji je exprimován na tepnách, ale také v okolních tkáních obklopujících tepny (hladké svalstvo v okolí tepen), zřejmě zajišťuje vzájemné interakce těchto tkání
- i když Ephrin-B2 a EphB4 tvoří „klasickou dvojici“ ligand-receptor - jejich vzájemné interakce jsou zřejmě možné pouze na rozhraní arterií a vén (⇐ Ephrin-B2 je pevně přichycen na buněčném povrchu!!)

Ephrin-B2 a EphB4 odlišují tepny a žíly



Primary Capillary Plexus

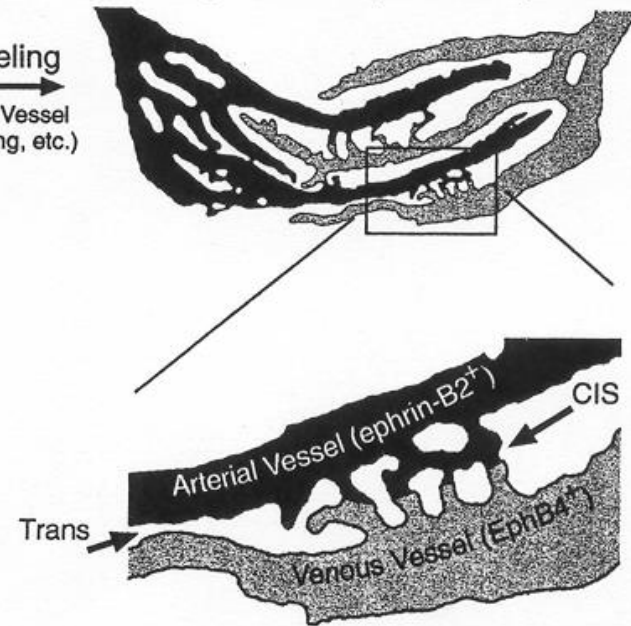
(Formation blocked in VEGF/VEGFR2 KOs)



Angiogenic Remodeling
(Interdigitation, Differential Vessel Growth, Branching, Sprouting, etc.)

Maturing Vascular Network

(Remodeling Perturbed in Ephrin-B2 & Ang1/Tie2 KOs)



vaskulogeneze → angiogeneze → arteriogeneze ???

Úloha VEGF, Ang1 a 2, Ephrinu-B2 a EphB4 při vaskulogenezi a angiogenezi



Vaskulogeneze - uplatňuje se **VEGF** a také od samého začátku **Ephrin-B2** a **EphB4** rozlišují primitivní tepny a cévy.

Na **angiogenní remodelaci** a **zrání** se vedle **VEGF** a **Ephrinu-B2/EphB4** dále podílí **Ang1**, který následně udržuje zralou vaskulaturu v klidovém stádiu.

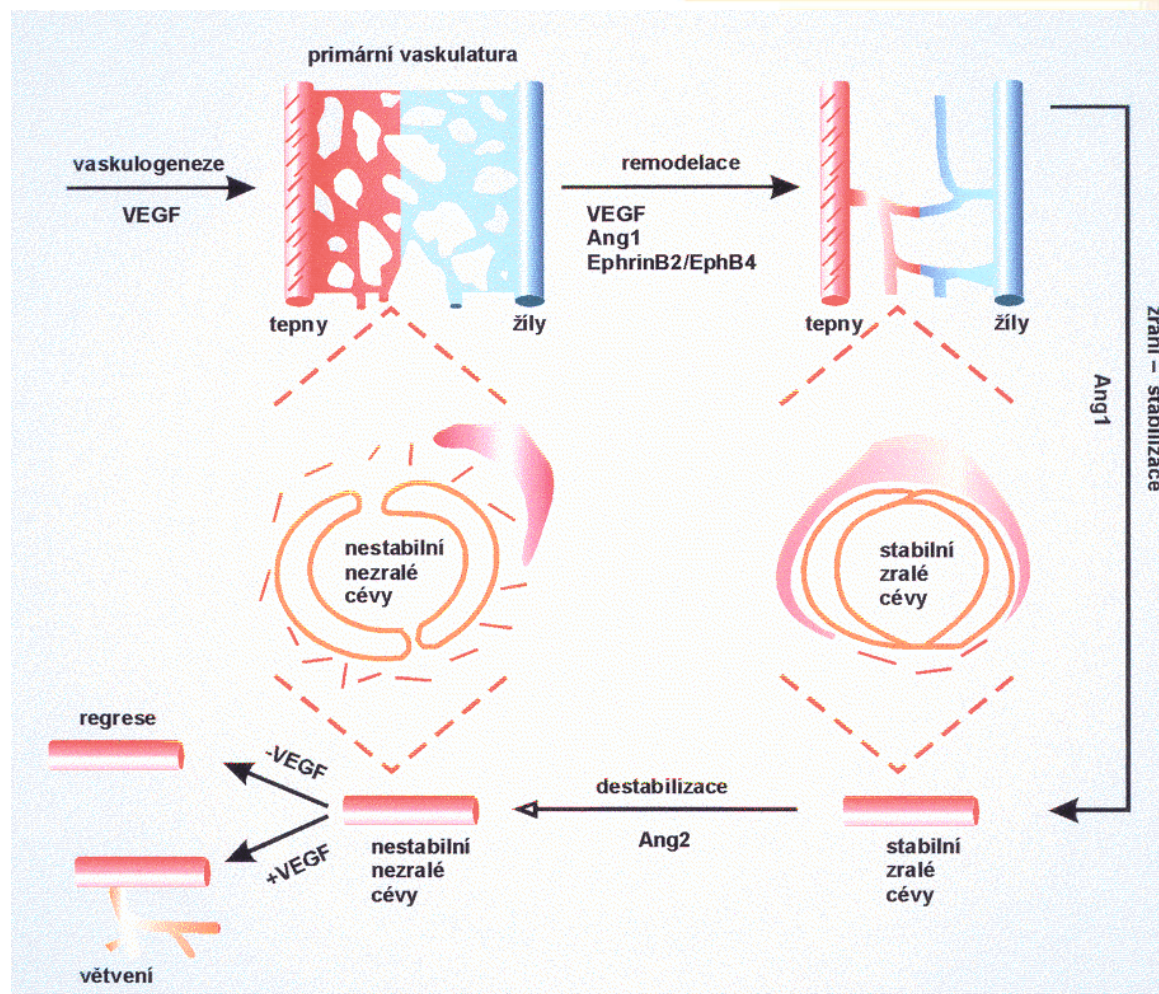
Pro **destabilizaci** je nezbytné působení **Ang2**.

Destabilizovaná nebo nezralá vaskulatura prochází buď **regresí** nebo **angiogenním větvením** v závislosti na přítomnosti nebo nepřítomnosti **VEGF**.

Úloha VEGF, Ang1 a 2, Ephrinu-B2 a EphB4 při vaskulogenezi a angiogenezi



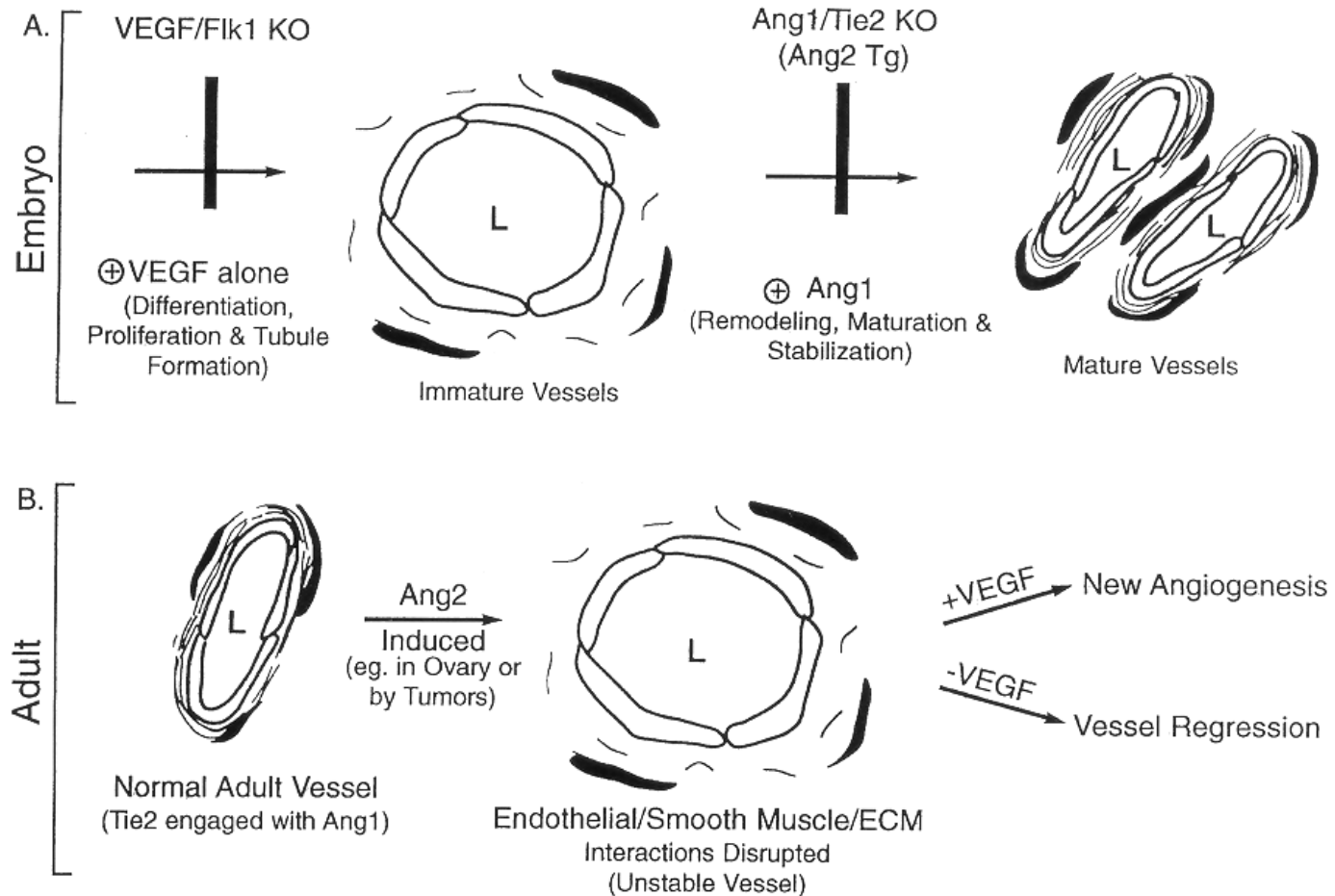
A



Úloha VEGF, Ang1 a 2, Ephrinu-B2 a EphB4 při vaskulogenezi a angiogenezi



B



Praktické využití znalostí o nádorové angiogenezi



1. Terapie nádorů

Blok aktivity **VEGF** zatím představuje nejúspěšnější anti-angiogenní taktiku při terapii nádorů!

- blok angiogeneze
- regrese nezralých stádií

2. Diagnostika nádorů

Prvním markerem provázejícím nádorovou angiogenezi je zvýšená exprese **Ang2**.

Klinické využití výzkumu neovaskularizace

1. Stimulace angiogeneze při hojení ran, pro „nechirurgické bypasování“ zjizveného srdce, apod.
2. Využití pro diagnózu a prognózu nádorů.
3. Využití pro terapii nádorů.

Angiogenní zapnutí



- Angiogeneze je nezbytná pro rychlou expanzi nádorových buněk.

⇒ Otázky:

- Kdy se objevuje během kancerogeneze?
- Kolik času je potřeba k navození angiogenního stavu?
- Je to postupný proces od neangiogenního k angiogennímu stavu?

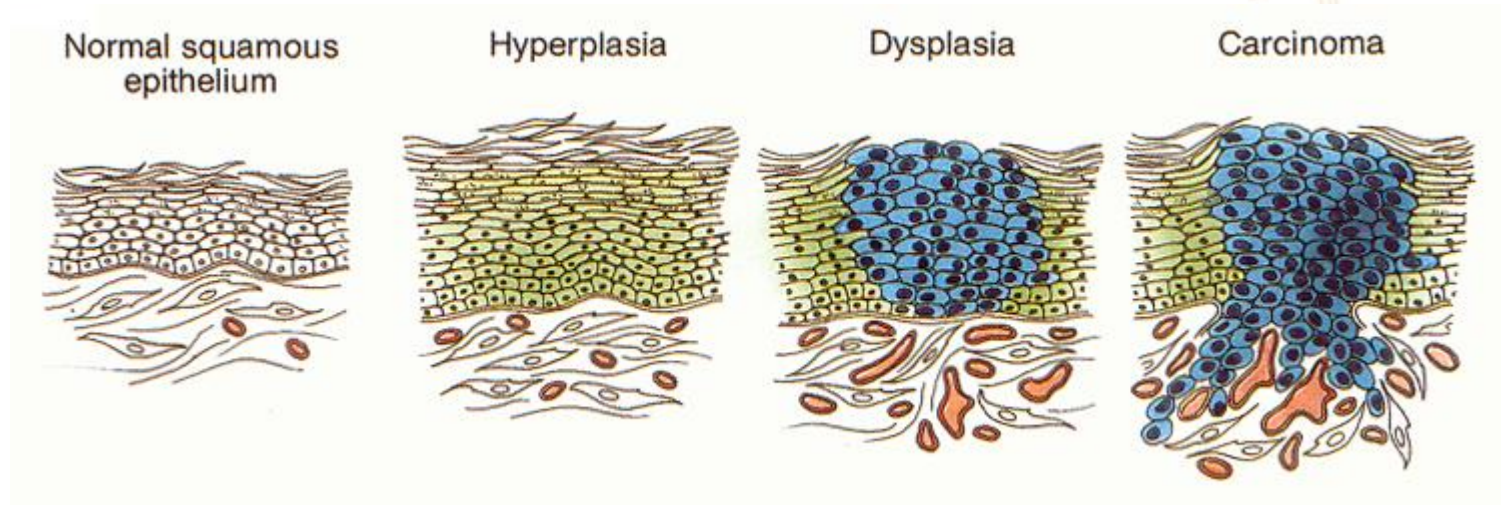
→ Odpověď (na základě několika modelů):

- Zapnutí angiogeneze je svébytným, samostatným krokem kancerogeneze a často se odehraje v ranných stádiích vývoje nádoru.

Model angiogenního zapnutí - 1



Myší bazální keratinocyty byly progresivně transformovány v karcinomy dlaždicobuněčných buněk expresí onkogenu viru HPV16.

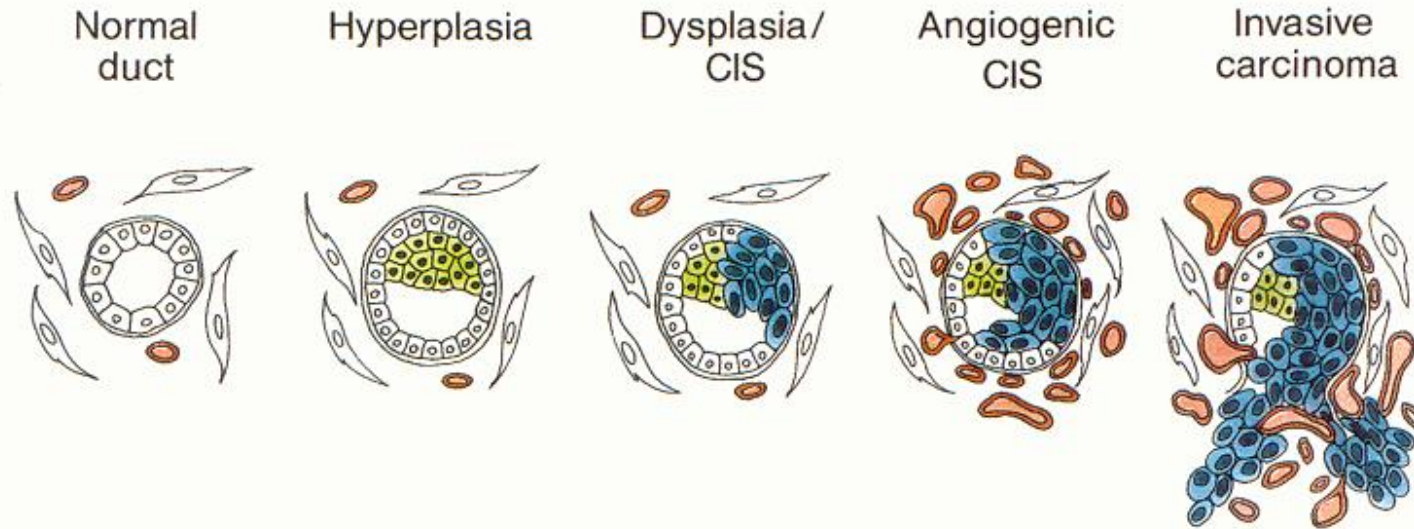


Zapnutí angiogeneze bylo opět zřetelně patrné jako samostatný krok. Slabá angiogenní aktivita byla pozorovatelná v hyperplastických stádiích (lehce zvýšená hustota kapilár), mohutná angiogeneze se objevila v dysplastickém stádiu.

Model angiogenního zapnutí - 2



Lidský model - duktální karcinom prsu - hustota krevních vlásečnic byla studována imunohistochemicky - barvením buněčných endoteliálních markerů vWF a CD31.

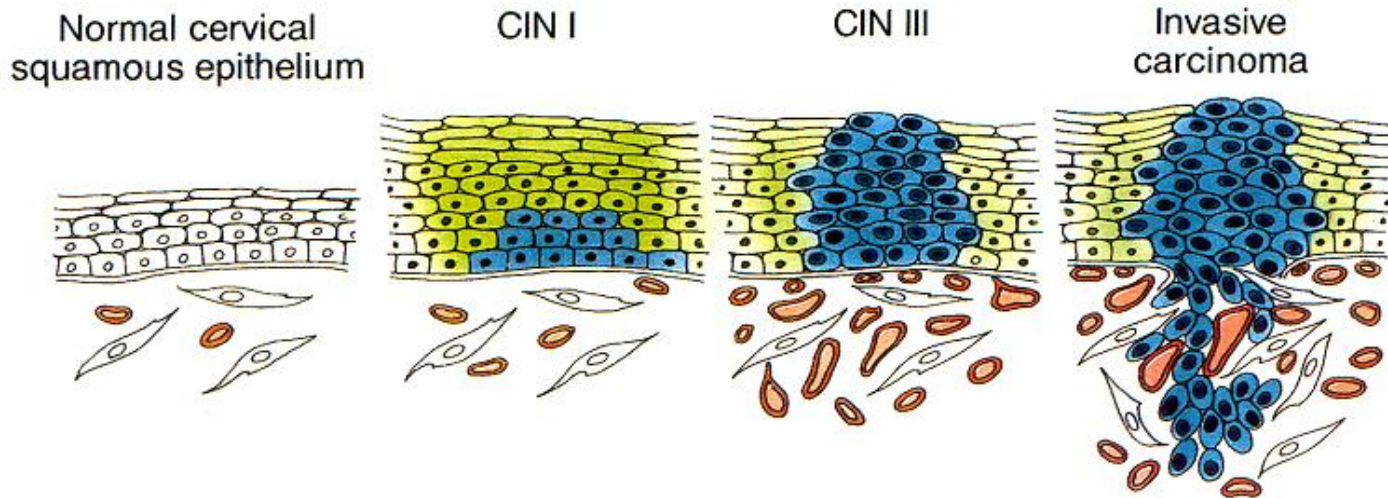


- Angiogenní karcinom *in situ* představoval přechodné a distinktní stádium mezi neangiogenním karcinomem *in situ* a invazivním karcinomem.
- Hustota krevních vlásečnic je u invazivního karcinomu prsu prognosticky významná.

Model angiogenního zapnutí - 3



Lidský model - karcinom děložního čípku - hustota krevních vlásečnic byla studována imunohistochemicky - barvením buněčných endoteliálních markerů vWF a CD31.



Mírné zvýšení hustoty cév se objevovalo ve stádiu CIN I/II, zatímco ve stádiu CIN III už je mnoho nových cév, což jasně indikuje angiogenní zapnutí - z klidové (quiescentní) stávající vaskulatury k nové vaskularizaci: nové cévy se výrazně objevily těsně pod bazální membránou dysplastického epithelia.

Zapnutí angiogeneze



- Angiogeneze je **nezbytná** pro rychlou expanzi nádorových buněk.
- Zapnutí angiogeneze je svébytným, **samostatným** krokem kancerogeneze.

Zapnutí angiogeneze je do jisté míry **rychlý jednorázový** krok - „**switch**“.

Podle **hypotézy rovnováhy** je angiogenní zapnutí regulováno rovnováhou mezi aktivátory a inhibitory angiogeneze: převaha inhibitorů nad aktivátory vypíná angiogenezi, převaha aktivátorů nad inhibitory ji zapíná.

Aktivátory angiogeneze



- **VEGFs** a jejich receptory
- bazický fibroblastový růstový faktor **bFGF** (FGF-2) a acidický fibroblastový růstový faktor **aFGF** (FGF-1); tyrozin kinázové receptory FGFR1-4 jsou obecněji exprimovány než třeba VEGFRs

VEGF a bFGF mohou fungovat synergisticky

Dnes popsáno více než 20 induktorů angiogeneze, ale zmíněné faktory jsou zvláště často detekovány ve zvýšené hladině u mnoha nádorů. Některé aktivátory jsou zřetelně tkáňově specifické.

Aktivátory angiogeneze



Jak je indukována exprese aktivátorů angiogeneze?

➤ epigenetické příčiny:

- **hypoxie**
- deprivace glukózy, ..

➤ genetické příčiny:

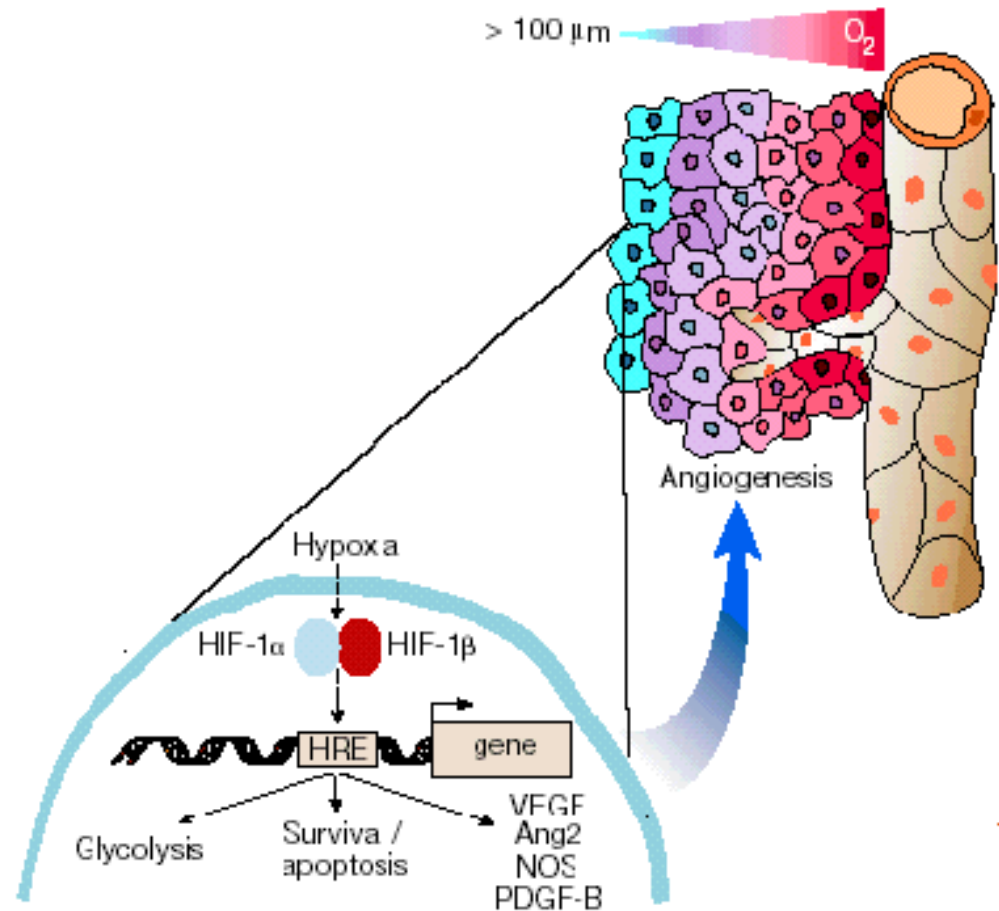
- především jasně prokázaná souvislost mezi mutací **ras** a VEGF. Ras je nezbytný pro udržování správné hladiny VEGF:
mutace ras → zvýšení hladiny VEGF

Úloha hypoxie v nádorové angiogenezi



V „neangiogenním“ nádoru vznikají nepravidelná místa s různou mírou hypoxie (stav snížené hladiny O_2):

1. Tlak na **selekcii** klonů s proangiogenním fenotypem.
2. Hypoxie aktivuje transkripční faktory **HIFs**, které transaktivují angiogenní geny, např. **VEGF**, **PDGF-B**, **Ang2**, a další).



Transkripční faktor HIF-1



- aktivován jako odpověď na hypoxii ve všech typech tkání/ buněk savčího organismu
- heterodimer složen z podjednotek **HIF-1 α** a **HIF-1 β**
 - podjednotka HIF-1 β je exprimována konstitutivně
 - podjednotka **HIF-1 α** regulována **kyslíkem**: hydroxylace HIF-1 α na zbytcích prolinu, následná ligace ubikvitinu a poté degradace proteazomem ← kyslík pochází přímo z molekulárního kyslíku!
- při **nedostatku kyslíku** je hydroxylace inhibována, HIF-1 α je translokována do jádra a stabilizována vazbou s HIF-1 β

Syndrom von Hippel-Lindau - VHL



- autozomálně dominantní onemocnění; spojeno s vysokým rizikem vývoje nádorů v mnoha orgánech, především:
- **retinální hemangiomy**: zpravidla nejčasnější detekce, v průměru kolem 25 let
- **hemangiomy CNS a páteře**: průměrný věk při detekci 30 let
- **karcinomy ledvin**: průměrný věk při diagnóze 37 let, objevují se u 28 - 45% postižených; jsou maligní a mohou metastazovat
- **feochromocytomy**
- onemocnění spojeno s vrozenými mutacemi genu **VHL**, který je lokalizován v oblasti **3p25.5**

Historie syndromu von Hippel-Lindau

- Eugene von Hippel (**1904**) popsal rodiny, ve kterých byli postižení s angiomy – nádory krevních vlásečnic v retině
- Arvind Lindau (**1927**) popsal, že tito postižení mají vysoké riziko vývoje nádorů krevních vlásečnic mozku a míchy (hemangioblastomy)
- ke spektru nádorů u postižených VHL patří dále: karcinomy renálních buněk, **feochromocytomy** (nádory dřeně nadledvinek, 20% familiální výskyt), **nádory endoteliální výstelky lymfatických uzlin**, nádory Langerhansových ostrůvků pankreatu

Syndrom von Hippel-Lindau



- frekvence výskytu je asi 1:36.000
- penetrance je 80-90%
- expresivita je vysoce variabilní - klinická variabilita je přímo znakem VHL; popsány dvě formy VHL:
typ 2 VHL („low risk“) je spojen s výskytem feochromocytomů a missense mutacemi (96%); **typ 1 VHL** („high risk“) spojen spíše s delecemi/inzercemi, nesmyslnými kodóny → vývoj feochromocytomů zřejmě spojen s pouze částečnou ztrátou aktivity pVHL
- somatické mutace VHL jsou časté také u sporadických hemangioblastomů a nádorů ledvin; gen může být inaktivován také methylacemi CpG ostrůvků v promotorové oblasti

VHL - protein

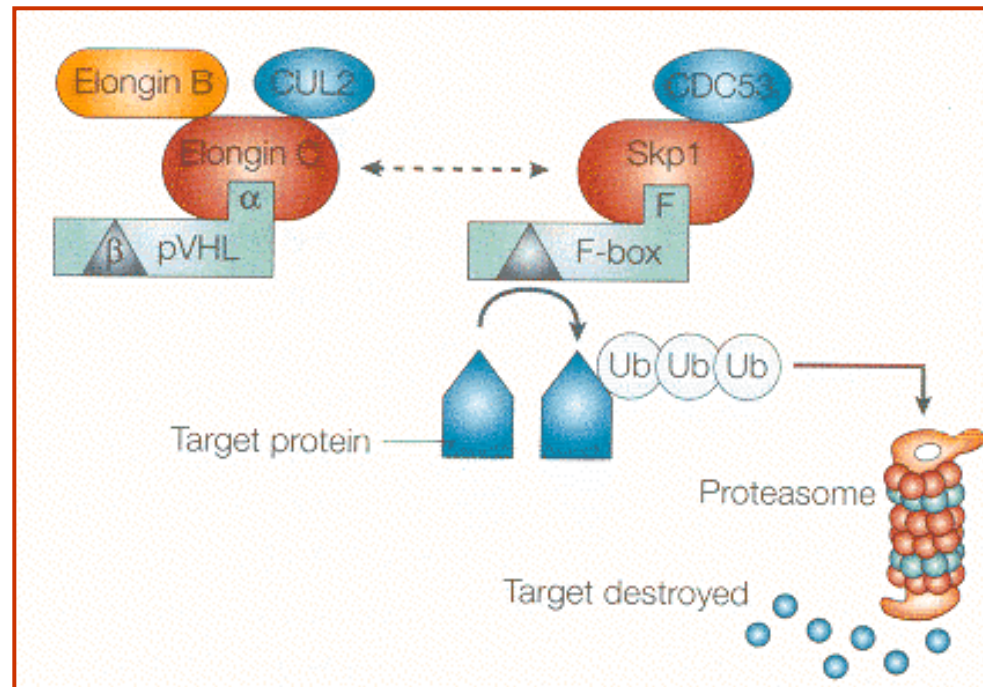


- protein **pVHL** lokalizován v jádře i v cytoplasmě, převaha proteinu je v cytoplasmě
- typicky koimunoprecipituje se specifickou sadou proteinů: interaguje s proteinem **elonginem C**, ten interaguje dále s **elonginem B** a proteinem **cullin-2 (CUL2)**
- tento komplex homologní s ubikvitin ligázovým komplexem **SCF** (Skp1 – Cdc53 – F-box) kvasinek – z této podobnosti se usoudilo na funkci pVHL a celého komplexu:

Funkce pVHL



pVHL jako součást komplexu s Elonginem B, C a CUL2 rozpoznává cílové proteiny, komplex poté způsobuje jejich ubiquitinaci a následnou degradaci proteazomem



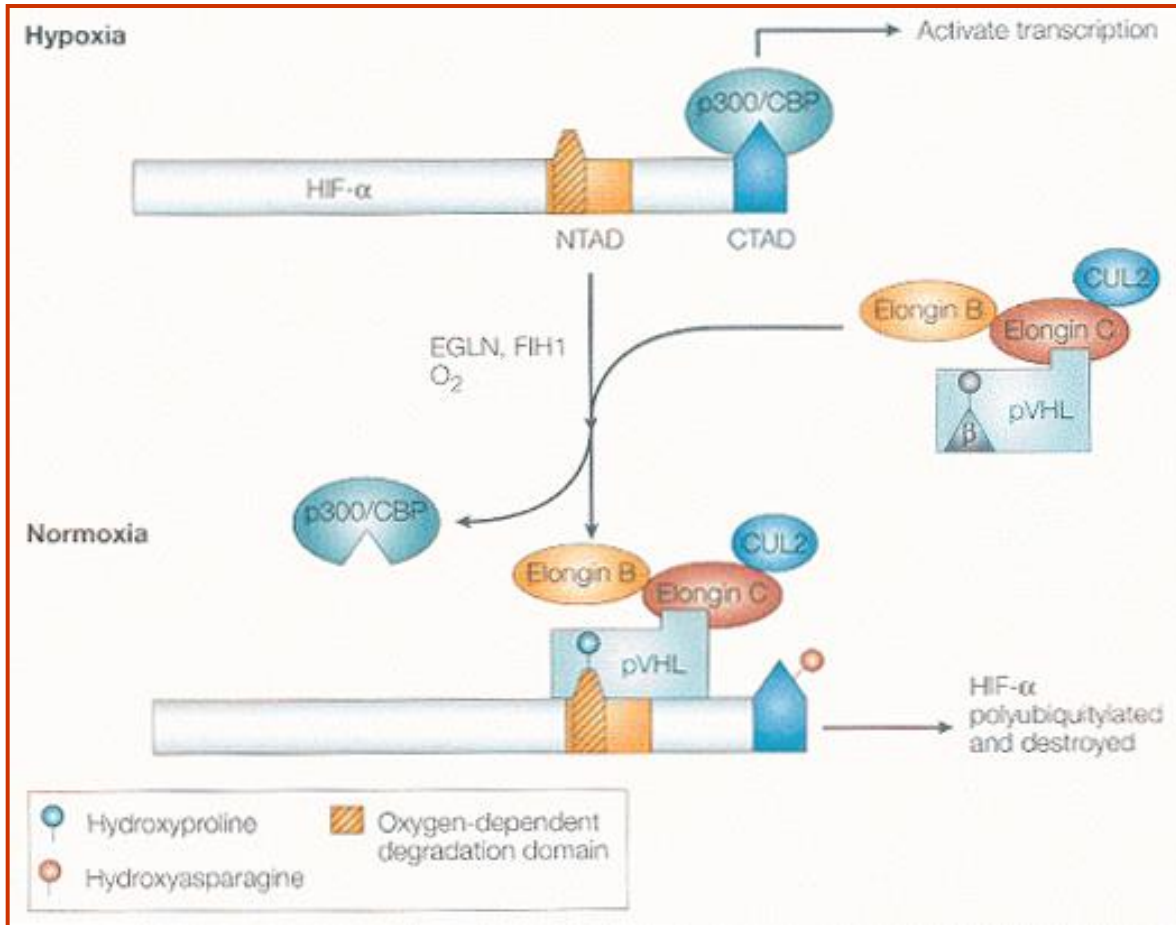
Funkce pVHL



- hemangiomy a nádory ledvin mají dva společné znaky:
 - 1.** vysoká **vaskularizace** spojená s vysokou hladinou **VEGF**
 - 2.** produkce erythropoietinu (**EPO**), který způsobuje navýšení počtu červených krvinek

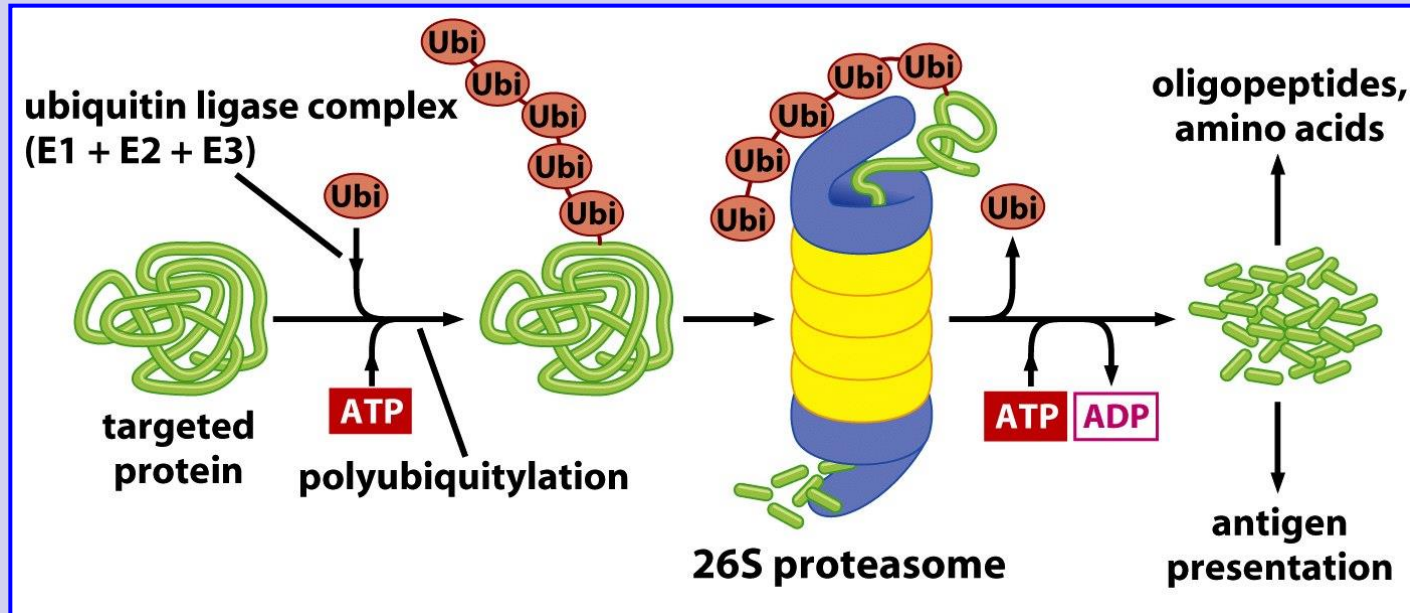
- tyto proteiny kódovány **geny indukovatelnými hypoxií** („*hypoxia-inducible genes*“)
- buňky s nefunkčním pVHL produkují vysoké hladiny mRNA genů indukovatelných hypoxií – bez ohledu na hladiny kyslíku – to je molekulárním markerem inaktivace VHL

Funkce pVHL: regulace HIF-1



NTAD, CTAD –
transkripční domény

Ubikvitinace a proteasom

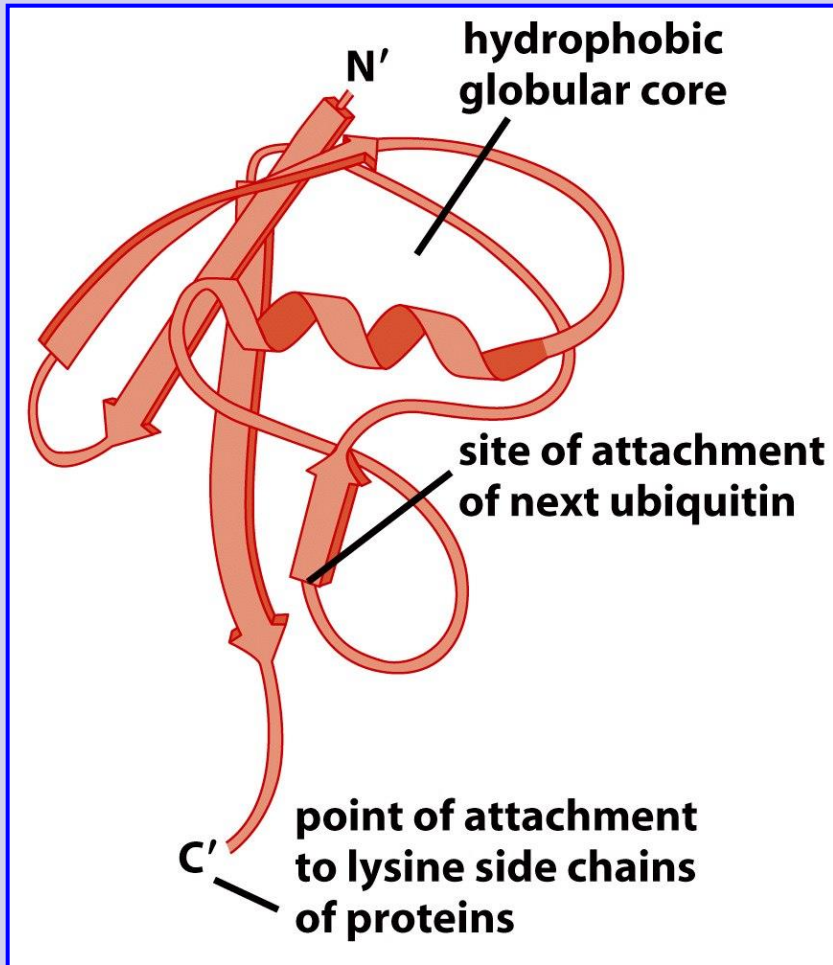


komplex ubikvitin ligázy (E1, E2 a E3) rozpoznává protein určený k degradaci → označuje ho připojením řetězce ubikvitinů: polyubikvitinuje jej → označený protein je zachycen proteasomem, ubikvitin je odstraněn a protein degradován na oligopeptidy

1. aktivace ubikvitinu enzymem **E1**; 2. ubikvitin konjugující enzym **E2**; 3. vazba na substrát (zbytek lysinu) ubikvitin ligázou **E3** – ta je specifická, je to klíčový enzym

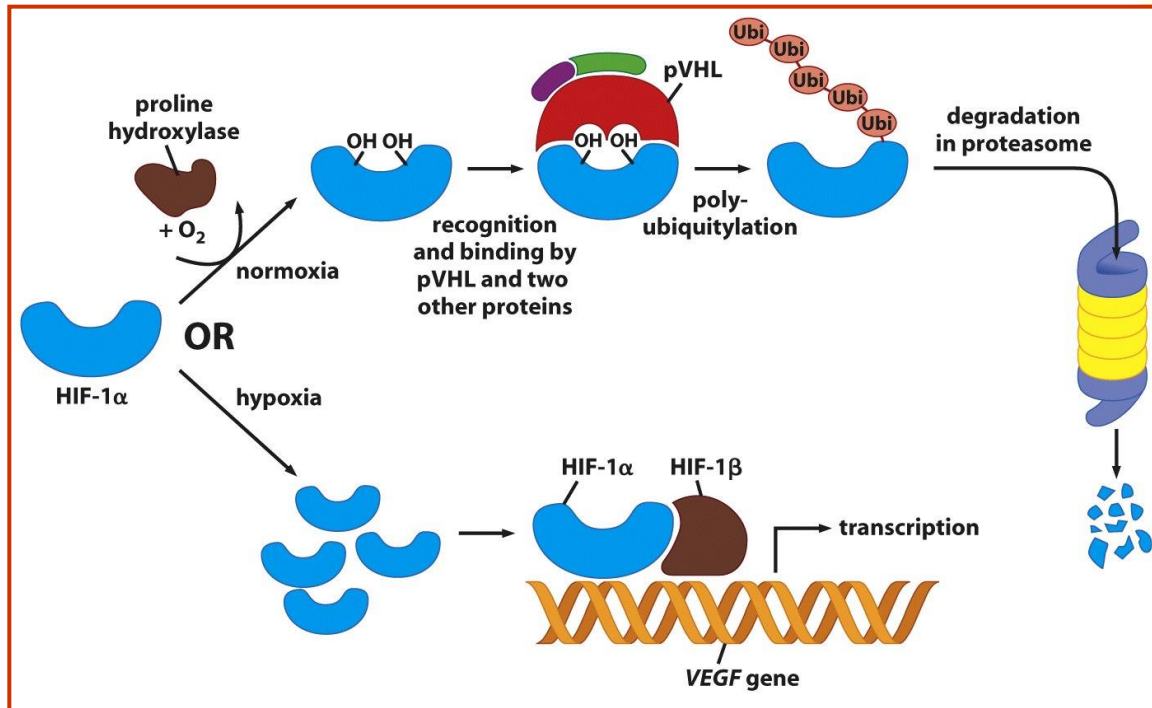
E3: např. **SCF**, **APC/C** („anaphase-promoting complex“), **MDM2**, **pVHL**

Ubikvitin



Ubikvitin je relativně malý peptid, složený ze 76 aminokyselinových zbytků. Jeho struktura je téměř úplně konzervovaná mezi eukaryotickými buňkami.

HIF-1 a jeho regulace pVHL



Při nedostatku kyslíku (**hypoxie**) prolin hydroxyláza nedokáže oxidovat proliny, HIF-1 α uniká degradaci, tvoří dimer s HIF-1 β a transaktivuje své cílové geny (např. VEGF).

Při dostatku kyslíku (**normoxie**) je HIF-1 α silně exprimován a téměř okamžitě účinně degradován účinkem pVHL. Prolin hydroxyláza oxiduje až dva zbytky prolinu na molekule HIF-1 α na hydroxyprolin. Tyto hydroxyproliny umožňují vazbu pVHL, který spolu s dalšími 2 proteiny ubikvitinuje HIF-1 α .

Aktivace aktivátorů angiogeneze



- (Ras, hypoxie)
- FGFs a další angiogenní faktory mohou být uloženy (zadržovány) v extracelulární matrix mnoha buněčných typů (včetně endoteliálních buněk) a uvolňovány - aktivovány **při proteolytické degradaci ECM.**

Inhibitory angiogeneze



- **Thrombospondin-1 (TSP-1)**: sekretovaný glykoprotein, ve vysoké hladině u normálních buněk, v nízké hladině u mnoha nádorových buněk. (Váže se na transmembránový receptor endoteliálních buněk CD36, který je spojen s intracelulární Src-like tyrozinkinázou.)
exprese TSP-1 je regulována **p53**:
inaktivace p53 → snížení hladiny TSP-1
- souvislost: Ras (protoonkoprotein) - aktivátory angiogeneze **X**
p53 (nádorový supresor) - inhibitory angiogeneze

Aktivace inhibitorů angiogeneze



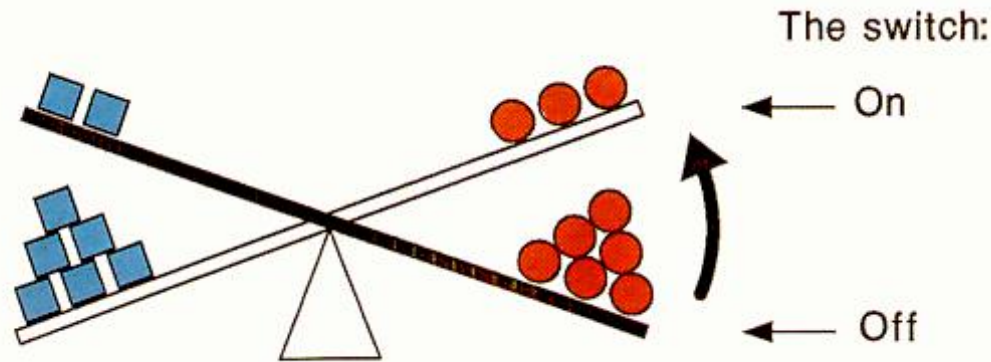
- Typickým znakem mnoha inhibitorů angiogeneze je, že jsou v buňce nebo v ECM přítomny ve formě neaktivních nebo málo aktivních prekurzorů (**fibronectin**, **plasminogen**, **platelet factor-4**), které mohou být **proteolytickým štěpením** aktivovány v účinné inhibitory angiogeneze (**plasminogen** → **angiostatin**) - **rychlý** mechanismus, který se pravděpodobně uplatňuje při procesech hojení, ovulace, atd. Podobně **platelet factor-4** je slabý inhibitor angiogeneze, ale může z něho být vyštípnut fragment s 50x vyšší inhibiční potencí.

Aktivace aktivátorů a inhibitorů angiogeneze



- Jak aktivátory, tak inhibitory angiogeneze jsou „vždy připraveny“ k činnosti, jen odlišným mechanismem. Inhibitory přímým proteolytickým štěpením, aktivátory uvolněním z vazeb na struktury ECM při degradaci ECM.
- Taková regulace aktivátorů a inhibitorů umožňuje zvládnout úkol: na jedné straně udržovat velmi stabilní klidové stádium vaskulatury a na straně druhé rychle reagovat v případě potřeby zapnutím angiogeneze.

Hypotéza rovnováhy zapnutí - přepnutí angiogeneze



■ Activators

aFGF
bFGF
VEGF
⋮
⋮
⋮

● Inhibitors

Thrombospondin-1
16 kD Prolactin
Interferon α/β
Platelet factor-4
Angiostatin
⋮
⋮

Přehled mediátorů angiogeneze



- proangiogenní faktory

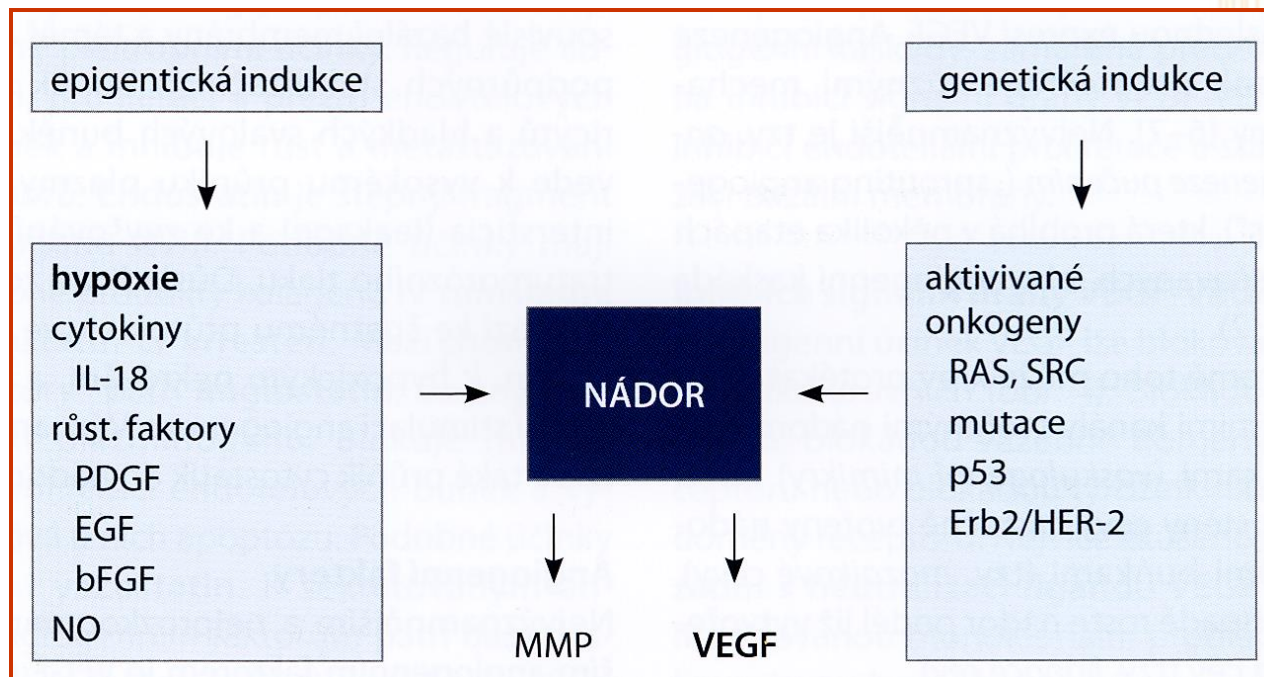
rodina VEGF, angiopoietiny, HGF, MMP, FGFb, PD-EPDGF, PDGF, EGF, TNF, IL-6, integriny

- antiangiogenní faktory

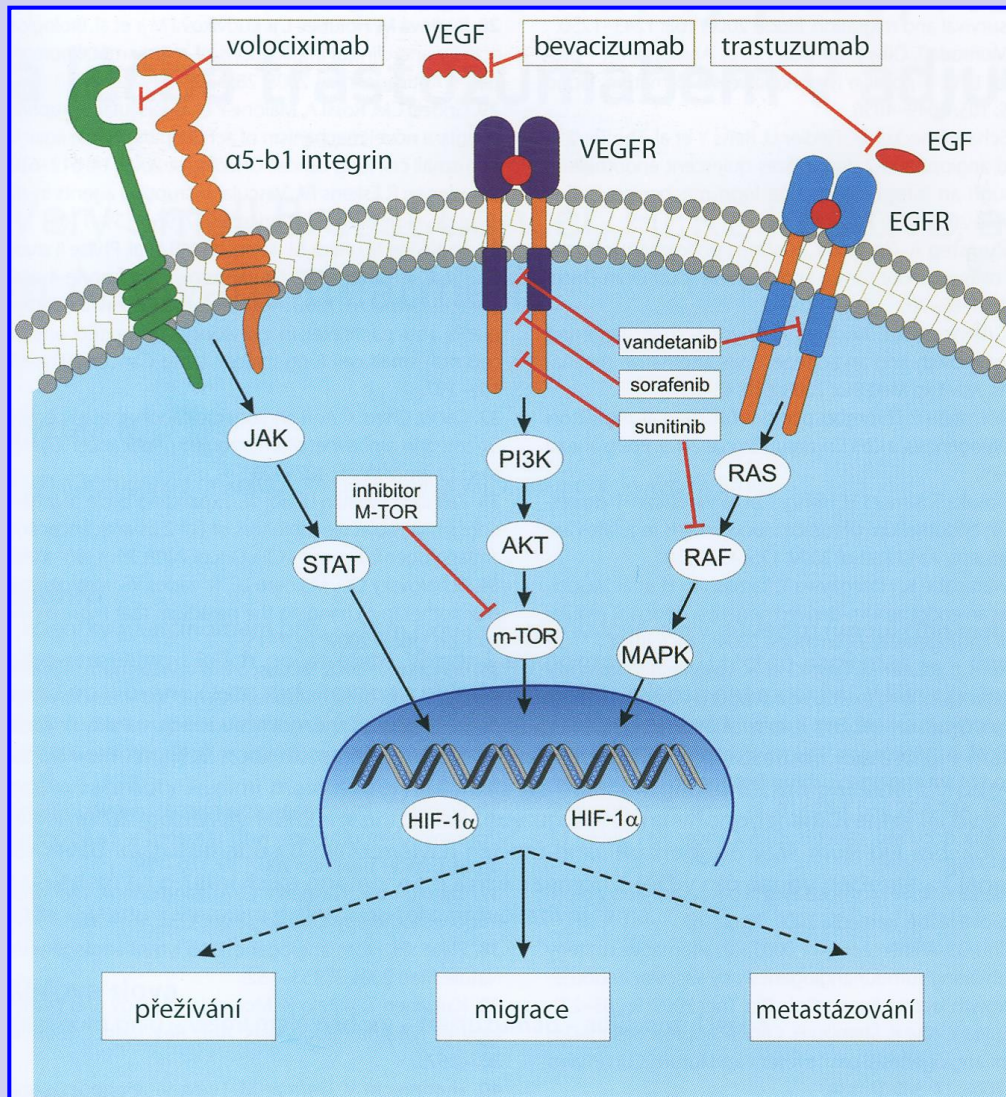
trombospondin, endostatin (fragment kolagenu XVIII), tumstatin, kanstatin (fragments kolagenu IV), angiostatin, vazostatin, TGF β , IFN α , IFN β , TIMPs, PAI, IL-12, IL-18, vasohibin

⇒ **biologický reostat**, který zahrnuje nádorové i nenádorové buňky (někdy více příspěvek aktivace *ras*, *myc*, jindy více vliv pericytů, zánětu, ...)

Indukce angiogenních faktorů



Možnosti inhibice signální dráhy VEGF



1. neutralizace ligandu VEGF humanizovanou monoklonální protilátkou: **bevacizumab-Avastin**, ...

2. blokáce vazebné domény receptoru monoklonální protilátkou: **volociximab, ramucirumab**, ...

3. inhibitory tyrozin protein kinázové domény receptorů: **sunitinib, sorafenib, nintedanib, pazopanib, regorafenib, vatalanib**, ...

Rezistence k anti-angiogenní terapii



- velké naděje vkládané do anti-angiogenní terapie nebyly naplněny
- řada nádorů vykazuje vůči anti-angiogenní terapii rezistenci

Důvody rezistence

1. některé nádory mohou využívat alternativní způsob indukce angiogeneze (FGF2, angiopoietin 2, ...)
2. některé nádory nejsou na angiogenezi závislé
 - vaskulogenní mimikry
 - kooptace stávajících cév

Typy nádorové vaskularizace: kooptace stávajících cév



- některé nádory při svém vývoji neindukují vznik vlastního cévního systému, kooptují již existující cévní systém
- vyvíjejí se tak na svém začátku jako malé, ale dobře prokrvené nádory.
- v nádorech zůstává vaskulatura se strukturou a topografickou distribucí shodnou s původní vaskulaturou

Kooptace stávajících cév



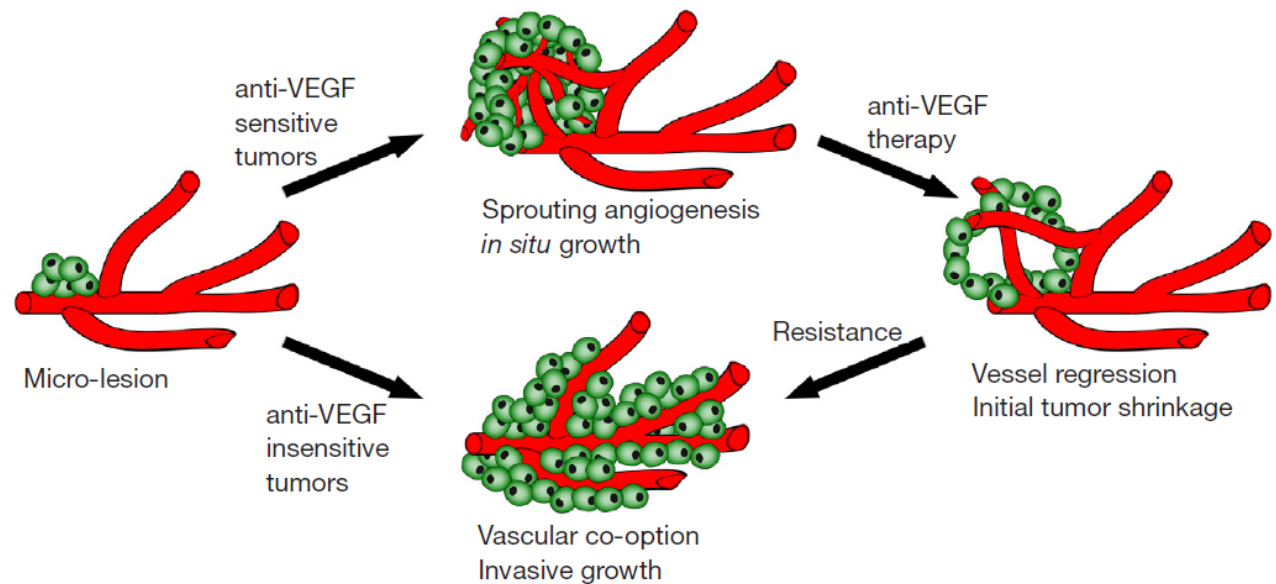
- **normální vaskulatura**, ve které jsou perfektně vybalancovány pro- a anti-angiogenní faktory, je tvořena zralými cévami, které jsou hierarchicky uspořádány: cévy – kapiláry – mikrovlásečnice
- **abnormální nádorová vaskulatura** typicky postrádá hierarchické uspořádání, je tvořena nezralými diferencovanými i nediferencovanými cévami se zvýšenou propustností, chybějícím nebo poškozeným lumen; tok krve je málo efektivní, v nádorovém mikroprostředí vzniká hypoxie, i když hustota mikrovlásečnic je oproti normální tkáni zvýšená
- **anti-angiogenní terapie** (anti-VEGF – bevacizumab) vyvolá normalizaci nádorové vaskulatury, ale nenormalizované (tj. stávající) cévy, které jsou dobře podporovány pericyty, zvětší průměr a dobře nádor zásobují – jsou rezistentní k anti-angiogenní terapii!

Kooptace stávajících cév



Nádory **citlivé** k anti-VEGF působení jsou ve svém zásobení krví typicky závislé na angiogenezi a rostou především *in situ*. Působení anti-VEGF způsobí regresi krevních vlásečnic, nekrózu buněk především uvnitř nádoru a zmenšení nádoru.

Nádory **rezistentní** k působení anti VEGF naopak přepnou na invazivní fenotyp, kooptují stávající cévy a nejsou proto ve svém růstu závislé na indukci angiogeneze.



Typy nádorové vaskularizace: vaskulogenní mimikry



- Avaskulární kanálky, tvořené nádorovými buňkami, kterými protéká krev:
 - tvoří se bez účasti endoteliální proliferace
 - připisuje se plasticitě geneticky deregulovaných nádorových buněk
- Poprvé popsáno u vysoce agresivních forem maligního melanomu; prokázáno také u karcinomu ovaria, prostaty, inflamatorního karcinomu prsu a sarkomů měkkých tkání.
- Spojeno s vysokým gradem, invazí, metastázami a sníženým přežíváním pacientů.
- Standardní antiangiogenní terapie je také zde neúčinná!

Způsoby nádorové vaskularizace



- Navzdory obecně přijímané teorii nádory mohou růst i bez neoangiogeneze.
- Jen málo nádorů je zcela neangiogenních, ale mnohé využívají jak angiogenní, tak neangiogenní mechanismy.
- Nádory mohou během svého vývoje přepínat z angiogenního do neangiogenního modu, v závislosti na anatomické lokalizaci a působení terapie.
- Mechanismus neangiogenního růstu je ovlivněn jak typem orgánu, ve kterém nádor roste, tak typem nádoru.
- Neangiogenní nádorové buňky jsou vysoce metastatické a jsou asociovány s vysokou pohyblivostí a schopností infiltrovat okolní prostředí.
- Neangiogenní růst je jedním z více způsobů, kterými mohou nádory unikat anti-angiogenní terapii.

Donnem T et al, *Nat Rev Cancer* 18 (2018): 323-336

Kuczynski EA et al, *Nat Rev Clin Oncol* (2019); doi: 10.1038/s41571-019-0181-9