

# Rakovina

## Terminologie:

- název rakovina („cancer“) je odvozen od latinského slova označujícího kraba, protože tohoto živočicha starým Řekům připomínaly výběžky šedé hmoty nádoru (řecky: karkinos = rak, onkos = krab)
- rakovina - choroba způsobenou **maligním nádorem**
- nádor („tumor“) - neoplazma, novotvar - patologický útvar vytvořený v tkáni mnohobuněčného organismu, jehož růst se vymkl kontrole. Dělení buněk není omezováno žádným regulačním mechanismem.

# Co je to rakovina?

- genetická nemoc
- začíná na úrovni jediné buňky
- následek mutace a přirozeného výběru v populaci buněk mnohobuněčného organismu

Rakovinné buňky jsou pro organismus nebezpečné proto, že ...

- se reprodukují bez ohledu na jeho potřeby (nereagují na běžné buněčné signální mechanismy)
- kolonizují tělní oblasti, které jsou vyhrazeny jiným buněčným typům

## Další termíny:

**Nádor X Hyperplazie X Metaplazie**

## Willis (1967):

Nádor je masa buněk, které nekoordinovaně rostou ve srovnání s buňkami okolní normální tkáně a který perzistuje i bez iniciačního stimulu (znemožněna reverze).

Hyperplazie je přechodné zvětšení tkáně nebo orgánu v důsledku přítomnosti většího počtu zdravých buněk, ke kterému dochází po hormonální stimulaci . Po odstranění signálu se orgán zmenšuje do normální velikosti (testosteron / prostata, těhotenství / prsní žláza).

Metaplazie je přechodná změna fenotypu buňky v důsledku vnějších signálů. (respirační epitelium/dlaždicové epitelium u kuřáků).

# Fenotyp nádorových buněk je dědičný

Virchow (1858):

- *Omnis cellulae cellula.*  
(Všechny buňky pocházejí z buněk)

Buňky metastáz připomínají buňky primárního nádoru

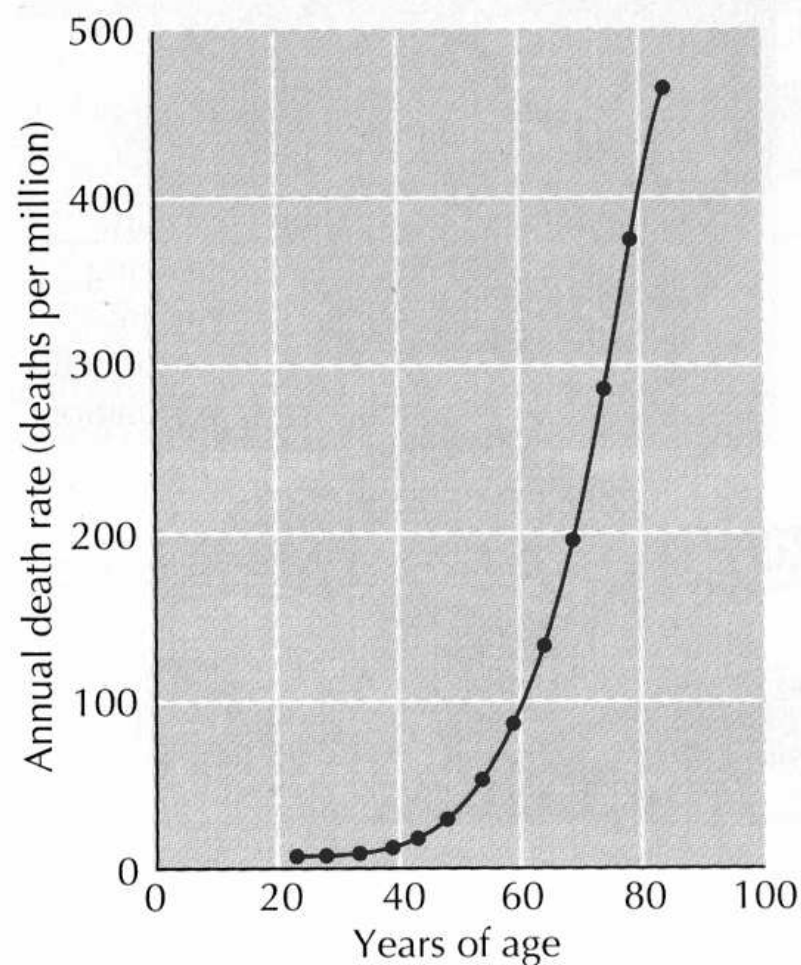
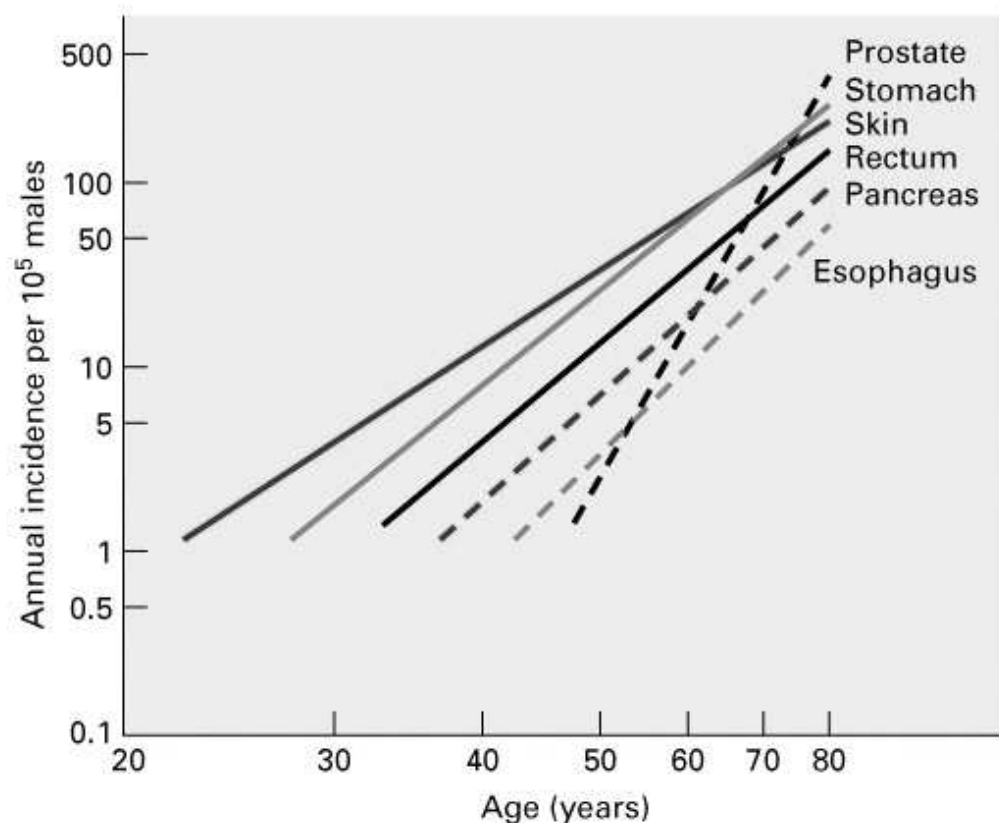
Všechny buňky nádoru pocházejí z jediné buňky  
(klonalita nádoru)

# Rakovina je primárně genetická nemoc

- ve většině nádorových buněk jsou zaznamenány somatické mutace
- u vzácných familiálních rakovinných syndromů jsou zaznamenány zděděné zárodečné mutace
- zvýšení frekvence mutací nebo genomová nestabilita zvyšuje frekvenci rakoviny

# Vývoj rakoviny je postupný proces kumulace změn

většina nádorů se objevuje v pokročilejším věku (např. frekvence výskytu rakoviny tlustého střeva se zvyšuje 10x mezi 30. - 50. rokem věku)

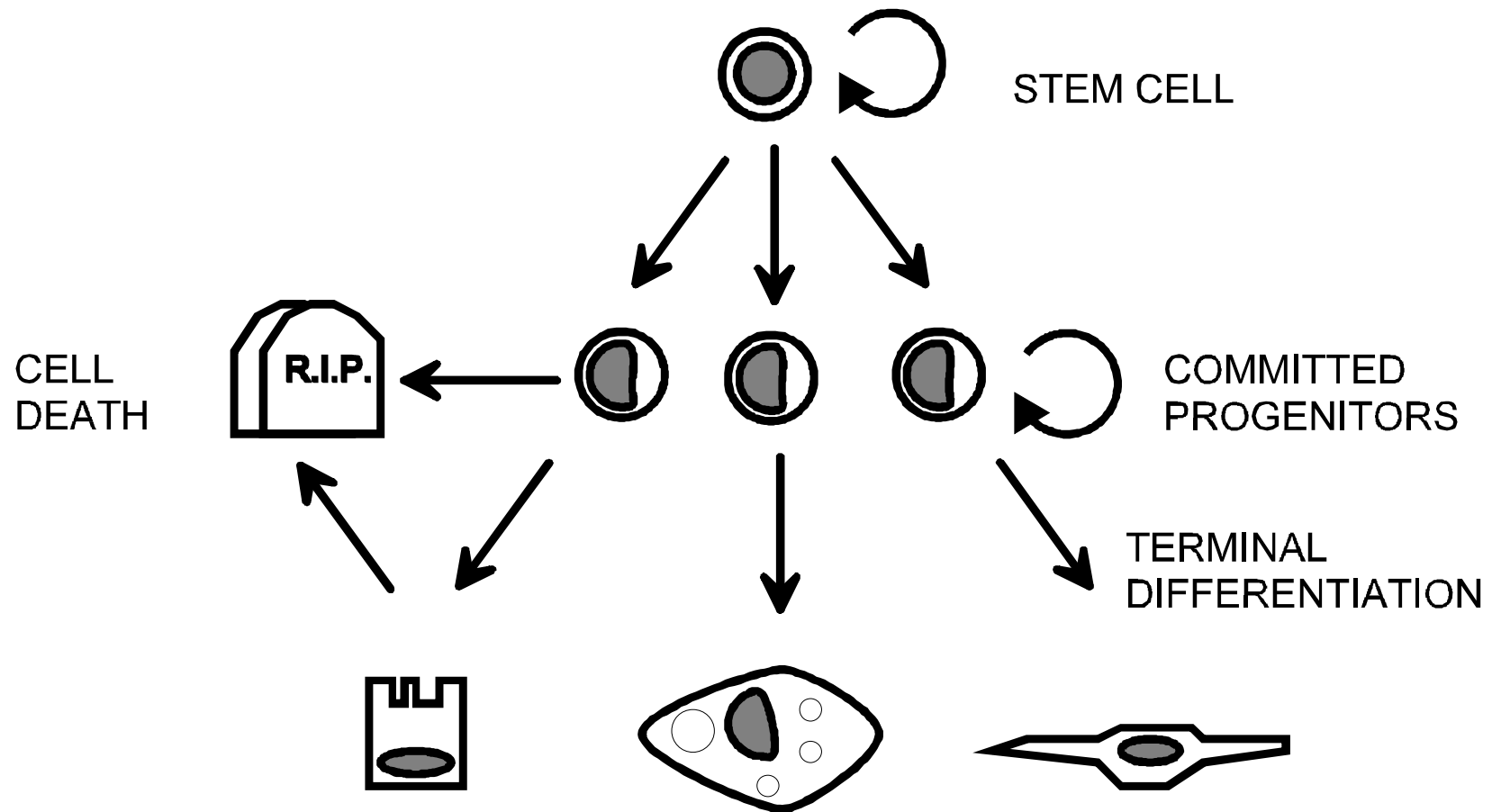


# Rakovina: Následek mutace a přirozeného výběru v populaci buněk mnohobuněčného organismu

- Buňky musí činit kritická rozhodnutí:
  - Růst a dělit se?
  - Diferencovat?
  - „Spát“ (dormance) ?
  - Zemřít?
- Na všech těchto úrovních může dojít k poruše
- Pokud je následkem poruchy nepřiměřená proliferace, vzniká nádor



# Rozhodování buněk



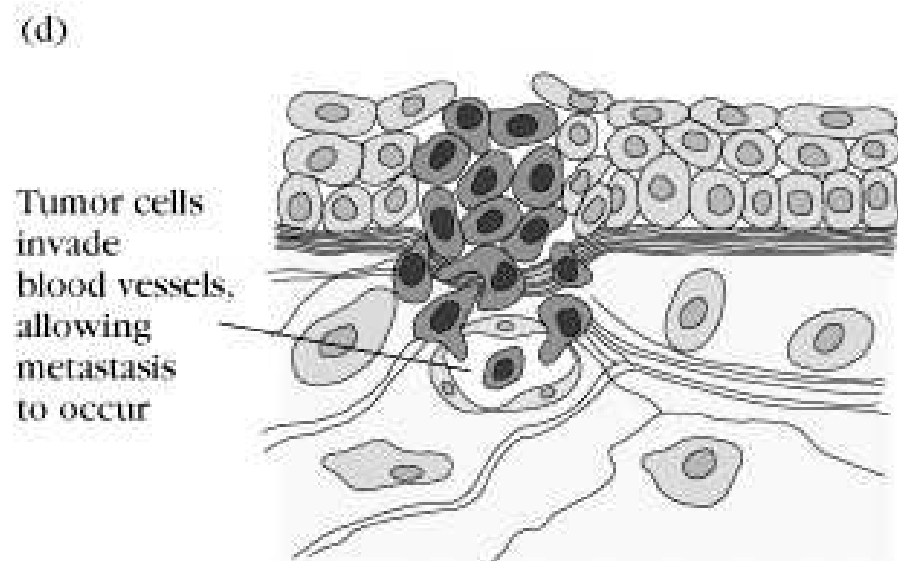
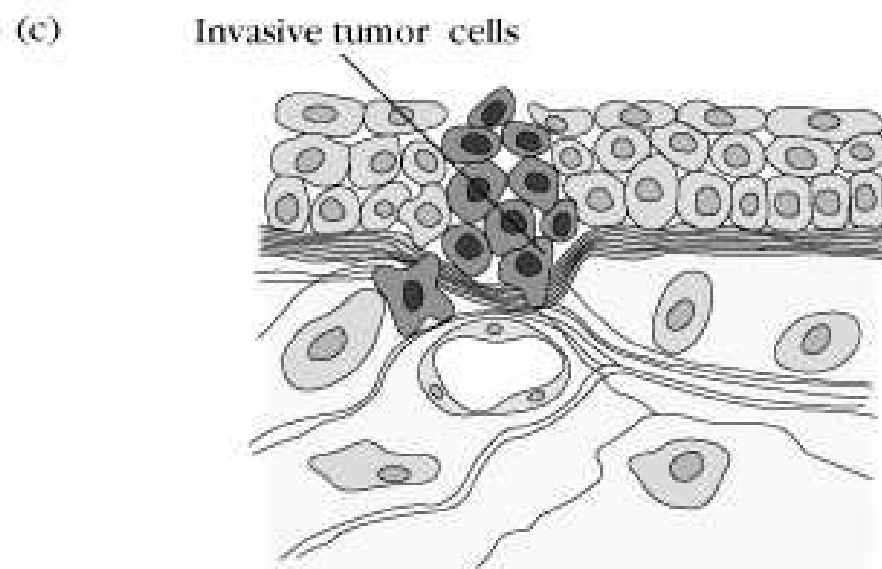
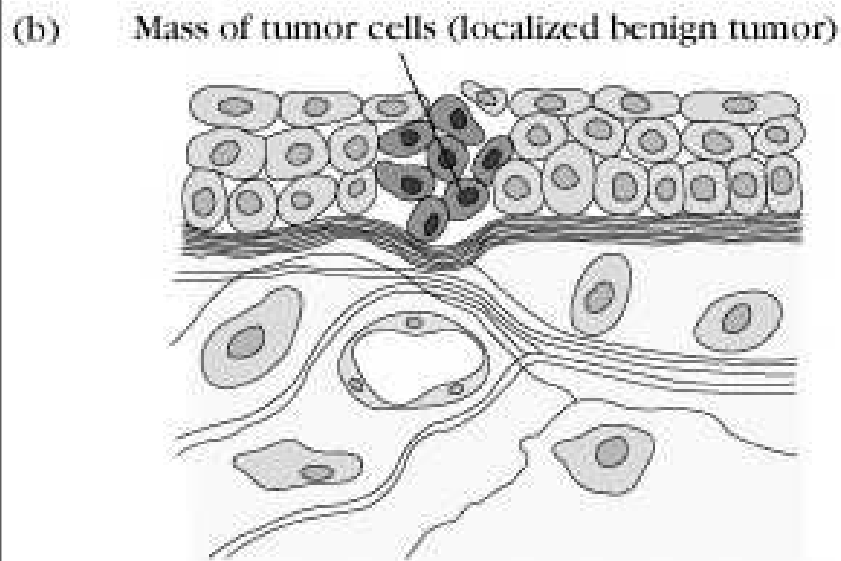
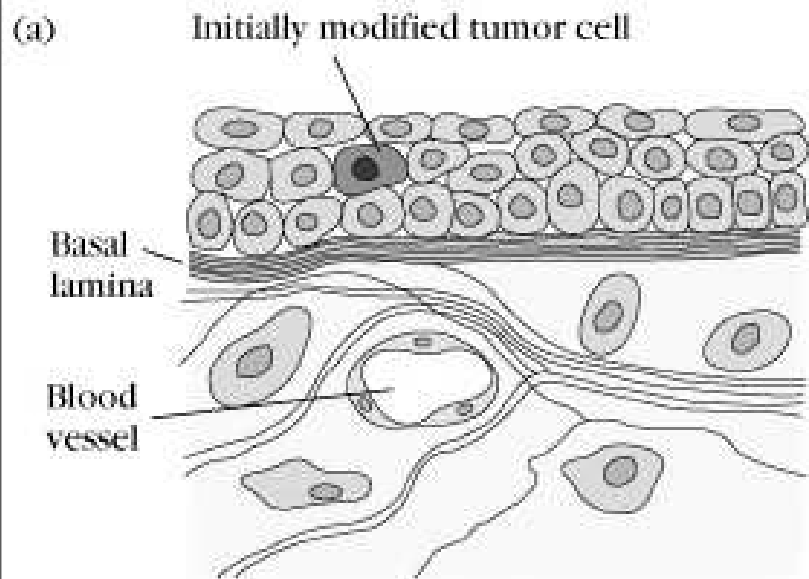
# Rozlišujeme nádory benigní a maligní

## Benigní

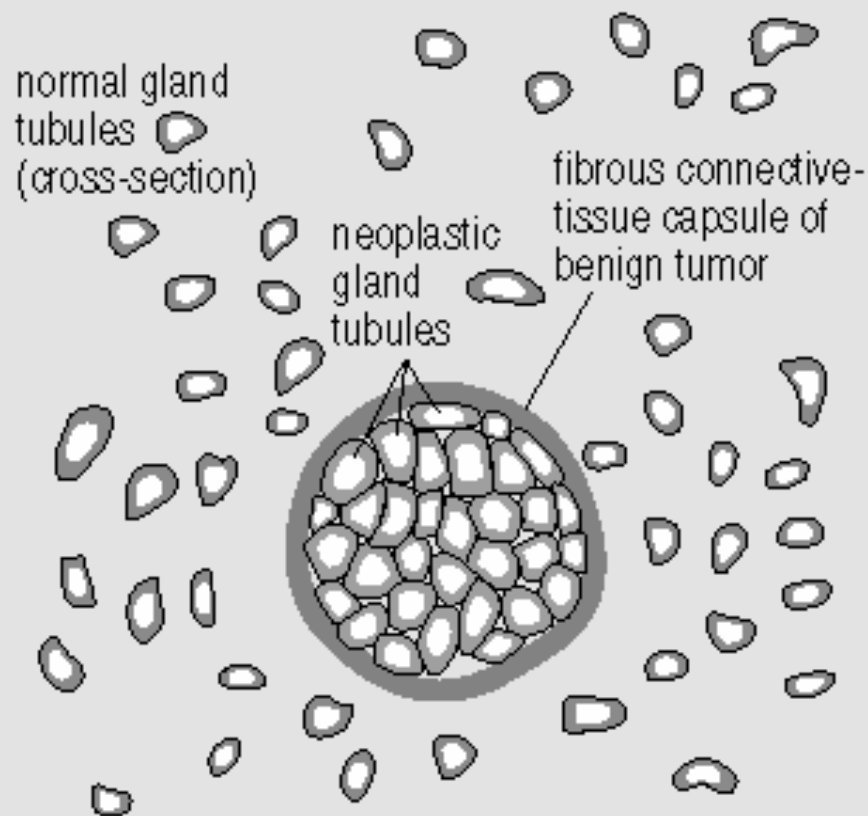
- pomalý růst
- podobnost s původní tkání (dobrá organizace buněk, vysoký stupeň diferenciacce)
- ohraničenost
- většinou neohrožují život

## Maligní

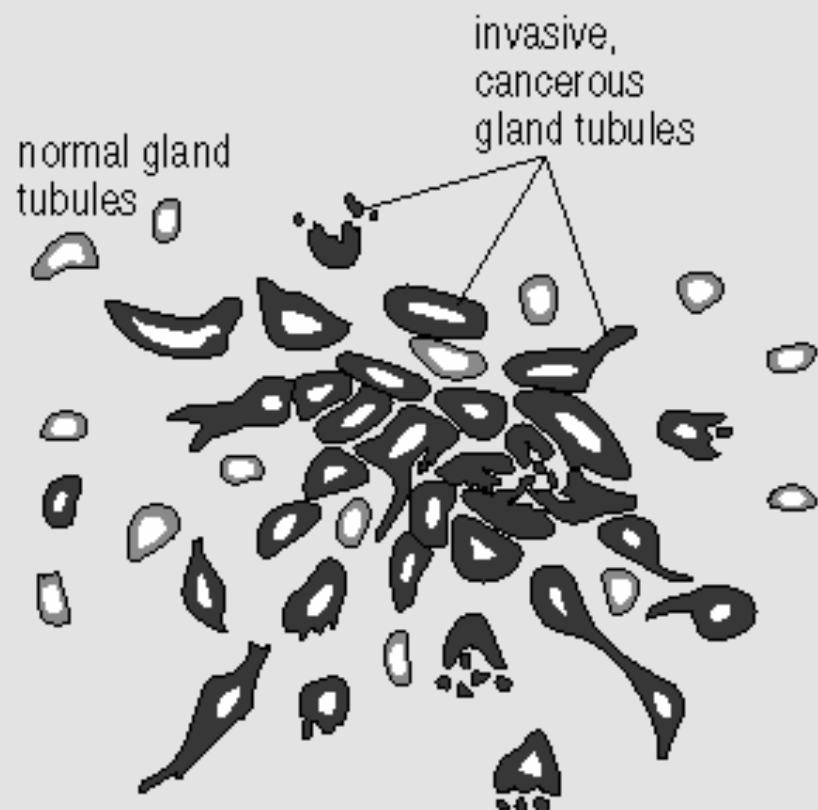
- vysoká proliferace (velká jádra, jadérka - tvorba ribozomů, polyzomy - tvorba proteinů potřebných pro buněčné dělení)
- změny v morfologii, velikosti a tvaru buněk
- nižší stupeň diferenciacce
- metastáze



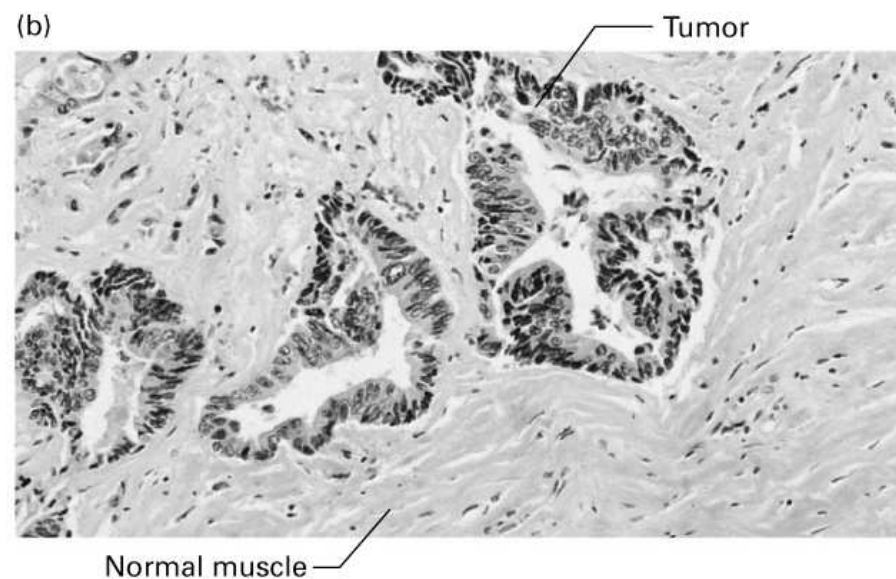
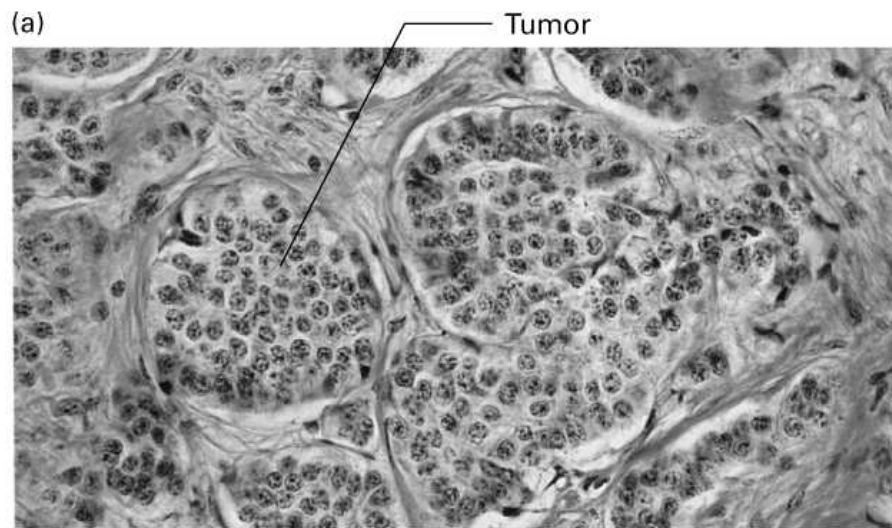
### Adenoma (benign)



### Adenocarcinoma (malignant)



Benigní nádory jsou poměrně časté, ale jsou relativně málo nebezpečné, protože jsou ohraničené a malé

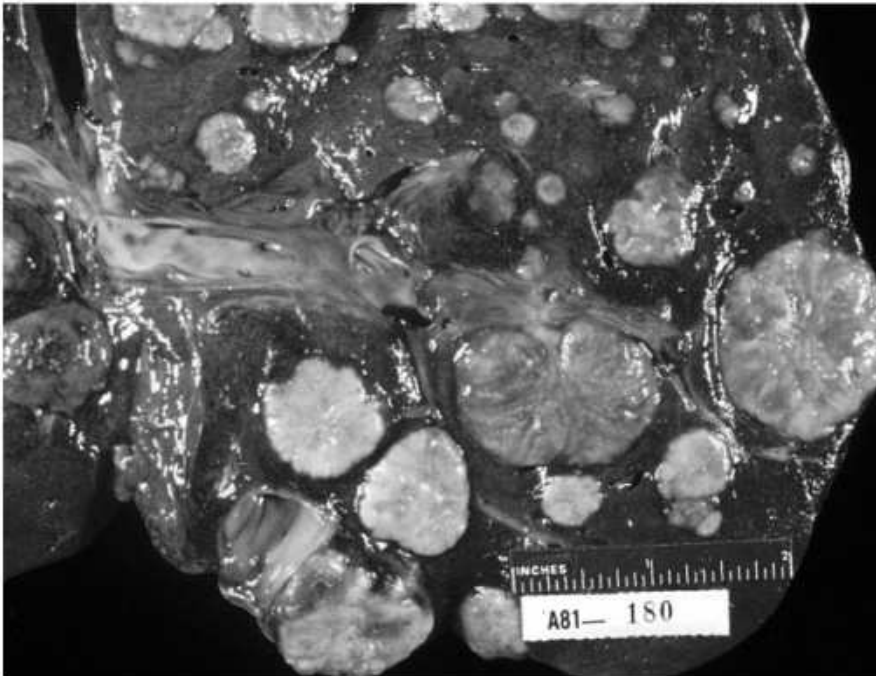


# I benigní nádory mohou být smrtelné!

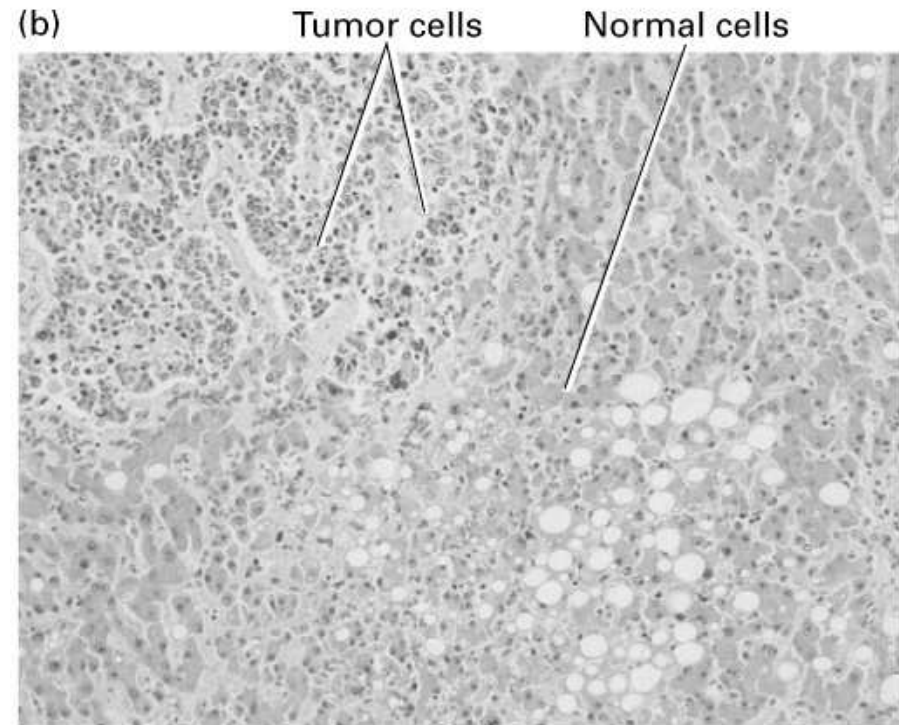
- nádor žlaznatých buněk: **nadprodukce důležitých biologicky aktivních molekul**  
Příklad: Langerhansovy ostrůvky - přílišná sekrece inzulínu - hypoglykemie - smrt
- **poloha nádoru narušuje nějakou životní funkci**  
Příklad: mozkové výstelka - narušení funkce vitálních center mozku - smrt

# Maligní nádory obsazují okolní tkáň a rozšiřují se do celého těla

(a)



(b)



# Klasifikace a nomenklatura nádorů

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



# Typy nádorů

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, atd	Chondrosarkom, atd.
		Neuroblastom
		Retinoblastom
		Nefroblastom
Zárodek	Teratom	Teratokarcinom
		Embryonální karcinom
Jiný		Melanom
		Leukemie

## Fakt:

Karcinomy představují asi 90% lidských nádorů.

## Proč?

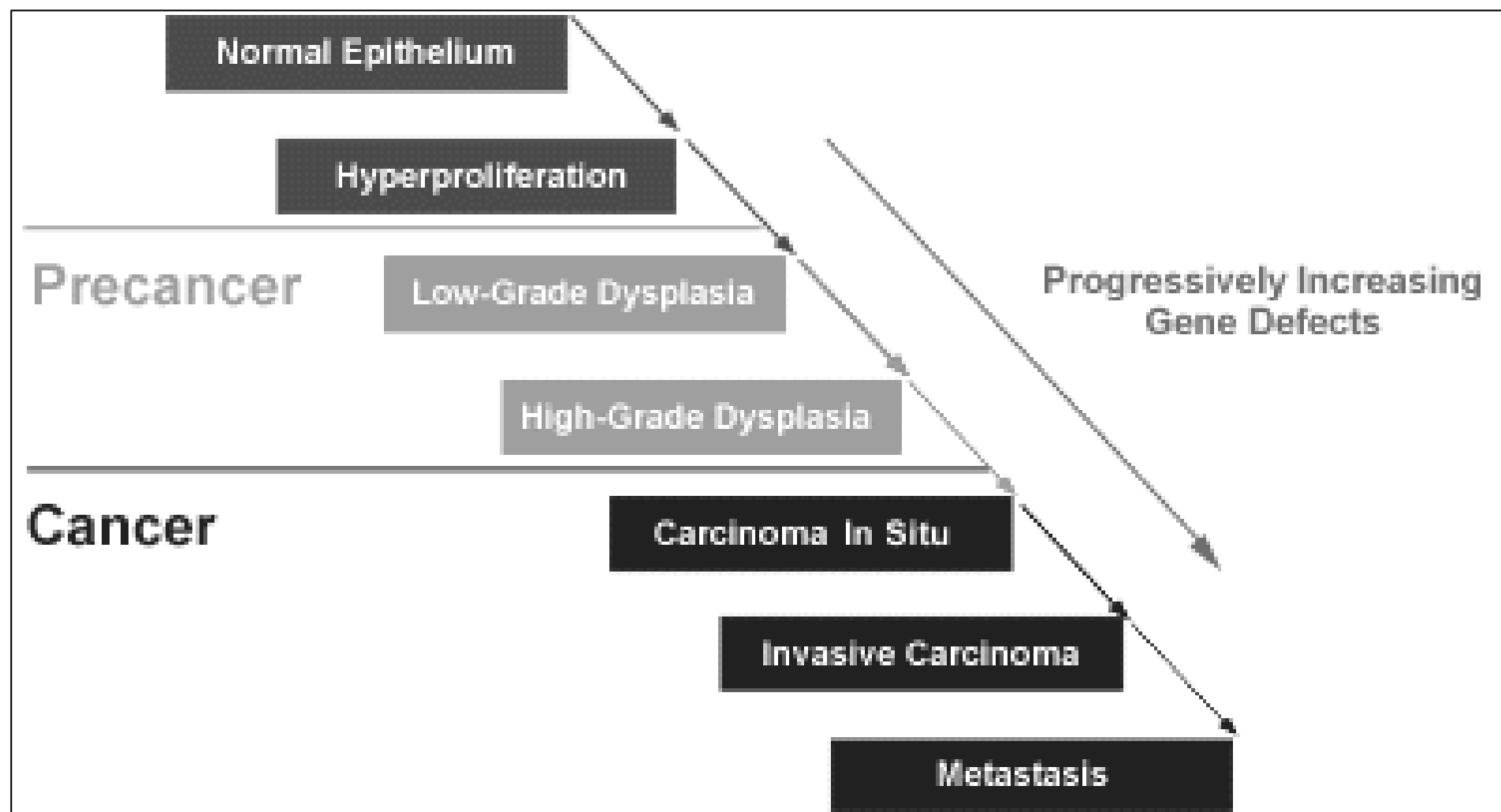
Protože epiteliální buňky aktivně proliferují?

Protože epiteliální tkáně jsou nejčastěji vystaveny faktorům, které mohou buňky poškodit a dát vznik rakovině?

# Karcinogeny jsou mutageny

- *Clunet 1908* - rentgenové záření u krys způsobuje rakovinu kůže
- *Yamagiwa and Ishikawa 1915* - tér způsobuje rakovinu kůže u králíků
- *Muller 1928* - rentgenové záření způsobuje mutace u octomilek
- *Miller and Miller 1960s* - metabolická konverze nemutagenních látek na mutagenní

# Nádor vzniká postupnou přeměnou zdravých buněk



# Stadia karcinogeneze:

- iniciace
- latence
- promoce
- progrese

# Iniciace

- interakce karcinogenu s DNA
- rychlý proces
- nevratná (genetická) změna buňky
- iniciované buňky se nevyvíjejí do podoby nádorů, pokud není přítomen vnější faktor s funkcí promotoru

# Latence

- období mezi aplikací karcinogenu a objevením se nádoru

# Promoce

- tvorba pre-rakovinných výrůstků vyvolaná působením nádorových promotorů
- negenetické změny
- stimulace signálních drah indukujících růst
- krátkodobé působení promotoru je reverzibilní



# Progrese

- následek dlouhodobého působení promotorů
- nádory ztrácí závislost na přítomnosti promotoru
- genetické změny

# Metastáze

- šíření primárního (maligního) nádoru do nových tělních lokalizací
- sekundární nádory mohou metastázovat dále
- typický znak maligních nádorů x zdravé buňky mají vymezený anatomický prostor, který neopouštějí

# Model tvorby karcinomů kůže u myši

## Iniciace nádoru

- tvorba abnormálních buněk působením tzv. iniciátorů - chemických činidel (nitrosoguanidin, dimetylbenzantracen)
- důsledek genetických změn (iniciátory nádorů jsou mutageny)
- bezprostřední účinky iniciátorů nejsou zřetelné, kůže zůstává normální

# Model tvorby karcinomů kůže u myši

## Promoce nádoru

- tvorba pre-rakovinných papilomů vyvolaná působením nádorových promotorů (např. 12 tetradecanoyl phorbol-13 acetate - **TPA**) na „iniciovanou“ kůži
- důsledek negenetických změn
- růst papilomů závisí na průběžné aplikaci promotoru (odstranění promotoru - zmenšení papilomů)

# Model tvorby karcinomů kůže u myši

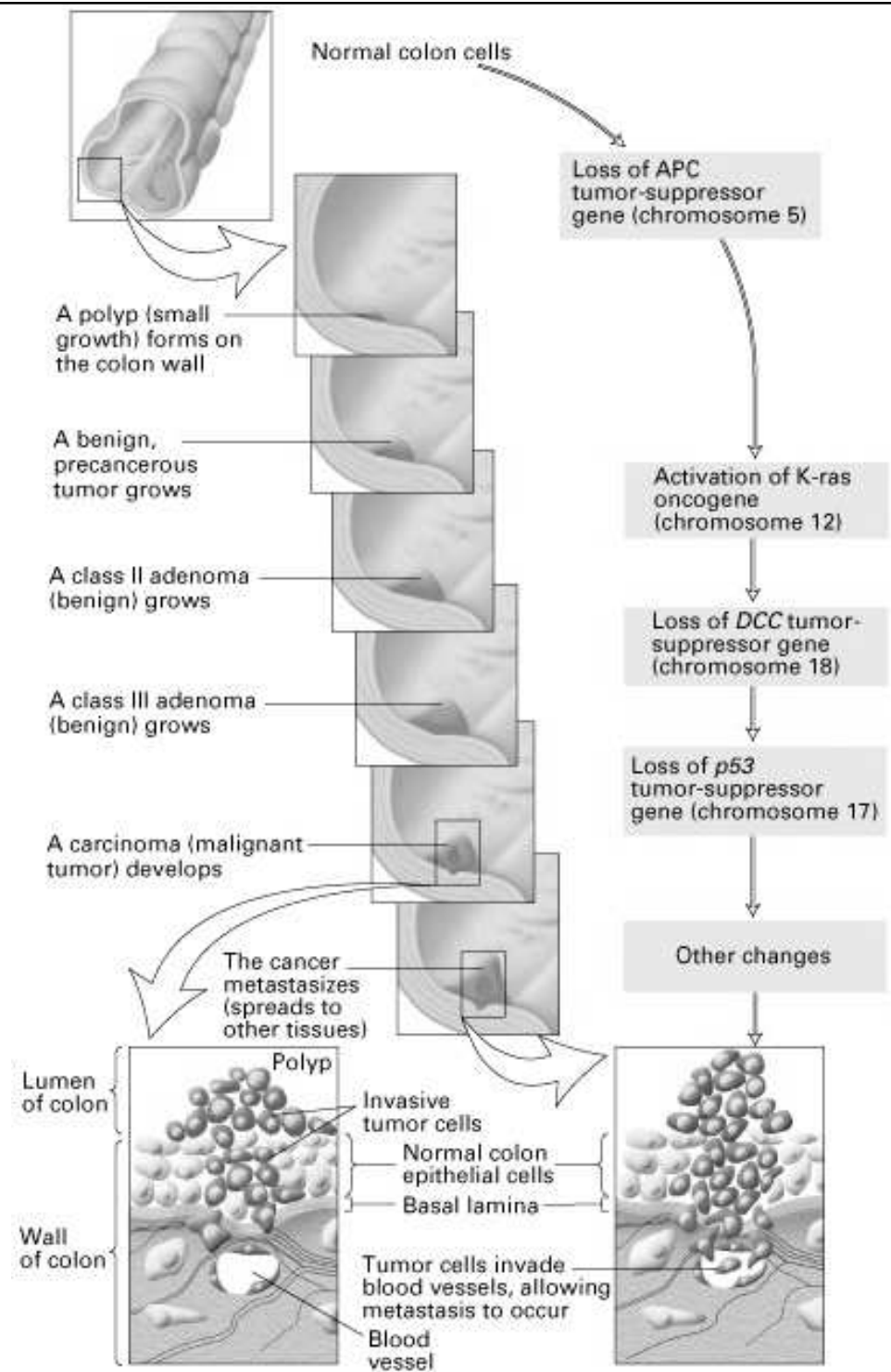
## Maligní konverze/progrese nádoru

- následek dlouhodobého působení promotorů (cca několik měsíců) - konverze papilomů na karcinomy
- karcinomy se od papilomů odlišují histologicky a ztrátou závislosti na průběžné aplikaci promotoru
- nezávislost papilomů na promotorech lze výrazně posílit mutagenními činidly (opět se jedná o genetickou změnu)

## Přeměna zdravé střevní buňky na nádorovou je postupná

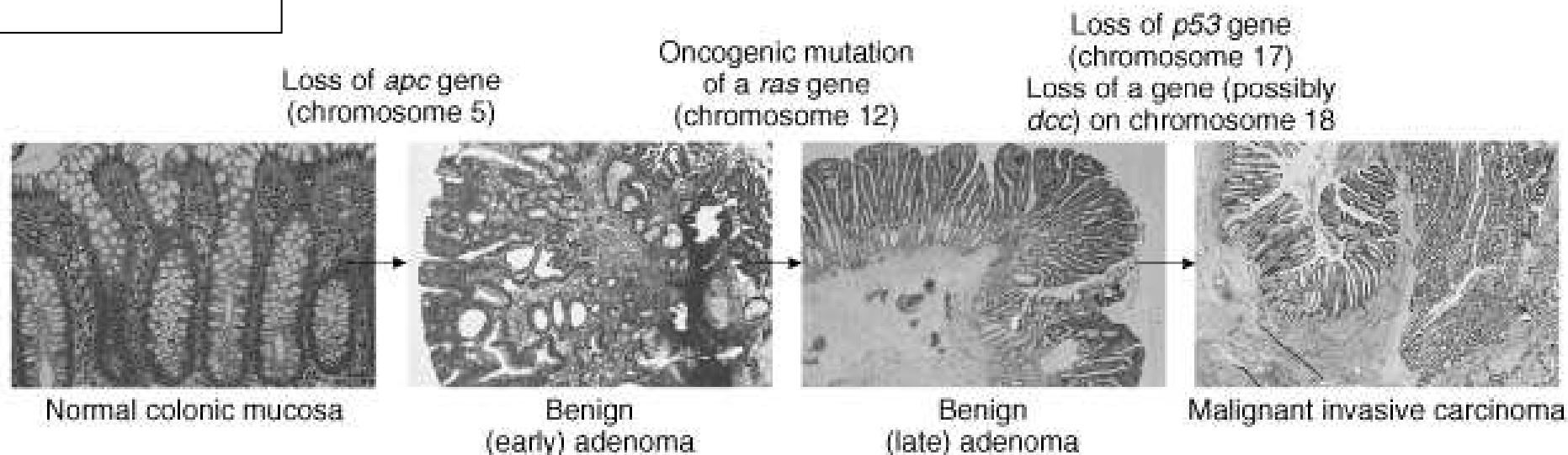
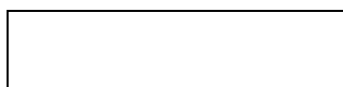
- 1) Ztráta nádorového supresoru **APC** s následkem stabilizace  $\beta$ -kateninu a ovlivnění mezibuněčné adheze: tvorba malého výrůstku - polypa
- 2) Stimulující („gain-of-function“) mutace *ras*: benigní adenom
- 3) Oslabující („Loss-of-function“) mutace nádorových supresorů **DCC** a **p53**; DCC se účastní regulace mezibuněčných kontraktů; p53 je součástí kontrolního bodu monitorujícího stupeň poškození DNA v buněčném cyklu: „late“ adenom a karcinom.

**Zděděné mutace nádorových supresorových genů jsou rizikové**

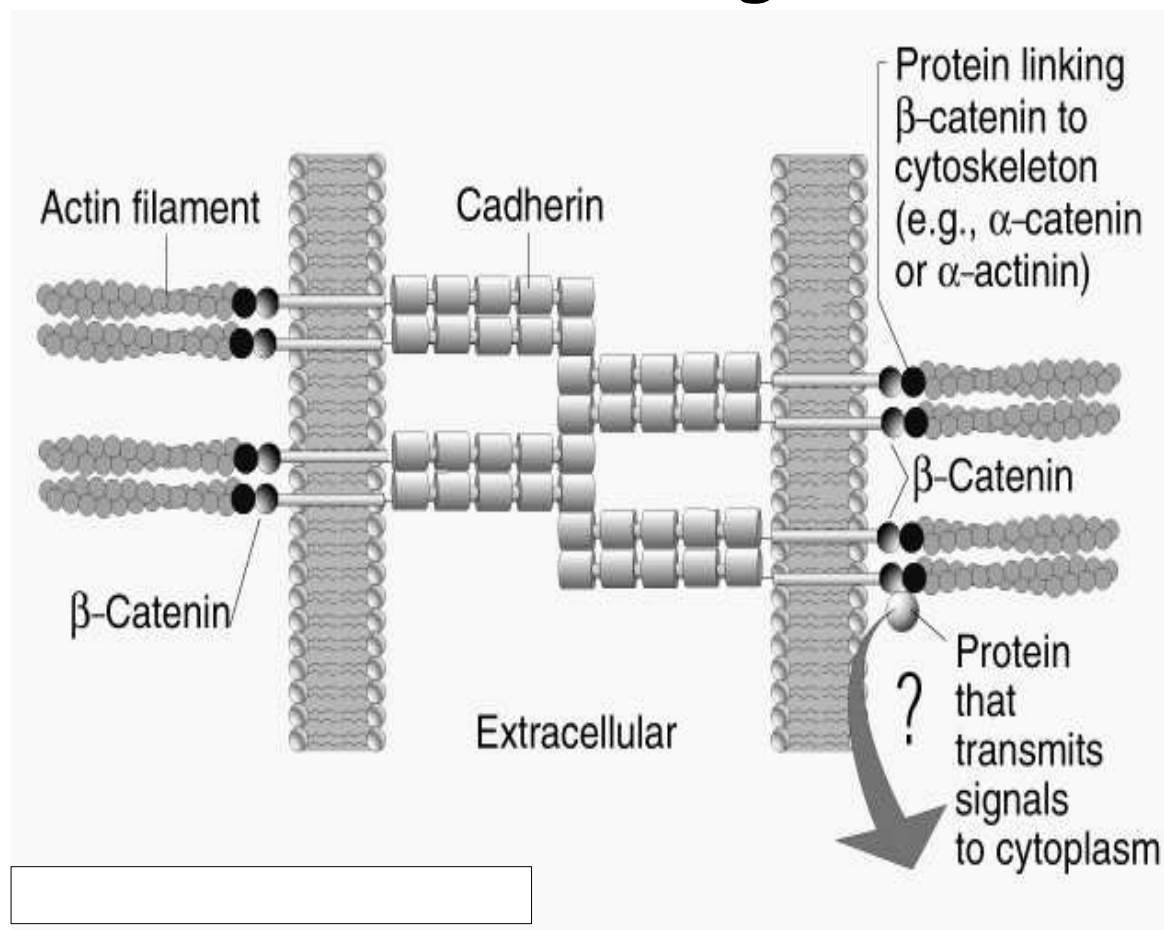


# Model postupných genetických změn vedoucích k zhoubnému nádoru střeva

Každé stádium přeměny je morfologicky distinktní



# Nádor tlustého střeva - signální dráha Wnt

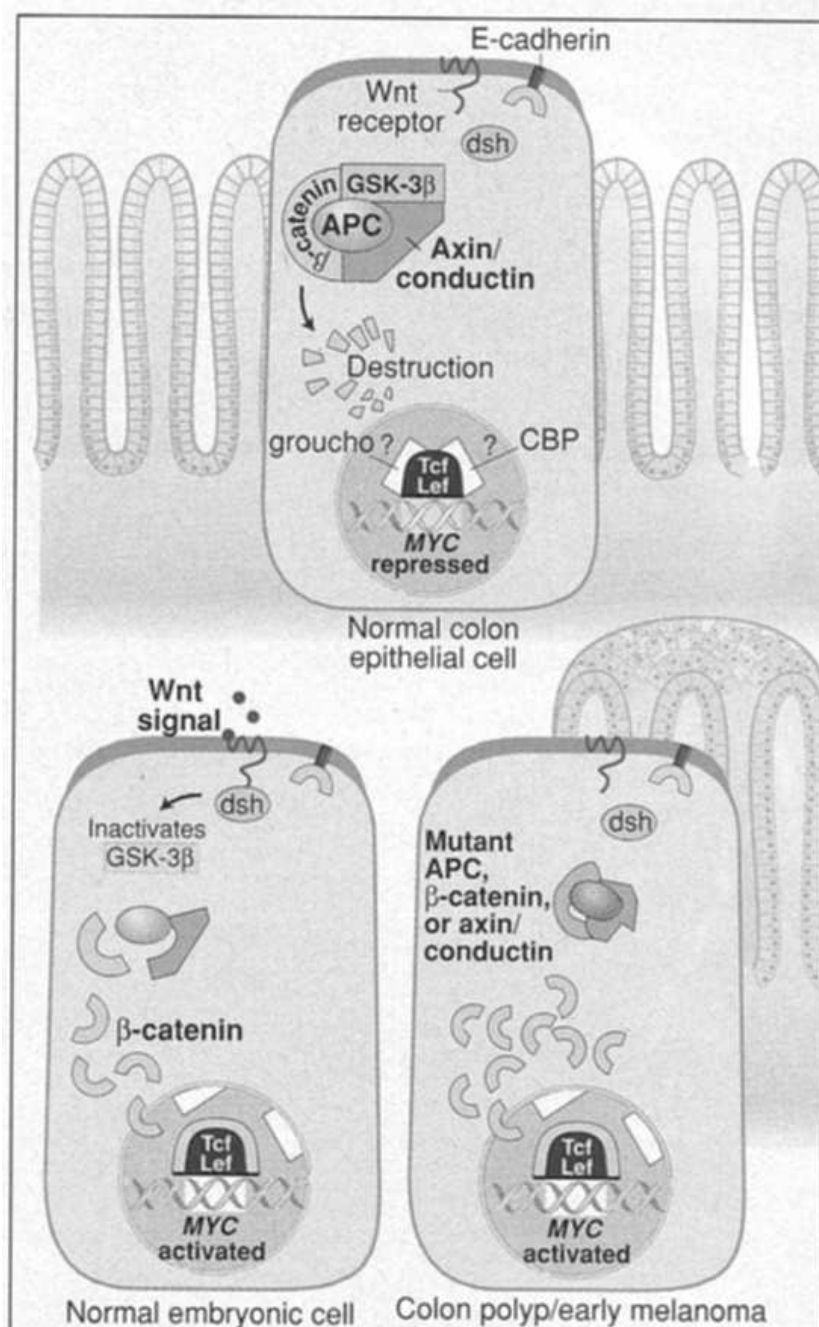


-  $\beta$ -katenin funguje jako esenciální součást adherentních spojů: -  
spojuje E-kadherin a  $\alpha$ -katenin

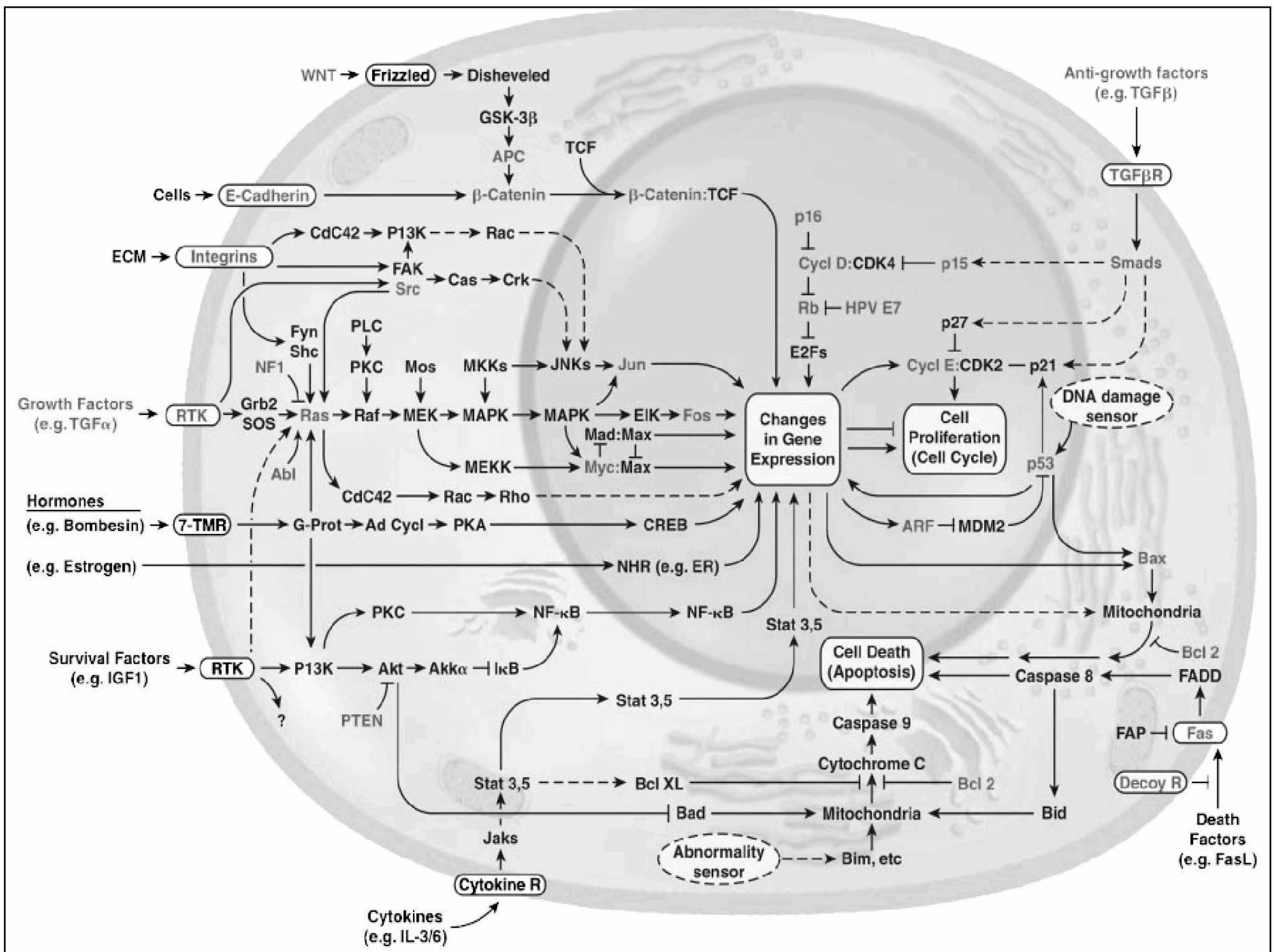
APC může proto kontrolovat mezibuněčnou adhezi.



# Nádor tlustého střeva - signální dráha Wnt



Ztráta APC stabilizuje  $\beta$ -katenin, mění transkripci a může mít vliv na adhezi buněk.



## Signální dráha Wnt/ $\beta$ -katenin: cílové geny

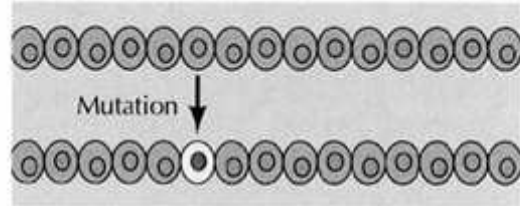
<i>Gene</i>	<i>Organism/system</i>	<i>up/down</i>	<i>Ref.</i>
<i>c-myc</i>	human colon cancer	up	He 1998
<i>Cyclin D</i>	human colon cancer	up	Tetsu 1999 Shtutman 1999
<i>Tcf-1</i>	human colon cancer	up	Roose 1999
<i>PPARdelta</i>	human colon cancer	up	He 1999
<i>c-jun</i>	human colon cancer	up	Mann B, 1999
<i>fra-1</i>	human colon cancer	up	Mann B, 1999
<i>uPAR</i>	human colon cancer	up	Mann B, 1999

Je to tedy další signální dráha kontrolující buněčný cyklus.

# Shrnutí

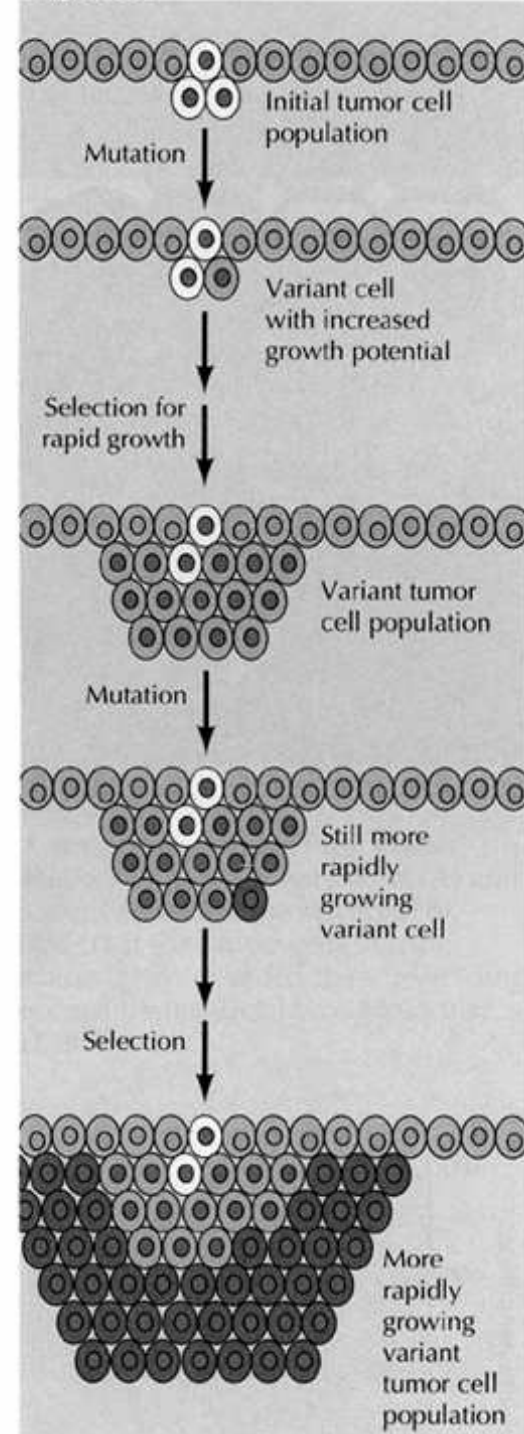
- proces vzniku rakoviny je zahájen v okamžiku, kdy jedna mutovaná buňka začne abnormálně proliferovat
- nádorotvorné procesy jsou urychleny dalšími mutacemi a následnou selekcí rychle rostoucích buněk

**Initiation**



Cell proliferation  
→

**Progression**



# Existuje více než 100 typů rakoviny

- Kolik regulačních okruhů musí být porušeno, aby se buňka zvrhla na nádorovou?
- Jsou tyto regulační okruhy univerzální?
- Které z těchto okruhů jsou autonomní a které jsou závislé na určitých signálech z okolí?
- Je možné, že početné geny spřažené s rakovinou se uplatňují u malého počtu regulačních okruhů?

# Odpovědi

- většina nebo všechny typy rakoviny během svého vývoje získávají řadu obdobných vlastností
- způsoby, jakými se k těmto novým vlastnostem buňka dostává mohou být rozmanité (mutace různých genů)

# Molekulární podstata rakoviny

požadavek vícenásobných mutací v jedné buňce, kompetice s buňkami zdravými, selekce

Aby byla rakovinná buňka úspěšná, mutace jí musí ...

1. Umožnit růst bez ohledu na vnější a vnitřní signály, které ovlivňují proliferaci
2. Umožnit přežít a růst i za přítomnosti signálů vedoucích k apoptóze a/nebo diferenciaci
3. Umožnit únik z rodné tkáně
4. Umožnit přežít a proliferovat i v cizích tkáních
5. Poskytnout genetickou nestabilitu (but not too much!)

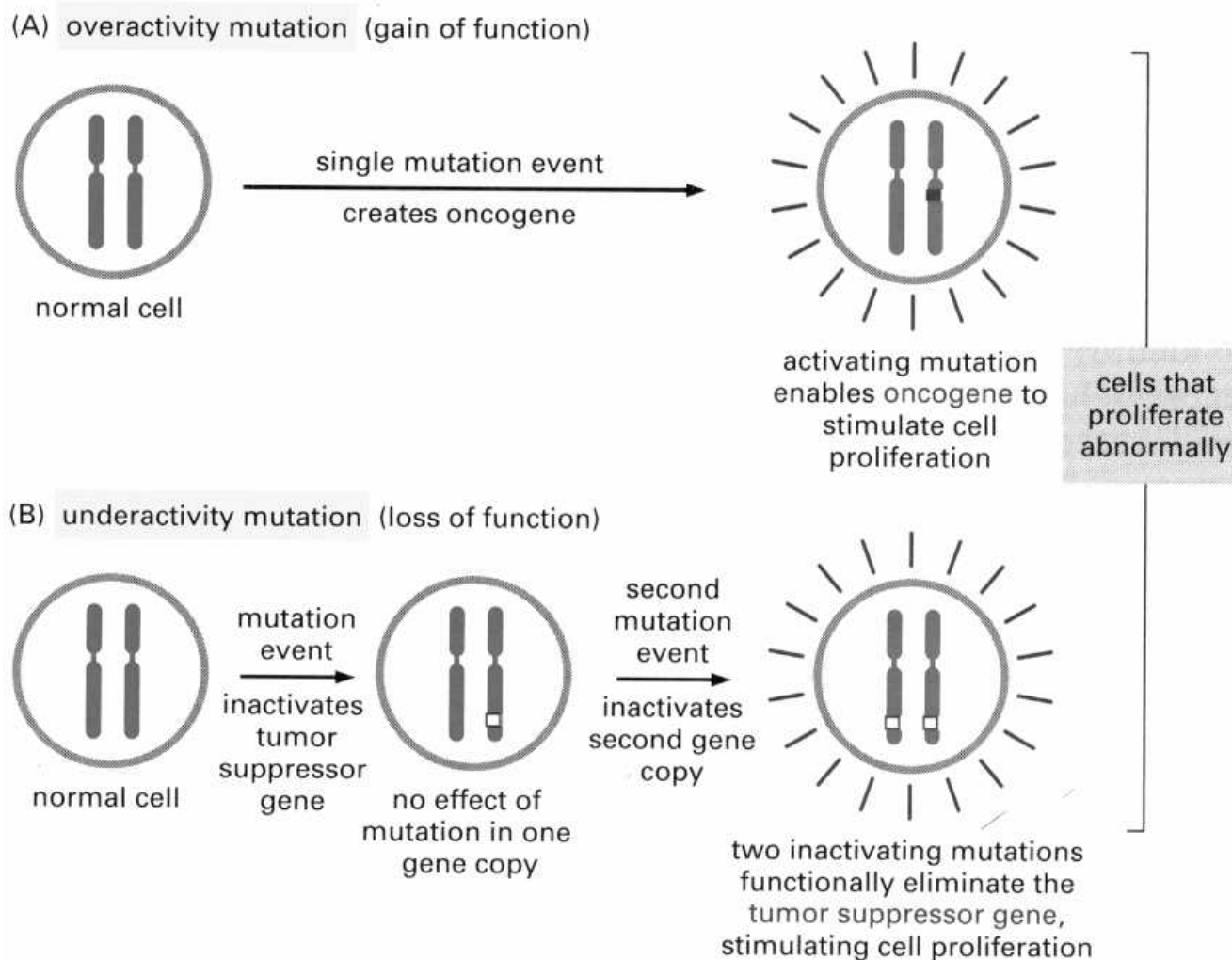


# Které geny jsou při vzniku rakoviny postiženy mutacemi?

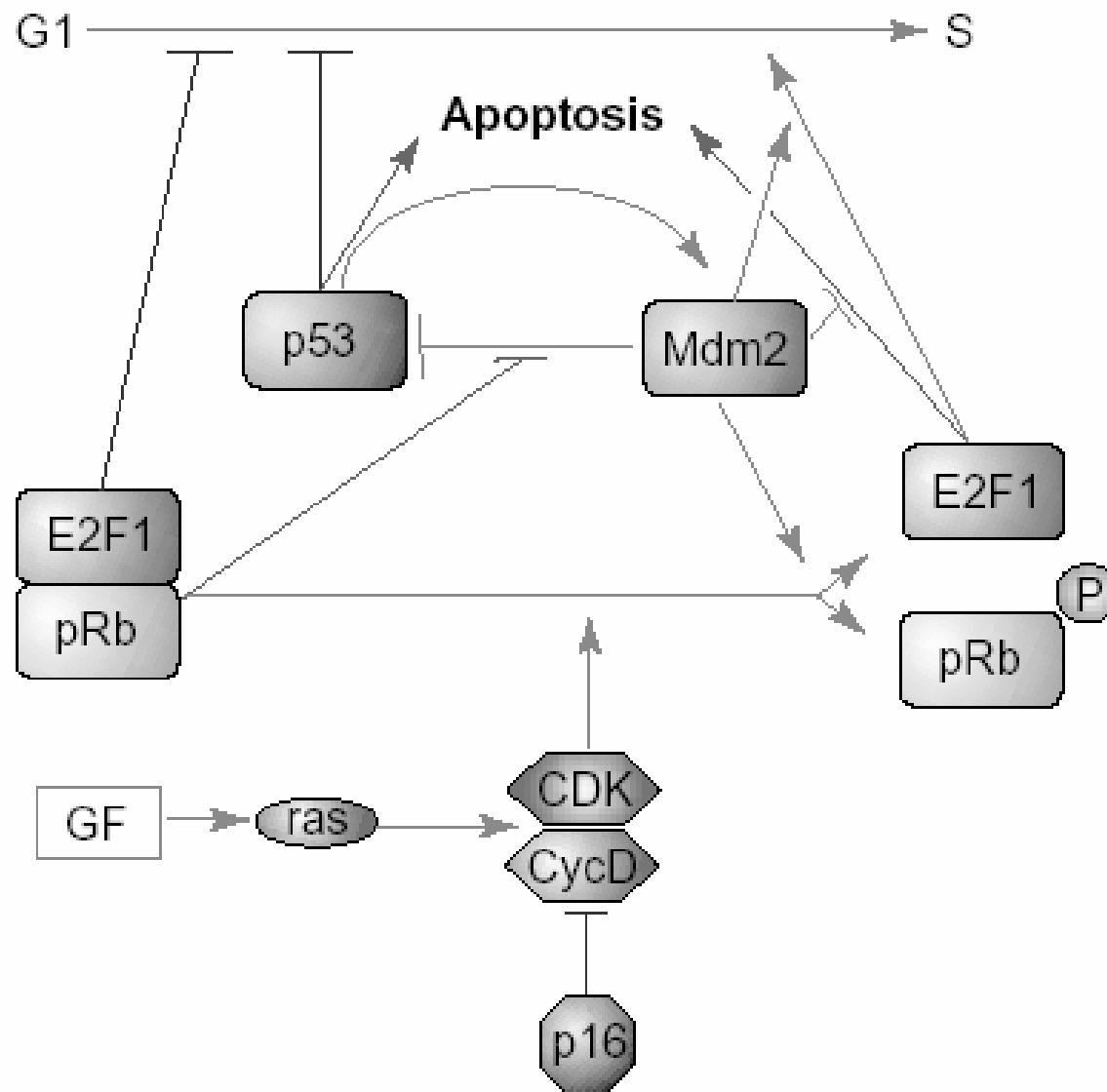
## Onkogeny a nádorové supresory

**Onkogeny** jsou geny, které pozitivně ovlivňují buněčný cyklus (urychlují jej)  
- proliferaci podporují  
dominantní mutace proto-onkogenů

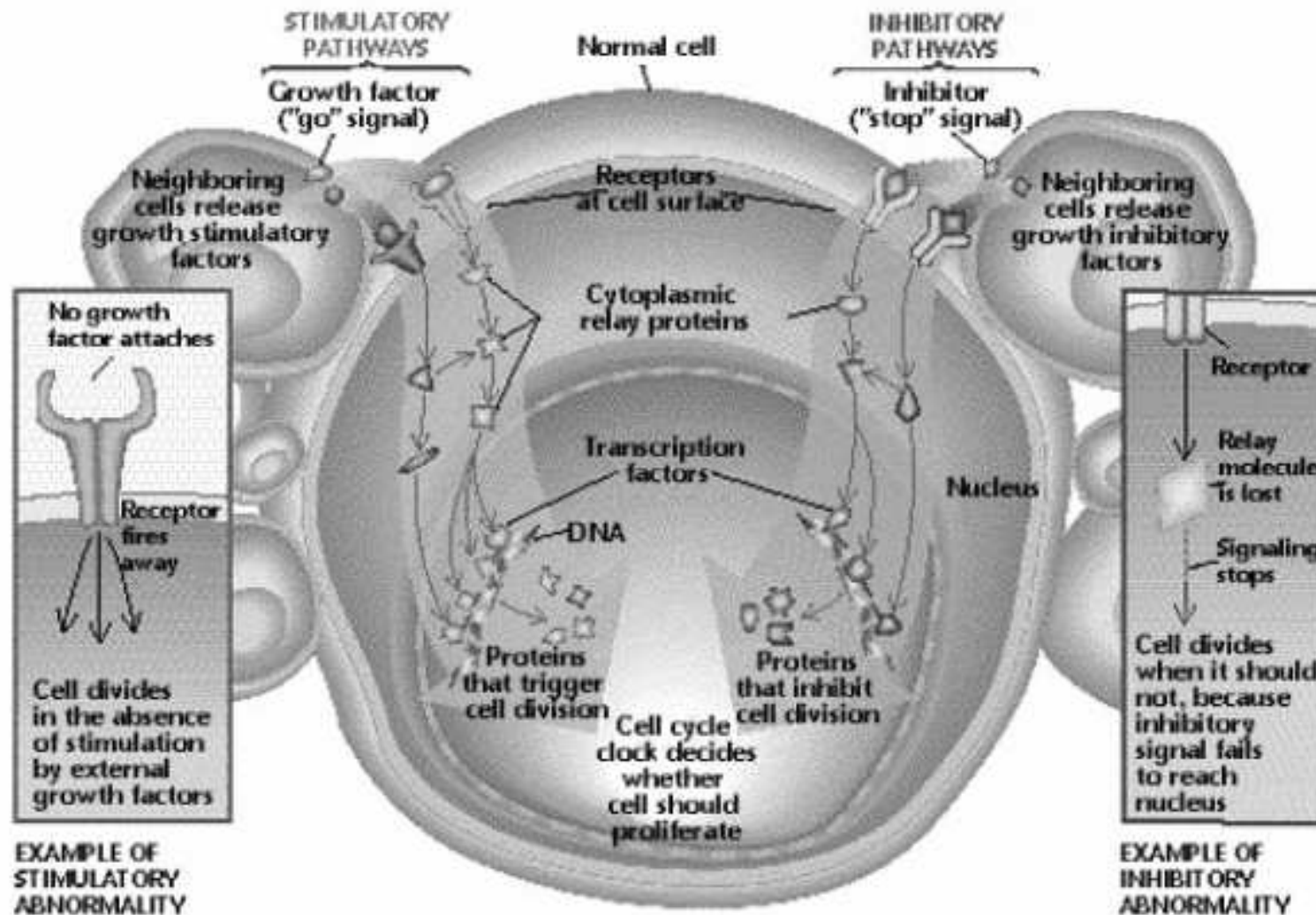
**Nádorové supresory** jsou geny, které negativně ovlivňují buněčný cyklus (zpomalují jej)  
- proliferaci podporují  
recesivní mutace nádorových supresorů



# Kontrola dělení savčích buněk - rovnováha aktivit protoonkogenů a nádorových supresorů



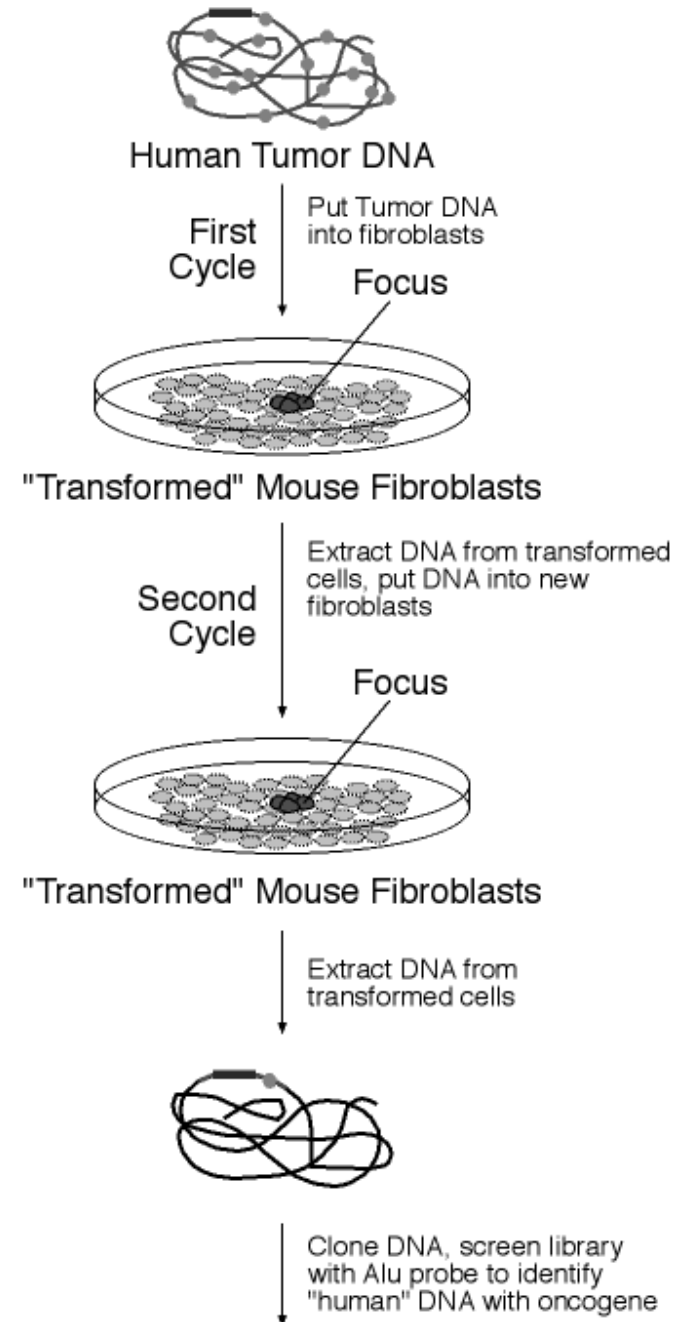
# Poruchy kontroly buněčného dělení jsou dvojího typu



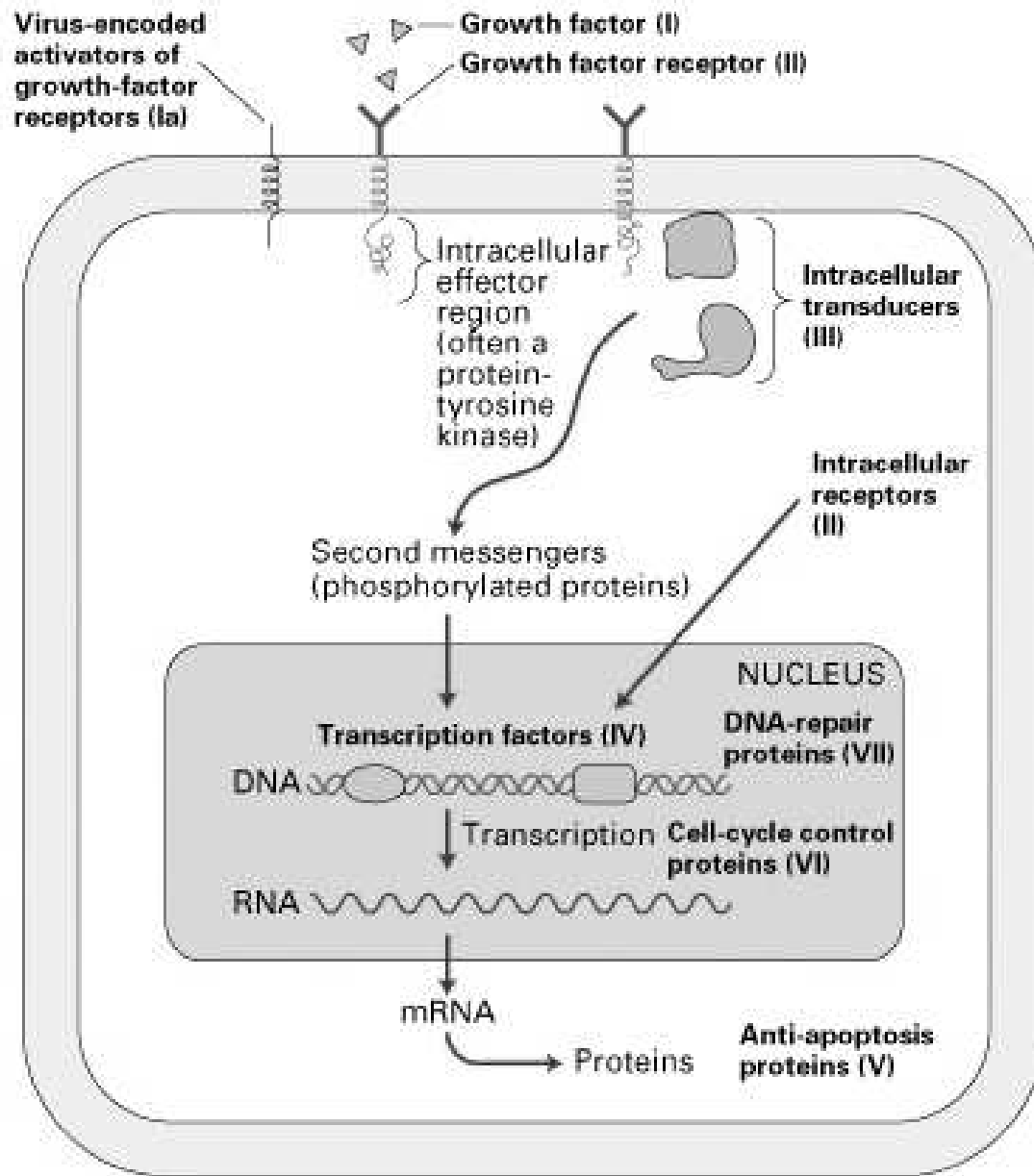
# Onkogeny

- Přirozeně se vyskytují v genomech živočichů v nemutované formě jako protoonkogeny plnící fyziologické funkce, obvykle spojené s růstem a proliferací - např. řízení buněčného cyklu. Mutací nebo aktivací virem se protoonkogeny mění na transformující onkogeny.
- Onkoproteiny se zapojují do rozmanitých signálních drah buňky. Jsou to jednak dráhy mitogenní, ale také dráhy spojené 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 (onkoprotein Ret) nejsou poruchy v onkogenech dědičné a nebývají tedy podstatou „dědičné“ formy rakoviny
- Onkogeny lze detekovat v nádorových virech nebo „klasickým transformačním testem“: transfekcí savčích buněk.

# Jak nalézt onkogeny?

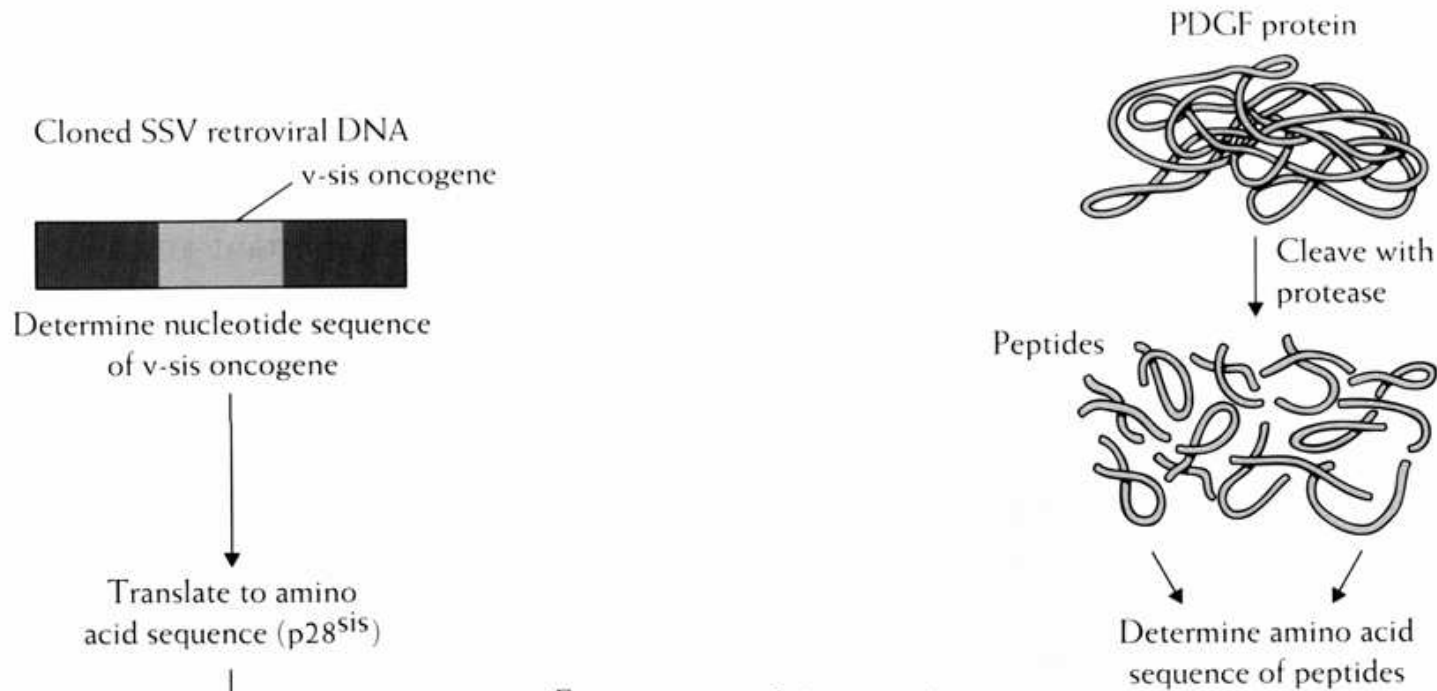


# Protoonkogeny a nádorové supresorové geny kódují proteiny, které se účastní řízení růstu buněk

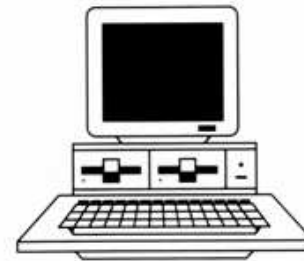


1. Růstové faktory (sis=PDGF)
2. Receptory pro růstové faktory (ErbB=EGF-R)
3. Nitrobuněčné přenašeče (Ras, Src)
4. Transkripční faktory (Myc)
5. Regulátory apoptózy (Bcl2)
6. Proteiny řídící b. cyklus (PRAD1=cyklin D)
7. Proteiny zapojené do oprav DNA

# Onkoprotein Sis je homologem růstového faktoru PDGF



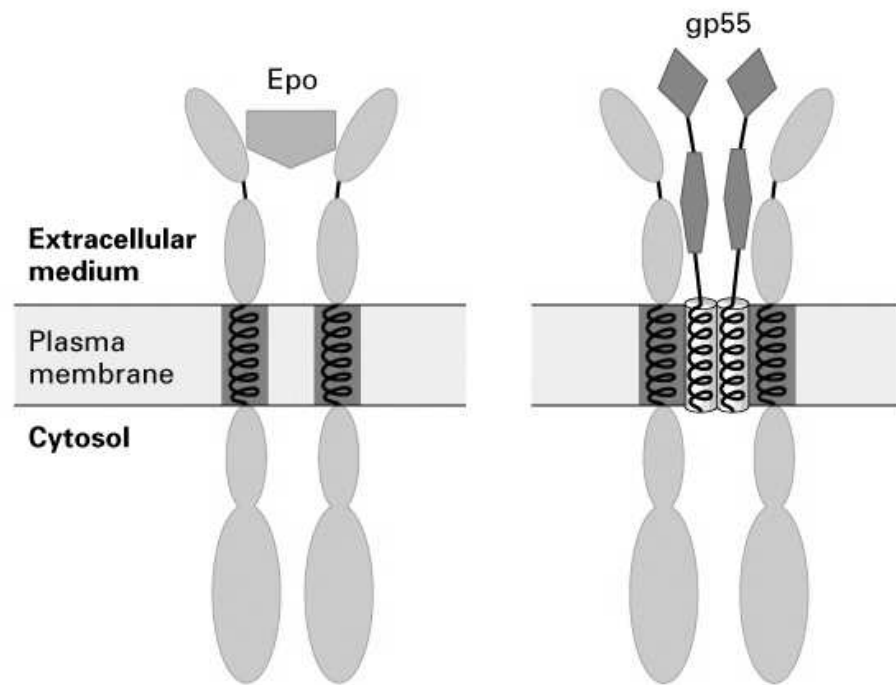
Enter sequences into computer



Computer finds match between p28<sup>Sis</sup> and PDGF

Amino acid number	<p>p28<sup>Sis</sup> 51 RSHSGGELESLARGKRS          PDGF 1 SLGSL TIAEPAMIAECKTR</p>	<p>EVFEISRRLIDR TNANFLVW          DR?????????????PPC</p>	<p>VEVK RCTGCCNRRNVK          CRPSQVQLRP</p>	<p>QVQRKIEIVRKKPIF 150          QVQRKIEIVRK 80</p>	Amino acid number
-------------------------	--	--	--	--	-------------------------

# Aktivátory receptorů pro růstové faktory kódované viry mohou fungovat jako onkoproteiny

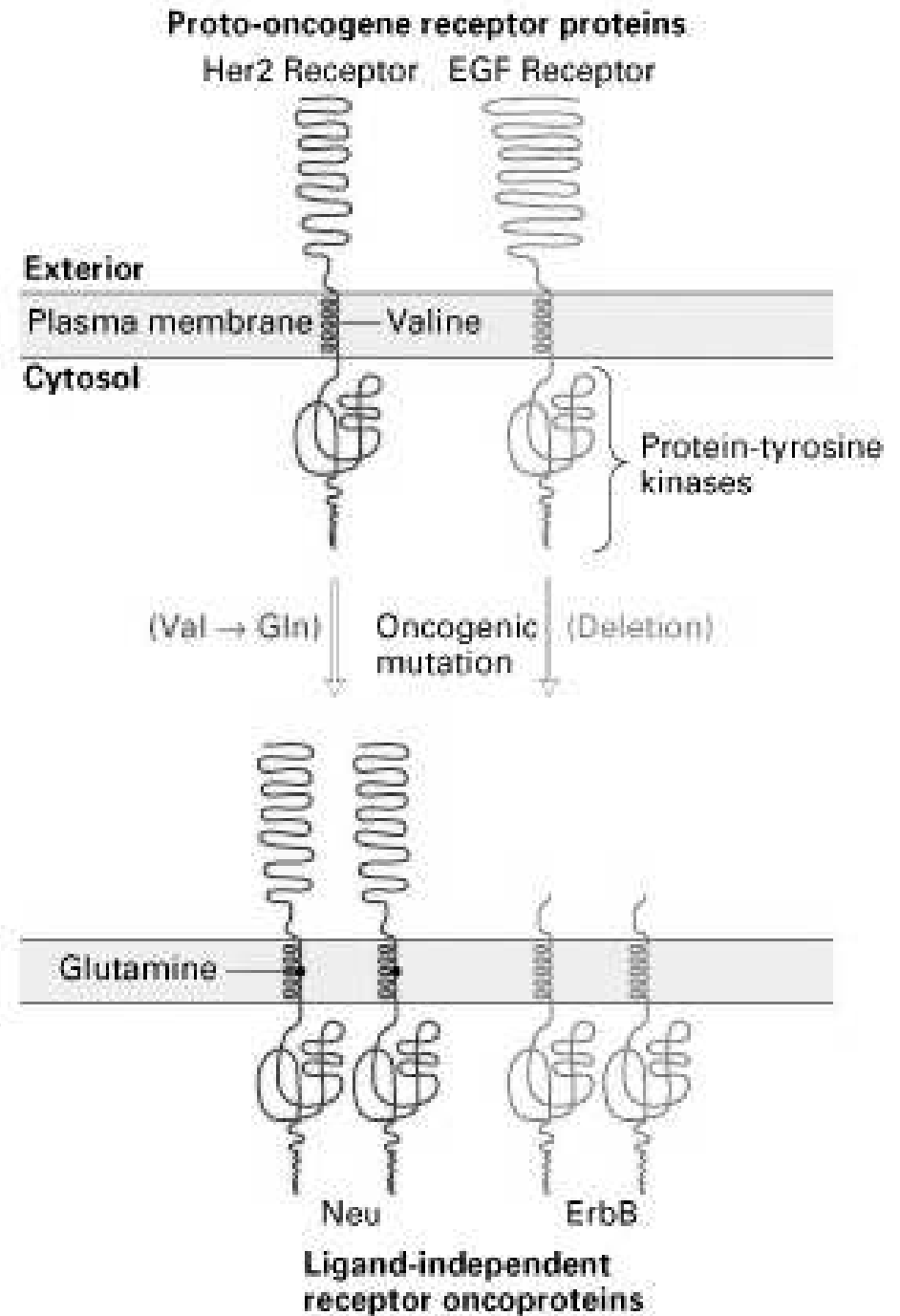


- glykoprotein gp55 retroviru SFFV („spleen focus-forming virus“) indukuje erytroleukémii
- gp55 je transmembránový protein schopný vyvolat dimerizaci a aktivaci receptoru EPO za nepřítomnosti jeho přirozeného ligandu
- vznik nadměrného množství erytrocytů



# Aktivující mutace nebo silná exprese receptorů pro růstové faktory mohou vyvolat transformaci buňky

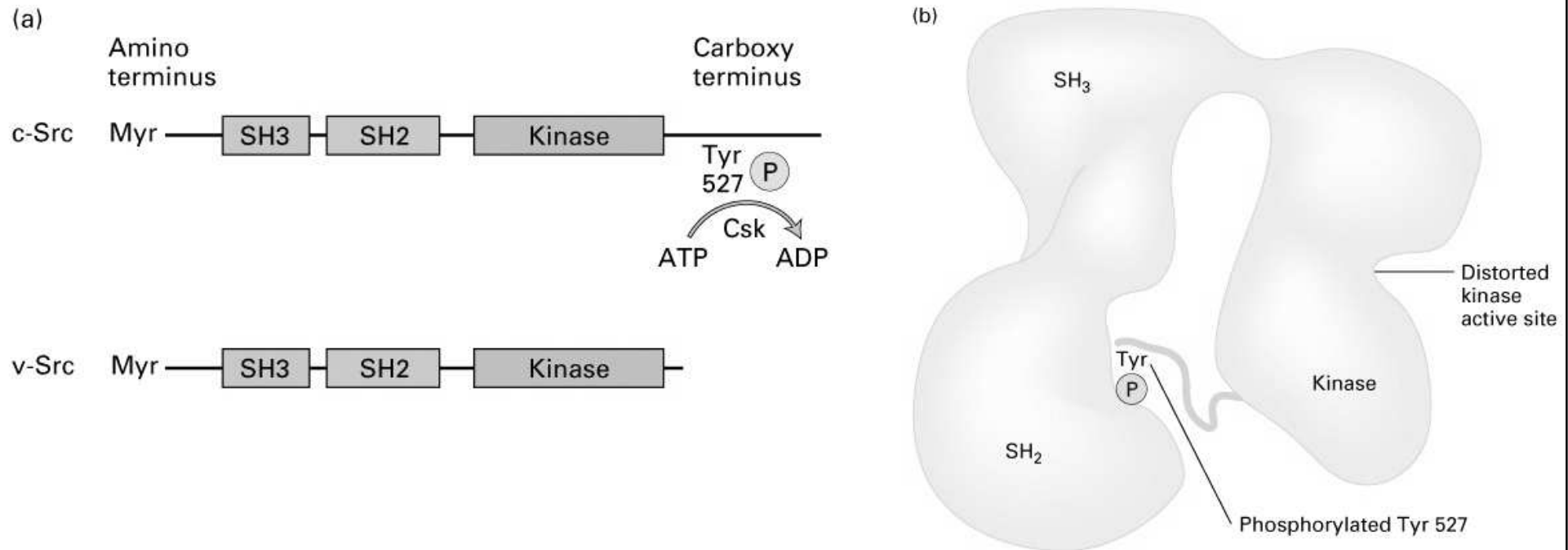
- bodová mutace mění normální receptor Her2 na onkoprotein Neu, který vytváří dimery a vykazuje kinázovou aktivitu i za nepřítomnosti ligandu
- delece domény pro vazbu ligandu receptoru pro EGF způsobuje vznik konstitutivně aktivní dimerizující formy (ErbB)



Monoklonální protilátky specifické pro Her2 jsou pozoruhodně účinné při léčbě určité skupiny nádorů prsu, které vykazují vysokou produkci Her2.

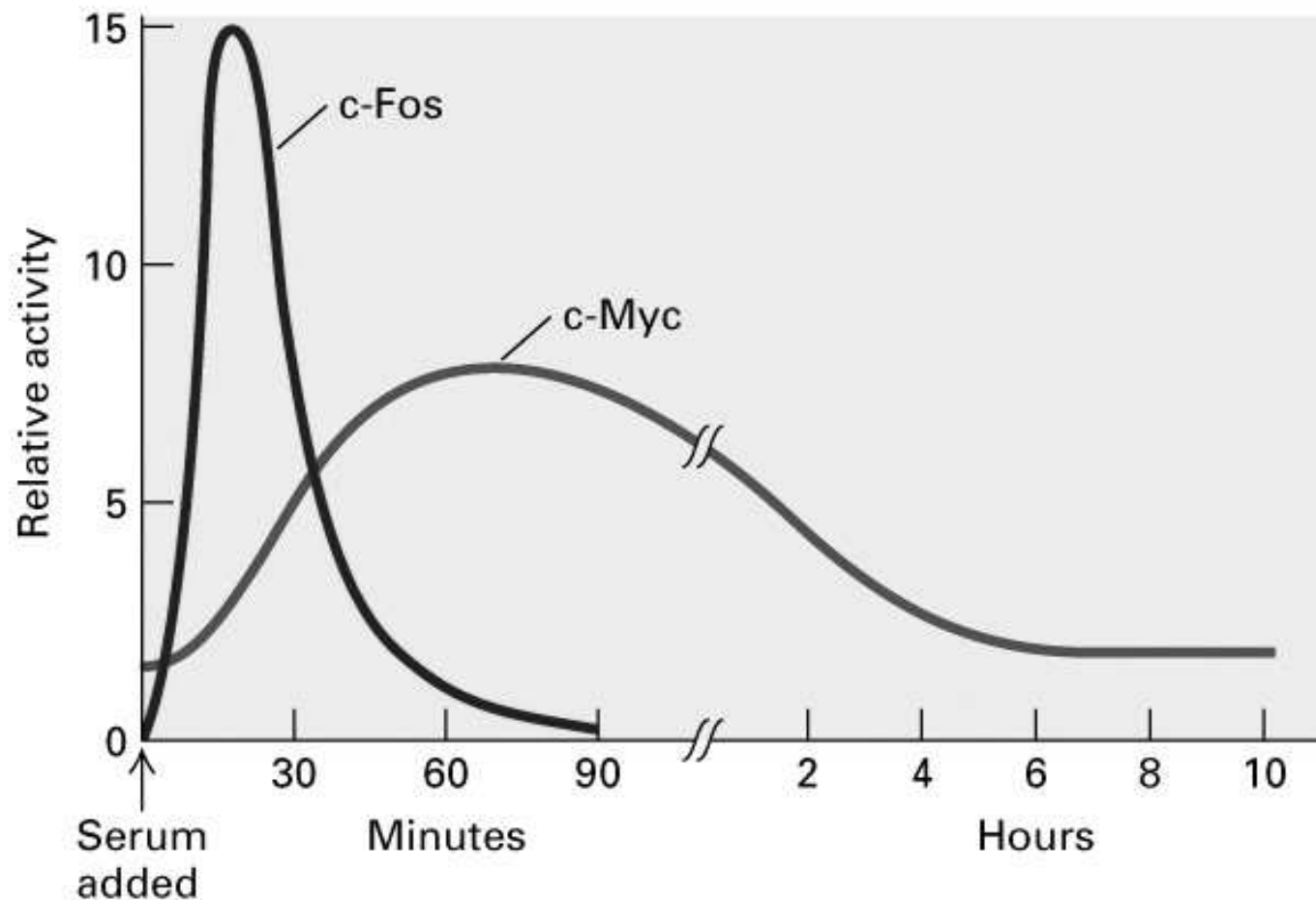
Protilátky se injikují do krve a vážou se na Her2 a selektivně zabíjejí nádorové buňky, aniž by ovlivnily okolní zdravou tkáň

# Onkogeny často kódují konstitutivně aktivní proteiny zapojené do přenosu signálů



- Kinázová aktivita c-Src je inhibována fosforylací Tyr 527 (6. AA od C-konce) kinázou Csk
- 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

# Transformaci může vyvolat neadekvátní exprese jaderných transkripčních faktorů



# Tři možné způsoby přeměny protoonkogenů na onkogeny:

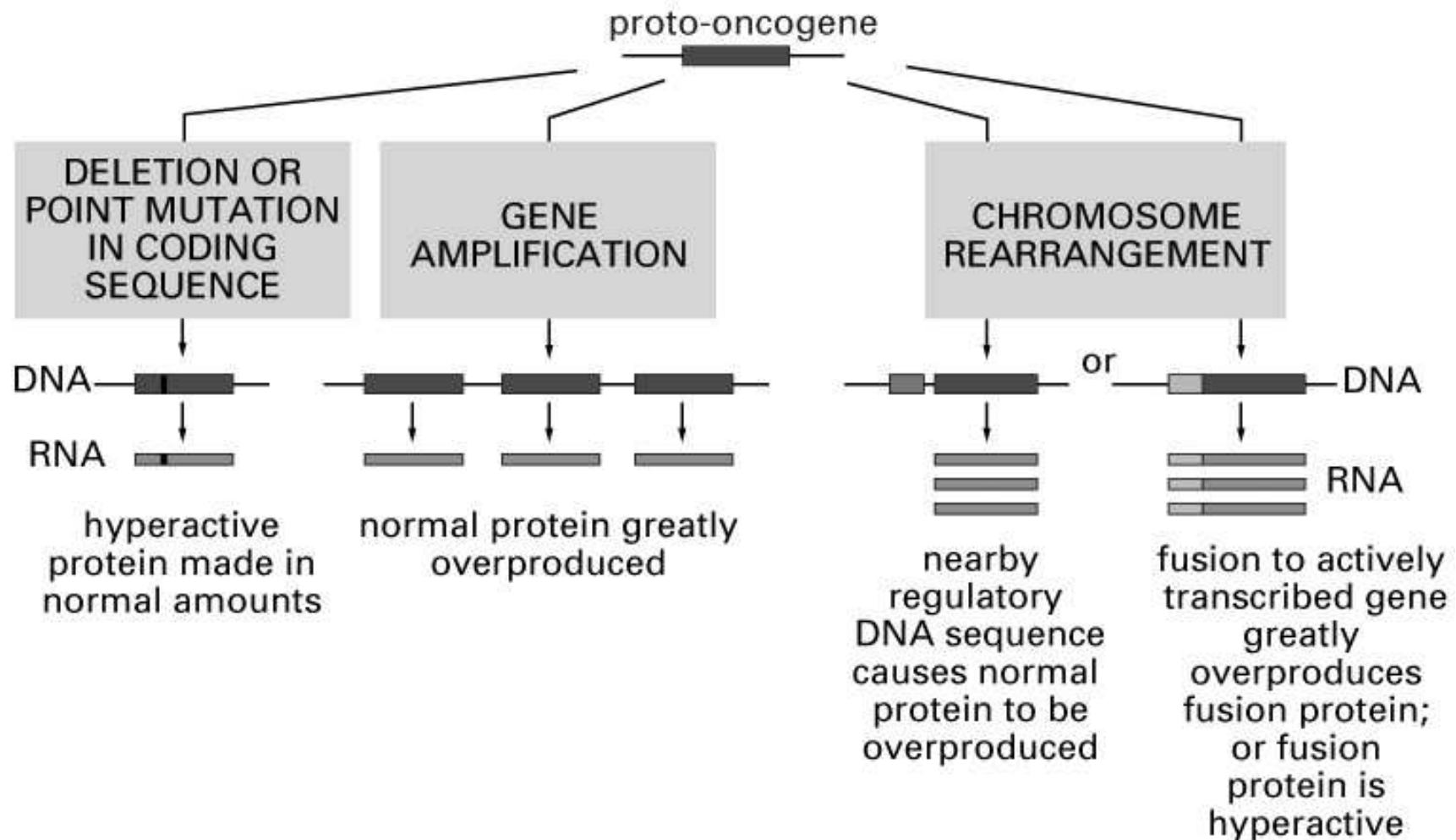
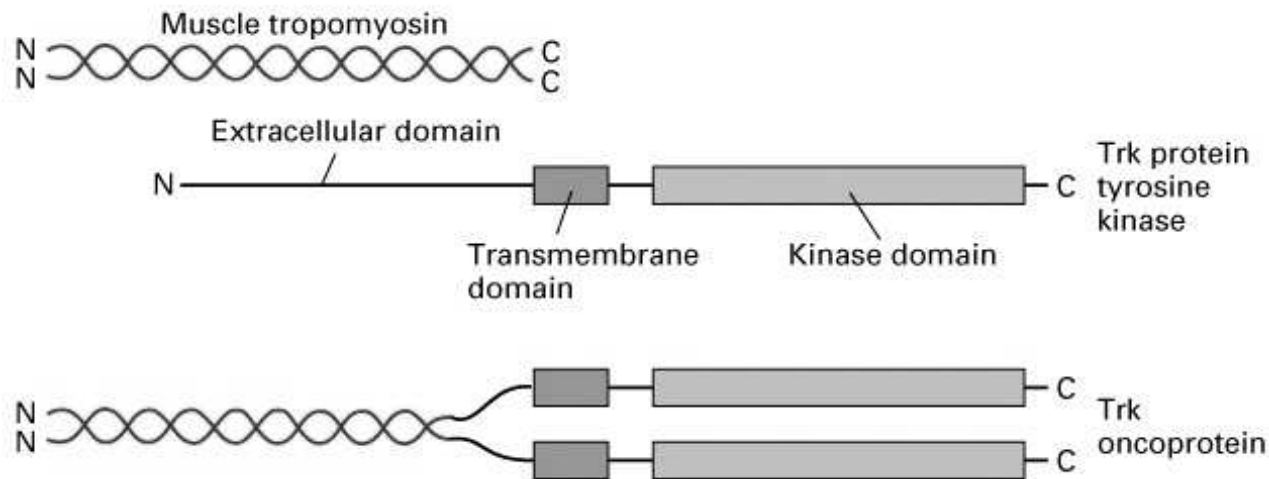


Figure 23-27. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.

# Chromozomální translokací může vzniknout transformující onkoprotein (proteinová chiméra)



## Protein Trk

- receptorová tyrosin kináza
- lokalizace na buněčném povrchu
- váže nervový růstový faktor

## Onkoprotein Trk

- izolován z karcinomu tlustého střeva
- produkt translokace: nahrazení sekvencí kódujících mimobuněčnou doménu Trk sekvencemi kódujícími N-konec tropomyosinu
- translokovaný tropomyosin zajistí dimerizaci
- konstitutivní aktivita
- lokalizace v cytozolu

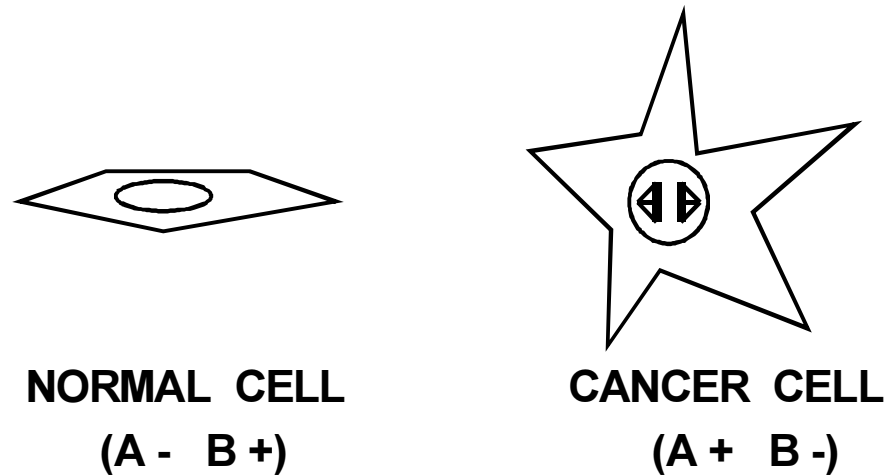
## Posilující („gain-of-function“) mutace mění protoonkogeny na onkogeny

Onkogeny byly původně nalezeny u transformujících retrovirů

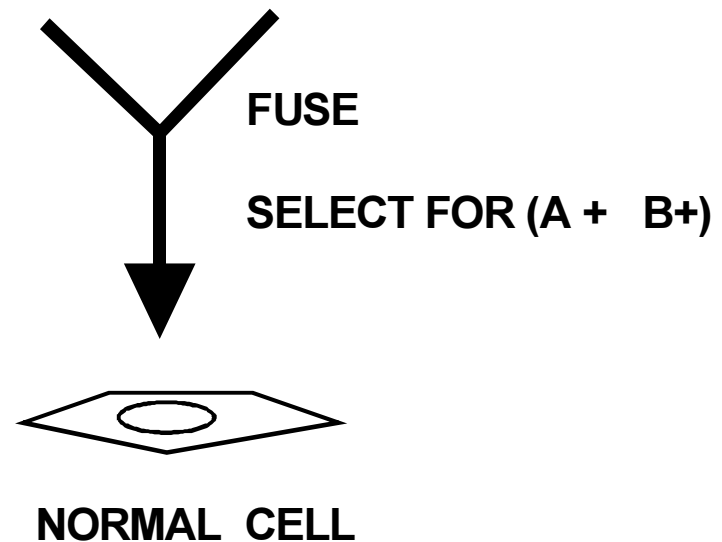
- Virus Rousova sarkomu (RSV) obsahuje gen (*src*), který se uplatňuje při vzniku rakoviny, ale nezajišťuje žádnou virovou funkci
- normální buňky obsahují příbuzný gen, který kóduje tyrosin kinázu
- normální gen (*c-src*) je protoonkogen, virový gen (*v-src*) je onkogen, kódující konstitutivně aktivní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

DNA viry také obsahují onkogeny, ale ty se uplatňují jako přirozené regulátory virové replikace (nemají buněčné protějšky)

# Transformace je recesivní



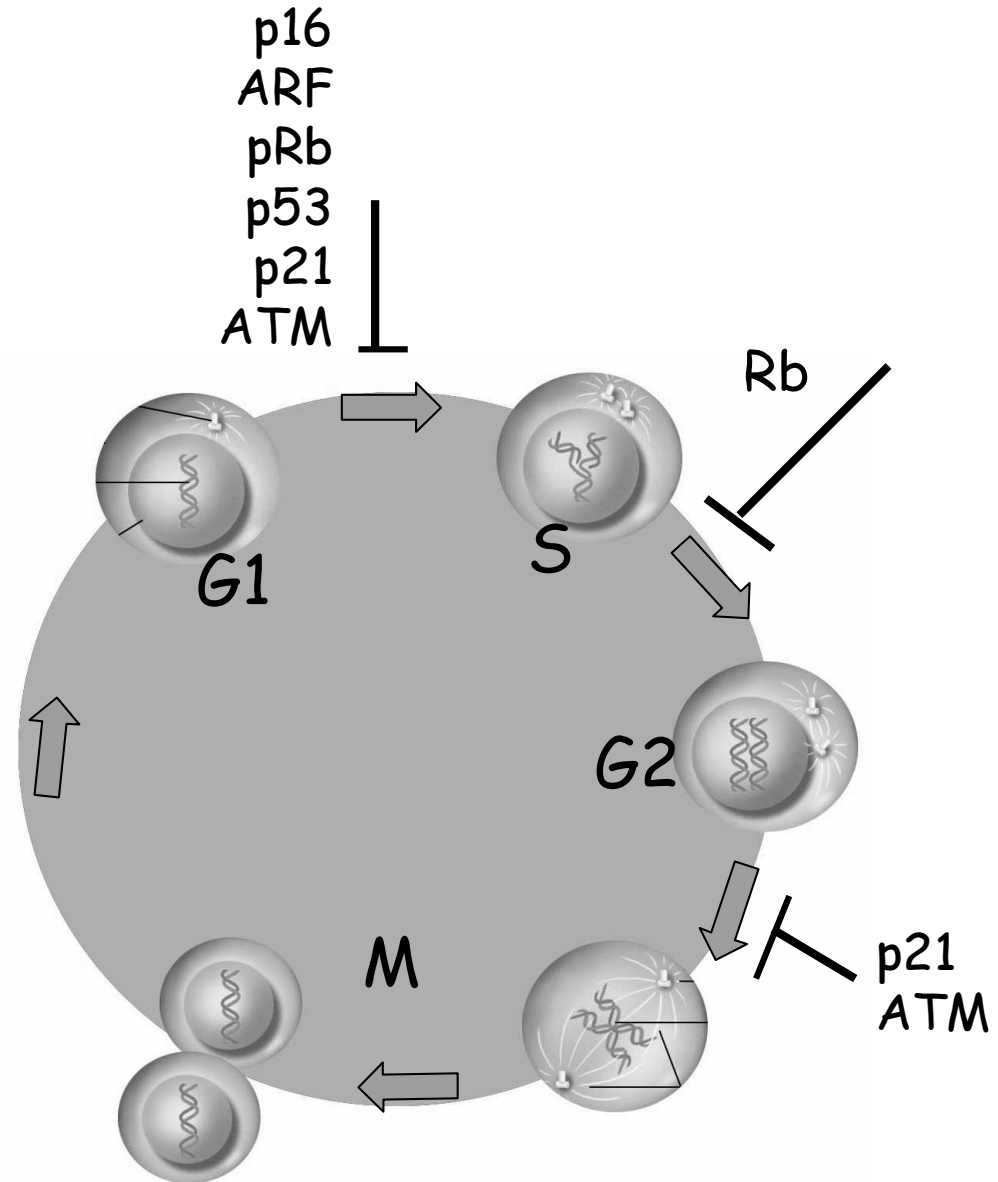
Vznik skutečných lidských nádorů se většinou nedá vysvětlit pouhou aktivací onkogenů



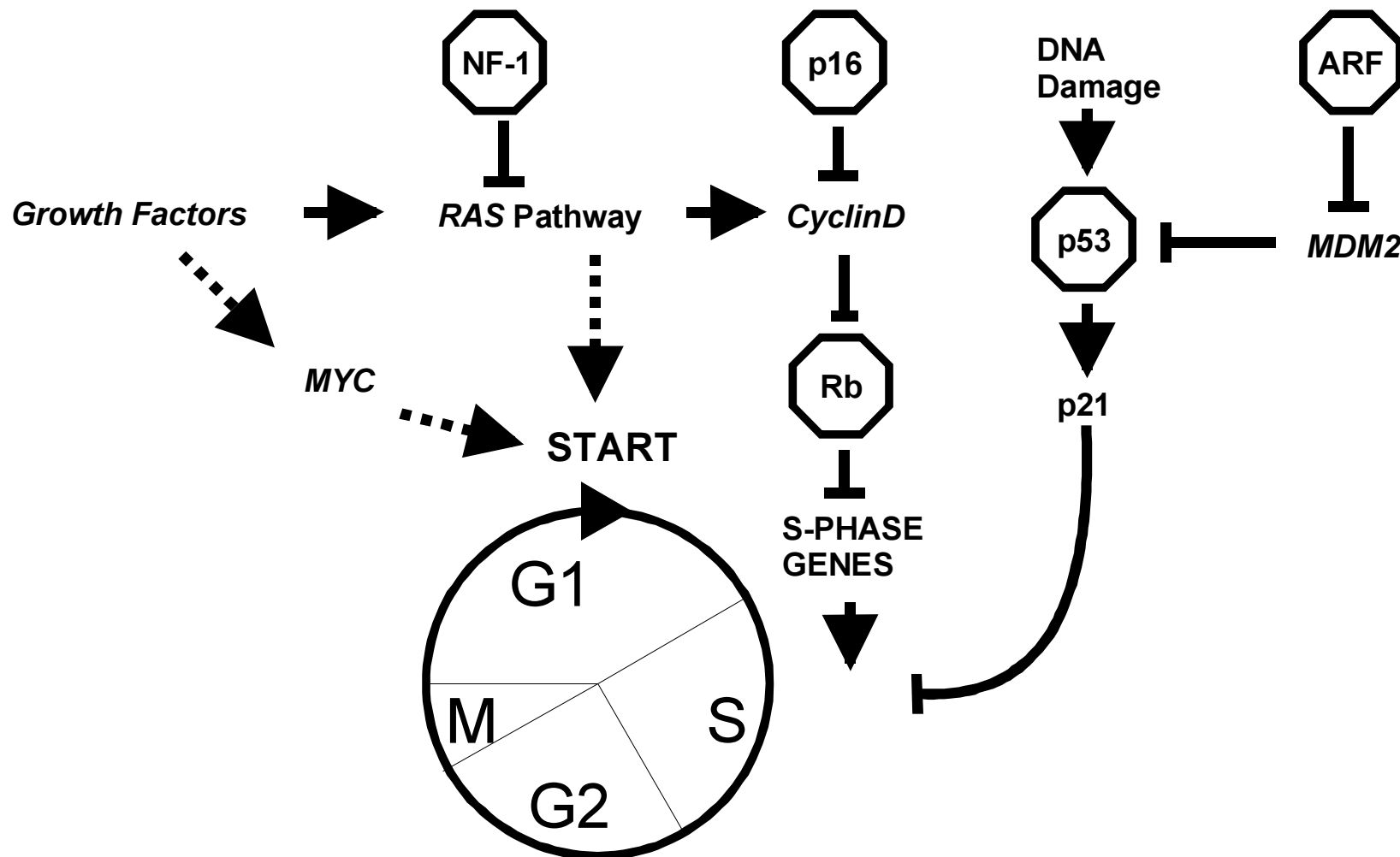


# Inaktivující („loss-of-function“) mutace nádorových supresorových genů jsou onkogenní

Většina nádorových supresorů funguje jako negativní regulátory buněčného cyklu



# Nádorové supresory a buněčný cyklus

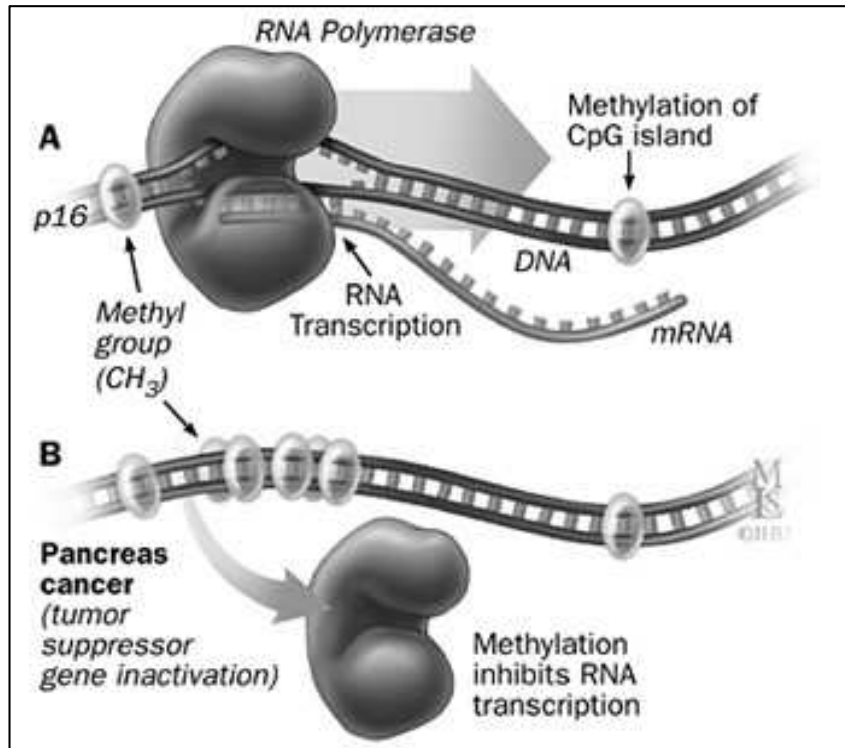


# Funkce nádorových supresorů

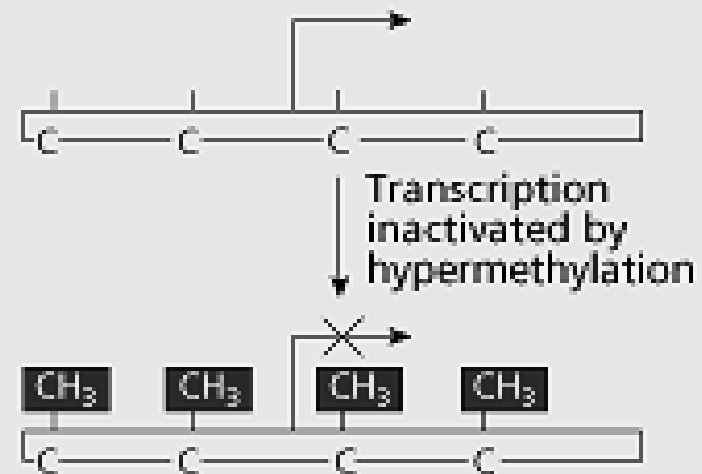
- negativní regulátory buněčného cyklu (Rb, p16)
- negativní regulátory buněčných signalizací (WT-1 inhibuje EGR-1; NF-1 inhibuje RAS)
- pozitivní regulátory mezibuněčné adheze (APC, DCC)
- složky aparátu rozeznávajícího poškození DNA a reparačního aparátu (p53, MSH2, MLH1)

# Nádorové supresory mohou být inaktivovány různými způsoby

např. metylací DNA



## Silencing tumour suppressor genes



eg *p16* in solid tumours, *p15* in acute leukaemia

Key



Nádorové supresory, které jsou mutované u vzácných familiálních rakovinných syndromů jsou často mutovány u nedědičných forem rakoviny

- příklady z nádorů tlustého střeva
  - *p53* postihuje mutace v 70% sporadických nádorů tlustého střeva
  - *APC* postihuje mutace v 70% sporadických nádorů tlustého střeva
  - *MSH2* postihuje mutace v 15% sporadických nádorů tlustého střeva

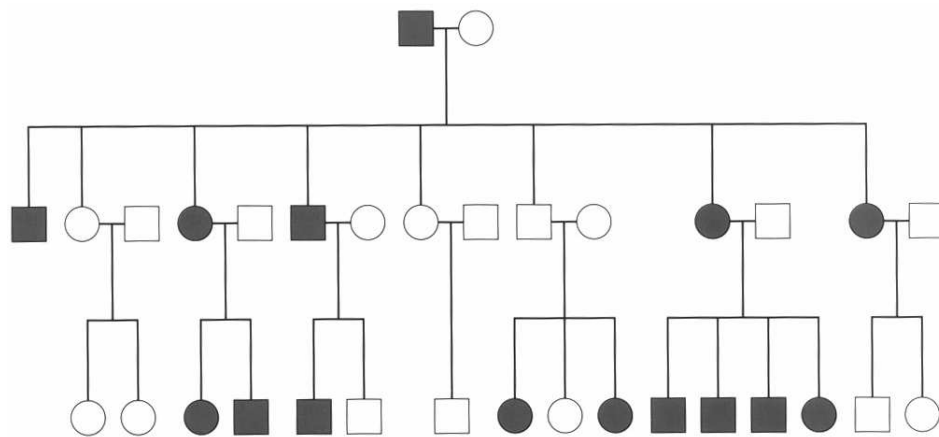
**První nádorový supresorový gen byl nalezen u pacientů s dědičným retinoblastomem**



# Retinoblastom

Na obrázku je rodokmen rodiny s dědičnou formou retinoblastomu, může se ale vyskytovat i tzv. „sporadicky“.

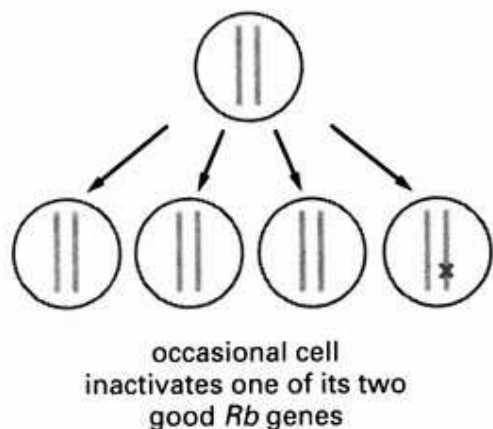
Na základě výskytu obou forem tohoto nádoru Knudson došel k závěru, že pro vznik retinoblastomu je potřeba 2 genetických změn.



	Familiální	Sporadický
Frekvence	1:1	1:30,000
Počet nádorů	mnoho	1
Postižené oči	obě	1
První detekce	brzká	pozdní

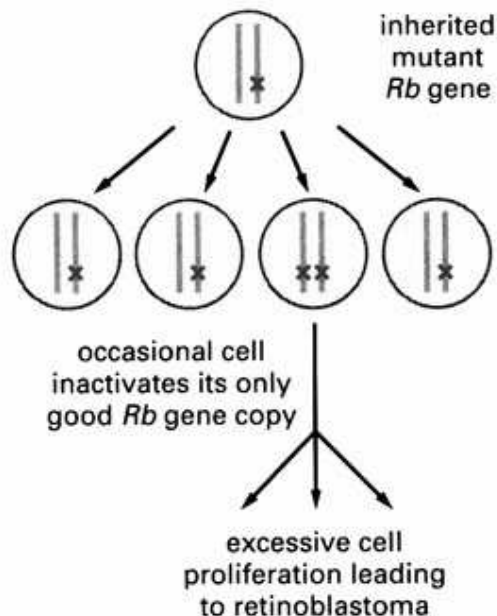
# Mutace inaktivující Rb. Člověk, který zdědil mutaci Rb v heterozygotní podobě je predisponován k rakovině (retinoblastom je častý v dětském věku)

NORMAL, HEALTHY INDIVIDUAL



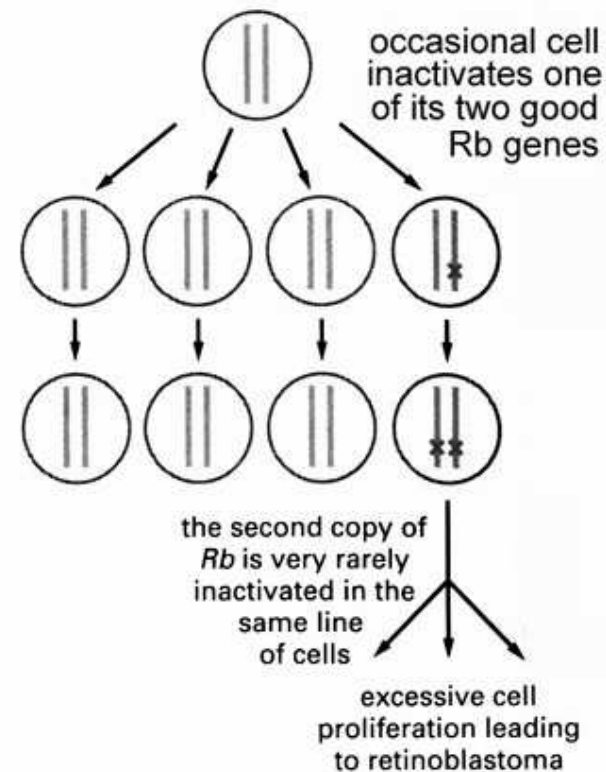
RESULT: NO TUMOR

HEREDITARY RETINOBLASTOMA



RESULT: MOST PEOPLE WITH INHERITED MUTATION DEVELOP TUMOR

NONHEREDITARY RETINOBLASTOMA

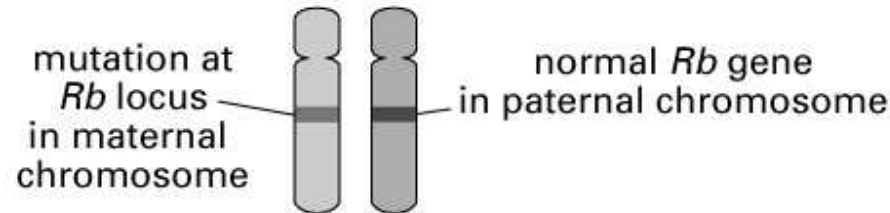


RESULT: ONLY ABOUT 1 IN 30,000 NORMAL PEOPLE DEVELOP TUMOR

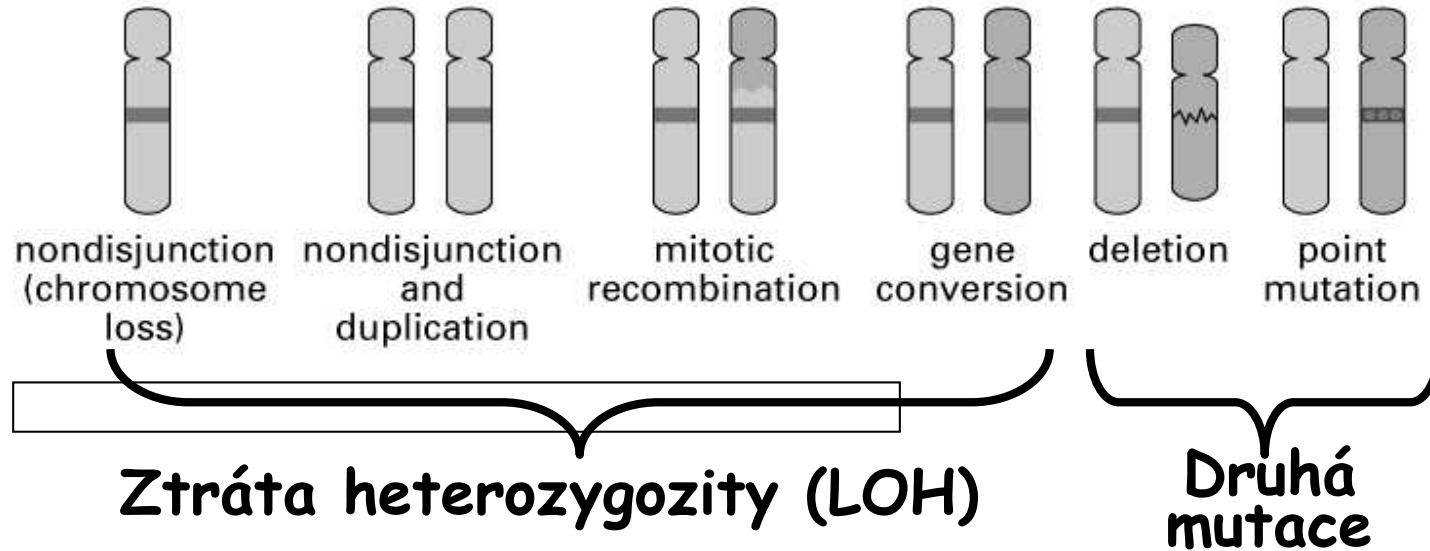


# Různé způsoby inaktivace zbývající „zdravé“ alely Rb

HEALTHY CELL WITH ONLY 1 NORMAL *Rb* GENE COPY



POSSIBLE WAYS OF ELIMINATING NORMAL *Rb* GENE

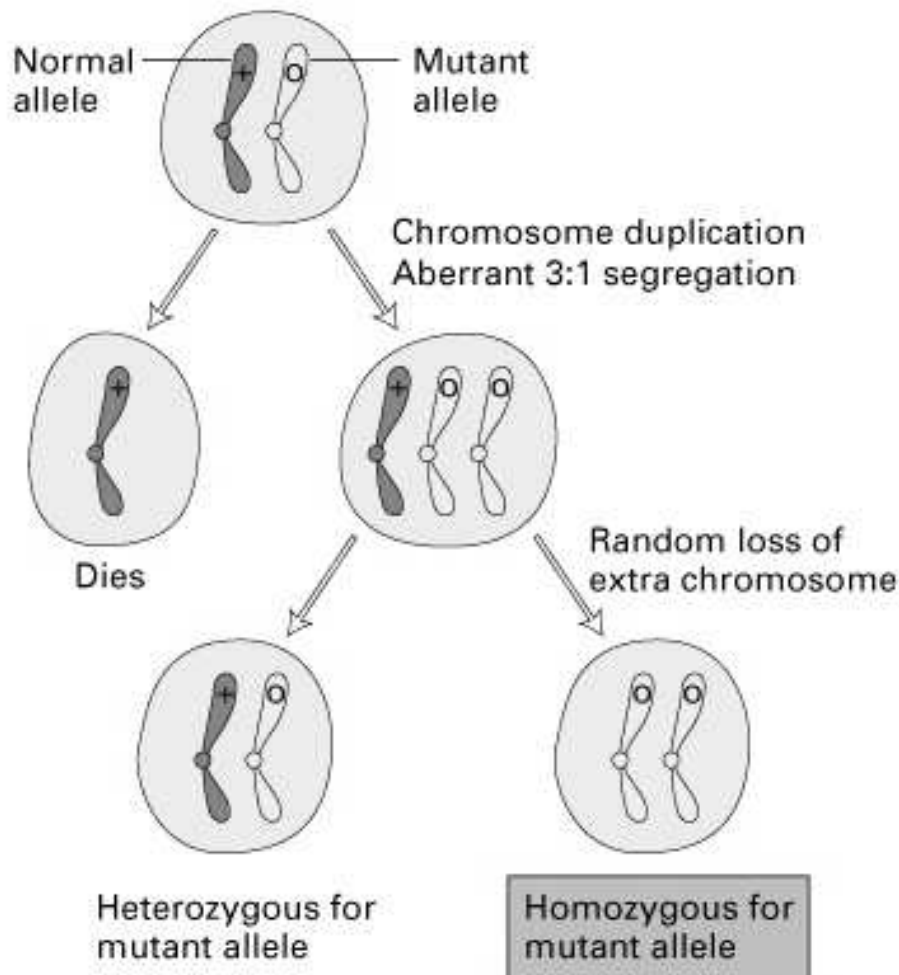


další možností je, že dojde ke ztrátě exprese 'zdravé' alely

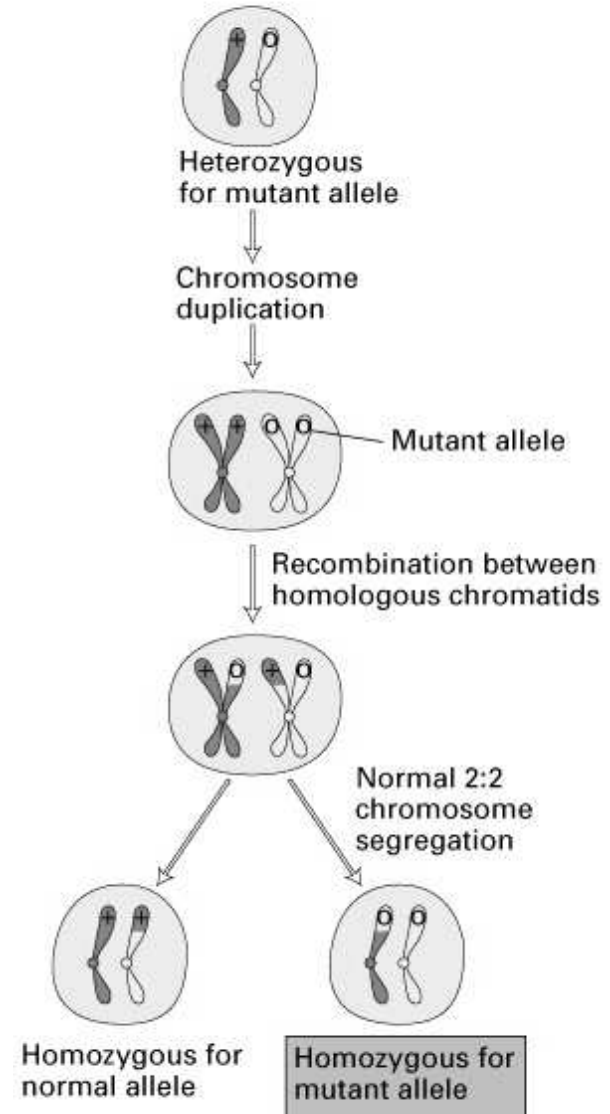
**Konečný výsledek** - úplná ztráta aktivity nádorového supresorového proteinu

# Ztráta heterozygoty („loss of heterozygosity“, LOH) nádorových supresorových genů často nastává chybnou segregací nebo mitotickou rekombinací chromozomů

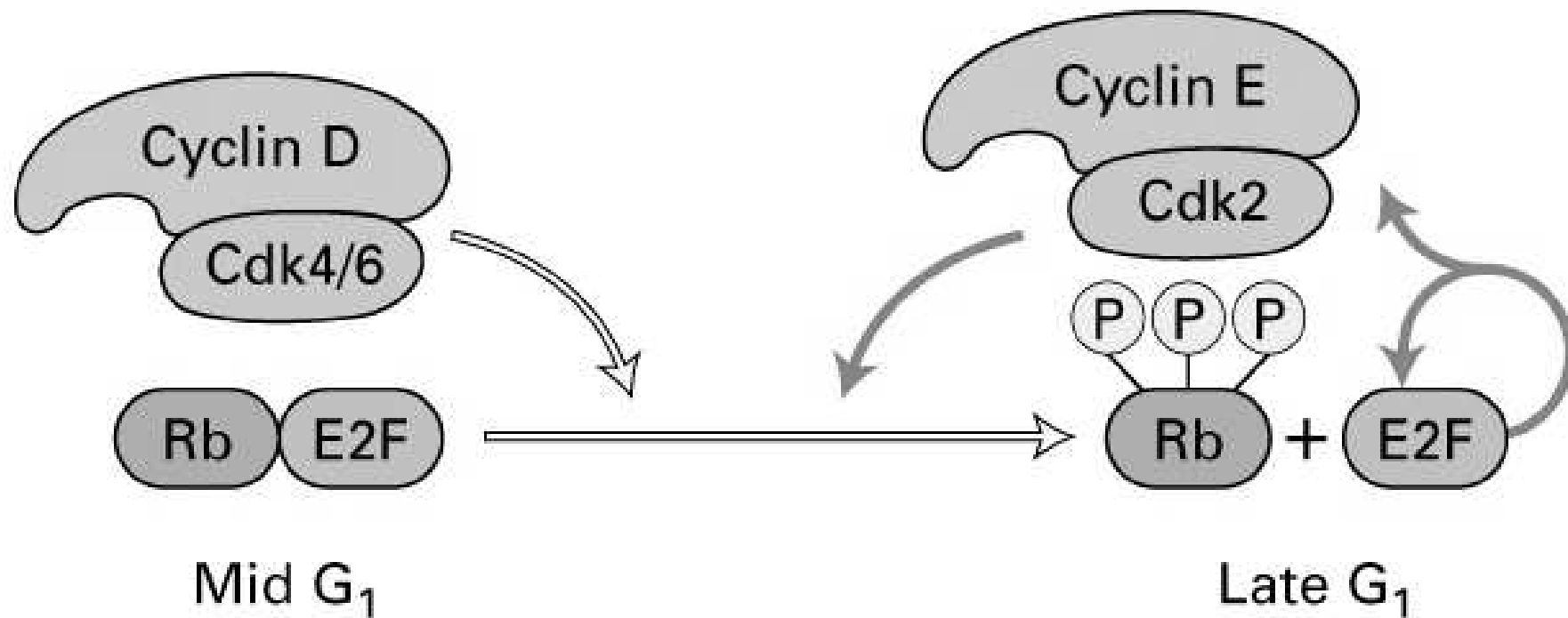
(a) Missegregation



(b) Mitotic recombination

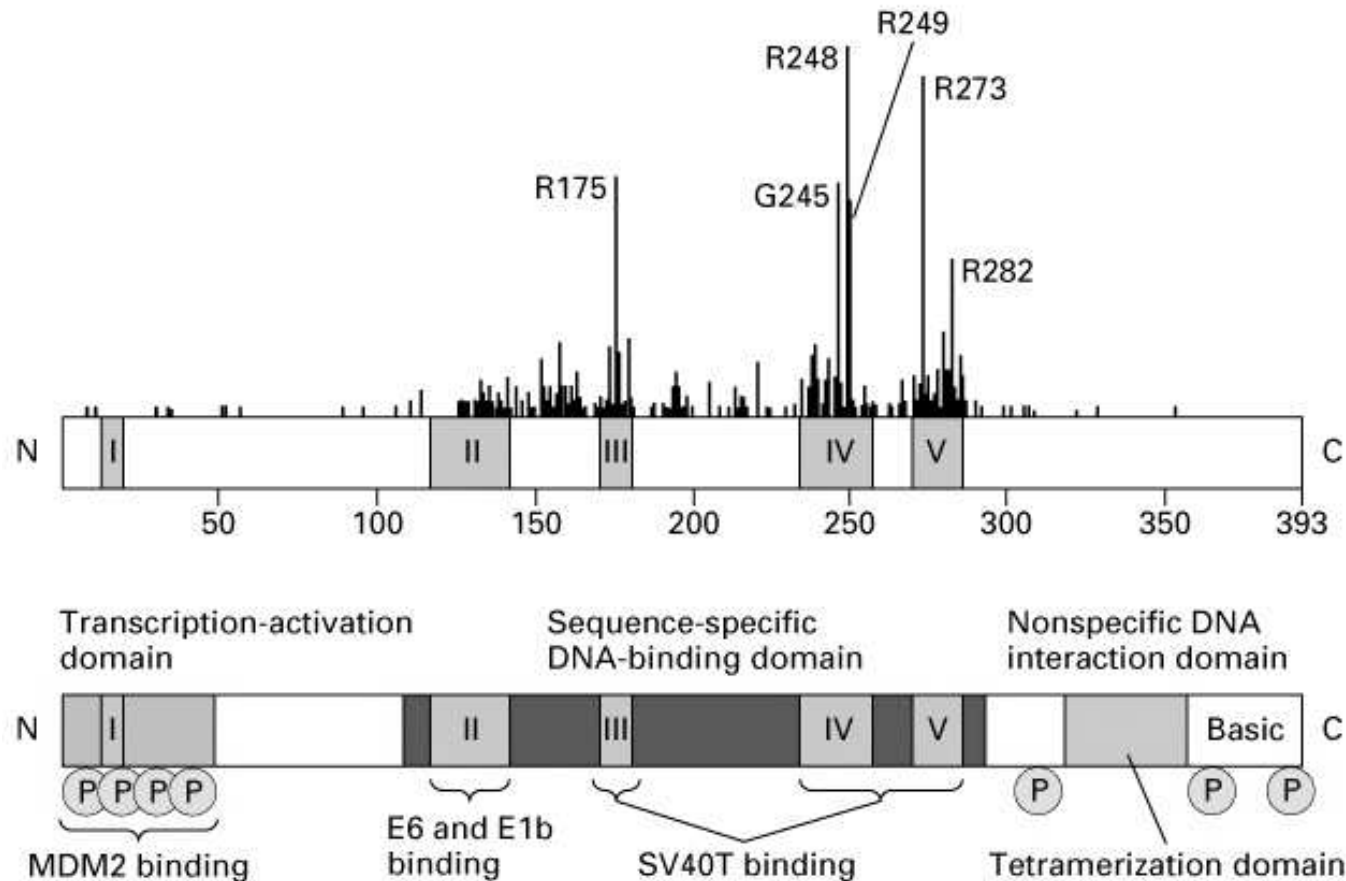


# Fyziologickou funkcí proteinu Rb je blokovat buněčný cyklus inaktivací proteinu E2F

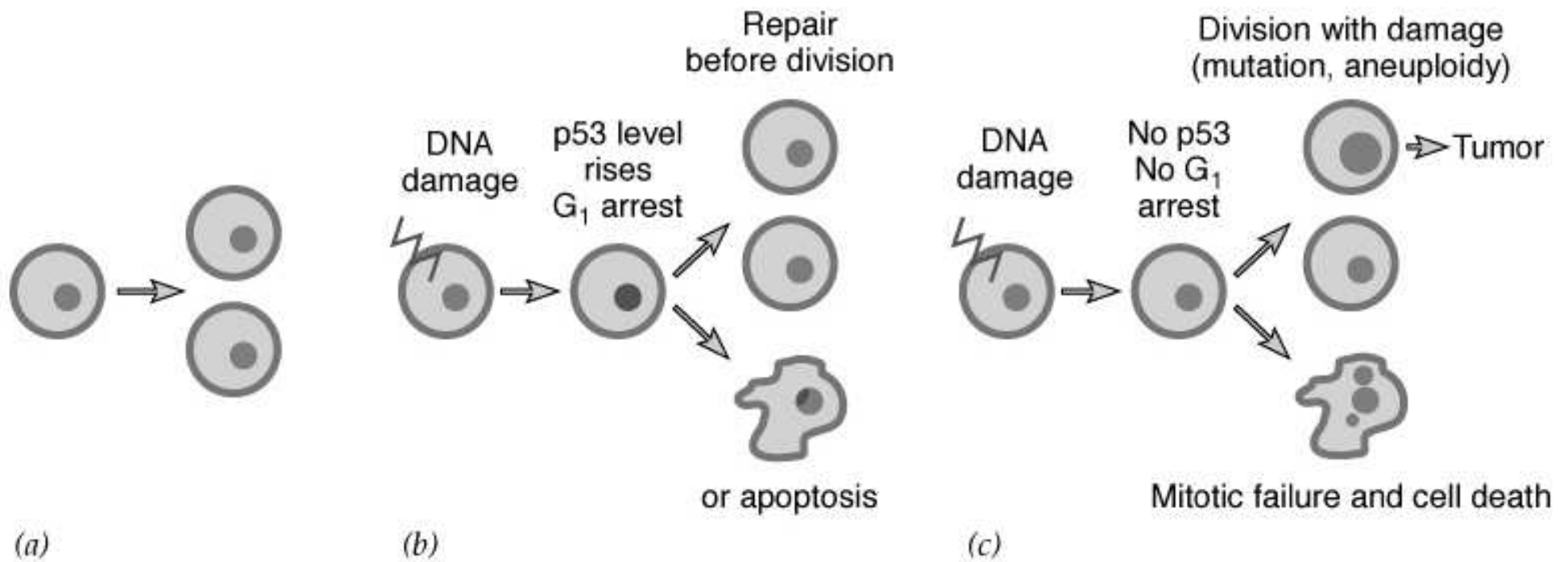


E2F je důležitý transkripční faktor pro vstup buňky do fáze S buněčného cyklu

# Mutace p53 inaktivuje kontrolní bod G<sub>1</sub>

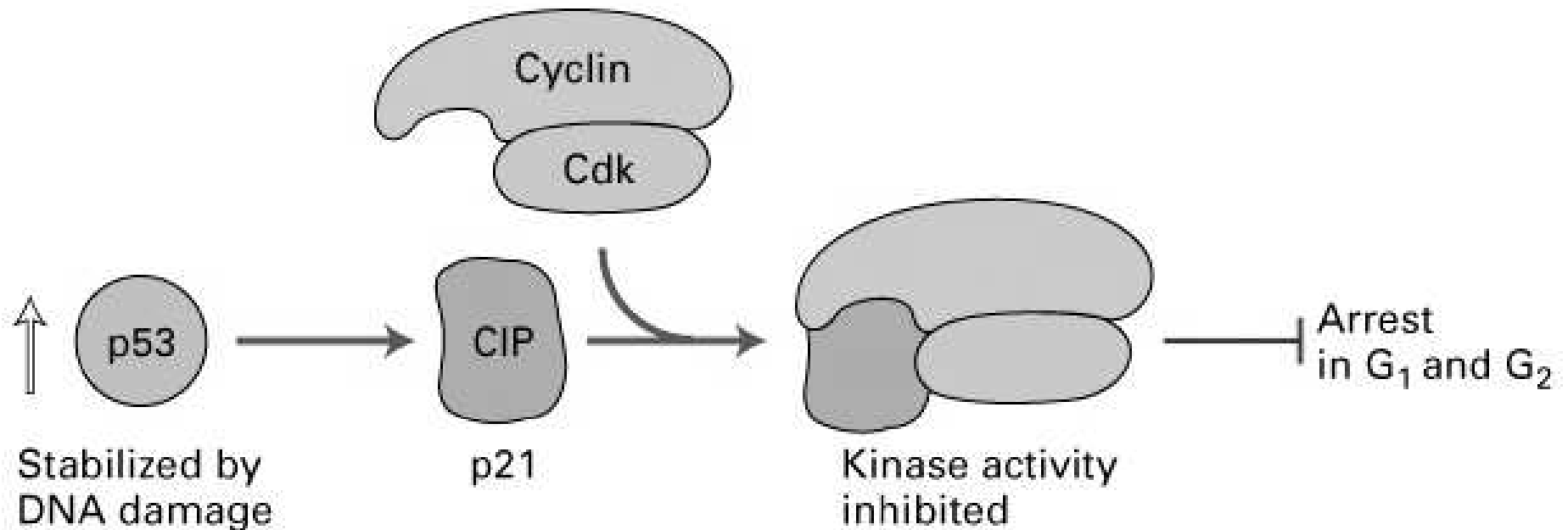


Některé karcinogeny indukují (inaktivující) mutace genu p53.  
Aktivitu p53 rovněž inhibují určité proteiny kódované DNA nádorovými viry.

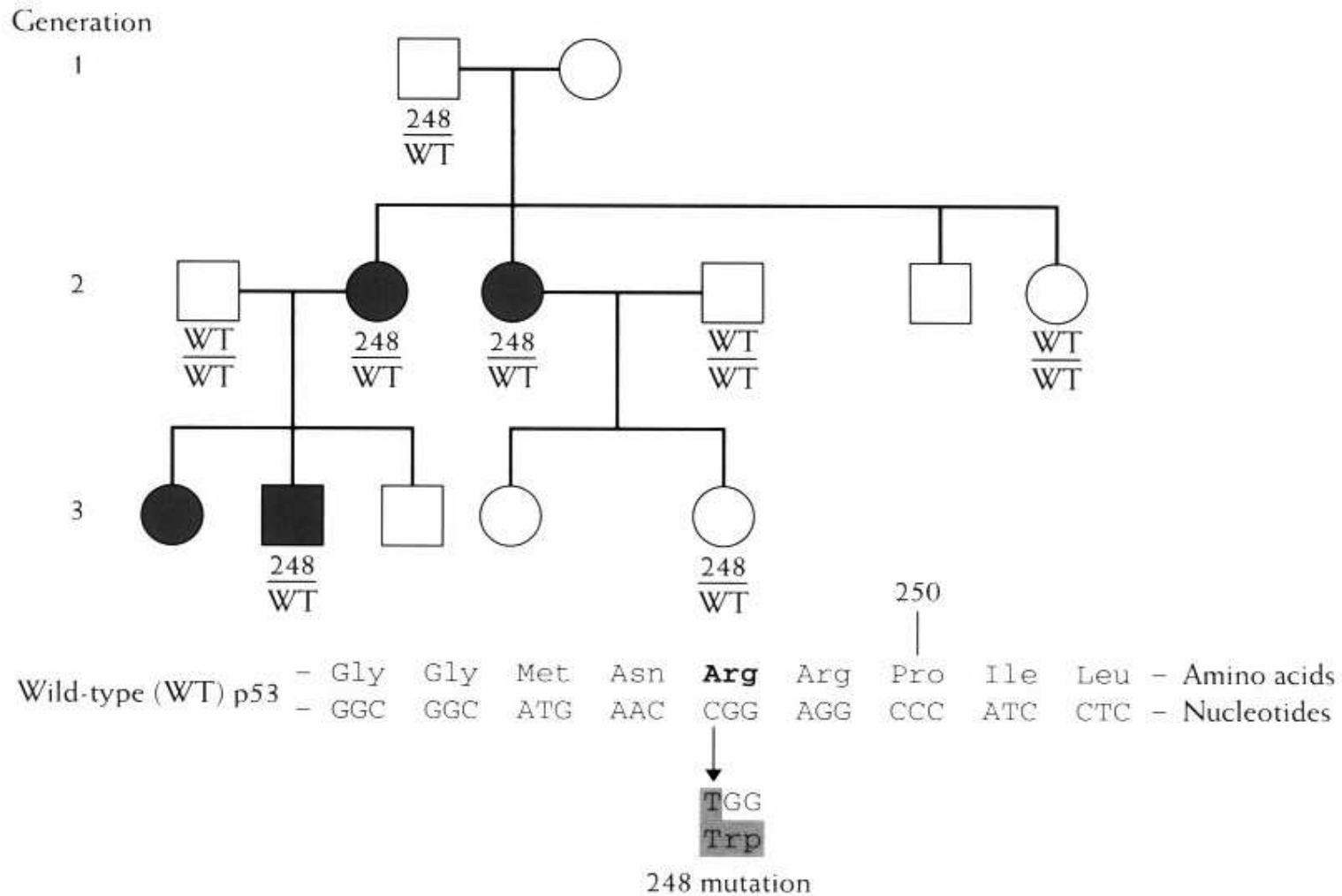


(a) After D. P. Lane, reprinted with permission from *Nature* 358:15, 1992.  
 © Copyright 1992, Macmillan Magazines Ltd.  
 Copyright 1999 John Wiley and Sons, Inc. All rights reserved.

# Mechanismus bloku buněčného cyklu proteinem p53 jako odpovědi na poškození DNA



# Porucha v jedné kopii genu p53 způsobuje dědičnou predispozici k rakovině



Rodokmen rodiny postižené Li-Fraumeniho syndromem a mutace p53, která jej způsobuje.

# Mutace genu p53 v lidských nádorech

Tumor type (n)	p53 mutation	Tumor type (n)	p53 mutation
Lung (897)	56%	Adrenal (31)	23%
Colon (960)	50%	Breast (1536)	22%
Esophagus (279)	45%	Endometrium (224)	22%
Ovary (386)	44%	Mesothelioma (23)	22%
Pancreas (170)	44%	Renal (102)	19%
Skin (220)	44%	Thyroid (299)	13%
Gastric (314)	41%	Hematological (1916)	12%
Head & neck (524)	37%	Carcinoid (13)	11%
Bladder (308)	34%	Melanoma (70)	9%
Sarcoma (339)	31%	Parathyroid (13)	8%
Prostate (87)	30%	Cervix (350)	7%
Hepatocellular (716)	29%	Neuroblastoma (212)	1%
Brain (456)	25%	others (155)	0%
<b>All tumors: 37%</b>			



# Poruchy reparačních systémů DNA napomáhají vzniku mutací a přispívají ke vzniku nádorů

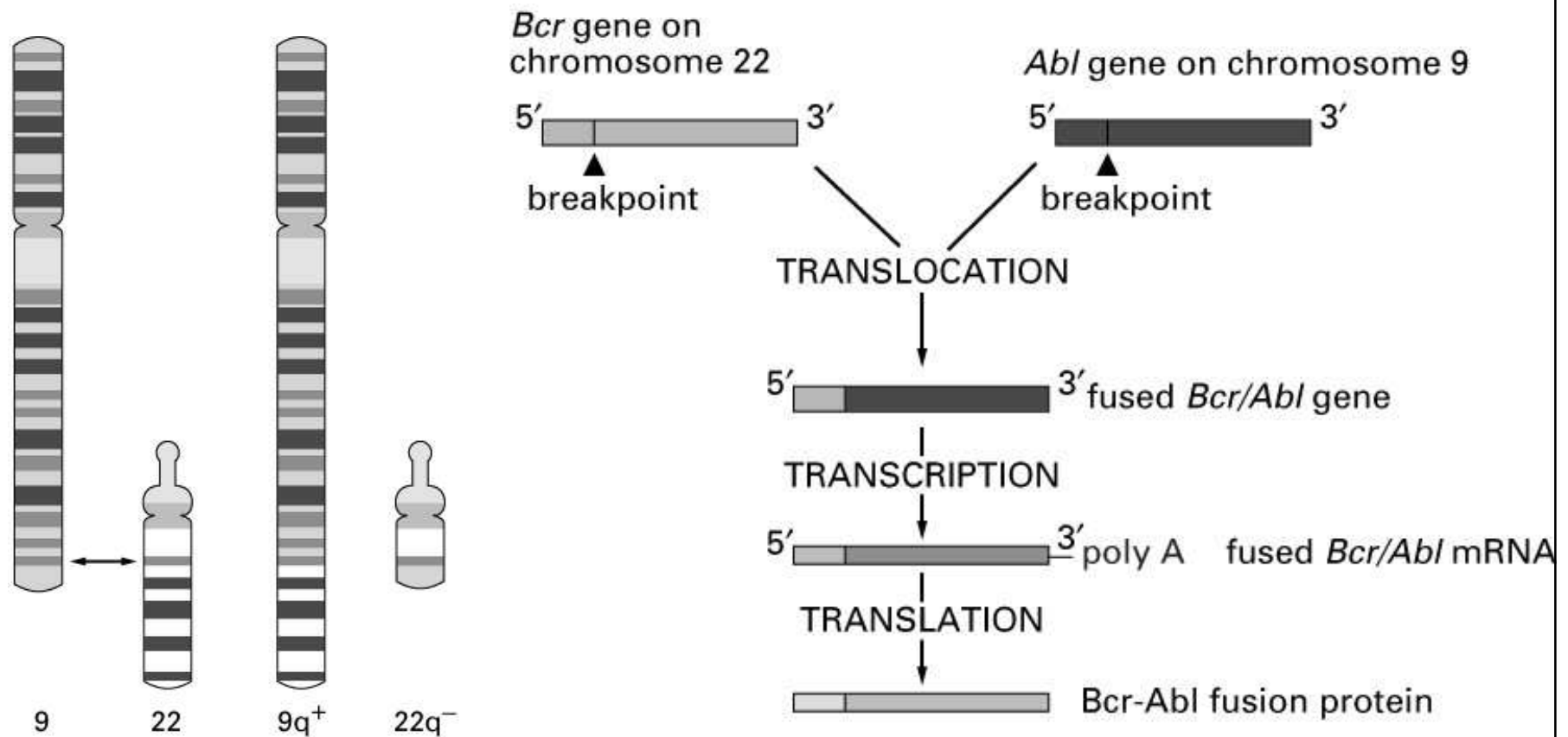
**TABLE 24-1** Human Hereditary Diseases Associated with DNA-Repair Defects

Disease*	Sensitivity	Cancer Susceptibility	Symptoms
Ataxia telangiectasia	$\gamma$ irradiation	Lymphomas	Ataxia, dilation of blood vessels in skin and eyes, chromosome aberrations, immune dysfunction
Bloom's syndrome	Mild alkylating agents	Carcinomas, leukemias, lymphomas	Photosensitivity, facial telangiectases, chromosome alterations
Cockayne's syndrome	UV irradiation		Dwarfism, retinal atrophy, photosensitivity, progeria, deafness, trisomy 10
Fanconi's anemia	Cross-linking agents	Leukemias	Hypoplastic pancytopenia, congenital anomalies
Hereditary nonpolyposis colorectal cancer	UV irradiation, chemical mutagens	Colon, ovary	Early development of tumors
Xeroderma pigmentosum	UV irradiation, chemical mutagens	Skin carcinomas and melanomas	Skin and eye photosensitivity, keratoses

\*Other human hereditary disorders that may be related to DNA-repair defects include dyskeratosis congenita (Zinsser-Cole-Engman syndrome), progeria (Hutchinson-Gilford syndrome), and trichothiodystrophy.

source: Modified from A. Kornberg and T. Baker, 1992, *DNA Replication*, 2d ed., W. H. Freeman and Company, p. 788.

Translokace mezi lidskými chromozomy 9 & 22 může umístit gen *myc* pod kontrolu aktivního promotoru genu pro imunoglobulin v pre-B lymfocytech a způsobit tak leukémii (CML). Markerem je přítomnost "Filadelfského" chromozomu.



(Ph<sup>1</sup>) Figure 23-44. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.

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

# Příčinou CML je chybná regulace c-Abl

## **c-Abl je tyrozin kináza**

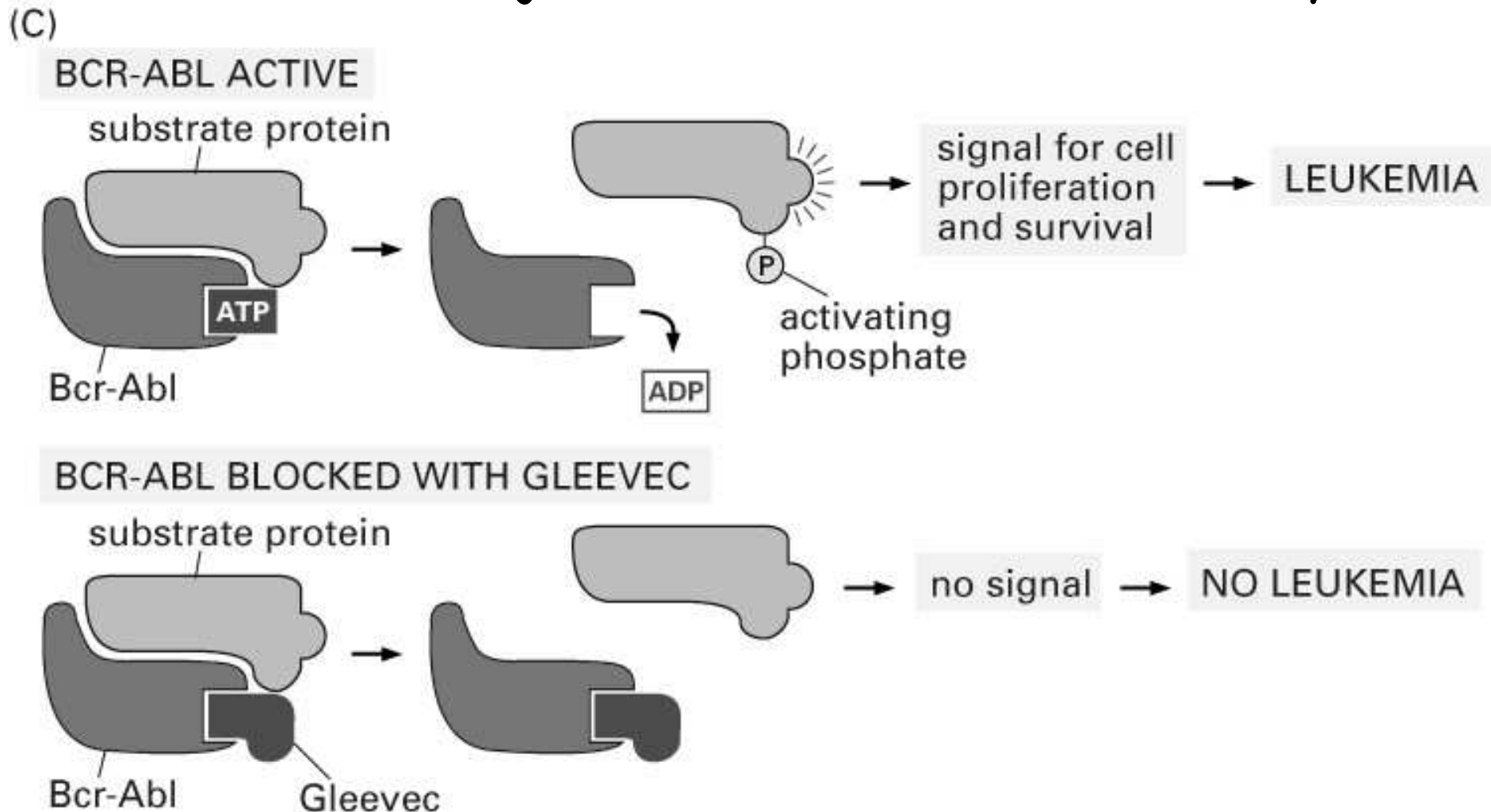
- je inhibována vazbou Rb
- fosforylace Rb (kinázou Cdk2) uvolňuje c-Abl
- c-Abl v jádře napomáhá transkripci genů zapojených do buněčného cyklu

## **Fúzí s *bcr* je *c-abl* chybně exprimován**

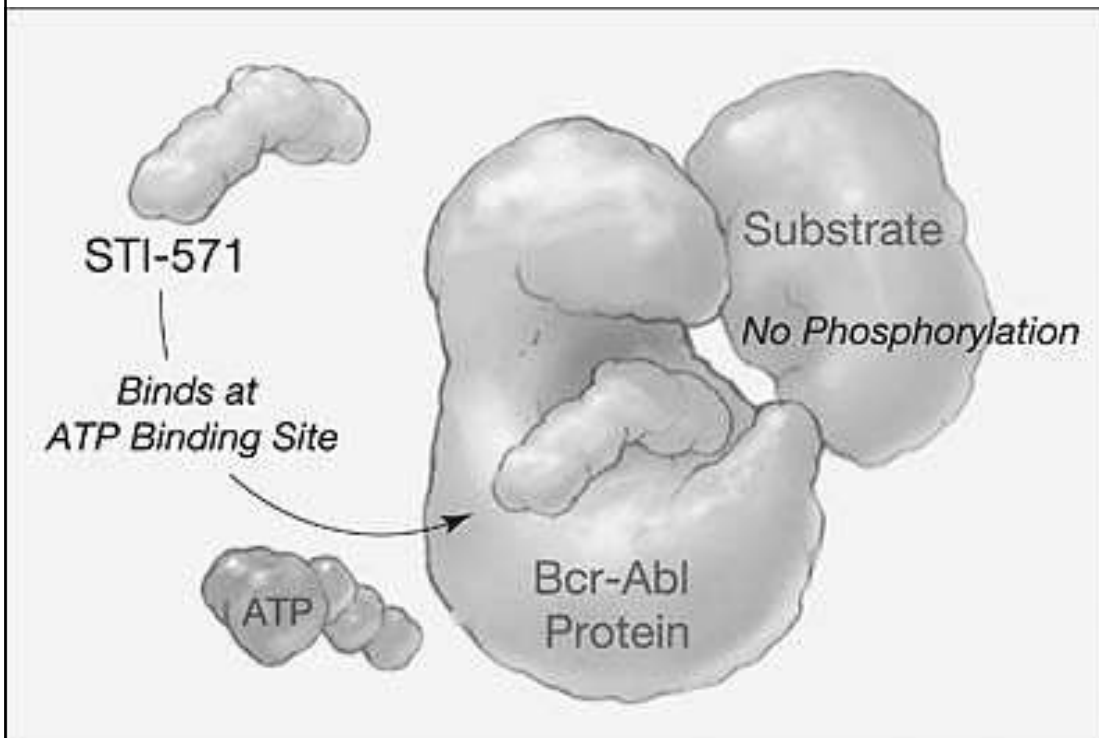
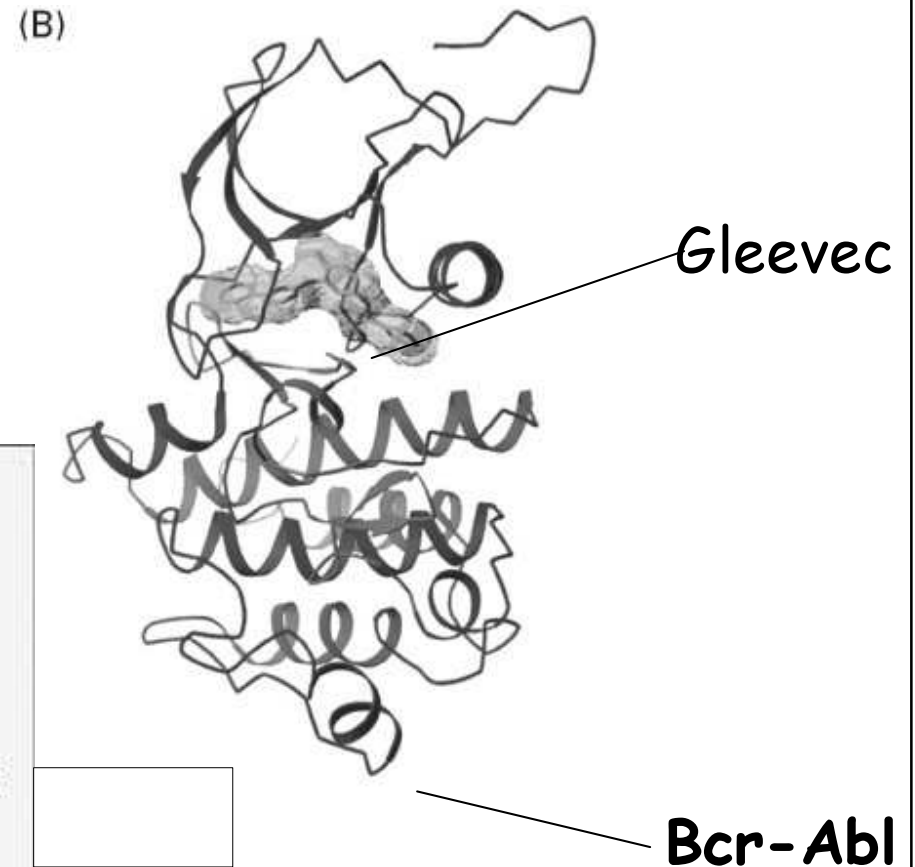
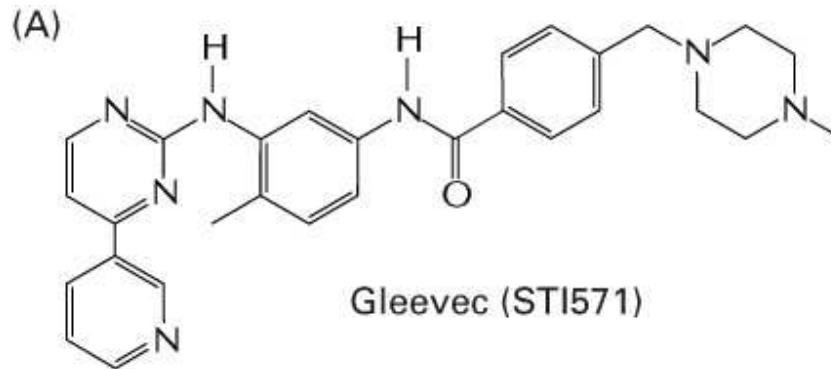
- produkt má neadekvátně vysokou tyrozin kinázovou aktivitu
- následkem je hyperproliferace a de-diferenciace

# Úspěch protinádorové terapie: CML a Gleevec

## Gleevec blokuje aktivitu chimérické kinázy



# Gleevec byl připraven firmou Novartis podle 3-D struktury aktivního místa chimérického enzymu



## Chiméra je specifická pro nádorové buňky, proto tento způsob terapie může být velmi účinný

- Gleevec může proniknout do každé buňky, ale pouze buňky obsahující danou translokaci tvoří chimérický enzym, proto pouze tyto buňky mohou být ovlivněny
- Gleevec se ukazuje být do určité míry úspěšný i při léčbě jiných nádorů, patrně proto, že jeho aktivita není zcela specifická

# Ztráta genomové integrity

## chromozomální abnormality

- somatické alterace jsou specifické pro určité typy nádorů
- užitečné pro diagnózu a monitorování nemoci
- implikace pro léčbu  
např. translokace t(15;17), fúzující PML-RAR,  
umožňuje léčbu akutní myeloidní leukémie  
podáváním RA

# Vlastnosti nádorových buněk (1. část)

Nádorové buňky mají řadu jiných vlastností než normální buňky:

- **Klonální původ** - nádory jsou 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 (2. část)

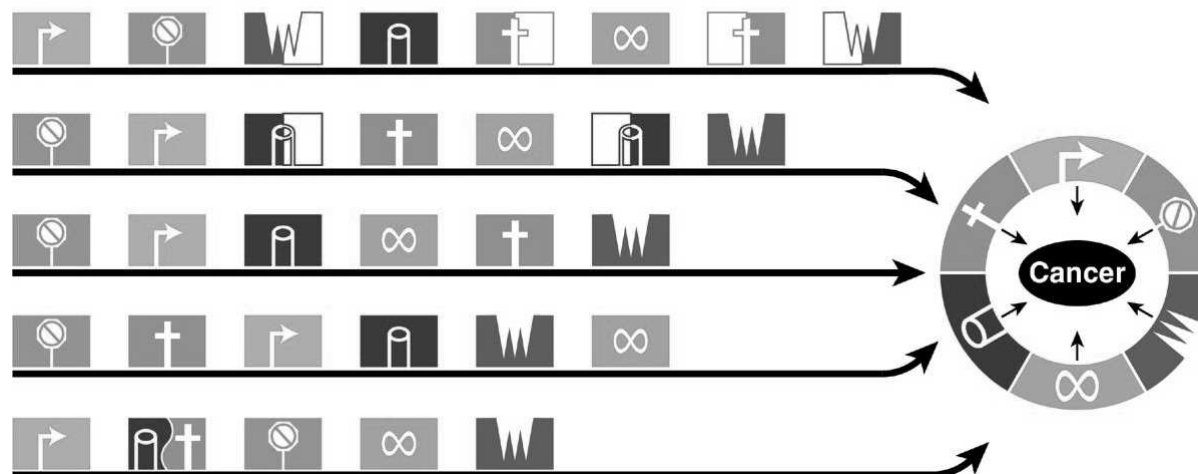
- **Změněné biochemické vlastnosti**, které zvyšují růstový potenciál:
  - **zvýšená glykolytická aktivita** umožňující růst i za snížených koncentrací kyslíku
  - **sekrece hydrolytických enzymů** umožňujících degradaci bazálních membrán a dalších struktur mimobuněčné matrix
  - **tvorba angiogenních faktorů**
- **Pozměněný cytoskelet** - chybná organizace cytoskeletu a změněná buněčná morfologie
- **Chromozomální 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

**A**

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

**B**



# 1. Nezávislost na růstových faktorech

- zdravé buňky nemohou proliferovat za nepřítomnosti 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 i u nádorových buněk pěstovaných *in vitro*

## Tři molekulární strategie pro získání nezávislosti na růstových faktorech

- změna charakteru růstových faktorů nebo způsobu jejich tvorby
- změna transmembránových přenašečů signálu
- změna nitrobuněčných signálních drah

## A. 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  
TGF $\alpha$  - produkován sarkomy

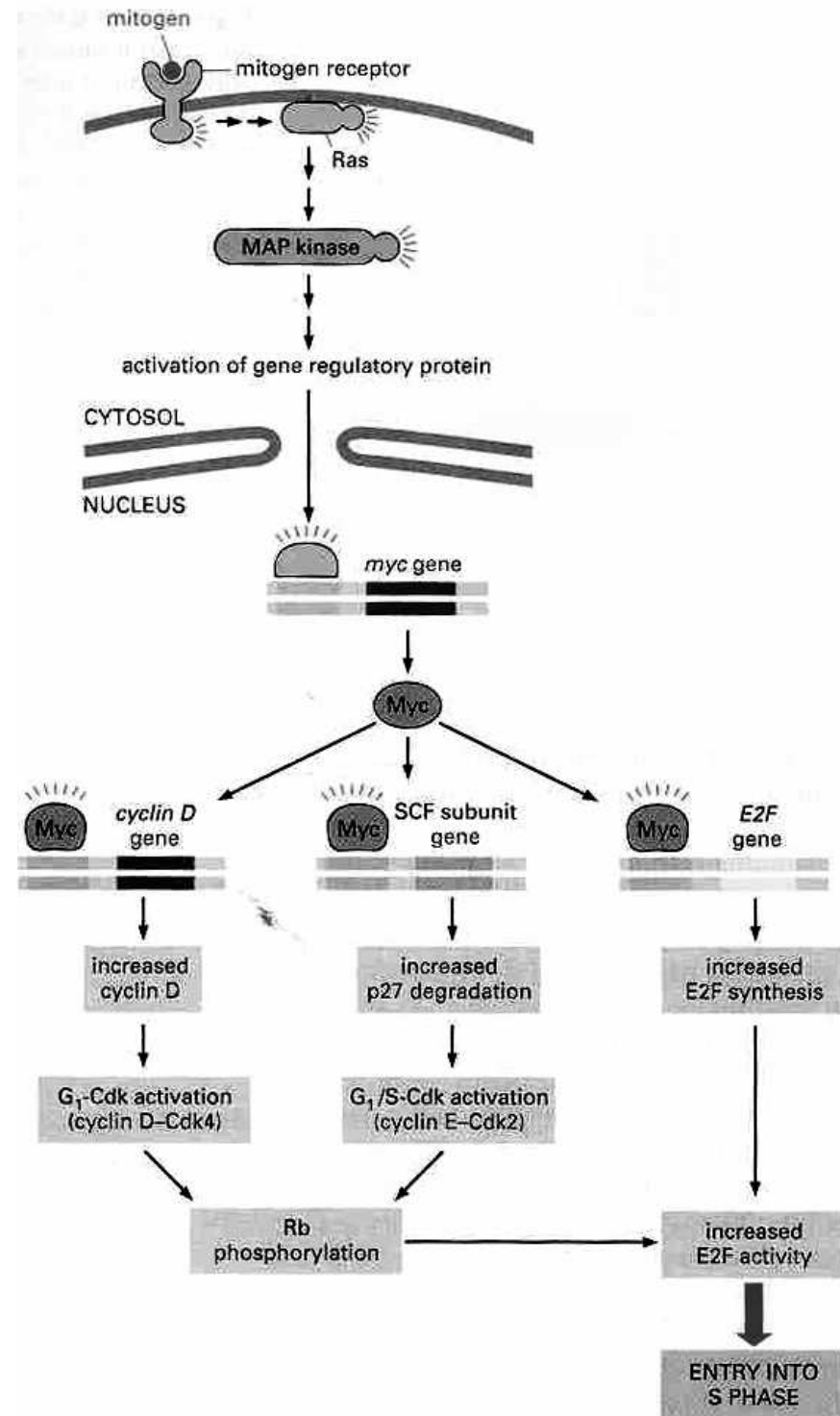
## B. změna transmembránových přenašečů signálu

deregulace povrchových receptorů je běžná při vzniku rakoviny:

- **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 i za nepřítomnosti ligandu

# C. změna nitrobuňčných signálních drah

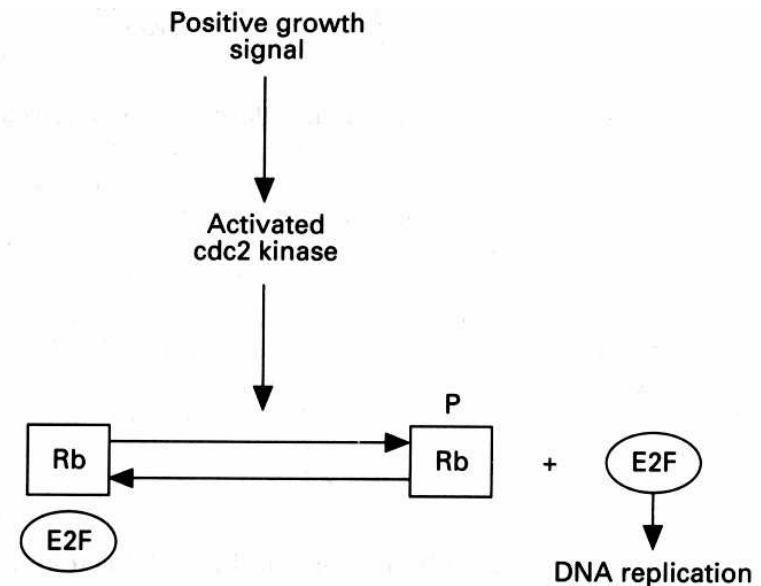
- hlavní úlohu má kaskáda Ras-Raf-MAPK
- proteiny Ras jsou pozměněny u 25% lidských nádorů
- je pravděpodobné, že růstové signální dráhy jsou deregulovány u všech lidských nádorů



## 2. Necitlivost na protirůstové signály

### Zdravá buňka

- ve zdravé tkáni fungují protirůstové signály v podobě rozpustných faktorů a inhibitorů imobilizovaných v matrix a na povrchu buněk
- na protirůstové signály buňka reaguje stejně jako na růstové faktory (prostřednictvím receptorů a nitrobuňčných signálních kaskád)
- na molekulární úrovni protirůstové signály využívají protein Rb, který v nefosforylovaném stavu neumožní expresi genů nutných pro přechod z G1 do S
- protirůstovým signálem je např.  $TGF\beta$ , který brání fosforylaci Rb a expresi genu *c-myc*



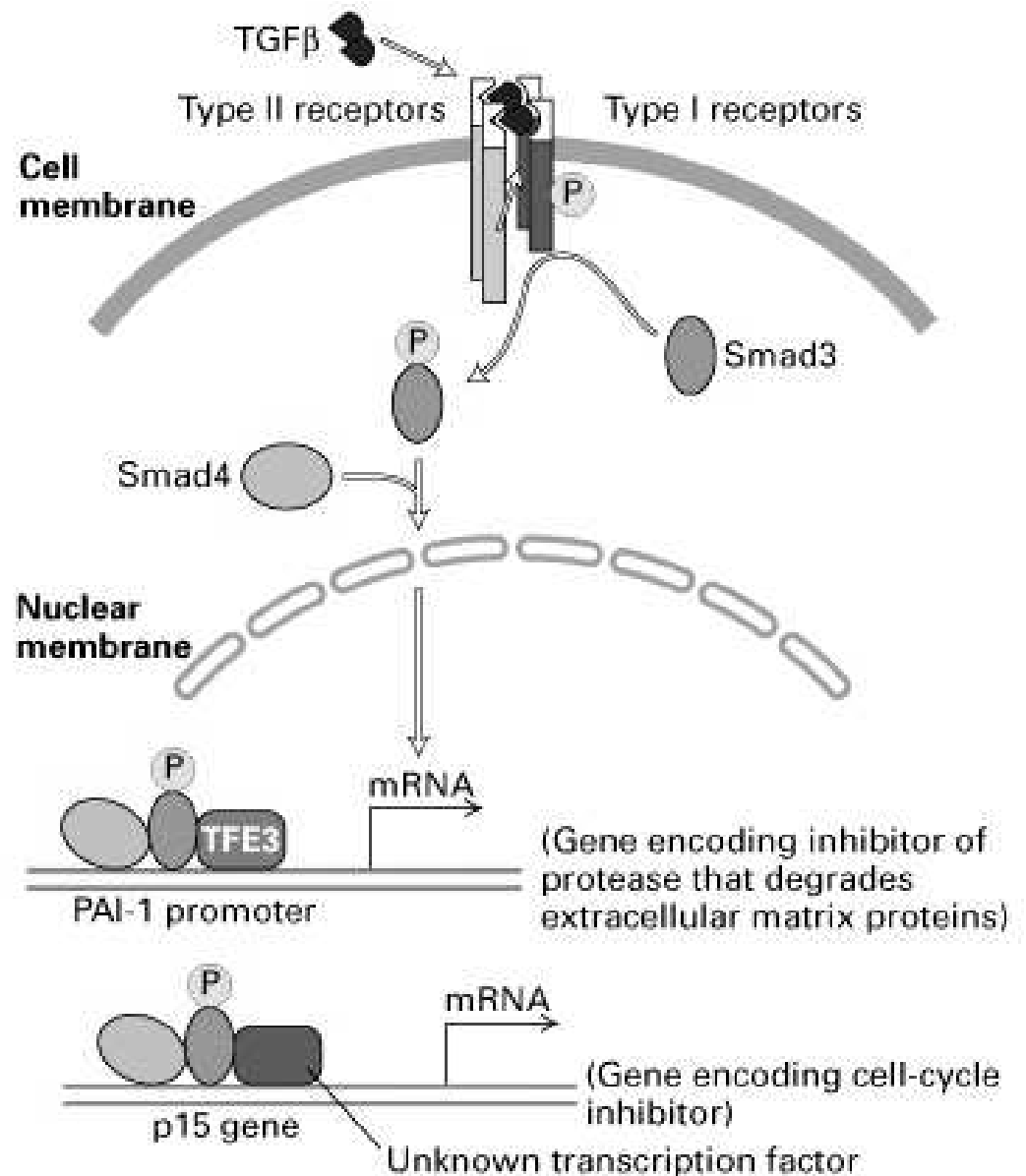


# Abnormální proliferaci a vzniku nádoru napomáhá ztráta signalizace TGF $\beta$

## Nádorová buňka

může ztratit citlivost na TGF $\beta$  různými způsoby:

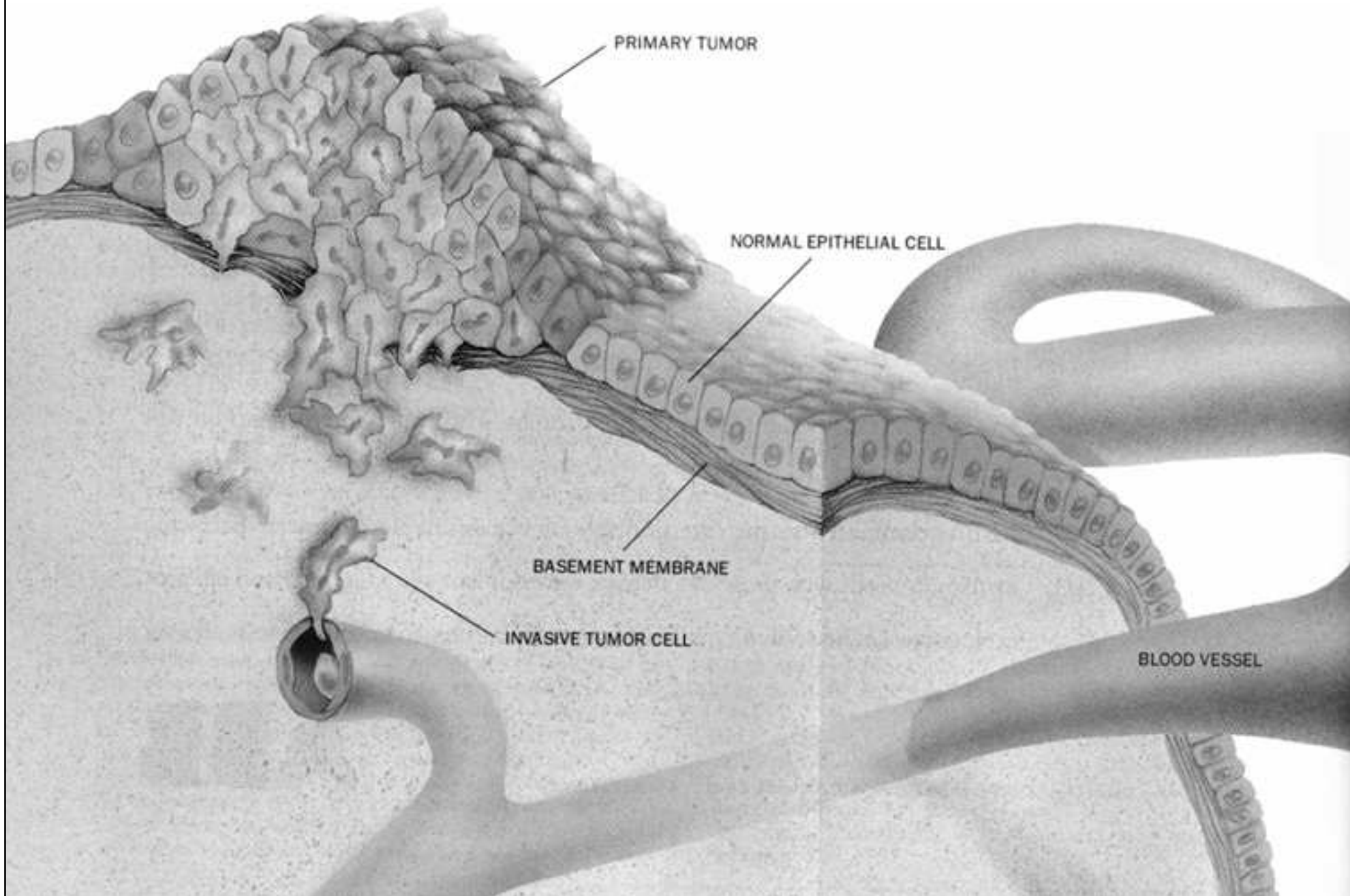
- snížením exprese receptorů TGF $\beta$
- mutací ve genu kódujícím receptor TGF $\beta$
- mutací v genu kódujícím některý z dalších nitrobuňčných přenašečů (proteiny SMAD)



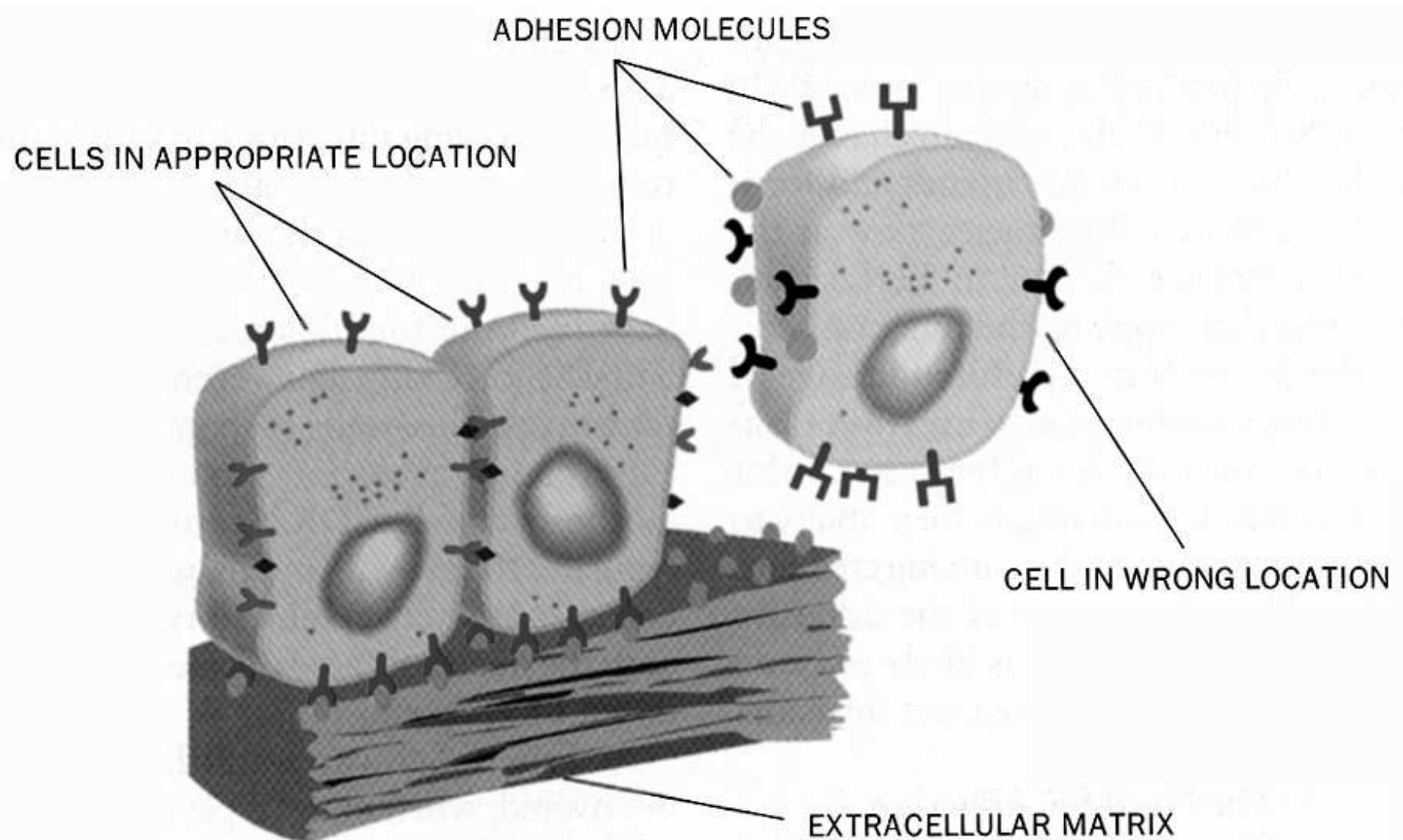
## 3. Průnik do tkání - metastáze

- přechod z primárního nádoru do nové tělní lokalizace, ve které je alespoň zpočátku 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

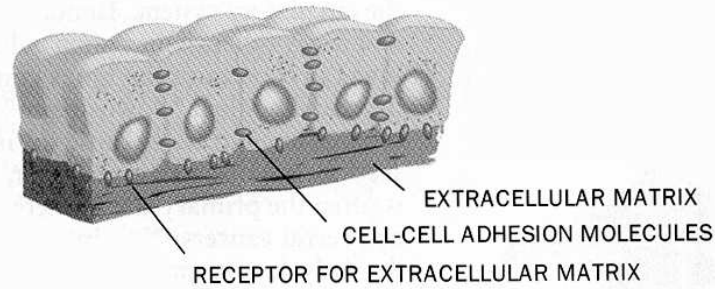


# Adhezivní molekuly a receptory určují správnou lokalizaci buněk ve tkáních

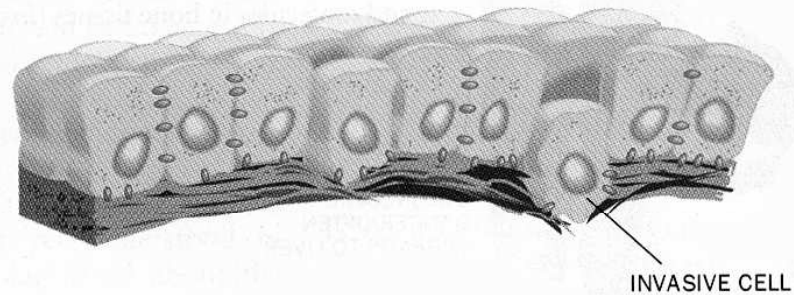


# Adheze buněk a metastáze

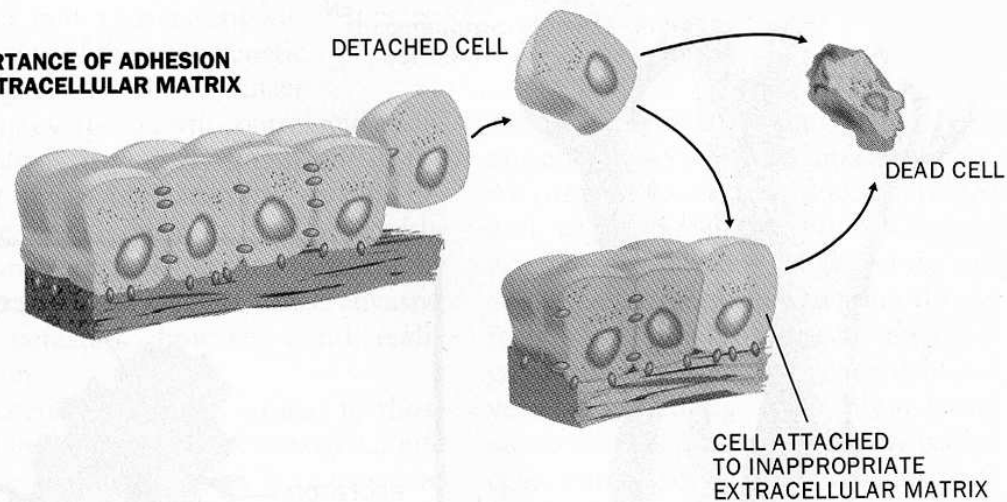
## CELLULAR ADHESION



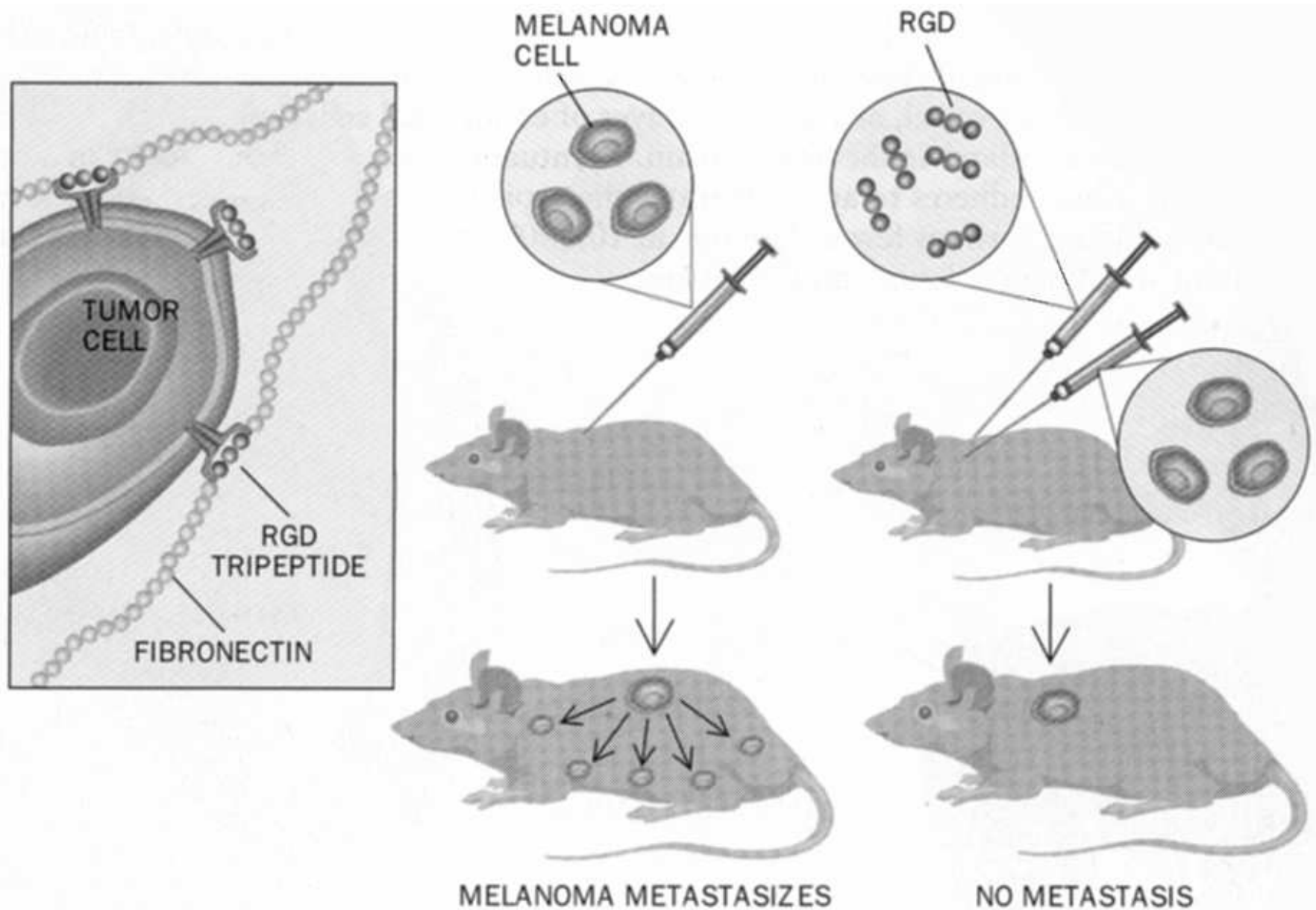
## IMPORTANCE OF CELL-CELL ADHESION



## IMPORTANCE OF ADHESION TO EXTRACELLULAR MATRIX



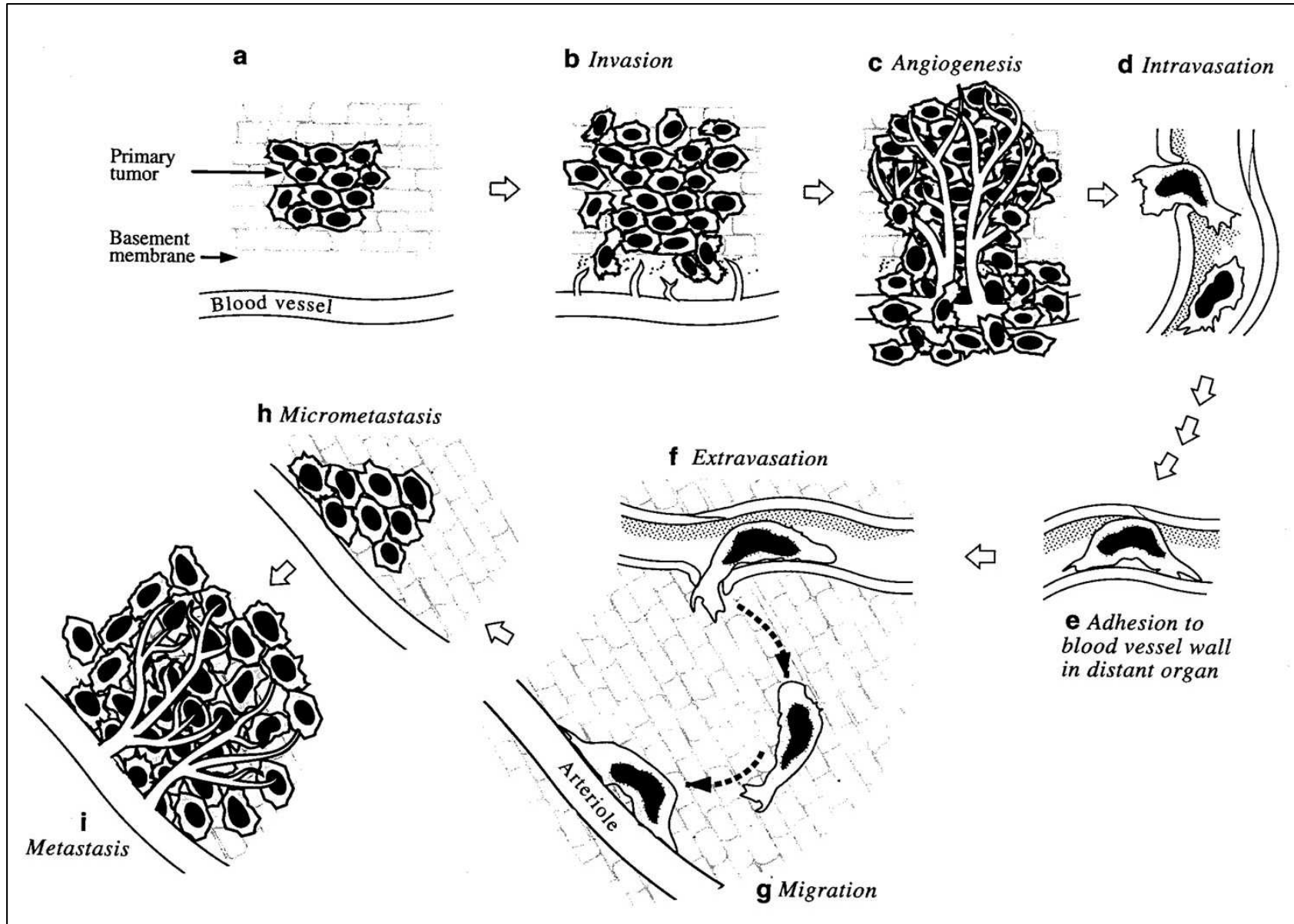
# Peptid RGD může zabránit metastázi



# Metastatická kaskáda

- rozrušení basální 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 (krevní a lymfatické kapiláry se nevyskytují v epiteliích)
- bazální membrána musí být rozrušena, aby karcinomové buňky získaly přístup ke krevnímu toku
- rozklad membrány zajišťují enzymy (proteázy)
- **Cathepsin B** je proteolytický enzym rozkládající složky bazální membrány: jeho hladina stoupá v krvi pacientů s nádory gastrointestinálního traktu a především u metastázujících pacientů s rakovinou plic a jater (marker metastázování)

## Inhibice kolagenolytické aktivity snižuje metastatickou aktivitu nádorů

- inhibitory metaloproteináz snižují metastatický potenciál nádoru plic

## Oddělení buněk („cell detachment“)

- snížená vzájemná přilnavost (koheze) nádorových buněk
- normální buňky téhož typu se od sebe v tkáni neoddělují
- redukce exprese genů pro adhezivní povrchové molekuly (kadheriny, kateniny)
- transfekce invazivních buněk cDNA kódující kadherin E snižuje jejich invazivitu

## Pohyb buněk („cell motility“)

- buňky odvozené z nádoru vykazují zvětšenou pohyblivost (lze kvantifikovat)
- 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

- průnik konektivní tkáně ke kapilárám
- obdoba překonání bazální membrány
- syntéza kolagenázy I
- nádory se liší mírou produkce kolagenázy I, klinický význam nejasný

# 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
- narušení celistvosti stěn kapilár napomáhá kolegenáza IV
- drobnými mezerami se buňky dostávají do kapiláry (diapedeza)

## Cirkulace a opuštění krevního řečiště

- nádorové buňky nasedají na sebe navzájem, na lymfocyty a krevní destičky
- vzniklý komplex („embolus“) může adherovat na vnitřní povrch kapilár
- stabilizace embolu fibrinem
- rostoucí embolus může ucpat kapiláru
- stabilizované nádorové buňky interagují s endoteliálními buňkami kapilár - průnik
- slabá účinnost - mnohé nádorové buňky zůstávají uvnitř kapilár a jsou časem rozloženy

# Antikoagulační terapie

- rozpuštění komplexů nádorových buněk, které mají tendenci ucpat kapiláry - prodloužení pobytu nádorových buněk v krevním řečišti - vyšší pravděpodobnost jejich přirozeného rozložení
- prodloužení doby přežití u pacientů s karcinomem plic
- slabý účinek na jiné nádory



# Geny řídící tvorbu metastáz

- některé druhy rakoviny mají vysokou tendenci k tvorbě metastáz x rakovina vaječníku metastázuje v minimální míře
- snaha najít geny, které o metastázování rozhodují (poznání principu - potenciální cíl terapie)
- metastázování je složitý proces - řízeno patrně řadou genů, koordinace

# Gen CD44

- kóduje povrchový glykoprotein, který se účastní mezibuněčné adheze
- podléhá alternativnímu sestřihu
- lze rozlišit metastázuující nádory prsu nebo střeva od nemetastázuujících podle nadprodukce transkriptu určitého typu
- alternativně sestřihované transkripty jsou potenciálními markery nádorových buněk

# Gen KAI1

(„kang ai“ = čínsky „protinádorový“)

- na krátkém raménku lidského chromozomu 11
- zapojen do suprese metastázování rakoviny prostaty

## Ewing (1916):

„Metastasis is the most convincing evidence of cancer“.

## 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 embryo se dostává do dělohy až v okamžiku, kdy je schopné implantace děložní výstelky
  - implantaci embrya zajišťují agresivní trofoblastové buňky: - schopnost rozložit děložní výstelku, včetně matrix konektivní tkáně a mateřských krevních kapilár (účast proteáz)

# Růst a metastáze metastáz

- aktivní migrace nádorových buněk mezi endoteliálními buňkami a děravou bazální membránou do mezibuněčné matrix konektivní tkáně
- proliferace nádorových buněk nastává buď okamžitě nebo po různě dlouhém období dormance
- rozhoduje přístup ke krvi (angiogeneze)

## 4. 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 0,5-1 mm (nekróza buněk ve středu kolonie nádorových buněk)
- nádorové buňky ve zvýšené míře tvoří induktory angiogeneze a méně inhibitory angiogeneze

## Vývoj nových cév za normálních fyziologických podmínek

Při růstu cév se uplatňují 2 mechanismy:

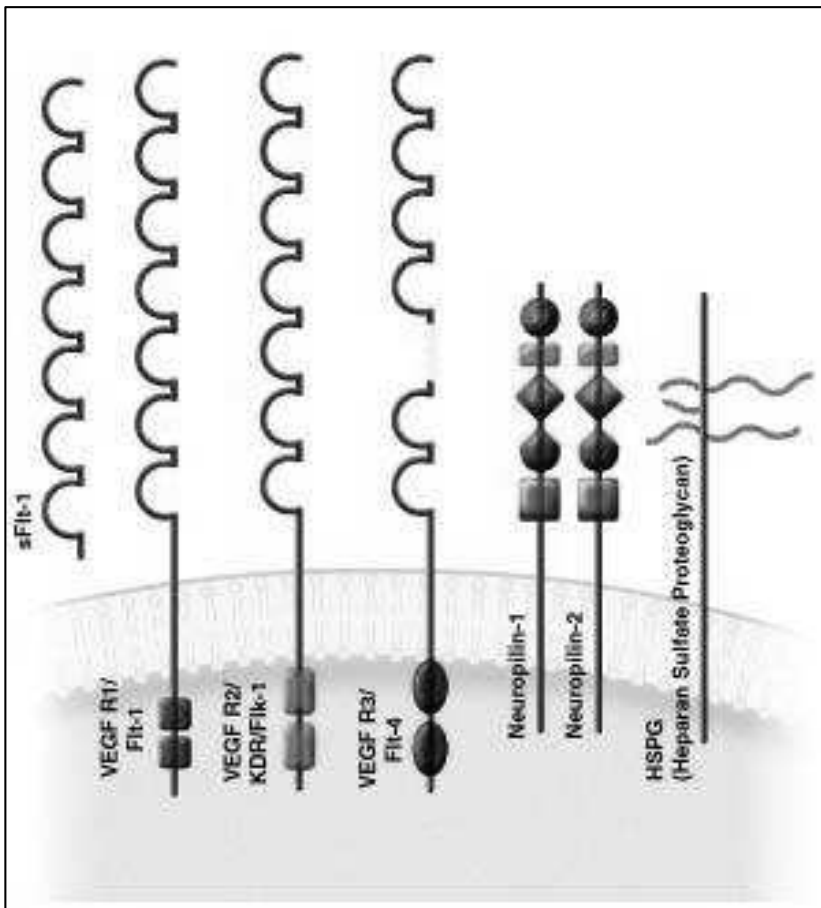
- **angiogeneze** - růst nových cév ze starých
- **vaskulogeneze** - objevení se cév „z ničeho“ - tj. sestavením a diferenciací endoteliálních prekurzorů u embrya.
  
- kyslík ve tkáních difunduje do vzdálenosti 100 mikronů (0,1 mm)
  
- tvorba cév - je řízena metabolickými potřebami



# Molekuly regulující růst cév

- VEGF - byl objeven jako první. Nyní známe VEGF-A, B, C, D, E; (3 receptory VEGFR nebo-li FL1-3)
- Angiopoietiny 1-4; (receptory TIE1 a 2)
- Ephriny (nervový systém); (receptorové tyrosinové kinázy)
- Geny Notch
- PDGF
- Fibroblastové růstové faktory
- TGF $\beta$

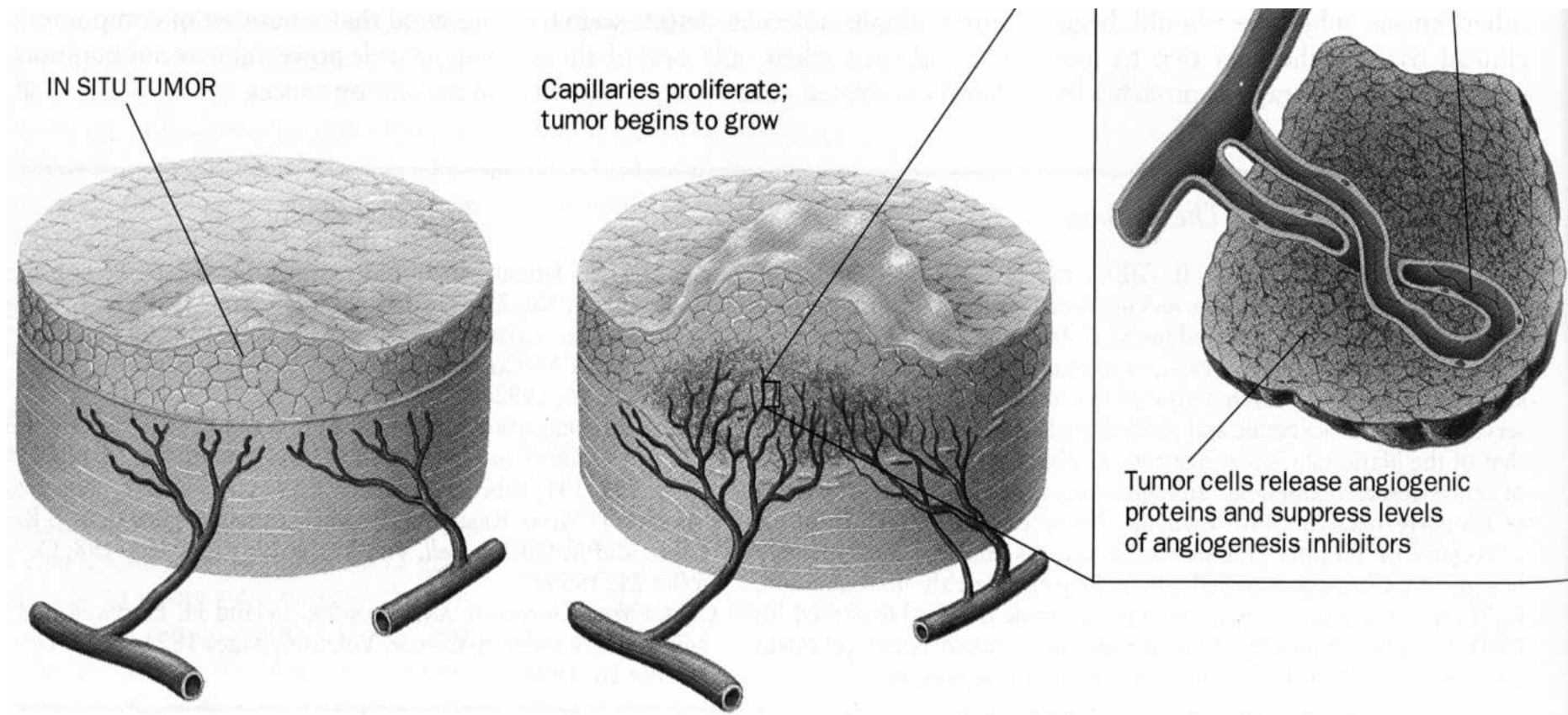
VEGF - pozitivní regulátor tvorby cév  
 VEGF - receptor má kinázovou aktivitu, stimuluje angiogenezi a buněčnou proliferaci



RECEPTORS	LIGANDS				
	PlGF	VEGF-A	VEGF-B	VEGF-C	VEGF-D
sFlt-1	●	●			
VEGFR1/ Flt-1	●	●	●		
VEGFR2/ KDR/Flk-1		●		●	●
VEGFR3/ Flt-4				●	●
Neuropilin-1	●	●	●		
Neuropilin-2		●			

KEY: ● Binding

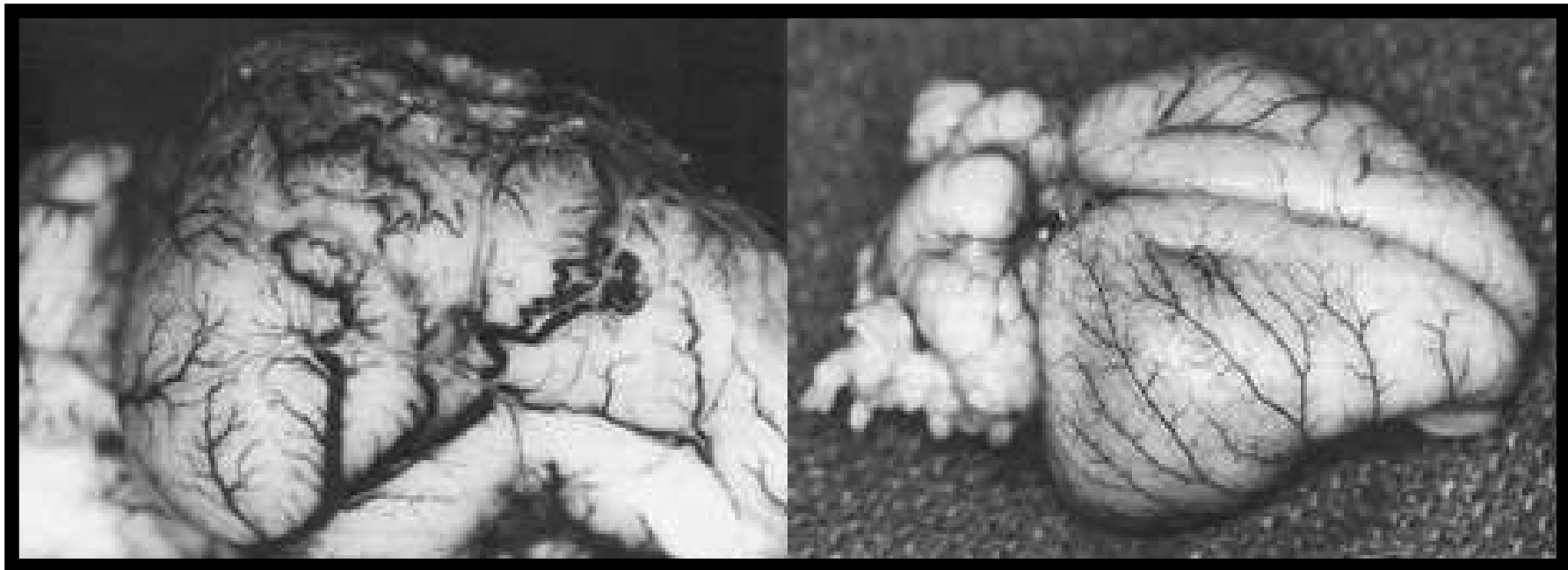
# Nádorové buňky mohou spouštět angiogenezi



# Ovlivňováním angiogeneze lze s nádorem manipulovat

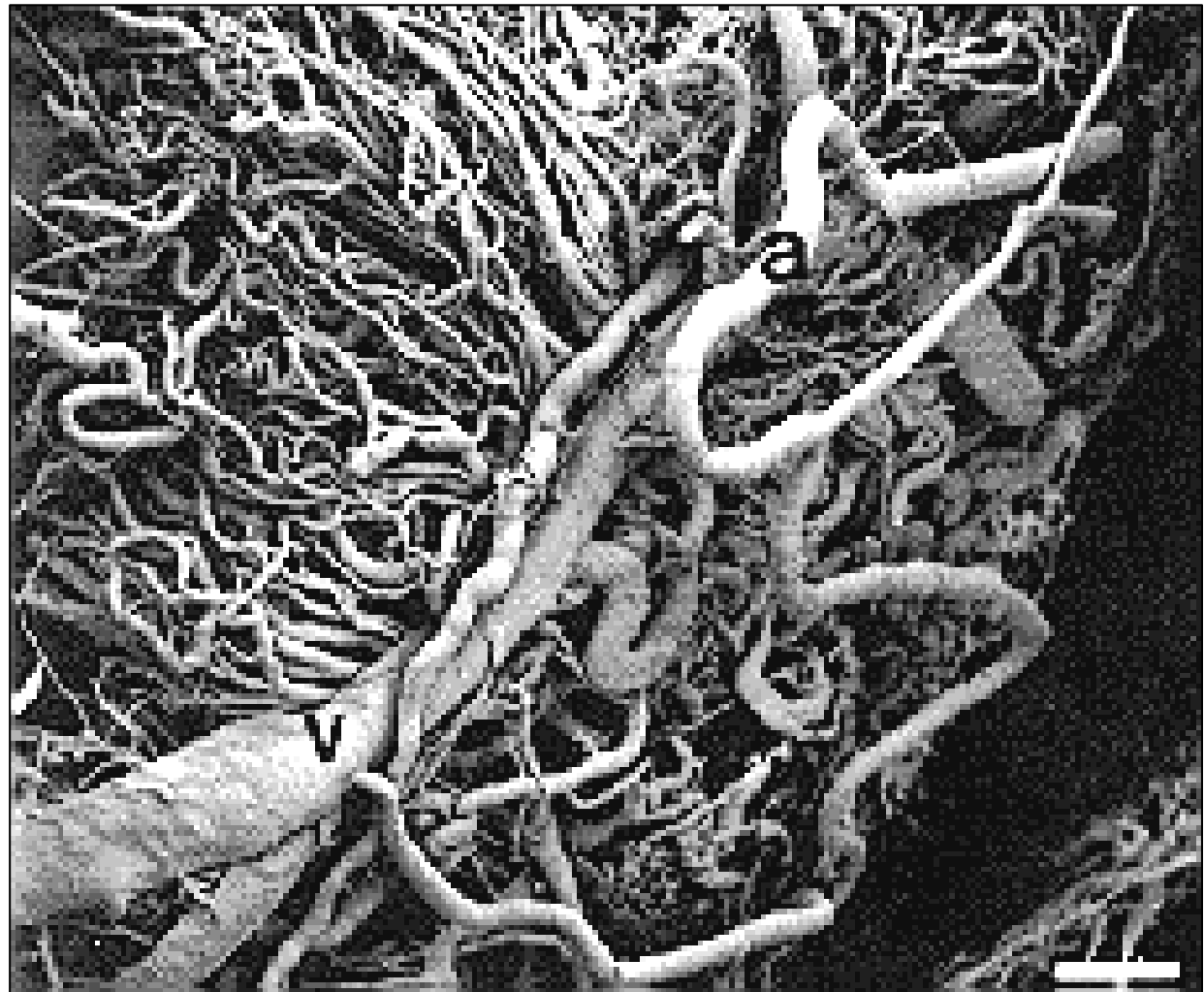
- angiogeneze je výsledkem dynamické rovnováhy mezi pro- a antiangiogenními faktory. Pro boj s nádory by bylo možno odstranit proangiogenní faktory a přidat antiangiogenní.
- Cévy v nádorech jsou podobné jako cévy jinde, jen jsou trochu neorganizované, mění se jejich průměr, mají heterogenní vzhled.
- U různých nádorů vypadají cévy různě, protože vznikly působením různých kombinací pro a antiangiogenních faktorů.

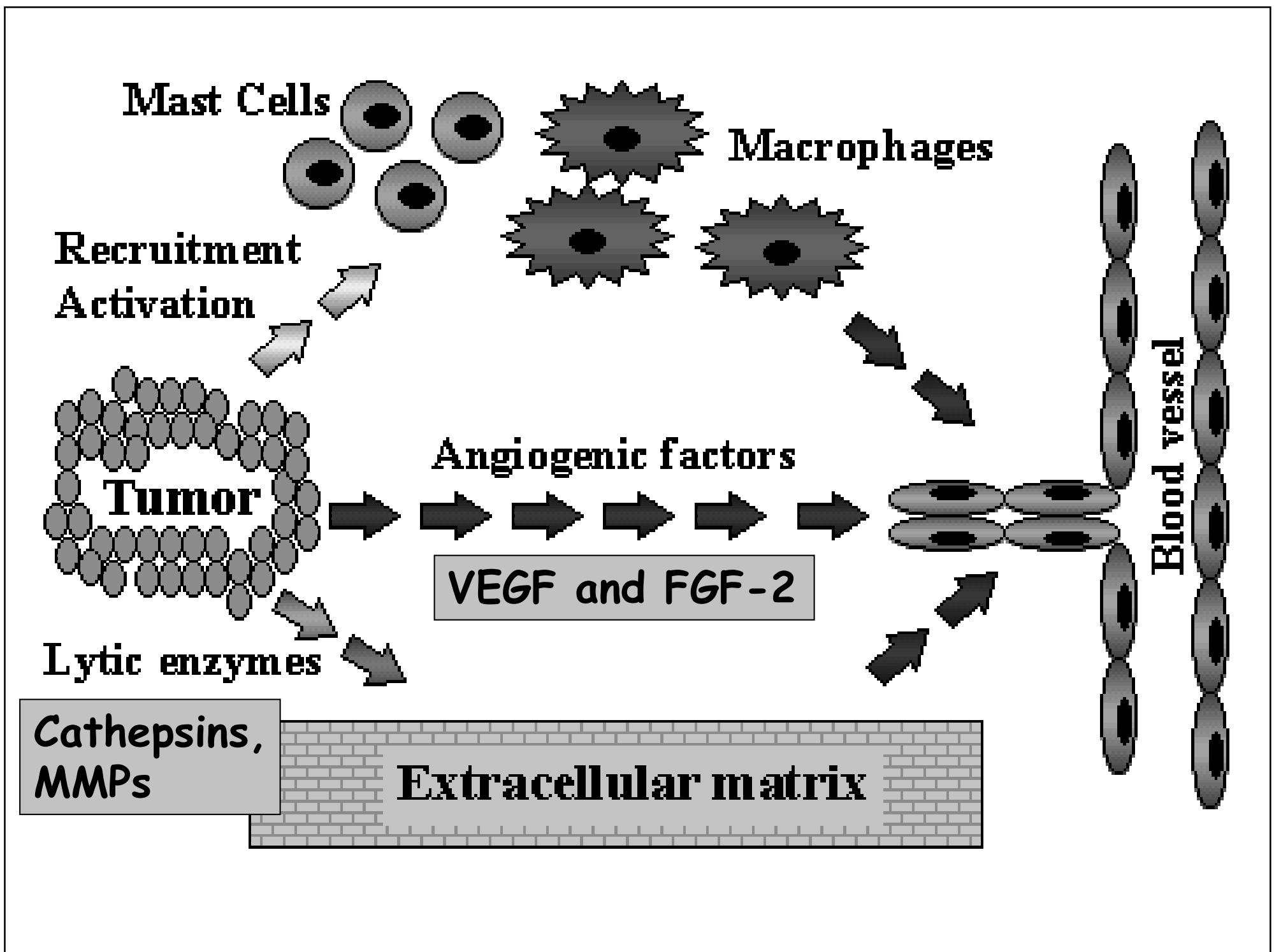
**Normální vaskulatura (vpravo) je velmi uspořádaná ve srovnání s vaskulaturou nádoru (vlevo)**



# Typická struktura nádorové vaskulatury

Časté jsou  
ohyby,  
nepravidelnosti,  
rozdíly ve  
velikosti





**Mast Cells**

**Macrophages**

**Recruitment  
Activation**

**Tumor**

**Angiogenic factors**

**VEGF and FGF-2**

**Blood vessel**

**Lytic enzymes**

**Cathepsins,  
MMPs**

**Extracellular matrix**

## Molekuly 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



## 5. 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 zaměňami karyotypu (vznik fúzních chromozomů) a masivně odumírají
- vzácně dojde k vzniku nesmrtelné buňky (frekvence 1:10<sup>7</sup>)
- většinu nádorových buněk lze úspěšně pěstovat *in vitro*

# Imortalizace a telomery

## Telomery:

- zajišťují počítání dělení buněk
- konce chromozomů složené z několika tisíců opakování sekvence 6 pb
- během každého buněčného cyklu dochází ke ztrátě 50-100 pb z konce každého chromozomu
- postupná eroze telomer vede ke ztrátě schopnosti chránit konce chromozomální DNA před chromozomálními 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

## 6. Únik apoptóze

Apoptóza = programovaná buněčná smrt

- obvyklá při organogenezi a nedostatku růstových faktorů
- fyziologické odstranění nežádoucích buněk bez rizika pro buňky sousední
- opak nekrózy (následek poranění, kdy buňky prasknou, vylijí svůj obsah do okolí a způsobí tak zánětlivou reakci)

Projevy apoptózy:

- odbourání cytoskeletu
- rozklad jaderné membrány
- fragmentace jaderné DNA
- buněčný povrch je změněn tak, aby byl způsobil okamžitou fagocytózu

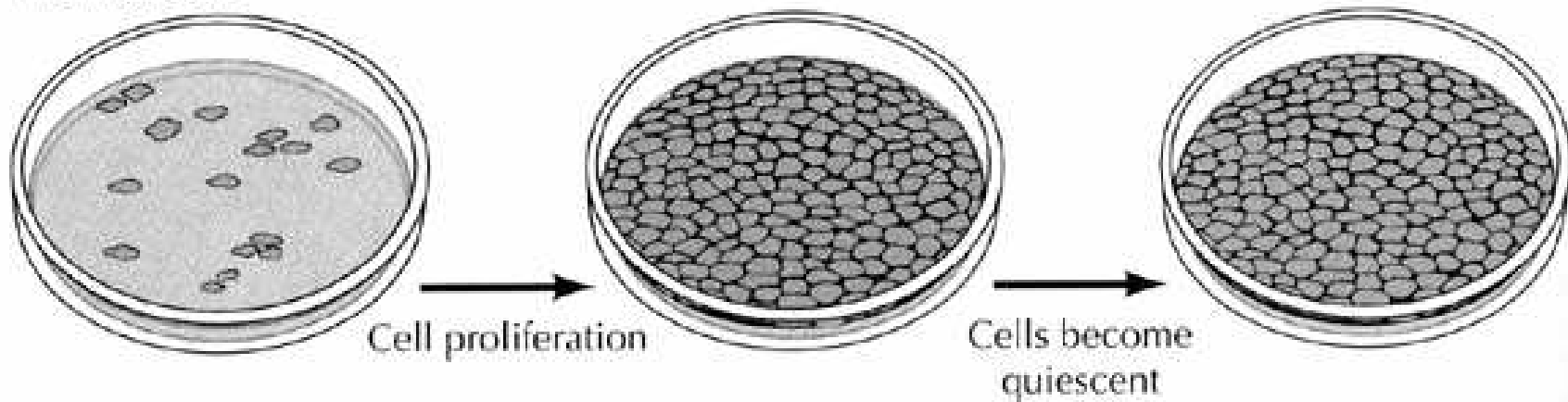
## Rakovinné buňky se neřídí regulačními signály pro buněčnou smrt

- 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 prodloužené životaschopnosti nádorových buněk

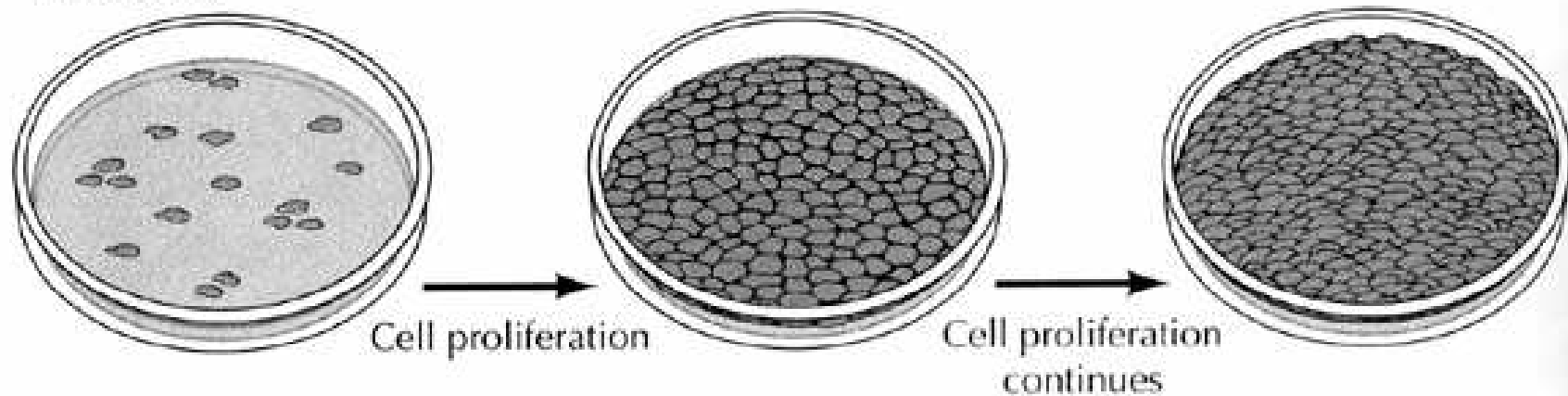
# Vlastnosti nádorových buněk pěstovaných v kultuře

1. absence přirozené inhibice růstu po dosažení určité hustoty buněk

Normal cells

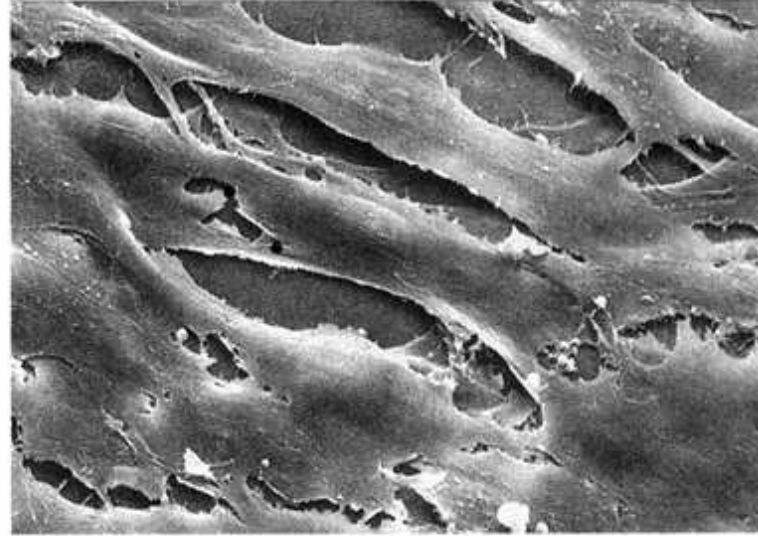
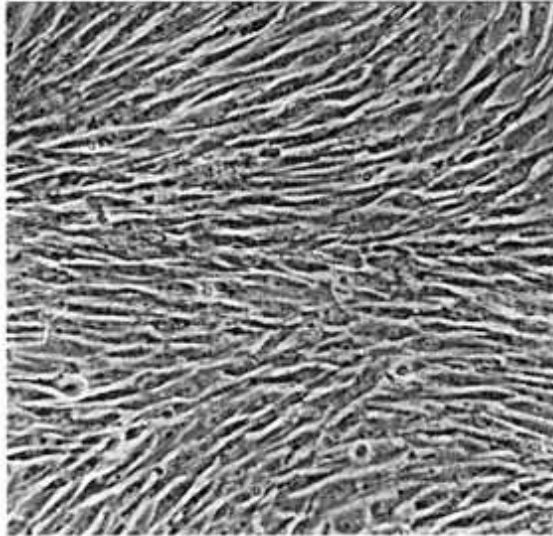


Tumor cells

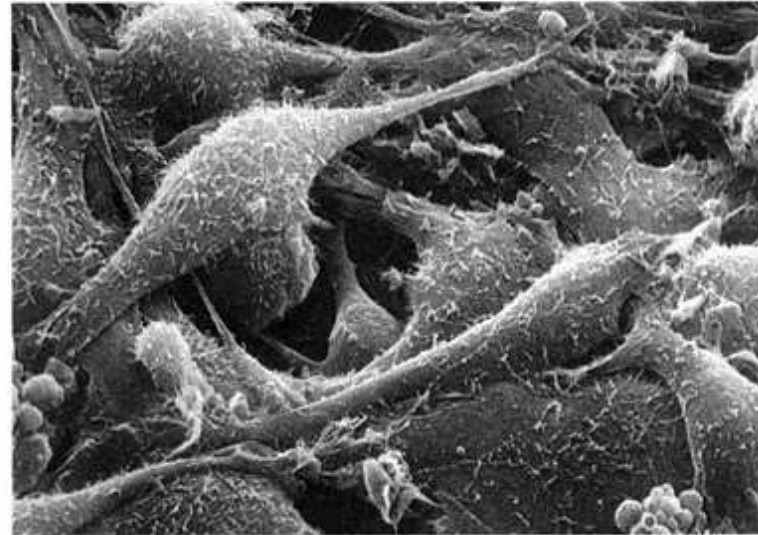
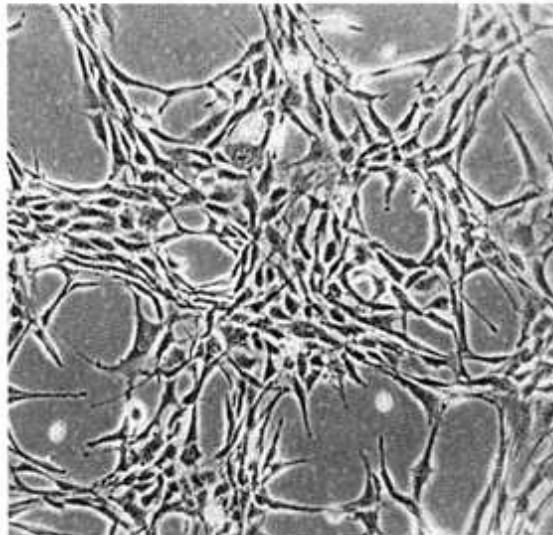


## 2. absence kontaktní inhibice růstu a pohybu buněk

Normal cells



Tumor cells



3. Snížená adheze, větší pohyblivost

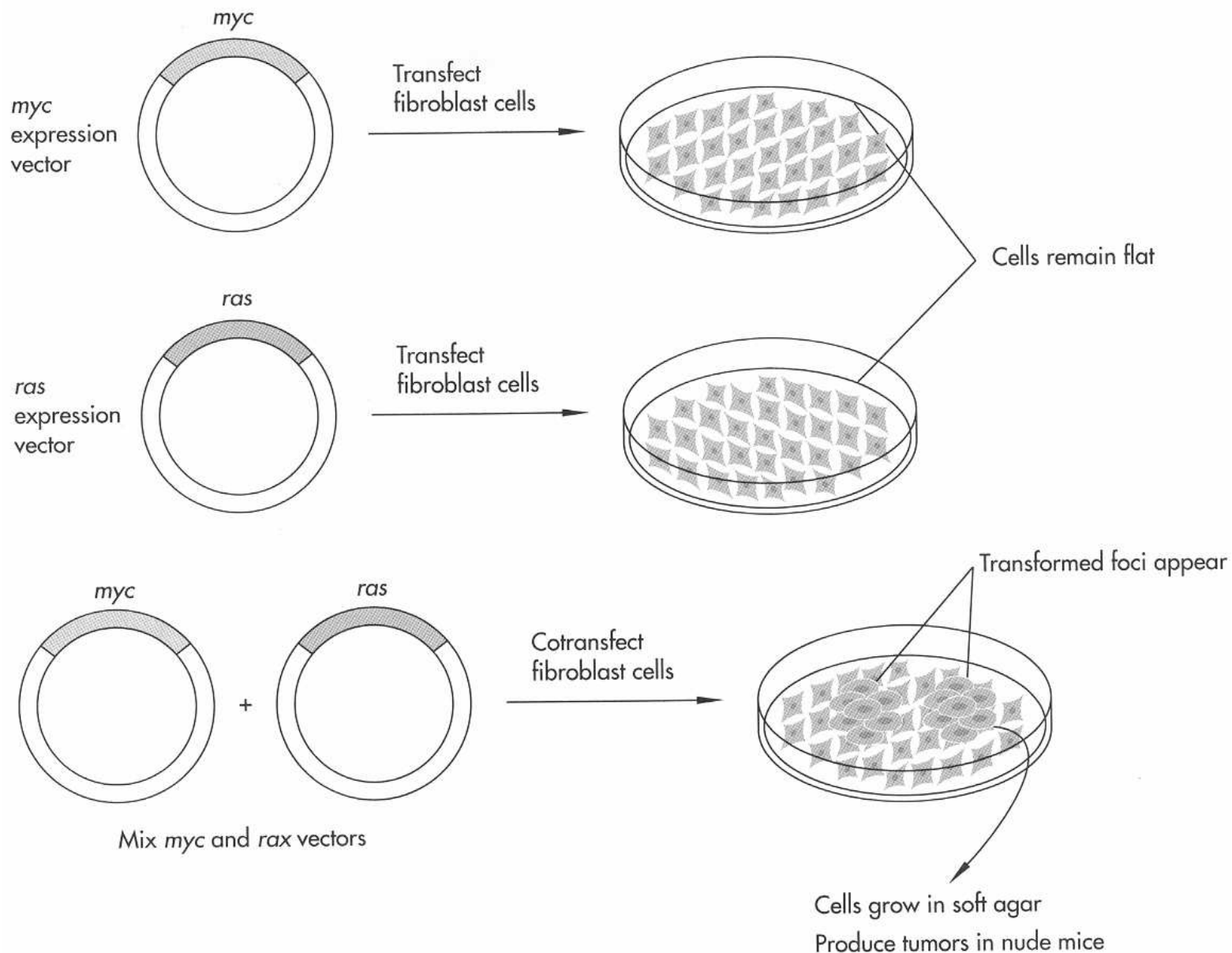
4. Produkce a sekrece proteáz, které *in vivo* rozkládají složky extracelulární matrix

## Transformace buněk pěstovaných v kultuře

- nezbytná pro výzkum mechanismu indukce nádoru
- „focus assay“:
  - test pro sledování transformace *in vitro*
  - založen na detekci morfologicky distinktních plaků transformovaných buněk na pozadí buněk netransformovaných
  - transformované buňky přerůstají netransformované
  - buňky transformované *in vitro* mohou po injekci do laboratorních živočichů vyvolat tvorbu nádorů



# Transfekčními technikami se potvrdila hypotéza, že onkogeny při transformaci spolupracují

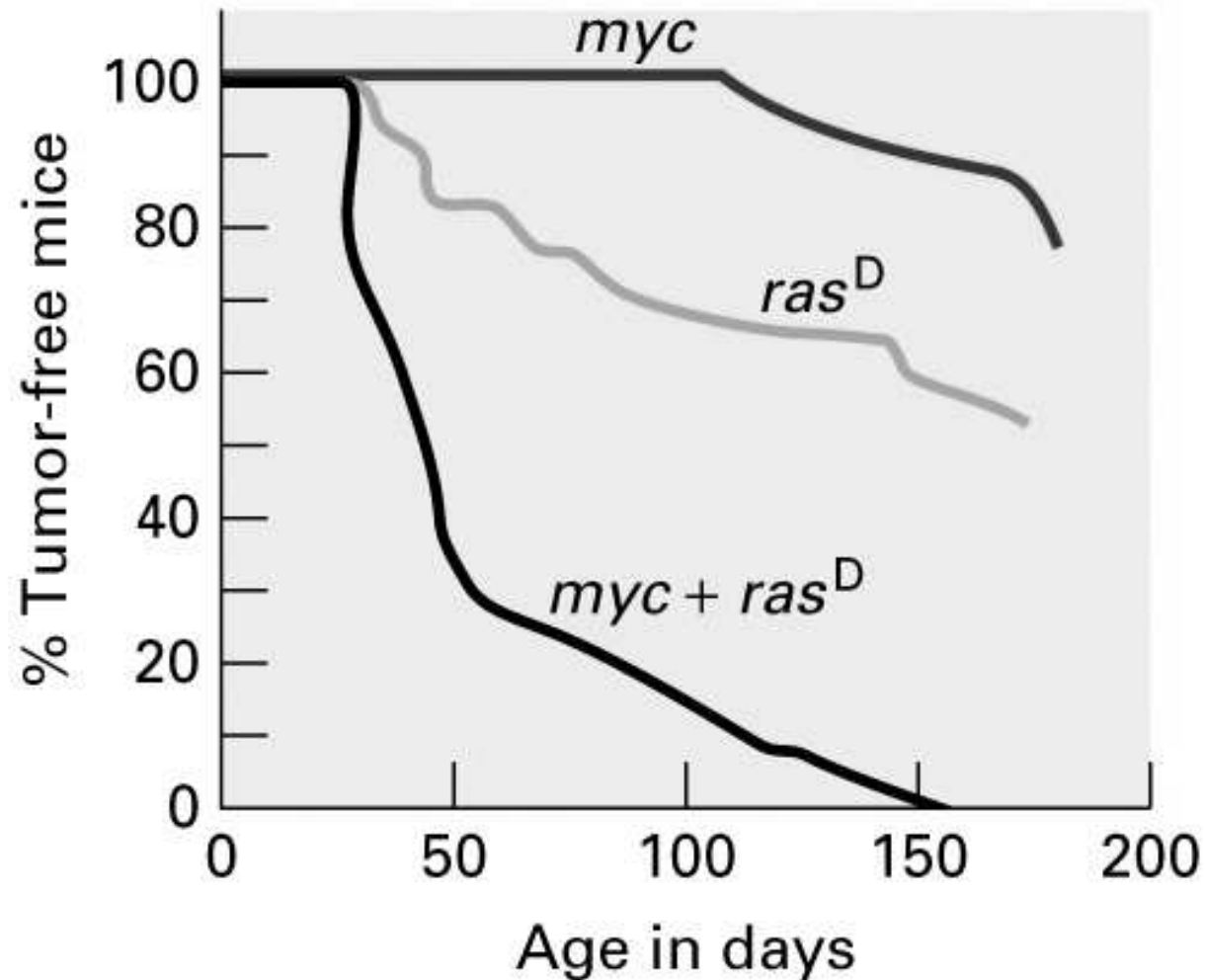


# Páry spolupracujících onkogenů

<i>ras, ros, src, yes, sea, erbB, nebo fps</i> .....	<i>myc</i>
<i>ras</i> .....	<i>N-myc</i>
<i>ras</i> .....	<i>L-myc</i>
<i>ras</i> .....	<i>Adenovirus E1A</i>
střední <i>T antigen Polyomaviru</i> .....	velký <i>Tant.</i> / <i>Polyomaviru</i>
<i>ras</i> .....	velký <i>T antigen viru SV40</i>
<i>ras</i> .....	<i>Papilomavirus E7</i>
<i>erbA</i> .....	<i>erbB</i> (erythr. a fibr. kuřat)
<i>myc</i> .....	<i>raf</i> (makrofágy kuřat)
<i>myc</i> .....	<i>src</i> (ptačí chondroblasty)
<i>myc</i> .....	<i>bcl-2</i> (myší preB buňky)
<i>myc</i> .....	<i>raf</i> (neuroretin kuřat)

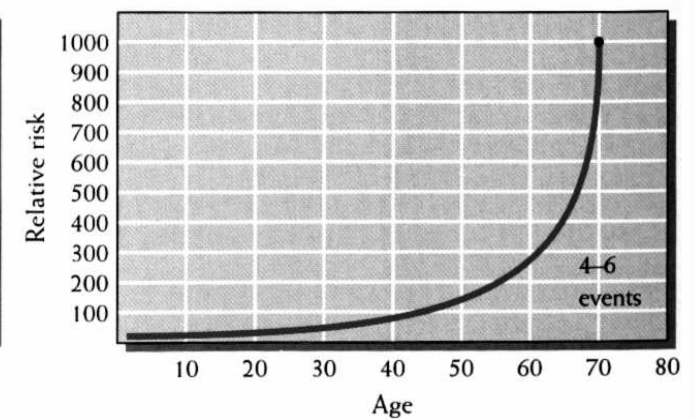
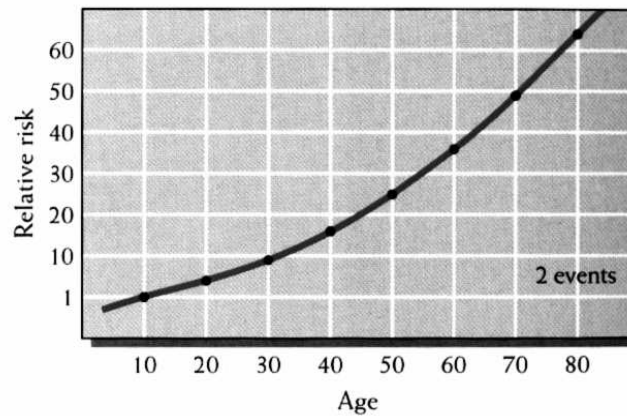
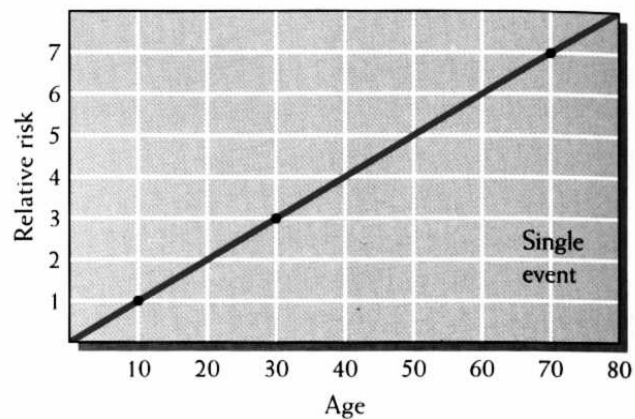
onkogeny získané z nevirových nádorů představují jednotlivé stupně nádorového zvratu buňky

# Spolupráce onkogenů při transformaci



# Epidemiologie nádorů - nádor je výsledkem 4-6 genetických změn

Závislost výskytu nádoru na věku není lineární



Model vpravo nejlépe odpovídá skutečnosti: 80-letý člověk má asi 1000x větší pravděpodobnost, že má nádor tlustého střeva, než člověk 20-letý.

# DNA nádorové viry

- 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 onkogeny
- "rané" virové proteiny funkčně inaktivují nádorové supresorové proteiny

# Proteiny DNA nádorových virů se vážou na Rb a p53

	Rb	p53
SV40	T antigen	T antigen
Adenovirus	E1A	E1B
Papilloma	E7	E6

# The Big Picture

