

Úvod do nádorové biologie

Roman Hrstka

hrstka@mou.cz

Masarykův onkologický ústav, Brno



Životní cyklus

Vývoj a růst organismu - rovnovážný stav (reparační mechanismy, proliferace ~ buněčná smrt) - stárnutí - smrt.

- Metazoa - krátký životní cyklus, dospělí jedinci tvořeni převážně post-mitotickými buňkami
- Obratlovci - delší život, velká část buněk stále schopna dělení a proliferace

Vývoj mnohobuněčného organismu

1. Dělení (cleavage)
2. „Pattern formation“ - zajišťuje, založení orgánů na správných místech
3. Organogeneze
4. Růst

Nádor, tumor, neoplazma, novotvar

- je nová a abnormální tkáň v mnohobuněčném organismu, která v tomto organismu nemá fyziologickou funkci a roste neregulovaným způsobem.
- je geneticky podmíněný abnormální přírůstek buněčné tkáňové hmoty klonálního charakteru. Jeho růst není v koordinaci s růstem okolních tkání a rovnovážným stavem organismu.

Klasifikace nádorů:

(A) podle schopnosti infiltrovat se do jiné tkáně

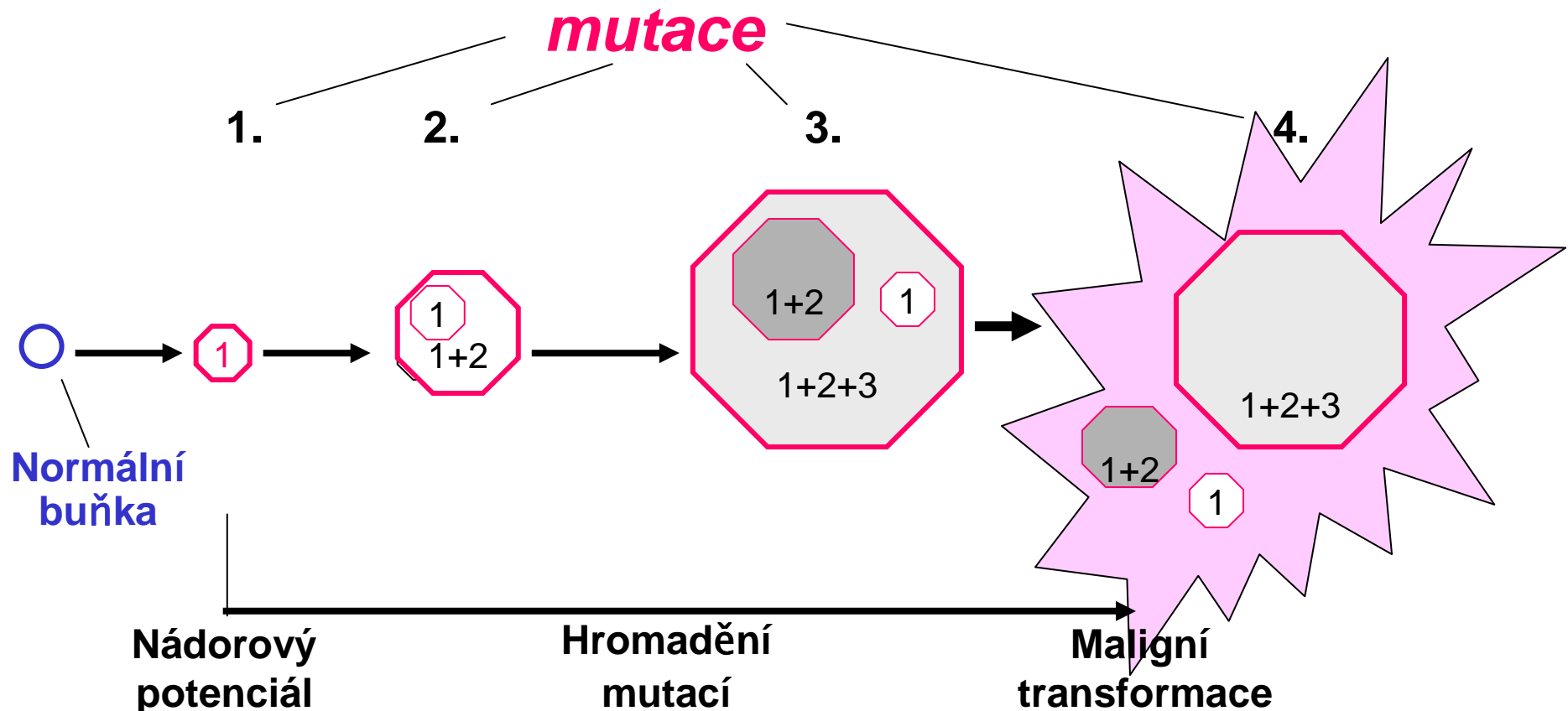
- **Benigní (nezhoubné):** zůstávají v místě svého vzniku, nemigrují, neinvadují jiné tkáně.
- **Maligní (zhoubné):** pronikají do okolních tkání a prostřednictvím krevního a lymfatického systému do celého těla, v nových tkáních vyvolávají tvorbu sekundárních nádorů (metastází)

(B) podle původu

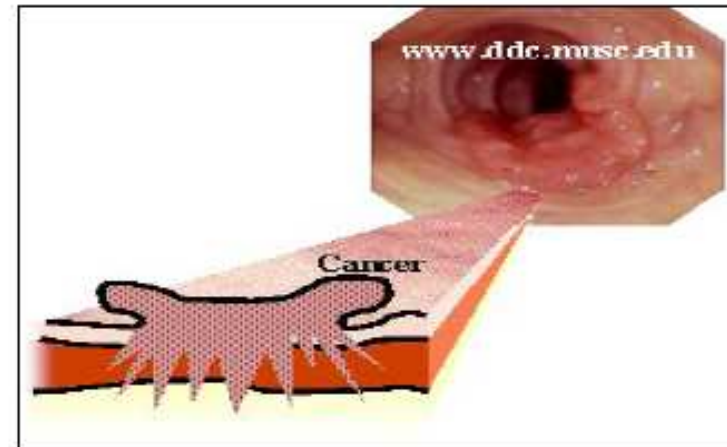
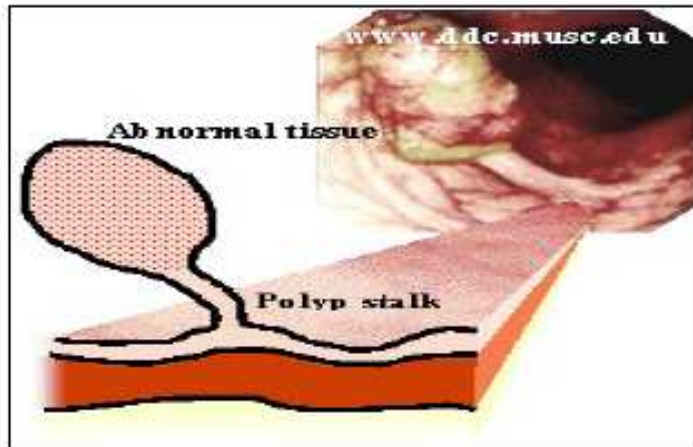
- **Karcinomy:** z epiteliálních buněk (~ 90% nádorů)
- **Sarkomy:** z pojivových tkání (< 1% onemocnění)
- **Leukemie:** z hematopoetických buněk

Kancerogeneze

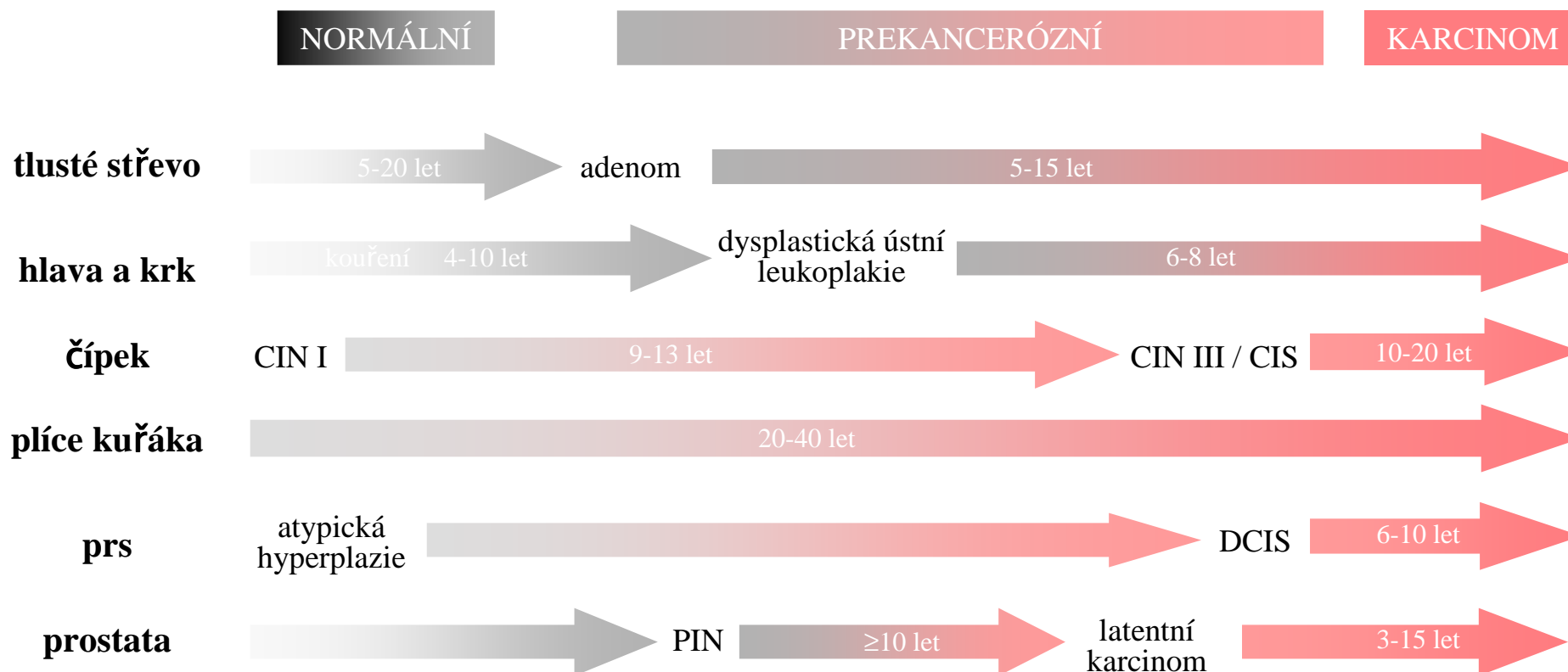
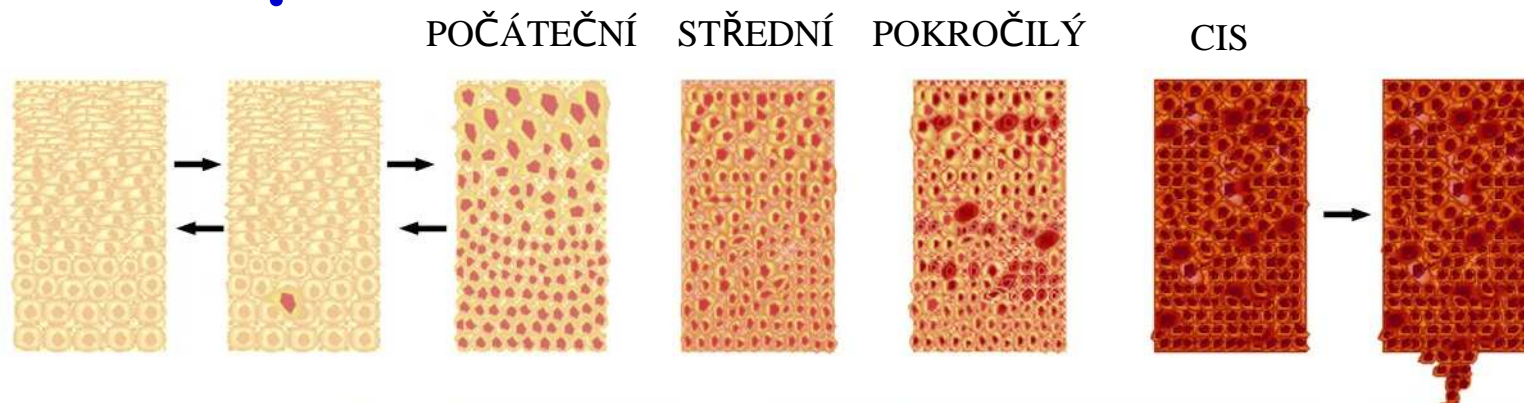
- je proces vzniku a vývoje nádoru
- je vícestupňový proces
- podstatou kancerogeneze je postupné hromadění genetických (a epigenetických) změn



Molekulární model iniciace nádoru (familiární adenomatózní polypóza)



Neoplastická transformace



Objevení onkogenů!

*ONCOGENES OF RNA TUMOR VIRUSES AS
DETERMINANTS OF CANCER*

1969

BY ROBERT J. HUEBNER AND GEORGE J. TODARO

VIRAL CARCINOGENESIS BRANCH, NATIONAL CANCER INSTITUTE, NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH,
BETHESDA, MARYLAND

Communicated September 16, 1969

Abstract.—Evidence from sero-epidemiological studies and from cell culture studies supports the hypothesis that the cells of many, and perhaps all, vertebrates contain information for producing C-type RNA viruses. It is postulated that the viral information (the virogene), including that portion responsible for transforming a normal cell into a tumor cell (the oncogene), is most commonly transmitted from animal to progeny animal and from cell to progeny cell in a covert form. Carcinogens, irradiation, and the normal aging process all favor the partial or complete activation of these genes. An understanding of how normal cells and normal animals prevent expression of endogenous viral information would appear to offer one of the best hopes for the control of naturally occurring cancers.

Jako první byly ve vztahu k tvorbě nádorů objeveny geny RNA virů v genomu obratlovců odpovědné za transformaci normální buňky na buňku nádorovou (nazvané onkogeny), které byly částečně nebo i kompletně aktivovány karcinogeny, zářením nebo i normálním procesem stárnutí.

Co z toho vyllynulo?

Pochopení mechanismů, kterými se normální buňka brání expresi těchto endogenních virových informací, může vést k nalezení cesty potenciální terapie některých typů nádorů.

Onkogeny

Protoonkogen je strukturní gen eukaryotické buňky, který se svým translačním produktem podílí do značné míry na regulaci dělení buněk a jejich diferenciaci.

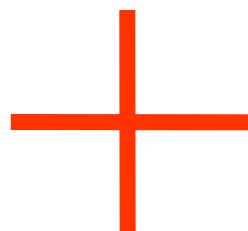
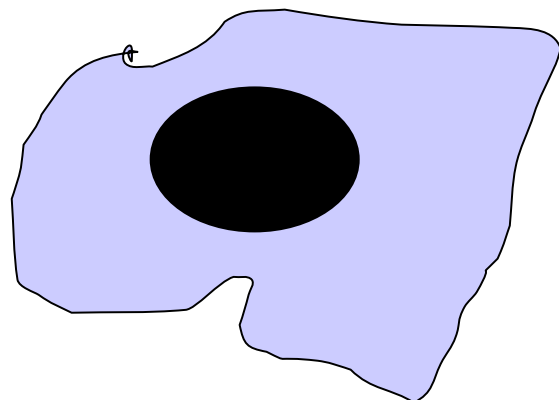
Onkogen je protoonkogen pozměněný nebo aktivovaný tak, že vyvolává neoplastickou transformaci buňky.

Mutace protoonkogenů jsou:

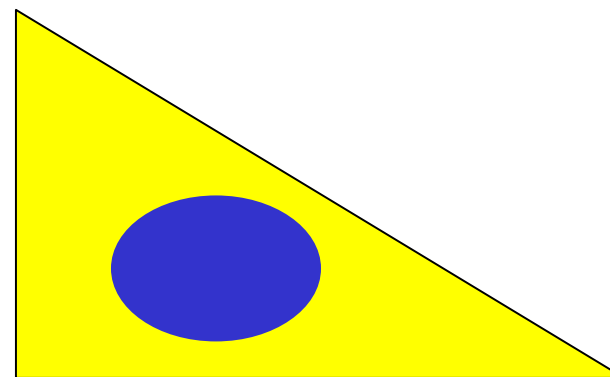
- aktivující
- dominantní
- vyskytují se v somatických buňkách a jen výjimečně v zárodečných buňkách [Vrozená citlivost k medulárnímu thyroïdnímu karcinomu (MTC) je typickým příkladem hereditárního karcinomu způsobeného mutací *RET* protoonkogenu. → prediktivní genetické vyšetření]

I. Fúze buněk

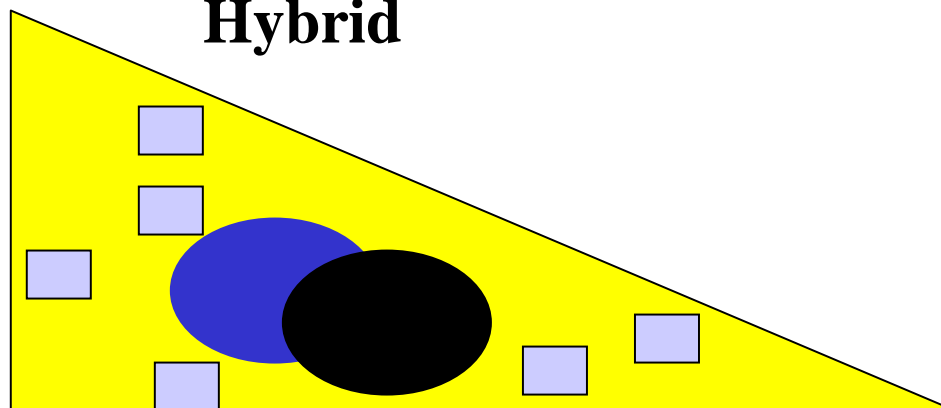
Nádorová buňka



Normální buňka



Hybrid



Výsledky fúze

- Hybridní buňky rostou jako normální buňky.
- Charakteristika maligního růstu je recesivní. Normální buňky potlačují abnormální růst.
- V případě ztráty některých chromozomů, se maligní růst znovu projeví.



Nesouhlasí s teorií o onkogenech.

Nádorové supresory

Produkty genů pro nádorové supresory (**antionkogeny**) v normálních buňkách nevyvolávají proliferaci, ale naopak ji potlačují a udržují buňky ve stádiu klidu (G_0). Jejich ztráta se projevuje neregulovanou proliferací.

Mutace nádorových supresorů jsou:

- inaktivující
- recesivní (spojeno s LOH) („recesivní onkogeny“)
- vyskytují se v somatických a také v zárodečných buňkách

Objevení proteinu p53

(Reprinted from Nature, Vol. 278, No. 5701, pp. 261-263, March 15, 1979)

© Macmillan Journals Ltd., 1979

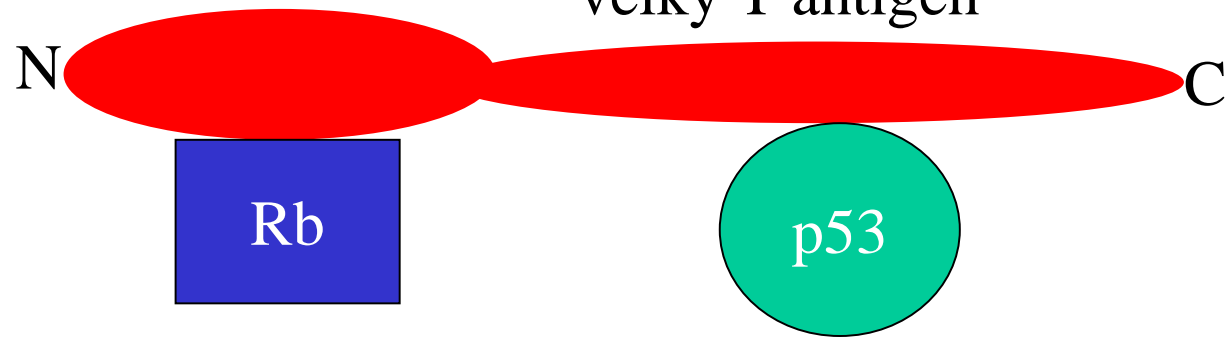
T antigen is bound protein in SV40-tr

THE early region of the small 40 (SV40), is known to code for T and t antigens ('small t' and 'large t') which are expressed in cells transfected with SV40.



SV40-transformed mouse cell line
indicated by as little as 1 μ l of a rabbit

velký T antigen



μ l antiserum



Virology. **1979 Oct 30**; 98(2):308-18.

The SV40 A gene product is required for the production of a 54,000 MW cellular tumor antigen. Linzer DI, Maltzman W, Levine AJ.

Proč nebyla od počátku objevení proteinu p53 jasná jeho funkce?

MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY, Feb. 1988, p. 531-539
0270-7306/88/020531-09\$02.00/0
Copyright © 1988, American Society for Microbiology

1988

Vol. 8, No. 2

Activating Mutations for Transformation by p53 Produce a Gene Product That Forms an hsc70-p53 Complex with an Altered Half-Life

C. A. FINLAY,¹ P. W. HINDS,¹ T.-H. TAN,¹ D. ELIYAHU,² M. OREN,² AND A. J. LEVINE^{1*}

Department of Molecular Biology, Princeton University, Princeton, New Jersey 08544,¹ and Weizmann Institute of Science, Rehovot 76,100, Israel²

Received 21 September 1987/Accepted 31 October 1987

The 11-4 p53 cDNA clone failed to transform primary rat fibroblasts when cotransfected with the *ras* oncogene. Two linker insertion mutations at amino acid 158 or 215 (of 390 amino acids) activated this p53 cDNA for transformation with *ras*. These mutant cDNAs produced a p53 protein that lacked an epitope, recognized by monoclonal antibody PAb246 (localized at amino acids 88 to 110 in the protein) and preferentially bound to a heat shock protein, hsc70. In rat two populations of p53 proteins were detected, PAb246⁺ monoclonal antibody, respectively. The PAb246⁻ p53 had a half-life 4- to 20-fold longer than free p53 (PAb246⁺). This was observed in the transformation process. cDNAs for p53 derived from rat cells in cooperation with the *ras* oncogene and produced Recombinant clones produced between a Meth A cDNA and rat cells. A single amino acid substitution at residue 132 transformed. These studies have identified a region by which, when mutated, can activate the p53 cDNA. These studies identify a wild-type sequence and whether a wild-type p53 gene c

REVIEW

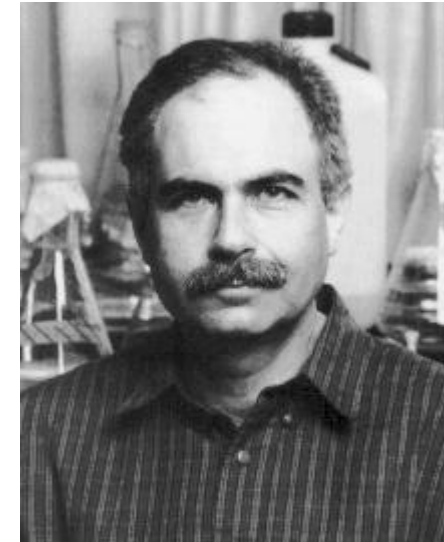
p53: oncogene or anti-oncogene? 1990

David P. Lane¹ and Sam Benchimol²

¹Imperial Cancer Research Fund, Clare Hall Laboratories, South Mimms, Potters Bar, Herts EN6 3LD UK; ²The Ontario Cancer Institute, University of Toronto, Toronto, Ontario, M4X 1K9 Canada

The products of two groups of DNA tumor viruses bind to p53

p53, a 375-amino-acid nuclear phosphoprotein, was first detected because it formed a tight complex with the SV40 large-T antigen (Lane and Crawford 1979; Linzer and Levine 1979) and therefore was coimmunoprecipitated with anti-T antibodies from extracts of SV40-transformed cells. This observation revealed the first example of such a complex between a viral oncogene and a host protein and served as a precedent for the discovery of a large number of protein-protein interactions between the products of oncogenes and other proteins. For



frog, chicken, and bony fish. The frog and rodent proteins bind tightly to SV40 large-T antigen, whereas the human and monkey proteins form a much less stable complex. Comparison of the amino acid sequences of these p53 proteins reveals five blocks of particularly highly conserved sequence (for review, see Jenkins and Sturzbecher 1988). Several of these blocks are important for the interaction with large-T antigen, leading to the suggestion that they may represent sites of interaction with host cell proteins that are mimicked by large-T antigen.

Gen a protein p53

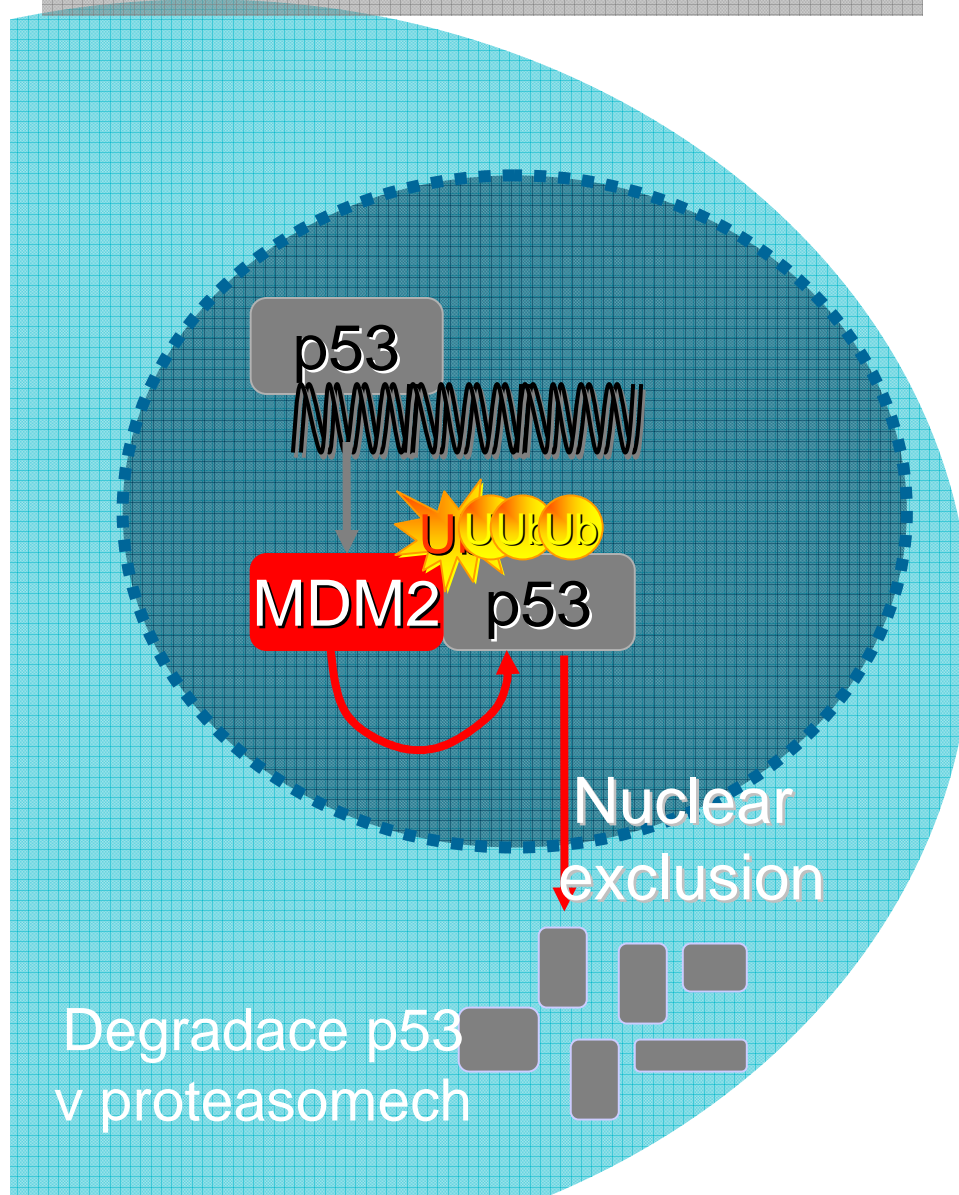
Gen leží na chromozomu 17 (17p13) a má 11 exonů (z nichž první se neexprimuje).

Protein je jaderný fosfoprotein, 393 AA, 53 kDa.

- poprvé popsán jako protein interagující s LT SV40
- jedná se o transkripční faktor
- funguje jako tetramer
- konsensus sekvence: 5' - Pu-C(A/T)(A/T)G-Py - 3'
- mutace u cca 40% všech lidských nádorů

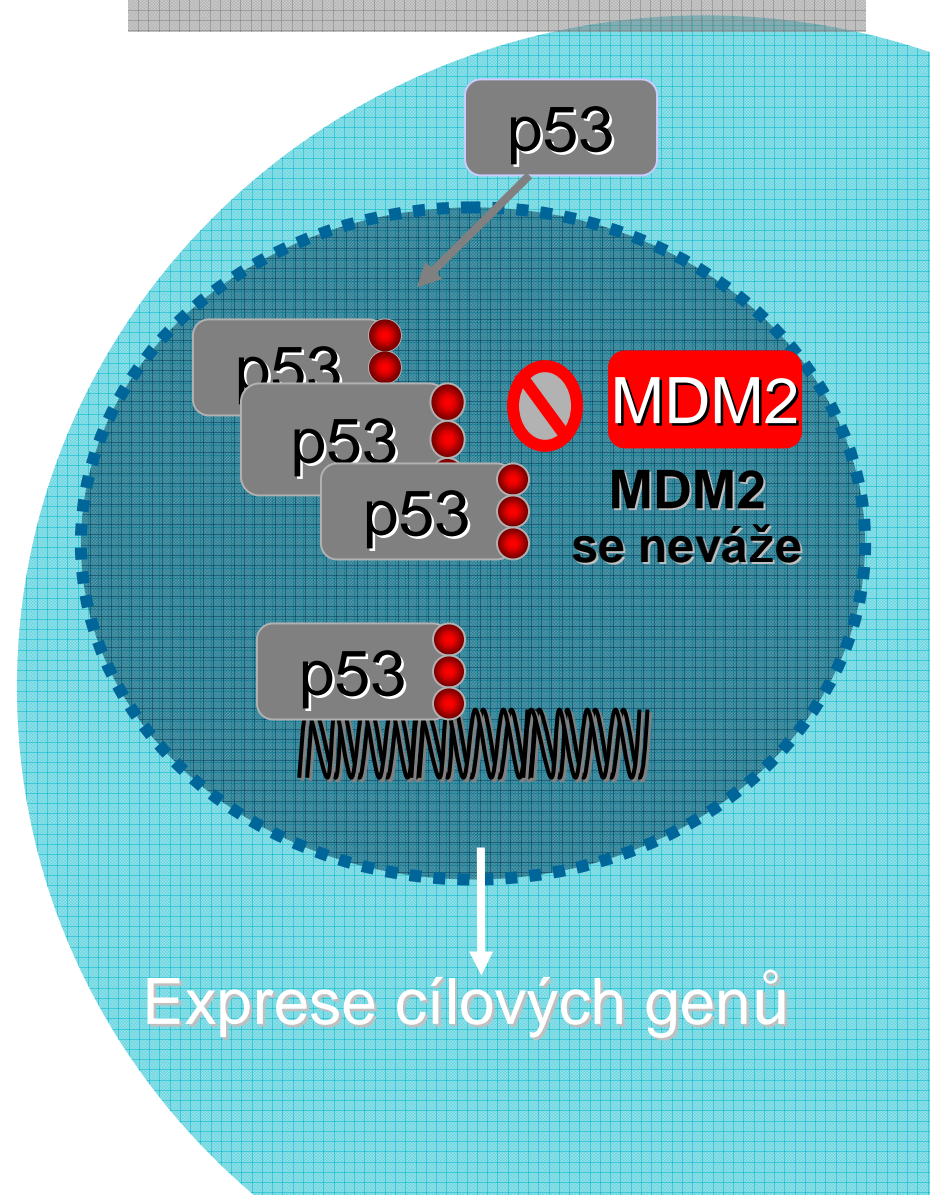
Fyziologické podmínky

Nízká hladina p53 v jádře

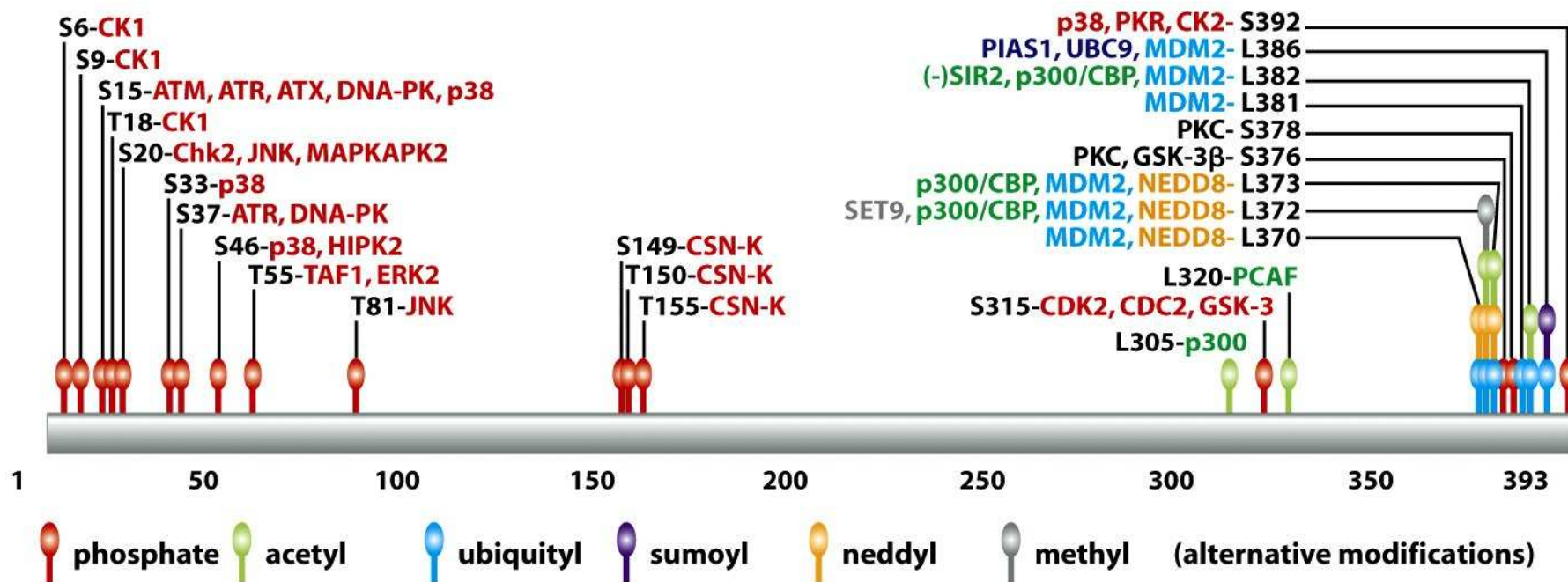


Stresové podmínky

Zvýšení hladiny p53



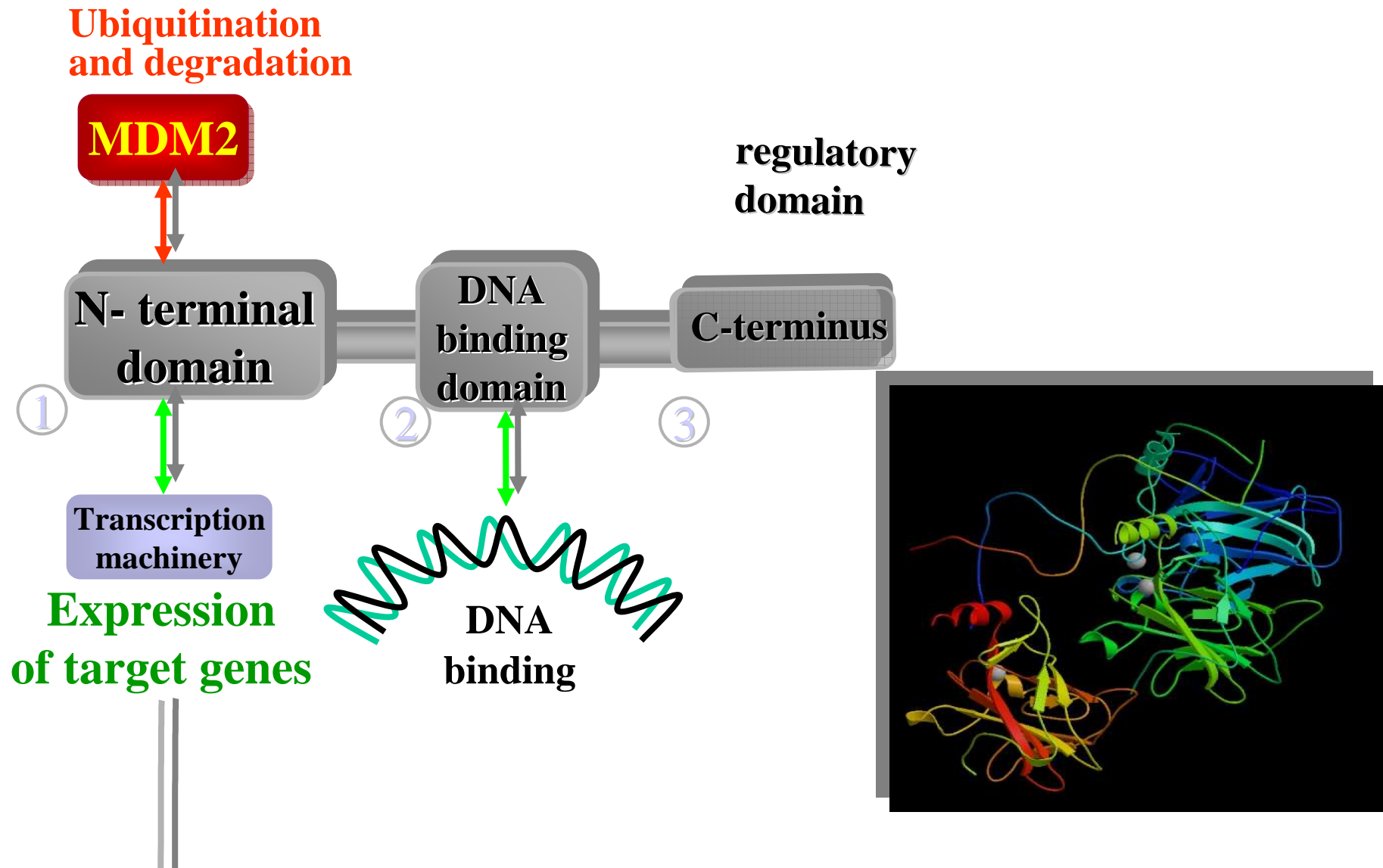
Posttranslační modifikace p53



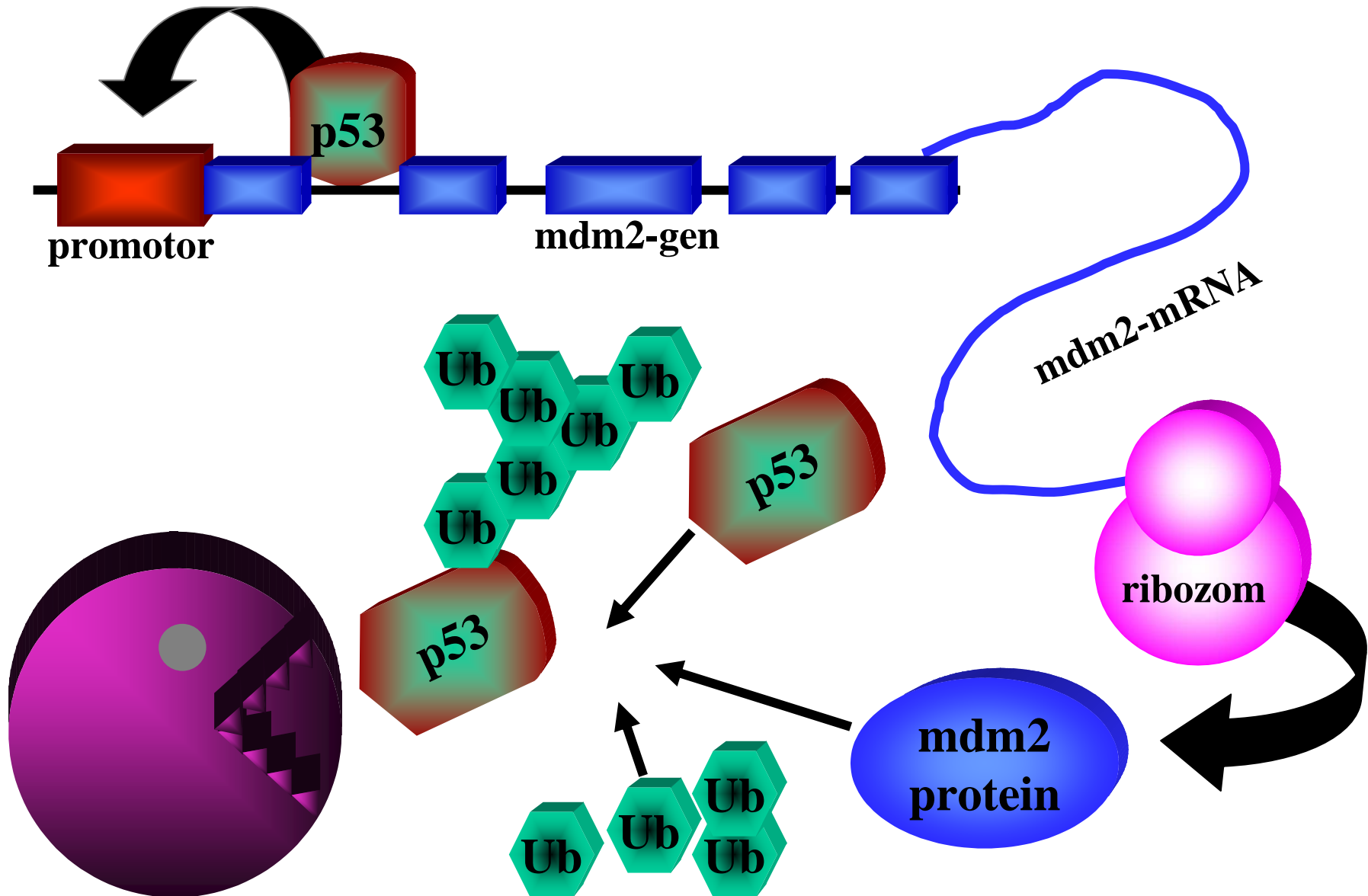
Posttranslační modifikace souvisejí s regulací aktivity a také stability p53.



Struktura proteinu p53



Regulate stability p53



Regulace buněčné lokalizace p53

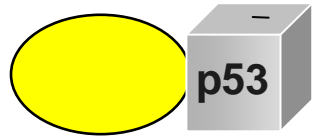
p53 má na C-konci několik signálů jaderné lokalizace - **NLS**, je po syntéze transportován **do jádra**.

p53 má dvě sekvence pro export z jádra - **NES**: v oligomerizační doméně (ve funkčním tetrameru odstíněno) a na N-konci v MDM2 vazebné doméně. Export z jádra je výrazně potencován vazbou MDM2 (i když vazba MDM2 není podmínkou) a také ovlivněn fosforylací v dané oblasti: fosforylace vyvolaná stresem inhibuje transport z jádra (vedle toho, že znemožňuje vazbu MDM2)
Popsána kináza **Parc**, která zadržuje p53 v cytoplasmě.

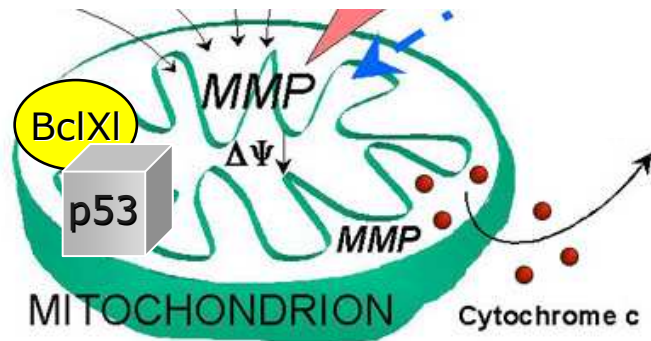
p53 funguje hlavně jako transkripční faktor. Proč je regulován export z jádra?

1. Je to další mechanismus umožňující přesnou regulaci p53.
2. Export z jádra souvisí s nějakou další funkcí p53 v cytoplasmě (apoptóza - lokalizace v mitochondriích).

Responses To p53 Activation

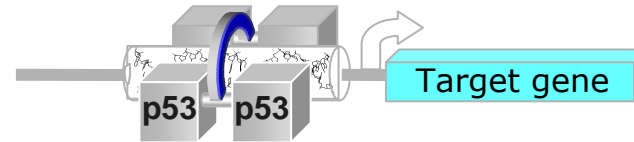


Protein Interactions

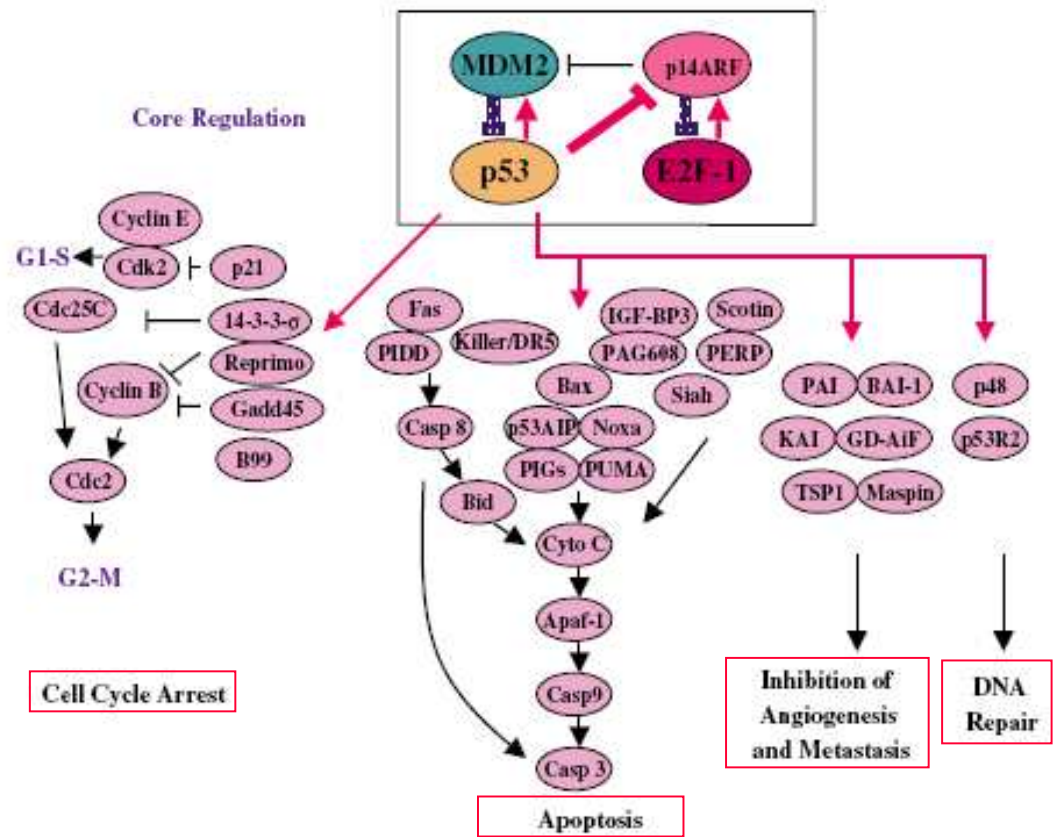


Other?.....

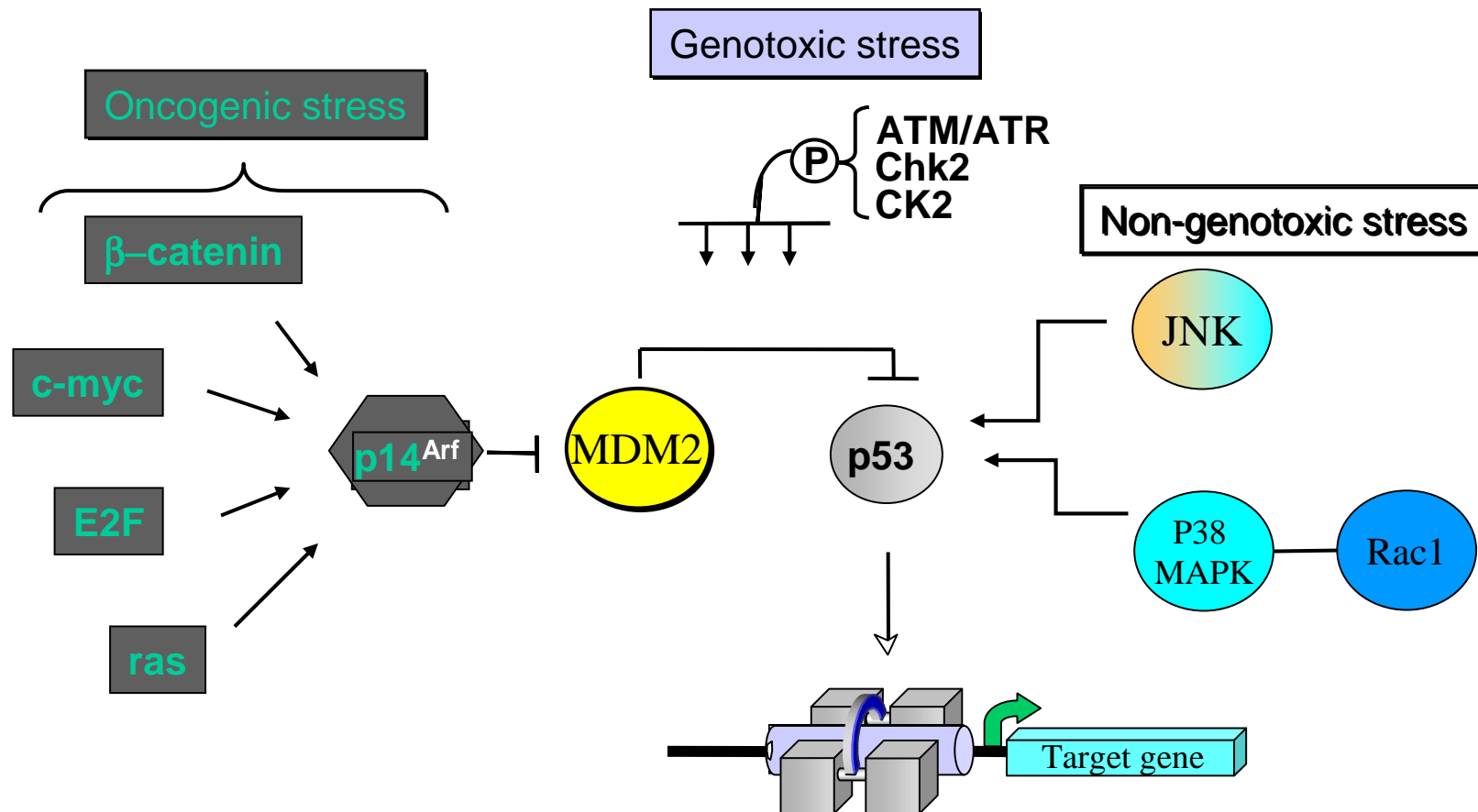
Genomic integrity
Growth control



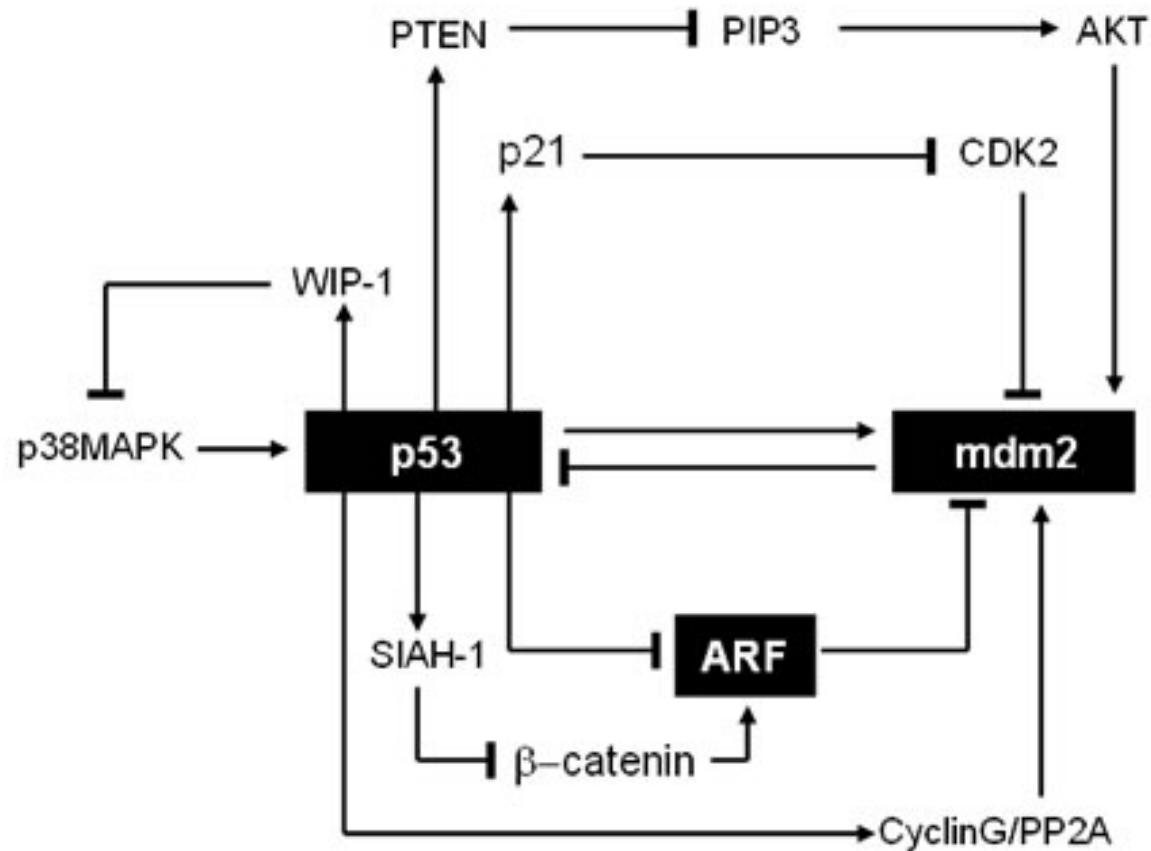
Induction of target genes



Pathways of p53 Activation



The p53 pathway: positive and negative feedback loops



Harris SL and Levine AJ, Oncogene (2005)

TP53 is a Tumor Suppressor Gene

% mice with tumor



p53+/+



1% at 18 months



p53+/-



2% at 9 months



p53-/-



75% at 6 months

Donehower LA, Harvey M, Slagle BL et al. Nature (1992)

TP53 a vývoj embrya



p53 +/+
mdm2 +/+



p53 +/+
mdm2 -/-



p53-/-
Mdm2 +/+

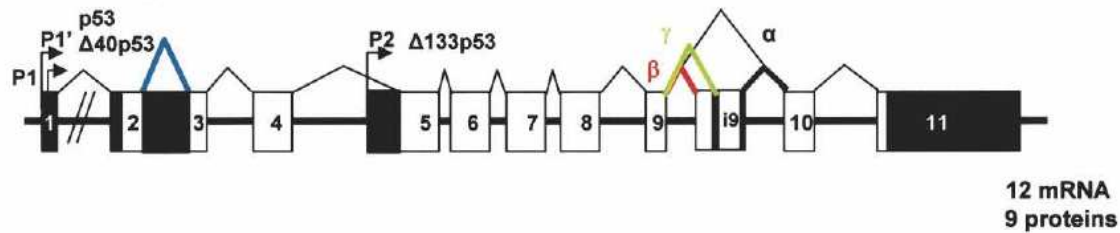


p53-/-
Mdm2 -/-

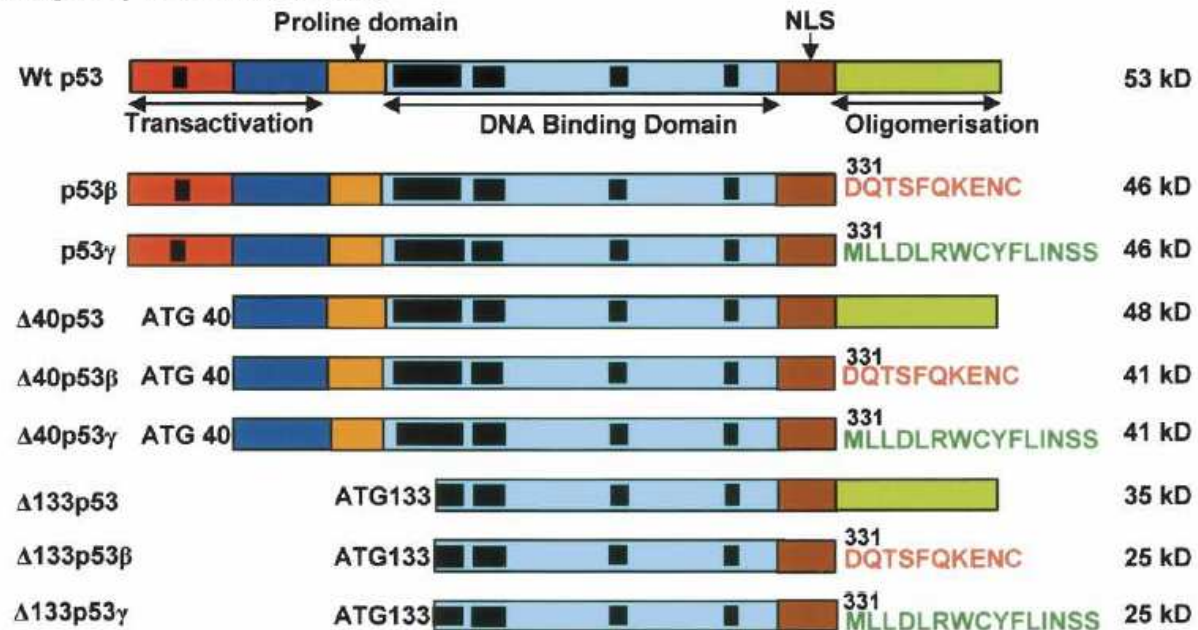


p53 izoformy

Human p53 gene structure

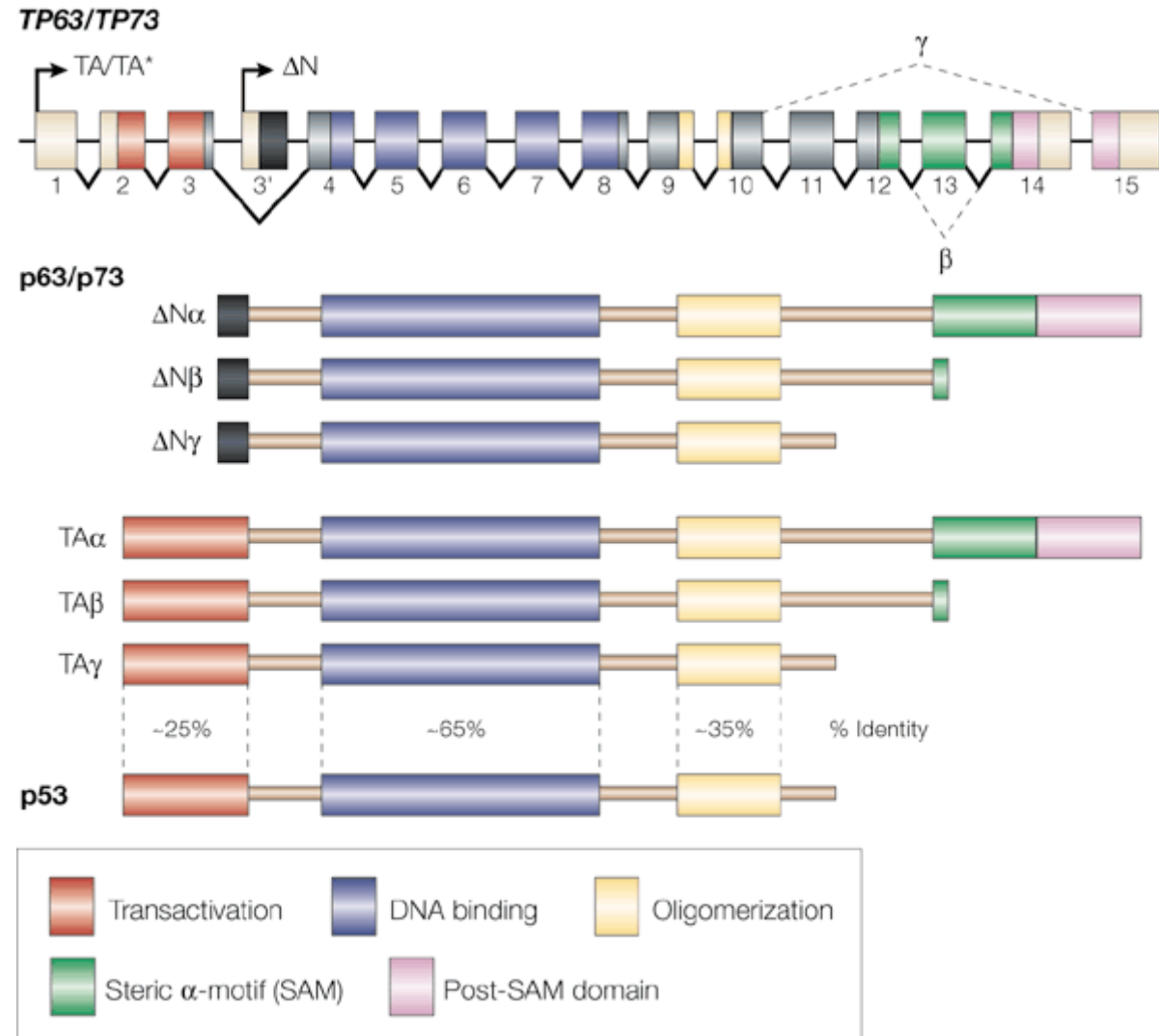


Putative p53 protein isoforms



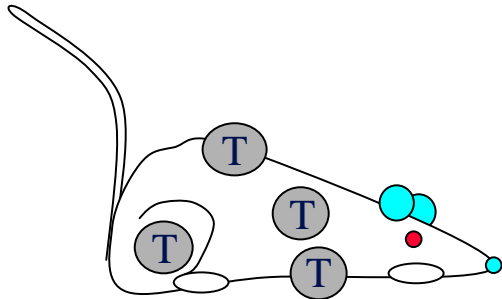
Bourdon JC., Fernandes K. et al. Genes Dev. (2005)

p63 & p73 isoforms alternativní sestřih a promotory



Yang and McKeon, Nat Rev Mol Cell Biol. (2000)

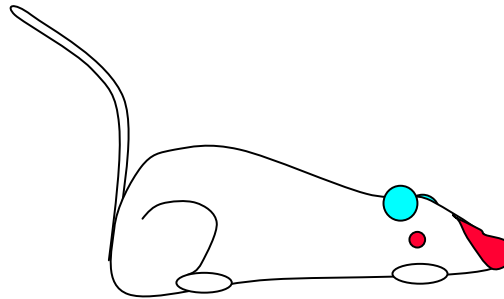
TP53 rodina: rozdílné funkce



TP53

17p13

**Zvýšená citlivost ke
spontánní
kancerogenezi**

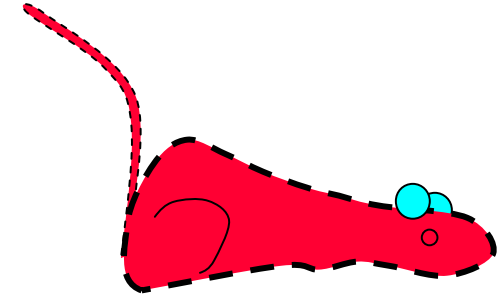


TP73

1p36

**vážné neurologické defekty
(hypokampální malformace,
hydrocefalus) chronické
infekce a záněty, postižení
feromonových sensorických
drah**

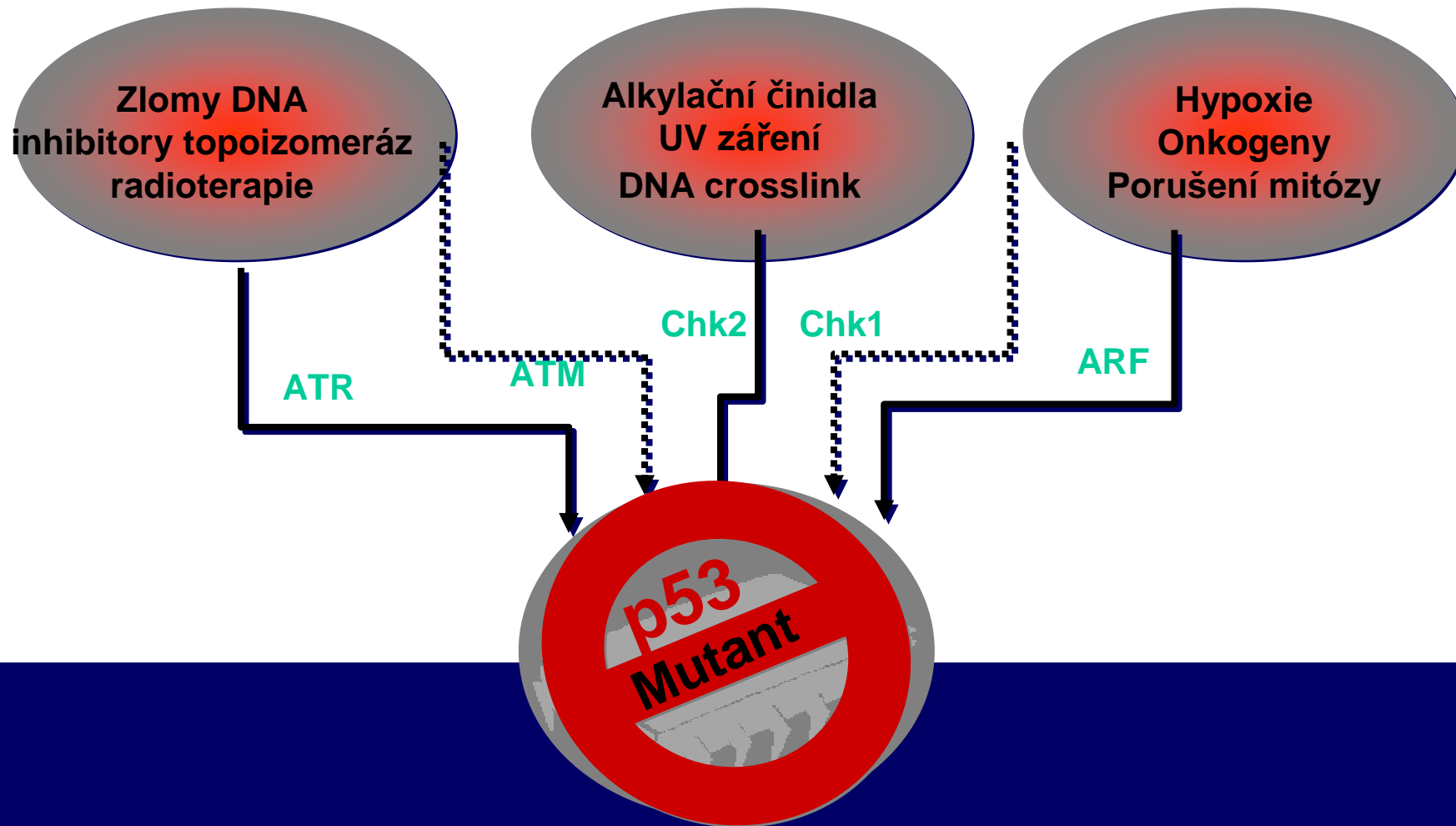
**Není zvýšená citlivost ke
spontánní kancerogenezi**



TP63

3q27-28

**zkrácené končetiny,
nemají vlasové folikuly,
zuby, prsní, slzné a
slinné žlázy**

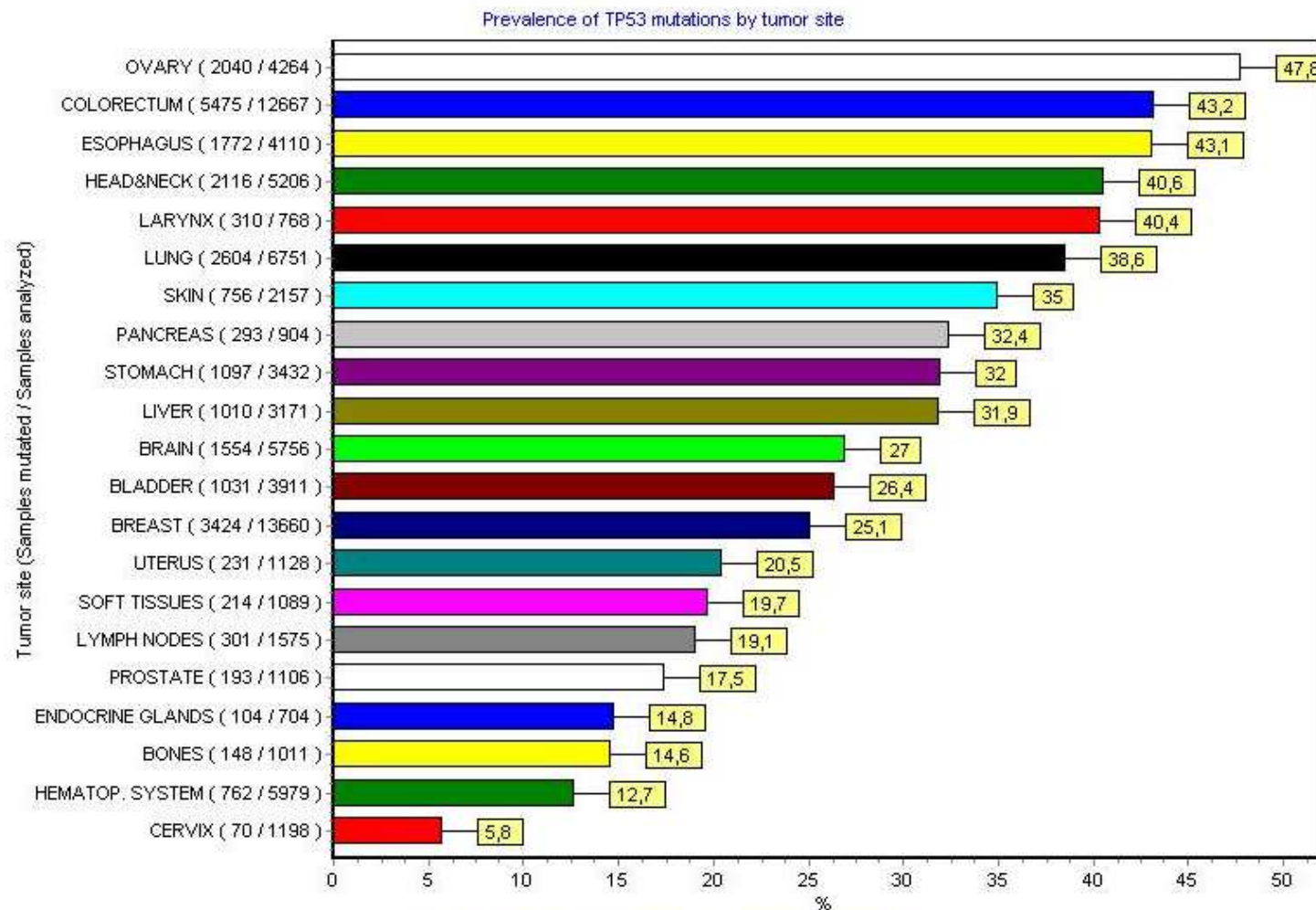


- **Genová nestabilita**
- **Nekontrolovaná proliferace**
- **Inhibice apoptózy**

Inaktivace p53 v nádorech

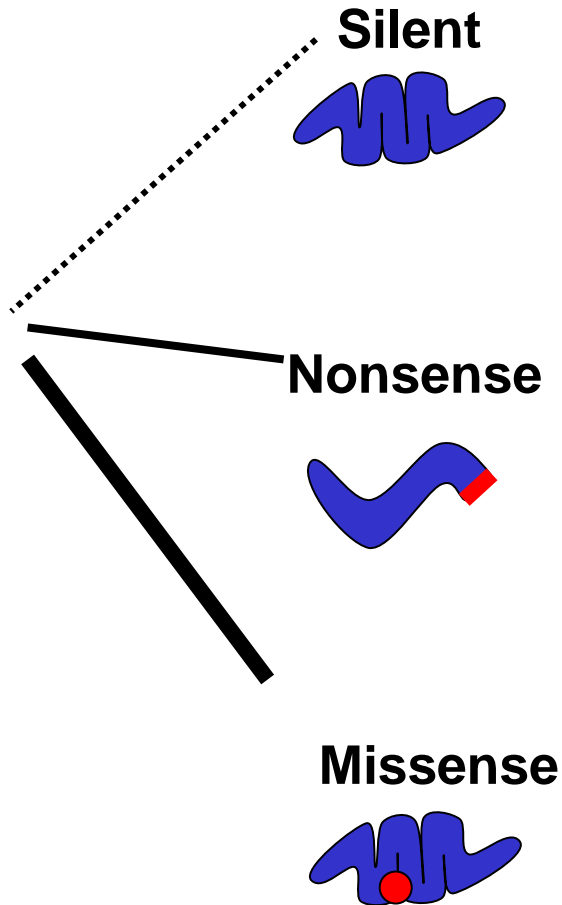
- **Mutace**
- **Jaderná exkluze** (37% zánětlivých karcinomů prsu, více než 90% nediferencovaných neuroblastomů)
- **Interakce s virovými onkoproteiny** (LT SV40, E1B, E6)
- **Amplifikace *mdm2*** (neuroblastomy), případně *mdmX* (gliomy)

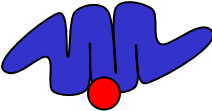

Frekvence mutací p53 v nádorech



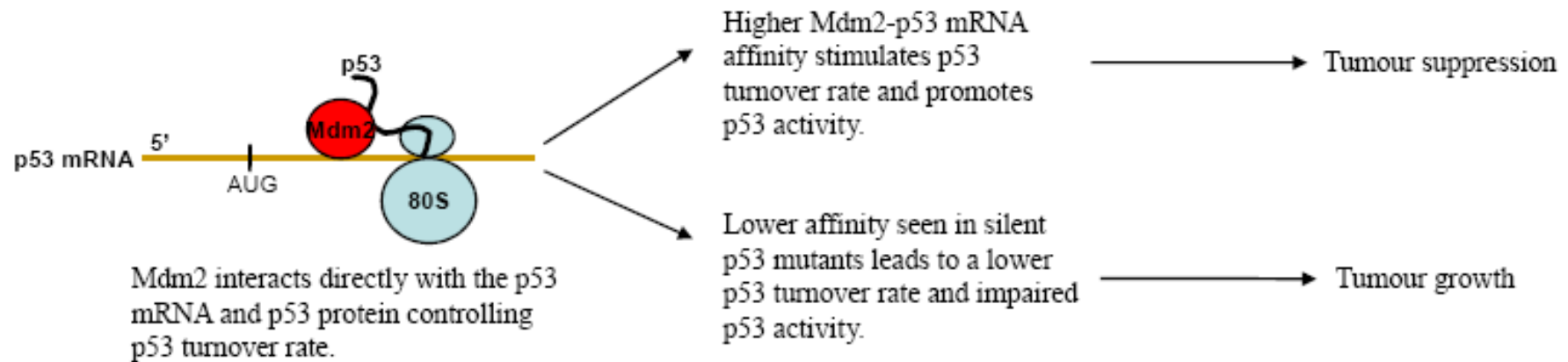
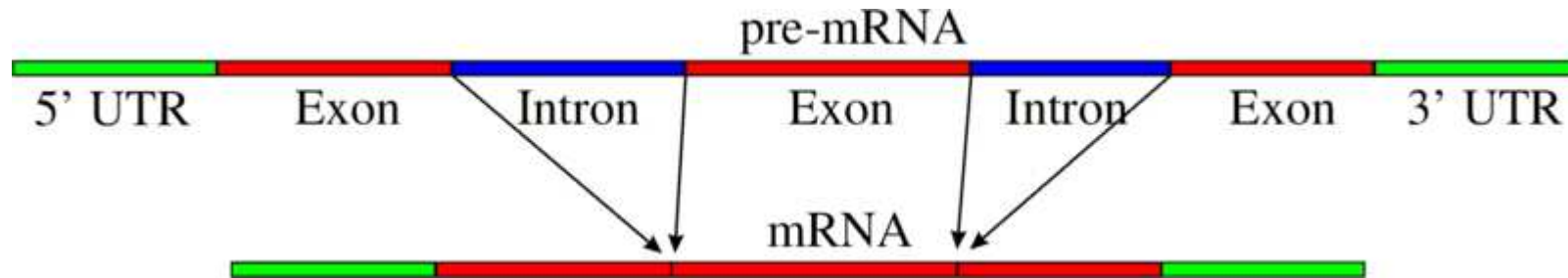
(C) IARC TP53 Mutation Database, R12 release, October 2007

Mutations of p53



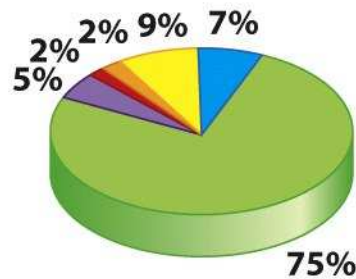
Position	Folding	Transactivation
N-terminal		Functional
C-terminal	Folded 	Partially Functional (p21>>Bax)
Core domain	Unfolded 	Nonfunctional

Silent mutace

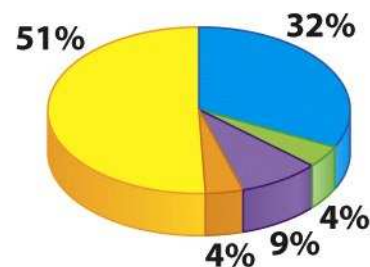


Typy mutací p53

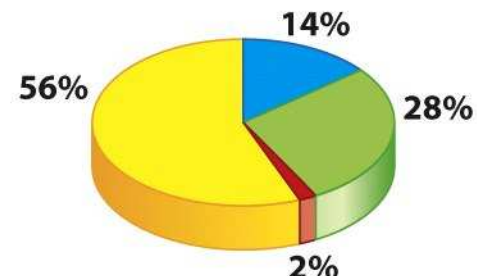
- především bodové missense mutace
- krátké delece a inserce (více v okrajových částech genu)



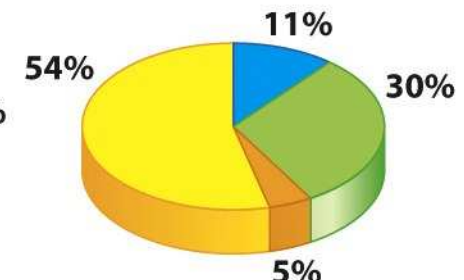
p53 (n = 15,122)



APC (n = 15,451)



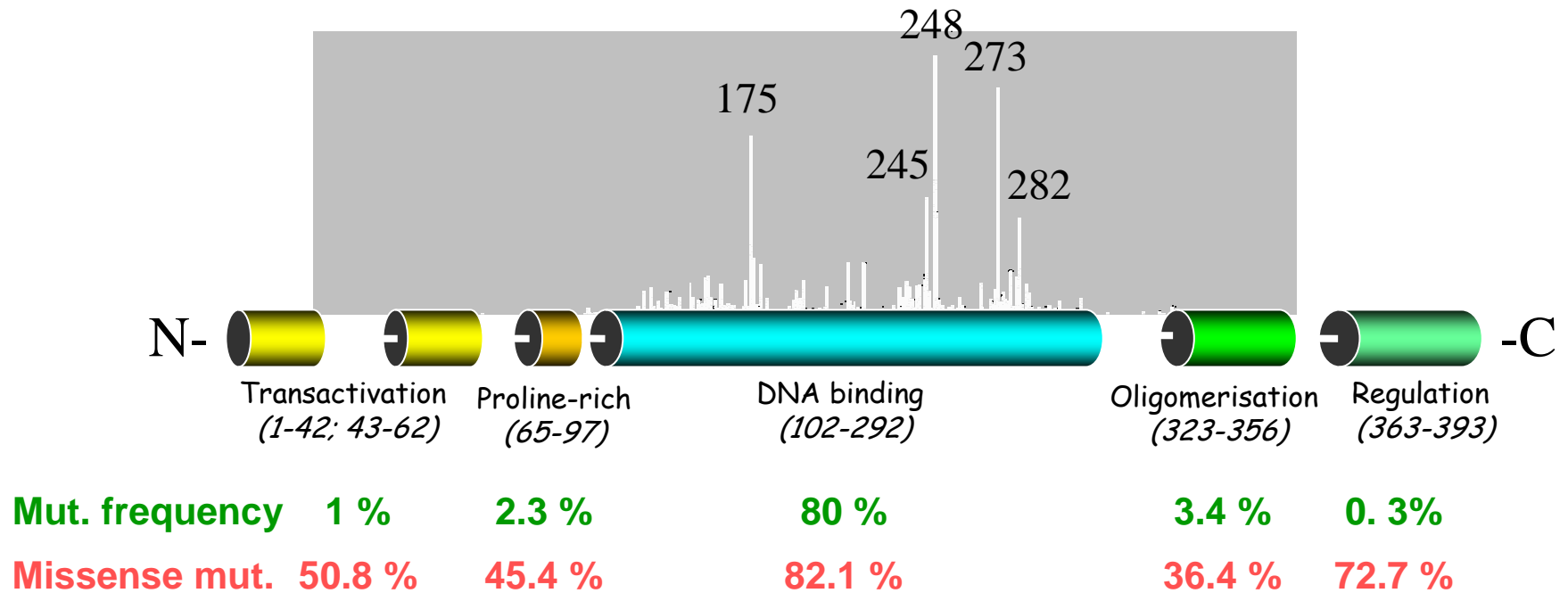
ATM (n = 617)



BRCA1 (n = 3,703)



Missense Mutations are Clustered in the DNA-binding Domain

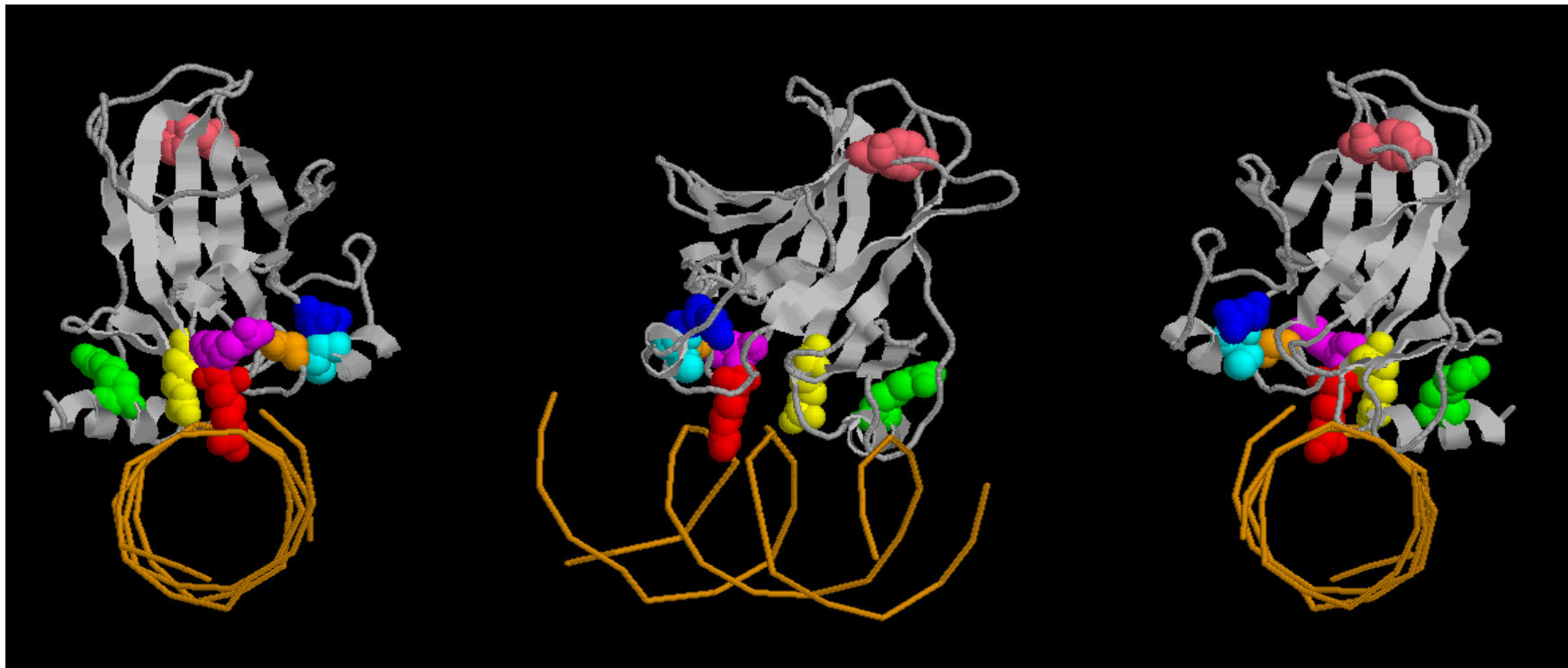


Most Frequent Mutations Are In The Loops That Make Contact With DNA

0°

90°

180°



Codon:

175

>

248

>

273

>

282

>

249

>

245

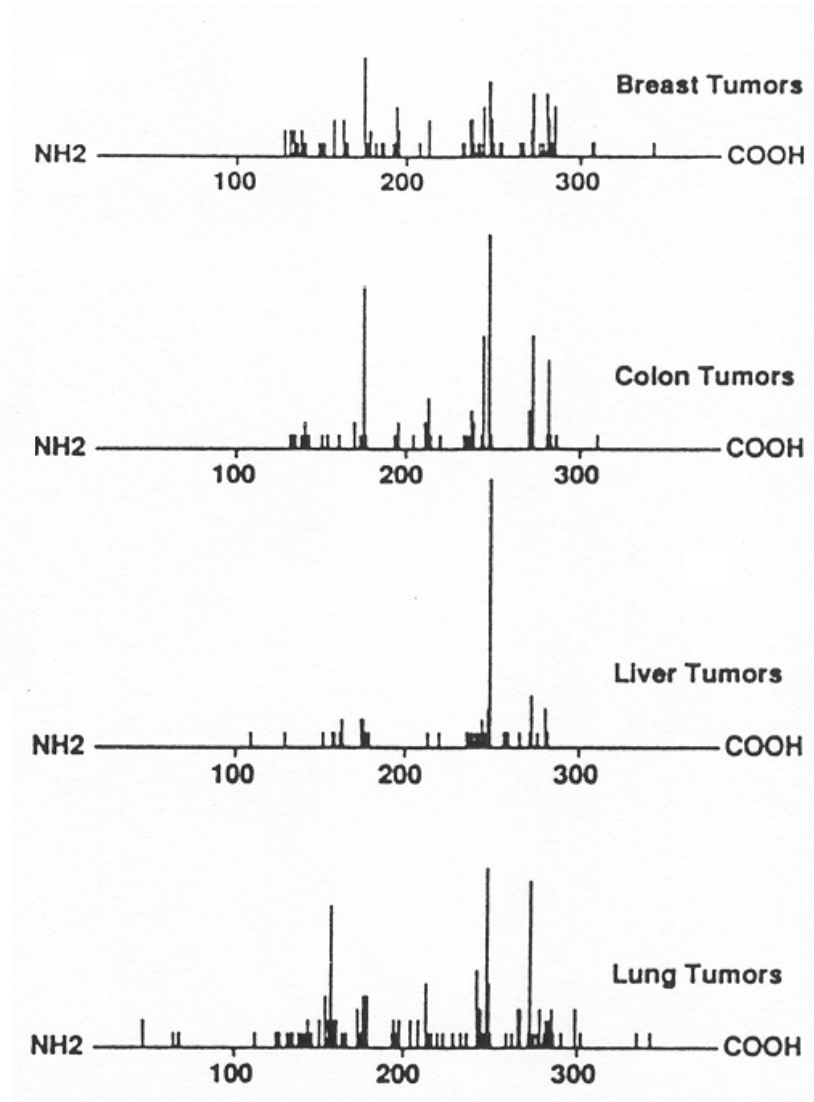
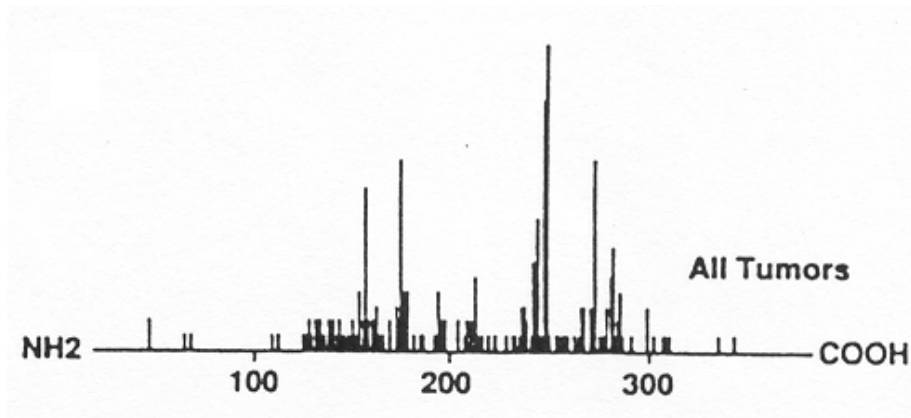
>

220

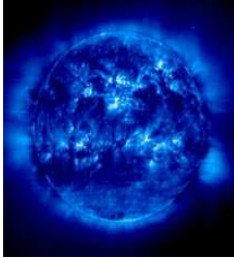
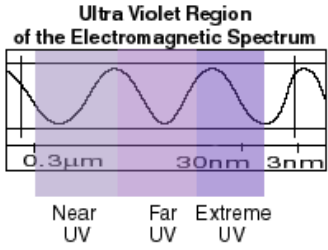
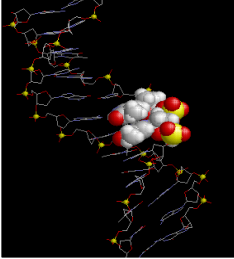

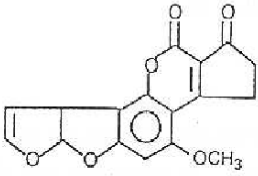
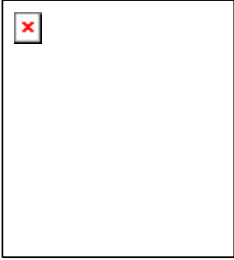

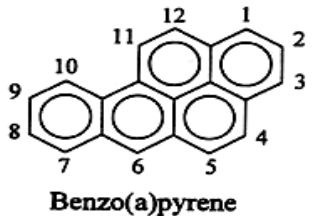
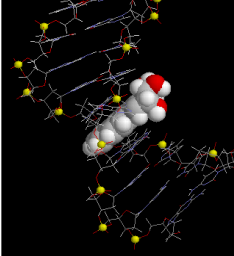
>

176

Mutační spektra p53

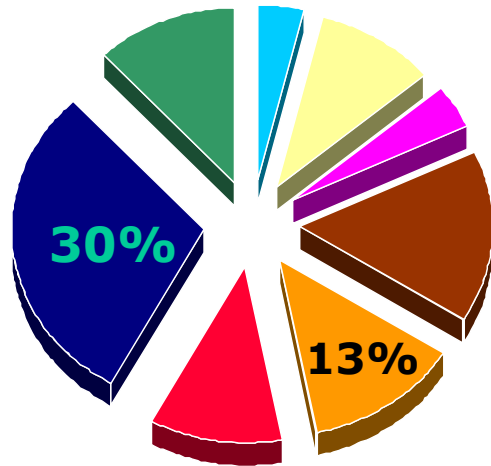


Příklady nádorově specifických mutací

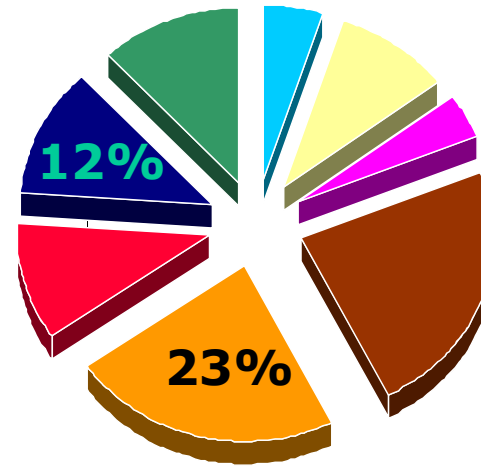
	Source	Mutagen	Adduct	TP53 pattern
UV radiations		<p>Ultra Violet Region of the Electromagnetic Spectrum</p>  <p>Near UV Far UV Extreme UV</p>		<p><u>CC to TT</u> Various codons Skin cancer: 7% Other cancers: 0%</p>
Aflatoxins		 <p>B₁: C₁₇H₁₂O₆ PM: 312.3</p>		<p><u>G to T</u> Codon 249 Liver cancer: >50% Other cancers: <2%</p>
Tobacco smoke		 <p>Benzo(a)pyrene</p>		<p><u>G to T</u> Codons 157, 158, 248, 273 Lung cancer: 30% Other cancers: <10%</p>

A Specific Mutation Pattern In Lung Cancer from Smokers

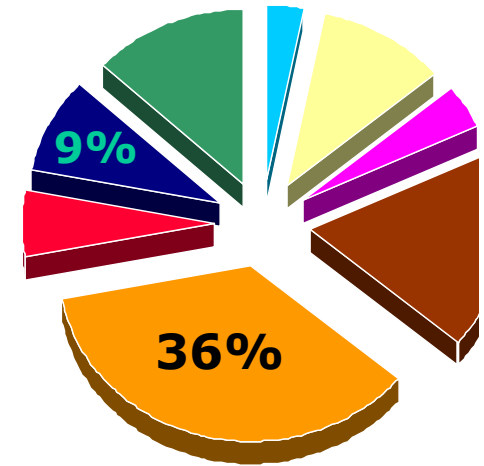
G to T



Smokers
(N=419)



Non-Smokers
(N=153)



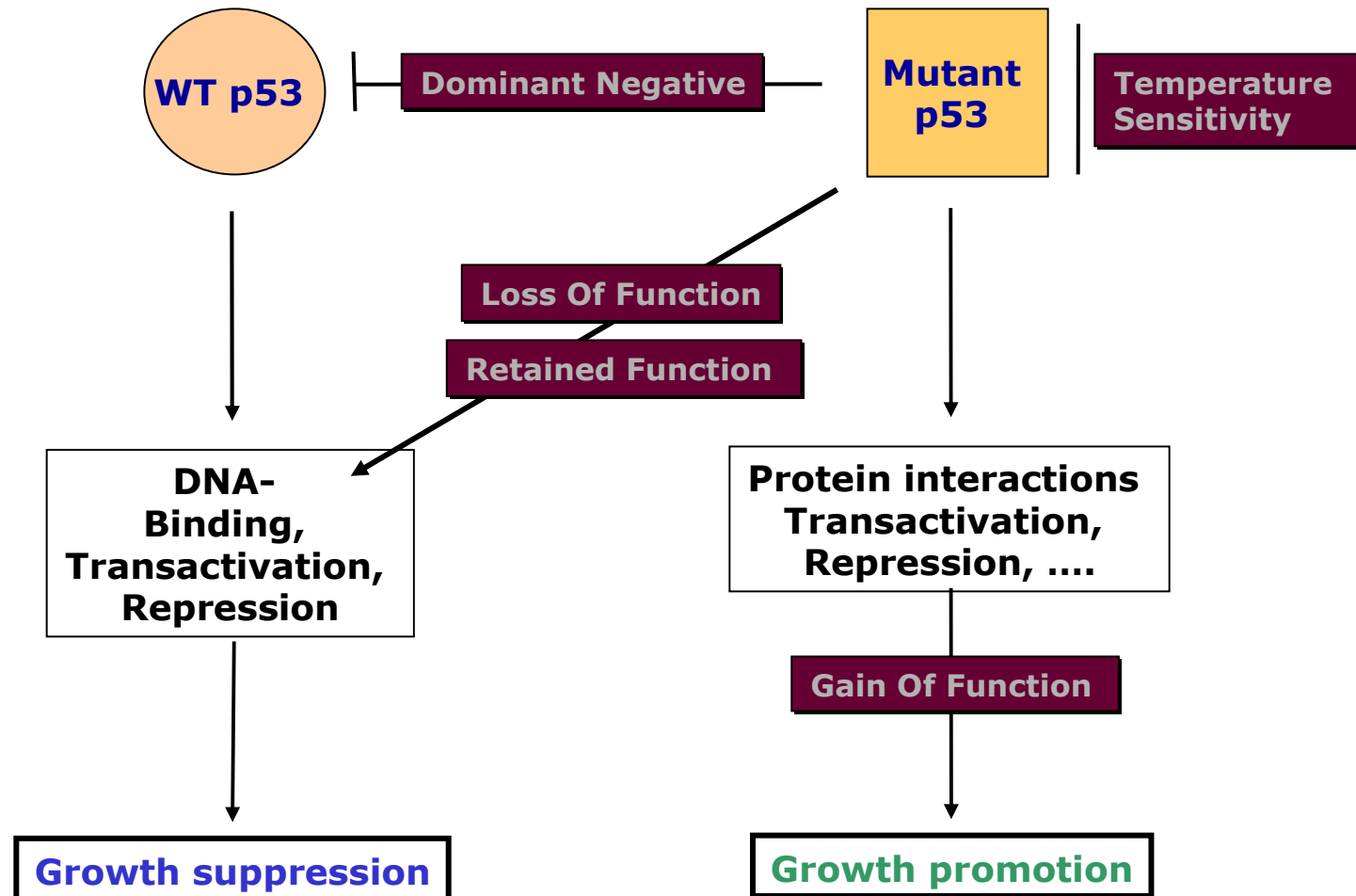
Non-tobacco related
(N=4516)

G to A (CpG)

- | | |
|--|--|
| ■ G:C>T:A | ■ A:T>T:A |
| ■ del/ins/complex | ■ G:C>A:T |
| ■ A:T>C:G | ■ G:C>A:T at CpG |
| ■ A:T>G:C | ■ G:C>C:G |

Pfeifer et al. Oncogene (2002)

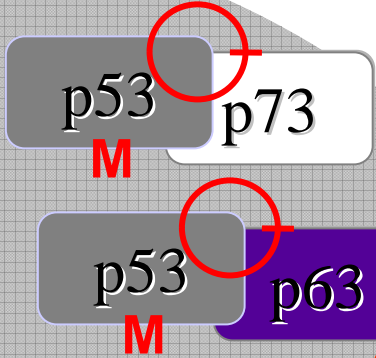
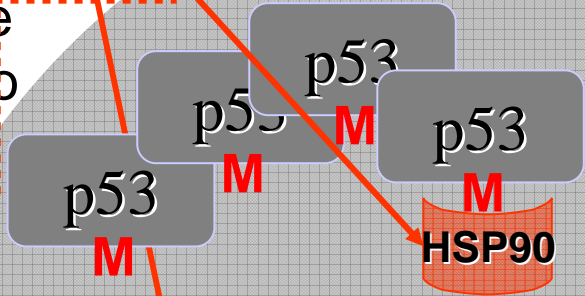
Biologická aktivita TP53 Mutantů



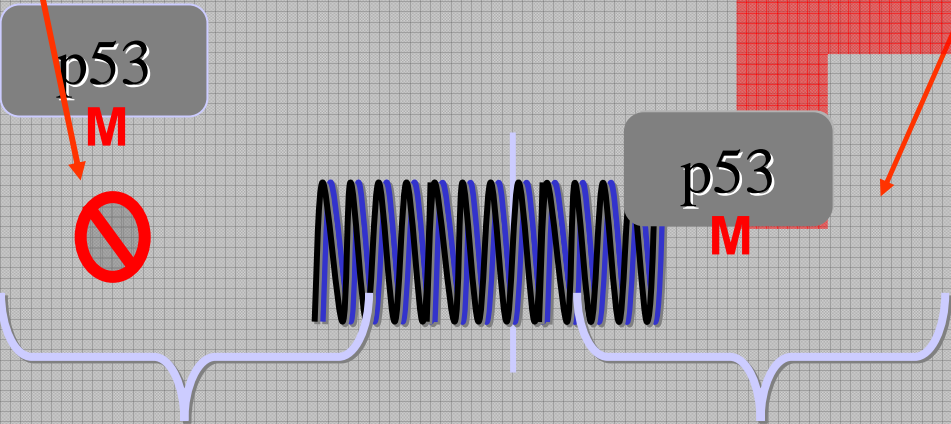
Ztráta přirozené funkce

Gain of function

Kumulace defektního proteinu



NO MDM2



Neschopnost vazby na své „přirozené“ sekvence

Spouštění „cizích“ promotorů

ONKO

První zmínka o pojmu „Gain of Function“ proteinu p53



Different Tumor-Derived p53 Mutants Exhibit Distinct Biological Activities

1990

ORNA HALEVY, DAN MICHALOVITZ, MOSHE OREN*

In its wild-type form, the protein p53 can interfere with neoplastic processes. Tumor-derived cells often express mutant p53. Full-length mutant forms of p53 isolated so far from transformed mouse cells exhibit three common properties in vitro: loss of transformation-suppressing activity, gain of pronounced transforming potential, and ability to bind the heat shock protein cognate hsc70. A tumor-derived mouse p53 variant is now described, whose site of mutation corresponds to a hot spot for p53 in human tumors. While absolutely nonsuppressing, it is only weakly transforming and exhibits no detectable hsc70 binding. The data suggest that the ability of a p53 mutant to bind endogenous p53 is not the sole determinant of its oncogenic potential. The data also support the existence of gain-of-function p53 mutants.

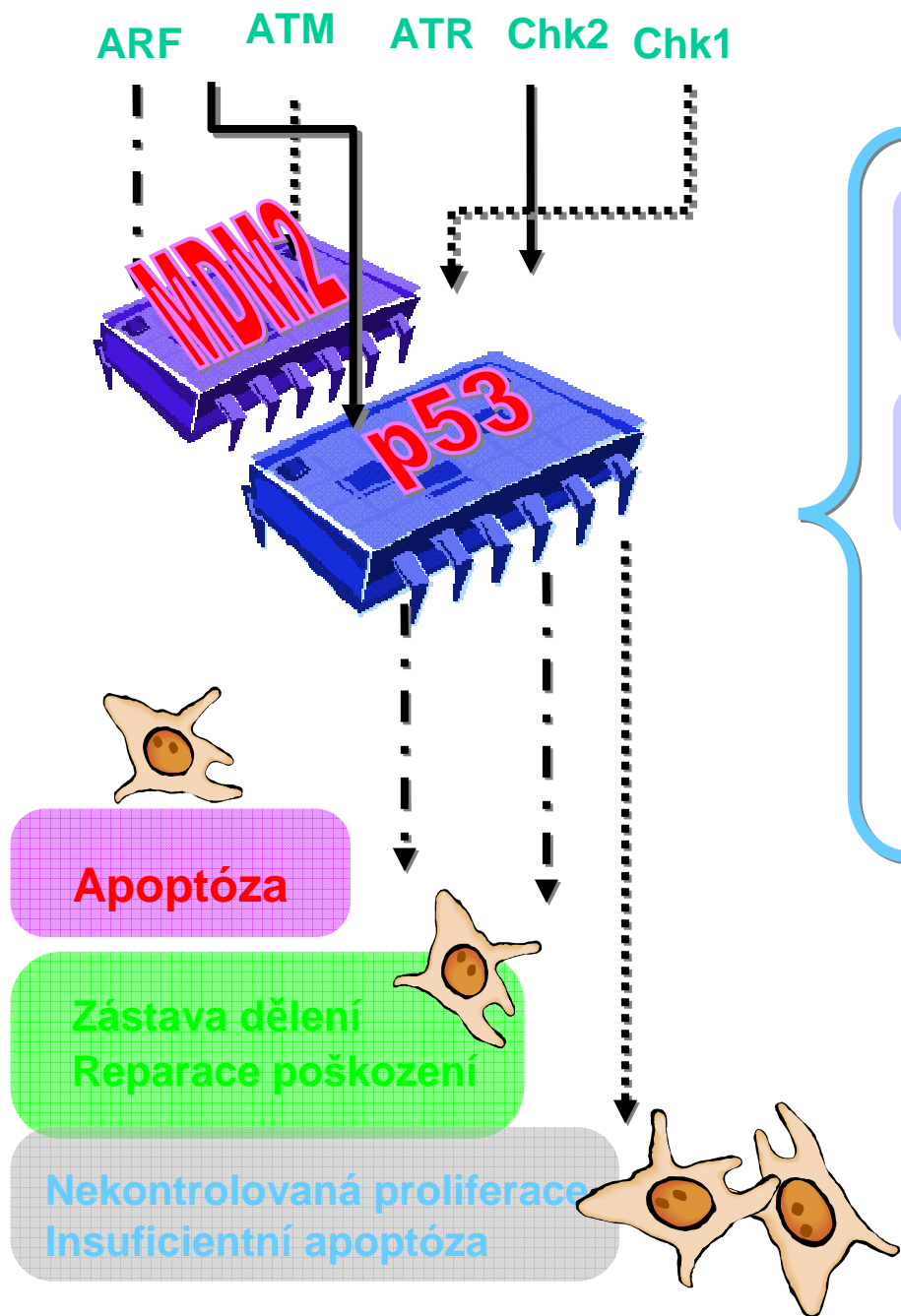
Definitivní ustálení pojmu „Gain of Function“ pro protein p53



Nature Genetics 4, 42 - 46 (1993)

Gain of function mutations in p53

Dirk Dittmer¹, Sibani Pati¹, Gerard Zambetti¹, Shelley Chu¹,
Angelika K. Teresky¹, Mary Moore¹, Cathy Finlay¹ & Arnold J.
Levine¹ ¹Department of Molecular Biology, Princeton
University, Princeton, New Jersey 08544–1014, USA



Hladina p53
schopnost indukce

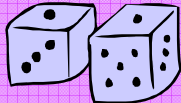
Stav genu
mutace, delece, LOH
izoformy

Posttranslační modifikace
fosforylace
acetylace

Konformace

DNA vazebná
kapacita

Interakce s proteiny:
transkripční aparát
stresové proteiny
inhibiční proteiny

Možnost predikce ? 

Terapie založená na stavu p53

TERAPIE ZALOŽENÁ NA STAVU p53

p53 mutovaný ?

+ ANO

NE **-**

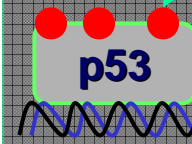
jaké jsou vlastnosti mutace ?

Aktivovatelný

Neaktivovatelný

Terapie založená na aktivaci p53

chemoterapie
radioterapie...



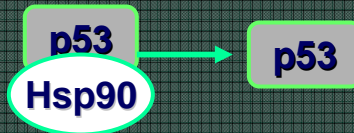
posttranslační modifikace

Stabilizace struktury proteinu



PRIMA
Amifostin
+
posttranslační modifikace

Inhibice HSPs



Geldanamycin
17-allyl-aminogeld.

Genoterapie

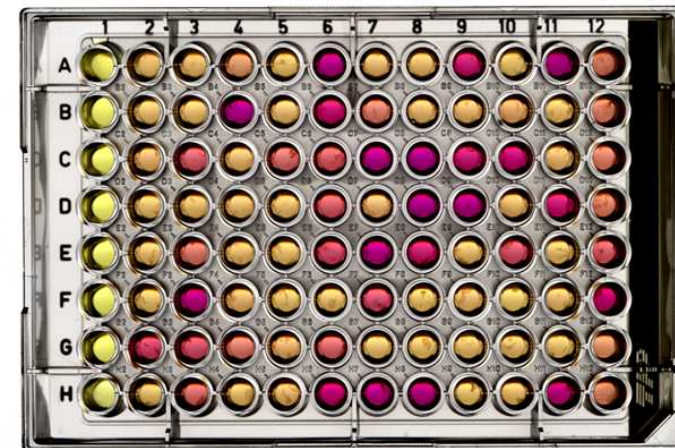
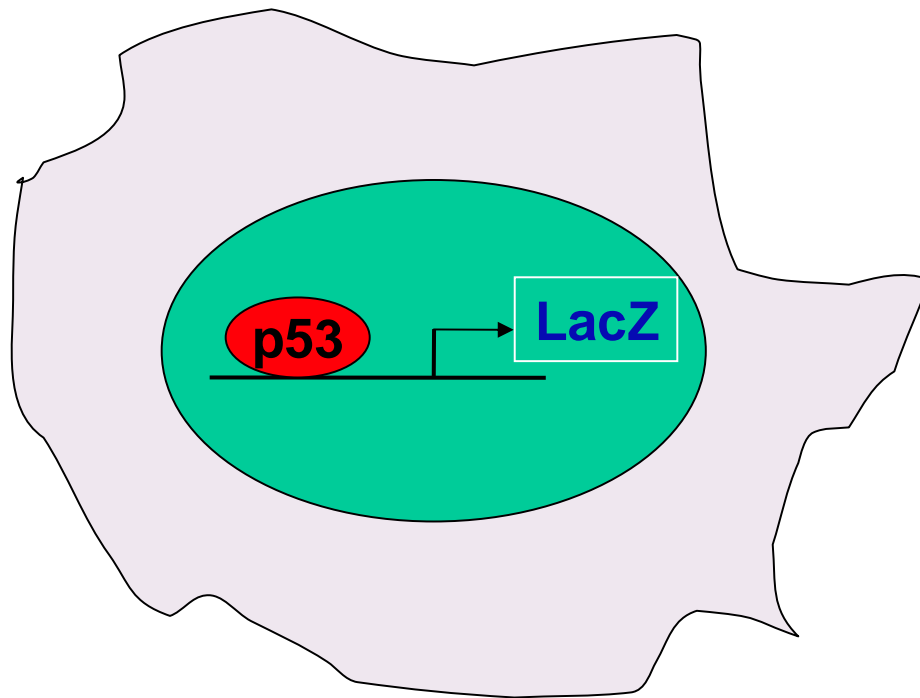
Adenovirus +
upravený p53



Snížení
Gain of function,

Inhibice HSPs

Screening malých molekul, které aktivují p53

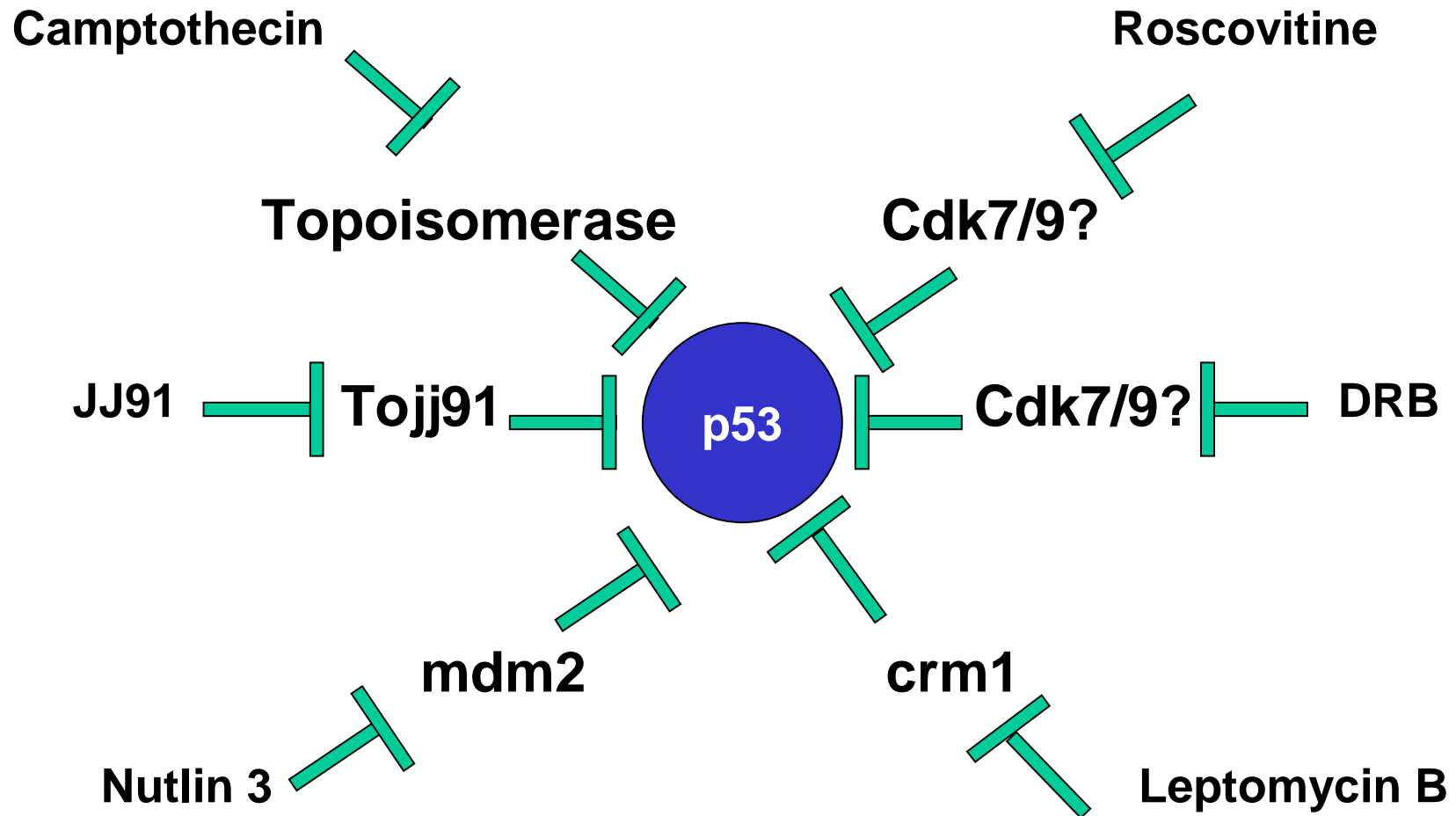


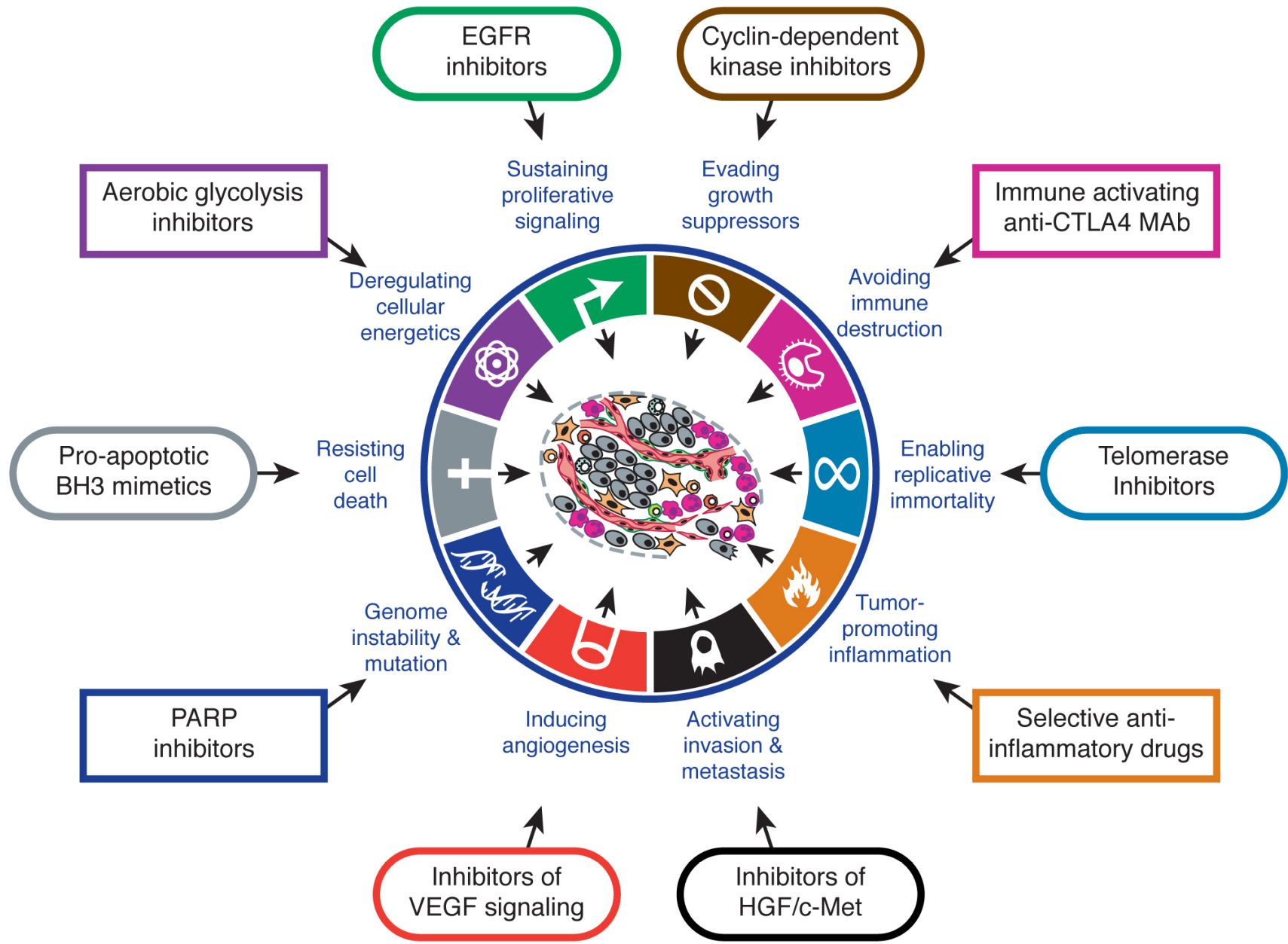
p53 activity

Over 130,000 compounds screened

Lain S., Hollick JJ. et al. Cancer cell (2008)

p53 cílená léčba





Hanahan and Weinberg, 2011

I. Soběstačnost při tvorbě růstových signálů

Normální buňka vyžaduje mitogenní růstové signály

x

Nádorová buňka vykazuje výrazně redukovanou závislost na exogenních růstových stimulech.

Strategie:

- Tvorba vlastních růstových faktorů
- Receptory na buněčném povrchu
 - Zesílená exprese
 - Strukturní změny
 - „Přepnutí“ integrinů
- Alterace v „downstream“ signalizaci

Růstové faktory

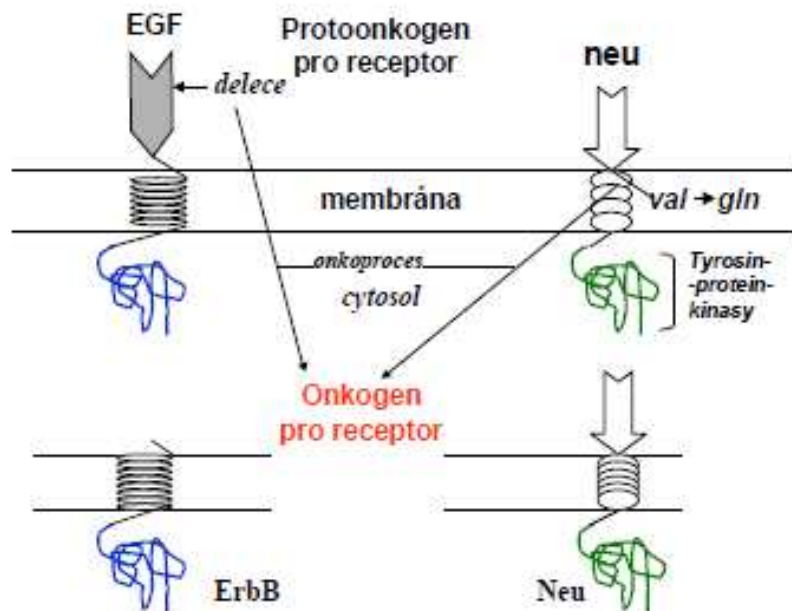
Onkogeny jen zřídka vznikají z genů kódujících růstové faktory. Je to kupř. sis-onkogen, který kóduje syntézu růstového faktoru odvozeného od krevních destiček (PDGF). Ten se může navázat na přirozený PDGF-receptor a navodit maligní transformaci buňky.

Příkladem autokrinní stimulace (autostimulace) je sekrece transformujícího růstového faktoru $TGF\alpha$; jde o analog EGF, který je secernován řadou nádorových buněk a který se váže na EGF-receptor, navozuje tak jeho trvalou stimulaci.


Receptory růstových faktorů

Receptory po vazbě příslušného specifického faktoru přenášejí růstový signál jednou nebo více kaskádami signální transdukce. Některé povrchové buněčné receptory mají jako integrální součást tyrozinkinázu ve své cytoplasmatické doméně. Geny těchto receptorů se stávají onkogenními, když po mutaci zůstávají receptory aktivní i v nepřítomnosti navázaného ligandu.

Jiným příkladem je produkt *erbA* onkogenu, jehož proto-onkogen kóduje intracelulární receptor pro hormon štítné žlázy. Vazba hormonu transformuje receptor na transkripční faktor. Onkogenem pozměněný receptor (ErbA), který působí jako negativní faktor, kompetuje s endogenním tyreoidálním receptorem, a důsledkem je usnadnění buněčného růstu.



Hormonální receptory

- Na povrchu buněk (transmembránové) i uvnitř
peptidové (G-spřážené receptory)
- Dělíme na  steroidní (obv. solubilní proteiny)

Estrogenní receptory:

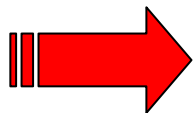
2 varianty: - G-spřážený receptor (GPR30) - syntéza PIP3
- nukleární hormonální receptor

Genomicky
vazba na ERE,
iniciace transkripce

Negenomicky
komplexy s G prot., TK →
MAPK, PI3K/AKT

II. Ztráta citlivosti k signálům zastavujícím buněčný růst a proliferaci

- Buňka je „přepnuta“ antiproliferačními signály z proliferace do *G0* fáze, ale je stále připravena působením dalších extracelulárních signálů opět proliferovat
- V buňce dojde k permanentnímu zablokování schopnosti proliferovat vstupem do tzv. postmitotické fáze, respektive dojde k terminální diferenciaci



Nádorová buňka musí obejít tento kontrolní mechanismus: vyřazením **pRb** dráhy

- kóduje tzv. retinoblastoma 1 protein (RB1, pRb) - reguluje buněčný cyklus
- v případě mutace --> retinoblastom (sporadický x dědičný, „two hits“ hypotéza)
- brání buňkám v replikaci poškozené DNA - *G1* blok

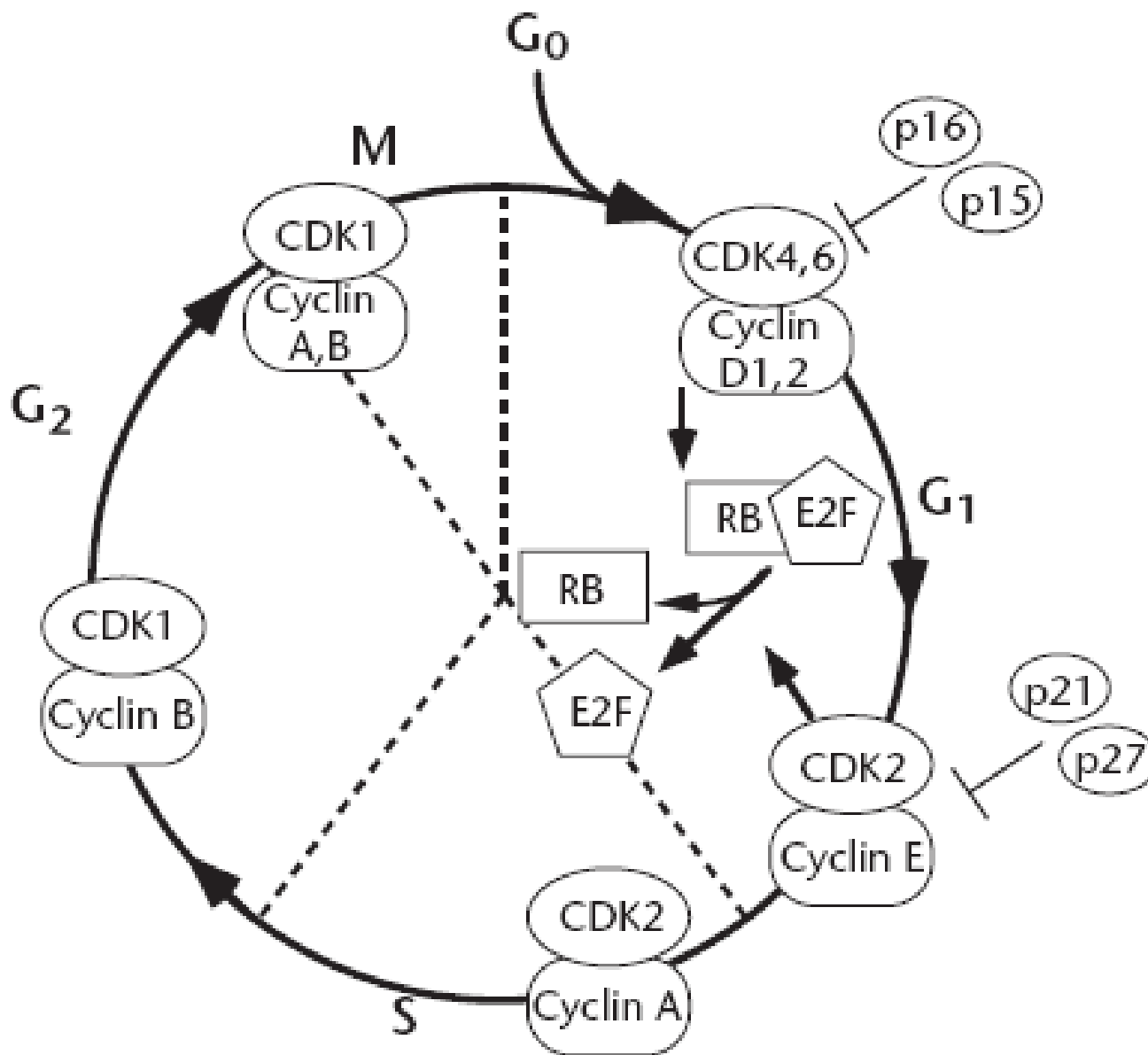
Výjimky („two hits“)

- Haploinsuficience - jedna funkční alela není dostatečná
- Imprinting - 1-2% lidských genů, kdy jen 1 rodičovská alela aktivní. Např. IGF-2, obvykle exprese otcovské alely, při ztrátě imprintingu a overexpresi --> Wilmsův tumor, hepatoblastom, rhabdomyosarkom,... Přibližně 10% populace konstitutivní ztráta IGF-2 imprintingu (hypometylace) = zvýšené riziko ca kolorekta.

<http://www.geneimprint.com>

- Dominantně negativní mutace - vedou ke vzniku proteinu, který neplní správně svoji funkci a navíc interaguje s proteinem tvořeným funkční alelou a tím ho inaktivuje.

Buněčný cyklus a nádory



Deregulace b.cyklu u nádorů

1. aberantní exprese pozitivních regulátorů (cykliny)
2. ztráta funkce negat. regulátorů (CDKI)

Table 1 Cell cycle regulators and cancer

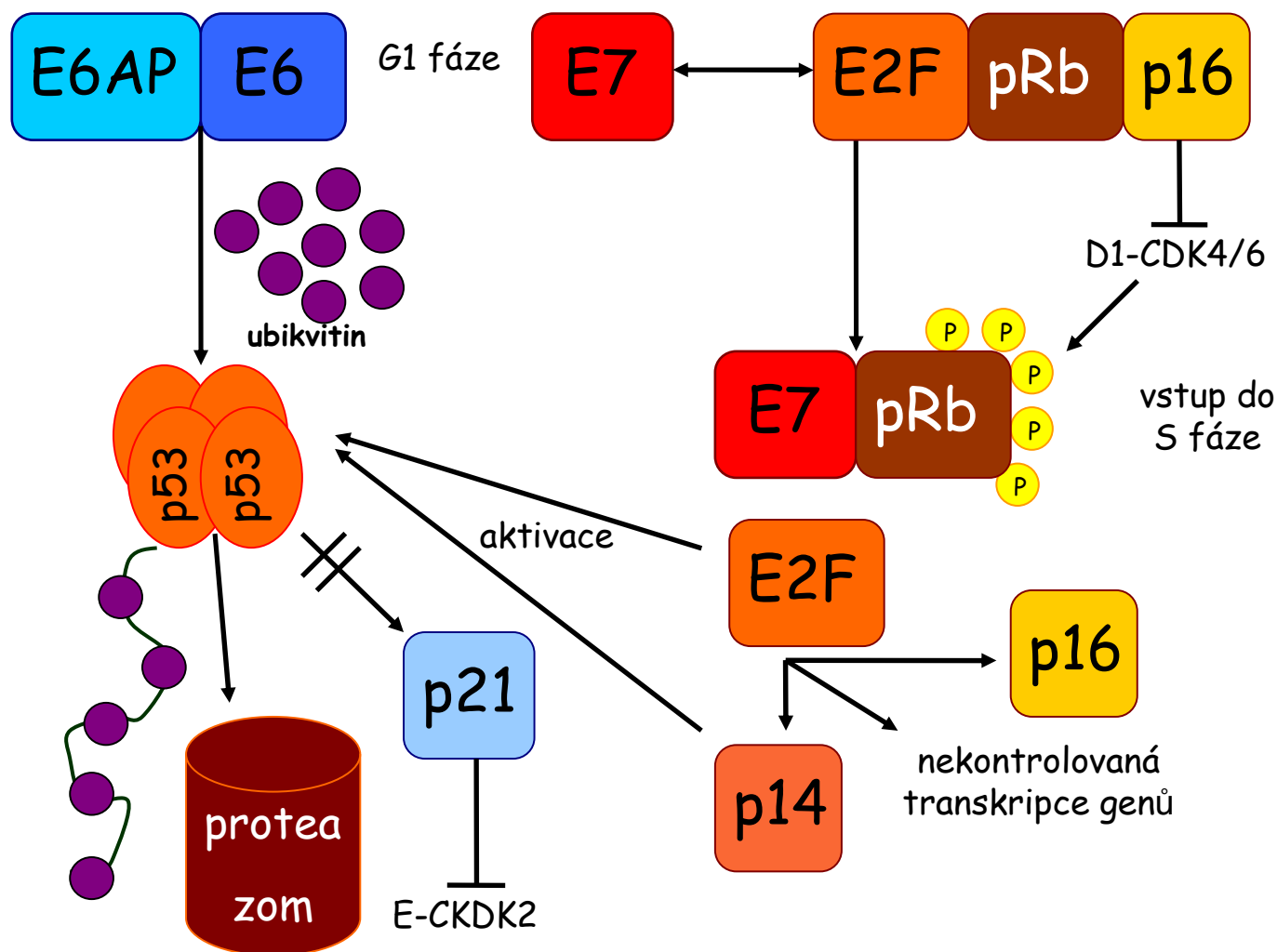
Protein	Chromosome	Function	Relevance in human cancer
Cyclin A	4(q25–q31)	Complexed with CDK2 and 1 to regulate S phase and G ₂ –M	Overexpressed in some breast carcinoma, hepatocellular carcinoma
Cyclin B1	5(q13–qter)	Complexed with CDK1 to regulate G ₂ –M	Overexpressed in some breast carcinoma
Cyclin D1	11q13	Complexed with CDK4/6 to regulate early G ₁	Overexpressed in multiple tumors, for example, breast cancer, lymphoma, parathyroid adenoma
Cyclin D2	12p13	Complexed with CDK4/6 (in some cell types) to regulate early G ₁	Overexpressed in some colorectal cancers
Cyclin E	19q12	Complexed with CDK2 to regulate late G ₁ and the G ₁ –S transition	Overexpressed in multiple tumors including leukemias, carcinomas of the breast, colon, prostate
CDK1	10	Complexed with cyclin B1 to regulate G ₂ –M	Overexpressed in some breast cancers
CDK4	12q13	Complexed with D-type cyclins to regulate early G ₁	Amplified in brain tumors, infrequently mutated in melanomas

Table 2 Cyclin-dependent kinase (CDK) inhibitors and cancer

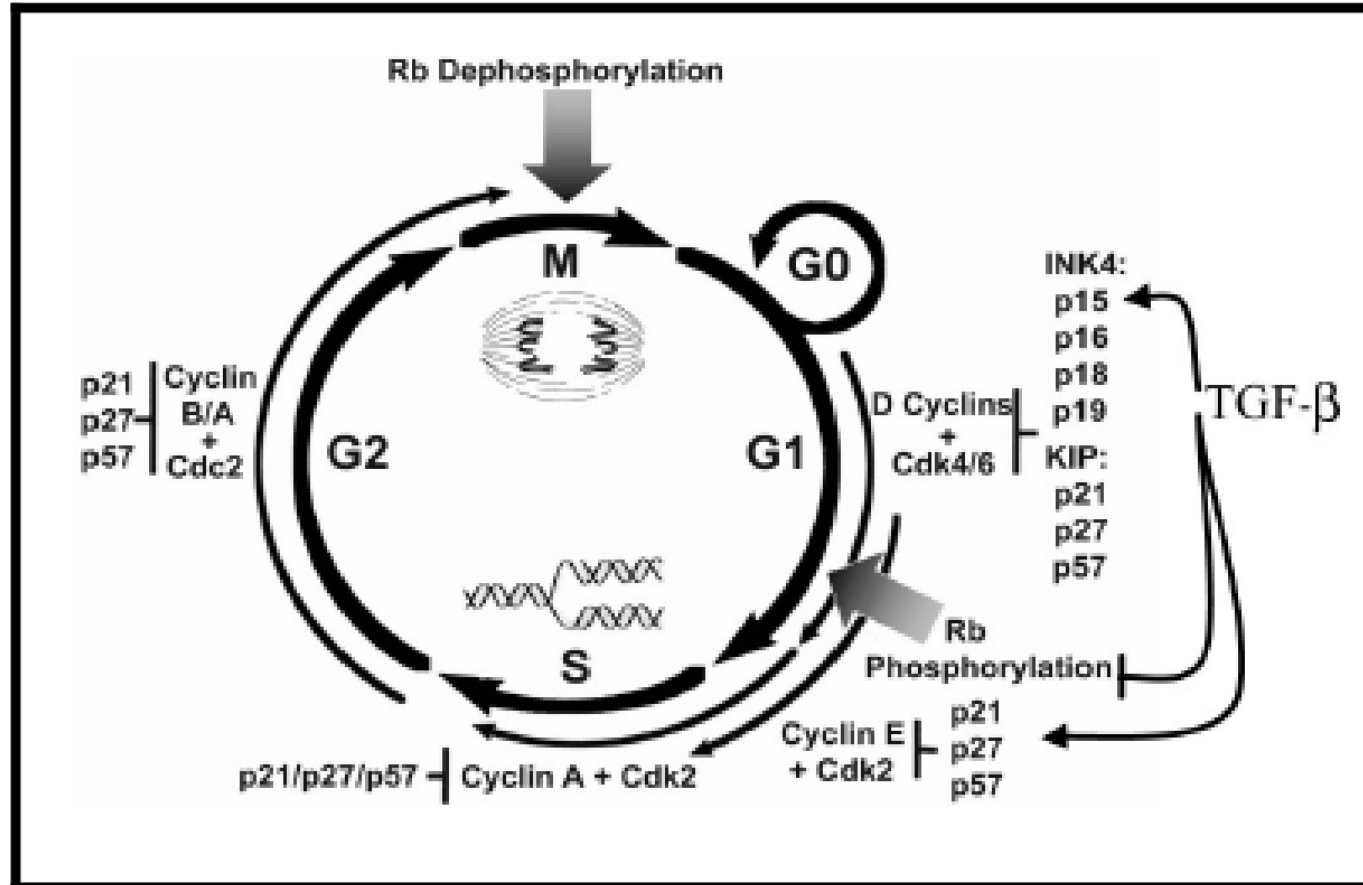
Protein	Chromosome	Function	Role in human cancer	Mouse knockout models
21CIP1	6p21	Binds to and inhibits multiple CDK/cyclin complexes and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) to block G ₁ and S phase; induced by p53	Rare mutations in prostate, bladder and breast carcinomas	No spontaneous tumors, defective DNA damage G ₁ -S checkpoint; no tumor suppressor
27KIP1	12p13	Binds to and inhibits multiple CDK/cyclin complexes to induce G ₁ arrest	Loss of heterozygosity not uncommon; variable loss of protein expression in many malignancies	Gigantism, organomegaly, pituitary hyperplasia/adenoma; haploinsufficient tumor suppressor
57KIP2	11p15.5	Binds to and inhibits multiple CDK/cyclin complexes to induce G ₁ arrest; imprinted	Few inactivations identified; mutations found in patients with Beckwith-Wiedemann syndrome	Neonatal lethality, developmental defects, adrenal hyperplasia; no spontaneous tumors
16INK4a	9p21	Binds to and inhibits CDK4/6 to induce G ₁ arrest	Frequently inactivated in cancers, especially melanoma, pancreatic adenocarcinomas, lung and bladder carcinomas	Low incidence of spontaneous tumors, carcinogen-induced increase in melanomas; cooperative effects with haploinsufficient p14ARF status
14ARF	9p21	Blocks MDM2 inhibition of p53, thereby inducing G ₁ and G ₂ arrest	Few exclusive deletions identified in melanoma cell lines, gliomas; targeted in acute T-cell leukemia	High incidence of spontaneous and induced tumors; p16INK4a ^{-/-} p19ARF ^{-/-} show very similar phenotype

Schéma funkce proteinů E6 a E7 při infekci

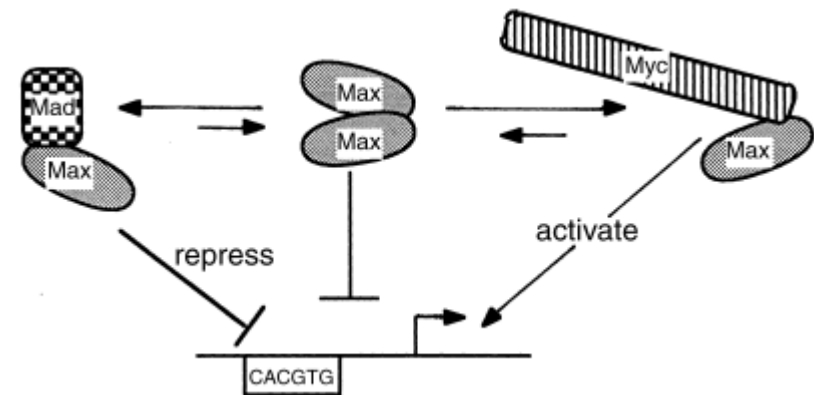
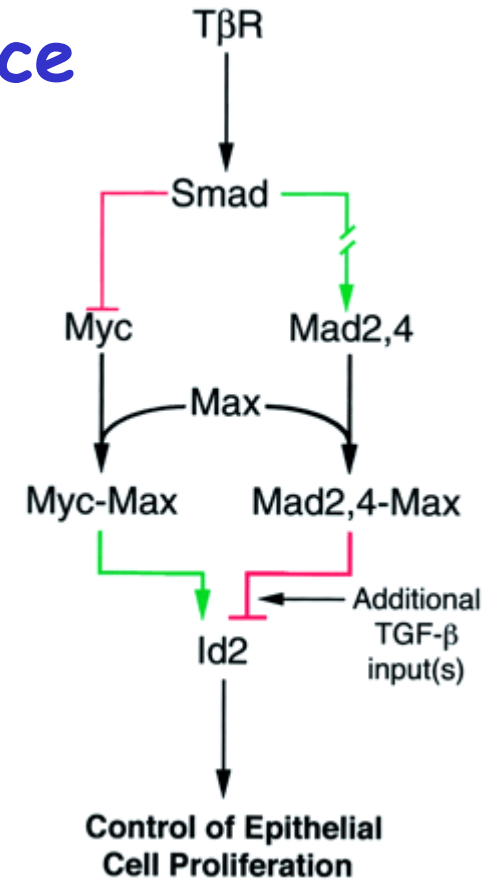
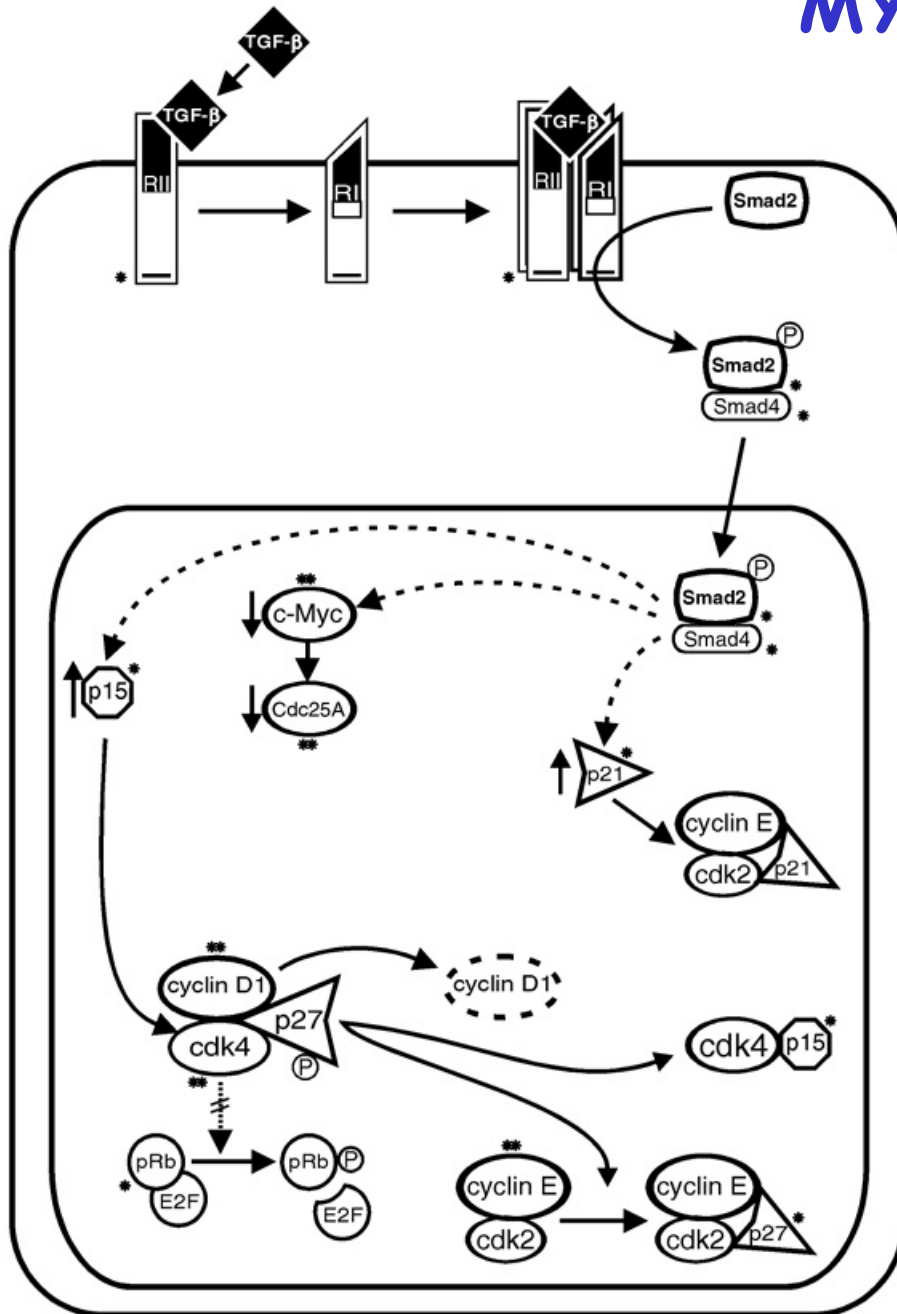
proteiny E6 a E7 high risk HPV jsou schopné transformovat zdravou buňku pouze v kooperaci



TGF β



MYC signalizace



III. Neomezený replikační potenciál

- Pokusy *in vitro* na normálních lidských diploidních fibroblastech ukázaly, že buněčná kultura má limitovanou životnost - asi po 50-70 děleních se růst zastavuje, avšak buňky mohou v G1 fázi vydržet až několik roků.
- Pokud u dané populace dojde k danému počtu dělení, přestávají se množit = senescence
- Např. inhibicí pRb nebo p53 může dojít k opětovnému dělení buněk → krize (masivní buněčná smrt)

Nádorové buňky proliferují neomezeně - jsou „nesmrtelné“.

Stárnutí organismu

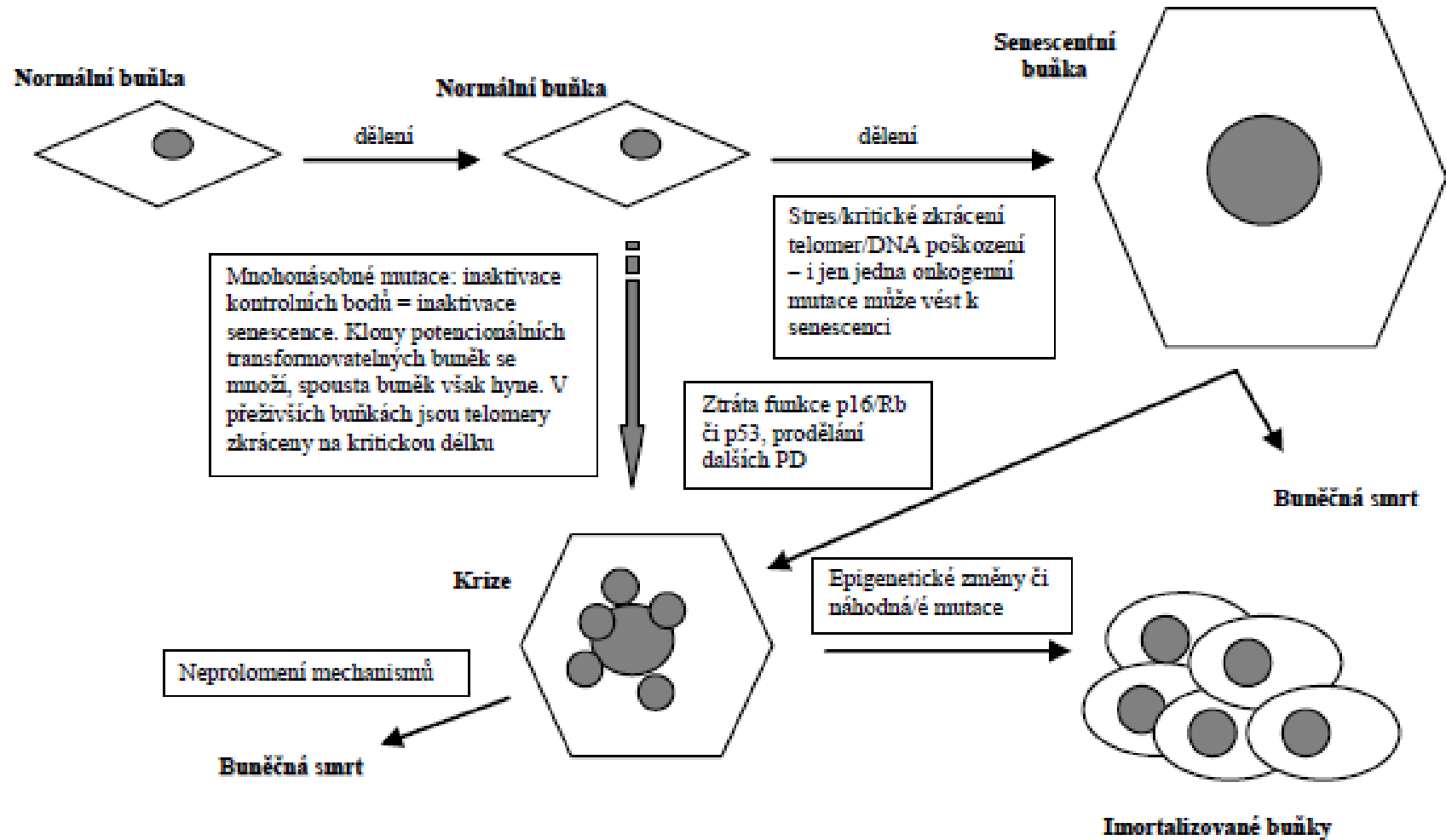
- Multifaktoriálně podmíněné děje → dlouhověkost je schopnost jedince udržet homeostázu obrannými a reparačními mechanismy
- Rychlost stárnutí je řízena
 - a) genetickou složkou - reparační mechanismy, antioxidační obrana, polymorfismy „genů dlouhověkosti“ (apolipoprotein E2, SNP192 genu kódujícího paraoxonasu)
 - b) složkami vnějšího prostředí → životní styl (tělesná aktivita, regulovaný příjem potravy)
- S postupujícím věkem se objevují funkční i morfologické změny skoro ve všech orgánech a tkáních. Tyto změny mají svůj podklad především ve stárnutí buněk.

Stárnutí buněk

Hlavní mechanismy stárnutí:

- Alterace nebo ztráta genů pro regulaci buněčného růstu (c-fos nebo RB-1), či indukce inhibitorů buněčného růstu
- Replikativní stárnutí (telomery)
- Apoptóza
- Neenzymová glykace proteinů (posttr. modifikace → AGE products)
- Volné radikály (ROS) 1. Peroxidace - poškození NK, denně 10000 alterací DNA bází v jedné buňce, s věkem prudký nárůst; 2. oxidační modifikace proteinů → degradace; vlivy prostředí - ion. záření
- Změny v indukci Hsp proteinů (Hsp70)

Senescence



IV. Apoptóza

Fyziologický proces udržující rovnováhu mezi buněčným růstem a smrtí buněk

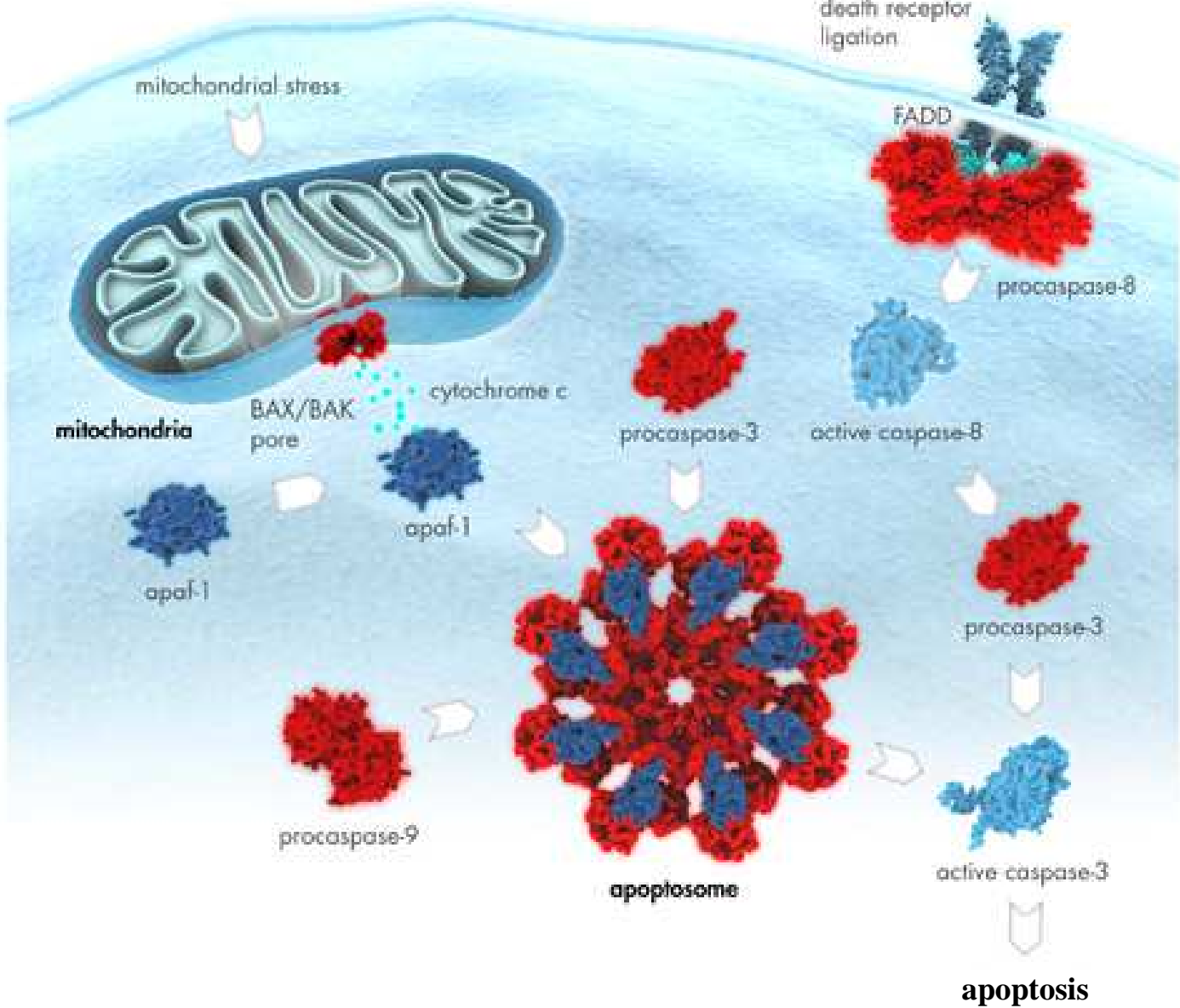
Kaskáda reakcí cysteinových proteáz (kaspázy), vazba na tzv. substráty smrti (proteiny cytoskeletu, proteiny řídící opravu DNA, proteiny zabraňující apoptóze apod., štěpení DNA cca 180bp). V konečném důsledku morfologické změny - sraštění buněk, apoptotická tělíska
→ fagocytóza

Postupující věk → pokles transkripční aktivity genů vyvolávajících apoptózu → např. Snížená schopnost likvidovat buňky imunitního systému reagující proti vlastním tkáním → autoimunitní onemocnění

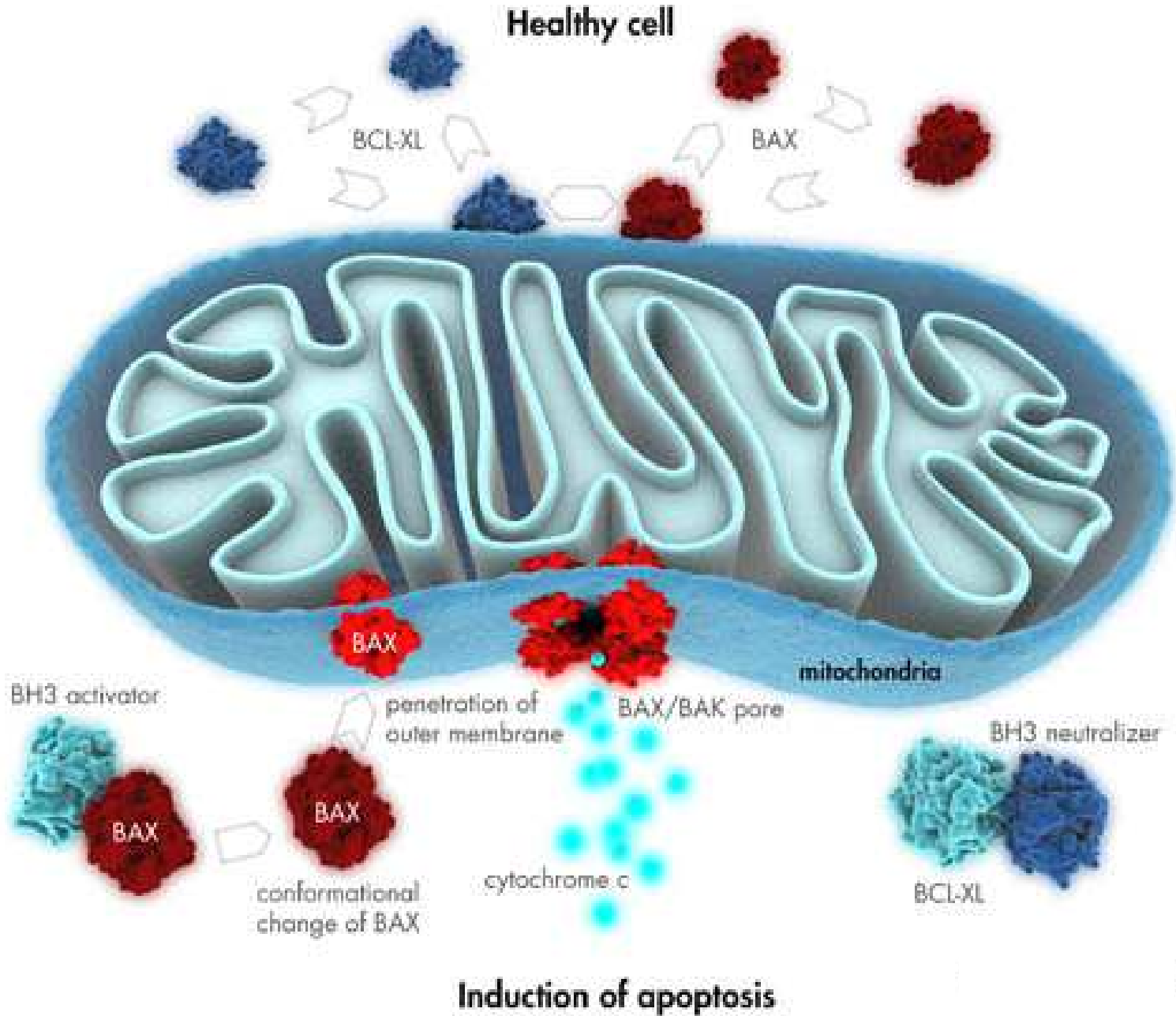
Apoptotic pathways

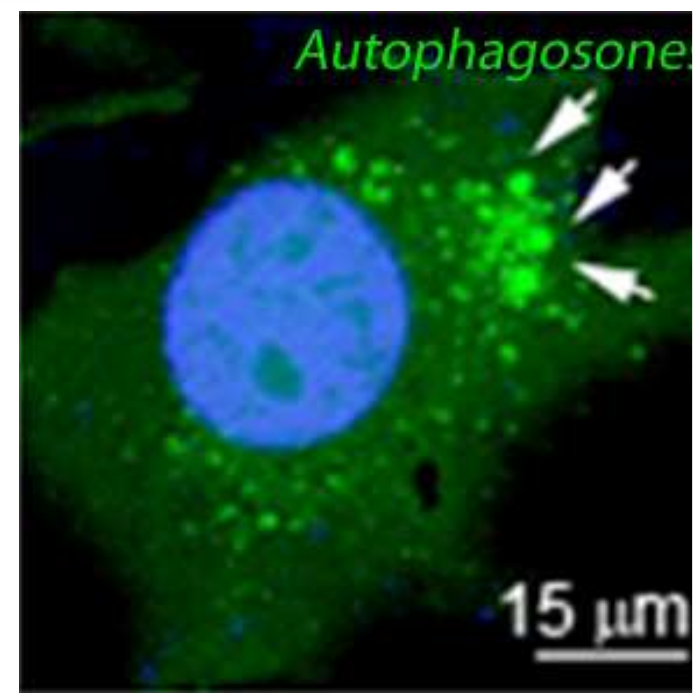
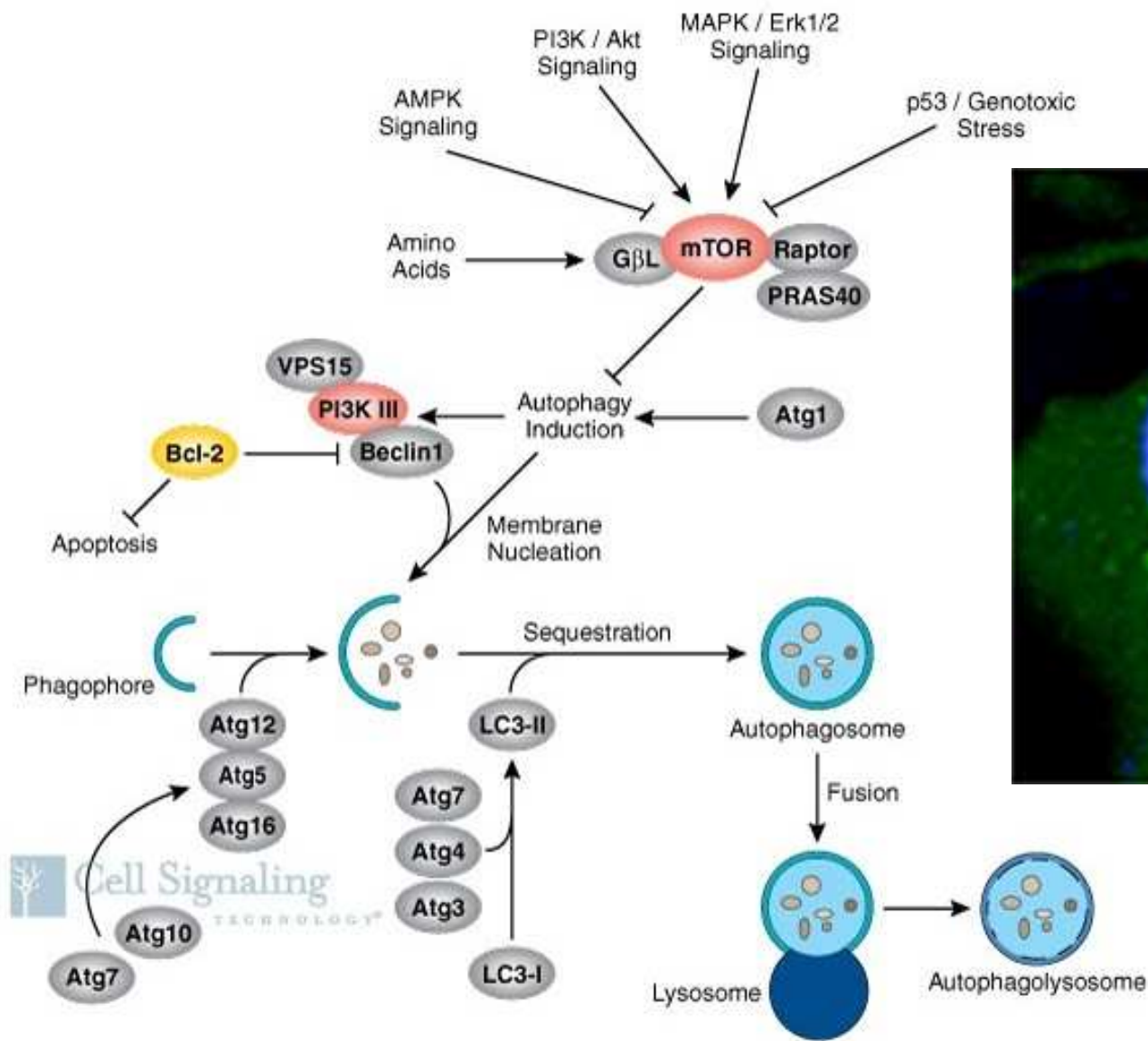
Intrinsic

Extrinsic

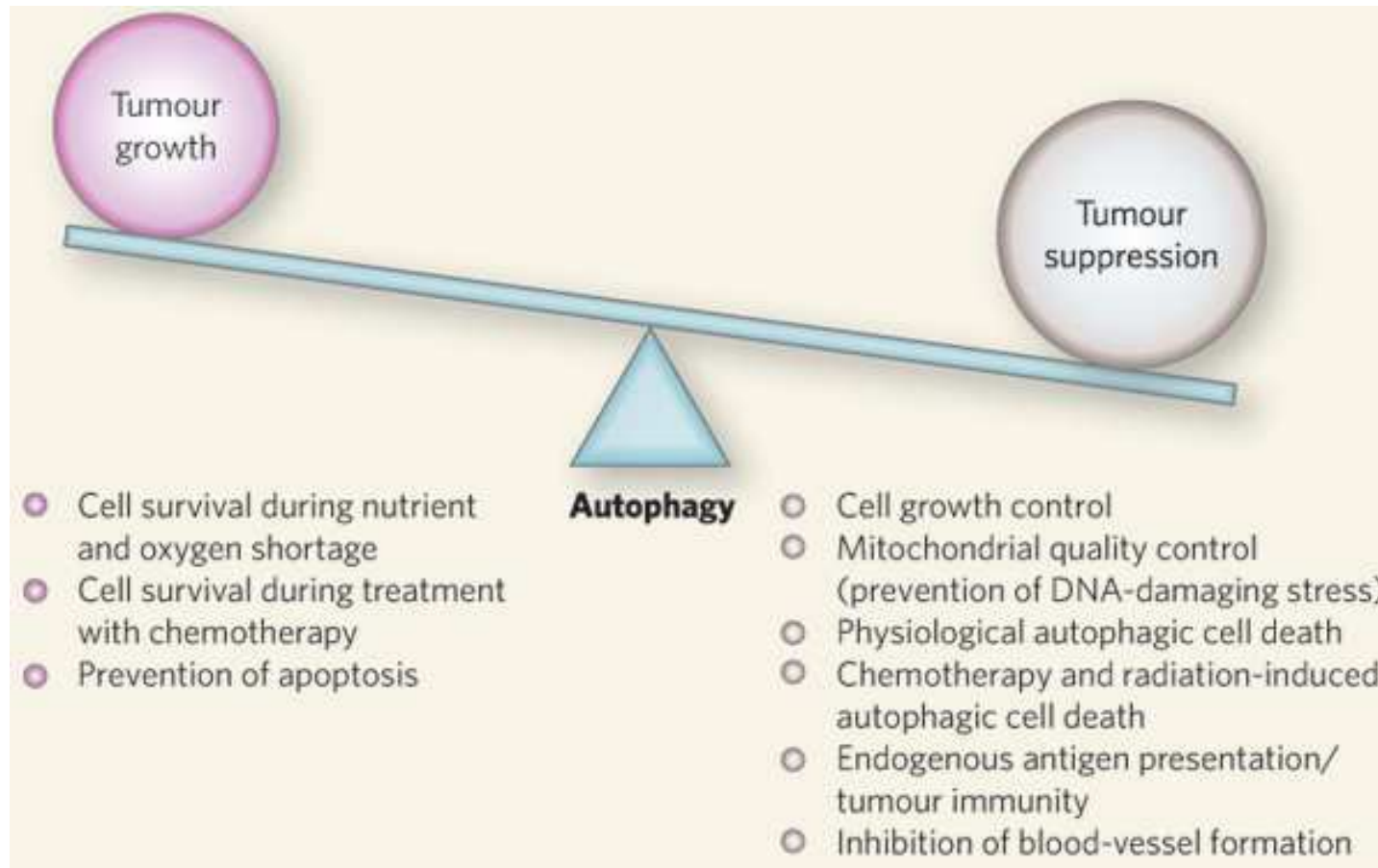


Regulation of mitochondrial apoptosis





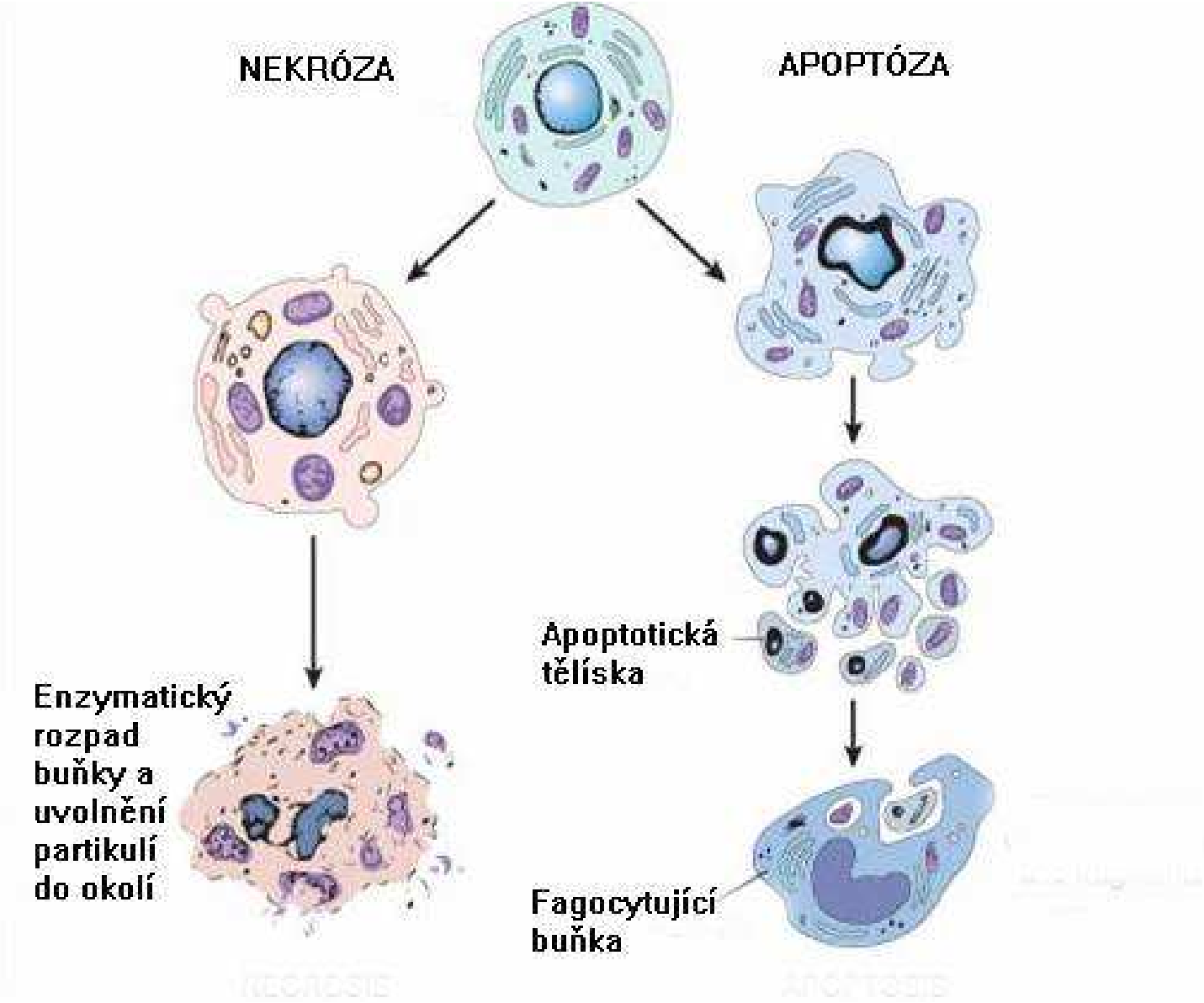
Autofágie



cytoprotektivní
mechanismus
(rezistence k terapii)

X

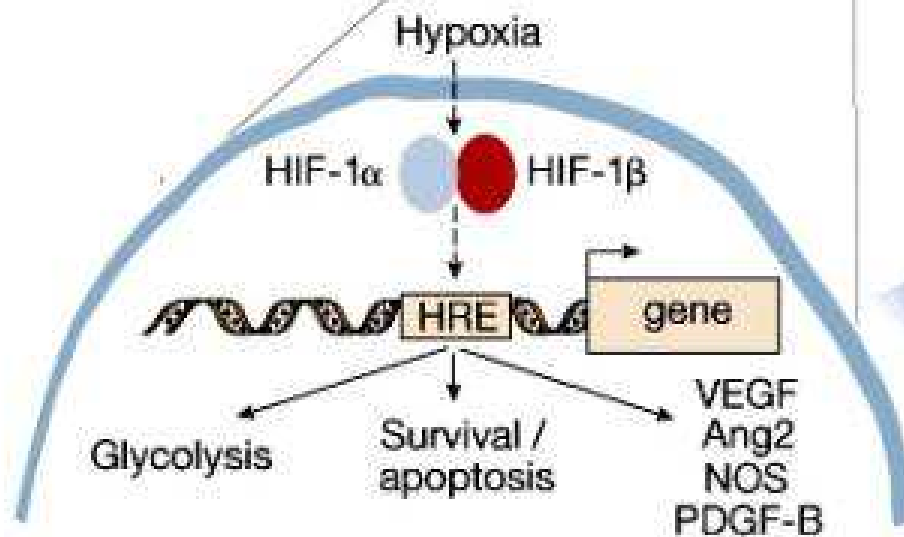
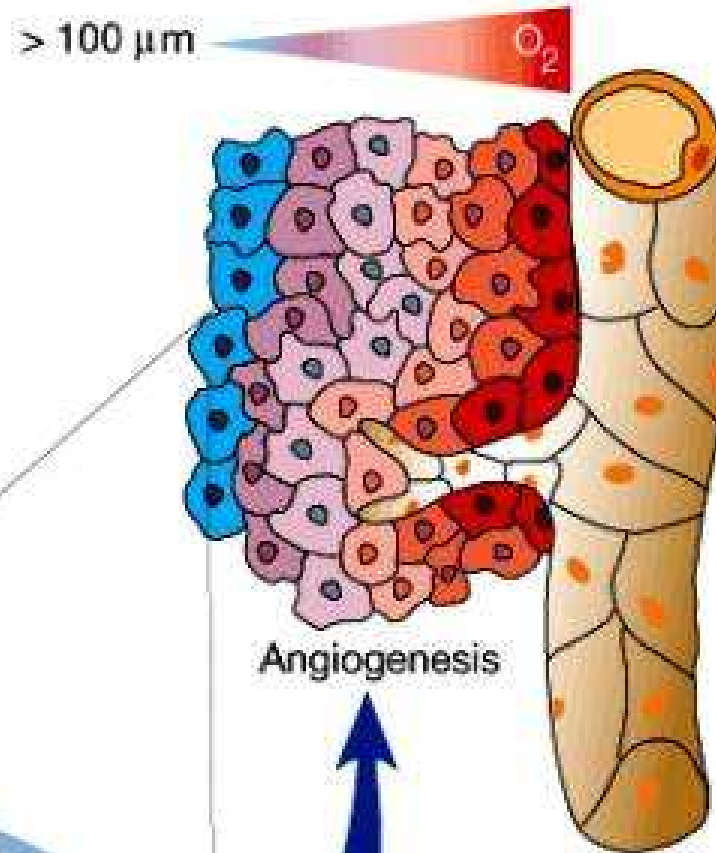
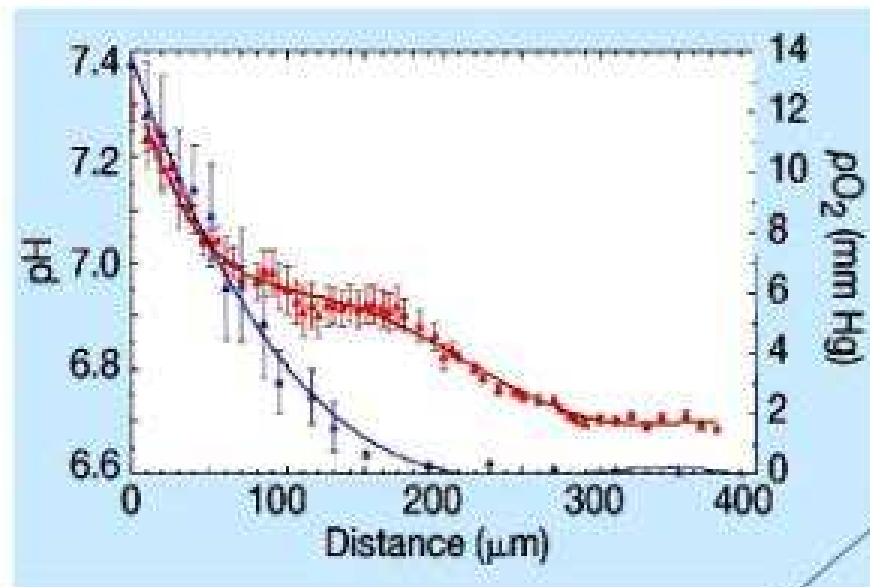
odstranění poškozených
organel, redukce chrom.
nestability

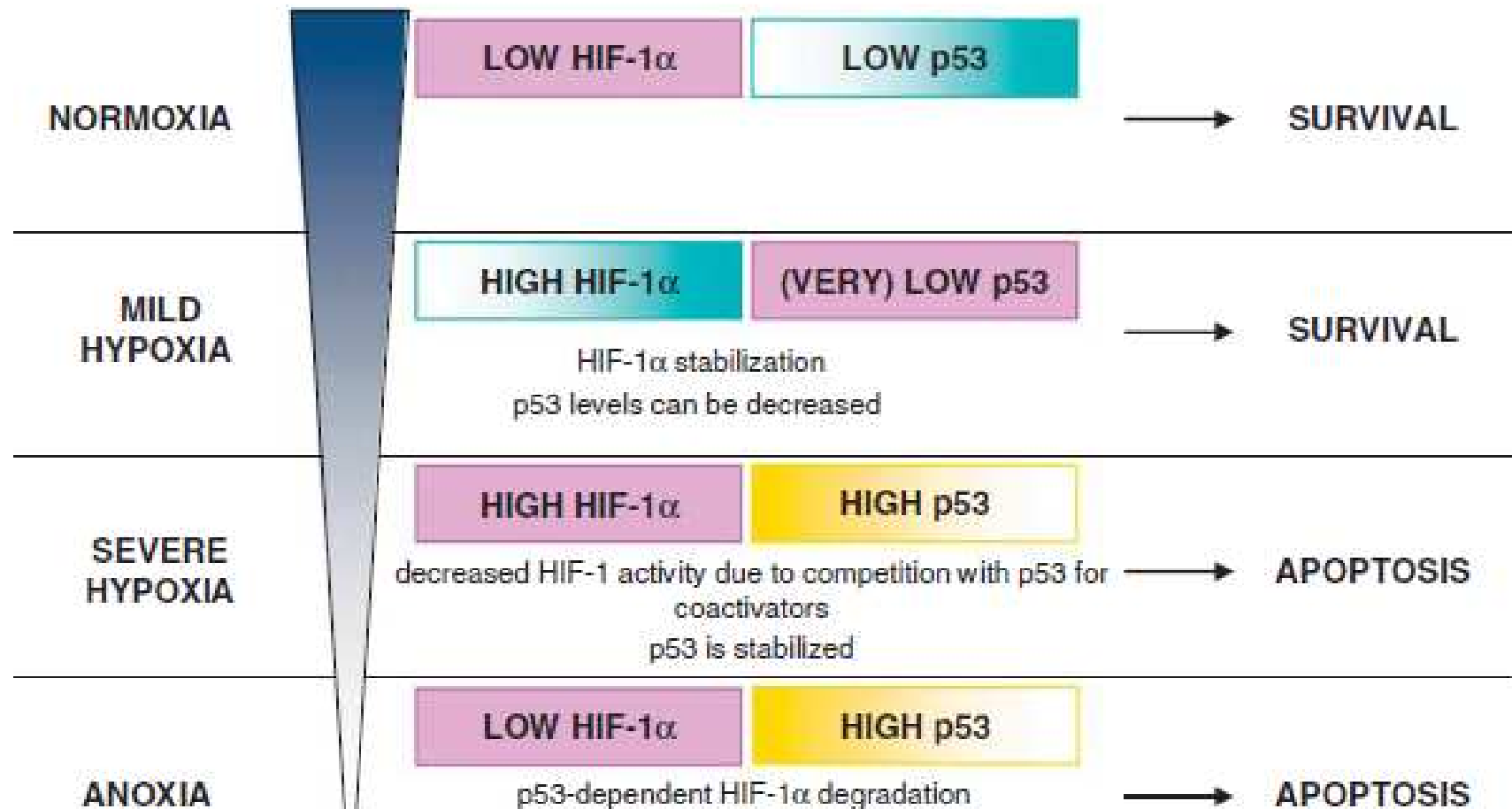


V. Angiogeneze (neokapilarizace, neovaskularizace)

- Proces novotvorby krevních kapilár, díky této schopnosti může nádor stimulovat okolní tkáň k růstu cév, kterými mu je dopravována krev bohatá na živiny a kyslík
- Rostoucí nádorové ložisko může bez cévního zásobení dosáhnout velikosti pouze 1 - 2 mm³, kdy přívod kyslíku a živin je možný ještě difuzí z okolní tkáně
- Hypoxie, genetická nestabilita --> „angiogenní switch“ tj. nový fenotyp nádorových buněk, suprese antiangiogenních faktorů (thrombospondinu), zvýšená tvorba angiogenních faktorů. Buňky nádoru a sousední endotélie se v tomto směru vzájemně ovlivňují parakrinní, ale i autokrinní sekrecí angiogenetických faktorů.

Role of hypoxia in Tumor angiogenesis





Decreased pO₂
Increased duration

Transactivation activity not frequently described
Induction of protective, anti-apoptotic genes
Induction of pro-apoptotic genes

Angiogeneze (pokračování)

Čím je angiogeneze intenzivnější, tím je prognóza nádorového onemocnění nepříznivější; zvyšuje se riziko metastáz.

Praktické důsledky:

stupeň angiogeneze může sloužit jako prognostický faktor. Nejintenzivnější angiogeneze bývá na okraji nádorového ložiska, kde lze její intenzitu posoudit histologicky. Používá se také zviditelnění tzv. horkých ložisek (hot spots) pomocí monoklonálních protilátek proti cévním endoteliím nebo proti adhezním molekulám (CD31, CD34), event. proti tzv. von Willebrandovu faktoru. Citlivým ukazatelem hustoty kapilárního řečiště je stanovení akvaporinu-1 (AqP-1); jde o faktor působící synergicky s VEGF a významně zvyšující cévní propustnost.

Terapie založená na potlačení angiogeneze:

cíl: zpomalit až zastavit růst nádoru

- přirození antagonisté angiogeneze, popř inhibitory stimulátorů: např. rekombinantní thrombospondin (thrombospondin mimetic peptid - TPS-1) - blokuje odpověď na angiogenní podněty, inhibuje aktivitu endotelií a podporuje jejich apoptózu.
- Neutralizace účinku angiogenních faktorů: zablokování EGF nebo VEGF vytvořením komplexu s mAb (bevacizumab).
- Blokáda receptorů angiogenních faktorů: solubilní receptory, které vytvoří na membránových receptorech inaktivní heterodimery, neschopné iniciovat signální transdukcii, inhibice receptorových kináz
- Genová terapie: antisense mRNA (VEGF), angiozym (specif. ribozym)
- Inhibice proliferace endotelu: fumagilin (*A. fumigatus*, toxický), syntetická varianta AGM-1470 (o-chloracetyl-karbamoyl-fumagilol) netoxický, potlačuje proliferaci endotelií inhibicí translokace membránových bioproteinů a transkripčního faktoru Ets-1.
- Stabilizace bazální membrány a extracelulární matrix: neporušená bazální membrána znesnadňuje invazi endotelií. Inhibice metalo-proteinas, které bazální membránu a extracelulární matrix rozrušují (extrakt ze žraločích chrupavek - neovastat)

Drosophila jako model angiogeneze

Cévní systém drozofily je málo vyvinut, ale dobrým modelem pro savčí angiogenezi je na molekulární úrovni překvapivě podobný hmyzí tracheální systém. Podobně jako u savčích cév - obecná organizace trachejí drozofily je určena geneticky, ale jejich větvení je určováno tlakem O_2 .

Mutace různých drozofilích genů účastnících se vývoje trachejí a jejich savčí protějšky:

- *trachealess* (homolog HIF),
- *branchless* (FGF),
- *breathless* (FGF receptor),
- *sprouty* (ras interactor)

VI. Invazivita a schopnost metastázovat

- Ztráta závislosti adherovat k podkladu (normální buňky v b. kultuře mohou metabolizovat (žít), ale nikoliv se dělit; nádorové buňky ano)
- Ztráta inhibice motility kontaktem se sousedními buňkami (buňky mohou růst jedna přes druhou)
- Změny na buněčné membráně (modifikace glykolipidů a glykoproteinů --> změny v morfologii nádorové b.)

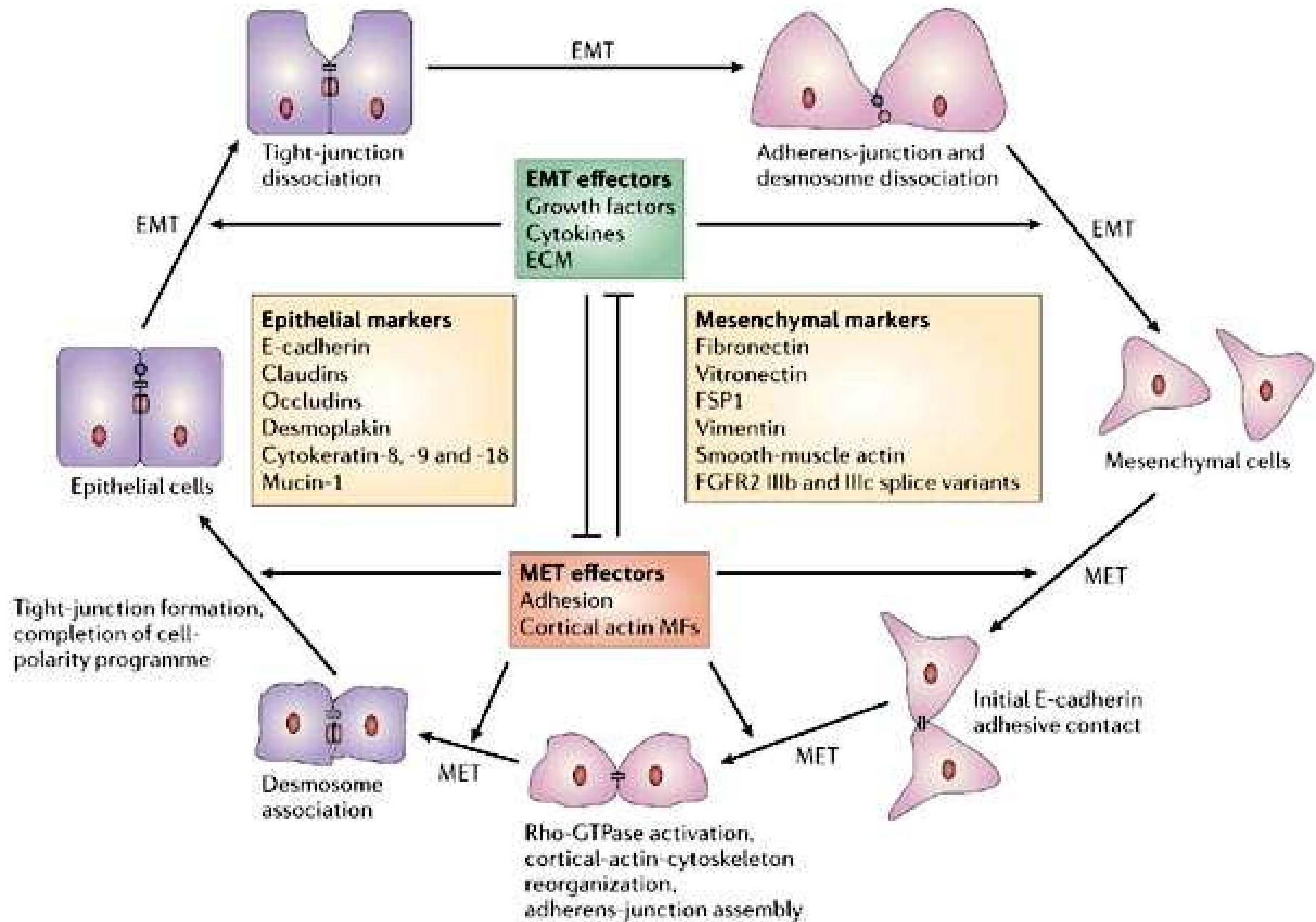
Maligní buňky: zvýšená motilita a invazivita, po průniku do krevní cirkulace schopnost tvořit metastázy. S tím spojena schopnost produkovat receptory, aby se mohly zachytit na proteinech bazální membrány (tvorba adhezních molekul), dále tvorba hydrolytických enzymů, které pomohou rozrušit kolageny, proteoglykany a glykosaminoglykany bazální laminy a umožnit tak pronikání do okolí, natrávit stěnu cév, zachytit se v cirkulaci na shlucích trombocytů a vytvořit tak nádorové emboly, odolávat účinkům protinádorového imunitního systému, zachytit se na stěně cév vzdáleného místa, proniknout do intersticia tkáně, založit metastázu, proliferovat, podporovat angiogenezi a případně vytvářet nové metastázy.

Metastáze

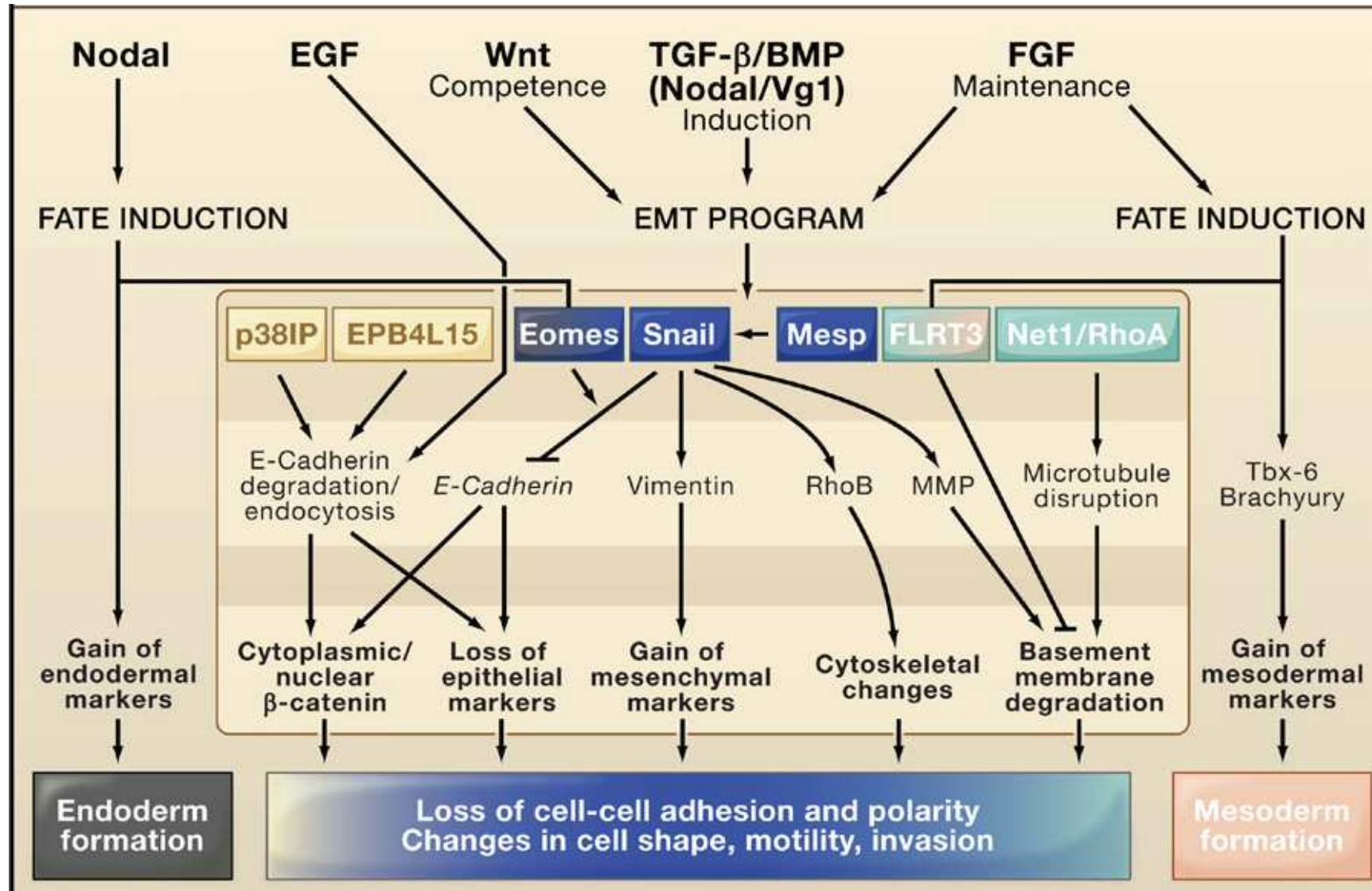
- Nejčastější příčina úmrtí
- Schopnost metastázovat je jedním ze základních znaků malignity nádorových onemocnění, řada faktorů (druh nádoru, velikost primárního nádoru, angiogenní procesy)
- Při vzniku metastáz hrají důležitou úlohu chemokiny. Jde o superrodinu prozánětlivých cytokinů, které selektivně přitahují a aktivují různé typy buněk tím, že se váží na specifické povrchové receptory (G-protein)

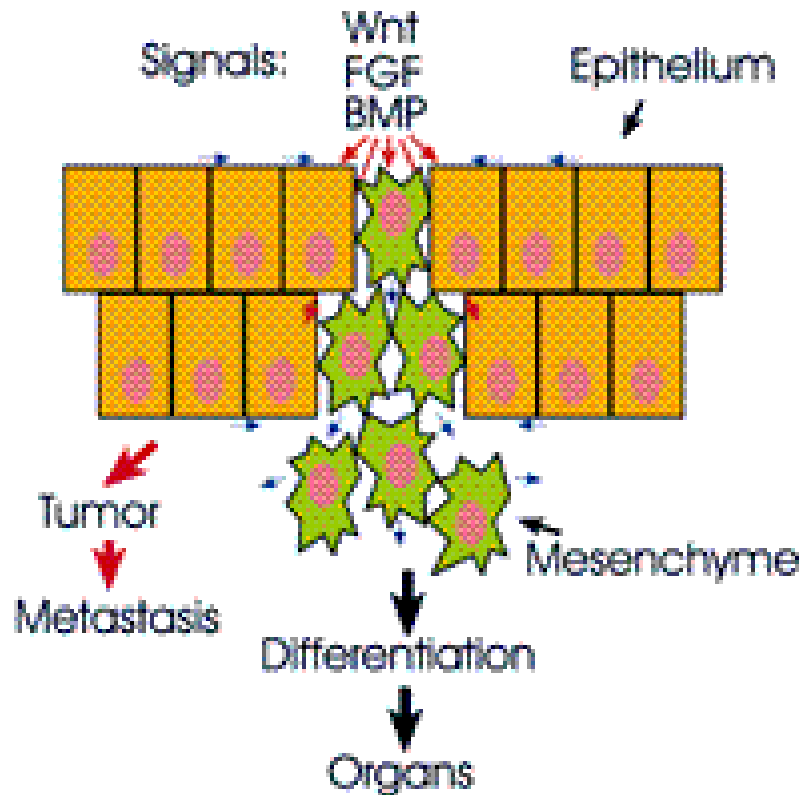
Šíření metastáz:

- lymfogenní - nádorové buňky se šíří cestou lymfatických cév do lymfatických uzlin. Nejběžnější způsob šíření epiteliálních nádorů.
- hematogenní - nádorové buňky se šíří krví a zachycují se v kapilárách. Nádory vycházející z pojivových tkání a pokročilé nádory epitelové.
- porogenní (per continuitatem) - nádorové buňky se šíří mechanicky preformovanými dutinami. (nádory mozku nebo vaječníků)



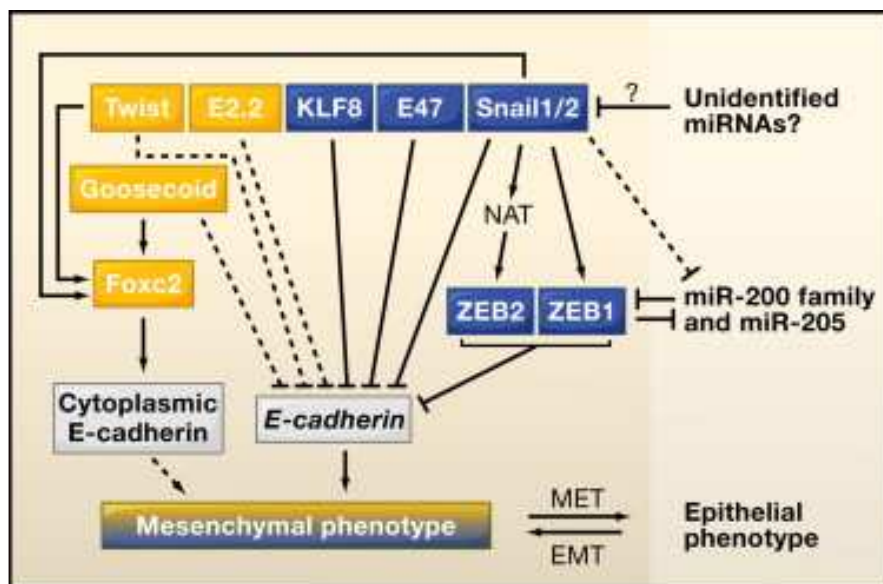
Gastrulace u mnohobuněčných



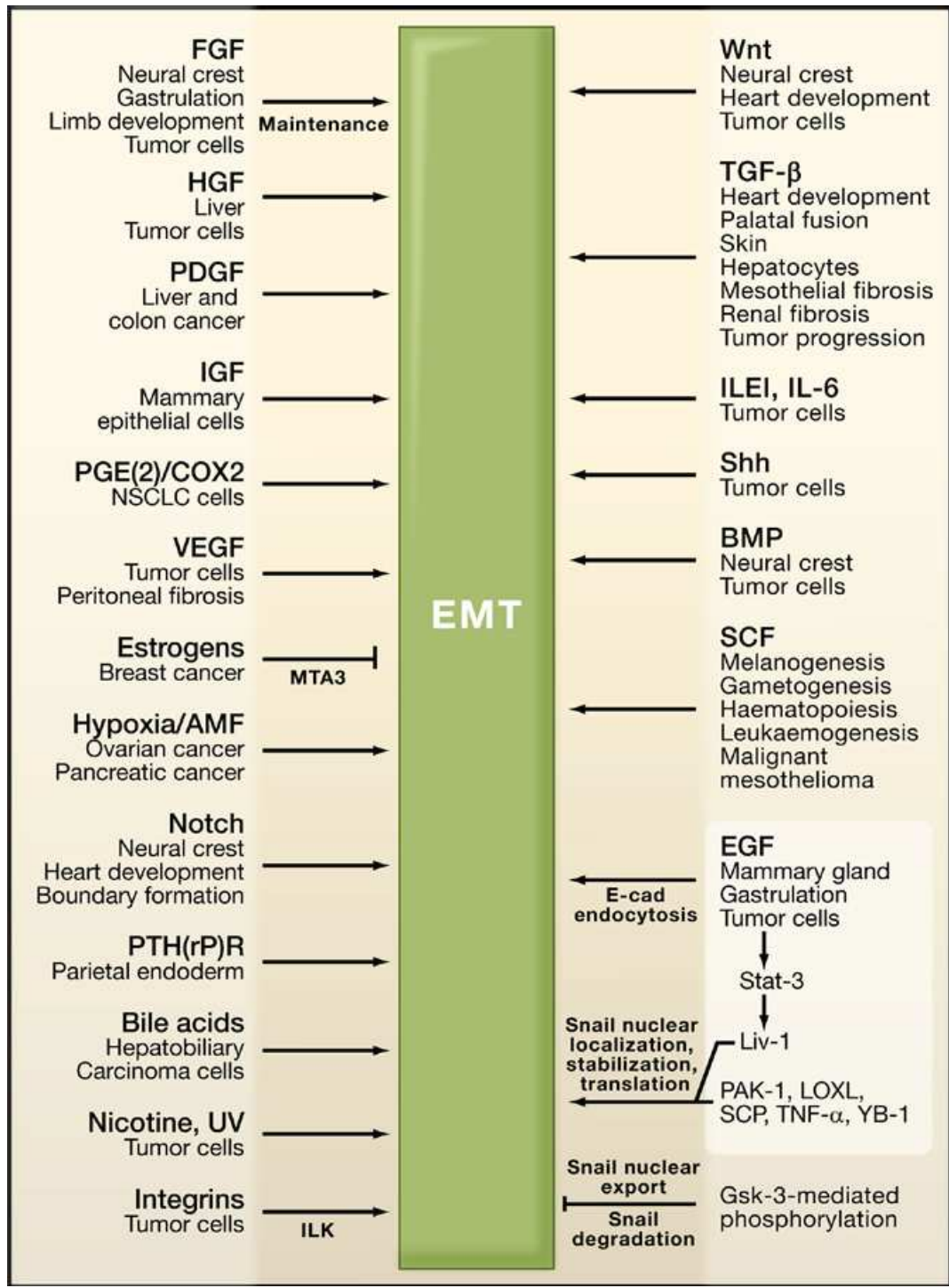


3 hlavní signální dráhy:

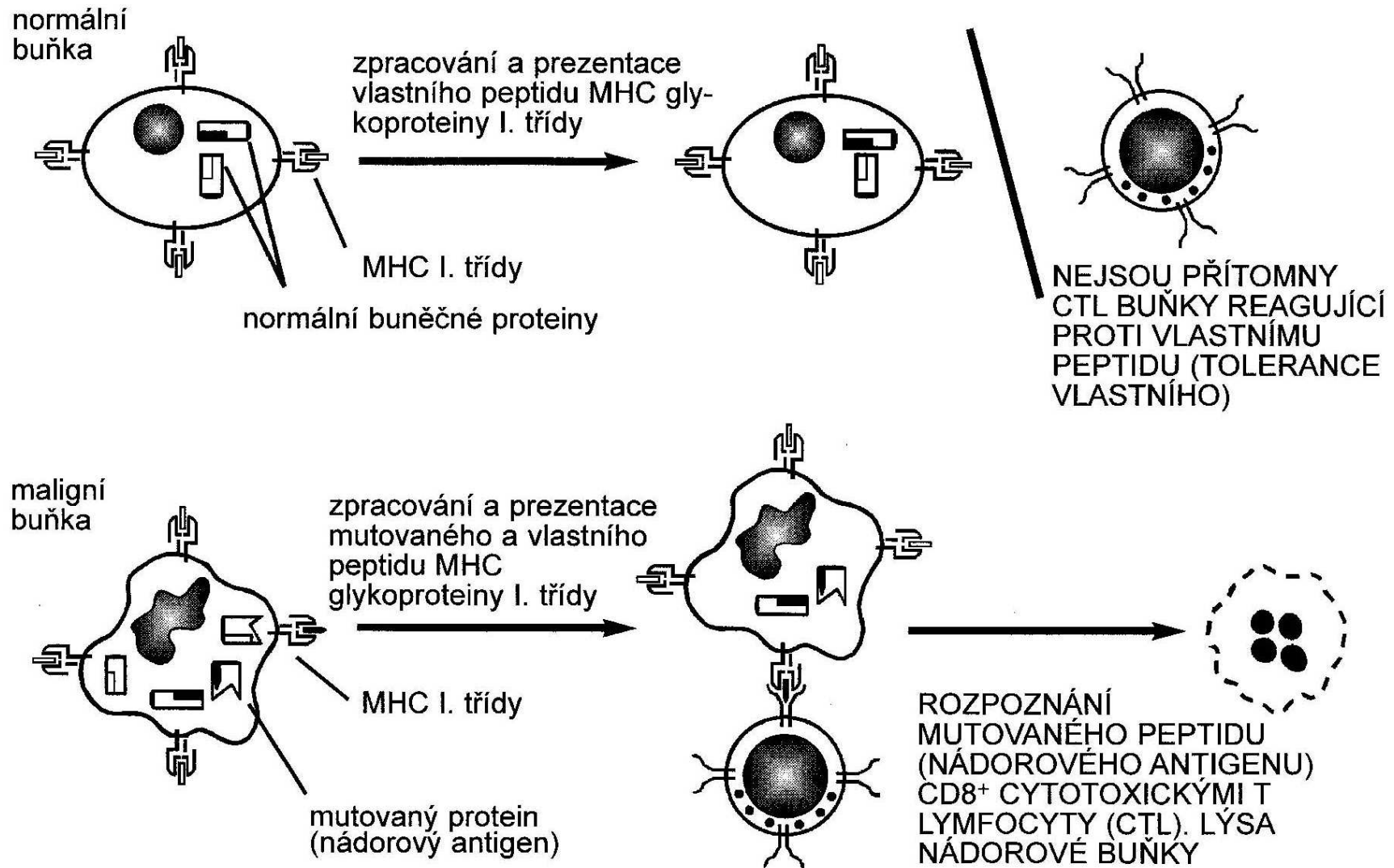
- *Wnt/β-katenin*
- *FGF*
- *TGF-β/BMP*



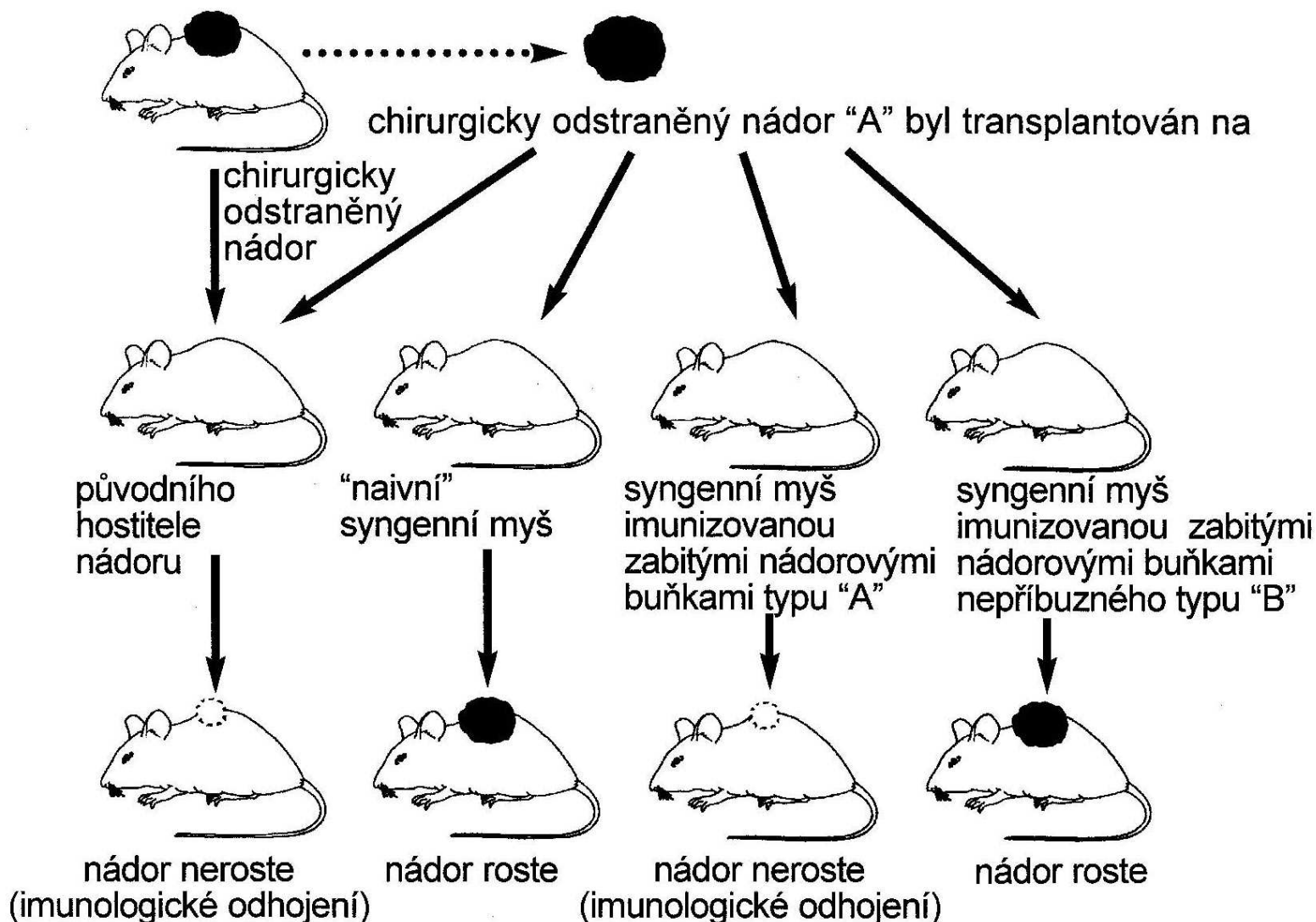
TF: Snail, Slug, Twist, Zeb1/2



VII. Protinádorová imunitní odpověď

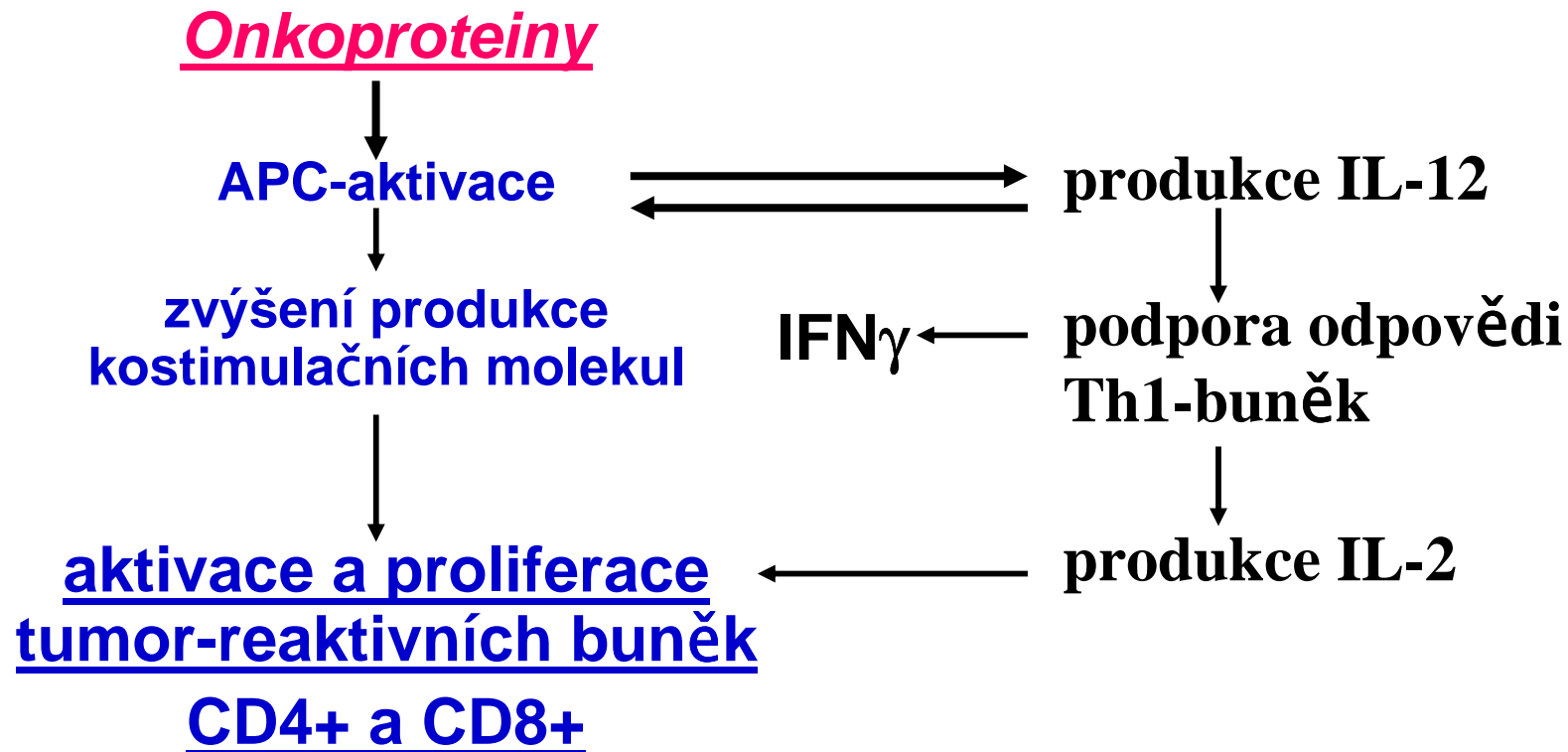


myš s MCA indukovaným sarkomem "A"



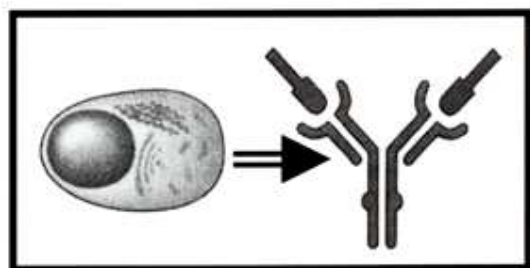
Důkaz: imunokompromitovaní pacienti - 200krát vyšší riziko vzniku nádorového onemocnění

Protinádorová imunitní odpověď

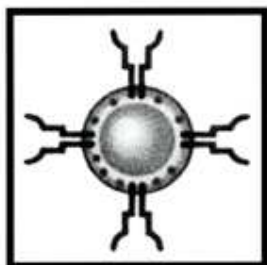


Protinádorová imunitní odpověď

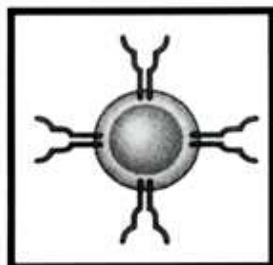
- Velký význam cytolytické T-lymfocyty typu CD8+ a T-lymfocyty typu CD4+: Aktivované T-buňky CD4+ exprimují CD40 ligand (gp39), který aktivuje CD40-receptor na antigen-prezentujících buňkách (dendritické buňky). Secernace prozánětlivých cytokinů, zejména IL-12, čímž dochází k aktivaci T-lymfocytů typu CD8+ a navození produkce IFN γ IL-2, což má za následek atrahování dalších imunokompetentních buněk.
- Kromě cytolytických T-lymfocytů, které vyžadují aktivaci (IL-2) a prezentaci cílového antigenu za přítomnosti HLA I. třídy, jsou ještě NK-buňky, nevyžadující prezentaci antigenu. Některé NK-buňky participují na buněčné cytotoxicitě vyvolané specifickou protilátkou (antibody-dependent cellular cytotoxicity = ADCC). Také aktivované makrofágy (pomocí IFN γ) se mohou podílet na protinádorové cytotoxicitě (účinkem reaktivních forem kyslíku). Humorální protilátky působí dvěma mechanismy: (a) aktivací komplementu a (b) aktivací NK-buněk ADCC-mechanismem.



plasmatická buňka sekretující protilátky
protilátka



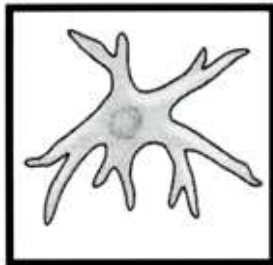
CD8 CTL



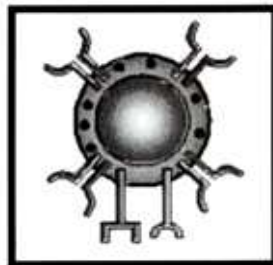
CD4 Th
lymfocyt



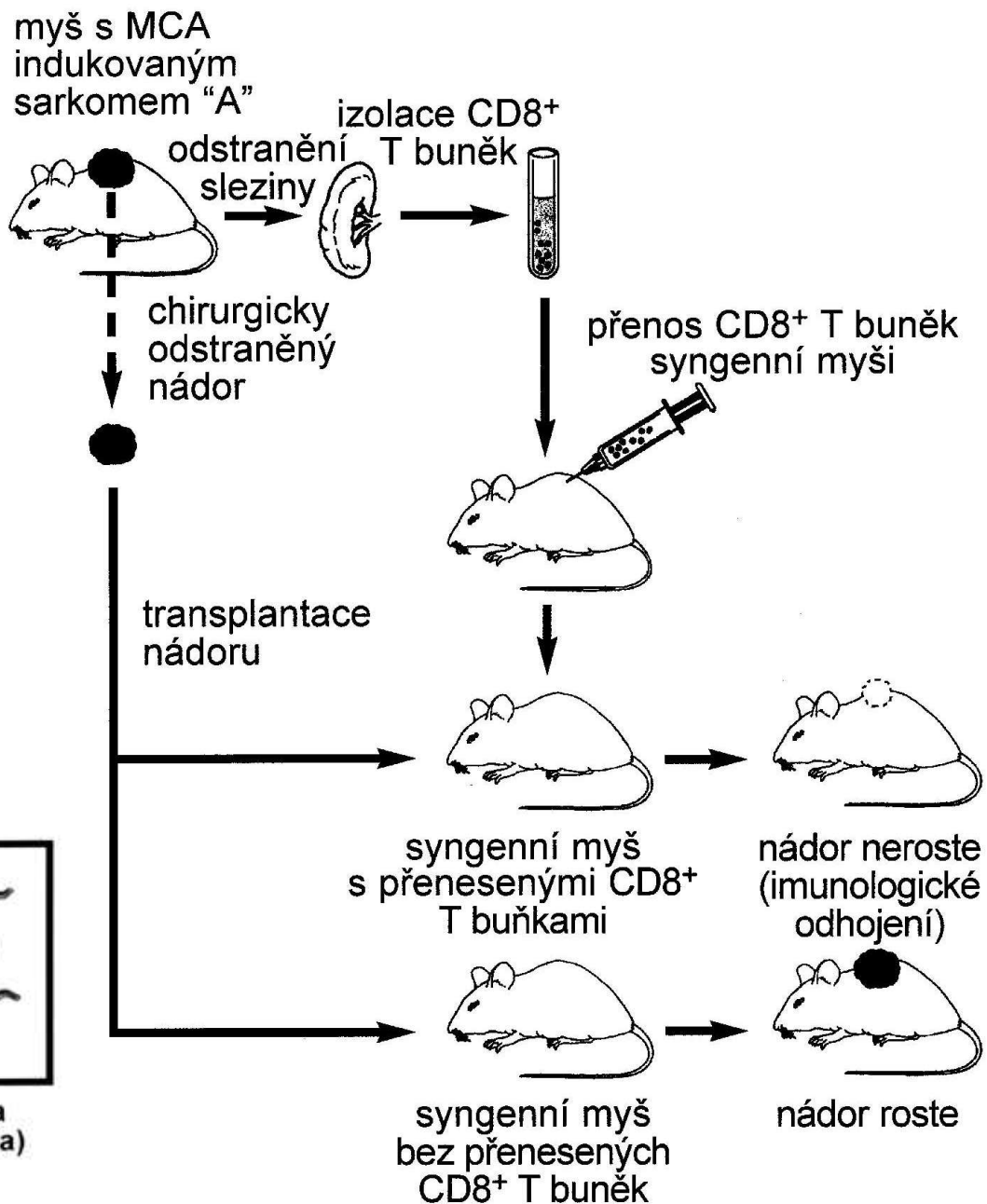
makrofág
(APC)



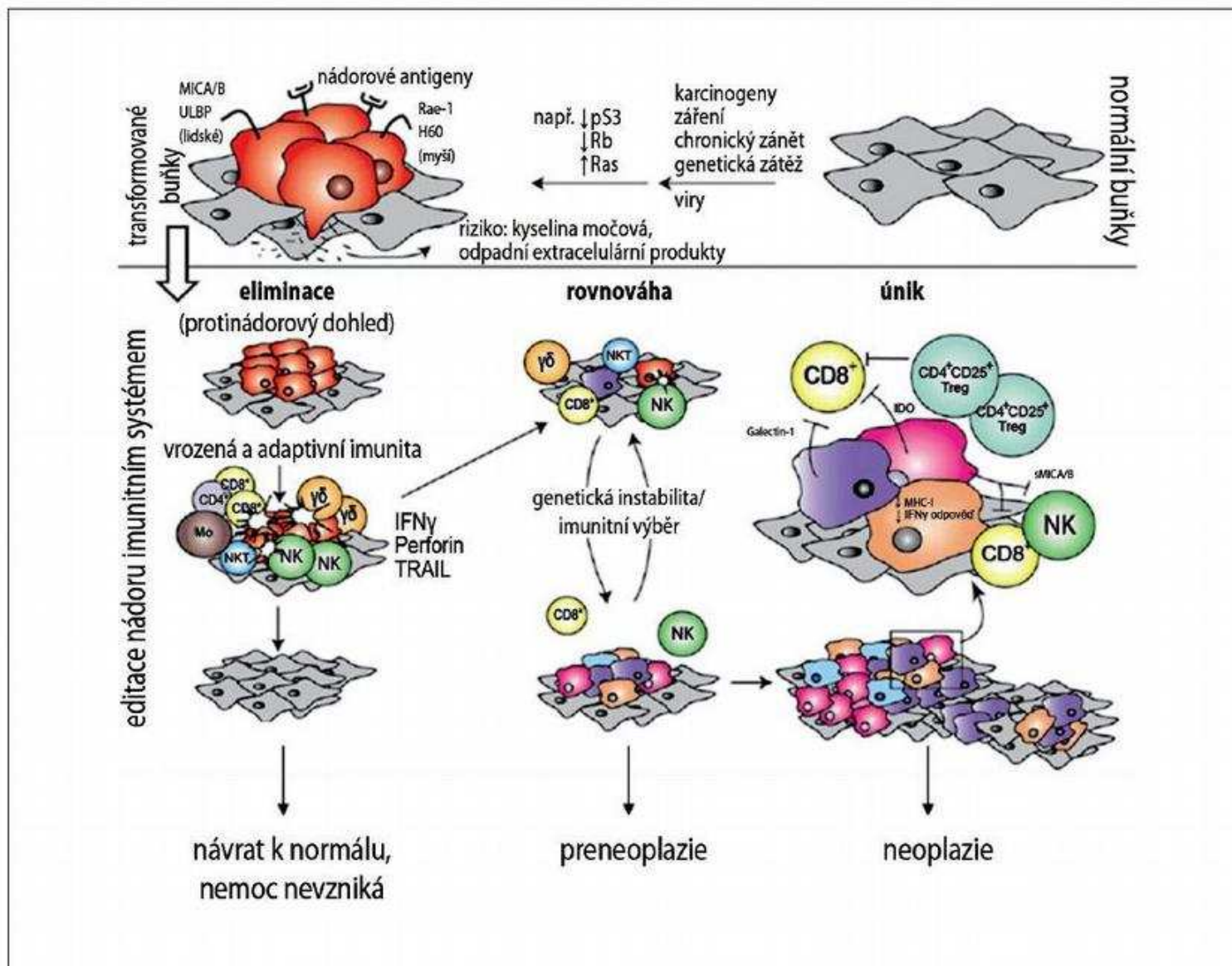
dendritická
buňka



NK buňka
(LAK buňka)

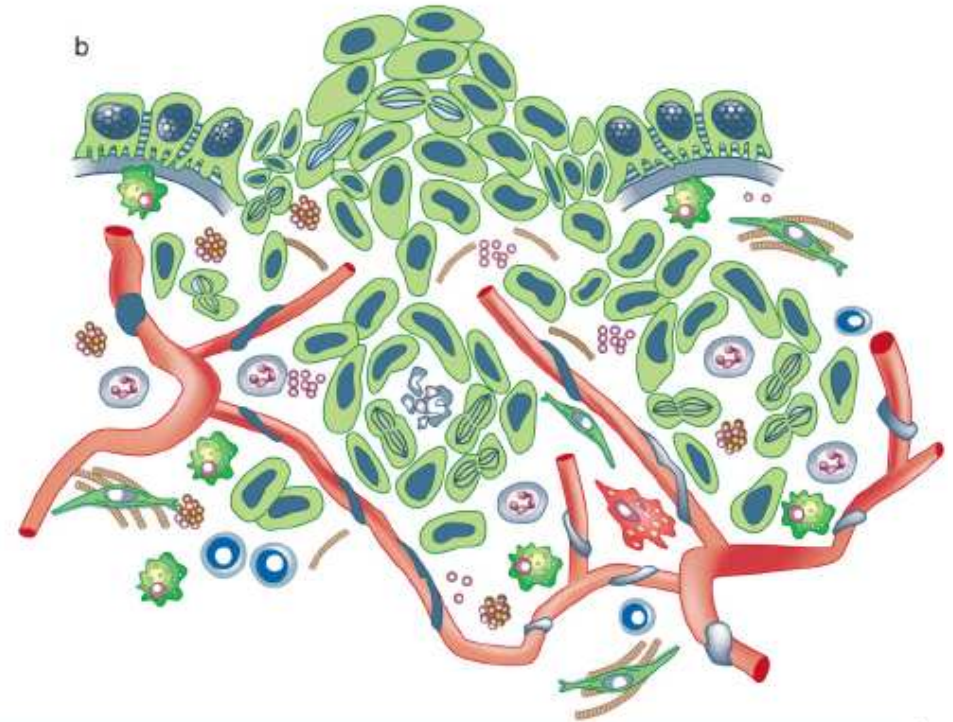
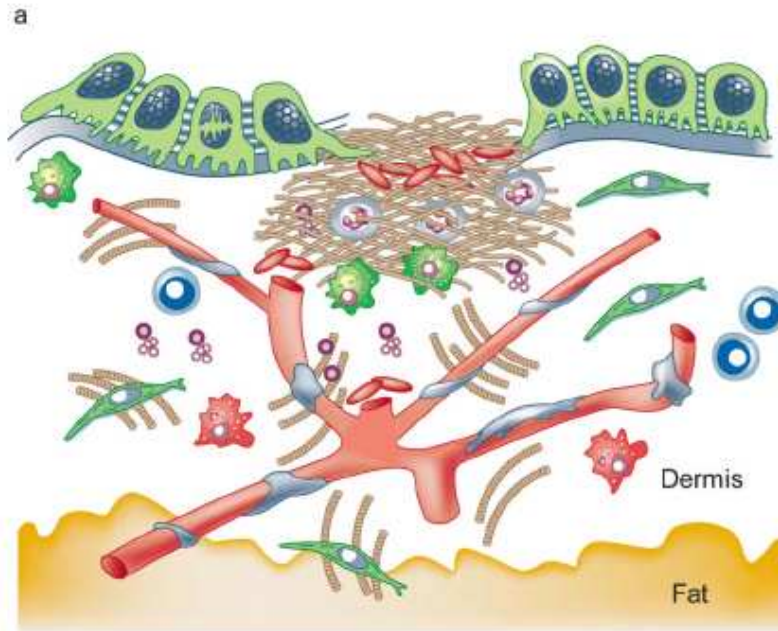


Teorie protinádorového imunologického dohledu („cancer immunoeediting“)



■ *Obz. 1 – Teorie protinádorového dohledu, editace nádoru imunitním systémem a klinický korelát jednotlivých stadií. Převzato a upraveno podle Dunn a kol.*

VIII. Zánět a nádorová onemocnění



Epithelial cell and basement membrane



Neutrophils



Lymphocytes



Macrophage/monocyte



Endothelial cells and capillary support cells
(pericytes, smooth muscle cells)



Mast cells/eosinophils/basophils



Fibroblasts and fibrillar collagens



Platelets and fibrin clot



Cytokines/chemokines



Malignant epithelial cells

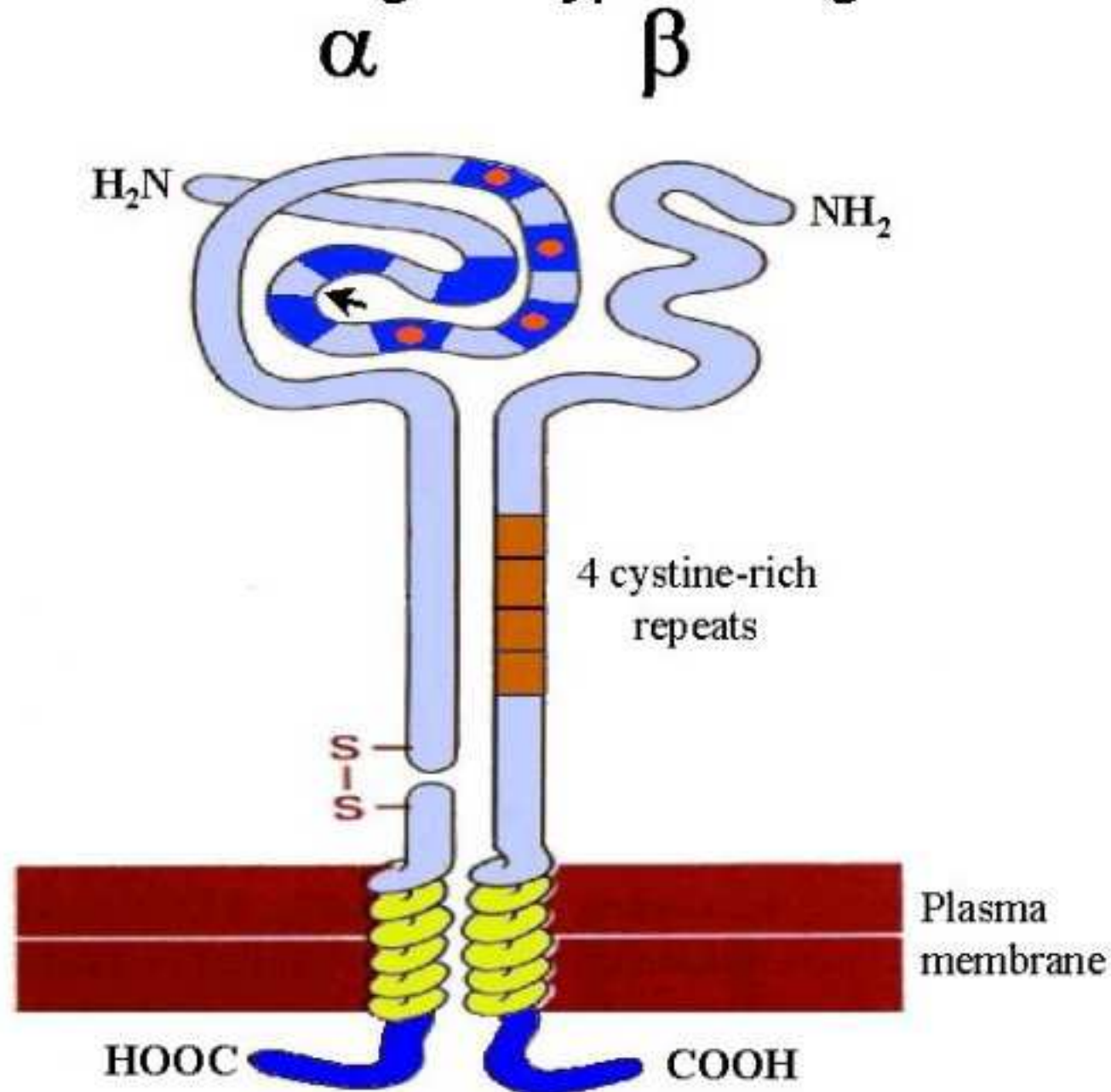
Extracelulární matrix (ECM)

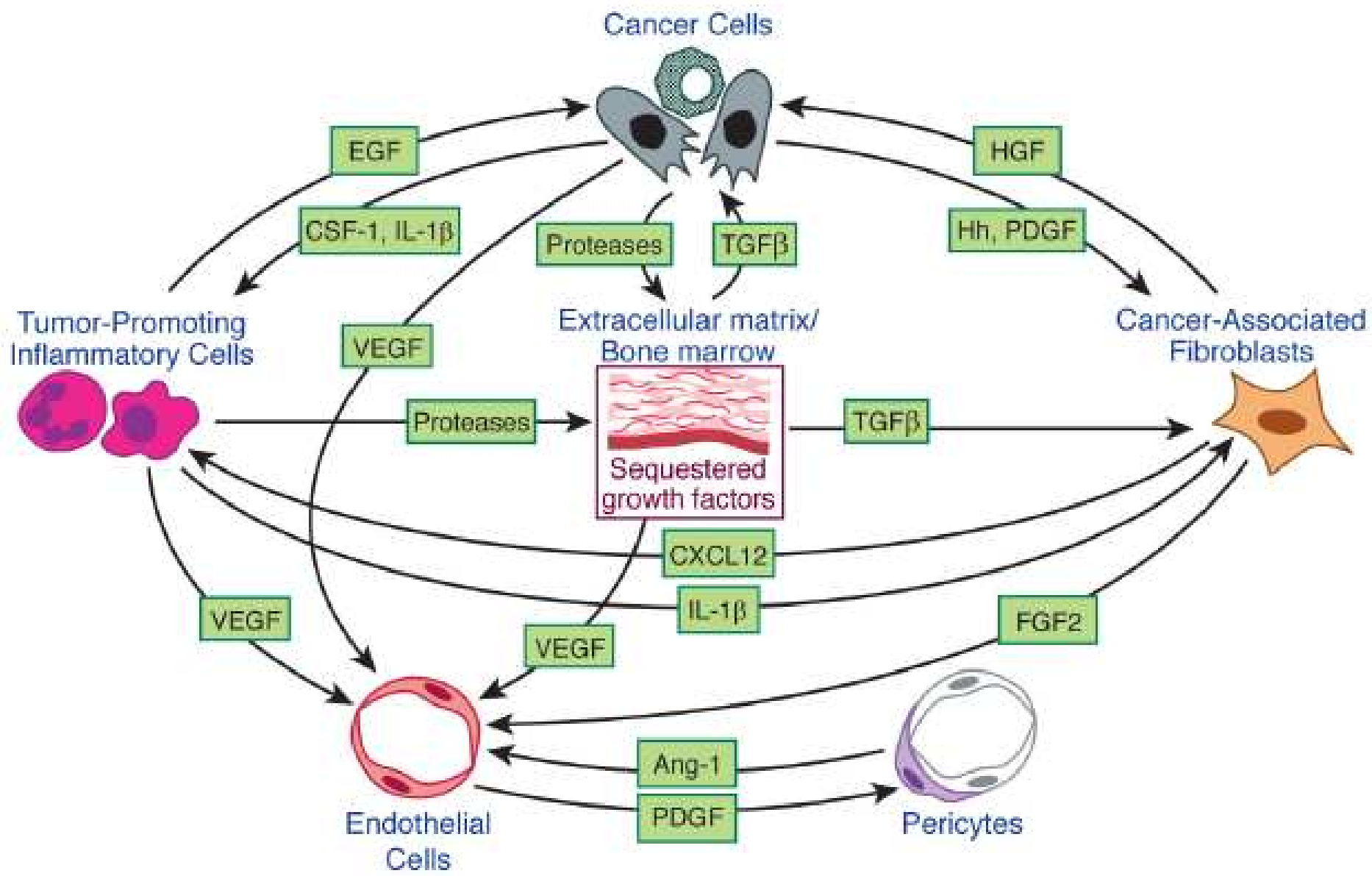
- Pletivo makromolekul vně buněk (bílkoviny, glykoproteiny, proteoglykany a polysacharidy)
- Poskytuje mechanickou podporu pro buňky
- Ovlivňuje chování, proliferaci a diferenciaci buněk, které jsou s ní v kontaktu
- Hlavními receptory buněk, které zprostředkovávají interakci buněk s ECM jsou integriny

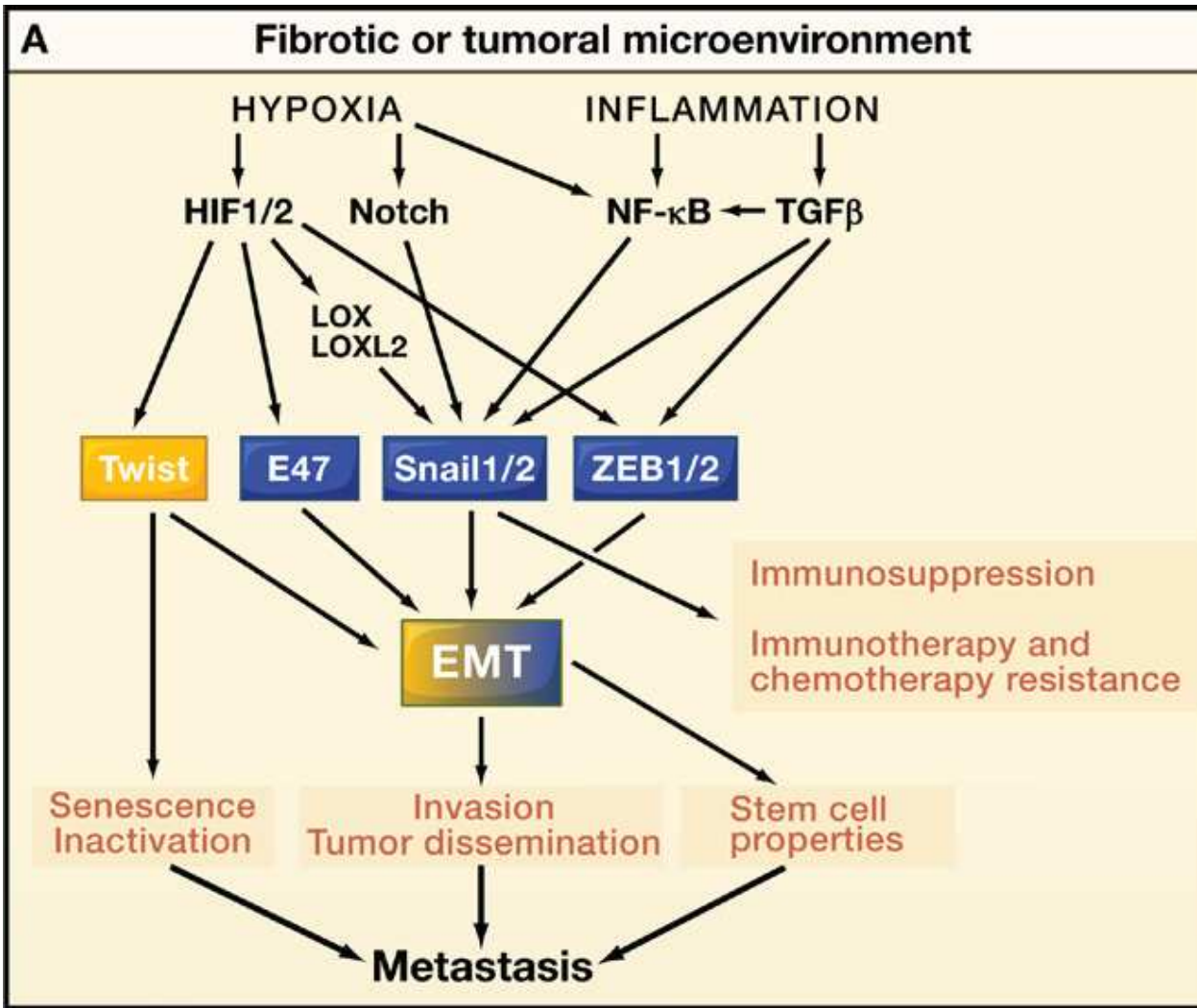
Integriny

- Nepostradatelné komponenty všech Metazoi (od mořských hub po člověka)
- Členy velké rodiny transmembránových proteinů, které jsou receptory pro adhesivní sekvence molekul extracelulární matrix
- Zprostředkují přichycení buňky k ECM nebo k jiné buňce a umožňují přenos signálu (informace) mezi ECM a buňkou. Signalizace probíhá jak z ECM do buňky (outside-in signaling), tak z buňky do extracelulárního prostoru (inside-out signaling)
- Heterodimerní molekula v které jsou α a β podjednotky spolu nekovalentně vázány

Schematic drawing of a typical integrin dimer

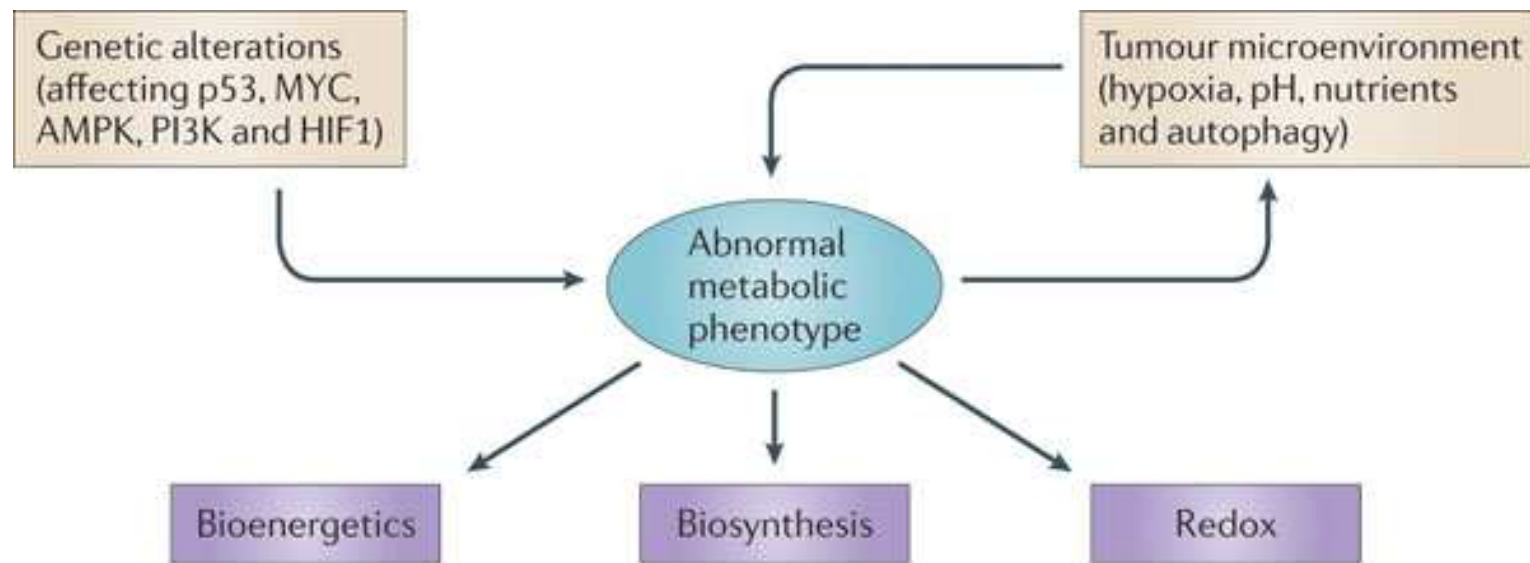




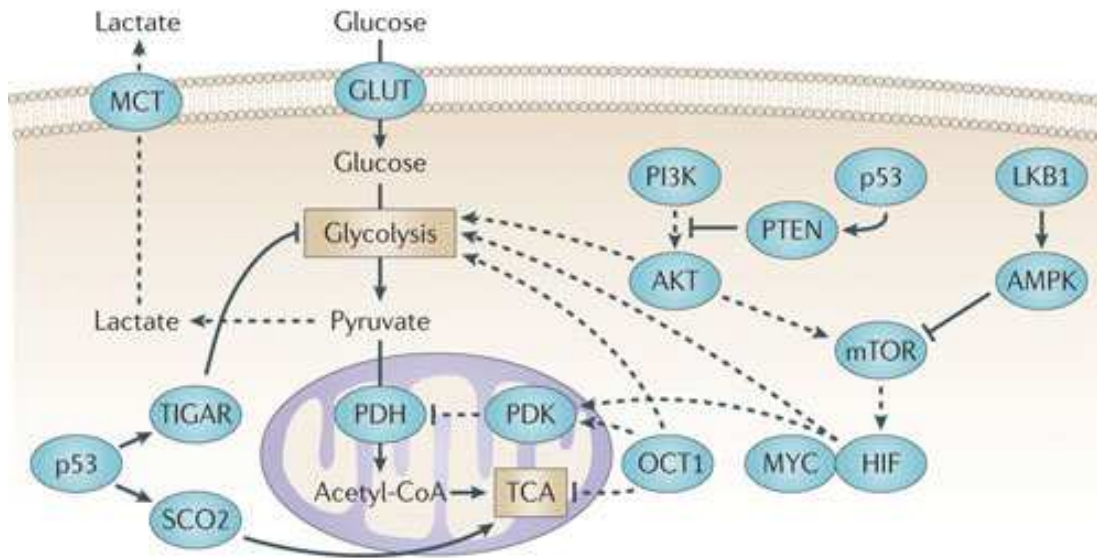


IX. Změny v metabolické aktivitě

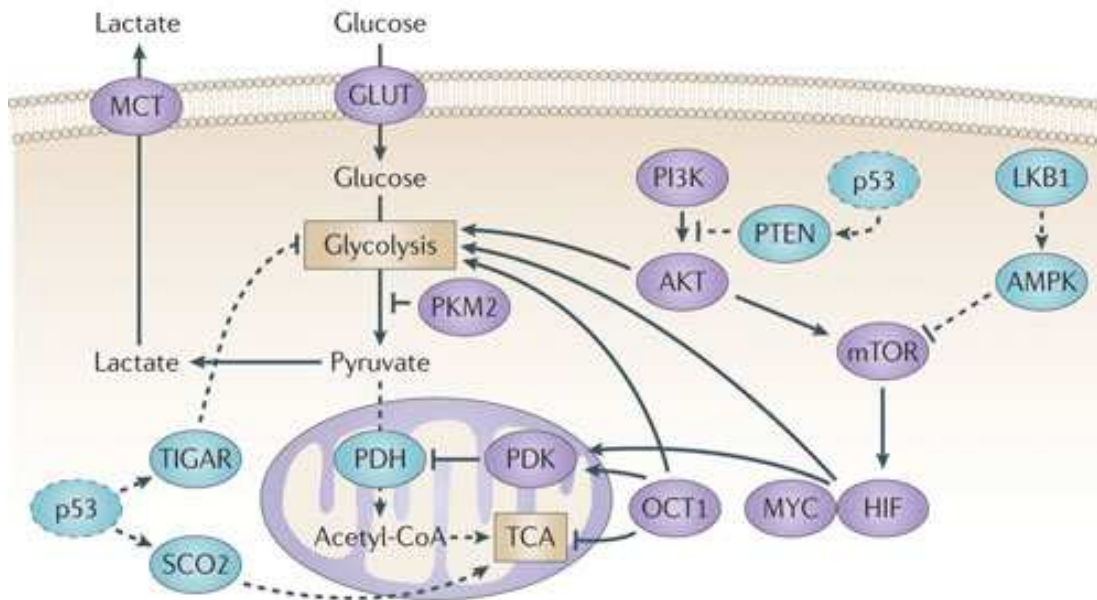
Nekontrolovaná buněčná proliferace je nejen spojena s deregulací kontroly buněčného cyklu, ale má též zvýšené nároky na metabolickou aktivitu



a Quiescent normal cell



b Proliferating tumour cell



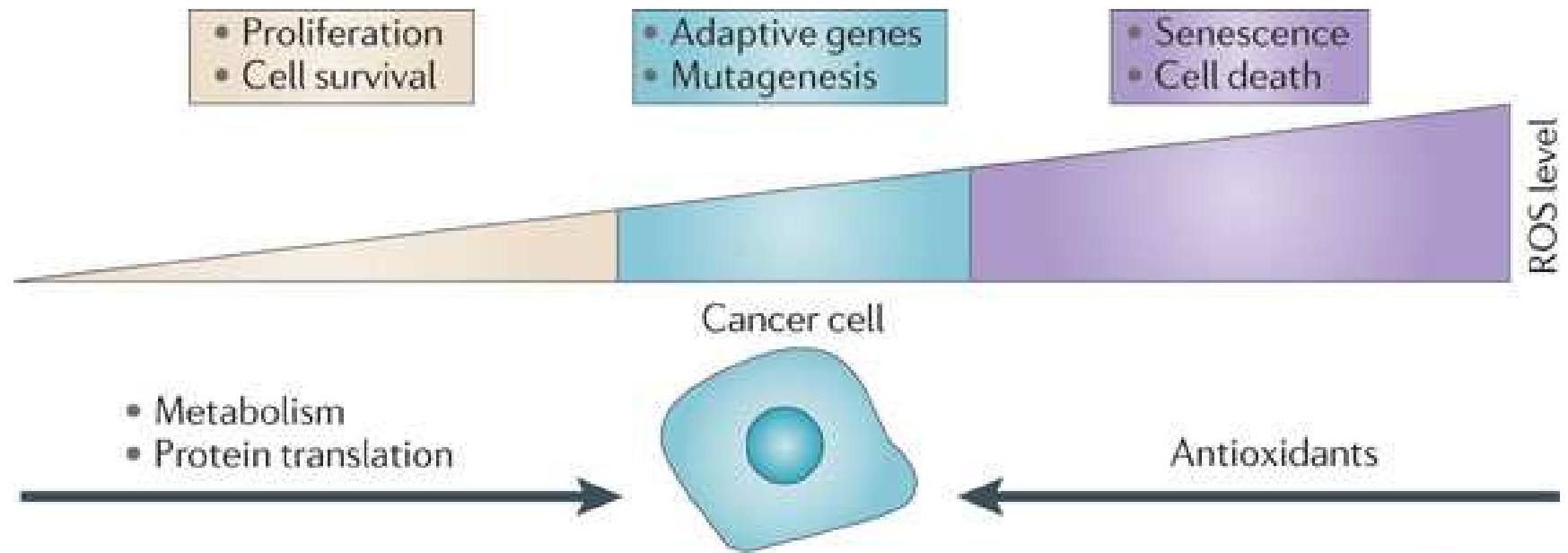
~ 18x vyšší účinnost

Aerobní glykolýza (O. Warburg)

- GLUT1 ↑ (PET)
- Hypoxie
- Glykolytické intermediáty

➡ 2 subpopulace buněk

ROS vs. antioxidant



X. Genomová nestabilita

Funkčnost genetických reparačních mechanismů → výskyt spontánních mutací je poměrně nízký → při kancerogenezi musí dojít k vyřazení systému monitorujícího genomovou stabilitu = "caretakers" of the genome (Kinzler and Vogelstein, 1997)

Nejčastěji se jedná o faktory zodpovědné za:

- (1) detekci DNA poškození a aktivaci reparační mašinerie
- (2) přímo se podílející na opravě poškozené DNA
- (3) inaktivující mutagenní molekuly dříve než poškodí DNA

Ztráta telomerické DNA u řady nádorů vede ke karyotypické nestabilitě a s tím spojeným amplifikacím a delecím na chromozomech