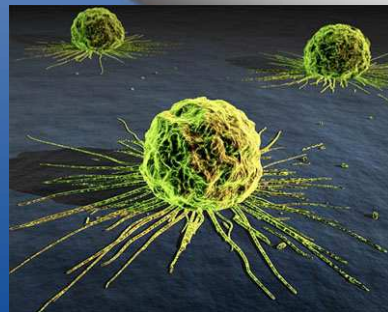


Molekulární podstata vzniku nádorů

Jan Šmarda
Ústav experimentální biologie
Přírodovědecká fakulta MU



Přednáška kurzu Molekulární biologie eukaryot

Rakovina - definice

- název **rakovina** („cancer“) odvozen od latinského slova označujícího kraba, protože tohoto živočicha starým Řekům připomínaly výběžky šedé hmoty nádoru (řecky: karkinos = krab)
- choroba způsobená **maligním nádorem**
- nádor („tumor“) - neoplazma, novotvar - patologický útvar vytvořený v tkáni mnohobuněčného organismu, jehož růst se vymkl kontrole



Základní charakteristika

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



Proč jsou rakovinné buňky nebezpečné?

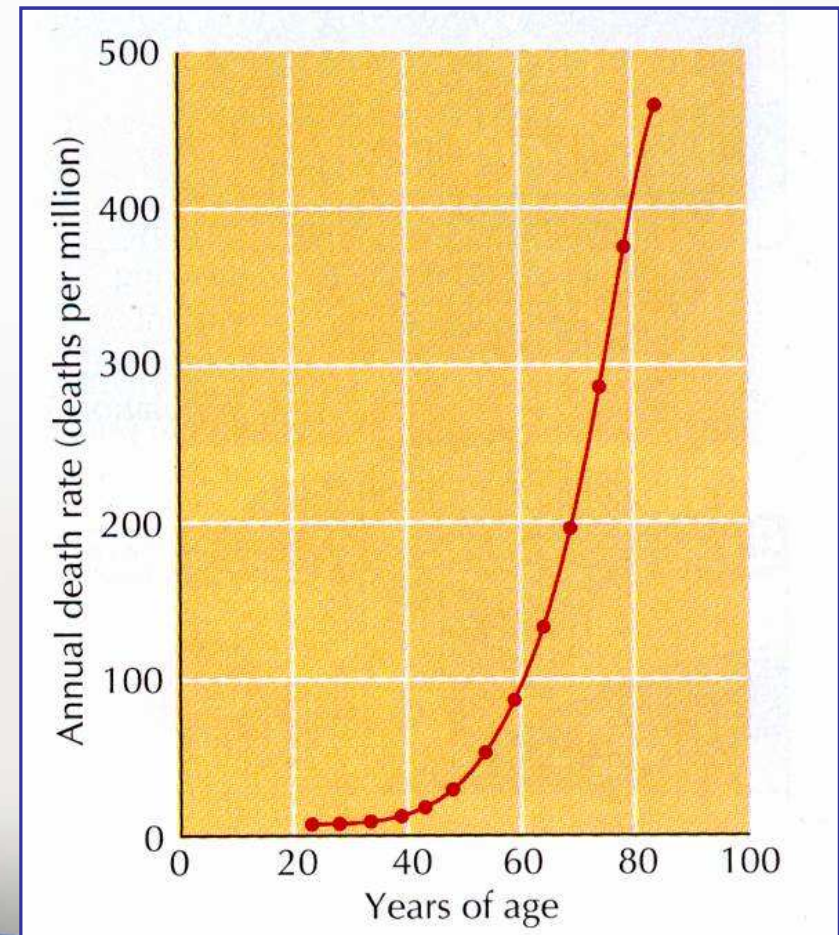
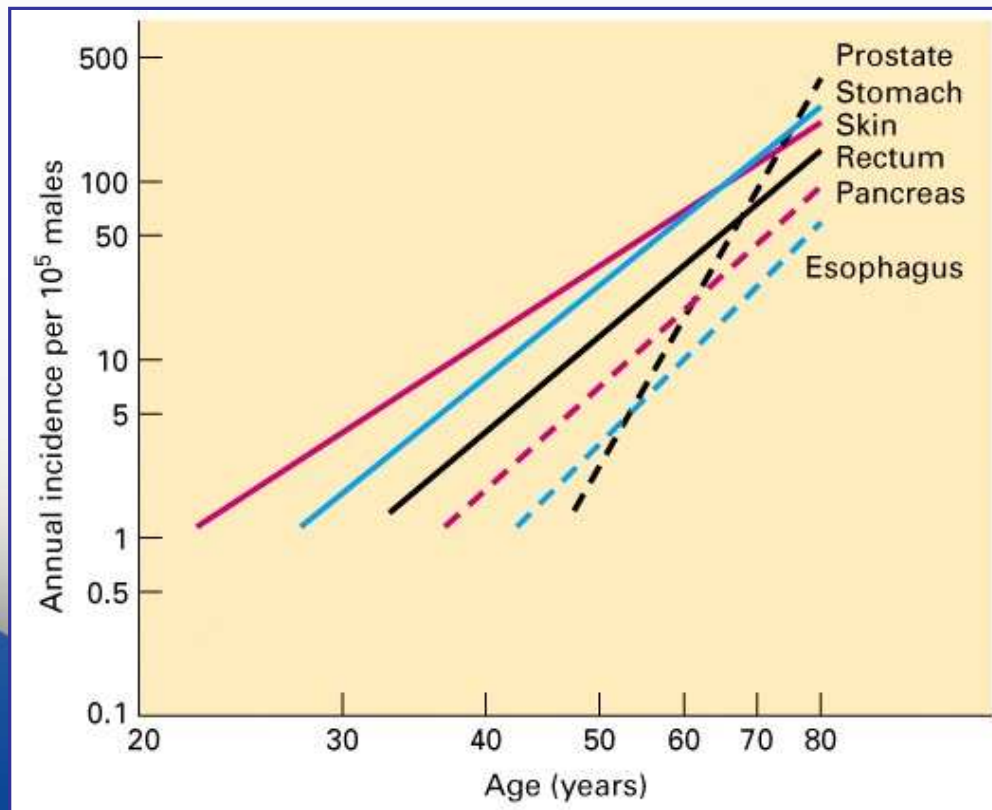
- reprodukují se bez ohledu na potřeby organismu (nereagují na běžné buněčné signály)
- kolonizují tělní oblasti, které jsou vyhrazeny jiným buňkám
- narušují funkci postižených orgánů
- vyčerpávají organismus
- imunitní systém je obtížně odlišuje od buněk zdravých
- nádor je tvořen heterogenní a průběžně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

Je rakovina dědičná nemoc?

- **predispozice** k tvorbě nádorů **lze zdědit**: dědičné jsou mutantní alely nádorových supresorů
- zděděné onkogeny se v potomstvu objevují velmi vzácně kvůli svým drastickým účinkům znemožňujícím řádný vývoj organismu (výjimka – onkogen *ret* způsobující syndrom MEN – „multiple endocrine neoplasia“ nebo nádory štítné žlázy)
- predispozice k tvorbě nádorů mohou vyplývat ze zděděných defektů opravných mechanismů - zvýšená frekvence mutací/genomová nestabilita
- běžné jsou nádory odvozené ze **somatických buněk**, ve kterých došlo k nežádoucí kombinaci nádorotvorných mutací

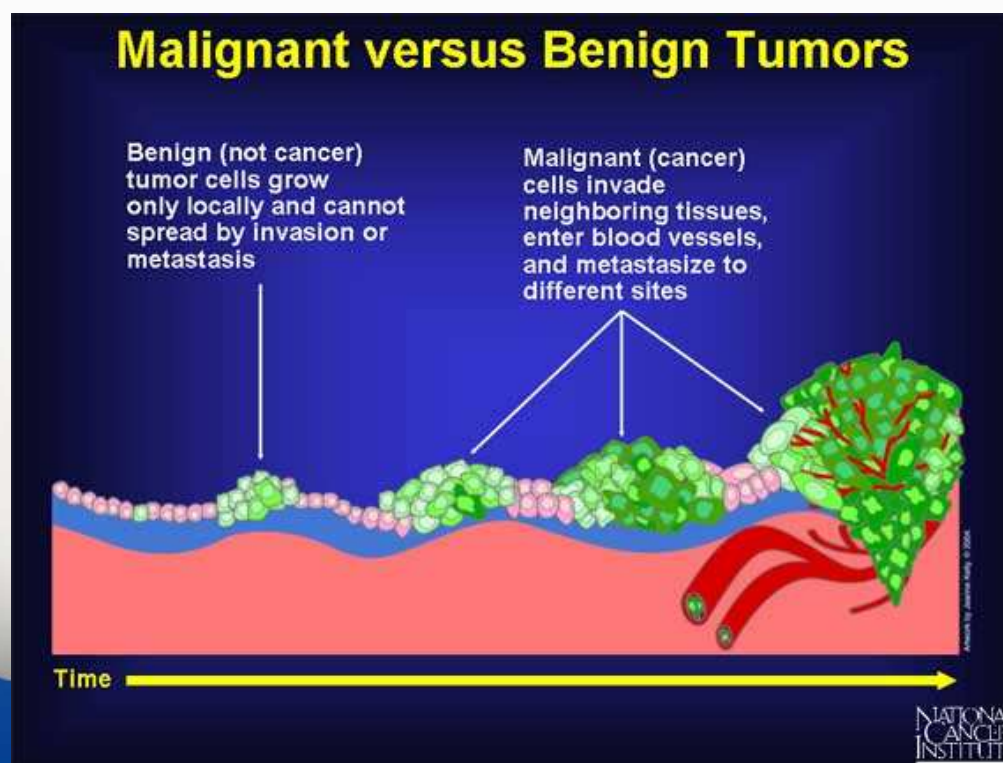
Vývoj rakoviny - postupné hromadění genetických změn

většina nádorů se objevuje v pokročilejším věku



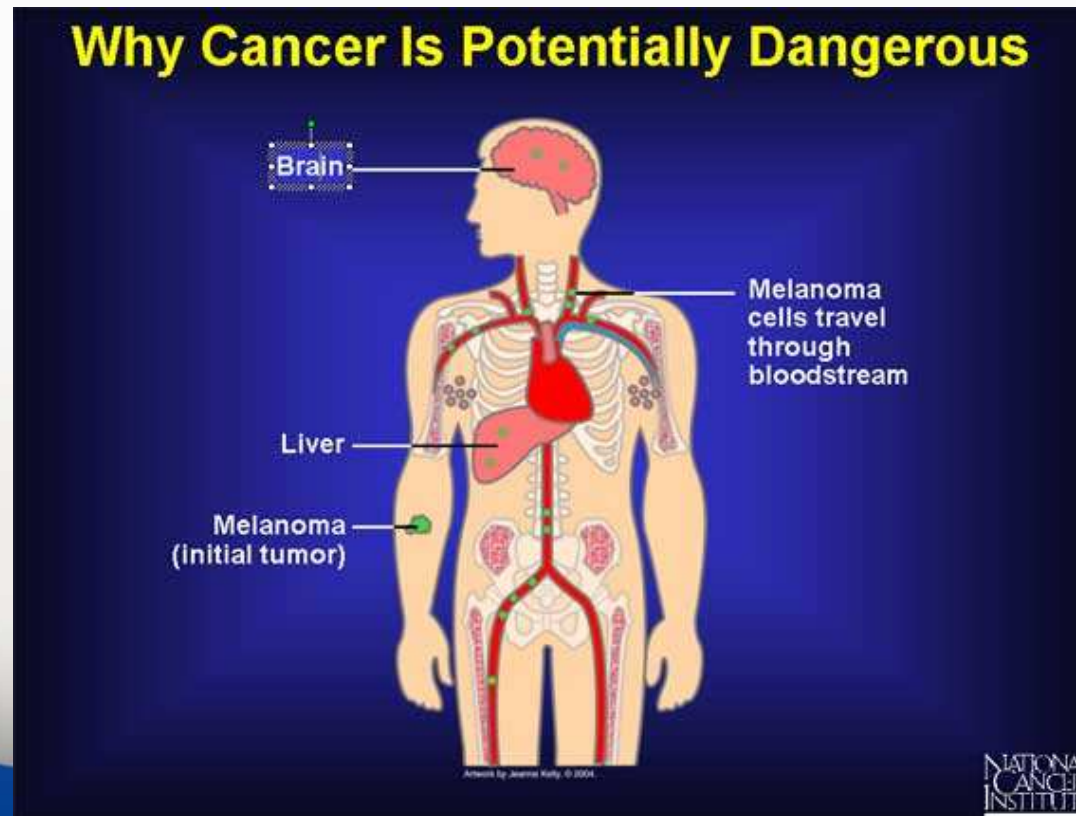
Nádory benigní (nezhoubné)

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



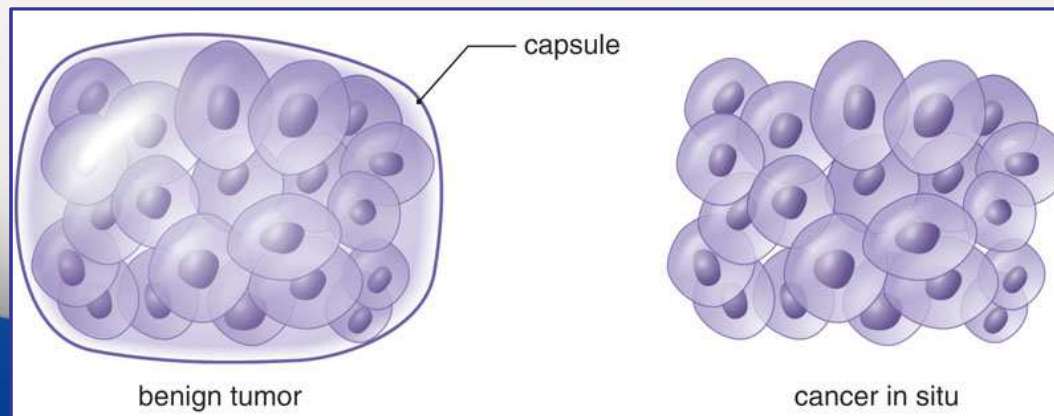
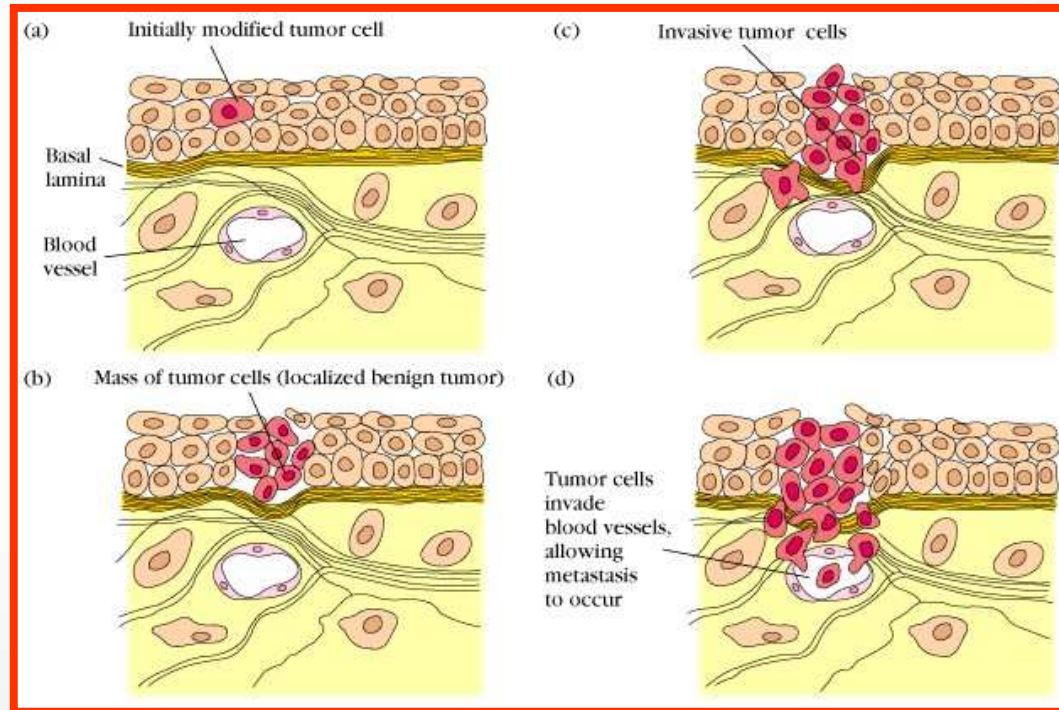
Nádory maligní (zhoubné)

- vysoká proliferace (velká jádra, jadérka - tvorba ribozomů, polyzomy - tvorba proteinů potřebných pro buněčné dělení)
- změny v morfologii, velikosti a tvaru buněk, nižší stupeň diferenciacce
- metastázuje, metastázy ohrožují funkci postižených orgánů, špatně se odstraňují



Benigní

Malignní



I benigní nádory mohou být smrtelné!

- **nadprodukce důležitých biologicky aktivních molekul (např. hormonů)**
příklad: nádor žláznatých buněk - Langerhansovy ostrůvky - přílišná sekrece inzulínu - fatální hypoglykemie
- **poloha nádoru narušuje nějakou životní funkci**
příklad: mozkové výstelka - narušení funkce vitálních mozkových center

Klasifikace a nomenklatura nádorů

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

Typizace nádorů - příklady

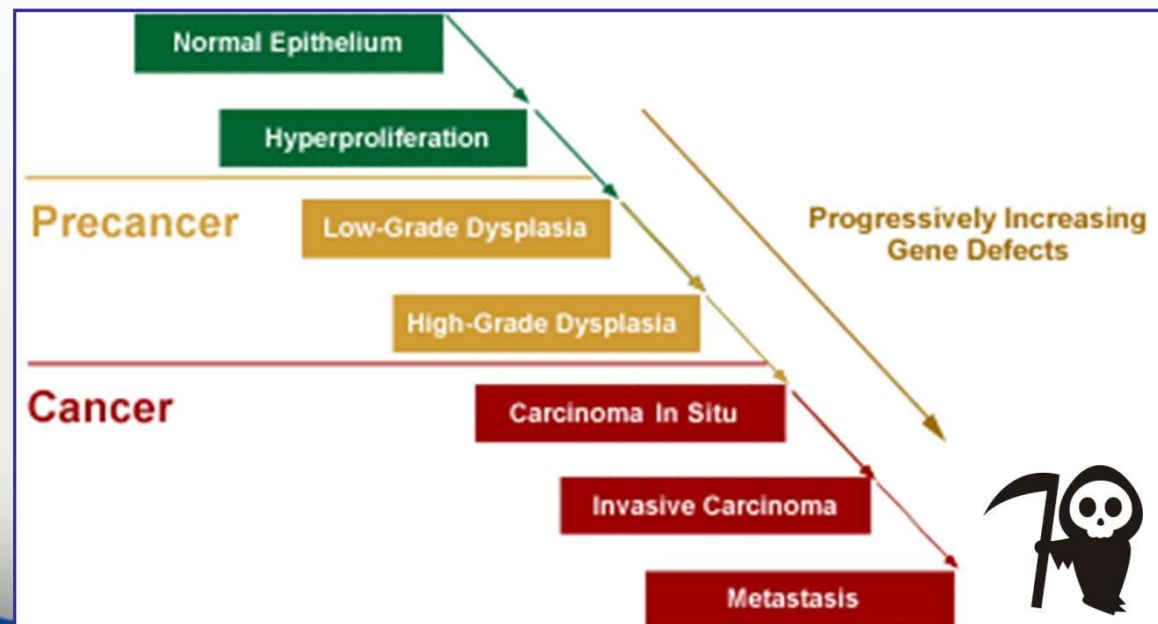
Původ	Benigní	Maligní
Epiteliální/Endoteliální	Adenom jater, slinivky, tlustého střeva, ledvin, atd.	Adenokarcinom jater slinivky,tlustého střeva, ledvin, atd.
Mezenchymální pojivová tkáň	Lipom	Liposarkom
	Fibrom	Fibrosarkom
	Chondrom	Chondrosarkom
		Neuroblastom
		Retinoblastom
Zárodek	Teratom	Teratokarcinom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

Většina lidských nádorů je odvozena z epitelů

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

Nádor vzniká postupnou přeměnou zdravých buněk

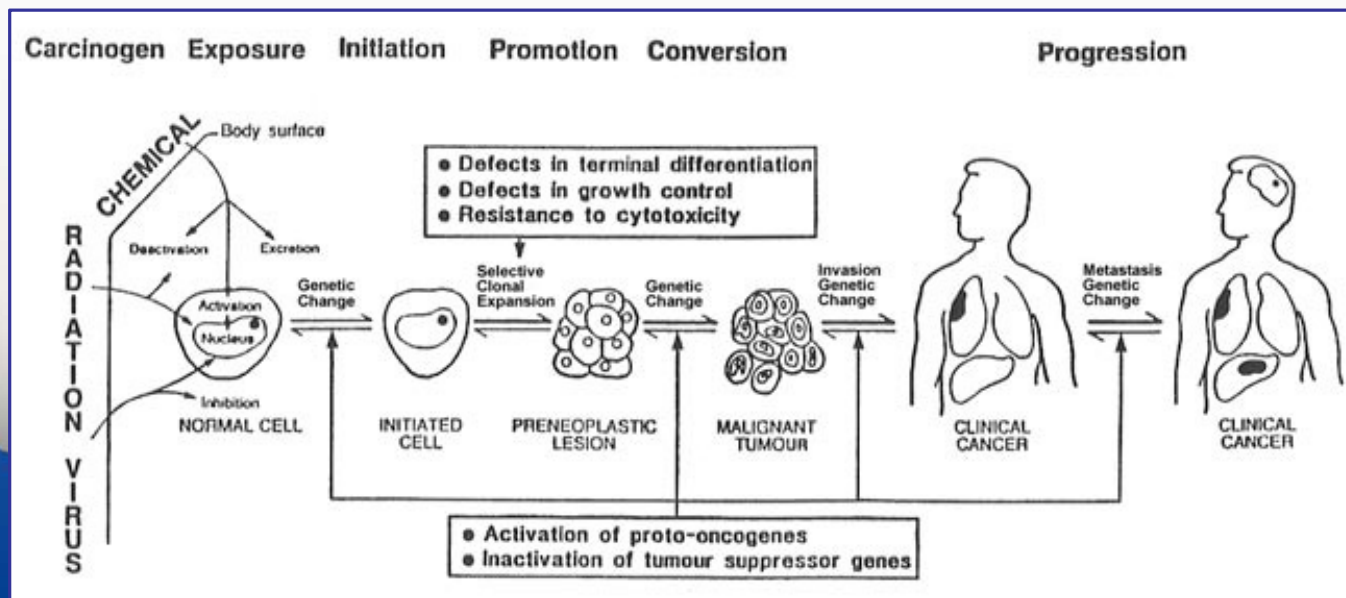
- mezi normálním a maligním fenotypem je široké spektrum přechodných stádií
- vývoj nádoru je vícestupňový proces



Nádor vzniká postupnou přeměnou zdravých buněk

Fáze karcinogeneze:

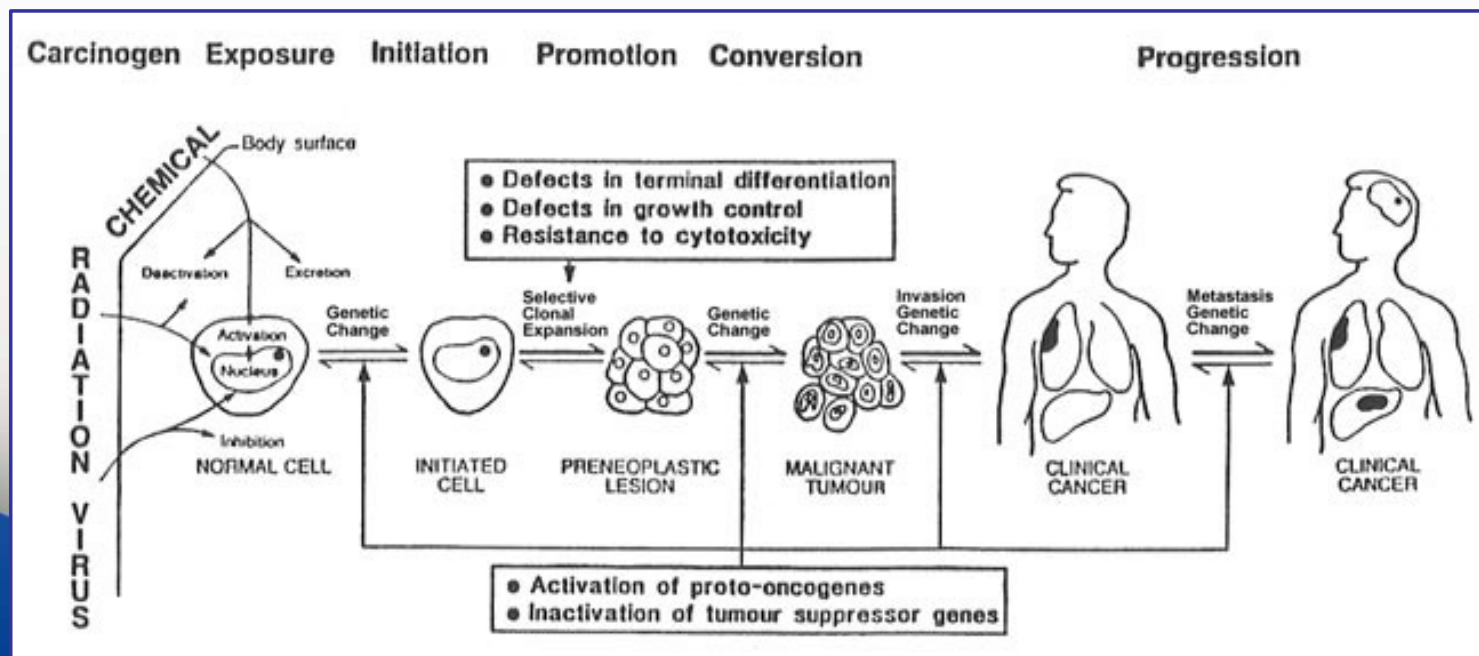
- **iniciace** (indukce mutace v kritickém genu): růstová selekční výhoda; krátkodobá fáze
- **promoce** (rozvoj nádoru) – klonální růst preneoplastických buněk v důsledku epigenetických a negenotoxických změn; deregulace genové exprese na transkripční, translační nebo posttranslační úrovni; dlouhodobá fáze



Nádor vzniká postupnou přeměnou zdravých buněk

Fáze karcinogeneze:

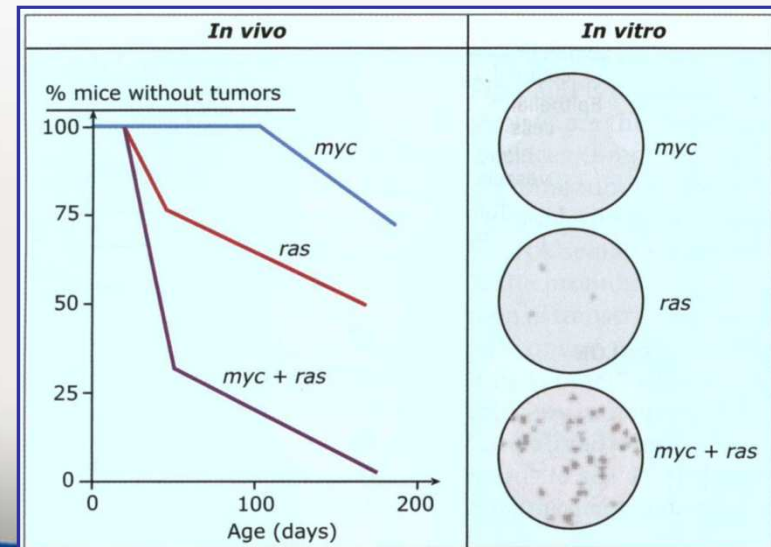
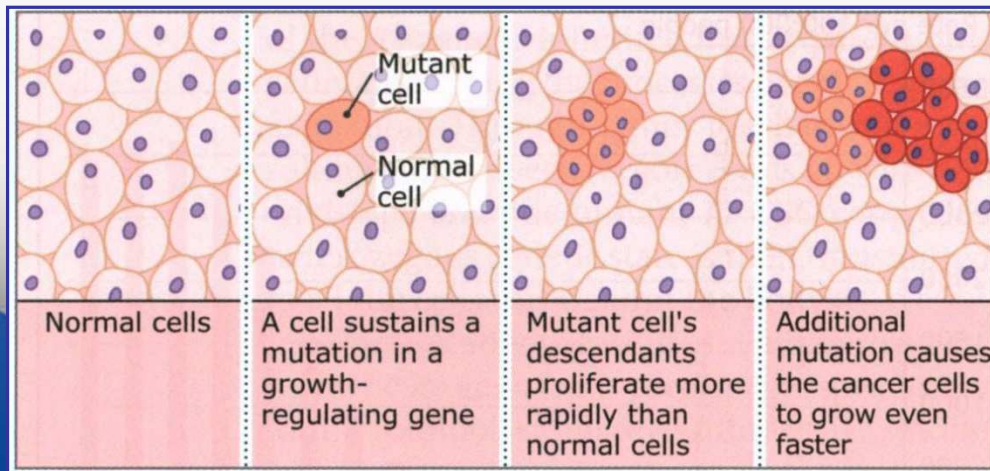
- **konverze** (transformace) – vznik maligního klonu v důsledku mutací
- **progrese** – hromadění dalších mutací, přestavby chromozomů, apod., nevratný přechod do maligního stádia



Postupnost kancerogeneze spočívá v hromadění mutací

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

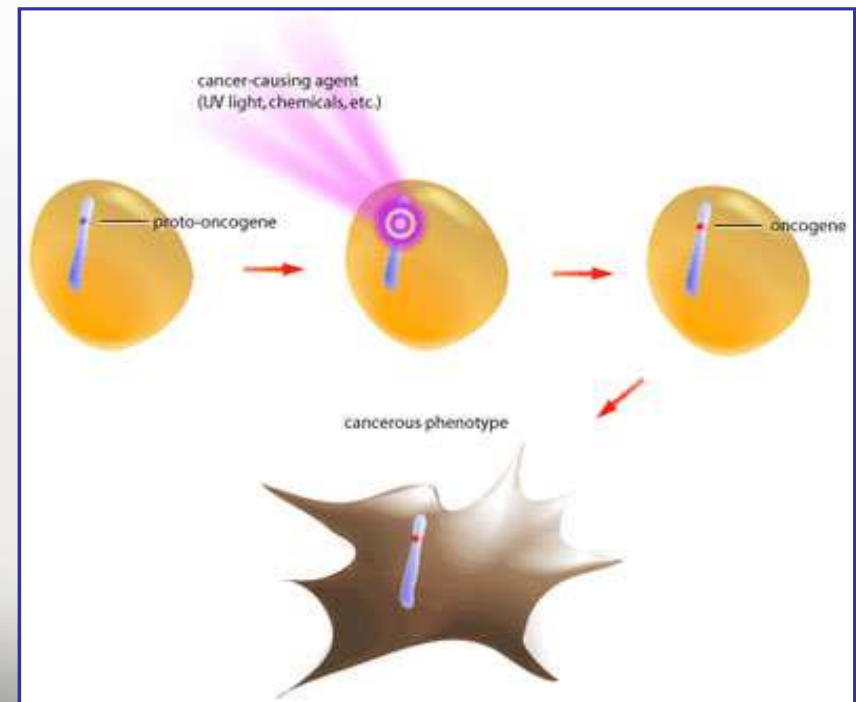
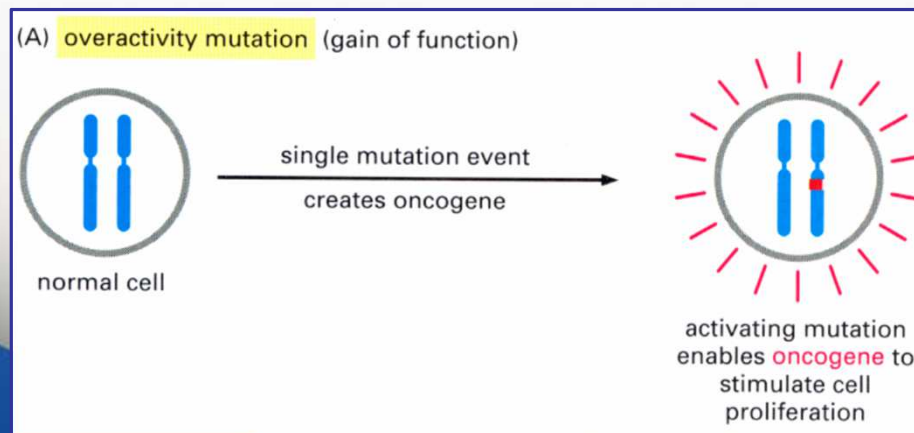
- mutace umožňující **přežití a růst bez ohledu na vnější a vnitřní signály**
- mutace umožňující **únik z rodné tkáně**
- mutace umožňující **přežití a proliferaci v cizích tkáních**
- mutace stimulující **genetickou nestabilitu ("but not too much"!)**



Které typy genů jsou při kancerogenezi postiženy mutací?

protoonkogeny

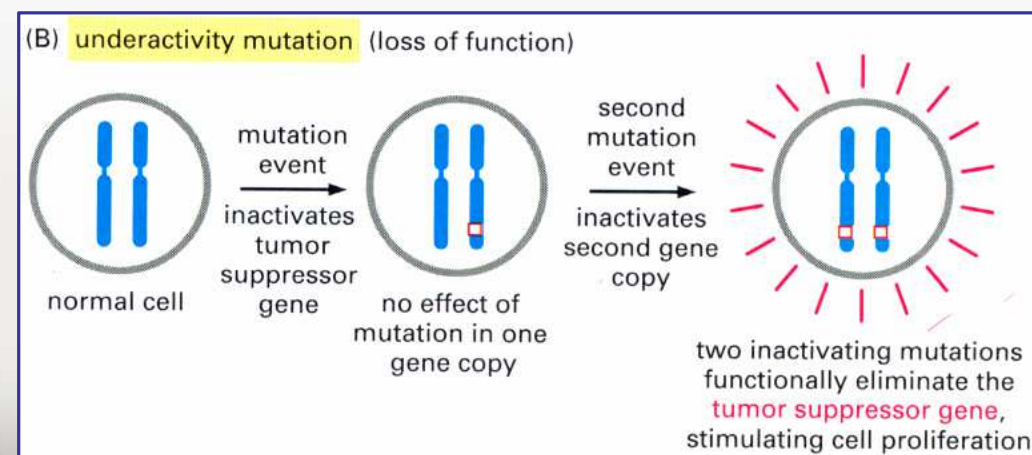
- geny, které pozitivně ovlivňují buněčný cyklus (urychlují jej), tlumí apoptózu nebo diferenciaci buněk
- kancerogenní jsou mutace způsobující hyperaktivitu jejich produktů („**gain-of-function**“)
- dominantní charakter mutací



Které typy genů jsou při kancerogenezi postiženy mutací?

nádorové supresory

- geny, které negativně ovlivňují buněčný cyklus (zpomalují jej), indukují buněčnou smrt nebo diferenciaci buněk
- v případě poškození umožňují opravu DNA
např. p53 – ochránce genomu
- kancerogenní jsou mutace eliminující jejich funkci (**„loss-of-function“**)
- recesivní charakter mutací



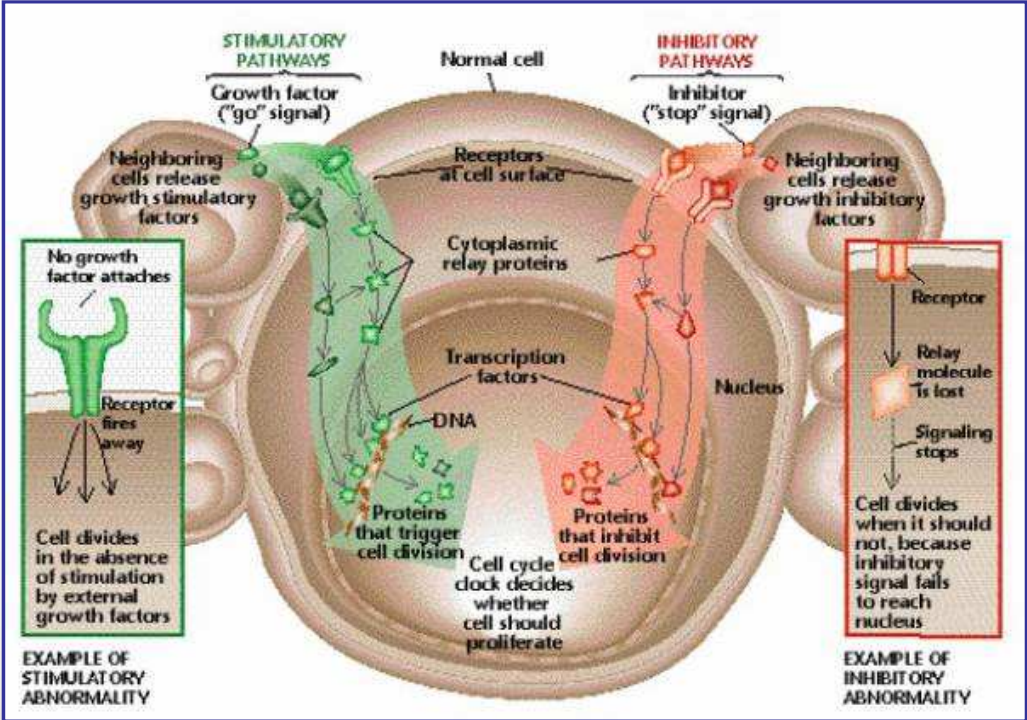
Důsledek mutací: ztráta kontroly růstu

zdravá buňka kontroluje růst/proliferaci dvěma způsoby :

- inaktivací prorůstové signální dráhy
- aktivací protirůstové, apoptotické nebo diferenciační dráhy

u **nádorových buněk** jsou tyto dráhy nefunkční

Poruchy signalizace



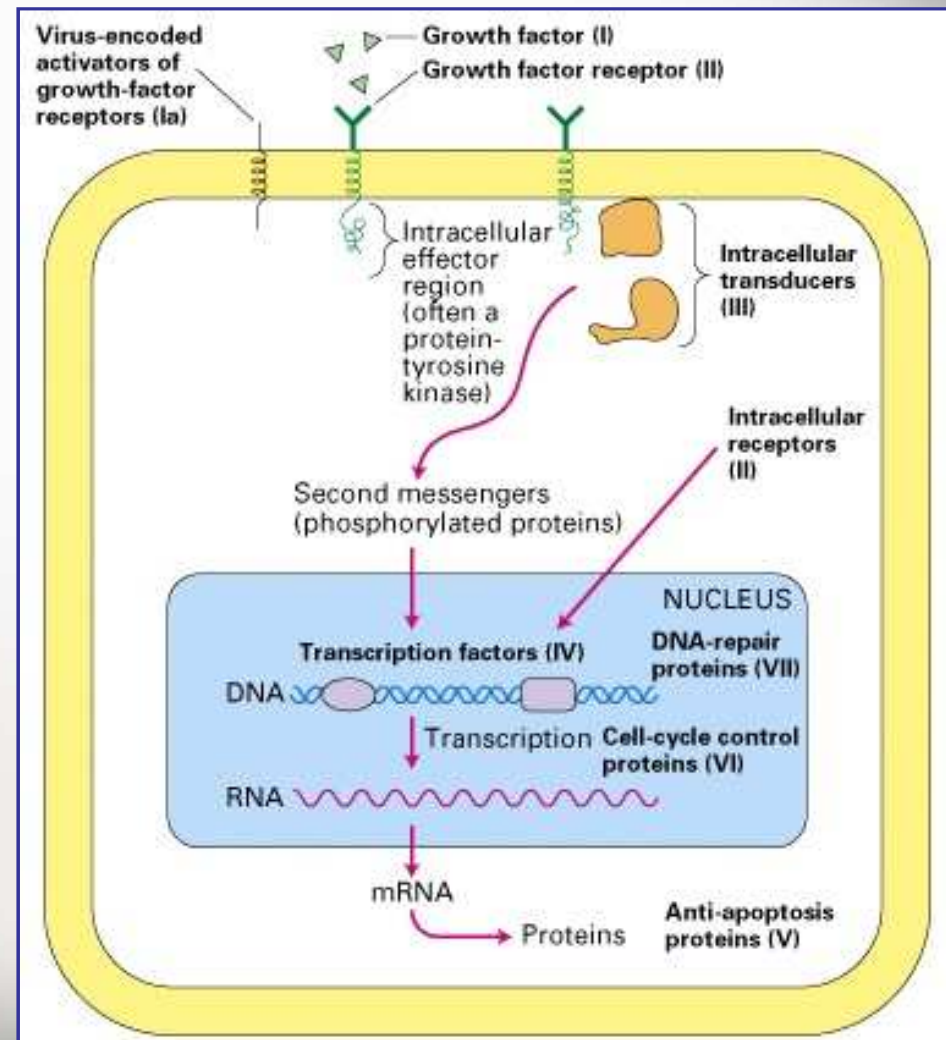
PATHWAY	PROTEINS
EXTRACELLULAR SPACE	Growth factor c-sis KS/HST wnt1 int2
MEMBRANE	Growth factor receptor c-erbB c-kit erbB2,3 mas c-fms
	SH3/SH2 containing protein crk vav
CYTOSOL	G protein/signal transduction c-ras gsp/gip
	Intracellular Tyr kinase c-src c-abl c-fps
CYTOSOL	Ser/Thr kinase c-raf c-mos
	NUCLEUS

Onkogeny

- deriváty **protoonkogenů**
- protoonkogeny plní fyziologické funkce, obvykle spojené se signalizací, růstem a proliferací
- mutací nebo zvýšenou expresí se protoonkogeny mohou změnit na transformující onkogeny
- onkogeny kódují **onkoproteiny**
- onkoproteiny se zapojují do mitogenních **signálních drah** a signalizací spojených s diferenciací nebo apoptózou
- na úrovni buňky se chovají dominantně, porucha v jedné alele již vyvolává účinek (účinek jednoho onkogenu ale k vyvolání nádoru většinou nestačí)

Rozmanité funkce onkoproteinů

- **růstové faktory** (sis=PDGF)
- **receptory** pro růstové faktory (ErbB=EGF-R)
- nitrobuněčné **přenašeče** (Ras, Src)
- **transkripční faktory** (Myc)
- regulátory **apoptózy** (Bcl-2)
- proteiny řídící **b. cyklus** (PRAD1=cyklin D)



Historie onkogenů

- termín se poprvé použil v roce 1969 v USA
- první prokázaný onkogen: *src* (1970) ve struktuře ptačího retroviru (RSV)



Steven Martin



Peter Vogt



Peter Duesberg

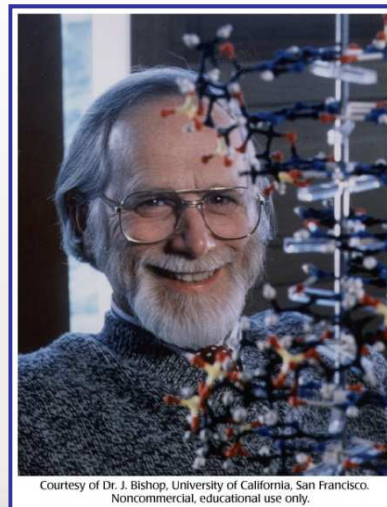
Historie onkogenů

1976: **Dominique Stehelin, J. Michael Bishop** a **Harold E. Varmus** (University of California, San Francisco) dokazují, že onkogeny představují aktivované protoonkogeny a jsou přítomny u mnoha organismů, vč. člověka

- 1989: Bishop a Varmus získávají Nobelovu cenu v oboru Fyziologie a medicíny

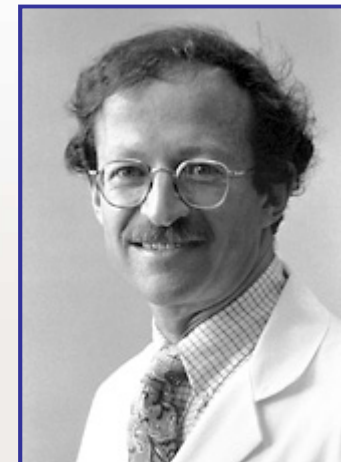


Dominique Stehelin
(* 4.9. 1943)



Courtesy of Dr. J. Bishop, University of California, San Francisco.
Noncommercial, educational use only.

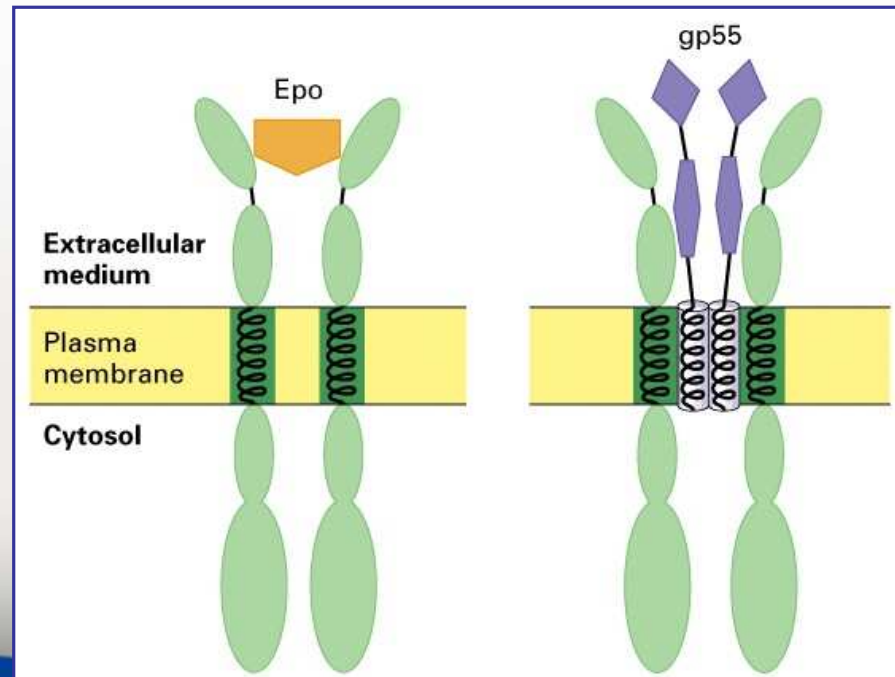
John Michael Bishop
(* 22.2. 1936)



Harold Eliot Varmus
(* 18.12. 1939)

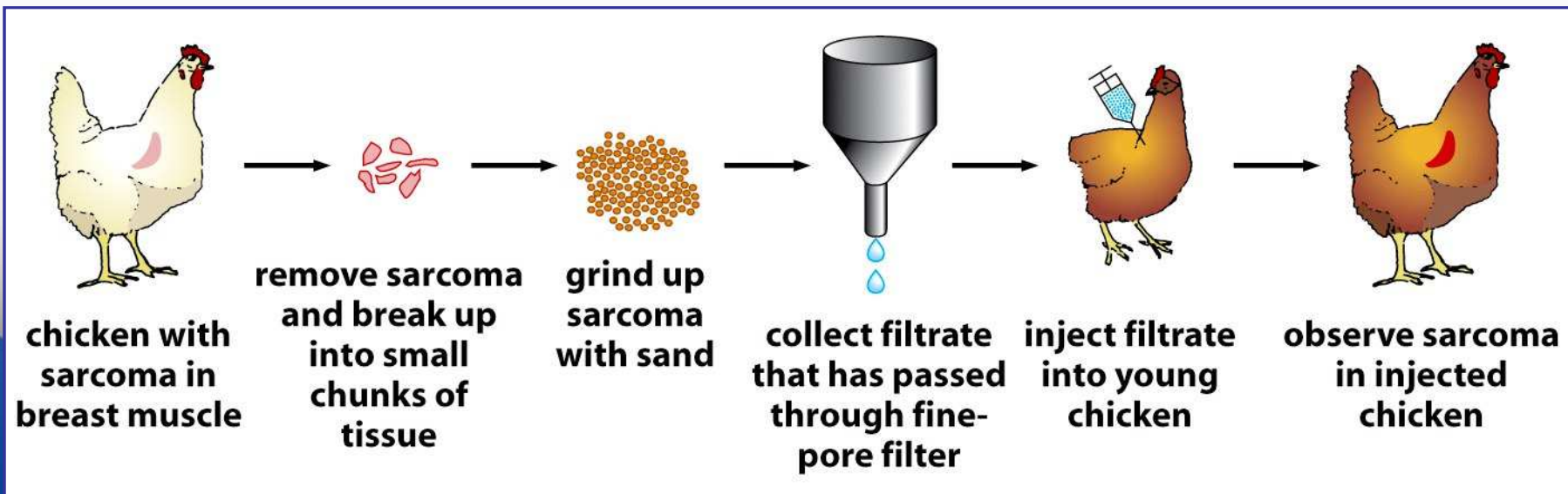
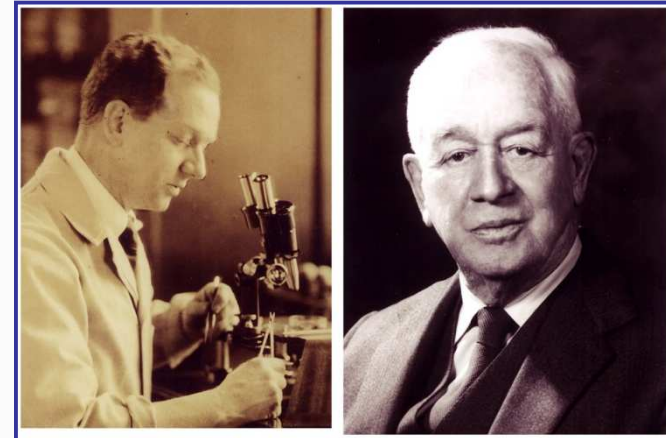
Onkoproteiny mohou být kódovány viry: gp55 SFFV

- 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



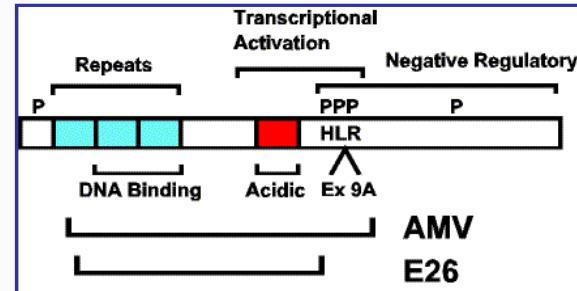
Indukce sarkomů u kuřat

- **Peyton Rous** obdržel Nobelovu cenu v roce 1966
- důkaz účasti virů u některých typů rakoviny



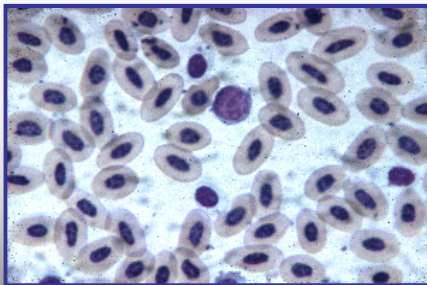
Onkoproteiny mohou být kódovány viry: *v-myb* AMV/E26

- *v-myb* viru ptačí myeloblastózy indukuje myeloblastózu u kuřat
- *v-myb* a *v-ets* viru E26 indukují myeloblastózu a erytroblastózu u kuřat

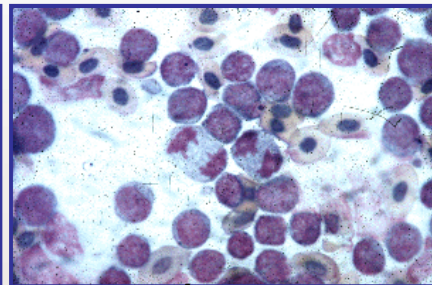


Joe Lipsick
Stanford University

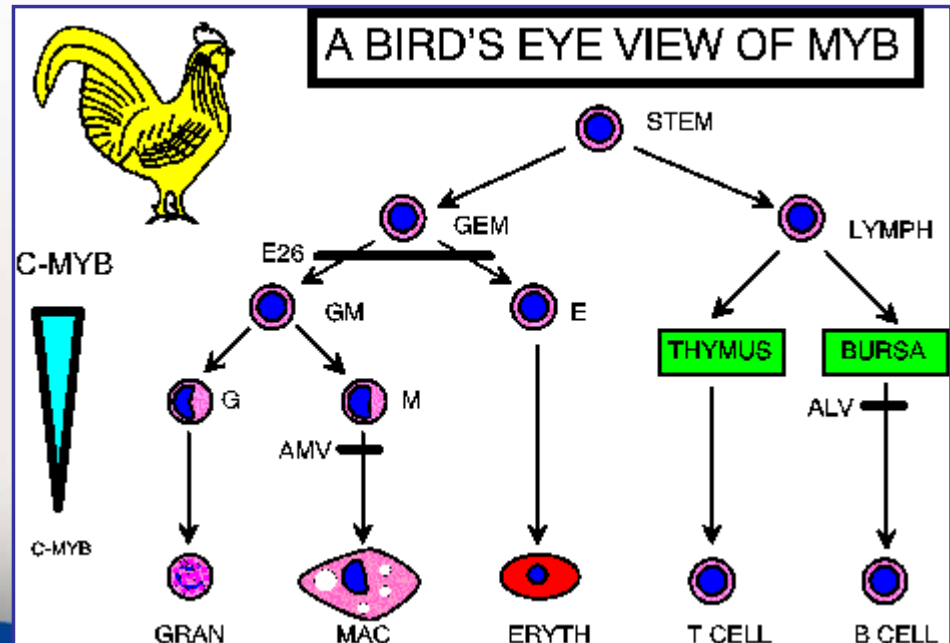
roztěr kuřecí krve



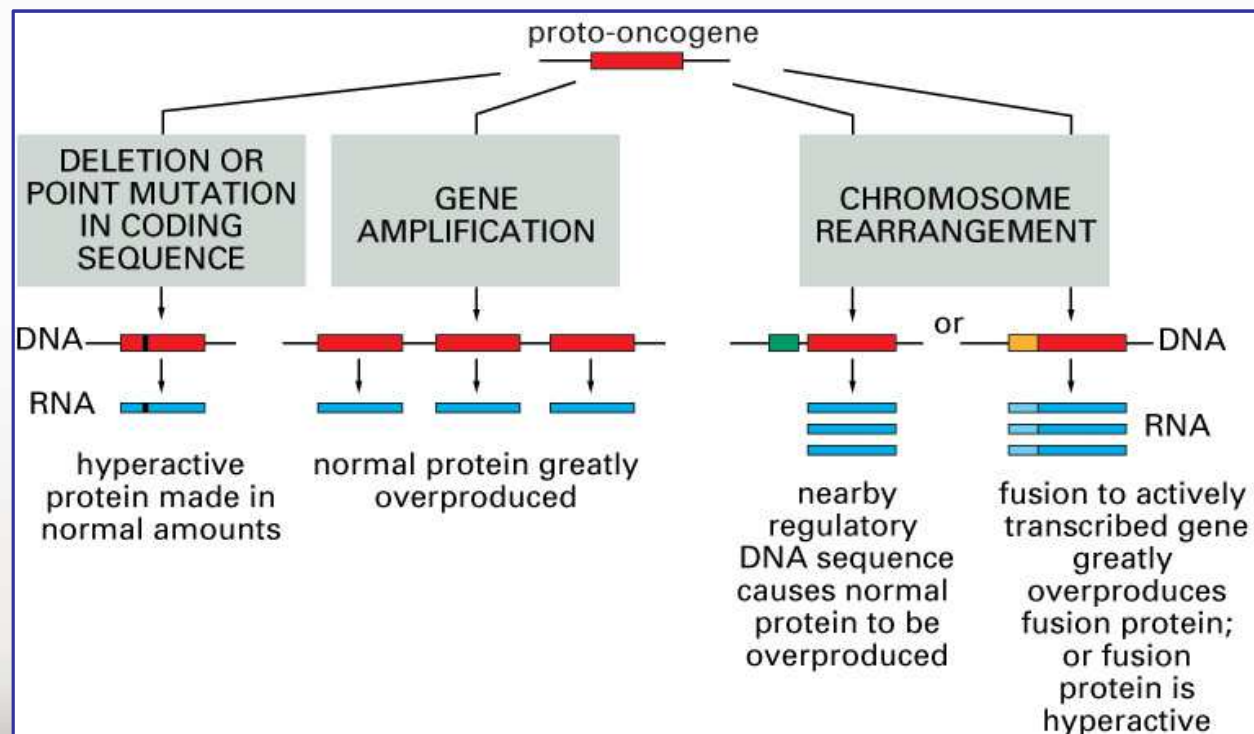
kontrola



1 týden po
infekci AMV



Přeměna protoonkogenů na onkogeny

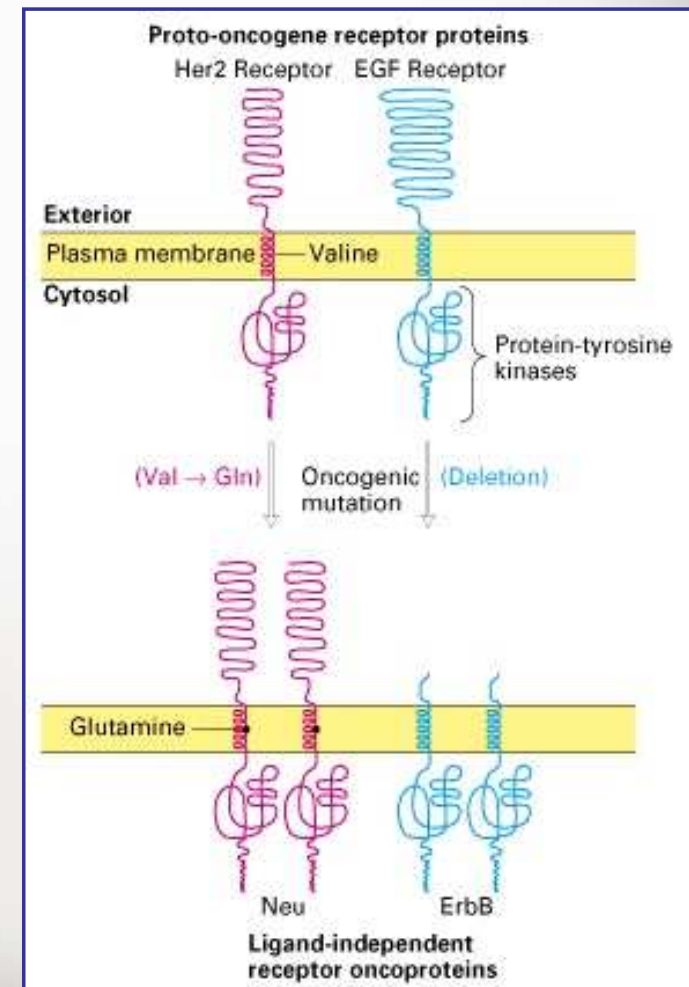


Změna receptorů pro růstové faktory

- aktivující mutace nebo silná exprese genů kódujících receptory

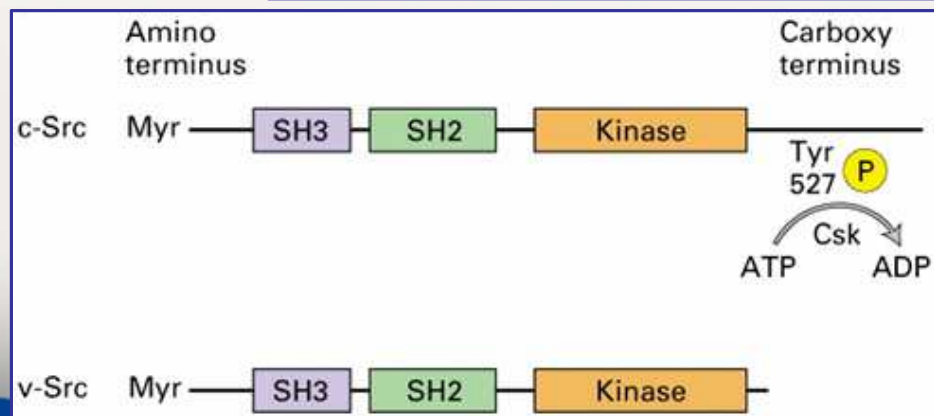
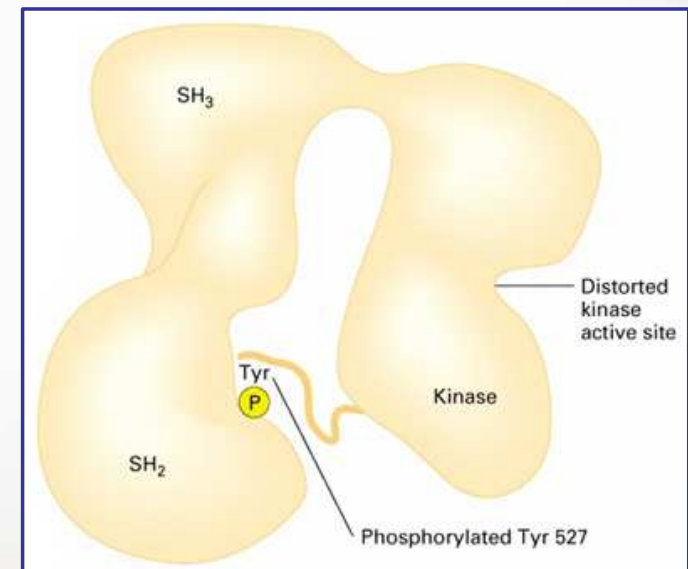
Příklady:

- specifická bodová mutace mění normální receptor **Her2** na onkoprotein **Neu**
- záměna hydrofobní aminokyseliny (valin) za hydrofilní (glutamin) v transmembránové doméně
- receptor se dimerizuje a vykazuje kinázovou aktivitu i za nepřítomnosti ligandu



Onkogeny často kódují trvale aktivní signální proteiny

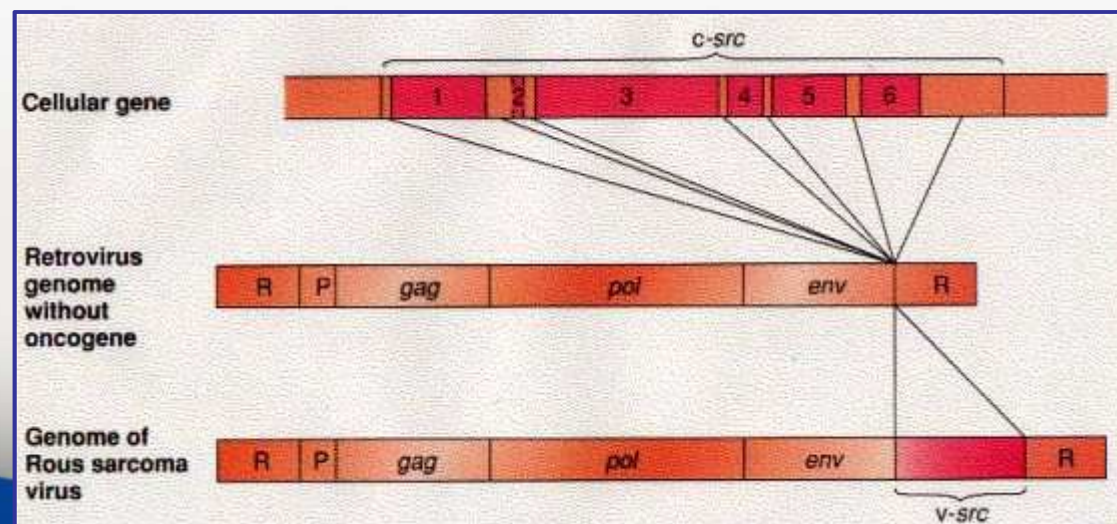
- kinázová aktivita **c-Src** je inhibována fosforylací Tyr 527 (6. AA od C-konce) kinázou Csk
- Tyrosin 527 často chybí u onkoproteinů Src, které vykazují konstitutivní aktivitu (tj. nemusí být aktivovány fosfatázou)
- např. **v-Src** RSV postrádá 18 C-koncových AA, včetně Tyr 527



Posilující mutace protoonkogenů

První onkogeny byly nalezeny u transformujících retrovirů

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



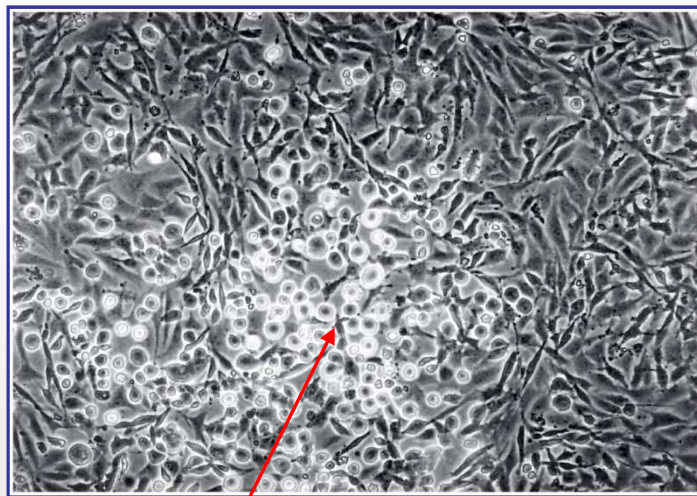
První onkogeny nalezeny u transformujících retrovirů

Howard Temin

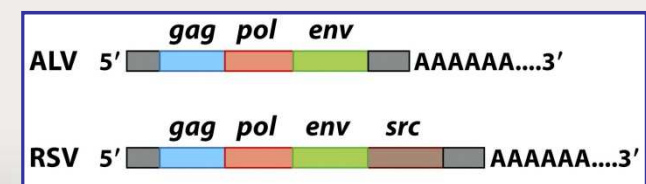
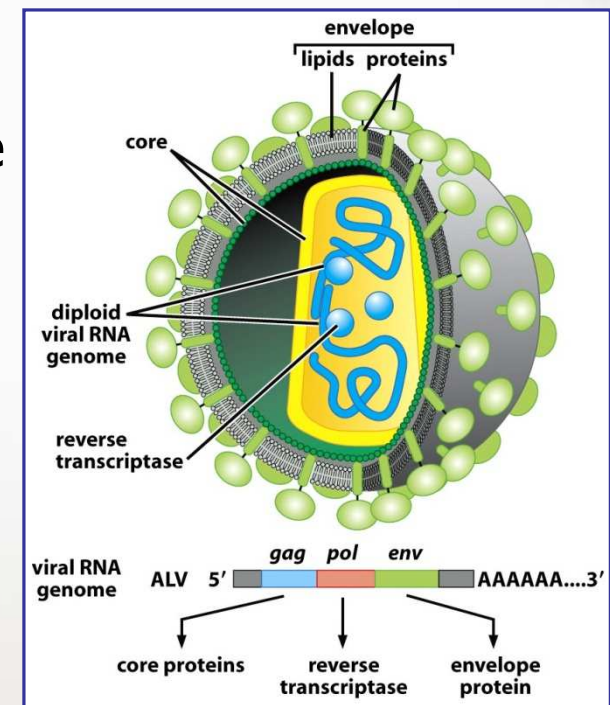
- objevitel zpětné transkriptázy
- jako první dokázal vyvolat „rakovinu“ na misce



Howard Temin
(1934-1994)



Ohnisko „focus“ nádorových buněk



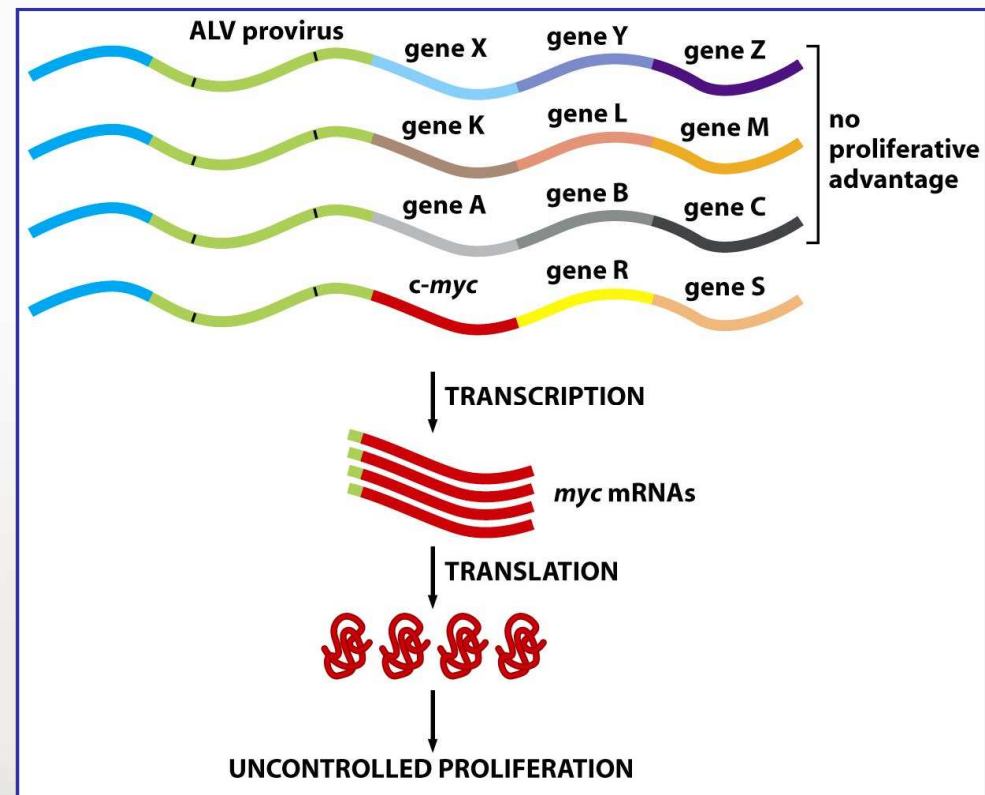
Akutně transformující retroviry transdukují onkogeny

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

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

Pomalou transformující retroviry

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

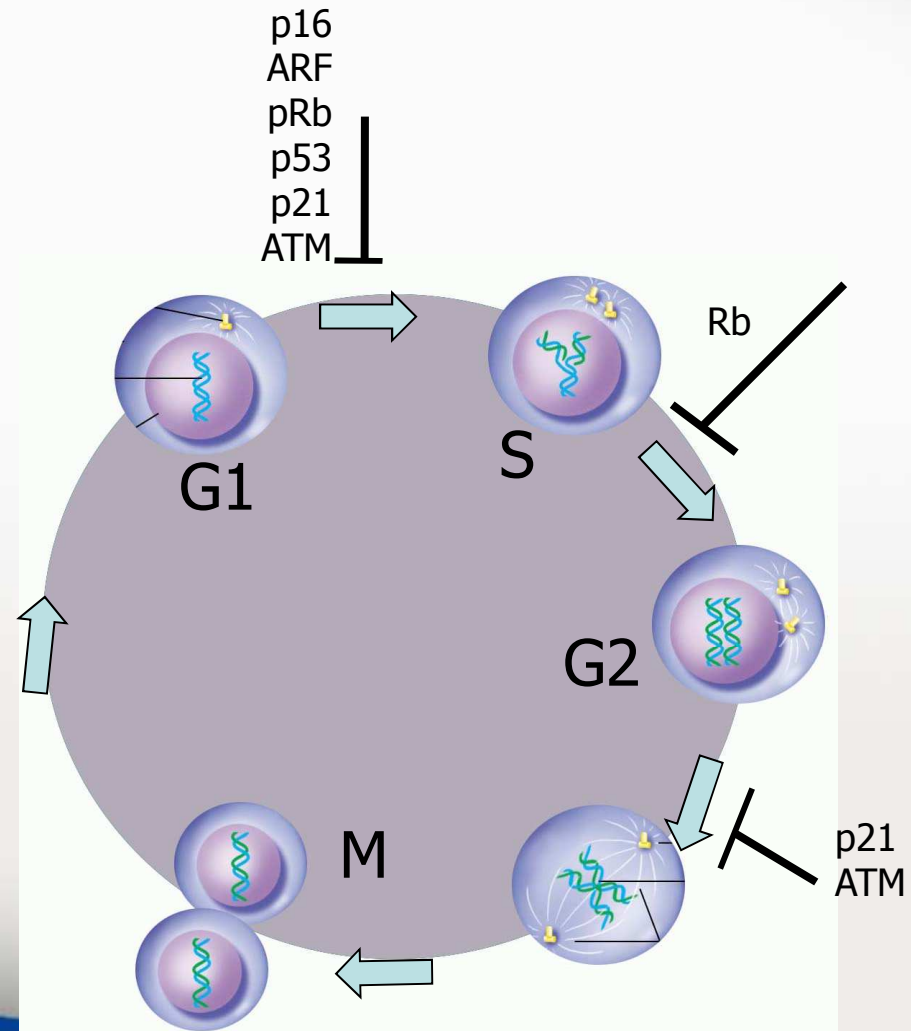


DNA-nádorové viry

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

Inaktivující mutace nádorových supresorů

- většina nádorových supresorů funguje jako negativní regulátory buněčného cyklu

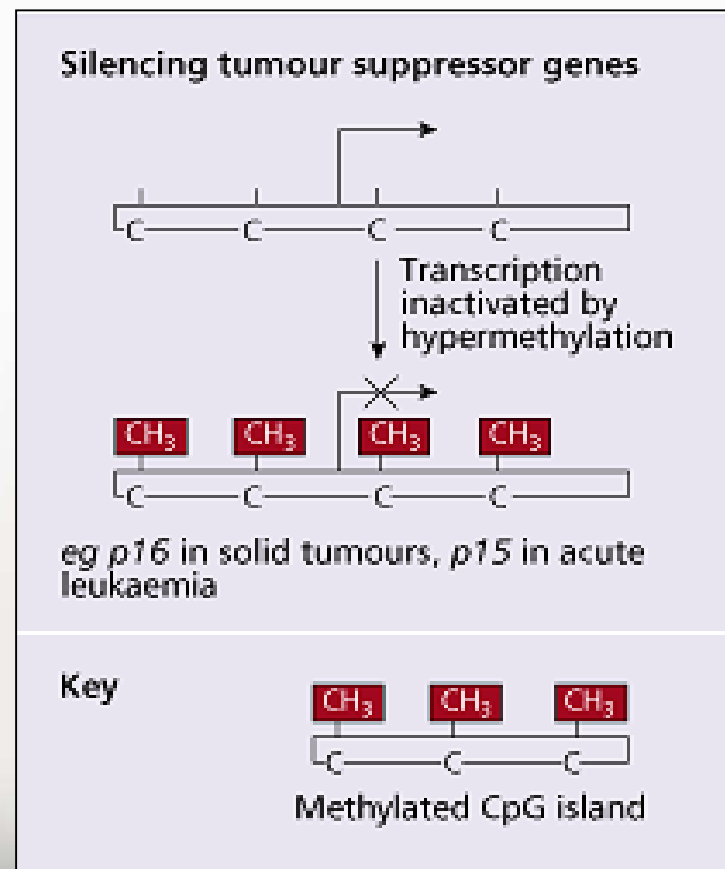
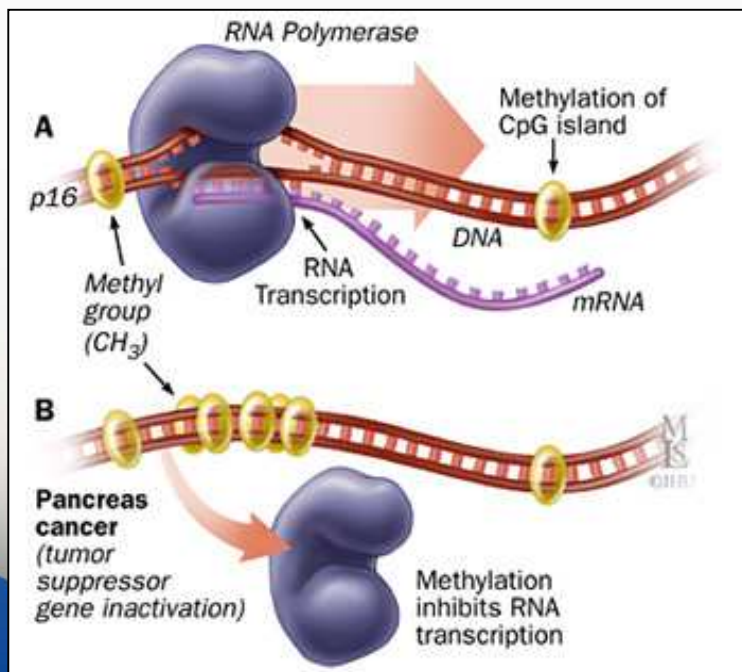


Funkce nádorových supresorů

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

Způsoby inaktivace nádorových supresorů

- mutace
- metylace

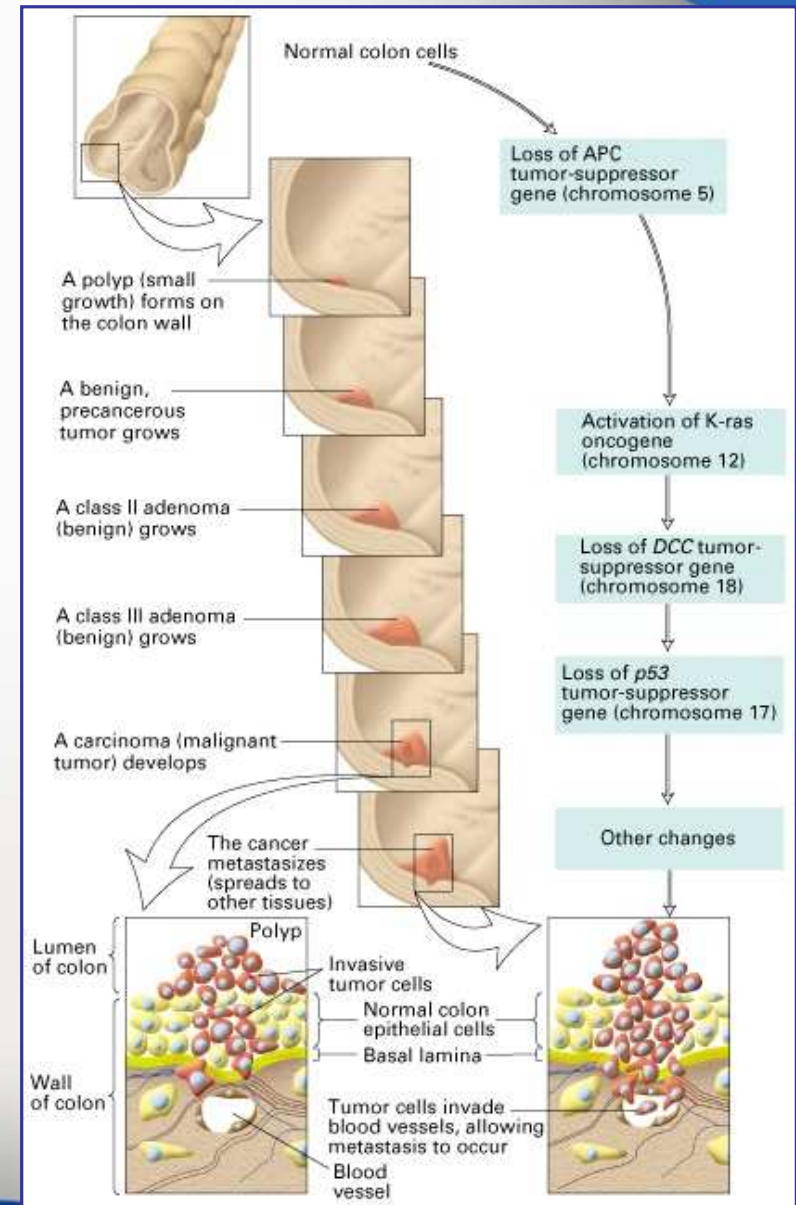


Mutace nádorových supresorů jsou u nádorů velmi časté

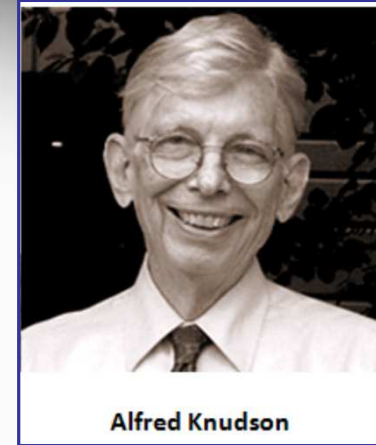
- postihují i sporadické (nedědičné) formy nádorů
- příklady mutací nádorových supresorů u nádorů tlustého střeva:
 - mutace p53 nalezeny v 70% sporadických nádorů
 - mutace APC nalezeny v 70% sporadických nádorů
 - mutace MSH2 nalezeny v 15% sporadických nádorů

Přeměna střevní buňky na nádorovou

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



Teorie dvou zásahů Alfreda Knudsona



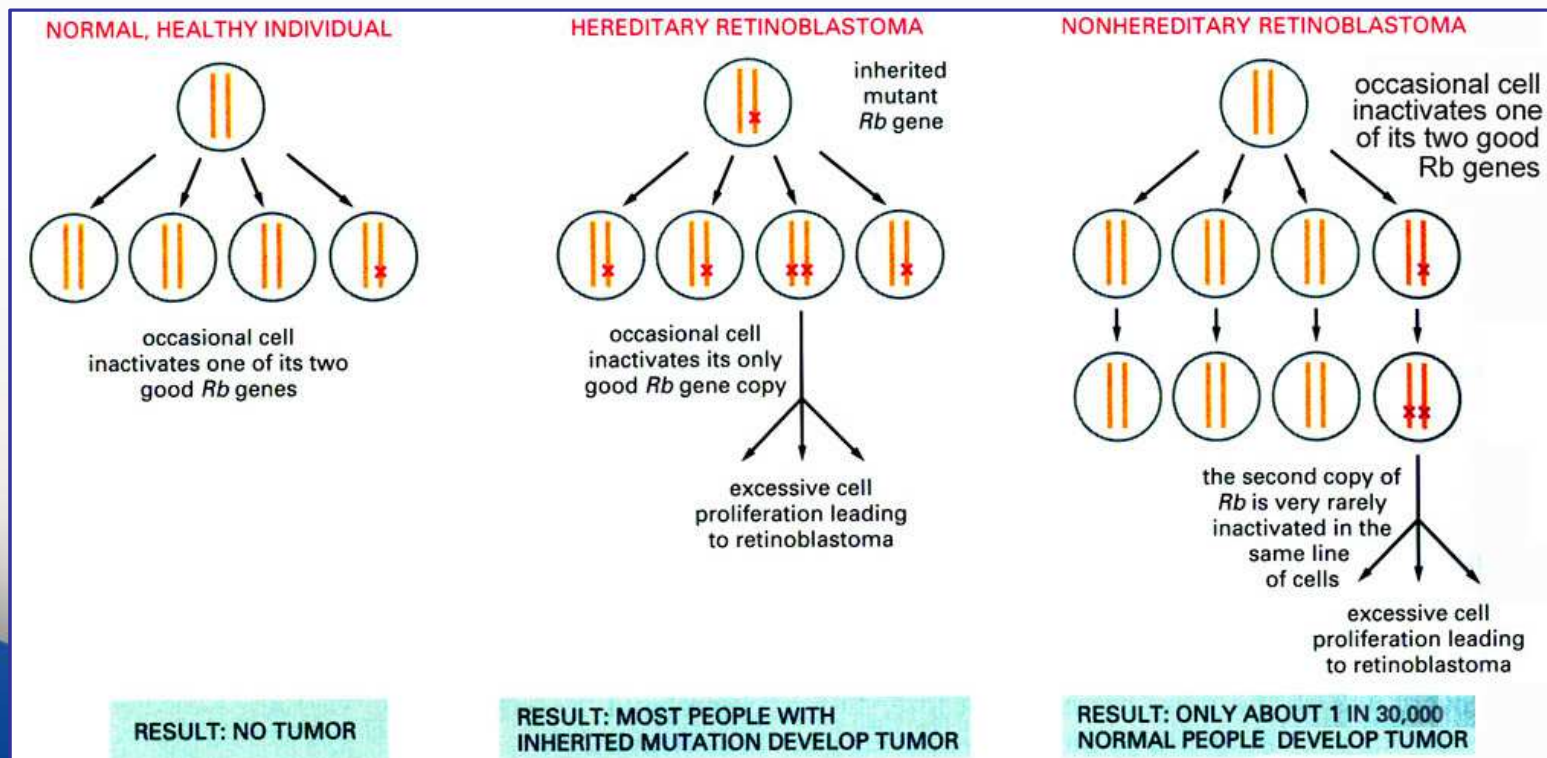
Dětský nádor oční sítnice – **retinoblastom** se vyskytuje ve 2 formách:



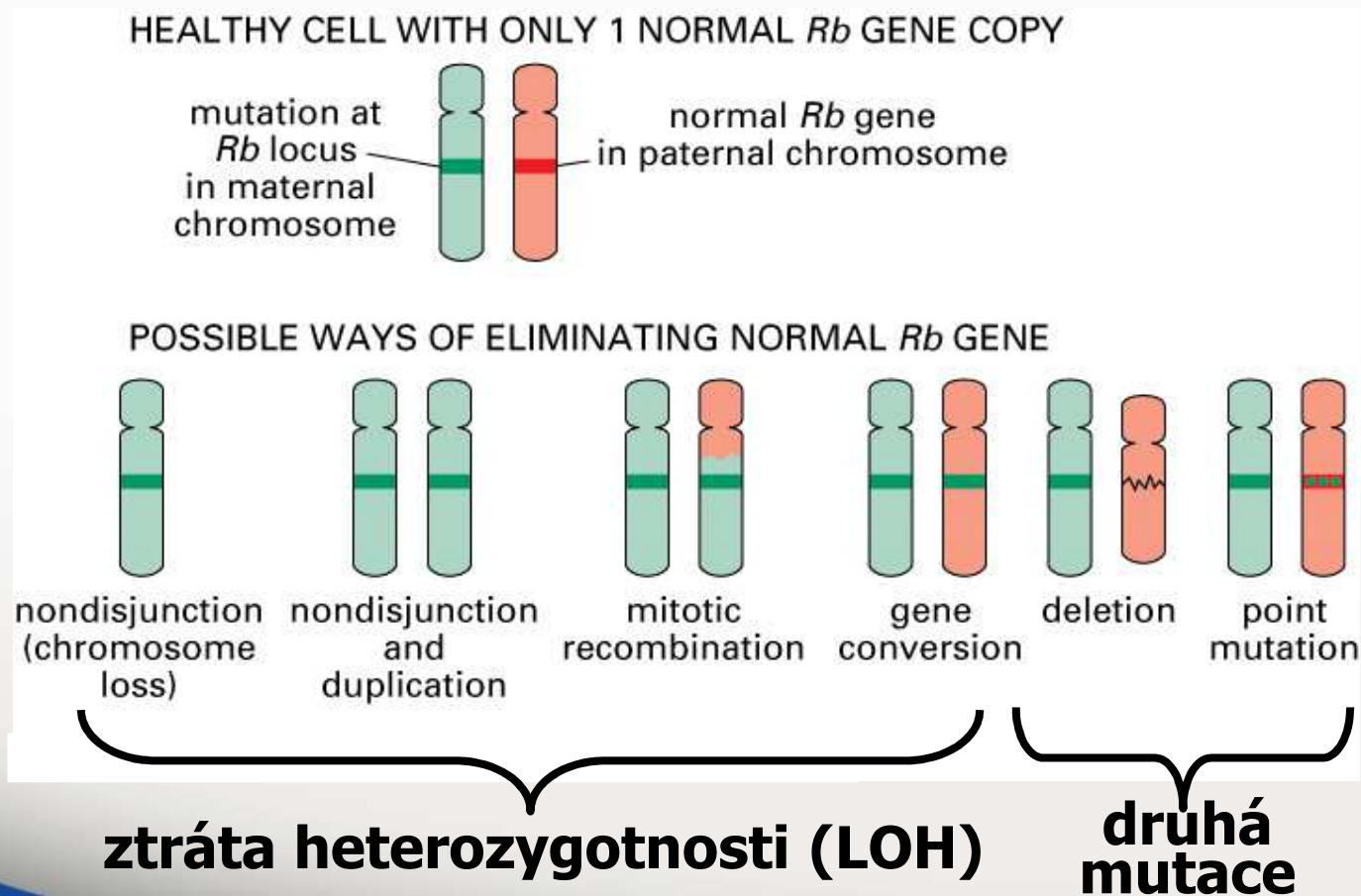
- **dědičné** (familiální): zvýšený výskyt v rodinách, nádory zpravidla v obou očích, výskyt ve věku 2-6 měsíců
- **sporadické**: bez rodinné historie, výskyt vždy jen v 1 oku, výskyt ve věku 2-4 let
- Knudson se snažil odlišnosti mezi oběma variantami vysvětlit matematicky

Teorie dvou zásahů Alfreda Knudsona

- zděděná mutace alely Rb predisponuje své nositele k retinoblastomu
- sporadická forma: postupná inaktivace obou alel Rb



Mechanismy ztráty heterozygotnosti



Transformace v důsledku translokace

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



Janet Rawleyová

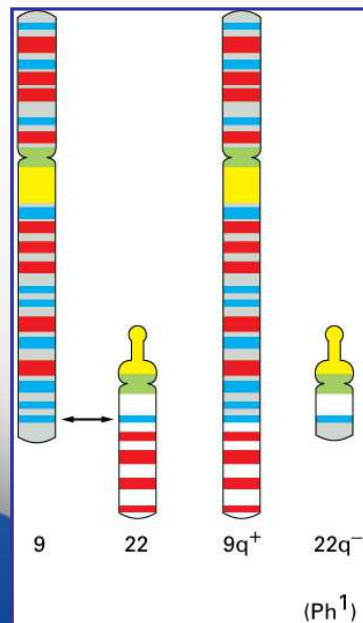
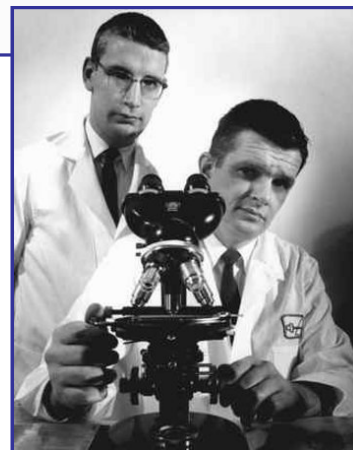


Figure 23-5. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.



Peter Nowell
David Hungerford

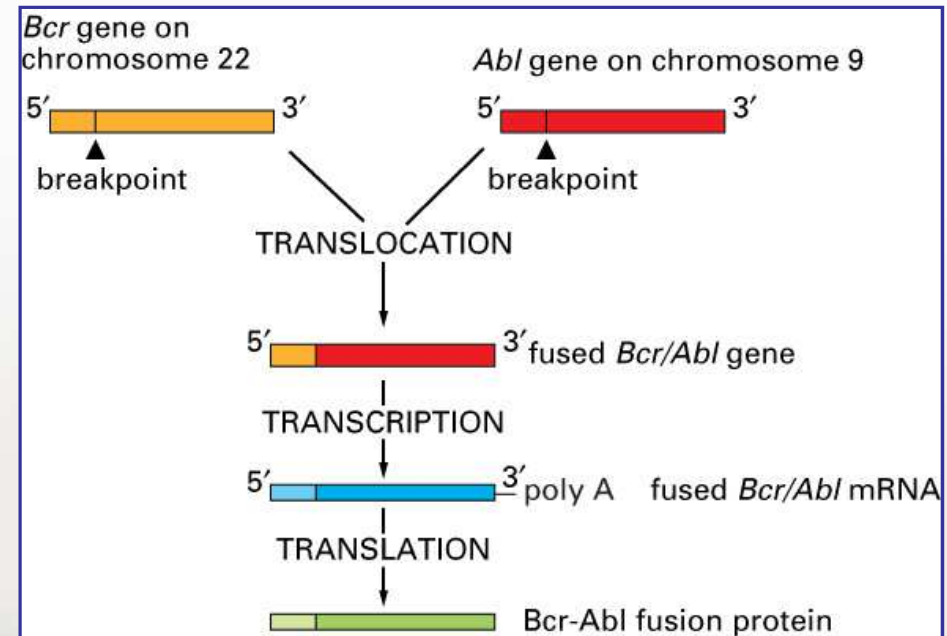
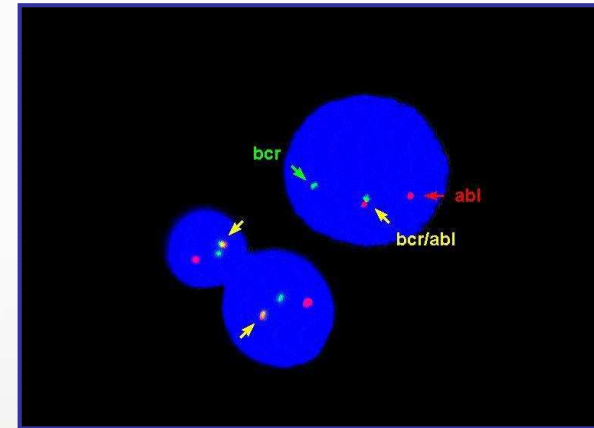


Figure 23-44. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.

Příčinou CML je selhání regulace c-Abl

- **c-Abl je tyrozin kináza**
- v normálních buňkách je inhibována vazbou Rb
- fosforylace Rb (kinázou Cdk2) přerušuje vazbu s c-Abl
- c-Abl v jádře napomáhá transkripci genů zapojených do buněčného cyklu

Proteinová chiméra Bcr-Abl má vysokou konstitutivní tyrozin kinázovou aktivitu



Úspěch protinádorové terapie: Glivec/Imatinib

Glivec inhibuje chimérickou kinázu blokováním jejího místa pro vazbu ATP

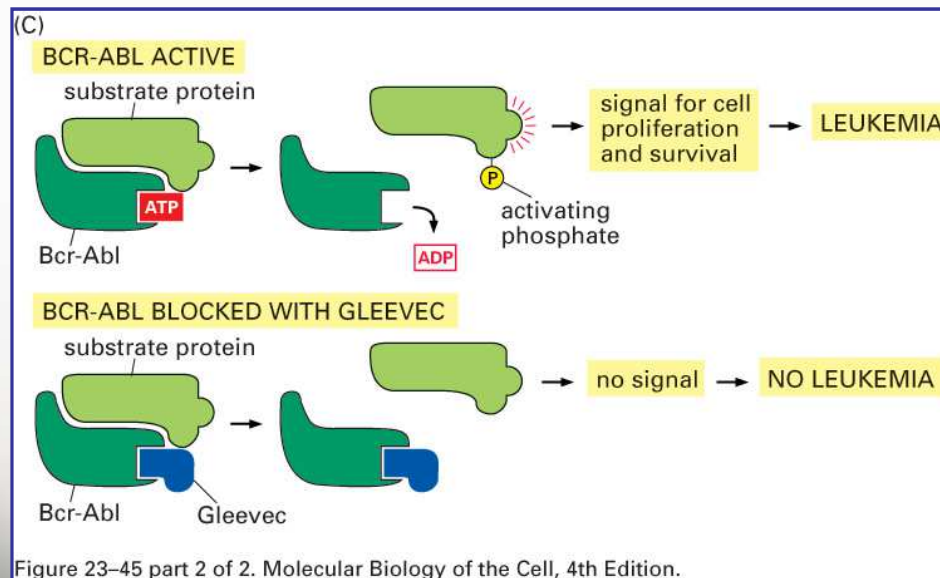
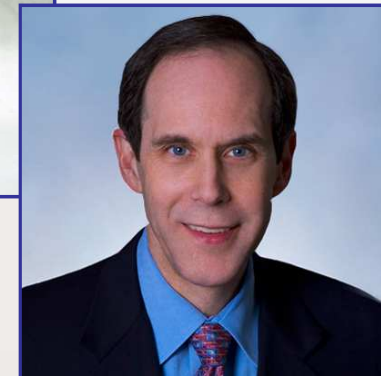








Figure 23-45 part 2 of 2. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.

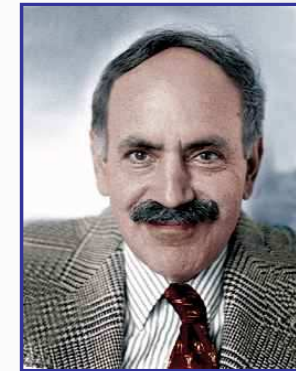


Brian Druker

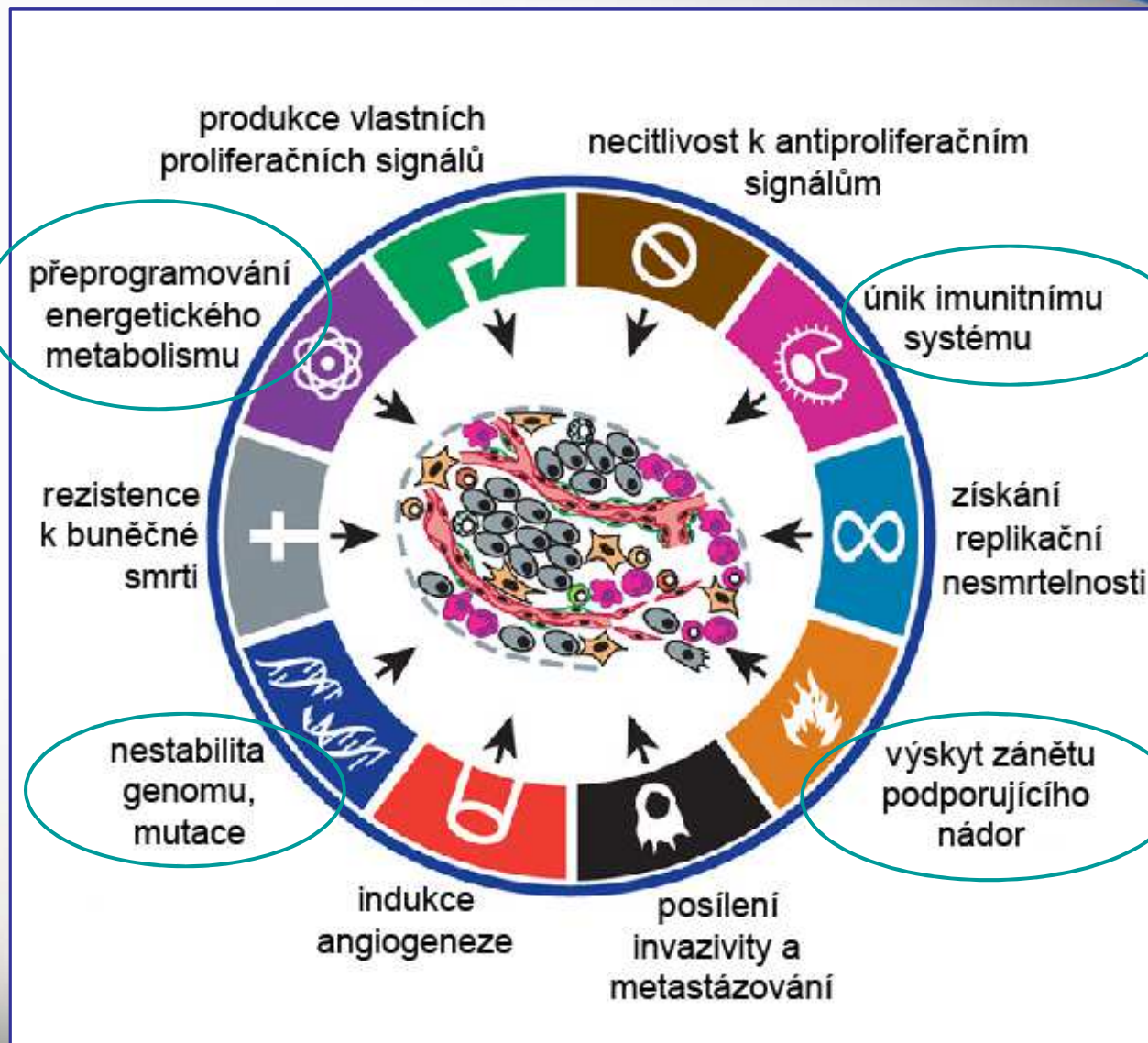
Cesty k rakovině

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

A circular diagram with a central black circle labeled 'Cancer'. Six colored segments (green, orange, grey, blue, red, purple) surround the center, each containing an icon from the table above. Arrows point from each segment towards the central 'Cancer' node.



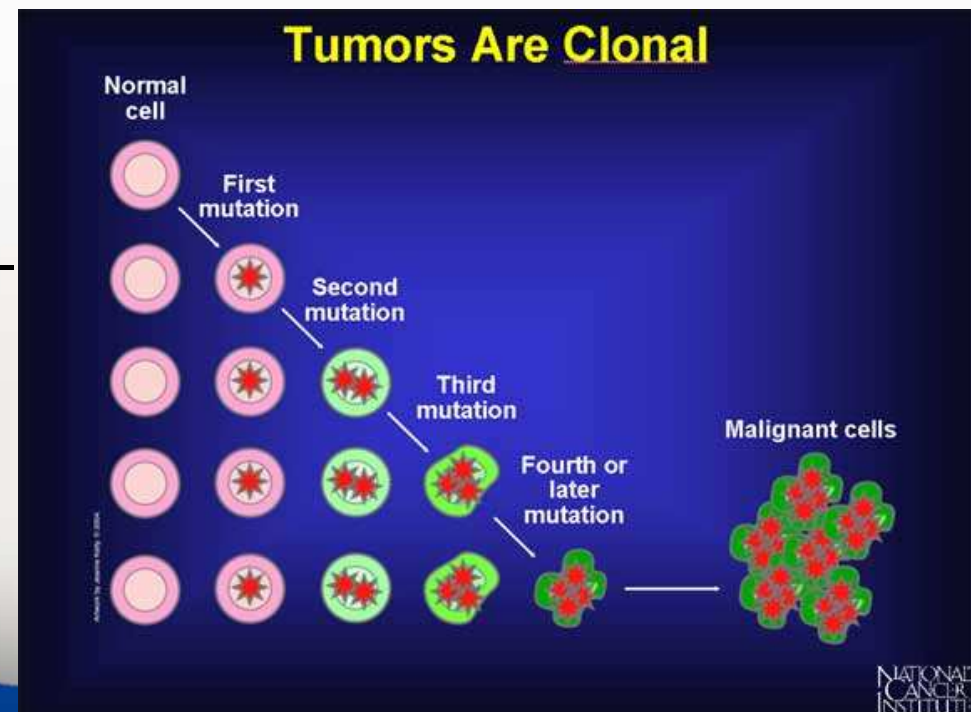
Douglas Hanahan, Robert Weinberg
Cell 100:57, (2000)



Douglas Hanahan, Robert Weinberg
Cell 144: 645, (2011)

Vlastnosti nádorových buněk

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



Vlastnosti nádorových buněk

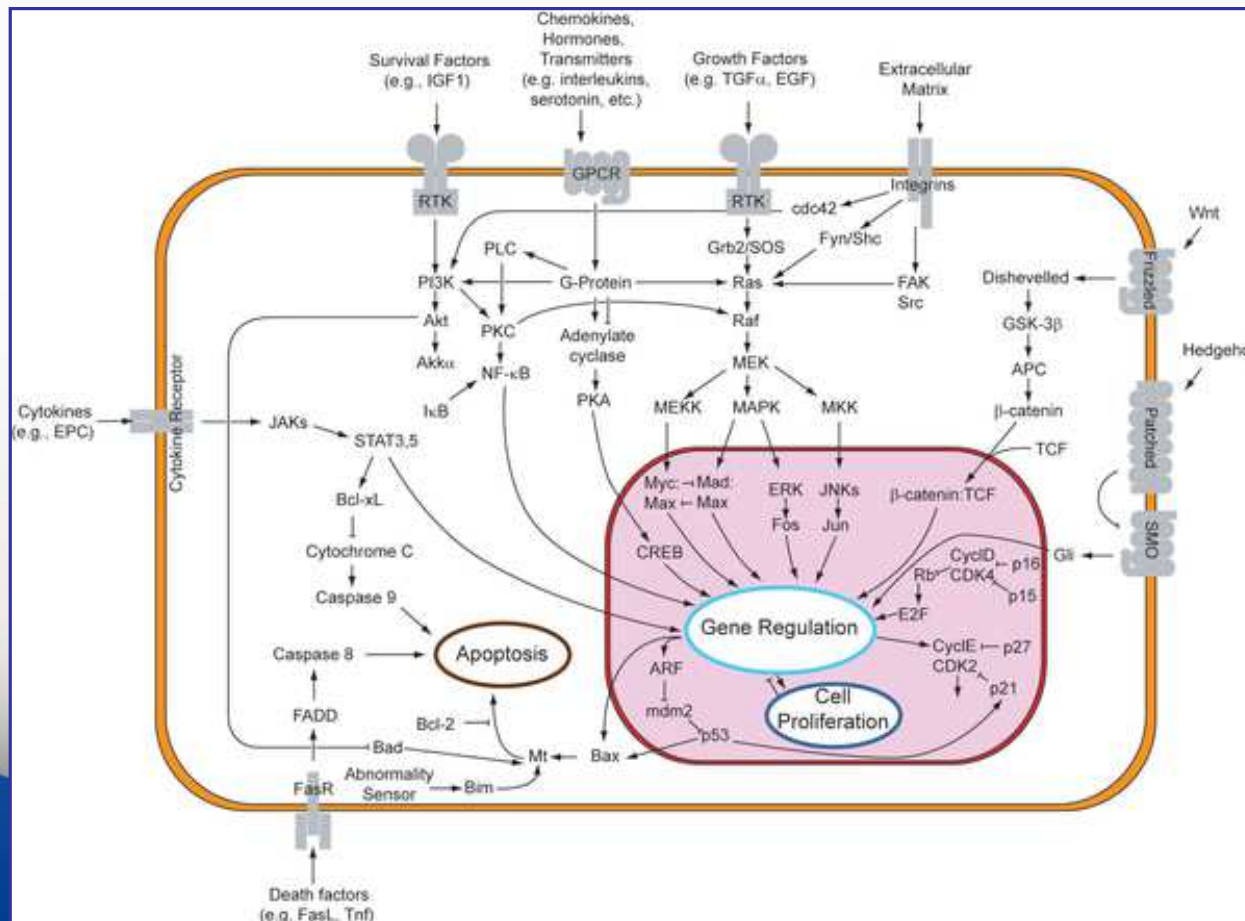
- **změněné biochemické vlastnosti**, které zvyšují růstový potenciál:
 - zvýšená glykolytická aktivita umožňující růst i za snížených koncentrací kyslíku
 - sekrece hydrolytických enzymů umožňujících degradaci bazálních membrán a dalších struktur mimobuněčné matrix
 - tvorba angiogenních faktorů
- **pozměněný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

Nezávislost na růstových faktorech

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

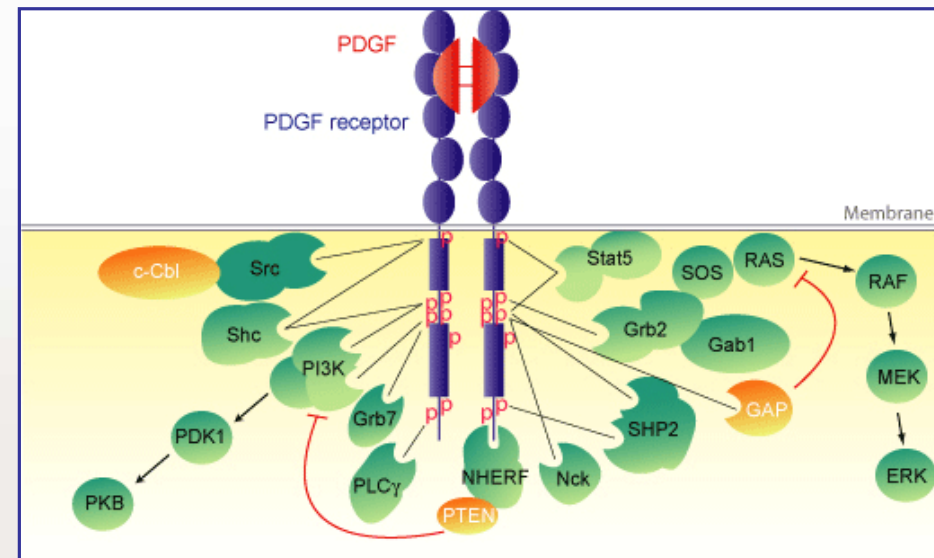
Získání nezávislosti na růstových faktorech

- změna charakteru růstových faktorů nebo způsobu jejich tvorby
- změna receptorů nebo nitrobuněčných přenašečů signálu



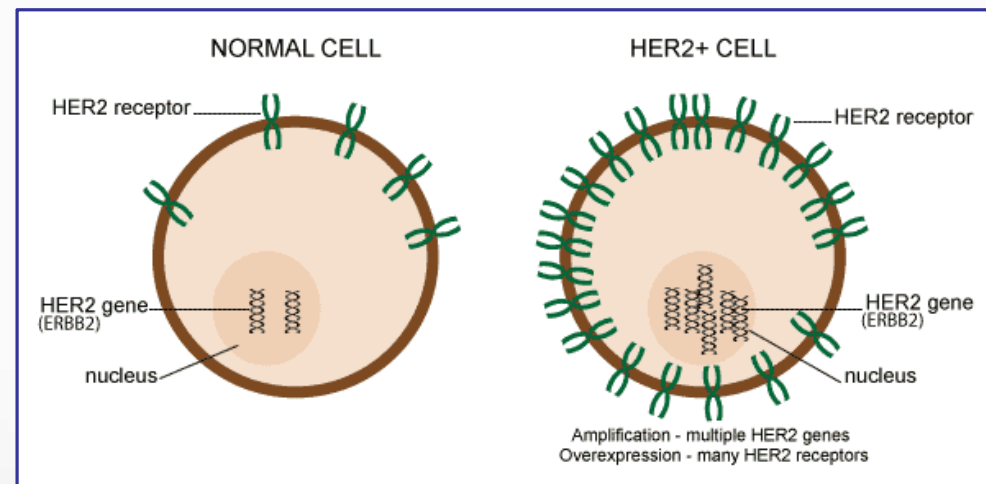
Změna způsobu tvorby růstových faktorů

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



Změna receptorů

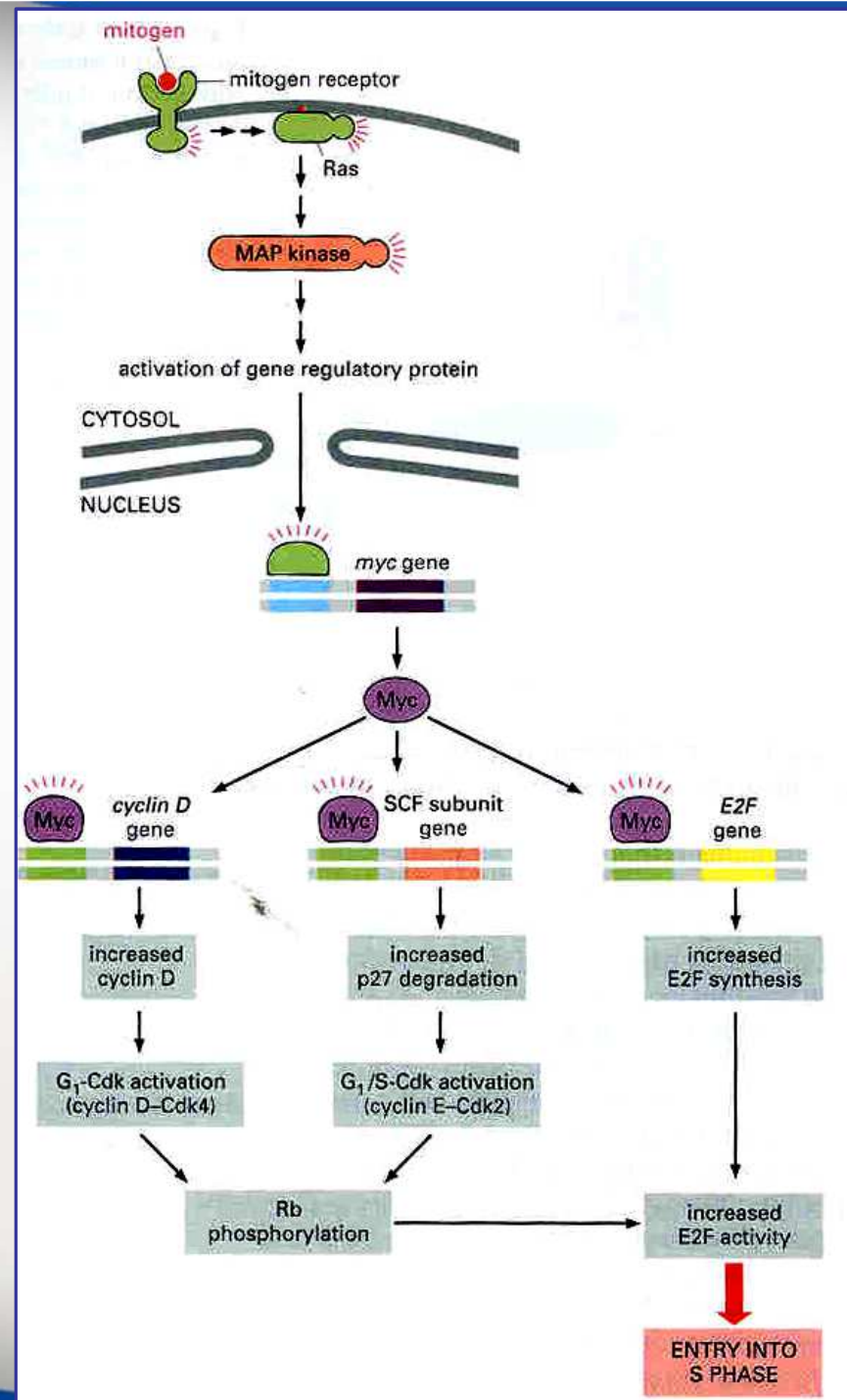
- **změna struktury receptoru:** konstitutivní aktivita za nepřítomnosti ligandu



- **amplifikace/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)

Změny signálních drah

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



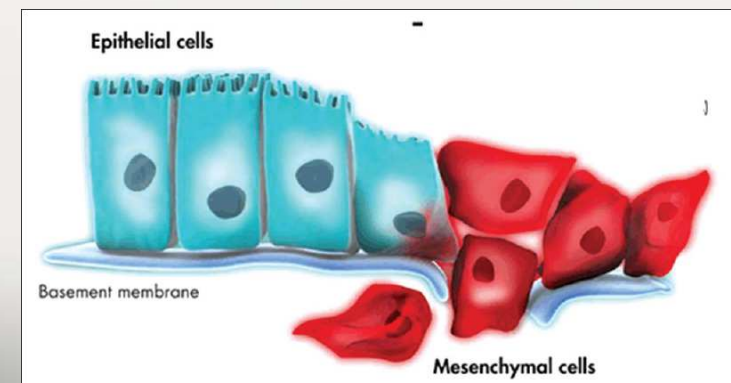
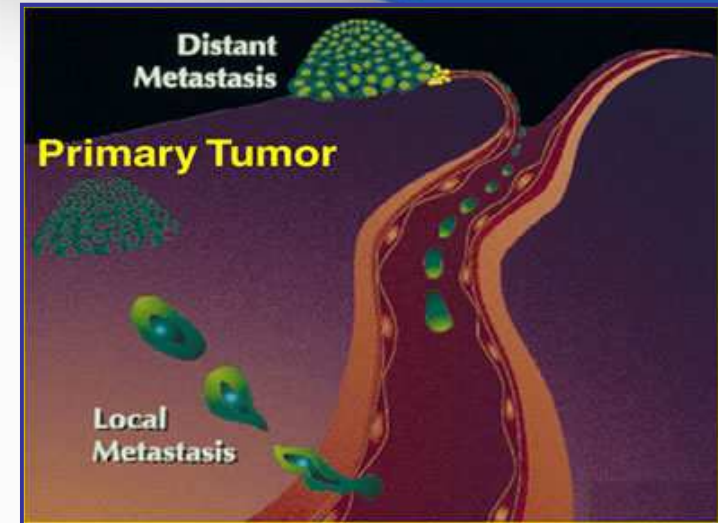
Necitlivost na protirůstové signály

Zdravá tkáň

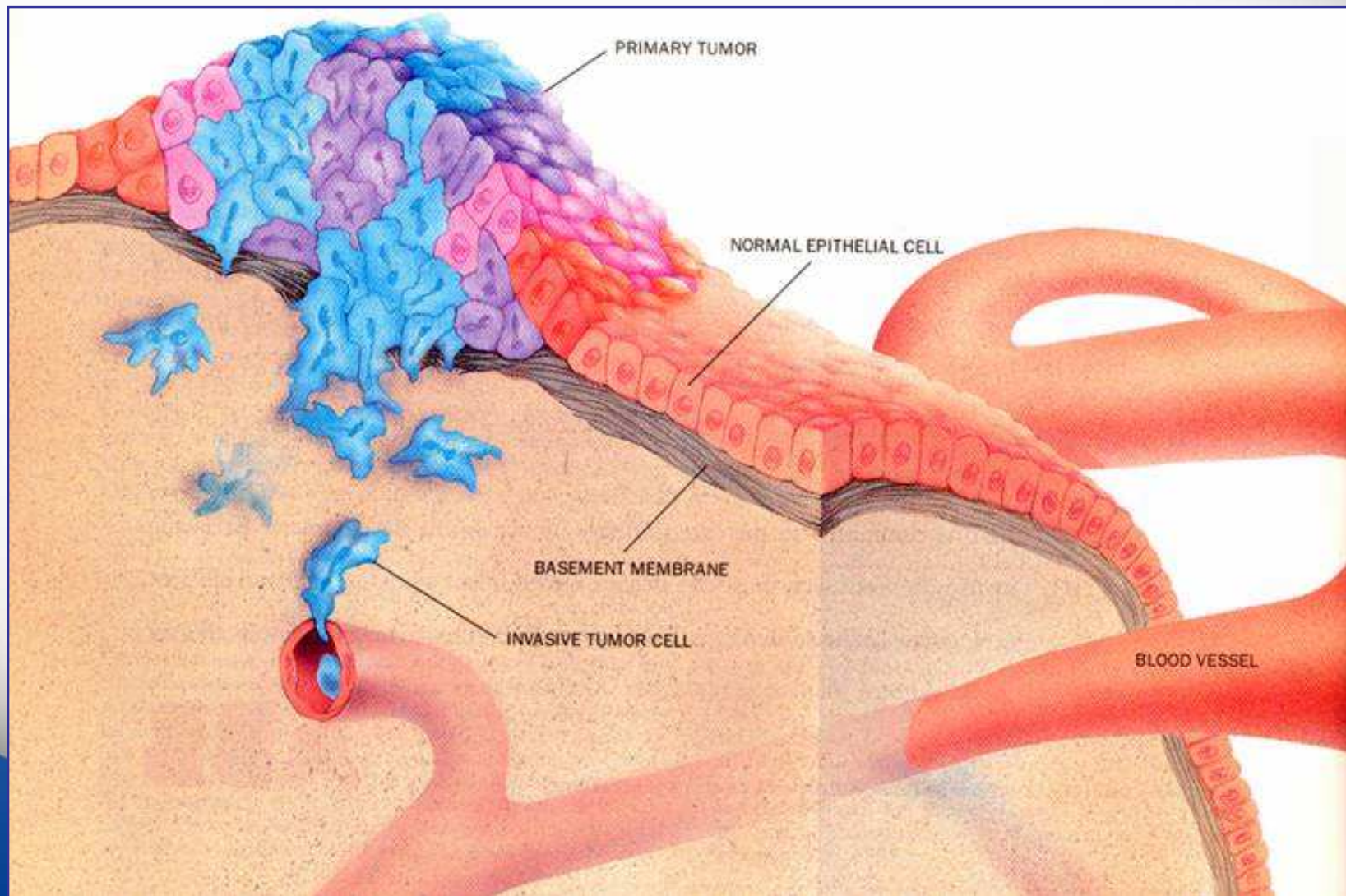
- existence protirůstových signálů v podobě rozpustných faktorů a inhibitorů imobilizovaných v matrix a na povrchu buněk
- na protirůstové signály buňka reaguje stejně jako na růstové faktory (prostřednictvím receptorů a nitrobuněčných signálních kaskád)
- na molekulární úrovni protirůstové signály využívají proteinu Rb, který v nefosforylovaném stavu neumožní expresi genů nutných pro přechod z G1 do S
- protirůstovým signálem je např. TGF β , který brání fosforylaci Rb a expresi genu *c-myc*

Metastázy

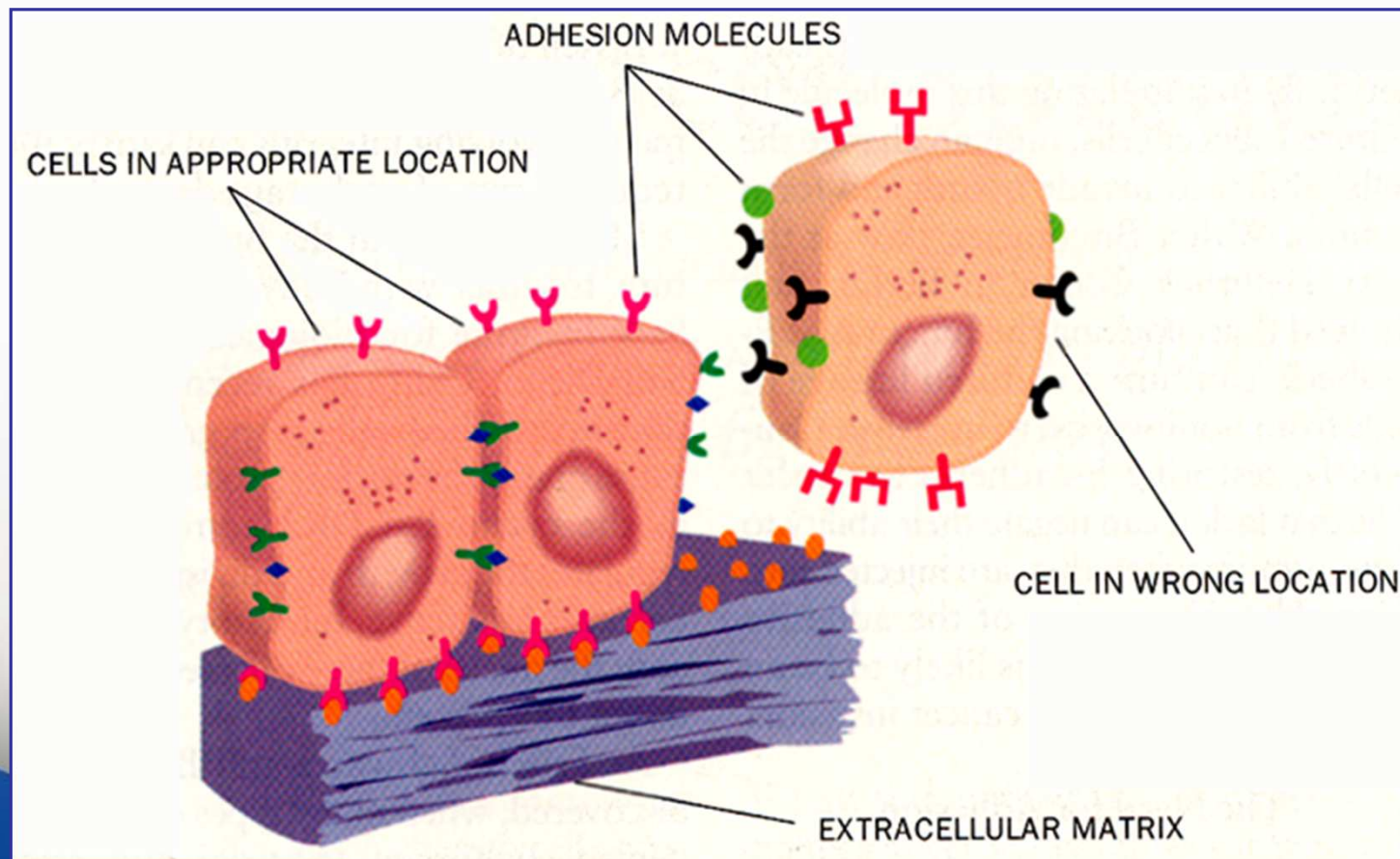
- přechod nádorových buněk z primárního nádoru do nové tělní lokalizace, ve které je alespoň zpočátku dostatek prostoru a výživy
- umožněno změnami dvou typů proteinů:
 - proteinů, které zajišťují upevnění buněk k okolním buňkám (**CAM**) a matrix (**integriny**)
 - **mimobuněčných proteáz** (zvýšená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



Šíření nádorů



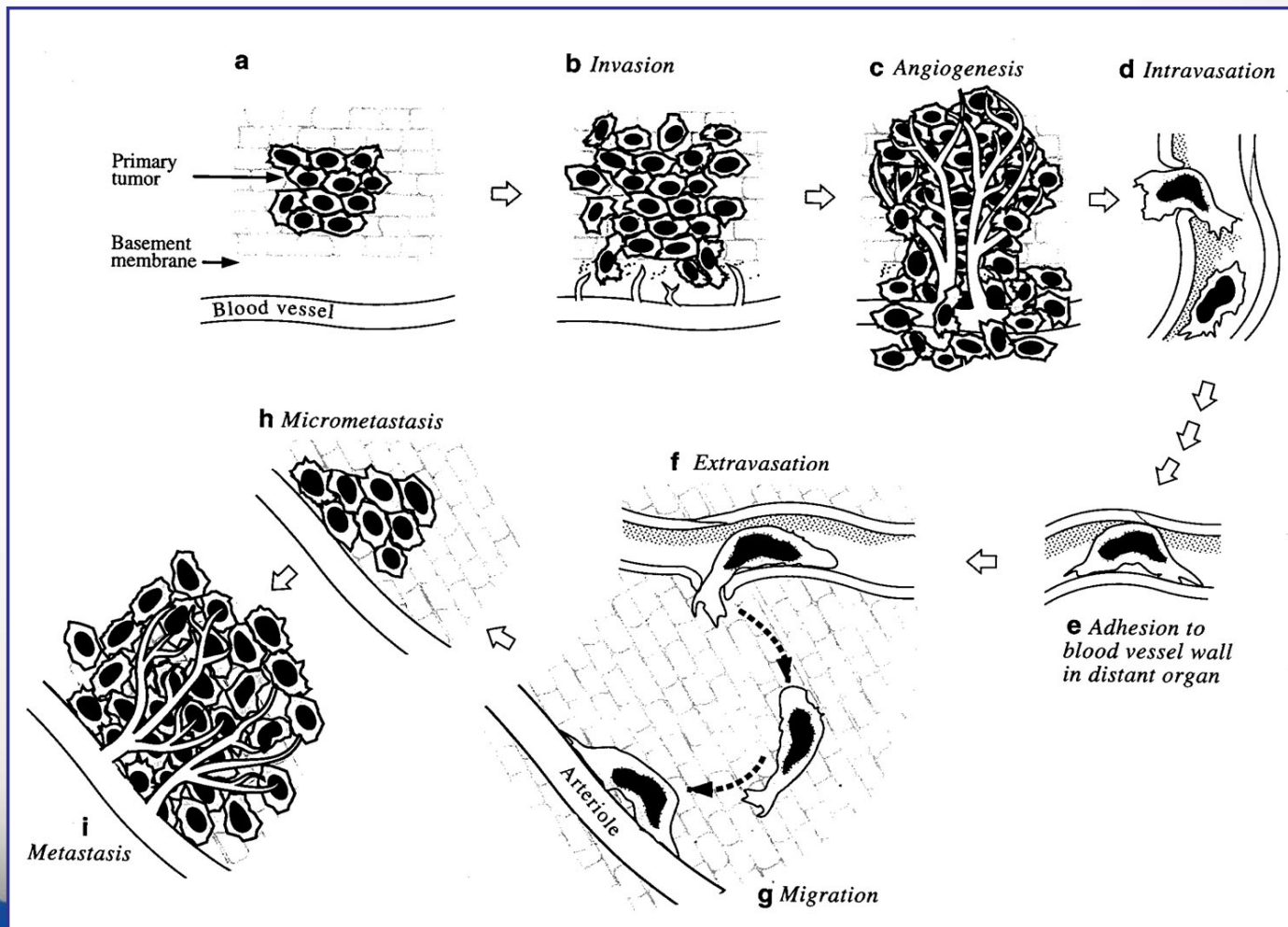
Buňky ve tkáních fixují adhezivní molekuly a receptory



Metastázová kaskáda

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

Tvorba metastáz

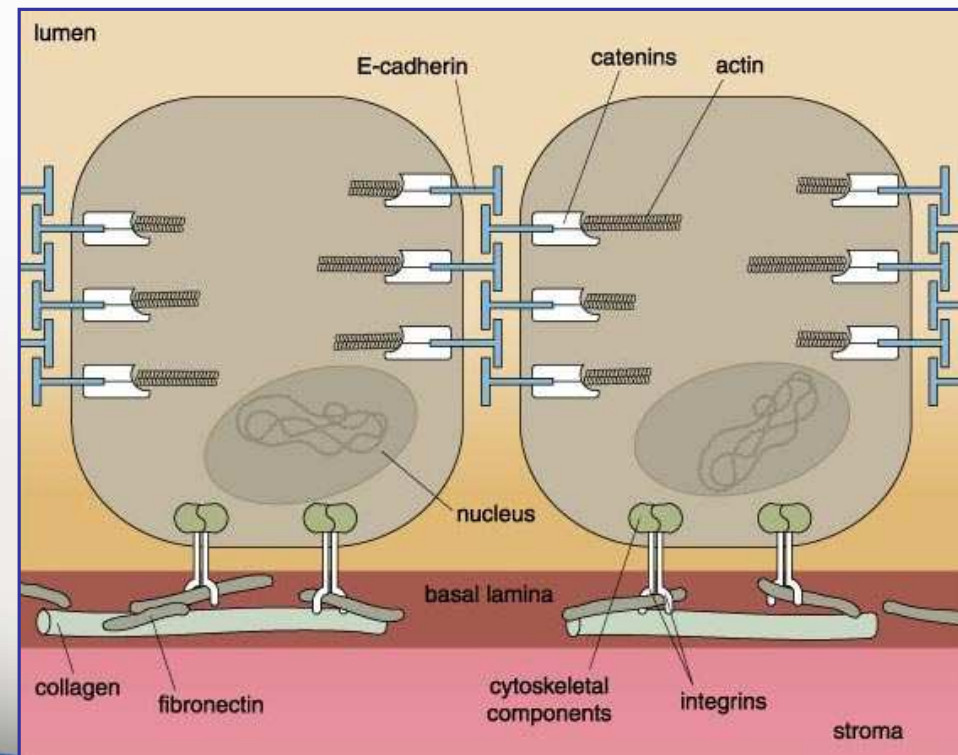


Složky bazální membrány

- bazální membrána je tenká vrstva mimobuněčné matrix
- odděluje epiteliální buňky od prokrvených konektivních tkání
- bazální membrána musí být rozrušena, aby nádorové 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 nádorů plic a jater (marker metastazování)

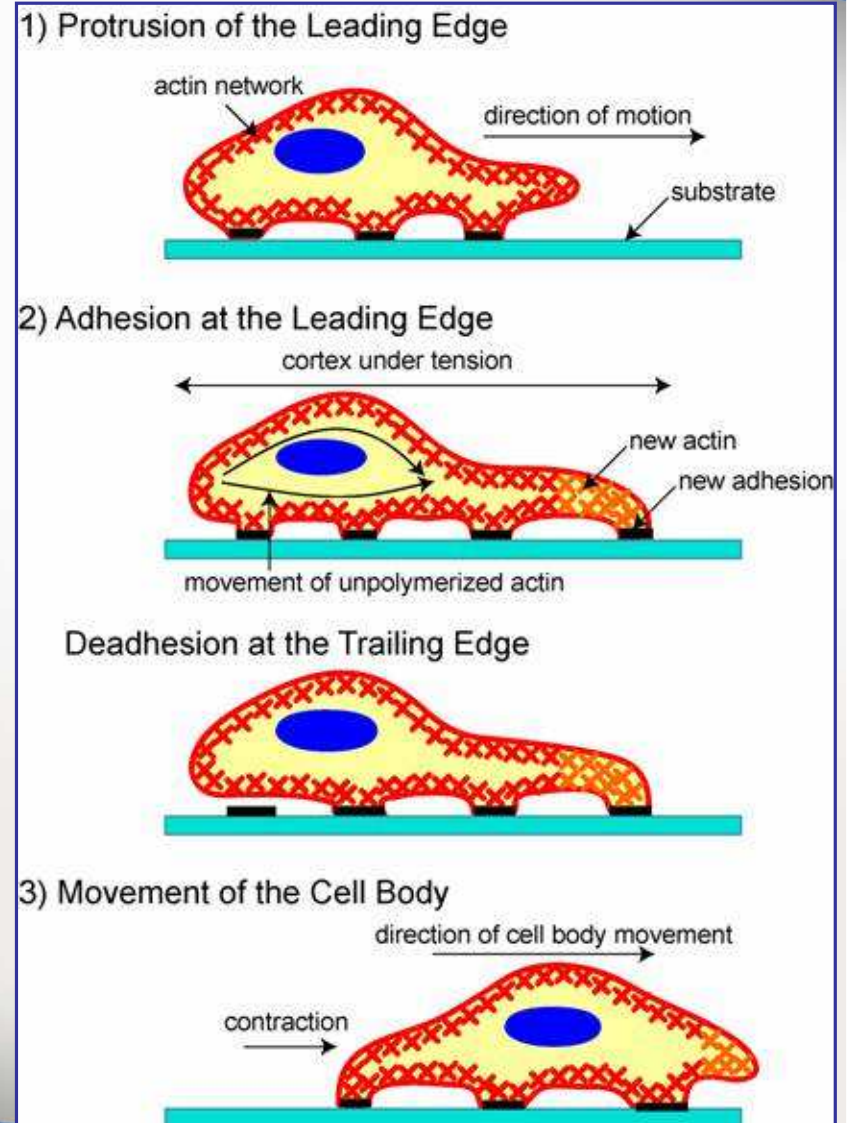
Oddělení buněk (cell detachment)

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



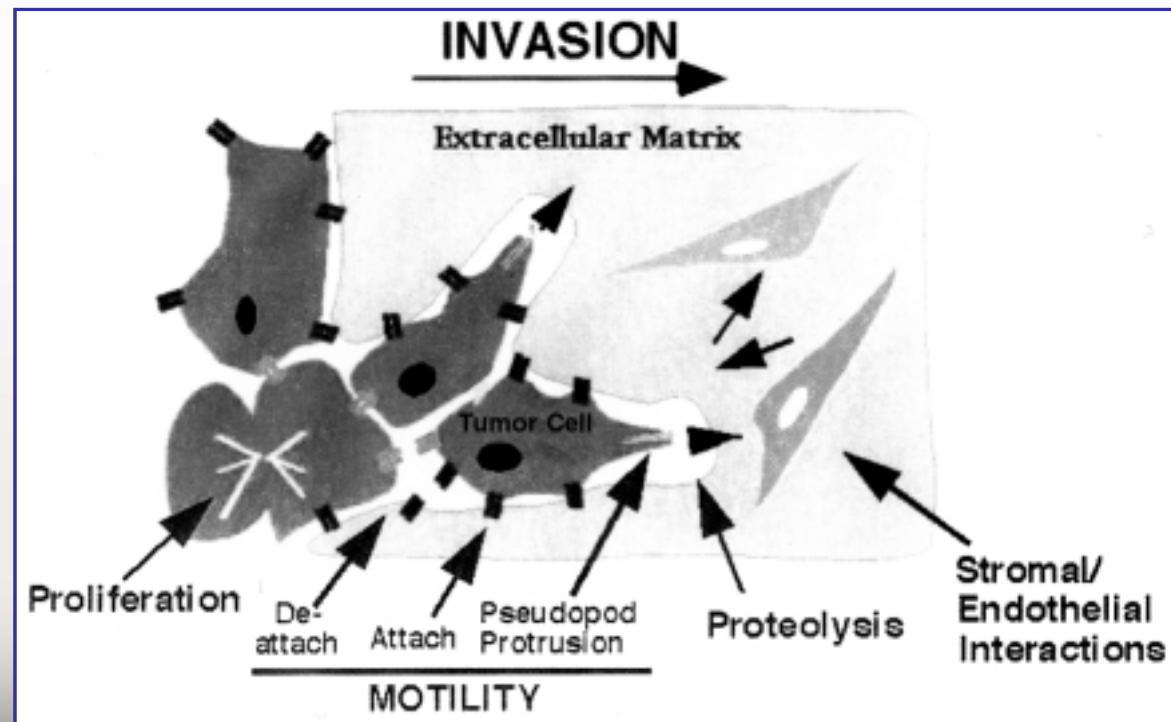
Pohyblivost buněk („cell motility“)

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



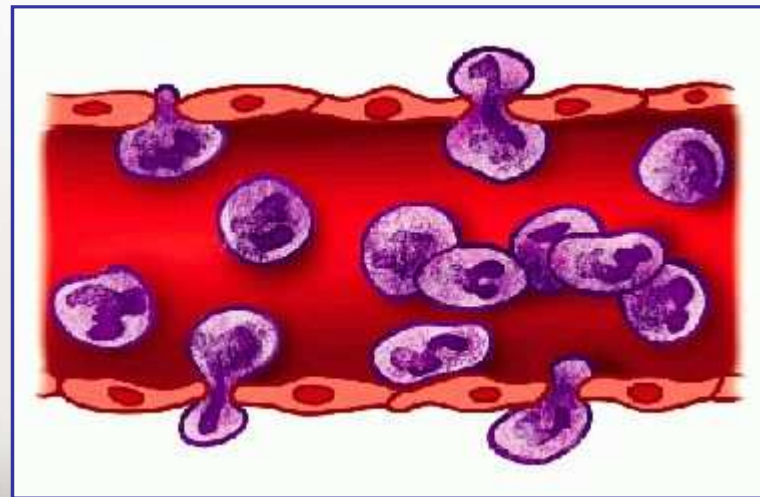
Invaze buněk

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



Penetrace vaskulárního systému

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



Podpora angiogeneze

- angiogeneze = růst nových krevních vlásečnic
- život všech buněk závisí na přísunu živin a kyslíku
- tvorbu kapilár určuje rovnováha mezi **induktory angiogeneze** (např. FGF, VEGF) a **inhibitory angiogeneze** (trombospondin-1)
- růst nádoru je omezen stupněm prokrvení
- za nepřítomnosti živin a kyslíku nádor nemůže přerůst průměr 0,5-1 mm (nekróza buněk ve středu kolonie nádorových buněk)
- nádorové buňky ve zvýšené míře tvoří induktory angiogeneze a méně inhibitorů angiogeneze

Vývoj nových cév za fyziologických podmínek

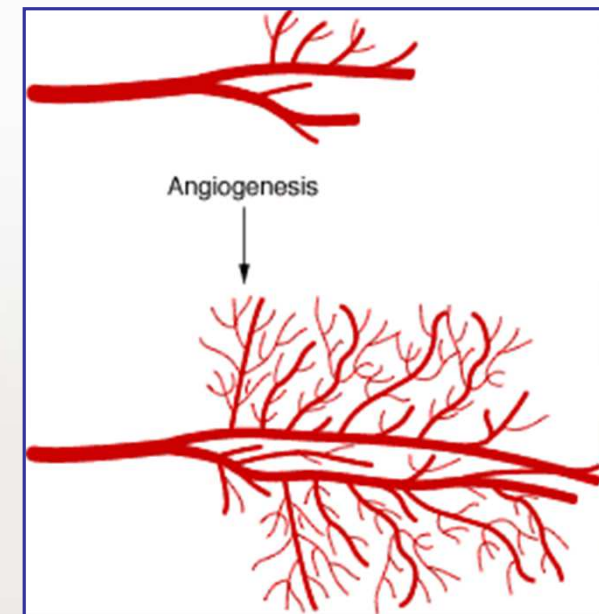
Při růstu cév se uplatňují 2 mechanismy:

– **angiogeneze** – růst nových cév ze starých

– **vaskulogeneze** – tvorba cév „z ničeho“ - diferenciací

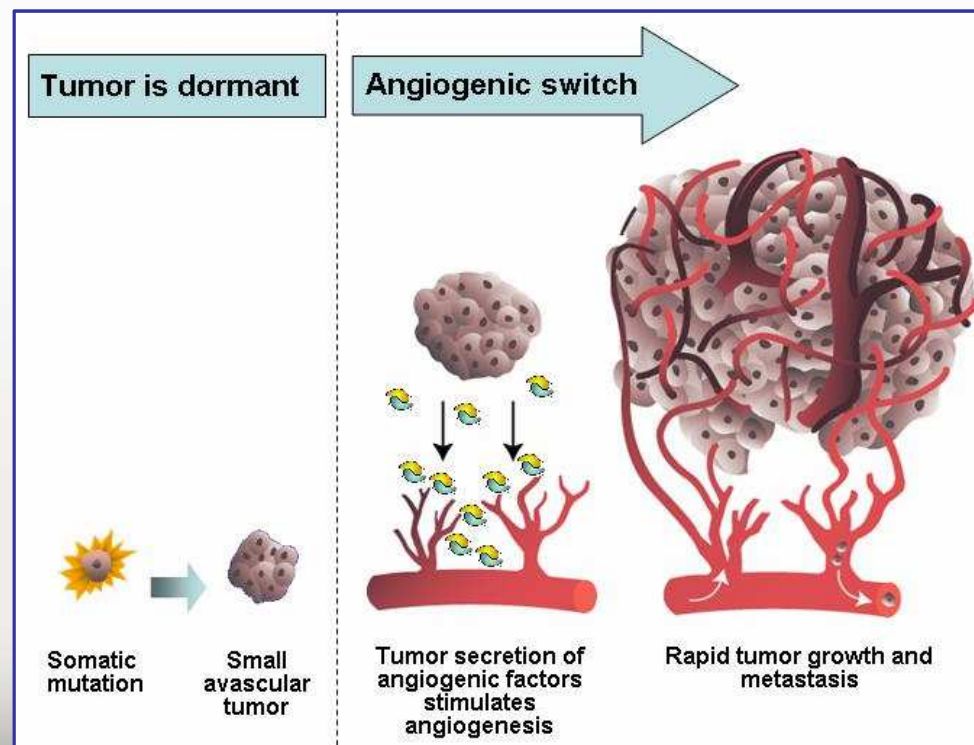
endoteliálních prekursorů u embrya

- tvorba cév je řízena metabolickými potřebami



Zapnutí angiogeneze je podmínkou růstu nádoru

nádorové buňky produkují angiogenní faktory

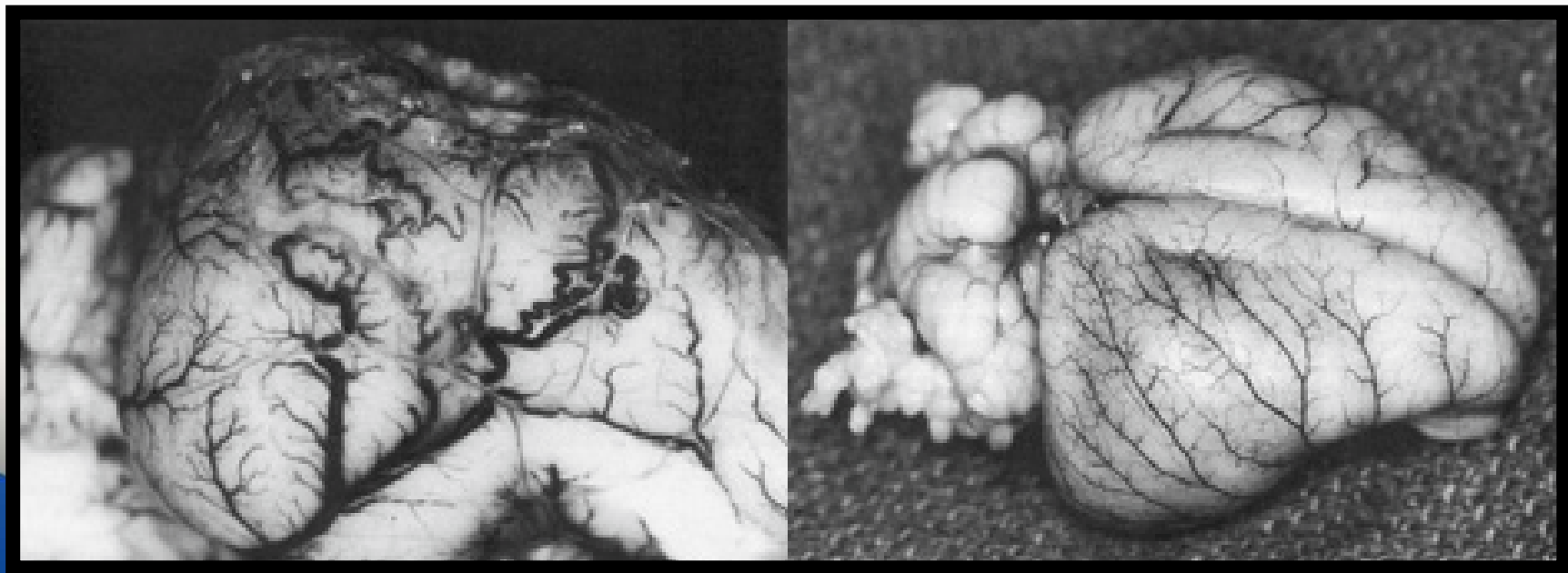


Ovlivňováním angiogeneze lze s nádorem manipulovat

- angiogeneze je výsledkem dynamické rovnováhy mezi pro- a antiangiogenními faktory; pro boj s nádory je vhodné rovnováhu porušit směrem k antiangiogenním
- cévy v nádorech jsou podobné běžným cévám, ale mají nižší stupeň organizace, jejich průměr je proměnlivý, heterogenní vzhled
- u různých nádorů vypadají cévy různě, protože vznikly působením různých kombinací pro- a antiangiogenních faktorů

Vaskulatura nádoru je nedokonalá (ale stačí...)

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



Nádorová vaskulatura

Časté jsou ohyby,
nepravidelnosti,
rozdíly ve velikosti



Látky s anti-angiogenním účinkem: potenciální léčiva

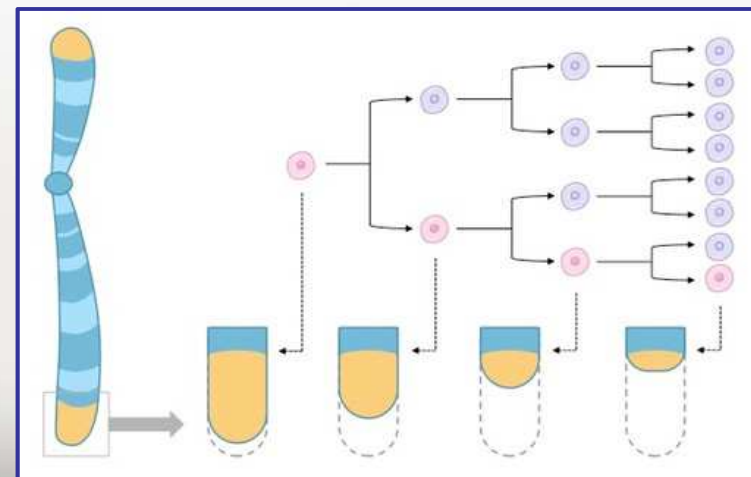
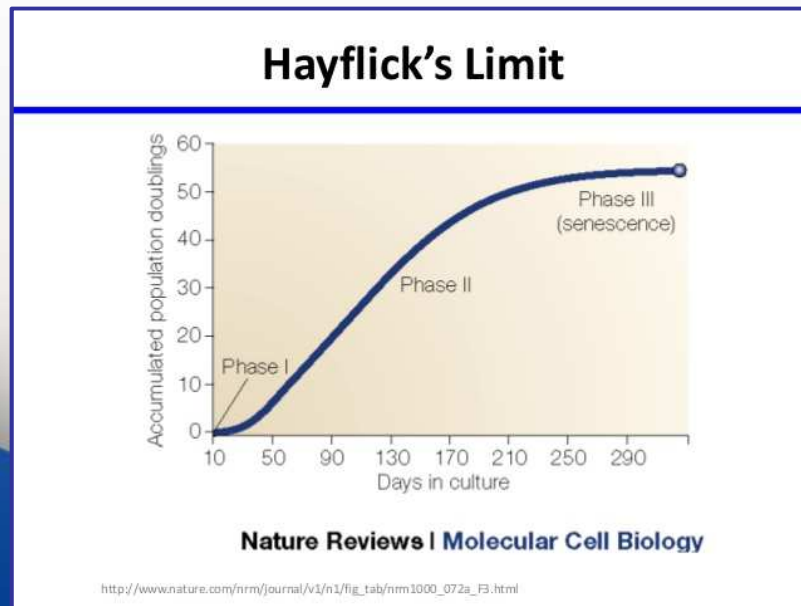
- protilátky proti pozitivním regulátorům - VEGF or FGF-2 nebo jejich receptorům (zatím nejúspěšnější)
- inhibitory matrixových metaloproteináz

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

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

Neomezený replikační potenciál

- somatické buňky procházejí omezeným počtem dělení, pak se dělit přestávají, stárnou a odumírají
- maximální počet dělení, kterým může projít somatická buňka se označuje **Hayflickův limit** – u lidských buněk cca 50 (neplatí pro embryonální a kmenové buňky a buňky nádorové)
- podstatou je zkrácení telomer pod kritickou délkou



Neomezený replikační potenciál

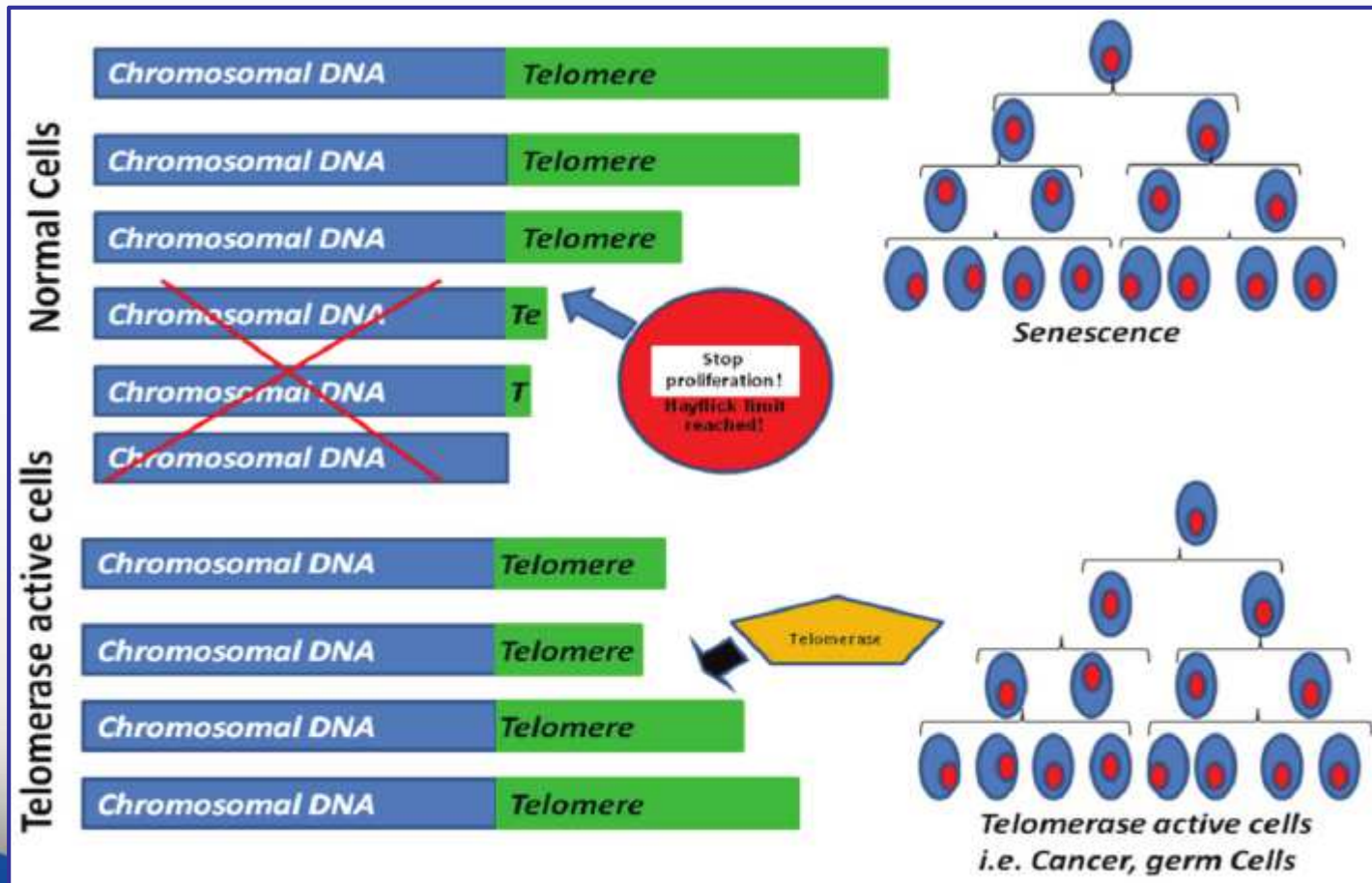
- genetickými změnami buňky mohou získat schopnost dělení po další generace až do nástupu „krize“
- buňky ve stadiu „krize“ vykazují časté změny karyotypu (fúzní chromozomy) a masivně odumírají
- vzácně dojde ke vzniku nesmrtelné buňky (frekvence $1:10^7$)
- většinu nádorových buněk lze úspěšně pěstovat *in vitro*

Imortalizace a telomery

Telomery

- zajišťují počítání dělení buněk
- konce chromozomů složené z několika tisíců opakování krátké nukleotidové sekvence
- během každého buněčného cyklu dochází ke ztrátě 50-100 pb z konce každého chromozomu
- postupná eroze telomer vede ke ztrátě schopnosti chránit konce chromozomové DNA před chromozomovými fúzemi, které ve zdravé buňce nejsou tolerovány a vedou k její smrti
- 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

Imortalizace a telomery

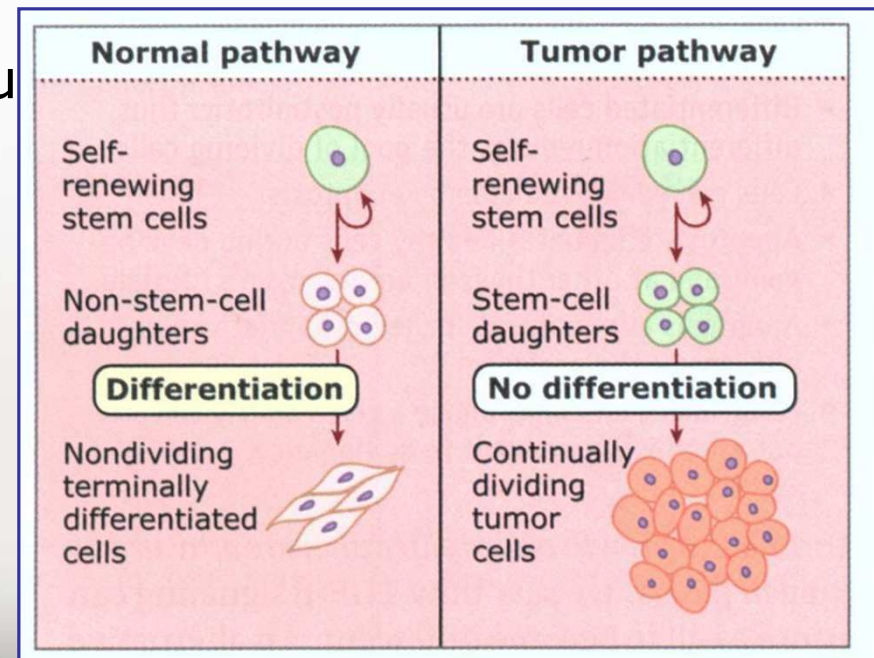


Rakovinné buňky odmítají zemřít apoptózou

- běžné signály indukující apoptózu selhávají
- zdravé buňky mohou žít jen za přítomnosti růstových faktorů, jinak odumírají apoptózou
- nádorové buňky přežívají i bez růstových faktorů
- zdravé buňky s poškozenou DNA odumírají apoptózou x nádorové buňky nikoliv
- rezistence k apoptóze je jedním z důvodů zvýšené životaschopnosti nádorových buněk

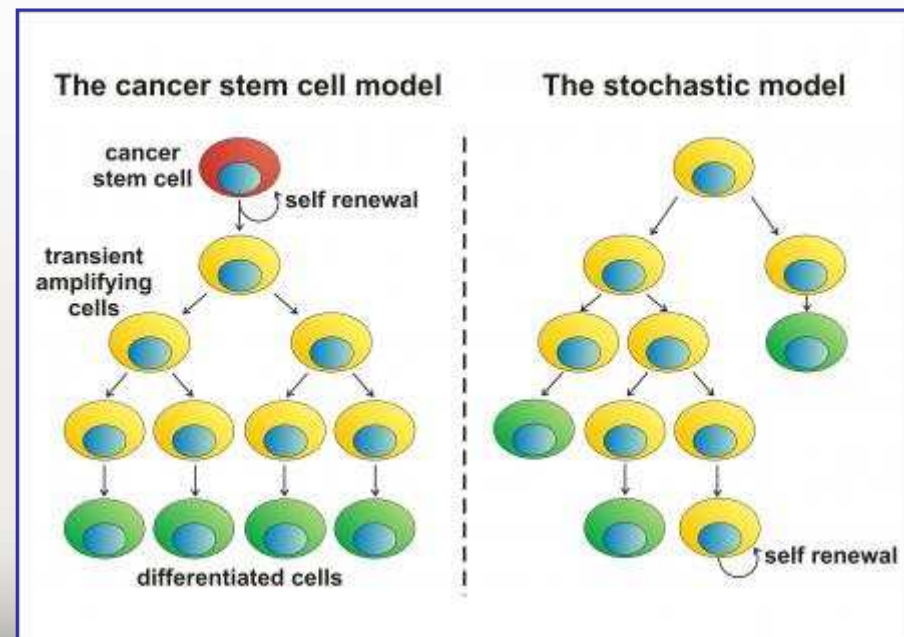
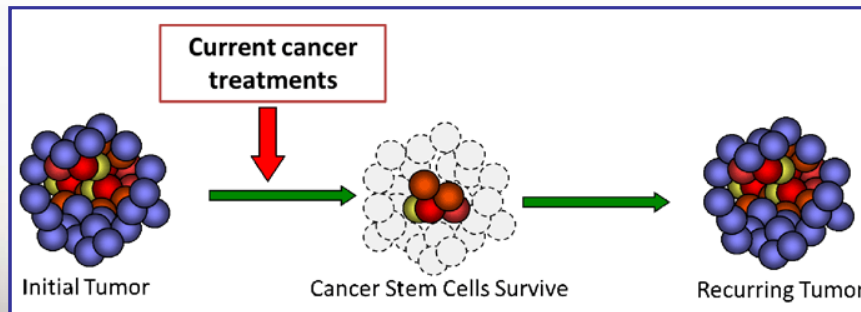
Nádorové kmenové buňky

- zdravé buňky dozrávají do **postmitotického** diferenciačního stavu z buněk kmenových
- kmenové buňky mají neomezenou schopnost růstu a dělení
- nádorové buňky se často chovají jako buňky kmenové se zablokovanou schopností diferenciacce a přechodu do postmitotického stavu



Nádorové kmenové buňky

- populace nádorových buněk je heterogenní – zahrnuje nediferencované proliferující buňky i více diferencované postmitotické buňky
- jen nádorové kmenové buňky dokážou vyvolat tvorbu nového nádoru po přenesení do zvířecího modelu
- nádorové kmenové buňky přispívají k rekurenci nádoru po chemoterapii



Nádorové kmenové buňky a vliv prostředí

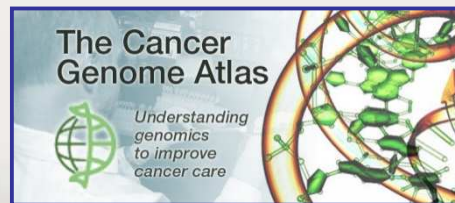
- rychlost proliferace nádorových buněk spoluurčuje okolní prostředí

Čtyři možnosti původu a expanze nádorových kmenových buněk:

- **změní se buňky určující niku** (např. mutacemi) tak, že zvětší prostor vhodný pro reprodukci kmenových buněk, z nichž některé se mohou stát nádorovými kmenovými buňkami
- **změní se budoucí nádorové kmenové buňky** (např. mutacemi), které jim umožní růst a proliferaci v nise, která jim normálně není vlastní
- **kmenové buňky si začnou produkovat vlastní růstové faktory**, které jim poskytnou nezávislost na faktorech dané niky
- **progenitorové buňky**, které mají schopnost vlastní reprodukce omezenou, **získají mutacemi nesmrtelnost** (získají „kmenovost“)

Projekt Cancer Genome Atlas

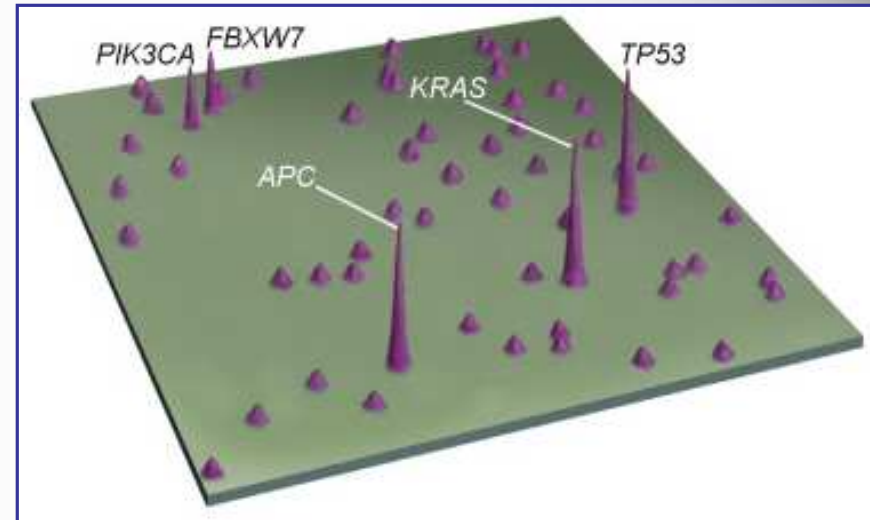
- probíhá od roku 2005
- stanovení úplné sekvence genomů u různých variant rakoviny člověka
- „high-throughput“ technologie analýzy genomu
- Human Genome Project dokončen v roce 2003, slouží jako srovnávací základna pro Atlas
- smyslem je vytvořit mapu rakovinotvorných mutací



Výsledky projektu Atlas

Mutací je v nádorech mnoho:

- 50 – 80 u rakoviny prsu a střeva
- 50 – 60 u rakoviny slinivky
- 40 – 50 u rakoviny mozku



Heterogenita mutací u různých vzorků téhož nádoru – dělí se do 2 typů:

- **pasivní**: vznikají náhodně, v populaci nádorových buněk se udržují, ale nemají vliv na biologii nádoru („**passenger mutations**“)
- **aktivní**: přímo určují růst a chování nádoru („**driver mutations**“), obvykle zasahují onkogeny a nádorové supresory, opakují se u různých vzorků, lze je zařadit do signálních drah

Počet zasažených drah u rakoviny?

- 11 – 15, obvykle 13
- pro každou z nich je třeba identifikovat „driver“ mutace a nalézt příslušné cílené terapeutické postupy pro eliminaci jejich účinku

Frost and Levin (1992):

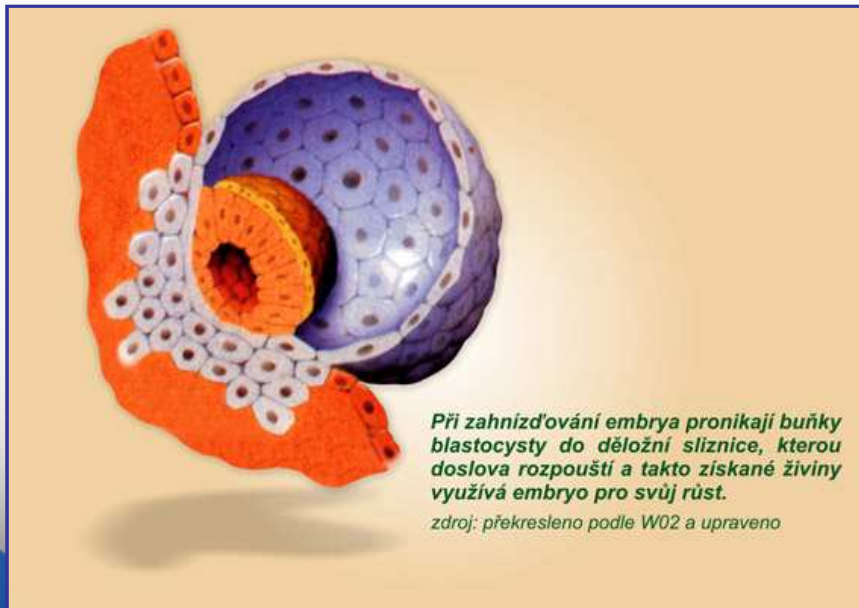
„There is nothing that a metastatic cell can do that is not a routine task for normal cells“.

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

Mobilita je vlastní mnoha normálním buňkám

- např. granulocytům, lymfocytům, monocytům a makrofágům,
myogenním kmenovým buňkám somitů, primordiálním zárodečným
buňkám

Agresivní chování nádorových buněk má rovněž fyziologickou obdobu



např. proces oplodnění:

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

Stádia vývoje nádoru dle patologů: „grading / staging“

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

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

Stádia vývoje nádoru dle patologů: „grading / staging“

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

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

GRADE THE TUMOR!
STAGE THE PATIENT!

