

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.

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 vyplynulo?

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 thyroideálnímu karcinomu (MTC) je typickým příkladem hereditárního karcinomu způsobeného mutací *RET* protoonkogenu. → prediktivní genetické vyšetření]

Nukleární transkripční faktory

Onkogeny této třídy kódují tvorbu proteinů, které přímo působí na míru transkripce aktuální vazbou na příslušnou sekvenci DNA; modifikují též iniciaci transkripce.

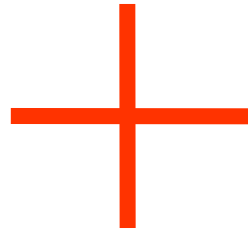
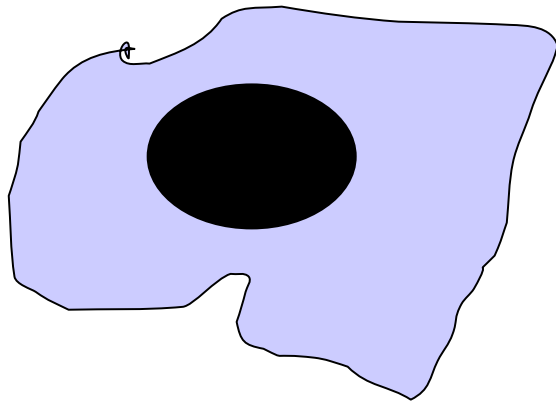
Proto-onkogen *c-jun* kóduje část transkripčního faktoru AP-1, který vazbou na promotorovou sekvenci podporuje transkripci řady genů. AP-1 často tvoří dimerový komplex s Fos (Jun+Fos). Onkoproteiny (z onkogenů *fos* a *jun*) iniciují transkripci klíčových genů, kódujících proteiny podporující růst nebo inhibují transkripci genů potlačujících růst.

Působení PDGF na klidové 3T3-buňky stimuluje (až 50krát) produkci c-Fos a c-Myc (produkty normálních proto-onkogenů). Fos působí obvykle krátce, ale *myc* déle. Dojde-li k prolongované expresi *myc*, účinek se mění na onkogenní.

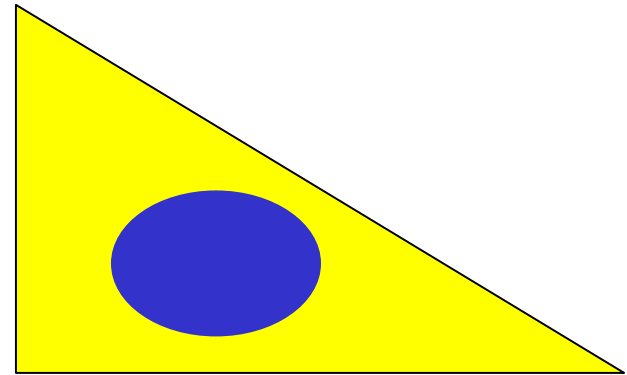
Klíčovým transkripčním faktorem pro řady signálních kaskád je *nukleární faktor kappa B (NF-κB)*. Je v inaktivní formě v cytoplasmě v komplexu s rodinou inhibitorů (IκB), které po fosforylaci IKK-kinázou se od komplexu oddělí, a tím umožní translokaci *NF-κB* do jádra, kde vazbou na příslušný promotorový úsek genu dojde k expresi příslušných kódujících úseků.

I. Fúze buněk

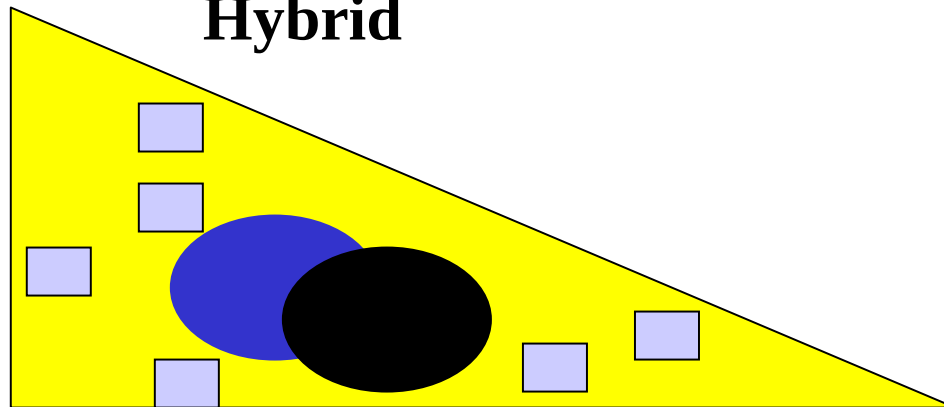
Nádorová buňka



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 stadiu klidu (G_0). Jejich ztráta se projevuje neregulovanou proliferací.

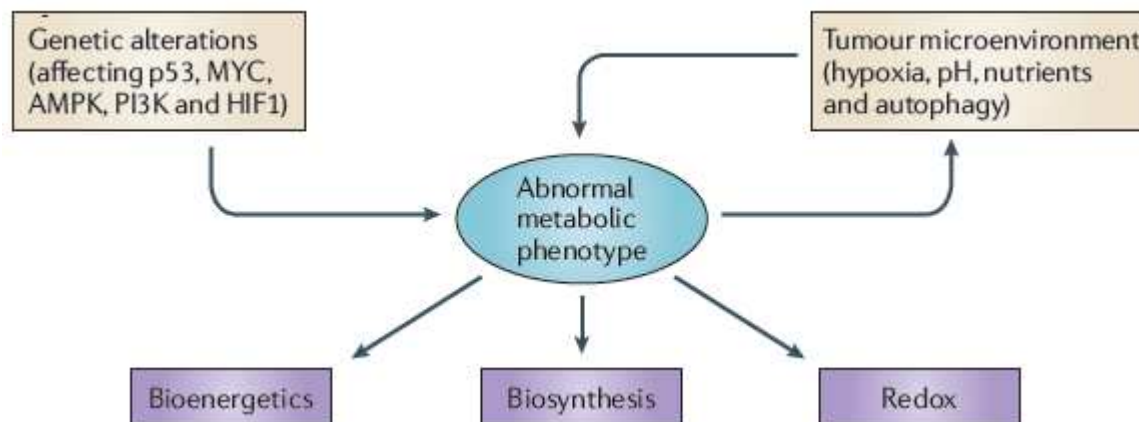
Mutace nádorových supresorů jsou:

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

NÁDOROVÝ FENOTYP

MALIGNÍ TRANSFORMACE BUŇKY

- **Ztráta kontroly PROLIFERACE**
 - alterace buněčného cyklu
 - anti-apoptotické mechanismy („nesmrtelnost buňky“)
 - alterace v transdukci signálu
- **Ztráta inhibice kontaktem** buňka-buňka
- **Invazivita, podpora angiogeneze**
- **Alterace v metabolismu**



Charakteristika nádorově transformovaných buněk

- Transformované buňky vykazují zvýšené vychytávání glukosy pro vyšší afinitu glukózového transportéru v membráně, podobně jako je tomu normálně pouze u erytrocytů nebo buněk v mozku. Koreluje to s vysokou glykolytickou aktivitou.
- Chybí u nich dále povrchový fibronektin, který mají klidové buňky a který udržuje jejich tvar.
- Změny cytoskeletových elementů (aktinová mikrofilamenta nejsou difúzně rozptýlena, ale koncentrují se blíže povrchu) jsou příčinou zvýšené mobility povrchových proteinů.
- Nepřiměřená sekrece transformujícího růstového faktoru TGF a dalších růstových faktorů, které řídí normálně vývoj embryonálních buněk.
- Produkují též plasminogenový aktivator, což je proteáza přeměňující plasminogen na plasmin. Vysoká tvorba plasminu nádorovou buňkou pomáhá penetraci skrz lamina basalis.
- Mikroprostředí nebo stroma, v kterém se nádorové buňky nalézají, mají rovněž vliv na progresi (teorie semene a půdy"). Bylo prokázáno, že metaloproteinázy stromální proteinové matrix (MMP 9) hrají významnou úlohu v časných stádiích vývoje tumoru a při angiogenezi.
U metastáz karcinomu prostaty do kostí se předpokládá jakýsi „osteomimetický“ účinek (chemoatrakce a podpora adherence ke kostnímu endotelu) a ovlivňování vlastností a chování osteoblastů a osteoklastů.

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)
- Metastázy jsou nejzhoubnějším jevem při nádorovém onemocnění a jsou příčinou asi 90 % úmrtí pacientů s nádorovým onemocněním.
- Více než 70 % pacientů s invazivním nádorem má zjevné nebo skryté metastázy v době stanovení diagnózy.

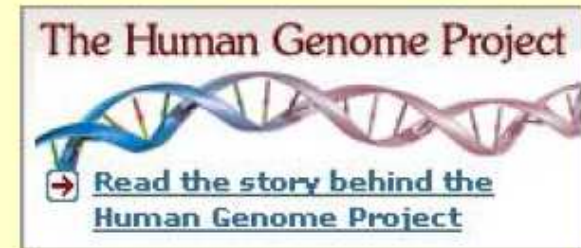
(B) podle původu

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

Grade: I-IV

Stage: TNM klasifikace

Lidský genom...



Sekvenace: kompletní

Anotace: kompletní, nikoliv však definitivní

Funkce genových produktů a regulace exprese: ve výzkumu

Evoluce, výměna genetické informace a dělení miliard buněk během života organismu: probíhá

...a karcinogeneze

Karcinogeneze: vyvolána poškozením genomu

KARCINOGENEZE

Multifaktoriální a vícestupňový proces

- Fyzikální karcinogenní faktory
 - Chemické karcinogeny
 - Biologické karcinogenní faktory
 - Konstituční karcinogenní faktory
- 
- mutace DNA vedoucí k aktivaci onkogenů a/nebo inaktivaci antionkogenů

Reparační mechanismy

- fungují → oprava DNA
- nefungují

pak buď
→ apoptóza

nebo
→ šíření mutací do dalších buněčných generací → karcinom

Fyzikální karcinogenní faktory:

Radiační vlivy

- Ionizující záření
korpuskulární (částicové): α , β
elektromagnetické: γ , rtg
- UV záření

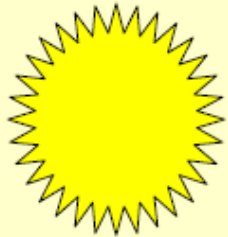
Ionizující záření:

- Chromosomální aberace: nestabilní (letální) vs. stabilní (přenášející se do dalších buněčných generací)
- Účinek závisí na dávce a době působení
- Nejohroženější: lymfatická tkáň
- Latence – různá – Hirošima:
leukémie ~ 8 let
ca. plic a BrCa: ~12-18 let



Fyzikální karcinogenní faktory:

Radiační vlivy



UV záření

- tvorba pyrimidinových dimerů => eliminace => apyrimidinová místa
- jedno- a dvouřetězcové zlomy, spojování řetězců
- tvorba volných radikálů $\cdot\text{OH}$, $\cdot\text{O}_3^-$
- adaptace na UV: pigmentace

→ aktivace onkogenů/deaktivace antionkogenů

→ ? karcinom

Fyzikální karcinogenní faktory:

Mechanické vlivy



- Jednorázové mechanické poškození tkáně - v žádném případě není prokázána souvislost s karcinogenezí
- Karcinogeneze vyvolaná dlouhodobým působením (implantáty) prokázána u některých druhů zvířat, u jiných nikoliv (pravděpodobně iritace a indukce proliferace – promoční charakter)



Chemické karcinogeny

Vždy mutageny

Mechanismus účinku: elektrofilní látky – chemická reakce s DNA, RNA

Přímé (ultimátní) karcinogeny

- **alkylační** látky (cytostatika – cyklofosfamid, chlorambucil, busulfan nitrosurea, ...)
- **acylační** látky (1-acetyl-imidazol, dimethylsulfát, ...)

Prokarcinogeny (=proximální karcinogen) -> intermediární karcinogeny
-> finální (terminální) karcinogeny

- aromatické uhlovodíky, aromatické aminy, nitrosaminy, produkty plísní (aflatoxin), kovy (Cr, Ni, Co), As, azbest, insekticidy, fungicidy, ... viz tabulka

Hlavní skupiny (pro)karcinogenů

Skupina	Látka (příklady)	Postižený orgán, typ nádoru	Latence (roky)	Výskyt
Polycyklické aromatické uhlovodíky	3-metylcholantren, benzantracén, benzpyrén, dibenzantracén atd.	Plíce, hrtan, kůže, močový měchýř (Ca)	9–20	Uhelný, cigaretový dehet, asfalt, roštované maso, uzené maso a ryby
Aromatické aminy, amidy, azo-barviva	Auramin, benzidin, α -, β -naftylamin, 4-aminodifenyl, 4-nitrodifenyl, dimetylaminoazobenzen	Terminální karcinogen: diol-epoxid		
		Močový měchýř, ureter, ledvina, játra (Ca)	13–30	Anilínové a potravinářské barvy (máslová žlut), guma
Nitrozoaminy	Ultimální karcinogen: dimetyl-nitrozoamin N-metyl-nitrozoamin N-etyl-nitrozourea N-metyl-nitrozouretan N-metyl-nitrozoguanidin	Terminální karcinogen: 2- amino-1-naftol		
		Játra, hrtan, plíce, žaludek, jícen (Ca)	10–20	Vznik v organismu z prokarcinogenu nitraty, nitrity (umělá hnojiva), rychlé uzeniny, rybí maso, atd.
Produkty rostlin a mykotoxiny	Alfatoxin (Aspergillus flavus) Islandotoxin (Penicillium Islandicum)	Terminální karcinogen: totožný s ultimálním		
		Játra (Ca)	2–5	Plíseň na zvlhlém obilí, luštěninách, arašidech, siláži atd.
Kovy	Chrom Nikl Kobalt	Terminální karcinogen: 2,3-dihydroxy-aflatoxin (2,3-epoxid)		
		Nosní dutina, Paranasální dutiny, Larynx, plíce (Ca, Sa)	15–25	Chromování, Výroba sklářská, acetylenu, linolea, autobaterií atd.
Jiné	Arzen	Kůže, plíce, játra, paranasální dutiny, močový měchýř (Ca)	10+	Hutnictví, svářečství, dřevařský průmysl
	Vinylchlorid	Játra (Ca)	20–30	Výroba plastů
	Benzen	Kostní dřeň (LE)	6–14	Výroba výbušnin, lepidel, obuvi
	Azbest	Plíce, pleura, peritoneum (Ca, Sa, mezoteliom)	4–50	Výroba azbestových textilů, obkladů

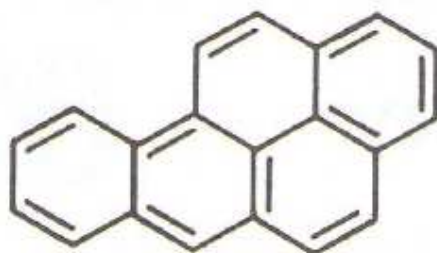
Enzymy odpovědné za karcinogenezi

E

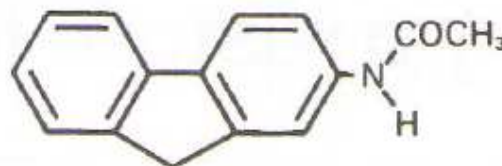
E

Prokarcinogen → intermediární karcinogen → terminální karcinogen

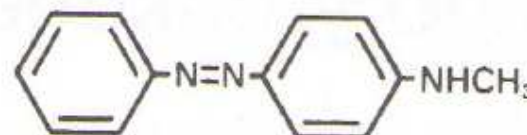
- **Monoxygenasy** ze systému **cytochromu P-450 (CYP)**
(metabolismus xenobiotik – léčiv a škodlivin z vnějšího prostředí – funkčně heterogenní skupina)
- **Hydroxylasa aromatických uhlovodíků (cytochrom P-448)**



Benzo [a] pyren



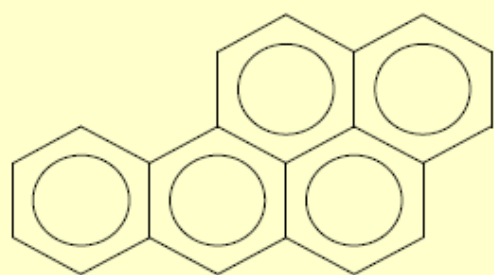
2-Acetaminofluoren



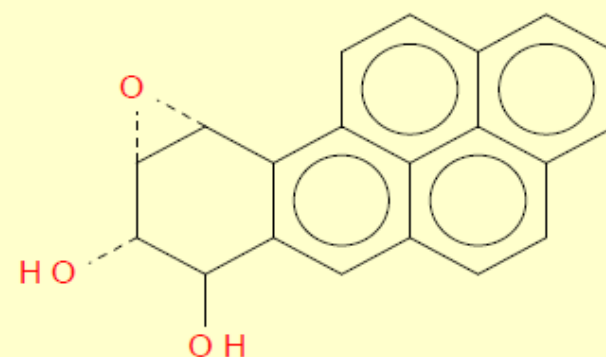
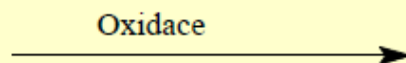
N-Methyl-4-aminoazobenzen

Obr. 62–1. Struktura 3 důležitých experimentálně užívaných chemických karcinogenů.

Enzymy odpovědné za karcinogenezi: tvorba vysoce reaktivních epoxidů



Benzo[a] pyren



7,8-Diol-9,10-epoxy benzo[a]pyrenu

silné kancerogeny

Metabolická přeměna benzo[a]pyrenu hydroxylasou aromatických
uhlovodíků (cytochrom P-448)

Testování mutagenity: Amesův test

- kmen *Salmonella typhimurium* s mutací v genu enzymu zapojeného do syntézy His (His⁻)
- další mutace testovaným mutagenem:

?

His⁻ → His⁺

- mutovaný kmen je schopen růstu na médiu bez His
- problém: bakterie nemají monooxygenasy (simulace metabolické aktivace prokarcinogen → terminální karcinogen) – řešení: inkubace látky se supernatantem S-9 krysích jater
- schopnost detekce 90% známých karcinogenů



Kolonie *S. typhimurium*



Testování mutagenity *in vivo*

- Transgenní myším, v jejichž genomu je inkorporován bakteriofág λ nesoucí *lacI* gen, je podávána testovaná látka
- Po určité době je fág aktivován
- Fágové částice vneseny do *E. coli*
- Produkt **lacI** je represorem β -galaktosidasy, **mutovaný produkt není funkční**
- β -galaktosidáza štěpí analog laktosy X-gal za vzniku modrého zbarvení
- látka je mutagenní ... $\rightarrow$... modré plaky
- látka není mutagenní ... $\rightarrow$... bílé plaky



Látky ve stravě a kancerogeneze

Tab. 1.5.4 Vliv diety na karcinogenezi v semikvantitativním hodnocení

SKUPINA A LÁTKA	RIZIKO TRANSFORMACE	
	Zvyšuje:	Snižuje:
CELKOVÝ PŘÍSTUP A VÝMĚNA ENERGIE:		
Obezita – vysoký BMI	♦♦♦	
pohybová aktivita		♦♦♦
CHEMICKY DEFINOVANÉ SLOŽKY STRAVY:		
základní nutrienty:		
jednoduché cukry	♦	
komplexní cukry		♦♦
tuky	♦♦♦♦	
vitamíny a minerály:		
karotenoidy		♦♦♦
vitamin C		♦♦♦
vitamin E		♦
selen		♦
fytochemikálie např.:		
allium (cibule, česnek), saponiny (soja) atd.		♦♦
KOMPLEXNÍ POTRAVINY A NÁPOJE:		
maso červené	♦♦♦	
vejce, mléko	♦	
zelenina		♦♦♦♦
ovoce		♦♦♦
alkohol	♦♦♦♦	
UCHOVÁNÍ A PŘÍPRAVA POTRAVIN:		
konzervace solením – kuchyňská sůl	♦♦♦	
konzervace uzením	♦♦	
konzervace zmrazováním		♦♦
Úprava – grilování, smažení	♦♦	

Biologické karcinogenní faktory:

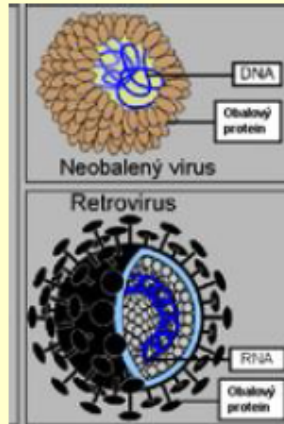
Virová transformace

Živé příčiny: viry

Helicobacter pylori – spojován s ca. žaludku

10% v současné době popsáných virů má onkogenní charakter, nádory i při prokázaném virovém původu však nelze považovat za infekční v pravém slova smyslu – mechanismus, hostitelské předpoklady

RNA viry x DNA viry



Retroviry= RNA-viry s reverzní transkriptázou

Retroviry obecně:

- transformující => vznik nádoru, nebo
- netransformující (chybí informace pro maligní přeměnu, bez cytopatického efektu)
- výjimečně způsobuje i nenádorové onemocnění – HIV (infekce lymfocytů)

Nesou

- strukturní a funkční geny
- reverzní transkriptázu
- LTR (long terminal repeat) úseky s funkcí promotoru a enhanceru – regulující transkripci v hostiteli (DNA → mRNA)

3 mechanismy transformace retroviry

- **silně onkogenní vir** - nese přímo onkogen (**v**-onc = virový onkogen, např. **v**-src, **v**-ras vs. **c**-ras)
- **slabě onkogenní vir**, nemusí obsahovat v-onc, transformuje prostřednictvím LTR inzerovaného v sousedství celulárního protoonkogenu (p-onc)
- vir nese **gen-tat** kódující protein, který zprostředkovává transaktivaci celulárních onkogenů

Transformace retroviry: příklady

U člověka prokázána pouze transformace virem HTVL-1 (slabě onkogenní, nenese v-onc, onemocní 1% nakažených 20-30 let po infekci, leukémie-Japonsko, Karibik, sporadicky)

RNA viry u zvířat:

Tab. 1.5.5 Příklady onkogenů retrovirů

Virus	Hostitel	Nádor	Onkogen
Abelsonův myší leukemický	Hlodavci – myš	leukemie	v-abl
Moloneyův myší sarkomový	Hlodavci – myš	sarkomy měkkých tkání	v-mos
FBJ myšího osteosarkomu	Hlodavci – myš	osteosarkom	v-fos
Rousův sarkomový	Ptáci	sarkomy měkkých tkání	v-src
Ptačí myelocytomatózy	Ptáci	leukemie	v-myc
Ptačí myeloblastózy	Ptáci	myeloblastóza	v-myb
Ptačí erytroblastózy	Ptáci	erytroleukemie	v-erb B
Harveyův potkaní sarkomový	Hlodavci – potkan	sarkomy měkkých tkání	v-H-ras
Kirstenův potkaní sarkomový	Hlodavci – potkan	sarkomy měkkých tkání	v-K-ras
Kočí sarkomový	Kočka	sarkomy měkkých tkání	v-fms
Simian (opičí) sarkomový	Pavián	sarkomy měkkých tkání	v-sis

DNA-onkogenní viry

Nižší transformační potenciál (méně agresivní) než RNA-viry, ale epidemiologicky závažnější

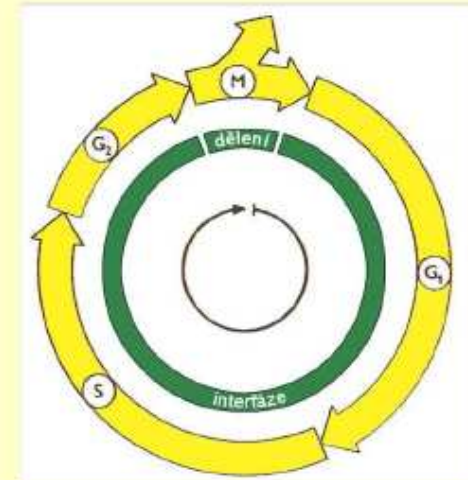
V jádře napadené buňky replikace virové DNA, permanentní přechod buněk z G0 a G1 fáze do S fáze

Příklady:

HPV – human papillomavirus (ca. děložního čípku,...) – proteiny E6 a E7: blokace antionkogenů p53 (E6) a RB1 (E7)

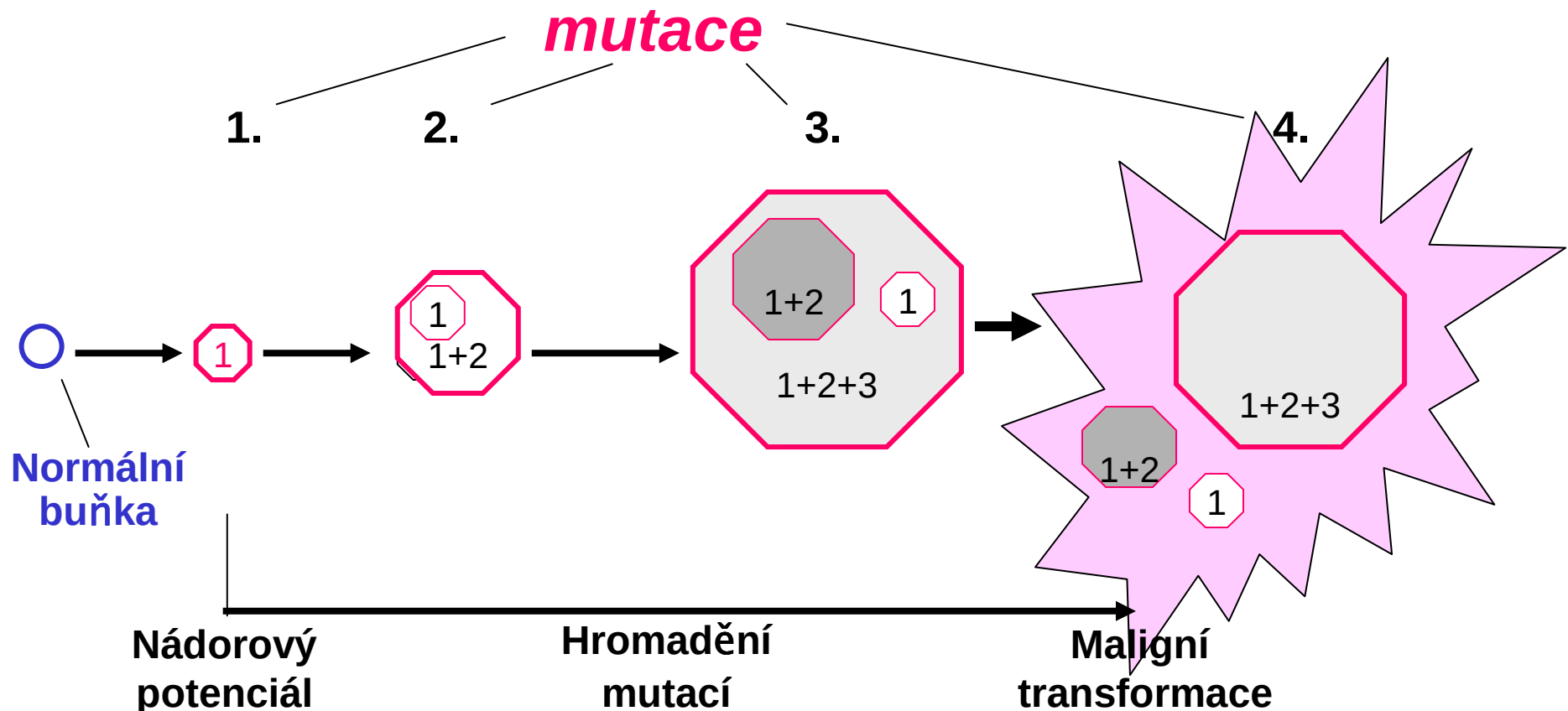
EBV – Epstein-Barrové virus (Burkittův lymfom; mononukleóza)

HBV – hepadnavirus (hepatocelulární ca.; hepatitida B)

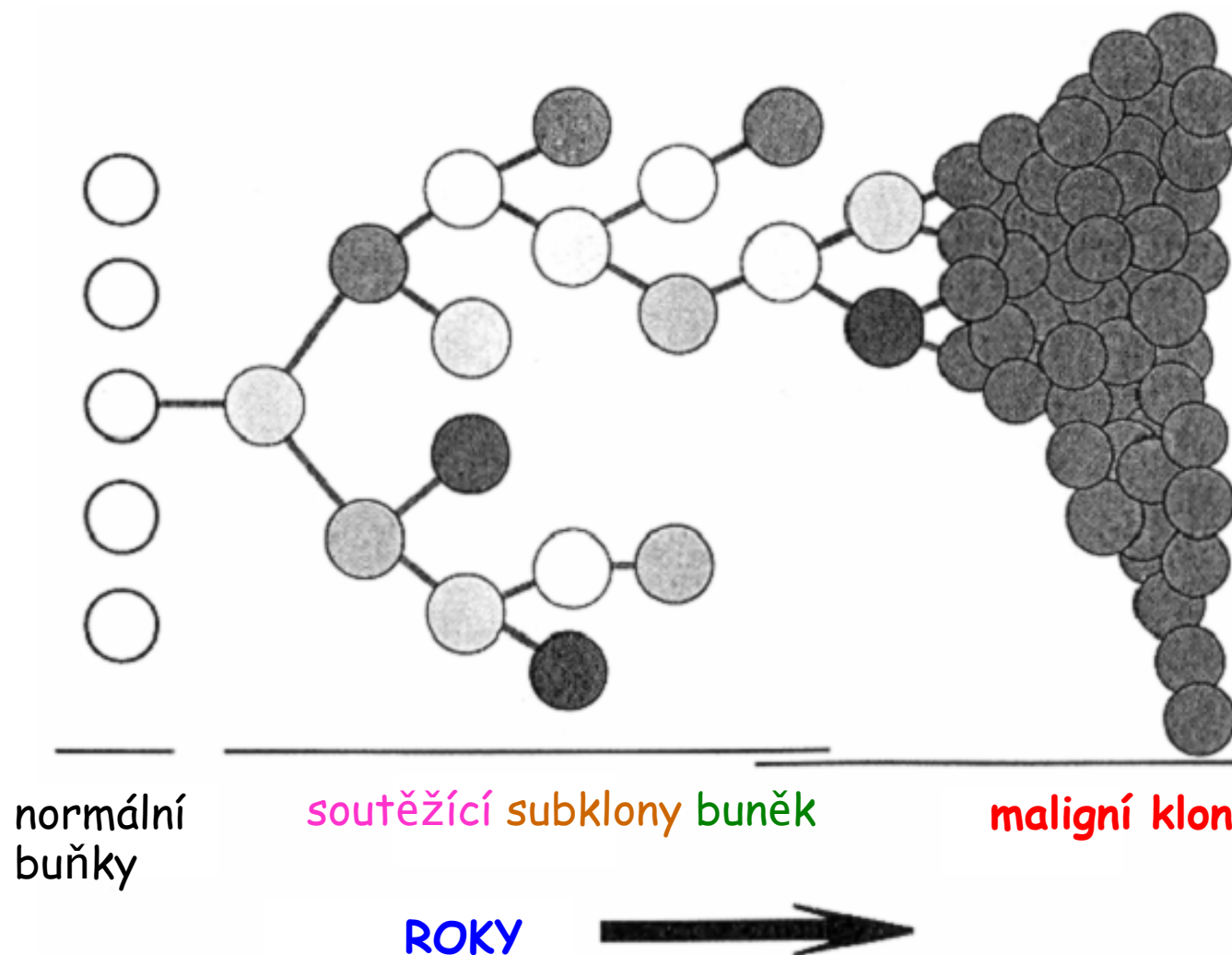


Kancerogeneze

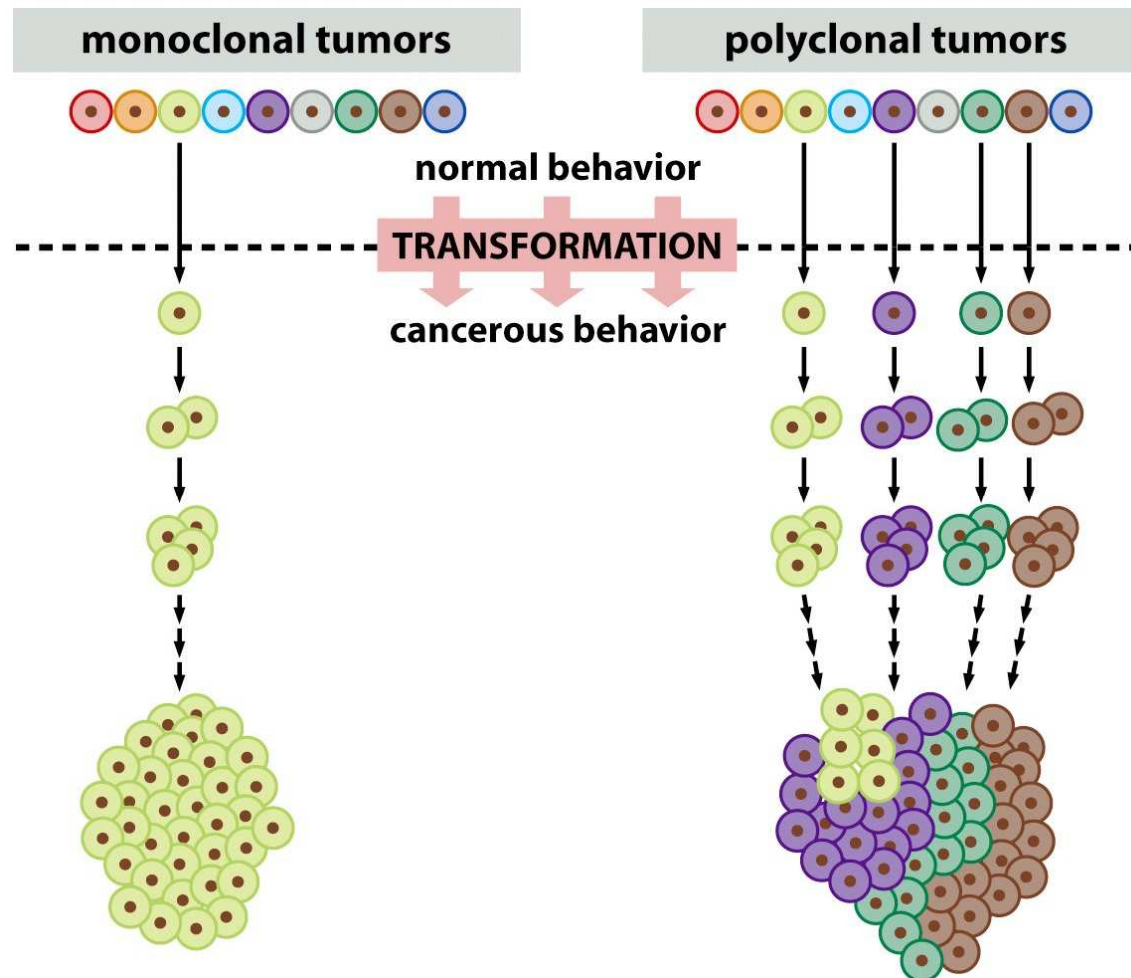
- je proces vzniku a vývoje nádoru
- je vícestupňový proces
- podstatou kancerogeneze je postupné hromadění genetických (a epigenetických) změn



Klonální model vývoje nádoru: selekce, klonální expanze

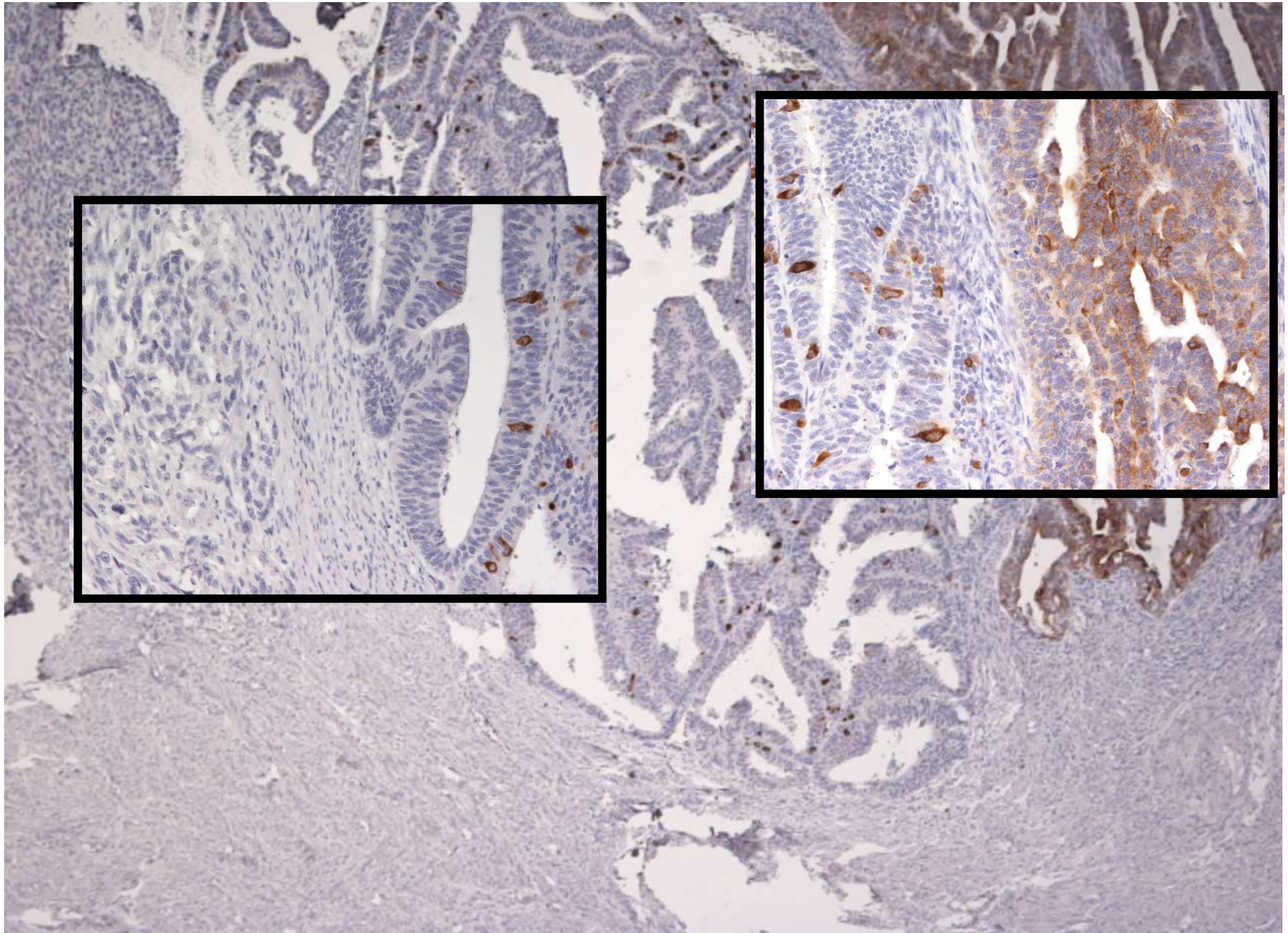


Jsou nádory monoklonální nebo polyklonální?

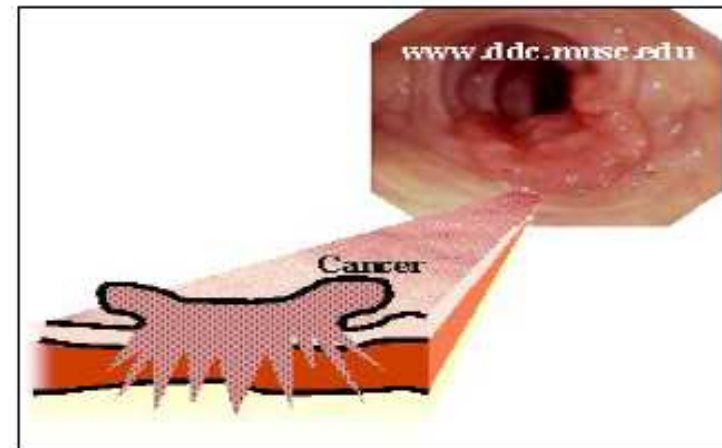
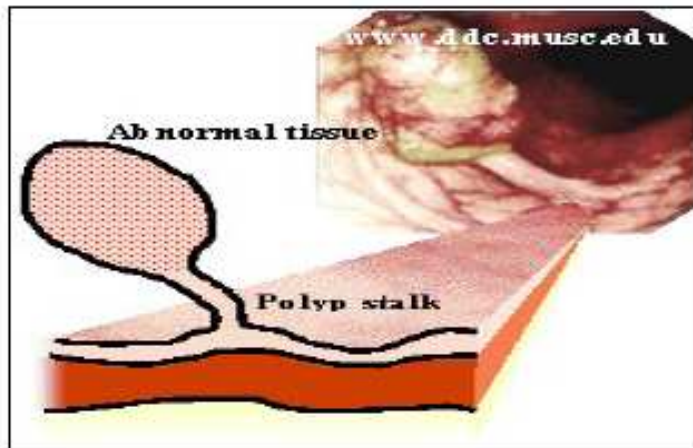


Jsou nádory monoklonální nebo polyklonální?

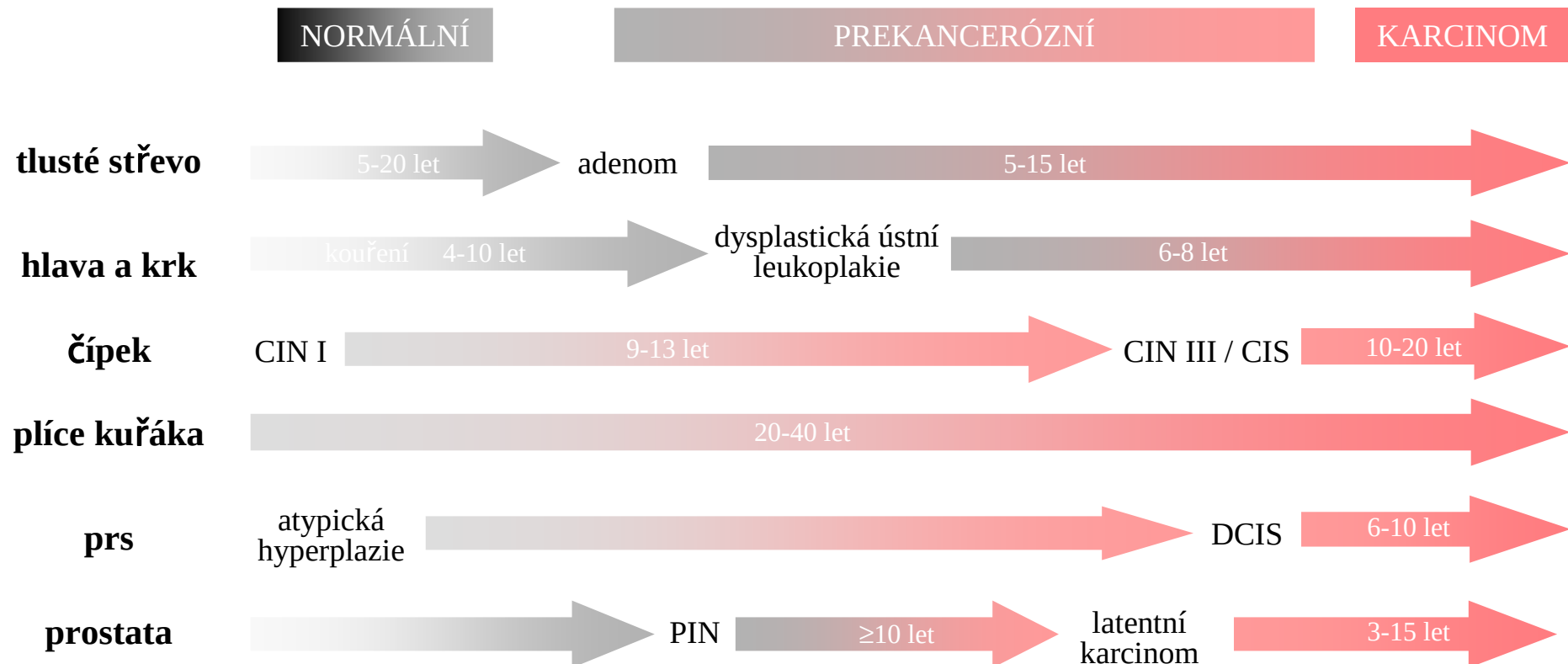
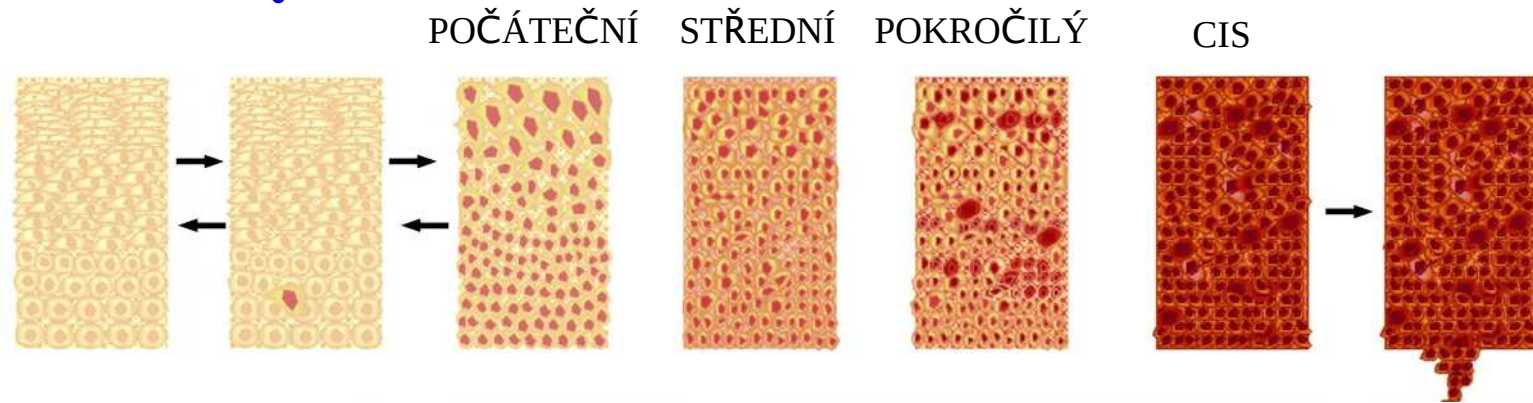
- Obecný konsensus říká, že nádory jsou většinou **monoklonální** a jejich vývoj začíná **jedinou odrodilou buňkou**.
- Klonalitu lze studovat na základě sledování nějakého unikátního genetického/epigenetického markeru (např. Barrovo tělísko) $\Rightarrow$ tak lze prokázat, že buněčná populace v nádoru je monoklonální
- X Na počátku mohl být vývoj polyklonální, ale přerostla nejúspěšnější buněčná populace.
- X Během vývoje narůstá genetická nestabilita a tedy i heterogenita.



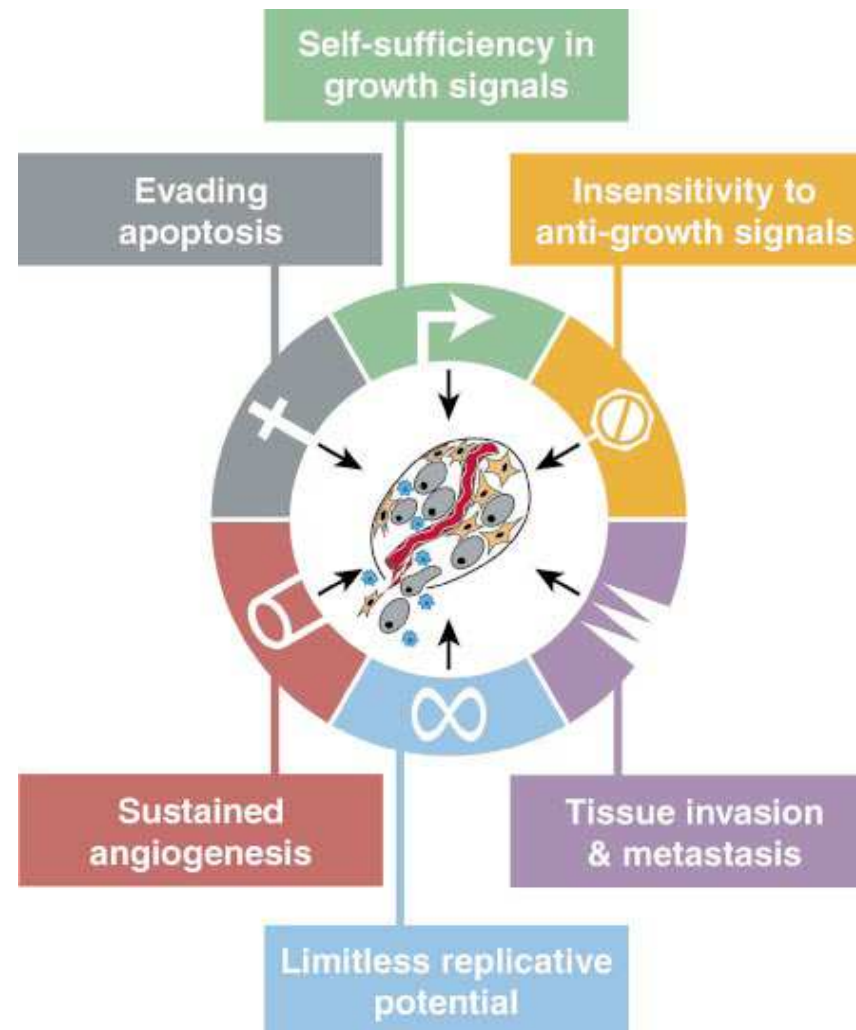
Molekulární model iniciace nádoru (familiární adenomatózní polypóza)

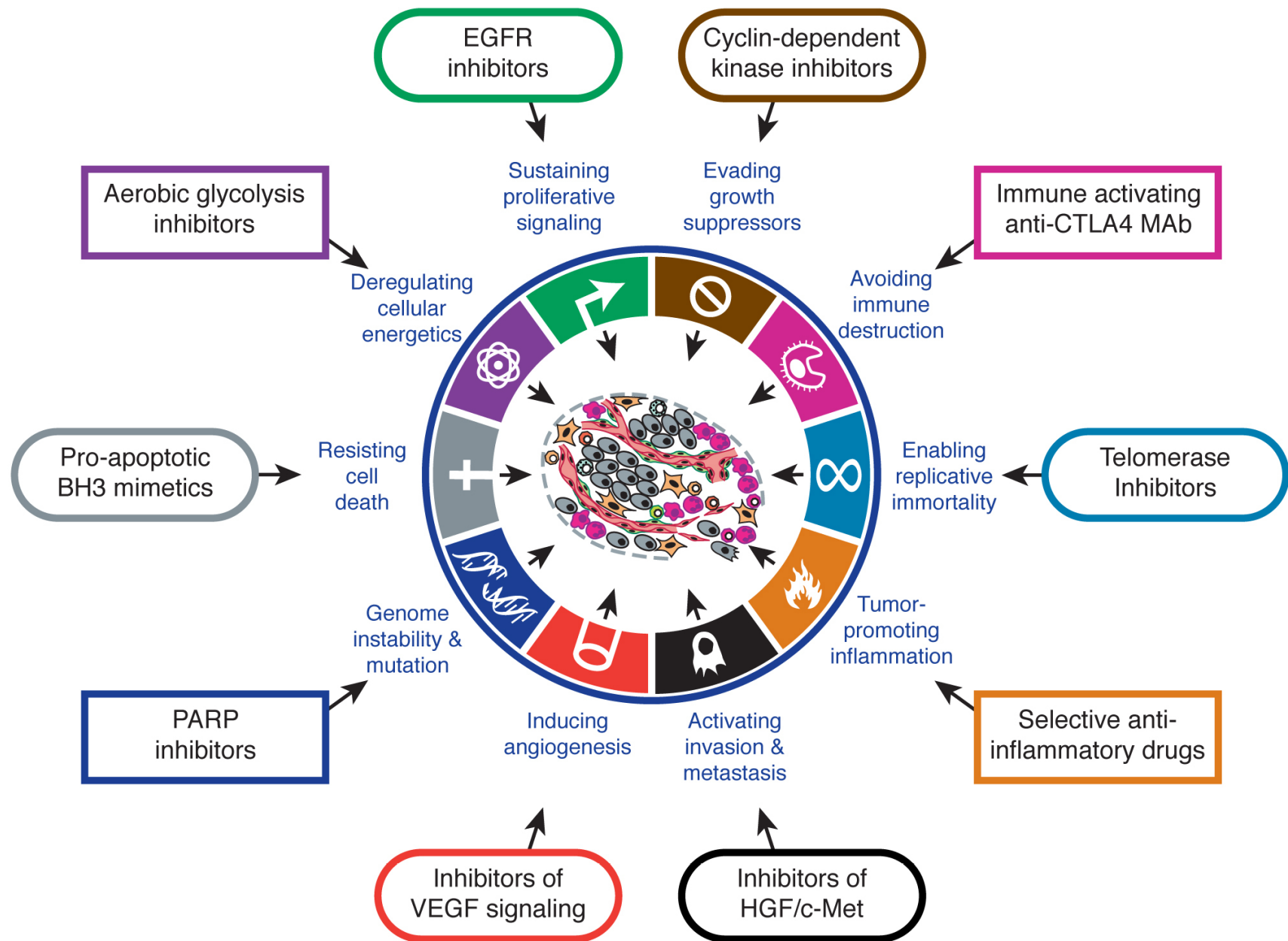


Neoplastická transformace



**Nádor = defekt v regulaci
b. proliferace a homeostázy**





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

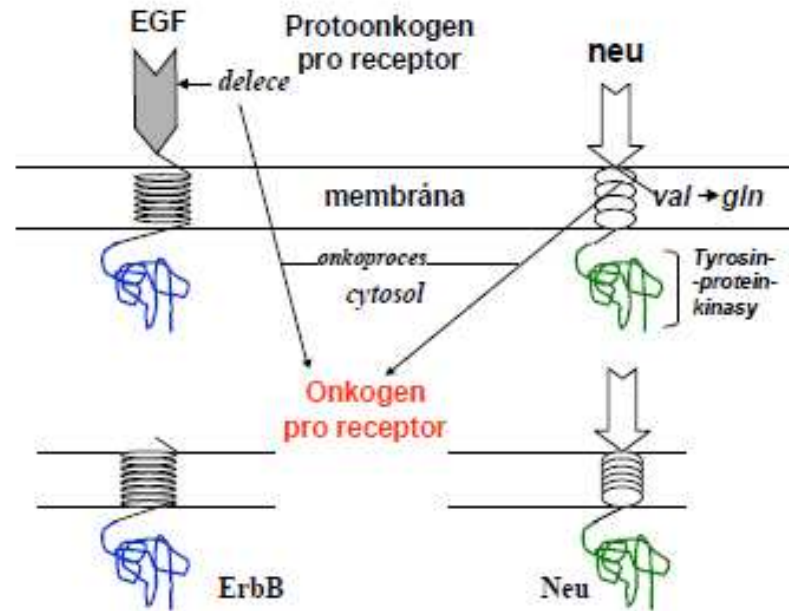
Růstové faktory

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.

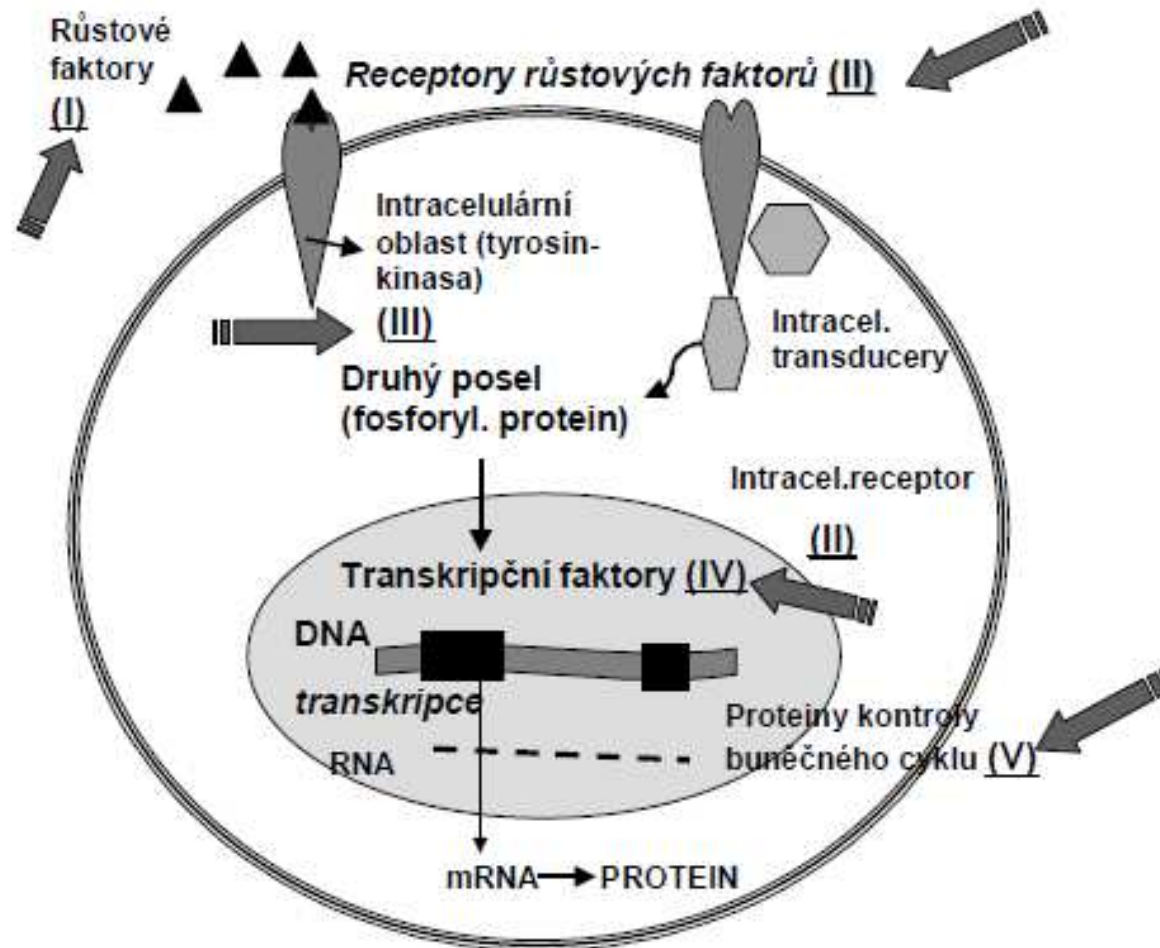
Receptory růstových faktorů

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.



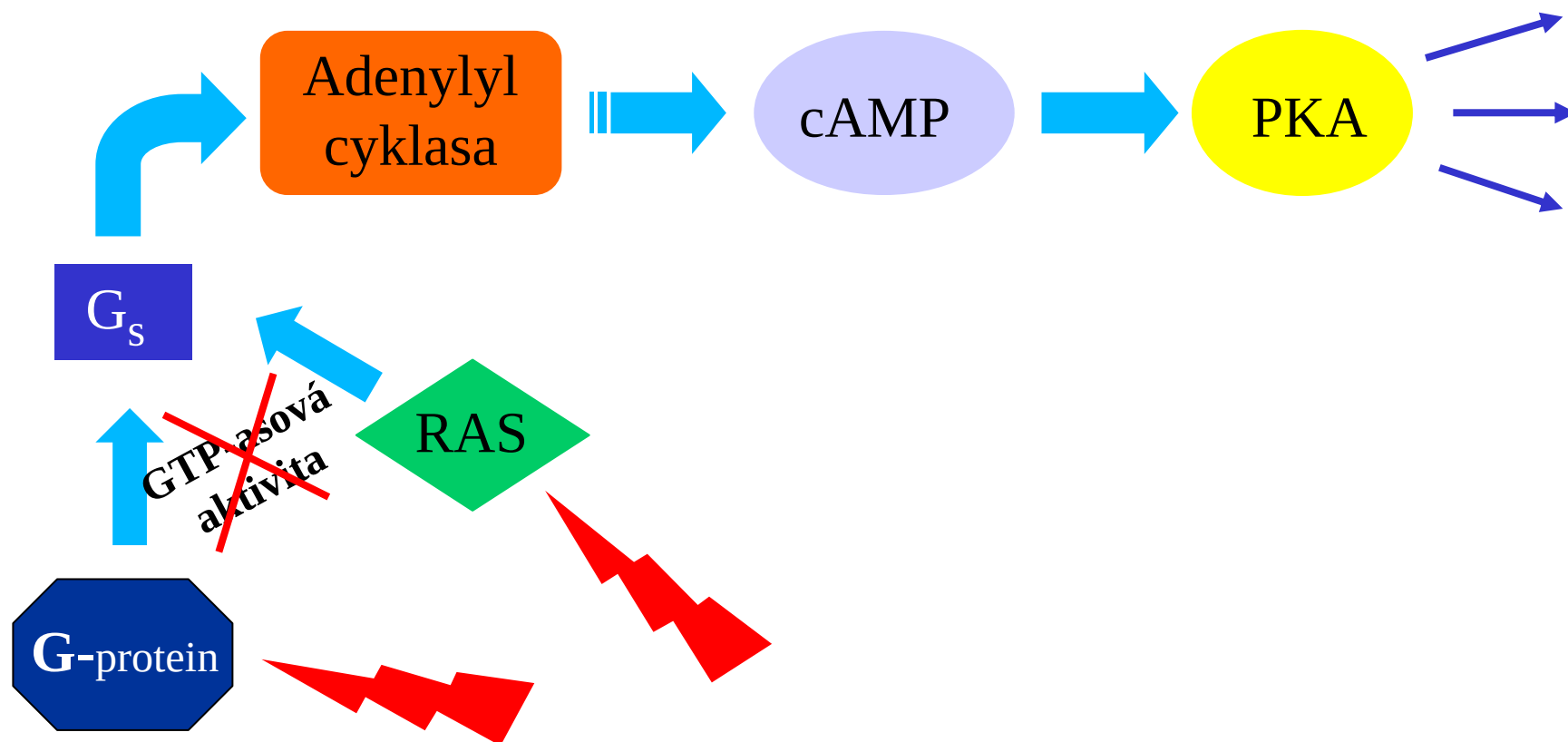
Maligní transformace buňky

Navození *transkripce onkogenů*, kódujících syntézu *onkoproteinů* zahajuje maligní transformaci buňky.



Intracelulární transducery signálu

V této třídě jsou proteiny, které, jsou-li normálním proto-onkogenem, přenášejí signál z receptoru na cílové místo v buňce. Mezi nejznámější patří *G-proteiny*.



Hormonální receptory

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

Estrogenní receptory:

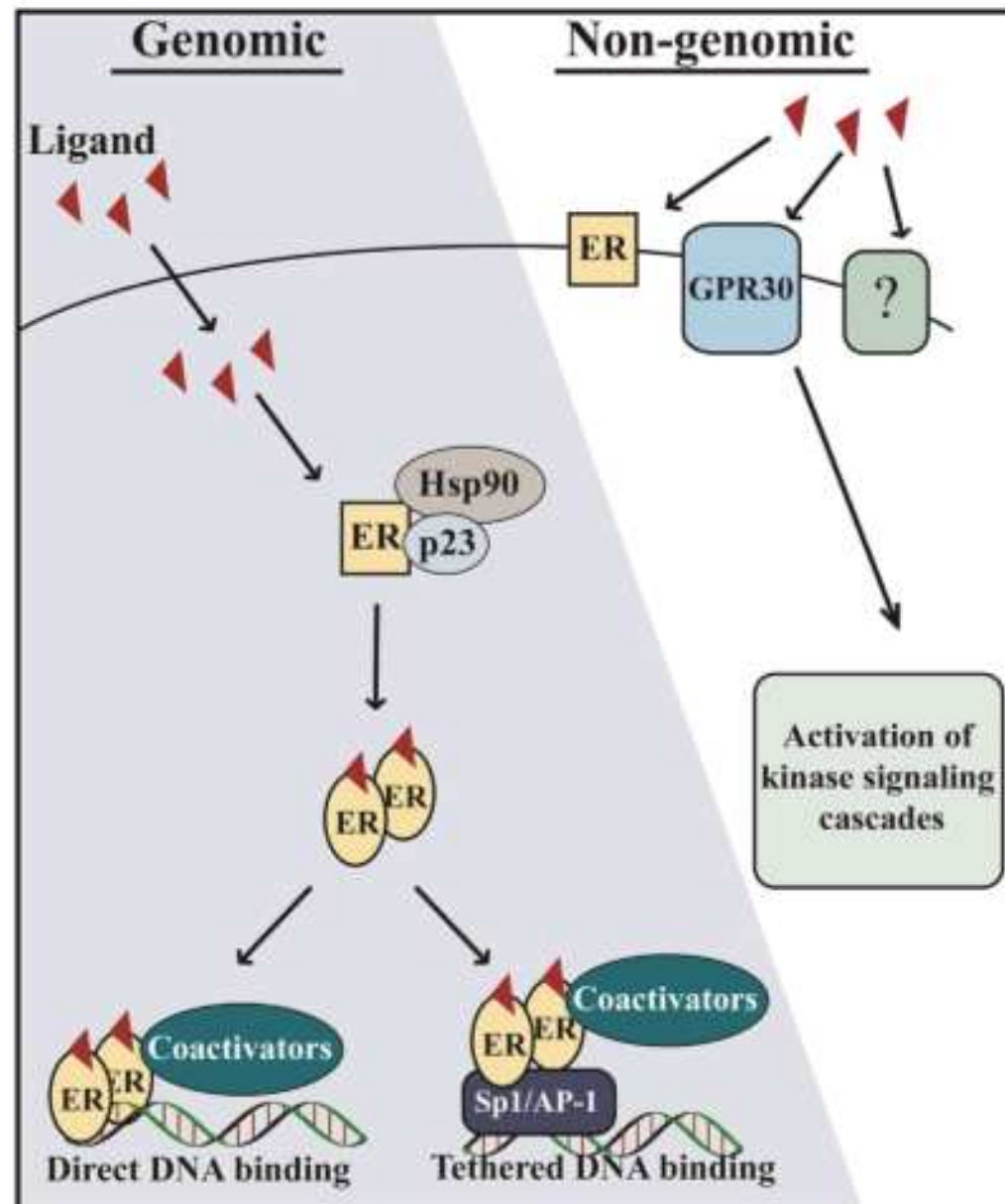
2 varianty: - G-spřážený receptor (GPR30) - syntéza PIP3
- nukleární hormonální receptor

Genomicky

vazba na ERE,
iniciace transkripce

Negenomicky

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



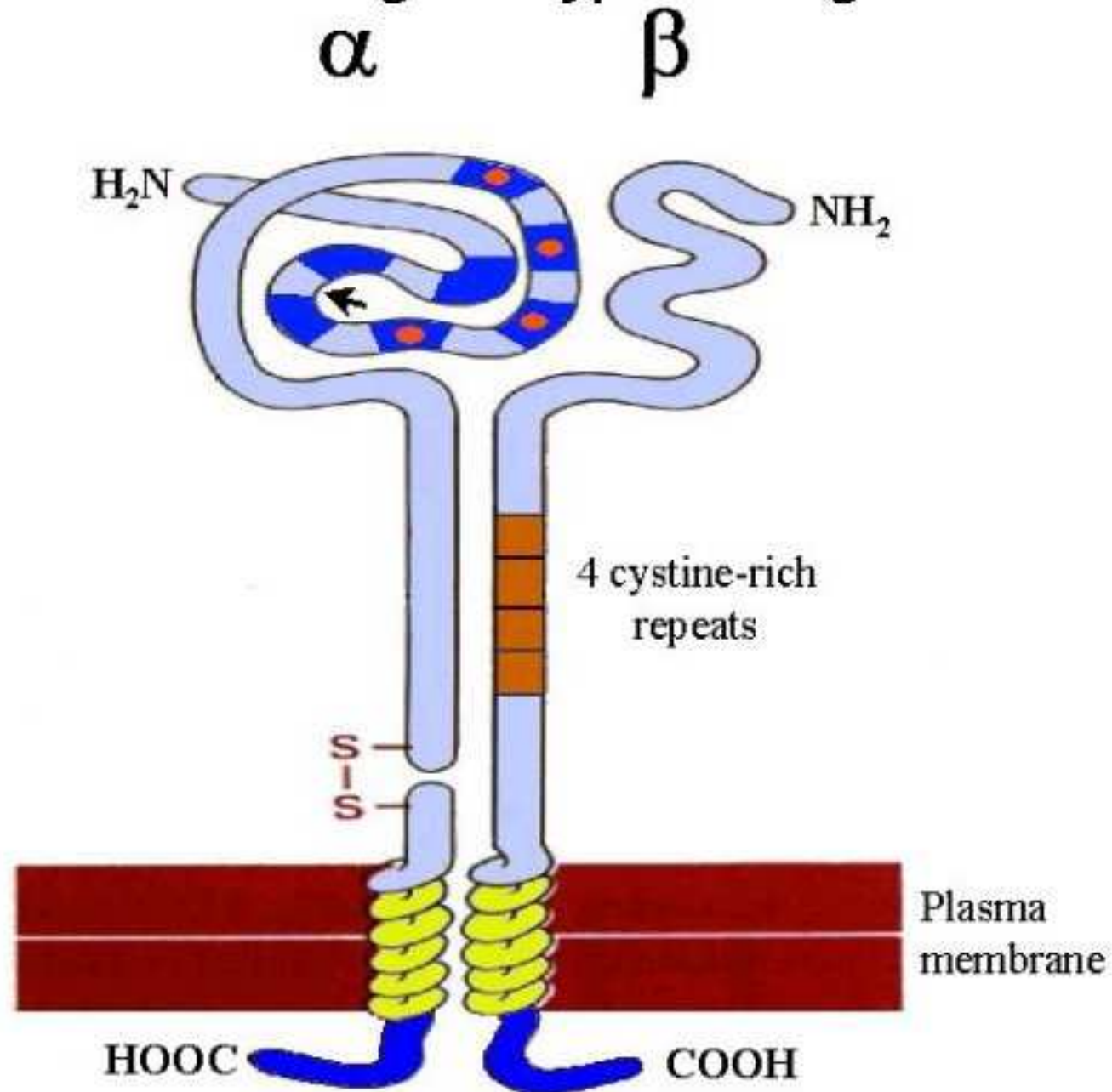
Extracelulární matrix (ECM)

- 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

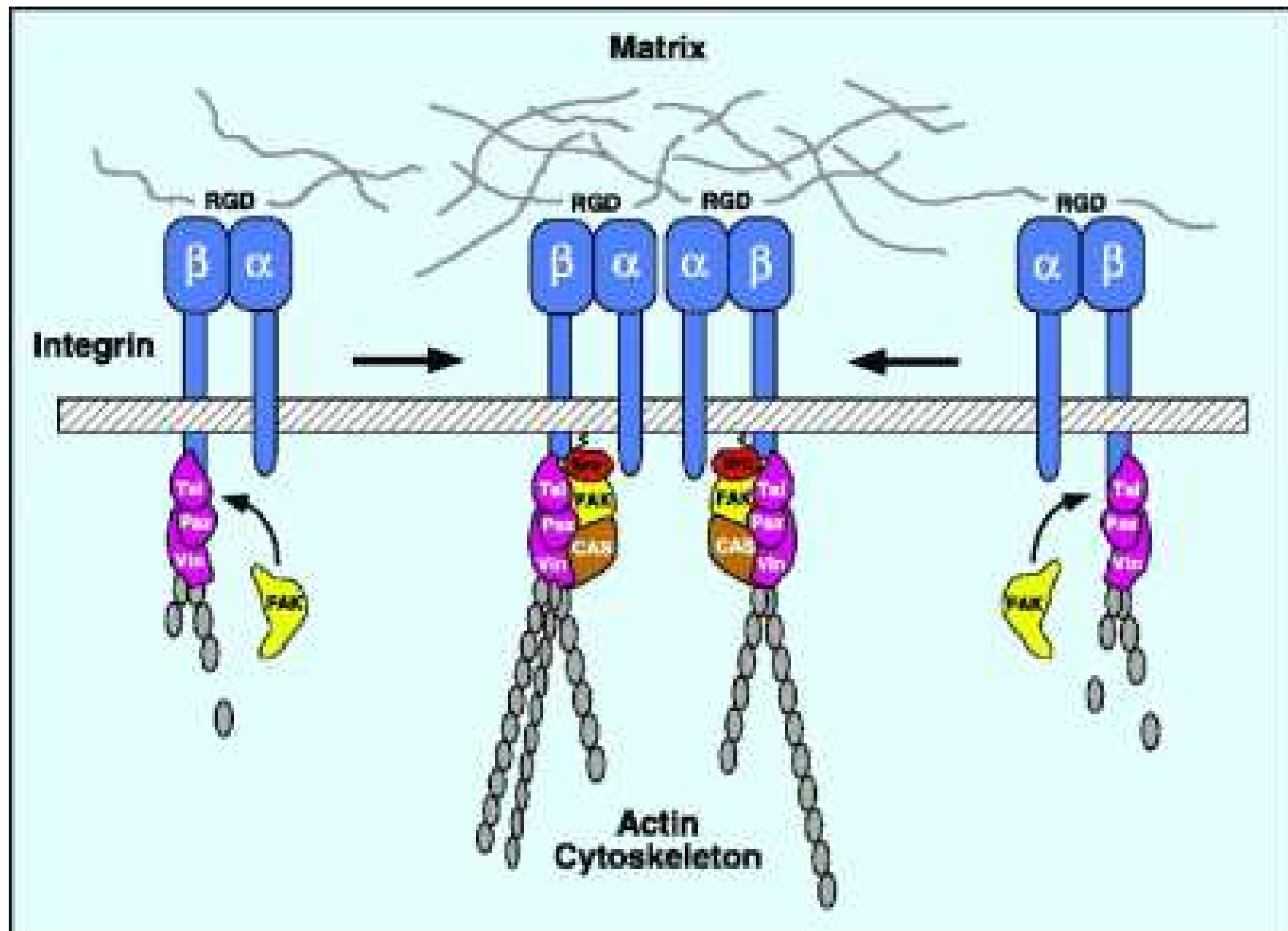
- Nepostradatelné komponenty všech Metazoi (od mořských hub po člověka)
- Členy velké rodiny transmembránových proteinů, které jsou receptory pro adhesivní sekvence molekul extracelulární matrix
- Zprostředkují přichycení buňky k ECM nebo k jiné buňce a umožňují přenos signálu (informace) mezi ECM a 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

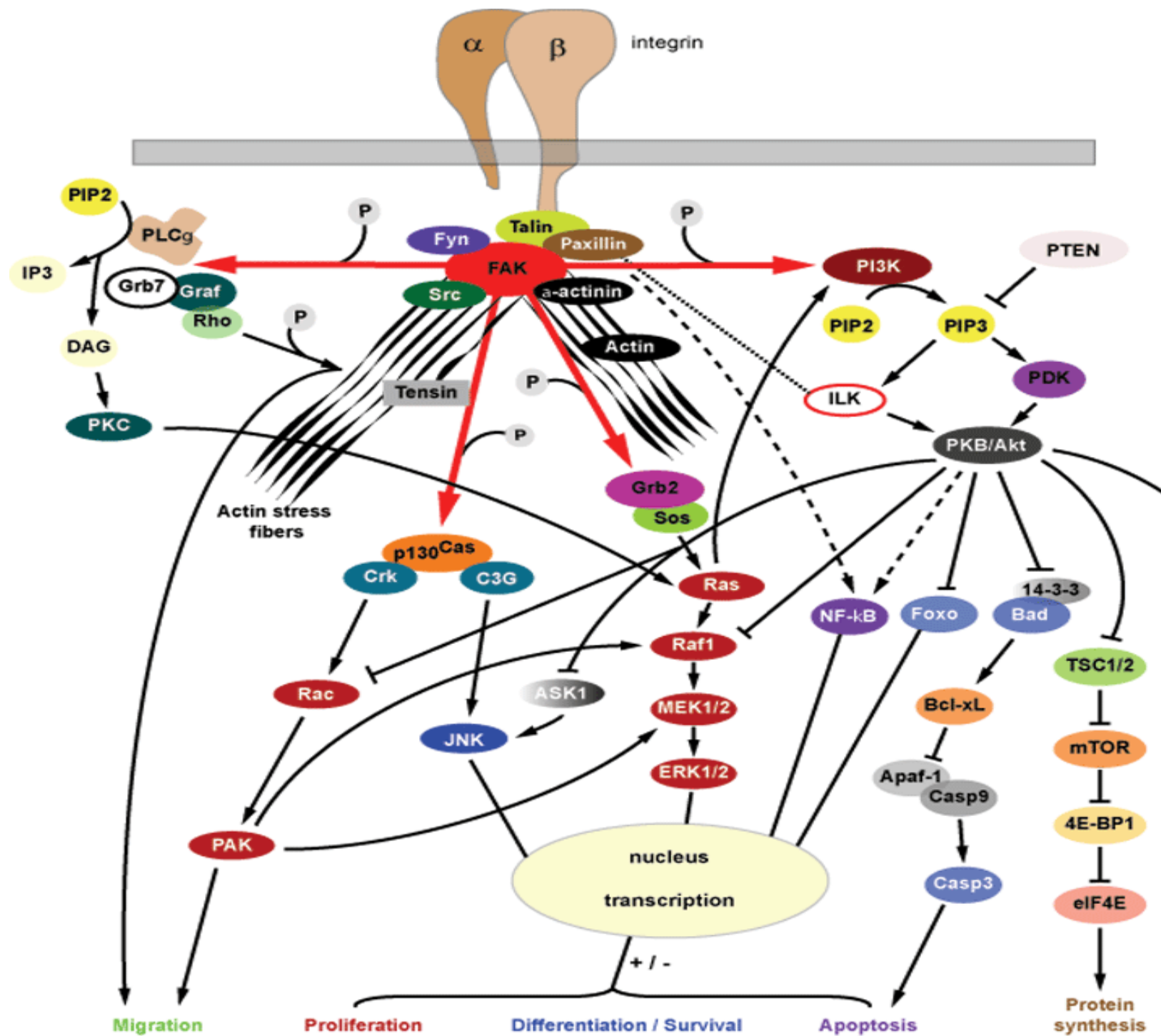
Schematic drawing of a typical integrin dimer



Outside-in signalizace

- 1) Vazba komponenty ECM (specifické sekvence) na vazné místo integrinu způsobí konformační změny v molekule integrinu
- 2) K změně konformace dochází i v cytoplasmatické části integrinu a to vyvolá následné interakce s procesy, které řídí intracelulární signální dráhy (např. aktivace cytoplasmatických TPK (FAK) a serin/threonin kinas , aktivace malých GTPas, indukce vápníkového transportu a změny v fosfolipidové syntéze)
- 3) Konformační změny vedou také k shlukování molekul integrinu v membráně (tzv. clustering) a to dále modifikuje interakce cytoplasmatických domén integrinu
- 4) Buněčný fenotyp je určován tímto typem signalisace; integriny slouží buňkám jako mechanické sensory přenášející informaci o ECM do buňky a ta dle toho modifikuje svůj cytoskeleton

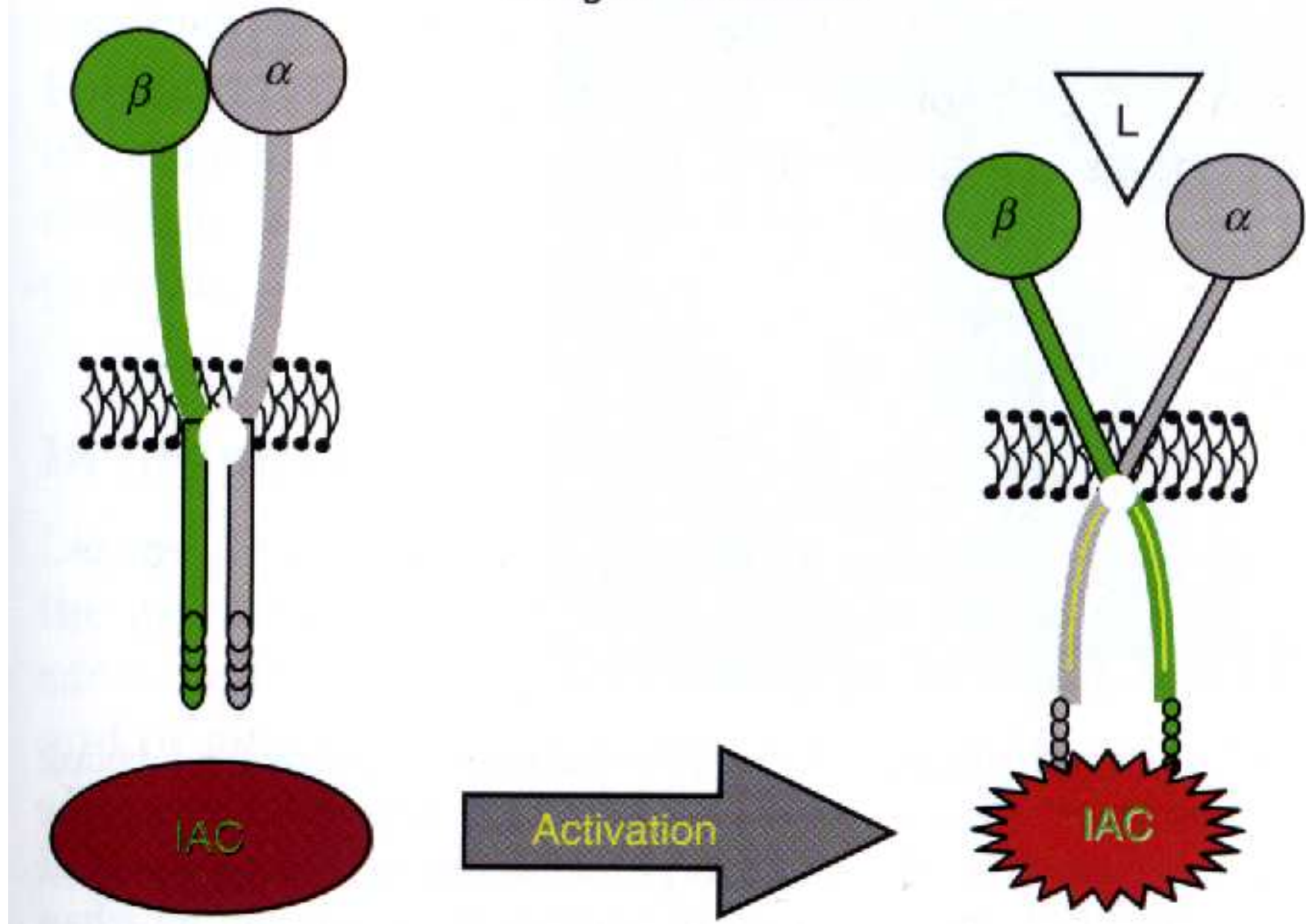




Inside-out signalizace

- Mechanismus této signalizace je založen na změně afinity receptoru (vazného místa pro ligand ECM)
- Neaktivované buňky mají integrin s nízkou afinitou
- Aktivace buněk vede k tomu, že intracelulární část molekuly integrinu se váže na integrin aktivující komplex (IAC). To vede ke konformační změně celé molekuly integrinu
- Konformační změna extracelulární části integrinu následně změní afinitu ligand vazacího místa z nízkoafinitního na vysoce afinitní
- Díky vysoce afinitnímu receptoru je více komponent vázáno přes integriny na aktivovanou buňku

Integrin "activation"



Alterace v „downstream“ signalizaci

= deregulace v procesování signálů ligand aktivovanými receptory pro růstové faktory nebo integriny

Centrální úloha: SOS-Ras-Raf-MAPK kaskádovitě mitogenní reakce ~25% všech lidských nádorů

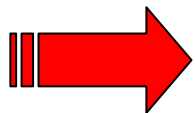
* Nejčastěji mutovaný RAS protein → strukturní změny
→ masivní indukce a přenos signálu bez předchozí stimulace receptoru ligandem

Interakce s dalšími signálními dráhami: extracelulární signály mohou ovlivňovat řadu biologických drah a vykazovat řadu efektů

* Např. RAS $\leftrightarrow$ PI3 kináza

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

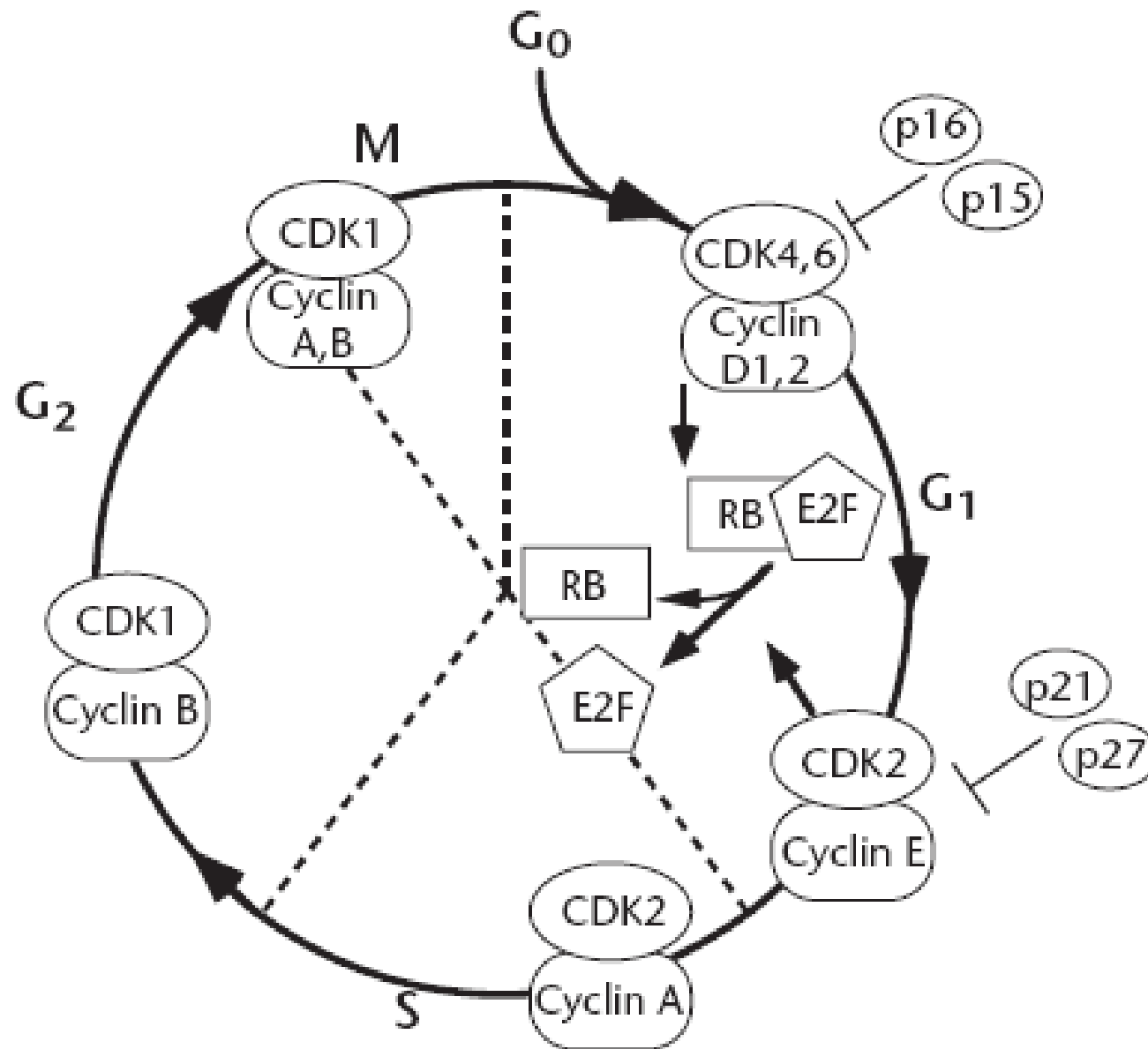
Výjimky („two hits“)

- 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

TGF β a MYC signalizace

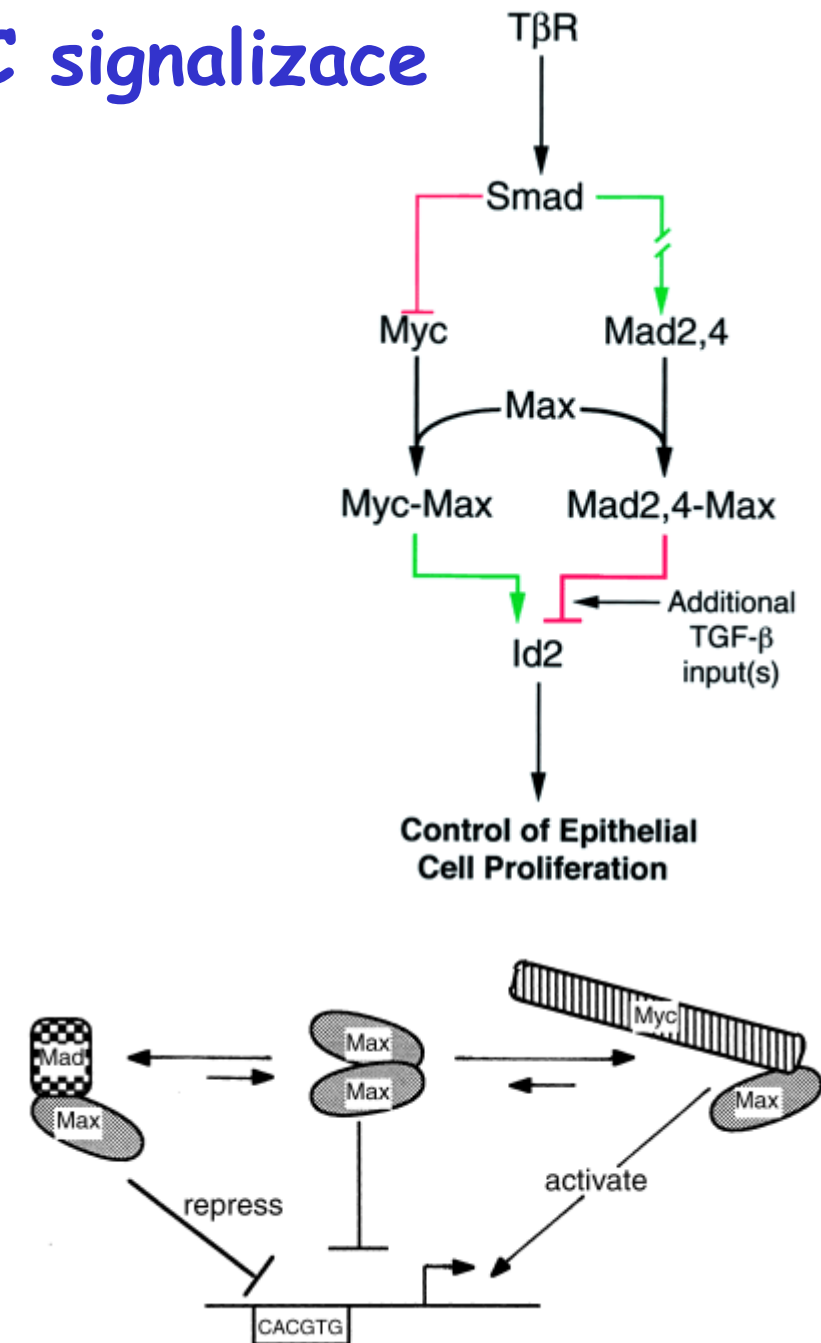
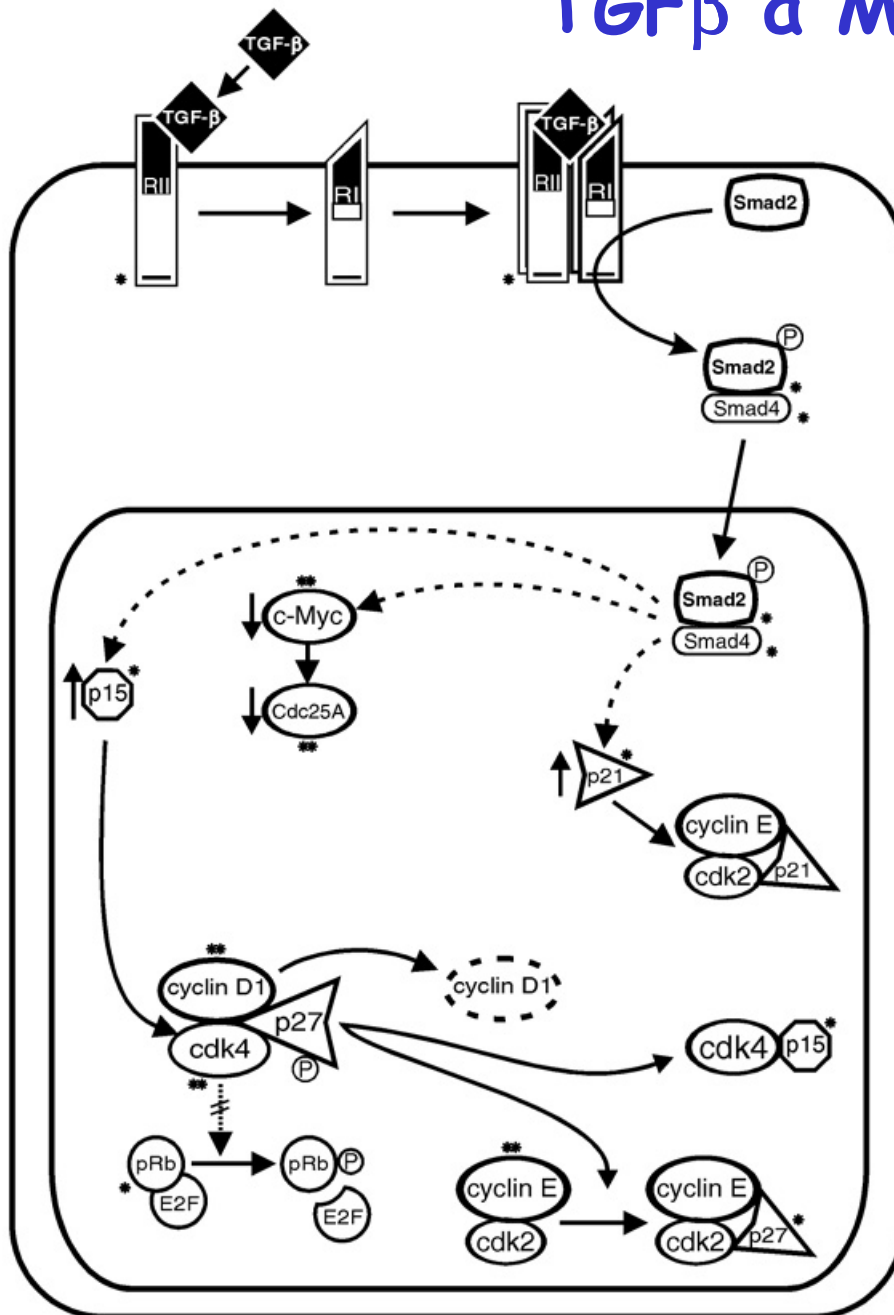
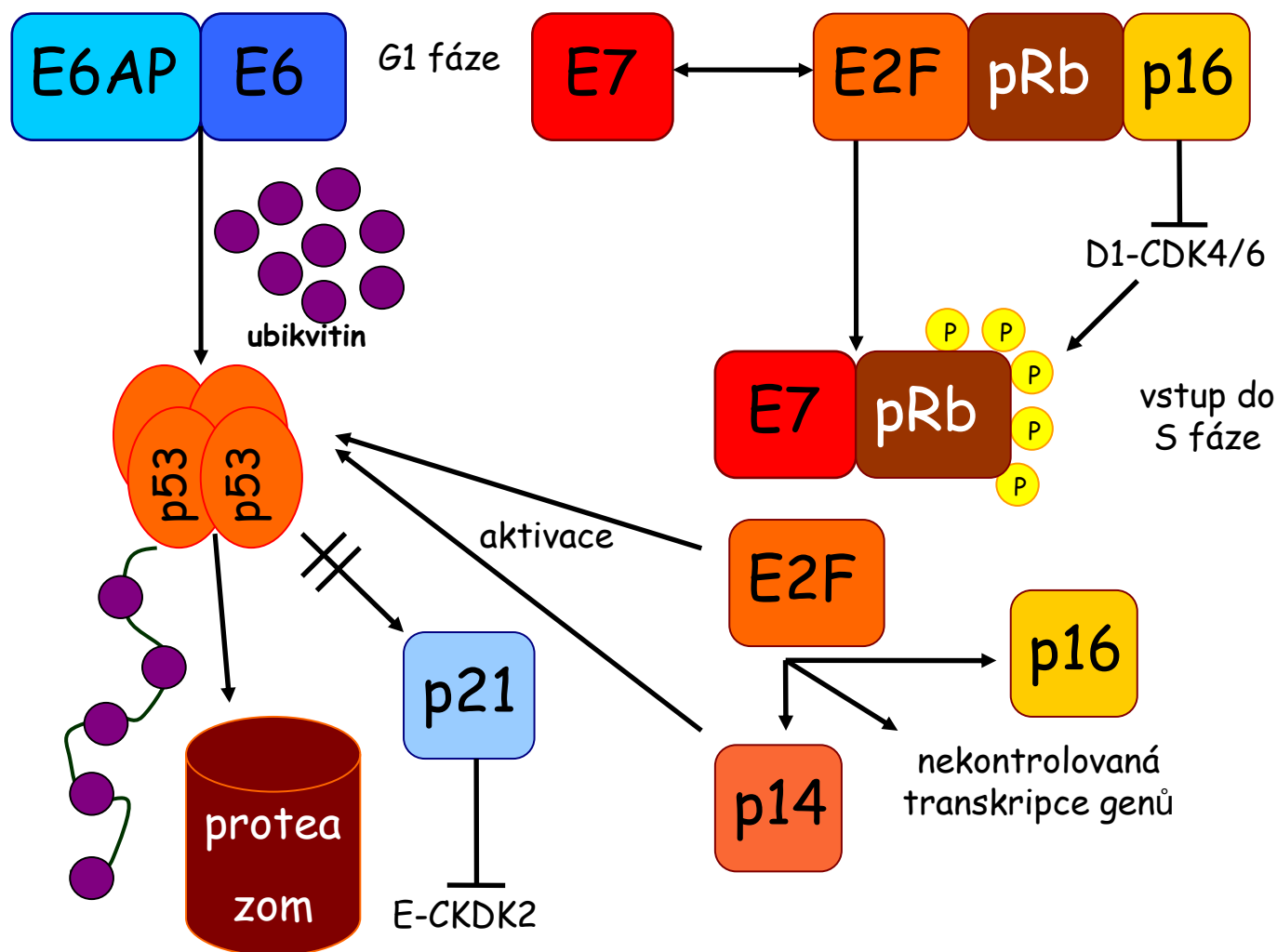


Schéma funkce proteinů E6 a E7 při infekci

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



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

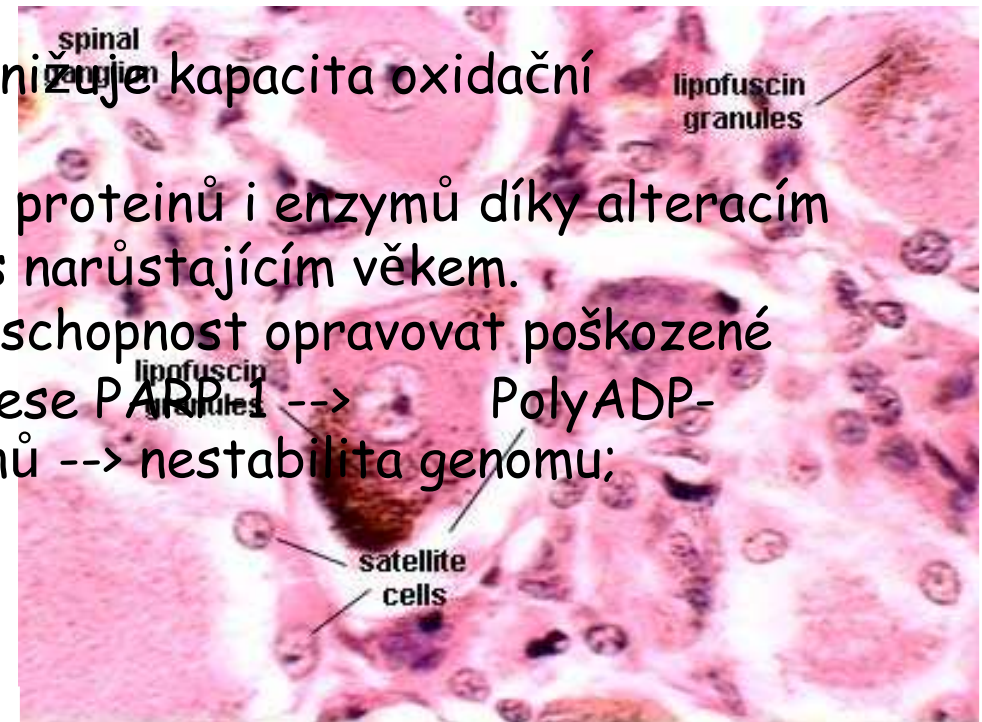
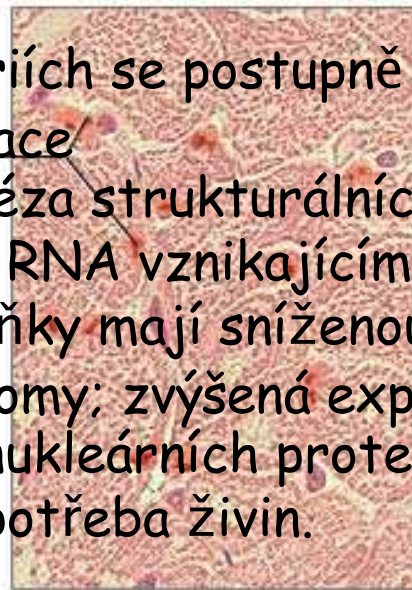
- Multifaktoriálně podmíněné děje → dlouhověkost je schopnost jedince udržet homeostázu obrannými a reparačními mechanismy
- Rychlost stárnutí je řízena
 - a) genetickou složkou - reparační mechanismy, antioxidační obrana, polymorfismy „genů dlouhověkosti“ (apolipoprotein E2, SNP192 genu kódujícího paraoxonasu)
 - 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 buňky

- Změny v morfologii buňky: Jádro se stává abnormálně laločnaté a nepravidelné, dochází k pleomorfní vakuolizaci mitochondrií, ubývá endoplasmatického retikula a Golgiho aparát se zkrucuje. V jádrech buněk se hromadí lipofuscin jako produkt reakce volných radikálů s nenasycenými mastnými kyselinami (peroxidace lipidů).



- V mitochondriích se postupně snižuje kapacita oxidační fosforylace
- Mění se syntéza strukturálních proteinů i enzymů díky alteracím v DNA a RNA vznikajícím s narůstajícím věkem.
- Stárnoucí buňky mají sníženou schopnost opravovat poškozené chromosomy; zvýšená exprese PAPP-1 --> PolyADP-ribosylace nukleárních proteinů --> nestabilita genomu;
- Snižuje se spotřeba živin.



Stárnutí buněk

Rodina Sir2-proteinů udržuje úseky chromosomů v inaktivním stavu působením na histony obklopující DNA, takže není přístupná mechanismu „čtení“. Restrikce tvorby energie prostřednictvím tvorby acetyl-CoA (tedy ze sacharidů a tuků), který aktivuje reakcí s citrátem (Krebsův oxidační cyklus), prodlužuje u experimentálních zvířat délku života.

Ztráta elasticity kůže, pomalé hojení ran a svalová atrofie souvisejí s aktivitou genu FoxM1B, umístěného na chromosomu 12. Když tento gen chybí nebo je vyřazen z funkce, DNA buňky se nemůže duplikovat, buněčný cyklus se zastavuje, buňka nemůže proliferovat, vyžrávat a zaniká. Děje se tak pravděpodobně prostřednictvím proteinu p21^{Cip1}, který aktivuje řadu procesů blokujících replikaci DNA a naopak aktivuje geny spojené s chorobami vyššího věku.

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)

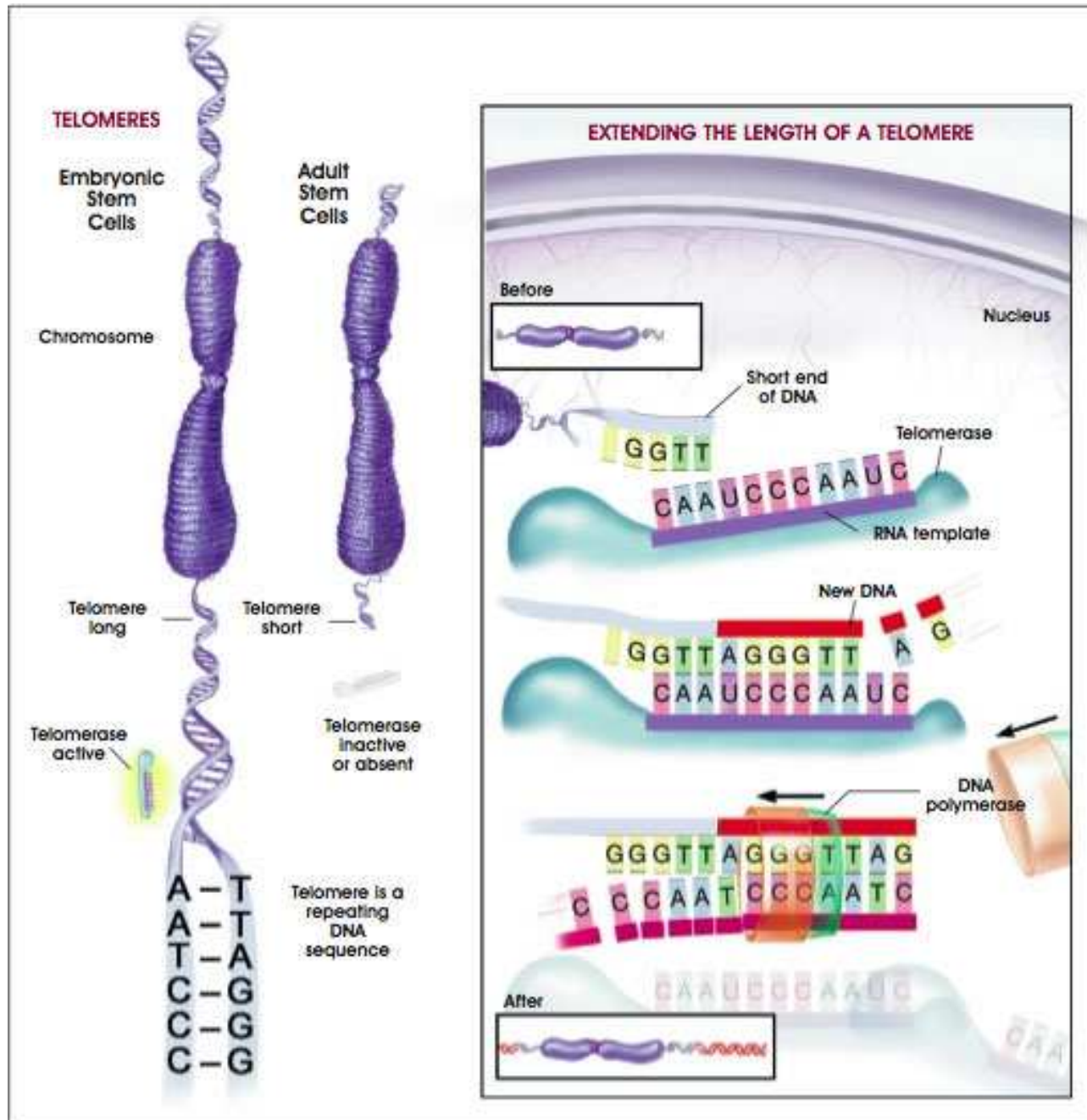
Zkracování telomer

Telomery jsou klíčovým stabilizačním faktorem terminální části chromosomu a ukotvují je k nukleární matrix. Délka telomer se zmenšuje po mnohonásobných pasážích a především pak v buněčných kulturách od pacientů v pokročilém věku. Nejdelší jsou u spermií; u buněk fetálních jsou delší než u buněk z dospělých jedinců.

Jejich obnovování je katalyzováno *telomerázou*; délka telomer koreluje s obsahem telomeráz. Z toho důvodu se předpokládá, že úbytek DNA od konce chromosomů zkracováním telomerů vede k delecí nezbytných genů, což má za následek omezení života buněk.

Aktivita telomerasy souvisí s funkcí a proliferační aktivitou buněk, upravuje například délku telomer v embryonálních buňkách, v buňkách obnovujících se tkáně (v lymfocytech, hematopoietických kmenových buňkách, bazálních buňkách epidermis, v zárodečných buňkách dospělých mužů atp.) Aktivita telomerázy mizí v diferencovaných somatických buňkách.

ALT (alternative lengthening of telomeres)
mechanismus založený na homologní rekombinaci částí chromosomů



Senescence

