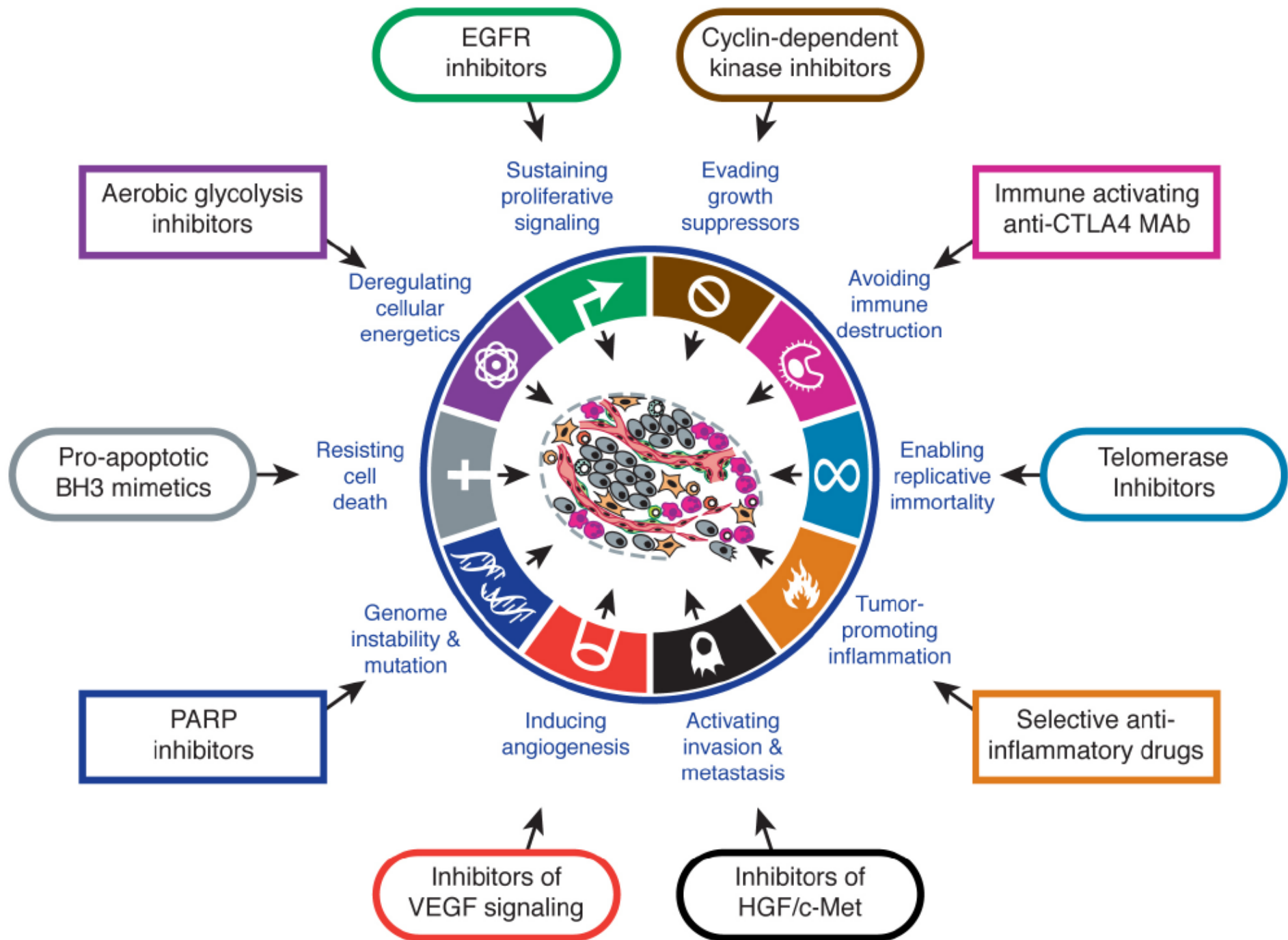




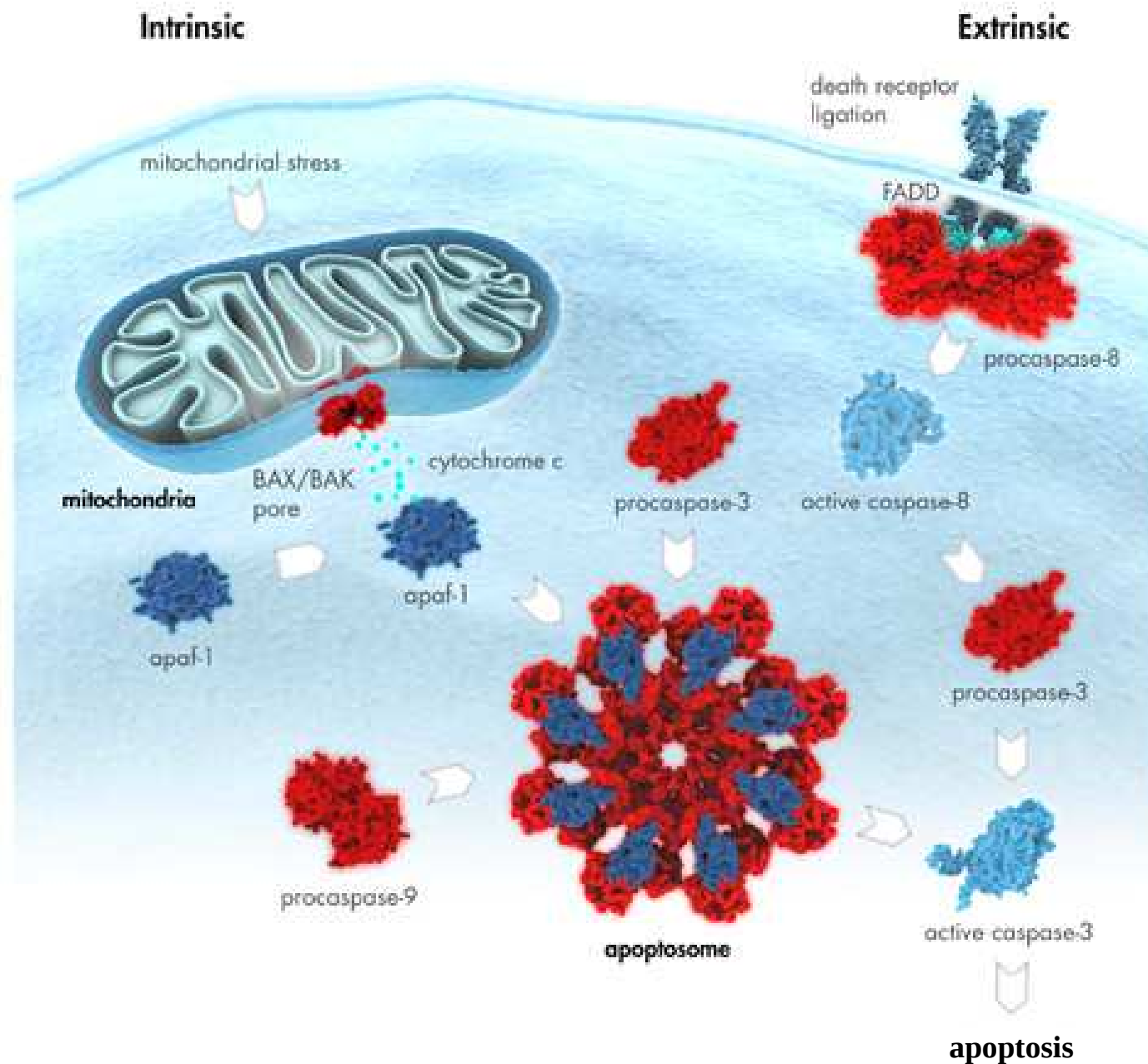
## 4. Apoptóza

Fyziologický proces udržující rovnováhu mezi buněčným růstem a smrtí buněk

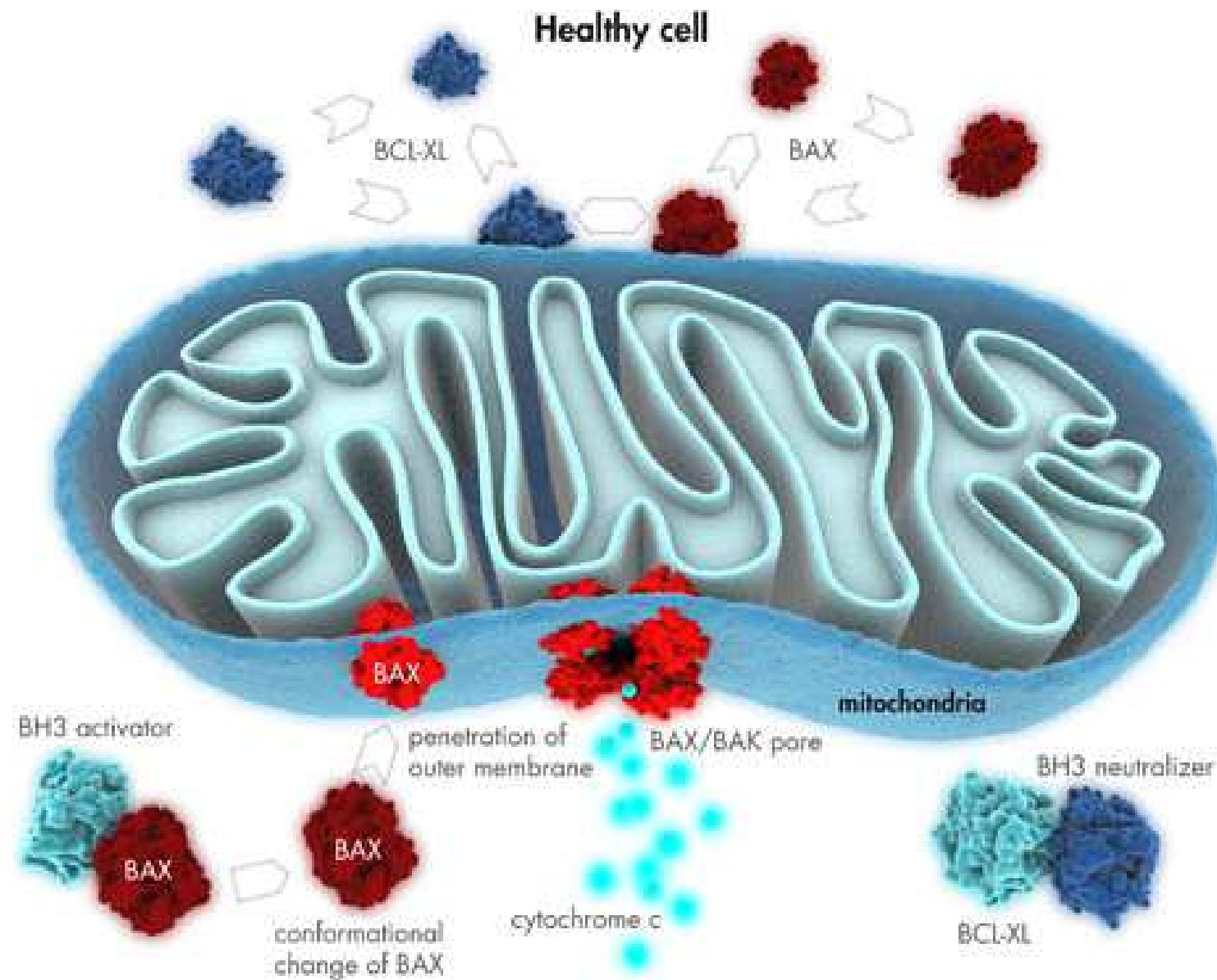
Kaskáda reakcí cysteinových proteáz (kaspázy), vazba na tzv. substráty smrti (proteiny cytoskeletu, proteiny řídící opravu DNA, proteiny zabráňující apoptóze apod., štěpení DNA cca 180bp). V konečném důsledku morfologické změny - srašťování buněk, apoptotická tělíska  
→ fagocytóza

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

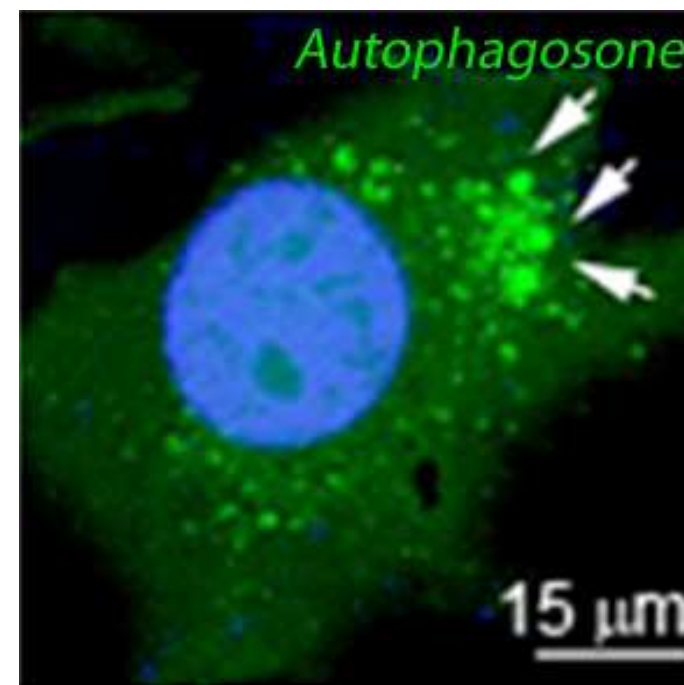
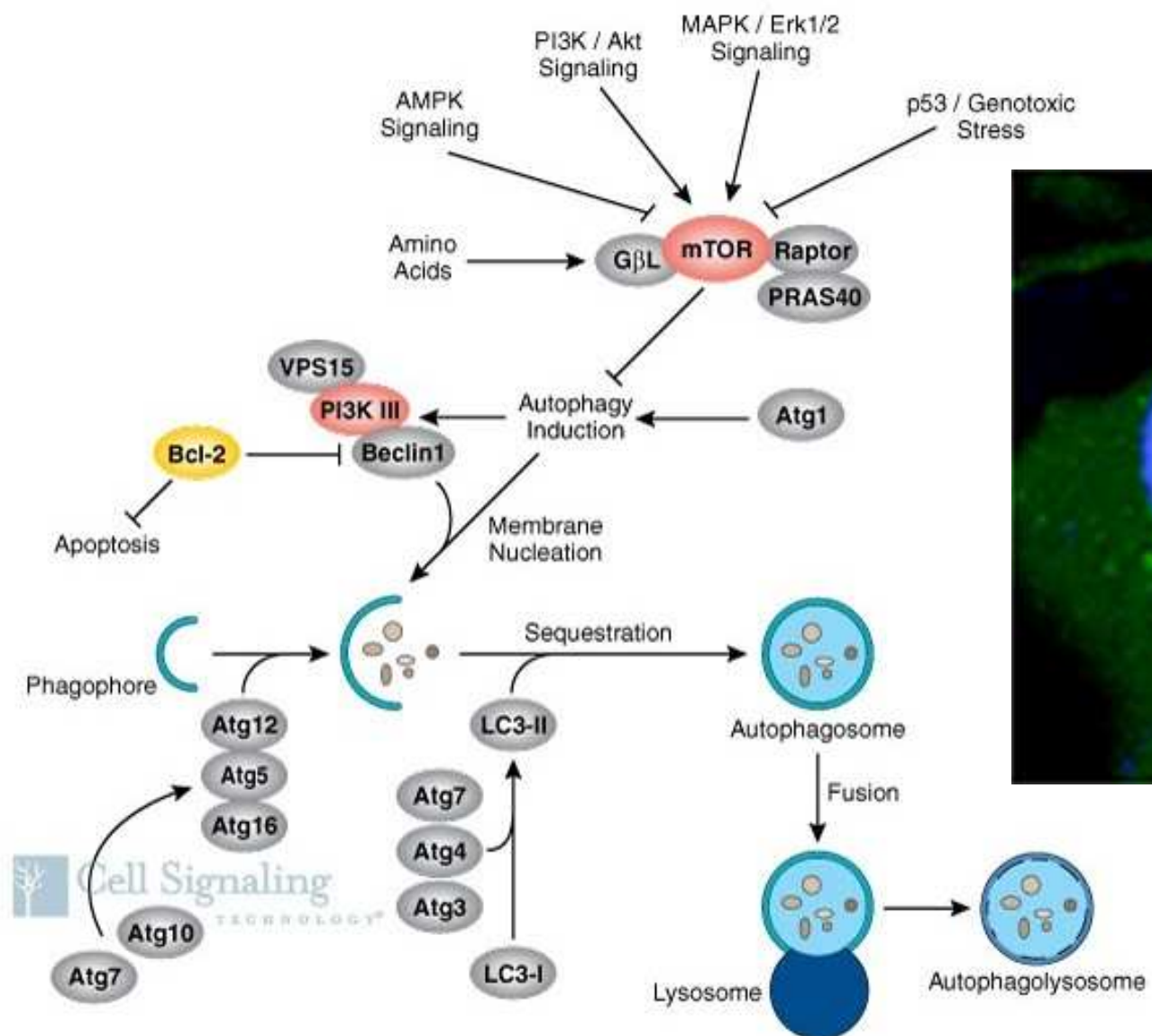
# Apoptotic pathways



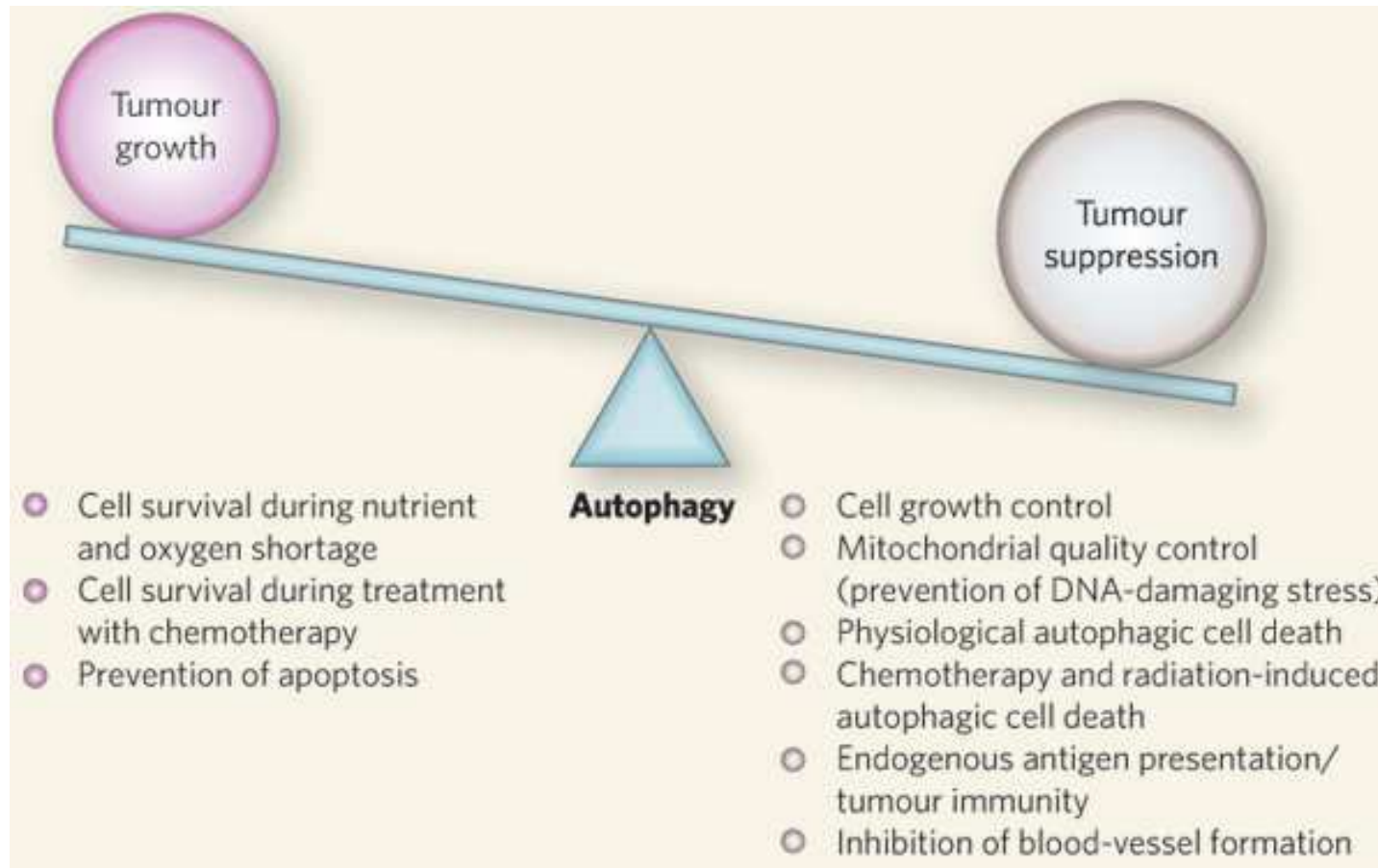
## Regulation of mitochondrial apoptosis



### Induction of apoptosis



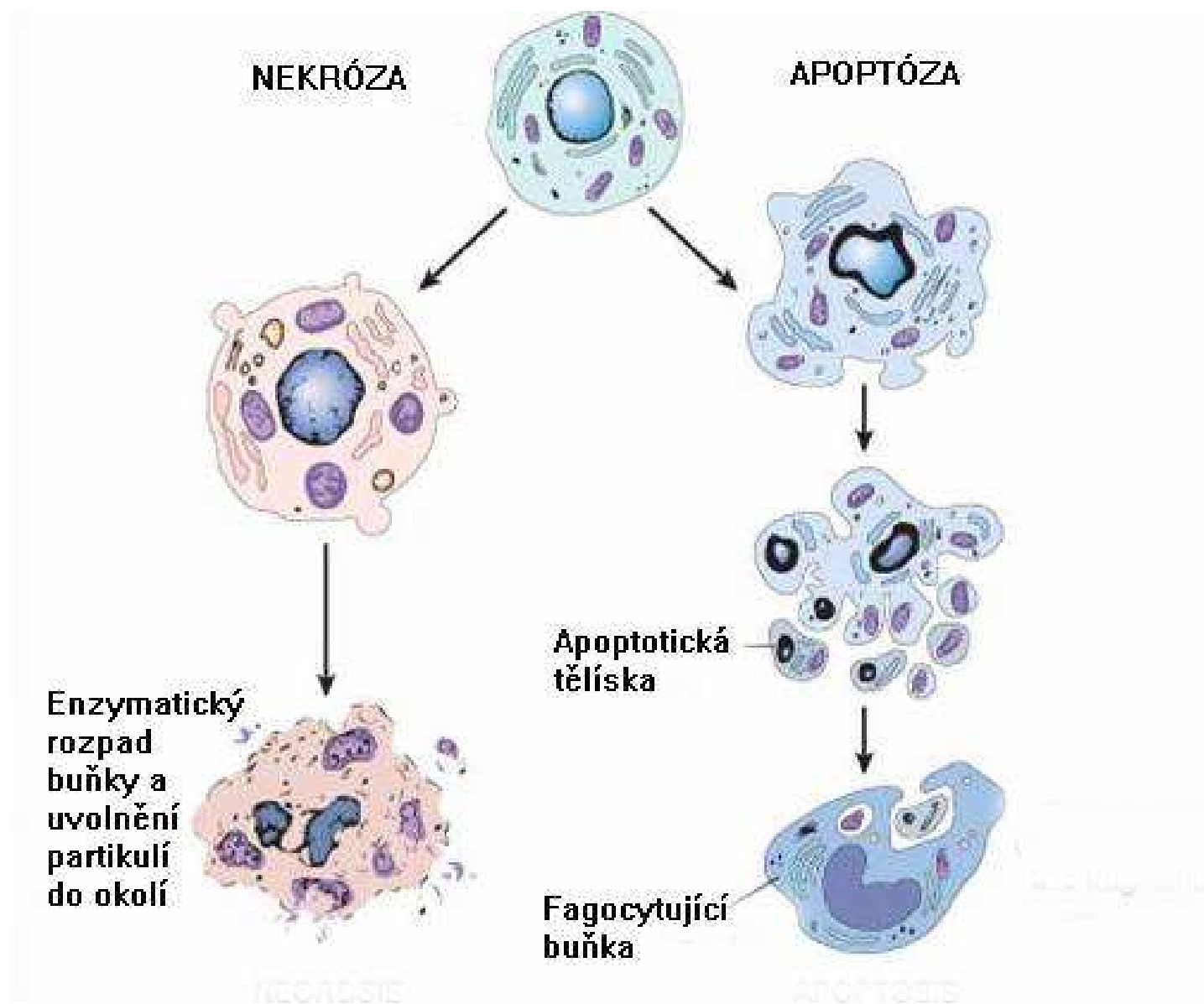
# Autofágie



cytoprotektivní  
mechanismus  
(rezistence k terapii)

X

odstranění poškozených  
organel, redukce chrom.  
nestability



# Objevení proteinu p53

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

© Macmillan Journals Ltd., 1979

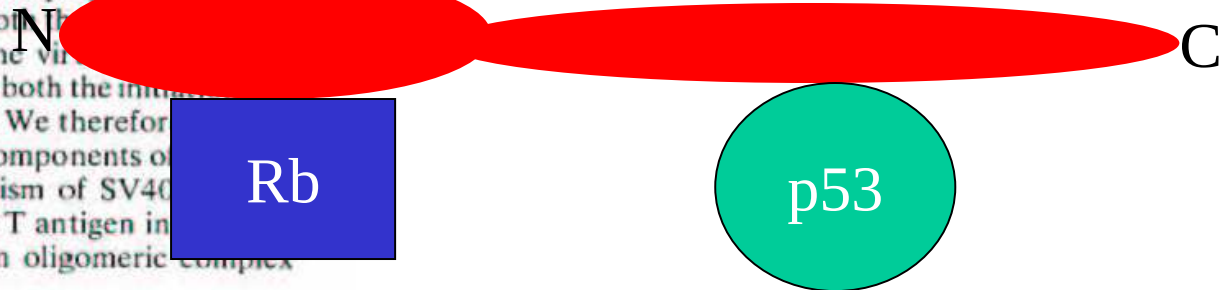
## T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells

THE early region of the small DNA tumour virus, simian virus 40 (SV40), is known to code for at least two polypeptides, the T antigens ('small t' and 'large T'). Both are expressed in cells transformed by the virus.



essential for both the initiation and maintenance of the transformed state<sup>5-9</sup>. We therefore have been interested in the mechanism of SV40 transformation. Here we show that the T antigen in SV40-transformed cells forms an oligomeric complex with a host protein. This protein is identified as the product of the Rb gene. SV40-transformed mouse cell line initiated by as little as 1 ul of a rabbit

velký T antigen



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.**

# Proteiny onkogenních DNA virů inaktivují nádorové supresorové proteiny p53 a Rb

## Podobnosti a rozdíly:

- Váží p53 odlišným způsobem
  - a) T a E1b **stabilizují**, ale inaktivují
  - b) E6 způsobuje degradaci ?
- Všechny váží pRb pomocí stejného peptidového sekvenčního motivu

# 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,<sup>1</sup> P. W. HINDS,<sup>1</sup> T.-H. TAN,<sup>1</sup> D. ELIYAHU,<sup>2</sup> M. OREN,<sup>2</sup> AND A. J. LEVINE<sup>1\*</sup>

Department of Molecular Biology, Princeton University, Princeton, New Jersey 08544,<sup>1</sup> and Weizmann Institute of Science, Rehovot 76,100, Israel<sup>2</sup>

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 cells, two populations of p53 proteins were detected, PAb246<sup>+</sup> and PAb246<sup>-</sup> p53 proteins, respectively. The PAb246<sup>-</sup> p53 protein had a half-life 4- to 20-fold longer than free p53 (PAb246<sup>+</sup>). This suggests that the hsc70-p53 complex is involved 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 a *ras* cDNA. A single amino acid substitution at residue 132, which, when mutated, can activate the p53 cDNA. These studies have identified a region by which a wild-type sequence is and whether a wild-type p53 gene c

### REVIEW

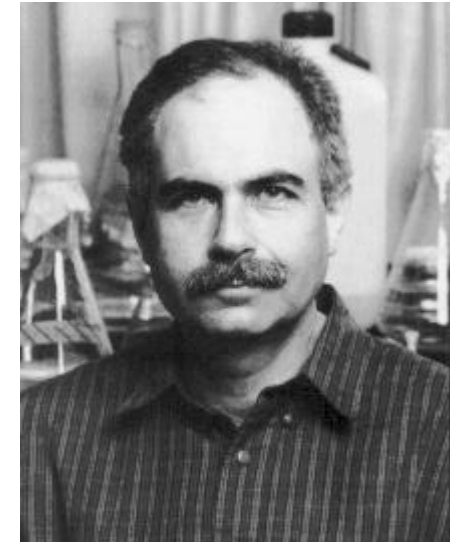
## p53: oncogene or anti-oncogene? 1990

David P. Lane<sup>1</sup> and Sam Benchimol<sup>2</sup>

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

*The products of two groups of DNA tumor viruses bind 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

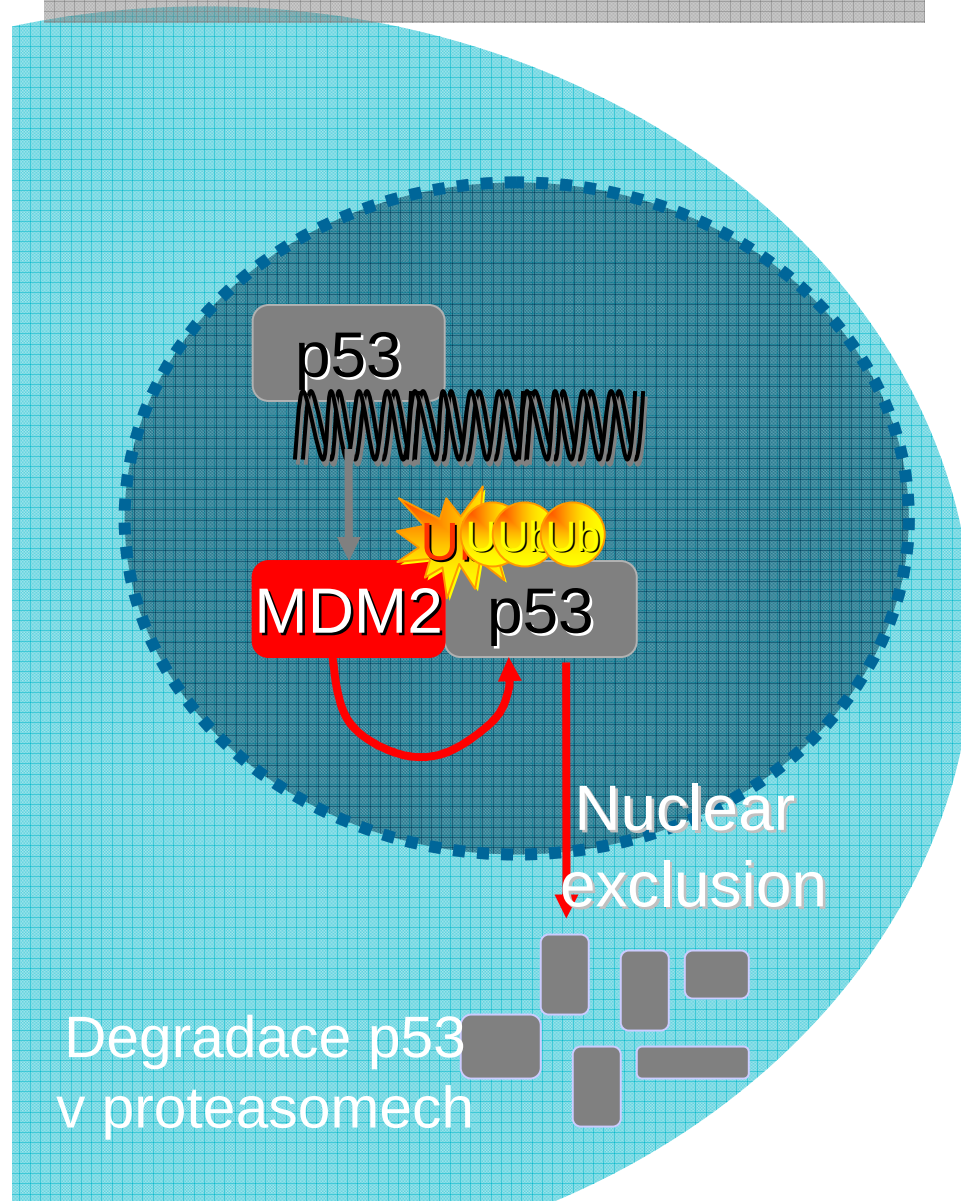
Gen leží na chromozomu 17 (17p13) a má 11 exonů (z nichž první se nepřekládá).

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

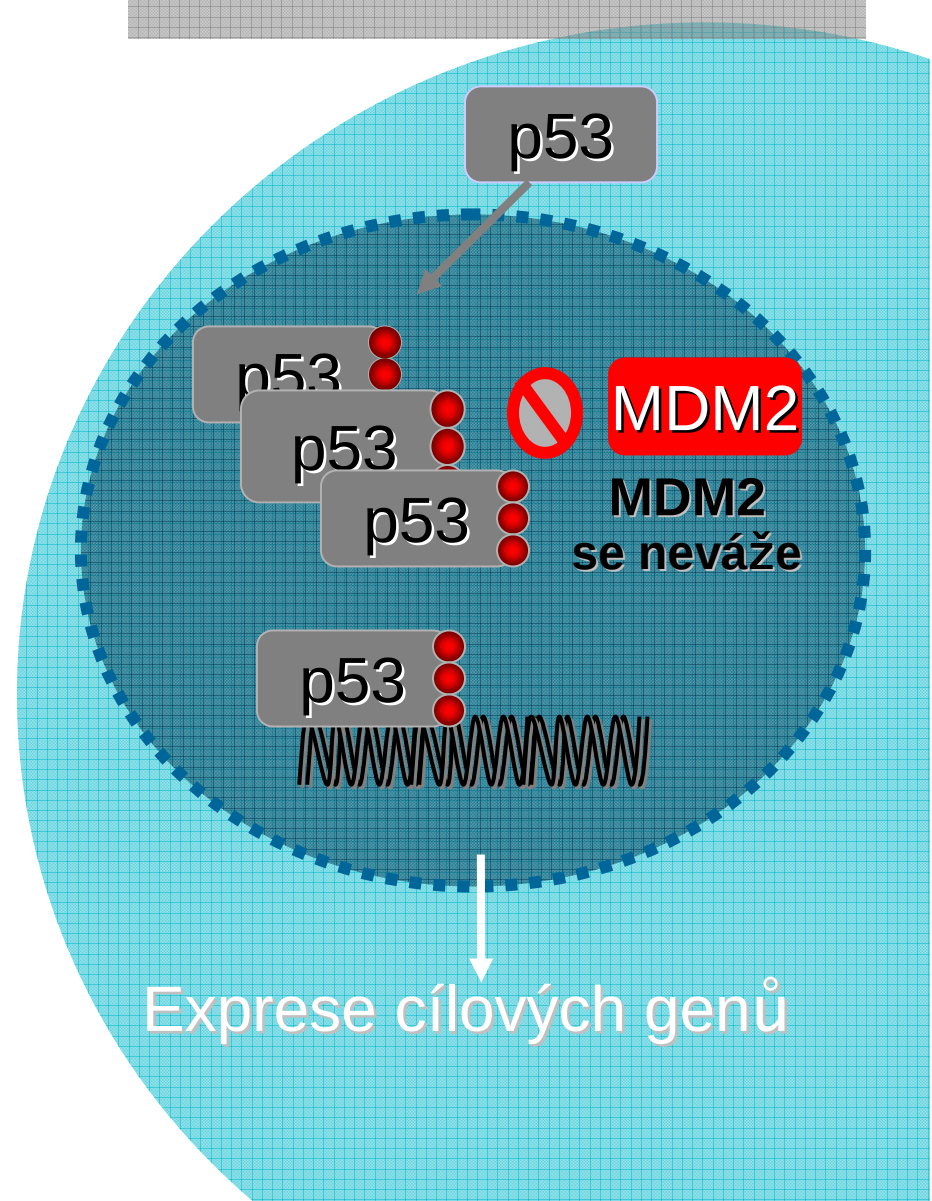
## Fyziologické podmínky

Nízká hladina p53 v jádře

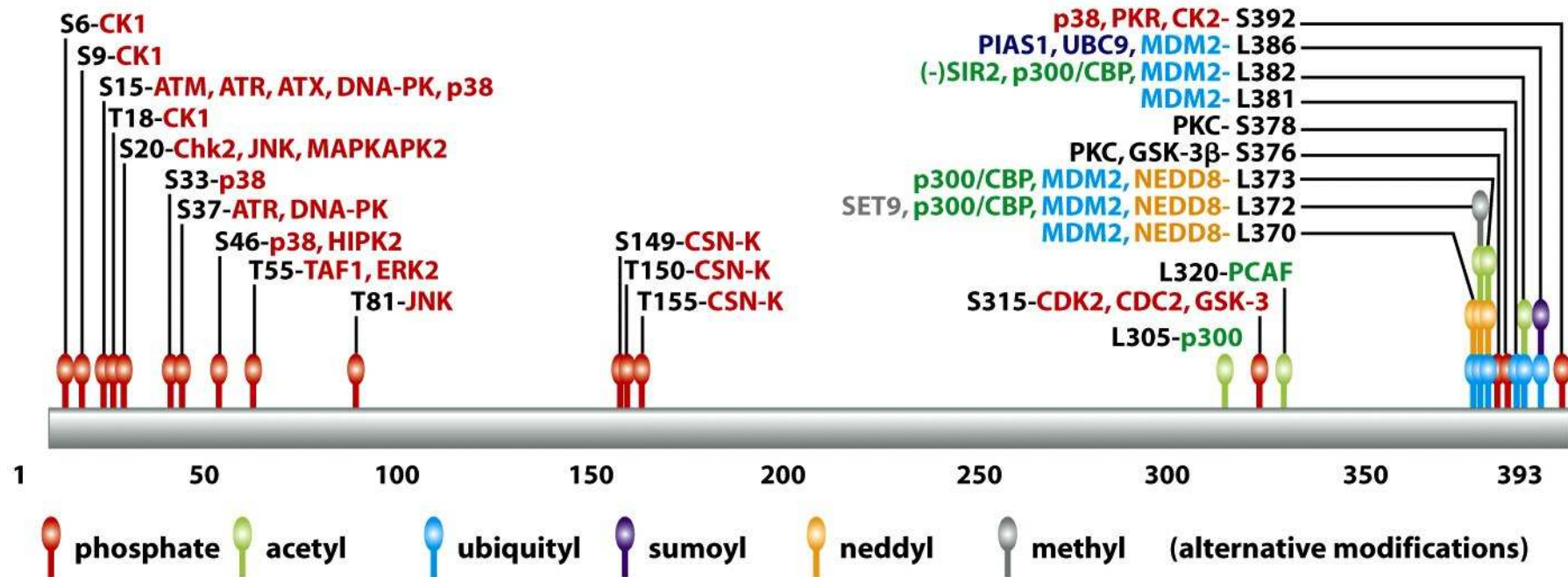


## Stresové podmínky

Zvýšení hladiny p53



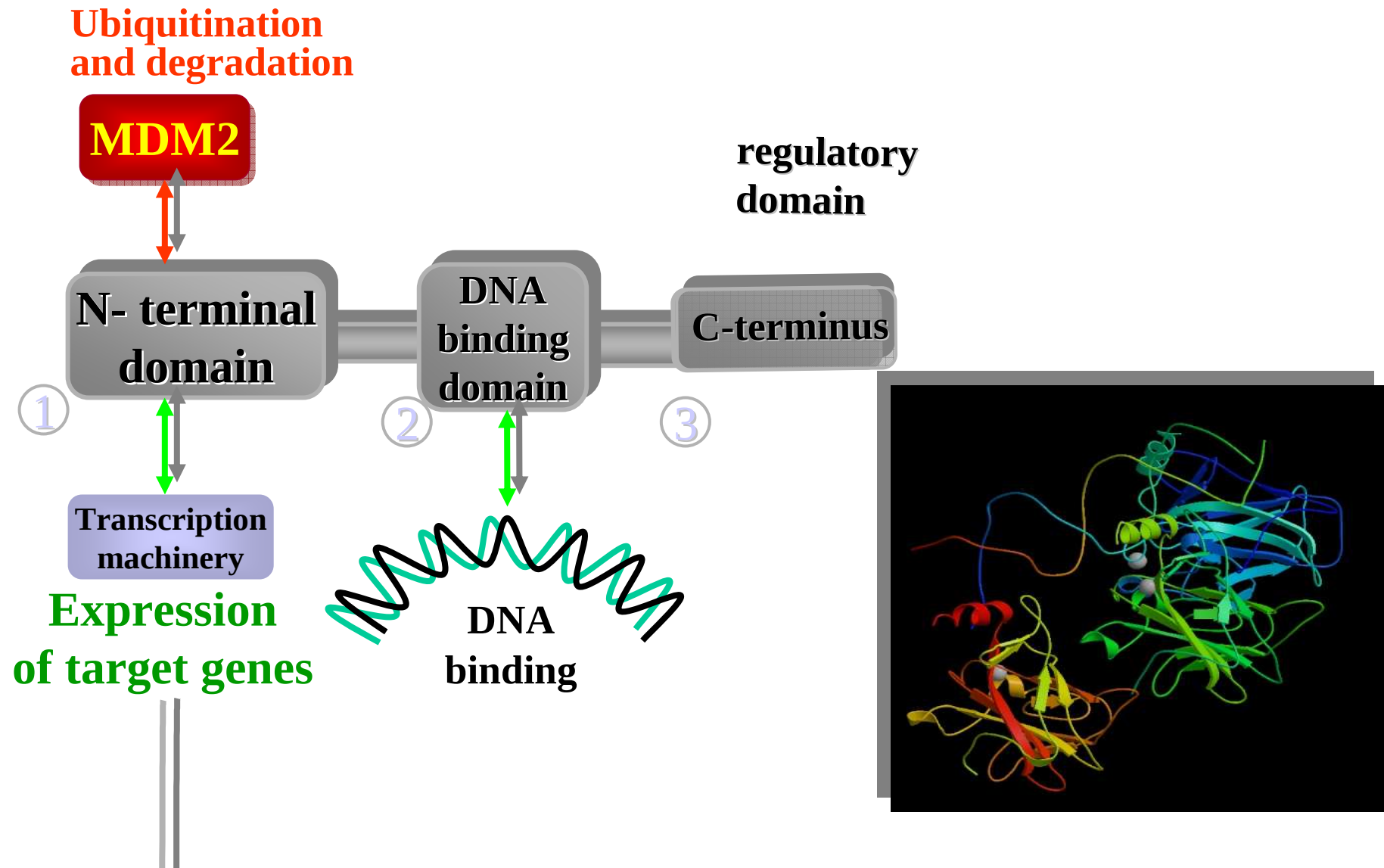
# Posttranslační modifikace p53



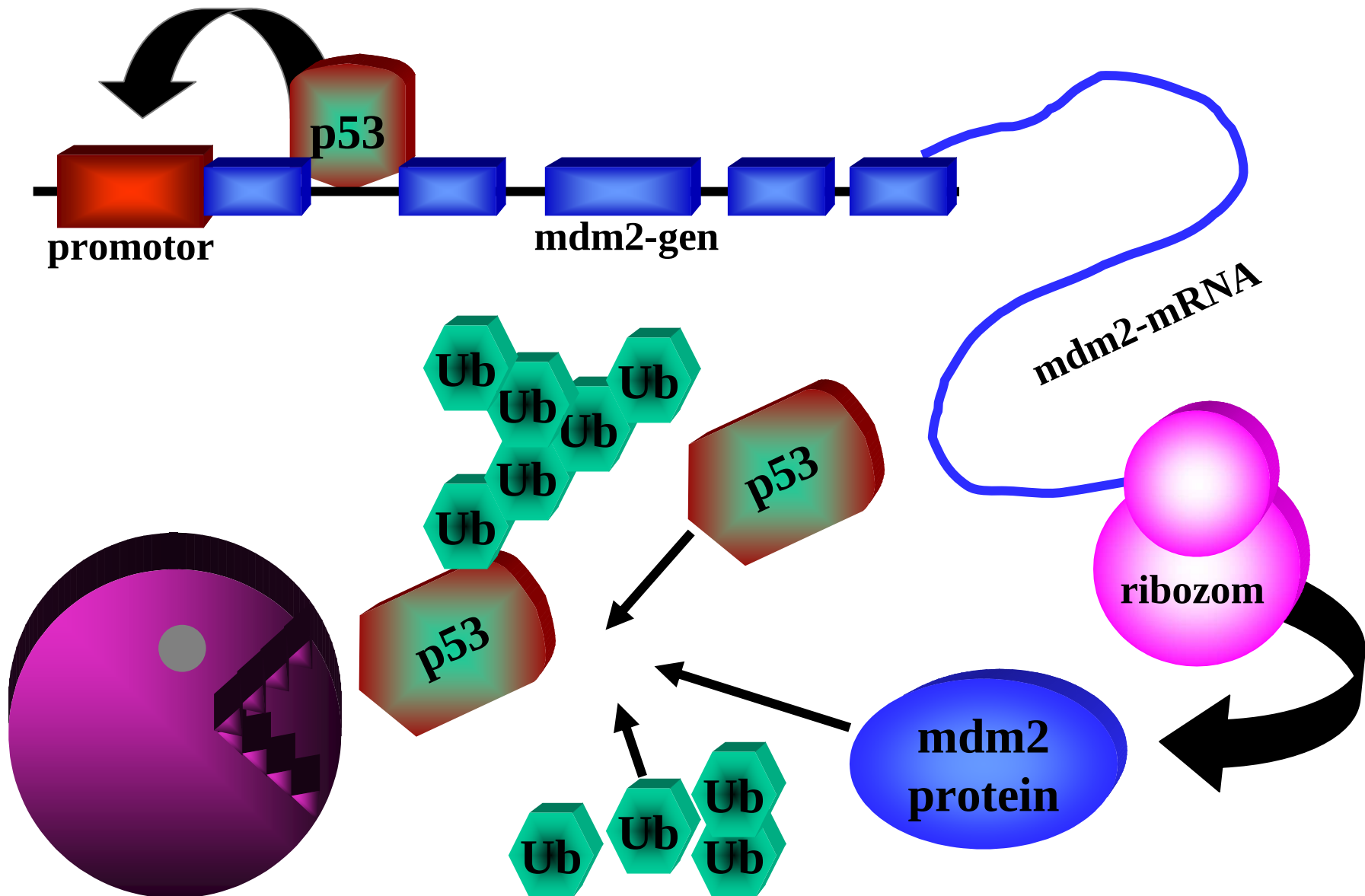
Posttranslační modifikace souvisejí s regulací aktivity a také stability p53.



# Struktura proteinu p53



# Regulate stability p53



# Regulace vazby p53 - MDM2

- p53 interaguje s MDM2 malou doménou na N-konci.
- Interakce může být znemožněna fosforylací p53 v této oblasti.
- p53 je fosforylován jako odpověď na buněčný stres (poškození DNA, hypoxie, ...) kinázami: **Chk1**, **Chk2**, **ATM** a **ATR**, JNK, Polo-like kinase,...

Buňky s mutacemi v ATM a Chk2 mají poškozenou schopnost stabilizovat p53!

Vrozená heterozygotní mutace v genu **Chk2** („G2 checkpoint kinase“) byla detekována u LFS!!

- Různé stresy vedou k různým spektrům fosforylací na p53.

## Kdo např. přispívá ke stabilizaci p53?

- c-Abl**: podílí se na stabilizaci - váže se na p53 a znemožňuje ubikvitinaci
- HIF1 $\alpha$**  („hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$ “): stabilizuje a aktivuje p53 - souvislost s vývojem nádorů!
- ARF (p14<sup>ARF</sup>)** - inhibuje MDM2 - stabilizuje p53 - jako odpověď na deregulovanou aktivitu řady onkogenů
- např. vysoká hladina volného  $\beta$ -kateninu vede ke stabilizaci p53 přes ARF: v počátečních stádiích vývoje kolorektálních karcinomů bývá ještě funkční p53, ale hypermetetylovaný promotor genu pro ARF;

# Regulace buněčné lokalizace p53

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

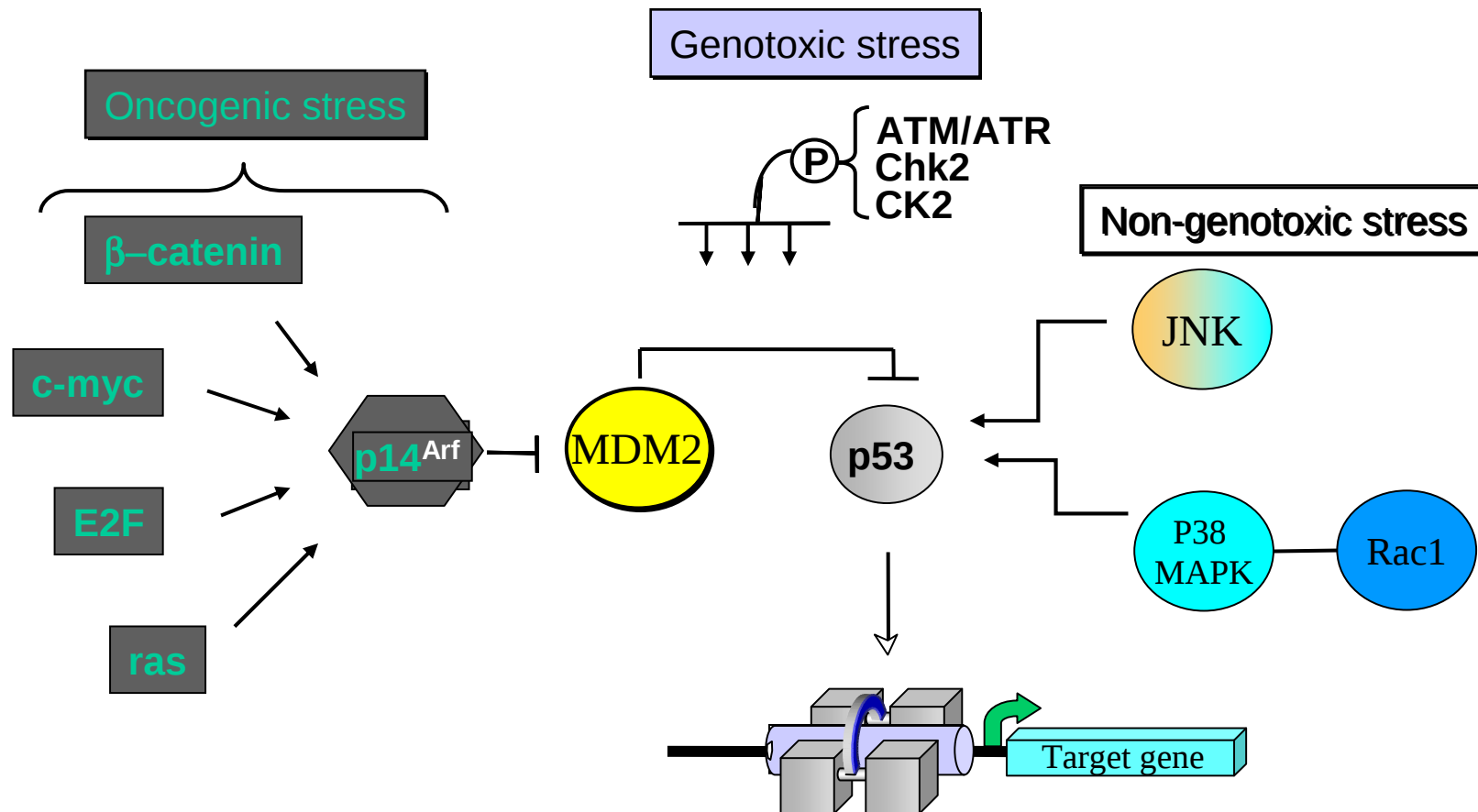
p53 má dvě sekvence pro export **z jádra** - **NES**: v oligomerizační doméně (ve funkčním tetrameru odstíněno) a na N-konci v MDM2 vazebné doméně. Export z jádra je výrazně potencován vazbou MDM2 (i když vazba MDM2 není podmínkou) a také ovlivněn fosforylací v dané oblasti: fosforylace vyvolaná stresem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

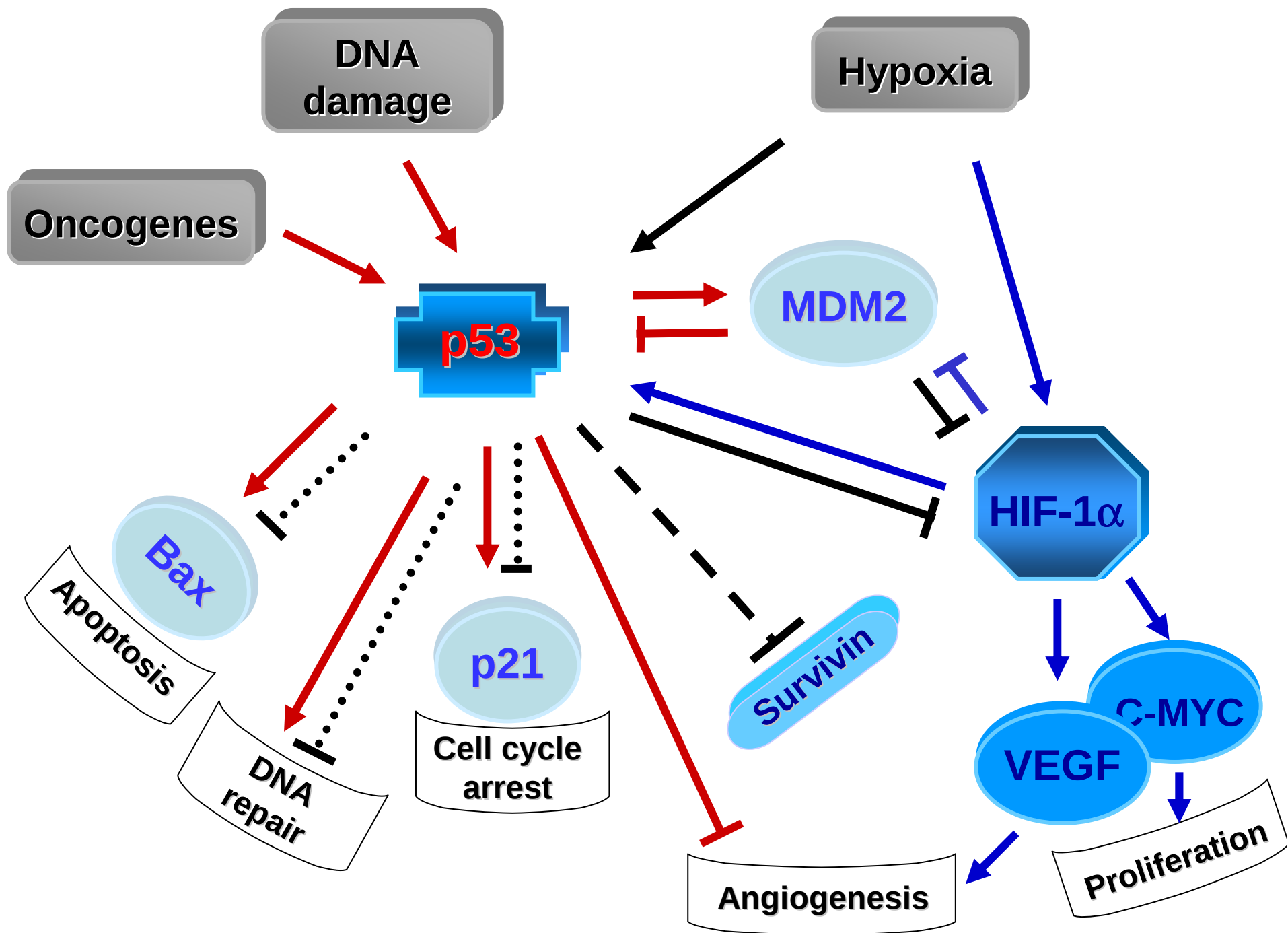
Popsána kináza **Parc**, která zadržuje p53 v cytoplasmě.

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

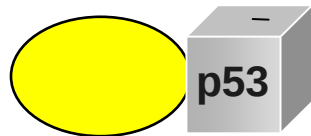
1. Je to další mechanismus umožňující přesnou regulaci p53.
2. Export z jádra souvisí s nějakou další funkcí p53 v cytoplasmě (apoptóza - lokalizace v mitochondriích).

# Pathways of p53 Activation

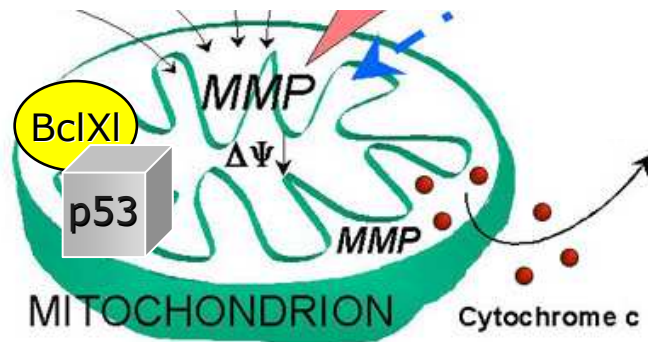




# Responses To p53 Activation

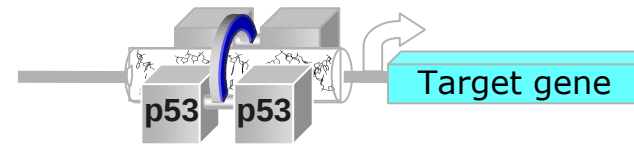


Protein Interactions

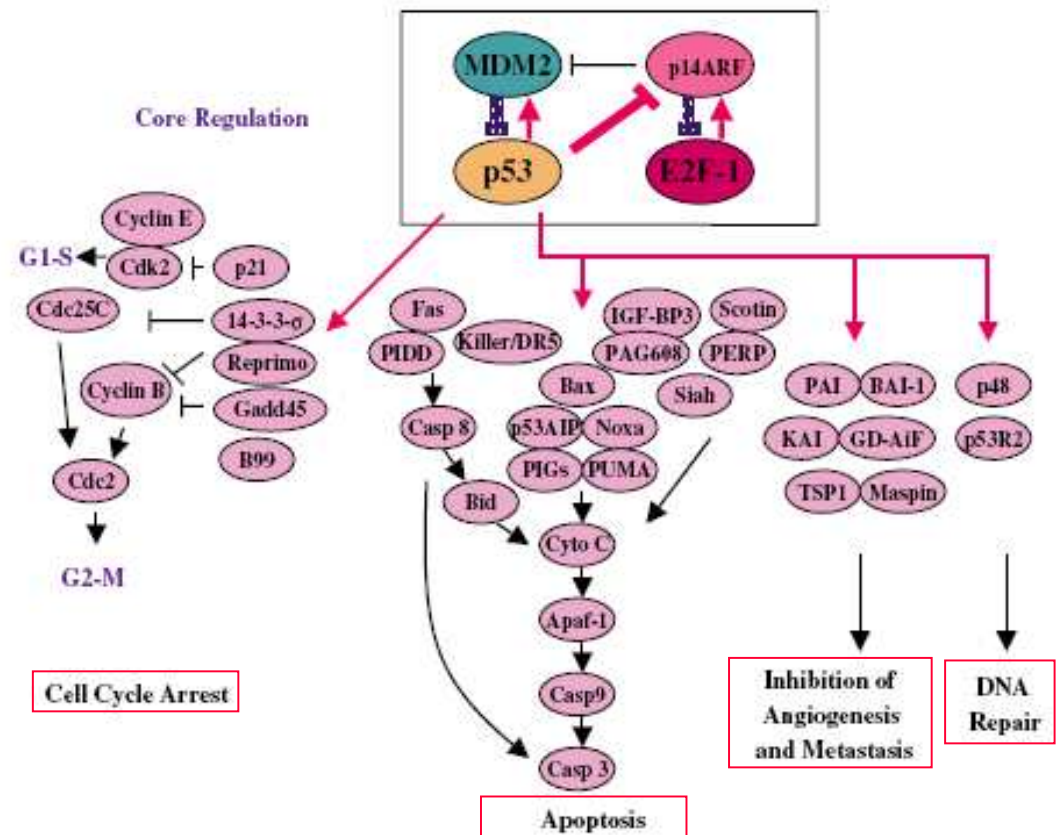


Other?.....

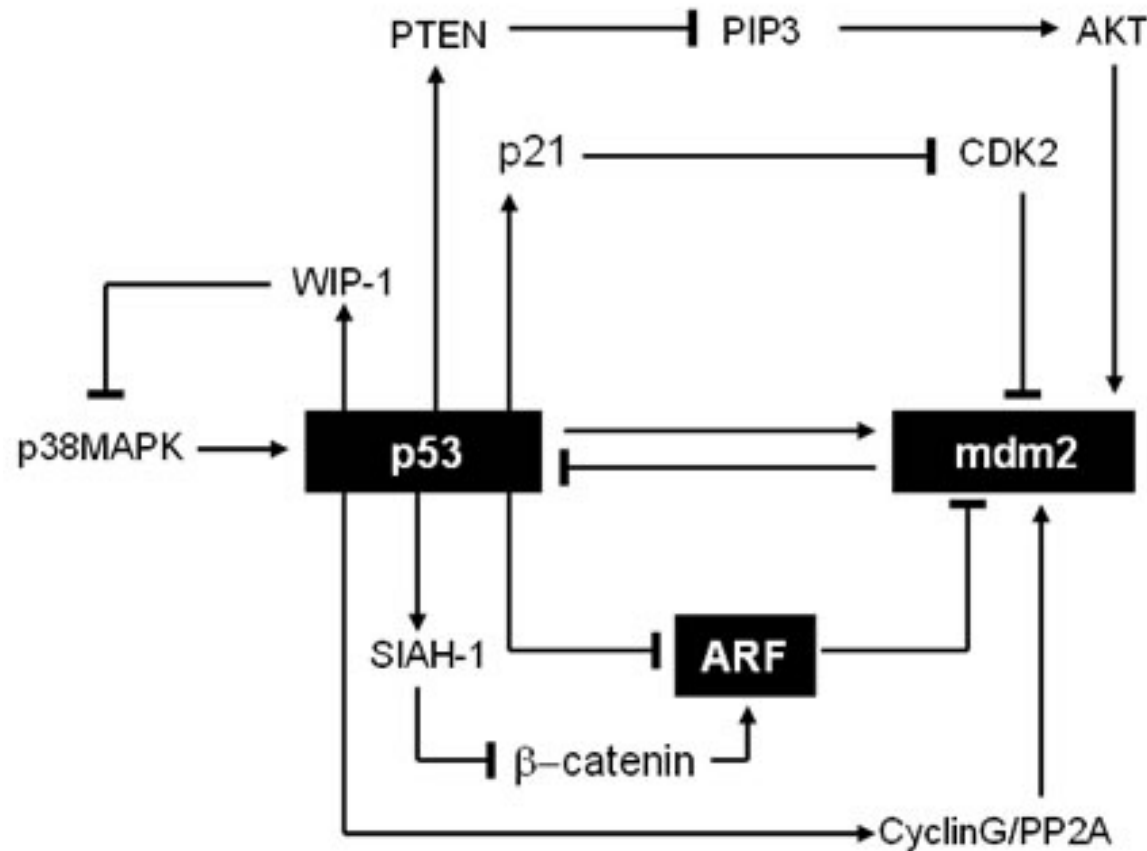
Genomic integrity  
Growth control



Induction of target genes



# 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 +/+**

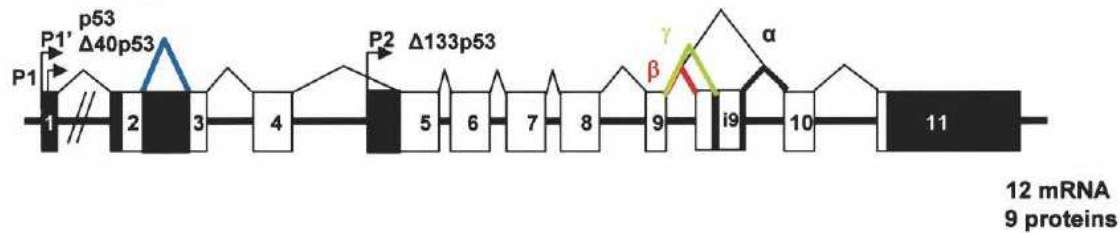


**p53 -/-**  
**Mdm2 -/-**

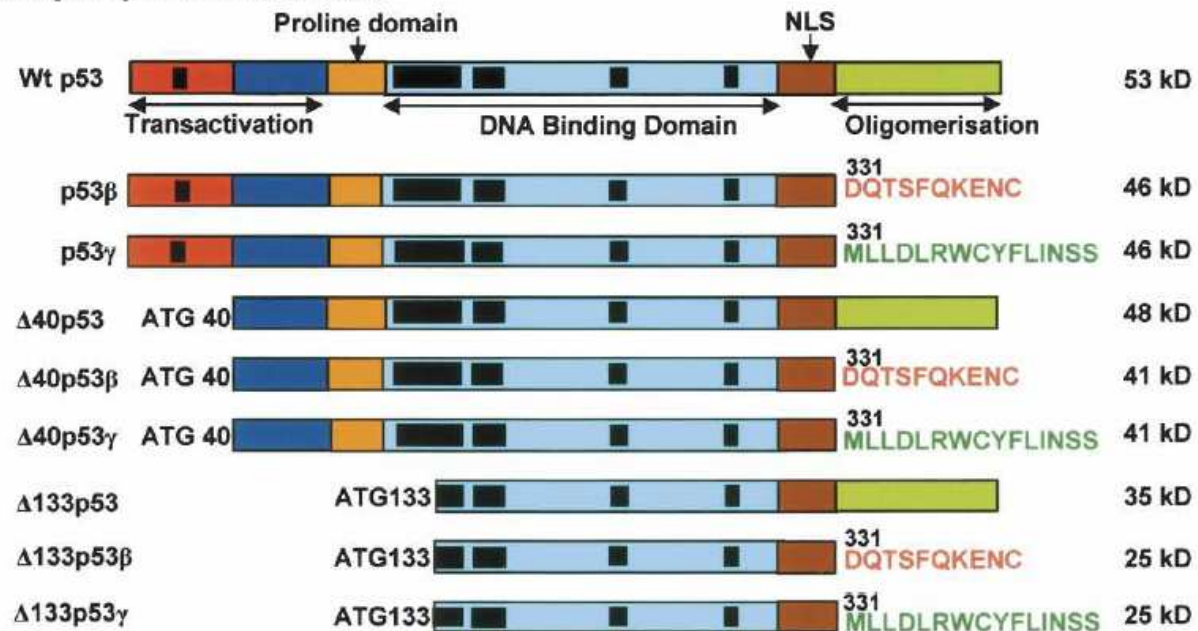


# p53 izoformy

Human p53 gene structure

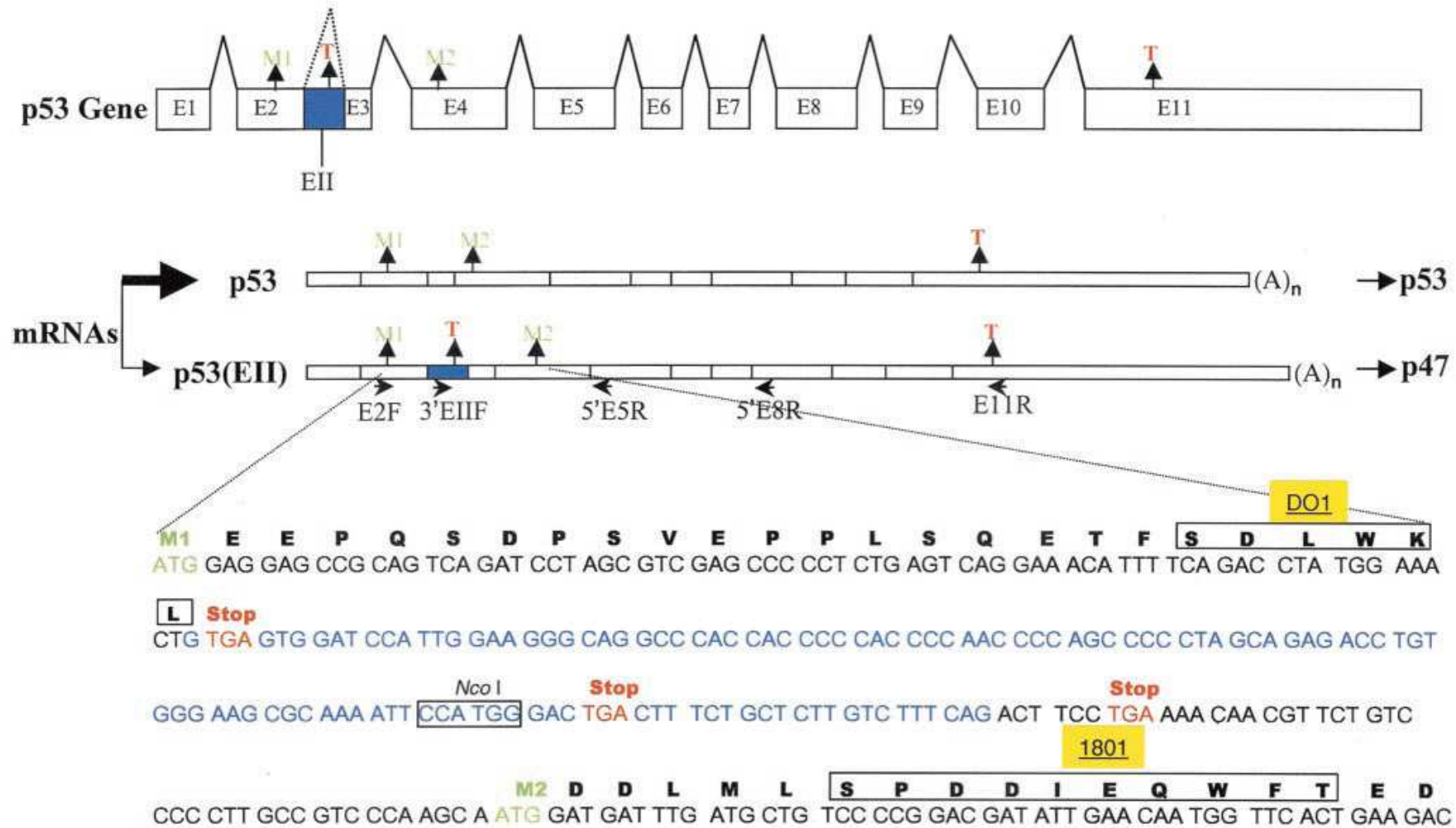


Putative p53 protein isoforms



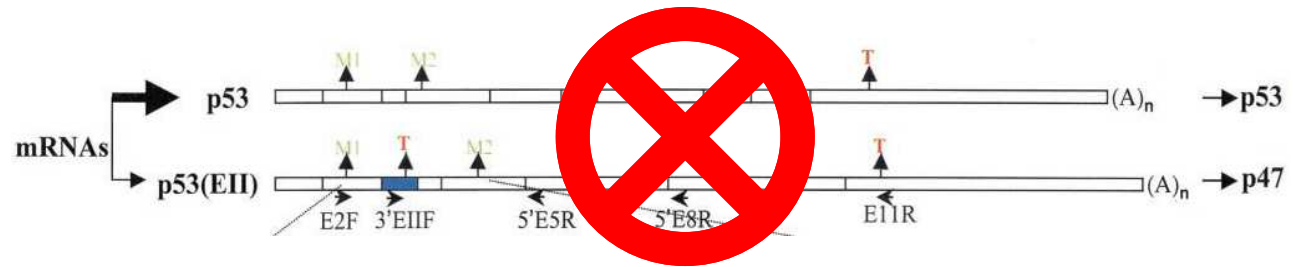
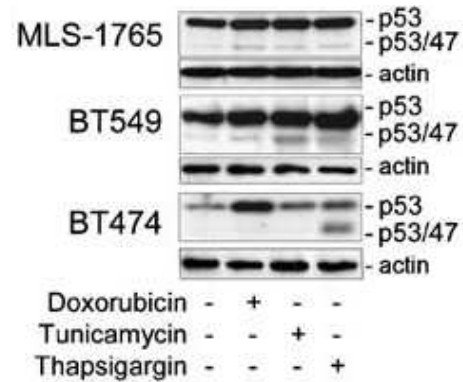
Bourdon JC., Fernandes K. et al. Genes Dev. (2005)

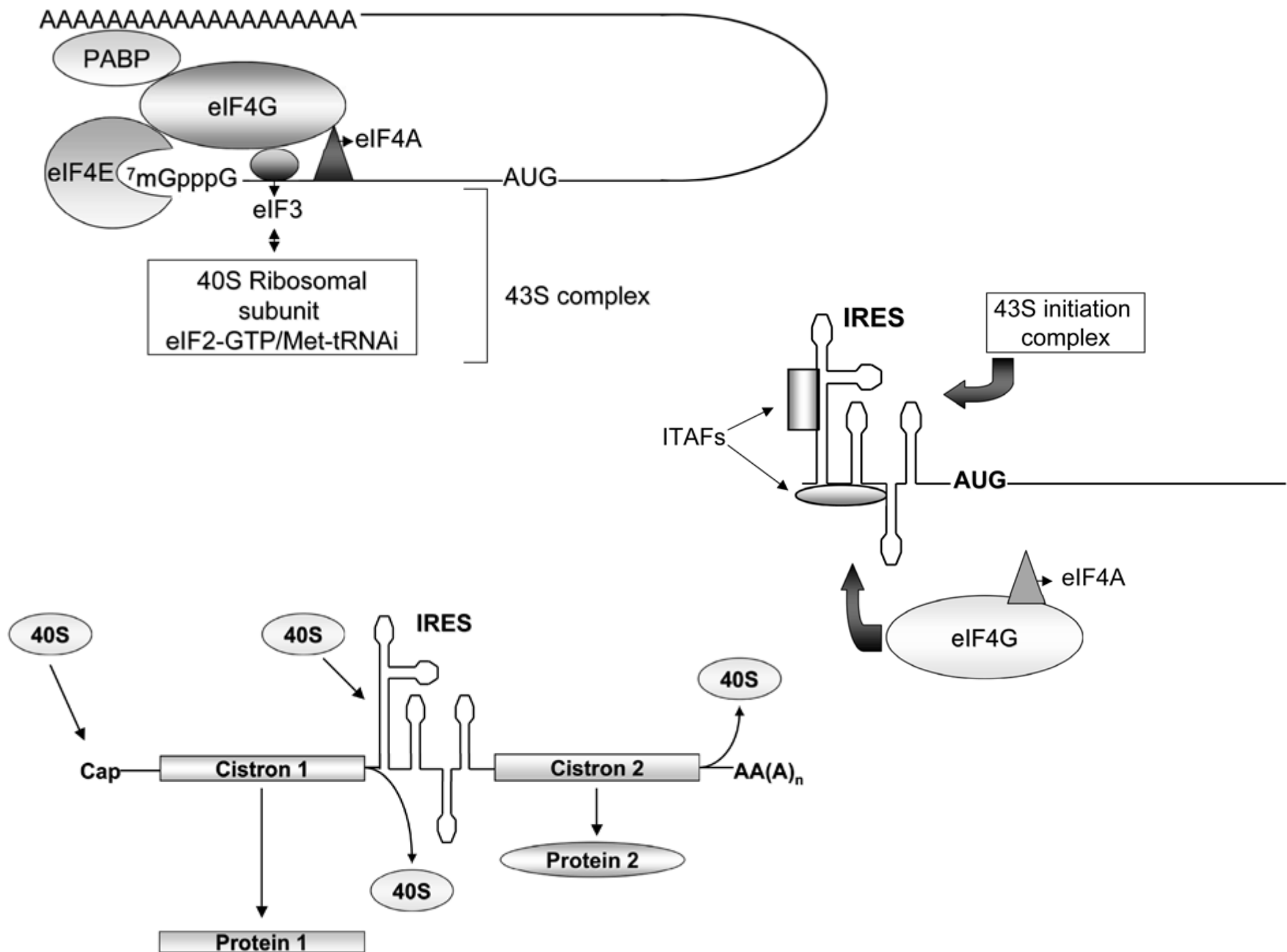
# Regulate p53/47 expresse



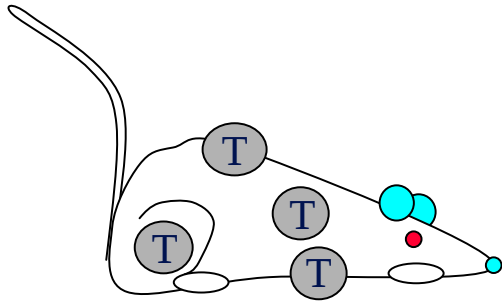
Matlashewski G, Pim D, Banks L, et al., Oncogene Res. (1987)

# p53/47 alternativní translace





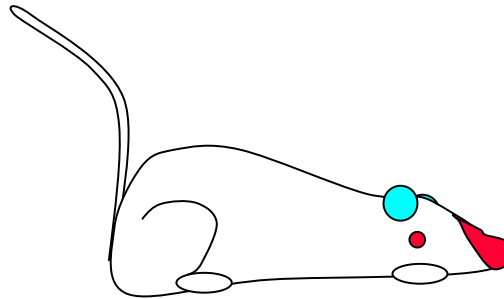
# TP53 rodina: rozdílné funkce



## TP53

17p13

**Zvýšená citlivost ke  
spontánní  
kancerogenezi**

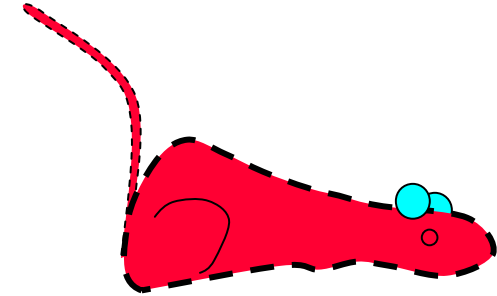


## TP73

1p36

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

**Není zvýšená citlivost ke  
spontánní kancerogenezi**

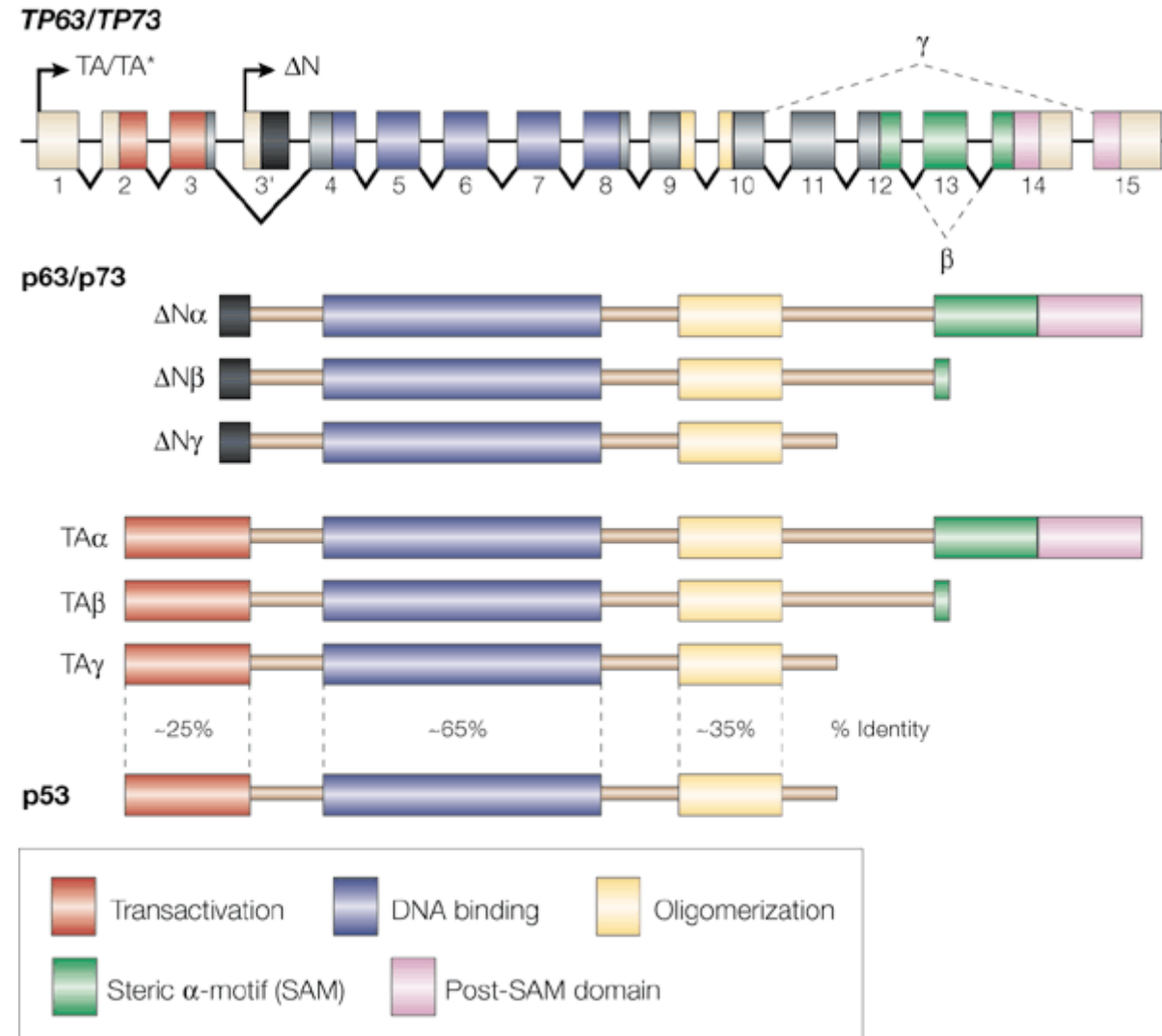


## TP63

3q27-28

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

# p63 & p73 isoforms alternativní sestřih a promotory

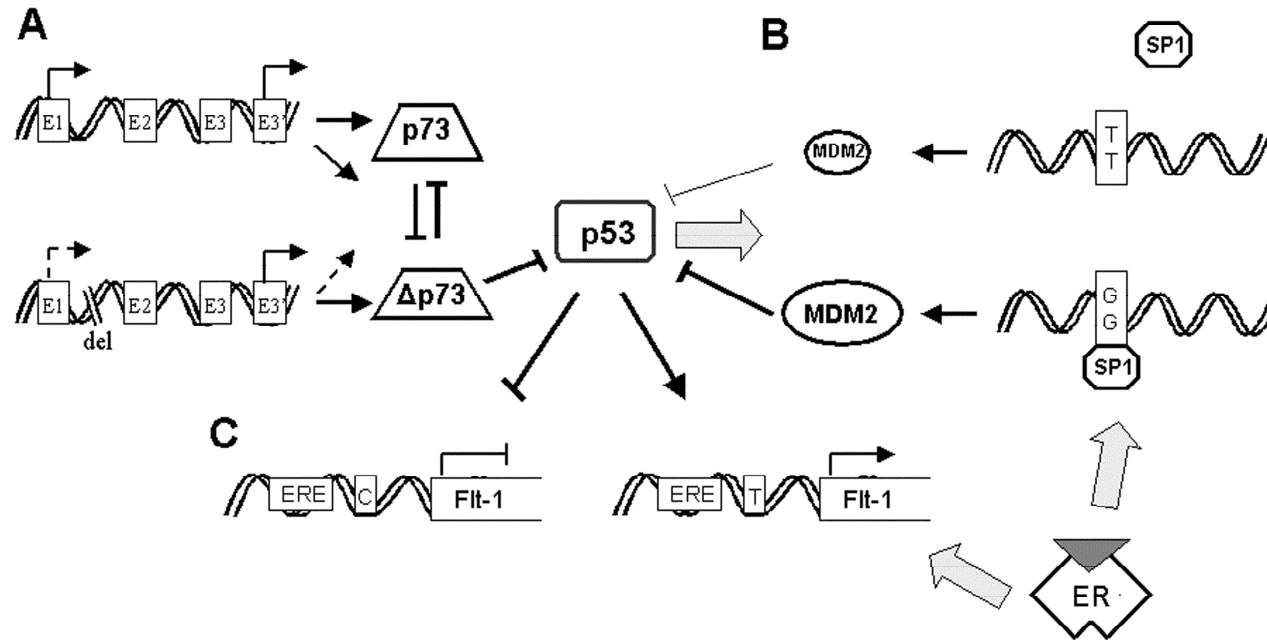


Yang and McKeon, Nat Rev Mol Cell Biol. (2000)

# Polymorfismy v p53 dráhách

- polymorfismus: mutace s vyšší frekvencí výskytu
- polymorfismy v TP53 (P47S, R72P, I3 ins 16bp,)
- P72: 17% v africké populaci x 63% S Evropa
- polymorfismy v promotorech genů (RE) regulovaných p53
- stanovení výskytu v rámci populací
- analýza vzhledem k riziku vzniku onemocnění
- Studium vzhledem k dalším klinicko-patologickým znakům

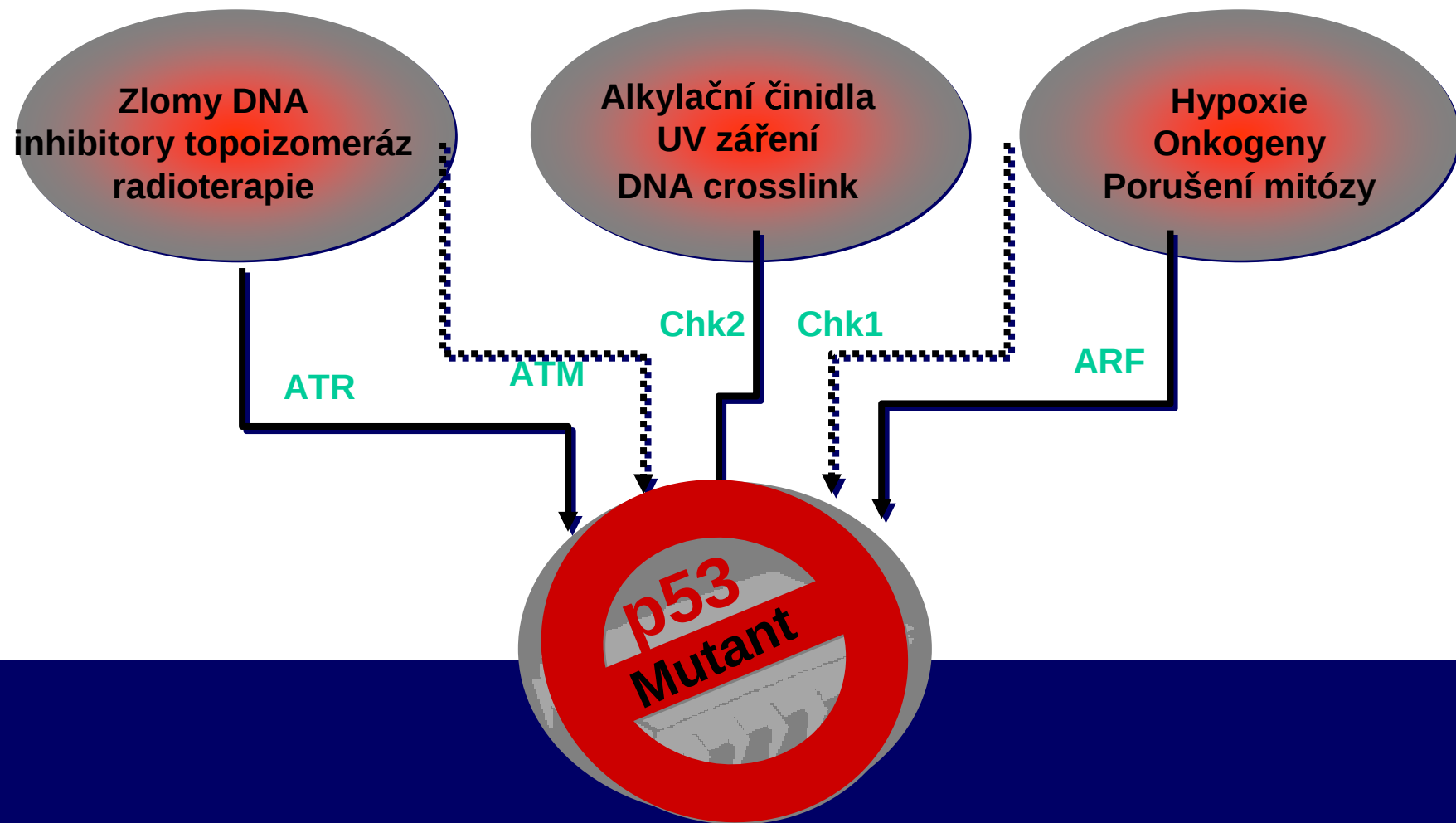
Figure 2



A: I1 del 73bp (TAp73/ΔTAp73 )

B: MDM2 SNP309 (afinita SP1)

C: C/T Flt-1 promotor (vznik p53 vazebného miesta)

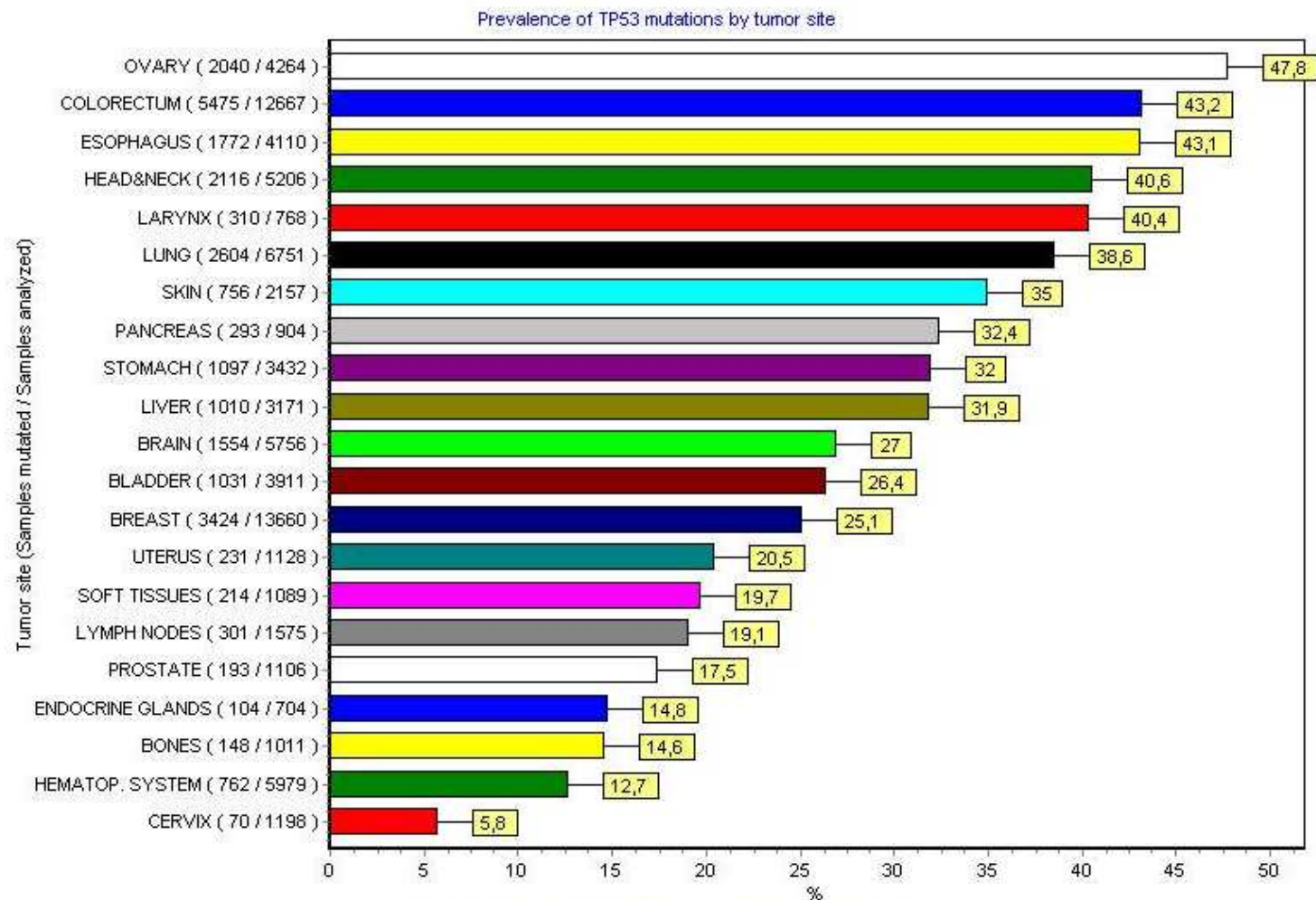


- Genová nestabilita
- Nekontrolovaná proliferace
- Inhibice apoptózy

# Inaktivace p53 v nádorech

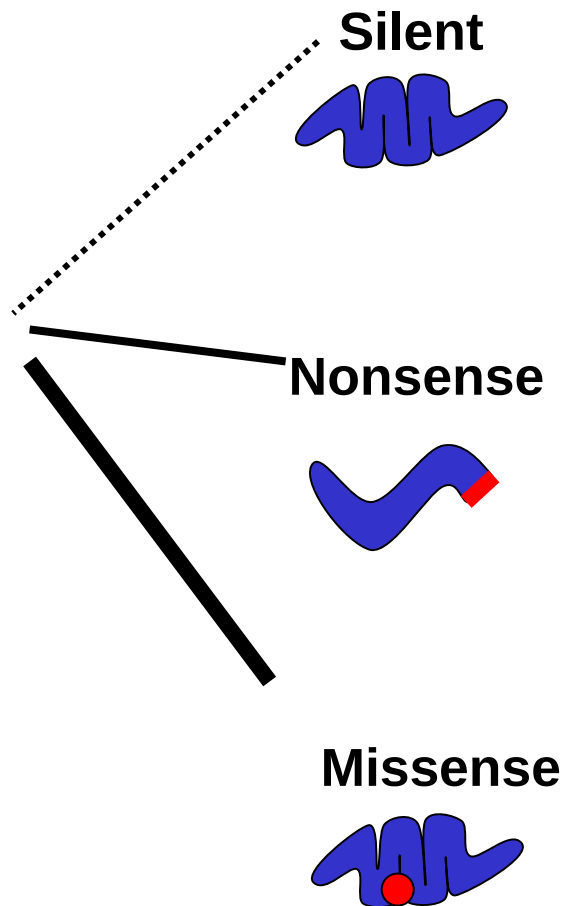
- **Mutace**
- **Jaderná exkluze** (37% zánětlivých karcinomů prsu, více než 90% nediferencovaných neuroblastomů)
- **Interakce s virovými onkoproteiny** (LT SV40, E1B, E6)
- **Amplifikace *mdm2*** (neuroblastomy), případně *mdmX* (gliomy)

# Frekvence mutací p53 v nádorech



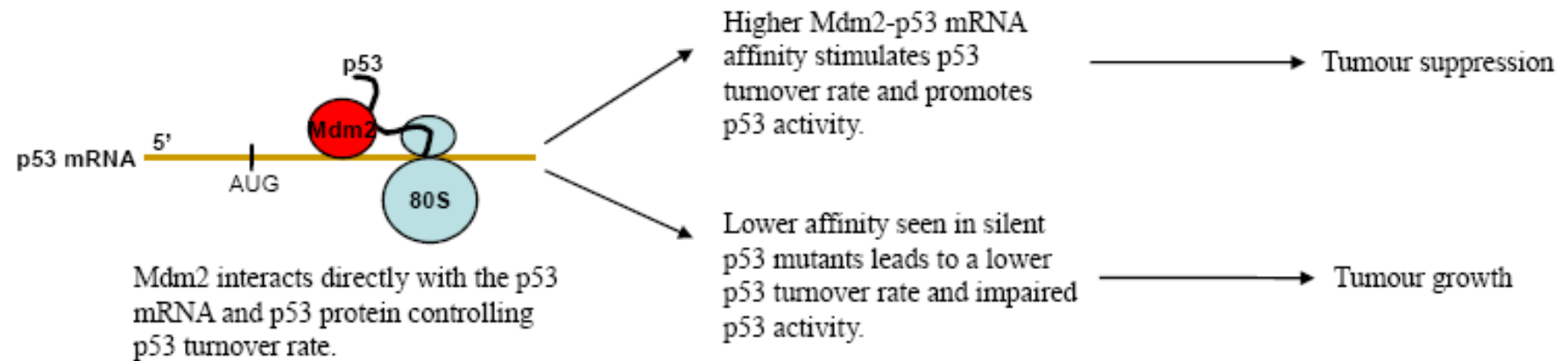
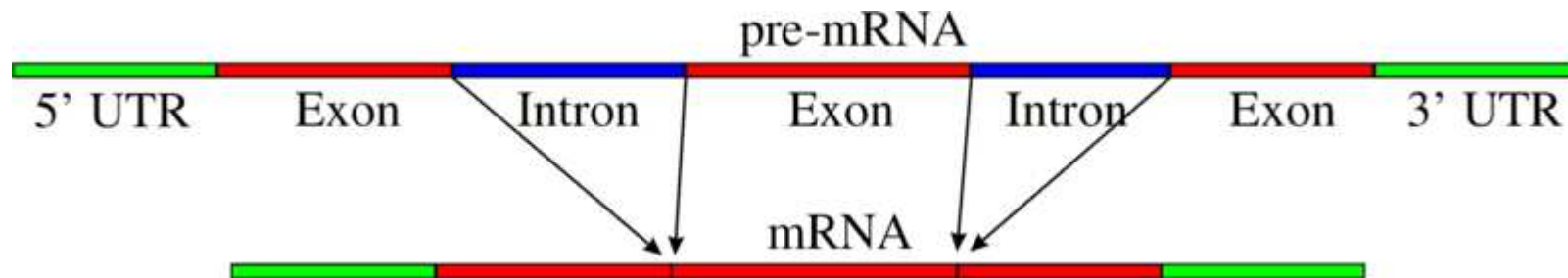
(C) IARC TP53 Mutation Database, R12 release, October 2007

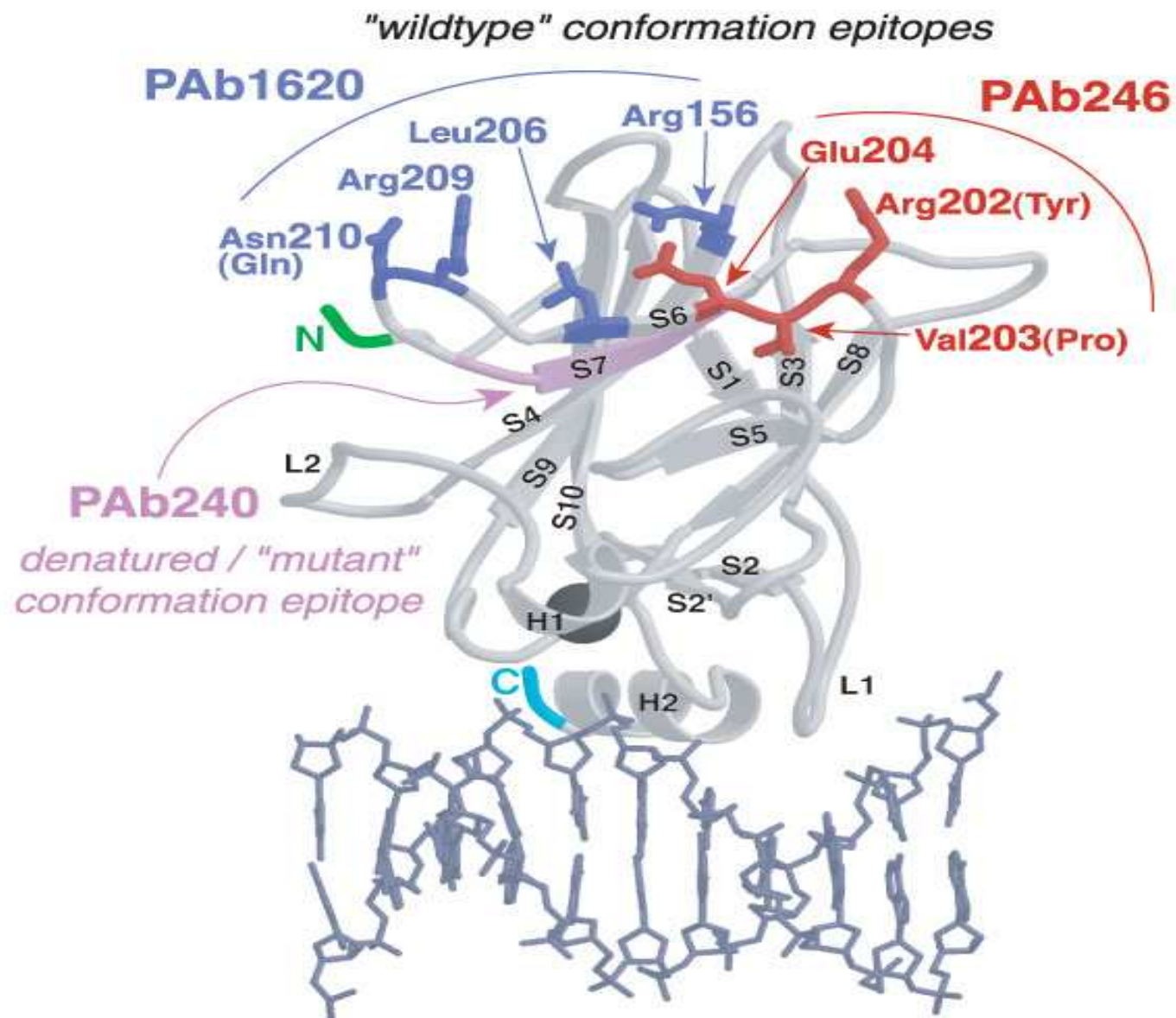
## Mutations of p53



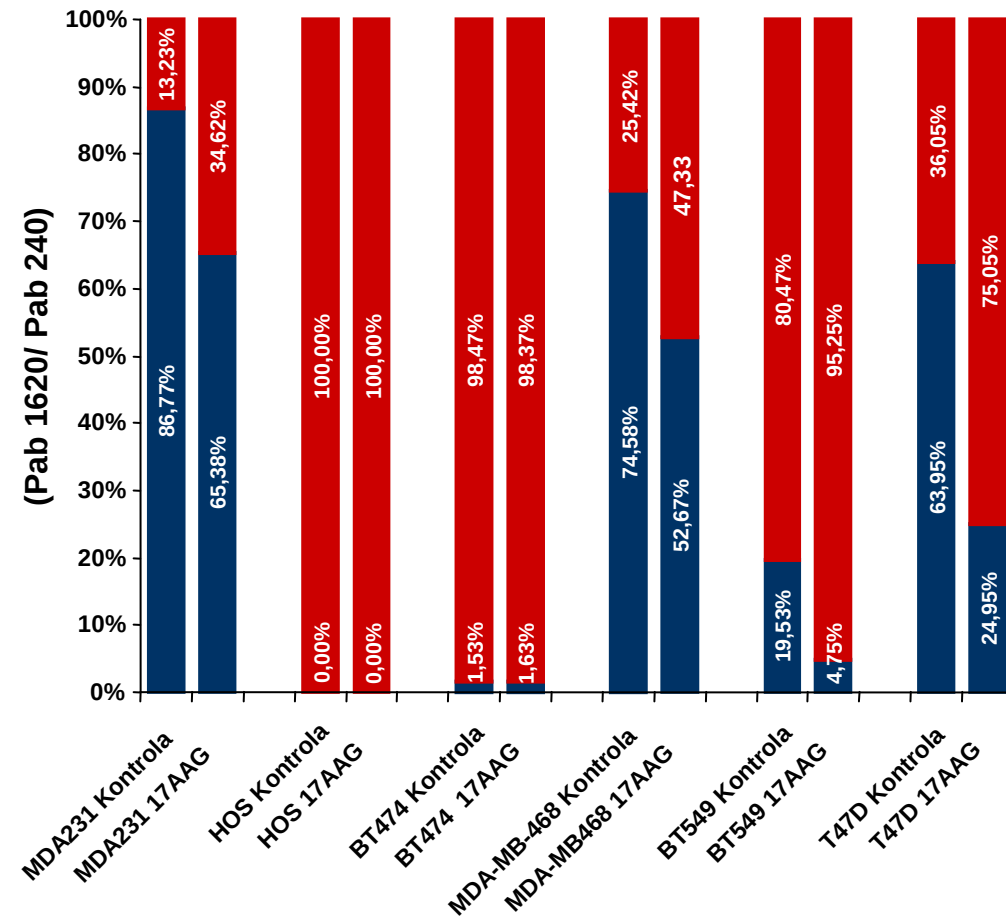
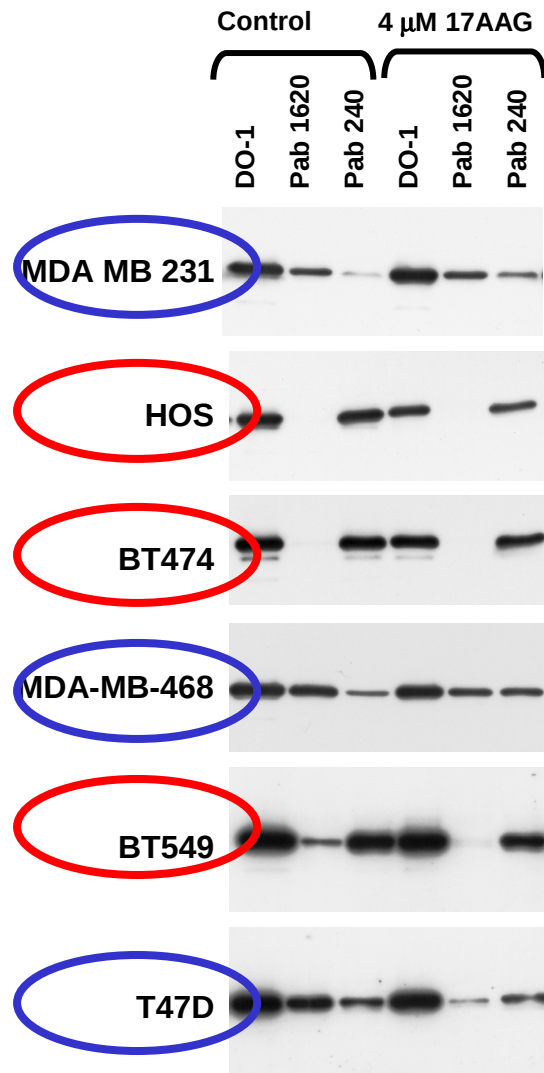
| Position    | Folding  | Transactivation                    |
|-------------|----------|------------------------------------|
| N-terminal  | Folded   | Functional                         |
| C-terminal  |          | Partially Functional<br>(p21>>Bax) |
| Core domain | Unfolded | Nonfunctional    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

# Silent mutace





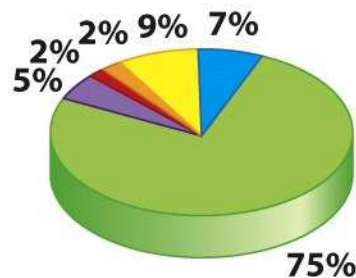
# Konformace mut p53



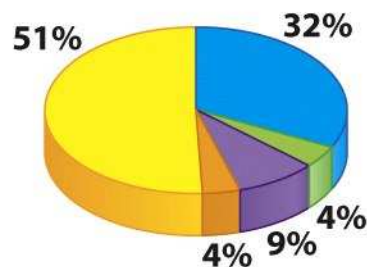
Native conformation is dependent on Hsp90

# Typy mutací p53

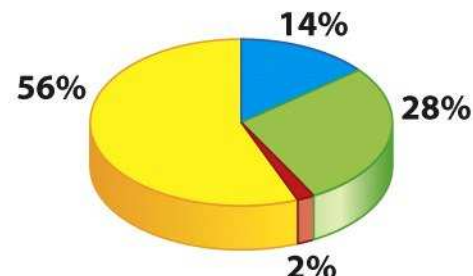
- především bodové missense mutace
- krátké delece a inserce (více v okrajových částech genu)



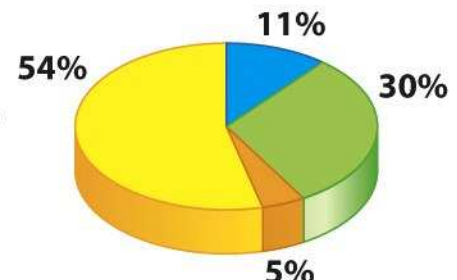
p53 (n = 15,122)



APC (n = 15,451)



ATM (n = 617)



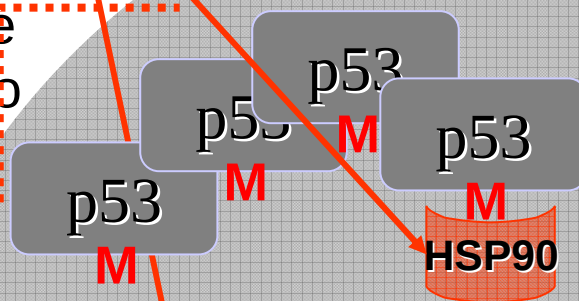
BRCA1 (n = 3,703)



## Ztráta přirozené funkce

## Gain of function

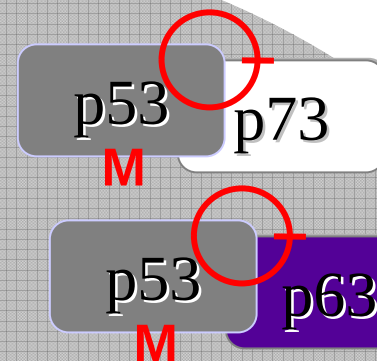
Kumulace  
defektního  
proteinu



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

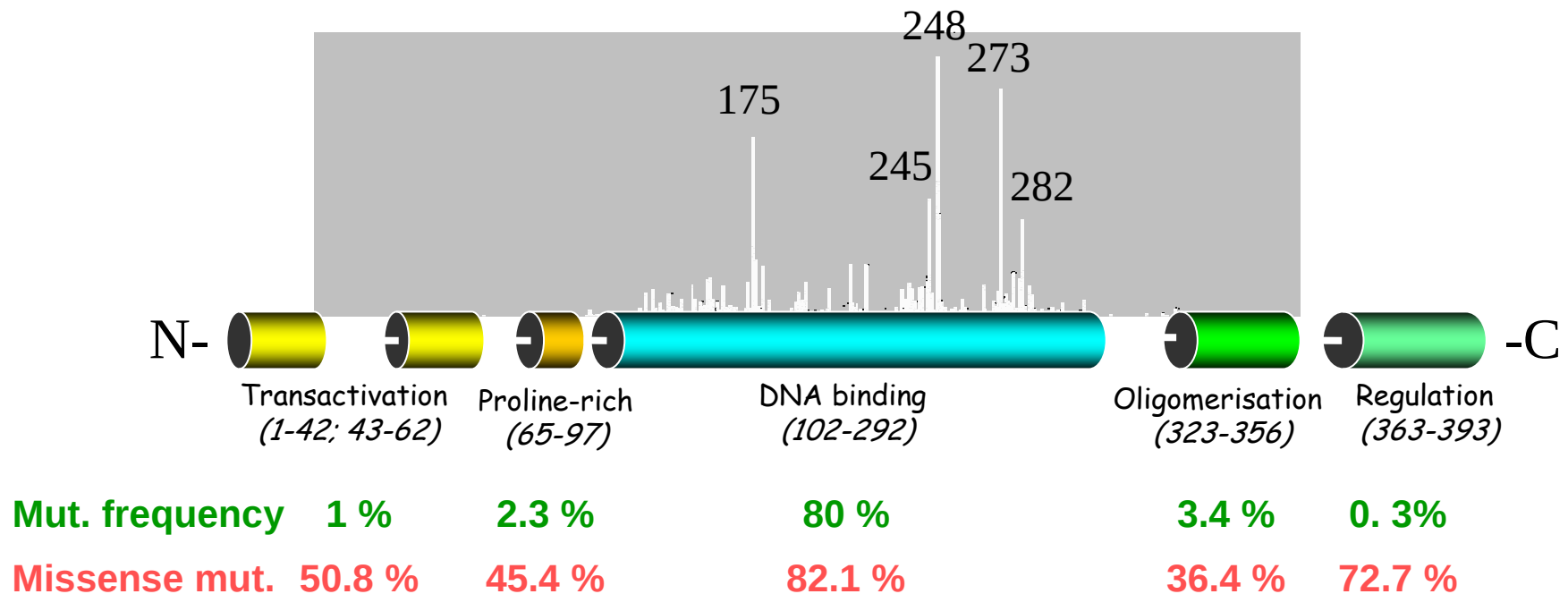


*Nature Genetics* 4, 42 - 46 (1993)

**Gain of function** mutations in p53

Dirk Dittmer<sup>1</sup>, Sibani Pati<sup>1</sup>, Gerard Zambetti<sup>1</sup>, Shelley Chu<sup>1</sup>,  
Angelika K. Teresky<sup>1</sup>, Mary Moore<sup>1</sup>, Cathy Finlay<sup>1</sup> & Arnold J.  
Levine<sup>1</sup> <sup>1</sup>Department of Molecular Biology, Princeton  
University, Princeton, New Jersey 08544–1014, USA

# Missense Mutations are Clustered in the DNA-binding Domain

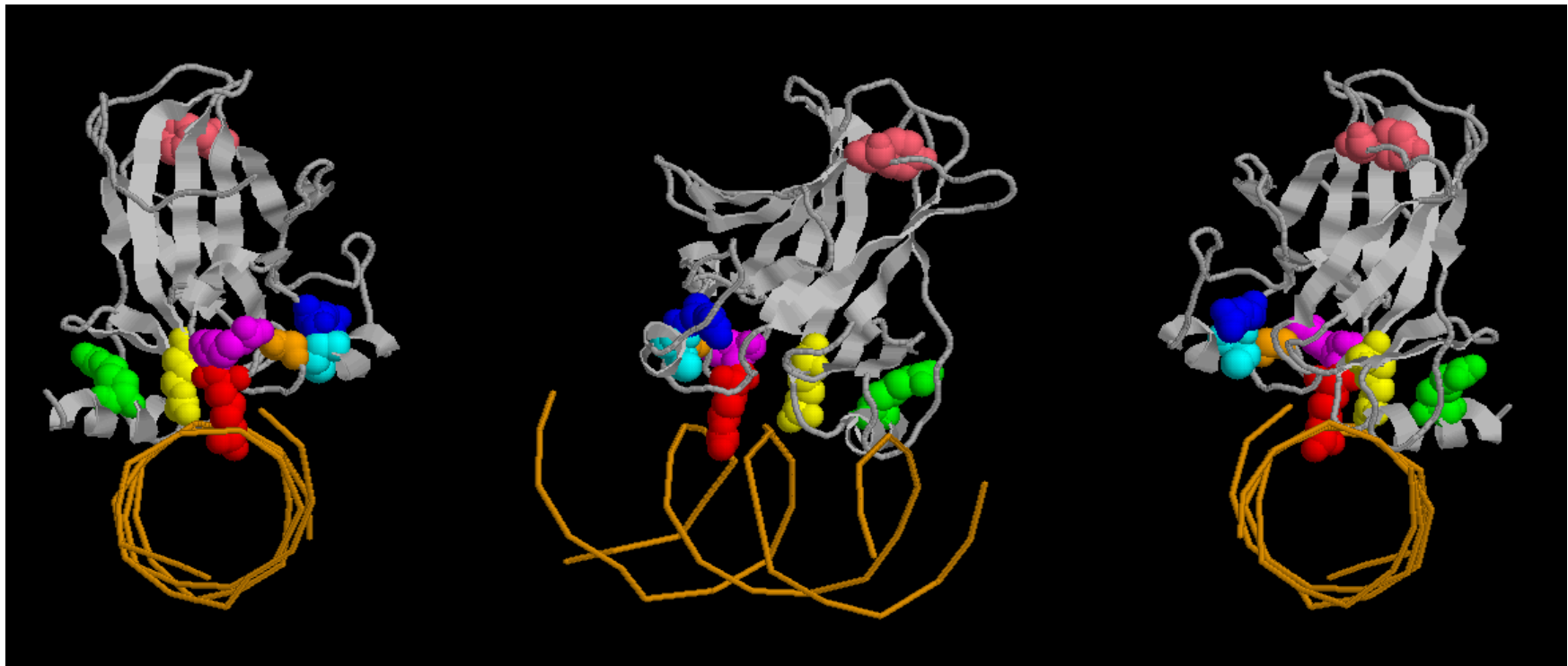


# Most Frequent Mutations Are In The Loops That Make Contact With DNA

0°

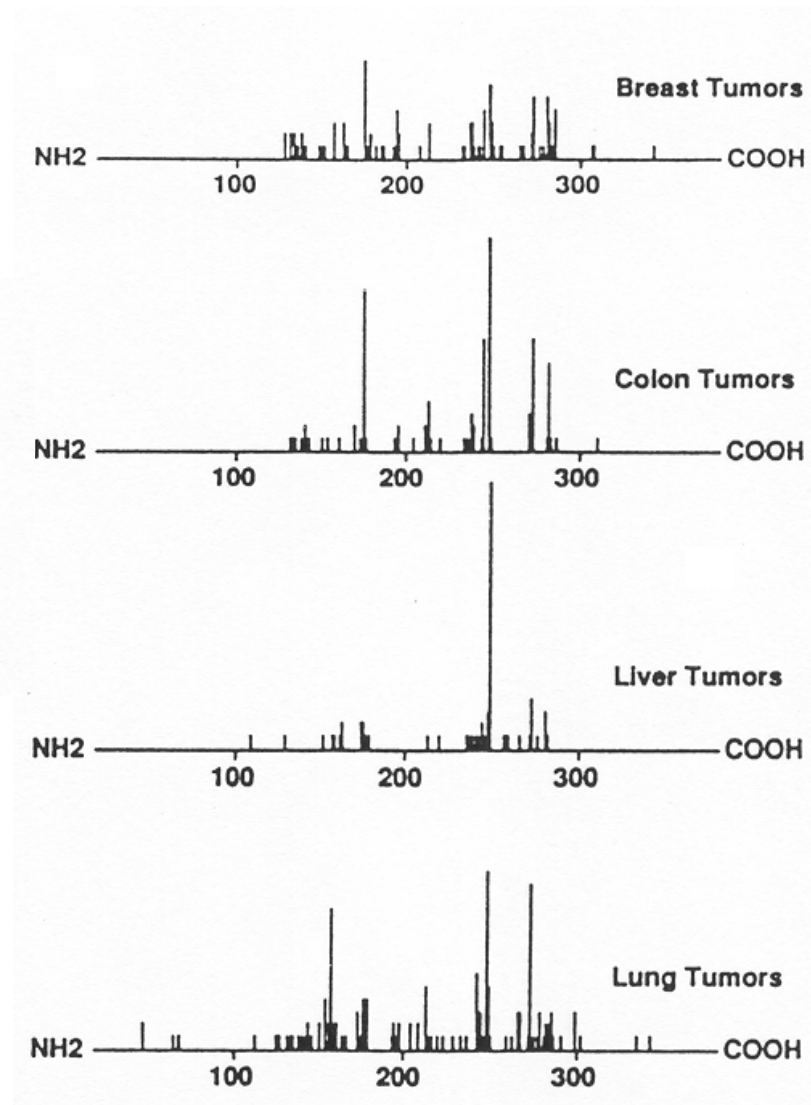
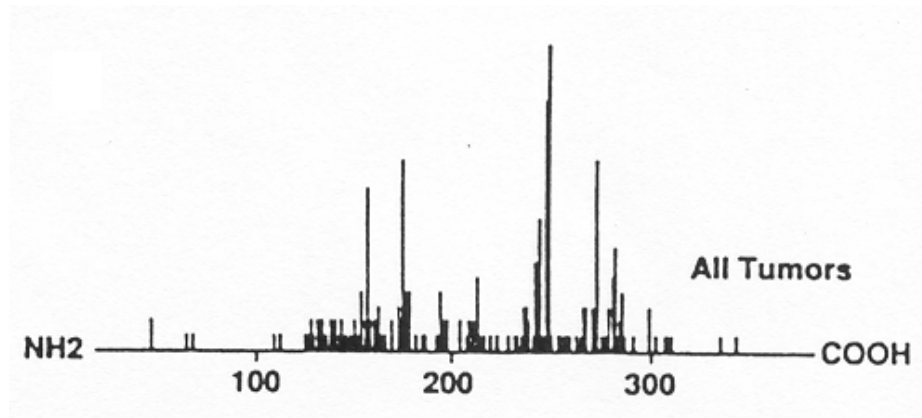
90°

180°

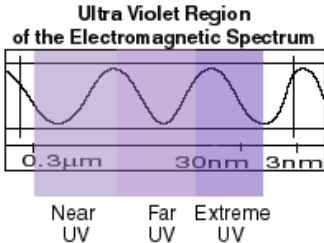
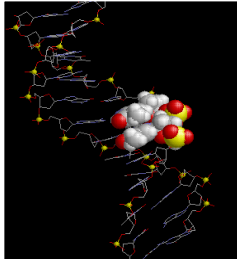
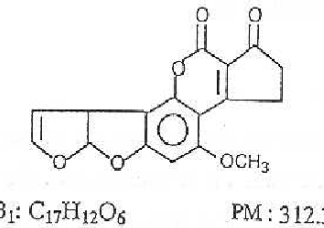
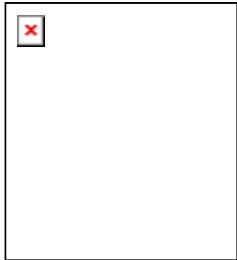
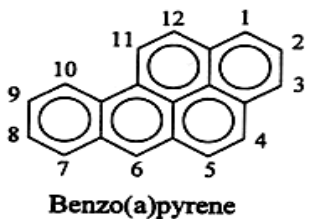
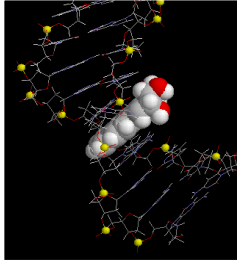


Codon: 175 > 248 > 273 > 282 > 249 > 245 > 220 > 176

# Mutační spektra p53



# Příklady nádorově specifických mutací

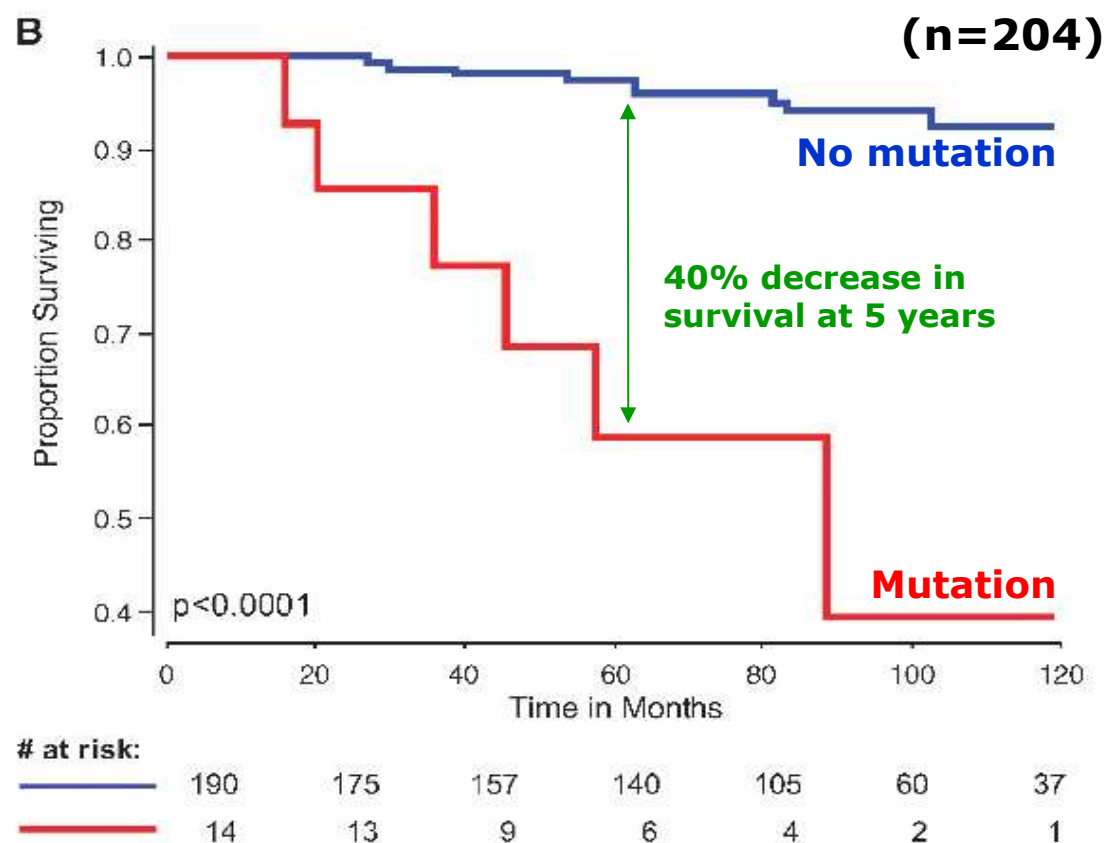
|               | Source                                                                              | Mutagen                                                                              | Adduct                                                                                | TP53 pattern                                                                          |
|---------------|-------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|
| UV radiations |    |    |    | <u>CC to TT</u><br>Various codons<br>Skin cancer: 7%<br>Other cancers: 0%             |
| Aflatoxins    |   |   |   | <u>G to T</u><br>Codon 249<br>Liver cancer: >50%<br>Other cancers: <2%                |
| Tobacco smoke |  |  |  | <u>G to T</u><br>Codons 157, 158, 248, 273<br>Lung cancer: 30%<br>Other cancers: <10% |

# Prognostická hodnota TP53 mutací

| TUMOR SITE   | <u>Number of studies reporting that TP53 mutations are :</u> |                           |                          |
|--------------|--------------------------------------------------------------|---------------------------|--------------------------|
|              | Related to bad prognosis                                     | Related to good prognosis | Not related to prognosis |
| Bladder      | 4                                                            | -                         | 5                        |
| Brain        | 6                                                            | 2                         | 6                        |
| Breast       | 22                                                           | -                         | 6                        |
| Colorectum   | 11                                                           | -                         | 10                       |
| Corpus uteri | 3                                                            | -                         | -                        |
| Esophagus    | 4                                                            | 1                         | 3                        |
| Head & Neck  | 7                                                            | -                         | 3                        |
| Hematol.     | 13                                                           | -                         | 1                        |
| Lung         | 8                                                            | -                         | 6                        |
| Ovary        | 8                                                            | 1                         | 5                        |
| Pancreas     | 1                                                            | 1                         | -                        |
| Sarcomas     | 3                                                            | -                         | 1                        |
| Stomach      | 1                                                            | 1                         | 3                        |

# Asociace TP53 mutací s horší prognózou u ca prsu

Tumor grade <3, tumor size <5 cm, node negative and ER or PR positive cases



Olivier *et al.* Clin Cancer Res. (2006)

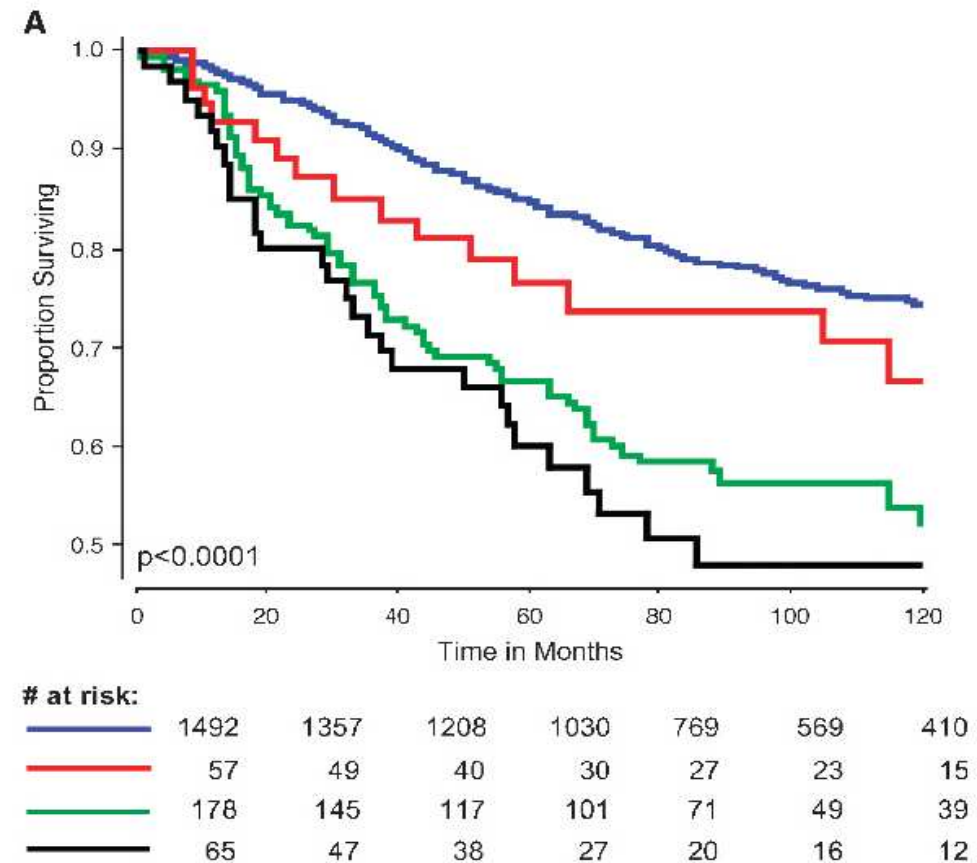
# TP53 Missense Mutations Within The DNA-binding Loops And Non-Missense Mutations Are Associated With The Worst Prognosis In Breast Cancer

**No Mutation**

**Missense in DBM**

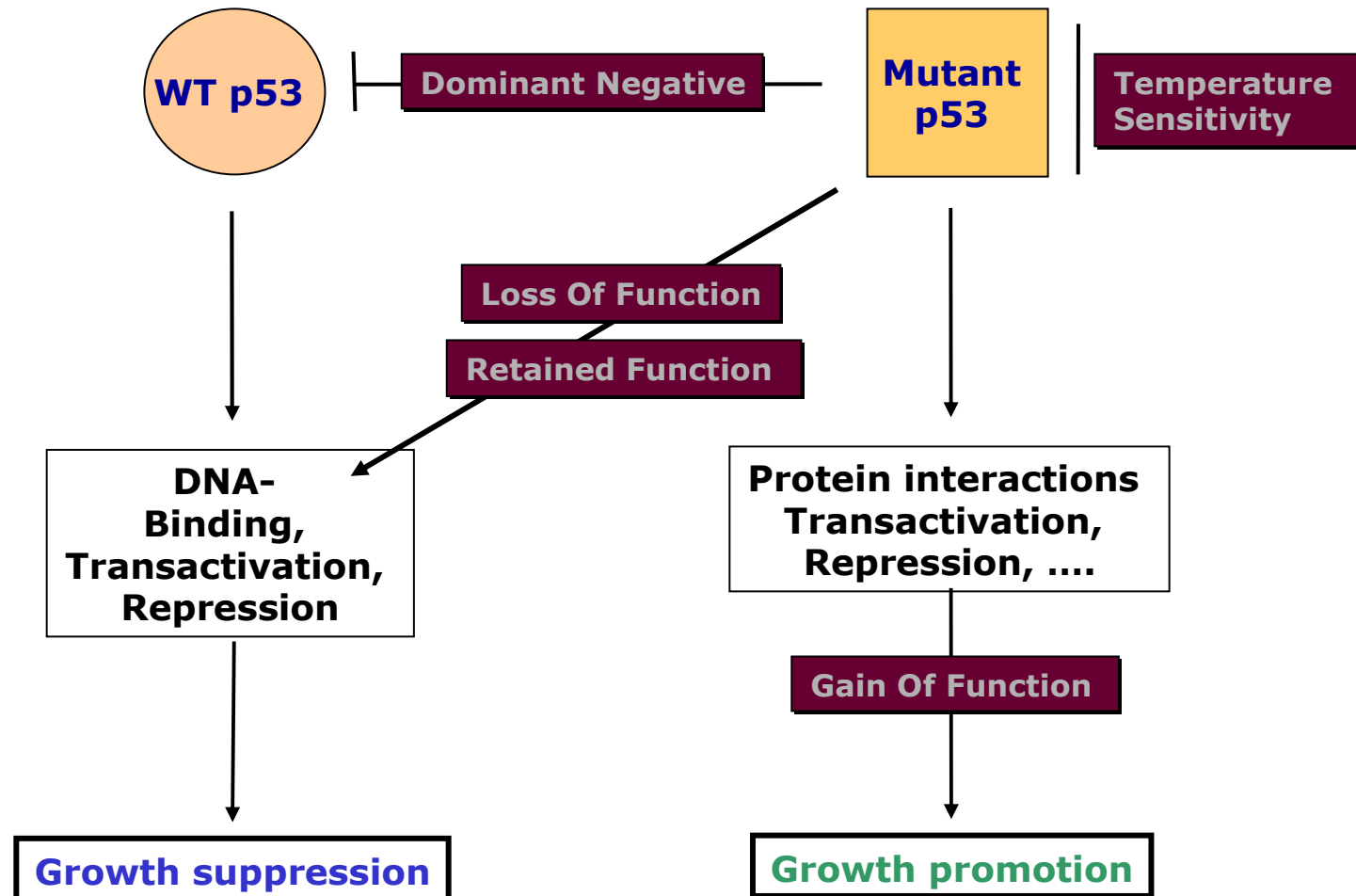
**Other missense**

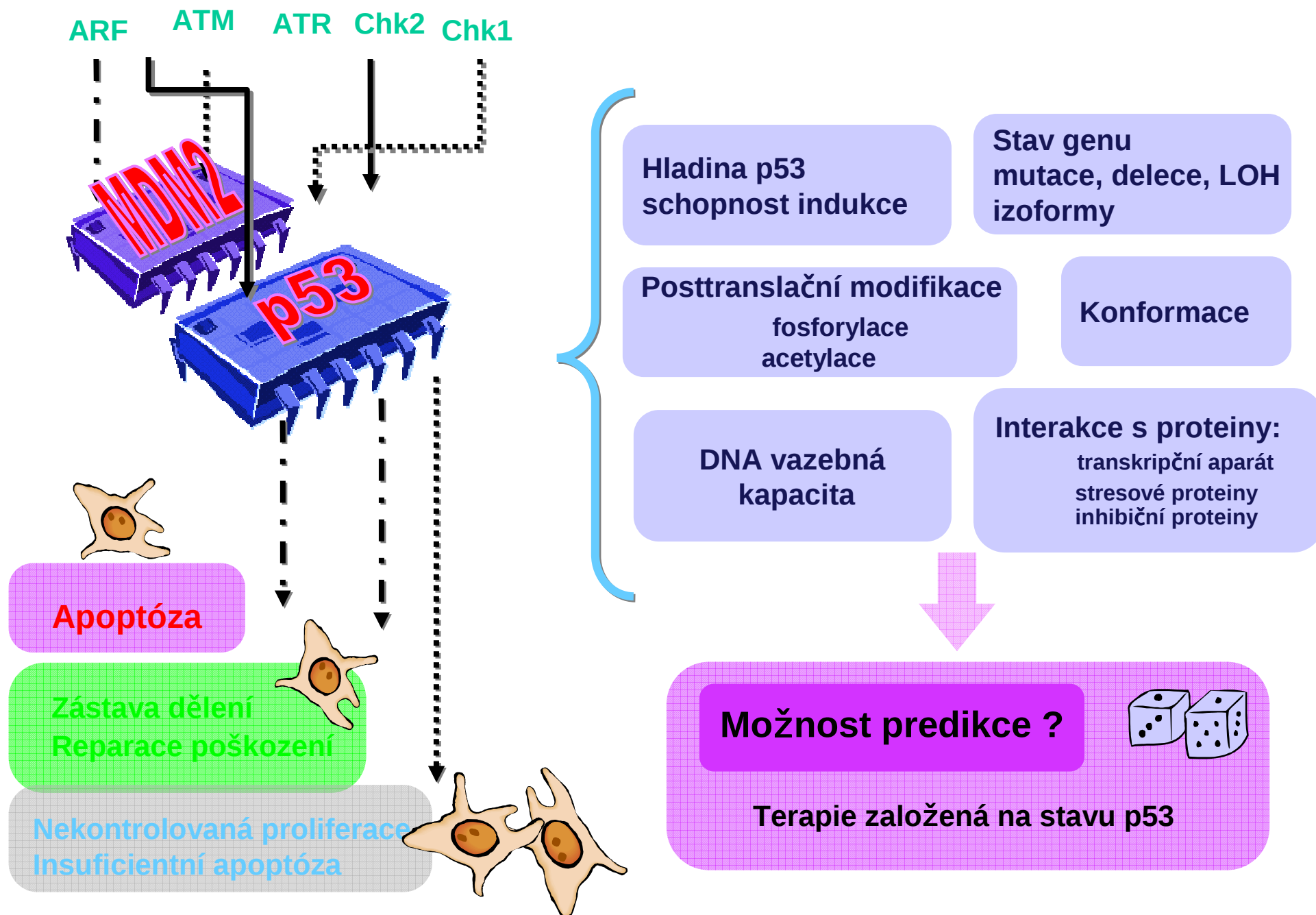
**Nonsense mutations**



Olivier *et al.*, Clin Cancer Res, 2006

# Biologická aktivita TP53 Mutantů





# TERAPIE ZALOŽENÁ NA STAVU p53

p53 mutovaný ?

**+** ANO

NE **-**

jaké jsou vlastnosti mutace ?

Aktivovatelný

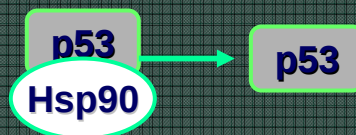
Neaktivovatelný

Stabilizace struktury  
proteinu



PRIMA  
Amifostin  
+  
posttranslační modifikace

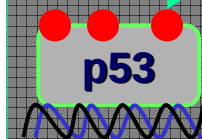
Inhibice HSPs



Geldanamycin  
17-allyl-aminogeld.

Terapie založená  
na aktivaci p53

chemoterapie  
radioterapie...



posttranslační  
modifikace

Genoterapie

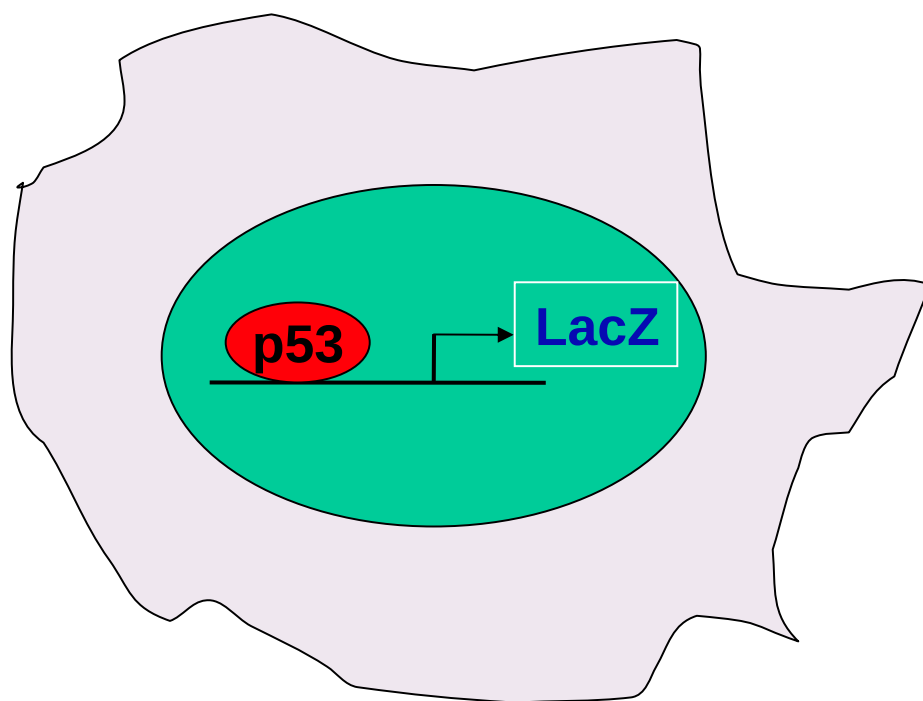
Adenovirus  
+  
upravený p53



Snížení  
Gain of function,

Inhibice HSPs

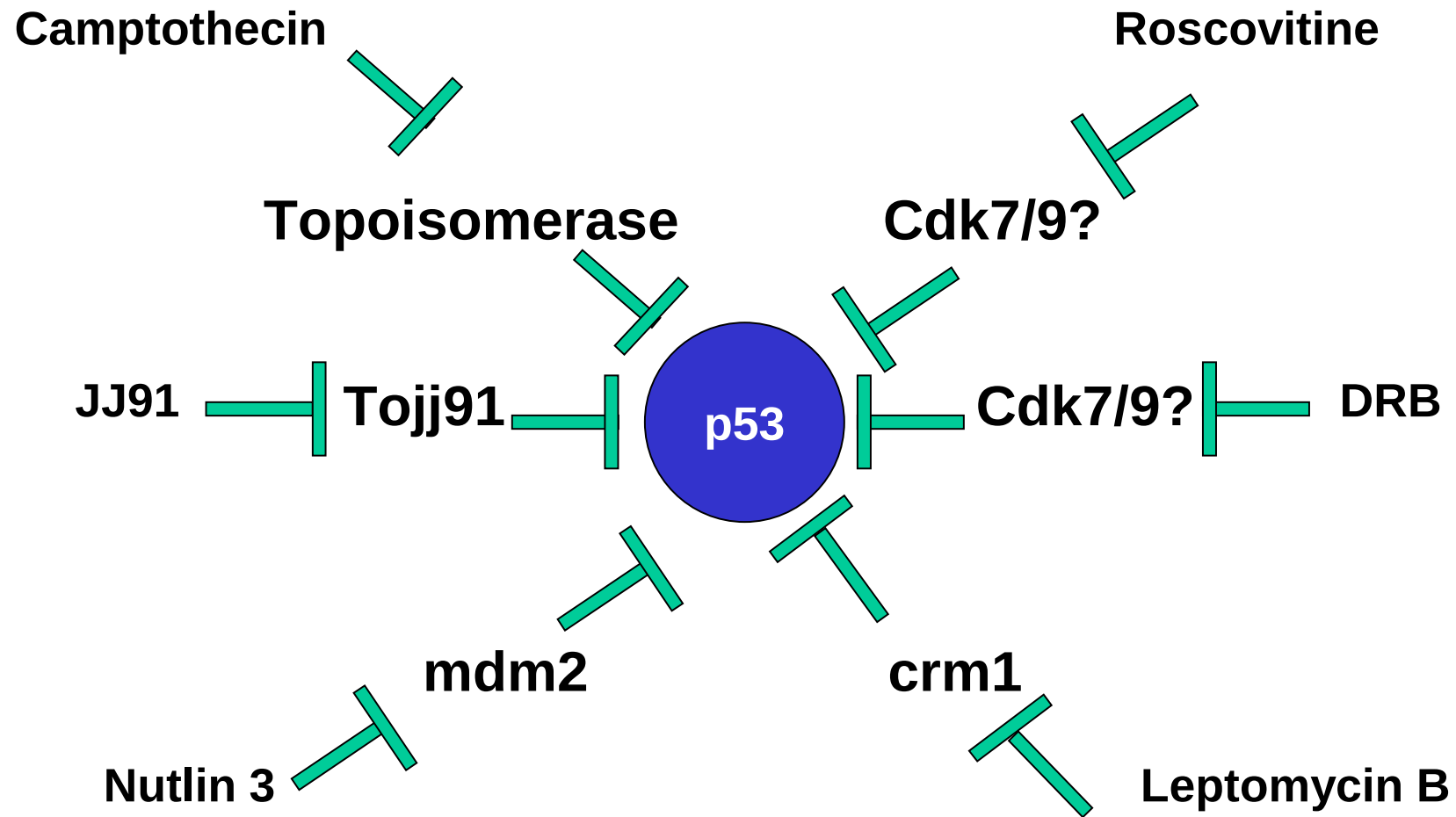
# Screening malých molekul, které aktivují p53



**Over 130,000 compounds screened**

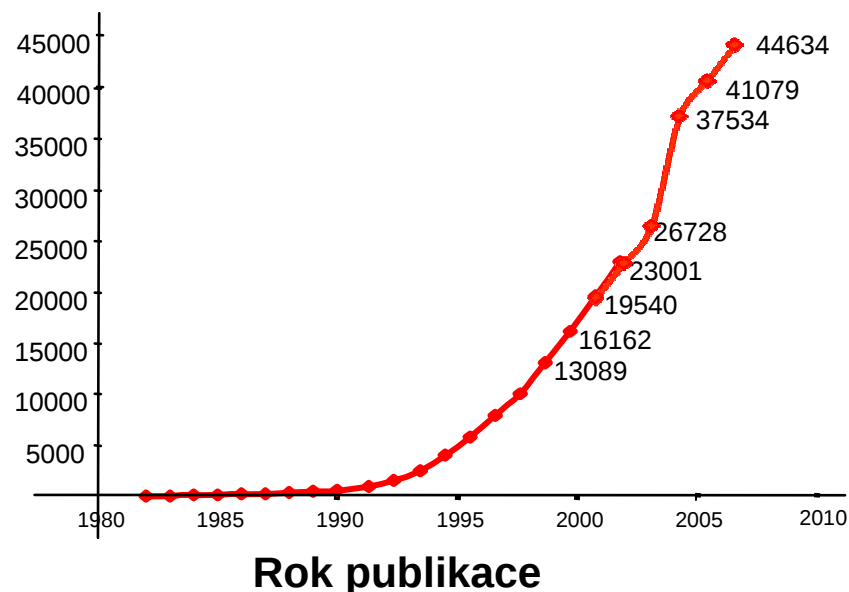
**Lain S., Hollick JJ. et al. Cancer cell (2008)**

# p53 cílená léčba



# Vývoj publikační aktivity v oblasti p53

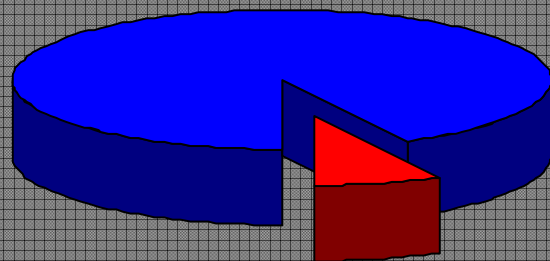
Počet publikací týkajících se p53 ke 31. 12. 2007  
(zdroj National Library of Medicine - PubMed)



Data z WEB of SCIENCE 92%

54565 = 100%

4281 = 8%



8%

8% prací v oblasti p53  
cituje námi dosažené a  
publikované výsledky.

## 5. 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 mm<sup>3</sup>, 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 angiogenních faktorů.

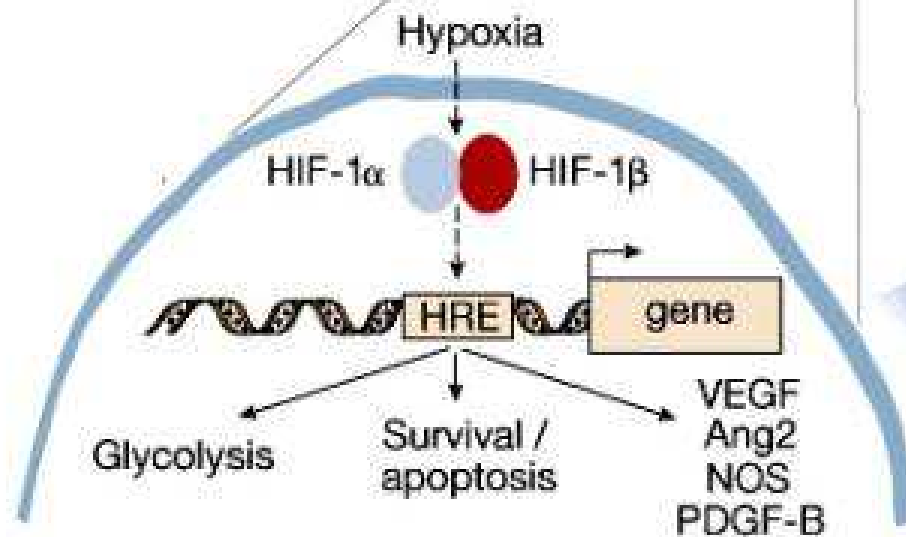
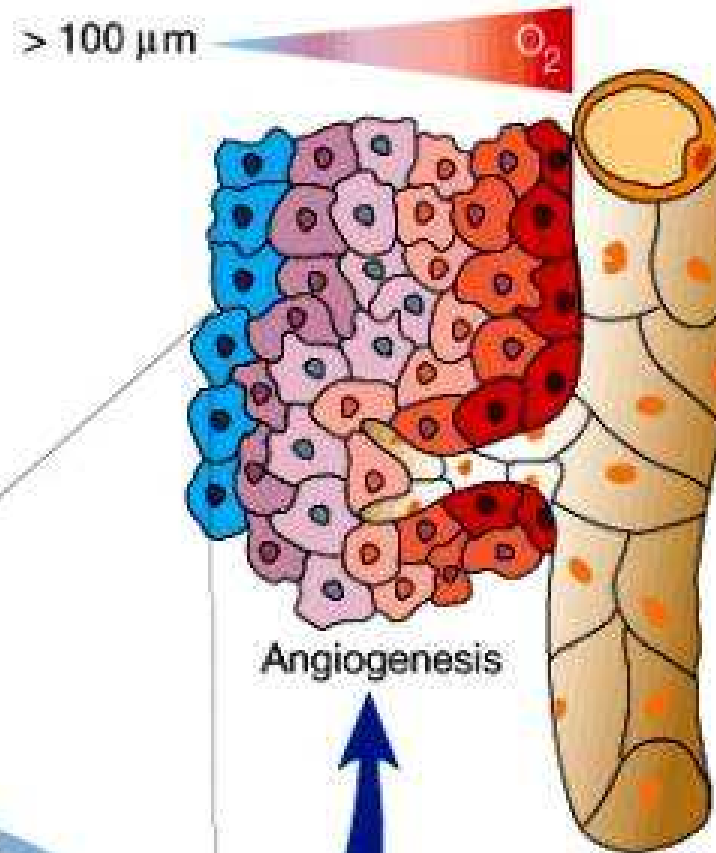
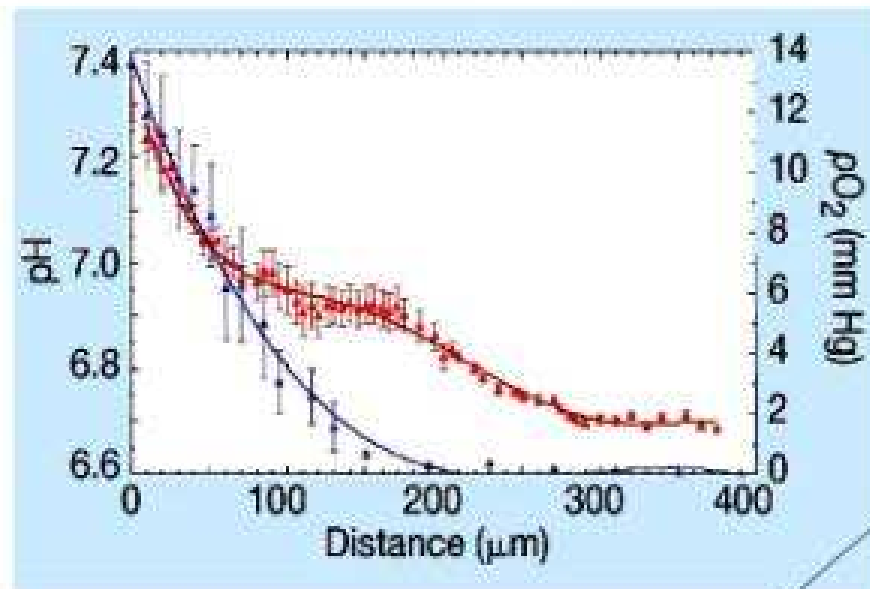
# Angiogeneze (neokapilarizace, neovaskularizace)

Novotvorbě cév v nádorovém ložisku předchází vazodilace cév v nejbližším okolí navozená především zvýšenou aktivitou NO-syntasy a tím produkcí NO-radikálů.

Radikály potencují mitogenní účinek VEGF. Produkce metaloproteinas rozrušuje bazální membránu, čímž se usnadňuje nejen migrace endotelových buněk po fibrinových vláknech tvořených stimuly fibroblastů, ale i migrace tumorových buněk.

Migrující endotelie jsou zdrojem integrinů zajišťujících jejich životnost. Kapilární morfogenezi podporují ještě další faktory - (např. E-selektin). Vaskularizace nádorového ložiska umožní jeho prokrvení (perfuzi), a tím jeho další růst.

# Role of hypoxia in Tumor angiogenesis



# 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 transdukci, 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)

## Drozofila 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)

## 6. 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.

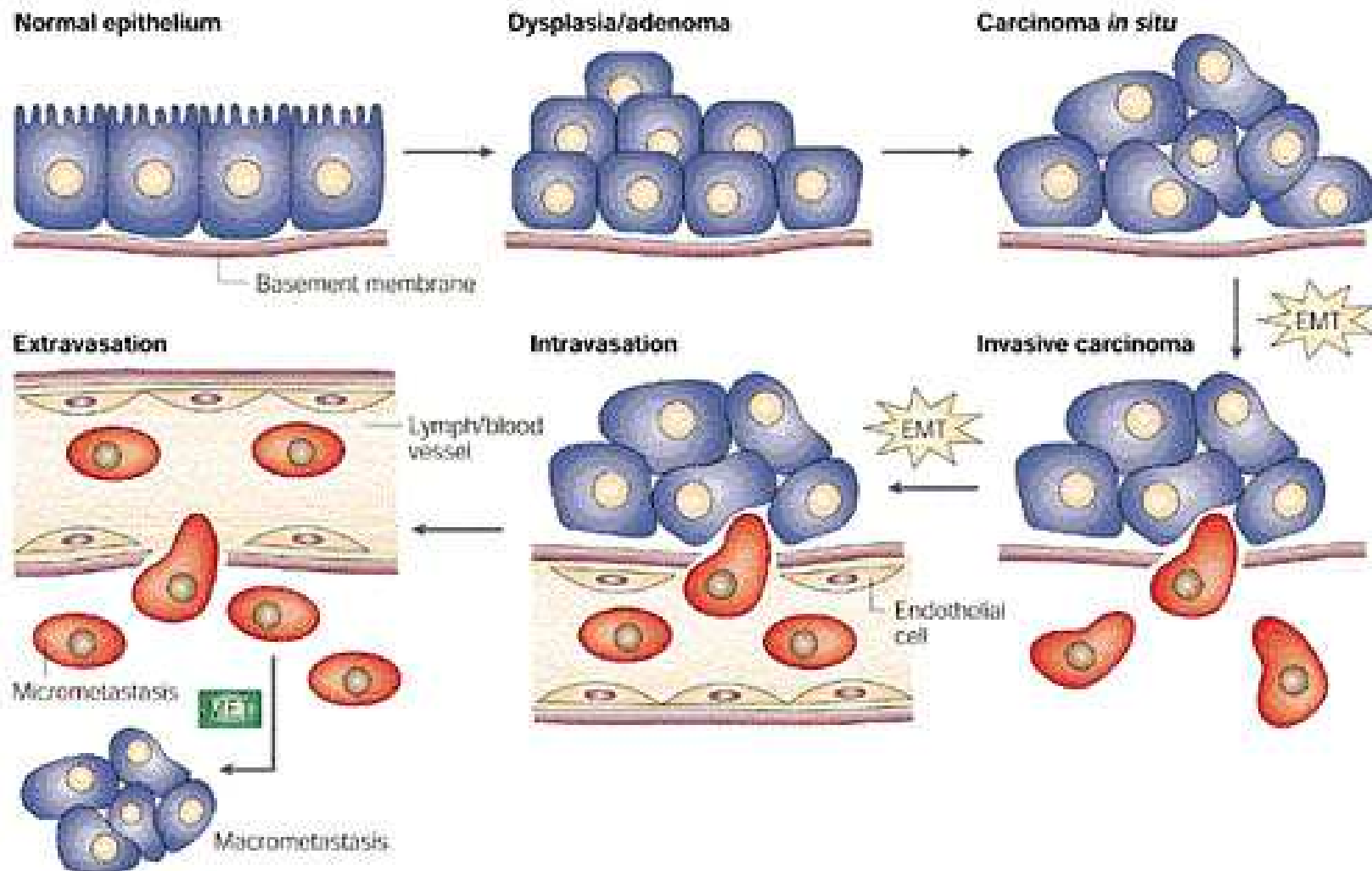
# Metastáze

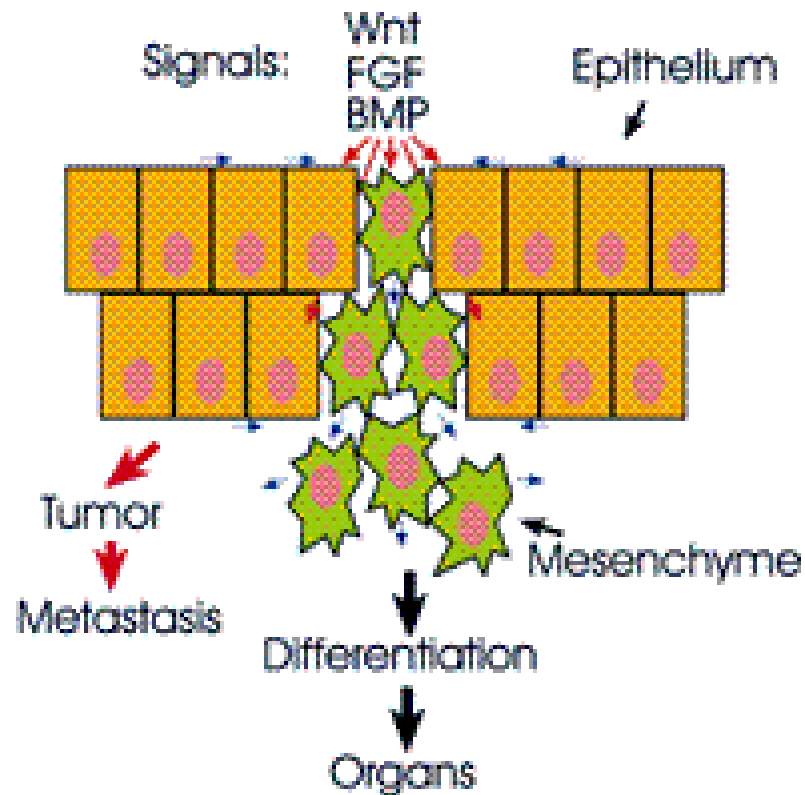
- Nejčastější příčina úmrtí
- Schopnost metastázovat je jedním ze základních znaků malignity nádorových onemocnění, řada faktorů (druh nádoru, velikost primárního nádoru, angiogenní procesy)
- Při vzniku metastáz hrají důležitou úlohu chemokiny. Jde o superrodinu prozánětlivých cytokinů, které selektivně 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)

# EMT/MET



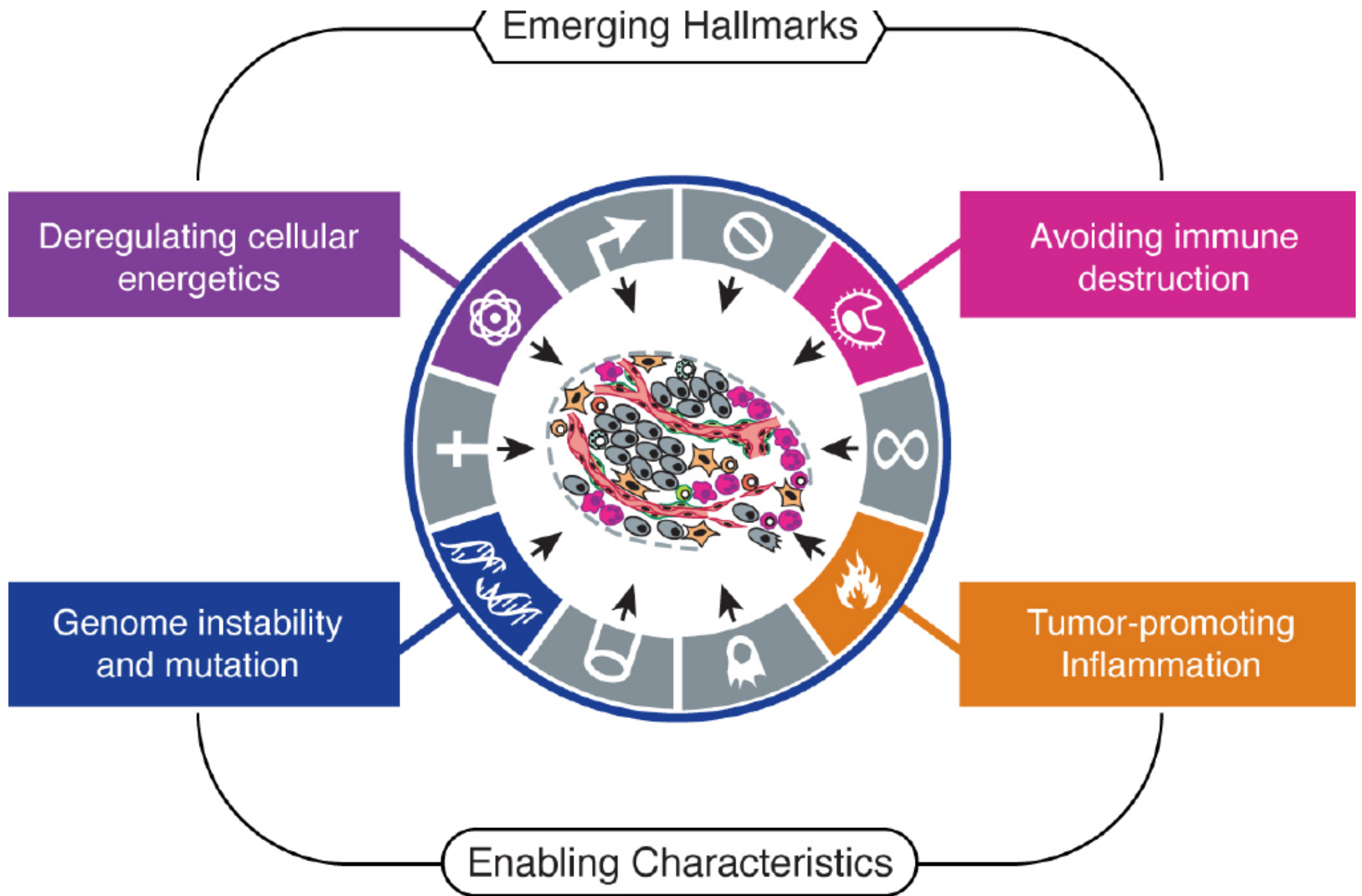


3 hlavní signální dráhy:

- *Wnt/ $\beta$ -catenin*
- *FGF*
- *TGF- $\beta$ /BMP*

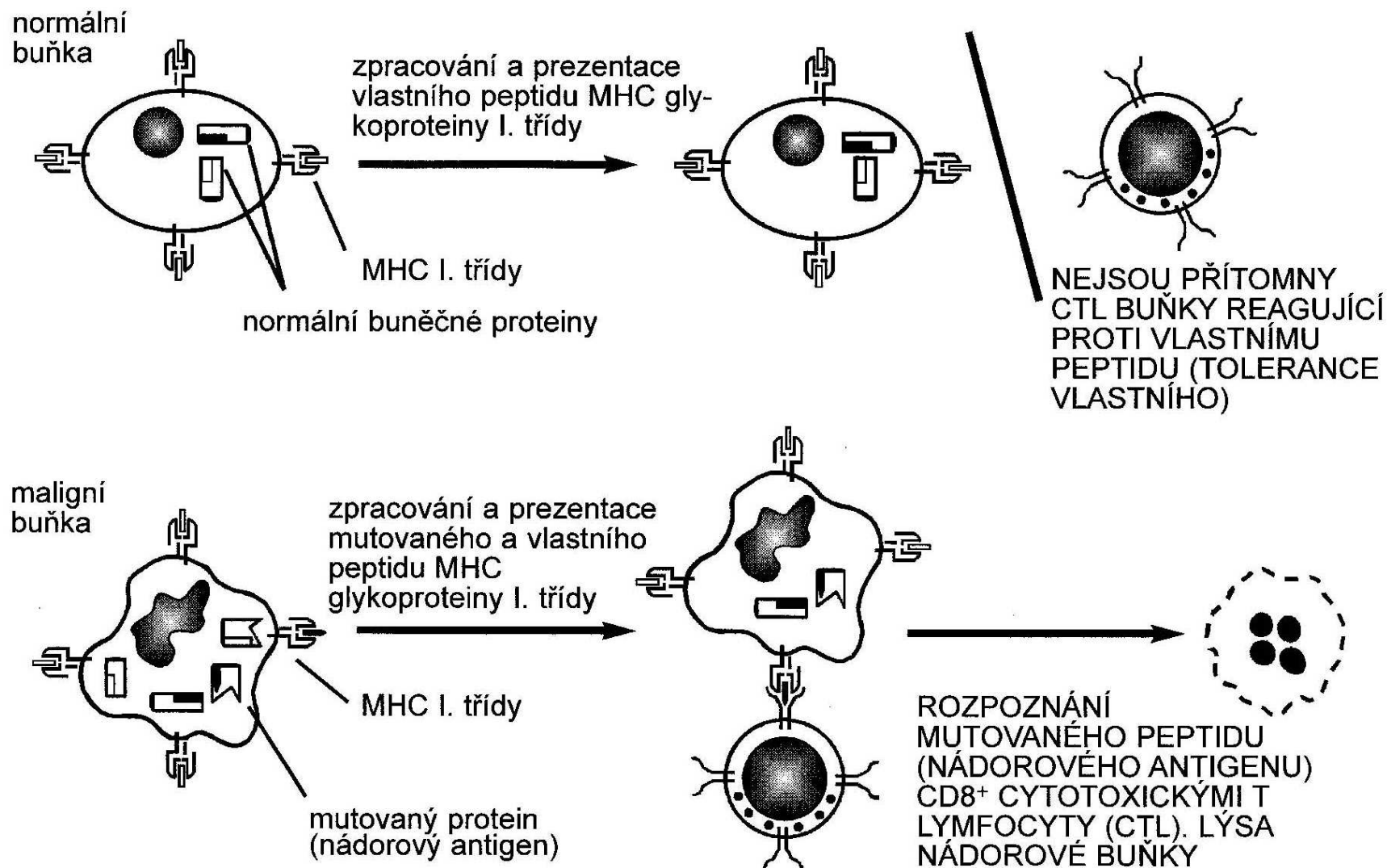
TF: Snail, Slug, Twist, Zeb1/2

Nádorová buňka  $\rightarrow$  IL-4/CSF-1  
 $\rightarrow$  TAMs  $\rightarrow$  matrix degradující  
 enzymy (metaloproteinázy,  
 proteázy)/EGF

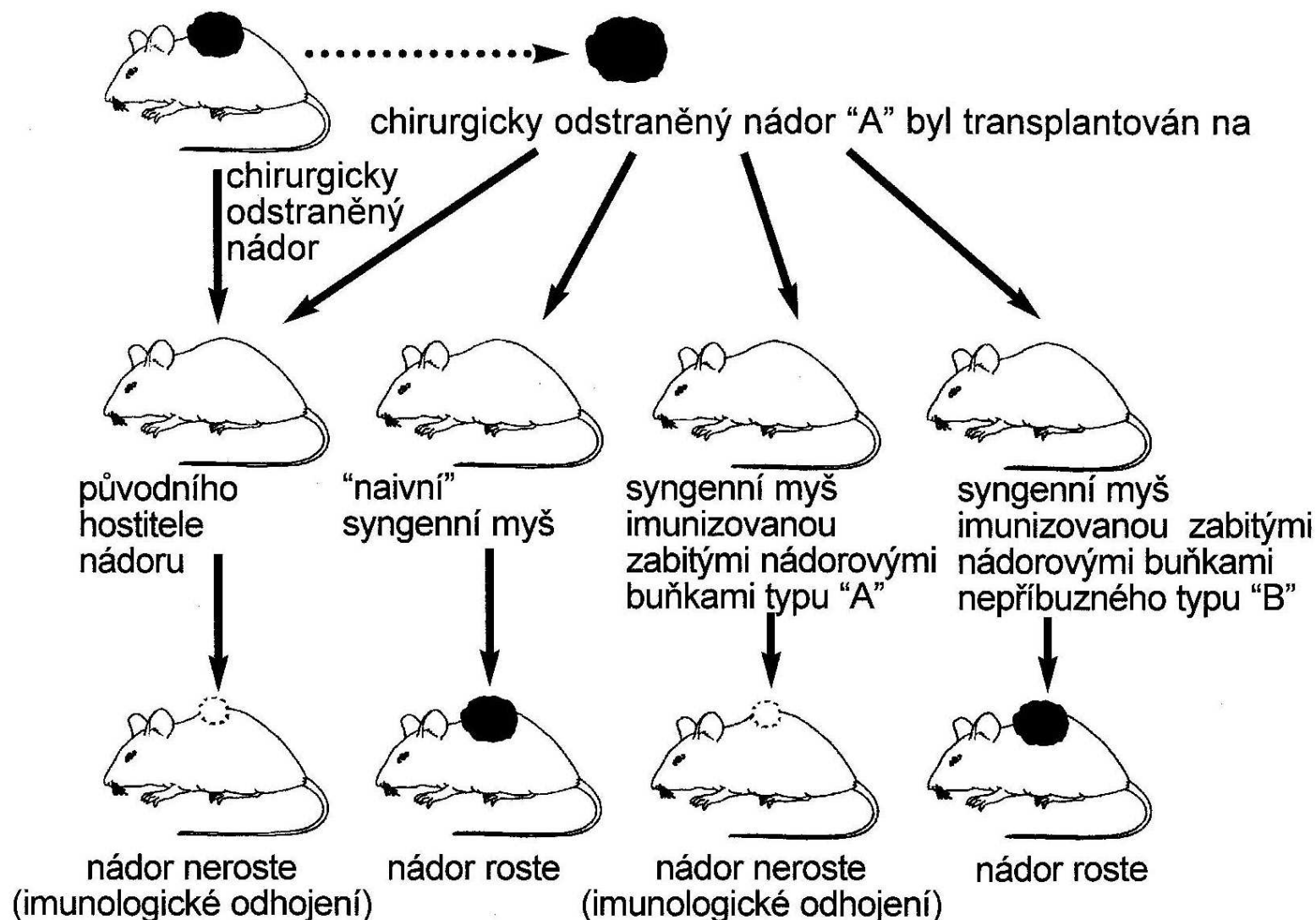


Hanahan and Weinberg. 2011

# Protinádorová imunitní odpověď

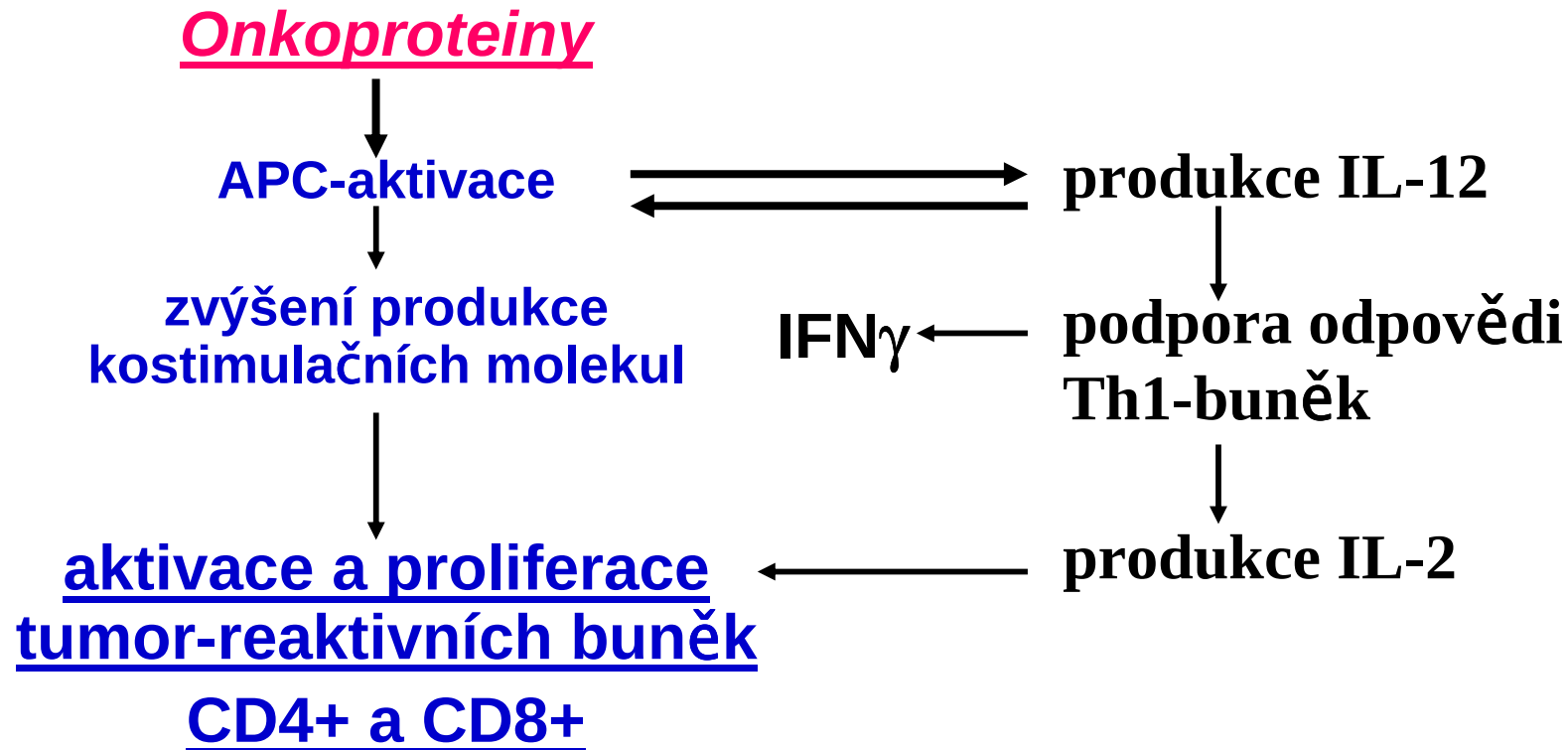


myš s MCA indukovaným  
sarkomem "A"



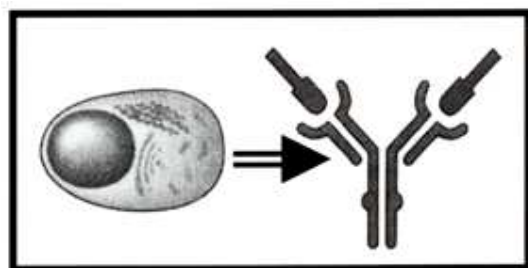
Důkaz: imunokompromitovaní pacienti - 200krát vyšší  
riziko vzniku nádorového onemocnění

# Protinádorová imunitní odpověď

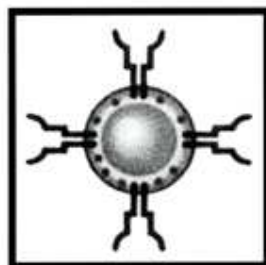


# Protinádorová imunitní odpověď

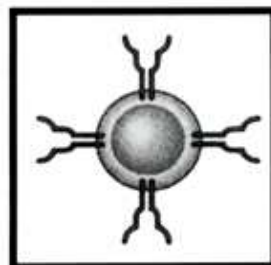
- Velký význam cytolytické T-lymfocyty typu CD8+ a T-lymfocyty typu CD4+: Aktivované T-buňky CD4+ exprimují CD40 ligand (gp39), který aktivuje CD40-receptor na antigen-prezentujících buňkách (dendritické buňky). Secernace prozánětlivých cytokinů, zejména IL-12, čímž dochází k aktivaci T-lymfocytů typu CD8+ a navození produkce IFN $\gamma$  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 $\gamma$ ) 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    protilátka  
sekretující protilátky



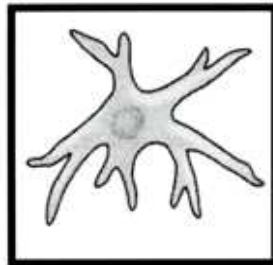
CD8 CTL



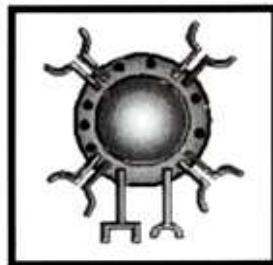
CD4 Th  
lymfocyt



makrofág  
(APC)



dendritická  
buňka



NK buňka  
(LAK buňka)

myš s MCA  
indukovaným  
sarkomem "A"

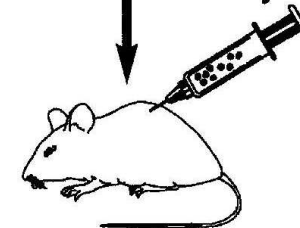


izolace CD8<sup>+</sup>  
odstranění T buněk  
sleziny

chirurgicky  
odstraněný  
nádor

přenos CD8<sup>+</sup> T buněk  
syngenní myši

transplantace  
nádoru



syngenní myš  
s přenesenými CD8<sup>+</sup>  
T buňkami

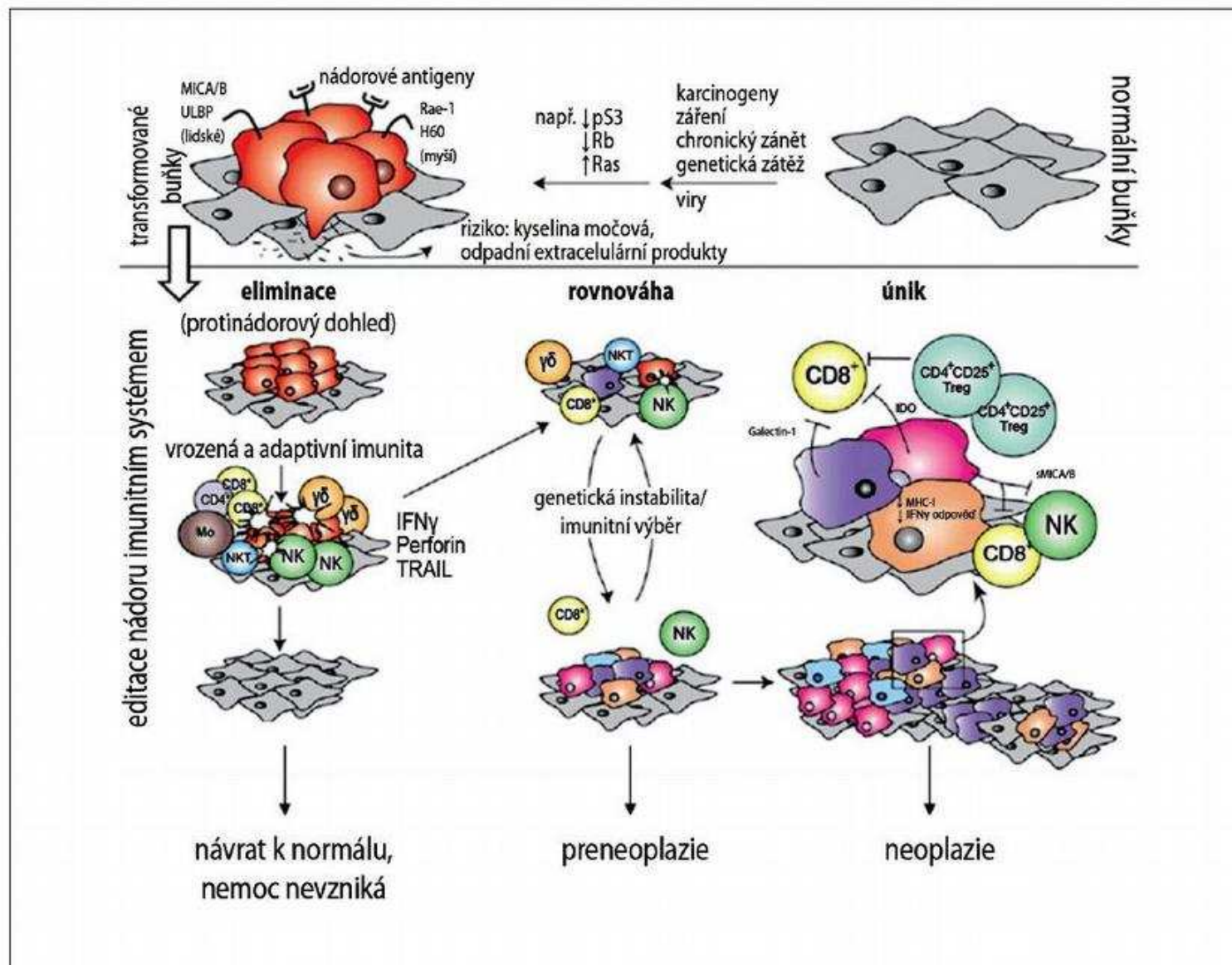
nádor neroste  
(imunologické  
odhojení)



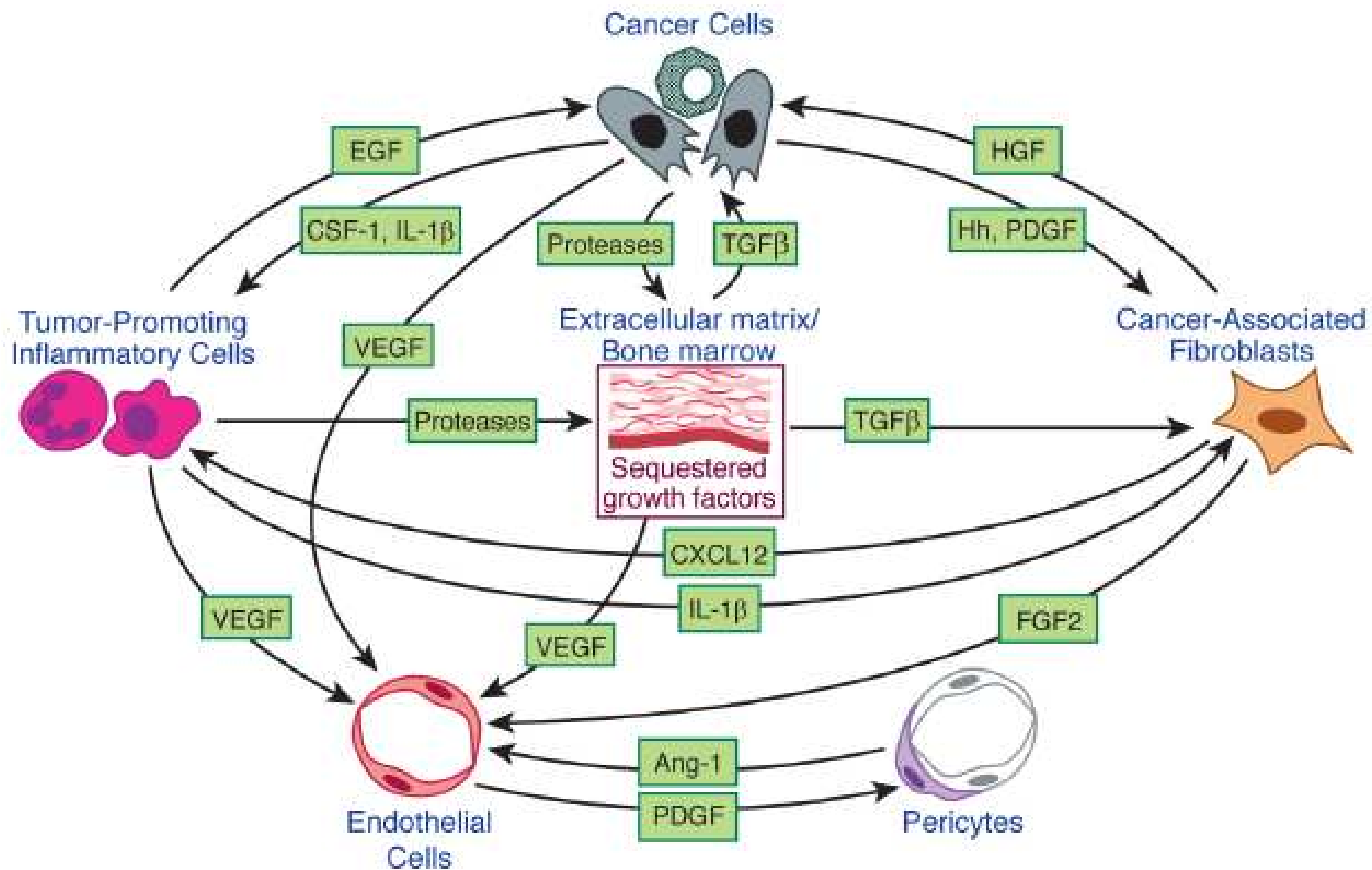
syngenní myš  
bez přenesených  
CD8<sup>+</sup> T buněk

nádor roste

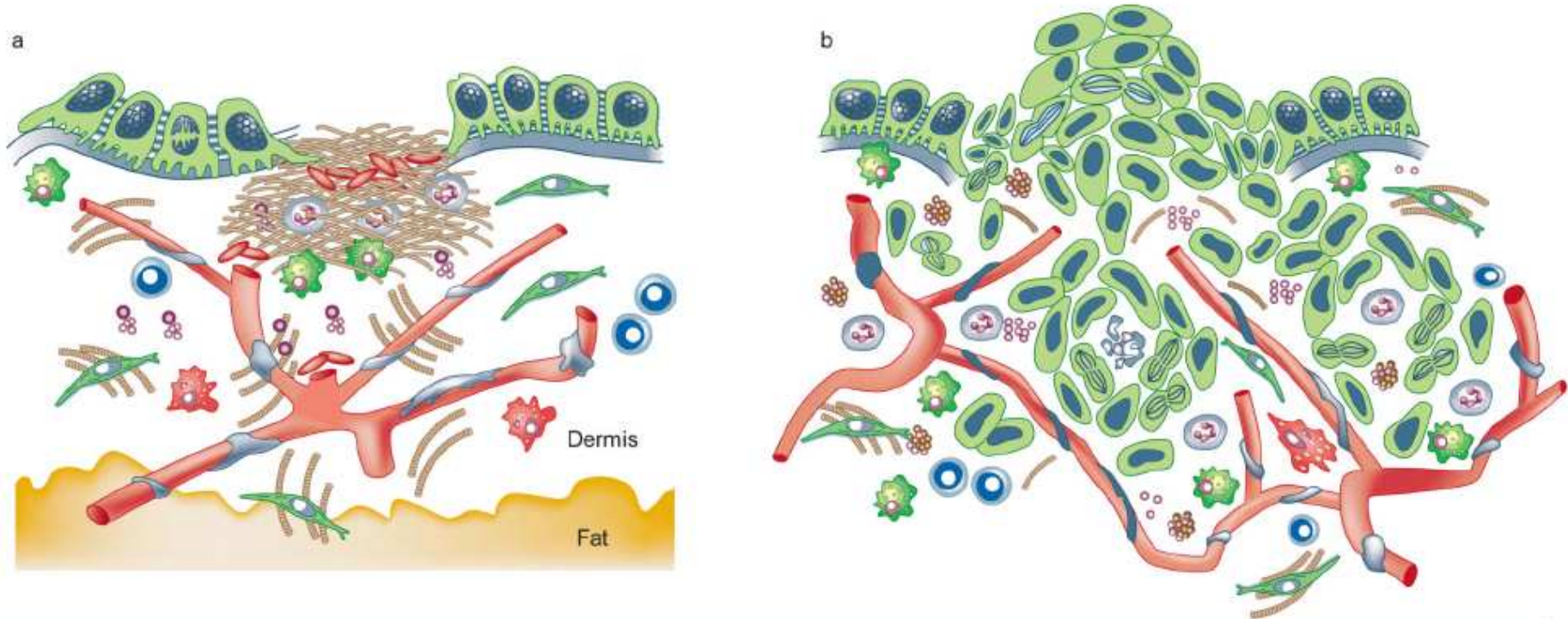
# Teorie protinádorového imunologického dohledu („cancer immunoediting“)



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



# 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

