

Molekulární a buněčná biologie nádorů

Prof. RNDr. Jana Šmardová, CSc.

Ústav experimentální biologie
Přírodovědecká fakulta
MU Brno

Bi9910

středa 14.00 – 16.00

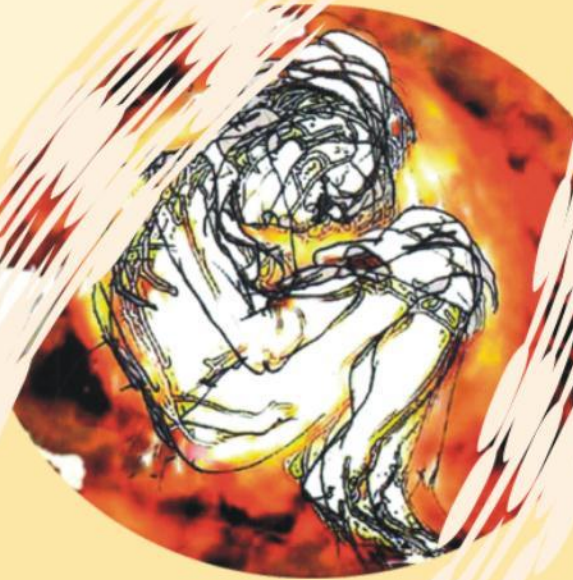
A11 – č. 306



2020

Molekulární a buněčná biologie nádorů

10. Tvorba metastáz



Metastázy - nejčastější příčina smrti



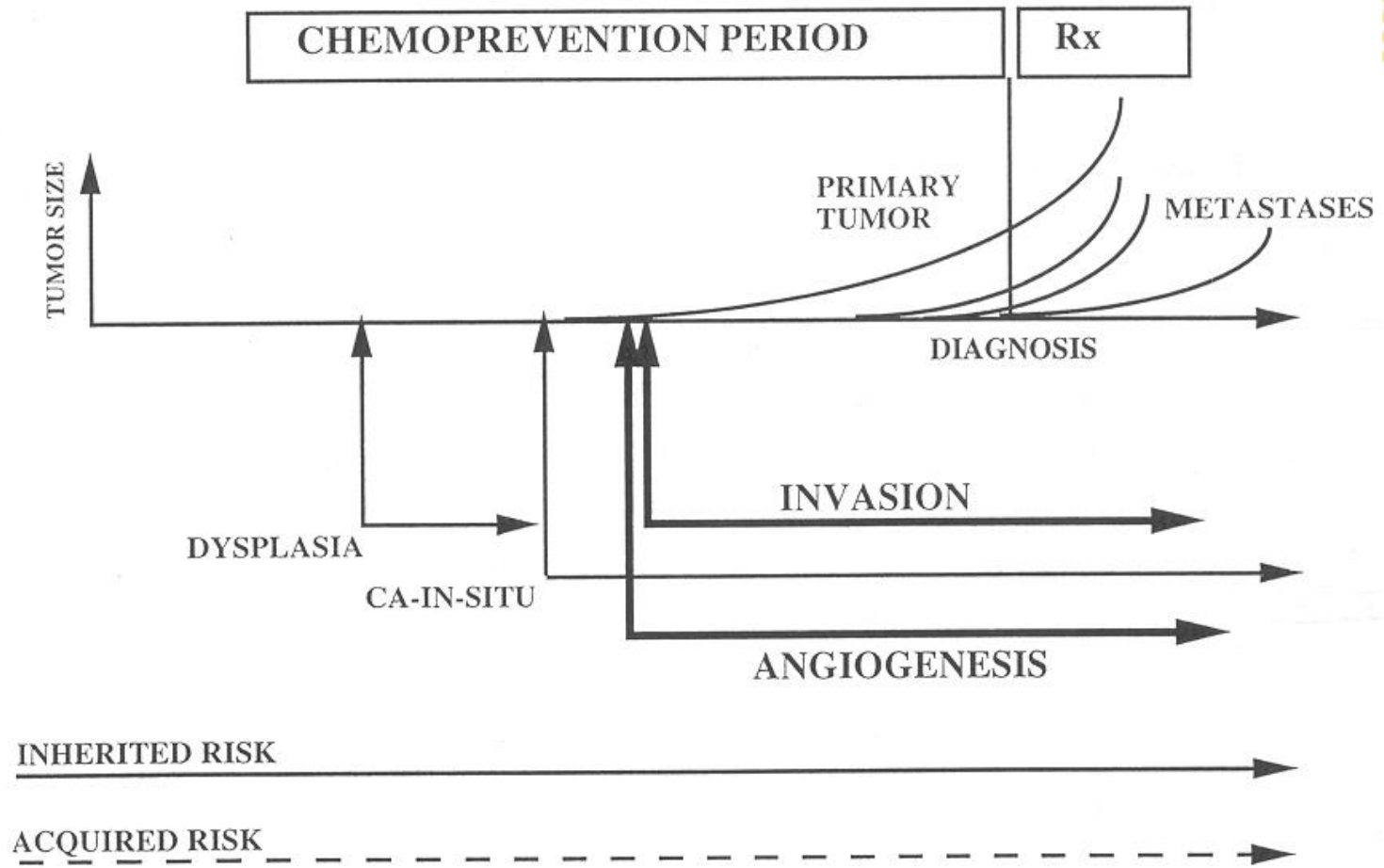
- metastázy jsou **nejzhoubnějším** jevem při nádorovém onemocnění a jsou příčinou asi **90 %** úmrtí pacientů s nádorovým onemocněním
- méně častou příčinou je **bezprostřední působení primárního nádoru**; většina primárních nádorů vzniká jako benigní a jsou relativně neškodné, leda, že narůstající masa utlačuje vitální orgány (**nádory mozku**) nebo uvolňuje nebezpečné množství hormonů
 - **langerhansovy ostrůvky** - nadprodukce inzulínu - hypoglykemie – smrt
 - **thyroidní adenomy** (pre maligní epiteliální růst) mohou způsobit uvolnění nadměrného množství thyroïdního hormonu, což vede k hyperthyroidismu
 - **adenomy hypofýzy** mohou uvolňovat do oběhu nadměrné množství růstového hormonu → akromegalismus
 - **leukémie, lymfomy**

Špatné zprávy o metastázách

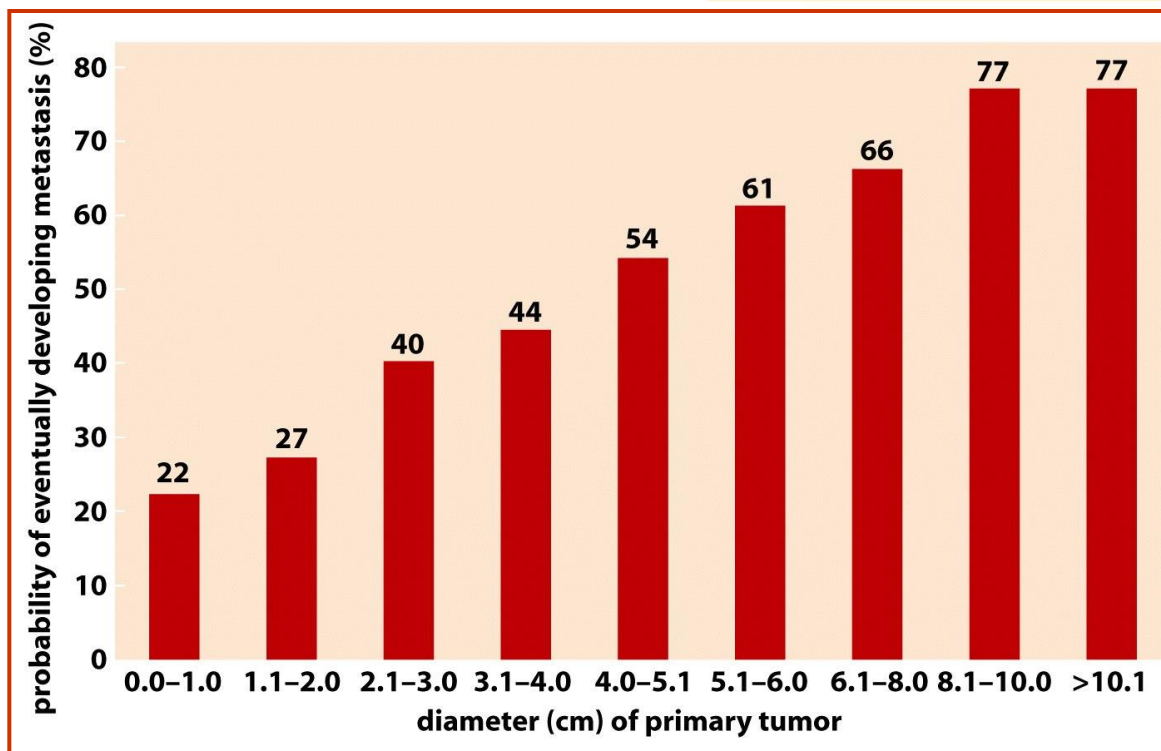


- **více než 70 %** pacientů s invazivním nádorem má zjevné nebo skryté metastázy v době stanovení diagnózy
- získání invazivního a metastatického charakteru je časná událost během progresu nádoru
- **milióny** nádorových buněk se denně dostávají do krevního řečiště
- **angiogeneze** je obecným znakem kancerogeneze, je také časnou událostí a potencuje metastatickou diseminaci nádoru

Tvorba metastáz je časná událost ve vývoji nádoru



Velikost primárního nádoru a riziko metastáz



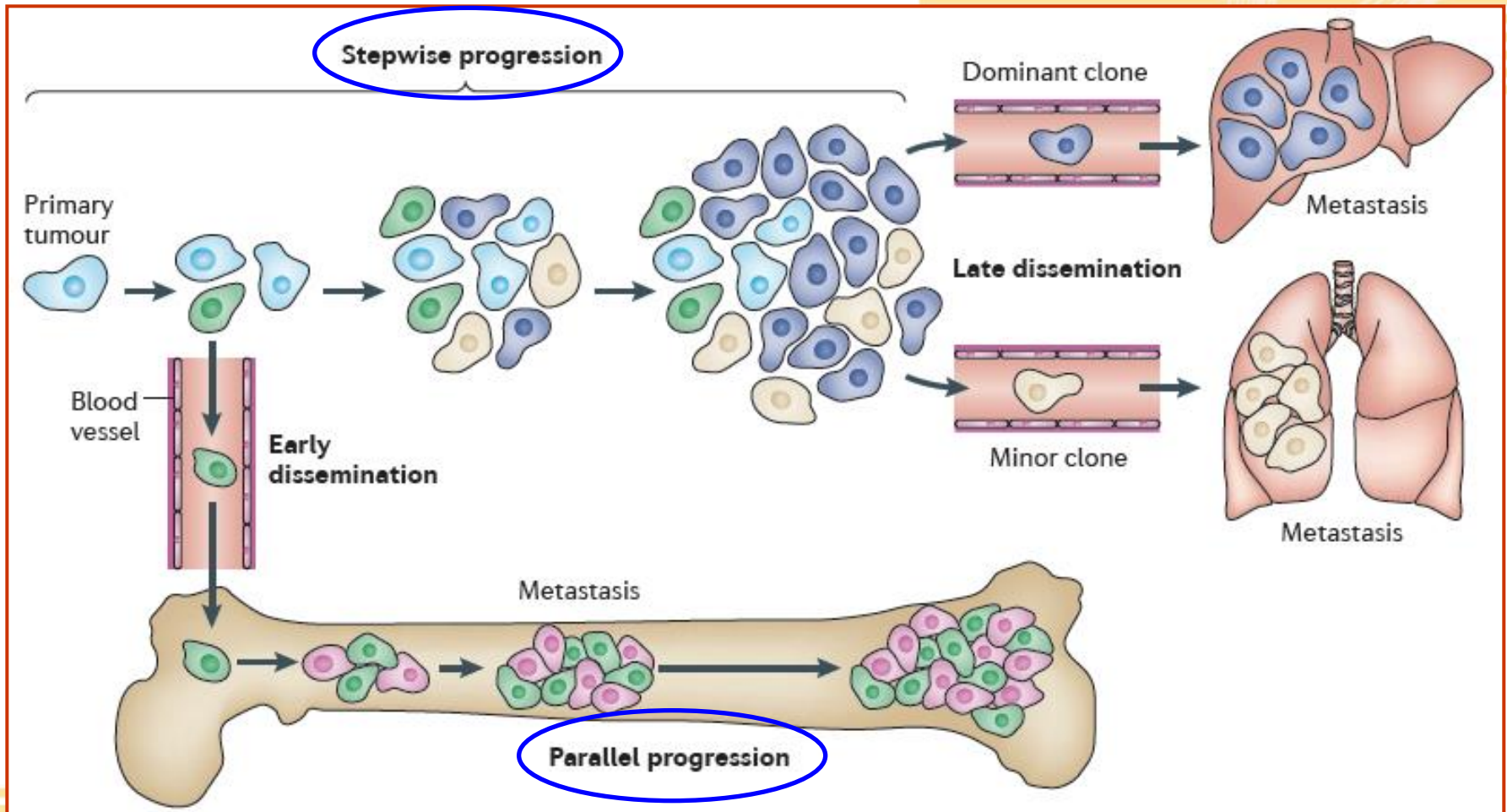
čím je velikost diagnostikovaného primárního nádoru prsu větší, tím je vyšší pravděpodobnost výskytu metastáz: % žen s primárním nádorem dané velikosti, u kterých se vytvořily metastázy

„Dobré“ zprávy o metastázách



- metastazování je **málo efektivní**: méně než 0.01 % cirkulujících nádorových buněk úspěšně založí metastatické ohnisko
- cirkulující nádorové buňky jsou **zachytitelné dříve** než se u pacienta vyvine zjevná metastáza
- k potírání metastáz může být použito **stejné terapie** jako k léčbě primárního nádoru, ze kterého jsou odvozené: chirurgické odstranění, radioterapie, chemoterapie, imunoterapie, hormonální terapie nebo jejich kombinace
- výsledky DNA čipů: podobnost primárních nádorů a metastáz na úrovni exprese genů!! (naopak mohou být velké rozdíly v expresních profilech mezi různými nádory téhož typu)

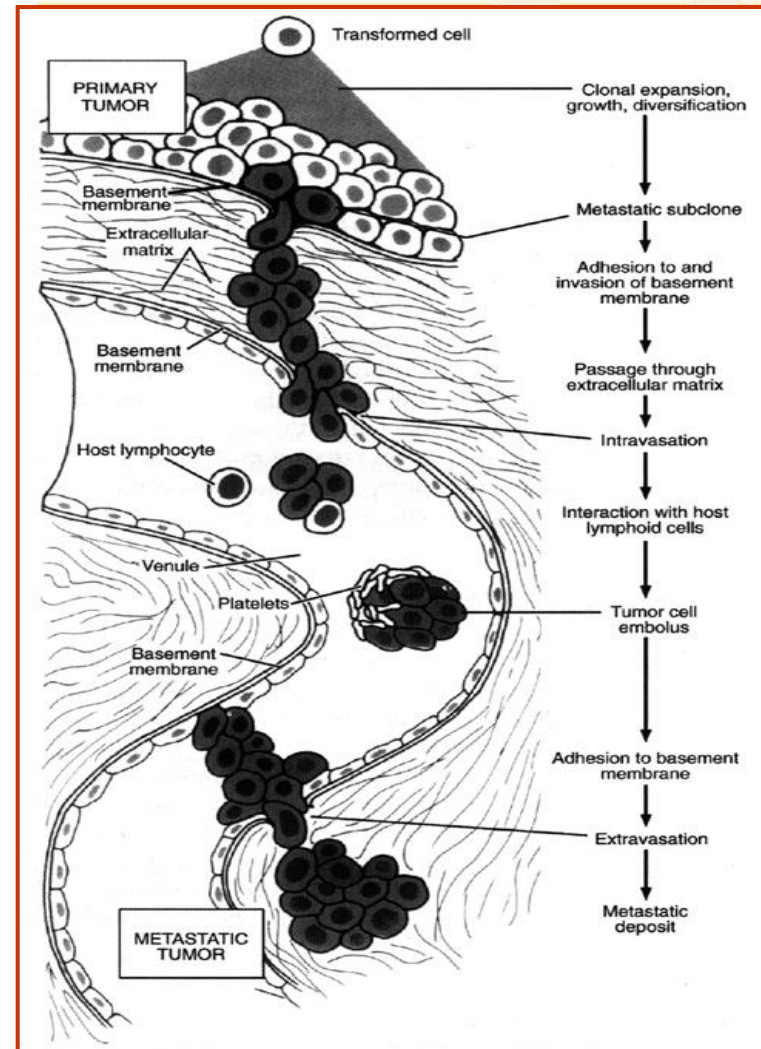
Lineární a paralelní metastazování



Metastatická kaskáda



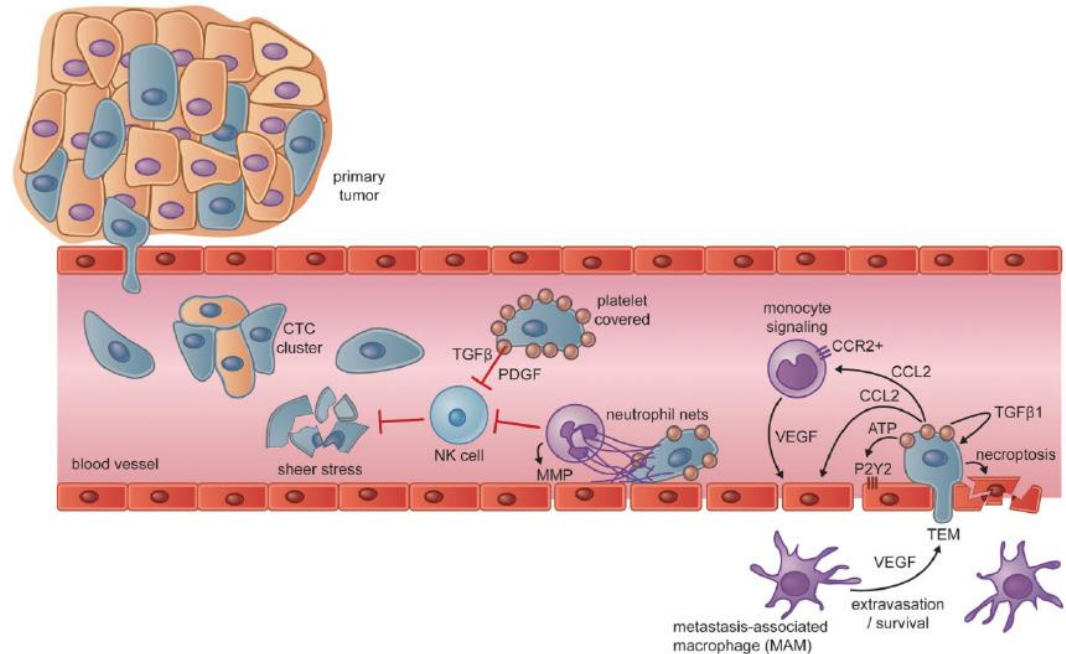
1. uvolnění nádorové buňky z primárního nádoru - **lokální invaze**
2. prostoupení ECM a bazální membrány, vstup do cirkulačního systému - **intravazace**
3. **migrace** cirkulačním systémem
4. **extravazace**
5. vznik (**dormantních**) **mikrometastáz**
6. **kolonizace**



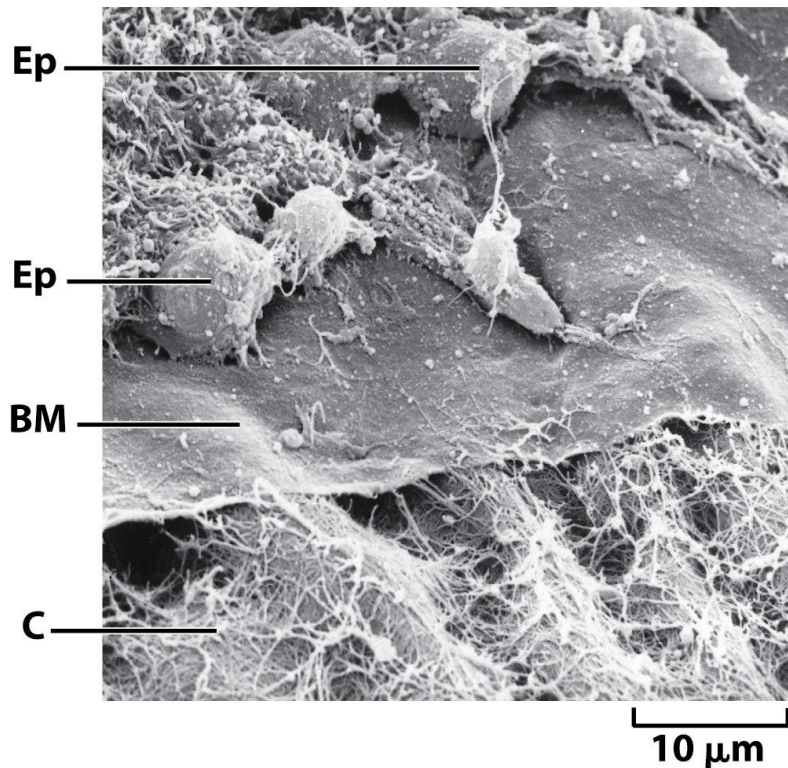
Cirkulující nádorové buňky



- cirkulující nádorové buňky (CTC) mohou být **individuální** nebo ve shlucích; **shluky** CTC se zdají být při kolonizaci efektivnější než jednotlivé buňky
- významná je interakce CTC s **krevními destičkami**: ty je chrání a podporují, ovlivňují i endoteliální buňky, jejich interakci s CTC a propustnost pro CTC
- také **neutrofil** spíše CTC podporují a stimulují extravazaci



Karcinomy a bazální membrána



- **Karcinomy *in situ***: jsou na „epiteliální“ straně bazální membrány. I tak mohou stimulovat angiogenezi na „stromální“ straně – uvolňováním angiogenních faktorů přes (porézní/propustnou) bazální membránu.
- Ovšem porušení bazální membrány (**invaze**) je pro nádor obrovská výhoda pro následující kroky metastazování: přímý přístup ke krevním/lymfatickým kapilárám, které jsou normálně pouze na stromální straně BM.

Má tvorba metastáz fyziologickou podstatu?



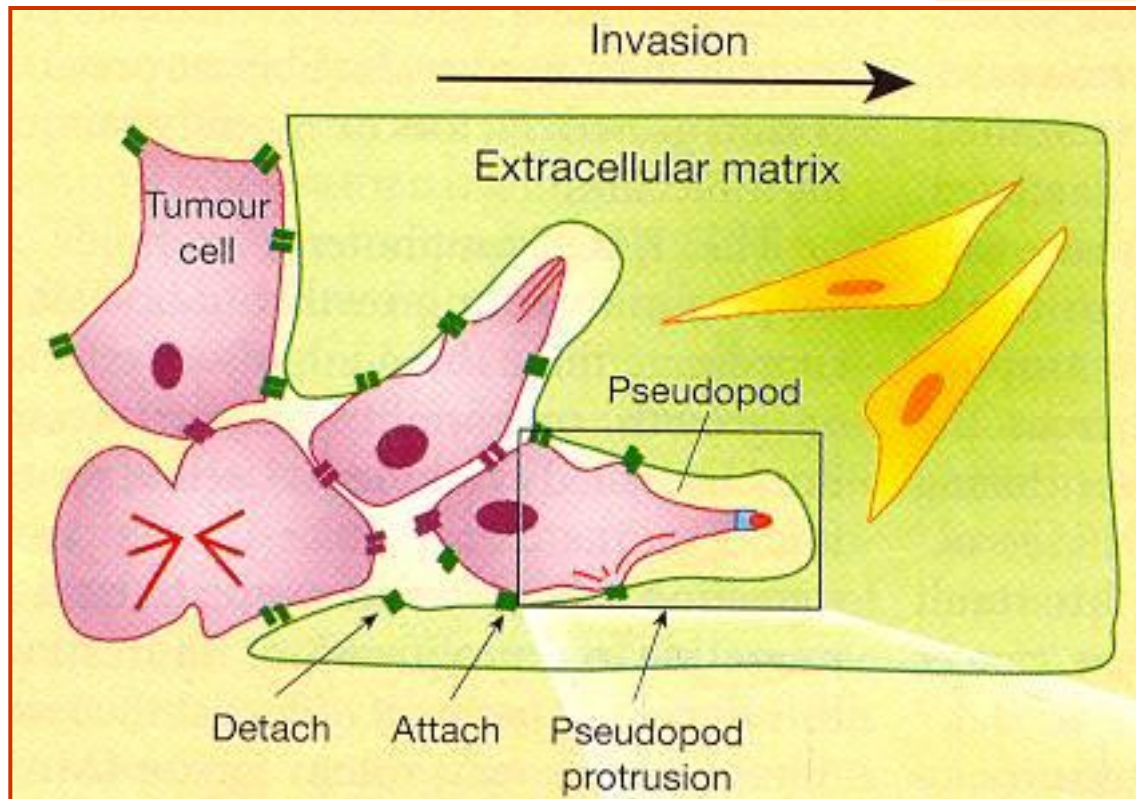
- nádorová invaze může být **deregulovanou** formou **fyziologických** invazivních procesů, které se uplatňují například:
 - při prorůstání neurálních výběžků během vývoje mozku
 - při remodelaci tkání
 - při tvorbě cévního systému (a také při *nádorové* angiogenezi)
 - při hojení
 - a další

Mechanismus invaze nádorových buněk



- invazi lze chápat jako **pohyb** buněk spojený s regulovanou **adhezí** a uvolňováním adheze (od ECM, mezi buňkami navzájem) a **proteolýzou ECM**; průnik buněčných pseudopodií (výběžků) - související s tvorbou aktinových polymerů, složek cytoskeletonu - zřejmě vyžaduje souhru enzymů degradujících povrchové proteiny buněk a dalších enzymů - receptorů a aktivátorů
- při remodelaci ECM musí existovat souhra mezi degradací (ECM) a procesem, který inhibuje proteolytické enzymy, aby byla umožněna postupná adheze

Mechanismus invaze nádorových buněk



|| Intercellular adhesion molecules

|| Cell-matrix adhesion molecules

>< Actin filaments

Epiteliální mezenchymální tranzice - EMT



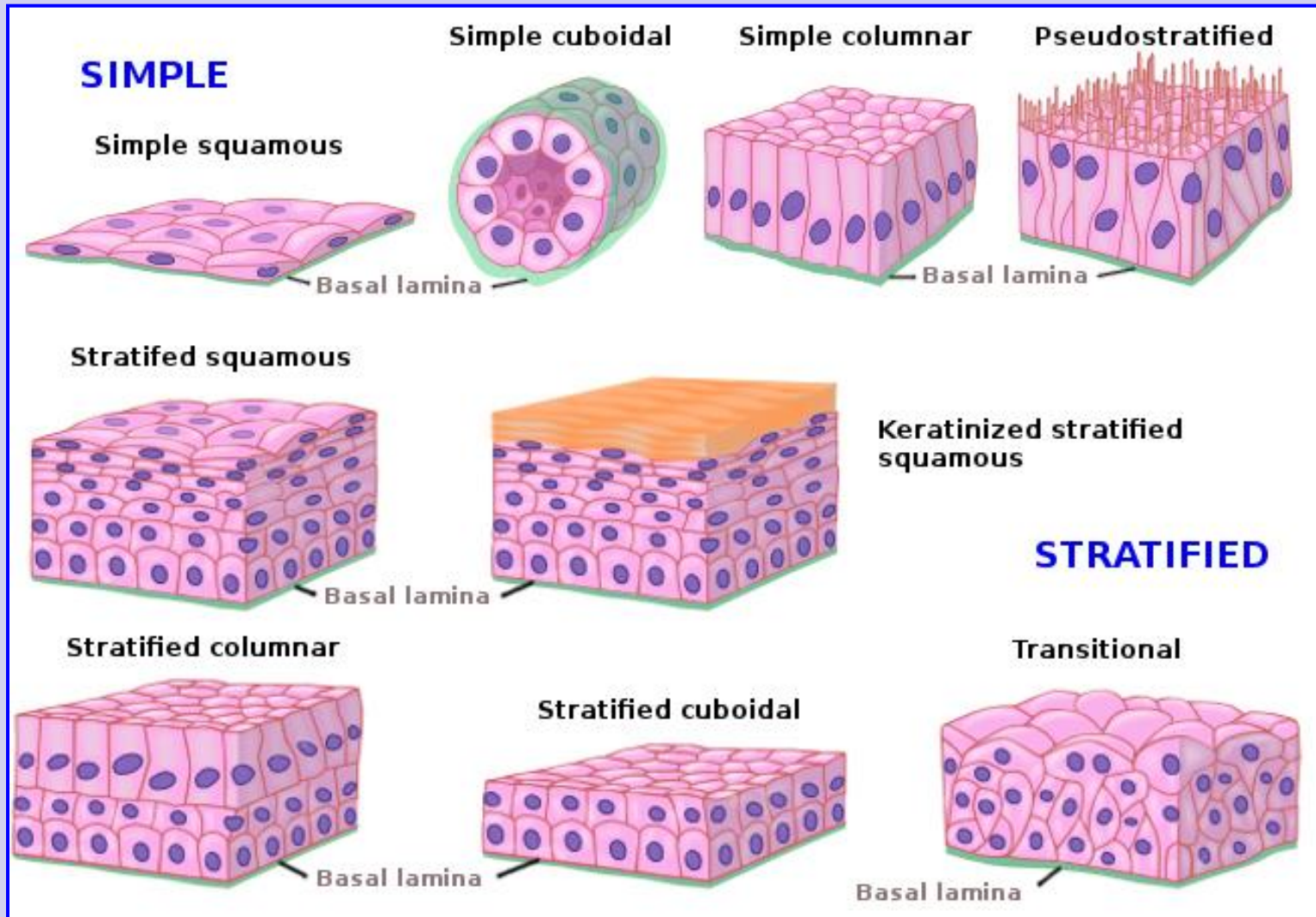
- **vývojový program***, který umožňuje polarizovaným epiteliálním buňkám, které normálně interagují s bazální membránou, získat fenotyp mezenchymálních buněk s větší pohyblivostí, invazivitou, zvýšenou rezistencí k apoptóze a zvýšenou schopností degradovat komponenty ECM
- dokončení EMT se projevuje degradací bazální membrány a vznikem mezenchymálních buněk, které migrují z epiteliální vrstvy, kde vznikly
- tento vývojový program **transdiferenciace** je **využíván** během embryogeneze, ale i v dospělosti, například v souvislosti s hojením/reparací epiteliálních tkání
- „**zneužíván**“ nádorovými buňkami karcinomů během maligního vývoje

* poprvé popsán Elisabeth Hay v roce 1982

Typické epitelium

- vrstva, plocha („sheet“) buněk, často o tloušťce právě jedné buňky s jednotlivými buňkami sousedícími jedna s druhou **uniformním** způsobem
- uniformní vzdálenosti mezi sousedními buňkami a mezi nimi buněčné spoje („cell junctions“) a adheze, které je drží **pevně** pohromadě a **inhibují pohyb** jednotlivých buněk mimo vrstvu
- vnitřní adhezivita umožňuje buněčné ploše vytvářet trojrozměrné prostorové struktury, které mají velkou mechanickou pevnost
- plocha buněk je **polarizovaná** ve směru **apikální – bazální**, což je někdy vizuálně patrné
- vrstva buněk může adherovat k různým substrátům a má různé funkce

Typické epitelium



Typické mezenchymální buňky

- obecně nevytváří přesně uspořádané („*regimented*“) struktury a nemají pevné mezibuněčné adheze
- tvoří struktury **nepravidelných** tvarů a bez pravidelné struktury a hustoty
- adheze mezi mezenchymálními buňkami jsou mnohem méně pevné a umožňují mnohem větší migraci buněk
- mezenchymální buňky mají více protažené podlouhlé tvary a mají **předo-zadní polaritu**
- nepravidelná struktura neumožňuje rigidní topologickou specializaci
- **migrace** mezenchymálních buněk je mechanisticky odlišná od migrace epiteliálních buněk: EB se pohybují jako celek, MB se pohybují individuálně, mohou opustit oblast ostatních MB

Epiteliální-mezenchymální tranzice (EMT)



- tranzice/přepnutí epiteliální buňky v buňku mezenchymální vyžaduje změnu morfologie, buněčné architektury, adheze a migrační kapacity

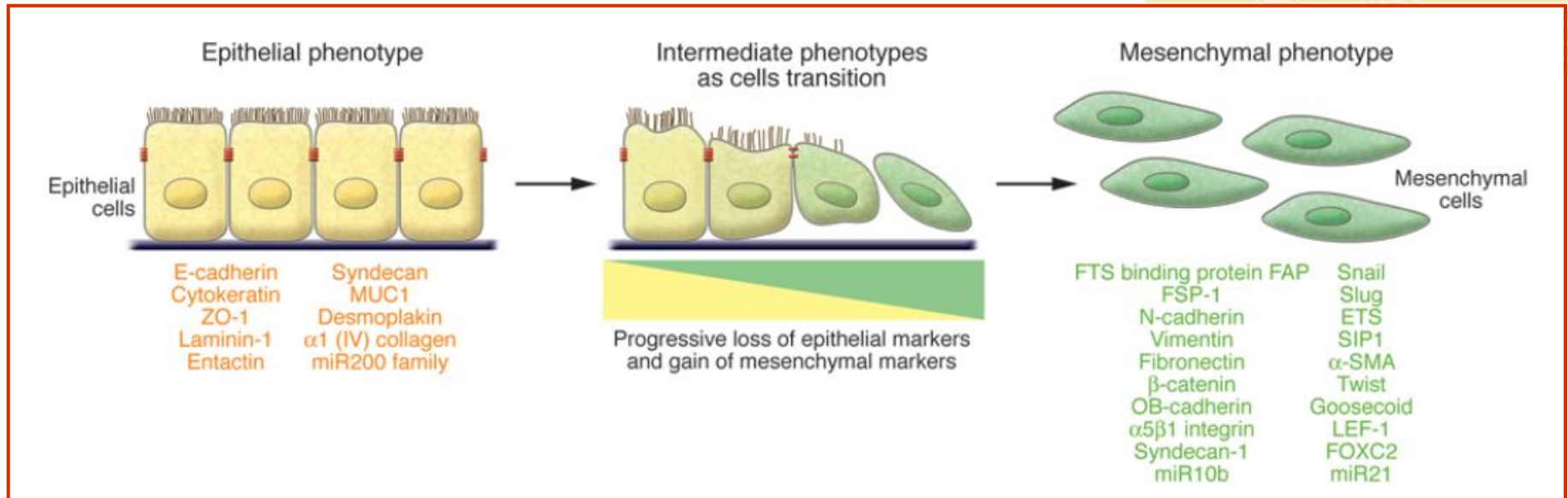
Fenotypické znaky

- zvýšená migrační kapacita
- trojrozměrná invaze
- rezistence k anoikis, k apoptóze

Molekulární znaky

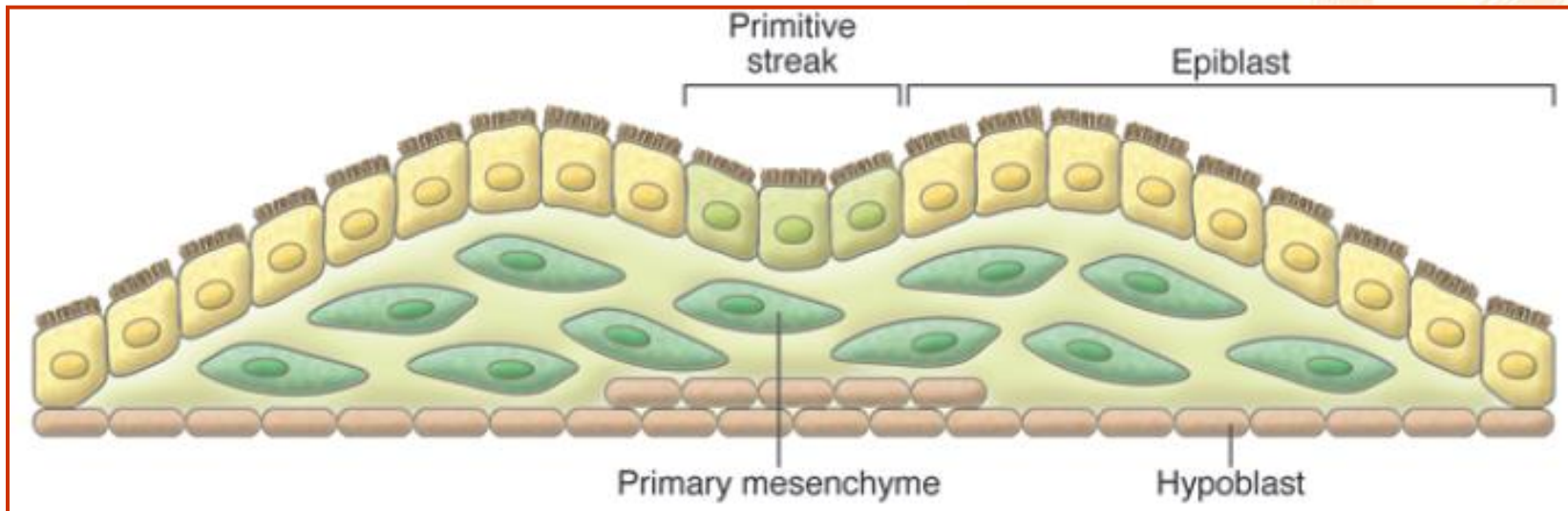
- zvýšená exprese **N-kadherinu** a **vimentinu**
- zvýšená exprese transkripčních faktorů jako **SNAIL**, **TWIST**, **ZEB1**, **SLUG**
- jaderná lokalizace **β -kateninu**
- inhibice exprese **E-kadherinu**

Epiteliální-mezenchymální tranzice



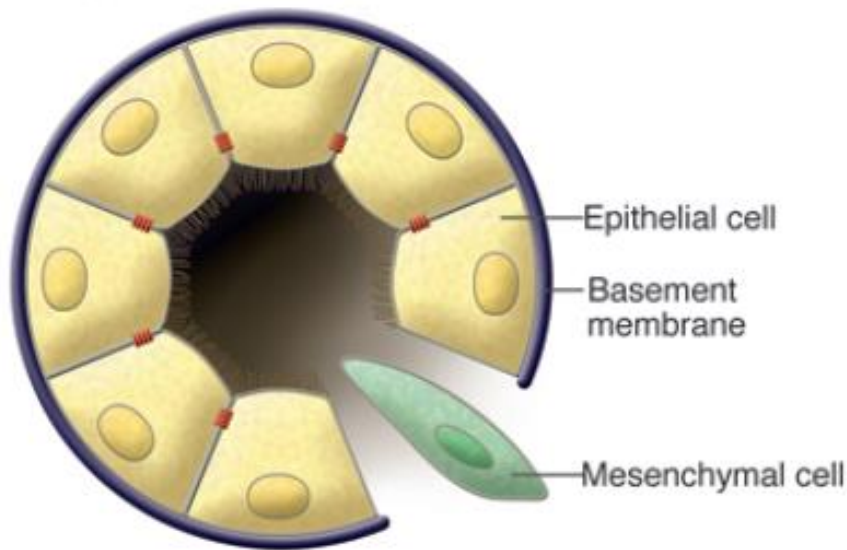
- EMT zahrnuje funkční tranzici polarizovaných epiteliálních buněk v pohyblivé mezenchymální buňky, které produkují komponenty ECM

EMT typu 1



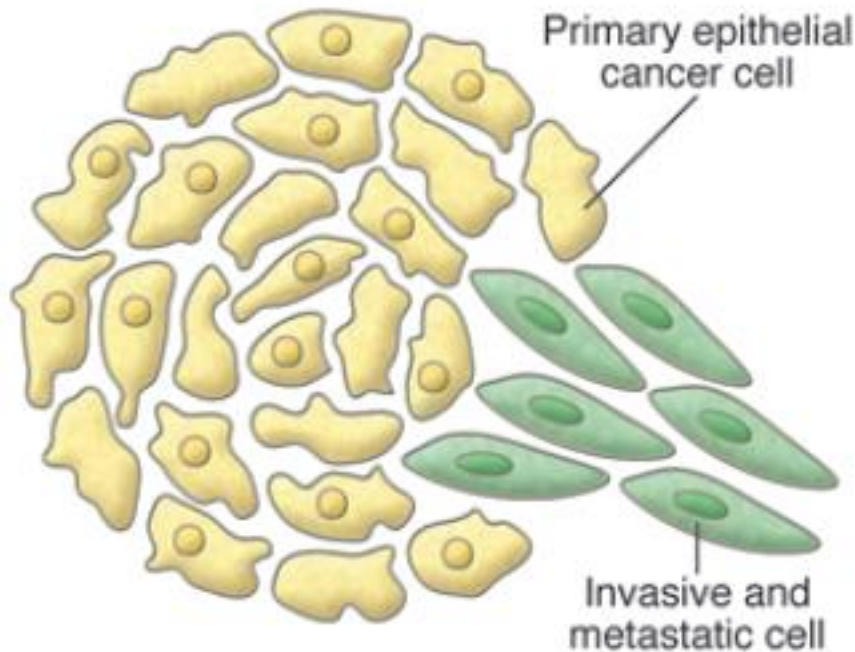
- souvisí s **implantací embrya** a gastrulací; vede ke vzniku mezodermu a endodermu a k pohyblivým buňkám neurální lišty
- nezpůsobuje fibrózu (zmnožení vaziva), neindukuje invazivní fenotyp
- generuje mezenchymální buňky, které mohou následně prodělat **MET** a vytvářet sekundární epitel

EMT typu 2



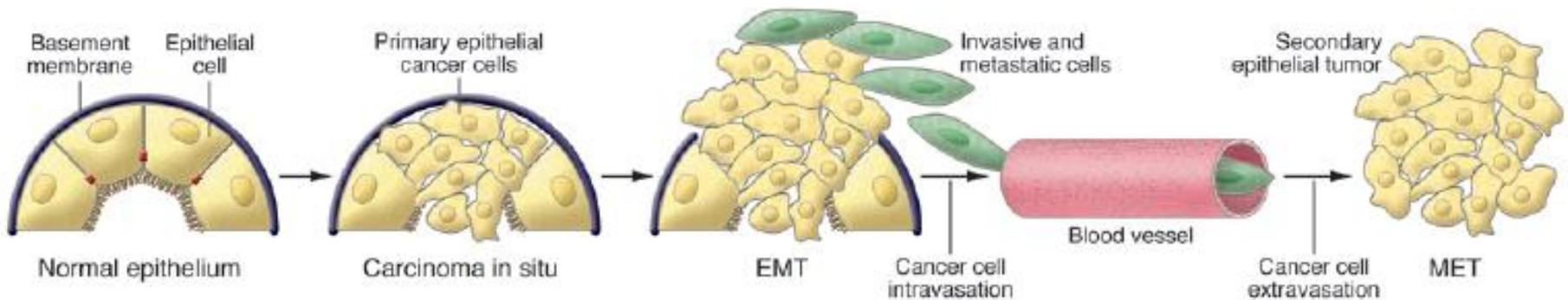
- souvisí s **hojením ran**, regenerací tkání a **fibrózou**
- program EMT začíná jako součást reparace tkání, generuje fibroblasty, které jsou nutné k rekonstrukci tkání
- fibróza je důsledkem přetrvávajícího zánětu, je to vlastně neustálý, nekončící proces hojení

EMT typu 3



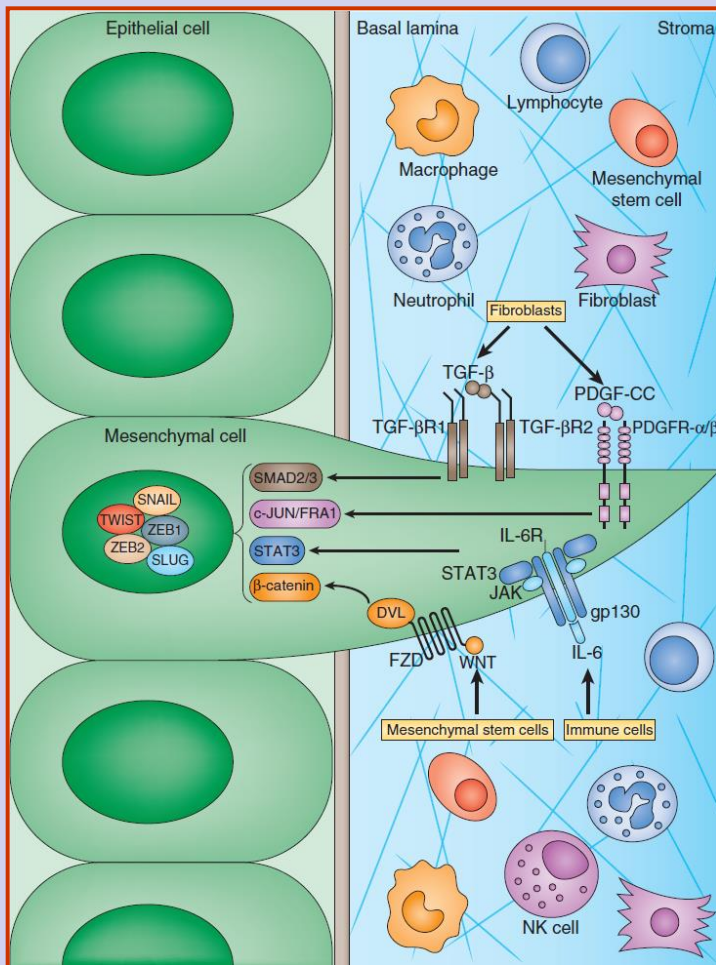
- objevuje se u **neoplastických** buněk, které prodělaly genetické a epigenetické změny, a to hlavně v genech, které upřednostňují klonální růst a vývoj lokalizovaných nádorů
- buňky karcinomů prodávajících EMT typu 3 mohou invadovat a metastázovat

Přínos EMT k progresi nádorů



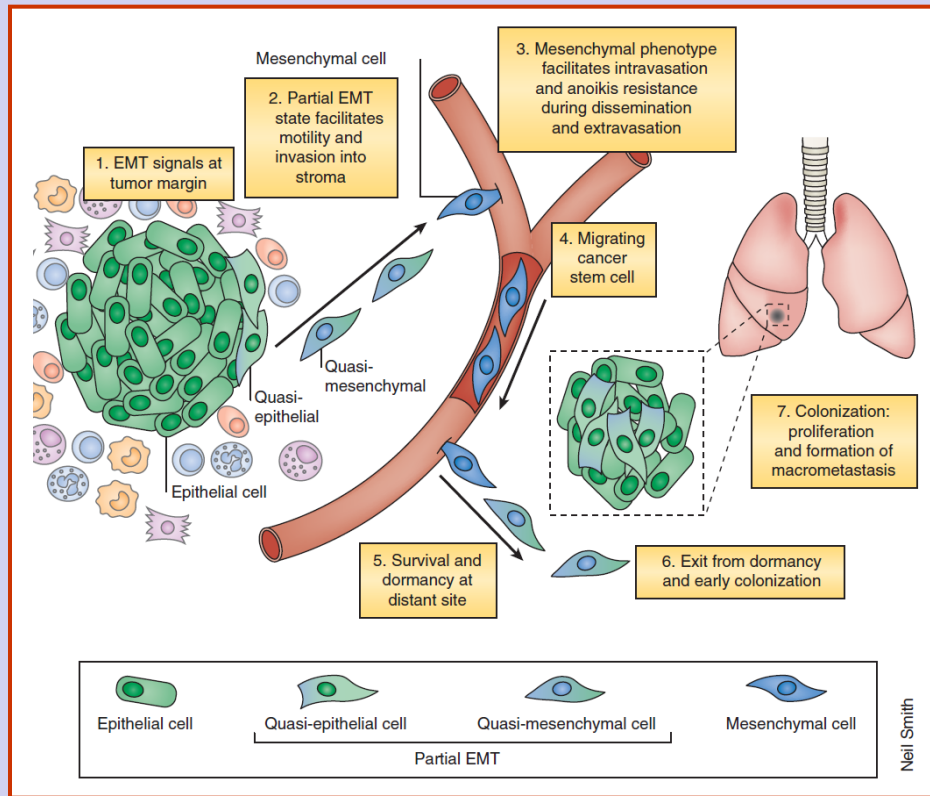
epiteliální buňky ztrácejí polaritu, uvolňuje se jejich vazba na bazální membránu → EMT a angiogenní zapnutí → vstup nádorových buněk do cirkulace → opuštění krevního řečiště a vytvoření mikro- a následně makro- metastázy, což může zahrnovat **MET** a návrat k epiteliálnímu fenotypu

Spojení extracelulárních signálů a EMT transkripčních faktorů



- fyziologická aktivace programu EMT závisí na souběhu mnoha signálů ze **stroma** (**TGF- β** , **WNT**, **PDGFs**, **IL-6**)
- primární reakcí buňky je exprese/aktivace **EMT-TFs** („*EMT-inducing transcription factors*“: **TWIST**, **SNAIL**, **SLUG**, **ZEB1**)
- EMT-TFs reprimují (ovlivňují) expresi svých cílových genů v součinnosti s epigenetickými mechanismy (acetylace, methylace histonů,...)

Díky epiteliální-mesenchymální plasticitě se nádorové buňky adaptují během metastazování

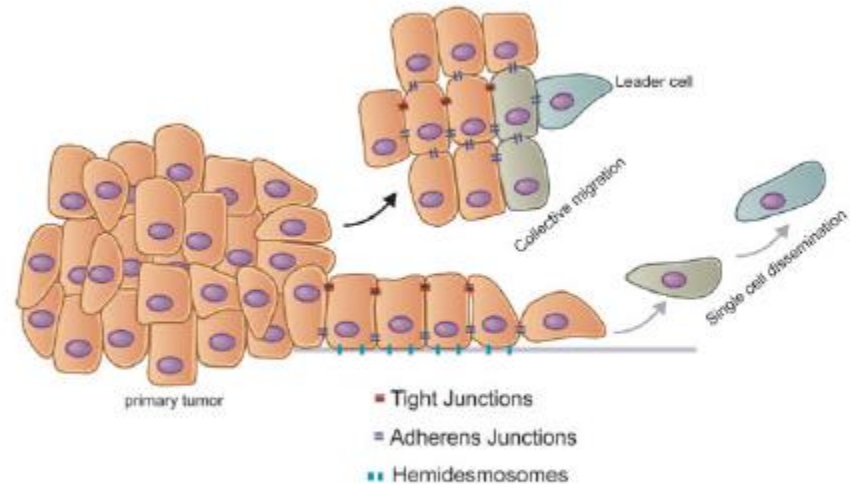


- vlivem EMT-indukujících signálů subpopulace epiteliálních buněk ztrácí epiteliální charakter a uvolněním z primárního nádoru se mezenchymální charakter prohlubuje, což posiluje potenci k intravazaci, průchodu cévním/lymfatickým systémem...
- v cílovém místě jsou buňky vystaveny odlišným signálům mikroprostředí a podle toho buď podstupují dormanci nebo MET a následnou tvorbu sekundárního nádoru, který je obvykle opět tvořen převážně epiteliálními buňkami

EMT: metastazující buňky



- invaze z primárního nádoru je spíše **kolektivní**: migruje spíše větší soudržná skupina (shluk) buněk než jednotlivé buňky; soudržnost zajišťuje E-kadherin



- invadující skupina buněk tak představuje **komplex** různých buněk: na čelní/invadující hraně skupiny jsou buňky zajišťující postup vpřed, tj. nabývající výrazněji mezenchymální charakter, zatímco uvnitř komplexu si buňky více ponechávají epiteliální charakter

EMT - pleiotropní dopad na průběh metastatické kaskády



- EMT představuje **dynamický** a **plastický** program, vede k indukci rozmanitých fenotypických stavů: od plně epiteliálního k mezenchymálnímu stavu
- EMT přispívá (epigenetickými mechanismy) k **fenotypické heterogenitě** nádorů
- indukce EMT zároveň jako by buňku posouvala ke „**kmenovosti**“; v obou procesech se uplatňují podobné/ překrývající se programy, například TFs a podobně (přinejmenším v kontextu některých tkání)
- EMT zvyšuje **rezistenci** k buněčné smrti a rezistenci **k terapii**, včetně imunoterapie a také k působení imunitního dohledu vlastního mikroprostředí

Degradace ECM



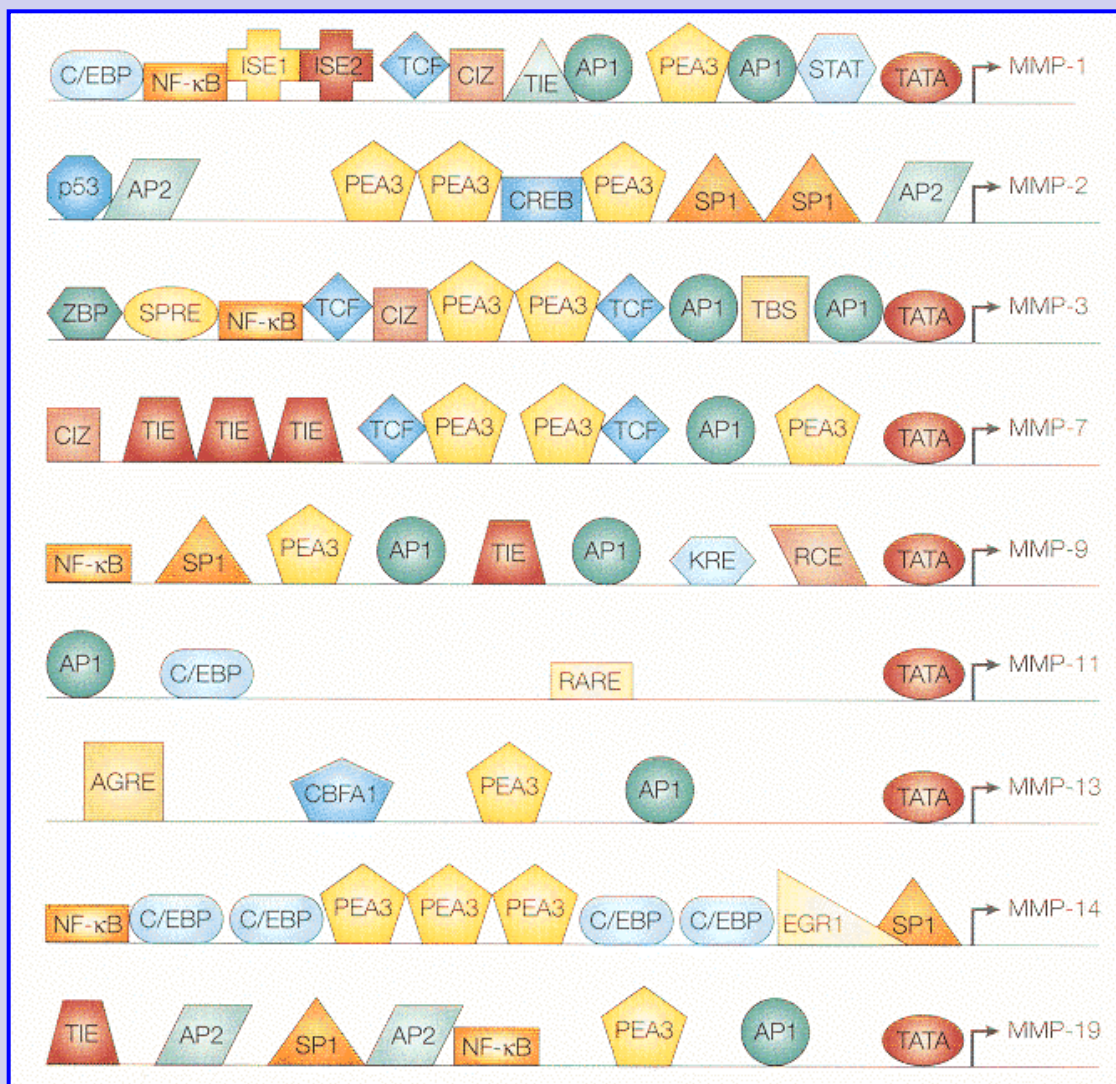
- na degradaci ECM (a bazální membrány) se mohou podílet čtyři třídy proteolytických enzymů: **cysteinové proteázy**, **aspartátové proteázy**, **serinové proteázy** a **metaloproteinázy**
- především **metaloproteinázy ECM (MMPs)** hrají klíčovou roli při remodelaci ECM:
 - za fyziologických podmínek při vývoji tkání plodu
 - postnatálně při opravách tkání
 - jejich deregulovaná aktivita je podstatou mnoha patologií (artritida, astma, ateroskleróza, chronická tvorba vředů,...)
 - a je také součástí procesu tvorby metastáz

Regulace aktivity MMPs



- většina MMPs není *in vivo* konstitutivně v buňkách exprimována
- exprese MMPs je regulována především **na úrovni transkripce**
- exprese většiny MMPs (-1, -3, -7, -9, -10, -12, -13 a -19) je indukována **růstovými faktory, cytokiny, onkogeny, hormony a kontaktem s ECM**

Regulace exprese MMPs na úrovni transkripce



Regulace aktivity MMPs



- většinou jsou MMPs secernovány jako latentní prekurzory (**zymogeny**); **proteolytická aktivita** MMPs je uvolněna proteolytickým štěpením v extracelulárním prostoru
- aktivita MMPs v pericelulárním prostředí je přísně regulována **nespecifickými** **proteinázovými inhibitory** a
- **specifickými tkáňovými inhibitory** **TIMPs** („tissue inhibitors of metalloproteinases“); TIMPs jsou exprimovány různými buněčnými typy

MMPs a tvorba metastáz



- existuje pozitivní korelace mezi expresí MMP a metastatickým potenciálem maligních nádorů

příklady:

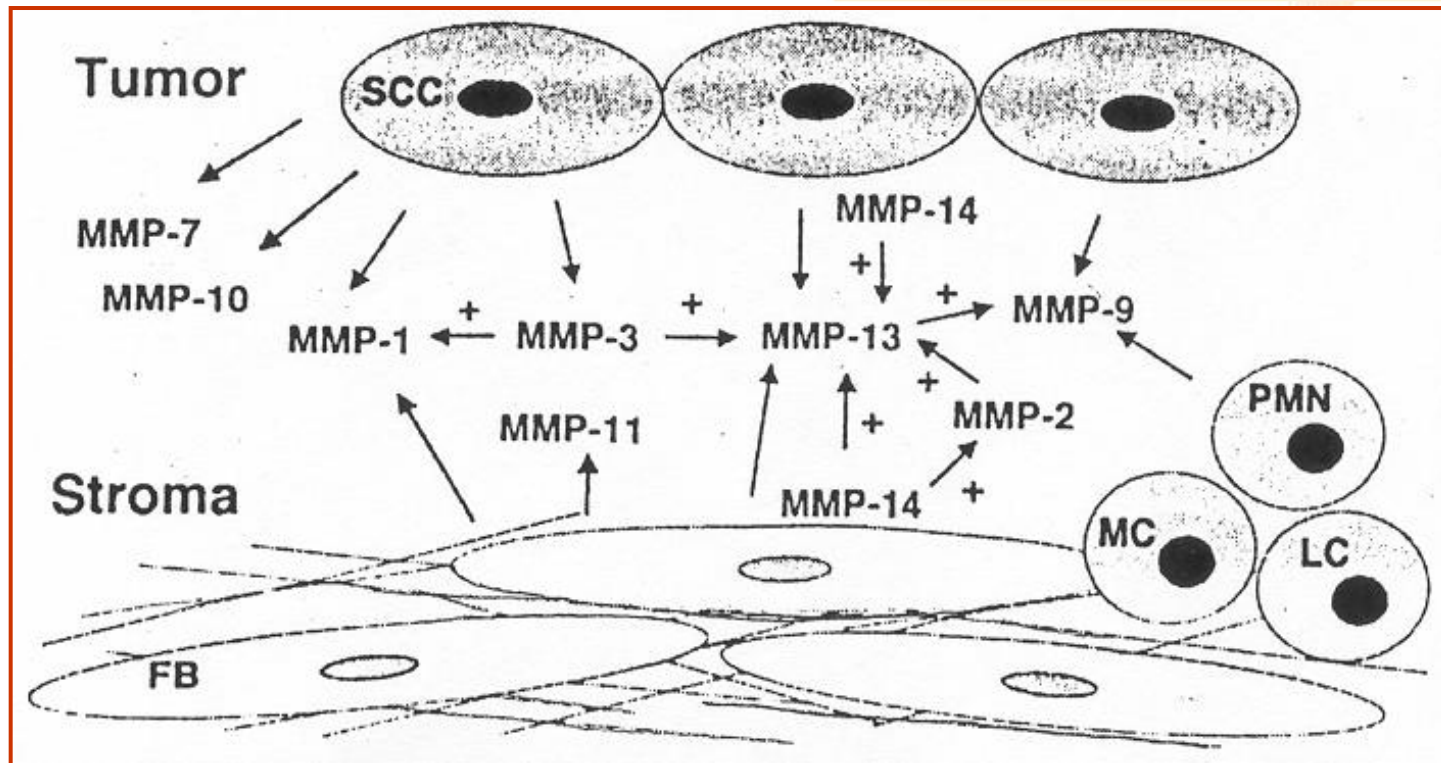
- exprese MMP-1 asociuje se špatnou prognózou u kolorektálních nádorů a nádorů jícnu
- MMP-13, MMP-7 a MTI-MMP jsou specifické pro metastazující nádory odvozené z keratinocytů
- MMP-2 je markerem maligní transformace epitelálních buněk děložního čípku

MMPs a tvorba metastáz



- u maligních nádorů je **většina MMPs produkována stromálními buňkami** spíše než samotnými nádorovými buňkami
 - nádorové buňky mohou secernovat faktory (např. MMP induktor EMMPRIN), které potencují expresi MMP-1, -2 a -3 fibroblastů
 - také další cytokiny a růstové faktory secernované zánětovými buňkami, které infiltrují nádor, ale i nádorovými a stromálními buňkami, mohou modulovat expresi MMPs
- při invazi maligního nádoru kooperují nádorové buňky, stromální buňky a zánětové buňky

Různé buňky produkují různé MMPs



+ - aktivace latentní MMP

LC - lymphocyte

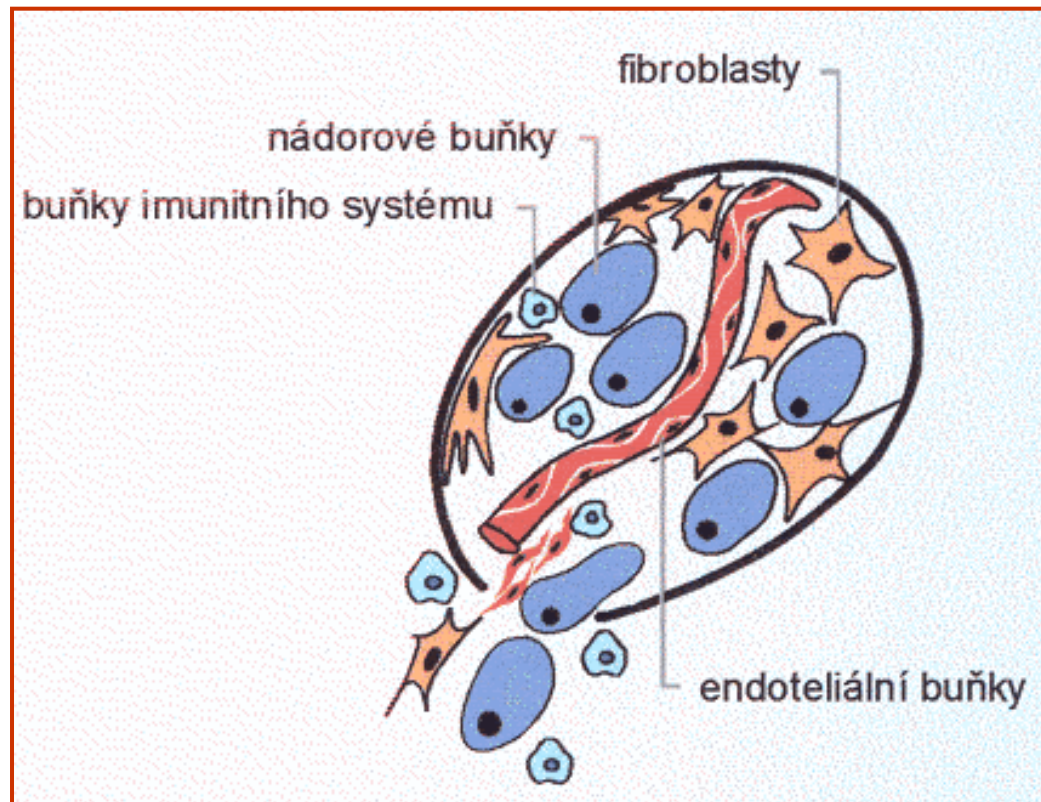
PMN - polymorphonuclear leukocyte

MC - monocyte

Při remodelaci ECM kooperují různé buňky



nádor je komplexní tkáň



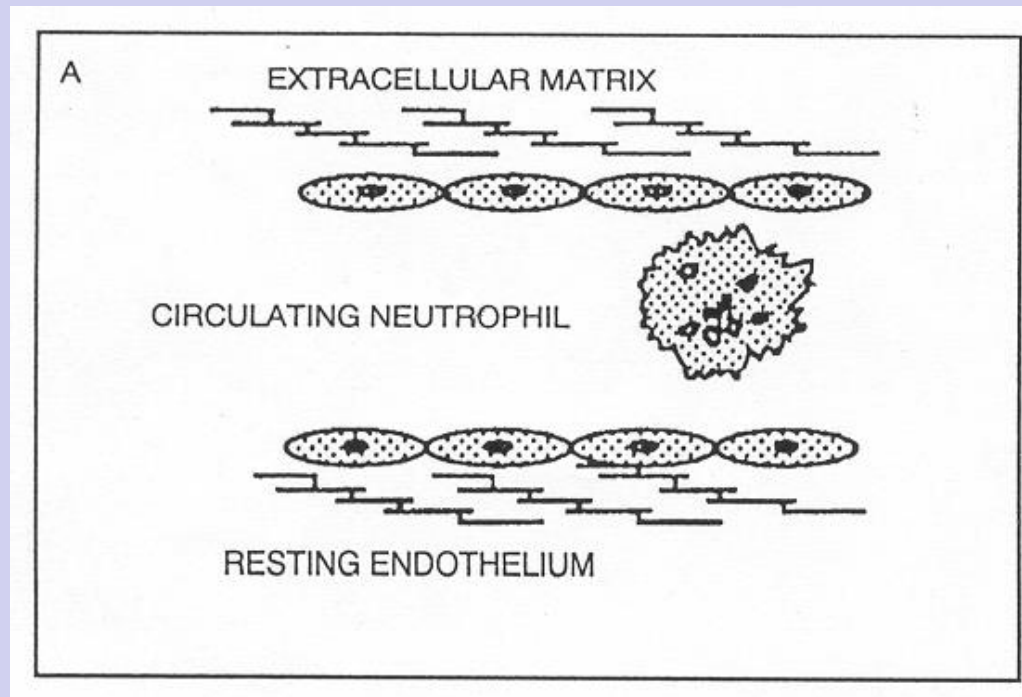
Úloha adhezivních komplexů při tvorbě metastáz



- každý krok při tvorbě metastáz zahrnuje zrušení stávajících a ustavení nových adhezivních interakcí
- adhezivní interakce jsou funkcí buněčných receptorů, jejichž exprese a funkce je přísně regulována
- nádorové buňky jsou obecně méně adhezivní než buňky normální a vytvářejí méně extracelulární matrix

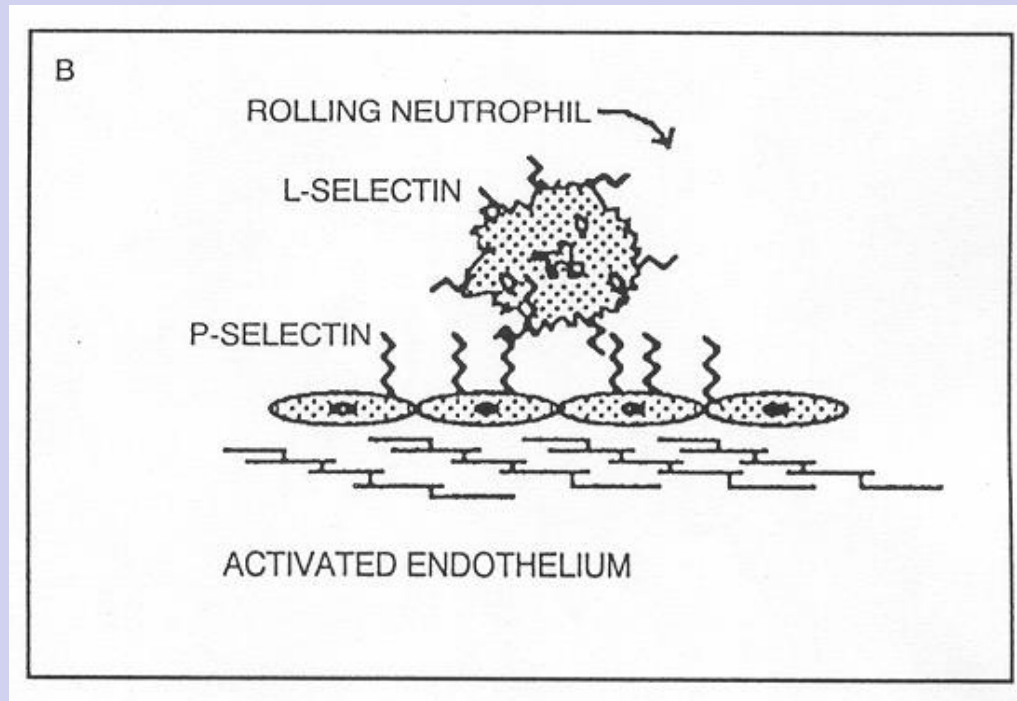
Záněťová kaskáda - A

Může sloužit jako **mechanistické paradigma** pro model metastatické kaskády.



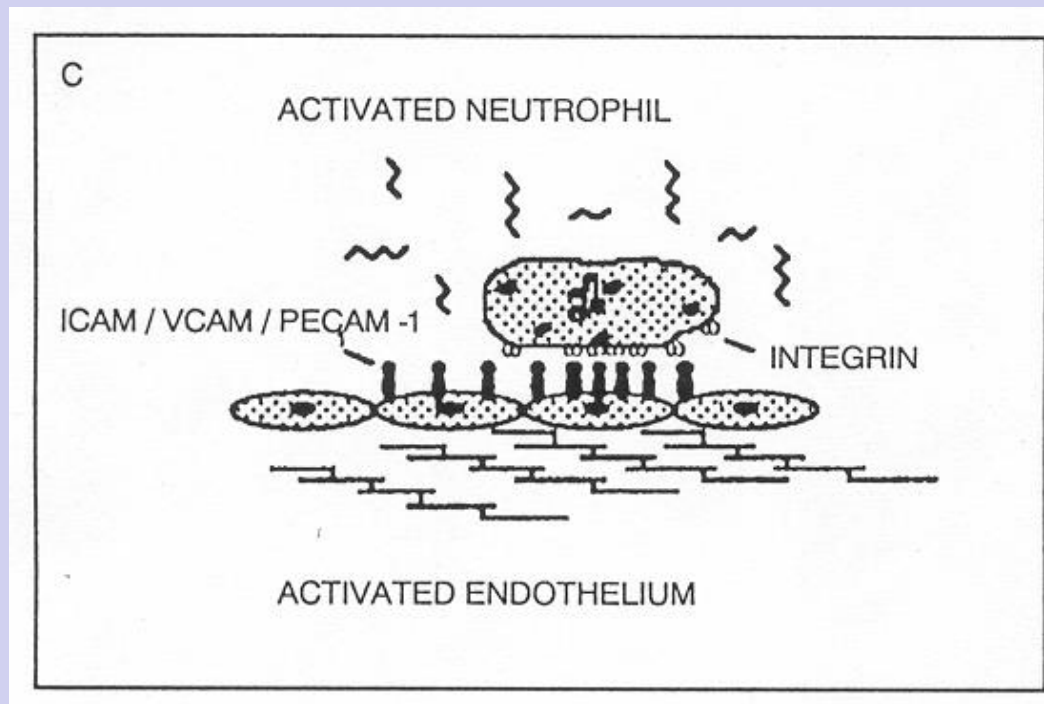
Volně cirkulující neutrofil, žádná interakce s endoteliálními buňkami.

Záněťová kaskáda - B



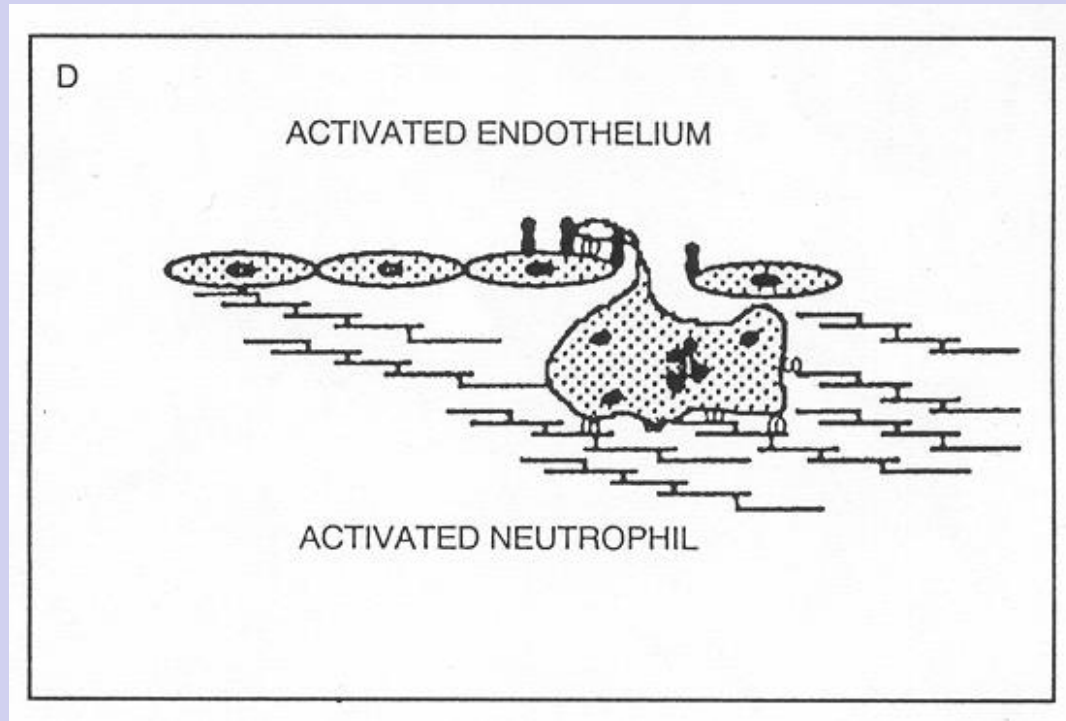
Následkem infekce nebo poranění, působením histaminů, cytokinů,... začnou endoteliální buňky exprimovat specifické receptory - **selektiny** - ty interagují se specifickými receptory na povrchu neutrofila a zpomalují ho.

Záněťová kaskáda - C



Dochází k expresi specifických receptorů - **integrinů** - na povrchu neutrofila, a také specifických receptorů - členů **imunoglobulinové nadrodiny** - na povrchu endoteliálních buněk, dojde k vzájemné adhezi. Přestávají se exprimovat **selektiny**.

Záněťová kaskáda - D



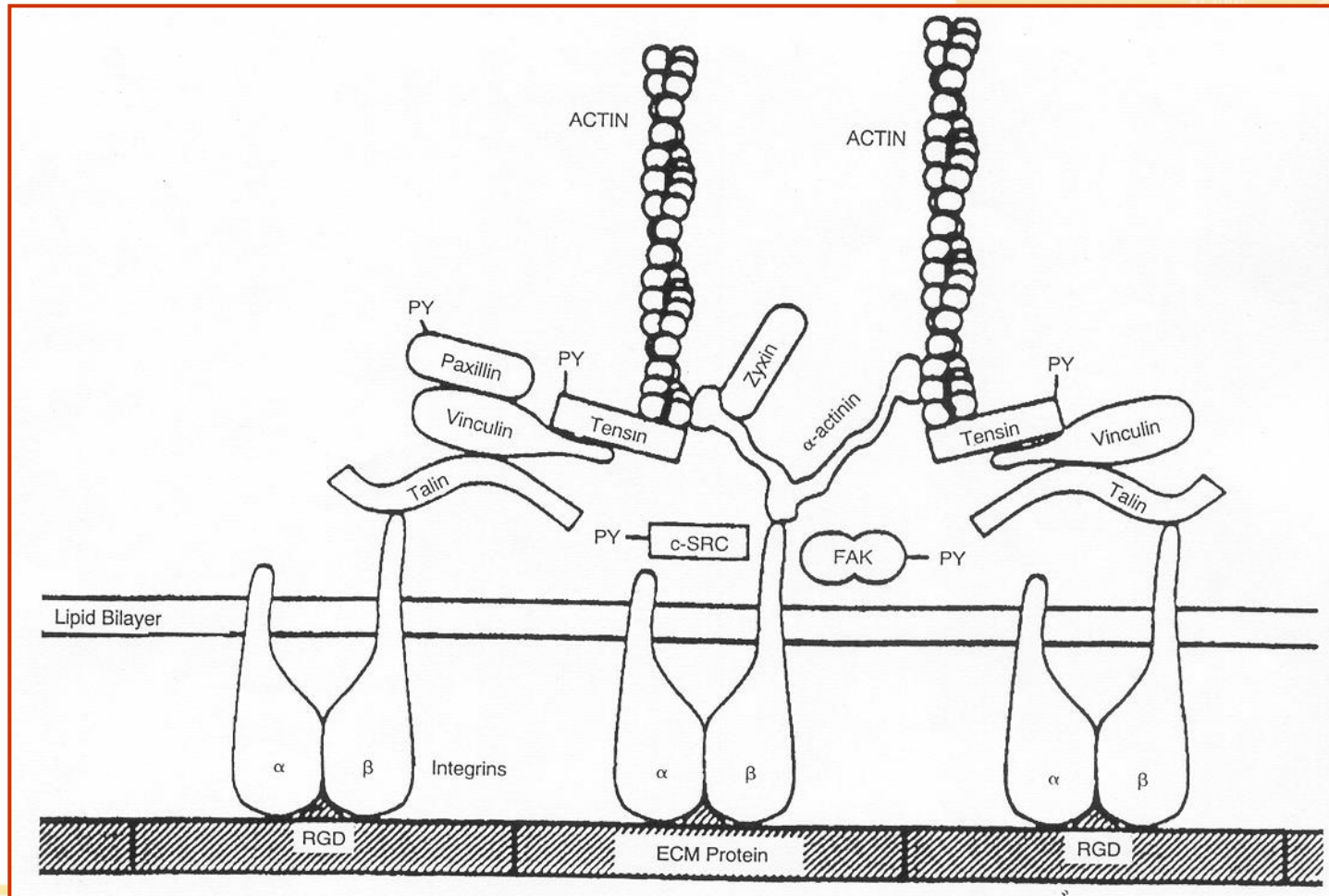
Pohyb neutrofila skrz endoteliální buňky je spojen s expresí další sady specifických receptorů - např. **CD44**.

Obecná struktura adhezivního komplexu



- Klíčovou strukturou adhezivního komplexu je **receptor**.
- **extracelulární doména** interaguje s příslušným **ligandem**: signální molekulou nebo specifickou strukturou ECM nebo sousední buňky
- **hydrofobní transmembránová doména**
- **cytoplazmatická doména** má regulační elementy zajišťující **transdukci signálu** z extracelulárního prostředí do buňky (proteinkinázy, fosfatázy, proteiny G, fosfolipázy) a/nebo interaguje s některými složkami **cytoskeletonu**

Obecná struktura adhezivního komplexu



Hlavní skupiny adhezivních receptorů



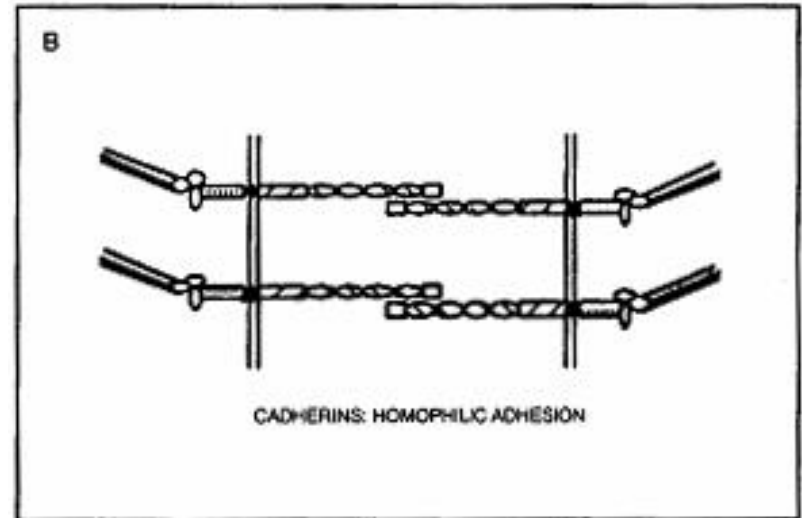
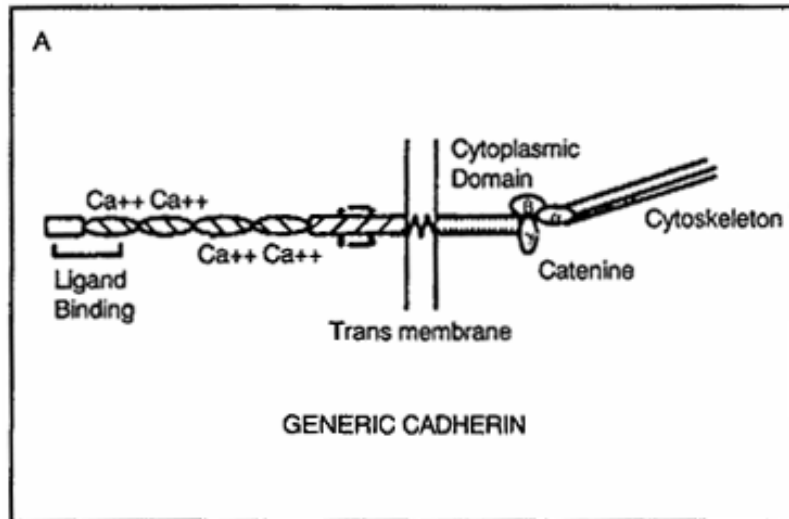
- kadheriny
- integriny
- imunoglobulinová nadrodina
- selektiny
- další adhezivní receptory (CD44)

Kadheriny



- nadrodina jednořetězcových transmembránových glykoproteinů, které zprostředkovávají **homotypické** adherence **buňka-buňka**, a to svými N-koncovými extracelulárními doménami a kalcium dependentně
- hrají klíčovou roli v rozpoznávání buněk a jejich třídění během vývoje
- jsou exprimovány ve vysokých hladinách ve všech pevných tkáních
- existuje mnoho různých kadherinů, nejlépe prostudovány a popsány jsou „epiteliální“ **E-kadheriny**

Obecná struktura kadherinů



N-koncová část kadherinů zprostředkovává **homofilní** interakce.

Intracelulární C-koncová část interaguje s **β -kateniny** a **γ -kateniny**, ty asociují s **α -kateniny** a společně zprostředkovávají vazbu kadherinů na **aktinové** složky cytoskeletonu.

E-kadherin a nádory



- Hlavní adhezivní molekula **epiteliálních (E)** buněk.
 - Během **morfogeneze** je exprese kadherinů modulována: buňky se pohybují z jedné buněčné vrstvy do druhé, a to je vždy spojeno se ztrátou exprese původního kadherinu a s indukcí exprese jiného kadherinu.
- Ztráta exprese E-kadherinu je často detekována u epiteliálních nádorů. Ztráta exprese nebo funkce E-kadherinu výrazně koreluje s invazivitou a tvorbou metastáz nádorů - často koinciduje s „přepnutím“ benigního nádoru na invazivní typ.

Dědičný difúzní nádor žaludku HDGC



- „*Hereditary Diffuse Gastric Cancer*“
- Autozomálně **dominantní** syndrom související s vrozenými mutacemi genu **CDH1** (16q22.1), který kóduje **E-kadherin**.
- Především histologicky difúzní, málo diferencované nádory žaludku, ale také zvýšené riziko kolorektálních nádorů a nádorů prsu.
- Mutace **CDH1** časté (9/16) také u sporadických difúzních nádorů žaludku (50%) a u lobulárního karcinomu prsu (až 60%).
- Poměrně vzácně (1/9/16) se vyskytuje „LOH“ **CDH1**; častá (9/16) metylace promotoru **CDH1** jako „druhý zásah“.
- Agresivní nádory - zřejmě souvisí se zvýšenou ochotou metastázovat.
- Mutace **CDH1** se ale zřejmě uplatňuje i v iniciačních stádiích kancerogeneze - zřejmě souvislost s regulací dráhy **WNT/β-katenin**: funkční E-kadherin inhibuje progresi buněčného cyklu - pravděpodobně downregulací cytoplazmatického β-kateninu, a to nezávisle na zprostředkování buněčných adhezí

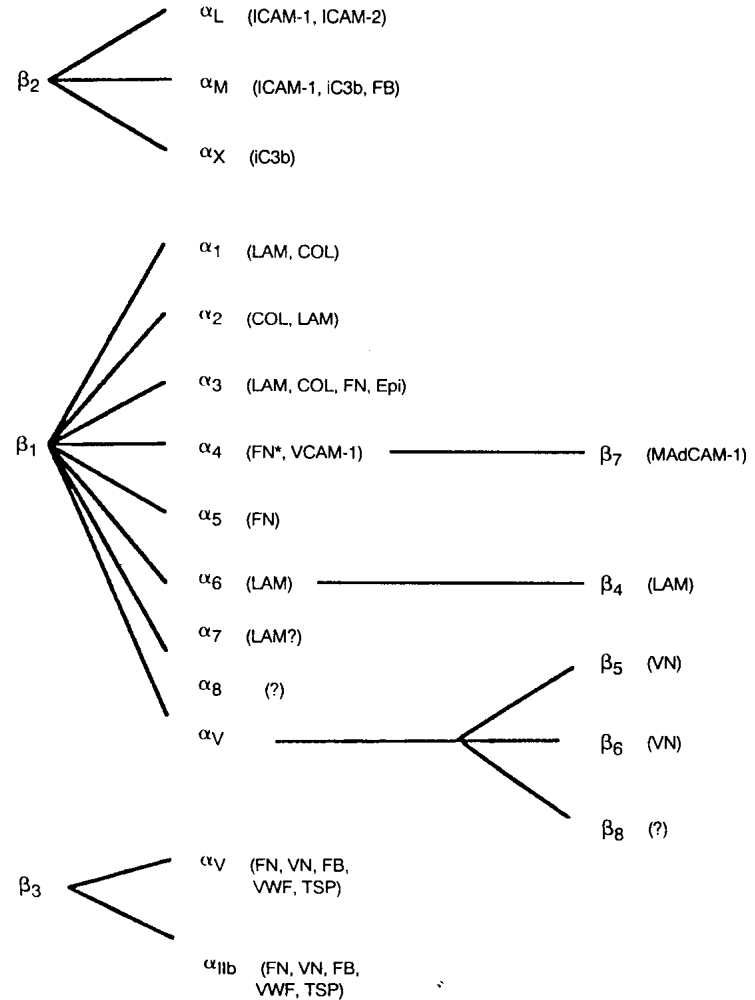
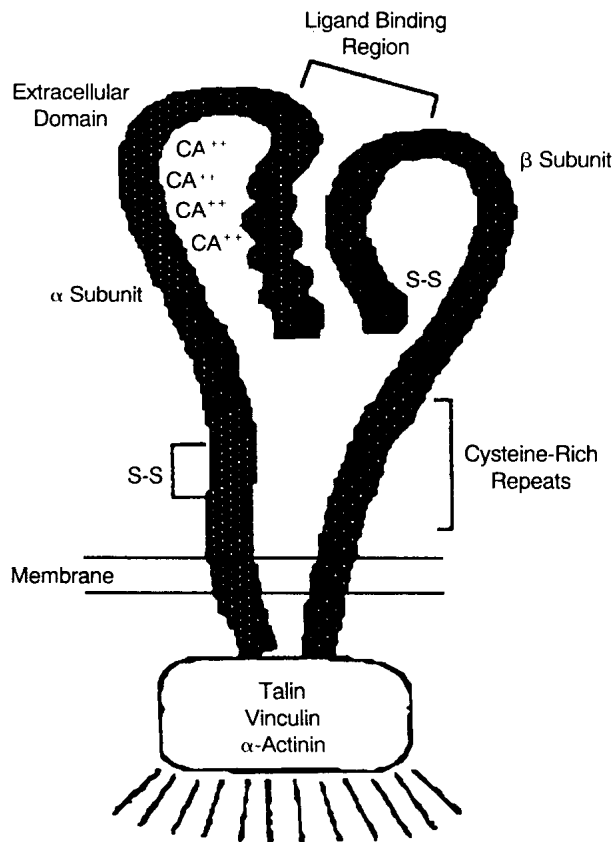
Integriny



- heterodimerické receptory složené z 1 α a 1 β podjednotky
- popsáno 18 různých α a 8 různých β podjednotek; ty kovalentně asociují a tvoří **24 různých integrinů**
- mají velkou extracelulární doménu, krátkou transmembránovou a relativně malou intracelulární doménu
- nejvýznamnější skupina molekul odpovědná za adhezi **buňka-ECM**, ale také **buňka-buňka**: 18 různých integrinů se váže na proteiny ECM (RGD*, kolagen, laminin), další integriny na proteiny na povrchu jiných buněk (leukocyty), některé integriny zprostředkovávají oba typy interakcí

* historicky první specifické místo rozpoznávané integriny byla sekvence **RGD** (Arg-Gly-Asp) nalezená u fibronektinu, postupně nalezená i u dalších proteinů ECM, virových proteinů, toxinů a růstových faktorů; většina integrinů ale tuto sekvenci nerozpoznává

Struktura integrinů



Funkce integrinů



Integriny jsou **univerzální receptory**: transdukují signály:

- z vnějšku buňky dovnitř - regulují pohyb, morfologii, proliferaci a genovou expresi
- zevnitř buňky směrem ven - podle vnitřních okolností může být měněna vazebná specifita integrinů
- uvnitř buňky, jsou-li lokalizovány na jiných membránách než cytoplazmatické

Intracelulární proteiny interagující s integriny:

- komponenty cytoskeletonu: **tensin**, **α -actinin**, **talin**, **vinculin**, **F-aktin**, **paxillin**, **FAK**
- molekuly různých signálních drah: **FAK**, **Src-like kinázy**, **Ras**, **MAP kinázy**

Funkce integrinů

Existuje funkční vztah mezi integriny a **metaloproteinázami**:

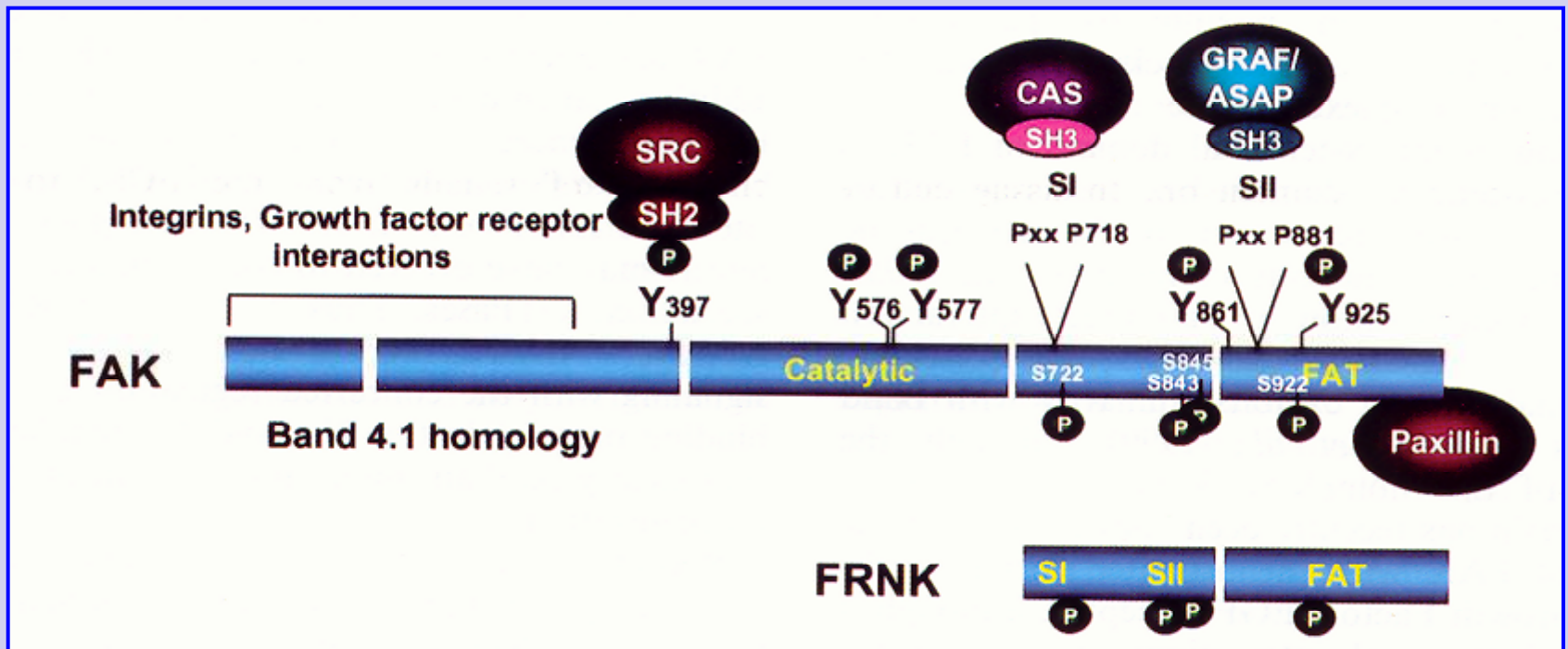
- některé integriny ovlivňují expresi některých MMP genů
- některé integriny ovlivňují sekreci některých MMPs
- některé integriny ovlivňují aktivitu MMPs

- některé komponenty ECM aktivují integriny a následkem je specifická degradace ECM: „**integrin-guided proteolysis**“

FAK - „focal adhesion kinase“

- Nereceptorová tyrozin protein kináza. První, o které se zjistilo, že je aktivovaná po aktivaci integrinů.
- Po aktivaci se FAK autofosforyluje na **Tyr397** a tím se vytvoří vazebné místo pro SH2 doménu **Src** nebo **Fyn**.
- Src potom fosforyluje další substráty včetně cytoskeletálních komponent, především **paxillinu** a **tensinu**.
- FAK hraje klíčovou roli při přenosu **signálů přežití** z ECM (anoikis) - pravděpodobně inaktivací proapoptotických proteinů **Bad** a **prokaspázy-9**.

Struktura FAK kinázy



N-koncová doména: interakce s integriny, růstovými faktory

centrální doména: katalytická

C-koncová doména: interakce protein-protein

Integriny a nádory



- Změny exprese nebo funkce integrinů popsány během proměny nádorů v metastazující invazivní formy.
- Změny exprese nebo funkce integrinů způsobují „anchorage-independence“: za normálních okolností právě integriny spouštějí **anoikis** (apoptózu v důsledku ztráty adheze).
- Vztah ECM-integriny se výrazně uplatňuje také během angiogeneze nádorů: přežití angiogenních endoteliálních buněk nádorových cévek je závislé na integrinech α_v .

Pohyb nádorových buněk vaskulárním systémem



- Během tvorby metastáz nádorové buňky nejdříve uvolní své vazby s ostatními buňkami v nádoru (**E-kadheriny**) a prostoupí ECM směrem ke krevnímu systému (**integriny**).
- Pro vstup do vaskulatury („intravasation“) musí prostoupit také vaskulárním endoteliem a v této fázi se uplatňují především **selektiny** a členové **imunoglobulinové nadrodiny** (včetně VCAM-1, ICAM-1, -2 a -3 a dalších), integriny, **CD44**, glykoproteiny nalezené u lymfocytů a orgánově specifické endoteliální adhezivní molekuly jako např. **Lu-ECAM-1** („lung-endotelial cell adhesion molecule“).

Selektiny



- Fungují prostřednictvím terminální kalcium-dependentní lektinové domény a jsou především zodpovědné za **heterotypické adheze buňka-buňka**, a to především mezi endoteliálními a krevními buňkami.
- V klidu jsou buňky schopny adherovat prostřednictvím celé řady ligandů. Ale **cirkulující** buňka může být zpomalena (a získat tak možnost interagovat s dalšími ligandy) pouze interakcí selektinů s endoteliem.

⇒ Selektiny hrají roli v adhezi metastatických buněk k **endoteliu**.

Receptory imunoglobulinové nadrodiny



- Zprostředkovávají **homotypické** a **heterotypické** adheze **buňka-buňka**.
- Po zpomalení nádorových buněk selektiny a CD44 nádorové buňky pravděpodobně pevněji interagují s endoteliálními buňkami a následně vstupují do stroma cílového orgánu. V této fázi se zřejmě výrazněji uplatňují právě receptory imunoglobulinové nadrodiny.

Imunoglobulinové receptory a nádory



- velmi divergentní skupina receptorů
- při metastazování nádorů se nejvíce uplatňují receptory odpovědné za interakce s endoteliálními buňkami - např. **ICAMs** (např. melanomy: korelace exprese ICAM-1 s metastatickým potenciálem) a **VCAM-1**
- **CEA** - historicky prominentní receptor - spojen s progresí kolorektálních karcinomů
- **NCAM** - spojen s progresí některých neuroendokrinních nádorů, Wilmsova nádoru, malobuněčných nádorů plic, feochromocytomů,...
- **EpCAM** – marker epiteliálních buněk

Orgánově specifické metastazování



- nádory prsu často metastazují do kostí a plic a méně často do jater a mozku
- nádory prostaty preferenčně metastazují do kostí
- pacienti s kolorektálními nádory mají často metastázy v játrech
- melanomy mají tendenci metastazovat do jater
- neuroblastomy, karcinomy štítné žlázy, prostaty, ledvin metastazují nejčastěji do kostí
- nádory ledvin, trávicího traktu a plic často metastazují do mozku

1. Metastazování je ovlivněno tokem krve



- počáteční osud nádorových buněk uvolněných z primárního nádoru ovlivňují mechanické faktory
- tok krve ovlivní, do kterého orgánu jako prvního dorazí nádorové buňky uvolněné z primárního nádoru

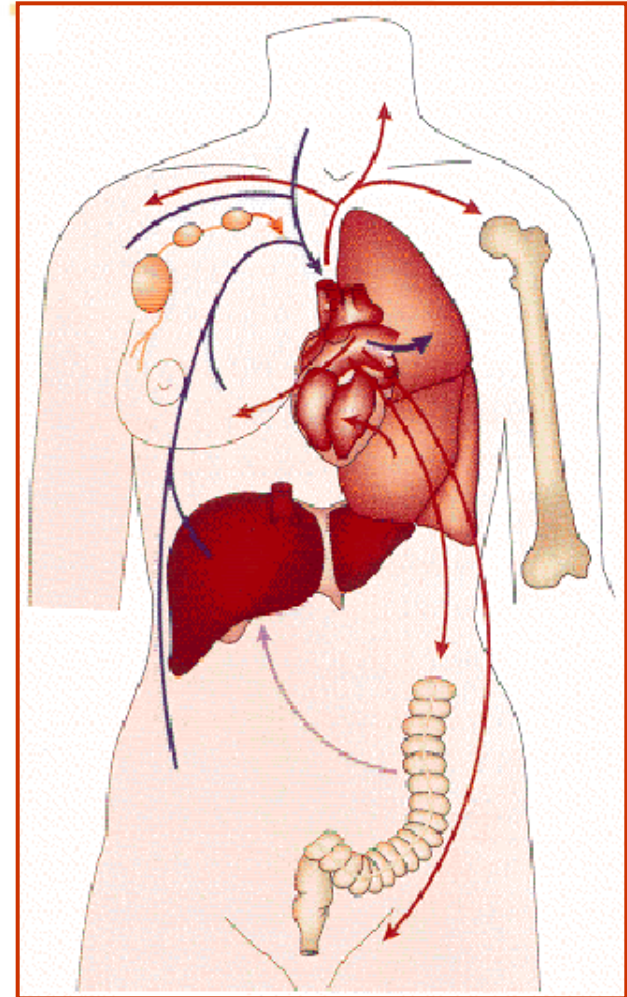
Způsoby šíření nádoru (*)

- hematogenní - šíření cévním systémem
- lymfogenní - šíření lymfatickým systémem (posléze může vstoupit do žilního systému)
- porogenní - šíření tělními dutinami

Tok krve ovlivňuje metastazování



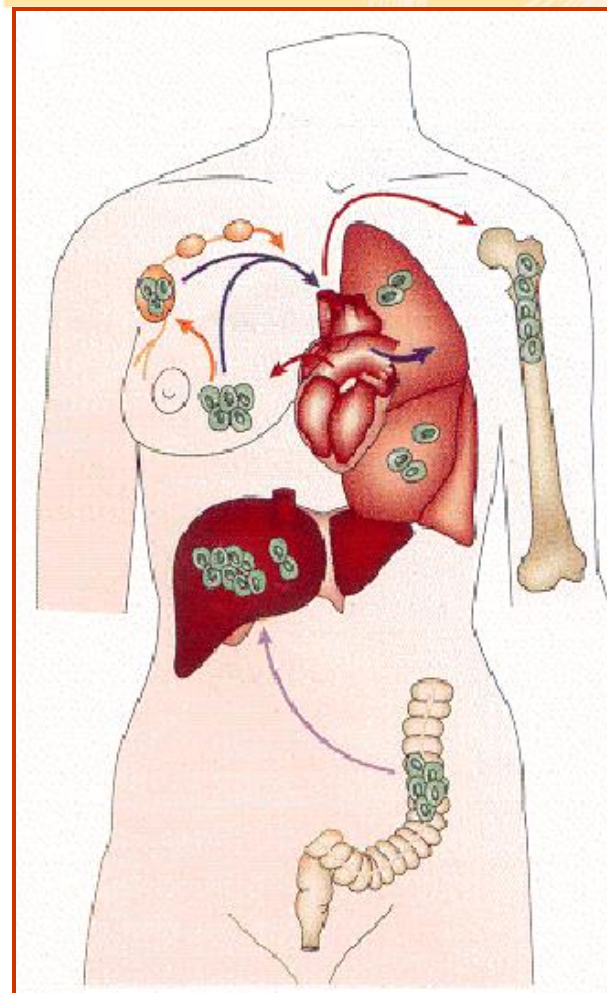
- Krev z většiny orgánů je vedena žilním systémem **(B)** přímo do srdce a míří do plic. Potom se vrací do srdce a je rozváděna tepnami **(Č)** do celého těla.
- Ale například krev ze střev vede nejdříve do jater **(R)** než vstoupí do žilního systému.
- V celém těle je nadbytek extrabuněčné tekutiny veden do lymfatických cév **(O)** a přes lymfatické uzliny do žilního systému.
(*)



Tok krve ovlivňuje metastazování



- Například nádorové buňky uvolněné z primárního nádoru prsu jsou vedeny do srdce, a dále do kapilárního systému plic. Některé buňky projdou tímto systémem a jsou dále transportovány cévním systémem do vzdálených orgánů, jako například do kostí. Jiné buňky mohou tvořit metastázy v plicích.
- Naproti tomu nádorové buňky uvolněné z nádoru střeva jsou vedeny nejdříve do jater.

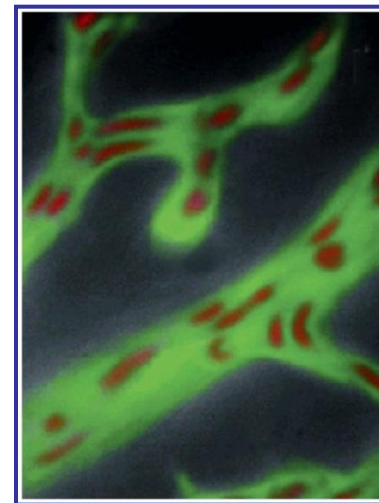


Tok krve ovlivňuje metastazování



- relativní velikost nádorových buněk a kapilár ovlivní efektivitu, s jakou budou buňky zachytávány na daném místě
- jsou-li buňky zachyceny v orgánu, rozhodnou o schopnosti v daném místě přežít /a proliferovat molekulární interakce mezi buňkami a mikroprostředím

→ 2.



2. Hypotéza „seed and soil“



- 1889 - Stephen Paget (anglický chirurg):
Záleží na kompatibilitě „semen“ (nádorových buněk) a správné „půdy“ (faktory v potenciálním místě nové metastázy).
- Molekulární faktory přítomné ve specifickém orgánu významně ovlivní to, zda v tomto orgánu porostou nádorové buňky určitého typu. Tak jsou například nádorové buňky uvolněné z nádoru prsu nebo prostaty, které se dostanou do kostí, zde adekvátně stimulovány k růstu, zatímco buňky jiného typu zde nemohou růst, protože nemají adekvátní stimulaci k růstu.

Pre-metastatická nika

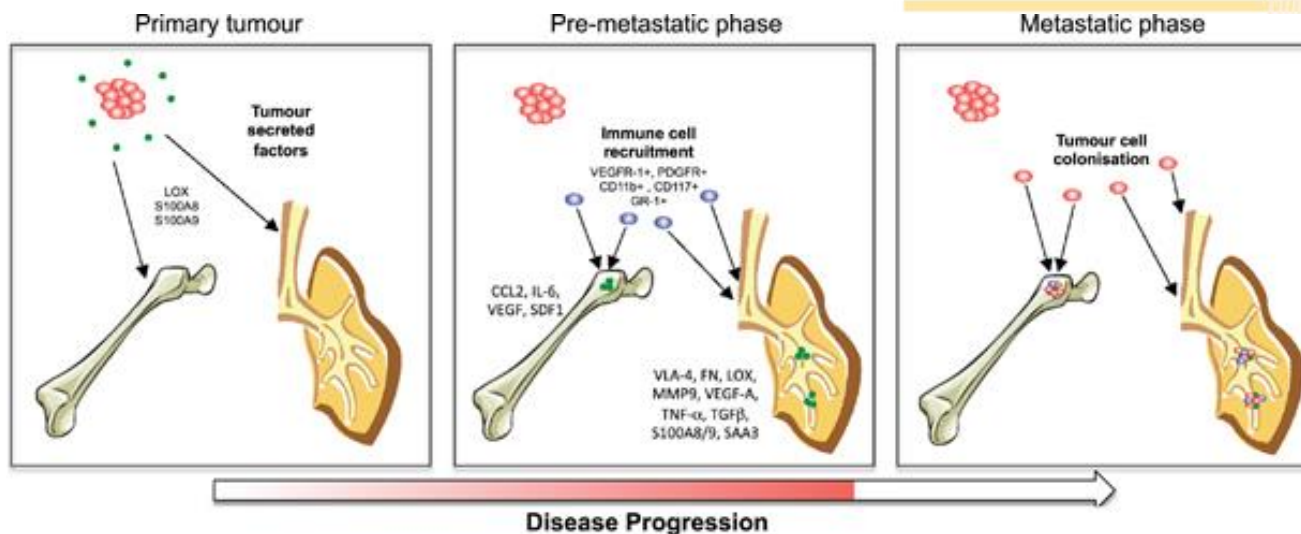


- podle tohoto konceptu jsou primární nádory schopné ovlivňovat místa sekundárního výskytu takovým způsobem, aby byla vhodnější, přizpůsobenější pro osídlení nádorovými buňkami ještě před jejich příchodem
- „primární“ nádorové buňky vysílají signály, kterými aktivují normální hostitelské buňky k tomu, aby začaly remodelovat ECM budoucích sekundárních ohnisek, tak aby se vytvořily permissivní niky - v nepřítomnosti nádorových buněk – které by usnadnily jejich následující kolonizaci
- PMN: mikroprostředí ve specifických orgánech připravené ke kolonizaci a diseminaci pro cirkulující nádorové buňky

Guo Y et al. *Mol Cancer* (2019) doi.org/10.1186/s12943-019-0995-1

Kaplan RN et al. *Nature* 438 (2005) 820-827

Pre-metastatic nika



- nádorové buňky secernují během progresu primárního nádoru faktory, které působí systemicky na vzdálená sekundární místa, modifikují lokální mikroprostředí a vtahují imunitní hostitelské buňky k dalšímu přizpůsobení těchto míst pro úspěšnou kolonizaci nádorovými buňkami

Nádor jako systémové onemocnění



- progrese nádorů ovlivněna vedle **genetických změn** nádorových buněk a **parakrinních** interakcí v jejich mikroprostředí také
- **systémovou odpovědí** organismu na nádor ⇒ nádor je **systémové onemocnění**
- primární nádor ovlivňuje například kostní dřeň: z té jsou uvolňovány buňky do nádorového mikroprostředí, kde nádor stimuluje (například některé aktivované BMC uvolňují faktory přeměňující fibroblasty v mikroprostředí nádorů na CAFs, které exprimují prozánětlivé faktory a faktory remodelující ECM)
- dále například slezinu, pre-metastatické niky, ...
- některé agresivní primární nádory utlumují protinádorovou imunitu organismu a tím vytvářejí tumor-permisivní systémové prostředí

Nádor jako systémové onemocnění



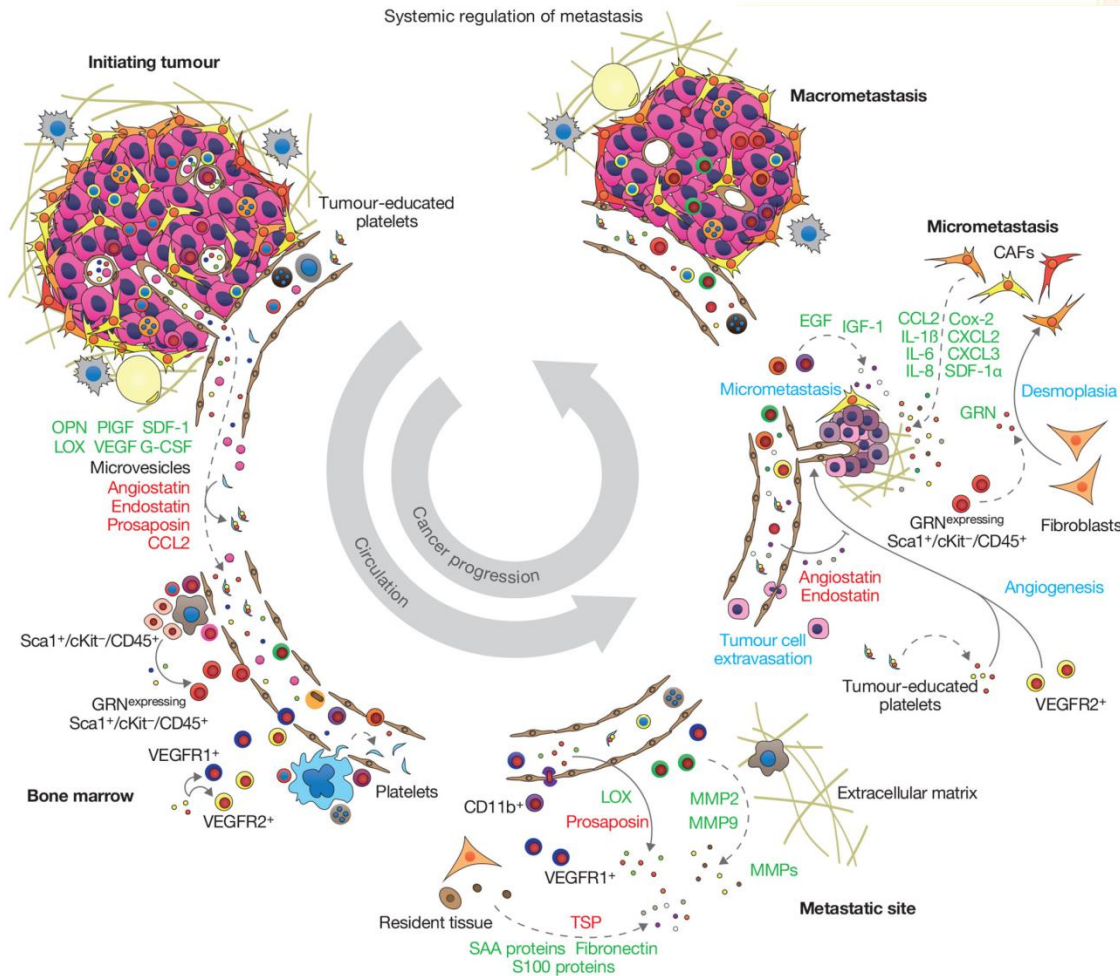
- kromě **rozpuštěných cytokinů** jsou uvolňovány také
- **exosomy** (obsahující lipidy, proteiny, mRNAs, miRNAs), které potom v celém těle mohou ovlivňovat pro-metastatické progenitory, pro-angiogenní buňky, atd. ... obecně nejrůznější hostitelské buňky, a to i ve vzdálených tkáních, které následně mohou stimulovat (ale také suprimovat) další růst a vývoj primárních nádorů i metastáz – obecně tzv. systemic instigation (*systemic instigation*)
- **krevní destičky** fungují jako doručovatelé „informací“ na dlouhé vzdálenosti mezi agresivně rostoucím nádorem a indolentními nádorovými buňkami (dopad může být jako pro-angiogenní, tak anti-angiogenní)

Nádor jako systémové onemocnění

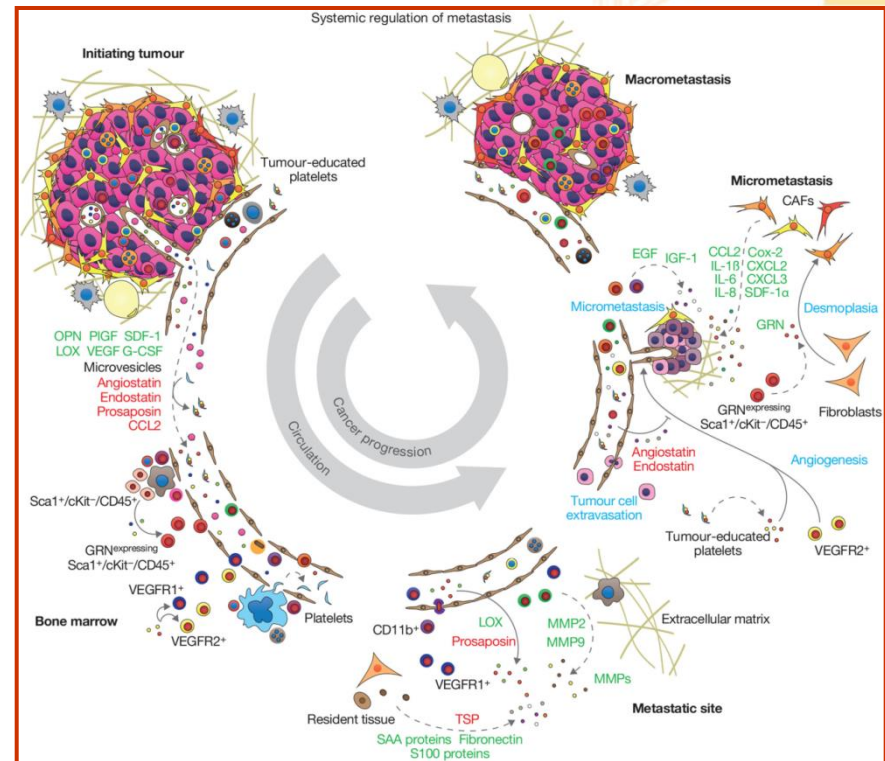
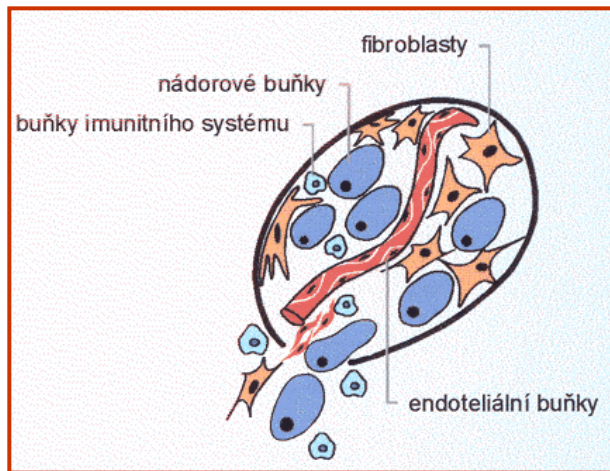


- vedle samotného nádoru mohou být možná i **další systémové způsoby podněcování nádorů**, například:
- **obezita**, o níž epidemiologické studie prokázaly, že zvyšuje incidenci některých nádorů,
- **těhotenství**, které pravděpodobně může stimulovat rozvoj počínajících nádorů prsu,
- **chirurgické zákroky** obecně, které zatím neznámým mechanismem zřejmě mohou stimulovat rozvoj dormantních metastáz

Nádor jako systémové onemocnění



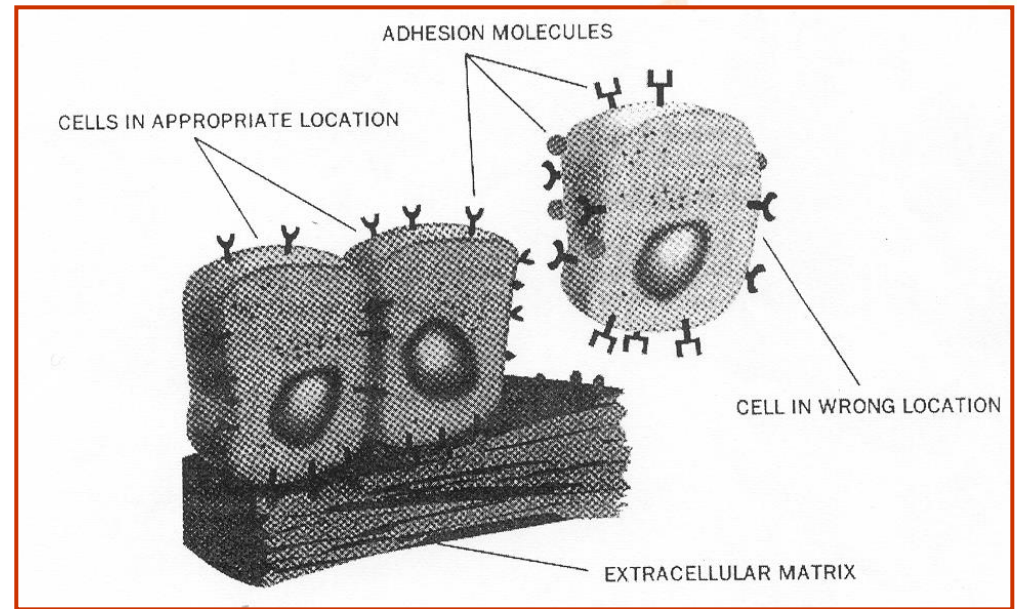
Nádor je komplexní tkáň → Nádor je systémové onemocnění



3. Hypotéza pozičního kódu



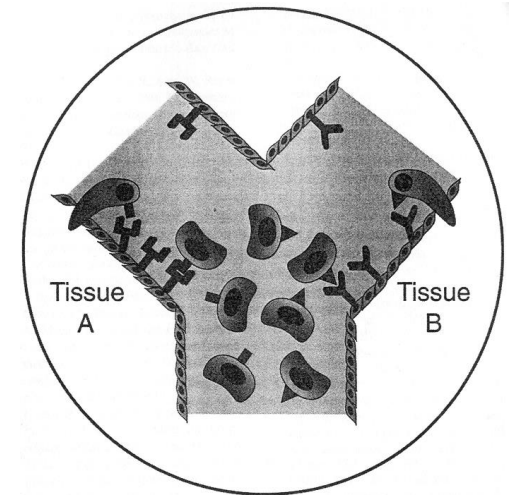
- Podle této starší představy nese buňka na svém povrchu jakýsi systém adres (soubor molekul, který může být rozpoznán molekulami jiných buněk), který určuje, kam která buňka patří („**homing**“).
- Tyto adresy jsou „zapsány“ formou konfigurace exprimovaných adhezivních receptorů.



Orgánově specifické metastázování



- **Vaskulatura** jednotlivých tkání je vysoce specializovaná - tkáňově specifická. Endoteliální buňky nesou „homing peptides“ specifické pro dané tkáň - potenciálně využitelné pro „adresnost“ terapie!
- Orgánově specifického metastázování se nějak účastní **vaskulární endotelium**: metastatické buňky adherují ke kapilárním endoteliálním buňkám, ale ne k endoteliu velkých cév (\Leftrightarrow mikrometastázy se vždy nacházejí v kapilárních stěnách!).
- Zdá se, že neexistují přímo konkrétní receptory restriktivně exprimované na endoteliu konkrétní tkáň. Spíš je to záležitost kvantitativní: různá množství různých kombinací (konfigurace) více receptorů exprimovaných v endoteliálních buňkách.

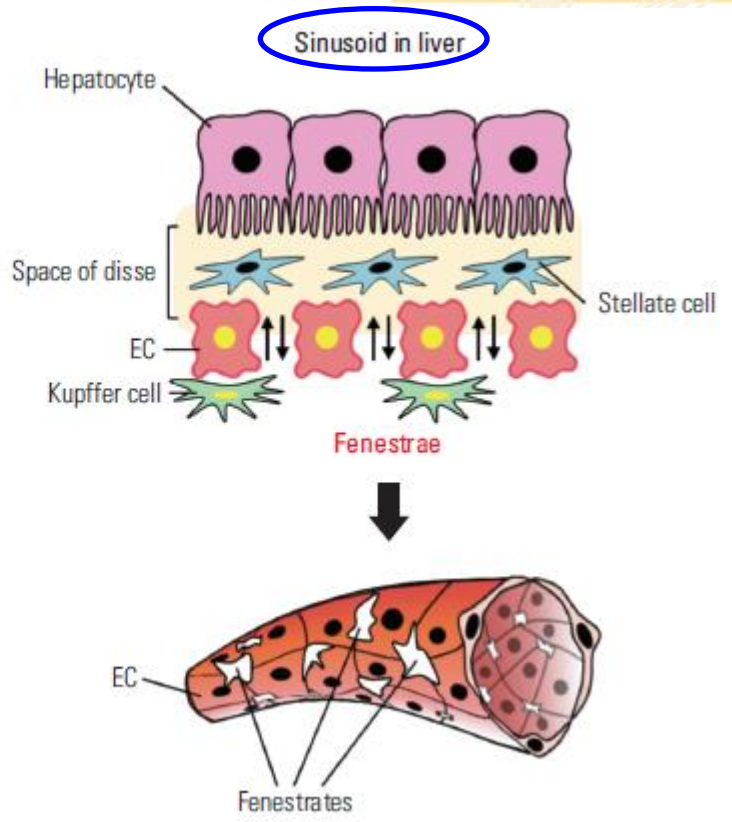
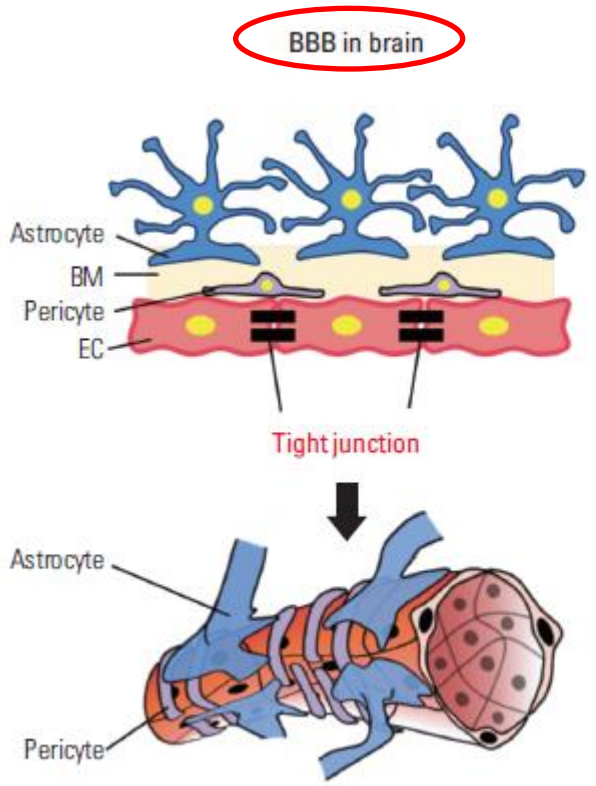


Příklad odlišně uspořádané vaskulatury



- součástí všech krevních cévek jsou endoteliální buňky (ECs), ale ty stejné ECs mohou spoluvytvářet zcela odlišné krevní cévy
- **krevní mozková bariéra** (BBB): musí striktně blokovat průchod toxických látek do mozku – **nejtěsnější mezibuněčné spoje** mezi ECs vznikající za účasti astrocytů
- **játerní sinusoidy**: v játerní tkáni, která zajišťuje detoxifikaci, musí být umožněna aktivní výměna materiálu mezi hepatocyty a krevními vlásečnicemi; ve vlásečnicích se proto tvoří otvory (tzv. **sinusoidy**) tuto výměnu umožňující

Příklad odlišně uspořádané vaskulatury



Nádor jako systémové onemocnění



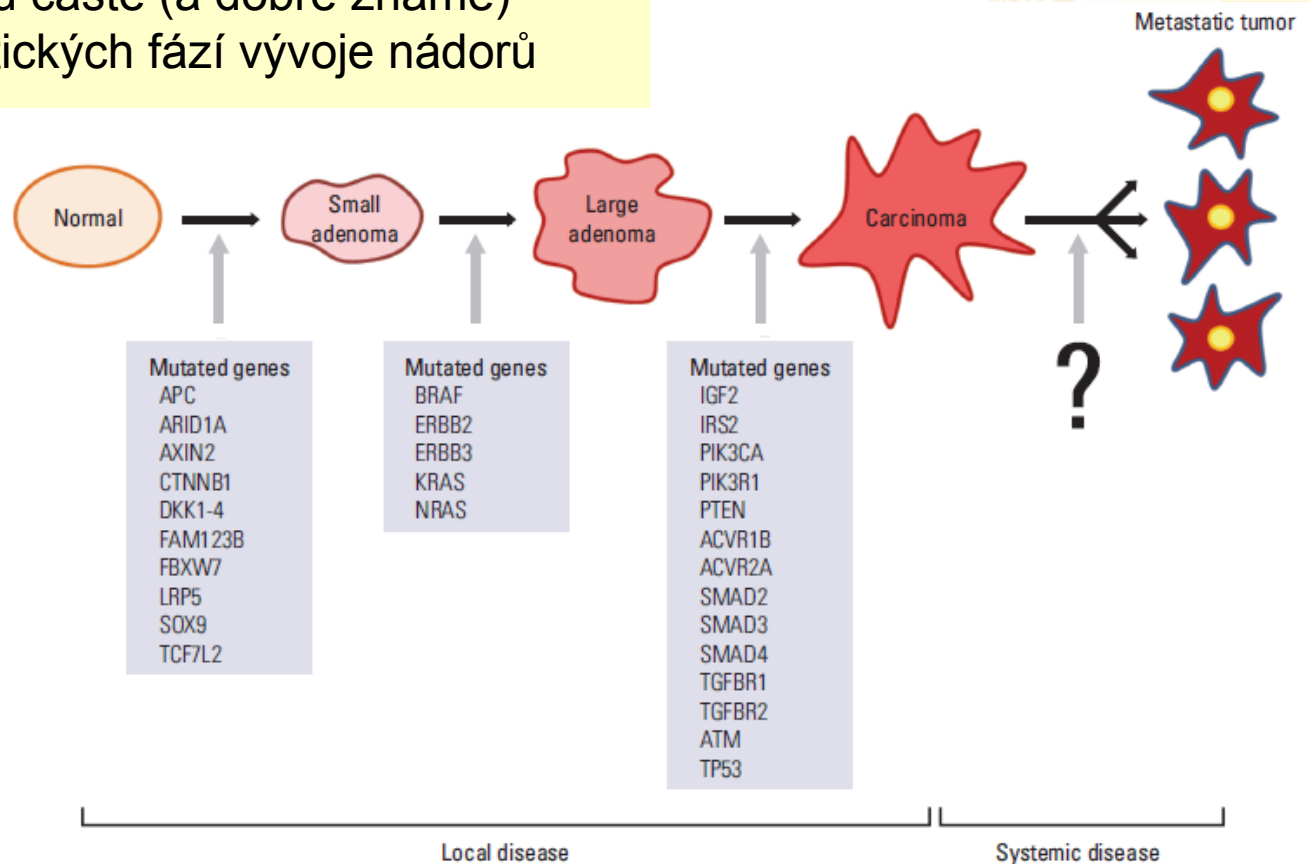
- **cancer genomic studies**: analyzují genomické mutace během procesu karcinogeneze; ty jsou časté (a dobře známé) během ne-metastatických fází vývoje nádorů; ale nejsou známé mutace ve fázi přechodu do metastatické fáze
- zde se pravděpodobně mnohem více uplatňují změny v mezibuněčné kooperaci mezi nádorovými a nenádorovými buňkami – což zřejmě reprezentuje přeměnu **lokálního** onemocnění v **systémové** →
- **cell network study**

Nádor jako systémové onemocnění



genomické mutace provázející proces karcinogeneze jsou časté (a dobře známé) během ne-metastatických fází vývoje nádorů

nejsou známe mutace související s přechodem do metastatické fáze



Efektivita metastázování



- celý proces tvorby metastáz je málo efektivní; první fáze metastatické kaskády jsou efektivnější, pozdnější fáze (**kolonizace**) mohou být **extrémně málo efektivní**
- odhaduje se, že uspěje asi 0,01% buněk; většina diseminovaných buněk (DTCs) je buď eliminována, nebo vstoupí do dormantního stavu (na týdny, měsíce i roky) ⇒ metastázy se mohou objevit roky po „vyléčení“ primárního nádoru
- **dormance** (definice): klinicky asymptomatický stav, kdy diseminované nádorové buňky zůstávají nedetekovatelné po dobu 5-7 let po zdánlivě úspěšné léčbě primárního nádoru
- dormantní buňky často unikají terapii, protože ta je často namířena na dělící se buňky

Dormantní mikrometastázy



1. mikrometastázy, kterým chybí některá klíčová vlastnost, např. schopnost indukovat **angiogenezi**
2. výživová deprivace může indukovat intenzivní **autofagii**, která způsobí, že se nádorové buňky zmenší, stáhnou a přetrvávají ve stavu reverzibilní dormance
3. dormance vyvolaná anti-růstovými signály normálního **ECM** v novém mikroprostředí
4. aktivní suprimující vliv **imunitního systému**