

Mechanismy vzniku nádorů

Mechanismy vzniku nádorů – Patobiochemie nádorové transformace (poznámky k přednášce: <https://el.lf1.cuni.cz/p45782335/>).

Základní charakteristiky maligní transformace

Maligní nádor je **genetickým onemocněním**. Vzniká na podkladě **kumulace somatických alterací** určitých genů (viz dále) vyvolaných **genotoxickým působením** vlivů fyzikálních (ionizující záření), chemických (genotoxické látky), či biologických (selhání endogenních procesů replikace, viry). Vznik maligního nádoru u postiženého jedince může být více nebo méně urychlen existencí **dědičných (hereditárních) mutací** (alterace vysoce penetrantních predispozičních genů vs. alterace genů s omezenou penetrancí). Na jeho rozvoj mají významný dopad i **epigenetické faktory** ovlivňující expresi genetické informace (hl. modifikace histonů).

Nejvýznačnější charakteristikou nádorových buněk je jejich nekontrolovatelný **růst napříč hierarchickým výstavbovým plánem organismu**. Tento výstavbový plán počíná u jednotlivých buněk sdružujících se do buněčných uskupení, ze kterých se skládají tkáně tvořící jednotlivé orgány, uspořádané do orgánových soustav synchronizovaně pracujících v rámci organismu. Výstavbovému plánu organismu odpovídá i jeho řízení – lokální regulace jednotlivých buněk v rámci tkání je realizována pomocí **lokální signalizace** (růstové faktory, cytokiny, imunomodulační molekuly), zatímco regulaci orgánů a jejich soustav ovládají **distančně působící neurohumorální systémy** (především hormony). Správnou funkci buněčných komponent v organismu trvale dozoruje **imunitní systém**. Vznik maligního nádoru je poruchou této homeostázy počínající na úrovni genomů buněk maligně transformované tkáně, která – při selhání kontrolních imunitních mechanismů a v důsledku distančně se šířících metastáz – může vyvolat až příznaky systémového kolapsu vedoucího ke smrti. Ačkoliv postup nádorové transformace se v jednotlivých případech odlišuje, neoplastická tkáň vždy vykazuje některé shodné charakteristiky vyplývající z poruch transformujících se buněk na úrovni:

- **Interpretace lokální i systémové signalizace.**
- **Vnitřní homeostázy** – především na úrovni genomu.
- **Vzájemné lokální intercelulární komunikace** a komunikace s mikroprostředím.

Tyto procesy totiž slouží pro regulaci základního chování jednotlivých buněk v rámci tkání:

- **Regulace sebeobnovy buněk** (replikace buněk, jejich stárnutí a zániku apoptózou).
- **Regulace funkční kapacity v rámci tkáně** (diferenciace a migrace buněk).

To vše zajišťuje **tkáňovou homeostázu** – dynamickou rovnováhu vzniku a zániku buněk s ohledem na aktuální potřeby zajišťované příslušnou tkání v rámci organismu (tedy neporušenou existenci hierarchického výstavbového plánu, jež je podmínkou fyziologické integrity organismu). Selhání těchto pochodů vede ve svém důsledku k charakteristickým projevům transformovaných nádorových populací:

- Autonomie v produkci růstových signálů.
- Snížená senzitivita na inhibiční růstové signály.
- Poruchy apoptózy.
- Bezprahový replikační potenciál (imortalizace).
- Poruchy v reparaci DNA (genomová nestabilita).
- Významná angiogeneze.
- Schopnost tkáňové invazivity a metastazování.

Přesto, že na vlastní transformaci se podílí deregulace řady intracelulárních signálních systémů, je nekontrolovatelný růst nádoru výsledkem selhání dvou kritických dějů – **buněčného cyklu** (<https://el.lf1.cuni.cz/bunecnycyklus/>) a **apoptózy** (<https://el.lf1.cuni.cz/apoptoza/>) komplementárně ovlivňující tkáňovou homeostázu (rovnováha mezi novotvorbou buněk vznikajících dělením v buněčném cyklu a zánikem opotřebovaných, nepotřebných či poškozených buněk v procesu apoptózy charakterizuje normální fyziologický stav ve tkáni dospělého organismu). Nádorové buňky se vždy vyznačují poruchou této rovnováhy, jež je způsobena zvýšením rychlosti buněčného cyklu a rezistencí k indukci apoptózy. Poruchy obou dějů jsou podmíněny mutacemi doprovázenými epigenetickými alteracemi genů, které oba děje řídí (**onkogeny** resp. protoonkogeny – podílející se na stimulaci buněčného cyklu a inhibici apoptózy a opačně působící **tumorsupresorové geny**). Genetické alterace jsou v nádorových buňkách tolerovány, protože třetí **kritickou podmínkou** nádorové transformace je **deregulace DNA reparačních mechanismů**. Selhání reparačních dějů způsobuje nestabilitu genomu, v němž dochází ke kumulaci nereparovaných genetických alterací, které mohou poškodit další regulační mechanismy zodpovědné za vznik heterogenních nádorových populací s vysokým maligním potenciálem.

Poznámka k původu nádorových buněk

Co je základem populace, ze které vzniká iniciální cluster nádorově transformovaných imortalizovaných buněk? V každé tkáni lze vysledovat (nebo alespoň předpokládat) tři hlavní vývojové populace, které jsou nutné pro fyziologickou obnovu tkání v průběhu lidského života, neboť – až na výjimky z pravidla (např. pyramidální nervové buňky) – generační čas většiny buněk představuje zlomek doby života organismu:

- **Tkáňově specifické kmenové buňky** – jsou nositeli časově neomezeného replikačního potenciálu ve tkáni:

obnovují zásobu progenitorových buněk.

Charakteristiky: replikační potenciál srovnatelný s dobou života celého organismu; koncentrace ve tkáni velmi nízká; neomezený, avšak nízký mitotický potenciál; chybění většiny fenotypových znaků maturovaných buněčných populací.

- **Progenitorové buňky** – suplementují potřebu průběžně ubývajících opotřebovaných konkrétních maturovaných buněk tkání.

Charakteristiky: mají omezený generační potenciál; rychlé dělení; schopnost migrace; schopnost diferenciaci do podoby specializovaných buněčných populací příslušné tkáně. V jejich fenotypové výbavě se tak podle stupně jejich diferenciaci setkáváme se znaky maturovaných buněk.

- **Specializované buňky tkání** vznikající diferenciací ze svých progenitorů tvoří > 99,9 % buněčné populace ve tkáních.

Charakteristiky: jsou vykonavateli tkáňově specifických funkcí; mají nízký replikační potenciál (v průběhu svých několika dělení stárnou a musí být nahrazeny novou populací nových buněk vzniknuvších diferenciací z progenitorů); terminální a specializovaný fenotyp; omezená nebo žádná schopnost migrace (platí pro solidní tkáně).

S ohledem na známé charakteristiky nádorových buněk (neomezený replikační potenciál, ztráta kontaktní inhibice, migrace, neúplná exprese fenotypových znaků plně diferencovaných buněk tkáně atd.) je pravděpodobné, že prvotní klon nádorově transformovaných buněk (**nádorové kmenové buňky**) vzniká postupnou kumulací genetických a epigenetických alterací spíše na úrovni kmenových nebo progenitorových buněk, než majoritních populací plně maturovaných buněk tkání.

Poruchy (selhání) intracelulární signalizace vedoucí k nádorové transformaci

Jestliže jsou základem nádorové transformace poruchy řízení buněčného cyklu a apoptózy, za současně inaktivace DNA reparačních mechanismů, kterých konkrétních genů a signálních procesů se tato selhání týkají? Přestože somatických alterací v DNA a epigenetických inzultů byly popsány tisíce, lze předpokládat, že existují některé signálně transdukční dráhy, jejichž poruchy jsou pro nádorovou transformaci kritické.

Poruchy mitotické signalizace a selhání buněčného cyklu

Poruchy řízení buněčného cyklu se, s ohledem na mechanismus jeho regulace, dotýkají především úvodní fáze – vstupu do buněčného cyklu a regulace kontrolních bodů buněčného cyklu. Promitotická signalizace zahrnuje detekci, přenos, šíření a amplifikaci mitotického signálu, jež v konečném důsledku iniciuje takové změny v genové expresi stimulované buňky, které navozují syntézu proteinových regulátorů řídících postup buněčným cyklem (např. cyklinů). Tyto pochody jsou na biochemické úrovni vyjádřeny signálními kaskádami zahrnujícími vlastní signální molekuly (ligandy), jejich bílkovinné receptory, a případně transduktory přenášející mitotický signál na soustavy vzájemně komunikujících kináz modulujících aktivitu specifických transkripčních faktorů (TFs), jež regulují genovou expresi genů zodpovědných za průchod buněčným cyklem. Reprezentanty těchto dějů je například signalizace:

- **Růstových faktorů (RFs)** a jejich receptorů (RTKs) – receptory s vlastní – intrinsickou – tyrosinkinázovou (TK) aktivitou zahrnujících RF>RRFs>adaptory (Grb/Sos)>transduktory (Ras)>systém kináz (MAPKKK>MAPKK>MAPK) a cílové TFs (Elk). Všechny uvedené komponenty stimulují buněčný cyklus.
- **Cytokinů** a jejich receptorů – jako příkladu přímé cesty signalizace, v typické podobě založené na aktivaci cytokinového receptoru (bez vlastní TK aktivity), který (následkem ligandem indukované konformační změny) asociuje s membránově vázanou molekulou Jak kináz fosforylujících samotný receptor tak následně s fosforylovaným receptorem asociující molekulu STAT proteinů (signal transducers and activators of transcription). Aktivační fosforylace STAT proteinů umožňuje jejich dimerizaci a translokaci do buněčného jádra, kde vykonávají přímo roli specifických TFs.
- **Signalizace zahrnující proteinkinázu B (AKT)** – integrující signalizaci z řady membránových receptorů (RTKs, cytokinové receptory) a ovlivňující nejen buněčný cyklus, ale i proces apoptózy.
- **β-keninové signalizace** – regulované kontaktní inhibicí, kterou zprostředkovávají adhezivní molekuly (kadherinů a β-keninu), nebo stimulované signálními molekulami sekrečních (často autokrinních) signálních molekul Wnt proteinů interagujících s komplexem jejich receptorů (Frizzled/LRPs) a ovlivňujících diferenciacní procesy v buňce.
- další – Notch, Hedgehog, NFκB (nuclear factors κB), nukleární a intracytoplasmatické receptory lipofilních signálních molekul (např. steroidní hormony)

Mutace onkogenů kódující jednotlivé proteinové komponenty signálních drah, které způsobují aktivaci jimi kódovaných proteinů bez ohledu na přítomnost stimulace nadřazenou signální molekulou, jsou typickou známkou somatických alterací v nádorových buňkách (např. mutace genů **EGFR**, **k-Ras**, **PI3K**) a způsobující promitotickou hyperstimulaci nezávislou na přítomnosti nadřazeného regulačního signálu. Podobný účinek mají i genové amplifikace (zmnožení kopií alel) genů kódujících jednotlivé proteiny transdukčních kaskád (např. **ErbB-2** kódující her2/neu receptor, heterodimerizující s dalšími členy EGFR rodiny).

Ke stejnému výsledku však mohou vést i **mutace v tumorsupresorových genech** za fyziologických okolností inhibujících (utišujících) signální kaskády. Například:

- Mutace v neurofibrominu (**NF-1**) způsobují ztrátu GAP aktivity (GTPase activating proteins), umožňující prodlouženou existenci aktivovaného Ras-GTP a tím promitotickou hyperstimulaci.
- Inaktivující mutace v **APC**, jehož genový produkt APC (adenomatous polyposis coli) protein za normálních okolností inaktivuje β -kateninovou signalizaci retencí β -kateninu v cytoplasmě, umožňují uvolnění β -kateninu a jeho translokaci do buněčného jádra s transkripční regulátorů buněčného cyklu.
- Mutace tumorsupresorového genu **PTEN** způsobují inaktivaci fosfatázy PTEN (phosphatase and tensin homolog) defosforylující 3,4,5-fosfatidylinositoltrifosfát (PIP3), který je podmínkou aktivace PKB/AKT kinázové kaskády, na signálně neaktivní 4,5-fosfatidylinositoldifosfát (PIP2). Prodloužení poločasu PIP3 aktivuje AKT kinázovou kaskádu bez ohledu na nepřítomnost nadřazených stimulačních signálů.

Výsledky prací posledních let naznačují, že důležitou úlohu v regulaci genové exprese signálních regulátorů ovlivňujících mitotickou signalizaci nesou i mikroRNA (**miRNA**) molekuly působící jako onkogenní i tumorsupresorové signály. Jejich mutace či změny v jejich genové expresi se pravděpodobně podílejí na patogenezi řady nádorových onemocnění.

Kromě mutací mohou být negativní regulátory mitotické stimulace postiženy i epigenetickými změnami na úrovni hypermetylací (např. hypermetylace promotorů SOCS proteinů fyziologicky inhibujících cytokinovou signalizaci).

Poruchy buněčného cyklu se (kromě výše uvedených poruch mitotické signalizace) dotýkají i řízení vlastního buněčného cyklu. Na úrovni vstupu do buněčného cyklu se často setkáváme s deregulací hlavního kontrolního bodu v G1 fázi. Jeho molekulární podstatou je překonání inhibičního vlivu **Rb proteinu**, fyziologicky dosaženého dostatečnou mitotickou stimulací vedoucí k syntéze genů časné (např. E2Fs) a následně oddálené/pozdní (cykliny skupiny D a E) odpovědi. Cykliny tvoří aktivní komplexy s CDKs hyperfosforylují Rb protein, čímž znemožňují jeho interakci (a tím inhibici) řady regulačních proteinů (např. TFs skupiny E2Fs). Rb protein může být patologicky inhibován na úrovni mutací v genu (viz retinoblastom – hereditární inaktivace), nebo patologické hyperexprese cyklinů (cestou amplifikace jejich genů, méně často mutací) hyperfosforylujících (inaktivujících) Rb protein.

Dalším důležitým mechanismem deregulace buněčného cyklu v nádorových buňkách je **inaktivace inhibičních faktorů**, které za fyziologických okolností blokují průchod buněčným cyklem při mitotické hyperstimulaci, poruchách replikace DNA v S-fázi či poruchách segregace chromosomů v M-fázi. Tyto faktory zahrnují hlavně produkty tumorsupresorových genů z rodin CIP/KIP (cyclin-dependent inhibitory proteins/kinase inhibitory proteins; s proteiny p21, p27, p57) a Ink4 (Inhibitors of kinases; s proteiny p15, p16, p18, p19). Kromě jejich přímé inaktivace mutacemi je častou poruchou v nádorových buňkách i funkční inaktivace těchto negativních regulátorů buněčného cyklu na úrovni alterací signálních cest a TFs, které řídí jejich genovou expresi (např. **TGF β /SMAD a p53**).

Poruchy apoptózy

Růst maligních buněk v rámci iniciální klonální expanze primárního ložiska transformovaných buněk je rovněž umožněn poruchou schopnosti iniciace apoptotických mechanismů. **Poruchy apoptózy** zahrnují iniciaci extrinzické cesty (zahrnující sestavení komplexu DISC) – eliminující regulační vliv imunokompetentních buněk, intrinsické části aktivace apoptózy (charakterizovanou vznikem apoptosomu) – umožňující existenci nádorové buňky a i její dělení přes poškození její genomové DNA, ale i poruchy na úrovni šíření apoptotického signálu cestou kaskády kaspáz.

Vznik **komplexu DISC** (death-inducing signalling complex) je umožněn trimerizací death receptorů (DRs) exprimovaných na povrchu všech buněk (s výjimkou imunologicky privilegovaných tkání) stimulovaných death ligandy (DL) – signálními ligandy membránově vázanými na povrchu imunokompetentních buněk. Tato interakce je v nádorových buňkách inhibována snížením exprese DRs na úrovni jejich genové exprese například inaktivací jejich TFs (inhibice/mutace/ubikvitinylace p53, inhibiční fosforylace TFs skupiny FOXO transaktivujících promotor pro CD95/Apo1/FasR) nebo inhibicí DL na základě decoy receptorů (DR postrádajících intracytoplasmatickou část obsahující DD, která umožňuje asociaci adaptorových molekul a vznik aktivního komplexu DISC).

Vzhledem k tomu, že většina aktivních komplexů DRs vede ke vzniku proměnlivých signálních komplexů v závislosti na aktuální přítomnosti adaptorových molekul v buňce, může **změna genové exprese adaptorových proteinů** kriticky ovlivňovat schopnost indukce apoptózy. Např. zatímco navázáním FADD proteinu (Fas-associated protein with death domain) obsahujícího DD i death effector domény (DED) umožňuje dokončení aktivace komplexu DISC navázáním prokaspázy-8 a její aktivaci na kaspázu 8, asociace aktivovaného DRs trimeru s adaptory TRAFs (TNF receptor-associated factors) iniciuje (přes několik proteinů kináz) „signální přesmyk“ vedoucí například k aktivaci transkripčních faktorů NF κ B s výrazně antiapoptotickými účinky.

Vznik apoptosomu (aktivace APAF1 a navázání prokaspázy-9) v **intrinsické části apoptózy** je ovlivněn translokací cytochromu C z intermembránového prostoru mitochondrie do cytoplasmy. Hlavní skupinou bílkovin regulující tento děj je **rodina proteinů Bcl-2** zahrnující jak proapoptotické (Bax) tak antiapoptotické (Bcl-2) proteiny asociující se zevní mitochondriální membránou. Poměr pro- a antiapoptotických proteinů citlivě reguluje schopnost indukce apoptózy v její intrinsické části. Hyperexprese antiapoptotických zástupců (např. způsobená amplifikací jejich genů) a snížení exprese proapoptotických členů Bcl-2 rodiny (např. indukovaná poruchou jejich genové exprese inhibicí TFs, které regulují jejich genovou expresi – typicky mutace v genu p53 kódující protein p53 transaktivující expresi genů Bax, PUMA (p53-upregulated modulator of apoptosis; BBC3) a NOXA kódujících proapoptotické proteiny) znemožňuje iniciaci intrinsické části apoptózy.

Porucha aktivace kaspáz je dalším mechanismem inhibice apoptózy v nádorových buňkách. K inhibici aktivace proximální kaspázy-8 (FLICE) v extrinzické cestě apoptózy může dojít zvýšenou expresí proteinu **CFLAR** (Caspase-8 and FADD-like apoptosis regulator) postrádajícího proteolytickou aktivitu, který kompetuje s molekulou prokaspázy-8 o vstup do komplexu DISC a znemožňuje tak její aktivaci. Aktivita exekutivních kaspáz (kaspáza-3) je v řadě nádorových buněk inhibována vlivem proteinů ze skupiny **IAP** (inhibitors of apoptosis; např. BIRC5 – baculoviral IAP repeat-containing protein 5 – survivin) zvýšeně exprimovaných v řadě nádorových buněk.

Poruchy DNA-reparačních mechanismů

Alterace genů regulujících buněčný cyklus a apoptózu je v nádorových buňkách umožněna díky **poruchám DNA reparačních mechanismů**, jejichž plná aktivita by za fyziologických okolností znemožňovala kumulaci genových inzultů a jejich toleranci. Za fyziologických okolností tak DNA reparační mechanismy tvoří efektivní protektivní bariéru zabráňující vzniku maligně transformovaných buněk. Reparační procesy jsou úzce spojené s regulací buněčného cyklu a apoptózy, neboť (1) za fyziologických okolností může do buněčného cyklu vstoupit pouze buňka s intaktní genomovou DNA, (2) průchod buněčným cyklem a postup do jeho finální fáze může uskutečnit buňka se správně a přesně replikovanou genomovou DNA a (3) k vlastní mitóze a finální cytokinezi může dojít pouze u buněk symetricky segregujících duplikovaný genetický materiál. V případě nesplnění těchto podmínek dochází k zástavě buněčného cyklu umožňující reparaci genomové DNA a, v případě jejího selhání, k iniciaci apoptotických mechanismů. Na molekulární úrovni je vztah mezi regulací buněčného cyklu, reparace DNA a apoptózy reprezentován regulačními proteiny, které ovlivňují signalizaci do všech výše uvedených signálních cest (např. proteinkináza **ATM** (ataxia-telangiectasia mutated), aktivovaná dvouřetězcovými zlomy v DNA iniciuje nejen aktivaci oprav DNA (fosforylací např. proteinu BRCA1), ale díky fosforylaci proteinu p53 aktivuje tento transkripční faktor, který je zodpovědný za rychlé zvýšení exprese nejen inhibitoru buněčného cyklu p21^{waf1/cip1}, ale i apoptózu stimujících zástupců Bcl-2 rodiny (Bax, PUMA, NOXA)).

Poruchy DNA reparačních mechanismů v nádorových buňkách mohou postihnout všechny DNA reparační systémy:

- Poruchy mechanismů oprav na úrovni bazí (**BER/NER systém**) rezultující ve vznik mikromutací (missense/nonsense).
- Velmi závažné jsou alterace oprav dvouřetězcových zlomů DNA reparovaných buď méně přesným mechanismem **NHEJ** (non-homologous end joining) nebo procesem vysoce účinné **HR** (homologní rekombinace), jejichž inaktivací dochází ke chromosomálním translokacím / ztrátám / amplifikacím genetického materiálu v nádorových buňkách, které způsobují fyzickou likvidaci alel tumorsupresorových genů a amplifikaci chromosomálních úseků kódujících onkogeny.

Poruchy DNA reparačních mechanismů jsou jedním z nejčasnějších projevů iniciálních stádií kancerogeneze. V případě sporadických (t. j. nehereditárních) nádorových onemocnění je řada z genů, kódujících proteiny angažované v reparačních procesech, inaktivována somatickými mutacemi (bodové mutace i rozsáhlé delece postihující celé geny) a/nebo hypermetylacemi příslušných promotorů. Relativně vzácně se vyskytující hereditární mutace v těchto genech jsou podstatou řady závažných dědičných nádorových syndromů (tvořících obvykle <5-10% nádorů; např. MSH/MLH geny, ATM, BRCA1/2, MRE11, a řada dalších), kdy preexistující alterace obvykle jedné z alel genu výrazně zvyšuje riziko maligní transformace v predilekční tkáni.

Význam

Nádorových onemocnění v naší populaci neustále přibývá. Pochopení příčin vzniku a rozvoje nádorových onemocnění je závažnou otázkou nejen pro výzkum v molekulární onkogenetice, ale je důležitým předpokladem pro racionální využití **cílené (targeted) biologické léčby**, která je, na rozdíl od klasické chemoterapie, zaměřena proti vybraným molekulárním znakům (např. overexprimovanému receptoru her2/neu; mutovaným k-Ras či B-Raf onkoproteinům) u konkrétního pacienta s konkrétním nádorovým onemocněním. Přestože tato nová léčebná strategie přináší dobré výsledky, její často závratná cena striktně vyžaduje nasazení pouze u indikovaných pacientů, u kterých existuje slušná naděje na pozitivní léčebnou odpověď. Tuto apriorní otázku musí racionálně zodpovědět onkolog, který pro validní rozhodnutí musí nezbytně chápat striktní biologická kritéria vycházející z molekulární podstaty léčeného nádorového onemocnění a fenotypu/genotypu nádorových buněk u konkrétního pacienta.

Další oblastí, která se významným způsobem proměňuje díky pokroku v molekulární biologii nádorů, je **onkologická diagnostika**. Rozkrývání molekulární podstaty nádorových onemocnění umožňuje využití **molekulární taxonomie** pro klasifikaci nádorových onemocnění, která pravděpodobně umožní vhodnější skupinové zařazení jednotlivých forem nádorových onemocnění, lépe odpovídající jejich biologické podstatě, než tomu doposud bylo u čistě patologické a imunohistochemické analýzy. Významnou diagnostickou oblastí je i **detekce patogenních mutací v nádorových predispozičních genech**, které tvoří sice malou, ale vysoce rizikovou skupinu osob.

Například i řešení otázky původu populací buněk v maligním nádoru není jen významným teoretickým problémem, ale její řešení může přinést značný pokrok v onkologické terapii. Většina současných léčebných strategií sice často umožňuje likvidaci majoritních populací masy nádorových buněk, avšak pravděpodobně není adekvátně účinná na kmenové buňky nádoru. Jejich setrvávání ve tkáních je pravděpodobně častou příčinou recidivy onemocnění.

Konečně, obnova negativní regulace buněčného cyklu a zvýšení senzitivity k proapoptotickým mechanismům v nádorové buňce je základní obecný koncept konvenční protinádorové chemo- i radioterapie.