

# Molekulární biologie nádorů

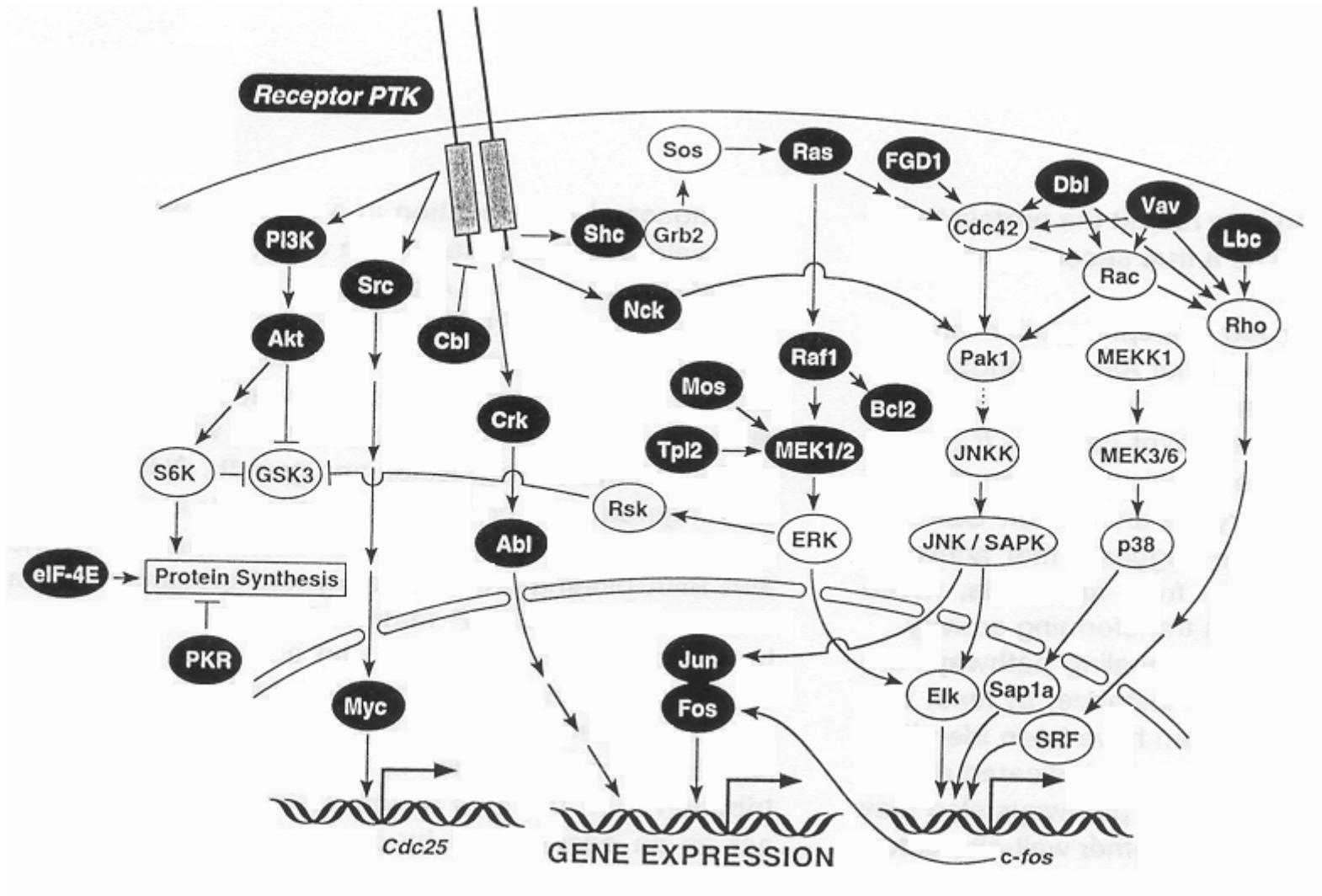
Prof. RNDr. Jana Šmardová, CSc.

Ústav patologie, FN Brno  
Přírodovědecká fakulta MU Brno  
Lékařská fakulta MU Brno  
2011

# 2. Mitogenní signalizace

## II

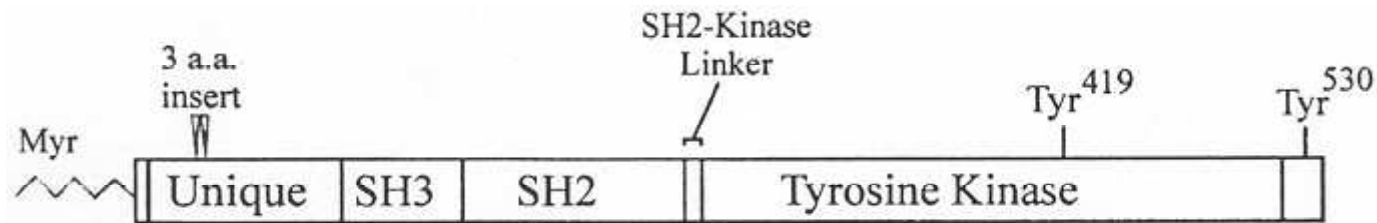
# Sítě onkoproteinů II



# Protoonkoprotein Src - pp60<sup>c-src</sup>

- První popsaný buněčný analog virového onkoproteinu v-Src, obsaženého ve viru Rousova sarkomu (1909 - Peyton Rous) - pp60<sup>v-src</sup>.
- První objevený protoonkogen, ale až v roce 1999 (tedy po více než 25 letech!) nalezeny mutantní varianty (asi u 12% pokročilých CRC)
- Nereceptorová (cytoplazmatická) tyrozinová proteinkináza, přenašeč signálu.
- Účastní se řízení řady buněčných procesů jako proliferace, diferenciace, pohyb, adheze.
- Normálně je v inaktivním stavu, může být přechodně aktivován, např. během mitózy.
- Je asociován s buněčnými membránami, především s plazmatickou membránou a endozomální membránou.
- Rodina Src má mnoho členů: **Fyn, Yes, Lck, Hck, Blk, Fgr, Lyn, Yrk.**

# Struktura c-Src



Human Src - 536 amino acids

- Molekula c-Src má 536 AA (pp60).
- N-konec je modifikován myristylátem.
- Následují domény SH3, SH2 a SH2 linker
- Dvě hlavní fosforylační místa:
  1. **Tyr 530** (527) **negativní** regulační místo na C-konci
  2. **Tyr 419** (416) **pozitivní** autoregulační místo v katalytické doméně

# Vsuvka: myristylace

- posttranslační modifikace
- připojení zbytku nenasycené mastné kyseliny  
 $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{12}-\text{COOH}$
- tato modifikace umožňuje ukotvení proteinů na buněčných membránách

# Regulace c-Src fosforylací

Hlavním regulačním místem na molekule Src je Tyr(530/527): Je-li fosforylován, interaguje s SH2 doménou Src, a tak inhibuje tyrozinproteinkinázovou aktivitu Src.

Tyr(419/416) se nachází v katalytické doméně. Jeho fosforylací je umožněn přístup Src k jeho substrátům.

Na molekule Src další fosforylační místa (např. Thr34, Thr46, Ser72, a další), ale mají menší význam.

# Aktivace c-Src

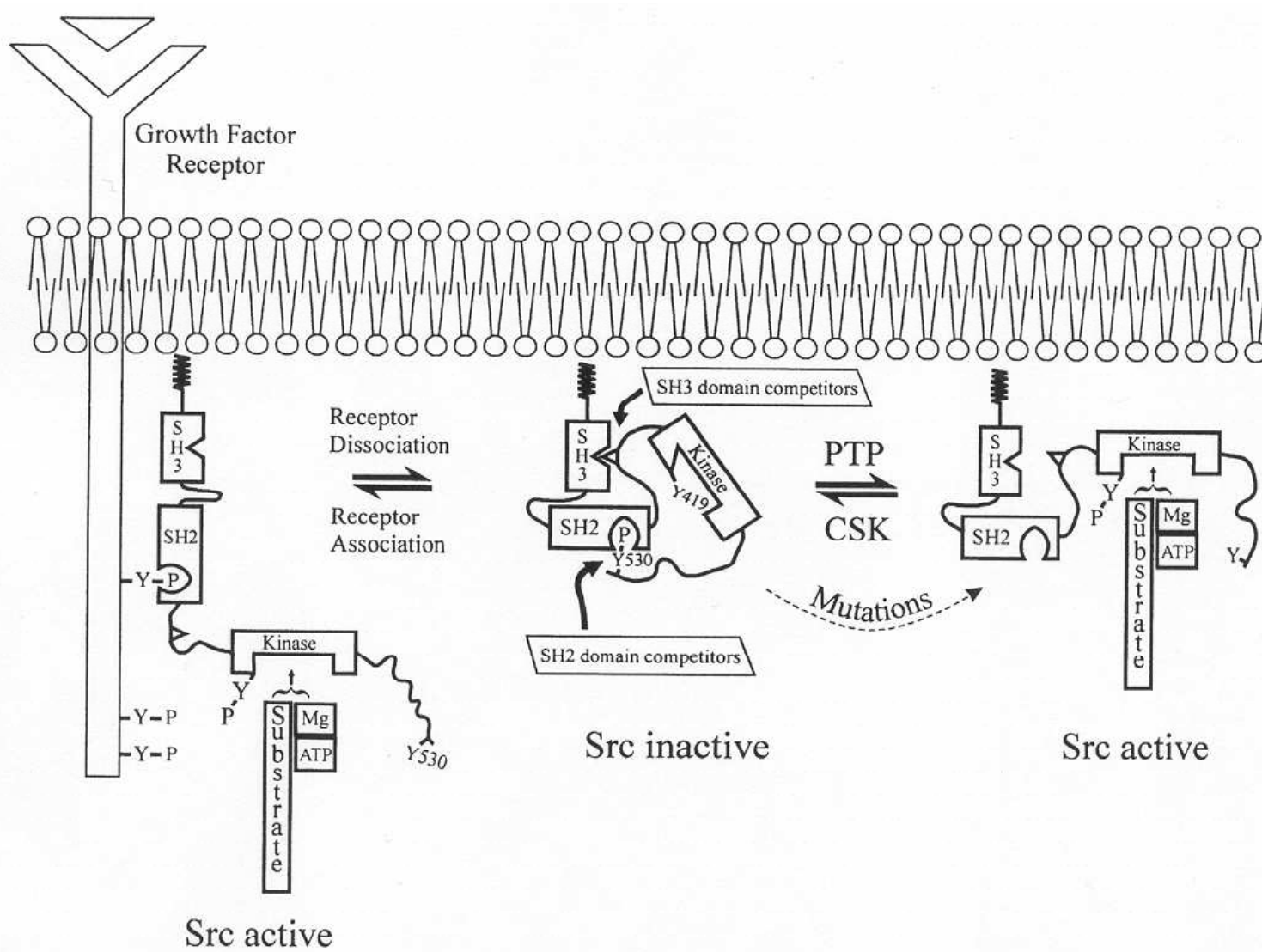
V inaktivním stavu (Tyr 530/527 fosforylován) je vytvořena interakce mezi C-koncem a SH2 doménou a dále mezi SH3 doménou a SH2 linkerem, Tyr 419/416 obvykle defosforylován.

1. Defosforylace Tyr 530/527 způsobí uvolnění interakcí C-konce s doménou SH2 a Tyr 419/416 může být autofosforylován, a tím aktivován.
2. Vazba Src (doménou SH2) na fosforylovaný RTK uvolňuje interakci C-konce a umožňuje fosforylaci Tyr 419/416 a tím aktivaci Src.

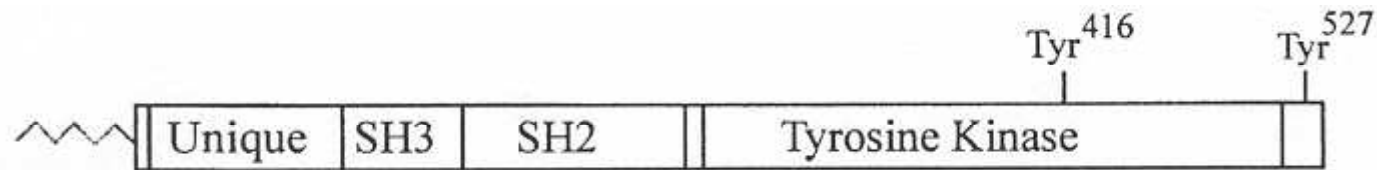
**Dále** vliv celé řady kináz a fosfatáz, které mohou fosforylovat a defosforylovat Src.



# Aktivace c-Src

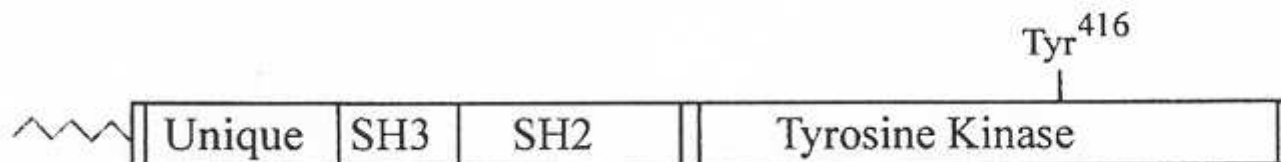


## Porovnání struktury kuřecího c-*Src* a RSV v-*Src*



Chicken Src - 533 amino acids

- Několik jednoaminokyselinových záměn.
- 19 C-koncových AA c-*Src* je nahrazeno jinými 12 AA.



v-*Src* - 526 amino acids

# Regulace c-Src interakcemi s dalšími proteiny

**PDGF** a **FAK** interagují s SH2 doménou, a tak Src aktivují.

**FAK** vedle vlastní aktivace Src také reguluje jeho lokalizaci - přivádí ho do fokálních adhezí, kde Src dále fosforyluje FAK, zvyšuje jeho aktivitu a následuje aktivace Ras/MEK/ERK dráhy.

**Nef** a **Sin** interagují s SH3 doménou, a tak aktivují některé členy rodiny Src.

Popsána řada kináz, které specificky fosforylují Src a řada fosfatáz, které specificky defosforylují Src.

# Regulace c-Src buněčnou lokalizací

Src asociuje s buněčnými membránami: částečně díky myristylátu na N-konci, a dále zprostředkováno některými sekvencemi AA na N-konci.

Lokalizace ovlivňuje funkci Src:

- Plazmatická membrána (fokální adheze, cytoskeleton, místa mezibuněčných kontaktů,...) - mitogenní signalizace přes RTKs a GPCRs; adheze buněk, migrace, mezibuněčné kontakty.
- Cytoplazma a perinukleární prostor (Golgi, endozomy, synaptické vezikuly,...) - transport proteinů, progresse buněčného cyklu.
- Jádro - regulace buněčného cyklu.

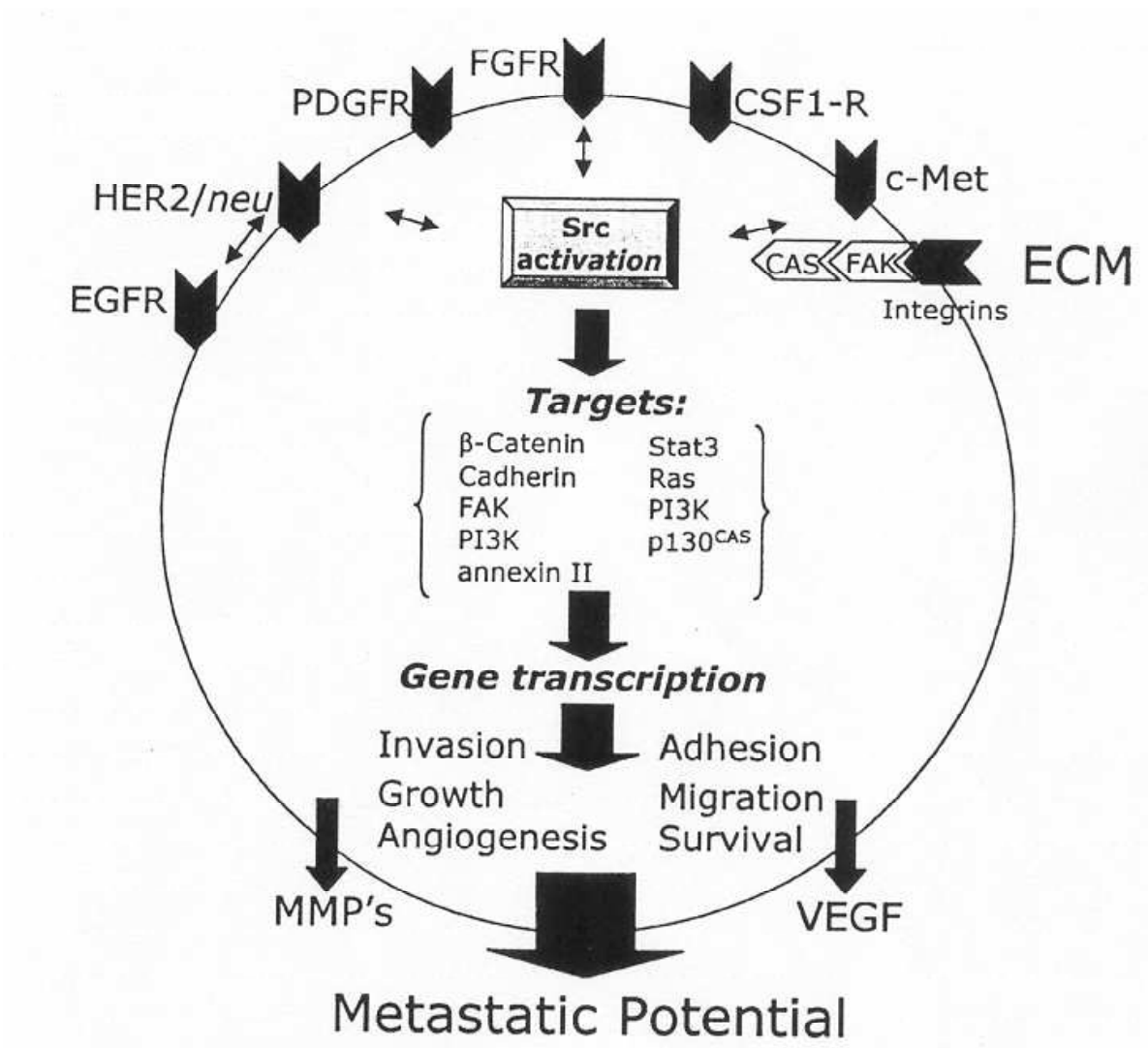
# c-Src a nádory

Hladina proteinu a ještě více aktivita Src jsou často **zvýšeny** v nádorových buňkách ve srovnání s normálními buňkami a tyto hladiny rostou se stupněm malignity.

Aktivita kinázy Src je zvýšena 4-20x u nádorů prsu oproti normálním tkáním. Jeden z možných mechanismů tohoto zvýšení souvisí s aktivitou fosfatázy defosforylující Tyr530 . U nádoru prsu se Src nachází převážně v perinukleárním prostoru, zatímco v normálních tkáních je pravidelněji v celé cytoplazmě.

U většiny kolorektálních nádorů je aktivita Src zvýšena 5-8x, je to spíše časná událost (i v premaligních stádiích) a se zvyšujícím se stádiem se zvyšuje aktivita Src (zřejmá souvislost také s lokalizací metastáz).

# Úloha onkoproteínu Src v kancerogenezi



# Protoonkoprotein Myc

Myc je jaderný fosfoprotein (430 AA) s mnoha znaky transkripčního faktoru.

Původně popsán jako buněčný homolog v-*myc* viru ptačí myelocytomatózy

Do rodiny proteinů Myc patří tři odlišné proteiny, které se uplatňují v kancerogenezi: c-**Myc**, N-**Myc** a L-**Myc**.

Pro úspěšnou transformaci většiny buněk potřebuje onkogen *myc* kooperaci s dalším onkogenem (např. *ras*).

# Struktura proteinu Myc

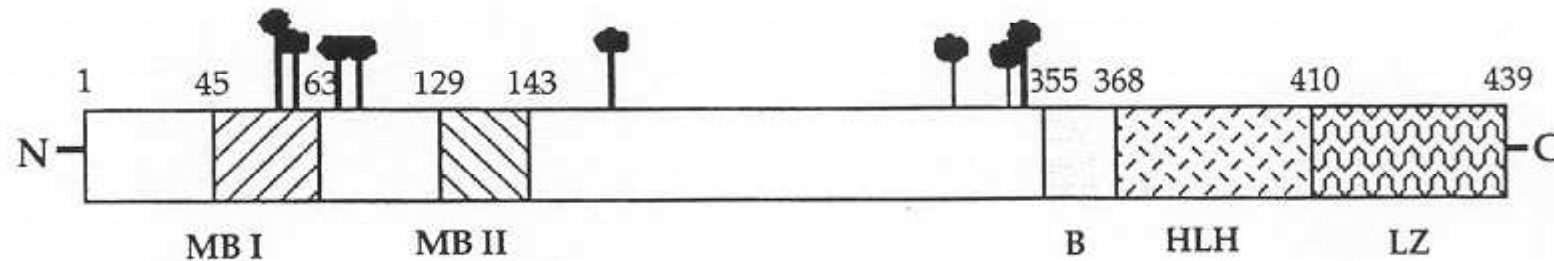
Pro biologickou funkci Myc jsou nezbytné vysoce konzervované oblasti na N-konci **MBI** a **MBII** („Myc Boxes I a II“), na C-konci bazická oblast (b) a motivy **HLH** („helix-loop-helix“) a **LZ** („leucine zipper“) - **bHLHZ**.

Myc patří mezi tzv. **proteiny bHLH** : typicky tvoří homodimery a heterodimery. Na DNA - v promotorech svých cílových genů - rozpoznávají tzv. **E boxy** (obsahující sekvenci CACGTG).

bHLHZ - zajišťuje vazbu na DNA a protein-proteinové interakce (včetně dimerizace s Max),  
MBI a II - transaktivaci a obsahuje řadu **fosforylačních míst**.



# Struktura proteinu Myc

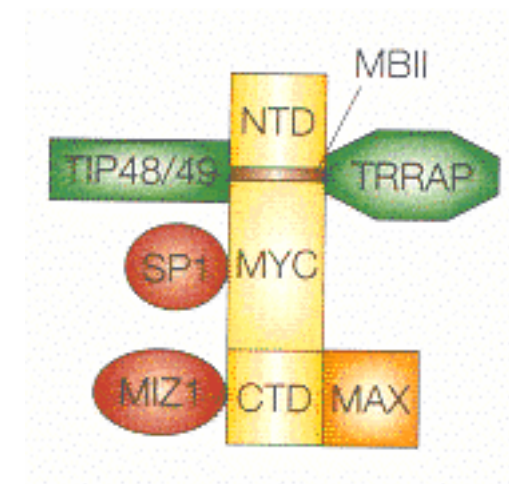


- transaktivační doména
- DNA vazebná doména
- dimerizační doména

Mutace ovlivňující **fosforylační místa** (především threonin 58) zvyšují transformační potenciál Myc a byly nalezeny u některých nádorů. Fosforylace T58 vede k degradaci Myc proteazomem  $\Rightarrow$  mutace T58 zvyšuje hladinu Myc.

# Myc/Max jako transaktivátor

- Myc tvoří heterodimery s proteinem **Max**. Ty potom fungují jako TF a aktivují transkripci svých cílových genů, které posilují proliferaci.
- Hladina Myc je silně potencována mitogenními signály, zatímco hladina Max je relativně konstantní.
- Transaktivace cílových genů dimerem Myc/Max dále regulována proteiny, které se váží na N-konec proteinu Myc: **BIN-1**, **TRRAP**. TRRAP zprostředkovává asociaci Myc s proteiny zajišťujícími acetylaci histonů.

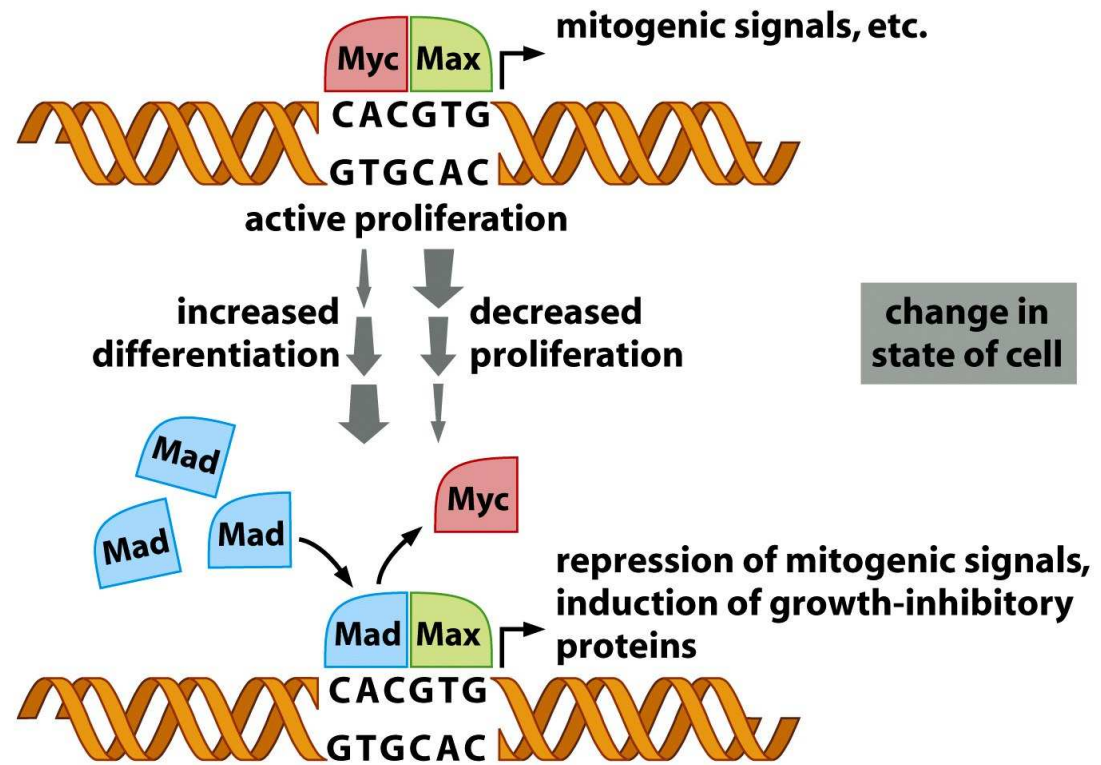


# Max/Mad

- Protein **Mad** (také z rodiny bHLH) kompetuje s Myc o Max. Mad/Max tvoří represor, a tak negativně ovlivňuje transkripci cílových genů.

- Proteiny rodiny Mad nejen nahrazují v dimeru Myc, ale přivádějí k promotorům komplex **Sin3/HDAC** a tak je aktivně reprimují.

- S úbytkem proliferace ubývá Myc a přibývá Mad.



# Myc jako transaktivátor

Cílové geny dimeru Myc/Max se podílejí na řízení buněčné proliferace:

- gen pro **cyklin D2 (CND2)**
- gen pro **CDK4**
- **Cul1**, který následně degraduje **p27<sup>Kip1</sup>**

Myc indukuje expresi **E2F1**, **E2F2** a **E2F3**

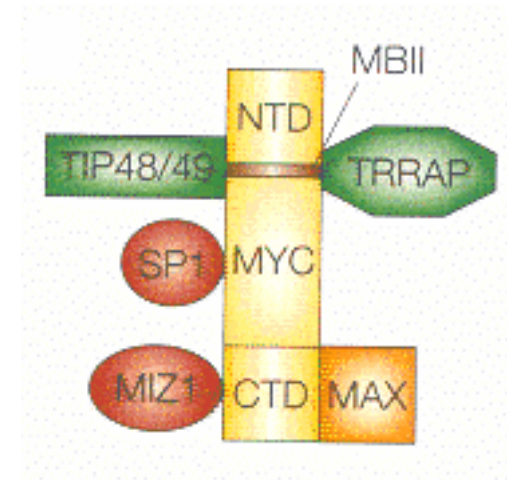
Myc/Max indukuje aktivitu telomerázy transaktivací katalytické podjednotky **hTERT**

Myc/Max indukuje expresi **Bim**; Bim váže a tím inaktivuje Bcl-2  
( $\Rightarrow$  wt Myc indukuje apoptózu)

# Myc jako represor

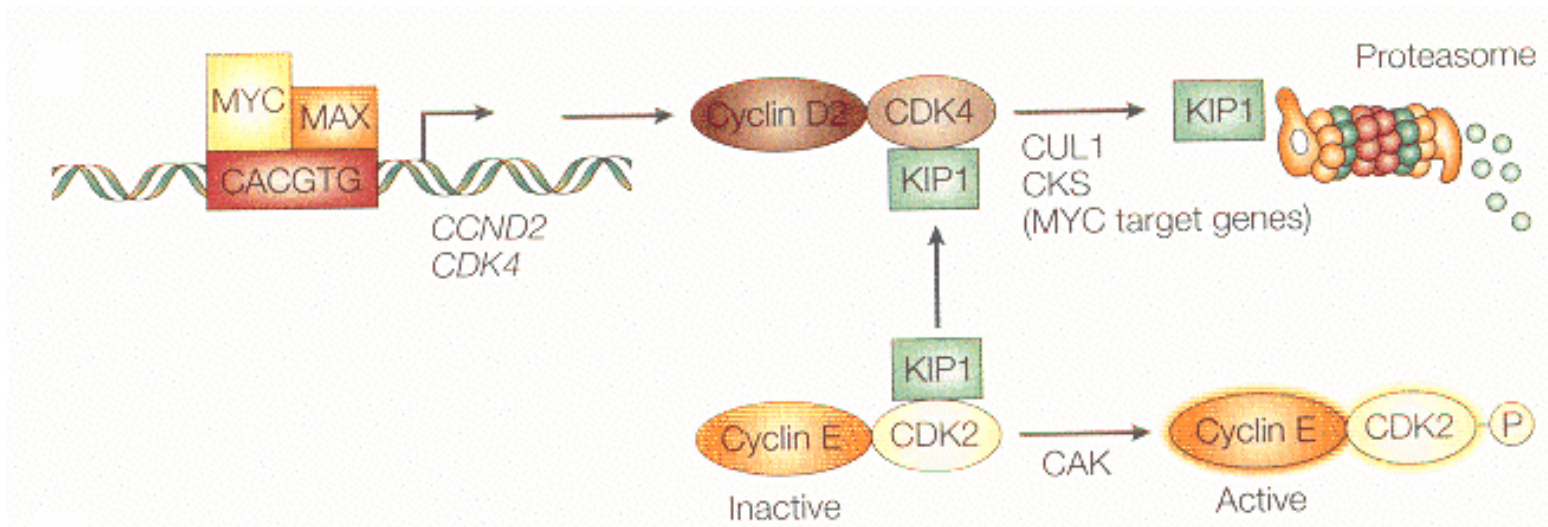
K C-konci Myc se mohou vázat další proteiny ovlivňující vazbu na DNA, jako např. **Miz-1**.

- Geny uplatňující se při zastavení buněčného cyklu **p15<sup>INK4B</sup>** a **p21<sup>WAF1</sup>**.
- Zpětnovazebnou regulací **Myc** reprimuje vlastní expresi.
- Geny uplatňující se v buněčné adhezi - integriny  **$\alpha$ L $\beta$ 2** a  **$\alpha$ 3 $\beta$ 1**.
- Geny specifické pro diferenciaci **mim-1**, **lysosyme** a **C/EBP $\alpha$** .

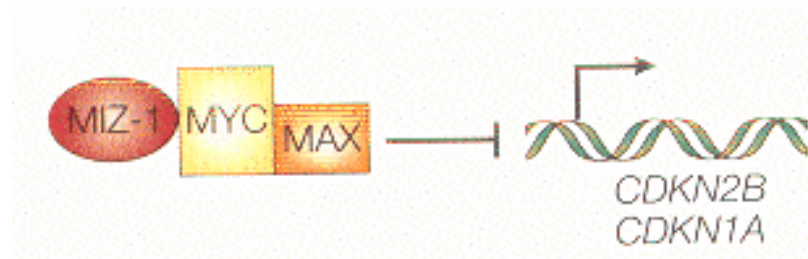


# Myc reguluje progresi G1-S aktivací i represí

## Aktivace cyklinu D2 a CDK4

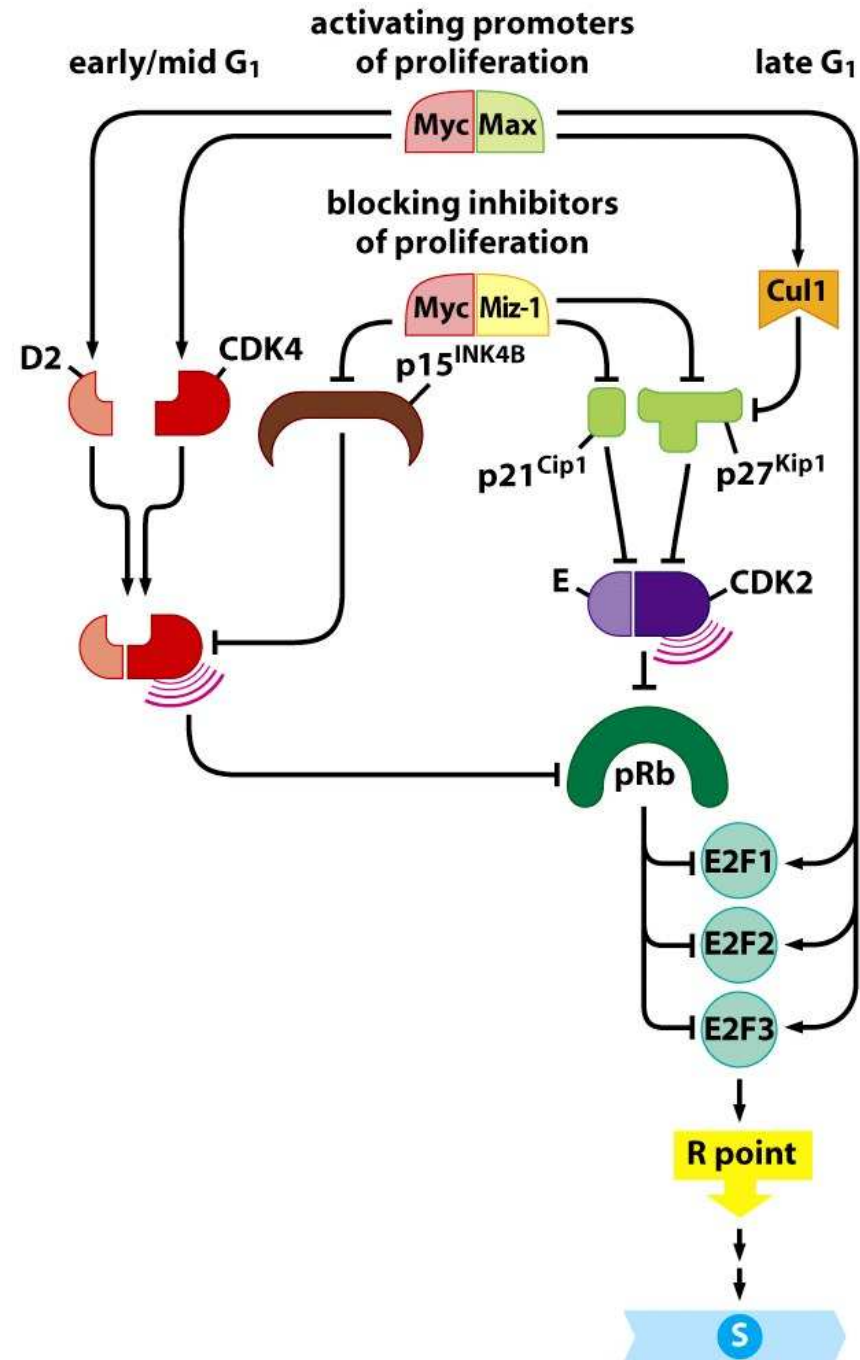


## Represe p15 a p21



# Vliv Myc na buněčný cyklus

- Dimer Myc-Max indukuje expresi cyklinu D2 a CDK4 → **↑BC** (G1)
- Dimer Myc-Miz-1 indukuje expresi Cul1, který zprostředkovává degradaci p27 → **↑BC** (G1)
- Dimer Myc-Max indukuje expresi E2Fs → **↑BC** (S)
- Dimer Myc-Miz-1 reprimuje expresi p15, p21 a p27 → **↑BC** (G1)



# Myc a nádory

Do rodiny proteinů Myc patří tři odlišné proteiny:  
**c-Myc, N-Myc a L-Myc.**

Jsou si podobné svou strukturou a mechanismem účinku.

Výrazně se liší expresí během vývoje a také se zdá, že ovlivňují - i ve stejném buněčném kontextu - jiné sady genů, participují - i ve stejných buněčných typech - na jiných buněčných programech.

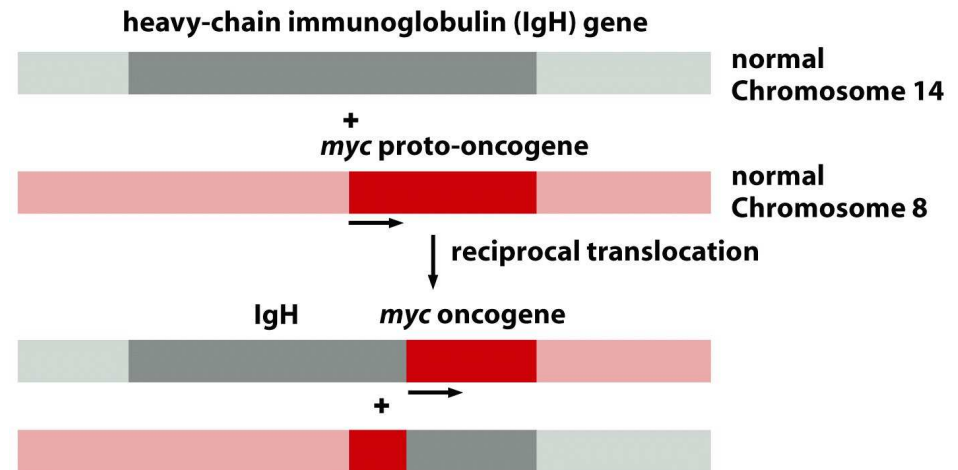
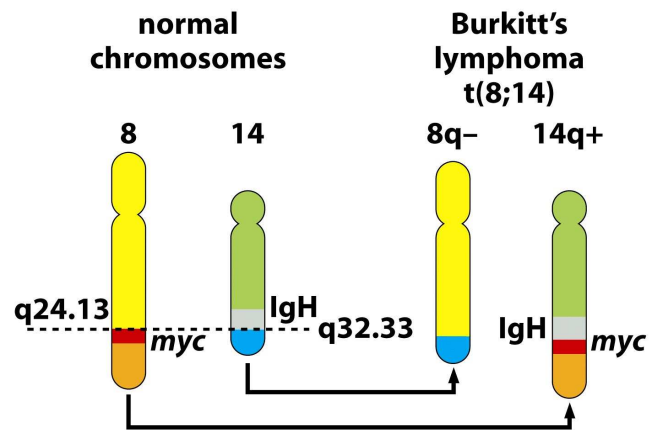
Liší se významně také svou úlohou ve vývoji jednotlivých typů neoplastických onemocnění.



# c-myc a nádory

## Burkittův lymfom:

Téměř všechny případy Burkittova lymfomu souvisí s **translokací** genu *c-myc* (na chromozomu 8) buď s těžkým řetězcem  $\mu$  nebo  $\lambda$  nebo lehkým řetězcem  $\kappa$  imunoglobulinů (na chromozomech 14, 22 a 2).



# c-myc a nádory

## Ostatní lymfomy:

- Low-grade folikulární lymfom je většinou spojen s translokací Ig/Bcl-2, jen vzácně lze detekovat přestavby c-myc. 60-80% těchto lymfomů transformuje v agresivnější formu a u těch už jsou detekovány i přestavby Ig/c-myc.
- Difúzní velkobuněčné lymfomy B-buněk jsou heterogenní a asi u 50% lze detekovat translokaci Ig buď s BCL2, BCL6 nebo c-myc.

# c-myc a nádory

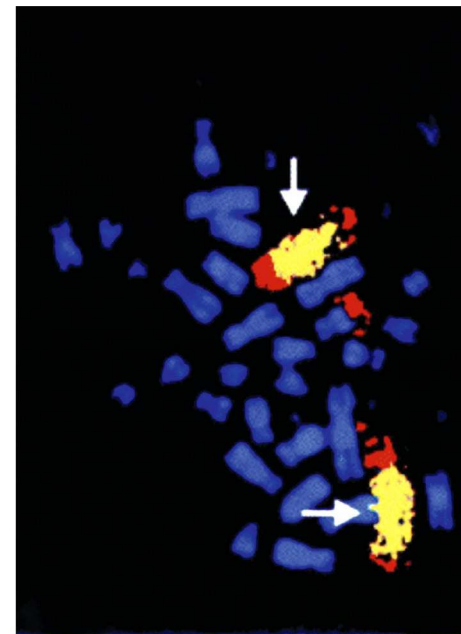
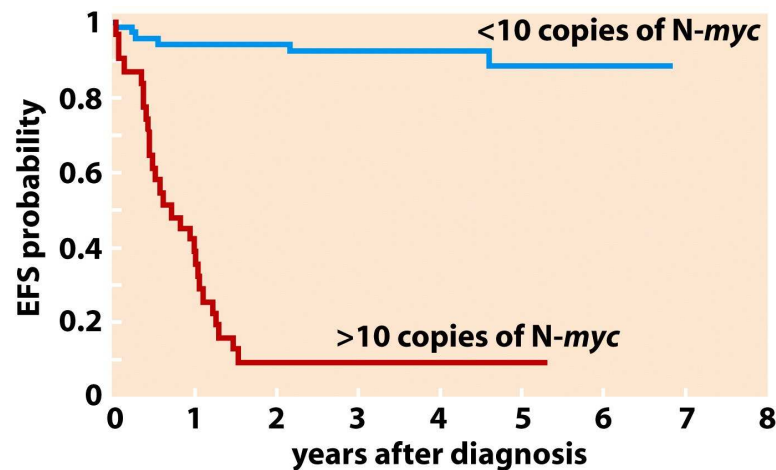
## Solidní nádory:

**Amplifikace a/nebo zvýšená exprese c-myc se vyskytuje u významného podílu invazivních duktálních karcinomů prsu (spojeno s horší prognózou), u některých nádorů prostaty, u gastrointestinálních nádorů (souvislost c-myc:APC:β-katenin: jaderný β-katenin slouží jako koaktivátor TF Tcf-4, který transaktivuje c-myc), u některých melanomů a u mnohočetného myelomu (koreluje s agresivitou onemocnění).**

# N-myc a nádory

**Amplifikace N-myc** se vyskytuje asi u 30% (až 40% pokročilých) případů neuroblastomu (tumor periferního NS) a je spojena s horší prognózou onemocnění. Některé nádory mají 10 až 30 kopií genu N-myc, jiné až 100-150 kopií (**žlutě značená sonda FISH**).

**Zvýšená exprese N-myc** byla popsána u významného podílu případů malobuněčného nádoru plic a u menšího počtu případů medulárního tyroidního nádoru, retinoblastomu, rhabdomyosarkomu a astrocytomů.



# L-myc a nádory

**Amplifikace a zvýšená exprese L-myc** (a také c-myc a N-myc) byla pozorována u některých případů malobuněčného karcinomu plic.

# Konec

