

Molekulární biologie nádorů







Prof. RNDr. Jana Šmardová, CSc.

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

2. Mitogenní signalizace I

(protoonkogeny - onkogeny,
signální dráhy, regulace
buněčného cyklu)

Sedm získaných vlastností maligního nádoru

	získaná schopnost	příklad
	Soběstačnost v produkci růstových signálů	aktivace <i>H-ras</i>
	Necitlivost k signálům zastavujícím b.c.	ztráta RB
	Poškození apoptózy	produkce IGF
	Neomezený replikační potenciál	aktivace telomerázy
	Posílení angiogeneze	produkce VEGF
	Tvorba metastáz	inaktivace E-kadherinu

Nestabilita genomu jako podmínka akumulace všech nutných změn

Je rakovina nemoc buněčného cyklu?

- Ztráta regulace buněčného cyklu je kritická součást buněčné transformace.
- Ztráta regulace buněčného cyklu není jedinou součástí kancerogeneze, většinou sama o sobě není plně transformující.

Průběh buněčného cyklu

M - G1 - S - G2

M - kopie DNA jsou separovány; kondenzované chromozomy

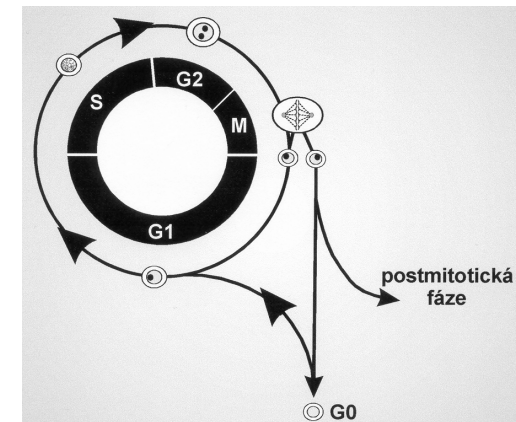
G1 - obsah DNA: 2N

S - replikace DNA; inkorporace značených nukleotidů

G2 - obsah DNA: 4N

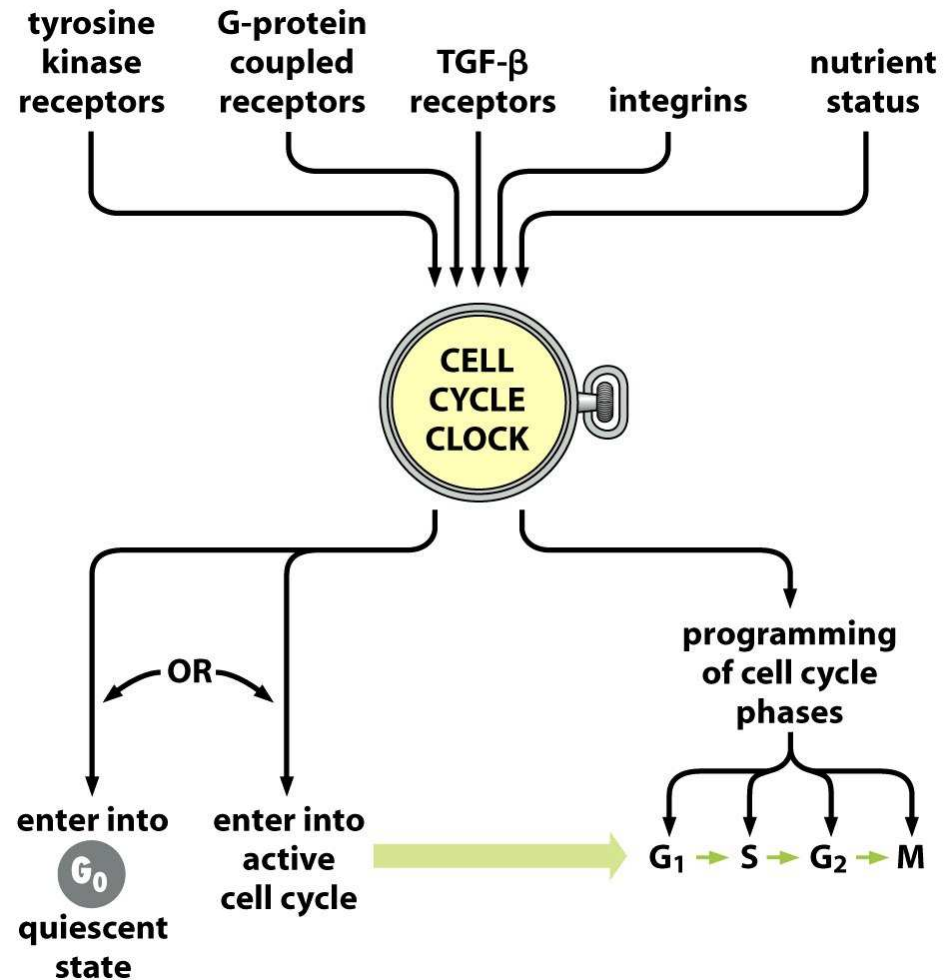
G0 - stárnoucí nebo dlouhodobě se nedělící buňky

postmitotický stav - bez možnosti návratu do cyklu, spojen s terminální diferenciací



Řídící centrum buněčného cyklu

Název „cell cycle clock“ naznačuje, že v jádře buňky funguje nějaké molekulární zařízení, které integruje všechny možné signály přicházející zevnitř i vnějšku buňky a rozhoduje o vstupu buňky do aktivního buněčného cyklu nebo naopak ustoupení do neproliferačního stavu.



Klíčové molekuly buněčného cyklu

Každá fáze cyklu je katalyzovaná specifickými komplexy cyklin dependentní kinázy a cyklinu.

cyklin dependentní kinázy (CDK, CDC) (human: 13 - 2009)

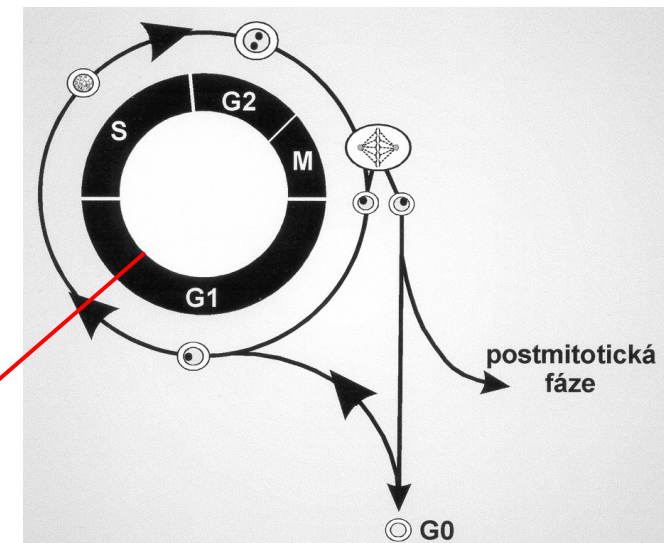
- fosforylují své substráty
- mají katalytickou a regulační podjednotku, aktivita vždy závislá na vazbě cyklinu

cykliny (human: 29 - 2009)

- jejich hladina kolísá v závislosti na fázi buněčného cyklu
- uplatňují se v příslušné fázi cyklu tím, že aktivují příslušnou CDK a směřují ji k jejím substrátům, pak jsou rychle odbourány

Bod restrikce

- Mitogenní stimulace navozuje buněčný cyklus
- Antimitogenní stimulace blokuje buněčný cyklus
- Buněčný cyklus je závislý na exogenní mitogenní signalizaci pouze po určitou dobu fáze G1 - tak byl objeven „rozhodovací“ moment cyklu - bod restrikce

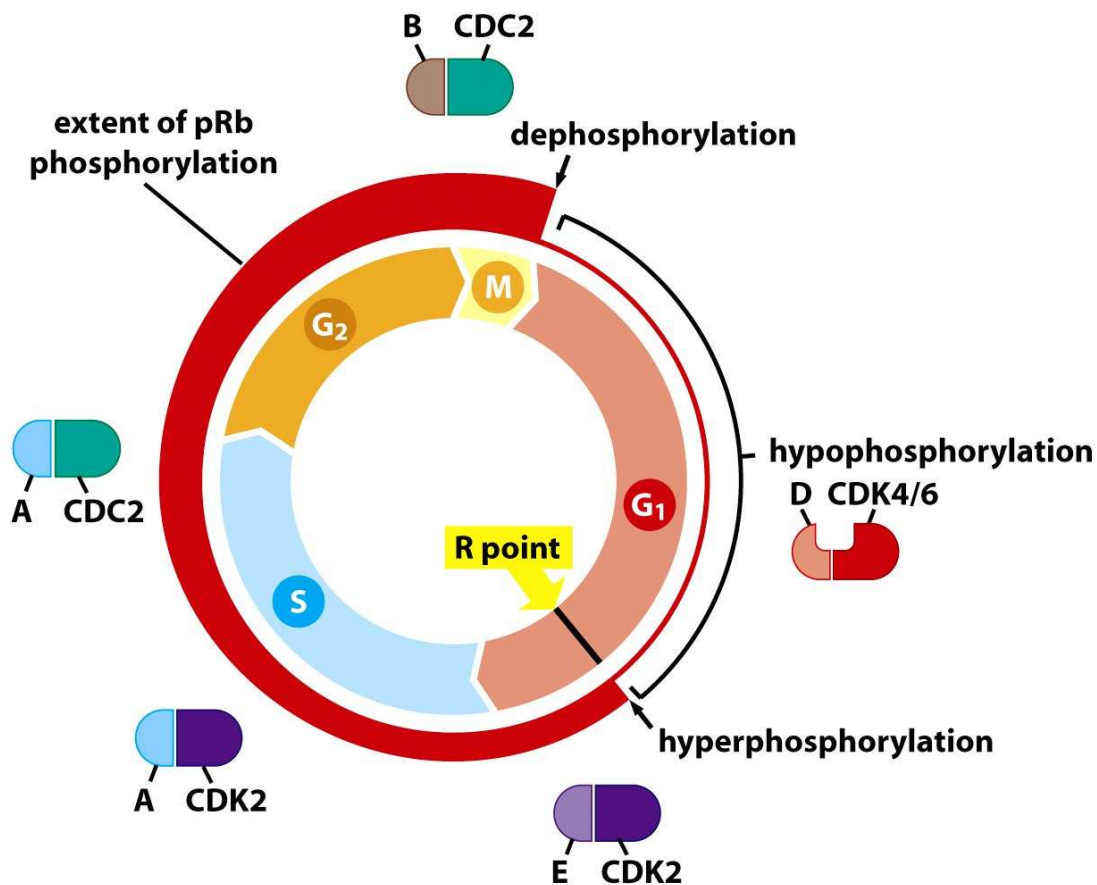


**bod restrikce: klíčový
regulační / rozhodovací
bod buněčného cyklu**

pRB - spínač buněčného cyklu

- pRB v málo fosforylovaném/ nefosforylovaném (hypofosforylovaném) stavu blokuje průchod bodem restrikce: interaguje s TF rodiny E2F a blokuje jejich schopnost transaktivovat jejich cílové geny, jejichž produkty jsou nutné pro S fázi
 - fosforylací ztrácí pRB schopnost vázat E2F a průchod bodem restrikce je tak možný
- ⇒ regulace průchodu bodem restrikce = regulace fosforylace pRB

Úroveň fosforylace pRB v průběhu buněčného cyklu



Stupeň fosforylace pRB je úzce koordinován s průběhem buněčného cyklu: při přechodu M/G₁ jsou všechny fosfátové zbytky odstraněny; při přechodu bodem R masivně narůstá fosforylace až k dosažení fáze M.

(pRB je fosforylován na zbytcích serinů a threoninů.)

Regulace fosforylace pRB

Fosforylace pRB

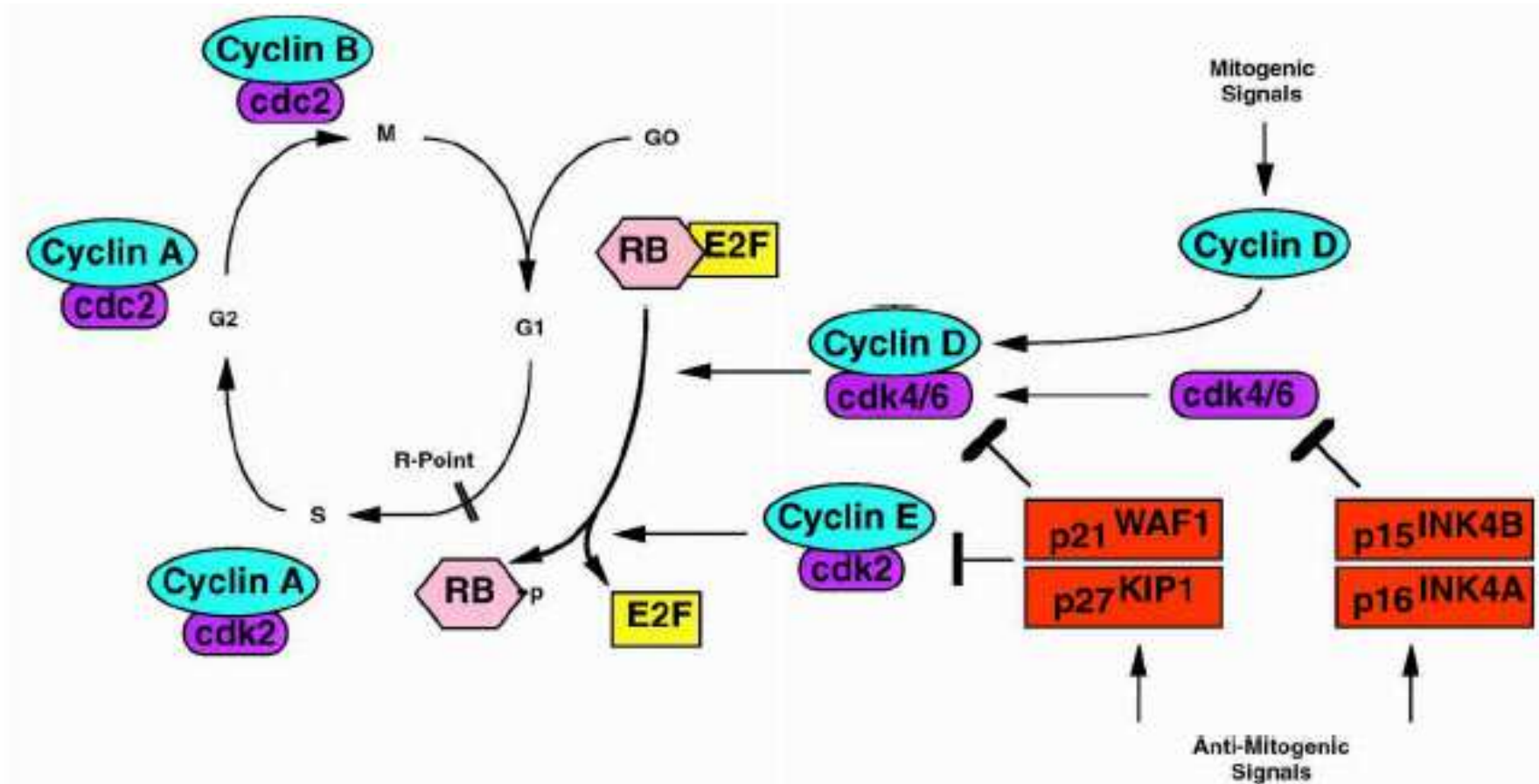
- pozitivně ovlivněna:
komplexy cyklinů D (D1, D2 a D3) a CDK4/CDK6
komplexy cyklinu E a CDK2
- negativně ovlivněna:
inhibitory komplexů cyklin:CDK p21^{WAF1} a p27^{KIP1}
inhibitory CDK p15^{INK4B} a p16^{INK4A}

Mitogenní signalizace vede ke zvýšené expresi cyklinů D a snížení hladiny inhibitorů

Antimitogenní signalizace vede ke snížení hladiny cyklinů D, k navýšení hladiny některého inhibitoru

Regulace buněčného cyklu:

- (1) komplexy CDK:cyklin;
- (2) bod restrikce;
- (3) fosforylace pRB



Co je poškozeno při transformaci?

- nádorový supresor **pRB** (retinoblastom, ..)
- nádorový supresor **p16^{INK4A}** (melanom, ..)
- protoonkogeny **cykliny D**
 - Amplifikace nebo zvýšená exprese cyklinu D1 u téměř 50% nádorů prsu (cyklin D1 v této tkáni má i funkci nesouvisející s CDK: váže se na estrogenový receptor a způsobuje jeho aktivaci nezávisle na hormonu)
 - Chromozomální translokace zahrnující cyklin D1 u parathyroidních adenomů a lymfomů /MCL: t(11;14)/
- „**periferní hráči**“ - součásti mitogenních a antimitogenních drah

Mitogenní signalizace

Klasifikace protoonkogenů I

I. Růstové faktory

II. Receptory růstových faktorů

III. Proteiny Ras

IV. Nereceptorové tyrozinové proteinkinázy

V. Transkripční faktory

Toto rozdělení souvisí se strukturou signální dráhy:

1. Vazba růstového faktoru na receptor
2. Aktivace receptorové proteinkinázy
3. Přenos signálu do jádra kaskádou proteinkináz
4. Aktivace transkripčního faktoru

Klasifikace protoonkogenů II

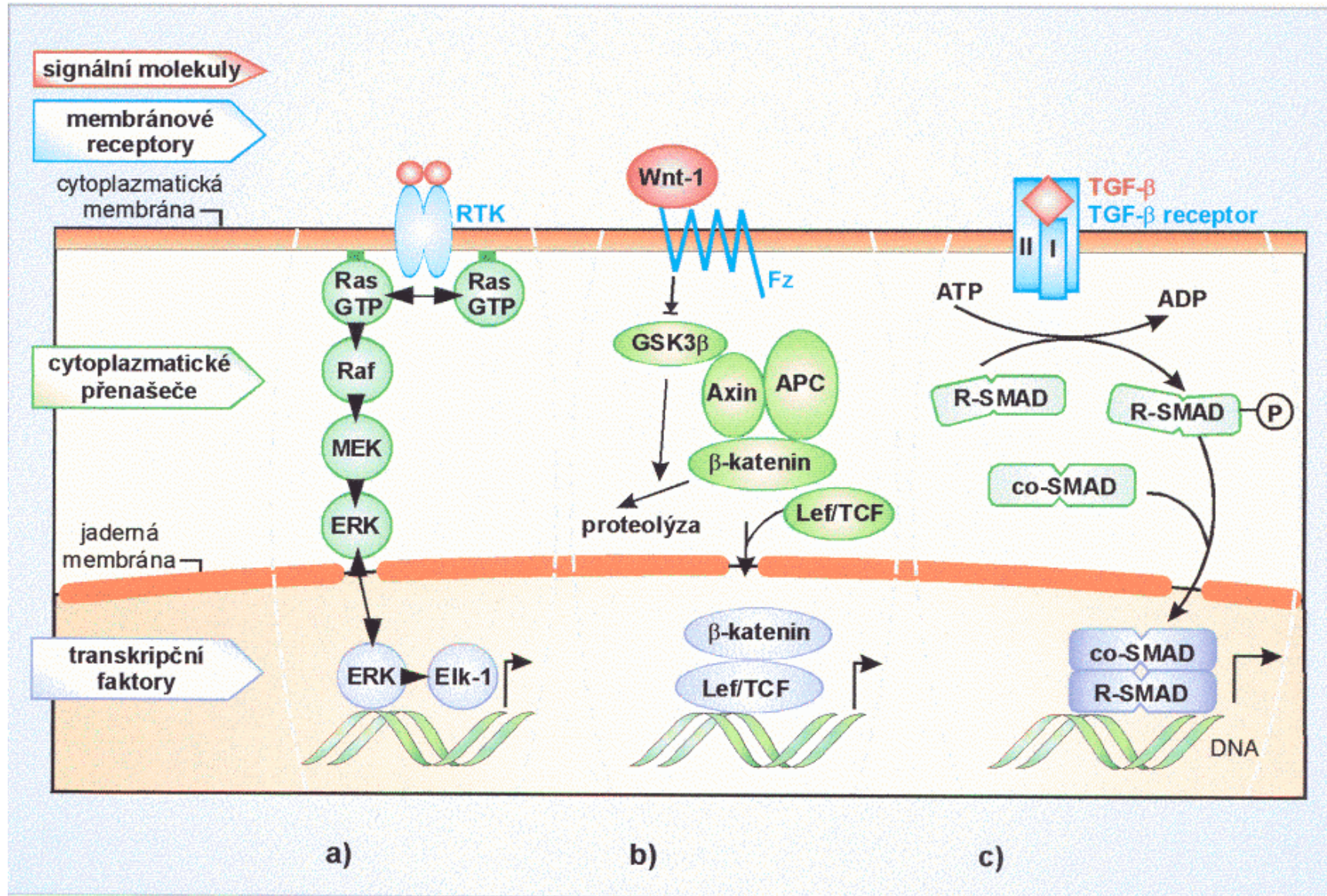
(Mareš, Sedláček, Goetz 1996)

1. Růstové faktory
2. Receptory růstových faktorů
3. G-proteiny
4. Nereceptorové tyrozinové proteinkinázy (plazmatická membrána)
5. Cytoplazmatické serinové/threoninové proteinkinázy (cytoplazma)
6. Jaderné proteiny
7. Neklasifikované (např. BCL-2)

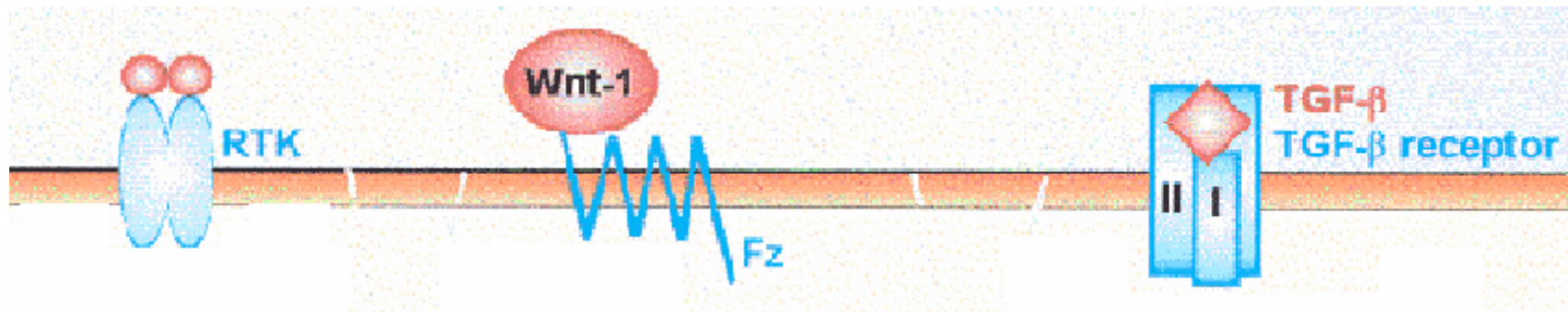
? klasifikace protoonkogenů není jednotná ?

? vztah protoonkogenů k regulaci buněčného dělení ?

Příklady signálních drah



Růstové faktory a tyrozin- proteinkinázové (RTK) receptory



Signalizace prostřednictvím fosforylace zbytků **tyrozinů** je využívána hlavně v **mitogenní** signalizaci. Ostatní signalizace využívají výlučně zbytky **serinů** a **threoninů**.

Růstové faktory a tyrozin- proteinkinázové receptory (RTK)

Růstové faktory: Polypeptidy, které jsou produkovány buňkami a navozují signalizaci k zahájení nebo zastavení proliferace, diferenciaci, přežívání, ... aktivací svých specifických receptorů na povrchu buněk

- Potvrzení účasti extracelulárních signálních molekul v procesu maligní transformace: faktory produkované nádorovými buňkami jsou schopny indukovat transformaci buněk *in vitro*.

Stimulace:

- **autokrinní** - růstový faktor stimuluje produkující buňku
- **parakrinní** - stimulace sousední buňky
- **endokrinní** - stimulace vzdálených buněk

Růstové faktory a RTK receptory

RTK receptory:

- transmembránové glykoproteiny složené z extracelulární, transmembránové a cytoplazmatické domény
- extracelulární doména - cysteinové zbytky vytvářejí dva typy domén: **Ig-like** domény nebo **cystein-rich** domény - tvoří „kapsy“ pro vazbu růstového faktoru

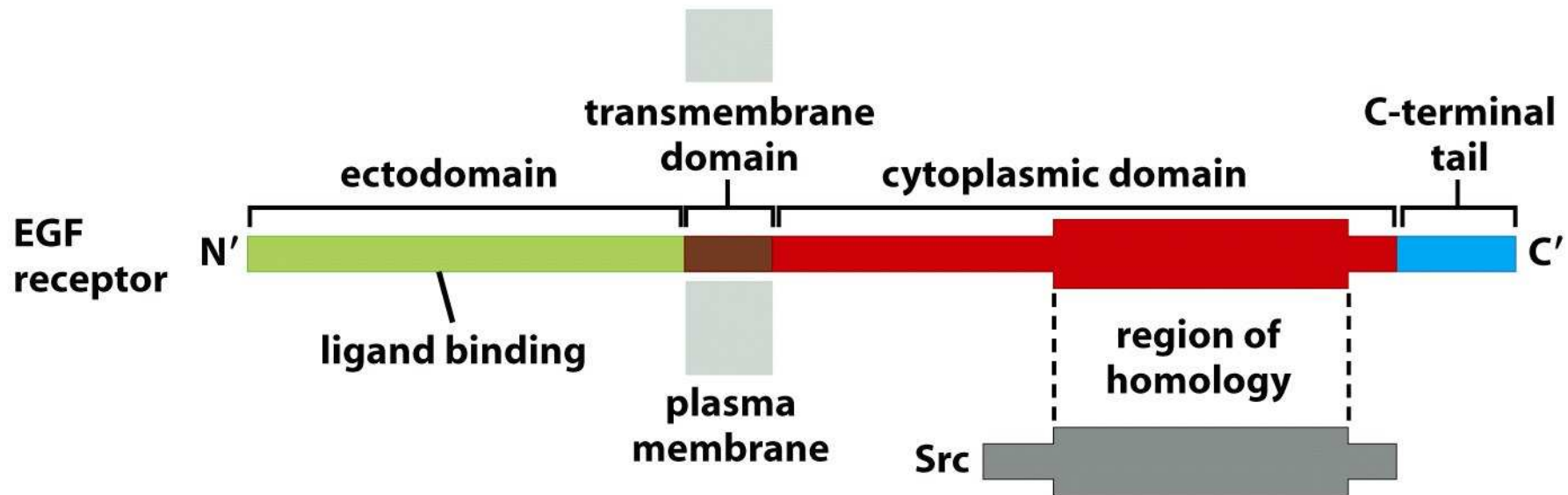
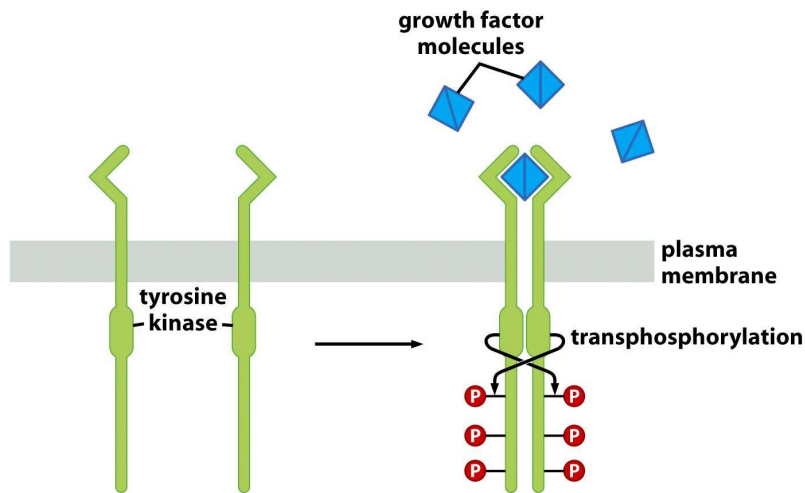


Schéma přenosu signálu na EGFR



Po vazbě svých specifických ligandů receptory dimerizují (s výjimkou IGF, který je kovalentně vázaným homodimerem) a dochází k autofosforylaci.

Autofosforylací se změjí konformace - zpřístupní se katalytická doména a vazebná doména pro substráty. Substráty interagují především prostřednictvím svých SH2 a SH3 („Src-homology“) domén.

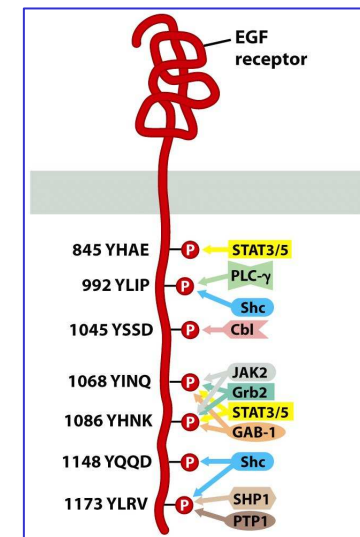
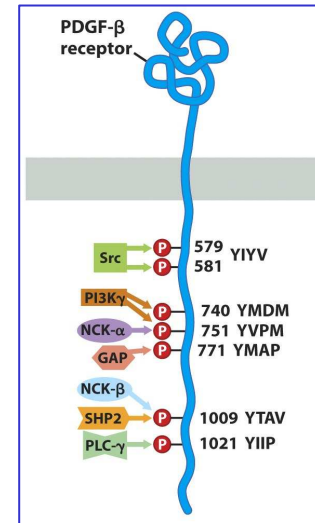
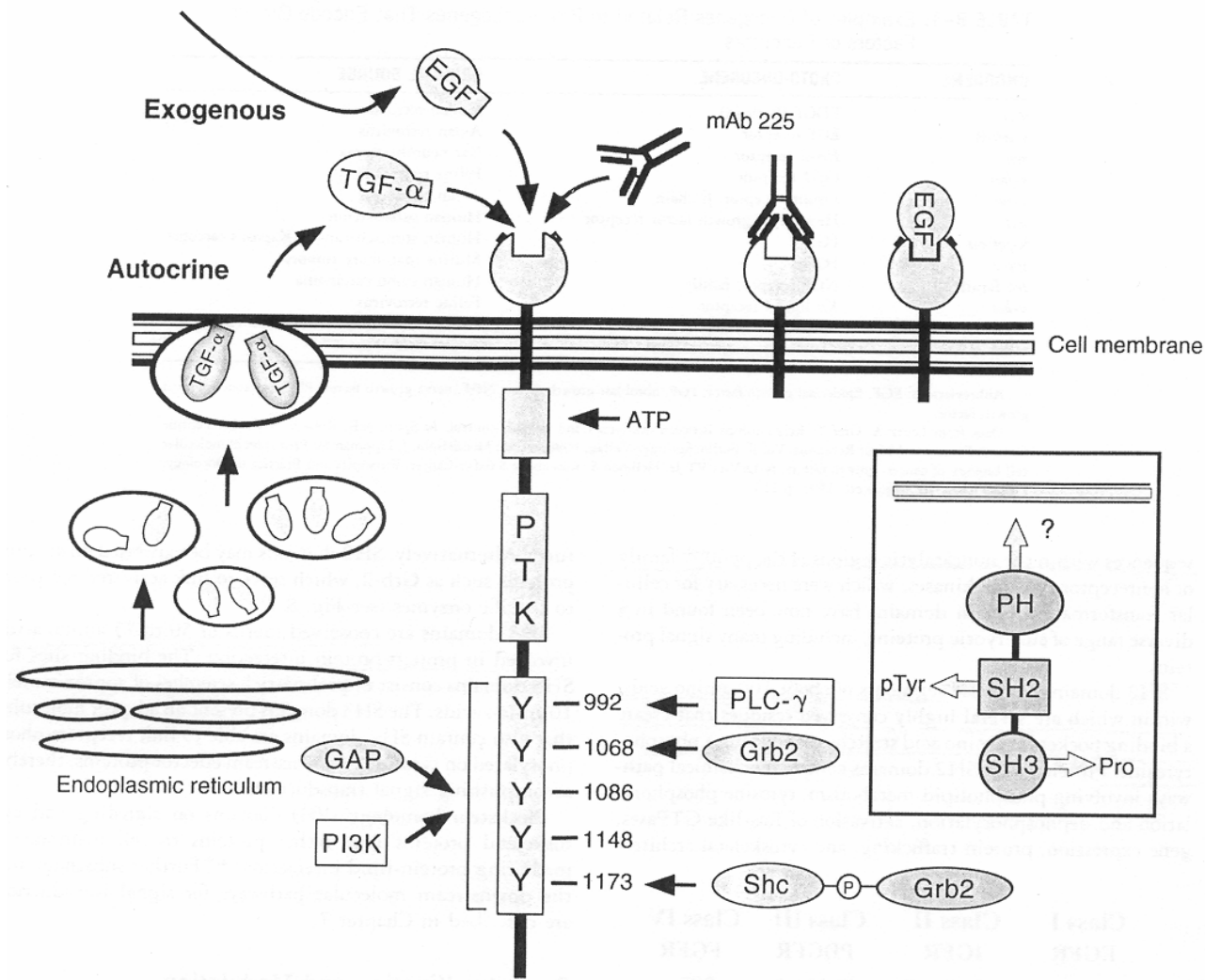


Schéma přenosu signálu na EGFR

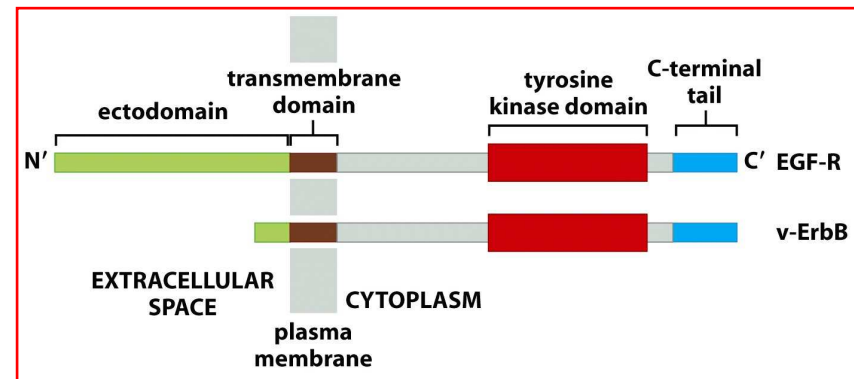
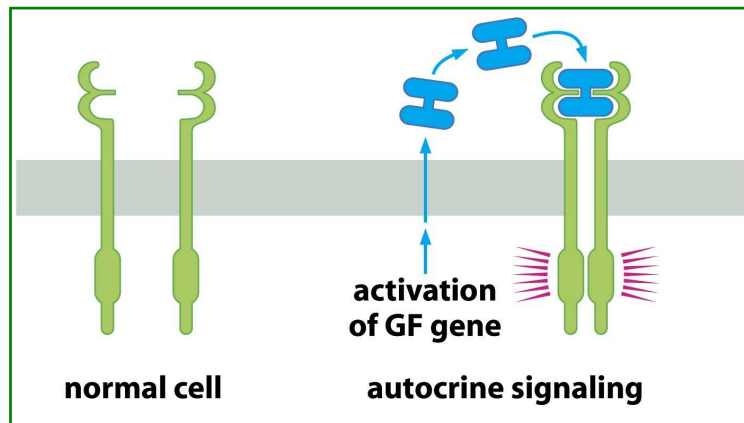


Typy mutací postihující růstové faktory a RTK receptory

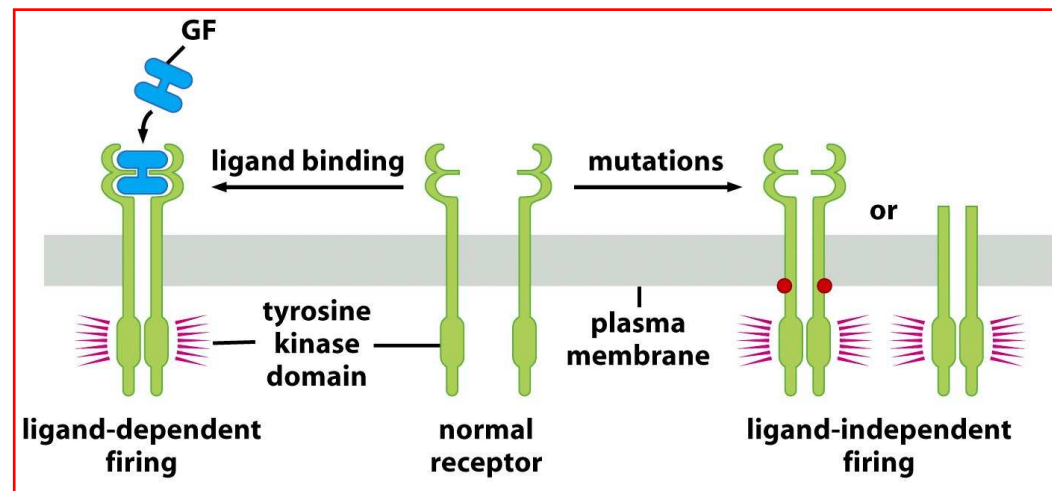
- Produkce/nadprodukce (vlastních) růstových signálů (→ autokrinní stimulace).
- Amplifikace receptoru: neadekvátně efektivní „vychytávání“ extracelulárního signálu: (1) buňky s koncentrovaným receptorem jsou pozitivně stimulovány k buněčnému cyklu, i když hladina extracelulárního signálu je nízká a za normálních okolností by mitogenní dráhu neaktivovala; (2) koncentrace receptorových proteinů na povrchu buňky tak vysoká, že se molekuly nahodile setkávají a dimerizují i bez vazby ligandu.
- Změna struktury receptoru: jeho aktivace nezávislá na vazbě ligandu (bodovými mutacemi, krátkými delecemi, zkrácené formy, v důsledku fúze s jinými geny,...).

Změny postihující RTK receptory

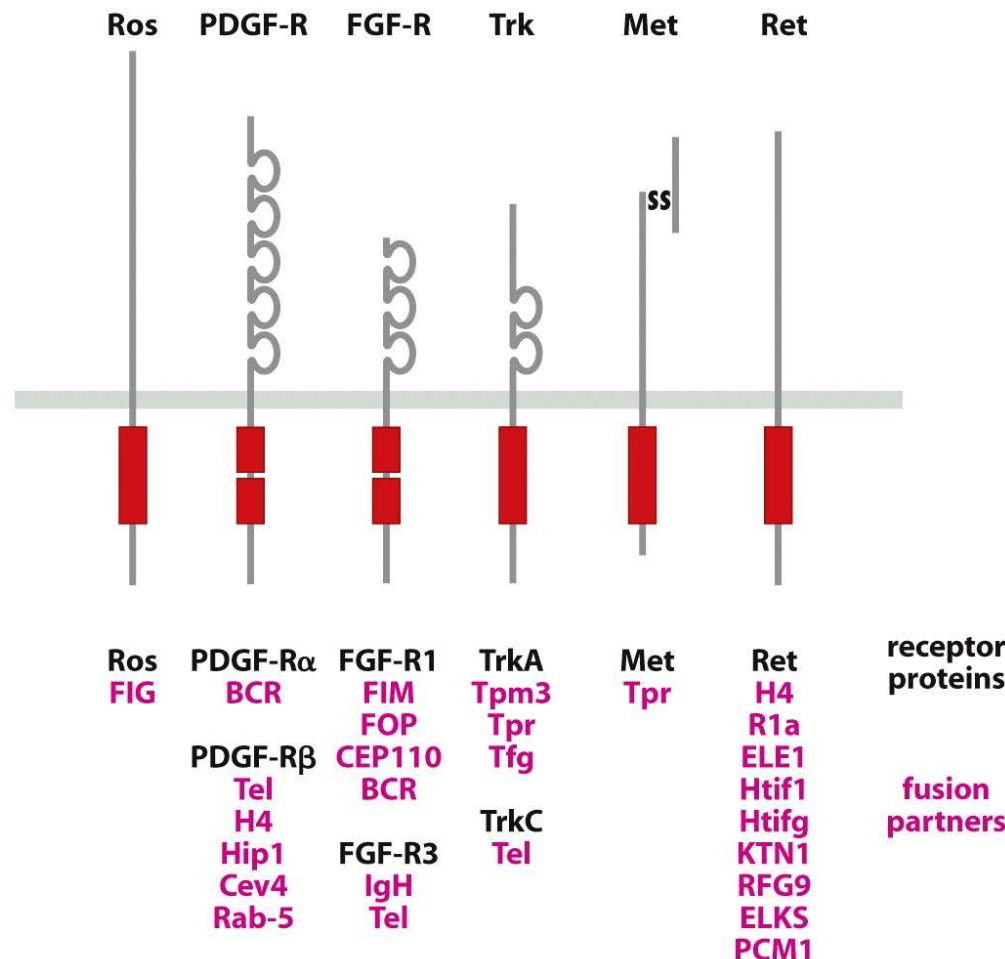
(1984 - odhalena strukturální podobnost EGFR a v-ErbB: „real bombshell“ - RAW)



v-ErbB má oproti **EGFR** zkrácenou extracelulární doménu ⇒ přenáší mitogenní signál konstitutivně bez vazby ligandu

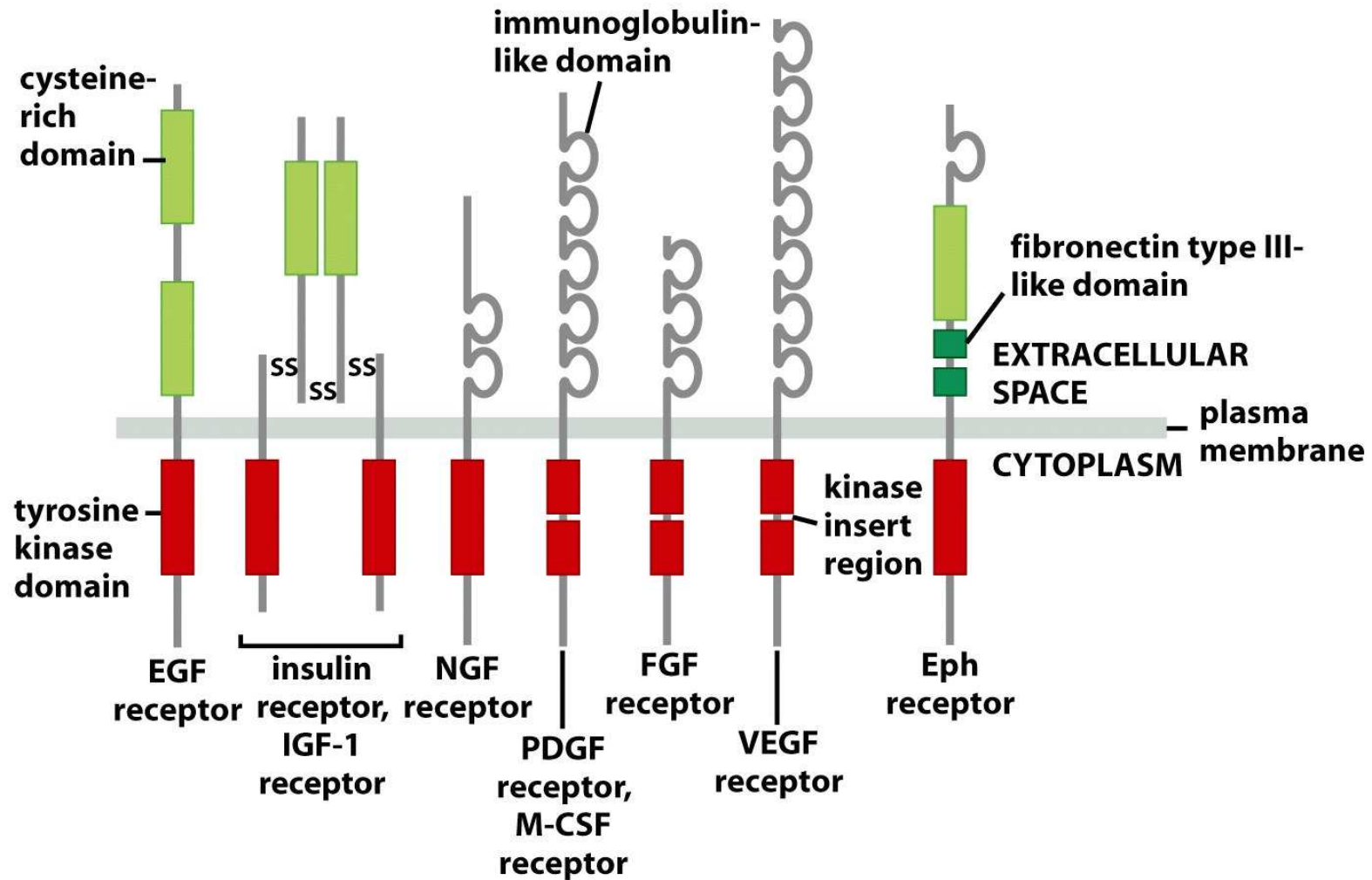


Fúze genů pro RTK receptory s jinými geny



Konstitutivní dimerizace receptoru v důsledku fúze genu pro receptor s **genem pro protein**, který přirozeně tvoří dimery nebo oligomery (RTK receptory ve vzniklé chiméře mívají zkrácenou extracelulární doménu).

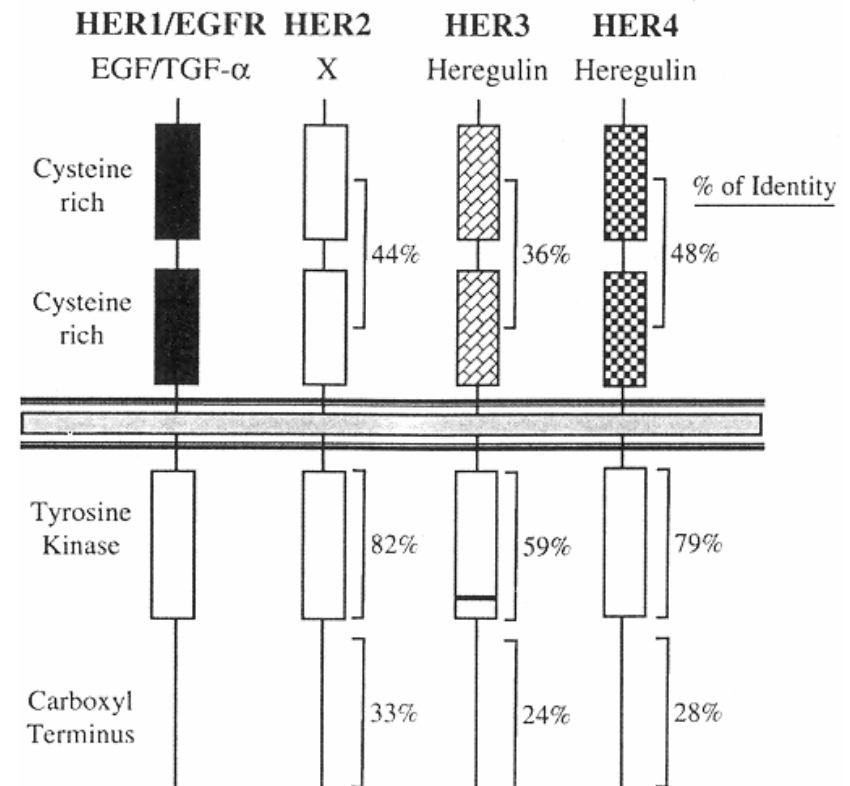
Struktura a hlavní třídy RTK receptorů



Rodina EGF

rodina **receptorů** EGFR: *erbB-1* (EGFR); *erbB-2* (HER-2/neu); *erbB-3* (HER-3); *erbB-4* (HER-4)

růstové faktory, které se váží na receptory EGFR: EGF, TGF- α , amphiregulin (AR), HB-EGF (heparin-binding EGF-like růstový faktor), cripto, betacellulin (BTC), epiregulin



Rodina EGF

EGF („epidermal growth factor“)

- 53 aminokyselin
- první identifikovaný a purifikovaný růstový faktor (Stanley Cohen - Nobelova cena)
- syntetizován jako prekurzor (1217 AA)
- stimuluje proliferaci a diferenciaci různých buněčných typů

TGF- α („transforming growth factor α “)

- 50 AA, 40% homologie s EGF, také mitogen
- první identifikovaný autokrinní RF
- syntetizován jako na membránu vázaný prekurzor, uvolňován ve dvou krocích proteolytickým štěpením
- exprimován v mnoha nádorových buněčných liniích a také u mnoha nádorů, které exprimují EGFR

Rodina EGFR

EGFR (EGF receptor)

- je kódován genem *c-erbB-1* - homologní s *v-erbB* (přenášen retrovirem „avian erythroblastosis virus“: má deleci extracelulární domény)
- někdy označovány jako **erb-B receptory** nebo **HER** („human EGF receptor“)
- mohou fungovat jako homodimery a heterodimery
- exprese TGF α a EGF receptoru byla detekována u mnoha nádorů a tyto faktory zřejmě autokrinně stimulují nádorové buňky:
- zvýšená exprese EGF receptoru byla detekována u nádorů **prsu**, hrtanu, jícnu, žaludku, vaječnicků, endometria a děložního čípku a dalších; u nádoru prsu, jícnu a vaječnicků je spojena se špatnou prognózou
- simultánní exprese EGF/TGF α a EGFR je spojena s progresí a špatnou prognózou nádorů žaludku

Rodina EGFR

HER2/neu kódován genem *c-erbB2*

- receptor homologní s EGFR, ale neváže ani EGF ani TGF- α (a zřejmě ani neu)
 - asi u 33% primárních nádorů prsu a vaječníků detekována mutace v transmembránové doméně V664E dávající vznik variantě p185erbB2, která je konstitutivně dimerizovaná / aktivní a konstitutivně stimuluje MAPK
 - amplifikace c-erbB2 detekována u adenokarcinomů slinných žláz, prsu, vaječníků, střeva a žaludku; u karcinomu prsu a vaječníků amplifikace a zvýšená exprese *c-erbB2* koreluje s horší prognózou a rezistencí k terapii *
- amplifikace *c-erbB2* detekována častěji ve vzdálených metastatických místech než u primárních nádorů
- * Amplifikace HER2/neu je uznávaným prognostickým a prediktivním faktorem u nádoru prsu; pacientky s amplifikací HER2/neu podstupují radikálnější terapii a mohou být léčeny **Herceptinem** - monoklonální protilátkou rozpoznávající protein HER2/neu

Rodina PDGF

PDGF („platelet-derived growth factor“) - účinný mitogen - stimuluje **mezenchymální buňky** (fibroblasty, adipocyty, endoteliální buňky, buňky hladkého svalstva) (X EGF stimuluje hlavně epiteliální buňky!)

- homodimer (AA, BB) nebo heterodimer (AB) dvou příbuzných řetězců A a B: B je kódován *c-sis*
- v roce 1983 nalezena podobnost B řetězce s *v-sis* přenášeným virem opičího sarkomu: pozměněný B řetězec je konstitutivně exprimován a konstantně stimuluje k proliferaci buňky s příslušným receptorem
- mnoho akutně transformujících retrovirů je schopno transformovat široké spektrum buněčných typů X SSV pouze fibroblasty - zde vysvětlení - dáno expresí PDGFR!

PDGF

- exprese PDGF A nebo B nebo obou často detekována u sarkomů, gliomů, karcinomů plic, prsu, jícnu, žaludku, střeva

PDGF receptor α a β :

- jsou výrazně exprimovány u gliomů, karcinomů štítné žlázy, jícnu, žaludku a střeva

VEGF („vascular endothelial growth factor“)/VPG („vascular permeability factor“)

- účinný mitogen vaskulárních endoteliálních buněk; hraje významnou roli v **angiogenezi**
- VEGF/VPG mají 18% homologii s PDGF A a B

flt kóduje receptor, který váže VEGF/VPG s vysokou afinitou a zprostředkovává jeho biologickou funkci; popsány příbuzné receptory: KDR a receptory kódované flt-3 a flt-4

Rodina FGF

- velká rodina polypeptidů (popsáno 18 genů) - FGF1 až FGF18, ale spíše se používají původní názvy (ne všechny faktory jsou mitogeny fibroblastů!!)
- někdy se nazývají „heparin-binding growth factors“ - HBGFs, protože se na ně může heparin vázat a stimulovat jejich aktivitu **bFGF** (FGF2) a **aFGF** (FGF1) („basic, acidic fibroblast growth factor“)
- veliké asi 17.000 Da, mají 55% homologii, podobnou funkci, ale bFGF je mnohem aktivnější; název odvozen od rozdílného isoelektrického bodu
- jsou to mitogeny buněk mezenchymálního, neuroektodermálního a epidermálního původu, uplatňují se v **angiogenezi**
- autokrinní růstový faktor gliomů a meningiomů
- zvýšená exprese často detekována u pokročilých astrocytomů
- přispívají k růstu melanomů, osteosarkomů, hepatomů

Vsuvka: Achondroplázie

- Nejčastější příčina lidského trpaslictví; autozomálně dominantní onemocnění.
- Příčinou specifické mutace v genu **FGFR3** (G1138A ~ 98%; G1138C ~ 1-2%).
- Aktivace FGFR3 potlačuje v echondrální kosti proliferaci chondrocytů v růstové ploténce a pomáhá tak koordinovat růst a diferenciaci chondrocytů a diferenciaci progenitorových buněk kosti.
- Mutace jsou aktivující, vedou k nepatřičné inhibici proliferace chondrocytů a diferenciaci progenitorových buněk.

Rodina HGF

HGF („hepatocyte growth factor“; hematopoietin A; hematotropin)

- účinný mitogen hepatocytů, hraje roli při regeneraci jater, ale nejen hepatocytů!!
- patří mezi faktory scatter (SF), které se podílejí na rozvolnění mezibuněčných interakcí některých epiteliálních a vaskulárních endoteliálních buněk
- produkován jako profaktor

c-met kóduje receptor, který specificky váže HGF

- byla detekována mutantní onkogenní forma *c-met* - zkrácená, konstitutivně aktivní (bez vazby HGF) nebo bodové mutace v TPK doméně
- HGF produkováný stromálními buňkami (overexprese) a *c-met* exprimovaný buňkami stromálními a nádorovými mohou kooperovat při růstu a morfogenezi některých nádorů

Hereditární papilární karcinom ledviny

- Autozomálně dominantní dědičnost; vysoce penetrantní.
- Spojeno se zárodečnými mutacemi *c-met*. Gen lokalizován v lokusu 7q31.
- Představují asi 15% všech nádorů ledvin.
- Predisponuje k násobným, bilaterální papilárním nádorům ledvin, naštěstí nemají tendenci brzy metastázovat.
- Nebývá doprovázeno vývojovými vadami.
- Většina germinálních i somatických mutací bodových, missense v TPK doméně MET.
- Aktivace MET blokuje terminální diferenciaci renálních tubulárních buněk.
- Protoonkogen *c-met* je mutován asi u 15 % sporadických papilárních nádorů ledvin.

RET

- nejvíce příbuzný asi FGFR
- potenciální ligandy: GDNF („glial cell line derived neurotrophic factor“), neurturin, persephin, artemin
- exprimován hlavně v neurální, neuroendokrinní a nefrogenní tkáni
- popsány dva typy mutací:
 - „loss-of-function“ mutace (inaktivace receptoru RET) - spojeny s vývojovým onemocněním Hirschprungova nemoc (kompletně chybí některé nebo všechny gangliové buňky myenterického a submukozálního plexu tlustého střeva: střevní aganglióza narušuje peristaltiku)
 - „gain-of-function“ = onkogenní mutace - aktivace receptoru RET

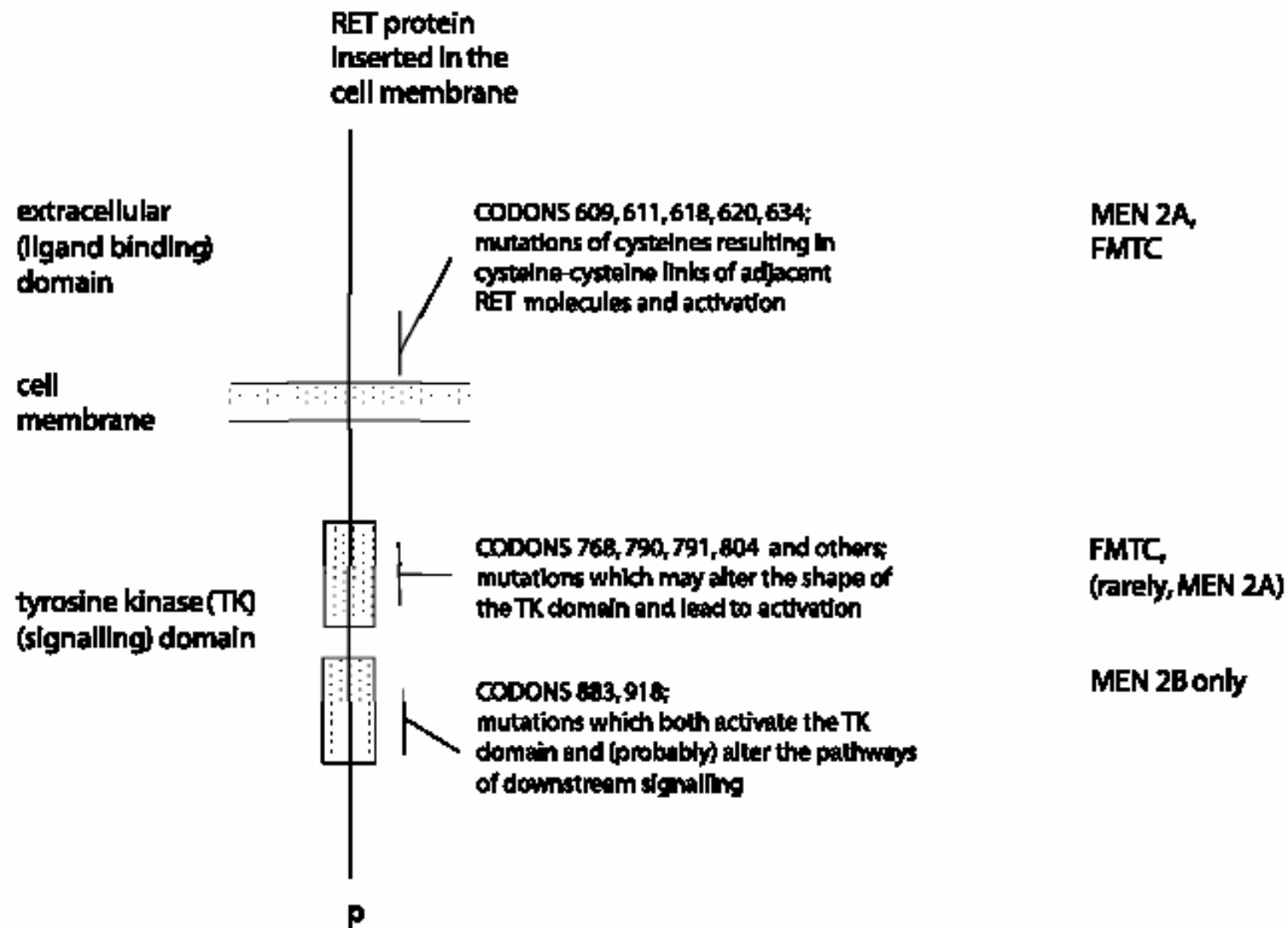
RET

- „gain-of-function“ = onkogenní mutace
RET je prototypem protoonkogenu RTK, protože při onkogenní aktivaci *RET* se uplatňuje několik odlišných typů mutací:
- Missense mutace způsobují konstitutivní aktivaci RET. Ta je spojena s autozomálně dominantními vrozenými nádorovými syndromy **MEN** typu **2A** a **2B** („multiple endocrine neoplasia“ - mnohočetné endokrinní neoplazie) a **FMTc** („familial medullary thyroid carcinoma“ - familiální medulární karcinom štítné žlázy).

1. Mutace se vyskytují hlavně v extracelulární doméně v oblasti pěti cysteinů C609, 611, 618, 620, 634 (u MEN 2A a FMTc), kde způsobují trvalou dimerizaci (tvorbou disulfidických můstků nespárovaných cysteinů) a aktivaci receptoru bez vazby ligandu.

2. U několika FMTc rodin detekovány mutace v katalytické - kinázové doméně (kodony 768, 804). Vzácnější syndrom MEN 2B je spojen s mutacemi kodonu 910 ve druhé části kinázové domény.

Mutace *RET* vyskytující se u MEN2 a FMTC



RET

„gain-of-function“

- Missense mutace
- Translokace vedou k deregulaci výsledného chimerického proteinu. Tato translokace detekována při studiu lymfomů: při transfekci DNA z postižených do experimentálních buněk (*RET*-„*RE*arranged during *Transfection*“). Translokace 3' - částí *RET* spolu s 5' - částí jiného genu se vyskytuje u **thyroidních papilárních karcinomů**. Výsledný hybridní gen obsahuje tyrozin kinázovou doménu *RET* a část genu, který umožňuje konstitutivní dimerizaci, a tím konstitutivní aktivaci.

Mnohočetná endokrinní neoplazie typ2 (MEN2)

- Autozomálně dominantní onemocnění; spojeno s mutacemi **RET**.
- Typ A: vysoká incidence medulárního karcinomu štítné žlázy (nádor produkující kalcitonin z parafolikulárních buněk š.ž.), často sdruženo s feochromocytomy nebo benigními adenomy paratyreoidy nebo obojím.
- Typ B: navíc ztlustění nervů a vývoj benigních neurálních tumorů - tzv. neurinomů, které se tvoří na sliznici úst a rtů
- Typ A je častější než typ B.
- Medulární karcinomy štítnice se vyvíjejí v různém věku - od 1 roku, v 70 letech je penetrance asi 70 %.

Vsuvka: feochromocytomy

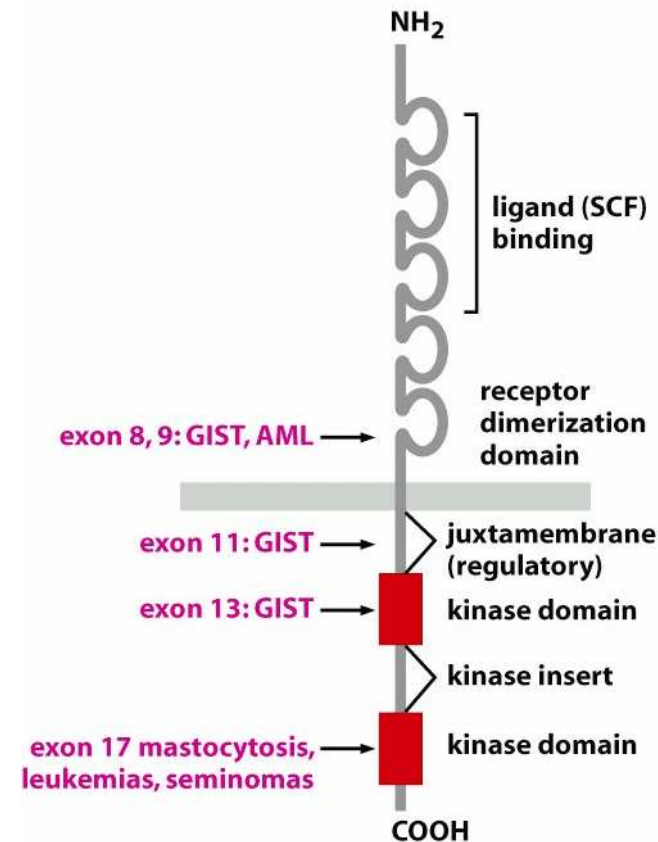
- nádory dřeně nadledvin (80%), asi 20% z tkání mimo nadledviny (tzv. paragliomy)
- 90% benigní, asi 10% malignizuje (metastazuje)
- hormonálně vysoce aktivní (noradrenalin, adrenalin), bez léčby život ohrožující, fatální onemocnění („maligní“?)
- většina feochromocytomů sporadických
- asi 20% familiální výskyt, pak jsou mnohočetné; vyskytují se v rámci MEN II (A, B, FMTC), VHL, NF1

Familiální medulární karcinom štítné žlázy - FMTC

- Toto onemocnění je méně časté než MEN₁, objevuje se u postižených později a je obecně méně agresivní.
- Souvisí se specifickými mutacemi **RET**
- Mutace *RET* spojené s MEN2 a FMTC jsou poměrně přesně vymezené, existuje korelace mezi fenotypem a genotypem: mechanismus této korelace není znám, ale možné souvislosti:
 - různé mutace různou měrou ovlivňují sílu aktivace receptoru
 - různé mutace mají rozdílný dopad na down-regulované dráhy

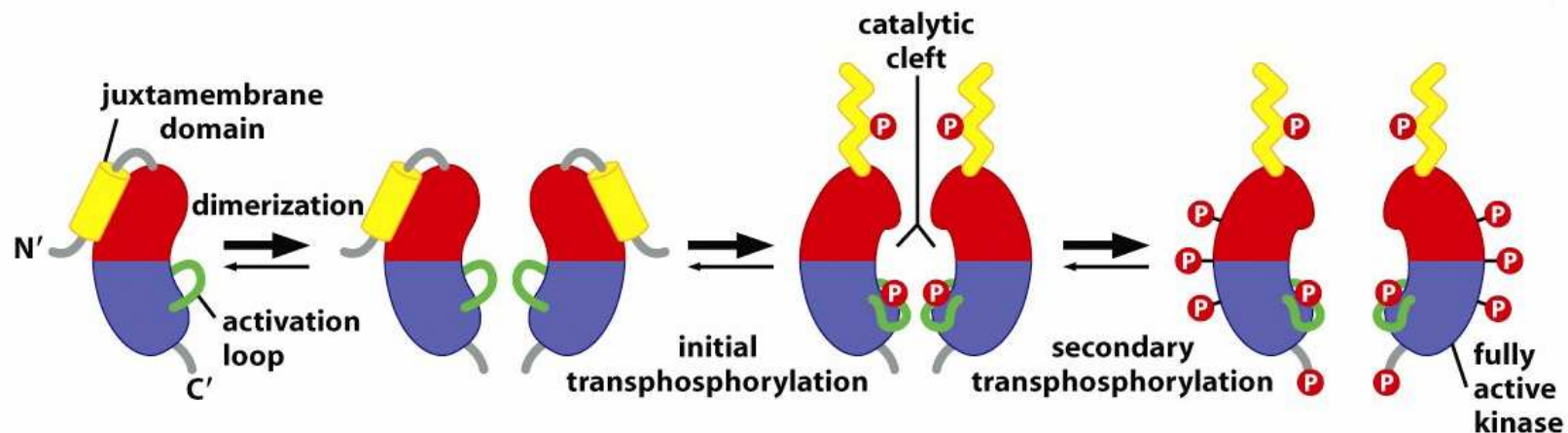
RTK receptor Kit

- Původně popsán jako onkoprotein kódovaný retrovirem kočičího sarkomu („feline sarcoma retrovirus“)
- Jeho ligandem je **MGF** („mast cell growth factor“). MGF stimuluje některé krevní buňky, ale také nehematopoietické buňky, např. melanocyty.
- Mutantní formy Kit signalizují konstitutivně, bez vazby ligandu. Typické mutace se nacházejí v **juxtamembránové** cytoplazmatické doméně.



Mechanismus aktivace receptoru Kit

- Juxtamembránová (JM) doména hraje **inhibiční** roli v regulaci Kit.
- Vazba ligandu na Kit vede nejdříve k transfosforylaci tyrozinových zbytků na JM. Tím se uvolní vazba JM domény a N-terminální domény, dojde k fosforylaci aktivační domény a následné aktivaci celého receptoru.
- Proto mutace v JM doméně odstraňující její funkci mají za následek částečnou konstitutivní aktivaci receptoru Kit.



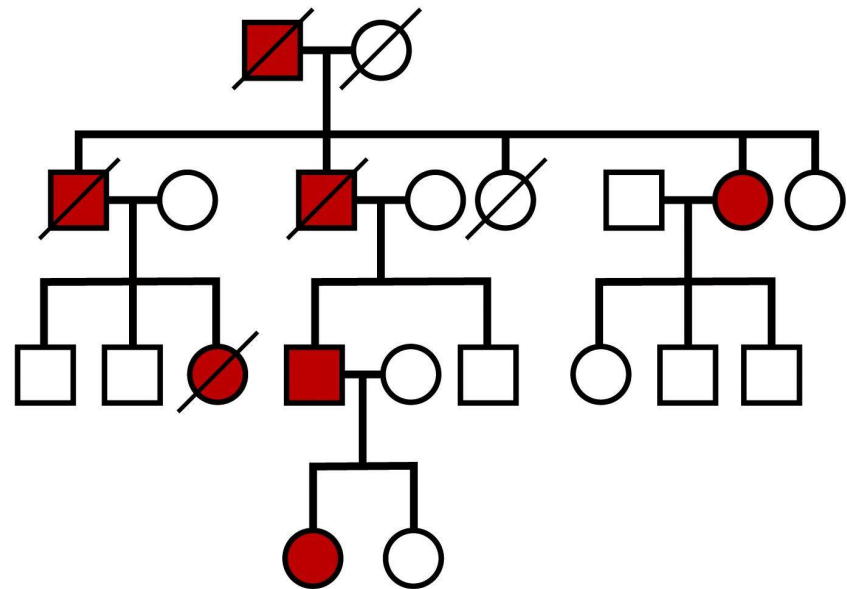
Mutace genu *c-kit*

- *GISTs* se vyvíjejí z mezenchymálních „pacemaker“ buněk spodního gastrointestinálního traktu: zajišťují peristaltické kontrakce hladkého svalstva. **Inaktivační mutace *kit*** v těchto buňkách má skutečně za následek jejich úplnou nefunkci (myší modely).
- **Aktivující mutace *c-kit*** nalezeny téměř ve všech gastrointestinálních stromálních nádorech, vyskytují se také u leukémií. Často se jedná o bodové mutace JM domény, někdy o delece celé JM domény. *GISTs* s bodovými mutacemi mají lepší prognózu než nádory s delecí celé JM domény.

Familiální gastrointestinální stromální nádory (GISTs)

- Familiální GISTs spojeny s mutacemi *c-kit* v zárodečné linii.
- Spektrum zárodečných mutací *kit* je stejné jako u somatických mutací souvisejících se sporadickými GISTs.
- Ligandem je *MGF* („*mast cell growth factor*“).

- Příklad japonské rodiny s mutací *kit* v zárodečné linii.
- Delece 1 AA v JM doméně.
- Fenotypická exprese této mutace se objevovala poměrně v pozdním věku, proto se také mohla udržet po 4 generace.



Mutace protoonkogenů (RTK) v zárodečné linii ?!

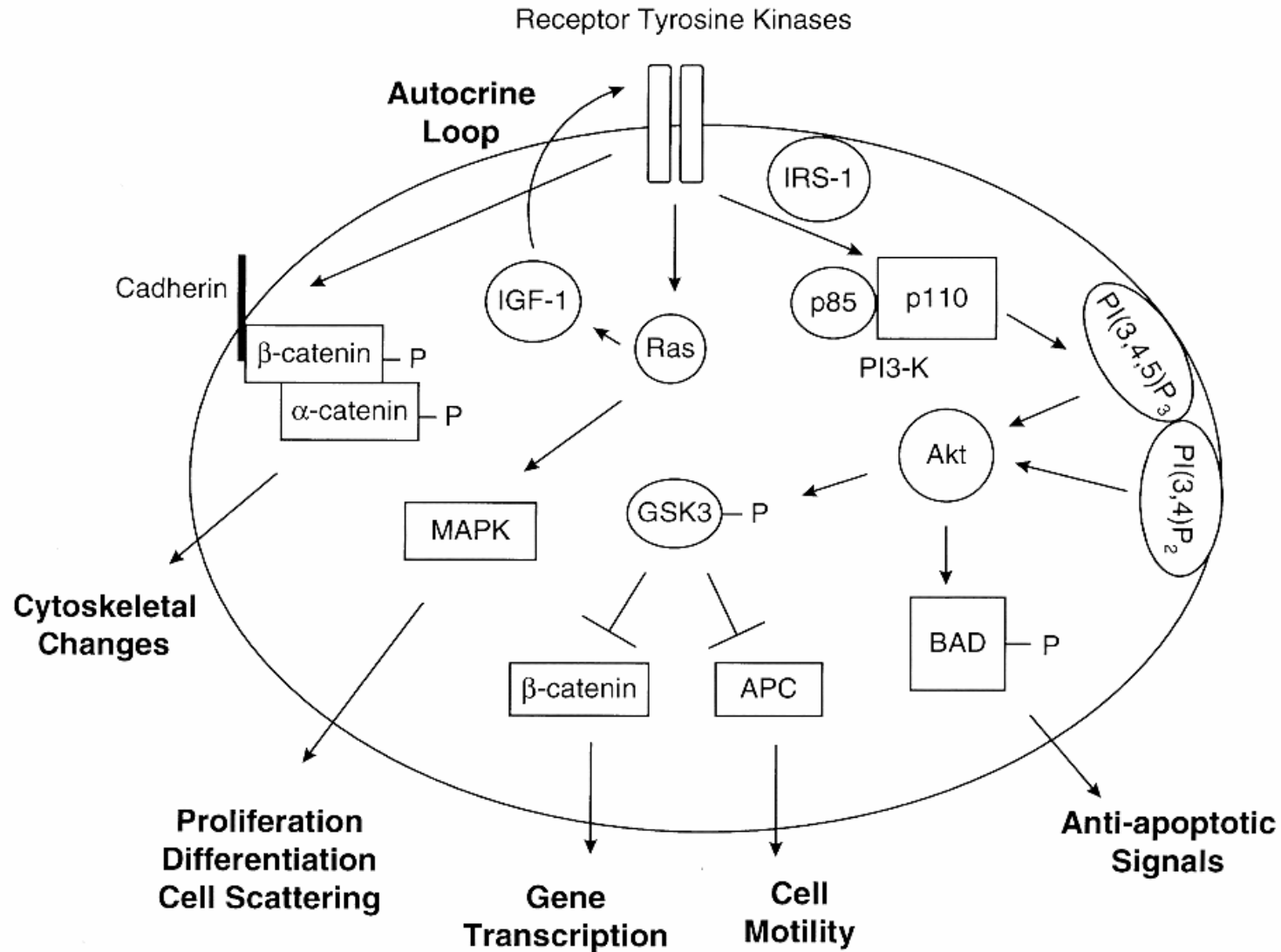
Proč tolerováno??

- Exprese omezena na úzce vymezené typy tkání (*ret, kit*).
- Exprese daných protoonkogenů se během organogeneze objevuje natolik pozdě, že umožňuje normální vývoj embrya.
- Specifické typy mutací (*cdk 4*).

X Costello syndrom

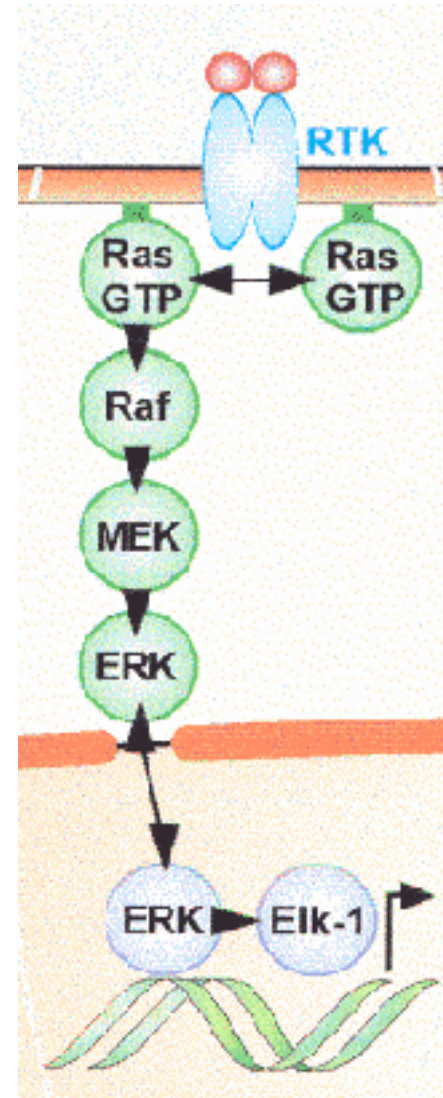
- Mentální retardace, vysoká porodní váha, kardiomyopatie, tendence k vývoji nádorů.
- Spojeno s vrozenou aktivující mutací *H-ras*.
- Postižení jedinci nepřežijí do dospělosti (zatím popsáno 12 jedinců); mutace je vždy *de novo*.
- Většina orgánů kupodivu vyvinuta normálně.

Signální dráhy aktivované RTK



Proteiny Ras

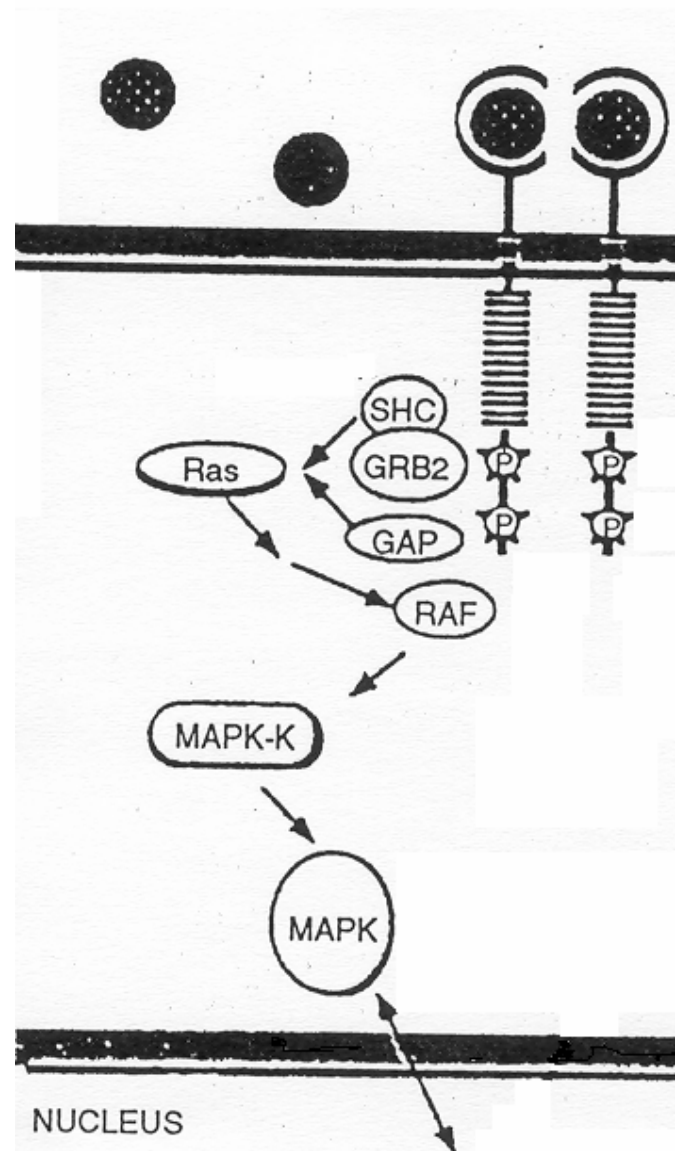
ras/Ras - první
identifikovaný
onkogen/onkoprotein



Proteiny Ras

Původní představa o funkci Ras: zprostředkovává vazbu **Raf-1** k cytoplazmatické membráně, kde jsou přítomny další faktory účastnící se aktivace Raf-1, a spoluaktivuje Raf-1

(Fosforylované zbytky RTK jsou vazebným místem pro proteiny s SH2-doménami (GRB2). Tyto proteiny jsou fosforylovány a signál potom přenášejí dále prostřednictvím proteinů Ras.)



Proteiny Ras

Dnešní znalosti ukazují:

- Aktivace Raf-1 je **komplexní mnohostupňový** proces. I přímé interakce mezi Ras a Raf-1 zahrnují několik vazebných míst na molekule Ras a nejméně dvě vazebná místa na Raf-1.
- Raf-1 není jediným substrátem („downstream“ efektoem) proteinů Ras. Ras aktivuje řadu **různých efektorů**, které přenášejí signál různými drahami.
- Nadrodina Ras má nejméně 35/65 **různých členů** (RAW/2000). Všechny proteiny mají homologii s Ras, ale liší se signálními vlastnostmi.

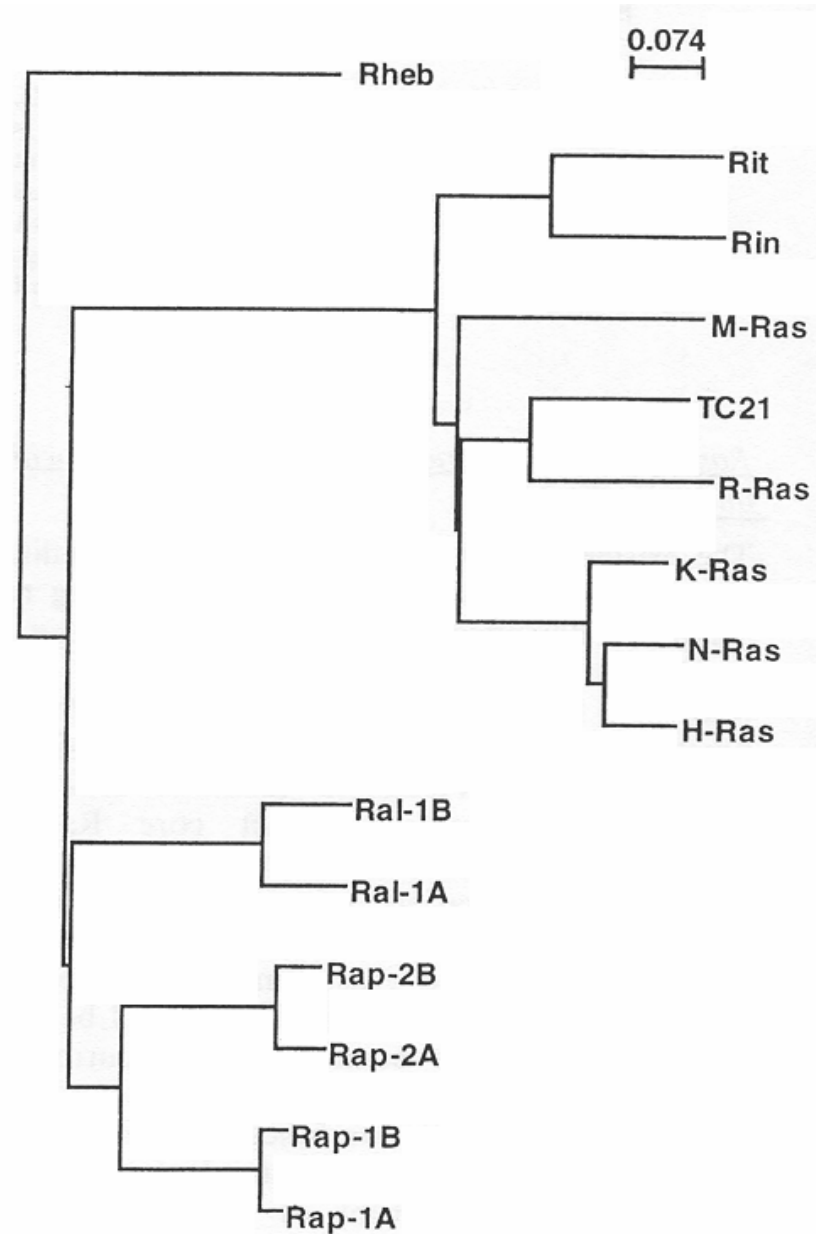
Proteiny rodiny Ras

Nadrodina Ras má nejméně 35 / 65 členů:

Rodiny: Ras, **Rho**, Rab, Ran, Rad, Arf

Rodina Ras má podrodiny: Rap, **Ral**, R-Ras, Rheb, H-Ras, Ras

Společně se nazývají **malé G proteiny**.



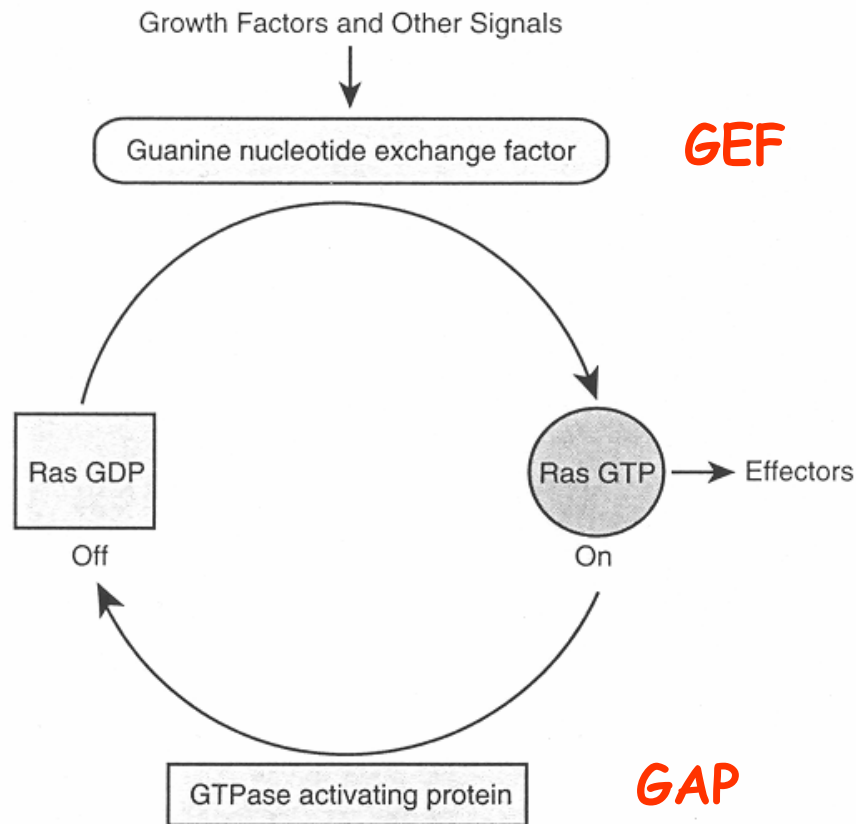
Proteiny Ras

Proteiny **H-Ras**, **N-Ras** a **K-Ras4A** a **K-Ras4B** (189 AA) mají 188 aminokyselin (p21^{Ras}). Jsou lokalizovány na vnitřní straně cytoplazmatické membrány, kde fungují jako přepínače při přenosu extracelulárních signálů do cytoplazmy. Účastní se řízení buněčného cyklu, diferenciaci a apoptózy.

Proteiny Ras mají GTPázovou aktivitu: jsou inaktivní, váže-li se na ně GDP, a aktivní, váže-li se na ně GTP. Vlastní schopnost proteinů Ras vyměňovat GTP/GDP a hydrolyzovat GTP je nízká, proto účast dvou typů proteinů:

- **GEFs**: faktory vyměňující guaninový nukleotid, které posilují tvorbu aktivního GTP vázajícího proteinu Ras (např. SOS1/2, RasGRF/mCDC25,...)
- **GAPs**: proteiny aktivující GTPázu, které posilují tvorbu inaktivního stavu (p120 GAP, NF1/neurofibromin,...)

GTPázový cyklus proteinu Ras



GEFs posilují tvorbu aktivního Ras, který váže GTP

GAPs aktivují GTPázu, posilují tvorbu inaktivního stavu Ras, který váže GDP

Proteiny Ras

Posttranslační modifikace:

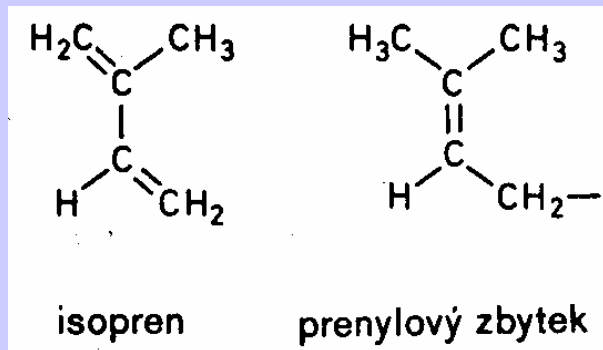
Interakce s vnitřní stranou cytoplazmatické membrány (bez této vazby je Ras neaktivní) je zajištěna posttranslačními modifikacemi CAAX motivu na C-konci:

- Cys186 motivu CAAX je farnezylován
- proteolyticky je odstraněna sekvence AAX
- terminální Cys186 je karboxymetylován
 - takto vzniká protein s hydrofobnějším charakterem, s větší afinitou k cytoplazmatické membráně; stabilní vazbu k membráně zajišťuje:
- vazba palmitoylové skupiny na Cys v hypervariabilní oblasti na C-konci

Pro onkogenní vlastnosti Ras je klíčová farnezylace!

Vsuvka: Prenylace

- **Prenylace** - kovalentní modifikace proteinů
izoprenoidy - intermediáty biosyntézy
cholesterolu - na thio skupinu zbytku cysteinu na
C konci proteinů v motivu CAAX (FT a GGTI) nebo
CXC (GGTII)
- **Izopren** - nenasycený uhlovodík s 5 atomy uhlíku a
jedním metylovým rozvětvením



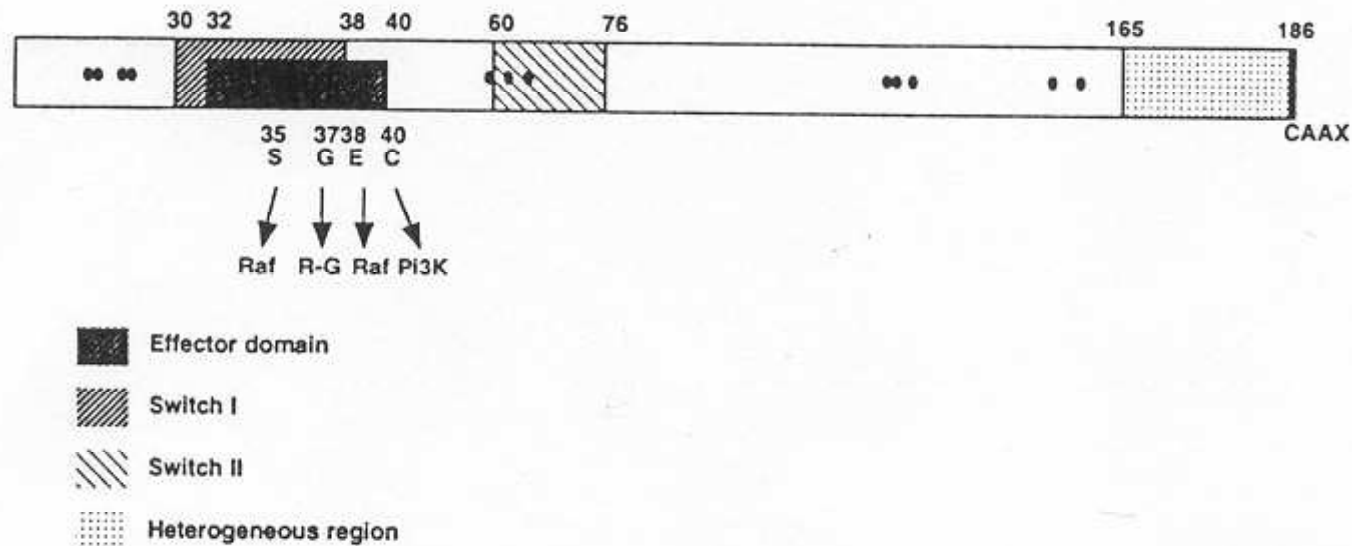
Vsuvka: Prenylace

Farnezylace - připojení farnezylu (15 C)

Geranylgeranylce - připojení geranylgeranylu (20 C)

- Katalyzováno 3 prenyltransferázami: farnezyltransferázou (FT), geranylgeranyltransferázou I a II (GGTI a GGII).
- V lidském proteomu je odhadem 300 proteinů s cysteinem na C konci, ale kolik je jich skutečně prenylováno, se zatím neví.
- Potvrzeno - farnezylovány: H-, K- a N-Ras, jaderná lamina, CENPE (kinetochory); geranylgeranylovány: Rho A a C, Rac1, cdc-42; RhoB - farnezylován i geranylgeranylován; K-Ras - geranylgeranylován, pokud je FT inhibována

Struktura proteinů Ras



- Heterogenní doména: proteiny Ras jsou vysoce homologní v prvních 164 AA, 25 AA na C-konci je variabilních
- Efektorová doména (AA 32-40) zajišťuje vazbu k efektorovým molekulám
- Switch I (30-38) je hlavním vazebným místem pro GAPs
- Switch II (60-76) zajišťuje vazbu na GEFs

Onkogenní aktivace Ras

Přítomnost onkogenní mutace Ras detekována téměř u 35% nádorů.

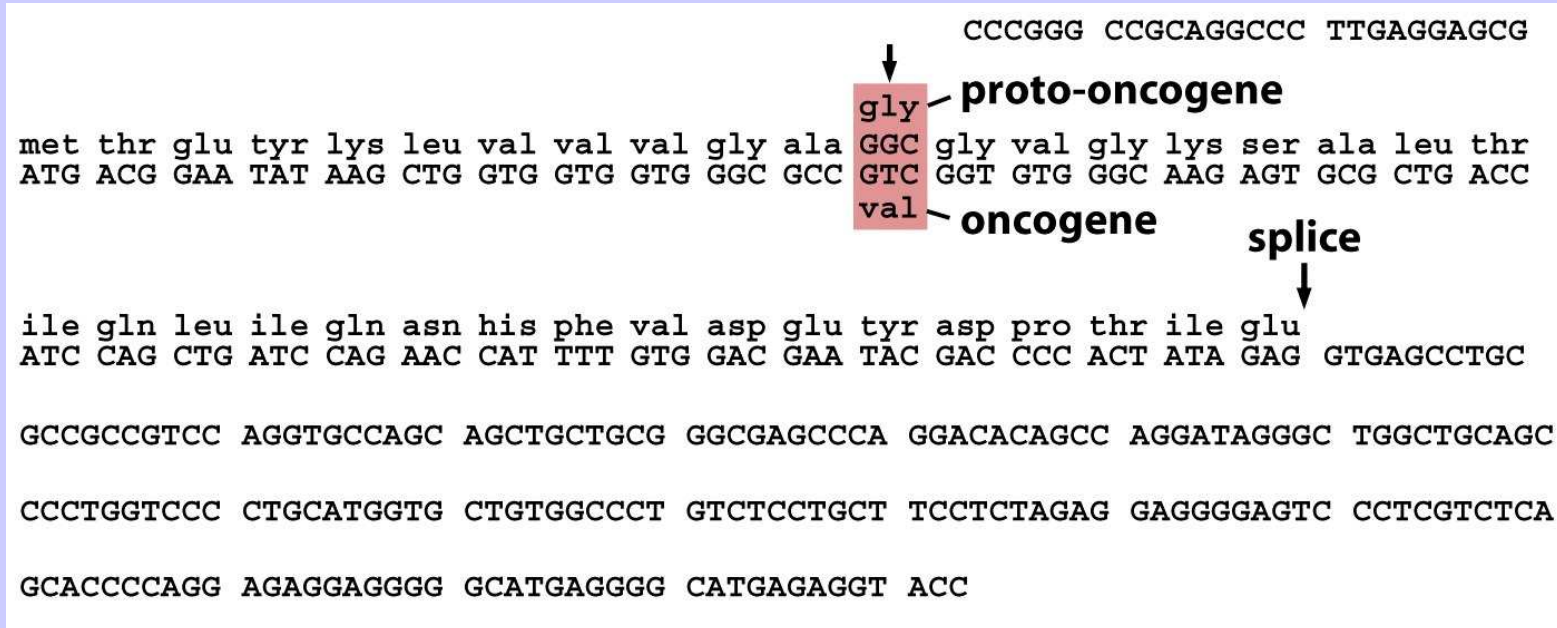
- Mutace *H-ras* hlavně u nádorů kůže a dlaždicobuněčných nádorů hlavy a krku.
- Mutace *K-ras* hlavně u adenokarcinomů, karcinomů chrupavek, kolorektálních nádorů a nádorů pankreatu.
- Mutace *N-ras* jsou běžné u hematopoietických malignit, hlavně u AML a MDS.

Onkogenní mutace posilují aktivitu Ras:

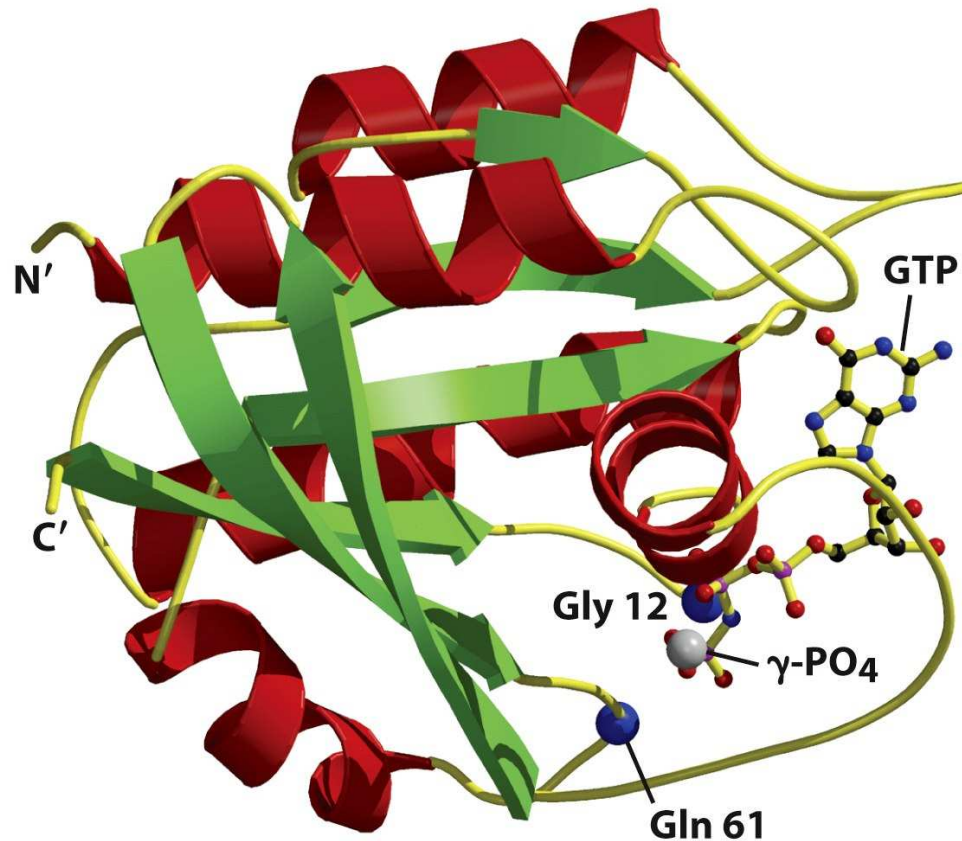
- V kodonech: **12**, **13**, **59**, **61**, **63** - vzniklé proteiny mají poškozenou GTPázovou aktivitu a jsou rezistentní k působení GAP proteinů
- V kodonech **16**, **19**, **116**, **117**, **119**, **144**, **146** - vzniklé proteiny mají usnadněnou výměnu GDP/GTP
- U některých nádorů je **zvýšená exprese Ras**

Onkogenní aktivace Ras

1982: identifikována mutace *ras* v kodonu 12 (simultánně ve 3 laboratořích!). Byla to první nalezená bodová mutace kauzální v neoplastickém vývoji.



Onkogenní aktivace Ras



Glycin v poloze **12** a **glutamin** v poloze **61** jsou klíčové pro správnou interakci proteinu Ras s GTP.

To vysvětluje proč právě kodony kódující tyto aminokyseliny jsou nejčastěji u nádorů mutovány.

Inhibice proteinů Ras

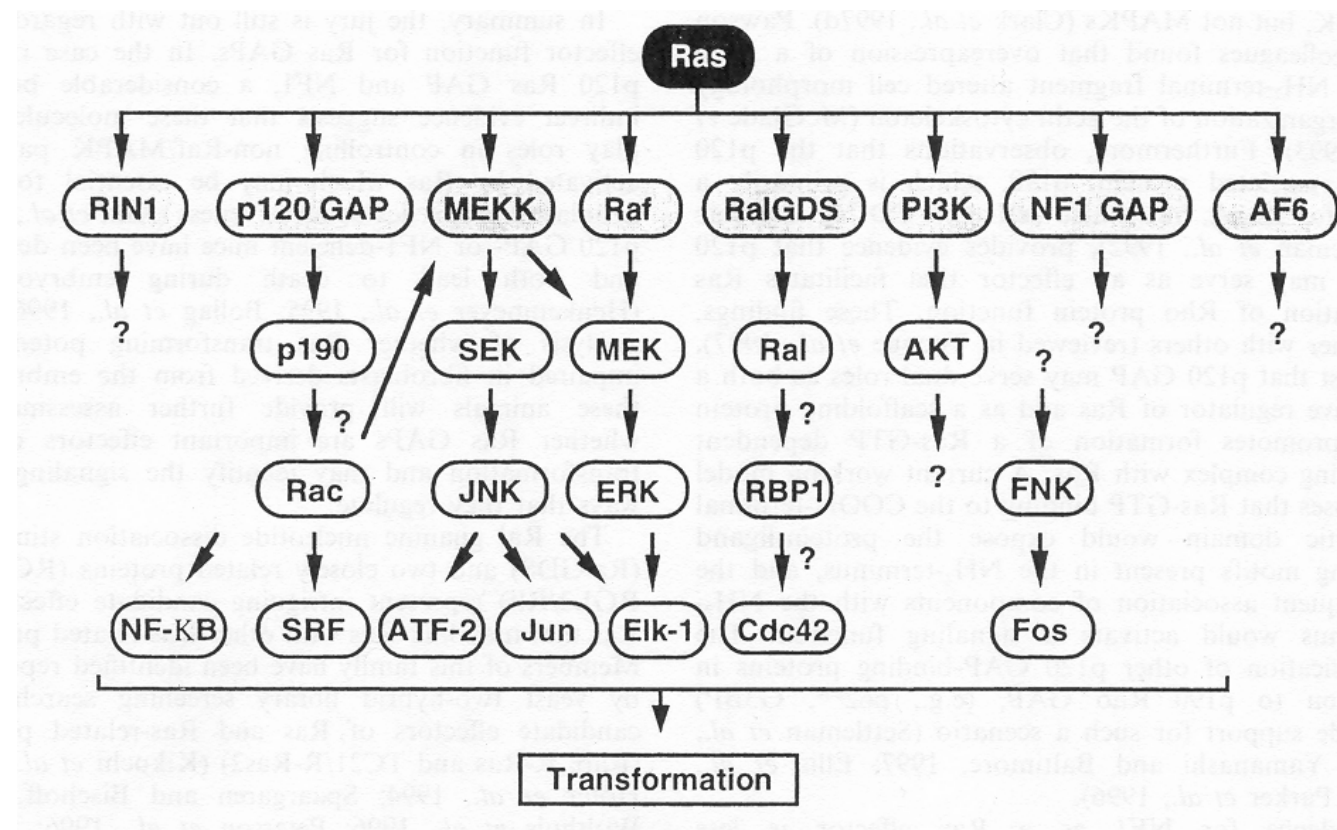
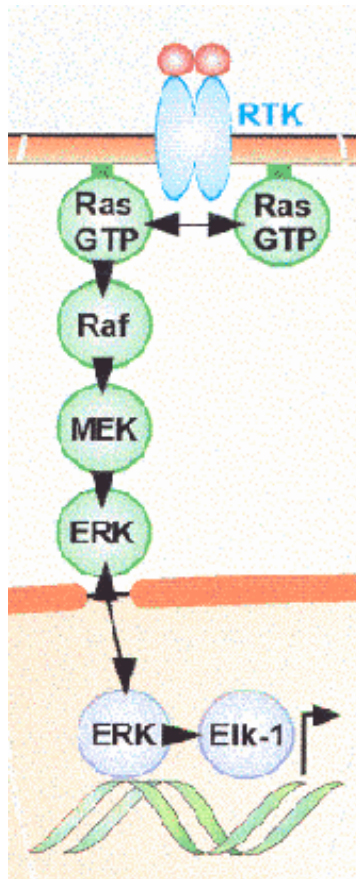
Pro onkogenní vlastnosti Ras je klíčová farnezylace!

Inhibitory farnezyl transferázy (FTIs): (např.

peptidy typu CAAX - dobře pronikají do buněk, jsou specifické a účinné, málo cytotoxické)

- Inhibují farnezylacii Ras a blokují tak jeho posttranslační modifikaci a jeho aktivitu.
- Jsou tak potenciálními protinádorovými činidly.
- Nevýhodou je, že proteiny Ras mají v buňce mnohočetné funkce a FTIs blokují všechny tyto funkce (malá specifita účinku). Dále, Ras mohou být vedle farnezylace také geranylgeranylovány (a FTIs neblokují geranylgeranyltransferázy).
- Proteiny Ras nejsou jediné cíle FTIs (Rho).

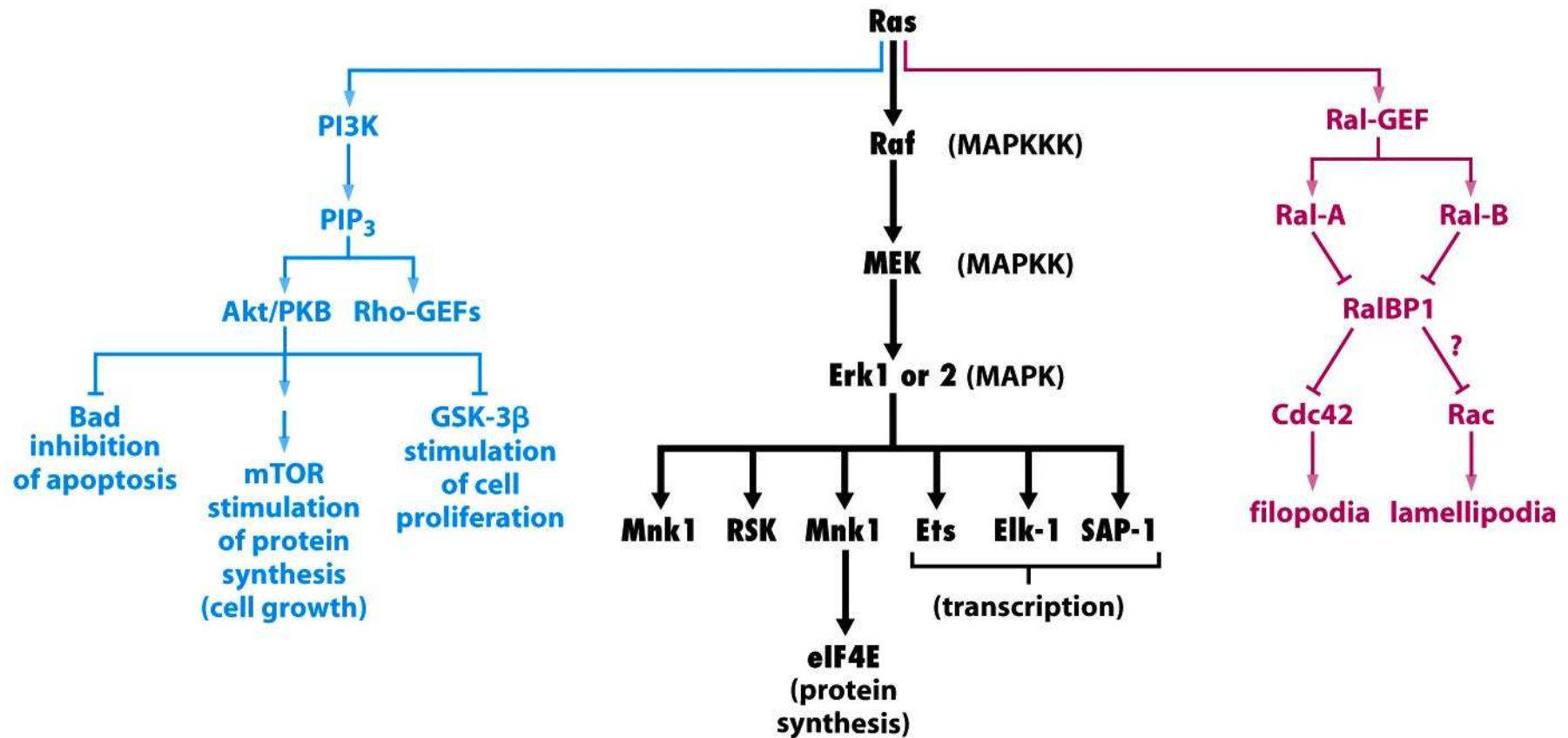
Proteiny Ras mají mnoho efektorů



Ras aktivuje tři klíčové efektorové dráhy

1. Dráha **Raf-1** (aktivace genů stimulujících růst, růst nezávislý na přichycení, ztráta kontaktní inhibice)
2. Dráha **PI3K** (antiapoptotický efekt)
3. Dráha **Ral** (potencující invazivitu a metastatický potenciál buněk)

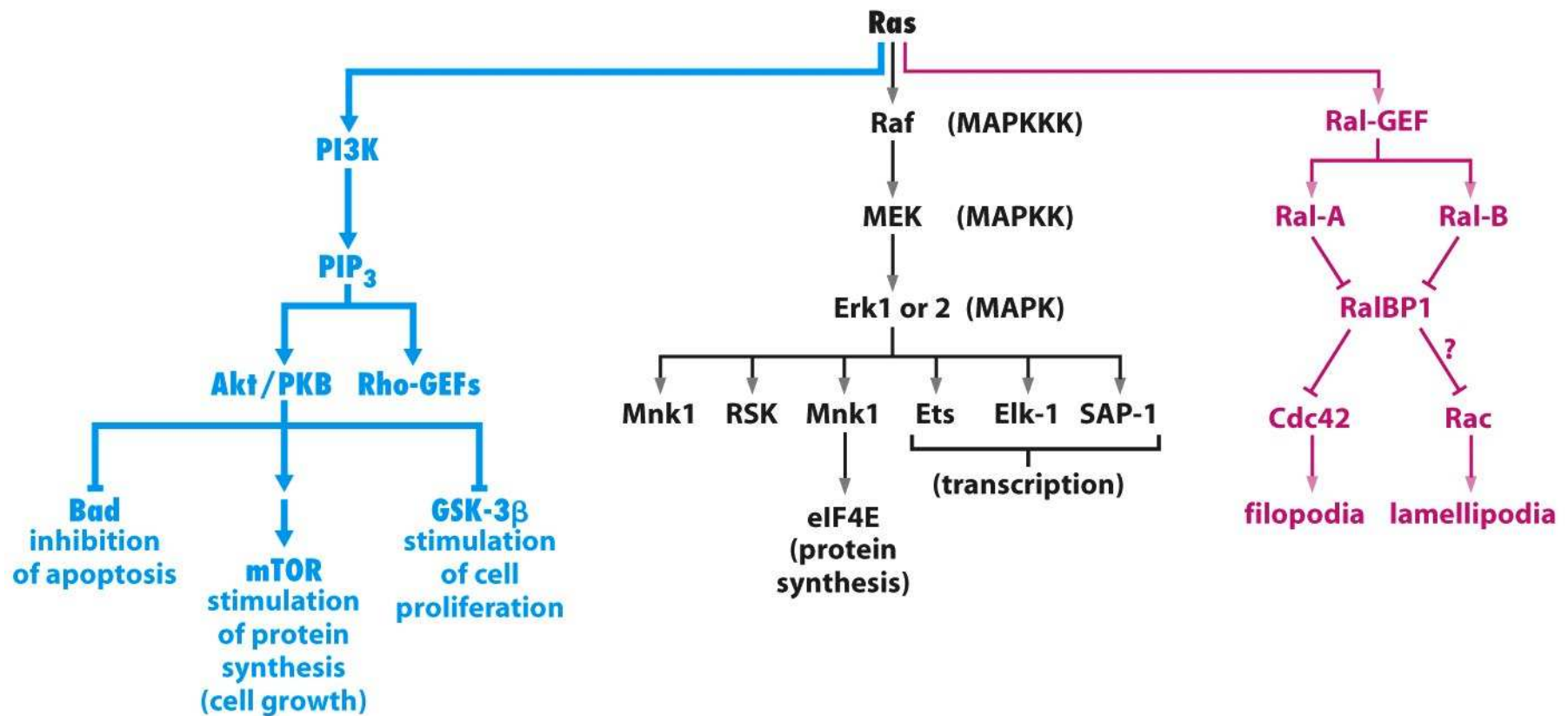
1. Ras \Rightarrow Raf-1



Raf-1

- **Raf-1**: je volně v cytosolu, ale silně přitahován aktivním Ras - tak je přiváděn k membráně a aktivován.
- Aktivovaný Raf-1 stimuluje **MEK** („MAP-kinase extracellular signal-regulated kinase“) fosforylací na serinu.
- Aktivovaná MEK je duální kináza: fosforyluje na tyrozinu i serinu/threoninu své cílové molekuly. Mezi nimi MAP kinázy **p44 ERK1** a **p42 ERK2** („extracellular signal-regulated kinases“).
- ERKs mají mnoho substrátů mezi cytoplazmatickými (**Rsk**, **SOS**, **MEK**,...) a po translokaci do jádra také mezi jadernými (**Ets**, **Elk-1**, **SAP-1**,...) proteiny, včetně proteinů ovlivňujících strukturu chromatinu. Mezi cílové TFs této dráhy patří také **Jun** a **Fos**.
- (Asi 60-70% melanomů má „namísto“ mutace *ras*, mutaci *B-raf*.)

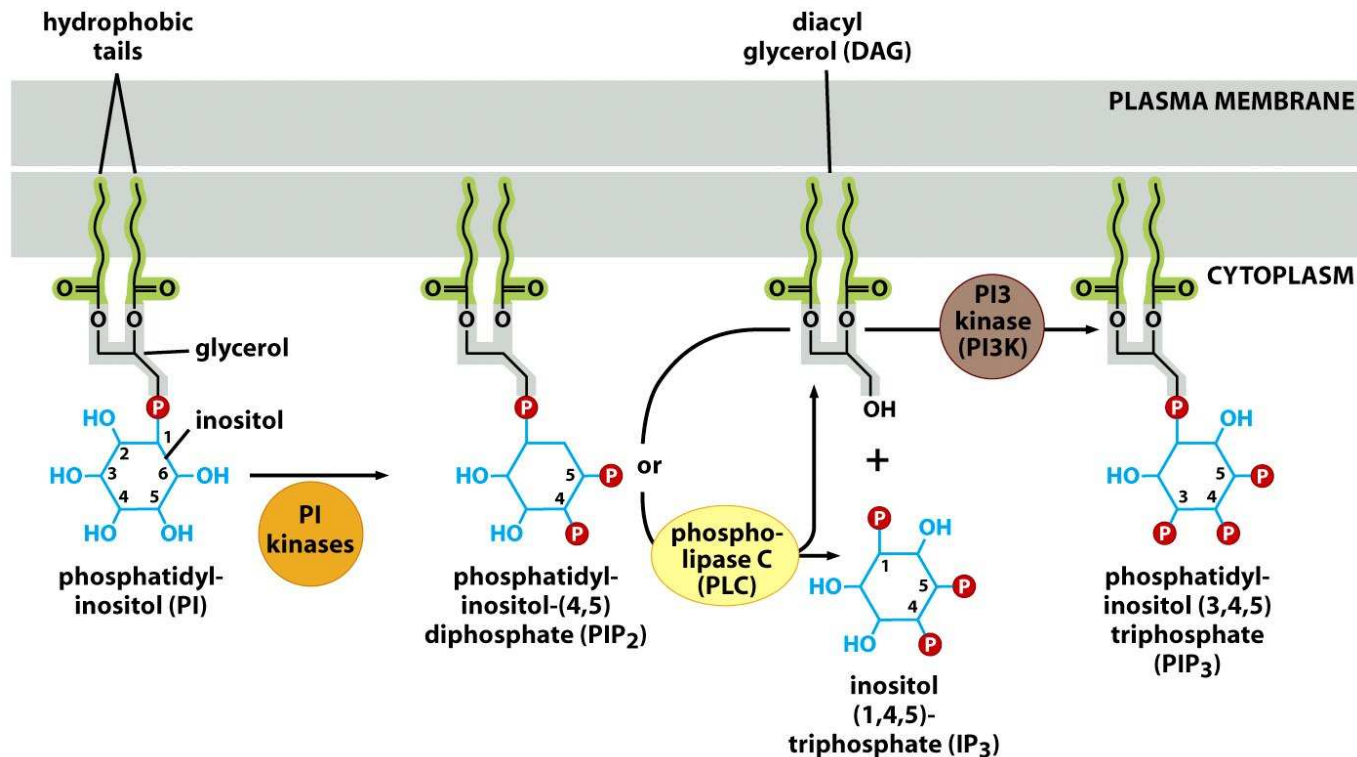
2. Ras \Rightarrow PI3K



PI3K

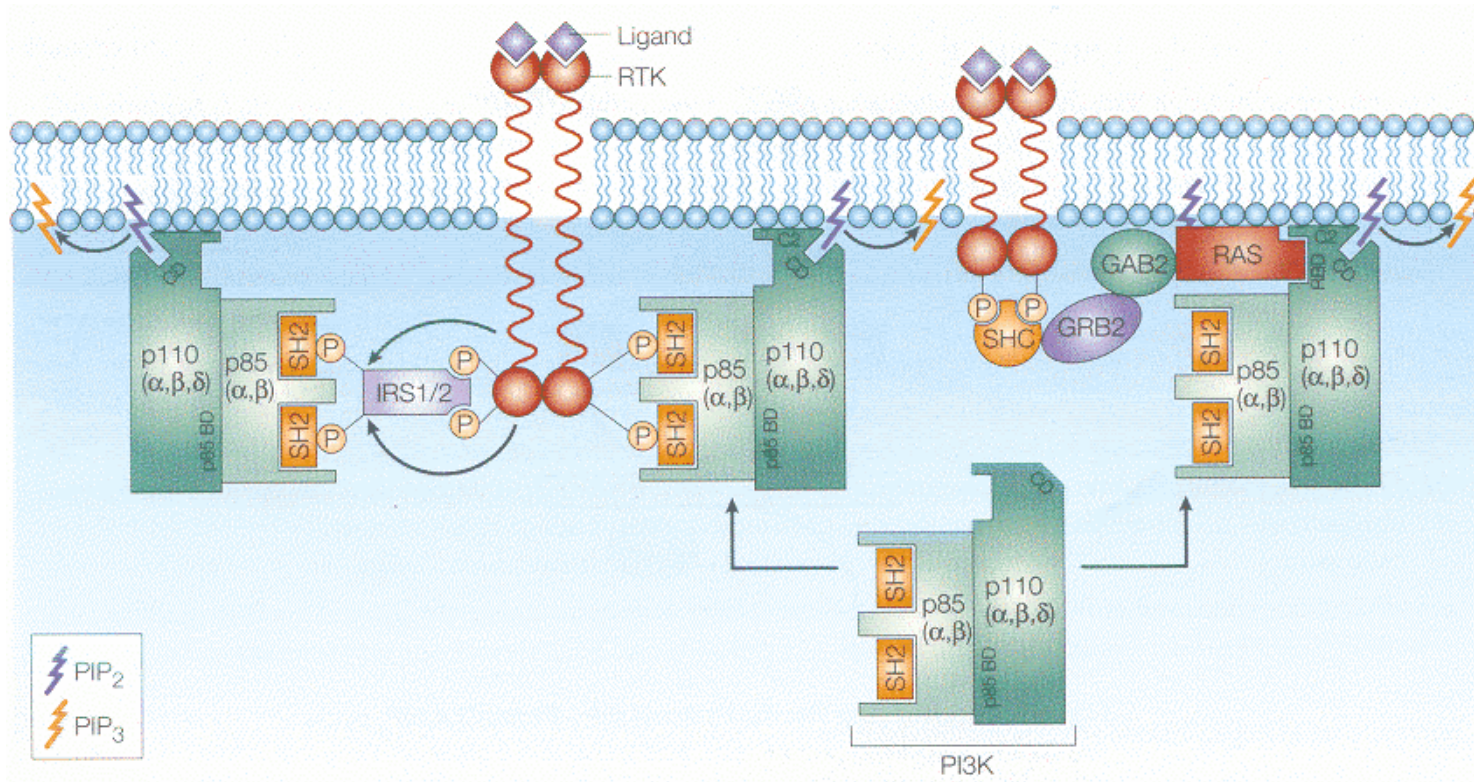
Fosfatidyl inozitol 3 - kináza: lipid kináza, která katalyzuje fosforylaci fosfoinozitolu v pozici D-3, a tak produkuje fosfolipidový sekundární „messenger“ ($PIP_2 \rightarrow PIP_3$) nutný k aktivaci „downstream“ efektorů.

Je složena ze dvou podjednotek: regulační p85 a katalytické p110.



Dva modely aktivace PI3K

1. **Přes Ras:** aktivovaný Ras se váže na podjednotku p110 a aktivuje ji
2. **Přímá aktivace aktivovaným RTK:** vazba komplexu p85-p110 na RTK prostřednictvím SH2 domény podjednotky p85 (za účasti IRS1 a IRS2 - „insulin receptor substrate“) ⇒ konformační změna komplexu p85-p110 → jeho aktivace

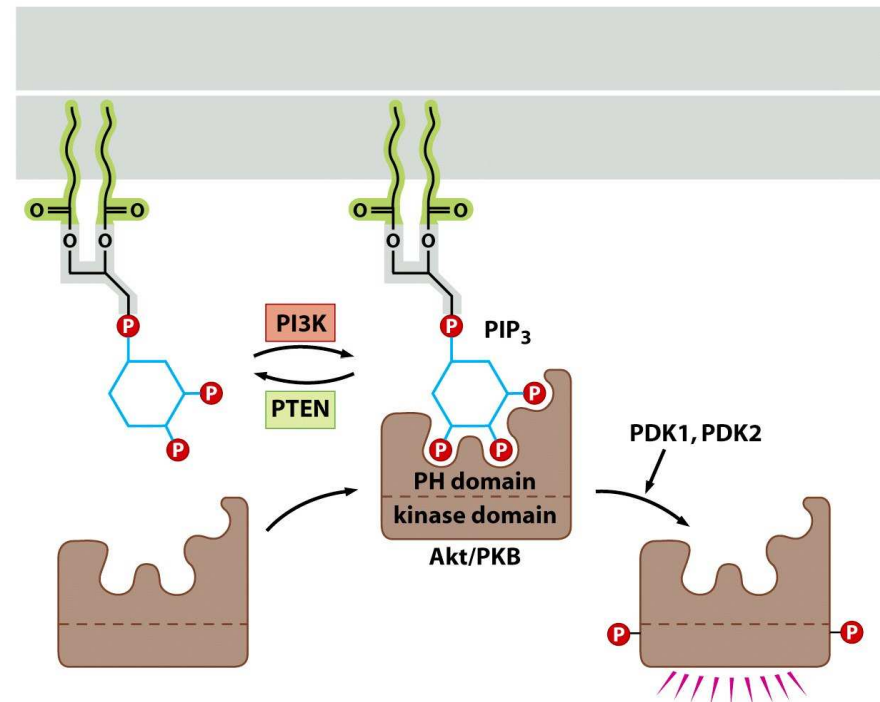


PI3K a PIP₃

- Hladina PIP₃ je přísně regulovaná. PIP₃ vzniká účinkem PI3K a je zpět konvertován na PIP₂ účinkem fosfatáz: **PTEN**, SHIP1, SHIP2
- PTEN = PIP₃ lipid fosfatáza; **nádorový supresor** (v nádorech prsu a glioblastomech; Cowdenův syndrom)
- PI3K může být aktivována prostřednictvím např. PDGF, NGF, IGF-1, intreleukinu-3, přes integriny...

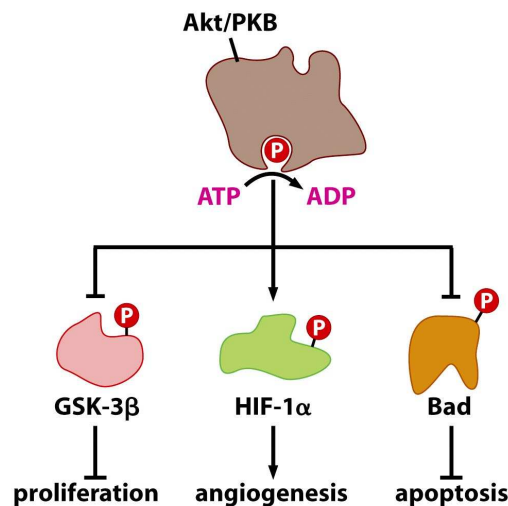
- PI3K vytvoří PIP₃ a na PIP₃ se váže kináza **Akt** svou PH doménou.
- Tím je Akt vázána na membránu, fosforylována a tím aktivována.

- Dva mechanismy vedoucí k hyperaktivitě Akt:
 1. Aktivace PI3K
 2. Inaktivace PTEN



AKT/PKB

- Popsán virový onkogen *v-akt*, konstitutivně aktivovaná forma.
- Jedna z nejčastěji aktivovaných proteinkináz u nádorů.
- Hyperaktivace Akt je spojena s (1) rezistencí k apoptóze, (2) zvýšenou buněčnou proliferací a (3) růstem buněk, (4) se stimulací pohybu buněk.
- Serin/threoninové kinázy z rodiny protein kinázy B (savčí buňky exprimují 3 vysoce homologní (80%) izoformy Akt kódované 3 odlišnými geny - **AKT1**, **AKT2** a **AKT3**, někdy PKB α , PKB β a PKB γ).

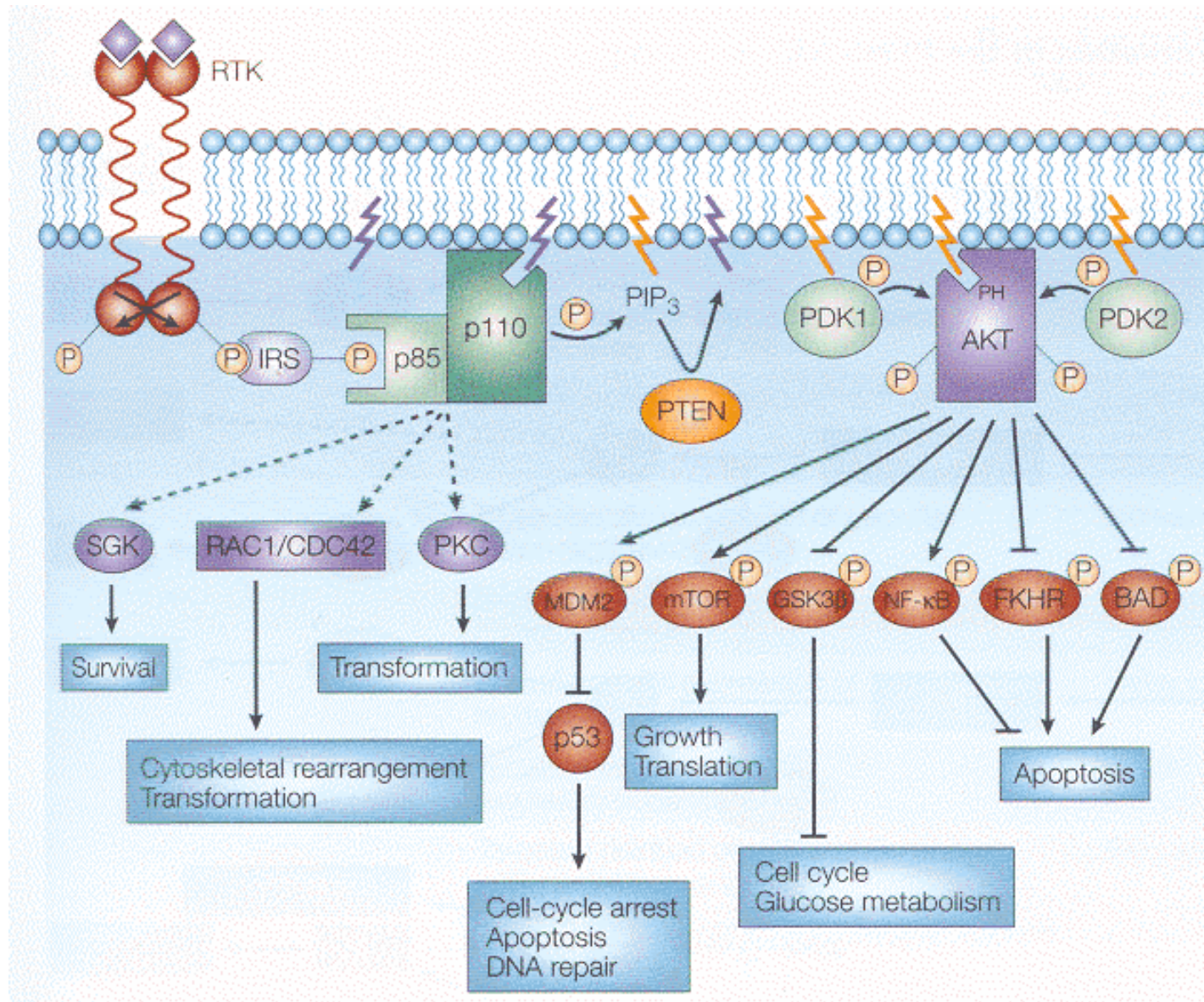


Biological effect	Substrate of Akt/PKB	Functional consequence
<i>Anti-apoptotic</i>	Bad (pro-apoptotic) ^a	inhibition
	caspase-9 (pro-apoptotic) ^b	inhibition
	I κ B kinase (anti-apoptotic) ^c	activation
	FOXO1 TF (pro-apoptotic) ^d	inhibition
	Mdm2 (anti-apoptotic) ^e	activation
<i>Proliferative</i>	GSK-3 β (anti-proliferative) ^f	inhibition
	FOXO4 (anti-proliferative) ^g	inhibition
	p21 ^{Cip1} (anti-proliferative) ^h	inhibition
<i>Growth</i>	Tsc2 (anti-growth) ⁱ	inhibition

AKT po aktivaci:

- Může fosforylovat více než 9000 proteinů.
- Indukuje antiapoptotické signály, zabraňuje uvolnění cytochromu C z mitochondrií, inaktivuje faktory (TF forkhead) indukující např. FasL, inaktivuje pro-apoptotický faktor Bad a prokaspázu-9
- Aktivuje buněčný cyklus: reguluje stabilizaci cyklinu D, blokuje transport p21^{WAF1} do jádra a transport p27^{KIP1} do jádra.
- Stimuluje aktivitu telomerázy aktivací TERT.
- Indukuje translokaci MDM2 do jádra (a tím k degradaci p53).
- Inaktivuje GSK3, což vede ke zvýšení hladiny volného β-keninu.
- Inaktivuje TSC2 („tuberous sclerosis complex 2“), který jinak inhibuje mTOR. mTOR je spojen s navýšeným buněčným růstem.
- AKT často zásadním způsobem mění jejich subcelulární lokalizaci → reguluje kompartmentalizaci svých substrátových molekul.

AKT po aktivaci:



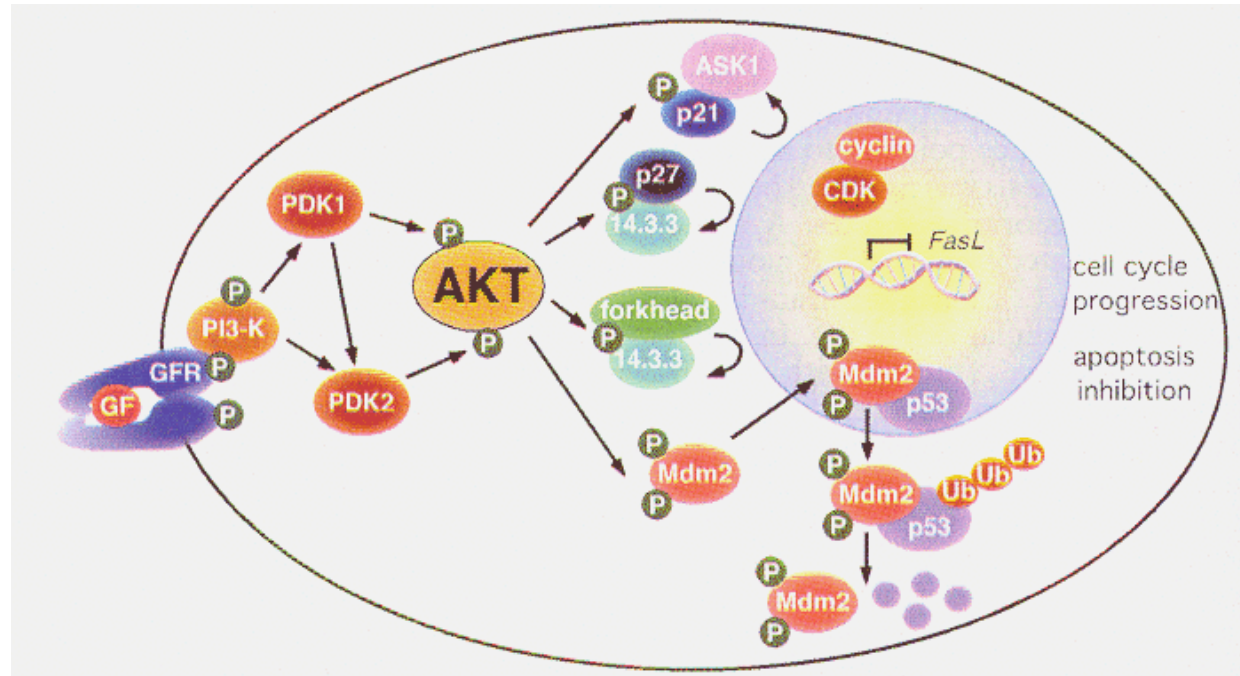
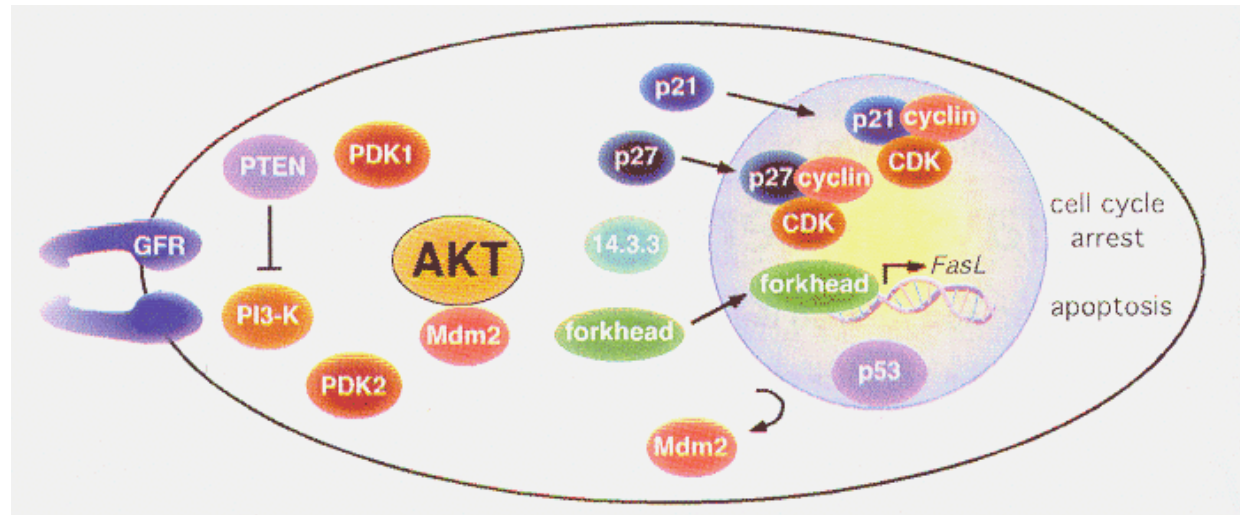
AKT

reguluje

kompartmentalizaci

svých

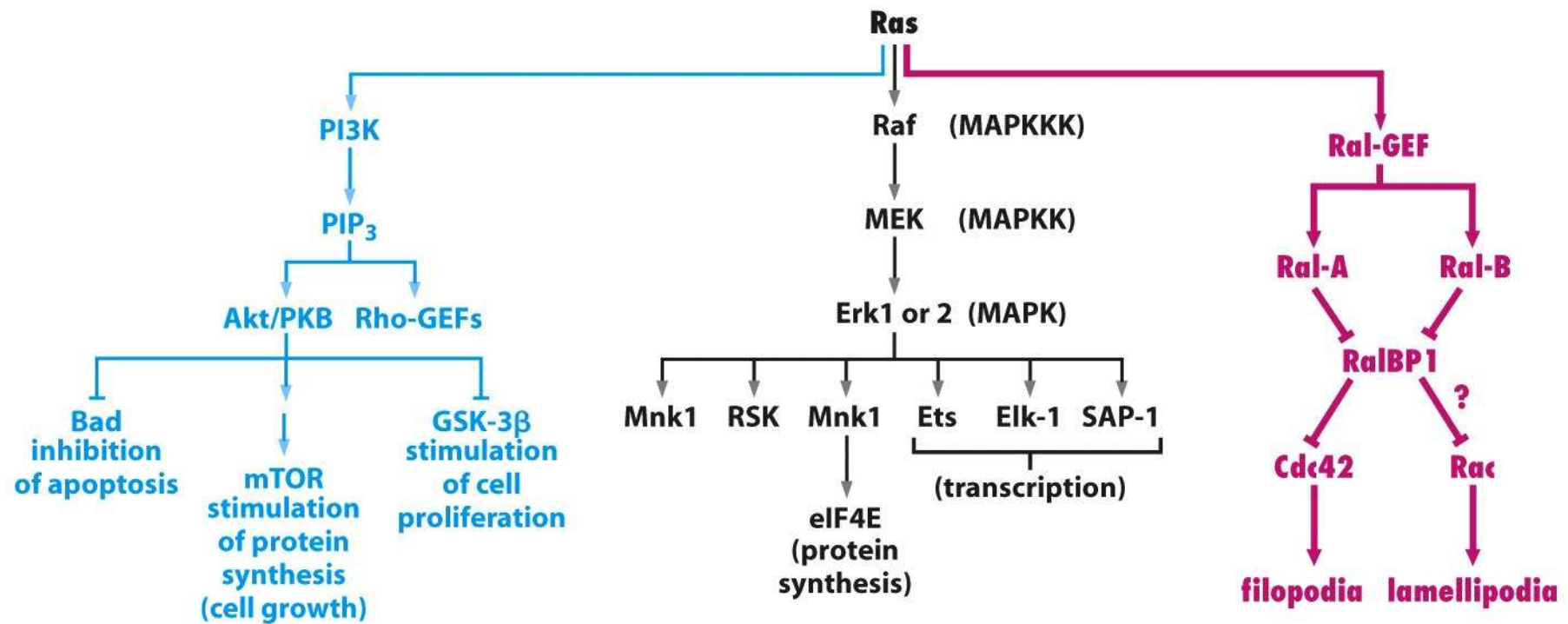
substrátů



AKT v kancerogenezi

- amplifikace a zvýšená exprese AKT2 u 10-20% nádorů vaječníků a pankreatů, zvýšená aktivita AKT2 u 40% nádorů vaječníků
- amplifikace AKT1 popsána u nádorů žaludku
- zvýšená aktivita AKT1 u nádorů prostaty, nádorů prsu - spojeno s horší prognózou (zvýšení aktivity AKT může být u nádorů prsu v důsledku amplifikace HER2/neu)
- inaktivující mutace nebo delece PTEN (karcinomy prostaty a endometria, glioblastomy, melanomy)
- amplifikace nebo overexprese katalytické podjednotky p110 PI3K
- aktivující mutace *ras* (asi 1/3 všech epiteliálních nádorů)
- zvýšená aktivita TPK receptoru, hlavně ErbB2/ErbB3 (na ErbB3 je „docking“ místo pro PI3K).

3. Ras \Rightarrow Ral



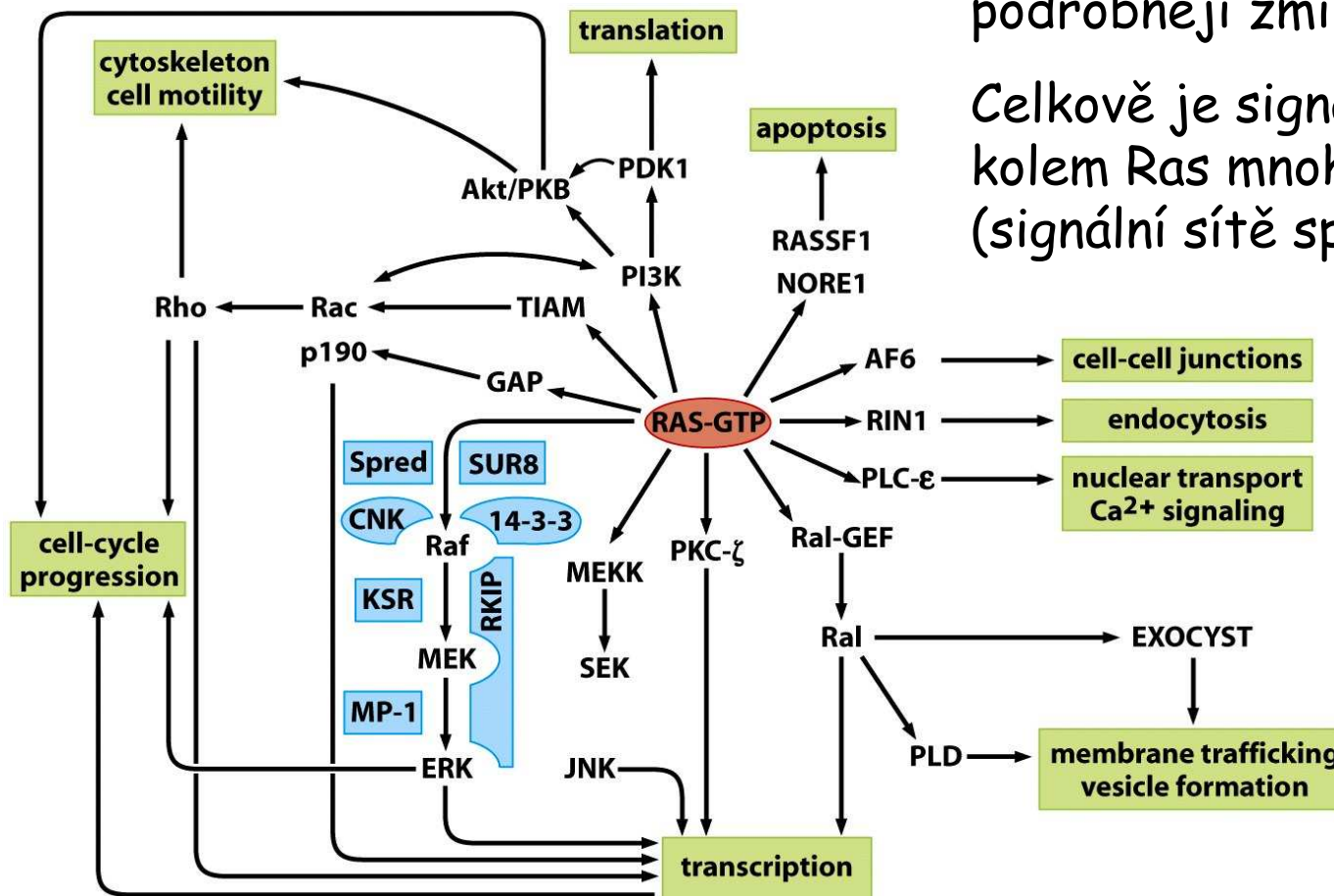
3. Ras \Rightarrow Ral

- Třetí ze tří hlavních efektorových drah Ras zahrnuje **Ral A** a **Ral B**. Patří do rodiny Ras a mají 58% homologii s Ras.
- Komunikace Ral a Ras je přes GEF proteinu Ral: tento **Ral-GEF** má vazebné místo pro aktivovaný Ras. V důsledku vazby aktivovaného Ras na Ral-GEF dojde:
 - a) k lokalizaci Ral-GEF k vnitřní straně cytoplazmatické membrány
 - b) ke konformační změně Ral-GEF \rightarrow k aktivaci GEF aktivity \rightarrow k aktivaci Ral-A a Ral-B
- Aktivované Ral-A a Ral-B pak aktivují své substrátové molekuly.
- Zatím ne zcela jasným mechanismem je v důsledku aktivace této dráhy stimulována invazivita a metastatický potenciál buněk.

Efektorové dráhy Ras

Popsáno alespoň 8 dalších efektorových drah kromě tří podrobněji zmíněných.

Celkově je signalizace (nejenom) kolem Ras mnohem **komplexnější** (signální sítě spíše než dráhy).



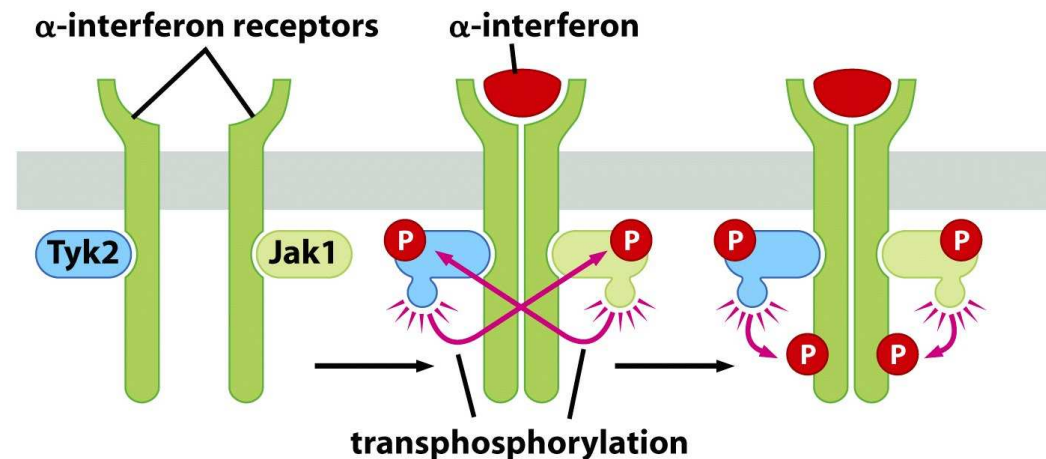
Další typy receptorů

- Tyrozin-proteinkinázové receptory
- Receptory pracující s Janusovými kinázami
- TGF- β receptory
- „Serpentinové“ receptory
 - GPCRs
 - Frizzled (Wnt-1/ β -katenin)
 - Patched
- Notch
- Integriny

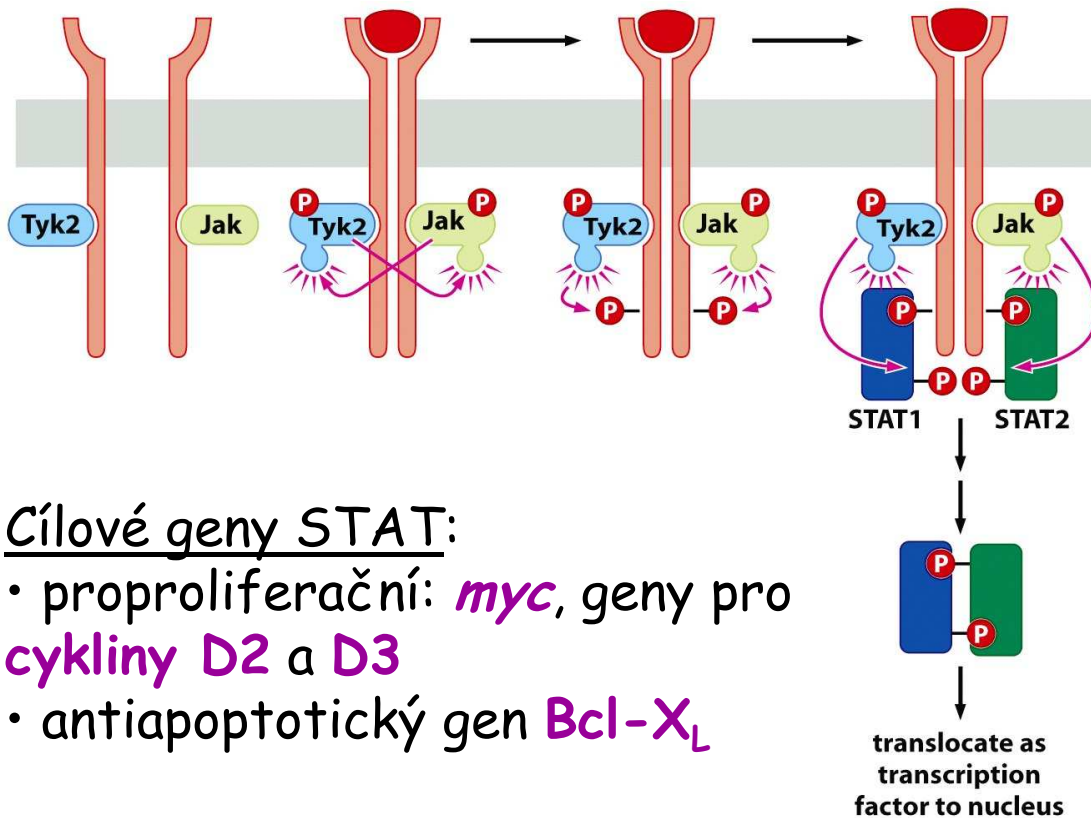
Janusovy kinázy

- Skupina receptorů významná hlavně v hematopoietickém systému.
- Také využívají **tyrozinové** kinázy, tzv. Janusovy kinázy (JK), která je ale **separovaná**, s cytoplazmatickou doménou receptoru je spojena **nekovalentně**.
- Receptor pro **erythropoietin** (EPO) - reguluje vývoj erytrocytů.
- Receptor pro **thrombopoietin** (TPO) - reguluje vývoj prekurzorů krevních destiček, tzv. megakaryocytů.
- Receptory **interferonů**.

(1) Receptory po vazbě ligandu dimerizují → (2) asociované JK se vzájemně fosforylují → (3) fosforylují C-konec receptoru a tím jej aktivují.



Dráha Jak-STAT



Cílové geny STAT:

- proproliferační: *myc*, geny pro **cykliny D2 a D3**
- antiapoptotický gen **Bcl-X_L**

Jaks mají vedle STATs další substráty, včetně dráhy **Ras-MAPK**.

Na fosfotyroziny receptoru se vážou SH2 domény TFs **STAT** („signal transducers and activators of transcription“) → STAT jsou fosforylovány kinázami Jak a tím jejich SH2 doména získává afinitu k fosfotyrozinu na molekule STAT ⇒ vznikají **dimery STAT-STAT** → migrují do jádra → fungují jak **TFs**

Dráha Jak-STAT a nádory

- Konstitutivní aktivace Stat3 u mnoha melanomů (většinou zároveň s konstitutivní aktivací Src (← 4 „bratřanci“ Src mohou fosforylovat/aktivovat Stat3) ⇒ STAT mohou být fosforylovány i jinak než Jak.
(U melanomů inhibice Src deaktivuje Stat3 a indukuje apoptózu.)
- U nádorů prsu je konstitutivně aktivován Stat3 (by Src a Jaks)
- U nádorů hlavy a krku je konstitutivně aktivován Stat3 (by EGF-R).

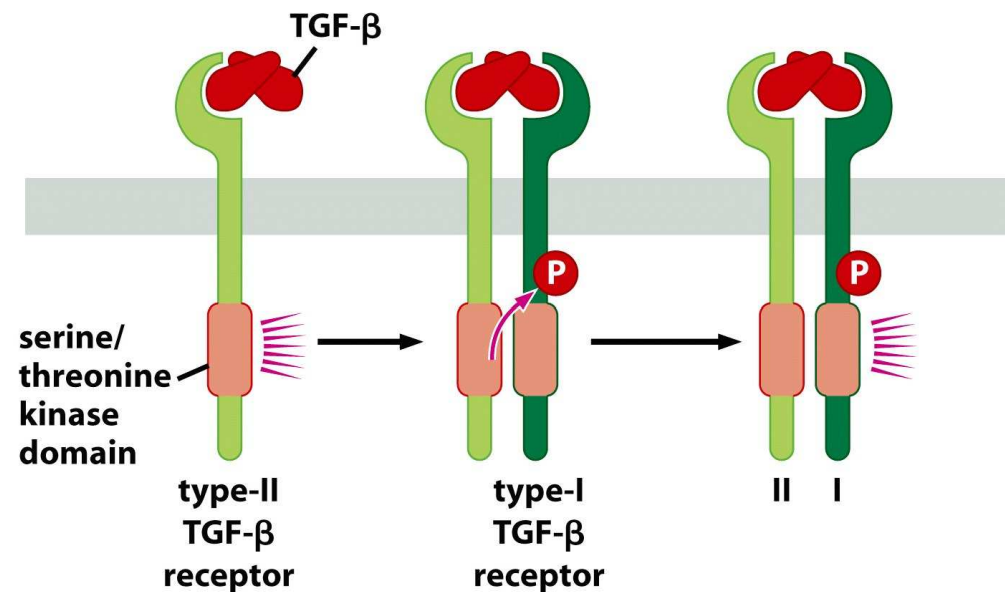
Rodina TGF- β

TGF- β („transforming growth factor“) - alespoň 30 různých faktorů TGF β u člověka

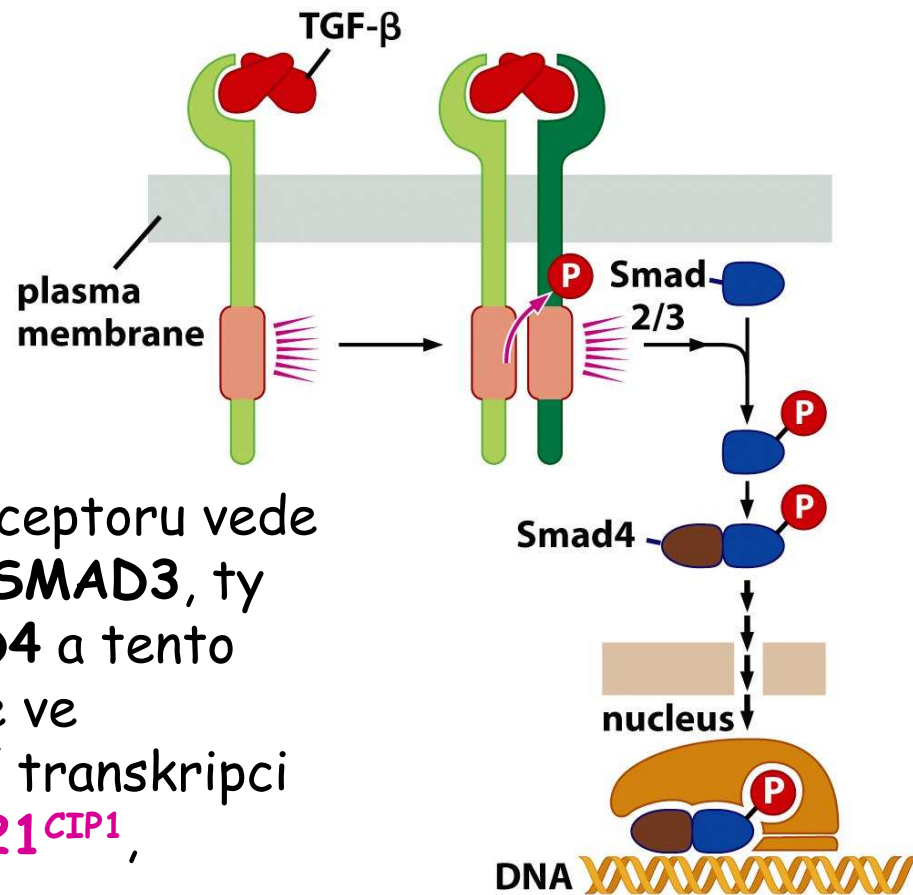
- na většinu buněk působí inhibičně: inhibuje růst normálních epiteliálních, endoteliálních, neuronálních, lymfoidních a hematopoietických buněk
- spíše **potencuje** invazivní vlastnosti již transformovaných, nádorových buněk odvozených z těchto tkání
- indukuje apoptózu u některých nádorových buněk
- představuje antimitogenní signalizaci, má charakter nádorového supresoru!
- inaktivován somatickými mutacemi nebo delecemi genu, především u kolorektálních nádorů a nádorů žaludku

TGF- β receptory

- **TGF- β R** (typu **I** a **II**) fungují jako heterodimery.
 - Jejich kinázová doména fosforyluje serin a threonin.
- Po vazbě ligandu je podjednotka TGF- β R_{II} (s konstitutivně aktivní Ser/Thr kinázou) přivedena do blízkosti podjednotky TGF- β R_I, která je fosforylována, tj. aktivována. Ta následně fosforyluje cytosolické proteiny, které migrují do jádra.



Signální dráha TGF- β



Vazba TGF- β k příslušnému receptoru vede k fosforylaci **SMAD2** a/nebo **SMAD3**, ty potom tvoří komplex se **SMAD4** a tento komplex migruje do jádra, kde ve spolupráci s dalšími TF spouští transkripci TGF- β -cílových genů (např. **p21^{CIP1}**, **p15^{INK4B}**, a další).

Dráha TGF- β a nádory

Vyřazení dráhy TGF- β je pro nádorové buňky velmi významné. Svým způsobem tuto dráhu „vyřazuje“ jakákoliv inaktivace RB, protože pak vyústění dráhy TGF- β , tj. působení inhibitorů p21 a p15 neefektivní.

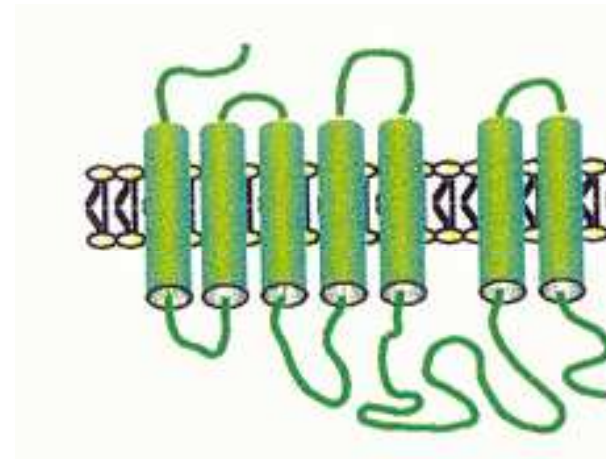
- U karcinomů střeva jsou časté mutace *smad2*.
- Asi u 50% karcinomů slinivky a 25% karcinomů střeva je inaktivní *Smad4*.
- Většina karcinomů střeva s mikrosatelitovou nestabilitou má mutaci inaktivující TGF- β II receptor.

Serpentinové receptory

Mají typickou strukturu se sedmi hydrofóbními membránovými doménami: prostupují 7x cytoplazmatickou membránu.

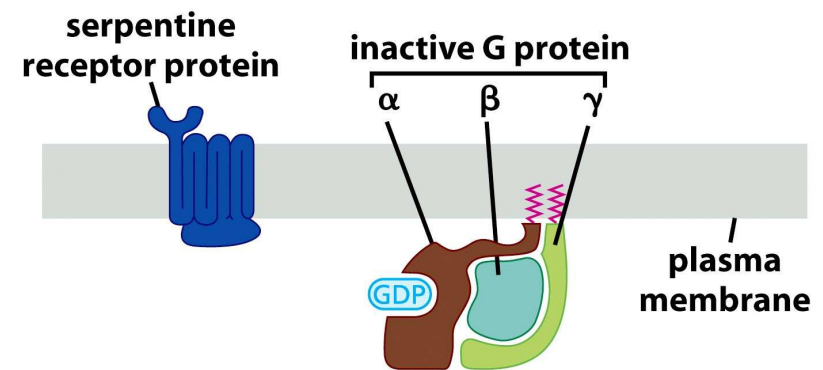
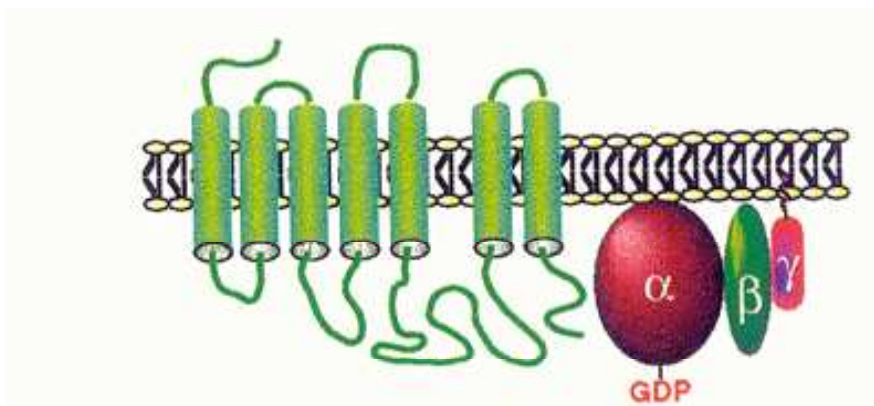
Patří k nim:

- receptory spřažené s G-proteiny
- Patched
- Frizzled

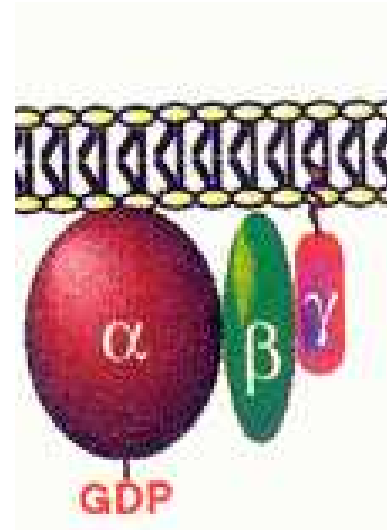


Receptory spřažené s G-proteiny (GPCRs)

- GPCRs tvoří vůbec **největší** skupinu povrchových receptorů (více než 1000 v savčím genomu - představují téměř 5% genů v lidském genomu!).
- Jsou aktivovány vazbou ligandu.
- Jako ligandy fungují pro GPCRs nejrůznější extrabuněčné molekuly: růstové faktory, hormony (serotonin, epinefrin, glukagon, tyrotropin,...), fosfolipidy, neurotransmitery, a další.



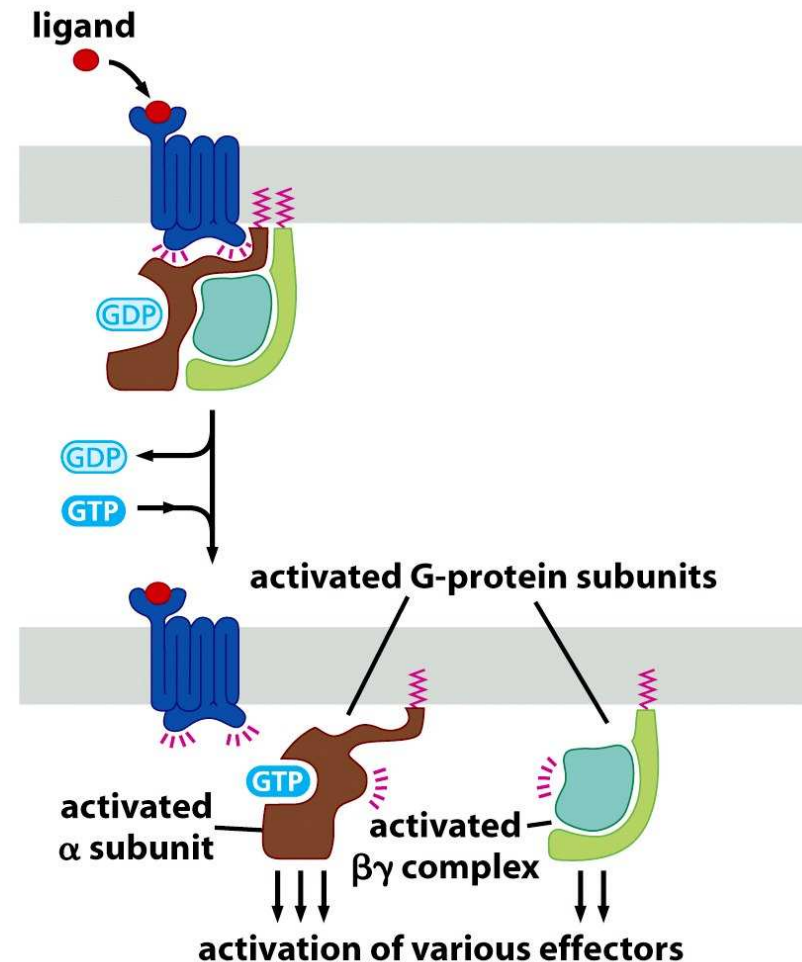
G-proteiny



- **G-proteiny**: „guanine nucleotide-binding proteins“
- **Heterotrimery** složené z podjednotek **alfa**, **beta** a **gama**.
- Celkem bylo popsáno 17 různých alfa podjednotek, 5 beta podjednotek a 12 gama podjednotek (teoreticky existuje 800 odlišných komplexů).
- Klasifikace G proteinů je podle alfa podjednotek, které tvoří 4 různé třídy (s, i, q, 12).

Aktivace GPCRs

- (1) Po aktivaci - vazbě ligandu - receptor interaguje s G-proteinem a katalyzuje výměnu GDP za GTP na podjednotce alfa.
- (2) Po aktivaci G-proteinu (vazbě GTP) je uvolněn z komplexu receptor a G-protein se rozpadne na podjednotku alfa-GTP a dimer beta/gama.
- (3A) Disociovaná podjednotka alfa zprostředkovává přenos signálu na efektorové molekuly.
- (3B) Podjednotka alfa uvolní GTP a reasociuje s podjednotkami beta a gama.



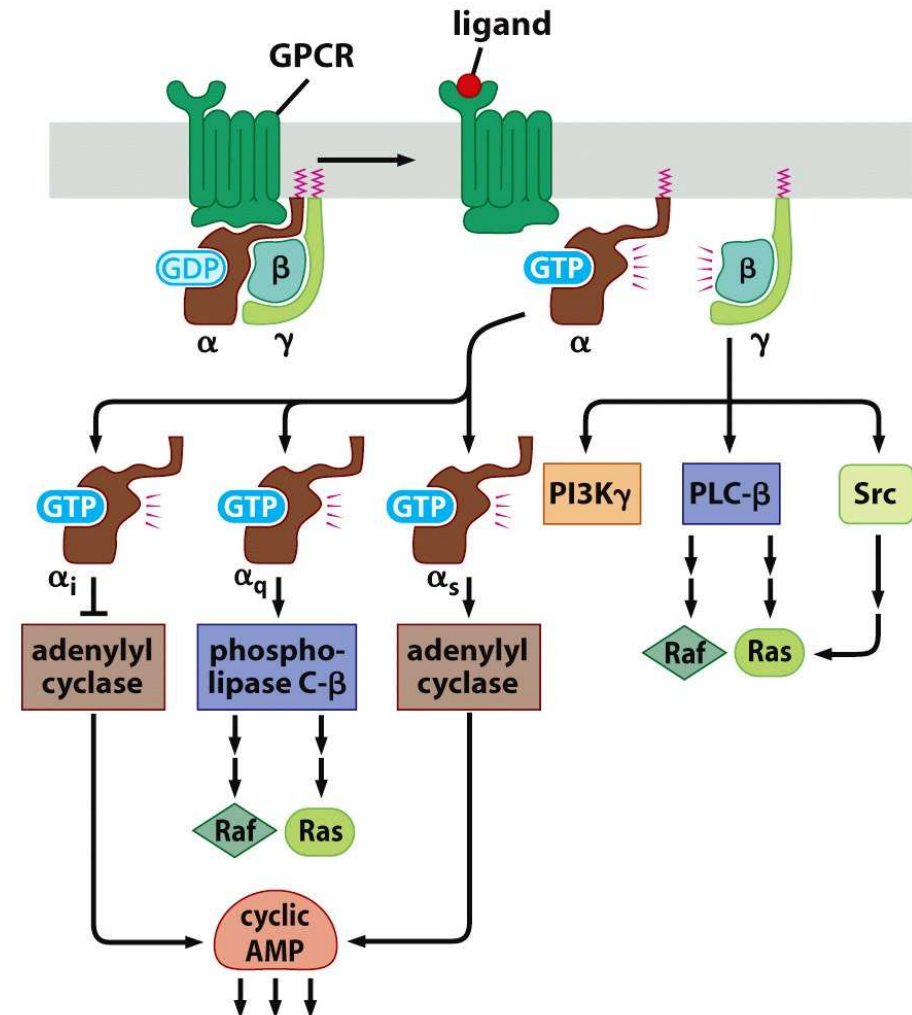
Aktivace GPCRs

Disociovaná podjednotka α -GTP aktivuje řadu cytoplazmatických enzymů:

- adenylátcyklázu (ATP \rightarrow cAMP)
- fosfolipázu C- β (štípe PIP₂)
- Src

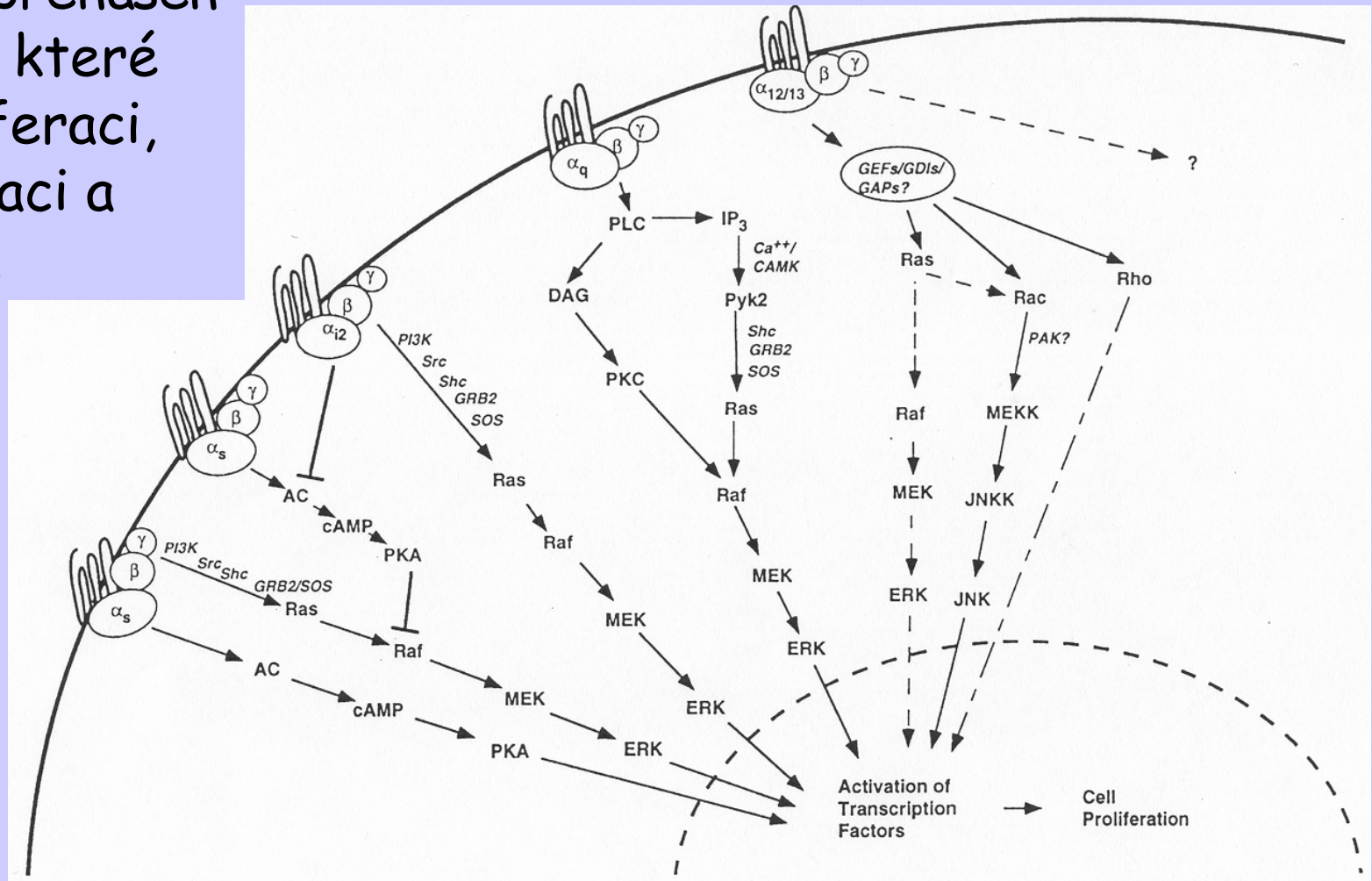
Komplexy podjednotek β + γ zřejmě stimulují PI3K, Src.

\Rightarrow GPCRs mohou signalizovat mitogenně; mohou se podílet na vývoji nádorů.



Signální dráhy GPCR

Přes G proteiny je signál přenášen na dráhy, které řídí proliferaci, diferenciaci a apoptózu.



GPCRs a nádory

- Některé malobuněčné karcinomy plic (časté u kuřáků) **uvolňují faktory** - ligandy (např. bombesin, bradykinin, gastrin, neurotensin,...), které stimulují jejich vlastní odpovídající GPCRs (tj. **autokrinní stimulační smyčka**).
- Thyroidní adenomy a thyroidní karcinomy mají **bodové mutace** v genu kódujícím **receptor** thyroïd-stimulujícího hormonu způsobující jeho konstitutivní aktivaci.
Nebo jsou **bodové mutace na podjednotce α** , které inaktivují GTPázovou aktivitu (tj. velmi podobná mutace Ras).
→ Alespoň 10 ze 17 lidských genů kódujících **α** podjednotky G proteinů bylo nalezeno jako aktivní onkogeny v lidských nádorech.

GPCRs a nádory

- Asi k nejbizarnější deregulaci GPCRs dochází během infekce herpesvirů, např. HHV-8 (tj. KSHV - Kaposi sarkoma herpesvirus). Tento virus přímo **kóduje vlastní GPCR**, který je již **aktivovaný**, konstitutivně aktivní bez vazby ligandu. Mezi jinými důsledky HHV-8 infikované endoteliální buňky sekretují trvale VEGF.

Signální dráhy:
Wnt/ β -katenin
Sonic hedgehog/Gli
NOTCH

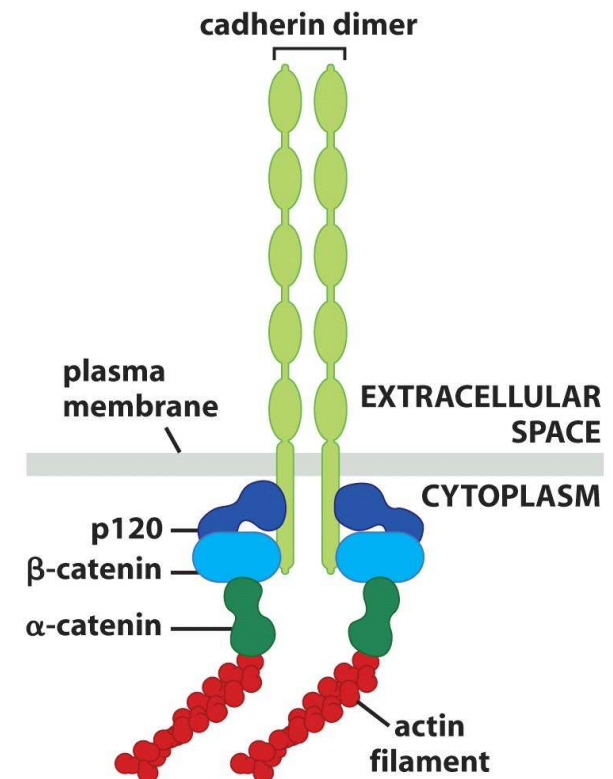
- hrají úlohu v rozhodování o osudu buněk, při ustavení tkáňově specifických kmenových buněk a jejich regulaci v dospělých tkáních
- jsou důležité i v kontextu lidských nádorů

Signální dráha Wnt/ β -katenin

Pro většinu buněk je kaskáda RTK \rightarrow Ras dominantní při zprostředkování odpovědi na mitogenní signály. Ale není jediná.

β -kateniny hrají v buňkách dvě odlišné role a obě tyto role se mohou podílet na kancerogenezi; nachází se ve třech různých stavech:

1. Molekuly β -kateninu jsou strukturální součástí cytoskeletonu a **adhezivních komplexů** (zprostředkovávají vztah mezi kadheriny a aktinovými složkami cytoskeletonu). Ztráta/změna buněčné adheze se uplatňuje při metastázování nádoru.

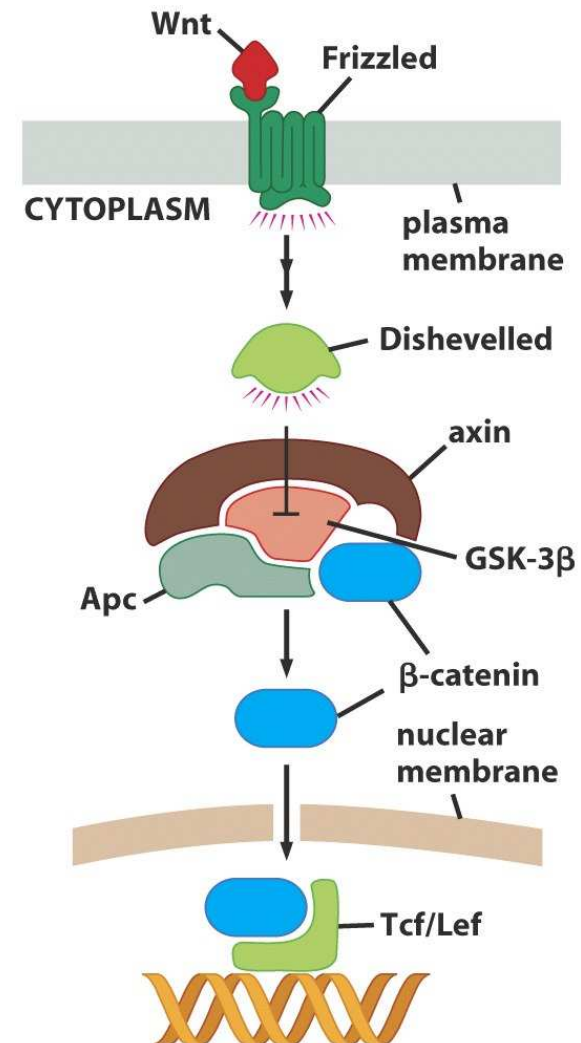


Signální dráha Wnt/ β -katenin

2A. Volný β -katenin se nachází v cytoplazmě („lifetime“ asi 20 minut), funguje jako signální molekula dráhy Wnt/ β -katenin.

Může být transportován do jádra (**2B.**), kde je součástí **transkripčního faktoru**, účastní se regulace transkripce.

Transkripce genů zprostředkovaná β -kateniny může zapnout geny nutné k buněčné proliferaci nebo geny s antiapoptotickou funkcí.



Regulace β -kateninů

Hladina **volného** β -kateninu je udržována pomocí tzv. **destrukčního komplexu**. Ten je tvořen proteiny: GSK-3, Axin, APC a β -TrCP/Slimb.

Aktivace dráhy Wnt - tj. vazba glykoproteinu **Wnt*** na příslušný receptor **Frizzled** (ale např. i aktivace EGFR a dalších) vede k aktivaci proteinu **Dsh** (**disheveled**), který interaguje s destrukčním komplexem a blokuje aktivitu **GSK-3 β** . Tím je znemožněna fosforylace β -kateninu, jeho „lifetime“ vzroste na 1-2 hodiny a příslušně se zvýší hladina **volného** β -kateninu.

Ten je transportován do jádra a spolu s proteiny **Tcf** („T cell factor“) a **Lef** („lymphoid enhancer factor“) vytvoří multiproteinový TF a aktivují transkripci svých cílových genů.

- * Ligandy Wnt jsou v extrabuněčném prostoru, ale jsou pomocí lipidové složky pevně vázané k buněčné membráně. Nemohou volně difundovat.

Regulace β -kateninů

K cílovým genům β -kateninu/Tcf/Lef patří např. *c-myc* a gen pro *cyklin D1*, což vede ke zvýšení buněčné proliferace.

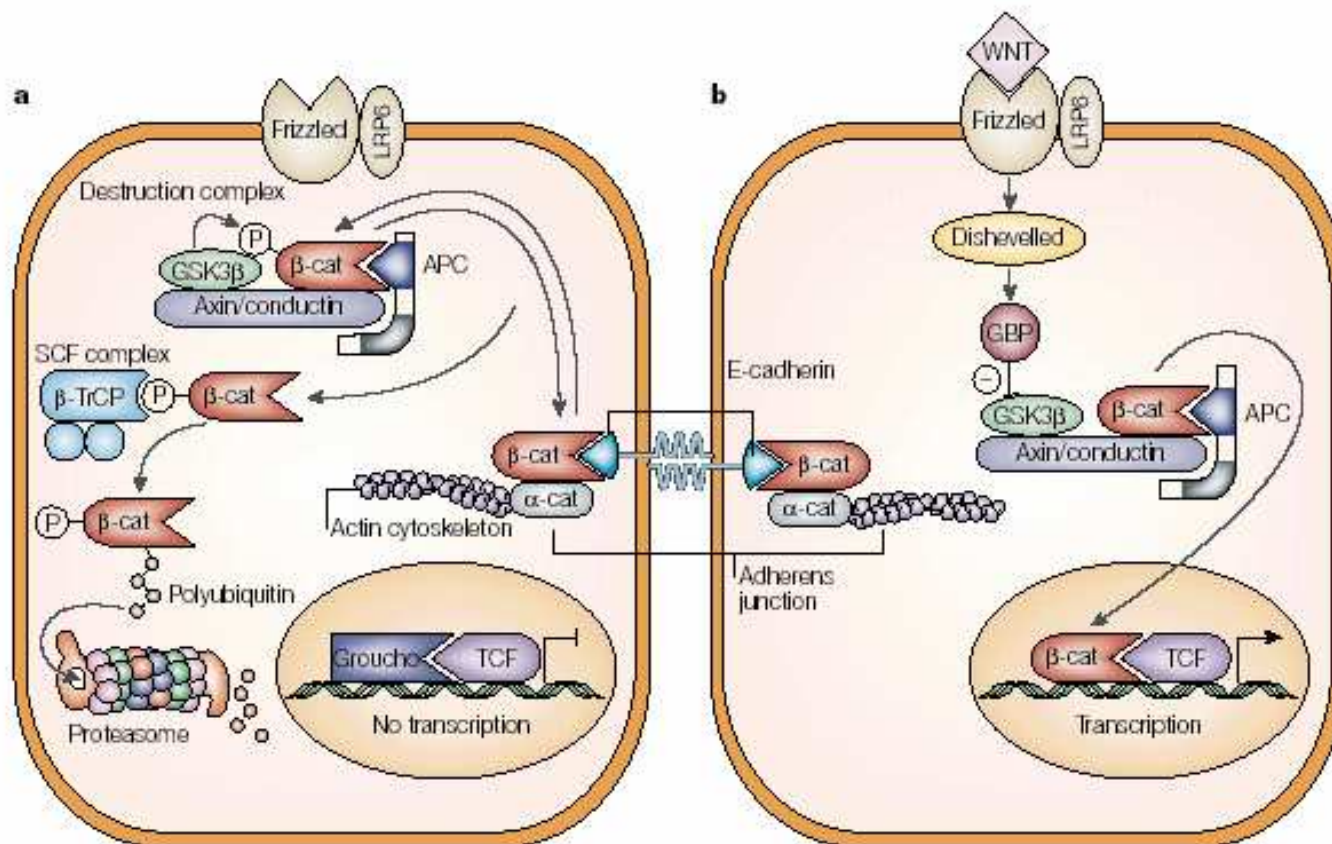
Signální dráha Wnt/ β -katenin se uplatňuje během vývoje, možná při řízení buněčného cyklu (fluktuace β -kateninu během cyklu).

Destrukční komplex

Axin a *APC* fungují jako "lešení" destrukčního komplexu a podmiňují jeho fungování. Axin obsahuje vazebná místa pro všechny jeho součásti.

GSK-3 serin/threoninová kináza, která fosforyluje β -katenin (S33, S37, T47 a S45). Tato fosforylace funguje jako signál k následné ubikvitinaci a degradaci β -kateninu.

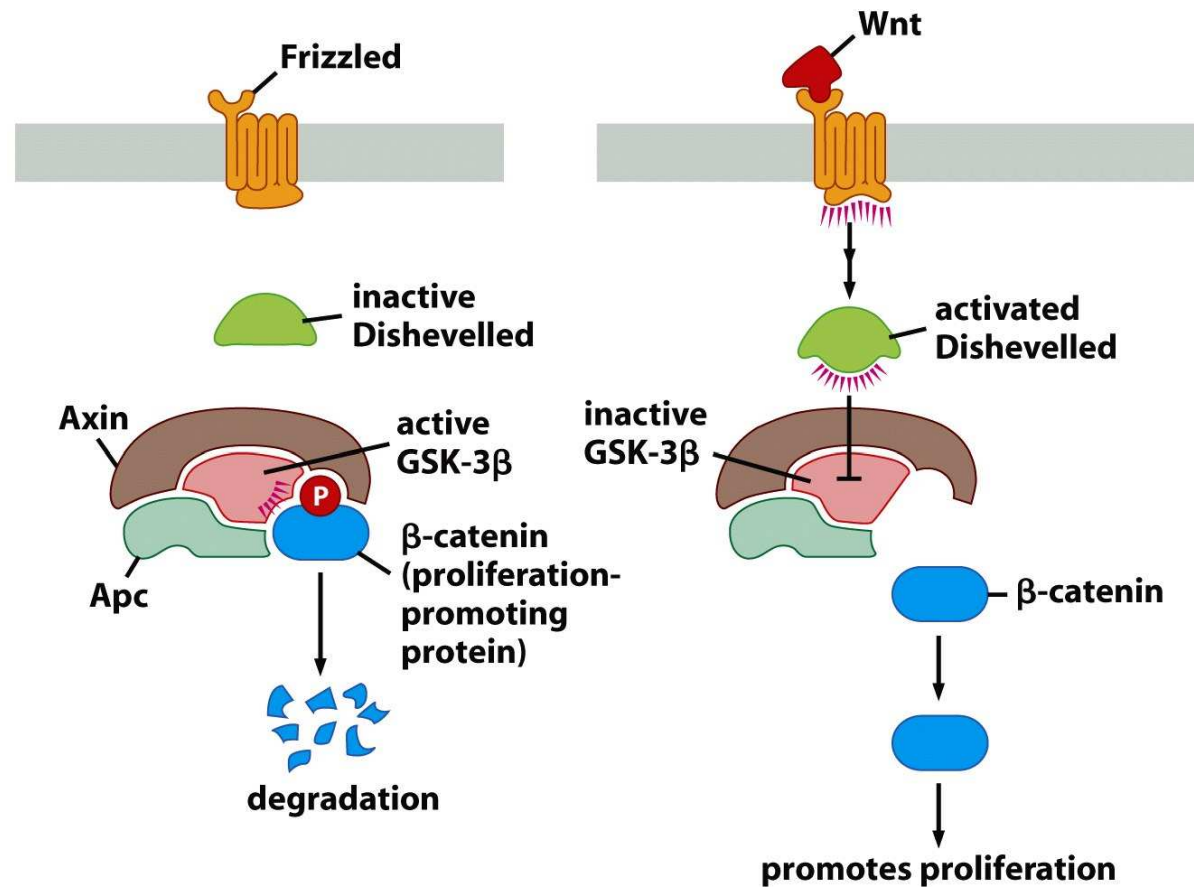
Signální dráha Wnt/ β -katenin



Přebytek volného β -kateninu je degradován, což je zprostředkováno destrukčním komplexem.

Signální dráha Wnt/ β -katenin

- Smyslem dráhy Wnt/ β -katenin je udržování adekvátní hladiny volného β -kateninu.
- Klíčová je aktivita kinázy GSK-3 β .



Signální dráha Wnt/ β -katenin

- Mezi substráty **GSK-3 β** patří také **cyklin D1**. GSK-3 β fosforyluje cyklin D1 a určuje ho k degradaci.
- ⇒ Dráha Wnt/ β -katenin ovlivňuje hladinu cyklinu D1 na dvou úrovních: **transkripčně** (přes β -katenin) a **posttranslačně** (přes GSK-3 β).
- Wnt není pouze morfogenem, ale také mitogenem.
- Zdá se, že dva pooly β -kateninu (1. ve vazbě s E-kadherinem, 2. volný cytoplazmatický) jsou regulovány separovaně. Např. ztráta E-kadherinu nemá v buňce za následek navýšení volného β -kateninu.

Signální dráha Wnt/ β -katenin a nádory

- Zvýšená exprese Wnt-1 se podílí na vzniku nádorů prsu.
- Mutace APC znemožňující vazbu APC na β -katenin nebo vazbu APC na axin způsobují konstitutivní aktivaci β -kateninu.
- Mutace APC patří k nejčasnějším genetickým změnám při vývoji kolorektálního karcinomu (plus vrozené mutace), dávají buňkám růstovou výhodu.
- Mutace axinu, které znemožňují vazbu axinu na β -katenin, byly nalezeny u některých hepatocelulárních nádorů.
- Mutace β -kateninu buď odstraňují serin nebo mění serin na jinou aminokyselinu, což znemožňuje fosforylaci GSK-3 β a odbourávání β -kateninu. Např. v nádorech prostaty, jater střeva, dělohy, vaječníků, melanomů.
- Mutace β -kateninu se vyskytují i u kolorektálního nádoru, nikdy ne zároveň s mutacemi APC (princip exkluzivity).

Regulace β -kateninů Siah-1

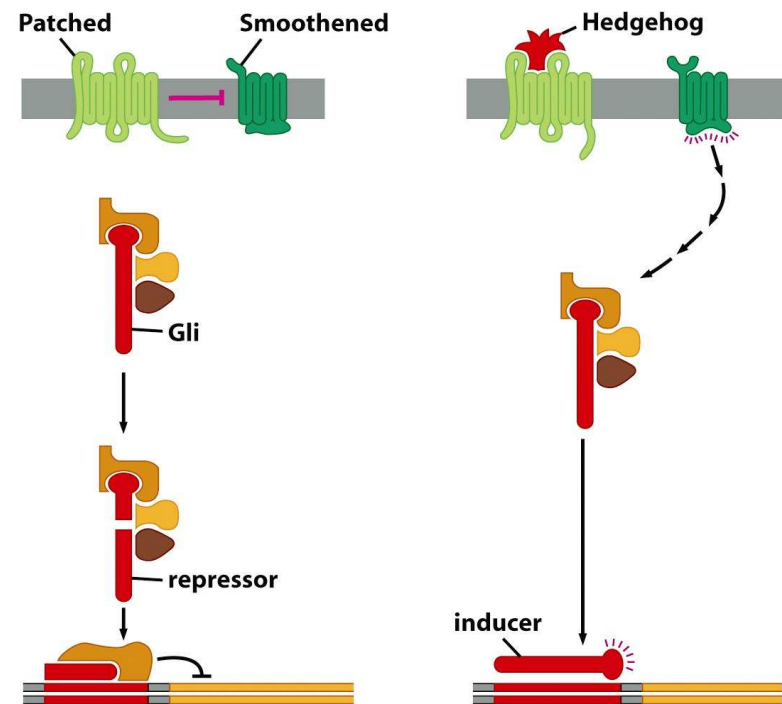
Recentně popsán další nezávislý mechanismus odbourávání β -kateninu: zprostředkovaný proteinem **Siah-1**.

- Tato dráha je závislá na funkčním APC.
- Tato dráha může odbourávat i onkogenní formy β -kateninu, které nejsou odbourávány Wnt signalizací. !! Většina mutací APC jsou delece té části molekuly, která odpovídá za vazbu axinu a Siah-1 !!
- Tato dráha funkčně spojuje **p53** a β -katenin: aktivace p53 zvyšuje expresi Siah-1 (overexprese p53 způsobuje downregulaci β -kateninu). Dysregulace β -kateninu není ale klíčový důsledek inaktivace p53.

Signální dráha Hedgehog/Patched/Gli

Hedgehog proteiny jsou sekretované glykoproteiny, které ovlivňují membránové receptorové komplexy, které přenášejí signál na transkripční faktory Gli.

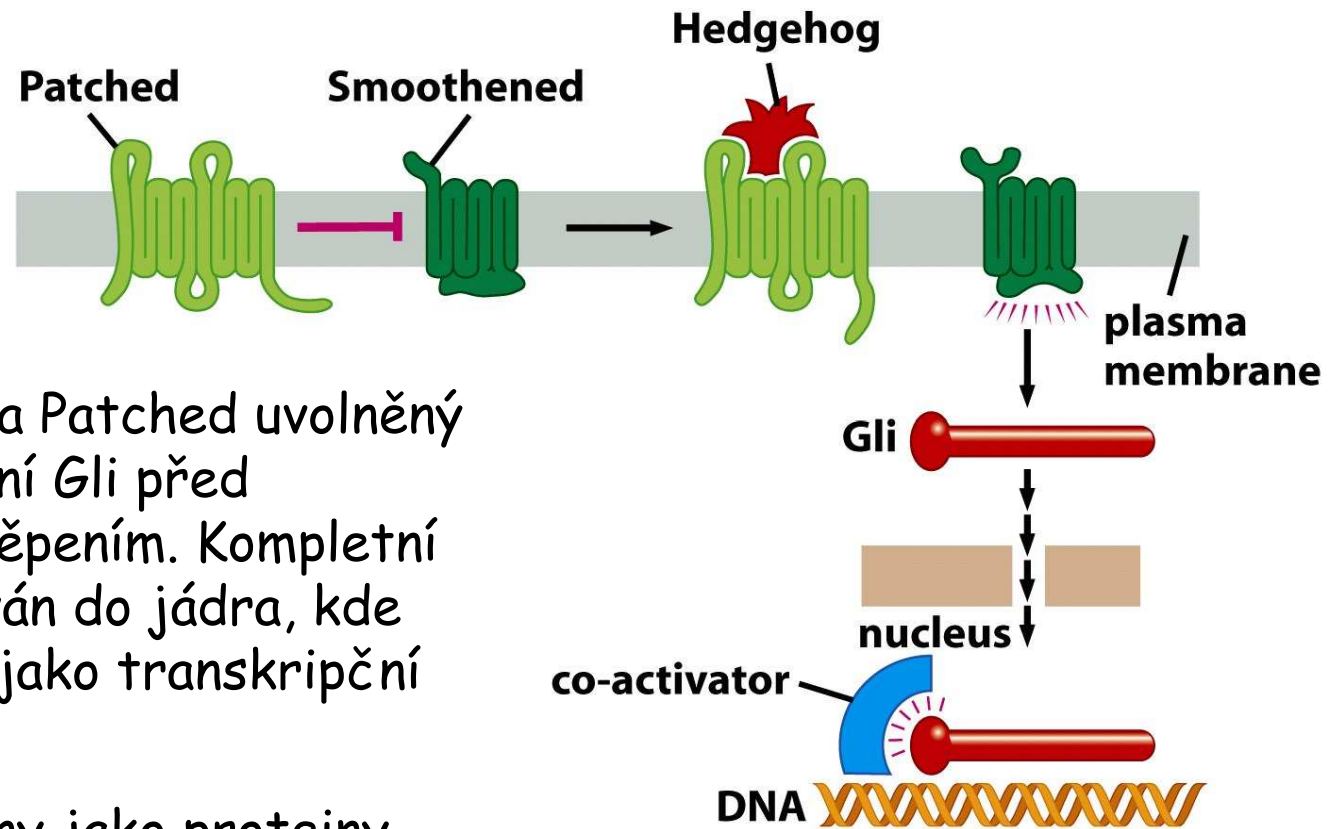
SHH (**Sonic hedgehog**) inhibuje receptor **Patched** (**Ptc** - **nádorový supresor**), který normálně inhibuje receptorový komplex **Smoothened** (**Smo** - **onkogen**). Inhibice Ptc tedy aktivuje Smo, což vede k aktivaci TF **Gli**.



Po většinu času je dráha SHH/Gli neaktivní, pouze ve specifickém čase na specifickém místě je dráha aktivována.

U savců 3 typy Hedgehog proteinů: Sonic (**SHH**), Desert, Indian.

Signální dráha Patched



Aktivní, z vazby na Patched uvolněný Smoothened chrání Gli před proteolytickým štěpením. Kompletní Gli je transportován do jádra, kde následně funguje jako transkripční aktivátor.

Gli poprvé objeveny jako proteiny vysoce exprimované u glioblastomů. Ve vysokých hladinách fungují jako onkoproteiny.

Transkripční faktory Gli

- **Gli** jsou velké (asi 1000 AA) multifunkční TF.
- Lokalizovány v jádře i cytoplazmě.
- V nepřítomnosti SHH jsou Gli štěpeny proteazomem a C-karboxylová zkrácená forma je translokována do jádra, kde funguje jako **transkripční dominantní represor**.
- V přítomnosti SHH signálu, tedy aktivního Smoothened, je tvorba represoru inhibována a protein o plné délce funguje jako **aktivátor**.
- **Gli1, 2 a 3** - liší se svým chováním; jsou částečně redundantní, částečně fungují specificky a zřejmě fungují kombinatoriálně a v závislosti na kontextu.

Hedgehog/Patched/Gli a nádory

Ztráta funkce (**inaktivace**) SHH-Gli vede k vývojovým defektům včetně holoprozencefalie.

Nefyziologická aktivace dráhy může vést k vývoji nádorů, a to sporadických a také familiálních.

- 40% sporadických basocelulárních karcinomů (většinou benigní nádory) má **mutace PTCH nebo SMO**. Mutace PTCH také u meduloblastomů, meningiomů, karcinomu prsu a jícnu.
- U nádorů jícnu, žaludku, žlučových, pankreatu je častá **vysoká hladina receptoru Patched a ligandů** (Sonic Hedgehog, Indian Hedgehog). Důsledkem jsou vysoké hladiny Gli v jádrech buněk. (Anti-hedgehog protilátky tlumily u těchto nádorů proliferaci a stimulovaly apoptózu.)

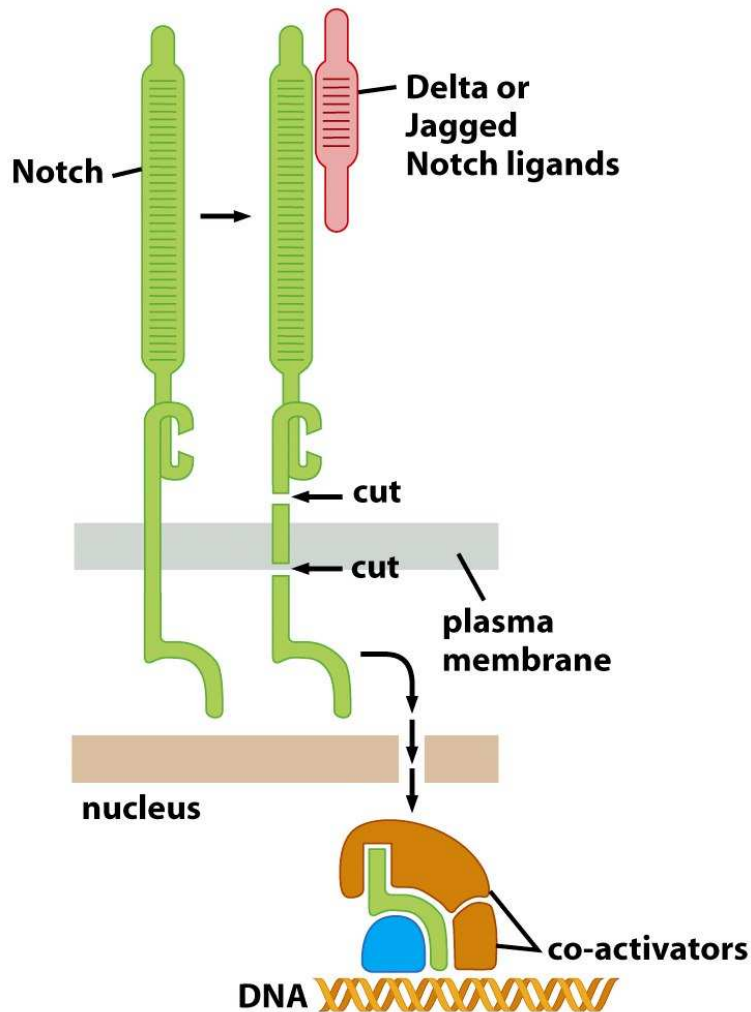
Vsuvka: Holoprozencefalie

- SHH funguje během vývoje jako **vývojový morfogen**: parakrinní signály s krátkým dosahem působení, které řídí vypínání a zapínání genů a vyvolávají četné odpovědi v závislosti na hladině podél koncentračního gradientu
- Difúze proteinu SHH vytváří gradient, ve kterém různé koncentrace proteinu přimějí okolní buňky přijmout různé predestinace.
- Mutace inaktivující SHH vedou k vývoji **holoprozencefalie** (dominantní dědičnost - stačí 50% snížení exprese genu) - porucha vývoje střední části obličeje a předního mozku, vedoucí až k rozštěpu patra, hypotelorismu a absenci struktur předního mozku.
- Velmi variabilní expresivita: od velmi lehkých projevů (jediný centrální řezák) - pravděpodobně modifikátorové geny.

Signální dráha Notch

- Hraje klíčovou roli ve vývoji embryonální vaskulatury a v angiogenezi.
- 1919 - popsány „notches“ - vroubky/zářezy na křídlech Drosophily.
- Až mnohem později bylo objeveno, že *notch* kóduje transmembránový protein - receptor **Notch**. V savčích buňkách existují 4 různé varianty kódované 4 různými geny.
- Jako ligand fungují **Notch L, Delta, Jagged1, Jagged2**.
- Signál začíná interakcí proteinů Notch L a Notch sousedních buněk (endoteliální b. - nádorová b. - stromální b.: nádor je komplexní tkáň).

Signální dráha Notch

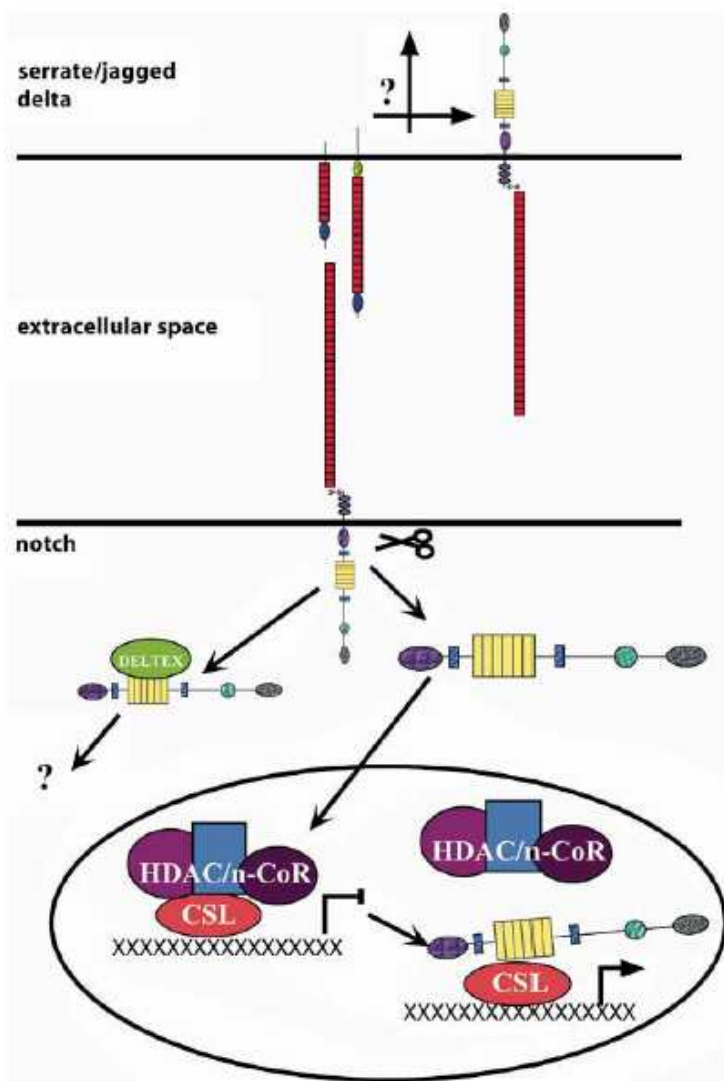


- Po vazbě ligandu (Notch L, Delta, Jagged) dojde ke dvěma proteolytickým štěpením receptoru Notch: 1x v extracelulární doméně, 1x v transmembránové doméně. *
- Tím je uvolněn cytoplazmatický fragment z ukotvení v membráně a migruje do jádra, kde spolu s partnerskými proteiny funguje jako transkripční faktor.
- K cílovým genům patří geny **Hes** a **Hey**.

Receptory Notch

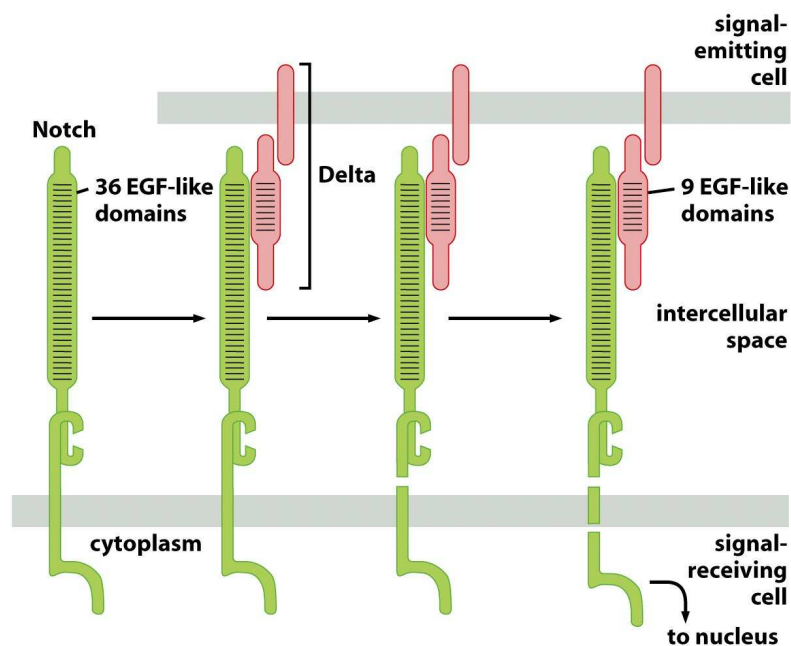
- * Receptory Notch fungují zcela jinak než např. RTK:
 - Vždy po vazbě ligandu dojde k **ireverzibilní** přeměně receptoru (proteolytickým štěpěním) ⇒ každá receptorová molekula signalizuje **pouze 1x**
 - Receptory Notch **nemohou amplifikovat signál** jako např. RTK.

Signální dráha NOTCH



Signál začíná interakcí proteinů Notch L a Notch **sousedních buněk** (např. endoteliální buňka - nádorová buňka - stromální buňka).

⇒ **nádor je komplexní tkáň**



Signální dráha Notch a nádory

- U většiny karcinomů čípku a menšího podílu karcinomů střeva a dlaždicobuněčných karcinomů plic je **zvýšená exprese proteinu Notch**. Ta spojena s **jadernou lokalizací** tohoto proteinu.
- **Zvýšená exprese ligandu** (Notch L, Jagged a Delta) detekována u karcinomů čípku a prostaty.
- 10% ALL má konstitutivně aktivní Notch, a to v důsledku **delece** té části genu NOTCH-1, který kóduje **extracelulární doménu receptoru**.

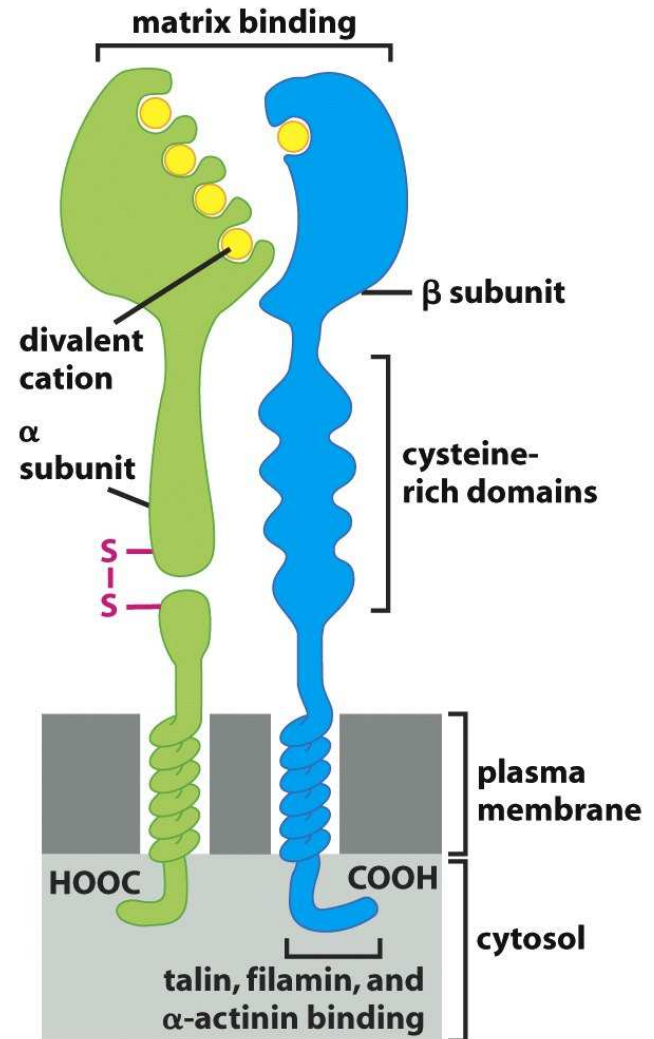
Integrinové receptory

Integriny jsou povrchové receptory, které zprostředkovávají (1) buněčnou adhezi k extracelulární matrix a k ostatním buňkám.

Zprostředkovávají ale také (2) signalizaci týkající se buněčné proliferace a přežívání.

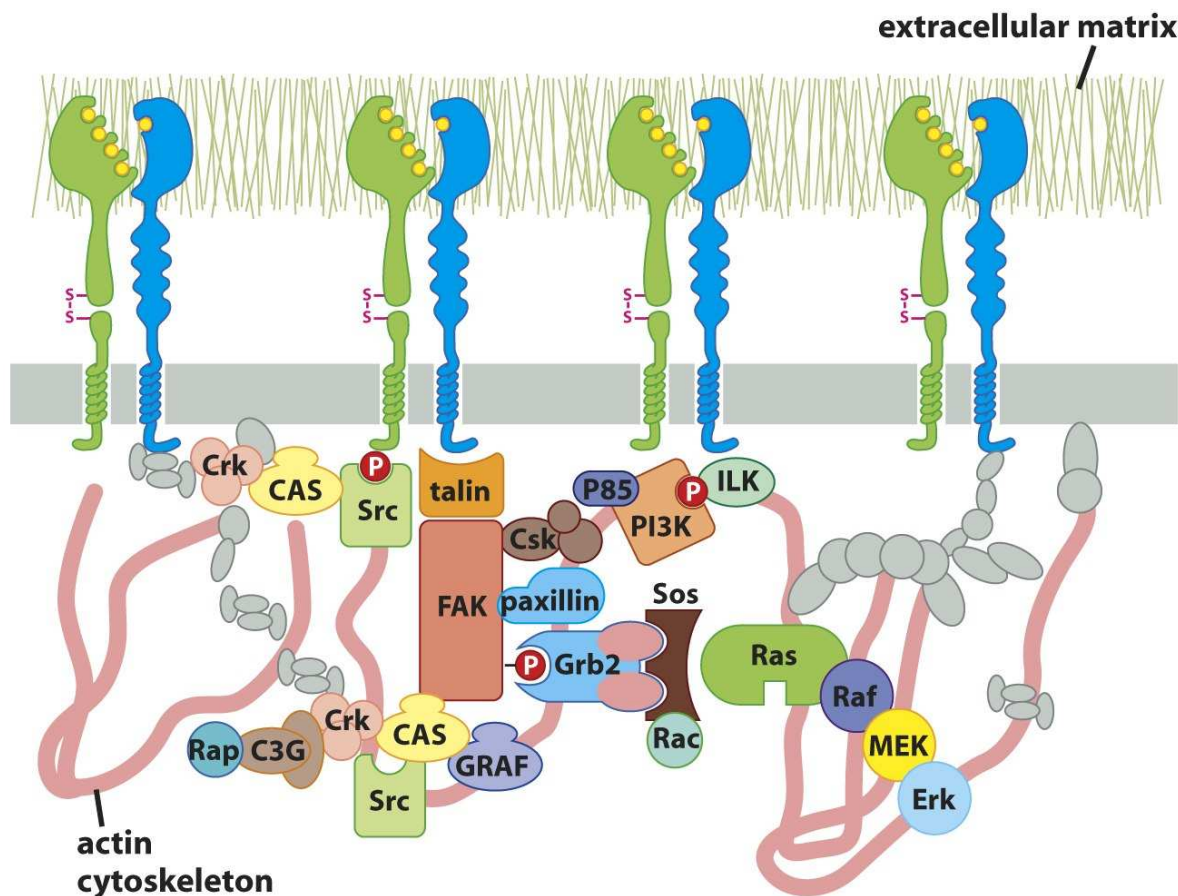
Jsou to **heterodimery** nekovalentně asociovaných podjednotek **alfa** a **beta**. Popsáno 18 podjednotek alfa a 8 podjednotek beta, tvoří 24 různých heterodimerů s různou specifitou.

Tvořeny velkou extracelulární doménou (vazba ligandu), krátkou transmembránovou doménou a různě dlouhou cytoplazmatickou C-koncovou doménou.



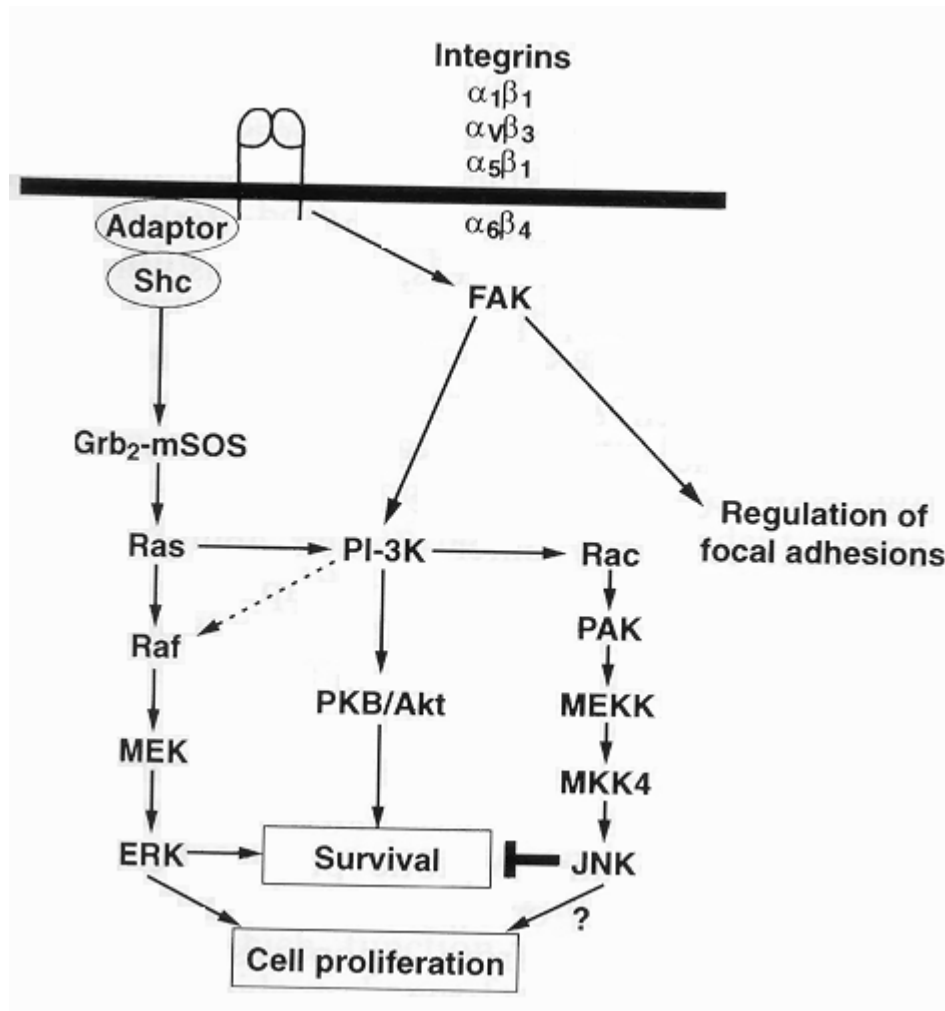
Co umí integriny

Buňka neustále monitoruje své úspěšné přichycení na složky ECM (**anoikis**). Následně jsou do cytoplazmy uvolňovány signály přežití, což snižuje pravděpodobnost indukce apoptózy.



- fyzicky interagovat s ECM
- ovlivňovat uspořádání cytoskeletonu
- signalizovat dovnitř buňky
- signalizovat zevnitř buňky ven: o přichycení na jiné složky ECM
- umožňují pohyb buňky postupnou tvorbou a rušením vazeb na ECM

Integrinové receptory

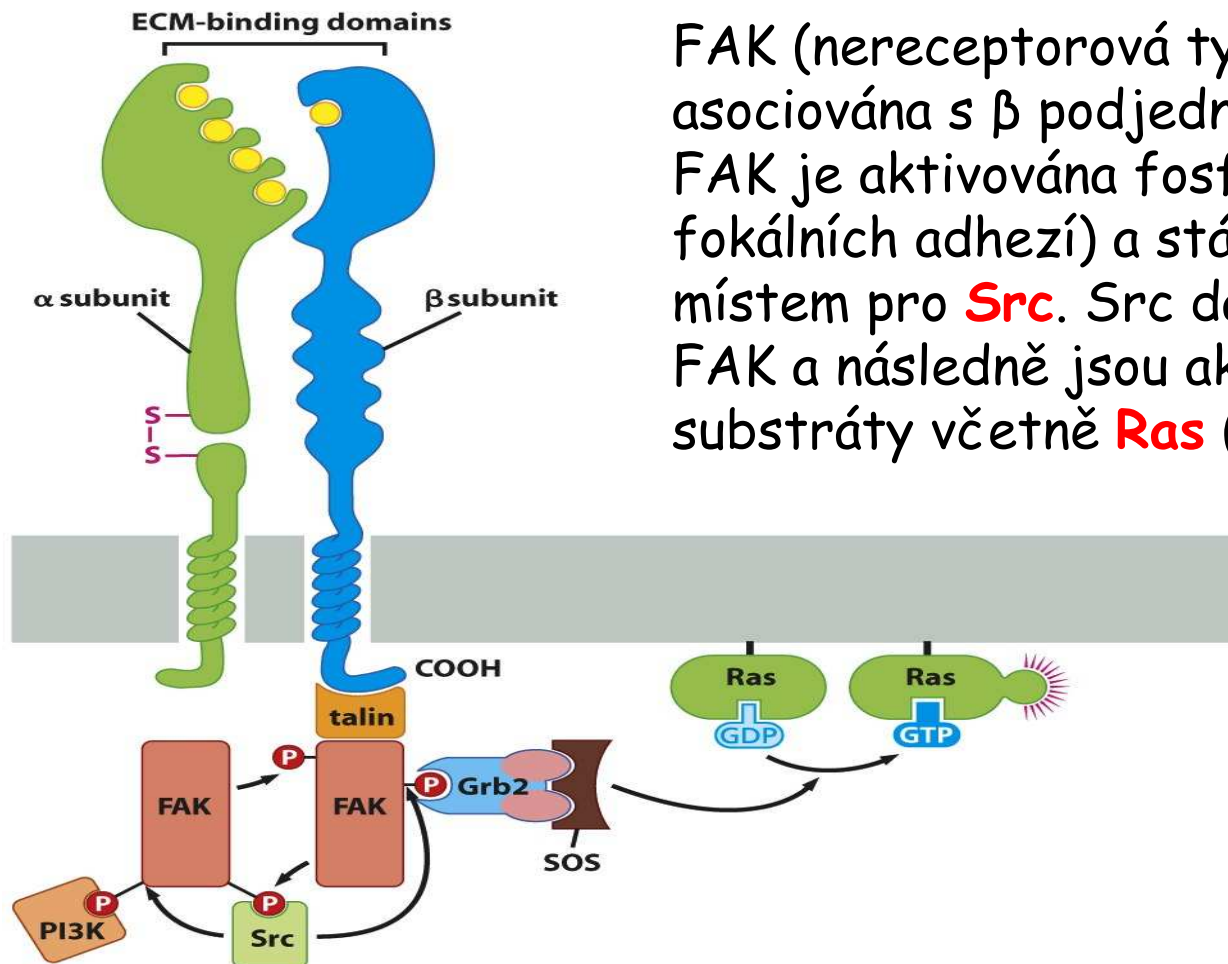


- Klíčová pro funkci integrinů je jejich schopnost aktivovat **FAK** - „focal adhesion kinase“.

- Integriny mohou tvořit klastry a tvořit tzv. fokální adheze. Ty aktivují FAK.

- FAK se uplatňuje především při signalizaci související s regulací buněčné adheze, s pohybem buněk a jejich migrací.

Signalizace integriny



FAK (nereceptorová tyrozinkináza) je asociována s β podjednotkou integrinu. FAK je aktivována fosforylací (po vzniku fokálních adhezí) a stává se vazebným místem pro **Src**. Src dále fosforyluje FAK a následně jsou aktivovány další substráty včetně **Ras** (Erk) a **PI3K**.

ECM → integriny → Sos → Ras → Erk

Pochopení funkčního propojení těchto signálních drah pomohlo vysvětlit významný buněčně biologický efekt onkoproteinu Ras: jeho schopnost umožnit buňce přežití a růst bez jejího ukotvení. Normálně přežití buňky závisí na signalizaci integrinů směrem k Ras. Bez této signalizace buňka věří, že se jí nepodařilo ukotvení k ECM, což blokuje proliferaci nebo dokonce indukuje apoptózu (anoikis).

Onkogenní aktivace Ras tak mimikuje stav, kdy buňka dostává informace o úspěšném ukotvení na ECM - i bez tohoto ukotvení.

Zdá se, že právě schopnost vyhnout se anoikis stojí na počátku vývoje některých nádorů, např. nádorů prsu.

Spolupráce receptorů

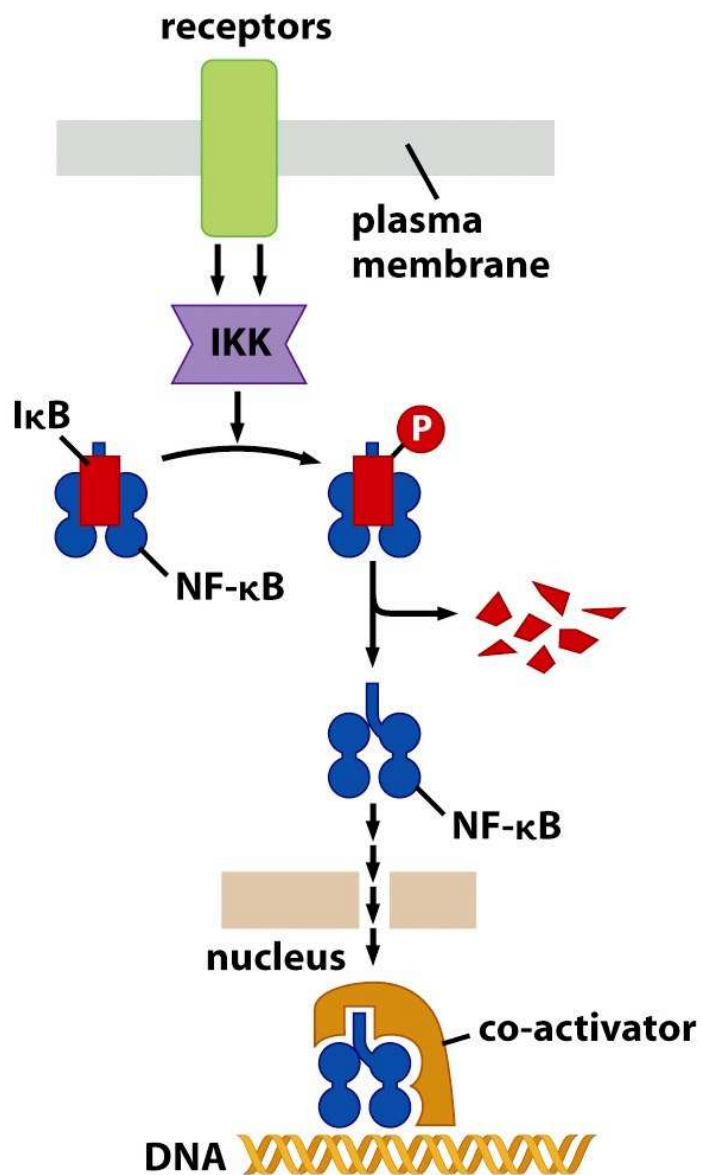
Při regulaci buněčného dělení je funkce receptorů nezastupitelná a naprosto klíčová:

Receptory musí zaznamenat, zda je adekvátní úroveň mitogenů (**RTK**) a zda je také adekvátní prostředí (**integriny**).

Signální dráha NF-κB

- První signál svědčící o významu dráhy NF-κB pro kancerogenezi: objevení onkogenu *v-rel* u akutně transformujících virů krůty způsobujících retikuloendoteliozu (lymfom B-buněk).
- **Rel** patří do rodiny faktorů NF-κB, které tvoří homodimery a heterodimery v cytoplazmě. Nejčastější je dimer **p65-p50**.
- Dimery jsou v cytoplazmě udržovány proteinem **IκB**. Tím je celá dráha udržována ve stavu klidu.
- Jako odpověď na různé signály je IκB fosforylován a následně degradován (~ β-kenin) a NF-κB uvolněn a translokován do jádra. Tam aktivuje expresi asi 150 cílových genů.
- Kináza fosforylující IκB (**IKK**) je stimulována např. TNF-α, interleukinem-1β, lipopolysacharidy, reaktivním kyslíkem (ROS), protinádorovými terapeutiky,...

Signální dráha NF- κ B



Cílové geny NF- κ B:

- Antiapoptotické: např. *bcl-2*, *IAP-1*, *IAP-2* a další.
- Pro-proliferační: např. *myc*, *cyklin D1* a další.

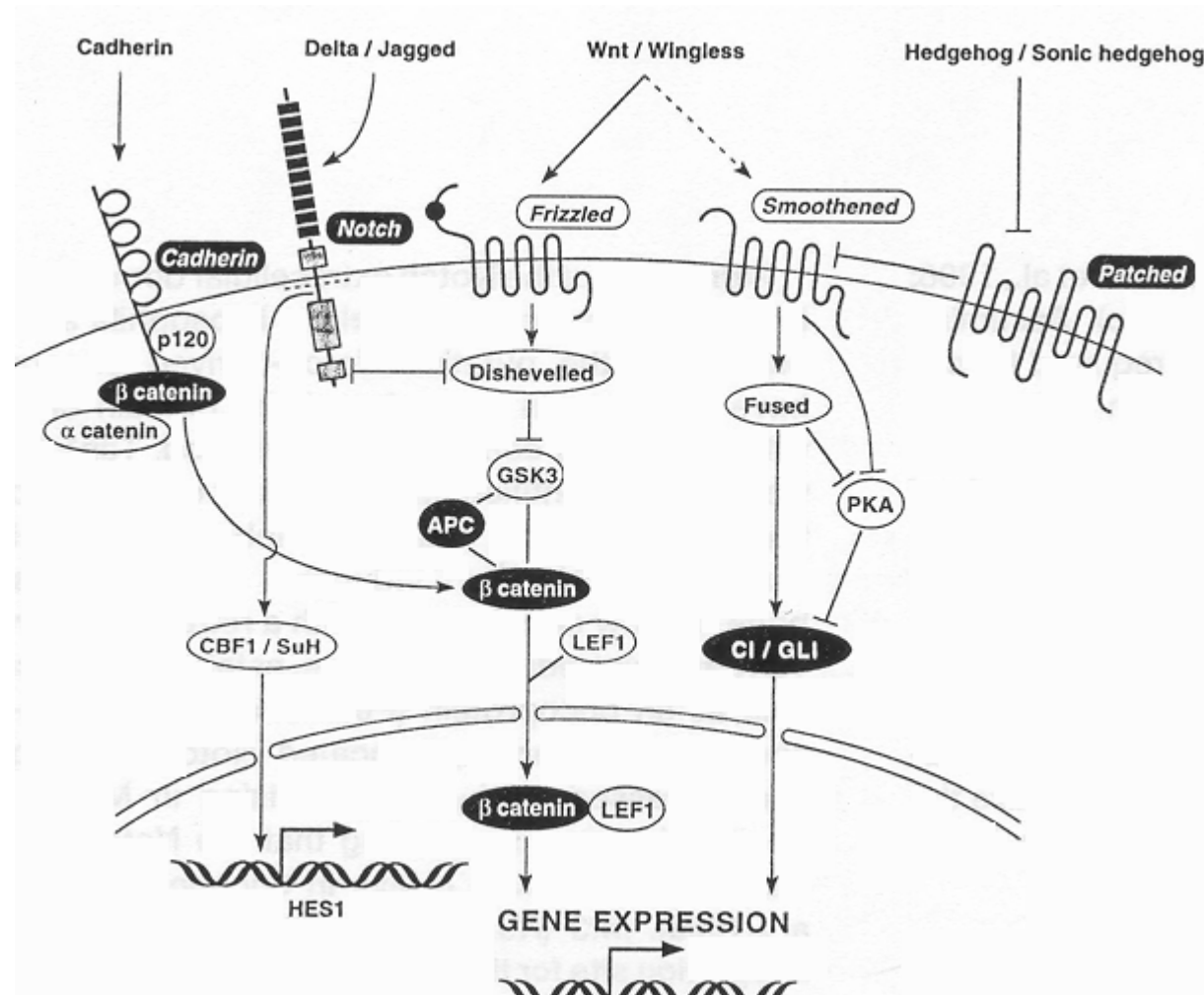
Dráha NF-κB a nádory

- U nádorů jsou mutace jednotlivých složek dráhy NF-κB velmi vzácné, ale častá je **konstitutivní aktivace dráhy** - např. u nádorů prsu.

Největší význam má tato dráha u nádorů lymfocytů:

- Asi u $\frac{1}{4}$ DLBCL **amplifikován gen *REL***, což vede asi ke 4x až 35x navýšené hladině proteinu Rel.
- **Translokace zahrnující gen *NFKB2*** je častá u B- a T-buněčných lymfomů a myelomů (nádory buněk produkujících protilátky).

Sítě onkoproteinů I



Konec

