

# Molekulární a buněčná biologie nádorů

**Prof. RNDr. Jana Šmardová, CSc.**

Ústav experimentální biologie  
Přírodovědecká fakulta  
MU Brno

**Bi9910**

pondělí 16.00 – 18.00

A11 – č. 305



**2020**

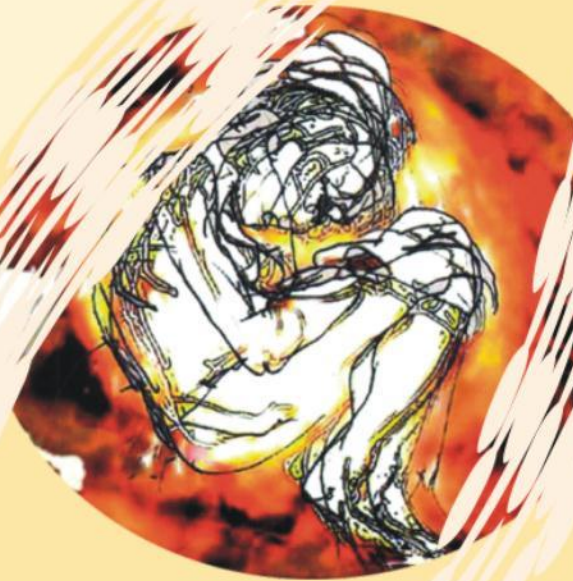
# Molekulární a buněčná biologie nádorů

## 3. Mitogenní signalizace II

**Bi9910**

pondělí 16.00 – 18.00

A11 – č. 305



**2020**

# Další typy receptorů



- Tyrozin-proteinkinázové receptory
- Receptory pracující s Janusovými kinázami
- TGF- $\beta$  receptory
- „Serpentinové“ receptory
  - GPCRs
  - Frizzled (Wnt-1/ $\beta$ -katenin)
  - Patched
- Notch
- Integriny
- NF- $\kappa$ B

# Rodina TGF- $\beta$



TGF- $\beta$  („transforming growth factor“) - alespoň 30 různých faktorů TGF $\beta$  u člověka

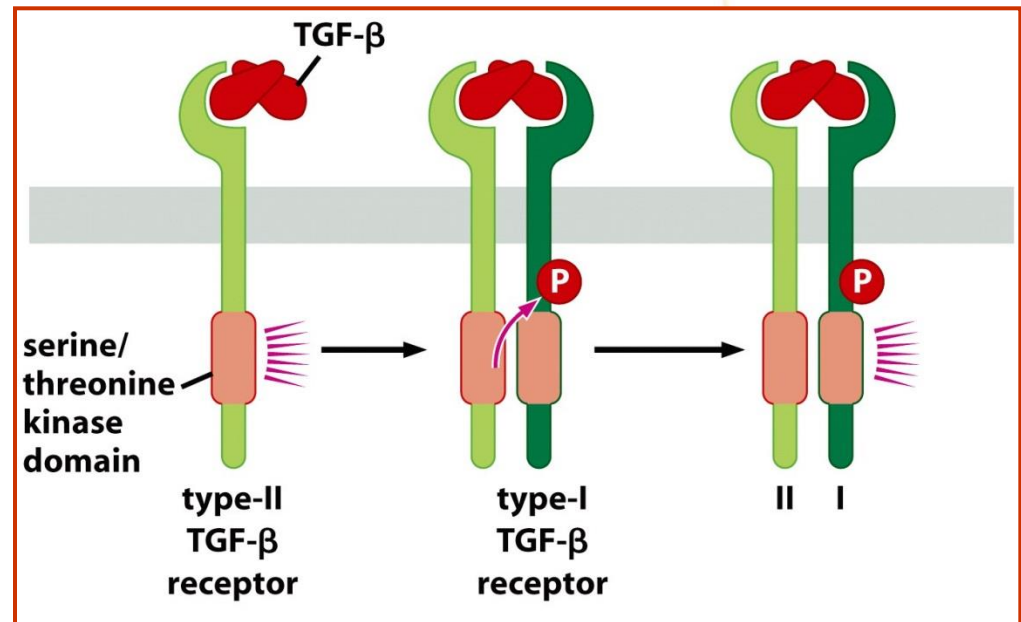
- na většinu buněk působí **inhibičně**: inhibuje růst normálních epiteliálních, endoteliálních, neuronálních, lymfoidních a hematopoietických buněk
- spíše **potencuje** invazivní vlastnosti již transformovaných, nádorových buněk odvozených z těchto tkání
- indukuje apoptózu u některých nádorových buněk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

# TGF- $\beta$ receptor

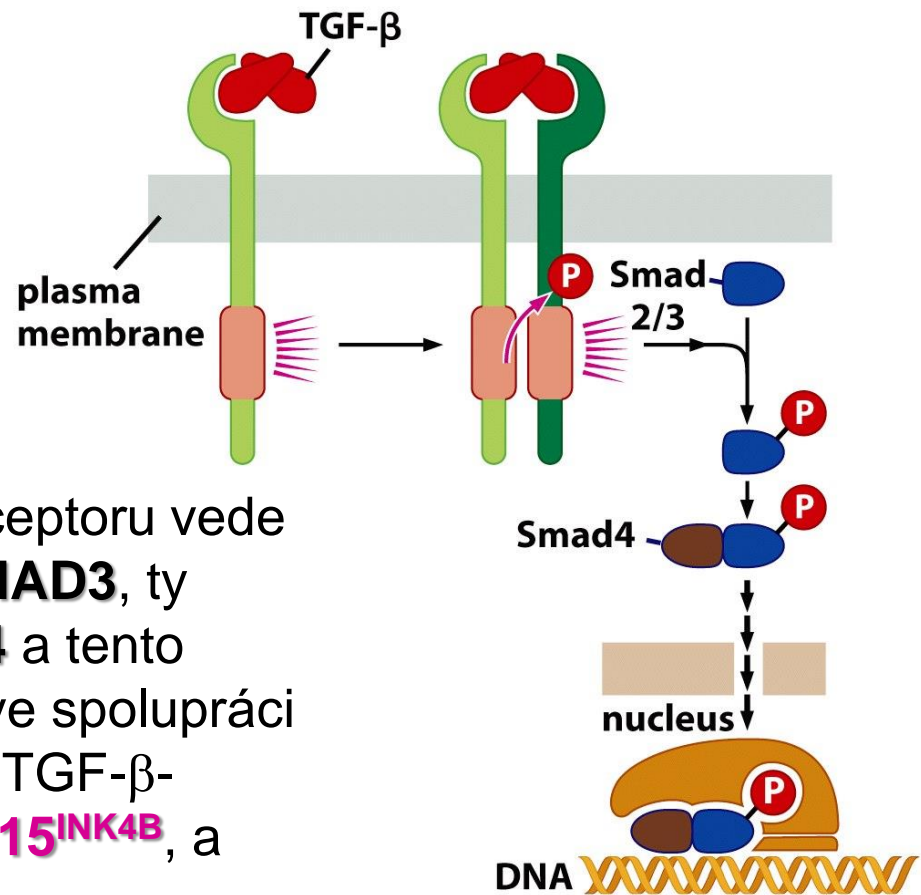


- **TGF- $\beta$ R** (typu **I** a **II**) fungují jako **heterodimery**.
- Jejich kinázová doména fosforyluje **serin** a **threonin**.

Po vazbě ligandu je podjednotka TGF- $\beta$ RII (s konstitutivně aktivní Ser/Thr kinázou) přivedena do blízkosti podjednotky TGF- $\beta$ RI, která je fosforylována, tj. aktivována. Ta následně fosforyluje cytosolické proteiny, které migrují do jádra.



# Signální dráha TGF- $\beta$



Vazba TGF- $\beta$  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- $\beta$ -cílových genů (např. **p21<sup>CIP1</sup>**, **p15<sup>INK4B</sup>**, a další).

# Dráha TGF- $\beta$ a nádory



Vyřazení dráhy TGF- $\beta$  je pro nádorové buňky velmi významné.

- 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- $\beta$ II receptor**.

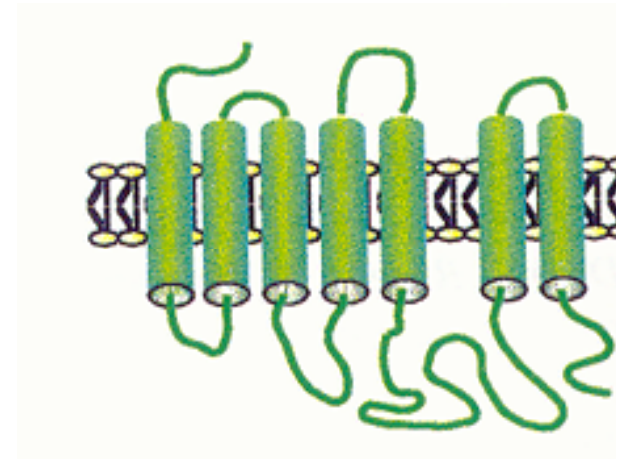
# Serpentinové receptory



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

Patří k nim:

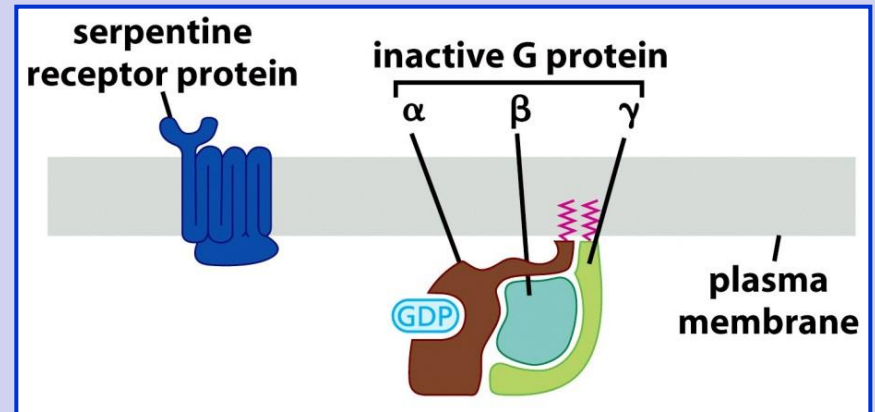
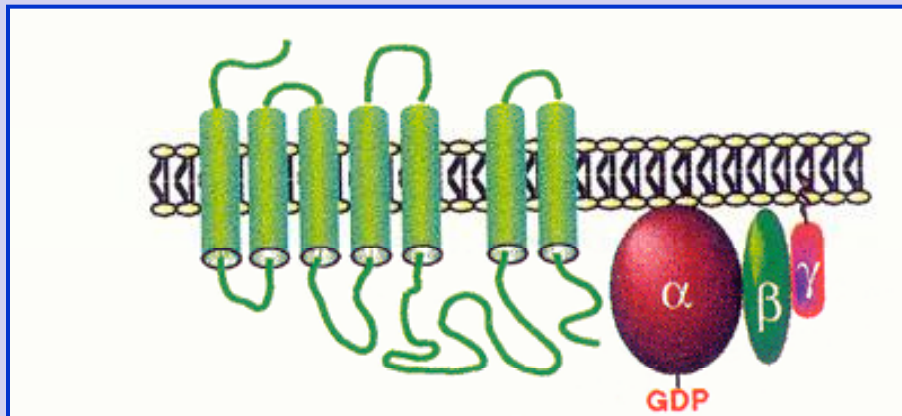
- receptory spřažené s G-proteiny
- Frizzled
- Patched





# 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.



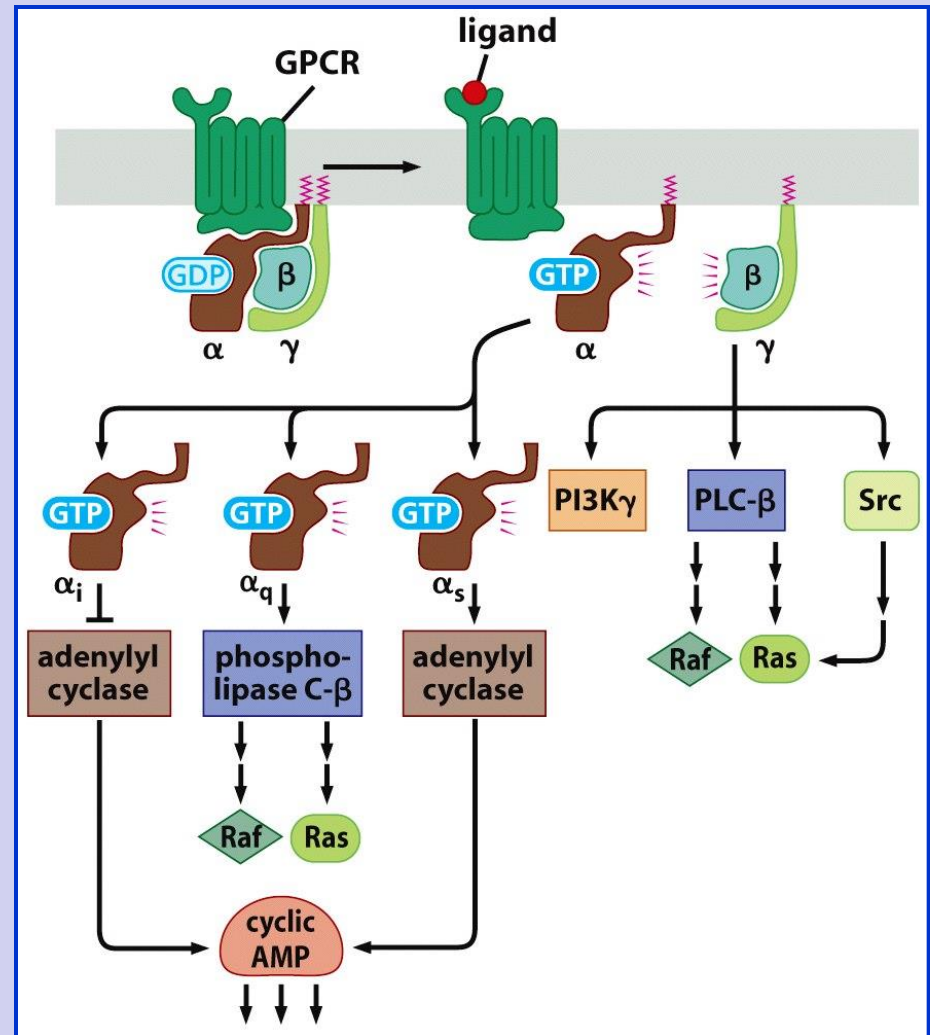
# Aktivace GPCRs

Disociovaná podjednotka  **$\alpha$ -GTP** aktivuje řadu cytoplazmatických enzymů:

- **adenylátcyklázu** (ATP  $\rightarrow$  cAMP)
- **fosfolipázu C- $\beta$**  (štěpí PIP<sub>2</sub>)
- **Src**

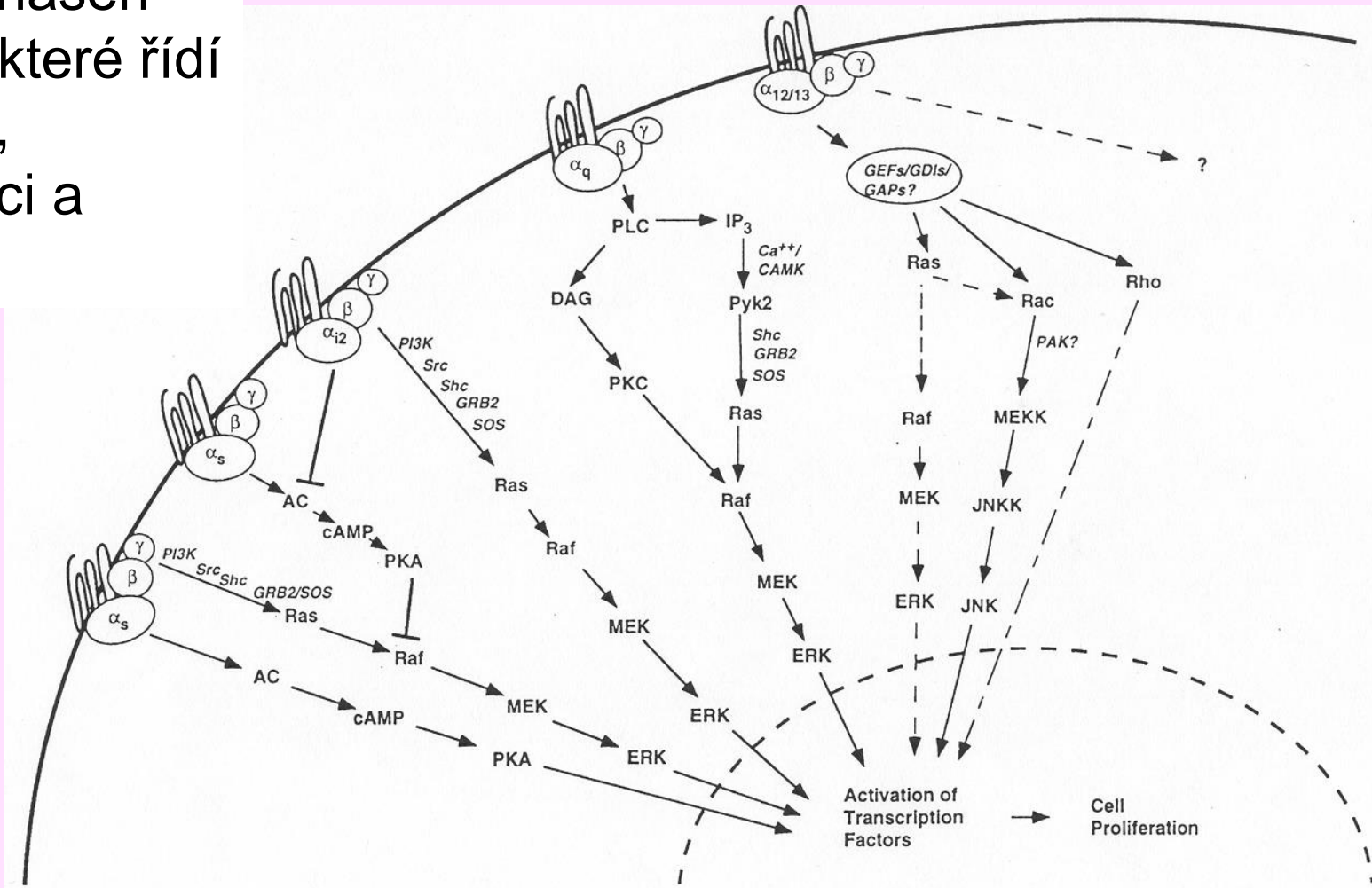
Komplexy podjednotek  **$\beta$ + $\gamma$**  zřejmě stimulují **PI3K**, **Src**.

$\Rightarrow$  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.



# Signální dráhy: Wnt/ $\beta$ -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

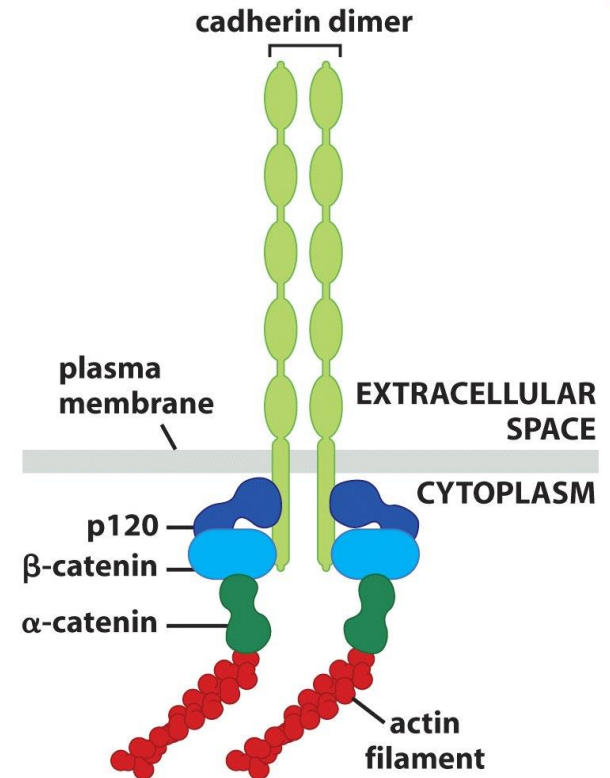
Pro většinu buněk je kaskáda RTK → Ras dominantní při zprostředkování odpovědi na mitogenní signály. Ale není jediná.

# Signální dráha Wnt/ $\beta$ -katenin



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

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

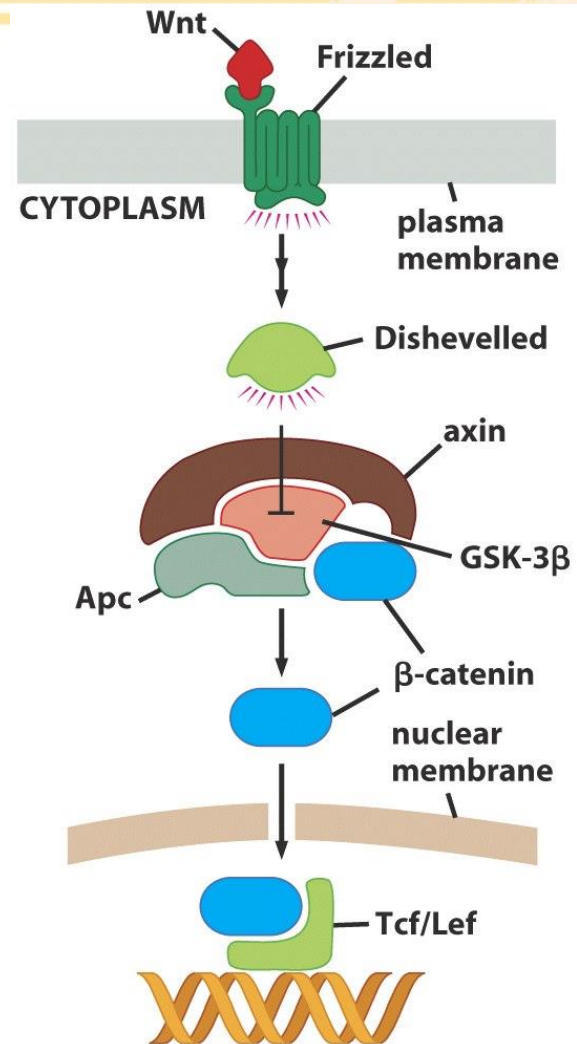


# Signální dráha Wnt/ $\beta$ -katenin

**2A.** Volný  $\beta$ -katenin se nachází v cytoplasmě (životnost asi 20 minut), funguje jako signální molekula dráhy Wnt/ $\beta$ -katenin.

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

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



# Regulace $\beta$ -kateninů



- Hladina **volného**  $\beta$ -kateninu je udržována pomocí tzv. **destrukčního komplexu**. Ten je tvořen proteiny: **GSK-3**, **Axin** a **APC**.

**Axin** a **APC** fungují jako “lešení“ destrukčního komplexu a podmiňují jeho fungování, obsahují vazebná místa pro všechny jeho součásti.

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

# Regulace $\beta$ -kateninů



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

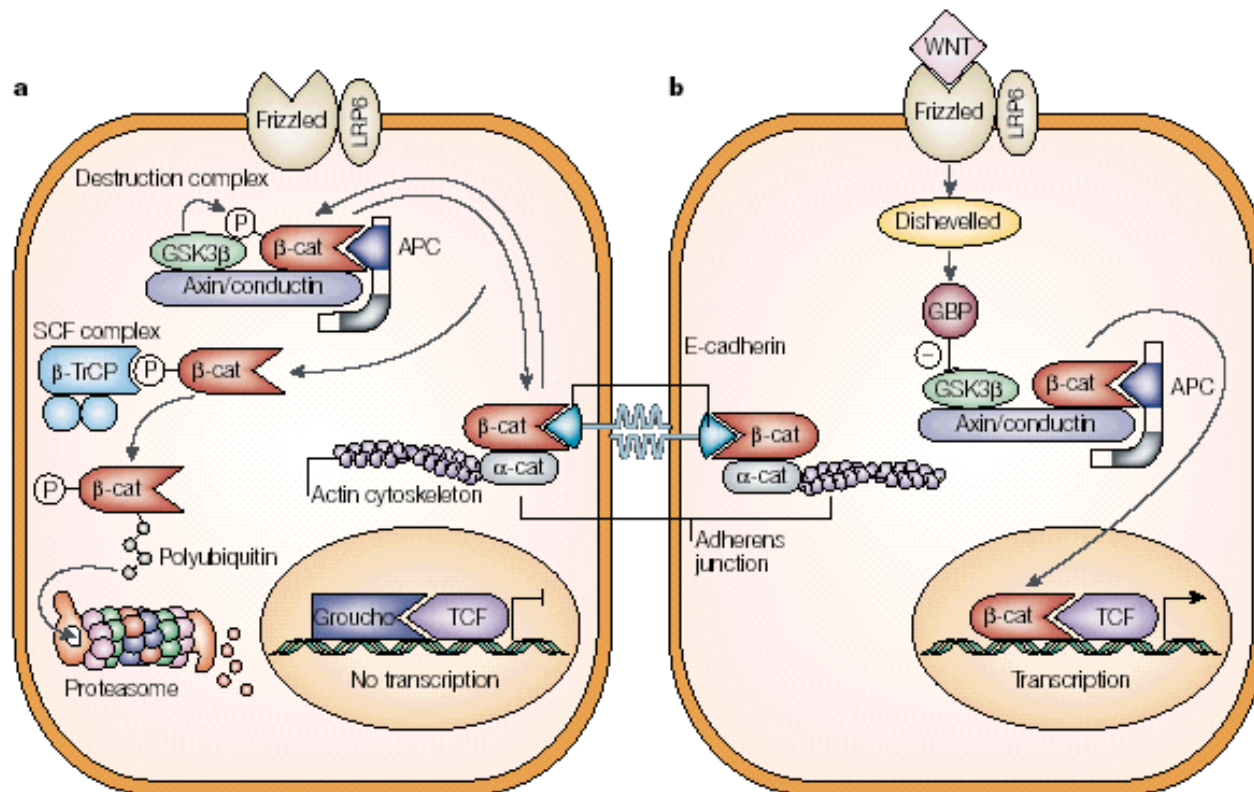


# Regulace $\beta$ -kateninů



- K cílovým genům  $\beta$ -kateninu/Tcf/Lef patří např. **c-myc** a gen pro **cyklin D1 (CCND1)**, což vede ke zvýšení buněčné proliferace.
- Signální dráha Wnt/ $\beta$ -katenin se uplatňuje během vývoje, při řízení buněčného cyklu (fluktuace  $\beta$ -kateninu během cyklu).

# Signální dráha Wnt/ $\beta$ -katenin

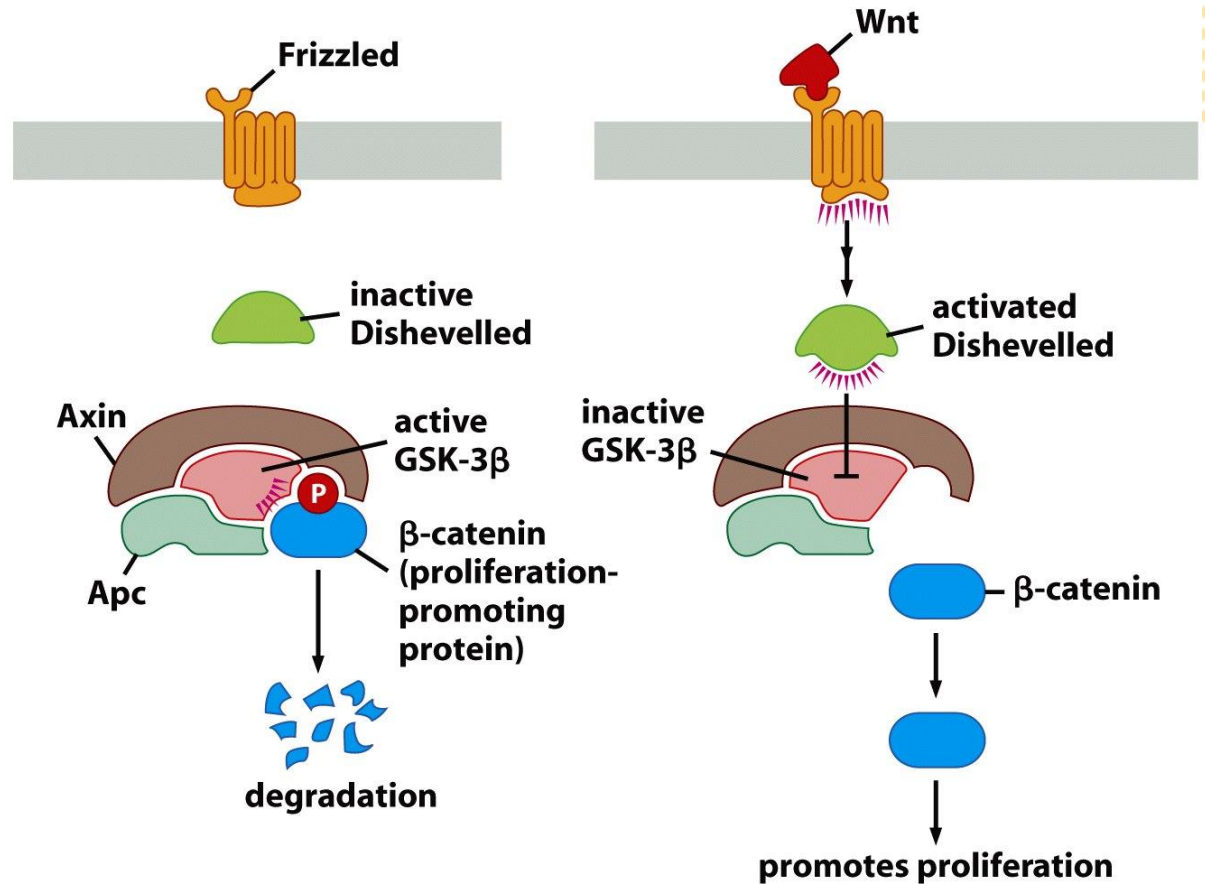


Přebytek volného  $\beta$ -kateninu je degradován, což je zprostředkováno destrukčním komplexem.

# Signální dráha Wnt/ $\beta$ -katenin



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



# Signální dráha Wnt/ $\beta$ -katenin



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

# Signální dráha Wnt/ $\beta$ -katenin a nádory



- Zvýšená exprese **Wnt-1** se podílí na vzniku nádorů prsu.
- Mutace **APC** znemožňující vazbu APC na  $\beta$ -katenin nebo vazbu APC na axin způsobují konstitutivní aktivaci  $\beta$ -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  $\beta$ -katenin, byly nalezeny u některých hepatocelulárních nádorů.
- Mutace  **$\beta$ -kateninu** buď odstraňují serin nebo mění serin na jinou aminokyselinu, což znemožňuje fosforylaci GSK-3 $\beta$  a odbourávání  $\beta$ -kateninu. Např. v nádorech prostaty, jater střeva, dělohy, vaječníků, melanomů.
- Mutace  $\beta$ -kateninu se vyskytují i u kolorektálního nádoru, obvykle ne zároveň s mutacemi APC (**princip exkluzivity**).

# Regulace $\beta$ -kateninů Siah-1

Později popsán další nezávislý mechanismus odbourávání  $\beta$ -kateninu: zprostředkovaný proteinem **Siah-1**.

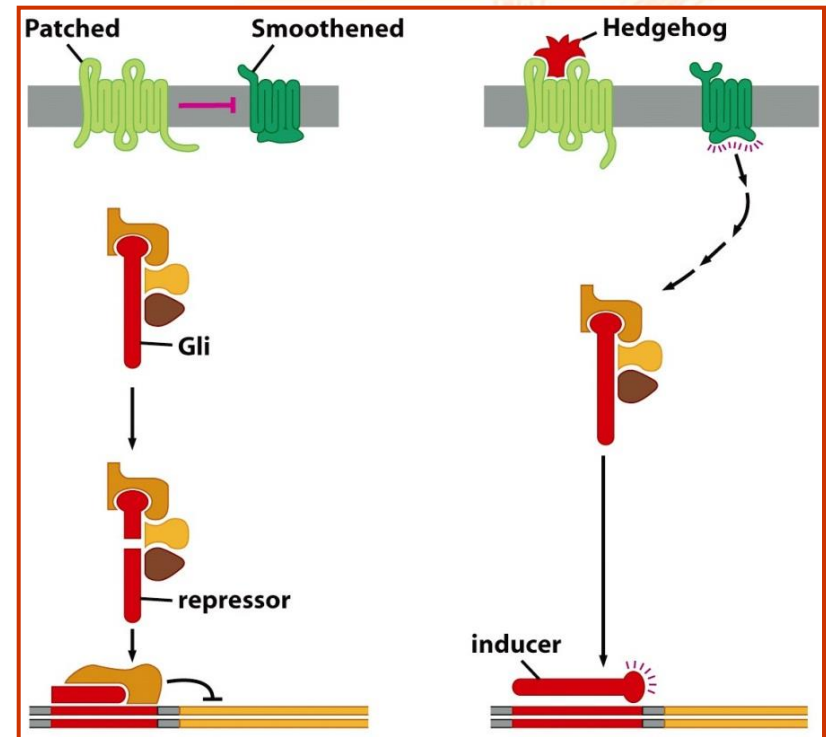
- Tato dráha může odbourávat i onkogenní formy  $\beta$ -kateninu, které nejsou odbourávány Wnt signalizací.
- Tato dráha je také závislá na funkčním APC.
- !! Většina mutací APC jsou delece té části molekuly, která odpovídá za vazbu axinu a Siah-1 !!
- Tato dráha funkčně spojuje **p53** a  $\beta$ -katenin: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

# Signální dráha Hedgehog/Patched/Gli



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

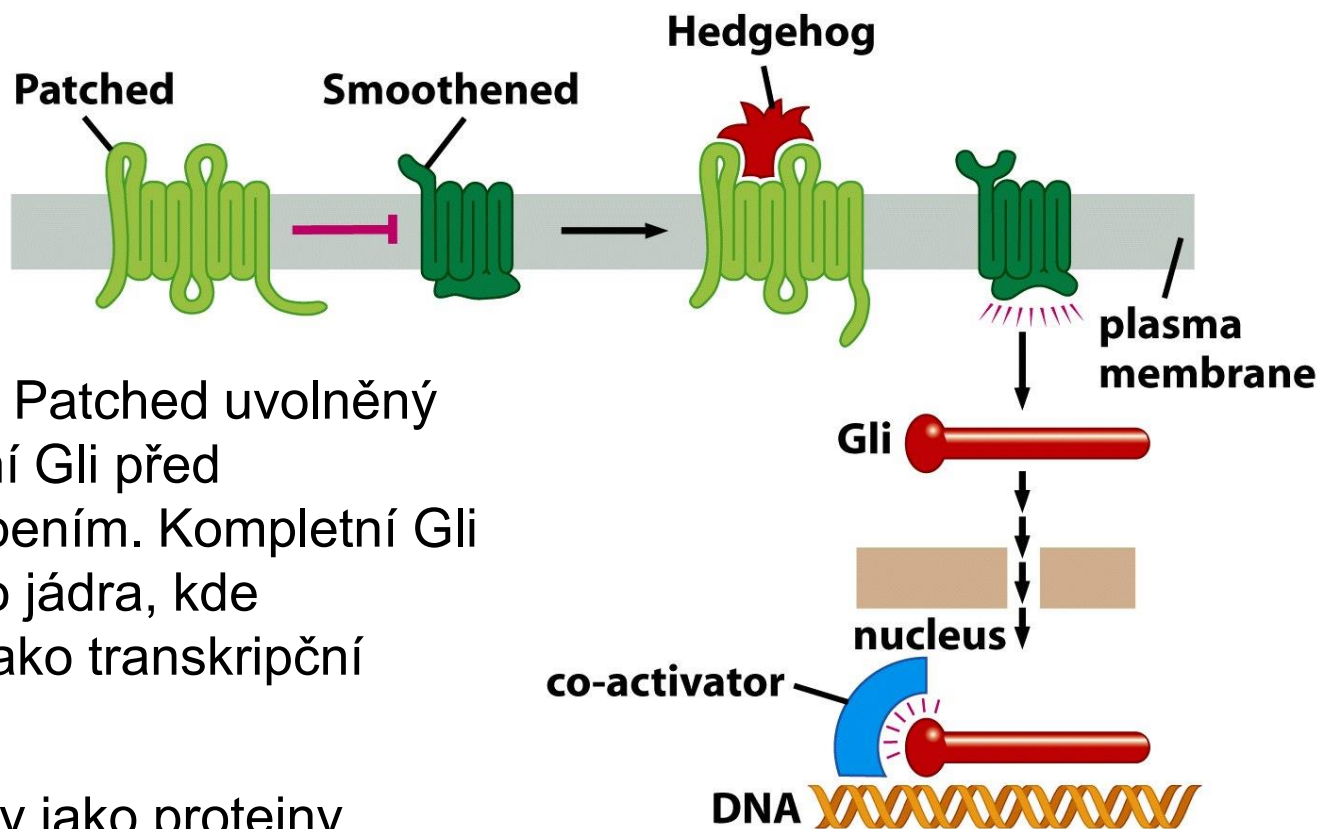
**SHH** (**S**onic **h**edgehog) inhibuje receptor **Patched** (**Ptc** - **n**ádorový **s**upresor), který normálně inhibuje receptorový komplex **Smoothened** (**Smo** - **o**nkogen). Inhibice Ptc tedy aktivuje Smo, což vede k aktivaci TF **Gli**.



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.

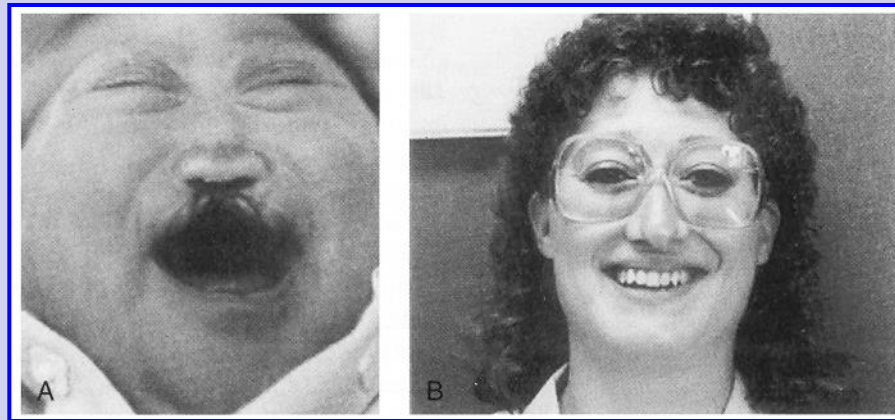
Nefyziologická **aktivace** dráhy může vést k vývoji **nádorů**, a to sporadických a také familiálních.

- 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 morfogén**: 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.

# Vsuvka: Holoprozencefalie



Variabilní expresivita mutace genu SHH: matka a její dcera:

A: dcera těžce postižena mikrocefálií, hypotelorismem a rozštěpem patra

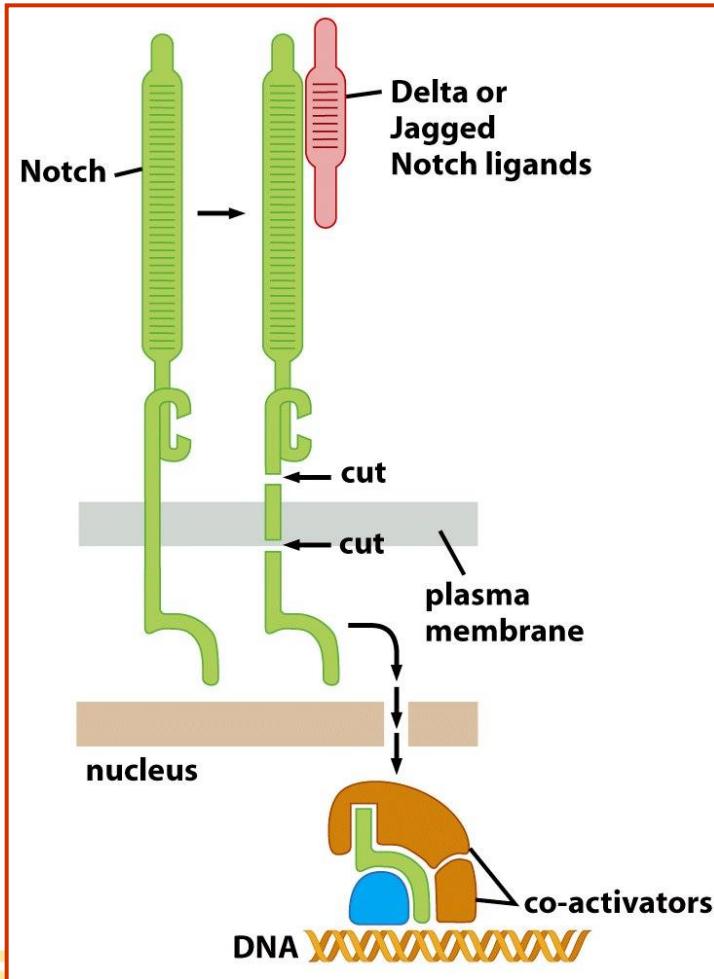
B: matka – pouze jeden centrální řezák

# Signální dráha Notch



- Hraje klíčovou roli ve vývoji embryonální vaskulatury a v angiogenezi.
- 1919 – popsány „notches“ – vroubky/zářezy na křídlech Drosophily.
- **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



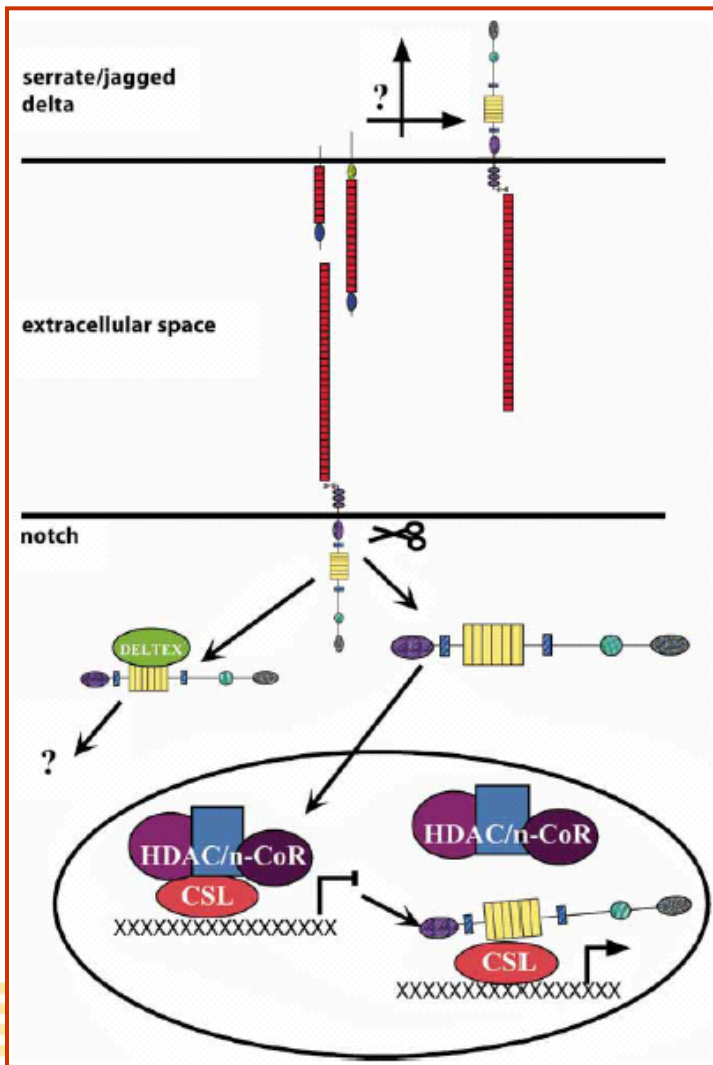
- Po vazbě ligandu (Notch L, Delta, Jagged) dojde ke dvěma proteolytickým štěpením receptoru Notch: 1x v extracelulární doméně, 1x v transmembránové doméně. \*
- Tím je uvolněn cytoplazmatický fragment z ukotvení v membráně a migruje do jádra, kde spolu s partnerskými proteiny funguje jako transkripční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

# Receptory Notch



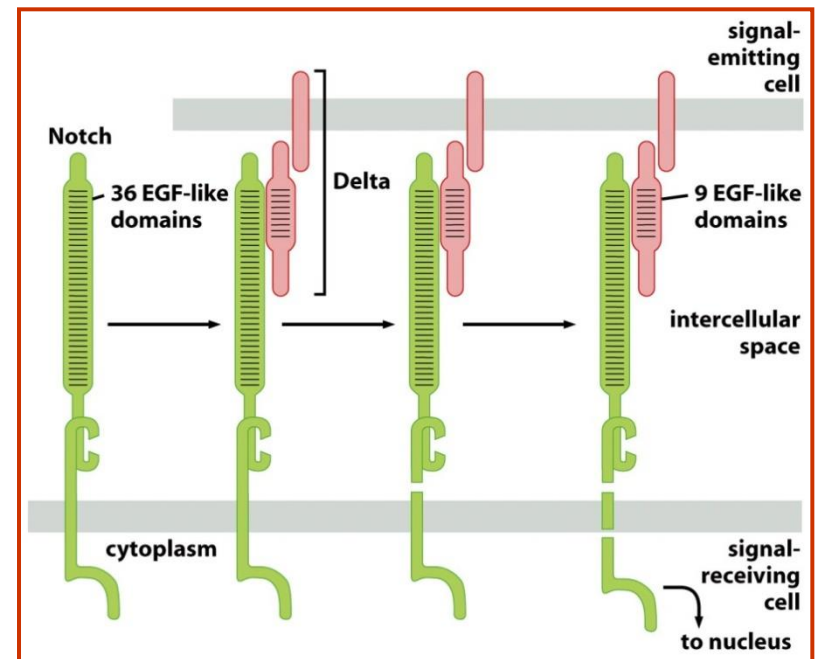
- \* receptory Notch fungují zcela jinak než např. RTK:
  - vždy po vazbě ligandu dojde k **ireverzibilní** přeměně receptoru (proteolytickým štěpěním)  $\Rightarrow$  každá receptorová molekula signalizuje **pouze 1x**
  - receptory Notch **nemohou amplifikovat signál** jako např. RTK

# 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

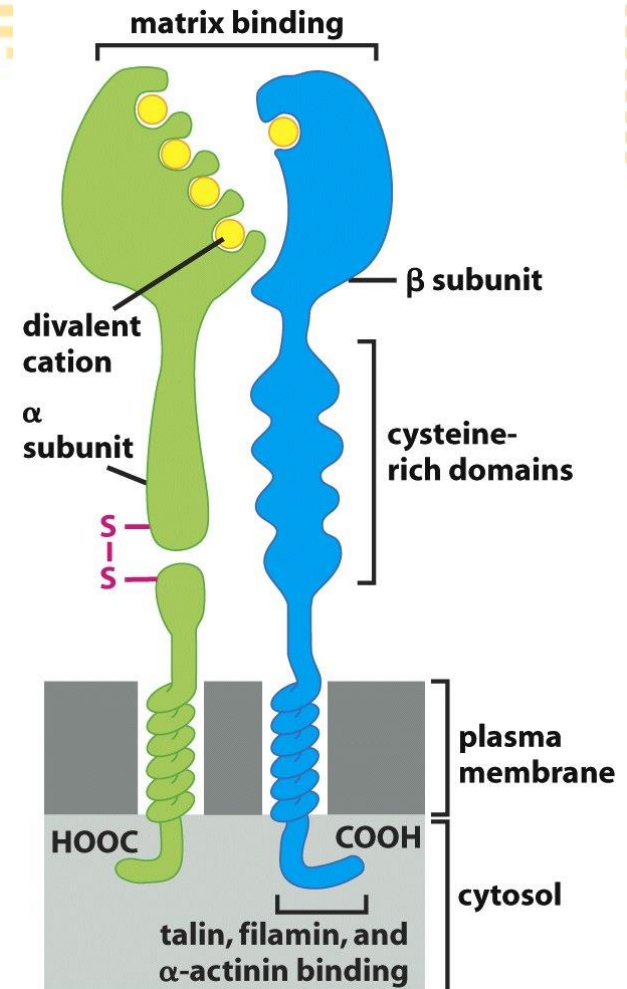


**Integriny** jsou povrchové receptory, které zprostředkovávají (1) buněčnou adhezi k extracelulární matrix a k ostatním buňkám.

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.

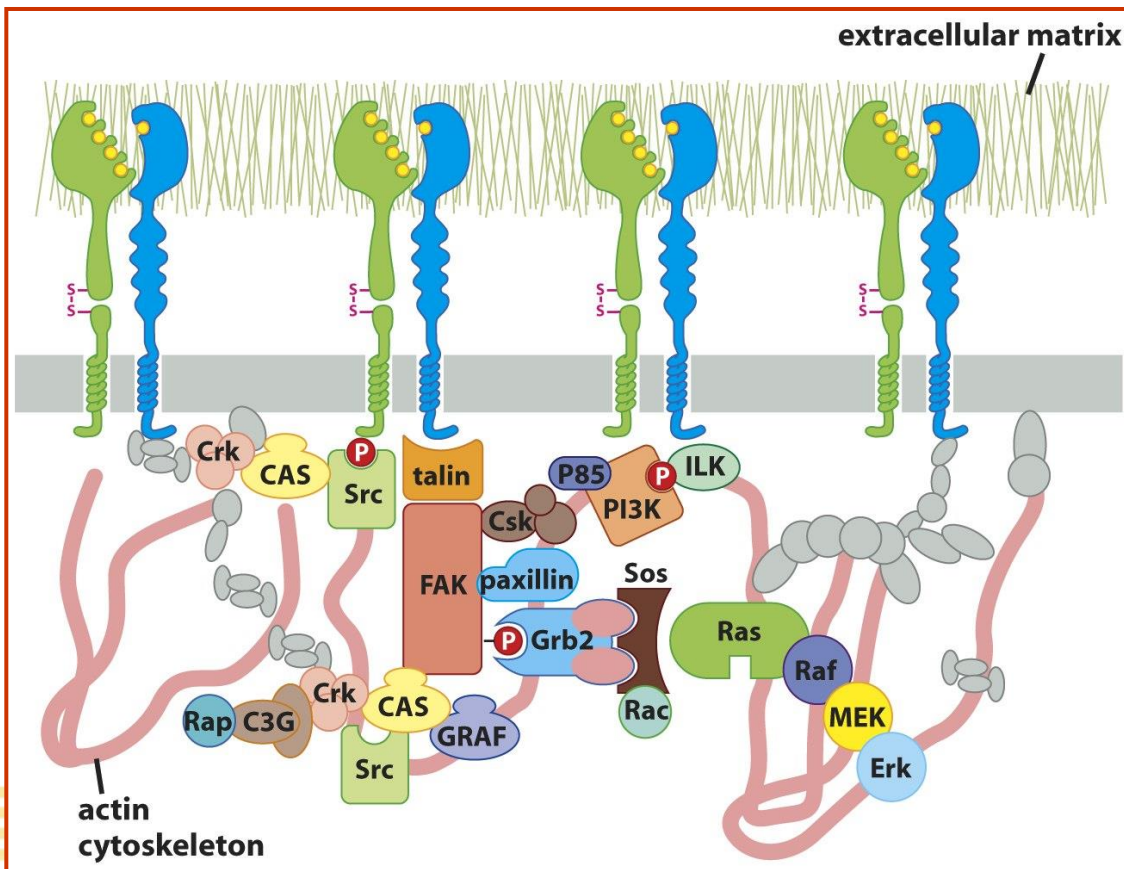
Tvořeny velkou extracelulární doménou (vazba ligandu), krátkou transmembránovou doménou a různě dlouhou cytoplazmatickou C-koncovou doménou.



# Co umí integriny

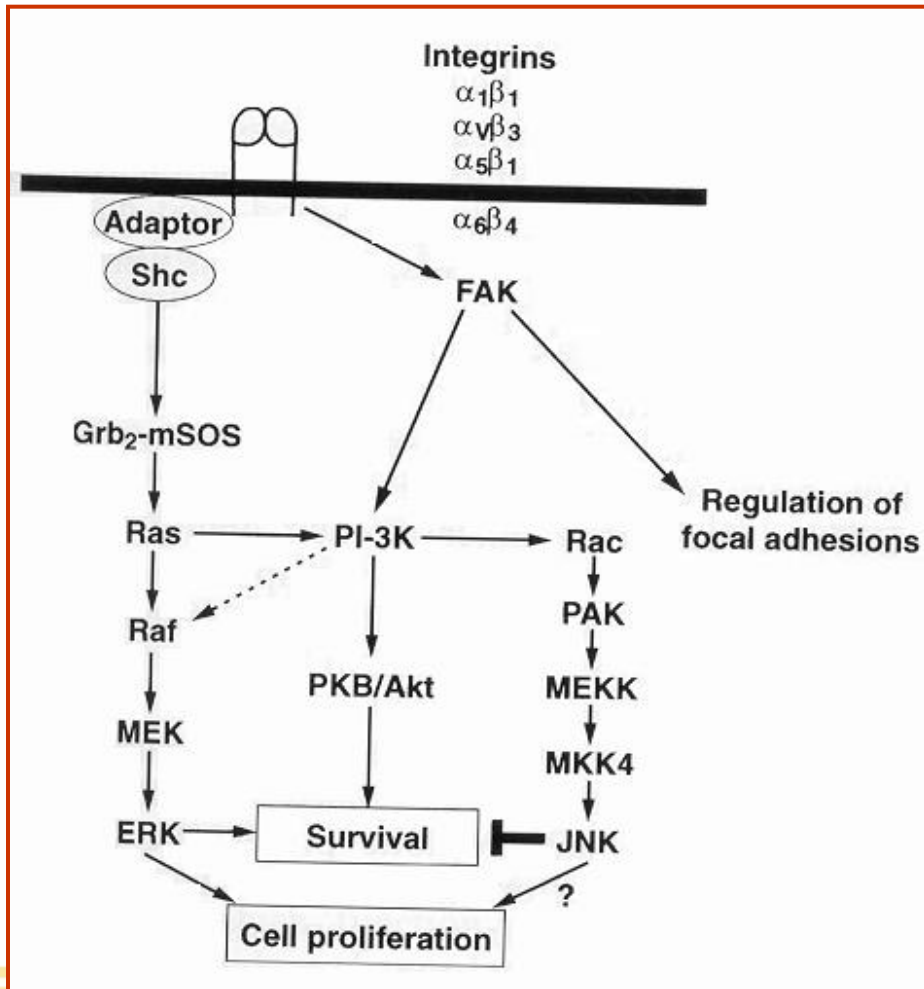


Buňka neustále monitoruje své úspěšné přichycení na složky ECM (**anoikis**). Následně jsou do cytoplazmy uvolňovány signály přežití, což snižuje pravděpodobnost indukce apoptózy.



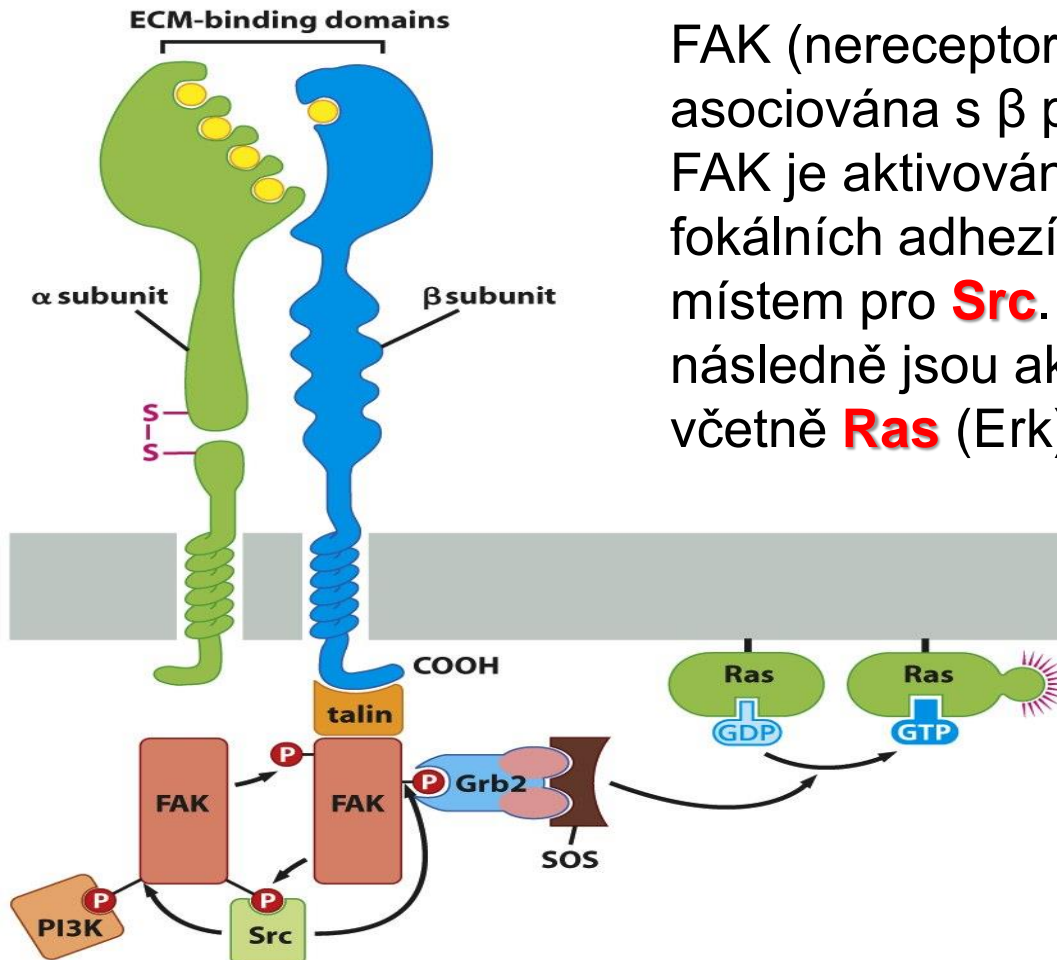
- fyzicky interagovat s ECM
- ovlivňovat uspořádání cytoskeletonu
- signalizovat dovnitř buňky
- signalizovat zevnitř buňky ven: o přichycení na jiné složky ECM
- umožňují pohyb buňky postupnou tvorbou a rušením vazeb na ECM

# 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  $\beta$  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).

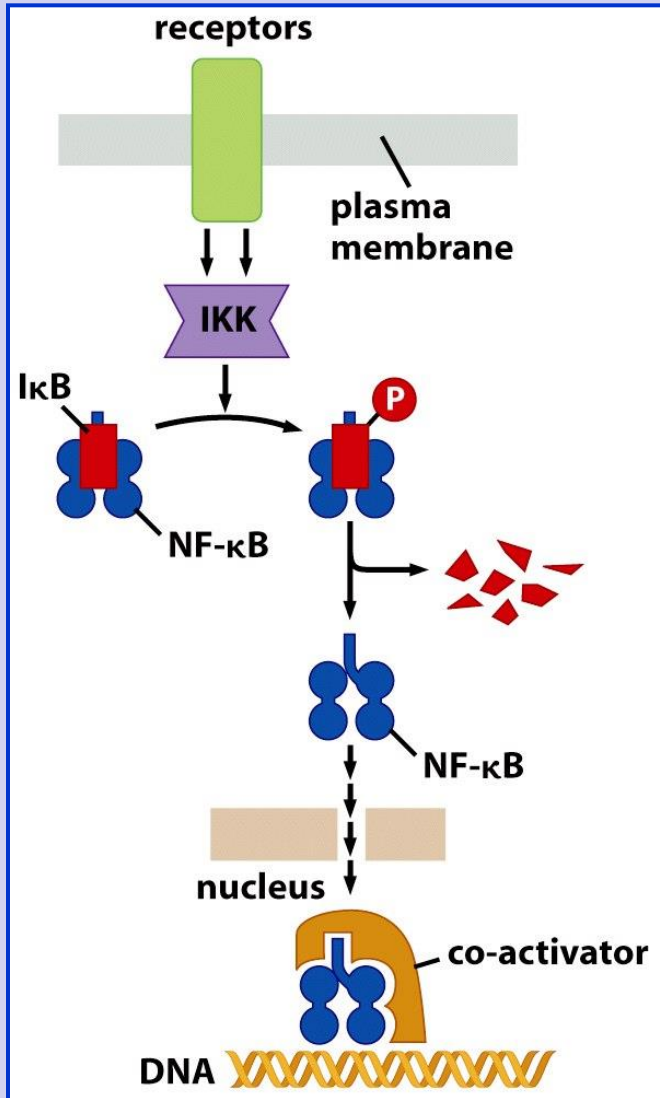
Onkogenní aktivace Ras tak mimikuje stav, kdy buňka dostává informace o úspěšném ukotvení na ECM – i bez tohoto ukotvení.

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

# 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 cytoplasmě. Nejčastější je dimer **p65-p50**.
- Dimery jsou v cytoplasmě 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-κB



## Cílové geny NF-κB:

- Antiapoptotické: např. *bcl-2*, *IAP-1*, *IAP-2* a další.
- Pro-proliferační: např. *myc*, *cyklin D1* a další.
- **Klíčová úloha NF-κB při regulaci zánětu!**
- **Antagonista p53!**



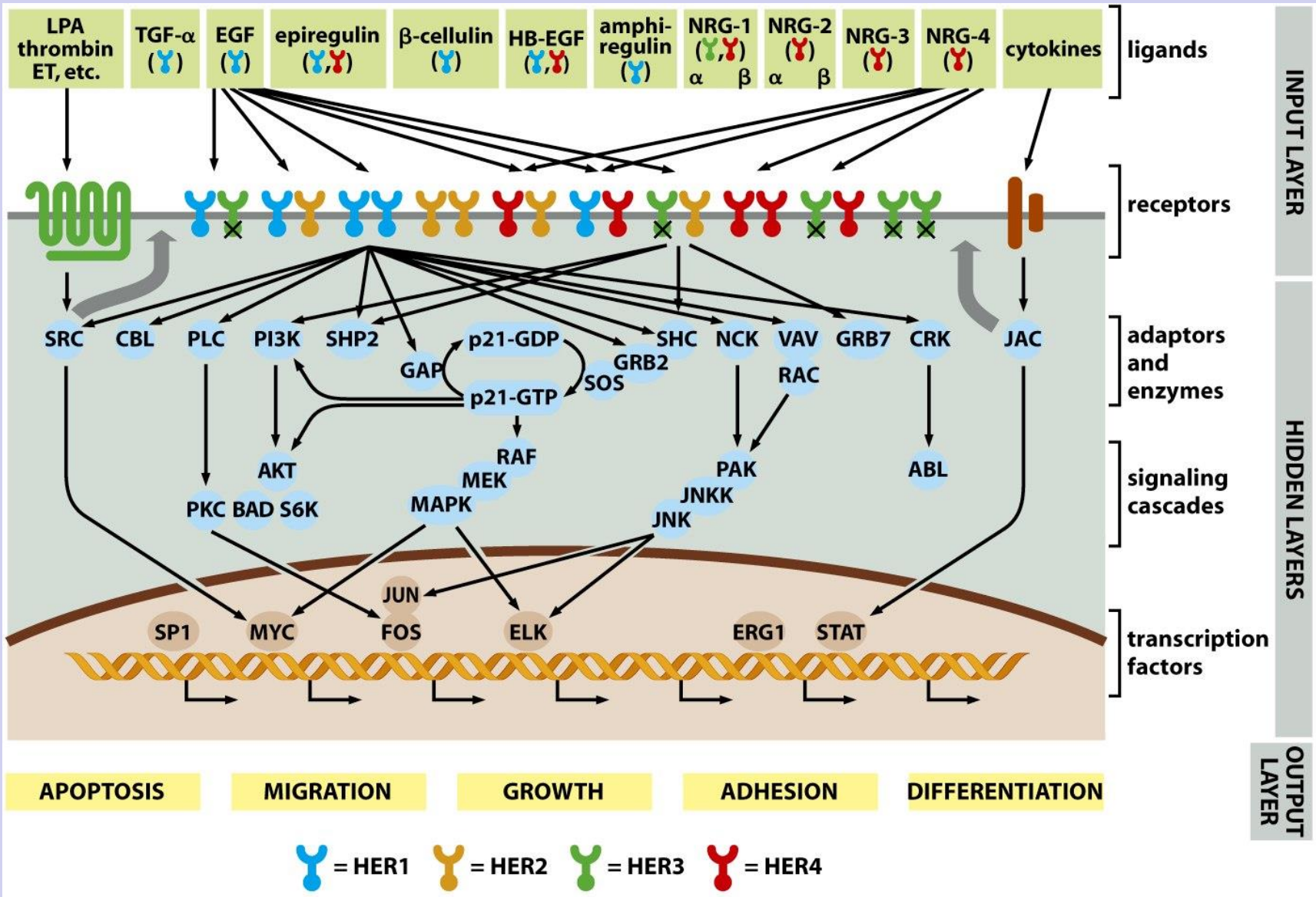
# Dráha NF-κB a nádory

- 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 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)

# Signální síť...



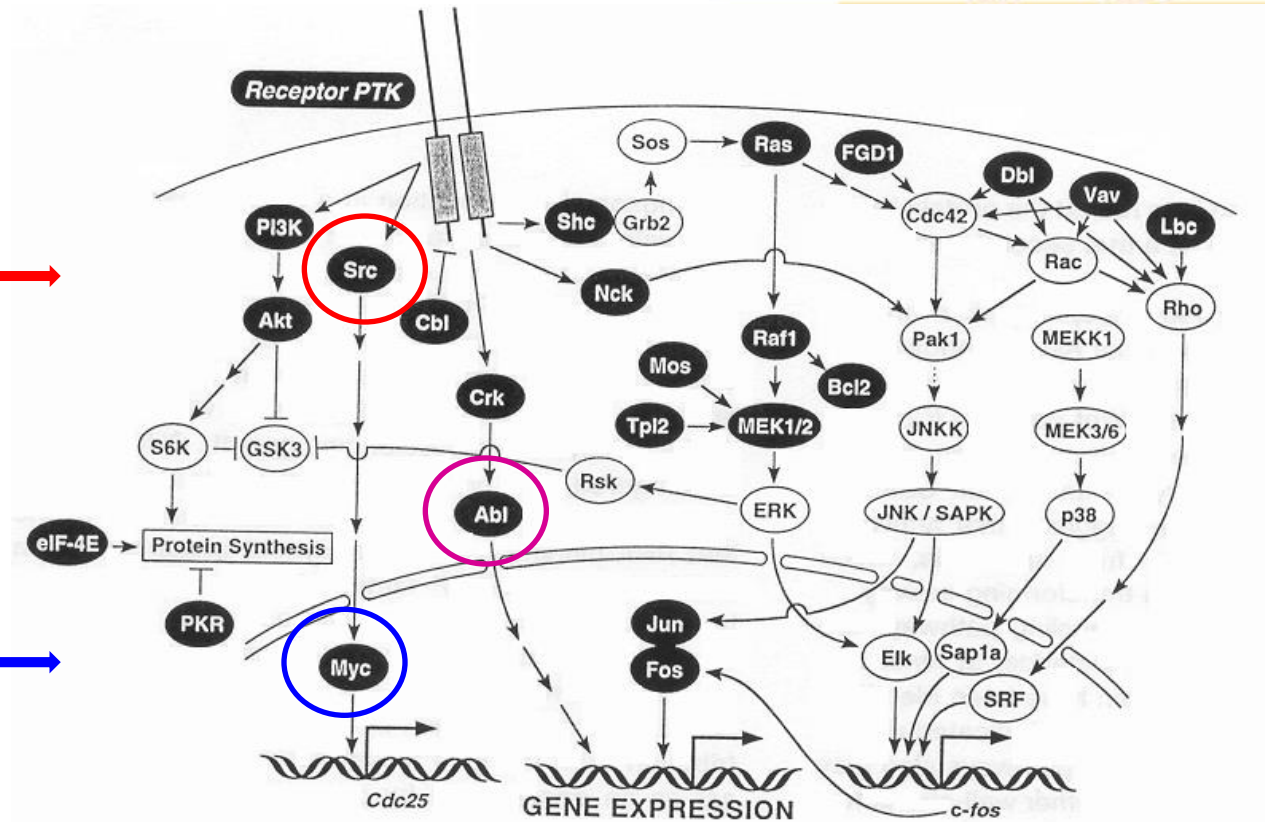
# Signální sítě...



cytoplazmatický  
přenašeč



transkripční  
faktor



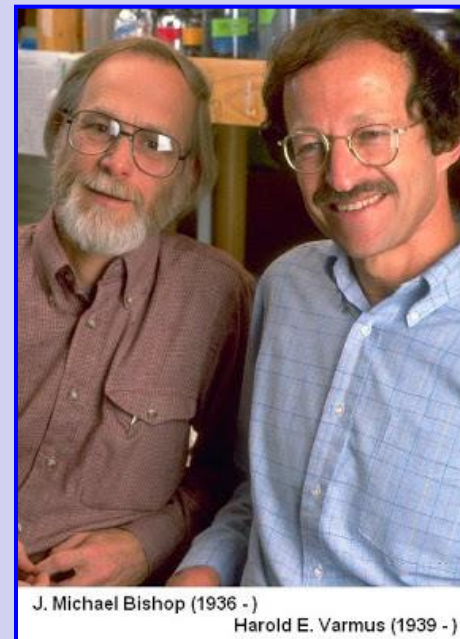
# Protoonkoprotein Src - pp60<sup>c-src</sup>



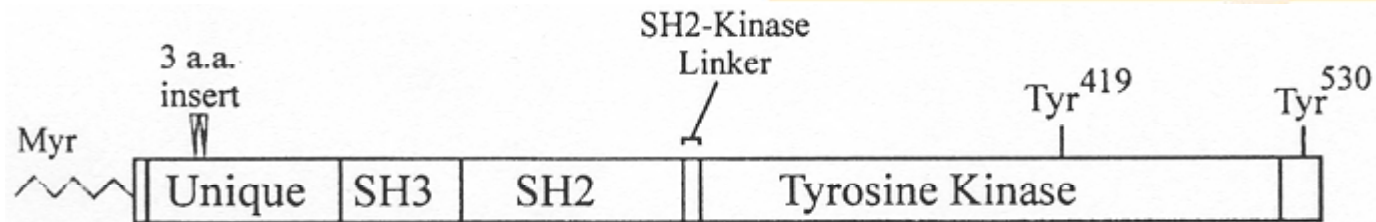
- **První** popsáný buněčný analog virového onkoproteinu v-Src, obsaženého ve viru Rousova sarkomu (1909 - Peyton Rous) - pp60<sup>v-src</sup>. Jeden z prvních objevených protoonkogenů, ale až v roce 1999 (tedy po více než 25 letech!) nalezeny mutantní varianty (asi u 12% pokročilých CRC)
- Nereceptorová (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**.

# Objev protoonkogenu *c-src*

- 1979: **J. Michael Bishop** a **Harold E. Varmus** objevili, že kuřata mají gen, který je strukturně blízce příbuzný onkogenu *v-src*
- značen jako cellular – *c-src*
- 1989: Nobelova cena



# 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.

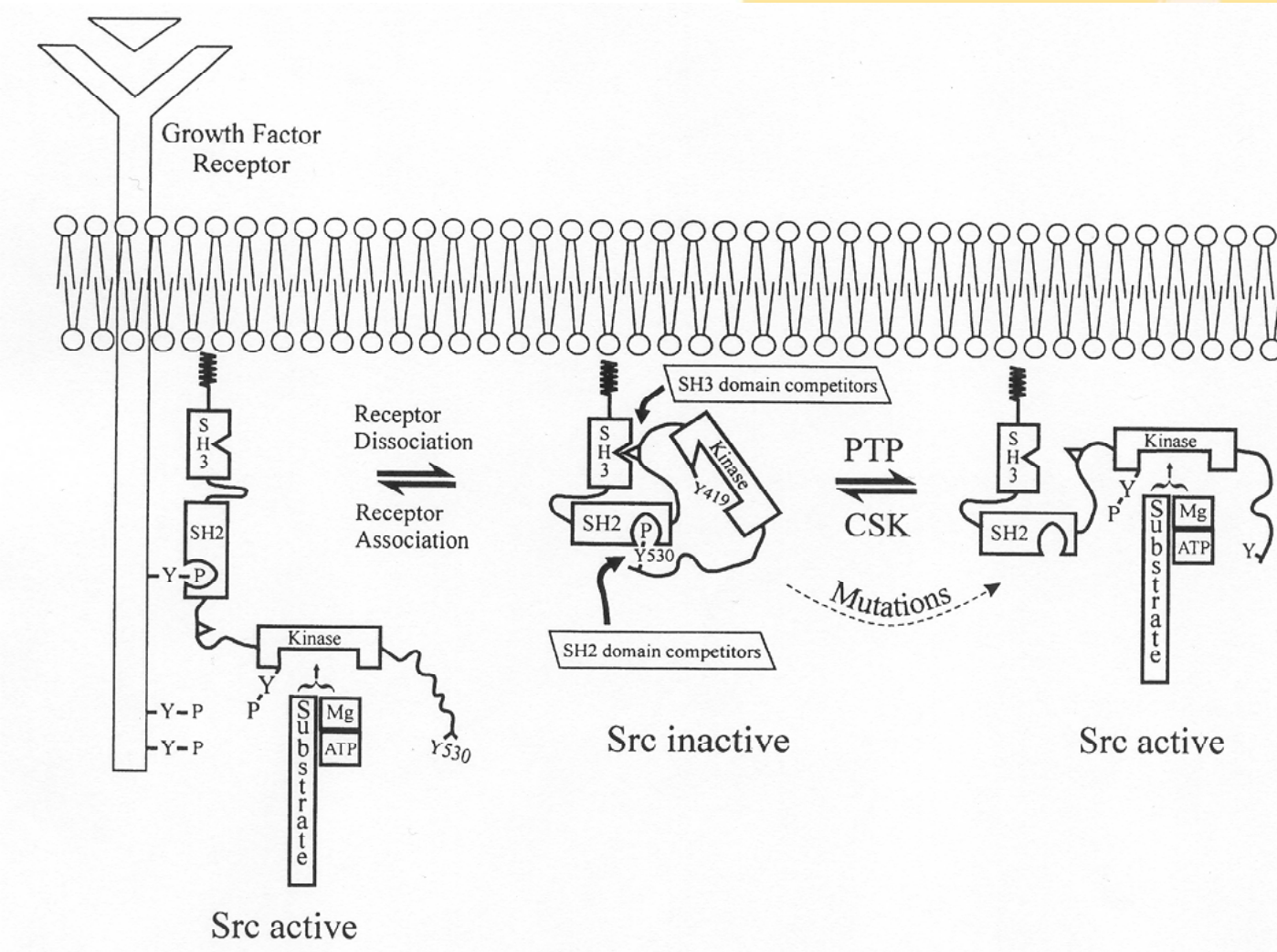


# Aktivace c-Src

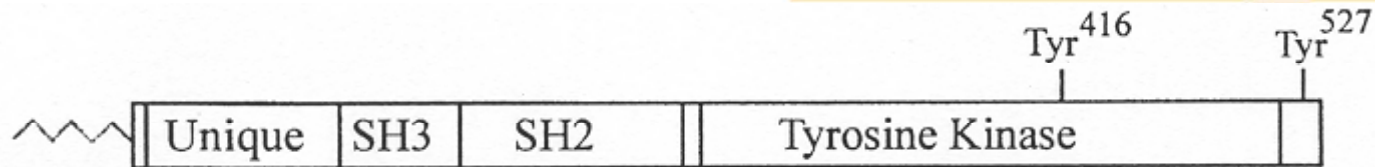


- V inaktivním stavu (Tyr 530/527 fosforylován) je vytvořena interakce mezi C-koncem a SH2 doménou a dále mezi SH3 doménou a SH2 linkerem, Tyr 419/416 obvykle defosforylován.
1. Defosforylace Tyr 530/527 způsobí uvolnění interakcí C-konce s doménou SH2 a Tyr 419/416 může být autofosforylován, a tím aktivován.
  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

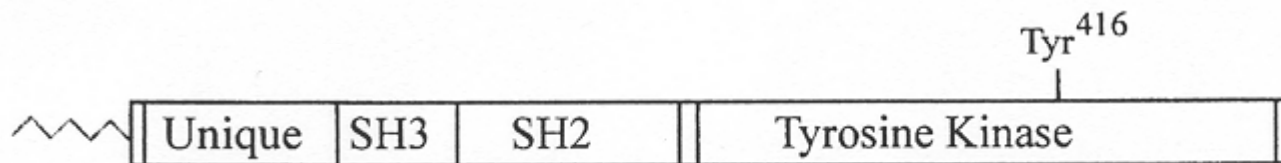


# Porovnání struktury kuřecího c- Src a RSV v-Src



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.

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:

- Cytoplazmatická 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, progrese buněčného cyklu.
- Jádro - regulace buněčného cyklu.

# c-Src a nádory

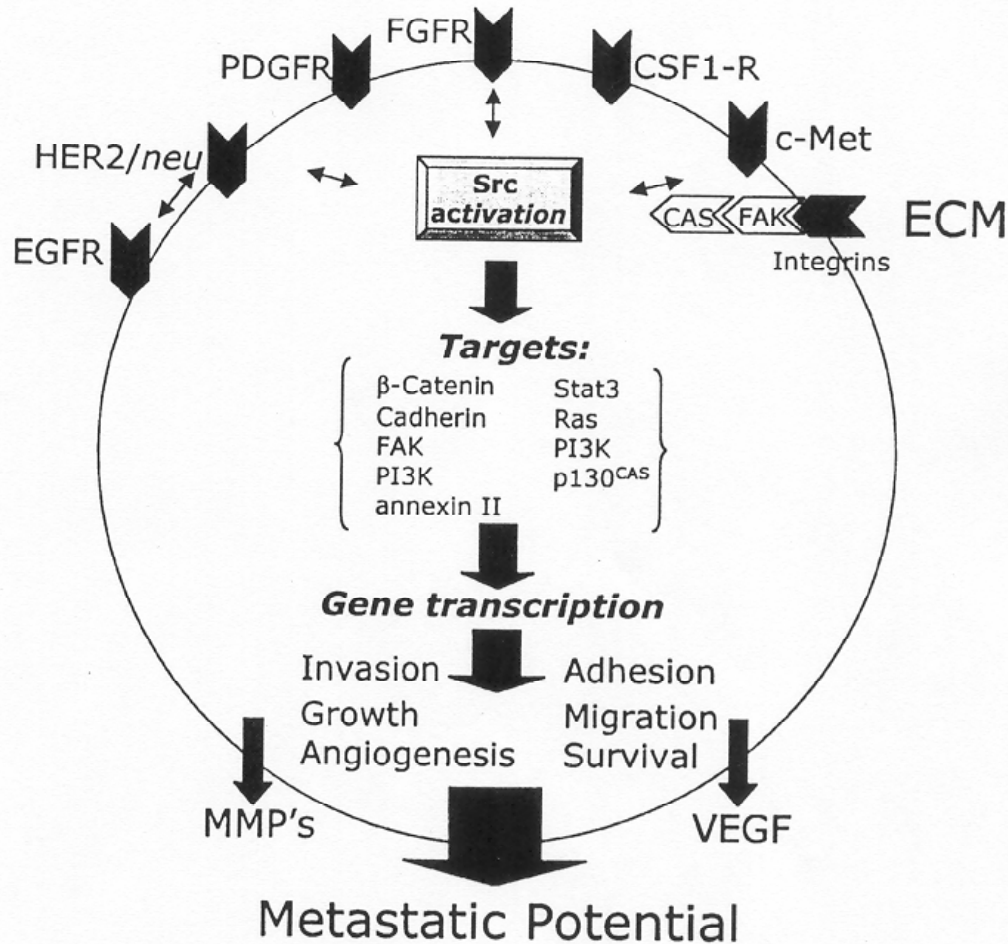


**Hladina proteinu** a ještě více **aktivita Src** jsou často **zvýšeny** v nádorových buňkách ve srovnání s normálními buňkami a tyto hladiny rostou se stupněm malignity.

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



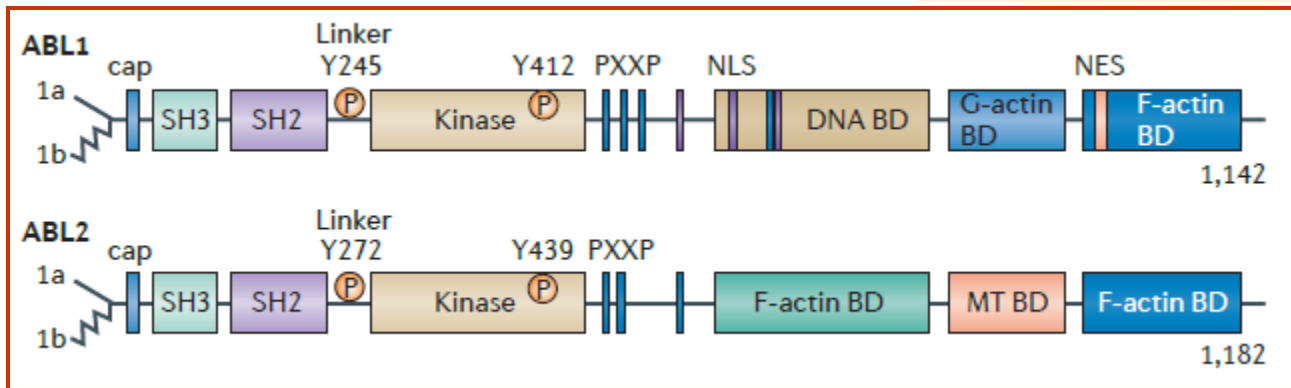
# Protonkoprotein ABL



- 1980: virový onkogen (**v-*abl***) Abelsonovy myší leukemie
  - všeobecně exprimovaná **nereceptorová tyrozinkináza**
  - člověk (savci): 2 geny ***ABL1*** a ***ABL2*** (více izoform): regulují překrývající se (redundantní) i jedinečné funkce v různých buněčných typech, asi 90% homologie N-konce
    - propojuje nejrůznější extracelulární i intracelulární signály se signálními drahami, které řídí růst, přežívání, invazi, adhezi a migraci buněk
    - některé specializované funkce ABL: signalizace antigen receptorů u lymfocytů, tvorba synapsí u neuronů, adheze bakterií buněk střevního epitelu,...
- ⇒ mnoho **tkáňově-specifických** a **kontext-dependentních** funkcí



# Struktura proteinu ABL



## N-konec:

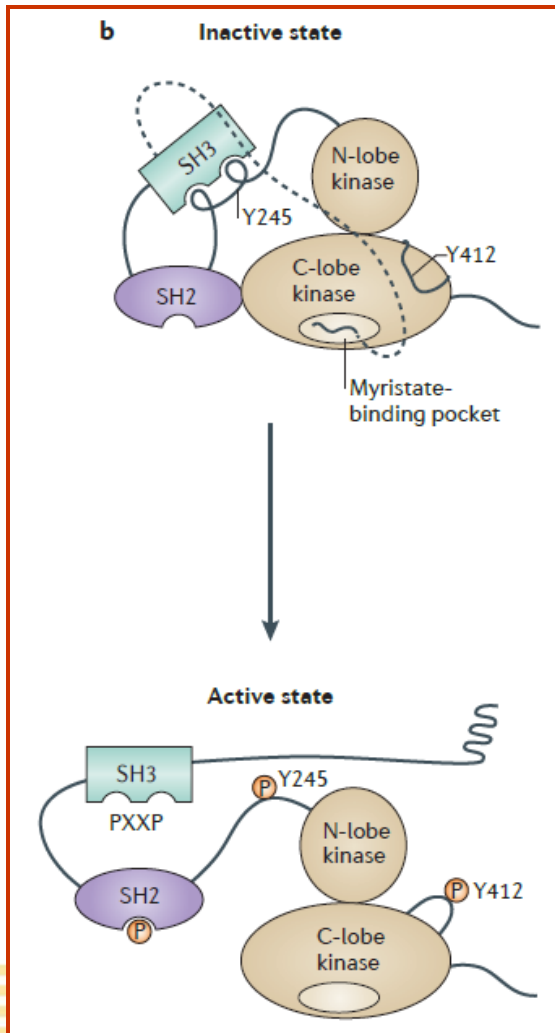
- SH3 a SH2 domény
- kinázová doména

## C-konec:

- doména vázající aktin (ABD)
- 3 NLS – import do jádra (pouze ABL1; ABL2 je lokalizována v cytoplasmě)
- NES – export z jádra (vazbou na exportin-1)

→ *shuttling*

# Regulace proteinu ABL



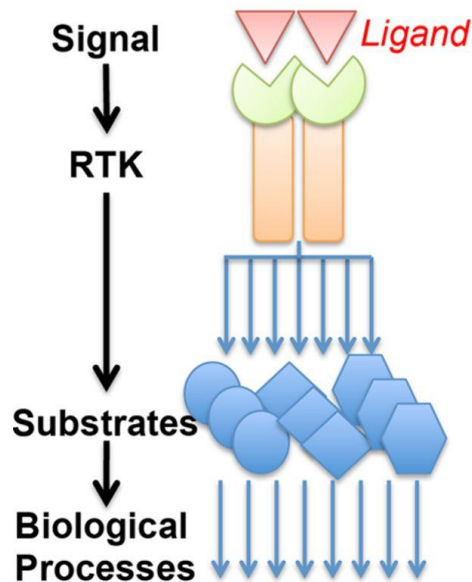
Katalytická aktivita je regulována:

- intermolekulárními interakcemi (např. stimulující interakce s adaptorovými proteiny RIN1, které interagují s SH3 a SH2)
- intramolekulárními interakcemi (**b**): autoinhibice zahrnující SH2 a SH3 domény, blokuující aktivitu kinázové domény
- posttranslačními modifikacemi (fosforylace tyrozinových zbytků Y412 a Y245 / Y272<sup>ABL2</sup>: snižují stabilitu proteinu ABL, vedou k ubikvitinaci a degradaci)

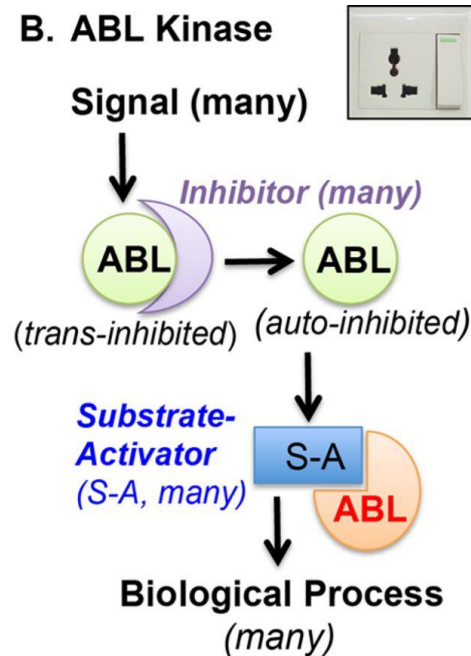
# Funkce proteinu ABL



## A. Master Switch Kinase



## B. ABL Kinase



## ABL (B):

- aktivováni mnoha různými **signály** externími (jako RTK) i interními (poškození DNA, oxidativní stres,..)
- každý signál může aktivovat pouze frakci buněčného proteinu ABL a fosforylovat selektivní substráty

## „Klasické“ přepínače signálů (A):

- RTKs: po vazbě ligandu (externího) autofosforylace a fosforylace dalších cílových intracelulárních proteinů
- aktivace prostřednictvím cAMP nebo PIP3

# Funkce proteinu ABL



- proteiny ABL se pohybují („*shuttling*“ - kyvadlové spojení) mezi jádrem a cytoplasmou
- široké spektrum cílových proteinů ABL, jak **jaderných** (regulujících **transkripci** a **chromatin**), tak **cytoplasmatických** (regulujících **polymeraci aktinu** a biologické funkce zahrnující aktin)
- aktivované ABL například regulují funkci invadopodií (nádorové struktury bohaté na aktin, které remodelují ECM během nádorové invaze), polaritu epiteliálních buněk
- „BCR/ABL: jediná známá mutace, která je sama o sobě dostatečná k vývoji nádorů“ (prof. M.J.)

# Onkoprotein BCR/ABL



- 1986: **Filadelfský chromozom**, (*Philadelphia chromosome*): vzniká reciprokou translokací t(9;22) - protoonkogen **ABL** (9q34.12) fúzován s genem **BCR** (22q11.21). Gen BCR má velice silný promotor, fúzí vzniká **aktivní onkogen**: chimérický protein (p190 nebo p210) je exprimován ve velké míře, kvůli strukturální odlišnosti od původní kinázy nereaguje na regulační mechanismy (je neustále aktivní) a buňky jsou tak stimulovány k nekontrolovatelné proliferaci.
- Filadelfský chromozom je přítomen u asi 95% pacientů s chronickou myeloidní leukémií **CML** a podílu (tzv. **Ph<sup>+</sup>**) **ALL**.
- protein BCR-ABL lze inaktivovat pomocí inhibitorů tyrozinkináz, např. **imatinib** (**Glivec**), dasatinib, nilotinib; Imatinib: první a zatím nejúspěšnější terapie pomocí inhibitorů proteinkináz!!
- aberace ABL také u **solidních nádorů**, (především amplifikace a/nebo zvýšená hladina mRNA, hlavně ABL2) ale mnohem méně časté

# Protoonkoprotein Myc



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

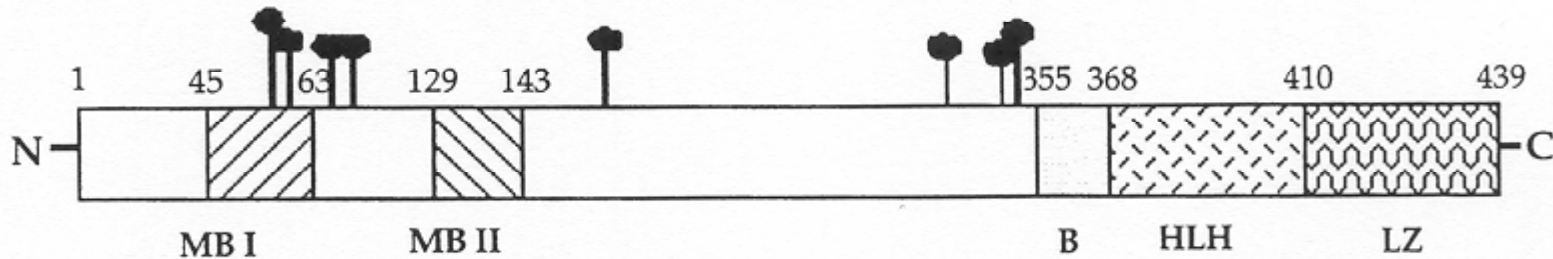
Do rodiny proteinů Myc patří tři odlišné proteiny, které se uplatňují v kancerogenezi: **c-Myc**, **N-Myc** a **L-Myc**.

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

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

Pro biologickou funkci Myc jsou nezbytné vysoce konzervované oblasti na N-konci **MBI** a **MBII** („Myc Boxes I a II“).

# Struktura proteinu Myc



- transkripční doména
- DNA vazebná doména
- dimerizační doména

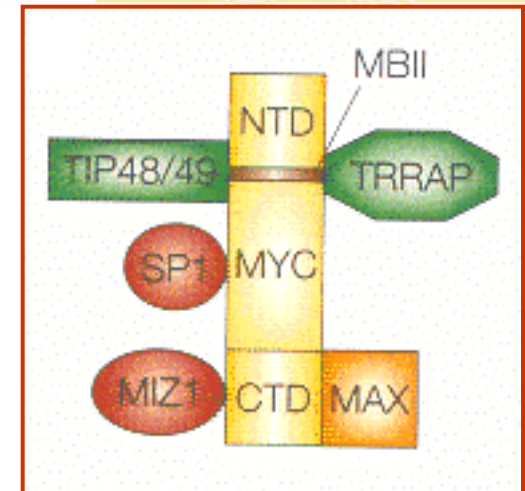
MBI a II – zajišťují transkripci a obsahují řadu **fosforylačních míst**.

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

# Myc/Max jako transaktivátor



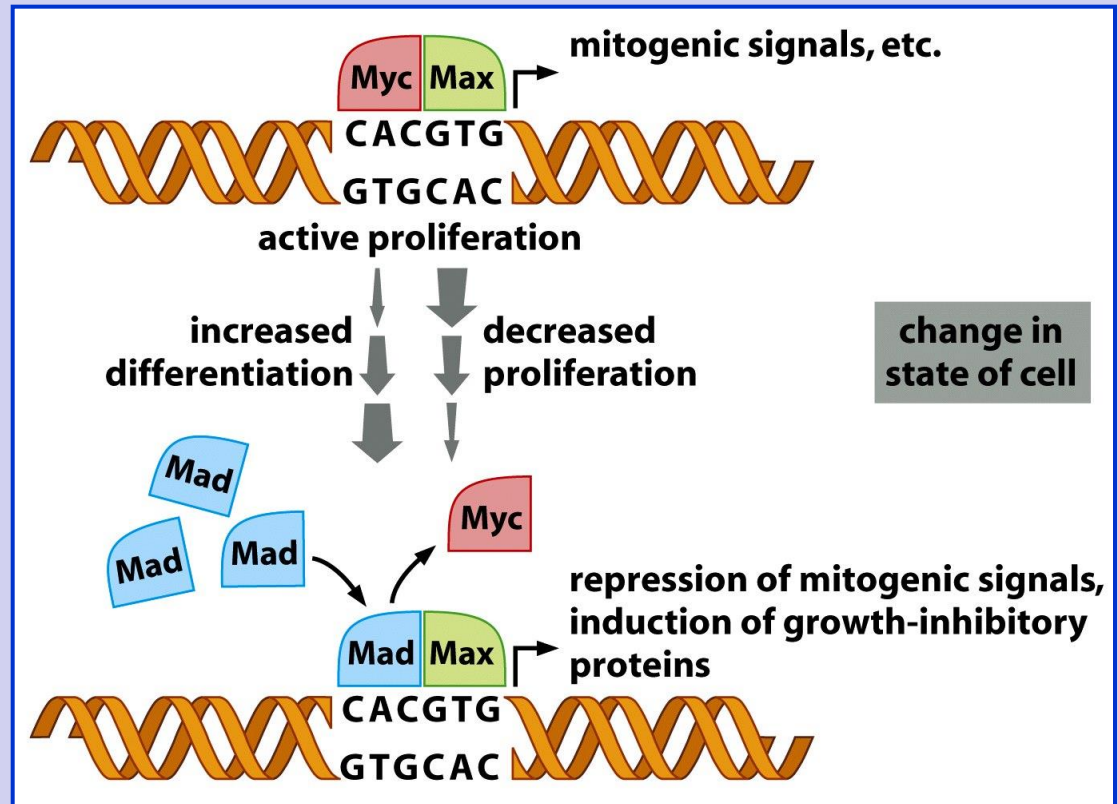
- **Myc** tvoří heterodimery s proteinem **Max**. Ty potom fungují jako TF a aktivují transkripci svých cílových genů, které posilují proliferaci.
- Hladina Myc je silně potencována mitogenními signály, zatímco hladina Max je relativně konstantní.
- *Transaktivace cílových genů dimerem Myc/Max dále regulována 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** kompetuje s Myc o Max. Mad/Max tvoří reprezor, 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** (**CCND2**)
- 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**

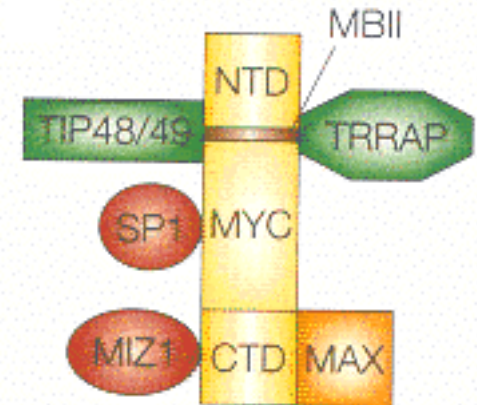
Myc/Max indukuje expresi **Bim**; Bim váže a tím inaktivuje Bcl-2 (⇒ wt Myc indukuje apoptózu)

# Myc jako represor



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

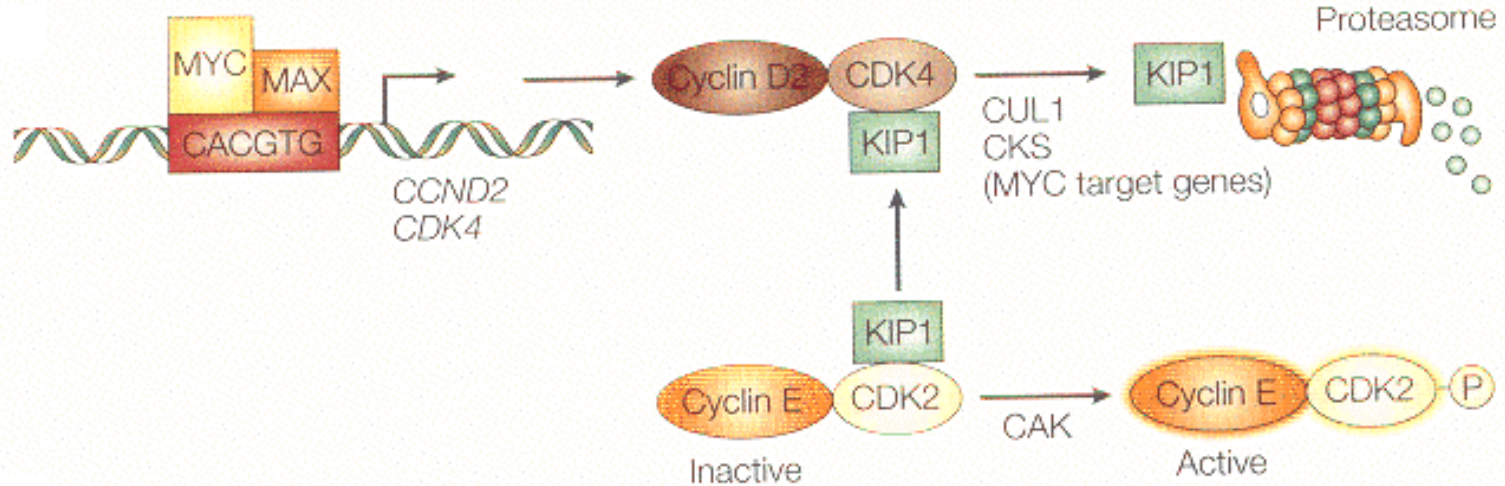
- Geny uplatňující se při zastavení buněčného cyklu **p15<sup>INK4B</sup>** a **p21<sup>WAF1</sup>**.
- Zpětnovazebnou regulací **Myc** reprimuje vlastní expresi.
- Geny uplatňující se v buněčné adhezi - integriny  **$\alpha$ L $\beta$ 2** a  **$\alpha$ 3 $\beta$ 1**.
- Geny specifické pro diferenciaci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



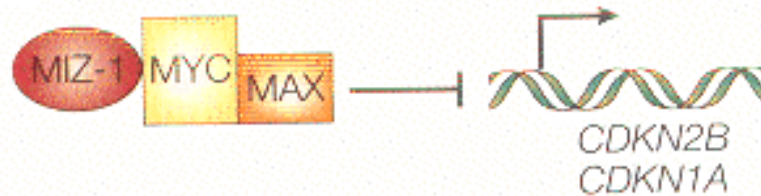
# Myc reguluje progresi G1-S aktivací i represí



## Aktivace cyklinu D2 a CDK4

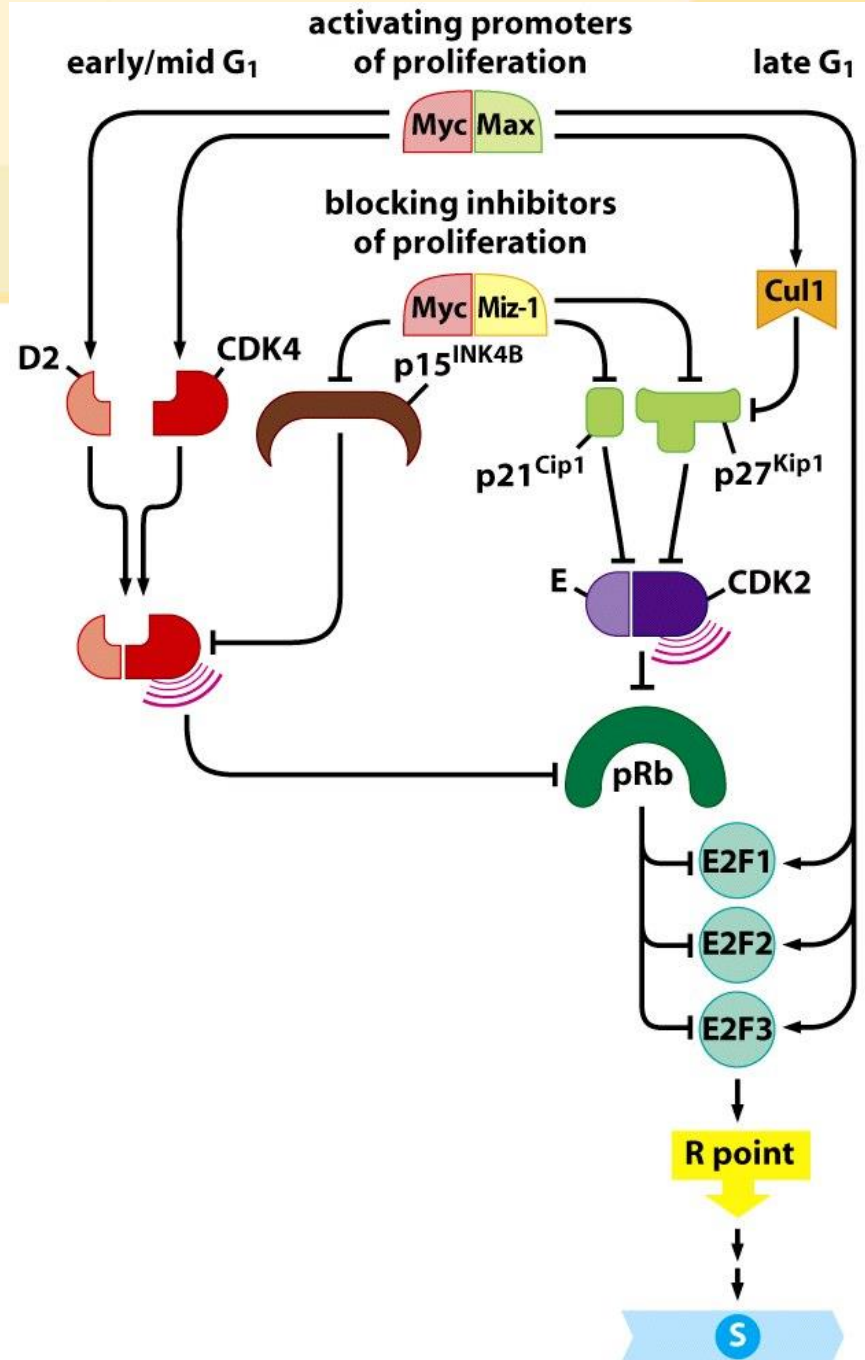


## Represe p15 a p21



# Vliv Myc na buněčný cyklus

- Dimer Myc-Max indukuje expresi cyklinu D2 a CDK4 → **↑BC** (G1)
- Dimer Myc-Mac 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



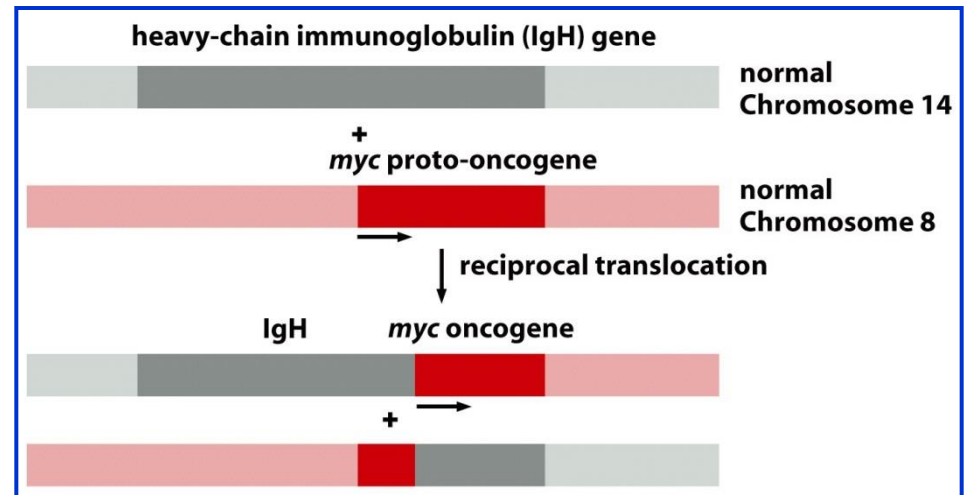
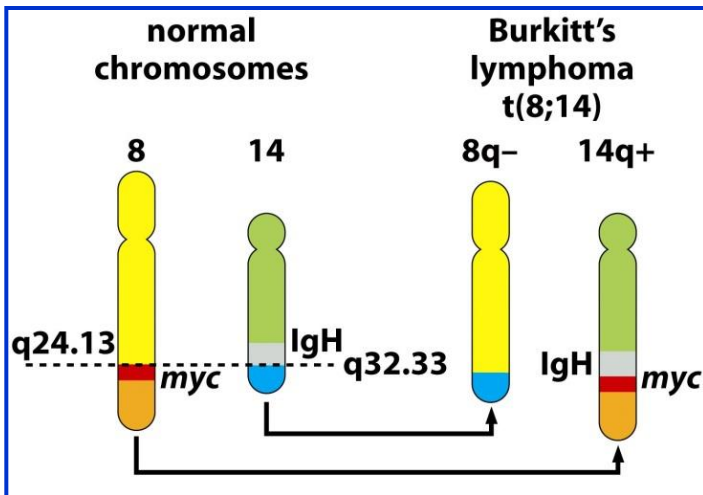
- Do rodiny proteinů Myc patří tři odlišné proteiny:  
**c-Myc, N-Myc a L-Myc.**
- Jsou si podobné svou strukturou a mechanismem účinku.
- Výrazně se liší expresí během vývoje a také se zdá, že ovlivňují - i ve stejném buněčném kontextu - jiné sady genů, participují - i ve stejných buněčných typech - na jiných buněčných programech.
- Liší se významně také svou úlohou ve vývoji jednotlivých typů neoplastických onemocnění.

# c-myc a nádory



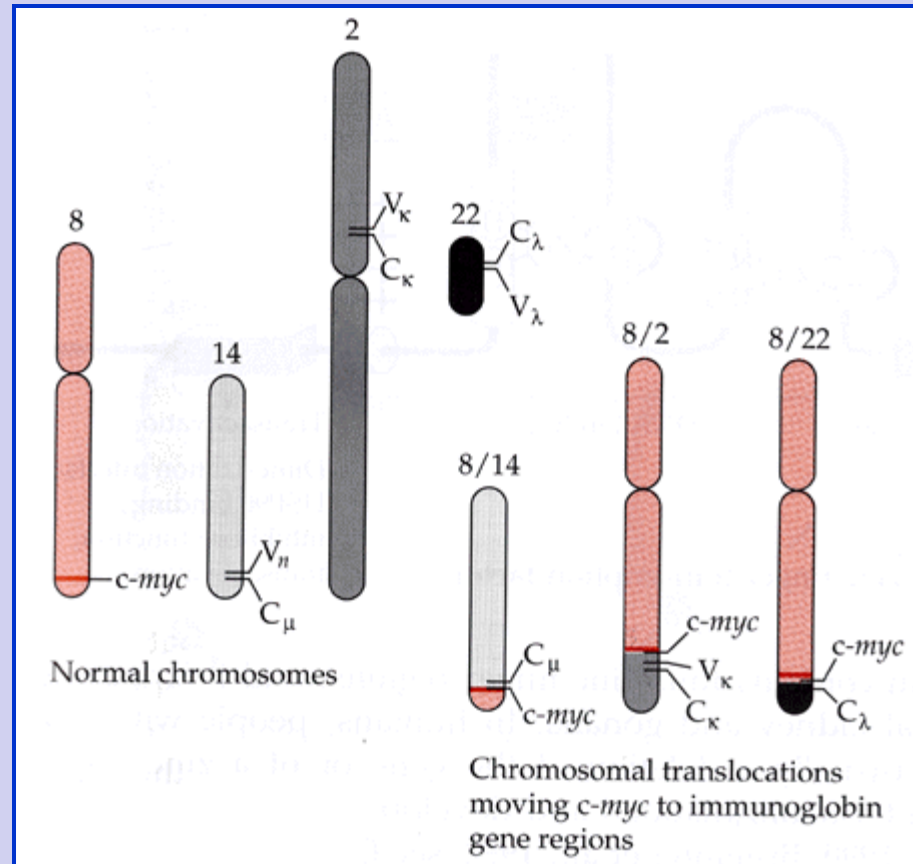
## Burkittův lymfom:

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



# Typy translokací u Burkittova lymfomu

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

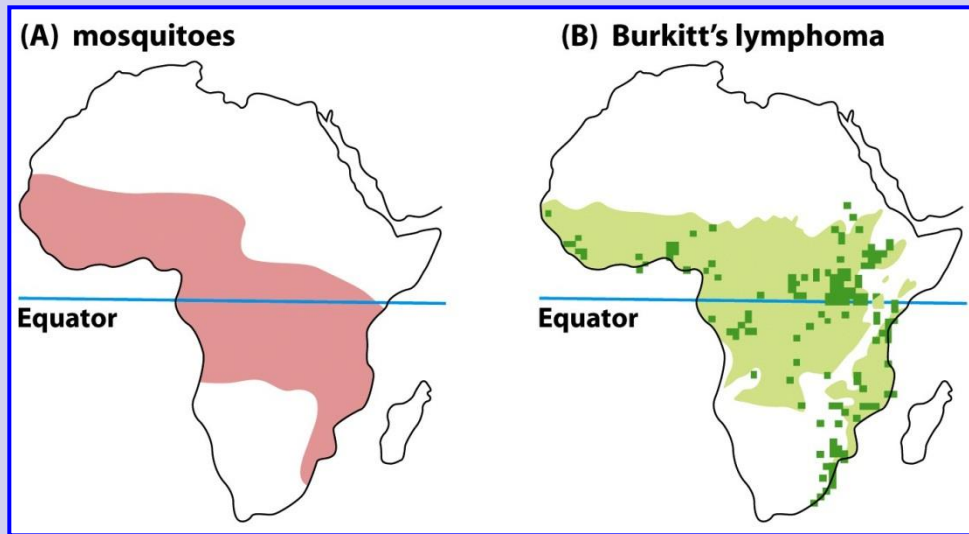




# Vsuvka: Burkittův lymfom



Vyskytuje se často u dětí východní a centrální Afriky, ve spojitosti s infekcí virem Epstein-Barrové a malarickými parazity.



**Růžová:** geografická distribuce *Aedes simpsoni*, přenašeče malárie.

**Zelená:** geografická distribuce dětského Burkittova lymfomu (popsáno Dennisem Burkitem)

## Možné vysvětlení

Chronická **malárie** oslabuje imunitní systém dětí  $\Rightarrow$  jsou vnímavější k infekci **EBV**  $\Rightarrow$  to může vést k obrovské akumulaci populace imortalizovaných (EBV) B lymfocytů: v nich enzymatická mašinérie zajišťující přeskupení imunoglobulinů  $\rightarrow$  občas dojde omylem k **translokaci** zahrnující onkogen *c-myc*.

# c-myc a nádory

## Ostatní lymfomy:

- Low-grade folikulární lymfom je většinou spojen s translokací Ig/Bcl-2 - t(14;18), jen vzácně lze detekovat přestavby *c-myc*. Některé z nich transformují v agresivnější formu a u těch už jsou detekovány i přestavby Ig/*c-myc*: t(8;14), t(2;8), t(8;22)
- 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:

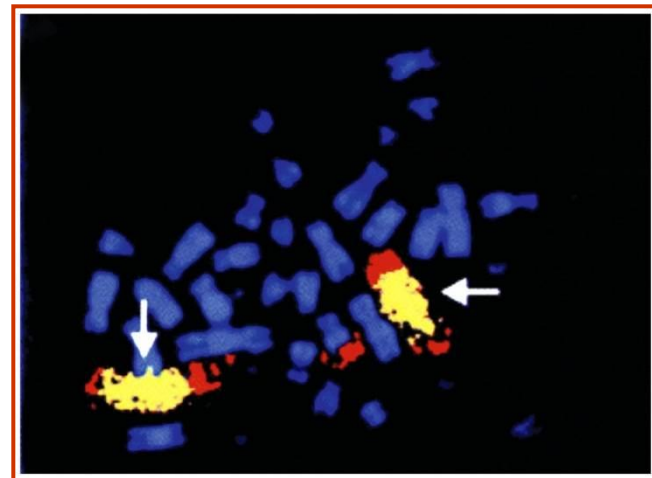
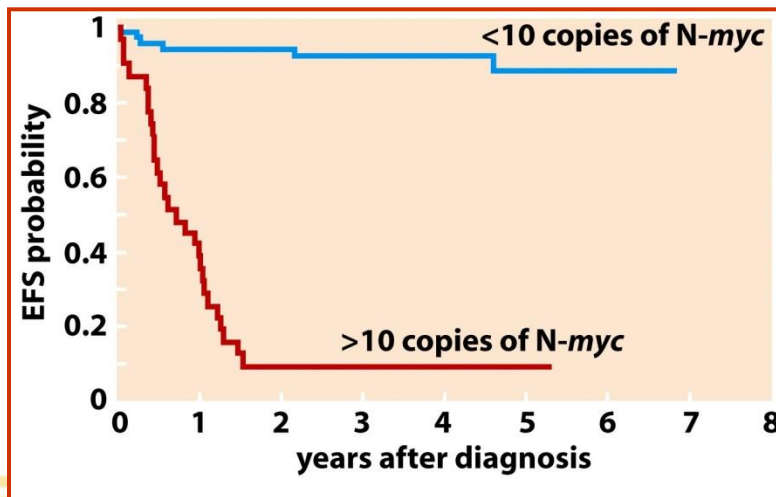
**Amplifikace** a/nebo **zvýšená exprese** *c-myc* se vyskytuje u významného podílu invazivních duktálních karcinomů prsu (spojeno s horší prognózou), u některých nádorů prostaty, u gastrointestinálních nádorů (souvislost *c-myc*:APC:β-katenin: jaderný β-katenin slouží jako koaktivátor TF Tcf-4, který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