

# 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

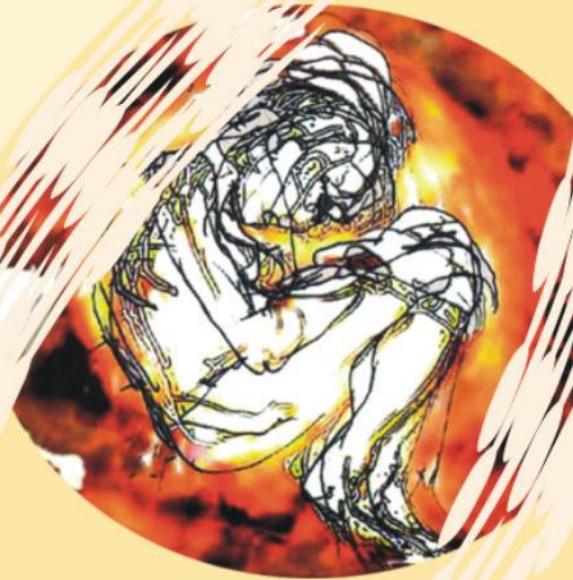
## 2. Mitogenní signalizace I

protoonkogeny, onkogeny, signální  
dráhy, regulace buněčného cyklu

**Bi9910**

pondělí 16.00 – 18.00

A11 – č. 305



**2020**

# Získané vlastnosti maligního nádoru



- (1) Produkce vlastních proliferačních signálů
- (2) Necitlivost k signálům zastavujícím buněčný cyklus
- (3) Odolnost k programované buněčné smrti
- (4) Neomezený replikační potenciál
- (5) Indukce angiogenese
- (6) Aktivace invazivity a metastazování
- (7) Genetická nestabilita a mutace
- (8) Přítomnost zánětu podporující nádor
- (9) Přeprogramování energetického metabolismu
- (10) Schopnost vyhnout se destrukci imunitním systémem
- (11) Změny mikroprostředí nádoru

# 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

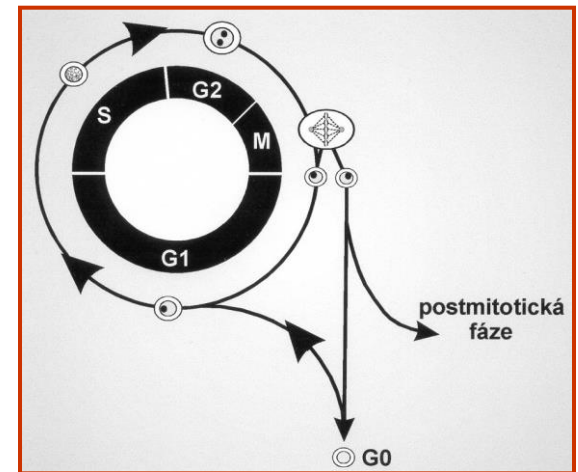
**G1** - obsah DNA: 2N

**S** - replikace DNA; inkorporace značených nukleotidů

**G2** - obsah DNA: 4N

**G0** - stárnoucí nebo dlouhodobě se nedělící buňky

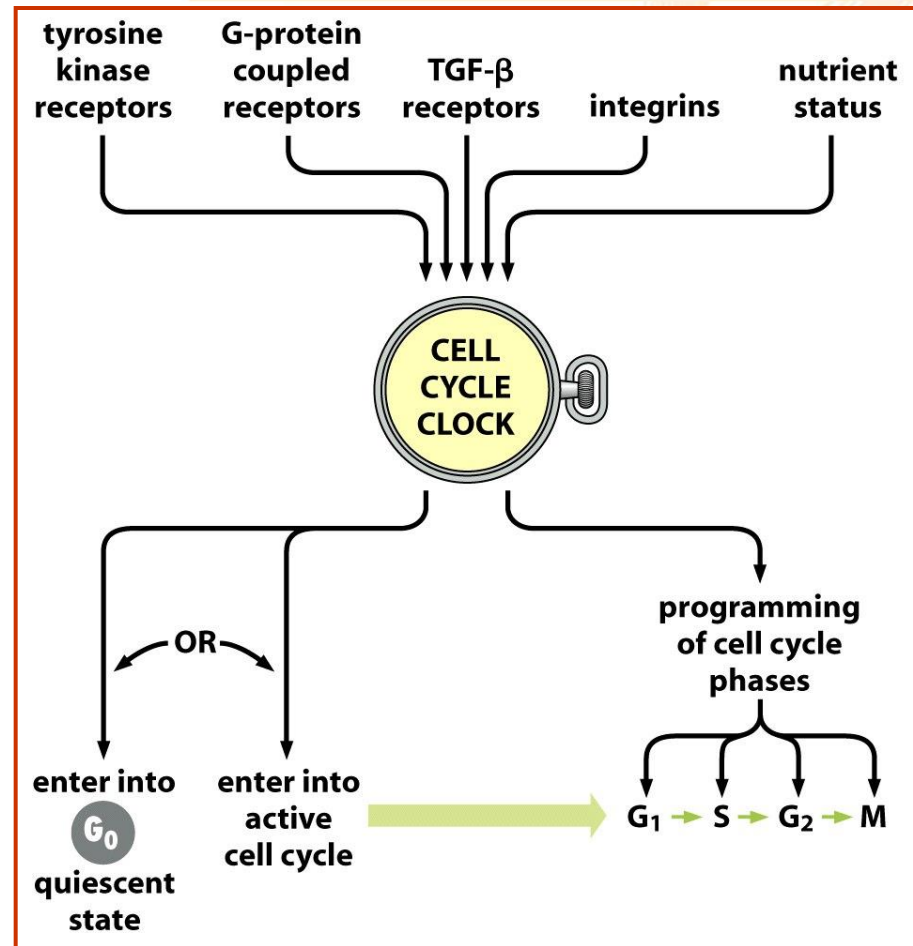
**postmitotický stav** - bez možnosti návratu do cyklu, spojen s terminální diferenciací



# 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 z okolí buňky a rozhoduje o vstupu buňky do aktivního buněčného cyklu nebo naopak ustoupení do neproliferačního stavu.

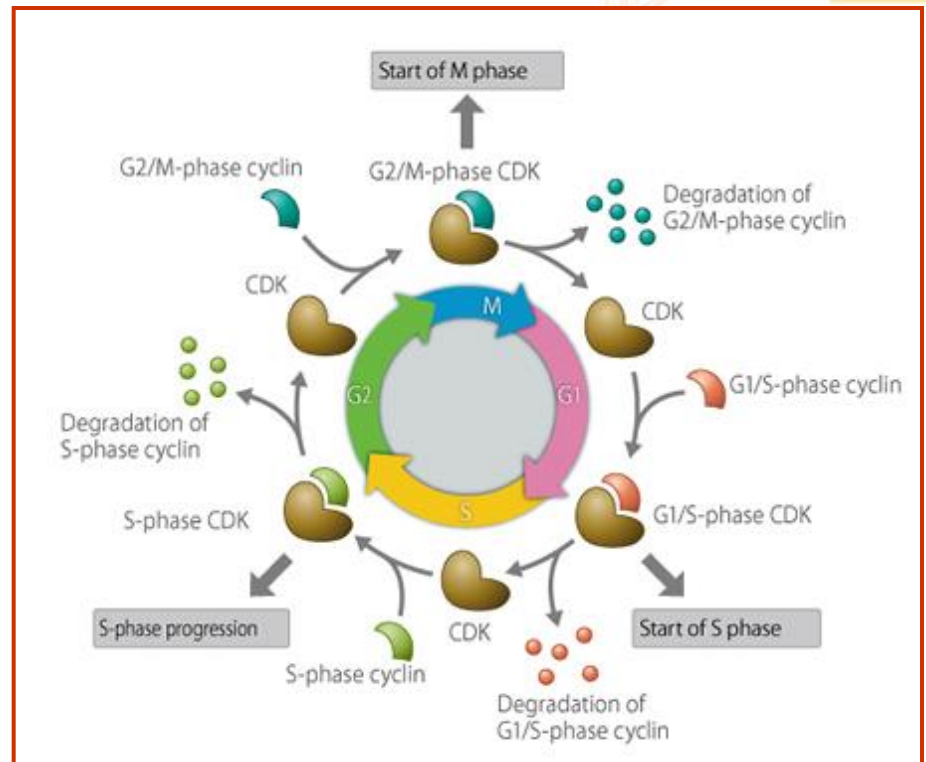
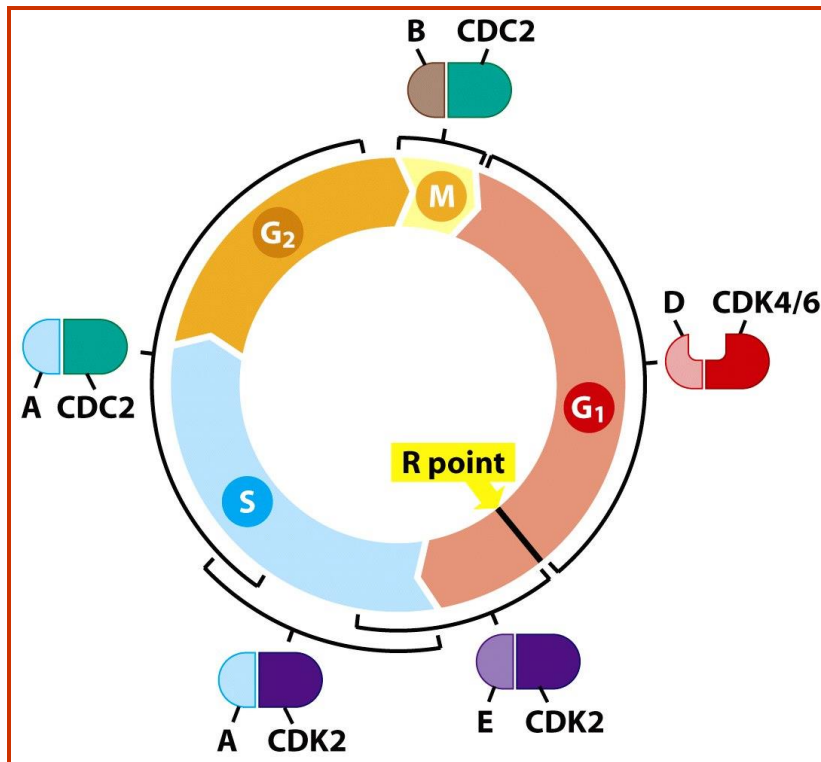


# Klíčové molekuly řízení buněčného cyklu



- **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
  - některé necyklují, i další funkce,...
- **inhibitory** (CKIs)
  - Ink4 rodina CKIs (p16, p15, p18, p19) – cílí především na Cdk4 a Cdk6
  - Cip/Kip rodina (p21, p27, p57) – promiskuitnější, často interferují s vazbou cyklinu

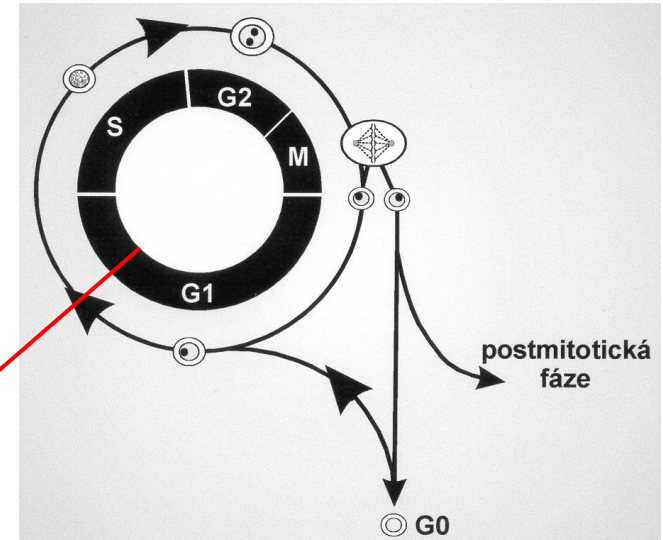
# Klíčové molekuly řízení buněčného cyklu



# 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



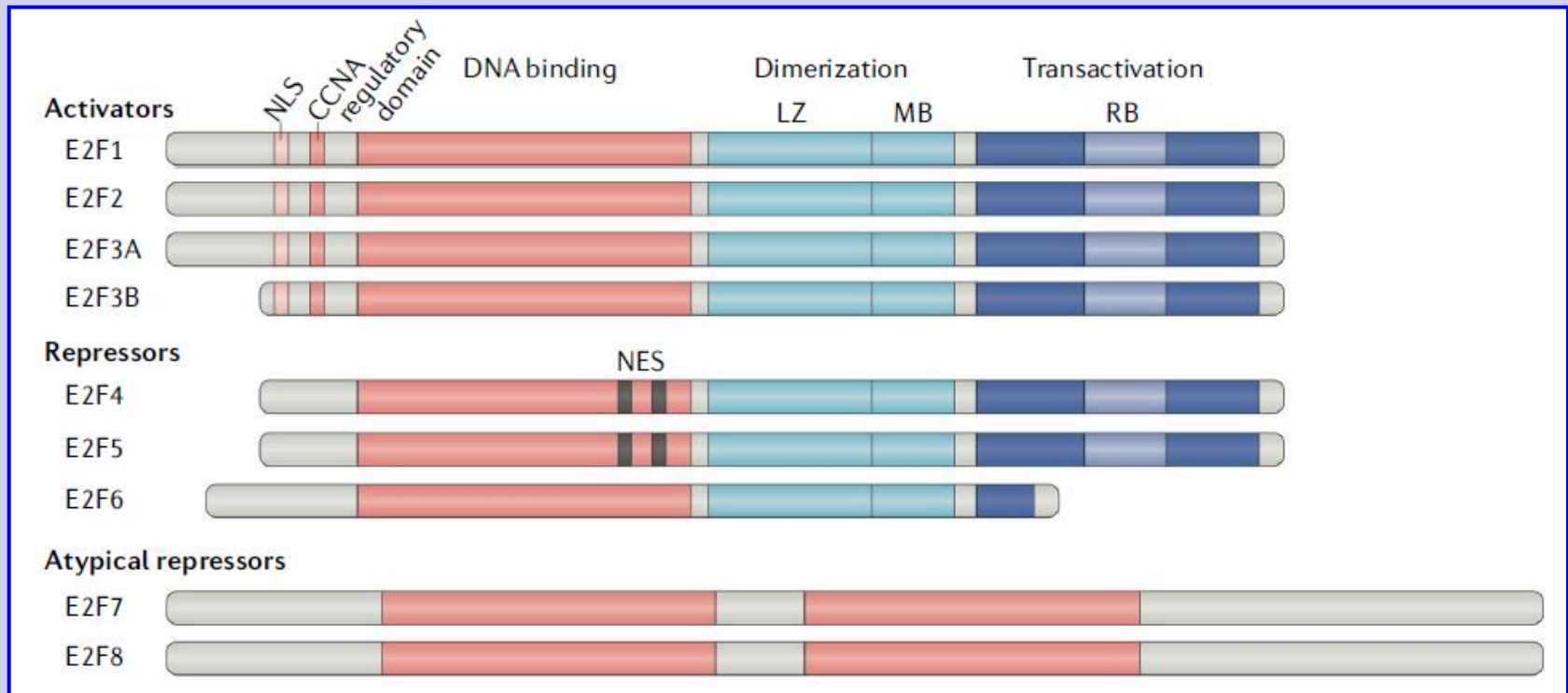
# pRB - spínač buněčného cyklu



- pRB v málo fosforylovaném (nefosforylovaném, hypofosforylovaném) stavu blokuje průchod bodem restrikce: interaguje s TF rodiny **E2F** (8 genů) 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

# Rodina faktorů E2F

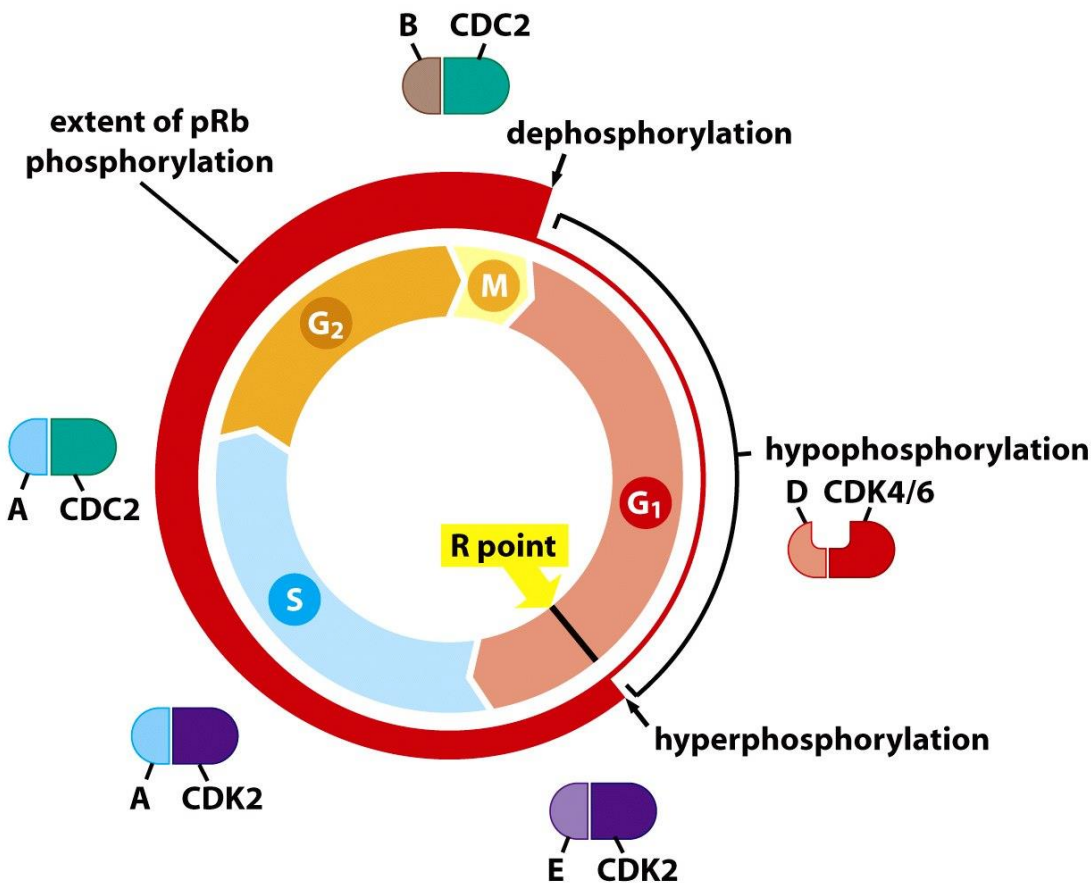
- 8 genů + alternativní sestřih + násobné transkripční počátky
- regulace: transkripční, translační, posttranslační, degradace proteinů, vazba kofaktorů, buněčná lokalizace



# Klíčové molekuly řízení buněčného cyklu

- **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
  - některé necyklují, i další funkce,...
- **inhibitory** (CKIs)
  - Ink4 rodina CKIs (p16, p15, p18, p19) – cílí především na Cdk4 a Cdk6
  - Cip/Kip rodina (p21, p27, p57) – promiskuitnější, často interferují s vazbou cyklinu
- **pRB**
- **E2Fs**

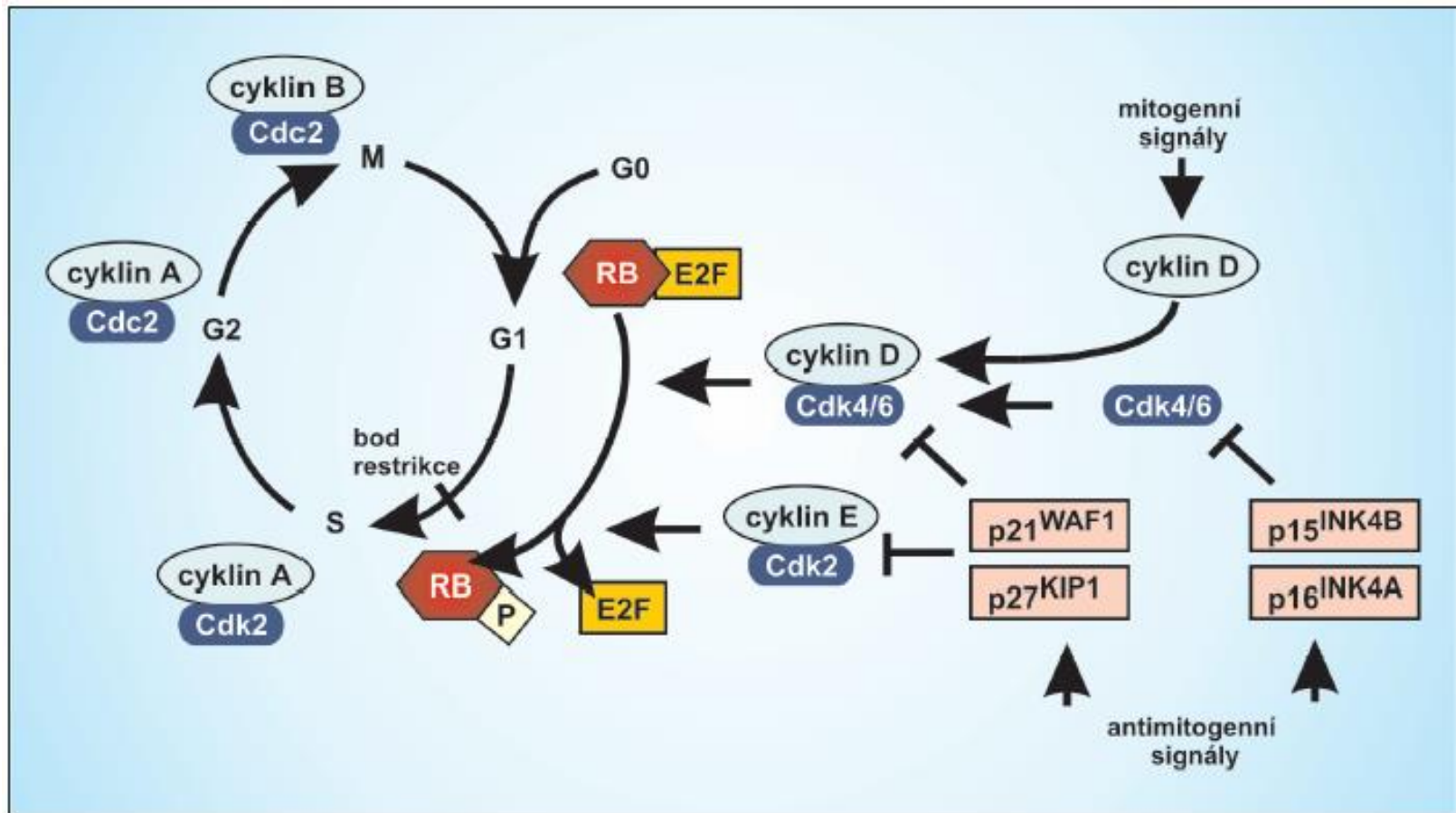
# Úroveň fosforylace pRB v průběhu buněčného cyklu



**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 buněčného cyklu



# 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<sup>WAF1</sup> a p27<sup>KIP1</sup>
  - inhibitory CDK p15<sup>INK4B</sup> a p16<sup>INK4A</sup>

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

**Antimitogenní signalizace** vede k **navýšení hladiny některého inhibitoru** a snížení hladiny cyklinů D

# Co je poškozeno při transformaci?

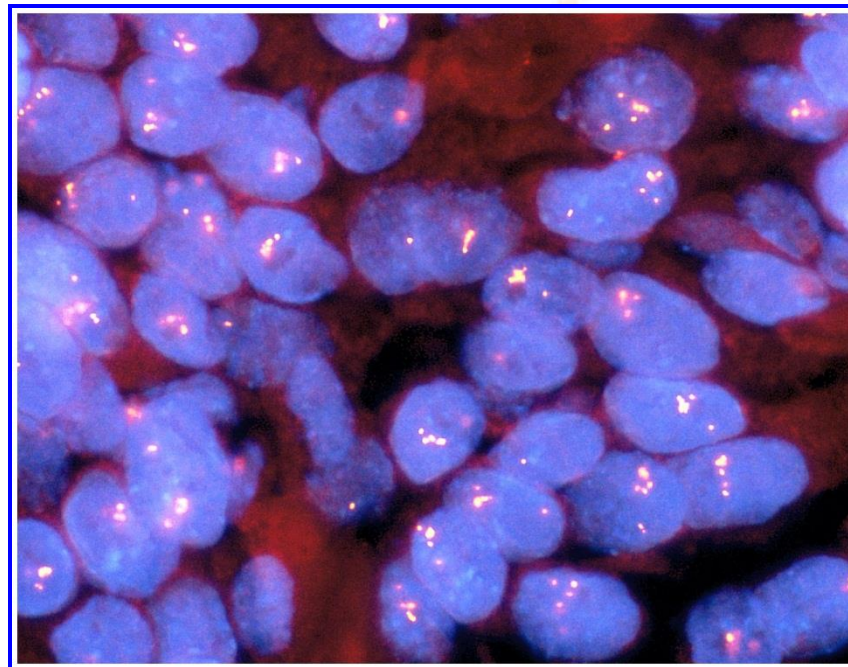


- nádorový supresor **pRB** (retinoblastom, ..)
- nádorový supresor **p16<sup>INK4A</sup>** (melanom, ..)
- protoonkogeny **cykliny D**
  - amplifikace nebo zvýšená exprese cyklinu D1 u téměř 50% nádorů prsu, HNSCC
  - chromozomální translokace zahrnující cyklin D1 u lymfomů z buněk plášťové zóny – MCL - *mantle cell lymphoma*: t(11;14)
- „**periferní hráči**“ - součásti mitogenních a antimitogenních drah

# Amplifikace genu pro cyklin D1 a nádory hlavy a krku



- Příklad detekce amplifikace genu **CCND1 (11q13)** v dlaždicobuněčném karcinomu hlavy a krku (HNSCC) metodou FISH. Zde 3 až 5 kopií na buňku.
- Asi 1/3 těchto nádorů má amplifikaci *CCND1* a tomu odpovídající zvýšenou expresi cyklinu D1 a tím rozvrácenou regulaci fosforylace pRB.

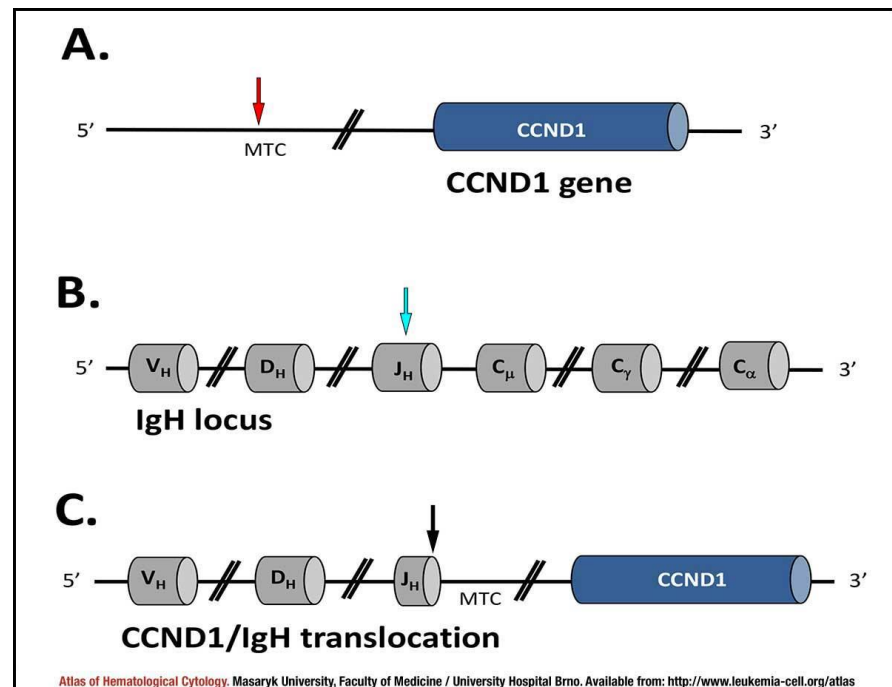
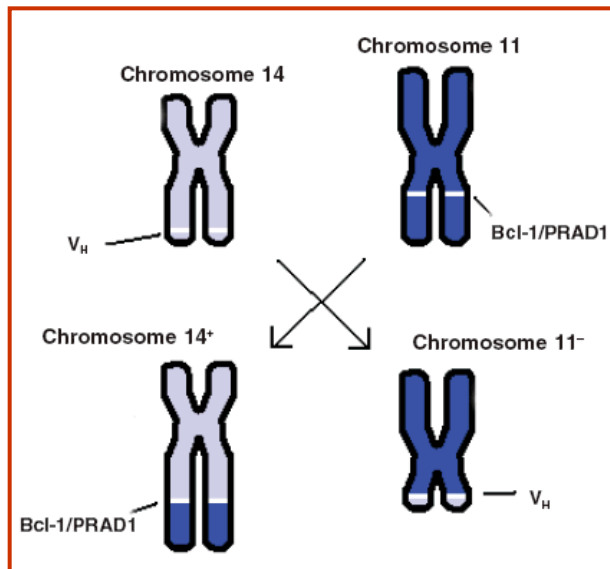




# Cyklin D1 a lymfom z buněk pláštěvé zóny (MCL)



Typickým znakem je translokace t(11;14)(q13;q32). Jejím důsledkem je fúze transkripčního zesilovače genu *IGH* pro těžký imunoglobulinový řetězec  $\mu$  na chromozomu 14q32 a genu *CCND1* kódujícího cyklin D1 na chromozomu 11q13, a následně vysoká exprese cyklinu D1.



# Co je poškozeno při transformaci?



- nádorový supresor **pRB** (retinoblastom, ..)
- nádorový supresor **p16<sup>INK4A</sup>** (melanom, ..)
- protoonkogeny **cykliny D**
  - amplifikace nebo zvýšená exprese cyklinu D1 u téměř 50% nádorů prsu, HNSCC
  - chromozomální translokace zahrnující cyklin D1 u a lymfomů z buněk plášťové zóny – MCL - *mantle cell lymphoma*: t(11;14)
- „**periferní hráči**“ - součásti mitogenních a antimitogenních drah

# 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)

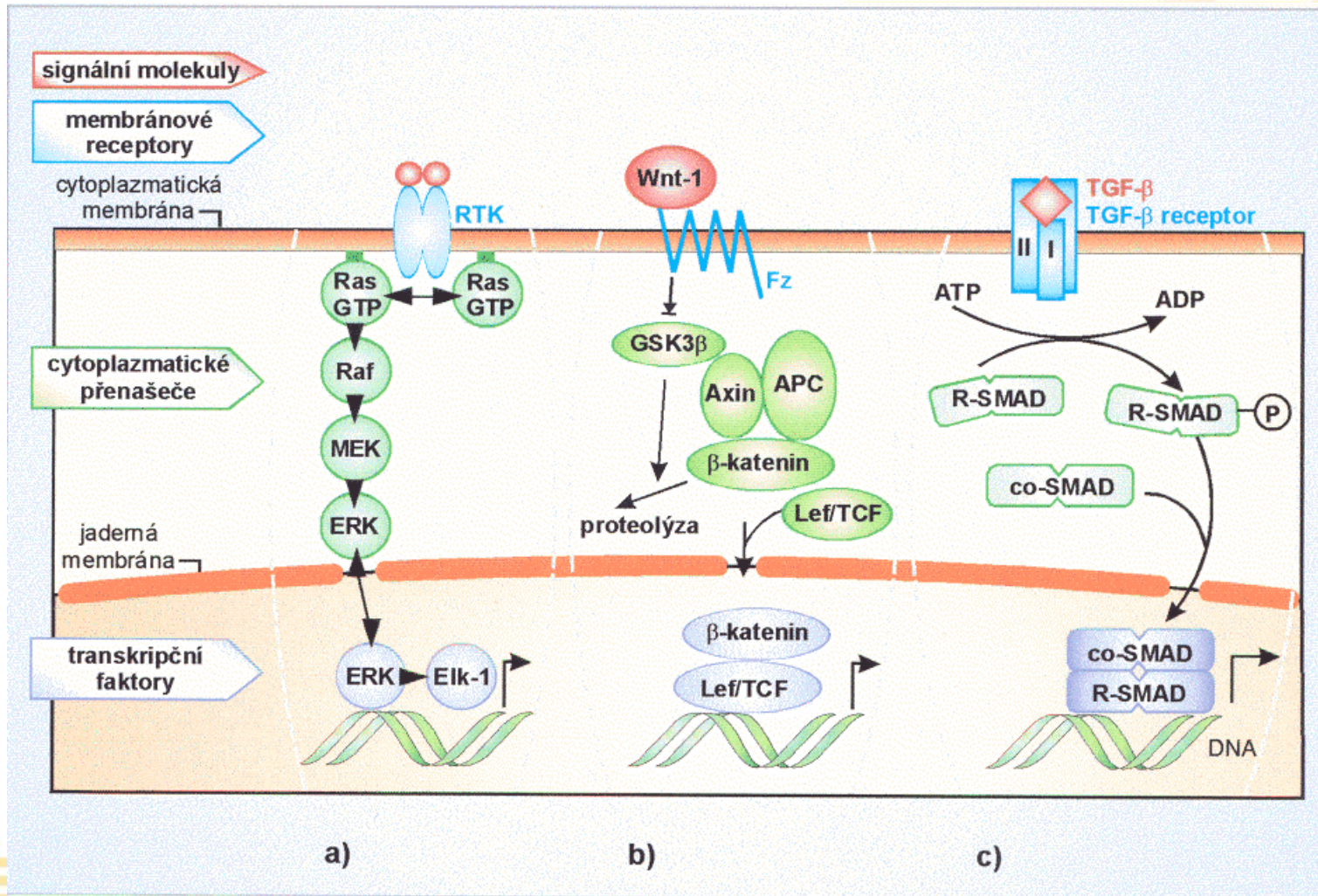


1. **Růstové faktory**
2. **Receptory růstových faktorů**
3. **G-proteiny**
4. **Nereceptorové tyrozinové proteinkinázy** (plazmatická membrána)
5. **Cytoplazmatické serinové/threoninové proteinkinázy** (cytoplazma)
6. **Jaderné proteiny**
7. **Neklasifikované** (např. BCL-2)

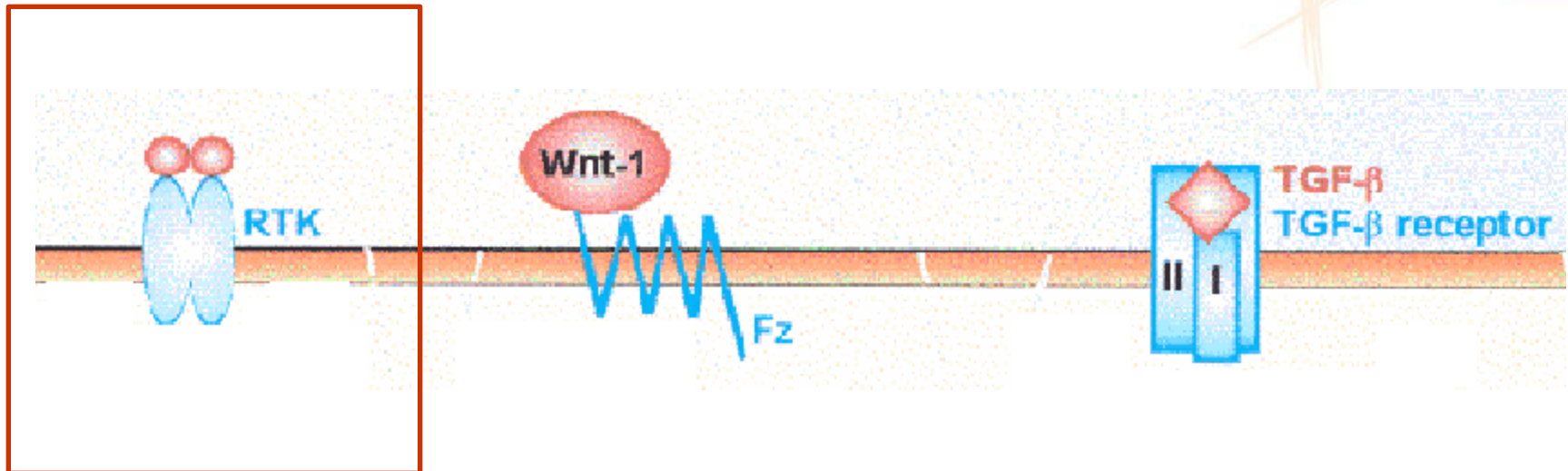
? klasifikace protoonkogenů není jednotná ?

? 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, diferenciace, 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:

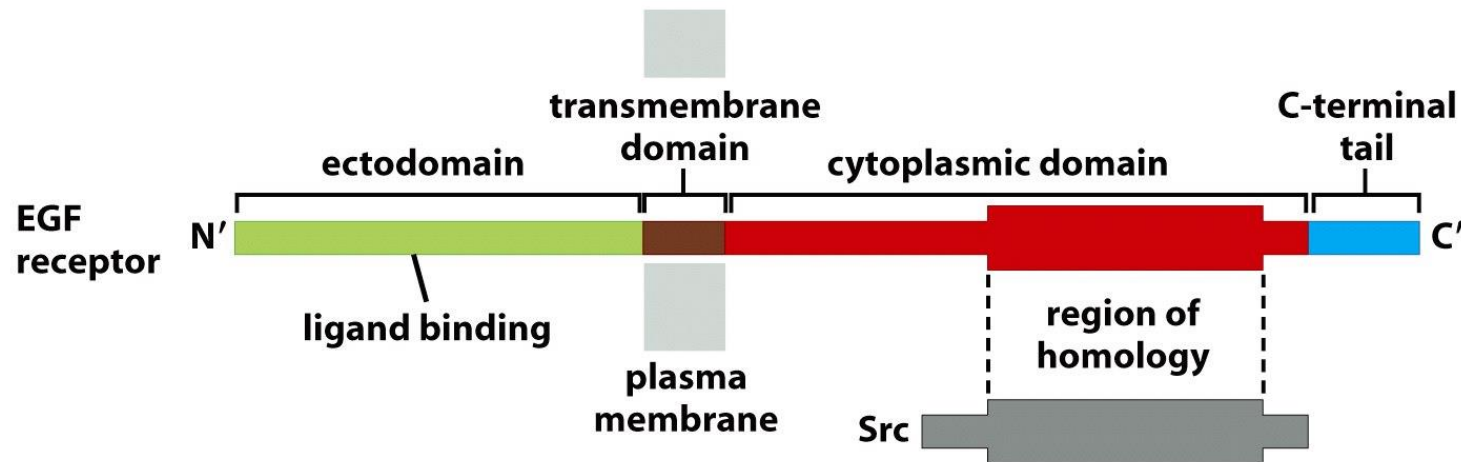
- **autokrinní** - růstový faktor stimuluje produkující buňku
- **parakrinní** - stimulace sousední buňky
- **endokrinní** - stimulace vzdálených buněk

# Růstové faktory a RTK receptory



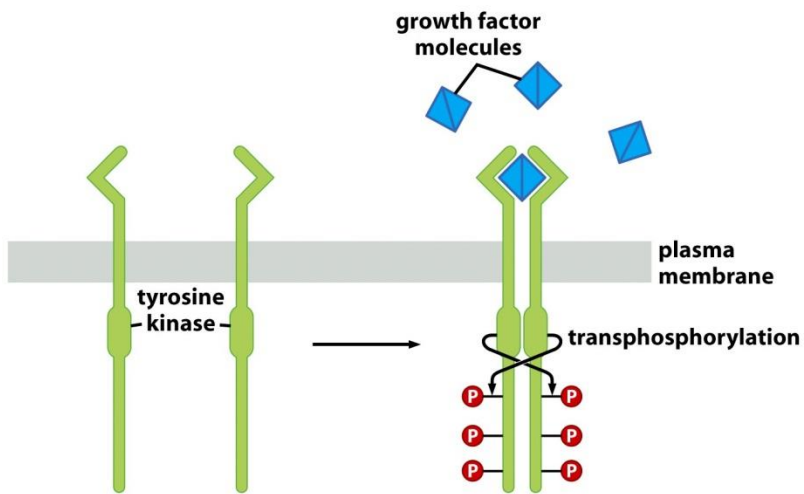
## RTK receptory:

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



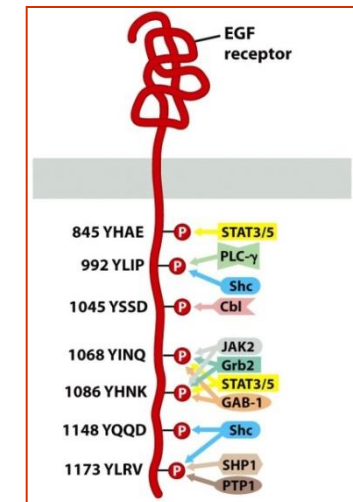
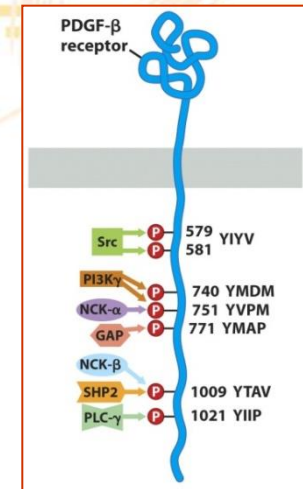


# Schéma přenosu signálu na EGFR

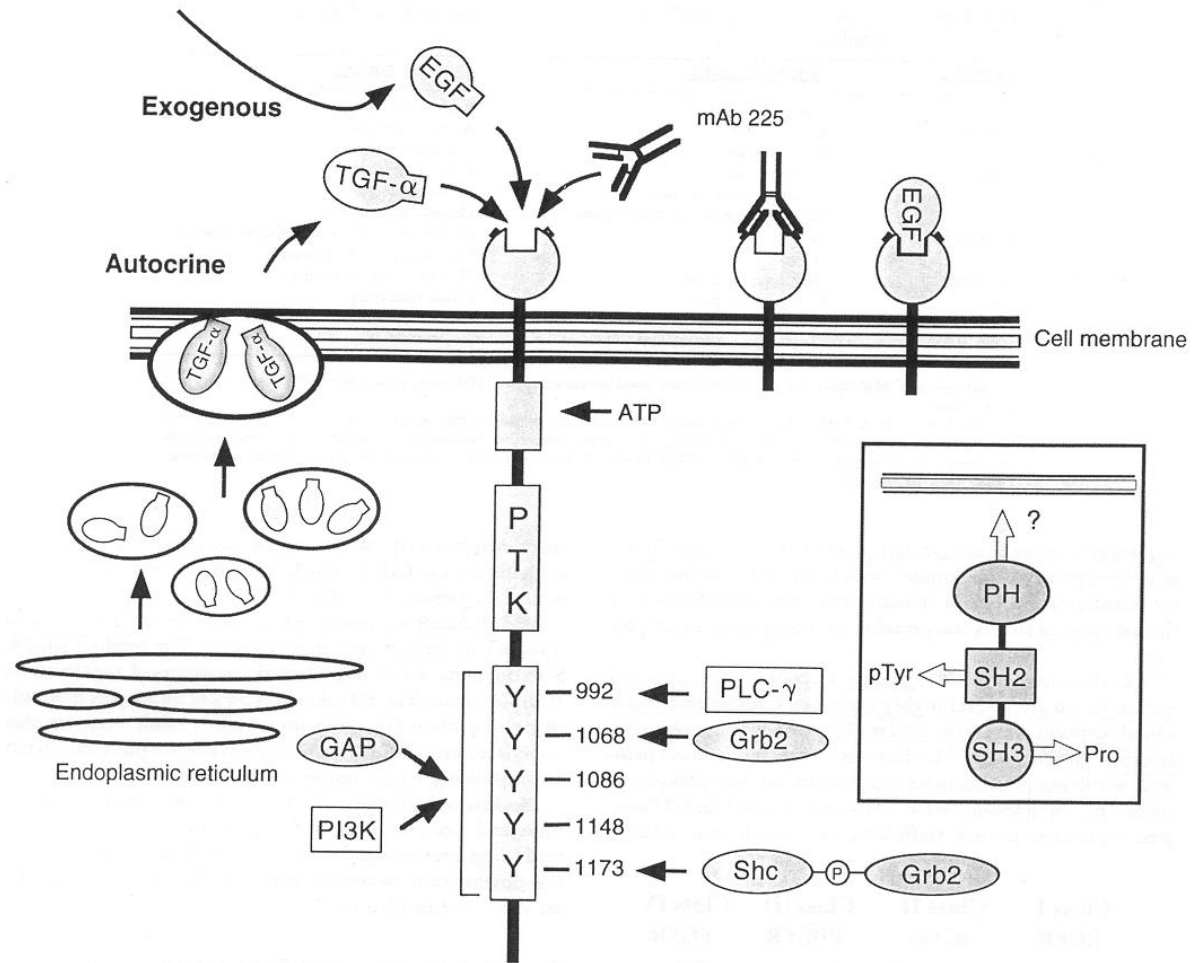


Po vazbě svých specifických ligandů receptory dimerizují (s výjimkou IGF, který je kovalentně vázaným homodimerem) a dochází k autofosforylaci.

Fosforylací se změní 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

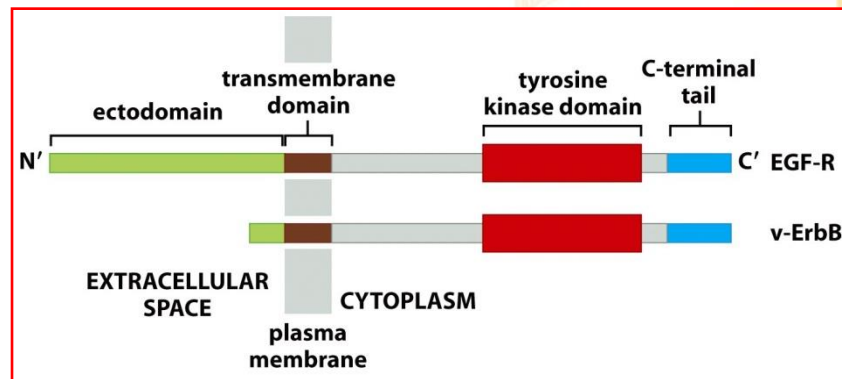
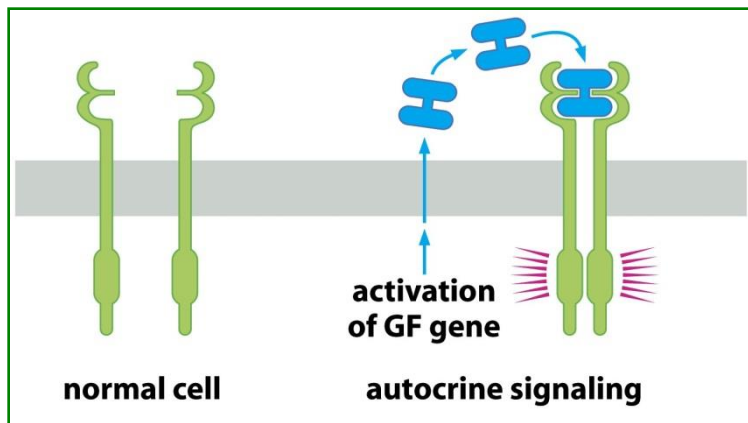


- produkce/nadprodukce (vlastních) růstových signálů (→ autokrinní stimulace)
- amplifikace receptoru: (a) koncentrace receptorových proteinů na povrchu buňky tak vysoká, že se molekuly nahodile setkávají a dimerizují i bez vazby ligandu; (b) neadekvátně efektivní „vychytávání“ extracelulárního signálu: 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
- změna struktury receptoru: jeho aktivace nezávislá na vazbě ligandu (bodovými mutacemi, krátkými delecemi, zkrácené formy, v důsledku fúze s jinými geny,...).

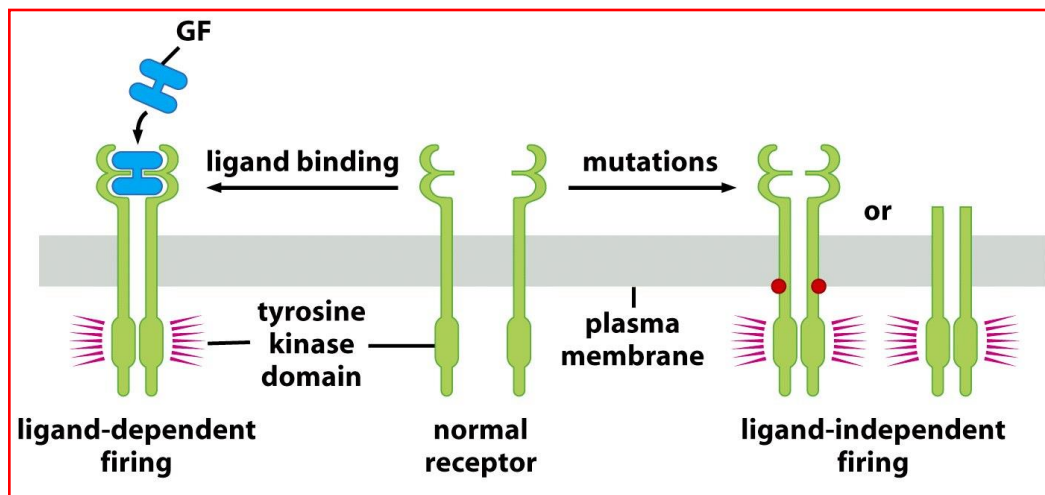
# Změny postihující RTK receptory



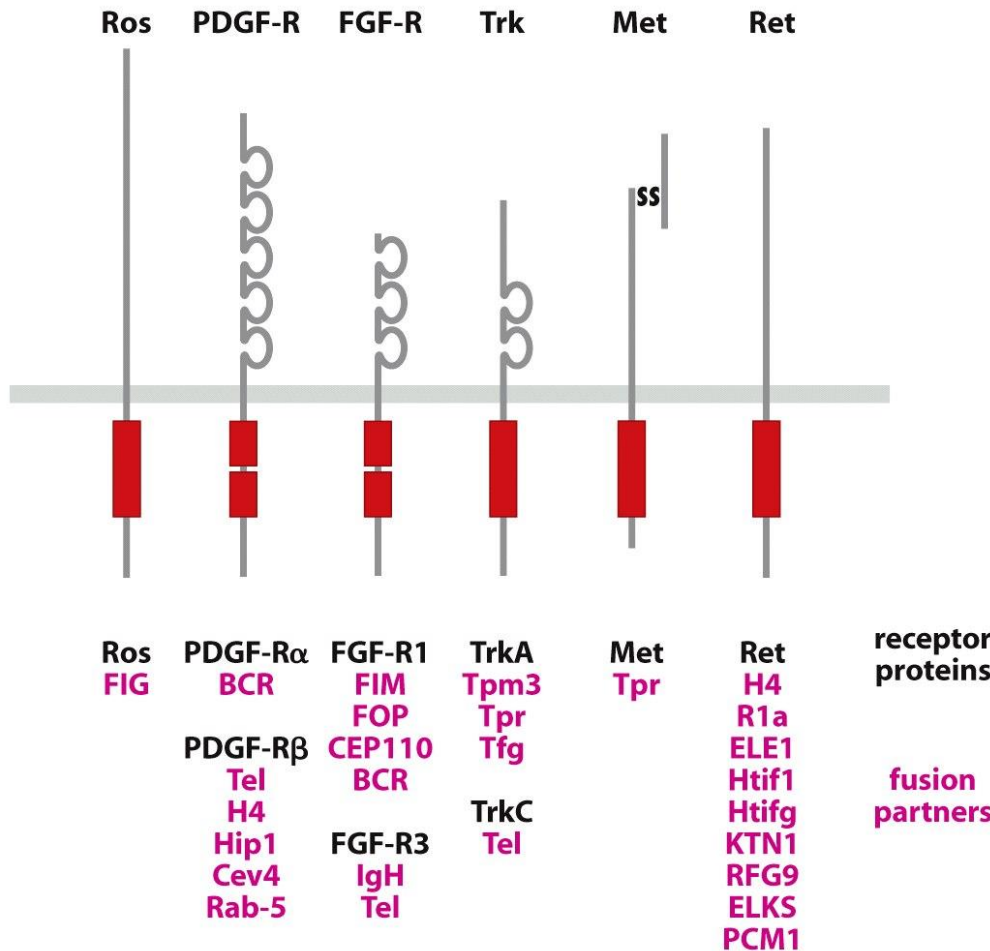
(1984 – odhalena strukturální podobnost EGFR a v-ErbB: „*real bombshell*“ - RAW)



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

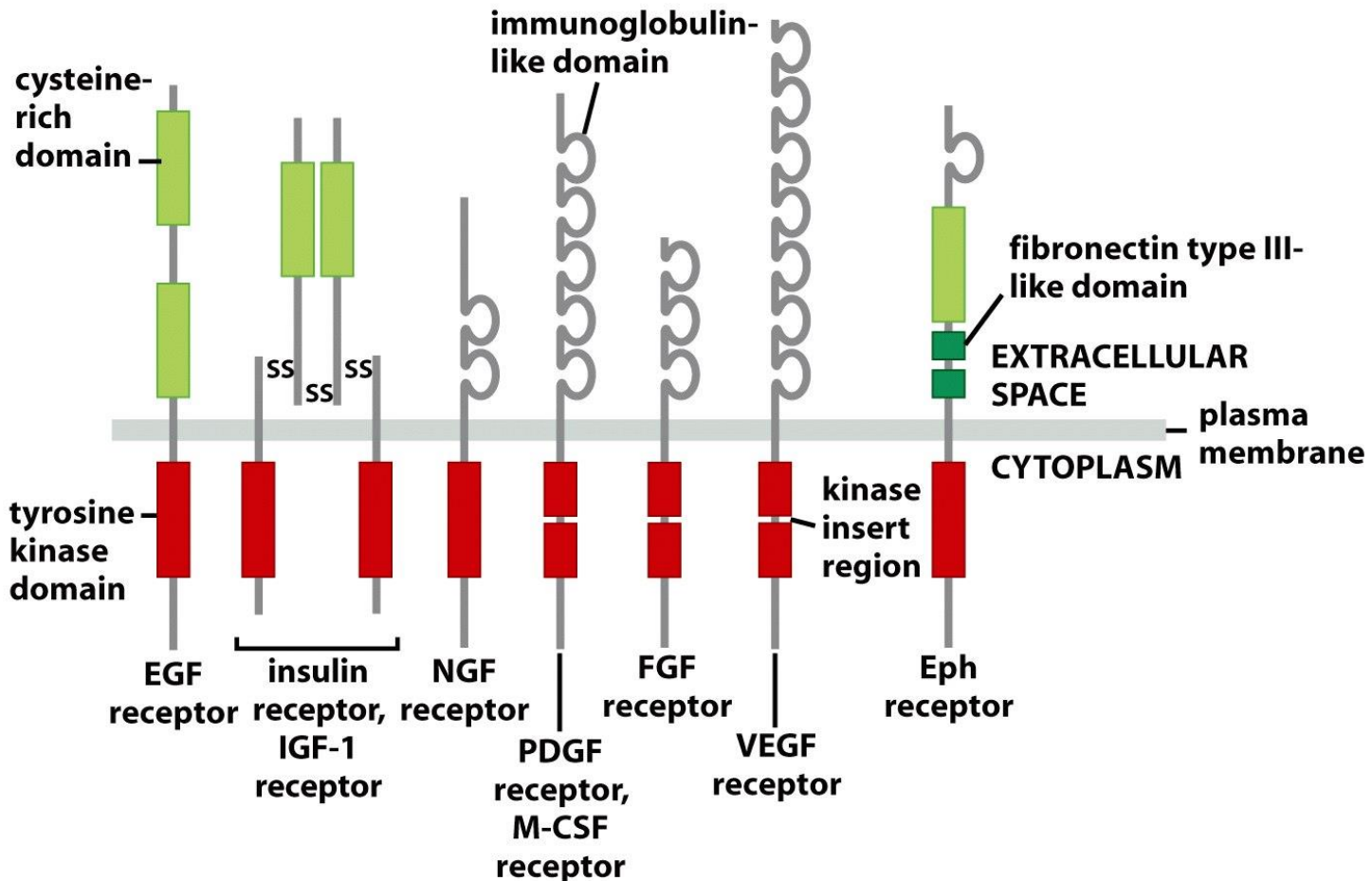


# Fúze genů pro RTK receptory s jinými geny



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

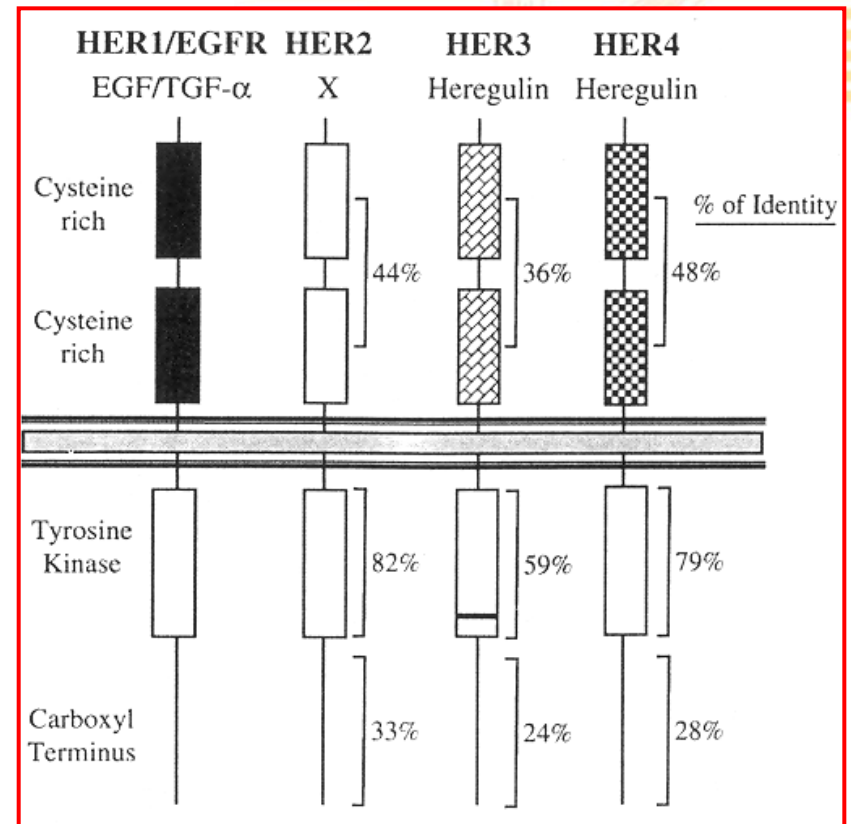


# Rodina EGF



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- $\alpha$** , **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 1986**)
- syntetizován jako prekurzor (1217 AA)
- stimuluje proliferaci a diferenciaci různých buněčných typů

## TGF- $\alpha$ („transforming growth factor $\alpha$ “)

- 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
- zvýšená exprese EGFRs byla detekována u nádorů prsu, hrtanu, jícnu, žaludku, vaječníků, endometria a děložního čípku a dalších; u nádoru prsu, jícnu a vaječníků je spojena se špatnou prognózou
- bodové mutace EGFR1 u karcinomů plic: možnost cílené terapie malými inhibitory kinázové domény

# Rodina EGFR



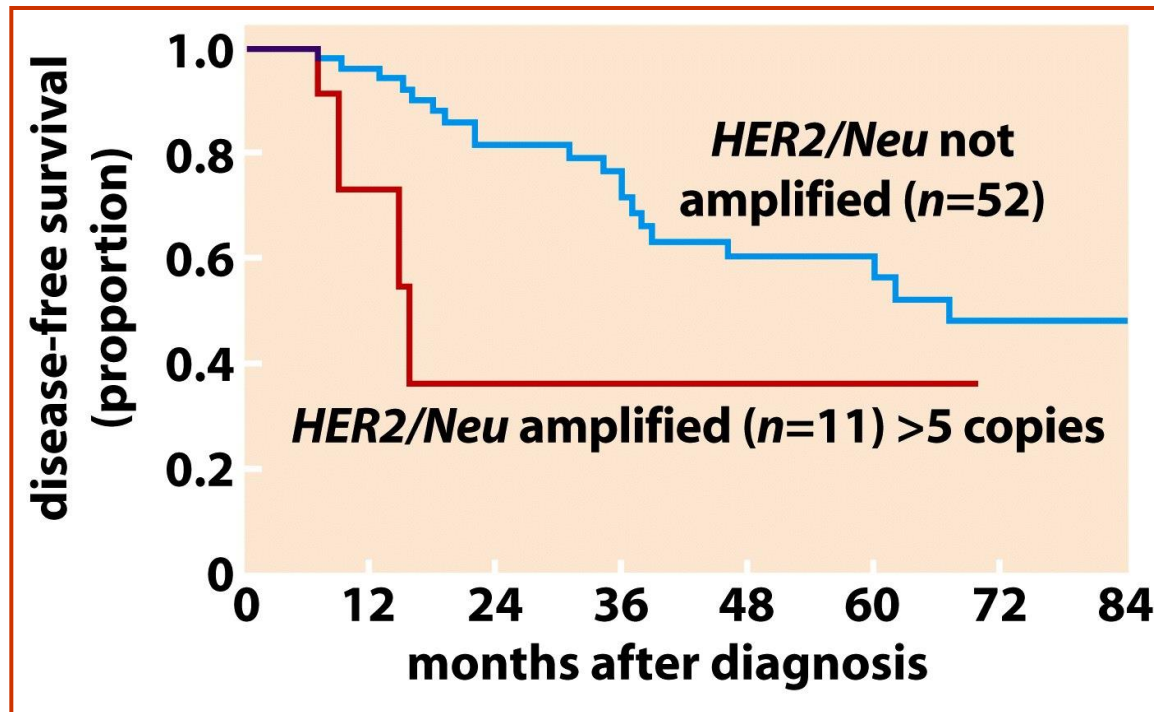
**HER2/neu** kódován genem **c-erbB2**; receptor homologní s EGFR, ale neváže ani EGF ani TGF- $\alpha$  (a zřejmě ani neu)

- vysoká exprese a/nebo amplifikace c-erbB2 detekována u adenokarcinomů prsu, slinných žláz, vaječníků, střeva a žaludku
- u karcinomu prsu a vaječníků amplifikace a zvýšená exprese c-erbB2 koreluje s horší prognózou a rezistencí k terapii
- 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 vázající se na protein HER2/neu

# Amplifikace *HER2/neu* u nádoru prsu



- amplifikace *HER2/neu* poprvé nalezena u nádoru prsu v roce **1987**
- amplifikace alespoň **5 kopií genu *HER2/neu* na buňku** spojena s horší prognózou



# Vsuvka: terapie cílená na členy EGFR

Terapie nádorů zaměřená na receptory EGFR:

## A. Monoklonální protilátky

**Herceptin (Trastuzumab)** – anti ErbB2 (HER2): léčba metastatických nádorů prsu, které mají vysokou expresi (a amplifikaci) *HER2/neu*

**Cetuximab (Erbix)** – anti EGFR: léčba pokročilých CRC spojených s expresí *EGFR*

(Cetuximab váže EGFR asi 50x silněji než EGF – mechanismus účinku je pravděpodobně přímá kompetice s ligandem)

Nutné vyšetření *K-ras*! (Proč?)

# Vsuvka: terapie cílená na členy EGFR

## B. Malé molekuly – inhibitory TPK domény

**Gefitinib (Iressa), Erlotinib (Tarceva)** – inhibují ATP vazebné místo EGFR: léčba pokročilých nemalobuněčných nádorů plic; gefitinib je účinný pouze u subpopulace pacientů s určitými mutacemi TPK domény EGFR

### **Lapatinib (Tyverb®)**

- 4-anulinochinazolin
- duální inhibitor HER1 a HER2
- inhibuje intracelulární tyrozinkinázové domény HER1 a HER2
- indikován k léčbě pokročilého nebo metastazujícího ca prsu s vysokou expresí *HER2*

# 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 konstitutivně stimuluje k proliferaci buňky s příslušným receptorem
  - exprese PDGF A nebo B nebo obou často detekována u sarkomů, gliomů, karcinomů plic, prsu, jícnu, žaludku, střeva

# PDGF



**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 - **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“)
- asi 17.000 Da, mají 55% homologii, podobnou funkci, ale bFGF je mnohem aktivnější; název odvozen od rozdílného isoelektrického bodu
- 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



# Rodina FGF



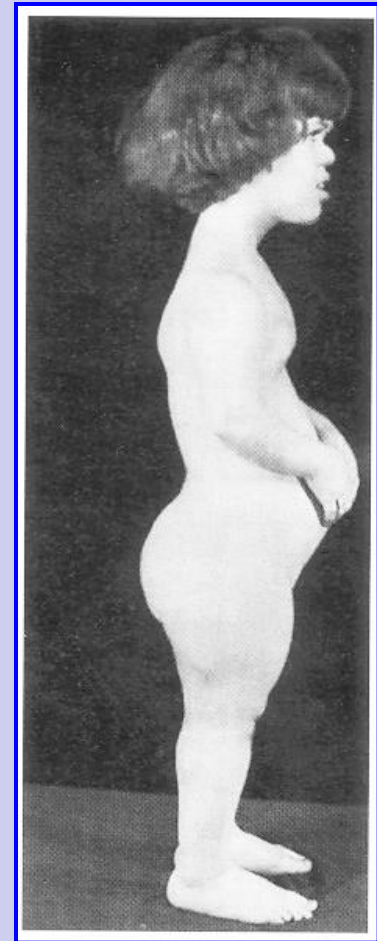
FGF receptory - 4 geny: **FGFR1** (*flg* nebo *fms*-like gen), **FGFR2**, **FGFR3** a **FGFR4** - geny ale mohou být alternativně sestřihovány a tvoří tak velmi komplexní skupinu receptorů (až 100 kombinací) s velmi různou afinitou k jednotlivým FGF faktorům

**K-sam** - receptor z rodiny **FGFR2**

- je detekován hlavně u málo diferencovaných adenokarcinomů
- zvýšená exprese koreluje s invazivitou a špatnou prognózou u nádorů žaludku

# Vsuvka: Achondroplázie

- Nejčastější příčina lidského trpaslictví; autozomálně dominantní onemocnění.
- Příčinou specifické mutace v genu **FGFR3** (G1138A ~ 98%; G1138C ~ 1-2%) v zárodečné linii.
- 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



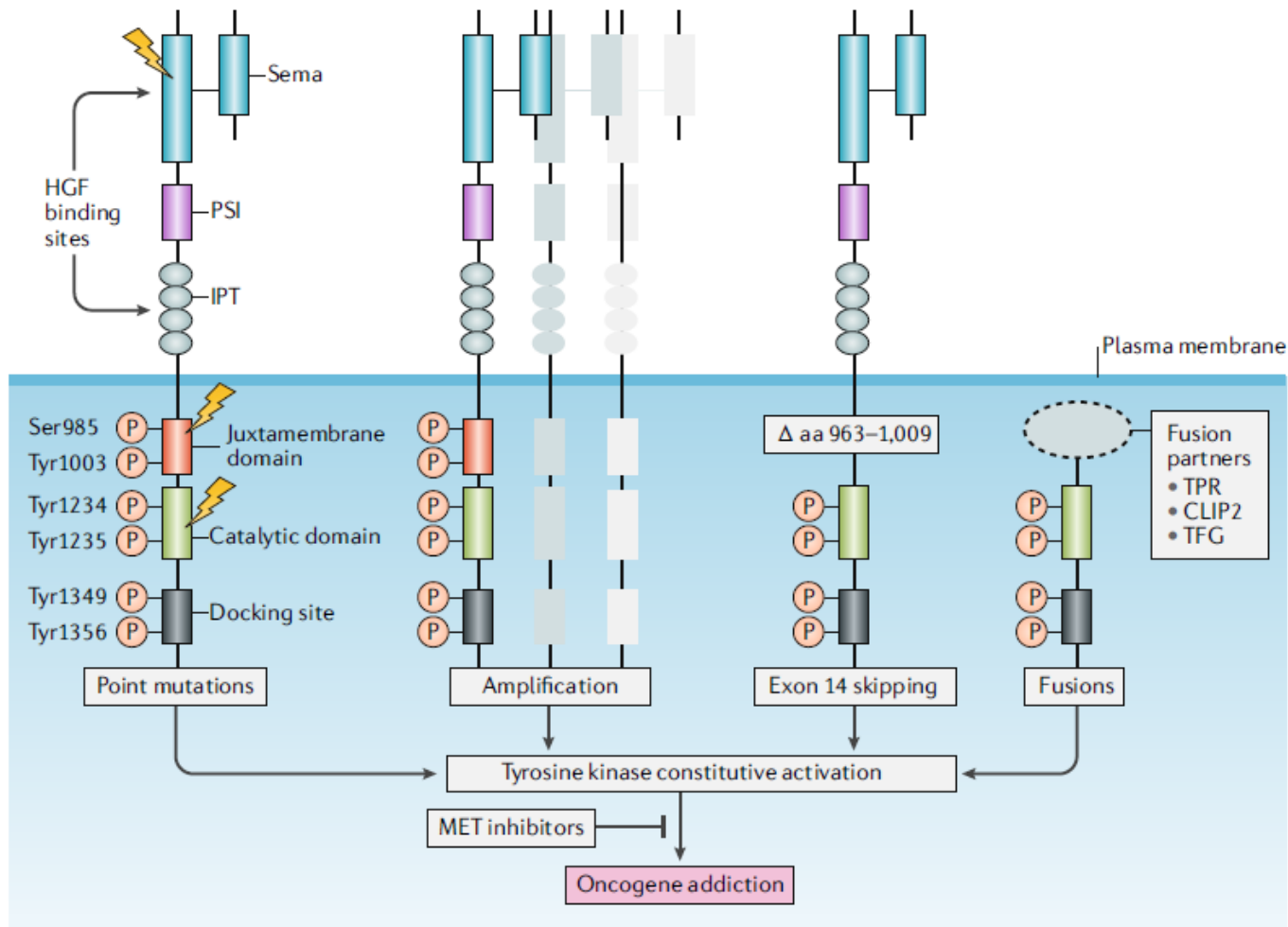
**HGF** („hepatocyte growth factor“; hepatopoietin A)

- 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

**c-met** (**MET**) kóduje receptor, který specificky váže HGF

- amplifikace c-met (nádory žaludku, melanomy)
- mutantní onkogenní forma c-met - zkrácená, konstitutivně aktivní (bez vazby HGF) nebo bodové mutace v TPK doméně (nádory ledvin)
- HGF produkovaný stromálními buňkami (zvýšená exprese) a c-met exprimovaný buňkami stromálními a nádorovými mohou kooperovat při růstu a morfogenezi některých nádorů

# Způsoby aktivace onkogenu *MET*



# Hereditární papilární karcinom ledviny



- autozomálně dominantní dědičnost; vysoce penetrantní
- spojeno se zárodečnými mutacemi **c-met**; gen lokalizován v lokusu 7q31
- papilární ca ledvin 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 *c-met*
- aktivace *c-met* blokuje terminální diferenciaci renálních tubulárních buněk
- protoonkogen *c-met* je mutován asi u **15 % sporadických** papilárních nádorů ledvin

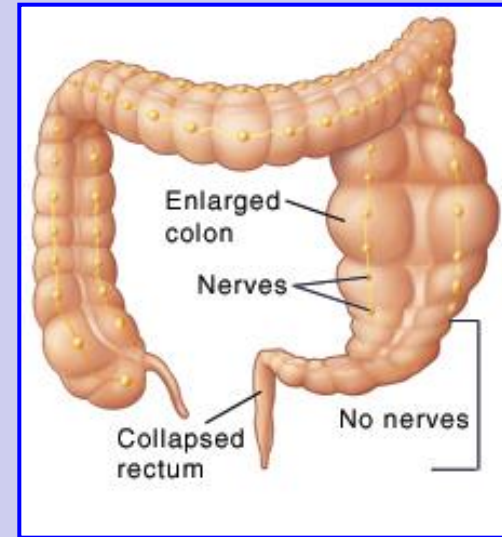
# RET



- „orphan“ receptor
- 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

# Vsuvka: Hirschprungova choroba

- 1886 – Harald Hirschprung popsal příčinu úmrtí dvou nemluvňat
- nedostatečná inervace způsobuje nedostatečnou peristaltiku a vede k chronické zácpě
- 18,6 případů na 100 000 narozených dětí
- pravděpodobnou příčinou je kombinace dvou mutací ve dvou genech: *RET* (CH 10) a *EDNRB* (CH 13)
- *RET* kóduje protein **RET**, který se účastní vývoje některých částí nervového systému (pohyb neuroblastů z neurální trubice k trávicímu traktu během vývoje embrya)



- protein **EDNRB** spojuje tyto nervové buňky s trávicím traktem – pravděpodobně více přispívá k vývoji HCH než se původně soudilo

# Vsuvka: Hirschprungova choroba

- asi 20% dětí má přidružené vývojové vady nebo syndrom; HN nejčastěji asociována s Downovým syndromem (7% pacientů), hluchotou, medulárním karcinomem štítné žlázy, MEN2, neurofibromatózou, neuroblastomem a vývojovými vadami srdce, trávicí trubice, mozku a močopohlavního ústrojí
- většina případů sporadických, familiární zátěž zvyšuje riziko až 200x
- multigenní onemocnění s více než 10 příčinnými geny, protoonkogen *RET* je nejprobádanější
- mutace *RET*: u poloviny familiárních a 7-35% sporadických forem



# RET



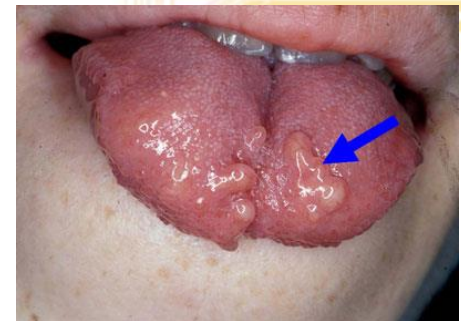
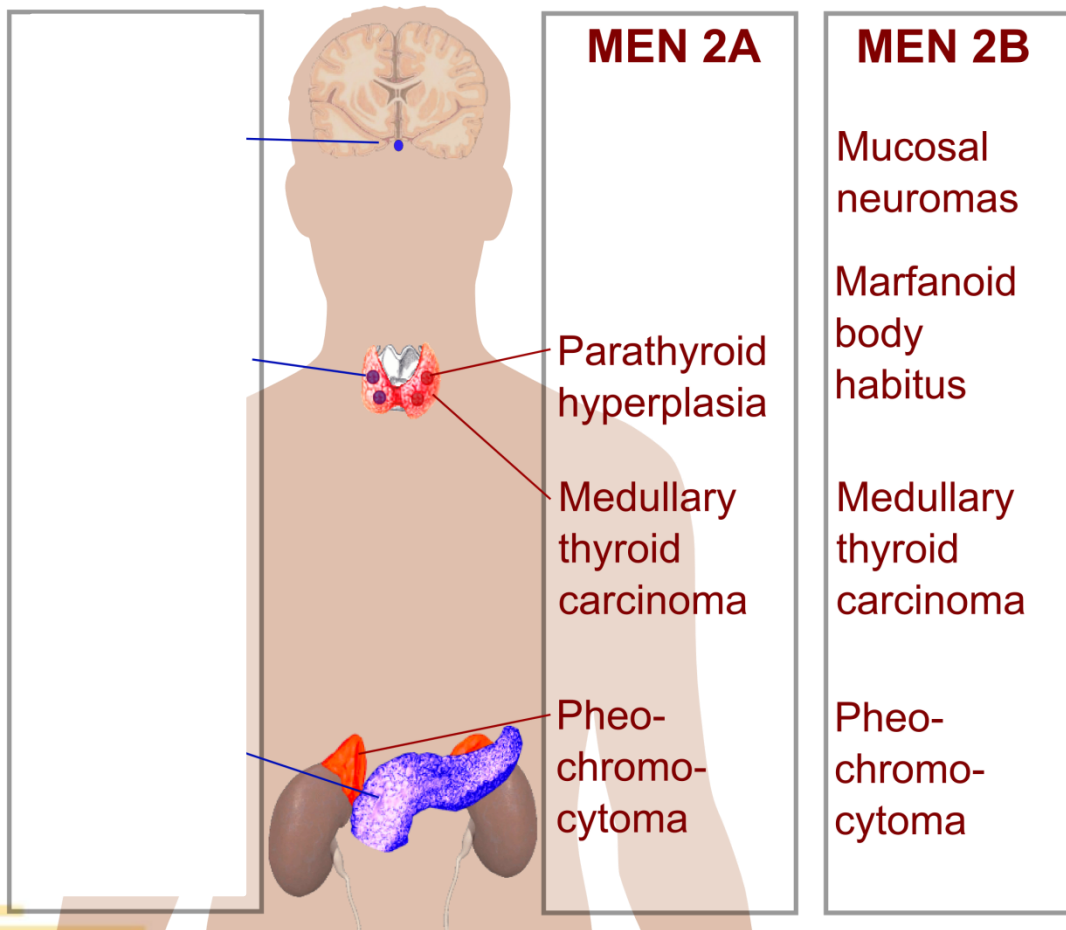
- „**gain-of-function**“ = onkogenní mutace  
při onkogenní aktivaci *RET* se uplatňuje několik odlišných typů mutací:
- **Vrozené missense mutace** způsobující konstitutivní aktivaci *RET* jsou spojeny s autozomálně dominantními vrozenými nádorovými syndromy **MEN** typu **2A** a **2B** („multiple endocrine neoplasia“ – mnohočetné endokrinní neoplazie) a **FMTTC** („familial medullary thyroid carcinoma“ – familiální medulární karcinom štítné žlázy).

# Mnohočetná endokrinní neoplazie typ2 (MEN2)



- autozomálně dominantní onemocnění; spojeno s mutacemi **RET**
- gen lokalizován v lokusu 10q11.2
- Typ A: vysoká incidence medulárního karcinomu štítné žlázy (nádor produkující kalcitonin z parafolikulárních buněk štítné žlázy), 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 %

# Mnohočetná endokrinní neoplazie typ2 (MEN2)



# 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



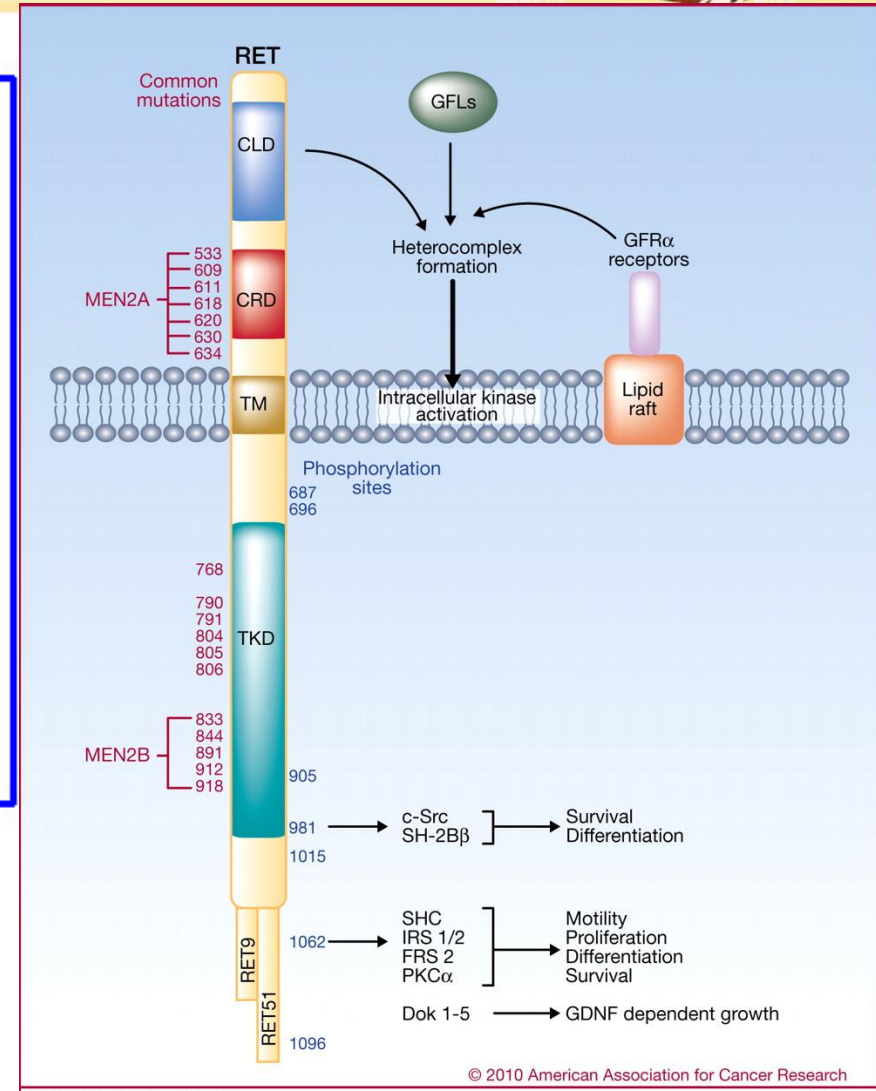
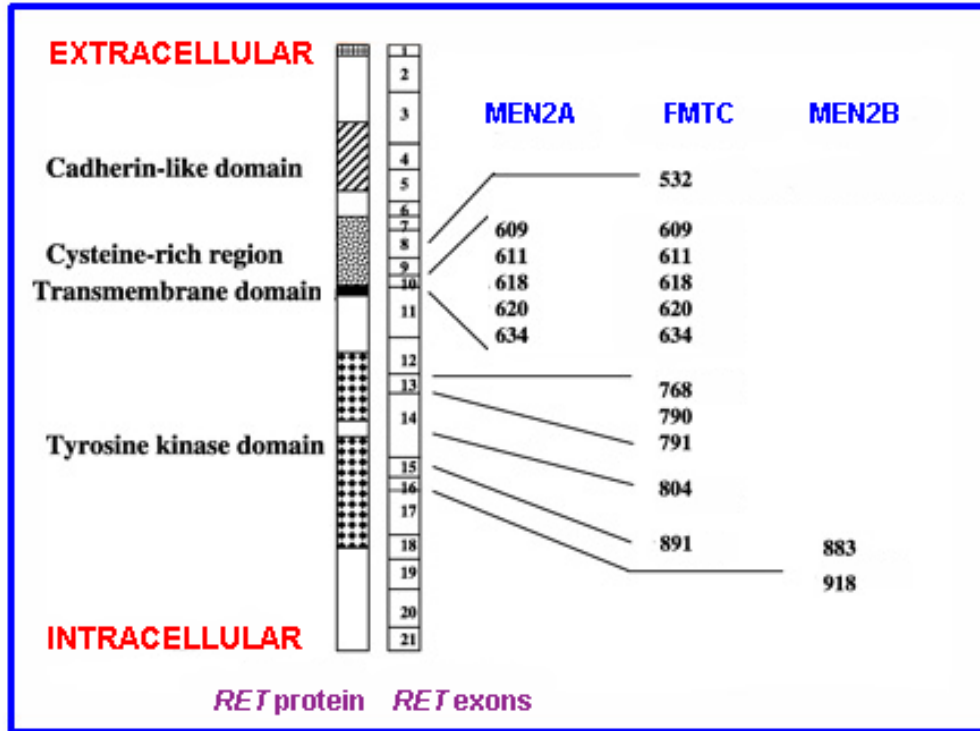
- toto onemocnění je méně časté než MEN, objevuje se u postižených později a je obecně méně agresivní
- souvisí se specifickými mutacemi **RET**
- mutace *RET* spojené s MEN2 a FMTC jsou poměrně přesně vymezené, existuje korelace mezi fenotypem a genotypem: mechanismus této korelace není znám, ale možné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

# Mutace *RET* vyskytující se u MEN2 a FMTC



1. Mutace se vyskytují hlavně v extracelulární doméně v oblasti pěti cysteinů („cystein rich domain“) 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



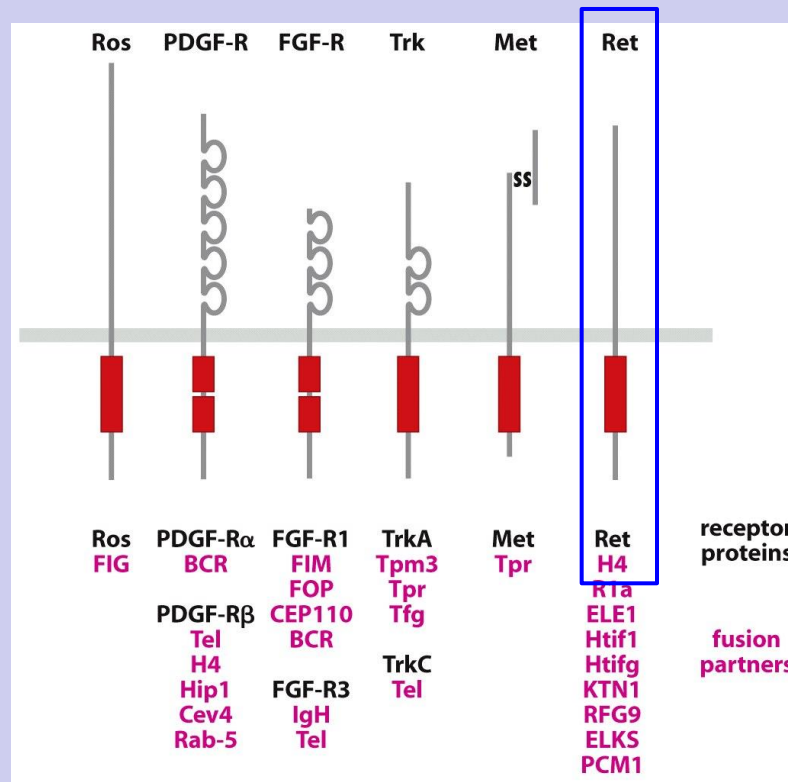
## „gain-of-function“

- 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 fúzní gen obsahuje tyrozin kinázovou doménu *RET* a část genu, který umožňuje konstitutivní dimerizaci, a tím konstitutivní aktivaci.



# RET

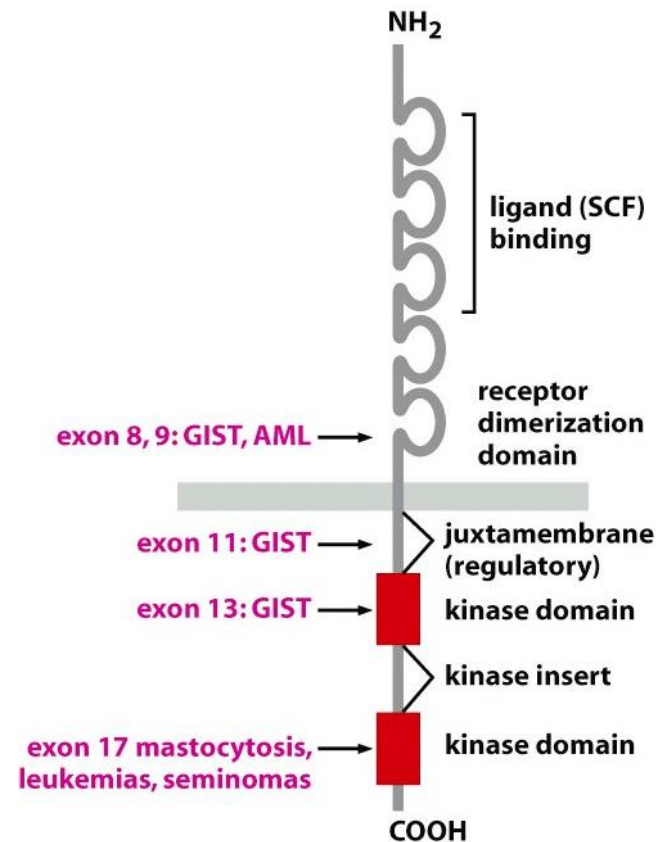


- Translokace 3' - částí *RET* spolu s 5' - částí jiného genu se vyskytuje u thyroidních papilárních karcinomů. Výsledný fúzní gen obsahuje tyrozin kinázovou doménu *RET* a část genu, který umožňuje konstitutivní dimerizaci, a tím konstitutivní aktivaci.
- *Radiation-induced human papillary thyroid cancer (PTC) is associated with chromosomal inversions that involve the genetic loci H4 and RET on chromosome 10.*

# RTK receptor Kit

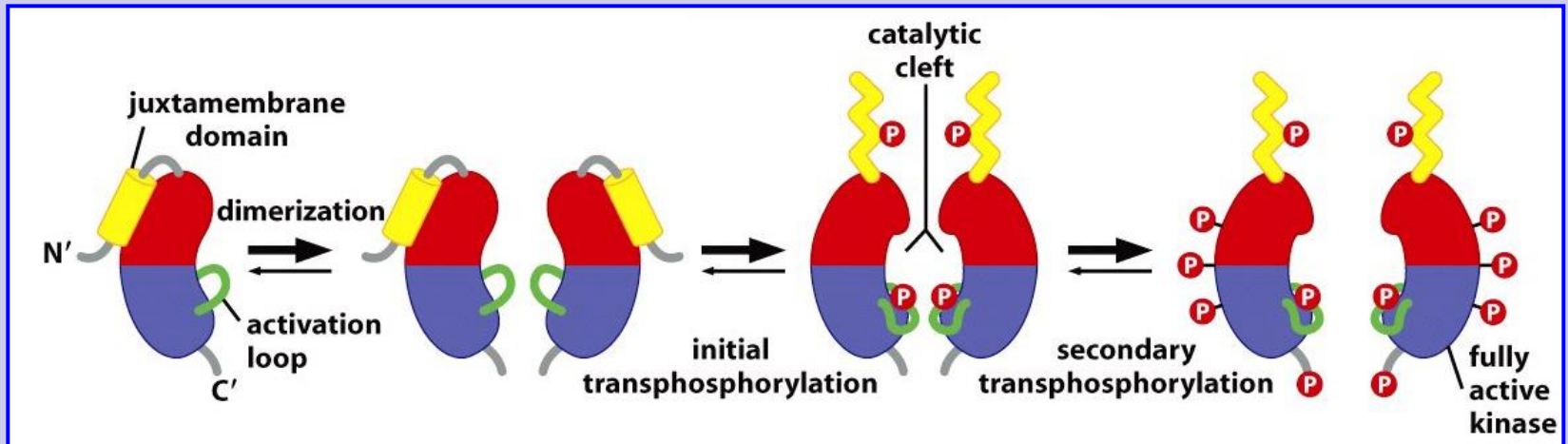


- původně popsán jako onkoprotein kódovaný retrovirem kočičího sarkomu
- jeho ligandem je **SCF** „*stem cell factor*“, dříve **MGF** „*mast cell growth factor*“; stimuluje některé krevní, ale také nehematopoietické buňky, např. melanocyty
- mutantní formy Kit signalizují konstitutivně, bez vazby ligandu; 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 JMD; 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*

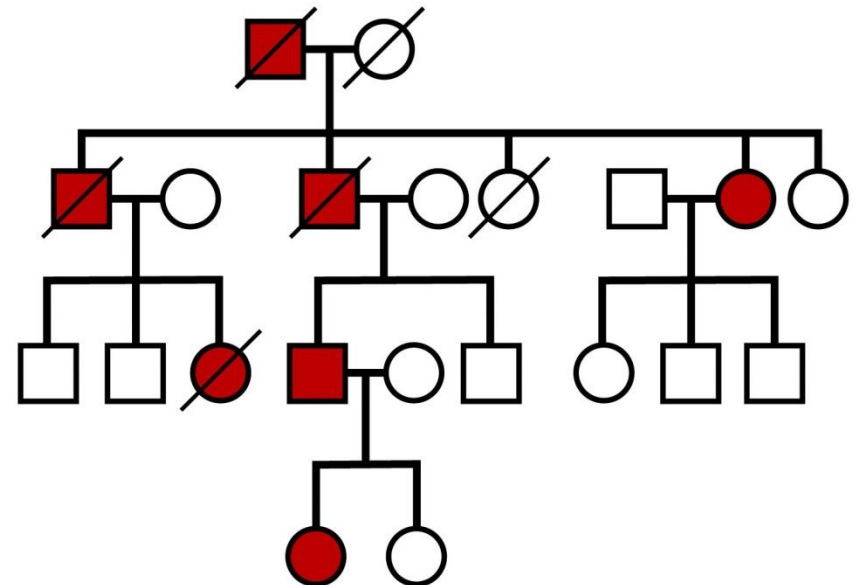


- GISTs se vyvíjejí z **mezenchymálních** buněk spodního gastrointestinálního traktu: zajišťují peristaltické kontrakce hladkého svalstva; **inaktivující mutace *kit*** v těchto buňkách má skutečně za následek jejich úplnou nefunkci (myší modely)
- **aktivující** mutace *c-kit* nalezeny téměř ve všech 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

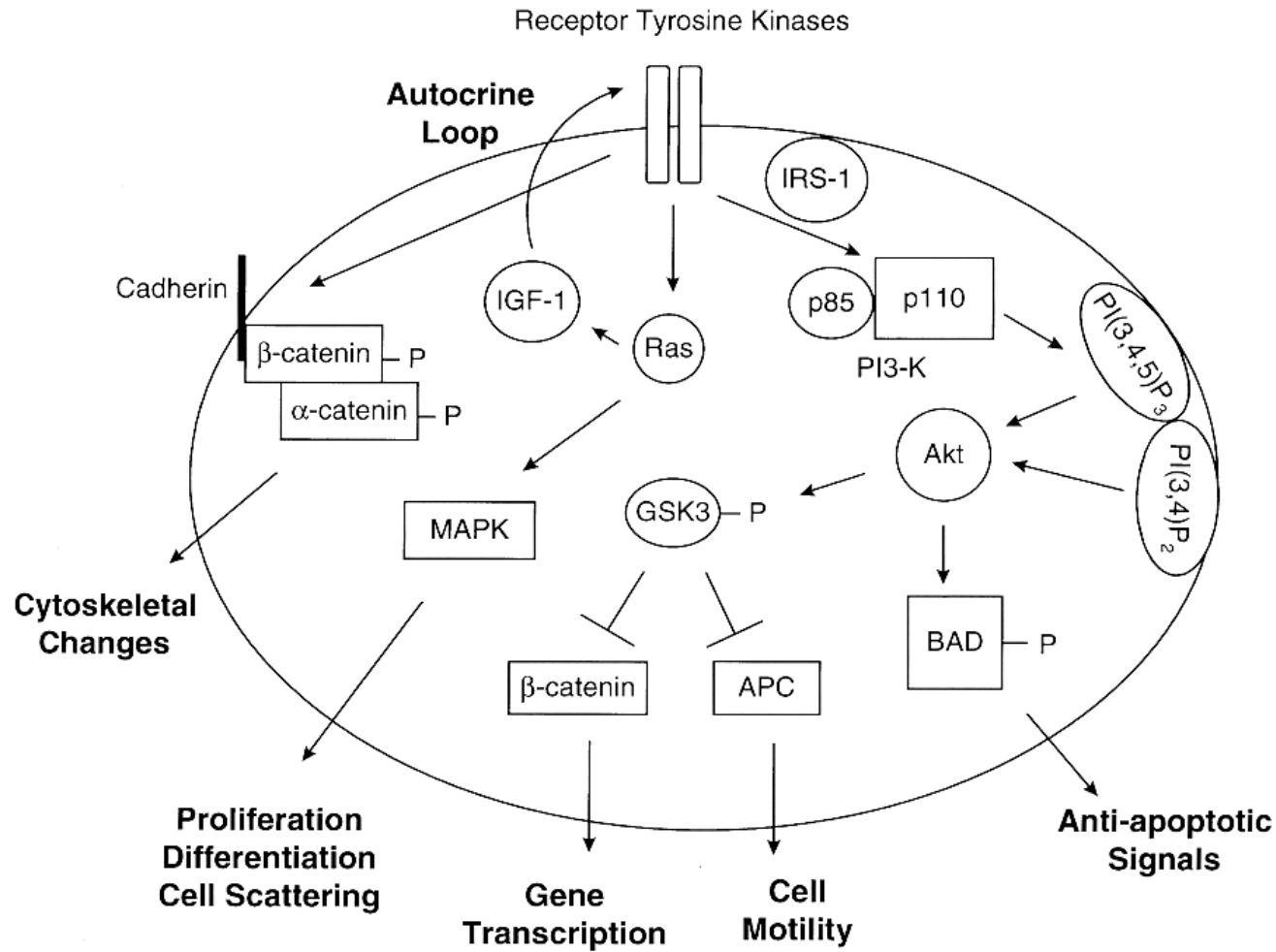
# Familiální gastrointestinální stromální nádory (GISTs)



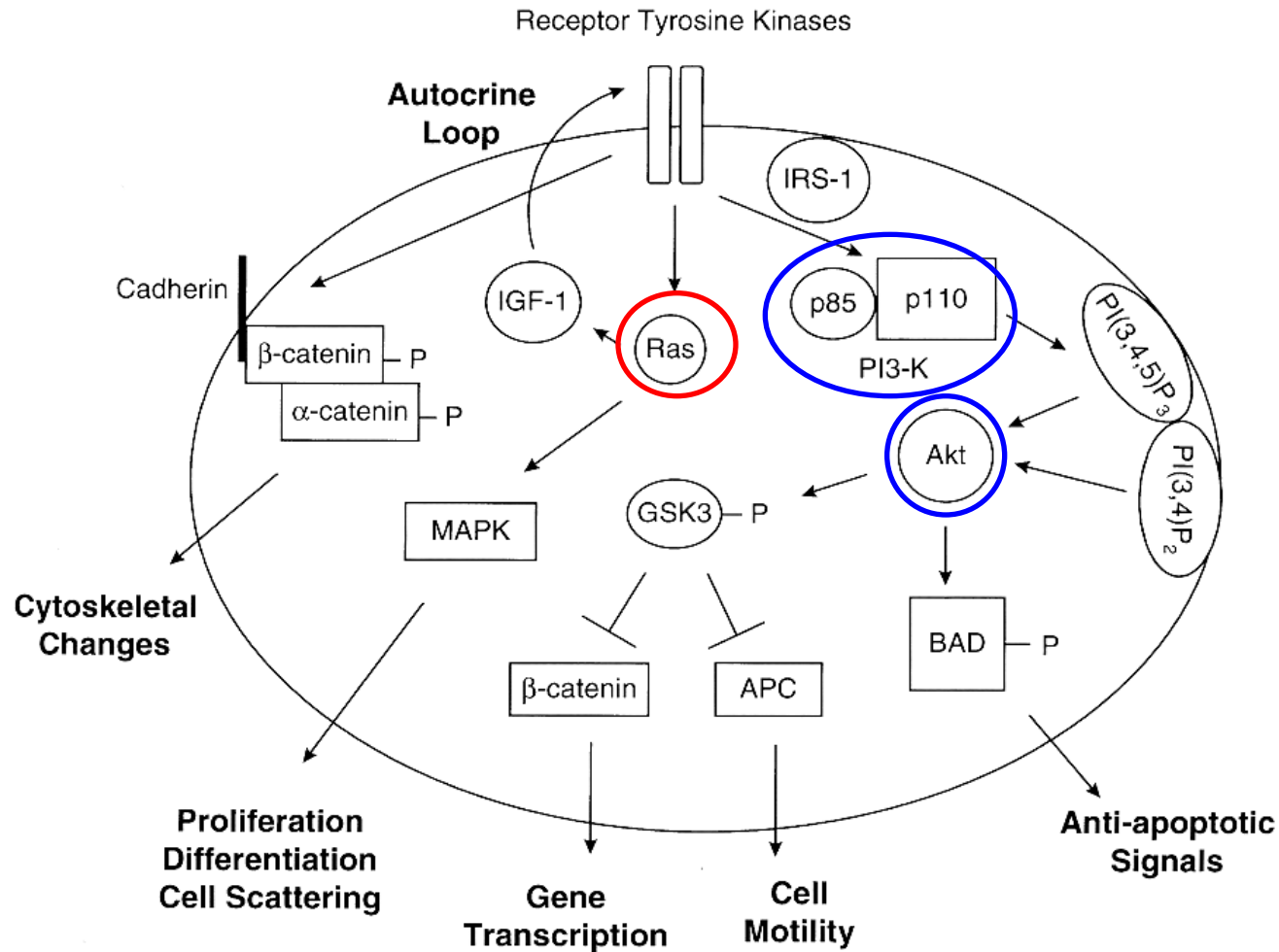
- familiální GISTs spojeny s mutacemi **c-kit** v zárodečné linii
- spektrum zárodečných mutací *c-kit* je stejné jako u somatických mutací souvisejících se sporadickými GISTs
- gen lokalizován v lokusu 4q11-12
- příklad japonské rodiny s mutací *kit* v zárodečné linii
- delece 1 AA v JM doméně
- fenotypická exprese této mutace se objevovala poměrně v pozdním věku, proto se také mohla udržet po 4 generace



# Signální dráhy aktivované RTK

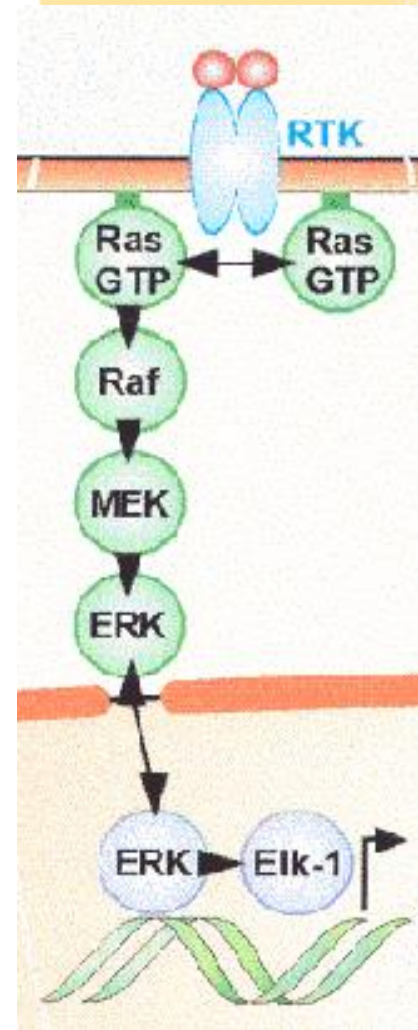


# Signální dráhy aktivované RTK



# Proteiny Ras

ras/Ras - první  
identifikovaný  
onkogen/onkoprotein

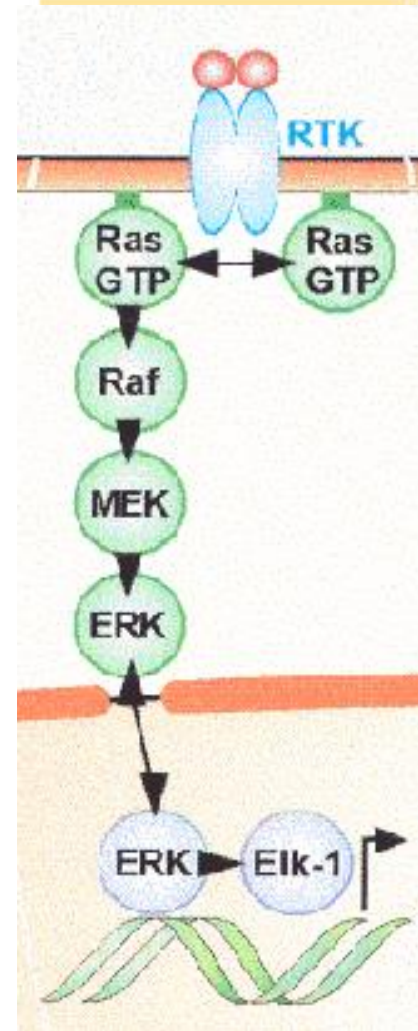




# Proteiny Ras

ras/Ras - první identifikovaný onkogen/onkoprotein

Původní představa o funkci Ras: zprostředkovává vazbu **Raf-1** k cytoplazmatické membráně a spoluaktivuje Raf-1



# Proteiny Ras

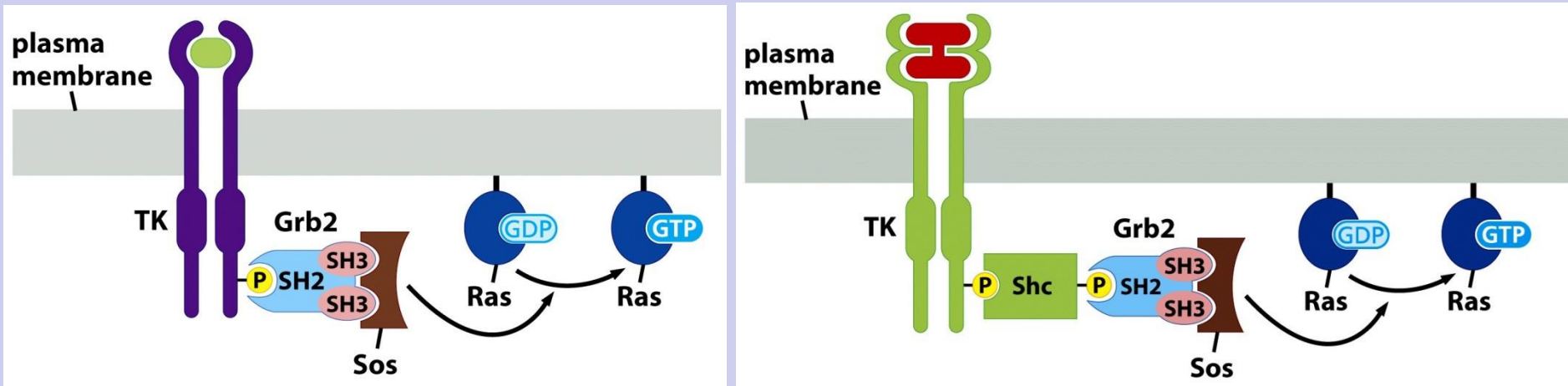


## Dnešní znalosti ukazují:

- 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“ efektem) 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.

# Přenos signálu z RTK receptoru na Ras

- I samotný přenos signálu z RTK receptoru na protein Ras je komplikovanější než se původně soudilo.
- 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 rodiny Ras

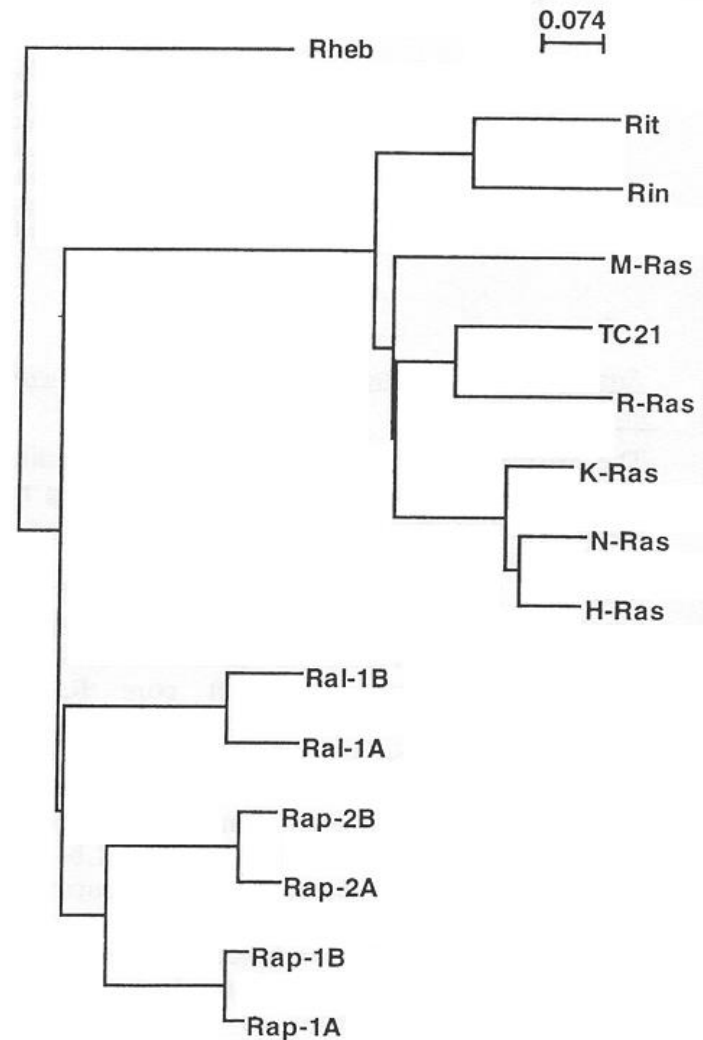


Nadrodina Ras má  
nejméně 35 / 65 členů:

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

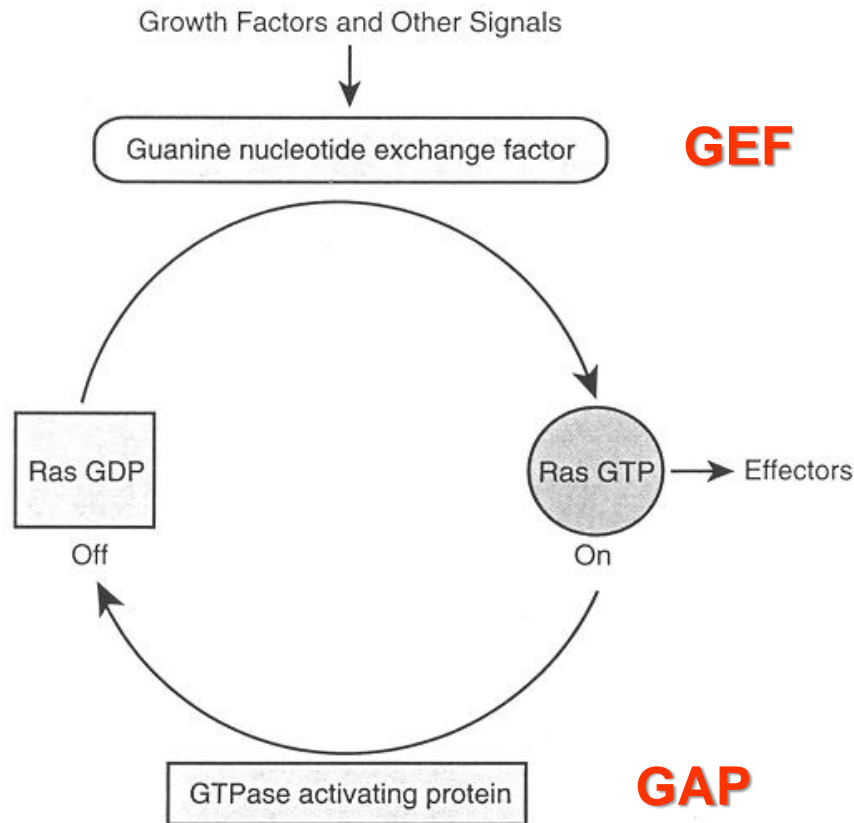


Proteiny **H-Ras**, **N-Ras** a **K-Ras4A** a **K-Ras4B** mají 188/189 aminokyselin (**p21<sup>Ras</sup>**). Jsou lokalizovány na vnitřní straně cytoplazmatické membrány, kde fungují jako přepínače při přenosu extracelulárních signálů do cytoplazmy.

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



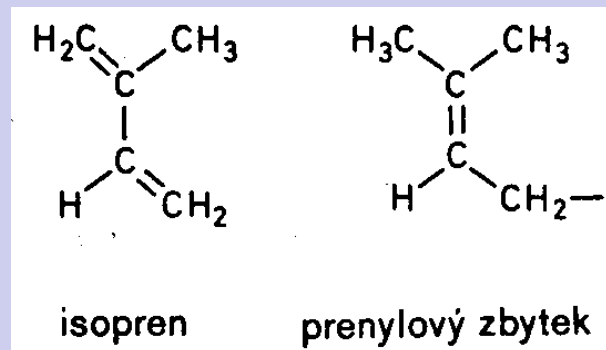
## Posttranslační modifikace:

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

# 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

# Proteiny Ras



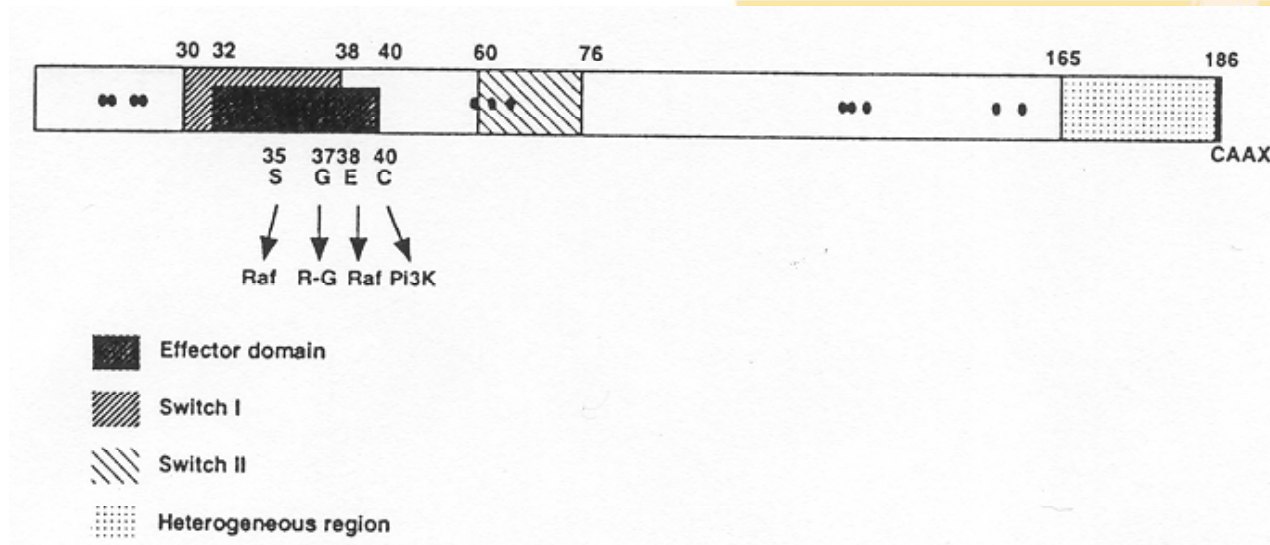
## Posttranslační modifikace:

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!**

# 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**.

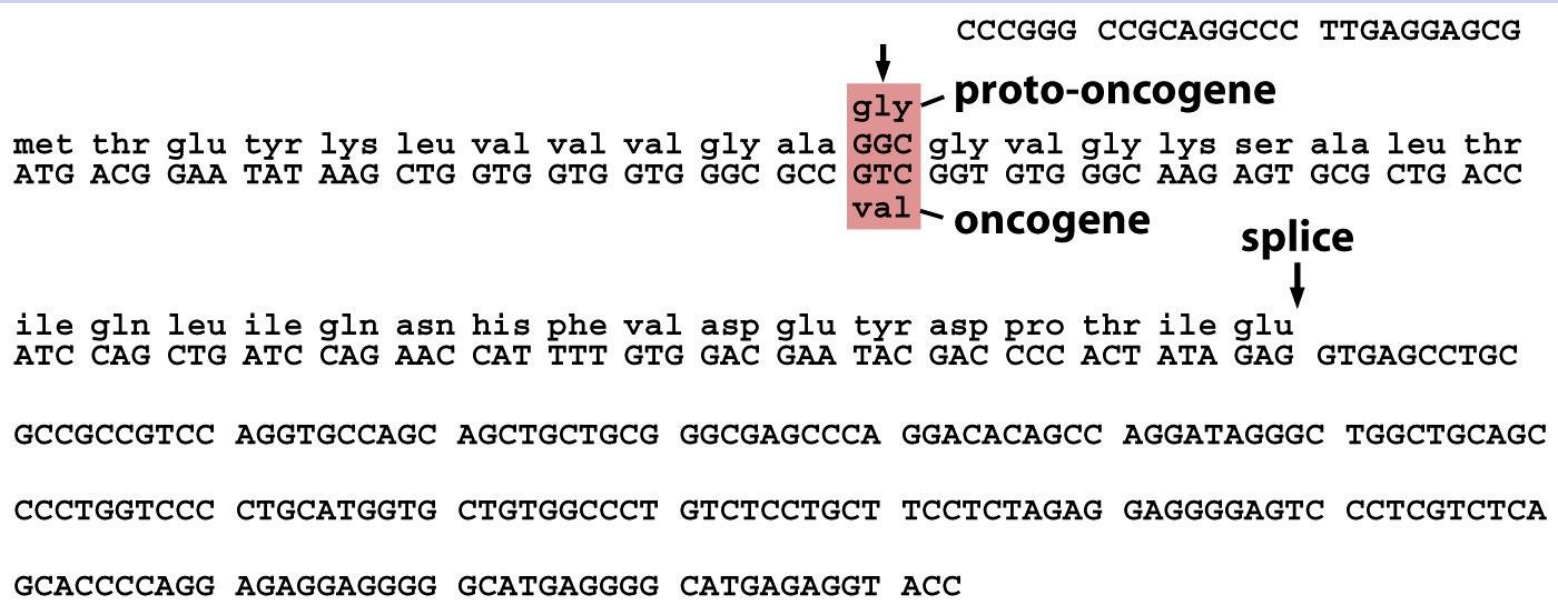
- mutace **H-ras** hlavně u nádorů kůže a dlaždicobuněčných nádorů hlavy a krku
- mutace **K-ras** hlavně u adenokarcinomů, kolorektálních nádorů a nádorů pankreatu
- mutace **N-ras** jsou časté u hematopoiетických malignit, hlavně u AML a MDS

Onkogenní mutace posilují aktivitu Ras:

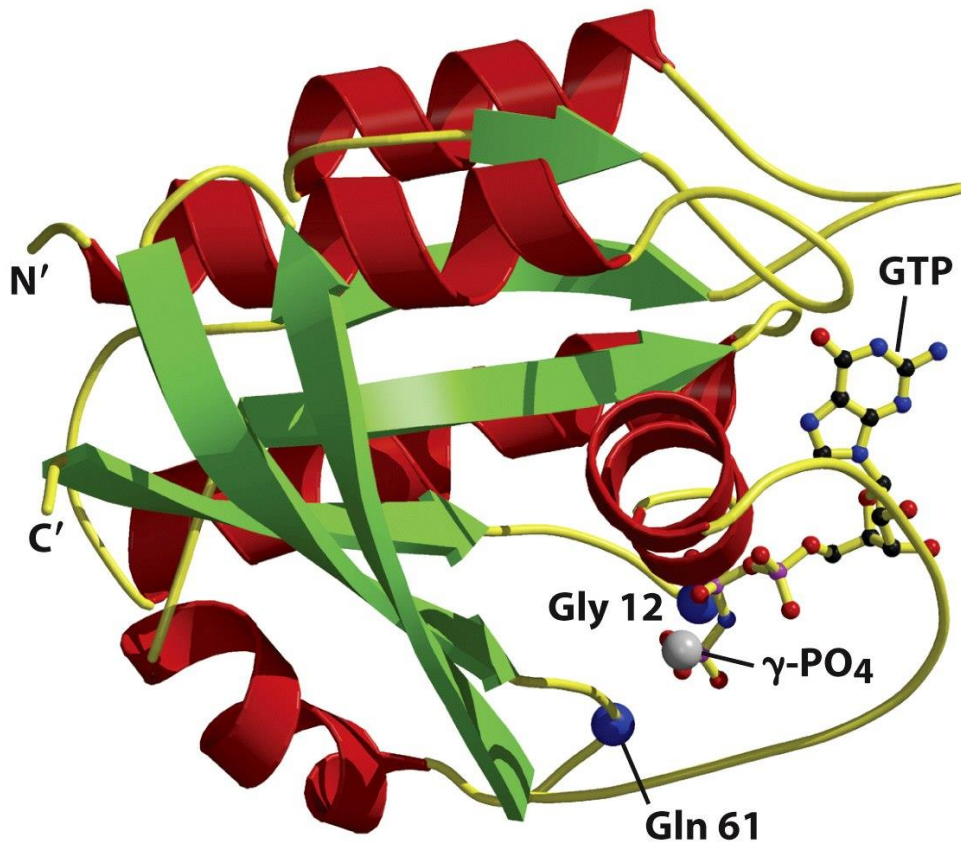
- v kodonech: **12, 13, 59, 61, 63** - vzniklé proteiny mají poškozenou GTPázovou aktivitu a jsou rezistentní k působení GAP proteinů
- v kodonech **16, 19, 116, 117, 119, 144, 146** - vzniklé proteiny mají usnadněnou výměnu GDP/GTP
- u některých nádorů je zvýšená exprese Ras

# 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 farnezylyl transferázy (FTIs):** (např. peptidy typu CAAX - dobře pronikají do buněk, jsou specifické a účinné, málo cytotoxické)

- Inhibují farnezylacii Ras a blokují tak jeho posttranslační modifikace 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).

# Inhibitory FT (FTIs)

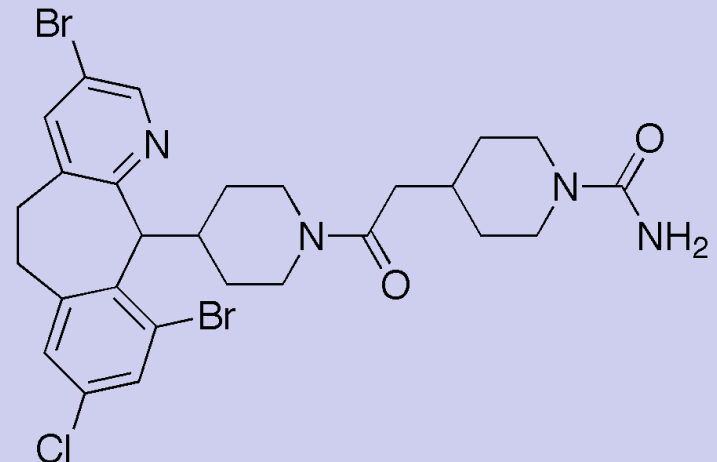
V klinických testech testováno alespoň šest inhibitorů:

1. **BMS-214662** (Bristol-Myers Squibb, Princeton, NJ)
2. **L778123** (Merck and Co., Inc., Whitehouse Station, NJ)
3. **lonafarnib** (experimentální název SCH66336; Sarasar™; Schering-Plough Corporation, Kenilworth, NJ)
4. **FTI-277** (Calbiochem, EMD Bio-Sciences, San Diego)
5. **L744832** (Biomol International L.P., Plymouth Meeting, PA)
6. **tipifarnib** (experimentální název R115777; Zarnestra®; Ortho Biotech Products, L.P., Bridgewater, NJ); nejpokročilejší testování



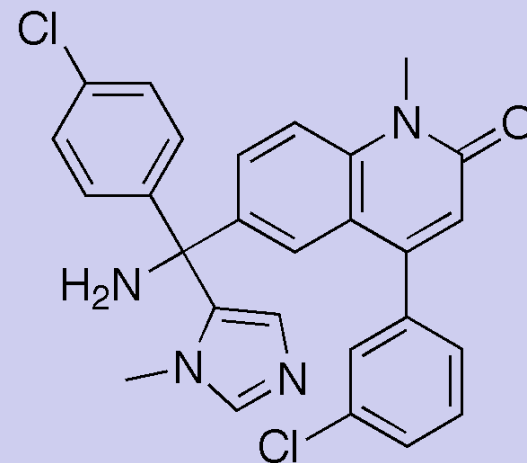
# Lonafarnib: inhibitor FT

- syntetický tricyklický derivát karboxamidu s protinádorovými vlastnostmi
- primárně určeno pro léčbu nádorů (klinické studie)
- jako součást koktejlu lonafarnibu a dalších dvou léků prokázal pozitivní účinek u pacientů s progerií



# Tipifarnib: inhibitor FT

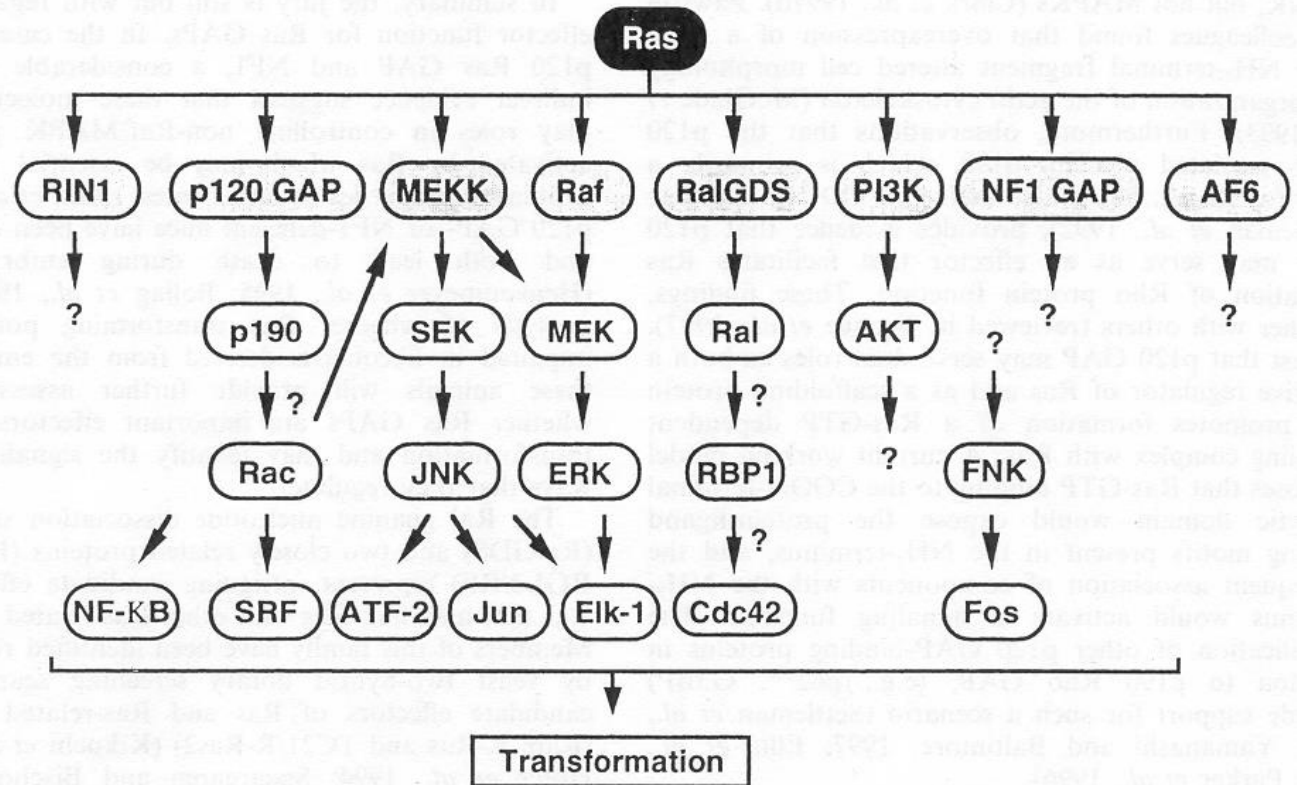
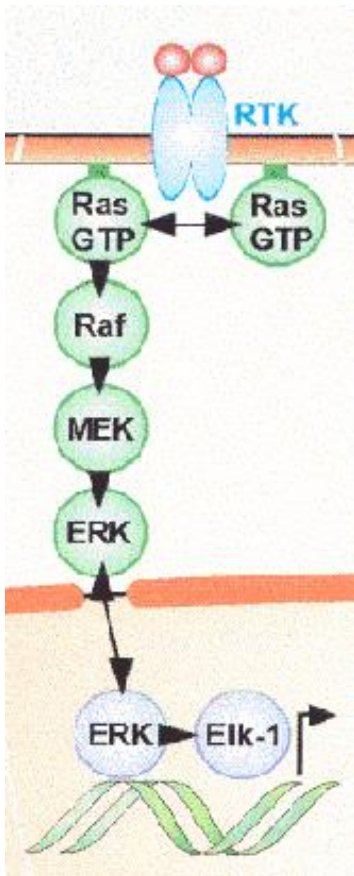
- klinické studie: podání Tipifarnibu pacientům s **AML** nad 65 let – nepovoleno FDA, neosvědčilo se (2005)
- dále testováno u pacientek s karcinomem prsu, u pacientů s neurofibromatózou



# Inhibitory FT (FTIs)

- zatím se jako protinádorová léčba příliš neosvědčily
- vedlejší účinky
- zpochybněno, zda jejich efekt je primárně přes inhibici Ras
- ...

# Proteiny Ras mají mnoho efektorů

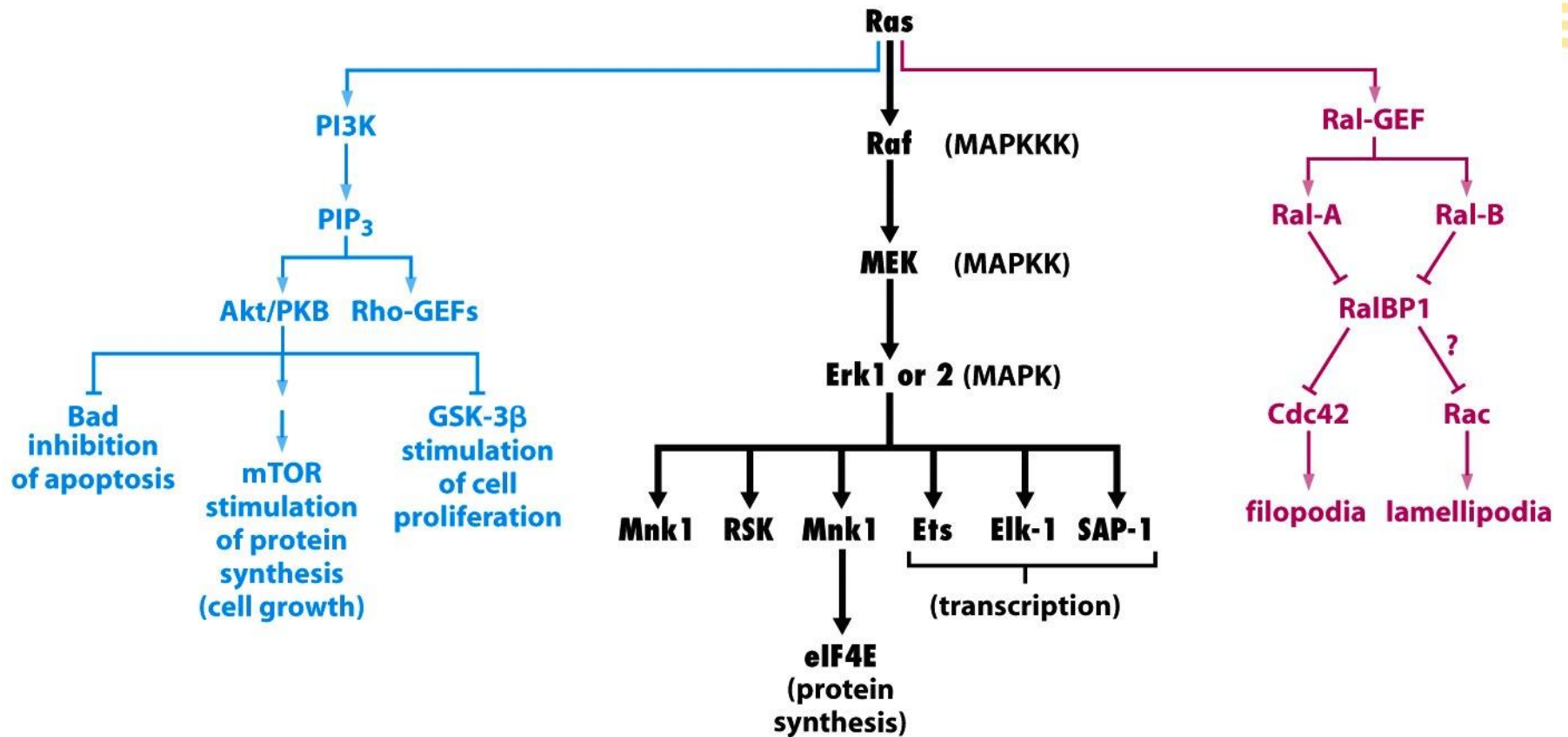


# Ras aktivuje tři klíčové efektorové dráhy



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

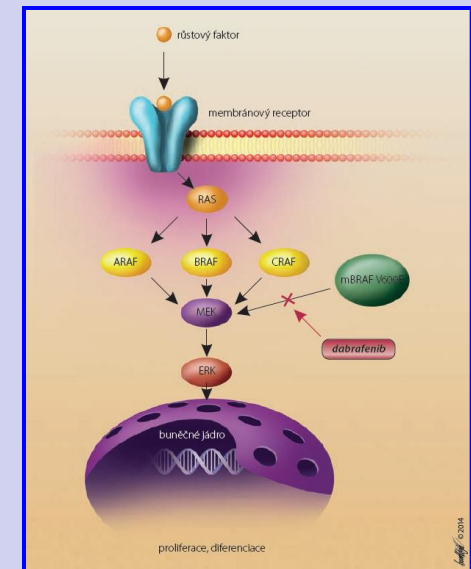


- **Raf-1**: je volně v cytosolu, ale silně přitahován aktivním Ras – tak je přiváděn k membráně a aktivován.
- Aktivovaný Raf-1 stimuluje **MEK** („MAP-kinase extracellular signal-regulated kinase“) fosforylací na serinu.
- Aktivovaná MEK je duální kináza: fosforyluje na tyrozinu i serinu/threoninu 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*

# BRAF

- gen *BRAF* je lokalizovaný na chromozomu 7 v oblasti 7q34
- skládá se z 18 exonů, délka přepisované mRNA je 2478 bp
- mutace genu *BRAF* asociovány s řadou nádorů: kolorektální karcinom, maligní melanom, nehodgkinské lymfomy, thyroidní papilární karcinom, nemalobuněčný karcinom plic a adenokarcinom plic
- **80%** mutací je způsobeno transverzí T1799A, která vede k aminokyselinové záměně **V600E**
- Mutace V600E propůjčuje buňkám transformační aktivitu, protože simuluje fosforylaci na T599 a/nebo S602 v aktivační doméně proteinu BRAF. Díky tomu zůstává protein BRAF permanentně v aktivním stavu, bez ohledu na signalizaci RAS.





# RASopatie



- **RAS/MAPK Syndromes**
- skupina neuro-kardio-facio-kutánních syndromů (NCFC)
- specifická skupina vývojových vad vyvolaných **zárodečnými mutacemi genů**, které kódují proteiny participující v signální kaskádě **RAS/MAPK**
- podobné příznaky - např. kožní příznaky, vady obličeje, opožděný růst, mentální retardace, srdeční vady, zvýšené riziko nádorového onemocnění
- **syndrom Noonanové**, neurofibromatóza typu 1, **Legiův syndrom**, **Costello syndrom** a další
- přestože každé z těchto onemocnění má své typické klinické příznaky, existuje zde celá řada fenotypově se překrývajících příznaků, které značně komplikují možnost správné diagnostiky a tím i účinné léčby
- jako celek tvoří RASopatie jednu z největších skupin malformačních syndromů postihujících přibližně 1 z 1000 jedinců

# RASopatie



- **somatické** mutace v RAS/MAPK dráze často vedou ke vzniku **nádorových onemocnění**, proto se předpokládalo, že i **RASopatie** budou spojeny s větším výskytem malignit: riziko **jen asi 3,5x větší** než u běžné populace; nejčastěji se jedná o **hematologické malignity**
- přestože některé aktivační somatické mutace jsou shodné s mutacemi zárodečnými, mutace způsobující RASopatie obvykle nebývají tolik aktivující: například velmi častá onkogenní mutace v genu **BRAF (V600E)** se u kardio-facio-kutánního syndromu, pro který jsou mutace v *BRAF* typické, **nenachází**
- předpokládá se, že **silně aktivační** onkogenní mutace **nejsou** v **zárodečném** stavu **slučitelné se životem**

# RASopatie: přehled syndromů



Syndrom	Číslo OMIM	Asociované geny
Syndrom Noonanové	# 163950	<i>PTPN11, SOS1, KRAS, NRAS, RAF1, BRAF, RRAS, SOS2, LZTR1, A2ML1, RIT1, RASA2, KAT6B</i>
Neurofibromatóza typu 1	# 162200	<i>NF1</i>
Legiův syndrom	# 611431	<i>SPRED1</i>
LEOPARD syndrom (Noonan syndrom with multiple lentiginies)	# 151100	<i>BRAF, PTPN11, RAF1</i>
Costellův syndrom	# 218040	<i>HRAS</i>
Kardio-facio-kutánní (CFC) syndrom	# 115150	<i>BRAF, KRAS, MA2K1, MAP2K2</i>
Noonan-like syndrom with loose anagen hair	# 607721	<i>SHOC2</i>
Hereditární gingivální fibromatóza	# 135300	<i>SOS1, GINGF2, REST</i>
Kapilární malformace – arteriovenózní malformace	# 608354	<i>RASA1</i>
CBL syndrom	# 613563	<i>CBL</i>
Neurofibromatóza-Noonan syndrom	# 601321	<i>NF1, MAP2K2</i>



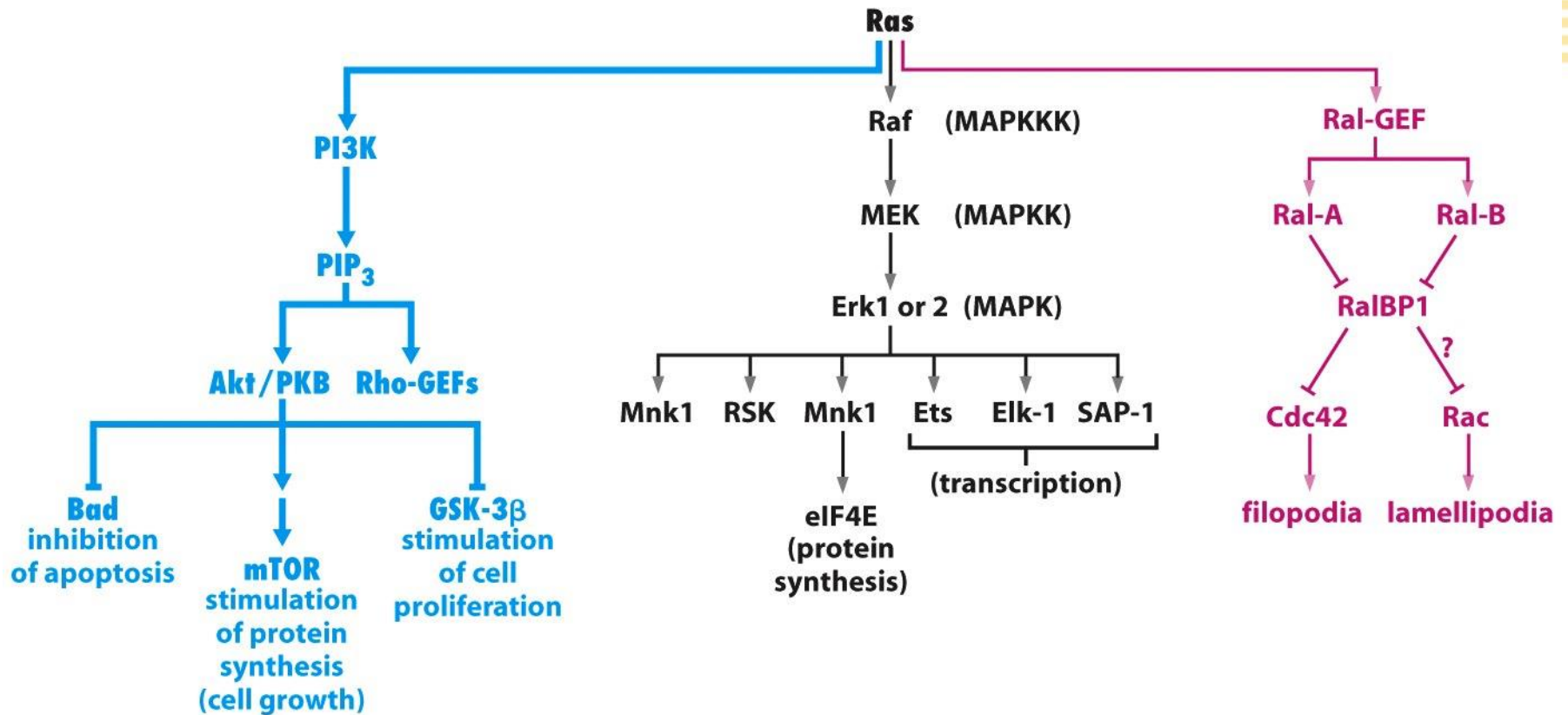
# Mutace protoonkogenů v zárodečné linii ?!



## Proč tolerováno??

- exprese omezena na úzce vymezené typy tkání (*RET*, *c-kit*)
- exprese daných protoonkogenů se během organogeneze objevuje natolik pozdě, že umožňuje normální vývoj embrya (*c-met*)
- „jen mírně“ aktivující mutace (*rasopatie*, *c-kit*)
- specifické typy mutací (*cdk 4*)

## 2. Ras ⇒ PI3K

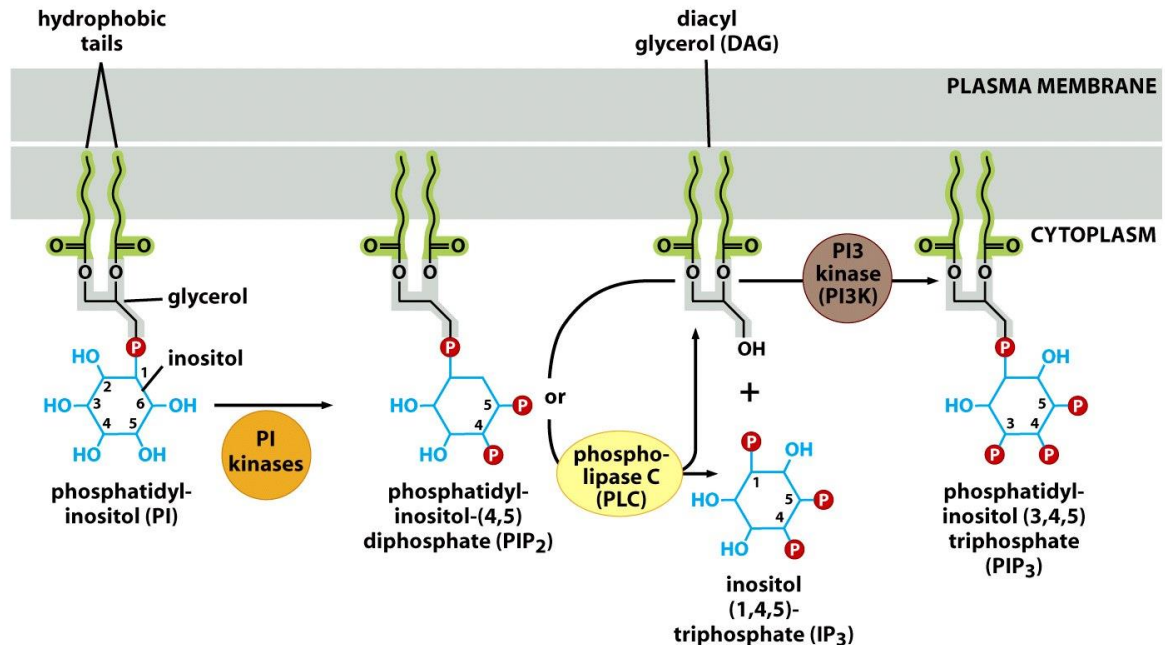


# PI3K



## Fosfatidyl inozitol 3 – kináza - lipid kináza

- složena ze dvou podjednotek: regulační p85 a katalytické p110
- katalyzuje fosforylaci fosfatidyl-inozitolu v pozici D-3, a tak produkuje fosfolipidový **sekundární „messenger“** ( $\text{PIP}_2 \rightarrow \text{PIP}_3$ ) nutný k aktivaci následných („downstream“) efektorů



# PI3K a PIP<sub>3</sub>

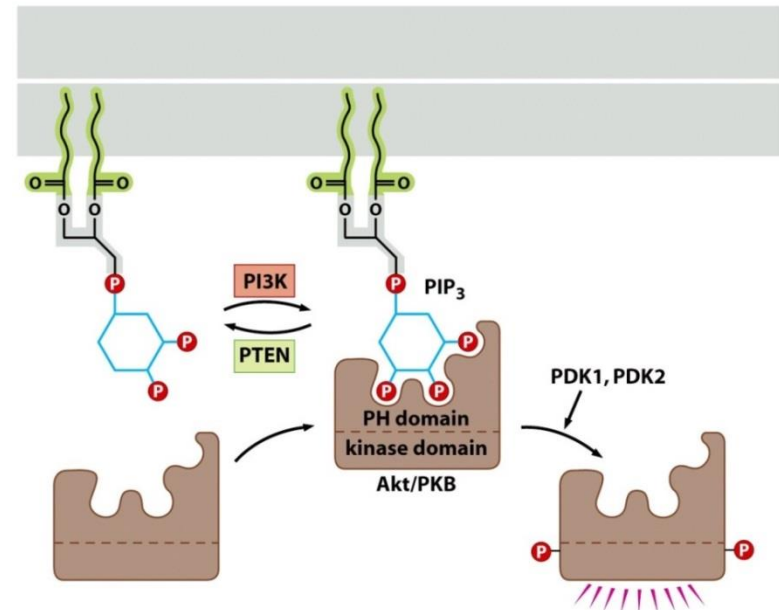


- Hladina PIP<sub>3</sub> je přísně regulovaná. PIP<sub>3</sub> vzniká účinkem **PI3K** a je zpět konvertován na PIP<sub>2</sub> účinkem fosfatáz: PTEN, SHIP1, SHIP2
- **PTEN** = PIP<sub>3</sub> lipid fosfatáza; **nádorový supresor** (v nádorech prsu a glioblastomech; Cowdenův syndrom)
- PI3K může být aktivována prostřednictvím např. PDGF, NGF, IGF-1, interleukinu-3, přes integriny...

- PI3K vytvoří PIP<sub>3</sub> a na PIP<sub>3</sub> se váže kináza **Akt**
- tím je Akt vázána na membránu, fosforylována a tím aktivována

➤ Dva mechanismy vedoucí k hyperaktivitě Akt:

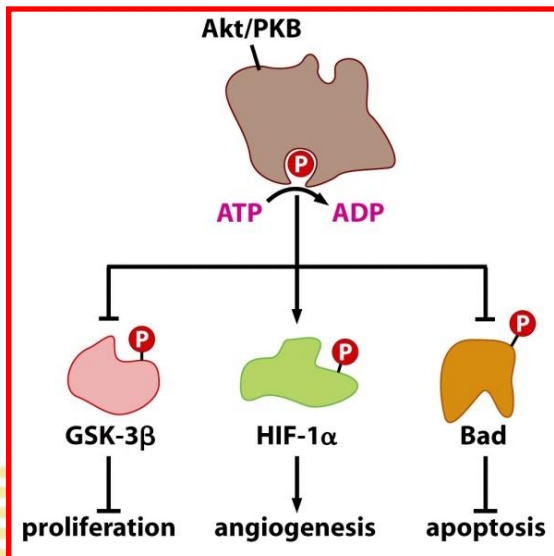
1. aktivace PI3K
2. inaktivace PTEN



# 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 $\alpha$ , PKB $\beta$  a PKB $\gamma$ ).



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

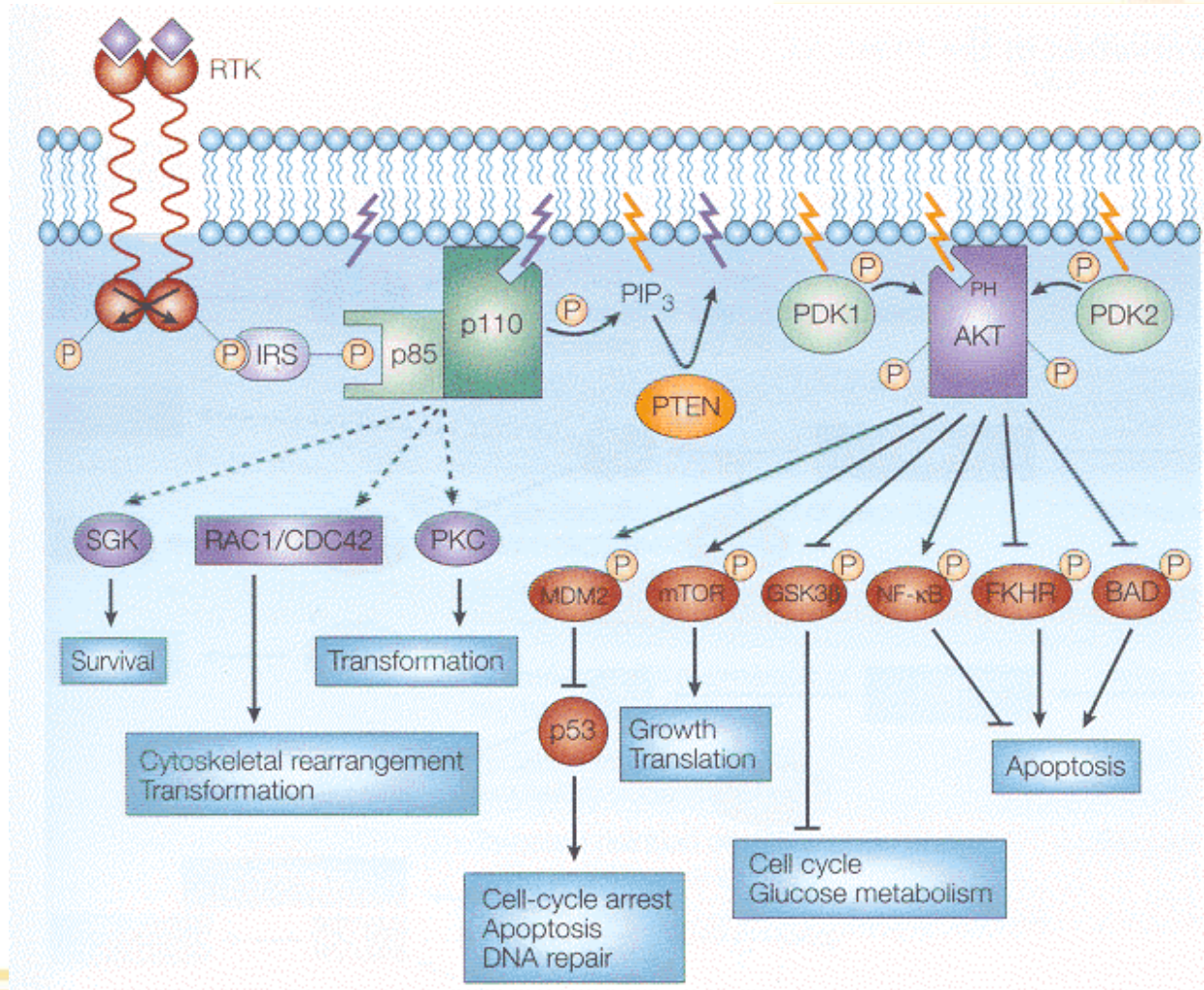


# AKT po aktivaci

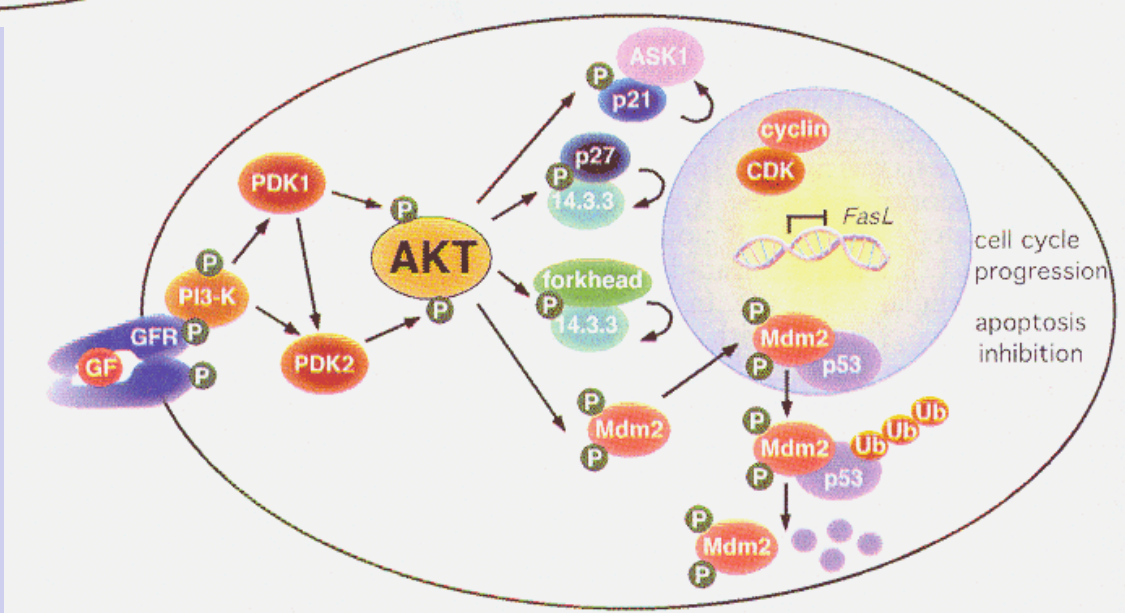
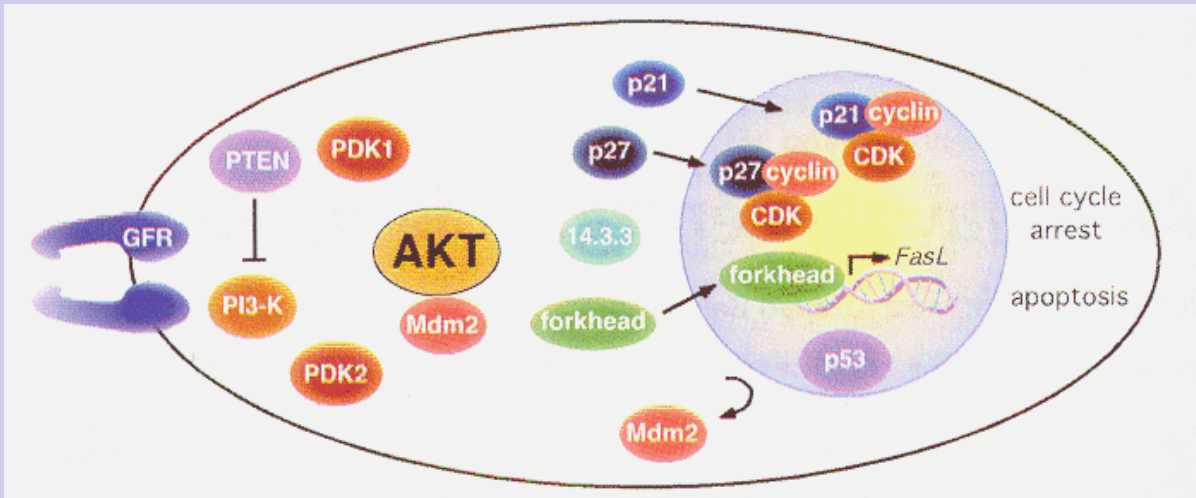


- Může fosforylovat více než 9000 proteinů.
- Indukuje antiapoptotické signály, zabraňuje uvolnění cytochromu C z mitochondrií, inaktivuje faktory (TF forkhead) indukující např. **FasL**, inaktivuje pro-apoptotický faktor **Bad** a **prokaspázu-9**
- Aktivuje buněčný cyklus: reguluje stabilizaci **cyklinu D**, blokuje transport **p21<sup>WAF1</sup>** do jádra a transport **p27<sup>KIP1</sup>** 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  $\beta$ -kateninu.
- 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



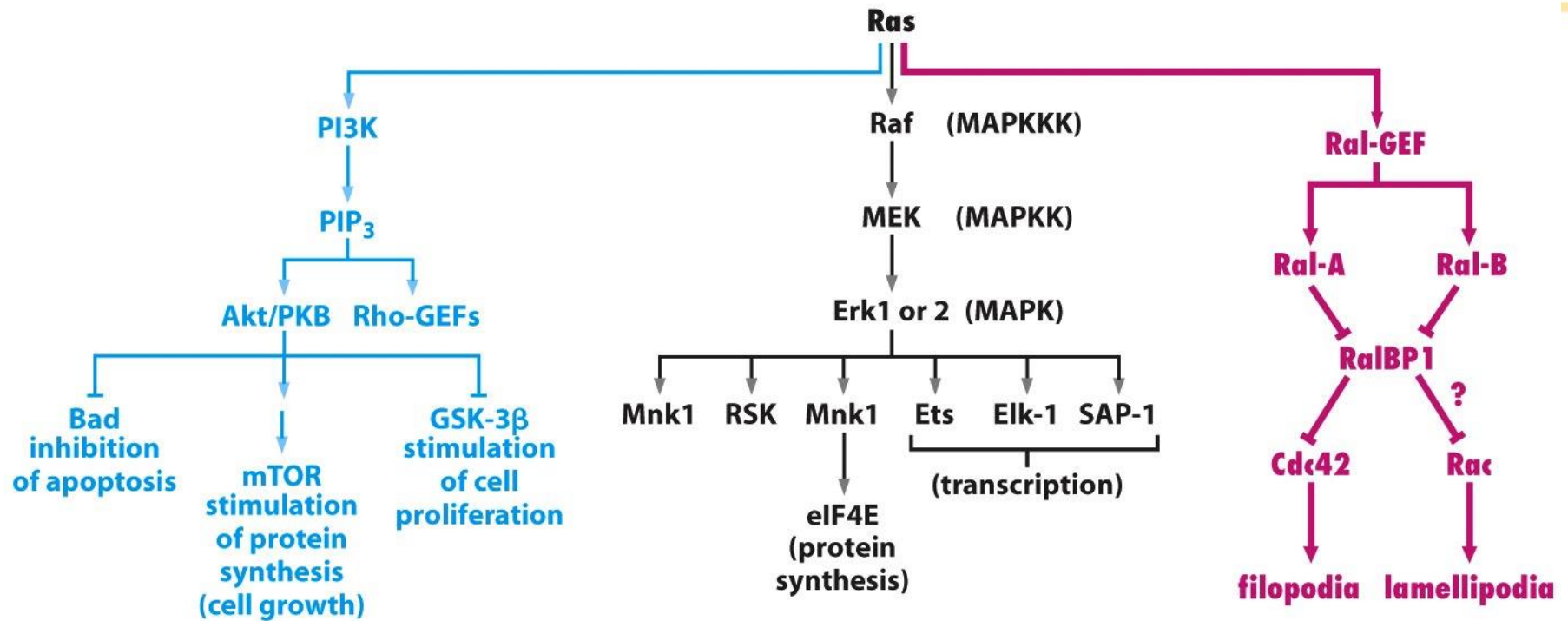
# AKT v kancerogenezi

- 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 zvýšená exprese 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).

# Změny dráhy PI3K u lidských nádorů

Cancer type	Type of alteration
Glioblastoma (25–50%)	<i>PTEN</i> mutation
Ovarian carcinoma	<i>PTEN</i> mutation; <i>AKT2</i> amplification; <i>PI3K</i> amplification; PI3K <i>p85α</i> mutation
Breast carcinoma	increased Akt1 activity; <i>AKT2</i> amplification; <i>PTEN</i> mutation
Endometrial carcinoma (35%)	<i>PTEN</i> mutation; <i>PTEN</i> methylation <sup>a</sup>
Hepatocellular carcinoma	<i>PTEN</i> mutation
Melanoma	<i>PTEN</i> mutation; <i>PTEN</i> methylation <sup>a</sup>
Lung carcinoma	<i>PTEN</i> mutation
Renal cell carcinoma	<i>PTEN</i> mutation
Thyroid carcinoma	<i>PTEN</i> mutation; Akt/PKB overexpression
Lymphoid	<i>PTEN</i> mutation
Prostate carcinoma (40–50%)	<i>PTEN</i> mutation
Colon carcinoma (>30%)	Akt/PKB overexpression; <i>PI3K</i> mutation

# 3. Ras ⇒ 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.

