

Curso de fármacos antitumorales
ICIC-2006
TENERIFE

Terapia antitumoral y productos de traslocación oncogénicos 2ª parte: Bcr-Abl y Myc

Javier León (Universidad de Cantabria)
27 de Julio 2006

CLASIFICACION DE LEUCEMIAS Y LINFOMAS (SEGÚN LOS BIOLOGOS MOLECULARES)

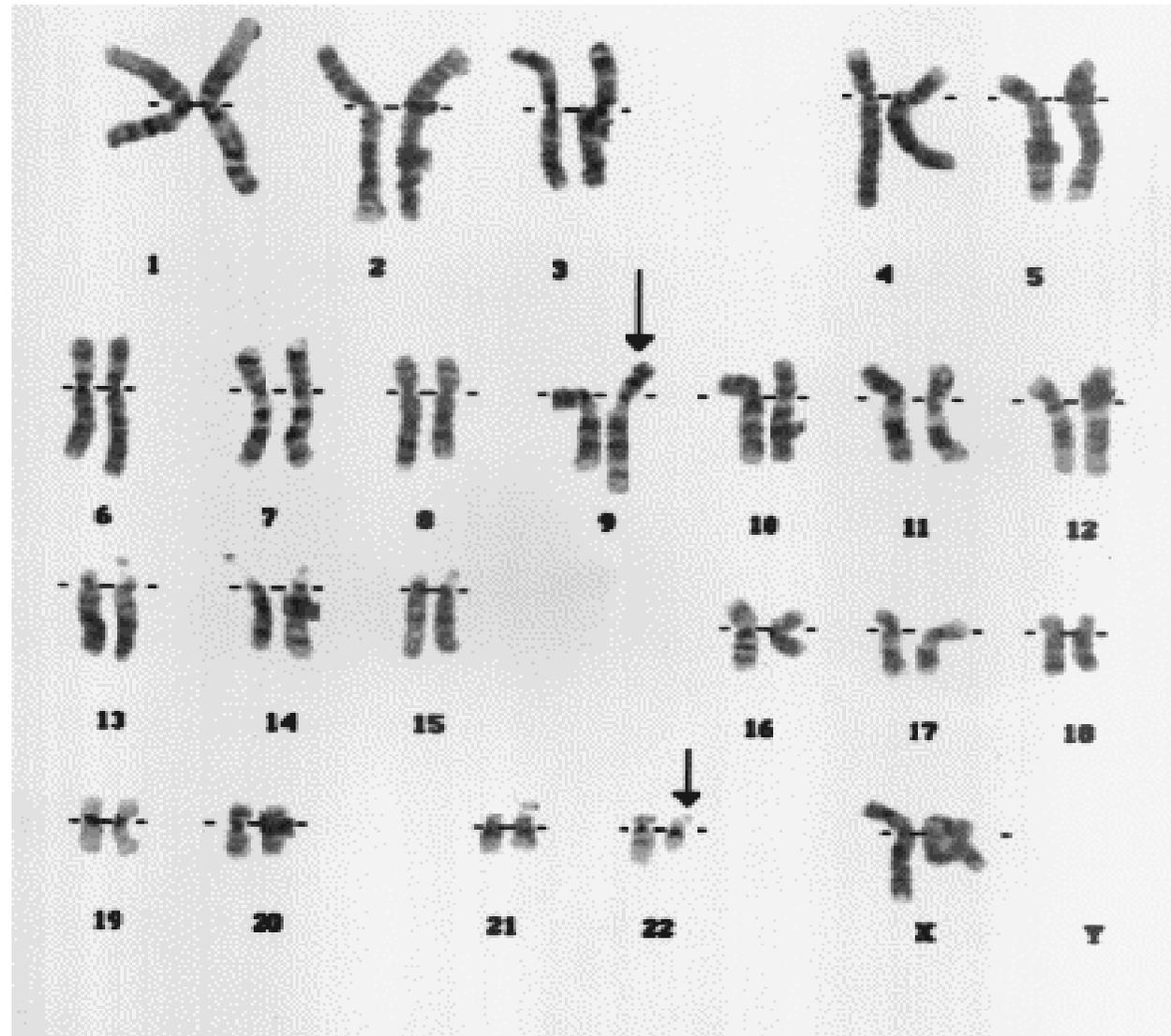
A) Las que se conoce el oncogén:

- Todas las leucemias promielocíticas (M3): *PML-RAR α*
- Todas las leucemias mieloides crónicas: *BCR-ABL*
- Todos los linfomas de Burkitt: *c-Myc*
- Casi todos los linfomas foliculares: *Bcl2*
- Casi todos los linfomas del manto: *Ciclina D1 (Bcl1)*

B) Las que no se sabe el oncogén responsable:

- El resto (aunque en casi todos los tipos aparecen oncogenes o genes supresores de tumores con frecuencias de hasta el 50%): *AML1, ALL1, Bcl6, N-ras,*

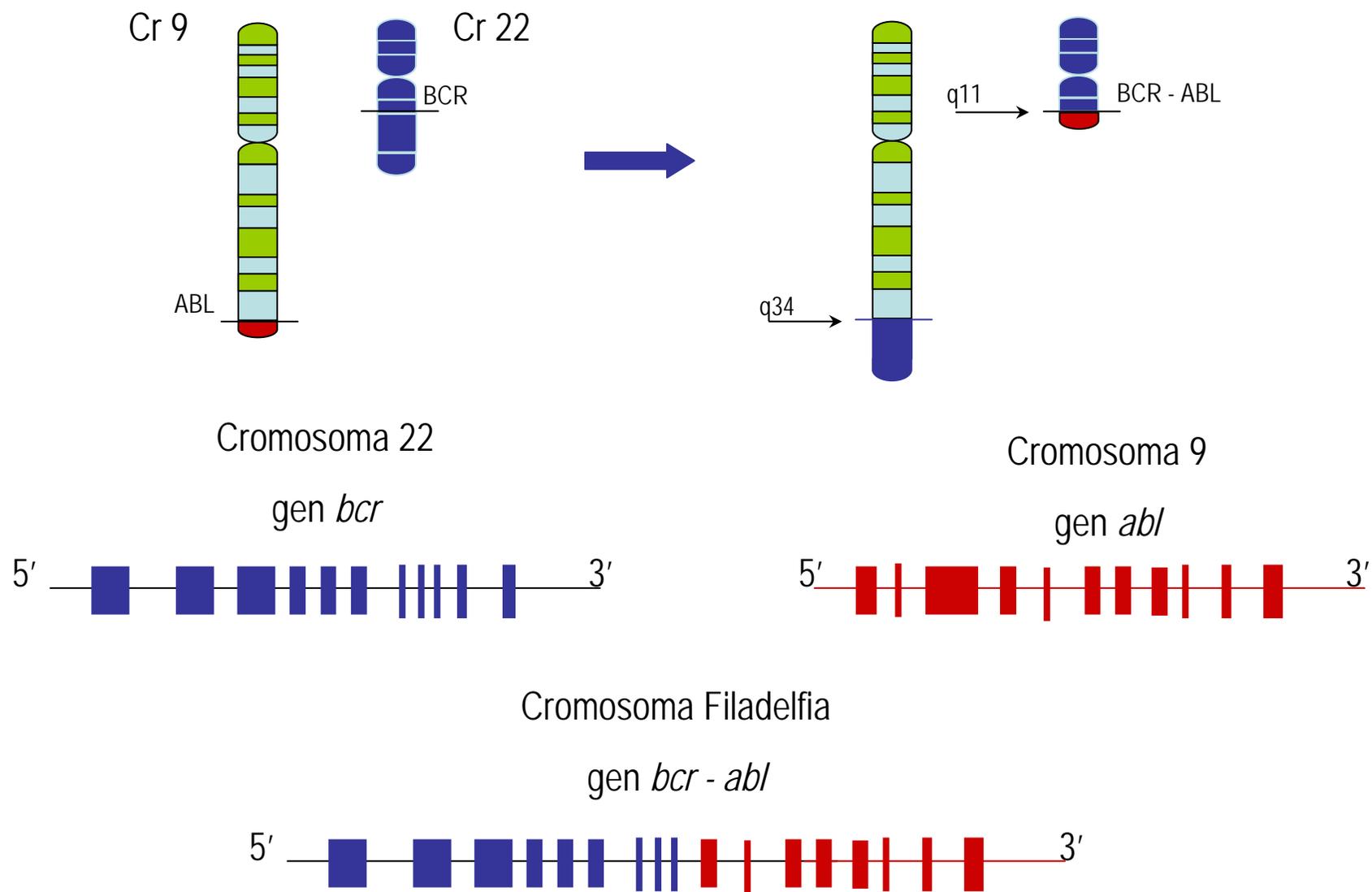
Todos los casos de leucemia mieloide crónica tienen la traslocación t(9;22)
→ cromosoma Filadelfia
(1960)



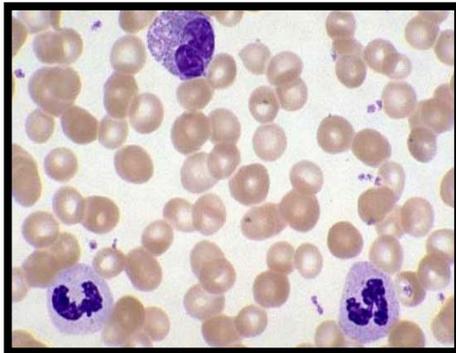
Leucemia Mieloide Crónica

- 1960 – Se asocia Cromosoma Filadelfia y LMC
- 1973 – El cromosoma Filadelfia es el resultado de t(9;22) traslocación recíproca de estos cromosomas
- 1983 – Se descubren los genes involucrados en la traslocación Bcr-Abl, se define la actividad desregulada de “Tirosin Kinasa” como mecanismo patogénico y se desarrollan los primeros modelos animales.
- 1996 – Inhibidores específicos de esta acción “Tirosin-Kinasa”
- 2001 – Se publican los primeros resultados de estudios clínicos con el STI571 (imatinib)

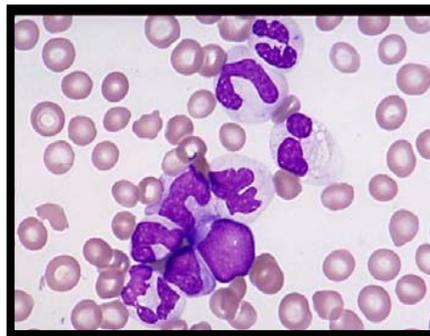
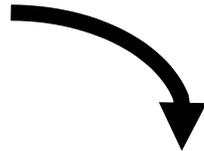
Cromosoma Filadelfia - t(9;22)



Leucemia mieloide crónica: un ejemplo de Myc en progresión tumoral



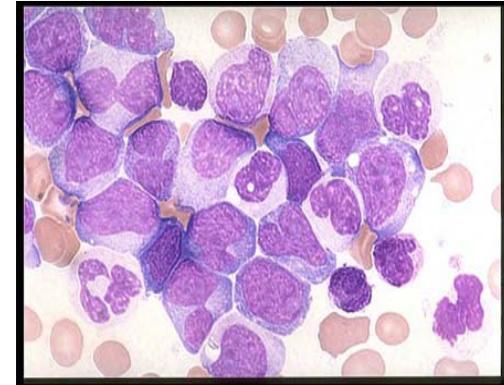
**Granulocitos
normales**



FASE CRÓNICA
Acumulación de células
diferenciadas



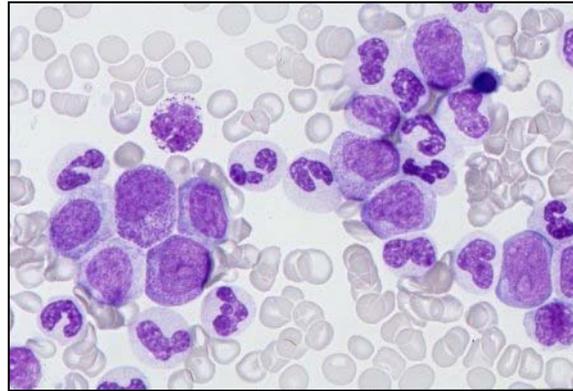
2-4 years



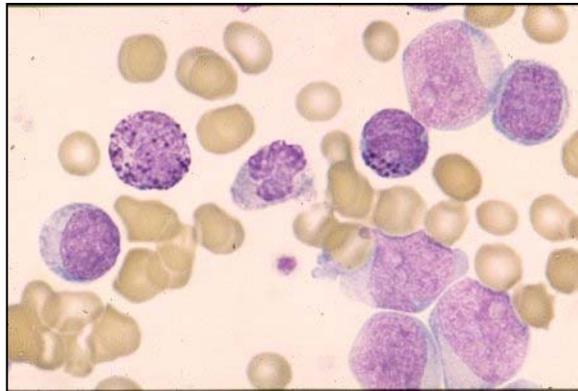
CRISIS BLÁSTICA

Acumulación de células indiferenciadas
(blásticas) Bcr-Abl⁺

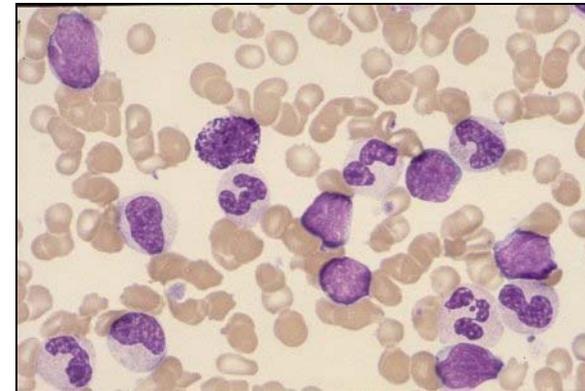
Crisis final blástica de la LMC



CML chronic, blood smear

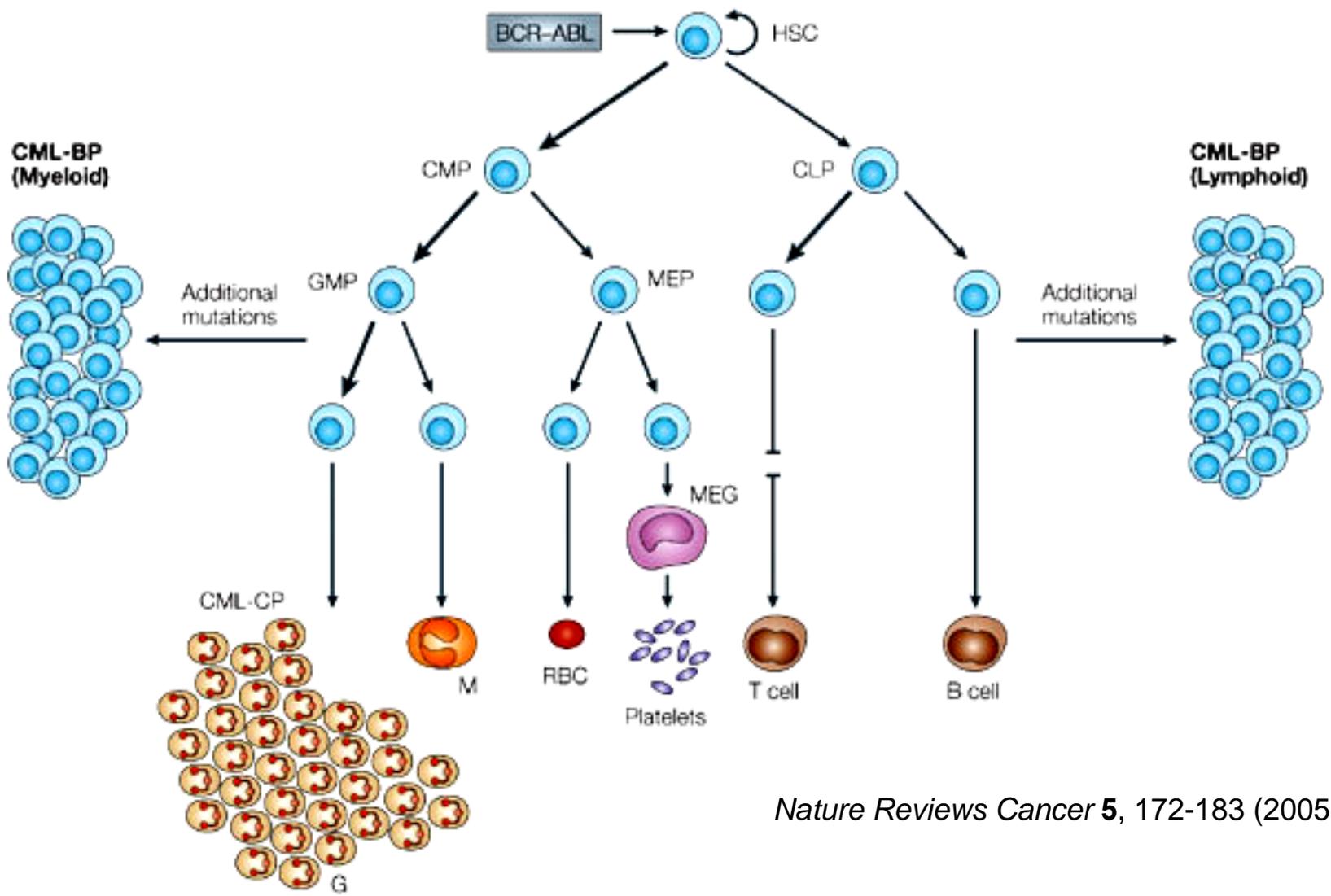


CML blastic myeloid, with increased basophil precursors; peripheral blood.



CML blastic lymphoid peripheral blood film showing several lymphoblasts, with residual chronic phase myeloid elements still present

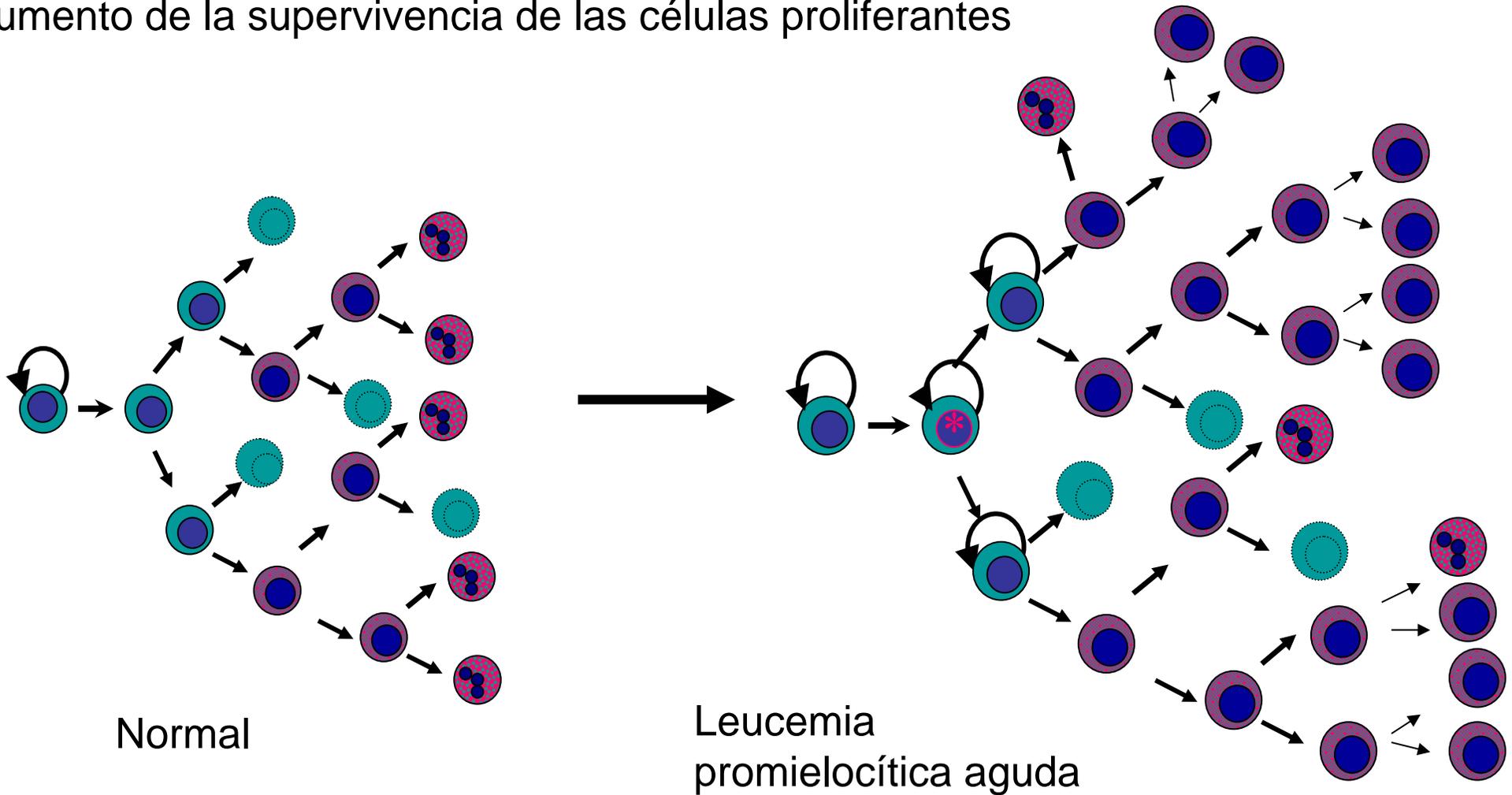
The development of chronic myelogenous leukaemia.



Nature Reviews Cancer 5, 172-183 (2005)

Leucemia promielocítica aguda (LPA):

- Diferenciación celular muy retardada
- Las células en diferenciación tiene aumentada la proliferación
- Aumento de la supervivencia de las células proliferantes

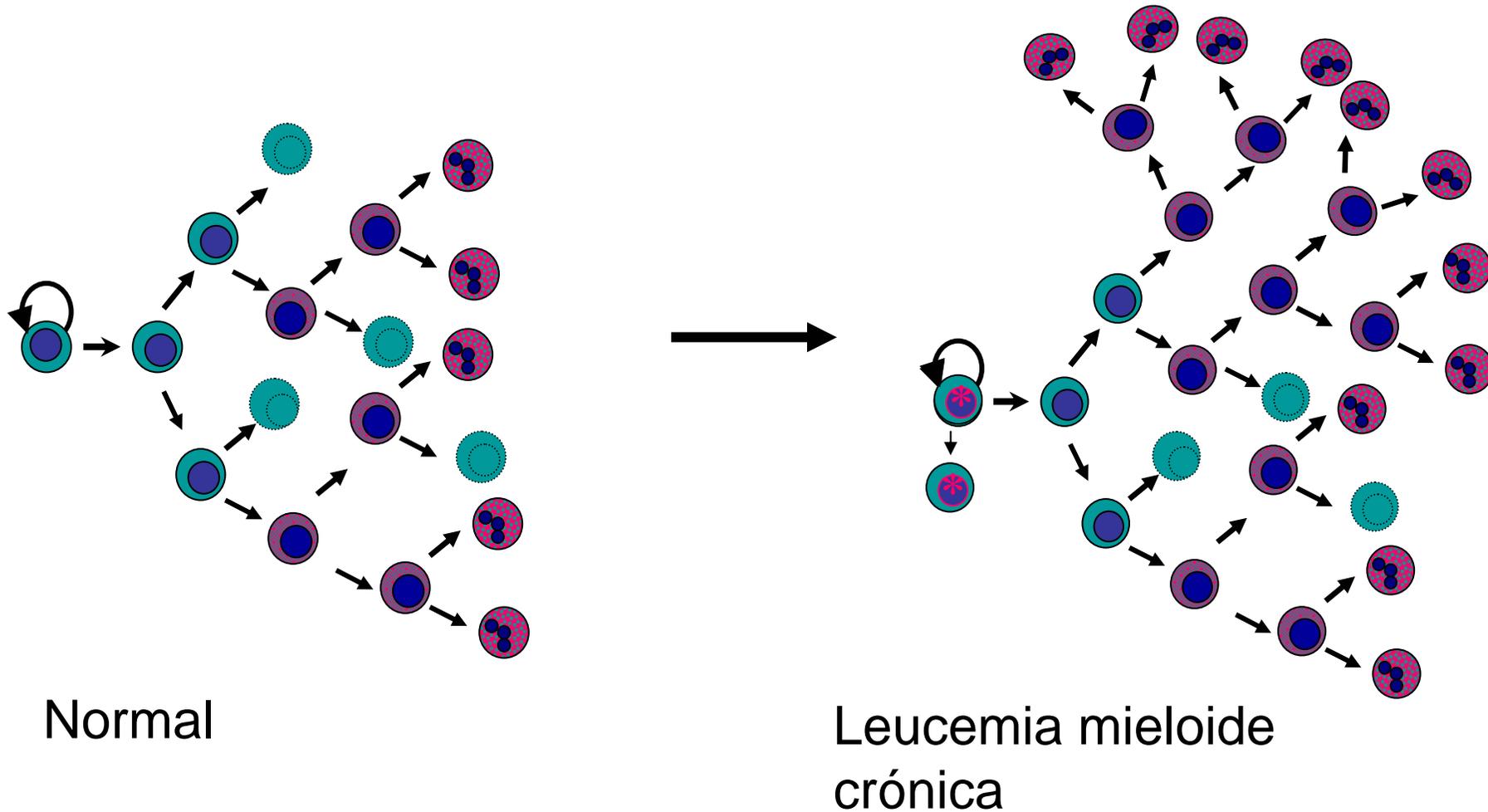


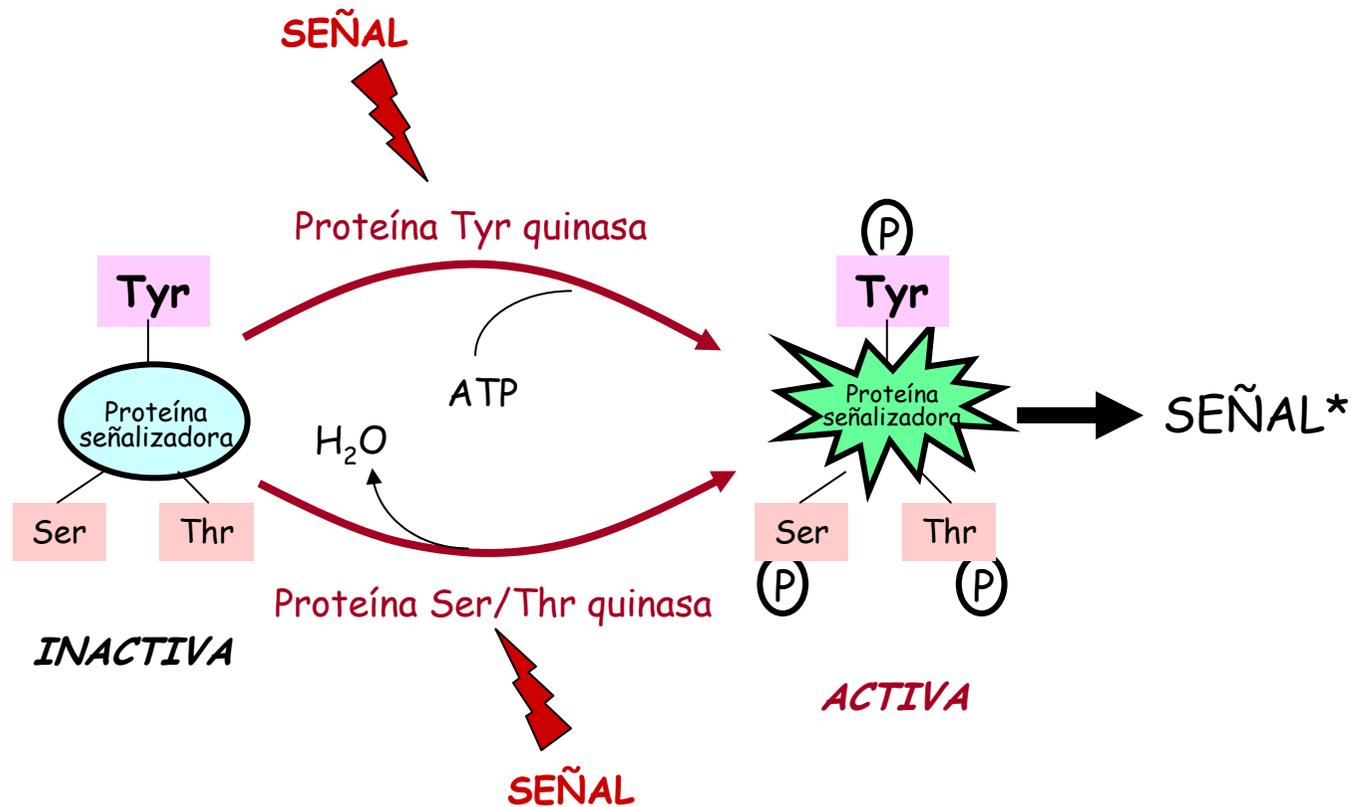
Normal

Leucemia
promielocítica aguda

Leucemia mieloide crónica (LMC):

- Aumento en la autorenovación de célula madre
- Aumento de supervivencia de las células proliferantes
- Diferenciación retardada

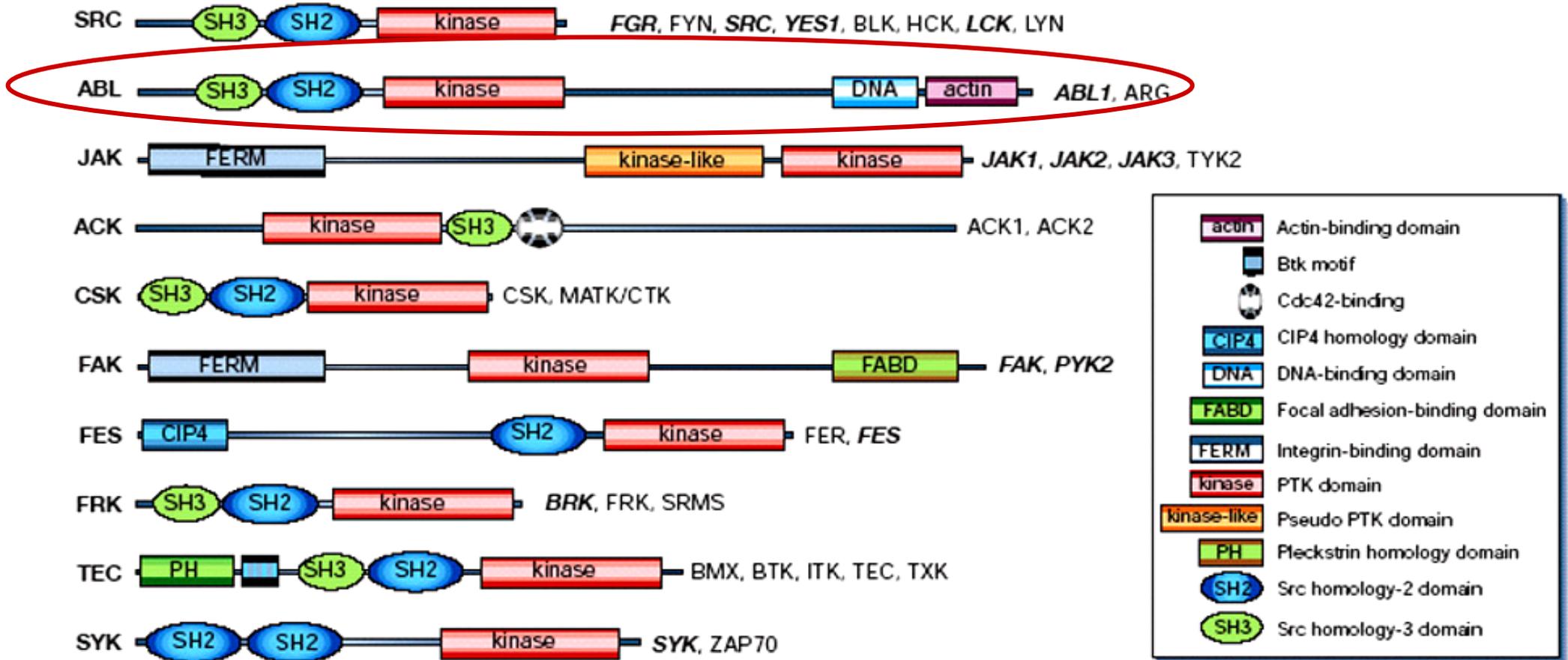




En el genoma humano:

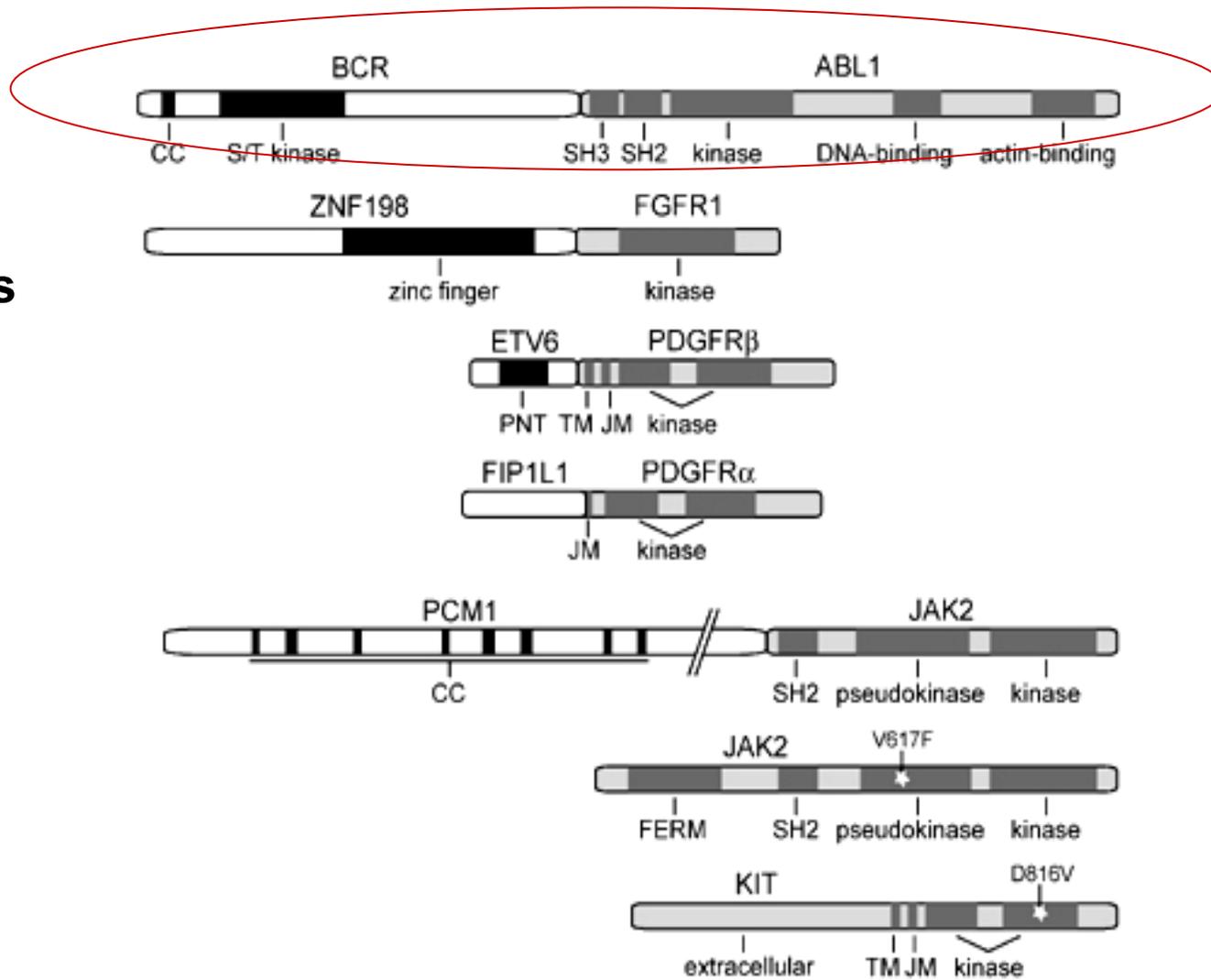
520 proteína quinasas → 90 Tyr quinasas (TK) → 58 receptores TK + 32 no-receptores TK
+ unas cien fosfatasas

Non receptor tyrosine kinases



(Nature 411, 355).

Otras Tyr-quinasas aberrantes implicadas en síndromes mieloproliferativos



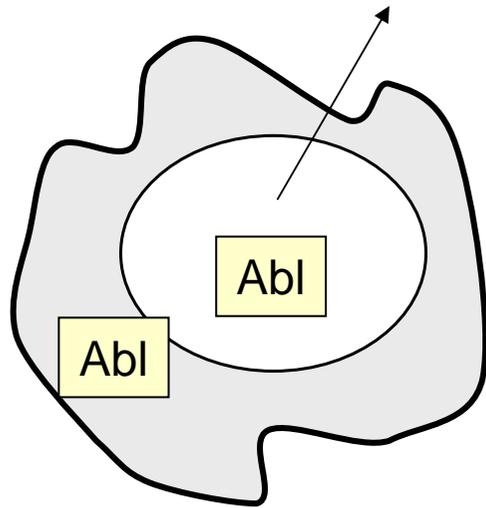
TK receptores

FGFR
 PDGFR α
 PDGFR β

TK no receptores:

JAK2
 KIT

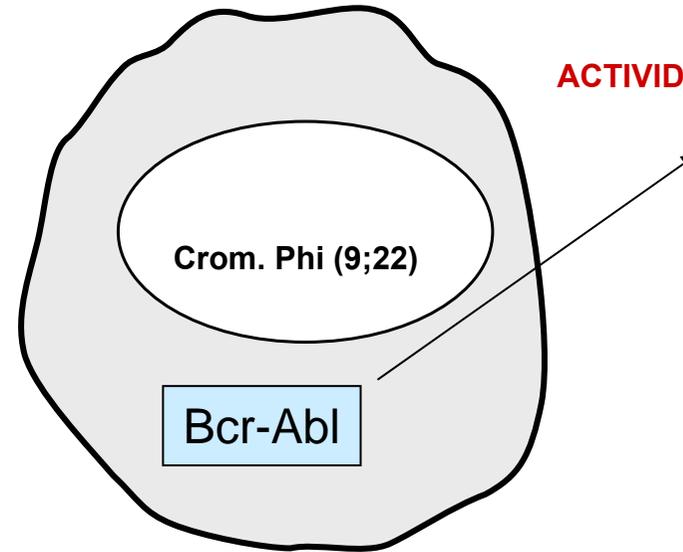
ACTIVIDAD QUINASA: +



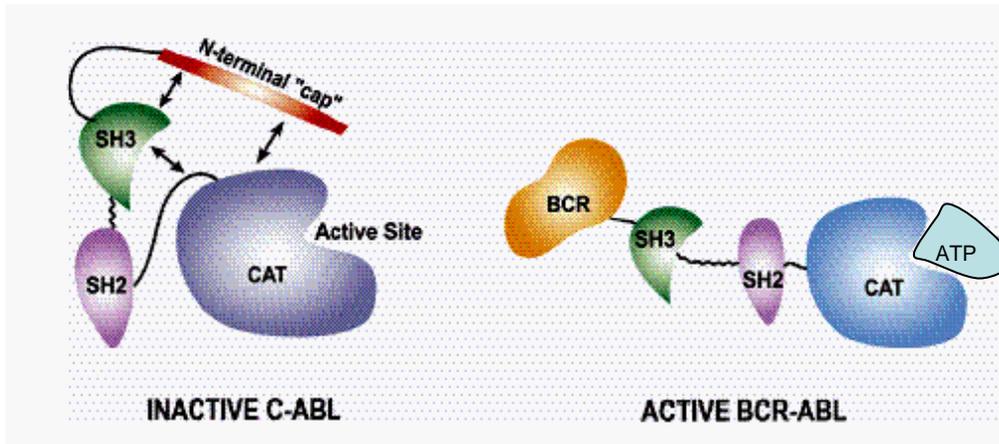
Normal



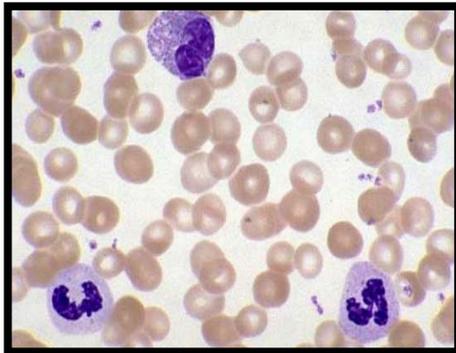
ACTIVIDAD QUINASA: +++



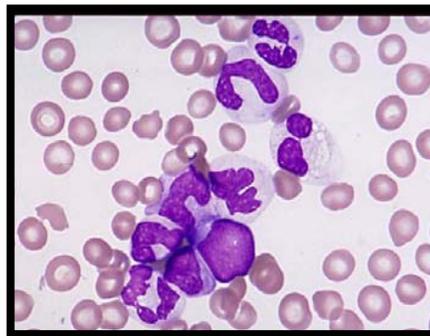
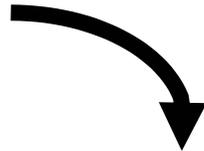
Leucemia Mieloide Crónica



Leucemia mieloide crónica: un ejemplo de Myc en progresión tumoral



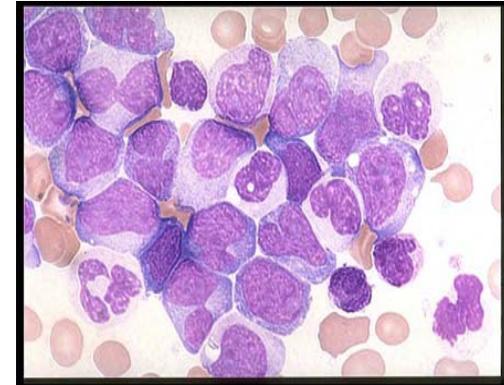
**Granulocitos
normales**



FASE CRÓNICA
Acumulación de células
diferenciadas Bcr-Abl⁺

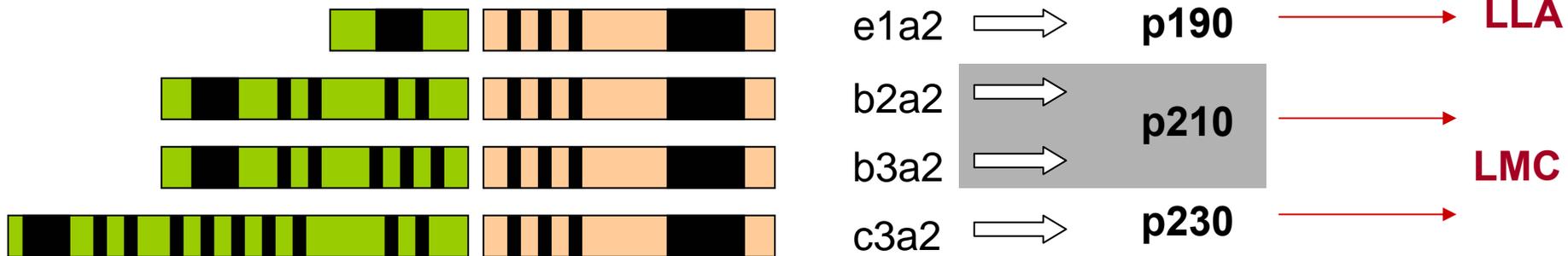
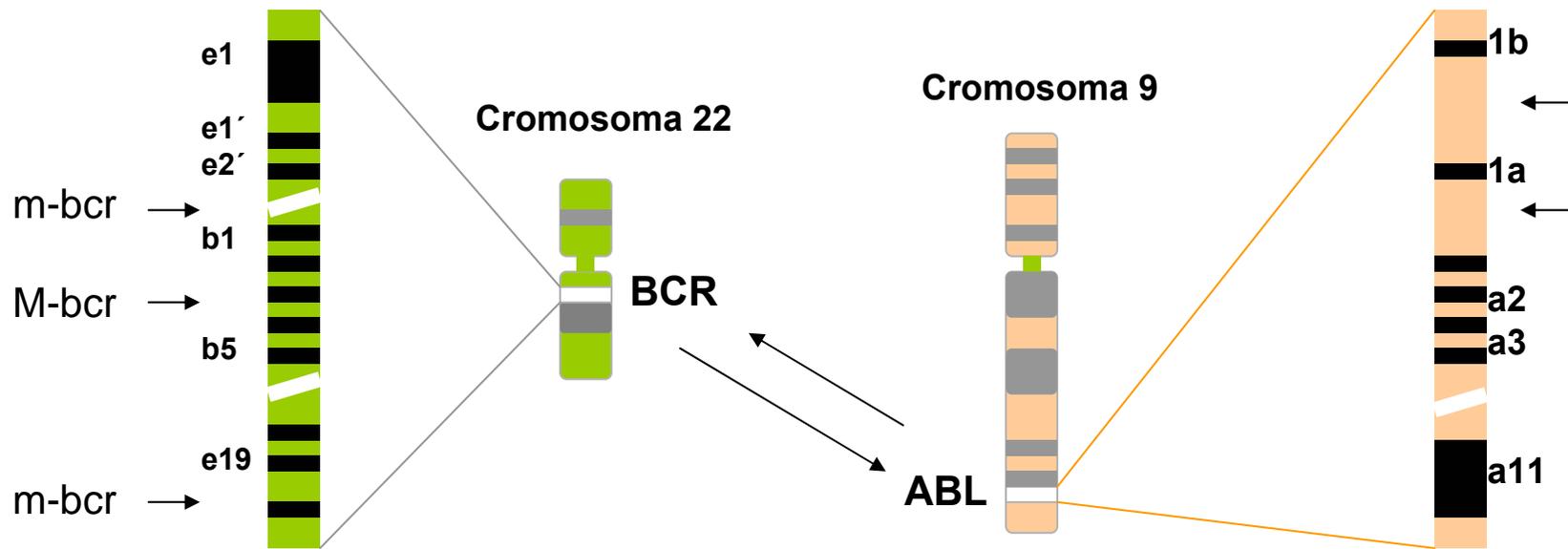


2-4 years

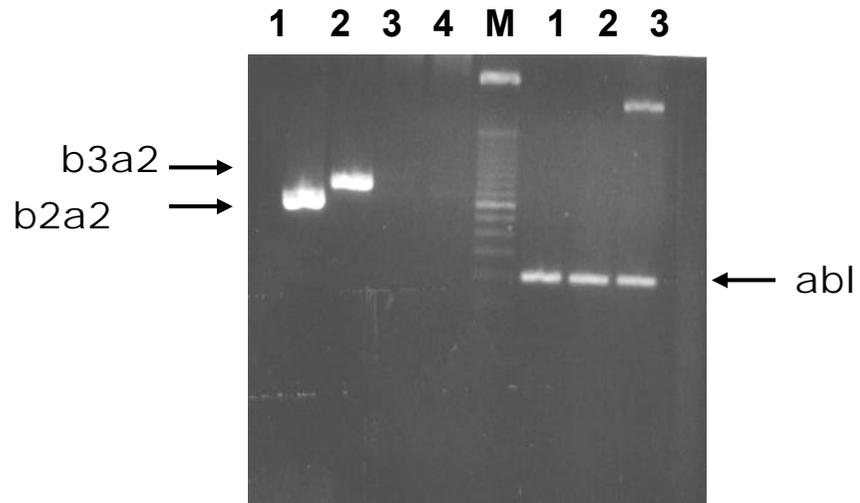
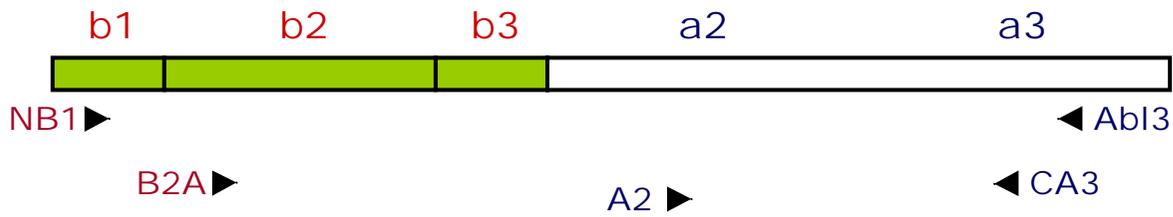


CRISIS BLÁSTICA

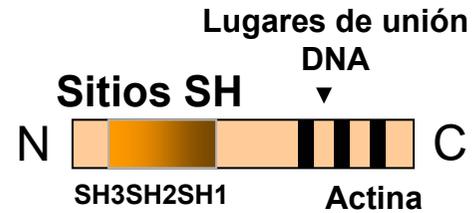
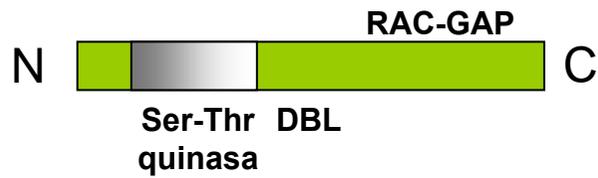
Acumulación de células indiferenciadas
(blásticas) Bcr-Abl⁺



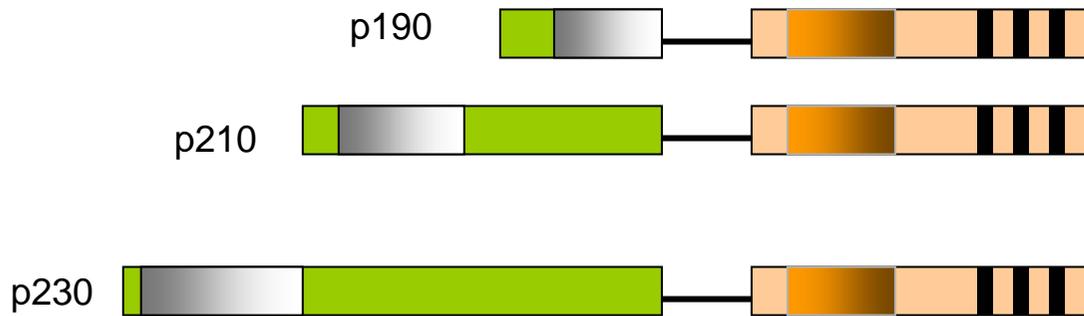
Bcr-Abl (p210)



(Marta Albajar, H MV)



**Actividad
tirosina quinasa**



Proteína b1a2 → **LLA**

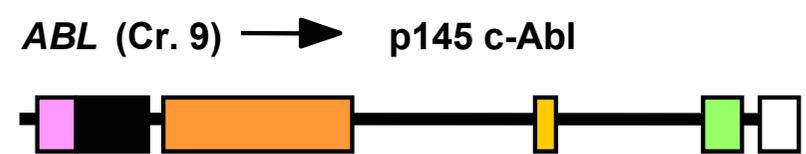
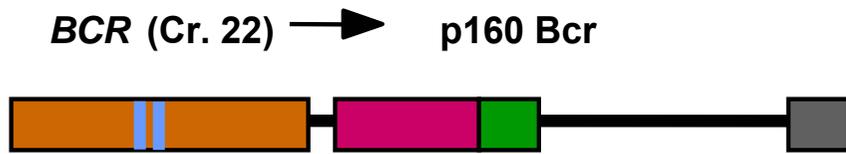
Proteína b2a2
o b3a2 → **LMC**

Proteína c3a2 → **LMC**

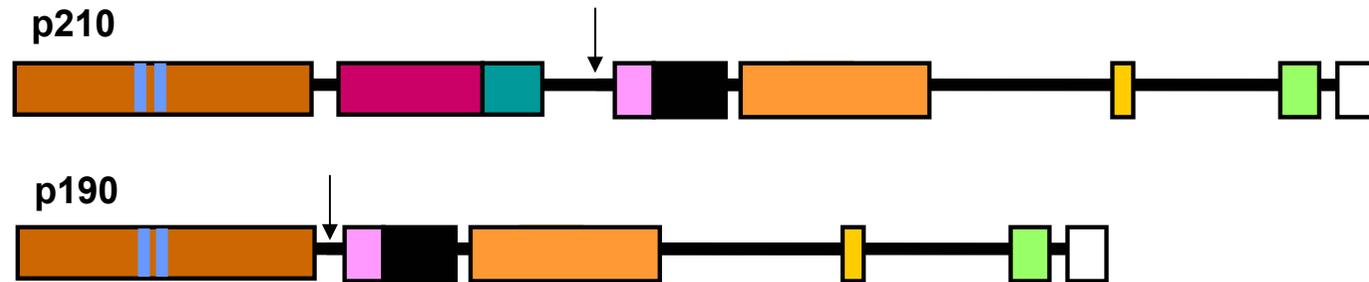
Alteraciones citogenéticas recurrentes en LLA

Cariotipo	Genes	Frecuencia (%)		Características	SLE (%)	
		niños	adultos		niños	adultos
<u>Línea B</u>						
Hiperdiploidía		25	4	CD10+, < 10 años	80-90	30
t(12;21)	<i>TEL-AML1</i>	25	1-2	B-precursora, < 10 años	80-90	?
t(9;22)	<i>BCR-ABL</i>	3-5	20-30	Predominio B precursora	20	<10
t(4;11)	<i>MLL-AF4</i>	2-3	3-6	< 1año, CD10-/CD15+	40-70	10-20
t(1;19)	<i>E2A-PBX1</i>	5-6	3	Pre-B; pseudodiploidía	70	30
t(8;14)	<i>MYC-IgH</i>					
t(8;22)	<i>MYC-Igλ</i>	2	4	B; FAB: L3	70-85	50
t(2;8)	<i>MYC-Igk</i>					
<u>Línea T</u>						
t(1;14)	<i>TAL1-TCRδ</i>					
t(8;14)	<i>MYC-TCRα</i>	3-4	1	CD10, > leucocitosis	60-70	?
t(11;14)	<i>RBTN-TCRδ</i>			predominio en varones		
t(1;7)	<i>TAL-TCRβ</i>					
del 9p		7		>leucocitosis, masa mediastínica	20-30	?

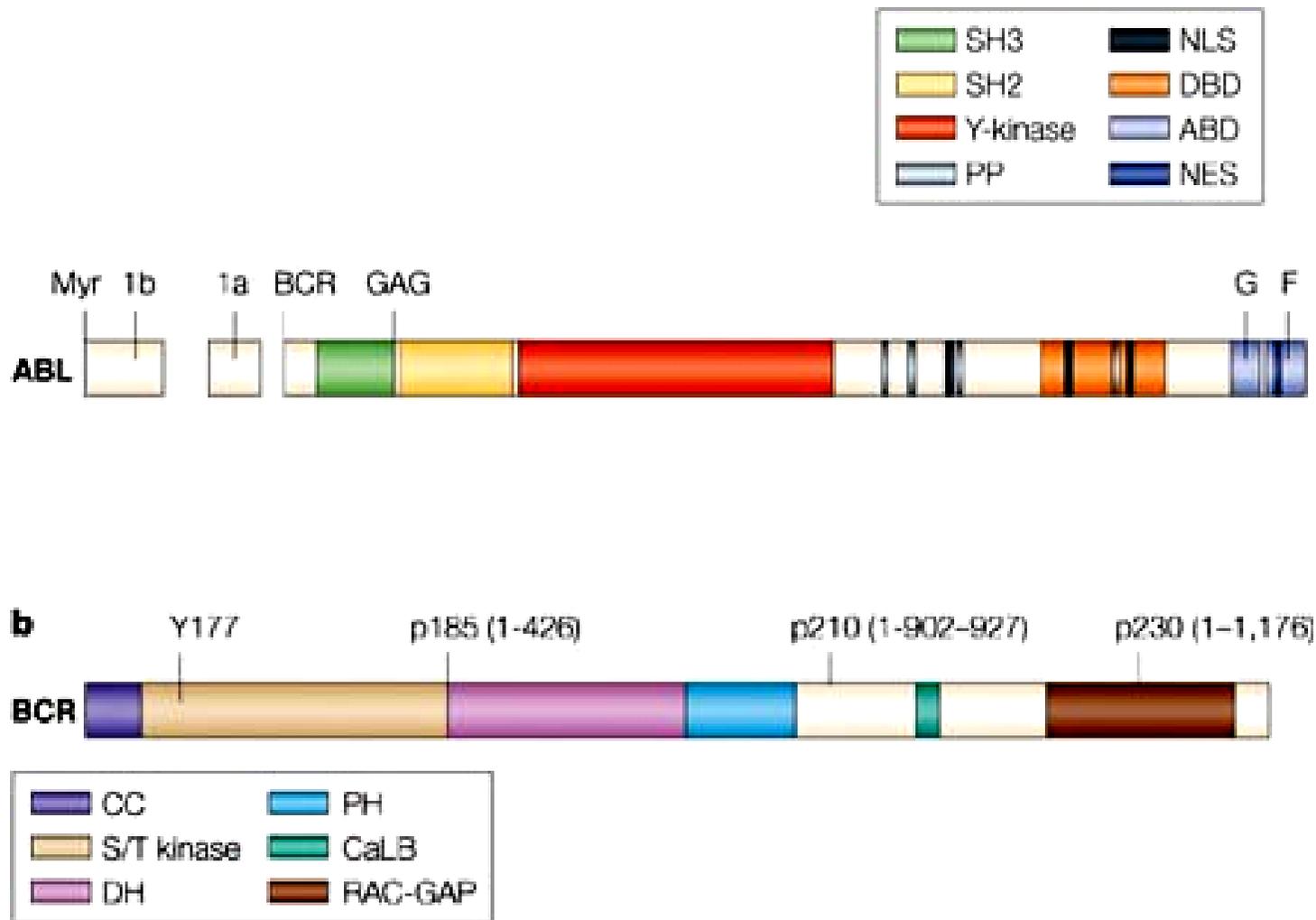
Figura 12.2



***BCR-ABL* Cromosoma Filadelfia t(9;22) (q34;q11)**

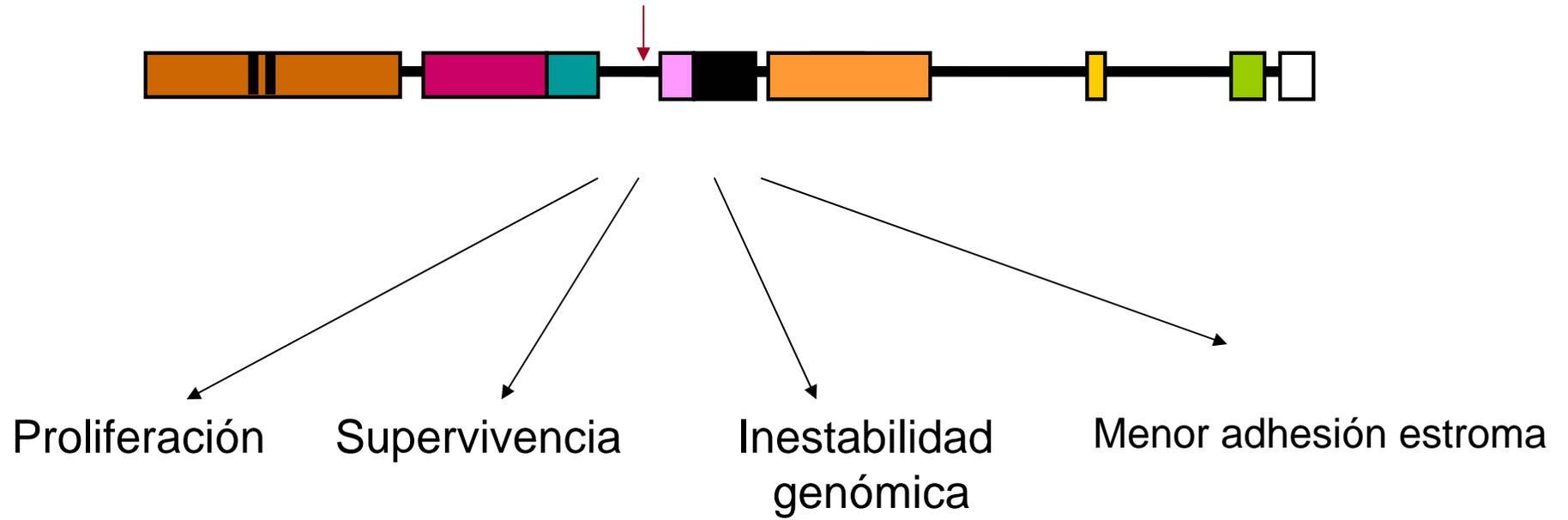


- | | | | |
|---|-------------------------------|---|-------------------------------|
|  | Ser/Thr quinasa |  | Dominio SH3 |
|  | Unión a SH2 |  | Dominio SH2 |
|  | Homología con Dbl (DH) |  | Tyr quinsa |
|  | Homología con plekstrina (PH) |  | Señal de localización nuclear |
|  | Actividad GAP para Rho |  | Unión a DNA |
| | |  | Unión a F- Actina |



(Ren, Nat Rev Cancer, 2005)

Bcr-Abl



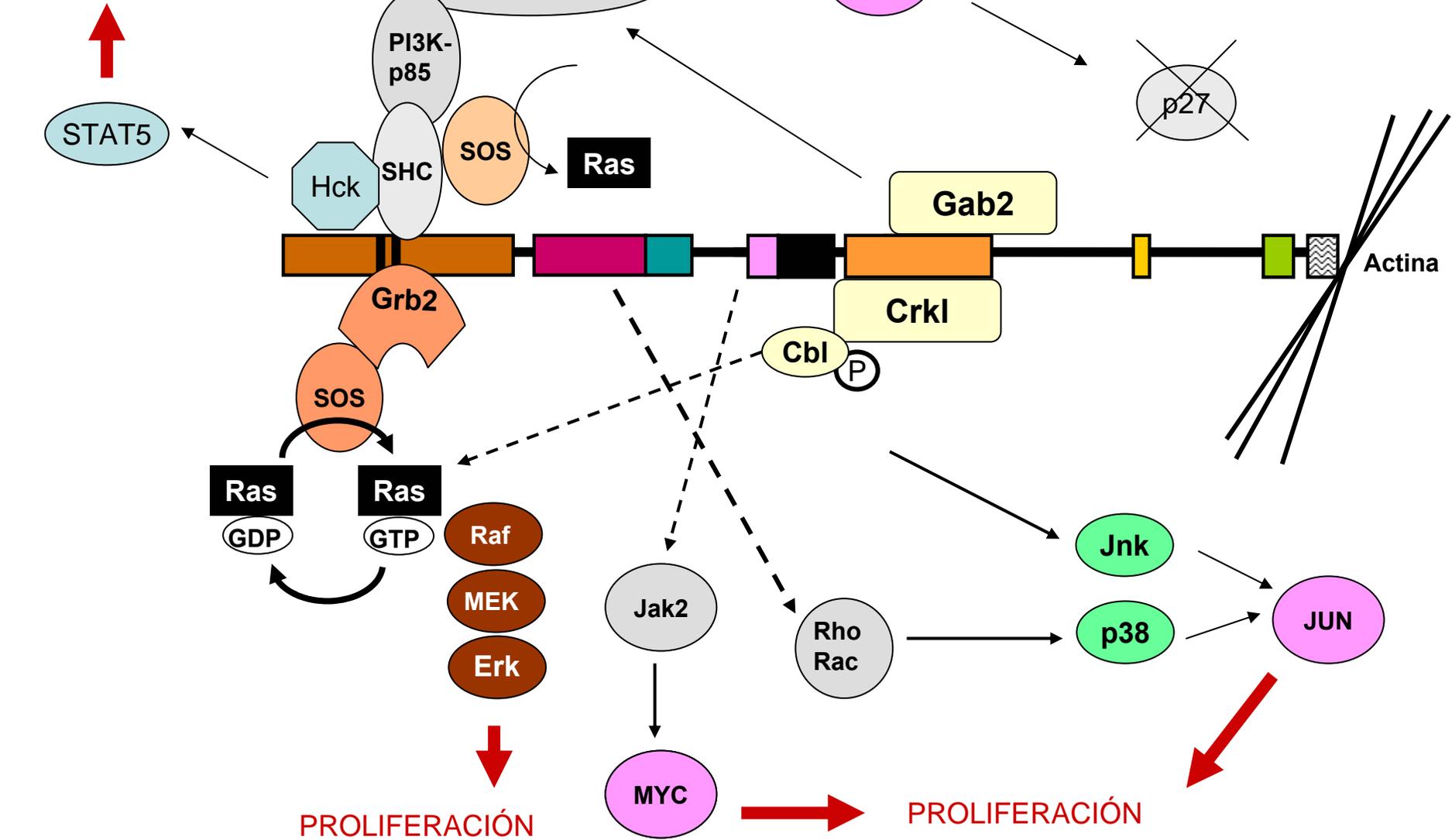
Proliferación

Supervivencia

Inestabilidad genómica

Menor adhesión estroma

PROLIFERACIÓN
SUPERVIVENCIA



Sustratos de Bcr-Abl

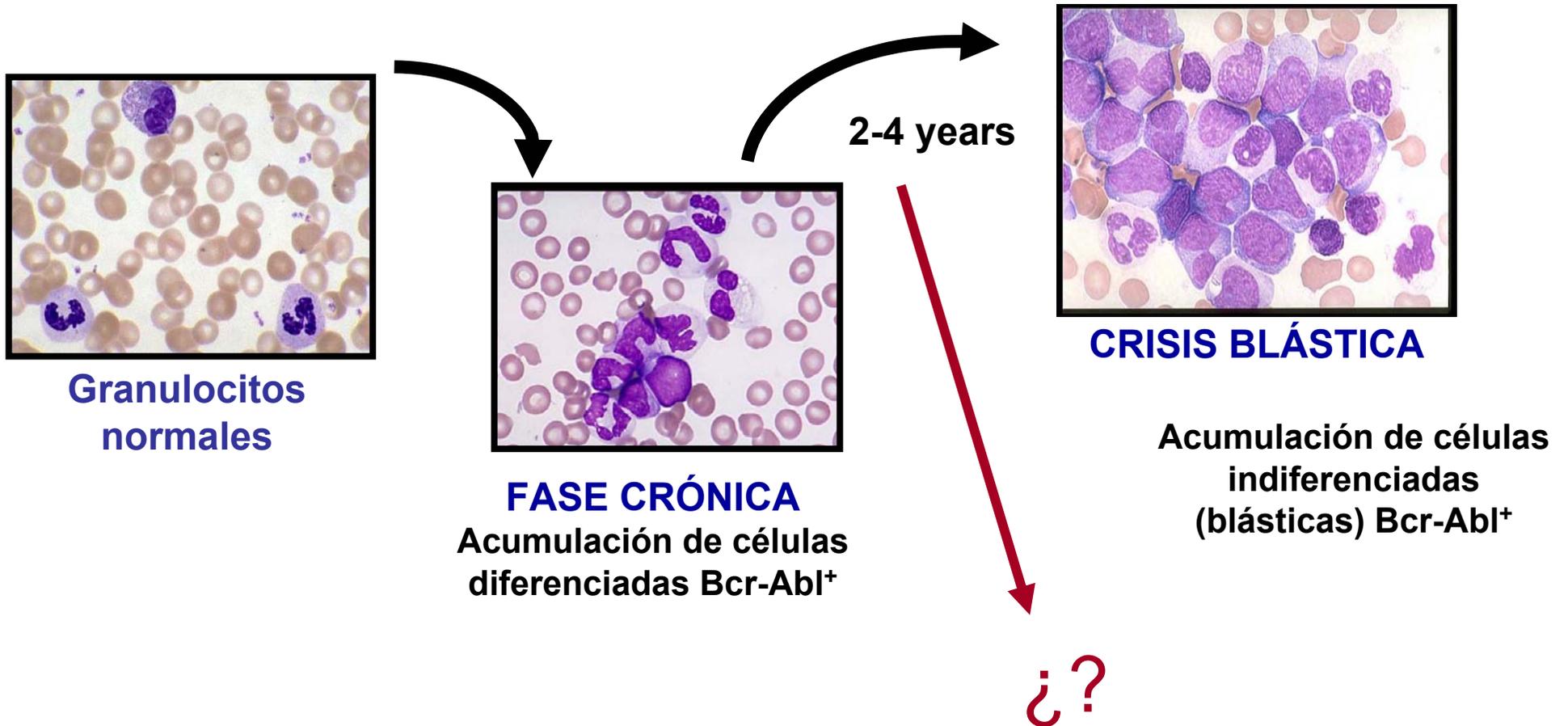
Proteína	Función
p62 DOK	Adaptadora
Crkl	Adaptadora
Crk	Adaptadora
SHC	Adaptadora
Talina	Citoesqueleto/membrana
Paxilina	Citoesqueleto/membrana
Fak	Quinasa/ citoesqueleto
Fes	Quinasa
GAP	Ras- GTPasa
PLC γ	Fosfolipasa C γ
PI3K (p85)	Quinasa
Syp	Fosfatasa
Cbl	Adaptadora
Vav	Factor de intercambio para Rac

Mouse models for BCR-ABL leukemogenesis

Promotor	Oncogene	Disease phenotype
MT	p190	B-ALL/lymphoma
MT	p210 b3/a2	T-ALL; B-ALL; myeloblastic leukemia
Tec	p210 b3/a2	T-ALL; CML-like
MMTV-tTA + tet-p210	p210 b3/a2	B-ALL
CD34-tTA + tet-p210	p210 b3/a2	CML-like; thrombocytosis

(Calabretta et al, Blood 2004)

Leucemia mieloide crónica: un ejemplo de Myc en progresión tumoral



Secondary genetic and molecular abnormalities in CML-BC

Abnormality

Patients (%)

Genetic

Double Ph ¹ chromosome	38
Trisomy chromosome 8	38
i(17q)	20
Trisomy chromosome 19	13
t(3;21)(q26;q22)	2
t(7;11)(p15;p15)	<1

Molecular

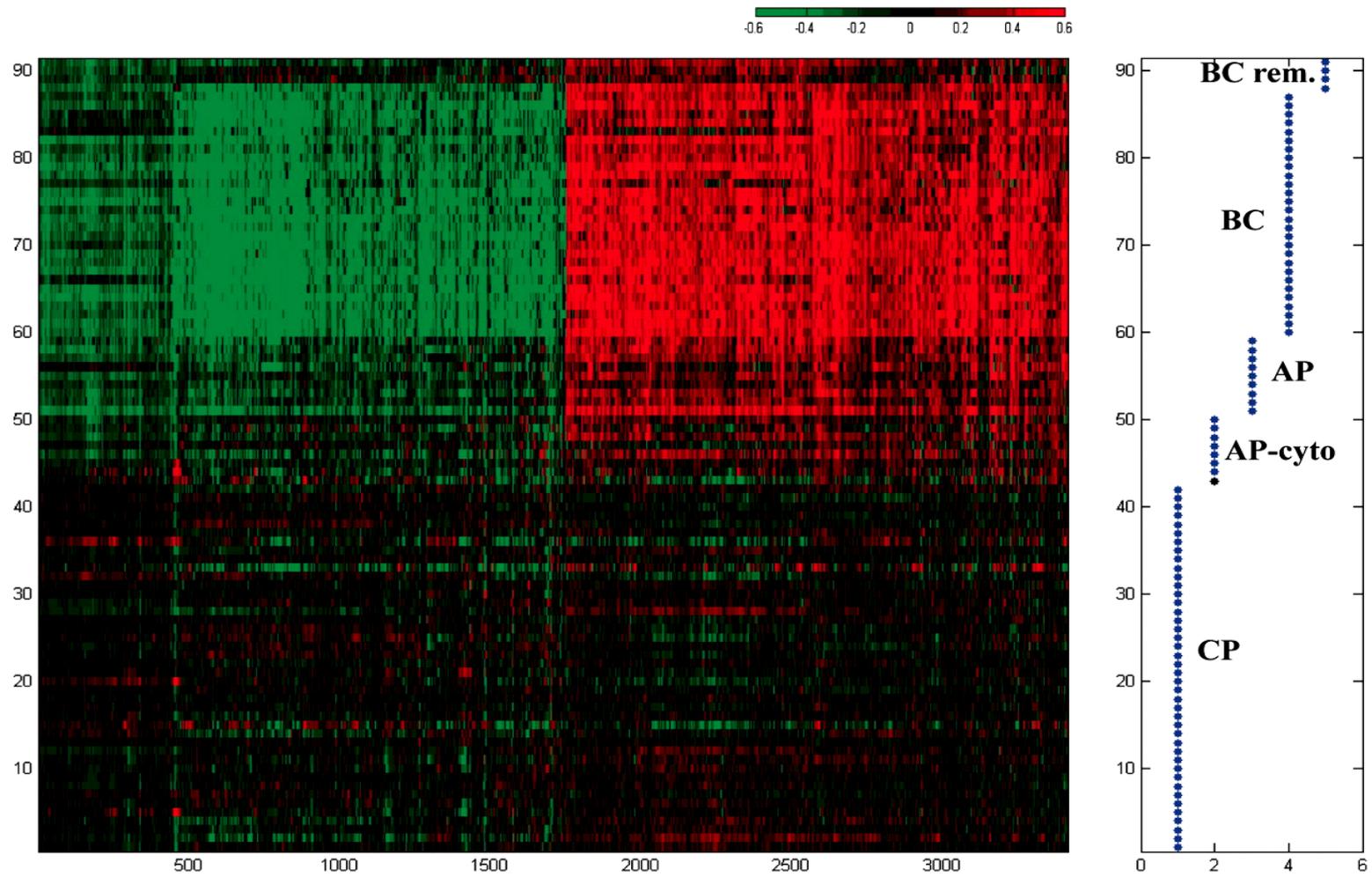
p53 mutations	25-30*
p16/ARF mutations	50**
Rb mutation/deletion	18***
Ras mutation	Rare

* Occurred in 30% of myeloid blast crisis cases

** In 50% of lymphoid blast crisis cases

*** In 18% of lymphoid blast crisis cases

Genes associated with CML progression



Radich, Jerald P. et al. (2006) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103, 2794-2799

Table 1. Functional annotation of “progression” genes

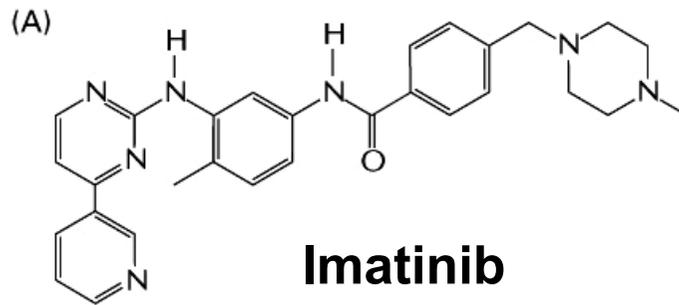
Keyword	Number (%) [*]	Examples
Ribosome	18 (21)	ROK13A
Wnt signaling	16 (11)	Cadherin, MDI1, Prickle 1, FZD2
Nucleosome	22 (22)	BSZ1A, HIST1H2AE
<i>Sugar metabolism</i>	45 (26)	RP1A, ALDOC, G6PD
<i>Myeloid differentiation</i>	27 (14)	CEBPA, CEBPE, FOXO3A
<i>Apoptosis</i>	42 (10)	GADD45G, BCL2, FOXO3A, MCL1
<i>DNA damage response</i>	36 (10)	GASDD45G, FANCG, XRN2

Bold functions are up-regulated in progression; italic functions are down-regulated.

^{*}The number of genes present on the array with the specific keyword; in parentheses are the percentage of significant genes found differentially expressed among the keyword class.

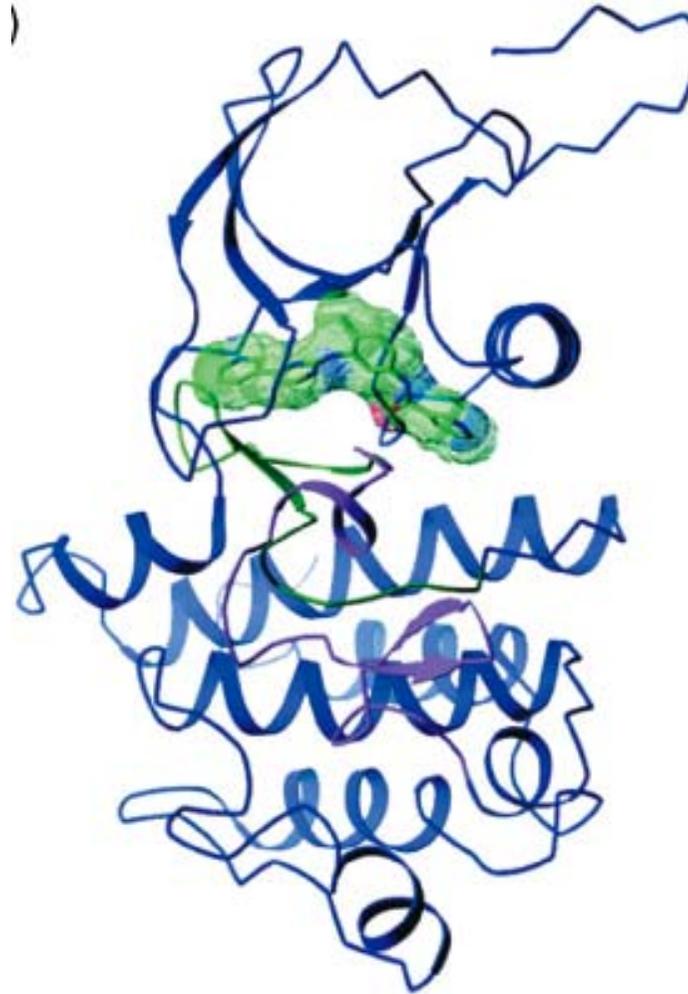
Radich, et al. (2006) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103, 2794-2799

El imatinib, primer antitumoral de uso en clínica descubierto por “búsqueda racional”



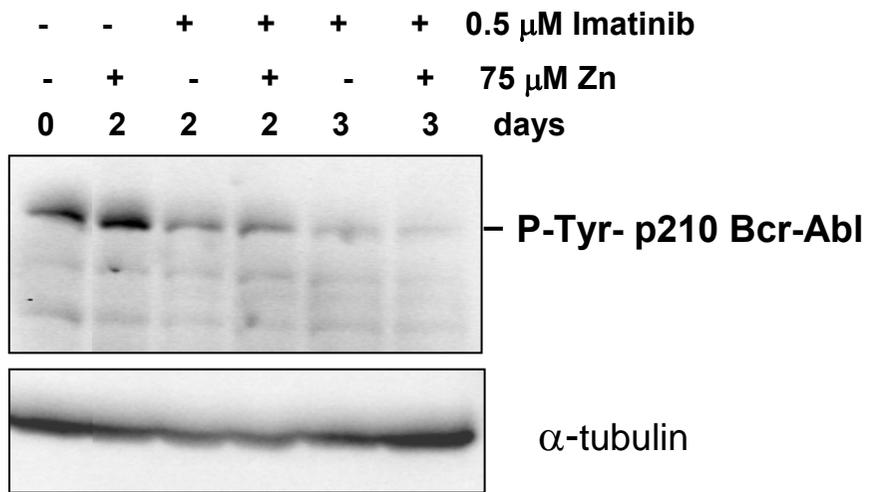
[Abl-STI.val](#)

Abl kinase



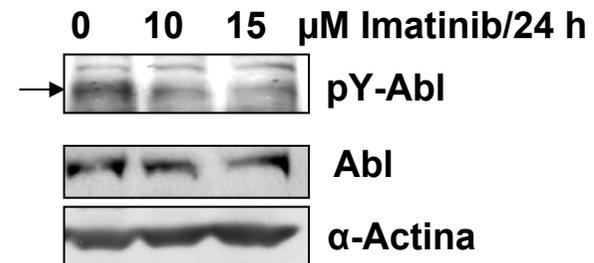
I, Science 289 1938 (2000)

K562 (Leucemia mieloide crónica)



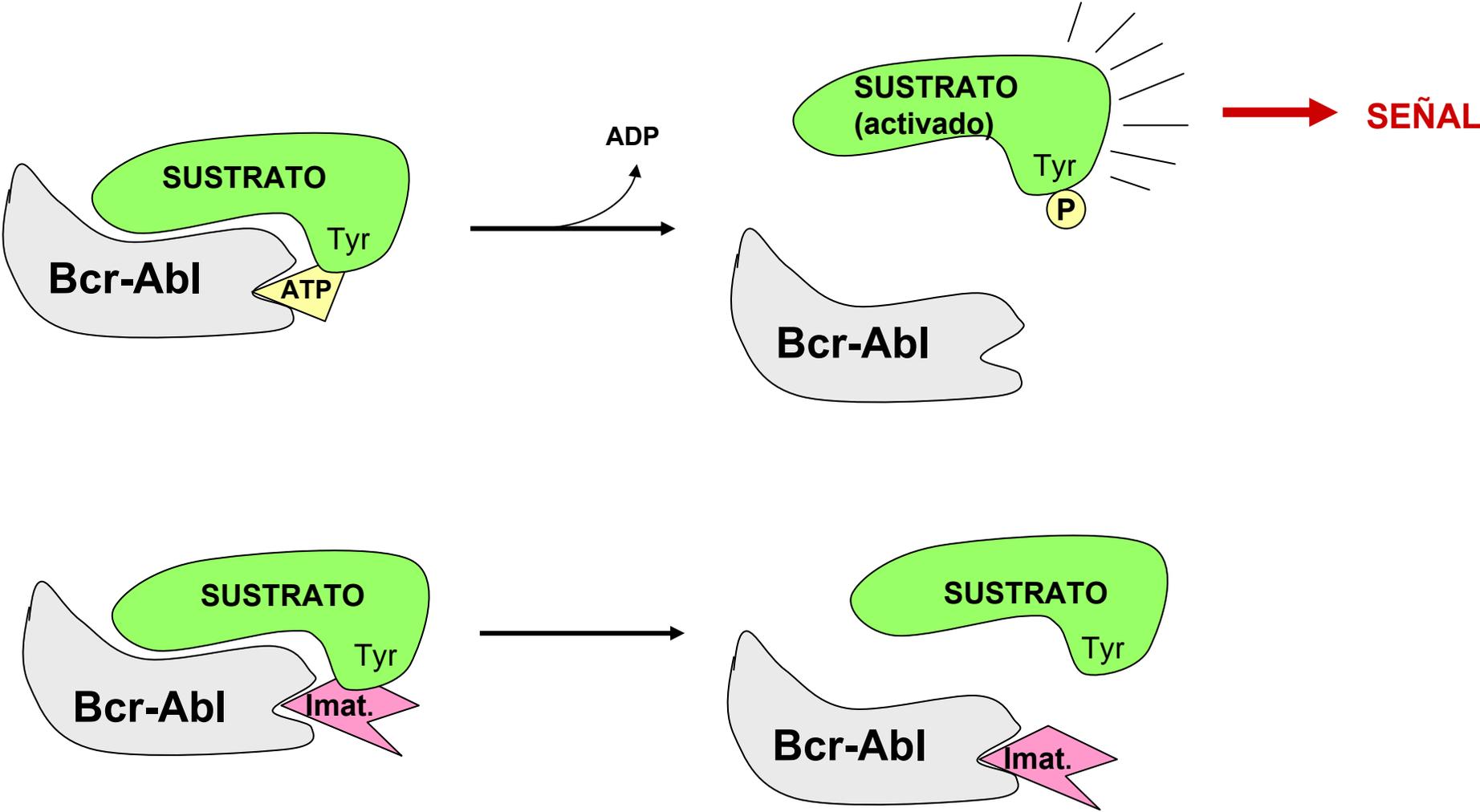
M.Dolores Delgado, Maite Gómez-Casares

HCT116p21KO (colon cancer)

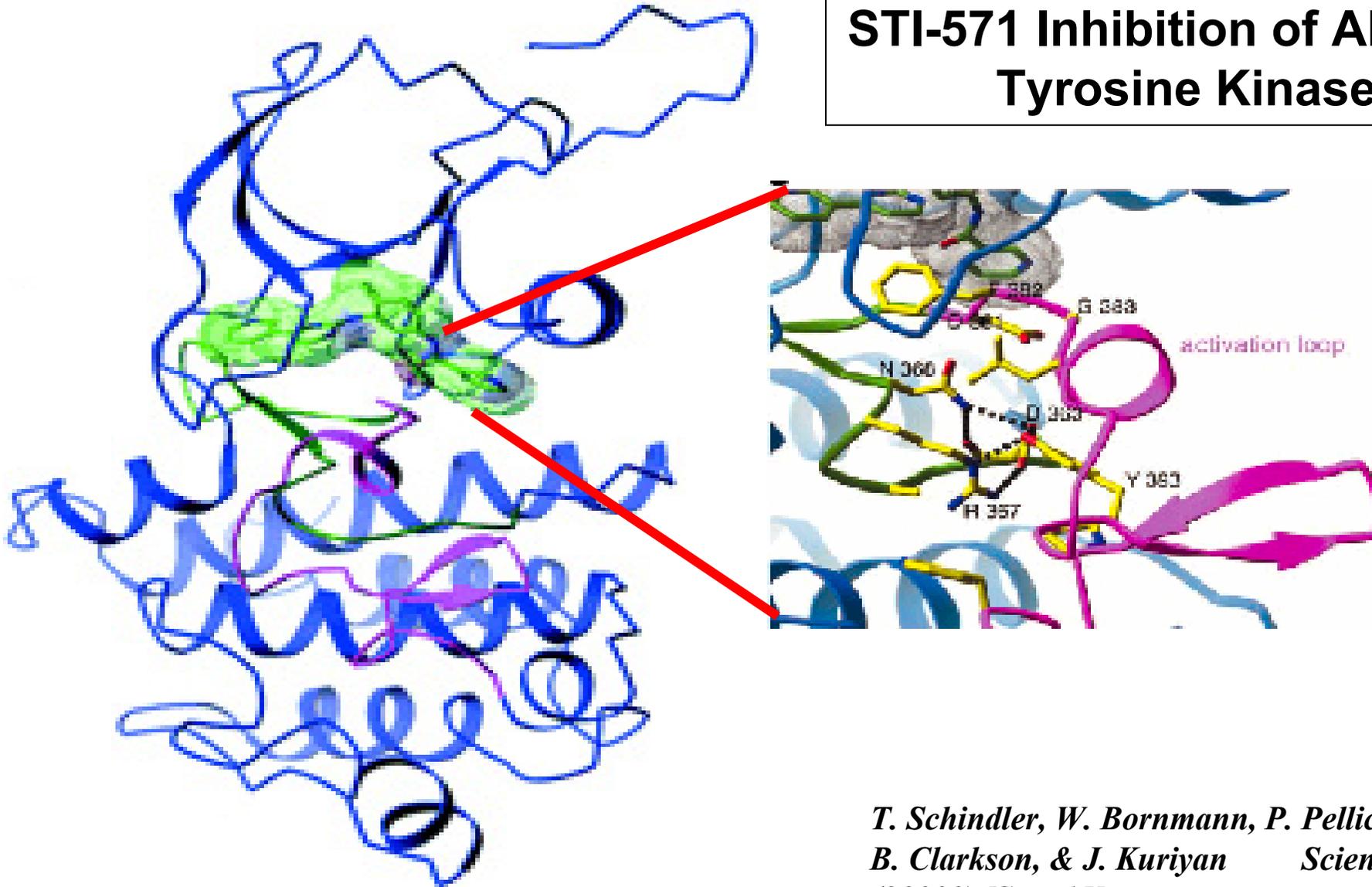


Nuria Ferrándiz

Modo de acción del imatinib

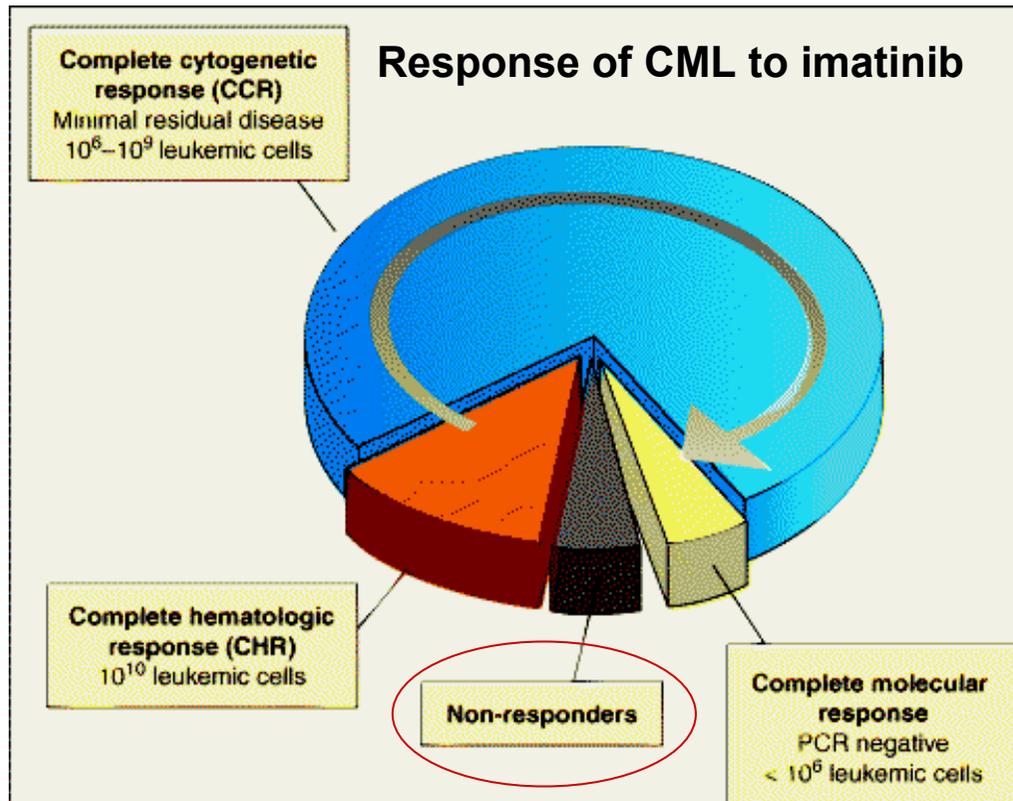


Structural Mechanism for STI-571 Inhibition of Abelson Tyrosine Kinase

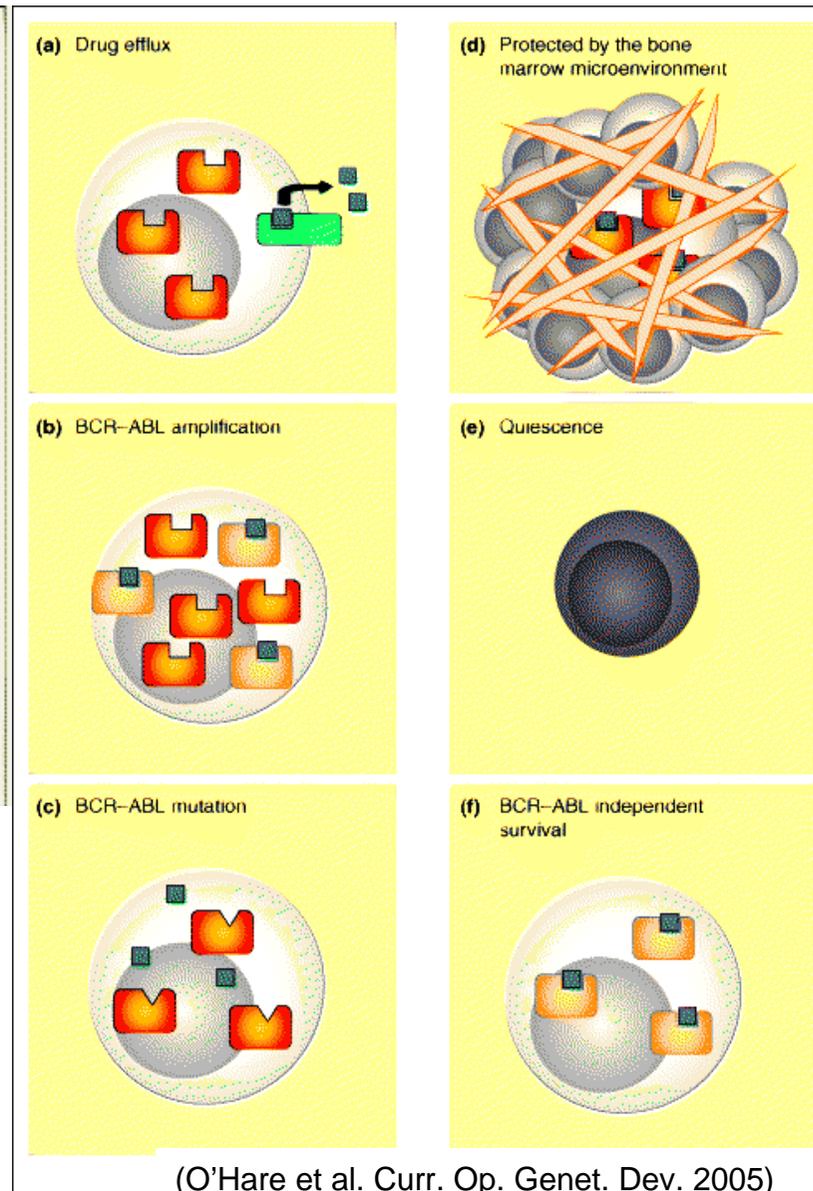


*T. Schindler, W. Bornmann, P. Pellicena, W. T. Miller,
B. Clarkson, & J. Kuriyan Science 289, 1998
(2000) [Sept 15]*

Potential mechanisms of disease persistence on imatinib therapy

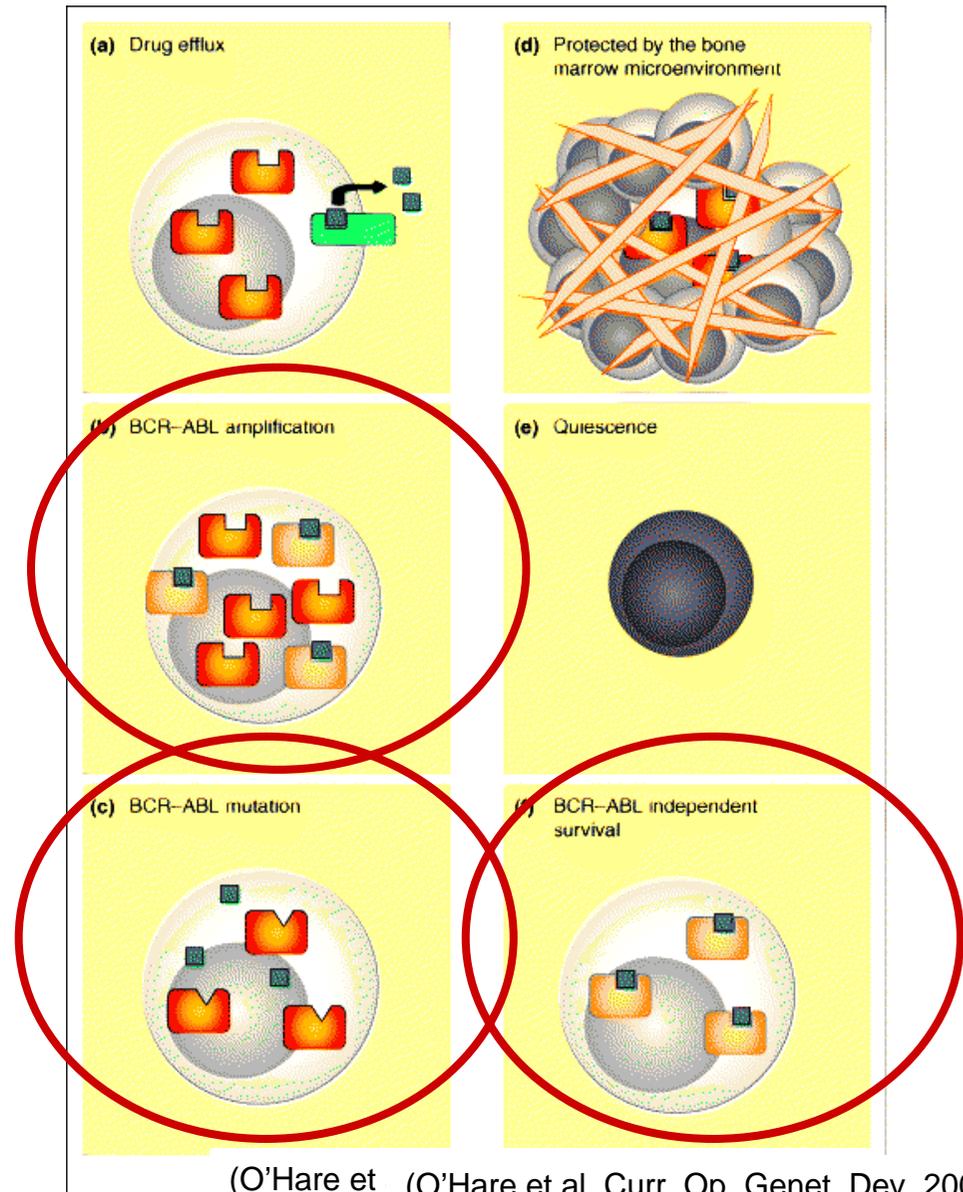


(O'Hare et al. Curr. Op. Genet. Dev. 2005)



(O'Hare et al. Curr. Op. Genet. Dev. 2005)

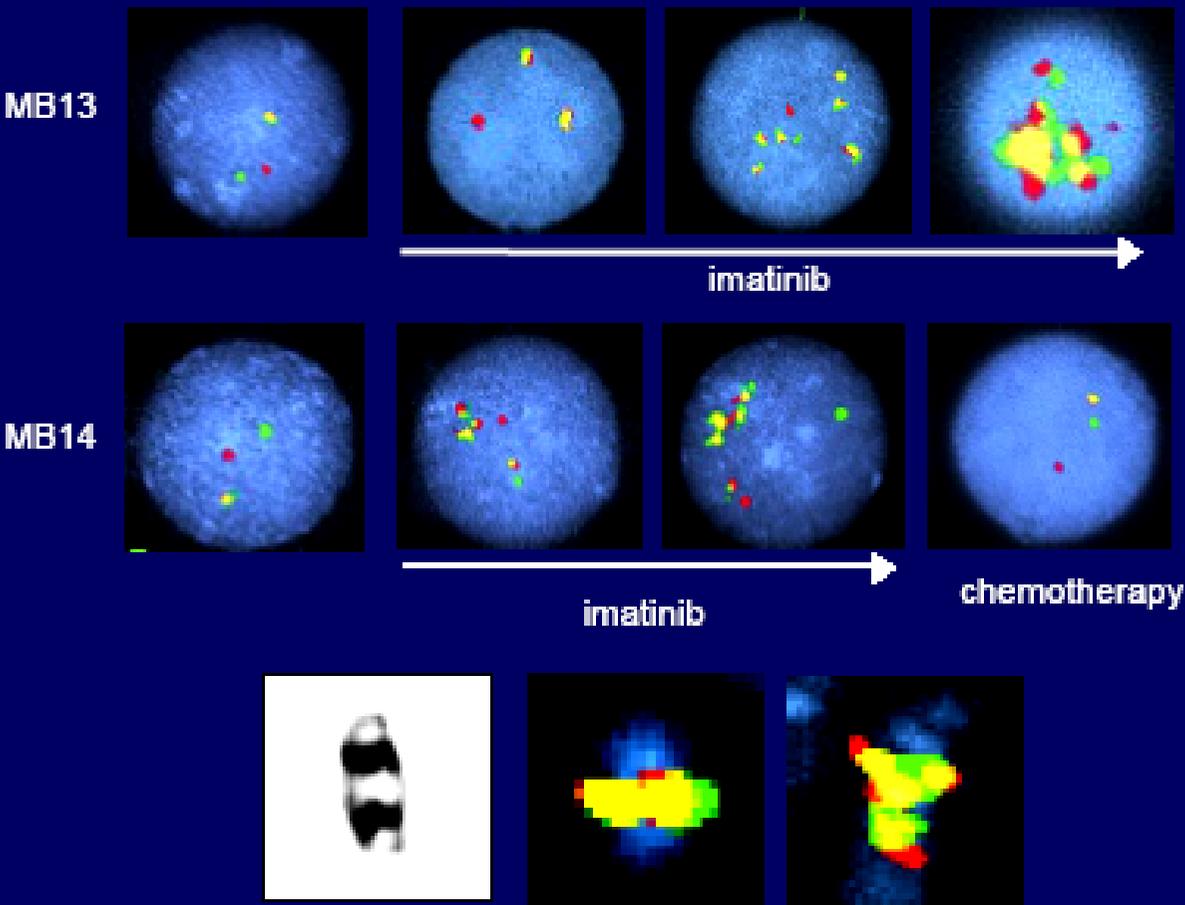
Potential mechanisms of disease persistence on imatinib therapy



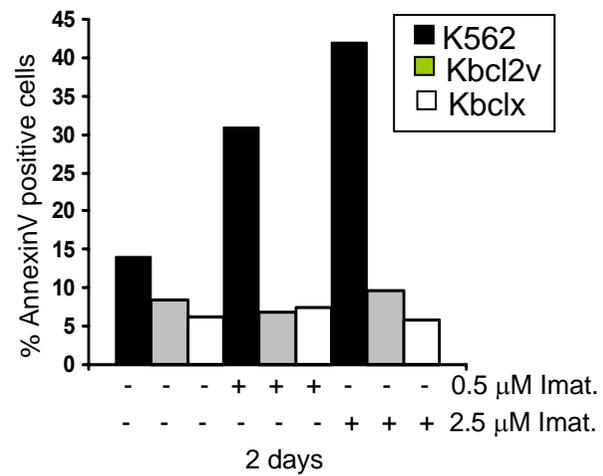
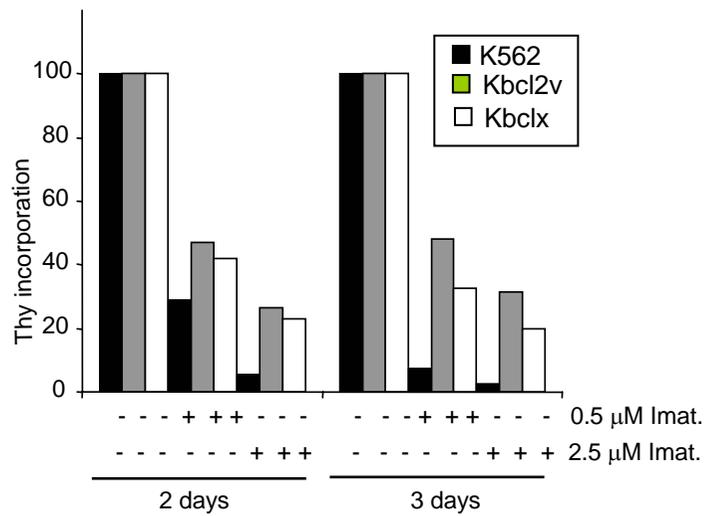
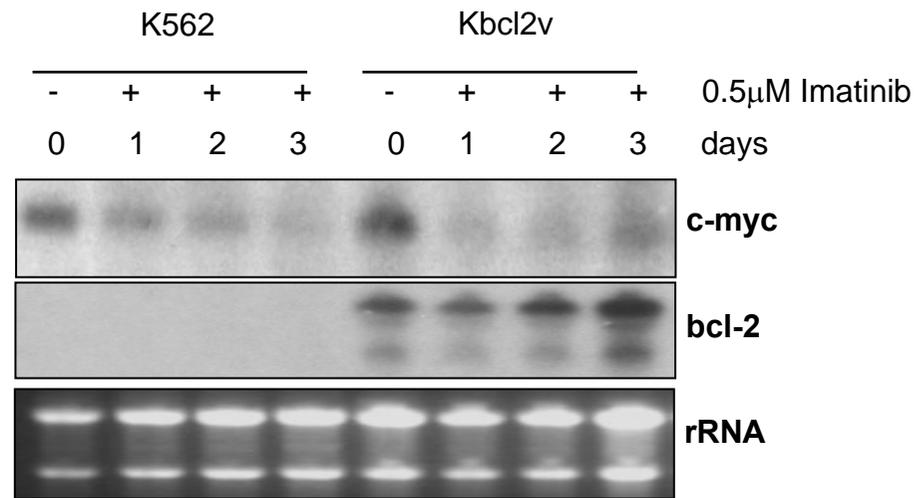
(O'Hare et al. Curr. Opin. Genet. Dev. 2005)

Javier León

BCR-ABL gene amplification associated with clinical imatinib resistance

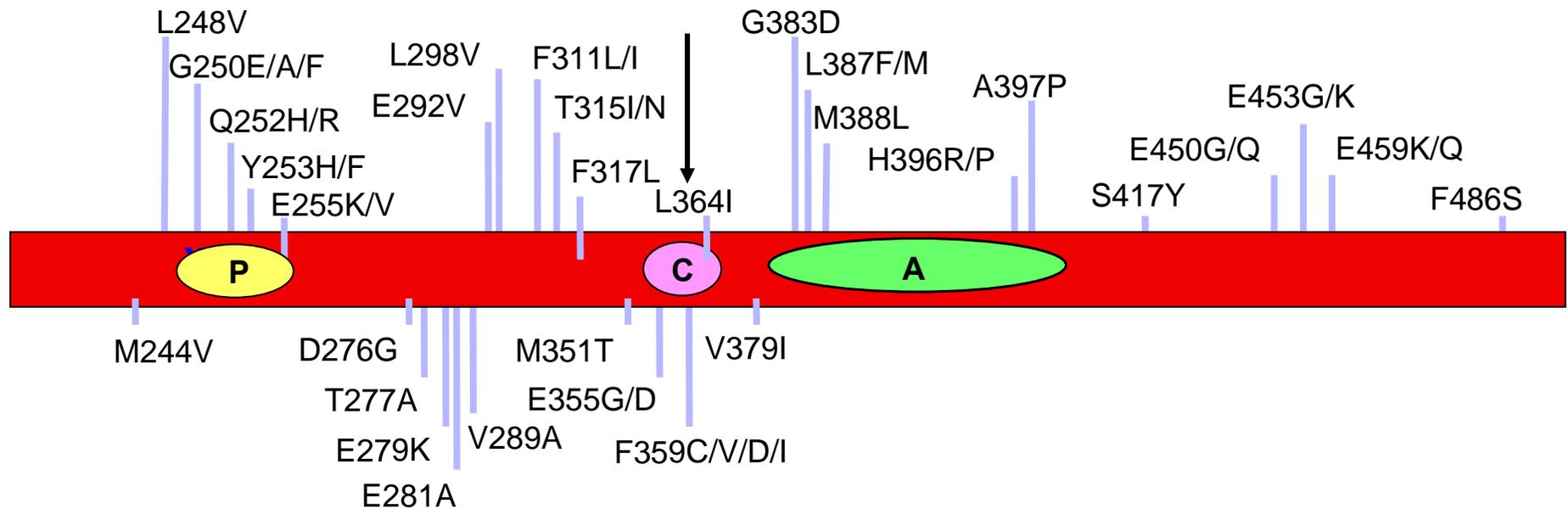


Imatinib has a non-apototic cytostatic effect

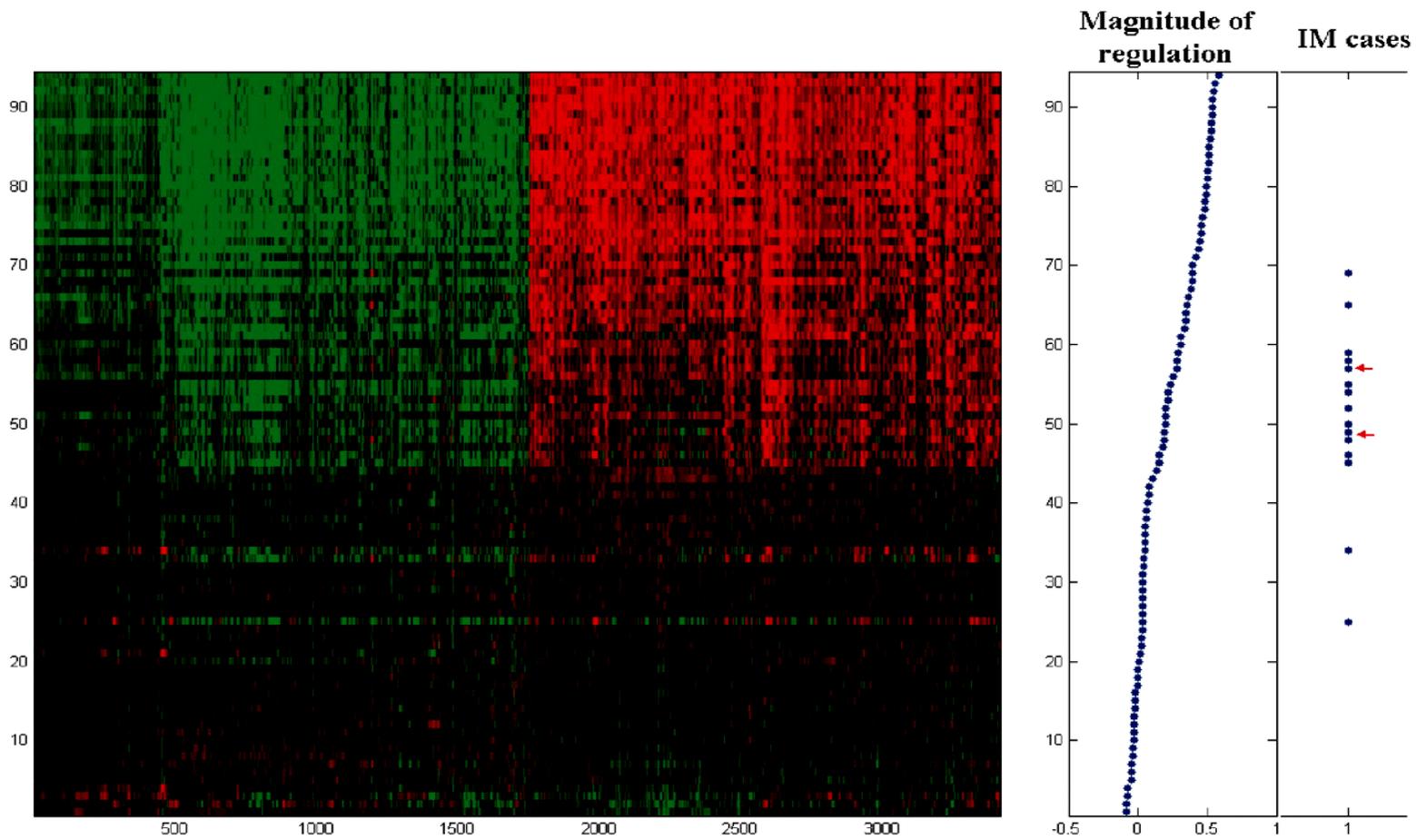


Maiite Gönez-Casares et al.

Map of *BCR-ABL* Kinase Domain Mutations Associated with Clinical Resistance to Imatinib

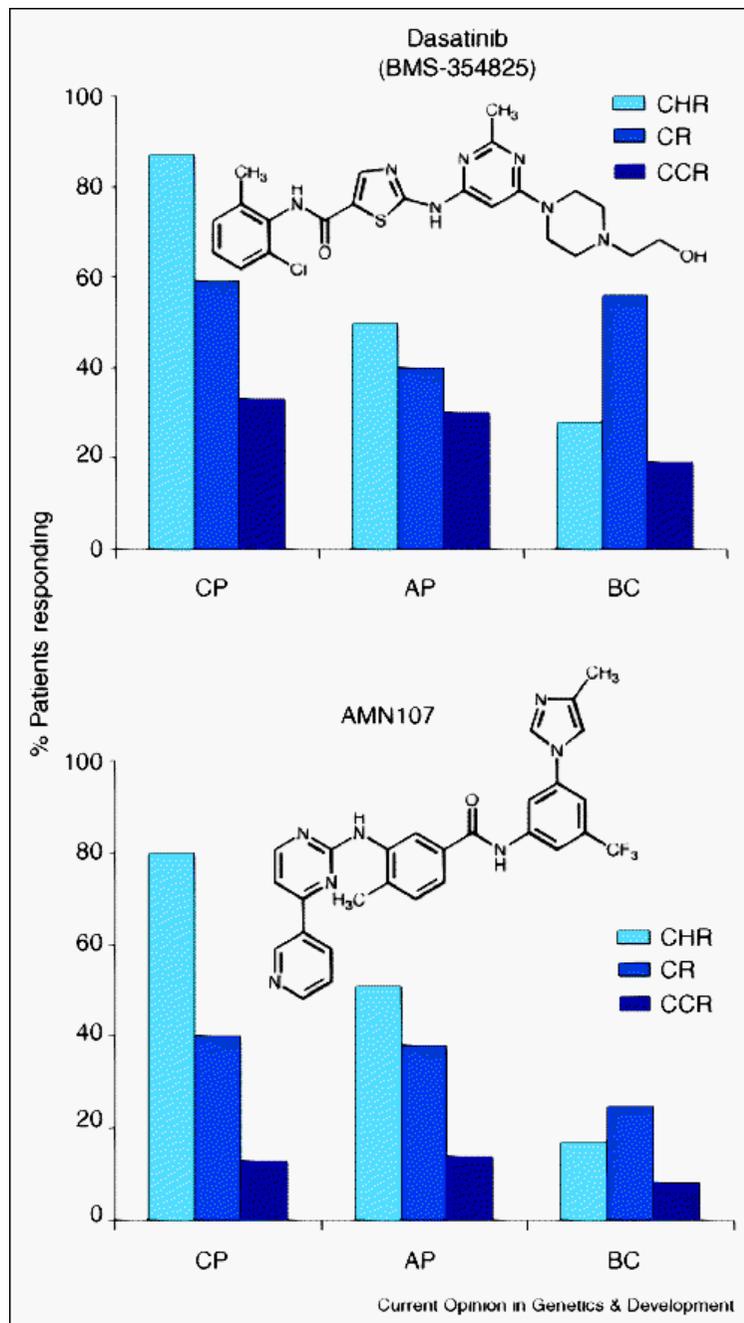


Gene expression in patients with resistance to Imatinib



Radich, Jerald P. et al. (2006) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103, 2794-2799

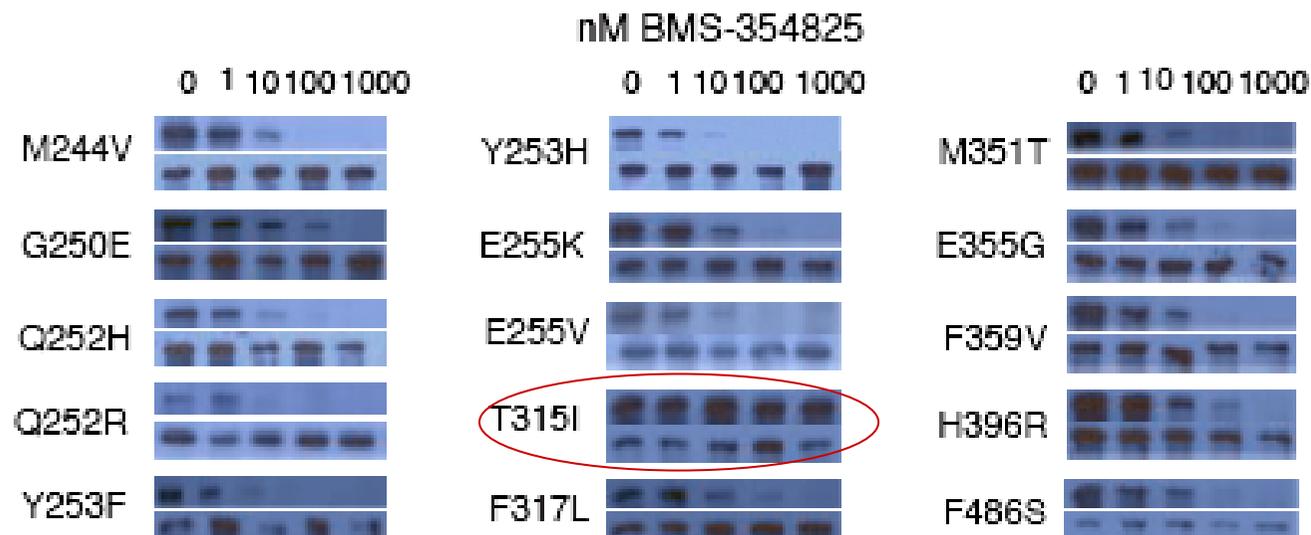
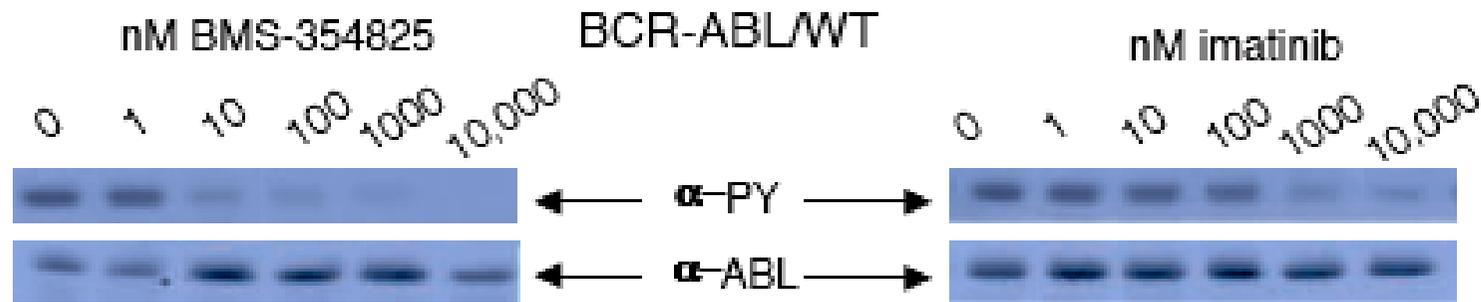
Imatinib alternatives



X300 vs Imat.

X30 vs Imat.

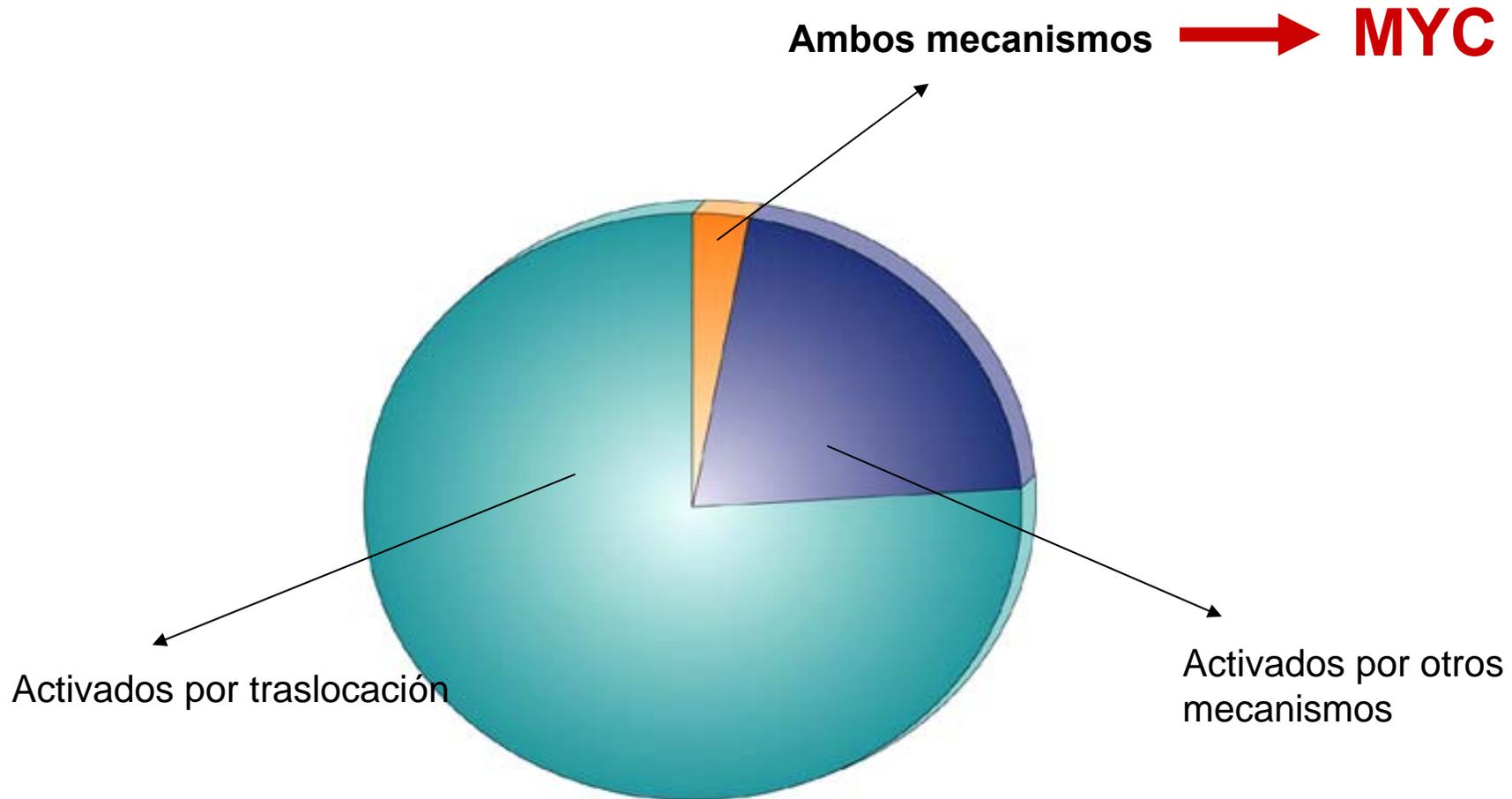
Dasatinib (BMS-354825) was more potent than Imatinib at inhibiting nonmutated BCR-ABL kinase activity in a cell-based assay.



T315I Only resistant form

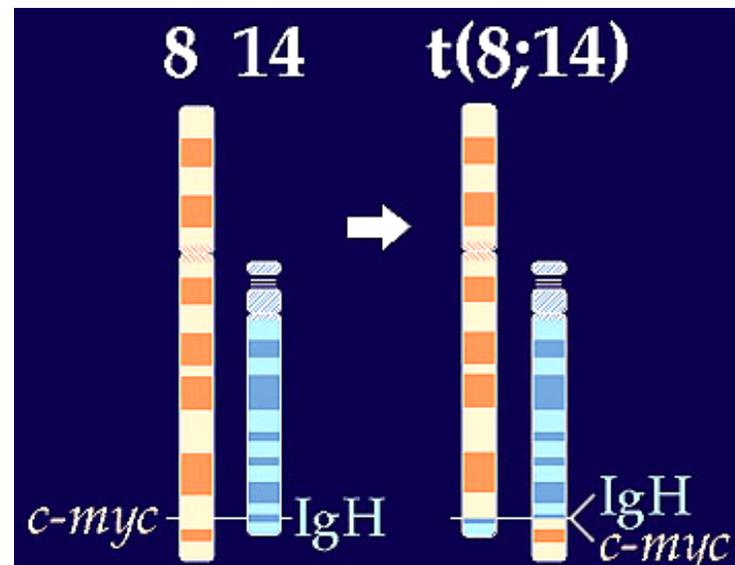
A CENSUS OF HUMAN CANCER GENES

Futreal et al, Nature Rev Cancer, Marzo 2004

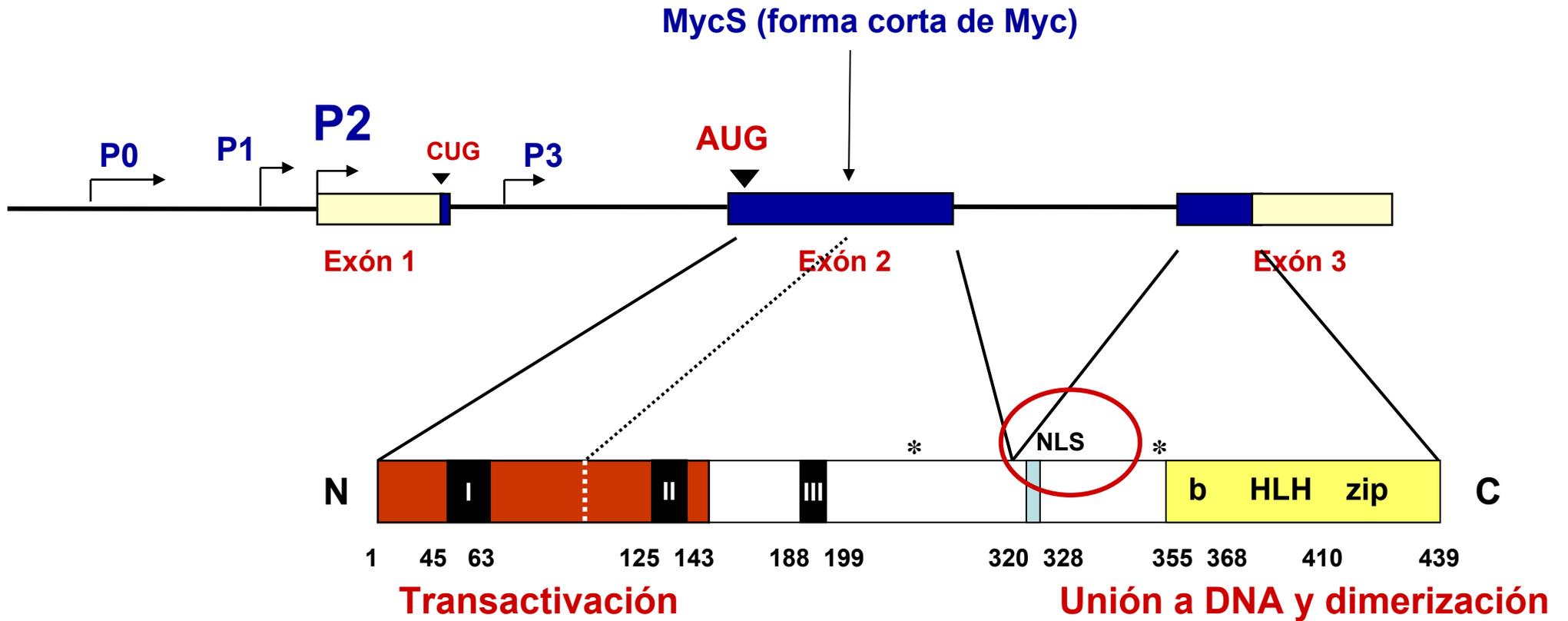


C-MYC (MYC)

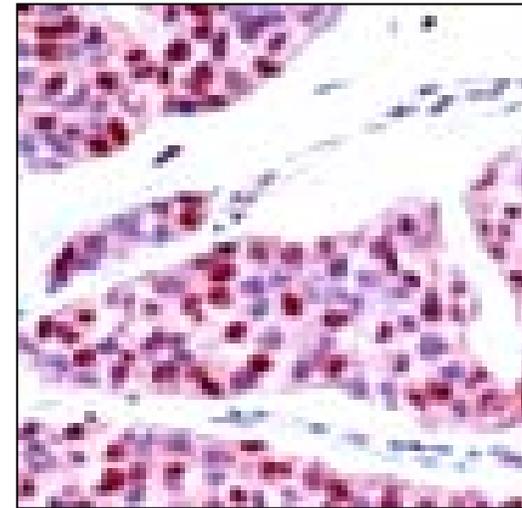
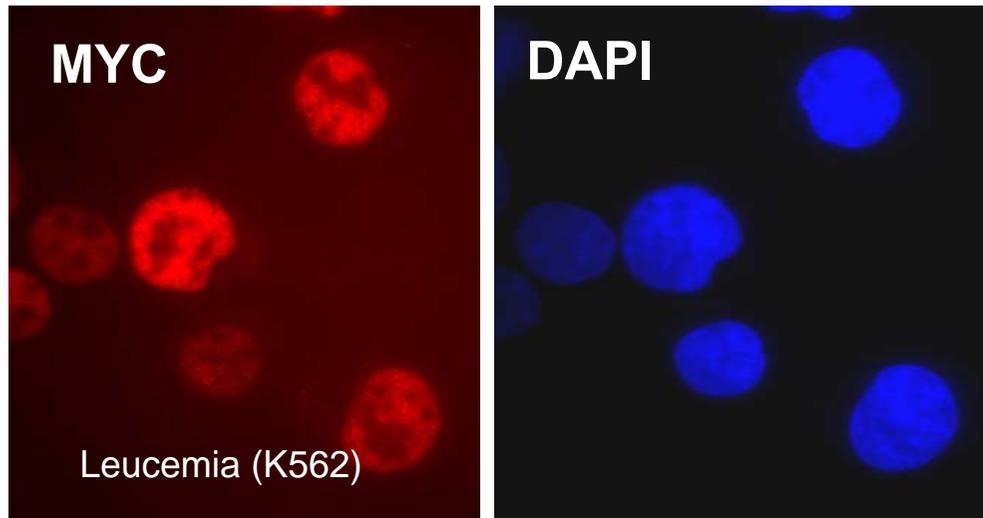
- El primer oncogén nuclear descubierto (1979), en varias cepas de retrovirus que inducían “myelocytomatosis” en pollos.
- Es un factor de transcripción (el primer factor de transcripción oncogénico descubierto)
- Es necesario para el desarrollo embrionario
- Está traslocado en todos los linfomas de Burkitt (1982) y amplificado y/o sobre-expresado en muchos otros tumores, normalmente en relación con progresión tumoral.
- Familia de tres genes: c-MYC, N-MYC, L-MYC. El c-MYC es el de expresión más ubícua y más implicado en cáncer



Estructura y expresión de *MYC*



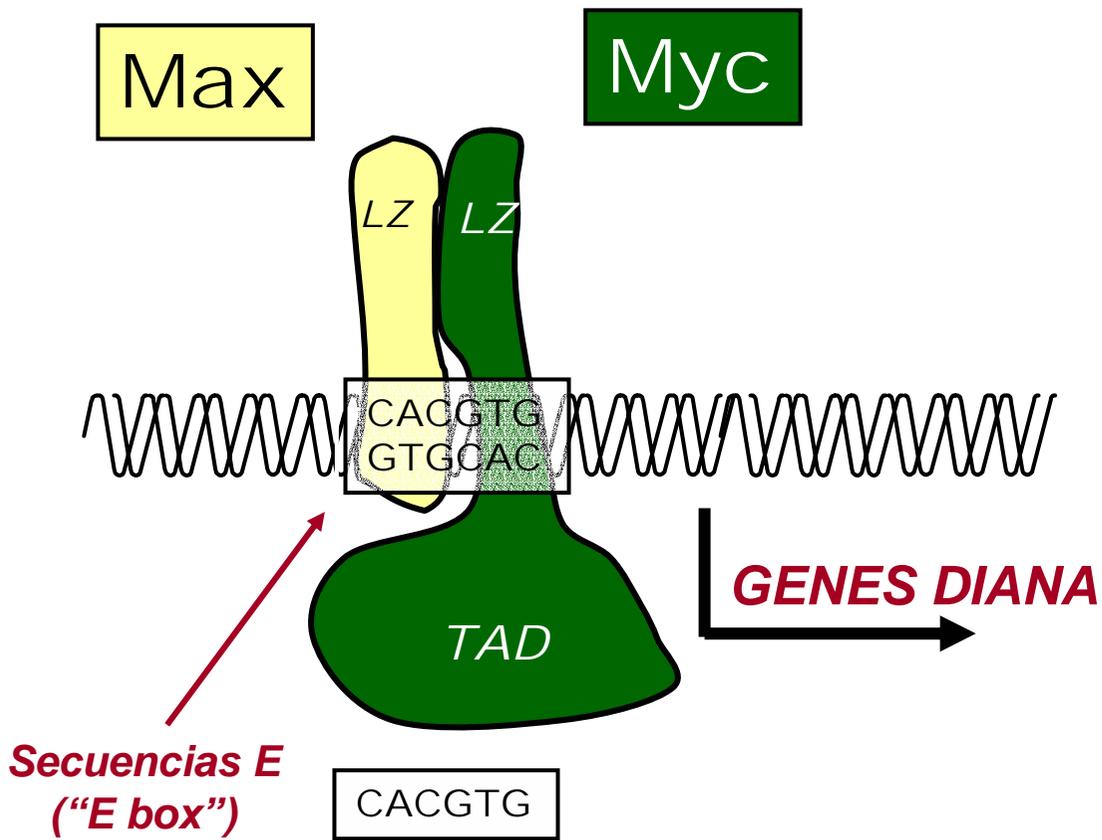
Como todo buen factor de transcripción, Myc está mayoritariamente en el núcleo



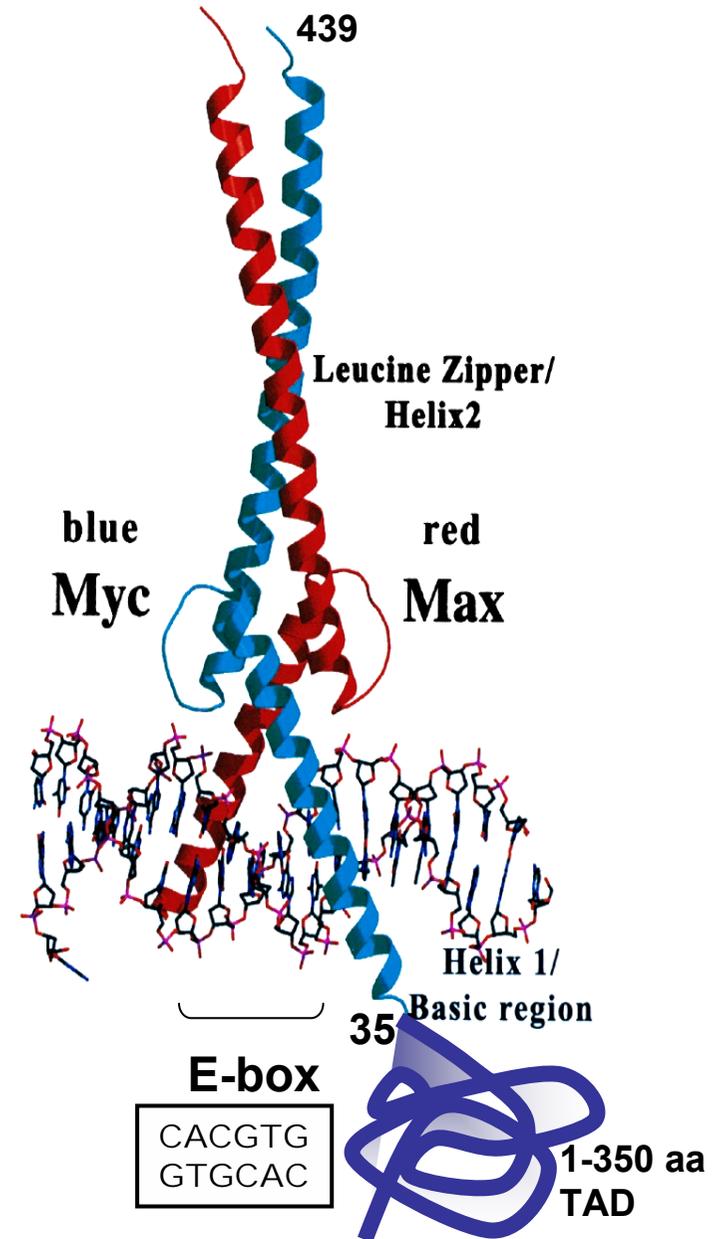
Cáncer de mama

- También en el citoplasma en células quiescentes con mucho Myc
- También en los nucleolos
- También en “cuerpos nucleares –PML”

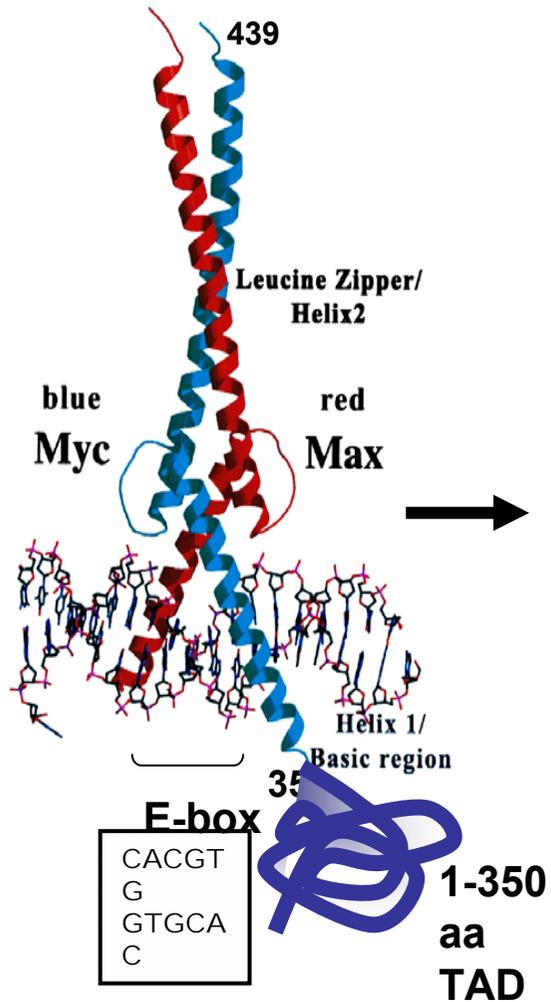
Los complejos Myc-Max transactivan genes por unión a "secuencias E"



(Nair & Burley, Cell 112:193-205,



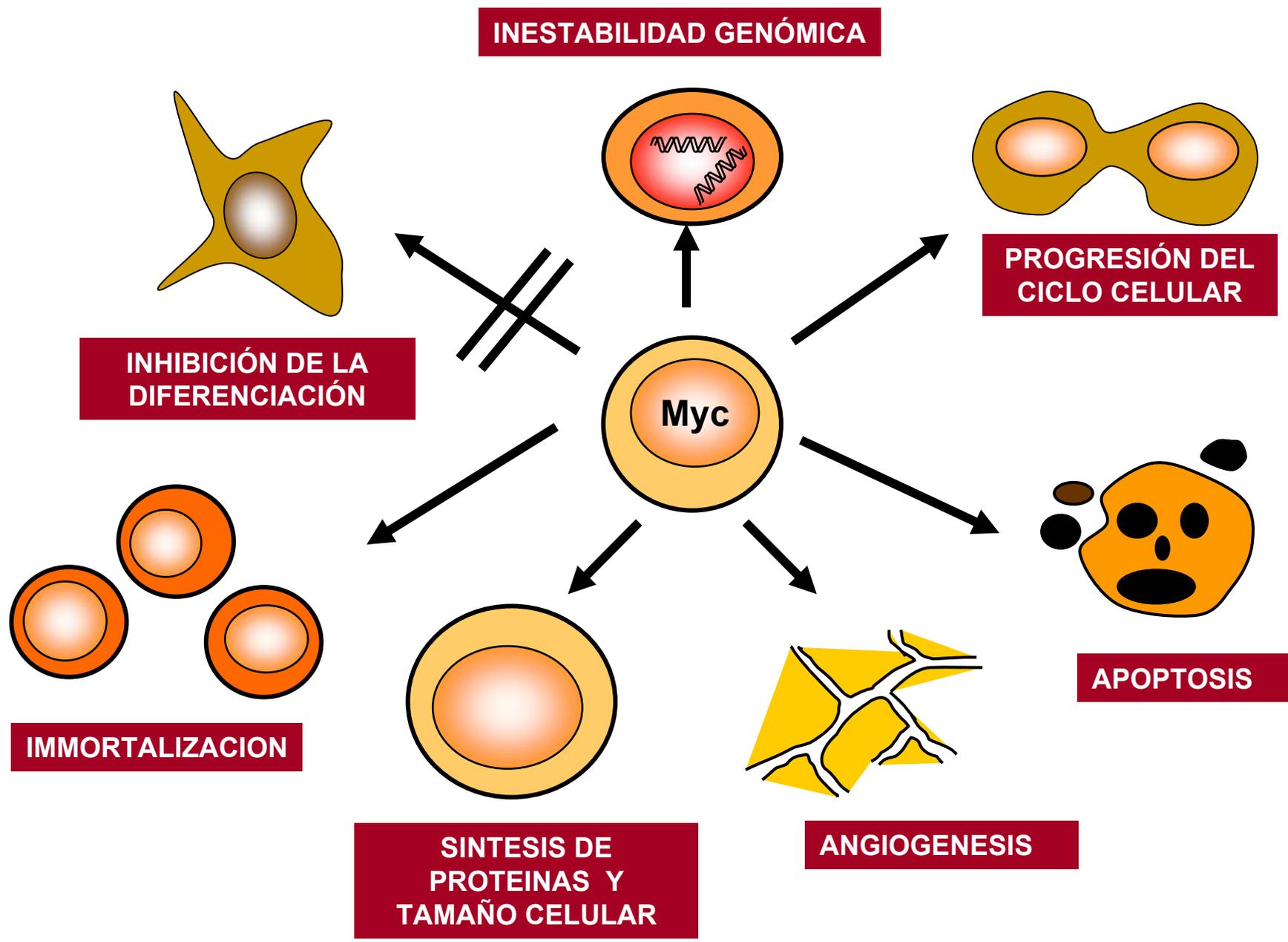
Genes diana de Myc-Max



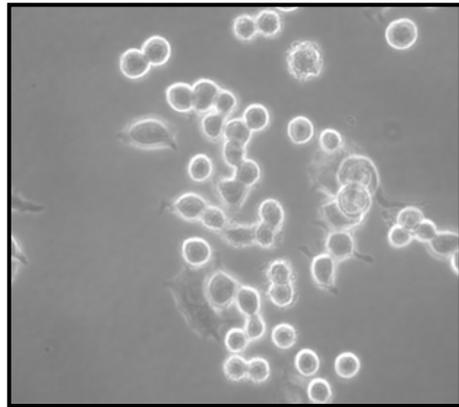
Cerca de 800 genes diana de Myc en el genoma humano

- 800 genes “regulados por Myc” en la base de datos (www.myccancergene.org)
- Myc presente en el 5-15% de los promotores humanos (por ChIP)
- PERO sólo el 10% de los genes con Myc unido al promotor son regulados (cambia su expresión) en respuesta a Myc

Myc está involucrado en múltiples funciones de la célula

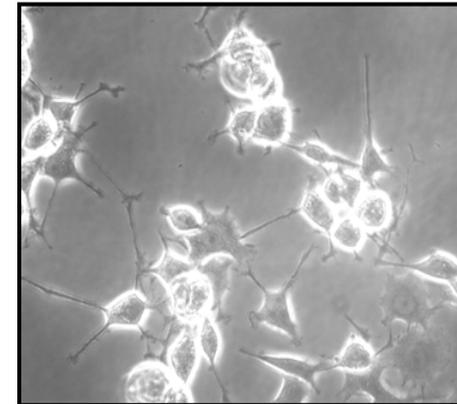


Myc inhibe la diferenciación neuronal de células de feocromocitoma

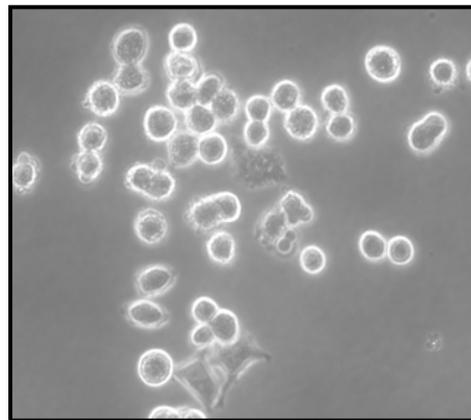


UR61

Ras

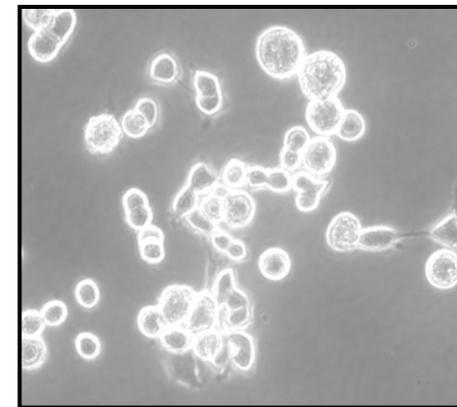


Diferenciación neuronal



UR61-Myc

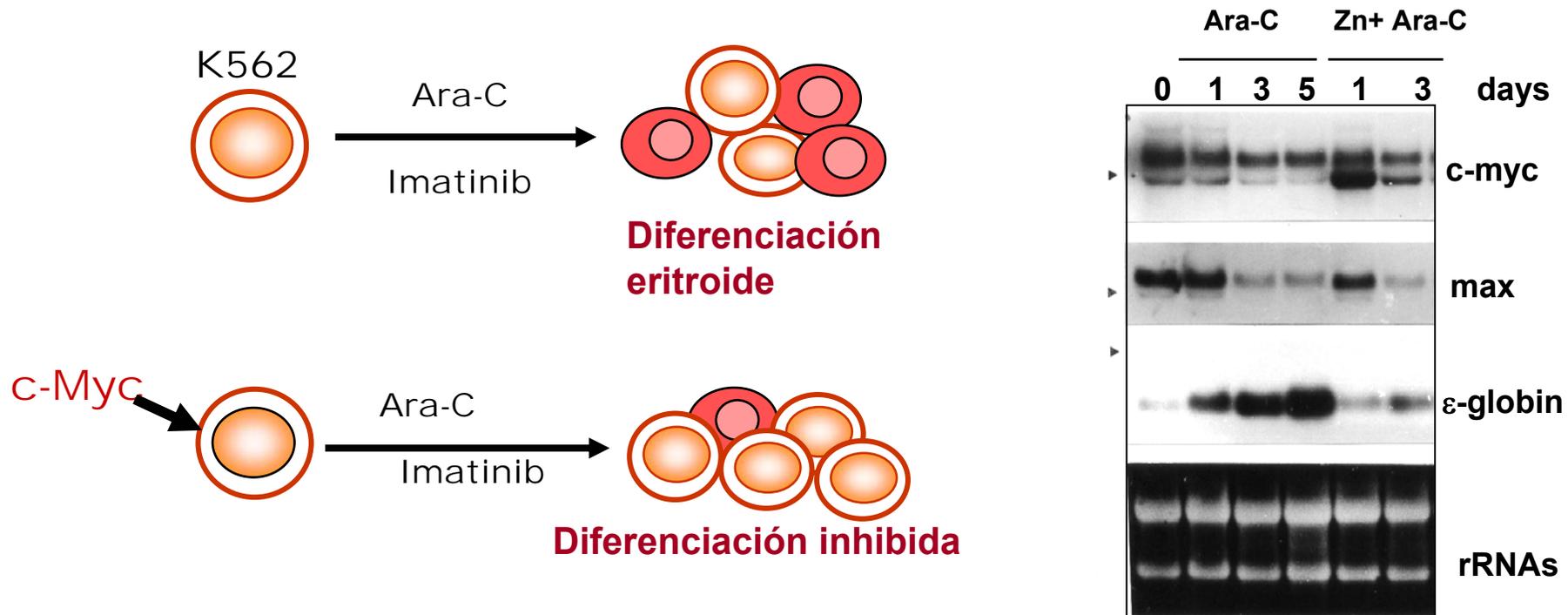
Ras



No diferenciación

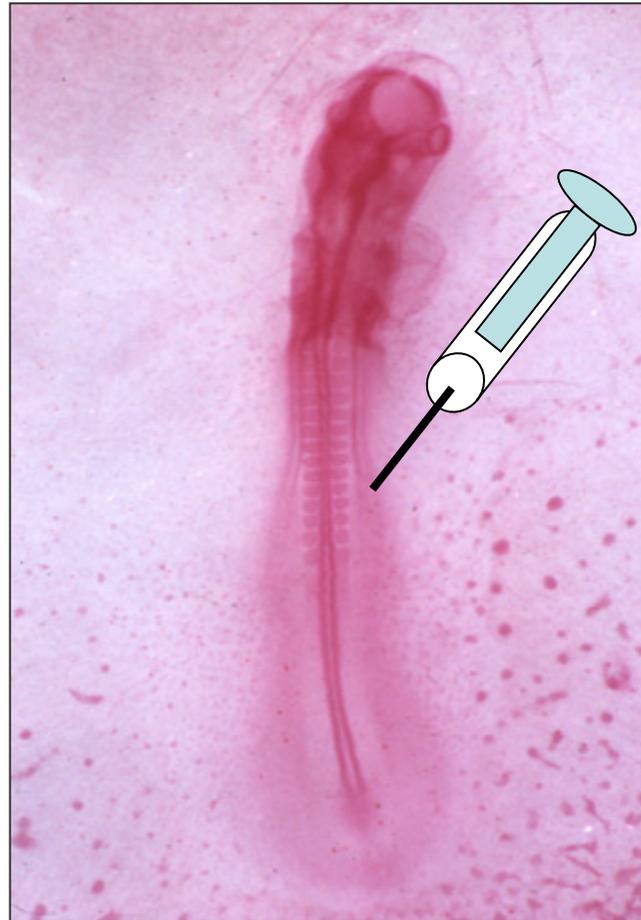
Jose Pedro Vaqué

Myc inhibe la diferenciación eritroide de células K562



(Delgado M.D. et al., 1995; Cañelles, M. et al., 1997)

Retroviral transduction of c-Myc in developing chicken limb



Chick embryo, 2 days (stage 12-14 HH)

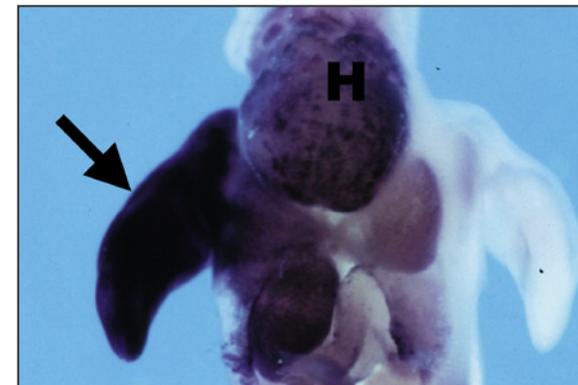
(Piedra et al. 2002)

Retrovirus
RCASBP(A)-c-myc

4 days

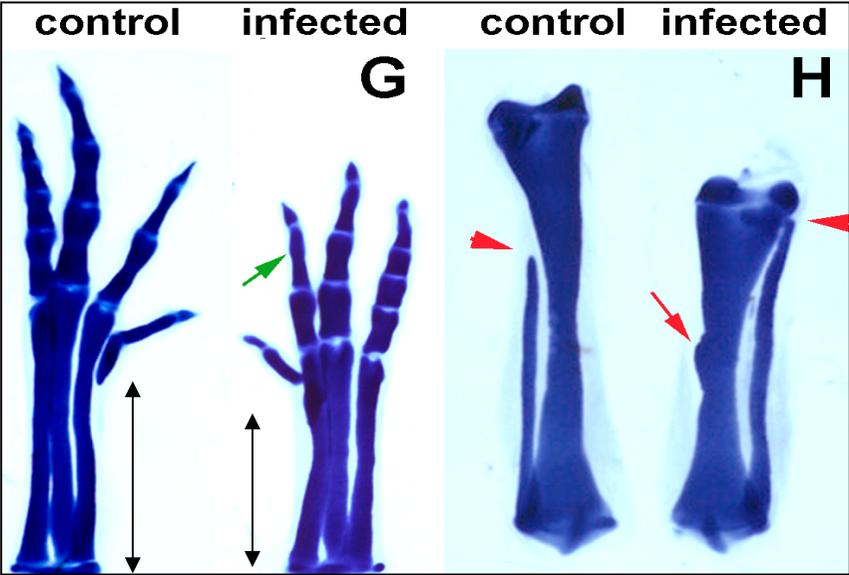


2+4 days (stage 26)



Myc mRNA expression (whole mounts)

c-Myc induces abnormalities in limb skeletal elements interfering with chondrocyte differentiation



(Piedra et al. 2002)

mRNA:

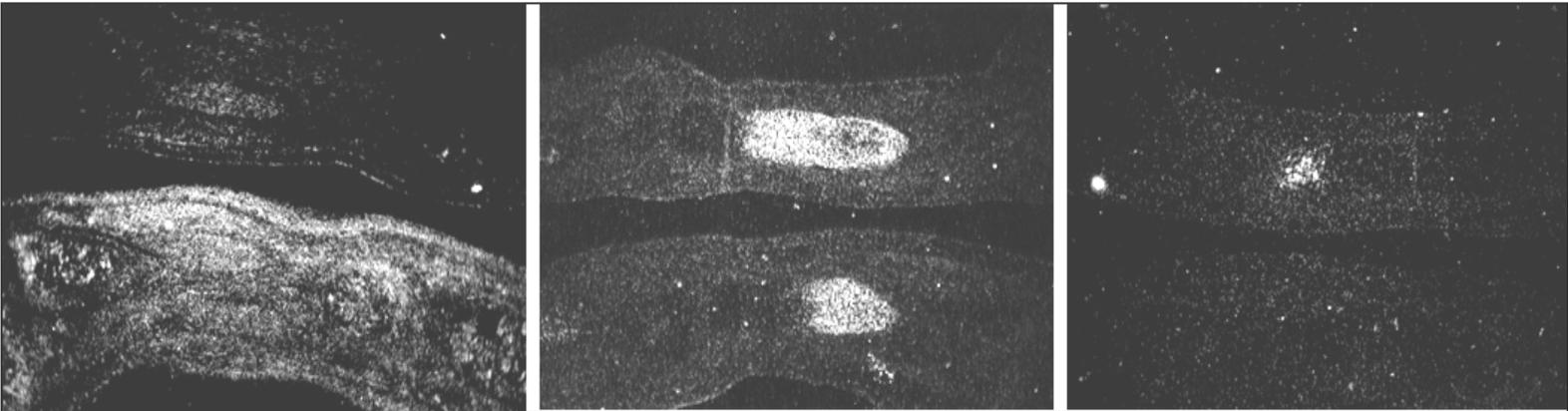
c-myc

Ihh

Collagen X

Myc

Control



**¿Por qué se sobre-expresa Myc en tumores?:
1) A consecuencia de traslocación**

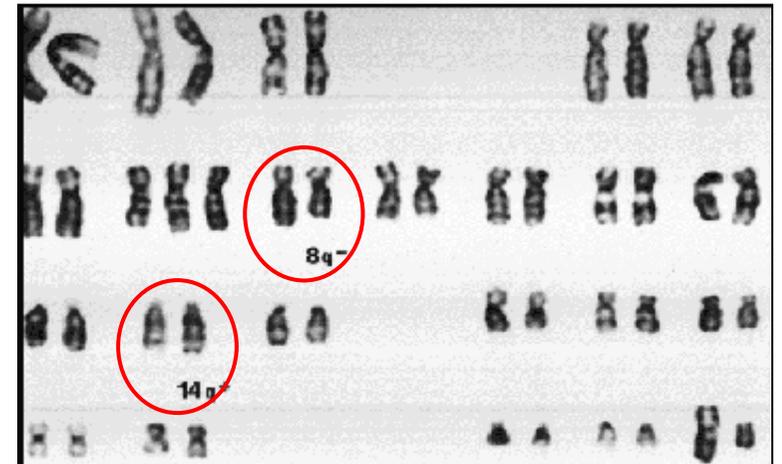
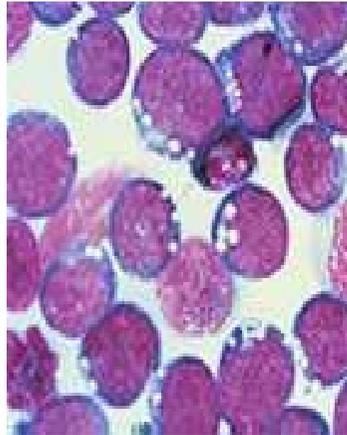
Casi todos los linfomas de Burkitt y linfoblásticas tipo L3 tienen traslocado el gen *MYC*



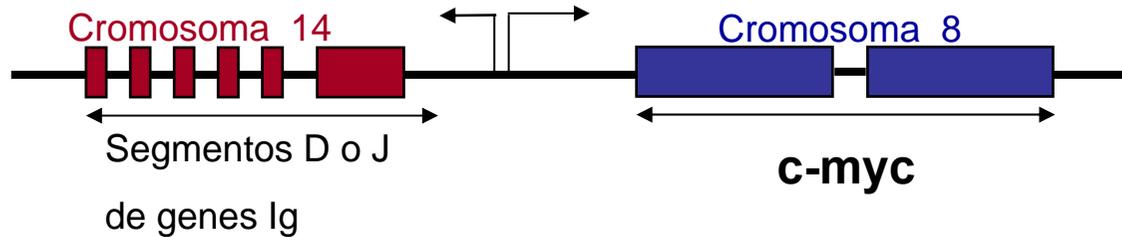
Denis Burkitt, 1961



Linfoma de Burkitt



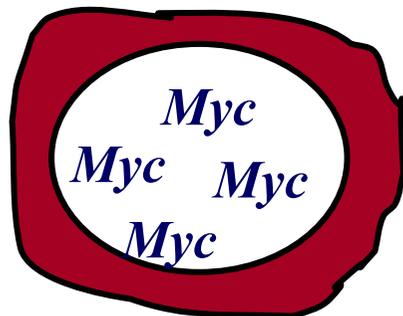
1982



Traslocación	Gen	Frec.
t(8;14)	IgH	80% *
t(2;8)	Igκ	15%
t(8;22)	Igλ	5%

* También en una pequeña fracción de linfomas de células B grandes, mieloma múltiple y leucemia linfoblásticas-T

¿Por qué se sobre-expresa Myc en tumores?
 2) A consecuencia de amplificación y/o sobreexpresión



Tumor

% con sobre-expresión o amplificación de MYC

<i>Linfoma de Burkitt/leucemia L3</i>	95 ¹
<i>Linfomas alto grado</i>	6-15 ¹
<i>Colon</i>	40-60
<i>Mama</i>	15-30 *
<i>Microcítico pulmón</i>	10-30 ²
<i>Cervix</i>	10-40
<i>Osteosarcoma</i>	20-40
<i>Ovario</i>	10-50 ²
<i>Estómago</i>	5-30 *
<i>Próstata</i>	15-50 ^{3*}
<i>Leucemia mieloide crónica-CB</i>	50-70 ³
<i>Neuroblastoma</i>	25-30 ⁴ *

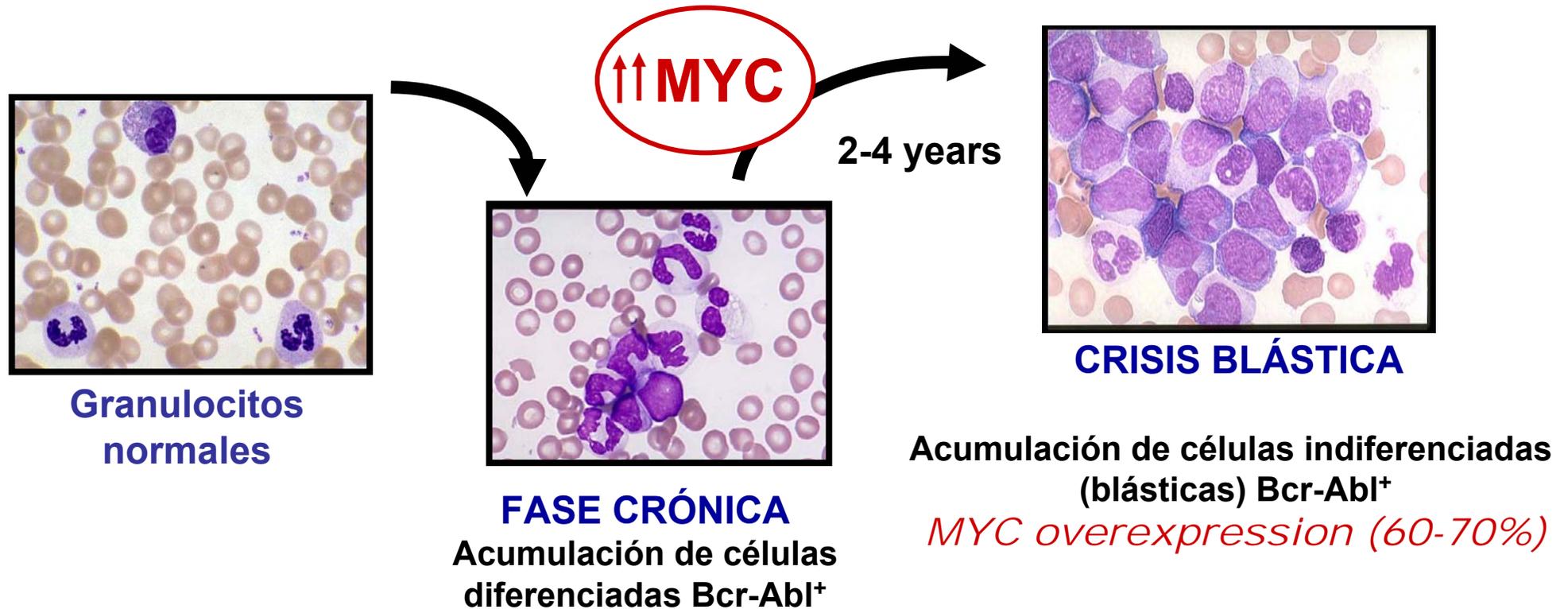
*Amplificación frecuente

¹Incluye traslocaciones; ²Incluye N-myc y L-myc;

³Incluye trisomía-8

⁴ MYCN

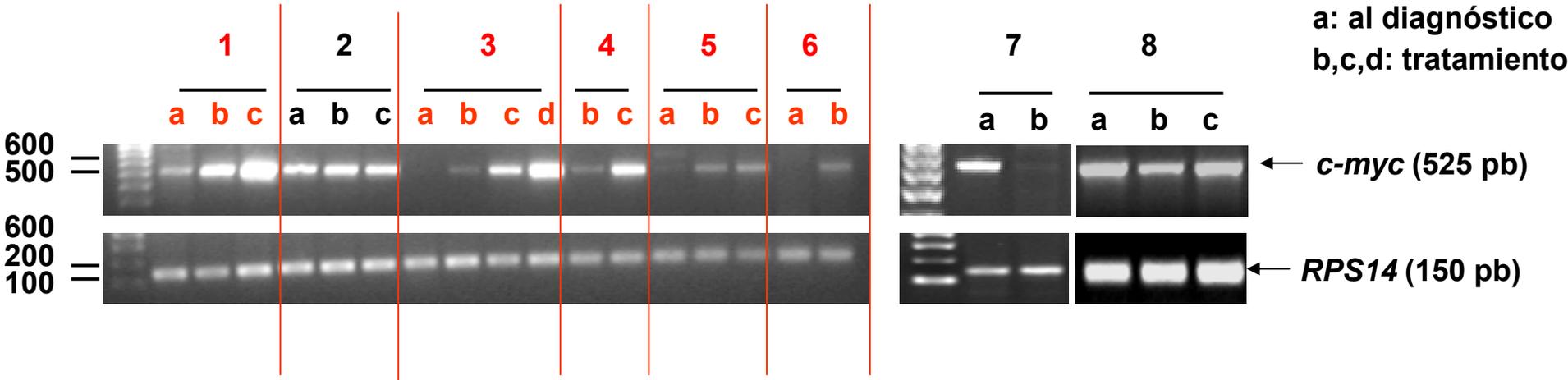
Leucemia mieloide crónica: un ejemplo de Myc en progresión tumoral



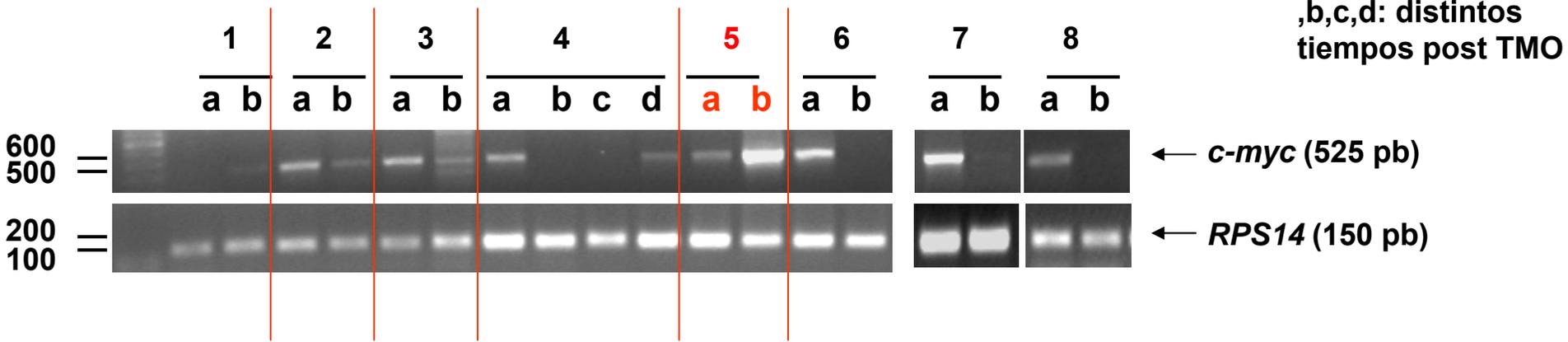
1. Myc inhibe la diferenciación de células K562 inducida por citarabina y por imatinib (*M.Dolores Delgado, Maite Gómez-Casares*)
2. La sobre-expresión de Myc se asocia a peor respuesta al tratamiento (IFN, Imatinib) (*Marta Albajar, Maite Gómez-Casares*)

MYC en la progresión de leucemia mieloide crónica

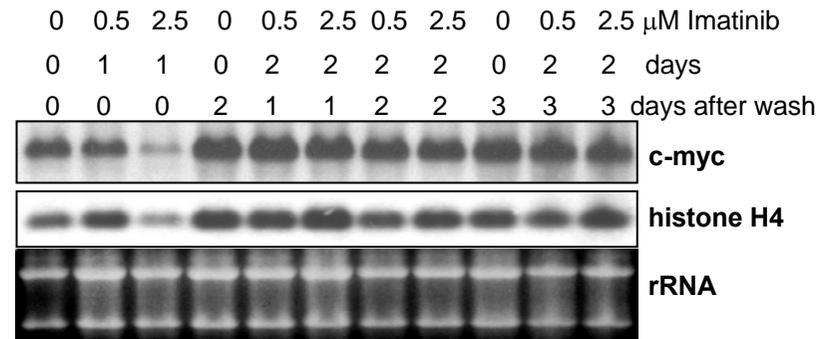
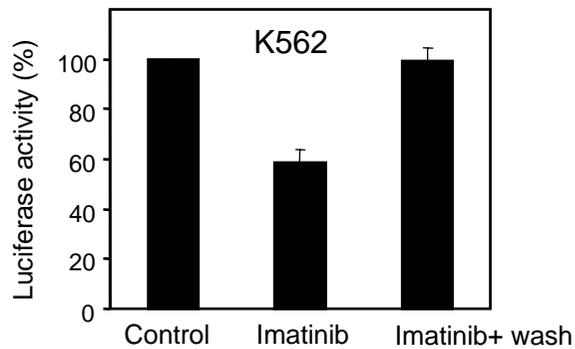
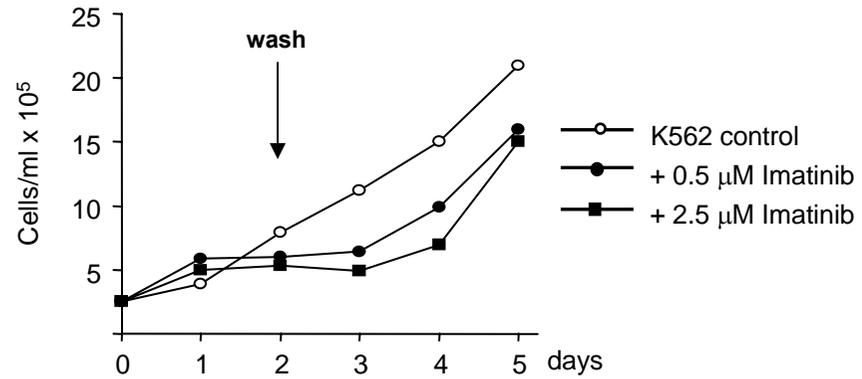
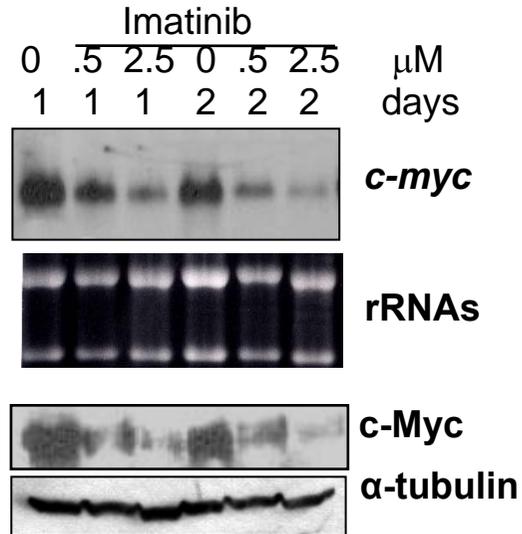
LMC en fase crónica



LMC después del trasplante

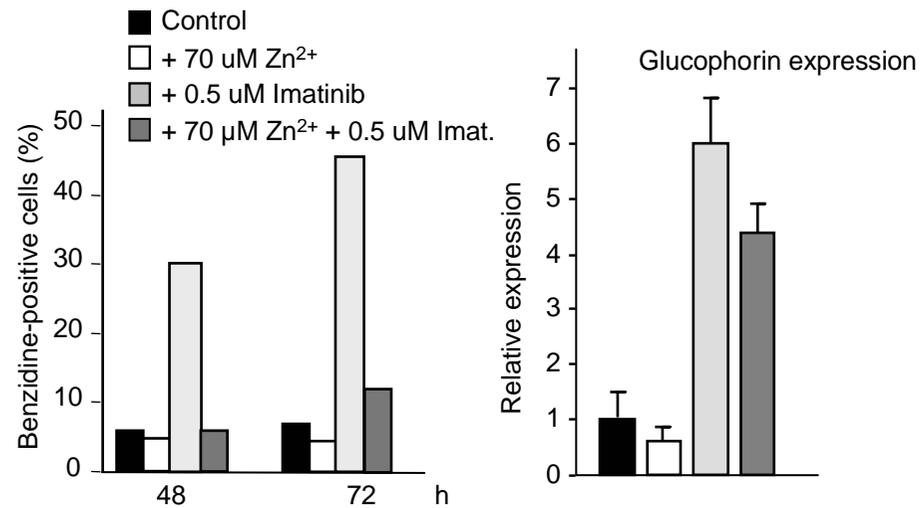
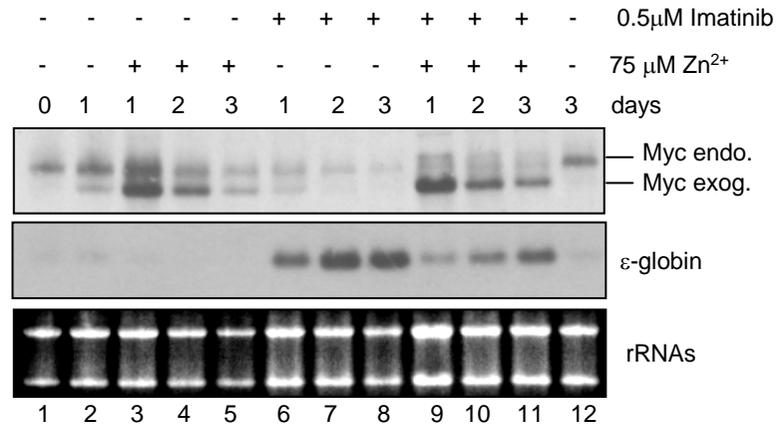


Bcr-Abl mantiene elevados los niveles de Myc en células LMC



Maite Gómez-Casares, Dolores Delgado et al.

Myc inhibits imatinib-induced erythroid differentiation

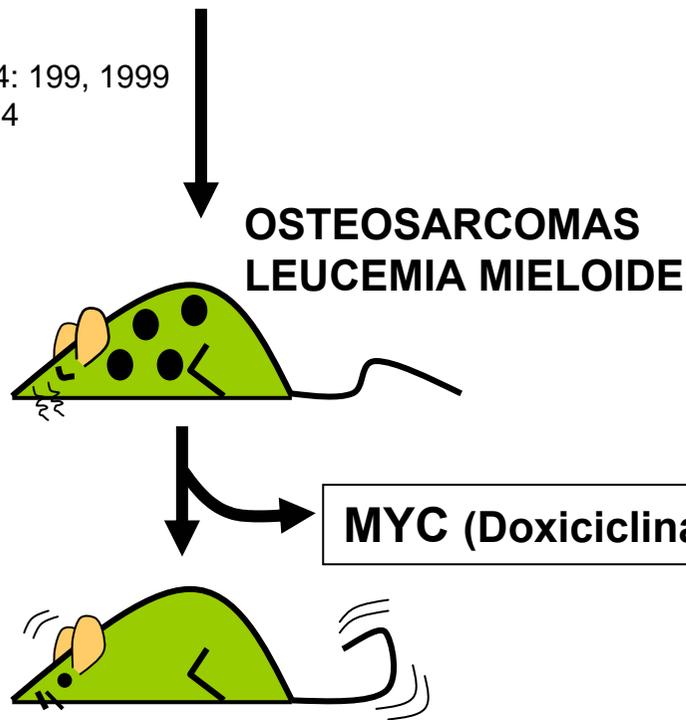


Maite Gómez-Casares, Carmen Elsa López, Nuria Ferrándiz

¿La inhibición de diferenciación es esencial para la tumorigénesis mediada por Myc?

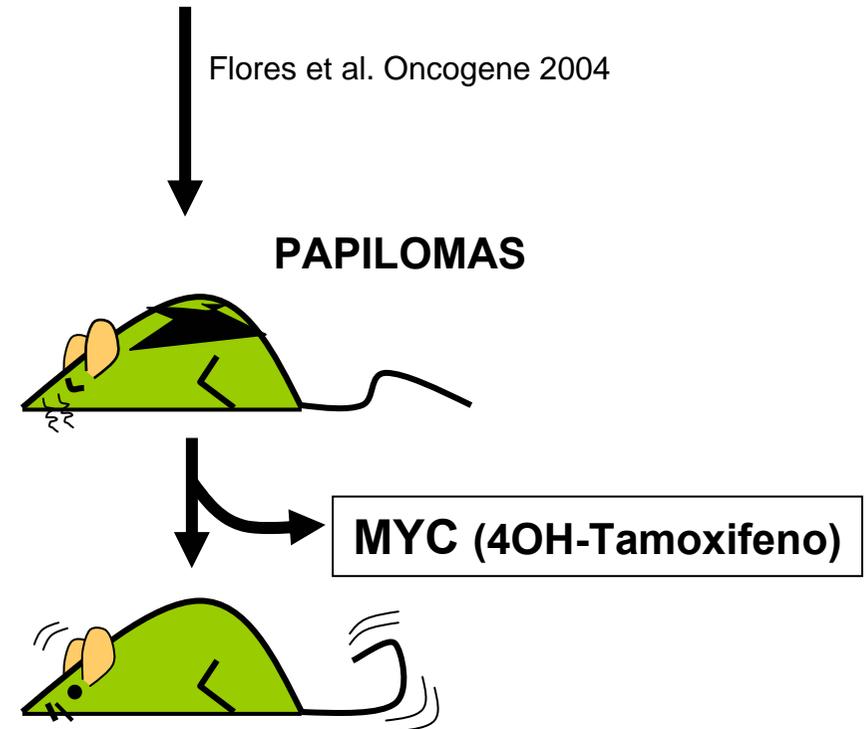
Tet-off-Myc en Miloblastos y osteoblastos

Felsher et al., *Mol. Cell.*, 4: 199, 1999
Shachaf et al. *Nature* 2004
Jain et al. *Science* 2002



MycER en queratinocitos

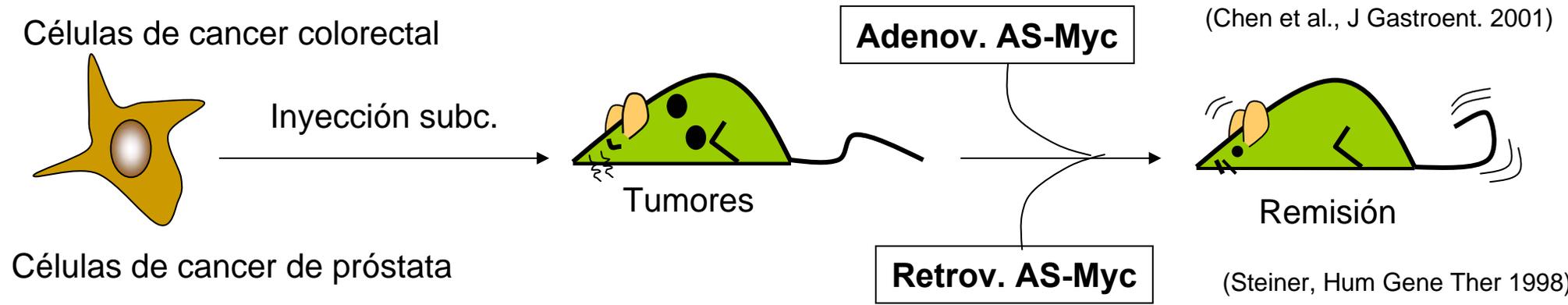
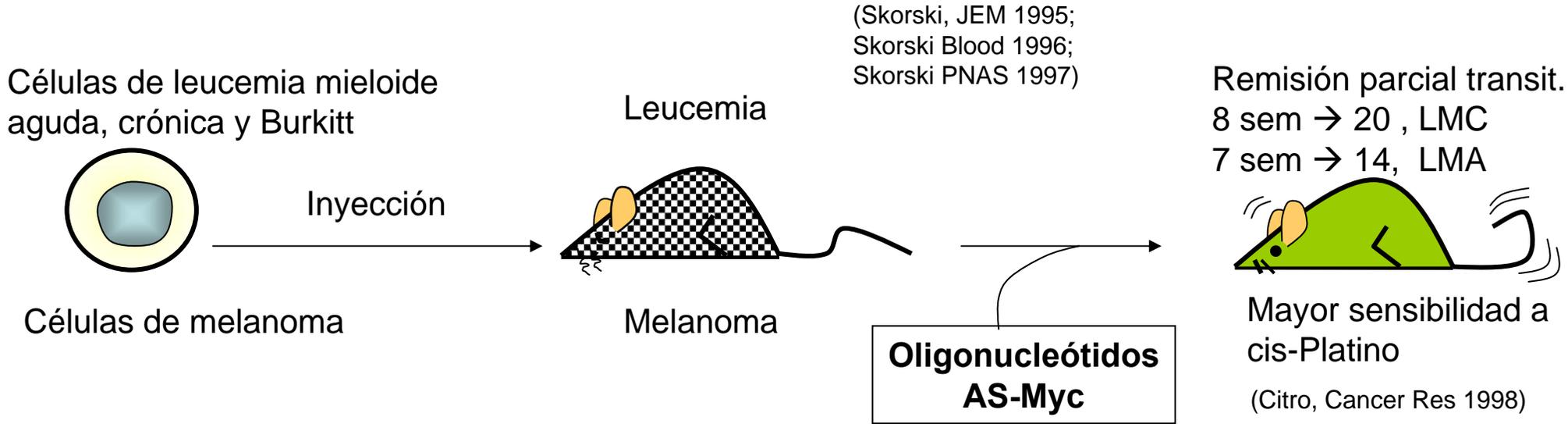
Flores et al. *Oncogene* 2004



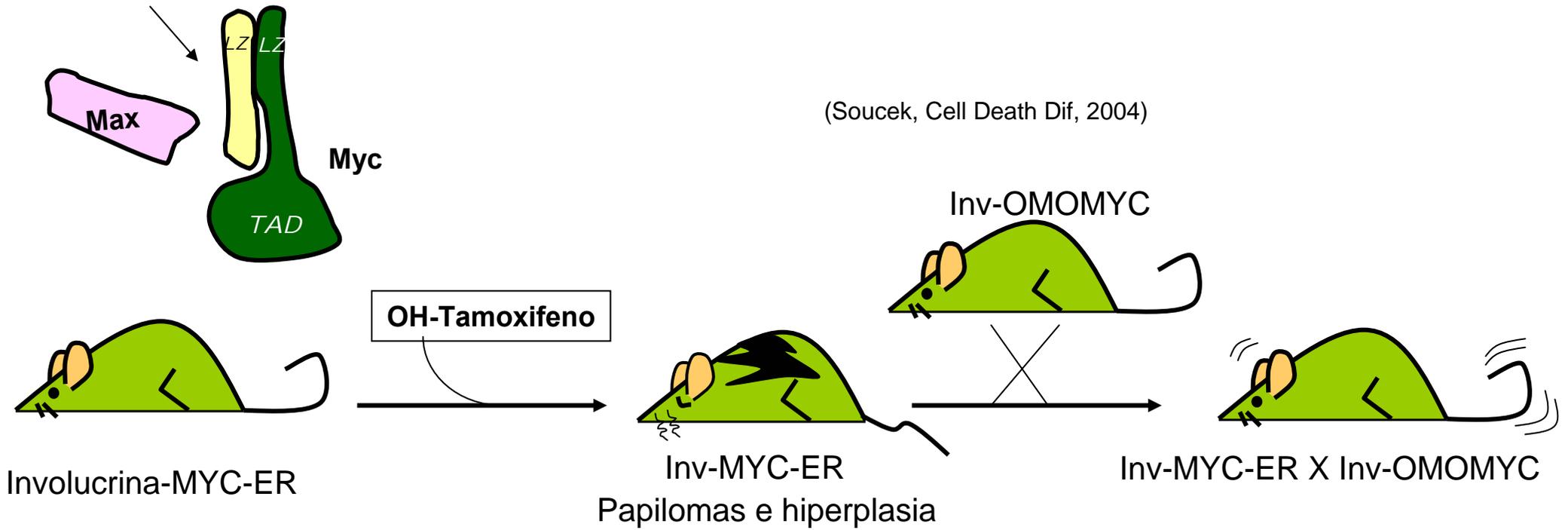
**REGRESION TUMORAL
POR RE-DIFERENCIACIÓN**

Intentos de terapia génica basados en Myc

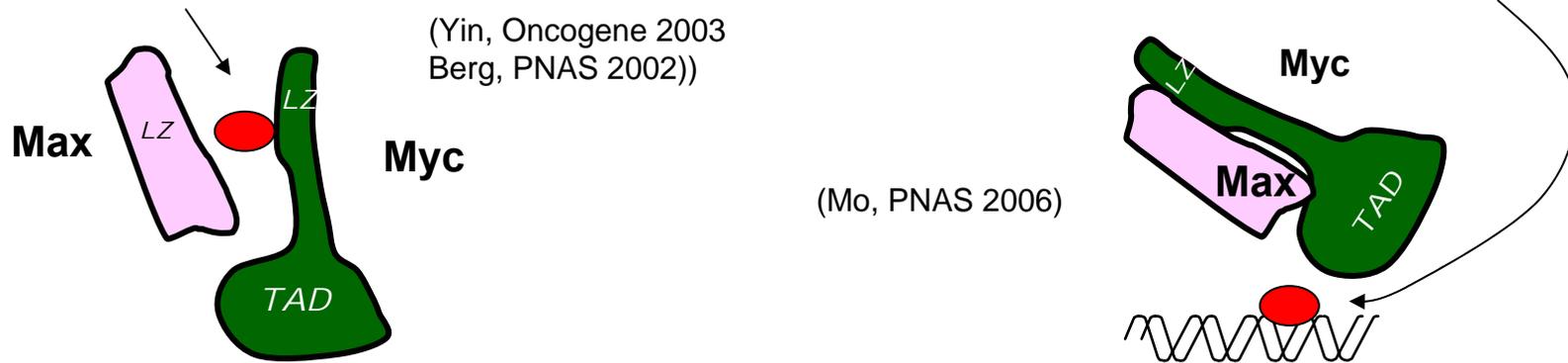
1. Myc antisentido



2. "OMOmyc": mutante enHLH que secuestra Myc en complejos incapaces de unirse a cajas E



3. Moléculas pequeñas que inhiben la dimerización Myc-Max o la unión de Myc-Max al DNA



FIN DE LA SEGUNDA CLASE