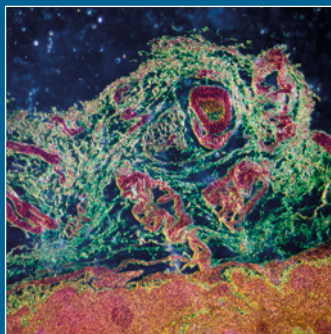


TOMASZ CHOJNACKI

PIOTR RZEPECKI

GENETYKA I LECZENIE
CHŁONIAKA ROZLANEGO
Z DUŻYCH KOMÓREK B (DLBCL)

W ERZE LEKÓW UKIERUNKOWANYCH
NA CELE MOLEKULARNE



**Genetyka i leczenie
chłoniaka rozlanego z dużych komórek B (DLBCL)
w erze leków ukierunkowanych
na cele molekularne**

Tomasz Chojnacki, Piotr Rzepecki

Genetyka i leczenie chłoniaka rozlanego z dużych komórek B (DLBCL) w erze leków ukierunkowanych na cele molekularne

Tomasz Chojnacki, Piotr Rzepecki

© Copyright by Tomasz Chojnacki, Piotr Rzepecki

Wszystkie prawa zastrzeżone.

Żaden z fragmentów tej książki nie może być publikowany w jakiegokolwiek formie bez wcześniejszej pisemnej zgody wydawcy. Dotyczy to także fotokopii i mikrofilmów oraz rozpowszechniania za pośrednictwem nośników elektronicznych.

Wydanie na podstawie udzielonych licencji:

Termedia Wydawnictwa Medyczne
ul. Kleberga 2
61-615 Poznań
tel./faks +48 61 822 77 81
e-mail: termedia@termedia.pl
<http://www.termedia.pl>

termedia

Termedia Wydawnictwa Medyczne
Poznań 2016 r.
Wydanie I

Skład i łamanie: TERMEDIA

ISBN: 978-83-7988-108-6

Wydawca dołożył wszelkich starań, aby cytowane w książce nazwy leków, ich dawki oraz inne informacje były prawidłowe. Wydawca ani autorzy nie ponoszą odpowiedzialności za konsekwencje wykorzystania informacji zawartych w niniejszej publikacji. Każdy produkt, o którym mowa w książce, powinien być stosowany zgodnie z odpowiednimi informacjami podanymi przez producenta. Ostateczną odpowiedzialność ponosi lekarz prowadzący.

SPIS TREŚCI

ROZDZIAŁ 1	
Genetyka	5
Tomasz Chojnacki	
ROZDZIAŁ 2	
Zalecenia diagnostyczne	43
Tomasz Chojnacki	
ROZDZIAŁ 3	
Leczenie	51
Tomasz Chojnacki	
ROZDZIAŁ 4	
Rola przeszczepienia krwiotwórczych komórek macierzystych – stan wiedzy na 2015 rok	81
Piotr Rzepecki	

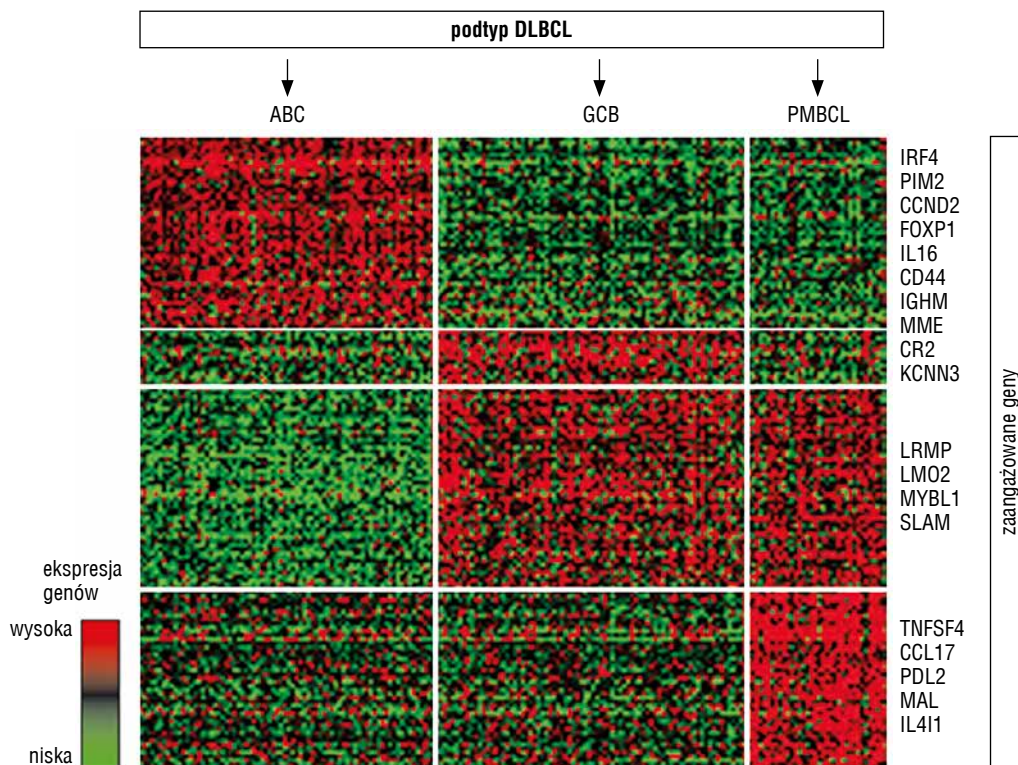
GENETYKA

Tomasz Chojnacki

Informacje ogólne

Chłoniak rozlany z dużych komórek B (*diffuse large B-cell lymphoma* – DLBCL) jest najczęstszym chłoniakiem rozpoznawanym u dorosłych. Stanowi 30–40% wszystkich przypadków chłoniaków nieziarniczych (*non-Hodgkin's lymphoma* – NHL). Terminem „chłoniak rozlany z dużych komórek B” tak naprawdę określa się jednorodną morfologicznie, ale heterogenną pod innymi względami grupę chorób o różnej manifestacji klinicznej i różnej odpowiedzi na leczenie. Dotychczasowe próby podziału tej jednostki na podkategorie bazują na morfologii, cytogenetyce, immunohistochemii, dominujących manifestacjach klinicznych i profilu genowym. W przyszłości populacja chorych na DLBCL nie będzie leczona w ten sam sposób. Już teraz wiadomo, że wśród pacjentów z DLBCL istnieje pewna grupa o szczególnie niekorzystnym rokowaniu, w której zastosowanie immunochemioterapii wg schematu R-CHOP (rytuksymab, cyklofosfamid, doksorubicyna, winkrystyna, prednizon) jest niewystarczające. Do tej grupy zaliczają się pacjenci z obecnością translokacji MYC; t(8;14), a także pacjenci ze współistnieniem tej translokacji z translokacją BCL2; t(14;18), tzw. *double hit lymphoma*, oraz pacjenci ze współistnieniem MYC, BCL2 i BCL6; t(3;14), tzw. *triple hit lymphoma*. Podkreśla się, że bardziej intensywnej chemioterapii wymagają najprawdopodobniej również młodzi pacjenci (< 60. roku życia) z dużym i pośrednim dużym stopniem ryzyka wg Międzynarodowego Wskaźnika Rokowniczego (*International Prognostic Index* – IPI).

Na podstawie profilu ekspresji genów (*gene expressions profile* – GEP), wg klasyfikacji *Cell of Origin* (COO) DLBCL można podzielić na 3 podtypy molekularne. Klasyfikacja ta ujawnia w poszczególnych podtypach choroby całe kompleksy genów ulegających nadekspresji. Pokazuje również, że medycyna „spersonalizowana” (ukierunkowana na cele molekularne) w DLBCL musi brać pod uwagę nie tylko mutacje odpowiedzialne za genezę nowotworu, lecz także szereg mutacji współistniejących, warunkujących np. oporność na stosowaną terapię.



Rycina 1. Profil ekspresji genów w chłoniaku rozlanym z dużych komórek B (DLBCL) z podziałem na 3 podkategorie wg klasyfikacji *Cell of Origin* [za Roschewski M, Staudt LM, Wilson WH. Diffuse large B-cell lymphoma – treatment approaches in the molecular era. *Nat Rev Clin Oncol* 2014; 11: 12-23]

Nadekspresja danych grup genów w poszczególnych typach chłoniaka koresponduje z etapem rozwoju, na jakim znajduje się limfocyt B, z którego wywodzi się nowotwór.

Podtyp GCB wywodzi się z komórek centrów rozmnażania (germinalnych), w których zachodzą somatyczne hipermutacje związane z reakcją w ośrodkach rozmnażania i dlatego cechuje się nadekspresją genów uczestniczących w tej reakcji, np. LRMP i LMO2. Dla tego podtypu charakterystyczna jest ekspresja genów związanych z proliferacją i wzmożonym metabolizmem komórek. Ponadto w podtypie GCB częste są translokacje BCL6, który jest głównym regulatorem transkrypcji w centrum rozmnażania, a także BCL2. W 21% przypadków GCB występuje mutacja w EZH2. Utrata ekspresji PTEN (55% przypadków DLBCL GCB) skutkuje aktywacją szlaku sygnałowego 3-kinazy fosfatydyloinozytolu i kinazy Akt – PI3K/Akt, który staje się obecnie jednym z głównych celów leczenia ukierunkowanego.

Podtyp ABC wywodzi się z limfocytów postgerminalnych i charakteryzuje się nadekspresją genów zaangażowanych w różnicowanie limfocytów B w komórki plazma-

Tabela 1. Mechanizmy onkogenezy i potencjalne cele terapeutyczne w poszczególnych typach chłoniaka rozlanego z dużych komórek B

Podtyp	Mechanizmy onkogenezy	Potencjalne cele terapeutyczne
GCB	translokacje BCL2 mutacje EZH2 delecja PTEN utrata ekspresji PTEN	BCL6 EZH2 PI3K-AKT
ABC	aktywacja NF- κ B mutacje CARD11 delecje A20 aktywacja szlaku BCR konstytutywna aktywność MYD88	BCR kompleks CBM IRAK4 JAK-STAT
PMBCL	aktywacja NF- κ B amplifikacje 9p24 amplifikacje REL mutacje JAK2 translokacje CIITA	JAK-STAT PD-1

tyczne, takich jak IRF4, PIM2 i FOXP1. Zasadniczą wspólną cechą chłoniaków ABC jest konstytutywna aktywacja szlaków NF- κ B i szlaku sygnałowego BCR. Stwierdzone są też mutacje MYD88, CARD11 i CD79B oraz delecje i mutacje TNFAIP3.

Podtyp PMBCL cechuje się amplifikacją fragmentu chromosomu 9 (9p24) i aktywacją szlaku NF- κ B. Nadekspresji w tym podtypie ulegają też PDL1 i PDL2, czyniąc receptor PD-1 potencjalnym celem terapeutycznym. Mogą występować również translokacje, których wynikiem jest aktywacja szlaku PD-1. Podtyp PMBCL wywodzi się z unikalnych limfocytów B, które opuściły grasicę, i charakteryzuje się ekspresją rzadkiego garnituru genów typowego bardziej dla chłoniaka Hodgkina niż DLBCL, dlatego też nie będzie przedmiotem tego opracowania.

Nadekspresje i rearanżacje onkogenów

Rearanżacje MYC

W prawidłowych limfocytach B BCL6 hamuje transkrypcję onkogenu MYC. W 10–15% przypadków DLBCL mechanizm ten jest omijany poprzez translokację onkogenu MYC, co skutkuje niekontrolowanym wzrostem i proliferacją komórek chłoniaka. U ok. 10% pacjentów z nowo zdiagnozowanym DLBCL stwierdza się rearanżacje onkogenu MYC ze złożonym kariotypem i u tych pacjentów występuje największe ryzyko niepowodzenia leczenia z użyciem standardowo stosowanej chemioterapii R-CHOP. Nie wiadomo, czy do złego rokowania w DLBCL-MYC+ wystarcza sama obecność rearanżacji MYC czy też niezbędne jest współlistnienie dodatkowych aberracji cytogenetycznych. Badania retrospektywne wskazują, że guzy, w których występuje rearanżacja MYC, mają również inne dodatkowe rearanżacje, np. BCL2, BCL6 lub CCND1. Te tzw. *double-* i *triple-hit lymphomas* cechują się szczególnie złym rokowaniem, gdy są leczone R-CHOP. Ograniczone dane pokazują, że w tych przy-

padkach skuteczne może być leczenie DA-EPOCH-R (etopozyd, winkrystyna, cyklofosfamid, doksorubicyna, prednizon oraz rytuksymab), co jest obecnie przedmiotem badań klinicznych. Co istotne, z badania CORAL wynika, że pacjenci z rearanżacją MYC podczas nawrotu nie odnoszą korzyści z autotransplantacji (*autologous stem cell transplantation* – ASCT). W fazie wczesnych badań klinicznych znajdują się inhibitory bromodomeny BET, które są próbą regulacji epigenetycznej guzów związanych z rearanżacją onkogeny MYC.

Białka z rodziny Bcl-2 i ich znaczenie w patogenezie chłoniaka rozlanego z dużych komórek B

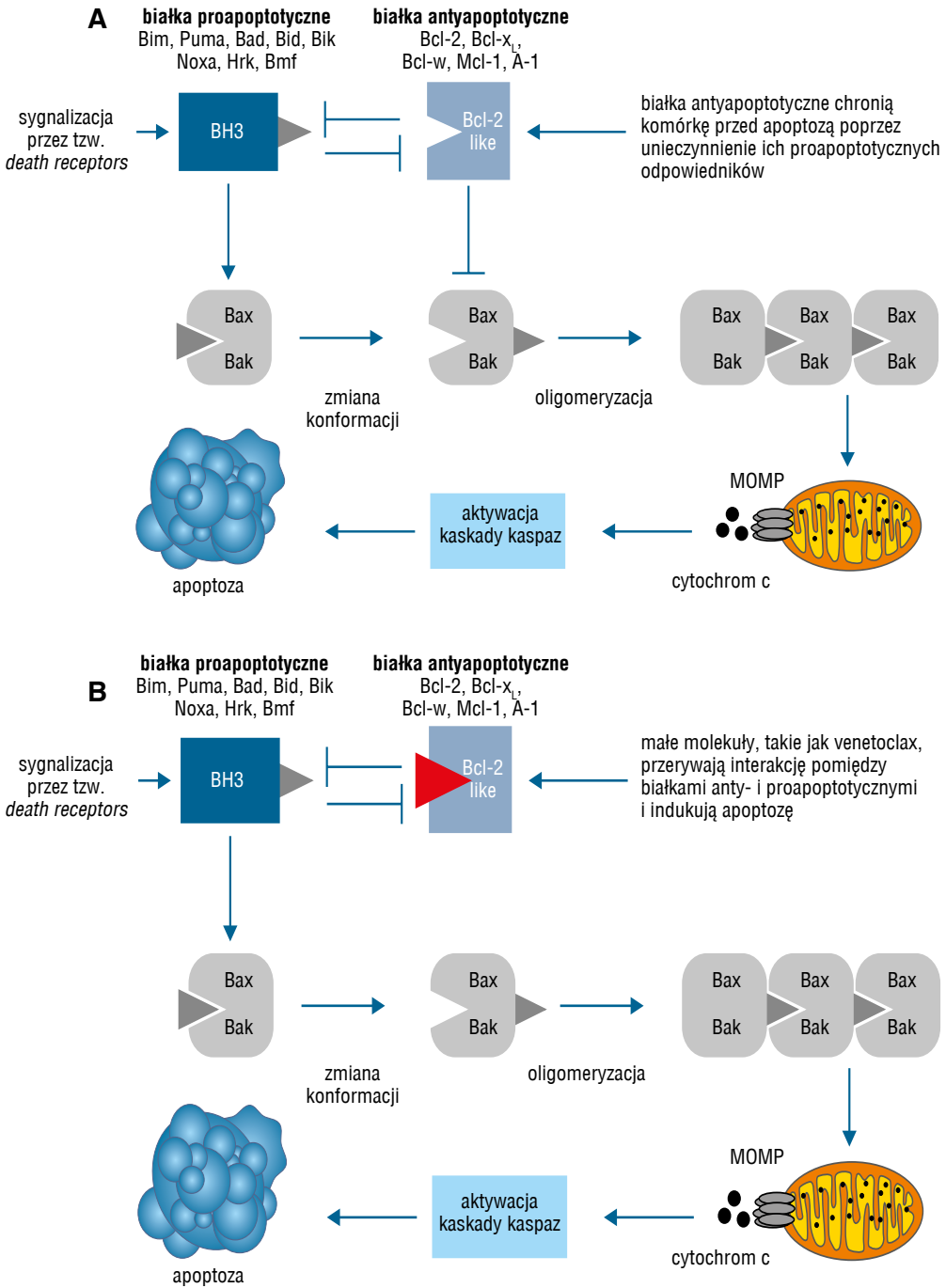
Głównymi białkami wykonawczymi uczestniczącymi w procesie apoptozy są proteazy cysteinowe zwane kaspazami. Jest to rodzina białek występujących w komórkach w formie nieaktywnych zymogenów, które są uczynniane na dwa niezależne od siebie sposoby. Pierwsza droga aktywacji kaspaz (ewolucyjnie starsza), zwana szlakiem wewnątrzpochodnym (lub mitochondrialnym), jest indukowana wewnątrzkomórkowym stresem. W odpowiedzi na uwolnienie cytochromu c z uszkodzonych mitochondriów aktywowana jest kaspaza 9. Szlak ten jest regulowany przez białka z rodziny Bcl-2. Szlak zewnętrzny rozpoczyna się od tzw. *death receptors* na powierzchni komórki, do których przyłączają się białka z rodziny TNF. Powoduje to aktywację kaspaz 8 i 10. Aktywowane w obu szlakach kaspazy (9 lub 8 i 10) uczynniają kolejne „kaspazy efektorowe”, tj. kaspazę 3, 6 i 7. Te z kolei powodują destrukcję komórek poprzez „wyłączenie” kilkuset białek. Oba szlaki są od siebie niezależne do tego stopnia, że nadekspresja Bcl-2 nie chroni limfocytów przed apoptozą wywołaną przez ligandy receptorów śmierci komórkowej (*death receptors*).

Rodzina białek Bcl-2 funkcjonuje w komórce na podobieństwo przełącznika (życie lub śmierć) [1]. Zbierając wewnątrz- i międzykomórkowe sygnały o stresie komórkowym, decydują one o skierowaniu komórki na drogę apoptozy. Podczas gdy część rodziny Bcl-2 stanowią białka antyapoptotyczne (Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, Mcl-1, A1 i Bcl-B), inne dwie podrodziny (tzw. białka wiążące Bcl-2) mają działanie proapoptotyczne. Należą tu podrodzina białek apoptotycznych Bax-like (Bax, Bak i Bok) o strukturze podobnej do Bcl-2 oraz podrodzina białek BH3-only (*BH3-only proteins*), obejmująca białka: Bik, Bad, Bid, Bim, Bmf, Hrk, Noxa i Puma, zawierające na podobieństwo Bcl-2 tylko domenę BH3, która jest jednak kluczowa dla ich funkcji.

W „normalnych” warunkach białka proapoptotyczne (Bax i Bak) są związane i unieczynnione przez białka antyapoptotyczne z rodziny Bcl-2, co chroni komórkę przed skierowaniem na drogę apoptozy (ryc. 2A). Stres komórkowy indukuje ekspresję białek BH3-only, które wypierają białka Bax i Bak z kompleksów z białkami antyapoptotycznymi. Uwolnione białka proapoptotyczne doprowadzają do permabilizacji błony mitochondrialnej, uwolnienia cytochromu c i aktywacji kaspaz.

Rearanżacje Bcl-2

Translokacje Bcl-2 są stwierdzane w ponad 35% przypadków DLBCL GCB i 20–25% DLBCL ogółem. Dla podtypu ABC charakterystyczne są natomiast ampli-



Rycina 2. Schemat działania białek z rodziny Bcl-2 (**A**) oraz inhibitora Bcl-2 – ABT-199 (**B**) [za: Mobasher M. Poster. ASCO 2014 (abstr. TPS7120)]

fikacje Bcl-2 w locus 18q24 [2]. Zaburzenia te skutkują nadekspresją Bcl-2, które zyskuje przewagę ilościową nad białkami proapoptotycznymi, co powoduje zahamowanie apoptozy komórki nowotworowej. Translokacja t(14;18) może być związana z transformacją z chłoniaka grudkowego (*follicular lymphoma* – FL) lub wystąpić *de novo*. Podczas gdy obecność translokacji t(14;18) nie koreluje z gorszym przeżyciem w DLBCL *de novo*, ekspresja białka Bcl-2 jest związana z gorszym przeżyciem, szczególnie w podtypie ABC.

Celem terapeutycznym stało się więc zablokowanie funkcji białek antyapoptotycznych z rodziny Bcl-2 przez mimetyki BH3 (inhibitory Bcl-2). Obecnie najbardziej zaawansowana w badaniach klinicznych jest cząsteczka ABT-199 – selektywny inhibitor Bcl-2, który w odróżnieniu od swoich poprzedników (inhibitorów nieselektywnych, np. navitoclax) pozbawiony jest wielu działań niepożądanych. Inhibicja Bcl-X_L skutkowała bowiem głęboką małopłytkowością, znacznie ograniczającą stosowanie leków nieselektywnych [3].

Deregulacje Bcl-6

Kolejnym czynnikiem transkrypcyjnym, którego konstytutywna aktywność w znacznym stopniu warunkuje fenotyp komórek nowotworowych w części DLBCL, jest Bcl-6. Chłoniaki DLBCL zależne od szlaków molekularnych regulowanych przez ten czynnik transkrypcyjny wykazują skoordynowany profil ekspresji genów kontrolowanych przez Bcl-6, odrębny od profilu chłoniaków niezależnych od Bcl-6.

Bcl-6 jest często aktywowany w DLBCL GCB i wiąże się to z wystąpieniem mutacji w domenie odpowiadającej za autoregulację Bcl-6. Dla podtypu ABC charakterystyczne są natomiast translokacje Bcl-6.

Deregulacje Bcl-6 skutkują nasileniem proliferacji komórek nowotworowych poprzez:

- zmniejszenie ekspresji protein p21 i p27, pełniących funkcje punktów kontrolnych cyklu komórkowego,
- upośledzenie naprawy DNA w wyniku zmniejszonej ekspresji p53,
- zaburzenie metabolizmu komórki,
- oporność na apoptozę.

Do pełnienia funkcji represora transkrypcji BCL6 wymaga korepresorów BCoR, NCoR oraz SMRT, zatem rozerwanie tej interakcji za pomocą peptydu BPI (*Bcl-6 peptide inhibitor*) wyłącza funkcję Bcl-6. W badaniach *in vitro* BPI powodował zahamowanie proliferacji i apoptozę w liniach komórkowych DLBCL o charakterystyce molekularnej „BCR”. Podobny efekt obserwowano w badaniach *in vivo* z użyciem ludzkich DLBCL ksenotransplantowanych immunoniekompetentnym myszom. Peptyd BPI, ze względu na niski stopień helikalności i stabilności w roztworach, wymaga wysokich stężeń, co nie wyklucza jego stosowania jako związku „narzędziowego” w celu udokumentowania hipotezy, lecz wyklucza jego wykorzystanie w terapii. Tych wad może być pozbawiony peptyd inhibitorowy sztucznie stabilizowany „klamrą” węglowodorową obejmującą jeden skok helisy (*hydrocarbon-stapled peptide*). Leki, których celem są kluczowe białka korepresorowe Bcl-6, są w trakcie badań przedklinicznych.

Rola sygnału z receptora B-komórkowego w patogenezie chłoniaka rozlanego z dużych komórek B

Sygnal za pośrednictwem receptora B-komórkowego (*B-cell receptor* – BCR) jest kluczowy dla rozwoju i przeżycia limfocytów B. W świetle liczby szlaków pochodzących od BCR promujących proliferację i przeżycie komórek nie dziwi, że także chłoniaki wykorzystują ten receptor dla promowania swojego przeżycia.

Rola zarówno zależnej, jak i niezależnej od antygeny sygnalizacji z BCR, jak również sygnalizacji tonicznej została już opisana w odniesieniu do wielu typów chłoniaków. W przypadku szeregu tych nowotworów trwają badania nad lekami ukierunkowanymi na cele molekularne uczestniczące w przekazywaniu sygnału z tego receptora. Obecnie leki te są z powodzeniem stosowane w terapii niektórych chłoniaków.

Różne typy chłoniaków używają jakościowo różnych „trybów” aktywacji szlaków sygnałowych pochodzących od receptora B-komórkowego. W celu odpowiedniego zahamowania tego sygnału niezbędna jest znajomość tych niuansów [4].

Fizjologiczne znaczenie sygnalosu BCR

Każdy limfocyt B, a co za tym idzie – każda komórka chłoniaka z komórek B, ma unikalny BCR składający się z par immunoglobulin o łańcuchach lekkich (IgL) i ciężkich (IgH). Każda IgH i IgL cechuje się unikalnym regionem zmiennym (*variable* – V), pozwalającym na przyłączenie różnych antygenów ze środowiska zewnętrznego komórki. Ta część receptora jest połączona niekowalencyjnie za pomocą mostka dwusiarczkowego z podjednostkami CD79 α i CD79 β (Iga i Ig β), które pośredniczą w przekazywaniu sygnału do wnętrza komórki. Częsteczki te mają moduły pośredniczące w przekazywaniu sygnału zawierające dwie reszty tyrozynowe zwane ITAM (*immunoreceptor tyrosine based activation motif*). Sygnal z receptora BCR prowadzi do fosforylacji tyrozyn ITAM przez kinazy z rodziny SRC (Lyn, Fyn i Blk). Do ufosforylowanych ITAM przyłącza się kinaza SYK poprzez swoje podwójne domeny SH2 (*SRC homology 2 domain*). Skutkuje to fosforylacją SYK, aktywacją kinaz z rodziny SRC i następczą dalszą autoaktywacją. Aktywowana SYK przyłącza kompleksy białkowe CIN85 (*Cbl-interacting protein of 85 kDa*), znane również jako SH3KBP1, oraz BLNK (*B-cell linker protein*). Te z kolei koordynują fosforylację i aktywację kinazy BTK (*Bruton tyrosine kinase*) oraz fosfolipazy C γ 2 (PLC γ 2). PLC γ 2 katalizuje hydrolizę fosfatydyloinozytolo-4,5-bisfosforanu (PIP2) do diacyloglicerolu (DAG) i trifosforanu inozytoli (IP3), co powoduje wzrost wewnątrzkomórkowego poziomu wapnia. Koincydencja DAG i zwiększającego się stężenia wapnia powoduje aktywację PKC β (*protein kinase C β*). Ta z kolei fosforyluje wiele substratów, w tym CARD11 (*caspase recruitment domain-containing protein 11*). Białko to jest łącznikiem koordynującym działanie kompleksu aktywowującego szlak NF- κ B.

Aktywacja szlaku BCR powoduje także przekształcenie fosfatydyloinozytolo-4,5-bisfosforanu (PIP2) w fosfatydyloinozytolo-3,4,5-trifosforan (PIP3) przez kinazę Lyn z rodziny SRC i co za tym idzie – dalszą aktywację szlaku PI3K/Akt/mTOR. O znaczeniu tego szlaku będzie mowa w dalszej części opracowania.

Końcowym efektem aktywacji sygnałosomu BCR jest aktywacja szlaków NF- κ B, PI3K, MAPK (*mitogen activated protein kinase*), NFAT (*nuclear factor of activated T-cells*) oraz RAS. Wszystkie te szlaki uczestniczą w procesach promujących proliferację i przeżycie zarówno prawidłowych, jak i patologicznych limfocytów B.

Aktywacja sygnałosomu BCR inicjująca odpowiedź w limfocytach ośrodków rozmnażania

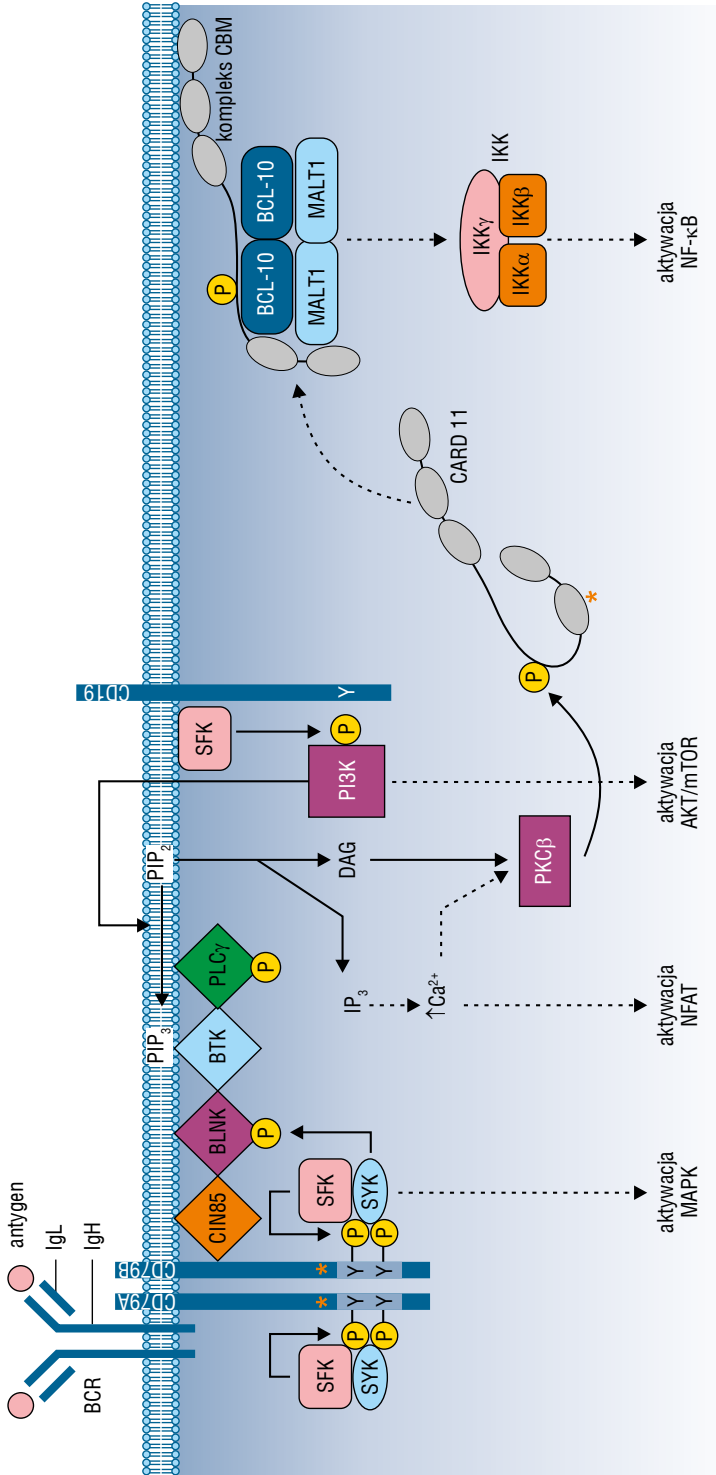
„Montaż” elementów IgL i IgH rozpoczynają białka RAG1 (*recombination-activating protein 1*) i RAG2. Zapoczątkowują one rekombinację genów V, D (*diversity*) i J (*joining*), która prowadzi do stworzenia kompletnego regionu V. Kompletny region V składa się z trzech dalece zmiennych podregionów zwanych CDRs (*complementarity-determining regions*), zdolnych do rozpoznawania licznych antygenów. Regiony V są połączone z regionami C (*constant*). W przypadku IgH regiony te mogą należeć do wszystkich klas immunoglobulin (IgM, IgD, IgG, IgA i IgE). Klasy te mogą być „użyte” do budowy receptora zamiennie w procesie zwanym *class switch recombination*. Klasa IgH ma znaczenie dla „trybu” sygnalizacji za pośrednictwem BCR.

Antygeny rozpoznawane jako obce powodują odpowiedź immunologiczną, w którą zaangażowane są zarówno dojrzałe limfocyty B, jak i limfocyty T pomocnicze. Stwarza to warunki dla powstania nowej mikrośrodowiskowej niszy, zwanej ośrodkiem rozmnażania, składającej się z limfocytów B ośrodka rozmnażania (GCB), grudkowych pomocniczych komórek T oraz grudkowych komórek dendrytycznych. Limfocyty z ośrodków rozmnażania mają odrębny charakterystyczny fenotyp narzucony przez zbiór charakterystycznych dla nich czynników transkrypcyjnych. W ośrodkach rozmnażania następuje zmiana klas immunoglobulin tworzących IgH BCR z początkowych IgM lub IgD (charakterystycznych dla *naive* GCB) na IgA, IgE i IgG. Dodatkowo komórki centrów rozmnażania urozmaicają wachlarz możliwości w zakresie różnorodności regionów V łańcuchów lekkich i ciężkich poprzez zachodzące tu somatyczne hipermutacje (*somatic hypermutations* – SHM). Mechanizm ten jest katalizowany przez AID (*activation-induced cytidine deaminase*).

Antygen związany na prezentującej go komórce dendrytycznej zostaje przechwycony przez GCB i jest prezentowany komórkom TFH, które wytwarzają immunologiczne połączenie aktywujące komórki B. Podtyp GCB ze zmutowanym BCR, charakteryzującym się większym powinowactwem do antygeny, są ewolucyjnymi zwycięzcami i wchodzi na ścieżkę różnicowania do komórek plazmatycznych produkujących przeciwciała.

Toniczna aktywacja sygnałosomu BCR w dojrzałych limfocytach

Proces tonicznej aktywacji BCR jest niezbędny dojrzałym limfocytom B do przeżycia. Proces ten jest najpewniej niezależny od obecności antygeny BCR, choć na razie brakuje na to formalnych dowodów. Doświadczenia pokazują, że kluczowym szlakiem w przekazywaniu tonicznego sygnału BCR jest szlak PI3K. Niejasny pozostaje jednak sposób aktywacji PI3K. Rolę aktywatora PI3K przypisuje się m.in.



Rycina 3. Podstawy fizjologicznej aktywacji sygnałosomu BCR [za: Young RM, Staudt LM. Targeting pathological B cell receptor signalling in lymphoid malignancies. Nature 2013; 12: 229-243]

kinazie SYK [5] albo GTP-azie TC21 [6], znanej także jako R-RAS2, która może być pośrednikiem tonicznego sygnału pomiędzy CD79 a PI3K. Możliwe jest również, że PI3K wiąże się bezpośrednio z niefosforylowaną formą CD79A, inicjując toniczną aktywację. Najnowsze badania wskazują, że na limfocytach znajdujących się w spoczynku BCR jako monomery nie istnieją, występują jednak jako samokontrolujące się oligomery zdolne do produkcji tonicznego sygnału [7].

Fizjologiczne znaczenie szlaku PI3K/Akt/mTOR

Szlak sygnałowy 3-kinazy fosfatydyloinozytoli (PI3K) odgrywa rolę w wielu procesach komórkowych, które są krytyczne dla progresji, wzrostu, migracji i przeżycia komórek nowotworowych oraz angiogenezy. W warunkach fizjologicznych szlak ten jest aktywowany w wyniku stymulacji receptora/białka przezbłonowego CD19 insuliną, cytokinami i różnymi czynnikami wzrostu: płytkowym czynnikiem wzrostu (*platelet-derived growth factor* – PDGF), naskórkowym czynnikiem wzrostu (*epidermal growth factor* – EGF), czynnikiem wzrostu fibroblastów (*basic fibroblast growth factor* – bFGF), czynnikiem wzrostu śródbłonna naczyniowego (*vascular endothelial growth factor* – VEGF), czynnikiem wzrostu hepatocytów (*hepatocyte growth factor* – HGF) czy insulinopodobnym czynnikiem wzrostu (*insulin-like growth factor 1* – IGF-1). Aktywacja szlaku następuje także podczas aktywacji szlaku sygnałowego BCR przez kinazę Lyn z rodziny SRC. Jak wspomniano powyżej, szlak PI3K/Akt/mTOR jest kluczowy dla przekazywania tonicznego sygnału z BCR w dojrzałych limfocytach.

Przylączenie czynnika wzrostu do CD19 powoduje autoaktywację w wyniku fosforylacji i rekrutacji do błony komórkowej PI3K. Kinaza PI3K przekształca fosfatydyloinozytolo-4,5-bisfosforan (PIP2) w fosfatydyloinozytolo-3,4,5-trifosforan (PIP3). Fosfatydyloinozytolo-3,4,5-trifosforan wpływa na aktywację poprzez rekrutację do błony komórkowej kinaz Akt, BTK (poprzez interakcję z domeną PH na tych efektorach) i PDK-1.

Niektóre badania wskazują, że za aktywację szlaku PI3K/Akt może odpowiadać także nadekspresja miR-155 (microRNA-155). Aktywacja ta może się odbywać kilkoma drogami:

- poprzez supresję p85 α – podjednostki regulatorowej PI3K,
- poprzez mechanizm *down-regulation* ukierunkowany na supresory PI3K, np. PTEN (za pośrednictwem miR-21 i miR-17-92) i SHIP1.

Wykazano, że nadekspresja miR-155 występuje znacząco częściej w podtypie ABC niż GCB [8].

Akt to serynowo-treoninowa kinaza białkowa zwana także PKB (*protein kinase B*). Jest ona głównym efekтором PI3K przyczyniającym się w warunkach fizjologicznych do przeżycia komórek w odpowiedzi na działanie czynników wzrostu [9]. Wyróżnia się 3 izoformy kinazy Akt: Akt1 (PKB α), Akt2 (PKB β) i Akt3 (PKB γ). Ponadto istnieje jeszcze kinaza Akt3-(γ 1) stanowiąca produkt alternatywnego składowania mRNA dla Akt3. Izoformą odgrywającą rolę w regulacji procesów związanych z przeżyciem komórki jest PKB α . Akt2 jest zaangażowana w regulację gospodarki węglowodanowej, a Akt3 w regulację rozwoju układu nerwowego.

Wszystkie kinazy Akt są zbudowane z trzech domen: N-końcowej domeny PH (*pleckstrin homology domain*), centralnej domeny kinazowej oraz C-końcowej domeny regulatorowej. W domenie regulatorowej znajduje się stały motyw charakterystyczny dla wszystkich kinaz z podrodziny AGC – FxxF/Y-S/T-Y/F (x oznacza dowolny aminokwas). Do aktywacji kinazy jest potrzebna fosforylacja seryny w pozycji 473 i treoniny, które znajdują się w tym motywie. Za fosforylację treoniny (w pozycji 308 w przypadku Akt1) odpowiada wspomniana wcześniej kinaza PDK-1. Umieszczenie przy błonie komórkowej kinazy Akt, ale także kinazy PDK-1 jest możliwe dzięki domenie PH wykazującej duże powinowactwo do PIP3. Nie ma pewności, która kinaza odpowiada za fosforylację seryny domeny regulatorowej. Jako „kandydatów” do tej roli bierze się pod uwagę kinazy PDK-1 i -2, ILK (*integrin-linked kinase*), MK2 (*MAPK-activated protein kinase 2*), kinazę białkową CβII, mTORC2 (*mTOR complex 2*). Istnieje też możliwość, że proces ten zachodzi autokatalitycznie. Aktywna kinaza Akt fosforyluje wiele białek związanych z procesami proliferacji, metabolizmu, apoptozy czy migracji komórki.

Wpływ aktywacji szlaku na metabolizm komórki

Jednym z enzymów fosforylowanych, a co za tym idzie – inaktywowanych przez Akt jest TSC2 (*tuberous sclerosis complex 2*). TSC2 jest białkiem aktywowującym GTP-azę Rheb. Brak tej aktywacji powoduje, że białko Rheb pozostaje połączone z GTP i aktywuje kinazę mTOR (*mammalian target of rapamycin*). Aktywna kinaza mTOR reguluje syntezę białka przez fosforylację kinazy p70S6 i regulację eukariotycznego czynnika inicjacyjnego eIF-4F, wpływając m.in. na ekspresję swoistych białek oraz wraz z innymi enzymami aktywowanymi przez Akt na regulację metabolizmu glukozy (nasilenie procesu glikolizy beztlenowej) oraz transport przez błonę komórkową innych substancji, np. aminokwasów (w sposób zależny od mTORC1). Aktywacja szlaku PI3K/Akt/mTOR w komórkach nowotworowych ma znaczący wpływ na metabolizm tych komórek. Poprzez nasilenie procesów wychwytywania glukozy, glikolizy beztlenowej, supresję β-oksydacji i stymulację syntezy kwasów tłuszczowych szlak ten zabezpiecza znaczne potrzeby energetyczne tych komórek i promuje ich przeżycie.

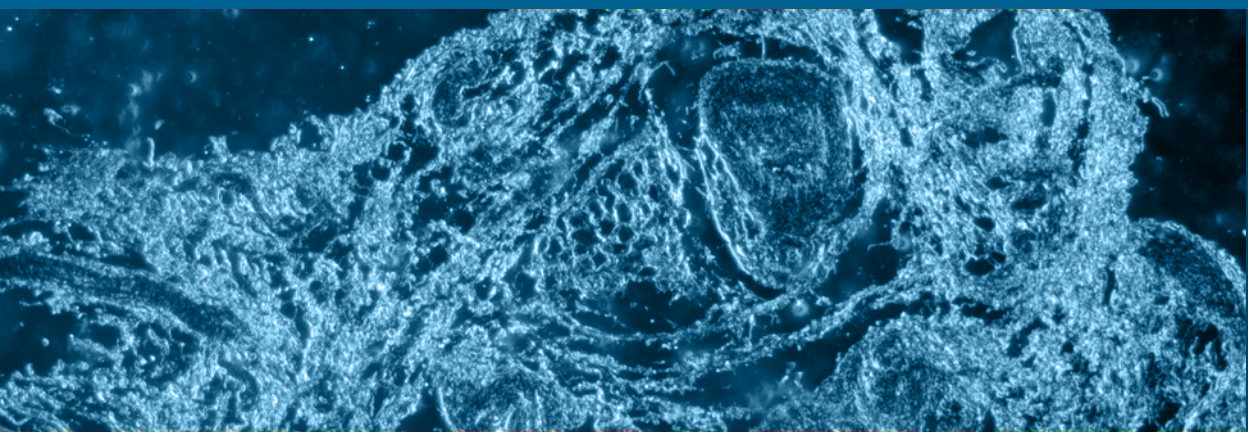
Wpływ aktywacji szlaku na proces apoptozy

Akt wpływa na proces apoptozy w sposób bezpośredni i pośredni. Bezpośrednio poprzez fosforylację proapoptotycznych białek, a pośrednio poprzez fosforylację czynników transkrypcyjnych, modyfikujących działanie genów związanych z apoptozą, co następuje w odpowiedzi na działanie czynników proapoptotycznych. Antyapoptotyczne działanie kinazy Akt przejawia się hamowaniem wielu mechanizmów proapoptotycznych.

Fosforylacja białka Bad, należącego do rodziny kinaz Bcl-2, powoduje jego nieprzyłączenie do Bcl-x_L, dzięki czemu białko to nabiera zdolności do blokowania uwalniania cytochromu c z mitochondriów do cytoplazmy. Uwalniany do cytoplazmy w przebiegu apoptozy cytochrom c jest odpowiedzialny za aktywację proka-

Tabela 2. Białka fosforylowane przez Akt [na podstawie: Krześlak A. Akt kinase: a key regulator of metabolism and progression of tumors. *Postepy Hig Med Dosw* 2010; 64: 490-503]

Białko fosforylowane przez Akt	Efekt regulacyjny	Procesy zachodzące za pośrednictwem regulowanego białka
Acinus	hamowanie	białko proapoptotyczne
ACL	aktywacja	metabolizm; synteza lipidów; liaza ATP-cytrynianowa
AS160/TBC1D4	hamowanie	metabolizm; transport Glut4; białko aktywujące GTP-azę Rab
ASK1	hamowanie	apoptoza; kinaza kinazy MAPK
Bad	hamowanie	apoptoza; białko proapoptotyczne z rodziny Bcl-2
Bax	hamowanie	apoptoza; białko proapoptotyczne z rodziny Bcl-2
Chk1	hamowanie	prolifracja; kinaza punktu kontrolnego fazy S
CREB	aktywacja	przeżycie komórki, proliferacja; czynnik transkrypcyjny
eNOS	aktywacja	angiogeneza; syntaza tlenu azotu
FOXO (FOXO1, FOXO3A, FOXO4)	hamowanie	przeżycie komórki, proliferacja, wzrost; czynniki transkrypcyjne
GIV/Girdin	–	migracja; białko wiążące aktynę
GSK3 α/β	hamowanie	przeżycie komórki, metabolizm, proliferacja; 3-kinaza syntazy glikogenowej
Htra2/Omi	hamowanie	apoptoza; proteaza serynowa, powoduje proteolizę inhibitorów apoptozy
IKK α	aktywacja	przeżycie komórki; kinaza fosforylująca I- κ B
kaspaza 9	hamowanie	apoptoza; białko proapoptotyczne
MDM2	aktywacja	przeżycie komórki, proliferacja; białko hamujące aktywność p53
MLK3	hamowanie	apoptoza; kinaza kinazy MAPK
p21 (CIP1/WAF1)	hamowanie	prolifracja; inhibitor kinaz cyklozależnych
p27 (KIP1)	hamowanie	prolifracja; inhibitor kinaz cyklozależnych
PRAS40	hamowanie	wzrost komórki; inhibitor kinazy mTOR
RAF1	hamowanie	przeżycie komórki, proliferacja; kinaza kinazy MAPK
SEK1/MKKK4	hamowanie	apoptoza, kinaza kinazy MAPK
TSC2	hamowanie	wzrost komórki, proliferacja
WNK1	–	regulacja przepuszczalności błon dla jonów
YAP	hamowanie	apoptoza, koaktywator czynników transkrypcyjnych



www.termedia.pl

termedia

ISBN: 978-83-7988-108-6

