

Prawidłowe funkcjonowanie komórki jest uzależnione od ścisłej kontroli przekazywania informacji. W proces przenoszenia sygnałów zaangażowane są substancje sygnałowe (ligandy), takie jak czynniki wzrostu, cytokiny, hormony, które oddziałują na określone białka receptorowe, co rozpoczyna kaskadę reakcji, w wyniku których aktywowane są kolejne białka, tzw. przekaźniki 2. rzędu (ang. *second-messengers*), do momentu, aż sygnał zostanie przekazany do jądra komórkowego. W przekazywaniu sygnałów onkogennych zasadniczą rolę pełnią szlaki sygnałowe: Ras-Raf – kaskada kinaz MAP, fosfolipidów inozytolowych – kinaza 3 fosfatydyloinozytolu (PI3K) oraz kinazy białkowej C. Zaburzenia w szlakach sygnałowych komórki mogą prowadzić do rozwoju procesu nowotworowego przez promowanie niekontrolowanego wzrostu komórek, zdobycie przez nie zdolności do inwazji i tworzenia przerzutów, nasilenie procesów angiogenezy oraz blokowanie apoptozy.

**Słowa kluczowe:** szlaki sygnalizacyjne komórki, receptorowe kinazy tyrozynowe, niereceptorowe kinazy tyrozynowe, substancje sygnałowe (ligandy).

## Terapia celowana

### Część I. Mechanizmy przesyłania sygnałów przy udziale receptorów o aktywności kinazy tyrozynowej

#### *Targeted therapy*

#### *Part I. Signalling by tyrosine kinase receptors*

**Beata Wiczyńska, Janusz Rolski**

Klinika Nowotworów Układowych i Uogólnionych, Centrum Onkologii  
– Instytut im. M. Skłodowskiej-Curie, Oddział w Krakowie

#### Wstęp

Przekazanie informacji do komórki zależy od ścisłej współpracy białek występujących zarówno w błonie cytoplazmatycznej, w jej bezpośrednim sąsiedztwie, jak i cytoplazmie. Przekaz sygnału do jądra komórkowego jest wieloetapowy. Substancje sygnałowe (ligandy), takie jak czynniki wzrostu, cytokiny czy hormony peptydowe, nie mogą przenikać przez błonę komórkową, oddziałują więc na określone białka receptorowe. Procesy te zapoczątkowują kaskadę reakcji, w wyniku których aktywowane są kolejne białka, tzw. przekaźniki 2. rzędu (ang. *second-messengers*), do momentu, aż sygnał zostanie przekazany do jądra komórkowego.

Przekaz informacji odbywa się za pomocą sygnałów chemicznych przenoszonych przez białka, które funkcjonują jako swoiste przekaźniki, oscylując między postacią ufosforylowaną (stan aktywny) a postacią defosforylowaną (stan nieaktywny). Aktywowany element szlaku sygnalizacyjnego fosforyluje z kolei resztę aminokwasową białka znajdującego się poniżej w szlaku sygnalizacyjnym. Reakcje fosforylacji polegają na enzymatycznym przeniesieniu końcowej grupy fosforanowej z ATP na specyficzną resztę aminokwasową w białkach i są katalizowane przez kinazy białkowe (ryc. 1). Kinazy należące do klasy I (kinazy seryno-treoninowe) przenoszą grupę fosforanową na serynę i treoninę, kinazy klasy II fosforylują tyrozinę. Modyfikacja białek przez fosforylację jest procesem odwracalnym. Proces defosforylacji, czyli odłączenie grupy fosforanowej od zmodyfikowanego białka, jest katalizowany przez fosfatazy [1–3].

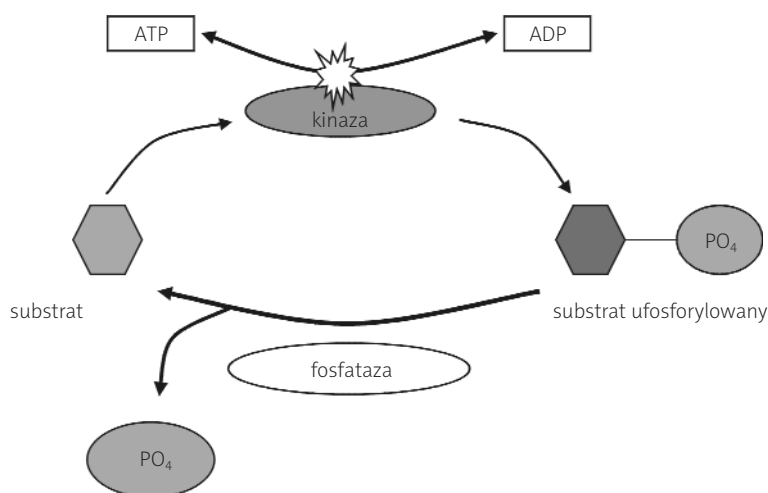
Analiza sekwencji genomu człowieka wykazała, że ok. 20% genów koduje kinazy białkowe biorące udział w przekazywaniu sygnału w komórce. Dotychczas opisano ponad 500 kinaz, wśród których odrębną grupę stanowią kinazy tyrozynowe. Obecnie znanych jest 90 genów kodujących białkowe kinazy tyrozynowe – 58 genów koduje błonowe receptorowe kinazy tyrozynowe, a 32 – cytoplazmatyczne, niereceptorowe kinazy tyrozynowe. [4]

#### Receptorowe kinazy tyrozynowe

Receptorowe kinazy tyrozynowe są enzymami przekazującymi sygnał od receptorów błonowych do wnętrza komórki. Receptory te, o charakterystycznym trójskładnikowym schemacie budowy, są glikoproteinami błonowymi o zróżnicowanej strukturze, zakotwiczonymi w błonie komórkowej dzięki domenie transbłonowej, która pełni jedynie pasywną rolę w przekazywaniu sygnału. Domena zewnątrzkomórkowa rozpoznaje i wiąże substancję sygnałową (ligand), w wyniku czego następuje aktywacja domeny cytoplazmatycznej (ryc. 2.) [5, 6].

Cell signalling is tightly controlled for normal cell function. The signal transduction system comprises ligands (growth factors, cytokines, hormones), transmembrane receptors and cytoplasmic secondary messengers. The crucial effectors in signalling cascades include the Ras-Raf-MAP pathway, lipid kinase phosphoinositide-3-kinase (PI3K) pathway and protein kinase C pathway. Dysregulation of the three major signalling pathways can lead to the malignant phenotype of uncontrolled proliferation, metastasis, angiogenesis and inhibition of apoptosis.

**Key words:** signal transduction pathways, receptor tyrosine kinases, non-receptor tyrosine kinases, signaling molecules (ligands).



Ryc. 1. Schemat fosforylacji i defosforylacji białka (substrat)

Fig. 1. Scheme of phosphorylation and dephosphorylation of protein (substrate)

Do nadrodziny receptorów związanych z kinazą tyrozynową zalicza się receptory dla czynników wzrostu, hormonów i cytokin, które ze względu na rodzaj połączenia z układem efektorowym podzielić można na dwie klasy. Do klasy pierwszej należą receptory mające w swojej cząsteczce integralne kinazy tyrozynowe (receptory dla czynników wzrostu, receptor insulinowy), do klasy drugiej receptory, które po pobudzeniu rekrutują i aktywują niereceptorowe, cytoplazmatyczne kinazy tyrozynowe (receptory dla interferonów, interleukiny, receptor dla hormonu wzrostu).

Do rodziny receptorów z aktywnością kinazy tyrozynowej należą receptory:

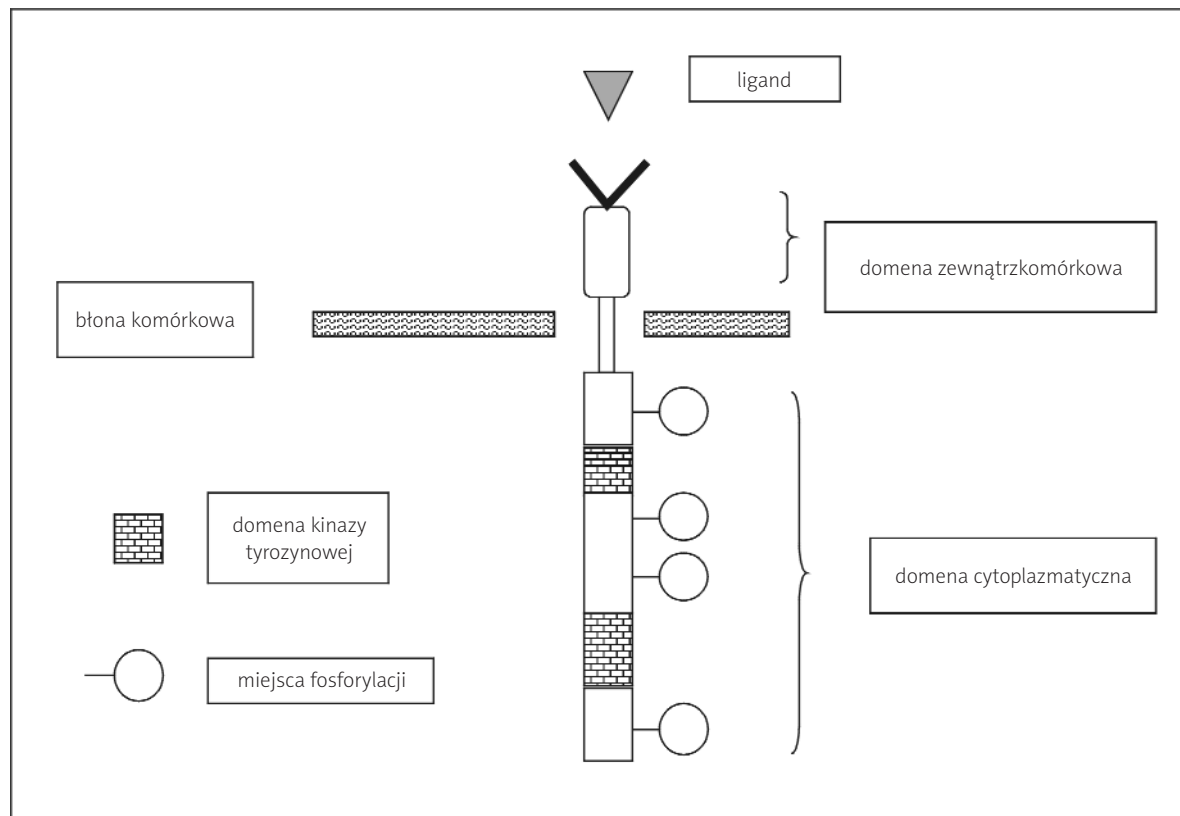
- dla naskórkowego czynnika wzrostu (ang. *epidermal growth factor receptor*) – ErbB1/EGFR/HER1, ErbB2/HER2-neu, ErbB3/HER3, ErbB4/HER4;
- dla naczyniowo-śródbłonkowych czynników wzrostu (ang. *vascular endothelial growth factor receptor*) – VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3;
- dla płytkowych czynników wzrostu (ang. *platelet-derived growth factor receptor*) – PDGFR $\alpha$ , PDGFR $\beta$ , KIT;
- dla czynników wzrostu fibroblastów (ang. *fibroblast growth factor receptor*) – FGFR1, FGFR2, FGFR3, FGFR4;
- dla czynników wzrostu hepatocytów (ang. *hepatocyte growth factor receptor*);
- dla insuliny (ang. *insulin-like growth factor*) – IGF1.

### Niereceptorowe kinazy tyrozynowe

Wśród niereceptorowych kinaz tyrozynowych znajdują się kinazy związane z receptorami transbłonowymi, które ulegają aktywacji przez przyłączenie się ligandu do ich swoistego receptora, oraz kinazy wolne, aktywowane przez transport jonów przez błonę komórkową, progresję w cyklu komórki lub adhezję komórek. Ich wspólną cechą jest brak domeny zewnętrznej komórki. Poznane obecnie niereceptorowe kinazy tyrozynowe zaliczyć można do 10 rodzin sklasyfikowanych na podstawie ich analizy strukturalnej (np. kinazy src, abl, JAK). Kinazy seryno-treoninowe występują prawie wyłącznie w cytoplazmie. Do tej grupy kinaz należą kluczowe mediatory kancerogenezy, takie jak raf, kinaza białkowa B (Akt/KB) czy kinaza MEK [5].

### Szlaki sygnalizacyjne

Pierwszym etapem aktywacji receptorowych kinaz tyrozynowych jest dimeryzacja receptorów i zmiana ich konformacji. W etapie drugim dochodzi do autofosforylacji i transfosforylacji reszt tyrozynowych w obrębie domen katalitycznych części cytoplazmatycznej sąsiadujących ze sobą receptorów.



Ryc. 2. Budowa receptora o aktywności kinazy tyrozynowej

Fig. 2. Structure of tyrosine kinase receptor

Zaktywowane kinazy tyrozynowe receptora służą następnie jako miejsca wiążące dla licznych białek sygnałowych oraz białek pomocniczych, co zapoczątkowuje szlak przekazywania sygnału w komórce (ryc. 3.) [7].

Białka przyłączające się do ufosforylowanych kinaz receptorowych, które mają charakterystyczne domeny SH2 i SH3 (domena homologii z białkami Src; ang. *Src homology*), to enzymy i białka adaptorowe. Do mających aktywność enzymatyczną białek z domenami SH2 zalicza się np. kinazę tyrozynową Src, fosfolipazę C, białka Ras-GAP, kinazę 3 fosfatydyloinozytolu. Białka z domenami SH2 i SH3 (np. Grb2, Shc) działają jako białka adaptorowe. Nie mają one aktywności enzymatycznej, umożliwiają natomiast gromadzenie się różnych białek sygnałowych, pośrednicząc między receptorowymi kinazami tyrozynowymi a szlakami przekazywania sygnałów. Ważną rolę w przekazywaniu sygnału odgrywają też białka zakotwiczące (ang. *docking proteins*), które umożliwiają przyłączanie się kolejnych białek docelowych z domenami SH2 w obszarze pobłonowym w obrębie kompleksów receptorowych [8].

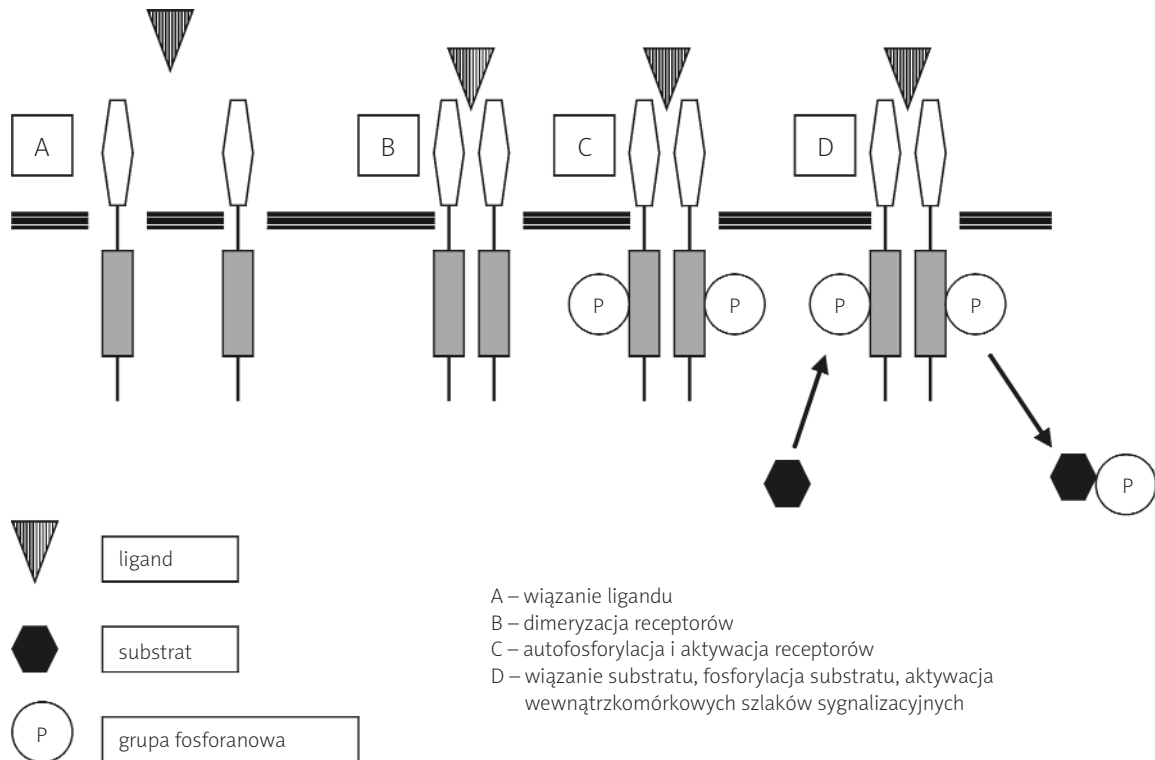
#### Szlak Ras → Raf → MEK → ERK

Nadrodzina genów *ras* koduje małe białka wiążące GTP – białka Ras (R-ras, M-ras, N-Ras, H-Ras i K-Ras), które są zaangażowane w regulację wielu procesów komórkowych (różnicowanie komórek, organizacja cytoszkieletu, transport jądro) [9–11]. Po zsyntetyzowaniu w postaci nieaktywnych, cytoplazmatycznych propeptydów, białka Ras przechodzą

serię modyfikacji posttranslacyjnych, z których najważniejsza polega na dołączeniu cząsteczki lipidu (farnesyli) na C-końcu białka w procesie katalizowanym przez enzym farnesylotransferazę. Prowadzi do zwiększenia własności hydrofobowych białek Ras, umożliwiając im zakotwiczenie się do wewnętrznej powierzchni błony cytoplazmatycznej komórki [12]. Białka Ras funkcjonują jako *molekularny przełącznik*, oscylując między formą aktywną (Ras-GTP) *włączającą* a nieaktywną (Ras-GDP) *wyłączającą* system informacji [11]. Po aktywacji receptora dochodzi do fosforylacji reszt tyrozynowych adaptorowego białka Shc i uruchomienia jego aktywności katalitycznej. Aktywne białko Shc wiąże się następnie z kompleksem białko adaptorowe Grb2/białko Sos. Białko Sos jest białkiem GEF (ang. *guanine nucleotide exchange factor*, aktywator wymiany nukleotydów guaninowych), które stymuluje wymianę GDP na GTP w białku Ras.

Przemieszczenie się białka Sos do błony komórkowej umożliwia jego interakcję z zakotwiczonym w błonie białkiem Ras i jego aktywację. Białko Ras aktywuje następnie kinazę Raf (ryc. 4.) [13–15].

Rodzina protoonkogenów raf koduje 3 cytoplazmatyczne białka A-Raf, B-Raf i C-Raf o aktywności kinaz seryno-tryeoninowych, które są zaangażowane w regulację procesów proliferacji, różnicowania i przeżycia komórki, a także w regulację procesu angiogenezy adhezji i migracji komórek [15]. Aktywacja Raf przebiega w sposób pośredni. Białko Ras wiąże się z nieaktywnymi izoformami białka Raf, a następnie kompleks Ras-Raf jest przenoszony do błony



Ryc. 3. Aktywacja szlaku sygnałowego wg [6] (zmodyfikowane)  
 Fig. 3. Mechanisms of activation of signal transduction pathway [6] (modified)

komórkowej, gdzie dopiero następuje aktywacja białka Raf w wieloetapowym procesie fosforylacji i defosforylacji, połączonym ze zmianami konformacyjnymi [16]. Raf może być także aktywowane przez kinazy niezależne od Ras (kinaza Src, kinaza Janus 1), kinazę białkową C, białka antyapoptyczne (Bcl-2), interferon  $\beta$ , erytropoetynę, retinoidy, promieniowanie jonizujące, światło ultrafioletowe oraz poprzez dimeryzację własnych izoform [13]. Zaktywowane Raf uruchamia kaskadę kinaz MAP [16].

Kaskada kinaz MAP pozwala na aktywowanie przez fosforylację kolejnych kinaz z rodziny kinaz MAP [14]. Sygnał jest przenoszony na dwie kinazy kinaz MAP (ang. *mitogen-activated protein kinase kinase* – MAPKK; kinaza kinazy białkowej aktywowanej przez mitogeny), zwane również MEK 1 i MEK 2 (ang. *mitogen extracellular kinase*), które z kolei aktywują kinazy ERK 1 i ERK 2 (ang. *extracellularly regulated protei kinases* – ERK 1 i ERK 2) aktywowane przez sygnały zewnątrzkomórkowe. Kinazy przemieszczają się do jądra komórkowego, gdzie dochodzi do fosforylacji i aktywacji rybosomalnej kinazy S6 i czynników transkrypcyjnych, takich jak c-jun, c-fos, c-myc i c-fos, co w konsekwencji prowadzi do indukcji ekspresji genów związanych z procesem proliferacji [16–18].

#### Szlak PI3K/AKT

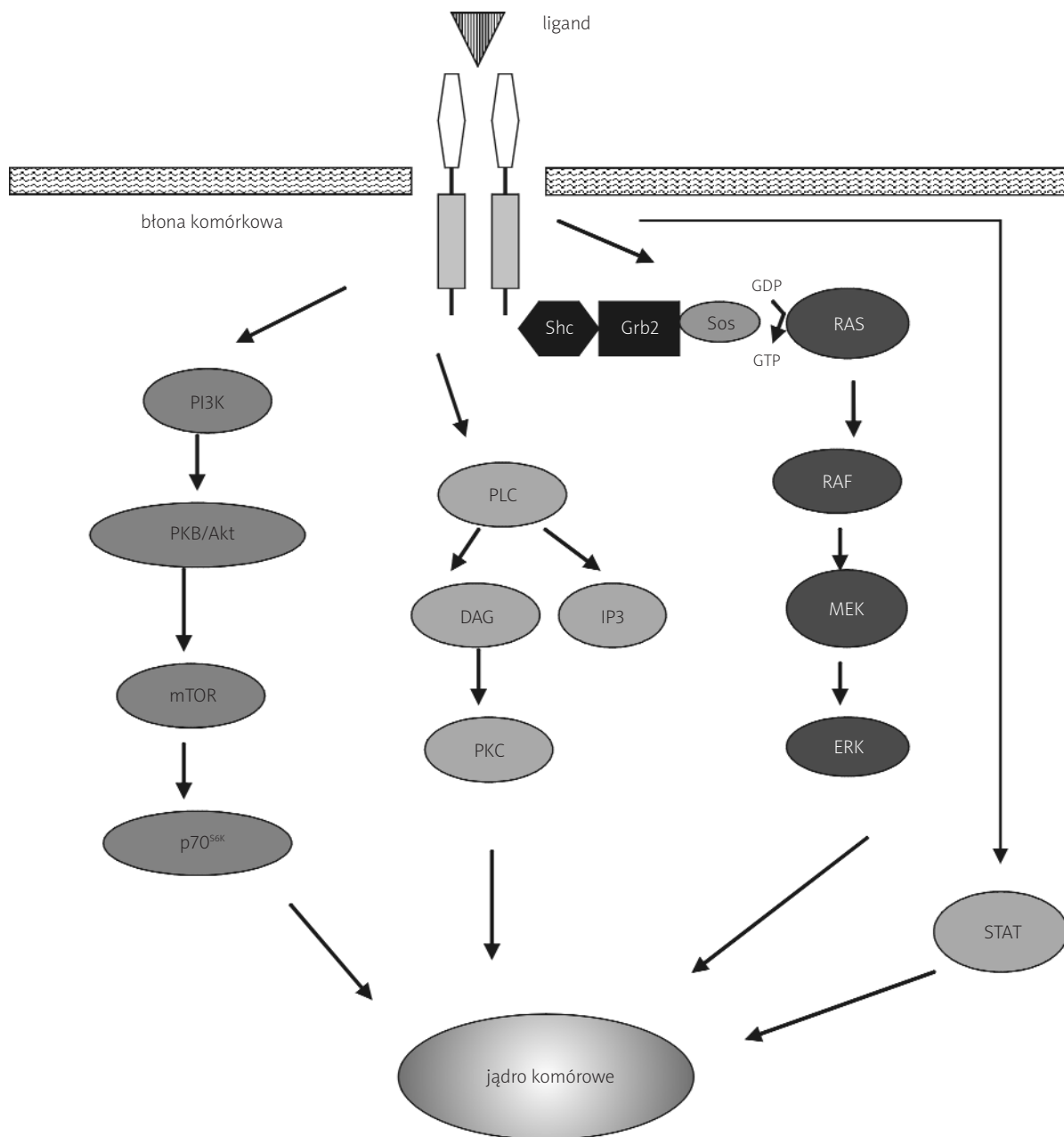
W pierwszym etapie przekazywania informacji szlakiem sygnalizacyjnym PI3K/AKT aktywny kompleks receptorowy przyłącza kinazę 3 fosfatydyloinozytolu (PI3K). PI3K jest heterodimerem p85/p110, w którym podjednostka 85 kDa sta-

nowi część regulacyjną, natomiast podjednostka 110 kDa część katalityczną enzymu. Przyłączenie się regulatorowej podjednostki PI3K do ufosforylowanych reszt tyrozynowych receptora powoduje zmianę konformacyjną podjednostki katalitycznej, co prowadzi nie tylko do wzrostu aktywności, ale także do przemieszczenia kinazy do błony komórkowej w pobliże jej substratu PIP2 [fosfatydyloinozytolo-(4, 5)-difosforan].

Zaktywowana PI3K katalizuje fosforylację PIP2 do PIP3 [fosfatydyloinozytolo-(3, 4, 5)-trifosforan], który uczestniczy w aktywacji kinazy białkowej B (PKB), znanej też jako AKT. W wyniku bezpośredniej interakcji PIP3 z domeną PH zlokalizowaną w N-końcowej części AKT dochodzi do przemieszczenia się białka do błony komórkowej i jego aktywacji przez kinazę fosfatydyloinozytoli (PDK-1). Aktywna AKT, będąca kinazą seryno-treoninową, fosforyluje liczne białka komórkowe zaangażowane w regulację proliferacji, wzrostu i przeżywalności komórek [5, 19]. Ważnym substratem dla AKT jest kinaza seryno-treoninowa – mTOR (ang. *mammalian target of rapamycin*, znana też jako FRAP, RAFT1 I RAP1), zaangażowana w liczne procesy komórkowe związane ze wzrostem, proliferacją, zdolnością naciekania, a także w niektórych komórkach z procesem apoptozy (ryc. 4.) [20, 21].

#### Szlak kinaz białkowych C

Rodzina kinaz białkowych C (PKC) obejmuje ponad 12 specyficznych enzymów seryno-treoninowych, które pod względem własności zostały podzielone na 3 główne grupy:



**Ryc. 4.** Główne szlaki sygnalizacyjne komórki pobudzone przez aktywację receptorów związanych z kinazą tyrozynową (objaśnienia w tekście)  
**Fig. 4.** Scheme of key intracellular signal transduction pathways

- izoenzymy klasyczne, pobudzone przez diacylglicerol (DAG) i jony wapnia,
- izoenzymy nowe, zależne od jonów wapnia, niezależne od DAG,
- izoenzymy nietypowe, niezależne od jonów wapnia i DAG [22].

Sygnaty stymulujące receptory związane z białkiem G oraz sygnaty stymulujące receptory i niereceptorowe kinazy tyrozynowe aktywują fosfolipazę C- $\gamma$  – enzym, który powoduje rozszczepienie 4, 5-difosforanu fosfatydyloinozytolu (PIP<sub>2</sub>) na 2 cząsteczki informacyjne – 1, 4, 5-trifosforan inozytolu (IP<sub>3</sub>) i diacylglicerol (DAG). IP<sub>3</sub>

podwyższa stężenie jonów wapnia w cząsteczce, aktywując szlak przekazywania sygnałów zależny od jonów wapnia i kalmoduliny, DAG aktywuje kinazę białkową C. Główną ścieżką sygnałową pobudzaną przez PKC jest szlak raf → MEK → ERK [22, 24]. Ostatnie badania wykazały, że izoenzymy PKC pełnią ważną rolę w przekazywaniu sygnałów w komórce – są zaangażowane w regulację procesów proliferacji, przechodzenia przez cykl komórkowy, różnicowania komórek, wpływają także na proces apoptozy i angiogenezy. W badaniach udowodniono, że izoformy PKC mogą uczestniczyć w powstawaniu oporności wielolekowej (ryc. 4.) [22, 25].

## Szlak Jak → STAT

Mimo że wewnątrzkomórkowa domena receptorów dla cytokin nie wykazuje aktywności katalitycznej, to jednak po aktywacji przez ligand dochodzi do fosforylacji licznych białek. Badania wykazały, że związanie się cytokin z receptorem powoduje ich dimeryzację i połączenie się z kinazami tyrozynowymi z rodziny Jak. Nazwa Jak pochodzi od rzymskiego boga o dwóch twarzach i została nadana, ponieważ kinazy Jak charakteryzują się występowaniem dwóch domen kinazowych. Dotychczas opisano 4 kinazy Jak – Jak1, Jak2, Jak3 i Tyk2. Agregacja kinaz Jak i współdziałanie zwykle dwóch kinaz z tej rodziny powoduje ich wzajemną fosforylację i następową fosforylację receptorów tyrozynowych, które przez domeny SH2 wiążą zaangażowane w dalsze przenoszenie sygnału białka STAT (ang. *signal transducers and activators of transcription*). Białka te są cytoplazmatycznymi czynnikami transkrypcyjnymi. Fosforylacja jednej reszty tyrozynowej białek STAT powoduje ich dimeryzację, oddysocjowanie od receptora i przemieszczenie do jądra komórkowego, gdzie łączą się z DNA i aktywują transkrypcję genów docelowych (ryc. 4.) [26].

Transformacja nowotworowa, czyli przekształcenie się komórki prawidłowej w komórkę raka, jest procesem, który najlepiej opisuje stwierdzenie Roberta A. Wienberga: *Rak zaczyna powstawać wówczas, gdy komórka wyłamuje się spod kontroli mechanizmów decydujących o jej podziatach i lokalizacji*. Zaburzenia w szlakach sygnałowych komórki mogą prowadzić do rozwoju procesu nowotworowego nie tylko przez promowanie niekontrolowanego wzrostu komórek i blokowanie apoptozy, lecz także w wyniku zdobycia przez komórki zdolności do inwazji i tworzenia przerzutów. Badania wykazały, że te same drogi sygnalizacyjne, które odpowiadają za nabycie fenotypu nowotworowego, są zaangażowane w stymulację angiogenezy nowotworowej oraz mogą odgrywać kluczową rolę w procesie nabywania oporności na leczenie chemioterapią lub radioterapią.

## Piśmiennictwo

- Hunter T. Protein kinases and phosphatases: the yin and yang of protein phosphorylation and signaling. *Cell* 1995; 80: 225-36.
- Tonks NK, Neel BG. From form to function: signaling by protein tyrosine phosphatases. *Cell* 1996; 87: 365-8.
- Matozaki T, Kasuga M. Roles of protein-tyrosine phosphatases in growth factor signaling. *Cell Signal* 1996; 8: 13-9.
- Robinson DR, Wu YM, Lin SF. The protein tyrosine kinase family of the human genome. *Oncogene* 2000; 19: 5548-57.
- Adjei AA, Hidalgo M. Intracellular signal transduction pathway proteins as targets for cancer therapy. *J Clin Oncol* 2005; 23: 5386-403.
- Majsterek I, Pytel D, Błasiak J. Kinazy tyrozynowe. Nowy cel terapii przeciwnowotworowej. *Post Biochem* 2005; 51: 251-60.
- Schlessinger J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* 2000; 103: 211-25.
- Carpenter CL, Cantley LC. Molecular target in oncology. In: Principles and practice of oncology 7th edition. Devita VT, Hellman S, Rosenberg SA (eds). Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia 2005; 3: 73-83.
- Barbacid M. Ras genes. *Annu Rev Biochem* 1987; 56: 779-827.
- Adjei AA. Blocking oncogenic Ras signaling for cancer therapy. *J Natl Cancer Inst* 2001; 193: 1062-74.
- Macara IG, Lounsbury KM, Richards SA, McKiernan C, Bar-Sagi D. The Ras superfamily of GTPases. *FASEB J* 1996; 10: 625-30.
- Jamroz-Wiśniewska A, Bętkowski J. Izoprenylacja białek. *Post Biochem* 2004; 50: 316-29.
- Schlessinger J. Ligand-induced, receptor-mediated dimerization and activation of EGF receptor. *Cell* 2002; 110: 669-72.
- Vojtek AB, Der CJ. Increasing complexity of the Ras signaling pathway. *J Biol Chem* 1998; 273: 19925-8.
- Gollob JA, Scott W, Carter C, Kelley SL. Role of Raf kinase in cancer: Therapeutic potential of targeting the Raf/Mek/Erk signal transduction pathway. *Semin Oncol* 2006; 33: 392-406.
- Kolch W. Meaningful relationships: The regulation of the Ras/Raf/Mek/Erk pathway by protein interaction. *Biochem J* 2000; 351: 289-305.
- Guan KL. The mitogen activated protein kinase signal transduction pathway: from the cell surface to the nucleus. *Cell Signal* 1994; 6: 581-9.
- Stefanovsky VY, Pelletier G, Hannan R, Gagnon-Kugler T, Rothblum LI, Moss T. An immediate response of ribosomal transcription to growth factor stimulation in mammals is mediated by ERK phosphorylation of UBF. *Mol Cell* 2001; 8: 1063-73.
- Favre S, Djelloul S, Raymond E. New paradigms in anticancer therapy: Targeting multiple signaling pathways with kinase inhibitors. *Semin Oncol* 2006; 33: 407-20.
- Downward J. Mechanism and consequences of activation of protein kinase B/Akt. *Curr Opin Cell Biol* 1998; 10: 262-7.
- Schmelzle T, Hall MN. TOR, a central controller of cell growth. *Cell* 2000; 103: 253-62.
- Newton AC. Protein kinase C: Structure, function, and regulation. *J Biol Chem* 1995; 270: 28495-8.
- Serova M, Ghouli A, Benhadji KA, Cvitkovic E, Favre S, Calvo F, Lokiec F, Raymond E. Preclinical and clinical development of novel agents that target the protein kinase C family. *Semin Oncol* 2006; 33: 466-78.
- Sebolt-Leopold JS, Herrera R. Targeting the mitogen-activated protein kinase cascade to treat cancer. *Nat Rev Cancer* 2004; 4: 937-47.
- Nishizuka Y. Protein kinase C and lipids signaling for sustained cellular responses. *FASEB J* 1995; 9: 484-69.
- Ihle JN, Kerr IM. Jaks and Stats in signaling by the cytokine receptor superfamily. *Trends Genet* 1995; 11: 69-74.

## Adres do korespondencji

dr Beata Wiczyńska

Klinika Nowotworów Układowych i Uogólnionych  
Centrum Onkologii – Instytut im. M. Skłodowskiej-Curie  
ul. Garncarska 11  
31-115 Kraków