

Prof. dr n. med. Mariusz A. Wąsik

Konspekt wykładu: ROLA INHIBITORÓW mTOR JAKO PRZYKŁAD NOWEJ GENERACJI LEKÓW O DZIAŁANIU PRZECIWNOWOTWOROWYM

W komórkach nowotworowych aktywowane są trwale liczne kinazy białkowe odpowiedzialne za fosforylację seryny, treoniny, a także innych aminokwasów, co determinuje utrzymującą się aktywację przekazywania sygnałów. Konsekwencją tego jest transformacja nowotworowa.

mTOR (Mammalian Target of Rapamycin) jest powszechnie występującą, wysoce konserwatywną kinazą serynowo-treoninową, związaną z raptorem lub riptorem i innymi białkami, tworzącą kolejno kompleksy mTORC1 i mTORC2. Poznano dość dokładnie funkcje i szlaki przekazywania sygnałów przez mTORC1, który wpływa na kluczowe funkcje biologiczne, jak cykl komórkowy i ekspresja genów. Kompleks ten działa, aktywując bezpośrednio kinazę p70S6K1 i hamując białko wiążące 4E-BP1.

p70S6K1 jest kinazą serynowo-treoninową fosforylującą białko S6, będące podjednostką rybosomalnej 40S (S6rp, także znane jako rybosomalne białko 6S).

Rapamycyna i jej analogi są wysoce wybiórczymi, potencjalnie aktywnymi i względnie nietoksycznymi inhibitorami kompleksu mTORC1. Działają poprzez hamowanie wiązania kinazy do FKBP12, należącej do kompleksu mTORC1. Utrzymująca się aktywacja mTORC1, jak wykazano, występuje w wielu nowotworach układu krwiotwórczego, co sprawia, że kompleks mTORC1 stanowi atrakcyjny cel dla interwencji terapeutycznej. Okazało się, że rzeczywiście niektóre rodzaje nowotworów są wrażliwe na działanie inhibitorów mTORC1 typu rapamycyny, stosowanych nawet w terapii jednofarmakowej.

W pracach własnych badaliśmy aktywację kompleksu mTORC1 w różnych typach chłoniaków, zwracając uwagę na częstość występowania aktywacji, na poznanie mechanizmów odpowiedzialnych za jego aktywację oraz na odpowiedź komórek nowotworowych w następstwie zahamowania jego aktywności. Wykazaliśmy aktywację szlaku sygnałowego mTORC1 w niektórych zaburzeniach limfoproliferacyjnych występujących po transplantacjach, i to niezależnie od stanu ekspresji genomu wirusa Epstein-Barr. Otrzymane wyniki wskazują, że inhibitory kompleksu mTORC1 mogą okazać się efektywne w leczeniu, a biorąc pod uwagę ich znane działanie immunosupresyjne, także w zapobieganiu występującym potransplantacyjnym zaburzeniom limfoproliferacyjnym.

W badaniach chłoniaków transformowanych genem fuzyjnym NPM/ALK kinazy tyrozynowej wykazaliśmy w komórkach chłoniaka, zarówno pasażowanych *in vitro*, jak i pochodzących ze zmiany nowotworowej, utrzymującą się aktywację kinazy mTOR, określaną fosforylacją białek S6rp i 4E-BP1. Aktywacja mTOR jest zależna od ekspresji i aktywności enzymatycznej białka NPM/ALK. Ta aktywacja jest transdukowana przez szlak sygnałowy NPM/ALK i w mniejszym stopniu przez szlak sygnałowy PI3/Akt. W efekcie rapamycyna jako inhibitor mTOR znacząco obniża proliferację i powoduje nieznaczny wzrost stopnia apoptozy komórek ALK+ białaczki T komórkowej (TCL). Te wyniki pozwalają identyfikować mTOR jako nowy kluczowy cel dla białka fuzyjnego NPM/ALK i sugerują, że inhibitory mTOR mogą okazać się efektywne w leczeniu ALK+ nowotworów.

Przedmiotem naszych badań był także stan czynnościowy, mechanizm aktywacji i rola biologiczna szlaku sygnałowego kompleksu mTORC1 w skórnej postaci chłoniaka T komórkowego (CTCL-Cutaneous T Cell Lymphoma). O ile proliferujące spontanicznie komórki CTCL wykazują utrzymującą się aktywację kompleksu mTORC1, jak również szlaku sygnałowego PI3K/Akt i MEK/ERK, to w komórkach linii, których proliferacja jest zależna od IL-2, aktywowany jest szlak sygnałowy w odpowiedzi na stymulację podaniem IL-2 i IL-5, ale nie poda-

niem IL-21. Szlaki sygnałowe mTORC1, PI3K/Akt i MEK/ERK mogą być także aktywowane podaniem IL-2 w pierwotnie białaczkowych, preaktywowanych mitogenem komórkach CTCL. Aktywacja mTORC1 wykrywalna jest także w zmianach nowotworowych w zależności od okresu choroby, z najwyższym odsetkiem pozytywnych komórek w przypadkach najbardziej zaawansowanych (transformacja wielkokomórkowa).

Rapamycyna hamuje szlak sygnałowy mTORC1 i skutecznie tłumi proliferację komórek chłoniaka CTCL, bez wyraźnego wpływu na proces apoptozy. Aktywacja mTORC1 transdukowana była preferencyjnie poprzez szlak PI3/Akt. Nasze wyniki dokumentują wybiórczą, zależną od cytokiny aktywację szlaku sygnałowego mTORC1 w komórkach chłoniaka CTCL i wskazują ten szlak jako reprezentujący nowy cel terapeutyczny w leczeniu chłoniaków CTCL i podobnych chłoniaków wywodzących się z komórek T.

Stosowanie leków typu rapamycyny prowadzi zazwyczaj do zatrzymania procesu nowotworowego czy częściowej remisji, rzadko do całkowitej eliminacji zmian nowotworowych. Ten nieoptymalny efekt terapeutyczny wskazuje raczej na działanie cytostatyczne niż na działanie cytotoksyczne tych preparatów. Uzyskane wyniki wskazują na celowość stosowania tej grupy leków w terapii kojarzonej ze stosowaniem innych leków przeciwnowotworowych, co optymalnie winno prowadzić do kompletnej remisji i wyleczenia. Jednakże dotychczasowe próby kojarzenia podawania inhibitorów mTORC1 z innymi cytostatykami wpływającymi na replikację DNA jak dotąd okazały się niezadowolające, ponieważ prowadziły niekiedy do efektu antagonistycznego, pomimo że stosowanie ich łącznie z cis-platyną lub metotreksatem w modelowych badaniach przedklinicznych wydawało się obiecujące.

W badaniach własnych wykazaliśmy, że ekspozycja komórek chłoniaka CTCL na inhibitory mTORC1, podawane w kombinacji z inhibitorami innej kinazy sererynowo-treoninowej o nazwie MNK, hamuje wzrost komórek nowotworowych, wywołując ich śmierć apoptotyczną. Preparat MNK fosforyluje białko eIF4E, hamowane przez 4EBP, które jest celem działania mTORC1. Ostatnie badania wskazują, że związki typu rapamycyny nie są w pełni efektywne w tłumieniu efektu działania mTORC1, obniżającego ekspresję białka 4EBP1. Natomiast dodanie inhibitora MNK poprawia ten efekt i powoduje całkowite zahamowanie eIF4E, kluczowego efektoru dla funkcji mTORC1, prowadzącej nie tylko do zahamowania proliferacji komórek chłoniaka CTCL, lecz także do ich śmierci. Wyniki te sugerują, że równoczesne działanie na mTORC1 i na kinazy MNK może okazać się skuteczne w leczeniu chłoniaka CTCL i innych podobnych nowotworów.

Niezwykła zdolność komórek nowotworowych do wykorzystywania przemiany glukozy w kwas mlekowy, by wytworzyć ATP i inne metabolity istotne do ich replikacji nawet w warunkach wysycenia tlenem (glikoliza tlenowa), znana była od dawna i uznawana za cechę „złośliwości”, a nazywana „efektem Warburga”. Enzym heksokinaza II odgrywa istotną rolę, inicjując glikolizę tlenową związaną z wysokim powinowactwem do glukozy i lokalizacją na zewnętrznej błonie mitochondrialnej, przylegającej do syntetazy ATP. Spektroskopia rezonansu magnetycznego (MRS) i inne metody obrazowania funkcjonalnego pozwalają monitorować stan metabolizmu komórkowego, w tym także mierzyć stężenie kwasu mlekowego, końcowego produktu glikolizy. Wykorzystując model chłoniaka B-komórkowego, wykazaliśmy, że zahamowanie szlaku sygnałowego mTORC1 może być wykrywane w komórkach nowotworowych zarówno *in vivo*, jak i *in vitro* pomiarem stężenia kwasu mlekowego. Spadek stężenia mleczanu jest stopniowy i jest sprzężony z hamowaniem ekspresji heksokinazy II. Nasze badania sugerują, że wykrywanie we właściwie dobranej chwili zmian stopnia glikolizy może umożliwić monitorowanie bezpośredniego lub pośredniego hamowania mTORC1 u pacjentów z chłoniakiem czy z innym nowotworem.