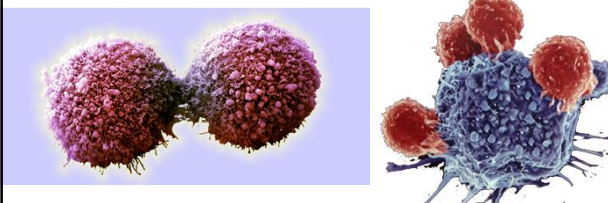
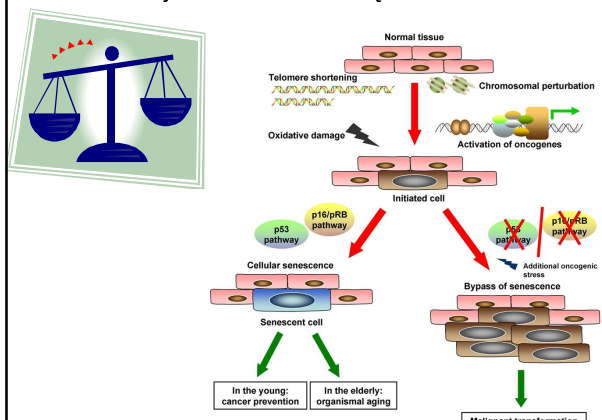


Właściwości komórki nowotworowej, wybrane zagadnienia z biologii nowotworów, leczenie tradycyjne i celowane

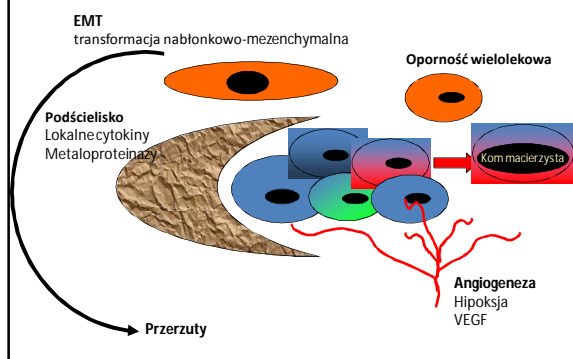
Dr n. med. Izabela Młynarczuk-Biały



Nowotwór jest efektem ominięcia szlaku starzenia



Nie sama komórka nowotworowa



Podścielisko

Metalloproteinases

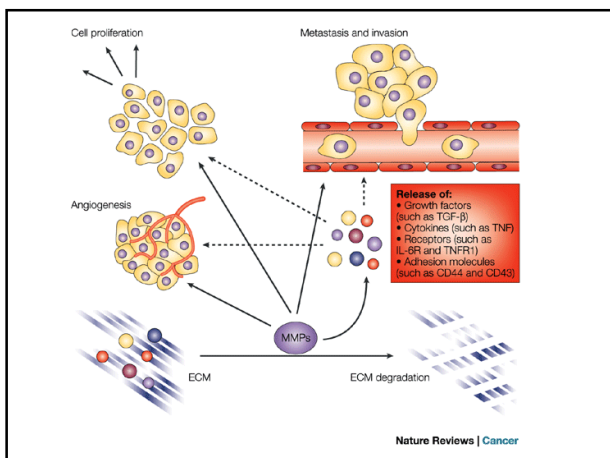
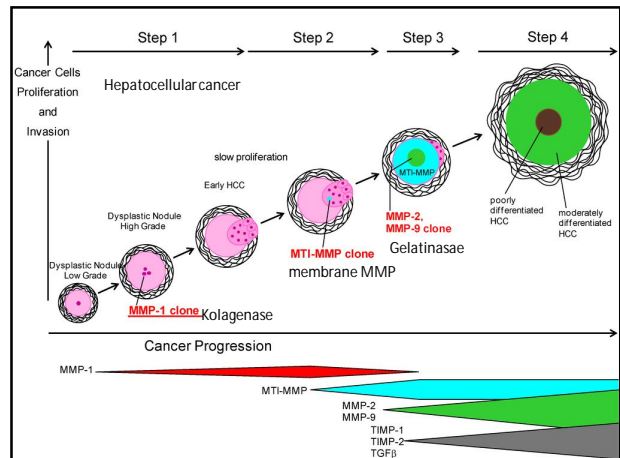
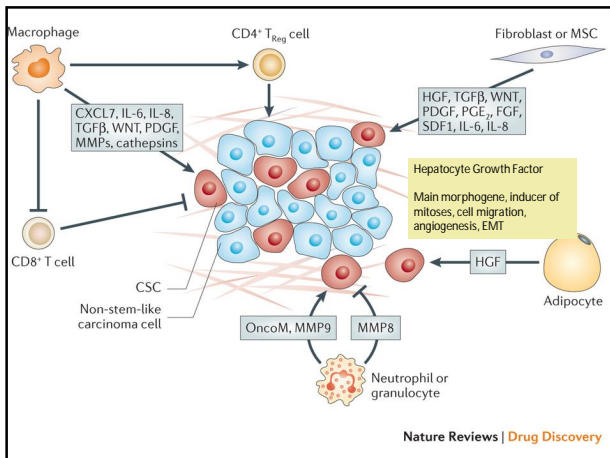
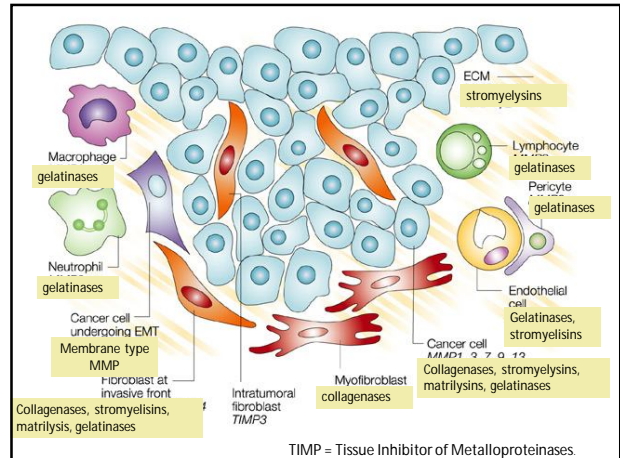
- Matrix metalloproteinases (MMPs) are enzymes performing digestion of various components of ECM
- MMPs are calcium-dependent zinc-containing endopeptidases

MMP

- Only few metalloproteinases are secreted directly by the tumor cells.
- Tumor cells by paracrine secretion produce **interferons, interleukins, growth factors, and extracellular matrix metalloproteinase inducer (EMMPRIN)** that stimulate surrounding host cells for MMP production
- MMP secreted by non-tumor cells might be then absorbed at the surface of tumor cells.

Matrix metalloproteinases (MMPs) are calcium-dependent zinc-containing endopeptidases

- **Collagenases** MMP-1, -8, -13, -18 are capable of degrading triple-helical fibrillar of bone cartilage, dentin in particular: I, II, III, V, IX
- **Gelatinases**, MMP-2 i -9 collagen type IV, laminina, gelatin
- **Stromelysins**, MMP-3 i -10 degradation of ECM
- **Matrilysin** MMP-7 i -26 degradation of matrix + celavage of: FASL, pro TNFalfa, E-cadherin
- **Membrane type MMP** are localized directly in the cell membrane
- **Other MMP**
- TIMP tissue inhibitors of metalloproteinases TIMP 1, 2, 3, 4
- Metalloproteinases are secreted by: tumor cells, fibroblasts, macrophages, mast cells, neutrophils, endothelial cells
- The enzymes regulate migration, angiogenesis, EMT



Adhezja komórkowa

Jest konieczna do formowania i podtrzymywania trójwymiarowej struktury i prawidłowego funkcjonowania tkanek.

- Kompleksy odpowiedzialne za formowanie struktur adhezyjnych składają się z trzech typów białek: **receptorów, zewnątrzkomórkowych molekuł macierzy i białek tworzących połączenia międzykomórkowe**
- Kompleksy te są strukturami dynamicznymi (wychwytyują i reagują na sygnały pochodzenia wewnątrz- i zewnątrzkomórkowego)
- Wśród cząsteczek adhezyjnych odpowiedzialnych za przyleganie wyróżniono:
 - integryny**
 - selektyny**
 - cząsteczki immunoglobulinopodobne**
 - kadheryny**

Transformacja epitelialno-mezenchymalna

- Komórki, które tworzyły silne oddziaływania komórka-komórka (kadheryny), oraz oddziaływania komórka-macierz pozakomórkowa (integryny) **nabywają zdolności samodzielnego przemieszczania się**
- Połączenia międzykomórkowe zostają osłabione, **komórki tracą kontakt z podłożem**.
- Zjawisku temu towarzyszy zmiana wyglądu komórek – z postaci przypominającej tkankę nabłonkową (fac. epithelium) przeistaczają się one **do formy podobnej do mezenchymy**
- Ma miejsce tak zwane „przełączenie kadherynowe” (**ekspresja N-kadheryny**)
- Zmienia się polarność komórek

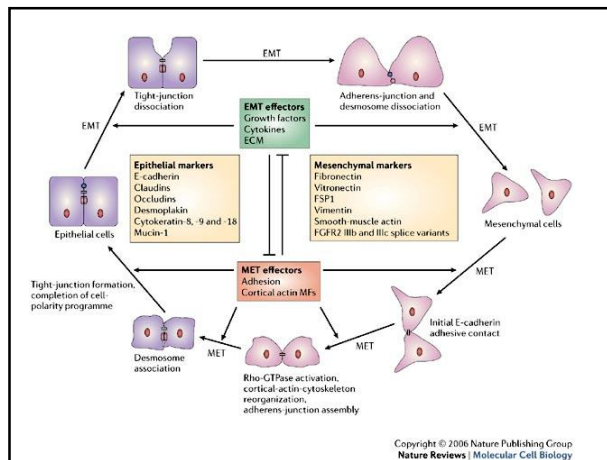
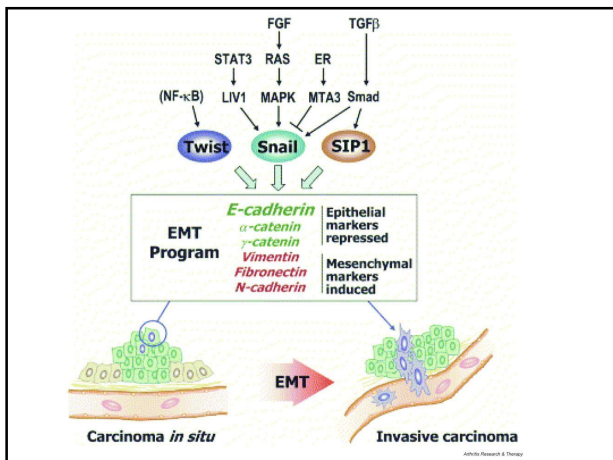
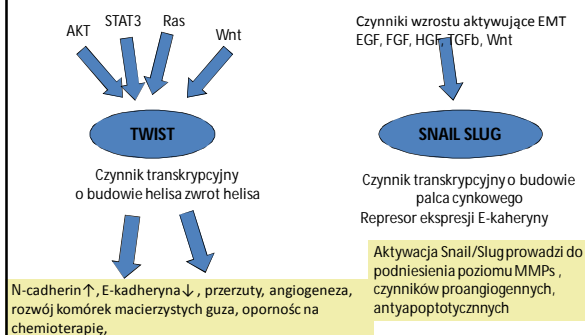
Transformacja epitelialno-mezenchymalna

- EMT jest **głównym mechanizmem odpowiedzialnym za inwazyjność i przerzutowanie** nowotworów w późnym stadium zaawansowania, jak również formowanie wielu rodzajów tkanek w procesie embriogenezy.
- Przerzutujące komórki nowotworowe, w odległych organach, stają się komórkami osiadłymi (**tzw. przejście mezenchymalno-epitelialne, MET**).
- W wyniku tej reakcji komórki nowotworowe odzyskują fenotyp zbliżony do fenotypu komórek epitelialnych, a wpływ na tę reakcję mają komórki mikrośrodowiska.

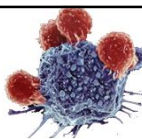
Transformacja epitelialno-mezenchymalna

- Proces EMT może być indukowany czynnikami wzrostowymi (**EGF, FGF, HGF, TGFβ**, białka morfogenetyczne kości, czynnik wzrostu komórek pnia, szlak **Wnt**) lub stymulatorami z mikrootoczenia komórki nowotworowej,
- W EMT istotną rolę odgrywają czynniki transkrypcyjne: **Snail (SNAI1), Slug (SNAI2), Twist** (hamujące ekspresję kadheryn i innych białek tworzących połączenia międzykomórkowe)
- Wzrost ekspresji tych czynników doprowadza do aktywacji wielu genów (i w efekcie wzrostu tempa proliferacji, zahamowania apoptozy, wzrostu mobilności)
- W komórkach przechodzących EMT pojawiają się markery macierzystych komórek nowotworowych (**Notch czy Oct-4**).

Czynniki transkrypcyjne w EMT



Komórki macierzyste guza

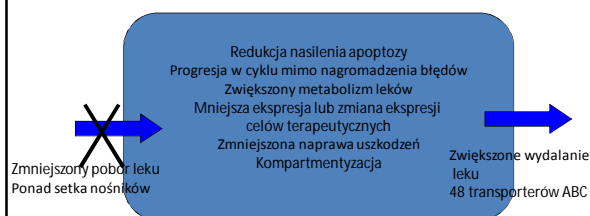


- Jest to wciąż hipoteza
- Komórki macierzyste dzielą się bardzo rzadko, są w fazie G0 cyklu i trudno je zabić
- Zazwyczaj żyją w niszach schowane przed wpływem środowiska (na dnie krypt, głęboko w mieszk włosowym, w ząbkach szpiku kostnego)
- Wykazują wysoką ekspresję gp-100 i są MDR
- Zazwyczaj są odporne na indukcję apoptozy

Oporność wielolekowa

MDR i gp-100

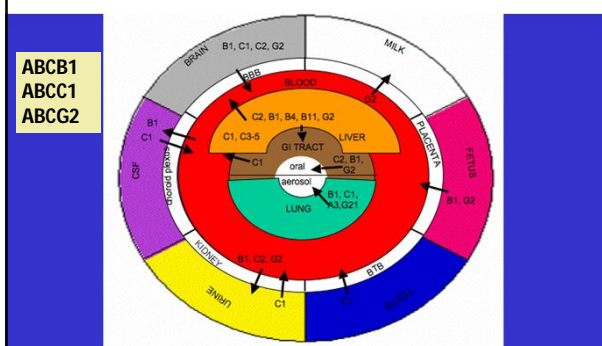
- Może dotyczyć jednocześnie wielu leków, również tych nowych celowanych



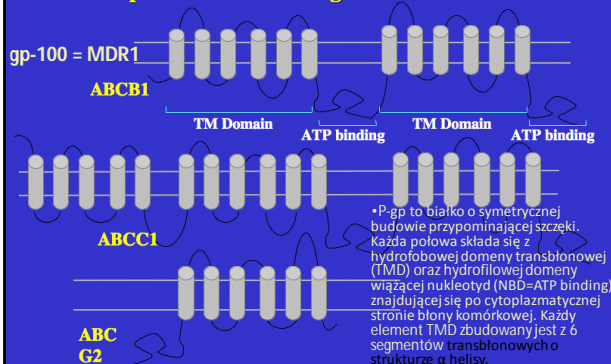
Gp100 = ABCB1 = MDR1

- P-gp (Gen ABCB1 na chr 7) należy do rodziny białek charakteryzujących się występowaniem wysoce konserwowanego motywu zwanego **kasetą wiążącą ATP** (ABC, z ang. ATP-binding cassette).
- Rodzinę ABC tworzą transportery błonowe, które przenoszą cząsteczki przez błonę komórkową wbrew gradientowi stężeń, zużywając energię pochodzącą z hydrolizy ATP.
- W ludzkim genomie zidentyfikowano 49 genów kodujących transportery ABC, tworzące 7 podrodzín
- P-gp jest pierwszym odkrytym członkiem podrodziny B dlatego też znana jest pod nazwą ABCB1 (z ang. ATP-binding cassette subfamily B member 1). Zwyczajowo nazywana jest też białkiem oporności wielolekowej 1 (MDR1, z ang. multidrug resistance protein 1) ze względu na związek z lekoopornością linii komórek nowotworowych, w których ulega nadekspresji.
- Przyjmuje się, że mechanizm działania P-gp oparty jest na modelu hydrofobowej pompy próżniowej. Model ten zakłada, że substrat znajdujący się w cytoplazmie lub w wewnętrznej warstwie błony komórkowej oddziałuje z białkową kieszenią wiążącą lek, a następnie dzięki energii powstałej z hydrolizy ATP jest transportowany z do przestrzeni zewnątrzkomórkowej

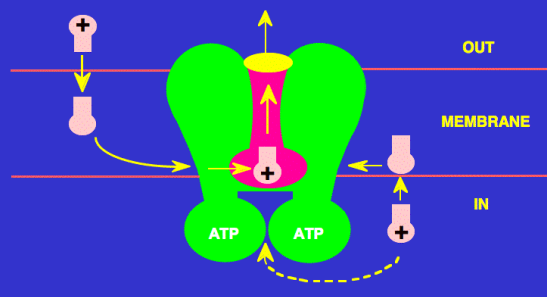
Transportery ABC determinują biodostępność, wydalanie, penetrację oraz chronią organizm przed ksenobiotykami

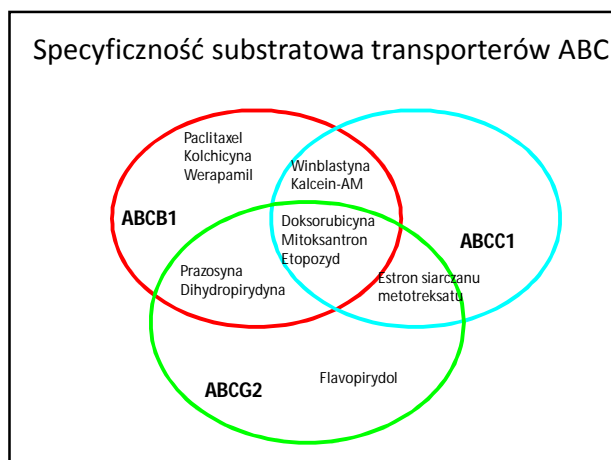
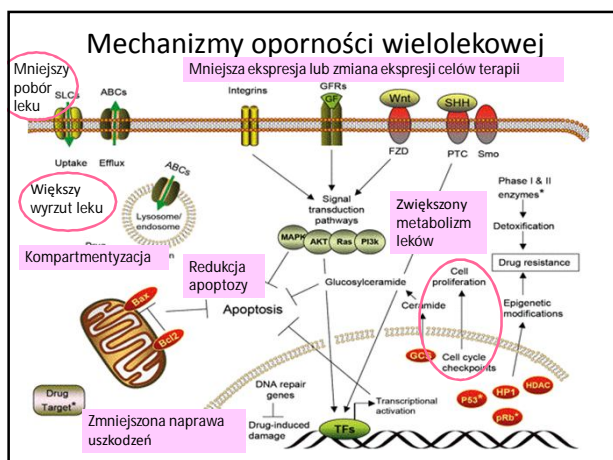


ABC transporters: Domain organization



P-glycoprotein removes hydrophobic substrates directly from the plasma membrane





Leki onkologiczne

- Tradycyjne
- Cisplatyna
- Doxorubicyna
- 5FU
- Thalidomid
- Celowane
- Inhibitory proteasomów bortezomib
- Przeciwciała – rituximab
- Drobnocząsteczkowe inhibitory kinaz Gleevec

Podstawy farmakologicznego leczenia nowotworów

- Wrażliwość nowotworu na leczenie:
 - Zależna od fazy cyklu komórkowego
 - Zależna od odsetka komórek proliferujących (Ki-67)
 - Heterogenność komórkowa guza (różna wrażliwość na różne substancje lecznicze)
 - Masa guza
 - Ukrwienie / utlenowanie guza
 - Obecność receptorów – punktów „uchwyty” dla leków na powierzchni komórek nowotworowych
- Terapie hormonalne
- Terapie „celowane”
 - Tzw. terapie genowe – leczenie ukierunkowane na szlaki przekazywania informacji wewnątrz komórki (kinazy)

Rodzaje leczenia systemowego nowotworów:

- Rodzaje hormonoterapii:
 - Estrogeny (rak prostaty)
 - Androgeny (rak piersi)
 - Gestageny (progesteron – rak endometrium)
 - Antyhormony (tamoxifen – rak piersi)
 - Analogi gonadoliberyny (podwzgórze) – rak prostaty, rak piersi
 - Czynniki wzrostu (granulocytów, erytrocytów)
 - Leki tzw. biologiczne – celowane (inhibitory kinaz i innych szlaków przekazywania sygnału)

Przykładowe schematy terapii

Cancer type	Drugs	Acronym
Rak piersi	Cyklofosfamid, metotrexat, 5-fluorouracyl	CMF
	Doxorubicyna, cyclophosphamide	AC
Chłoniak Hodgkina	Mustine, winkrystyna, prokarbazyna, prednizolon	MOPP
	Doxorubicin, bleomycyna, winblastyna, dakarbazyna	ABVD
Chłoniaki nie Hodgkinowskie	Cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, prednisolone	CHOP
Nowotwory komórek germinalnych	Bleomycin, etopozyd, cisplatyna	BEP
Rak żołądka	Epirubicyna, cisplatin, 5-fluorouracil	ECF
	Epirubicin, cisplatin, kapecitabina	ECX
Rak pęcherza	Metotrexat, vincristine, doxorubicin, cisplatin	MVAC
Rak płuc	Cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine,	CAV
Rak okrężnicy	5-fluorouracil, kwas folinowy, oksapalina	FOLFOX

Kategorie nowych leków onkologicznych

- **Przeciwciała monoklonalne sprzężone z:** -lekiem, -toksyną, lub -radioizotopem
- **Modyfikatory odpowiedzi immunologicznej** (n.p., interferony, IL-2)
- **Immunoterapia**
- **Hematopoetyczne czynniki wzrostu**
- **Induktory różnicowania komórkowego** (retinoidy)
- **Terapia genowa**
- **Terapia antysensowna**
- **Szczepionki przeciwnowotworowe**
- **Leki ograniczające przerzuty** (inhibitory metaloproteinaz)
- **Inhibitory angiogenezy**
- **Inhibitory proteasomów** (bortezomib, carfilzomib)

Lista 10 najlepiej sprzedających się w USA leków w roku 2013

No.	Nazwa leku	Firma	Mechanizm działania	Wskazania
1	Rituximab	Roche/Mab Thera	Anty Cd-20	Chłoniaki nie Hodgkinowskie, CLL
2	Bevacizumab	Astellin	Inhibitor angiogenezy, humanizowane przeciwciało anty VEGF-A	Raki okrężnicy, płuc, jajnika, mózgu
3	Trastuzumab	Herceptin	Anty HER2, przeciwciało monoklonalne humanizowane	Rak piersi przetyku i żółtąka
4	Imatinib	Gleevec	Inhibitor kinazy tyrozynowej zwłaszcza w białaczkach z chromosomem Philadelphia	Białaczka, raki pościeliska (GI)
5	Lenalidomid	Revlimid	Pochodna talidomidu łącząca E3 dla czynników transkrypcyjnych IKZF1 i 3	Szpiczak mnogiej, chłoniak z komórek płaszczka
6	Pemetrexed	Alimta	Antymetabolit – antagonistą kwasu folowego	Rak płuc
7	Bortezomib	Velcade	Inhibitor proteasomów	Szpiczak mnogiej, GIST
8	Cetuximab	Erlotinib	Przeciwciało blokujące receptor dla EGF chimeryczne myślo-ludzkie	Raki okrężnicy, szyi i głowy
9	Leuprorelin	Lupron, Eligard	Analog GnRH – w nowotworach hormonalnych	Raki prostaty i jajnika
10	Abirateron	Zytiga	Steroidowy antyandrogen	Rak prostaty

Leki działające na układ immunologiczny

- Toksyna BCC w leczeniu raka pęcherza moczowego

Szlaki kluczowe dla rozwoju nowotworów i związane z nimi leki celowane

MAPKKK/MAPKK/MAPK

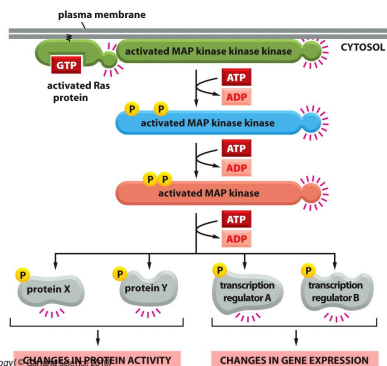
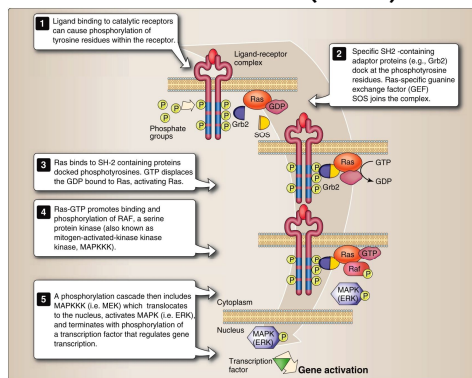


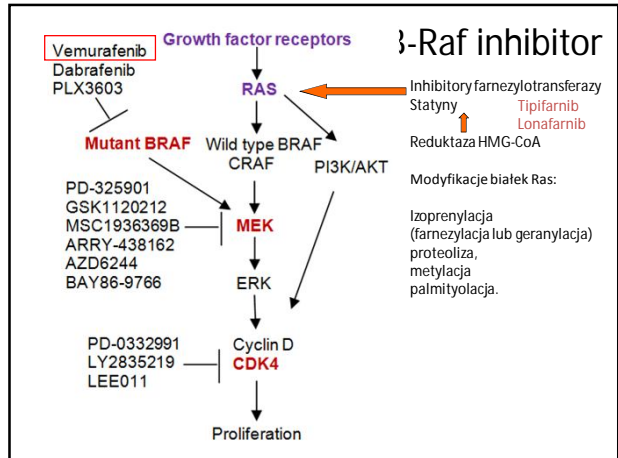
Figure 16-32 Essential Cell Biology

Ras/Raf/Erk (MAP)



Ras/Raf/MEK/ERK

- K-Ras (rak płuca, jelita grubego, trzustki, przew. żółciowych) N-Ras (czerniak) H-Ras (rak pęcherza moczowego)
- Białka Ras są farnezylowane
- Sama nadekspresja Ras może wystarczyć
- Nadaktywność Ras stwierdza się w 20-80% wszystkich nowotworów
- Raf szczególnie nadekspresja w czerniakach
- MEK kluczowa kinaza
- ERK bezpośrednio aktywuje czynniki transkrypcyjne w tym c-myc



IP3/Akt (PKB)

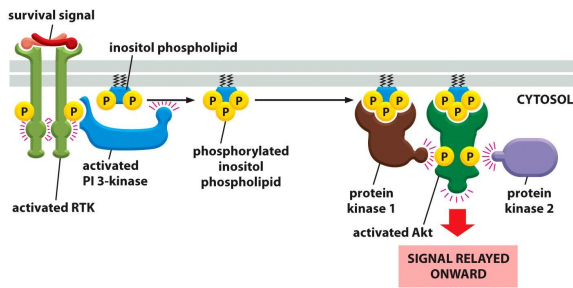


Figure 16-33. Essential Cell Biology (© Garland Science 2010)

PTEN działa antagonistycznie do PI3K

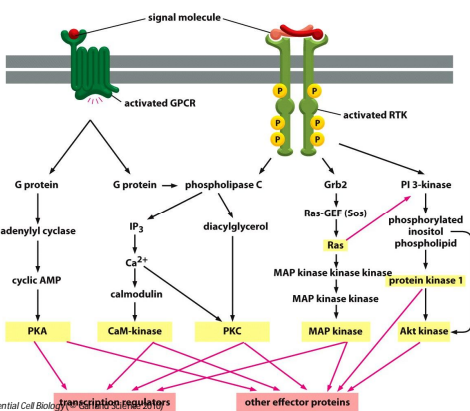
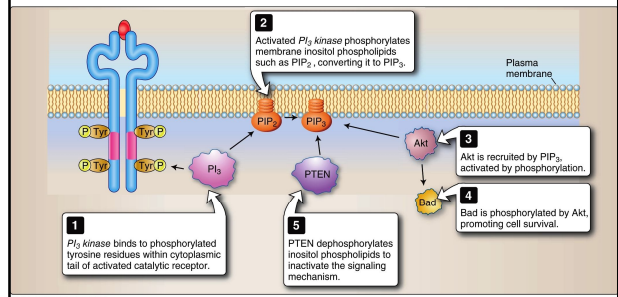
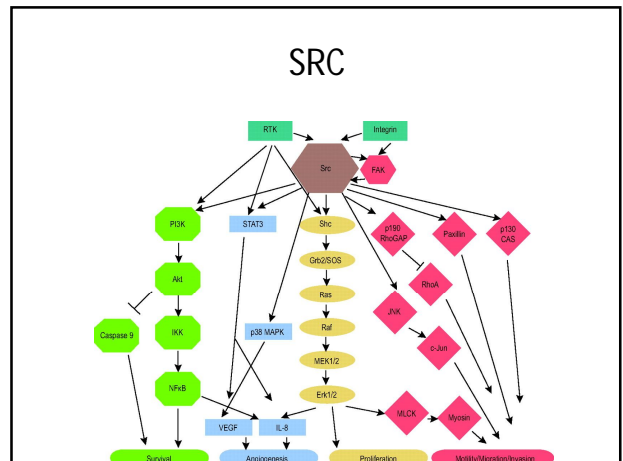
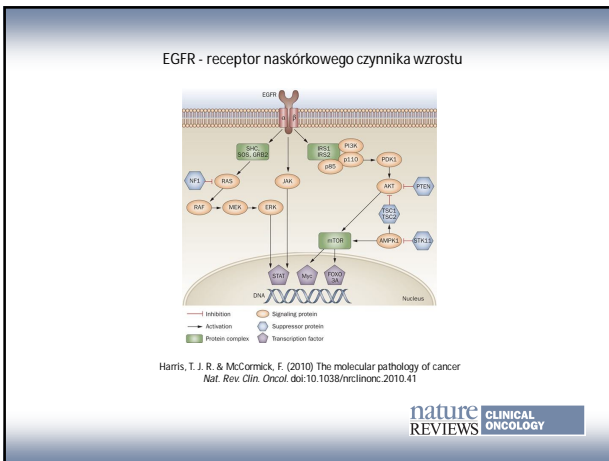
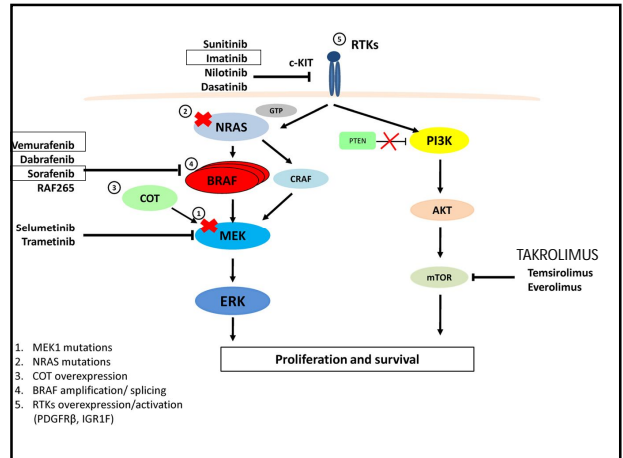
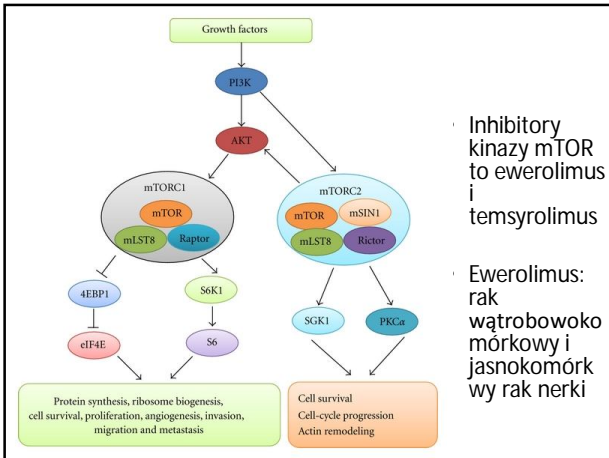


Figure 16-42. Essential Cell Biology (© Garland Science 2010)

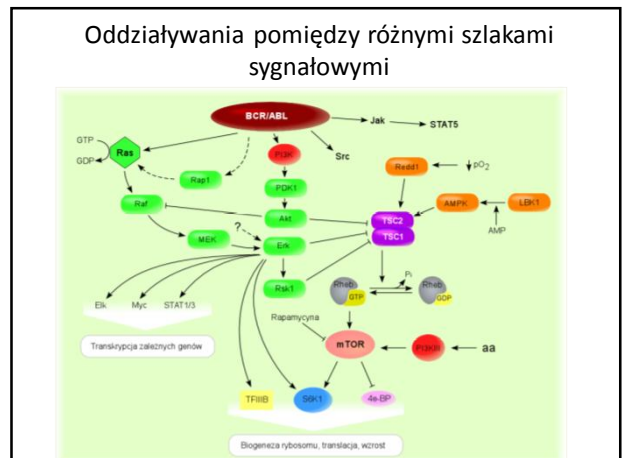
Szlak mTOR

- Mammalian target of rapamycin



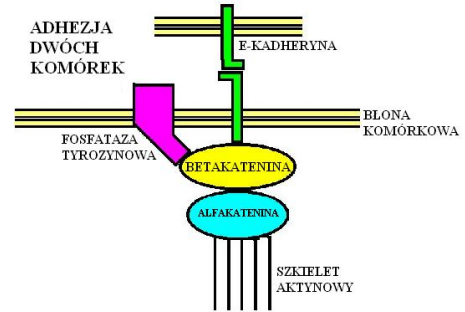
C-MYC

- c-Myc jest czynnikiem transkrypcyjnym
- Aktywowany przez czynniki mitogenne w różnych szlakach przekazywania sygnału np.: Wnt, Shh and EGF (via MAPK/ERK)
- Hamuje ekspresję p21, Bcl-2,
- nasila – cyklin, rRNA
- Myc jest bardzo silnym a proto-onkogenem
- Ma udział w powstawianiu wielu typów nowotworów.

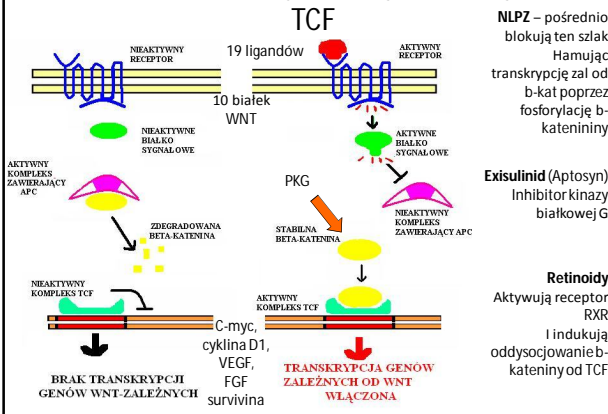


Szlak WNT/Catenina

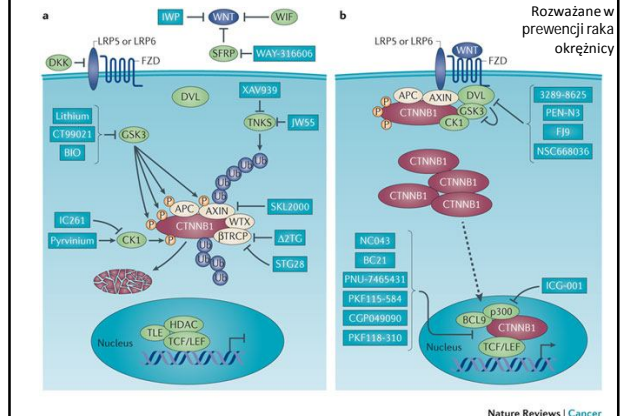
Dobrze znana rola b-kateniny w adhezji komórek nabłonkowych



Stabilna b-katenina jako aktywator czynnika TCF



WNT/B-catenina



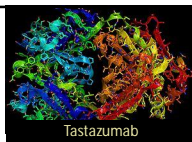
Receptory wzrostu

- HER2 jest przezblonowym receptorem o aktywności kinazy tyrozynowej.
- Aktywuje w kom PI3K/Akt, oraz MAPK.
- Blokowanie HER2 powoduje blok w fazie G1, zmniejszenie angiogenezy i indukację ADCC
- Niepożądane: zaburzenia rytmu serca i kardiomiopatia, toksyczna nekroliza naskórka
- Objawy grypopodobne

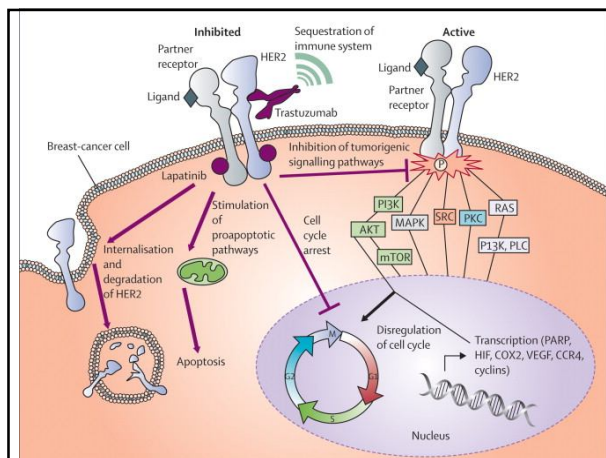
GF recetor inhibition

- VEGF
- Bevacizumab (AVASTIN)

Herceptyna = trastuzumab



- rekombinowane, humanizowane przeciwciało monoklonalne IgG1, łączące się wybiórczo z receptorem ludzkiego naskórkowego czynnika wzrostu typu 2 (Human Growth Factor Receptor – HER2).
- Preparat jest stosowany do leczenia przypadków raka piersi z przerzutami, w których stwierdzono nadekspresję HER2.
- W kombinacji z innymi chemoterapeutykami istotnie zmniejsza ryzyko nawrotu choroby i stopień odpowiedzi na leczenie.
- Niepożądane: zaburzenia rytmu serca i kardiomiopatia, objawy grypopodobne



Tamoksyfen

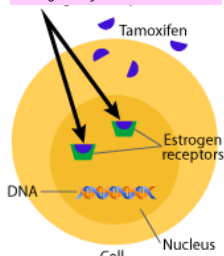
- Tamoksyfen (tamoxifen) – organiczny związek chemiczny, należący do selektywnych modulatorów receptora estrogenowego (SERM), syntetyczny lek o działaniu antyestrogenowym, stosowany głównie w terapii raka sutka.
- Lek wiąże się również z receptorami estrogenowymi w kośćcu (agonista) zwiększając gęstość kości.
- Tamoksyfen powoduje także zmniejszenie stężenia w osoczu wolnego estradiolu, co prowadzi do pobudzenia wydzielania przez przedni płat przysadki mózgowej FSH, który stymuluje jajniki do wytwarzania estrogenów w okresie przedmenopauzalnym.
- Prawdopodobnie indukuje uwalnianie czynnika transformującego TGF-β.

Tamoksyfen-wskazania

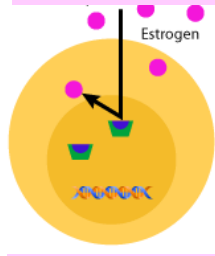
- rak sutka hormonowrażliwy (wykazując ekspresję receptorów estrogenowych) u kobiet po i przed menopauzą
- chemioprewencja raka sutka u kobiet z dużym ryzykiem
- indukcja owulacji
- mastopatia

Tamoksifen blokuje receptory estrogenowe

Tamoksifen wnika do komórki i wiąże się z receptorem estrogenowym



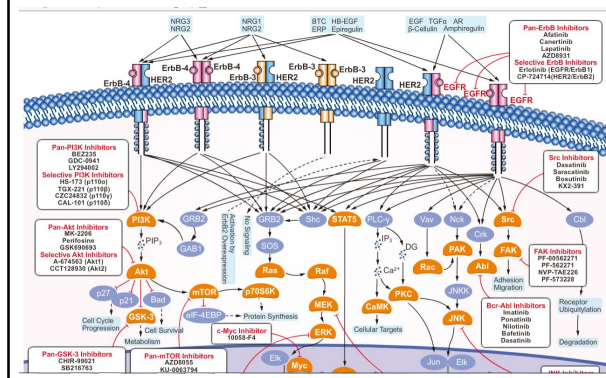
Kiedy estrogeny wnika do komórki, nie mogą połączyć się ze swoim receptorem

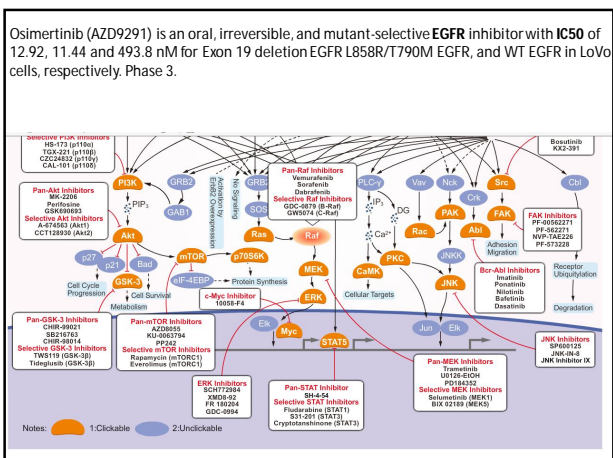


Komórka nowotworowa nie może się dzielić

RiverPharmacy.ca

Podsumowanie szlaki





Leki celowane to nie tylko onkologia

- Anty TNF alfa – choroby zapalne jelit, łuszczyca, reumatoidalne zapalenie stawów
- Anty IL-12 i -23 - ustekinumab Stellara łuszczyca
- Anty CD20 rituximab
- Anty RANK-L denosumab

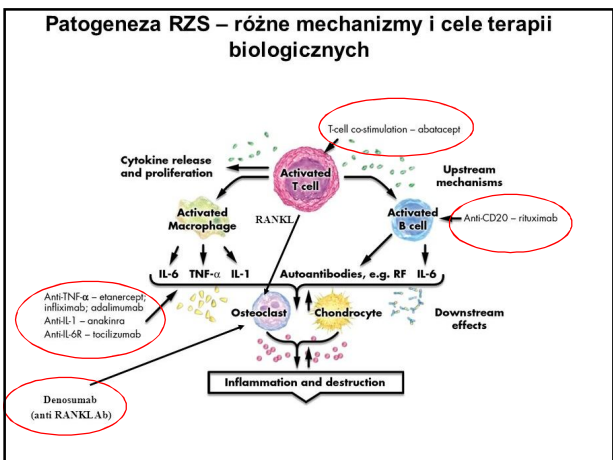


Table 1-2. Biologic Agents to Treat Rheumatoid Arthritis USA

Agent	Class
Abatacept	T-cell costimulation modulator
Adalimumab	TNF-α inhibitor
Anakinra	IL-1 receptor antagonist
Certolizumab	TNF-α inhibitor
Etanercept	TNF-α inhibitor
Golimumab	TNF-α inhibitor
Infliximab	TNF-α inhibitor
Rituximab	Anti-CD 20
Tocilizumab	IL-6 receptor antagonist
Tofacitinib	Janus kinase enzyme inhibitor 5 mg PO

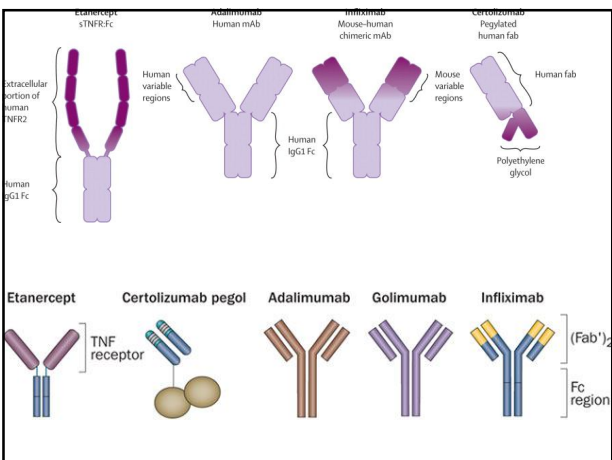
IL = interleukin; IV = intravenously; PO = by mouth; SC = subcutaneously; TNF = tumor necrosis factor.

Nomenklatura białek stosowanych jako leki biologiczne

Końcówka wskazuje na rodzaj cząsteczki

- **cept** = ludzkie białko receptorowe połączone z fragmentem FC e.g. etanercept
- **ximab** = chimeryczne przeciwciało monoklonalne (75% ludzkie 25% mysie) e.g. infliximab
- **zumab** = humanizowane przeciwciało monoklonalne (95% ludzkie) e.g. efalizumab
- **umab** = w pełni ludzkie przeciwciało monoklonalne (100% ludzkie) e.g. adalimumab, ustekinumab

1. Johnston SL. J Clin Pathol. 2007;60(1):8-17.





Właściwości komórki nowotworowej, wybrane zagadnienia z biologii nowotworów, leczenie tradycyjne i celowane

Transformacja nowotworowa jest między innymi efektem ominięcia/nie zadziałania szlaków starzenia kontrolowanych przez p53 i p16/RB.

Guz nowotworowy jest osadzony w **podścielisku** zawierającym: komórki, tkankę łączną: macierz zewnątrzkomórkową, włókna kolagenowe, sprężyste, etc. Komórki podścieliska to m. in.: fibroblasty, neutrofile, limfocyty, makrofagi, komórki mioepitelialne, pericyty. Grupa komórek w obrębie guza zazwyczaj jest heterogenna i może mieć w sobie różne mutacje, zróżnicowaną oporność wielolekową, zawierać komórki macierzyste guza, oraz komórki przechodzącą tzw. **transformację epitelialno-mezenchymalną** (EMT). Komórki po przejściu EMT mają zdolność migracji, naciekania, przechodzenia przez błony podstawne, mogą też w innym miejscu osiąść i przejść proces odwrotny: stać się z mezenchymalnych znowu nabłonkowe (MET).

Wszystkie komórki obecne w tkance guza aktywnie wydzielają cytokiny, czynniki wzrostu i różnicowania i w ten sposób modulują i warunkują rozwój guza.

Ważnymi czynnikami które modulują podścielisko, umożliwiają migrację komórek są enzymy metaloproteinazy. MMP zbudowane są przynajmniej z dwóch domen: domeny katalitycznej i prodomeny, zawierają także peptyd sygnałowy. W centrum aktywnym znajduje się atom cynku oraz dodatkowy atom cynku i trzy atomy wapnia pełniące funkcję strukturalną i stabilizujące strukturę enzymu. Metaloproteinazy wymagają aktywacji, polegającej na usunięciu prodomeny

Metaloproteinazy wydzielane są przez: kom. nowotworowe, fibroblasty, makrofagi, kom. tłuczne, neutrofile, kom. śródbłonna.

Wyróżniamy kilka grup metaloproteinaz:

Kolagenazy (MMP-1,-8,13,-18) degradują kolagen I, II, III,V,IX

Żelatynazy, (MMP-2 i -9) degradują denaturowany kolagen I (żelatynę) kol IV, laminina.

Stromielizyny (MMP-3 i -10) degradują macierz zewnątrzkomórkową a więc glikozaminoglikany, proteoglikany, glikoproteiny.

Matrylizyny (MMP-7 i -26) trawią składniki macierzy + odcinają z pow komórki: FASL, pro TNFalfa, E-kadheryna

Błonowe MMP zlokalizowane są bezpośrednio w błonie komórek

Niesklasyfikowane MMP

Oprócz metaloproteinaz istnieją inhibitory metaloproteinaz TIMP 1-4.

Wreszcie guz nowotworowy do wzrostu potrzebuje tlenu i składników odżywczych czyli przy wielkości ponad 3-5 mm potrzebuje naczyń krwionośnych. Naczynia zaopatrujące guz nowotworowy powstają w 3 mechanizmach:

-angiogenezy: stymulacja istniejących naczyń krwionośnych do wytwarzania pączkujących naczyń które wnikają w obręb guza.

-waskulogenezy: powstawania naczyń krwionośnych z angioblastów różnicujących się z mezenchymy

-tzw. naśladownictwo naczyniowe: kom macierzyste nowotworu różnicują się w nowotworowy śródbłonek.

Cześć zaadoptowanych nowych naczyń krwionośnych z powodu szybkiego wzrostu guza ulega przerwaniu stąd często martwica w środku guza. Martwica i hipoksja jest silnym stymulatorem angiogenezy, więc tym silniej stymulowane jest ukrwienie obrzeża nowotworu. Martwica w środku guza jest czynnikiem złym rokowniczo i świadczy o gwałtownym wzroście guza oraz jego inwazyjności.

Naczynia nowotworowe z powodu gwałtowności rośnięcia są często kręte, poszerzone i nieszczelne. Dlatego w badaniach obrazowych z zastosowaniem kontrastu dożylnego często dochodzi do wzmocnienia wybarwienia tkanki w obrębie guza – co też dowodzi iż dany guz jest ukrwiony, ma nieszczelne naczynia krwionośne i z dużym prawdopodobieństwem jest złośliwy.

Sorafenib jest małowcząsteczkowym doustnym inhibitorem wielu kinaz tyrozynowych hamującym angiogenezę. Działa poprzez blokadę licznych kinaz –m.in. kinazy Raf, receptorowych kinaz: PDGF β (PDGFR β), VEGF oraz pośrednio białka C-KIT, C-RAF, B-RAF i kinazy tyrozynowej RET.

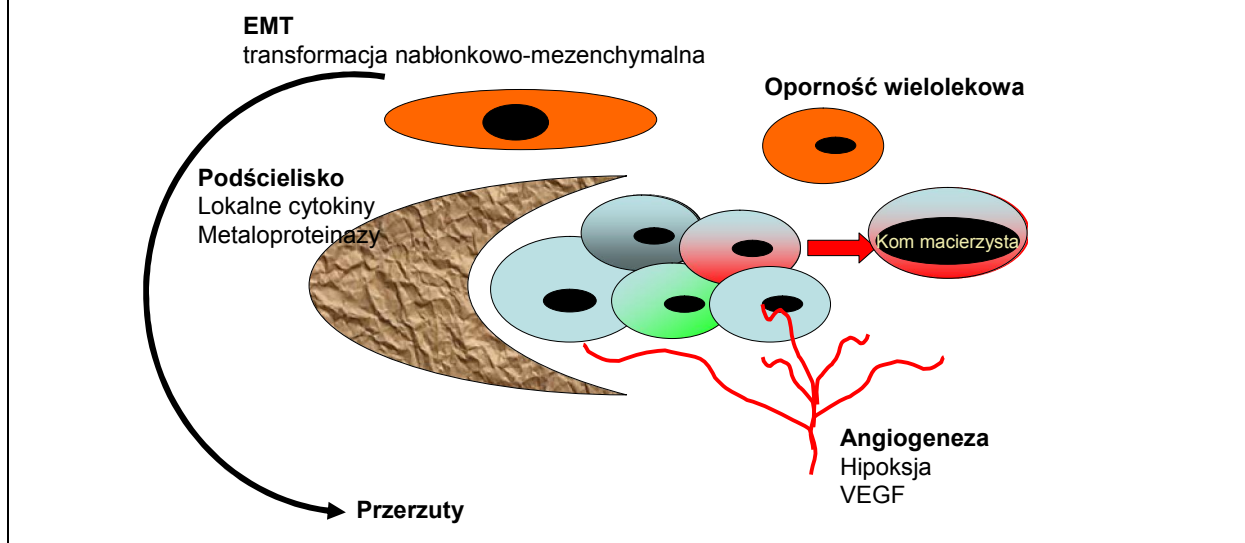
Lek wydłuża przeżycie u chorych na raka wątrobowokomórkowego.

Istnieją kliniczne i patomorfologiczne kryteria złośliwości danego nowotworu.

Do kryteriów klinicznych zaliczamy: wielkość guza w cm, obecność martwicy we wnętrzu guza, naciekanie sąsiadujących tkanek, ucisk tych tkanek, towarzyszący obrzęk tkanek, obecność przerzutów.

Histopatologicznie ocenia się typ histologiczny guza, ilość mitoz, różnorodność komórkową guza, czy jest zróżnicowany (przypomina strukturę zdrowej tkanki) czy też jest niezróżnicowany. Każdy pacjent z podejrzeniem choroby nowotworowej musi mieć badanie histopatologiczne.

Rycina 1: Wzajemne zależności i interakcje podścieliska i komórek guza nowotworowego. Podstawowe zagadnienia związane z biologią nowotworów.



Transformacja epitelialno-mezenchymalna:

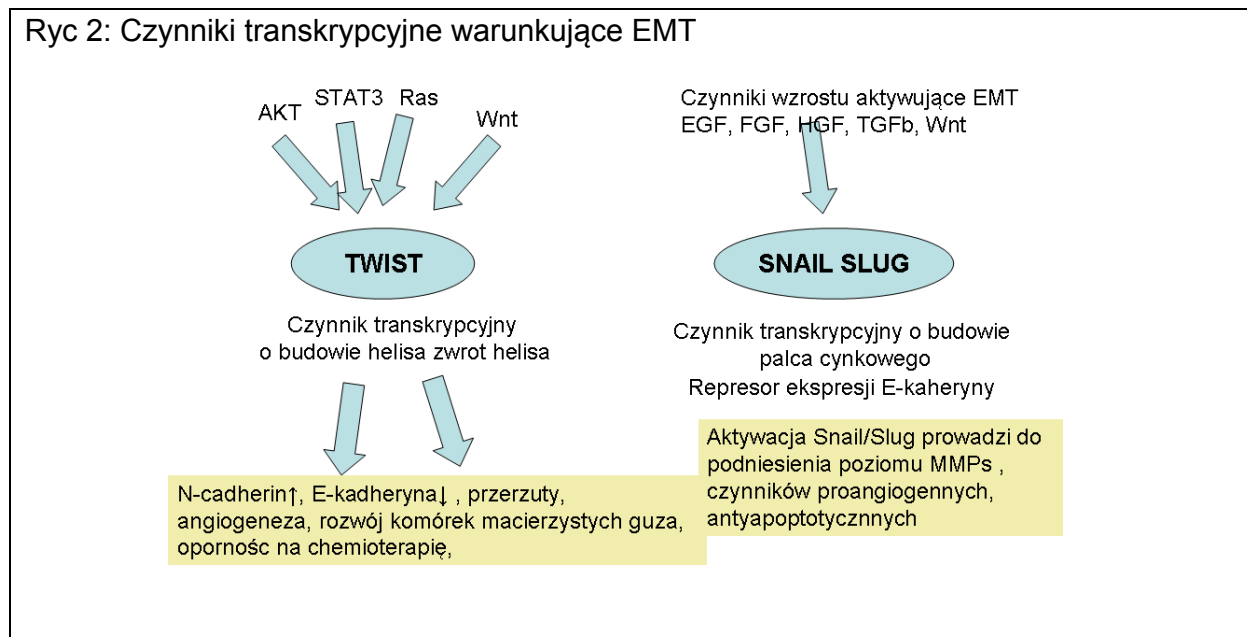
Proces EMT może być indukowany czynnikami wzrostowymi (EGF, FGF, HGF, TGF β , białka morfogenetyczne kości, czynnik wzrostu komórek pnia, szlak Wnt) lub stymulatorami z mikrootoczenia komórki nowotworowej,

W EMT istotną rolę odgrywają czynniki transkrypcyjne: **Snail** (SNAI1), **Slug** (SNAI2), **Twist** (hamujące ekspresję kadheryn i innych białek tworzących połączenia międzykomórkowe)

Wzrost ekspresji tych czynników doprowadza do aktywacji wielu genów (i w efekcie wzrostu tempa proliferacji, zahamowania apoptozy, wzrostu mobilności)

W komórkach przechodzących EMT pojawiają się markery macierzystych komórek nowotworowych (Notch czy Oct-4).

Ryc 2: Czynniki transkrypcyjne warunkujące EMT



Komórki macierzyste guza

Ich istnienie jest wciąż hipotezą. Uważa się, że komórki macierzyste dzielą się bardzo rzadko, zazwyczaj są w fazie G0 cyklu. Zazwyczaj żyją w niszach schowane przed wpływem środowiska (na dnie krypt jelitowych, głęboko w mieszku włosowym, w zachyłkach szpiku kostnego). Wykazują wysoką ekspresję gp-100 i są MDR. Zazwyczaj są odporne na indukcję apoptozy

Oporność wielolekowa (MDR)

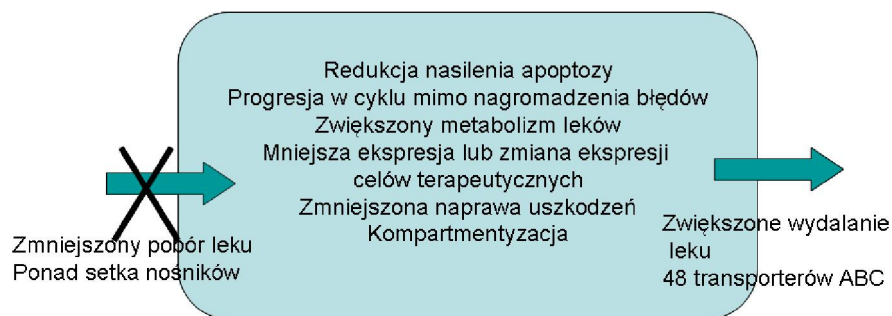
P-gp (Gen ABCB1 na chr 7) należy do rodziny białek charakteryzujących się występowaniem wysoce konserwowanego motywu zwanego kasetą wiążącą ATP (ABC, z ang. ATP-binding cassette). Rodzinę ABC tworzą transportery błonowe, które przenoszą cząsteczki przez błonę komórkową wbrew gradientowi stężeń, zużywając energię pochodzącą z hydrolizy ATP.

W ludzkim genomie zidentyfikowano 49 genów kodujących transportery ABC, tworzące 7 podrodzin

P-gp jest pierwszym odkrytym członkiem podrodziny B dlatego też znana jest pod nazwą ABCB1 (z ang. ATP-binding cassette subfamily B member 1). Zwyczajowo nazywana jest też białkiem oporności wielolekowej 1 (MDR1, z ang. multidrug resistance protein 1) ze względu na związek z lekoopornością linii komórek nowotworowych, w których ulega nadekspresji.

Przyjmuje się, że mechanizm działania P-gp oparty jest na modelu hydrofobowej pompy próżniowej. Model ten zakłada, że substrat znajdujący się w cytoplazmie lub w wewnętrznej warstwie błony komórkowej oddziałuje z białkową kieszenią wiążącą lek, a następnie dzięki energii powstałej z hydrolizy ATP jest transportowany z do przestrzeni zewnątrzkomórkowej.

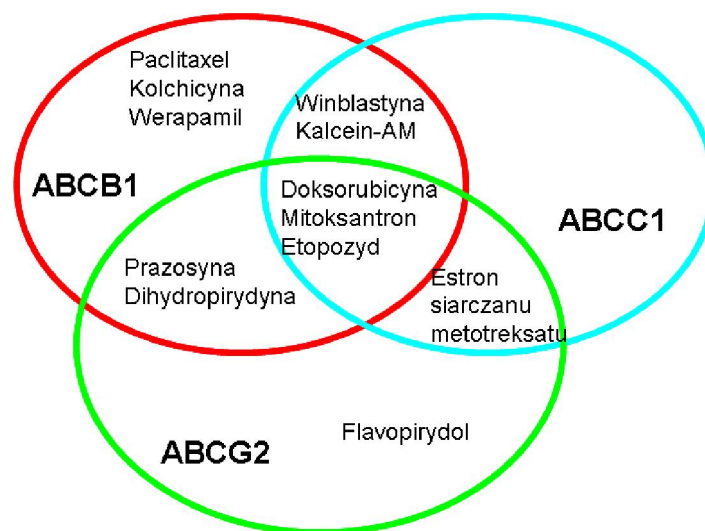
Rycina 3: Czynniki warunkujące oporność wielolekową komórek nowotworowych



Nadekspresja trzech transporterów jest związana z opornością wielolekową komórek nowotworowych. Są to transportery: ABCB1, ABCC1, ABCG2.

ABCB1 (P-gp100) to białko o symetrycznej budowie przypominającej szczęki. Każda połowa składa się z hydrofobowej domeny transbłonowej (TMD) oraz hydrofilowej domeny wiążącej nukleotyd (NBD=ATP binding) znajdującej się po cytoplazmatycznej stronie błony komórkowej. Każdy element TMD zbudowany jest z 6 segmentów transbłonowych o strukturze α helisy.

Specyficzność substratowa transporterów ABC



Flawopirydol: inhibitor białka p53 (nie stosowany w klinice), werapamil, dihydropirydyna (inhibitory kanałów wapniowych stosowane w kardiologii), kalceina stosowana do badań nad MDR w komórkach, prazosyna – inhibitor receptorów alfa1 adrenergicznych ma efekt obniżający ciśnienie krwi.

Grupy leków cytotoksycznych –klasyczne chemioterapeutyki

- Leki alkilujące. Historycznie najstarsza grupa leków cytotoksycznych, powodująca uszkodzenia DNA w wyniku reakcji chemicznej polegającej na przyłączeniu grupy alkilowej do guaniny w pozycji 7 (do atomu azotu pierścienia purynowego) łańcucha DNA.

Przykładowe leki: busulfan, chlorambucyl, **cyklofosfamid**, ifosfamid, temozolomid, **karmustyna**, **lomustyna**, **fotemustyna**, **dakarbazyne**. Leki te są stosowane w leczeniu nowotworów układu krwiotwórczego, jak również szeregu guzów litych, w tym mięsaków i nowotworów ośrodkowego układu nerwowego.

- Analogi platyny. Podstawowym mechanizmem działania tej grupy leków jest uszkodzenie DNA poprzez tworzenie nieprawidłowych wiązań pomiędzy związkami platyny a nicią DNA. Upośledza to dostęp enzymów naprawczych DNA i powoduje katastrofę mitotyczną.

Przykładowe leki: **cisplatyna**, (karboplatyna i oksaliplatyna). Leki z tej grupy są szeroko stosowane w większości guzów litych, w tym w leczeniu raka płuca, raka jajnika i nowotworów przewodu pokarmowego.

- Antymetabolity. Leki z tej grupy działają poprzez zahamowanie działania enzymów uczestniczących w syntezie kwasów nukleinowych lub poprzez wbudowywanie się w miejsce strukturalnie związków tworzących DNA i RNA. Najgroźniejszym objawem niepożądanym w przypadku antymetabolitów jest uszkodzenie szpiku (szczególnie nasilone w przypadku analogów purynowych). Wszystkie antymetabolity są swoiste dla fazy S cyklu komórkowego. Do zalet leczenia antymetabolitami należy to, że z wyjątkiem cytarabiny względnie rzadko wywołują silne dolegliwości ze strony przewodu pokarmowego.

Przykładowe leki: **metotreksat**, **5-fluorouracyl**, **gemcytabina**, kapecytabina, arabinozyd cytozyny, fludarabina, kladrybina, cytarabina, , pemetreksed. Leki te znajdują szerokie zastosowanie w leczeniu nowotworów układu krwiotwórczego oraz większości guzów litych.

- Inhibitory topoizomerazy. Topoizomeraza jest wspólną nazwą dla kilku enzymów uczestniczących w zmianach struktury dwuniciowego DNA, niezbędnych w trakcie procesów replikacji DNA. Enzymy te są potrzebne do prawidłowej syntezy DNA oraz transkrypcji genów. Zahamowanie ich prawidłowego działania powoduje efekt przeciwnowotworowy.

Przykładowe leki: topotekan i irynotekan, **etopozyd** i tenipozyd. Hamowanie topoizomerazy jest jednym z głównych mechanizmów działania antracyklin, leków pochodzenia roślinnego, do których należy **doksorubicyna** i epirubicyna. Leki z grupy antracyklin posiadają bardzo szerokie spektrum działania, obejmujące między innymi pośrednie uszkodzenia DNA poprzez reakcje z udziałem wolnych rodników.

- Inhibitory wrzeciona mitotycznego. Wspólną cechą tej grupy leków jest działanie hamujące proces prawidłowego podziału komórkowego. Taksoidy są grupą leków pochodzenia roślinnego, pierwotnie wydzielone z igieł cisu, powodujące stabilizację wrzeciona mitotycznego i zahamowanie podziału w fazie M cyklu komórkowego. Pochodne barwinka są również lekami pochodzenia roślinnego, powodującymi destabilizację i zniszczenie mikrotubul uniemożliwiając dokończenie prawidłowej mitozy.

Przykładowe leki: taksoidy – **taksol**, docetaksel i paklitaksel – są szeroko stosowane m. in. w leczeniu raka piersi, raka płuca i raka jajnika; alkaloidy barwinka – **winkrystyna**, **winblastyna**, winorelbina – są stosowane między innymi w leczeniu raka płuca, nowotworów jądra i chłoniaków.

Podstawy farmakologicznego leczenia nowotworów: Cykl komórkowy:

- | | |
|---|--|
| <ul style="list-style-type: none"> • <u>Leki działające w fazie G1:</u> • Asparaginaza • Glikokortykosterydy | <ul style="list-style-type: none"> • <u>Leki działające w fazie G2:</u> • Bleomycyna • Irynotekan • Mitoksantron |
| <ul style="list-style-type: none"> • <u>Leki działające w fazie S:</u> • Doksorubicyna • Fludarabina • Fluorouracyl • Gemcytabina • Kapecytabina • Metotreksat • Prokarbazyna | <ul style="list-style-type: none"> • <u>Leki działające w fazie M:</u> • Winkrystyna • Winblastyna • Etopozyd • Paklitaksel • Docetaksel |

Przykładem hormonoterapii raka piersi jest zastosowanie tamoksyfenu, doustnego inhibitora receptorów estrogenowych.

Tamoksyfen (tamoxifen) – organiczny związek chemiczny, należący do selektywnych modulatorów receptora estrogenowego (SERM), syntetyczny lek o działaniu antyestrogenowym, stosowany głównie w terapii raka sutka.

Lek wiąże się również z receptorami estrogenowymi w kości (agonista) zwiększając gęstość kości.

Tamoksyfen powoduje także zmniejszenie stężenia w osoczu wolnego estradiolu, co prowadzi do pobudzenia wydzielania przez przedni płat przysadki mózgowej FSH, który stymuluje jajniki do wytwarzania estrogenów w okresie przedmenopauzalnym.

Prawdopodobnie indukuje uwalnianie czynnika transformującego TGF-β.

– Rodzaje hormonoterapii:

- Estrogeny (rak prostaty)
- Androgeny (rak piersi)
- Gestageny (progesteron – rak endometrium)
- Antyhormony (tamoxifen – rak piersi)
- Analogi gonadoliberyn (podwzgórze) – rak prostaty, rak piersi

Kategorie nowych leków onkologicznych

- **Przeciwciała monoklonalne sprzężone z:** -lekiem, -toksyną, lub –radioizotopem

Modyfikatory odpowiedzi immunologicznej

(n.p., interferony, IL-2)

Immunoterapia

Hematopoetyczne czynniki wzrostu

Induktory różnicowania komórkowego (retinoidy)

Terapia genowa

Terapia antysensowna

Szczepionki przeciwnowotworowe

Leki ograniczające

przerzuty (inhibitory metaloproteinaz)

Inhibitory angiogenezy

Inhibitory proteasomów (bortezomib, carfilzomib)

Szlaki i związane z nimi leki:

Ras/Raf/MEK/ERK

- Są trzy izoformy białka Ras których nadaktywność związana jest z określonymi nowotworami: K-Ras (rak płuca, jelita grubego, trzustki, przew. żółciowych) N-Ras (czerniak) H-Ras (rak pęcherza moczowego)
- Białka Ras są farnesylowane stąd **statyny** i **inhibitory farnesylotransferazy** mogą hamować podziały komórek z nadekspresją aktywnej formy Ras
- Sama nadekspresja Ras może wystarczyć aby komórka stała się komórką nowotworową
- Nadaktywność Ras stwierdza się w 20wszystkich nowotworów i w -80% -95% nowotworów o których wiemy że sa związane z mutacją Ras (np. rak trzustki)
- Raf szczególnie nadekspresja w czerniakach - vemurafenib – małącząsteczkowy inhibitor kinazy BRAF
- MEK kluczowa kinaza
- ERK bezpośrednio aktywuje czynniki transkrypcyje w tym c-myc

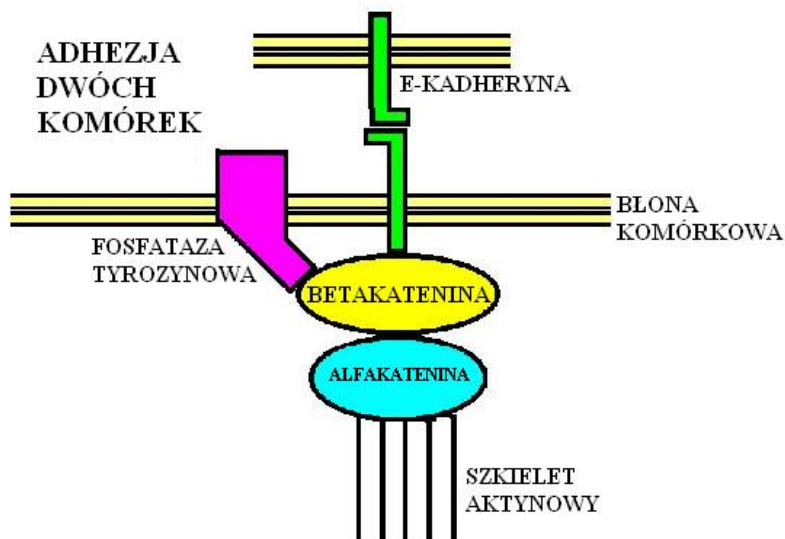
Szlak WNT/bKatenina

B Katenina z jednej strony uczestniczy w tworzeniu połączeń międzykomórkowych, z drugiej jest aktywatorem czynnika transkrypcyjnego TCF. O ile nie otrzyma pobudzenia receptor WNT wbudowany w błonę komórkową cytoplazmatyczna bKatenina jest stale ubikwitynowana i degradowana przez proteasom. Pobudzenie receptora WNT aktywuje białko sygnałowe, Katenina ulega stabilizacji i oddysocjowuje od swojej ligazy ubikwityny a wiąże się z czynnikiem TCF i aktywuje transkrypcję genów zależnych od TCF. Między innymi: c-myc, cykliny D1, VEGF, FGF, surwiwiny. Inhibitorami tego szlaku są **NLPZ** (np. aspiryna), **exisulimid**, **retinoidy**.

Szlak WNT

Jak brak genu może prowadzić do wzrostu nowotworu? Czyli początek historii o ścieżce Wnt na przykładzie raka jelita grubego

U ludzi cierpiących na **raka jelita grubego** wykryto **gen APC** (ang. adenomatous polyposis coli), który często ulegał delecji lub inaktywacji u tych chorych. Podczas prób analizy funkcji genu, naukowcy zastosowali przeciwciała przeciwko APC w celu wyizolowania tego białka z ekstraktu uzyskanego z hodowli komórek ludzkich. Przeciwciała anty-APC wychwyciły to białko, lecz razem z innym - **β -kateniną**. Powyższe odkrycie początkowo błędnie zasugerowało badaczom rolę APC w raku jelita grubego, gdyż do tej pory β -katenina występująca u ssaków była znana jedynie jako łącznik pomiędzy transbłonową częścią kadheryny i wewnątrzkomórkowym cytoszkieletem aktynowym, więc stwierdzono, że funkcja białka APC może być związana z adhezją komórkową. Jednakże w przeciągu kilku lat udało się odkryć całkowicie inną funkcję i interakcję β -kateniny z białkiem APC i ich udział w procesie nowotworzenia.



A nieco wcześniej...

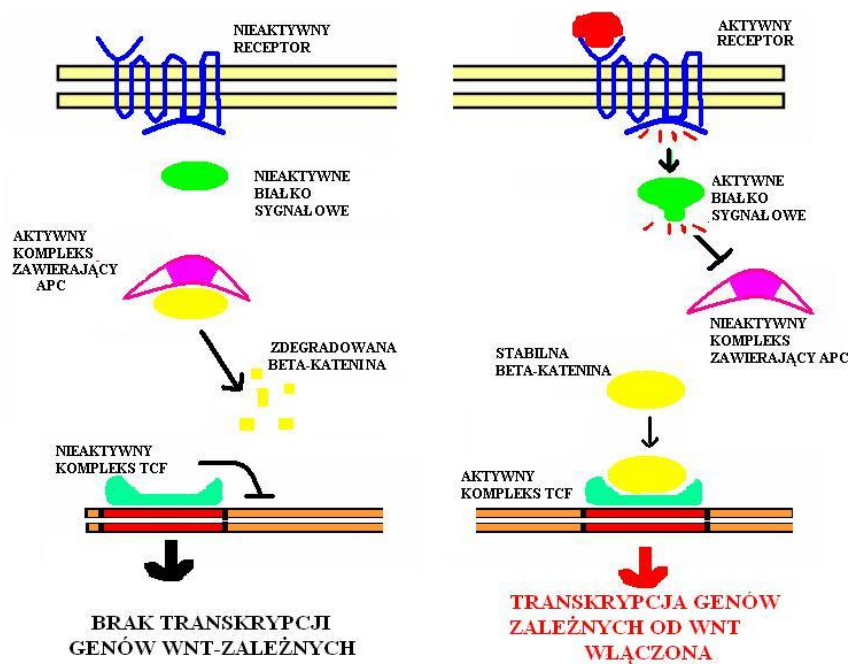
W badaniach nad muszką owocówką *Drosophila sp.* udało się zauważyć, że białko Armadillo występujące u tego gatunku ma podobną sekwencję aminokwasową do ludzkiej β -kateniny. Białko Armadillo było znane z powodu swego znaczenia w szlaku sygnałowym odgrywającym znaczącą rolę w rozwoju osobniczym muszki. Szlak ten jest aktywowany przez cząsteczki sygnałowe należących do rodziny białek Wnt. Pierwszy gen z rodziny Wnt nazwany został *wingless* (ang. bezskrzydły) od fenotypu mutanta. Białka należące do rodziny Wnt łączą się z receptorami błonowymi komórek uruchamiając wewnątrzkomórkową kaskadę sygnałów prowadzących między innymi do aktywacji zestawu genów wpływających na wzrost, podziały komórkowe czy różnicowanie. Mutacja któregośkolwiek białka biorącego udział w kaskadzie sygnałowej prowadzi do wad rozwojowych, które zakłócały podstawowy plan budowy muszki. Jedną z najłagodniejszych mutacji prowadziła do rozwoju much bezskrzydłych (właśnie *wingless*), ale większość mutacji spowodowała śmierć muszek jeszcze w zarodku. Obserwacje u muszek doprowadziły do postawienia tezy, że ludzki homolog β -katenina nie

tylko bierze udział w adhezji komórkowej, ale co ważniejsze w pewien sposób uczestniczy w kontroli ekspresji genów.

Stawiając pierwsze kroki na ścieżce Wnt

Z połączenie nazw pierwszych genów u muszki owocówki- **wingless** i ludzi- **int-1** zapoczątkowało określenie **Wnt**. Sygnał zależny od białek z rodziny Wnt jest przekazywany w komórce poprzez różne ścieżki. Połączenie liganda Wnt z receptorem Fzd prowadzi do aktywacji ścieżek:

- kanonicznej – zależnej od β -kateniny
- niekanonicznej – zależnej od jonów Ca^{2+}
- niekanonicznej – polarnej.



Rysunek 3. Białko APC- wspomagając degradację β -kateniny- utrzymuje szlak sygnałowy Wnt w stanie nieaktywnym w czasie, gdy do komórki nie dociera białko Wnt (strona lewa). W obecności białka Wnt wolna β -katenina występuje w nadmiarze i łączy się z białkiem regulatorowym genów TCF i dochodzi do transkrypcji genów aktywowanych przez Wnt (strona prawa).

Kluczowa rola pewnego białka

Badania szlaku Wnt/ β -katenina przeprowadzone zarówno u kręgowców, jak i bezkręgowców wykazały, że **β -katenina** jest centralnym białkiem tego szlaku. Kaskadowo przekazywany wewnątrzkomórkowy sygnał w każdej z tych ścieżek jest inny, ale punktem wspólnym dla wszystkich trzech jest związanie liganda Wnt z receptorem Frizzled (Fzd).

Aktywacja konkretnej ścieżki zależy od rodzaju liganda Wnt oraz warunków panujących w komórce. Obecnie wykryto 19 ligandów Wnt oraz 10 różnych członków rodziny receptorów Fzd. Konsekwencją tego są liczne odpowiedzi inicjowane oddziaływaniami Wnt-Fzd.

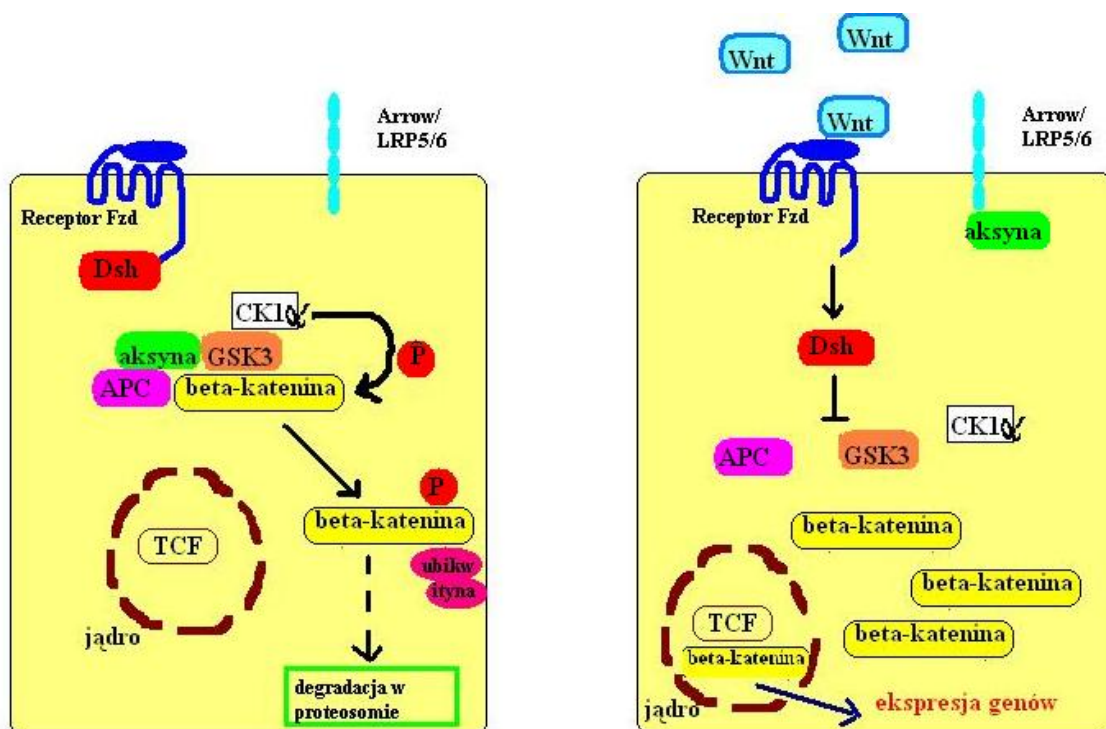
Poszczególne ligandy należące do rodziny Wnt zaklasyfikowano do dwóch grup funkcjonalnych:

1. zawierające glikoproteiny o właściwościach onkogennych (transformujących), do której należą m.in. Wnt-1, Wnt-3A, Wnt-8 oraz Wnt-8B. Białka należące do tej grupy bezpośrednio aktywują ścieżkę związaną z β -kateniną
2. nie wykazujące zdolności transformujących, należą tutaj m.in. Wnt-4, Wnt-5a oraz Wnt-11. Białka te aktywują ścieżkę niekanoniczną oraz działają antagonistycznie wobec białek z pierwszej grupy

Białka Wnt, będące białkami sekrecyjnymi, oprócz wiązania z receptorami Fzd wymagają obecności także innych białek transbłonowych, takich jak LRP5 oraz LRP6 należących do rodziny receptorów LDL (Low-Density Lipoprotein-Receptor Related Proteins), które odpowiadają za działania para- lub autokrynne .

Po związaniu liganda Wnt z Fzd cytoplazmatyczne białko Dishevelled (Dvl) ulega fosforylacji i zostaje przetransportowane do błony komórkowej prawdopodobnie przy udziale fosfolipidów i/lub białek Fzd. W ten sposób następuje aktywacja Dvl, które po związaniu z kompleksem APC-Aksyna hamuje działanie kinazy β syntazy glikogenu (GSK3 β) oraz kinazy kazeiny 1 α (CK1 α). Prowadzi to do zablokowania fosforylacji β -kateniny. Fosforylacja β -kateniny na N-końcu przez GSK3b oraz CK1a jest konieczna do rozpoznania tego białka przez składnik kompleksu ligazy ubikwitynowej E3, która odpowiada za degradację w proteasomach. Natomiast brak fosforylacji β -kateniny prowadzi do jej stabilizacji oraz przetransportowania do jądra, gdzie tworzy kompleksy z czynnikami transkrypcyjnymi Tcf/Lef, co z kolei prowadzi do indukcji ekspresji genów zależnych od Wnt.

Co ważne, β -katenina oddziałuje także z cytoplazmatyczną domeną E-kadheryny, co chroni przed jej fosforylacją i degradacją przez kompleks ligazy ubikwitynowej E3.



Rysunek 4. Nieaktywna ścieżka Wnt (strona lewa) oraz aktywacja ścieżki Wnt rozpoczynająca się od związania liganda Wnt z receptorem Fzd (strona prawa). Szczegółowy opis w tekście.

Alternatywy dla ścieżki kanonicznej

Ścieżka niekanoniczna Wnt zależna od jonów Ca^{2+} przebiega poprzez wewnątrzkomórkowe uwalnianie wapnia pod wpływem liganda. Reguluje ona adhezję i przemieszczanie się komórek niezależnie od β -kateniny. W proces ten zaangażowane są kinaza proteinowa C (PKC) oraz kinaza II zależna od wapnia/kalmoduliny (CamKII). Co może być ciekawe, Wnt-5a, które jest głównym ligandem tej ścieżki działa antagonistycznie do ścieżki kanonicznej Wnt/ β -katenina. Białko Wnt-5a aktywuje kinazę NLK zależną od kinazy MAP, która fosforyluje Tcf i hamuje transkrypcję zależną od Tcf/ β -kateniny. Drugi mechanizm hamowania polega na fosforylacji Dvl przez PKC.

Stosowane terapie działające na szlak Wnt/ β -katenina

Wśród obecnie stosowanych terapii, które niespecyficznie oddziałują na szlak Wnt/ β -katenina wyróżnia się między innymi:

- niesteroidowe leki przeciwzapalne – takie jak aspiryna, sulindac, indometacin. Leki te obniżają ryzyko rozwoju raka piersi i jelita grubego, zwłaszcza u pacjentów z mutacjami APC, ponieważ hamują transkrypcję zależną od β -kateniny i Tcf poprzez fosforylację β -kateniny
- exisulind (Aptosyn®) – należy do selektywnych leków anty-neoplastycznych. Indukuje ekspresję kinazy białkowej G (PKG), która powoduje fosforylację β -kateniny na C-końcu, co prowadzi do jej degradacji bez udziału APC i GSK-3b
- witamina A oraz D- retinoidy – są regulatorami proliferacji i różnicowania. Witamina A hamuje onkogenne działanie AP-1 oraz kompleksu β -kateniny i Tcf poprzez działanie receptora retinoidowego X (RXR), który indukuje degradację tego kompleksu
- endostatyna oraz inne leki antyangiogeniczne wykazują działanie hamujące na szlak Wnt, poprzez aktywację procesu degradacji β -kateniny w proteasomach
- imatinib (Gleevec®) – to inhibitor receptora dla płytkowego czynnika wzrostu (PDGF) oraz kinazy Bcr-Abl. Gleevec stosowany jest powszechnie w leczeniu białaczek, wykazuje także działanie w przypadku nowotworów litych.

Znane są stosowane również działania specyficzne dla ścieżki:

- terapie z użyciem przeciwciał monoklonalnych – które blokują wiązanie Wnt z Fzd i indukują apoptozę jedynie w komórkach nowotworowych
- małowzrasteczkowe inhibitory – mogą hamować wiązanie Wnt do receptorów Fzd lub inhibitory Dvl, jak również związków zwiększających ekspresję naturalnych inhibitorów tego szlaku, tj. WIF-1 czy sFRP

Jaka jest przyszłość badań?

Zainteresowanie inhibitorami szlaku Wnt/ β -katenina wzrasta w wyniku zwiększonej liczby badań wskazujących na istotne znaczenie poszczególnych elementów tego szlaku w patogenezie wielu schorzeń. Biorąc pod uwagę to, że aktywacja β -kateniny jest kluczowym etapem rozwoju wielu chorób, wydaje się, że specyficzna farmakologiczna inhibicja tego szlaku może być skuteczną strategią w walce z nowotworami. Obecnie duże nadzieje wiązane są z wykorzystaniem zjawiska interferencji RNA (RNAi). Wiele badań wskazuje, że zastosowanie siRNA (small interfering RNA) powoduje wyciszenie aktywności β -kateniny oraz innych białek regulujących ten szlak, indukuje apoptozę oraz hamuje proliferację komórek nowotworowych. W fazie badań stosowane są siRNA, wyciszające poszczególne białka szlaku Wnt/ β -katenina, zaś poszczególne rezultaty prowadzą do wniosku, że oddziaływanie siRNA na szlak Wnt/ β -katenina może być skutecznym narzędziem w walce z nowotworami.

Szlak mTOR

- mTOR = Mammalian target of rapamycin – kinaza białkowa treoninowo-serynowa
- Istnieje w postaci kompleksu C1 i C2. Kompleks C2 aktywuje kinazę Akt.
- Reguluje wzrost, proliferację i ruch komórki oraz translację i transkrypcję
- Działa poprzez szlak insulinowy i insulinopodobny
- Jest sensorem komórkowego poziomu ATP
- Inhibitory kinazy mTOR to **ewerolimus** i **temsylolimus**
- **Ewerolimus**: dopuszczony w Polsce w programie lekowym leczenia raka wątrobowokomórkowego i raka nerki

Kinaza mTOR (źródło Wikipedia z małymi modyfikacjami)

Kinaza mTOR, tzw. ssaczy cel rapamycyny (ang. mammalian target of rapamycin kinase; inne nazwy: FKBP12-rapamycin complex associated protein 1; FRAP1) – kinaza białkowa treoninowo-serynowa, której funkcją jest regulacja wzrostu, proliferacji i ruchu komórki, a także procesów translacji i transkrypcji.

Kinaza mTOR integruje także wiele szlaków sygnalizacyjnych komórki, w tym szlak insulinowy i czynników wzrostu, jak insulinopodobny czynnik wzrostu 1 i 2, oraz szlak mitogenów. mTOR funkcjonuje również jako sensor komórkowego poziomu związków energetycznych, poziomu ATP i stanu redoks. Dysregulacja szlaku kinazy mTOR może być czynnikiem patogenezy różnych chorób człowieka, zwłaszcza nowotworów. Rapamycyna jest otrzymanym z bakterii białkiem, które hamuje kinazę mTOR przez związanie się z wewnątrzkomórkowym receptorem FKBP12. Kompleks FKBP12-rapamycyna wiąże się bezpośrednio do domeny wiążącej cząsteczki kinazy mTOR, zwanej domeną FRB (FKBP12-rapamycin binding).

Kinaza mTOR funkcjonuje jako katalityczna podjednostka w dwóch różnych kompleksach białkowych, mTORC1 i mTORC2.

Inhibitory kinazy mTOR używane są w transplantologii jako leki immunosupresyjne, zapobiegające odrzuceniu przeszczepu. Prowadzone są również badania kliniczne nad ich wykorzystaniem w terapii nowotworów i stwardnienia guzowatego.

mTORC1

Kompleks 1 kinazy mTOR (mTORC1) składa się z kinazy mTOR, białka raptor (ang. regulatory associated protein of mTOR), i białka mLST8/GβL (mammalian LST8/G-protein β-subunit like protein). Kompleksowi temu przypisuje się funkcję komórkowego sensora związków energetycznych-ATP-stanu redoks i funkcję regulowania syntezy białek. Aktywność kompleksu mTORC1 jest stymulowana przez insulinę, czynniki wzrostu, czynniki osoczowe, kwas fosfatydylowy, aminokwasy (zwłaszcza leucynę) i stres oksydacyjny.

mTORC1 jest hamowany przez niski poziom związków energetycznych w komórce, niski poziom czynników wzrostu, niski potencjał redoks komórki, kofeinę, rapamycynę, kwas farnezyliotiosalicylowy (FTS) i kurkuminę. Dwoma najlepiej scharakteryzowanymi

substratami kompleksu mTORC1 są kinaza p70-S6 (S6K1) i białko wiążące eukariotyczny czynnik inicjacji translacji 4E (eIF4E binding protein 1, 4E-BP1).

mTORC1 fosforyluje S6K1 na przynajmniej dwóch resztach aminokwasowych, z których najbardziej kluczowa jest fosforylacja reszty treoninowej T389. Reakcja ta stymuluje następnie fosforylację białka S6K1 przez kinazę PDK1. Aktywowana kinaza S6K1 może wtedy stymulować inicjację syntezy białek przez fosforylację rybosomalnego białka S6 i innych białek biorących udział w translacji mRNA. S6K1 może też brać udział w pętli dodatniego sprzężenia zwrotnego, fosforylując cząsteczkę kinazy mTOR w miejscach jej reszt treoninowej T2446 i serynowej S2448, znajdujących się w regulatorowej domenie kinazy mTOR; wydaje się, że fosforylacja ta zwiększa aktywność enzymu.

mTORC1 fosforyluje przynajmniej cztery reszty aminokwasowe białka 4E-BP1 w hierarchicznym porządku. Niefosforylowane białko 4E-BP1 wiąże się silnie z czynnikiem inicjacji transkrypcji eIF4E, zapobiegając jego związaniu do kapu przy 5'-końcu mRNA i rekrutacji do rybosomalnego kompleksu inicjacyjnego. Wskutek fosforylacji przez mTORC1 4E-BP1 uwalnia białko eIF4E, które może wtedy pełnić swoje funkcje w komórce, co prowadzi do inicjacji translacji. Wydaje się, że aktywność mTORC1 jest regulowana przez dynamiczne interakcje między kinazą mTOR i białkiem raptor, w których pośredniczy białko GβL. Raptor i kinaza mTOR są związane silnym oddziaływaniem blisko N-końca i słabszym bliżej C-końca, w pobliżu domeny o aktywności enzymatycznej białka mTOR. Kiedy przekazany jest sygnał stymulujący kinazę mTOR, taki jak wysoki poziom ATP w komórce, wiązanie bliżej C-końca ulega osłabieniu i, prawdopodobnie, całkiem zanika, co uwalnia domenę o aktywności kinazy i pozwala białku mTOR na jego enzymatyczne działania. W przypadku negatywnego sygnału, takiego jak niski poziom składników odżywczych w komórce, wiązanie mTOR-raptor bliżej C-końca staje się silniejsze, wyłączając aktywność kinazową białka mTOR.

mTORC2

Kompleks mTORC2 składa się z kinazy mTOR, białka rictor (ang. rapamycin-insensitive companion of mTOR), białka GβL, i białka związanego z aktywowaną stresem kinazą białkową ssaków 1 (mammalian stress-activated protein kinase interacting protein 1, mSIN1). Wykazano, że mTORC2 funkcjonuje jako istotny czynnik regulujący funkcje cytoszkieletu komórki, przez interakcje z białkami F-aktyną, paksyliną, RhoA, Rac1, Cdc42 i kinazą białkową Cα (PKCα). Wykazano także, że mTORC2 działa jak 'kinaza białkowa D' (PDK2), fosforylując resztę serynową S473 kinazy białkowej serynowo-treoninowej Akt/PKB. Reakcja ta stymuluje fosforylację Akt przez PDK1 na reszcie treoninowej T308 i prowadzi do pełnego uaktywnienia kinazy Akt.

mTORC2 jest najprawdopodobniej regulowany przez insulinę, czynniki wzrostu, czynniki osocza, i poziom związków odżywczych. Początkowo uważano, że aktywność kompleksu mTORC2 jest niewrażliwa na rapamycynę, ponieważ ekspozycja na duże stężenia rapamycyny nie wpływała na proces fosforylacji kinazy Akt. Jednakże dalsze badania wykazały, że przy przewlekłym działaniu rapamycyny co prawda nie wpływa ona na funkcjonowanie kompleksu mTORC2, ale wiąże się do wolnych cząsteczek kinazy mTOR, co uniemożliwia tworzenie się nowych kompleksów mTORC2. Wykazano też, że kurkumina może hamować zależną od mTORC2 fosforylację kinazy Akt w miejscu reszty serynowej S473, z następczym brakiem fosforylacji zależnej od PKD1 na reszcie treoniny T308.

Inhibitory mTOR jako leki

Inhibitory kinazy mTOR są używane jako leki immunosupresyjne w transplantologii. Podjęto również pierwsze próby kliniczne zastosowania ich w terapii nowotworów i stwardnienia guzowego. Sugerowano również użycie inhibitorów mTOR w leczeniu chorób nowotworowych spowodowanych mutacją w genie PTEN: choroby Lhermitte'a-Duclosa i glejaka wielopostaciowego.

Inhibitorami kinazy mTOR o udowodnionej skuteczności klinicznej w onkologii, są ewerolimus i temsyrolimus.

Ewerolimus jest refundowany przez NFZ w ramach programów lekowych "Leczenie raka wątrobokomórkowego i "Leczenie raka nerki.

Szlaki związane z receptorami wzrostu

HER2 jest przezbłonowym receptorem o aktywności kinazy tyrozynowej. Aktywuje w kom PI3K/Akt, oraz MAPK. Blokowanie HER2 powoduje blok w fazie G1, zmniejszenie angiogenezy i indukcję limfocytów cytotoksycznych.

Herceptyna = trastuzumab rekombinowane, humanizowane przeciwciało monoklonalne IgG1, łączące się wybiórczo z receptorem ludzkiego naskórkowego czynnika wzrostu typu 2 (Human Growth Factor Receptor – HER2). Preparat jest stosowany do leczenia przypadków **raka piersi** i raka piersi z przerzutami, w których stwierdzono **nadekspresję HER2**. W kombinacji z innymi chemoterapeutykami istotnie zmniejsza ryzyko nawrotu choroby i stopień odpowiedzi na leczenie. Objawy niepożądane zastosowania herceptyny: zaburzenia rytmu serca i kardiomiopatia, toksyczna nekroliza naskórka. Objawy grypopodobne

Przeciwciała i drobnocząsteczkowe leki stosowane w terapiach celowanych

Imatinib (Gleevec) – małowcząsteczkowy inhibitor receptorowej kinazy tyrozynowej zwł skuteczny w komórkach z mutacją BCL/ABL (tzw. chromosomem Filadelfia).

Bortezomib, carfilzomib – inhibitory proteasomów stosowane w leczeniu szpiczaka mnogiego również w Polsce

Anakinra antagonistą receptora dla IL-1 w leczeniu reumatoidalnego zapalenia stawów (RZS)

Modulatory szlaku TNF (RZS, nieswoiste zapalenia jelit, łuszczyca):

Abatacept T-cell costimulation modulator

Adalimumab TNF- α inhibitor

Certolizumab TNF- α inhibitor

Etanercept TNF- α inhibitor

Golimumab TNF- α inhibitor

Infliximab TNF- α inhibitor

Rituximab AB Anti-CD 20 w leczeniu rozrostu limfocytów zawierających CD20 (chłoniaki nie Hodgkinowskie), RZS, rozrostu limfocytów B

Tocilizumab antagonistą receptora dla IL-6

Tofacitinib Denosumab	Inhibitor kinazy Janusowej, doustny anty RANK-L Ab w leczeniu RZS z osteolizą, w leczeniu osteoporozy, wspomagająco przy przerzutach do kości i bólach kostnych
Sorafenib Vemurafeinib Everolimus	inh. Wielu kinaz, inhibitor angiogenezy inh bRAF w leczeniu czerniaka inh. mTOR w leczeniu raka wątrobowokomórkowego i raka nerki
Talidomid	stosowany w leczeniu trądu i szpiczaka mnogiego

Instrukcja klasyfikacji leków biologicznych:

W zależności od procentowego udziału białka ludzkiego w budowie przeciwciała jego nazwa przyjmuje odpowiednią końcówkę. I tak:

- -momab (białko mysie, np. tositumomab),
- -symab (ximab – Ang) (białko chimeryczne zawierające 50-90% białka ludzkiego, np. cetuksymab),
- -zumab (ponad 90% białka ludzkiego, np. trastuzumab).
- -mumab (ponad 100% białka ludzkiego, np. adalimumab).
- -cept (białko fuzyjne zawierające np. fragment receptora dla danego ligandu, np. etanercept).

Nazwy drobnocząsteczkowych inhibitorów kinaz zawierają końcówkę

- --nib (np. erlotynib, imatynib).

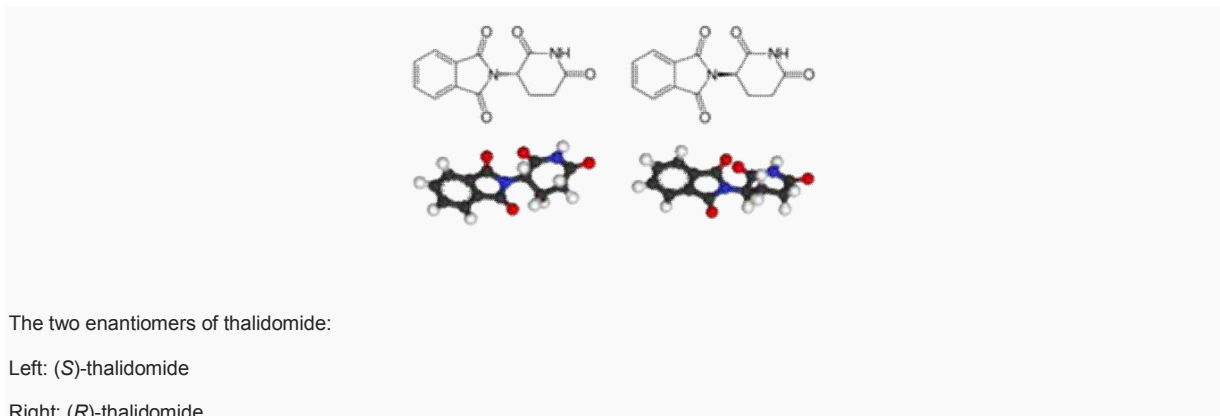
DLA ZAINTERESOWANYCH - CIEKAWOSTKI

THALIDOMIDE:

The precise mechanism of action for thalidomide is unknown, but possible mechanisms include anti-angiogenic and oxidative stress-inducing effects.^[22] It also inhibits [TNF- \$\alpha\$](#) , [IL-6](#), [IL-10](#) and [IL-12](#) production,^[23] modulates the production of [IFN- \$\gamma\$](#) ^[23] and enhances the production of [IL-2](#), [IL-4](#) and [IL-5](#) by immune cells.^[23] It increases lymphocyte count, costimulates T cells and modulates [natural killer cell](#) cytotoxicity.^[23] It also inhibits [NF- \$\kappa\$ B](#) and [COX-2](#) activity.^[22]

In 1990, a group of researchers in Brazil noted that [TNF alpha](#) levels went up in leprosy reactional states and observed that TNF levels decreased in some patients on treatment with thalidomide, hence potentially explaining the efficacy of thalidomide in treating ENL.^[24]

The mechanism of thalidomide's [teratogenic](#) action has led to over 2000 research papers and the proposal of 15 or 16 plausible mechanisms.^[25] [Angiogenesis](#) is critical during limb development of the foetus. Thalidomide can directly inhibit angiogenesis induced by bFGF or VEGF *in vivo*.^[26] Teratogenic analogs inhibit angiogenesis whereas nonteratogenic analogs do not inhibit angiogenesis.^[26] In 2009, research by other groups confirmed "conclusively that loss of newly formed blood vessels is the primary cause of thalidomide teratogenesis, and developing limbs are particularly susceptible because of their relatively immature, highly angiogenic vessel network".^{[27][28]}



Thalidomide is [racemic](#); the individual enantiomers can [racemize](#) due to the acidic hydrogen at the [chiral centre](#), which is the carbon of the glutarimide ring bonded to the phthalimide substituent. The racemization process can occur *in vivo*^{[1][29][30][31]} so that any plan to administer a purified single enantiomer to avoid the teratogenic effects will most likely be in vain.^{[30][32][33]}

HYDROKSYMOCZNIK

Hydroxycarbamide decreases the production of [deoxyribonucleotides](#)^[13] via inhibition of the enzyme [ribonucleotide reductase](#) by scavenging tyrosyl free radicals as they are involved in the reduction NDPs.^[12]

In the treatment of [sickle-cell disease](#), hydroxycarbamide increases the concentration of [fetal hemoglobin](#). The precise mechanism of action is not yet clear, but it appears that hydroxycarbamide increases [nitric oxide](#) levels, causing soluble [guanylyl cyclase](#) activation with a resultant rise in [cyclic GMP](#), and the activation of gamma globin chain synthesis necessary for [fetal hemoglobin](#) production (which inhibits the formation of sickle hemoglobin aggregates). A few red cell clones called F cells are progeny of a small pool of immature committed erythroid precursors (BFU-e) that retain the ability to produce HbF.^{[12][14]}