INHIBITORY SZLAKU PI3K-Akt/PKB-mTOR W LECZENIU GLEJAKÓW

INHIBITORS OF PI3K-Akt/PKB-mTOR PATHWAY IN GLIOMA THERAPY

Joanna JAKUBOWICZ-GIL

Zakład Anatomii Porównawczej i Antropologii, UMCS, Lublin

Streszczenie: Glejak wielopostaciowy – GBM (łac. *glioblastoma multiforme*) jest nowotworem złośliwym, wywodzącym się z tkanki glejowej. Średnia długość przeżycia pacjentów z tym typem nowotworu, leczonych operacyjnie i poddanych radioterapii, wynosi około 1 roku. Wysoka inwazyjność glejaka wielopostaciowego wynika z nieprawidłowego przekazywania sygnałów poprzez wewnątrzkomórkowy szlak związany z kinazami PI3K, Akt/PKB i mTOR, które odpowiadają za regulację proliferacji, różnicowania i przeżywania komórek. Mutacje genów kodujących wspomniane enzymy prowadzą do zwiększenia ich aktywności, powodując wzrost oporności na chemioterapię. W pracy opisano przebieg szlaku PI3K-Akt/PKB-mTOR w komórkach glejaka. Scharakteryzowano również związki blokujące ten szlak oraz ich potencjalne zastosowanie w terapii przeciwnowotworowej.

Słowa kluczowe: PI3K, Akt/PKB, mTOR, glejaki.

Summary: Glioblastoma multiforme (GBM) is the most frequent malignant tumor derived from glial cells. Median survival with this type of tumor is about 1 year after surgical resection followed by radiotherapy. High invasiveness of GBM is the result of improper signal transduction through the intracellular pathway involving PI3K, Akt/PKB and mTOR, kinases responsible for the regulation of proliferation, differentiation and survival. Mutations in genes encoding mentioned enzymes lead to the increased activity of kinases and to increased cell survival after chemotherapy. In this article, the function of mentioned kinases in GBM cells has been described, as well as specific inhibitors of these enzymes and their potential usefulness in cancer therapy.

Key words: PI3K, Akt/PKB, mTOR, gliomas.

WSTĘP

Glejaki (łac. *glioma*) stanowią grupę nowotworów centralnego układu nerwowego wywodzących się z komórek glejowych, będących zrębem tkanki nerwowej i pełniących funkcje podporowe i odżywcze wobec neuronów [1,41].

TABELA 1. Klasyfikacja glejaków wg WHO

Stopień zaawan-sowania	Przykłady schorzeń nowotworowych
I	– gwiaździak włoskowatokomórkowy (in. gąbczak, łac.*astrocytoma ilocyticum seu spongioblastoma*) – podwyściółczak (łac. *subependymoma*) – wyściółczak śluzowobrodawkowaty (łac. *ependymoma myxopapillomatosum*
II	– gwiaździak włókienkowaty (łac.*astocytoma fibrillare*) – gwiaździak tucznokomórkowy (łac. *astrocytoma gemistocyticum*) – skąpodrzewiak (łac. *oligodendroglioma*) – wyściółczak (łac. *ependymoma*)
III	– gwiaździak anaplastyczny (łac. *astrocytoma anaplasticum*) – wyściółczak anaplastyczny (łac. *ependymoma anaplasticum*) – skąpodrzewiak anaplastyczny (łac. *oligodendroglioma anaplasticum*)
IV	– glejak wielopostaciowy (łac. *glioblastoma multiforme)*

Ze względu na stopień złośliwości, glejaki zostały sklasyfikowane (tab. 1) przez Światową Organizację Zdrowia (WHO) w czterostopniowej skali od najłagodniejszych (I) do najbardziej złośliwych (IV) [27].

Glejak wielopostaciowy jest najczęstszym (ok. 50%) złośliwym nowotworem, wywodzącym się z tkanki glejowej. Rośnie najczęściej w płacie czołowym i skroniowym mózgu. Średnia długość przeżycia pacjentów z tym typem nowotworu wynosi około 1 roku przy standardowym leczeniu, czyli operacyjnym usuwaniu guza i radioterapii. Tylko 3–5% pacjentów przeżywa dłużej niż 3 lata [29].

Pomimo ogromnego postępu w rozwoju technik chirurgicznych oraz radio- i chemioterapii leczenie glejaków jest niezwykle trudne i umożliwia jedynie przedłużenie życia pacjentów o kilka miesięcy. Wysoka inwazyjność glejaków wynika ze zdolności rozproszonego, tzw. dyfuzyjnego przenikania komórek nowotworowych pomiędzy prawidłowe komórki mózgu, co uniemożliwia całkowite chirurgiczne usunięcie. Problem oporności glejaków na leczenie należy również rozpatrywać na poziomie molekularnym. Zaobserwowano bowiem szereg nieprawidłowości w funkcjonowaniu wewnątrzkomórkowych szlaków przekazywania sygnałów od błony komórkowej do jądra komórkowego. W komórkach glejaka wykryto szereg mutacji w obrębie genów kodujących kinazy PI3K, Akt/PKB i mTOR, czyli białek wchodzących w skład jednego z ważniejszych szlaków odpowiadających za regulację proliferacji, różnicowania i przeżywania komórek. Dlatego też związki hamujące przekazywanie sygnałów przez ten szlak są często brane pod uwagę jako potencjalne leki przeciwnowotworowe [6,22,30,48].

W niniejszej pracy opisano przebieg szlaku przekazywania sygnałów poprzez PI3K, Akt/PKB i mTOR w komórkach glejaka. Scharakteryzowano również związki blokujące ten szlak oraz ich potencjalne, praktyczne zastosowanie w terapii przeciwnowotworowej.

KINAZA 3-FOSFATYDYLOINOZYTOLU (PI3K)

PI3K (ang. *phosphatidyl-inositol 3-kinases*) stanowią rodzinę lipidowych kinaz, mających zdolność fosforylowania grupy hydroksylowej w pozycji 3 pierścienia fosfatydyloinozytolu

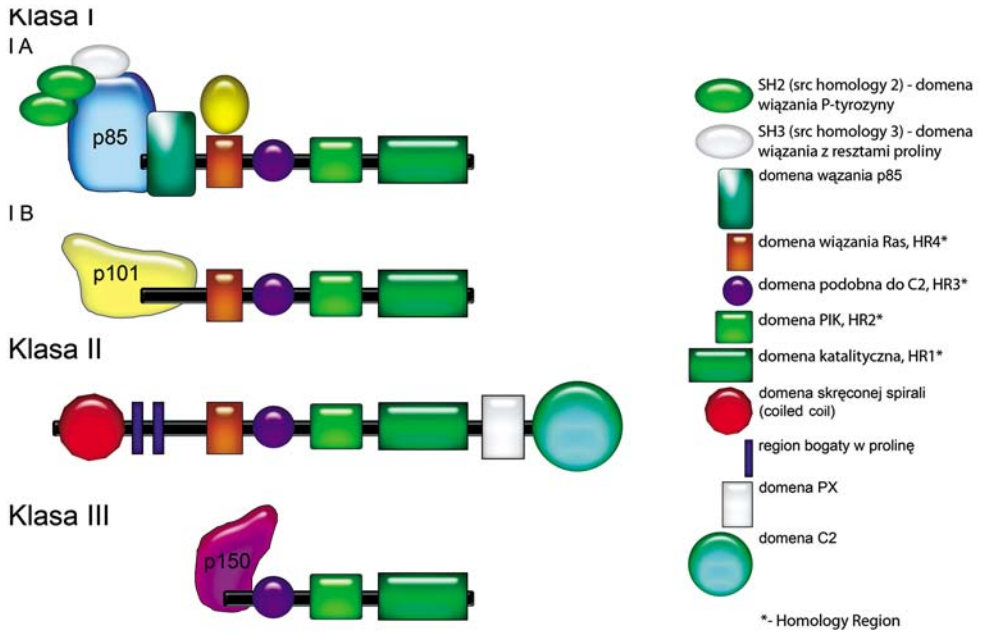
(PtdIns) [11,23,49]. Są to heterodimery złożone z podjednostki katalitycznej i regulatorowej. Wyodrębniono 8 różnych izoform enzymu odpowiadających 8 różnym podjednostkom katalitycznym. Ze względu na budowę, specyficzność wobec lipidowego substratu oraz rodzaj podjednostek regulatorowych kinazy PI3K podzielono na 3 klasy [8,13,35,55] [ryc. 1, tab. 2].

TABELA 2. Klasyfikacja kinaz PI3K ze względu na rodzaj podjednostki katalitycznej regulatorowej

Klasy	Podjednostka katalityczna	Podjednostka regulatorowa	Rodzaj substratu
I A I B	p110α p110β p110δ	p85s (p85α,p85β, p55α, p55γ, p50α)	PtdIns PtdIns(4)P PtdIns(4,5)P_2
	p110γ	p101	
II	PI3K-C2α PI3K-C2β PI3K-C2γ	brak	PtdIns PtdIns(4)P
III	Vps34*	Vps15* (p150)	PtdIns

(*ang. *Vacuolar Protein Sorting*)

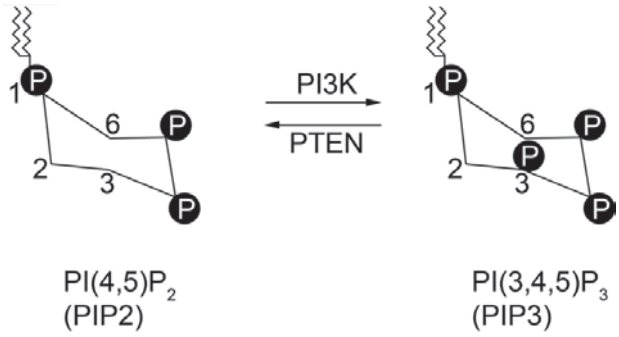
Jedną z przyczyn transformacji nowotworowej są mutacje w obrębie genów kodujących podjednostki katalityczne i regulatorowe PI3K. Dla nowotworów mózgu charakterystyczne są mutacje określane jako E542K i E545G w obrębie egzonu 9 oraz mutacja H1047R w obrębie egzonu 20 genu *PIK3CA*, kodującym katalityczną podjednostkę 110α klasy IA. Podjednostka katalityczna 110α będąca produktem genu z mutacją H1047R wykazuje większą aktywność w porównaniu z prawidłową formą białka bez mutacji (*wild type 110α*) [25,50].



RYCINA 1. Schemat budowy podjednostkowej PI3K należących do klas I, II i III

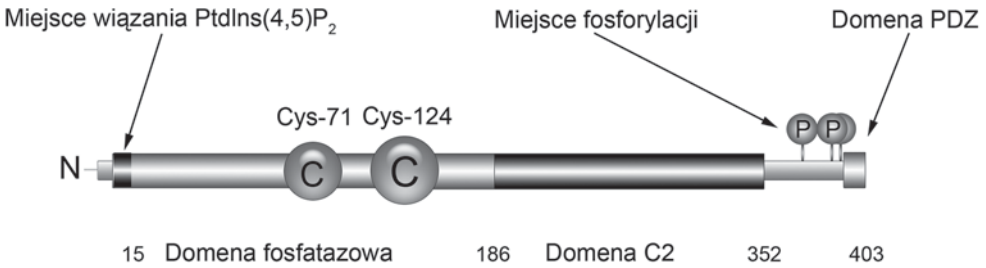
PTEN

PTEN (ang. *phosphate and tensin homolog deleted on chromosome 10*), inaczej MMAC1 (ang. *mutated in multiple advanced cancers*) lub TEP1 (ang. *TGFβ-regulated and epithelial-cell-enriched phosphatase*) jest fosfatazą fosfatydyloinozytolu specyficzną w stosunku do reszty fosforanowej w pozycji 3 pierścienia inozytolowego [ryc. 2]. Najważniejszym substratem jest PtdIns(3,4,5)P_3. PTEN może również defosforylować PtdIns(3)P, PtdIns(3,4)P_2 oraz białka zawierające ufosforylowaną tyrozynę np. FAK (ang. *focal adhesion kinase*). Kluczową rolę w regulacji aktywności enzymu oraz stabilności cząsteczki PTEN odgrywają trzy potencjalne miejsca fosforylacji zlokalizowane na końcu C: seryna w pozycji 380 (S380) oraz dwie treoniny (T383 i T382) [ryc. 3]. Defosforylacja wspomnianych miejsc prowadzi do zwiększenia aktywności fosfatazy i obniżenia ilości PtdIns(3,4,5)P_3 w komórce. PTEN działa antagonistycznie w stosunku do PI3K. Obniżając poziom PtdIns(3,4,5)P_3, PTEN hamuje aktywność Akt/PKB i tym samym zwiększa podatność komórek na apoptozę [31].



RYCINA 2. Reakcje fosforylacji dwufosfatydyloinozytolu (PtdIns(4,5)P_2) i defosforylacji trójfosfatydyloinozytolu (PtdIns(3,4,5)P_3) katalizowane przez PI3K oraz PTEN

W komórkach piramidowych hipokampa, komórkach Purkiniego, komórkach opuszki węchowej, PTEN zlokalizowany jest w cytoplazmie i jądrze komórkowym. Nawet minimalne obniżenie poziomu fosfatazy w komórkach nerwowych uniemożliwia prawidłowy przebieg wewnątrzkomórkowych procesów metabolicznych i prowadzi do zaburzeń w



RYCINA 3. Struktura białka PTEN, wyróżniono 4 domeny: domena fosfatazowa wiążąca PtdIns(4,5)P_2, obejmująca dwie reszty cysteiny (Cys71, Cys124); domena C2 umożliwiająca wiązanie PTEN z fosfolipidami błony komórkowej; domena PDZ (ang. *postsynaptic-density-95/disc-large/ZO1 homology*) warunkująca prawidłowy przebieg interakcji pomiędzy PTEN a PKB; P – miejsca fosforylacji: seryna w pozycji 380 (S380) oraz dwie treoniny (T383 i T382) [wg 31]

funkcjonowaniu neuronów. Doświadczenia na myszach *PTEN* $^{+/-}$ wykazały dezorganizację struktury mózgu, związaną najprawdopodobniej ze wzmożoną migracją komórek w obrębie tkanki mózgowej. Zaobserwowano również większe rozmiary neuronów. Inne fosfatazy PtdIns obecne w mózgu nie są w stanie zrekompensować utraty choćby jednej kopii *PTEN* [31,54]. PTEN jest bardzo ważnym supresorem glejaków. Mutacje w obrębie genu *PTEN* obserwuje się w około 76% przypadków nowotworu [14]. Prowadzą również do choroby Cowdena, syndromu Bannayan-Zonana, choroby Lhermitte-Duclosa [31].

Akt/ PKB

Kinaza serynowo-treoninowa Akt/ PKB (ang. *protein kinase B*) należy do grupy kinaz AGC, zależnych od wtórnych przekaźników. Aktywacja Akt/PKB uzależniona jest od obecności PtdIns(3,4,5)P_3, wtórnego przekaźnika związanego z błoną komórkową [10].

U człowieka zidentyfikowano 3 geny kodujące 3 izoformy Akt/PKB:

– PKBα (Akt1, gen *Akt1*, chromosom 14q32) – występuje głównie w mózgu, sercu i płucach,
– PKBβ (Akt2, gen *Akt2*, chromosom 19q13.1-13.2) – ulega ekspresji w mięśniach szkieletowych,
– PKBγ (Akt3, gen *Akt3*, chromosom 1q44) – zlokalizowana w mózgu, sercu i nerkach embrionów.

Zidentyfikowano 2 dodatkowe warianty enzymu, różniące się od wymienionych specyficzną budową C-końca, a mianowicie: PKBβ1 zawierający dodatkowy, 40-aminokwasowy fragment C-końcowy oraz PKBγ1 mający krótszą domenę regulatorową oraz dodatkowy 20-aminokwasowy fragment C-końcowy [14,18,21] (ryc. 4).

Nieaktywny enzym zlokalizowany jest na terenie cytoplazmy w formie trwałego kompleksu z p38MAPK, MAPKAPK-2 oraz Hsp27 (ang. *heat shock protein*).

RYCINA 4. Struktura izoform kinazy Akt/PKB z uwzględnieniem N-końcowej domeny PH odpowiedzialnej za swoiste wiązanie PtdIns(3,4,5)P_3 centralnie położonej domeny katalitycznej i C-końcowej domeny regulatorowej z zaznaczonymi miejscami fosforylacji niezbędnymi do aktywacji enzymu: treonina (T308) oraz seryna (S473) [wg 18]

Nagromadzenie PtdIns(3,4,5)P_3 powoduje przemieszczenie kompleksu enzymatycznego kinazy Akt/PKB do błony komórkowej, w czym pośredniczy domena PH, ułatwiając interakcję z substratem. Pod wpływem PtdIns(3,4,5)P_3 domena PH Akt/PKB ulega konformacyjnym zmianom, co prowadzi do odsłonięcia treoniny w pozycji 308. To z kolei ułatwia dostęp do domeny katalitycznej błonowej kinazie PDK1, odpowiedzialnej za fosforylację T308, w wyniku czego dochodzi do częściowej aktywacji Akt/PKB. Zmiany konformacyjne zachodzące w Akt/PKB pod wpływem PtdIns(3,4,5)P_3 powodują również przesuwanie MAPKAPK-2 w sąsiedztwo seryny 473 oraz jej fosforylację. MAPKAPK-2 nie jest jedynym enzymem fosforylującym S473. Przypuszcza się, że za przyłączanie reszt fosforanowych do wspomnianej seryny odpowiadają również kinazy: ILK (ang. *integrin linker kinase*), PDK2 oraz DNA-PK (ang. *DNA dependent kinase*). Do fosforylacji S473 niezbędne jest białko mTOR zasocjowanie z białkiem Rictor [14,21,44]. Po ufosforylowaniu T308 i S473 i tym samym aktywacji Akt/PKB następuje fosforylacja Hsp27 i jego oddysocjowanie od kompleksu enzymatycznego. Uwolniona kinaza przemieszcza się do cytoplazmy i jądra, gdzie wiąże się z odpowiednimi substratami, zawierającymi specyficzną sekwencję: R-x-R-x-x-(S/T)-Hyd, gdzie R oznacza aminokwas zasadowy, natomiast Hyd – aminokwas hydrofobowy [2,10,21,40].

Akt/PKB pełni w komórkach funkcję anty-apoptotyczną oraz pro-nowotworową. Wzmożoną ekspresję Akt/PKB zaobserwowano m.in. w nowotworach jajników, piersi, prostaty i trzustki. W komórkach glejaków ze zmutowanym *PTEN* i/lub *PI3K* obserwuje się stałą fosforylację Akt/PKB i tym samym aktywację enzymu. Towarzyszy temu zwiększenie oporności komórek na induktory apoptozy [25]. PKB pobudza angiogenezę poprzez fosforylację i aktywację nabłonkowej syntazy NO [21].

Mechanizm hamowania apoptozy przez Akt/PKB jest bardzo złożony i wiąże się fosforylacją szeregu białek na różnych poziomach szlaku przekazywania sygnałów inicjujących zaprogramowaną śmierć. Głównym fizjologicznym substratem fosforylacji Akt/PKB jest pro-apoptotyczne białko BAD należące do rodziny białek Bcl-2. Białko to wiążąc się z Bcl-xL w zewnętrznej błonie mitochondrialnej, uczestniczy w uwalnianiu cytochromu c z mitochondrium do cytozolu. Akt/PKB, fosforylując BAD w pozycji S136, promuje wiązanie BAD z cytoplazmatycznym białkiem 14-3-3, co w konsekwencji prowadzi do zahamowania apoptozy. Akt/PKB może również wiązać się z kaspazą 9 i blokować jej aktywność poprzez fosforylację w pozycji S196. Kinaza uczestniczy w inaktywacji genów śmierci poprzez fosforylowanie czynników transkrypcyjnych należących do rodziny Forkhead oraz zwiększa ekspresję anty-apoptotycznych genów, takich jak *BCL-2* czy *mcl-1*, aktywując białko CREB (ang. *cyclic AMP-response element binding protein*). Akt/PKB promuje destabilizację i degradację p53, zwiększając tym samym oporność komórek nowotworowych na indukcję zaprogramowanej śmierci [21]. Anty-apoptotyczna funkcja Akt/PKB ma również związek ze wspomnianą wcześniej fosforylacją i oddysocjowaniem Hsp27 od kompleksu enzymatycznego. Uwolnione białko Hsp27 rozpoczyna swoją niezależną aktywność anty-apoptotyczną poprzez inaktywację kaspazy 3 i 9 oraz hamowanie uwalniania cytochromu C z mitochondriów. Akt/PKB i Hsp27 tworzą więc synergistyczny układ, w którym Hsp27 stabilizuje Akt/PKB i ułatwia jej

aktywację, natomiast Akt/PKB aktywuje białko szoku cieplnego [2,40]. Białkiem stabilizującym cząsteczkę Akt/PKB jest również Hsp90. Zahamowanie aktywności Hsp90 przez specyficzny inhibitor geldanamycynę oraz jej pochodne, powoduje indukcję apoptozy w komórkach nowotworowych m.in. przez degradację Akt/PKB. Obniżenie poziomu Akt/PKB inicjuje zależne od Bax uwalnianie cytochromu c z mitochondrium [2,3,15]. Białko szoku Hsp70 nie uczestniczy w stabilizowaniu cząsteczki Akt/PKB, jest natomiast substratem dla aktywnego już enzymu. Nadekspresji Akt/PKB w neuronach towarzyszy wzrost ilości Hsp70, co sugeruje, że aktywacja Akt/PKB uruchamia w komórkach nerwowych odpowiedź stresową poprzez podwyższanie ekspresji białka szoku cieplnego 70. Komórki mające wysoki poziom Hsp70 są mniej wrażliwe na indukcję apoptozy [32].

mTOR

mTOR (ang. *mammalian target of rapamycin*), inaczej FRAP (ang. *FKBP-12/ rapamycin-associated protein*) lub RAFT1 (ang. *rapamycin and KKBP-12 target 1*) lub RAPT (ang. *rapamycin target 1*) jest kinazą serynowo-treoninową o masie 289 kDa. Gen zlokalizowany jest na chromosomie 1p36.2. Należy do rodziny kinaz spokrewnionych z PI3K [4,46,53] (ryc. 5).

mTOR funkcjonuje jako ważny przełącznik między katabolizmem a anabolizmem. Aktywuje biogenezę rybosomów, pobudza szlak przekazywania sygnałów wewnątrzkomórkowych z udziałem PKC. mTOR, wiążąc się z białkiem Raptor tworzy kompleks mTORC1, który inicjuje translację poprzez fosforylację i aktywację kinazy S6Kp70^{S6k} (kinaza serynowo-treoninowa fosforylująca rybosomowe białko S6). Równolegle fosforyluje i blokuje białko inhibitorowe eukariotycznego czynnika eIF-4E (4E-BP1) [4,16,17,19,26,56]. mTOR w połączeniu z białkiem Rictor (kompleks mTORC2) uczestniczy w fosforylacji i aktywacji Akt/PKB [39,43,44]. Zahamowanie aktywności mTOR przez specyficzny inhibitor – rapamycynę prowadzi do indukcji autofagii w komórkach glejaków [24]. Zablokowanie mTOR w komórkach

RYCINA 5. Rozmieszczenie domen HEAT, FAT, FRB, FATC oraz domeny katalitycznej w obrębie cząsteczki mTOR: motyw HEAT odpowiada za prawidłowe interakcje białko-białko w wielobiałkowych kompleksach, domena FAT (ang. *focal adhesion targeting region*) odgrywa ważną rolę w oddziaływaniach białko-białko lub pełni funkcję białka szkieletowego (ang. *scaffold protein*), domena FRB (ang. *FKBP-rapamycin binding*) jest miejscem wiązania kompleksu rapamycyny i FKBP (ang. *FK506 binding protein*), sekwencja FATC (FRAP, ATM, TRRAP, C-terminal) na końcu C reguluje aktywności katalityczną kinazy [wg 53]

astrocytoma powoduje apoptozę komórek nowotworowych oraz przekształcenie pozostałych komórek w komórki oligodendroglioma [22]

POTENCJALNE STRATEGIE W TERAPII GLEJAKÓW

Indukcja apotozy przez TRAIL

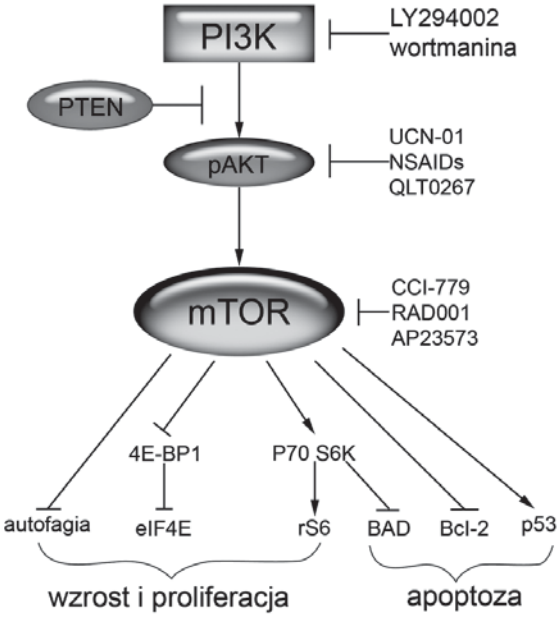
TRAIL (ang. *TNF-related apoptosis inducing ligand*) jest 281-aminokwasowym polipeptydem, należącym do rodziny TNF, indukującym apoptozę. W komórkach nowotworowych wiąże się z receptorami śmierci TRAIL R1 i TRAIL R2. Indukcja apoptozy poprzez receptory TRAIL rozpoczyna się od utworzenia kompleksu z białkiem adaptorowym FADD (ang. *Fas associated protein with death-domain*) oraz prokaspazą 8. Zapoczątkowuje to kaskadę reakcji aktywujących kaspazy zaangażowane w indukcję apoptozy niezależnej od mitochondrium (kaspaza 7) lub zależnej od mitochondrium (kaspaza 9) [20]. W glejakach, TRAIL inicjuje apoptozę zależną od mitochondrium poprzez aktywację kaspazy 8 i 9, a następnie kaspazy 3, która katalizuje ograniczoną proteolizę PKCε z uwolnieniem fragmentu o masie cząsteczkowej 43 kDa [36,42]. Obniżeniu poziomu PKCε towarzyszy obniżenie aktywności Akt/PKB. Mechanizm tej reakcji nie jest do końca poznany. Przypuszcza się, że PKCε obniża poziom Hsp90, które jest niezbędne do stabilizacji Akt/PKB. PKCε może również bezpośrednio regulować ekspresję Akt/PKB. Kompleksy Akt/PKB-PKCε odnaleziono w wielu systemach komórkowych. W glejakach PKC ulega nadekspresji [36].

TRAIL indukuje apoptozę wybiórczo w komórkach nowotworowych, nie uszkadzając przy tym komórek prawidłowych. Ta selektywność została wykorzystana w badaniach nad leczeniem glejaków. Wykazano, że bezpośrednie podanie TRAIL do mózgu myszy z wszczepionymi komórkami ludzkiego glejaka powoduje zahamowanie wzrostu nowotworu bez skutków ubocznych. Niestety ponad 50% glejaków było opornych na indukcję apoptozy. Początkowo przypuszczano, że przyczyna leży w nieprawidłowej budowie lub wyciszeniu aktywności receptorów. Okazało się jednak, że czynnikiem decydującym o wrażliwości komórek glejaka na TRAIL jest obecność inhibitora kaspazy 8 – białka FLIP (*c-FLICE inhibitory protein*), którego poziom jest regulowany przez szlak PTEN-Akt/PKB-mTOR [37]. Wzmożona aktywność Akt/PKB, często obserwowana w glejakach w konsekwencji utraty funkcji PTEN, powoduje wzrost aktywności mTOR, który to enzym wpływa na wzrost translacji mRNA kodującego białko FLIP. Zahamowaniu ulega dojrzewanie prokaspazy 8, co prowadzi do zahamowania programowanej śmierci. Farmakologiczne lub genetyczne hamowanie aktywności mTOR ogranicza ekspresję FLIP i obniża oporność komórek glejaka na TRAIL [37].

INHIBITORY SZLAKU PI3K-Akt/PKB-mTOR

Nieprawidłowe przekazywanie sygnałów poprzez szlak PI3K-Akt/PKB-mTOR jest jedną z głównych przyczyn transformacji nowotworowej komórek mózgowych.

Zablokowanie szlaku na różnym etapie transmisji sygnałów stwarza szerokie możliwości wykorzystania inhibitorów w walce z nowotworami [37] (ryc. 6).



RYCINA 6. Przebieg szlaku PI3K/PKB/mTOR z uwzględnieniem miejsca działania inhibitorów poszczególnych enzymów

Inhibitory PI3K

Dwa główne inhibitory PI3K: wortmanina i LY294002, są bardzo intensywnie testowane w badaniach przedklinicznych. Wortmanina jest metabolitem grzyba *Talaromyces wortmanii.* Przyłącza się do miejsca wiązania ATP kinazy i nieodwracalnie hamuje aktywność enzymatyczną PI3K. Niestety ze względu na słabą rozpuszczalność i utratę stabilności w roztworach wodnych nie jest łatwo przyswajany przez organizm człowieka. Wykazano również jej hepatotoksyczne działanie [34,52].

LY294002 jest pochodną flawonoidów. Blokuje cykl komórkowy, prowadząc do apoptozy lub autofagii. Związek ten jest szeroko stosowany w badaniach przedklinicznych w kombinacjach z innymi lekami. Jako samodzielny lek, hamuje wzrost nowotworu przy zastosowaniu wysokich stężeń, czego skutkiem ubocznym są stany zapalne skóry [14,47,51].

Inhibitory Akt/PKB

Do grupy inhibitorów Akt/PKB szeroko testowanych w badaniach klinicznych i laboratoryjnych należy pochodna staurosporyny – 7-hydroksystaurosporyna (UCN-01). Związek ten inaktywuje Akt/PKB pośrednio poprzez hamowanie aktywności kinazy PDK1, co w konsekwencji ogranicza fosforylację Akt/PKB w pozycji T308 [45]. Bardzo obiecująco wyglądają badania nad inhibitorami kinazy IKL (*integrin-linked kinase*), takimi jak QLT0267 czy NSAIDs. Związki te pośrednio hamują fosforylację Akt/PKB w pozycji S473 w komórkach ze zmutowanym PTEN [28,33].

Inhibitory mTOR

Związkami hamującymi aktywność mTOR, będącymi w fazie badań klinicznych, jest rapamycyna (sirolimus) oraz jej pochodne: CCI-779 (Temsirolimus^{TM}, Wyeth), RAD001 (Everolimus^{TM}, Novartis), AP23573 (ARIAD Pharmaceuticals) [38].

CCI-779 jest obecnie w drugiej fazie badań klinicznych w przypadku *glioblastoma multiforme* [5].

Rapamycyna jest antybiotykiem makrolidowym wyizolowanym po raz pierwszy z bakterii glebowej *Streptomyces hygroscopicus* z wyspy Rapa Nui. Komórki glejaków z uszkodzonym PTEN wykazują większą wrażliwość na rapamycynę niż komórki z prawidłowym PTEN [14]. Podawanie rapamycyny przez 7 dni wyselekcjonowanej grupie pacjentów z glejakiem z uszkodzonym PTEN spowodowało zahamowanie proliferacji komórek nowotworowych, czemu towarzyszyło obniżenie aktywności mTOR. Niestety, u kilku pacjentów zaobserwowano dodatkową aktywację Akt/PKB, co znacząco osłabiło antyproliferacyjny efekt antybiotyku [7]. Wydaje się więc, że zastosowanie inhibitorów hamujących aktywność Akt/PKB w połączeniu z rapamycyną może stanowić skuteczniejszą formę leczenia niż obniżenie aktywności pojedynczego enzymu. Zaobserwowano, że jednoczesne podanie kilku inhibitorów: LY294002, UCN-01 oraz rapamycyny zahamowało szlak przekazywania sygnału PI3K-Akt/PKB-mTOR oraz synergistycznie indukowało autofagię zarówno w rapamycyno-zależnych, jak i rapamycyno-opornych komórkach glejaka znacznie efektywniej niż po zastosowaniu wspomnianych inhibitorów osobno [48]. Przyszłością w leczeniu glejaków może się również okazać zastosowanie jednego inhibitora wybiórczo i specyficznie hamującego aktywność kilku kinaz jednocześnie. Niedawno wykryty związek PI-103, w nanomolarnych stężeniach skutecznie hamował proliferację komórek glejaka *in vitro* i *in vivo*, selektywnie blokując podjednostkę katalityczną p110α PI3K oraz mTOR [9]. Warto również zwrócić uwagę na wykorzystanie rapamycyny w terapii wielokomórkowego gwiaździaka podwyściółkowego – SEGA (ang. *subependymal giant cell astrocytoma*), w którym mutacje genów TSC1 i TSC2 prowadzą do nadmiernej aktywacji mTOR. Podanie antybiotyku w tych warunkach prowadziło do blokowania aktywności kinazy oraz powodowało regresję SEGA u wszystkich poddanych leczeniu pacjentów [12]. Potwierdza to tym samym wcześniejsze obserwacje, że hamowanie aktywności kinaz należących do szlaku PI3K-Akt/PKB-mTOR jest ważnym celem w tworzeniu nowych możliwości leczenia glejaków.

LITERATURA

[1] ALDAPE KD, OKCU MF, BONDY ML, WRENSCH M. Molecular epidemiology of glioblastoma. *Cancer J* 2003; **9**(2): 99–106.

[2] BEERE HM. „The stress of dying": the role of heat shock proteins in the regulation of apoptosis. *J Cell Sci* 2004; **117**: 2641–2651.

[3] BEERE HM. Death versus survival: functional interaction between the apoptotic and stress-inducible heat shock protein pathways. *J Clin Invest* 2005; **115**(10): 2633–2639.

[4] CARRERA AC. TOR signaling in mammals. *J Cell Sci* 2004; **117**: 4615–4616.

[5] CHANG SM, WEN P, CLOUGHESY T, GREENBERG H, SCHIFF D, CONRAD C, FINK K, ROBINS HI, DE ANGELIS L, RAIZER J, HESS K, ALDAPE K, LAMBORN KR, KUHN J, DANCEY J, PRADOS MD. North American Brain Tumor Consortium and the National Cancer Institute. Phase II study of CCI-779 in patients with recurrent glioblastoma multiforme. *Invest New Drugs* 2005; **23**(4): 357–361.

[6] CHOE G, HORVATH S, CLOUGHESY TF, CROSBY K, SELIGSON D, PALOTIE A, INGE L, SMITH BL, SAWYERS CL, MISCHEL PS. Analysis of the phosphatidylinositol 3'-kinase signaling pathway in glioblastoma patients *in vivo*. *Cancer Res* 2003; **63**(11): 2742–2746.

[7] CLOUGHESY TF, YOSHIMOTO K, NGHIEMPHU P, BROWN K, DANG J, ZHU S, HSUEH T, CHEN Y, WANG W, YOUNGKIN D, LIAU L, MARTIN N, BECKER D, BERGSNEIDER M, LAI A, GREEN R, OGLESBY T, KOLETO M, TRENT J, HORVATH S, MISCHEL PS, MELLINGHOFF IK, SAWYERS CL. Antitumor activity of rapamycin in a Phase I trial for patients with recurrent PTEN-deficient glioblastoma. *PLoS Med* 2008; **5**(1): e8.

[8] FALASCA M, MAFFUCCI T. Role of class II phosphoinositide 3-kinase in cell signalling. *Biochem Soc Trans* 2007; 35: 211–214.

[9] FAN QW, KNIGHT ZA, GOLDENBERG DD, YU W, MOSTOV KE, STOKOE D, SHOKAT KM, WEISS WA. A dual PI3 kinase/mTOR inhibitor reveals emergent efficacy in glioma. *Cancer Cell* 2006; **9**(5): 341–349.

[10] FAYARD E, TINTIGNAC LA, BAUDRY A, HEMMINGS BA. Protein kinase B/Akt at a glance. *J Cell Sci* 2005; **118**: 5675–5678.

[11] FOSTER FM, TRAER CJ, ABRAHAM SM, FRY MJ. The phosphoinositide (PI) 3-kinase family. *J Cell Sci* 2003; **116**: 3037–3040.

[12] FRANZ DN, LEONARD J, TUDOR C, CHUCK G, CARE M, SETHURAMAN G, DINOPOULOS A, THOMAS G, CRONE KR. Rapamycin causes regression of astrocytomas in tuberous sclerosis complex. *Ann Neurol* 2006; **59**: 490–498.

[13] GEERING B, CUTILLAS PR, NOCK G, GHARBI SI, VANHAESEBROECK B. Class IA phosphoinositide 3-kinases are obligate p85-p110 heterodimers. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; **104**(19): 7809–7814.

[14] GEORGAKIS GV, YOUNES A. From Rapa Nui to rapamycin: targeting PI3K/Akt/mTOR for cancer therapy. *Expert Rev Anticancer Ther* 2006; **6**(1): 131–140.

[15] GEORGAKIS GV, YOUNES A. Heat-shock protein 90 inhibitors in cancer therapy: 17AAG and beyond. *Future Oncol* 2005; **1**: 273–281.

[16] GINGRAS AC, RAUGHT B, SONENBERG N. mTOR signaling to translation. *Curr Top Microbiol Immunol* 2004; **279**: 169–197.

[17] GONZALEZ-GARCIA A, GARRIDO E, HERNANDEZ C, ALVAREZ B, JIMENEZ C, CANTRELL DA, PULLEN N, CARRERA AC. A new role for the p85-phosphatidylinositol 3-kinase regulatory subunit linking FRAP to p70 S6 kinase activation. *J Biol Chem* 2002; **277**(2): 1500–1508.

[18] HANADA M, FENG J, HEMMINGS BA. Structure, regulation and function of PKB/AKT – a major therapeutic target. *Biochim Biophys Acta* 2004; **1697**(1–2): 3–16.

[19] HARA K, MARUKI Y, LONG X, YOSHINO K, OSHIRO N, HIDAYAT S, TOKUNAGA C, AVRUCH J, YONEZAWA K. Raptor, a binding partner of target of rapamycin (TOR), mediates TOR action. *Cell* 2002; **110**(2): 177–189.

[20] HAWKINS CJ. TRAIL and malignant glioma. *Vitamins and Hormones* 2004; **67**: 427–452.

[21] HILL MM, HEMMINGS BA. Inhibition of protein kinase B/Akt. Implications for cancer therapy. *Pharmacol Ther* 2002; **93**: 243–251.

[22] HU X, PANDOLFI PP, LI Y, KOUTCHER JA, ROSENBLUM M, HOLLAND EC. mTOR promotes survival and astrocytic characteristics induced by PTEN/Akt signaling in glioblastoma. *Neoplasia* 2005; **7**(4): 356–368.

[23] ITO K, CARAMORI G, ADCOCK IM. Therapeutic potential of phosphatidylinositol 3-kinase inhibitors in inflammatory respiratory disease. *J Pharmacol Exp Ther* 2007; **321**(1): 1–8.

[24] IWAMARU A, KONDO Y, IWADO E, AOKI H, FUJIWARA K, YOKOYAMA T, MILLS GB, KONDO S. Silencing mammalian target of rapamycin signaling by small interfering RNA enhances rapamycin-induced autophagy in malignant glioma cells. *Oncogene* 2007; **26**(13): 1840–1851.

[25] KANG S, BADER AG, VOGT PK. Phosphatidylinositol 3-kinase mutations identified in human cancer are oncogenic. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; **102**(3): 802–807.

[26] KIM DH, SARBASSOV DD, ALI SM, KING JE, LATEK RR, ERDJUMENT-BROMAGE H, TEMPST P, SABATINI DM. mTOR interacts with raptor to form a nutrient-sensitive complex that signals to the cell growth machinery. *Cell* 2002; **110**: 163–175.

[27] KLEIHUES P, LOUIS DN, SCHEITHAUER BW, RORKE LB, REIFENBERGER G, BURGER PC, CAVENEE WK. The WHO classification of tumors of the nervous system. *J Neuropathol Exp Neurol* 2002; **61**: 215–225.

[28] KOUL D, SHEN R, BERGH S, LU Y, DE GROOT JF, LIU TJ, MILLS GB, YUNG WK. Targeting integrin-linked kinase inhibits Akt signaling pathways and decreases tumor progression of human glioblastoma. *Mol Cancer Ther* 2005; **4**(11): 1681–1688.
[29] KREX D, KLINK B, HARTMANN C, VON DEIMLING A, PIETSCH T, SIMON M, SABEL M, STEINBACH JP, HEESE O, REIFENBERGER G, WELLER M, SCHACKERT G. German Glioma Network. Long-term survival with glioblastoma multiforme. *Brain* 2007; **130**: 2596–2606.
[30] LEFRANC F, FACCHINI V, KISS R. Proautophagic drugs: a novel mean to combat apoptosis-resistant cancers, with special emphasis on glioblastomas. *Oncologist* 2007; **12**: 1395–1403.
[31] LI L, LIU F, ROSS AH. PTEN regulation of neural development and CNS stem cells. *J Cell Biochem* 2003; **88**(1): 24–28.
[32] MAGRANÉ J, ROSEN KM, SMITH RC, WALSH K, GOURAS GK, QUERFURTH HW. Intraneuronal beta-amyloid expression downregulates the Akt survival pathway and blunts the stress response. *J Neurosci* 2005; **25**(47): 10960–10969.
[33] OBARA S, NAKATA M, TAKESHIMA H, KATAGIRI H, ASANO T, OKA Y, MARUYAMA I, KURATSU J. Integrin-linked kinase (ILK) regulation of the cell viability in PTEN mutant glioblastoma and *in vitro* inhibition by the specific COX-2 inhibitor NS-398. *Cancer Lett* 2004; **208**(1): 115–122.
[34] OKAICHI K, SUZUKI K, MORITA N, IKEDA M, TAKAHASHI H, MATSUDA N, WATANABE M, OKUMURA Y. Low dose of wortmannin reduces radiosensitivity of human glioblastoma cells through the p53 pathway. *Oncol Rep* 2002; **9**(4): 859–862.
[35] OKAMOTO T, NAMIKAWA K, ASANO T, TAKAOKA K, KIYAMA H. Differential regulation of the regulatory subunits for phosphatidylinositol 3-kinase in response to motor nerve injury. *Brain Res Mol Brain Res* 2004; **131**(1–2): 119–125.
[36] OKHRIMENKO H, LU W, XIANG C, HAMBURGER N, KAZIMIRSKY G, BRODIE C. Protein kinase C-epsilon regulates the apoptosis and survival of glioma cells. *Cancer Res* 2005; **65**(16): 7301–7309.
[37] PANNER A, JAMES CD, BERGER MS, PIEPER RO. mTOR controls FLIPS translation and TRAIL sensitivity in glioblastoma multiforme cells. *Mol Cell Biol* 2005; **25**(20): 8809–8823.
[38] PANNER A, PARSA AT, PIEPER RO. Use of APO2L/TRAIL with mTOR inhibitors in the treatment of glioblastoma multiforme. *Expert Rev Anticancer Ther* 2006; **6**(9): 1313–1322.
[39] PEARCE LR, HUANG X, BOUDEAU J, PAWŁOWSKI R, WULLSCHLEGER S, DEAK M, IBRAHIM AF, GOURLAY R, MAGNUSON MA, ALESSI DR. Identification of Protor as a novel Rictor-binding component of mTOR complex-2. *Biochem J* 2007; **405**(3): 513–522.
[40] RANE MJ, PAN Y, SINGH S, POWELL DW, WU R, CUMMINS T, CHEN Q, MCLEISH KR, KLEIN JB. Heat shock protein 27 controls apoptosis by regulating Akt activation. *J Biol Chem* 2003; **278**(30): 27828–27835.
[41] SANAI N, ALVAREZ-BUYLLA A, BERGER MS. Neural stem cells and the origin of gliomas. *N Engl J Med* 2005; **353**(8): 811–822.
[42] SAQR HE, OMRAN OM, OBLINGER JL, YATES AJ. TRAIL-induced apoptosis in U-1242 MG glioma cells. *J Neuropathol Exp Neurol* 2006; **65**(2): 152–161.
[43] SARBASSOV DD, ALI SM, KIM DH, GUERTIN DA. Rictor, a novel binding partner of mTOR, defines a rapamycin-insensitive and raptor-independent pathway that regulates the cytoskeleton. *Curr Biol* 2004; **14**(14): 1296–1302.
[44] SARBASSOV DD, GUERTIN DA, ALI SM, SABATINI DM. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science* 2005; **307**(5712): 1098–1101.
[45] SATO S, FUJITA N, TSURUO T. Interference with PDK1-Akt survival signaling pathway by UCN-01 (7-hydroxystaurosporine). *Oncogene* 2002; **21**(11): 1727–1738.
[46] SCHMELZLE T, HALL MN. TOR, a central controller of cell growth. *Cell* 2000; **103**(2): 253–262.
[47] SHINGU T, YAMADA K, HARA N, MORITAKE K, OSAGO H, TERASHIMA M, UEMURA T, YAMASAKI T, TSUCHIYA M. Growth inhibition of human malignant glioma cells induced by the PI3-K-specific inhibitor. *J Neurosurg* 2003; **98**(1): 154–161.
[48] TAKEUCHI H, KONDO Y, FUJIWARA K, KANZAWA T, AOKI H, MILLS GB, KONDO S. Synergistic augmentation of rapamycin-induced autophagy in malignant glioma cells by phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B inhibitors. *Cancer Res* 2005; **65**(8): 3336–3346.
[49] VANHAESEBROECK B, ALESSI DR.The PI3K-PDK1 connection: more than just a road to PKB. *Biochem J* 2000; **346**: 561–576.

[50] VOGT PK, KANG S, ELSLIGER MA, GYMNOPOULOS M. Cancer-specific mutations in phosphatidylinositol 3-kinase. *Trends Biochem Sci* 2007; **32**(7): 342–349.
[51] WALKER EH, PECOLD ME, PERISIC O, STEPHENS L, HAWKINS PT, WEYMANN MP, WILLIAMS RL. Structural determinants of phosphoinositide 3-kinase. Inhibition by Wortmannin, LY294002, quercetin, myricetin and staurosporine. *Mol Cell* 2000; **6**: 909–919.
[52] WIPF P, MINION DJ, HALTER RJ, BERGGREN MI, HO CB, CHIANG GG, KIRKPATRICK L, ABRAHAM R, POWIS G. Synthesis and biological evaluation of synthetic viridins derived from C(20)-heteroalkylation of the steroidal PI-3-kinase inhibitor wortmannin. *Org Biomol Chem* 2004; **2**(13): 1911–1920.
[53] WULLSCHLEGER S, LOEWITH R, HALL MN. TOR signaling in growth and metabolism. *Cell* 2006; **124**(3): 471–484.
[54] YAMADA KM, ARAKI M. Tumor suppressor PTEN: modulator of cell signaling, growth, migration and apoptosis. *J Cell Sci* 2001; **114**: 2375–2382.
[55] YAN Y, BACKER JM. Regulation of class III (Vps34) PI3Ks. *Biochem Soc Trans* 2007; **35**: 239–241.
[56] YONEZAWA K, YOSHINO KI, TOKUNAGA C, HARA K. Kinase activities associated with mTOR. *Curr Top Microbiol Immunol* 2004; **279**: 271–282.

Redaktor prowadzący – Barbara Kamińska-Kaczmarek

Otrzymano: 03.07. 2008 r.
Przyjęto: 03.04. 2009 r.
Dr Joanna Jakubowicz-Gil
Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej,
Zakład Anatomii Porównawczej i Antropologii
ul. Akademicka 19, 20-033 Lublin
e-mail: jjgil@biotop.umcs.lublin.pl