

Lek. Nina Miązek-Zapała

**Regulacja ekspresji antygeny CD20 przez szlak sygnałowy kinazy
3-fosfatydyloinozytolu i kinazy AKT w komórkach
nowotworowych wywodzących się z limfocytów B**

Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych i nauk o zdrowiu
w dyscyplinie nauki medyczne

Promotor: dr hab. n. med. Magdalena Winiarska

Promotor pomocniczy: dr n. med. Małgorzata Bobrowicz

Zakład Immunologii Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego



Obrona rozprawy doktorskiej przed Radą Dyscypliny Nauk Medycznych
Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

Warszawa 2025 r.

Słowa kluczowe: CD20, kinaza AKT, rytuksymab, salinomycyna

Key words: CD20, AKT kinase, rituximab, salinomycin

Nazwy i numery projektów badawczych w ramach których wykonano badania do pracy doktorskiej:

- 1) Diamentowy grant z MNiSW nr DI 2014 0073 44 zatytułowany „Analiza wpływu wybranych chemioterapeutyków na skuteczność immunoterapii anty-CD20 w nowotworach wywodzących się z limfocytów B” - kierownik Nina Miązek-Zapała
- 2) Grant OPUS z NCN nr 2012/07/B/NZ6/03498 zatytułowany „Badanie wpływu zahamowania szlaków związanych z aktywacją receptora limfocytów B (BCR) na ilość CD20 w komórkach nowotworowych i działanie przeciwciał monoklonalnych anty-CD20” - kierownik Magdalena Winiarska
- 3) Grant dla młodych naukowców z WUM nr 1M19/PM13/11 zatytułowany „Wpływ zahamowania kinaz z rodziny Src na przeciwnowotworowe działanie rytuksymabu i ekspresję cząsteczki CD20” - kierownik Magdalena Winiarska

*Składam serdeczne podziękowania za pomoc w przygotowaniu mojej pracy
członkom zespołu Zakładu Immunologii WUM.
Szczególne wyrazy wdzięczności kieruję
mojej promotorce dr hab. Magdalenie Winiarskiej i
promotorce pomocniczej dr Małgorzacie Bobrowicz za
wsparcie merytoryczne i cierpliwość
oraz Śp. Dr Kamilowi Bojarczukowi
za wprowadzenie w świat hematologii eksperymentalnej.*

*Mojemu Mężowi, Dzieciom i Rodzinie za wsparcie, wyrozumiałość,
obecność w chwilach trudnych i radość dzieloną w momentach sukcesu.*

Spis treści

Nazwy i numery projektów badawczych w ramach których wykonano badania do pracy doktorskiej:	3
Spis rycin i tabel	8
Spis rycin	8
Spis tabel	11
Wykaz używanych skrótów	12
Streszczenie w języku polskim	19
Streszczenie w języku angielskim	20
1. Wstęp	21
1.1 Chłoniaki w Polsce i na świecie	21
1.2 Antygen CD20	23
1.3 Rytuksymab i jego mechanizmy działania	25
1.3.1 Cytotoksyczność zależna od układu dopełniacza (CDC)	26
1.3.2 Cytotoksyczność zależna od przeciwciał (ADCC) i fagocytoza komórkowa zależna od przeciwciał (ADCP)	27
1.3.3 Indukcja apoptozy	27
1.3.4 Efekt „szczepionkowy”	27
1.3.5 Synergizm rytuksymabu z chemioterapeutykami	28
1.4 Oporność komórek nowotworowych na rytuksymab	28
1.4.1 Zmiany w ilości antygenu CD20	28
1.4.2 Składowe układu dopełniacza	29
1.4.3 Mechanizmy oporności na działanie rytuksymabu w mechanizmie ADCC	30
1.4.4 Inne mechanizmy oporności komórek nowotworowych na przeciwciała monoklonalne anti-CD20	31
1.5 Przeciwciała anti-CD20	32
1.6 Inne połączenia terapeutyczne	33
1.7 Szlak przekazywania sygnału z BCR	34
1.8 Inhibitory kinaz LYN, LCK, SYK, BTK	38
1.9 Inhibitory PI3K w terapii chorób limfoproliferacyjnych	41
1.10 Salinomycyna i związki jonoforowe	44
2. Cele pracy	47
3. Materiały i metody	48
3.1 Zasady prowadzenia hodowli komórkowych	48

3.2	Liczenie komórek żywych.....	49
3.3	Kriokonserwacja, przechowywanie i rozmrażanie hodowli komórkowych	50
3.4	Traktowanie komórek testowanymi związkami.....	50
3.5	Cytometria przepływowa.....	51
3.6	Ilościowa analiza antygenów powierzchniowych komórek	52
3.7	Test cytotoksyczności zależnej od aktywacji układu dopełniacza	54
3.8	Sortowanie komórek w oparciu o cechy morfometryczne oraz znakowanie fluorescencyjne (FACS, ang. fluorescence-activated cell sorting)	55
3.9	Detekcja białek metodą western blottingu.....	55
3.10	Izolacja i pomiar stężenia białek.....	56
3.11	Elektroforetyczny rozdział białek w żelu poliakrylamidowym oraz ich transfer na nitrocelulozową błonę	57
3.12	Inkubacja błon nitrocelulozowych z przeciwciałami i detekcja chemiluminescencji	57
3.13	Ilościowa metoda oceny DNA metodą łańcuchowej reakcji polimerazy w czasie rzeczywistym (qRT-PCR).....	59
3.14	Izolacja materiału genetycznego z komórek.....	60
3.15	Reakcja PCR w czasie rzeczywistym (qRT-PCR).....	61
3.16	Ocena aktywności promotora dla CD20 przy użyciu luminescencji	62
3.17	Transdukcja komórek z użyciem lentiwirusów w celu zmniejszenia ekspresji wybranych genów	64
3.18	Zwiększanie ekspresji genów metodą transdukcji retrowirusowej	65
3.19	Wyciszanie genów metodą CRISPR	66
3.20	Przegląd literatury	66
3.21	Analiza graficzna i statystyczna wyników liczbowych przeprowadzonych eksperymentów	67
4.	Wyniki.....	68
4.1	Wpływ inhibitorów kinaz rodziny SYK i BTK na ilość białka CD20 na powierzchni komórki w różnych liniach nowotworowych wywodzących się z limfocytów B	68
4.2	Wpływ inhibitorów kinaz tyrozynowych SYK i BTK na działanie cytotoksyczne przeciwciał monoklonalnych anti-CD20	69
4.3	Wpływ ibrutinibu i R406 na ekspresję innych antygenów powierzchniowych w komórkach linii Raji	70
4.4	Wpływ inhibitorów kinaz tyrozynowych SRC i BTK na ekspresję genu <i>MS4A1</i> kodującego białko CD20.....	72

4.5	Wpływ wyciszenia ekspresji genów SYK i BTK na ilość CD20 na powierzchni komórek Raji i skuteczność działania przeciwciał monoklonalnych anty-CD20	73
4.6	Wpływ inhibitorów kinaz rodziny PI3K i AKT na ilość powierzchniowego białka CD20 w różnych liniach nowotworowych wywodzących się z limfocytów B.....	75
4.7	Wpływ inhibitorów kinaz rodziny PI3K i AKT na działanie cytotoksyczne rytuksymabu	76
4.8	Wpływ inhibitorów kinazy AKT na ekspresję genu <i>MS4A1</i> kodującego CD20 77	
4.9	Wpływ nadekspresji kinazy AKT na ilość białka CD20 w komórkach nowotworowych Raji.....	78
4.10	Wpływ czynników transkrypcyjnych rodziny FOXO na ilość antygenu CD2079	
4.11	Wpływ salinomycyny na ilość i aktywność kinazy AKT	81
4.12	Wpływ salinomycyny na ilość CD20 na powierzchni komórek Raji	82
4.13	Wpływ salinomycyny na ilość CD20 na powierzchni komórki w modelach różnych ustalonych linii komórkowych.....	83
4.14	Wpływ salinomycyny na całkowitą ilość białka CD20 w komórkach linii Raji i Ramos85	
4.15	Zbadanie wpływu salinomycyny na cytotoksyczność rytuksymabu i ofatumumabu względem komórek Raji	85
4.16	Zbadanie wpływu salinomycyny na skuteczność działania rytuksymabu i ofatumumabu w mechanizmie CDC w panelu różnych ustalonych nowotworowych linii komórkowych wywodzących się z limfocytów B	86
4.17	Zbadanie wpływu pochodnych salinomycyny oraz innych związków z grupy jonoforów na ilość antygenu CD20 na powierzchni komórek nowotworowych oraz na skuteczność rytuksymabu w mechanizmie CDC	88
4.18	Wpływ salinomycyny na ekspresję białek inhibitorowych układu dopełniacza na powierzchni komórek Raji	90
4.19	Wpływ salinomycyny na ilość innych antygenów na powierzchni komórek Raji91	
4.20	Wpływ salinomycyny na ekspresję genu kodującego CD20.....	92
4.21	Wpływ salinomycyny na aktywność promotora genu <i>MS4A1</i>	93
4.22	Wpływ salinomycyny na białka rodziny SMAD.....	94
4.23	Wpływ salinomycyny na inne czynniki transkrypcyjne dla genu <i>MS4A1</i>	98
4.24	Wpływ salinomycyny na regulację niektórych genów zależnych od FOXO.....	99
5.	Dyskusja.....	101
6.	Wnioski	114
	Piśmiennictwo	115
	Opinia Komisji Bioetycznej.....	139

Spis rycin i tabel

Spis rycin

Rycina 1. Główne mechanizmy działania rytuksymabu w chłoniakach B-komórkowych.

Rycina 2. Szlak przekazywania sygnału z receptora BCR.

Rycina 3. Ocena ilości białka CD20 na powierzchni komórek nowotworowych linii komórkowych ludzkich chłoniaków B-komórkowych inkubowanych 48 godzin z nietoksycznymi stężeniami inhibitorów kinaz SYK (R406) i BTK (ibrutynib).

Rycina 4. Wpływ R406 oraz ibrutynibu na przeżywalność komórek Raji w mechanizmie CDC pod wpływem przeciwciał monoklonalnych anti-CD20.

Rycina 5. Ocena ilości inhibitorów układu dopełniacza na powierzchni komórek nowotworowych linii Raji inkubowanych 48 godzin z R406 lub ibrutynibem.

Rycina 6. Ocena ilości różnych antygenów powierzchniowych na komórkach nowotworowych linii Raji inkubowanych 48 godzin z R406 lub ibrutynibem.

Rycina 7. Ocena ilości transkryptu CD20 po 24-godzinnej inkubacji komórek linii Raji z R406 i ibrutynibem w stężeniu 1 μ M. Dane na wykresie przedstawiają stosunek mRNA dla CD20 do mRNA dla genu referencyjnego β 2-mikroglobuliny w odniesieniu do 100% w grupie kontrolnej.

Rycina 8. Ocena ilości transkryptu SYK lub BTK w komórkach z wprowadzonymi konstruktami wyciszającymi.

Rycina 9. Ocena ilości kinazy BTK i SYK w komórkach Raji z wyciszoną ekspresją genów BTK i SYK.

Rycina 10. Ocena ilości białka CD20 na powierzchni komórek Raji z wyciszoną ekspresją BTK i SYK.

Rycina 11. Wpływ wyciszenia ekspresji SYK i BTK na przeżywalność komórek pod wpływem rytuksymabu

Rycina 12. Ocena ilości białka CD20 na powierzchni komórek nowotworowych linii komórkowych ludzkich chłoniaków B-komórkowych inkubowanych 48 godzin z nietoksycznymi stężeniami inhibitorów kinaz PI3K/AKT.

Rycina 13. Wpływ idelalizybu, MK-2206 i GDC-0068 na śmiertelność komórek SU-DHL-4 w mechanizmie CDC pod wpływem rytuksymabu.

Rycina 14. Ocena ilości transkryptu CD20 po 24-godzinnej inkubacji komórek linii Raji z MK-2206 w stężeniu $1\mu\text{M}$ i GDC-0068 w stężeniu $2,5\mu\text{M}$. Dane na wykresie przedstawiają stosunek mRNA dla CD20 do mRNA dla genu referencyjnego mikroglobuliny β w odniesieniu do 100% w grupie kontrolnej.

Rycina 15. Ilościowa ocena całkowitej kinazy AKT oraz białka CD20 w komórkach Raji zmodyfikowanych konstruktem plazmidowym kodującym konstytutywnie aktywną kinazą AKT.

Rycina 16. Ocena całkowitej ilości CD20 w komórkach Raji z wyciszonym FOXO1 lub FOXO3

Rycina 17. Ocena ilości całkowitego białka AKT oraz jego ufosforylowanej formy (pAKT) w lizatach komórek (A) Raji oraz Pfeiffer (B) Karpas-422 oraz SU-DHL-4 inkubowanych przez 24 godziny z salinomycyną w stężeniach $0,5$ i $1\mu\text{M}$.

Rycina 18. Ocena żywotności komórek Raji pod wpływem 48-godzinnej inkubacji w pożywce z różnymi stężeniami salinomycyny.

Rycina 19. Ocena ilości cząsteczek CD20 na powierzchni komórek linii Raji inkubowanych 48 godzin z różnymi stężeniami salinomycyny.

Rycina 20. Ocena ilości cząsteczki CD20 na powierzchni komórek różnych ustalonych linii nowotworów B-komórkowych inkubowanych 48 godzin z różnymi stężeniami salinomycyny.

Rycina 21. Ocena całkowitej ilości białka CD20 w komórkach linii Raji i Ramos inkubowanych przez 48 godzin z salinomycyną w stężeniach $0,5$ lub $1\mu\text{M}$.

Rycina 22. Żywotność komórek Raji kontrolnych oraz preinkubowanych z salinomycyną w stężeniu $0,5\mu\text{M}$ po inkubacji z terapeutycznymi przeciwciałami monoklonalnymi: rytuksymabem (R-CDC) i ofatumumabem (O-CDC).

Rycina 23. Wpływ salinomycyny na śmiertelność komórek w mechanizmie CDC pod wpływem przeciwciał monoklonalnych anti-CD20 w modelach linii Karpas-422, OCI-LY7 i Pfeiffer.

Rycina 24. Ocena żywotności komórek Raji pod wpływem 48-godzinnej inkubacji w pożywce z różnymi stężeniami związków jonoforowych.

Rycina 25. Ocena ilości cząsteczki CD20 na powierzchni komórek linii Raji inkubowanych 48 godzin z różnymi stężeniami monenzyny, narazyny, nigerycyny i kwasu lasalowego.

Rycina 26. Wpływ narasyny i kwasu lasalowego na śmiertelność komórek Raji w mechanizmie CDC pod wpływem rytuksymabu.

Rycina 27. Ocena ilości cząsteczki CD46 i CD55 na powierzchni komórek linii Raji inkubowanych 48 godzin z różnymi stężeniami salinomycyny.

Rycina 28. Ocena ilości cząsteczki CD19, CD21 i CD22 na powierzchni komórek linii Raji inkubowanych 48 godzin z salinomycyną.

Rycina 29. Ocena ilości transkryptu CD20 po inkubacji przez 24 godziny A) komórek Raji z salinomycyną i narazyną w stężeniach 0,5μM B) komórek Daudi i Ramos z salinomycyną w stężeniu 0,5μM.

Rycina 30. Ocena aktywności promotora genu *MS4A1* dla CD20 w nukleofekowanych komórkach linii Raji po inkubacji z salinomycyną.

Rycina 31. Ocena ilości antygenu CD20 na powierzchni komórek Ramos stymulowanych przez 48 godzin wzrastającymi stężeniami TGF-β.

Rycina 32. Ocena aktywności promotora genu *MS4A1* dla CD20 w komórkach linii Raji bez lub z wprowadzonym konstruktem aktywnych SMAD po inkubacji z salinomycyną.

Rycina 33. Ocena ekspresji białka CD20 na powierzchni komórek Raji z wprowadzonym konstruktem aktywnego SMAD2 lub SMAD3.

Rycina 34. Ocena całkowitej ilości białka SMAD 2 i SMAD3 w komórkach linii Ramos i Daudi inkubowanych przez 4, 12 i 24 godziny z salinomycyną w stężeniu 0.5μM.

Rycina 35. Ocena aktywności czynnika NF-κB w nukleofekowanych komórkach linii Raji po inkubacji z salinomycyną

Rycina 36. Wpływ salinomycyny na ilość mRNA dla IL7R oraz SGK1.

Spis tabel

Tabela 1. Zastosowanie niektórych inhibitorów BCR w różnych nowotworach hematologicznych.

Tabela 2. Linie komórkowe wykorzystywane do eksperymentów wraz z typem nowotworu, który reprezentują.

Tabela 3. Lista związków chemicznych użytych w eksperymentach in vitro.

Tabela 4. Wykaz i charakterystyka przeciwciał użytych do badań cytometrycznych.

Tabela 5. Lista przeciwciał użytych do analizy białek metodą Western blotting.

Tabela 6. Sekwencje starterów sensownych i antysensownych użytych do badania regulacji transkrypcyjnej genów w reakcji PCR w czasie rzeczywistym.

Tabela 7. Sekwencje starterów sensownych i antysensownych użytych do generowania sgRNA (CRISPR/Cas9).

Wykaz używanych skrótów

ABC	<i>ATP-binding cassette</i> – kasetta wiążąca ATP
ABC DLBCL	<i>activated B-cell DLBCL</i> - DLBCL przypominające aktywowane komórki B
ADCC	<i>antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity</i> – cytotoksyczność komórkowa zależna od przeciwciał
ADCP	<i>antibody-dependent cellular phagocytosis</i> - fagocytoza komórkowa zależna od przeciwciał
AKT	kinaza AKT
ALL	<i>acute lymphoblastic leukemia</i> - ostra białaczka limfoblastyczna
AMV	<i>avian myeloblastosis virus</i> – wirus ptasiej mieloblastozy
APS	<i>ammonium persulfate</i> – nadsiarczan amonu
ASCT	<i>autologous stem cell transplantation</i> - autologiczny przeszczep komórek macierzystych
β_2m	beta-2 mikroglobulina
B-ALL	<i>B-cell acute lymphoblastic leukemia</i> – ostra białaczka limfoblastyczna z limfocytów B
BAK	<i>BCL2 Antagonist/Killer</i> - białko proapoptotyczne
BCL-2	B-cell lymphoma 2 protein
BCL-XL	<i>B-cell lymphoma-extra large</i> – białko antyapoptyczne
BCR	<i>B-cell receptor</i> –receptor limfocytów B
BIRC5	<i>Baculoviral IAP Repeat Containing 5</i>
BL	<i>Burkitt's lymphoma</i> – chłoniak Burkitt'a
BSA	<i>bovine serum albumin</i> – albumina z surowicy bydlęcej
BTK	<i>Bruton's tyrosine kinase</i> – kinaza tyrozynowa Brutona
CAR-T	<i>chimeric antigen receptor T-cell therapy</i> – terapia chimerycznymi limfocytami T
CARD11	<i>caspase recruitment domain 11 protein</i>
CD16	Fc γ RIII, klaster cząsteczek różnicujących
CD19	pozytywny koreceptor BCR
CD20	marker różnicowania występujący na powierzchni m.in. limfocytów B, tetraspanina
CD21	<i>complement receptor</i> - receptor dla składnika C3d dopełniacza

CD22	negatywny koreceptor BCR
CD40	białko występujące na powierzchni komórek prezentujących antygen
CD46	<i>membrane cofactor protein MCP</i> – błonowy antygen białkowy wiążący C3b i C4b
CD53	marker różnicowania występujący na powierzchni m.in. limfocytów B, tetraspanina
CD55	<i>decay accelerating factor DAF</i> – czynnik przyspieszający rozkład konwertaz C3 i C5 dopełniacza
CD56	marker fenotypowy komórek NK
CD58	<i>lymphocyte function-associated LFA 3</i> – antygen 3 związany z funkcją limfocytów
CD59	protektyna
CD79b	receptor powierzchniowy limfocytów B związany z przekazywaniem sygnału z BCR
CD81	marker różnicowania występujący na powierzchni m.in. limfocytów B, tetraspanina
CD82	marker różnicowania występujący na powierzchni m.in. limfocytów B, tetraspanina
CDC	<i>complement-dependent cytotoxicity</i> – cytotoksyczność zależna od układu dopełniacza
R-CDC	<i>rituximab-mediated complement-dependent cytotoxicity</i> – cytotoksyczność zależna od układu dopełniacza mediuwana przez rytuksymab
O-CDC	<i>ofatumumab-mediated complement-dependent cytotoxicity</i> – cytotoksyczność zależna od układu dopełniacza mediuwana przez ofatumumab
CDS	<i>Coding DNA Sequence</i> – fragment DNA kodujący białko
CHOP	<i>cyclophosphamide, hydroxydaunomycine, oncovin, prednisolone</i> - czyli cyklofosfamid, oksorubicyna, winkrystyna, prednizolon
R- CHOP	<i>rituximab, cyclophosphamide, hydroxydaunomycine, oncovin i prednisolone</i> - rytuksymab, cyklofosfamid, oksorubicyna, winkrystyna, prednizolon
CLL	<i>chronic lymphocytic leukemia</i> – przewlekła białaczka limfocytowa
CR	<i>complete response</i> – wskaźnik odpowiedzi całkowitej

CR1	<i>Complement Receptor 1</i> , białko regulacyjne układu dopełniacza
DLBCL	<i>diffuse large B-cell lymphoma</i> – chłoniak rozlany z dużych komórek B
DMSO	<i>dimethyl sulfoxide</i> – dimetylosulfotlenek
dNTP	trifosforany deoksynukleotydów
DTT	1,4-ditiotreitol
EGFR	<i>epidermal growth factor receptor</i> – receptor dla naskórkowego czynnika wzrostu
ELK	kinaza ELK
ERK	extracellular signal-regulated kinase - kinaza ERK
ETS	<i>Electron Transport System</i> – czynnik transkrypcyjny ETS
EZH2	metylotransferaza EZH2
FACS	<i>fluorescence-activated cell sorting</i> - sortowanie komórek w oparciu o cechy morfometryczne oraz znakowanie fluorescencyjne
FASL	<i>Fas Cell Surface Death Receptor Ligand</i>
FBS	<i>fetal bovine serum</i> – płodowa surowica bydlęca
FDA	<i>Food and Drug Administration</i> - Agencja Żywności i Leków
FITC	<i>fluorescein isothiocyanate</i> – izotiocyjanian fluoresceiny
FL	<i>follicular lymphoma</i> – chłoniak grudkowy
FOXO1/3/4	<i>forkhead box protein O 1/3</i> – czynniki transkrypcyjne z rodziny FoxO
FYN	<i>proto-oncogene tyrosine-protein kinase Fyn</i> – kinaza FYN
GAPDH	dehydrogenaza gliceraldehydu-3-fosforanu
GCB DLBCL	<i>germinal center B-cell-like</i> - DLBCL z komórek B ośrodków rozmnażania
GAB1	<i>GRB2-associated-binding protein 1</i> – kinaza GAB
GFP	<i>green fluorescence protein</i> – białko zielonej fluorescencji
GSK3	<i>glycogen synthase kinase 3</i> – kinaza syntazy glikogenowej 3
HDAC	<i>histone deacetylases</i> – deacetylazy histonów
HL	<i>Hodgkin lymphoma</i> - chłoniak Hodgkina
HLA	<i>human leukocyte antigen</i>
HRP	<i>horseradish peroxidase</i> – peroksydaza chrzanowa
IARC	<i>International Agency for Research on Cancer</i> – Międzynarodowa Agencja Badań nad Rakiem
ICD-10	<i>International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems, 10th Revision</i> - Międzynarodowa Klasyfikacja Chorób i

Problemów Zdrowotnych opracowana przez Światową Organizację Zdrowia

IgM	immunoglobuliny klasy M
IGVH	<i>Immunoglobulin Heavy Chain Variable Region</i> - region zmienny łańcucha ciężkiego immunoglobulin
IκB	<i>inhibitor of kappa B</i> – negatywny czynnik regulujący aktywność NFκB
IL	interleukina
IMDM	Iscoe's Modified Dulbecco's Medium
iNHL	<i>Indolent Non Hodgkin's Lymphoma</i> – indolentny NHL
IRF4	<i>interferon regulatory factor 4</i> – czynnik transkrypcyjny IRF4
ITAM	<i>immunoreceptor tyrosine-based activation motif</i> , domeny wchodzące w skład łańcuchów Iga oraz Igb
ITIM	<i>immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif</i>
ITK	kinaza ITK znana też jako TSK or EMT
JNK	<i>c-Jun NH2-terminal kinase</i> – kinaza JNK
KIR	<i>killer-cell immunoglobulin-like receptors</i> – receptory immunoglobulinopodobne znajdujące się m.in. na powierzchni komórek NK
LCK	<i>lymphocyte-specific protein tyrosine kinase</i> – kinaza LCK
LYN	<i>tyrosine-protein kinase LYN</i> – kinaza LYN
M	mol
MAC	<i>membrane attack complex</i> – kompleks atakujący błonę
MALT1	<i>mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma translocation protein 1</i>
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i> – kinaza aktywowana mitogenem
MCL	<i>mantle cell lymphoma</i> – chłoniak z komórek płaszczu
MCL-1	<i>induced myeloid leukemia cell differentiation protein MCL-1</i> – antyapoptotyczne białko MCL-1
MFI	<i>mean fluorescence intensity</i> – średnia intensywność fluorescencji
MHCII	<i>major histocompatibility complex</i> – białka głównego układu zgodności tkankowej
MS4A1	membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 1 – pełna nazwa genu kodującego antygen CD20
mTOR	<i>mammalian target of rapamycin</i> – kinaza serynowo-treoninowa hamowana przez rapamycynę

MYC	<i>v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog</i> – onkogen MYC
MZL	<i>marginal zone lymphoma</i> – chłoniak strefy brzeżnej
NAG-1	<i>nonsteroidal anti-inflammatory drug-activated gene-1</i>
NANOG	czynn timeranskrypcyjny NANOG
NF-AT	<i>nuclear factor of activated T-cells</i>
NF-κB	<i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i> – czynnik transkrypcyjny NF-κB
NF-Y	<i>nuclear transcription factor Y</i> - czynnik transkrypcyjny NF-κB
NHL	<i>ang. non-Hodgkin's lymphoma</i> – chłoniak nie-Hodgkina
NK	<i>natural killers</i> – komórki NK
NOTCH	<i>Neurogenic locus notch homolog protein</i>
NOXA	<i>phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1</i> – proapoptotyczne białko rodziny Bcl-2
NRSI	<i>non-randomized studies of interventions</i> – nierandomizowane badanie interwencyjne
OCT-1/2/4	<i>octamer transcription factor 1/2/4</i> - czynnik transkrypcyjny OCT-1/2/4
OS	<i>overall survival</i> - czas przeżycia całkowitego
ORR	<i>objective response rate</i> – odsetek obiektywnych odpowiedzi
P53	<i>tumor suppressor p53</i> - czynnik transkrypcyjny o własnościach supresora nowotworowego
PAG	<i>phosphoprotein associated with glycosphingolipid-enriched microdomains</i> – fosfoproteina związana z domenami bogatymi w glikolipidy
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i> – sól fizjologiczna buforowana buforem fosforanowym, pozbawiona jonów wapnia i magnezu
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> – reakcja łańcuchowa polimerazy
PDK1	<i>3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1</i> - 3-fosfatydyloinozytydozależna kinaza białkowa 1
P-gp	glikoproteina P
PE	<i>phycoerythrin</i> – fikoerytryna
PI3K	<i>phosphoinositide 3-kinase</i> – kinaza fosfatydyloinozytolu
PIP	<i>phosphatidylinositol phosphate kinase</i> – kinaza PIP
PFS	<i>progression-free survival</i> – czas wolny od progresji
PKC	<i>protein kinase C</i> – kinaza białkowa C

PRDX1	peroksyredoksyna 1
PTEN	<i>phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten</i> – białko supresorowe względem wielu komórek nowotworowych
PU.1	<i>purine-rich box 1</i> - czynnik transkrypcyjny PU.1
RCF	<i>relative centrifugal force</i> – względna siła odśrodkowa
RCT	<i>randomized controlled trial</i> – randomizowane kontrolne badanie kliniczne
RL	lucyferaza Renilli
RPL29	<i>ribosomal protein L29</i> – białko rybosomalne L29
R/R	<i>relapsed/refractory</i> – nawrotowy lub oporny na leczenie
RR CL	<i>rituximab resistant cell lines RRCL</i> – linie komórkowe odporne na rytuksymab
RT-PCR	<i>real-time PCR</i> – reakcja łańcuchowa polimerazy w czasie rzeczywistym
SAE	<i>serious adverse event</i> - poważne działanie niepożądane
SD	<i>standard deviation</i> – odchylenie standardowe
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> – dodecylosiarczan sodu
SDS-PAGE	<i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i> - elektroforeza w żelu poliakrylamidowym w obecności SDS
sgRNA	<i>single guide RNA</i> – pojedynczy przewodnik RNA
shRNA	<i>small hairpin RNA</i> – krótkie RNA o kształcie spinki do włosów
SLL	<i>small lymphocytic lymphoma</i> – chłoniak z małych limfocytów
SMAD	<i>small mother against decapentaplegic</i> – białka rodziny SMAD, czynniki transkrypcyjne
SOCS-1	<i>suppressor of cytokine signaling-1</i>
SOX2	<i>SRY-box transcription factor 2</i> – czynnik transkrypcyjny
SP-1	kinaza SP-1, regulator cyklu komórkowego
SRC	<i>proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src</i> – kinaza SRC
STAT3	<i>signal transducer and activator of transcription 3</i> – białko przekaźnicze i aktywator transkrypcji STAT3
SYK	<i>spleen tyrosine kinase</i> – kinaza SYK
TCGA	<i>The Cancer Genome Atlas</i> – atlas genomu raka
TEMED	N,N,N',N'-tetrametyloetylenodiamina
TGF- β	<i>transforming growth factor β</i> - transformujący czynnik wzrostu beta
TK	<i>thymidine kinase</i> – kinaza tymidynowa

TLR	<i>Toll-like receptor</i> – receptor Toll-podobny, receptor związany z rozpoznawaniem wzorców molekularnych związanych z patogenami
T _m	<i>temperature of melting</i> – temperatura topnienia/przyłączania się primerów
TNF	<i>tumor necrosis factor</i> – czynnik martwicy nowotworu
TORC-1	<i>target of rapamycin complex 1</i>
TRIS	trihydroksymetyloaminometan
uMRD	<i>unmeasurable residual disease uMRD</i> - minimalna choroba resztkowa
V	wolt
XIAP	<i>X-linked inhibitor of apoptosis protein</i> – białko antyapoptotyczne
ZAP-70	<i>Zeta-chain-associated protein kinase of 70 kDa</i> – kinaza ZAP-70

Streszczenie w języku polskim

Większość schematów terapeutycznych stosowanych w pierwszej linii w leczeniu chłoniaków nie-Hodgkina opiera się na przeciwciałach monoklonalnych anty-CD20, spośród których najpowszechniej stosowanym jest rytuksymab. Jednym z czynników warunkujących skuteczność rytuksymabu jest ilość antygenu CD20 będącego celem terapeutycznym dla tego przeciwciała na powierzchni komórek. Próby zwiększenia ekspresji CD20 w komórkach nowotworowych wywodzących się z limfocytów B są jedną ze strategii zwiększania przeciwnowotworowej skuteczności rytuksymabu. Jednym ze szlaków mogących wpływać na ekspresję CD20 jest ścieżka PI3K/AKT o szeroko udokumentowanej roli w patogenezie rozrostów limfoproliferacyjnych.

Wiodącym celem pracy doktorskiej była weryfikacja hipotezy możliwości regulacji ilości CD20 przez szlak PI3K/AKT. Kolejnym celem była walidacja *in vitro* salinomycyny jako środka aktywującego szlak PI3K/AKT i zwiększającego w tym mechanizmie skuteczność rytuksymabu.

Prace badawcze miały charakter eksperymentalny i przeprowadzono je w modelach *in vitro* w ustalonych liniach komórkowych reprezentujących różne typy nowotworów wywodzących się z limfocytów B. W kolejnych krokach badawczych rozprawy doktorskiej badano wpływ stosowanych w badaniach klinicznych i przedklinicznych inhibitorów kinaz SYK i BTK, a następnie PI3K i AKT na ilość antygenu CD20 na powierzchni komórek nowotworowych wywodzących się z limfocytów B oraz na skuteczność przeciwciał monoklonalnych anty-CD20 w mechanizmie CDC. Stosując narzędzia biologii molekularnej zaobserwowano spadek ilości CD20 po wyciszeniu szlaku PI3K, natomiast w wyniku aktywacji tego szlaku dochodziło do zwiększenia ilości CD20. W związku z tym, po wykonaniu przeglądu systematycznego literatury, wytypowano salinomycynę jako związek modelowy o udowodnionym działaniu przeciwnowotworowym i potencjalnym działaniu aktywującym na szlak PI3K/AKT. W kolejnych krokach potwierdzono wpływ salinomycyny na aktywację szlaku PI3K/AKT, zwiększenie ekspresji CD20 oraz cytotoksyczności przeciwciał monoklonalnych anty-CD20: rytuksymabu oraz ofatumumabu. Wyniki przeprowadzonych eksperymentów opublikowano w kilku artykułach w recenzowanych czasopismach naukowych.

Streszczenie w języku angielskim

Regulation of CD20 antigen expression by the phosphatidylinositol 3-kinase and AKT kinase signaling pathway in B-cell-derived cancer cells

Most therapeutic regimens used in the treatment of non-Hodgkin's lymphomas rely on anti-CD20 monoclonal antibodies, the most commonly used being rituximab. One of the determinants of rituximab efficacy is the expression of the CD20 antigen, which serves as its therapeutic target. Modulating the levels of CD20 protein on the surface of malignant cells derived from B lymphocytes remains among crucial strategies to enhance the antitumor efficacy of rituximab. One of the most promising pathways that may influence CD20 expression is the PI3K/AKT, which has a well-described role in the pathogenesis of lymphoproliferative malignancies. The PI3K/AKT pathway can be activated by various drugs, often as an incidental finding, reflecting the pleiotropic property of the pharmaceuticals.

The primary aim of this study was to verify the hypothesis of CD20 regulation via the PI3K/AKT pathway. A secondary, post-hoc aim was to validate salinomycin *in vitro* as an agent enhancing rituximab efficacy through this mechanism.

The research was experimental and conducted *in vitro* using established cancer cell lines representing various types of B-cell-derived malignancies. The impact of SYK, BTK, PI3K, and AKT kinase inhibitors used in clinical and preclinical studies, on the surface levels of CD20 in B-cell-derived cancer cells and the efficacy of anti-CD20 monoclonal antibodies via the CDC mechanism was evaluated in subsequent experimental steps. Activation and silencing of the PI3K pathway resulted in increased and decreased CD20 expression, respectively. Following a systematic literature review, salinomycin was identified as a model compound with already proven anticancer activity and potential effects on the PI3K/AKT pathway. Subsequent validation confirmed the positive impact of salinomycin on PI3K/AKT pathway activation, increased CD20 expression, and the cytotoxicity of rituximab and ofatumumab via this mechanism.

1. Wstęp

1.1 Chłoniaki w Polsce i na świecie

Chłoniaki stanowią heterogenną grupę nowotworów wywodzących się z komórek układu limfatycznego. Główna klasyfikacja chłoniaków klasycznie opiera się na podziale na dwie grupy: chłoniaki Hodgkina (HL, ang. Hodgkin lymphoma) oraz charakteryzujące się gorszym rokowaniem i częściej występujące chłoniaki niehodgkinowskie (NHL, ang. non Hodgkin lymphoma). W większości (85%) chłoniaki niehodgkinowskie wywodzą się z limfocytów B (1). Wg IARC (ang. International Agency for Research on Cancer) w 2020 r. stanowiły one jedenasty pod względem częstości zachorowań nowotwór na świecie (2). W Polsce w 2022 r. chłoniaki niehodgkinowskie (C82-C85, C96 wg ICD10) stanowiły ponad 2% spośród wszystkich nowotworów zarówno u mężczyzn jak i u kobiet (3). Na przestrzeni trzech ostatnich dekad zaobserwowano globalny, znaczący wzrost dynamiki zachorowań na NHL (1). Na efekt ten składają się czynniki środowiskowe, infekcyjne, zwiększająca się zachorowalność na zespoły niedoborów odporności, coraz częstsze stosowanie leków immunosupresyjnych ale także wzrost średniego czasu przeżycia w populacji (4). W zależności od typu chłoniaka, stopnia zaawansowania choroby i chorób towarzyszących pacjenta w leczeniu stosowana jest radioterapia, chemioterapia, immunoterapia, chirurgia, przeszczep komórek macierzystych i inne (5) .

Pomimo znaczących postępów w terapii chorób hematologicznych leczenie pacjentów w tej grupie w dalszym ciągu pozostaje wyzwaniem klinicznym. Najczęściej występujący, stanowiący około 30% spośród diagnozowanych NHL chłoniak rozlany z dużych komórek B (DLBCL, ang. Diffuse large B-cell lymphoma) charakteryzuje się najagresywniejszym przebiegiem (6). Początkowo leczenie DLBCL oparte było na systemowej chemioterapii, najczęściej w skojarzonym schemacie ośmiu cykli CHOP (akronim od angielskich nazw leków: cyclophosphamide czyli cyklofosfamid, hydroxydaunomycine czyli doksorubicyna, oncovin czyli winkrystyna i prednizolone czyli prednizolon). Dodanie do schematu rytuksymabu - przeciwciała monoklonalnego skierowanego przeciwko cząsteczce CD20 obecnej na komórkach nowotworowych, doprowadziło do znaczącej poprawy przeżycia całkowitego (OS, ang. overall survival). W badaniu GELA dodanie rytuksymabu do schematu CHOP zwiększyło wskaźnik całkowitej odpowiedzi (CR, ang. complete response) o 10% a 2-letnie przeżycie całkowite wzrosło z 57% do 70% (7). Schemat o akronimie R-CHOP jest obecnie światowym

standardem leczenia pierwszej linii postaci niezaawansowanej (stadium I i II) oraz zaawansowanej (III i IV) choroby u pacjentów we wszystkich grupach wiekowych, jeżeli stan ogólny pozwala na zastosowanie terapii (8,9). Pomimo znaczącej poprawy wyników leczenia po wprowadzeniu rytuksymabu do protokołów leczniczych nowotworów hematologicznych problemem pozostaje grupa chorych pierwotnie opornych lub rozwijających wtórną oporność na rytuksymab. Średnia odpowiedź na leczenie u pacjentów w grupie DLBCL oscyluje na poziomie 60% (10). W grupie pacjentów objętych najwyższym ryzykiem wczesnego zgonu przeżycie wolne od progresji (PFS, ang. progression-free survival) oraz OS wynoszą odpowiednio 30 i 33% w pięcioletniej obserwacji (11). U około 40% pacjentów występuje oporność na terapię pierwszego rzutu lub obserwowany jest nawrót choroby, co czyni DLBCL najgorzej rokującym wśród rozrostów hematologicznych (12,13). Wciąż brakuje także wystandaryzowanych wytycznych dotyczących kolejnych linii leczenia. Stosowane schematy wysokodawkowej chemioterapii oraz autologiczne przeszczepy komórek macierzystych nie wydłużają w sposób satysfakcjonujący mediany przeżycia (8,14). Dlatego w ostatnich latach wysiłki badaczy ukierunkowane były na poszukiwanie strategii zwiększających skuteczność terapii pierwszej linii i przełamujących oporność na R-CHOP oraz rozwijanie nowych podejść terapeutycznych – przeciwciał bispecyficznych oraz limfocytów CAR-T. Opisano markery genetyczne i inne czynniki ryzyka stratyfikujące pacjentów wysokiego ryzyka np. z podwójną ekspresją MYC i BCL2 lub agresywne chłoniaki „double/triple hit”, dla których opracowywane są bardziej personalizowane protokoły terapeutyczne, w tym z użyciem intensywniejszych schematów chemioterapeutycznych lub nowoczesnych form immunoterapii (14–17). W ostatnim czasie szczególne nadzieje wiązano z terapią CAR-T. Dotychczas zarejestrowano i wprowadzono do trzeciej i kolejnej linii leczenia chorych z DLBCL trzy konstrukty CAR-T (tj. tisagenlecleucel, axicabtagene ciloleucel oraz lisocabtagene maraleucel) (18–20). Mimo początkowego entuzjazmu ostatnie badania nie wykazały przewagi CAR-T nad wysokodawkową chemioterapią z autologicznym przeszczepieniem komórek macierzystych ASCT (ang. autologous stem cell transplantation) (21). Również metaanaliza randomizowanych badań kontrolowanych (RCT, ang. randomized controlled trial) i porównawczych nierandomizowanych badań interwencyjnych (NRSI ang. non-randomized studies of interventions) nie wykazała jednoznacznej przewagi terapii CAR-T w zakresie przeżycia całkowitego w porównaniu z innymi stosowanymi metodami leczenia (ASCT, chemioterapia, infuzja limfocytów dawcy, polatuzumab) u chorych z opornym/nawrotowym (R/R ang. relapsed/refractory) DLBCL (22). Mimo obiecujących rezultatów w grupie pacjentów z ostrą białaczką limfoblastyczną (ALL, ang. acute

lymphoblastic leukemia) zastosowanie terapii CAR-T w przypadku DLBCL daje szansę na pełne wyleczenie niespełna połowie z tej grupy pacjentów (22–24). Intensyfikacja chemioterapii (25,26), stosowanie leczenia podtrzymującego (27,28) czy też kombinacja leczenia pierwszej linii z ASCT również nie poprawiły wystarczająco odpowiedzi na leczenie (29).

Mimo wprowadzenia nowych form leczenia oraz nowych przeciwciał anti-CD20 większość schematów terapeutycznych wciąż opiera się na rytuksymabie. Dlatego poszukiwanie możliwości potencjalizowania jego działania pozostaje jednym z wiodących kierunków badań. Stworzenie nowych schematów w oparciu o znane już terapeutyki ma przewagę ekonomiczną oraz zwykle krótszy czas do implementacji klinicznej od prób stworzenia zupełnie nowych rozwiązań leczniczych. Dlatego obecnie dla samego DLBCL toczy się ponad 150 badań klinicznych oceniających skuteczność nowych schematów terapeutycznych w z zastosowaniem rytuksymabu (zgodnie z clinicaltrials.gov.pl).

1.2 Antygen CD20

Białko CD20 jest kodowane przez znajdujący się na chromosomie 11 gen *MS4A1*. Gen *MS4A1* o długości 16 kb zbudowany jest z 8 eksonów (30,31). Opisano kilka różnych wariantów transkryptów mRNA dla CD20, z których większość tłumaczona jest na identyczne, prawidłowe białko. W niektórych komórkach nowotworowych zidentyfikowano alternatywne transkrypty bez eksonu III kodujące skrócone białka CD20, w wyniku czego nie dochodzi do prawidłowego wiązania się z nimi przeciwciał anti-CD20 (32). Częsteczką CD20 jest nieglikozylowanym białkiem czterokrotnie przechodzącym przez błonę komórkową, a jej większa część i oba końce (-C i -N) zakotwiczone są w cytozolu. Miejscem wiązania rytuksymabu do CD20 jest zewnątrzkomórkowy obszar dużej pętli między 3 a 4 regionem transbłonowym.

CD20 może występować w postaci trzech różnych izoform (33, 35 i 37 kDa) w zależności od stopnia fosforylacji. W przypadku proliferujących, nowotworowych komórek B obserwowano najwyższy stopień fosforylacji. CD20 zwykle występuje na powierzchni komórek w formie homodimerów lub tetramerów, często w bliskim sąsiedztwie innych tetraspanin tj. CD53, CD81 i CD82. Jest także sprzężone z częsteczką CD40, MHC II oraz powiązanym z kinazami SRC receptorem BCR (ang. B cell receptor, główny receptor limfocytów B) (33,34).

CD20 jest markerem obecnym na powierzchni limfocytów B od stadium późnych limfocytów pre-B oraz komórek nowotworowych wywodzących się z limfocytów B i traconym na etapie zróżnicowanych plazmoblastów i komórek plazmatycznych. Białko CD20 pełni funkcję transportera błonowego dla jonów wapniowych. Jest też częścią kompleksu uczestniczącego w przewodzeniu sygnałów regulujących proliferację i różnicowanie limfocytów B (30). W modelu *in vitro* na liniach ludzkich limfocytów B potwierdzono, że zmniejszenie ekspresji CD20 za pomocą siRNA prowadzi również do zmniejszenia przepływu wapnia aktywowanego przez BCR (35). Poziom ekspresji CD20 różni się w zależności od typu nowotworu. Komórki przewlekłej białaczki limfocytowej (CLL, ang. chronic lymphocytic leukemia) charakteryzują się najniższą ekspresją CD20, z kolei komórki DLBCL i białaczki włochatokomórkowej na ogół zawierają dużo CD20 (36). Wysoka ekspresja CD20 jest pozytywnym czynnikiem rokowniczym u pacjentów z DLBCL i niektórymi innymi rozrostami hematologicznymi leczonych rytuksymabem (37–39).

Funkcja biologiczna CD20 w limfocytach B nie jest jednak do końca poznana. Opisano przypadek pacjenta z całkowitą utratą CD20 na skutek homozygotycznej mutacji *MS4A1* w miejscu splicingu czyli składania eksonu 5 (40). U pacjenta obserwowano prawidłowe poziomy IgM w surowicy i całkowitą liczbę limfocytów B. Brak CD20 skutkował w tym przypadku jedynie zmniejszeniem liczby krążących limfocytów B pamięci i obniżonym poziomem IgG oraz zmniejszoną zdolnością do reagowania na antygeny T-niezależne. Podobne łagodne konsekwencje immunologiczne ograniczone do niewielkiego upośledzenia odpowiedzi na antygeny T- zależne i niezależne zaobserwowano u myszy z celowo usuniętym CD20 na skutek wprowadzenia homozygotycznej mutacji w genie *MS4A1* (41,42).

CD20 dzieli z receptorem BCR elementy wewnątrzkomórkowej kaskady sygnałowej, dlatego leczenie rytuksymabem może zaburzać ścieżki przekazywania BCR, a nawet zmniejszać jego ekspresję (43). W modelu komórek CLL wykazano korelację powierzchniowej ekspresji, a nawet możliwość współregulacji CD20 i BCR (44). Wyciszenie CD20 w komórkach nowotworowych powodowało upośledzenie fosforylacji białek przekazywania sygnału z BCR (tj. LYN, SYK, GAB1 i ERK) (44). Sugeruje to, że antygen CD20 może w pewnym zakresie uczestniczyć w procesie tonicznej aktywacji BCR. Z tego względu istnieje możliwość wzajemnych interakcji molekularnych pomiędzy drobnocząsteczkowymi inhibitorami kinaz przekazującymi sygnał z BCR a rytuksymabem i innymi przeciwciałami anti-CD20. Dotychczasowe wyniki badania II fazy nie wykazały korzyści z dodania rytuksymabu do

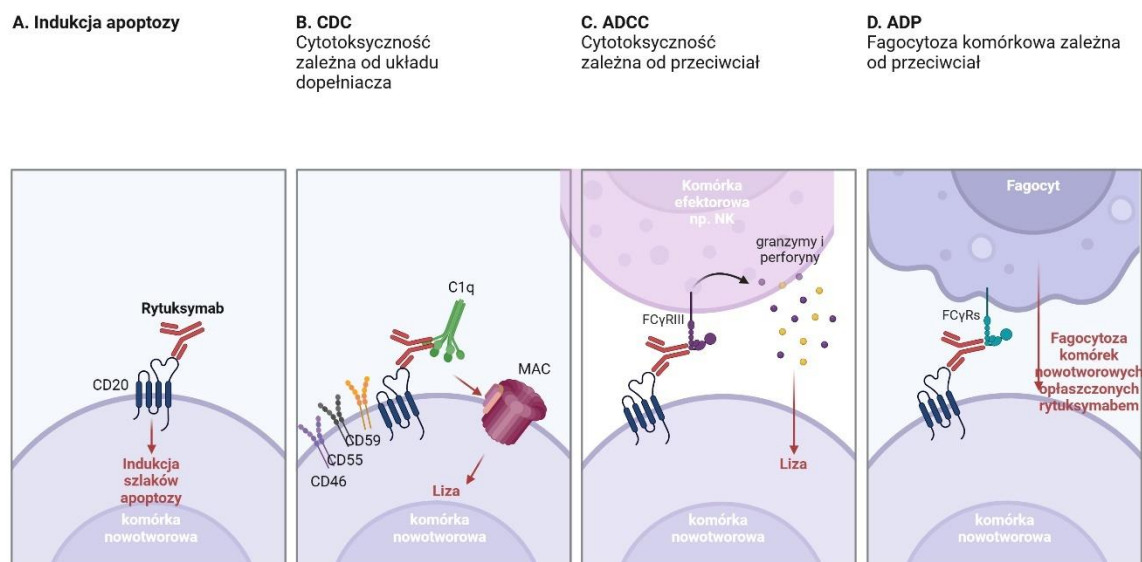
ibrutinibu w terapii pacjentów z CLL (45), pozostaje jednak niejasnym czy brak efektu wynika z negatywnych interferencji molekularnych czy z braku synergizmu.

1.3 Rytuksymab i jego mechanizmy działania

Rytuksymab łączy się z białkiem CD20 obecnym na powierzchni komórek pre-B, dojrzałych limfocytów B i wywodzących się z nich komórek nowotworowych. Antygeny nie wytwarzają wczesne komórki prekursorowe ani plazmatyczne, dlatego nie ma ryzyka trwałego zniszczenia populacji limfocytów B ani całkowitego upośledzenia odpowiedzi humoralnej podczas terapii rytuksymabem (30,46). Rytuksymab wiąże się do CD20 w jego zewnątrzkomórkowej części.

Znane są przynajmniej 4 główne mechanizmy cytotoksyczności rytuksymabu wobec komórek docelowych: cytotoksyczność zależna od przeciwciał (ADCC, ang. antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity), cytotoksyczność zależna od układu dopełniacza (CDC, ang. complement dependent cytotoxicity), fagocytoza komórkowa zależna od przeciwciał (ADCP, ang. antibody-dependent cellular phagocytosis) oraz indukcja apoptozy (47).

Główne mechanizmy działania rytuksymabu w chłoniakach B-komórkowych



Rycina 1. Główne mechanizmy działania rytuksymabu w chłoniakach B-komórkowych.

Na podstawie dostępnych badań *in vitro* i *in vivo* wydaje się, że udział poszczególnych mechanizmów w całkowitej skuteczności leczniczej rytuksymabu jest zmienny i zależny od

rodzaju rozrostu nowotworowego (48). Ponadto, przeciwciało zwykle stanowi jedynie część schematu terapeutycznego i jego działanie może być modulowane przez równolegle stosowane leki. Wreszcie efektywność poszczególnych procesów jest także zależna od czynników gospodarza (np. polimorfizmy genów receptorowych), może być modyfikowana czynnikami zależnymi od nowotworu oraz mikrośrodowiska guza (49–51). W zależności od mikrośrodowiska guza zmienia się wiodący mechanizm działania przeciwciał monoklonalnych anti-CD20. Eksperymenty w modelach myszy transgenicznym wykazały, że ADCC jest głównym mechanizmem usuwania komórek nowotworowych krążących we krwi, podczas gdy za lizę limfocytów B ze strefy brzeżnej węzłów chłonnych odpowiada w głównej mierze CDC (52). Zauważono, że najwyższa oporność na rytuksymab występuje wśród komórek zlokalizowanych w ośrodkach rozmnażania węzłów chłonnych, co najprawdopodobniej wiąże się z obecnością sygnałów przeżyciowych (53).

1.3.1 Cytotoksyczność zależna od układu dopełniacza (CDC)

Po związaniu się rytuksymabu z antygenem CD20 dochodzi do aktywacji drogi klasycznej układu dopełniacza. Do fragmentu Fc przeciwciała wiąże się składnik C1q, następuje uruchomienie kaskady dopełniacza w efekcie czego powstaje kompleks atakujący błonę C5b-9 (MAC, ang. membrane attack complex). Jest to kanał perforujący błonę komórek B, przez który z komórki na zewnątrz wydostają się jony, substancje odżywcze i ATP, a do środka napływa woda i czynniki bakteriobójcze. Dochodzi do zaburzenia równowagi jonowo-osmotycznej i do lizy komórki. Ponadto związanie rytuksymabu z CD20 wywołuje migrację antygeny do obecnych w błonie komórkowej obszarów tratw lipidowych co prowadzi do przekazywania sygnału do wnętrza komórki (48,54). Proporcjonalnie do ilości CD20 aktywacji dopełniacza towarzyszy powstawanie reaktywnych form tlenu (55). Aktywność dopełniacza jest najwyższa w przypadku komórek chłoniaka grudkowego (FL, ang. follicular lymphoma) i chłoniaka z komórek płaszczka (MCL, ang. mantle cell lymphoma), najmniej wrażliwe wydają się być komórki przewlekłej białaczki szpikowej (CML, ang. chronic myeloid lymphoma) prawdopodobnie z uwagi na niższą ekspresję białka CD20 (56). Wydaje się, że w przypadku DLBCL dopełniacz nie pełni wiodącej roli dla efektywności rytuksymabu z uwagi na niewielką ilość nowotworowych komórek wolno krążących. Z drugiej strony niedobór C1q w odróżnieniu od wyczerpania komórek NK lub granulocytów skutkowało niepełną odpowiedzią na rytuksymab w mysim modelu DLBCL (57). Wykazano także zasadniczy udział CDC w toksyczności przeciwciała wobec komórek B w strefie brzeżnej węzłów chłonnych (58).

Ponadto wysoka ekspresja jednego z głównych inhibitorów układu dopełniacza - CD59, jest czynnikiem niekorzystnym rokowniczo i przekłada się na zmniejszenie OS i PFS w grupie pacjentów z DLBCL (59).

1.3.2 Cytotoksyczność zależna od przeciwciał (ADCC) i fagocytoza komórkowa zależna od przeciwciał (ADCP)

Wolny koniec Fc związanego z CD20 rytuksymabu może również aktywować poprzez receptory FcγR komórki efektorowe. Pobudzone w ten sposób komórki (monocyty, makrofagi, neutrofile, eozynofile oraz komórki NK a w szczególności subpopulacja CD56dim o wysokiej ekspresji FcγRIII (CD16)) uwalniają enzymy cytolityczne lub fagocytują opłaszczone rytuksymabem komórki nowotworowe (60). Liczne badania *in vitro* oraz *in vivo* sugerują wiodącą rolę ADCC i ADCP w przeciwnowotworowym działaniu rytuksymabu w leczeniu chłoniaków (60,61).

1.3.3 Indukcja apoptozy

Związanie rytuksymabu z CD20 skutkuje translokacją cząsteczek i tworzeniem klasterów białek CD20. Takie przemieszczenie w obrębie tratw lipidowych aktywuje związane z CD20 kinazy LYN, FYN i LCK i uruchamia ścieżki przekazywania sygnałów wewnątrzkomórkowego poprzez mediatory tj. NF-κB, PI3K/AKT, MAPK, ERK1/2 i p38. Rytuksymab może wpływać na poziom ekspresji białek anty- i proapoptotycznych, a także cząsteczek Fas na powierzchni komórek nowotworowych (62–65). W efekcie rytuksymab bezpośrednio hamuje proliferację i indukuje apoptozę komórek nowotworowych oraz uwrażliwia je na działanie niektórych chemioterapeutyków (66).

1.3.4 Efekt „szczepionkowy”

Ciekawym i nie do końca wyjaśnionym zagadnieniem wydaje się być tzw. „booster effect” czyli obserwowana często silniejsza odpowiedź na rytuksymab przy kolejnych podaniach. Możliwe, że fragmenty zniszczonych przez rytuksymab komórek nowotworowych mogą być wyłapywane i prezentowane przez komórki odpornościowe odpowiednim limfocytom cytotoksycznym. Dzięki temu odpowiedź na powtórne podanie leku jest szybsza, a czas remisji osiągniętej kolejnym podaniem rytuksymabu może być dłuższy od pierwszego okresu remisji (67).

1.3.5 Synergizm rytuksymabu z chemioterapeutykami

Podaż rytuksymabu może uwrażliwiać komórki nowotworowe na równoczesne działanie chemioterapeutyków i umożliwia stosowanie ich w mniejszych, mniej toksycznych dawkach. Wydaje się, że uwrażliwianie na chemioterapeutyki oraz proapoptotyczne właściwości rytuksymabu mają wspólne podłoże molekularne. Działanie cytostatyków opiera się na uszkodzaniu mechanizmów naprawczych komórek, nici DNA, hamowaniu ich proliferacji. Rytuksymab zmniejsza poziom IL-10, co prowadzi do spadku aktywności czynnika transkrypcyjnego STAT3, który z kolei reguluje ekspresję antyapoptotycznego białka BCL-2 (68). Przekłada się to na silne uwrażliwienie komórek na cytotoksyczny wpływ chemioterapeutyków. Wykazano synergistyczne, proapoptotyczne działanie przeciwciała z paklitakselem (69), cyklofosfamidem, cisplatyną i innymi (70).

1.4 Oporność komórek nowotworowych na rytuksymab

Dane na temat oporności pierwotnej i wtórnej na rytuksymab są niejednoznaczne. W praktyce przeciwciało zwykle podawane jest jako część terapii kombinowanej razem z chemioterapeutykami lub innymi lekami. Trudno jest więc ocenić izolowany udział rytuksymabu w skuteczności całego schematu lub też oporność na niego. Badania kliniczne dotyczące efektywności rytuksymabu w monoterapii są ograniczone. Przyjmuje się, że brak odpowiedzi na leczenie schematem zawierającym rytuksymab lub progresja choroby w ciągu 6 miesięcy takiego leczenia oznacza oporność na rytuksymab. Szacuje się, że oporność pierwotna w postaci braku odpowiedzi na pierwszą linię leczenia z użyciem rytuksymabu dotyczy 15% pacjentów. Blisko 60% pacjentów początkowo odpowiadających na lek wykształca oporność wtórną (71,71–73).

Mechanizmy oporności na rytuksymab można podzielić na dwie grupy: oporność związana z inwazyjnością nowotworu oraz oporność związaną z mechanizmami immunologicznymi pacjenta. W praktyce komórki guza często wykształcają mechanizmy nasilające niekorzystne uwarunkowania osobnicze pacjenta i czasami trudno jednoznacznie sklasyfikować zaobserwowane zjawisko do poszczególnej grupy.

1.4.1 Zmiany w ilości antygeny CD20

Jednym z głównych mechanizmów oporności na rytuksymab jest zmniejszenie ilości białka CD20 na powierzchni komórek nowotworowych. Zmniejszona ekspresja zarówno na poziomie

przed jak i potranslacyjnym jest częściej obserwowana w przypadku oporności pierwotnej (74). Do obniżenia ilości białka CD20 może jednak dochodzić na wszystkich etapach syntezy białka (transkrypcji, modyfikacji potranskrypcyjnej, translacji, modyfikacji potranslacyjnej oraz transportu do błony komórkowej) co zostało wykazane w licznych modelach *in vitro* i *in vivo* (75–77). Opisano możliwość wykształcenia oporności wtórnej na skutek internalizacji CD20 przez komórki MCL oraz CLL (78). Procesy epigenetyczne mogą także odpowiadać za wykształcenie oporności wtórnej w modelu DLBCL (79), a związki o właściwościach demetylacyjnych teoretycznie mogłyby odwracać ten efekt. Nasz zespół udowodnił możliwość potencjalizacji cytotoksycznego działania rytuksymabu m.in. poprzez potranslacyjne zwiększanie ilości CD20 przy użyciu inhibitorów deacetylaz histonów (80). Z kolei delecja w końcu C genu *MS4A1* dla CD20 może wpływać na miejsce wiązania rytuksymabu do białka powierzchniowego i upośledzać jego działanie (81). Innym mechanizmem utraty białka CD20, zwłaszcza w przypadku dłuższego stosowania wysokich, wysycających dawek przeciwciała, może być usuwanie kompleksów rytuksymab/CD20 z powierzchni komórek B przez komórki efektorowe – w szczególności monocyty i makrofagi (81). Wykazano także, że komórki niektórych chłoniaków wywodzących się z limfocytów B są zdolne do wydzielania egzosomów zawierających białka CD20. Wydzielone antygeny wiążą się z przeciwciałami anti-CD20, co prowadzi do wiązania i zużywania składowych układu dopełniacza, a w efekcie chroni komórki nowotworowe przed toksycznością rytuksymabu w mechanizmie CDC (82).

Dotychczas opisano wiele czynników transkrypcyjnych (tj. SMAD2/3, NF- κ B, OCT1/2, PU.1, ELK1, ETS1, SP1, MYC) oraz epigenetycznych (HDAC1/2, HDAC1/4, HDAC6, EZH2,) wpływających na ekspresję CD20 (75). Podejmowane są próby wykorzystania związków oddziałujących na powyższe czynniki (tj. inhibitory deacetylazy histonowej, bryostatyna-1, inhibitory kinazy Aurora A/B, gemcytabina) w celu potencjalizacji działania rytuksymabu i innych przeciwciał poprzez zwiększanie ilości CD20. Niektóre spośród tych związków np. bryostatyna, azacytydyna, alisertib stosowane są nawet w połączeniu z leczeniem anti-CD20 w badaniach klinicznych (83–86).

1.4.2 Składowe układu dopełniacza

Aktywność układu dopełniacza jest normalizowana m.in. przez białka błonowe znane jako regulatory dopełniacza tj. CD46 (MCP), CD55 (DAF), CD59 i mniej aktywne CD35 (CR1). W niektórych liniach komórkowych wykazujących oporność na rytuksymab zaobserwowano wzrost ekspresji wymienionych białek regulatorowych. Nasz zespół badawczy wykazał także,

że negatywna regulacja tych białek przekłada się na zwiększenie skuteczności przeciwciał monoklonalnych anti-CD20 (87). Podanie świeżo mrożonego osocza jako źródła składowych komplementu w grupie pacjentów z CLL opornym na rytuksymab również przekłada się na poprawę odpowiedzi na przeciwciało (88). Opisano, że wysoka ekspresja CD59 oraz zmniejszenie ilości miR-224, który jest jego negatywnym regulatorem są czynnikami niekorzystnymi rokowniczo i przekładają się na niższe wskaźniki OS i PFS u pacjentów z DLBCL (59). Zablokowanie CD55 i CD59 *in vitro* oraz *ex vivo* skutkowało wzrostem toksyczności rytuksymabu wobec komórek chłoniaka Burkitta i chłoniaka grudkowego (73). Z drugiej strony w innych badaniach *ex vivo* na większej grupie nie potwierdzono aby poziom ekspresji antygenów CD46, CD55 lub CD59 był czynnikiem prognostycznym odpowiedzi na terapię rytuksymabem w modelu chłoniaka grudkowego (90).

Oprócz niekorzystnego wpływu na działanie przeciwciał monoklonalnych anti-CD20 białka regulatorowe chronią komórki nienowotworowe przed nadmiernym efektem cytotoksycznym (91). Dlatego negatywna regulacja białek CD46, CD55 i CD59 obecnie nie ma szerszego zastosowania klinicznego. Trwają badania nad przeciwciałami bispecyficznymi i imitującymi CD55 anti-idiotypowymi, które mogłyby selektywnie upośledzać działanie białek regulatorowych wobec komórek nowotworowych bez ogólnoustrojowych efektów niepożądanych (92).

1.4.3 Mechanizmy oporności na działaniu rytuksymabu w mechanizmie ADCC

Zdolność do zabijania komórek nowotworowych w mechanizmie ADCC jest zależna od polimorfizmu receptora Fcγ komórek efektorowych, najprawdopodobniej poprzez wpływ na siłę wiązania rytuksymabu przez komórki efektorowe (49). W kohortach pacjentów z DLBCL zaobserwowano lepszą odpowiedź na rytuksymab i schemat R-CHOP wyrażoną w wyższych wskaźnikach PFS i OS w grupie homozygot FcγRIIIa-158 V (związanych z polimorfizmem receptora i syntezą waliny w pozycji 559) (93,94). Niektóre badania podważają jednak wartość prognostyczną polimorfizmu FcγRIIIaR w kontekście odpowiedzi na leczenie schematem R-CHOP (95,96). Wiadomo, że wrodzona niska ekspresja FcγRIII negatywnie wpływa na cytotoksyczność rytuksymabu (97).

Efektywność ADCC jest także zależna od wiązania receptorów KIR komórek NK z HLA II komórek nowotworowych. Potwierdzono, że zarówno wysoka liczba ligandów KIR oraz

nadekspresja HLA na powierzchni komórek chłoniaka są negatywnymi markerami prognostycznymi odpowiedzi na rytuksymab (98) (99).

Spadek zdolności rytuksymabu do indukcji ADCC zaobserwowano także pod wpływem hamowania syntezy cholesterolu przez statyny (77), w niedoborze witaminy D (100) oraz przy dużej dostępności składowej dopełniacza C3b (101). Degranulacja komórek NK może być także bezpośrednio hamowana przez komórki NHL z wysokim poziomem inhibitora proteazy serynowej – serpiny B9 (102).

Skuteczność ADCC jest także modyfikowana przez inne komórki układu odpornościowego, niezaangażowane bezpośrednio w aktywność cytotoksyczną. Wykazano, że monocyty dzięki proteazom serynowym mogą bezpośrednio usuwać rytuksymab z powierzchni komórek nowotworowych, a wraz z neutrofilami wytwarzają reaktywne formy tlenu, które upośledzają żywotność i aktywność efektorową komórek NK (103,104). Nadekspresja peroksyredoksyny-1 (PRDX1) w komórkach NK zwiększała ich aktywność przeciwnowotworową (105).

1.4.4 Inne mechanizmy oporności komórek nowotworowych na przeciwciała monoklonalne anty-CD20

Analiza ekspresji genów w próbkach 240 pacjentów z DLBCL wykazała zmniejszoną ekspresję MHC i CD58 na powierzchni komórek nowotworowych, co przekłada się na obniżenie aktywności limfocytów T i komórek NK (106,107). Analiza *in vitro* komórek opornych na rytuksymab (RRCL, ang. rituximab resistant cell lines) wykazała nadekspresję i hiperaktywację białek szlaków przekazujących sygnały proliferacyjne tj. NF- κ B, PI3K/AKT i ERK1/2 i antyapoptotycznych BCL-2, BCL-XL i MCL-1 oraz obniżenie poziomu białek BAK i BAX o funkcji proapoptotycznej (36,65,108). Aberracje niektórych z tych białek (np. NOXA) skutkują nawet zmniejszeniem efektywności komórek NK do mediacji ADCC w DLBCL (109). Wykazano z kolei, że poprzez modyfikację aktywności rodziny białek BCL-2 można potencjalizować toksyczność rytuksymabu względem komórek nowotworowych (110).

Zbadanie mechanizmów oporności na przeciwciała monoklonalne anty-CD20 jest pierwszym krokiem do zaprojektowania rozwiązań zwiększających ich skuteczność. Materiał biologiczny od pacjentów z R/R DLBCL jest trudny do uzyskania ze względu na lokalizację zmian chorobowych w węzłach chłonnych oraz brak rutynowego wykonywania powtórnych biopsji w trakcie leczenia. W związku z tym podstawowym narzędziem badawczym służącym

weryfikacji kolejnych hipotez badawczych w tym zakresie są modelowe linie komórkowe odporne na rytuksymab. Większość z nich powstała w wyniku wielokrotnej i wydłużonej ekspozycji komórek na wzrastające stężenia rytuksymabu, tak by proces nabywania oporności naśladował warunki kliniczne (111,112).

1.5 Przeciwciała anty-CD20

Jednym z wiodących kierunków zwiększania skuteczności obecnie stosowanych strategii terapeutycznych jest projektowanie nowych przeciwciał monoklonalnych mogących zastąpić rytuksymab. Jak dotychczas opracowano kilka nowszej generacji przeciwciał monoklonalnych, skierowanych podobnie jak rytuksymab przeciwko cząsteczce CD20, tj. ofatumumab, obinutuzumab, ocrelizumab oraz znakowane radioizotopami tozytumomab i ibrytumomab. W licznych badaniach klinicznych oceniano skuteczność tych przeciwciał w leczeniu różnych typów chłoniaków i nie wykazano znaczącej przewagi nad rytuksymabem (113–116). W randomizowanym badaniu III fazy GOYA, gdzie do schematu CHOP dodano obinutuzumab, nie zaobserwowano różnic w czasie przeżycia bez progresji choroby między ramieniem eksperymentalnym, a grupą leczoną schematem R-CHOP. Odnotowano natomiast wyższy wskaźnik zdarzeń niepożądanych stopnia 3 i 4 w stosunku do grupy kontrolnej (117). Analogicznie, nie wykazano różnic w PFS, ORR (ang. objective response rate, odsetek obiektywnych odpowiedzi) i OS między ramieniem leczonym ofatumumabem w monoterapii (109) a rytuksymabem w monoterapii w grupie pacjentów z nawrotowym chłoniakiem grudkowym (118). Ibrytumomab oraz tozytumomab osiągają podobne do rytuksymabu wskaźniki PFS i ORR ale wiążą się z wyższym ryzykiem wystąpienia zdarzeń niepożądanych. Podobne wnioski zawarto w metaanalizie 11 randomizowanych badań kontrolnych oceniających skuteczność poszczególnych przeciwciał anty-CD20 u 5261 pacjentów z chłoniakiem B-NHL CD20⁺. Dotychczas żaden z wymienionych terapeutyków nie zastąpił rytuksymabu w protokołach pierwszej linii leczenia chłoniaków, a ich zastosowanie w kolejnych rzutach jest ograniczone (119).

Pewne nadzieje związane są również z przeciwciałami bispecyficznymi, które wiążą się z dwoma różnymi antygenami, często obecnymi na innych komórkach np. komórce nowotworowej i limfocycie efektorowym wykazującym działanie cytotoksyczne. Przykładami takich przeciwciał jest odronekstamab i glofitamab skierowane przeciwko antygenom CD20 oraz CD3. Odronekstamab wiążąc się poprzez cząsteczkę CD3 z limfocytami T może angażować je do bezpośredniego cytotoksycznego wpływu na komórki chłoniaka CD20⁺.

Wstępne wyniki badania fazy 1 wskazują, że odronekstamab w monoterapii może powodować trwałą odpowiedź u pacjentów z nawrotowym lub opornym na leczenie chłoniakiem nieziarniczym z limfocytów B, a profil bezpieczeństwa przeciwciała jest akceptowalny (120). Podobne obiecujące rezultaty w badaniach 2 fazy wykazuje glofitamab (121).

1.6 Inne połączenia terapeutyczne

Dołączanie do schematu leczniczego kolejnych chemioterapeutyków i innych leków wiąże się z ryzykiem zwiększania potencjału toksycznego terapii. Poszukiwane są więc kombinacje toksyn z przeciwciałami monoklonalnymi, które umożliwią celowane dostarczanie leku do komórek nowotworowych. Polatuzumab wedotyny jest koniugatem przeciwciała wiążącego się z antygenem CD79b (obecny na powierzchni 95% komórek chłoniaków DLBC) oraz monometyloaurystatyny (MMAE), która wykazuje potencjał antymitotyczny. Kombinowana budowa związku pozwala w sposób selektywny dostarczać MMAE do komórek nowotworowych ograniczając jej toksyczny efekt systemowy. W wieloośrodkowym, randomizowanym badaniu II fazy GO29365 dodanie polatuzumabu wedotyny do bendamustyny i rytuksymabu znacząco zwiększało odpowiedź na leczenie i zmniejszało ryzyko zgonu o 58% u pacjentów z nawrotowym lub opornym DLBCL. W ramieniu badanym czas przeżycia był 3-krotnie dłuższy w stosunku do ramienia standardowego (122). 2-letni wskaźnik PFS wynosił odpowiednio 76,7% i 70,2% (123). Dlatego w kwietniu 2023 FDA (ang. Food and Drug Administration, Amerykańska Agencja ds. Żywności i Leków) zatwierdziła polatuzumab wedotyny w połączeniu z rytuksymabem, cyklofosfamidem, doksorubicyną i prednizolem (R-CHP) w pierwszej linii leczenia dorosłych pacjentów z DLBCL, chłoniakiem nieokreślonym lub chłoniakiem z komórek B o wysokim stopniu złośliwości i Międzynarodowym Wskaźnikiem Prognostycznym wynoszącym co najmniej 2 (124). Dotychczas FDA dopuszczała stosowanie koniugatu przeciwciało-lek w skojarzeniu z bendamustyną i rytuksymabem (BR) do leczenia pacjentów z nawrotowym lub opornym na leczenie DLBCL, którzy wcześniej otrzymali co najmniej dwie linie terapii.

Pomimo intensywnych badań nad nowymi strategiami terapeutycznymi, w tym terapiami celowanymi i immunomodulującymi schematy oparte o przeciwciała monoklonalne anty-CD20 pozostają podstawą leczenia DLBCL. Rytuksymab pełni kluczową rolę w obowiązujących protokołach terapeutycznych i stanowią fundament schematów pierwszego rzutu.

1.7 Szlak przekazywania sygnału z BCR

Aktywacja receptora limfocytów B (BCR) jest niezbędna do prawidłowego funkcjonowania i proliferacji komórek B. W warunkach prawidłowych aktywność tej ścieżki przekazywania sygnału jest regulowana wielopoziomowo. W przypadku komórek nowotworowych obserwowana jest nieprawidłowa, chroniczna aktywacja szlaku przekazywania sygnału z BCR, co umożliwia przeżycie zmienionych chorobowo komórek. W charakteryzującym się gorszym rokowaniem i słabą odpowiedzią na leczenie podtypie ABC-DLBCL opisano szczególny wpływ BCR oraz TLR9 na utrzymującą się aktywność czynnika przeżyciowego NF-κB (125). Obserwacje te stanowią przesłankę do testowania inhibitorów kinaz szlaku BCR w terapii białaczek i chłoniaków B-komórkowych (126,127). Do tej pory wiele inhibitorów kinaz szlaku przekazywania sygnału BCR znalazło miejsce w badaniach przedklinicznych, klinicznych a nawet uzyskało rejestrację FDA. Niektóre z nich stosowano również w kombinacji z przeciwciałami anti-CD20. Tabela 1 podsumowuje zastosowanie niektórych z inhibitorów BCR.

INHIBITOR	CEL MOLEKULARNY	ZASTOSOWANIE
Ibrutinib (PCI-32765)	Inhibitor BTK	- chłoniak z komórek płaszcza (ang. mantle cell lymphoma, MCL) (rejestracja FDA)(128) - przewlekła białaczka limfocytowa (CLL) (rejestracja FDA) (129) - makroglobulinemia Waldenströma (WM) (rejestracja FDA) (130) - chłoniak rozlany z dużych komórek B (DLBCL) – faza 3 badań klinicznych (131) - chłoniak grudkowy (FL) – faza 3 badań klinicznych (132)

		-chłoniak strefy brzeżnej (MZL, ang. marginal zone lymphoma) (rejestracja FDA) (128) -chłoniak z małych limfocytów B (SLL, ang. small lymphocytic lymphoma) – faza 3 badań klinicznych (133)
R406 (forma aktywna fostamatynibu)	Inhibitor SYK	- chłoniak rozlany z dużych komórek B (DLBCL)- Faza 2 badań klinicznych (134) - chłoniak z obwodowych limfocytów T – faza 2 badań klinicznych (135)
Idelalizyb (CAL-101)	Inhibitor PI3K	- przewlekła białaczka limfocytowa (CLL) – faza 3 badań klinicznych (136) - chłoniak z małych limfocytów B (SLL, ang. small lymphocytic lymphoma) – faza 3 (137) - chłoniak grudkowy – faza 3 (138) - indolentny chłoniak – faza 3 (139)
SC-204052	Inhibitor LCK	- dotychczas nie stosowany w badaniach klinicznych
MK-2206	Inhibitor AKT	- chłoniak rozlany z dużych komórek B (DLBCL)- 2 faza (140) - ostra białaczka szpikowa (AML, ang. acute myeloid leukemia) – 2 faza (141) - przewlekła białaczka limfocytowa (ang. chronic lymphocytic leukaemia, CLL) faza 2 (142)

		- chłoniak z małych limfocytów B (SLL, ang. small lymphocytic lymphoma) – faza 2 (142)
GDC-0068 (Ipatasertib)	Inhibitor AKT	- nawrotowe i oporne na leczenie chłoniaki - faza 2 (143)

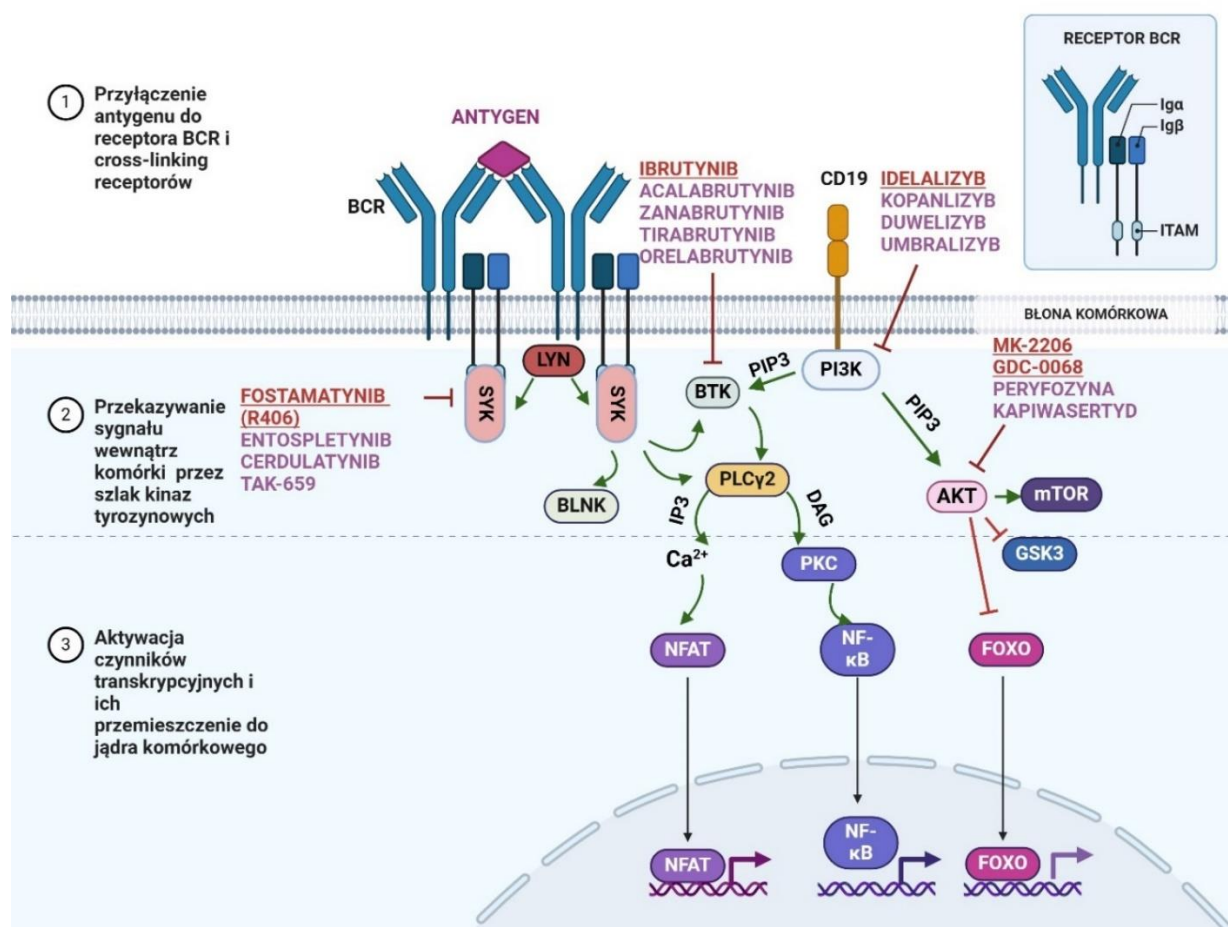
Tabela 1. Zastosowanie niektórych inhibitorów BCR w różnych nowotworach hematologicznych.

Aby wytypować najlepsze cele molekularne do hamowania aktywności szlaku należy szczegółowo poznać schemat ścieżki sygnałowej z BCR. Na rycinie 2 przedstawiono schemat przekazywania sygnału z BCR. Po związaniu antygeny z częścią zewnętrzną receptora BCR kinaza LYN fosforyluje wysoce konserwatywne motywy aktywacyjne oparte na tyrozynie (ITAM), które znajdują się w obrębie receptorów CD79A (Igα) i CD79B (Igβ) (144). Następnie dochodzi do zależnej od LYN aktywacji kinazy SYK – jej fosforylacji na tyrozynie 352. Jednocześnie kinaza LYN aktywuje fosfatazy hamujące transdukcję sygnału z BCR, a więc pełni podwójną rolę pozytywnego i negatywnego regulatora szlaku. Gdy kinaza SYK zwiąże się z aktywnymi domenami ITAM CD79A/B dochodzi do jej autofosforylacji na tyrozynie 525/526 co wzmacnia sygnał BCR. Kolejny sygnał aktywacyjny przekazywany jest przez kinazę tyrozynową Brutona (BTK) (145). Ponadto dochodzi do zależnej od LYN fosforylacji cytoplazmatycznej części antygeny CD19 (pozytywnego koreceptora BCR) co powoduje przemieszczenie się w stronę błony komórkowej PI3Kδ. Kinaza PI3 przekształca 4,5-bisfosforan fosfatydyloinozytolu (PIP2) w 3,4,5-trifosforan fosfatydyloinozytolu (PIP3). PIP3 wzmacnia sygnał podwójnie: z jednej strony wraz z 3-fosfatydyloinozytylozależną kinazą białkową 1 (PDK1) aktywuje kinazę AKT, z drugiej strony jest niezbędny do przekazania sygnału przez wcześniej aktywowaną BTK (144).

Aktywna kinaza AKT (czyli ufosforylowana w dwóch miejscach: na treoninie 308 przez PDK1 i serynie 473 przez kompleks kinazowy mTORC2) reguluje białka mTOR, GSK3 oraz czynniki transkrypcyjne FOXO1/3 a dalej MCL-1, BCL-x_L, XIAP, cyklina D2, MYC. W efekcie ta część szlaku bezpośrednio reguluje cykl komórkowy, apoptozę i mechanizmy naprawcze (146,147).

Jak wspomniano PIP3 jest także niezbędny do przekazania sygnału przez kinazę BTK. BTK hydrolizuje PIP3 przez PLCγ2 w efekcie czego powstają dwa drugorzędowe przekaźniki

sygnału tj. 1,4,5-trójfosforan inozytolu (IP₃) oraz diacyloglicerolu (DAG). IP₃ poprzez uwolnienie jonów wapnia do wnętrza komórki aktywuje kalmodulinę, która za pomocą czynników transkrypcyjnych NF-AT oraz IRF4 reguluje m.in. powstawanie komórek plazmatycznych. Z kolei uruchomienie szlaku DAG aktywuje kinazę PKC β niezbędną do utworzenia kompleksu CBM (CARD11, BCL10 i MALT1), który rekrutuje IKK - aktywator czynnika transkrypcyjnego NF- κ B. W postaci nieaktywnej NF- κ B jest związany w cytoplazmie przez białko inhibitorowe I κ B. Podczas aktywacji kanonicznego szlaku przekąźnictwa kinaza IKK2 fosforyluje inhibitor I κ B, co prowadzi do jego oddysocjowania od NF- κ B. Uwolniony NF- κ B przemieszcza się do jądra komórkowego, gdzie działa jako regulator ekspresji genów związanych z przeżyciem i proliferacją limfocytów. Poza aktywacją wspomnianych przekąźników drugorzędowych dodatkowo PLC γ 2 wpływa na szlak kinaz aktywowanych przez mitogen (MAPK) zawierający białka ERK1/2, JNK oraz p38 MAPK. Na ostatnim etapie szlaku możliwa jest negatywna regulacja NF- κ B za pomocą A20. Fosfatazy SHIP-1 i PTEN hamują natomiast sygnalizację PI3K (144).



Rycina 2. Szlak przekąźnictwa sygnału z receptora BCR.

1.8 Inhibitory kinaz LYN, LCK, SYK, BTK

Jak wspomniano kinaza LYN pełni podwójną funkcję regulatora pozytywnego i negatywnego szlaku przekazywania z BCR. Wydaje się, że sama rzadko jest czynnikiem onkogennym, ale udowodniono, że może wykazywać takie właściwości w połączeniu z białkami adaptorowymi Cbp/PAG (148). Ponadto opisano udział LYN w tworzeniu mikrośrodowiska wspierającego wzrost komórek nowotworowych w CLL (149). Dlatego ewentualne próby jej izolowanej regulacji nie są obiecujące w kontekście działania przeciwnowotworowego i ograniczają się obecnie do prób regulacji mikrośrodowiska CLL za jej pośrednictwem (150).

Udowodniono, że uznawana wcześniej za specyficzną dla limfocytów T kinaza LCK również uczestniczy w transdukcji sygnałów prożyciowych z BCR, a w przypadku niektórych nowotworów z limfocytów B opisano jej możliwy potencjał onkogenny (151). Dotychczas największe możliwości przeciwnowotworowego działania poprzez inhibicję kinazy LCK opisano w modelu CLL (152). Zastosowanie zotyrycylu (TG02), który jest niespecyficznym inhibitorem wielu kinaz (w tym LCK i FYN) powoduje blokadę przekazywania sygnału przez BCR oraz uniemożliwia aktywację NF- κ B i AKT, co w efekcie może prowadzić do apoptozy komórek białaczkowych (153). W połączeniu z ibrutynibem TG02 wykazuje umiarkowaną synergię co sugeruje możliwość wykorzystania związku do przełamывania oporności na działanie antagonistów BCR (153). Aktywacja niereceptorowej kinazy SYK jest niezbędna w celu przekazania sygnału z BCR na niższe molekuly szlaku - PI3K, BTK i PLC γ 2. Silną aktywację tej kinazy, a więc jej potencjalny udział onkogenny opisano w przypadku komórek linii DLBCL i CLL (154).

Najwięcej badań o najwyższym zaawansowaniu klinicznym nad antyonkogennym potencjałem hamowania kinazy SYK przeprowadzono przy użyciu fostamatynibu, który jest prolekiem aktywnego metabolitu o nazwie R406 i specyficznym inhibitorem kinazy SYK. Inne dostępne inhibitory (entospletynib (GS-9973), cerdatulatinib (PRT062070) oraz TAK-659) używano w badaniach wcześniejszych faz. Inkubacja komórek z R406 wywołuje blokadę sygnału z BCR i receptorów integrynowych, zmniejsza migrację i adhezję komórek w szpiku i węzłach chłonnych, a nawet częściowo powoduje apoptozę w modelach komórkowych CLL i innych nowotworów B-komórkowych (155). W mysim modelu CLL podanie R406 powodowało blokadę sygnału z BCR, redukcję proliferacji i przeżywalności komórek i w efekcie zahamowanie progresji choroby (156). Mimo zachęcających rezultatów z badań przedklinicznych w badaniu II fazy wśród pacjentów z nawrotowym i opornym DLBCL, ORR

na leczenie fostamatynibem wynosił jedynie 3% (134). Wydaje się, że połączenie inhibitorów SYK z innymi lekami ukierunkowanymi na szlak przekąźnictwa z BCR mogłoby potencjalizować ich antyonkogenne działanie. Jednakowoż wstępne wyniki badania fazy II skojarzonego stosowania entospletynibu z inhibitorem PI3K – idelalizybem sugerują ostrożne ich łączenie z uwagi na wysokie ryzyko (prawie 20%) występowania ciężkich działań niepożądanych takich jak zapalenie płuc i zgon w jego przebiegu. W wyniku łączonego użycia dwóch badanych leków doszło do nieoczekiwanego, silnego zahamowania szlaku mTOR i wiążącej się z tym silnej reakcji zapalnej (157).

Należąca do rodziny SYK/ZAP kinaza tyrozynowa ZAP-70 również ma znaczenie prognostyczne dla agresywnego przebiegu CLL (158). Niezależnie od zaawansowania klinicznego choroby wysoka ekspresja ZAP-70 koreluje ze skróceniem OS (159). Nieprawidłowa koekspresja ZAP-70 i SYK jest opisanym czynnikiem onkogennym również w przypadku ostrej białaczki limfoblastycznej (ALL) i w chłoniaku płaszczka (127). Wydaje się, że udział ZAP-70 w transmisji sygnału z BCR polega na stabilizacji wiązania fosforylacji SYK, a nie jej autonomicznej aktywności enzymatycznej, która jest bardzo niska (161). Dlatego próby jej hamowania nie wydają się być obiecującą strategią terapeutyczną. Jak dotychczas próby użycia selektywnych inhibitorów ZAP-70 ograniczone są do chorób autoimmunologicznych (162).

Kolejną cząsteczką sygnałową w kaskadzie przekąźnictwa z BCR jest kinaza BTK. Kinaza tyrozynowa Brutona (BTK) jest jedną z kinaz z rodziny TEC. Zahamowanie działania kinazy BTK prowadzi do upośledzenia funkcjonowania zależnego od BCR, antyapoptycznego białka BCL-xL a więc w konsekwencji prowadzi do apoptozy komórek. Udowodniono także jej udział w przekazywaniu sygnału z receptorów chemokinowych, TLR oraz Fc (163,164). Ze względu na bezpośredni udział w przekazywaniu sygnału z BCR, białko BTK jest atrakcyjnym celem do projektowania leków hamujących całą ścieżkę w nowotworach wywodzących się z limfocytów B. Ponadto, z uwagi na ekspresję BTK w populacjach komórek mieloidalnych stanowiących element mikrośrodowiska guzów, od niedawna hamowanie kinazy budzi zainteresowanie także w kontekście terapii guzów litych (163). Inhibitory BTK mogą wiązać się z kinazą kowalencyjnie w resztach cysteiny typu dzikiego (WT, ang. wild-type) lub zmutowaną formą Cys481 oraz niekowalencyjnie zajmować kieszeń ATP lub H3 BTK. Wszystkie obecnie zatwierdzone są inhibitorami kowalencyjnymi hamującymi aktywność enzymatyczną BTK silnie i nieodwracalnie. W efekcie upośledzają proliferację, chemotaksję,

transport i adhezję limfocytów B oraz komórek nowotworowych wywodzących się z nich (165).

Ibrutynib (inaczej PCI-32765) czyli inhibitor BTK pierwszej generacji ma największe spośród całej grupy zastosowanie kliniczne. W 2013 roku FDA wydała pozwolenie na stosowanie ibrutynibu u chorych z chłoniakiem z komórek płaszcza (166). Obecnie wskazania do stosowania ibrutynibu uległy rozszerzeniu i obejmują: przewlekłą białaczkę limfocytową (również w skojarzeniu z rytuksymabem), makroglobulinemię Waldenströma (również w skojarzeniu z rytuksymabem), nawrotową/oporną formę chłoniaka strefy brzeżnej, chłoniaka z małych limfocytów, przewlekłą chorobę przeszczep-przeciwko-gospodarzowi, a w połączeniu z obinutuzumabem przewlekłą białaczkę limfocytową w pierwszej linii leczenia (130).

Skuteczność ibrutynibu w monoterapii w kolejnej linii leczenia u pacjentów z nawrotowym lub opornym CLL jest wysoka, całkowity odsetek obiektywnych odpowiedzi wynosił ponad 70% nawet w grupie pacjentów z obecnym niekorzystnym czynnikiem rokowniczym zgodnej z linią zarodkową CLL sekwencji IGVH (ang. Immunoglobulin Heavy Chain Variable Region, region zmienny łańcucha ciężkiego immunoglobulin) (75, 76). Odpowiedź była długotrwała, po 26 miesiącach szacowano wskaźnik PFS na 75% a OS na 83%. W badaniach III fazy u pacjentów z CLL ibrutynib wykazał wyższy ORR, dłuższe PFS i OS w porównaniu do terapii konwencjonalnych (ofatumumabu, rytuksymabu, chlorambucylu oraz immunochemioterapii) (165). Zadawalające wyniki stosowania ibrutynibu w monoterapii nowotworów hematologicznych okazały się być kamieniem milowym przynosząc możliwość leczenia nowotworów z komórek B bez chemioterapii. Doświadczenia kliniczne wykazały jednak liczne wady monoterapii: niski wskaźnik całkowitych remisji, niewykrywalność minimalnej choroby resztkowej (uMRD, ang. unmeasurable residual disease), lekooporność, potencjalną toksyczność. Ibrutynib jest niespecyficznym inhibitorem BTK. Wykazano, że poprzez tworzenie niespecyficznych wiązań w resztami cysteinowymi innych białek może hamować kinazy rodzin EGFR, SRC, ITK i inne (168). Toksyczność niezwiązana z podstawowym celem molekularnym (tzw. ang. off-target toxicity) jest przyczyną pojawiania się podczas terapii działań niepożądanych (kardiotoksyczność, zaburzenia krzepnięcia, występowanie infekcji oportunistycznych (168,169)) i jest najpoważniejszym czynnikiem ograniczającym szerokie zastosowanie ibrutynibu oraz najczęstszą przyczyną przerywania terapii. Inhibitory BTK drugiej generacji do których zaliczamy akalabrutynib (ACP-196), zanubrutynib (BGB-3111), tirabrutynib (ONO/GS-4059) i orelabrutynib (ICP-022) wykazują wyższą selektywność wobec

BTK, co przekłada się na mniejszą toksyczność (170). Kolejnym problemem terapeutycznym jest oporność na ibrutynib powiązana ze zmniejszeniem powinowactwo do kinazy w przypadku zamiany cysteiny na serynę w miejscu wiązania leku. W przypadku mutacji typu nabycia funkcji w PLC γ 2 (R655W i L845F) dochodzi do autonomicznej aktywności BCR, a mutacja zmiany sensu w obrębie CARD11 promuje niezależną od BTK aktywację NF- κ B w DLBCL i MCL (171). Ponadto w przypadku CLL i FL stwierdzono aktywującą mutację w BTK (L528 W), która może powodować oporność na leczenie ibrutynibem. Podczas długotrwałej terapii może dochodzić do aktywacji alternatywnych szlaków sygnałowych niezależnych od BCR, co także promuje przeżycie i wzrost komórek nowotworowych (172). W kolejnych próbach klinicznych łączy się więc ibrutynib lub inne inhibitory BTK z dostępnymi schematami leczniczymi aby potencjalizować efekty terapii, ograniczać oporność na pojedyncze leki i toksyczność związaną z dużymi dawkami poszczególnych substancji. W badaniu III fazy HELIOS wykazano, że dodanie ibrutynibu do bendamustyny stosowanej z rytuksymabem u pacjentów z R/R CLL/SLL znacząco poprawia skuteczność leczenia ocenianą w postaci pierwszorzędowych punktów końcowych tj. długość PFS i OS oraz drugorzędowego punktu końcowego ORR bez pogorszenia profilu bezpieczeństwa terapii (173).

1.9 Inhibitory PI3K w terapii chorób limfoproliferacyjnych

Kinaza PI3K jest heterodimerem jednostek regulatorowych oraz katalitycznych występujących w 4 izoformach (p110 α , p110 β , p110 δ i p110 γ) spośród których p110 δ odgrywa szczególną rolę w dojrzewaniu limfocytów B. Obecność dysregulacji w obrębie szlaku PI3K–AKT–mTOR występuje w prawie 40% różnych typów nowotworów (174). Najczęściej do zaburzeń szlaku dochodzi na skutek całkowitej utraty ekspresji białka PTEN (30%), czyli negatywnego regulatora szlaku, oraz mutacji genów PIK3CA (13%), PTEN (6%) i AKT (1%) (174). Chociaż początkowa analiza danych TCGA (ang. The Cancer Genome Atlas, Atlas Genomu Raka) nie wykazała zwiększonej częstości mutacji PI3K w grupie pacjentów z DLBCL, to obecnie pojawia się coraz więcej doniesień o zaburzeniach szlaków związanych z AKT w licznych nowotworach hematologicznych (175). U prawie 10% pacjentów z DLBCL stwierdza się zwiększoną aktywność szlaku wywołaną mutacją w obrębie genu kodującego p110 α (176). Mutacje lub amplifikację PIK3CA stwierdza się w 68% przypadków chłoniaka z komórek płaszczka i tylko w 5,6% przewlekłej białaczki limfatycznej (177). Ponadto wykazano, że wyższy poziom p-AKT koreluje z nadekspresją MYC i BCL-2, co klinicznie związane jest z agresywnym przebiegiem choroby i przekłada się na krótszy PFS (178). W przypadku

chłoniaka grudkowego do zwiększonej aktywacji szlaku PI3K/AKT najczęściej prowadzi zwiększona fosforylacja AKT lub obniżony poziom ekspresji PTEN (179). W większości przypadków GCB (ang. Germinal Center B-cell-like) DLBCL stwierdza się utratę PTEN powodującą nadaktywność PI3K/AKT (180). Nadmierną fosforylację AKT stwierdzono w 63% preparatów biopsyjnych pacjentów z chłoniakiem Hodgkina oraz prawie 50% przypadków chłoniaka z obwodowych limfocytów T (181,182). Wysoki poziom aktywnej kinazy AKT występuje także w grupie pacjentów z CLL z niekorzystnymi rokowniczo mutacjami TP53 i NOTCH oraz w charakteryzującym się agresywnym przebiegiem zespole Richtera. Eksperymentalne zwiększenie aktywacji AKT w modelu mysim CLL wywołało transformację w zespół Richtera (183). W przypadku GCB DLBCL za aktywację AKT odpowiada toniczny (niezależny od antygeny) sygnał z BCR, a wyciszenie kinazy jest toksyczne dla komórek nowotworowych. Podobnie konstytutywna aktywacja czynnika NF- κ B, który również podlega regulacji przez AKT, jest obserwowana w podtypie ABC DLBCL (177). Wykazano, że pojawienie się konstytutywnej aktywacji szlaku PI3K/AKT i czynnika NF- κ B może odpowiadać za nabywanie oporności komórek NHL na radioterapię. Zastosowanie inhibitorów kinazy PI3K/AKT (LY294002 lub SH-5) zwiększa apoptozę komórek różnych linii chłoniaka Burkitta poddawanych radioterapii (184). Badania w modelu *in vitro* wskazywały, że inhibitory PI3K (ale nie AKT) mogą wywoływać apoptozę komórek nowotworowych poprzez wpływ na szlak RAF-MEK-ERK ale obserwacje te nie zostały powtórzone w warunkach *in vivo* (185). Wobec tak licznych doniesień nt. roli szlaku PI3K/AKT w patogenezie nowotworów limfoproliferacyjnych, hamowanie poszczególnych składowych szlaku PI3K-AKT-mTOR jest obecnie prężnie rozwijającym się kierunkiem poszukiwań nowych strategii leczenia.

Spośród dostępnych inhibitorów kinazy PI3K największe zastosowanie mają idelalizyby (selektywny wobec PI3K δ), kopanlizyby (inhibitor PI3K δ oraz α) oraz duwelizyby (inhibitor PI3K δ oraz γ) (144). Początkowo obserwowana wysoka skuteczność prekursora grupy -idelalizybu w leczeniu opornego/nawrotowego DLBCL przesądziła o szybkim rozpoczęciu badań w grupie chorych na wczesnych etapach choroby, dla których dotychczas linię leczenia stanowiła standardowa immunochemioterapia (186). Niemniej, w trzech badaniach klinicznych fazy III oceniających korzyść z dodania idelalizybu do standardowego schematu leczenia pierwszego rzutu CLL i wczesnego stadium NHL o powolnym przebiegu/chłoniaka z małych limfocytów (iNHL/SLL) zanotowano nieakceptowalną ilość poważnych działań niepożądanych (SAE, ang. serious adverse event) i zwiększone ryzyko zgonu w porównaniu do grupy kontrolnej. Ze względu na niepewny profil bezpieczeństwa leku przerwano niektóre

toczące się badania kliniczne i poddano weryfikacji wskazania do stosowania idelalizybu (157). Ograniczono stosowanie idelalizybu jedynie do leczenia kolejnego rzutu w skojarzeniu z rytuksymabem pacjentów z CLL lub w pierwszym rzucie przy występowaniu delecji 17p/mutacji TP53 jeśli nie kwalifikują się do innych terapii. Ponadto idelalizybu można stosować w przypadku opornego na leczenie chłoniaka grudkowego. Obecnie jego zastosowanie w terapii NHL jest marginalne.

Wydaje się, że na skutek preferencyjnego hamowania izoformy δ może dochodzić do kompensacyjnego wzrostu ilości izoformy α , co indukuje oporność na idelalizybu. Kapanlizybu jako inhibitor obu izoform zapobiega nabywaniu oporności przez komórki nowotworowe. Wykazano jego wysoką skuteczność nawet w opornym na ibrutynib podtypie ABC DLBCL, gdzie ekspresja PI3K α jest szczególnie nasiloną (187). Jednak ostatnie wyniki podwójnie zaślepionego, kontrolowanego placebo badania 3 fazy CHRONOS-4 nie wykazały przewagi kapanlizybu w połączeniu ze standardową immunochemioterapią w porównaniu z ramieniem kontrolnym u pacjentów z nawrotowym iNHL. Ponadto w ramieniu badanym zaobserwowano istotnie gorszą tolerancję leczenia (188).

Do najnowszych zarejestrowanych inhibitorów należą duwelizybu (wcześniej IPI-145, podwójny inhibitor PI3K δ i PI3K γ) i umbralizybu (dawniej TGR-1202, selektywny inhibitor PI3K δ , jak również kinazy kazeinowej-1 ϵ), charakteryzujący się korzystnym profilem bezpieczeństwa (189). Metaanaliza Wang i wsp. wykazała skuteczność i akceptowalny profil bezpieczeństwa kapanlizybu w skojarzeniu z rytuksymabem w terapii R/R B-NHL (190). W badaniu fazy III porównującym ofatumumab z duwelizybem w leczeniu nawrotowej i opornej na leczenie CLL/SLL wykazano przewagę inhibitora PI3K w zakresie ORR i PFS (191). Duwelizybu uzyskał rejestrację w kolejnej linii leczenia R/R CLL/SLL a umbralizybu w razie niepowodzenia leczenia chłoniaka grudkowego i strefy brzożnej (189). Wyniki badania III fazy DUO wykazały zwiększone ryzyko zgonu i SAE po 5-latach obserwacji pacjentów leczonych duwelizybem, co zaskutkowało wydaniem ostrzeżenia FDA w 2022 r (192). Najnowszy z zarejestrowanych inhibitorów PI3K – umbralizybu wykazał skuteczność w połączeniu z ublituksymabem (nowej generacji przeciwciałem anti-CD20) a nawet z ublituksymabem i z ibrutynibem/akalabrutynibem (w kombinacji pionowej) w leczeniu w CLL i NHL (193–195).

Dotychczas opracowano wiele inhibitorów samej kinazy AKT z których największą grupę stanowią inhibitory kompetycyjne ATP oraz allosteryczne. Przykładem inhibitora I generacji jest peryfazyna, która ze względu na niewielką skuteczność i umiarkowaną toksyczność nie jest

obecnie testowana w badaniach klinicznych w kontekście leczenia nowotworów limfoproliferacyjnych (196). Trwają badania skuteczności allosterycznego inhibitora drugiej generacji MK-2206, który w badaniach przedklinicznych wykazał silną aktywność toksyczną wobec komórek różnych typów chłoniaka zarówno *in vitro* jak i *ex vivo* (197). W badaniu II fazy u pacjentów z nawrotowym lub opornym na leczenie chłoniakiem, MK2206 również wykazał wysoką skuteczność i akceptowalny profil bezpieczeństwa (140). Innym kompetycyjnym inhibitorem wszystkich trzech izoform pAKT jest ipatasertyb (GDC-0068) (198), który obecnie testowany jest w badaniu II fazy u pacjentów z różnymi typami nowotworów o potwierdzonych mutacjach szlaku PI3K/AKT (143). W 2023 r. FDA zatwierdziła kapiwasertyd - inny inhibitor II generacji, do leczenia zaawansowanego raka piersi z mutacją PIK3CA/AKT1/PTEN (199). Skuteczność kapiwasertybu w leczeniu R/R NHL obecnie oceniana jest w badaniu II fazy o akronimie CAPITAL (200). W badaniach przedklinicznych wykazano także skuteczność kapiwasertybu w połączeniu z wenetoklaksem i rytuksymabem w modelach R/R DLBCL *in vitro* i *in vivo*.

Podsumowując, po początkowym entuzjazmie wynikającym z wyników badań przedklinicznych i pierwszych badań klinicznych, zastosowanie inhibitorów PI3K w leczeniu nowotworów zostało ograniczone z powodu ostrzeżeń dotyczących występowania poważnych działań niepożądanych. Najnowsze inhibitory kinazy AKT charakteryzują się lepszą tolerancją leczenia. W opublikowanej niedawno pracy zaproponowano wielopoziomowe, pionowe kombinacje inhibitorów osi PI3K/AKT. Zastosowanie 3 inhibitorów (idelalazybu, ipatasertibu, GSK2334470) pozwoliło uzyskać wysoką aktywność przeciwnowotworową wobec komórek DLBCL przy niskich dawkach poszczególnych inhibitorów, a więc bez ryzyka poważnych działań niepożądanych, co potwierdzono w badaniu *in vivo* w modelu mysim (201). Przed sformułowaniem konkretnych wniosków nt. możliwości transpolowania takich kombinacji do schematów terapeutycznych konieczne jest przeprowadzenie kolejnych badań.

1.10 Salinomycyna i związki jonoforowe

Spośród wielu związków o opisanym już wpływie na kinazę AKT szczególnie interesująca jest salinomycyna. Salinomycyna jest antybiotykiem politerowym wyizolowanym ze *Streptomyces albus*. Aktywność przeciwdrobnoustrojowa salinomycyny wynika z jej właściwości jonoforowych czyli kompleksujących jedno- i dwuwartościowe kationy (w szczególności potas) i udziale w ich przez błonowy transporcie, co powoduje zaburzenie ciśnienia osmotycznego, a w konsekwencji śmierć komórki. Salinomycyna wykazuje silne i

selektywne działanie przeciwnowotworowe. Wykazano jej zdolność do indukowania apoptozy w komórkach nowotworowych pacjentów z ostrą białaczką z limfocytów T. Równocześnie nie wykazywała takiego działania wobec limfocytów T od zdrowych dawców (202). W modelu niedrobnokomórkowego raka płuc salinomycyna hamowała wzrost i przeżycie kolonii oraz potencjał inwazyjny komórek nowotworowych (203). Salinomycyna uwrażliwia komórki nowotworowe na radioterapię (204). Aktywność przeciwnowotworową salinomycyny wykazano wobec różnych typów nowotworów, m.in. chłoniaków i CLL. Dokładne mechanizmy tego działania pozostają nieznane, ale dotychczas opisano jej hamujący wpływ na szlak WNT/ β -kateniny (205), mTORC1, czynniki transkrypcyjne NANOG, OCT4 i SOX2, cyklinę D, regulację proapoptycznego białka NAG-1 (203), akumulację jądrową p27kip1, hamowanie fosforylacji oksydacyjnej (206) oraz wpływ na transportery ABC glikoproteiny P (207). Salinomycyna zwiększa produkcję reaktywnych form tlenu poprzez hamowanie autofagii i akumulację uszkodzonych mitochondriów (179). Zaobserwowano, że salinomycyna może efektywnie przełamywać oporność komórek nowotworowych na standardowo stosowane chemioterapeutyki. Za ten efekt prawdopodobnie odpowiada jej negatywny wpływ na glikoproteinę P. Stąd próby łączenia salinomycyny z paklitakselem w obrębie nośników nanosystemowych (209).

Wydaje się, że salinomycyna może regulować aktywność AKT zarówno pozytywnie jak i negatywnie, w zależności od typu nowotworu. Pozytywny wpływ na aktywność kinazy AKT zaobserwowano w komórkach raka piersi (210). Z drugiej strony w innych pracach wykazano, że salinomycyna może hamować aktywność AKT i NF- κ B a także zależny od niej kompleks TORC1 (205,211). Dotychczas nie zbadano szczegółowo mechanizmów przeciwnowotworowego działania salinomycyny w modelach chłoniaków B-komórkowych.

Stosowanie salinomycyny i jej pochodnych u ludzi jest ograniczone z uwagi na potencjalną toksyczność. Jednym z głównych działań niepożądanych jest martwica mięśni spowodowana zahamowaniem produkcji ATP przez uszkodzone, w wyniku zaburzeń równowagi jonowej, mitochondria. Dlatego trwają prace na opracowaniu pochodnych salinomycyny charakteryzujących się mniejszym potencjałem toksycznym, ale większą aktywnością przeciwnowotworową (212).

Dotychczas opisano ponad 100 struktur chemicznych związków o podobnym do salinomycyny mechanizmie działania, jednak to salinomycyna jest najbardziej obiecującym związkiem w kontekście leczenia przeciwnowotworowego. Monenzyna była pierwszym spośród

wyizolowanych związków jonoforowych. W modelu *in vitro* wykazano jej przeciwnowotworowe działanie wobec komórek różnych typów chłoniaków poprzez zatrzymanie cyklu komórkowego i indukcję apoptozy (213). Podobnie jak salinomycyna charakteryzuje się toksycznością względem kardiomiocytów. Opisano także proapoptotyczny wpływ innego jonoforu - jonomycyny wobec komórek raka nerki w warunkach *in vitro* i *in vivo* (214). Do innych badanych w kontekście leczenia przeciwnowotworowego związków jonoforowych należą narazyna, nigerycyna i kwas lazallowy (215,215,216).

Każdego roku do badań klinicznych trafia ponad 500 nowych związków o potencjalnie przeciwnowotworowym działaniu. Szacuje się, że całkowity koszt opracowania nowej substancji chemicznej od etapu badań przedklinicznych do zatwierdzenia jej jako lek przez odpowiednie organy regulacyjne może wynosić nawet 2,5 miliarda dolarów (217). Tylko 5-10% leków testowanych w badaniach klinicznych uzyskuje rejestrację do leczenia. Dodatkowo proces oceny w badaniach klinicznych jest długotrwały. Z przytoczonych powodów poszukiwanie nowych kombinacji terapeutycznych w oparciu o istniejące już związki jest jednym z wiodących kierunków badań w onkologii. Dwadzieścia lat od wprowadzenia rytuksymabu do powszechnego stosowania w schemacie R-CHOP poszukiwania kombinacji zwiększającej skuteczność przeciwciał anti-CD20 celem stworzenia schematu wolnego od chemioterapii pozostają nieukończone. Wydaje się, że jedną z przyczyn dotychczasowych niepowodzeń może być odcięcie podejmowanych klinicznie prób od oceny synergizmu połączeń lekowych na etapie molekularnym. Dlatego, punktem wyjścia dla przedmiotowej rozprawy doktorskiej było ustalenie mechanizmów regulacji ekspresji antygenu CD20, a następnie próba wpłynięcia na te mechanizmy znanymi już lekami. Założenia te usystematyzowano w szczegółowych celach pracy przedstawionych poniżej.

2. Cele pracy

Cele niniejszej pracy doktorskiej:

1. Zbadanie wpływu inhibitorów przekazywania sygnału z receptora BCR (z uwzględnieniem kinaz SYK, BTK, PI3K i AKT) na ilość antygenu CD20 na powierzchni komórek nowotworowych wywodzących się z limfocytów B.
2. Zbadanie wpływu inhibitorów kinaz SYK, BTK, PI3K i AKT na przeciwnowotworowy efekt przeciwciał monoklonalnych anti-CD20.
3. Zwiększenie ilości antygenu CD20 i spotęgowanie skuteczności działania przeciwciał anti-CD20 poprzez wpływ na ścieżkę PI3K/AKT.
4. Poszukiwanie mechanizmu wpływu salinomycyny i innych związków jonoforowych na ilość antygenu CD20.

3. Materiały i metody

3.1 Zasady prowadzenia hodowli komórkowych

Wszystkie czynności hodowlane na kulturach komórkowych wykonywano z użyciem komory o laminarnym przepływie powietrza [NuAire] zapewniającej sterylne warunki pracy. Hodowle komórkowe prowadzono w specjalistycznych butelkach hodowlanych [BD Biosciences], w inkubatorze zapewniającym stabilne środowisko tj. temperaturę 37°C, 5% CO₂ oraz przy 95% wilgotności.

Komórki Karpas-422 pochodzą z Leibniz Institute DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures. Line OCI-Ly1 i 7 otrzymano od Prof. Margaret Shipp, Dana-Farber Cancer Institute, Boston, USA. Pozostałe ustalone linie komórkowe zakupiono w Amerykańskiej Kolekcji Hodowli Komórkowych (ang. American Type Culture Collection ATCC).

W tabeli zestawiono wykorzystywane linie komórkowe z typem nowotworu, który reprezentują.

Linia komórkowa	Typ nowotworu
PGA C1	Przewlekła białaczka limfocytowa B-komórkowa (ang. B-CLL)
Raji Ramos Daudi	Chłoniak Burkitta (BL, ang. Burkitt lymphoma)
OCI-Ly1 OCI-Ly7 SU-DHL-4 Karpas 422 Toledo Pfeiffer	Chłoniak rozlany z dużych komórek B (DLBCL)
HEK293T	Ustalona linia embrionalnych komórek ludzkiej nerki

Tabela 2. Linie komórkowe wykorzystywane do eksperymentów wraz z typem nowotworu, który reprezentują.

Większość hodowli prowadzono z zastosowaniem pożywki RPMI 1640 [Sigma Aldrich]. Komórki linii OCI-Ly-1 i OCI-Ly-7 hodowano w pożywce IMDM (ang. Iscove's Modified Dulbecco's Medium) [Gibco BRL]. Pożywki suplementowano 10% surowicą bydlęcą (FBS ang. Fetal bovine serum) [Gibco BRL] oraz mieszaniną penicyliny (100 jednostek/ml) i streptomycyny 100 µg/ml [Sigma Aldrich].

Pożądana gęstość komórek w hodowli wynosiła $1-2 \times 10^6$ /ml. W zależności od tempa namnażania pasaż komórkowy wykonywano co 2-3 dni. Każdorazowo zawiesinę komórkową przenoszono do sterylnych probówek [BD Falcon] o pojemności 15ml, a następnie wirowano [Wirówka Megafuge 1.0R Heraeus SEPATECH] przez 4 minuty w temperaturze 4°C i przyspieszeniu 350 RCF. Po usunięciu supernatantu osad komórkowy rozpuszczano w niewielkiej ilości pożywki. Po policzeniu komórek odpowiednią ilość pasażowano do butelki ze świeżą pożywką, a pozostałe przeznaczano do doświadczeń, mrożono w celu zabezpieczenia hodowli lub utylizowano.

W przypadku adherentnej linii HEK293T pożywkę usuwano w momencie całkowitego pokrycia powierzchni hodowlanej butelki przez komórki. Konfluentną hodowlę przepłukiwano 5 ml roztworem PBS [Biowest] pozbawionym jonów Mg^{2+} i Ca^{2+} , które mogłyby inaktywować tripsynę. Aby odwarstwić komórki od podłoża stosowano 5-minutową inkubację w 0,25% tripsynie [Cytogen] w cieplarni laboratoryjnej. Następnie dodawano 5ml świeżej pożywki hodowlanej w celu zahamowania aktywności proteolitycznej tripsyny. Komórki wirowano w standardowych warunkach i pasażowano według standardowej procedury.

Za pomocą testu PCR [MycosPY] – (PCR Mycoplasma Test Kit) systematycznie badano prowadzone hodowle komórkowe w kierunku zakażenia mykoplazmą. W przypadku pozytywnego wyniku hodowle leczono gotowym zestawem eliminacyjnym BM Cycling [Roche] zawierającym pleuromutylinę i tetracyklinę. Do pożywki dodawano kolejno oba antybiotyki w stężeniu odpowiednio 10 µg/ml i 5 µg/ml. Komórki leczono przez 2 tygodnie (minimum 2 cykle eliminacyjne) lub do czasu uzyskania negatywnego wyniku PCR.

3.2 Liczenie komórek żywych

Liczebność kolonii szacowano w 10-krotnym powiększeniu odwróconego mikroskopu optycznego [Axiovert 25 CarlZeiss] z użyciem kamery Bürkera [Heinz Herenz]. Aby odróżnić komórki martwe od żywych barwiono je wcześniej 0,4% błękitem trypanu [Sigma-Aldrich],

który wnika do wnętrza martwych komórek przez uszkodzone błony komórkowe i barwi je na niebiesko. Zawiesinę komórkową mieszano z barwnikiem w stosunku 1:1 (20 μ l: 20 μ l), a następnie połowę mieszaniny przenoszono na kamerę do ręcznego policzenia.

Liczba komórek w 1 ml pożywki odpowiada liczbie komórek żywych zliczonych w 25 polach wewnętrznych kamery pomnożonej przez 2 (ze względu na rozcieńczenie zawiesiny barwnikiem) oraz przez współczynnik kamery wynoszący 10 000. Tą samą metodą szacowano śmiertelność czyli odsetek martwych, niebieskich komórek w stosunku do wszystkich komórek z 25 kwadratów.

3.3 Kriokonserwacja, przechowywanie i rozmrażanie hodowli komórkowych

Komórki przeznaczone do mrożenia zawieszano w mieszaninie FBS oraz środka krioprezerwacyjnego DMSO [Sigma Chemicals] w stosunku 9:1. Pożądane stężenie komórek do przechowywania wynosiło $5-10 \times 10^6$ komórek/ml a końcowa objętość krioprecypitatu 750 μ L. W pierwszym etapie komórki w sterylnych kriotubkach [SARSTEDT] umieszczano na 24 godziny w temperaturze -80°C w kriotankach z izopropanolem spowalniającym temperaturę chłodzenia do około $-1^{\circ}\text{C}/\text{min}$. Następnie kriotubki bankowano w zbiornikach z ciekłym azotem w temperaturze -198°C . Podczas rozmrażania początkowo szybko ocieplano kriotubki w inkubatorze CO_2 a następnie ich zawartość przenoszono do odpowiedniej probówki i uzupełniano świeżym medium hodowlanym do objętości 15ml. Kolejno, po odwirowaniu (350 RCF, 4 minuty, 4°C), usuwano nadsącz zawierający DMSO a precypitat komórkowy zawieszano w świeżej pożywce i kontynuowano hodowlę w butelce.

3.4 Traktowanie komórek testowanymi związkami

Do eksperymentów z użyciem badanych związków terapeutycznych komórki nowotworowe wysiewano na płytkę 6-dołkową [BD Falcon] w zagęszczeniu około milion komórek na 10 ml dedykowanej pożywki. Do oznakowanych dołków dodawano seryjne rozcieńczenia testowanych substancji. Komórki z grupy kontrolnej inkubowano równocześnie z dodatkiem rozpuszczalnika (zwykle DMSO, w przypadku doświadczeń z salinomycyną z metanolem) w ilości odpowiadającej objętości testowanej substancji. Po upływie ustalonego czasu inkubacji (rutynowo 24 lub 48 godzin) komórki zbierano pipetą Pasteura [BD Bioscience] i wirowano w PBS [Biomed] (350 RCF, 4 minuty, 4°C).

Tabela 3 zawiera wykaz związków terapeutycznych stosowanych podczas realizacji projektu.

Typ substancji	Nazwa substancji	Producent	Stosowany środek rozpuszczający
Przeciwciała monoklonalne	Rytuksymab	Roche	Roztwór gotowy do iniekcji
	Ofatumumab	GlaxoSmithKline	
Drobnocząsteczkowe inhibitory kinaz	sc-204052	Santa Cruz Biotechnology	DMSO
	R406	SelleckChem	
	Ibrutynib (PCI-32765)	SelleckChem	
	Idelalizyb (CAL-101)	SelleckChem	
	MK-2206	SelleckChem	
	GDC-0068 (ipatasertyb)	SelleckChem	
Związki polietierowe	salinomycyna	Sigma Aldrich	Metanol/etanol
	narazyna	Sigma Aldrich	
	monenzyna	Sigma Aldrich	
	nigerycyna	Sigma Aldrich	
	kwas lasalowy	Sigma Aldrich	

Tabela 3. Lista związków chemicznych użytych w eksperymentach *in vitro*.

3.5 Cytometria przepływowa

Jednym z głównych narzędzi badawczych wykorzystywanych w projekcie była cytometria przepływowa. Badanie umożliwia równoczesną, wysoce wydajną (analizuje kilkaset tysięcy komórek w ciągu kilku minut) wieloparametrową analizę właściwości komórek żywych lub utrwalonych. W pracy wykorzystano możliwość cytometrycznej analizy następujących parametrów biologicznych i fizycznych:

- Rozmiar, kształt i ziarnistość komórek – oceniane na podstawie rozproszenia światła wywoływanego przez komórki przepuszczane przez wiązkę lasera. Niezbędne do prawidłowego wyselekcjonowania badanych subpopulacji komórek do analizy.

- Ekspresja antygenów powierzchniowych – umożliwia oznaczenie badanych białek na powierzchni komórek. Białka muszą być wcześniej wyznakowane przeciwciałami sprzężonymi ze związkami fluorochromowymi. Właściwość była wykorzystywana w tej pracy do badania wpływu leków na ekspresję białek powierzchniowych.
- Żywotność komórek – analiza pozwala na ocenę liczby martwych i żywych komórek po wybarwieniu odpowiednim barwnikiem żywotności, co zostało wykorzystane w badaniach toksyczności leków i przeciwciał monoklonalnych.
- Sortowanie komórek (w modelu z funkcją sortera) – możliwość oddzielania komórek o różnym poziomie ekspresji fluorescencyjnie oznaczonych markerów lub antygenów np. wprowadzonych do komórek przy użyciu plazmidów. Tą funkcją posłużono się do oddzielenia komórek po transdukcji plazmidem z barwnikiem fluorescencyjnym i zaprojektowaną kodującą sekwencją.

3.6 Ilościowa analiza antygenów powierzchniowych komórek

Badania przeprowadzono na cytometrach przepływowych FACScan i FACSriaIII [BD Biosciences] oraz FACS Canto II [Becton Dickinson] wyposażonych w oprogramowanie Cell Quest Pro 5.2 i FACSDiva Software v 6.1.3 [BD Biosciences]. Aby ocenić wpływ badanych terapeutyków na poziom antygenów obecnych na powierzchni komórek przeprowadzono analizę ilości antygenów przy użyciu cytometrii przepływowej. Do grupy kontrolnej użyto takiej samej ilości komórek inkubowanych jedynie z rozpuszczalnikiem. Ilość białek powierzchniowych oceniono po wcześniejszym oznakowaniu antygenów na komórkach odpowiednimi przeciwciałami sprzężonymi z fluorochromami (Tabela 4).

Do barwienia używano 1×10^5 badanych komórek, które zawieszano w 50 μ l PBS w polistyrenowych probówkach [BD Falcon]. Następnie dodawano nasycającą ilość odpowiedniego przeciwciała sprzężonego z fluorochromem. Komórki inkubowano w temperaturze pokojowej przez 30 minut bez dostępu światła. Po tym czasie w celu usunięcia nadmiaru niezwiązanego z badanymi antygenami przeciwciała komórki płukano 1 ml PBS, a następnie wirowano w standardowych warunkach (350 RCF, 4 minuty, 4°C). Płynny nadsącz usuwano, a pozostały osad komórkowy zawieszano w 100 μ l PBS lub 100 μ l roztworu jodku propidyny o stężeniu 4 μ g/ml [Sigma Aldrich]. Analiza cytometryczna każdorazowo obejmowała minimum 10 000 komórek, barwienia powtarzano przynajmniej dwukrotnie. Analizę ilościową antygenów powierzchniowych przeprowadzono wyłącznie w populacji komórek żywych, niezabarwionych jodkiem propidyny, który wnika do komórek

apoptotycznych i nekrotycznych. Odsetek komórek żywych, negatywnych względem barwienia jodkiem wynosił od 80% do 99% w zależności od substancji zastosowanej w eksperymencie. Do analizy ilościowej wykorzystano parametr MFI (ang. mean fluorescence index, średnia geometryczna intensywności fluorescencji), a wyniki przedstawiono jako procent MFI w odniesieniu do komórek kontrolnych. Do kontroli izotypowej pozwalającej wystandaryzować sygnał swoistych przeciwciał względem sygnału tła używano nieswoistego przeciwciała IgG1 sprzężonego z odpowiednim fluorochromem.

Białko powierzchniowe	Funkcja	Barwnik fluorochromowy	Klon	Producent
IgG1	kontrola izotypowa	FITC/PE	X40	Becton Dickinson
CD19	białko typowe limfocytów B, docelowe dla terapii CAR-T oraz przeciwciał monoklonalnych tj. blinatumomabu, denintuzumabu, inebilizumabu	FITC	4G7	Becton Dickinson
CD20	białko docelowe dla przeciwciał monoklonalnych	FITC	L27	Becton Dickinson
CD20	(rytuksymab, ofatumumab, obinituzumab)	PE	2H7	Becton Dickinson
CD21	białko typowe dla limfocytów B znane też jako CR2, receptor dla wirusa EBV	FITC	B-ly4	Becton Dickinson
CD22	białko charakterystyczne dla limfocytów B, cel terapeutyczny dla inotuzumabu oraz ogamycyny	FITC	S-HCL-1	Becton Dickinson
CD46	białko o funkcji inhibitora układu dopełniacza -	FITC	E4.3	BD Pharmingen

	kofaktor białkowy wiążący składniki C3b i C4b dopełniacza			
CD55	białko działające jako inhibitor układu dopełniacza – DAF czynnik przyspieszający rozkład konwertaz C3 i C5 układu dopełniacza	FITC	IA10	BD Pharmingen
HLA-DR	antygen zgodności tkankowej klasy II (MHC II), cel dla przeciwciał bi-specyficznych anti-CD20	FITC	L243	BD Pharmingen
ICAM-1	znane także jako antygen adhezyjny CD54, jego poziom ekspresji koreluje z funkcją kostymulującą względem limfocytów	PE	LB-2	Becton Dickinson
IgM	białko powierzchniowe BCR	FITC		DAKO

Tabela 4. Wykaz i charakterystyka przeciwciał użytych do badań cytometrycznych.

3.7 Test cytotoksyczności zależnej od aktywacji układu dopełniacza

Do oceny wpływu badanych leków na zdolność cytotoksyczną rytuksymabu i ofatumumabu poprzez aktywację układu dopełniacza (odpowiednio R-CDC lub O-CDC) również wykorzystano metodę cytometrii przepływową. W każdym dołku 24-dołkowej płytki umieszczono 250 μ l zawiesiny komórkowej (bez FBS) o gęstości 1×10^6 /ml. Źródłem dopełniacza było po 50 μ l surowicy pozyskanej od zdrowego dawcy o grupie krwi AB [Sigma Aldrich]. Następnie dodawano po 200 μ l odpowiednich rozcieńczeń rytuksymabu lub ofatumumabu (0, 1 lub 10 μ g/ml). Uzyskaną mieszaninę komórek, surowicy i przeciwciał w celu rozwinięcia działania układu dopełniacza inkubowano przez 1 godzinę w temperaturze 37°C. Następnie dodawano po 500 μ l zimnego (4°C) roztworu jodku propidyny (4 μ g/ml) w PBS w celu szybkiego i równoczesowego zatrzymania zachodzącej reakcji i zabezpieczenia komórek. Uzyskane zawiesiny komórkowe niezwłocznie analizowano w cytometrze

przepływowym w odpowiednich probówkach cytometrycznych. Oceniano odsetek żywych komórek (niezabarwionych jodkiem propidyny) w porównaniu do 100% żywotności w grupie kontrolnej (bez przeciwciała i badanej substancji).

3.8 Sortowanie komórek w oparciu o cechy morfometryczne oraz znakowanie fluorescencyjne (FACS, ang. fluorescence-activated cell sorting)

Eksperymenty wykonywano na cytometrze przepływowym z funkcją sortera komórek FACS Aria III [BD Biosciences] wyposażonym w oprogramowanie FACSDiva 6.1.2. Transdukowane retrowirusowo komórki Raji (także te z ekspresją białka zielonej fluorescencji, GFP ang. green fluorescent protein), zawieszano w sterylnym PBS w gęstości $10 \times 10^6/\text{ml}$. W celu rozbicia konglomeratów komórkowych filtrowano je sterylnym sitem podłączonym do probówek cytometrycznych. Następnie przeprowadzono sortowanie komórek w polu elektrycznym generowanym w cytometrze. System hydrauliczny cytometru pobierał zawieszinę ustawiając komórki w pojedynczym przepływie z zachowaniem odległości między komórkami równej minimum 1 średnicy pojedynczej komórki. Ruch wibracyjny dzielił przepływający strumień na pojedyncze krople zawierające tylko jedną komórkę. Intensywność świecenia białka GFP w komórkach mierzono w punkcie pomiarowym fluorescencji jeszcze przed podziałem strumienia na krople, tak aby pierścień znajdujący się w punkcie podziału nadawał ładunek elektrostatyczny jedynie kroplom z komórkami o wysokiej ekspresji GFP. Następnie naładowane dodatnio (a więc GFP pozytywne) opadające krople trafiały do osobnej próbki przyciągane za pomocą wbudowanych elektrod. Wyselekcjonowane komórki wymagały początkowo ostrożnego hodowania z uwagi na potencjalne mikrouszkodzenia i stres związany ze zmianą ładunku elektrostatycznego na błonach komórkowych oraz obecnością śladowych ilości azydku sodowego z cieczy osłonowej.

3.9 Detekcja białek metodą western blottingu

Do oceny wpływu badanych leków na całkowitą ilość poszczególnych białek w komórkach nowotworowych posłużono się techniką western blottingu. Jest to metoda biochemiczna umożliwiaющая wykrycie konkretnego białka, porównywanie poziomów ekspresji białek między różnymi próbkami lub badanie kierunku zmian ekspresji pod wpływem badanych leków ale nie metoda oceny ilościowej białka. Na wieloetapowe badanie składa się: izolacja białka z przygotowanych komórek, elektroforeza białek, transfer białek na odpowiednią membranę, inkubacja z przeciwciałem detekcyjnym oraz znakowanym, detekcja sygnału i

analiza danych. W projekcie wykorzystano metodę western blottingu do oszacowania zmian w ilości białek CD20, AKT i innych kinaz oraz niektórych czynników transkrypcyjnych pod wpływem badanych substancji lub w wyprowadzonych, zmodyfikowanych genetycznie klonach komórkowych.

3.10 Izolacja i pomiar stężenia białek

Próbki komórkowe poddawano lizie w celu uwolnienia białek. Minimum 1×10^6 badanych komórek płukano dwukrotnie w PBS, wirowano w standardowych warunkach i przenoszono do probówek typu Eppendorf (pojemność 1,5 ml). Następnie osad komórkowy poddawano lizie za pomocą 50-100 μ l buforu lizującego zawierającego 1% Triton X-100, 50 mM HEPES (pH 7.4), 150 mM NaCl, 5 mM EDTA oraz 10% glicerol, do którego przed użyciem dodawano inhibitory fosfataz i proteaz. Lizowanie komórek odbywało się na lodzie i trwało 30 minut. Następnie w warunkach 12 000 RCF przez 4 min w 4°C separowano niezlizowane struktury komórkowe. Metodą Bradforda mierzono stężenie białek w supernatancie. Do dołka płytki 96-dółkowej wprowadzono po 200 μ l PBS, 1 μ l lizatu białkowego oraz 50 μ l odczynnika Bradforda [BioRad]. Następnie mierzono absorbancję dokładnie wymieszanej zawartości dołków przy użyciu spektrofotometru Asys UVM340 [Biochrom] przy długości fali $\lambda=595$ nm. Pomiar absorbancji roztworów wzorcowych surowiczej albuminy bydlęcej (BSA, ang. bovine serum albumin) [Sigma Aldrich] o pewnych stężeniach w buforze lizującym wykreślały krzywą standardową. W drugiej części projektu, czyli eksperymentach z użyciem związków jonoforowych do pomiaru stężenia białek używano zestawu testowego Pierce BCA Protein Assay Kit [Thermo Fisher Scientific]. Metoda wykorzystuje reakcję bityncjoninianu sodu z jonami miedzi, które są redukowane w obecności białek. Zredukowane w obecności aminokwasów jony miedzi (Cu^{2+} do jonu Cu^{+}) tworzą, proporcjonalnie do ilości białka w próbce, intensywnie fioletowe związki kompleksowe z bityncjoninianem. Absorbancja kompleksów jest mierzona przy fali długości 562 nm za pomocą spektrofotometru i porównywana do krzywej wzorcowej. Całkowita denaturacja i nasycenie białek dodecylosiarczanem sodu (SDS) jest niezbędna przed przeprowadzeniem ich rozdzielania w żelu poliakrylamidowym. W tym celu po 10 μ g lizatu białkowego mieszano z 10 μ g buforu zawierającego Tris-HCl (62 mM, pH 6,8), 5% β -merkaptobetanol, 10% glicerol, 2,5% SDS i 0,004% błękit bromofenolowy. Próbkę przez 5 minut pozostawiano w temperaturze 97°C w termobloku celem skutecznej denaturacji. Dodecylosiarczan sodu (SDS) nadaje białkom ujemny ładunek niezbędny do migracji i rozdzielenia białek w polu elektrycznym podczas

elektroforezy. Dodatek β -merkaptoetanolu jest niezbędny do przerywania mostków dwusiarczkowych. Tak przygotowane lizaty białkowe wykorzystywano od razu do kolejnych etapów lub przechowywano w temperaturze -20°C .

3.11 Elektroforetyczny rozdział białek w żelu poliakrylamidowym oraz ich transfer na nitrocelulozową błonę

Próbki o łącznej zawartości białka między 1 a 25 μg (ale identycznej w próbkach tego samego eksperymentu) poddawano elektroforezie w żelu poliakrylamidowym w obecności SDS (SDS-PAGE). Elektroforezę prowadzono na samodzielnie przygotowanych żelach, zawierających od 7,5% do 15% poliakrylamidu [Sigma Chemicals] w zależności od masy poszukiwanych białek. Do przygotowania żeli używano także wody dejonizowanej, 10% APS, TEMEDu, 10% SDS i 1,5M Tris-HCl o pH 8,8. Do elektroforezy w aparacie ProteanPlus™ Tetra Cell [BIO-RAD Laboratories] w natężeniu $<40\text{ mA}$ używano buforu (0,1% SDS, 25 mM Tris, 192 mM glicyny). Po uwidocznieniu błękitu w żelu rozdzielającym elektroforezę napięcie zwiększano do wartości 120 V. Elektroforezę kończono w momencie całkowitego wypłynięcia znacznika bromofenolowego z żelu do buforu. Rozdzielone białka przenoszono na membranę nitrocelulozową [Whatman] metodą mokrej komory w urządzeniu Mini Trans-Blot® Electrophoretic Transfer Cell [BIO-RAD Laboratories] w obecności odpowiedniego buforu (25 mM Tris, 10% metanol, 192 mM glicyna). Procedura trwała 2 godziny, odbywała się w chłodni, używano natężenia 200 mA.

3.12 Inkubacja błon nitrocelulozowych z przeciwciałami i detekcja chemiluminescencji

Następnie oceniano efektywność przeprowadzonego transferu barwiąc błonę roztworem czerwieni Ponceau [Sigma Aldrich], który uwidacznia prążki rozdzielonych białek wiążąc się z nimi czasowo i niespecyficznie. Aby zapobiec niespecyficznemu wiązaniu się przeciwciał do detekowanych białek, błona była inkubowana przez 30 minut w 5% roztworze blokującym z BSA lub 5% odtłuszczonego mleku w proszku w TBST (0,1% Tween, 150 mM NaCl, 50 mM Tris HCl). Tak wyblokowaną błonę trzykrotnie płukano w TBST w celu usunięcia nadmiaru buforu blokującego. Następnie błonę inkubowano z pierwszorzędowym przeciwciałem skierowanym przeciwko białku docelowemu. Czas inkubacji zwykle wynosił 12-24 godzin, stosowano rozcieńczenia zgodne z kartami charakterystyki przeciwciał. Po trzykrotnym wypłukaniu błony w TBST prowadzono godzinną inkubację z przeciwciałem drugorzędowym, którego koniec Fc łączy się z peroksydazą chrzanową (HRP, ang. horseradish peroxidase). W

zależności od pochodzenia przeciwciała pierwszorzędowego stosowano przeciwciała drugorzędowe wykrywające fragment Fc myszy lub króliczy [Jackson ImmunoResearch]. Po finalnych 3 płukaniach błonę traktowano odczynnikiem Super Signal West Femto Substrate [Thermo Fisher Scientific] zawierającym luminol, który jest substratem dla HRP w reakcji chemiluminescencyjnej. Intensywność reakcji chemiluminescencyjnej wizualizowano za pomocą aparatów Odyssey Fc [Li-COR] lub Stella 8300 Bioimager [Raytest]. Wynikiem eksperymentu jest sygnał pochodzący z badanego białka zobrazowany na błonie nitrocelulozowej. Identyfikacja białka jest możliwa dzięki naniesionemu razem z próbkami markerowi wielkości białek Page Ruler Pre-Stained Protein Ladder [Thermo Scientific]. Intensywność emitowanego sygnału koreluje z ilością badanego białka w komórce. Do potwierdzenia równomiernego użycia lizatów białkowych, błony ponownie inkubowano z przeciwciałem przeciwko białkom referencyjnym tj. β -aktynie [Sigma Aldrich].

Antygen	Klon	Pochodzenie	Producent, nr katalogowy
CD20	poli- klonalne	królicze	Abcam, ab27093
AKT (pan)	p40D4	królicze	Cell Signaling #4685
fosfo-AKT seryna 473	40D4	królicze	Cell Signaling #4060
SYK	D3Z1E	królicze	Cell Signaling, #13198
BTK	D3H5	królicze	Cell Signaling #8547
SMAD2	D43B4	królicze	Cell Signaling, #5339
SMAD3	C67H9	królicze	Cell Signaling, #9523
SMAD4	D3M6U	królicze	Cell Signaling, #38454
FLAG tag	poli- klonalne	królicze	Cell Signaling, 5407
FOXO 1	C29H4	królicze	Cell Signaling, C29H4
FOXO 3	75D8	królicze	Cell Signaling,

β -aktyna (skoniugowane z HRP)	AC-15	mysie	Sigma Aldrich, A3854
króliczy koniec Fc przeciwciała (skoniugowane z HRP)	poli- klonalne	kozie	Jackson Immuno Research, 111-035-003
mysi koniec Fc przeciwciała (skoniugowane z HRP)	poli- klonalne	kozie	Jackson Immuno Research 111-035-144

Tabela 5. Lista przeciwciał użytych do analizy białek metodą Western blotting.

3.13 Ilościowa metoda oceny DNA metodą łańcuchowej reakcji polimerazy w czasie rzeczywistym (qRT-PCR)

Aby ocenić czy testowane związki zwiększają ilość transkryptu dla CD20 przeprowadzano ilościową reakcję łańcuchową polimerazy w czasie rzeczywistym (qRT-PCR, ang. real-time polymerase chain reaction). Technika ta umożliwia nie tylko końcowy pomiar ilości wybranego DNA w próbce ale także obserwację jego tempa przyrastania. Podczas eksperymentu próbka z matrycowym DNA jest ogrzewana i schładzana w termocyklerze, a materiał DNA kopiowany przez termostabilną polimerazę DNA z użyciem trifosforanów deoksyrybonukleozydów oraz specyficznych względem DNA starterów. Ilość produktu w postaci DNA jest podwajana w każdym cyklu. Jeżeli więc badany związek reguluje poziom CD20 na etapie transkrypcyjnym powinniśmy wcześniej zaobserwować wzrost ilości DNA z *MS4A1* w porównaniu do grupy kontrolnej. Detekcja jest możliwa dzięki wyznakowanym fluorochromami lub sondami starterom lub produktom. W moich eksperymentach posłużyłam się sondami fluorescencyjnymi typu TaqMan, które przewyższają specyficznością detekcji popularne i tanie barwniki typu SYBR Green. Sondy TaqMan składają się z krótkich fragmentów DNA (komplementarnego do sekwencji badanej) rozpoczynających się w końcu 5' reporterem ze znacznikiem fluorescencyjnym i zakończonych w 3' quencherem wygaszającym fluorescencję. W nieaktywnej sondzie quencher wygasza sygnał fluorescencyjny z położonego blisko reportera. Po hybrydyzacji sondy do komplementarnego DNA polimeraza Taq uwalnia reporter

i fluorescencja nie jest już wygaszana przez quencher. Sygnał fluorescencyjny jest proporcjonalny do ilości DNA znakowanego w reakcji.

Spektrofluorymetr rejestruje sygnał i umożliwia jego analizę ilościową. Na podstawie ilości produktu końcowego wynikającej z pomiaru intensywności sygnału można określić początkową zawartość badanego mRNA. Do normalizacji wyniku niezbędne jest wykonanie reakcji kontrolnych z użyciem „housekeeping genes” czyli referencyjnych genów o stałej ekspresji, nie regulowanej przez badane leki. W eksperymentach do tego celu posłużono się β -aktyną, β -2 mikroglobuliną i glicerinaldehydo-3-fosforanem dehydrogenazy (GAPDH).

3.14 Izolacja materiału genetycznego z komórek

Komórki inkubowane z lekami oraz odpowiadające im grupy kontrolne przenoszono do probówek typu Eppendorf i wirowano (400 RCF, 4 min., 4°C). Procedurę wykonywano dwukrotnie, każdorazowo płuczac komórki w PBS. Z odseparowanego peletu komórkowego izolowano RNA zestawem High Pure RNA Extraction Kit [Roche]. Otrzymany materiał genetyczny rozpuszczano w specjalnej wodzie pozbawionej enzymów o aktywności RNaz [EurX]. Stężenie i czystość RNA sprawdzano metodą spektrofotometryczną na urządzeniu Nano Drop Thermo Scientific 2000. Minimalna zadawalająca czystość RNA odpowiadała ilorazowi absorbancji $\lambda=260$ nm: $\lambda=280$ nm wynoszącym więcej niż 1.8. Materiał przechowywano w temperaturze -80°C.

Startery zaprojektowano w oparciu o konsensusowe sekwencje kodujące CDS (ang. Coding DNA Sequence) dla białka CD20 z bazy NCBI CCDS ID (baza CDS stworzona przez National Center for Biotechnology Information). Primery obejmowały dwa sąsiednie egzony, co eliminowało namnażanie niespecyficznego DNA z genomu i dawało produkty końcowej długości 100-150 bp. Specyficzność starterów sprawdzono in silico przy użyciu oprogramowania primer BLAST, które identyfikuje inne geny o częściowej komplementarności, a więc mogące powodować powstawanie niespecyficzných produktów. Analizowano również możliwość powstania struktur primer-dimer i cross-primer w programie Beacon Primer Design. Finalnie startery zawierały około 20 nukleotydów, minimum 50% zawartości GC (guanina i cytozyna) i temperaturę topnienia ok. 60°C.

Substratem do reakcji PCR jest stabilny, dwuniciowy cDNA. Dlatego kolejnym krokiem jest przekształcenie wyizolowanego w poprzednim kroku mRNA w cDNA. W tym celu

przeprowadzano reakcję odwrotnej transkrypcji. Enzym odwrotnej transkryptazy wirusa mieloblastozy ptasiej (AMV) [Eurex] na matrycy RNA z użyciem trifosforanów deoksynukleozydów (10mM dNTP [oligo.pl]), DTT (ditiotreitol [Sigma Chemicals]) i dedykowanych primerów oligo dT (10 μ M, [oligo.pl]) syntezuje cDNA. Pierwszy etap czyli przyłączenie primerów do mRNA zachodzi w czasie 5 minut w temperaturze 65°C. Następnie mieszanina chłodzona jest na lodzie. Po dodaniu AMV, DTT i buforu reakcja kontynuowana jest przez 15 minut w 42°C, a następnie przez 45 min w temperaturze 50°C. Otrzymane cDNA wykorzystywano od razu do reakcji PCR a nadmiar przechowywano w -20°C.

3.15 Reakcja PCR w czasie rzeczywistym (qRT-PCR)

Badane cDNA rozcieńczano 10-krotnie za pomocą wody wolnej od RNaz. Następnie przenoszono po 5 μ l cDNA na pola płytki 96-dółkowej [Roche]. Do mieszaniny reakcyjnej dodawano także dedykowane startery, sondy, składnik LightCycler® 480 Probe Master [Roche] z mieszaniną deoksynukleotydów (dNTP) i polimerazą FastStart Taq. Wykonywano po 3 powtórzenia techniczne w każdym eksperymencie.

Następnie płytkę reakcyjną umieszczano w urządzeniu LightCycler® 480 (Roche). Standardowo 45-cykłowa reakcja obejmowała:

- denaturację wstępną materiału oraz w każdym cyklu w temperaturze 95°C,
- annealing czyli przyłączanie starterów do komplementarnych fragmentów DNA – w niższej temperaturze (54–65°C), odpowiadającej T_m starterów,
- elongacja czyli wydłużanie nici – polimeraza tworzy kopię matrycy przyłączając dNTP do starterów w temperaturze 72°C. Na koniec reakcji polimeraza uzupełnia niekompletnie zsintezowane DNA.

Dzięki detekcji fluorescencji po zakończeniu każdego cyklu możliwe jest śledzenie przyrostu DNA w czasie rzeczywistym podczas trwania reakcji. Przeliczenie sygnału fluorescencyjnego na ilość materiału wyjściowego jest możliwe dzięki metodzie kwantyfikacji oprogramowania standardowego termocyklera (LightCycler® 480 Software 1.5). Analiza krzywych topnienia jest niezbędna w celu potwierdzenia specyficzności reakcji. Wynik jest stosunkiem ekspresji genu badanego – *CD20/SYK/BTK* do genu referencyjnego – *GAPDH/ β -AKTYNA/ β -2M* $\pm$ SD (ang. standard deviation, odchylenie standardowe).

Nazwa białka kodowanego	Sekwencja startera sensownego (5' → 3')	Sekwencja startera antysensownego (5' → 3')	T _m [°C]
β2M	ACCTTCTACATGAGC TGCG	CCTGGATAGCAACG TACATGG	54
CD20	GAATGGGCTCTTCCA CATTGCC	TCTCCGTTGCTGCCA GGAGT	60
β-aktyna	TTCCTTCCTGGGCAT GGAGT	ATCCACATCTGCTGGAG GGT	60
GAPDH	GTCTCCTCTGACTTC AACAGCG	ACCACCCTGTTGCTGTAG CCAA	60
SYK	TCAGCGGGTGGGAAT AATCTC	TGCAAGTTCTGGCTCATA CG	60
BTK	TGCAAGGATGTCTGT GAAGC	GGACAGGCCGAAATCAG ATA	60

Tabela 6. Sekwencje starterów sensownych i antysensownych użytych do badania regulacji transkrypcyjnej genów w reakcji PCR w czasie rzeczywistym.

3.16 Ocena aktywności promotora dla CD20 przy użyciu luminescencji

Promotor genu to obszar, który wiąże polimerazę RNA oraz białka regulatorowe np. czynniki transkrypcyjne kontrolując inicjację transkrypcji danego genu. Promotor leży bezpośrednio przed regionem kodującym gen (w kierunku 5'). W niniejszej pracy doktorskiej oceniano jak pod wpływem badanych leków zmienia się aktywność promotora genu dla CD20 czyli inicjacja ekspresji genu reporterowego kodującego białko emitujące światło.

W tym celu metodą nukleofekcji wprowadzono do komórek Raji konstrukt kodujący gen dla CD20 wklonowany do wektora pGL4 Luc [Promega] zawierającego gen lucyferazy świetlika (*Firefly luciferase*). Równocześnie komórki transfekowano też pustym wektorem pGL4 bez promotora *MS4A1*, również sprzężonym z bioreporterem *Firefly luc*. Plazmid referencyjny

zawierał sekwencję lucyferazy *Renilla* regulowaną konstytutywnie aktywnym promotorem dla kinazy tymidynowej (TK [Promega]).

Proces nukleofekcji umożliwia wprowadzenie do jądra komórkowego plazmidów podczas elektroporacji czyli zmiany przepuszczalności błon w polu elektrycznym. Pelet komórek Raji (2×10^6) po odwirowaniu w PBS (10 minut, 100 RCF, 18°C) zawieszano w 100 μ l mieszaniny nukleofekcyjnej Amaxa Cell Line Nucleofector Solution V [Lonza]. Następnie w dedykowanych kuwetach dodawano do mieszaniny plazmidy reporterowe i referencyjne (odpowiednio 1,5 μ g oraz 0,5 μ g). Proces nukleofekcji przeprowadzono w urządzeniu Amaxa II [Lonza] w programie M-013. Transfekowane komórki Raji inkubowano przez 24 godziny na 24-dółkowej płytce. Inkubacja jest niezbędna, aby promotor mógł zainicjować transkrypcję genu lucyferazy. Po inkubacji, przepłukaniu i odwirowaniu, komórki dzielono na 4 grupy i traktowano odpowiednimi lekami przez kolejne 24 godziny. Następnie zebrane komórki ponownie płukano i wirowano, a zebrany osad komórkowy lizowano przez 20 minut w 50 μ l dedykowanego buforu lizującego Passive Lysis Buffer [Promega] na lodzie. Aby oddzielić niekompletne produkty lizy, mieszaninę ponownie wirowano (12 000 RCF przez 10 min w 4°C). Po 10 μ l nadsącza przenoszono na odpowiednie pola białej płytki 96-dółkowej – za każdym razem wykonywano 2 powtórzenia techniczne. Po dodaniu 50 μ l substratu dla lucyferazy *Firefly* [Promega] (reprezentującej gen reporterowy) wykonywano pierwszy pomiar luminescencji na czytniku Victor™ X4 [Perkin Elmer]. Drugi pomiar (czyli aktywności genu referencyjnego) wykonywano po dodaniu 50 μ l substratu dla lucyferazy *Renilli* [Promega]. Ekspresję lucyferazy świetlika znormalizowano do genu reporterowego lucyferazy z *Renilli*. Wynikiem był iloraz luminescencji *Firefly/Renilla* w komórkach traktowanych badanym lekiem w odniesieniu do komórek grupy kontrolnej. Eksperyment pozwala ocenić czy i w jaki sposób aktywność promotora dla CD20 wyrażona intensywnością luminescencji zmienia się pod wpływem testowanych leków.

W eksperymentach używano mieszanin plazmidów:

Ryc. 30: pGL4 Luc – CD20 prom [Promega] (1.5 ug) + pRL-TK [Promega] (0.5 ug)

Ryc. 30: pGL4 Luc – (pusty) [Promega] (1.5 ug) + pRL-TK [Promega] (0.5 ug)

Ryc. 32: pSMAD2Luc [Addgene] (1.5ug) + pRL-TK [jw.] (0.5 ug)

Ryc. 32: pSMAD3Luc [Addgene] (1.5ug) + pRL-TK [jw.] (0.5 ug)

Ryc. 32: pCDNALuc (2ug) [jw.] + pRL-TK [jw.] (0.5 ug).

Ryc. 35: pCDNA3 (2 ug) + pNFkB-Luc [Stratagene] (1.5 ug) + pRL-TK (0.5 ug)

3.17 Transdukcja komórek z użyciem lentiwirusów w celu zmniejszenia ekspresji wybranych genów

Do wyciszenia ekspresji genów *SYK* i *BTK* użyto sekwencji shRNA (ang. small hairpin RNA) działających poprzez interferencję RNA (RNAi). Sekwencje wyciszające zawierają regiony komplementarne do mRNA dla *SYK* lub *BTK* połączone z pętlą nadającą im kształt „szpilki” (ang. hairpin). W tym przypadku shRNA wprowadzono do komórek docelowych metodą transdukcji za pomocą nośników lentiwirusowych. Wprowadzane sekwencje w procesie odwrotnej transkrypcji wykorzystywane są do tworzenia shDNA. Następnie enzymy wirusa trwale integrują shDNA z genomem komórek Raji. Dzięki temu komórki gospodarza same tworzą kopie shRNA w procesie transkrypcji. Dzięki białkom Drosha i eksportynie 5 cząsteczki są następnie modyfikowane i eksportowane z jądra komórkowego. Dalej cząsteczki shRNA są cięte przez kompleks enzymatyczny Dicer na krótsze, dwuniciowe fragmenty siRNA (small interfering RNA). SiRNA łączą się z kompleksami białkowymi RISC (ang. RNA-induced silencing complex), co prowadzi do ich rozdzielenia na pojedyncze nici. Antysensowane fragmenty RNA związane z RISC łączą się z mRNA dla celowanych białek doprowadzając do jego degradacji. Nie dochodzi więc do ekspresji genu w mechanizmie zablokowania translacji mRNA na białko.

Funkcjonalne nośniki lentiwirusowe muszą zawierać trzy plazmidy: plazmid z shRNA, plazmid z genami dla białek pakujących genom do kapsydów wirusa oraz plazmid kodujący białka dla otoczek wirusa. Wszystkie 3 plazmidy muszą być równoczasowo transfekowane do komórek pakujących HEK293T. Do procesu transfekcji używano zestawu GeneJuice®, który zmienia ładunek błon komórkowych zwiększając ich przepuszczalność dla DNA. Adherentne komórki linii HEK293T wysiewano na płytce 6-dółkowej w stężeniu 4×10^5 / 4 ml pożywki i pozostawiano na 24 godziny w inkubatorze. Następnie usuwano pożywkę znad hodowli i zastępowano ją 2ml medium bez FBS. W dalszej części do komórek dodawano mieszaninę plazmidów (1,5 µg plazmidu pakującego psPAX.2 [Addgene], 2 µg plazmidu kodującego shRNA pLKO.1 shBTK [Sigma-Aldrich] lub pLKO.1 shSYK [j.w.] i 1 µg plazmidu otoczkowego pMD2.G [Addgene]) z odczynnikiem GeneJuice [EMD Chemicals]. Komórki kontrolne transfekowano plazmidem kontrolnym pLKO.1 zawierającym sekwencję niewyciszającą NTC (ang. non targeting-control) [Sigma-Aldrich]. Po 24 godzinach inkubacji ponownie wymieniano pożywkę na 2ml świeżego medium z FBS. Po kolejnej dobie dodano 2 ml nowej pożywki. Po 72 godzinach od transfekcji 4ml pożywki znad komórek pakujących

przefiltrowano filtrem strzykawkowym [Millipore] aby oddzielić wiriony od resztek komórkowych.

Komórki Raji przeznaczone do transdukcji wysiewano na płytkę 6-dołkową w stężeniu 2×10^5 /ml pożywki. Następnie dodawano mieszaninę wirionów oraz zwiększający wydajność transdukcji polybrene (2 μ g/ml) [Sigma-Aldrich]. Plazmidy z genem pLKO.1 warunkowały oporność komórek na puromycynę. Po 5 dniach rozpoczynano proces selekcji klonów z zastosowaniem antybiotyku (stęż. 2 μ g/ml). Puromycyna działała cytotoksycznie względem komórek, które nie uległy transdukcji. Po tygodniowej inkubacji przetrwały jedynie komórki transdukowane, odporne na puromycynę. Uznaje się, że po 3-krotnej wymianie medium wyprowadzone klony tracą właściwości zakaźne a ich hodowla jest bezpieczna. Ze względu na stałą integrację transgenu z genomem komórki gospodarza transdukcja jest uznawana za skuteczną metodą modyfikacji genomu. Transgen jest replikowany wraz z kolejnymi podziałami komórek gospodarza.

3.18 Zwiększanie ekspresji genów metodą transdukcji retrowirusowej

Do zwiększenia ekspresji AKT w komórkach Raji wykorzystano metodę transdukcji retrowirusowej, która lepiej sprawdza się w przypadku transdukcji większymi fragmentami cDNA. W celu zapewnienia stałej aktywacji, do fragmentu kodującego AKT zakotwiczone w błonie komórkowej dołączono domenę 14-aminkwasowego sygnału mirystylacji z kinazy SRC. Procedura transdukcji z pewnymi odmiennościami przebiegała podobnie jak w przypadku punktu 3.17. Mieszanina transfekcyjna składała się z: 10 μ g plazmidu kodującego konstytutywnie aktywną formę kinazy AKT pMIG-AKT1-GFP lub kontrolnego pMIG-GFP [j.w.], 5 μ g plazmidu kodującego białko otoczkowe pVSVg [j.w.] oraz 10 μ g plazmidu kodujący białko pakujące pKAT. Wszystkie plazmidy otrzymano od Prof. Margaret Shipp, Dana-Farber Cancer Institute, Boston, USA. Użyto 62,5 μ l odczynnika transfekcyjnego Lipofectamine®2000 [Invitrogen]. Mieszaninę plazmidów dopełniano medium bez FBS do objętości 9 ml. Komórki wraz z zawiesiną wirionów oraz polybrene wirowano przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej w 460 RCF. 9 ml nadsącza wraz z 4 milionami komórek Raji/grupę inkubowano na czystych szalkach hodowlanych. Komórki transdukowane dzięki ekspresji białka zielonej fluorescencji (ang. Green Fluorescent Protein) były dobrze widoczne w mikroskopie fluorescencyjnym [Carl Zeiss]. Selekcję klonów transdukowanych czyli GFP-pozytywnych przeprowadzono na cytometrze FACS Aria III z funkcją sortera.

3.19 Wyciszanie genów metodą CRISPR

Klony komórek Raji z wyciszoną ekspresją czynników FOXO1 i FOXO3 zostały wyprowadzone w Zakładzie Immunologii Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego we współpracy z dr Beatą Pyrzyńską. Sekwencje sgFOXO1 i sgFOXO3 zostały wklonowane do wektora lentiwirusowego pLenti-CRISPRv2. Sekwencje sgRNA (ang. single guide RNA) komplementarne do docelowego fragmentu DNA kierują do niego białko Cas9 celem przecięcia i edycji DNA w pożądanym miejscu, czyli loci FOXO1 lub FOXO3. Sama transfekcja przeprowadzana była z użyciem chlorku wapnia. Stosowano 8,6 µg pLenti-CRISPRv2 oraz 8,6 µg psPAX2 i 5,5 µg pMD2. Po 2 dobach medium z lentiwirusami dodawano do komórek Raji w stosunku objętościowym 1:1. Selekcja komórek transdukowanych ponownie odbywała się za pomocą puromycyny.

Sekwencje primerów użytych do utworzenia sgRNAs (CRISPR/Cas9):

sgRNA	Sekwencje starterów użyte do generowania sgRNA (CRISPR/Cas9)
sgFOXO1	CACCGACAGGTTGCCCCACGCGTTG AAACCAACGCGTGGGGCAACCTGTC
sgFOXO1	CACCGGCTCGTCCCGCCGCAACGCG AAACCGCGTTGCGGCGGGACGAGCC
sgFOXO3	CACCGCACTTCGAGCGGAGAGAGCG AAACCGCTCTCTCCGCTCGAAGTGC
sgFOXO3	CACCGACTGCCACGGCTGACTGATA AAACTATCAGTCAGCCGTGGCAGTC

Tabela 7. Sekwencje starterów sensownych i antysensownych użytych do generowania sgRNA (CRISPR/Cas9).

3.20 Przegląd literatury

Wykonano przegląd bazy danych PubMed pod kątem związków/leków aktywujących AKT i jednocześnie wykazujących właściwości przeciwnowotworowe. Pod uwagę wzięto wyłącznie dane pochodzące z eksperymentalnych badań przedklinicznych. Wykluczono przeglądy, metaanalizy, listy, artykuły redakcyjne, streszczenia spotkań i artykuły w języku innym niż angielski. Finalnie analizowano badania w których testowano substancje w ludzkich liniach

komórkowych wywodzących się nowotworów. Ze względu na liczne doniesienia nt. jej przeciwnowotworowego działania w modelach różnych nowotworów oraz wzrastającą liczbę doniesień naukowych na ten temat w ostatnim czasie szczególne zainteresowanie wzbudziła salinomycyna.

3.21 Analiza graficzna i statystyczna wyników liczbowych przeprowadzonych eksperymentów

Uzyskane z przeprowadzonych eksperymentów wyniki liczbowe importowano do programu GraphPadPrism10. Dla porównań ilości ekspresji antygenów powierzchniowych lub ilości transkryptu między dwiema grupami użyto jednoczynnikowej analizy wariancji (ang. One way ANOVA) uzupełnionej o test post-hoc Tukey'a aby porównać średnie między parami grup.

Analizy jednoczynnikowe porównujące 2 grupy przeprowadzono w oparciu o test t-studenta a porównujące więcej niż 2 grupy przy użyciu jednoczynnikowej analizy wariancji (ang. *one way ANOVA*).

Wyniki testów cytotoksyczności analizowano dwuczynnikową analizą wariancji (ang. *two way ANOVA*) uzupełnioną testem post-hoc Bonferroniego.

Istotność statyczną wyników oznaczano symbolicznie na rycinach gwiazdkami, które wyrażały odpowiednio: * dla $p < 0.05$, ** dla $p < 0.01$, *** dla $p < 0.001$, **** dla $p < 0.0001$.

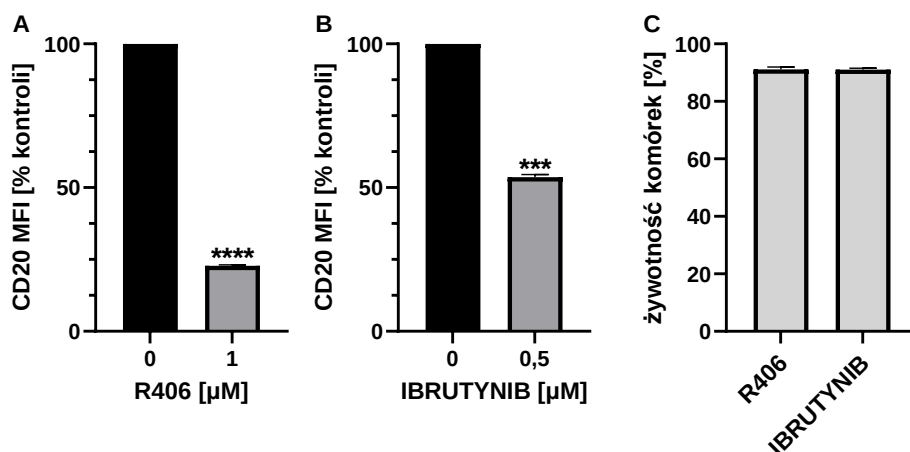
We wszystkich eksperymentach (chyba, że zaznaczono inaczej) wykonywano minimum po 2 powtórzenia biologiczne i 2 powtórzenia techniczne. Eksperymenty typu Western blotting wykonywano dwukrotnie za wyjątkiem 4.9.

Graficzna prezentacja wyników w postaci rycin 3- 36 wykonana była wykonana przy w GraphPadPrism10. Ryciny 1 i 2 wykonano z użyciem programu BioRender.

4. Wyniki

4.1 Wpływ inhibitorów kinaz rodziny SYK i BTK na ilość białka CD20 na powierzchni komórki w różnych liniach nowotworowych wywodzących się z limfocytów B

Kinazy SRC i BTK są jednymi z głównych przekazników sygnału z receptora BCR. W pierwszym etapie sprawdzono jak zahamowanie kinaz wpływa na ekspresję CD20. Zbadano więc wpływ wybranych drobnocząsteczkowych inhibitorów kinaz SYK (R406 - fostamatynib) i BTK (ibrutynib - PCI 32765) na ilość białka CD20 na powierzchni komórek nowotworowych. Oba testowane inhibitory stosowano już w immunoterapii niektórych nowotworów hematologicznych w próbach klinicznych. Komórki linii nowotworowych wywodzących się z limfocytów B reprezentujące chłoniaka Burkitt'a (Raji) oraz DLBCL (Ly-1) inkubowano 48 godzin w pożywkach z dodatkiem wzrastających stężeń badanych inhibitorów kinaz. Następnie znakowano komórki przeciwciałem rozpoznającym antygen CD20 sprzężonym z fluorochromem FITC. Metodą cytometrii przepływowej oszacowano ilość antygenu CD20 na powierzchni badanych komórek. Toksyczność inhibitorów oszacowano metodą cytometrii przepływowej po wyznakowaniu komórek martwych jodkiem propidyny. Stężenia inhibitorów zastosowanych w eksperymencie były nietoksyczne dla inkubowanych przez 48 godzin komórek (Ryc. 3 C). Żywotność w grupach inkubowanych z inhibitorami wynosiła ok. 90% w stosunku do 100% żywotności w grupie kontrolnej. W obu przypadkach zaobserwowano istotny spadek ilości antygenu CD20 na komórkach nowotworowych inkubowanych z inhibitorami kinaz (Ryc. 3 A i 3 B).



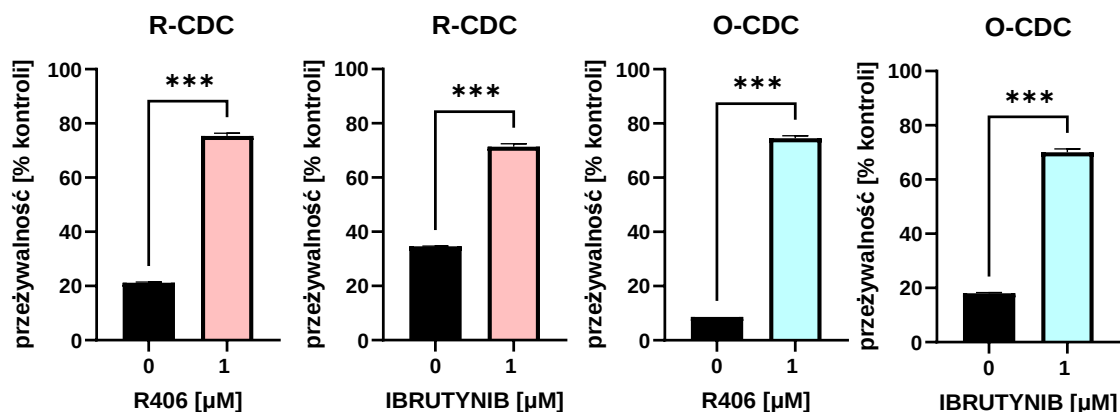
Rycina 3. Ocena ilości białka CD20 na powierzchni komórek nowotworowych linii komórkowych ludzkich chłoniaków B-komórkowych inkubowanych 48 godzin z nietoksycznymi stężeniami inhibitorów kinaz SYK (R406) i BTK (ibrutynib).

Komórki nowotworowe chłoniaka Burkitt'a Raji (A) lub DLBCL Ly-1 (B) inkubowano przez 48 godz. w pożywce z dodatkiem nietoksycznych stężeń A) R406, B) ibrutynibu. Następnie komórki wyznakowano przeciwciałem anti-CD20 sprzężonym z fluorochromem FITC. Do pomiaru fluorescencji użyto metody cytometrii przepływowej. Uzyskane średnie wartości fluorescencji (MFI) $\pm$ SD porównano do 100% w komórkach grupy kontrolnej. C) wykres przedstawia żywotność komórek inkubowanych przez 48 godz. z testowanymi inhibitorami kinaz w stężeniach: 1 μ M R406, 0,5 μ M ibrutynib. Wyniki są reprezentatywne dla minimum 2 powtórzeń biologicznych eksperymentu i przedstawiają średnią arytmetyczną z 2 powtórzeń technicznych.

4.2 Wpływ inhibitorów kinaz tyrozynowych SYK i BTK na działanie cytotoksyczne przeciwciał monoklonalnych anti-CD20

Ilość antygenu CD20 na powierzchni komórek nowotworowych jest jednym z głównych czynników wpływających na skuteczność przeciwciał anti-CD20 stosowanych w immunoterapii niektórych nowotworów hematologicznych. Dlatego w następnym etapie sprawdzono, jak zmniejszenie ilości białka CD20 na powierzchni komórek nowotworowych obserwowane po inkubacji komórek z testowanymi inhibitorami kinaz wpływa na cytotoksyczność rytuksymabu i ofatumumabu wobec komórek nowotworowych. Do dalszych eksperymentów użyto modelu linii komórkowej chłoniaka Burkitta Raji charakteryzującej się wysoką ekspresją CD20 i wrażliwością zarówno na rytuksymab jak i ofatumumab.

Komórki linii Raji inkubowano przez 48 godzin w pożywce z dodatkiem nietoksycznych stężeń R406 lub ibrutynibu. Następnie sprawdzono toksyczność rytuksymabu i ofatumumabu po 1 godzinie inkubacji z komórkami kontrolnymi oraz poddanych działaniu testowanych inhibitorów kinaz. Źródłem dopełniacza była surowica ludzka pozyskana od dawcy z grupą krwi AB, a więc pozbawiona przeciwciał skierowanych przeciwko antygenom A i B potencjalnie występujących na powierzchni komórek nowotworowych. Wyjściowo wykluczono eksperymentalnie toksyczność samej surowicy. Przeżywalność komórek nowotworowych eksponowanych na dopełniacz i rytuksymab/ofatumumab była znacząco wyższa po zastosowaniu testowanych inhibitorów kinaz w porównaniu z komórkami kontrolnymi (Ryc.4). W oparciu o powyższą obserwację wywnioskowano, że zastosowanie inhibitorów kinaz SRC i BTK upośledza cytotoksyczne działanie zarówno rytuksymabu jak i ofatumumabu w mechanizmie CDC. Obserwacja ta była zgodna z przedstawionymi wcześniej spadkami ilości CD20.



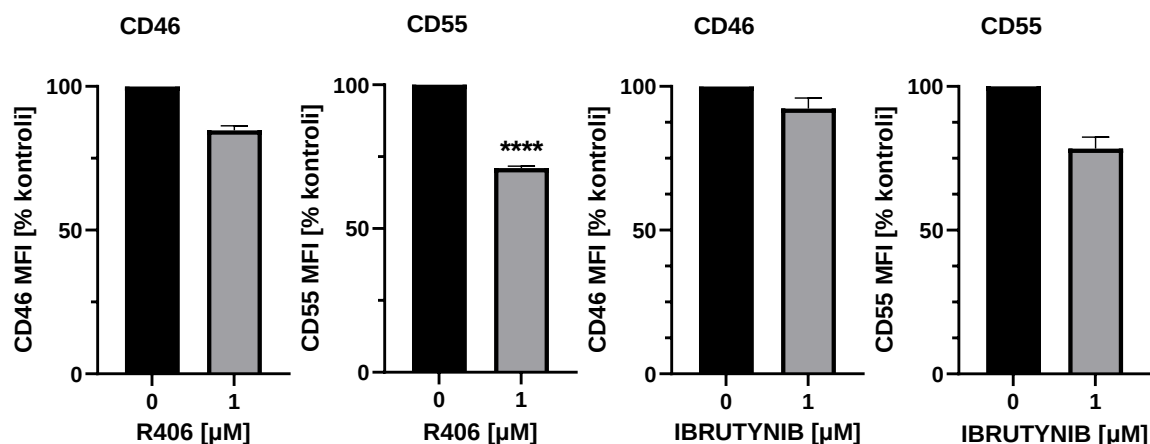
Rycina 4. Wpływ R406 oraz ibrutynibu na przeżywalność komórek Raji w mechanizmie CDC pod wpływem przeciwciał monoklonalnych anti-CD20.

Wykresy przedstawiają żywotność komórek kontrolnych oraz preinkubowanych 48 godzin z wybranymi, nietoksycznymi stężeniami inhibitorów kinaz po inkubacji z terapeutycznymi przeciwciałami monoklonalnymi w stężeniu 1 μg/mL : rytuksymabem i ofatumumabem. Jako źródła składników dopełniacza użyto surowicy ludzkiej. Przeżywalność komórek oceniono metodą cytometrii przepływowej po wyznakowaniu komórek martwych jodkiem propidyny. Eksperymenty wykonano na liniach komórkowych Raji. Wyniki są reprezentatywne dla minimum 2h powtórzeń biologicznych eksperymentu, przedstawiają średnią arytmetyczną z 2 powtórzeń technicznych.

4.3 Wpływ ibrutynibu i R406 na ekspresję innych antygenów powierzchniowych w komórkach linii Raji

W kolejnym etapie zbadano czy inhibitory kinaz wpływają na inne antygeny na powierzchni komórek nowotworowych. Jako model wybrano linię komórkową Raji. Przy użyciu cytometrii przepływowej zweryfikowano ilość wybranych antygenów powierzchniowych po inkubacji komórek Raji z inhibitorami kinaz. W pierwszej kolejności oceniono ekspresję białek CD46 i CD55, które wykazują negatywną zdolność regulacji aktywności układu dopełniacza. Nie sprawdzono wpływu leku na ilość białka CD59 ze względu na brak jego ekspresji w linii komórkowej Raji. Nie zaobserwowano istotnego statystycznie zmniejszenia ilości antygenów CD46 i CD55 (Ryc. 5). Antygeny te wpływając na działanie układu dopełniacza są jednym z czynników determinujących skuteczność działania rytuksymabu i ofatumumabu (87). Brak wpływu R406 i ibrutynibu na ich ekspresję jest zgodny z hipotezą, że upośledzenie działania cytotoksycznego przeciwciał anti-CD20 jest spowodowane przede wszystkim spadkiem ekspresji białka CD20. Sprawdzono także ilość białek zaangażowanych w przekazywanie sygnału z BCR: CD19 (białko docelowe dla terapii CAR-T oraz przeciwciał monoklonalnych tj. blinatumomabu, coltuksymabu, denintuzumabu, inebilizumabu i innych), CD21 (znany pod inną nazwą jako CR2, receptor dla wirusa EBV, białko specyficzne dla limfocytów B) oraz

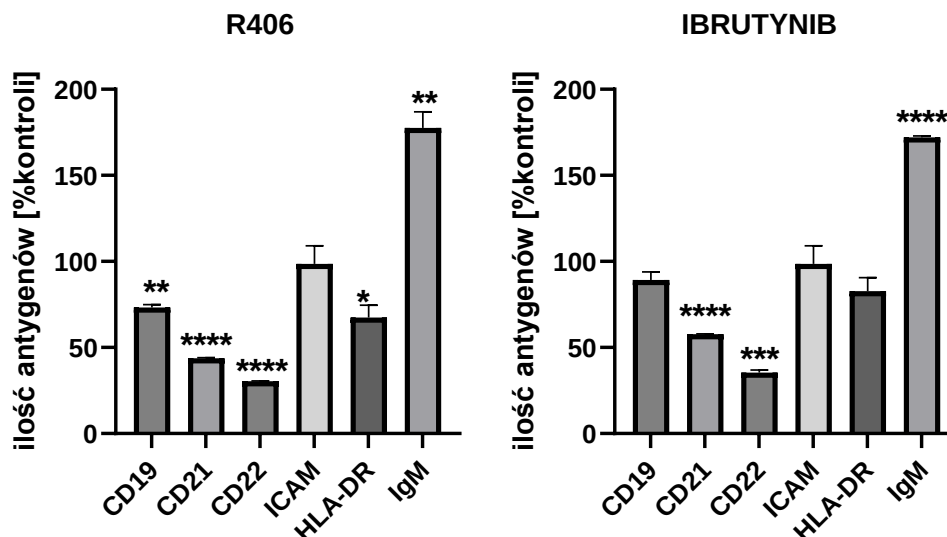
CD22 (cel terapeutyczny dla inotuzumabu ozogamycyny (218)). Zbadano także ekspresję IgM (występującej na powierzchni jako BCR), ICAM (którego poziom ekspresji koreluje z funkcją kostymulującą względem limfocytów T (219)) i HLA-DR (rozpatrywany jako jeden z celów terapeutycznych dla przeciwciał bi-specyficznych anti-CD20 (220)) .



Rycina 5. Ocena ilości inhibitorów układu dopełniacza na powierzchni komórek nowotworowych linii Raji inkubowanych 48 godzin z R406 lub ibrutynibem.

Komórki nowotworowe chłoniaka Burkitt'a Raji inkubowano przez 48 godz. w pożywce z dodatkiem R406 lub ibrutynibu w stężeniu 1 μ M. Następnie komórki wyznakowano przeciwciałami sprzężonymi z fluorochromem FITC lub PE skierowanymi przeciwko antygenom CD46 i CD55. Do oszacowania ilości wyznakowanych fluorescencyjnie antygenów użyto metody cytometrii przepływowej. Uzyskane średnie wartości fluorescencji (MFI) $\pm$ SD porównano do 100% w komórkach grupy kontrolnej.

Zastosowanie R406 i ibrutynibu nie miało również istotnego wpływu na ilość antygenów ICAM i HLA-DR ale znacząco zmniejszyło powierzchniową ekspresję CD21 i CD22 oraz CD19 w przypadku R406 (Ryc. 6). Ponadto zaobserwowano wzrost ekspresji immunoglobulin klasy M. Otrzymane wyniki wskazują, że zmniejszeniu ilości CD20 towarzyszy zmniejszenie ekspresji niektórych antygenów kompleksu BCR, jednak jest to proces selektywny i dotyczy przede wszystkim białek CD21 i CD22.

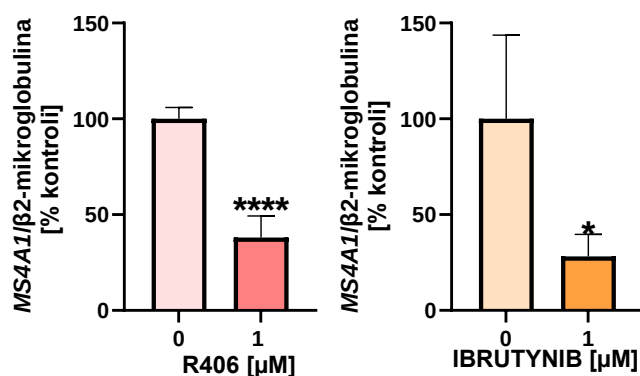


Rycina 6. Ocena ilości różnych antygenów powierzchniowych na komórkach nowotworowych linii Raji inkubowanych 48 godzin z R406 lub ibrutynibem.

Komórki nowotworowe chłoniaka Burkitt'a Raji inkubowano przez 48 godz. w pożywce z dodatkiem R406 lub ibrutynibu w stężeniu 1 μM . Następnie komórki wyznakowano przeciwciałami sprzężonymi z fluorochromem FITC lub PE skierowanymi przeciwko różnym antygenom tj. CD19, CD21, CD22, ICAM, HLA-DR, IgM. Do oszacowania ilości wyznakowanych fluorescencyjnie antygenów użyto metody cytometrii przepływowej. Uzyskane średnie wartości fluorescencji (MFI) $\pm$ SD porównano do 100% w komórkach grupy kontrolnej.

4.4 Wpływ inhibitorów kinaz tyrozynowych SRC i BTK na ekspresję genu *MS4A1* kodującego białko CD20

W celu zbadania molekularnego mechanizmu zmniejszenia ekspresji białka CD20 w komórkach nowotworowych przez inhibitory kinaz tyrozynowych SRC i BTK sprawdzono, czy testowane związki wpływają na proces transkrypcji genu *MS4A1* kodującego białko CD20. W tym celu użyto metody ilościowej reakcji RT-PCR w czasie rzeczywistym.



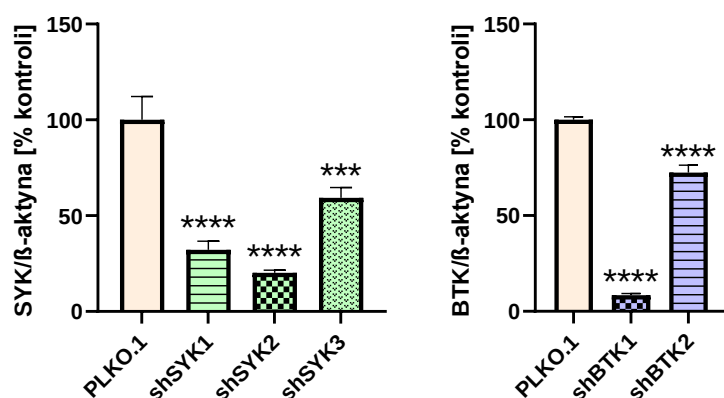
Rycina 7. Ocena ilości transkryptu CD20 po 24-godzinnej inkubacji komórek linii Raji z z R406 i ibrutynibem w stężeniu 1 μ M. Dane na wykresie przedstawiają stosunek mRNA dla CD20 do mRNA dla genu referencyjnego β -mikroglobuliny w odniesieniu do 100% w grupie kontrolnej.

Zaobserwowano, że pod wpływem inkubacji komórek Raji zarówno z inhibitorem kinazy BTK (ibrutynibem) jak i inhibitorem kinazy SYK (R406) dochodzi do istotnego spadku ilości transkryptu genu *MS4A1*. Wyniki przeprowadzonych eksperymentów pokazują, że testowane inhibitory kinaz tyrozynowych zmniejszają powierzchniową ilość antygenu CD20 w komórkach poprzez wpływ na transkrypcję genu *MS4A1*.

4.5 Wpływ wyciszenia ekspresji genów SYK i BTK na ilość CD20 na powierzchni komórek Raji i skuteczność działania przeciwciał monoklonalnych anti-CD20

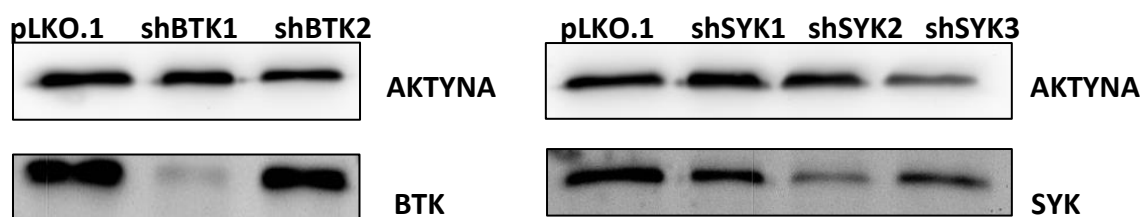
Dla wykluczenia nieselektywnego działania stosowanych inhibitorów kinaz zbadano, czy spadek ilości CD20 jest specyficznie związany z hamowaniem w kinaz SYK i BTK. W tym celu wyprowadzono linie komórkowe Raji, w których za pomocą konstruktów plazmidowych selektywnie wyciszono ekspresję kinaz SYK lub BTK. Komórki Raji transdukowano wektorami lentiwirusowymi zawierającymi shRNA wyciszające gen SYK lub BTK lub plazmidem kontrolnym pLKO.1.

W pierwszym etapie za pomocą metody ilościowej reakcji PCR (Ryc. 8) oraz Western blottingu (Ryc. 9) sprawdzono, które z badanych sekwencji najskuteczniej wyciszały ekspresję genów BTK lub SYK.



Rycina 8. Ocena ilości transkryptu SYK lub BTK w komórkach z wprowadzonymi konstruktami wyciszającymi.

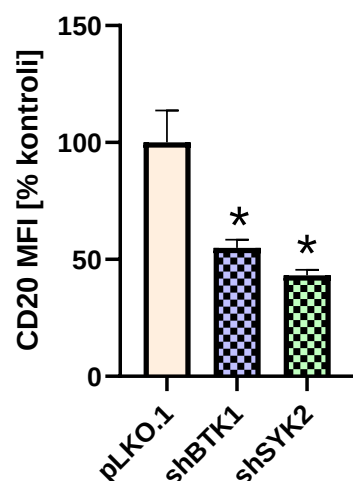
Komórki Raji poddano transdukcji lentiwirusowej plazmidami zawierającymi różne sekwencje shRNA wyciszające ekspresję BTK lub SYK. Wykres przedstawia stosunek mRNA dla SYK/BTK do mRNA dla genu referencyjnego β -aktyny w odniesieniu do 100% w grupie kontrolnej. Grupę kontrolną stanowią komórki transdukowane plazmidem pLKO.1 bez wyciszającego shRNA.



Rycina 9. Ocena ilości kinazy BTK i SYK w komórkach Raji z wyciszoną ekspresją genów BTK i SYK.

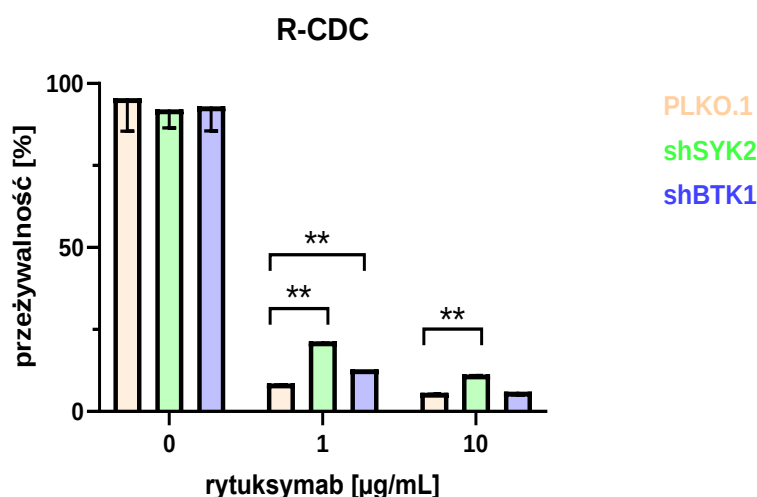
Komórki Raji poddano transdukcji lentiwirusowej plazmidami zawierającymi różne sekwencje shRNA wyciszające ekspresję BTK lub SYK. Następnie metodą Western blottingu oceniono ilość białka BTK i SYK w lizatach komórkowych poddanych elektroforezie. Do normalizacji odczytu użyto β -aktyny.

Do dalszych eksperymentów wykorzystano spośród wyprowadzonych te linie, w których potwierdzono największy stopień wyciszenia BTK (shBTK1) i SYK (shSYK2). W tych liniach oceniono ekspresję białka CD20 oraz wrażliwość na rytuksymab w mechanizmie CDC.



Rycina 10. Ocena ilości białka CD20 na powierzchni komórek Raji z wyciszoną ekspresją BTK i SYK.

Komórki nowotworowe chłoniaka Burkitt'a Raji poddano transdukcji lentiwirusowej plazmidami zawierającymi shRNA wyciszające ekspresję BTK lub SYK. Ilość CD20 na powierzchni komórek oceniono metodą cytometrii przepływowej. Uzyskane średnie wartości fluorescencji (MFI) $\pm$ SD porównano do 100% w komórkach grupy kontrolnej.



Rycina 11. Wpływ wyciszenia ekspresji SYK i BTK na śmiertelność komórek pod wpływem rytuksymabu.

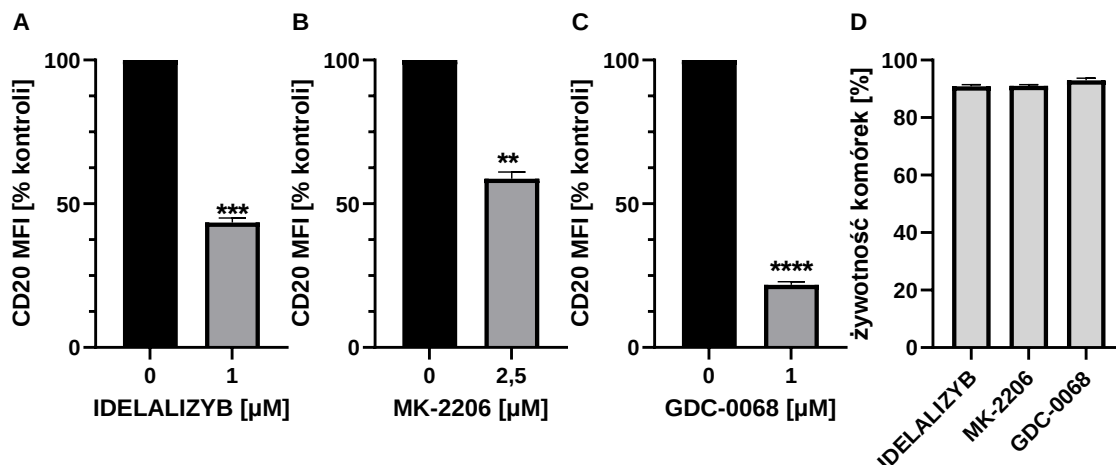
Komórki nowotworowe chłoniaka Burkitt'a Raji z wyciszoną ekspresją SYK i BTK poddano testowi cytotoxyczności zależnej od dopełniacza w obecności rytuksymabu. Żywotność oceniono wybarwiając komórki jodkiem propidyny. Do eksperymentu użyto metody cytometrii przepływowej.

Zarówno wyciszenie ekspresji BTK jak i SYK spowodowało istotne zmniejszenie ilości CD20 na powierzchni komórek Raji (Ryc. 10). Potwierdzono także, że komórki Raji z wprowadzonymi konstruktami wyciszającymi SYK i BTK są mniej wrażliwe na rytuksymab w porównaniu do komórek kontrolnych (Ryc. 11). Upośledzenie działania rytuksymabu było jednak mniejsze niż w przypadku zastosowania inhibitorów kinaz BTK lub SYK (Ryc. 4).

4.6 Wpływ inhibitorów kinaz rodziny PI3K i AKT na ilość powierzchniowego białka CD20 w różnych liniach nowotworowych wywodzących się z limfocytów B

Obok białek SRC i BTK kinazy PI3K oraz AKT stanowią ważne ramię szlaku sygnalizacyjnego inicjowanego przez receptor BCR (Ryc. 2). Dlatego w kolejnym etapie sprawdzono czy zahamowanie szlaku PI3K/AKT również wpływa na ekspresję CD20. Do eksperymentów użyto inhibitora zarejestrowanego już w immunoterapii (idelalizyb, CAL-101 – inhibitor PI3K) oraz związki testowane w próbach klinicznych: MK-2206 (inhibitor AKT) oraz GDC-0068 (ipatasertyb – inhibitor AKT). Komórki linii nowotworowych chłoniaka Burkitt'a Ramos oraz DLBCL SU-DHL-4 inkubowano 48 godzin w pożywkach z dodatkiem badanych inhibitorów kinaz w nietoksycznych stężeniach (Ryc. 12 D). Ilość antygenu CD20 oszacowano metodą cytometrii przepływowej. Toksyczność inhibitorów kinaz oszacowano metodą cytometrii przepływowej po wyznakowaniu komórek martwych jodkiem propidyny.

Zaobserwowano znaczące zmniejszenie ilości CD20 na powierzchni komórek nowotworowych chłoniaka Burkitt'a oraz DLBCL pod wpływem zastosowanych inhibitorów kinaz PI3K/AKT (Ryc. 12 A-C).



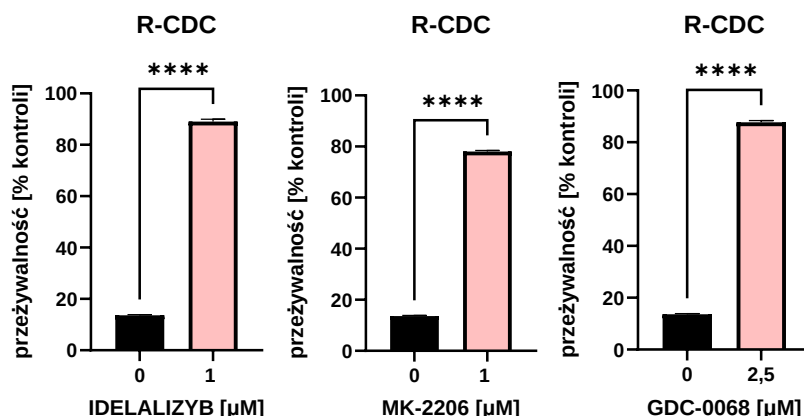
Rycina 12. Ocena ilości białka CD20 na powierzchni komórek nowotworowych inii komórkowych ludzkich chłoniaków B-komórkowych inkubowanych 48 godzin z nietoksycznymi stężeniami inhibitorów kinaz PI3K/AKT.

Komórki nowotworowe chłoniaka Burkitt'a Ramos (A) lub DLBCL SU-DHL-4 (B i C) inkubowano przez 48 godz. w pożywce z dodatkiem nietoksycznych stężeń A) idelalizybu, B) MK-2206 oraz C) GDC-0068. Komórki wyznakowano przeciwciałem anti-CD20 sprzężonym z fluorochromem FITC. Pomiar fluorescencji wykonano metodą cytometrii przepływowej. Uzyskane średnie wartości fluorescencji (MFI) $\pm$ SD porównano do 100% w komórkach grupy kontrolnej.

D) wykres przedstawia żywotność komórek inkubowanych przez 48 godz. z testowanymi inhibitorami kinaz w stężeniach 1 μM .

4.7 Wpływ inhibitorów kinaz rodziny PI3K i AKT na działanie cytotoksyczne rytuksymabu

W następnym kroku sprawdzono, czy obserwowany spadek ilości CD20 w wyniku działania inhibitorów kinaz PI3K/AKT wpływa na skuteczność przeciwciał monoklonalnych anti-CD20 wobec komórek nowotworowych. W tym celu zbadano przeżywalność komórek nowotworowych wywodzących się z limfocytów B w obecności rytuksymabu (przeciwciała anti-CD20) oraz ludzkiej surowicy grupy AB. Pod wpływem zastosowania inhibitorów kinaz PI3K/AKT zaobserwowano istotny wzrost przeżywalności komórek nowotworowych eksponowanych na dopełniacz oraz rytuksymab (Ryc. 13).



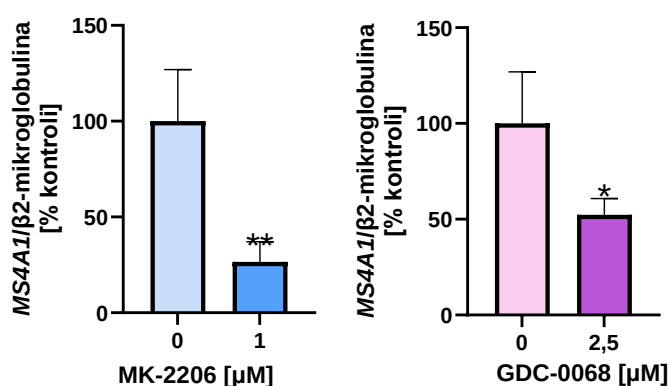
Rycina 13. Wpływ idelalizybu, MK-2206 i GDC-0068 na śmiertelność komórek SU-DHL-4 w mechanizmie CDC pod wpływem rytuksymabu.

Przedstawiono żywotność komórek kontrolnych oraz preinkubowanych 48 godzin z wybranymi, nietoksycznymi stężeniami inhibitorów kinaz PI3K/Akt po inkubacji z rytuksymabem w stężeniu 1 μg/mL. Jako źródła składników dopełniacza użyto surowicy ludzkiej. Przeżywalność komórek oceniono metodą cytometrii przepływowej po wyznakowaniu komórek martwych jodkiem propidyny. Eksperymenty wykonano na linii SU-DHL-4 reprezentującej DLBCL. Wyniki są reprezentatywne dla minimum 2 powtórzeń biologicznych eksperymentu, przedstawiają średnią arytmetyczną z 2 powtórzeń technicznych.

Podobnie jak w przypadku inhibitorów kinaz SRC i BTK, zahamowanie szlaku przekazywania sygnału z BCR związanego z PI3K/AKT także znacząco upośledza cytotoksyczne działanie rytuksymabu w mechanizmie CDC.

4.8 Wpływ inhibitorów kinazy AKT na ekspresję genu *MS4A1* kodującego CD20

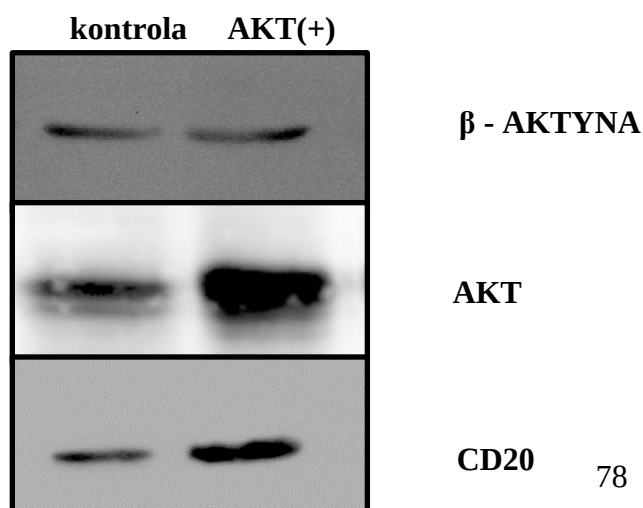
W kolejnym etapie metodą ilościowej reakcji RT-PCR w czasie rzeczywistym zbadano jak inkubacja z inhibitorami PI3K/AKT wpływa na ilość transkryptu genu *MS4A1*. Potwierdzono, że inkubacja komórek Raji z badanymi inhibitorami PI3K/AKT powoduje zmniejszenie ilości transkryptu genu kodującego CD20 w porównaniu do komórek kontrolnych (Ryc. 14).



Rycina 14. Ocena ilości transkryptu CD20 po 24-godzinnej inkubacji komórek linii Raji z MK-2206 w stężeniu $1\mu M$ i GDC-0068 w stężeniu $2,5\mu M$. Dane na wykresie przedstawiają stosunek mRNA dla CD20 do mRNA dla genu referencyjnego mikroglobuliny β w odniesieniu do 100% w grupie kontrolnej.

4.9 Wpływ nadekspresji kinazy AKT na ilość białka CD20 w komórkach nowotworowych Raji

Wyniki przeprowadzonych eksperymentów pokazały, że ilość białka CD20 jest regulowana nie tylko poprzez aktywność kinaz SRC/BTK ale także przez aktywność kinaz szlaku PI3K/AKT. Przebadane inhibitory kinaz tyrozynowych szlaku PI3K/AKT w znaczący sposób zmniejszają ilość CD20 na powierzchni komórek nowotworowych, co przekłada się na upośledzenie skuteczności działania przeciwciał monoklonalnych anty-CD20. Dlatego w kolejnym etapie zbadano, jak zwiększenie ekspresji AKT wpływa na ilość antygenu CD20 na powierzchni komórek nowotworowych. W tym celu wyprowadzono wariant komórek Raji z aktywną formą kinazy AKT (ufosforylowanymi izoformami S473 i T308). Za pomocą transdukcji retrowirusowej do komórek Raji wprowadzono konstrukt plazmidowy (pMIG-GFP-AKT) z sekwencją kodującą konstytutywnie aktywną kinazę AKT oraz GFP. Grupę kontrolną stanowiły komórki transdukowane pustym plazmidem zawierającym jedynie gen GFP (pMIG-GFP). Następnie za pomocą cytometru przepływowego z funkcją sortowania wyselekcjonowano komórki o najwyższej intensywności zielonej fluorescencji czyli z wysoką ekspresją sekwencji kodowanych na wprowadzonych plazmidach. W tak otrzymanych subpopulacjach komórek metodą Western blottingu sprawdzono ilość całkowitego białka AKT oraz CD20. Jako kontroli ilości użytego białka zastosowano białko referencyjne β -aktynę, której ilość powinna być niezmienna w poszczególnych próbkach. Wyniki eksperymentu przedstawiono na Rycinie 15.



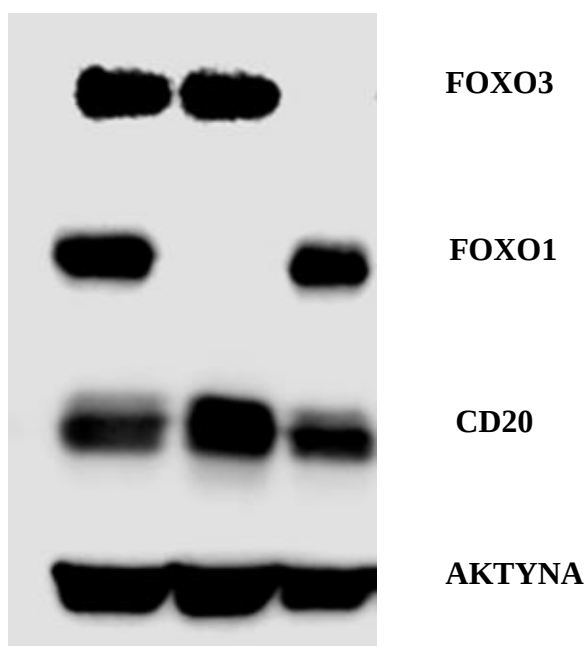
Rycina 15. Ilościowa ocena całkowitej kinazy AKT oraz białka CD20 w komórkach Raji zmodyfikowanych konstruktem plazmidowym kodującym konstytutywnie aktywną kinazę AKT. Rycina przedstawia ilość białka normalizującego – aktyny, CD20 oraz całkowitą ilość AKT w komórkach kontrolnych transfekowanych plazmidem pustym (kontrola, AKT-) oraz komórkach z wprowadzonym konstruktem aktywnej AKT (AKT+).

W komórkach ze zwiększoną ilością kinazy AKT zaobserwowano wzrost ilości białka CD20. Ta obserwacja potwierdza, że ilość białka CD20 jest regulowana m. in. poprzez kinazę AKT, a poprzez zwiększenie ekspresji AKT można zwiększyć ilość antygenu CD20.

4.10 Wpływ czynników transkrypcyjnych rodziny FOXO na ilość antygenu CD20

Jednymi z efektorów ścieżki sygnałowej PI3K/AKT jest rodzina czynników transkrypcyjnych FOXO. Do rodziny tej należą cztery spokrewnione białka (FOXO1, 3, 4 i 6), z których w komórkach układu odpornościowego najwyższą ekspresję wykazują FOXO1, FOXO3 oraz FOXO4. Aktywacja AKT prowadzi do fosforylacji FOXO, jego zatrzymania w cytoplazmie i w konsekwencji do zahamowania jego aktywności transkrypcyjnej (221,222). Dlatego w kolejnym etapie zbadano wpływ czynników transkrypcyjnych FOXO1 oraz FOXO3 na regulację ilości CD20. W tym celu wykorzystano technologię modyfikacji genów CRISPR/Cas9 umożliwiającą wyciszenie ekspresji czynników transkrypcyjnych FOXO1 lub FOXO3. Metodą transdukcji lentiwirusowej komórki Raji zmodyfikowano sgRNA edytującymi loci FOXO1 lub FOXO3. Grupę kontrolną stanowiły komórki z wprowadzonym pustym wektorem lub sgEGFP. Metodą Western Blotting analizowano ilość białka FOXO1, FOXO3 oraz CD20 w uzyskanych populacjach komórek Raji.

kontrola sgFoxO1 sgFoxO3



Rycina 16. Ocena całkowitej ilości CD20 w komórkach Raji z wyciszonym FOXO1 lub FOXO3. Za pomocą technologii CRISPR/Cas9 wyprowadzono klony komórek Raji z wyciszonym FOXO1 (sgFOXO1) lub FOXO3 (sgFOXO3). Wyselekcjonowano komórki transfekowane przy użyciu puromycyny. Skuteczność transdukcji potwierdzono detekcją białek FOXO1 lub FOXO3. Grupę kontrolną stanowią komórki z wprowadzonym wektorem pustym. Dla potwierdzenia użycia jednakowych ilości lizatów białkowych posłużono się detekcją białka β -aktyny.

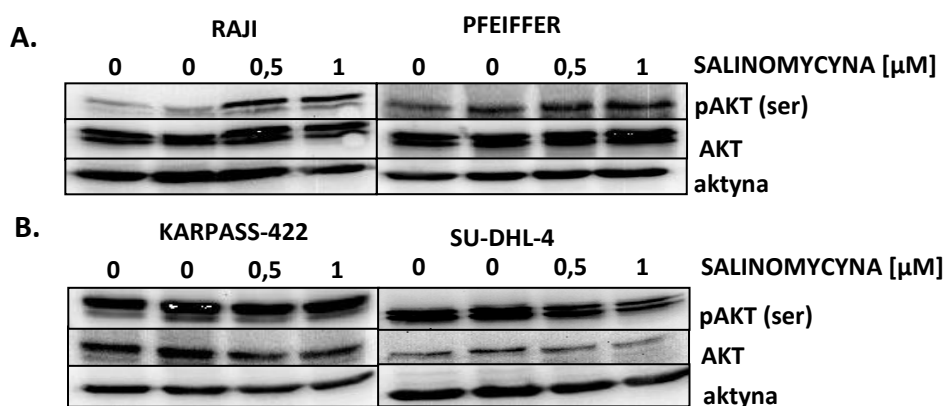
W porównaniu do komórek kontrolnych zaobserwowano wyraźne zwiększenie ilości CD20 w komórkach z wyciszonym FOXO1 (Ryc. 16) oraz brak zmian ilości CD20 w komórkach z wyciszonym FOXO3. Nie oceniono wpływu wyciszenia FOXO4 ze względu na jego brak detekcji w badanych komórkach.

Podsumowując tę część rozprawy ustalono, że badane inhibitory kinaz tyrozynowych szlaku PI3K/AKT (podobnie jak opisane już przez nasz zespół inhibitory kinaz SRC/BTK (223)) w znaczący sposób zmniejszają ilość CD20 na powierzchni komórek nowotworowych, co przekłada się na upośledzenie skuteczności działania przeciwciał monoklonalnych anty-CD20. Wyniki przeprowadzonych eksperymentów pokazały także, że ilość białka CD20 jest bezpośrednio zależna od ekspresji kinazy AKT oraz czynnika transkrypcyjnego FOXO1. Biorąc pod uwagę odkrycie nowego mechanizmu regulacji ilości CD20 poprzez kinazę AKT, w następnym etapie przeprowadzono systematyczny przegląd literatury w poszukiwaniu związków, które mogłyby poprzez stymulację szlaku PI3K/AKT zwiększać ekspresję CD20 i

w ten sposób potęgować działanie cytotoksyczne przeciwciał monoklonalnych rozpoznających antygen CD20, takich jak rytuksymab i ofatumumab (metodologia wykonanego przeglądu literatury oraz wykorzystane w wyszukiwaniu hasła są opisane w punkcie 3.20 rozdziału materiały i metody).

4.11 Wpływ salinomycyny na ilość i aktywność kinazy AKT

Jednym ze związków o opisanej w literaturze zdolności do aktywacji AKT jest salinomycyna (210). Salinomycyna i pochodne związki z grupy jonoforów dotychczas z powodzeniem stosowano jako środki o działaniu antybakteryjnym u zwierząt. Zainteresowanie przeciwnowotworowym potencjałem salinomycyny wzrosło po wykazaniu jej silnego cytostatycznego działania względem macierzystych komórek nowotworowych (224,225). W pierwszym etapie badań sprawdzono, czy salinomycyna aktywuje szlak PI3K/AKT w komórkach wybranych linii B-komórkowych reprezentujących chłoniaka Burkitt'a (Raji) i DLBCL (Pfeiffer, SU-DHL-4 i Karpas-422). Przy użyciu metody Western blotting sprawdzono jak zmienia się całkowita ilość białka AKT oraz jego aktywnej, ufosforylowanej formy pod wpływem preinkubacji komórek z salinomycyną.



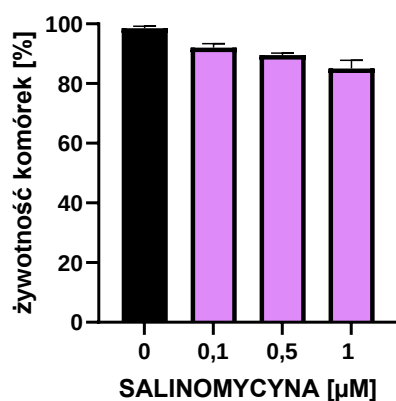
Rycina 17. Ocena ilości całkowitego białka AKT oraz jego ufosforylowanej formy (pAKT) w lizatach komórek (A) Raji oraz Pfeiffer (B) Karpas-422 oraz SU-DHL-4 inkubowanych przez 24 godziny z salinomycyną w stężeniach 0,5 i 1 μM.

Przeprowadzono elektroforezę próbek lizatów z komórek Raji (chłoniak Burkitta), Pfeiffer, Karpas-422 i SU-DHL-4 (DLBCL) inkubowanych w pożywce z dodatkiem 0,5 lub 1 μM salinomycyny. Ilość białek badanych oszacowano metodą Western blottingu. Dla potwierdzenia użycia jednakowych ilości lizatów białkowych posłużono się detekcją białka β-aktyny. Inkubacja z salinomycyną spowodowała wyraźny wzrost ufosforylowanej w pozycji

Ser473, czyli aktywnej formy kinazy AKT w szczególności w komórkach linii Raji (Ryc. 17), w porównaniu do komórek kontrolnych. W liniach komórek Karpas-422 i SU-DHL-4 (Ryc. 17 B) nie zaobserwowano zmiany ilości i aktywacji kinazy AKT pod wpływem salinomycyny.

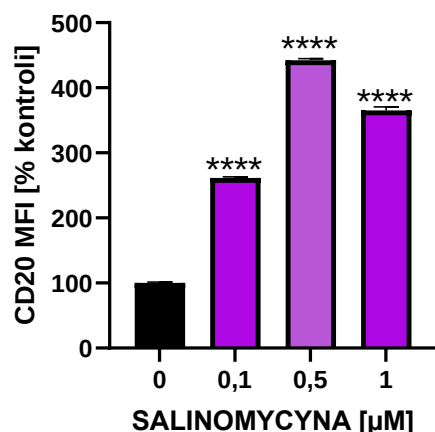
4.12 Wpływ salinomycyny na ilość CD20 na powierzchni komórek Raji

W następnym etapie sprawdzono jak aktywacja AKT pod wpływem salinomycyny wpływa na ilość powierzchniowego białka CD20. W tym celu komórki linii nowotworowej Raji inkubowano 48 godzin w pożywce z dodatkiem wzrastających stężeń salinomycyny. Toksyczność salinomycyny oszacowano metodą cytometrii przepływowej po wyznakowaniu komórek martwych jodkiem propidyny. W zakresie wybranych stężeń (0.1-1 μM) żywotność komórek nie spadała poniżej 90% w stosunku do 100% w grupie kontrolnej (Ryc. 18). Następnie, po wyznakowaniu komórek przeciwciałem anti-CD20 sprzężonym z fluorochromem (FITC) oszacowano ilość powierzchniowego białka CD20 przy użyciu cytometrii przepływowej. Zaobserwowano, że salinomycyną istotnie, nawet 4-krotnie zwiększa ilość białka CD20 na powierzchni komórek Raji (Ryc.19).



Rycina 18. Ocena żywotności komórek Raji pod wpływem 48-godzinnej inkubacji w pożywce z różnymi stężeniami salinomycyny.

Komórki linii Raji inkubowano przez 48 godz. w pożywce z dodatkiem salinomycyny w stężeniach 0; 0,1 μM ; 0,5 μM i 1 μM . Po inkubacji komórki wyznakowano jodkiem propidyny zabarwiającym komórki nieżywe. Do pomiaru ilości komórek absorbujących PI użyto metody cytometrii przepływowej. Przedstawiono uzyskane średnie wartości fluorescencji (MFI) $\pm$ SD porównano do 100% w komórkach grupy kontrolnej.



Rycina 19. Ocena ilości cząsteczek CD20 na powierzchni komórek linii Raji inkubowanych 48 godzin z różnymi stężeniami salinomycyny.

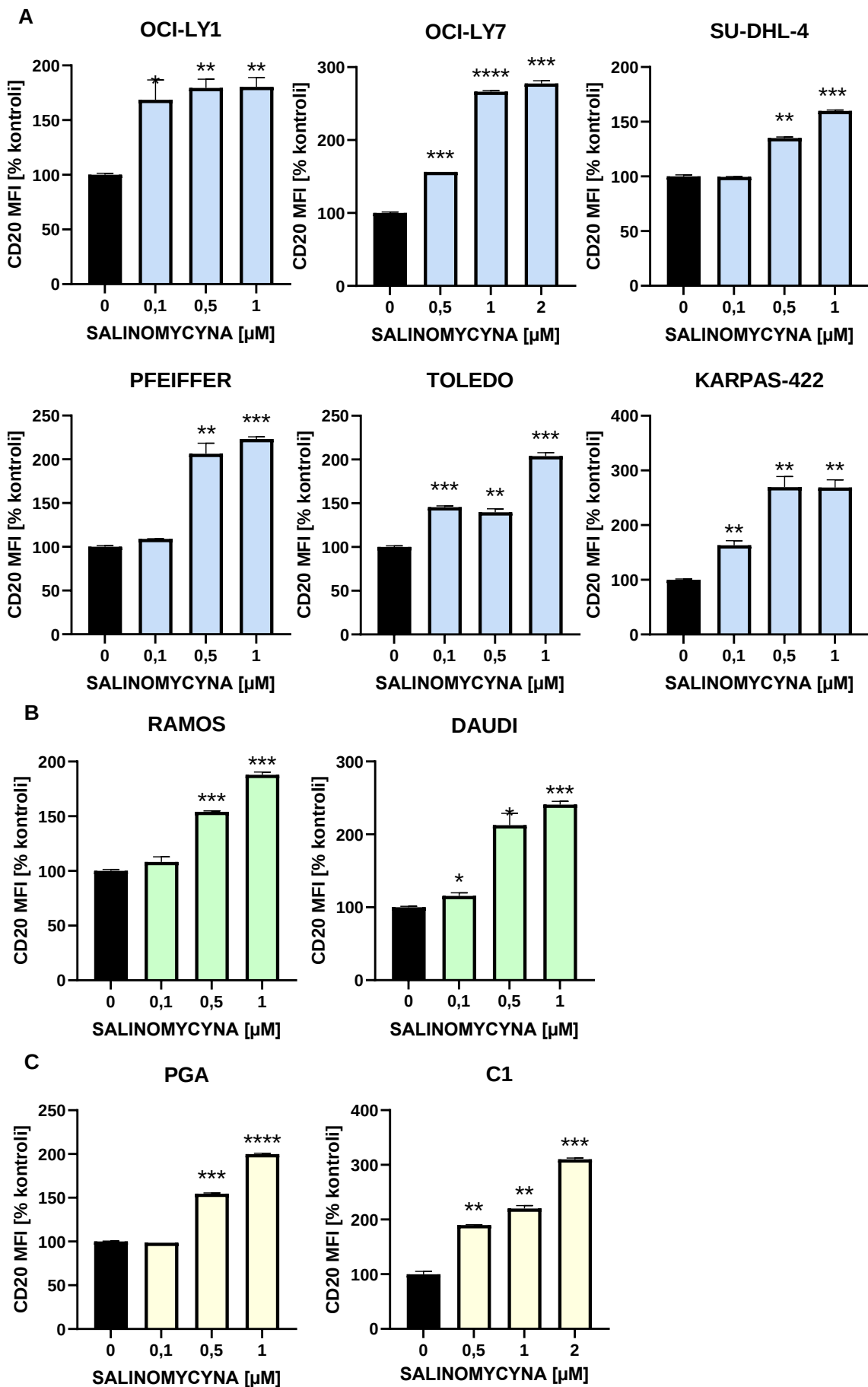
Komórki nowotworowe Raji inkubowano przez 48 godz. w pożywce z dodatkiem nietoksycznych stężeń salinomycyny. Następnie komórki wyznakowano przeciwciałem anti-CD20 sprzężonym z fluorochromem FITC. Do pomiaru fluorescencji użyto metody cytometrii przepływowej. Uzyskane średnie wartości fluorescencji (MFI) $\pm$ SD porównano do 100% w komórkach grupy kontrolnej. Lek był nietoksyczny w stężeniach 0,1 i 0,5 μ M. .

Wyniki eksperymentu udokumentowały nieznany dotychczas wpływ salinomycyny na ilość białka CD20 w komórce. Do większości kolejnych eksperymentów wykorzystano salinomycynę w stężeniu 0,5 μ M, ponieważ toksyczność wobec komórek nowotworowych nie przekraczała 10% (Ryc. 18).

4.13 Wpływ salinomycyny na ilość CD20 na powierzchni komórki w modelach różnych ustalonych linii komórkowych

W kolejnym etapie badawczym zbadano zdolność salinomycyny do zwiększania ilości powierzchniowego CD20 w panelu wybranych nowotworowych linii komórkowych wywodzących się z limfocytów B. W tym celu komórki ustalonych 10 linii komórkowych reprezentujących chłoniaka Burkitt'a, DLBCL lub przewlekłą białaczkę limfocytową (lista w tab. 2) inkubowano przez 48 godzin w pożywce z dodatkiem wzrastających stężeń salinomycyny. Ilość CD20 oceniono za pomocą cytometrii przepływowej, jak opisano wyżej.

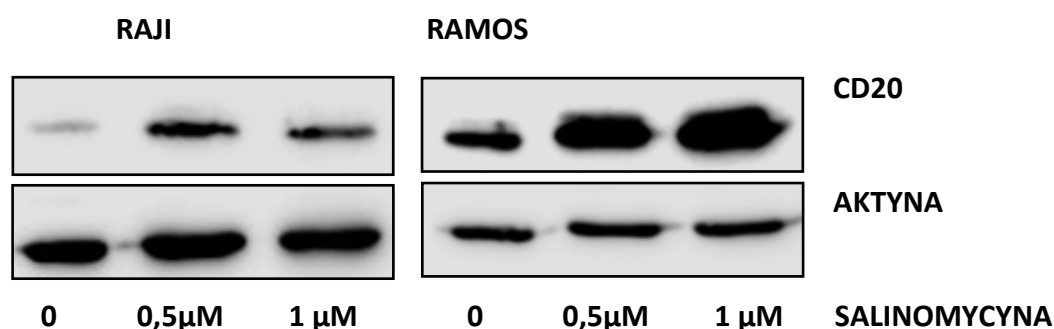
Zaobserwowano zwiększenie ilości antygenu CD20 na powierzchni komórki pod wpływem salinomycyny. Wzrost ten korelował ze wzrostem stężeń salinomycyny i był obserwowany we wszystkich badanych liniach. Najsilniejszy wpływ salinomycyny na ekspresję CD20 zaobserwowano w liniach KARPAS422 i LY7, które wykazały blisko 3-krotny wzrost ilości CD20 na powierzchni komórek pod wpływem salinomycyny.



Rycina 20. Ocena ilości cząsteczki CD20 na powierzchni komórek różnych ustalonych linii nowotworów B-komórkowych inkubowanych 48 godzin z różnymi stężeniami salinomycyny. Komórki linii a) DLBCL: OCI- LY1, OCI- LY7, SU-DHL4, Karpas-s422, Pfeiffer, Toledo, b) chłoniaka Burtitta Ramos, Daudi, c) CLL: C1 i PGA inkubowano przez 48 godz. w pożywce z dodatkiem nietoksycznych stężeń salinomycyny. Następnie komórki wyznakowano przeciwciałem anti-CD20 sprzężonym z fluorochromem FITC. Do pomiaru fluorescencji użyto metody cytometrii przepływowej. Uzyskane średnie wartości fluorescencji (MFI) $\pm$ SD porównano do 100% w komórkach grupy kontrolnej.

4.14 Wpływ salinomycyny na całkowitą ilość białka CD20 w komórkach linii Raji i Ramos

W kolejnym etapie badań sprawdzono czy wzrost ilości CD20 na powierzchni komórek jest związany ze zwiększoną całkowitą ilością białka CD20 w komórkach. W tym celu korzystając z metody Western blottingu zbadano całkowitą ilość białka CD20 w lizatach komórek Raji oraz Ramos traktowanych przez 48 godzin wzrastającymi stężeniami salinomycyny (Ryc. 21).



Rycina 21. Ocena całkowitej ilości białka CD20 w komórkach linii Raji i Ramos inkubowanych przez 48 godzin z salinomycyną w stężeniach 0.5 lub 1 μ M

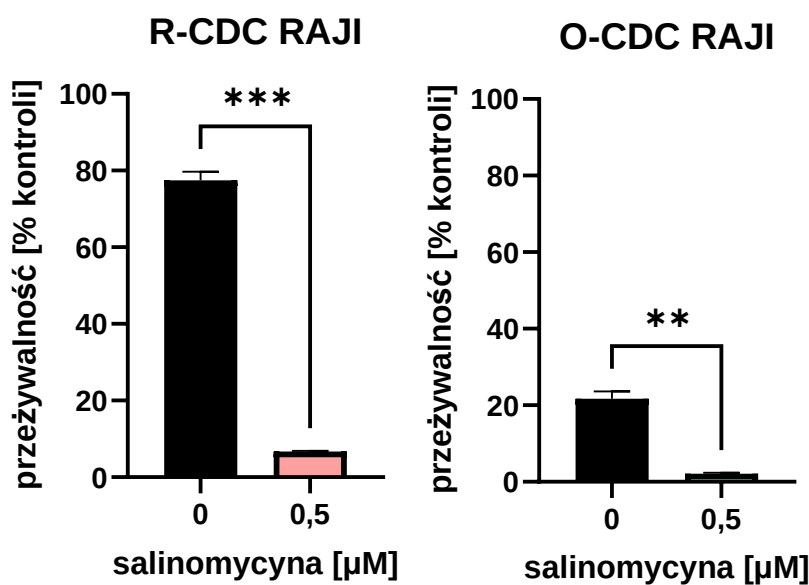
Przeprowadzono elektroforezę próbek lizatów z komórek Raji i Ramos inkubowanych przez 48 godzin w pożywce z dodatkiem 0,5 lub 1 μ M salinomycyny. Ilość białka CD20 oceniono metodą Western blottingu i porównano z ilością białka β -aktyny użytej jako kontrola nałożenia jednakowej ilości lizatów białkowych.

Wyniki wskazują, że salinomycyna zwiększa zarówno ekspresję powierzchniową CD20, jak i jego całkowitą ilość w komórkach Raji i Ramos.

4.15 Zbadanie wpływu salinomycyny na cytotoksyczność rytuksymabu i ofatumumabu względem komórek Raji

Po zbadaniu wpływu salinomycyny na ilość antygenu CD20 na powierzchni komórek sprawdzono, czy efekt ten przekłada się na cytotoksyczność przeciwciał monoklonalnych anti-CD20. Komórki Raji preinkubowane przez 48 godz. z wybranym, nietoksycznym stężeniem

salinomycyny poddano testowi CDC z zastosowaniem przeciwciał monoklonalnych. Śmiertelność komórek oceniono z użyciem cytometrii przepływowej po wybarwieniu martwych komórek jodkiem propidyny. Zaobserwowano znaczący wzrost śmiertelności komórek nowotworowych preinkubowanych z salinomycyną w stosunku do grupy kontrolnej (Ryc. 22). Wyniki eksperymentu wskazują, że salinomycyna może potęgować efekt cytotoksyczny przeciwciał monoklonalnych.



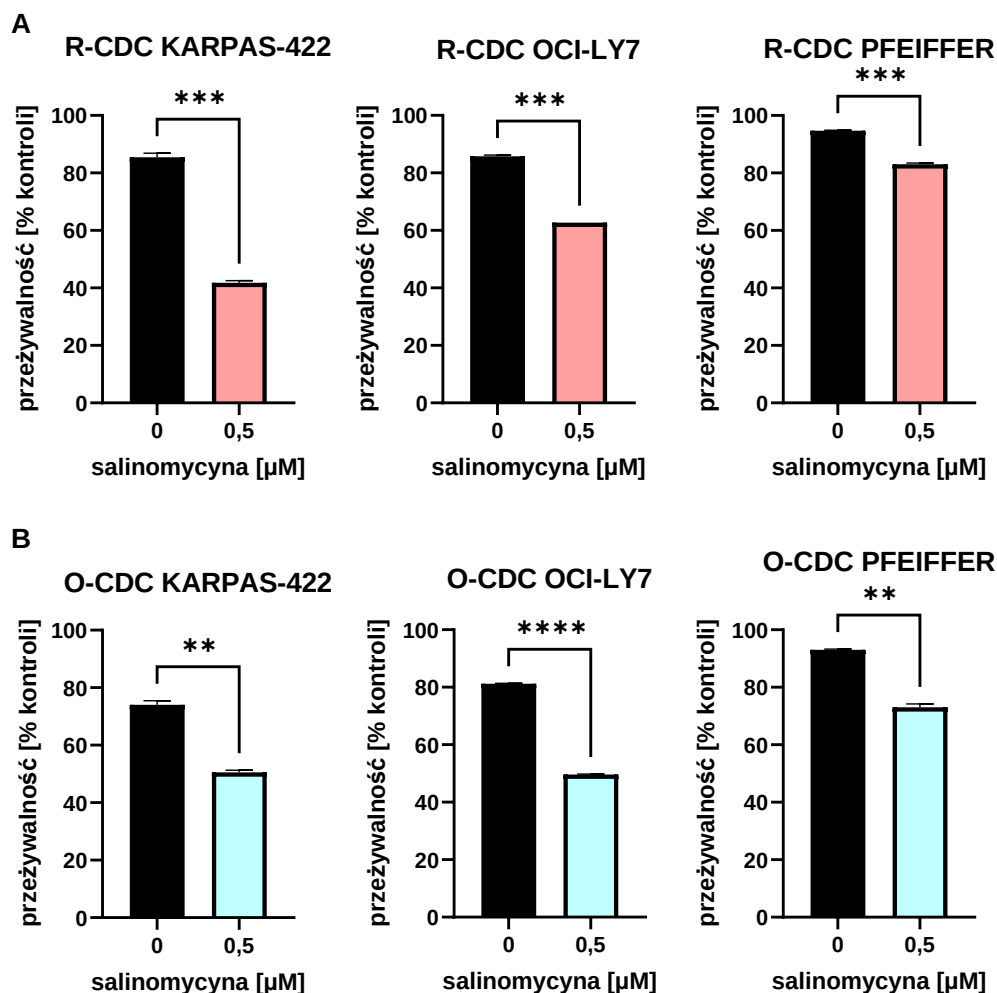
Rycina 22. Żywotność komórek Raji kontrolnych oraz preinkubowanych z salinomycyną w stężeniu 0,5 µM po inkubacji z terapeutycznymi przeciwciałami monoklonalnymi: rytuksymabem (R-CDC) i ofatumumabem (O-CDC).

Żywotność komórek Raji kontrolnych i traktowanych salinomycyną w obecności rytuksymabu/ofatumumabu w stężeniu 1 µg/mL i 10% surowicy ludzkiej analizowano z użyciem cytometrii przepływowej.

4.16 Zbadanie wpływu salinomycyny na skuteczność działania rytuksymabu i ofatumumabu w mechanizmie CDC w panelu różnych ustalonych nowotworowych linii komórkowych wywodzących się z limfocytów B

Następnie sprawdzono czy salinomycyna wpływa na działanie cytotoksyczne przeciwciał monoklonalnych w panelu wybranych linii komórkowych wywodzących się z nowotworowych limfocytów B. W tym celu użyto komórek linii Pfeiffer, OCI-Ly7 oraz Karpas-422 reprezentujących chłoniaka rozlanego z dużych komórek B. Eksperymenty przeprowadzano na komórkach kontrolnych oraz preinkubowanych przez 48 godzin z salinomycyną w stężeniu 0,5 µM. Do testu CDC z surowicą ludzką wykorzystano rytuksymab i ofatumumab. Ponownie zaobserwowano wzrost śmiertelności komórek preinkubowanych z

salinomycyną pod wpływem salinomycyny w porównaniu do grupy kontrolnej (Ryc. 23). Wyniki potwierdzają, że zdolność salinomycyny do potęgowania efektu cytotoksycznego rytuksymabu i ofatumumabu dotyczy całego panelu linii komórek nowotworowych reprezentujących różne podtypy chłoniaków.

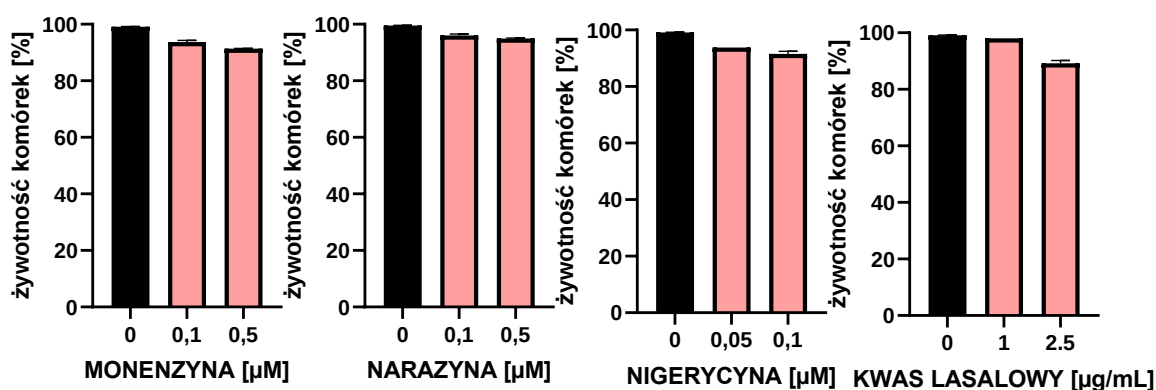


Rycina 23. Wpływ salinomycyny na śmiertelność komórek w mechanizmie CDC pod wpływem przeciwciał monoklonalnych anti-CD20 w modelach linii Karpas-422, OCI-LY7 i Pfeiffer. Przedstawiono żywotność komórek kontrolnych oraz preinkubowanych z salinomycyną przez 48 godzin w stężeniu 0,5 μM po inkubacji z terapeutycznymi przeciwciałami monoklonalnymi: A) rytuksymabem i B) ofatumumabem. Eksperyment przeprowadzono z użyciem cytometrii przepływowej.

4.17 Zbadanie wpływu pochodnych salinomycyny oraz innych związków z grupy jonoforów na ilość antygenu CD20 na powierzchni komórek nowotworowych oraz na skuteczność rytuksymabu w mechanizmie CDC

W kolejnym etapie oceniono czy działanie podobne do salinomycyny można zaobserwować dla całej grupy związków jonoforowych, których salinomycyna jest najbardziej znanym i zaawansowanym w badaniach w modelach ludzkich linii komórkowych przedstawicielem. W tym celu komórki linii Raji potraktowano wzrastającymi stężeniami komercyjnie dostępnych związków jonoforowych: narazyny, kwasu lasalowego, monenzyny i nigerycyny. Wszystkie te związki należą do grupy antybiotyków jonoforowych, ale w znaczący sposób różnią się strukturą chemiczną. Monenzyna jest drugim po salinomycynie związkiem jonoforowym zatwierdzonym przez FDA do stosowania z przeznaczeniem weterynaryjnym. Podobnie jak salinomycyna, monenzyna jest przedmiotem zainteresowania w kontekście jej potencjału toksycznego względem komórek nowotworowych w ludzkich modelach *in vitro*.

Dobór odpowiednich stężeń testowanych związków zaczerpnięto z bardzo ograniczonych danych literaturowych. Dlatego przed zbadaniem wpływu wybranych związków na efektywność CDC szczegółowo sprawdzono ich potencjał toksyczny poprzez wybarwienie komórek nekrotycznych i późnoapoptotycznych jodkiem propidyny i porównanie ich odsetka z grupą kontrolną w analizie cytometrycznej. Dane przedstawiono na Ryc. 24. We wszystkich testowanych stężeniach toksyczność nie przekraczała 10%.



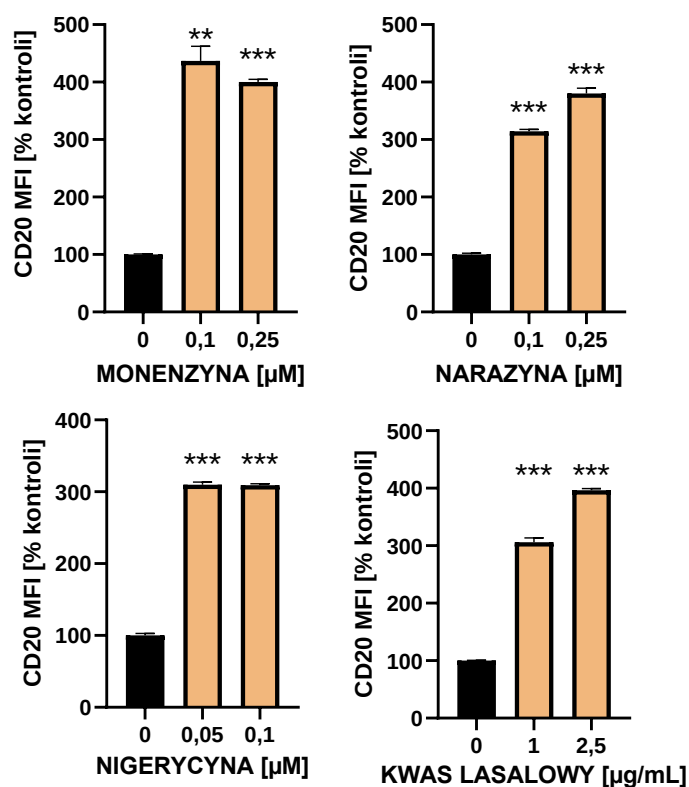
Rycina 24. Ocena żywotności komórek Raji pod wpływem 48-godzinnej inkubacji w pożywce z różnymi stężeniami związków jonoforowych.

Komórki linii Raji inkubowano przez 48 godz. w pożywce z dodatkiem monenzyny w stężeniach 0; 0,1 μM ; 0,5 μM , narazyny w stężeniach 0; 0,1 μM i 0,5 μM , nigerycyny w stężeniach 0; 0,05 μM , 0,1 μM i kwasu lasalowego w stężeniach 0; 1 $\mu\text{g/mL}$; 2,5 $\mu\text{g/mL}$. Po inkubacji komórki wyznakowano jodkiem propidyny znakującym martwe komórki i analizowano za

pomocą cytometrii przepływowej. Przedstawiono uzyskane średnie wartości fluorescencji (MFI) $\pm$ SD porównano do 100% w komórkach grupy kontrolnej.

W celu oceny wpływu badanych związków na ilość CD20, komórki inkubowano z wybranymi, nietoksycznymi stężeniami leków przez 48 godzin. Następnie wybarwiono komórki znakowanym przeciwciałem wykrywającym antygen CD20. Ponownie ilość antygenu na komórkach oszacowano przy użyciu cytometru przepływowego.

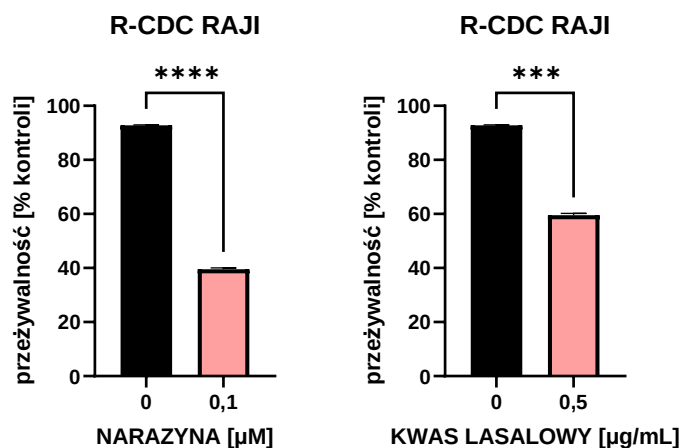
Zaobserwowano istotny, kilkukrotny wzrost powierzchniowego antygenu CD20 pod wpływem inkubacji ze wszystkimi testowanymi związkami jonoforowymi (Ryc. 25). W toku przeprowadzonych eksperymentów wykazano więc, że nie tylko salinomycyna, ale cała grupa związków jonoforowych znacząco zwiększa ilość antygenu CD20 na powierzchni badanych komórek nowotworowych.



Rycina 25. Ocena ilości cząsteczki CD20 na powierzchni komórek linii Raji inkubowanych 48 godzin z różnymi stężeniami monenzyny, narazyny, nigerycyny i kwasu lasalowego.

Komórki linii Raji inkubowano przez 48 godz. w pożywce z dodatkiem monenzyny w stężeniach 0; 0,1 μM; 0,25 μM, narazyny w stężeniach 0; 0,1 μM; 0,25 μM, nigerycyny w stężeniach 0; 0,05 μM, 0,1 μM i kwasu lasalowego w stężeniach 0; 1 μg/mL; 2,5 μg/mL. Po inkubacji komórki wyznakowano fluorescencyjnym przeciwciałem wykrywającym powierzchniowe białko CD20. Do pomiaru fluorescencji użyto metody cytometrii przepływowej. Uzyskane średnie wartości fluorescencji (MFI) $\pm$ SD porównano do 100% w komórkach grupy kontrolnej.

W toku dalszych eksperymentów sprawdzono także, czy wzrost ekspresji białka CD20 przekłada się na uwrażliwienie komórek na działanie rytuksymabu i ofatumumabu a więc efektywność CDC. Potwierdzono, że związki jonoforowe prowadzą do uwrażliwienia komórek Raji na działanie nawet najniższych dawek rytuksymabu w procesie CDC (Ryc. 26).



Rycina 26. Wpływ narasyny i kwasu lasalowego na śmiertelność komórek Raji w mechanizmie CDC pod wpływem rytuksymabu.

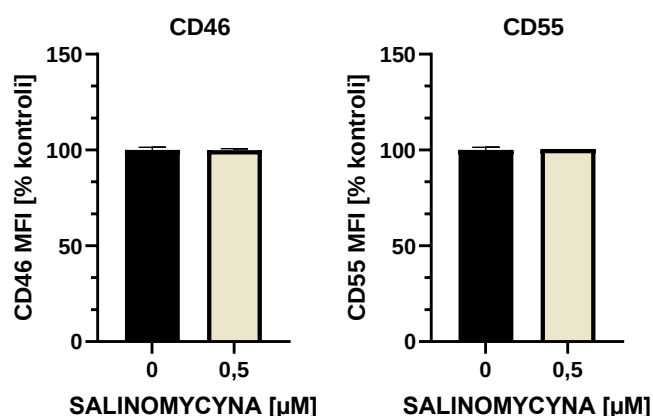
Przedstawiono żywotność komórek kontrolnych oraz preinkubowanych przez 48 godzin z narasyną (0,1 μM) lub kwasem lasalowym (0,5 μg), a następnie traktowanych terapeutycznym przeciwciałem monoklonalnym anti-CD20 – rytuksymabem, w obecności 10% surowicy ludzkiej. Eksperyment przeprowadzono z użyciem cytometrii przepływowej.

Przeprowadzone eksperymenty wykazały uwrażliwianie komórek linii Raji na cytotoksyczne działanie rytuksymabu przez inne związki jonoforowe. Salinomycyna jest jednak substancją o najlepiej opisanej w literaturze charakterystyce farmakokinetycznej i farmakodynamicznej spośród rodziny jonoforów. Dlatego do kolejnych eksperymentów mających na celu wyjaśnienie mechanizmu modulacji ilości antygenu CD20 przez związki jonoforowe wybrano salinomycynę jako związek reprezentatywny dla całej grupy o najbardziej obiecującym potencjale zastosowania klinicznego.

4.18 Wpływ salinomycyny na ekspresję białek inhibitorowych układu dopełniacza na powierzchni komórek Raji

Aby potwierdzić, że potęgowanie działania rytuksymabu i ofatumumabu pod wpływem salinomycyny jest spowodowane wzrostem ilości CD20 zbadano wpływ salinomycyny na ilość inhibitorów dopełniacza, czyli antygenów CD46, CD55 i CD59 – wykazujących negatywną zdolność regulacji aktywności układu dopełniacza.

Wykonano analizę cytometryczną ilości białek CD46 i CD55 na powierzchni komórek Raji inkubowanych przez 48 godzin ze wzrastającymi nietoksycznymi stężeniami salinomycyny. Komórki wybarwiono przeciwciałami rozpoznającymi CD46 lub CD55 sprzężonymi z fluorochromem FITC lub PE. Nie badano antygenu CD59 ze względu na brak jego ekspresji w linii komórkowej Raji. Ilość wybarwionych fluorescencyjnie białek oszacowano z użyciem cytometrii przepływowej.



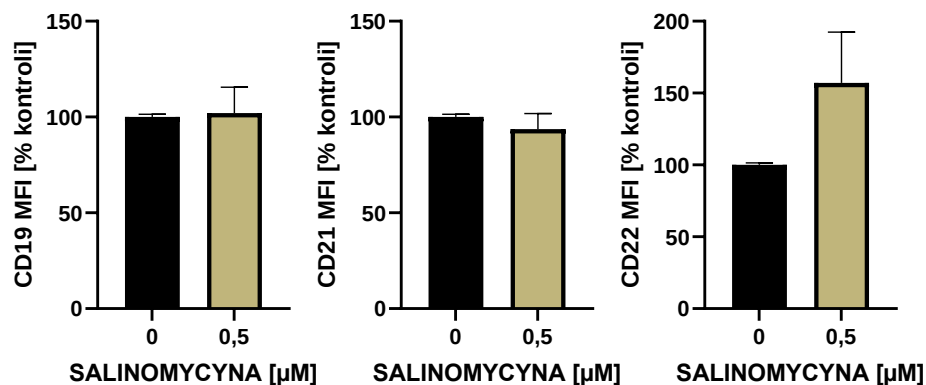
Rycina 27. Ocena ilości cząsteczki CD46 i CD55 na powierzchni komórek linii Raji inkubowanych 48 godzin z salinomycyną.

Komórki nowotworowe inkubowano przez 48 godz. w pożywce z dodatkiem nietoksycznych stężeń salinomycyny. Następnie komórki wyznakowano przeciwciałem anty-CD20 sprzężonym z fluorochromem FITC. Do pomiaru fluorescencji użyto metody cytometrii przepływowej. Uzyskane średnie wartości fluorescencji (MFI) $\pm$ SD porównano do 100% w komórkach grupy kontrolnej.

Nie zaobserwowano istotnej statystycznie zmiany ekspresji badanych białek inhibitorowych na powierzchni komórek Raji pod wpływem salinomycyny (Ryc. 27). Tym samym wykluczono udział białek regulujących aktywność kaskady dopełniacza – CD46 i CD55 w potęgowaniu działania cytotoksycznego rytuksymabu i ofatumumabu przez salinomycynę.

4.19 Wpływ salinomycyny na ilość innych antygenów na powierzchni komórek Raji

W kolejnym etapie ceniciono także czy salinomycyna wpływa na ilość innych antygenów występujących na powierzchni komórek nowotworowych wywodzących się z limfocytów B, takich jak CD19, CD21 i CD22, będących celami molekularnymi w terapii nowotworów wywodzących się z limfocytów B.



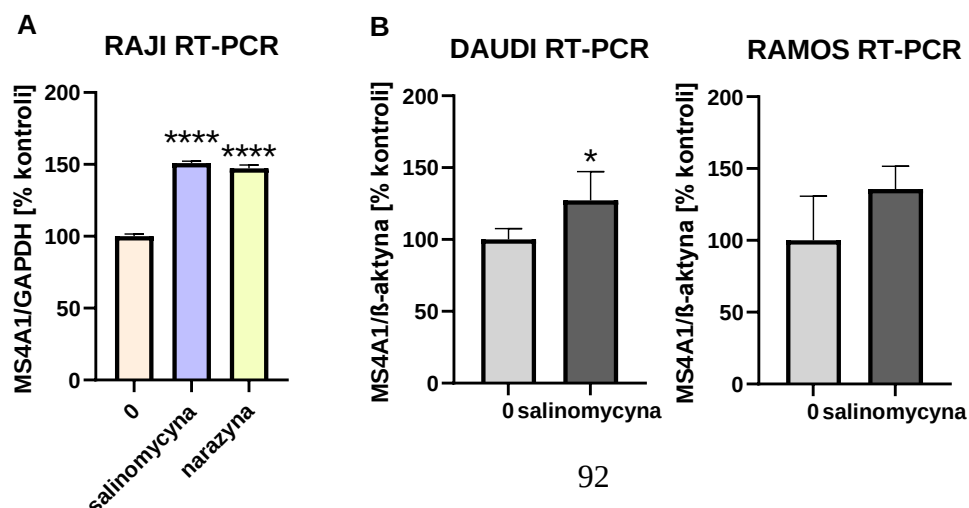
Rycina 28. Ocena ilości cząsteczki CD19, CD21 i CD22 na powierzchni komórek linii Raji inkubowanych 48 godzin z salinomycyną.

Komórki nowotworowe inkubowano przez 48 godz. w pożywce z dodatkiem nietoksycznych stężeń salinomycyny. Następnie komórki wyznakowano przeciwciałem anti-CD21, anti-CD19 lub anti-CD22 sprzężonym z fluorochromem FITC lub PE. Do pomiaru fluorescencji użyto metody cytometrii przepływowej. Uzyskane średnie wartości fluorescencji (MFI) $\pm$ SD porównano do 100% w komórkach grupy kontrolnej.

Nie zaobserwowano istotnych zmian w ilości białek CD21 i CD19 pod wpływem inkubacji z salinomycyną (Ryc. 28). Zauważono natomiast nieistotny statystycznie wzrost ilości antygenu CD22 na powierzchni komórek Raji, które charakteryzują się niską bazalną ekspresją tego antygenu na powierzchni błony komórkowej.

4.20 Wpływ salinomycyny na ekspresję genu kodującego CD20

W kolejnych eksperymentach sprawdzono czy salinomycyna oraz narazyna regulują ilość antygenu CD20 na poziomie transkrypcyjnym. W tym celu przy użyciu metody ilościowej reakcji RT-PCR w czasie rzeczywistym oceniono ilość transkryptu dla genu *MS4A1* w komórkach Raji kontrolnych oraz inkubowanych z wybranymi jonoforami. Eksperyment z salinomycyną przeprowadzono także w liniach Ramos i Daudi.

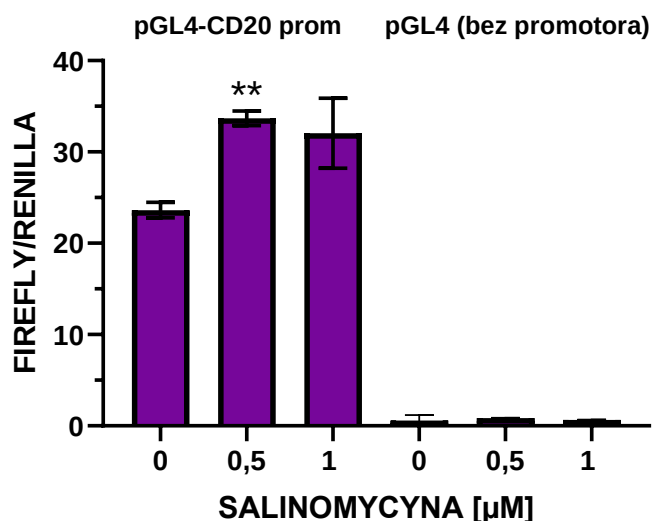


Rycina 29. Ocena ilości transkryptu CD20 po inkubacji przez 24 godziny A) komórek Raji z salinomycyną i narazyną w stężeniach 0,5 μ M B) komórek Daudi i Ramos z salinomycyną w stężeniu 0,5 μ M. Dane na wykresie wyrażone są jako stosunek mRNA dla CD20 do mRNA dla genów referencyjnych aktyny β /GAPDH w odniesieniu do 100% w grupie kontrolnej.

W komórkach inkubowanych z salinomycyną zaobserwowano niewielki (około 1.5-krotny), ale powtarzalny wzrost ilości transkryptu MS4A1 (Ryc. 29) wskazujący, że salinomycyna zwiększa transkrypcję mRNA kodującego białko CD20.

4.21 Wpływ salinomycyny na aktywność promotora genu MS4A1

W celu dalszego zbadania mechanizmu regulacji transkrypcji genu MS4A1 przez salinomycynę oceniono jej wpływ na aktywność promotora genu MS4A1. W tym celu do komórek Raji przy użyciu nukleofekcji wprowadzono konstrukt plazmidowy pGL zawierający promotor genu MS4A1 z bioreporterem Firefly luc (czyli lucyferazą świetlika) oraz gen reporterowy lucyferazy Renilli (RL). Kontrolę negatywną stanowiły komórki transfekowane pustym wektorem pGL4 bez promotora MS4A1. Po inkubacji nukleofekowanych komórek z salinomycyną zmierzono bioluminescencję katalizowaną przez lucyferazę świetlika, której aktywność zależy od promotora genu MS4A1. Wyniki przedstawiono jako stosunek luminescencji Firefly/Renilla w komórkach inkubowanych z badanym związkiem wobec komórek kontrolnych.



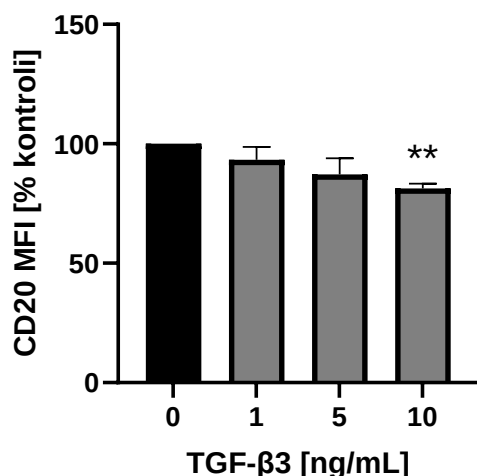
Rycina 30. Ocena aktywności promotora genu MS4A1 dla CD20 w nukleofekowanych komórkach linii Raji po inkubacji z salinomycyną.

Komórki linii Raji nukleofekowano plazmidem zawierającym bioreporter w postaci lucyferazy świetlika oraz promotor dla MS4A1 lub plazmidem pustym a następnie inkubowano przez 24 godziny w pożywce z dodatkiem salinomycyny w stężeniach 0,5 i 1 μ M. Poziom bioluminescencji wyrażony ilorazem Firefly/Renilla wskazuje na aktywność badanego promotora.

W komórkach inkubowanych z salinomycyną stwierdzono wzrost aktywności promotora w porównaniu do komórek kontrolnych (Ryc. 30), zatem w kolejnych etapach pracy skupiono się na identyfikacji mechanizmów i szlaków odpowiedzialnych za regulację promotora genu *MS4A1* przez salinomycynę.

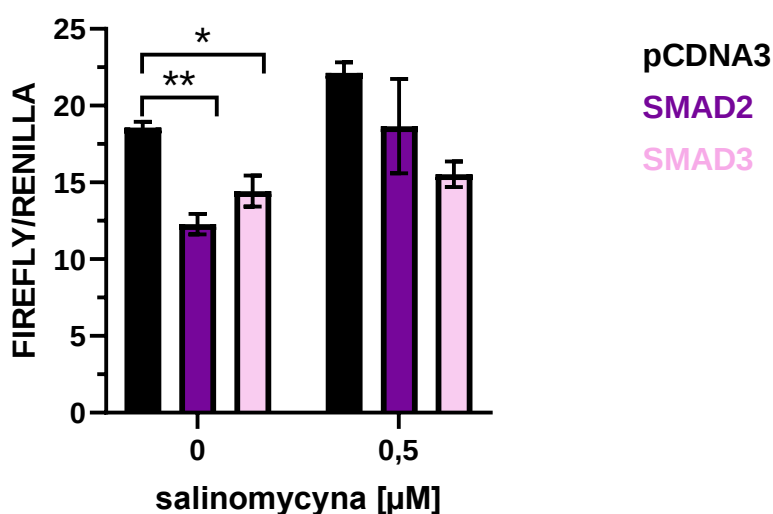
4.22 Wpływ salinomycyny na białka rodziny SMAD

Dane literaturowe wskazują, że salinomycyna może negatywnie oddziaływać na kompleks czynników transkrypcyjnych rodziny SMAD należących do szlaku przekazywania zależnego od TGF- β (226). Z kolei inne doniesienia wskazują na możliwość hamowania aktywności promotora genu *MS4A1* w komórkach linii chłoniaka Burkitta poprzez TGF- β , a więc pośrednio także poprzez aktywację czynników SMAD (227). Stąd w pierwszej kolejności sprawdzono czy salinomycyna wpływa na ilość antygenu CD20 poprzez zablokowanie białek SMAD i ich wpływ na promotor *MS4A1*. W eksperymencie badano białka SMAD 2 i 3, ponieważ są one fosforylowane bezpośrednio po aktywacji receptorów dla TGF- β i pełnią funkcję pozytywnych regulatorów tego szlaku. Najpierw sprawdzono czy w badanych modelowych liniach komórkowych aktywacja ścieżki przekazywania z receptora dla TGF- β reguluje ilość antygenu CD20 na powierzchni komórek. W tym celu metodą cytometrii przepływowej oceniono ilość białka CD20 w komórkach linii Ramos stymulowanych przez 48 godzin wzrastającymi stężeniami TGF- β .



Rycina 31. Ocena ilości antygenu CD20 na powierzchni komórek Ramos stymulowanych przez 48 godzin wzrastającymi stężeniami TGF-β.

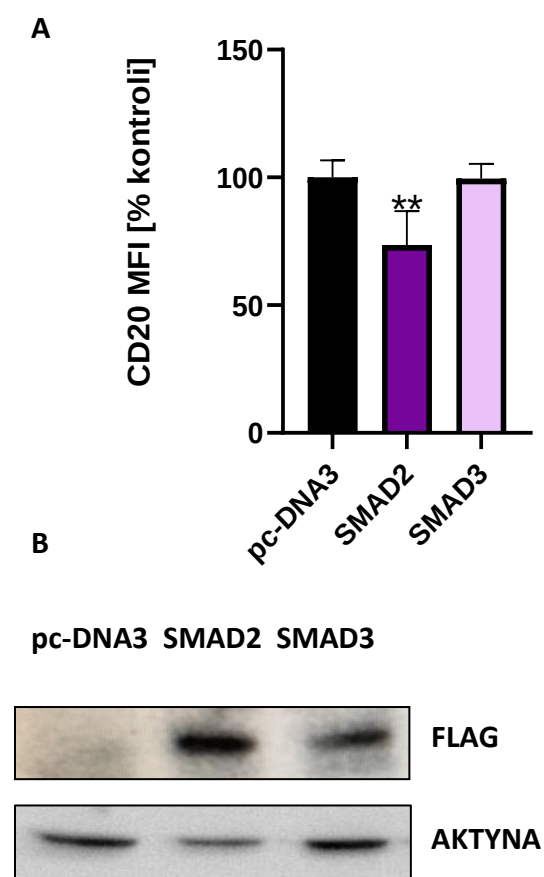
Zaobserwowano niewielki, ale powtarzalny spadek ilości powierzchniowego antygenu CD20 pod wpływem inkubacji z TGF-β (Ryc. 31). W dalszym etapie komórki linii Raji nukleofekowano konstruktem plazmidowym z aktywnym białkiem SMAD 2 lub SMAD3 lub kontrolnym pCDNA3 oraz wektorem z promotorem dla genu kodującego CD20 sprzężonym z lucyferazą świetlika i genem reporterowym lucyferazy *Renilli*. Następnie komórki traktowano wzrastającymi stężeniami salinomycyny. Ponownie intensywność luminescencji lucyferazy świetlika zmierzono po 48 godzinach inkubacji i normalizowano względem lucyferazy *Renilli*.



Rycina 32. Ocena aktywności promotora genu *MS4A1* dla CD20 w komórkach linii Raji bez lub z wprowadzonym konstruktem aktywnych SMAD po inkubacji z salinomycyną.

Komórki linii Raji nukleofekowano plazmidem zawierającym bioreporter w postaci lucyferazy świetlika oraz promotor dla *MS4A1* lub plazmidem pustym oraz aktywny konstrukt *SMAD2/3* a następnie inkubowano przez 48 godzin w pożywce z dodatkiem salinomycyny w stężeniu 0,5 μ M. Poziom bioluminescencji wyrażony ilorazem *Firefly/Renilla* wskazuje na aktywność badanego promotora.

Komórki Raji z wprowadzonym konstruktem aktywnych *SMAD2* i *SMAD3* charakteryzowały się obniżoną aktywnością promotora dla genu *MS4A1* (Ryc. 32), co potwierdza hamujący wpływ białek *SMAD* (w szczególności *SMAD2*) na aktywność promotora badanego genu. Efekt ten był częściowo odwracany przez salinomycynę. Następnie sprawdzono czy zmiana aktywności promotora koreluje z poziomem powierzchniowego antygenu *CD20*. W tym celu komórki Raji nukleofekowano z użyciem plazmidów zawierających sekwencję aktywnego *SMAD2* lub *3* z molekularnym znacznikiem *FLAG* oraz równocześnie fluorescencyjnym białkiem markerowym *GFP*. Efektywność nukleofekcji potwierdzono poprzez detekcję metodą *Western blottingu* białek *FLAG* w lizatach nukleofekowanych komórek (Ryc. 33 B). Następnie z użyciem cytometrii przepływowej po wybarwieniu komórek przeciwciałem anti-*CD20* sprzężonym z fikoerytryną sprawdzono poziom powierzchniowego białka *CD20* w komórkach wykazujących fluorescencję białka *GFP*.

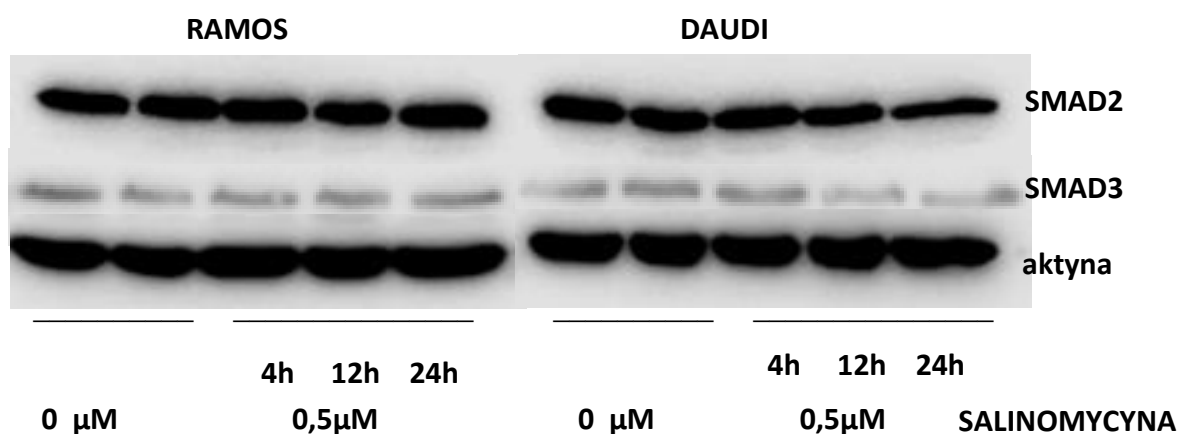


Rycina 33. Ocena ekspresji białka CD20 na powierzchni komórek Raji z wprowadzonym konstrukt aktywnego SMAD2 lub SMAD3.

A) Komórki linii Raji nukleofekowano plazmidem zawierającym aktywny konstrukt SMAD2 lub 3 oraz znacznik fluorescencyjny GFP. Komórki inkubowano z przeciwciałem skierowanym przeciwko antygenowi CD20 sprzężonym z fikoerytryną świecącą w kanale czerwonym. Następnie metodą cytometrii przepływowej oszacowano ilość CD20 na powierzchni komórek z barwnikiem zielonym a więc nukleofekowanych równocześnie konstrukt zawierającym SMAD2 lub SMAD3. Wyniki przedstawiono w stosunku do pomiaru wykonanego w grupie kontrolnej transfekowanej wektorem pustym (pc-DNA3).

B) Detekcja białek ze znacznikiem FLAG oraz aktywny (kontrola) metodą Western blottingu w lizatach komórek nukleofekowanych Raji.

Nie stwierdzono znaczącej różnicy w ilości powierzchniowego białka CD20 w komórkach z wprowadzonym aktywnym konstrukt SMAD3. Zaobserwowano natomiast niewielki spadek ilości CD20 w komórkach z aktywnym konstrukt SMAD2.



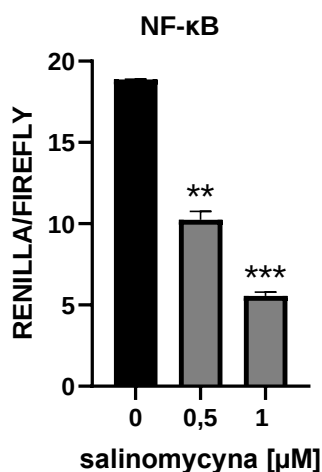
Rycina 34. Ocena całkowitej ilości białka SMAD 2 i SMAD3 w komórkach linii Ramos i Daudi inkubowanych przez 4, 12 i 24 godziny z salinomycyną w stężeniu 0.5 μM.

Przeprowadzono elektroforezę próbek lizatów z komórek Ramos i Daudi inkubowanych w pożywce z dodatkiem 0.5 μM salinomycyny. Ilość białka SMAD2 i SMAD3 oceniono metodą Western blottingu. Jednakowy poziom białka β-aktyny w poszczególnych próbkach uwierzytelnia wynik wskazując na użycie jednakowej ilości lizatów białkowych.

Sprawdzono także, czy salinomycyna reguluje ilość białek SMAD2 i SMAD3 w badanych komórkach nowotworowych. Metodą Western blottingu oszacowano ilość białek SMAD2 i SMAD3 w lizatach z komórek Ramos i Daudi, które poprzednio preinkubowano przez 4, 12 lub 24 godziny z salinomycyną w stężeniu 0.5 μM (Ryc. 34). Otrzymane wyniki wskazują, że salinomycyna nie zmienia ilości białek SMAD2 i SMAD3 w komórkach badanych linii, a regulacja aktywności promotora genu *MS4A1* przez salinomycynę nie jest związana z jej wpływem na białka SMAD2 i SMAD3.

4.23 Wpływ salinomycyny na inne czynniki transkrypcyjne dla genu *MS4A1*

Kolejnym z opisanych w literaturze czynników transkrypcyjnych zwiększających w komórkach ilość CD20 jest czynnik NF- κ B (228,229). Wykazano także szereg interakcji i połączeń między ścieżką przekazywania NF- κ B a szlakiem WNT/ β -kateniny (230), którego salinomycyna jest znanym inhibitorem (231,232). Przypuszczalnie salinomycyna mogłaby nasilać aktywność czynnika NF- κ B, co w konsekwencji prowadziłoby do zwiększonej ekspresji CD20. Sprawdzone zatem, czy w komórkach inkubowanych z salinomycyną zmienia się aktywność NF- κ B. W tym celu komórki Raji nukleofekowano konstruktem plazmidowym zawierającym NF- κ B sprzężony z lucyferazą świetlika oraz reporterowym genem lucyferazy *Renilli*. Intensywność luminescencji lucyferazy świetlika zmierzono po 48 godzinach inkubacji z salinomycyną i normalizowano względem luminescencji lucyferazy *Renilli*.

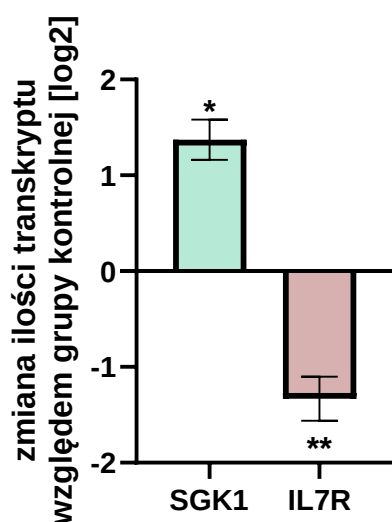


Rycina 35. Ocena aktywności czynnika NF- κ B w nukleofekowanych komórkach linii Raji po inkubacji z salinomycyną. Komórki linii Raji nukleofekowano plazmidem zawierającym gen dla NF- κ B połączonym z bioreporterem lucyferazy świetlika oraz reporterowym genem *Renilli*. Następnie komórki inkubowano przez 48 godzin w pożywce z dodatkiem salinomycyny w stężeniach 0,5 i 1 μ M. Poziom bioluminescencji wyrażony ilorazem *Firefly/Renilla* w stosunku do kontroli wskazuje na aktywność badanego genu dla czynnika.

Nieoczekiwanie zaobserwowano spadek aktywności NF- κ B w komórkach inkubowanych z salinomycyną (Ryc. 35). Na podstawie otrzymanych wyników wywnioskowano, że regulacja ilości CD20 przez salinomycynę nie zależy od czynnika transkrypcyjnego NF- κ B.

4.24 Wpływ salinomycyny na regulację niektórych genów zależnych od FOXO

W licznych przeprowadzonych eksperymentach nie udało się ustalić jednego konkretnego mechanizmu wyjaśniającego tak znaczący wpływ salinomycyny na ekspresję antygenu CD20. Wydaje się, że zaobserwowany efekt może być wieloczynnikowy, a kinaza AKT może pełnić jedną z kluczowych ról w mechanizmach tej regulacji. Nasz zespół opisał już zależny od AKT czynnik transkrypcyjny FOXO jako negatywny regulator transkrypcji genu dla CD20 (233), co również potwierdzono eksperymentalnie w niniejszej pracy (Rycina 16). Dlatego w ostatnim etapie pracy wykonano reanalizę danych pochodzących z profilowania transkrypcyjnego komórek Raji inkubowanych z salinomycyną (dane dostępne w suplemencie opublikowanej przez nas pracy (237)). Poszukiwano zmian w ekspresji genów regulowanych przez FOXO lub wpływających na ekspresję FOXO. Analiza ekspresji genów na podstawie danych RNA-seq (przy wartości progowej $q < 0,05$) wykazała istotne zmiany w ekspresji 65 genów w komórkach traktowanych salinomycyną. Stwierdzono, że salinomycyna silnie moduluje ekspresję mRNA dla IL7R, którego transkrypcja jest silnie zależna od FOXO1 (234). Zaobserwowano, że ilość mRNA dla IL7R była jednym z najsilniej zmniejszających się pod wpływem salinomycyny transkryptów (Ryc. 36). Ponadto przeanalizowano ilość transkryptu dla SGK1, który koduje białko hamujące aktywność czynników transkrypcyjnych FOXO (235,236).



Rycina 36. Wpływ salinomycyny na ilość mRNA dla IL7R oraz SGK1.

Komórki Raji inkubowano z salinomycyną o stężeniu $0,5 \mu\text{M}$ przez 18 godzin. Następnie poddano analizie sekwencjonowania nowej generacji (NGS, ang. Next Generation Sequencing).

Zaobserwowano, że salinomycyna istotnie zwiększała ilość mRNA SGK1 o działaniu hamującym wobec FOXO (Ryc.36). Obserwacje te sugerują, że salinomycyna może hamować

aktywność czynników transkrypcyjnych FOXO, które z kolei mają udokumentowany negatywny wpływ na ilość CD20. Dalsze, niedawno opublikowane badania prowadzone przez nas zespół jednoznacznie wskazują na regulację aktywności transkrypcyjnej FOXO1 przez salinomycynę (237).

5. Dyskusja

Wprowadzenie pierwszego przeciwciała anti-CD20 do schematów terapeutycznych w hematologii stanowiło przełom w leczeniu chłoniaków niehodgkinowskich. Mimo, że od pierwszej rejestracji przez FDA minęło ponad 25 lat, rytuksymab wciąż jest najczęściej stosowanym immunoterapeutykiem w terapii nowotworów B-komórkowych, a lista jego zastosowań powiększa się (238). Niestety w przypadku najgorzej rokującego chłoniaka DLBCL oporność na immunochemioterapię pierwszego rzutu z użyciem rytuksymabu (tzw. schemat R-CHOP) wynosi ponad 40%. Kolejnym problemem jest wykształcanie wtórnej oporności na immunoterapię anti-CD20 u pacjentów pierwotnie odpowiadających na leczenie (72).

Wśród znanych przyczyn oporności na rytuksymab wiodąca wydaje się niska ekspresja antygenu CD20 na powierzchni komórek nowotworowych. Opisano wiele transkrypcyjnych i potranskrypcyjnych mechanizmów warunkujących niską ekspresję CD20. Dotychczas jednak nie udało się wdrożyć metody klinicznej skutecznie potęgującej terapię anti-CD20 poprzez zwiększanie ilości CD20 na powierzchni komórek nowotworowych. Jedną z obiecujących strategii jest opisana już przez nasz zespół możliwość pozytywnej regulacji CD20 za pomocą inhibitorów deacetylazy histonów (80). Istnieje jednak potrzeba kolejnych badań nad szlakami regulującymi ekspresję CD20 - białka rozpoznawanego przez przeciwciała monoklonalne takie jak rytuksymab czy ofatumumab.

Celem niniejszej rozprawy doktorskiej było zbadanie zależności między kinazą AKT a ilością CD20 w komórkach reprezentujących nowotwory B-komórkowe. Wiadomo, że długotrwała ekspozycja komórek chłoniaka na rytuksymab sprzyja wytworzeniu oporności nie tylko na rytuksymab, ale również krzyżowo na niektóre chemioterapeutyki, co sugeruje powstawanie wspólnych ścieżek oporności, z których jedną z opisanych są zaburzenia funkcji ścieżki sygnałowej PI3K/AKT (239,240). Szlak przekazywania PI3K/AKT jako jeden z głównych mechanizmów efektorowych przewodzenia sygnału z receptorów BCR i pre-BCR uczestniczy w regulacji proliferacji, cyklu komórkowego i apoptozy oraz mechanizmach naprawczych i ochronnych (241). Zaburzenia kluczowej dla rozwoju komórek ścieżki PI3K/AKT są jednym z głównych mechanizmów patogenezy nowotworów hematologicznych (242).

W pierwszym etapie pracy sprawdzono czy ilość antygenu CD20 zmienia się pod wpływem testowanych w badaniach klinicznych oraz stosowanych już w praktyce klinicznej inhibitorów

kinaz tyrozynowych SYK i BTK a następnie inhibitorów kinaz AKT i PI3K uczestniczących w przekazywaniu sygnału z receptora BCR. Niektóre z tych inhibitorów były już testowane w zaawansowanych badaniach klinicznych w połączeniu z przeciwciałami anti-CD20 (MK2205, ibrutynib, idelalizyb). Po przeanalizowaniu dostępnych danych dotyczących profilu bezpieczeństwa badanych inhibitorów i ich zaawansowania w badaniach klinicznych zdecydowano o użyciu w większości eksperymentów inhibitorów BTK (ibrutynib) i SYK (R406) (243,244). Związki te wykazywały dodatkowo wyjściowo niską toksyczność *in vitro* wobec badanych komórek (Ryc. 3C). Ponadto do zahamowania kinazy PI3K zastosowano idelalizyb, który cieszył się dużym zainteresowaniem w kontekście stosowania w monoterapii nowotworów B-komórkowych. Mimo początkowo zachęcających rezultatów idelalizybu w monoterapii nie osiągał jednak wyższych wskaźników ORR w porównaniu do stosowanych schematów terapeutycznych. Stanowiło to uzasadnienie dla kolejnych badań klinicznych, w których łączono inhibitor PI3K z innymi inhibitorami kinaz drobnocząsteczkowych i stosowanymi już chemioterapeutykami (245,246) oraz przeciwciałami monoklonalnymi anti-CD20 (247–249). Badanie III fazy wskazało przewagę kombinacji idelalizybu-ofatumumabu w porównaniu do monoterapii ofatumumabem u pacjentów z nawrotową lub oporną CLL (ORR 75,3% v. 18,4% oraz mediana PFS 16,3 v. 8,0 miesięcy, OS bez różnicy). Przewaga kombinacji idelalizybu-rytuksymabu (R) nad ramieniem kontrolnym R-placebo (ORR 81% vs. 13%, OS w rok po rozpoczęciu leczenia 92% vs 80% i redukcja limfadenopatii 92% vs. 80%) przesądziła o rejestracji idelalizybu w leczeniu nawrotowej i opornej postaci CLL (250,251). Wyniki dalszych badań wskazywały jednak znaczny potencjał toksyczny idelalizybu. Ze względu na występowanie szeregu działań niepożądanych, w szczególności takich jak zapalenie jelit (14-23%), śródmiąższowe zapalenia płuc (ok. 3%), hepatotoksyczność – zwłaszcza w połączeniu z ofatumumabem (79%), neutropenia stopnia III i IV (30%), perforacje przewodu pokarmowego prowadzące do zgonu, wstrzymano rekrutację w toczących się już badaniach klinicznych (245,252). W badaniu I fazy u chorych z CLL odnotowano istotnie wyższą śmiertelność (7,4% vs. 3,5%) w ramieniu leczonym idelalizybem z rytuksymabem i bendamustyną (B) w porównaniu do B+R lub R w monoterapii (253). Te obserwacje skutkowały czasowym wstrzymaniem badań klinicznych nad skutecznością idelalizybu (oświadczenie FDA z marca 2016 r.) (254). Stosowanie idelalizybu ograniczono następnie do terapii skojarzonej z R w leczeniu pacjentów z CLL (kolejna linia leczenia) lub o niekorzystnej rokowniczo mutacji TP53/delecji 17p13 i przeciwwskazaniami do podania chemioimmunoterapii lub ibrutynibu (pierwsza linia leczenia) (255). Obecnie idelalizyb nie ma już zastosowania w terapii CLL i innych indolentnych rozrostach B-komórkowych. Brak badań

in vitro oceniających interakcje stosowanego połączenia rytuksymabu i inhibitora PI3K na poziomie komórkowym stanowi jedno z uzasadnień eksperymentów przeprowadzonych w toku rozprawy doktorskiej. W przeprowadzonych w ramach niniejszej pracy eksperymentach wykazano, że wszystkie testowane inhibitory (zarówno samej kinazy AKT i PI3K jak również kinaz SYK i BTK pośrednio regulujących PI3K/AKT (256)) istotnie obniżają ilość antygenu CD20 w różnych liniach B-komórkowych (Ryc.3A i B oraz Ryc. 12), co przekłada się na blisko 70-procentowe upośledzenie działania rytuksymabu i ofatumumabu w mechanizmie CDC (Ryc.4 i Ryc.13). Zahamowanie aktywności przeciwnowotworowej obserwowane dla ofatumumabu było słabsze w porównaniu z rytuksymabem. Zgodnie z obserwacjami innych badaczy ofatumumab wykazuje wyjściowo wyższą toksyczność względem komórek nowotworowych w porównaniu z rytuksymabem. Efekt ten jest zależny od jego wiązania się do pętli epitopowej położonej bliżej błony komórkowej, co sprzyja z kolei efektywniejszej aktywacji MAC przy takiej samej dostępności antygenu CD20 (257). Wykazano, że wiązanie w unikalnym miejscu zwiększa stabilność kompleksu co spowolnia proces dysocjacji i przekłada się na dodatkowy wzrost skuteczności CDC (257).

Aby wykluczyć, że obserwowany wpływ wybranych inhibitorów na CD20 wynika z nieselektywnego oddziaływania z innymi kinazami wyprowadzono klony komórek Raji z wyciszonymi genami dla SYK lub BTK (258). Problem plejotropowego oddziaływania jest powszechny dla wielu inhibitorów kinaz. W wielu przypadkach pomimo szerokiej analizy właściwości farmakodynamicznych w modelach *in vitro* oraz *in vivo*, interakcje pomiędzy kinazami były wykrywane dopiero w późnych fazach badań klinicznych. Dlatego początkowo ustalono, że selektywne wyciszenie ekspresji SYK i BTK prowadzi do istotnego zmniejszenia ilości powierzchniowego CD20 (Ryc. 10), co przekładało się z kolei na upośledzenie przeciwnowotworowego działania rytuksymabu w mechanizmie CDC (Ryc. 11).

Zbadano też wpływ inhibitorów SYK i BTK na ekspresję innych antygenów powierzchniowych. Ibrutynib i R406 w sposób powtarzalny zmniejszały ekspresję antygenów CD46 i CD55 będących negatywnymi regulatorami układu dopełniacza (Ryc. 5). Chociaż uzyskany spadek ekspresji był niewielki, zmniejszenie ilości tych antygenów powinno skutkować (odwrotnie do naszej obserwacji) zwiększeniem efektywności CDC (259). W tym kontekście wywnioskowano, że upośledzenie działania przeciwciał jest spowodowane w głównej mierze zmniejszeniem ekspresji CD20 na powierzchni badanych komórek. Ibrutynib i R406 nieznacznie zmniejszały też powierzchniową ilość CD19, a istotnie CD21 i CD22 (Ryc.

6). Ta obserwacja może mieć znaczenie kliniczne, ponieważ wszystkie wymienione antygeny są białkami docelowymi dla terapeutycznych przeciwciał monoklonalnych lub terapii CAR-T (260,261). Obserwacje te wymagają jednak przeprowadzenia dalszych badań.

Zaobserwowano także istotny wzrost ilości powierzchniowego IgM, (Ryc. 6), co prawdopodobnie wynika z opisanego już zaangażowania kinaz SRC w proces jego internalizacji (262). Oba inhibitory zwiększały także w niewielkim stopniu ekspresję HLA-DR na powierzchni badanych komórek. Podobne obserwacje opisał niedawno zespół Manukyan'a w doświadczeniach na komórkach wyizolowanych od pacjentów z CLL. W tej pracy długotrwałe podawanie ibrutynibu zwiększało ekspresję HLA-DR na wszystkich podgrupach monocytów, a także zwiększało ilość komórek CD4⁺ HLA-DR⁺ (263). Poznanie konsekwencji klinicznych tej obserwacji wymaga przeprowadzenia badań walidacyjnych, ale wiadomo, że zwiększona ekspresja HLA-DR może sprzyjać efektywniejszej prezentacji antygenów przez te komórki (264). Ponadto antygen ten jest celem terapeutycznym dla przeciwciał bi-specyficznych anti-CD20 i HLA-DR, które wykazują obiecujące działanie przeciwnowotworowe wobec komórek chłoniaka (265) zarówno *in vitro* (266) jak i *in vivo* (267). Na przykładzie różnych antygenów powierzchniowych wykazano więc, że negatywny wpływ testowanych inhibitorów nie dotyczy wszystkich białek błonowych, ale ogranicza się do kilku antygenów, zachowując szczególną selektywność w stosunku do CD20 (Ryc. 3, Ryc. 5 i Ryc.6).

Wykazano także, że R406 i ibrutynib regulują ilość CD20 na poziomie transkrypcyjnym (Ryc.7). Zaobserwowano ponad 50-procentowy spadek ilości transkryptu genu *MS4A1* kodującego CD20 pod wpływem inkubacji komórek z tymi inhibitorami. Podobne wartości uzyskano dla inhibitorów kinazy AKT, która działa poniżej w szlaku PI3K (MK-2206 i GDC-0068) (Ryc. 14).

W dostępnych w literaturze wynikach analiz ekspresji genów można znaleźć potwierdzenie negatywnego wpływu zarówno R406 jak i ibrutynibu na transkrypcję genu *MS4A1*. Dodatkowo, w wykonanej przez nasz zespół re-analizie przeprowadzonych przez Chen i zespół badań mikromacierzowych wykonanych w panelu 5 linii komórkowych DLBCL wykazano wyraźne zmniejszenie ekspresji *MS4A1* po 24 godzinach inkubacji z R406 (154,268). W analizie ekspresji genów w komórkach wyizolowanych od pacjentów z CLL leczonych kombinacją ibrutynibu i rytuksymabu w jednoramiennym badaniu 2 fazy wykazano ponad 2-krotny spadek ekspresji *MS4A1* po 7 dniach terapii (269).

Podsumowując, w pierwszej części projektu zbadano regulację antygenu powierzchniowego CD20 poprzez wpływ na szlaki przekazywania sygnału z receptora BCR. W szczególności potwierdzono negatywną regulację CD20 przez stosowane w badaniach klinicznych lub już zarejestrowane drobnocząsteczkowe inhibitory kinaz BTK, SYK oraz PI3K/AKT. Udowodniono w modelu *in vitro* negatywny wpływ badanych inhibitorów na przeciwnowotworowe działanie stosowanych w klinice przeciwciał anti-CD20. Część z przytaczanych wyników badań zawartych w pracy doktorskiej została opublikowana w pracy „*Inhibitors of SRC kinases impair antitumor activity of anti-CD20 monoclonal antibodies*”, której jestem współautorką (223).

W kolejnym etapie sprawdzono, jak zwiększenie aktywności szlaku PI3K/AKT wpływa na ilość białka CD20. W tym celu do komórek Raji wprowadzono konstrukty plazmidowe z konstytutywnie aktywną, ufosforylowaną kinazą AKT. W komórkach z aktywną kinazą zaobserwowano znaczny wzrost białka CD20 (Ryc.15). W oparciu o te wyniki poszukiwano następnie związków, które poprzez aktywację szlaku PI3K/AKT mogłyby pozytywnie regulować ilość CD20, a w konsekwencji zwiększać skuteczność rytuksymabu i ofatumumabu. W tym celu wykonano systematyczny przegląd literatury pod kątem związków potencjalnie aktywujących szlak PI3K/AKT.

W wyniku przeglądu literaturowego do dalszych eksperymentów wytypowano salinomycynę – związek polieterowy z grupy jonoforów dotychczas stosowany od 1983 roku jako środek antybakteryjny u zwierząt (210). W ostatnich latach salinomycyna stała się przedmiotem zainteresowania wielu zespołów badawczych ze względu na jej potencjalne zastosowania w onkologii. W badaniach na wytypowanych 16 tysiącach związków o potencjale przeciwnowotworowym salinomycyna wykazała najsilniejszy hamujący wpływ wobec komórek macierzystych raka piersi, przewyższając ponad 100-krotnie niektóre z chemioterapeutyków stosowanych w aktualnych protokołach terapeutycznych np. paklitaksel (270). Globalna analiza ekspresji genów wykazała, że salinomycyna zmniejsza ekspresję wielu genów typowych dla komórek macierzystych (270). Opisano także silny proapoptotyczny wpływ salinomycyny na komórki raka endometrium potwierdzony wzrostem transkrypcji genów *BAX*; *TP53*; *FASL* i zmniejszeniem ekspresji genów *BCL2L12*; *BIRC5* (271). Podobne wyniki uzyskano w modelach komórkowych białaczki z limfocytów T oraz chłoniaka Burkitta (202). Potwierdzono też, że pod wpływem salinomycyny komórki nowotworowe są bardziej wrażliwe na stosowane leki chemioterapeutyczne. Salinomycyna jest silnym inhibitorem

glikoproteiny-P (P-gp), białka z domeną wiążącą ATP (ABC, ang. ATP-binding cassette transporter), które ułatwia transport leków na zewnątrz komórki czyniąc ją oporną np. na chemioterapeutyki. Pod wpływem inkubacji z salinomycyną wielolekooporne (ang. MDR, multi-drug resistance) ludzkie komórki białaczkowe (CEM-VBL 10 i CEM-VBL 100) oraz komórki raka jajnika A2780/ADR odzyskiwały pierwotną wrażliwość na winblastynę i taksany (225). Salinomycyna zwiększa również skuteczność radioterapii wydłużając okres fazy G2 w komórkach napromieniowanych (272).

Co jednak najistotniejsze z perspektywy zagadnień poruszanych w rozprawie doktorskiej, niedawno opisano pozytywny wpływ salinomycyny na aktywność AKT w komórkach raka piersi i raka płaskonabłonkowego jamy ustnej (210). Zastosowanie inhibitorów szlaku PI3K (LY294002 lub wortmaniny) znosiło tą zależność, co sugeruje, że salinomycyna może regulować AKT poprzez wpływ na szlak PI3K (210). Opisany związek salinomycyny ze szlakiem PI3K/AKT oraz jej plejotropowy potencjał przeciwnowotworowy były silnymi przesłankami do rozpoczęcia badań nad salinomycyną w kontekście możliwości regulacji antygenu CD20.

Potencjał toksyczny salinomycyny i innych związków jonoforowych jest jednak jednym z poważnych czynników ograniczających ich użycie w badaniach *in vivo*. Jonofory dysregulując wewnątrzkomórkową równowagę jonową hamują fosforylację oksydacyjną w szczególności w miocytach i kardiomiocytach, w wyższych dawkach wykazują też działanie nefro- i hepatotoksyczne (273). Trwają jednak zaawansowane prace nad stworzeniem pochodnych salinomycyny o lepszym profilu bezpieczeństwa i aktywności przeciwnowotworowej, w których wiodącą rolę ma polski zespół prof. Huczyńskiego (Wydział Chemii Uniwersytetu Poznańskiego) (224,274,275,275). Szczególnie obiecujące w tym kontekście wydają się być analogi C20 salinomycyny, które charakteryzowały się szczególnie efektywnym działaniem przeciwnowotworowym w modelach *in vitro* i *ex vivo* ostrej białaczki limfoblastycznej (204,274). Mając na uwadze powyższe, w pierwszej kolejności oszacowano żywotność komórek Raji traktowanych różnymi stężeniami salinomycyny i w większości eksperymentów posłużono się 0,5 μ M stężeniem salinomycyny, dla którego toksyczność nie przekraczała 10% (Ryc.18). Takie stężenie wykorzystywano także w opisanych wyżej pracach.

Metodą Western blotting pokazaliśmy, że salinomycyna zwiększa ilość oraz aktywność kinazy AKT w komórkach chłoniaka Burkitta oraz DLBCL (Ryc. 17). Potwierdzono też hipotezę, że salinomycyna zwiększa ilość CD20 na powierzchni różnych komórek nowotworowych (Ryc. 20). W komórkach Raji salinomycyna w stężeniu 0,5 μ M zwiększała powierzchniową ekspresję

CD20 ponad 4-krotnie (Ryc.19). Według mojej wiedzy żadna z dotychczas testowanych substancji nie wykazywała tak silnego pozytywnego wpływu na ilość tego antygeny. Salinomycyna zwiększała ilość CD20 również na powierzchni komórek Karpas-422 i SU-DHL-4 (Ryc. 20), w których nie obserwowano jej wpływu na ilość i aktywność AKT (Ryc. 17). Wykazaliśmy też metodą Western blottingu, że salinomycyna zwiększa całkowitą ilość CD20, a nie jedynie jego ilość na powierzchni komórki np. zmieniając jego transport wewnątrz komórki lub powodując rearanżację błony komórkowej jako związek jonoforowy (Ryc. 21). Wzrost ilości CD20 na powierzchni komórek zależny od salinomycyny prowadził do potęgowania efektu przeciwnowotworowego rytuksymabu i ofatumumabu w procesie CDC w różnych liniach komórkowych (także SU-DHL-S i Karpas-422) (Ryc. 23). Eksperymenty powtórzone z zastosowaniem innych, dostępnych związków jonoforowych, których właściwości nie są tak szczegółowo opisane w literaturze. Wszystkie badane związki tj. monenzyna, narazyna, nigerycyna i kwas lasalowy stosowane w nietoksycznych stężeniach również silnie (nawet ponad 4-krotnie) zwiększały ilość antygeny CD20 na powierzchni komórek Raji (Ryc. 25), co przekładało się na spotęgowanie działania rytuksymabu przez CDC (Ryc.26). Zidentyfikowano zatem całą grupę związków o dotychczas nieopisanym, silnym pozytywnym wpływie na CD20, a w konsekwencji potęgujących działanie badanych przeciwciał monoklonalnych. Analiza wpływu salinomycyny na panel antygenów powierzchniowych dodatkowo wykluczyła wzrost efektywności CDC na skutek regulacji poziomu inhibitorów dopełniacza CD46 i CD55 (Ryc. 27).

W dalszych etapach potwierdzono, że pozytywna regulacja CD20 wynikała z modyfikacji procesów transkrypcyjnych, o czym świadczy zarówno zaobserwowany wzrost ilości transkryptu genu *MS4A1* jak i wzrost aktywności jego promotora w komórkach inkubowanych z salinomycyną (Ryc. 29 i 30). Biorąc pod uwagę umiarkowany wzrost aktywności promotora, należy jednocześnie przypuszczać, że nie jest to jedyny mechanizm odpowiedzialny za zmiany w ekspresji CD20.

W dalszej części projektu skupiono się na poszukiwaniu czynników transkrypcyjnych mogących regulować transkrypcję *MS4A1*. Analiza nie była ograniczona do czynników ściśle powiązanych ze szlakiem PI3K, gdyż w niektórych liniach komórkowych zaobserwowano podwyższenie ekspresji CD20 bez równoczesnego zwiększenia ilości i aktywności AKT (Ryc.17).

W tym celu przeanalizowano dostępne w literaturze wyniki badań ekspresji genów w komórkach traktowanych salinomycyną pod kątem możliwego związku regulowanych genów z CD20. Wśród wielu czynników transkrypcyjnych i białek przekąźnikowych szczególną

uwagę zwróciły geny związane z WNT, NF- κ B, a w szczególności białka związane ze szlakiem przekazywania sygnału z receptora dla TGF- β (271). Warto jednak podkreślić, że dane te nie pochodziły z badań z użyciem limfocytów B, ponieważ nie analizowano dotąd zmian ekspresji genów po salinomycynie w tych komórkach.

Wiadomo, że salinomycyna może negatywnie oddziaływać na kompleks czynników transkrypcyjnych rodziny SMAD należących do szlaku przekazywania sygnału zależnego od TGF- β (226). Z drugiej strony opisano możliwość hamowania aktywności promotora genu *MS4A1* w komórkach linii chłoniaka Burkitta poprzez TGF- β , a więc pośrednio także poprzez aktywację czynników SMAD (227). Doniesienia te stanowiły przesłankę do sprawdzenia czy salinomycyna zwiększa ilość antygenu CD20 poprzez zablokowanie białek SMAD hamujących promotor *MS4A1*. Weryfikację tej hipotezy rozpoczęto od potwierdzenia negatywnego wpływu szlaku TGF- β na ilość CD20 w modelu komórek Raji. Pod wpływem inkubacji z TGF- β zaobserwowaliśmy nieznaczny, ale powtarzalny i zależny od stężenia spadek ilości CD20 na powierzchni komórek (Ryc. 31). Wprowadzenie do komórek chłoniaka konstruktów z aktywnymi czynnikami SMAD2 i 3 rzeczywiście skutkowało nieznacznym obniżeniem aktywności promotora dla *MS4A1* (Ryc. 32) ale jedynie w przypadku SMAD2 przekładało się to na istotne zmniejszenie ilości CD20 (Ryc. 33 A). Ponieważ salinomycyna nie powodowała zmiany ilości białek SMAD 2 i 3 w komórkach badanych linii, wykluczono udział białek SMAD w regulacji ilości CD20 przez salinomycynę (Ryc. 34).

W kolejnym etapie przetestowano udział NF- κ B w regulacji ilości CD20 przez salinomycynę. NF- κ B jest silnie powiązany ze szlakiem WNT/ β -kateniny (230), którego salinomycyna jest znanym inhibitorem (231,232). NF- κ B jest także znanym dodatnim regulatorem ekspresji *MS4A1* (228,229). Nieoczekiwanie jednak przeprowadzone eksperymenty wykazały odwrotną od zakładanej zależność między salinomycyną a NF- κ B (Ryc.35). Tym samym wykluczono rolę NF- κ B jako czynnika regulującego i ekspresję *MS4A1* pod wpływem salinomycyny.

Żadne z dostępnych w literaturze i analizowanych przez nas wyników ekspresji genów pod wpływem salinomycyny nie były przeprowadzane w komórkach krwi. Dlatego w dalszej części wykonano globalną analizę ekspresji genów regulowanych przez salinomycynę w komórkach chłoniaka Raji. Wszystkie spośród 65 cząsteczek mRNA, których ekspresja zmieniła się pod wpływem salinomycyny w przeprowadzonym eksperymencie, okazały się być regulowane również przez inny jonofor monenzynę.

Wśród genów najbardziej obiecujących w kontekście wpływu na CD20 znalazły się geny regulowane przez takie czynniki transkrypcyjne jak FOXO, MYC, NF-Y oraz miRNA mir181 (237). W pracy doktorskiej w szczególności skupiono się na transkryptach potencjalnie związanych z aktywacją AKT i jej efektem FOXO, którego rolę w regulacji CD20 wykazano wcześniej (Ryc. 16). Zaobserwowano, że salinomycyna istotnie zwiększa ilość mRNA SGK1, które koduje kinazę o właściwościach hamujących względem FOXO (Ryc. 36). Ponadto, mRNA dla IL7R, który jest celem transkrypcyjnym dla FOXO (234), okazał się być jednym z najsilniej regulowanych negatywnie przez oba związki jonoforowe (Ryc.36). Wyniki przeprowadzonych eksperymentów, w których brałam aktywny udział, zostały opublikowane w piśmie *Haematologica* (237). Przytaczana obserwacja pokrywa się z opisanym przez zespół Kim J. H. negatywnym wpływem salinomycyny na FOXO1 w komórkach raka piersi (210).

Z perspektywy bieżącej rozprawy doktorskiej przytaczana zależność ma zasadnicze znaczenie, ponieważ FOXO jest końcowym elementem szlaku PI3K/AKT. Fosforylacja FOXO przez AKT prowadzi do jego zatrzymania w cytoplazmie, a w konsekwencji do zahamowania jego aktywności transkrypcyjnej (221,222). Możliwość negatywnej regulacji genu *MS4A1* przez czynnik transkrypcyjny FOXO1 została już opisana zarówno w modelu mysim jak i w ludzkich limfocytach B (276). Nasz zespół udowodnił i opisał już wcześniej, że wyciszenie czynnika FOXO1 jako efektora szlaku PI3K/AKT prowadzi do zwiększenia ilości CD20 w komórkach chłoniaka (233).

Czynnik transkrypcyjny c-MYC został także zidentyfikowany jako negatywny regulator ekspresji *MS4A1* przez inny zespół współpracujący z nami (242,277). Udowodniono, że MYC może hamować transkrypcję *MS4A1* przynajmniej w 2 mechanizmach: bezpośrednio oddziałując na promotor genu oraz poprzez pozytywną regulację zależnego od niego miR-222, który z kolei blokuje transkrypcję *MS4A1* łącząc się z obszarem 3'UTR genu kodującego CD20 (278,279). Wyciszenie genu dla MYC w komórkach chłoniaka Burkitta oraz DLBCL skutkowało wzrostem ilości CD20. Nadekspresja MYC związana z translokacją BCL2 i MYC jest też znanym i niekorzystnym rokowniczo czynnikiem występującym w 5-14% przypadków DLBCL tzw. double hit lymphoma (17). Dlatego u wszystkich pacjentów z DLBCL Polskie Towarzystwo Onkologii Klinicznej zaleca przeprowadzanie screeningu w kierunku translokacji MYC (280). Pomimo dobrze opisanej roli MYC w procesie kancerogenezy inhibitory tego białka nie mają jeszcze zastosowania w warunkach klinicznych, chociaż jest to jeden z obiecujących kierunków badawczych. Pozostałe dwa czynniki zidentyfikowane w globalnej

analizie ekspresji genów regulowanych przez salinomycynę tj. NF-Y oraz mir-181 według naszej wiedzy nie mają udowodnionego związku z transkrypcją *MS4A1*. Wiadomo jednak, że mir-181 ma udział w regulacji szlaku PI3K/AKT (281). Zwiększona ekspresja mir-181 powodująca aktywację AKT ma znaczenie dla procesu kancerogenezy oraz wykształcania oporności na chemioterapeutyki, także w przypadku nowotworów wywodzących się z limfocytów B (282). Rola mir-181 jako jeden z aktywatorów szlaku PI3K/AKT mającego znaczenie dla działania salinomycyny wymaga jednak dalszych badania.

Wyniki kluczowych eksperymentów przeprowadzonych w projekcie doktorskim tj. wpływu testowanych związków na CD20 i skuteczność przeciwciał monoklonalnych przeprowadzono w panelu wielu linii komórkowych reprezentujących różne rodzaje nowotworów hematologicznych tj. chłoniaka Burkitta, DLBCL (linie BCR zależne i niezależne) oraz CLL. Pokazuje to, że odkryty nowy mechanizm regulacji antygenu CD20 poprzez wpływ na ścieżkę przekazywania sygnału PI3K jest uniwersalny dla różnych nowotworów B-komórkowych i może mieć potencjalnie szerokie implikacje kliniczne.

Zaobserwowane niewielkie różnice w zmianach ilości CD20 oraz skuteczności przeciwciał monoklonalnych pod wpływem testowanych związków pomiędzy poszczególnymi liniami komórkowymi mogą wynikać m. in. z różnic w wyjściowej ekspresji inhibitorów układu dopełniacza lub wyjściowej ilości CD20. Większość eksperymentów, w których ustalano mechanizm działania salinomycyny wykonano z użyciem modelowej linii Raji m.in. ze względu na jej stosunkową łatwość w hodowli.

Przeprowadzone w ramach projektu doktorskiego badania cechują ograniczenia typowe dla przedklinicznego badania eksperymentalnego *in vitro*. Jednym z głównych ograniczeń zaprezentowanych badań jest brak modelu *in vivo*. Tradycyjny system hodowli *in vitro* nie pozwala na ocenę rzeczywistych efektów badanych leków i kombinowanych terapii uzależnionych od złożonych interakcji w obrębie tkanek, narządów i układów. W badaniach przedstawionych w pracy doktorskiej skupiono się na możliwości rozszerzenia skuteczności niektórych połączeń i poszukiwaniu mechanizmów molekularnych wyjaśniających efekt wspomnianych terapii skojarzonych. Ponadto, według naszej wiedzy, nikt dotychczas nie badał antybiotyków politerowych w kontekście potęgowania terapii anty-CD20. Dlatego nasze obserwacje dotyczące wpływu salinomycyny i innych jonoforów na antygen CD20 przeprowadzone w modelu *in vitro* wymagały potwierdzenia w innych testach biologicznych, zwłaszcza w kontekście ryzyka toksyczności salinomycyny względem komórek

nienowotworowych. W dalszych przeprowadzonych przez nasz zespół eksperymentach wykazano, że salinomycyna zwiększa ilość CD20 także na powierzchni komórek nowotworowych pochodzących z limfocytów B pobranych od pacjentów z CLL i DLBCL (kohorty liczące odpowiednio 24 i 10 pacjentów). Otrzymane w trakcie realizacji pracy doktorskiej wyniki dotyczące wpływu salinomycyny na CD20 zostały opublikowane w czasopiśmie *Hematologica* i stały się podstawą do przeprowadzenia eksperymentów *in vivo*. W modelu myszy SCID inokulowanych komórkami Raji potwierdzono pozytywny wpływ salinomycyny na skuteczność rytuksymabu (237). W szczególności wykazano, że stosowanie skojarzonej terapii rytuksymabu z salinomycyną lub monenzyną znacząco ogranicza wzrost nowotworu (na podstawie pomiarów średnicy guza 27 dni po wprowadzeniu komórek oraz masy guza na koniec eksperymentów). Równocześnie, efekt ten nie był obserwowany w przypadku myszy inokulowanych komórkami bez ekspresji CD20. Reasumując wszystkie przeprowadzone przez nasz zespół przedkliniczne testy biologiczne (*in vivo*, *ex vivo*, *in vitro*) potwierdziły pozytywny wpływ salinomycyny na CD20 i możliwość potęgowania efektu przeciwnowotworowego rytuksymabu.

Innym ograniczeniem przedstawionej pracy doktorskiej jest brak kompleksowej oceny skuteczności przeciwciał monoklonalnych pod wpływem badanych leków. Obserwowany przeciwnowotworowy efekt rytuksymabu w opisanym wyżej eksperymencie w modelu mysim wynika nie tylko z działania układu dopełniacza (a więc procesu CDC) ale też zachodzącego przy dostępności komórek NK mechanizmu ADCC (237). W przeprowadzonych eksperymentach *in vitro* ograniczono się do oceny skuteczności rytuksymabu w mechanizmie CDC jako, że to właśnie ten mechanizm jest bezpośrednio zależny od powierzchniowej ilości białka CD20 (48,283). Wiadomo jednak, że udział ADCC w przypadku niektórych rozrostów hematologicznych może być nawet wiodącym mechanizmem działania rytuksymabu (60,284). W dalszych badaniach prowadzonych przez nasz zespół wykazano, że zarówno salinomycyna jak i monenzyna zwiększają skuteczność rytuksymabu również w mechanizmie ADCC. Ponadto komórki NK wykazywały zwiększoną toksyczność względem komórek nowotworowych już po samej inkubacji z jonoforami, nawet w przypadku braku przeciwciała anti-CD20. Być może za efekt ten odpowiada pozytywny wpływ salinomycyny na powierzchniową ilość niektórych białek aktywujących receptory komórek NK, tj. CD80, CD155, ULBP2/5/6 i CD86 (237).

Z dużą ostrożnością należy również podchodzić do wykorzystania wykrytej w toku eksperymentów możliwości zwiększania ekspresji CD20 poprzez stymulowanie AKT. Proste i szybkie wdrożenie tego odkrycia w praktyce klinicznej będzie trudne do realizacji. Chociaż stymulacja szlaku PI3K wydaje się bardzo obiecującą metodą potęgowania działania przeciwciał terapeutycznych, wymaga rozważnego stosowania. Podwyższona aktywność szlaku PI3K/AKT ma udowodnione działanie proonkogenne w wielu nowotworach. Potwierdzono udział konstytutywnej aktywacji PI3K/AKT wynikającej z utraty ekspresji PTEN w patogenezie chłoniaka z komórek płaszczka (285). U około 10% pacjentów z rozlanym chłoniakiem z dużych komórek B obserwuje się mutacje lub amplifikacje PI3K również skutkujące zwiększeniem aktywności szlaku (178). Dlatego też celowa, pozytywna regulacja szlaku wydaje się być niebezpieczną strategią terapeutyczną, a zainteresowanie badaczy obecnie skupia się raczej wokół możliwości hamowania ścieżki PI3K/AKT. Z drugiej strony pojawiają się doniesienia o odwrotnym, antyonkogenym wpływie AKT/FOXO np. w ostrej białaczce szpikowej (AML) (286). W eksperymencie *ex vivo* zaobserwowano podwyższoną aktywność FOXO w blisko 40% próbek pobranych od pacjentów z AML. Aktywacja AKT lub zahamowanie FOXO1/3/4 przekładała się na zahamowanie wzrostu guza, a nawet wydłużała przeżycie myszy z ludzką białaczką AML (286). Podobnie, farmakologiczne hamowanie FOXO1 dawało przeciwbiałaczkowy efekt w ksenograftach komórek ALL do myszy (287). Wyniki te sugerują, że inhibicja FOXO w niektórych przypadkach jest możliwą efektywną strategią terapeutyczną. Należy jednak przeprowadzić dalsze dokładne badania aby ustalić w jakich grupach pacjentów takie działanie może przynieść pożądany, przeciwnowotworowy efekt, oraz wyselekcjonować tych, gdzie wpływ mógłby okazać się proonkogeny. W pierwszym etapie należałoby przeprowadzić dokładne badania *ex vivo* oraz w modelu zwierzęcym, ze szczegółową oceną jak miareczkowanie dawek badanych stymulatorów szlaku PI3K/AKT wpływa na potencjalne szlaki proonkogenne. Dopiero pozytywne wyniki takich eksperymentów mogłyby być podstawą do zaprojektowania badań I fazy.

Podsumowując, przeprowadzone przeze mnie eksperymenty wykazały, że szlaki przekazywania sygnału z BCR poprzez BTK, SYK oraz PI3/AKT są zaangażowane w regulację transkrypcji genu *MS4A1* kodującego CD20. Wykazano możliwość negatywnej regulacji tego szlaku przez komercyjnie dostępne inhibitory kinaz tyrozynowych. Wreszcie, zidentyfikowano całą grupę związków jonoforowych, które poprzez wpływ na AKT nawet kilkukrotnie zwiększają ilość białka CD20 na powierzchni komórek nowotworowych oraz pozytywnie wpływają na skuteczność przeciwciał monoklonalnych. Moje badania przyczyniły się do lepszego

zrozumienia mechanizmów regulacji CD20, co może stanowić istotny krok w projektowaniu skuteczniejszych kombinacji terapeutycznych z wykorzystaniem przeciwciał monoklonalnych. Wyniki przeprowadzonych eksperymentów mogą być przyczynkiem do dyskusji nad efektywnością stosowanych już w badaniach klinicznych połączeń inhibitorów kinaz z rytuksymabem i ofatumumabem. Równocześnie w swojej pracy doktorskiej zaproponowałam potencjalną możliwość włączenia do armamentarium hematologicznego nieznanych dotychczas, nieoczywistych kombinacji leków jonoforowych z przeciwciałami anty-CD20. Chociaż to ostatnie odkrycie wymaga jeszcze wielu szczegółowych badań przed bezpośrednim wprowadzeniem do kliniki to na etapie modelu *in vitro* oraz *in vivo* wykazuje wyjątkową skuteczność i daje nadzieje na uzyskanie obiecujących rezultatów w kolejnych etapach badań.

6. Wnioski

1. Zahamowanie szlaku przekazywania sygnału z receptora BCR poprzez inhibitory kinaz SYK i BTK powoduje zmniejszenie ilości CD20 na powierzchni komórek nowotworowych wywodzących się z limfocytów B oraz zmniejszenie efektywności przeciwnowotworowej przeciwciał monoklonalnych anty-CD20.
2. Drobnocząsteczkowe inhibitory kinaz szlaku sygnałowego PI3K/AKT powodują spadek ilości CD20 na powierzchni komórek nowotworowych, co przekłada się na obniżenie skuteczności działania przeciwciał monoklonalnych anty-CD20 w mechanizmie CDC.
3. Ilość antygenu CD20 na powierzchni komórek nowotworowych wywodzących się z limfocytów B zwiększa się na skutek aktywacji ścieżki PI3K/AKT/FOXO.
4. Białka z rodziny FOXO w sposób negatywny regulują transkrypcję genu *MS4A1* dla CD20.
5. Salinomycyna zwiększa aktywność kinazy AKT w niektórych liniach komórkowych wywodzących się z limfocytów B.
6. Salinomycyna i pochodne z grupy jonoforów powodują zwiększenie ilości antygenu CD20 na powierzchni komórek nowotworowych wywodzących się z limfocytów B.
7. Salinomycyna i pochodne z grupy jonoforów potęgują przeciwnowotworowe działanie rytuksymabu i ofatumumabu względem komórek nowotworowych poprzez zwiększenie ilości CD20 na powierzchni komórek nowotworowych.
8. Pozytywna regulacja ścieżki PI3K/AKT oraz negatywna regulacja działania FOXO1 są jednym z mechanizmów regulacji ekspresji CD20 przez salinomycynę.

Piśmiennictwo

1. Cai W, Zeng Q, Zhang X, Ruan W. Trends Analysis of Non-Hodgkin Lymphoma at the National, Regional, and Global Level, 1990–2019: Results From the Global Burden of Disease Study 2019. *Front Med (Lausanne)*. 23 wrzesień 2021;8:738693.
2. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, i in. *Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries*. CA: A Cancer Journal for Clinicians. 2021;71(3):209–49.
3. Raporty | Krajowy Rejestr Nowotworów [Internet]. [cytowane 10 grudzień 2024]. Dostępne na: <http://onkologia.org.pl/pl/raporty>
4. Zhang N, Wu J, Wang Q, Liang Y, Li X, Chen G, i in. Global burden of hematologic malignancies and evolution patterns over the past 30 years. *Blood Cancer J*. 17 maj 2023;13(1):82.
5. B-Cell Non-Hodgkin Lymphoma Treatment (PDQ®) - NCI [Internet]. 2023 [cytowane 10 grudzień 2024]. Dostępne na: <https://www.cancer.gov/types/lymphoma/hp/b-cell-lymphoma-treatment-pdq>
6. Sehn LH, Salles G. Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *N Engl J Med*. 4 marzec 2021;384(9):842–58.
7. Coiffier B, Lepage E, Briere J, Herbrecht R, Tilly H, Bouabdallah R, i in. CHOP chemotherapy plus rituximab compared with CHOP alone in elderly patients with diffuse large-B-cell lymphoma. *N Engl J Med*. 24 styczeń 2002;346(4):235–42.
8. Qualls D, Armand P, Salles G. The current landscape of frontline large B-cell lymphoma trials. *Blood*. 9 styczeń 2025;145(2):176–89.
9. SEOM-GOTEL clinical guidelines on diffuse large B cell lymphoma (2022) | Clinical and Translational Oncology [Internet]. [cytowane 22 maj 2025]. Dostępne na: https://link.springer.com/article/10.1007/s12094-023-03206-5?utm_source=chatgpt.com
10. Feugier P, Van Hoof A, Sebban C, Solal-Celigny P, Bouabdallah R, Fermé C, i in. Long-term results of the R-CHOP study in the treatment of elderly patients with diffuse large B-cell lymphoma: a study by the Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte. *J Clin Oncol*. 20 czerwiec 2005;23(18):4117–26.
11. Zhou Z, Sehn LH, Rademaker AW, Gordon LI, Lacasce AS, Crosby-Thompson A, i in. An enhanced International Prognostic Index (NCCN-IPI) for patients with diffuse large B-cell lymphoma treated in the rituximab era. *Blood*. 6 luty 2014;123(6):837–42.
12. Crump M, Neelapu SS, Farooq U, Van Den Neste E, Kuruvilla J, Westin J, i in. Outcomes in refractory diffuse large B-cell lymphoma: results from the international SCHOLAR-1 study. *Blood*. 19 październik 2017;130(16):1800–8.
13. Tilly H, Gomes da Silva M, Vitolo U, Jack A, Meignan M, Lopez-Guillermo A, i in. Diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL): ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. wrzesień 2015;26 Suppl 5:v116-125.

14. High dose chemotherapy with autologous stem cell transplantation in diffuse large B-cell lymphoma - PMC [Internet]. [cytowane 22 maj 2025]. Dostępne na: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC2703236/>
15. Friedberg JW. How I treat double-hit lymphoma. *Blood*. 3 sierpień 2017;130(5):590–6.
16. Davies A. Double-hit lymphoma: So what? *Hematol Oncol*. czerwiec 2019;37 Suppl 1:19–23.
17. Ott G, Rosenwald A, Campo E. Understanding MYC-driven aggressive B-cell lymphomas: pathogenesis and classification. *Blood*. 5 grudzień 2013;122(24):3884–91.
18. FDA approves tisagenlecleucel for adults with relapsed or refractory large B-cell lymphoma | FDA [Internet]. [cytowane 22 maj 2025]. Dostępne na: <https://www.fda.gov/drugs/resources-information-approved-drugs/fda-approves-tisagenlecleucel-adults-relapsed-or-refractory-large-b-cell-lymphoma>
19. FDA approves axicabtagene ciloleucel for large B-cell lymphoma | FDA [Internet]. [cytowane 22 maj 2025]. Dostępne na: <https://www.fda.gov/drugs/resources-information-approved-drugs/fda-approves-axicabtagene-ciloleucel-large-b-cell-lymphoma>
20. FDA approves lisocabtagene maraleucel for second-line treatment of large B-cell lymphoma | FDA [Internet]. [cytowane 22 maj 2025]. Dostępne na: <https://www.fda.gov/drugs/resources-information-approved-drugs/fda-approves-lisocabtagene-maraleucel-second-line-treatment-large-b-cell-lymphoma>
21. Shadman M, Ahn KW, Kaur M, Lekakis L, Beitinjane A, Iqbal M, i in. Autologous transplant vs. CAR-T therapy in patients with DLBCL treated while in complete remission. *Blood Cancer J*. 8 lipiec 2024;14(1):108.
22. Saiz LC, Leache L, Gutiérrez-Valencia M, Erviti J, Rojas Reyes MX. Efficacy and safety of chimeric antigen receptor T-cell (CAR-T) therapy in hematologic malignancies: a living systematic review on comparative studies. *Ther Adv Hematol*. 2023;14:20406207231168211.
23. Miazek-Zapala N, Slusarczyk A, Kusowska A, Zapala P, Kubacz M, Winiarska M, i in. The „Magic Bullet” Is Here? Cell-Based Immunotherapies for Hematological Malignancies in the Twilight of the Chemotherapy Era. *Cells*. 15 czerwiec 2021;10(6):1511.
24. Efficacy and safety of chimeric antigen receptor-T cells in the treatment of B cell lymphoma: a systematic review and meta-analysis | Chinese Medical Journal [Internet]. [cytowane 22 maj 2025]. Dostępne na: https://mednexus.org/doi/10.1097/CM9.0000000000000568?utm_source=chatgpt.com
25. Récher C, Coiffier B, Haioun C, Molina TJ, Fermé C, Casasnovas O, i in. Intensified chemotherapy with ACVBP plus rituximab versus standard CHOP plus rituximab for the treatment of diffuse large B-cell lymphoma (LNH03-2B): an open-label randomised phase 3 trial. *Lancet*. 26 listopad 2011;378(9806):1858–67.
26. Cunningham D, Hawkes EA, Jack A, Qian W, Smith P, Mouncey P, i in. Rituximab plus cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisolone in patients with newly

- diagnosed diffuse large B-cell non-Hodgkin lymphoma: a phase 3 comparison of dose intensification with 14-day versus 21-day cycles. *Lancet*. 25 maj 2013;381(9880):1817–26.
27. Haioun C, Mounier N, Emile JF, Ranta D, Coiffier B, Tilly H, i in. Rituximab versus observation after high-dose consolidative first-line chemotherapy with autologous stem-cell transplantation in patients with poor-risk diffuse large B-cell lymphoma. *Ann Oncol*. grudzień 2009;20(12):1985–92.
 28. Jaeger U, Trneny M, Melzer H, Praxmarer M, Nawarawong W, Ben Yehuda D, i in. Rituximab maintenance for patients with aggressive B-cell lymphoma in first remission: results of the randomized NHL13 trial. *Haematologica*. lipiec 2015;100(7):955–63.
 29. Autologous Transplantation as Consolidation for Aggressive Non-Hodgkin's Lymphoma | NEJM [Internet]. [cytowane 12 sierpień 2022]. Dostępne na: <https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMoa1301077>
 30. Tedder TF, Engel P. CD20: a regulator of cell-cycle progression of B lymphocytes. *Immunol Today*. wrzesień 1994;15(9):450–4.
 31. Tedder TF, Klejman G, Schlossman SF, Saito H. Structure of the gene encoding the human B lymphocyte differentiation antigen CD20 (B1). *J Immunol*. 1 kwiecień 1989;142(7):2560–8.
 32. Gamonet C, Bole-Richard E, Delherme A, Aubin F, Toussiot E, Garnache-Ottou F, i in. New CD20 alternative splice variants: molecular identification and differential expression within hematological B cell malignancies. *Exp Hematol Oncol*. 2015;5:7.
 33. Deans JP, Kalt L, Ledbetter JA, Schieven GL, Bolen JB, Johnson P. Association of 75/80-kDa phosphoproteins and the tyrosine kinases Lyn, Fyn, and Lck with the B cell molecule CD20. Evidence against involvement of the cytoplasmic regions of CD20. *J Biol Chem*. 22 wrzesień 1995;270(38):22632–8.
 34. Szöllösi J, Horejsi V, Bene L, Angelisová P, Damjanovich S. Supramolecular complexes of MHC class I, MHC class II, CD20, and tetraspan molecules (CD53, CD81, and CD82) at the surface of a B cell line JY. *J Immunol*. 1 październik 1996;157(7):2939–46.
 35. Li H, Ayer LM, Lytton J, Deans JP. Store-operated cation entry mediated by CD20 in membrane rafts. *J Biol Chem*. 24 październik 2003;278(43):42427–34.
 36. Olejniczak SH, Hernandez-Ilizaliturri FJ, Clements JL, Czuczman MS. Acquired resistance to rituximab is associated with chemotherapy resistance resulting from decreased Bax and Bak expression. *Clin Cancer Res*. 1 marzec 2008;14(5):1550–60.
 37. Fang C, Zhuang Y, Wang L, Fan L, Wu Y, Zhang R, i in. High levels of CD20 expression predict good prognosis in chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Sci*. sierpień 2013;104(8):996–1001.
 38. Prevodnik VK, Lavrenčak J, Horvat M, Novaković BJ. The predictive significance of CD20 expression in B-cell lymphomas. *Diagn Pathol*. 12 kwiecień 2011;6:33.

39. Johnson NA, Boyle M, Bashashati A, Leach S, Brooks-Wilson A, Sehn LH, i in. Diffuse large B-cell lymphoma: reduced CD20 expression is associated with an inferior survival. *Blood*. 16 kwiecień 2009;113(16):3773–80.
40. Kuijpers TW, Bende RJ, Baars PA, Grummels A, Derks IAM, Dolman KM, i in. CD20 deficiency in humans results in impaired T cell-independent antibody responses. *J Clin Invest*. styczeń 2010;120(1):214–22.
41. O’Keefe TL, Williams GT, Davies SL, Neuberger MS. Mice carrying a CD20 gene disruption. *Immunogenetics*. lipiec 1998;48(2):125–32.
42. Reduced T-dependent humoral immunity in CD20-deficient mice - PubMed [Internet]. [cytowane 11 grudzień 2024]. Dostępne na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23966626/>
43. Kheirallah S, Caron P, Gross E, Quillet-Mary A, Bertrand-Michel J, Fournié JJ, i in. Rituximab inhibits B-cell receptor signaling. *Blood*. 4 luty 2010;115(5):985–94.
44. Pavlasova G, Borsky M, Svobodova V, Oppelt J, Cerna K, Novotna J, i in. Rituximab primarily targets an intra-clonal BCR signaling proficient CLL subpopulation characterized by high CD20 levels. *Leukemia*. wrzesień 2018;32(9):2028–31.
45. Burger JA, Sivina M, Jain N, Kim E, Kadia T, Estrov Z, i in. Randomized trial of ibrutinib vs ibrutinib plus rituximab in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 7 marzec 2019;133(10):1011–9.
46. Stashenko P, Nadler LM, Hardy R, Schlossman SF. Characterization of a human B lymphocyte-specific antigen. *J Immunol*. październik 1980;125(4):1678–85.
47. Okroj M, Österborg A, Blom AM. Effector mechanisms of anti-CD20 monoclonal antibodies in B cell malignancies. *Cancer Treat Rev*. październik 2013;39(6):632–9.
48. Manches O, Lui G, Chaperot L, Gressin R, Molens JP, Jacob MC, i in. In vitro mechanisms of action of rituximab on primary non-Hodgkin lymphomas. *Blood*. 1 luty 2003;101(3):949–54.
49. Burkhardt B, Yavuz D, Zimmermann M, Schieferstein J, Kabickova E, Attarbaschi A, i in. Impact of Fc gamma-receptor polymorphisms on the response to rituximab treatment in children and adolescents with mature B cell lymphoma/leukemia. *Ann Hematol*. wrzesień 2016;95(9):1503–12.
50. Kuroda Y, Yashima-Abo A, Koyama D, Kikuchi J, Mori S, Ito S, i in. Bone marrow stromal cell-mediated degradation of CD20 leads to primary rituximab resistance in mantle cell lymphoma. *Leukemia*. maj 2021;35(5):1506–10.
51. Mechanisms of Immune Evasion and Novel Treatments for Relapsed and Refractory Diffuse Large B-cell Lymphoma [Internet]. [cytowane 22 maj 2025]. Dostępne na: https://www.xiahepublishing.com/2996-3427/OnA-2024-00006?utm_source=chatgpt.com
52. Beum PV, Lindorfer MA, Taylor RP. Within peripheral blood mononuclear cells, antibody-dependent cellular cytotoxicity of rituximab-opsonized Daudi cells is promoted by NK cells and inhibited by monocytes due to shaving. *J Immunol*. 15 sierpień 2008;181(4):2916–24.

53. Rezvani AR, Maloney DG. Rituximab resistance. *Best Pract Res Clin Haematol.* czerwiec 2011;24(2):203–16.
54. Cragg MS, Morgan SM, Chan HTC, Morgan BP, Filatov AV, Johnson PWM, i in. Complement-mediated lysis by anti-CD20 mAb correlates with segregation into lipid rafts. *Blood.* 1 luty 2003;101(3):1045–52.
55. Bellosillo B, Villamor N, López-Guillermo A, Marcé S, Esteve J, Campo E, i in. Complement-mediated cell death induced by rituximab in B-cell lymphoproliferative disorders is mediated in vitro by a caspase-independent mechanism involving the generation of reactive oxygen species. *Blood.* 1 listopad 2001;98(9):2771–7.
56. Kusowska A, Kubacz M, Krawczyk M, Slusarczyk A, Winiarska M, Bobrowicz M. Molecular Aspects of Resistance to Immunotherapies-Advances in Understanding and Management of Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *Int J Mol Sci.* 28 styczeń 2022;23(3):1501.
57. Di Gaetano N, Cittera E, Nota R, Vecchi A, Grieco V, Scanziani E, i in. Complement activation determines the therapeutic activity of rituximab in vivo. *J Immunol.* 1 sierpień 2003;171(3):1581–7.
58. Gong Q, Ou Q, Ye S, Lee WP, Cornelius J, Diehl L, i in. Importance of cellular microenvironment and circulatory dynamics in B cell immunotherapy. *J Immunol.* 15 styczeń 2005;174(2):817–26.
59. Deregulated Expression of miR-224 and its Target Gene: CD59 Predicts Outcome of Diffuse Large B-cell Lymphoma Patients Treated with R-CHOP | Request PDF. ResearchGate [Internet]. 22 październik 2024 [cytowane 11 grudzień 2024]; Dostępne na: https://www.researchgate.net/publication/264988971_Deregulated_Expression_of_miR-224_and_its_Target_Gene_CD59_Predicts_Outcome_of_Diffuse_Large_B-cell_Lymphoma_Patients_Treated_with_R-CHOP
60. Clynes RA, Towers TL, Presta LG, Ravetch JV. Inhibitory Fc receptors modulate in vivo cytotoxicity against tumor targets. *Nat Med.* kwiecień 2000;6(4):443–6.
61. Boross P, Jansen JHM, de Haij S, Beurskens FJ, van der Poel CE, Bevaart L, i in. The in vivo mechanism of action of CD20 monoclonal antibodies depends on local tumor burden. *Haematologica.* grudzień 2011;96(12):1822–30.
62. Stel AJ, Ten Cate B, Jacobs S, Kok JW, Spierings DCJ, Dondorff M, i in. Fas receptor clustering and involvement of the death receptor pathway in rituximab-mediated apoptosis with concomitant sensitization of lymphoma B cells to fas-induced apoptosis. *J Immunol.* 15 luty 2007;178(4):2287–95.
63. Vega MI, Huerta-Yepez S, Jazirehi AR, Garban H, Bonavida B. Rituximab (chimeric anti-CD20) sensitizes B-NHL cell lines to Fas-induced apoptosis. *Oncogene.* 8 grudzień 2005;24(55):8114–27.
64. Alas S, Emmanouilides C, Bonavida B. Inhibition of interleukin 10 by rituximab results in down-regulation of bcl-2 and sensitization of B-cell non-Hodgkin's lymphoma to apoptosis. *Clin Cancer Res.* marzec 2001;7(3):709–23.

65. Jazirehi AR, Vega MI, Bonavida B. Development of rituximab-resistant lymphoma clones with altered cell signaling and cross-resistance to chemotherapy. *Cancer Res.* 1 luty 2007;67(3):1270–81.
66. Stolz C, Schuler M. Molecular mechanisms of resistance to Rituximab and pharmacologic strategies for its circumvention. *Leukemia & Lymphoma.* 1 styczeń 2009;50(6):873–85.
67. Selenko N, Maidic O, Draxier S, Berer A, Jäger U, Knapp W, i in. CD20 antibody (C2B8)-induced apoptosis of lymphoma cells promotes phagocytosis by dendritic cells and cross-priming of CD8⁺ cytotoxic T cells. *Leukemia.* październik 2001;15(10):1619–26.
68. Vega MI, Huerta-Yepaz S, Garban H, Jazirehi A, Emmanouilides C, Bonavida B. Rituximab inhibits p38 MAPK activity in 2F7 B NHL and decreases IL-10 transcription: pivotal role of p38 MAPK in drug resistance. *Oncogene.* 29 kwiecień 2004;23(20):3530–40.
69. Jazirehi AR, Gan XH, De Vos S, Emmanouilides C, Bonavida B. Rituximab (anti-CD20) selectively modifies Bcl-xL and apoptosis protease activating factor-1 (Apaf-1) expression and sensitizes human non-Hodgkin's lymphoma B cell lines to paclitaxel-induced apoptosis. *Mol Cancer Ther.* listopad 2003;2(11):1183–93.
70. Marcus R, Imrie K, Belch A, Cunningham D, Flores E, Catalano J, i in. CVP chemotherapy plus rituximab compared with CVP as first-line treatment for advanced follicular lymphoma. *Blood.* 15 luty 2005;105(4):1417–23.
71. Kesireddy M, Lunning M. Relapsed or Refractory Diffuse Large B-Cell Lymphoma: “Dazed and Confused”. 16 czerwiec 2022;36:366–75.
72. McLaughlin P, Grillo-López AJ, Link BK, Levy R, Czuczman MS, Williams ME, i in. Rituximab chimeric anti-CD20 monoclonal antibody therapy for relapsed indolent lymphoma: half of patients respond to a four-dose treatment program. *J Clin Oncol.* sierpień 1998;16(8):2825–33.
73. Seyfizadeh N, Seyfizadeh N, Hasenkamp J, Huerta-Yepaz S. A molecular perspective on rituximab: A monoclonal antibody for B cell non Hodgkin lymphoma and other affections. *Crit Rev Oncol Hematol.* styczeń 2016;97:275–90.
74. Haidar JH, Shamseddine A, Salem Z, Mrad YA, Nasr MR, Zaatari G, i in. Loss of CD20 expression in relapsed lymphomas after rituximab therapy. *Eur J Haematol.* maj 2003;70(5):330–2.
75. Pavlasova G, Mraz M. The regulation and function of CD20: an “enigma” of B-cell biology and targeted therapy. *Haematologica.* czerwiec 2020;105(6):1494–506.
76. Winiarska M, Bil J, Nowis D, Golab J. Proteolytic pathways involved in modulation of CD20 levels. *Autophagy.* sierpień 2010;6(6):810–2.
77. Winiarska M, Bil J, Wilczek E, Wilczynski GM, Lekka M, Engelberts PJ, i in. Statins impair antitumor effects of rituximab by inducing conformational changes of CD20. *PLoS Med.* 25 marzec 2008;5(3):e64.

78. Salles G, Seymour JF, Offner F, López-Guillermo A, Belada D, Xerri L, i in. Rituximab maintenance for 2 years in patients with high tumour burden follicular lymphoma responding to rituximab plus chemotherapy (PRIMA): a phase 3, randomised controlled trial. *Lancet*. 1 styczeń 2011;377(9759):42–51.
79. Hiraga J, Tomita A, Sugimoto T, Shimada K, Ito M, Nakamura S, i in. Down-regulation of CD20 expression in B-cell lymphoma cells after treatment with rituximab-containing combination chemotherapies: its prevalence and clinical significance. *Blood*. 14 maj 2009;113(20):4885–93.
80. Bobrowicz M, Dwojak M, Pyrzynska B, Stachura J, Muchowicz A, Berthel E, i in. HDAC6 inhibition upregulates CD20 levels and increases the efficacy of anti-CD20 monoclonal antibodies. *Blood*. 5 październik 2017;130(14):1628–38.
81. Terui Y, Mishima Y, Sugimura N, Kojima K, Sakurai T, Mishima Y, i in. Identification of CD20 C-terminal deletion mutations associated with loss of CD20 expression in non-Hodgkin's lymphoma. *Clin Cancer Res*. 1 kwiecień 2009;15(7):2523–30.
82. Aung T, Chapuy B, Vogel D, Wenzel D, Oppermann M, Lahmann M, i in. Exosomal evasion of humoral immunotherapy in aggressive B-cell lymphoma modulated by ATP-binding cassette transporter A3. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 13 wrzesień 2011;108(37):15336–41.
83. Kelly KR, Friedberg JW, Park SI, McDonagh K, Hayslip J, Persky D, i in. Phase I Study of the Investigational Aurora A Kinase Inhibitor Alisertib plus Rituximab or Rituximab/Vincristine in Relapsed/Refractory Aggressive B-cell Lymphoma. *Clin Cancer Res*. 15 grudzień 2018;24(24):6150–9.
84. Roberts JD, Smith MR, Feldman EJ, Cragg L, Millenson MM, Roboz GJ, i in. Phase I study of bryostatin 1 and fludarabine in patients with chronic lymphocytic leukemia and indolent (non-Hodgkin's) lymphoma. *Clin Cancer Res*. 1 październik 2006;12(19):5809–16.
85. Fanqiao M, Maoyuan X, Cuicui P, Yu L, Dongfeng Z. ABCL-006 Azacytidine plus rituximab–gemcitabine–oxaliplatin as salvage treatment in patients with relapsed/refractory diffuse large B-cell lymphoma. *Clinical Lymphoma Myeloma and Leukemia*. 1 wrzesień 2024;24:S453.
86. Martin P, Bartlett NL, Chavez JC, Reagan JL, Smith SM, LaCasce AS, i in. Phase 1 study of oral azacytidine (CC-486) plus R-CHOP in previously untreated intermediate- to high-risk DLBCL. *Blood*. 24 luty 2022;139(8):1147–59.
87. Dwojak M, Bobrowicz M, Bil J, Bojarczuk K, Pyrzynska B, Siernicka M, i in. Sorafenib improves rituximab and ofatumumab efficacy by decreasing the expression of complement regulatory proteins. *Blood Cancer J*. 10 kwiecień 2015;5:e300.
88. Klepfish A, Gilles L, Ioannis K, Rachmilewitz EA, Eliezer R, Schattner A, i in. Enhancing the action of rituximab in chronic lymphocytic leukemia by adding fresh frozen plasma: complement/rituximab interactions & clinical results in refractory CLL. *Ann N Y Acad Sci*. wrzesień 2009;1173:865–73.
89. Golay J, Zaffaroni L, Vaccari T, Lazzari M, Borleri GM, Bernasconi S, i in. Biologic response of B lymphoma cells to anti-CD20 monoclonal antibody rituximab in vitro: CD55

- and CD59 regulate complement-mediated cell lysis. *Blood*. 15 czerwiec 2000;95(12):3900–8.
90. Weng WK, Levy R. Expression of complement inhibitors CD46, CD55, and CD59 on tumor cells does not predict clinical outcome after rituximab treatment in follicular non-Hodgkin lymphoma. *Blood*. 1 wrzesień 2001;98(5):1352–7.
 91. Fishelson Z, Donin N, Zell S, Schultz S, Kirschfink M. Obstacles to cancer immunotherapy: expression of membrane complement regulatory proteins (mCRPs) in tumors. *Molecular Immunology*. 1 wrzesień 2003;40(2):109–23.
 92. Chaudhary AK, Shi J, Cai W, Wang B, Zaman MS, Huang C, i in. Abstract LB067: Development of a novel bispecific antibody targeting PD-L1 and CD55 for cancer therapy. *Cancer Research*. 1 lipiec 2021;81(13_Supplement):LB067.
 93. Büyükkurt N, Özcan MA, Ergene Ü, Payzın B, Tunalı S, Demirkan F, i in. The Effect of FcγRIIIA Gene Polymorphism on the Treatment of Diffuse Large B-cell Non-Hodgkin Lymphoma: A Multicenter Prospective Observational Study. *Turk J Haematol*. czerwiec 2015;32(2):152–7.
 94. Ahlgrimm M, Pfreundschuh M, Kreuz M, Regitz E, Preuss KD, Bittenbring J. The impact of Fc-γ receptor polymorphisms in elderly patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with CHOP with or without rituximab. *Blood*. 27 październik 2011;118(17):4657–62.
 95. Mitrović Z, Aurer I, Radman I, Ajduković R, Sertić J, Labar B. FCgammaRIIIA and FCgammaRIIA polymorphisms are not associated with response to rituximab and CHOP in patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Haematologica*. lipiec 2007;92(7):998–9.
 96. Váróczy L, Zilahi E, Gyetvai A, Kajtár B, Gergely L, Sipka S, i in. Fc-gamma-receptor IIIa polymorphism and gene expression profile do not predict the prognosis in diffuse large B-cell lymphoma treated with R-CHOP protocol. *Pathol Oncol Res*. styczeń 2012;18(1):43–8.
 97. Danielou-Lazareth A, Henry G, Geromin D, Khaznadar Z, Briere J, Tamouza R, i in. At diagnosis, diffuse large B-cell lymphoma patients show impaired rituximab-mediated NK-cell cytotoxicity. *Eur J Immunol*. maj 2013;43(5):1383–8.
 98. Borgerding A, Hasenkamp J, Engelke M, Burkhart N, Trümper L, Wienands J, i in. B-lymphoma cells escape rituximab-triggered elimination by NK cells through increased HLA class I expression. *Exp Hematol*. marzec 2010;38(3):213–21.
 99. Makanga DR, Jullien M, David G, Legrand N, Willem C, Dubreuil L, i in. Low number of KIR ligands in lymphoma patients favors a good rituximab-dependent NK cell response. *Oncoimmunology*. 14 czerwiec 2021;10(1):1936392.
 100. Bittenbring JT, Neumann F, Altmann B, Achenbach M, Reichrath J, Ziepert M, i in. Vitamin D deficiency impairs rituximab-mediated cellular cytotoxicity and outcome of patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with but not without rituximab. *J Clin Oncol*. 10 październik 2014;32(29):3242–8.

101. Wang SY, Racila E, Taylor RP, Weiner GJ. NK-cell activation and antibody-dependent cellular cytotoxicity induced by rituximab-coated target cells is inhibited by the C3b component of complement. *Blood*. 1 luty 2008;111(3):1456–63.
102. Medema JP, de Jong J, Peltenburg LT, Verdegaal EM, Gorter A, Bres SA, i in. Blockade of the granzyme B/perforin pathway through overexpression of the serine protease inhibitor PI-9/SPI-6 constitutes a mechanism for immune escape by tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 25 wrzesień 2001;98(20):11515–20.
103. Pedersen AE, Jungersen MB, Pedersen CD. Monocytes mediate shaving of B-cell-bound anti-CD20 antibodies. *Immunology*. czerwiec 2011;133(2):239–45.
104. Hansson M, Asea A, Ersson U, Hermodsson S, Hellstrand K. Induction of apoptosis in NK cells by monocyte-derived reactive oxygen metabolites. *J Immunol*. 1 styczeń 1996;156(1):42–7.
105. Kłopotowska M, Bajor M, Graczyk-Jarzynka A, Kraft A, Pilch Z, Zhylko A, i in. PRDX-1 Supports the Survival and Antitumor Activity of Primary and CAR-Modified NK Cells under Oxidative Stress. *Cancer Immunol Res*. luty 2022;10(2):228–44.
106. Rimsza LM, Roberts RA, Miller TP, Unger JM, LeBlanc M, Braziel RM, i in. Loss of MHC class II gene and protein expression in diffuse large B-cell lymphoma is related to decreased tumor immunosurveillance and poor patient survival regardless of other prognostic factors: a follow-up study from the Leukemia and Lymphoma Molecular Profiling Project. *Blood*. 1 czerwiec 2004;103(11):4251–8.
107. Challa-Malladi M, Lieu YK, Califano O, Holmes A, Bhagat G, Murty VV, i in. Combined Genetic Inactivation of Beta2-Microglobulin and CD58 Reveals Frequent Escape from Immune Recognition in Diffuse Large B-cell Lymphoma. *Cancer Cell*. 13 grudzień 2011;20(6):728–40.
108. Tomita A, Hiraga J, Kiyoi H, Ninomiya M, Sugimoto T, Ito M, i in. Epigenetic regulation of CD20 protein expression in a novel B-cell lymphoma cell line, RRBL1, established from a patient treated repeatedly with rituximab-containing chemotherapy. *Int J Hematol*. lipiec 2007;86(1):49–57.
109. Sordo-Bahamonde C, Lorenzo-Herrero S, Payer ÁR, Gonzalez S, López-Soto A. Mechanisms of Apoptosis Resistance to NK Cell-Mediated Cytotoxicity in Cancer. *Int J Mol Sci*. 25 maj 2020;21(10):3726.
110. Stolz C, Hess G, Hähnel PS, Grabellus F, Hoffarth S, Schmid KW, i in. Targeting Bcl-2 family proteins modulates the sensitivity of B-cell lymphoma to rituximab-induced apoptosis. *Blood*. 15 październik 2008;112(8):3312–21.
111. Czuczman MS, Olejniczak S, Gowda A, Kotowski A, Binder A, Kaur H, i in. Acquirement of rituximab resistance in lymphoma cell lines is associated with both global CD20 gene and protein down-regulation regulated at the pretranscriptional and posttranscriptional levels. *Clin Cancer Res*. 1 marzec 2008;14(5):1561–70.
112. Jazirehi AR, Vega MI, Bonavida B. Development of rituximab-resistant lymphoma clones with altered cell signaling and cross-resistance to chemotherapy. *Cancer Res*. 1 luty 2007;67(3):1270–81.

113. Iacoboni G, Zucca E, Ghielmini M, Stathis A. Methodology of clinical trials evaluating the incorporation of new drugs in the first-line treatment of patients with diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL): a critical review. *Annals of Oncology*. maj 2018;29(5):1120–9.
114. Safety and Efficacy Of Obinutuzumab (GA101) Plus CHOP Chemotherapy In First-Line Advanced Diffuse Large B-Cell Lymphoma: Results From The Phase 2 Gather Study (GAO4915g) | Blood | American Society of Hematology [Internet]. [cytowane 12 sierpień 2022]. Dostępne na: <https://ashpublications.org/blood/article/122/21/1820/13697/Safety-and-Efficacy-Of-Obinutuzumab-GA101-Plus>
115. Morschhauser FA, Cartron G, Thieblemont C, Solal-Céligny P, Haioun C, Bouabdallah R, i in. Obinutuzumab (GA101) monotherapy in relapsed/refractory diffuse large b-cell lymphoma or mantle-cell lymphoma: results from the phase II GAUGUIN study. *J Clin Oncol*. 10 sierpień 2013;31(23):2912–9.
116. Le Gouill S, Ghesquières H, Oberic L, Morschhauser F, Tilly H, Ribrag V, i in. Obinutuzumab vs rituximab for advanced DLBCL: a PET-guided and randomized phase 3 study by LYSA. *Blood*. 29 kwiecień 2021;137(17):2307–20.
117. Sehn LH, Martelli M, Trněný M, Liu W, Bolen CR, Knapp A, i in. A randomized, open-label, Phase III study of obinutuzumab or rituximab plus CHOP in patients with previously untreated diffuse large B-Cell lymphoma: final analysis of GOYA. *J Hematol Oncol*. 6 czerwiec 2020;13(1):71.
118. Maloney DG, Ogura M, Fukuhara N, Davis J, Lasher J, Izquierdo M, i in. A phase 3 randomized study (HOMER) of ofatumumab vs rituximab in iNHL relapsed after rituximab-containing therapy. *Blood Adv*. 18 sierpień 2020;4(16):3886–93.
119. Luo C, Wu G, Huang X, Ma Y, Zhang Y, Song Q, i in. Efficacy and safety of new anti-CD20 monoclonal antibodies versus rituximab for induction therapy of CD20+ B-cell non-Hodgkin lymphomas: a systematic review and meta-analysis. *Sci Rep*. 5 luty 2021;11:3255.
120. Bannerji R, Arnason JE, Advani RH, Brown JR, Allan JN, Ansell SM, i in. Odronextamab, a human CD20×CD3 bispecific antibody in patients with CD20-positive B-cell malignancies (ELM-1): results from the relapsed or refractory non-Hodgkin lymphoma cohort in a single-arm, multicentre, phase 1 trial. *The Lancet Haematology*. 1 maj 2022;9(5):e327–39.
121. Dickinson MJ, Carlo-Stella C, Morschhauser F, Bachy E, Corradini P, Iacoboni G, i in. Glofitamab for Relapsed or Refractory Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *N Engl J Med*. 15 grudzień 2022;387(24):2220–31.
122. Sehn LH, Herrera AF, Flowers CR, Kamdar MK, McMillan A, Hertzberg M, i in. Polatuzumab Vedotin in Relapsed or Refractory Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *J Clin Oncol*. 10 styczeń 2020;38(2):155–65.
123. Tilly H, Morschhauser F, Sehn LH, Friedberg JW, Trněný M, Sharman JP, i in. The POLARIX Study: Polatuzumab Vedotin with Rituximab, Cyclophosphamide, Doxorubicin, and Prednisone (pola-R-CHP) Versus Rituximab, Cyclophosphamide, Doxorubicin, Vincristine and Prednisone (R-CHOP) Therapy in Patients with Previously Untreated Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *Blood*. 4 grudzień 2021;138(Supplement 2):LBA-1-LBA-1.

124. [Ad hoc announcement pursuant to Art. 53 LR] FDA approves Roche's Polivy in combination with R-CHP for people with certain types of previously untreated diffuse large B-cell lymphoma [Internet]. [cytowane 13 grudzień 2024]. Dostępne na: <https://www.roche.com/media/releases/med-cor-2023-04-19>
125. Young RM, Phelan JD, Wilson WH, Staudt LM. Pathogenic B cell receptor signaling in lymphoid malignancies: new insights to improve treatment. *Immunol Rev.* wrzesień 2019;291(1):190–213.
126. Young RM, Staudt LM. Targeting pathological B cell receptor signalling in lymphoid malignancies. *Nat Rev Drug Discov.* marzec 2013;12(3):229–43.
127. Chen L, Monti S, Juszczynski P, Daley J, Chen W, Witzig TE, i in. SYK-dependent tonic B-cell receptor signaling is a rational treatment target in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood.* 15 luty 2008;111(4):2230–7.
128. Lipfert C, Kim MS, Haslam A, Prasad VK. Recall of ibrutinib and issues with therapeutic approval. *bmj onc* [Internet]. 7 sierpień 2024 [cytowane 22 maj 2025];3(1). Dostępne na: <https://bmjoncology.bmj.com/content/3/1/e000418>
129. Research C for DE and. FDA approves ibrutinib plus rituximab for chronic lymphocytic leukemia. FDA [Internet]. 8 wrzesień 2024 [cytowane 22 maj 2025]; Dostępne na: <https://www.fda.gov/drugs/resources-information-approved-drugs/fda-approves-ibrutinib-plus-rituximab-chronic-lymphocytic-leukemia>
130. Drugs.com [Internet]. [cytowane 13 grudzień 2024]. Imbruvica (ibrutinib) FDA Approval History. Dostępne na: <https://www.drugs.com/history/imbruvica.html>
131. National Cancer Institute (NCI). A Randomized Double-Blind Phase III Study of Ibrutinib During and Following Autologous Stem Cell Transplantation Versus Placebo in Patients With Relapsed or Refractory Diffuse Large B-Cell Lymphoma of the Activated B-Cell Subtype [Internet]. *clinicaltrials.gov*; 2025 sty [cytowane 22 maj 2025]. Report No.: NCT02443077. Dostępne na: <https://clinicaltrials.gov/study/NCT02443077>
132. Pharmacyclics LLC. A Multicenter, Randomized, Double-blind, Placebo-controlled Phase 3 Study of the Bruton's Tyrosine Kinase (BTK) Inhibitor, Ibrutinib, in Combination With Rituximab Versus Placebo in Combination With Rituximab in Treatment Naïve Subjects With Follicular Lymphoma (PERSPECTIVE) [Internet]. *clinicaltrials.gov*; 2025 sty [cytowane 22 maj 2025]. Report No.: NCT02947347. Dostępne na: <https://clinicaltrials.gov/study/NCT02947347>
133. Loxo Oncology, Inc. A Phase 3 Open-Label, Randomized Study of Pirtobrutinib (LOXO-305) Versus Ibrutinib in Patients With Chronic Lymphocytic Leukemia/Small Lymphocytic Lymphoma (BRUIN-CLL-314) [Internet]. *clinicaltrials.gov*; 2025 kwi [cytowane 22 maj 2025]. Report No.: NCT05254743. Dostępne na: <https://clinicaltrials.gov/study/NCT05254743>
134. Flinn IW, Bartlett NL, Blum KA, Ardeschna KM, LaCasce AS, Flowers CR, i in. A phase II trial to evaluate the efficacy of fostamatinib in patients with relapsed or refractory diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL). *Eur J Cancer.* luty 2016;54:11–7.

135. Rigel Pharmaceuticals. Phase II, Multicenter, Simon Two-Stage Study of Fostamatinib Disodium in Patients With Relapsed or Refractory T-Cell Lymphoma [Internet]. clinicaltrials.gov; 2016 sie [cytowane 23 maj 2025]. Report No.: NCT00798096. Dostępne na: <https://clinicaltrials.gov/study/NCT00798096>
136. Gilead Sciences. A Phase 3, Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Study Evaluating the Efficacy and Safety of Idelalisib (GS-1101) in Combination With Rituximab for Previously Treated Chronic Lymphocytic Leukemia [Internet]. clinicaltrials.gov; 2019 maj [cytowane 23 maj 2025]. Report No.: NCT01539512. Dostępne na: <https://clinicaltrials.gov/study/NCT01539512>
137. Loxo Oncology, Inc. A Phase 3 Open-Label, Randomized Study of LOXO-305 Versus Investigator's Choice of Idelalisib Plus Rituximab or Bendamustine Plus Rituximab in BTK Inhibitor Pretreated Chronic Lymphocytic Leukemia & Small Lymphocytic Lymphoma (BRUIN CLL-321) [Internet]. clinicaltrials.gov; 2025 kwi [cytowane 23 maj 2025]. Report No.: NCT04666038. Dostępne na: <https://clinicaltrials.gov/study/NCT04666038>
138. Bird ST, Tian F, Flowers N, Przepiorka D, Wang R, Jung TH, i in. Idelalisib for Treatment of Relapsed Follicular Lymphoma and Chronic Lymphocytic Leukemia. JAMA Oncol. luty 2020;6(2):248–54.
139. Gilead Sciences. A Phase 3, Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Study Evaluating the Efficacy and Safety of Idelalisib (GS-1101) in Combination With Rituximab for Previously Treated Indolent Non-Hodgkin Lymphomas [Internet]. clinicaltrials.gov; 2018 paź [cytowane 23 maj 2025]. Report No.: NCT01732913. Dostępne na: <https://clinicaltrials.gov/study/NCT01732913>
140. Oki Y, Fanale M, Romaguera J, Fayad L, Fowler N, Copeland A, i in. Phase II study of an AKT inhibitor MK2206 in patients with relapsed or refractory lymphoma. Br J Haematol. listopad 2015;171(4):463–70.
141. National Cancer Institute (NCI). A Phase 2 Study of the AKT Kinase Inhibitor MK-2206 in Patients With Relapsed Refractory Acute Myelogenous Leukemia [Internet]. clinicaltrials.gov; 2018 lip [cytowane 23 maj 2025]. Report No.: NCT01253447. Dostępne na: <https://clinicaltrials.gov/study/NCT01253447>
142. National Cancer Institute (NCI). Phase I&II Study of the Combination of Bendamustine, Rituximab and MK-2206 in the Treatment of Relapsed Chronic Lymphocytic Leukemia and Small Lymphocytic Lymphoma [Internet]. clinicaltrials.gov; 2017 sie [cytowane 23 maj 2025]. Report No.: NCT01369849. Dostępne na: <https://clinicaltrials.gov/study/NCT01369849>
143. National Cancer Institute (NCI). MATCH Treatment Subprotocol Z1K: Ipatasertib in Patients With Tumors With AKT Mutations [Internet]. clinicaltrials.gov; 2024 lis [cytowane 15 grudzień 2024]. Report No.: NCT06400251. Dostępne na: <https://clinicaltrials.gov/study/NCT06400251>
144. Valla K, Flowers CR, Koff JL. Targeting the B cell receptor pathway in non-Hodgkin lymphoma. Expert Opin Investig Drugs. czerwiec 2018;27(6):513–22.

145. Mócsai A, Ruland J, Tybulewicz VLJ. The SYK tyrosine kinase: a crucial player in diverse biological functions. *Nat Rev Immunol*. czerwiec 2010;10(6):387–402.
146. Fayard E, Xue G, Parcellier A, Bozulic L, Hemmings BA. Protein kinase B (PKB/Akt), a key mediator of the PI3K signaling pathway. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2010;346:31–56.
147. Lindvall J, Islam TC. Interaction of Btk and Akt in B cell signaling. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 24 maj 2002;293(5):1319–26.
148. Tauzin S, Ding H, Khatib K, Ahmad I, Burdevet D, van Echten-Deckert G, i in. Oncogenic association of the Cbp/PAG adaptor protein with the Lyn tyrosine kinase in human B-NHL rafts. *Blood*. 15 luty 2008;111(4):2310–20.
149. Nguyen PH, Fedorchenko O, Rosen N, Koch M, Barthel R, Winarski T, i in. LYN Kinase in the Tumor Microenvironment Is Essential for the Progression of Chronic Lymphocytic Leukemia. *Cancer Cell*. 10 październik 2016;30(4):610–22.
150. Vom Stein AF, Rebolledo-Rios R, Lukas A, Koch M, von Lom A, Reinartz S, i in. LYN kinase programs stromal fibroblasts to facilitate leukemic survival via regulation of c-JUN and THBS1. *Nat Commun*. 10 marzec 2023;14(1):1330.
151. Harr M, Caimi P, McColl K, Zhong F, Patel S, Barr P, i in. Inhibition of Lck enhances glucocorticoid sensitivity and apoptosis in lymphoid cell lines and in chronic lymphocytic leukemia. *Cell Death Differ*. wrzesień 2010;17(9):1381–91.
152. Talab F, Allen JC, Thompson V, Lin K, Slupsky JR. LCK is an important mediator of B-cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia cells. *Mol Cancer Res*. maj 2013;11(5):541–54.
153. Chen R, Tsai J, Thompson PA, Chen Y, Xiong P, Liu C, i in. The multi-kinase inhibitor TG02 induces apoptosis and blocks B-cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia through dual mechanisms of action. *Blood Cancer J*. 13 marzec 2021;11(3):57.
154. Chen L, Monti S, Juszczynski P, Ouyang J, Chapuy B, Neuberg D, i in. SYK Inhibition Modulates Distinct PI3K/AKT-dependent Survival Pathways and Cholesterol Biosynthesis in Diffuse Large B-cell Lymphomas. *Cancer cell*. 6 czerwiec 2013;23(6):826.
155. Suljagic M, Longo PG, Bennardo S, Perlas E, Leone G, Laurenti L, i in. The Syk inhibitor fostamatinib disodium (R788) inhibits tumor growth in the Eμ- TCL1 transgenic mouse model of CLL by blocking antigen-dependent B-cell receptor signaling. *Blood*. 2 grudzień 2010;116(23):4894–905.
156. Liu D, Mamorska-Dyga A. Syk inhibitors in clinical development for hematological malignancies. *J Hematol Oncol*. 28 lipiec 2017;10:145.
157. Clinical phase 2 study of idelalisib and entospletinib | thasso [Internet]. [cytowane 27 wrzesień 2022]. Dostępne na: <https://thasso.com/clinical-phase-2-study-of-idelalisib-and-entospletinib-pneumonitis-limits-combination-therapy-in-relapsed-refractory-cll-and-nhl/>
158. Rossi FM, Del Principe MI, Rossi D, Irno Consalvo M, Luciano F, Zucchetto A, i in. Prognostic impact of ZAP-70 expression in chronic lymphocytic leukemia: mean

- fluorescence intensity T/B ratio versus percentage of positive cells. *Journal of Translational Medicine*. 8 marzec 2010;8(1):23.
159. Schroers R, Griesinger F, Trümper L, Haase D, Kulle B, Klein-Hitpass L, i in. Combined analysis of ZAP-70 and CD38 expression as a predictor of disease progression in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*. maj 2005;19(5):750–8.
 160. Leveille E, Chan LN, Mirza AS, Kume K, Müschen M. SYK and ZAP70 kinases in autoimmunity and lymphoid malignancies. *Cellular Signalling*. 1 czerwiec 2022;94:110331.
 161. Chen L, Huynh L, Apgar J, Tang L, Rassenti L, Weiss A, i in. ZAP-70 enhances IgM signaling independent of its kinase activity in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 1 marzec 2008;111(5):2685–92.
 162. Rao D, Li H, Ren X, Sun Y, Wen C, Zheng M, i in. Discovery of a potent, selective, and covalent ZAP-70 kinase inhibitor. *Eur J Med Chem*. 5 lipiec 2021;219:113393.
 163. Pal Singh S, Dammeijer F, Hendriks RW. Role of Bruton's tyrosine kinase in B cells and malignancies. *Mol Cancer*. grudzień 2018;17(1):1–23.
 164. Anderson JS, Teutsch M, Dong Z, Wortis HH. An essential role for Bruton's [corrected] tyrosine kinase in the regulation of B-cell apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1 październik 1996;93(20):10966–71.
 165. Alu A, Lei H, Han X, Wei Y, Wei X. BTK inhibitors in the treatment of hematological malignancies and inflammatory diseases: mechanisms and clinical studies. *J Hematol Oncol*. 1 październik 2022;15:138.
 166. Ibrutinib approved for mantle cell lymphoma. *Cancer Discov*. styczeń 2014;4(1):OF1.
 167. Hamblin TJ, Davis Z, Gardiner A, Oscier DG, Stevenson FK. Unmutated Ig V(H) genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 15 wrzesień 1999;94(6):1848–54.
 168. Zimmerman SM, Peer CJ, Figg WD. Ibrutinib's off-target mechanism: cause for dose optimization. *Cancer Biol Ther*. 2 grudzień 2021;22(10–12):529–31.
 169. Lew TE, Anderson MA, Seymour JF. Promises and pitfalls of targeted agents in chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Drug Resist*. 23 maj 2020;3(3):415–44.
 170. Byrd JC, Hillmen P, Ghia P, Kater AP, Chanan-Khan A, Furman RR, i in. Acalabrutinib Versus Ibrutinib in Previously Treated Chronic Lymphocytic Leukemia: Results of the First Randomized Phase III Trial. *J Clin Oncol*. 1 listopad 2021;39(31):3441–52.
 171. Ja W, Rr F, Tm L, Hg O, M Z, As R, i in. Resistance mechanisms for the Bruton's tyrosine kinase inhibitor ibrutinib. *The New England journal of medicine [Internet]*. 6 grudzień 2014 [cytowane 4 listopad 2022];370(24). Dostępne na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24869598/>

172. Strati P, Schlette EJ, Solis Soto LM, Duenas DE, Sivina M, Kim E, i in. Achieving complete remission in CLL patients treated with ibrutinib: clinical significance and predictive factors. *Blood*. 13 luty 2020;135(7):510–3.
173. Fraser G, Cramer P, Demirkan F, Silva RS, Grosicki S, Pristupa A, i in. Updated results from the phase 3 HELIOS study of ibrutinib, bendamustine, and rituximab in relapsed chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma. *Leukemia*. kwiecień 2019;33(4):969–80.
174. Millis SZ, Ikeda S, Reddy S, Gatalica Z, Kurzrock R. Landscape of Phosphatidylinositol-3-Kinase Pathway Alterations Across 19 784 Diverse Solid Tumors. *JAMA Oncol*. 1 grudzień 2016;2(12):1565–73.
175. Westin JR. Status of PI3K/Akt/mTOR Pathway Inhibitors in Lymphoma. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*. październik 2014;14(5):335–42.
176. Abubaker JA, Bavi PP, Al-Harbi S, Atizado VL, Al-Dayel F, Ezzat A, i in. Frequent Mutation of the PIK3CA Gene in Saudi Arabian Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *Blood*. 16 listopad 2006;108(11):4308.
177. Tarantelli C, Lupia A, Stathis A, Berton F. Is There a Role for Dual PI3K/mTOR Inhibitors for Patients Affected with Lymphoma? *International Journal of Molecular Sciences* [Internet]. luty 2020 [cytowane 1 grudzień 2022];21(3). Dostępne na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7037719/>
178. Wang J, Xu-Monette ZY, Jabbar KJ, Shen Q, Manyam GC, Tzankov A, i in. AKT Hyperactivation and the Potential of AKT-Targeted Therapy in Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *Am J Pathol*. sierpień 2017;187(8):1700–16.
179. Yahiaoui OI, Nunès JA, Castanier C, Devillier R, Broussais F, Fabre AJ, i in. Constitutive AKT activation in follicular lymphoma. *BMC Cancer*. 5 sierpień 2014;14(1):565.
180. Pfeifer M, Grau M, Lenze D, Wenzel SS, Wolf A, Wollert-Wulf B, i in. PTEN loss defines a PI3K/AKT pathway-dependent germinal center subtype of diffuse large B-cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 23 lipiec 2013;110(30):12420–5.
181. Cai Q, Deng H, Xie D, Lin T, Lin T. Phosphorylated AKT protein is overexpressed in human peripheral T-cell lymphomas and predicts decreased patient survival. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*. kwiecień 2012;12(2):106–12.
182. Georgakis GV, Li Y, Rassidakis GZ, Medeiros LJ, Mills GB, Younes A. Inhibition of the phosphatidylinositol-3 kinase/Akt promotes G1 cell cycle arrest and apoptosis in Hodgkin lymphoma. *Br J Haematol*. luty 2006;132(4):503–11.
183. Kohlhaas V, Blakemore SJ, Al-Maarri M, Nickel N, Pal M, Roth A, i in. Active Akt signaling triggers CLL toward Richter transformation via overactivation of Notch1. *Blood*. 4 luty 2021;137(5):646–60.
184. Qiao Q, Jiang Y, Li G. Inhibition of the PI3K/AKT-NF-κB pathway with curcumin enhanced radiation-induced apoptosis in human Burkitt's lymphoma. *J Pharmacol Sci*. 2013;121(4):247–56.

185. Will M, Qin ACR, Toy W, Yao Z, Rodrik-Outmezguine V, Schneider C, i in. Rapid induction of apoptosis by PI3K inhibitors is dependent upon their transient inhibition of RAS-ERK signaling. *Cancer Discov.* marzec 2014;4(3):334–47.
186. Hewett YG, Uprety D, Shah BK. Idelalisib- a PI3K δ targeting agent for B-cell malignancies. *J Oncol Pharm Pract.* kwiecień 2016;22(2):284–8.
187. Paul J, Soujon M, Wengner AM, Zitzmann-Kolbe S, Sturz A, Haike K, i in. Simultaneous Inhibition of PI3K δ and PI3K α Induces ABC-DLBCL Regression by Blocking BCR-Dependent and -Independent Activation of NF- κ B and AKT. *Cancer Cell.* 9 styczeń 2017;31(1):64–78.
188. Zinzani PL, Wang H, Feng J, Kim TM, Tao R, Zhang H, i in. CHRONOS-4: phase 3 study of copanlisib plus rituximab-based immunochemotherapy in relapsed indolent B-cell lymphoma. *Blood Adv.* 24 wrzesień 2024;8(18):4866–76.
189. Research C for DE and. FDA grants accelerated approval to umbralisib for marginal zone lymphoma and follicular lymphoma. FDA [Internet]. 6 listopad 2021 [cytowane 29 listopad 2022]; Dostępne na: <https://www.fda.gov/drugs/resources-information-approved-drugs/fda-grants-accelerated-approval-umbralisib-marginal-zone-lymphoma-and-follicular-lymphoma>
190. Wang J, Zhou H, Mu M, Zhao A, Cai Z, Li L, i in. Efficacy and safety of copanlisib in relapsed/refractory B-cell non-Hodgkin lymphoma: A meta-analysis of prospective clinical trials. *Front Immunol.* 11 listopad 2022;13:1034253.
191. The phase 3 DUO trial: duvelisib vs ofatumumab in relapsed and refractory CLL/SLL - PubMed [Internet]. [cytowane 29 listopad 2022]. Dostępne na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30287523/>
192. Commissioner O of the. Copiktra (duvelisib): Drug Safety Communication - FDA Warns about Possible Increased Risk of Death and Serious Side Effects. FDA [Internet]. 8 wrzesień 2024 [cytowane 14 grudzień 2024]; Dostępne na: <https://www.fda.gov/safety/medical-product-safety-information/copiktra-duvelisib-drug-safety-communication-fda-warns-about-possible-increased-risk-death-and>
193. Lunning M, Vose J, Nastoupil L, Fowler N, Burger JA, Wierda WG, i in. Ublituximab and umbralisib in relapsed/refractory B-cell non-Hodgkin lymphoma and chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 21 listopad 2019;134(21):1811–20.
194. Roeker LE, Feldman TA, Soumerai JD, Falco V, Panton G, Dorsey C, i in. Adding Umbralisib and Ublituximab (U2) to Ibrutinib in Patients with CLL: A Phase II Study of an MRD-Driven Approach. *Clin Cancer Res.* 15 wrzesień 2022;28(18):3958–64.
195. Ahn IE, Zhou Y, Tyekucheva S, Cormier H, Fernandes SM, Montegaard J, i in. A Phase 2 Study of Acalabrutinib, Umbralisib, and Ublituximab (AU2) in Treatment-Naïve and Relapsed or Refractory Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL). *Blood.* 2 listopad 2023;142(Supplement 1):1914.
196. Guidetti A, Carlo-Stella C, Locatelli SL, Malorni W, Pierdominici M, Barbati C, i in. Phase II study of sorafenib in patients with relapsed or refractory lymphoma. *Br J Haematol.* lipiec 2012;158(1):108–19.

197. Buglio D, Lemoine M, Estrella J, Neelapu SS, Davis RE, Doyle L, i in. The Allosteric AKT Inhibitor MK-2206 Demonstrates Potent Antiproliferative Activity in Lymphoma Cells and Synergizes with the HDAC Inhibitor Vorinostat,. *Blood*. 18 listopad 2011;118(21):3729.
198. Lin J, Sampath D, Nannini MA, Lee BB, Degtyarev M, Oeh J, i in. Targeting activated Akt with GDC-0068, a novel selective Akt inhibitor that is efficacious in multiple tumor models. *Clin Cancer Res*. 1 kwiecień 2013;19(7):1760–72.
199. Research C for DE and. FDA approves capivasertib with fulvestrant for breast cancer. FDA [Internet]. 8 wrzesień 2024 [cytowane 15 grudzień 2024]; Dostępne na: <https://www.fda.gov/drugs/resources-information-approved-drugs/fda-approves-capivasertib-fulvestrant-breast-cancer>
200. AstraZeneca. A Modular Phase II, Open-Label, Multicentre Study to Assess the Efficacy and Safety of Capivasertib in Patients With Relapsed or Refractory B-cell Non-Hodgkin Lymphoma (CAPITAL) [Internet]. *clinicaltrials.gov*; 2024 sie [cytowane 15 grudzień 2024]. Report No.: NCT05008055. Dostępne na: <https://clinicaltrials.gov/study/NCT05008055>
201. Kupcova K, Senavova J, Jura F, Herman V, Rajmonova A, Pacheco-Blanco M, i in. Vertical targeting of the PI3K/AKT pathway at multiple points is synergistic and effective for non-Hodgkin lymphoma. *Experimental Hematology & Oncology*. 1 listopad 2024;13(1):108.
202. Fuchs D, Heinold A, Opelz G, Daniel V, Naujokat C. Salinomycin induces apoptosis and overcomes apoptosis resistance in human cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 18 grudzień 2009;390(3):743–9.
203. Arafat K, Iratni R, Takahashi T, Parekh K, Dhaheri YA, Adrian TE, i in. Inhibitory Effects of Salinomycin on Cell Survival, Colony Growth, Migration, and Invasion of Human Non-Small Cell Lung Cancer A549 and LNM35: Involvement of NAG-1. *PLOS ONE*. 21 czerwiec 2013;8(6):e66931.
204. Antoszczak M, Urbaniak A, Delgado M, Maj E, Borgström B, Wietrzyk J, i in. Biological activity of doubly modified salinomycin analogs - Evaluation in vitro and ex vivo. *Eur J Med Chem*. 5 sierpień 2018;156:510–23.
205. Lu W, Li Y. Salinomycin suppresses LRP6 expression and inhibits both Wnt/ β -catenin and mTORC1 signaling in breast and prostate cancer cells. *J Cell Biochem*. październik 2014;115(10):1799–807.
206. Mitani M, Yamanishi T, Miyazaki Y, Otake N. Salinomycin effects on mitochondrial ion translocation and respiration. *Antimicrob Agents Chemother*. kwiecień 1976;9(4):655–60.
207. Koo KH, Kim H, Bae YK, Kim K, Park BK, Lee CH, i in. Salinomycin induces cell death via inactivation of Stat3 and downregulation of Skp2. *Cell Death Dis*. czerwiec 2013;4(6):e693.

208. Klose J, Stankov MV, Kleine M, Ramackers W, Panayotova-Dimitrova D, Jäger MD, i in. Inhibition of Autophagic Flux by Salinomycin Results in Anti-Cancer Effect in Hepatocellular Carcinoma Cells. PLOS ONE. 9 maj 2014;9(5):e95970.
209. Basu SM, Yadava SK, Singh R, Giri J. Lipid nanocapsules co-encapsulating paclitaxel and salinomycin for eradicating breast cancer and cancer stem cells. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. 1 sierpień 2021;204:111775.
210. Kim JH, Choi AR, Kim YK, Kim HS, Yoon S. Low amount of salinomycin greatly increases Akt activation, but reduces activated p70S6K levels. Int J Mol Sci. 22 sierpień 2013;14(9):17304–18.
211. Parajuli B, Lee HG, Kwon SH, Cha SD, Shin SJ, Lee GH, i in. Salinomycin inhibits Akt/NF-κB and induces apoptosis in cisplatin resistant ovarian cancer cells. Cancer Epidemiol. sierpień 2013;37(4):512–7.
212. A case of human poisoning by salinomycin, an agricultural antibiotic - PubMed [Internet]. [cytowane 18 grudzień 2024]. Dostępne na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15107902/>
213. [PDF] Monensin-mediated growth inhibition in human lymphoma cells through cell cycle arrest and apoptosis by Woo Hyun Park, Jae Goo Seol, Eun Shil Kim, Won Ki Kang, Young Hyuck Im, Chul Won Jung, Byoung Kook Kim, Young Yiul Lee · 10.1046/j.1365-2141.2002.03834.x · OA.mg. [cytowane 16 grudzień 2024]; Dostępne na: <https://oa.mg/work/10.1046/j.1365-2141.2002.03834.x>
214. Okamoto M, Hara I, Miyake H, Hara S, Gotoh A, Arakawa S, i in. Synergistic antitumor effect of ionomycin and cisplatin against renal cell carcinoma in vitro and in vivo. Urology. styczeń 2001;57(1):188–92.
215. Kim KY, Kim SH, Yu SN, Park SG, Kim YW, Nam HW, i in. Lasalocid induces cytotoxic apoptosis and cytoprotective autophagy through reactive oxygen species in human prostate cancer PC-3 cells. Biomed Pharmacother. kwiecień 2017;88:1016–24.
216. Umeyama H, Shigemi Z, Baba Y, Hara N, Watanabe T, Fujimuro M. Nigericin Induces Apoptosis in Primary Effusion Lymphoma Cells by Mitochondrial Membrane Hyperpolarization and β-Catenin Destabilization. Anticancer Res. czerwiec 2023;43(6):2455–65.
217. Miljković MD, Tuia J, Olivier T, Haslam A, Prasad V. Cancer Drug Price and Novelty in Mechanism of Action. JAMA Network Open. 11 grudzień 2023;6(12):e2347006.
218. Yurkiewicz IR, Muffly L, Liedtke M. Inotuzumab ozogamicin: a CD22 mAb-drug conjugate for adult relapsed or refractory B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. Drug Des Devel Ther. 2018;12:2293–300.
219. Dennig D, Lacerda J, Yan Y, Gasparetto C, O'Reilly RJ. ICAM-1 (CD54) expression on B lymphocytes is associated with their costimulatory function and can be increased by coactivation with IL-1 and IL-7. Cell Immunol. lipiec 1994;156(2):414–23.

220. Zhao L, Xie F, Tong X, Li H, Chen Y, Qian W, i in. Combating non-Hodgkin lymphoma by targeting both CD20 and HLA-DR through CD20-243 CrossMab. *MAbs*. 2014;6(3):740–8.
221. Trinh DL, Scott DW, Morin RD, Mendez-Lago M, An J, Jones SJM, i in. Analysis of FOXO1 mutations in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood*. 2 maj 2013;121(18):3666–74.
222. Tzivion G, Dobson M, Ramakrishnan G. FoxO transcription factors; Regulation by AKT and 14-3-3 proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. 1 listopad 2011;1813(11):1938–45.
223. Inhibitors of SRC kinases impair antitumor activity of anti-CD20 monoclonal antibodies - PubMed [Internet]. [cytowane 22 październik 2024]. Dostępne na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25517315/>
224. Versini A, Colombeau L, Hienzs A, Gaillet C, Retailleau P, Debieu S, i in. Salinomycin Derivatives Kill Breast Cancer Stem Cells by Lysosomal Iron Targeting. *Chemistry*. 10 czerwiec 2020;26(33):7416–24.
225. Riccioni R, Dupuis ML, Bernabei M, Petrucci E, Pasquini L, Mariani G, i in. The cancer stem cell selective inhibitor salinomycin is a p-glycoprotein inhibitor. *Blood Cells Mol Dis*. 15 czerwiec 2010;45(1):86–92.
226. Woeller CF, O'Loughlin CW, Roztocil E, Feldon SE, Phipps RP. Salinomycin and other polyether ionophores are a new class of antiscarring agent. *J Biol Chem*. 6 luty 2015;290(6):3563–75.
227. Kawabata KC, Ehata S, Komuro A, Takeuchi K, Miyazono K. TGF- β -induced apoptosis of B-cell lymphoma Ramos cells through reduction of MS4A1/CD20. *Oncogene*. 18 kwiecień 2013;32(16):2096–106.
228. The regulation and function of CD20: an “enigma” of B-cell biology and targeted therapy | Haematologica [Internet]. [cytowane 26 październik 2021]. Dostępne na: <https://www.haematologica.org/article/view/9425>
229. Hayashi K, Nagasaki E, Kan S, Ito M, Kamata Y, Homma S, i in. Gemcitabine enhances rituximab-mediated complement-dependent cytotoxicity to B cell lymphoma by CD20 upregulation. *Cancer Sci*. maj 2016;107(5):682–9.
230. Du Q, Geller DA. Cross-Regulation Between Wnt and NF- κ B Signaling Pathways. *For Immunopathol Dis Therap*. 2010;1(3):155–81.
231. Lu D, Choi MY, Yu J, Castro JE, Kipps TJ, Carson DA. Salinomycin inhibits Wnt signaling and selectively induces apoptosis in chronic lymphocytic leukemia cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 9 sierpień 2011;108(32):13253–7.
232. Wang Z, Feng T, Zhou L, Jiang D, Zhang Y, He G, i in. Salinomycin nanocrystals for colorectal cancer treatment through inhibition of Wnt/ β -catenin signaling. *Nanoscale*. 8 październik 2020;12(38):19931–8.

233. Pyrzynska B, Dwojak M, Zerrouqi A, Morlino G, Zapala P, Miazek N, i in. FOXO1 promotes resistance of non-Hodgkin lymphomas to anti-CD20-based therapy. *Oncoimmunology*. 2018;7(5):e1423183.
234. Kerdiles YM, Beisner DR, Tinoco R, Dejean AS, Castrillon DH, DePinho RA, i in. Foxo1 links homing and survival of naive T cells by regulating L-selectin, CCR7 and interleukin 7 receptor. *Nature immunology*. 11 styczeń 2009;10(2):176.
235. Du YN, Tang XF, Xu L, Chen WD, Gao PJ, Han WQ. SGK1-FoxO1 Signaling Pathway Mediates Th17/Treg Imbalance and Target Organ Inflammation in Angiotensin II-Induced Hypertension. *Front Physiol*. 2018;9:1581.
236. (PDF) Serum- and glucocorticoid-induced kinase drives hepatic insulin resistance by directly inhibiting AMP-activated protein kinase. ResearchGate [Internet]. 9 grudzień 2024 [cytowane 9 kwiecień 2025]; Dostępne na: https://www.researchgate.net/publication/355097815_Serum-_and_glucocorticoid-induced_kinase_drives_hepatic_insulin_resistance_by_directly_inhibiting_AMP-activated_protein_kinase
237. Torun A, Zdanowicz A, Miazek-Zapala N, Zapala P, Pradhan B, Jedrzejczyk M, i in. Potassium/sodium cation carriers robustly up-regulate CD20 antigen by targeting MYC, and synergize with anti-CD20 immunotherapies to eliminate malignant B cells. *Haematologica*. 19 grudzień 2024;
238. Grillo-López AJ, White CA, Dallaire BK, Varns CL, Shen CD, Wei A, i in. Rituximab: the first monoclonal antibody approved for the treatment of lymphoma. *Curr Pharm Biotechnol*. lipiec 2000;1(1):1–9.
239. Hernandez-Ilizaliturri FJ, Czuczman MS. Understanding the Mechanisms of Resistance to Rituximab: Paving the Road for the Development of Therapeutic Strategies to Overcome Rituximab-Resistance. W: Bonavida B, redaktor. *Resistance to Immunotherapeutic Antibodies in Cancer: Strategies to Overcome Resistance* [Internet]. New York, NY: Springer; 2013 [cytowane 27 sierpień 2024]. s. 73–92. Dostępne na: https://doi.org/10.1007/978-1-4614-7654-2_4
240. Frys S, Skomra A, Czuczman NM, Mavis C, Rolland DCM, Lim M, i in. The Acquirement Of Rituximab Resistance Is Associated With De-Regulation Of The PI3K/Akt/mTOR Signaling Pathway Leading To Chemotherapy Resistance In Burkitt Lymphoma Pre-Clinical Models. *Blood*. 15 listopad 2013;122(21):5144.
241. Szydłowski M, Jabłońska E, Juszczynski P. PI3K-AKT axis in normal lymphoid development and B-cell tumors. Part I. *Hematology in Clinical Practice*. 2013;4(2):103–13.
242. Szydłowski M, Kiliszek P, Sewastianik T, Jablonska E, Bialopiotrowicz E, Gorniak P, i in. FOXO1 activation is an effector of SYK and AKT inhibition in tonic BCR signal-dependent diffuse large B-cell lymphomas. *Blood*. 11 luty 2016;127(6):739–48.
243. Ramanathan S, Di Paolo JA, Jin F, Shao L, Sharma S, Robeson M, i in. Pharmacokinetics, Pharmacodynamics, and Safety of Entospletinib, a Novel pSYK Inhibitor, Following Single and Multiple Oral Dosing in Healthy Volunteers. *Clin Drug Investig*. luty 2017;37(2):195–205.

244. Paydas S. Management of adverse effects/toxicity of ibrutinib. *Crit Rev Oncol Hematol*. kwiecień 2019;136:56–63.
245. Cheah CY, Nastoupil LJ, Neelapu SS, Forbes SG, Oki Y, Fowler NH. Lenalidomide, idelalisib, and rituximab are unacceptably toxic in patients with relapsed/refractory indolent lymphoma. *Blood*. 21 maj 2015;125(21):3357–9.
246. Barr PM, Saylor GB, Spurgeon SE, Cheson BD, Greenwald DR, O'Brien SM, i in. Phase 2 study of idelalisib and entospletinib: pneumonitis limits combination therapy in relapsed refractory CLL and NHL. *Blood*. 19 maj 2016;127(20):2411–5.
247. Furman RR, Sharman JP, Coutre SE, Cheson BD, Pagel JM, Hillmen P, i in. Idelalisib and rituximab in relapsed chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 13 marzec 2014;370(11):997–1007.
248. Sharman JP, Coutre SE, Furman RR, Cheson BD, Pagel JM, Hillmen P, i in. Final Results of a Randomized, Phase III Study of Rituximab With or Without Idelalisib Followed by Open-Label Idelalisib in Patients With Relapsed Chronic Lymphocytic Leukemia. *J Clin Oncol*. 1 czerwiec 2019;37(16):1391–402.
249. Jones JA, Robak T, Brown JR, Awan FT, Badoux X, Coutre S, i in. Efficacy and safety of idelalisib in combination with ofatumumab for previously treated chronic lymphocytic leukaemia: an open-label, randomised phase 3 trial. *Lancet Haematol*. marzec 2017;4(3):e114–26.
250. Hoellenriegel J, Meadows SA, Sivina M, Wierda WG, Kantarjian H, Keating MJ, i in. The phosphoinositide 3'-kinase delta inhibitor, CAL-101, inhibits B-cell receptor signaling and chemokine networks in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 29 wrzesień 2011;118(13):3603–12.
251. Drugs.com [Internet]. [cytowane 28 sierpień 2024]. FDA Approves Zydelig (idelalisib) for CLL and Lymphoma. Dostępne na: <https://www.drugs.com/newdrugs/fda-approves-zydelig-idelalisib-ctl-lymphoma-4056.html>
252. Coutre SE, Barrientos JC, Brown JR, de Vos S, Furman RR, Keating MJ, i in. Management of adverse events associated with idelalisib treatment: expert panel opinion. *Leuk Lymphoma*. 2015;56(10):2779–86.
253. Cheah CY, Fowler NH. Idelalisib in the management of lymphoma. *Blood*. 21 lipiec 2016;128(3):331–6.
254. Research C for DE and. FDA Alerts Healthcare Professionals About Clinical Trials with Zydelig (idelalisib) in Combination with other Cancer Medicines. FDA [Internet]. 11 marzec 2018 [cytowane 28 sierpień 2024]; Dostępne na: <https://www.fda.gov/drugs/drug-safety-and-availability/fda-alerts-healthcare-professionals-about-clinical-trials-zydelig-idelalisib-combination-other>
255. Hus I, Giannopoulos K, Jamroziak K, Wołowicz D, Roliński J, Robak T. Rekomendacje diagnostyczne i terapeutyczne dla przewlekłej białaczki limfocytowej w 2023 roku — Raport Grupy Roboczej Polskiego Towarzystwa Hematologów i Transfuzjologów oraz PALG-CLL. *Hematologia - Edukacja*. 2023;3(3–4):75–103.

256. McMullen JR, Boey EJH, Ooi JYY, Seymour JF, Keating MJ, Tam CS. Ibrutinib increases the risk of atrial fibrillation, potentially through inhibition of cardiac PI3K-Akt signaling. *Blood*. 11 grudzień 2014;124(25):3829–30.
257. Epitope interactions of monoclonal antibodies targeting CD20 and their relationship to functional properties - PubMed [Internet]. [cytowane 28 sierpień 2024]. Dostępne na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23211638/>
258. Ghoreschi K, Laurence A, O'Shea JJ. Selectivity and therapeutic inhibition of kinases: to be or not to be? *Nat Immunol*. kwiecień 2009;10(4):356–60.
259. Geis N, Zell S, Rutz R, Li W, Giese T, Mamidi S, i in. Inhibition of membrane complement inhibitor expression (CD46, CD55, CD59) by siRNA sensitizes tumor cells to complement attack in vitro. *Curr Cancer Drug Targets*. grudzień 2010;10(8):922–31.
260. Fry TJ, Shah NN, Orentas RJ, Stetler-Stevenson M, Yuan CM, Ramakrishna S, i in. CD22-targeted CAR T cells induce remission in B-ALL that is naive or resistant to CD19-targeted CAR immunotherapy. *Nat Med*. styczeń 2018;24(1):20–8.
261. Hu Y, Zhou Y, Zhang M, Ge W, Li Y, Yang L, i in. CRISPR/Cas9-Engineered Universal CD19/CD22 Dual-Targeted CAR-T Cell Therapy for Relapsed/Refractory B-cell Acute Lymphoblastic Leukemia. *Clin Cancer Res*. 15 maj 2021;27(10):2764–72.
262. Cornall RJ, Cheng AM, Pawson T, Goodnow CC. Role of Syk in B-cell development and antigen-receptor signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 15 luty 2000;97(4):1713–8.
263. Manukyan G, Turcsanyi P, Mikulkova Z, Gabcova G, Urbanova R, Gajdos P, i in. Dynamic changes in HLA-DR expression during short-term and long-term ibrutinib treatment in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Res*. wrzesień 2018;72:113–9.
264. Monocyte human leukocyte antigen-DR expression-a tool to distinguish intestinal bacterial infections from inflammatory bowel disease? - PubMed [Internet]. [cytowane 29 sierpień 2024]. Dostępne na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23860582/>
265. Zeng J, Chen Y, Zhang T, Wang J, Yang Y, Fang Y. Effect of a CrossMab cotargeting CD20 and HLA-DR in non-Hodgkin lymphoma. *Oncologie*. 1 wrzesień 2023;25(5):553–64.
266. Zeng J, Liu R, Wang J, Fang Y. A bispecific antibody directly induces lymphoma cell death by simultaneously targeting CD20 and HLA-DR. *J Cancer Res Clin Oncol*. listopad 2015;141(11):1899–907.
267. Ohashi T, Miyashita H, Nagata Y, Tatebe S, Otsuka H, Suzuki H, i in. A Novel Anti-IgM/HLA-DR Bispecific Antibody for Treatment of Refractory B Cell Malignancies. *Blood*. 29 listopad 2018;132:1670.
268. Bojarczuk K, Siernicka M, Dwojak M, Bobrowicz M, Pyrzynska B, Gaj P, i in. B-cell receptor pathway inhibitors affect CD20 levels and impair antitumor activity of anti-CD20 monoclonal antibodies. *Leukemia*. maj 2014;28(5):1163–7.

269. Burger JA, Keating MJ, Wierda WG, Hartmann E, Hoellenriegel J, Rosin NY, i in. Ibrutinib plus rituximab for patients with high-risk chronic lymphocytic leukaemia: a single-arm, phase 2 study. *Lancet Oncol.* wrzesień 2014;15(10):1090–9.
270. Gupta PB, Onder TT, Jiang G, Tao K, Kuperwasser C, Weinberg RA, i in. Identification of selective inhibitors of cancer stem cells by high-throughput screening. *Cell.* 21 sierpień 2009;138(4):645–59.
271. Talkowski K, Kiełbasiński K, Peszek W, Grabarek BO, Boroń D, Oplawski M. Salinomycin Modulates the Expression of mRNAs and miRNAs Related to Stemness in Endometrial Cancer. *Curr Pharm Biotechnol.* 2021;22(2):317–26.
272. Kim WK, Kim JH, Yoon K, Kim S, Ro J, Kang HS, i in. Salinomycin, a p-glycoprotein inhibitor, sensitizes radiation-treated cancer cells by increasing DNA damage and inducing G2 arrest. *Invest New Drugs.* sierpień 2012;30(4):1311–8.
273. Ashrafihelan J, Eisapour H, Erfani AM, Kalantary AA, Amoli JS, Mozafari M. High mortality due to accidental salinomycin intoxication in sheep. *Interdiscip Toxicol.* wrzesień 2014;7(3):173–6.
274. Czerwonka D, Podsiad M, Stefańska J, Antoszczak M, Huczyński A. Activity of singly and doubly modified derivatives of C20-epi-salinomycin against *Staphylococcus* strains. *J Antibiot.* sierpień 2022;75(8):445–53.
275. Antoszczak M. A comprehensive review of salinomycin derivatives as potent anticancer and anti-CSCs agents. *European Journal of Medicinal Chemistry.* 15 marzec 2019;166:48–64.
276. Dominguez-Sola D, Kung J, Holmes AB, Wells VA, Mo T, Basso K, i in. The FOXO1 Transcription Factor Instructs the Germinal Center Dark Zone Program. *Immunity.* 15 grudzień 2015;43(6):1064–74.
277. Szydłowski M, Garbicz F, Jabłońska E, Górniak P, Komar D, Pyrżyńska B, i in. Inhibition of PIM Kinases in DLBCL Targets MYC Transcriptional Program and Augments the Efficacy of Anti-CD20 Antibodies. *Cancer Res.* 1 grudzień 2021;81(23):6029–43.
278. Szydłowski M, Garbicz F, Jabłońska E, Górniak P, Komar D, Pyrżyńska B, i in. Inhibition of PIM Kinases in DLBCL Targets MYC Transcriptional Program and Augments the Efficacy of Anti-CD20 Antibodies. *Cancer Res.* 1 grudzień 2021;81(23):6029–43.
279. Kim JW, Mori S, Nevins JR. Myc-induced microRNAs integrate Myc-mediated cell proliferation and cell fate. *Cancer Res.* 15 czerwiec 2010;70(12):4820–8.
280. Warzocha K. 2.13. Chłoniaki rozlane z dużych komórek B. *Onkologia w Praktyce Klinicznej - Edukacja.* 2020;6(A):411–38.
281. Henao-Mejia J, Williams A, Goff LA, Staron M, Licona-Limón P, Kaech SM, i in. The microRNA miR-181 is a critical cellular metabolic rheostat essential for NKT cell ontogenesis and lymphocyte development and homeostasis. *Immunity.* 23 maj 2013;38(5):984–97.

282. Zhu DX, Zhu W, Fang C, Fan L, Zou ZJ, Wang YH, i in. miR-181a/b significantly enhances drug sensitivity in chronic lymphocytic leukemia cells via targeting multiple anti-apoptosis genes. *Carcinogenesis*. 1 lipiec 2012;33(7):1294–301.
283. van Meerten T, van Rijn RS, Hol S, Hagenbeek A, Ebeling SB. Complement-induced cell death by rituximab depends on CD20 expression level and acts complementary to antibody-dependent cellular cytotoxicity. *Clin Cancer Res*. 1 lipiec 2006;12(13):4027–35.
284. Hamaguchi Y, Xiu Y, Komura K, Nimmerjahn F, Tedder TF. Antibody isotype-specific engagement of Fc γ receptors regulates B lymphocyte depletion during CD20 immunotherapy. *The Journal of Experimental Medicine*. 20 marzec 2006;203(3):743.
285. Rudelius M, Pittaluga S, Nishizuka S, Pham THT, Fend F, Jaffe ES, i in. Constitutive activation of Akt contributes to the pathogenesis and survival of mantle cell lymphoma. *Blood*. 1 wrzesień 2006;108(5):1668–76.
286. Sykes SM, Lane SW, Bullinger L, Kalaitzidis D, Yusuf R, Saez B, i in. AKT/FOXO signaling enforces reversible differentiation blockade in myeloid leukemias. *Cell*. 2 wrzesień 2011;146(5):697–708.
287. Wang F, Demir S, Gehringer F, Osswald CD, Seyfried F, Enzenmüller S, i in. Tight regulation of FOXO1 is essential for maintenance of B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 28 czerwiec 2018;131(26):2929–42.

Opinia Komisji Bioetycznej



Komisja Bioetyczna przy Warszawskim Uniwersytecie Medycznym

Tel.: 022/ 57 - 20 -303
Fax: 022/ 57 - 20 -165

ul. Żwirki i Wigury nr 61
02-091 Warszawa

e-mail: komisja.bioetyczna@wum.edu.pl
www.komisja-bioetyczna.wum.edu.pl

KB/.....¹⁹⁵/2014

Komisja Bioetyczna przy Warszawskim Uniwersytecie Medycznym
po zapoznaniu się z wnioskiem /wymienić wnioskodawcę/ - w dniu 07 października 2014r
Prof.dr hab. Jakub Gołąb, Zakład Immunologii,
ul. Chałubińskiego 5,02-004 Warszawa,

dotyczącym: wyrażenia opinii w sprawie badania pt.: „Badanie wpływu szlaku AKT
na ekspresję antygenu CD20 oraz działanie przeciwnowotworowe terapeutycznych
przeciwciał monoklonalnych.”

wyraża następującą opinię

- stwierdza, że jest ono dopuszczalne i zgodne z zasadami naukowo-etycznymi*.
- ~~— stwierdza, że jest ono niedopuszczalne i niezgodne z zasadami naukowo-etycznymi.*~~

Uwagi Komisji-verte

Pouczenie-w ciągu 14 dni od otrzymania decyzji wnioskodawcy przysługuje Prawo
odwołania do Komisji Odwoławczej za pośrednictwem Komisji Bioetycznej przy
Warszawskim Uniwersytecie Medycznym.

Komisja działa na podstawie art.29 ustawy z dnia 5.12.1996r. o zawodzie lekarza /Dz.U.nr 28/97 poz.152
wraz z późn.zm./, zarządzenia MZiOS z dn.11.05.1999r. w sprawie szczegółowych zasad powoływania i
finansowania oraz trybu działania komisji bioetycznych /Dz.U.nr 47 poz.480/, Ustawy prawo
farmaceutyczne z dnia 6 września 2001r. (Dz.U.Nr 126, poz. 1381 z późn. zm.) Zarządzenie nr 56/2007
z dnia 15 października 2007 r.w sprawie działania Komisji Bioetycznej przy Warszawskim Uniwersytecie
Medycznym /Regulamin Komisji Bioetycznej przy Warszawskim Uniwersytecie Medycznym/.

Komisja działa zgodnie z zasadami GCP.

W załączeniu- skład Komisji oraz lista obecności.

Przewodnicząca
Komisji Bioetycznej

Prof. nadzw.dr hab. n .med. Beżena Tarchalska-Kryńska

*niepotrzebne skreślić