

Budoucnost v léčbě chronické lymfocytární leukémie? Inhibice kasein kinázy 1

Chronická lymfocytární leukémie (CLL) je nádorové onemocnění, které se řadí mezi nejčastější typy leukémie v západních zemích a postihuje především starší jedince (medián věku při této diagnóze je 65 let). V Evropě a Severní Americe tvoří 30 % ze všech leukemických případů. V České republice se incidence pohybuje okolo 5–6 nových případů na 100 tisíc osob za rok (obr. 1) a podle statistik se vyskytuje skoro dvakrát častěji u mužů než u žen. Jde stále o nevléčitelné onemocnění, jehož průběh bývá výrazně rozdílný.

Chronická lymfocytární leukémie vychází z buněk imunitního systému, bílých krvinek, konkrétně B-lymfocytů v periferní krvi, kostní dřeni a sekundárních lymfatických orgánech, jako jsou slezina a lymfatické uzliny, kde se buňky nekontrolovane množí. Rozvoj onemocnění probíhá většinou velmi pomalu. Typické je dlouhé období (roky až desetiletí) bez příznaků, kdy lze nemoc diagnostikovat pouze z krevního obrazu. Mezi příznaky CLL patří lymfocytóza (mnohonásobné zvýšení počtu B-lymfocytů v krvi; > 5 000 buněk v 1 μ l krve, oproti 1 500 u zdravého jedince), dále nebolestivé zvětšení lymfatických uzlin, sleziny (splenomegalie, obr. 2), jater (hepatomegalie) až selhání imunitního systému, které může vést ke smrti pacienta.

Pokud nemoc probíhá asymptomaticky, nemocní jsou pouze sledováni a léčba jim poskytována není. Ta je zahájena, až pokud se objeví příznaky a dojde k progresi. Pacient v takových případech trpí únavou, prudkým hubnutím, nočním pocením, anémií (způsobenou infiltrací kostní dřeni CLL buňkami) a dalšími již zmiňovanými příznaky. Onemocnění má u různých jedinců hodně heterogenní průběh. Nejčastěji je podávána kombinovaná léčba, imunochemoterapie – fludarabin, cyklofosamid,

rituximab (FCR), tedy kombinace purinového analogu, alkylační látky a monoklonální protilátky. Standardně se používá v první fázi léčby. V případech, kdy leukemické buňky nesou cytogenetické aberace – defekty, např. del(17p), nebo mutaci v genu *TP53* – zodpovědné za agresivnější průběh onemocnění, však tato léčba nemusí být účinná a je nutné nasadit jiné látky, vůči kterým budou tyto buňky citlivé. V posledních letech se objevují stále nové přístupy, např. látky schopné zastavit signalizaci B-buněčného receptoru odpovědnou za rozvoj onemocnění. Typickým příkladem je inhibice Brutonovy tyrozin-kinázy (BTK) nebo fosfatidylinositol-3-kinázy (PI3K), tedy složek dráhy B-buněčného receptoru, která je v leukemických buňkách aktivní. Alternativně také může být spuštěna u leukemických buněk řízená buněčná smrt – apoptóza, působením antagonistů antiapoptické signalizace řízené proteinem Bcl2. Klinické studie, jež se zabývaly účinkem těchto látek u pacientů s CLL a dalšími typy leukémií či lymfomů (obecně nádorů lymfatického systému), ukázaly, že jsou velmi efektivní a prospěšné pro mnoho z nich. Vysoce účinné bývají zejména v rizikových případech, u kterých již předchozí terapie selhala. Problémem

však nadále zůstává množství vedlejších účinků těchto látek a fakt, že léčba nevede k naprostému vyléčení nemocných a musí neustále pokračovat nebo být přerušena a nahrazena jinou. Vývoj nových léčiv je potřebný především pro pacienty s velmi špatnou prognózou a je důležité přistupovat ke každému individuálně (Gomes a kol. 2018).

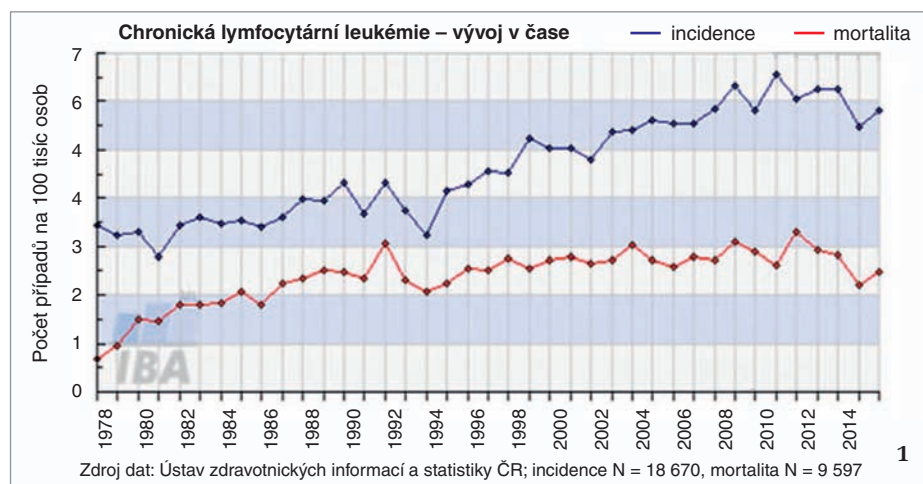
Wnt signální dráha a kasein kináza 1

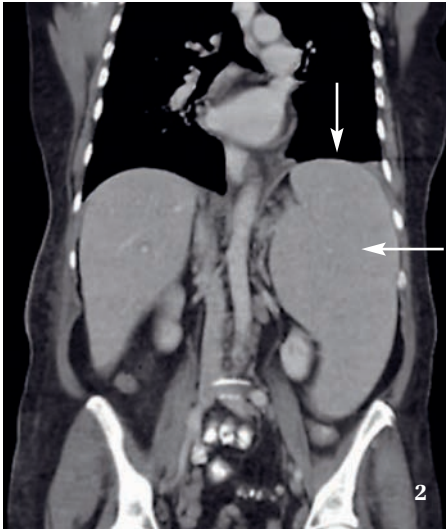
V laboratoři Vítězslava Bryji v Ústavu experimentální biologie Přírodovědecké fakulty Masarykovy univerzity v Brně se s těmito inovativními přístupy snažíme pracovat a zaměřili jsme se na inhibici dalšího typu buněčné signalizace zodpovědné za rozvoj CLL. Zabýváme se studiem Wnt signální dráhy (pojmenované podle dvou genů, *Wingless* – *wg*, *Integration 1* – *int-1*), konkrétně její nekanonickou větví, drahou planární buněčné polaritě (PCP). Ta může regulovat buněčnou migraci, polaritu leukemických B-lymfocytů a její aktivita hraje roli v progresi onemocnění a infiltraci lymfatických orgánů CLL buňkami. Právě inhibice této dráhy by mohla být účinnou formou terapie CLL, lymfomů s podobnou patogenezi i dalších nádorových onemocnění, u nichž je známa závislost na aktivitě Wnt signální dráhy. Látky, které vyvíjíme, působí jako inhibitory této dráhy, především její klíčové složky kasein kinázy 1 (CK1, obr. 3). Tato kináza se účastní regulace buněčného růstu, embryonálního vývoje, homeostázy, diferenciace, apoptózy a dalších důležitých buněčných procesů. Podílí se také na regulaci imunitního systému, kde ovlivňuje vývoj a diferenciaci lymfocytů z hematopoetických progenitorových buněk. Deregulací uvedených procesů může dojít ke vzniku různých typů leukémií a lymfomů, včetně CLL. Kináza CK1 je tedy významnou molekulou při vzniku a vývoji těchto onemocnění. V buňce ji můžeme najít téměř ve všech oddílech, bylo popsáno již 7 izoform a mezi nejvíce zkoumané patří CK1 δ/ϵ , jimiž se zabýváme i v naší laboratoři.

Ve spolupráci s organickými chemiky ze skupiny Kamila Parucha (Ústav chemie PŘF MU) se snažíme vyvinout látky (inhibitory), které by účinně blokovaly CK1 a tím zabránily rozvoji onemocnění. Náplní mé práce je hlavně testování těchto potenciálních nových léčiv, převážně *in vitro* nejen na buněčných kulturách (obr. 4), ale i přímo na krevních buňkách pacientů.

Testování neprobíhá pouze na leukemických liniích, ale také na buněčných liniích odvozených od jiných nádorových onemocnění, jako je karcinom prostaty, vaječníků, prsu a štítné žlázy. Tímto širším spektrem bychom chtěli zjistit, zda by mohly mít nově vyvinuté látky i další uplatnění. Dosavadní preklinická testování dostupných inhibitorů CK1 dokazují, že tento přístup k léčbě by mohl být účinný, ale dostupné látky nejsou dostatečně aktivní nebo selektivní pro CK1. Naším cílem je tedy vytvořit skupiny látek s lepšími vlastnostmi potenciálně využitelnými k léčbě.

Pro testování nově připravených látek využíváme různých přístupů a metod. Sledujeme např. cytotoxické působení, kdy buňky kultivujeme spolu s inhibitory po dobu 6–24 hodin a zaznamenáváme po-





1 Časový vývoj incidence (počet nových případů na 100 tisíc osob) a mortality (počet úmrtí na danou diagnózu na 100 tisíc osob) pro chronickou lymfocytární leukémii (CLL) v celé populaci tehdejšího Československa i dnešní České republiky. Převzato z webového portálu www.svod.cz, upraveno

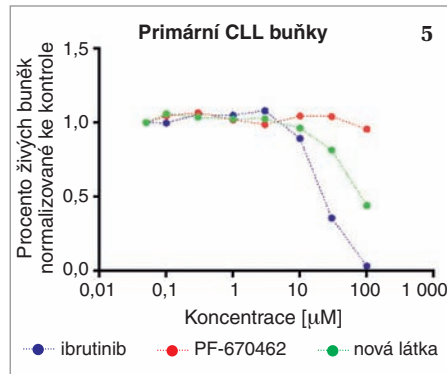
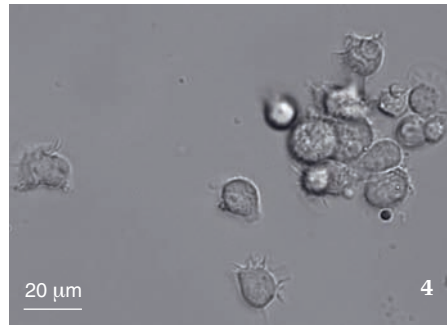
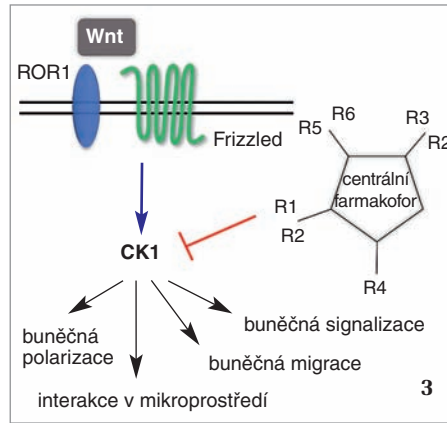
2 Snímek z počítačové tomografie (CT) ukazuje zvětšenou slezinu – splenomegaliu (viz šipky) jako jeden z příznaků CLL. Převzato z Wikimedia Commons, v souladu s podmínkami použití

3 Schéma Wnt/PCP dráhy a role izoformy kasein kinázy CK1 δ/ϵ u leukemických B-lymfocytů a její inhibice pomocí nově připravovaných látek s různými strukturálními modifikacemi. Po navázání Wnt ligandu na receptory dochází k aktivaci signální dráhy a přenosu signálu na další proteiny včetně CK1, kterou se snažíme blokovat inhibitory a zabránit tak progresi nádorového onemocnění. Blíže v textu. R1–R6 – různé modifikace chemické struktury centrálního farmakoforu; ROR1 a Frizzled – transmembránové receptory, které přijímají a dále přenášejí signál v buňce, Wnt – ligand spouštějící tuto signalizaci.

4 Populace B-lymfocytů, konkrétně HG3 CLL – buněčné linie odvozené od CLL, v kultuře *in vitro*. Foto Š. Čada

5 Výsledky testu cytotoxického působení CK1 inhibitorů po dobu 6 hodin na primární leukemické buňky izolované z periferní krve pacientů. Ibrutinib je látka, která se již běžně využívá při léčbě. Jde o inhibitor Brutonovy tyrozin kinázy, která má klíčové postavení v přenosu signálu od B-buněčného receptoru ovlivňujícího aktivaci B-lymfocytů, jejich proliferaci a produkci protilátek. Je zde vidět, že s rostoucí koncentrací dochází k výraznému snížení počtu živých buněk. Nejtoxicičtější účinky vykazuje právě ibrutinib, dále naše nová látka a nejslabší účinek má komerční CK1 inhibitor PF-670462.

čet buněk, které přežily jejich působení (obr. 5). Pro analýzu výsledků z těchto experimentů využíváme především průtokovou cytometrii jako rychlou a zároveň velmi spolehlivou metodu. S pomocí fluorescenčních látek lze buňky označit a tím následně odlišit živé a mrtvé.



Aktivitu CK1 kinázy v buňkách jsme sledovali metodou western blot (obr. 6) spolu s autofosforylačními analýzami (Cheong a Virshup 2011). Autofosforylace CK1 je studována na nenádorové buněčné linii HEK293 (human embryonic kidney), která se používá standardně a poskytuje konzistentní, dobře porovnatelné výsledky.

Kromě experimentů prováděných na buněčných liniích či leukemických buňkách z krve pacientů kolegyně Pavlína Janovská testuje účinek inhibitorů CK1 *in vivo* na modelu leukemických myší (transgenní myší linie Eμ-TCL1), u nichž dochází ke spontánnímu rozvoji B-lymfocytární leukémie s většinou příznaků běžně se nacházejících u pacientů trpících CLL. Na tomto modelu se potvrdilo, že léčba CK1 inhibitorem zpomaluje rozvoj onemocnění, prodlužuje dobu přežití myší a také prokazatelně zlepšuje jejich zdravotní stav. Uvedená fakta doplňují naše předchozí pozorování u buněčných linií a buněk pacientů. Na základě všech těchto poznatků můžeme říct, že inhibice CK1 by mohla představovat vhodný terapeutický prostředek.

Vliv inhibitorů CK1 na sekreci chemokinů a migraci buněk

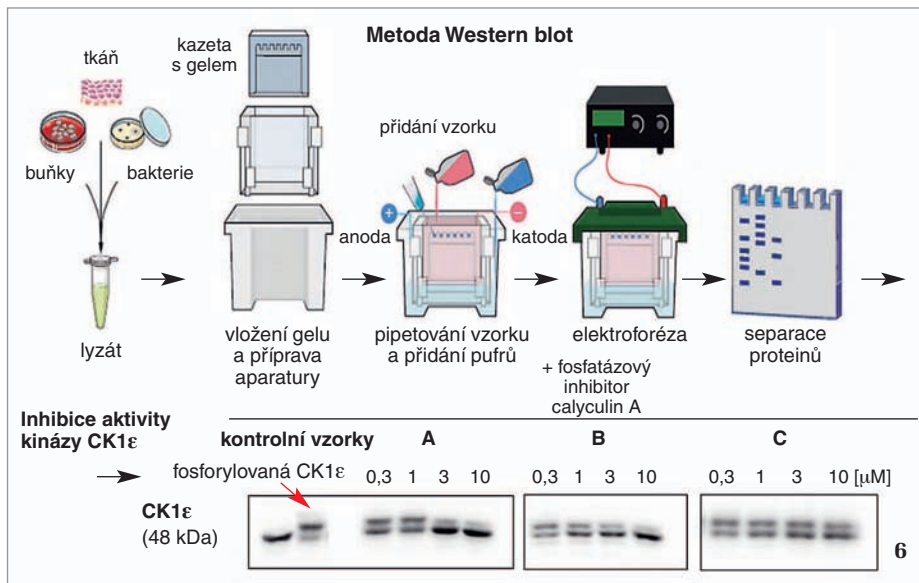
Dalším cílem bylo sledování vlivu inhibitorů CK1 na nádorové mikroprostředí pomocí společných kultivací CLL buněk

s podpůrnými stromálními buňkami kostní dřeně (obr. 7). Stromální buňky tvoří běžnou součást kostní dřeně a produkují velké množství faktorů, jimiž komunikují s okolními buňkami, včetně nádorových CLL buněk, a mohou chránit nádorové buňky před působením chemoterapeutik nebo podporovat jejich proliferaci (dělení). Buňky chronické lymfocytární leukémie při interakci se stromálními nebo samotné stromální buňky produkují mnoho růstových faktorů a také chemokinů CCL3 a CCL4, které mohou podporovat další interakci CLL buněk s podpůrnými T-lymfocyty a dále mohou vést k aktivaci a proliferaci CLL buněk. Sledovali jsme, zda působením CK1 inhibitorů dochází k potlačení produkce těchto chemokinů na úrovni genové exprese v CLL buňkách a také k sekreci proteinů buňkami do růstového média. Změny exprese genů kódujících CCL3 a CCL4 jsme hodnotili pomocí kvantitativní polymerázové řetězové reakce (Real-Time PCR). Ověřili jsme, že použití CK1 inhibitorů opravdu narušuje interakci leukemických a stromálních buněk a následně tlumí produkci chemokinů CCL3 a CCL4. Buňky tak ztrácejí stimuly potřebné pro vytvoření mikroprostředí, které by vedlo k jejich ochraně a indukovalo buněčné dělení. Testování jsme prováděli nejen na nádorových liniích, ale také přímo na primárních buňkách pacientů, které jsou velice heterogenní, citlivější než buněčné linie, a představují tak dobrý model pro podrobnější zkoumání. Bohužel přesný mechanismus narušení této buněčné interakce zatím popsán nebyl a je předmětem dalšího výzkumu.

S využitím migračních testů bylo také ověřováno, zda po působení vybraných látek dochází k ovlivnění chemotaxe lymfocytů. V tomto případě se sleduje buněčná migrace pomocí speciálních destiček (obr. 8), na nichž buňky putují skrze membránu s póry o průměru jen několik mikrometrů (záleží na velikosti použitých buněk) a zkoumá se vliv inhibitorů na jejich pohyb. Jelikož migrace lymfocytů patří k důležitým aspektům progresu onemocnění, a navíc je regulována aktivitou CK1 kinázy, je tento postup vhodný pro testování aktivity nově vytvořených látek.

K vyhodnocování účinnosti inhibitorů jsme používali komerčně dostupný inhibitor CK1 – PF-670462, který sloužil jako referenční hodnota. Pokud byla naše látka účinnější než tato komerčně dostupná, byla vybrána pro podrobnější testování. Posuzovali jsme také cytotoxické údaje, a to nejen vůči nádorovým buňkám, ale i zdravým B-lymfocytům. Aby látky mohly postupovat do klinického testování, je potřeba vyloučit cytotoxicitu ke zdravým buňkám. Hlavním kritériem bylo, zda látka nádorové buňky spíše „zabíjí“, nebo tlumí Wnt signální dráhu a tím i blokuje rozvoj onemocnění. Hodnocení probíhá postupně a pomáhá směřovat další vývoj látek. Ty nejlepší jsou posílány na další analýzy *in vitro* na základě jejich selektivity či aktivity vůči jednotlivým izoformám CK1.

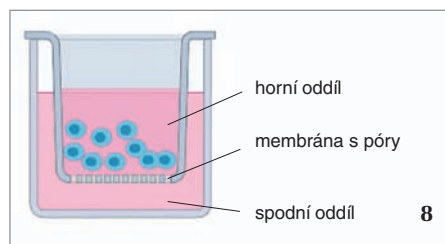
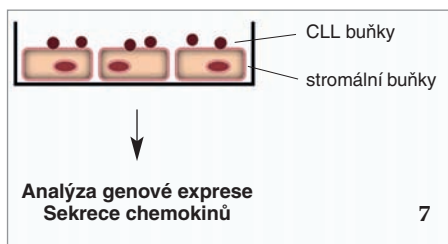
Do testování jsme zahrnuli i buňky se záměrně odstraněnými geny pro CSNK1 δ nebo CSNK1 ϵ . Během jejich vývoje se totiž podařilo připravit vysoce selektivní inhibitory vůči konkrétním izoformám.



6 Sledování inhibice CK1ε metodou western blot, která se využívá pro detekci konkrétního proteinu ve vzorku. Elektroforézou dojde k rozdělení proteinů podle velikosti, poté jsou přeneseny z gelu na membránu a detekovány pomocí specifických protilátek (horní část obr.). Upraveno podle: B. T. Kurien a R. H. Scofield (2015). Aktivní fosforylovaná forma CK1ε je označena červenou šipkou (spodní část obr.). Po přidání inhibitorů A a B dochází k úbytku fosforylované formy a k blokaci její autofosforylační aktivity. Inhibitor C aktivitu CK1ε neovlivňuje.

7 Schematické znázornění společné kultivace leukemických a stromálních buněk a následná analýza genové exprese nebo sekrece chemokinů

8 Migrační jamka – buňky umístěné do horního oddílu se nechají procházet několik hodin skrze membránu s póry až do spodního oddílu. Množství buněk schopných migrace se kvantifikuje s využitím průtokového cytometru. Foto a orig.: M. Gregorová, pokud není uvedeno jinak



Podpořeno z grantů Masarykovy univerzity (MUNI/A/0968/2017, MUNI/C/1306/2017), Ministerstva zdravotnictví (15-29793A, FNBr 65269705), Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy – CEITEC 2020 (LQ1601), LQ1605 (MEYS CR), CZ-OPENSREEN, a BrnoPhDTalent. Tento projekt je také financován z Evropské unie – Horizon 2020 research and innovation programme (č. 692298).

Použitá literatura uvedena na webu Živa. K dalšímu čtení např. Živa 2005, 1: 46–48; 2013, 3: 98–100; 2017, 1: 2–4.

Chtěli bychom tedy objasnit a ověřit, zda je výhodnější a účinnější blokovat pouze jednu izoformu, nebo používat panCK1 inhibitory, které jich blokují více.

Závěrem

Naší snahou je vytvořit skupiny účinných a selektivních látek blokuujících aktivitu

kinázy CK1, potvrdit jejich aktivitu *in vitro* a *in vivo* a popsat jejich účinky na migraci a přežití leukemických buněk. Zatím žádné podobné látky v klinickém testování nebyly, jde tedy o velkou příležitost. Pokud budou úspěšné v preklinických a klinických studiích, mohly by přinést novou naději v léčbě nádorových onemocnění.

Zdeněk Soldán

Kam zařadit „nemožný mech“ *Takakia*?

Bryologové, tedy vědci zabývající se mechorosty, popisují každoročně desítky nových taxonů. Objevují se hlavně nové druhy nebo jejich poddruhy, řidčeji i nové rody, a případnou polemiku může vyvolat jen jejich zařazení do vyšších taxonomických kategorií. Vždy je ale od prvního okamžiku zřejmé, že dotyčný taxonom studoval zástupce jednoho ze tří oddělení mechorostů – mechů (Bryophyta), játrovek (Marchantiophyta) nebo hlevíků (Anthocerotophyta). Jediným případem, který tomu odporuje, je takakia.

Začněme historickým exkurzem...

... tedy chronologicky, dvě století nazpět od současnosti. Z území Himálaje (v indickém svazovém státu Sikkim) se v jednom ze sběrů Josepha Daltona Hookera z první poloviny 19. století objevuje podivný mechorost a anglickým bryologem Willia-

mem Mittenem je popsán jako nový druh játrovky *Lepidozia ceratophylla* (rod *Lepidozia* je u nás zastoupen vcelku běžným druhem plevinkou plazivou – *L. reptans*), avšak příslušná typová položka zůstává prakticky bez povšimnutí dalších badatelů deponována v herbáři po více než 100 let.

Přichází r. 1951 a japonský bryolog Noriwo Takaki sbírá na ostrově Honšú podobné rostliny, které jsou v r. 1958 popsány jeho kolegy (Sinske Hattori a Hiroshi Inoue) vědeckým jménem *Takakia lepidozioides*. Nové rodové jméno je samozřejmě vytvořeno k počtě původního sběratele. V národním japonském jmenoslaví dostává výstižný přídomek nanjamonja-goke, v překladu „nemožný mech“ nebo alespoň mírněji citově zabarvený „poptený“ či „záhadný mech“ (v angličtině puzzle moss). Německý hepatikolog (specialista na játrovky) Riclef Grolle později (1963) převádí do stejného rodu i dříve známý druh *L. ceratophylla*. Avšak zvýšený zájem o tyto druhy vyvolává nevídané rozpaky: kde je vlastně – vzhledem ke zcela unikátnímu souboru znaků – nejprůročnější zakotvení v systematice mechorostů? Vzácné vzorky sběrů, případně alespoň zobrazení a popisy rostlin jsou dokonce ve formě ankety rozesílány s prosbou o vyjádření názoru řadě světově proslulých bryologů, ale též algologům (co kdyby to byla prapodivná ancestrální heterotrichální řasa?). Posléze, po objevení archegonií u rostlin z Japonska, dochází k potvrzení anketou získaného většinového názoru, že jde skutečně o mechorost, a je zařazen mezi játrovky do příbuznosti primitivního rodu přímenka (*Haplomitrium*), tedy do řádu Calobryales (dnes