



Contents lists available at ScienceDirect

**Acta Haematologica Polonica**journal homepage: [www.elsevier.com/locate/achaem](http://www.elsevier.com/locate/achaem)**Praca poglądowa/Review**

# Stres siateczki śródplazmatycznej i stres oksydacyjny w ostrych białaczkach szpikowych



## Endoplasmic reticulum stress and oxidative stress in acute myeloid leukemia

Justyna Chlebowska<sup>1,2,3,\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratorium Medycyny Doświadczalnej Centrum Nowych Technologii Uniwersytetu Warszawskiego, kierownik: dr hab. Dominika Nowis, Warszawa, Polska

<sup>2</sup>Zakład Immunologii Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego, kierownik prof. dr hab. Jakub Gołąb, Warszawa, Polska

<sup>3</sup>Zakład Medycyny Genomowej Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego, kierownik: prof. dr hab. Krystian Jażdżewski, Warszawa, Polska

## INFORMACJE O ARTYKULE

## Historia artykułu:

Otrzymano: 06.04.2016

Zaakceptowano: 27.07.2016

Dostępne online: 06.08.2016

## Słowa kluczowe:

- ostra białaczka szpikowa
- stres ER
- stres oksydacyjny
- odpowiedź na nieprawidłowo sfaldowane białka
- reaktywne formy tlenu
- CEBP $\alpha$

## Keywords:

- Acute myeloid leukemia
- ER stress
- Oxidative stress
- Unfolded protein response
- Reactive oxygen species
- CEBP $\alpha$

## A B S T R A C T

Use of differentiation-inducing agents (all-trans retinoic acid and arsenic trioxide) that degrade fusion PML-RAR $\alpha$  receptor have revolutionized management of acute promyelocytic (APL) leukemia in 2008. However, despite significant advances in the treatment of APL, the cure rates of patients suffering with other acute myeloid leukemia (AML) subtypes are still not satisfying. Abnormal reactive oxygen species levels and constitutive expression of ER stress marker proteins are characteristic of AML. AML patients with activated unfolded protein response and increased ER chaperone levels showed suppressed CEBP $\alpha$  protein expression. CEBP $\alpha$  is an essential transcription factor that regulates multiple aspects of myelopoiesis. Understanding how the unfolded protein response trigger down-regulation of CEBP $\alpha$  and lead to differentiation blockage opens new possibilities for the design of anti-AML therapeutic strategies.

© 2016 Polskie Towarzystwo Hematologów i Transfuzjologów, Instytut Hematologii i Transfuzjologii. Published by Elsevier Sp. z o.o. All rights reserved.

\* Adres do korespondencji: Centrum Nowych Technologii Laboratorium Medycyny Doświadczalnej, ul. Banacha 2c, 02-097 Warszawa, Polska.

Adres email: [j.chlebowska@uw.edu.pl](mailto:j.chlebowska@uw.edu.pl).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.achaem.2016.07.001>

0001-5814/© 2016 Polskie Towarzystwo Hematologów i Transfuzjologów, Instytut Hematologii i Transfuzjologii. Published by Elsevier Sp. z o.o. All rights reserved.

## Wstęp

Ostre białaczki szpikowe (*acute myeloid leukemia*; AML) to heterogenna grupa nowotworów, różniąca się wiekiem, w którym rozpoczyna się choroba, zmianami cytogenetycznymi, morfologią i immunofenotypem komórek białaczkowych, a co za tym idzie, także rokowaniem. Mimo znaczącego postępu w terapii innych nowotworów hematologicznych w ciągu ostatnich dwóch dekad, wyniki leczenia AML są nadal niezadowalające. Od 2008 roku pacjentom z podtypem białaczki promielocytowej (*acute promyelocytic leukemia*; APL) w kombinacji z klasyczną chemioterapią podaje się związki mające promować różnicowanie się komórek białaczkowych, co znacznie zwiększa odsetek pacjentów osiągających całkowitą remisję [1].

W celu wyjaśnienia patomechanizmu choroby oraz zjawisk doprowadzających do transformacji blastycznej badacze śledzili zmiany cytogenetyczne, molekularne oraz transkryptyczne w AML. Uwaga naukowców długo skupiona była głównie na poznaniu onkogenów i genów supresorowych białaczek. Wyróżnienie ważnych nieprawidłowości genetycznych w AML zaowocowało wprowadzeniem przez WHO w 2008 roku nowej systematyki i klasyfikacji tych nowotworów (jej aktualizacja planowana jest w 2016 roku). Wydaje się jednakże, że dopiero zrozumienie przyczyn zmian w tempie proliferacji i bloku różnicowania komórek białaczkowych może przynieść nowe, bardziej skuteczne propozycje terapeutyczne dla pacjentów. Komórki ostrej białaczki szpikowej, konstytutywnie wykazują ekspresję markerów stresu siateczki śródplazmatycznej. Pacjenci o zwiększonej ekspresji białek opiekuńczych siateczki, których zadaniem jest przywracanie prawidłowej konformacji białkom, charakteryzują się niewielką ekspresją CEBP $\alpha$  [2, 3], czynnika transkrypcyjnego kluczowego dla zachowania prawidłowej mielopoety i przejścia komórek z etapu progenitorów komórek mieloidalnych (*common myeloid progenitor*; CMP), do bardziej zróżnicowanej formy komórek progenitorowych granulocytów i monocytów (*granulocyte-monocyte progenitor*; GMP) [4, 5].

## Zastosowanie leków promujących różnicowanie komórek białaczkowych w APL

Kwas retinowy (*all-trans retinoic acid*; ATRA) i trójtlenek arsenu (*arsenic trioxide*; ATO) w kombinacji z klasyczną chemioterapią opartą na zastosowaniu antybiotyków z grupy antracyklin promuje różnicowanie się komórek białaczkowych, hamując aktywność produktu genu fuzyjnego PML-RARA i prowadzi do zmiany fenotypu komórek białaczkowych z typowego dla niedojrzałych promielocytów, na charakterystyczny dla krótko żyjących, w pełni dojrzałych neutrofilów [6, 7]. Takie postępowanie terapeutyczne okazało się niezwykle skuteczne i korzystne dla pacjentów – wydłużyło ich całkowity czas przeżycia oraz długość okresu bez wznowy choroby [8, 9]. Według aktualnych zaleceń należy jak najszybciej wdrażać terapię z użyciem ATRA i/lub ATO nawet u pacjentów bez potwierdzonej rearanżacji PML-RAR $\alpha$ , a jedynie zmianami w mielogramie sugerującymi APL,

w celu uniknięcia powikłań związanych z zaburzeniami układu krzepnięcia. Niejednoznaczne są wyniki prób klinicznych porównujących skuteczność kombinacji antracyklin z ATRĄ ze schematem włączającym także arabinozyd cytozyny w leczeniu indukującym oraz konsolidacyjnym [8, 10]. Nie ma natomiast wątpliwości co do korzyści z włączenia ATO do leczenia indukującego – dwa dodatkowe 25-dniowe cykle leczenia ATO po standardowym protokole łączącym antracykliny z ATRĄ znacznie poprawiają czas przeżycia wolny od zdarzeń (*event free survival*; EFS) [8, 10]. Wyniki obecnie trwających prób klinicznych sugerują także przewagę zastosowania kombinacji kwasu retinowego z trójtlenkiem arsenu względem połączenia kwasu retinowego z klasyczną chemioterapią, szczególnie w zakresie okresu wolnego od wznowy ustalonego jako punkt końcowy badania (*disease free survival*; DFS) [11].

## „Stres siateczki śródplazmatycznej” w komórkach ostrej białaczki szpikowej

Gwałtowna proliferacja komórek nowotworowych, obniżone wytwarzanie ATP (adenozyno-5'-trifosforanu) związane z efektem Warburga oraz warunki hipoksji prowadzą do upośledzenia glikozylacji białek i nagromadzenia w siateczce śródplazmatycznej nieprawidłowo sfałdowanych polipeptydów. Kiedy w komórce gromadzą się uszkodzone białka, dochodzi do stanu nazywanego stresem siateczki śródplazmatycznej charakteryzującego się aktywacją układów enzymatycznych i czynników transkrypcyjnych mających przywrócić komórkom homeostazę. W komórkach poddanych stresowi dochodzi także do zahamowania translacji oraz do degradacji w proteasomach nagromadzonych, nieprawidłowo sfałdowanych białek (*ER-associated degradation*; ERAD). Wszystkie te zjawiska nazwano zbiorczo odpowiedzią komórek na nieprawidłowo sfałdowane białka (*unfolded protein response*; UPR) [12, 13].

W komórkach prawidłowych zjawisko stresu siateczki śródplazmatycznej i aktywacja UPR może spowodować wejście komórek na szlak apoptozy, jednak konstytutywny, łagodny stres, któremu poddawane są komórki nowotworowe, może prowadzić do uruchomienia mechanizmów adaptacyjnych, umożliwiających przeżycie. W komórkach nowotworowych mechanizm ten ma funkcje ochronne i umożliwia przystosowanie do niekorzystnych warunków [14-17]. Stres siateczki śródplazmatycznej oraz potencjalne korzyści terapeutyczne z zastosowania związków hamujących aktywność białek związanych z UPR, ale także indukujących stres ER i wprowadzających komórki na szlak apoptozy, zostały opisane dla wielu typów komórek nowotworowych w tym także dla AML [2, 3, 18-21].

Rozpoczęcie szlaku sygnałowego UPR zależne jest od trzech przezbłonowych białek retikulum: enzymu IRE1 (*inositol requiring enzyme 1*), kinazy białkowej PERK (*pancreatic endoplasmic reticulum eIF2 $\alpha$  kinase*) oraz czynnika transkrypcyjnego ATF6 (*activating transcription factor 6*). Końce aminowe – NH<sub>2</sub> tych białek znajdują się w świetle siateczki, a końce karboksylowe – COOH w cytozolu. W warunkach homeostazy te trzy wspomniane białka są związane z białkiem opiekuńczym – chaperonem BiP (*binding protein*),

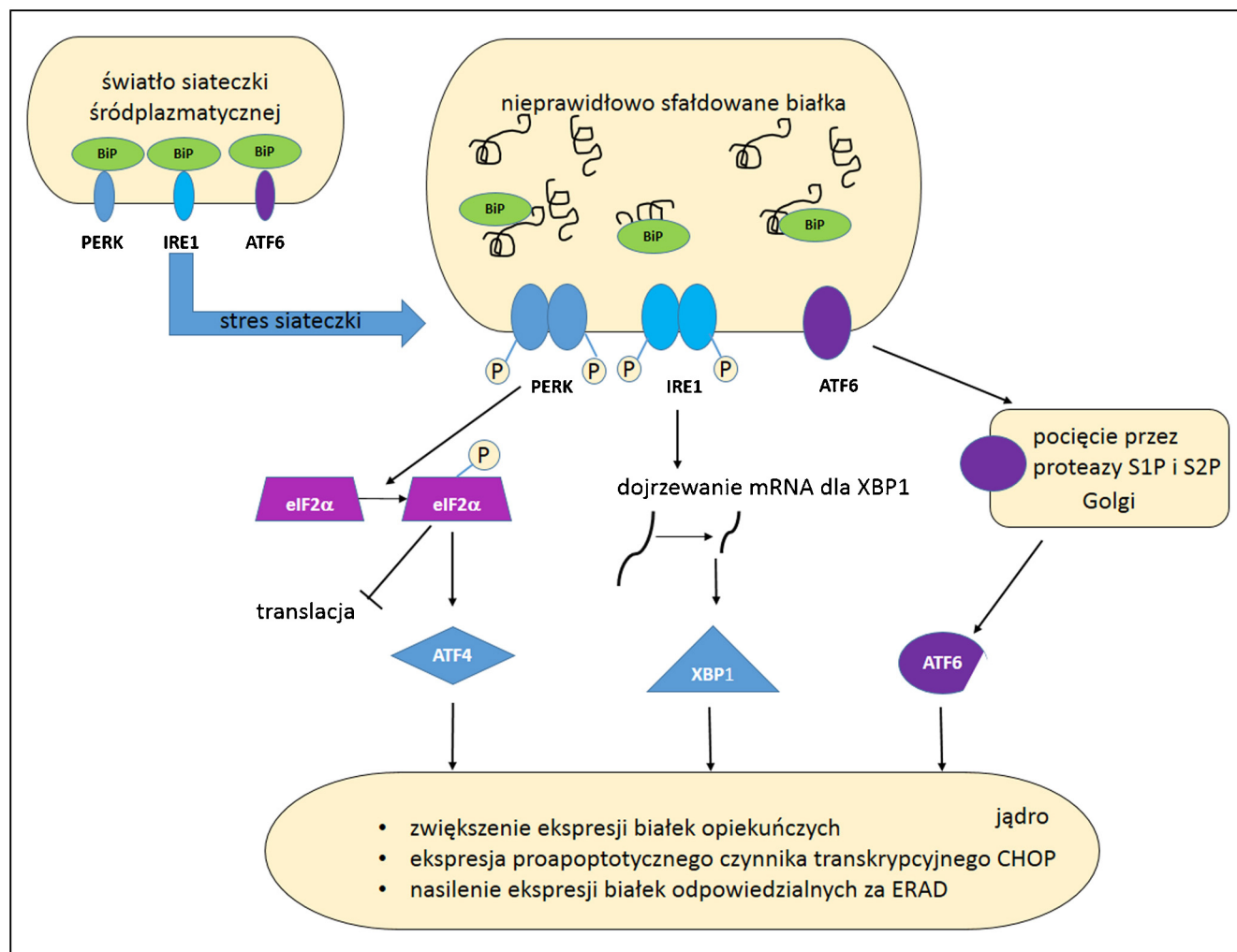
znajdującym się w świetle siateczki. BIP zapobiega aktywacji wyżej wymienionych enzymów, głównych przekaźników sygnału szlaku UPR poprzez niedopuszczenie do ich homodimeryzacji [22, 23]. W warunkach stresu siateczki BiP jako chaperon wiąże się z nieprawidłowo sfałdowanymi białkami, uwalniając IRE1, PERK i ATF6 (Ryc. 1).

Przyczyny aktywacji UPR w ostrej białaczce szpikowej są niejasne. Istnieją przesłanki świadczące o udziale w tym procesie białka będącego produktem genu fuzyjnego PML-RARA u pacjentów z ostrą białaczką promielocytową. Białko fuzyjne PML-RAR $\alpha$  może prowadzić do nagromadzenia w świetle siateczki korepresora receptora jądrowego N-CoR1 (nuclear hormone receptor corepressor) [24]. Białko N-CoR1 jest zaangażowane w kontrolę procesu transkrypcji w wyniku interakcji z różnymi białkami zaangażowanymi w regulację epigenetyczną [25]. Nieprawidłowe pofałdowanie białka N-CoR1 jest przyczyną nasilonej proliferacji komórek białaczki podtypu M3 oraz M5 wg klasyfikacji FAB (French-American-British classification) [26]. W przypadku komórek białaczki typu M5 potranslacyjna utrata N-CoR1 wiąże się z nasiloną transkrypcją onkogennej kinazy tyrozynowej 3 związanej z fms (fms-related tyrosine kinase 3; FLT3)

zarówno w komórkach z mutacją aktywującą, jak i w komórkach z prawidłową kopią genu [26]. Flawonoid genisteina, stabilizując N-CoR1, hamuje ekspresję kinazy FLT3 w komórkach linii białaczkowych niezależnie od statusu mutacji w tym genie i różnicuje blasty białaczkowe do dojrzałych komórek układu ziarnistokrwińkowego [26]. Znaczące cytoprotekcyjne działanie UPR w grupie pacjentów z ostrą białaczką szpikową o złym rokowaniu, mających aktywującą mutację FLT3-ITD (*internal tandem duplication*), może wiązać się m.in. ze zmniejszoną ekspresją genu supresorowego nowotworów – DAPK1 (*death-associated protein kinase 1*) odpowiedzialnego za indukcję apoptozy w przebiegu stresu [27].

### Aktywacja IRE1

Rozpoczęcie szlaku sygnałowego dla UPR zależne od autofosforylacji enzymu IRE1 uruchamia jego aktywność jako RNAzy, umożliwiając wycięcie 26-nukleotydowego intronu z mRNA dla białka XBP1 (*X-box DNA binding protein*) (Ryc. 1). mRNA dla XBP1 koduje czynnik transkrypcyjny o budowie zamka leucynowego, a jego pocięcie przez IRE1 umożliwia



Ryc. 1 – Aktywacja odpowiedzi na nieprawidłowo sfałdowane białka  
Fig. 1 – Activation response to misfolded proteins

powstanie dojrzałego mRNA, a następnie translację XBP1 [28]. Białko XBP1 wiąże się z regionami ERSE (ER stress element) w obrębie DNA [CCAAT(N<sub>9</sub>)CCACG] obecnymi w promotorach wielu genów szlaku UPR, aktywując m.in. transkrypcję genów dla rodziny białek szoku cieplnego i innych chaperonów siateczkowych, a także samego XBP1 [22, 28].

Pacjenci z AML wykazują aktywację szlaku odpowiedzi na nieprawidłowo sfałdowane białka zdefiniowaną przez obecność dojrzałego mRNA dla XBP1 [3, 18]. W tak określonej grupie chorych zaobserwowano zwiększoną ekspresję mRNA dla białek opiekuńczych siateczki, np. kalretikuliny i BiP oraz mRNA dla czynnika transkrypcyjnego indukowanego przez stres i uszkodzenia DNA – CHOP (CEBP homologous protein) [3, 18]. Pacjenci ci charakteryzują się niższą leukocytozą oraz zmniejszeniem stężeniadehydrogenazy mleczanowej we krwi, co wiąże się z lepszą prognozą i z dłuższym czasem przeżycia [3, 18].

Zwiększona ekspresja białka szoku cieplnego Hsp70 w komórkach ustalonej, monocytarnej linii AML – U937 nasila aktywność RNAzową enzymu IRE1, ułatwiając blastom białaczkowym adaptację do nasilonego stanu stresu siateczki śródplazmatycznej. Zahamowanie ekspresji Hsp70 poprzez interferencję RNA lub przez zastosowanie flawonoidu kwercetyny zmniejsza aktywację IRE1, zmniejsza ekspresję BiP, natomiast nie wpływa na poziom czynnika transkrypcyjnego CHOP, tym samym uwrażliwia komórki AML na apoptozę aktywowaną nasiloną odpowiedzią na nieprawidłowo sfałdowane białka [29].

Aktywacja UPR w wyniku zaburzeń homeostazy wapnia w komórkach U937 inkubowanych z sorafenibem – inhibitorem licznych kinaz m.in. Raf (*rapidly accelerated fibrosarcoma*), MAPK (*mitogen-activated protein kinase*), ERK (*extracellular signal regulated kinase*) i FLT3 i związana z odpowiedzią na nieprawidłowo pofałdowane białka nasiloną ekspresją IRE1 zmniejsza cytotoxycywność inhibitora [21]. Wyciszenie ekspresji IRE1 lub XBP1 zwiększa wrażliwość U937 na cytotoxyczne działanie sorafenibu, nie wpływając jednocześnie na mechanizm, w którym doszło do indukcji stresu siateczki, czyli zaburzenia homeostazy wapniowej [21].

### Aktywacja ATF6

Czynnik transkrypcyjny ATF6, po odłączeniu od białka BIP, przechodzi do aparatu Golgiego, gdzie jest aktywowany poprzez cięcie przez proteazy S1P (*site 1 protease*; proteaza jako pierwsza przecinająca czynnik transkrypcyjny SREBP) i S2P (*site 2 protease*; proteaza jako druga przecinająca SREBP) [22, 23, 28] (Ryc. 1). Powstałe białko ma masę około 50 kDa i strukturę zamka leucynowego, który podobnie jak XBP1 przyłącza się do regionów ERSE w obrębie DNA, ale jedynie w połączeniu z czynnikiem transkrypcyjnym CBF (CCAAT binding factor). ATF6 zwiększa transkrypcję XBP1, BIP, kalretikuliny, izomerazy dwusiarczkowej białek – PDI (*protein disulfide isomerase*) oraz CHOP [22, 23, 28].

Pacjenci o nasiloną w wyniku aktywacji ATF6 ekspresji białek opiekuńczych siateczki, takich jak kalretikulina lub PDI, mają obniżoną ekspresję ważnego czynnika transkryp-

cyjnego kontrolującego proces mielopoezy – CEBP $\alpha$ , o czym więcej w rozdziale **Chaperony siateczkowe** [7, 8].

### Aktywacja PERK

Kinaza białkowa PERK po uwolnieniu z połączenia z BIP dimeryzuje i podobnie do IRE1 ulega trans-autofosforylacji (Ryc. 1). Aktywny PERK fosforyluje podjednostkę  $\alpha$  drugiego czynnika inicjującego translację – eIF2 $\alpha$  (*eukaryotic translation initiation factor 2*) [23]. Ufosforylowana forma eIF2 $\alpha$  gorzej rozpoznaje kodon inicjacji translacji AUG, co powoduje zahamowanie syntezy białka zależnej od obecności czapeczki, czyli 7-metyloguanozyny [22]. Taka kontrola translacji pomaga zredukować ilość nieprawidłowo sfałdowanych białek w komórce narażonej na stres siateczki śródplazmatycznej i umożliwia jej przeżycie. Zatrzymanie translacji prowadzi do zablokowania cyklu komórkowego w fazie G<sub>1</sub> z powodu braku cykliny D1 [23]. Paradoksalnie translacja niektórych cząsteczek mRNA, mających obniżone wymagania co do dostępności aktywnej formy czynnika inicjującego translację, zostaje wzmożona. Cząsteczki mające specjalne sekwencje regulatorowe nazwane IRES (*internal ribosome entry site*; wewnętrzne miejsce wiązania rybosomu) mogą ominąć zależny od PERK blok translacji. Przykładem takiej cząsteczki jest czynnik transkrypcyjny ATF4 (*activating transcription factor 4*) [22, 23]. Wykazano, że ATF4 może wpływać na przeżycie komórek poprzez indukowanie genów związanych z metabolizmem aminokwasów czy zmianą potencjału oksydoredukcyjnego [30]. Z drugiej jednak strony, ATF4 jest uznawany za najsilniejszy sygnał do transkrypcji proapoptotycznego czynnika CHOP [31]. ATF4 powoduje także aktywację transkrypcji białka GADD34 (*growth arrest and DNA damage-inducible protein*), które reguluje aktywność fosfatazy PP1 (*protein phosphatase 1*) mogącej odciąć resztę fosforanową od czynnika eIF2 $\alpha$  [22, 23]. Defosforylacja eIF2 $\alpha$  odblokowuje translację białek w komórce.

Aktywność PP1 nie ma udowodnionego udziału w regulacji procesu UPR w komórkach białaczkowych, jednak wiadomo, że fosfataza ta ogranicza skuteczność terapii nowotworów hematologicznych z wykorzystaniem wywołujących stres retikulum inhibitorów proteasomu. Jednoczesna inkubacja komórek linii ostrej białaczki promielocytowej HL-60 z inhibitorem PP1 – salubrinalem wraz z bortezomibem lub MG132 zwiększa toksycywność tych ostatnich względem komórek AML [32].

Uruchomienie w komórkach białaczkowych szlaku zależnego od PERK i fosforylacji eIF2 $\alpha$  w wyniku inkubacji ze związkami indukującymi stres siateczki może odegrać dwójną rolę. Aktywacja tej ścieżki w komórkach linii monocytarnej U937 inkubowanych z sorafenibem obniża cytotoxycywność tego drobnocząsteczkowego inhibitora kinaz. Zastosowanie siRNA wyciszającego ekspresję PERK lub zniesienie aktywności tego enzymu w mechanizmie *dominant negative* zwiększa wrażliwość komórek białaczkowych na sorafenib [21]. Komórki wykazujące ekspresję zmodyfikowanego czynnika eIF2 $\alpha$  niepodatnego na fosforylację również są znacząco wrażliwsze na cytotoxyczne działanie sorafenibu [21]. Jednocześnie zastosowanie siRNA wyciszającego ekspresję proapoptotycznego czynnika CHOP, którego ekspresja zwiększa się w wyniku aktywacji PERK po inkubacji



z sorafenibem, nie wpływa istotnie na przeżywalność komórek AML [21].

Z drugiej strony aktywność PERK wydaje się niezbędna dla efektywnego zabijania komórek linii białaczki promielocytowej – HL-60 w wyniku inkubacji z syntetycznym retinoidem- fenretynidem (4-hydroxy(phenyl)retinamide; 4-HPR) [19]. Zhamowanie PERK lub eIF2 $\alpha$  w mechanizmie *dominant negative* zmniejsza wrażliwość komórek na fenretynid oraz blokuje aktywację kaspazy 3 i 9 [19].

### Chaperony siateczkowe: izomeraza mostków dwusiarczkowych i kalretikulina jako inhibitory translacji CEBP $\alpha$

Mutacje genu dla czynnika transkrypcyjnego CEBP $\alpha$  dotyczą około 10–20% pacjentów z AML [33–36]. Jednak w wielu przypadkach ostrej białaczki szpikowej dochodzi do zahamowania ekspresji CEBP $\alpha$  lub jego obniżonej aktywności, mimo braku mutacji w obrębie genu CEBPA.

Transkrypcja CEBP $\alpha$  pozostaje pod kontrolą białka RUNX1, więc jest obniżona u chorych, u których dochodzi do mutacji genu RUNX1 lub u chorych z obecnością translokacji powodujących powstanie białek fuzyjnych hamujących aktywność tego czynnika transkrypcyjnego [9, 37]. U pacjentów z mutacjami typu FLT3-ITD dochodzi do fosforylacji przez kinazę ERK seryny 21 białka CEBP $\alpha$ , co zmniejsza jego aktywność jako czynnika transkrypcyjnego. Metylacja promotora CEBPA jest obecna niemal u połowy pacjentów cierpiących na ostrą białaczkę szpikową [38]. Receptor kwasu retinowego  $\alpha$  (*retinoic acid receptor  $\alpha$* ; RARA) uczestniczy

w aktywacji czynników transkrypcyjnych rodziny CEBP. Upośledzenie procesu transkrypcji CEBP $\alpha$  w wyniku translokacji t(15;17)(q22,q12) i powstania fuzyjnego białka PML-RAR $\alpha$ , związane jest z hamowaniem funkcji prawidłowego białka RAR $\alpha$  działającego w mechanizmie *dominant negative* [39].

Izomeraza mostków dwusiarczkowych białek jest enzymem siateczki śródplazmatycznej katalizującym wytwarzanie oraz izomeryzację mostków dwusiarczkowych pomiędzy resztami cysteinowymi białek. PDI pełni istotną rolę pomocniczą podczas przyjmowania prawidłowej konformacji trzeciorzędowej wielu białek. Enzym ten zaliczany jest do białek opiekuńczych retikulum – tzw. chaperonów, których zadaniem jest przywracanie białkom prawidłowego ułożenia przestrzennego. PDI pełni także unikatową rolę w regulacji ekspresji genów na poziomie potranskrypcyjnym. Izomeraza mostków dwusiarczkowych białek w kooperacji z kalretikulina, wiąże się z regionem *stem loop* mRNA dla CEBP $\alpha$  i hamuje jego translację, co prowadzi do blokady różnicowania komórek w neutrofile (Ryc. 2). Wyciszenie ekspresji genu P4HB (PDIA1) kodującego PDI przywraca w komórkach linii ostrej białaczki promielocytowej HL-60 translację mRNA dla CEBP $\alpha$  [2, 3].

Blasty białaczkowe u około 25% pacjentów z AML wykazują cechy aktywacji szlaku odpowiedzi na nieprawidłowo sfaldowane białka. U pacjentów tych wykrywana jest zwiększona ilość mRNA dla PDI, co jednocześnie odwrotnie proporcjonalnie koreluje z nasileniem ekspresji białka CEBP $\alpha$  [2, 3].

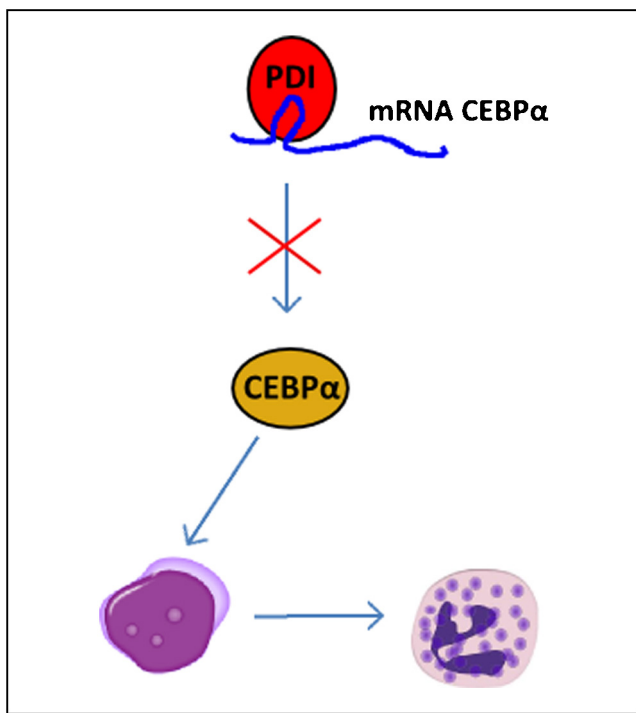
### Stres oksydacyjny w komórkach ostrej białaczki szpikowej

Zwiększone wytwarzanie reaktywnych form tlenu (*reactive oxygen species*; ROS) w blastach białaczkowych wynikające z m.in. aktywności onkogenów, z mutacji w obrębie genów mitochondrialnych, np. kodujących białka cytochromu P450, oraz ze zmniejszenia ekspresji białek o właściwościach antyoksydacyjnych, zaobserwowane zostało zarówno w ustalonych liniach oraz w pierwotnych komórkach wyizolowanych z krwi bądź szpiku chorych na AML [40, 41].

Zarówno zachowanie prawidłowej hematopoezy, jak i utrzymanie proliferacji komórek białaczkowych wymaga aktywacji czynnika indukowanego hipoksją (*hypoxia-inducible factor*; HIF). Wyciszenie ekspresji HIF-2 $\alpha$  wiąże się ze zwiększeniem wytwarzania ROS, a następnie, z kompensacyjnym uruchomieniem odpowiedzi UPR i zwiększonej podatności na apoptozę w wyniku stresu siateczki śródplazmatycznej [42]. Pierwotne komórki pochodzące od pacjentów z AML o wyciszonej ekspresji HIF-2 $\alpha$  traciły zdolność wywołania białaczki u myszy z niedoborami odporności [42].

Onkogeny np. białka Ras czy kinazy FLT3-ITD prowadzą do aktywacji oksydaz NADPH, w szczególności podjednostki 47phox [40, 41].

Zwiększone wytwarzanie ROS w blastach białaczkowych jest dość częste wśród pacjentów z mutacjami w genach IDH1 i IDH2 (*isocitrate dehydrogenase*) kodujących dehydrogenazę izocytrynianową – jeden z enzymów cyklu Krebsa. Powoduje to przemianę izocytrynianu w 2-hydroksyglutaran zamiast w  $\alpha$ -ketoglutaran, co prowadzi do oksydacyjnego uszkodzenia DNA oraz onkogenego, kompetytywnego



Ryc. 2 – Zahamowanie translacji mRNA dla CEBP $\alpha$  przez izomerazę mostków dwusiarczkowych białek (PDI)  
Fig. 2 – Inhibition of translation of mRNA by CEBP $\alpha$  protein disulfide bridges isomerase (PDI)

**Tabela I – Rola stresu siateczki i oksydacyjnego w ostrych białaczkach szpikowych**  
**Table I – The role of oxidative stress and mesh in acute myeloid leukemia**

leukemogeneza	potencjalne strategie terapeutyczne
powstanie białka fuzyjnego PML-RAR $\alpha$ i związane z nim nagromadzenie w świetle siateczki nieprawidłowo sfałdowanego białka N-CoR1 regulującego proliferację blastów	stabilizacja białka N-CoR1 np. za pomocą genisteiny (inhibitor białek rodziny szoku cieplnego)
zahamowanie translacji czynnika transkrypcyjnego CEBP $\alpha$ przez PDI prowadzące do zahamowania różnicowania	przywrócenie ekspresji CEBP $\alpha$ , zahamowanie funkcji PDI
mutacje IDH1 i IDH2 prowadzące do hydroksylacji DNA i stresu oksydacyjnego	inhibitory enzymów będących produktami zmutowanych genów IDH1 i IDH2
procesy adaptacyjne komórek białaczki	potencjalne strategie terapeutyczne
zmniejszenie ekspresji kinazy DAPK1 odpowiedzialnej za indukcję apoptozy w przebiegu stresu siateczki u pacjentów z mutacją FLT3-ITD.	przywrócenie ekspresji kinazy DAPK1, zahamowanie aktywności kinazowej FLT3-ITD.
zwiększona ekspresja Hsp70 powodująca aktywację adaptacyjnego szlaku IRE1	zahamowanie ekspresji Hsp70, IRE1 lub XBP1 np. przez zastosowanie rutynozydu kwercetyny
aktywność fosfatazy PP1odcinającej resztę fosforanową od czynnika eIF2a i przywracającej translację białek	zahamowanie aktywności PP1 np. poprzez zastosowanie salubrinału
represja TXNIP skutkująca zwiększoną aktywnością tioredoksyny, co umożliwi przeżycie blastów białaczkowych narażonych na nasilony stres oksydacyjny	odblokowanie transkrypcji TXNIP np. poprzez zastosowanie inhibitora metylotransferaz histonów – DZNep

zahamowania dioksygenaz w komórkach [43–45]. Trwające obecnie próby kliniczne z wykorzystaniem inhibitorów produktów zmutowanych genów IDH1 i IDH2 u chorych na AML przynoszą obiecujące rezultaty [46, 47].

Wśród przyczyn nasilenia stresu oksydacyjnego w AML należy wymienić epigenetyczne wyciszenie ekspresji genów dla białek antyoksydacyjnych, np. peroksyredoksyny IV w komórkach ostrej białaczki promielocytowej lub peroksyredoksyn I, II i V w pozostałych podtypach AML [48]. Peroksyredoksyny są białkami o małej masie cząsteczkowej katalizującymi redukcję nadtlenu wodoru. W AML opisano również częste przypadki zwiększonej ekspresji białka hamującego tioredoksynę – TXNIP (*thioredoxin interacting protein*) [40, 41]. System tioredoksyna/reduktaza tioredoksyny należy do jednych z najważniejszych układów chroniących przed wpływem stresu oksydacyjnego. Z drugiej jednak strony pojawiają się także doniesienia o represji TXNIP u pacjentów z AML, będącej mechanizmem adaptacyjnym, pozwalającym na przeżycie blastów białaczkowych narażonych na nasilony stres oksydacyjny. Odblokowanie transkrypcji TXNIP poprzez zastosowanie inhibitora metylotransferaz histonów – 3-deazaneplanocyny A (DZNep) powoduje zwiększone wytwarzanie ROS oraz apoptozę komórek ustalonych linii AML [49]. Do innych mechanizmów przystosowawczych wobec stresu oksydacyjnego należą m.in.: nasilone wytwarzanie glutationu, nadekpresja tioredoksyny, oksygenazy hemowej i katalazy – enzymu z grupy oksydoreduktaz katalizujący proces rozkładu nadtlenu wodoru do wody i tlenu [40, 41].

Terapia oparta na nasileniu stresu oksydacyjnego i zniesieniu mechanizmów adaptacyjnych okazała się bardzo skuteczną strategią w ostrej białaczkę promielocytowej. Trójtlenek arsenu wprowadzony do kliniki w 2008 roku znacznie poprawił rokowania pacjentów z tym podtypem białaczki. ATO indukuje stres oksydacyjny w blastach białaczkowych poprzez aktywację oksydazy

NADPH, zahamowanie tioredoksyny i deplecję peroksyredoksyny III [40, 41].

## Podsumowanie

Stres siateczki śródplazmatycznej oraz stres oksydacyjny zarówno biorą udział w procesie leukemogenezy, jak i nasilają mechanizmy adaptacyjne w blastach białaczkowych chroniące komórki przed apoptozą (Tab. I) Zahamowanie aktywności białek opiekuńczych siateczki lub białek inaktywujących reaktywne formy tlenu może stanowić ważny cel terapeutyczny w AML. W części przypadków AML odpowiedź na nieprawidłowo sfałdowane białka prawdopodobnie związana jest z patomechanizmem tej choroby – charakterystycznym zahamowaniem różnicowania blastów w dojrzałe neutrofile, co wynika z zablokowania translacji czynnika transkrypcyjnego CEBP $\alpha$  po związaniu jego mRNA przez białka opiekuńcze siateczki. W obliczu pojedynczych doniesień, że pacjenci z AML wykazujący aktywację szlaku UPR charakteryzują się odmiennym rokowaniem, istotne jest poznanie zjawisk, które zapoczątkowują stres siateczki w różnych podtypach AML i jakie implikacje kliniczne ma aktywacja szlaku odpowiedzi na nieprawidłowo pofałdowane białka w komórkach ostrej białaczki szpikowej.

## Konflikt interesu/Conflict of interest

Nie występuje.

## Finansowanie/Financial support

Źródła finansowania: badania mające na celu ocenę roli inhibitorów peroksyredoksyn, układu tioredoksyna/reduktaza tioredoksyny oraz białkowej izomerazy dwusiarczkowej

w komórkach nowotworowych zostały sfinansowane przez Narodowe Centrum Nauki (2013/10/E/NZ5/00778), Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego [IP2012048172, IP2011 038971] oraz środki przyznane w ramach projektu młodego badacza (1M19/PM11D/14).

## Etyka/Ethics

Treści przedstawione w artykule są zgodne z zasadami Deklaracji Helsińskiej, dyrektywami EU oraz ujednoliconymi wymaganiami dla czasopism biomedycznych.

## PIŚMIENNICTWO / REFERENCES

- [1] Douer D, Zickl LN, Schiffer CA, et al. All-trans retinoic acid and late relapses in acute promyelocytic leukemia: very long-term follow-up of the North American Intergroup Study I0129. *Leuk Res* 2013;37:795–801.
- [2] Zhang JW, Wang JY, Chen SJ, et al. Mechanisms of all-trans retinoic acid-induced differentiation of acute promyelocytic leukemia cells. *J Biosci* 2000;25:275–284.
- [3] Lang E, Grudic A, Pankiv S, et al. The arsenic-based cure of acute promyelocytic leukemia promotes cytoplasmic sequestration of PML and PML/RARA through inhibition of PML body recycling. *Blood* 2012;120:847–857.
- [4] Lo-Coco F, Cicconi L, Breccia M. Current standard treatment of adult acute promyelocytic leukaemia. *Br J Haematol* 2015.
- [5] Sanz MA, Lo-Coco F. Modern approaches to treating acute promyelocytic leukemia. *J Clin Oncol* 2011;29:495–503.
- [6] Burnett AK, Russell NH, Hills RK, et al. Arsenic trioxide and all-trans retinoic acid treatment for acute promyelocytic leukaemia in all risk groups (AML17): results of a randomised, controlled, phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2015;16:1295–1305.
- [7] Haefliger S, Klebig C, Schaubitzer K, et al. Protein disulfide isomerase blocks CEBPA translation and is up-regulated during the unfolded protein response in AML. *Blood* 2011;117:5931–5940.
- [8] Schardt JA, Eyholzer M, Timchenko NA, et al. Unfolded protein response suppresses CEBPA by induction of calreticulin in acute myeloid leukaemia. *J Cell Mol Med* 2010;14:1509–1519.
- [9] Paz-Priel I, Friedman A. C/EBPalpha dysregulation in AML and ALL. *Crit Rev Oncog* 2011;16:93–102.
- [10] Nakajima H. Role of transcription factors in differentiation and reprogramming of hematopoietic cells. *Keio J Med* 2011;60:47–55.
- [11] Cicconi L, Lo-Coco F. Current management of newly diagnosed acute promyelocytic leukemia. *Ann Oncol* 2016.
- [12] Kozutsumi Y, Segal M, Normington K, et al. The presence of malformed proteins in the endoplasmic reticulum signals the induction of glucose-regulated proteins. *Nature* 1988;332:462–464.
- [13] Walter P, Ron D. The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation. *Science* 2011;334:1081–1086.
- [14] Wang WA, Groenendyk J, Michalak M. Endoplasmic reticulum stress associated responses in cancer. *Biochim Biophys Acta* 2014.
- [15] Alemdehy MF, Erkeland SJ. MicroRNAs: key players of normal and malignant myelopoiesis. *Curr Opin Hematol* 2012;19:261–267.
- [16] Bu Y, Diehl JA. PERK Integrates Oncogenic Signaling and Cell Survival During Cancer Development. *J Cell Physiol* 2016.
- [17] Manie SN, Lebeau J, Chevet E. Cellular mechanisms of endoplasmic reticulum stress signaling in health and disease. 3. Orchestrating the unfolded protein response in oncogenesis: an update. *Am J Physiol Cell Physiol* 2014;307:C901–C907.
- [18] Schardt JA, Weber D, Eyholzer M, et al. Activation of the unfolded protein response is associated with favorable prognosis in acute myeloid leukemia. *Clin Cancer Res* 2009;15:3834–3841.
- [19] Lai WL, Wong NS. The PERK/eIF2 alpha signaling pathway of Unfolded Protein Response is essential for N-(4-hydroxyphenyl)retinamide (4HPR)-induced cytotoxicity in cancer cells. *Exp Cell Res* 2008;314:1667–1682.
- [20] Lin JJ, Hsu HY, Yang JS, et al. Molecular evidence of anti-leukemia activity of gypenosides on human myeloid leukemia HL-60 cells in vitro and in vivo using a HL-60 cells murine xenograft model. *Phytomedicine* 2011;18:1075–1085.
- [21] Rahmani M, Davis EM, Crabtree TR, et al. The kinase inhibitor sorafenib induces cell death through a process involving induction of endoplasmic reticulum stress. *Mol Cell Biol* 2007;27:5499–5513.
- [22] Liu CY, Kaufman RJ. The unfolded protein response. *J Cell Sci* 2003;116:1861–1862.
- [23] Davenport EL, Morgan GJ, Davies FE. Untangling the unfolded protein response. *Cell Cycle* 2008;7:865–869.
- [24] Khan MM, Nomura T, Chiba T, et al. The fusion oncoprotein PML-RARalpha induces endoplasmic reticulum (ER)-associated degradation of N-CoR and ER stress. *J Biol Chem* 2004;279:11814–11824.
- [25] Deltour S, Guerdardel C, Leprince D. Recruitment of SMRT/N-CoR-mSin3A-HDAC-repressing complexes is not a general mechanism for BTB/POZ transcriptional repressors: the case of HIC-1 and gammaFPB-B. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:14831–14836.
- [26] Nin DS, Kok WK, Li F, et al. Role of misfolded N-CoR mediated transcriptional deregulation of Flt3 in acute monocytic leukemia (AML)-M5 subtype. *PLoS One* 2012;7:e34501.
- [27] Shanmugam R, Gade P, Wilson-Weekes A, et al. A noncanonical Flt3ITD/NF-kappaB signaling pathway represses DAPK1 in acute myeloid leukemia. *Clin Cancer Res* 2012;18:360–369.
- [28] Kaufman RJ. Orchestrating the unfolded protein response in health and disease. *J Clin Invest* 2002;110:1389–1398.
- [29] Storniolo A, Raciti M, Cucina A, et al. Quercetin affects Hsp70/IRE1alpha mediated protection from death induced by endoplasmic reticulum stress. *Oxid Med Cell Longev* 2015;2015:645157.
- [30] Szegezdi E, Logue SE, Gorman AM, et al. Mediators of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *EMBO Rep* 2006;7:880–885.
- [31] Bateman DA. Unfolded Protein Response (UPR): Cellular control for our errors in life. *Hypothesis* 2006;4.
- [32] Drexler HC. Synergistic apoptosis induction in leukemic cells by the phosphatase inhibitor salubrinal and proteasome inhibitors. *PLoS One* 2009;4:e4161.
- [33] Dombret H. Gene mutation and AML pathogenesis. *Blood* 2011;118:5366–5367.
- [34] Murati A, Brecqueville M, Devillier R, et al. Myeloid malignancies: mutations, models and management. *BMC Cancer* 2012;12:304.
- [35] Naoe T, Kiyoi H. Gene mutations of acute myeloid leukemia in the genome era. *Int J Hematol* 2013;97:165–174.
- [36] Reilly JT. Pathogenesis of acute myeloid leukaemia and inv (16)(p13;q22): a paradigm for understanding leukaemogenesis? *Br J Haematol* 2005;128:18–34.
- [37] Santana-Lemos BA, de Lima Lange AP, de Lira Benicio MT, et al. The CEBPA gene is down-regulated in acute promyelocytic leukemia and its upstream promoter, but

- not the core promoter, is highly methylated. *Haematologica* 2011;96:617-620.
- [38] Hackanson B, Bennett KL, Brena RM, et al. Epigenetic modification of CCAAT/enhancer binding protein alpha expression in acute myeloid leukemia. *Cancer Res* 2008;68:3142-3151.
- [39] de The H, Chen Z. Acute promyelocytic leukaemia: novel insights into the mechanisms of cure. *Nat Rev Cancer* 2010;10:775-783.
- [40] Irwin ME, Rivera-Del Valle N, Chandra J. Redox control of leukemia: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities. *Antioxid Redox Signal* 2013;18:1349-1383.
- [41] Hole PS, Darley RL, Tonks A. Do reactive oxygen species play a role in myeloid leukemias? *Blood* 2011;117:5816-5826.
- [42] Rouault-Pierre K, Lopez-Onieva L, Foster K, et al. HIF-2alpha protects human hematopoietic stem/progenitors and acute myeloid leukemic cells from apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress. *Cell Stem Cell* 2013; 13:549-563.
- [43] Rakheja D, Konoplev S, Medeiros LJ, et al. IDH mutations in acute myeloid leukemia. *Hum Pathol* 2012;43:1541-1551.
- [44] Marcucci G, Maharry K, Wu YZ, et al. IDH1 and IDH2 gene mutations identify novel molecular subsets within de novo cytogenetically normal acute myeloid leukemia: a Cancer and Leukemia Group B study. *J Clin Oncol* 2010;28: 2348-2355.
- [45] Ward PS, Patel J, Wise DR, et al. The common feature of leukemia-associated IDH1 and IDH2 mutations is a neomorphic enzyme activity converting alpha-ketoglutarate to 2-hydroxyglutarate. *Cancer Cell* 2010;17:225-234.
- [46] Fathi AT, Wander SA, Faramand R, et al. Biochemical, Epigenetic, and Metabolic Approaches to Target IDH Mutations in Acute Myeloid Leukemia. *Semin Hematol* 2015;52:165-171.
- [47] Stein EM. IDH2 inhibition in AML: Finally progress? *Best Pract Res Clin Haematol* 2015;28:112-115.
- [48] Palande KK, Beekman R, van der Meeren LE, et al. The antioxidant protein peroxiredoxin 4 is epigenetically down regulated in acute promyelocytic leukemia. *PLoS One* 2011;6:e16340.
- [49] Zhou J, Bi C, Cheong LL, et al. The histone methyltransferase inhibitor, DZNep, up-regulates TXNIP, increases ROS production, and targets leukemia cells in AML. *Blood* 2011;118:2830-2839.