Abstrakt

Nehodgkinské lymfomy (NHL) jsou skupinou heterogenních lymfoproliferativních malignit pocházejících z B/T lymfocytů nebo NK buněk. Deregulace signální dráhy fosfatidyl-inositol-3-kináza – protein-kináza B/AKT (PI3K-AKT) hraje důležitou roli v patogenezi, chemorezistenci a progresi řady B-NHL. Molekulární mechanismy vedoucí k aberantní aktivaci PI3K-AKT dráhy jsou odlišné u různých podtypů B-NHL.

Lymfom z plášťových buněk (MCL) je B buněčný agresivní Nehodgkinský lymfom charakterizovaný chromozomální translokací (11;14) a přítomností mnoha rekurentních molekulárních a cytogenetických změn, včetně zisku/amplifikaci genu *PIK3CA*, kódujícího p110α katalytickou podjednotku fosfatidyl-inositol-3-kinázy (PI3K), nebo ztráta funkce fosfatázy a homologu tenzinu (PTEN), negativního regulátoru PI3K.

Cílem této studie byla komplexní analýza vlivu výše uvedených aberací genů *PIK3CA* a *PTEN* na biologii a lékovou rezistenci MCL a to pomocí buněčných linií MCL (MINO, JEKO-1, UPF1H, UPF19U a Z138) s transgenní (over)expresí genu *PIK3CA* (*PIK3CA* UP) a knockout/ knockdown genem *PTEN* (*PTEN* KO)/(*PTEN* KD), napodobující celkovou a částečnou ztrátu proteinu PTEN . Pro studium dopadu studovaných aberací na přežití MCL buněk dané signalizací z BCR byly z buněčných linií *PIK3CA* UP, *PTEN* KO, a *PTEN* KD odvozeny buňky s dalším knockoutem B-buněčného receptoru. Exprese a aktivita fosforylované proteinkinázy B (AKT) byla analyzována pomocí Western blotting a pomocí metody Förster resonance energy transfer (FRET). Energo-metabolické dráhy byly zkoumány pomocí Seahorse analyzátoru a pomocí hypoxického inkubátoru. Ke stanovení citlivosti/rezistence buněčných linií *PIK3CA* UP, *PTEN* KO, a *PTEN* KD k léčbě byl použit panel různých selektivních inhibitorů izoformy PI3K, inhibitor AKT, inhibitor Bruton tyrozinkinázy (BTK), inhibitor glykolýzy a BH3 mimetika.

Transgenní nadměrná exprese genu *PIK3CA* nebyla spojena s patrnými změnami ve fosforylaci nebo aktivaci AKT. Navíc citlivost buněčných linií *PIK3CA* UP na panel inhibitorů PI3K nebo ibrutinib (inhibitor BTK) zůstala prakticky nezměněna. Je zajímavé, že dvě ze 4 testovaných buněčných linií byly odolnější vůči venetoclaxu (inhibitor BCL2), který se používá při léčbě recidivujícího/refrakterního (R/R) MCL, a vůči S63845 (inhibitor MCL1). Zvýšená

exprese genu *PIK3CA* snížila závislost testovaných buněčných linií MCL na přežití, dané signalizací z BCR, snížila hladiny oxidativní fosforylace (OXPHOS), zvýšila rezistenci na inhibitor glykolýzy, 2-deoxyglukózu (2-DG), a zrychlila rychlost růstu nádoru in vivo. Přesné molekulární mechanismy, které jsou příčinou těchto pozorování, zůstávají nerozpoznané, nicméně nezměněná aktivita a nezměněný stav fosforylace AKT naznačují, že důsledky zisku funkce genu *PIK3CA* u MCL jsou zprostředkovány nezávisle na AKT. Ztráta PTEN byla spojena s výrazným fenotypem *PTEN* KO buněk, který byl manifestován hyperfosforylací a nadměrnou aktivací proteinu AKT, zvýšenou rezistencí na většinu testovaných inhibitorů PI3K, ibrutinib (inhibitor BTK) a venetoclax (inhibitor BCL2), zvýšenou citlivostí na inhibitor BCL-XL, zvýšenou glykolýzou spojenou se zvýšenou rezistencí na 2-DG (inhibitor glykolýzy), zvýšeným rychlost růstu nádoru in vivo a pozoruhodně sníženou závislostí na přežití, dané signalizací z BCR. Částečná ztráta PTEN měla podobnou, ale méně výraznou manifestaci ve srovnání s totální ztrátou PTEN, kde buňky *PTEN* KD vykázaly nadměrnou aktivaci proteinu AKT, zvýšenou rezistenci na copanlisib (inhibitor pan-PI3K), ibrutinib (inhibitor BTK) a venetoclax (inhibitor BCL2), nezměněnou citlivost na BCL – XL inhibitor a zvýšená odolnost vůči 2-DG.

Lze shrnout, že zisk funkce genu *PIK3CA* a ztráta funkce proteinu PTEN vedly k různým fenotypům, nicméně u obou došlo ke snížení závislosti MCL buněk na přežití, dané signalizací z BCR, a zvýšení přežití MCL buněk při inhibici BCL2, inhibici glykolýzy a hypoxii.