

Contents lists available at [SciVerse ScienceDirect](#)

Acta Haematologica Polonica

journal homepage: www.elsevier.com/locate/achaem

Praca poglądowa/Review

Cereblon: molekularny cel leków immunomodulujących



Cereblon: A molecular target of immunomodulatory drugs

Anna Stępień¹, Krzysztof Jamroziak^{2,*}

¹Pracownia Immunologii Klinicznej, Transplantacyjnej i Genetyki WSS im. Kopernika w Łodzi, Polska

²Klinika i Katedra Hematologii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, Polska

INFORMACJE O ARTYKULE

Historia artykułu:

Otrzymano: 06.08.2013

Zaakceptowano: 08.08.2013

Dostępne online: 13.08.2013

Słowa kluczowe:

- cereblon
- CRBN
- talidomid
- lenalidomid
- pomalidomid
- szpiczak plazmocytowy

Keywords:

- Cereblon
- CRBN
- Thalidomide
- Lenalidomide
- Pomalidomide
- Multiple myeloma

ABSTRACT

Molecular background of complex biological effects of immunomodulatory drugs (IMiDs) thalidomide, lenalidomide and pomalidomide has been largely unknown. Recently, a role of cereblon (CRBN) as a common molecular target for IMiDs and protein crucial for teratogenicity of thalidomide, as well as anti-proliferative, anti-angiogenic and immunomodulatory effects of IMiDs, has been elucidated. In this paper we review published pre-clinical and clinical data on the significance of CRBN expression. Moreover, we discuss perspectives on clinical application of evaluation of CRBN for individualization and monitoring of IMiDs-based therapy.

© 2013 Polskie Towarzystwo Hematologów i Transfuzjologów, Instytut Hematologii i Transfuzjologii. Published by Elsevier Urban & Partner Sp. z o.o. All rights reserved.

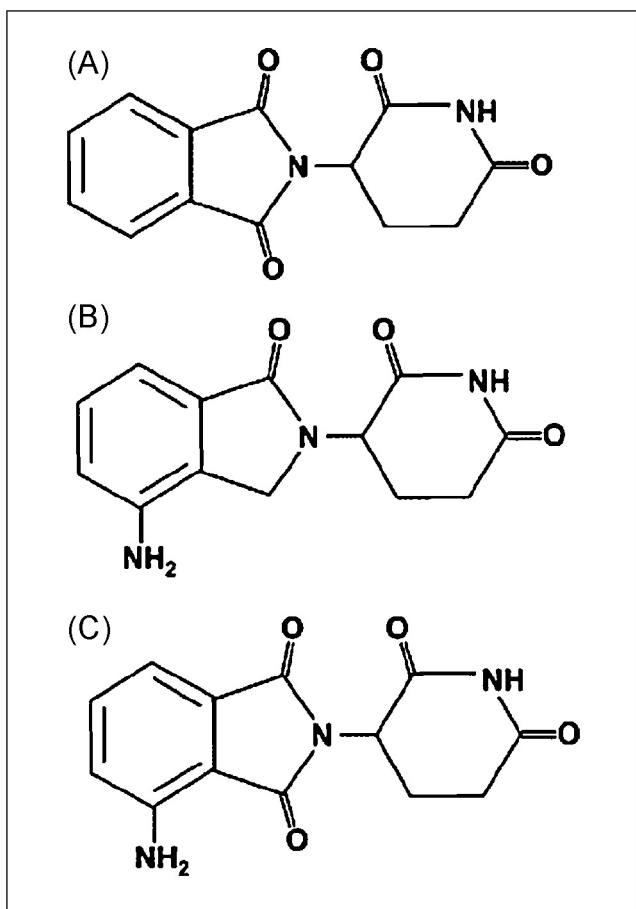
Leki immunomodulujące

Mianem leków immunomodulujących (*immunomodulatory drugs*; IMiDs) określa się grupę podobnych pod względem

struktury, ale częściowo odmiennych funkcjonalnie, cząsteczek, których prekursorem był talidomid. Oprócz tego leku do IMiDs stosowanych w praktyce klinicznej zalicza się obecnie lenalidomid oraz pomalidomid, ostatnio zarejestrowany przez Amerykańską Agencję ds. Żywności i Leków

* Adres do korespondencji: Klinika i Katedra Hematologii Uniwersytetu Medycznego, ul. Ciołkowskiego 2, 93-510 Łódź, Polska. Tel.: +48 42 689 51 91; fax: +48 42 689 51 92.

Adres email: krzysztof.jamroziak@wp.pl (K. Jamroziak).



Ryc. 1 – Struktura chemiczna zarejestrowanych leków immunomodulujących: a) talidomidu, b) lenalidomidu i c) pomalidomidu

Fig. 1 – The chemical structure of registered immunomodulatory drugs: a) thalidomide, b) lenalidomide and c) pomalidomide

(Food and Drug Administration; FDA). Różnice i podobieństwa budowy chemicznej pomiędzy poszczególnymi IMiDs przedstawia rycina 1.

Talidomid, pierwszy przedstawiciel IMiDs, został zsyntetyzowany we wczesnych latach pięćdziesiątych XX wieku. Lek ten został wprowadzony do sprzedaży jako środek nasenny i uspokajający, szczególnie zalecany kobietom ciężarnym ze względu na dodatkowe działanie antyemetogenne [1]. Niestety, wkrótce pojawiły się doniesienia o występowaniu wrodzonych anomalii u dzieci matek, które stosowały talidomid w pierwszym tryestrze ciąży. Teratogenne działanie talidomidu objawiało się zespołem różnych wad wrodzonych, wśród których najbardziej charakterystyczne były zniekształcenia kończyn o typie fokomelii i amelii, chociaż obserwowano szereg innych zaburzeń [1]. Konsekwencją powszechnego stosowania talidomidu przez kobiety ciężarne w ponad 40 krajach w okresie 1957–1962 r. była prawdopodobnie największa tragedia w historii farmakologii, która dla wielu spośród urodzonych co najmniej 10 000 tzw. dzieci talidomidowych trwa do dzisiaj [1]. Chociaż w następnych dekadach zjawisku temu poświęcono setki prac badawczych i opracowano

dziesiątki teorii naukowych, aż do niedawna mechanizm molekularny indukowania wad płodu przez talidomid pozostawał całkowicie niewyjaśniony.

Pomimo wycofania talidomidu z rynku w latach 1961–62, badania nad tym lekiem były kontynuowane. Już w 1965 roku przypadkowo stwierdzono wybitną aktywność talidomidu w leczeniu trądzowego rumienia guzowatego stanowiącego powikłanie trądu (*erythema nodosum leprosum*) [2]. Następnie, w latach dziewięćdziesiątych XX wieku, lek był również stosowany w zespole przewlekłego zmęczenia w przebiegu nabytego zespołu niedoboru odporności (AIDS). Jednak prawdziwy renesans talidomidu nastąpił w związku ze stwierdzeniem jego skuteczności u chorych na szpiczaka plazmocytozy (SzP) opornego na inne terapie [3]. W następstwie tego odkrycia talidomid, a następnie także lenalidomid, stały się jednym z głównych filarów nowoczesnej terapii SzP oraz przyczyniły się do znacznej poprawy rokowania chorych z tym rozpoznaniem. Aktualnie terapia SzP i pokrewnych chorób rozrostowych plazmocytozy (amyloidozą AL, zespół POEMS) jest wciąż dominującym wskazaniem dla IMiDs, jednak leki z tej grupy są również testowane w wielu innych chorobach [4].

Mechanizm działania IMiDs

Po analizie wielokierunkowych efektów biologicznych IMiDs, które obejmują aktywność antyproliferacyjną, antyangiogeną i immunomodulacyjną, mechanizm działania tych leków wydaje się być bardzo złożony. Ponadto spektrum obserwowanych efektów różni się częściowo pomiędzy poszczególnymi lekami z tej grupy. Jak wykazano w wielu badaniach przedklinicznych, podstawą skutecznego działania przeciwnowotworowego IMiDs jest regulacja wydzielania przez komórki nowotworu, komórki mikrośrodowiska oraz komórki efektorowe układu immunologicznego wielu cytokin, cząstek adhezyjnych oraz receptorów powierzchniowych [5].

Początkowo najwięcej badań na temat działania przeciwnowotworowego u chorych na SzP dotyczyło talidomidu. Co interesujące, lek ten jest mieszaniną dwóch enancjomerów, które mogą różnić się właściwościami terapeutycznymi i toksycznością, jednak ulegają szybkiej racemizacji w warunkach *in vivo* [1]. Wykazano, że głównym czynnikiem odpowiedzialnym za działania przeciwnowotworowe i przeciwzapalne talidomidu jest zdolność do inhibicji czynnika martwicy nowotworów (Tumour Necrosis Factor; TNF). Produkcja TNF jest hamowana poprzez zwiększoną degradację mRNA dla TNF oraz aktywację α -glikoprotein [6, 7]. Oprócz aktywności anti-TNF talidomid hamuje również produkcję interleukin: IL-6, IL-10 i IL-12, natomiast zwiększa wydzielanie IL-4 i IL-5 [5]. Dodatkowo, talidomid moduluje aktywność limfocytów T poprzez łączenie się z cząsteczką CD28, co bezpośrednio wpływa na ich aktywację. Zjawisko to stymuluje proliferację limfocytów T oraz powoduje zwiększenie ilości uwalnianych cytokin, w szczególności interferonu gamma (INF- γ). Stymulacja wydzielania IL-2 przez talidomid aktywuje cytotoksyczne limfocyty TCD8+ oraz limfocyty NK [8]. Dodatkowo, działanie przeciwnowotworowe w SzP objawia się poprzez hamowanie ekspresji międzykomórkowych i naczyniowych cząstek adhezyjnych ICAM i VCAM [9] oraz

toksyczne działanie na DNA komórek nowotworowych poprzez uwalnianie reaktywnych form tlenu (*Reactive Oxygen Species*; ROS) [10].

Celem syntezy nowych analogów talidomidu było zwiększenie aktywności przeciwszpizakowej oraz redukcja działań niepożądanych. Pierwsza z tych cząsteczek, lenalidomid, charakteryzuje się 50 tysięcy razy silniejszą zdolnością do inhibicji TNF w porównaniu z talidomidem [5]. Wpływa on na zwiększenie cytotoxycywności limfocytów, a także działa przeciwwzapalnie poprzez stymulację produkcji IL-10 i hamowanie wydzielania IL-1, IL-6 oraz IL-12 [5]. Ponadto, odmiennie od talidomidu, lenalidomid bezpośrednio powoduje apoptozę komórek SzP na drodze aktywacji kaspazy 8 oraz uwrażliwia na indukcję apoptozy zależną od szlaku związanego z receptorem FAS [5, 11]. Lenalidomid charakteryzuje się zdolnością do zatrzymywania cyklu komórkowego poprzez indukcję ekspresji genów supresorowych, takich jak p21, p27 oraz EGR [11]. Stwierdzono także hamujący wpływ lenalidomidu na ekspresję białek z rodziny inhibitorów apoptozy: cIAP oraz FLIP. Efekt ten jest osiągnięty pośrednio przez zahamowanie ekspresji czynnika transkrypcyjnego NFκB, działającego antyapoptotycznie [12]. Pomalidomid jest trzecim zarejestrowanym lekiem z grupy IMiDs. Zakończone oraz nadal trwające badania kliniczne pomalidomidu u chorych na SzP pokazują, że jest on zdolny do wywołania głębokich i długotrwałych odpowiedzi u ciężko przeleczonych pacjentów, również opornych na talidomid lub lenalidomid [13]. Należy podkreślić, że chociaż stosunkowo dobrze scharakteryzowano powyższe efekty biologiczne związane ze stosowaniem IMiDs, szczegółowy mechanizm molekularny zachodzący w komórce docelowej pozostawał do niedawna całkowicie nieznanym.

Odkrycie roli cereblonu

Pomimo początkowego wycofania talidomidu z terapii, nadal intensywnie prowadzono badania nad jego właściwościami. Główny wysiłek badaczy był skupiony na próbach wyjaśnienia mechanizmu działania teratogennego leku. Podczas ponad 50 lat badań opracowano ponad 30 hipotez tłumaczących związek talidomidu z występowaniem zaburzeń formowania się zawiązków kończyn [1]. Wczesne teorie dotyczyły, między innymi, uszkodzeń komórkowych szlaków sygnałowych poprzez interkalację talidomidu pomiędzy zasady azotowe DNA, udział w acetylacji dużych cząsteczek lub wpływ na zaburzenia metabolizmu glutaminianu i kwasu foliowego. Jednak żadna z tych hipotez nie została potwierdzona w badaniach doświadczalnych.

Duże znaczenie uzyskały natomiast teorie działania antyangiogennego oraz stresu oksydacyjnego wywołanych przez talidomid. W 1999 roku Parman i wsp. [10] zasugerowali, że zmiany teratogenne indukowane przez talidomid są spowodowane przez stres oksydacyjny. Doświadczenia przeprowadzone na królikach ujawniły, że talidomid jest odpowiedzialny za produkcję ROS powodujących oksydację nici DNA oraz akumulację 8-hydroksy-2-deoksyguanozyny. Inne badanie wykazało, że ROS powstające w komórce po podaniu talidomidu wywołują apoptozę, działając prawdopodobnie poprzez hamowanie ścieżek sygnałowych kinazy Akt, wybranych

czynników wzrostu fibroblastów (*Fibroblast Growth Factor*; FGF) i białek z rodziny Wnt [14]. Zasugerowano, że te mechanizmy prowadzą do zahamowania proliferacji oraz nadmiernej apoptozy komórek, co skutkuje zaburzeniami wzrostu i rozwoju kończyn o typie fokomelii i amelii [14]. Hipoteza stresu oksydacyjnego nie tłumaczyła jednak lokalizacji defektów rozwojowych w kończynach. Równie istotna teoria przypisała powstawanie wad wrodzonych właściwościom antyangiogennym talidomidu. D'Amato i wsp. [15] stwierdzili, że talidomid hamuje proces tworzenia nowych naczyń krwionośnych, które są niezbędne do prawidłowego rozwoju kończyn płodu. Wykazano doświadczalnie, że talidomid jest zdolny do zahamowania neowaskularyzacji indukowanej przez zasadowy czynnik wzrostu fibroblastów (bFGF) oraz śródbłonkowy czynnik wzrostu (VEGF) [16]. Teorie te nie tłumaczyły jednak, jakie jest molekularne podłoże efektów wywołanych przez talidomid.

Przełomem w poznawaniu mechanizmu powstawania wad wrodzonych zależnych od talidomidu były wyniki badań zespołu japońskich naukowców pod kierownictwem Takumi Ito [17]. Dzięki zastosowaniu nowoczesnych technik oczyszczania białek badaczom tym udało się scharakteryzować molekularny cel talidomidu, czyli białko, do którego lek przyłącza się w komórkach docelowych. Eksperyment polegał na inkubacji specjalnie zaprojektowanych kulek opłaszczonych talidomidem z ekstraktem komórek linii He-La. Następnie białka, które przyłączyły się do talidomidu, zostały odseparowane magnetycznie, oczyszczone i poddane analizie spektrometrii mas. W ten sposób odkryto, że cząsteczką, z którą talidomid łączy się bezpośrednio, jest stosunkowo mało znane białko o nazwie cereblon (CRBN). Co niezwykle ważne, dzięki badaniom na modelu zwierzęcym (ryba danio pręgowany – *Danio reio*) potwierdzono, że wiązanie CRBN jest niezbędnym etapem do wywołania zmian teratogennych po podaniu talidomidu [17]. W tym celu wykorzystano oligonukleotydową technikę wyciszania genów, dzięki której osiągnięto znaczny spadek ekspresji rybiego genu kodującego zCrbn, białko, które jest w około 70% homologiczne do ludzkiego CRBN i również wiąże talidomid. Wynikiem tego eksperymentu było potwierdzenie, że wyciszenie genu kodującego CRBN powoduje tożsame efekty z podaniem talidomidu, czyli hamuje rozwój płetw piersiowych i naczyń w obrębie uszu oraz powoduje spadek ekspresji czynnika wzrostu fibroblastów-8 (FGF-8) w zawiązkach płetw u ryb *Danio reio*. Talidomid powoduje więc pośrednio spadek ekspresji FGF-8, który, wraz z czynnikiem FGF-10 pozostającym z nim w dodatnim sprzężeniu regulacyjnym, jest kluczowym czynnikiem wzrostowym kończyn [17].

W kolejnej, niezwykle ważnej pracy dokonano kluczowego odkrycia z punktu widzenia terapeutycznego zastosowania IMiDs [18]. Wykazano mianowicie, że wiązanie CRBN jest niezbędnym warunkiem nie tylko dla teratogenności talidomidu, ale także dla bezpośredniej aktywności przeciwnowotworowej lenalidomidu i pomalidomidu [18]. Ponadto, wykazano również, że jednym z białek biorących udział w szlaku molekularnym inicjowanym przez wiązanie IMiDs z CRBN jest czynnik regulatorowy interferonu-4, (*Interferon Regulatory Factor-4*; IRF4), który jest niezbędny dla przeżycia komórek SzP i którego rola prognostyczna w SzP była już wcześniej sugerowana [18]. Co istotne, w innym badaniu stwierdzono, że wiązanie CRBN jest konieczne nie tylko do

aktywności antyproliferacyjnej, ale również do działania immunomodulującego IMiDs [19].

Fizjologiczne funkcje cereblonu

Przed publikacją pracy Ito i wsp. [17] CRBN nie budził zainteresowania onkologów, jednak wcześniej znana już była pewna rola tego białka w patologii człowieka. Dotyczyła ona związku mutacji genu CRBN z występowaniem autosomalnej recesywnej formy łagodnego upośledzenia umysłowego [20]. Mutacja ta polega na pojawieniu się w sekwencji kodonu „stop” i przedwczesnego zakończenia translacji, co powoduje powstanie nieprawidłowego białka CRBN. Efektem tego jest wystąpienie zaburzeń pamięci i zdolności uczenia się określane jako upośledzenie umysłowe [20].

Cereblon jest białkiem o masie cząsteczkowej około 51 kDa zbudowanym z 442 aminokwasów. Białko to jest kodowane u człowieka przez gen CRBN zlokalizowany na chromosomie 3 (locus3p26.2), zawierający 11 eksonów, które stanowią odcinek o długości ponad 30 tysięcy par zasad [21]. Cechą charakterystyczną CRBN są domeny zlokalizowane na końcu N-terminalnym, w tym ATP-zależna domena Lon odpowiedzialna za interakcje z innymi białkami oraz specyficzne miejsca fosforylacji kinazy kazeinowej II, fosforylacji kinazy C, glikozylacji N-końcowej oraz mirystylacji. Region C-terminalny jest najbardziej konserwatywnym miejscem białka CRBN, jednak nie stwierdzono homologii pomiędzy jego sekwencją, a innymi znanymi domenami czynnościowymi. Ekspresja CRBN jest wykrywana głównie w cytoplazmie i jądrze komórek śledziony, wątroby, trzustki, nerek, jelit, mózgu oraz w leukocytach obwodowych [22]. Co interesujące, wykazano, że istnieje przynajmniej 6 izoform składowania mRNA (*splicing*) dla CRBN. Transkrypty CRBN-002, CRBN-003 i CRBN-005 zawierają w swej sekwencji otwarte ramki odczytu (*Open Reading Frames*; ORFs), czyli mogą kodować różne warianty białka [23].

Fizjologiczna rola CRBN została tylko częściowo wyjaśniona. Ze względu na związek mutacji CRBN z występowaniem łagodnej formy upośledzenia umysłowego poszukiwano, między innymi, czynnościowego związku CRBN z procesami uczenia się i pamięci [21]. Stwierdzono, że CRBN łączy się z podjednostką α białka wiążącego kanał potasowy aktywowany jonami wapnia (*Large-conductance Ca²⁺ activated potassium channel alpha-subunit binding protein*) [24]. CRBN kontroluje ilość tych kanałów w błonie poprzez zapobieganie formowaniu się tetramerów oraz utrzymywanie ich w retikulum endoplazmatycznym, co może wpływać na procesy nerwowe [24]. CRBN odgrywa również rolę w kontroli ilości kanałów chlorkowych, które biorą udział w regulacji objętości komórek oraz zachowaniu potencjału czynnościowego neuronów [25].

Oprócz znaczącej roli odgrywanej w tkance neuronalnej, CRBN bierze również udział w kontroli ilości energii w komórce poprzez łączenie się z kinazą białkową aktywowaną AMP (*AMP-activated protein kinase*; AMPK), której jest inhibitorem [26]. AMPK jest białkiem wrażliwym na zmiany w równowadze energetycznej komórki: podczas dużego wysiłku i spadku poziomu ATP w komórce spowalnia procesy anaboliczne, tj. syntezę cholesterolu czy uwalnianie

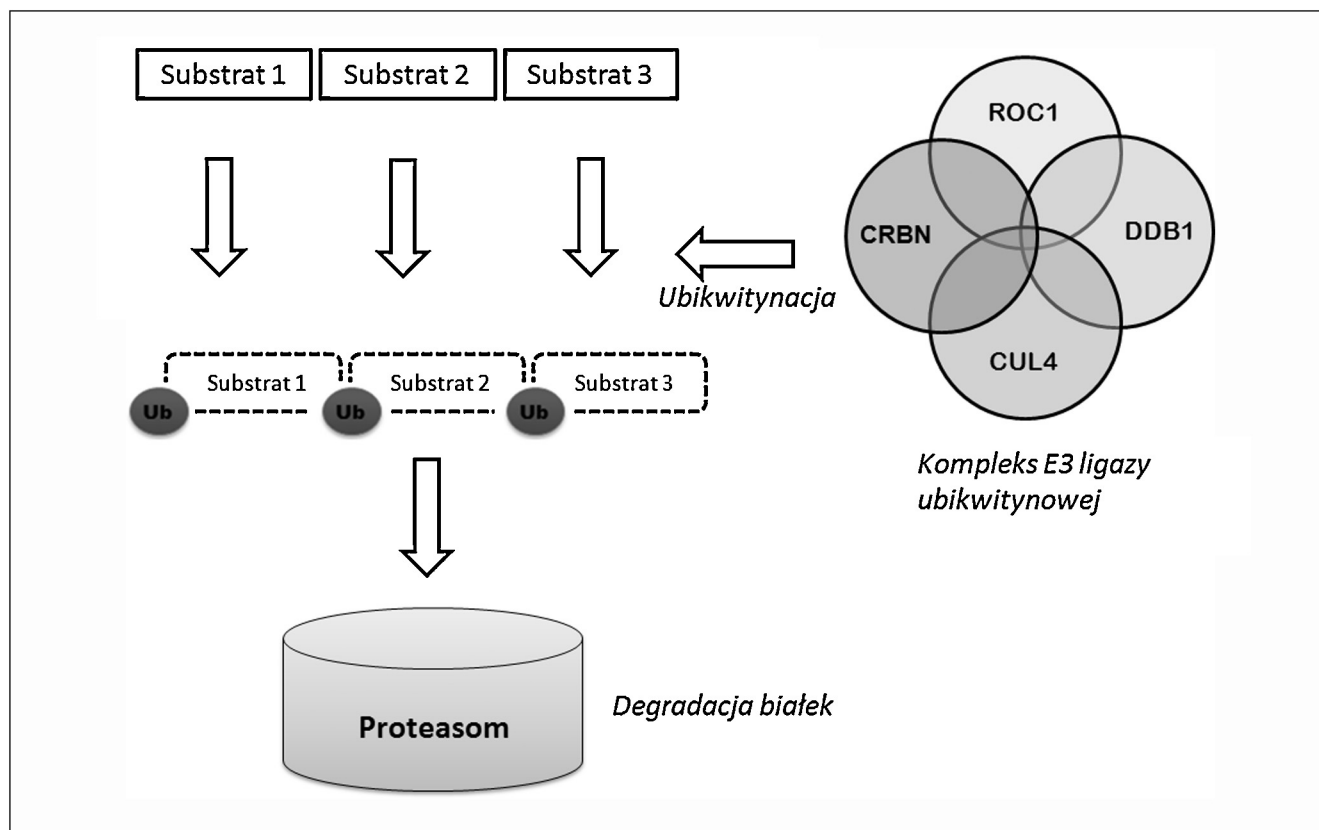
insuliny z komórek beta trzustki, oraz przyspiesza procesy kataboliczne, tj. oksydację kwasów tłuszczowych w wątrobie czy mięśniach szkieletowych, co pozwala na przywrócenie prawidłowego poziomu ATP. Negatywny wpływ regulacyjny CRBN na AMPK udowodniono, analizując zachowanie myszy pozbawionych genu CRBN w mechanizmie *knock-out* genowego w zależności od zawartości kwasów tłuszczowych w diecie. Badania te sugerują, że CRBN może również odgrywać pewną rolę w chorobach metabolicznych [27].

Jednak obecnie najbardziej udokumentowana i interesująca wydaje się rola CRBN w regulacji procesów degradacji białek w komórce, w tym szczególnie ubikwitynacji i aktywności proteasomów. Z punktu widzenia molekularnego mechanizmu działania IMiDs najważniejsze jest funkcjonowanie CRBN jako części kompleksu E3 ligazy ubikwitynowej, który tworzy wraz z białkami DDB1 (*Damaged DNA Binding protein 1*), Cullin-4 (CUL4) oraz Roc1 [28] (Ryc. 2). Kompleks ten jest odpowiedzialny za regulację procesów degradacji białek, naprawy uszkodzonego DNA, replikacji i transkrypcji. Na podstawie dotychczasowych badań wydaje się, że CRBN może funkcjonować jako czynnik rekrutujący białka do procesu ubikwitynacji. Wykazano, że talidomid, wiążąc się z CRBN, powoduje zahamowanie kompleksu E3 ligazy ubikwitynowej (Ryc. 3). W konsekwencji dochodzi do gromadzenia się jego nieznanymi substratów białkowych, które powinny ulec ubikwitynacji i następnie degradacji przez proteasom [14, 18]. Wydaje się więc, że spektrum działania IMiDs, zarówno przeciwnowotworowego, immunomodulującego jak i teratogennego, wynika z nagromadzenia nieznanymi substratów białkowych w komórce, które następnie aktywują różne szlaki sygnałowe [18]. Zapewne za poszczególne efekty biologiczne odpowiedzialne są inne substraty, jednak wymaga to dalszych badań. Ponadto, nie można wykluczyć, że poszczególne IMiDs mają dodatkowe receptory poza CRBN, które odpowiedzialne są za ich różne właściwości [29]. Ostatnio w doświadczeniach na komórkach ludzkiej linii komórkowej nerwiaka płodowego wykazano również, że ekspresja CRBN hamuje aktywność proteasomów [30]. Podjednostka $\beta 7$ kompleksu 20S będąca częścią składową proteasomowej podjednostki β PSMB4, została zidentyfikowana jako białko łączące się bezpośrednio z CRBN [30]. To odkrycie wskazuje, że CRBN bierze udział w bezpośredniej regulacji aktywności proteasomów [30].

Znaczenie cereblonu w terapii IMiDs

Odkrycie roli, jaką pełni CRBN, pozwala przypuszczać, że poziom jego ekspresji może mieć kluczowe znaczenie w odpowiedzi na leczenie IMiDs. Uważa się, że niska ekspresja tego białka jest przyczyną występowania oporności na talidomid, lenalidomid i pomalidomid. Przykładowo, badania prowadzone przez Zhu i wsp. [18] wykazały, że ludzkie linie komórkowe SzP odporne na lenalidomid lub pomalidomid mają mniejszy poziom ekspresji CRBN niż wrażliwe na IMiDs linie komórkowe OPM2 czy MM1.S [19].

Podobne wyniki sugerują więc, że ekspresja CRBN może być potencjalnym markerem prognostycznym w trakcie terapii IMiDs. Ten problem oceniono następnie w retrospektywnych badaniach klinicznych. Heintel i wsp. [31]



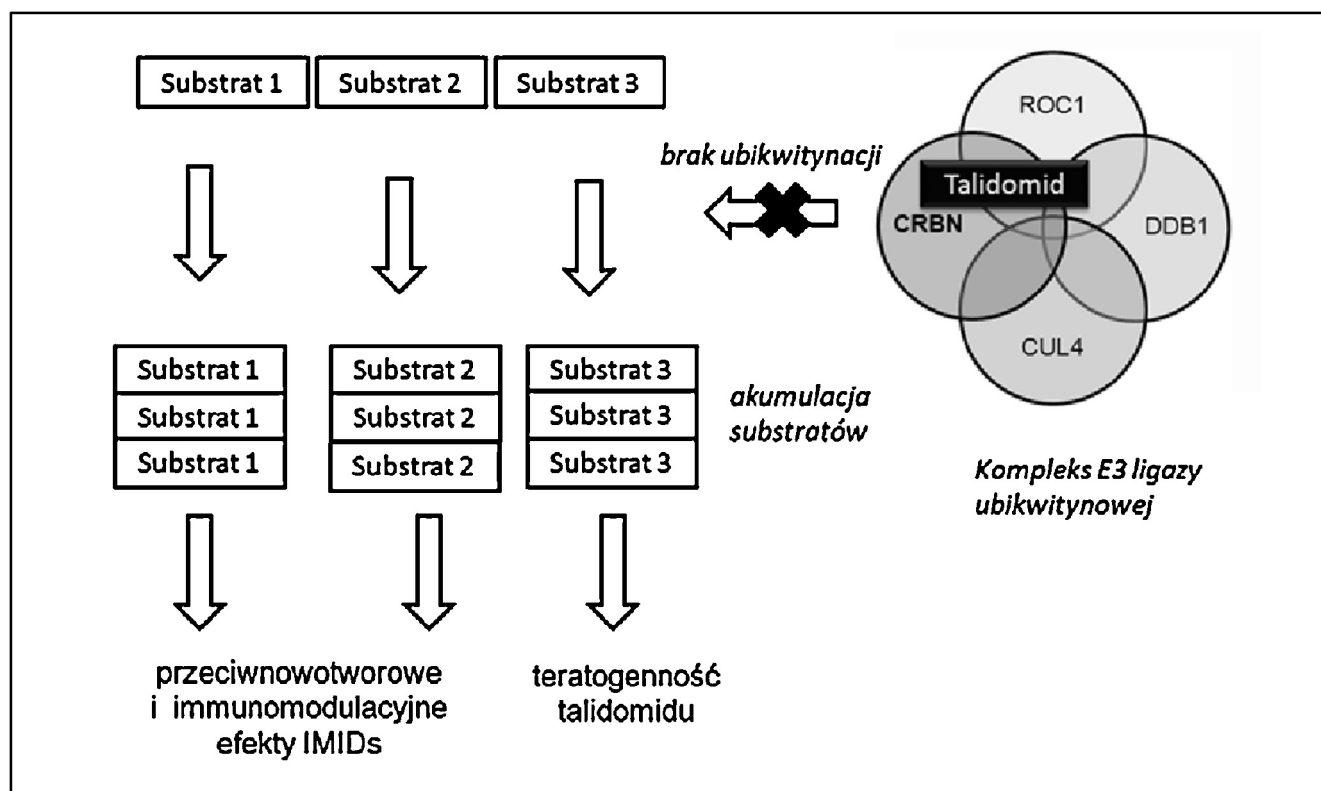
Ryc. 2 – Mechanizm działania kompleksu ligazy ubikwitynowej E3 w warunkach fizjologicznych. Cereblon pełni w tym kompleksie rolę czynnika rekrutującego określone substraty białkowe do procesu ubikwytynacji i następnie degradacji przez proteasom

Fig. 2 – The mechanism of E3 ubiquitin ligase complex under physiological conditions. Cereblon, in this complex, acts as a factor that recruits certain protein substrates for the process of ubiquitination and subsequent degradation by the proteasome

zaobserwowali istotny związek pomiędzy ekspresją genu CRBN i odpowiedzią na leczenie lenalidomidem i deksametazonem (Len-Dex). Ekspresja CRBN okazała się trzykrotnie wyższa u pacjentów, którzy reagowali na leczenie w porównaniu z chorymi, którzy nie uzyskali odpowiedzi, jednak współczynnik korelacji ekspresji CRBN z odpowiedzią był w całej grupie stosunkowo niski ($r=0,48$) [31]. W innym badaniu, Schuster i wsp. [32] przeanalizowali ekspresję CRBN w grupie 148 pacjentów ze rozpoznaniem SzP leczonych kombinacją pomalidomidu z deksametazonem [32]. Wykazano, że wysoka ekspresja CRBN jest statystycznie istotnie związana z odsetkiem odpowiedzi, czasem wolnym od progresji oraz, co najistotniejsze, z czasem przeżycia w SzP [32]. Autorzy sugerują, że ocena ekspresji CRBN przed podaniem pomalidomidu może stać się czynnikiem predykcyjnym odpowiedzi na leczenie [32]. Zgodnie z tymi obserwacjami, Broyl i wsp. [33] oraz Klimowicz i wsp. [34] stwierdzili związek wysokiej ekspresji CRBN z rokowaniem pacjentów leczonych odpowiednio talidomidem i lenalidomidem. Co interesujące, w jednym z badań stwierdzono również, że zmniejszona ekspresja CRBN koreluje z zaburzeniami cytogenetycznymi wiążącymi się z gorszym rokowaniem (obecność $del17p13$ i $1q21$) [35]. Pewne dane na temat roli CRBN są już również dostępne dla innych chorób, w których stosuje się IMiDs.

Przykładowo wykazano, że odpowiedź na lenalidomid linii komórkowej chłoniaka DLBCL jest zależna od ekspresji CRBN i IRF4 [36].

Należy podkreślić, że niektóre obserwacje z badań klinicznych nad niepełnym związkiem poziomu CRBN ze skutecznością IMiDs budzą jednak pewne wątpliwości [31–35]. Jak wskazują wyniki badań na liniach komórkowych, istnieją z pewnością inne uwarunkowania odpowiedzi poza całkowitą ekspresją CRBN w komórkach nowotworu, szczególnie jeśli jest ona badana na poziomie mRNA. Przykładowo, stwierdzono, że niektóre odporne linie komórkowe charakteryzują się wysoką ekspresją CRBN [18]. Ponadto izoforma CRBN-002 jest pozbawiona eksonu 10, który zawiera część domeny zapewniającej wiązanie IMiDs, a ekspresja tej izoformy może stanowić nawet 50% transkryptu CRBN [23]. Analiza pierwotnie wrażliwych i opornych na leczenie analogami talidomidu linii komórkowych SzP wykazała, że ekspresja CRBN jest regulowana na poziomie transkrypcji oraz posttranskrypcyjnie [37]. Natomiast nabyte mutacje części kodującej genu CRBN powodujące oporność są prawdopodobnie rzadkim zjawiskiem. Gandhi i wsp. [38] wykryli jedynie 5 zmian pojedynczego nukleotydu w genie kodującym CRBN: trzy w pozycji 735 (Y245Y), jedną w pozycji 219 (H73H) i kolejną w 939 (C313C) w analizowanych próbkach



Ryc. 3 – Thalidomid, podobnie jak inne leki immunomodulujące, łączy się z cereblonem, który jest składnikiem kompleksu E3 ligazy ubikwitynowej. Wiązanie cereblonu powoduje inhibicję ubikwytynacji i w następstwie nagromadzenie się nieznanymi substratów białkowych, które bezpośrednio lub pośrednio odpowiadają za efekty biologiczne leków immunomodulujących

Fig. 3 – Thalidomide, like other immunomodulatory drugs, connects to the cereblon, a component of E3 ubiquitin ligase complex. Cereblon binding inhibits ubiquitination and subsequent accumulation of unknown protein substrates that are directly or indirectly responsible for the biological effects of immunomodulatory drugs

od pacjentów ze SzP i w liniach komórkowych [38]. Należy również podkreślić, że przypuszczalnie istnieją inne, niezależne od CRBN białka wiążące IMiDs, które również mogą mieć pewien udział w odpowiedzi i oporności na poszczególne leki z tej grupy [29].

Perspektywy kliniczne badań nad cereblonem

Wyniki omówionych badań przedklinicznych i klinicznych niewątpliwie wskazują na ważną rolę, jaką odkrycie CRBN może odegrać w rozwoju terapii chorób, w których stosuje się IMiDs. Najbardziej oczywistym zastosowaniem klinicznym byłaby ocena ekspresji CRBN jako biomarkera służącego do indywidualizacji terapii za pomocą IMiDs. Teoretycznie, leczenie z wykorzystaniem IMiDs ma największe uzasadnienie u pacjentów wysoką ekspresją CRBN, natomiast chorzy z bardzo niskim poziomem CRBN powinni być prawdopodobnie leczeni w inny sposób. Wydaje się również, że ocena ekspresji CRBN powinna być dokonywana nie tylko w chwili rozpoznania, ale również przy każdym nawrocie choroby, ze względu na możliwość indukcji oporności oraz zjawisko ewolucji klonalnej. W mniejszym stopniu rozważa się również wykorzystanie takiego testu w diagnostyce różnicowej,

ponieważ ekspresja CRBN w nowotworach hematologicznych jest typowo wyższa niż w MGUS i większości guzów litych [17, 18, 23].

Należy jednak podkreślić, że dotychczas nie opracowano standardowej metody oceny ekspresji CRBN [39]. W szczególności nie ustalono, czy ekspresja CRBN powinna być mierzona na poziomie mRNA (RT-PCR, Q-PCR, GEP) czy białka (cytometria przepływową, Western blot, immunohistochemia). Oprócz samej ekspresji, warte analizy wydają się również warianty składowania CRBN, a także wrodzone warianty polimorficzne oraz nabyte mutacje tego genu. Nie jest również pewne, w jakich komórkach powinna być oceniana ekspresja CRBN. Chociaż, w przypadku SzP, najważniejsze wydają się sortowane komórki CD138+, nie należy zapominać, że duża część aktywności IMiDs zależy od mikrośrodowiska szpiku i komórek efektorowych układu immunologicznego. Z tych względów, chociaż opracowanie optymalnego testu i jego standaryzacja, szczególnie w ramach dużych prospektywnych prób klinicznych, miałyby istotne znaczenie dla codziennej praktyki klinicznej, można przypuszczać, że nie nastąpi to szybko i będzie to test raczej złożony [39].

Innym perspektywnym kierunkiem badań nad CRBN są próby opracowania nowych, bardziej efektywnych leków i strategii terapeutycznych. W pierwszym rzędzie należy

tutaj myśleć o cząsteczkach, które bezpośrednio wiążą się z CRBN w silniejszy i trwalszy sposób niż obecne IMiDs. Przykładowo, nadzieje budzi nowy związek o właściwościach immunomodulujących CC-220, który również działa poprzez przyłączenie się do CRBN [40]. Wykazano, że w porównaniu z analogami talidomidu, lek ten ma 30-krotnie większe powinowactwo do CRBN, a także hamuje autoubikwitynację tego białka 110-krotnie silniej niż pomalidomid [40]. Udowodniono również, że CC-220 silniej stymuluje produkcję IL-2 przez limfocyty T oraz hamuje produkcję immunoglobulin [40]. Patrząc jednak z szerszej perspektywy, wszelkie badania nad mechanizmami inhibicji ligazy ubikwitynowej E3, znaczeniem partnerów CRBN w kompleksie enzymatycznym i szlakami sygnałowymi leżącymi „poniżej” CRBN oraz identyfikacją substratów ubikwitynacji mogą zaowocować powstaniem nowych, skutecznym metod terapii.

Wkład autorów/Authors' contributions

Według kolejności.

Konflikt interesu/Conflict of interest

Nie występuje.

Finansowanie/Financial support

Nie występuje.

Etyka/Ethics

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

PIŚMIENNICTWO / REFERENCES

- [1] Franks ME, Macpherson GR, Figg WD. Thalidomide. *Lancet* 2004;363:1802–1811.
- [2] Sheskin J. Thalidomide in the treatment of lepra reactions. *Clin Pharmacol Ther* 1965;6:303–306.
- [3] Singhal S, Mehta J, Desikan R, et al. Antitumor activity of thalidomide in refractory multiple myeloma. *N Engl J Med* 1999;341:1565–1571.
- [4] Piechnik A, Giannopoulos K. Mechanizmy działania leków immunomodulujących w szpiczaku plazmocytozowym. *Hematologia* 2011;2:105–115.
- [5] Bartlett JB, Dredge K, Dalglish AG. The evaluation of thalidomide and its IMiD derivatives as anticancer agents. *Nat Rev Cancer* 2004;4:314–322.
- [6] Moreira AL, Sampaio EP, Zmuidzinas A, Frindt P, Smith KA, Kaplan G. Thalidomide exerts its inhibitory action on tumor necrosis factor alpha by enhancing mRNA degradation. *J Exp Med* 1993;177:1675–1680.
- [7] Turki BE, Jiang H, Liu JO. Binding of thalidomide to alpha I-acid glycoprotein may be involved in its inhibition of tumor necrosis factor alpha production. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:7552–7556.
- [8] Corral LG, Kaplan G. Immunomodulation by thalidomide and thalidomide analogues. *Ann Rheum Dis* 1999;58:107.
- [9] Hideshima T, Chauhan D, Shima Y, et al. Thalidomide and its analogs overcome drug resistance of human multiple myeloma cells to conventional therapy. *Blood* 2000;96:2943–2950.
- [10] Parman T, Wiley MJ, Wells PG. Free radical-mediated oxidative DNA damage in the mechanism of thalidomide teratogenicity. *Nat Med* 1995;5:82–85.
- [11] Gandhi AK, Kang J, Naziruddin S, Parton A, Schafer PH, Stirling DI. Lenalidomide inhibits proliferation of Namalwa CSN.70 cells and interferes with Gab1 phosphorylation and adaptor protein complex assembly. *Leuk Res* 2006;30:849–858.
- [12] Mitsiades N, Mitsiades CS, Poulaki V, et al. Apoptotic signaling induced by immunomodulatory thalidomide in human multiple myeloma cells: therapeutic implications. *Blood* 2002;99:4525–4530.
- [13] Lacy MQ, Hayman SR, Gertz MA, et al. Pomalidomide (CC4047) Plus Low-Dose Dexamethasone As Therapy for Relapsed Multiple Myeloma. *JCO* 2009;27:5008–5014.
- [14] Ito T, Ando H, Handa H. Teratogenic effects of thalidomide: molecular mechanisms. *Cell Mol Life Sci* 2011;68:1569–1579.
- [15] D'Amato RJ, Loughnan MS, Flynn E, Folkman J. Thalidomide is an inhibitor of angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:4082–4085.
- [16] Kenyon BM, Browne F, D'Amato RJ. Effects of thalidomide and related metabolites in a mouse corneal model of neovascularization. *Exp Eye Res* 1997;64:971–978.
- [17] Ito T, Ando H, Suzuki T, et al. Identification of a primary target of thalidomide teratogenicity. *Science* 2010;327:1345–1350.
- [18] Zhu YX, Braggio E, Shi CX, et al. Cereblon expression is required for the antimyeloma activity of lenalidomide and pomalidomide. *Blood* 2011;118:4771–4779.
- [19] Lopez-Girona A, Mendy D, Ito T, et al. Cereblon is a direct protein target for immunomodulatory and antiproliferative activities of lenalidomide and pomalidomide. *Leukemia* 2012;1–10.
- [20] Higgins JJ, Tal AL, Sun X, et al. Temporal and spatial mouse brain expression of cereblon, an ionic channel regulator involved in human intelligence. *J Neurogenet* 2010;24:18–26.
- [21] Dijkhuizen T, van Essen T, van der Vlies P, et al. FISH and array-CGH analysis of a complex chromosome 3 aberration suggests that loss of CNTN4 and CRBN contributes to mental retardation in 3pter deletions. *Am J Med Genet A* 2006;140:2482–2487.
- [22] Chang XB, Stewart AK. What is the functional role of the thalidomide binding protein cereblon? *Int J Biochem Mol Biol* 2011;2:287–294.
- [23] Gandhi AK, Avet-Loiseau H, Waldman M, et al. Detection and quantification of cereblon protein and mRNA in multiple myeloma cell lines and primary CD138+ multiple myeloma cells. *ASH 54th Annual Meeting* 2012;120:2963.
- [24] Jo S, Lee KH, Song S, Jung YK, Park CS. Identification and functional characterization of cereblon as a binding protein for large conductance calcium-activated potassium channel in rat brain. *J Neurochem* 2005;94:1212–1224.
- [25] Hohberger B, Enz R. Cereblon is expressed in the retina and binds to voltage-gated chloride channels. *FEBS Lett* 2009;583:633–637.
- [26] Lee KM, Jo S, Kim H, Lee J, Park CS. Functional modulation of AMP-activated protein kinase by cereblon. *Biochem Biophys Acta* 2011;1813:448–455.
- [27] Lee KM, Yang SJ, Kim YD, et al. Disruption of the cereblon gene enhances hepatic AMPK activity and prevents high fat

- diet-induced obesity and insulin resistance in mice. *Diabetes* 2013 Jan 24.
- [28] Angers S, Li T, Yi X, et al. Molecular architecture and assembly of the DDB1-CUL4A ubiquitin ligase machinery. *Nature* 2006;443:590-593.
- [29] Piechnik A, Dmoszynska A, Giannopoulos K, et al. The VEGF receptor, neuropilin-1, represents a promising novel target for chronic lymphocytic leukemia patients. *Int J Cancer* 2013;133:1489-1496.
- [30] Lee KM, Lee J, Park ChS. Cereblon inhibits proteasome activity by binding to the 20S core proteasome subunit beta type 4. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2012;427:618-622.
- [31] Heintel D, Bolomsky A, Schreder M, et al. High expression of the thalidomide-binding protein cereblon (CRBN) is associated with improved clinical response in patients with multiple myeloma treated with lenalidomide and dexamethasone. *Blood* 2011;118:2879.
- [32] Schuster SR, Kortuem KM, Zhu YX, et al. Cereblon expression predicts response, progression free and overall survival after pomalidomide and dexamethasone therapy in multiple myeloma. *ASH 54th Annual Meeting* 2012;120:194.
- [33] Broyl A, Kuiper R, van Duin M, et al. Relation between cereblon expression and survival in patients with newly diagnosed multiple myeloma treated with thalidomide. *Blood* 2013;121:624-627.
- [34] Klimowicz A, Neri P, Belch A, et al. High cereblon protein expression correlates with improved response and survival in myeloma patients treated with lenalidomide. *ASH 54th Annual Meeting* 2012;120:931.
- [35] Kuchenbauer F, Bloehdorn J, Kull M, et al. Expression of Cereblon is associated with disease stage, genetic subgroups and specific micro-RNAs in multiple myeloma. *ASH 54th Annual Meeting* 2012;120:1820.
- [36] Zhang LH, Kosek J, Wang M, Heise C, Schafer PH, Chopra R. Lenalidomide efficacy in activated B-cell-like subtype diffuse large B-cell lymphoma is dependent upon IRF4 and cereblon expression. *Br J Haematol* 2013;160:487-502.
- [37] Neri P, Belch AR, Johnson J, et al. A miRNA risk score for the prediction of response to lenalidomide in multiple myeloma patients. *Blood* 2011;118:987.
- [38] Gandhi AK, Lentzsch S, Schey SA, et al. Exon Mutations in Cereblon (CRBN) and DNA Damage Binding Protein 1 (DDB1) Genes are Rare in Myeloma Cells and Patients. Presentation at International Myeloma Workshop, Tokyo, Japan; 2013.
- [39] Lodé L, Amiot M, Maiga S, Touzeau C, et al. Cereblon expression in multiple myeloma: not ready for prime time. *Br J Haematol* 2013 Jul 17. <http://dx.doi.org/10.1111/bjh.12477>.
- [40] Schafer PH, Rychak E, Mendy D, et al. Targeting cereblon with high affinity immunomodulatory compound CC-220: a novel therapeutic agent for B cell dyscrasias. *ASH 54th Annual Meeting* 2012;120:1055.