

# Kinazy PIM jako cel terapeutyczny w nowotworach układów krwiotwórczego i chłonnego

## PIM kinases as therapeutic targets in lymphoid and myeloid malignancies

Przemysław Juszczynski

Pracownia Hematologii Doświadczalnej, Zakład Diagnostyki Hematologicznej  
 Instytut Hematologii i Transfuzjologii, Warszawa

### Streszczenie

*Do rodziny kinaz serynowo-treoninowych PIM należą trzy homologiczne białka — PIM1, PIM2 i PIM3 — regulujące aktywność szerokiego spektrum substratów i wpływające na procesy transkrypcji, translacji, proliferacji, apoptozy, metabolizmu i migracji komórek. Wpływ na te procesy to istotne ogniwo patogenezy nowotworów układów krwiotwórczego i chłonnego, a także wielu nowotworów litych. Kinazy PIM ponadto współdziałają, wzmacniają i konsolidują działanie innych silnych onkogenów — w tym c-MYC i BCL6. Nadekspresja kinaz PIM, którą się obserwuje w części nowotworów, stanowi niekorzystny czynnik rokowniczy. Kinazy PIM nie wymagają modyfikacji potranslacyjnych dla pełnej aktywności, zatem ekspresja białka oznacza aktywność enzymatyczną. Unikatowa struktura kinaz z tej rodziny pozwala na opracowanie swoistych inhibitorów, a łagodne konsekwencje biologiczne genetycznego wyłączenia kinaz PIM u zwierząt pozwalają przypuszczać, że farmakologiczne zahamowanie ich aktywności nie będzie związane z istotnymi działaniami niepożądanymi. W ostatnich latach opracowano wiele inhibitorów kinaz PIM. Wykazują one aktywność w stosunku do linii komórkowych ostrej białaczki szpikowej (AML), chłoniaków rozlanych z dużych komórek B (DLBCL), chłoniaka z komórek płaszczka (MCL), przewlekłej białaczki limfocytowej (CLL), szpiczaka plazmocytozy (PCM) oraz w modelach in vivo, a część z nich trafiła do badań klinicznych. Unikatowy charakter regulacji aktywności tych kinaz powoduje również, że w warunkach klinicznych trudno określić, jaki poziom ekspresji kinaz PIM jest istotny patogenetycznie. Identyfikacja racjonalnych biomarkerów dla inhibitorów kinaz PIM stanowi obecnie największe wyzwanie, które musi znaleźć swe rozwiązanie przed wprowadzeniem inhibitorów kinaz PIM do praktyki klinicznej.*

**Słowa kluczowe:** kinazy PIM, terapia celowana, ostra białaczka szpikowa, przewlekła białaczka limfocytowa, chłoniaki, szpiczak plazmocytozy

*Hematologia* 2014; 5, 4: 305–316

### Abstract

*PIM family of serine-threonine kinases comprises three homologous proteins, PIM1, PIM2 and PIM3, regulating broad spectrum of cellular substrates and tuning important processes, such as translation, transcription, proliferation, apoptosis, metabolism and migration. In addition, PIM kinases cooperate with, augment and consolidate the transforming potential of other strong*

**Adres do korespondencji:** Przemysław Juszczynski, Pracownia Hematologii Doświadczalnej, Zakład Diagnostyki Hematologicznej, Instytut Hematologii i Transfuzjologii, ul. Indiry Gandhi 14, 02–776 Warszawa, tel.: 22 34 96 477, faks: 22 34 96 237 e-mail: puszczynski@ihit.waw.pl

*oncogenes, such as c-MYC and BCL6. PIM kinases play important pathogenetic role in multiple hematologic and solid malignancies, and in some tumors their expression is associated with adverse prognosis. PIM kinases do not require posttranslational modifications for their activity. Mild phenotypes of knockout mice, lacking all PIM isoforms suggest that PIM kinases are good, druggable targets and their pharmacological inhibition will be well tolerated. The unique structure-function relationship facilitates designing specific small molecule inhibitors, and multiple such compounds targeting PIM kinases have been identified. PIM inhibitors exhibit promising activity against in vitro and in vivo models of multiple lymphoid and myeloid malignancies. However, given the unique mechanism of PIM kinases regulation, definition of pathogenetically important level of PIM expression is not feasible, and rational, clinically useful biomarker has not been yet developed. Identification of such biologically and clinically relevant biomarkers is the major challenge hampering successful translation of basic knowledge on PIM biology to clinically available drugs.*

**Key words:** PIM kinases, targeted therapy, acute myeloid leukemia, non-Hodgkin lymphoma, chronic lymphocytic leukemia, plasma cell myeloma

**Hematologia 2014; 5, 4: 305–316**

## Wprowadzenie

Do rodziny kinaz serynowo-treoninowych PIM należą trzy homologiczne białka — PIM1, PIM2 i PIM3 (*Pim-1, -2, -3 proto-oncogene, serine/threonine kinase*) — regulujące aktywność szerokiego spektrum substratów i wpływające na procesy proliferacji, apoptozy, odpowiedzi na stres komórkowy i odpowiedź zapalną. Fizjologiczna rola kinaz PIM dotyczy regulacji wzrostu i proliferacji komórek w odpowiedzi na czynniki mitogenne, w tym czynniki wzrostu [1]. Na onkogenny potencjał białek z tej rodziny zwrócono uwagę z powodu obserwacji wskazującej, że w komórkach nowotworowych *locus* kinazy PIM1 często zawiera insercje sekwencji wirusa mysiej białaczki Moloney (MMLV, *Moloney murine leukemia virus*), prowadzące do indukcji transkrypcji kinazy PIM1 [2]. W modelach mysich konstytutywna ekspresja kinazy PIM1 zależna od sekwencji wzmacniających transkrypcję *loci* immunoglobulinowych ( $E\mu$ ) i wirusowej sekwencji LTR prowadzi do nadekspresji tej kinazy w komórkach T i B oraz spontanicznych chłoniaków T-komórkowych. Rozwijające się nowotwory występowały ze stosunkowo niską częstością i po długim okresie latencji, co wskazuje na zależność potencjału onkogenego kinaz PIM od innych, współwystępujących zaburzeń [3]. Należy do nich ekspresja onkogenu *c-MYC* (*v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog*), występująca we wszystkich chłoniakach indukowanych przez MMLV [4]. Koekspresja transgenów  $E\mu$ -*Myc* i  $E\mu$ -*Pim1* w komórkach limfoidalnych u myszy prowadzi do rozwoju agresywnych chłoniaków już *in utero* lub we wczesnym okresie po narodzeniu [5]. Wyłączenie aktywności kinaz PIM (PIM1/2 lub PIM1/2/3) powoduje natomiast znaczące wydłużenie czasu latencji białaczek/chłoniaków B-komórkowych indukowanych przez  $E\mu$ -*Myc*, co wskazuje, że aktywność kinaz PIM jest czynnikiem warunkującym potencjał onkogenny białka *c-MYC* [6]. Kinazy PIM2 i PIM3 zidentyfikowano w toku podobnych eksperymentów z użyciem mutageny insercyjnej MMLV, w których wykazano, że w komórkach *PIM1*<sup>-/-</sup> lub *PIM1*<sup>-/-</sup>; *PIM2*<sup>-/-</sup> w ponad 90% przypadków dochodzi do włączenia ekspresji, odpowiednio, genu *PIM2* lub *PIM3* [1, 6, 7].

O ile transformacja komórek prekursorowych przez współdziałające onkogeny *PIM* i *c-MYC* prowadzi do agresywnie proliferujących nowotworów, o tyle wprowadzenie tych onkogenów do dojrzałych limfocytów IgM<sup>+</sup> nie prowadzi do spontanicznej ani indukowanej aktywacji proliferacji [8]. Zdolność transformująca współdziałających onkogenów *c-MYC* i *PIM1* wydaje się zatem ograniczona tylko do wczesnych stadiów rozwojowych komórek B, co nie wyklucza wpływu występującej w części nowotworów z dojrzałych limfocytów B koekspresji *c-MYC* i *PIM1* na ich charakterystykę kliniczno-biologiczną i agresywność.

Ten model onkogennej roli kinaz PIM, polegający na współdziałaniu i nasileniu aktywności innego onkogenu, wykazano również w stosunku do onkogenów *ABL* (*ABL, proto-oncogene 1, non-receptor tyrosine kinase*) i *BCL6* (*B-cell leukemia/lymphoma 6*) [9, 10]. W modelu chłoniaków indukowanych trans-

genem *BCL6* kinaza PIM1 stanowi najczęstszy gen koaktywowany wskutek mutagenyzy insercyjnej, a ludzkie chłoniaki B-komórkowe BCL6+ charakteryzuje uniwersalna nadekspresja tej kinazy [9]. W mysich prekursorowych komórkach krwiotwórczych kinazy PIM1 i PIM2 są również niezbędne dla transformujących właściwości onkogenu *ABL* [10]. Wprowadzenie tego onkogenu do komórek *PIM1<sup>-/-</sup> PIM2<sup>-/-</sup>* nie powodowało ich transformacji i niezależnej od czynników wzrostu autonomicznej proliferacji. Zachowanie ekspresji kinazy PIM1 lub PIM2 wystarczało natomiast do transformującego efektu *ABL* na komórki pre-B, co wskazuje na funkcjonalną redundancję PIM1 i PIM2 w tym zakresie [10].

Nadekspresja kinaz PIM jest częstą cechą nowotworów układów krwiotwórczego i chłonnego oraz wielu guzów litych, w których stanowią istotne ogniwo ich patogenezy. Ze względu na te okoliczności kinazy z tej rodziny w ostatnich latach stały się obszarem intensywnych badań zmierzających do identyfikacji mechanizmów patogenetycznych, za które odpowiada aktywność kinaz z tej rodziny, oraz do opracowania ich celowanych małowcząsteczkowych inhibitorów, które mogłyby znaleźć swoje zastosowanie kliniczne.

### Regulacja ekspresji i aktywności kinaz PIM

W genomie człowieka *locus* kinazy *PIM1* znajduje się na chromosomie 6 (6p21.2), *PIM2* — na chromosomie X (Xp11), a kinazy *PIM3* — na chromosomie 22 (22q13) [1]. Matrycowy RNA dla kinaz PIM obejmuje 6 eksonów i dużych regionów niekodujących 5' i 3'. Region 3' zawiera powtórzone sekwencje destabilizujące AUUUA odpowiadające za szybką degradację mRNA [11, 12]. Region 5' charakteryzuje się natomiast wysoką zawartością GC, przez co stanowi „słaby” transkrypt, którego translacja wymaga czapeczki 5'-m<sup>7</sup>G [13]. Delecja regionu bogatego w GC *PIM1* powoduje znaczne zwiększenie ekspresji białka [14].

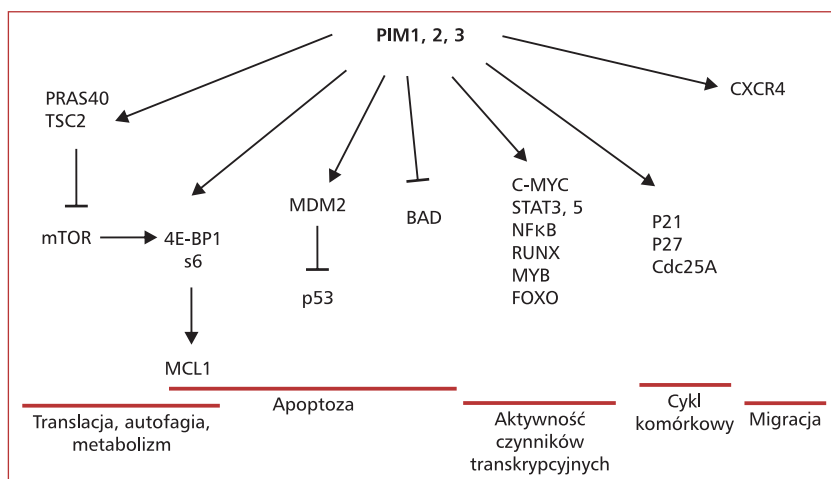
Kinazy PIM 1 i PIM 2 wykazują 61%, a PIM1 i PIM3 — 77% homologii w zakresie sekwencji aminokwasowej [1]. Kinazy z rodziny PIM zawierają wysoce konserwowaną domenę katalityczną, ale w swojej strukturze nie mają typowych dla innych kinaz sekwencji regulatorowych [15, 16]. W konsekwencji kinazy PIM nie wymagają modyfikacji potranslacyjnych warunkujących ich aktywność katalityczną. Ich aktywność jest zatem regulowana jedynie na poziomie transkrypcji, translacji i stabilności mRNA i białka.

Kinazy PIM ulegają ekspresji wskutek pobudzenia komórek przez czynniki wzrostu i cytokiny. W komórkach limfoidalnych ekspresję kinaz z tej rodziny indukują między innymi cytokiny z rodziny czynników martwicy nowotworu alfa (TNF $\alpha$ , *tumor necrosis factor  $\alpha$* ): czynnik aktywujący komórki B (BAFF, *B-cell activating factor*), czynnik indukujący proliferację (APRIL, *a proliferation-inducing ligand*) i CD40, które prowadzą do aktywacji czynników transkrypcyjnych z rodziny STAT (*signal transducer and activator of transcription*) i jądrowego czynnika transkrypcyjnego kappa B (NF $\kappa$ B, *nuclear factor kappa B*) [17–21]. Stopień wzbudzenia transkrypcji poszczególnych kinaz PIM i udział określonych czynników transkrypcyjnych wykazuje jednak dużą zmienność zależnie od typu komórek. Wzbudzenie osi JAK/STAT i/lub NF $\kappa$ B i nadekspresja kinaz PIM może wynikać z konstytutywnej aktywności receptorów zależnych od mutacji aktywujących (np. *FLT3-ITD*, *fms-related tyrosine kinase 3-internal tandem duplication*), od interakcji z mikrośrodowiskiem lub od obecności białek fuzyjnych — w tym BCR-ABL1 [22–24]. Transkrypcję tych kinaz może indukować również czynnik KLF5 (*Kruppel-like factor 5*) w odpowiedzi na uszkodzenia DNA, co prowadzi do antyapoptycznej aktywności PIM w uszkodzonych komórkach [25]. W komórkach chłoniaków z rearanżacją *c-MYC locus* kinazy *PIM3* jest aktywowane przez ten czynnik transkrypcyjny [26].

Jak wyżej wskazano, struktura kinaz z rodziny PIM warunkuje ich konstytutywną aktywność niewymagającą modyfikacji potranslacyjnych. Modyfikacje takie mogą jednak wpływać na stabilność białka. Rolę taką przypisuje się fosforylacji tyrozyny Y218 PIM1 przez kinazę ETK [27]. Kinaza PIM1 może ponadto ulegać autofosforylacji (seryna S8), ale funkcjonalne konsekwencje tej modyfikacji pozostają niewyjaśnione [28]. Stabilność kinaz PIM jest regulowana głównie poprzez ich proteasomalną degradację [29]. Sprzyjają temu między innymi wiązanie i defosforylacja PIM1 i PIM3 przez fosfatazę PP2A (*protein phosphatase 2A*) [30, 31]. Za stabilizację białka PIM1 odpowiada natomiast białko opiekuńcze HSP90 (*heat shock protein 90*) [32]. Zahamowanie jego aktywności HSP90 geldanamycyną prowadzi do szybkiej proteasomalnej degradacji PIM1 [29, 32].

### Wpływ kinaz PIM na aktywność czynników transkrypcyjnych

Kinazy PIM regulują aktywność niektórych czynników transkrypcyjnych, w tym *c-MYC*, *MYB*



**Rycina 1.** Mechanizmy patogenetyczne związane z aktywnością kinaz PIM

**Figure 1.** Pathogenetic mechanisms associated with PIM kinase activity

(*v-myb avian myeloblastosis viral oncogene homolog*), RUNX1 (*runt-related transcription factor 1*), RUNX3, FOXO1 (*Forkhead box O*), FOXO3a i NFκB [33–39] (ryc. 1). Kinazy PIM1 i PIM2 zwiększają stabilność białka c-MYC poprzez fosforylację, odpowiednio, seryny S62 i S329 oraz S293 [37, 40]. Modyfikacje te zapobiegają ubikwitynacji i degradacji proteasomalnej c-MYC i powodują zwiększenie transkrypcji zależnej od c-MYC i jego potencjału onkogenego. Białko c-MYC, poprzez bezpośrednie wiązanie PIM1, rekrutuje ponadto tę kinazę w obręb sekwencji E-box, gdzie fosforyluje ona serynę S10 histonu H3 (H3S10) [41]. Modyfikacja ta powoduje rekrutację między innymi acetylotransferazy MYST (*KAT8, K(lysine) acetyltransferase 8*), acetylację H4K16 oraz dokowanie BRD4 (*bromodomain containing 4*) i kompleksu p-TEFb (*positive transcription elongation factor b*), który fosforyluje serynę S2 polimerazy RNA II i sprzyja jej pełnej aktywacji transkrypcyjnej [42, 43]. Ocenia się, że ten mechanizm zwiększa aktywność transkrypcyjną c-MYC o około 20% [41].

Kinazy PIM wpływają również na aktywność czynników transkrypcyjnych rodziny STAT. Kinazy te wiążą się bezpośrednio z czynnikiem STAT5 i fosforylują S731, leżącą w C-końcowym obszarze wpływającym na aktywność transkrypcyjną tego czynnika [40]. Zahamowanie kinaz PIM powoduje głębokie zmniejszenie fosforylacji S371, ale ma słabszy wpływ na fosforylację Y694/699 zależną od kinaz JAK2/TYK2 i konstytutywnie aktywnych kinaz tyrozynowych (np. BCR-ABL1, FLT3-ITD). Wskazuje to na mechanizm dodatniego sprzężenia zwrotnego między ekspresją kinaz PIM, regulowanych

transkrypcyjnie przez STAT5, a aktywnością tego czynnika transkrypcyjnego. Kinaza PIM3 zwiększa ponadto aktywność czynnika STAT3 poprzez fosforylację tyrozyny Y705 i wpływa na jego aktywność w komórkach nowotworowych [44]. Poprzez wpływ na czynniki transkrypcyjne STAT kinazy PIM mogą modulować ekspresję/aktywność wielu białek działających antyapoptotycznie (BCL-xL, surwiwina) i powodujących oporność na chemioterapeutyki (HIF1a, MDR-1) [45].

Kinaza PIM1 wpływa również na stabilizację podjednostki RelA/p65 NFκB przez fosforylację S276 [35, 36]. Za nasilenie aktywności NFκB może również odpowiadać kinaza PIM2, zdolna do fosforylacji onkogennej kinazy serynowo-treoninowej Cot, prowadząc do zwiększenia jej aktywności, zwiększenia jądrowej obecności heterodimerów p65/p50 kosztem homodimerów p50 i wzmożenia ekspresji genów zależnych od NFκB [35].

Miejsca fosforylacji czynnika transkrypcyjnego FOXO3a (T32, S253), typowo modyfikowane przez kinazę AKT (*v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1*), leżą w obrębie regionów częściowo odpowiadających sekwencji *consensus* dla kinaz PIM. Fosforylacja FOXO3a przez AKT lub PIM powoduje eksport tego czynnika transkrypcyjnego z jądra komórkowego i wyłączenie jego aktywności transkrypcyjnej [34].

### Wpływ na translację i metabolizm komórek

Kinazy PIM (głównie PIM2) wykazują funkcjonalną homologię ze szlakiem PI3K/AKT/mTOR i dzielą z nim niektóre substraty odpowiedzialne za regulację metabolizmu komórkowego i trans-

lacji, ale nie podlegają tym samym mechanizmom regulacyjnym, co mTOR (*mammalian target of rapamycin*) [46]. Z tego względu aktywność PIM2 może częściowo kompensować utratę aktywności mTOR (ryc. 1) [19]. Funkcjonalną homologię osi PI3K/AKT/mTOR i PIM2 potwierdzają obserwacje dotyczące limfocytów B z wyłączoną ekspresją kinazy PIM2, w których działanie IL-4 i BAFF w obecności rapamycyny nie jest w stanie zapobiec ich apoptozie [17, 47]. Ekspresja PIM2 w komórkach B jest zatem niezbędna dla działania B-komórkowych czynników wzrostu w sytuacji, gdy aktywność mTOR ulega wyłączeniu. Biochemiczną podstawą tych zjawisk jest niepoddająca się hamowaniu rapamycyną, zależna od kinazy PIM2, fosforylacja T37, T46, S65 białka 4E-BP1 (*eukaryotic translation initiation factor 4E binding protein 1*) [15]. Fosforylowany czynnik 4E-BP1 oddysocjowuje od białka EIF4E (*eukaryotic translation initiation factor 4E*), odpowiedzialnego za zależną od czapeczki 5'-7mG mRNA indukcję translacji tak zwanych słabych transkryptów [13]. Należą do nich białka odpowiedzialne za progresję cyklu komórkowego (cyklina D3), antyapoptyczne białko MCL-1 (*myeloid cell leukemia 1*) z rodziny BCL2, c-MYC oraz same kinazy PIM [13, 14, 48].

Zbliżone spektrum substratów kinaz AKT/mTOR i kinazy PIM (w tym głównie PIM2) tłumaczy funkcjonalną homologię obu białek i wpływ na podobne procesy komórkowe, w tym metabolizm białek i translację. Homologia ta może również tłumaczyć wpływ kinaz PIM na autofagię. Autofagia stanowi odpowiedź komórek na różnego rodzaju stres, w tym stres metaboliczny (np. głodzenie), którego kluczowym regulatorem jest kinaza mTOR [49]. Zahamowanie mTOR (wskutek głodzenia lub działania rapamycyny) powoduje indukcję autofagii. Kinazy PIM1 i PIM2 hamują aktywność mTOR poprzez wpływ, odpowiednio, na białka PRAS40 (Thr 246) i TSC2 (Ser 1798) [50, 51]. Fosforylacja PRAS40 (*proline rich AKT substrate 40*) przez PIM1 powoduje oddysocjowanie tego białka od mTORC1 i aktywację mTORC1. Fosforylowane przez PIM2 lub AKT białko TSC2 (*tuberous sclerosis*) pełni funkcję aktywatora GTPazy (GAP, *GTPase activating protein*) dla białka RHEB (*Ras homolog enriched in brain*). Włączenie GTPazy RHEB hamuje jej zdolność do aktywacji mTORC1. W konsekwencji, wskutek fosforylacji TSC2 przez PIM2, aktywność mTOR ulega zahamowaniu. Po farmakologicznym zahamowaniu kinaz PIM w szpiczakowych plazmocytach obserwuje się indukcję procesu autofagii prowadzącą do śmierci komórek [52].

### Wpływ na migrację komórek

Krwiotwórcze komórki macierzyste zwierząt pozbawionych kinaz PIM charakteryzują się obniżoną zdolnością do zasiedlania nisz szpikowych [53]. Wyłączenie aktywności kinaz PIM upośledza również zdolność do migracji i chemotaksji komórek nowotworowych. Kinaza PIM1 fosforyluje S339 wewnątrzkomórkowej domeny receptora chemokiny SDF1 (*stromal cell derived factor 1*) białka CXCR4 (*chemokine [C-X-C motif] receptor 4*) [54]. Modyfikacja ta stabilizuje białko i zwiększa jego powierzchniową ekspresję. Genetyczne bądź farmakologiczne wyłączenie kinaz PIM powoduje zmniejszenie ekspresji receptora CXCR4, mniejsze natężenie wewnątrzkomórkowego sygnału wyzwalanego przez wiązanie SDF1 oraz obniżenie zdolności migracyjnych komórek w gradiencie tej chemokiny [54, 55]. Obok wpływu na adhezję i migrację komórkową, oś SDF1-CXCR4 wywołuje plejotropowe efekty w odniesieniu do białaczkowych komórek macierzystych obejmujące regulacje ich proliferacji i różnicowania, a inhibitory CXCR4 wykazują działanie przeciwbiałaczkowe *in vitro*, *in vivo* i w warunkach badań klinicznych [56, 57]. Wpływ kinaz PIM1 na działanie CXCR4 może zatem pośrednio oddziaływać na charakterystykę białaczkowych komórek macierzystych.

Kinazy PIM wpływają ponadto na adhezję, chemotaksję i zdolności migracyjne komórek w mechanizmach niezależnych od CXCR4, obejmujących między innymi wpływ na ekspresję receptora czynnika wzrostu hepatocytów, białka MET oraz aktywność czynnika transkrypcyjnego NFATc (*nuclear factor of activated T cells, cytoplasmic, calcineurin dependent 1*) [58, 59].

### Wpływ na cykl komórkowy

Poza zwiększeniem translacji białek odpowiedzialnych za progresję cyklu komórkowego, kinazy PIM wpływają na aktywność białek bezpośrednio i sprzyjają proliferacji. Kinaza PIM1 fosforyluje Cdc25A (*cell division cycle 25A*), prowadząc do zwiększenia aktywności tej fosfatazy i promocji cyklu na etapie G1/S (ryc. 1) [60, 61]. Podobny wpływ na punkt kontrolny G1/S mają fosforylacja i inaktywacja przez PIM1 inhibitorów kinaz cyklozależnych p21Cip1/Waf1 (CDKN1A, *cyclin-dependent kinase inhibitor 1A*) [34, 62]. Kinazy PIM wpływają również na aktywność inhibitora p27 (CDKN1B), fosforylując jego T157 i T198 i powodując jego proteasomalną degradację [34]. Aktywność p27 jest regulowana przez kinazy PIM również pośrednio, poprzez zmniejszenie transkrypcji genu zależną od inaktywacji czynników transkrypcyjnych FOXO1 i FOXO3a [34].

### Wpływ na apoptozę

Nadekspresja kinaz PIM w modelach linii komórkowych i zwierzęcych ma charakter antyapoptotyczny. Kinazy z tej rodziny wpływają na translację i aktywność białek pro- i antyapoptotycznych z rodziny BCL2, w tym BAD (*BCL2-associated agonist of cell death*) i MCL1. Proapoptotyczna funkcja BAD zależy od stanu fosforylacji trzech reszt serynowych (S112, S135 i S155) [63]. Za ich fosforylację odpowiadają kinazy indukowane przez czynniki wzrostu, w tym wszystkie izoformy kinaz PIM [15, 64–66]. Fosforylacja BAD powoduje oddysocjowanie i uwolnienie antyapoptotycznych białek BCL2 i BCL-XL1 oraz relokalizację BAD z mitochondrium do cytozolu [63]. Poza tym fosforylacja S155 BAD wywołuje indukcję glukokinazy i nasilenie glikolizy, stanowi zatem molekularny „przełącznik” między proapoptotycznym i metabolicznym działaniem BAD [67]. Kinaza PIM1 wpływa ponadto na szlak p53 poprzez fosforylację białka MDM2 (MDM2, *proto-oncogene, E3 ubiquitin protein ligase*), ligazy E3 ubikwityny dla p53. Kinaza PIM1 fosforyluje Ser166 i Ser186 MDM2 i zwiększa ilość MDM2 w komórce, co prowadzi do zwiększenia stopnia ubikwitynacji p53 [68]. Antyapoptotyczne działanie kinaz PIM wynika również z mechanizmów pośrednich, między innymi wpływu na aktywność FOXO3a i NFκB i transkrypcję białek regulowanych przez te czynniki.

### Kinazy PIM jako cel terapeutyczny

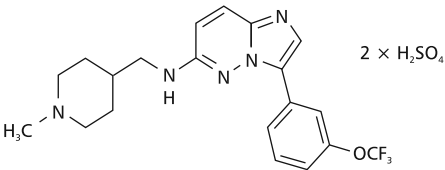
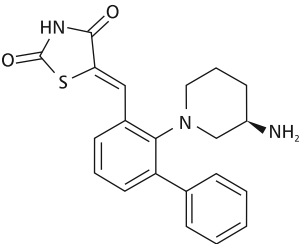
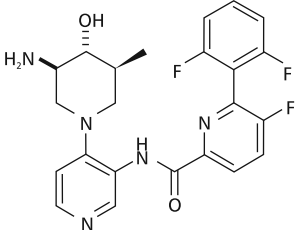
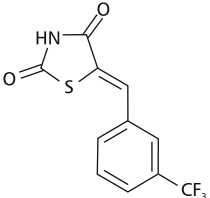
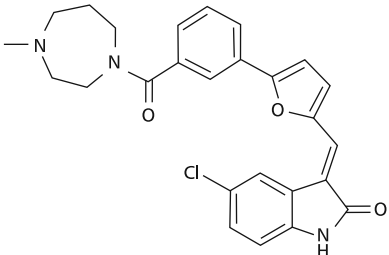
Ze względu na regulację fundamentalnych procesów biologicznych warunkujących wzrost i przeżycie komórek nowotworowych oraz współdziałanie z innymi onkogenami kinazy PIM budzą duże zainteresowanie jako cel terapeutyczny. Wyłączenie (*knockout*) kinaz PIM ma niewielki wpływ na fenotyp zwierząt modelowych [53]. W przypadku PIM1 wyłączenie aktywności tej kinazy powoduje defekt transdukcji sygnału interleukiny 7 (IL 7) i zaburzenia różnicowania komórek pre-B w szpiku kostnym [69, 70]. Komórki macierzyste pozbawione *PIM1* wykazywały obniżoną zdolność do repopulacji nisz szpikowych u napromienionych zwierząt — biorców [54]. Myszy pozbawione *PIM2* wykazują obniżony poziom aktywacji limfocytów T w obecności rapamycyny, a wyłączenie kinazy *PIM3* powoduje zaburzenia tolerancji glukozy [47, 71]. Myszy pozbawione wszystkich 3 izoform charakteryzują się natomiast zmniejszonymi rozmiarami i masą ciała, obniżoną odpowiedzią komórek na działanie czynników wzrostu oraz mniejszą liczbą płytek i hipochromią erytrocytów w stosunku do zwierząt kontrolnych [11, 53]. Krwiotwórcze komórki ma-

cierzyste myszy *PIM1/2/3<sup>-/-</sup>* cechowała ponadto obniżona zdolność tworzenia kolonii, repopulacji szpiku i odtwarzania hemopoezy u napromienionych zwierząt syngenicznych [53]. Obserwacje te wskazują na istotną fizjologiczną rolę kinaz PIM w biologii krwiotwórczych komórek macierzystych, obejmującą wpływ na ich ekspansję, różnicowanie, samoodnowę i zdolności repopulacyjne. Myszy z wyłączonymi genetycznie kinazami z rodziny PIM pozostają jednak płodne i żywotne, a brak głębokich patologii narządowych u zwierząt pozbawionych tych kinaz wskazuje, że przewlekłe stosowanie inhibitorów PIM nie będzie powodowało znaczących działań niepożądanych [11].

Struktura kinazy PIM1 obejmuje N-końcową pętlę bogatą w glicynę (aminokwasy 44-52) oraz C-końcową pętlę aktywacyjną (aminokwasy 186-210), połączone elastycznym regionem zawiasowym (*hinge region*), a centrum aktywne enzymu jest umiejscowione w bruzdzie na styku obu pętli [45, 72]. Pętla aktywacyjna, przez oddziaływania polarne — nawet przy braku fosforylacji, stabilizuje PIM w aktywnej konformacji, co tłumaczy konstytutywną aktywność tych kinaz. O ile kinazy PIM wykazują strukturalną homologię z innymi kinazami serynowo-treoninowymi, o tyle unikatowa struktura regionu zawiasowego (prolina 123 tego regionu oraz przylegające aminokwasy) i inna niż w pozostałych kinazach przestrzenna konfiguracja kieszeni wiążącej adenosynotrifosforan (ATP, *adenosine triphosphate*) pozwalają na opracowanie swoistych dla rodziny PIM inhibitorów małowcząsteczkowych [45, 72]. W piśmiennictwie raportowano kilkaset związków z różną selektywnością hamujących poszczególne izoformy lub wszystkie kinazy PIM [45]. Ze względu na funkcjonalną redundancję izoform kinaz PIM, uwarunkowaną zbliżonym spektrum substratów, klinicznie użyteczny inhibitor powinien wykazywać aktywność wobec wszystkich trzech białek z tej rodziny. Opracowanie takiej cząsteczki, działającej jako ATP-kompetytywny inhibitor pan-PIM, w praktyce może jednak stanowić problem ze względu na zróżnicowanie stałych dysocjacji ATP dla PIM1, 2 i 3 (odpowiednio  $K_m = 400 \mu\text{M/L}$ ,  $4 \mu\text{M/L}$  i  $40 \mu\text{M/L}$ ) [73]. Kinaza PIM2 wiąże ATP najsilniej, a zatem jej pełne zahamowanie wymaga wysoce aktywnego związku, zdolnego do kompetycji i wyparcia ATP z kieszeni wiążącej ATP w PIM2 mimo wysokiego komórkowego stężenia ATP (1–10 mM/L — 250–2500-krotnie przekraczającego stałą dysocjacji ATP dla PIM2) [73]. Wyłączenie pojedynczej izoformy powoduje ponadto kompensacyjny wzrost ekspresji dwóch

Tabela 1. Wybrane inhibitory kinaz PIM w badaniach przedklinicznych i klinicznych

Table 1. Selected PIM inhibitors in preclinical and clinical studies

Związek (producent)	Wzór strukturalny	Stan badań
SGI-1776 (Supergen/Astex Pharmaceuticals)	 $2 \times \text{H}_2\text{SO}_4$	Zakończone/przerwane badania fazy I/II w chłoniakach, raku prostaty i białaczkach szpikowych z powodu toksyczności (wydłużenie QTc)
AZD1208 (AstraZeneca)		Ostra białaczka szpikowa (NCT01489722), faza I Guzy lite i chłoniaki, (NCT01588548), faza I
LGH447 (Novartis)	Nie ujawniono	Ostra białaczka szpikowa, zespoły mielodysplastyczne: NCT02078609, faza I Szpiczak plazmocytowy: NCT01456689, faza I Szpiczak plazmocytowy: NCT02144038 faza I/II Nowotwory hematologiczne: NCT02160951, faza I
LGB321 (Novartis)		Badania przedkliniczne
SMI-4a (Medical University of South Carolina)		Badania przedkliniczne
CX-6258 (Cylene)		Badania przedkliniczne
SLV B489 (Selvita)	Nie ujawniono	Badania przedkliniczne

pozostałych izoform, a więc selektywna inhibicja pojedynczych izoform nie jest strategią o racjonalnych podstawach. Większość opracowanych

inhibitorów pan-PIM jest obecnie na etapie badań przedklinicznych, ale część z nich pozostaje w trakcie badań klinicznych wczesnych faz (tab. 1).

### Kinazy PIM w nowotworach układu krwiotwórczego

Spośród nowotworów układu krwiotwórczego wysoką ekspresją kinaz PIM charakteryzują się przede wszystkim przewlekła białaczka szpikowa (CML, *chronic myelogenous leukemia*) oraz ostre białaczki szpikowe (AML, *acute myeloid leukemia*) [40, 72–75]. Nadekspresję PIM obserwuje się u około 30% chorych na AML. Szczególnie wysoką ekspresję obserwowano u chorych z re-aranżacją *MLL* oraz z mutacjami aktywującymi *FLT3* [22, 76, 77]. W pierwszym przypadku indukcja ekspresji tych kinaz wynika z epigenetycznej aktywacji ekspresji czynnika transkrypcyjnego *HOXA9* (*homeobox A9*), wpływającego z kolei na PIM [76]. W komórkach *FLT3-ITD+* do indukcji kinaz PIM prowadzi natomiast aktywność czynników transkrypcyjnych STAT wywołana obecnością aktywowanego mutacją receptora [40]. Ekspresję kinaz PIM indukują również mutacje aktywujące V617F *JAK2* (*Janus tyrosine kinase 2*) oraz białko fuzyjne BCR-ABL1; w obu przypadkach w mechanizmie zależnym od czynników STAT [78–80]. Kinazy PIM w tych nowotworach stanowią ważne ogniwo patogenetyczne i istotny element efektorowy tych onkogennych aberracji strukturalnych. Inhibitory kinaz PIM w modelach przedklinicznych wykazują wysoką aktywność w modelach *in vitro* i *in vivo*. W blastach białaczkowych inkubowanych z inhibitorem pan-PIM następuje zmniejszenie aktywności czynników transkrypcyjnych zależnych od PIM — w tym c-MYC i STAT5, zahamowanie fosforylacji H3S10 oraz zahamowanie translacji zależnej od czapeczki mRNA (spadek aktywności 4E-BP1, białka rybosomalnego S6 oraz spadek aktywności mTOR zależny od wpływu kinaz PIM na białko PRAS40) [40, 73–75]. W komórkach AML obserwowano również spadek fosforylacji S112 BAD i obniżenie ekspresji antyapoptotycznego białka MCL1 (zależnego od spadku translacji). W konsekwencji inhibitory kinaz PIM (w tym SGI-1776, AZD1208, LGB321) powodują zahamowanie cyklu komórkowego i prowadzą do apoptozy blastów AML [40, 73–75]. Największą wrażliwość na inhibitory PIM wykazują komórki białaczkowe charakteryzujące się wysoką ekspresją aktywnej formy czynnika transkrypcyjnego STAT5 (fosfo-Y694/699) i ekspresją białka regulowanego przez STAT5, powierzchniowego receptora IL 2, białka ILR2A (CD25) [40]. Wymuszona ekspresja aktywnego STAT5 prowadzi do zwiększenia ekspresji CD25 i zwiększenia wrażliwości na inhibitory PIM. Do aktywacji STAT5 dochodzi między innymi w trakcie nabywania przez blasty białaczkowe

oporności na cytostatyki, na przykład cytarabinę [40]. Komórki linii AML KG1 odporne na cytarabinę charakteryzowały się wyższą ekspresją CD25 niż komórki kontrolne (wrażliwe na ten cytostatyki) i charakteryzowały się istotnie większą wrażliwością na inhibitory PIM. We wszystkich komórkach odpowiadających na zahamowanie tych kinaz obserwowano spadek fosforylacji c-MYC, jego zwiększoną ubikwitynację i degradację [40]. Ponieważ STAT5 i c-MYC odgrywają istotną rolę w podtrzymywaniu, ekspansji i samoodnowie prawidłowych i białaczkowych komórek macierzystych, to obserwacje te mogą sugerować, że inhibitory PIM — poprzez wyłączenie tych czynników transkrypcyjnych — uderzają w program transkrypcyjny odpowiadający za fenotypowe i czynnościowe cechy białaczkowej komórki macierzystej. Aktywność STAT5 i ekspresja regulowanego przez ten czynnik powierzchniowego antygeny CD25 mogą ponadto stanowić biomarker wrażliwości na inhibitory pan-PIM. W odróżnieniu od wielu innych kinaz onkogennych, będących celem małowcząsteczkowych inhibitorów, na aktywność kinaz PIM nie wpływają aberracje strukturalne, zatem nie mogą one stanowić klinicznego „binarnego” biomarkera wskazującego na aktywność bądź brak aktywności kinazy ani stanowić podstawy do stratyfikacji chorych do badania klinicznego (mutacja → aktywność, włączenie leku; brak mutacji → brak aktywności i brak wskazań do włączenia leku). Z tego względu stan powierzchniowej ekspresji CD25 może być bardzo istotnym czynnikiem stratyfikującym w badaniach klinicznych nad racjonalnym zastosowaniem inhibitorów tych kinaz w AML. Jak w przypadku wszelkich zmiennych ciągłych, wykorzystanie ekspresji CD25 będzie jednak wymagało precyzyjnego zdefiniowania punktów odcięcia i dychotomizacji wyników cytometrii przepływowej (brak/niska ekspresja *v.* wysoka ekspresja) oraz standaryzacji w celu zapewnienia porównywalności między laboratoriami.

Do badań klinicznych w nowotworach układu krwiotwórczego dotychczas trafiły dwa inhibitory — SGI-1776 (*Supergen*), którego rozwój zakończono ze względu na kardiotoksyczność, oraz LGH447 (*Novartis*). Trwa badanie I fazy u chorych na AML i MDS wysokiego ryzyka (NCT02078609).

### Kinazy PIM w nowotworach układu chłonnego

Od czasu odkrycia roli kinaz PIM w akceleracji nowotworów układu chłonnego inicjowanych przez c-MYC nadekspresję kinaz z tej rodziny opisano w wielu nowotworach B-komórkowych. Ekspre-



się przynajmniej jednej z 3 izoform kinaz PIM obserwuje się w większości chłoniaków rozlanych z dużych komórek B (DLBCL, *diffuse large B-cell lymphoma*), chłoniaku grudkowym (FL, *follicular lymphoma*), przewlekłej białaczce limfocytowej (CLL, *chronic lymphocytic leukemia*), chłoniaku z komórek płaszczka (MCL, *mantle cell lymphoma*) i szpiczaku plazmocytowym (PCM, *plasma cell myeloma*) [81]. W DLBCL i chłoniaku Burkitta (BL, *Burkitt lymphoma*) locus kinazy *PIM1* zawiera mutacje wynikające z aberrantnej hipermutacji somatycznej [82]. Mutacje te występują u około 40% chorych na DLBCL i dotyczą N-końcowej części białka, zawierającej domenę katalityczną i kieszeń wiążącą ATP [82]. Funkcjonalne konsekwencje tych mutacji nie zostały jednak dotychczas wyjaśnione. Ekspresja kinazy *PIM1* jest większa w DLBCL o profilu ekspresji ABC (*activated B-cell like*) niż w chłoniakach GCB (*germinal center B-cell like*) i towarzyszy jej obecność aktywnych czynników transkrypcyjnych *STAT3* i *STAT5* [83]. Jądrowa obecność kinazy *PIM1* w DLBCL wiąże się z większą aktywnością proliferacyjną komórek DLBCL i wyższym klinicznym stopniem zaawansowania choroby [84].

Ekspresja kinazy *PIM1* wykazuje ponadto związek z rokowaniem u chorych na MCL. Wysoka ekspresja *PIM1* oceniana immunohistochemicznie stanowiła niekorzystny czynnik rokowniczy w zakresie czasu przeżycia wolnego od progresji i całkowitego czasu przeżycia w homogennej grupie wcześniej nieleczonych pacjentów z MCL, których poddano intensywnej immunochemioterapii, a następnie autologicznemu przeszczepieniu krwiotwórczych komórek macierzystych (auto-HSCT, *autologous hematopoietic stem cell transplantation*) [85]. Ekspresja *PIM1* występuje u 1/2–2/3 chorych na MCL, a obecność *PIM1* i *PIM2* dotyczy do 90% chorych [81, 85]. U chorych na MCL z wysoką ekspresją *PIM1* lub *PIM2* obserwowano również wyższą ekspresję *MDM2*, ligazy *E3* ubikwityny destabilizującej między innymi *p53* [68]. Inhibicja kinaz PIM w modelach linii komórkowych MCL *in vitro* powoduje zahamowanie fosforylacji i aktywności ich substratów, a w konsekwencji — zmniejszenie translacji białek, zahamowanie progresji cyklu komórkowego i śmierć komórek [86]. W szczególności zahamowanie kinaz PIM w MCL (zarówno w liniach MCL, jak i komórkach pierwotnych) powoduje destabilizację *c-MYC* i zmniejszenie jego ekspresji, a w rezultacie — globalny spadek transkrypcji [86]. Zahamowanie kinaz PIM w komórkach MCL prowadzi do zmniejszenia translacji „słabych” transkryptów, w tym *MCL1*. W tych badaniach stopień

zahamowania transkrypcji i translacji w komórkach MCL był wprost proporcjonalny do nasilenia apoptozy, co wskazuje, że upośledzenie tych fundamentalnych procesów komórkowych jest głównym mechanizmem toksyczności pan-inhibitora PIM, SGI-1776 w MCL [86]. Podobne zjawiska związane z toksycznością występują wskutek inaktywacji kinaz PIM poprzez interferencję RNA, co potwierdza specyficzność działania inhibitorów macierzasteczkowych.

W komórkach CLL z nadekspresją PIM receptor *CXCR4* jest hiperfosforylowany (S339), a inhibicja lub genetyczne wyłączenie kinazy *PIM1* powoduje zmniejszenie fosforylacji tej seryny, spadek powierzchniowej ekspresji *CXCR4* oraz niższe natężenie sygnału zależnego od tego receptora w komórkach CLL [55]. Komórki białaczkowe po zahamowaniu *CXCR4* wykazywały obniżoną zdolność do zasiedlania nisz szpikowych i śledziony. W odróżnieniu od kinazy *PIM1*, regulującej głównie migrację, kinazy *PIM2* i *PIM3* w CLL działają antyapoptotycznie [55]. Blokada kinaz PIM w CLL może zatem prowadzić do uwolnienia komórek z cytoprotekcyjnego mikrośrodowiska węzłowego i szpikowego oraz zwiększać wrażliwość komórek na działanie leków cytotoksycznych.

W komórkach PCM najwyższą ekspresję spośród kinaz PIM wykazuje *PIM2* [19, 51]. Ekspresja kinazy *PIM2* w PCM jest regulowana siecią powiązań parakrynych z mikrośrodowiskiem i prowadzi do zwiększenia oporności nowotworowych plazmocytoów na czynniki proapoptotyczne — w tym leki [19]. W modelach komórkowych *in vitro* jej obecność jest niezbędna do podtrzymania proliferacji [51]. Farmakologiczne wyłączenie aktywności kinaz PIM (LGB321) prowadzi do zahamowania wzrostu komórek w modelach *in vitro* i *in vivo* (ksenoprzeszczepach linii komórek PCM) [51]. Biochemicznym podłożem tych zjawisk jest wpływ kinazy *PIM2* na aktywność szlaku *mTORC1*, zależny od fosforylacji Ser1798 inhibitora szlaku *mTORC1*, białka *TSC2* [51]. Obok wpływu na translację *mTORC1* jest kluczowym regulatorem autofagii, zatem spadek aktywności tego kompleksu, spowodowany działaniem paninhibitora PIM, SGI-1776 może tłumaczyć indukcję tego procesu i działanie cytodestrukcyjne również w tym mechanizmie [52]. Nadekspresja *PIM2* dotyczy jednak nie tylko plazmocytoów nowotworowych, ale również komórek podścieliska i prekursorów osteoblastów, w których aktywność tego enzymu powoduje zahamowanie kościotworzenia [87]. Kinaza *PIM2* w osteoblastach jest indukowana działaniem uwalnianych w PCM cytokin prozapalnych hamujących

osteogenezę (TNF $\alpha$ , IL 3, IL 7, czynnik wzrostu nowotworów  $\beta$  [TGF- $\beta$ , *tumor growth factor  $\beta$* ]). Indukowana przez te czynniki aktywność kinazy PIM2 w prekursorach osteoblastów antagonizuje działanie BMP2 (*bone morphogenetic protein 2*) — cytokiny działającej anabolicznie i osteogennie [87]. W konsekwencji zablokowanie PIM2 w tych komórkach zwiększa osteogenezę, a w mysich modelach PCM paninhibitor PIM zmniejszał proliferację komórek nowotworowych i skutecznie zapobiegał utracie tkanki kostnej [87]. Z tego względu strategia terapeutyczna ukierunkowana na zahamowanie kinaz PIM w PCM może wywierać działanie plejotropowe dotyczące zarówno komórek nowotworowych, jak i ich mikrośrodowiska oraz przerywać ich wzajemne powiązania patogenetyczne. Toczą się badania kliniczne z udziałem chorych na nowotwory układu chłonnego z zastosowaniem inhibitora pan-PIM LGH447 (*patrz* tab. 1).

### Perspektywy

Ze względu na szerokie spektrum substratów wpływających na ważne funkcje biologiczne komórek nowotworowych oraz współdziałanie z innymi onkogenami kinazy PIM stanowią obiecujący cel terapeutyczny. Dane z modeli przedklinicznych *in vitro* i *in vivo* z użyciem małowcząsteczkowych inhibitorów potwierdzają potencjał strategii terapeutycznych ukierunkowanych na kinazy z tej grupy. Badania te pozwoliły również zdefiniować kluczowe szlaki sygnałowe i białka, których aktywność ulega zmianie wskutek wyłączenia PIM — w tym translację, transkrypcję, apoptozę i cykl komórkowy. Kinazy PIM wpływają na aktywność tych szlaków w nieco odmienny sposób niż ich „kanoniczne” regulatory, co wskazuje na duży potencjał racjonalnego łączenia tych inhibitorów z innymi modulatorami tych szlaków. Na przykład, dane eksperymentalne potwierdzają synergię między inhibitorami mTOR i PIM w zakresie zahamowania translacji, a badania kliniczne I/II fazy nad połączeniem inhibitorów szlaku AKT/mTOR i inhibitora kinaz PIM są w toku. Poprzez wpływ na szlak p53 i białko BAD inhibitory PIM mogą uwrażliwiać komórki nowotworowe na klasyczne chemioterapeutyki, a pierwsze obserwacje również potwierdzają prawidłowość tych założeń. Podobnie jak w przypadku każdej terapii celowanej racjonalne stosowanie kliniczne inhibitorów kinaz PIM będzie wymagało wskazania populacji chorych, u których stosowanie leku będzie uzasadnione. Ze względu na molekularny mechanizm regulacji aktywności kinaz PIM w odniesieniu do większości nowotworów obecnie nie jest znany żaden racjonalny biomarker, a w szczególności brakuje biomarkera

„binarnego”, który pozwalałby w sposób jednoznaczny określić wskazania dla tej grupy cząstek. W większości badań pojęcia „wysokiej” i „niskiej” ekspresji są arbitralne i niemożliwe do wystandaryzowania i zastosowania w praktyce klinicznej, a w szczególności w ramach badań klinicznych. Dlatego obecnie trwają intensywne poszukiwania biomarkerów wskazujących na aktywność kinaz PIM w sposób pośredni, a jednocześnie uwzględniających kontekst biologiczny aktywności i sposobu ich regulacji. Pierwszym sukcesem w tym zakresie może się okazać ekspresja CD25 w AML. Trwające i przyszłe badania kliniczne, zwłaszcza oparte na racjonalnej, rygorystycznej stratyfikacji chorych z zastosowaniem biomarkerów odzwierciedlających kontekst biologiczny aktywności tych kinaz, mogą się przyczynić do wprowadzenia do praktyki tej nowej klasy leków.

### Źródła finansowania

Projekt został sfinansowany ze środków Narodowego Centrum Nauki przyznanych na podstawie decyzji numer DEC-2011/03/B/NZ4/02020.

### Piśmiennictwo

1. Nawijn M.C., Alendar A., Berns A. For better or for worse: the role of Pim oncogenes in tumorigenesis. *Nat. Rev. Cancer* 2011; 11: 23–34.
2. Cuypers H.T., Selten G., Quint W. i wsp. Murine leukemia virus-induced T-cell lymphomagenesis: integration of proviruses in a distinct chromosomal region. *Cell* 1984; 37: 141–150.
3. van Lohuizen M., Verbeek S., Krimpenfort P. i wsp. Predisposition to lymphomagenesis in pim-1 transgenic mice: cooperation with c-myc and N-myc in murine leukemia virus-induced tumors. *Cell* 1989; 56: 673–682.
4. Selten G., Cuypers H.T., Zijlstra M., Melief C., Berns A. Involvement of c-myc in MuLV-induced T cell lymphomas in mice: frequency and mechanisms of activation. *EMBO J.* 1984; 3: 3215–3222.
5. Verbeek S., van Lohuizen M., van der Valk M., Dömen J., Kraal G., Berns A. Mice bearing the E mu-myc and E mu-pim-1 transgenes develop pre-B-cell leukemia prenatally. *Mol. Cell. Biol.* 1991; 11: 1176–1179.
6. Mikkers H., Allen J., Knipscheer P. i wsp. High-throughput retroviral tagging to identify components of specific signaling pathways in cancer. *Nat. Genet.* 2002; 32: 153–159.
7. van der Lugt N.M., Dömen J., Verhoeven E. i wsp. Proviral tagging in E mu-myc transgenic mice lacking the Pim-1 proto-oncogene leads to compensatory activation of Pim-2. *EMBO J.* 1995; 14: 2536–2544.
8. Bouquet C., Melchers F. Pim1 and Myc reversibly transform murine precursor B lymphocytes but not mature B lymphocytes. *Eur. J. Immunol.* 2012; 42: 522–532.
9. Baron B.W., Anastasi J., Hyjek E.M. i wsp. PIM1 gene cooperates with human BCL6 gene to promote the development of lymphomas. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2012; 109: 5735–5739.
10. Chen J.L., Limnander A., Rothman P.B. Pim-1 and Pim-2 kinases are required for efficient pre-B-cell transformation by v-Abl oncogene. *Blood* 2008; 111: 1677–1685.

11. Mikkers H., Nawijn M., Allen J. i wsp. Mice deficient for all PIM kinases display reduced body size and impaired responses to hematopoietic growth factors. *Mol. Cell. Biol.* 2004; 24: 6104–6115.
12. Domen J., Von Lindern M., Hermans A., Breuer M., Grosveld G., Berns A. Comparison of the human and mouse PIM-1 cDNAs: nucleotide sequence and immunological identification of the in vitro synthesized PIM-1 protein. *Oncogene Res.* 1987; 1: 103–112.
13. De Benedetti A., Graff J.R. eIF-4E expression and its role in malignancies and metastases. *Oncogene* 2004; 23: 3189–3199.
14. Hoover D.S., Wingett D.G., Zhang J., Reeves R., Magnuson N.S. Pim-1 protein expression is regulated by its 5'-untranslated region and translation initiation factor eIF-4E. *Cell. Growth Differ.* 1997; 8: 1371–1380.
15. Fox C.J., Hammerman P.S., Cinalli R.M., Master S.R., Chodosh L.A., Thompson C.B. The serine/threonine kinase Pim-2 is a transcriptionally regulated apoptotic inhibitor. *Genes Dev.* 2003; 17: 1841–1854.
16. Qian K.C., Wang L., Hickey E.R. i wsp. Structural basis of constitutive activity and a unique nucleotide binding mode of human Pim-1 kinase. *J. Biol. Chem.* 2005; 280: 6130–6137.
17. Woodland R.T., Fox C.J., Schmidt M.R. i wsp. Multiple signaling pathways promote B lymphocyte stimulator dependent B-cell growth and survival. *Blood* 2008; 111: 750–760.
18. Zhu N., Ramirez L.M., Lee R.L., Magnuson N.S., Bishop G.A., Gold M.R. CD40 signaling in B cells regulates the expression of the Pim-1 kinase via the NF-kappa B pathway. *J. Immunol.* 2002; 168: 744–754.
19. Asano J., Nakano A., Oda A. i wsp. The serine/threonine kinase Pim-2 is a novel anti-apoptotic mediator in myeloma cells. *Leukemia* 2011; 25: 1182–1188.
20. Miura O., Miura Y., Nakamura N. i wsp. Induction of tyrosine phosphorylation of Vav and expression of Pim-1 correlates with Jak2-mediated growth signaling from the erythropoietin receptor. *Blood* 1994; 84: 4135–4141.
21. Matikainen S., Sareneva T., Ronni T., Lehtonen A., Koskinen P.J., Julkunen I. Interferon-alpha activates multiple STAT proteins and upregulates proliferation-associated IL-2Ralpha, c-myc, and pim-1 genes in human T cells. *Blood* 1999; 93: 1980–1991.
22. Kim K.T., Baird K., Ahn J.Y. i wsp. Pim-1 is up-regulated by constitutively activated FLT3 and plays a role in FLT3-mediated cell survival. *Blood* 2005; 105: 1759–1767.
23. Mizuki M., Schwable J., Steur C. i wsp. Suppression of myeloid transcription factors and induction of STAT response genes by AML-specific Flt3 mutations. *Blood* 2003; 101: 3164–3173.
24. Nieborowska-Skorska M., Hoser G., Kossev P., Wasik M.A., Skorski T. Complementary functions of the antiapoptotic protein A1 and serine/threonine kinase pim-1 in the BCR/ABL-mediated leukemogenesis. *Blood* 2002; 99: 4531–4539.
25. Zhao Y., Hamza M.S., Leong H.S. i wsp. Kruppel-like factor 5 modulates p53-independent apoptosis through Pim1 survival kinase in cancer cells. *Oncogene* 2008; 27: 1–8.
26. Forshell L.P., Li Y., Forshell T.Z. i wsp. The direct Myc target Pim3 cooperates with other Pim kinases in supporting viability of Myc-induced B-cell lymphomas. *Oncotarget* 2011; 2: 448–460.
27. Kim O., Jiang T., Xie Y., Guo Z., Chen H., Qiu Y. Synergism of cytoplasmic kinases in IL6-induced ligand-independent activation of androgen receptor in prostate cancer cells. *Oncogene* 2004; 23: 1838–1844.
28. Bullock A.N., Debreczeni J., Amos A.L., Knapp S., Turk B.E. Structure and substrate specificity of the Pim-1 kinase. *J. Biol. Chem.* 2005; 280: 41675–41682.
29. Shay K.P., Wang Z., Xing P.X., McKenzie I.F., Magnuson N.S. Pim-1 kinase stability is regulated by heat shock proteins and the ubiquitin-proteasome pathway. *Mol. Cancer Res.* 2005; 3: 170–181.
30. Losman J.A., Chen X.P., Vuong B.Q., Fay S., Rothman P.B. Protein phosphatase 2A regulates the stability of Pim protein kinases. *J. Biol. Chem.* 2003; 278: 4800–4805.
31. Ma J., Arnold H.K., Lilly M.B., Sears R.C., Kraft A.S. Negative regulation of Pim-1 protein kinase levels by the B56beta subunit of PP2A. *Oncogene* 2007; 26: 5145–5153.
32. Mizuno K., Shirogane T., Shinohara A., Iwamatsu A., Hibi M., Hirano T. Regulation of Pim-1 by Hsp90. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2001; 281: 663–669.
33. Brault L., Gasser C., Bracher F., Huber K., Knapp S., Schwaller J. PIM serine/threonine kinases in the pathogenesis and therapy of hematologic malignancies and solid cancers. *Haematologica* 2010; 95: 1004–1015.
34. Morishita D., Katayama R., Sekimizu K., Tsuruo T., Fujita N. Pim kinases promote cell cycle progression by phosphorylating and down-regulating p27Kip1 at the transcriptional and posttranscriptional levels. *Cancer Res.* 2008; 68: 5076–5085.
35. Hammerman P.S., Fox C.J., Cinalli R.M. i wsp. Lymphocyte transformation by Pim-2 is dependent on nuclear factor-kappaB activation. *Cancer Res.* 2004; 64: 8341–8348.
36. Nihira K., Ando Y., Yamaguchi T., Kagami Y., Miki Y., Yoshida K. Pim-1 controls NF-kappaB signalling by stabilizing RelA/p65. *Cell Death Differ.* 2010; 17: 689–698.
37. Zhang Y., Wang Z., Li X., Magnuson N.S. Pim kinase-dependent inhibition of c-Myc degradation. *Oncogene* 2008; 27: 4809–4819.
38. Levenson J.D., Koskinen P.J., Orrico F.C. i wsp. Pim-1 kinase and p100 cooperate to enhance c-Myb activity. *Mol. Cell.* 1998; 2: 417–425.
39. Aho T.L., Sandholm J., Peltola K.J., Ito Y., Koskinen P.J. Pim-1 kinase phosphorylates RUNX family transcription factors and enhances their activity. *BMC Cell Biol.* 2006; 7: 21.
40. Guo Z., Wang A., Zhang W. i wsp. PIM inhibitors target CD25-positive AML cells through concomitant suppression of STAT5 activation and degradation of MYC oncogene. *Blood* 2014; 124: 1777–1789.
41. Zippo A., De Robertis A., Serafini R., Oliviero S. PIM1-dependent phosphorylation of histone H3 at serine 10 is required for MYC-dependent transcriptional activation and oncogenic transformation. *Nat. Cell Biol.* 2007; 9: 932–944.
42. Zippo A., Serafini R., Rocchigiani M., Pennacchini S., Krepelova A., Oliviero S. Histone crosstalk between H3S10ph and H4K16ac generates a histone code that mediates transcription elongation. *Cell* 2009; 138: 1122–1136.
43. Rahl P.B., Lin C.Y., Seila A.C. i wsp. c-Myc regulates transcriptional pause release. *Cell* 2010; 141: 432–445.
44. Chang M., Kanwar N., Feng E. i wsp. PIM kinase inhibitors downregulate STAT3(Tyr705) phosphorylation. *Mol. Cancer Ther.* 2010; 9: 2478–2487.
45. Isaac M., Siu A., Jongstra J. The oncogenic PIM kinase family regulates drug resistance through multiple mechanisms. *Drug Resist. Update* 2011; 14: 203–211.
46. Amaravadi R., Thompson C.B. The survival kinases Akt and Pim as potential pharmacological targets. *J. Clin. Invest.* 2005; 115: 2618–2624.
47. Fox C.J., Hammerman P.S., Thompson C.B. The Pim kinases control rapamycin-resistant T cell survival and activation. *J. Exp. Med.* 2005; 201: 259–266.
48. Culjkovic B., Topisirovic I., Skrabanek L., Ruiz-Gutierrez M., Borden K.L. eIF4E is a central node of an RNA regulon that governs cellular proliferation. *J. Cell Biol.* 2006; 175: 415–426.
49. Janku F., McConkey D.J., Hong D.S., Kurzrock R. Autophagy as a target for anticancer therapy. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 2011; 8: 528–539.
50. Zhang F., Beharry Z.M., Harris T.E. i wsp. PIM1 protein kinase regulates PRAS40 phosphorylation and mTOR activity in FDCP1 cells. *Cancer Biol. Ther.* 2009; 8: 846–853.

51. Lu J., Zavorotinskaya T., Dai Y. i wsp. Pim2 is required for maintaining multiple myeloma cell growth through modulating TSC2 phosphorylation. *Blood* 2013; 122: 1610–1620.
52. Cervantes-Gomez F., Chen L.S., Orlowski R.Z., Gandhi V. Biological effects of the Pim kinase inhibitor, SGI-1776, in multiple myeloma. *Clin. Lymphoma Myeloma Leuk.* 2013; 13 (supl. 2): S317–S329.
53. An N., Kraft A.S., Kang Y. Abnormal hematopoietic phenotypes in Pim kinase triple knockout mice. *J. Hematol. Oncol.* 2013; 6: 12.
54. Grundler R., Brault L., Gasser C. i wsp. Dissection of PIM serine/threonine kinases in FLT3-ITD-induced leukemogenesis reveals PIM1 as regulator of CXCL12-CXCR4-mediated homing and migration. *J. Exp. Med.* 2009; 206: 1957–1970.
55. Decker S., Finter J., Forde A.J. i wsp. PIM kinases are essential for chronic lymphocytic leukemia cell survival (PIM2/3) and CXCR4-mediated microenvironmental interactions (PIM1). *Mol. Cancer Ther.* 2014; 13: 1231–1245.
56. Peled A., Tavor S. Role of CXCR4 in the pathogenesis of acute myeloid leukemia. *Theranostics* 2013; 3: 34–39.
57. Uy G.L., Rettig M.P., Motabi I.H. i wsp. A phase 1/2 study of chemosensitization with the CXCR4 antagonist plerixafor in relapsed or refractory acute myeloid leukemia. *Blood* 2012; 119: 3917–3924.
58. Cen B., Xiong Y., Song J.H. i wsp. The Pim-1 protein kinase is an important regulator of MET receptor tyrosine kinase levels and signaling. *Mol. Cell Biol.* 2014; 34: 2517–2532.
59. Santio N.M., Vahakoski R.L., Rainio E.M. i wsp. Pim-selective inhibitor DHPCC-9 reveals Pim kinases as potent stimulators of cancer cell migration and invasion. *Mol. Cancer* 2010; 9: 279.
60. Mochizuki T., Kitanaka C., Noguchi K., Muramatsu T., Asai A., Kuchino Y. Physical and functional interactions between Pim-1 kinase and Cdc25A phosphatase. Implications for the Pim-1-mediated activation of the c-Myc signaling pathway. *J. Biol. Chem.* 1999; 274: 18659–18666.
61. Bachmann M., Kosan C., Xing P.X., Montenarh M., Hoffmann I., Moroy T. The oncogenic serine/threonine kinase Pim-1 directly phosphorylates and activates the G2/M specific phosphatase Cdc25C. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2006; 38: 430–443.
62. Wang Z., Bhattacharya N., Mixer P.F., Wei W., Sedivy J., Magnuson N.S. Phosphorylation of the cell cycle inhibitor p21Cip1/WAF1 by Pim-1 kinase. *Biochim. Biophys. Acta* 2002; 1593: 45–55.
63. Danial N.N. BAD: undertaker by night, candyman by day. *Oncogene* 2008; 27 (supl. 1): S53–S70.
64. Yan B., Zemska M., Holder S. i wsp. The PIM-2 kinase phosphorylates BAD on serine 112 and reverses BAD-induced cell death. *J. Biol. Chem.* 2003; 278: 45358–45367.
65. Aho T.L., Sandholm J., Peltola K.J., Mankonen H.P., Lilly M., Koskinen P.J. Pim-1 kinase promotes inactivation of the pro-apoptotic Bad protein by phosphorylating it on the Ser112 gatekeeper site. *FEBS Lett.* 2004; 571: 43–49.
66. Macdonald A., Campbell D.G., Toth R., McLauchlan H., Hastie C.J., Arthur J.S. Pim kinases phosphorylate multiple sites on Bad and promote 14-3-3 binding and dissociation from Bcl-XL. *BMC Cell Biol.* 2006; 7: 1.
67. Danial N.N., Gramm C.F., Scorrano L. i wsp. BAD and glucokinase reside in a mitochondrial complex that integrates glycolysis and apoptosis. *Nature* 2003; 424: 952–956.
68. Hogan C., Hutchison C., Marcar L. i wsp. Elevated levels of oncogenic protein kinase Pim-1 induce the p53 pathway in cultured cells and correlate with increased Mdm2 in mantle cell lymphoma. *J. Biol. Chem.* 2008; 283: 18012–18023.
69. Domen J., van der Lugt N.M., Acton D., Laird P.W., Linders K., Berns A. Pim-1 levels determine the size of early B lymphoid compartments in bone marrow. *J. Exp. Med.* 1993; 178: 1665–1673.
70. Domen J., van der Lugt N.M., Laird P.W. i wsp. Impaired interleukin-3 response in Pim-1-deficient bone marrow-derived mast cells. *Blood* 1993; 82: 1445–1452.
71. Vlach G., Nawijn M.C., Webb G.C., Steiner D.F. Pim3 negatively regulates glucose-stimulated insulin secretion. *Islets* 2010; 2: 308–317.
72. Alvarado Y., Giles F.J., Swords R.T. The PIM kinases in hematological cancers. *Expert Rev. Hematol.* 2012; 5: 81–96.
73. Garcia P.D., Langowski J.L., Wang Y. i wsp. Pan-PIM kinase inhibition provides a novel therapy for treating hematologic cancers. *Clin. Cancer Res.* 2014; 20: 1834–1845.
74. Keeton E.K., McEachern K., Dillman K.S. i wsp. AZD1208, a potent and selective pan-Pim kinase inhibitor, demonstrates efficacy in preclinical models of acute myeloid leukemia. *Blood* 2014; 123: 905–913.
75. Chen L.S., Redkar S., Taverna P., Cortes J.E., Gandhi V. Mechanisms of cytotoxicity to Pim kinase inhibitor, SGI-1776, in acute myeloid leukemia. *Blood* 2011; 118: 693–702.
76. Hu Y.L., Passegue E., Fong S., Largman C., Lawrence H.J. Evidence that the Pim1 kinase gene is a direct target of HOXA9. *Blood* 2007; 109: 4732–4738.
77. Agrawal S., Koschmieder S., Baumer N. i wsp. Pim2 complements Flt3 wild-type receptor in hematopoietic progenitor cell transformation. *Leukemia* 2008; 22: 78–86.
78. Wernig G., Gonneville J.R., Crowley B.J. i wsp. The Jak2V617F oncogene associated with myeloproliferative diseases requires a functional FERM domain for transformation and for expression of the Myc and Pim proto-oncogenes. *Blood* 2008; 111: 3751–3759.
79. Adam M., Pogacic V., Bendit M. i wsp. Targeting PIM kinases impairs survival of hematopoietic cells transformed by kinase inhibitor-sensitive and kinase inhibitor-resistant forms of Fms-like tyrosine kinase 3 and BCR/ABL. *Cancer Res.* 2006; 66: 3828–3835.
80. Hoover R.R., Gerlach M.J., Koh E.Y., Daley G.Q. Cooperative and redundant effects of STAT5 and Ras signaling in BCR/ABL transformed hematopoietic cells. *Oncogene* 2001; 20: 5826–5835.
81. Schatz J.H., Oricchio E., Wolfe A.L. i wsp. Targeting cap-dependent translation blocks converging survival signals by AKT and PIM kinases in lymphoma. *J. Exp. Med.* 2011; 208: 1799–1807.
82. Pasqualucci L., Neumeister P., Goossens T. i wsp. Hypermutation of multiple proto-oncogenes in B-cell diffuse large-cell lymphomas. *Nature* 2001; 412: 341–346.
83. Rosenwald A., Wright G., Chan W.C. i wsp. The use of molecular profiling to predict survival after chemotherapy for diffuse large-B-cell lymphoma. *N. Engl. J. Med.* 2002; 346: 1937–1947.
84. Brault L., Menter T., Obermann E.C. i wsp. PIM kinases are progression markers and emerging therapeutic targets in diffuse large B-cell lymphoma. *Br. J. Cancer* 2012; 107: 491–500.
85. Hsi E.D., Jung S.H., Lai R. i wsp. Ki67 and PIM1 expression predict outcome in mantle cell lymphoma treated with high dose therapy, stem cell transplantation and rituximab: a Cancer and Leukemia Group B 59909 correlative science study. *Leuk. Lymphoma* 2008; 49: 2081–2090.
86. Yang Q., Chen L.S., Neelapu S.S., Miranda R.N., Medeiros L.J., Gandhi V. Transcription and translation are primary targets of Pim kinase inhibitor SGI-1776 in mantle cell lymphoma. *Blood* 2012; 120: 3491–3500.
87. Hiasa M., Teramachi J., Oda A. i wsp. Pim-2 kinase is an important target of treatment for tumor progression and bone loss in myeloma. *Leukemia* 2015; 29: 207–217.