

# Nový cíl specifické protinádorové léčby mnohočetného myelomu – endoplazmatické retikulum a jeho signální dráhy

The endoplasmic reticulum and its signaling pathways – a novel target for multiple myeloma treatment

Dostálová A.<sup>1</sup>, Vlachová M.<sup>1</sup>, Gregorová J.<sup>1</sup>, Moráň L.<sup>2,3</sup>, Pečinka L.<sup>1</sup>, Gabrielová V.<sup>2</sup>, Vaňhara P.<sup>2,4</sup>, Ševčíková S.<sup>1,5</sup>

<sup>1</sup>Babákova myelomová skupina, Ústav patologické fyziologie, LF MU Brno

<sup>2</sup>Ústav histologie a embryologie, LF MU Brno

<sup>3</sup>Výzkumné centrum aplikované molekulární onkologie (RECAMO), MOÚ Brno

<sup>4</sup>Mezinárodní centrum klinického výzkumu, LF MU (ICRC) a FN u sv. Anny v Brně

<sup>5</sup>Oddělení klinické hematologie, FN Brno

## Souhrn

**Východiska:** Endoplazmatické retikulum (ER), organela tvořená soustavou cisteren a tubulů, je esenciální pro řadu buněčných dějů, mj. pro syntézu a transport proteinů. Pokud se chybně složené proteiny hromadí v lumen ER, dochází k rozvoji stresu ER, přičemž následnou odpovědí na narušení homeostázy je aktivace signální dráhy UPR (z angl. unfolded protein response, tj. odpověď na přítomnost nesbalených proteinů). Cílem procesu je obnovit homeostázu zvyšováním kapacity ER a jeho schopnosti skládat proteiny. K aktivaci homeostatické UPR dochází prostřednictvím některého ze tří transmembránových proteinů, kterými jsou enzym vyžadující inositol 1 $\alpha$  (inositol-requiring enzyme 1 $\alpha$  – IRE1 $\alpha$ ), kináza ER podobná R kináze (proteine kinase R-like ER kinase – PERK) a aktivující transkripční faktor 6 (activating transcription factor 6 – ATF6). V případě selhání pokusu o obnovu homeostázy naopak dochází prostřednictvím hyperaktivace těchto proteinů k rozvoji terminální UPR a apoptóze. Aktivace různých větví UPR byla popsána u mnoha nádorových onemocnění vč. mnohočetného myelomu (MM), který se vyznačuje maligní transformací plazmatických buněk a zvýšenou syntézou monoklonálního imunoglobulinu, kdy je role ER zvláště podstatná. Navzdory pokrokům v léčbě MM zůstává onemocnění jen obtížně léčitelné a cílení na signální dráhy spojené s UPR by mohlo např. podpořit účinek inhibitorů proteazomu. **Cíl:** Tato práce si klade za cíl představit molekulární odpověď na stres ER za fyziologických okolností i v kontextu nádorových onemocnění, a to zejména s přihlédnutím k potenciálním terapeutickým cílům u MM.

## Klíčová slova

mnohočetný myelom – endoplazmatické retikulum – signální dráha UPR

Autoři deklarují, že v souvislosti s předmětem studie nemají žádné komerční zájmy.

The authors declare that they have no potential conflicts of interest concerning drugs, products, or services used in the study.

Redakční rada potvrzuje, že rukopis práce splnil ICMJE kritéria pro publikace zasílané do biomedicínských časopisů.

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE recommendation for biomedical papers.



doc. RNDr. Sabina Ševčíková, Ph.D.  
Babákova myelomová skupina  
Ústav patologické fyziologie,  
LF MU Brno  
Kamenice 5  
625 00 Brno  
e-mail: sevcik@med.muni.cz

Obdrženo/Submitted: 13. 6. 2023

Přijato/Accepted: 13. 10. 2023

doi: 10.48095/ccko2023440

## Summary

**Background:** The endoplasmic reticulum (ER), an organelle composed of a system of cisternae and tubules, is essential for many cellular processes, including protein synthesis and transport. When misfolded proteins accumulate in the ER lumen, ER stress is induced, and the subsequent response to the disruption of homeostasis is the activation of the unfolded protein response (UPR). The purpose of this process is to restore homeostasis by increasing the capacity of the ER and its ability to fold proteins. Activation of the homeostatic UPR occurs via one of three transmembrane proteins, inositol-requiring enzyme 1 $\alpha$  (IRE1 $\alpha$ ), protein kinase R-like ER kinase (PERK) and activating transcription factor 6 (ATF6). Failure of the attempt to restore homeostasis, on the other hand, leads to the development of terminal UPR and apoptosis via hyperactivation of the same proteins. Activation of UPR has been described in many malignancies, including multiple myeloma (MM), which is characterized by malignant transformation of plasma cells and increased monoclonal immunoglobulin synthesis, where the role of the ER is of particular importance. Despite advances in the treatment of MM, the disease remains difficult to treat and targeting signaling pathways associated with the UPR could, for example, enhance the effect of proteasome inhibitors. **Purpose:** This review intends to present the molecular response to ER stress under physiological circumstances and in the context of cancer, particularly with regard to potential therapeutic targets in MM.

## Key words

multiple myeloma – endoplasmic reticulum – unfolded protein response

## Úvod

Mnohočetný myelom (MM) je hematologické onemocnění způsobené maligní transformací plazmatických buněk v kostní dřeni [1].

Endoplazmatické retikulum (ER) tvoří složitý systém membrán a tubulů soustředěných kolem jádra (obr. 1). Strukturně lze rozlišit dva typy ER, drsné a hladké. Drsné ER je tvořeno převážně plochými cisternami, na jejichž povrch je navázáno velké množství ribozomů. Tyto

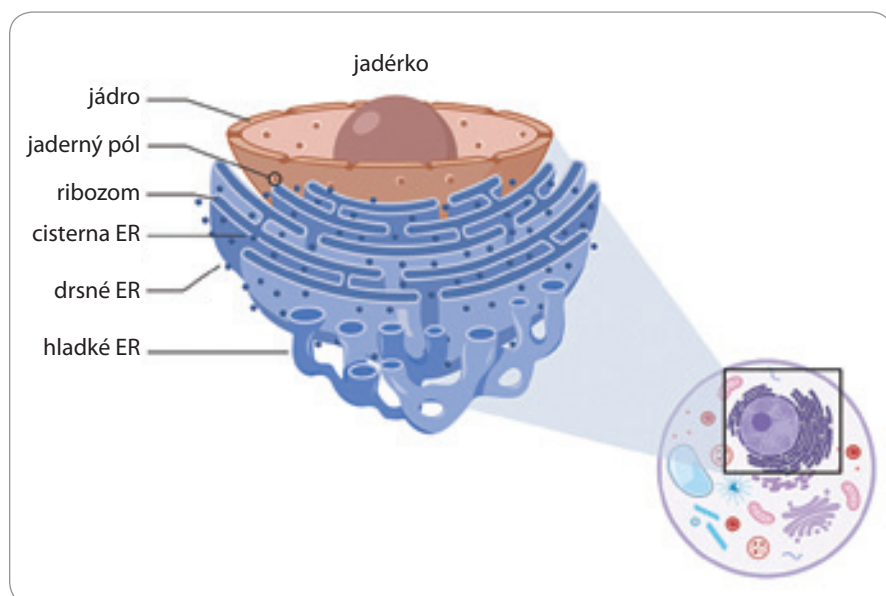
ribozomy překládají proteiny do cisteren ER prostřednictvím signální sekvence, která slouží jako ligand pro translokon [2–5]. V lumen ER jsou nascentní polypeptidy pomocí chaperonů a enzymů skládány a modifikovány (N-glykosylace), a získávají správnou terciární strukturu [6]. Hladké ER je tvořeno převážně tubuly a na rozdíl od drsného ER na něj nenasedají ribozomy, jeho funkce spočívá zejména v syntéze lipidů [2,3]. V plazmatických buňkách převládá

drsné ER, často v podobě dilatovaných a vakuolizovaných cisteren. Primární funkcí ER plazmatických buněk je proteosyntéza, skládání a kontrola kvality imunoglobulinů. Podobně maligní plazmatické buňky vytvářejí stejným mechanismem paraprotein [7].

Správný průběh proteosyntézy a skládání proteinů a jejich průchod ER je komplikovaný biochemický děj. Chybně syntetizované nebo poskládané proteiny jsou degradovány prostřednictvím ER-asociované degradace. Pokud vzniká nesprávně složených proteinů velké množství, začnou se hromadit v lumen ER, dochází k selhání homeostázy ER a nastalý stav je označován jako stres ER. Buňka na něj reaguje zvýšením kapacity a schopnosti ER skládat proteiny. K tomu slouží signální a metabolický proces souhrnně označovaný jako odpověď na přítomnost nesbalených proteinů (unfolded protein response – UPR) [8].

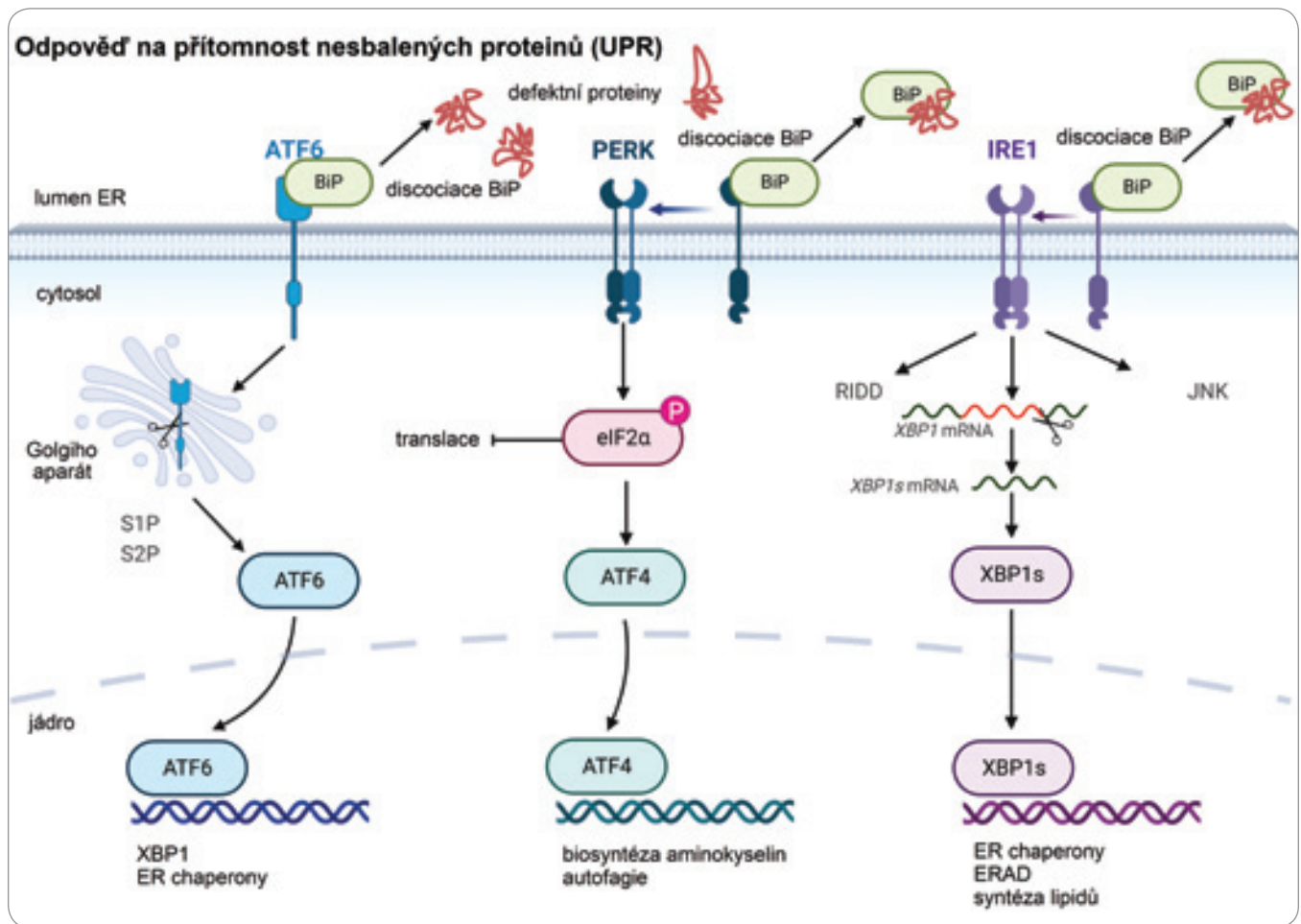
## Molekulární odpověď na stres ER

UPR je molekulárním nástrojem buňky, jak kompenzovat narušení homeostázy ER a proteosyntézy. K aktivaci UPR dochází třemi cestami, prostřednictvím tří transmembránových proteinů, které fungují jako senzory nahromaděných nesprávně poskládaných proteinů v ER. Jedná se o tyto transmembránové proteiny: enzym vyžadující inositol 1 $\alpha$  (inositol-requiring enzyme 1 $\alpha$  – IRE1 $\alpha$ ), kináza ER podobná R kináze (protein kinase R-like ER kinase – PERK) a aktivující transkripční faktor 6 (activating transcription factor 6 – ATF6) [9]. Pokud se



**Obr. 1. Endoplazmatické retikulum.** Tato organela je umístěna v těsné blízkosti buněčného jádra a je tvořena membránami, cisternami a tubuly. Strukturně se dělí na drsné ER s plochými cisternami, k jejichž vnějšímu povrchu jsou navázány ribozomy, a hladké ER tvořené tubuly bez ribozomů. Dvojí morfologie ER podtrhuje odlišnou roli v buněčných procesech, kdy v drsném ER dochází k syntéze proteinů, naproti tomu v hladkém ER se odehrává např. metabolismus lipidů.

ER – endoplazmatické retikulum



Obr. 2. Hlavní mechanismy odpovědi na přítomnost nesbalených proteinů. Transmembránové proteiny se aktivují v reakci na akumulaci defektních proteinů v lumen ER. ATF6, membránově vázaný transkripční faktor, je při stresu ER disociován od chaperonu BiP a následně je transportován do Golgiho aparátu. Tam je zpracován proteázami S1P a S2P, což uvolní jeho cytosolickou doménu, která migruje do jádra a reguluje transkripci cílových genů. Tam je zpracován proteázami S1P a S2P, což uvolní jeho cytosolickou doménu, která migruje do jádra a reguluje transkripci cílových genů. PERK, transmembránová proteinkináza, se po disociaci od BiP aktivuje a fosforyluje podjednotku eIF2 $\alpha$ , čímž dochází k redukci proteosyntézy; zároveň umožňuje zvýšenou expresi např. ATF4. IRE1 je transmembránová ribonukleáza, která po disociaci od BiP umožňuje sestřih XBP1 mRNA, což vede k tvorbě aktivního transkripčního faktoru XBP1s. Aktivovaná forma IRE1 $\alpha$  je schopna také degradovat některé mRNA procesem RIDD.

ATF4 – aktivující transkripční faktor 4, ATF6 – aktivující transkripční faktor 6, BiP – protein vázající imunoglobulin, ER – endoplazmatické retikulum, ERAD – ER-asociovaná degradace, eIF2 $\alpha$  – eukaryotický iniciační faktor 2 $\alpha$ , IRE1 $\alpha$  – enzym vyžadující inositol 1 $\alpha$ , JNK – c-Jun N-terminální kináza, PERK – kináza ER podobná R kináze, RIDD – regulovaný rozklad závislý na IRE1 $\alpha$ , S1P – site-1 proteáza, S2P – site-2 proteáza, UPR – odpověď na přítomnost nesbalených proteinů, XBP1 – X-box vázající protein 1

ER nachází v homeostatickém stavu (nedochází k hromadění nesprávně poskládaných proteinů v lumen ER), jsou transmembránové proteiny inaktivní díky interakci s chaperonem označovaným jako protein vázající imunoglobulin (binding Ig protein – BiP). BiP selektivně váže aminokyselinové zbytky typické pro nesbalené nebo chybně sbalené proteiny. Pokud je kapacita ER dostatečná, nesbalené proteiny se nevytvářejí ve zvýšeném množství, BiP vytváří komplex s IRE1 $\alpha$ , PERK a ATF6 a inaktivuje je. Naopak, v případě akumulace nesbalených

proteinů se BiP z komplexu s transmembránovými proteiny uvolňuje a umožňuje tak jejich aktivaci (obr. 2) [10].

IRE1 $\alpha$  je transmembránový protein v membráně ER. V inaktivní formě se vyskytuje ve formě monomeru. K jeho aktivaci dochází navázáním nesprávně poskládaného proteinu na jeho lumenální doménu a oligomerizací. Je-li ER v homeostatickém stavu, je na lumenální doménu vázán chaperon BiP, např. GRP78 nebo HSPA5. Jeho funkcí je s využitím ATP podporovat skládání proteinů nebo bránit jejich agregaci. Při na-

hromadění abnormálně poskládaných proteinů nebo přetížení kapacity ER se BiP uvolní z vazby s IRE1 $\alpha$ . Po uvolnění BiP dochází k oligomerizaci IRE1 $\alpha$  a tím také k jeho aktivaci [10,11]. Aktivovaná forma IRE1 $\alpha$  má RNázovou aktivitu, která umožňuje alternativní sestřih transkriptu X-box vázajícího proteinu 1 (X-box binding protein 1 – XBP1), čímž vzniká variantní transkripční faktor XBP1s, který selektivně podporuje transkripci genů podílejících se na biogenezi ER a skládání a sekreci proteinů [8]. Aktivovaná forma IRE1 $\alpha$  také dokáže štěpit a tím de-

gradovat některé mRNA, které tak nemohou být překládány do polypeptidového řetězce a nevstupují do cisteren ER. Tato schopnost IRE1 $\alpha$  se nazývá regulovaný rozklad závislý na IRE1 $\alpha$  (regulated IRE1 $\alpha$ -dependent decay – RIDD) [12].

Transmembránový protein PERK je ve své inaktivní formě (stejně jako IRE1 $\alpha$ ) monomer. Také způsob jeho aktivace je stejný jako u IRE1 $\alpha$ , regulovaný prostřednictvím vazby BiP [9]. V aktivované formě má schopnost fosforylovat translační iniciační faktor eIF2 $\alpha$ , a tlumit tak translaci velkého množství mRNA. Zároveň ale umožňuje translaci specifických mRNA, označovaných jako „integrated stress response“ (ISR) mRNAs, kódujících např. transkripční faktor ATF4 nebo protein QRICH1 s dosud ne zcela zřejmou funkcí. ATF4 reguluje expresi dalších chaperonů, QRICH1 je zřejmě zapojený do regulace programované buněčné smrti [9,13].

ATF6 je třetí z transmembránových proteinů. Způsob jeho aktivace je odlišný než ve dvou předchozích případech. Po disociaci BiP je proteolyticky aktivován S1P a S2P proteázami v Golgiho aparátu. Jeho aktivovaná forma translokuje do jádra, kde společně s XBP1s indukuje expresi genů, jejichž regulační oblasti obsahují specifické sekvence označované jako „ER stress specific elements“ (ERSE) [9,10].

Souhrnně lze tedy říct, že ať už je UPR aktivována jakoukoliv ze zmíněných cest, vede ve výsledku ke zvýšení schopnosti ER skládat proteiny a obnovit homeostázu. V takovém případě se jedná o tzv. homeostatické UPR. Když se však homeostázu obnovit nedaří a ER je vystaveno trvalému stresu, přechází homeostatické UPR v UPR terminální, kdy aktivace transmembránových proteinů vede k destrukci buňky. Děje se tak např. prostřednictvím proteinů ze skupiny BCL-2, které ovlivňují integritu mitochondriální membrány a mohou mít jak antiapoptotický, tak i proapoptotický účinek [14]. Hyperaktivace transmembránového proteinu PERK pak může pomocí zvýšené exprese transkripčního faktoru CHOP/GADD153 inhibovat expresi antiapoptotických a naopak iniciovat expresi proapoptotických BCL-2, což vede k buněčné smrti [15]. Dalším z mechanismů terminální UPR je zvý-

šená exprese či aktivace prozánětlivých a proapoptotických proteinů iniciovaná hyperaktivovaným oligomerizovaným IRE1 $\alpha$ . Ten pak pomocí své RNázové aktivity může degradovat specifické mikroRNA, které by se podílely na represi proapoptotických faktorů, jako je např. protein TXNIP. To vede k nárůstu koncentrace těchto proteinů, které pak pomocí aktivace dalších prozánětlivých a proapoptotických faktorů způsobí apoptózu buňky [16].

### UPR v patogenezi nádorových onemocnění

U nádorových buněk může být stav ER stresu vyvolán různými vnitřními i vnějšími příčinami [10]. Mezi ty vnitřní patří aktivace onkogenů nebo ztráta tumor supresorových genů, přetížení proteosyntézy a chyby ve skládání proteinů či oxidativní stres. Navíc samotné nádorové mikroprostředí může vyvolat ER stres v důsledku hypoxie, nedostatku živin, působení prozánětlivých signálních molekul nebo cytotoxického působení protinádorové terapie [17–19]. V odpovědi na tento stav dochází s různou intenzitou k aktivaci různých větví UPR, jak bylo prokázáno u různých typů hematologických malignit, jako je MM, leukemie a lymfomy [20–22], i u solidních nádorů, např. nádoru prsu, tlustého střeva, ledvin, jater, plic či slinivky břišní [23–28].

UPR tedy integruje působení řady faktorů a její pronádorový či protinádorový příspěvek k patogenezi tumoru závisí na konkrétním buněčném a molekulárním kontextu, příp. genotypu pacienta. Existují studie poukazující na jeho protinádorové působení [29]. Více je však těch, které dokládají, že aktivace UPR ovlivňuje různé buněčné procesy ve prospěch nádorových buněk, jak bude uvedeno dále.

Jedním ze způsobů pronádorového působení UPR je jeho vliv na angiogenezi. UPR podporuje angiogenezi u solidních nádorů, což jim umožňuje přežít v prostředí, kde jsou vystaveny nedostatku živin a kyslíku. Děje se tak prostřednictvím proangiogenního růstového faktoru VEGF-A, jehož exprese je indukována pomocí ATF4 [10,30].

Důležitou cestou pronádorového působení UPR je také jeho propojení s au-

tofagií – buněčným procesem zodpovědným za degradaci proteinů a organel [31]. Autofagie dokáže zmírnit akumulaci reaktivních forem kyslíku a zabránit tak poškození DNA, čímž může bránit vzniku nádoru. Na druhou stranu však mohou buňky díky autofagii získávat energii a recyklovat organelové komponenty, což může u nádorových buněk vystavených hypoxii a nedostatku živin zajistit přísun potřebné energie a tím přežití [32]. Bylo prokázáno, že složky všech tří aktivačních cest UPR mohou indukovat aktivaci autofagie [10,31].

UPR má dále vliv na schopnost nádorových buněk migrovat a tvořit metastázy. Např. aktivace transmembránového proteinu PERK může vést k expresi proteinu LAMP3, který je asociován s tvorbou metastáz [33].

Nádorové buňky mohou také využít aktivace UPR k pozměnění metabolických drah, což jim zajistí přežití v případě, že se nachází v prostředí s nedostatkem živin. Např. XBP1s i ATF4 indukuje produkci enzymu GFAT1, který je prvním enzymem hexosaminové biosyntetické dráhy. Ta produkuje UDP-N-acetylglukosamin, důležitý substrát v glykosylaci proteinů a lipidů [34,35].

Dalším ze způsobů, jak může UPR modulovat progresi nádoru je vliv na odpověď na chemoterapeutika [36]. Zvýšená exprese UPR transmembránových proteinů a dalších komponent UPR koreluje u nádoru prsu s rezistencí nádorových buněk k tamoxifenu [37]. Dále byla pozorována spojitost mezi zvýšenou hladinou BiP a rezistencí k léčivům indukujícím apoptózu, jako je doxorubicin. BiP dokáže např. inhibovat aktivaci kaspázy 7, čímž zabrání apoptóze buňky [38,39]. Aktivovaný transmembránový protein PERK fosforyluje nukleární transkripční faktor Nrf2, který indukuje expresi efluxního transportéru MRP1, vylučujícího cytotoxické léčivo z buňky. Buňky, u nichž byla pozorována zvýšená exprese PERK, vykazovaly rezistenci k léčivům oxaliplatinu, 5-fluorouracil a doxorubicin [40]. Jiná studie popisuje vliv ATF6 a proteinu PDIA5, podílejícího se na jeho aktivaci, na rezistenci leukemických buněk vůči léčivu imatinib. Inhibice PDIA5/ATF6 vedla u zkoumaných buněk k obnovení citlivosti k léčivům [41].

Vzhledem ke všem výše uvedeným zjištěním je UPR předmětem dalšího výzkumu jako potenciální cíl specifických cytostatických léčiv [42]. Zkoumány jsou tak např. inhibitory IRE1 $\alpha$  a jeho RNázové aktivity či inhibitory transmembránového proteinu PERK [43]. Inhibitor RNázové aktivity IRE1 $\alpha$  – STF-083010 – vykazoval schopnost cytotoxického působení na buňky MM [44]. A-I06, produkt hydrolyzy STF-083010, taktéž inhibuje RNázovou aktivitu IRE1 $\alpha$ , což vede ke snížené expresi XBP1 a indukci apoptózy nádorových buněk u chronické lymfocytární leukemie [45]. Na myších modelech triple negativního nádoru prsu byly pozorovány účinky MKC8866, dalšího z inhibitorů RNázové aktivity IRE1 $\alpha$ , jehož vlivem došlo k potlačení růstu nádoru [46]. Inhibitor transmembránového proteinu PERK – GSK2606414 – inhiboval u myší růst xenograftu lidského nádoru [47].

### UPR u mnohočetného myelomu

MM tvoří cca 1 % ze všech nádorových onemocnění. Je charakterizovaný klonální proliferací maligních plazmatických buněk (PB) v kostní dřeni, která vede k nadprodukcii monoklonálních imunoglobulinů; typickými projevy onemocnění jsou osteolytická ložiska, selhání ledvin, anemie a hyperkalcemie. V ČR je medián věku pacientů při diagnóze 68 let u mužů a 70 let u žen [1,48].

Signální dráhy asociované s ER jsou klíčové pro diferenciaci, mezibuněčné interakce i fyziologickou funkci plazmatických buněk. Bylo prokázáno, že ke správnému vývoji B lymfocytů a jejich diferenciaci v plazmatické buňky je potřeba transmembránový protein IRE1 $\alpha$  a XBP1 protein [49]. Jiná studie poukázala na dysregulaci XBP1s u pacientů s MM. Byla porovnána hladina XBP1s v normálních PB a PB pacientů s MM. Zatímco u normálních PB byla hladina XBP1s velmi nízká nebo nedetekovatelná, u myelomových PB byla výrazně zvýšená, a to až v 70 % zkoumaných vzorků [50].

V současné době jsou k léčbě MM využívány inhibitory proteazomu. Tyto látky působí inhibiči antiapoptotického transkripčního faktoru NF- $\kappa$ B a mimoto brání

proteazomu degradovat nesprávně poskládané proteiny, v důsledku čehož se proteiny hromadí, dochází ke vzniku stresu ER, aktivaci terminální UPR a indukci apoptózy myelomových buněk [51,52]. Kromě toho, že působí proti nádorovým buňkám, dokáží inhibitory proteazomu redukovat resorpci a zvýšit novotvorbu kostní tkáně u pacientů s MM. Hlavní roli v tomto mechanismu má XBP1s, které vzniká jako produkt aktivace IRE1 $\alpha$  v odpovědi na stres ER způsobený inhibitory proteazomu. XBP1s reguluje diferenciaci osteoblastů a podporuje osteogenezi [53].

Zavedení zmíněných léčiv přineslo významné zlepšení v léčbě pacientů s MM, přesto může dojít k relapsu onemocnění spojenému s rezistencí k inhibitorům proteazomu [54,55]. Proto se testují látky, jejichž použití by mohlo účinek stávajících léčiv podpořit. Zkoumány jsou např. GGS1 inhibitory geranylgeranyl difosfát syntázy (GGDPS). GGDPS se podílí na regulaci transportu proteinů. Je-li tento mechanismus pomocí GGS1 narušen, dochází k hromadění proteinů uvnitř buňky, indukci stresu ER, aktivaci UPR a apoptóze. V kombinaci s inhibitory proteazomu (bortezomib, karfilzomib) dochází ke zpomalení růstu nádoru [56]. Další studie se zaměřuje na inhibitory histonové deacetylázy. Jedním z nich je selektivní inhibitor TMP269. Ten v kombinaci s karfilzomibem indukoval expresi proapoptotického faktoru CHOP a také expresi ATF4, která vedla ke stresu ER a apoptóze. Tento účinek byl pozorován pouze při využití obou léčiv, TMP269 ani karfilzomib samostatně tuto schopnost neměly [57]. Při léčbě proteazomovým inhibitorem bortezomibem dochází k indukci stresu ER u myelomových buněk. Buňky však mohou využít autofagii, jako alternativní způsob vypořádání se s akumulovanými proteiny. Antibiotikum bafilomycin A1 působí jako inhibitor autofagie a v kombinaci s bortezomibem tak zvyšuje jeho účinnost [58]. Jiný inhibitor histonové deacetylázy, SAHA, zabraňuje degradaci nesprávně poskládaných proteinů, které jsou ve formě agregátů za pomoci histonové deacetylázy degradovány. To vede k jejich hromadění v buňce a SAHA v kombinaci s bortezomibem a klaritromycinem (makro-

lidovým antibiotikem zabraňujícím autofagii) tak indukuje stres ER a apoptózu [59]. Další studie se zaměřuje na P13K/Akt cestu, která má důležitou roli v patogenezi MM a podporuje růst nádoru. Inhibice Akt pomocí selektivního inhibitoru TAS-117 vede k aktivaci PERK a IRE1 $\alpha$ , indukci UPR a apoptóze. V kombinaci s inhibitory proteazomu, bortezomibem a karfilzomibem, zvyšuje jejich toxicitu vůči myelomovým buňkám [60]. Další studovanou látkou je verapamil, který blokuje vápníkové kanály a brání přísunu kalciových iontů do buňky. Indukuje tak produkci reaktivních forem kyslíku, autofagii a přispívá k tvorbě proapoptotických stresových signálů a aktivaci terminální UPR u buněk vystavených bortezomibu [61]. Dále bylo zjištěno, že v důsledku stresu ER způsobeného bortezomibem dochází ke zvýšení exprese DR5 receptoru, a naopak snížení exprese HLA-E na povrchu myelomových buněk. Snížená exprese HLA-E vede k senzitivizaci těchto buněk k degradaci NK buňkami, které mají receptor NKG2A. Infuze takovýchto NK buněk, následující po léčbě bortezomibem, by mohla zajistit degradaci i těch buněk, které unikly běžnému mechanismu působení bortezomibu, což by mohlo vést ke zlepšení účinnosti léčby [55]. Dalším ze způsobů, jak podpořit účinek inhibitorů proteazomu je prostřednictvím mutací genů *KRAS*, *NRAS* a *BRAF*, které se často vyskytují u pacientů s MM a podílejí se na rezistenci myelomových buněk k léčivům. Tyto mutace aktivují dráhu mitogenem aktivované protein kinázy (MAPK) a podporují expresi proteazomových podjednotek a chaperonů podílejících se na proteazomové aktivitě, čímž aktivitu proteazomu podporují. Dále mají vliv na aktivaci UPR, kterou snižují. Využití inhibitorů MAPK kinázy (MEK) vedlo k snížení proteazomové aktivity a senzitivizaci myelomových buněk k inhibitorům proteazomu [62]. Podobně Besse et al. popsali masivní změny v metabolismu buněk MM rezistentních k inhibitorům proteazomu, a identifikovali klíčové molekulární dráhy vč. UPR jako potenciální terapeutické cíle [63]. ER a jeho molekulární signalizace může představovat vhodný cíl i pro terapii komplikací MM, jako je např. AL amyloidóza,

pro kterou je typická produkce abnormálních lehkých řetězců, které agregují do amyloidových fibril a deponují v různých orgánech. Cytostatikum melflufen (melphalanflufenamid) je kandidátním léčivem právě pro AL amyloidózu asociovanou s MM. Flanagan et al. identifikovali buněčný cíl pro melflufen, kterým je právě ER a ATF-4 dependentní větev UPR [64].

## Závěr

Léčiva cílená na endoplazmatické retikulum plazmatických buněk a s ním související signální dráhy mohou přispět k léčbě pokročilého MM a k pochopení jeho etiopatogeneze a rozvoje chemorezistence.

## Podporující agentury

Publikace vznikla díky podpoře AZV NU21-03-00076 a LF MUNI/A/1370/2022.

## Literatura

- Rajkumar SV. Multiple myeloma: 2020 update on diagnosis, risk-stratification and management. *Am J Hematol* 2020; 95(5): 548–567. doi: 10.1002/ajh.25791.
- Shibata Y, Shemesh T, Prinz WA et al. Mechanisms determining the morphology of the peripheral ER. *Cell* 2010; 143(5): 774–788. doi: 10.1016/j.cell.2010.11.007.
- Shibata Y, Voeltz GK, Rapoport TA. Rough sheets and smooth tubules. *Cell* 2006; 126(3): 435–439. doi: 10.1016/j.cell.2006.07.019.
- Watson ML. The nuclear envelope. *J Biophys Biochem Cytol* 1955; 1(3): 257–270. doi: 10.1083/jcb.1.3.257.
- Hetzler MW. The nuclear envelope. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2010; 2(3): a000539. doi: 10.1101/cshperspect.a000539.
- Hartl FU, Hayer-Hartl M. Converging concepts of protein folding in vitro and in vivo. *Nat Struct Mol Biol* 2009; 16(6): 574–581. doi: 10.1038/nsmb.1591.
- Ricci D, Gidalevitz T, Argon Y. The special unfolded protein response in plasma cells. *Immunol Rev* 2021; 303(1): 35–51. doi: 10.1111/imr.13012.
- Oakes SA, Papa FR. The role of endoplasmic reticulum stress in human pathology. *Annu Rev Pathol* 2015; 10: 173–194. doi: 10.1146/annurev-pathol-012513-104649.
- Hetz C, Zhang K, Kaufman RJ. Mechanisms, regulation and functions of the unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2020; 21(8): 421–438. doi: 10.1038/s41580-020-0250-z.
- Oakes SA. Endoplasmic reticulum stress signaling in cancer cells. *Am J Pathol* 2020; 190(5): 934–946. doi: 10.1016/j.ajpath.2020.01.010.
- Gardner BM, Walter P. Unfolded proteins are Ire1-activating ligands that directly induce the unfolded protein response. *Science* 2011; 333(6051): 1891–1894. doi: 10.1126/science.1209126.
- Hollien J, Weissman JS. Decay of endoplasmic reticulum-localized mRNAs during the unfolded protein response. *Science* 2006; 313(5783): 104–107. doi: 10.1126/science.1129631.
- Han J, Back SH, Hur J et al. ER-stress-induced transcriptional regulation increases protein synthesis leading to cell death. *Nat Cell Biol* 2013; 15(5): 481–490. doi: 10.1038/ncb2738.
- Hetz C, Papa FR. The unfolded protein response and cell fate control. *Mol Cell* 2018; 69(2): 169–181. doi: 10.1016/j.molcel.2017.06.017.
- Urra H, Dufey E, Lisboa F et al. When ER stress reaches a dead end. *Biochim Biophys Acta* 2013; 1833(12): 3507–3517. doi: 10.1016/j.bbamcr.2013.07.024.
- Lerner AG, Upton JP, Praveen PVK et al. IRE1α induces thioredoxin-interacting protein to activate the NLRP3 inflammasome and promote programmed cell death under irremediable ER stress. *Cell Metab* 2012; 16(2): 250–264. doi: 10.1016/j.cmet.2012.07.007.
- Koumenis C, Naczi C, Koritzinsky M et al. Regulation of protein synthesis by hypoxia via activation of the endoplasmic reticulum kinase PERK and phosphorylation of the translation initiation factor eIF2α. *Mol Cell Biol* 2002; 22(21): 7405–7416. doi: 10.1128/MCB.22.21.7405-7416.2002.
- Zhang A, Zhang J, Sun P et al. EIF2α and caspase-12 activation are involved in oxygen-glucose-serum deprivation/restoration-induced apoptosis of spinal cord astrocytes. *Neurosci Lett* 2010; 478(1): 32–36. doi: 10.1016/j.neulet.2010.04.062.
- Yadav RK, Chae SW, Kim HR et al. Endoplasmic reticulum stress and cancer. *J Cancer Prev* 2014; 19(2): 75–88. doi: 10.15430/JCP.2014.19.2.75.
- Nakamura M, Gotoh T, Okuno Y et al. Activation of the endoplasmic reticulum stress pathway is associated with survival of myeloma cells. *Leuk Lymphoma* 2006; 47(3): 531–539. doi: 10.1080/10428190500312196.
- Schardt JA, Mueller BU, Pabst T. Activation of the unfolded protein response in human acute myeloid leukemia. *Methods Enzymol* 2011; 489: 227–243. doi: 10.1016/B978-0-12-385116-1.00013-3.
- Balague O, Colomo L, Lopez-Guillermo A et al. Activation of the endoplasmic reticulum (ER) unfolded protein response (UPR) in aggressive B-cell lymphomas. *Blood* 2006; 108(11): 2038. doi: 10.1182/blood.V108.11.2038.2038.
- Scriven P, Coulson S, Haines R et al. Activation and clinical significance of the unfolded protein response in breast cancer. *Br J Cancer* 2009; 101(10): 1692–1698. doi: 10.1038/sj.bjc.6605365.
- Piton N, Wason J, Colasse É et al. Endoplasmic reticulum stress, unfolded protein response and development of colon adenocarcinoma. *Virchows Arch Int J Pathol* 2016; 469(2): 145–154. doi: 10.1007/s00428-016-1961-6.
- Fu W, Wu X, Li J et al. Upregulation of GRP78 in renal cell carcinoma and its significance. *Urology* 2010; 75(3): 603–607. doi: 10.1016/j.urol.2009.05.007.
- Shuda M, Kondoh N, Imazeki N et al. Activation of the ATF6, XBP1 and grp78 genes in human hepatocellular carcinoma: a possible involvement of the ER stress pathway in hepatocarcinogenesis. *J Hepatol* 2003; 38(5): 605–614. doi: 10.1016/s0168-8278(03)00029-1.
- Wang Q, He Z, Zhang J et al. Overexpression of endoplasmic reticulum molecular chaperone GRP94 and GRP78 in human lung cancer tissues and its significance. *Cancer Detect Prev* 2005; 29(6): 544–551. doi: 10.1016/j.cdp.2005.09.010.
- Niu Z, Wang M, Zhou L et al. Elevated GRP78 expression is associated with poor prognosis in patients with pancreatic cancer. *Sci Rep* 2015; 5: 16067. doi: 10.1038/srep16067.
- Niederreiter L, Fritz TMJ, Adolph TE et al. ER stress transcription factor Xbp1 suppresses intestinal tumorigenesis and directs intestinal stem cells. *J Exp Med* 2013; 210(10): 2041–2056. doi: 10.1084/jem.20122341.
- Wang Y, Alam GN, Ning Y et al. The unfolded protein response induces the angiogenic switch in human tumor cells through the PERK/ATF4 pathway. *Cancer Res* 2012; 72(20): 5396–5406. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-12-0474.
- Yan MM, Ni JD, Song D et al. Interplay between unfolded protein response and autophagy promotes tumor drug resistance. *Oncol Lett* 2015; 10(4): 1959–1969. doi: 10.3892/ol.2015.3508.
- Jiang X, Overholtzer M, Thompson CB. Autophagy in cellular metabolism and cancer. *J Clin Invest* 2015; 125(1): 47–54. doi: 10.1172/JCI73942.
- Nagelkerke A, Bussink J, Mujic H et al. Hypoxia stimulates migration of breast cancer cells via the PERK/ATF4/LAMP3-arm of the unfolded protein response. *Breast Cancer Res* 2013; 15(1): R2. doi: 10.1186/bcr3373.
- Chaveroux C, Sarcinelli C, Barbet V et al. Nutrient shortage triggers the hexosamine biosynthetic pathway via the GCN2-ATF4 signalling pathway. *Sci Rep* 2016; 6: 27278. doi: 10.1038/srep27278.
- Wang ZV, Deng Y, Gao N et al. Spliced X-box binding protein 1 couples the unfolded protein response to hexosamine biosynthetic pathway. *Cell* 2014; 156(6): 1179–1192. doi: 10.1016/j.cell.2014.01.014.
- Avril T, Vauléon E, Chevet E. Endoplasmic reticulum stress signaling and chemotherapy resistance in solid cancers. *Oncogenesis* 2017; 6(8): e373. doi: 10.1038/oncogenesis.2017.72.
- Andruska N, Zheng X, Yang X et al. Anticipatory estrogen activation of the unfolded protein response is linked to cell proliferation and poor survival in estrogen receptor α-positive breast cancer. *Oncogene* 2015; 34(29): 3760–3769. doi: 10.1038/onc.2014.292.
- Reddy RK, Mao C, Baumeister P et al. Endoplasmic reticulum chaperone protein GRP78 protects cells from apoptosis induced by topoisomerase inhibitors: role of ATP binding site in suppression of caspase-7 activation. *Biol Chem* 2003; 278(23): 20915–20924. doi: 10.1074/jbc.M212328200.
- Lee E, Nichols P, Spicer D et al. GRP78 as a novel predictor of responsiveness to chemotherapy in breast cancer. *Cancer Res* 2006; 66(16): 7849–7853. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-1660.
- Salaroglio IC, Panada E, Moiso E et al. PERK induces resistance to cell death elicited by endoplasmic reticulum stress and chemotherapy. *Mol Cancer* 2017; 16(1): 91. doi: 10.1186/s12943-017-0657-0.
- Higa A, Taojui S, Lhomond S et al. Endoplasmic reticulum stress-activated transcription factor ATF6α requires the disulfide isomerase PDI5 to modulate chemoresistance. *Mol Cell Biol* 2014; 34(10): 1839–1849. doi: 10.1128/MCB.01484-13.
- Marciniak SJ, Chambers JE, Ron D. Pharmacological targeting of endoplasmic reticulum stress in disease. *Nat Rev Drug Discov* 2022; 21(2): 115–140. doi: 10.1038/s41573-021-00320-3.
- Hetz C, Axten JM, Patterson JB. Pharmacological targeting of the unfolded protein response for disease intervention. *Nat Chem Biol* 2019; 15(8): 764–775. doi: 10.1038/s41589-019-0326-2.
- Papandreou I, Denko NC, Olson M et al. Identification of an Ire1α endonuclease specific inhibitor with cytotoxic activity against human multiple myeloma. *Blood* 2011; 117(4): 1311–1314. doi: 10.1182/blood-2010-08-303099.
- Kriss CL, Pinilla-Ibarz JA, Mailloux AW et al. Overexpression of TCL1 activates the endoplasmic reticulum stress response: a novel mechanism of leukemic progression in mice. *Blood* 2012; 120(5): 1027–1038. doi: 10.1182/blood-2011-11-394346.
- Zhao N, Cao J, Xu L et al. Pharmacological targeting of MYC-regulated IRE1/XBP1 pathway suppresses MYC-driven breast cancer. *J Clin Invest* 2018; 128(4): 1283–1299. doi: 10.1172/JCI95873.
- Axten JM, Medina JR, Feng Y et al. Discovery of 7-methyl-5-(1-[[3-(trifluoromethyl)phenyl]acetyl]-2,3-dihydro-1H-indol-5-yl)-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4-amine (GSK2606414), a potent and selective first-in-class inhibitor of protein kinase R (PKR)-like endoplasmic reticulum kinase (PERK). *J Med Chem* 2012; 55(16): 7193–7207. doi: 10.1021/jm300713s.

48. Maluskova D, Svobodová I, Kucerova M et al. Epidemiology of multiple myeloma in the Czech Republic. *Klin Onkol* 2017; 30 (Suppl 2): 35–42. doi: 10.14735/amko20172535.
49. Zhang K, Wong HN, Song B et al. The unfolded protein response sensor IRE1 $\alpha$  is required at 2 distinct steps in B cell lymphopoiesis. *J Clin Invest* 2005; 115(2): 268–281. doi: 10.1172/JCI21848.
50. Carrasco DR, Sukhdeo K, Protopopova M et al. The differentiation and stress response factor XBP-1 drives multiple myeloma pathogenesis. *Cancer Cell* 2007; 11(4): 349–360. doi: 10.1016/j.ccr.2007.02.015.
51. Obeng EA, Carlson LM, Gutman DM et al. Proteasome inhibitors induce a terminal unfolded protein response in multiple myeloma cells. *Blood* 2006; 107(12): 4907–4916. doi: 10.1182/blood-2005-08-3531.
52. Hideshima T, Chauhan D, Richardson P et al. NF- $\kappa$ B as a therapeutic target in multiple myeloma. *J Biol Chem* 2002; 277(19): 16639–16647. doi: 10.1074/jbc.M200360200.
53. Zhang D, De Veirman K, Fan R et al. ER stress arm XBP1s plays a pivotal role in proteasome inhibition-induced bone formation. *Stem Cell Res Ther* 2020; 11(1): 516. doi: 10.1186/s13287-020-02037-3.
54. Kumar SK, Callander NS, Alsina M et al. NCCN Guidelines Insights: Multiple Myeloma, Version 3.2018. *J Natl Compr Canc Netw* 2018; 16(1): 11–20. doi: 10.6004/jncn.2018.0002.
55. Carlsten M, Namazi A, Reger R et al. Bortezomib sensitizes multiple myeloma to NK cells via ER-stress-induced suppression of HLA-E and upregulation of DR5. *Oncoimmunology* 2019; 8(2): e1534664. doi: 10.1080/2162402X.2018.1534664.
56. Haney SL, Varney ML, Williams JT et al. Geranylgeranyl diphosphate synthase inhibitor and proteasome inhibitor combination therapy in multiple myeloma. *Exp Hematol Oncol* 2022; 11(1): 5. doi: 10.1186/s40164-022-00261-6.
57. Kikuchi S, Suzuki R, Ohguchi H et al. Class IIa HDAC inhibition enhances ER stress-mediated cell death in multiple myeloma. *Leukemia* 2015; 29(9): 1918–1927. doi: 10.1038/leu.2015.83.
58. Kawaguchi T, Miyazawa K, Moriya S et al. Combined treatment with bortezomib plus bafilomycin A1 enhances the cytotoxic effect and induces endoplasmic reticulum stress in U266 myeloma cells: crosstalk among proteasome, autophagy-lysosome and ER stress. *Int J Oncol* 2011; 38(3): 643–654. doi: 10.3892/ijo.2010.882.
59. Moriya S, Komatsu S, Yamasaki K et al. Targeting the integrated networks of aggresome formation, proteasome, and autophagy potentiates ER stress-mediated cell death in multiple myeloma cells. *Int J Oncol* 2015; 46(2): 474–486. doi: 10.3892/ijo.2014.2773.
60. Mimura N, Hideshima T, Shimomura T et al. Selective and potent Akt inhibition triggers anti-myeloma activities and enhances fatal endoplasmic reticulum stress induced by proteasome inhibition. *Cancer Res* 2014; 74(16): 4458–4469. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-13-3652.
61. Meister S, Frey B, Lang VR et al. Calcium channel blocker verapamil enhances endoplasmic reticulum stress and cell death induced by proteasome inhibition in myeloma cells. *Neoplasia* 2010; 12(7): 550–561. doi: 10.1593/neo.10228.
62. Shirazi F, Jones RJ, Singh RK et al. Activating KRAS, NRAS, and BRAF mutants enhance proteasome capacity and reduce endoplasmic reticulum stress in multiple myeloma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2020; 117(33): 20004–20014. doi: 10.1073/pnas.2005052117.
63. Besse L, Besse A, Mendez-Lopez M et al. A metabolic switch in proteasome inhibitor-resistant multiple myeloma ensures higher mitochondrial metabolism, protein folding and sphingomyelin synthesis. *Haematologica* 2019; 104(9): e415–e419. doi: 10.3324/haematol.2018.207704.
64. Flanagan K, Kumari R, Miettinen JJ et al. The peptide-drug conjugate melflufen modulates the unfolded protein response of multiple myeloma and amyloidogenic plasma cells and induces cell death. *Hemasphere* 2022; 6(3): e687. doi: 10.1097/H59.0000000000000687.