

Received: 2010.03.11
Accepted: 2010.09.03
Published: 2010.10.19

Kinaza Akt: kluczowy regulator metabolizmu i progresji nowotworów*

Akt kinase: a key regulator of metabolism and progression of tumors

Anna Krześlak

Katedra Cytobiochemii Uniwersytetu Łódzkiego

Streszczenie

Serynowo-treoninowa kinaza białkowa Akt, będąca głównym przekaźnikiem sygnału w szlaku 3-kinazy fosfatydyloinozytolu (PI3K), odgrywa istotną rolę w regulacji procesów związanych ze wzrostem, metabolizmem, przeżyciem i proliferacją komórek. W komórkach ssaków występują trzy izoformy Akt (Akt1, Akt2 i Akt3), które są kodowane przez różne geny. Zwiększona ekspresja i aktywacja tej kinazy obserwowana w wielu nowotworach człowieka jest najczęściej związana z amplifikacją lub mutacją genów kodujących izoformy Akt, amplifikacją i aktywującą mutacją genu katalitycznej podjednostki PI3K oraz delecją lub mutacją genu fosfatazy fosfatydyloinozytolu-3,4,5-trisfosforanu – PTEN. Uważa się, że chociaż aktywność samej kinazy Akt nie jest zwykle wystarczająca do inicjowania procesu onkogenezy, to Akt przyczynia się do progresji nowotworów przez hamowanie apoptozy, promowanie odpowiednich zmian w metabolizmie i proliferacji komórek oraz regulowanie ich zdolności do migracji i inwazji. Ostatnie badania wykazały, że w zależności od typu komórek, poszczególne izoformy Akt mogą mieć pozytywny lub negatywny wpływ na migrację i inwazję komórek nowotworowych. Akt jest włączona także w regulację procesu angiogenezy nowotworów.

Słowa kluczowe:

nowotwory • kinaza Akt • metabolizm • apoptoza • proliferacja • metastaza • angiogeneza

Summary

The serine/threonine protein kinase Akt is a major transducer of the phosphoinositide 3-kinase pathway and plays a crucial role in regulation of cellular processes such as growth, metabolism, survival and proliferation. Mammalian cells are characterized by the expression of three different Akt isoforms (Akt1, Akt2, Akt3), encoded by distinct genes. Increased expression and activation of Akt observed in many human cancers is usually caused by amplification or mutation of Akt genes, amplification and activating mutation of the catalytic subunit of PI3K or deletion and mutations of phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate phosphatase – PTEN. Although activation of Akt alone is believed to be insufficient for tumorigenesis, it contributes to cancer progression by inhibiting apoptosis, promoting changes in metabolism and proliferation of cells and regulating their migration and invasion capabilities. Recent studies have provided evidence that depending on the cell type each specific Akt isoform may play a positive or negative role in cell migration and invasion. Akt is also involved in regulation of tumor angiogenesis.

Key words:

cancers • Akt kinase • metabolism • apoptosis • proliferation • metastasis • angiogenesis

* Praca powstała w trakcie realizacji projektu badawczego nr N301463534 finansowanego przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego.



Full-text PDF: <http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=921321>

Word count: 5487

Tables: 1

Figures: 3

References: 131

Adres autorki: dr Anna Krześlak, Katedra Cytobiochemii Uniwersytetu Łódzkiego, ul S. Banacha 12/16, 90-237 Łódź;
e-mail: krzeslaka@interia.pl

Wykaz skrótów: **4E-BP1** – białko wiążące eukariotyczny czynnik translacji 4E; **acinus** – białko jądrowe indukujące kondensację chromatyny w przebiegu apoptozy; **ACL** – liaza ATP-cytrynianowa; **AS160** – białko o masie 160 kDa, będące substratem dla Akt; **ASK1** – kinaza 1 indukowana sygnałami apoptotycznymi; **bFGF** – zasadowy czynnik wzrostu fibroblastów; **Chk1** – kinaza punktu kontrolnego fazy S; **CREB** – czynnik transkrypcyjny, białko regulujące ekspresję genów zależnych od cAMP; **EGF** – naskórkowy czynnik wzrostu; **eIF4E** – eukariotyczny czynnik inicjacyjny; **EMT** – przejście epithelialno-mezenchymalne; **eNOS** – śródbłonkowa syntaza tlenu azotu; **FOXO** – rodzina czynników transkrypcyjnych; **GSK3** – 3 kinaza syntazy glikogenowej; **HIF-1** – czynnik indukowany niedotlenieniem; **Htra2/Omi** – proteaza serynowa, odpowiada za proteolizę inhibitorów apoptozy IAP; **IKK** – kinaza inhibitora czynnika transkrypcyjnego NF-κB; **JNK** – kinaza białkowa fosforylująca N-koniec białka Jun; **MAPK** – kinaza białka aktywowanego przez mitogen; **MDM2** – E3 ligaza ubiquitynowa; **MLK3** – kinaza kinazy MAPK; **mTOR** – kinaza serynowo--treoninowa ssaków, której aktywność hamowana jest przez rapamycynę; **mTORC1** – kompleks 1 kinazy mTOR, składający się z kinazy mTOR oraz białek raptor i mLST8/GβL; **NK-κB** – czynnik transkrypcyjny zidentyfikowany w limfocytach B zaangażowany w ekspresję łańcucha lekkiego typu kappa immunoglobulin; **p21^{Cip/WAF1}** – inhibitor cyklinozależnych kinaz; **p27^{Kip1}** – inhibitor cyklinozależnych kinaz; **PDK1** – kinaza 1 zależna od fosfatydyloinozytolu; **PH** – domena homologiczna do domeny plekstryny, oddziałująca z fosfatydyloinozytofosforanami; **PI3K** – 3 kinaza fosfatydyloinozytolu; **PI3KCA** – domena kinazowa 3 kinazy fosfatydyloinozytolu; **PIP2** – fosfatydyloinozytolo-4,5-bisfosforan; **PIP3** – fosfatydyloinozytolo-3,4,5-trifosforan; **PKB** – kinaza białkowa B; **PP2A** – fosfataza białkowa 2A; **PRAS40** – bogaty w prolinę substrat kinazy Akt o masie cząsteczkowej 40 kDa; **PTEN** – homolog fosfatazy i tensyny; **RAF1** – kinaza kinazy MAPK; **RTK** – receptor o aktywności kinazy tyrozynowej; **SAPK** – szlak kinaz aktywowanych stresem; **SEK1** – kinaza kinazy MAPK; **SREBP** – białka zależne od steroli wiążące sekwencję regulatorową; **TSC2** – tuberyna, tworzy kompleks z hamartyną (TSC1), aktywujący GTP-azę Rheb; **VEGF** – czynnik wzrostu śródbłonka naczyniowego; **WNK1** – kinaza białkowa pozbawiona lizyny w domenie kinazowej; **YAP** – koaktywator czynników transkrypcyjnych.

WSTĘP

Serynowo-treoninowa kinaza Akt, zwana także kinazą białkową B (protein kinase B - PKB), została zidentyfikowana ponad dwadzieścia lat temu jako komórkowy homolog wirusowego onkogenu *v-AKT* [104]. Jednak funkcja tego białka pozostawała tajemnicą jeszcze przez kilka następnych lat, aż do czasu kiedy stwierdzono, że Akt jest głównym efektem 3-kinazy fosfatydyloinozytolu – PI3K (phosphatidylinositol 3-kinase) i przyczynia się do przeżycia komórek pośrednicząc w ich odpowiedzi na działanie czynników wzrostu [24,32]. Prowadzone później intensywne badania wykazały, że Akt odpowiada za fosforylację wielu białek związanych z regulacją podstawowych procesów komórkowych, takich jak transkrypcja, metabolizm, apoptoza, proliferacja czy migracja (tabela 1). Zaburzenia aktywacji Akt są obserwowane w wielu chorobach człowieka, a przede wszystkim w cukrzycy i nowotworach [14,25,75,121,123].

Kinaza Akt charakteryzuje się znaczną konserwatywnością struktury pierwszorzędowej. Sekwencje aminokwasowe Akt nicienia *Caenorhabditis elegans* i człowieka wykazują

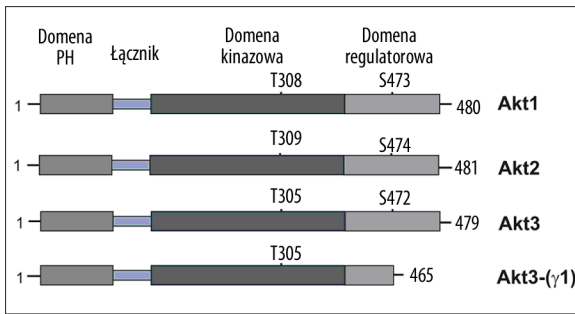
60% identyfikacji. Natomiast Akt myszy, szczura i człowieka mają w 95% taki sam skład aminokwasowy [43]. U ssaków występują trzy izoformy kinazy Akt określane jako Akt1 (PKBα), Akt2 (PKBβ) i Akt3 (PKBγ) będące produktami ekspresji różnych genów [31,43, 75]. Ponadto istnieje jeszcze kinaza Akt3-(γ1) stanowiąca produkt alternatywnego składania mRNA dla Akt3 [43,75].

W warunkach fizjologicznych izoformy Akt1 i Akt2 występują w większości tkanek i narządów, podczas gdy ekspresja Akt3 jest ograniczona do mózgu, jąder, serca, nerek, płuc i mięśni szkieletowych [80,123]. Poszczególne izoformy Akt wydają się spełniać różne biologiczne funkcje o czym świadczą wyniki badań z wykorzystaniem transgenicznych myszy z inaktywacją określonych genów. Stwierdzono, że myszy pozbawione izoformy Akt1 charakteryzują się małym rozmiarem, zaburzonym rozwojem narządów oraz większą podatnością komórek na apoptozę. Wskazuje to, że Akt1 odgrywa rolę w regulacji przeżycia komórek [12]. Natomiast brak Akt2 powoduje przede wszystkim zaburzenie przekazywania sygnału insuliny w wątrobie i mięśniach szkieletowych, co prowadzi do insulinooporności

Tabela 1. Białka fosforylowane przez Akt

Białko	Miejsce fosforylacji	Efekt regulacyjny	Procesy, w które zaangażowane jest białko	Piśmiennictwo
Acinus	S422, S573	hamowanie	apoptoza; białko proapoptotyczne	[47]
ACL	S454	aktywacja	metabolizm, synteza lipidów; liaza ATP-cytrynianowa	[8,94]
AS160/TBC1D4	S588, T642	hamowanie	metabolizm; transport Glut4, białko aktywujące GTP-azę Rab	[27,96]
ASK1	S83	hamowanie	apoptoza; kinaza kinazy MAPK	[58]
Bad	S136	hamowanie	apoptoza; białko proapoptotyczne z rodziny Bcl-2	[18,20]
Bax	S184	hamowanie	apoptoza; białko proapoptotyczne z rodziny Bcl-2	[37]
Chk1	S280	hamowanie	proliferacja; kinaza punktu kontrolnego fazy S	[62,87]
CREB	S133	aktywacja	przeżycie komórki, proliferacja; czynnik transkrypcyjny	[93]
eNOS	S1177	aktywacja	angiogeneza; syntaza tlenu azotu	[22,34]
FOXO (FOXO1, FOXO3A, FOXO4)	T24, S256, S319 (FOXO1)	hamowanie	przeżycie komórki, proliferacja, wzrost; czynniki transkrypcyjne	[48]
GIV/Girdin	S1416	–	migracja; białko wiążące aktywne	[29,30,36]
GSK3 α/β	S21/S9	hamowanie	przeżycie komórki, metabolizm, proliferacja; 3-kinaza syntazy glikogenowej	[15,21]
Htra2/Omi	S212	hamowanie	apoptoza; proteaza serynowa, powoduje proteolizę inhibitorów apoptozy	[116]
IKK α	T23	aktywacja	przeżycie komórki; kinaza fosforylująca I- κ B	[3,91]
Kaspaza 9	S196	hamowanie	apoptoza; białko proapoptotyczne	[9]
MDM2	S166, S186	aktywacja	przeżycie komórki, proliferacja; białko hamujące aktywność p53	[77,126]
MLK3	S674	hamowanie	apoptoza; kinaza kinazy MAPK	[4]
p21 ^{CIP1/WAF1}	T145	hamowanie	proliferacja; inhibitor kinaz cyklinozależnych	[45,125]
p27 ^{KIP1}	T157	hamowanie	proliferacja; inhibitor kinaz cyklinozależnych	[66,100,109]
PRAS40	T246	hamowanie	wzrost komórki; inhibitor kinazy mTOR	[64,95]
RAF1	S259	hamowanie	przeżycie komórki, proliferacja; kinaza kinazy MAPK	[92,131]
SEK1/MKKK4	S78	hamowanie	apoptoza, kinaza kinazy MAPK	[85]
TSC2	T939, T1462	hamowanie	wzrost komórki, proliferacja	[17,49,52,74]
WNK1	T60	–	regulacja przepuszczalności błon dla jonów	[57,110]
YAP	S127	hamowanie	apoptoza, koaktywator czynników transkrypcyjnych	[5,23]





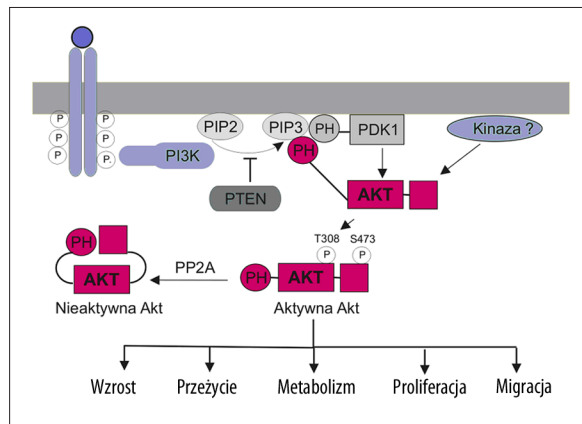
Ryc. 1. Struktura izoform Akt. Wszystkie trzy izoformy kinazy Akt składają się z N-terminalnej domeny PH (plekstrin homology) odpowiedzialnej za wiązanie fosfolipidu, centralnej domeny kinazowej i C-terminalnej hydrofobowej domeny regulatorowej. W domenie katalitycznej i C-terminalnej znajdują się reszty treoniny i seryny, których fosforylacja jest konieczna do aktywacji kinazy Akt. Akt3(γ1) jest wariantem izoformy Akt3 powstającym w wyniku alternatywnego składania mRNA

i cukrzycy [38]. W przypadku myszy pozbawionych Akt3 zaburzenia są głównie natury neurologicznej i u zwierząt tych stwierdza się mniejszy rozmiar mózgu [26].

STRUKTURA I MECHANIZM AKTYWACJI KINAZY AKT

Wszystkie trzy izoformy kinazy Akt mają podobną strukturę. Składają się one z trzech funkcjonalnych domen, tj. N-terminalnej domeny PH (plekstrin homology domain), centralnej domeny kinazowej i C-terminalnej domeny regulatorowej (ryc. 1) [31,43]. W tej ostatniej domenie znajduje się hydrofobowy motyw FxxF/Y-S/T-Y/F (x oznacza jakikolwiek aminokwas), który jest charakterystyczny dla wszystkich kinaz podrodziny AGC (PKA, PKG and PKC related kinases), do której należy Akt [43]. Fosforylacja seryny lub treoniny, znajdujących się w tym motywie jest niezbędna do pełnej aktywacji enzymów. W przypadku izoform Akt ssaków ten motyw jest identyczny – FPQFSY. Akt3-(γ1) powstająca w wyniku alternatywnego składania mRNA nie zawiera tego motywu, a więc aktywacja tej kinazy przebiega w sposób niezależny od fosforylacji reszty seryny.

Kinaza Akt może być aktywowana w wyniku stymulowania komórek insuliną, cytokinami i różnymi czynnikami wzrostu, np. PDGF (platelet derived growth factor), EGF (epidermal growth factor), bFGF (basic fibroblast growth factor), VEGF (vascular endothelial growth factor), HGF (hepatocyte growth factor) i IGF-1 (insulin-like growth factor). Przyłączenie insuliny lub czynników wzrostu do receptorów o charakterze kinaz tyrozynowych, przyczynia się do ich aktywacji w wyniku autofosforylacji i rekrutacji do błony komórkowej 3-kinazy fosfatydilinozytoli (PI3K). PI3K przekształca fosfatydilinozytolo-4,5-bisfosforan (PIP2) do fosfatydilinozytolo-3,4,5-trisfosforanu (PIP3), a ten wpływa na aktywację kinazy Akt poprzez jej rekrutację do błony komórkowej, a także rekrutację do błony kinazy PDK1 (phosphoinositide-dependent kinase 1), stanowiącej główny aktywator Akt (ryc. 2). Umiejscowienie przy błonie komórkowej obu kinaz jest możliwe ponieważ mają one domenę PH, która wykazuje duże powinowactwo do PIP3. PDK1 odpowiada za fosforylację odpowiedniej reszty treoniny znajdującej się w domenie kinazowej Akt

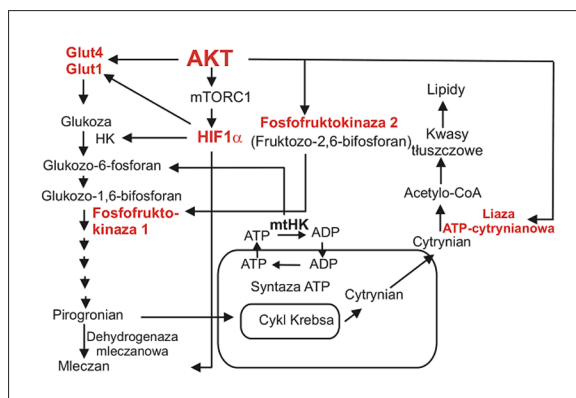


Ryc. 2. Aktywacja kinazy Akt. Zaktywowany przez przyłączenie liganda receptor o aktywności kinazy tyrozynowej powoduje aktywację 3-kinazy fosfatydilinozytoli (PI3K), która przekształca fosfatydilinozytolo 4,5-difosforan (PIP2) do fosfatydilinozytolo-3,4,5-trisfosforanu (PIP3). PIP3 przyczynia się do rekrutacji kinazy Akt do błony komórkowej, gdzie ulega aktywacji na skutek fosforylacji reszty treoniny i seryny. Aktywna Akt bierze udział w procesach związanych ze wzrostem, przeżyciem, metabolizmem, proliferacją i migracją komórek. PDK1 – kinaza 1 zależna od fosfatydilinozytoli, PP2A – fosfataza białkowa 2A

[31,43,59]. W przypadku izoformy Akt1 jest to treonina w pozycji 308 (ryc. 1). Pełna aktywacja kinazy Akt wymaga również fosforylacji reszty seryny 473. występującej w obrębie hydrofobowego motywu domeny C-terminalnej. Uważa się, że fosforylacja tych dwóch reszt jest niezależna od siebie. Nadal nie ma pewności, która kinaza odpowiada za fosforylację seryny w domenie regulatorowej. Sugeruje się, że zaangażowane w ten proces mogą być: kinazy PDK1 lub PDK2, ILK (integrin-linked kinase), MAPKAP 2-kinaza (MAPK-activated protein kinase 2), kinaza białkowa C βII, mTORC2 (mTOR (mammalian target of rapamycin) complex 2) lub fosforylacja zachodzi autokatalitycznie [31,43,74,75,114].

AKTYWNOŚĆ AKT W NOWOTWORACH

Zwiększoną ekspresję i aktywację Akt stwierdza się w wielu nowotworach człowieka. Amplifikację genów Akt wykazano w przypadku glejaka, raków głowy i szyi, żołądka, trzustki, jajników, prostaty i sutka [14,80]. W wielu różnych nowotworach obserwuje się zwiększoną ekspresję izoformy Akt2. Akt1 występuje przede wszystkim w nowotworach przewodu pokarmowego, prostaty, sutka i jajników. Ekspresja Akt3 w przypadku nowotworów, podobnie jak w tkankach prawidłowych, jest znacznie ograniczona. Nadekspresję tej kinazy stwierdzono tylko w raku prostaty opornym na hormonoterapię, czerniaku i raku sutka [14,80]. W literaturze biochemicznej niewiele jest danych dotyczących somatycznych mutacji genów kodujących izoformy Akt [103]. Niedawno jednak Carpten i wsp. [10] stwierdzili taką mutację w genie Akt1 w raku sutka, jelita grubego i jajnika. Rezultatem tej mutacji jest zamiana występującego w pozycji 17 kwasu glutaminowego na lizynę. Mutacja ta sprawia, że Akt1 umiejscawia się przy błonie komórkowej, dzięki czemu jest konstytutywnie aktywna. Podobnej mutacji nie stwierdzono dla Akt2 i Akt3.



Ryc. 3. Udział kinazy Akt w metabolizmie komórek nowotworowych. Akt wpływa na: 1) zwiększenie liczby transporterów glukozy w błonie komórkowej; 2) ekspresję HIF-1 α (który w warunkach niedotlenienia indukuje ekspresję Glut1, heksokinazy i dehydrogenazy mleczanowej); 3) aktywację fosfofruktokinazy 2, której produkt fruktozo-2,6-bifosforan jest aktywatorem fosfofruktokinazy 1; 4) umiejscowienie heksokinaz przy błonie mitochondrialnej; 5) aktywację liazy ATP-cytrynianowej (opracowano na podstawie [89] – zmodyfikowano)

Zwiększona aktywność Akt w nowotworach może wynikać również z amplifikacji genu PI3K, utraty aktywności fosfatazy PTEN (phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten) i aktywacji lub mutacji kinaz receptorowych oraz onkogenów [16]. Aktywująca mutacja genu kodującego katalityczną podjednostkę kinazy PI3K – *PI3KCA*, jest obserwowana w glejaku, ostrej białaczce szpikowej oraz rakach jelita grubego, żołądka, sutka, płuc, jajników, wątroby i tarczycy [55]. Amplifikacja i nadekspresja PI3KCA została stwierdzona w nowotworach szczy, żołądka, jajników i sutka. Supresor nowotworów PTEN, będący fosfatazą fosfotydylo-3,4,5-trisfosforanu odłączającą resztę fosforanową z pozycji 3, ulega często mutacji w przypadku glejaka, czerniaka oraz raka żołądka, jajników, nerek, sutka i płuc. Wynikająca z przedstawionych wyżej mechanizmów podwyższona aktywność Akt jest przeważnie skorelowana z progresją nowotworu i ze złymi rokowaniami [16].

Chociaż uważa się, że aktywacja samej kinazy Akt nie jest zwykle wystarczająca do wystąpienia onkogenezy, to odgrywa ona istotną rolę w progresji nowotworów, ponieważ zapobiega apoptozie, promuje zmiany w metabolizmie komórki nowotworowej oraz reguluje procesy związane z proliferacją i migracją komórek [31].

ROLA KINAZY AKT W METABOLIZMIE KOMÓREK NOWOTWOROWYCH

Cechą charakterystyczną metabolizmu komórek nowotworowych jest zwiększone zapotrzebowanie na glukozę oraz nasilenie procesu glikolizy [121]. Komórki prawidłowe w warunkach tlenowych całkowicie utleniają glukozę do dwutlenku węgla i wody w wyniku połączenia trzech procesów: zachodzącej w cytoplazmie glikolizy oraz cyklu kwasu cytrynowego i oksydacyjnej fosforylacji – procesów przebiegających w mitochondriach. Następstwem połączenia tych procesów jest uzyskanie maksymalnej ilości energii w postaci około 30 cząsteczek ATP z 1 cząsteczki glukozy. W przypadku niewystarczającej ilości tlenu,

komórki wykorzystują mniej korzystną energetycznie glikolizę beztlenową, której końcowym produktem jest mleczan, a zysk energetyczny to 2 cząsteczki ATP z 1 cząsteczki glukozy. W przeciwieństwie do komórek prawidłowych, komórki nowotworowe opierają swój metabolizm na mniej efektywnej beztlenowej glikolizie, nawet w obecności dostatecznej ilości tlenu. Zjawisko to po raz pierwszy zaobserwował ponad 70 lat temu Warburg [121]. Konieczność pokrycia znacznego zapotrzebowania energetycznego zmusza komórki nowotworowe do nasilenia procesu glikolizy. Stwierdzono, że w komórkach nowotworowych obrót glikolityczny jest ponad 20–30-krotnie większy niż w komórkach prawidłowych [35]. Wyniki wielu badań wskazują, że istotną rolę w zmienionym metabolizmie komórek nowotworowych odgrywa kinaza Akt.

Nasilenie procesu glikolizy możliwe jest m.in. dzięki zwiększonemu transportowi glukozy do komórki. Przechodzenie glukozy przez błonę komórkową odbywa się z udziałem białek z rodziny transporterów glukozy określanych jako Glut [115]. W tkankach insulinozależnych, np. mięśniach szkieletowych i tkance tłuszczowej w transporcie glukozy uczestniczy przede wszystkim Glut4, który zmagazynowany w pęcherzykach znajdujących się w cytoplazmie, ulega szybkiej translokacji do błony komórkowej w następstwie stymulacji komórek insuliną [113]. Akt pośrednio wpływa na transport Glut4 do powierzchni komórki przez fosforylację białka AS160 (Akt substrate 160 kDa) na resztach seryny 588. i treoniny 642. Białko AS160 określane także jako TBC1D4 (TBC domain family member 4), aktywuje GTP-azę Rab (małe białko G) zaangażowaną w translokację Glut4. Zahamowanie aktywności AS160 przez fosforylację sprawia, że GTP-aza Rab pozostaje połączona z GTP i może promować przemieszczanie się pęcherzyków do powierzchni komórki [27,63,122].

W większości typów komórek za transport glukozy odpowiada głównie Glut1. Ekspresja tego transportera jest znacząco zwiększona w komórkach nowotworowych w porównaniu z prawidłowymi [121]. Sugeruje się, że Akt pośrednio wpływa na ekspresję Glut1 dzięki aktywacji kinazy mTOR (mammalian target of rapamycin) [128]. Aktywacja szlaku PI3K/Akt przez insulinę lub czynniki wzrostu prowadzi do fosforylacji przez Akt, a co za tym idzie inaktywacji białka TSC2 (tuberous sclerosis complex 2), które jest białkiem aktywującym GTP-azę Rheb. Białko Rheb pozostaje połączone z GTP i aktywuje mTOR [54,74,128]. Aktywna kinaza mTOR reguluje syntezę białka przez fosforylację kinazy p70S6 i regulację eukariotycznego czynnika inicjacyjnego eIF-4F. Kinaza Akt przez aktywację szlaku mTOR zwiększa więc ekspresję swoistych białek [128]. Jednym z głównych czynników odpowiedzialnych za nadekspresję Glut1 w nowotworach jest czynnik transkrypcyjny indukowany przez niedotlenienie – HIF-1 (hypoxia-inducible factor-1). HIF-1 jest heterodimerem składającym się z podjednostki HIF-1 β ulegającej konstytutywnej ekspresji oraz podjednostki HIF-1 α , której ilość w komórce jest regulowana i zależy od obecności tlenu w środowisku. Istnieją pewne kontrowersje dotyczące udziału Akt w regulacji ekspresji i aktywności tego czynnika. Wyniki wielu badań sugerują, że aktywacja szlaku PI3K/Akt powoduje wzrost ekspresji HIF-1 α przez szlak z udziałem kinazy mTOR [50,124]. Inne z kolei wskazują, że Akt może powodować wzrost ekspresji HIF-1 α w sposób niezależny

od mTOR [86]. Chociaż większość doniesień potwierdza bezpośrednią korelację między wzrostem aktywności Akt a aktywnością HIF-1 α , wydaje się, że wpływ Akt na ekspresję HIF-1 α jest zależny od typu komórki [98].

Oprócz udziału w regulacji procesów związanych z transportem glukozy Akt uczestniczy także w regulacji ekspresji na powierzchni komórki transporterów dla innych substancji, np. aminokwasów, w sposób zależny od mTORC1. Jednak mechanizm tego procesu nie jest znany [74].

Po wnikięciu do komórki glukoza jest przekształcana w glukozo-6-fosforan w wyniku działania heksokinaz. Stymulacja komórki przez czynniki wzrostu i aktywacja szlaku PI3K/Akt, przyczynia się do lokalizacji izoform heksokinazy HKI i HKII na zewnętrznej błonie mitochondrialnej [89,90]. Połączenie heksokinaz z mitochondriami może być także wywołane przez konstytutywnie aktywną mirystylowaną Akt (myr-Akt) [73]. Mitochondrialne umiejscowienie heksokinaz jest związane ze zwiększeniem fosforylacji glukozy, zahamowaniem apoptozy i utrzymaniem potencjału błony mitochondrialnej [89, 90].

Glukozo-6-fosforan może być katabolizowany w procesie glikolizy lub przekształcany w glikogen. W obu przypadkach Akt odgrywa istotną rolę. Aktywacja Akt powoduje nasilenie procesu glikolizy, co prawdopodobnie jest związane z wpływem czynnika HIF-1 α na ekspresję enzymów glikolitycznych [28,71]. Akt pośrednio aktywuje fosfofruktokinazę 1 – PFK1 (phosphofruktokinase 1), enzym kontrolujący szybkość glikolizy, przez bezpośrednią fosforylację i aktywację fosfofruktokinazy 2 (PFK2), której głównym produktem jest fruktozo-2,6-bisfosforan, stanowiący alosteryczny aktywator PFK1 [90] (ryc. 3).

Kinaza Akt promuje syntezę glikogenu, zwłaszcza w mięśniach i wątrobie, przez inaktywację 3-kinazy syntazy glikogenowej (GSK3). Fosforylowana GSK3 nie może hamować aktywności syntazy glikogenowej [74]. Akt, przez fosforylację GSK3, reguluje również metabolizm lipidów. Nieaktywna kinaza GSK3 nie może fosforylować i co się z tym wiąże, wyznaczać do degradacji proteolitycznej białek SREBP (sterol regulatory element binding protein), będących czynnikami transkrypcyjnymi odpowiedzialnymi za aktywację genów kodujących białka włączone w biosyntezę cholesterolu i kwasów tłuszczowych [105].

Akt bezpośrednio fosforyluje i przez to aktywuje liazę ATP-cytrynianową – ACL (ATP citrate lyase), która jest głównym enzymem łączącym metabolizm glukozy z syntezą lipidów [6,8,121]. Nasilone wychwytywanie glukozy i zwiększony obrót glikolityczny powodują, że dużo pirogronianu wchodzi do mitochondriów, gdzie ulega przekształceniu w cytrynian, który następnie jest transportowany do cytosolu poprzez nośnik anionów trikarboksylanowych. W cytosolu ACL powoduje jego przekształcenie do acetylo-CoA, stanowiącego prekursor syntezy kwasów tłuszczowych i cholesterolu. Ekspresja i aktywacja Akt wzmacnia syntezę *de novo* kwasów tłuszczowych z glukozy. Hamowanie szlaku PI3K/Akt zwiększa β -oksydację (katabolizm) kwasów tłuszczowych. Natomiast ekspresja myr-Akt1 hamuje β -oksydację przez redukcję ekspresji palmitylotransferazy karnitynowej – podstawowego enzymu, który bierze udział w transportowaniu

kwasów tłuszczowych do mitochondriów, gdzie zachodzi β -oksydacja [19,121].

Podsumowując, aktywacja Akt przyczynia się do zmiany metabolizmu komórki nowotworowej przez zwiększenie wychwytywania glukozy, stymulację aktywności heksokinaz, nasilenie glikolizy, supresję β -oksydacji i stymulację syntezy kwasów tłuszczowych. Takie zmiany pozwalają na zabezpieczenie jej potrzeb energetycznych oraz skierowują metaboliczne prekursorsy na szlak biosyntezy lipidów niezbędnych do wytwarzania błon w szybko dzielących się komórkach (ryc. 3).

AKT A PROCES APOPTOZY

Rola Akt w promowaniu przeżycia komórki znana była dużo wcześniej zanim zidentyfikowano substraty Akt, które uczestniczą w regulacji procesu apoptozy. Obecnie wiadomo, że Akt może wpływać na apoptozę zarówno w sposób bezpośredni, jak i pośredni. Bezpośredni wpływ jest związany z fosforylacją proapoptotycznych białek, na skutek czego dochodzi do ich inaktywacji, degradacji lub zmiany lokalizacji. Natomiast pośrednio Akt wpływa na apoptozę głównie przez fosforylację czynników transkrypcyjnych modulujących, w odpowiedzi na działanie czynników apoptotycznych, transkrypcję niektórych genów związanych z apoptozą [83].

Białka rodziny Bcl-2

Jednym z białek fosforylowanych przez Akt jest proapoptotyczne białko Bad należące do rodziny Bcl-2 [18,20,43]. Białko Bad łączy się z białkiem antyapoptotycznym Bcl-X_L i indukuje śmierć komórki, prawdopodobnie przez hamowanie zdolności Bcl-X_L do blokowania uwalniania cytochromu c z mitochondriów do cytoplazmy [18,43]. Fosforylacja białka Bad na serynie 136 powoduje jego oddysocjowanie od Bcl-X_L i związanie z białkiem adaptorowym 14-3-3, w rezultacie czego białko Bad jest zatrzymywane w cytoplazmie. Innym białkiem należącym do rodziny Bcl-2 i regulowanym przez Akt jest białko Bax, które promuje apoptozę wpływając na przepuszczalność błony mitochondrialnej. Wykazano, że Bax jest fosforylowane przez Akt w pobliżu C-końca na serynie 184, co powoduje ograniczenie śmierci neutrofilów [25,37]. Ponadto kinaza GSK-3 fosforyluje serynę 163 białka Bax i ta modyfikacja promuje translokację Bax do mitochondriów [69]. Aktywność kinazy GSK-3 jest hamowana przez fosforylację dokonywaną przez Akt. Wydaje się więc, że Akt może wpływać na apoptotyczną aktywność Bax w dwojaki sposób: bezpośrednio przez fosforylację seryny 184 oraz pośrednio przez hamowanie aktywności GSK-3 [25]. Inaktywacja przez Akt kinazy GSK3 przyczynia się także do zwiększenia stabilności białka antyapoptotycznego Mcl-1. GSK3 promuje w komórkach apoptozę po usunięciu interleukiny 3 przez fosforylację Mcl-1. Konsekwencją fosforylacji Mcl-1 jest jego zwiększona ubikwitynacja, a następnie degradacja przez proteasomy. Zmniejszenie ilości Mcl-1 przyczynia się do uwalniania cytochromu c z mitochondriów do cytoplazmy i aktywacji procesu apoptozy [76].

Kaspaza 9

Kaspaza 9, podobnie jak inne kaspazy, będące protezami cysteinowymi, syntetyzowana jest w postaci nieaktywnego

proenzymu – prokaspazy 9. Podczas apoptozy uwalniane z mitochondriów do cytoplazmy cytochrom c wiąże się z Apaf-1 (apoptotic protease activating factor-1) i przyczynia się do aktywacji prokaspazy 9. Aktywna kaspaza 9, jako kaspaza inicjatorowa, powoduje proteolityczne cięcie i w rezultacie aktywację kaspaz wykonawczych 3 i 7, które z kolei degradują wiele białek jądrowych i cytoplazmatycznych. Stwierdzono, że Akt fosforyluje prokaspazę 9 na serynie 196, a modyfikacja ta hamuje jej proteolityczne dojrzewanie i zatrzymuje dalsze procesy [9,74,83].

Htra2/Omi

Serynowa proteaza Htra2/Omi jest syntetyzowana w postaci prekursora zlokalizowanego w mitochondriach. Po stymulacji apoptozy enzym ten ulega proteolitycznemu dojrzewaniu przez usunięcie N-terminalnej części i jest uwalniany do cytoplazmy. Htra2/Omi indukuje apoptozę przez proteolizę białek z rodziny inhibitorów apoptozy IAP (inhibitor of apoptotic protein), które wiążą i hamują kaspazy 3, 7 i 9. Kinaza Akt fosforyluje Htra2/Omi na serynie 212, co osłabia aktywność proteolityczną tego enzymu i hamuje jego proapoptotyczną funkcję oraz uwalnianie z mitochondriów do cytoplazmy [116].

AIF

Czynnik indukujący apoptozę AIF (apoptosis inducing factor) jest białkiem o funkcji oksydoreduktazy, umiejscowionym w przestrzeni międzybłonowej mitochondriów. Białko to jest uwalniane do cytosolu po indukcji apoptozy, a następnie przechodzi do jądra komórkowego, gdzie przyczynia się do kondensacji chromatyny i fragmentacji DNA, co prowadzi do śmierci komórki. Niedawno stwierdzono, że Akt blokuje indukowaną ceramidem apoptozę neuronów przez hamowanie translokacji AIF do jądra [62]. Mechanizm tego procesu nie jest do końca poznany, ale wydaje się, że AIF może być ważnym substratem Akt związanym z apoptozą.

Acinus

Acinus (apoptotic chromatin condensation inducer in the nucleus) jest jądrowym proapoptotycznym białkiem aktywowanym przez kaspazy i włączonym w kondensację chromatyny. Akt fosforyluje to białko na serynach 422 i 573 [47], a modyfikacja ta przyczynia się do jego oporności na działanie kaspaz i hamuje kondensację chromatyny.

Szlak SAPK

Kinaza Akt odgrywa także ważną rolę w regulacji szlaku SAPK (stress-activated protein kinase), który jest związany z odpowiedzią komórki na stres i cytokiny. W szlaku tym uczestniczą kinazy JNK i p38, należące do rodziny kinaz białek aktywowanych mitogenem (MAPK) (mitogen-activated protein kinase) [83]. Jedną z konsekwencji aktywacji szlaku SAPK jest promowanie apoptozy. Stwierdzono, że Akt może fosforylować trzy kinazy związane z tym szlakiem. ASK1 (apoptosis signal regulating kinase 1) jest kinazą MKKK (MAP kinase kinase kinase), która wchodzi w interakcje z Akt i ulega przez nią fosforylacji na serynie 83, w wyniku czego szlak SAPK i apoptoza indukowana przez ASK1 są hamowane. Akt fosforyluje także serynę

674 kinazy MKKK – MLK3 (mixed lineage kinase 3) oraz serynę 78 kinazy SEK1/MKKK4, co powoduje ich inaktywację i promuje przeżycie komórki [83].

NF-κB

Czynnik transkrypcyjny NF-κB promuje przeżycie komórek, indukując transkrypcję genów kodujących białka związane z przeciwdziałaniem apoptozie, na przykład inhibitory kaspaz c-IAP1 oraz c-IAP2. Przyłączenie do NF-κB inhibitora I-κB powoduje zatrzymanie tego czynnika w cytoplazmie i uniemożliwia jego udział w transkrypcji. Fosforylacja I-κB przez kinazę IKK (I-κB kinase) przyczynia się do degradacji inhibitora i NF-κB może bez przeszkód przemieszczać się do jądra aby indukować transkrypcję. W komórkach stymulowanych PDGF, Akt przejściowo łączy się z kinazą IKK i aktywuje ją [2,91].

Czynniki transkrypcyjne rodziny FOXO

Akt hamuje ekspresję białek rodziny Bcl-2 zawierających tylko domenę BH3, regulując czynniki transkrypcyjne z rodziny FOXO (forkhead box O transcription factors) [33]. Akt fosforyluje FOXO1 na treoninie 24, serynie 256 i serynie 319 oraz FOXO3a i FOXO4 w analogicznych miejscach. Fosforylacja białek FOXO znajdujących się w jądrze komórkowym sprawia, że wiążą się one z białkiem 14-3-3, są eksportowane z jądra i zatrzymywane w cytoplazmie. Akt blokuje przez ten mechanizm odbywającą się z udziałem FOXO transkrypcję genów promujących apoptozę i zatrzymanie cyklu komórkowego [33,74]. Ważnym celem czynników FOXO jest gen kodujący proapoptotyczne białko Bim, które po usunięciu cytokin, przyczynia się do śmierci komórek hematopoetycznych [33,74].

MDM2

Kinaza Akt promuje także przeżycie komórek przez fosforylację i aktywację białka MDM2 (murine double minute 2; u człowieka HDM2), będącego E3 ligazą ubikwitynową [41]. MDM2 kontroluje poziom białka supresorowego p53 [65]. Akt fosforyluje MDM2 na serynach 166 i 186, co wzmacnia jego aktywność i prawdopodobnie promuje translokację do jądra komórkowego, gdzie wiąże się ono z p53. MDM2 przyłącza do białka p53 ubikwitynę, wyznaczając je w ten sposób do degradacji proteolitycznej [77].

YAP

Białko YAP (Yes-associated protein) jest także substratem Akt. Fosforylacja YAP na serynie 127 powoduje jego wiązanie z białkiem 14-3-3 w cytoplazmie, w rezultacie czego YAP nie może ulegać translokacji do jądra komórkowego i działać jako koaktywator czynników transkrypcyjnych np. p73. Akt hamuje zdolność YAP do promowania pośredniczonej przez p73 transkrypcji genów proapoptotycznych białek, takich jak Bax [5,23].

UDZIAŁ AKT W PROLIFERACJI KOMÓREK

Cykl komórkowy jest ściśle kontrolowanym procesem, którego prawidłowy przebieg zależy od właściwej regulacji aktywności cyklinozależnych kinaz – Cdk (cyklin-dependent kinase). Akt promuje proliferację komórek wpływając



na postęp cyklu komórkowego, m.in. przez fosforylację oraz redukcję ekspresji inhibitorów cyklicznych kinaz. Akt fosforyluje inhibitor p27^{kip1}, który odgrywa główną rolę w regulacji kompleksów Cdk/cyklina. Fosforylacja treoniny 157 białka p27^{kip1} powoduje jego zatrzymanie w cytoplazmie przez związanie z białkiem 14-3-3 [67,97,100]. Uniemożliwienie przemieszczania się p27^{kip1} do jądra komórkowego osłabia jego działanie jako inhibitora postępu cyklu komórkowego. Akt ogranicza także ekspresję p27^{kip1} przez fosforylację i hamowanie czynników transkrypcyjnych z rodziny FOXO [78]. Stwierdzono również, że Akt podobnie jak w przypadku p27^{kip1}, przyczynia się do zatrzymania w cytoplazmie p21^{Cip1/WAF1} przez fosforylację jego treoniny 145. [125]. Interesującym jest, że taki wpływ na p21^{Cip1/WAF1} wykazuje tylko izoforma Akt1 [45]. W przeciwieństwie do tego, Akt2 wydaje się wiązać i stabilizować p21^{Cip1/WAF1}, co wpływa na zatrzymanie progresji cyklu komórkowego. Akt może także ograniczać ekspresję p21^{Cip1/WAF1} zależną od p53, w wyniku aktywacji MDM2 [74].

Kinaza Akt wpływa pośrednio na progresję cyklu komórkowego przez fosforylację i inaktywację kinazy GSK3, która fosforyluje, odgrywając istotną rolę w przejściu z fazy G1 do S, cykliny D i E oraz czynniki transkrypcyjne c-Jun i c-Myc. Fosforylacja tych białek przyczynia się do ich degradacji proteolitycznej [111,112,118], a więc inaktywacja GSK3 przez Akt, wpływa pozytywnie na ich stabilność i promuje proliferację. Stwierdzono także, że udział Akt w promowaniu proliferacji zależy od aktywacji mTORC1 [101]. Aktywny mTORC1 hamuje 4E-BP1, co prowadzi do aktywacji eIF-4E, a ten wpływa na ekspresję cykliny D1 i c-Myc.

WPŁYW AKT NA METASTAZĘ KOMÓREK NOWOTWOROWYCH

Progresja nowotworów wiąże się z ich zdolnością do tworzenia przerzutów. Metastaza jest złożonym procesem obejmującym kilka etapów, takich jak:

- a) odłączenie komórek od guza pierwotnego,
- b) przejście przez błonę podstawną i dostanie się do naczyń krwionośnych lub limfatycznych,
- c) przeżycie komórek podczas wędrówki dzięki oporności na anoikis, czyli śmierci w warunkach braku adhezji,
- d) zasiedlenie nowych miejsc – przejście z naczyń do otaczających tkanek,
- e) utworzenie wtórnego ogniska, adaptacja i zmiana lokalnego środowiska w celu dostosowania go do własnych potrzeb (np. oddziaływanie na komórki zrębu, aby wytwarzały czynniki wzrostu) [14].

Pierwszy etap powstawania inwazyjnego fenotypu komórek nowotworowych pochodzenia nabłonkowego wiąże się z przejściem epitelialno-mezenchymalnym (EMT). W wyniku tego procesu komórki nabłonkowe tracą swoje charakterystyczne cechy, takie jak określona polarność, oddziaływanie międzykomórkowe i przyleganie do błony podstawnej, a nabywają większej ruchliwości i zdolności do migracji [40]. Proces EMT jest związany m.in. ze zmianą ekspresji markerów powierzchniowych np. kadheryny E oraz reorganizacją cytoszkieletu. Uważa się, że Akt odgrywa istotną rolę w regulacji mechanizmów związanych z EMT. Jednym z substratów inaktywowanej przez Akt kinazy GSK3 jest czynnik transkrypcyjny SNAIL, który przyczynia się do

zmniejszenia ekspresji kadheryny E. Fosforylacja tego czynnika zmienia jego lokalizację i wpływa na zwiększoną degradację proteolityczną. Inaktywacja kinazy GSK3 przez Akt sprawia, że czynnik SNAIL jest bardziej stabilny, a przez to osłabiona jest adhezja międzykomórkowa na skutek obniżenia poziomu kadheryny E [88]. Zmiany te powodują uwolnienie β -kateniny, wchodzącej w interakcje z wewnątrzkomórkowym regionem cząsteczki kadheryny E. Translokacja β -kateniny do jądra komórkowego i połączenie jej z czynnikiem transkrypcyjnym LEF/TCF (lymphoid enhancer factor/T cell factor), prowadzi do ekspresji białek charakterystycznych dla komórek mezenchymalnych, np. wimentyny i określonych integryn [14,88].

Udział Akt w ruchliwości komórek wynika także z jej wpływu na organizację szkieletu aktynowego. Ważnym substratem Akt jest białko wiążące się z aktyną określane jako GIV ($G\alpha$ -interacting vesicle associated protein), znane również jako Girdin (girders for actin filaments), APE (Akt phosphorylation enhancer) lub HkRPI (Hook-related protein 1) [29,30,36,56]. Enomoto i wsp. [29] stwierdzili, że w fibroblastach, Akt w odpowiedzi na działanie czynników wzrostu np. EGF, fosforyluje to białko na serynie 1416. Fosforylacja powoduje jego akumulację przy krawędzi wiodącej migrujących komórek i wytwarzanie lamelli-podiów, płaskich cytoplazmatycznych wypustek, których głównym składnikiem jest sieć filamentów aktynowych [30]. Białko GIV/Girdin ulega zwiększonej ekspresji w nowotworach, np. w komórkach raka jelita grubego, sutka i szyjki macicy [56]. Badania potwierdziły także udział tego białka w ruchliwości i migracji komórek raka sutka linii MDA-MB-231 stymulowanych IGF-1 [56]. Białko to jest nie tylko fosforylowane przez Akt, ale wpływa na aktywację samej kinazy Akt. GIV/Girdin specyficznie wiąże się z C-terminalnym regionem Akt i przyczynia się do zwiększenia fosforylacji jej treoniny 308 i seryny 473, czego następstwem jest fosforylacja GSK3 β i czynnika transkrypcyjnego FOXO1 [30].

W przejściu przez błonę podstawną (inwazji) komórek ważną rolę odgrywają nie tylko zdolności komórek do migracji, ale także wytwarzanie metaloproteinaz, które są enzymami proteolitycznymi zdolnymi do degradacji białek macierzy zewnątrzkomórkowej. Stwierdzono, że w komórkach epitelialnych sutka myszy Akt1 stymuluje aktywność i sekrecję metaloproteinazy 2 [84]. Akt1 promuje także ruchliwość komórek i wytwarzanie metaloproteinazy 9 w przypadku komórek włókniamięsa przez aktywację czynnika transkrypcyjnego NF- κ B [60].

Obecnie uważa się, że izoformy Akt1 i Akt2 mogą mieć przeciwstawny wpływ na morfogenezę EMT, ruchliwość i inwazję komórek [14,108,114,119]. Zaskakujące rezultaty, dotyczące roli izoformy Akt1 w migracji i inwazji komórek, uzyskane zostały przez dwie grupy badaczy [51,120]. Stwierdzili oni, że zwiększona ekspresja i aktywacja Akt1 w komórkach epitelialnych sutka człowieka powoduje zmniejszenie migracji komórek i zapobiega przejściu epitelialno-mezenchymalnemu. Dwa niezależne mechanizmy zostały zaproponowane celem wyjaśnienia wpływu Akt1 na zachowanie tych komórek. Yoeli-Lerner i wsp. [120] stwierdzili, że hamujący wpływ Akt1 na migrację i inwazję komórek związany jest ze szlakiem prowadzącym do degradacji czynnika transkrypcyjnego – NFAT (nuclear

factor of activated T-cells). Akt1 pośrednio wpływa na degradację NFAT poprzez HDM2, który jest homologiem MDM2. W obecności aktywnej Akt1, HDM2 jest stabilizowany i ubikwitynuje NFAT, co prowadzi do degradacji proteolitycznej tego czynnika. Autorzy sugerują, że NFAT najprawdopodobniej indukuje w komórkach transkrypcję genów związanych z inwazją np. metaloproteinaz, dlatego brak tego czynnika hamuje inwazję. Irie i wsp. [53] skupili się na szlaku ERK. Hiperaktywacja ERK przez mutację Ras lub stymulację mitogenem powoduje indukcję przejścia EMT. Nadekspresja Akt1 przyczynia się do supresji ERK. Autorzy wykazali, że wyciszenie ekspresji Akt1 w komórkach nabłonkowych sutka MCF-10A przez zastosowanie RNA interferencji znacznie zwiększa w badanych komórkach aktywność ERK. Nie stwierdzili oni natomiast tego w przypadku obniżenia ekspresji Akt2. Niektóre badania na modelach zwierzęcych zdają się potwierdzać obserwacje dotyczące roli Akt1 w migracji komórek. Hutchison i wsp. [51] wykazali, że podczas gdy aktywowana Akt1 w nowotworach sutka transgenicznych myszy wpływa na zwiększenie proliferacji komórek, to jednak hamuje ona przerzuty.

Arboleda i wsp. [1] stwierdzili, że nadekspresja Akt2 zwiększa inwazję ludzkich komórek raka sutka i jajników związaną ze zwiększoną ilością $\beta 1$ integryn. W migracji i inwazji komórek sutka MCF-7 i MDA-MB-435 główną rolę odgrywa czynnik transkrypcyjny Twist, który wpływa na zwiększenie ekspresji Akt2, a ta stymuluje migrację komórek [13].

Wpływ izoform Akt na migrację wydaje się jednak zależeć od typu komórek. Badania z wykorzystaniem embrionalnych fibroblastów myszy pozbawionych poszczególnych izoform dały zupełnie odwrotny rezultat niż w przypadku komórek raka sutka. Stwierdzono, że Akt1 promuje migrację, natomiast Akt2 ją hamuje [127]. Akt1 powodowała także wzrost inwazji w komórkach włókniakomięsaka HT1080 [60] oraz komórkach raka trzustki [107].

AKT A PROCES ANGIOGENEZY

Rozpoczęciu metastazy sprzyja proces angiogenezy, który polega na tworzeniu nowych naczyń krwionośnych ze śródbłonna naczyń już istniejących. Proces angiogenezy obejmuje kilka etapów: pobudzenie komórek śródbłonna, degradację błony podstawnej i macierzy zewnątrzkomórkowej, migrację i proliferację komórek śródbłonna, formowanie światła nowych naczyń, dojrzewanie nowych naczyń przez rekrutację pericytów oraz formowanie błony podstawnej [106,129]. Angiogeneza odgrywa istotną rolę w rozwoju guza nowotworowego, ponieważ warunkuje ona zarówno jego wzrost, dzięki możliwości dostarczania składników odżywczych, jak i zdolność do metastazy, gdyż dzięki nowo utworzonym naczyniom odrywające się od guza pierwotnego komórki mogą się przemieszczać do innych narządów. Nawet małe guzy, o średnicy 1–2 mm, wymagają procesu angiogenezy, aby mogły się dalej rozwijać [55].

Akt jest ważnym czynnikiem zaangażowanym w angiogenezę poprzez regulację odpowiedzi komórek śródbłonna na czynniki angiogenne, migrację komórek oraz dojrzewanie nowo tworzonych naczyń.

Angiogeneza guza jest uruchamiana przez zewnątrzkomórkowe sygnały np. czynniki wzrostu oraz zmiany genetyczne, takie jak aktywacja onkogenów czy mutacje genów supresorów nowotworów (np. *PTEN, p53*) [55]. Głównym aktywatorem angiogenezy jest czynnik wzrostu śródbłonna naczyń VEGF (vascular endothelial growth factor). Zależność pomiędzy Akt i VEGF jest złożona. Z jednej strony w komórkach śródbłonna Akt jest znacząco aktywowana przez VEGF, a z drugiej – sama kinaza Akt przyczynia się do ekspresji VEGF w komórkach nowotworowych. Głównym regulatorem aktywacji transkrypcji VEGF jest czynnik indukowany niedotlenieniem HIF-1, który łączy się z HRE (hypoxia response element) w obrębie promotora genu VEGF. Akt wpływa pośrednio na ekspresję HIF-1 α przez aktywację p70S6K1 oraz HDM2 [11,55].

Migracja komórek śródbłonna do nowych miejsc i tworzenie nowych naczyń uzależnione jest od degradacji macierzy zewnątrzkomórkowej oraz błony podstawnej. Chen i wsp. [11] stwierdzili, że stężenie białek macierzy np. trombospondyn 1 i 2, kolagenu i lamininy u myszy z inaktywowanym genem izoformy Akt1 jest znacznie zredukowany w porównaniu z myszami mającymi dziki gen. Trombospondyna 1 jest inhibitorem procesu angiogenezy. Czynniki te wpływają na adhezję komórek śródbłonna, pobudzając przyleganie i blokując odpowiedź komórek śródbłonna na czynnik bFGF. Autorzy sugerują, że zaburzenia w macierzy zewnątrzkomórkowej u myszy pozbawionych Akt1 wynikają ze wzrostu aktywności metaloproteinaz i w efekcie redukcji ekspresji trombospondyny [11,102]. W tym przypadku brak izoformy Akt1 powoduje zmiany w ekspresji i organizacji białek zewnątrzkomórkowych sprzyjające angiogenezie.

Ważnym czynnikiem regulującym proces angiogenezy jest tlenek azotu. Powstaje on bezpośrednio z argininy w reakcji katalizowanej przez syntazę tlenu azotu. Tlenek azotu bierze udział w angiogenezie wpływając na proliferację i migrację komórek śródbłonkowych, hamowanie agregacji płytek krwi oraz pobudzanie wytwarzania czynników wzrostowych angiogenezy (VEGF i bFGF) [14,130]. W komórkach śródbłonna Akt aktywuje eNOS (endothelial nitric oxide synthase) poprzez fosforylację seryny 1177 [22].

Akt uczestniczy także w zależnej od angiopoetyny stabilizacji naczyń podczas angiogenezy. Angiopoetyna 1 jest czynnikiem, który utrzymuje i stabilizuje naczynia krwionośne przez hamowanie apoptozy komórek śródbłonna i promowanie interakcji między komórkami śródbłonna i otaczającymi komórkami podtrzymującymi. Angiopoetyna 1 poprzez receptor Tie-2 indukuje fosforylację Akt, a ta z kolei aktywuje surwiwinę, co chroni komórki śródbłonna przed wpływem czynników indukujących apoptozę [82].

INHIBITORY AKT JAKO CZYNNIKI PRZECIWNOWOTWOROWE

W wielu typach nowotworów dochodzi do zwiększenia ekspresji i aktywacji Akt, dlatego związki hamujące aktywność tej kinazy są brane pod uwagę jako potencjalne leki przeciwnowotworowe. W chwili obecnej najbardziej zaawansowane są badania dotyczące perifosyny (KRX-0401; Keryx Biopharmaceuticals). Perifosyna jest lipidowym inhibitorem Akt, który hamuje jej przemieszczanie się do błony komórkowej i w efekcie uniemożliwia aktywację



[70]. Badania przedkliniczne wykazały, że perifosyna hamuje wzrost komórek czerniaka, raka płuc, prostaty i piersi [70]. Ponadto stwierdzono synergistyczne działanie perifosyny i tradycyjnych czynników chemioterapeutycznych, takich jak etopozyd w przypadku komórek białaczkowych czy temozolomid w przypadku glejaka [79,81]. Perifosyna przyczynia się także do uwrażliwienia komórek na apoptozę indukowaną przez promieniowanie [70]. Perifosyna została przebadana w badaniach klinicznych II fazy u chorych na mięsaki, czerniaka, raka piersi, trzustki, prostaty oraz nowotwory głowy i szyi. Niestety efektywne działanie perifosyny stosowanej w monoterapii stwierdzono jedynie w przypadku pacjentów z mięsakami. Biorąc pod uwagę ograniczoną skuteczność perifosyny stosowanej pojedynczo, obecne badania koncentrują się na jej wykorzystaniu jako czynnika wspomagającego w chemioterapii i radioterapii. Firma Keryx Biopharmaceuticals przystąpiła do III fazy badań klinicznych perifosyny stosowanej z bortezomibem i deksametazonem u pacjentów ze szpiczakiem mnogim.

Tricyrybina to syntetyczny trójcykliczny nukleozyd, który jest obecnie w I fazie badań klinicznych [39]. Stosowana jest ona głównie w postaci fosforanu określanego jako TCN-P (tricyclic nucleoside 5'-phosphate) lub VQD-002 (VioQuest Pharmaceuticals). Tricyrybina jest od dawna znanym czynnikiem przeciwnowotworowym, który był intensywnie testowany w badaniach klinicznych w latach osiemdziesiątych i dziewięćdziesiątych ub.w. [70]. Jednak mechanizm działania tricyrybiny nie był wtedy znany a stosowane w badaniach duże dawki wywoływały wiele działań niepożądanych, takich jak hepatotoksyczność, hiperglikemia i hipertriglicydemia. Odkrycie, że tricyrybina hamuje aktywność kinazy Akt spowodowało ponowne zainteresowanie tym związkami. Obecnie prowadzone są badania kliniczne, w których stosowane są mniejsze dawki fosforanu tricyrybiny u pacjentów z przerzutującymi guzami litymi wykazującymi wysoką ekspresję fosforylowanej Akt oraz u pacjentów z nowotworami układu krwiotwórczego. Ponadto stosowane są terapie łączące fosforan tricyrybiny z inhibitorami kinaz tyrozynowych (erlotynib i lapatynib) [70].

Duże nadzieje wiąże się z testowanym przez badaczy związanym z firmą Merck nowym allosterycznym inhibitorem Akt MK-2206. Badania *in vitro* wykazały, że MK-2206 skutecznie hamuje proliferację komórek różnych linii nowotworów człowieka działając synergistycznie z erlotynibem i lapatynibem. Ponadto w liniach raka płuc NCI-H460 i jajników A2780 stwierdzono synergistyczne działanie MK-2206 z cytostatykami, takimi jak dokсорubicyna i kamptotecyna (inhibitory topoisomerazy), gemcytabina i fluorouracyl (antymetabolity), docetaksel (inhibitor mitozy), karboplatyna (czynnik odpowiedzialny za tworzenie wiązań krzyżowych w DNA) [46]. Wstępne wyniki I fazy badań klinicznych MK-2206 wskazują, że związek ten jest dobrze tolerowany przez chorych i ma długi okres półtrwania. Wyniki potwierdzają zdolność MK-2206 do efektywnego hamowania aktywności Akt i jego właściwości antyproliferacyjne oraz sugerują potencjalne właściwości antyangiogenetyczne [117].

Kilka grup badaczy jest zaangażowanych w identyfikację inhibitorów selektywnych względem poszczególnych izoform Akt. Ponieważ izoenzymy Akt pełnią różne funkcje

i mają różny profil ekspresji zastosowanie selektywnych związków może być bardziej efektywne i ograniczyć występowanie działań niepożądanych. Badacze z firmy Merck zidentyfikowali serię pochodnych chinoksaliny i naftyrydyny jako allosterycznych inhibitorów zdolnych do selektywnego hamowania aktywności izoform Akt1 i Akt2 w sposób zależny od domeny PH [66,68]. Obecnie nie ma specyficznego inhibitora Akt3. Inhibitor Akt3 mógłby mieć duże znaczenie w leczeniu niektórych nowotworów np. czerniaka, ponieważ wzrost ekspresji i aktywności Akt3 obserwuje się w 60–70% przypadków tego raka [72]. Naturalnie występujące izotiocyjaniany zidentyfikowano jako potencjalne inhibitory aktywności kinazy Akt3. Niestety, aby uzyskać efekt terapeutyczny należałoby je stosować w dużym stężeniu, co nie jest korzystne ze względu na możliwe działania niepożądane. Rozwiązaniem problemu wydają się bardziej efektywne, syntetyczne izoselenocyjaniany, w których siarka została zastąpiona przez selen a łańcuch alkilowy wydłużony. Sharma i wsp. [99] stwierdzili, że izoselenocyjaniany z cztero- (ISC-4) lub sześciowęglowym łańcuchem bocznym (ISC-6) łatwo wnikają do komórek czerniaka, gdzie skutecznie hamują aktywność Akt3 i indukują apoptozę. Obecnie nie prowadzi się badań klinicznych z wykorzystaniem inhibitorów selektywnych względem poszczególnych izoform Akt.

UWAGI KOŃCOWE

Kinaza Akt jest głównym regulatorem podstawowych procesów komórkowych, a zaburzenia szlaku sygnalizacyjnego tej kinazy są przyczyną wielu chorób człowieka. Ważna rola Akt w przeżyciu, proliferacji, angiogenezie i powstawaniu przerzutów nowotworowych sprawia, że można uznać Akt za główny czynnik promujący progresję nowotworów.

Mimo znacznego postępu, który od czasu odkrycia Akt, dokonał się w zrozumieniu mechanizmów aktywacji tej kinazy oraz jej komórkowej funkcji, nadal wiele pytań pozostaje bez odpowiedzi. Nie wiadomo na przykład, w jaki sposób czynniki aktywujące Akt wpływają na jej selektywność względem substratów oraz jakie są różnice w regulacji aktywności, umiejscowieniu i specyficzności poszczególnych izoform Akt. Nie rozszyfrowano także dokładnego mechanizmu związanego z fosforylacją seryny 473 w domenie regulatorowej tej kinazy.

Ponieważ Akt odgrywa istotną rolę w przeżyciu i proliferacji komórek nowotworowych, prowadzone są obecnie intensywne prace nad farmakologicznymi inhibitorami tej kinazy, które mogłyby mieć zastosowanie w terapii przeciwnowotworowej. Wyniki badań dotyczące wpływu poszczególnych izoform na metastazę różnych komórek sugerują, że trzeba w tych badaniach wykazać szczególną ostrożność. Na przykład selektywny inhibitor Akt1 w przypadku włóknakiomiesaka, może być bardzo użyteczny w hamowaniu wzrostu guza nowotworowego i tworzenia przerzutów. Zastosowanie takiego inhibitora nie powinno również wywoływać działań niepożądanych w postaci zaburzenia homeostazy glukozy, ponieważ ta, jak wskazują badania z wykorzystaniem transgenicznym myszy, zależy przede wszystkim od Akt2. Jednak zastosowanie inhibitora Akt1 w przypadku raka sutka, dałoby zupełnie odwrotny efekt. Brak Akt1 może bowiem promować migrację komórek epitelialnych sutka. Zanim więc uzna się

Akt za dobry cel dla terapii antynowotworowej, niezbędne jest lepsze zrozumienie procesów, w które zaangażowana jest ta kinaza oraz dokładne poznanie funkcji poszczególnych izoform i zależności między nimi.

PIŚMIENICTWO

- [1] Arboleda M.J., Lyons J.F., Kabbinar F.F., Bray M.R., Snow B.E., Ayala R., Danino M., Karlan B.Y., Slamon D.J.: Overexpression of AKT2/protein kinase B β leads to up-regulation of β 1 integrins, increased invasion, and metastasis of human breast and ovarian cancer cells. *Cancer Res.*, 2003; 63: 196–206
- [2] Arcaro A., Guerreiro A.S.: The phosphoinositide 3-kinase pathway in human cancer: genetic alterations and therapeutic implications. *Curr. Genomics*, 2007; 8: 271–306
- [3] Bai D., Ueno L., Vogt P.K.: Akt-mediated regulation of NF κ B and the essentialness of NF κ B for the oncogenicity of PI3K and Akt. *Int. J. Cancer*, 2009; 125: 2863–2870
- [4] Barthwal M.K., Sathyanarayana P., Kundu C.N., Rana B., Pradeep A., Sharma C., Woodgett J.R., Rana A.: Negative regulation of mixed lineage kinase 3 by protein kinase B/AKT leads to cell survival. *J. Biol. Chem.*, 2003; 278: 3897–3902
- [5] Basu S., Totty N.F., Irwin M.S., Sudol M., Downward J.: Akt phosphorylates the Yes-associated protein, YAP, to induce interaction with 14-3-3 and attenuation of p73-mediated apoptosis. *Mol. Cell*, 2003; 11: 11–23
- [6] Bauer D.E., Hatzivassiliou G., Zhao F., Andreadis C., Thompson C.B.: ATP citrate lyase is an important component of cell growth and transformation. *Oncogene*, 2005; 24: 6314–6322
- [7] Belkhir A., Dar A.A., Zaika A., Kelley M., El-Rifai W.: t-Darpp promotes cancer cell survival by up-regulation of Bcl2 through Akt-dependent mechanism. *Cancer Res.*, 2008; 68: 395–403
- [8] Berwick D.C., Hers I., Heesom K.J., Moule S.K., Tavaré J.M.: The identification of ATP-citrate lyase as a protein B (Akt) substrate in primary adipocytes. *J. Biol. Chem.*, 2002; 277: 33895–33900
- [9] Cardone M.H., Roy N., Stennicke H.R., Salvesen G.S., Franke T.F., Stanbridge E., Frisch S., Reed J.C.: Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. *Science*, 1998; 282: 1318–1321
- [10] Carpten J.D., Faber A.L., Horn C., Donoho G.P., Briggs S.L., Robbins C.M., Hostetter G., Boguslawski S., Moses T.Y., Savage S., Uhlik M., Lin A., Du J., Qian Y.W., Zeckner D.J., Tucker-Kellogg G., Touchman J., Patel K., Mousse S., Bittner M., Schevitz R., Lai M.H., Blanchard K.L., Thomas J.E.: A transforming mutation in the pleckstrin homology domain of AKT1 in cancer. *Nature*, 2007; 448: 439–444
- [11] Chen J., Somanath P., Razorenova O., Chen W.S., Hay N., Bornstein P., Byzova T.V.: Akt1 regulates pathological angiogenesis, vascular maturation and permeability *in vivo*. *Nat. Med.*, 2005; 11: 1188–1196
- [12] Chen W.S., Xu P.Z., Gottlob K., Chen M.L., Sokol K., Shiyanova T., Roninson I., Weng W., Suzuki R., Tobe K., Kadowaki T., Hay N.: Growth retardation and increased apoptosis in mice with homozygous disruption of the Akt1 gene. *Genes Dev.*, 2001; 15: 2203–2208
- [13] Cheng G.Z., Zhang W., Wang L.H.: Regulation of cancer cell survival, migration, and invasion by Twist: AKT2 comes to interplay. *Cancer Res.*, 2008; 68: 957–960
- [14] Chin Y.R., Toker A.: Function of Akt/PKB signaling to cell motility, invasion and the tumor stroma in cancer. *Cell. Signal.*, 2009; 21: 470–476
- [15] Cross D.A., Alessi D.R., Cohen P., Andjelkovich M., Hemmings B.A.: Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature*, 1995; 378: 785–789
- [16] Crowell J.A., Steele V.E., Fay J.R.: Targeting the Akt protein kinase for cancer chemoprevention. *Mol. Cancer Ther.*, 2007; 6: 2139–2148
- [17] Dan H.C., Sun M., Yang L., Feldman R.I., Sui X.M., Ou C.C., Nellist M., Yeung R.S., Halley D.J., Nicosia S.V., Pledger W.J., Cheng J.Q.: Phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway regulates tuberous sclerosis tumor suppressor complex by phosphorylation of tuberin. *J. Biol. Chem.*, 2002; 277: 35364–35370
- [18] Datta S.R., Dudek H., Tao X., Masters S., Fu H., Gotoh Y., Greenberg M.E.: Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell*, 1997; 91: 231–241
- [19] Deberardinis R.J., Lum J.J., Thompson C.B.: Phosphatidylinositol 3-kinase-dependent modulation of carnitine palmitoyltransferase 1A expression regulates lipid metabolism during hematopoietic cell growth. *J. Biol. Chem.*, 2006; 281: 37372–37380
- [20] del Peso L., González-García M., Page C., Herrera R., Nunez G.: Interleukin-3-induced phosphorylation of BAD through the protein kinase Akt. *Science*, 1997; 278: 687–689
- [21] Diehl J.A., Cheng M., Roussel M.F., Sherr C.J.: Glycogen synthase kinase-3 β regulates cyclin D1 proteolysis and subcellular localization. *Genes Dev.*, 1998; 12: 3499–3511
- [22] Dimmeler S., Fleming I., Fisslthaler B., Hermann C., Busse R., Zeiher A.M.: Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature*, 1999; 399: 601–605
- [23] Downward J., Basu S.: YAP and p73: a complex affair. *Mol. Cell*, 2008; 32: 749–750
- [24] Dudek H., Datta S.R., Franke T.F., Birnbaum M.J., Yao R., Cooper G.M., Segal R.A., Kaplan D.R., Greenberg M.E.: Regulation of neuronal survival by the serine-threonine protein kinase Akt. *Science*, 1997; 275: 661–665
- [25] Duronio V.: The life of a cell: apoptosis regulation by the PI3K/PKB pathway. *Biochem. J.*, 2008; 415: 333–344
- [26] Easton M.R., Cho H., Roovers K., Shineman D.W., Mizrahi M., Forman M.S., Lee V.M., Szabolcs M., de Jong R., Oltersdorf T., Ludwig T., Efstratiadis A., Birnbaum M.J.: Role of Akt3/protein kinase B γ in attainment normal brain size. *Mol. Cell. Biol.*, 2005; 25: 1869–1878
- [27] Egeuz L., Lee A., Chavez J.A., Miinea C.P., Kane S., Lienhard G.E., McGraw T.E.: Full intracellular retention of GLUT4 requires AS160 Rab GTPase activating protein. *Cell Metab.*, 2005; 2: 263–272
- [28] Elstrom R.L., Bauer D.E., Buzzai M., Karnauskas R., Harris M.H., Plas D.R., Zhuang H., Cinalli R.M., Alavi A., Rudin C.M., Thompson C.B.: Akt stimulates aerobic glycolysis in cancer cells. *Cancer Res.*, 2004; 64: 3892–3899
- [29] Enomoto A., Murakami H., Asai N., Morone N., Watanabe T., Kawai K., Murakumo Y., Usukura J., Kaibuchi K., Takahashi M.: Akt/PKB regulates actin organization and cell motility via Girdin/APE. *Dev. Cell*, 2005; 9: 389–402
- [30] Enomoto A., Ping J., Takahashi M.: Girdin, a novel actin-binding protein, and its family of proteins possess versalite functions in the Akt and Wnt signaling pathways. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 2006; 1086: 169–184
- [31] Fayard E., Tintignac L.A., Baudry A., Hemmings B.A.: Protein kinase B/Akt at a glance. *J. Cell Sci.*, 2005; 118: 5675–5678
- [32] Franke T.F., Yang S.I., Chan T.O., Datta K., Kazlauskas A., Morrison D.K., Kaplan D.R., Tsichlis P.N.: The protein kinase encoded by Akt proto-oncogene is a target of the PDGF-activated phosphatidylinositol 3-kinase. *Cell*, 1995; 81: 727–736
- [33] Fu Z., Tindall D.J.: FOXOs, cancer and regulation of apoptosis. *Oncogene*, 2008; 27: 2312–2319
- [34] Fulton D., Gratton J.P., McCabe T.J., Fontana J., Fujio Y., Walsh K., Franke T.F., Papapetropoulos A., Sessa W.C.: Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase AKT. *Nature*, 1999; 399: 597–601
- [35] Ganapathy V., Thangaraju M., Prasad P.D.: Nutrient transporters in cancer: relevance to Warburg hypothesis and beyond. *Pharmacol. Ther.*, 2009; 121: 29–40
- [36] Garcia-Marcos M., Ghosh P., Farquhar M.G.: GIV is a nonreceptor GEF for G α i with a unique motif that regulates Akt signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2009; 106: 3178–3183
- [37] Gardai S.J., Hildeman D.A., Frankel S.K., Whitlock B.B., Frasch S.C., Borregaard N., Marrack P., Bratton D.L., Henson P.M.: Phosphorylation of Bax Ser184 by Akt regulates its activity and apoptosis of neutrophils. *J. Biol. Chem.*, 2004; 279: 21085–21095
- [38] Garofalo R.S., Orena S.J., Rafidi K., Torchia A.J., Stock J.L., Hildebrandt A.L., Coskran T., Black S.C., Brees D.J., Wicks J.R., McNeish J.D., Coleman K.G.: Severe diabetes, age-dependent loss of adipose tissue and mild growth deficiency in mice lacking Akt2/PKB β . *J. Clin. Invest.*, 2003; 112: 197–208
- [39] Giamas G., Man Y.L., Hirner H., Bischof J., Kramer K., Khan K., Ahmed S.S., Stebbing J., Knippschild U.: Kinases as targets in the treatment of solid tumors. *Cell. Signal.*, 2010; 22: 984–1002

PODZIĘKOWANIA

Autorka dziękuje pani prof. dr hab. Annie Lipińskiej za cenne wskazówki i uwagi dotyczące niniejszej pracy.



- [40] Gos M., Miłoszewska J., Przybyszewska M.: Rola przejścia epithelialno-mezenchymalnego w progresji nowotworów. *Postepy Biochem.*, 2009; 55: 121–128
- [41] Goswami A., Ranganathan P., Rangnekar V.M.: The phosphoinositide 3 kinase/Akt1/Par-4 axis: a cancer selective therapeutic target. *Cancer Res.*, 2006; 66: 2889–2892
- [42] Gottlieb T.M., Leal J.F., Seger R., Taya Y., Oren M.: Cross-talk between Akt, p53 and Mdm2: possible implications for the regulation of apoptosis. *Oncogene*, 2002; 21: 1299–1303
- [43] Hanada M., Feng J., Hemmings B.A.: Structure, regulation and function of PKB/AKT – a major therapeutic target. *Biochim. Biophys. Acta*, 2004; 1697: 3–16
- [44] Hatzivassiliou G., Zhao F., Bauer D.E., Andreadis C., Shaw A.N., Dhanak D., Hingorani S.R., Tuveson D.A., Thompson C.B.: ATP citrate lyase inhibition can suppress tumor cell growth. *Cancer Cell*, 2005; 8: 311–321
- [45] Heron-Milhavet L., Franckhauser C., Rana V., Berthet C., Fisher D., Hemmings B.A., Fernandez A., Lamb N.J.: Only Akt1 is required for proliferation, while Akt2 promotes cell cycle exit through p21 binding. *Mol. Cell. Biol.*, 2006; 26: 8267–8280
- [46] Hirai H., Sootome H., Nakatsuru Y., Miyama K., Taguchi S., Tsujioka K., Ueno Y., Hatch H., Majumder P.K., Pan B.S., Kotani H.: MK-2206, an allosteric Akt inhibitor, enhances antitumor efficacy by standard chemotherapeutic agents or molecular targeted drugs *in vitro* and *in vivo*. *Mol. Cancer Ther.*, 2010; 9: 1956–1967
- [47] Hu Y., Yao J., Liu Z., Liu X., Fu H., Ye K.: Akt phosphorylates acinus and inhibits its proteolytic cleavage, preventing chromatin condensation. *EMBO J.*, 2005; 24: 3543–3554
- [48] Huang H., Tindall D.J.: Dynamic FoxO transcription factors. *J. Cell Sci.*, 2007; 120: 2479–2487
- [49] Huang J., Manning B.D.: A complex interplay between Akt, TSC2 and the two mTOR complexes. *Biochem. Soc. Trans.*, 2009; 37: 217–222
- [50] Hudson C.C., Liu M., Chiang G.G., Otterness D.M., Loomis D.C., Kaper F., Giaccia A.J., Abraham R.T.: Regulation of hypoxia-inducible factor 1 α expression and function by the mammalian target of rapamycin. *Mol. Cell. Biol.*, 2002; 22: 7004–7014
- [51] Hutchinson J.N., Jin J., Cardiff R.D., Woodgett J.R., Muller W.J.: Activation of Akt-1 (PKB- α) can accelerate ErbB-2-mediated mammary tumorigenesis but suppresses tumor invasion. *Cancer Res.*, 2004; 64: 3171–3178
- [52] Inoki K., Li Y., Zhu T., Wu J., Guan K.L.: TSC2 is phosphorylated and inhibited by Akt and suppresses mTOR signalling. *Nat. Cell Biol.*, 2002; 4: 648–657
- [53] Irie H.Y., Pearlina R.V., Grueneberg D., Hsia M., Ravichandran P., Kothari N., Natesan S., Brugge J.S.: Distinct roles of Akt1 and Akt2 in regulating cell migration and epithelial-mesenchymal transition. *J. Cell Biol.*, 2005; 171: 1023–1034
- [54] Jiang B.H., Liu L.Z.: PI3K/PTEN signaling in tumorigenesis and angiogenesis. *Biochim. Biophys. Acta*, 2008; 1784: 150–158
- [55] Jiang B.H., Liu L.Z.: Role of mTOR in anticancer drug resistance: perspectives for improved drug treatment. *Drug Resist. Updat.*, 2008; 11: 63–76
- [56] Jiang P., Enomoto A., Jijiwa M., Kato T., Hasegawa T., Ishida M., Sato T., Asai N., Murakumo Y., Takahashi M.: An actin-binding protein Girdin regulates the motility of breast cancer cells. *Cancer Res.*, 2008; 68: 1310–1318
- [57] Jiang Z.Y., Zhou Q.L., Holik J., Patel S., Leszyk J., Coleman K., Chouinard M., Czech M.P.: Identification of WNK1 as a substrate of Akt/protein kinase B and a negative regulator of insulin-stimulated mitogenesis in 3T3-L1 cells. *J. Biol. Chem.*, 2005; 280: 21622–21628
- [58] Kim A.H., Khursigara G., Sun X., Franke T.F., Chao M.V.: Akt phosphorylates and negatively regulates apoptosis signal-regulating kinase 1. *Mol. Cell. Biol.*, 2001; 21: 893–901
- [59] Kim D., Chung J.: Akt: versatile mediator of cell survival and beyond. *J. Biochem. Mol. Biol.*, 2002; 35: 106–115
- [60] Kim D., Kim S., Koh H., Yoon S.O., Chung A.S., Cho K.S., Chung J.: Akt/PKB promotes cancer cell invasion via increased motility and metalloproteinase production. *FASEB J.*, 2001; 15: 1953–1962
- [61] Kim N.H., Kim K., Park W.S., Son H.S., Bae Y.: PKB/Akt inhibits ceramide-induced apoptosis in neuroblastoma cells by blocking apoptosis-inducing factor (AIF) translocation. *J. Cell. Biochem.*, 2007; 102: 1160–1170
- [62] King F.W., Skeen J., Hay N., Shtivelman E.: Inhibition of Chk1 by activated PKB/Akt. *Cell Cycle*, 2004; 3: 634–637
- [63] Klip A.: The many ways to regulate glucose transporter 4. *Appl. Physiol. Nutr. Metab.*, 2009; 34: 481–487
- [64] Kovacina K.S., Park G.Y., Bae S.S., Guzzetta A.W., Schaefer E., Birnbaum M.J., Roth R.A.: Identification of a proline-rich Akt substrate as a 14-3-3 binding partner. *J. Biol. Chem.*, 2003; 278: 10189–10194
- [65] Kruse J.P., Gu W.: Modes of p53 regulation. *Cell*, 2009; 137: 609–622
- [66] Li Y., Liang J., Siu T., Hu E., Rossi M.A., Barnett S.F., Defeo-Jones D., Jones R.E., Robinson R.G., Leander K., Huber H.E., Mittal S., Cosford N., Prasit P.: Allosteric inhibitors of Akt1 and Akt2: discovery of [1,2,4]triazolo[3,4-f][1,6]naphthyridines with potent and balanced activity. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2009; 19: 834–836
- [67] Liang J., Zubovitz J., Petrocchi T., Kotchetkov R., Connor M.K., Han K., Lee J.H., Ciarallo S., Catzavelos C., Beniston R., Franssen E., Slingerland J.M.: PKB/Akt phosphorylates Bax and promotes its mitochondrial localization during neuronal apoptosis. *J. Neurosci.*, 2004; 24: 9993–10002
- [68] Lindsley C.W., Zhao Z., Leister W.H., Robinson R.G., Barnett S.F., Defeo-Jones D., Jones R.E., Hartman G.D., Hu J.R., Huber H.E., Duggan M.E.: Allosteric Akt (PKB) inhibitors: discovery and SAR of isozyme selective inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2005; 15: 761–764
- [69] Linseman D.A., Butts B.D., Precht T.A., Phelps R.A., Le S.S., Laessig T.A., Bouchard R.J., Florez-McClure M.L., Heidenreich K.A.: Glycogen synthase kinase-3 β phosphorylates Bax and promotes its mitochondrial localization during neuronal apoptosis. *J. Neurosci.*, 2004; 24: 9993–10002
- [70] LoPiccolo J., Blumenthal G.M., Bernstein W.B., Dennis P.A.: Targeting the PI3K/Akt/mTOR pathway: effective combinations and clinical considerations. *Drug Resist. Updat.*, 2008; 11: 32–50
- [71] Lum J.J., Bui T., Gruber M., Gordan J.D., DeBerardinis R.J., Covelto K.L., Simon M.C., Thompson C.B.: The transcription factor HIF-1 α plays a critical role in the growth factor-dependent regulation of both aerobic and anaerobic glycolysis. *Genes Dev.*, 2007; 21: 1037–1049
- [72] Madhunapantula S.V., Robertson G.P.: The PTEN-AKT3 signaling cascade as a therapeutic target in melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res.*, 2009; 22: 400–419
- [73] Majewski N., Nogueira V., Robey R.B., Hay N.: Akt inhibits apoptosis downstream of BID cleavage via a glucose-dependent mechanism involving mitochondrial hexokinases. *Mol. Cell. Biol.*, 2004; 24: 730–740
- [74] Manning B.D., Cantley L.C.: AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell*, 2007; 129: 1261–1274
- [75] Matheny R.W.Jr., Adamo M.L.: Current perspectives on Akt Activation and Akt-ions. *Exp. Biol. Med.*, 2009; 234: 1264–1270
- [76] Maurer U., Charvet C., Wagman A.S., Dejardin E., Green D.R.: Glycogen synthase kinase-3 regulates mitochondrial outer membrane permeabilization and apoptosis by destabilization of MCL-1. *Mol. Cell*, 2006; 21: 749–760
- [77] Mayo L.D., Donner D.B.: A phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway promotes translocation of Mdm2 from the cytoplasm to the nucleus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2001; 98: 11598–11603
- [78] Medema R.H., Kops G.J., Bos J.L., Burgering B.M.: AFX-like Forkhead transcription factors mediate cell-cycle regulation by Ras and PKB through p27kip1. *Nature*, 2000; 404: 782–787
- [79] Momota H., Nerio E., Holland E.C.: Perifosine inhibits multiple signaling pathways in glial progenitors and cooperates with temozolomide to arrest cell proliferation in gliomas *in vivo*. *Cancer Res.*, 2005; 65: 7429–7435
- [80] Noguchi M., Ropars V., Roumestand C., Suizu F.: Proto-oncogene TCL1: more than just a coactivator for Akt. *FASEB J.*, 2007; 21: 2273–2284
- [81] Nyakern M., Cappellini A., Mantovani I., Martelli A.M.: Synergistic induction of apoptosis in human leukemia T cells by the Akt inhibitor perifosine and etoposide through activation of intrinsic and Fas-mediated extrinsic cell death pathways. *Mol. Cancer Ther.*, 2006; 5: 1559–1570
- [82] Papapetropoulos A., Fulton D., Mahboubi K., Kalb R.G., O'Connor D.S., Li F., Altieri D.C., Sessa W.C.: Angiotensin II inhibits endothelial cell apoptosis via the Akt/survivin pathway. *J. Biol. Chem.*, 2000; 275: 9102–9105
- [83] Parcellier A., Tintignac L.A., Zhuravleva E., Hemmings B.A.: PKB and the mitochondria: AKTing on apoptosis. *Cell. Signal.*, 2008; 20: 21–30
- [84] Park B.K., Zeng X., Glazer R.I.: Akt1 induces extracellular matrix invasion and matrix metalloproteinase-2 activity in mouse mammary epithelial cells. *Cancer Res.*, 2001; 61: 7647–7653

- [85] Park H.S., Kim M.S., Huh S.H., Park J., Chung J., Kang S.S., Choi E.J.: Akt (protein kinase B) negatively regulates SEK1 by means of protein phosphorylation. *J. Biol. Chem.*, 2002; 277: 2573–2578
- [86] Pore N., Jiang Z., Shu H.K., Bernhard E., Kao G.D., Maity A.: Akt1 activation can augment hypoxia-inducible factor-1 α expression by increasing protein translation through a mammalian target of rapamycin-independent pathway. *Mol. Cancer Res.*, 2006; 4: 471–479
- [87] Puc J., Keniry M., Li H.S., Pandita T.K., Choudhury A.D., Memeo L., Mansukhani M., Murty V.V., Gaciong Z., Meek S.E., Pivnicka-Worms H., Hibshoosh H., Parsons R.: Lack of PTEN sequesters CHK1 and initiates genetic instability. *Cancer Cell*, 2005; 7: 193–204
- [88] Qiao M., Sheng S., Pardee A.B.: Metastasis and AKT activation. *Cell Cycle*, 2008; 7: 2991–2996
- [89] Robey R.B., Hay N.: Is Akt the “Warburg kinase”? – Akt-energy metabolism interactions and oncogenesis. *Semin. Cancer Biol.*, 2009; 19: 25–31
- [90] Robey R.B., Hay N.: Mitochondrial hexokinases, novel mediators of the antiapoptotic effects of growth factors and Akt. *Oncogene*, 2006; 25: 4683–4696
- [91] Romashkova J.A., Makarov S.S.: NF- κ B is a target of AKT in antiapoptotic PDGF signalling. *Nature*, 1999; 401: 86–90
- [92] Rommel C., Clarke B.A., Zimmermann S., Nunez L., Rossman R., Reid K., Moelling K., Yancopoulos G.D., Glass D.J.: Differentiation stage-specific inhibition of the Raf-MEK-ERK pathway by Akt. *Science*, 1999; 286: 1738–1741
- [93] Sakamoto K.M., Frank D.A.: CREB in the pathophysiology of cancer: implications for targeting transcription factors for cancer therapy. *Clin. Cancer Res.*, 2009; 15: 2583–2587
- [94] Sale E.M., Hodgkinson C.P., Jones N.P., Sale G.J.: A new strategy for studying protein kinase B and its three isoforms. Role of protein kinase B in phosphorylating glycogen synthase kinase-3, tuberlin, WNK1, and ATP citrate lyase. *Biochemistry*, 2006; 45: 213–223
- [95] Sancak Y., Thoreen C.C., Peterson T.R., Lindquist R.A., Kang S.A., Spooner E., Carr S.A., Sabatini D.M.: PRAS40 is an insulin-regulated inhibitor of the mTORC1 protein kinase. *Mol. Cell*, 2007; 25: 903–915
- [96] Sano H., Kane S., Sano E., Miinea C.P., Asara J.M., Lane W.S., Garner C.W., Lienhard G.E.: Insulin-stimulated phosphorylation of a Rab GTPase-activating protein regulates GLUT4 translocation. *J. Biol. Chem.*, 2003; 278: 14599–14602
- [97] Sekimoto T., Fukumoto M., Yoneda Y.: 14-3-3 suppresses the nuclear localization of threonine 157-phosphorylated p27Kip1. *EMBO J.*, 2004; 23: 1934–1942
- [98] Shafee N., Kaluz S., Ru N., Stanbridge E.J.: PI3K/Akt activity has variable cell-specific effects on expression of HIF target genes, CA9 and VEGF, in human cancer cell lines. *Cancer Lett.*, 2009; 282: 109–115
- [99] Sharma A., Sharma A.K., Madhunapantula S.V., Desai D., Huh S.J., Mosca P., Amin S., Robertson G.P.: Targeting Akt3 signaling in malignant melanoma using isoselenocyanates. *Clin. Cancer Res.*, 2009; 15: 1674–1685
- [100] Shin I., Yakes F.M., Rojo F., Shin N.Y., Bakin A.V., Baselga J., Arteaga C.L.: PKB/Akt mediates cell-cycle progression by phosphorylation of p27(Kip1) at threonine 157 and modulation of its cellular localization. *Nat. Med.*, 2002; 8: 1145–1152
- [101] Skeen J.E., Bhaskar P.T., Chen C.C., Chen W.S., Peng X.D., Nogueira V., Hahn-Windgassen A., Kiyokawa H., Hay N.: Akt deficiency impairs normal cell proliferation and suppresses oncogenesis in a p53-independent and mTORC1-dependent manner. *Cancer Cell*, 2006; 10: 269–280
- [102] Somanath P.R., Razorenova O.V., Chen J., Byzova T.V.: Akt1 in endothelial cell and angiogenesis. *Cell Cycle*, 2006; 5: 512–518
- [103] Soung Y.H., Lee J.W., Nam S.W., Lee J.Y., Yoo N.J., Lee S.H.: Mutational analysis of AKT1, AKT2 and AKT3 genes in common human carcinomas. *Oncology*, 2006; 70: 285–289
- [104] Staal S.P.: Molecular cloning of the Akt oncogene and its human homologues AKT1 and AKT2: amplification of AKT1 in a primary human gastric adenocarcinoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1987; 84: 5034–5037
- [105] Sundqvist A., Bengochea-Alonso M.T., Ye X., Lukiyanchuk V., Jin J., Harper J.W., Ericsson J.: Control of lipid metabolism by phosphorylation-dependent degradation of the SREBP family of transcription factors by SCFFbw7. *Cell Metab.*, 2005; 1: 379–391
- [106] Świdzińska E., Naumnik W., Chyczewska E.: Angiogeneza i neoangiogeneza – znaczenie w raku płuca i innych nowotworach. *Pneumonol. Alergol. Pol.*, 2006; 74: 414–420
- [107] Tanno S., Tanno S., Mitsuuchi Y., Altomare D.A., Xiao G.H., Testa J.R.: AKT activation up-regulates insulin-like growth factor 1 receptor expression and promotes invasiveness of human pancreatic cancer cells. *Cancer Res.*, 2001; 61: 589–593
- [108] Toker A., Yoeli-Lerner M.: Akt signaling and cancer: surviving but not moving on. *Cancer Res.*, 2006; 66: 3963–3966
- [109] Viglietto G., Motti M.L., Bruni P., Melillo R.M., D’Alessio A., Califano D., Vinci F., Chiappetta G., Tschlis P., Bellacosa A., Fusco A., Santoro M.: Cytoplasmic relocalization and inhibition of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27(Kip1) by PKB/Akt-mediated phosphorylation in breast cancer. *Nat. Med.*, 2002; 8: 1136–1144
- [110] Vitari A.C., Deak M., Collins B.J., Morrice N., Prescott A.R., Phelan A., Humphreys S., Alessi D.R.: WNK1, the kinase mutated in an inherited high-blood-pressure syndrome, is a novel PKB (protein kinase B)/Akt substrate. *Biochem. J.*, 2004; 378: 257–268
- [111] Wei W., Jin J., Schlisio S., Harper J.W., Kaelin W.G.Jr.: The v-Jun point mutation allows c-Jun to escape GSK3-dependent recognition and destruction by the Fbw7 ubiquitin ligase. *Cancer Cell*, 2005; 8: 25–33
- [112] Welcker M., Singer J., Loeb K.R., Grim J., Bloecher A., Gurien-West M., Clurman B.E., Roberts J.M.: Multisite phosphorylation by Cdk2 and GSK3 controls cyclin E degradation. *Mol. Cell*, 2003; 12: 381–392
- [113] Welsh G.I., Hers I., Berwick D.C., Dell G., Wherlock M., Birkin R., Leney S., Tavaré J.M.: Role of protein kinase B in insulin-regulated glucose uptake. *Biochem. Soc. Trans.*, 2005; 33: 346–349
- [114] Wickenden J.A., Watson C.J.: Key signalling nodes in mammary gland development and cancer. Signalling downstream of PI3 kinase in mammary epithelium: a play in 3 Akts. *Breast Cancer Res.*, 2010; 12: 202
- [115] Wood I.S., Trayhurn P.: Glucose transporters (GLUT and SGLT): expanded families of sugar transport proteins. *Br. J. Nutr.*, 2003; 89: 3–9
- [116] Yang L., Sun M., Sun X.M., Cheng G.Z., Nicosia S.V., Cheng J.Q.: Akt attenuation of the serine protease activity of Hra2/Omi through phosphorylation of serine 212. *J. Biol. Chem.*, 2007; 282: 10981–10987
- [117] Yap T.A., Patnaik A., Fearon I., Olmos D., Papadopoulos K., Tunariu N., Sullivan D., Yan L., De Bono J.S., Tolcher A.W.: First-in-class phase I trial of a selective Akt inhibitor, MK2206 (MK), evaluating alternate day (QOD) and once weekly (QW) doses in advanced cancer patients (pts) with evidence of target modulation and antitumor activity. *J. Clin. Oncol.*, 2010, 28 (Suppl. 15), 3009, ASCO Meeting Abstracts
- [118] Yeh E., Cunningham M., Arnold H., Chasse D., Monteith T., Ivaldi G., Hahn W.C., Stukenberg P.T., Shenolikar S., Uchida T., Counter C.M., Nevins J.R., Means A.R., Sears R.: A signalling pathway controlling c-Myc degradation that impacts oncogenic transformation of human cells. *Nat. Cell Biol.*, 2004; 6: 308–318
- [119] Yoeli-Lerner M., Toker A.: Akt/PKB signaling in cancer: a function in cell motility and invasion. *Cell Cycle*, 2006; 5: 603–605
- [120] Yoeli-Lerner M., Yiu G.K., Rabinovitz I., Erhardt P., Jauliac S., Toker A.: Akt blocks breast cancer cell motility and invasion through the transcription factor NFAT. *Mol. Cell*, 2005; 20: 539–550
- [121] Young C.D., Anderson S.M.: Sugar and fat – that’s where it’s at: metabolic changes in tumors. *Breast Cancer Res.*, 2008; 10: 202
- [122] Yuasa T., Uchiyama K., Ogura Y., Kimura M., Teshigawara K., Hosaka T., Tanaka Y., Obata T., Sano H., Kishi K., Ebina Y.: The Rab GTPase-activating protein AS160 as a common regulator of insulin- and G α q-mediated intracellular GLUT4 vesicle distribution. *Endocr. J.*, 2009; 56: 345–359
- [123] Zdychová J., Komers R.: Emerging role of Akt kinase/protein kinase B signaling in pathophysiology of diabetes and its complications. *Physiol. Res.*, 2005; 54: 1–16
- [124] Zhong X.S., Zheng J.Z., Reed E., Jiang B.H.: SU5416 inhibited VEGF and HIF-1 α expression through the PI3K/AKT/p70S6K1 signaling pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2004; 324: 471–480
- [125] Zhou B.P., Liao Y., Xia W., Spohn B., Lee M.H., Hung M.C.: Cytoplasmic localization of p21^{Cip1/WAF1} by Akt-induced phosphorylation in HER-2/neu-overexpressing cells. *Nat. Cell Biol.*, 2001; 3: 245–252
- [126] Zhou B.P., Liao Y., Xia W., Zou Y., Spohn B., Hung M.C.: HER2/neu induces p53 ubiquitination via Akt-mediated MDM2 phosphorylation. *Nat. Cell Biol.*, 2001; 3: 973–982
- [127] Zhou G.L., Tucker D.F., Bae S.S., Bhatheja K., Birnbaum M.J., Field J.: Opposing roles for Akt1 and Akt2 in Rac/Pak signaling and cell migration. *J. Biol. Chem.*, 2006; 281: 36443–36453



- [128] Zhou Q.L., Jiang Z.Y., Holik J., Chawla A., Hagan G.N., Leszyk J., Czech M.P.: Akt substrate TBC1D1 regulates GLUT1 expression through the mTOR pathway in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem. J.*, 2008; 411: 647–655
- [129] Zielonka T.M.: Angiogeneza – Część I. Mechanizm powstawania nowych naczyń krwionośnych. *Alergia Astma Immunologia*, 2003; 8: 169–174

- [130] Zielonka T.M.: Angiogeneza – Część II. Czynniki modulujące proces powstawania nowych naczyń krwionośnych. *Alergia Astma Immunologia*, 2004; 9: 25–31
- [131] Zimmermann S., Moelling K.: Phosphorylation and regulation of Raf by Akt (protein kinase B). *Science*, 1999; 286: 1741–1744

Autorka deklaruje brak potencjalnych konfliktów interesów.