

## Передача сигнала через В-клеточный рецептор: механизмы и ингибиторы

Е.А. Никитин

ФГБУ «Гематологический научный центр» МЗ РФ, 125167, Новый Зыковский проезд, д. 4, Москва, Российская Федерация

### РЕФЕРАТ

Сигнальный путь В-клеточного рецептора (BCR) имеет ключевое значение в жизнеспособности и дифференцировке нормальных В-лимфоцитов. Клетки лимфоидных опухолей используют различные аспекты этого сигнального пути для обеспечения пролиферации и роста. Они проявляются в разных формах: в форме особой антигенной специфичности BCR, в форме активирующих или, наоборот, ингибирующих мутаций генов, кодирующих белки пути BCR. Целый ряд малых молекул подавляют различные компоненты пути BCR.

В обзоре рассматривается передача сигнала через BCR в норме и патологии, а также ингибиторы тирозинкиназ, которые активно используются в клинических исследованиях, и, возможно, уже скоро изменят тактику ведения больных с лимфоидными опухолями.

**Ключевые слова:** В-клеточные лимфомы, В-клеточный рецептор, ингибиторы киназ.

**Принято в печать:** 8 мая 2014 г.

Е.А. Никитин — канд. мед. наук, доцент кафедры гематологии и трансфузиологии РМАПО, ведущий научный сотрудник научно-клинического отделения стандартизации методов диагностики и терапии, eugene\_nikitin@mail.ru

Для переписки: Е.А. Никитин, 125167, Новый Зыковский проезд, д. 4, Москва, Российская Федерация, eugene\_nikitin@mail.ru

Для цитирования: Никитин Е.А. Передача сигнала через В-клеточный рецептор: механизмы и ингибиторы. *Клин. онкогематол.* 2014; 7(3): 251–63.

## B-Cell Receptor Signaling Pathway: Mechanisms and Inhibitors

Е.А. Nikitin

Hematology Research Center, RF MH, Novyi Zykovskii proezd, 4, Moscow, 125167, Russian Federation

### ABSTRACT

Differentiation and survival of normal B-lymphocytes critically depends on the B-cell receptor (BCR) signaling pathway. Lymphoid malignancies use different aspects of the BCR-signaling pathway to provide their proliferation and growth. They manifest themselves in different forms, such as the form of BCR particular antigenic specificity, or the form of activating or, to the contrary, inhibiting gene mutations encoding proteins involved in BCR-signaling. A number of small molecules inhibit different proteins of BCR-signaling cascade. In this review, we dwell on normal and defective BCR-signaling pathways, as well as on tyrosine kinase inhibitors that are being widely used in clinical trials and will likely change the management of lymphoid malignancies.

**Keywords:** B-cell lymphomas, B-cell receptor, kinase inhibitors.

**Accepted:** May 08, 2014

Е.А. Nikitin — PhD, Associate professor of the subdivision of hematology and transfusiology of the Russian Academy for Postgraduate Education, Leading scientific worker of the scientific clinical department for standardization of diagnostic and therapeutic methods

Address correspondence to: Е.А. Nikitin, Novyi Zykovskii proezd, 4, Moscow, 125167, Russian Federation, eugene\_nikitin@mail.ru

For citation: Nikitin E.A. B-Cell Receptor Signaling Pathway: Mechanisms and Inhibitors. *Klin. onkogematol.* 2014; 7(3): 251–63 (In Russ.).



## СОКРАЩЕНИЯ

**AID** — Activation Induced cytidine Deaminase  
**AKT** — Protein Kinase B  
**AP-1** — Activation Protein 1  
**BCAP** — B-cell adaptor for PI3K  
**BLK** — B lymphocyte kinase  
**BLNK** — B-cell LiNKer protein  
**BTK** — Bruton Tyrosine Kinase  
**CARD11** — CAspase Recruitment Domain-containing protein 11  
**CDR** — Complementarity determination region  
**CIN85** — Cbl-INTERacting protein of 85 kDa = SH3KBP1  
**CXCL12/13** — C-X-C chemokine Ligand 12/13  
**DAG** — Diacyl-glycerol  
**ERK** — Extracellular-signal-Regulated Kinase  
**FLT3** — Fms-Like Tyrosine kinase 3  
**FYN** — Tyrosine-protein kinase FYN  
**FWR2** — FrameWork Region 2 of immunoglobulin variable region  
**GPIV** — GlycoProtein IV  
**ID3** — Inhibitor of DNA binding 3  
**IL-1** — InterLeukin-1  
**IRAK1/4** — Interleukin-1 Receptor-Associated Kinase 1/4  
**IP3** — Inositol trisphosphate  
**ITAM** — Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif  
**ITIM** — Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibitory Motif  
**JAK** — Janus Kinase

**LCK** — Lymphocyte Cell-specific protein-tyrosine Kinase  
**LYN** — LCK/YES-related novel  
**MAP-kinase** — Mitogen-Activated Protein kinase  
**MAPKK1** — Mitogen-Activated Protein kinase kinase 1  
**MYD88** — Myeloid Differentiation primary response protein 88  
**mTORC1** — mammalian Target Of Rapamycin Complex 1  
**NFAT** — Nuclear Factor of Activated T-cells  
**NF- $\kappa$ B** — Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells  
**N-WASP** — Neuronal Wiskott-Aldrich Syndrome Protein  
**PDK1-3** — Phosphoinositide-Dependent protein Kinase 1-3  
**PI3K** — Phosphatidylinositol 3-kinase  
**PIP3** — (PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub>) — Phosphatidylinositol-(3,4,5)-triphosphate (PIP3)  
**PIP2** (PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>) — Phosphatidylinositol-(4,5)-biphosphate (PIP2)  
**PTEN** — Phosphatase and TENsin homologue  
**RAC1** — RAS-related C3 botulinum toxin substrate 1  
**RAG-1/2** — Recombination activating gene-1/2  
**RasGRP** — Ras Guanyl nucleotide-Releasing Protein  
**SHP-1** — Src Homology 2 (SH2) domain-containing Phosphatase-1 (= PTPN6)  
**SHIP-1** — Src Homology 2 domain containing Inositol-5-Phosphatase (= INPP5D)  
**SRC** — sarcoma  
**SYK** — Spleen tyrosine kinase  
**VAV1** — tyrosine-phosphorylated protein (95 kDa)

## ВВЕДЕНИЕ

О возможной связи между возникновением лимфом и антигенной стимуляцией писали W. Dameshek и R. Schwartz еще в 1959 г. [1]. Многочисленные клинические наблюдения, касающиеся роли антигенов при лимфомах маргинальной зоны (ЛМЗ), экспериментальные данные о схожести и возможной одинаковой специфичности антигенных рецепторов при хроническом лимфолейкозе (ХЛЛ) и лимфоме из клеток мантии (ЛКМ), данные о специфическом характере хромосомных нарушений при лимфомах дополнили эту гипотезу. Однако при ясности общей концепции многочисленные детали ее оставались загадкой. Сегодня, благодаря достижениям функциональной геномики, ясно, что передача сигнала через В-клеточный рецептор (BCR) является центральным онкогенным путем, определяющим пролиферацию и жизнеспособность клеток большинства В-клеточных опухолей. Непосредственным доказательством этого может служить успешное фармакологическое ингибирование сигнального пути BCR. Множество киназ, активируемых передачей сигнала через BCR, сегодня доступны терапевтическому воздействию.

В данном обзоре рассматривается передача сигнала через BCR в норме, обсуждаются механизмы, посредством которых клетки лимфоидных опухолей используют этот сигнальный путь. Финальная часть обзора посвящена ингибиторам тирозинкиназ, которые активно изучаются в клинических исследованиях и, возможно, уже скоро изменят стандартную лечебную практику лимфоидных опухолей.

## СВЯЗЬ АНТИГЕННОЙ СТИМУЛЯЦИИ И ЛИМФОМОГЕНЕЗА: КЛИНИЧЕСКИЕ НАБЛЮДЕНИЯ

Как уже отмечалось, возможное участие антигенов в лимфоомогенезе обсуждается давно. В 1990-е годы по-

явилось немало интригующих наблюдений на эту тему. Достаточно вспомнить историю с так называемыми псевдолимфомами кожи, лимфоидными гиперплазиями кожи (лимфоидная инфильтрация Йесснера—Канофа [M. Jessner, N.B. Kanof]), многие случаи которых оказались поздними проявлениями боррелиоза [2–5]. Неполный перечень возбудителей инфекций, связанных с лимфомами, представлен в табл. 1.

Сама по себе возможность регресса опухоли после назначения антибиотиков до сих пор осознается не всеми: слишком уж это наблюдение противоречит принципам традиционной онкологии. На самом деле этот факт по сути ничем не отличается от эффективности ингибиторов тирозинкиназ при хроническом миелолейкозе или стромальных опухолях ЖКТ. Во всех этих случаях речь идет о прерывании сигнального пути, от которого критически зависит жизнеспособность опухолевых клеток. При MALT-лимфомах этот сигнальный путь запускается антигеном. Если в клетках опухолевого клона происходят мутации, позволяющие им выживать в отсутствие BCR-сигнала, антибиотики оказываются неэффективными. Читатель, возможно, задастся вопросом: где проходит граница между опухолью и реактивным процессом? С точки зрения

Таблица 1. Клинические наблюдения о роли антигенов

Антиген	Опухоль	Источник
<i>Helicobacter pylori</i>	MALT-лимфомы желудка	[6, 7]
<i>Chlamydia psittaci</i>	ЛМЗ орбиты	[8, 9]
<i>Campylobacter jejuni</i>	MALT-лимфома кишки	[10]
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	ЛМЗ легкого	[11, 12]
<i>Borrelia burgdorferi</i>	Лимфомы кожи	[2–5]
<i>Escherichia coli</i> ; другие возбудители	MALT-лимфома мочевого пузыря	[13–15]
Вирус гепатита С	ЛМЗ селезенки	[16]

диагноза это важно. С биологической точки зрения граница не должна быть дискретной. Наоборот, для развития опухоли необходимо множество онкогенных событий. Некоторые ранние из них могут приводить к избыточной пролиферации и появлению морфологической картины, полностью соответствующей опухолевому процессу. Мы застаем опухоль на раннем этапе ее развития, когда она еще полностью зависит от антигенной стимуляции. Так или иначе, пробное назначение антибиотиков при MALT-лимфомах орбиты и желудка входит в международные рекомендации по лечению этих опухолей.

**ОСОБЕННОСТИ СТРУКТУРЫ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ В КЛЕТКАХ ЛИМФОМ, СВИДЕТЕЛЬСТВУЮЩИЕ ОБ АКТИВНОСТИ СИГНАЛЬНОГО ПУТИ BCR**

Косвенные экспериментальные доказательства роли антигенов можно почерпнуть из анализа структуры иммуноглобулинов в клетках лимфом (табл. 2). Несколько групп фактов свидетельствует о значении антигенов или активности сигнального пути BCR. К ним относятся постоянство экспрессии BCR, неслучайность изотипа, сходство переменных регионов и, наконец, совсем новые данные о специфичности BCR в клетках ХЛЛ и фолликулярной лимфомы (ФЛ) (см. табл. 2). На этих данных мы остановимся подробнее.

Патогенез многих лимфом связан с хромосомными транслокациями, которые разрушают локус генов иммуноглобулинов и помещают онкогены под контроль энхансера генов иммуноглобулинов. Таким образом, один локус иммуноглобулинов на одной из гомологичных хромосом поврежден. За исключением казуистически редких случаев, все В-клеточные лимфомы характеризуются экспрессией BCR на поверхности клеток [17]. Это означает, что второй локус тяжелой и легкой цепей всегда сохранен. Например, для ФЛ характерна транслокация t(14;18) с перемещением гена *BCL-2* под контроль энхансера тяжелой цепи иммуноглобулинов. Продуктивный аллель тяжелой цепи никогда не участвует в транслокации, и это не может быть случайностью. Если бы экспрессия BCR не имела значения, мы бы видели ее утрату в половине случаев. Постоянство экспрессии BCR означает, что опухоль развивается только из тех клеток, где путь BCR активен.

Еще один важный аспект касается изотипа иммуноглобулинов. Так, 4 самые частые лимфоидные опухоли (ХЛЛ, ДВКЛ, ФЛ и ЛБ) экспрессируют иммуноглобу-

лины класса М (а не класса G, А или Е), хотя возникают из клеток герминативного центра или постгерминальных В-клеток, где в В-лимфоцитах в норме должен происходить сдвиг изотипа (смена класса иммуноглобулина с IgM на IgG/IgA/IgE). Частота экспрессии IgM слишком велика для случайности. Это объясняется другой причиной: В-клеточные рецепторы IgM и IgG продуцируют качественно разный сигнальный результат. IgM передает сигнал только через молекулы CD79A и CD79B (см. далее). Этот процесс подчиняется сложнейшей регуляции и в зависимости от контекста может приводить к принципиально разным последствиям для клетки (пролиферация, анергия, апоптоз). Молекулы IgG и IgE передают сигнал не только через CD79A и CD79B, но и непосредственно через длинные цитоплазматические части этих молекул. Передача сигнала от IgG В-клеточного рецептора более однозначна: она приводит к плазмоклеточной дифференцировке через активацию ERK и MAP-киназы [18, 19].

При ФЛ транслокация t(14;18) касается только непродуктивного аллеля тяжелой цепи. Очень часто именно этот непродуктивный аллель подвергается в герминативном центре рекомбинационному сдвигу изотипа на *S<sub>γ</sub>*, кодирующего IgG. Продуктивный аллель, экспрессирующий IgH, остается связан с *S<sub>μ</sub>*, кодирующим IgM («аллельный парадокс»)[20].

Диффузная В-крупноклеточная лимфома (ДВКЛ) биологически гетерогенна и представлена двумя молекулярными вариантами: GCB-типа (герминальный вариант) и ABC-типа (активированный вариант) [21]. Герминальный вариант в типичных случаях экспрессирует IgG [22]. Активированный вариант ДВКЛ использует IgM-сигнал, причем это происходит вследствие делеции (!), повреждающей механизм сдвига изотипа [23]. Эти делеции в switch-регионах *S<sub>μ</sub>* и *S<sub>γ</sub>* происходят селективно именно на продуктивном аллеле тяжелой цепи, в то время как непродуктивный аллель не имеет этих делеций и может подвергаться рекомбинации со сдвигом изотипа [24].

Лимфома Беркитта (ЛБ) возникает из клеток герминативного центра, где большинство В-клеток претерпевает сдвиг изотипа. Клетки ЛБ почти всегда экспрессируют IgM [25]. Наконец, ХЛЛ с мутациями VH-генов происходят из постгерминальных В-клеток, но также сохраняют экспрессию IgM. Таким образом, экспрессия IgM в клетках этих лимфом является следствием специфической онкогенной селекции.

Наконец, третье важное наблюдение — сходство переменных регионов, особенно при ХЛЛ. При анализе

**Таблица 2.** Экспериментальные данные о неслучайности структуры иммуноглобулинов в клетках лимфом

Постоянство экспрессии BCR	В основе патогенеза ФЛ, ЛКМ, ЛБ лежат транслокации, повреждающие локусы генов иммуноглобулинов. Если бы экспрессия BCR была не важна, она бы не выявлялась в половине случаев. Это не так, поскольку экспрессия BCR в клетках этих лимфом всегда сохраняется
Постоянство изотипа IgM	ФЛ, ЛБ, ABC-ДВКЛ, вариант ХЛЛ с мутациями IgVH возникают из клеток герминативного центра, где в норме должен происходить сдвиг изотипа. Несмотря на это, клетки этих лимфом стабильно экспрессируют IgM, а не IgG, что неслучайно
Структура IgVH	Сходство (стереотипность) IgVH у разных больных с лимфоидной опухолью говорит о наличии единого антигена (антигенов). Стереотипность иммуноглобулинов наблюдается в 30 % случаев ХЛЛ и во многих случаях ЛКМ
Специфичность BCR	IgVH при HCV-ассоциированной ЛМЗ селезенки специфичны в отношении E2-антигена HCV IgVH при ХЛЛ специфичны против FWR2 собственного иммуноглобулина. Таким образом, клетки ХЛЛ аутоспецифичны и стимулируют выживаемость друг друга IgVH при ФЛ специфичны в отношении маннозасвязывающих лектинов, которые имеются на стромальных клетках. Таким образом, клетки ФЛ стимулируются клетками микроокружения

ЛБ — лимфома Беркитта; ЛКМ — лимфома из клеток мантии; ЛМЗ — лимфома маргинальной зоны; ABC-ДВКЛ — диффузная В-крупноклеточная лимфома ABC-типа; HCV — вирус гепатита С; IgVH — переменный регион иммуноглобулина.

вариабельных регионов клонов ХЛЛ можно видеть, что они часто практически совпадают у разных пациентов [26–28]. Множество разных комбинаций VH-D-JH генов, среди которых полная идентичность зарегистрирована по крайней мере у двух разных пациентов, в совокупности называется стереотипными рецепторами. Существуют примеры, когда идентичная последовательность вариабельного региона встречается у десятков совершенно разных больных, из разных стран. Стереотипные рецепторы обнаруживаются в 30 % случаев ХЛЛ, во многих случаях ЛКМ [29]. Все это не может быть случайностью и говорит о наличии антигенов, вызывающих ХЛЛ или ЛКМ [30]. Но что является антигеном для клеток ХЛЛ и других лимфом?

Вопрос антигенной специфичности клеток ХЛЛ изучается более 25 лет [31–34]. Удивительное объяснение предложено M. Duhren-von Minden и соавт.: клетки ХЛЛ стимулируют друг друга через BCR [35]. Экспрессия BCR, полученных из клонов ХЛЛ в В-клетках мышей, не экспрессирующих собственных BCR, приводила к спонтанной активации В-клеток во всех тестированных случаях. Напротив, экспрессия в мышках BCR, полученных из нормальных В-лимфоцитов человека, такого эффекта не вызывала. Установлено, что BCR из клеток ХЛЛ реагирует с инвариантным эпитопом своего собственного V-региона, с участком, расположенным в районе FWR2 [35]. Клетки ХЛЛ могут распознавать и другие антигены. Не исключено, что разные антигены могут иметь значение на разных этапах развития ХЛЛ или в разных тканях.

Другой интересный пример антигенной специфичности BCR обнаружен при ФЛ. Соматическая гипермутация при этой опухоли часто приводит к образованию в составе V-гена сайтов N-гликозилирования по остаткам аспарагина, с которыми могут соединяться олигосахариды с высоким содержанием маннозы [36, 37]. Механизм не уникален для ФЛ: N-гликозилирование необходимо для формирования пре-BCR. Так или иначе, антитело в составе BCR, соединенное с маннозным олигосахаридом, может реагировать с маннозасвязывающими лектинами, имеющимися на стромальных клетках, и, таким образом, опухолевое микроокружение стимулирует клетки ФЛ через антигенный рецептор [38, 39].

Есть и прямые доказательства роли чужеродных антигенов, например, при ЛМЗ селезенки, возникающей на фоне гепатита С [40]. В 1 случае HCV-ассоциированной лимфомы доказано, что BCR опухолевых клеток непосредственно связывал вирусный гликопротеин HCV-E2, что является непосредственным доказательством антигензависимой передачи сигнала через BCR [16]. Применение интерферона останавливает репликацию вируса и приводит к ремиссии лимфомы более чем в 75 % случаев [41]. Таким образом, путь BCR может иметь ключевое значение в патогенезе лимфом. Для понимания того, как он используется при лимфомах, а также механизмов действия новых ингибиторов тирозинкиназ необходимо знание строения BCR и передачи сигнала через него. Этому посвящены три следующих раздела.

### СТРОЕНИЕ В-КЛЕТОЧНОГО РЕЦЕПТОРА

Каждая нормальная В-клетка и, следовательно, каждая лимфоидная опухоль обладает уникальным BCR. Для нормальных В-лимфоцитов BCR является главным

рецептором, обеспечивающим жизнеспособность, активацию и пролиферацию клеток. Отличие BCR от других рецепторных молекул в том, что он распознает бесчисленное множество лигандов. Лигандом для него служат антигены. BCR состоит из двух частей: вариабельной — иммуноглобулина и инвариантной — молекул, передающих сигнал в клетку. Таким образом, BCR присутствует на мембране в виде комплекса, в котором одна молекула иммуноглобулина связана с двумя инвариантными добавочными молекулами: CD79A (Ig $\alpha$ ) и CD79B (Ig $\beta$ ). Молекула иммуноглобулина состоит из пары тяжелых (IgH) и пары легких (IgL) цепей. Каждая тяжелая и каждая легкая цепь антитела имеют уникальный вариабельный регион. Вариабельные регионы тяжелых и легких цепей совместно составляют сайт, позволяющий BCR связываться с разнообразными антигенами.

Сначала рассмотрим кратко перестройки генов, кодирующих иммуноглобулины, на разных этапах созревания лимфоцита, а затем перейдем к молекулам, связанным с иммуноглобулином, и к передаче сигнала через BCR.

### ПЕРЕСТРОЙКИ ГЕНОВ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ НА РАЗНЫХ ЭТАПАХ СОЗРЕВАНИЯ В-ЛИМФОЦИТОВ

Ассоциация компонентов легких и тяжелых цепей в BCR начинается с V(D)J-рекомбинации, которая осуществляется белками RAG1 и RAG2, опосредующими рекомбинационное разнообразие, в результате которого образуется полный вариабельный регион (V-регион) как тяжелых, так и легких цепей. В составе V-региона имеется три гипервариабельных участка, которые называются районами, определяющими комплементарность (CDR). Эти районы особенно разнообразны по аминокислотному составу и поэтому могут связываться с различными антигенами.

V-регионы легких и тяжелых цепей соединены с константными регионами (C-регионами). Константные регионы тяжелых и легких цепей кодируются независимо от V-регионов группами генов, определяющих изотип цепи. В случае легких цепей возможно два изотипа: каппа и лямбда. В каждом В-лимфоците экспрессируется только один тип легкой цепи — каппа или лямбда. В случае тяжелых цепей изотип может меняться в ходе дифференцировки В-лимфоцитов. Наивные клетки экспрессируют IgM и IgD, в то время как клетки, контактировавшие с антигеном, экспрессируют IgG, IgA или IgE. Класс тяжелой цепи определяет функцию иммуноглобулина и влияет на передачу сигнала через BCR.

Ранние этапы созревания В-лимфоцитов (V(D)J-рекомбинация и формирование молекул иммуноглобулинов) происходят в костном мозге. В микроокружении костного мозга В-лимфоциты тестируются на функциональность BCR, а также на неспособность распознавать аутоантигены (механизм центральной толерантности). Наивные IgM+ IgD+ В-лимфоциты покидают костный мозг и контактируют с антигенами в периферических лимфоидных органах в нишах с особым микроокружением, именуемыми герминативными центрами. Герминативный центр состоит из В-клеток, фолликулярных Т-хелперов и фолликулярных дендритных клеток. Антигены, улавливаемые фолликулярными дендритными клетками, собираются в герминативном центре и презентуются фолликулярным Т-хелперам, которые образуют им-



мунный синапс, активирующий В-клетки [42]. В-клетки герминативного центра разнообразят V-регионы своих тяжелых и легких цепей с помощью соматической гипермутации — специализированного мутационного механизма, главным катализатором которого является белок AID. Соматической гипермутации сопутствует селекция антигенами, в результате которой происходит формирование аффинности антител. Кроме того, в герминативном центре запускается механизм сдвига изотипа, который меняет изотип тяжелой цепи иммуноглобулина с IgM/IgD на IgG, IgA или IgE. Более 95 % В-клеток герминативного центра погибают, поскольку в ходе соматической гипермутации утрачивают способность связывать антиген. От 1 до 5 % В-клеток переживают этап герминативного центра, поскольку приобретают BCR, связывающий антиген с высокой аффинностью. Эти клетки дифференцируются в плазматические клетки или клетки памяти.

В-клетки в пределах герминативного центра имеют своеобразный фенотип, определяемый набором характерных транскрипционных факторов. В этих клетках репрессированы антиапоптозные механизмы, а жизнеспособность определяется только передачей сигнала через BCR. Если она ослабевает или прекращается в результате утраты аффинности к антигену, клетка погибает.

**ПЕРЕДАЧА СИГНАЛА ЧЕРЕЗ BCR**

Молекулы CD79A (Igα) и CD79B (Igβ) образуют соединенный дисульфидными связями гетеродимер, субъединицы которого нековалентно связаны с молекулой иммуноглобулина. Функция гетеродимера состоит в 1) обеспечении экспрессии BCR на мембране, 2) пере-

даче сигнала внутрь клетки и 3) интернализации рецептора [43] (рис. 1).

До сих пор нет ясности в том, как именно инициируется передача сигнала через BCR. Существует несколько моделей [44, 45], но наиболее обоснованная из них заключается в том, что активация BCR происходит при их агрегации. Связывание с лигандом двух и более рецепторов приводит к их физическому сближению на мембране. При этом их цитоплазматические концы, связанные с ферментами, оказываются в непосредственной близости. Происходит их фосфорилирование, что дает возможность присоединяться к ним другим молекулам и в итоге приводит к активации внутриклеточного каскада. В отличие от цитокинов и ростовых факторов антигены, активирующие В-лимфоциты, обычно не би-/три-/тетравалентны, а поливалентны. Так, одна бактерия может иметь множество повторяющихся антигенных детерминант на поверхности, с которыми связывается множество BCR, что приводит к сближению и группировке в одном участке цитоплазмы В-лимфоцита большого числа BCR (олигомеризация BCR).

Молекулы CD79A и CD79B передают сигнал одинаково — посредством содержащихся в их цитоплазматических участках иммунорецепторных доменов ITAM. Каждый домен ITAM имеет два тирозиновых остатка [46]. Агрегация BCR после связывания с антигеном приводит к фосфорилированию тирозинов в составе ITAM. Это фосфорилирование осуществляется тремя тирозинкиназами семейства SRC (Src — сокращение от sarcoma): LYN, FYN и BLK [47]. В В-лимфоцитах преимущественно функционирует тирозинкиназа LYN. SRC-киназы прикреплены ко внутренней поверхности мембраны. Они широко распределены и перемещаются по внутренней

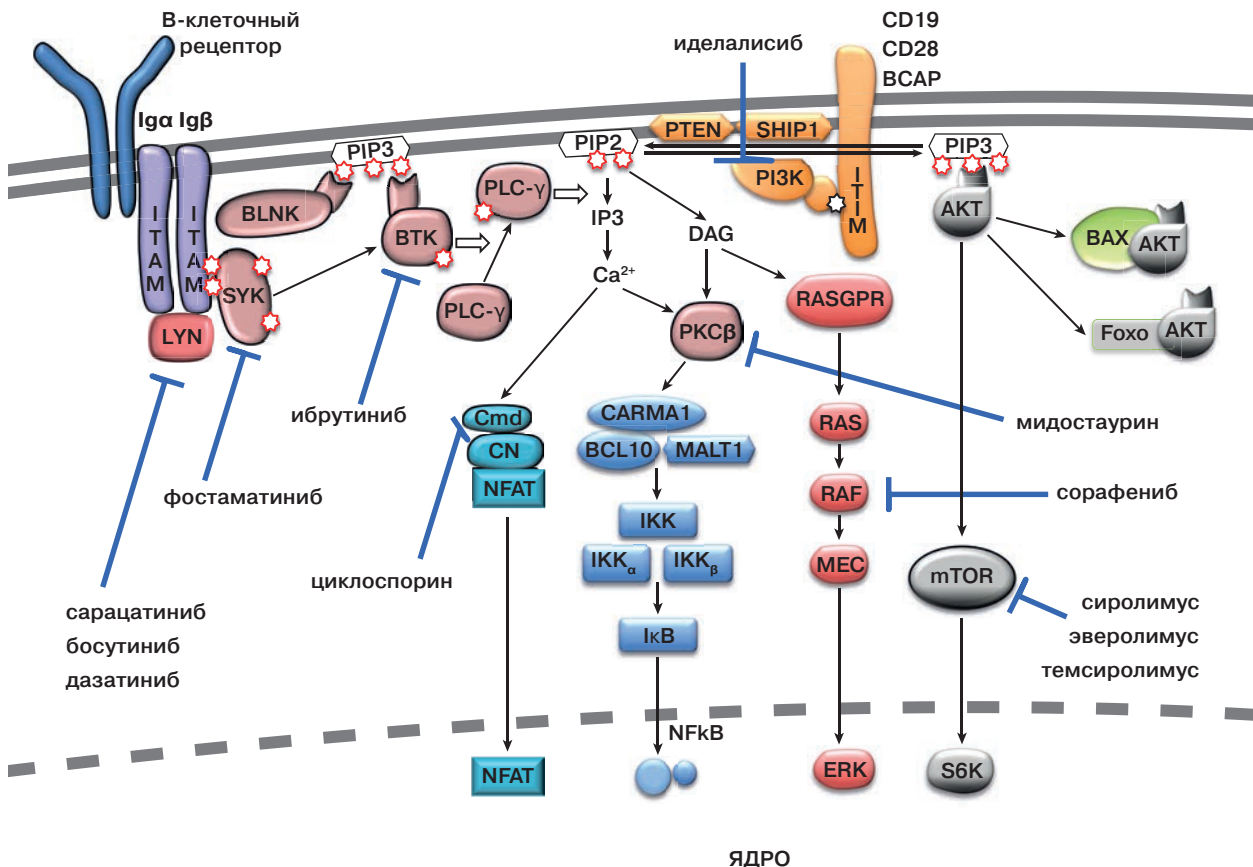


Рис. 1. Внутриклеточные пути передачи сигнала через В-клеточный рецептор

поверхности мембраны. Сближение цитоплазмических хвостов Ig $\alpha$  и Ig $\beta$  влечет за собой сближение SRC-киназ и фосфорилирование. На этом же этапе происходит и усиление сигнала: SRC-киназы могут связываться с образованными фосфотирозиновыми сайтами, что усиливает их активность.

Итогом этого этапа становится формирование в составе ITAM фосфотирозиновых сайтов, с которыми может связываться ряд других белков, и прежде всего тирозинкиназа SYK. Тирозинкиназа SYK активируется за счет содержащихся в ее составе tandemных (т. е. прилежащих друг к другу) доменов гомологии SRC 2 (SH2). Для ее активации необходимо, чтобы оба тирозина в составе ITAM были фосфорилированы. Это имеет большое значение в механизме анергии (см. разд. «Лимфоидные опухоли с постоянной активной передачей сигнала через BCR»). Будучи прикрепленной к ITAM, она фосфорилируется киназами семейства SRC, а также аутофосфорилированием [48].

SYK передает сигнал через группу белков, связанных с адаптерным белком BLNK. BLNK связан с CD79, но не по ITAM, а в другой области этих молекул. При активации он фосфорилируется и образует каркас для комплекса белков, куда входят SRC-киназы, SYK, BTK, VAV1 и фосфолипаза  $C\gamma 2$ . Этот комплекс обозначается как сигналосома. Вся группа удерживается прикрепленной к внутреннему листку цитоплазматической мембраны, поскольку в составе каждого из этих белков имеется домен плекстриновой гомологии, который связывается преимущественно с фосфоинозитол-3-фосфатом мембраны. SYK в сигналосоме фосфорилирует и активирует тирозинкиназу Брутона (BTK) [49]. Активная BTK фосфорилирует фосфолипазу  $C\gamma 2$  (PLC $\gamma 2$ ) [50, 51]. Фосфолипаза  $C\gamma 2$  катализирует гидролиз фосфатидинозитола, содержащегося во внутреннем листке цитоплазматической мембраны, до двух молекул, являющихся вторичными мессенджерами: диацилглицерола (DAG) и инозитол-трифосфата (IP $_3$ ). IP $_3$  водорастворим. Он поступает в цитоплазму и взаимодействует со своими рецепторами на эндоплазматическом ретикулуме, что приводит к высвобождению в цитоплазму ионов Ca $^{2+}$ . DAG, напротив, гидрофобен и остается у мембраны. DAG связывается с протеинкиназой  $C\beta$  (PKC $\beta$ ), которая активируется в присутствии кальция. Таким образом, оба сигнала (появление DAG и повышение концентрации внутриклеточного кальция) приводят к одному последствию — активации PKC $\beta$ . PKC $\beta$  фосфорилирует множество субстратов, включая белок CARD11. CARD11 — ключевой сигнальный адаптер, который координирует комплекс, активирующий сигнальный путь NF $\kappa$ B [52].

Кроме того, DAG активирует белок Ras GPR, и это приводит к активации MAPK-киназного пути (RAS-RAF-MEK), что обуславливает поступление в ядро транскрипционного фактора ERK [53].

Повышение внутриклеточного кальция приводит к откреплению кальциевых модулинов от кальциневрина. Кальциневрин фосфорилирует NFAT, поступающий в ядро и запускающий свою транскрипционную программу.

Таким образом, сигнальный путь от BCR обуславливает перемещение в ядро ключевых транскрипционных факторов: NF $\kappa$ B, NFAT, Erk, AP-1, которые обеспечивают пролиферацию и выживаемость нормальных и злокачественных В-клеток.

Возвращаясь к проксимальной передаче сигнала через BCR, важным компонентом ее является активация пути PI3K/AKT. SRC-киназы, главным образом тирозинкиназа LYN, фосфорилирует не только CD79A/B, но и молекулы CD19, CD28 и BCAP. Цитоплазматические участки молекул CD19, CD28 и BCAP содержат мотивы YXXM (где X — любая аминокислота). Эти мотивы и становятся мишенью для LYN. Их фосфорилирование создает сайты для связывания фосфоинозитол-3-киназы (PI3K) [54]. В свою очередь, PI3K, оказавшись около мембраны, катализирует реакцию превращения фосфатидинозитол-бифосфата (PIP2) в фосфатидинозитол-трифосфат (PIP3). Количество продуцируемого PIP3 и продолжительность этой продукции определяют активацию эффекторов PI3K. Как уже отмечалось, с PIP3 связываются белки, образующие сигналосома. Кроме того, с ним связываются эффекторные белки пути PI3K, к которым относятся PDK1, BTK и AKT. Все они соединяются с PIP3 через свой домен плекстриновой гомологии и оказываются у внутреннего листка плазматической мембраны [55]. Связанный с мембраной AKT фосфорилируется белком PDK1 и запускает множество сигнальных путей, определяющих рост, пролиферацию и жизнеспособность клеток [56]. Из них большое значение имеет путь AKT/mTOR, повышающий синтез белков и липидов и обеспечивающий клетку энергией [57]. Также важно, что AKT связывает BAX и, следовательно, делает клетку устойчивой к апоптозу. Как уже отмечалось, BTK передает сигнал по оси PLC $\gamma$ —PKC $\beta$ —CBM—NF $\kappa$ B.

Негативными регуляторами передачи сигнала через BCR являются трансмембранные рецепторные молекулы CD22, CD5, CD72 и Fc $\gamma$ RIIB. Цитоплазматические участки этих молекул содержат мотивы ITIM, которые фосфорилируются тирозинкиназой LYN во время стимуляции BCR. С фосфорилированными ITIM связываются и активируются фосфатазы SHP-1 и SHIP-1. SHP-1 дефосфорилирует множество белков, в т. ч. мотивы ITAM CD79. SHIP-1, а также активируемый другим механизмом белок PTEN служат антагонистами PI3K: они дефосфорилируют PIP3 в разных положениях (PTEN-3-фосфатаза; SHIP-1-5-фосфатаза). Дефосфорилирование различных белков и PIP3 прекращает сигнал. Выключение генов, кодирующих эти белки, приводит к разрушению механизмов толерантности и развитию аутоиммунных болезней. Негативными регуляторами бывают и некоторые липидные фосфатазы [58–62]. С. Liu и соавт. получили данные о том, что главным негативным регулятором пути BCR может быть N-WASP [63]. Оба пути (и активирующий, и ингибирующий) запускаются тирозинкиназой LYN. Поэтому передача сигнала через BCR — результат не вполне изученного баланса между активирующими и ингибирующими молекулами [64].

#### **Тоническая передача сигнала через BCR**

В отличие от активной антигензависимой формы передачи сигнала через BCR, который инициируется в герминативном центре, зрелые В-клетки используют его особым образом, известным как тоническая или базальная передача сигнала BCR. Этот процесс определяет жизнеспособность В-клеток, когда они не связаны с антигеном. Незрелые В-лимфоциты, покидающие костный мозг, завершают свое созревание в периферических лимфоидных органах, где дифференцировка в

разные субпопуляции В-клеток определяется различным микроокружением (селезенка, лимфатический узел, плевральная и перитонеальная полости). Большинство В-клеток, покидающих костный мозг, не встречает антиген и рециркулирует между кровью и фолликулами. Их жизнеспособность определяется именно тонической стимуляцией BCR. Если они контактируют с антигеном, то получают дополнительные сигналы через цитокиновые и костимуляторные рецепторы, что ведет к активации и клональной экспансии.

Доказательства существования тонической передачи сигнала через BCR были получены в экспериментах с кондициональной инактивацией IgM или CD79A в зрелых мышинных В-клетках [65]. В эксперименте, проведенном группой К. Rajewsky, можно было выключить экспрессию BCR в В-лимфоцитах трансгенных мышей в желаемое время с помощью сайт-специфической рекомбинации (рекомбинации Cre-Lox), которая активировалась интерфероном. При удалении из генома мыши любого компонента BCR В-лимфоциты не будут образовываться вообще, поскольку на каждом этапе созревания В-лимфоцитов тестируется функциональность BCR. Эксперимент позволял выключить экспрессию BCR у взрослых мышей, когда имелся уже большой пул сформированных В-клеток. Таким образом, можно было увидеть, какое значение имеет постоянная передача сигнала в зрелых В-клетках. Выключение BCR приводило к полному исчезновению периферических В-клеток у мышей в течение нескольких недель [65, 66]. Это доказывало, что подобно тому, как созревание В-лимфоцитов зависит от BCR, так и зрелые В-лимфоциты нуждаются в постоянной передаче сигнала через BCR даже в отсутствие контакта с антигеном. В 1997 г. это опровергло один из ключевых постулатов иммунологии, состоявшего в том, что В-лимфоциты постоянно отбираются на функциональность BCR, а нефункциональные клетки удаляются из иммунной системы. Тоническая передача сигнала не зависит от антигенов, поскольку она влияет на все В-лимфоциты независимо от специфичности экспрессируемых ими антител.

В следующей работе этой же группой показано, что ключевым посредником тонической передачи является PI3K. Трансгенная экспрессия конститутивно активной формы каталитической субъединицы PI3K позволяла зрелым В-лимфоцитам пережить кондициональное удаление BCR. Трансгенная экспрессия других посредников передачи сигнала — IKK $\beta$  (ингибитор NF $\kappa$ B киназы  $\beta$ ), MAPKK1, RAC1 — ничего не меняла. Прекращение экспрессии BCR приводило к исчезновению В-клеток [67]. Таким образом, ключевым посредником тонической передачи сигнала через BCR является именно PI3K.

Биофизические механизмы тонической передачи неясны. Они могут быть опосредованы белками SYK16 и TC21, которые связаны с ITAM и могут передавать сигнал в отсутствие антигена. PI3K активируется после фосфорилирования CD19, запускаемого BCR. Но следует вспомнить, что она также служит посредником сигналов, поступающих от CD40, TNF и BAFF [67–69].

Таким образом, существует два варианта передачи сигнала через BCR: активная, возникающая после контакта с антигеном, и тоническая (или базальная), которая происходит вне антигена. Лимфоидные опухоли используют те же механизмы для обеспечения пролиферации и

жизнеспособности, что и нормальные лимфоциты. В двух последующих разделах речь пойдет о том, как это происходит.

### **Постоянная активная передача сигнала через BCR**

Сигнальный путь BCR очень ярко используется клетками ДВКЛ [22, 70, 71]. По профилю экспрессии генов ДВКЛ подразделяется на два варианта: GCB (герминальный вариант, возникающий предположительно из клеток центра фолликула) и ABC (активированный вариант, возникающий из активированных В-клеток).

В ранних исследованиях было установлено, что жизнеспособность опухолевых клеток ДВКЛ ABC-типа зависит от антиапоптозного пути NF $\kappa$ B, в то время как при ДВКЛ GCB-типа она определяется другими механизмами. Причины конститутивной активации пути NF $\kappa$ B не были ясны [72]. Связь между NF $\kappa$ B и BCR была доказана в экспериментах с РНК-интерференцией [70]. Оказалось, что активность пути NF $\kappa$ B и выживаемость клеток ДВКЛ ABC-типа зависят от комплекса CBM (CARD11—BCL10—MALT1). В нормальных В-лимфоцитах именно этот комплекс выступает главным посредником между BCR и IKK, центральной регуляторной киназой пути NF $\kappa$ B [73]. Примерно в 10 % случаев ДВКЛ ABC-типа активация комплекса CBM обусловлена мутациями белка CARD11, которые вызывают образование спонтанных агрегатов комплекса и активируют путь NF $\kappa$ B [71].

Однако в большинстве случаев ДВКЛ ABC-типа CARD11 не содержит мутаций, но опухолевым клеткам необходима активация CARD11 [70]. Как показывают эксперименты по интерференции РНК, в этих случаях ключевое значение в активации NF $\kappa$ B и жизнеспособности клеток имеет BTK [22]. В нормальных В-клетках BTK активируется при стимуляции BCR; BTK передает сигнал преимущественно на путь NF $\kappa$ B [74, 75]. В экспериментах клетки ДВКЛ ABC-типа погибали при генетическом или фармакологическом выключении любых компонентов BCR (IgH, Ig $\kappa$ , CD79A или CD79B) или проксимальных эффекторов BCR (SYK, BLNK, PLC $\gamma$ 2, PI3K $\delta$  или PKC $\beta$ ) [22, 76]. Эти факты, а также активация NF $\kappa$ B и комплекса CBM говорят о том, что передача сигнала через BCR при ДВКЛ ABC-типа находится в активной форме [65].

Какой механизм запускает активацию пути BCR при ДВКЛ ABC-типа? Более чем в 20 % случаев этой опухоли обнаруживаются мутации ITAM CD79A и CD79B. Большинство мутаций изменяет первый аминоконцевой тирозин ITAM в составе CD79B на другой остаток [22]. Мутации, заменяющие другие аминокислоты в ITAM CD79B, встречаются реже. Мутации ITAM CD79A наблюдаются очень редко. При других лимфомах мутации CD79 практически не встречаются. Поэтому этот механизм уникален для ДВКЛ ABC-типа. Мутации CD79A и CD79B усиливают постоянную активацию пути BCR двумя путями. Во-первых, эти мутации препятствуют эндоцитозу BCR. В результате количество молекул BCR на поверхности клеток существенно увеличивается, образуются кластеры BCR, что приводит к постоянной стимуляции BCR.

Во-вторых, мутантная форма CD79B уменьшает активность тирозинкиназы LYN и перестает зависеть от нее. Дело в том, что LYN имеет большое значение в анергии В-клеток. Состояние анергии является нормальной



реакцией В-клеток на аутоантигены. Большинство развивающихся В-клеток экспрессирует аутореактивный BCR [77]. Контакт незрелого В-лимфоцита в костном мозге с аутоантигеном приводит к смене специфичности BCR (рецепторное обучение) или к гибели клетки. Аутореактивные В-клетки, пережившие этот механизм центральной толерантности, при столкновении с аутоантигенами в периферической крови функционально неактивны, т. е. находятся в анергии. Анергия — это состояние, когда нет ответа на антиген, которое индуцируется, если по меньшей мере 20 % BCR на поверхности клетки постоянно связаны с аутоантигенами. Дополнительная стимуляция антигенами не приводит к активации клетки. При удалении аутоантигенов В-клетка быстро выходит из состояния анергии [78]. Главные признаки анергии — низкая экспрессия IgM на поверхности В-клеток, высокая экспрессия тирозинкиназы LYN [79] и сниженная способность отвечать на дополнительную стимуляцию через BCR [79]. У человека, возможно, 30 % зрелых периферических В-клеток находятся в состоянии анергии [80]. Неспособность поддерживать анергичный фенотип приводит к развитию аутоиммунных болезней, таких как системная красная волчанка и сахарный диабет 1-го типа.

Аномально высокую экспрессию тирозинкиназы LYN вызывает постоянный контакт с аутоантигенами [61]. Высокая активность LYN ослабляет передачу сигнала через BCR за счет 1) монофосфорилирования ITAM и 2) активации фосфатаз SHP-1 и SHIP-1. Тирозинкиназа LYN обеспечивает монофосфорилирование тирозинов ITAM в молекулах CD79A и CD79B и, предположительно, будучи в избытке, связывается с ними и препятствует передаче сигнала на SYK, поскольку SYK может соединяться только с двумя фосфотирозиновыми сайтами (см. разд. «Передача сигнала через BCR»). SHIP-1 и SHP-1 — негативные регуляторы передачи сигнала через BCR.

Мутации CD79A и CD79B при ДВКЛ ABC-типа подавляют высокую активность LYN в таких анергичных клетках и перенаправляют сигнальный путь BCR на активацию BTK и NFκB, выводя клетку из состояния анергии. При наличии второго онкогенного события это дает начало опухоли. Из эпидемиологических данных известно, что один из факторов риска развития ДВКЛ — несколько аутоиммунных заболеваний. Это поддерживает гипотезу о том, что ДВКЛ ABC-типа частично использует те же самые патологические механизмы, что и аутореактивные В-клетки [81]. При ДВКЛ ABC-типа на поверхности клеток обнаруживаются кластеры BCR, что говорит об их постоянной активации [82].

В клетках ХЛЛ и ЛКМ имеет значение постоянная активная передача сигнала через BCR. Об этом свидетельствует как активация NFκB, так и активность ингибиторов BTK и SYK. Интересно, что CD79B может иметь значение и при ХЛЛ. Еще в 1999 г. А. Alfano показано, что в клетках ХЛЛ часто экспрессируется особая форма CD79B, возникающая в результате альтернативного сплайсинга, в которой отсутствует внеклеточный домен (ΔCD79B) [83]. Повторяющихся мутаций, объясняющих этот феномен, выявлено не было. Однако низкая экспрессия иммуноглобулинов, возможно, объясняется именно этим явлением. В этой ситуации ΔCD79B может выступать в качестве ложного рецептора (decoy receptor). Гиперстимуляция BCR должна приводить к апоптозу клеток ХЛЛ, но ослабление передачи сигнала позволяет этим клеткам выжить.

Как уже отмечалось, **тоническая стимуляция BCR** — качественно другой тип передачи сигнала [65–67], сопровождающийся активацией сигнального пути PI3K. Ярким примером опухоли с тонической передачей сигнала через BCR является ЛБ [84]. В основе патогенеза ЛБ лежит транслокация гена MYC в локус тяжелой цепи иммуноглобулинов. Кондициональной активации MYC в В-клетках герминативного центра мышей недостаточно для развития ЛБ — необходимы дополнительные онкогенные механизмы [85].

Как отмечалось в разд. «Особенности структуры иммуноглобулинов в клетках лимфом, свидетельствующие об активности сигнального пути BCR», клетки ЛБ постоянно экспрессируют IgM. Выключение экспрессии CD79A и SYK в клеточных линиях ЛБ приводит к их гибели. Иными словами, передача сигнала IgM имеет принципиальное значение. Дальнейшие события различаются. Выключение BTK и CARD11 нетоксично для клеток ЛБ, сигнал не идет на NFκB. В клетках ЛБ активирован путь PI3K, что выявляется по фосфорилированию AKT и p70 S6-киназы [84]. Фармакологическое подавление PI3K или воздействие на mTORC1 рапамицином подавляют рост клеточных линий ЛБ [84].

Таким образом, активная постоянная передача BCR-сигнала не имеет значения в клетках ЛБ. Здесь действует тоническая передача, и путь PI3K предоставляет необходимый сигнал, позволяющий клеткам ЛБ выжить в условиях эктопической экспрессии MYC [85, 86].

Тоническая передача сигнала в клетках ЛБ определяется мутациями генов, которые не встречаются при других видах лимфом. В 70 % случаев ЛБ выявляются мутации транскрипционного фактора TCF3 или мутации его негативного регулятора ID3 [84]. Большинство этих мутаций усиливает транскрипционную активность TCF3 (TCF3 утрачивает зависимость от ID3, или ID3 не может ингибировать TCF3). TCF3 1) усиливает экспрессию BCR и 2) подавляет экспрессию фосфатазы SHP-1, отрицательного регулятора передачи сигнала через BCR [84]. Таким образом, TCF3 усиливает передачу сигнала через BCR по двум отличающимся механизмам.

#### ИНГИБИТОРЫ СИГНАЛЬНОГО ПУТИ BCR

Фармакологическое подавление молекул сигнального пути BCR может оказаться новой вехой в терапии лимфом и ХЛЛ. Имеет значение тип передачи BCR-сигнала. При постоянной активной передаче сигнала через BCR при ДВКЛ ABC-типа участвуют киназы SYK и BTK, которые активируют пути NFκB и PI3K. При ЛБ имеет место тоническая передача сигнала, которая определяется PI3K, тогда как BTK и путь NFκB не участвуют в этом сигнальном каскаде.

Активация пути BCR при лимфомах может происходить в результате мутаций генов, продукты которых участвуют в этом пути, а может определяться контактом с антигеном или запускаться косвенно. Мутации CD79A и CD79B характерны для ДВКЛ ABC-типа и постоянной активной передачи сигнала через BCR. Клетки ХЛЛ чувствительны к ингибиторам пути BCR, но мутаций, активирующих путь BCR при ХЛЛ, не выявлено [87–89].

Основные молекулы-мишени пути BCR, ингибиторы, которые активно исследуются в настоящее время, а также их эффективность и токсичность суммированы в табл. 3.



**Таблица 3.** Молекулы-мишени пути BCR, эффективность и токсичность ингибиторов

Мишень	Ингибитор	Лимфоидная опухоль, общий ответ	Токсичность
LYN	Дазатиниб	ХЛЛ, 20 % [90]	Нейтропения IV, 40 % Тромбоцитопения IV, 14 % Инфекции III, 14 %
SYK	Фостаматиниб	ХЛЛ, 55 % ФЛ, 10 % ЛКМ, 11 % ДВКЛ, 22 % [91]	Диарея III, 54 % Нейтропения > III, 25 % Тромбоцитопения I–II, 25 % ФН > III, 8 %
ВТК	Ибрутиниб	ХЛЛ, 71 % ФЛ, 27 % ЛКМ, 75 % ДВКЛ ABC, 40 % ЛМЗ, 33 % МВ, 75 % [92–95]	Диарея, 46,5 % Нейтропения > III, 12,5 % Тромбоцитопения > III, 7 %
PI3K $\delta$	Иделалисиб	ХЛЛ, 26 % ФЛ, 62 % ЛКМ, 62 % ДВКЛ, 0 % [96, 97]	Нейтропения > III, 24 % Тромбоцитопения > III, 7 % ФН > III, 7 %
mTOR	Эверолимус	ХЛЛ, 18 % ЛКМ, 10–32 % ДВКЛ, 20 % [98–100]	Тромбоцитопения > III, 50 % Нейтропения > III, 32 % Инфекции > III, 23 %
mTOR	Темсиролимус	ХЛЛ, 11 % ФЛ, 54 % ЛКМ, 38 % ДВКЛ, 28 % [101, 102]	

МВ — макроглобулинемия Вальденстрема; ФН — фебрильная нейтропения.

### Ингибиторы ВТК

ВТК — нерцепторная цитоплазматическая тирозинкиназа семейства ТЕС. Инактивирующие мутации ВТК вызывают X-сцепленную агаммаглобулинемию [103, 104], которая характеризуется практически полным отсутствием В-клеток и иммуноглобулинов и сопровождается рецидивирующими бактериальными инфекциями. ВТК также имеет важное значение в передаче сигнала через рецептор коллагена GPIV в тромбоцитах [105]. У больных с X-сцепленной агаммаглобулинемией наблюдается снижение агрегации тромбоцитов, снижение секреции плотных гранул и мобилизация кальция в тромбоцитах.

ВТК является центральным звеном передачи сигнала через BCR и активирует множество других путей, включая NF $\kappa$ B [50, 51, 106–108]. Терапевтическое подавление ВТК оправдано при лимфоидных опухолях, которые зависят от постоянной активной передачи сигнала через BCR. Ни генетическая, ни фармакологическая инактивация ВТК не оказывают влияния на тоническую передачу сигнала, которая идет по сигнальному пути PI3K.

Поливалентным ингибитором тирозинкиназ является дазатиниб, который используется для блокирования BCR-ABL при хроническом миелолейкозе. Дазатиниб эффективно подавляет киназы семейства SRC и ВТК [109]. В исследованиях дазатиниба в клеточных линиях ДВКЛ ABC-типа продемонстрированы блокада активной передачи сигнала через BCR и апоптоз под действием дазатиниба [22]. Публикаций по исследованию дазатиниба у больных ДВКЛ нет. Во II фазе клинического исследования у больных с рецидивами ХЛЛ объективный ответ был получен в 20 % случаев [90].

Компанией Pharmacyclics был разработан более селективный и мощный ингибитор ВТК — ибрутиниб

[110]. Ибрутиниб связывается с ВТК необратимо за счет формирования ковалентной связи с цистеином 481 около активного сайта ВТК. Только 9 других киназ в геноме человека имеют сходно расположенный цистеиновый остаток, что определяет высокий уровень специфичности ибрутиниба [110]. Иными словами, он практически не действует на другие киназы, поэтому теоретически должен обладать минимальной токсичностью [111].

В клеточных системах ибрутиниб оказывал токсическое действие на клеточные линии ДВКЛ ABC-типа в наномолярных концентрациях. При ХЛЛ ибрутиниб подавлял жизнеспособность клеток в первичных культурах, независимо от присутствия стромальных клеток или цитокинов [112, 113]. В первых исследованиях ибрутиниба у больных ХЛЛ было установлено, что он снижает содержание хемокинов CCL3 и CCL4 в плазме, повышение которых предположительно есть следствие активной передачи сигнала через BCR в клетках ХЛЛ, находящихся в микроокружении лимфатических узлов [34, 113]. Клетки ХЛЛ поступают в пролиферативные центры лимфатических узлов, двигаясь по градиенту концентрации хемокинов CXCL12 и CXCL13 благодаря наличию на поверхности рецепторов CXCR4 и CXCR5 соответственно, а также в результате адгезии через интегрины [114]. Передача сигнала через оба хемокиновых рецептора осуществляется ВТК. Поэтому ингибирование ВТК ибрутинибом блокирует поступление клеток ХЛЛ в пролиферативные центры и способствует их выходу в циркуляцию. Этот механизм объясняет, почему после назначения ибрутиниба у больных ХЛЛ наблюдается временное повышение клеток ХЛЛ в крови.

В одном из первых исследований ибрутиниба было установлено, что препарат хорошо переносится и не вызывает кумулятивной токсичности при длительном приеме [92]. Из побочных эффектов отмечена нейтропения и реакции гиперчувствительности. Объективный ответ (полная и частичная ремиссия) был получен у 20 из 47 пациентов, в т. ч. с ХЛЛ (9/15), ЛКМ (3/4), ФЛ (4/15), ДВКЛ (3/8) и ЛМЗ (1/3). У больных с рецидивами макроглобулинемии Вальденстрема ибрутиниб эффективен в 75 % случаев.

Отдельное исследование было проведено у 70 больных с рецидивами и рефрактерными формами ДВКЛ. Ибрутиниб назначался в дозе 560 мг в сутки. ABC- и GCB-варианты ДВКЛ идентифицировались на основании изучения генетического профиля экспрессии [94]. В группе больных ДВКЛ ABC-типа объективный ответ был получен в 40 % случаев. Несколько пациентов достигли полной ремиссии. Напротив, в группе больных ДВКЛ GCB-типа был получен только один ответ (5 %), что согласуется с гипотезой о том, что этот вариант ДВКЛ не зависит от активной передачи сигнала через BCR [36]. Наиболее чувствительны к ибрутинибу оказались случаи ДВКЛ ABC-типа с мутациями домена ITAM CD79B (60 %). Меньшая эффективность наблюдалась при ДВКЛ ABC-типа без мутаций CD79B (37 %). При наличии мутаций CARD11 ибрутиниб не оказывал никакого влияния. Этот результат был ожидаем: опухоли с мутациями CARD11 не зависят от ВТК. Таким образом, впервые становится принципиально важным идентифицировать ABC- и GCB-типы ДВКЛ, а также мутации CD79 и CARD11, поскольку от этого может непосредственно зависеть выбор терапии.

Ибрутиниб эффективен при ХЛЛ, в т. ч. в случаях рефрактерности к флударабину. В исследовании J. Вурд показано, что ибрутиниб вызывает минимальную токсичность и позволяет добиться объективного ответа у 71 % больных ХЛЛ с рецидивами и рефрактерностью к флударабину [95]. У пациентов без мутаций IgVH было получено 77 % ремиссий, в то время как у больных с мутациями IgVH было получено только 33 % ремиссий. Несмотря на эту особенность, различий в беспрогрессивной выживаемости не было. Никакой разницы в частоте ремиссий в зависимости от традиционных прогностических факторов, в случаях с инактивацией p53 за счет делеции 17p и инактивации ATM за счет делеции 11q не выявлено [95].

Неожиданно высокая активность ибрутиниба продемонстрирована при ЛКМ. Во II фазе клинического исследования у больных с рецидивами и рефрактерными формами ЛКМ ибрутиниб назначался в дозе 560 мг в сутки. В исследование включено 111 больных. Объективный ответ получен у 68 % пациентов, полные ремиссии — у 21 % [93]. В настоящее время ибрутиниб официально зарегистрирован FDA (Управление по контролю за качеством пищевых продуктов и лекарственных средств США) при ЛКМ.

#### Ингибиторы SYK

SYK — нерецепторная тирозинкиназа, которая активируется двойным фосфорилированием ITAM после стимуляции BCR [115]. Так же как и BTK, SYK имеет принципиальное значение в антигензависимой передаче и принимает участие как в постоянной активной стимуляции BCR при ДВКЛ ABC-типа, так и в тонической передаче сигнала при ЛБ.

SYK участвует в сигнальных каскадах в клетках других гемопоэтических линий. Например, она принимает участие в передаче сигнала от рецепторов врожденной иммунной системы, а также в сигнальных путях интегрин и селектина [115]. Таким образом, ингибиторы SYK могут вызывать разнообразные побочные эффекты, поскольку влияют не только на В-клетки. Фостаматиниб (Rigel Pharmaceuticals и AstraZeneca) — первый ингибитор SYK, который в настоящее время активно изучается в клинических исследованиях у пациентов с лимфомами и аутоиммунными заболеваниями. Фостаматиниб назначается внутрь и превращается в организме в активный метаболит R406, который конкурирует с АТФ за связывание с SYK. R406 только отчасти селективен в отношении SYK. Он ингибирует киназы FLT3, KIT, LCK, JAK1, JAK3, RET и аденозиновый рецептор А3, причем с такой же эффективностью, как SYK [116, 117]. При использовании фостаматиниба возможна большая токсичность.

Воздействие R406 вызывает апоптоз клеток ХЛЛ [118] и препятствует протективному антиапоптозному действию стромальных клеток [119]. R406 токсичен для клеточных линий ДВКЛ ABC-типа, характеризующихся постоянной активной передачей сигнала через BCR [22].

Фостаматиниб успешно прошел I и II фазы клинических исследований, в которых токсичность и эффективность этого препарата изучались в контексте аутоиммунных болезней и лимфоидных опухолей. Фостаматиниб демонстрирует значительную клиническую активность у больных с рецидивами и рефрактерными формами различных вариантов лимфом [91]. К частым токсическим

эффектам относились диарея, слабость, лейкопения, нейтропения и анемия. Объективный ответ в исследовании J.W. Friedberg и соавт. составил 55 % при ХЛЛ, 24 % при ДВКЛ, 11 % при ЛКМ и 10 % при ФЛ. У пациентов с ХЛЛ происходит повышение циркулирующих лимфоцитов — феномен, который также наблюдается у больных ХЛЛ, получающих терапию другими ингибиторами пути BCR [114]. В настоящее время испытывается и ряд других ингибиторов SYK.

#### Ингибиторы PI3K, AKT и mTOR

PI3K собирает сигналы от разных рецепторов и активирует множество путей, определяющих усиление метаболизма и рост, пролиферацию, дифференцировку, жизнеспособность и миграцию клеток [55, 56]. Неудивительно, что PI3K, а также посредники и регуляторы ее эффектов, такие как PTEN, часто оказываются онкогенами при различных опухолях человека. Основная функция PI3K состоит в генерации вторичных мессенджеров, в частности PIP3 (см. разд. «Передача сигнала через BCR»)[120].

По различиям в структуре PI3K подразделяются на три класса [121]. В лимфоцитах действуют преимущественно PI3K I класса. Они, в свою очередь, подразделяются на две группы: IA и IB.

PI3K IA класса представляет собой гетеродимерный фермент, состоящий из двух субъединиц: регуляторной (p85 $\alpha$ , p85 $\beta$  или p55 $\gamma$ ) и каталитической (p110 $\alpha$ , p110 $\beta$  или p110 $\delta$ ). Любая каталитическая единица может соединяться с любой регуляторной [121]. Киназы IA активируются иммунотирозиновыми рецепторами, такими как BCR или TCR.

PI3K IB класса (PI3K $\gamma$ ) состоит из одной регуляторной единицы (p101) и одной каталитической единицы (p110 $\gamma$ ) и активируется рецепторами, связанными с G-протеином (в лимфоцитах — в основном хемокиновыми рецепторами) [121].

К настоящему времени разработано несколько ингибиторов сигнального пути PI3K, как универсальных, так и специфичных в отношении отдельных ее изоформ. Эти препараты могут иметь широкое применение в терапии онкологических заболеваний, и лимфоидные опухоли не являются исключением. Подавление PI3K токсично для опухолей как с активной, так и тонической передачей сигнала через BCR. В исследованиях *in vitro* установлена зависимость жизнеспособности первичных культур и клеточных линий ДВКЛ от PI3K. В клеточных линиях ДВКЛ ABC-типа с постоянной активной передачей сигнала PI3K активирована. Она усиливает антиапоптозное действие пути NF $\kappa$ B [122]. При тонической передаче сигнала, характерной для ЛБ, активность PI3K передает сигнал на пути AKT и mTORC1 [84, 85]. При бластоидном варианте ЛКМ, характеризующемся высокой пролиферативной фракцией, во всех случаях выявляется фосфорилирование AKT. Подавление PI3K токсично для клеточных линий ЛКМ [123]. Молекулярный механизм активации PI3K при ЛКМ не установлен, но, учитывая высокую активность ибрутиниба, вероятно, он связан с передачей сигнала через BCR.

Мощным специфическим ингибитором PI3K $\delta$  является идедалисиб (GS-1101, CAL-101; Calistoga Pharmaceuticals/Gilead Sciences). IC<sub>50</sub> этого препарата для PI3K $\delta$  всего 2,5 нМ, а в отношении других киназ

(PI3K $\beta$  и PI3K $\alpha$ ) значительно больше — 500–900 нМ [121, 122]. Иделалисиб вызывал апоптоз клеток ХЛЛ в первичных культурах в концентрации до 10 мкМ, в то время как жизнеспособность нормальных В-клеток в этой концентрации не подавлялась [124] и препарат был преимущественно токсичен в отношении образцов ХЛЛ с высоким уровнем PI3K $\delta$ . В эксперименте с кокультивированием клеток ХЛЛ и стромальных клеток показано, что GS-1101 в клетках ХЛЛ блокировал как BCR-сигнал, так и сигнал от хемокиновых рецепторов (CXCR4 и CXCR5) [125]. GS-1101 был токсичен в отношении клеточных линий ДВКЛ и первичных культур ЛКМ [126].

В исследовании иделалисиба у 54 больных с рецидивами ХЛЛ побочные эффекты III–IV степени были следующими: пневмония — 24 %, нейтропения — 24 %, тромбоцитопения — 7 %, фебрильная нейтропения — 7 %, анемия — 6 %, повышение аминотрансфераз (АЛТ и АСТ) — 6 % [96]. Ответ по критериям IWCLL 2008 был получен у 26 % больных к 11-му месяцу терапии, хотя уменьшение лимфатических узлов более чем на 50 % было зафиксировано у 80 % больных. Отсутствие частичной ремиссии констатировалось преимущественно по факту персистирующего лимфоцитоза. Иделалисиб снижал фосфорилирование АКТ в опухолевых клетках, а также концентрацию цитокинов CCL3, CCL4 и CXCL13. Снижение уровня CXCL13 в сыворотке больных ХЛЛ после первого приема иделалисиба коррелировало с увеличением количества клеток ХЛЛ в крови. Таким образом, иделалисиб прерывает хемокиновые сигналы, которые удерживают нормальные лимфоциты и клетки ХЛЛ в микроокружении лимфатических узлов. Как и в случае с ибрутинибом, мобилизация клеток ХЛЛ из ниш содействует эффективности иделалисиба [96].

У больных с лимфомами GS-1101 вызывал только частичные ремиссии. При индолентных лимфомах ответ был получен у 62 % (15/24) больных, в группе ЛКМ — у 62 % (10/16), в группе ДВКЛ — у 0 % (0/9). Выделение ABC- и GCB-вариантов ДВКЛ не проводилось. Возможно, в исследование не были включены PI3K-зависимые случаи [97].

Кроме специфических для каждой изоформы ингибиторов PI3K существует несколько универсальных ингибиторов, которые изучаются в онкологии. Так, NVP-ВКМ120 (Novartis) демонстрирует существенную активность в клеточных линиях ЛБ [84].

PI3K передает сигнал на АКТ, который также может служить фармакологической мишенью [127]. Подавление mTORC1 рапамицином и его аналогами сопровождается клинической эффективностью в 20–38 % случаев ЛКМ и 30 % рефрактерных случаев ДВКЛ [99–101].

#### ДРУГИЕ ИНГИБИТОРЫ ПРОКСИМАЛЬНЫХ ЭТАПОВ ПУТИ BCR

Активация BCR-сигнала начинается с фосфорилирования тирозинов в составе ITAM, которое осуществляется SRC-киназами. SRC-киназы имеют принципиальное значение в развитии В-лимфоцитов [47]. Функции SRC-киназ в значительной степени перекрываются, поэтому генетическими методами трудно оценить меру, в которой отдельная киназа участвует в активации BCR-сигнала. Фармакологические подходы к ингибированию SRC-киназ осложняются тем, что все имеющиеся ингибиторы вызывают эффект в отношении многих тирозинкиназ.

Дазатиниб — поливалентный ингибитор, подавляющий активность SRC-киназ в концентрации 50–200 нМ в клеточных линиях ДВКЛ ABC-типа. Однако дазатиниб подавляет и ВТК, поэтому неясно, какой механизм в его эффекте является ведущим [36]. В настоящее время в клинических исследованиях изучаются более специфичные ингибиторы SRC-киназ нового поколения: SU6656 (Sugen, Inc.), сарацатиниб (Biovision), KX-01 (Kinex Pharmaceuticals), CGP76030 (Novartis) и босутиниб (Pfizer). Эти новые ингибиторы демонстрируют эффективность при лимфомах как с постоянной активной, так и с тонической передачей сигнала через BCR.

#### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Детальное исследование патологической передачи сигнала через BCR привело к разработке целого ряда ингибиторов пути BCR, которые могут применяться для лечения лимфом. К настоящему времени эти препараты продемонстрировали высокую эффективность в лечении опухолей, рефрактерных к стандартной химиотерапии. Побочные эффекты ингибиторов пути BCR легко контролируются, хотя данных по отдаленным осложнениям еще мало. Это важно, поскольку ингибиторы пути BCR должны назначаться длительно.

Существует два варианта сигнального пути BCR: активный и тонический. Каждый из этих вариантов требует разных терапевтических подходов, и поэтому их определение имеет важное значение. К сожалению, надежного способа идентификации пока нет. Анализ мутаций генов, кодирующих белки пути BCR, также приобретает важное значение, поскольку может влиять на выбор лечения. Так, при мутациях CARD11 назначение ингибиторов проксимальной передачи BCR-сигнала бессмысленно.

Тем не менее ясно, что ингибиторы пути BCR изменяют тактику ведения лимфом. Это будет касаться всех аспектов: диагноза, показаний к терапии, выбора терапии, критериев ремиссии, поддерживающего лечения и, наконец, показаний к трансплантации костного мозга.

#### КОНФЛИКТЫ ИНТЕРЕСОВ

Автор подтверждает отсутствие скрытых конфликтов интересов.

#### ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Dameshek W., Schwartz R.S. Leukemia and auto-immunization-some possible relationships. *Blood* 1959; 14: 1151–8.
2. Goodlad J.R. et al. Primary cutaneous B-cell lymphoma and *Borrelia burgdorferi* infection in patients from the Highlands of Scotland. *Am. J. Surg. Pathol.* 2000; 24(9): 1279–85.
3. Vasudevan B., Chatterjee M. Lyme borreliosis and skin. *Indian J. Dermatol.* 2013; 58(3): 167–74.
4. Scholkopf C., Melbye M., Munksgaard L. et al. *Borrelia* infection and risk of non-Hodgkin lymphoma. *Blood* 2008; 111(12): 5524–9.
5. Garbe C., Stein H., Dienemann D., Orfanos C.E. *Borrelia burgdorferi*-associated cutaneous B cell lymphoma: clinical and immunohistologic characterization of four cases. *J. Am. Acad. Dermatol.* 1991; 24(4): 584–90.
6. Wotherspoon A.C., Doglioni C., Diss T.C. et al. Regression of primary low-grade B-cell gastric lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue type after eradication of *Helicobacter pylori*. *Lancet* 1993; 342(8871): 575–7.
7. Du M.Q., Isaccson P.G. Gastric MALT lymphoma: from aetiology to treatment. *Lancet Oncol.* 2002; 3(2): 97–104.
8. Ferreri A.J., Ponzoni M., Guidoboni M. et al. Regression of ocular adnexal lymphoma after *Chlamydia psittaci*-eradication antibiotic therapy. *J. Clin. Oncol.* 2005; 23(22): 5067–73.



9. Ferreri A.J., Govi S., Pasini E. et al. Chlamydomydia psittaci eradication with doxycycline as first-line targeted therapy for ocular adnexae lymphoma: final results of an international phase II trial. *J. Clin. Oncol.* 2012; 30(24): 2988–94.
10. Al-Saleem T., Al-Mondhry H. Immunoproliferative small intestinal disease (IPSID): a model for mature B-cell neoplasms. *Blood* 2005; 105(6): 2274–80.
11. Anttila T.I., Lehtinen T., Leinonen M. et al. Serological evidence of an association between chlamydial infections and malignant lymphomas. *Br. J. Haematol.* 1998; 103(1): 150–6.
12. Ishimatsu Y., Mukae H., Matsumoto K. et al. Two cases with pulmonary mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma successfully treated with clarithromycin. *Chest* 2010; 138(3): 730–3.
13. Fujimura M., Chin K., Sekita N. et al. Regression of mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma of the bladder after antibiotic therapy: a case report. *Hinyokika Kyo* 2008; 54(12): 783–6.
14. Van den Bosch J., Kropman R.F., Blok P., Wijermans P.W. Disappearance of a mucosa-associated lymphoid tissue (MALT) lymphoma of the urinary bladder after treatment for *Helicobacter pylori*. *Eur. J. Haematol.* 2002; 68(3): 187–8.
15. Oscier D., Bramble J., Hodges E., Wright D. Regression of mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma of the bladder after antibiotic therapy. *J. Clin. Oncol.* 2002; 20(3): 882.
16. Quinn E.R., Chan C.H., Hadlock K.G. et al. The B-cell receptor of a hepatitis C virus (HCV)-associated non-Hodgkin lymphoma binds the viral E2 envelope protein, implicating HCV in lymphomagenesis. *Blood* 2001; 98(13): 3745–9.
17. Kupperts R. Mechanisms of B-cell lymphoma pathogenesis. *Nat. Rev. Cancer* 2005; 5(4): 251–62.
18. Martin S.W., Goodnow C.C. Burst-enhancing role of the IgG membrane tail as a molecular determinant of memory. *Nat. Immunol.* 2002; 3(2): 182–8.
19. Dogan I., Bertocci B., Vilmont V. et al. Multiple layers of B cell memory with different effector functions. *Nat. Immunol.* 2009; 10(12): 1292–9.
20. Vaandrager J.-W., Schuurin Ed., Kluijn-Nelemans H.C. et al. DNA fiber fluorescence in situ hybridization analysis of immunoglobulin class switching in B-cell neoplasia: aberrant CH gene rearrangements in follicle center-cell lymphoma. *Blood* 1998; 92(8): 2871–8.
21. Alizadeh A.A., Eisen M.B., Davis R.E. et al. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature* 2000; 403(6769): 503–11.
22. Davis R.E., Ngo V.N., Lenz G. et al. Chronic active B-cell-receptor signaling in diffuse large B-cell lymphoma. *Nature* 2010; 463(7277): 88–92.
23. Lenz G., Nagel I., Siebert R. et al. Aberrant immunoglobulin class switch recombination and switch translocations in activated B cell-like diffuse large B cell lymphoma. *J. Exp. Med.* 2007; 204(3): 633–43.
24. Ruminy P., Etancelin P., Couronne L. et al. The isotype of the BCR as a surrogate for the GCB and ABC molecular subtypes in diffuse large B-cell lymphoma. *Leukemia* 2011; 25(4): 681–8.
25. Klein U., Klein G., Ehlin-Henriksson B. et al. Burkitt's lymphoma is a malignancy of mature B cells expressing somatically mutated V region genes. *Mol. Med.* 1995; 1(5): 495–505.
26. Damle R.N., Wasil T., Fais F. et al. Ig V gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1999; 94(6): 1840–7.
27. Hamblin T.J., Davis Z., Gardiner A. et al. Unmutated Ig V(H) genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1999; 94(6): 1848–54.
28. Nikitin E.A., Pivnik A.V., Sudarikov A.B. et al. A comparison of the forms of chronic lympholeukemia in relation to the mutational status of the genes of the immunoglobulin variable region. *Ter. Arkh.* 2000; 72(7): 52–6.
29. Hadzidimitriou A., Agathangelidis A., Darzentas N. et al. Is there a role for antigen selection in mantle cell lymphoma? Immunogenetic support from a series of 807 cases. *Blood* 2011; 118(11): 3088–95.
30. Agathangelidis A., Darzentas N., Hadzidimitriou A. et al. Stereotyped B-cell receptors in one-third of chronic lymphocytic leukemia: a molecular classification with implications for targeted therapies. *Blood* 2012; 119(19): 4467–75.
31. Herve M., Xu K., Ng Y.S. et al. Unmutated and mutated chronic lymphocytic leukemias derive from self-reactive B cell precursors despite expressing different antibody reactivity. *J. Clin. Invest.* 2005; 115(6): 1636–43.
32. CATERA R., Silverman G.J., Hatzi K. et al. Chronic lymphocytic leukemia cells recognize conserved epitopes associated with apoptosis and oxidation. *Mol. Med.* 2008; 14(11–12): 665–74.
33. Chu C.C., CATERA R., Zhang L. et al. Many chronic lymphocytic leukemia antibodies recognize apoptotic cells with exposed nonmuscle myosin heavy chain IIA: implications for patient outcome and cell of origin. *Blood* 2010; 115(19): 3907–15.
34. Herishanu Y., Perez-Galan P., Liu D. et al. The lymph node microenvironment promotes B-cell receptor signaling, NF-kappaB activation, and tumor proliferation in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2011; 117(2): 563–74.
35. Duhren-von Minden M., Uebelhart R., Schneider D. et al. Chronic lymphocytic leukaemia is driven by antigen-independent cell-autonomous signalling. *Nature* 2012; 489(7415): 309–12.
36. Zhu D., Ottensmeier C.H., Du M.Q. et al. Incidence of potential glycosylation sites in immunoglobulin variable regions distinguishes between subsets of Burkitt's lymphoma and mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma. *Br. J. Haematol.* 2003; 120(2): 217–22.
37. Radcliffe C.M., Arnold J.N., Suter D.M. et al. Human follicular lymphoma cells contain oligomannose glycans in the antigen-binding site of the B-cell receptor. *J. Biol. Chem.* 2007; 282(10): 7405–15.
38. Coelho V., Krysov S., Ghaemmaghami A.M. et al. Glycosylation of surface Ig creates a functional bridge between human follicular lymphoma and microenvironmental lectins. *PNAS* 2010; 107(43): 18587–92.
39. Satchell K.L., Strohmaier M.J., Singletary J. et al. Self-antigen recognition by follicular lymphoma B-cell receptors. *Blood* 2012; 120(20): 4182–90.
40. Marcucci F., Mele A. Hepatitis viruses and non-Hodgkin lymphoma: epidemiology, mechanisms of tumorigenesis, and therapeutic opportunities. *Blood* 2011; 117(6): 1792–8.
41. Gisbert J.P., Garcia-Buey L., Pajares J.M. et al. Systematic review: regression of lymphoproliferative disorders after treatment for hepatitis C infection. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 2005; 21(6): 653–62.
42. Victoria G.D., Nussenzweig M.C. Germinal centers. *Annu. Rev. Immunol.* 2012; 30: 429–57.
43. Clark M.R., Tanaka A., Powers S.E., Veselits M. Receptors, subcellular compartments and the regulation of peripheral B cell responses: the illuminating state of anergy. *Mol. Immunol.* 2011; 48(11): 1281–6.
44. Yang J., Reth M. Oligomeric organization of the B-cell antigen receptor on resting cells. *Nature* 2010; 467(7314): 465–9.
45. Pierce S.K., Liu W. The tipping points in the initiation of B cell signalling: how small changes make big differences. *Nat. Rev. Immunol.* 2010; 10(11): 767–77.
46. Reth M. Antigen receptor tail clue. *Nature* 1989; 338(6214): 383–4.
47. Saijo K., Schmedt C., Su I.H. et al. Essential role of Src-family protein tyrosine kinases in NF-kappaB activation during B cell development. *Nat. Immunol.* 2003; 4(3): 274–9.
48. Rowley R.B., Burkhardt A.L., Chao H.G. et al. Syk protein-tyrosine kinase is regulated by tyrosine-phosphorylated Ig alpha/Ig beta immunoreceptor tyrosine activation motif binding and autophosphorylation. *J. Biol. Chem.* 1995; 270(19): 11590–4.
49. Oellerich T., Bremes V., Neumann K. et al. The B-cell antigen receptor signals through a preformed transducer module of SLP65 and CIN85. *EMBO J.* 2011; 30(17): 3620–34.
50. Watanabe D., Hashimoto S., Ishiai M. et al. Four tyrosine residues in phospholipase C-gamma 2, identified as BTK-dependent phosphorylation sites, are required for B cell antigen receptor-coupled calcium signaling. *J. Biol. Chem.* 2001; 276(42): 38595–601.
51. Ozdener F., Dangelmaier C., Ashby B. et al. Activation of phospholipase Cgamma2 by tyrosine phosphorylation. *Mol. Pharmacol.* 2002; 62(3): 672–9.
52. Shinohara H., Yasuda T., Aiba Y. et al. PKC beta regulates BCR-mediated IKK activation by facilitating the interaction between TAK1 and CARMA1. *J. Exp. Med.* 2005; 202(10): 1423–31.
53. Coughlin J.J., Stang S.L., Dower N.A., Stone J.C. RasGRP1 and RasGRP3 regulate B cell proliferation by facilitating B cell receptor-Ras signaling. *J. Immunol.* 2005; 175(11): 7179–84.
54. Xu Y., Harder K.W., Huntington N.D. et al. Lyn tyrosine kinase: accentuating the positive and the negative. *Immunity* 2005; 22(1): 9–18.
55. Deane J.A., Fruman D.A. Phosphoinositide 3-kinase: diverse roles in immune cell activation. *Annu. Rev. Immunol.* 2004; 22: 563–98.
56. Yuan T.L., Cantley L.C. PI3K pathway alterations in cancer: variations on a theme. *Oncogene* 2008; 27(41): 5497–510.
57. Laplante M., Sabatini D.M. mTOR signaling in growth control and disease. *Cell* 2012; 149(2): 274–93.
58. Stone J.C. Regulation and Function of the RasGRP Family of Ras Activators in Blood Cells. *Genes Cancer* 2011; 2(3): 320–34.
59. Guo B., Su T.T., Rawlings D.J. Protein kinase C family functions in B-cell activation. *Curr. Opin. Immunol.* 2004; 16(3): 367–73.
60. Suzuki A., Kaisho T., Ohishi M. et al. Critical roles of PTEN in B cell homeostasis and immunoglobulin class switch recombination. *J. Exp. Med.* 2003; 197(5): 657–67.
61. O'Neill S.K., Getahun A., Gauld S.B. et al. Monophosphorylation of CD79a and CD79b ITAM motifs initiates a SHIP-1 phosphatase-mediated inhibitory signaling cascade required for B cell anergy. *Immunity* 2011; 35(5): 746–56.
62. Pao L.J., Lam K.P., Henderson J.M. et al. B cell-specific deletion of protein-tyrosine phosphatase Shp1 promotes B-1a cell development and causes systemic autoimmunity. *Immunity* 2007; 27(1): 35–48.
63. Liu C., Bai X., Wuet J. et al. N-wasp is essential for the negative regulation of B cell receptor signaling. *PLoS Biol.* 2013; 11(11): e1001704.
64. Ingley E. Src family kinases: regulation of their activities, levels and identification of new pathways. *Biochim. Biophys. Acta* 2008; 1784(1): 56–65.
65. Lam K.P., Kuhn R., Rajewsky K. In vivo ablation of surface immunoglobulin on mature B cells by inducible gene targeting results in rapid cell death. *Cell* 1997; 90(6): 1073–83.
66. Kraus M., Alimzhanov M.B., Rajewsky N., Rajewsky K. Survival of resting mature B lymphocytes depends on BCR signaling via the Igalphabeta heterodimer. *Cell* 2004; 117(6): 787–800.
67. Srinivasan L., Sasaki Y., Calado D.P. et al. PI3 kinase signals BCR-dependent mature B cell survival. *Cell* 2009; 139(3): 573–86.
68. Baracho G.V., Miletic A.V., Omori S.A. et al. Emergence of the PI3-kinase pathway as a central modulator of normal and aberrant B cell differentiation. *Curr. Opin. Immunol.* 2011; 23(2): 178–83.
69. Ramadani F., Bolland D.J., Garcon F. et al. The PI3K isoforms p110alpha and p110delta are essential for pre-B cell receptor signaling and B cell development. *Sci. Signal.* 2010; 3(134): ra60.



70. Ngo V.N., Davis R.E., Lamy L. et al. A loss-of-function RNA interference screen for molecular targets in cancer. *Nature* 2006; 441(7089): 106–10.
71. Lenz G. et al. Oncogenic CARD11 mutations in human diffuse large B cell lymphoma. *Science* 2008; 319(5870): 1676–9.
72. Davis R.E., Davis E., Ngo V.N. et al. Constitutive nuclear factor kappaB activity is required for survival of activated B cell-like diffuse large B cell lymphoma cells. *J. Exp. Med.* 2001; 194(12): 1861–74.
73. Rawlings D.J., Sommer K., Moreno-Garcia M.E. The CARMA1 signalosome links the signalling machinery of adaptive and innate immunity in lymphocytes. *Nat. Rev. Immunol.* 2006; 6(11): 799–812.
74. Bajpai U.D., Zhang K., Teutsch M. et al. Bruton's tyrosine kinase links the B cell receptor to nuclear factor kappaB activation. *J. Exp. Med.* 2000; 191(10): 1735–44.
75. Petro J.B., Rahman S.M.J., Ballard D.W. et al. Bruton's tyrosine kinase is required for activation of I kappaB kinase and nuclear factor kappaB in response to B cell receptor engagement. *J. Exp. Med.* 2000; 191(10): 1745–54.
76. Naylor T.L., Tang H., Ratsch B.A. et al. Protein kinase C inhibitor sotrastaurin selectively inhibits the growth of CD79 mutant diffuse large B-cell lymphomas. *Cancer Res.* 2011; 71(7): 2643–53.
77. Wardemann H., Yurasov S., Schaefer A. et al. Predominant autoantibody production by early human B cell precursors. *Science* 2003; 301(5638): 1374–7.
78. Gauld S.B., Benschop R.J., Merrell K.T., Cambier J.C. Maintenance of B cell energy requires constant antigen receptor occupancy and signaling. *Nat. Immunol.* 2005; 6(11): 1160–7.
79. Yarkoni Y., Getahun A., Cambier J.C. Molecular underpinning of B-cell energy. *Immunol. Rev.* 2010; 237(1): 249–63.
80. Quach T.D., Manjarrez-Orduno N., Adlowitz D.G. et al. Anergic responses characterize a large fraction of human autoreactive naive B cells expressing low levels of surface IgM. *J. Immunol.* 2011; 186(8): 4640–8.
81. Smedby K.E., Hjalgrim H., Askling J. et al. Autoimmune and chronic inflammatory disorders and risk of non-Hodgkin lymphoma by subtype. *J. Natl. Cancer Inst.* 2006; 98(1): 51–60.
82. Rui L., Schmitz R., Ceribelli M., Staudt L.M. Malignant pirates of the immune system. *Nat. Immunol.* 2011; 12(10): 933–40.
83. Alfaro A., Indraccolo S., Circosta P. et al. An alternatively spliced form of CD79b gene may account for altered B-cell receptor expression in B-chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1999; 93(7): 2327–35.
84. Schmitz R., Young R.M., Ceribelli M. et al. Burkitt lymphoma pathogenesis and therapeutic targets from structural and functional genomics. *Nature* 2012; 490(7418): 116–20.
85. Sander S., Calado D.P., Srinivasan L. et al. Synergy between PI3K signaling and MYC in Burkitt lymphomagenesis. *Cancer Cell* 2012; 22(2): 167–79.
86. Evan G.I., Wyllie A.H., Gilbert C.S. et al. Induction of apoptosis in fibroblasts by c-myc protein. *Cell* 1992; 69(1): 119–28.
87. Quesada V., Conde L., Villamor N. et al. Exome sequencing identifies recurrent mutations of the splicing factor SF3B1 gene in chronic lymphocytic leukemia. *Nat. Genet.* 2012; 44(1): 47–52.
88. Wang L., Lawrence M.S., Wan Y. et al. SF3B1 and other novel cancer genes in chronic lymphocytic leukemia. *N. Engl. J. Med.* 2011; 365(26): 2497–506.
89. Puente X.S. et al. Whole-genome sequencing identifies recurrent mutations in chronic lymphocytic leukaemia. *Nature* 2011; 475(7354): 101–5.
90. Amrein P.C., Attar E.C., Takvorian T. et al. Phase II study of dasatinib in relapsed or refractory chronic lymphocytic leukemia. *Clin. Cancer Res.* 2011; 17(9): 2977–86.
91. Friedberg J.W., Sharman J., Sweetenham J. et al. Inhibition of Syk with fostamatinib disodium has significant clinical activity in non-Hodgkin lymphoma and chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2010; 115(13): 2578–85.
92. Advani R.H., Buggy J.J., Sharman J.P. et al. Bruton tyrosine kinase inhibitor ibrutinib (PCI-32765) has significant activity in patients with relapsed/refractory B-cell malignancies. *J. Clin. Oncol.* 2013; 31(1): 88–94.
93. Wang M.L., Rule S., Martin P. et al. Targeting BTK with ibrutinib in relapsed or refractory mantle-cell lymphoma. *N. Engl. J. Med.* 2013; 369(6): 507–16.
94. Wyndham W., Gerecitano J.F., Goy A. et al. The Bruton's tyrosine kinase (BTK) inhibitor, ibrutinib (PCI-32765), has preferential activity in the ABC subtype of relapsed/refractory de novo diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL): interim results of a multicenter, open-label, phase 2 study. *Blood (ASH Annual Meeting Abstracts)* 2012; 120: 686.
95. Byrd J.C., Furman R.R., Coutre S.E. et al. Targeting BTK with ibrutinib in relapsed chronic lymphocytic leukemia. *N. Engl. J. Med.* 2013; 369(1): 32–42.
96. Coutre S., Byrd J.C., Furman R.R. et al. Phase I study of CAL-101, an isoform-selective inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase P110d, in patients with previously treated chronic lymphocytic leukemia. *J. Clin. Oncol. (ASCO Annual Meeting Abstracts)* 2011; 29: 6631.
97. Kahl B., Byrd J.C., Flinn I.W. et al. Clinical safety and activity in a phase 1 study of CAL-101, an isoform-selective inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase P110(delta), in patients with relapsed or refractory non-Hodgkin lymphoma. *Blood (ASH Annual Meeting Abstracts)* 2010; 116(21): 1777.
98. Zent C.S., LaPlant B.R., Johnston P.B. et al. The treatment of recurrent/refractory chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma (CLL) with everolimus results in clinical responses and mobilization of CLL cells into the circulation. *Cancer* 2010; 116(9): 2201–7.
99. Renner C., Zinzani P.L., Gressin R. et al. A multicenter phase II trial (SAKK 36/06) of single-agent everolimus (RAD001) in patients with relapsed or refractory mantle cell lymphoma. *Haematologica* 2012; 97(7): 1085–91.
100. Witzig T.E., Reeder C.B., LaPlant B.R. et al. A phase II trial of the oral mTOR inhibitor everolimus in relapsed aggressive lymphoma. *Leukemia* 2011; 25(2): 341–7.
101. Witzig T.E., Geyer S.M., Ghobrial I. et al. Phase II trial of single-agent temsirolimus (CCI-779) for relapsed mantle cell lymphoma. *J. Clin. Oncol.* 2005; 23(23): 5347–56.
102. Smith S.M., van Besien K., Karrison T. et al. Temsirolimus has activity in non-mantle cell non-Hodgkin's lymphoma subtypes: The University of Chicago phase II consortium. *J. Clin. Oncol.* 2010; 28(31): 4740–6.
103. Bruton O.C. Agammaglobulinemia. *Pediatrics* 1952; 9(6): 722–8.
104. Rawlings D.J., Safran D.C., Tsukada S. et al. Mutation of unique region of Bruton's tyrosine kinase in immunodeficient XID mice. *Science* 1993; 261(5119): 358–61.
105. Quek L.S., Bolen J., Watson S.P. A role for Bruton's tyrosine kinase (Btk) in platelet activation by collagen. *Curr. Biol.* 1998; 8(20): 1137–40.
106. Kurosaki T., Hikida M. Tyrosine kinases and their substrates in B lymphocytes. *Immunol. Rev.* 2009; 228(1): 132–48.
107. Rawlings D.J., Lin S., Scharenberg A.M. et al. Activation of BTK by a phosphorylation mechanism initiated by SRC family kinases. *Science* 1996; 271(5250): 822–5.
108. Mohamed A.J., Yu L., Backesjo C.M. et al. Bruton's tyrosine kinase (Btk): function, regulation, and transformation with special emphasis on the PH domain. *Immunol. Rev.* 2009; 228(1): 58–73.
109. Hantschel O., Rix U., Schmid U. et al. The Btk tyrosine kinase is a major target of the Bcr-Abl inhibitor dasatinib. *PNAS* 2007; 104(33): 13283–8.
110. Pan Z., Scheerens H., Li S.J. et al. Discovery of selective irreversible inhibitors for Bruton's tyrosine kinase. *Chem. Med. Chem.* 2007; 2(1): 58–61.
111. Honigberg L.A., Smith A.M., Sirisawadet M. et al. The Bruton tyrosine kinase inhibitor PCI-32765 blocks B-cell activation and is efficacious in models of autoimmune disease and B-cell malignancy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 2010; 107(29): 13075–80.
112. Herman S.E., Gordon A.L., Hertlein E. et al. Bruton tyrosine kinase represents a promising therapeutic target for treatment of chronic lymphocytic leukemia and is effectively targeted by PCI-32765. *Blood* 2011; 117(23): 6287–96.
113. Ponader S., Chen Sh.-Sh., Buggy J.J. et al. The Bruton tyrosine kinase inhibitor PCI-32765 thwarts chronic lymphocytic leukemia cell survival and tissue homing in vitro and in vivo. *Blood* 2012; 119(5): 1182–9.
114. de Rooij M.F., Kuil A., Geest C.R. et al. The clinically active BTK inhibitor PCI-32765 targets B-cell receptor- and chemokine-controlled adhesion and migration in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2012; 119(11): 2590–4.
115. Mocsai A., Ruland J., Tybulewicz V.L. The SYK tyrosine kinase: a crucial player in diverse biological functions. *Nat. Rev. Immunol.* 2010; 10(6): 387–402.
116. Clemens G.R., Schroeder R.E., Magness S.H. et al. Developmental toxicity associated with receptor tyrosine kinase Ret inhibition in reproductive toxicity testing. *Birth Defects Res. Clin. Mol. Teratol.* 2009; 85(2): 130–6.
117. Braselmann S., Taylor V., Zhao H. et al. R406, an orally available spleen tyrosine kinase inhibitor blocks Fc receptor signaling and reduces immune complex-mediated inflammation. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2006; 319(3): 998–1008.
118. Gobessi S., Laurenti L., Longo P.G. et al. Inhibition of constitutive and BCR-induced Syk activation downregulates Mcl-1 and induces apoptosis in chronic lymphocytic leukemia B cells. *Leukemia* 2009; 23(4): 686–97.
119. Quiroga M.P., Balakrishnan K., Kurtova A.V. et al. B-cell antigen receptor signaling enhances chronic lymphocytic leukemia cell migration and survival: specific targeting with a novel spleen tyrosine kinase inhibitor, R406. *Blood* 2009; 114(5): 1029–37.
120. So L., Fruman D.A. PI3K signalling in B- and T-lymphocytes: new developments and therapeutic advances. *Biochem. J.* 2012; 442(3): 465–81.
121. Okkenhaug K., Vanhaesebroeck B. PI3K in lymphocyte development, differentiation and activation. *Nat. Rev. Immunol.* 2003; 3(4): 317–30.
122. Kloo B., Nagel D., Pfeifer M. et al. Critical role of PI3K signaling for NF-kappaB-dependent survival in a subset of activated B-cell-like diffuse large B-cell lymphoma cells. *PNAS* 2011; 108(1): 272–7.
123. Rudelius M., Pittaluga S., Nishizuka S. et al. Constitutive activation of Akt contributes to the pathogenesis and survival of mantle cell lymphoma. *Blood* 2006; 108(5): 1668–76.
124. Herman S.E., Gordon A.L., Wagner A.J. et al. Phosphatidylinositol 3-kinase-delta inhibitor CAL-101 shows promising preclinical activity in chronic lymphocytic leukemia by antagonizing intrinsic and extrinsic cellular survival signals. *Blood* 2010; 116(12): 2078–88.
125. Hoellenriegel J., Meadows S.A., Sivina M. et al. The phosphoinositide 3'-kinase delta inhibitor, CAL-101, inhibits B-cell receptor signaling and chemokine networks in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2011; 118(13): 3603–12.
126. Lannutti B.J., Meadows S.A., Herman S.E.M. et al. CAL-101, a p110delta selective phosphatidylinositol-3-kinase inhibitor for the treatment of B-cell malignancies, inhibits PI3K signaling and cellular viability. *Blood* 2011; 117(2): 591–4.
127. Mattmann M.E., Stoops S.L., Lindsley C.W. Inhibition of Akt with small molecules and biologics: historical perspective and current status of the patent landscape. *Expert Opin. Ther. Pat.* 2011; 21(9): 1309–38.