

Przedstawiono działanie 3 onkoprotein, na których opiera się zaburzenie prawidłowego wzrostu komórek prowadzące do transformacji nowotworowej i progresji fenotypu złośliwego w przypadku nowotworów pochodzenia nabłonkowego z nadekspresją receptora HER2 (p185). Pokazano na tym tle korzystne terapeutycznie, bardziej wielokierunkowe działanie Herceptyny.

Na podstawie przeglądu literatury światowej, dotyczącej tego zagadnienia, a obejmującej ostatnie 5 lat badań podstawowych i klinicznych, pokazano, że rozwój i progresja fenotypu złośliwego nowotworów nabłonkowych z nadekspresją receptora p185 opiera się na 3-punktowej osi wyznaczonej przez działanie 3 wzajemnie regulujących się onkoprotein: heterodimeru receptorów HER2 i HER3, autokrynych heregulin i cyklooksygenazy 2 (COX 2). Centralnym ogniwem tej osi jest heterodimer receptorów HER2/HER3. Zablokowanie tego ogniwia Herceptyną neutralizuje mitogenną aktywność pozostałych 2 onkoprotein, gdyż przekazują one swoje pobudzenia albo, jak autokryne hereguliny, przez ten właśnie heterodimer, lub, jak w przypadku cyklooksygenazy 2, heterodimer ten indukuje onkogeną, konstytucjonalną aktywację genu COX2 ze wszystkimi kancerogennymi skutkami działania tego enzymu.

Słowa kluczowe: onkoproteiny (HER2/HER3, autokryne heregulin, COX2), Herceptyna.

Heterodimer receptorów HER2/HER3, autokryne hereguliny i cyklooksygenaza 2 a działanie Herceptyny

Heterodimer of HER2/HER3 receptors, autocrine heregulins and cyclo-oxygenase 2, and Herceptin effects

Ewa Szacikowska, Wojciech Kozłowski

Zakład Patomorfologii Klinicznej Centralnego Szpitala Klinicznego
Wojskowej Akademii Medycznej w Warszawie

WSTĘP

Badania podstawowe i kliniczne ostatnich kilku lat przyniosły ogromny postęp wiedzy w poznaniu i zrozumieniu wielu procesów zachodzących z udziałem zamplifikowanego genu *HER2* w nowotworach pochodzenia nabłonkowego u ludzi. Wyniki tych badań doprowadziły do przesunięcia środka ciężkości w rozumieniu tych nowotworów z produktu tego genu, czyli receptora *HER2* (białka p185), na heterodimer receptorów *HER2/HER3*, co z jednej strony zachowało ogromne faktyczne znaczenie receptora *HER2*, z drugiej zaś ujawniło bardzo ważną rolę receptora *HER3*, o którym jeszcze kilka lat temu wiadano bardzo niewiele. Również wyniki ostatnich lat wykazały podstawowe znaczenie autokrynej ekspresji heregulin (HRGs) dla kancerogenezy i progresji fenotypu złośliwego nowotworów pochodzenia nabłonkowego z amplifikacją genu *HER2*, co bezpośrednio wiąże się z działaniem heterodimeru receptorów *HER2/HER3*. Także wynikiem badań ostatnich lat jest zidentyfikowanie nowego onkogenu, którego produkt – enzym cyklooksygenaza 2 – odgrywa ogromną rolę w kancerogenezie nowotworów nabłonkowych.

Późną wiosną 1999 r. ukazało się w *Oncogene* praca amerykańskich badaczy, której pierwszym autorem był Vadlamudi [1]. W pracy tej po raz pierwszy wykazano współdziałanie i wzajemne regulowanie się wymienionych wyżej 3 onkoprotein, czyli heterodimeru receptorów *HER2/HER3*, autokrynie produkowanych heregulin i cyklooksygenazy 2, pozwalające sformułować 3-punktową oś, na której opiera się zaburzenie wzrostu komórek nowotworowych pochodzenia nabłonkowego u ludzi. Celem artykułu jest prezentacja tych 3 onkoprotein i omówienie na ich tle działania Herceptyny.

SPECYFIKA RECEPTORA HER2

Wszystkie 4 receptory rodziny *HER* wykazują podobną budowę, jednak różnią się znacznie specyficznością ligandów i funkcją

fosfokinazy, stanowiącej cytoplazmatyczną domenę tych receptorów. Receptor *HER1* (EGFR) może wiązać się z kilkoma różnymi ligandami, których prototypem jest naskórkowy czynnik wzrostu EGF, podczas gdy receptory *HER3* i *HER4* wiążą swoiście wszystkie z ponad 15 izoform pokrewnego czynnika wzrostu, które nazwano heregulinami – HRGs [2, 3, 4].

Wieloletnie poszukiwania ligandu receptora *HER2* zostały zakończone, nie dlatego, że znaleziono peptydowy czynnik wzrostu, który może wiązać się z tym receptorem aktywując go, ale dlatego, że okazało się, iż receptor ten ulega aktywacji na zupełnie innej zasadzie niż pozostałe receptory rodziny *HER* oraz w ogóle inne receptory wymagające kontaktu ze swoistymi dla nich ligandami. Sposób aktywacji tego receptora jest szczególny i dlatego towarzyszą temu szczególne skutki [4, 5].

Receptor *HER2* (białka p185) nie przyłącza bezpośrednio żadnego ligandu, lecz inaczej niż receptor *HER1*, którego aktywność kinazy tyrozynowej wykazuje ścisłą zależność od ligandu oraz receptor *HER3*, który charakteryzuje się bardzo niską aktywnością kinazy tyrozynowej, katalityczne działanie receptora *HER2* jest bardzo wysokie [4-8].

Receptor *HER2*, pomimo braku wybiórczego ligandu własnego, może ulegać bardzo silnej aktywacji przez ligandy heterologiczne. Wykazano, że ligandy typu EGF mogą znacznie zwiększać fosforylację reszt tyrozynowych receptora *HER2* (białka p185), a tym samym zwiększać aktywność kinazy tyrozynowej tego receptora, przez utworzenie heterodimerów receptora *HER1* (EGFR) z receptorem *HER2* [3-8]. Już w 1989 r. Kokai wykazał, że równoczesna nadekspresja tych 2 białek, sy-

Three oncoproteins are presented in this work. They are responsible for disturbance of normal cellular growth, leading to neoplastic transformation and progression of malignant phenotype in the case of epithelial neoplasms with HER2 (p185) receptor overexpression. In this context, therapeutically favourable, more multidirectional Herceptin effect is presented.

On the basis of review of world literature on this problem, covering recent five years of basic and clinical studies it was demonstrated that the development and progression of malignant phenotype of epithelial tumours with p185 receptor overexpression is founded on three-point axis established by the effects of three oncoproteins, mutually regulating themselves: HER2 and HER3 receptor heterodimer, autocrine heregulins and cyclo-oxygenase2 (cox2). The central link of this axis is heterodimer of HER2 and HER3 receptors. The blockade of this link with Herceptin neutralizes the mitogenic activity of the remaining two oncoproteins since they transmit their stimulations either as autocrine heregulins via this special heterodimer, or as in the case of cyclo-oxygenase2, the heterodimer induces oncogenic, constitutional activation of COX2 gene with all cancerogenic results of this enzyme's action.

Key words: oncoproteins (HER2/HER3, autocrine HRG and COX2), Herceptin.

nergistycznie nasila nowotworową transformację fibroblastów i wzmagą ich mitogenną odpowiedź w wyniku podania EGF [9]. Podobnie hereguliny (HRGs) zwiększają fosforylację tyrozyn receptora *HER2* przez wiązanie się do swych własnych receptorów *HER3* i *HER4*, które następnie wiążą się z receptorem *HER2* [4–8], co jak wykazał Sliwkowski w 1994 r. wynika ze zwiększenia powinowactwa do wiązania HRGs przez te receptory w obecności receptora *HER2* [10]. Tak więc receptor *HER2* może tworzyć heterodimery zarówno z receptorem *HER1* (EGFR), jak i receptorami dla HRGs (*HER3* i *HER4*), co świadczy o tym, że rzeczywiście podlega on aktywacji przez ligandy heterologiczne [5]. Wykazano, że nadekspresja receptora *HER2* zwiększa powinowactwo wiązania obydwu typów ligandów (EGF i HRGs) do właściwych dla nich receptorów, poprzez zmniejszanie ich dysocjacji, co znacząco przedłuża wysyłanie sygnałów mitogennych, wychodzących od odpowiednich heterodimerów [5]. Wykazano też, że usunięcie receptorów *HER2* z powierzchni komórki prawie całkowicie znosi wiązanie obydwu typów czynników wzrostu (EGF i HRGs) w związku z bardzo szybkim ich oddysocjowaniem od właściwych receptorów, co bezpośrednio wynika z niemożliwości utworzenia heterodimerów z receptorem *HER2*, kiedy to dysocjacja jest znacznie opóźniona, a heterodimeryzacja prowadzi do efektu stymulowania szlaków transdukcji sygnału mitogennego [5]. Efektem takiej przedłużonej stymulacji jest pobudzenie 2 głównych szlaków cytoplazmatycznych przekazywania sygnału przez obydwie typy ligandów, mianowicie szlaku MAPK (*mitogen activated protein kinase*) i kinaz Jun/SAPK (*stress activated protein kinase*) [11]. Tak więc fizjologicznymi receptorami dla HRGs i EGF są w rzeczywistości heterodimery zawierające receptor *HER2* [5].

Jak wykazał Karunakaran, wiązanie HRG i EGF do komórek raka piersi zależy od obecności receptora *HER2* na powierzchni tych komórek i znacznie wzrasta w miarę wzrostu nadekspresji tego receptora [5]. Z rozważań tych wynika, że receptor *HER2* jest podjednostką *HER*, która występując w heterodimerze, nasila sygnalizowanie idące od czynnika wzrostu, z którym związany jest współdimeryzujący z nim partner. Receptory *HER* w prawidłowym nabłonku ulegają bardzo niskiej i zróżnicowanej ekspresji, zaś ich nadprodukcja pojawia się w wielu różnych gruczolakorakach [2].

HETERODIMER RECEPTORÓW HER2/HER3 – JEDNA Z NAJAGRESYWNIEJSZYCH ONKOPROTEIN

Regulowanie aktywności receptorów rodziny *HER* jest bardzo złożone. Mogą one być aktywowane na wiele różnych sposobów zależnych od określonego ligandu (czynnika wzrostu, czyli mitogenu) oraz właściwości receptora, z którym dimeryzują [3, 7, 8]. O właściwościach receptora decydują cechy jego

katalicznej domeny, czyli cechy kinazy tyrozynowej. Siła sygnału mitogennego, wychodzącego od określonego heterodimeru zależy ponadto w dużym stopniu od tego, przez które białka przekąźnikowe z domeną SH2 (domena homologii z białkami Src) zostaną swoicie rozpoznane podwójne zestawy tyrozynowych miejsc autofosforylacji tych receptorów [3, 11]. Tak więc cytoplazmatyczne białka przekąźnikowe z domeną SH2 tworzą szlaki przewodzenia sygnału, różne dla różnych heterodimerów i zależne od kinaz tyrozynowych, które w nich występują. Szlaki te w znacznym stopniu różnią się siłą przekazywanego sygnału. Receptor *HER3* wyróżnia się wśród receptorów rodziny *HER* tym, że ma znacznie osłabioną aktywność kinazy tyrozynowej, co bierze się stąd, że 3 aminokwasy tego białka zastąpione są innymi niż w pozostałych, bardziej konserwatywnych strukturalnie receptorach i budowa tego enzymu jest nietypowa [12]. W związku z tym np. homodimery tego receptora nie wysyłają w ogóle żadnego sygnału do jądra komórkowego, bo nie uruchamiają żadnego szlaku sygnalizacyjnego. Pomimo tego faktu wykazano, że w pewnych warunkach receptor *HER3* może ulegać bardzo wysokiej aktywacji i wzbudzać intensywne sygnały mitogenne przez swoisty dla niego szlak białek z domeną SH2, przeznaczony dla prowadzenia przekazu o wyjątkowo wysokiej zdolności pobudzania proliferacji komórki [3, 7, 8]. Aby tak się stało muszą jednak wystąpić określone okoliczności. Na te zagadnienia bardzo wyraźne światło rzuciły badania Zhanga i wsp. z 1996 r. prowadzone na komórkach NIH 3T3, z których łatwo izoluje się subklon 7d, w którym nie występuje ekspresja żadnego z receptorów *HER* [13]. Transfekowanie komórek tego podklonu pojedynczymi receptorami *HER*, jak i po 2 w różnych kotransfekcjach pozwoliło uzyskać istotne dane na temat działania receptora *HER3* oraz heterodimerów z jego udziałem. Wyniki tej pracy pokazały, że komórki podklonu 7d, jeżeli wykazują wyłącznie ekspresję receptora *HER3* charakteryzują przyspieszenie wzrostu, jednak nie dochodzi w nich do transformacji morfologicznej.

Zdecydowanie odmienne wyniki uzyskano w tej pracy, analizując skutki transfekcji receptora *HER1* lub *HER2* do komórek subklonu 7d. Każdy z tych receptorów transfekowany jako pojedynczy, wywołuje zarówno przyspieszenie wzrostu badanych komórek, jak i transformację nowotworową. Najważniejszym jednak faktem uzyskanym w tej pracy było wykazanie, że istnieje synergistyczny efekt kombinacji ekspresji receptorów *HER2* i *HER3* najprawdopodobniej w związku z utworzeniem przez nie heterodimeru. Efekt ten, choć uzależniony od dostępności HRG, był jednak spełniony, gdyż komórki NIH 3T3 odznaczają się autokrynną ekspresją. W innych wcześniejszych pracach również wykazano, że nadekspresja receptorów *HER1* lub *HER2* z którymiś z receptorów HRG, czyli receptorów *HER3* lub *HER4* ma znacznie większy potencjał transformujący prawidłowe fibroblasty do

komórek nowotworowych aniżeli ulegający zwiększonej ekspresji pojedynczy receptor, tworzący w tej sytuacji głównie homodimery, których aktywność biologiczna jest stosunkowo niska w porównaniu z aktywnością heterodimerów.

Nowsze prace wykazują, że cząsteczki należące do ligandów z grupy HRG (wszystkie izoformy tej grupy ligandów) niosą ze sobą zwiększoną zdolność do tworzenia heterodimerów *HER2* z *HER3*, co wynika z ich biwalentności [3, 11]. Wszystko wskazuje na to, że jednym z najbardziej skutecznych sposobów pobudzania proliferacji komórkowej przez receptory *HER* jest możliwość konstytucjonalnej transaktywacji fosfokinazy tyrozynowej receptora *HER2* (białka p185) poprzez transaktywację tego receptora w wyniku utworzenia przez niego heterodimeru z innym receptorem z rodziny *HER*, który obsadzony jest silnie stymulującym ligandem i że efekt ten wzrasta wraz ze wzrostem ekspresji receptora *HER2* [3, 5, 7, 8]. Z taką właśnie sytuacją, jak wynika z najnowszych badań, mamy do czynienia w przypadku amplifikacji i/lub nadekspresji genu *HER2* w nowotworach pochodzenia nabłonkowego. Ligandy HRG mogą konstytucjonalnie aktywować receptor *HER2*, jeżeli obsadzone tym czynnikiem wzrostu receptory *HER3* lub *HER4* utworzą odpowiednio heterodimery *HER2/HER3* i *HER2/HER4* [3, 5, 7, 8]. W heterodimerach tych pobudzony receptor *HER2* zapewne gwałtownie wzmacnia aktywność kinazy tyrozynowej dimeryzujących z nim partnerów, bowiem wcześniej wykazano, że transaktywacja kinazy tyrozynowej receptorów *HER3* i *HER4* wymaga obecności receptorów *HER1* lub *HER2* [3, 13, 14]. Utworzone w ten sposób heterodimery *HER2/HER3* lub *HER2/HER4*, ale również *HER1/HER3* i *HER1/HER4*, przy równoczesnej nadekspresji receptora *HER2* w komórce, wykazują bardzo silne właściwości do nadawania ciągłych, niezależnych od sygnałów zewnętrznych, wewnątrzkomórkowych sygnałów mitogennych i są intensywnie działającymi onkoproteinami w zaburzaniu wzrostu komórek nowotworowych [3, 5, 7, 8] i pobudzania w nich zdolności do przerzutowania [15, 16]. W procesach tych szczególną rolę odgrywa heterodimer *HER2/HER3*, ponieważ jest on najsilniejszym mitogenem wśród heterodimerów rodziny receptorów *HER* [3, 5, 7, 8, 11, 14], na co składają się 3 omówione wyżej cechy tego heterodimeru, a więc:

- ▶ wyjątkowo silne transpobudzenie katalitycznych właściwości kinazy tyrozynowej receptora *HER2* przez czynniki wzrostu typu HRGs,
- ▶ szczególne nasilenie katalitycznych właściwości kinazy tyrozynowej receptora *HER3* przez fosfokinazę tyrozynową receptora *HER2*,
- ▶ uruchomienie przez receptor *HER3* szlaku przekazywania wewnątrzkomórkowego o szczególnie intensywnym sygnale mitogennym, prowadzonym przez swoiste dla tego receptora białka endoplazmatyczne z domeną SH2 [3, 5, 7, 8, 11].

Znaczenie receptorów *HER2* i *HER3* jest stosunkowo dobrze wykazane w raku piersi, m.in. w związku z tym, że obydwa geny kodujące te receptory są estrogenozależne [17]. Z drugiej zaś strony, ponieważ w prawidłowym nabłonku gruczołu piersiowego oraz w ok. 90 proc. raka piersi u ludzi dochodzi do ekspresji genu *HER3* [18], a nadekspresja genu *HER2* pojawia się w ok. 40 proc. pierwotnych raków piersi, wszystko wskazuje na to, że w przypadkach tych dochodzi do tworzenia heterodimerów *HER2/HER3* [19].

Badania ostatnich lat wykazują ponadto, że w guzach przewodu pokarmowego powszechnie występuje nadekspresja genu *HER2* [1, 20, 21] oraz intensywne wybarwienie receptora *HER3* w teście immunohistochemicznym [1, 22]. Stopniowo umacniało się przekonanie dotyczące konieczności powstawania heterodimerów *HER2/HER3* w najbardziej złośliwych nowotworach pochodzenia nabłonkowego. W 1999 r. Vadlamudi i wsp. [1] wykazali, że w rakach jelita grubego u ludzi, receptory *HER2* i *HER3* są konstytucjonalnie zaktywowane i występują w formie heterodimerycznych kompleksów, co oznacza, że heterodimery te wykazują bardzo silne właściwości do nadawania ciągłych, fałszywych, niezależnych od sygnałów zewnętrznych, wewnątrzkomórkowych impulsów o intensywnym mitogennym charakterze. Działają więc w komórce jak silne onkoproteiny.

AUTOKRYNNE HEREGULINY – HRGS

Hereguliny (ponad 15 aktywnych biologicznie izoform) są peptydami wzrostowymi powstającymi w wyniku alternatywnego splicingu genu kodującego neureguliny [3, 4]. Zostały one pierwotnie wyizolowane z komórkowych linii raka piersi [23]. W komórkach nowotworów nabłonkowych u ludzi peptydy HRGs wiążą się specyficznie z receptorem *HER3* i *HER4* jako ligandy prowadząc do aktywacji tych receptorów oraz ich spontanicznej, preferowanej heterodimeryzacji z receptorem *HER2* (białkiem p185) [3, 5, 7, 8, 11]. W tym heterodimerze obydwa receptory szczególnie intensywnie aktywują się wzajemnie, a powstały kompleks jest wyjątkowo trwały, co przedłuża jego mitogenne działanie [3, 4, 5].

Autokrylna produkcja peptydów wzrostowych HRGs wydaje się odgrywać niesłychanie ważną rolę we wzroście nowotworów u ludzi, gdyż, jak wskazują wyniki najnowszych prac, jest to główny mechanizm prowadzący do powstania jednej z najagresywniejszych onkoprotein, jaką jest heterodimer *HER2/HER3*. Już w 1995 r., kiedy opublikowano wyniki badań pierwotnego raka piersi, wykazujące obecność szeregu czynników wzrostu w ich utkaniu, sugerowano, że mechanizm autokrynnego działania może odgrywać bezpośrednią rolę w patobiologii nowotworów [24]. Z prac wcześniejszych było również wiadomo, że w liniach komórkowych ludzkiego raka piersi moż-

na stwierdzić ekspresję różnych peptydów wzrostowych, w tym również heregulin. Jednak dopiero w 1996 r. po raz pierwszy wykazano, że transformacja nowotworowa komórek nabłonkowych gruczołu piersiowego MCF-10A u ludzi, poprzez wywołanie w nich nadekspresji receptora *HER2* (białka p185), prowadzi w tych komórkach do indukcji zwiększonej ekspresji mRNA HRG i immunoreaktywnej izoformy peptydów HRG [19]. Ponieważ komórki MCF-10A i ich formy transformowane nadekspresją *HER2* wykazują ekspresję genu *HER3* przyjęto, że endogenne hereguliny mogą działać jak autokrynni czynnik wzrostu dla transformowanych nadekspresją *HER2* nabłonkowych komórek gruczołu piersiowego u ludzi, badanych w tej pracy. Autorzy oparli swój wniosek na bardzo istotnym fakcie, że receptor *HER3* wykazuje wyjątkowo wysokie powinowactwo do peptydów HRG, a po ich związaniu peptydy te silnie indukują tworzenie heterodimerów z receptorem *HER2*. Po utworzeniu tego kompleksu dochodzi do silnej transaktywacji receptora *HER2* wywołanej heregulinami, które – jak wykazano wcześniej – najsilniej transaktywują fosforylację tyrozyn receptora *HER2* w tym właśnie heterodimerze [3, 5, 7, 8, 11].

W kolejnym roku ukazała się praca będąca pierwszym doniesieniem wykazującym już bezpośrednio włączanie izoformy HRGs w autokrynnym mechanizmie wzrostu nowotworowego komórek raka piersi u ludzi [25]. Autorzy z komórek linii raka piersi MDA-MB-175 u ludzi, w której występuje ekspresja receptorów *HER2* i *HER3*, sklonowali nową izoformę HRG – gamma HRG. Wykazali także, że dla utrzymania pobudzonego wzrostu tych komórek nie wystarcza ekspresja gamma HRG i właściwego dla niej receptora *HER3*, lecz autokrynne pobudzenie tego wzrostu bezwzględnie wymaga dodatkowej koekspresji receptora *HER2*, co bardzo wyraźnie potwierdza potrzebę utworzenia heterodimeru *HER2/HER3* dla utrzymania dużego tempa wzrostu tych komórek. W pracy tej wykazano ponadto, że gamma heregulina, w przeciwieństwie do innych izoform HRG, nie występuje w nabłonkowych komórkach gruczołu piersiowego, wątroby czy jelita, a jej pojawienie się w komórkach raka piersi linii MDA-MB-175 może być bezpośrednio związane z transformacją nowotworową i może być albo jej przyczyną, albo z niej wynikać. Przyjmuje się, że w omawianej pracy po raz pierwszy zidentyfikowano aktywny autokrynnym system włączający HRG do stymulacji wzrostu komórek nowotworowych.

Ogromne jednak znaczenie dla postępowania klinicznego miał jeszcze inny wynik uzyskany w tej pracy. Stosując monoklonalne przeciwciała anty ECD (*extracellular domain*) receptora *HER2*, które rozrywa asocjujący kompleks heterodimeru *HER2/HER3*, obsadzony HRG jako ligandem, uzyskano silny hamujący wpływ na wzrost badanej linii komórkowej, co świadczy o tym, że gamma HRG jest włączana w autokrynne pobudzanie badanych

komórek przez heterodimer *HER2/HER3*. Działanie endogennych gamma heregulin można neutralizować stosując monoklonalne przeciwciała anty ECD *HER2* (Herceptyna) i uzyskać znaczny efekt antyproliferacyjny. Oznacza to również, że obniżając ekspresję receptora *HER2* lub blokując jego funkcję możemy nie dopuścić do tworzenia heterodimeru receptorów *HER2/HER3* i uzyskać hamowanie wzrostu nowotworów u ludzi, u których dochodzi do nadmiernej ekspresji któregoś z tych 2 receptorów. Pogląd ten z czasem zyskał znakomite potwierdzenie kliniczne i monoklonalne humanizowane przeciwciała anty ECD *HER2* jest sukcesywnie wprowadzane na całym świecie do leczenia raka piersi z nadekspresją genu *HER2*, stanowiąc trzon terapii opartej na strategii REC (*receptor enhanced chemosensitivity*), polegającej na uczulaniu komórek nowotworowych z nadekspresją genu *HER2* na chemoterapeutyki, które w leczeniu skojarzonym podawane są z tym przeciwciałem.

Kolejne bardzo interesujące dane dotyczące roli autokrynych heregulin w powiązaniu z działaniem heterodimeru receptorów *HER2/HER3* opublikowano w 1999 r. Vadlamudi i wsp. [1] zaprezentowali wyniki szeroko zakrojonych badań na liniach komórkowych raka jelita grubego u ludzi oraz w wycinkach pobranych od pacjentów z tym nowotworem. Jednym z celów, jakie autorzy postawili sobie w tej pracy, było przebadanie ekspresji i aktywacji receptorów rodziny *HER* w komórkach raka jelita grubego. Autorzy potwierdzili wcześniejsze doniesienia, że komórki raka jelita grubego wykazują powszechnie nadekspresję receptorów *HER2* i *HER3* oraz wykazali, że receptory te występują w formie heterodimerowych kompleksów. Wykazali także, że heterodimery te tworzą się pod nieobecność ligandu egzogenego i są konstytucjonalnie zaktywowane, czyli wysyłają ciągle fałszywe sygnały mitogenne do wnętrza komórki, do jej DNA włącznie. Okazało się jednak, że heterodimery *HER2/HER3* tworzące się pod nieobecność ligandu zewnętrznego dysponują odpowiednim ligandem produkowanym przez komórki samego raka. Wykazano bowiem w omawianej pracy, że opisywane dimery powstają jedynie w tych komórkach raka jelita grubego, które wykazują ekspresję i wydzielają białko 40kDa, rozpoznawane immunologicznie jako heregulinę. One to mogą aktywować receptor *HER2*, jeżeli powstają heterodimery *HER2/HER3*. Czyli w komórkach raka jelita grubego mamy do czynienia z konstytucjonalną aktywacją receptora *HER2* na drodze autokrynnego pobudzenia heterodimeru *HER2/HER3*. W pracy tej wykazano ponadto, że jeżeli odpowiednim przeciwciałem anty *HER3* blokowano miejsce odpowiedzialne za wiązanie się tego receptora z heregulinami, to gwałtownie obniżał się poziom heterodimeru *HER2/HER3*, czemu towarzyszył spadek dynamiki proliferacji komórek poddanych takiemu działaniu. Te wyniki są pierwszym doniesieniem wykazującym tworzenie konstytucjonalnie aktywnego heterodi-

meru *HER2/HER3* pod wpływem działania autokrynych heregulin, co razem tworzy mechanizm stymulacji wzrostu komórek raka jelita grubego.

CYKLOOKSYGENEZA 2 – NOWA ONKOPROTEINA O POTĘŻNYM DZIAŁANIU – WSPÓLZALEŻNOŚĆ Z RECEPTORAMI *HER*

Ostatnie lata przyniosły narastającą ilość danych wykazujących, że kancerogeneza w obrębie okrężnicy regulowana jest dającą się gwałtownie indukować czynnikami wzrostu izoformą cyklooksygenazy, enzymu odpowiedzialnego za przekształcanie kwasu arachidonowego (AA) do prostaglandyn (PG) [26-35]. Ta izoforma cyklooksygenazy produkowana przez gen wczesnej odpowiedzi nazywana została cyklooksygenazą 2 (COX2) w odróżnieniu od COX1 kodowanej przez odrębny gen z grupy genów *housekeeping*, którego ekspresja niezależnie od transformacji nowotworowej komórki, pozostaje na względnie niskim i stałym poziomie [33]. Autorzy wielu prac wykazali, że poziom ekspresji genu COX2 jest bardzo wysoki zarówno w komórkach gruczolaków jelita grubego u ludzi, jak i w gruczolakach u myszy, będących nosicielkami mutacji genu APC (*adenomatous polyposis coli*) [26, 27, 31, 34, 35].

Wykazano również, że zniszczenie genu APC u myszy prowadzi do wzrostu ekspresji COX2 w guzach jelit [31, 34]. W procesie bardzo żmudnych badań genetycznych wykazano, że nadekspresja genu COX2 jest wczesnym i kluczowym zdarzeniem w kancerogenezie okrężnicy u myszy i pojawia się po mutacji drugiego allelu genu APC [31]. Wykazano także na modelu doświadczalnym z *Min mouse* (myszy będącej nosicielką mutacji genu APC, u której występuje podobny do ludzkiego zespół polipowatości), że taki sam efekt jak uszkodzenie genu kodującego COX2, czyli znamienne statystycznie zmniejszenie ilości polipów, można uzyskać przez podanie środka farmakologicznego, hamującego selektywnie enzym COX2, mianowicie MF-tricyclic [31], lub Celecoxib [32] – nowoczesnych inhibitorów COX2. Wykazano również, że nieswoisty inhibitor Sulindac, hamujący zarówno COX1, jak i COX2, prowadzi jedynie do statystycznie nieznamiennego spadku ilości tworzących się polipów [31]. Wyniki te były kolejnym dowodem udziału COX2 we wczesnej kancerogenezie jelita grubego.

Szukając wyjaśnienia dla kancerogenego działania wysokich poziomów COX2 w komórce, zwrócono uwagę na hamowanie w tych komórkach procesu apoptozy i wzrostu stężenia białka Bcl 2, jako jeden z mechanizmów za pomocą których COX2 uczestniczy w pobudzaniu wzrostu komórek [36, 37]. Bardziej szczegółowe badania tego zagadnienia wykazały, że eikosanoidy, głównie prostaglandyny E2 (PGE2) powstające na szlaku działania COX2 na kwas arachidonowy, podawane egzogennie do medium hodowlanego komórek

raka jelita grubego HCA-7, wykazujących wysoką ekspresję COX2, wywołują 4-, 5-krotny wzrost poziomu białka Bcl 2, czemu towarzyszy wieloprocentowy spadek komórek podlegających apoptozie. Efekt ten można odwrócić przez traktowanie komórek w hodowli wysoce selektywnymi inhibitorami COX2, co wyraźnie wskazuje na ważną rolę, jaką eikosanoidy odgrywają jako metabolity AA powstające w zwiększonej ilości w związku z wysokim poziomem białka COX2 w komórce [36, 37]. Wielokrotnie w badaniach na liniach komórkowych zaobserwowano jednak, że te wysokie wzrosty poziomów COX2 były przejściowe, a utrzymywały się jedynie w tych komórkach, gdzie dochodziło do konstytucjonalnie wysokiej ekspresji COX2, co można było zaobserwować w niektórych liniach raka jelita grubego u ludzi, np. w komórkach HCA-7 [35, 38, 39, 40]. Wykazano również, że do konstytucjonalnej aktywacji genu COX2 dochodzi wówczas, gdy występuje aktywacja receptorów z rodziny *HER*, gdyż wówczas gen COX2 jest dla nich jedną z tarczy molekularnych [40-42]. Zależność ta ma niesłychanie istotne znaczenie, ponieważ pokazuje powiązania między szlakami działania receptorów *HER* i COX2.

Bardzo interesujące wyniki dotyczące powiązań konstytucjonalnej aktywacji genu COX2 z działaniem autokrynych heregulin w raku jelita grubego u ludzi, zaprezentowała wzmiankowana już grupa Vadlamudiego na łamach *Oncogene* w 1999 r. [1]. Wobec powszechności występowania nadekspresji receptora *HER2* i *HER3* w raku jelita grubego oraz wysokiej ekspresji COX2 w przypadku tego nowotworu, wymieniona grupa amerykańskich badaczy postanowiła sprawdzić, czy istnieje jakieś powiązanie między endogenną ekspresją HRGs lub szlakiem transdukcji sygnału mitogennego a ekspresją genu COX2. Autorzy tej pracy prowadzili badania na liniach komórkowych raka jelita grubego u ludzi oraz wycinkach z guzów pobranych od pacjentów.

Jak już wspomniano wcześniej w niniejszym artykule, Vadlamudi i wsp. wykazali tworzenie się w komórkach raka jelita grubego, konstytucjonalnie zaktywowanych heterodimerów *HER2/HER3*, czyli wysyłających ciągle fałszywe sygnały mitogenne do wnętrza komórki, pod warunkiem występowania w tych komórkach intrakrynną ekspresji HRG. Badając 8 różnych linii raka jelita grubego u ludzi i komórki z raka jelita grubego od 8 różnych pacjentów autorzy wykazali, że w przypadkach tych dochodzi do konstytucjonalnej transaktywacji receptora *HER2* na drodze autokrynnego pobudzenia heterodimeru *HER2/HER3*. W pracy tej wykazano następnie, że jeżeli hamowano specyficznym przeciwciałem anty *HER3* wiązanie ligandu HRG przez ten receptor, uzyskiwano nie tylko obniżenie się poziomu heterodimeru *HER2/HER3*, ale zupełnie nieoczekiwanie stwierdzono redukcję ekspresji genu COX2. W tej samej pracy w doświadczeniach na liniach komórkowych wykazano, że aktywacja heterodimeru *HER2/HER3* przez

podanie egzogennej HRG indukuje ekspresję mRNA COX2 oraz uwalnianie prostaglandyn do medium hodowlanego. Wykazano ponadto, że te biologiczne pobudzenia wywołane podaniem HRG – ligandem receptorów *HER3* – oraz pobudzanie przez niego proliferacji komórkowej, można zablokować specyficznym inhibitorem enzymu COX2, co świadczy o tym, że blokuje on powstawanie konstytucjonalnie aktywnego kompleksu dimerycznego *HER2/HER3*. Obserwacje te wykazują wyraźnie pośredniczenie szlaku działania enzymu COX2 w mitogennej odpowiedzi komórek raka jelita grubego stymulowanych HRGs. Widać więc, że z jednej strony heterodimer *HER2/HER3* reguluje ekspresję COX2, z drugiej zaś strony wysoki poziom COX2 sprzyja tworzeniu tego dimeru, gdyż specyficzne inhibitory COX2 niwelują działanie tego kompleksu.

Wiele dowodów doświadczalnych wskazuje na to, że endogenne HRGs w połączeniu z nadekspresją receptorów rodziny *HER* mogą działać jako potencjalny komórkowy czynnik, który kontroluje poziom ekspresji białka COX2 [1]. Jest to pewien mechanizm ogólny z którym mamy do czynienia, jak wykazano, w przypadku raka jelita grubego, jednak w obliczu wielu faktów uzyskanych w ostatnich latach, można uznać, że jego zasięg obejmuje również inne nowotwory pochodzenia nabłonkowego, choć pogląd ten wymaga dalszych intensywnych badań. Jednak należy podkreślić, że dotychczas zebrano już wiele danych na to, iż nadekspresja COX2 jest niezbędna w ogóle dla przemiany nowotworowej komórek nabłonkowych. Świadczy o tym między innymi powszechne występowanie wysokiej ekspresji COX2 tak w komórkach transformowanych [43], jak i w różnych typach nowotworów nabłonkowych u ludzi [27, 28, 44–46] oraz znany od dawna fakt, że nowotwory pochodzenia nabłonkowego produkują więcej prostaglandyn aniżeli prawidłowe tkanki z których same się wywodzą [47–50]. Również doniesienia najnowsze [40–42], wykazujące zależność konstytucjonalnej aktywacji genu COX2 od występowania w komórce nowotworowej, onkogennej aktywacji receptorów z rodziny *HER* i ekspresji endogennych heregulin, umacniają pogląd, że współdziałanie i wzajemne regulowanie się tych 3 typów onkoprotein, odgrywa podstawową rolę w zaburzeniach wzrostu nowotworowych komórek pochodzenia nabłonkowego.

DZIAŁANIE HERCEPTYNY

Pierwsze próby blokowania receptora *HER2* (p185) za pomocą monoklonalnego przeciwciała skierowanego przeciwko p185, pochodzą z końca lat 80. [51]. Podjęcie takich prób było związane z opublikowaniem w tym czasie wyników badań przeprowadzonych na komórkach transfekowanych genem *HER2* i na zwierzętach transgenicznym, podczas których wykazano, że prawdziwa jest hipoteza iż zwiększona produkcja receptora *HER2* (p185) jest nie tylko markerem, ale

bezpośrednio uczestniczy w patogenezie i klinicznej agresywności guzów wykazujących taką nadprodukcję [52–54]. Wyniki te były następnie w latach późniejszych wielokrotnie potwierdzone przez różne ośrodki badawcze na świecie i dziś jako niepodważalne stanowią bardzo obszerny materiał [55–60].

W badaniach przedklinicznych przeprowadzonych *in vitro* i *in vivo* wykazano następnie, że wymienione przeciwciała hamują znacząco wzrost komórek guza, wykazujących nadekspresję receptora *HER2* (p185) [61–65]. Te zachęcające wyniki doprowadziły do przeprowadzenia w 1996 r. pierwszej próby klinicznej dożylnego podania recombinant humanized anti-p185 *HER2* antibody (rhu Mab *HER2* (Herceptin), pacjentkom z rakiem piersi wykazującym nadekspresję p185, u których wystąpiły liczne przerzuty po intensywnym rutynowym leczeniu chemicznym [66]. W pracy tej wykazano, że podane przeciwciało jest aktywne klinicznie i nie daje efektu toksyczności. Tymczasem intensywnie prowadzone badania podstawowe, konsekwentnie wykazywały, że działanie monoklonalnych przeciwciał anty p185 jest skutecznym sposobem uczulania komórek nowotworowych z nadekspresją genu *HER2* na chemiczne leki przeciwnowotworowe [61, 63–65, 67, 68].

Badania komórek raka piersi i jajnika u ludzi z amplifikacją genu *HER2* przeprowadzono na dużą skalę celem sprawdzenia wpływu tych przeciwciał podanych pojedynczo i w kombinacji z cis-diaminodichloroplatiną (CDDP) [64]. Badania przeprowadzone zarówno na liniach komórkowych *in vitro*, jak i *in vivo* na bezgranicznych myszach wykazały, że wpływ monoklonalnych przeciwciał, specyficznych dla zewnątrzkomórkowego epitopu białka p185, stosowanych pojedynczo daje efekt cytostatyczny, a w kombinacji ze stosowanym lekiem – cytotoksycznym, podnosząc znacznie skuteczność działania leku [64]. Wpływ podawania leku i przeciwciała okazał się specyficznie wybiórczy dla komórek wykazujących nadprodukcję białka p185, i był obserwowany przy bardzo niskim stężeniu przeciwciała, przy którym po podaniu wyłącznie przeciwciała nie obserwowano efektu w ogóle. Stosowanie kojarzonego podawania przeciwciała z lekiem nie prowadziło do wzrostu toksyczności ogólnej u myszy i dawało całkowitą remisję przeszczepów guzów ludzkiego raka piersi u badanych zwierząt. Obserwowany synergizm związany jest jak wykazano [64, 65, 69] z wewnątrzkomórkowym blokowaniem zdolności naprawczych DNA przez stosowane przeciwciało. W wyniku tego działania uszkodzenia DNA wywołane przez CDDP były większe i większa ilość komórek guza uruchamia mechanizm zaprogramowanej śmierci komórki. Ta zaobserwowana synergistyczna aktywność została nazwana REC (*receptor enhanced chemosensitivity*) i ma ogromne potencjalne perspektywy zastosowania klinicznego ze względu na wysoką swoistą aktywność jedynie wobec komórek z nadekspresją białka p185 oraz ze względu

na statystycznie znamienne zwiększanie potencjału zabijania takich komórek [64].

W pierwszej pracy klinicznej, w której przedstawiono rezultaty zastosowania tej strategii włączającej kombinację CDDP i monoklonalnych przeciwciał u pacjentek z rakiem piersi z amplifikacją genu *HER2*, opornych na chemioterapię, zaprezentowano wyniki tak niezwykle zachęcające, że stały się one zapowiedzią dalszych tego typu prób klinicznych [70] przeprowadzanych z zastosowaniem również innych leków przeciwnowotworowych (np. antracyklin czy taksanów), które uzyskały bardzo dobre wyniki w badaniach przedklinicznych [68]. Najnowsze badania przedkliniczne i podstawowe wykazały addytywny lub synergistyczny sposób działania szerokiego spektrum chemicznych leków przeciwnowotworowych w połączeniu ze specyficznymi monoklonalnymi przeciwciałami anty p185 i w pełni potwierdziły doniesienia wcześniejsze [71].

Również najnowsze badania kliniczne potwierdziły obserwacje poprzednie [72]. W 1999 r. po raz drugi została wykonana kliniczna próba skuteczności i bezpieczeństwa podawania rhu Mab *HER2* – Herceptyny, pacjentkom z rakiem piersi, wykazującym nadekspresję receptora *HER2* [73]. Grupa badanych pacjentek obejmowała 222 przypadki i była pięciokrotnie liczniejsza niż w 1996r kiedy to dokonano pierwszej takiej próby. Do badania tego zakwalifikowano również i tym razem pacjentki u których wystąpiły liczne przerzuty po intensywnym leczeniu chemicznym. Wielorakie korzyści z zastosowanej terapii, trwała obiektywna odpowiedź i korzystny profil toksyczności – oto podstawowe wyniki uzyskane w tej pracy, której autorzy wnioskują, że podawanie rhu Mab *HER2* jest nowym ważnym sposobem leczenia pacjentek z guzami wykazującymi nadekspresję genu *HER2* [73].

Z omawianych wyżej wyników uzyskanych w pracach podstawowych, przedklinicznych i klinicznych wynika, że strategia REC góruje nad leczeniem wg konwencjonalnych sposobów leczenia chemicznego, głównie ze względu na dużą skuteczność, brak toksyczności i wysoce swoiste działanie polegające na kierowaniu leku na tarczę molekularną, czyli na ściśle określoną onkoproteinę, którą w tym przypadku jest receptor *HER2* (p185).

Postęp wiedzy w zakresie działania receptorów z rodziny *HER*, jaki nastąpił w ciągu ostatnich kilku lat, pozwala dziś znacznie lepiej rozumieć korzyści płynące ze stosowania strategii REC. Dziś wiemy już, że stosując ludzkie monoklonalne przeciwciało anty p185 (Herceptynę) doprowadzamy do dysocjacji heterodimeru *HER2/HER3* – jednej z najagresywniejszych onkoprotein – i likwidujemy centralne i najważniejsze ogniwo 3-punktowej osi wyznaczonej przez 3 współdziałające i współregulujące się wzajemnie onkoproteiny, jakimi są: heterodimer *HER2/HER3*, endogenne hereguliny i cyklooksygenaza 2 (COX2).

Monoklonalne przeciwciała anty p185 powoduje dysocjację istniejących heterodimerów *HER2/HER3* oraz uniemożliwia komórkom z nadprodukcją p185 tworzenie nowych kompleksów tego rodzaju, przez co za jednym pociągnięciem niweluje w komórce również skutki nadekspresji receptora *HER3* oraz skutki działania autokrynych heregulin, gdyż obsadzone nimi receptory *HER3* i tak nie mogą utworzyć heterodimeru *HER2/HER3*.

Jak wykazał Vadlamudi i wsp., zmniejszenie w komórce ilości heterodimeru *HER2/HER3* prowadzi jednocześnie do zmniejszenia ekspresji białka COX2, które skutecznie blokuje apoptozę. Widzimy więc kolejną korzyść pośrednią z działania monoklonalnego przeciwciała anty-p185. Znacząco zmniejszając w komórce ilość heterodimeru *HER2/HER3* i nie dopuszczając do powstawiania tego kompleksu, stosowane przeciwciała prowadzi w konsekwencji do obniżania ekspresji COX2 i wzrostu apoptozy w komórkach guza. Podawane przeciwciała stwarza jednocześnie dogodne warunki do wybiórczego podawania leku chemicznego na tarczę molekularną w ramach strategii REC i uzyskanie z niej pełnej korzyści, a więc maksymalnego zabijania komórek z amplifikacją genu *HER2*.

Do ukazania się pracy Vadlamudiego i wsp. nie było wiadomo, że Herceptyna hamuje pośrednio również COX2, oraz, że specyficzne inhibitory COX2 niwelują biologiczne pobudzenia heterodimeru *HER2/HER3* przez HRGs i najprawdopodobniej przez inne czynniki wzrostu oddziaływujące na receptory *HER*, przez co gwałtownie zmniejszają proliferację komórek i zwiększają ich apoptozę. Wydaje się, że starannie opracowany nowoczesny sposób leczenia oparty na strategii REC może teraz sprawdzić się również w leczeniu raka jelita grubego. Należy oczekiwać, że można by strategię REC wzbogacić dołączeniem do przeciwciała i odpowiedniego leku chemicznego, swoistego inhibitora COX2. Wszystkie wskazują na to, że strategia REC może przynieść swoisty przełom w leczeniu wszystkich nowotworów pochodzenia nabłonkowego, połączonych ze zwiększoną produkcją receptorów *HER*, szczególnie w swej wersji wzbogaconej o specyficzny inhibitor COX2, gdyż jak wiadomo z szerokiego przeglądu publikacji, wysoka ekspresja COX2 jest powszechna w tych nowotworach.

PIŚMIENNICTWO

- Vadlamudi R, Mandal M, Adam L, et al. Regulation of cyclooxygenase-2 pathway by HER2 receptor. *Oncogene* 1999; 18: 305-14.
- Hynes NE, Stern DF. The biology of erb B2 (neu) HER2 and its role in cancer. *Biochim Biophys Acta* 1994; 1198: 165-84.
- Alroy I, Yarden Y. The Erb B signaling network in embryogenesis: signal diversification through combination ligand-receptor interaction. *FEBS Lett* 1997; 410: 83-6.
- Carraway KI, Cantley LC. Neu acquisition for Erb B3 and Erb B4: A role for receptor heterodimerization in growth signaling. *Cell* 1994; 78: 5-8.
- Karunakaran D, Tzahar E, Beerli R, et al. Erb B-2 is a common auxiliary subunit of NDF and EGF receptors: implications for breast cancer. *EMBO J* 1996; 15: 254-6.
- Dougall WC, Quian X, Peterson NC, et al. The neu-oncogene: signal transduction pathways, transformation mechanisms and evolving therapies. *Oncogene* 1994; 9: 2109-23.
- Pinkas-Kramarski R, Soussan L, Waterman H, et al. Diversification of neu differentiation factor and epidermal growth factor signaling by combinatorial receptor interactions. *EMBO J* 1996; 15: 2452-67.
- Pinkas-Kramarski R, Shelly M, Glathe S, et al. Neu differentiation factor/neuregulin isoforms activate receptor combination. *J Biol Chem* 1996; 271: 19029-32.
- Kokai Y, Myers J N, Wada T, et al. Synergistic interaction of p 185 c-neu and the EGF receptor leads to transformation of rodent fibroblasts. *Cell* 1989; 58: 287-92.
- Slivkowski MX, Schaefer G, Aktita RW, et al. Co-expression of erb B2 and erb B3 proteins reconstitutes a high affinity receptor for heregulin. *J Biol Chem* 1994; 269: 14661-5.
- Amundadottir LT, Leder P. Signal transduction pathways activated and required for mammary carcinogenesis in response to specific oncogenes. *Oncogene* 1998; 16: 737-46.
- Sierke SL, Cheng K, Kim HH, et al. Biochemical characterization of the protein tyrosine kinase homology domain of the Erb B3 (HER3) receptor protein. *Biochem J* 1997; 322: 757-63.
- Zhang K, Sun J, Lin N, et al. Transformation of NIH 3T3 cells by HER3 or HER4 receptors requires the presence of HER1 or HER2. *J Biol Chem* 1996; 271: 3884-90.
- Fitzpatrick VD, Pisacane PI, Vandlen R L, et al. Formation of high affinity heregulin binding site using the soluble extracellular domains of Erb B2 with Erb B3 or Erb B4. *FEBS Lett* 1998; 431: 102-6.
- Yu D H, Hung MC. Expression of activated rat neu oncogene is sufficient to induce experimental metastasis in 3T3 cells. *Oncogene* 1991; 6: 1991-6.
- Yu D, Wang SS, Dulski K M, et al. C-erb B-2/neu overexpression enhances metastatic potential of human lung cancer cells by induction of metastasis-associated properties. *Cancer Res* 1994; 54: 3260-6.
- Bates NP, Hurst HC. An intron 1 enhancer element mediates oestrogen-induced suppression of ERBB2 expression. *Oncogene* 1997; 15: 473-81.
- Lemoine NR, Barnes DM, Hollywood DP, et al. Expression of the ERBB3 gene product in breast cancer. *Br J Cancer* 1992; 66: 1116-21.
- Mincione G, Bianco C, Kannan S, et al. Enhanced expression of heregulin in c-erb B2 and c-Ha-ras transformed mouse and human mammary epithelial cells. *J Cell Biochem* 1996; 60: 437-46.
- Kapitanović S, Radošević S, Kapitanović M, et al. The expression of p 185 HER2/neu correlates with stage of disease and survival in colorectal cancer. *Gastroenterol* 1997; 112: 11103-13.
- Yang JL, Yu Y, Marković B, et al. Overexpression of c-erb B2 mRNA and/or c-neu oncoprotein is a predictor for metastases from colorectal cancer. *Anticancer Res* 1997; 17: 1023-6.
- Ciardello F, Kim N, Saeki T, et al. Differential expression of epidermal growth factor-related proteins in human colorectal tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 7792-6.
- Kung W, Dawid F, Laugen H, et al. Isolation of a heregulin-like growth factor secreted by estrogen receptor-negative MDA-MB-231 human breast cancer cells that stimulates estrogen positive cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1994; 202: 1357-65.
- Normano N, Kim N, Wen D, et al. Expression of messenger RNA for amphiregulin, heregulin and cripto-1, three new members of the epidermal growth factor family, in primary human breast carcinomas. *Breast Cancer Res Treat* 1999; 35: 293-7.
- Schaefer G, Fitzpatrick DV, Slivkowski MX. Heregulin: a novel heregulin isoform that is an autocrine growth factor for the human breast cancer cell line, MDA-MB-175. *Oncogene* 1997; 15: 1385-94.
- Prescott SM, White RL. Self-promotion? Intimate connections between APC and prostaglandin H synthase-2. *Cell* 1996; 87: 783-6.
- Eberhart CE, Coffey RY, Radhika A, et al. Up-regulation of cyclooxygenase-2 gene expression in human colorectal adenomas and adenocarcinomas. *Gastroenterol* 1994; 107: 1183-8.
- Ristimaki A, Honkanen N, Jankala H, et al. Expression of cyclooxygenase-2 in human gastric carcinoma. *Cancer Res* 1997; 57: 1276-80.
- DuBois RN, Radhika A, Reddy BS, et al. Increased cyclooxygenase-2 levels in carcinogen-induced rat colonic tumors. *Gastroenterol* 1996; 110: 1259-62.
- Tsuji M, Kowano S, DuBois RN. Cyclooxygenase-2 expression in human colon cancer cells increases metastatic potential. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 3336-40.
- Oshima M, Dinchuk JE, Kargman SL, et al. Suppression of intestinal polyposis in APC knockout mice by inhibition of oxygenase 2 (COX-2). *Cell* 1996; 87: 803-9.
- Kawamori T, Rao CV, Seibert K. Chemopreventive activity of Celecoxib, a specific cyclooxygenase-2 inhibitor, against colon carcinogenesis. *Cancer Res* 1998; 58: 409-12.
- Herschman HR. Prostaglandin synthase 2. *Biochim Biophys Acta* 1996; 1299: 125-40.
- Williams CW, Luongo C, Radhika A, et al. Elevated cyclooxygenase-2 levels in Min mouse adenomas. *Gastroenterology* 1996; 111: 1134-40.
- Sheng H, Shao J, Kirkland SC, et al. Inhibition of human colon cancer cell growth by selective inhibition of cyclooxygenase-2. *J Clin Invest* 1997; 99: 2254-9.
- Sheng H, Sho J, Morrow JD, et al. Modulation of apoptosis and Bcl-2 expression by prostaglandin E2 in human colon cancer cells. *Cancer Res* 1998; 58: 362-6.
- Tsuji M, DuBois RN. Alterations in cellular adhesion and apoptosis in epithelial cells overexpressing prostaglandin endoperoxide synthase-2. *Cell* 1995; 83: 493-501.
- DuBois RN, Awad J, Morrow J, et al. Regulation of eicosanoid production and mitogenesis in rat intestinal epithelial cells by transforming growth factor- α and phorbol ester. *J Clin Invest* 1994; 93: 493-8.
- DuBois RN, Tsuji M, Bishop P, et al. Cloning and characterization of a growth factor-inducible cyclooxygenase gene from rat intestinal epithelial cells. *Am J Physiol* 1994; 266: G822-7.
- Shin DM, Ro JY, Hong WK, et al. Dysregulation of epidermal growth factor receptor expression in premalignant lesions during head and neck tumorigenesis. *Cancer Res* 1994; 54: 3153-9.
- Coffey RJ, Hawkey CJ, Damstrup L, et al. EGF receptor activation induces nuclear targeting of COX2 basolateral release of prostaglandins and mitogenesis in polarizing colon cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 657-62.
- Mestre JR, Subbaramaiah K, Sacks PG, et al. Retinoids suppress epidermal growth factor-induced transcription of cyclooxygenase-2 in human oral squamous carcinoma cells. *Cancer Res* 1997; 57: 2890-5.
- Subbaramaiah K, Telang N, Ramonetti JT, et al. Transcription of cyclooxygenase-2 is enhanced in transformed mammary epithelial cells. *Cancer Res* 1996; 56: 4424-9.
- Hida T, Yatabe Y, Achiwa H, et al. Increased expression of cyclooxygenase-2 occurs frequently in human lung cancers, specifically in adenocarcinomas. *Cancer Res* 1998; 58: 3761-4.
- Tucker ON, Dannenberg AY, Yang EK, et al. Cyclooxygenase-2 expression is up-regulated in human pancreatic cancer. *Cancer Res* 1999; 59: 987-90.
- Chang G, Boyle JO, Yang EK, et al. Cyclooxygenase-2 expression is up-regulated in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer Res* 1999; 59: 991-4.
- Bennett A, Charlier EM, Mc Donald, et al. Prostaglandins and breast cancer. *Lancet* 1987; 2: 624-6.
- Bennett A. The production of prostanooids in human cancers, and their implications for tumor progression. *Prog Lipid Res* 1986; 25: 539-42.
- Jung TT, Berlinger NT, Juhn SK. Prostaglandins in

- squamous cell carcinoma of the head and neck: a preliminary study.* Laryngoscope 1985; 95: 307-12.
50. Bennett A, Carroll MA, Stanford JF, et al. *Prostaglandins and human lung carcinomas.* Br J Cancer 1982; 46: 888-93.
 51. Hudziak RM, Lewis GD, Winget M, et al. *p 185 HER2 monoclonal antibody has antiproliferative effects in vitro and sensitized human breast tumor cells to tumor necrosis factor.* Mol Cell Biol 1989; 9: 1165-72.
 52. Hudziak RM, Schlessinger J, Ullrich A. *Increased expression of the putative growth factor receptor p185 HER2 causes transformation and tumorigenesis of NIH 3T3 cells.* Proc Natl Acad Sci USA 1987; 84: 7159-63.
 53. Di Fiore PP, Pierce JH, Kraus MH, et al. *erbB-2 is a potent oncogene when overexpressed in NIH 3T3 cells.* Science 1987; 237: 178-82.
 54. Guy CT, Webster MA, Schaller M, et al. *Expression of the neu protooncogene in the mammary epithelium of transgenic mice induces metastatic disease.* Proc Natl Acad Sci USA 1992; 89: 10578-82.
 55. Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, et al. *Human breast cancer: Correlation of relapse and survival with amplification of the HER2/neu oncogene.* Science 1987; 235: 177-82.
 56. Slamon DJ, Godolphin W, Jones LA, et al. *Studies of HER2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer.* Science 1989; 244: 707-12.
 57. Allred DC, Clark GM, Tandon AK, et al. *HER-2/neu in node-negative breast cancer: Prognostic significance of overexpression influenced by the presence of in situ carcinoma.* J Clin Oncol 1992; 10: 599-605.
 58. Kern JA, Schwartz DA, Norolberg JE, et al. *p185 neu expression in human lung adenocarcinomas predicts shortened survival.* Cancer Res 1990; 50: 5184-91.
 59. Uchino S, Tsuda H, Maruyama K. *Overexpression of c-erbB-2 protein in gastric cancer.* Cancer 1993; 72: 3179-84.
 60. Ravdin PM, Chamness GC. *The c-erbB-2 proto-oncogene as a prognostic and predictive marker in breast cancer: A paradigm for the development of other macromolecular markers – A review.* Gene 1995; 159: 19-27.
 61. Hancock MC, Langton BC, Chan T, et al. *A monoclonal antibody against the c-erbB-2 protein enhances the cytotoxicity of cis-diaminedichloroplatinum against human breast and ovarian tumor cell lines.* Cancer Res 1991; 51: 4575-80.
 62. Harwerth IM, Wels W, Schlegel J, et al. *Monoclonal antibodies directed to the erb B-2 receptor inhibit in vivo tumor cell growth.* Br J Cancer 1993; 68: 1140-5.
 63. Artega CL, Carty-Dugger T, Winner A. *Antibodies p 185 HER-2 enhance etoposide-induced cytotoxicity against human breast carcinoma cells.* Proc Am Soc Clin Oncol 1993; 12: 1012.
 64. Pietras RJ, Fendly BM, Chazin VR, et al. *Antibody to HER-2/neu receptor blocks DNA repair after cisplatin in human breast and ovarian cancer cells.* Oncogene 1994; 9: 1829-38.
 65. Artega CL, Winner AR, Poirier MC, et al. *p185 c-erb B-2 signal enhances cisplatin-induced cytotoxicity in human breast carcinoma cells: Association between an oncogenic receptor tyrosine kinase and drug induced DNA repair.* Cancer Res 1994; 54: 3758-65.
 66. Baselga J, Tripathy D, Mendelsohn J, et al. *Phase II study of weekly intravenous recombinant humanized anti-p185 HER2 monoclonal antibody in patients with HER2/neu overexpressing metastatic breast cancer.* J Clin Oncol 1996; 14: 737-44.
 67. Lopez AM, Pegram MD, Landaw EM, et al. *Models to assess combination therapy interactions: Optimal timing of anti HER2 antibody and doxorubicin in breast cancer.* Proc Am Assoc Cancer Res 1997; 38: 605 (abstr 4061).
 68. Baselga J, Norton L, Albnell J, et al. *Recombinant humanized anti-HER2 antibody (Herceptin) enhances the antitumor activity of paclitaxel and doxorubicin against HER2/neu overexpressing human breast cancer xenografts.* Cancer Res 1998; 58: 2825-31.
 69. Klapper LN, Vaisman N, Hurwitz E, et al. *A subclass of tumor-inhibitory monoclonal antibodies to Erb-2/HER2 blocks crosstalk with growth factor receptors.* Oncogene 1997; 14: 2099-109.
 70. Pegram MD, Lipton A, Hayes DF, et al. *Phase II study of receptor-enhanced chemosensitivity using recombinant humanized anti-p 185 HER2/neu monoclonal antibody plus cisplatin in patients with HER2/neu-overexpressing metastatic breast cancer refractory to chemotherapy treatment.* J Clin Oncol 1998; 16: 2659-71.
 71. Pegram M, Hsu S, Lewis G, et al. *Inhibitory effects of combinations of HER-2/neu antibody and chemotherapeutic agents used for treatment of human breast cancers.* Oncogene 1999; 18: 2241-51.
 72. Slamon D, Leyland-Jones B, Shak S, et al. *Addition of Herceptin (humanized anti-HER2 antibody) to first line chemotherapy for HER2 overexpressing metastatic breast cancer (HER2+/MBC) markedly increases anticancer activity: A randomized multinational controlled phase III trial.* Proc Am Soc Clin Oncol 1998; 17: 98A, (abstr 377).
 73. Cobleigh MA, Vogel CL, Tripathy D, et al. *Multinational study of the efficacy and safety of humanized anti-HER2 monoclonal antibody in women who have HER2-overexpressing metastatic breast cancer that has progressed after chemotherapy for metastatic disease.* J Clin Oncol 1999; 17: 2639-48.

ADRES DO KORESPONDENCJIdr n. przyr. **Ewa Szackłowska**

Zakład Patomorfologii Klinicznej

CSK WAM

ul. Szaserów 128

00-909 Warszawa

tel./fax (22) 810 38 92