

W artykule podjęto próbę pokazania obecnego kierunku rozwoju wiedzy dotyczącej roli receptorów HER i heregulin w powstawaniu i progresji raka piersi. Nie ulega wątpliwości, że istnieje ogromne zainteresowanie wiodącą rolą heterodimeru receptorów HER2/HER3 jako głównego regulatora sygnałów mitogennych biegnących szlakiem MAPKs i sygnałów antyapoptotycznych biegnących szlakiem PI3K, w przypadku tego raka. Heterodimer receptorów HER2/HER3, jak pokazują liczne najnowsze badania, jest głównym i – jak wszystko na to wskazuje – jedynym mediatorem złożonego działania licznych izoform heregulin na najważniejsze procesy związane z progresją raka piersi, do których należą inwazyjność, angiogeneza i apoptoza.

W artykule przedstawiono i omówiono najnowsze prace pokazujące wpływ receptorów HER1 i HER2 na angiogenezę oraz prace prezentujące wpływ heregulin na ekspresję aktywatora uroplazminogenu i jego receptora. Przedstawiono również prace pokazujące, jak na obecnym etapie wiedzy można zrozumieć sposób, w jaki hereguliny pobudzają jeden z najaktywniejszych szlaków antyapoptotycznych i zaprezentowano kinazę PI3 jako jedną z najważniejszych molekuł sygnalizacyjnych, które decydują o przeżyciu komórki nabłonkowej. Ponieważ zwiększona ekspresja receptorów HER2 wiąże się z nasileniem sygnalizowania szlakiem PI3K, wydaje się, że kinaza ta może być atrakcyjnym obiektem docelowym dla kierowania działań terapeutycznych w przypadku guzów HER2-pozytywnych.

Słowa kluczowe: heterodimer HER2/HER3, angiogeneza, kinaza PI3, apoptoza, aktywator uroplazminogenu (uPA).

Rola receptorów HER i heregulin w powstawaniu przerzutów raka piersi

Role of HER receptors and heregulins in the development of breast cancer metastases

Ewa Szacikowska, Wojciech Kozłowski

Zakład Patomorfologii Klinicznej, CSK WAM w Warszawie

WSTĘP

Ciągle utrzymująca się na świecie wysoka śmiertelność związana z rakiem piersi wynika z faktu zdolności niektórych guzów do tworzenia mikroprzerzutów już wówczas, kiedy pierwotne miejsce zmiany jest jeszcze bardzo małe. Poza ogromnym znaczeniem nadekspresji receptora HER2 w klinicznym przebiegu raka piersi i w tworzeniu przerzutów, narastająca ilość danych badawczych pozwalających się w ostatnich latach zwraca uwagę na równie duże znaczenie w tym procesie szlaków sygnalizacyjnych uruchomianych przez peptydowe czynniki wzrostu – hereguliny (HRGs). Od połowy lat 90. wiadomo, że komórki raka piersi generalnie wykazują zwiększoną autokrynną produkcję HRGs i że uczestniczą one w progresji nowotworu również pod nieobecność estrogenów.

Wiele najnowszych prac poświęconych działaniu heregulin na komórki ludzkiego raka piersi wykazało, że hereguliny poza regulowaniem wzrostu komórek włączają się w regulację innych zachowań komórek nowotworowych, takich jak przyleganie, ich inwazyjność i migracja oraz w sposób decydujący włączają się w regula-

cję angiogenezy i apoptozy. Poznanie i zrozumienie molekularnych mechanizmów działania receptorów HER i heregulin ma ogromne znaczenie kliniczne, bowiem ułatwi sformułowanie zasad terapii zmierzającej do ograniczenia lub wręcz niweczenia zdolności komórek nowotworowych do tworzenia przerzutów.

RECEPTORY HER

Rodzina receptorów HER (*human epidermal growth factor receptors*) obejmuje 4 receptorowe białka o charakterze kinaz tyrozynowych. Są to następujące receptory: HER1 (EGFR), HER2 (białko p185), HER3 i HER4. Białka te umieszczone są w błonach komórkowych. Występują powszechnie w komórkach nabłonkowych, mezenchymalnych i nerwowych. Ogólnie wiadomo, że odgrywają one fundamentalną rolę w rozwoju płodowym. W komórkach nabłonkowych organizmu dorosłego wszystkie 4 receptory ulegają ekspresji na bardzo niskim, choć zróżnicowanym poziomie, i tak np. w komórkach nabłonkowych gruczołu piersiowego receptor HER3 dominuje ilościowo nad pozostałymi. Zaburzenia ekspresji receptorów HER występują często w chorobach nowotworowych u lu-

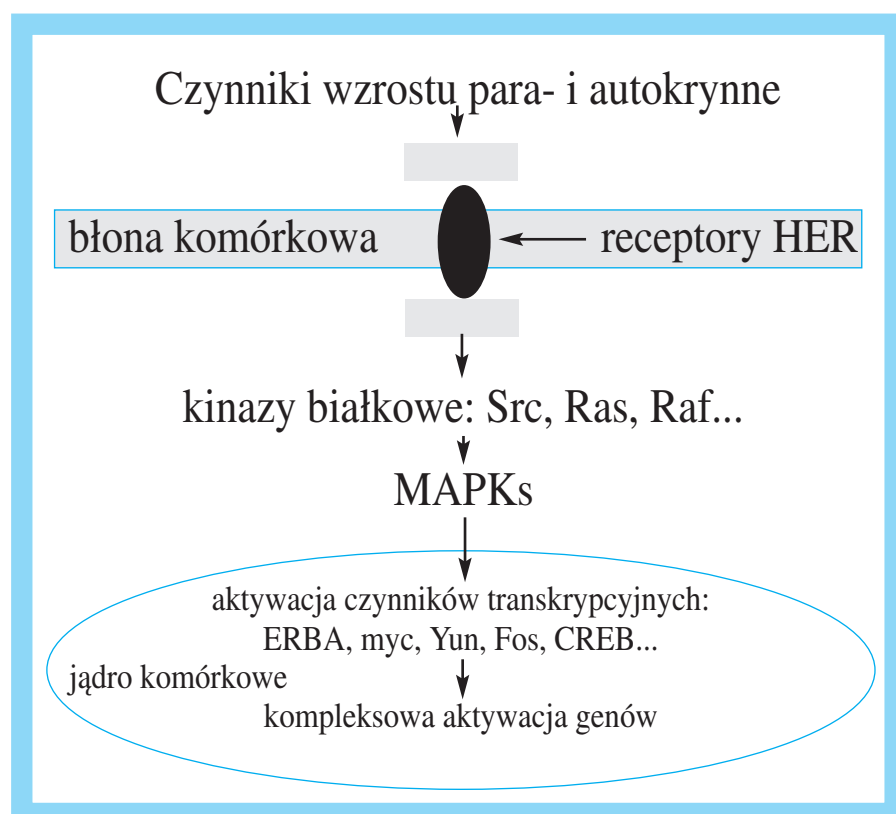
In the paper attempt was undertaken to present the current directions of knowledge progress of the role of HER receptors and heregulins in the development and progression of breast cancer. There is no doubt that great interest has been aroused by the leading role of HER2/HER3 receptors heterodimer as the main regulator of mitotic signals conducted along the MAPKs pathway and antiapoptotic signals conducted along the PI3K pathway in breast cancer. The heterodimer of HER2/HER3 receptors, as demonstrated by numerous recent studies is the main and, as it seems, the only mediator of the complex effects exerted by numerous isoforms of heregulins on the most important processes associated with breast cancer progression, among which worth mentioning are invasiveness, angiogenesis and apoptosis.

In addition to proliferative signals emanating from receptor tyrosine kinase family (RTKs) or their effectors, there is a requirement for a concurrent anti-apoptotic signal for efficient transformation. One important signaling molecule that has been implicated in epithelial cell survival is PI3K. More recently the ability of HER2/HER3 heterodimer to recruit the PI3 kinase in promoting tumor progression by providing cell survival signals has been revealed. In addition to stimulating tumor cell proliferation, HER2 overexpression in cancer cells acts as an antiapoptotic cell survival factor. Down-regulation of HER2 expression induces apoptosis in these cells. Selective inhibitors of the PI3K pathway significantly suppressed the growth of tumor cell lines that overexpress HER2 but not the growth of tumor lines with low HER2 expression. These data indicate that PI3K pathway plays an enhanced role in the growth of HER2 overexpressing breast cancer cells, therefore providing a molecular basis for a selective targeting of this signaling pathway in

dzi, szczególnie w nowotworach pochodzenia nabłonkowego czyli rakach [1]. Precyzyjne mechanizmy molekularne, poprzez które receptory HER wpływają na progresję raka, pomimo intensywnych badań i ogromnego postępu wiedzy w tym zakresie pozostają ciągle słabo poznane, choć wiadomo, że działanie to obejmuje szlaki przewodzenia sygnałów aktywowane związaniem ligandu przez receptor oraz olbrzymi wachlarz skutków biologicznych, wynikających z dotarcia tych sygnałów do DNA komórki w wyniku zaktywowania odpowiednich czynników transkrypcyjnych (ryc. 1.) [2].

Wiadomo że zaburzenia w ekspresji i działaniu czynników wzrostu oraz ich receptorów mają swój udział w progresji i utrzymaniu złośliwego fenotypu w raku piersi. Dobrym przykładem jest tutaj nadekspresja receptora HER2 (białka p185), charakterystyczna dla ponad 30 proc. raków piersi [3]. Kliniczne znaczenie zaburzeń dotyczących ekspresji, a więc wytwarzanej ilości receptorów HER2,

związanej z amplifikacją czy nadekspresją genu lub występowaniem obydwu tych zjawisk, zostało w minionej dekadzie bardzo dokładnie przebadane i ustalone. Wiadomo, że nadekspresja receptorów HER2 wiąże się z agresywnym klinicznie przebiegiem choroby, krótkim okresem wolnym od wznowy, złą prognozą i wzmożoną skłonnością do tworzenia przerzutów [4-10]. Biologiczne i molekularne mechanizmy wynikające z nadekspresji receptorów HER2, wpływające na niepomyślny przebieg choroby nowotworowej charakteryzują 2 główne szlaki tych wydarzeń (ryc. 2.). Przedstawione na ryc. 2. zachowanie się guzów z nadekspresją receptorów HER2 potwierdziła ogromna liczba prac klinicznych i podstawowych, prezentowanych w ciągu ostatnich 10 lat [4-10]. W pracach badawczych tego okresu wykazano również, że wśród receptorów rodziny HER, kompleks dimeryczny receptora HER2 i HER3 wysyła najsilniejszy sygnał mitogenny biegnący szlakiem ras-raf-MAPKs, przekładający się bez-



Ryc. 1. Schemat przewodzenia sygnałów przez receptory rodziny HER

the treatment of HER2 positive human breast malignancies.

In the paper some recent data that suggest the oncogenic properties of HER1 (EGFR) and HER2 (p185) that may be mediated by stimulation of tumor angiogenesis by up-regulation of vascular endothelial growth factor (VEGF) is also presented.

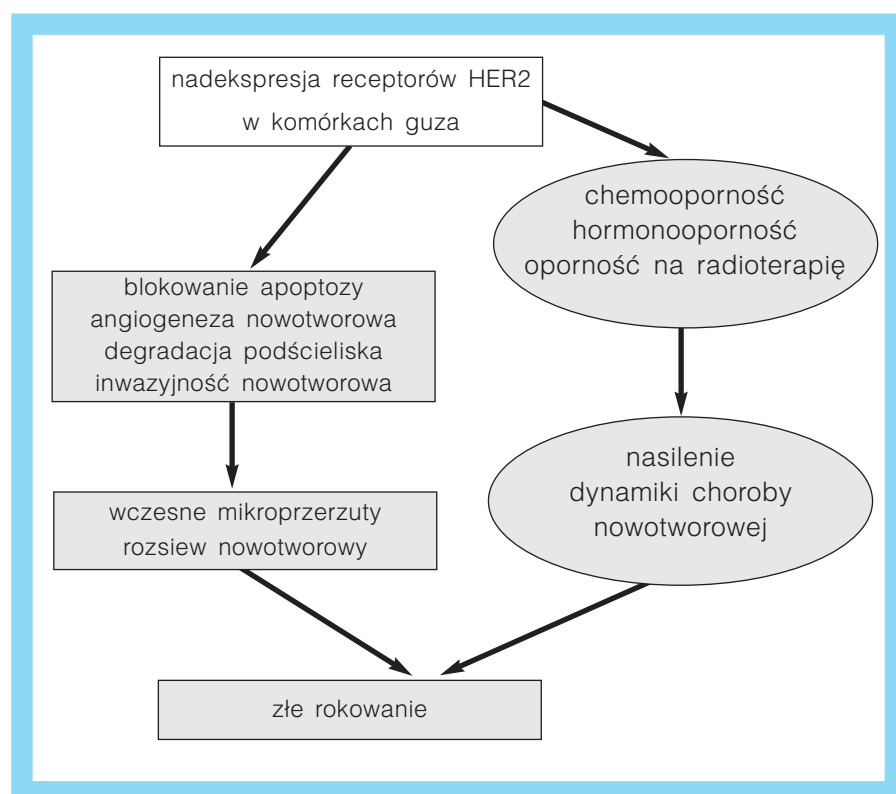
Considering the established role of urokinase plasminogen activator (uPA) and its receptor (uPAR) in invasion, these proteolytic enzymes can regulate cancer metastasis in addition to growth factors. The recent data concerning the possibility that heregulins use the uPA/uPAR autocrine pathway to transduce their signals, leading to invasion are really very intriguing. Additional support for these data is provided by earlier published studies showing that highly invasive breast cancer cells, which secrete HRGs express very high levels of the uPA/uPAR system.

Key words: HER2/HER3 heterodimer, angiogenesis. PI3 kinase, apoptosis, urokinase plasminogen activator (uPA).

pośrednio na progresję cyklu komórkowego [2, 11]. Szczególna spontaniczna skłonność do powstawania tego heterodimeru w komórkach raka z zaburzeniami ekspresji receptorów HER i autokrynie produkowanymi czynnikami wzrostu sprawia, że sygnały mitogenne wychodzące z MAPK są wyjątkowo intensywne, a tym samym proliferacja takich komórek niezwykle dynamiczna [2, 11].

Generalnie uważa się, że nadekspresja receptorowych kinaz tyrozynowych, takich jak HER1 czy HER2, przyczynia się do rozwoju guzów litych, początkowo poprzez ich wpływ na promowanie niekontrolowanej proliferacji komórek. Regulacja działania receptorów HER jest bardzo złożona, gdyż ulegają one aktywacji nie tylko w wyniku przyłączenia swoistego ligandu (czynnika wzrostu), lecz ulegają dodatkowo transaktywacji przez ligand innego receptora HER, z którym tworzą kompleks heterodimeryczny, co generuje nową jakość biologiczną wysłanego sygnału [3]. Duża różnorodność ligandów

powoduje, że receptory te mogą uruchamiać wiele różnych szlaków sygnalizowania, dlatego też występuje mnogość efektów biologicznych wywoływanych przez te receptory, a sygnały mitogenne są tylko jednymi z nich. Np. receptory HER3 i HER4 wiążą swoiście wyłącznie hereguliny. Ponieważ hereguliny mogą reprezentować ponad 15 aktywnych biologicznie izoform i wszystkie te połączenia mogą aktywować receptor HER2 po utworzeniu odpowiedniego heterodimeru, wobec tego może powstawać cały wachlarz różnych, biologicznie aktywnych sygnałów. Ostatnie lata przynoszą coraz więcej danych dotyczących udziału HRGs w progresji raka piersi do bardziej inwazyjnego fenotypu. Wydaje się, że o tego typu działaniu heregulin w dużym stopniu decydować będzie zdolność komórki nowotworowej do tworzenia heterodimeru HER2/HER3. Tak więc komórki raka piersi z nadekspresją receptorów HER2 będą w sposób szczególnie intensywny uruchamiać sygnalizacyjne szlaki HRGs [11].



Ryc. 2. Molekularne i biologiczne konsekwencje nadekspresji receptorów HER2 w komórkach guza

Wpływ receptorów HER1 i HER2 na angiogenezę

Badania laboratoryjne wykazują, że działanie czynników antagonizujących funkcje receptorów HER1 i HER2, np. działanie odpowiednich przeciwciał, może zniwelować transformujący wpływ tych receptorów. Jak większość czynników działających jako inhibitory przewodzenia sygnału, tak i specyficzne przeciwciała blokujące receptory HER generalnie traktowane są jako leki cytostatyczne. Pogląd ten bazuje na obserwacjach poczynionych na jednowarstwowych hodowlach komórek guza rosnących *in vitro*, kiedy to obserwuje się wyłącznie taki efekt. Jeżeli natomiast specyficzne przeciwciała poddano badaniom w różnych przedklinicznych modelach przeciwko guzom litym *in vivo*, uzyskiwano imponujący efekt cytotoksyczny. Tę niezwykle korzystną terapeutycznie rozbieżność między wynikami *in vitro* i *in vivo* uznano za wystarczającą, aby wysnuć przypuszczenie, że antagonizowanie receptorów HER1 i HER2 wyzwala być może jakiś efekt antyangiogeny, np. poprzez ustanie stymulacji jednego lub więcej czynników wzrostu, oddziałujących w procesie angiogenezy [12]. Jednym z takich czynników jest VEGF (*vascular endothelial cell growth factor*) występujący również pod nazwą VPF (*vascular permeability factor*), który działa jako główny stymulator angiogenezy w nowotworach pochodzenia nabłonkowego u ludzi, zwiększając przepuszczalność mikronaczyń i bezpośrednio pobudzając wzrost komórek endotelialnych i angiogenezę. Znamienne jest, że wśród znanych czynników indukujących wzrost produkcji VEGF najsilniej działające to czynniki wzrostu EGF i TGF-alfa, będące ligandami receptorów HER1 i transaktywujące receptor HER2 w ich onkogennych kompleksach heterodimerskich. Powstało więc pytanie czy recep-

tory HER1 i HER2 mogą przyczynić się do zwiększania ekspresji VEGF, a jeżeli tak, to czy farmakologiczne blokowanie tych receptorów, uniemożliwiające pobudzenie szlaku transmisji sygnału może prowadzić do obniżenia poziomu białka VEGF w komórkach ludzkiego raka *in vitro* i *in vivo* [12].

Obszerne wyniki badań dotyczących tego zagadnienia wykazały w zakresie badań *in vitro*, że prawidłowe komórki NIH 3T3, wykazujące brak ekspresji receptorów HER nie produkują mierzalnych ilości VEGF, zaś poddane hipoksji uwalniają do medium najniższe mierzalne ilości tego czynnika wzrostu [12].

Jednak po transformacji tych komórek spowodowanej transfekcją genu HER2, kiedy zaczynają one produkować receptor HER2, pojawia się w medium znaczna ilość VEGF, zaś po poddaniu tych komórek hipoksji ilość VEGF wzrasta jeszcze 100-krotnie.

Również *in vitro* poddano badaniom komórki ludzkiego raka piersi linii SKBR 3, o której wiadomo, że jest HER2-pozytywna, a komórki tej linii uwalniają do medium znaczne ilości VEGF. Komórki te, poddane działaniu specyficznych przeciwciał anti-HER2, wykazywały zależny od dawki tego przeciwciała spadek produkcji VEGF. Już te wyniki pokazują, że rzeczywiście funkcja receptorów HER2 może być co najmniej jednym z istotnych czynników regulujących ekspresję VEGF w badanych komórkach nowotworowych [12].

Podobne wyniki w badaniach *in vitro* uzyskano w przypadku epidermoidalnych komórek ludzkiego raka linii A 431, o której wiadomo, że wykazuje nadekspresję receptora HER1 (EGFR). Traktowanie tych komórek wzrastającymi stężeniami specyficznych przeciwciał anti-HER1, wywoływało zależny od dawki spadek zarówno sekrecji VEGF do medium hodowlanego, jak i zawartości mRNA dla VEGF

w hodowanych komórkach. Wyniki badań *in vivo* są jeszcze bardziej wymowne [12].

Poddano badaniu myszy obciążone guzami komórek A 431. Obiektem badań była ekspresja VEGF *in situ*, która jest wykładnikiem tempa angiogenezy w komórkach guza oraz ekspresja antygenu Ki 67 związanego z dynamiką proliferacji. Krótkotrwała terapia, polegająca na kilkakrotnej iniekcji specyficznego przeciwciała anti-HER1 powodowała hamowanie wzrostu guza, a badanie antygenu Ki 67 pokazywało, że o 33 proc. mniej komórek wchodzi do cyklu podziału komórkowego. Ten efekt wydaje się być wtórnie związany z hamowaniem angiogenezy w tych komórkach, gdyż takie samo zmniejszenie proliferacji obserwowano po podaniu myszom samego przeciwciała anti-VEGF. Tymczasem immunohistochemiczne badanie VEGF w skrawkach guzów wykazało intensywne wybarwienie tego białka w guzach kontrolnych, szczególnie w komórkach, które były negatywne w teście dla Ki 67. Badanie guzów leczonych przeciwciałem anti-HER1 wykazało głównie negatywne wybarwienie VEGF. Efekt ten łączył się z dwukrotnie mniejszą ilością naczyń w guzach leczonych w porównaniu z ilością naczyń w guzach kontrolnych [12].

HEREGULINY

Rodzina polipeptydowych czynników wzrostu o nazwie hereguliny (HRGs), występujących również pod nazwą NDF (*neu differentiation factors*), stanowi ponad 15 aktywnych biologicznie izoform białka składanego na tym samym mRNA. Wszystkie te izoformy wiążą się specyficznie do receptorów HER3 i HER4 jako ligandy, przez co indukują je do spontanicznego tworzenia heterodimerów z receptorem HER2. Prowadzi to do autofosforylacji tyrozyn obydwu receptorów tworzących heterodimer, co

jest równoznaczne z inicjacją przenoszenia sygnału dolnego strumienia, czyli biegnącego szlakiem ras-raf-MAPK [2, 3]. Należy przypomnieć, że utworzenie heterodimeru receptorów HER2 i HER3 oznacza transaktywację receptora HER2 przez heregulinę.

Wiadomo, że nabłonkowe komórki gruczołu piersiowego wykazują po transformacji nowotworowej zwiększoną ekspresję mRNA dla HRGs i immunoreaktywnych izoform tego peptydowego czynnika wzrostu [13]. Równie istotnym faktem badawczym jest sklonowanie w jednej z linii komórkowej raka piersi, nowej izoformy heregulin – gamma HRG, która nie ulega ekspresji w prawidłowym nabłonku, pojawia się dopiero po transformacji nowotworowej i jak wykazano, włączana jest w autokryny mechanizm wzrostu nowotworowego [14]. Z wcześniejszych prac również było wiadomo, że HRGs prowadzą do aktywacji receptora HER2 i pobudzają wzrost komórek raka piersi także pod nieobecność estrogenów [15]. Cytowane prace pokazują, że w komórkach raka piersi dochodzi do intensyfikacji oddziaływania peptydowych czynników wzrostu HRGs, w związku z transformacją nowotworową. Wzrost autokryny produkcji czynników wzrostu – HRGs wydaje się odgrywać niesłychanie ważną rolę we wzroście komórek raka piersi. Jak wskazują wyniki badań ostatnich kilku lat, autokryna ekspresja tego czynnika wzrostu w komórkach raka stanowi bowiem główny mechanizm prowadzący do powstawania w komórce jednej z najagresywniejszych onkoprotein, jaką jest heterodimer receptorów HER2/HER3. Tworzenie się tego heterodimeru w komórkach raka piersi odpowiedzialne jest za obserwowany w badaniach modelowych i klinicznych wzrost aktywności MAPKs, prowadzący m.in. do progresji cyklu komórkowego i nasilenia funkcji proliferacyjnej komórek [2]. Jednocześnie podwyższone poziomy ekspresji i aktywności MAPKs

i ich związek z fenotypem złośliwym, zostały wykazane w pierwotnym raku piersi, w porównaniu z tkanką prawidłową sutka i rozrostem łagodnym [16].

Fakty przedstawione powyżej koncentrują się na prezentowaniu działania HRGs jako czynnika wzrostu, a więc pokazują, jaki wywierają one wpływ na proliferację komórki. Fakty te pokazują również, że działanie HRGs odbywa się poprzez receptory z rodziny HER, a mianowicie przez receptory HER3 i HER4, które są bezpośrednio aktywowane heregulinami oraz przez receptor HER2, który jest transaktywowany przez HRGs w wyniku preferencyjnego tworzenia heterodimerów ze zaktwowanymi receptorami HER3 i HER4. Na podobnej zasadzie HRGs mogą również aktywować receptor HER1, co oznacza, że mogą one dokonywać aktywacji wszystkich czterech receptorów z rodziny HER [11].

Ostatnio opisano kilka szlaków przewodzenia sygnałów aktywowanych w wyniku działania HRGs. Wprowadzie wszystkie białka receptorowe rodziny HER po zligandowaniu i utworzeniu heterodimeru używają ras-raf-MAPKs jako głównego szlaku sygnalizacyjnego [17], jednak MAPKs nie są, jak wiadomo, jednolitym zbiorem kinaz, lecz rodziną białek, w skład której wchodzi podrodziny: ERKs (*extracellular signal regulated kinases*), p38 MAPKs i SAPKs/JNKs (*stress activated protein kinases*).

Wiadomo również, że wśród receptorów rodziny HER jedynie receptor HER3 aktywuje szlak sygnalizacyjny PI3K (*phosphatidylinositol 3 kinase*) [18]. W komórkach z nadekspresją receptorów HER2 wykazywano podwyższone poziomy PI3K, było to jednak związane z poziomem receptorów HER3 [19]. W różnych systemach badawczych obserwowano aktywowanie heregulinami wymienionych wyżej szlaków

w różnych kombinacjach, w zależności od badanego problemu. Ciągłe jednak niewiele wiadomo na temat powiązań między różnymi szlakami sygnalizacyjnymi uruchomianymi przez HRGs, a wielorakimi skutkami biologicznymi jakie biegnące tymi szlakami sygnały wywołują w komórkach raka piersi [20, 21].

Heregulinę pobudzają jeden z najaktywniejszych szlaków antyapoptotycznych

Dla skutecznej transformacji nowotworowej poza intensyfikacją sygnałów mitogennych wysyłanych przez receptorowe kinazy tyrozynowe i ich efekторы, istnieje również wymóg dotyczący równoczesnego nasilenia sygnałów antyapoptotycznych. Te komórki nowotworowe, które nie mają możliwości uruchomienia mechanizmu zaprogramowanej śmierci w obliczu uszkodzonego genomu, kumulują mutacje, stając się coraz bardziej złośliwymi. Ich wzrost jest coraz bardziej autonomiczny i zaczyna podlegać regulacji autokryny, a więc opartej na produkcji własnych czynników wzrostu i ich receptorów w całkowitej izolacji od sygnałów zewnątrzkomórkowych. Komórki takie uszkodzone chemicznie lub promieniowaniem jonizującym nadal żyją i szybko dzielą się, mając coraz bardziej uszkodzony genom i wykazując coraz większą złośliwość. U podłoża chemo- i radiooporności oraz ogromnej dynamiki wzrostu komórek nowotworowych leży wymknięcie się spod kontroli apoptozy. Im dłużej żyją takie komórki i im jest ich więcej, tym większe prawdopodobieństwo tworzenia przerzutów. Tak więc najbardziej złośliwe komórki decydują o dynamice procesu chorobowego, stając się dominującym klonem w guzie. Kontrola mechanizmu włączania apoptozy jest bardzo złożona. Komórki mają wiele różnych możliwości regulowania tego procesu i potrafią włą-

czać apoptozę również przy uszkodzonych genach p53, które nie są jedynym jej regulatorem [22]. W komórkach nowotworowych, w zależności od konstelacji różnych mutacji, różne okoliczności w komórce mogą prowadzić do pobudzania lub hamowania apoptozy. Wykazano eksperymentalnie, że w pewnych guzach raka piersi nadekspresja genu *c-myc* prowadzi do znacznego nasilenia apoptozy, jednak w innym kontekście mutacyjnym, nadekspresja genu *c-myc* nie działa proapoptotycznie [23]. Wykazano również, że w przypadku raka piersi o zdolności komórek nowotworowych do uruchomienia mechanizmu zaprogramowanej śmierci komórki w ogromnym stopniu decydują HRGs [19, 24]. Różne izoformy HRGs wykazują różną, tkankowo specyficzną zdolność wyzwalania apoptozy, co z kolei zmienia się podczas nowotworowej transformacji komórki, w związku z uaktywnianiem różnych protoonkogenów [24]. Hereguliny, jak wykazano zarówno w hodowlach komórkowych, jak i w guzach *in vivo*, indukują apoptozę w komórkach nabłonkowych gruczołu piersiowego, a zaprogramowana śmierć komórki związana z nadekspresją HRGs przebiega zgodnie ze schematem zależnym od białka Bcl-2 i kaspaz [24].

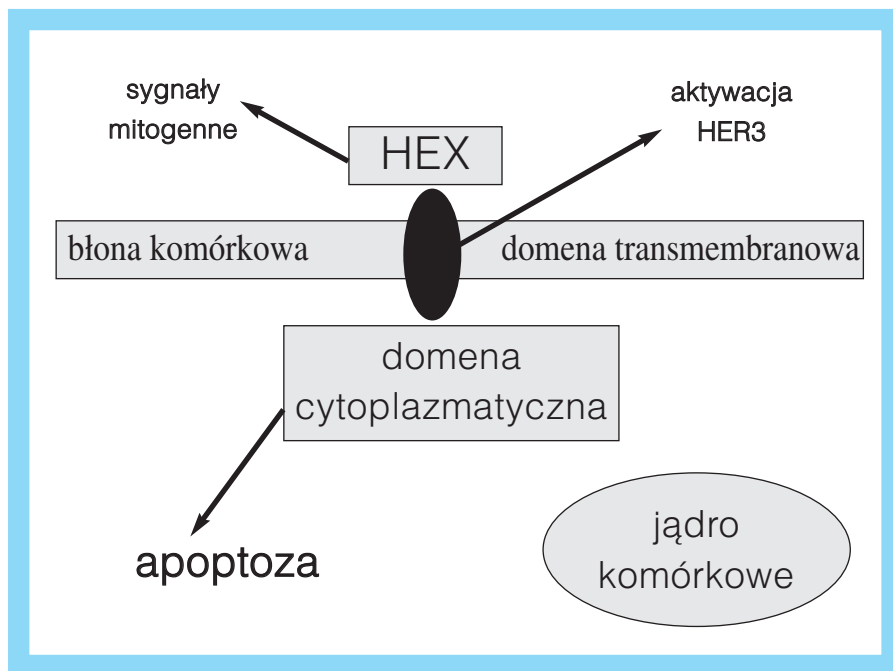
Jedną z najważniejszych molekuł sygnalizacyjnych, które decydują o przeżyciu komórki jest kinaza PI3. Stymulowanie sygnałów szlakiem PI3K przez zaktywowane receptory czynników wzrostu jest, jak wykazano, włączane w regulowanie przeżycia komórki i wykazuje w odpowiednich warunkach właściwości antyapoptotyczne [19]. W odpowiedzi na aktywację receptorów HER, immunoprecypitacja PI3K występuje jedynie z receptorem HER3. Tak więc PI3K odgrywa rolę w sygnalizowaniu poprzez receptor HER3. Znaczenie szlaku uruchomianego przez PI3K dla

wysyłania sygnałów antyapoptotycznych wykazano *in vivo* na mysich transgenicznym modelach raka gruczołu piersiowego. Wśród takich myszy rozwijających raka gruczołu piersiowego, wyhodowano mutanty niezdolne do ekspresji PI3K. U myszy tych stwierdzono podwyższone ilości komórek podlegających śmierci apoptotycznej, czemu towarzyszył znacznie wydłużony okres utajenia choroby w stosunku do myszy nie będących takimi mutantami [19]. Badano również myszy z tego modelu z wyindukowaną ekspresją inhibitora kinazy PI3, co skutkowało indukowaniem procesu zaprogramowanej śmierci komórki, a proces ten przebiegał równolegle z gwałtownym wzrostem liczby heterodimeru receptorów HER2/HER3, który wykorzystuje kinazę PI3 do wysyłania sygnałów antyapoptotycznych. W ten sposób komórki guza usiłowały rekompensować brak możliwości aktywowania kinazy PI3, zablokowanej i wyhamowanej przez inhibitor. Przedstawione obserwacje wyraźnie przemawiają za tym, że szlak sygnalizacyjny PI3K odgrywa krytyczną rolę w promowaniu progresji guza przez dostarczanie komórkom sygnałów do przeżycia, hamujących zaprogramowaną śmierć komórki [19].

Wielokrotnie wykazano na mysich transgenicznym modelach raka piersi, że w przypadku nadekspresji HRGs powstawał rak tego gruczołu [24]. Szczegółowe badania struktury i funkcji molekuł HRGs wykazały, że HRGs, podobnie jak receptory HER zbudowane są z trzech regionów (ryc. 3.) Region transmembranowy odpowiedzialny jest za wiązanie się z receptorem HER3 i jego aktywacją. Pozostałe regiony regulują liczne biologiczne funkcje HRGs, w tym region cytoplazmatyczny indukuje zaprogramowaną śmierć komórki [25, 26], zaś region zewnątrzkomórkowy o nazwie HEX, wiąże się z wysyłaniem intensywnych sygna-

łów mitogennych i prowadzi do kancerogenezy [27].

Zwierzęta transgeniczne omawianego modelu z pełną długością genu kodującego HRGs wykazywały zwiększoną sygnalizację mitogenną związaną z obecnością HEX, lecz wzrost komórek był przytłumiany przez sygnały proapoptotyczne idące od regionu cytoplazmatycznego. Zrozumiałe jest więc, że zwierzęta transgeniczne z transfekcją DNA kodującego jedynie domenę cytoplazmatyczną, wykazywały zwiększoną latentność kancerogenezy. Badania wykazały również, że zwierzęta, u których występowała nadekspresja jedynie regionu HEX nigdy nie wykazywały wysokich poziomów apoptozy w wytwarzanych guzach, w przeciwieństwie do zwierząt z ekspresją pełnej długości genu kodującego HRGs [27]. Nieślychanie ważnym spostrzeżeniem poczynionym w tych badaniach było wykazanie, że ekspresja pełnej długości genu dla HRGs wykazuje aktywację (fosforylację) wyłącznie genu HER3 [28], zaś u mutantów z nadekspresją HEX, zarówno receptory HER3, jak i HER2 występują w postaci ufosforylowanej, a więc sygnalizującej. Sugerowałoby to sposób działania zewnątrzkomórkowej domeny heregulin – HEX w powstawaniu raka gruczołu piersiowego [27]. Zewnątrzkomórkowy fragment HRGs jest bowiem wystarczający do indukcji kancerogenezy, nie indukuje jednak apoptozy, do inicjowania której potrzebny jest fragment cytoplazmatyczny. Tak więc w przypadku nadekspresji HEX powstaje ufosforylowana postać receptorów HER2 i HER3, czyli tworzy się heterodimer tych receptorów, wysyłający silny sygnał mitogenny przez MAPKs i silny sygnał antyapoptotyczny szlakiem PI3K (ryc. 4.). W przypadkach raka z nadekspresją receptorów HER2 właśnie nadekspresja HEX prowadzi do powstania sytuacji maksymalnie onkogenicznej, której



Ryc. 3. Trzy domeny białka hereguliny

nie stwarza ekspresja wyłącznie pełnej długości genu HRGs [27]. Wykazano eksperymentalnie [29], że zwiększona ekspresja receptorów HER2 w komórkach raka piersi wiąże się z nasileniem sygnalizowania szlakiem PI3K, zaś inhibitory transmisji sygnałów tym szlakiem prowadzą do zmniejszenia proliferacji takich komórek. Wydaje się więc uzasadnione badanie guzów HER2-pozytywnych na obecność nadekspresji HEX, natomiast kinaza PI3 wydaje się być atrakcyjnym obiektem docelowym, na który można by kierować działanie terapeutyczne w przypadku guzów HER2-pozytywnych, celem blokowania sygnałów antyapoptotycznych.

Hereguliny regulują ekspresję aktywatora uroplazminogenu i jego receptora

Procesy związane z tworzeniem przerzutów są liczne i złożone. Wśród wielu etapów muszą obejmować zmiany adhezji komórek, wzrost ich ruchliwości, produkcję enzymów o charakterze proteaz oraz inwazję podścieliska, a także angiogenezę. Jednym z bardzo ważnych etapów dla progresji i in-

wazji guza jest destrukcja macierzy zewnątrzkomórkowej (ECM), która rozdziela komórki nabłonkowe od różnych składników podścieliska. Degradacji takiej dokonują proteazy serynowe, takie jak np. aktywator uroplazminogenu (uPA), przyspieszając migrację i inwazyjność komórek. Działanie tych proteaz prowadzi do daleko idących uszkodzeń tkanki łącznej otaczającej komórki guza oraz uszkodzeń periwaskularnej błony podstawnej [30].

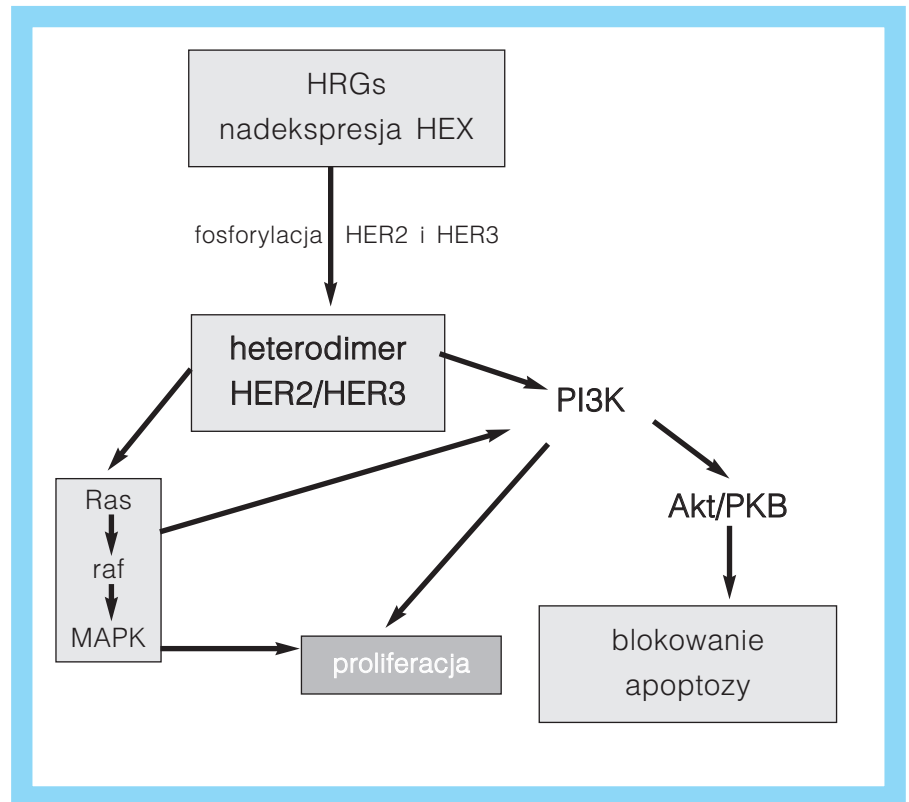
Działanie uPA wśród wielu innych proteaz serynowych wydaje się mieć szczególny udział w procesach ułatwiających powstawanie przerzutów, ze względu na fakt, iż na powierzchni komórek raka ma on swój receptor – uPAR, względem którego wykazuje wysokie powinowactwo [31, 32]. Receptor ten silnie wzmaga działanie uPA na plazminogen. Ekspresja uPA i uPAR została wykazana zasadniczo we wszystkich typach litych guzów badanych dotychczas pod tym względem [30, 31]. Ekspresja uPA i uPAR nie ogranicza się do komórek guza. Szereg komórek znajdujących się w pobliżu guza, takich jak makrofagi, fibroblasty czy komórki endotelialne zdolne

są również do ekspresji uPA i uPAR. Jednak ich wzór ekspresji w tych komórkach zależy od typu guza. I tak, np. komórki pewnych typów raka jelita grubego zawierają na powierzchni błon komórkowych wyłącznie uPAR. Do ligandowania tego receptora wykorzystują uPA produkowany przez otaczające komórki podścieliska.

Wykazano, że agresywność i inwazyjność komórek raka piersi i raka jelita grubego bardzo silnie koreluje z ekspresją uPAR na powierzchni tych komórek [33–35]. Dane dotyczące tego niesłuchanie ważnego faktu zaczęły ukazywać się w połowie lat 90. Uważano wówczas, że uPAR jest znakomitym niezależnym markerem, wyznaczającym przypadki o skróconym przeżyciu całkowitym oraz skróconym czasie wolnym od wznowy. Potrzeba było jednak jeszcze ponad 7 lat intensywnych badań podstawowych, aby zrozumieć, że działanie systemu uPA-uPAR jest bezpośrednio zależne od poziomu autokrynnie produkowanych heregulin w danym konkretnym przypadku komórek raka oraz od poziomu ekspresji receptorów HER w tych komórkach. Dziś, nie popełniając większego błędu, można pokusić się o uogólnienie, że poziom uPAR odzwierciedla stopień zaburzeń w ekspresji zarówno heregulin, jak i receptorów HER w danym przypadku komórek raka piersi czy jelita grubego. Wysokie poziomy uPAR świadczą, że zaburzenia te są poważne. Wyniki badań, które pozwalają na takie sformułowania pochodzą dosłownie z najnowszych prac [31]. Ponieważ na ich podstawie należy wnioskować, że rola HRGs i receptorów HER w progresji agresywności raka piersi i jelita grubego jest większa aniżeli wyobrażano to sobie do niedawna, należy uważniej przyjrzeć się temu problemowi.

Ogólnie przyjęto, że wytwarzanie uPA i uPAR, zarówno przez ko-

mórki guza, jak i sąsiadujące komórki podścieliska, jest równoznaczne z inicjacją degradacji *milieu* wokół komórek guza oraz z degradacją periwaskularnej błony podstawnej [30]. Obserwowano ekspresję uPA i uPAR w komórkach raka piersi i w preparatach z guza. Wykazano znamiennej korelację między zaawansowaniem raka piersi i wysokimi poziomami uPA i uPAR lub obydwu. Immunobarwienie uPAR występowało na granicy inwazyjnej (guz-gospodarz) i było zlokalizowane głównie w endotelialnych komórkach raka piersi [30]. uPA jest unikalną proteazą serynową, ponieważ posiada własny receptor związany z powierzchnią komórkową, do którego wykazuje wysokie powinowactwo, a wiązanie uPA z uPAR znamienne zwiększa enzymatyczną aktywność uPA. Komórki produkujące uPA prowadzą również jego sekrecję na zewnątrz komórki, dzięki czemu molekuly uPA mogą z łatwością ligandować swój receptor, czyli przyłączać się do uPAR w błonach komórkowych. System uPA-uPAR ma więc charakter autokryny [30]. Związanie uPA z uPAR wyzwała jego 2 podstawowe funkcje: funkcję proteolityczną oraz zdolność uPA do uruchomienia kaskad fosforylacji szlaku sygnalizacyjnego. Szlak sygnalizacyjny stymulujący fosforylację tyrozyn, indukuje ekspresję genu *fos* oraz fosforylację cytokeratyn. Mitogeny efekt działania uPA wiąże się z obecnością domeny czynnika wzrostu w strukturze tego białka. Wynika z tego, że zablokowanie możliwości przyłączenia uPA do uPAR powinno hamować progresję guza. Rzeczywiście wykazano, że zarówno przeciwciałem anti-uPA, jak i inhibitorem uniemożliwiającym wiązanie uPA z uPAR można uzyskać istotny efekt zmniejszenia wzrostu guza, ograniczenia przerzutowania oraz angiogenezy [30, 36, 37]. W świetle tych faktów niezwykle interesujące są wyniki pracy, w której po raz pierwszy wyka-



Ryc. 4. Sygnalizacja mitogenna i antyapoptyczna w nadekspresji HER

zono, że system uPA-uPAR podlega regulowaniu przez heregulin [31]. Otóż poddając działaniu heregulin nieinwazyjne komórki ludzkiego raka piersi MCF-7, uzyskano wzrost ekspresji mRNA uPA oraz wzrost ilości białka uPA produkowanego na tej matrycy przez hodowane komórki. Towarzystwo temu wydzielanie uPA do medium hodowlanego. Działanie heregulin na badane komórki linii MCF-7 wywoływało również zwiększenie ilości mRNA uPAR oraz zwiększenie ilości tego białka receptorowego. Opisane działanie heregulin na ekspresję uPA i uPAR w komórkach MCF-7 przebiegało równoległe z formowaniem się struktur związanych z ruchem komórki oraz z pojawieniem się immunoreaktywności uPA związanej z błoną komórkową wolnego brzegu poruszających się komórek [31]. Obserwowano również ruch komórek względem porów błony hodowlanej. Jest niezwykle istotne, że w omawianej pracy wykazano również, iż działanie heregulinami na komórki MCF-7 w obecności inhi-

bitora uPAR, który uniemożliwia wiązanie uPAR z uPA, obserwowano znamienne obniżoną inwazyjność indukowaną przez HRGs [31]. Świadczy to o tym, że autolub parakrynną stymulacja heregulinami szlaku uPA-uPAR włączana jest w raku piersi do regulowania możliwości przerzutowania komórek nowotworowych, a także o tym, że heregulin używają autokrynnego szlaku uPA-uPAR do przekazywania swoich sygnałów prowadzących do inwazji.

PODSUMOWANIE

Od połowy lat 90. systematycznie umacnia się przekonanie, że wzrost ekspresji i aktywności autokrynnie produkowanych heregulin, charakterystyczny w raku piersi, a nie pojawiających się ani w prawidłowym gruczole piersiowym, ani w jego rozroście łagodnym, jest główną siłą napędową progresji tego nowotworu. W zależności od stopnia zaburzeń ekspresji receptorów HER w danym

przypadku raka piersi, stan nadekspresji heregulin daje o sobie znać bardziej lub mniej intensywnie, gdyż te właśnie receptory są jedynymi mediatorami heregulin w komórkach nabłonkowych. Nic więc dziwnego, że przypadki raka piersi z nadekspresją receptorów HER2 tworzą dla będących w nadekspresji heregulin optymalne warunki do tworzenia heterodimeru receptorów HER2/HER3, co jak wiadomo, wiąże się z najintensywniejszą możliwą w komórce sygnalizacją mitogenną szlakiem MAPKs i sygnalizacją antyapoptotyczną biegnącą szlakiem PI3K. Pogląd dotyczący wiodącej roli heregulin w progresji raka piersi umocniły dodatkowo najnowsze badania laboratoryjne *in vivo* [19] wykazujące, że gwałtownej progresji raka sutka towarzyszy wzrost ekspresji receptorów HER3 oraz wzrost aktywności MAPKs i PI3K.

Zagadnienie zdolności do rozwijania apoptozy przez komórkę nowotworową ma kluczowe znaczenie dla progresji raka i odpowiedzi na stosowane leczenie. Ostatnio dużo miejsca poświęca się badaniom polegającym na wykorzystaniu terapii genowej do wprowadzania wirusowych genów proapoptotycznych do genomu komórek nowotworowych [22]. Pomijając ogromną złożoność tych technik oraz konieczność uzyskania dla nich pewnej minimalnej wydajności, aby mogły być efektywne, wydaje się, że o ich skuteczności mogłaby być mowa jedynie w powiązaniu z efektywnym hamowaniem antyapoptotycznych szlaków w komórkach nowotworowych. Temu celowi służą intensywne badania prowadzone nad receptorami HER i heregulinami jako regulatorami szlaków sygnalizacyjnych MAPKs i PI3K.

PIŚMIENICTWO

- Hynes NE, Stern DF. *The biology of erbB-2 (neu) HER-2 and its role in cancer*. Bioch Biophys Acta 1994; 1198: 165-84.
- Lewis TS, Shapiro PS, Ahn NG. *Signal transduction through MAP kinase cascades*. Adv Cancer Res 1998; 74: 49-139.
- Kozłowski W, Szacikowska E. *Receptory HER/ErbB w prawidłowym nabłonku i kancerogenezie*. Współczesna Onkologia 2000; 4: 7-12.
- Sjogren S, Inganas M, Lindgren A, et al. *Prognostic and predictive value of c-erbB2 overexpression in primary breast cancer alone and in combination with other prognostic markers*. J Clin Oncol 1998; 16: 462-9.
- Andrulis I, Bull S, Blackstein M, et al. *neu/erbB-2 amplification identifies a poor prognosis group of women with node-negative breast cancer*. J Clin Oncol 1998; 16: 1340-49.
- Szacikowska E, Kozłowski W. *Tamoksifen/antyestrogeny zwiększają agresywność raka piersi z amplifikacją i/lub nadekspresją genu HER2*. Współczesna Onkologia 1999; 3: 97-103.
- Szacikowska E, Kozłowski W. *Podłoże chemooporności raka piersi z amplifikacją i/lub nadekspresją genu HER2*. Współczesna Onkologia 1999; 4: 145-51.
- Yu DH, 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 KM, et al. *C-erbB-2/neu overexpression enhances metastatic potential of human lung cancer cells by induction of metastasis-associated properties*. Cancer Res 1994; 54: 3260-6.
- Zhang L, Lau Y-K, Xi L, et al. *Tyrosine kinase inhibitors emodin and its derivative repress HER-2/neu - induced cellular transformation and metastasis-associated properties*. Oncogene 1998; 16: 2855-63.
- Szacikowska E, Kozłowski W. *Heterodimer receptorów HER2/HER3, autokrynnie heregulin i cyklooksygenaza 2, a działanie Herceptyny*. Współczesna Onkologia 2000; 4: 93-9.
- Petit AMV, Rak J, Hung MC, et al. *Neutralizing antibodies against epidermal growth factor and ErbB-2/neu receptor tyrosine kinases down - regulate vascular endothelial growth factor production by tumor cells in vitro and in vivo*. Am J Pathol 1997; 151: 1523-31.
- Mincione G, Blanco C, Kannan S, et al. *Enhanced expression of heregulin in c-erb B2 and c-H ras trans-*
- formed mouse and human mammary epithelial cells*. J Cell Biochem 1996; 60: 437-46.
- Schaefer G, Fitzpatrick DV, Sliwkowski MX. *γ Heregulin a novel heregulin isoform that is an autocrin growth factor for the human breast cancer cell line. MDA-MB-175*. Oncogene 1997; 15: 1385-94.
- Pietras RJ, Arboleda J, Reese DM, et al. *HER-2 tyrosine kinase pathway targets estrogen receptor and promotes hormone - independent growth in human breast cancer cells*. Oncogene 1995; 10: 2435-46.
- Sivaraman VS, Wang H, Nuovo GJ, et al. *Hyperexpression of mitogen-activated protein kinase in human breast cancer*. J Clin Invest 1997; 99: 1478-3.
- Alroy I, Yarden Y. *The Erb B signaling network in embryogenesis signal diversification through combination ligand - receptor interaction*. FEBS Lett 1997; 410: 83-6.
- Fedi P, Pierce JH, Di Fiore PP, et al. *Efficient coupling with phosphatidylinositol 3 -kinase but not phospholipase C? or GTPase - activating protein distinguishes erb B-3 signaling from that of other Erb B/EGFR family members*. Mol Cell Biol 1994; 14: 492-500.
- Dankort DL, Muller WJ. *Signal transduction in mammary tumorigenesis: a transgenic perspective*. Oncogene 2000; 19: 1038-44.
- Tan M, Grijalva R, Yu D. *Heregulin β1 - activated phosphatidylinositol 3 - kinase enhances aggregation of MCF - 7 breast cancer cells independent of extracellular signal - regulated kinase*. Cancer Res 1999; 59: 1620-25.
- Xiong S, Grijalva R, Zhang L, et al. *Up - regulation of vascular endothelial growth factor in breast cancer cells by the heregulin - β1 - activated p38 signaling pathway enhances endothelial cell migration*. Cancer Res 2001; 61: 1727-32.
- Szala S. *Swoista indukcja apoptozy w komórkach nowotworowych*. Nowotwory 2000; 50: 111-21.
- Tsuneoka M, Mekada E. *Ras/MEK signaling suppresses Myc-dependent apoptosis in cells transformed by c-myc and activated ras*. Oncogene 2000; 19: 115-23.
- Weinstein EJ, Grimm S, Leder P. *The oncogene heregulin induces apoptosis*

- in breast epithelial cells and tumors.* Oncogene 1998; 17: 2107-13.
25. Grimm S, Leder P. *An apoptosis – inducing isoform of neu differentiation factor (NDF) identified a novel screen for dominant, apoptosis – inducing genes.* J Exp Med 1997; 185: 1137-47.
 26. Grimm S, Weinstein EJ, Krane JM, et al. *Neu differentiation factor (NDF) a dominant oncogene, causes apoptosis in vitro and in vivo.* J Exp Med 1998; 188: 1535-9.
 27. Weinstein EJ, Leder P. *The extracellular region of heregulin is sufficient to promote mammary gland proliferation and tumorigenesis but not apoptosis.* Cancer Res 2000; 60: 3856-61.
 28. Krane JM, Leder P. *NDF/hergulin induces persistence of terminal end buds and adenocarcinomas in the mammary glands of transgenic mice.* Oncogene 1996; 12: 1781-8.
 29. Hermanto U, Zong CS, Wang LH. *Erb B2-overexpressing human mammary carcinoma cells display an increased requirement for the phosphatidylinositol 3-kinase signaling pathway in anchorage-independent growth.* Oncogene 2001; 20: 7551-62.
 30. Mazar A, Henkin J, Goldfarb RH. *The urokinase plasminogen activator system in cancer: implication for tumor angiogenesis and metastasis.* Angiogenesis 1999; 3: 15-32.
 31. Mazumdar A, Adam L, Boyd D, Kuma R. *Heregulin regulation of urokinase plasminogen activator and its receptor: human breast epithelial cell invasion.* Cancer Res 2001; 61: 400-5.
 32. Andreasen PA, Kjoller L, Christensen L. *The urokinase – type plasminogen activator system in cancer metastasis: a review.* Int J Cancer 1997; 72: 1-22.
 33. Ganesh S, Sier CMF, Heerding MH, et al. *Urokinase receptor and colorectal cancer survival.* Lancet 1994; 344: 401-2.
 34. Dugan C, Maguire T, McDermott E, et al. *Urokinase plasminogen activator and urokinase plasminogen receptor in breast cancer.* Int J Cancer 1995; 61: 597-600.
 35. Grondahl-Hansen J, Peters H A, van Putten WLJ, et al. *Prognostic significance of the receptor for urokinase plasminogen activator in breast cancer.* Clin Cancer Res 1995; 1: 1079-87.
 36. Go Y, Chintala SK, Mahanam S, et al. *Inhibition of in vivo tumorigenicity and invasiveness of a human glioblastoma cell line transfected with anti-sense uPAR vectors.* Clin Exp Metastasis 1997; 5: 440-6.
 37. Crowley CW, Cohen RL, Lucas BK, et al. *Prevention of metastasis by inhibition of the urokinase receptor.* Proc Natl Acad Sci USA 1993; 90: 5021-5.

ADRES DO KORESPONDENCJI

dr hab. med. **Wojciech Kozłowski**
Zakład Patomorfologii Klinicznej
CSK WAM
ul. Szaserów 128
00-909 Warszawa

PRENUMERATA W 2002 ROKU 10 wydań!

Zaprenumeruj WSPÓŁCZESNĄ ONKOLOGIĘ!

Wydawca:

TERMEDIA Wydawnictwa Medyczne

Cena jednego egz.: 10 zł

Cena jednego egz. w prenumeracie: 9 zł

Cena prenumeraty (10 wydań) na 2002 r.: 90,00 zł

Ilustrowany periodyk medyczny ukazujący się od 1997 r., propagujący najnowsze światowe osiągnięcia w dziedzinie onkologii i upowszechniający wiedzę o nowoczesnych metodach zapobiegania, diagnostyki i leczenia chorób nowotworowych, propagujący efekty polskich badań związanych z szeroko pojętą biologią nowotworów. Czasopismo zamieszcza prace dotyczące onkologii w różnych specjalnościach lekarskich. Pismo niezbędne w codziennej praktyce w szpitalu, przychodni czy gabinecie prywatnym.

Wpłaty można dokonać na konto:

Termedia sp. z o.o. ul. Kleeberga 8, 61-615 Poznań
BZWBK SA III Oddział Poznań, 61 1090 1359 0000 0000 3505 2645
lub

wypełnić i wysłać formularz zamieszczony na stronach internetowych:
www.termedia.pl

