

W artykule przedstawiono najważniejsze cechy receptorów z rodziny HER/ErbB i ich ligandów, dzięki którym występuje ogromna, co do siły i jakości przekazu, różnorodność sygnałów biologicznych biegnących szlakiem uruchamianym przez te receptory w komórkach prawidłowego nabłonka. Receptory HER przekazują do DNA sygnały zależne od puli dostępnych czynników wzrostu lub stopnia ich wyczerpania i w ten sposób determinują jakość sygnału, który wyznacza konkretną ilość podziałów komórkowych, po przejściu których komórki ulegają końcowemu różnicowaniu. Przedstawiono następnie jak zmiana ekspresji tych receptorów, prowadząca do wzrostu ich ilości w związku z onkogeną aktywacją genów kodujących te receptory, pociąga za sobą zmianę ich funkcji. Wówczas nie reagują one na zewnętrzną regulację wzrostu komórki lecz będąc konstytucjonalnie aktywne, wysyłają ciągłe fałszywe mitogenne sygnały do jądra komórkowego, powodując stałe podziały takich komórek. Omówiono szczególną rolę heterodimeru HER2/HER3 będącego jedną z najagresywniejszych onkoprotein. W artykule przedstawiono również trypunktową oś wyznaczoną przez działanie trzech onkoprotein, na których opiera się zaburzenie prawidłowego wzrostu komórek, prowadzące do transformacji nowotworowej i progresji fenotypu złośliwego w nowotworowych komórkach pochodzenia nabłonkowego. Na podstawie wyników najnowszych prac podstawowych i klinicznych oraz najnowszych sprawdzonych hipotez wskazano na cyklooksygenazę 2, heterodimer HER2/HER3, oraz auto/intrakrynną ekspresję heregulin /HRG/, jako na współdziałające i wzajemnie regulujące się onkoproteiny, wywołujące jedne z najbardziej złośliwych nowotworów – nowotwory nabłonkowe z amplifikacją i/lub nadekspresją genu HER2.

Słowa kluczowe: receptory rodziny HER/ErbB, cyklooksygenaza 2 (COX2), kancerogeneza

Receptory HER/ErbB w prawidłowym nabłonku i w kancerogenezie

HER/ErbB receptors in normal epithelium and in malignant transformation

Wojciech Kozłowski, Ewa Szacikowska

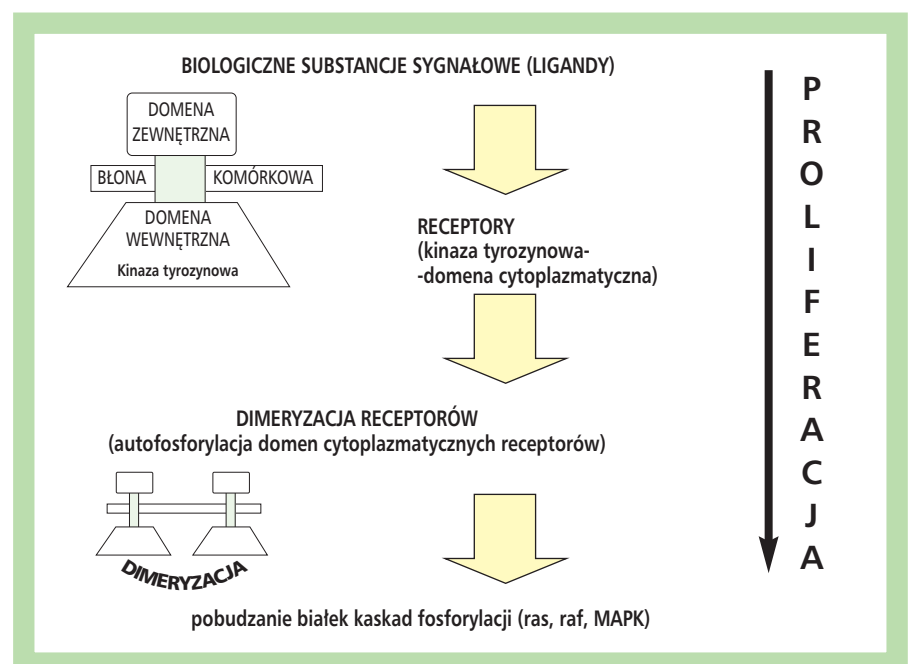
Zakład Patomorfologii Klinicznej Centralnego Szpitala Klinicznego
Wojskowej Akademii Medycznej w Warszawie

WSTĘP

Proliferacja komórek, ich różnicowanie i podejmowanie przez nie określonych funkcji w organizmie wielokomórkowym są procesami regulowanymi przez aktywne biologicznie substancje sygnałowe. Do zróżnicowanej grupy substancji sygnałowych zalicza się pełniące kluczową rolę w tych procesach peptydowe czynniki wzrostu (peptydowe hormony tkankowe). Substancje te, zwane ligandami, oddziaływują na komórki za pośrednictwem swoistych receptorów, zwykle usytuowanych w błonach komórek docelowych. Receptory czynników wzrostu są glikoproteinami błonowymi o zróżnicowanej strukturze, ale podobnym schemacie budowy [1]. Składają się one z trzech części:

- ▶ zewnątrzkomórkowej domeny rozpoznającej i wiążącej substancję sygnałową,
- ▶ części przechodzącej przez błonę komórkową i zakotwiczonej w niej receptor,
- ▶ części cytoplazmatycznej, mającej aktywność kinazy tyrozynowej.

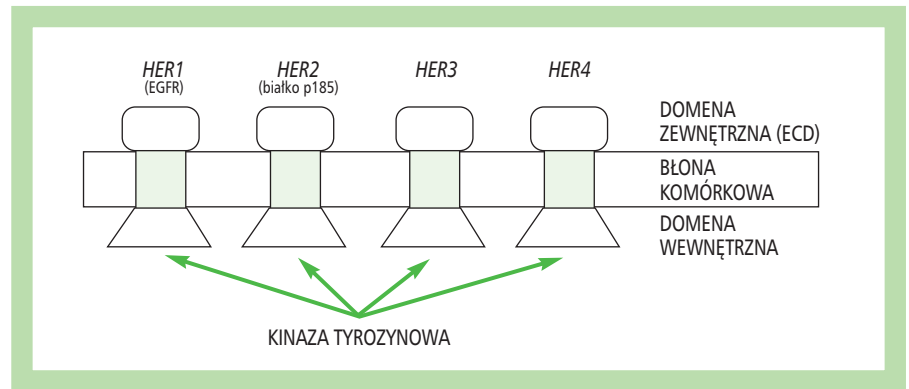
Fragment receptora o aktywności kinazy tyrozynowej jest niezmienną strukturalnie częścią wszystkich receptorów czynników wzrostu. Związanie ligandu z receptorem prowadzi do zmiany w konformacji jego części zewnątrzkomórkowej, powodując dimeryzację receptorów, co wywołuje interakcje między domenami cytoplazmatycznymi dimeryzującego kompleksu, w ostatecznym efekcie prowadząc do wzajemnej fosforylacji tych fragmentów cytoplazmatycznych [1]. Proces dimeryzacji, polegający na tworzeniu homo- i heterodimerów, ma zasadnicze znaczenie dla aktywacji kinazy tyrozynowej z następowym wykorzystaniem ściśle określonych białek cytoplazmatycznych do wzbudzenia określanych przez te białka kompleksów sygnalizacyjnych kaskad fosforylacji (ryc. 1.), prowadzących zewnątrzkomórkowy sygnał do właściwych czynników transkrypcyjnych w jądrze komórkowym [1]. Zatem proces ten decyduje o sile i jakości wychodzącego od receptora sygnału. Wśród receptorów czynników wzrostu z aktywnością kina-



Ryc. 1. Droga przekazu sygnałów biologicznych biegnących szlakiem uruchamianym przez receptory rodziny HER

In the paper the most important features of the receptors from the HER/ErbB family and their ligands are presented. The HER receptors transmit signals to DNA dependent on the pool of available growth factors or the degree of their exhaustion, and determine thus the quality of the signal that sets down a given number of cell divisions after which the cells undergo ultimate differentiation. Then it is shown how expression change of these receptors leading to increase of their number due to oncogenic activation of the genes encoding these receptors is followed by a change of their function. They react no more to external regulation of cell growth but, being constitutionally active, they send continuous false mitogenic signals to the cell nucleus, provoking continuous divisions of such cells. The particular role is discussed of the HER2/HER3 heterodimer which is one of the most aggressive oncoproteins. In the paper the three-point axis is also presented, determined by the action of three oncoproteins which are the basis for disturbing of normal cell growth leading to neoplastic transformation and progression of malignant phenotype in neoplastic epithelial cells. On the ground of the results of most recent basic and clinical studies and newest confirmed hypotheses, cyclo-oxygenase 2, HER2/HER3 heterodimer, and auto/intracrine expression of heregulins (HRG) have been determined as the cooperating and mutually regulating oncoproteins, causing the most malignant tumours – epithelial neoplasms with HER2 gene amplification and/or overexpression.

Key word: HER/ErbB receptors, cyclooxygenase 2 (COX2), malignant transformation



Ryc. 2. Rodzina transmembranowych receptorów czynników wzrostu z aktywnością kinazy tyrozynowej

zy tyrozynowej (RTKs) szczególne zainteresowanie klinicystów wzbudziła rodzina HER/ErbB tych receptorów, w związku z faktem, że ich nadekspresja pojawia się często w szeregu nowotworów złośliwych pochodzenia nabłonkowego u ludzi i wiąże się ze szczególnie złą prognozą [2-6].

TRANSDUKCJA SYGNAŁÓW BIOLOGICZNYCH SZLAKIEM RECEPTORÓW HER W PRAWIDŁOWYM NABŁONKU

Rodzina przezbłonowych receptorów czynników wzrostu z aktywnością kinazy tyrozynowej RTKs/HER/ErbB składa się z:

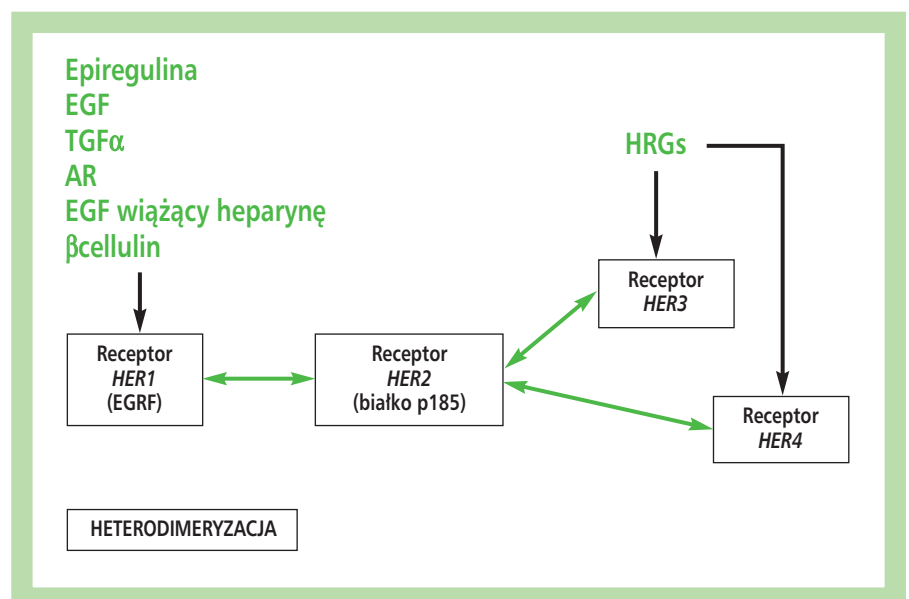
- ▶ receptora naskórkowego czynnika wzrostu EGFR (HER1),
- ▶ receptora HER2 (białko p185),
- ▶ receptorów HER3 i HER4 (ryc. 2.).

Te cztery receptory występują powszechnie, w różnym stopniu koekspresji, w komórkach prawidłowego dojrzałego nabłonka, a także biorą udział w rozwoju i progresji pewnych typów nowotworów [7]. Zewnątrzkomórkowe sygnały biegnące szlakiem receptorów HER mogą mieć charakter mitogenny lub kierujący komórkę do różnicowania. Mogą też decydować

o utrzymaniu komórki na etapie określonego stanu czynnościowego przez czas oddziaływania na tę komórkę innych sygnałów regulacyjnych, np. wykazano wzrost receptorów HER2(białko p185) w gruczole mlekowym szczurów podczas laktacji. Uważa się, że wzrost sygnalizacji tym szlakiem jest wynikiem regulacji ekspresji receptora HER2 przez hormony sterydowe, w wyniku czego komórka posiada zdolność utrzymania zróżnicowanego fenotypu [7, 8, 9].

W związku z możliwością intensywnego oddziaływania typu receptor-receptor w heterodimerze, rodzina receptorów HER tworzy sieć sygnalizacyjną, której siła różnicowania informacji biologicznej jest ogromna. Można wyróżnić trzy poziomy odbioru sygnalizacji za pomocą tych receptorów [9, 10]:

- ▶ pierwszy wiąże się z dwiema grupami ligandów (ryc. 3):
 - jedną grupą typu EGF obejmującą EGF, TGF alfa, amphiregulin (AR), EGF wiążący heparynę, betacellulin i epiregulin, kodowanych przez sześć różnych genów i wiążących się specyficznie tylko z receptorem HER1 (EGFR),
 - drugą grupą ligandów typu NDF (neu differentiation factors – nazwa stosowana u szczurów), czyli heregulinami



Ryc. 3. Proces tworzenia heterodimerów z receptorów rodziny HER

(HRG – nazwa i skrót stosowane u ludzi), specyficznymi wyłącznie dla receptorów *HER3* i *HER4*,

- drugi poziom różnicowania odbioru sygnalizacji szlakiem *HER*, wiąże się z tym, że każdy z ligandów ma różne zdolności do stabilizowania poszczególnych rodzajów dimerów receptorowych w związku z bivalentnością tych ligandów,
- trzeci poziom regulacji sygnału wiąże się z tym, że każdy typ receptorowego dimeru ma różny, podwójny zestaw tyrozynowych miejsc autofosforylacji, które są rozpoznawane specyficjnie przez różne cytoplazmatyczne białka z domeną SH2 (domena homologii z białkami Src), uczestniczące w przekaźnictwie wewnątrzkomórkowym i wiążące się z ufosforylowaną tyrozyną w części cytoplazmatycznej receptora.

Tak więc każdy typ receptorowego dimeru uruchamia sygnał biegnący innym szlakiem sygnalizacyjnym (jest przenoszony przez inne przekaźnikowe białka cytoplazmatyczne) i sygnały te mogą w znacznym stopniu różnić się od siebie tak siłą, jak i jakością przekazu [9, 10, 11]. Dodatkowo cały ten układ zależności ulega dalszej komplikacji w związku z istnieniem receptora, który zwiększa zdolność dimeryzacji i stabilizuje dimery, lecz sam nie przyłącza bezpośrednio żadnego ligandu (jest nim białko p185, czyli receptor *HER2*), oraz przez istnienie receptora, który może uruchamiać szczególnie intensywny szlak przekazywania sygnału mitogenowego przez specyficzne dla niego białka z domeną SH2, choć sam pozbawiony jest aktywności fosfokinazowej (jest to receptor *HER3*) [9, 10, 11].

Te opisywane cztery receptory rodziny *HER* ulegają ekspresji w niewielkim i różnicowanym stopniu w prawidłowych komórkach organizmu dorosłego, zaś onkogenna aktywacja receptorów *HER*, polegająca na amplifikacji i/lub nadekspresji kodujących je genów, zaburza prawidłowy wzrost komórek, prowadząc do indukowania transformacji nowotworowej oraz wywołuje dalsze zaburzenia wzrostu komórek prowadzące do progresji fenotypu złośliwego [7, 10].

Podobnie do innych allosterycznych systemów enzymatycznych, dimeryzacja białek *HER* (receptorów *HER*) prowadzi do pobudzenia aktywności enzymatycznej fosfokinazy stanowiącej integralną część receptora. Dimeryzacja ta nie ogranicza się do tworzenia homodimerów. Wykazano, że powszechnie dochodzi do tworzenia heterodimerów zbudowanych z receptora *HER2* oraz któregoś z pozostałych receptorów obsadzonych właściwym ligandem (ryc. 3.), a więc np. EGFR obsadzonego którymś z swoich ligandów lub *HER3* czy *HER4*, obsadzonych którymś z ligandów typu HRG. Zatem można stwierdzić, że receptor *HER2* dimeryzuje ze wszystkimi receptorami rodziny *HER* [7, 9, 10]. Wykazano również, że istnieje dziewięć różnych homo- lub he-

terodimerów receptorów *HER*, a ich powstawanie wykazuje wyraźną hierarchię [9]. Okazuje się bowiem, że w tej sieci informacyjnej, utworzonej przez receptory rodziny *HER*, receptor *HER2* (białko p185) odgrywa centralną i koordynacyjną rolę, ponieważ wszystkie inne bezpośrednio związane z ligandem receptory *HER* mają największe powinowactwo do receptora *HER2* jako partnera w czasie tworzenia dimeru. To preferowanie receptora *HER2* przy tworzeniu dimerów jest oczywiście spotęgowane w przypadku nadprodukcji tego receptora w związku z jego onkogeną aktywnością, czyli z amplifikacją i/lub nadekspresją genu *HER2*, spotykaną w wielu typach ludzkich komórek nowotworowych.

Dwa powody decydują o tym, że heterodimery zawierające receptor *HER2* (białko p185) charakteryzują się bardzo dużą siłą sygnalizacji mitogennej, szczególnie w przypadku nadekspresji tego białka. Pierwszy związany jest ze zdolnością białka p185 (receptora *HER2*) do znacznego zmniejszania stopnia dysocjacji ligandu w receptorze, z którym dimeryzuje. Powoduje to, że sygnał idący od czynników wzrostu, będących ligandami dla receptorów współtworzących dimer z receptorem *HER2* jest przedłużony, a utworzony kompleks białkowy intensywnie pobudza proliferację [9, 10]. Drugim powodem jest zdolność receptora *HER2* do sprawnego przekazywania przez kinazy MAP (*mitogen activated protein kinases*) sygnałów dla genów kodujących czynniki transkrypcyjne AP1, c-myc i STAT, które z kolei oddziałują na ekspresję innych genów, uruchamiając złożony program genetyczny cyklu komórkowego [9, 10]. Wyżej omówione uwarunkowania sprawiają, że komórki nowotworowe, u których występuje nadprodukcja receptora *HER2* (białka p185), lepiej wykorzystują którykolwiek z ligandów receptorów rodziny *HER*, w porównaniu z innymi komórkami nowotworowymi.

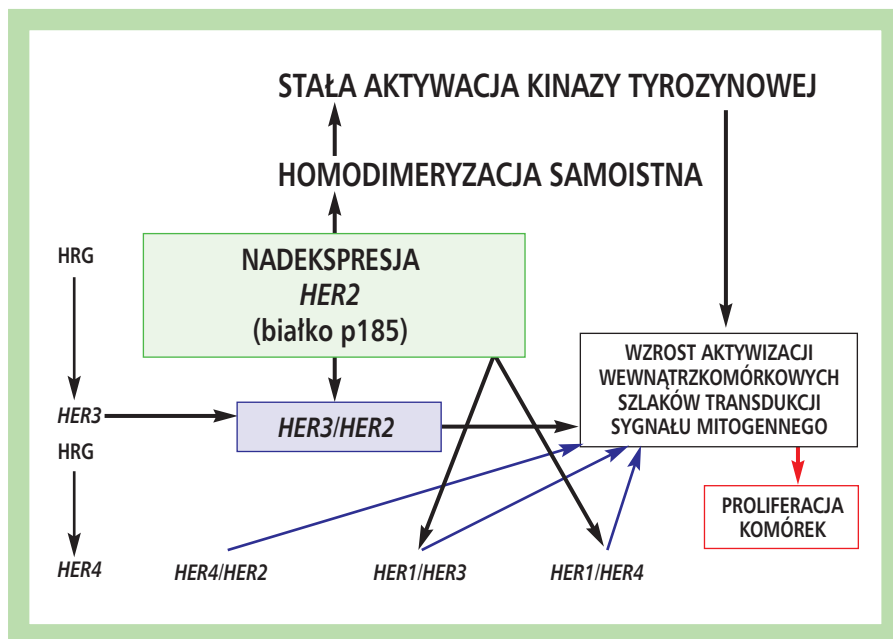
Wszystkie heterodimery mają znacznie większą aktywność biologiczną od homodimerów, których oddziaływanie jest względnie słabe. Wykazano, że konadekspresja receptorów *HER1* lub *HER2* z którymś z receptorów związanych z HRG, czyli receptorów *HER3* lub *HER4*, ma znacznie większy potencjał transformujący prawidłowe fibroblasty do komórek nowotworowych, aniżeli ulegający zwiększonej ekspresji pojedynczy receptor, tworzący w tej sytuacji głównie homodimery. Gradacja siły sygnałów mitogennych pochodzących od receptorów rodziny *HER* układa się od homodimerów *HER3* pozbawionych aktywności fosfokinazowej i nie wysyłających sygnałów w ogóle, po heterodimer *HER2/HER3* o największej sile sygnału pobudzającego proliferację. Utworzenie tego heterodimeru wymaga nie tylko ekspresji receptora *HER3*, ale również dostępności któregoś z HRGs jako ligandu dla tego receptora i ekspresji heterodimeryzującego receptora *HER2* [9, 12].

Pomimo że receptory rodziny *HER*, do przekazywania sygnałów do wnętrza komórki wykorzystują głównie szlak biegnący przez ki-

nazy ras – raf – MAP, to jednak typ dimeru decyduje o wyborze specyficznego zestawu poszczególnych wewnątrzkomórkowych białek sygnalizacyjnych, dzięki czemu każdy typ dimeru wysyła unikalny sygnał komórkowy [9]. Na bazie tych rozważań rodzi się jednak pytanie o rolę występowania tak licznych ligandów receptorów rodziny *HER* oraz o mechanizm, poprzez który związanie ligandu prowadzi do utworzenia dimeru z identycznych lub różnych receptorów. Badania ligandów z grupy HRGs wykazały, że wszystkie izoformy tej grupy ligandów niosą ze sobą zdolność do tworzenia heterodimerów *HER2* z *HER3* [9, 10]. Nowsze badania wykazują, że molekuly należące do ligandów z grupy HRGs mają dwa zupełnie różne miejsca, za pomocą których mogą wiązać się z receptorem *HER*. Jedno z tych miejsc (N końcowe) ma wysokie powinowactwo i specyficjnie wiąże się z receptorem *HER3* lub *HER4*, podczas gdy drugie z tych miejsc (C terminalne) ma niskie powinowactwo i stosunkowo szeroką receptorową selektywność [9, 10]. Ta bivalentność ligandów HRG sprzyja tworzeniu heterodimerów, zaś konkretny ligand ma skłonność do tworzenia określonego heterodimeru. Pośrednie dane wskazują na to, że ligandy specyficzne dla *HER1* (EGFR) również wykazują zdolność do tworzenia określonych heterodimerów [9]. Omówione cechy receptorów *HER* i ich ligandów określają ogromną różnorodność sygnałów biologicznych biegnących tym szlakiem oraz ogromną różnorodność wywołanych tymi sygnałami skutków tak w fizjologii, jak i po onkogennej aktywacji tych receptorów. Biorąc pod uwagę wiodącą rolę genu *HER2*, należy stwierdzić, że mechanizm wzbudzenia tych sygnałów jest jednak zupełnie odmienny w przypadku komórek z dzikim genem *HER2*, czyli jego formą natywną (formą, która posiada prawidłowe dwa allele) oraz w przypadku komórek nowotworowych, wykazujących amplifikację i/lub nadekspresję tego genu, kiedy ilość kopii tego genu jest znacznie zwielokrotniona, a poziom kodowanego białka p185 bardzo wysoki. W przypadku komórek z prawidłowym genem *HER2*, sygnały wzbudzone szlakami sieci *HER* zależą od puli dostępnych czynników wzrostu lub stopnia ich wyczerpania, które w ten sposób determinują określone sygnały, wyznaczające konkretną ilość podziałów komórkowych, po których komórki ulegają końcowemu różnicowaniu [11].

UDZIAŁ SZLAKÓW SYGNALIZACYJNYCH RECEPTORÓW *HER* W KANCEROGENEZIE LUDZKIEGO NABŁONKA

Wielokierunkowe oddziaływanie receptora *HER2* (białko p185) z innymi receptorami rodziny *HER*, jest szczególnie interesujące w złośliwych nowotworach pochodzenia nabłonkowego u ludzi. W nowotworach tych białko p185 (receptor *HER2*) wykazuje od 3 do 100 razy wyższy poziom, aniżeli w sąsiadującej zdrowej tkance. Ponieważ dyfuzja tego receptora w błonie komórkowej jest jedynie dwukierunkowa, wzrost zagęszczenia



Ryc. 4. Geneza molekularna nadekspresji receptora HER2

receptorów w błonie komórek nowotworowych jest znacznie wyższy. Przyjmuje się, że na poziomie molekularnym, nadekspresja białka HER2 (p185) powoduje aktywację tego receptora i pojawienie się potencjału transformującego przez co najmniej dwa różne mechanizmy (ryc. 4): duża ilość molekuł p185 w błonie komórkowej może prowadzić do, niezależnej od ligandu zewnętrznego (bez jego udziału lub obecności), homodimeryzacji wywołującej stałą aktywację kinazy tyrozynowej, stanowiącej wewnątrzkomórkową domenę receptora p185, która w zaistniałej sytuacji jest odpowiedzialna za ciągłe aktywowanie wewnątrzkomórkowych szlaków transdukcji sygnału mitogenne. Sprowadza się to do ciągłego nadawania fałszywych sygnałów mitogennych [9, 10], które prowadzą do podziałów komórkowych, znacząco zwiększając proliferację takich komórek.

Mechanizmem dużo bardziej skutecznym w pobudzaniu proliferacji komórkowej jest możliwość konstytucjonalnej transaktywacji fosfokinazy tyrozynowej receptora HER2 (białko p185), poprzez aktywizację tego receptora w wyniku utworzenia przez niego heterodimeru z innym receptorem z rodziny HER, który obsadzony jest silnie stymulującym ligandem [7, 9, 10]. Np. HRG może konstytucjonalnie aktywować receptor HER2, jeżeli obsadzone tym czynnikiem wzrostu receptory HER3 lub HER4 utworzą odpowiednie heterodimery; HER2/HER3 i HER2/HER4. W heterodimerach tych pobudzony receptor HER2 zapewne gwałtownie wzmaga aktywność kinazy tyrozynowej dimeryzujących z nim partnerów, bowiem wcześniej wykazano [9, 10, 12], że transaktywacja kinazy tyrozynowej receptorów HER3 i HER4 wymaga obecności receptorów HER1 lub HER2 [9, 10, 12]. Utworzone w ten sposób heterodimery HER2/HER3 lub HER2/HER4, ale również HER1/HER3 i HER1/HER4, przy równoczesnej nadekspresji białka p185 w komórce, wykazują bardzo silne właściwości do nadawania ciągłych, nie-

zależnych od sygnałów zewnętrznych, wewnątrzkomórkowych sygnałów mitogennych i są intensywnie działającymi onkoproteinami w zaburzeniach wzrostu komórek nowotworowych i narastania w nich zdolności do przerzutowania. W procesach tych szczególną rolę odgrywa heterodimer HER2/HER3 ze względu na powszechną w nowotworach złośliwych pochodzenia nabłonkowego nadekspresję obydwu tych receptorów oraz ze względu na to, że receptor HER3 ma największe powinowactwo do receptora HER2 i powstaje najłatwiej w komórce, przede wszystkim jednak ze względu na fakt, że jest on najsilniejszym mitogenem wśród heterodimerów receptorów rodziny HER [7, 9, 10, 12].

Znaczenie receptorów HER2 i HER3 jest stosunkowo dobrze wykazane w raku piersi między innymi w związku z tym, że obydwa geny kodujące te receptory są estrogenozależne [8]. Warto w tym miejscu przypomnieć, że w prawidłowym nabłonku gruczołu piersiowego oraz w ok. 90 proc. raka piersi u ludzi dochodzi do ekspresji genu HER3, a nadekspresja genu HER2 pojawia się w ok. 40 proc. pierwotnych raków piersi, wobec tego wszystko wskazuje na to, że w przypadkach tych najprawdopodobniej dochodzi do tworzenia heterodimerów HER2/HER3 [9, 10, 13].

W ostatnich latach badania nad kancerogenezą w obrębie przewodu pokarmowego również koncentrowały się w dużej mierze na obserwacji nadekspresji transmembranowych receptorów czynników wzrostu z rodziny HER. Badania tych receptorów były również prowadzone już w latach wcześniejszych. W 1991 r. Ciardiello wykazał występowanie ekspresji genu HER3 w 55 proc. pierwotnych i przerzutowych raków okrężnicy w porównaniu z ekspresją tego genu dającego się zidentyfikować jedynie w 22 proc. w prawidłowej błonie śluzowej. Ostatnie lata przyniosły dowody na to, że oprócz immunohistochemicznego wybar-

wiania receptora HER2 w nowotworowych guzach przewodu pokarmowego, można również uzyskać w nich intensywną reakcję z receptorem HER3 [14]. W 1997 r. Kapitanić wykazała, że gen HER2 ulega powszechnie nadekspresji w rakach okrężnicy w porównaniu z sąsiadującą z nimi prawidłową błoną śluzową, a intensywność nadekspresji koreluje ze stopniem zaawansowania choroby i przeżyciem pacjenta [4].

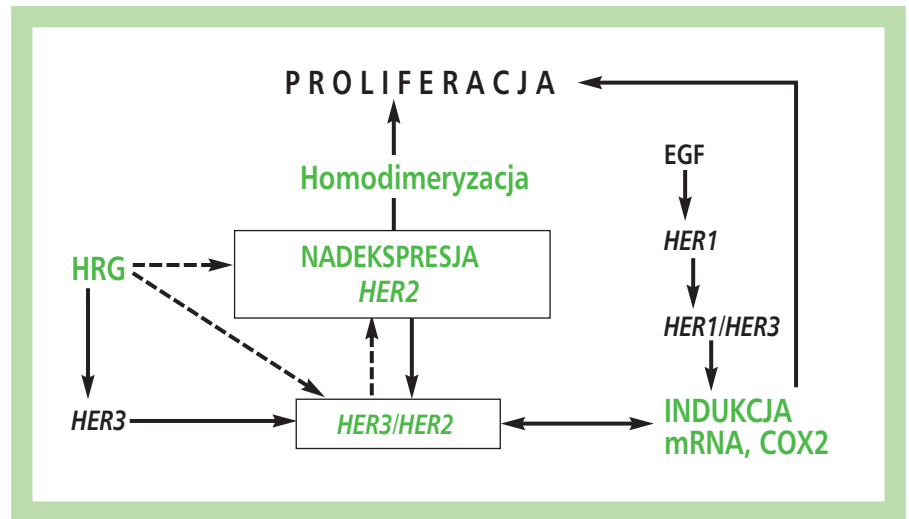
Uwagę badaczy z wielu ośrodków na świecie przykuwa od paru lat nowy problem związany ze sposobem działania i pobudzania heterodimeru HER2/HER3 w nowotworach nabłonkowych. Chodzi o fakt, że autokryna stymulacja receptorów HER3 i HER4 któryś z ligandów HRG może odgrywać zasadniczą rolę we wzroście ludzkich nowotworów nabłonkowych.

Hereguliny (HRGs) stanowią podrodzinę neuregulin, peptydów o charakterze czynników wzrostu, które pierwotnie wyizolowano z komórkowych linii raka piersi. Zidentyfikowano ponad piętnaście izoform HRGs, które pochodzą z alternatywnego splicingu jednego genu kodującego neureguliny [9, 10]. W komórkach nowotworów nabłonkowych u ludzi peptydy HRGs wiążą się specyficznie z receptorem HER3 i HER4 jako ligandy, prowadząc do aktywacji tych receptorów i ich spontanicznej, preferowanej heterodimeryzacji z receptorem HER2 (białkiem p185). Powstający heterodimer HER2/HER3 lub HER2/HER4 będący wysoce agresywną onkoproteiną, wysyła intensywną sygnalizację mitogenną, niezależną od sygnałów wewnątrzkomórkowych i gwałtownie pobudza proliferację takich komórek nowotworowych, jednak z siłą zróżnicowaną w zależności od izoform HRG. Autokryna produkta czynników wzrostu HRG wydaje się odgrywać niesłychanie ważną rolę we wzroście nowotworów u ludzi, gdyż jak wskazują na to wyniki najnowszych prac, jest to główny mechanizm prowadzący do powstania jednej z najagresywniejszych onkoprotein jaką jest heterodimer HER2/HER3 [10, 13, 14, 15, 16, 17].

Już od 1995 r., kiedy to opublikowano wyniki badań pierwotnego raka piersi wykazujące obecność szeregu czynników wzrostu w jego utkaniu, sugerowano, że mechanizm autokryny działania może odgrywać bezpośrednią rolę w patobiologii nowotworów. Kolejne lata przyniosły publikacje coraz wyraźniej potwierdzające te sugestie. Kilka z tych prac zasługuje na uwagę szczególną.

W 1996 r. ukazała się obszerna praca Mincione i wsp. [13], w której po raz pierwszy wykazano, że transformacja nowotworowa komórek nabłonkowych gruczołu piersiowego u ludzi, poprzez wywołanie w nich nadekspresji receptora HER2 (białko p185), prowadzi do nadekspresji w tych komórkach kilku izoform HRG. Autorzy uważają, że przynajmniej jedna z tych izoform może działać

w auto i/lub intrakryny sposób w regulacji wzrostu tych komórek, działając pojedynczo lub w kombinacji z innymi, endogennie produkowanymi, peptydami o charakterze ligandów receptorów z rodziny HER. Z kolei pierwszym doniesieniem bezpośrednio już wykazującym, że izoforma HRGs włączana jest w autokryny mechanizm wzrostu nowotworowego komórek raka piersi u ludzi, jest praca Schaefer'a i wsp. zamieszczona w *Oncogene* w 1997 r. [17]. Autorzy ci z komórek linii ludzkiego raka piersi MDA-MB-175, w której występuje ekspresja receptora HER2 i HER3, sklonowali nową izofর্মę HRG – gamma heregulinę (gamma HRG). Ekspresja gamma HRG, występująca łącznie z ekspresją potrzebnych do jej działania receptorów HER2 i HER3 sugeruje, że wzrost linii komórek MDA-MB-175 może być wynikiem autokryny stymulacji szlaku sygnalizacyjnego dla tego czynnika wzrostu. W pracy tej wykazano również, że w przypadku badanych komórek, do utrzymania ich pobudzonego wzrostu nie wystarcza ekspresja gamma HRG i receptora HER3, lecz pobudzenie autokryny tego wzrostu bezwzględnie wymaga dodatkowo koekspresji receptora HER2, co potwierdza potrzebę utworzenia heterodimeru HER2/HER3 dla utrzymania dużego tempa wzrostu tych komórek. Świadczy to o tym, że obniżanie ekspresji receptora HER2 lub blokowanie jego funkcji jest korzystne w hamowaniu wzrostu ludzkich nowotworów, w których dochodzi do nadmiernej ekspresji któregośkolwiek z receptorów HER. I rzeczywiście, stosując w omawianej pracy monoklonalne przeciwciała anty ECD (*extracellular domain*) receptora HER2, które rozrywa asocjujący kompleks heterodimeru HER2/HER3, obsadzony gamma HRG jako ligandem, uzyskano silny hamujący wpływ na wzrost badanej linii komórkowej, co świadczy o tym, że gamma HRG jest bezpośrednio włączana w autokryny pobudzenie wzrostu komórek MDA-MB-175. Przyjmuje się, że w omawianej pracy po raz pierwszy zidentyfikowano aktywny autokryny system włączający HRG do stymulacji komórek nowotworowych. Najważniejszym jednak wynikiem uzyskanym w tej pracy i mającym ogromne znaczenie dla postępowania klinicznego jest wykazanie, że można neutralizować endogenne gamma heregulinę, stosując monoklonalne przeciwciała anty ECD HER2 i uzyskać znaczny efekt antyproliferacyjny. Inny ważny fakt uzyskany w tej pracy również wydaje się godny podkreślenia. Otóż, jak wiadomo z badań wcześniejszych, gamma HRG jest białkiem ulegającym ekspresji w neuronach i komórkach pochodzenia mezenchymalnego, ale w przeciwieństwie do innych HRGs nie występuje w nabłonkowych komórkach gruczołu piersiowego, wątroby czy jelita. Wobec tego uważa się, że pojawienie się tej izoformy w komórkach raka piersi linii MDA-MB-175, może być związane z transformacją nowotworową prawidłowych komórek nabłonkowych gruczołu piersiowego i albo być przyczyną tej transformacji, albo z niej wynikać.



Ryc. 5. Konstytucjonalna aktywacja ekspresji genu COX2 związana z autokryną aktywacją heterodimeru HER2/HER3 przez HRG

Jak już wspomniano, ostatnie lata przyniosły wiele danych na temat powszechnego występowania nadekspresji receptorów HER2 i HER3 w rakach okrężnicy. W tym czasie pojawiła się również narastająca ilość danych wykazujących, że kancerogeneza w obrębie okrężnicy regulowana jest dającą się gwałtownie indukować czynnikami wzrostu izofর্মą cyklooksygenazy (COX), enzymu odpowiedzialnego za przekształcanie kwasu arachidonowego do prostaglandyn (problem ten przedstawiono szerzej w artykule: „Heterodimer receptorów HER-2/HER-3 reguluje ekspresję cyklooksygenazy-2 w raku jelita grubego”. *Współczesna Onkologia* 1999; 6: 235-38). Ta forma COX produkowana przez gen wczesnego reagowania nazwana została COX2 w odróżnieniu od COX1 kodowanej przez gen cytohomeostacyjny (ang. *house-keeping gen*), którego ekspresja niezależnie od transformacji nowotworowej, pozostaje na względnie niskim i stałym poziomie. W procesie bardzo żmudnych badań genetycznych wykazano, że nadekspresja COX2 jest wczesnym i kluczowym zdarzeniem w kancerogenezie okrężnicy i pojawia się po mutacji drugiego allelu genu APC [18]. Wyniki wielu najnowszych prac wykazały i jak się wydaje, dziś nie ma już co do tego wątpliwości, że ekspresja COX2 jest niezbędna w ogóle dla procesu kancerogenezy komórek nabłonkowych. Świadczy o tym m.in. powszechna wysoka ekspresja COX2 w transformowanych komórkach, jak i różnych typach nowotworów, a także znany od wielu lat fakt, że nowotwory nabłonkowe produkują więcej prostaglandyn aniżeli prawidłowe tkanki, z których same się wywodzą.

Powszechność występowania nadekspresji receptorów HER2 i HER3 w raku jelita grubego oraz wysokiej ekspresji COX2 w przypadku tego nowotworu, stały się punktem wyjścia dla grupy amerykańskich badaczy, którzy postanowili sprawdzić czy wobec tego istnieje jakieś powiązanie pomiędzy endogenną ekspresją HRG lub szlakiem transdukcji sygnału mitogenowego, a ekspresją genu COX2 [14]. Wyniki tej niezwyklej pracy, w której od-

kryto doniosły dla nauki i kliniki fakt, że heterodimer HER2/HER3 reguluje ekspresję genu COX2, opublikowano w *Oncogene* w 1999 r. [14]. Autorzy tej pracy, Vadlamudi i wsp. prowadzili badania na ludzkich liniach komórkowych raka jelita grubego oraz w wycinkach z guzów pobranych od pacjentów. Najpierw wykazali oni, że linie komórkowe ludzkiego raka jelita grubego zawierają duże ilości receptora HER2 i HER3 oraz że receptory te występują w formie heterodimerów HER2/HER3. Autorzy ci wykazali dalej, że heterodimery te tworzą się pod nieobecność ligandu egzogenego i są konstytucjonalnie zaktywowane, czyli wysyłają fałszywe sygnały mitogenne do wnętrza komórki i dalej do DNA. Okazało się jednak, że te heterodimery HER2/HER3 tworzące się pod nieobecność ligandu zewnętrznego, dysponują odpowiednim ligandem produkowanym przez własną komórkę raka. Wykazano bowiem w badaniach wycinków pobranych z guzów od pacjentów, że opisywane dimery powstają jedynie w tych komórkach raka jelita grubego, które wykazują ekspresję i wydzielają białko 40 kDa, rozpoznawane immunologicznie jako HRG – czynnik wzrostu, który bardzo intensywnie aktywuje receptor HER2, jeżeli powstają heterodimery HER2/HER3. Jest to więc przypadek konstytucjonalnej transaktywacji receptora HER2 na drodze autokryny pobudzenia heterodimeru HER2/HER3. W pracy tej wykazano również, że jeżeli hamowano specyficznym przeciwciałem anty HER3 wiązanie ligandu przez receptor HER3, to uzyskiwano nie tylko obniżenie się poziomu heterodimeru HER2/HER3, ale zupełnie nieoczekiwanie stwierdzono redukcję ekspresji genu COX2. Z kolei w doświadczeniach na liniach komórkowych w tej samej pracy wykazano, że aktywacja heterodimeru HER2/HER3 przez podanie egzogenego HRG indukuje ekspresję mRNA COX2 oraz uwalnianie prostaglandyn do medium hodowlanego. W pracy tej wykazano ponadto, że te biologiczne pobudzenia wywołane podaniem HRG – ligandem receptorów HER3 i pobudzenie przez niego proliferacji komórkowej, można zablokować specyficznym inhibitorem białka COX2. Obserwacje te wykazu-

ją pośredniczenie szlaku działania białka COX2 w mitogennej odpowiedzi komórek raka jelita grubego w wyniku stymulowania ich przez HRG. Wydaje się, że może to być precedensem dla roli białka COX2 w aspekcie oddziaływania również innych peptydów wzrostowych, ponieważ wiadomo, np. że w komórkach raka okrężnicy można indukować wysokie poziomy białka COX2 i prostaglandyn przez takie czynniki wzrostu jak EGF i TGF alfa [14]. Wskazuje to ponadto na udział w tym procesie również heterodimeru *HER1/HER3*.

Głównym wnioskiem z omawianej pracy Vadlamudi i wsp. jest stwierdzenie, że w komórkach ludzkiego raka jelita grubego dochodzi do konstytucjonalnej aktywacji ekspresji genu *COX2* w związku z autokrynną aktywacją heterodimeru *HER2/HER3* przez HRG (ryc. 5.). Tak więc w pracy tej nie tylko po raz kolejny wykazano powszechne występowanie nadekspresji receptorów *HER2* i *HER3* w komórkach nabłonkowych raka jelita grubego i ich egzystencję w postaci heterodimeru *HER2/HER3*, ale uzyskano w niej również dalsze potwierdzenie stosunkowo nowej hipotezy, że tworzenie tych heterodimerów wymaga autokrynnego i/lub intrakrynnego produkcji HRG. Zupełnie odkrywczym elementem tej pracy jest wykazanie, że monoklonalne przeciwciała anty *HER3*, które podobnie jak odpowiednie przeciwciała anty *HER2*, prowadzi do rozbitcia heterodimeryzującego kompleksu *HER2/HER3*, a przede wszystkim wywołuje zmniejszenie ekspresji genu *COX2*. Równie odkrywcze w tej pracy jest wykazanie, że specyficzne inhibitory białka COX2 blokują powstawanie aktywnego heterodimeru *HER2/HER3*. Wyniki uzyskane w tej pracy pokazują z jednej strony nowy dodatkowy aspekt wysokiej skuteczności stosowanej w leczeniu nowotworów nabłonkowych z amplifikacją genu *HER2* strategii REC (receptor *enhancement chemosensitivity*), polegający na możliwości hamowania ekspresji genu *COX2* przez Herceptynę (o czym do niedawna nie wiadomo), z drugiej zaś strony pokazują możliwość wzbogacenia tej strategii przez wprowadzenie do niej dodatkowo specyficznych inhibitorów białka COX2.

PIŚMIENNICTWO

1. 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.
2. Kern JA, Schwartz DA, Norberg JE, et al. *p185 neu expression in human lung adenocarcinomas predicts shortened survival*. Cancer Res 1990; 50: 5184-91.
3. Berchuk A, Kamel A, Whitaker R, et al. *Overexpression of HER-2/neu is associated with poor survival in advanced epithelial ovarian cancer*. Cancer Res 1990; 50: 4087-91.
4. Kapitanović S, Radosević M, et al. *The expression of p185 HER-2/neu correlates with stage of disease and survival in colorectal cancer*. Gastroenterol 1997; 112: 1103-13.
5. Borg A, Tandon AK, Sigurgson H, et al. *HER-2/neu amplification predicts poor survival in node-positive breast cancer*. Cancer Res 1990; 50: 4332-7.
6. Gusterson B, Gelber R, Goldhirsch A, et al. *Prognostic importance of c-erb B2 expression in breast cancer*. J Clin Oncol 1992; 10: 1049-56.

7. Hynes NE, Stern DF. *The biology of erb B-2 (neu) HER-2 and its role in cancer*. Bioch Bioph Acta 1994; 1198: 165-184.
8. Bates NP, Hurst HC. *An intron 1 enhancer element mediates oestrogen - induced suppression of ERB B2 expression*. Oncogene 1997; 15: 473-81.
9. Alroy I, Yarden Y. *The Erb B signaling network in embryogenesis: signal diversification through combination ligand-receptor interaction*. FEBS Lett 1997; 410: 83-6.
10. Amundadottir LT, Leder P. *Signal transduction pathways activated and required for mammary carcinogenesis in response to specific oncogenes*. Oncogene 1998; 16: 737-46.
11. Węgleński P. *Genetyka molekularna*. Wyd Nauk PWN Warszawa 1996.
12. 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.
13. Mincione G, Bianco C, Kannan S, et al. *Enhanced expression of heregulin in c-erb B-2 and c-Ha-ras transformed mouse and human mammary epithelial cells*. J Cell Biochem 1996; 60: 437-46.
14. Vadlamudi R, Mandal M, Adam L, et al. *Regulation of cyclooxygenase-2 pathway by HER2 receptor*. Oncogene 1999; 18: 305-14.
15. Pinkas-Kramarski R, Shelly M, Glathe S, et al. *Neu differentiation factor/neuregulin isoforms activate distinct receptor combination*. J Biol Chem 1996; 271: 19029-32.
16. Karunagaran 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: 254-64.
17. Schaefer G, Fitzpatrick DV, Sliwkowski 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.
18. Oshima M, Dinchuk JE, Kargman SL, et al. *Suppression of intestinal polyposis in Apc Knockout mice by inhibition of cyclooxygenase 2 (COX-2)*. Cell 1996; 87: 803-9.

ADRES DO KORESPONDENCJI

dr hab. n. med. **Wojciech Kozłowski**
Zakład Patomorfologii Klinicznej
Centralnego Szpitala Klinicznego
Wojskowej Akademii Medycznej
ul. Szaserów 128
00-909 Warszawa