

Omówiono publikacje z końca 1996 r. wykazujące, że gen kodujący cyklooksygenazę COX-2 (odpowiedzialną za przekształcanie kwasu arachidonowego do prostaglandyn) ulega wysokiej nadekspresji jako wczesne i centralne zdarzenie w karcinogenezie okrężnicy i pojawia się wkrótce po mutacji drugiego allelu genu APC. Wskazano publikacje świadczące o tym, że wysoka ekspresja COX-2 jest powszechna w nowotworach nabłonkowych. Omówiono również ważne odkrycie zaprezentowane w bieżącym roku, świadczące o tym, że gen HER-2 aktywuje ekspresję genu COX-2 w komórkach raka jelita grubego, co wzmacnia proliferację komórek i podnosi ich potencjał przerzutowania.

**Słowa kluczowe:** cyklooksygenaza (COX-2), HER-2, karcinogeneza jelita grubego

*Publications from the end of 1996 are discussed. They demonstrate that the gene encoding COX-2 cyclooxygenase (responsible for transformation of arachidonic acid to prostaglandins) undergoes high overexpression as early and central event of carcinogenesis in the colon and appears shortly after mutation of the second allele of the APC gene. The data points out that high COX-2 overexpression is common in epithelial neoplasms. Another recent important finding is also discussed. It demonstrates that the HER-2 gene activates COX-2 gene expression in large bowel cancer cells which enhances proliferation of the cells and increases their metastatic potential.*

**Key words:** cyclooxygenase (COX-2), HER-2, carcinogenesis in the colon

# Heterodimer receptorów HER-2/HER-3 reguluje ekspresję cyklooksygenazy-2 w raku jelita grubego

*Heterodimer of the HER-2/HER-3 receptors is the regulator of the cyclooxygenase-2 expression in colorectal cancer*

Wojciech Kozłowski, Ewa Szacikowska

Zakład Patomorfologii Klinicznej Centralnego Szpitala Klinicznego Wojskowej Akademii Medycznej w Warszawie

Od wielu lat wiadomo, że nowotwory pochodzenia nabłonkowego produkują więcej prostaglandyn aniżeli prawidłowe tkanki, z których te nowotwory się wywodzą [1-4]. Przykładem tego zjawiska może być rak piersi, płuc, głowy i szyi, okrężnicy lub trzustki występujące u ludzi, a także gruczolaki u myszy, będących nosicielkami mutacji genu polipowatości gruczolakowatej jelita grubego (ang. *adenomatous polyposis coli* – APC) [1-5].

Obecnie, coraz to nowe dane wykazują, że karcinogeneza w jelicie grubym jest regulowana przez izoformę cyklooksygenazy, enzymu odpowiedzialnego za metabolizm kwasu arachidonowego do prostaglandyn [5-8].

Prostaglandyny (PG) są jednym z końcowych produktów metabolizmu kwasu arachidonowego i odgrywają rozliczne funkcje w fizjologii przewodu pokarmowego. Biorą one udział również w procesach patologicznych, w tym także w nowotworzeniu [9, 10].

W 1996 r. wykazano, że enzym cyklooksygenaza (COX) występuje w dwu izoformach, produkowanych przez dwa różne geny [9]. Cyklooksygenaza 1 (COX-1) jest produkowana przez gen cytohomeostatyczny (ang. *housekeeping gen*) i wykazuje stałą, niski poziom ekspresji w komórkach. Natomiast cyklooksygenaza 2 (COX-2) jest produkowana przez gen wczesnego reagowania, który podobnie jak c-jun i c-fos może być gwałtownie indukowany przez czynniki wzrostu, kancerogeny lub onkoproteiny (produkty zaktywowanych onkogenów) [9].

Dziś zebrano już wiele danych na to, że ekspresja COX-2 jest niezbędna w przemianie nowotworowej komórek nabłonkowych. Świadczy o tym między innymi powszechna obecność, wysokiej ekspresji COX-2 w transformowanych komór-

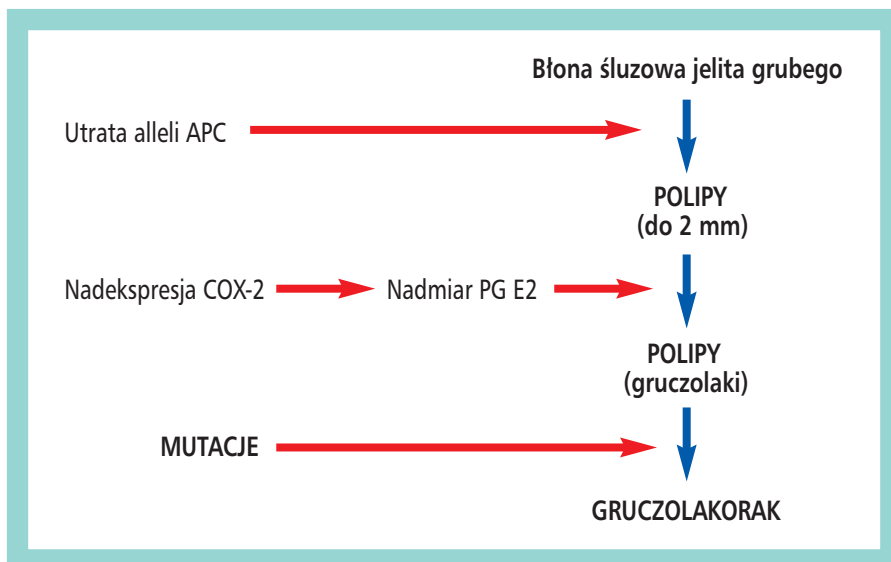
kach [11] i w różnych typach nowotworów [7, 8, 12, 13, 14], podczas gdy poziomy COX-1 w tych razach pozostają względnie niskie i stałe [9].

Przekonywującym dowodem na wyżej opisane zależności jest wzrost poziomów cyklooksygenazy i prostaglandyn w gruczolakorakach okrężnicy w stosunku do ich zawartości w sąsiadującej prawidłowej błonie śluzowej [6, 7, 8, 10].

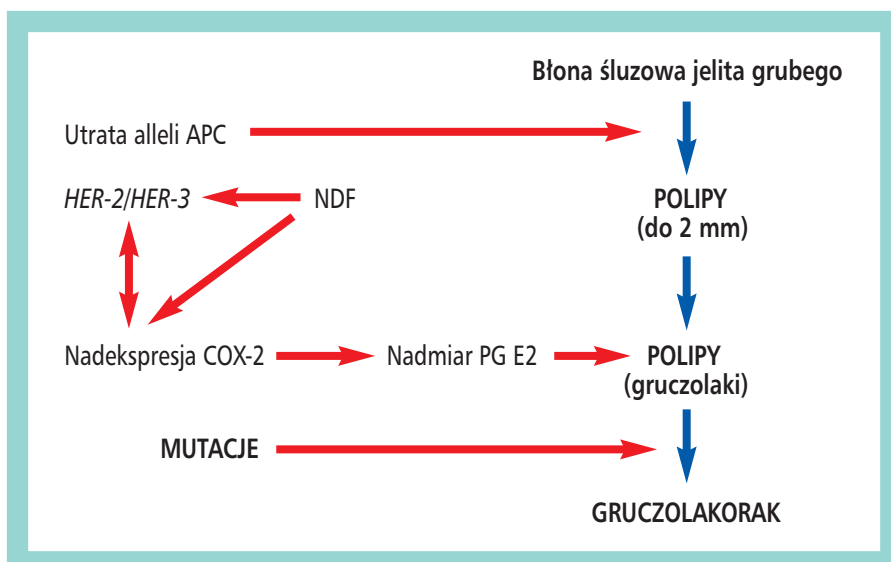
W badaniach genetycznych wykazano, że nadekspresja COX-2 jest wczesnym i centralnym zdarzeniem w karcinogenezie okrężnicy i pojawia się po mutacji drugiego allelu genu APC [5]. Przyjmuje się, że kolejność wydarzeń w nowotworzeniu w tym odcinku przewodu pokarmowego jest następująca: utrata obydwu alleli APC, wczesne tworzenie polipów (polipy poniżej 2 mm nie wykazują ekspresji COX-2 ani inicjacji procesu nowotworowego), ekspresja COX-2, wzrost polipów i/lub tworzenie gruczolaków, natomiast dalsze mutacje temu nowotworowi pozwalają osiągnąć stan inwazyjności [5] (ryc. 1.).

Gruczolakowa polipowatość rodzinna – FAP (ang. *familial adenomatous polyposis*) jest zespołem chorobowym dziedziczącym się jako mendelowska cecha autosomalna. Jest ona również podłożem dla nowotworzenia w obrębie okrężnicy. Dziedziczna utrata heterozygotyczności (LOH) w obrębie genów APC została uznana za bezpośrednią przyczynę tego zespołu [15]. Badania nad wpływem tej mutacji na powstanie raka w obrębie okrężnicy zostały przyspieszone dzięki badaniom ludzkiej gruczolakowatej polipowatości rodzinnej, na modelu doświadczalnym z *Min mouse*, myszy będącej nosicielką mutacji genu APC, u której występuje podobny do ludzkiego zespół polipowatości.

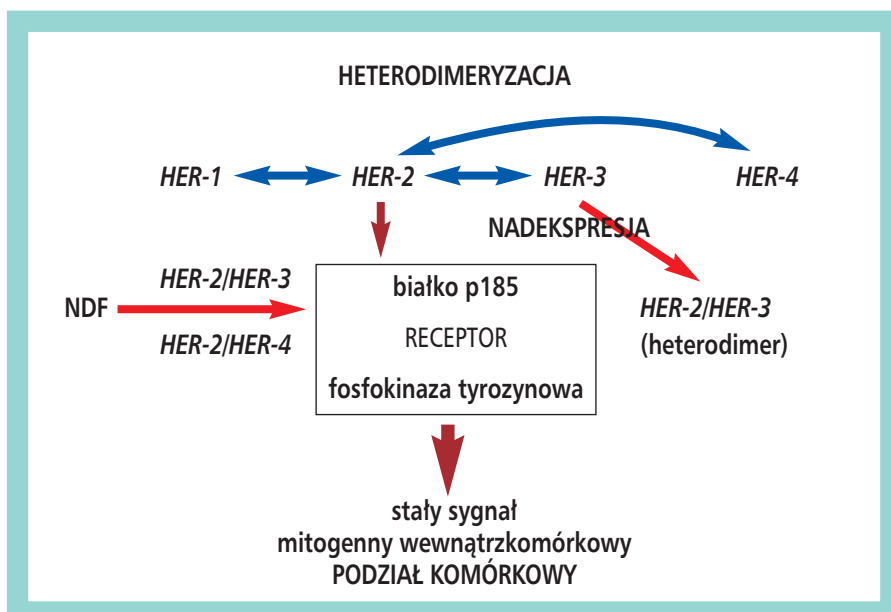
W 1996 r. opublikowano wyniki badań



Ryc. 1. Udział COX-2 w kancerogenezie gruczolakoraka jelita grubego



Ryc. 2. Współdziałanie receptorów HER-2 i HER-3 z COX-2 w kancerogenezie gruczolakoraka jelita grubego



Ryc. 3. Wewnątrzkomórkowe szlaki transdukcji sygnału mitogennego na receptory rodziny HER

przeprowadzonych na tym właśnie modelu, które dostarczyły istotnych dowodów na rolę COX-2 w procesie nowotworzenia w okrężnicy [16]. Badania zostały przeprowadzone przez dwa ośrodki japońskie we współpracy z ośrodkiem kanadyjskim. Myszy z mutacją genu APC krzyżowano z myszami, które były podwójnymi mutantami, tzn. oprócz mutacji genu APC miały wprowadzoną mutację genu kodującego COX-2. Badano następnie ich potomstwo i okazało się, że u osobników homozygotycznych pod względem dzikiego typu genu COX-2 znaleziono średnio 652 polipy jelita grubego, podczas gdy osobniki heterozygotyczne posiadały 224 polipy, a homozygotyczne (ze względu na zniszczenie obydwu alleli genu COX-2) jedynie 93 polipy. Jak należy wnosić, ten wynik można uznać za definitywny, genetyczny dowód na to, że COX-2 odgrywa wiodącą rolę we wczesnym etapie rozwoju gruczolaka jelita grubego.

Autorzy pracy również zbadali czy można zastąpić uszkodzenie genu kodującego COX-2 przez podanie środka farmakologicznego, hamującego enzym COX-2. W tym celu użyto MF tricyclic-nowoczesnego, selektywnego inhibitora COX-2 oraz nieselektywnego inhibitora Sulindac'u hamującego zarówno COX-1, jak i COX-2. U kontrolnych myszy przebywających na diecie pozbawionej leków w wieku ośmiu tygodni stwierdzono 424 polipy w jelicie grubym. Natomiast po podaniu dwu różnych dawek MF tricyclic dwóm grupom myszy, obserwowano rozrost w postaci 161 polipów po większej dawce i 210 po czterokrotnie niższej dawce.

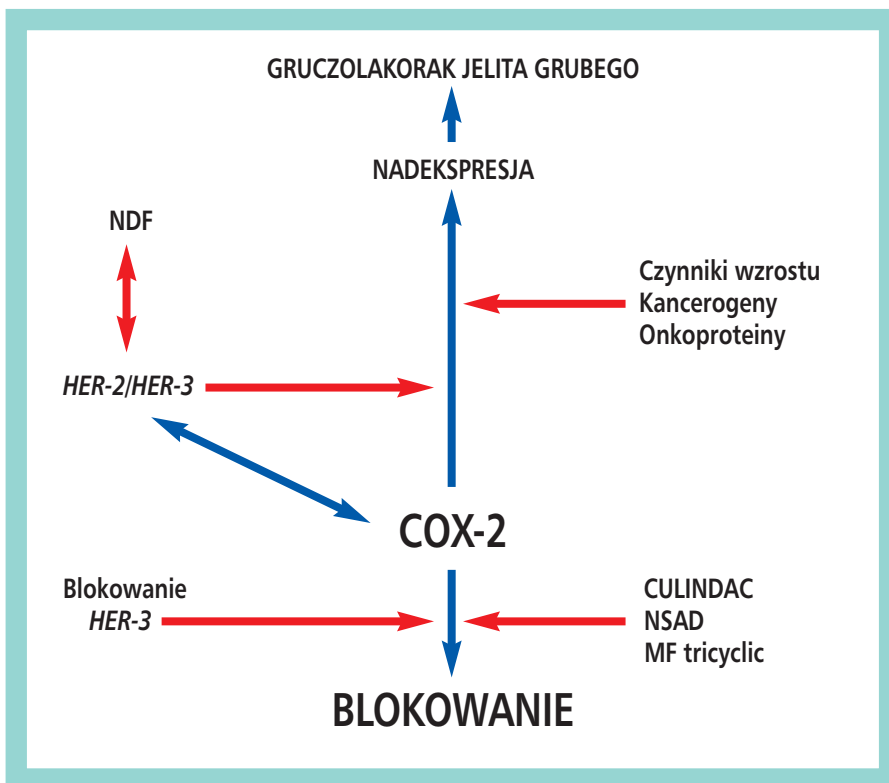
U myszy otrzymujących Sulindac znaleziono średnio 312 polipów. Tak więc w przypadku stosowania inhibitora swoistego otrzymano statystycznie znaczniejsze zmniejszenie liczby polipów, wynoszące 62 proc. i 50 proc. odpowiednio dla dwu stosowanych dawek, wobec nieznamiennego statystycznie zmniejszenia liczby polipów po podaniu Sulindac'u, bo wynoszącego 26 proc.

Wyniki tych badań w pełni potwierdziły, przeprowadzone równocześnie w tej pracy badania genetyczne, co jest jeszcze jednym dowodem udziału COX-2 we wczesnej kancerogenezie jelita grubego.

Wyniki tej pracy wskazują również na to, że selektywne inhibitory COX-2 mogą być nową, skuteczną klasą leków stosowanych w polipowatości gruczolakowatej i gruczolakoraku jelita grubego.

W ostatnich latach, badania nad kancerogenezą w obrębie przewodu pokarmowego koncentrowały się z jednej strony na roli COX-2 we wczesnym nowotworzeniu, z drugiej zaś na ocenie stanu ekspresji transmembranowych receptorów czynników wzrostu z rodziny HER.

Należy w tym miejscu zaznaczyć, że badania receptorów z rodziny HER prowadzone były również w latach wcześniej-



Ryc. 4. Uwarunkowania wzajemnej relacji *HER* i *COX-2*

szych. Już w 1991 r. Ciardello wykazał występowanie ekspresji genu *HER-3* w 55 proc. pierwotnych i przerzutowych raków okrężnicy, podczas gdy w prawidłowej błonie śluzowej ekspresję tego genu notowano w 22 proc. przypadków. Ostatnie lata dostarczyły dowodów na to, że oprócz identyfikacji immunohistochemicznej receptora *HER-2* w nowotworach przewodu pokarmowego, tą samą metodą można również wykazać obecność receptora *HER-3*. W 1997 r. Kapitanović [17] wykazała nadekspresję genu *HER-2* w rakach okrężnicy przy jej braku w prawidłowej błonie śluzowej oraz to, że stopień nadekspresji koreluje zarówno ze stadiem choroby, jak i długością przeżycia pacjenta.

Dalsze intensywne badania receptorów *HER-2* i *HER-3* w raku okrężnicy w 1999 r., zupełnie nieoczekiwanie, doprowadziły do odkrycia, jak się wydaje, niezwykle doniosłego dla nauki i kliniki faktu, że obydwa te receptory współdziałają z *COX-2* i wzajemnie się regulują, stanowiąc o wysokim stopniu złośliwości guzów i warunkując ich wzmożoną proliferację oraz wysoki potencjał przerzutownia (ryc. 2.).

Regulowanie receptorów rodziny *HER* jest bardzo złożone. Mogą one być aktywowane na wiele różnych sposobów zależnych od ligandu (czynnika wzrostu, czyli mitogenu) [18]. Np. *neu differentiation factor* (NDF) może aktywować receptor *HER-2*, jeżeli powstają heterodimery receptorowe *HER-2/HER-3* i *HER-2/HER-4*. Transaktywacja kinazy tyrozynowej receptorów *HER-3* i *HER-4* wymaga obecności *HER-2* lub *HER-1*. Chociaż transformujący poten-

cjał zwiększonej ekspresji genu *HER-2* został wykazany ponad wszelką wątpliwość, to mechanizm tego zjawiska nadal jest niezrozumiały. Przyjmuje się, że konstytucjonalna aktywacja fosfokinazy tyrozynowej wchodzącej w skład struktury receptora *HER-2* (białka p185) i stanowiącej jego wewnątrzkomórkową domenę, odpowiedzialna jest za ciągłe aktywowanie wewnątrzkomórkowych szlaków transdukcji sygnału mitogenowego, niezależnie od faktycznych sygnałów przychodzących z zewnątrz komórki. Sprowadza się to do ciągłego nadawania fałszywych sygnałów mitogenowych wewnątrzkomórkowych, które jednak są skuteczne i prowadzą do podziałów komórkowych, czyli znacząco zwiększają proliferację komórek. Obecnie wiadomo, że istnieje możliwość działania mechanizmu alternatywnego, który również prowadzi do transaktywacji fosfokinazy tyrozynowej receptora *HER-2* (białka p185) poprzez pobudzenie tego receptora w wyniku utworzenia przez niego heterodimeru z innym receptorem z rodziny *HER*. Na szczególną uwagę zasługuje heterodimer *HER-2/HER-3*. Wykazano [18], że ma najsilniejsze działanie w nadawaniu wewnątrzkomórkowych sygnałów mitogenowych, i że w przypadku nadekspresji genu *HER-3* powstaje bardzo łatwo, gdyż receptor *HER-3* ma duże powinowactwo do receptora *HER-2* (ryc. 3.).

Znaczenie receptorów *HER-2* i *HER-3* zostało stosunkowo dobrze wykazane w raku piersi i dopiero ostatnio zwrócono uwagę na ich rolę w pobudzaniu wzrostu nowotworów jelita grubego.

Inną publikacją wartą szczególnego zainteresowania jest praca amerykańskich autorów opublikowana w *Oncogene* w 1999 r. i poświęcona regulowaniu ekspresji *COX-2* przez receptor *HER-2* w ludzkich liniach komórkowych raka jelita grubego oraz w wycinkach z guzów pobranych od pacjentów [6].

Punktem wyjścia w tej pracy były wcześniej publikowane dane na temat powszechnego występowania nadekspresji receptorów *HER-2* i *HER-3* w raku jelita grubego oraz wysokiej ekspresji *COX-2* w przypadku tego nowotworu. Narzucało się pytanie czy NDF lub szlaki transmisji sygnału mitogenowego, uruchamiane przez heterodimer *HER-2/HER-3*, mają jakiś wpływ na ekspresję *COX-2*. Właśnie uzyskanie odpowiedzi na to pytanie było celem omawianej pracy [6]. Autorzy wykazali, że linie komórkowe ludzkiego raka jelita grubego zawierają duże ilości receptora *HER-2* i *HER-3* oraz, że receptory te występują w formie heterodimerów *HER-2/HER-3*. Wykazali oni także, że heterodimery te tworzą się pod nieobecność ligandu egzogenego i są konstytucjonalnie zaktywowane, czyli wysyłają fałszywe sygnały mitogenowe do wnętrza komórki i dalej do DNA. Okazało się jednak, że heterodimery *HER-2/HER-3* tworzące się pod nieobecność ligandu zewnętrznego, dysponują odpowiednim ligandem produkowanym przez komórkę samego raka. Wykazano bowiem, że opisywane dimery powstają jedynie w tych komórkach raka jelita grubego, które wykazują ekspresję i wydzielają białko 40 kDa, rozpoznawane immunologicznie jako NDF heregulin, czyli *neu differentiation factor* – czynnik wzrostu, który może aktywować receptor *HER-2*, jeżeli powstają heterodimery *HER-2/HER-3*. Jest to więc przypadek konstytucjonalnej transaktywacji receptora *HER-2* na drodze autokrynnego pobudzenia heterodimeru *HER-2/HER-3*. W pracy tej wykazano również, że jeżeli hamowano swoistym przeciwciałem anty *HER-3* wiązanie ligandu przez receptor *HER-3*, to uzyskiwano nie tylko obniżenie się poziomu heterodimeru *HER-2/HER-3*, ale zupełnie nieoczekiwanie stwierdzono redukcję ekspresji *COX-2*. Z kolei w doświadczeniach na liniach komórkowych w tej samej pracy wykazano, że aktywacja heterodimeru *HER-2/HER-3* przez podanie egzogenego NDF indukuje ekspresję mRNA *COX-2* oraz uwalnianie prostaglandyn do medium hodowlanego. Te biologiczne pobudzenia wywołane podaniem NDF-ligandem receptorów *HER* i pobudzanie przez niego proliferacji komórkowej, można zablokować swoistym inhibitorem *COX-2*. Obserwacje te wyraźnie wskazują na pośredniczenie szlaku działania *COX-2* w mitogennej odpowiedzi komórek raka jelita grubego stymulowanych NDF (ryc. 4.).

Wydaje się, że może to poszerzać rolę *COX-2* w procesie nowotworzenia o po-

tencjalne możliwości oddziaływania również innych czynników wzrostu, ponieważ wiadomo, że np. w komórkach raka okrężnicy można indukować wysokie poziomy COX-2 i prostaglandyn przez takie czynniki wzrostu jak EGF i TGF- $\alpha$  [19].

Głównym wynikiem omawianej pracy amerykańskich autorów [6] jest udowodnienie, że w komórkach ludzkiego raka jelita grubego dochodzi do konstytucjonalnej aktywacji ekspresji COX-2, w związku z autokrynną aktywacją heterodimeru *HER-2/HER-3* przez NDF.

## DYSKUSJA

Analizując wyniki przedstawione powyżej pracy amerykańskich autorów [6], należałoby przedyskutować zaobserwowany przez nich fakt zmniejszenia ilości heterodimeru *HER-2/HER-3* oraz ekspresji COX-2 pod wpływem swoistego przeciwciała anty *HER-3*. Z przeprowadzonych na ogromną skalę, w wielu ośrodkach na świecie, badań nad amplifikacją genu *HER-2* w raku piersi wiadomo, że podawanie swoistego przeciwciała anty p185, zmniejsza ilość receptora *HER-2* (białka p185), będącego produktem tego genu, co prowadzi do zmniejszenia proliferacji komórek raka u pacjenta z nadprodukcją tego receptora. W związku z tym przeciwciała te znalazły zastosowanie w leczeniu raka piersi z amplifikacją genu *HER-2*, zwłaszcza w skojarzeniu z chemicznymi lekami przeciwnowotworowymi, takimi jak cisplatyna i antracykliny. Okazało się bowiem, że stosowane te przeciwciała uczulają komórki nowotworowe z nadprodukcją genu *HER-2* na leki chemiczne, które wobec tego przy leczeniu skojarzonym mogą być podawane w bardzo niskich dawkach. Ten sposób leczenia określany mianem strategii REC (*receptor enhancer chemosensitivity*) jest bardzo nowoczesnym i skutecznym sposobem leczenia raka piersi z amplifikacją genu *HER-2*. Nie wykazuje on toksyczności ogólnoustrojowej, gdyż oddziałuje swoiście jedynie na komórki z amplifikacją genu *HER-2*. Pod wszystkimi względami strategia REC góruje nad leczeniem według konwencjonalnych schematów leczenia chemicznego zarówno niskimi, jak i wysokimi dawkami i od pewnego czasu zaczyna być stosowana w nowoczesnych ośrodkach krajów zachodnich. Wydaje się, że ten dobrze sprawdzony i starannie opracowany, nowoczesny sposób leczenia (przedstawiony szczegółowo we *Współczesnej Onkologii* w artykule: *Podłoże chemooporności raka piersi z amplifikacją genu HER-2* – 1999 r. w druku) może teraz sprawdzić się również w leczeniu raka jelita grubego, gdzie stwierdzono zmniejszanie się ilości heterodimeru *HER-2/HER-3* pod wpływem swoistego przeciwciała anty *HER-3*. Wszystko wskazuje na to, że strategia REC może przynieść swoisty przełom w leczeniu wszystkich nowotworów nabłonkowych połączonych ze zwiększoną produkcją re-

ceptorów z rodziny *HER*. Ponieważ w dyskutowanej pracy amerykańskiej wykazano także, że swoiste inhibitory COX-2 niwelują biologiczne pobudzenia heterodimeru *HER-2/HER-3* przez NDF i prawdopodobnie inne czynniki wzrostu oddziałujące na receptory *HER-2*, należy oczekiwać, że możnaby strategię REC wzbogacić dołączeniem do przeciwciała i odpowiedniego leku chemicznego, swoistego inhibitora COX-2, gdyż jak wiadomo z przeglądu wielu publikacji, wysoka ekspresja COX-2 jest powszechna w nowotworach pochodzenia nabłonkowego. Wydaje się również, że immunohistochemiczna identyfikacja COX-2 w materiale biopsyjnym z jelita grubego może być dobrym markerem rozrostu nowotworowego i przednowotworowego, bowiem pojawienie się ekspresji białka COX-2 przesądza o nowotworzeniu, zaś brak COX-2 jest charakterystyczny dla zmian nienowotworowych.

## PIŚMIENNICTWO

- Bennett A, Charlier EM, McDonald, et al. *Prostaglandins and breast cancer*. Lancet 1997; 2:624-626
- Bennett A. *The production of prostanoids in human cancers, and their implications for tumor progression*. Prog Lipid Res 1986; 25:539-542.
- Jung TT, Berlinger NT, Juhn SK. *Prostaglandins in squamous cell carcinoma of the head and neck: a preliminary study*. Laryngoscope 1985; 95:307-312.
- Bennett A, Carroll MA, Stanford JF, et al. *Prostaglandins and human lung carcinomas*. Br J Cancer 1982; 46:888-893.
- Prescott SM, White RL. *Self-promotion? Intimate connections between APC and prostaglandin H synthase-2*. Cell 1996; 87:783-786.
- Vadlamudi R, Mondal M, Adam L, et al. *Regulation of cyclooxygenase-2 pathway by HER-2 receptor*. Oncogene 1999; 18:305-314.
- Eberhart CE, Coffey RY, Radhika A, et al. *Up-regulation of cyclooxygenase-2 gene expression in human colorectal adenomas and adenocarcinomas*. Gastroenterology 1994; 107:1183-1188.
- Ristimaki A, Honkanen N, Jankala H, et al. *Expression of cyclooxygenase-2 in human gastric carcinoma*. Cancer Res 1997; 57:1276-1280.
- Herschman HR. *Prostaglandin synthase 2*. Biochim Biophys Acta 1996; 1299:125-140.
- DuBois RN, Radhika A, Reddy BS, et al. *Increased cyclooxygenase-2 levels in carcinogen-induced rat colonic tumors*. Gastroenterol 1996; 110:1259-1262.
- Subbaramaiah K, Telang N, Ramonetti JT, et al. *Transcription of cyclooxygenase-2 is enhanced in transformed mammary epithelial cells*. Cancer Res 1996; 56:4424-4429.
- 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; 58:3761-3764.
- Tucker ON, Dannenberg AY, Yang EK, et al. *Cyclooxygenase-2 expression is up-regulated in human pancreatic cancer*. Cancer Res 1999; 59:987-990.
- 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; 59:991-994.
- Kinzler KW and Vogelstein. *Lessons from hereditary colorectal cancer*. Cell 1996; 87:159-170.
- Oshima M, Dinchuk J, Kargman SL, et al. *Suppression of intestinal polyposis in Apc Knockout mice by inhibition of Cyclooxygenase 2 (COX-2)*. Cell 1996; 87:803-809.

- Kapitanović S, Radošević S, Kapitanović Metal. *The expression of p185 HER2/neu correlates with stage of disease and survival in colorectal cancer*. Gastroenterol 1997; 112:1103-1113.
- Pinkas-Kramarski R, Soussan L, Waterman H, et al. *Diversification of neu differentiation factor and epidermal growth factor signaling by combinatorial receptor interactions*. The EMBO J 1996; 15:2452-2467.
- DuBois RN, Awad J, Morrow J, et al. *Regulation of eicosanoid production and mutagenesis in rat intestinal epithelial cells by transforming growth factor alpha and phorbol ester*. J Clin Invest 1994; 93:493-498.

## ADRES DO KORESPONDENCJI

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