

Biologia molekularna nowotworów w praktyce klinicznej

WYDANIE 4

Lauren Pecorino

REDAKCJA WYDANIA POLSKIEGO

Piotr Dzięgiel · Andrzej Marszałek

Biologia molekularna nowotworów w praktyce klinicznej

LAUREN PECORINO

WYDANIE 4

Redakcja wydania polskiego

Piotr Dziągiel

Andrzej Marszałek

Tytuł oryginału: *Molecular Biology of Cancer. Mechanisms, Targets, and Therapeutics*
Fourth edition
Oxford University Press
Autor: Lauren Pecorino, University of Greenwich

© Lauren Pecorino 2016,
First edition 2005, Second edition 2008, Third edition 2012

Molecular Biology of Cancer. Mechanisms, Targets, and Therapeutics was originally published in English in 2016. This translation is published by arrangement with Oxford University Press. Edra Urban & Partner is solely responsible for this translation from the original work and Oxford University Press shall have no liability for any errors, omissions or inaccuracies or ambiguities in such translation or for any losses caused by reliance thereon.

Niniejsza książka jest tłumaczeniem publikacji *Molecular Biology of Cancer. Mechanisms, Targets, and Therapeutics* wydanej w 2016 r. na podstawie umowy z Oxford University Press. Edra Urban & Partner jest wyłącznym właścicielem tłumaczenia oryginalnego Dzieła. Wydawnictwo Oxford University Press nie uczestniczyło w tłumaczeniu niniejszej publikacji z języka angielskiego na język polski i nie ponosi żadnej odpowiedzialności za jakiegokolwiek błędy, pominięcia, nieścisłości czy inne ewentualne wady wydania polskiego.

ISBN 978-0-19-871734-8

Wszelkie prawa zastrzeżone, szczególnie prawo do przedruku i tłumaczenia na inne języki. Żadna część tej książki nie może być w jakiegokolwiek formie publikowana bez uprzedniej pisemnej zgody Wydawnictwa.

Ze względu na stały postęp w naukach medycznych lub odmienne nieraz opinie na temat diagnozowania i leczenia, jak również możliwość wystąpienia błędu, prosimy, aby w trakcie podejmowania decyzji lekarskiej uważnie oceniać zamieszczone w książce informacje, szczególnie dotyczące podawania leków nowych lub rzadko stosowanych. Radzimy zapoznać się również z informacjami producenta leków, używanych narzędzi i sprzętu.

© Copyright for the Polish edition by Edra Urban & Partner, Wrocław 2018.

Redakcja naukowa wydania polskiego:
prof. dr hab. n. med. Piotr Dziegiel
prof. dr hab. n. med. Andrzej Marszałek

Tłumaczenie z języka angielskiego: Edyta Petters

Korekta merytoryczna: dr n. med. Christopher Kobierzycki

Prezes Zarządu: Giorgio Albonetti
Dyrektor wydawniczy: lek. med. Edyta Błażejewska
Redaktor tekstu: Elżbieta Kożuchowska
Redaktor prowadzący: Dorota Lis-Olszewska
Opracowanie skorowidza: Aleksandra Ozga

ISBN 978-83-65835-63-5

Edra Urban & Partner
ul. Kościuszki 29, 50-011 Wrocław
tel.: +48 71 726 38 35
biuro@edraurban.pl
www.edraurban.pl

Łamanie i przygotowanie do druku: Paweł Kazimierczyk
Druk i oprawa: LCL, Łódź

■ SZCZEGÓŁOWY SPIS TREŚCI

PRZEDMOWA	vi
PODZIĘKOWANIA	x
1 Wprowadzenie	1
1.1 Czym jest nowotwór?	2
1.2 Dowody wskazujące na to, że nowotwór jest chorobą genomu na poziomie komórkowym	5
1.3 Czynniki sprzyjające kancerogenezie u ludzi	11
1.4 Zasady konwencjonalnych terapii przeciwnowotworowych	15
1.5 Badania kliniczne	17
1.6 Znaczenie celów molekularnych w terapiach przeciwnowotworowych	18
2 Struktura i stabilność DNA: mutacje oraz ich naprawa	24
2.1 Dwie części struktury genu: region regulatorowy i region kodujący	25
2.2 Mutacje	26
2.3 Czynniki kancerogenne	29
2.4 Naprawa DNA i predyspozycje do powstawania nowotworów	42
⊙ Strategie terapeutyczne	46
2.5 Terapie konwencjonalne: chemioterapia i radioterapia	46
2.6 Strategie ukierunkowane na szlaki naprawy DNA	52
3 Regulacja ekspresji genów	56
3.1 Czynniki transkrypcyjne i regulacja transkrypcji	57
3.2 Struktura chromatyny	63
3.3 Epigenetyczna regulacja transkrypcji	65
3.4 Dowód na rolę epigenetyki w kancerogenezie	68
3.5 Długie, niekodujące RNA	71
3.6 MikroRNA (miRNA) i regulacja ekspresji mRNA	72
3.7 Telomery i telomeraza	73
⊙ Strategie terapeutyczne	77
3.8 Leki epigenomowe i histonomowe	77
3.9 Zastosowanie niekodujących RNA w diagnostyce	78
3.10 Inhibitory telomerazy	79
4 Onkogeny i przekazywanie sygnałów czynników wzrostu	83
4.1 Ważny paradygmat: przekazywanie sygnałów czynników wzrostu	84
4.2 Onkogeny	93
⊙ Strategie terapeutyczne	101
4.3 Kinazy jako cele terapeutyczne	101

5	Cykl komórkowy	114
5.1	Cykliny i kinazy cyklinozależne (cdk)	115
5.2	Mechanizmy regulacji cdk	118
5.3	Przejście przez punkt kontrolny G ₁	120
5.4	Punkt kontrolny G ₂	122
5.5	Punkt kontrolny mitozy	123
5.6	Cykl komórkowy a nowotwory	125
⊙	Strategie terapeutyczne	128
5.7	Inhibitory kinaz cyklinozależnych	128
5.8	Inne kinazy cyklu komórkowego stanowiące cel strategii przeciwnowotworowych	129
5.9	Inhibitory wrzeciona mitotycznego	130
6	Hamowanie wzrostu i geny supresorowe nowotworów	134
6.1	Definicje genów supresorowych nowotworów	135
6.2	Gen retinoblastoma	140
6.3	Mutacje w szlaku RB a nowotwory złośliwe	141
6.4	Szlak p53	141
6.5	Mutacje w szlaku p53 a nowotwory złośliwe	150
6.6	Oddziaływanie produktów białkowych wirusów DNA z RB i p53	152
⊙	Strategie terapeutyczne	154
6.7	Strategie ukierunkowane na szlak p53	154
7	Apoptoza	162
7.1	Mechanizmy molekularne apoptozy	164
7.2	Apoptoza a nowotwór	173
7.3	Apoptoza i chemioterapia	177
⊙	Strategie terapeutyczne	178
7.4	Leki proapoptotyczne	178
8	Nowotworowe komórki macierzyste oraz regulacja szlaków samoodnowy i różnicowania komórek (ze szczególnym uwzględnieniem raka jelita grubego i białaczek)	186
8.1	Nowotworowe komórki macierzyste	188
8.2	Regulacja różnicowania przez ekspresję genów	199
⊙	Strategie terapeutyczne	204
8.3	Inhibitory szlaku Wnt	206
8.4	Inhibitory szlaku Hh	207
8.5	Inhibitory białek PcG	208
8.6	Białaczka i terapie polegające na różnicowaniu komórek	209
9	Przerzuty nowotworowe	214
9.1	Jak rozprzestrzeniają się nowotwory?	215
9.2	Proces tworzenia przerzutów nowotworowych	216
9.3	Inwazja i przejście nabłonkowo-mezenchymalne	217

9.4	Inwazja naczyń	222
9.5	Transport	223
9.6	Wynacznienie	223
9.7	Tworzenie ogniska przerzutu (kolonizacja przerzutu)	225
☉	Strategie terapeutyczne	229
9.8	Inhibitory metaloproteinaz (MPI)	230
9.9	Strategie ukierunkowane na przywrócenie aktywności genów supresorowych	230
9.10	Terapie zapobiegające tworzeniu przerzutów nowotworowych	232
10	Angiogeneza	237
10.1	Przełącznik angiogeny	238
10.2	Zachowanie komórek podczas procesu „kiełkowania” angiogenego	243
10.3	Inne sposoby neowaskularyzacji nowotworowej	244
☉	Strategie terapeutyczne	245
10.4	Terapia antyangiogenna	245
10.5	Destrukcja sieci naczyniowych z wykorzystaniem czynników uszkadzających naczynia	250
11	Wpływ składników odżywczych i hormonów na genom	255
11.1	Wprowadzenie do tematu żywności i nowotworów	255
11.2	Czynniki przyczynowe	257
11.3	Czynniki prewencyjne: mikroelementy z owoców i warzyw	263
11.4	Przeprogramowanie metabolizmu energetycznego w komórkach nowotworowych – niezwykła cecha	268
11.5	Polimorfizm genetyczny a dieta	272
11.6	Witamina D: składnik diety niezbędny do prawidłowego działania hormonów	273
11.7	Hormony i nowotwór	275
☉	Strategie terapeutyczne	279
11.8	Żywność ulepszona i suplementy diety dla chemioprewencji	279
11.9	Leki ukierunkowane na szlaki energetyczne	280
11.10	Leki ukierunkowane na estrogen	281
12	Immunologia i immunoterapia nowotworów	287
12.1	Limfocyty: komórki B i T	288
12.2	Rola układu immunologicznego w supresji nowotworów	290
12.3	Immunologiczne punkty kontrolne	292
12.4	Immunoedycja i promocja nowotworów	294
12.5	Mechanizmy unikania zniszczenia przez układ immunologiczny	296
☉	Strategie terapeutyczne	297
12.6	Przeciwciała terapeutyczne	297
12.7	Szczepionki przeciwnowotworowe	298
12.8	Blokowanie immunologicznych punktów kontrolnych	305

12.9	Adoptywny transfer limfocytów T, zmodyfikowane receptory limfocytów T i chimeryczne receptory antygenowe	307
12.10	Wirusy onkolityczne i wirusoterapia	309
13	Czynniki zakaźne i stan zapalny	313
13.1	Identyfikacja czynników zakaźnych jako kancerogenów	314
13.2	Stan zapalny a nowotwór	321
⊙	Strategie terapeutyczne	329
13.3	Narodowy program szczepień przeciwko wirusowi zapalenia wątroby typu B na Tajwanie	329
13.4	Eliminacja <i>H. pylori</i> i jej wpływ na zapobieganie rakowi żołądka	330
13.5	Szczepionki przeciwnowotworowe w prewencji raka szyjki macicy	330
13.6	Hamowanie stanu zapalnego	332
14	Technologia a rozwój leków i diagnostyki	338
14.1	Mikromacierze i profilowanie ekspresji genów	339
14.2	Analiza biomarkerów w celach diagnostycznych i prognostycznych	342
14.3	Badanie funkcji genów za pomocą CRISPR-Cas9	343
14.4	Obrazowanie	345
14.5	Nanotechnologia nowotworowa	346
14.6	Strategie opracowywania nowych leków	348
14.7	Opracowanie imatynibu	352
14.8	Leki drugiej i trzeciej generacji	353
14.9	Poprawa projektowania badań klinicznych	356
14.10	Medycyna spersonalizowana i bioinformatyka	359
14.11	Czy dokonujemy postępu?	361
	ZAŁĄCZNIK 1: REGULACJA CYKLU KOMÓRKOWEGO	367
	SŁOWNICZEK	368
	SKOROWIDZ	377



Rozdział 1

Wprowadzenie

Wprowadzenie

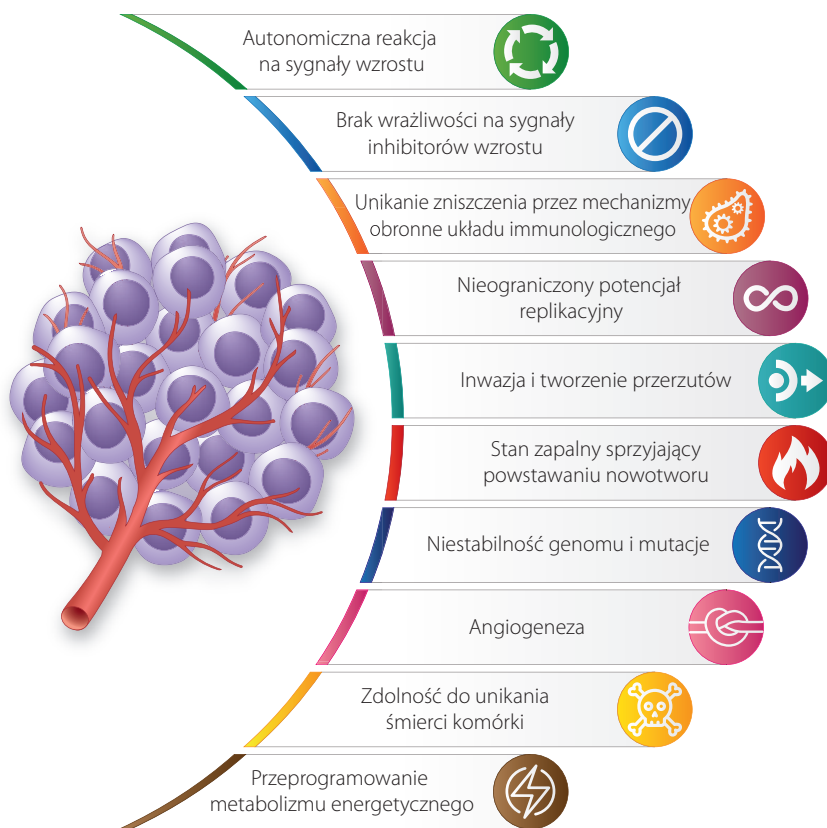
Celem tego podręcznika jest omówienie podstaw biologii molekularnej nowotworów oraz pokazanie procesu koncepcyjnego ukierunkowanego na projektowanie bardziej specyficznych leków przeciwnowotworowych. Przez poszczególne rozdziały przewijać się będą wspólne wątki, dzięki czemu utrwalenie terminologii i zrozumienie mechanizmów procesów komórkowych powinno być łatwiejsze. W podręczniku zawarto również wytyczne, którymi można się kierować w codziennym życiu, aby zmniejszyć ryzyko zachorowania na raka. Wiedza dotycząca szlaków molekularnych została przedstawiona w kontekście terapii o znaczeniu klinicznym (oznaczono to w tekście za pomocą symbolu ☺), co powinno uatrakcyjnić przyswajanie ważnych informacji. Pod względem akademickim Czytelnik zyska podstawy w zakresie biologii komórkowej i molekularnej nowotworów. Co jednak ważniejsze, rozwinie się intelektualnie w sposób, który pozwoli mu z zainteresowaniem pogłębiać wiedzę przez całe życie. Podręcznik ten miał w założeniach stanowić przede wszystkim inspirację, dlatego dla autora największym wyróżnieniem będzie, jeżeli po jego lekturze Czytelnik poczuje nieodpartą chęć do bezpośredniego włączenia się w badania dotyczące nowotworów. Wiedza to potęga!

Statystyki dotyczące raka są szokujące. Jedna na trzy osoby prawdopodobnie zachoruje w ciągu swojego życia na nowotwór. W 2015 roku Siegel i wsp. (2015) szacowali, że rok ten przyniesie 589 430 zgonów Amerykanów z powodu raka, a w 2012 roku w Wielkiej Brytanii wskaźnik śmiertelności (liczba zgonów spowodowanych w ciągu roku przez nowotwory na 100 000 osób) wyniósł dla mężczyzn 199 (*Mortality in the UK*, September 2014, Cancer Research, UK). Zapadalność (liczba nowych przypadków) na nowotwory na całym świecie oszacowano w 2012 roku na ok. 14,1 miliona przypadków (http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx). Liczby te są surowe i bezosobowe. Za nimi kryją się jednak łzy, troski, ból i strata, a na ryzyko zachorowania narażony jest każdy. Dlatego choroby nowotworowe należy poznać i zrozumieć, a wiedzę tę przełożyć na skuteczne metody

leczenia. Aby zrozumieć proces kancerogenezy, w którym komórka prawidłowa przekształca się w nowotworową, należy poznać zawilości jej funkcjonowania i leżące u jego podstaw szlaki molekularne oraz postrzegać komórkę w kontekście całego organizmu. Trzeba się wiele nauczyć! Znajomość szczegółów molekularnych ważnych szlaków komórkowych i biochemicznych można jednak zastosować do opracowywania nowych generacji terapii przeciwnowotworowych. Czy może istnieć lepsza nagroda za wysiłki włożone w naukę?

1.1 Czym jest nowotwór?

Nowotwór oznacza grupę chorób charakteryzujących się nieuregulowanym wzrostem komórek oraz inwazją i rozprzestrzenianiem się komórek z miejsca ich pochodzenia lub pierwotnego występowania do innych części ciała. W definicji tej należy podkreślić kilka punktów. Po pierwsze, za nowotwór uważa się grupę chorób. Jak dotąd sklasyfikowano ponad 100 typów nowotworów. Cechy charakterystyczne nadaje nowotworom tkanka, z której się wywodzą. W przybliżeniu 85% nowotworów rozwija się z komórek nabłonkowych i zalicza się je do **raków**. Nowotwory wywodzące się z komórek mezodermalnych (np. kości, mięśni) nazywane są **mięsakami**, a te z tkanki gruczołowej (np. piersi) – **gruczolakorakami**. Nowotwory o różnym pochodzeniu mają odmienne cechy charakterystyczne. Nowotwór skóry, na przykład, ma wiele cech, których nie posiada rak płuc. Główny czynnik wywołujący raka jest inny w przypadku każdej z tkanek: promieniowanie ultrafioletowe (UV) słońca może z łatwością oddziaływać na skórę, a wdychanie dymu papierosowego na płuca. Dodatkowo, jak zostanie omówione szczegółowo w dalszej części podręcznika, w obrębie każdego z typów komórek istnieją różnice w mechanizmach molekularnych zaangażowanych w kancerogenezę oraz wzorcach rozprzestrzeniania się komórek z miejsca ich pierwotnego występowania. Leczenie nowotworów też musi być zatem zróżnicowane. Chirurgiczne usunięcie zmiany nowotworowej jest częściej możliwe w przypadku zmian na skórze niż w płucach. Ten wstępny obraz nowotworów pokazuje złożoność, która może się wydawać przeszkodą niemożliwą do pokonania przy próbach ulepszenia konwencjonalnych podejść terapeutycznych. Chociaż leżące u podstaw procesu nowotworzenia szlaki komórkowe i molekularne mogą się różnić, efekt jest jednak taki sam. W roku 2000, po wieloletnich badaniach, Hanahan i Weinberg zdefiniowali sześć cech charakterystycznych większości, o ile nie wszystkich, nowotworów. Zauważyli, że do kancerogenezy niezbędne są: nabycie przez komórki zdolności autonomicznego wytwarzania czynników wzrostu, niewrażliwość na inhibitory wzrostu, brak wrażliwości na czynniki indukujące apoptozę, nieograniczony potencjał replikacyjny, zdolność do angiogenezy (tworzenia nowych naczyń krwionośnych) oraz naciekanie i tworzenie przerzutów. Niedawno zmodyfikowali swoją koncepcję i włączyli do niej dwie dodatkowe cechy umożliwiające nabycie sześciu cech opisanych wcześniej: niestabilność genomu oraz



Ryc. 1.1 Cechy charakterystyczne nowotworu. Opracowanie graficzne ryciny – mgr inż. Natalia Glatzel-Plucińska.

Cechy charakterystyczne nowotworu

- Autonomiczna reakcja na sygnały wzrostu:
 - komórki prawidłowe do podziału potrzebują zewnętrznych sygnałów pochodzących od czynników wzrostu,
 - komórki nowotworowe nie są zależne od normalnego przekazywania sygnałów czynników wzrostowych,
 - nabyte **mutacje** powodują zakłócenia szlaków sygnałowych czynników wzrostu, prowadząc do wzrostu nieuregulowanego.
- Brak wrażliwości na sygnały inhibitorów wzrostu:
 - komórki prawidłowe odpowiadają na sygnały hamujące w celu utrzymania homeostazy (większość komórek organizmu człowieka nie dzieli się w sposób ciągły),
 - komórki nowotworowe nie odpowiadają na sygnały inhibitorów wzrostu,
 - szlaki inhibitorowe zakłócają nabyte mutacje lub wyciszanie genów.
- Unikanie zniszczenia przez mechanizmy obronne układu immunologicznego (cecha potencjalna):
 - istnieją dowody wspierające teorię nadzoru immunologicznego, która mówi, że układ immunologiczny może rozpoznawać i eliminować komórki nowotworowe,



- – sukces mogą odnieść te komórki, które nie stymulują odpowiedzi immunologicznej lub mogą ją zakłócać, tak aby uniknąć zniszczenia przez układ odpornościowy.
- Nieograniczony potencjał replikacyjny:
 - prawidłowe komórki posiadają autonomiczny mechanizm definiujący skończoną liczbę podziałów komórki, po której osiągnięciu komórki przechodzą w stan senescencji,
 - mechanizmem tym jest skracanie zakończeń chromosomów – **telomerów**, do którego dochodzi podczas każdej rundy replikacji DNA,
 - komórki nowotworowe mają zdolność utrzymywania stałej długości telomerów,
 - zmieniona regulacja zachowywania telomerów skutkuje nieograniczonym potencjałem replikacyjnym.
- Inwazja i tworzenie przerzutów:
 - zdrowe komórki utrzymują swoją pozycję w organizmie i ogólnie nie migrują,
 - przemieszczanie się komórek nowotworowych do innych części organizmu człowieka stanowi główną przyczynę zgonów z powodu raka,
 - zmiany w genomie mogą wpływać na aktywność i/lub poziom enzymów zaangażowanych w inwazję lub cząsteczek biorących udział w adhezji komórka-komórka lub komórka-macierz pozakomórkowa.
- Stan zapalny sprzyjający powstawaniu nowotworu (cecha umożliwiająca):
 - praktycznie wszystkie guzy **nowotworowe** w swojej budowie zawierają odpornościowe komórki zapalne,
 - stan zapalny oznacza odpowiedź immunologiczną umożliwiającą nabycie podstawowych cech charakterystycznych raka; komórki zapalne mogą na przykład zapewniać czynniki wzrostu i enzymy sprzyjające angiogenezie i inwazji komórek,
 - komórki zapalne mogą ponadto wydzielać mutagenne formy tlenu.
- Niestabilność genomu i mutacje (cecha umożliwiająca):
 - nabycie podstawowych cech charakterystycznych raka zależy zazwyczaj od zmian na poziomie genomu,
 - do niestabilności genomu mogą się przyczynić wadliwie działające szlaki naprawy DNA.
- Angiogeneza (tworzenie nowych naczyń krwionośnych):
 - podaż tlenu i składników odżywczych do komórek prawidłowych zależy od naczyń krwionośnych, ale ich rozmieszczenie w organizmie dorosłego człowieka jest mniej lub bardziej stałe,
 - komórki nowotworowe indukują angiogenezę (rozwój nowych naczyń krwionośnych) potrzebną do przeżycia i ekspansji raka,
 - angiogenezę może wywołać zaburzenie równowagi między induktorami i inhibitorami tego procesu.
- Zdolność do unikania śmierci komórki:
 - prawidłowe komórki usuwane są na drodze **apoptozy**, często w odpowiedzi na uszkodzenie DNA,
 - komórkom nowotworowym udaje się unikać sygnałów kierujących je na drogę apoptozy.
- Przeprogramowanie metabolizmu energetycznego (cecha potencjalna):
 - niekontrolowany podział komórki wymaga więcej energii i prekursorów biosyntezy, co jest zapewniane przez dopasowanie metabolizmu energetycznego,
 - w przeciwieństwie do komórek prawidłowych, komórki nowotworowe przeprowadzają glikolizę, nawet w obecności tlenu; produkty pośrednie glikolizy mogą być wykorzystywane w szlakach biosyntezy.

sprzyjający powstawaniu nowotworu stan zapalny. W swojej pracy przedstawili ponadto dwie cechy potencjalne: przeprogramowanie metabolizmu energetycznego komórek nowotworowych oraz zdolność unikania niszczenia ich przez mechanizmy obronne układu immunologicznego (Hanahan i Weinberg, 2011). Chociaż istnieją dowody znaczącej roli tych dwóch ostatnich z wymienionych procesów w kancerogenezie, wciąż określa się je jako cechy potencjalne, ponieważ ich powiązanie z wymienionymi wcześniej, już ustalonymi sześcioma cechami raka wymaga dalszych badań. Cechy ustalone, potencjalne i umożliwiające (zob. ramka „Cechy charakterystyczne nowotworu”) zostaną omówione w tym podręczniku szczegółowo. Każda z nich stanowi potencjalny cel projektowania nowych leków.

Nowotwór charakteryzuje się nieuregulowanym wzrostem komórek oraz naciekaniem i rozprzestrzenianiem się komórek z miejsca ich pierwotnego występowania (tzw. guz, ognisko pierwotne). Prowadzi to do rozróżnienia między guzem łagodnym i **złośliwym**. Guz łagodny nie ma cech nowotworu złośliwego. Guzy łagodne nie rozprzestrzeniają się w organizmie (czyli nie tworzą przerzutów), chociaż niektóre z nich, ze względu na swoje umiejscowienie, mogą zagrażać życiu (np. łagodny guz mózgu, który może być trudny do usunięcia). W przeciwieństwie do nich, guzy złośliwe nie są otorebkowane, wykazują cechy **naciekania** (inwazji) i tworzą przerzuty.

DO PRZEMYŚLENIA

Dlaczego nowotwory złośliwe zagrażają życiu? Stanowią one przeszkodę fizyczną i ograniczają funkcje atakowanych przez siebie organów. Nowotwory ponadto silnie rywalizują ze zdrowymi tkankami o składniki odżywcze i tlen.

Komórki nowotworowe można odróżnić od komórek prawidłowych w warunkach hodowli komórkowej

Komórki na szalkach Petriego rosną normalnie jako pojedyncza warstwa, tzw. monowarstwa. Dzieje się tak ze względu na zjawisko określane jako hamowanie kontaktowe – kontakt z komórkami sąsiednimi hamuje ich wzrost.

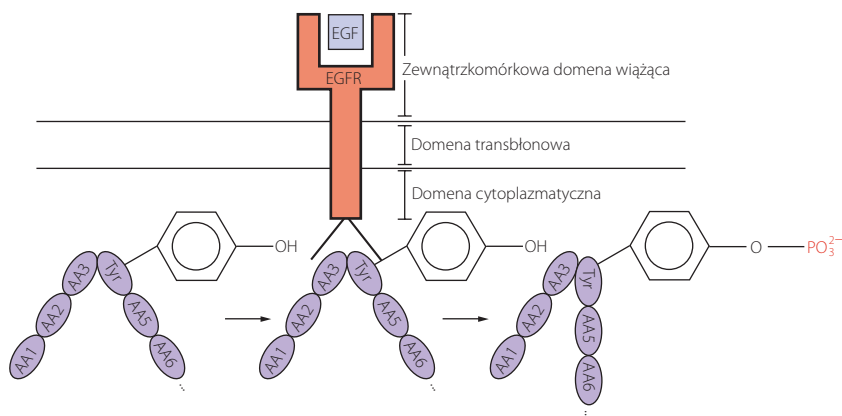
Komórki transformowane (komórki, które stały się nowotworowymi) nabywają następujące **cechy fenotypowe**:

- nie wykazują hamowania kontaktowego, nie rosną więc jak komórki prawidłowe – w monowarstwach, ale w układach wielowarstwowych lub tzw. ogniskach,
- rosną w warunkach niskiej zawartości surowicy,
- pod względem morfologicznym przyjmują kształt płaski i rozciągnięty zamiast okrągłego,
- posiadają zdolność do wzrostu bez przytwierdzania się do podłoża (np. szalki Petriego), czyli wykazują „niezależność od umocowania”.

1.2 Dowody wskazujące na to, że nowotwór jest chorobą genomu na poziomie komórkowym

Co ciekawe, większość czynników powodujących raka (**kancerogenów**) stanowią środki wywołujące zmiany sekwencji DNA, nazywane mutacjami (**mutageny**). Zatem podobnie jak wszystkie choroby genetyczne, nowotwory powstają w wyniku zmian w DNA. Istnieje szereg dowodów wskazujących na to, że DNA komórek nowotworowych zawiera wiele uszkodzeń, począwszy od

Ryc. 4.1 Receptory kinaz tyrozynowych fosforylują reszty tyrozyny białek docelowych. Fosforylacja skutkuje zazwyczaj zmianą konformacyjną docelowego białka.



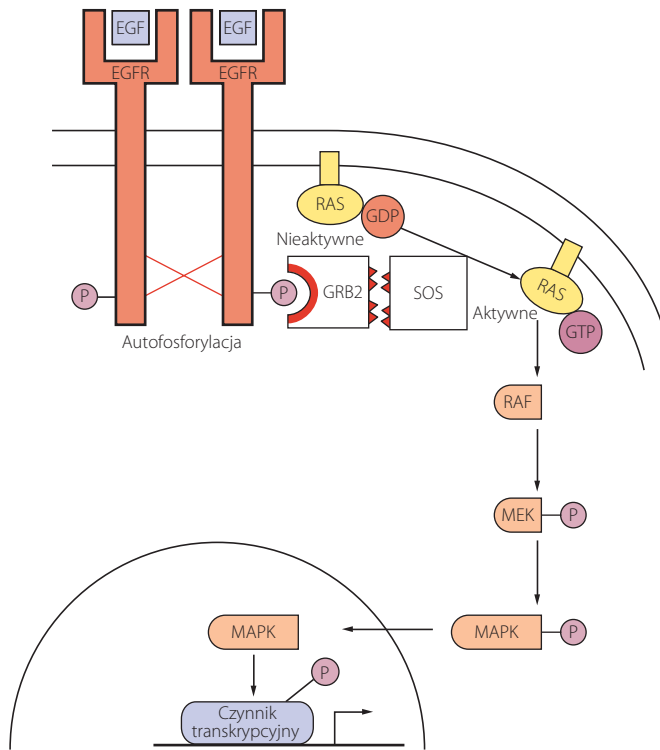
w docelowym białku. Kinazy tyrozynowe fosforylują w białkach tyrozynę (ryc. 4.1). Kinazy serynowo/treoninowe fosforylują reszty seryny i treoniny. Dołączenie grupy fosforanowej – dużej, naładowanej cząsteczki – może spowodować w białku zmianę konformacyjną skutkującą aktywacją lub inaktywacją aktywności enzymatycznej i/lub może służyć jako miejsce rozpoznania dla nowych oddziaływań białko–białko. W kolejnych podrozdziałach opisane zostaną przykłady dotyczące tego zagadnienia.

4.1 Ważny paradygmat: przekazywanie sygnałów czynników wzrostu

Naskórkowy czynnik wzrostu (*epidermal growth factor*, EGF) i jego rodzina receptorowych kinaz tyrozynowych stanowią ważny paradygmat mówiący o tym, jak sygnał pochodzący od zewnątrzkomórkowego czynnika wzrostu może być przekazywany przez komórkę, regulować ekspresję genów i inicjować proliferację komórki. Wiedza na temat tego modelu jest bardzo duża. Receptor EGF (EGFR – *epidermal growth factor receptor*; znany również jako ErbB1 czy HER1) jest receptorem kinazy tyrozynowej. Został on odkryty jako pierwszy z całej grupy, a do tej pory zidentyfikowano jeszcze trzech dodatkowych członków tej rodziny: ErbB2 (HER2), ErbB3 (HER3) i ErbB4 (HER4). Receptory te, jako członkowie rodziny receptorowych kinaz tyrozynowych, zawierają zewnątrzkomórkową domenę wiążącą ligand, pojedynczą domenę transbłonową i domenę cytoplazmatyczną w postaci białkowej kinazy tyrozynowej (ryc. 4.1). Od tego ogólnego schematu istnieją dwa wyjątki: HER2 nie wiąże żadnego znanego liganda, lecz działa jako koreceptor dla innych członków rodziny, natomiast HER3 wykazuje jedynie słabą aktywność kinazową. Doprowadzenie sygnału od czynnika wzrostu znajdującego się poza komórką do jądra, w którym zachodzi regulacja ekspresji genu, wymaga kilku etapów:

- związania czynnika wzrostu do receptora,
- dimeryzacji receptora,
- autofosforylacji,





Ryc. 4.2 Szlak przekazywania sygnałów EGF. Dla tego szlaku charakterystyczne są następujące po sobie etapy wiązania czynnika wzrostu, dimeryzacji receptora, autofosforylacji, aktywacji wewnątrzkomórkowych transduktorów, kaskady kinaz serynowo/treoninowych oraz czynników transkrypcyjnych i regulacji ekspresji genów. Szczegóły opisano w tekście.

- aktywacji transduktorów (przełączników) wewnątrzkomórkowych (w tym „głównego gracza” – RAS),
- aktywacji kaskady kinaz serynowo/treoninowych (Raf, MEK, MAPK),
- regulacji czynników transkrypcyjnych pod kątem ekspresji genu (w celu syntezy białek niezbędnych do wzrostu komórkowego).

Każdy z etapów zaangażowanych w szlak przekazywania sygnałów EGF zilustrowano na ryc. 4.2 i opisano w dalszych podrozdziałach. Aby ułatwić przyswojenie wiedzy o tym szlaku, podzielono go na dwie części: etapy wczesne szlaku, które zachodzą w błonie komórkowej (ryc. 4.4) oraz etapy późne szlaków EGF, przebiegające poza błoną komórkową (ryc. 4.5). Przyswojenie sobie tego modelowego systemu jest niezbędne, ponieważ umożliwi zrozumienie wielu innych szlaków sygnałowych i będzie stanowiło podstawę przy omawianiu mechanizmów kancerogenezy. Najciekawsze jednak jest to, że elementami składowymi tego szlaku są cząsteczki, na które ukierunkowane są nowo opracowywane leki przeciwnowotworowe, z których część zostanie opisana na końcu tego rozdziału.

Wiązanie czynników wzrostu

Pierwszym etapem szlaku transdukcji sygnałów EGF jest związanie EGF do jego receptora – EGFR. Domeny zewnątrzkomórkowe (I i III) EGFR tworzą



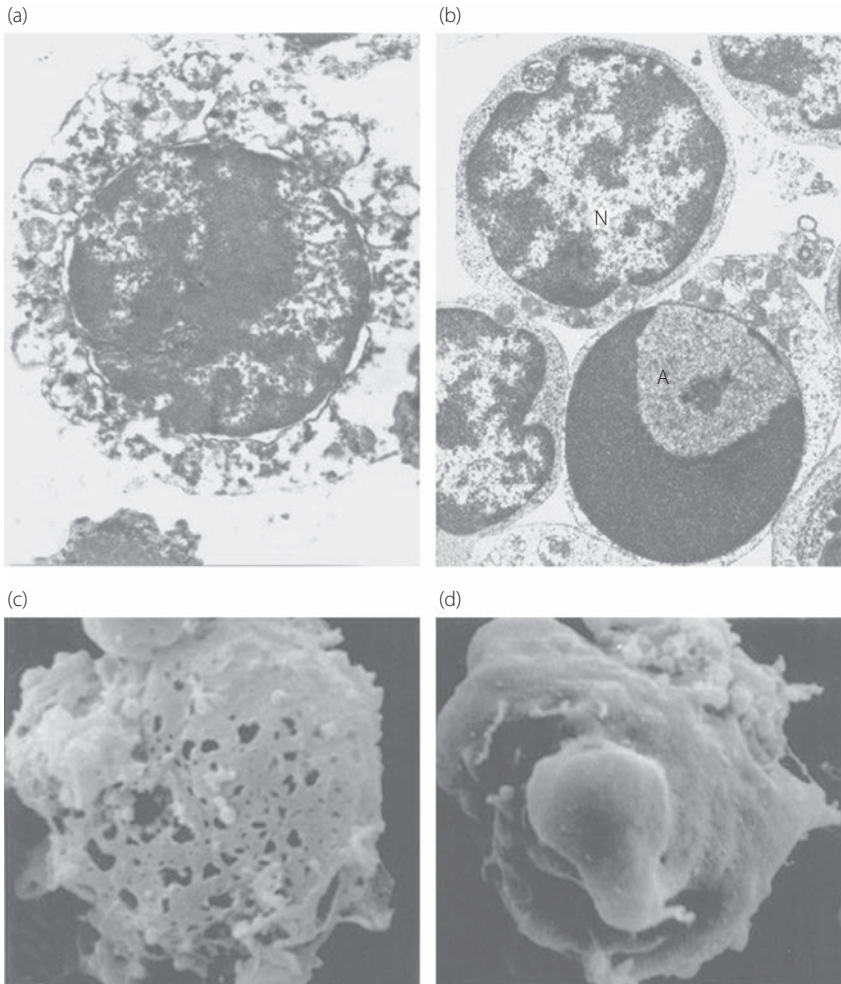
Rozdział 7

Apoptoza

Wprowadzenie

Apoptoza jest ściśle regulowanym procesem śmierci komórki, który nie tylko odgrywa rolę w morfogenezie, ale również kontroluje liczbę komórek i usuwa te, które są uszkodzone, a w związku z tym odgrywa ważną rolę w supresji nowotworów. Jak opisano w rozdziale 1, równowaga między namnażaniem komórek, ich różnicowaniem i apoptozą wpływa na liczbę komórek w organizmie, a zaburzenia regulacji tych procesów mogą prowadzić do rozwoju nowotworów. Apoptoza stanowi kluczowy mechanizm obrony przed nowotworami, ponieważ umożliwia usunięcie komórek z rozległymi uszkodzeniami DNA, które mogłyby doprowadzić do powstania nowotworu. W wyniku apoptozy dochodzi na przykład do schodzenia skóry po poparzeniu słonecznym – usuwane są wówczas komórki z poważnymi uszkodzeniami DNA, powstałymi na skutek ekspozycji na UV. Proces ten stanowi ważną linię obrony przed nowotworami skóry. Eliminacja komórek z uszkodzonym DNA pomaga chronić przed nowotworami cały organizm. Nieprawidłowości w przebiegu apoptozy wpływają również na skuteczność konwencjonalnych terapii przeciwnowotworowych, których działanie opiera się głównie na indukowaniu apoptozy. W tym rozdziale opisano molekularne mechanizmy apoptozy oraz mutacje wpływające na szlak apoptozy i odgrywające rolę w kancerogenezie. Przedstawiono też, jak mutacje szlaku apoptozy mogą prowadzić do oporności na leki chemioterapeutyczne. Na koniec zaprezentowano strategię przyjmowaną przy projektowaniu nowych, ukierunkowanych na apoptozę, leków przeciwnowotworowych. Na początku opisany zostanie jednak sam proces apoptozy.

Apoptoza stanowi rodzaj „samobójstwa komórki”. Jest to aktywny proces wymagający ekspresji programu genetycznego, który może zostać zrealizowany przez każdą komórkę. Proces apoptozy jest starannie zorganizowany, uporządkowany i nie pozostawia wielu śladów po unicestwionej komórce. Komórka przechodząca apoptozę jest usuwana podczas **fagocytozy** przez makrofagi i komórki sąsiadujące, które rozpoznają znaczniki molekularne (np. fosfatydyloserynę) prezentowane przez



Ryc. 7.1 (a) Transmisyjna mikroskopia elektronowa (TEM) martwiczko zmienionej komórki: można zaobserwować rozpad błony cytoplazmatycznej i organelli. Morfologia jądra wydaje się względnie zachowana (powiększenie oryginalne $\times 10\,000$). (b) TEM komórki apoptotycznej (A) i prawidłowej (N). W A widać charakterystyczną agregację chromatyny, bardzo odmienną od prawidłowej (N). Można również zaobserwować zachowanie błony i organelli (powiększenie oryginalne $\times 8000$). (c) Skaningowa mikroskopia elektronowa (SEM) martwiczko zmienionej komórki. Na powierzchni komórki widać liczne zmiany (powiększenie oryginalne $\times 5000$). (d) SEM komórki apoptotycznej. Widać wyraźnie powstawanie pęcherzyka na powierzchni (powiększenie oryginalne $\times 5000$).
Źródło: Watson, J. (1997) *The Purdue Cytometry CD-ROM*, t. 4, red. gościnny J. Paul Robinson. Purdue University Cytometry Laboratories, West Lafayette, IN (ISBN 1-890473-03-0).

komórki apoptotyczne. Apoptoza charakteryzuje się kurczeniem komórki, powstawaniem pęcherzyków błonowych (*blebbing*) i ich odpączkowywaniem (*budding*) oraz kondensacją chromatyny i jej dokładną fragmentacją – wszystkie te procesy przyczyniają się do „eleganckiej” utylizacji komórki. Kontrastuje to wyraźnie z „niechlujnym” procesem martwicy (**nekrozy**), w którego ramach komórki pęcznią, błony komórkowe zaczynają przeciekać, a zawartość komórek wylewa się do otaczających tkanek i powoduje stan zapalny. Różnice morfologiczne między komórkami przechodzącymi martwicę i apoptozę przedstawiono na ryc. 7.1.

Podobnie jak w szlakach sygnałowych czynników wzrostu kluczową rolę odgrywają kinazy, tak w apoptozie najważniejsze są **proteazy**, nazywane **kaspazami**. Katalizowana przez nie proteoliza pomaga w rozpadzie komponentów komórkowych, zapewniając charakterystyczną dla apoptozy „czystą” utylizację. Kaspazy wspomagają na przykład apoptotyczne kurczenie się jądra komórkowego – degradują sieć białek (lamin) nadających strukturę błonie jądrowej.

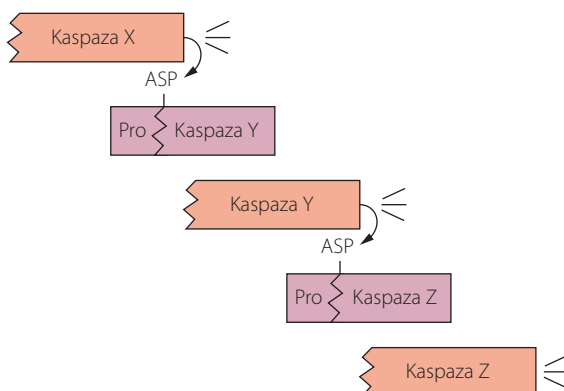
7.1 Mechanizmy molekularne apoptozy



Indukcja komórek do procesu apoptozy może przebiegać za pośrednictwem sygnałów zewnątrzkomórkowych, tzw. czynników śmierci, lub wewnętrznych zmian fizycznych lub chemicznych, takich jak uszkodzenie DNA czy stres oksydacyjny. W konsekwencji może dochodzić do aktywacji dwóch niewykluczających się szlaków molekularnych – zewnętrznego i wewnętrznego. Kaspazy są specyficznymi proteazami, które działają jak molekularne nożyce rozcinające wewnątrzkomórkowe białka w miejscach reszt asparaginanu (jednego z 20 aminokwasów). Kaspazy są kluczowe dla obu szlaków apoptozy. Określenie „kaspazy” pochodzi od trzech charakterystycznych enzymów: proteaz asparaginianowych bogatych w cysteinę (*cysteine-rich aspartate proteases* = *caspases*). Dotychczas u ssaków zidentyfikowano ponad 13 kaspaz. Kaspazy są syntezowane w postaci nieaktywnych enzymów, nazywanych prokaspazami, które muszą zostać rozcięte w miejscach reszt asparaginanowych, aby ulec aktywacji. Chociaż prokaspazy uważa się ogólnie za nieaktywne, w rzeczywistości wykazują one niewielkie działanie enzymatyczne – ok. 2% aktywności proteolitycznej w pełni aktywnych kaspaz. Może się to wydawać nieistotne, ale jak opisano w dalszej części tego rozdziału, ta niewielka aktywność jest bardzo ważna dla niektórych szlaków aktywacji kaspaz. Ponadto, ponieważ kaspazy przecinają wiązania peptydowe w miejscu asparaginanu, a prokaspazy są aktywowane przez przecięcie także w miejscu reszt asparaginanu, kaspazy uczestniczą w kaskadzie aktywacyjnej, w ramach której jedna kaspaza może aktywować inną w reakcji łańcuchowej (ryc. 7.2). Ten mechanizm, w którego ramach kaspazy aktywują prokaspazy, prowadzi do amplifikacji sygnału apoptozy – do szybkiej i pełnej konwersji puli prokaspaz wystarczy kilka początkowo aktywnych cząsteczek kaspaz. Poniżej omówiono zewnętrzne i wewnętrzne szlaki apoptotyczne.

Szlak zewnętrzny: za pośrednictwem błonowych receptorów śmierci

Zewnętrzny szlak wyzwalania śmierci komórki (ryc. 7.3) ma pewne cechy wspólne ze szlakami zaangażowanymi w wywoływanie wzrostu komórkowego



Ryc. 7.2 Prosta kaskada kaspaz.

Wykorzystując cechy charakterystyczne nowotworu jako punkt wyjścia, w podręczniku przeanalizowano mechanizmy komórkowe i molekularne leżące u podstaw transformacji komórek w komórki rakowe.

Każdy rozdział, oprócz omówienia podstaw teoretycznych, zawiera informacje, w jaki sposób można bezpośrednio wykorzystać tę wiedzę do opracowywania nowych sposobów leczenia, w tym terapii celowanych.

Podręcznik *Biologia molekularna nowotworów w praktyce klinicznej* przeznaczony jest dla studentów medycyny, biologii i kierunków pokrewnych oraz lekarzy i pracowników przemysłu farmaceutycznego zainteresowanych sposobami przełożenia wiedzy teoretycznej na nowe możliwości walki z chorobą.