

Molekularne podstawy karcynogenezy i ścieżki sygnałowe niektórych nowotworów ośrodkowego układu nerwowego

Wenancjusz Domagała

Zakład Patomorfologii Pomorskiej Akademii Medycznej w Szczecinie

STRESZCZENIE

W pracy przedstawiono najnowsze osiągnięcia w badaniach nad molekularno-genetycznymi aspektami patogenezy nowotworów, z uwzględnieniem guzów ośrodkowego układu nerwowego (OUN). Uznano je za grupę chorób cyklu komórkowego i zdefiniowano jako „nieprawidłową tkankę, która powstała z jednej komórki i rośnie jako następstwo zaburzeń dynamizmu i prawidłowego przebiegu cyklu komórkowego oraz zaburzeń różnicowania się komórki i komunikacji wewnątrzkomórkowej, międzykomórkowej i pozakomórkowej jej klonalnego potomstwa”. Zwrócono uwagę na fakt, że karcynogeneza jest procesem wieloczynnikowym i wielostopniowym, w którym zmiany narastają w miarę pogłębiania się niestabilności genomu. Przeanalizowano zmiany zachodzące w czterech różnych klasach genów, które regulują proliferację i stopień zróżnicowania komórek. Zmiany w tych genach prowadzą do transformacji nowotworowej. Opisano onkogeny, geny supresorowe, geny regulujące apoptozę lub naprawę DNA i telomerazę. Przedstawiono molekularne mechanizmy związane z inwazyjnością glejaków, a ponadto wspomniano o macierzystych komórkach nowotworów. Podkreślono, że odkrycie molekularnych ścieżek sygnałowych oraz komórek macierzystych nowotworu otworzyło nowe perspektywy w terapii glejaków, rdzeniaka i innych nowotworów OUN, a także stworzyło perspektywy dla precyzyjnego zablokowania ścieżek sygnałowych odpowiedzialnych za prolifera-

cję, inwazyjność komórek nowotworowych oraz za angiogenezę, poprzez inaktywację kluczowych białek niezbędnych do funkcjonowania tych ścieżek. Autor wyraził nadzieję, że dokładna molekularna charakterystyka komórek macierzystych nowotworu pozwoli na ich selektywne niszczenie, co powinno znacznie poprawić wyniki leczenia. Wydaje się bardzo prawdopodobne, że klasyfikacja nowotworów OUN na podstawie kryterium morfologicznego (mikroskopowego) zostanie zmodyfikowana dzięki zastosowaniu kryteriów molekularnych o znaczeniu rokowniczym i terapeutycznym.

Słowa kluczowe: guzy OUN, karcynogeneza, podstawy molekularno-genetyczne

Wprowadzenie

Zgodnie ze współczesną wiedzą na temat etiopatogenezy nowotworów zakłada się, że **nowotwór jest chorobą cyklu komórkowego**. Dokładniej nowotwór można zdefiniować jako „nieprawidłową tkankę, która powstała z jednej komórki i rośnie jako następstwo zaburzeń dynamizmu i prawidłowego przebiegu cyklu komórkowego oraz zaburzeń różnicowania się komórki i komunikacji wewnątrzkomórkowej, międzykomórkowej i pozakomórkowej (między komórką a podścieliskiem — macierzą pozakomórkową) jej klonalnego potomstwa” [1]. Nowotwór może powstać tylko z takiej tkanki, której komórki zachowały zdolność do podziału, do wejścia w cykl komórkowy. Zatem nowotwory nie powstają z dojrzałych komórek układu nerwowego. Wyniki badań eksperymentalnych nad transformacją nowotworową (*in vitro* oraz u zwierząt

Adres dla korespondencji: prof. dr hab. med. Wenancjusz Domagała
Zakład Patomorfologii PAM w Szczecinie
ul. Unii Lubelskiej 1, 71-252 Szczecin
tel.: 0 91 425 34 78, tel./faks: 0 91 487 00 32
e-mail: sekrpato@sci.pam.szczecin.pl
Polski Przegląd Neurologiczny 2007, tom 3, 3, 127-141
Wydawca: „Via Medica sp. z o.o.” sp. k.
Copyright © 2007 Via Medica

Tabela 1. Geny regulujące proliferację i różnicowanie komórek

Protoonkogeny (stymulujące proliferację)
Geny supresorowe (hamujące proliferację)
Geny kontrolujące apoptozę (czyli zaprogramowaną śmierć komórki)
Geny regulujące naprawę uszkodzonego DNA

doświadczalnych) i wykorzystanie do nich narzędzi biologii molekularnej ugruntowały powszechne obecnie przekonanie, że nowotwór powstaje w wyniku wielu nieletalnych zaburzeń (mutacji) w DNA komórki somatycznej, które, kumulując się, powodują utratę kontroli proliferacji, wzrostu i różnicowania.

Karcynogeneza jest procesem wieloczynnikowym i wielostopniowym, w którym zmiany narastają w miarę pogłębiania się niestabilności genomu. Większość czynników rakotwórczych (czynniki chemiczne, promieniowanie jonizujące i inne czynniki fizyczne, drobnoustroje onkogenne, takie jak niektóre wirusy i bakterie) bezpośrednio lub pośrednio oddziałuje na poziomie genomu komórki. Do transformacji nowotworowej dochodzi w wyniku zmian powstałych w obrębie 4 różnych klas genów, które regulują proliferację i stopień różnicowania komórek (tab. 1). Karcynogeneza rozpoczyna się klonalną ekspansją jednej (prekursorowej) komórki somatycznej, w której wystąpiło zaburzenie (uszkodzenie, mutacja) DNA w genach regulujących naprawę uszkodzonego DNA (tzn. genach kontrolujących integralność genomu) lub w genach supresorowych, lub w protoonkogenach albo w genach regulujących apoptozę (decydujących o tym, czy komórka wejdzie w cykl komórkowy i w mitozę czy też obumrze na drodze apoptozy). Mutacje w genach naprawy DNA znacznie zwiększają ryzyko utrwalenia się mutacji w pozostałych 3 kategoriach genów, dlatego mają one podstawowe znaczenie dla integracji genomu. W wyniku akumulacji wielu zmian w DNA komórek nowotworowych uzyskują one fenotypowe cechy złośliwości w procesie zwanym „progresją”.

Onkogeny

Geny prawidłowych komórek, które w odpowiedzi na działanie czynników mitogennych regulują proliferację i różnicowanie się komórek oraz biorą udział w przekazywaniu sygnałów międzykomórkowych, szczególnie w czasie embriogenezy i w procesach gojenia, nazywa się **protoonkogenami**. Geny

te znajdują się w stanie spoczynku lub spełniają określone funkcje. Ich transkrypcja jest ściśle kontrolowana, a zadaniem produktów białkowych tych genów (które cechuje bardzo krótki okres półtrwania) jest transdukcja sygnałów mitogennych i wykonanie związanych z nimi czynności. Są to sygnały, które od czynników zewnętrznych (np. czynników wzrostu), poprzez błonę komórkową, są przekazywane do jądra komórki. W związku z powyższym białka kodowane przez protoonkogeny pełnią różne funkcje związane z proliferacją i różnicowaniem się komórek. Mogą one być czynnikami wzrostu, receptorami czynników wzrostu, białkami przechwytyjącymi sygnały na wewnętrznej blaszce błony komórkowej lub białkami przekazującymi sygnały (np. przez kinazy tyrozynowe lub serynowo-treoninowe), mogą to być także czynniki transkrypcyjne regulujące proliferację. Przykłady protoonkogenów przedstawiono w tabeli 2.

Onkogeny komórkowe (*onc*, *c-onc*) to aktywowane protoonkogeny. Do aktywacji protoonkogenów lub do zaburzeń ich ekspresji prowadzi szereg mechanizmów, takich jak: mutacje punktowe, amplifikacje genów, translokacje chromosomowe i inne zmiany strukturalne (np. delecje) albo poddanie protoonkogenowi kontroli silnego promotora lub sekwencji wzmacniającej. Mutacje somatyczne, które aktywują protoonkogeny, powodują albo zmianę struktury kodowanego białka (mutacje punktowe, translokacje chromosomowe, których skutkiem jest zwiększona enzymatyczna aktywność białka, utrata dotychczasowych mechanizmów regulujących, pojawienie się białka hybrydowego), albo zwiększenie ilości i niekontrolowaną produkcję białka w komórce (amplifikacje genów, translokacje chromosomowe, których skutkiem jest zwiększona ekspresja białka lub jego zwiększona stabilność, tzn. dłużej pozostaje aktywne). Onkogeny kodują więc odpowiednio zmienione (w stosunku do prawidłowych) pod względem struktury i/lub funkcji białka, czyli **onkoproteiny**. Funkcja onkoprotein jest podobna do funkcji produktów białkowych protoonkogenów, dlatego można wśród nich wyróżnić białka jądrowe związane z regulacją proliferacji, cytoplazmatyczne białka przekaźnikowe, czynniki wzrostu i receptory tych czynników (tab. 2). Jednak już synteza i działanie onkoprotein nie muszą zależeć od czynników wzrostu i mechanizmów regulujących proliferację. Jedną z głównych cech komórek nowotworowych jest zdolność do endogennej produkcji sygnałów mitogennych bez obecności zewnętrznych czynników wzrostu. Onkoproteiny mogą być produkowane konstitu-

Tabela 2. Lokalizacja, funkcja kodowanych białek, sposób aktywacji i nowotwory związane z powstałymi wskutek aktywacji odpowiednimi onkogenami dla wybranych protoonkogenów

Protoonkogen	Lokalizacja	Funkcja białka	Aktywacja	Nowotwory
Czynniki wzrostu				
<i>SIS</i>	22q12.3-13.1	PDGF- β	N	<i>Astrocytoma, osteosarcoma</i>
<i>TGF-α</i>	2p13	TGF- α	N	<i>Astrocytoma, carcinoma hepatocellulare</i>
Receptory czynników wzrostu				
Kinazy tyrozynowe błonowe				
<i>EGFR(ERB-B1)</i>	7p1.1-1.3 7q12-13	Receptor dla EGF	N, A	Rak płaskonabłonkowy płuca (80%), <i>glioblastoma</i> (50%), <i>astrocytoma</i> (A), nowotwory głowy i szyi (80–100%), rak pęcherza moczowego, żołądka, jelit
<i>ERB-B2 (HER2/NEU)</i>	17q12-q21	Receptor czynnika wzrostu z rodziny EGF	A, M	Rak sutka (25%), gruczolakoraki jajnika, żołądka, płuca (M), ślinianek
<i>PDGF-R</i>		Receptor dla PDGF	N	Glejaki
<i>RET</i>	10q11.2	Receptor dla czynników neurotropowych GDNF/NTN/ART/PSP	M, R	MEN 2A, MEN 2B, rodzinny (i sporadyczny) rdzeniasty rak tarczycy (M); brodawkowy rak tarczycy (R)
Białka przekaźnikowe (przechwytywanie i przekazywanie sygnału)				
Kinazy tyrozynowe cytoplazmatyczne				
<i>SRC</i>	20p12-13	Kinaza tyrozynowa	K	Rak jelita grubego
Kinazy serynowo-treoninowe cytoplazmatyczne				
<i>RAF</i>	3p25	Kinaza białkowa	K	Mięsaki
Białka G błonowe				
<i>N-RAS</i>	1p11-13	GTP-aza	M	Czerniak, rak jelita grubego, tarczycy (pęcherzykowy i brodawkowy), białaczki, <i>seminoma</i>
<i>K-RA/S</i>	12p11.1-12.1	GTP-aza	M	Rak jelita grubego, trzustki, płuca, tarczycy; czerniak
<i>H-RAS</i>	11p15.5	GTP-aza	M	Rak nerki, pęcherza moczowego, tarczycy
Czynniki transkrypcyjne				
<i>MYCN</i>	2p24-25	Czynnik transkrypcyjny	A	<i>Neuroblastoma</i> , rak drobnokomórkowy płuc, <i>retinoblastoma</i> , <i>astrocytoma</i>
Regulatory cyklu komórkowego				
<i>MDM2</i>	12q14	Wiązanie P53	A	Mięsaki
<i>CYKLINA D1</i>	11q13	Cyklina	A, T	Rak sutka, przetyku (A), chłoniak płaszczca (T)
<i>CDK4</i>	12q14	Kinaza cyklinozależna	A	Czerniak, mięsák, glejak

SIS — protoonkogen SIS; TGF- α (*transforming growth factor α*) — transformujący czynnik wzrostu α ; PDGF- β (*platelet-derived growth factor β*) — płytkowy czynnik wzrostu β ; GDNF (*glial cell line-derived neurotrophic factor*) — glejopochodny czynnik neurotroficzny; NTN (*neurturin*) — neurtyryna; ART (*artemin*) — artemina; PSP (*persephin*) — persefina; EGF (*endothelial growth factor*) — śródbłonkowy czynnik wzrostu; N — nadekspresja; A — amplifikacja; M — punktowa mutacja; R — rearanżacja DNA; K — konstytutywna aktywacja; T — translokacja; MEN (*multiple endocrine neoplasia*) — mnoga gruczolakowatość wewnątrzwydzielnicza

tywnie (w sposób ciągły) i dlatego komórka ciągle się dzieli, nie podlegając kontroli czynników regulujących wzrost i proliferację. Jeżeli onkoproteina jest czynnikiem wzrostu (np. płytkowy czynnik wzrostu β [PDGF- β , *platelet derived growth factor* β] w *astrocytoma*) działającym autokrywnie, można powiedzieć, że komórka nowotworowa w sposób niekontrolowany sama się pobudza do ciągłych podziałów komórkowych.

Reasumując, protoonkogeny mogą zostać aktywowane w komórce poprzez zmianę ich struktury lub funkcji (w ten sposób powstają onkogeny). Aktywacja (nieszkodliwych) protoonkogenów w (niebezpieczne) onkogeny poprzez zmiany w ich strukturze spowoduje syntezę nieprawidłowych strukturalnie i czynnościowo białek, czyli onkoprotein. Natomiast zaburzenia regulacji ekspresji wywołają wzmocnienie lub osłabienie sygnałów kontrolujących wzrost, różnicowanie i proliferację komórek. Na poziomie komórki onkogeny wywołują transformację nowotworową (zmiany fenotypu) w sposób dominujący, to znaczy do wywołania efektu wystarczy jeden allel.

Najczęstszą zmianą stwierdzaną w dominujących onkogenach nowotworów człowieka są **mutacje genu RAS**. Występują one w około 20% wszystkich nowotworów człowieka (a np. w 90% raków trzustki). Wystarczy punktowa mutacja, powodująca, że guanozyna (G) zostaje zamieniona na tyminę (T) w ramce odczytu protoonkogenu *H-RAS*, i powstaje onkogen *H-RAS*. W wyniku tej substytucji glicyna białka kodowanego przez protoonkogen zostaje zastąpiona przez walinę w białku kodowanym przez onkogen. Ta drobna zmiana wystarczy do zapoczątkowania transformacji nowotworowej, ponieważ jej następstwem jest zablokowanie aktywności GTP-azowej białka RAS, co powoduje, że białko to raz aktywowane nie może się zdezaktywować i nieprzerwanie pobudza komórkę do mitozy (komórka pozostaje w stanie „ciąglego pobudzenia”).

Aktywacja protoonkogenu może być spowodowana zwielokrotnieniem liczby jego prawidłowych kopii nawet do kilkuset (amplifikacja). Na przykład, w *neuroblastoma* za pomocą fluoroscencyjnej hybridyzacji *in situ* (FISH, *fluorescence in situ hybridization*) można stwierdzić amplifikację *MYCN* pod postacią tak zwanych minipar (ang. *double minutes, dmin*), czyli licznych, bardzo małych fragmentów pozachromosomowego DNA albo regionów o zartętej strukturze prążkowej (HSR, *homogenous staining regions*). Na ogół amplifikacja protoonkogenów wiąże się ze złym rokowaniem.

Jak już wspomniano, proces powstawania nowotworu jest wieloczynnikowy i wieloetapowy, dlatego zazwyczaj dochodzi do ekspresji więcej niż jednego onkogenu. Jeżeli aktywacja protoonkogenu wystąpi w gametach, wówczas onkogen jest obecny w każdej komórce organizmu, a predyspozycja do powstawania nowotworów dziedziczą się dominująco. W ten sposób, na przykład *C-RET*, predysponuje do występowania gruczolakowatości mnogiej wewnątrzwydzielniczej typu 2 (MEN 2, *multiple endocrine neoplasia type 2*) i związanych z nią nowotworów.

Onkoproteiny

Onkoproteiny należą do kilku czynnościowo różnych klas w zależności od tego, jaką rolę w procesie proliferacji komórki spełniają białka odpowiadających im protoonkogenów (tab. 2). Przypominają one białka kodowane przez protoonkogeny, ale na ich syntezę nie wpływają już elementy regulatorowe. Jak już wspomniano, proliferację inicjuje wiązanie się czynnika wzrostu z jego receptorem w błonie komórkowej, co prowadzi do pobudzenia receptora i aktywacji białek przekaźnikowych po wewnętrznej stronie błony komórkowej, przeniesienia (transdukcji) sygnału do jądra i aktywacji czynników inicjujących transkrypcję DNA. Teraz komórka może wejść w cykl komórkowy wiodący do mitozy. W tej kaskadzie wydarzeń molekularnych biorą udział produkty białkowe różnych protoonkogenów (wykazujące funkcje czynników wzrostu, ich receptorów, białek zaangażowanych w transdukcję sygnałów z błony komórkowej do wnętrza komórki, regulatorów transkrypcji DNA i cyklu komórkowego). Poniżej podano tylko kilka przykładów, ponieważ zakres tego artykułu nie pozwala na omówienie większości z nich.

Czynniki wzrostu (np. PDGF, czynnik wzrostu fibroblastów [FGF, *fibroblast growth factor*], transformujący czynnik wzrostu α [TGF- α , *transforming growth factor* α]), nawet produkowane w nadmiarze, nie mogą same wywołać transformacji nowotworowej. Stanowią one raczej podatną „glebę” dla tej transformacji, ponieważ, wiążąc się ze swoistymi receptorami w błonie komórkowej, uruchamiają reakcję łańcuchową prowadzącą do proliferacji, a to zwiększa prawdopodobieństwo wystąpienia mutacji, które mogą się przyczynić do onkogenezy. Natomiast w już istniejącym nowotworze nadprodukcja czynników wzrostu, na drodze autokrywniej lub parakrywniej stymulacji, może wydatnie przyspieszyć jego wzrost. Nadekspresja czynników wzrostu, takich jak na przykład FGF2, PDGF oraz

ich receptorów, często występuje w glejakach o różnym stopniu złośliwości [2]. Na przykład, komórki *astrocytoma* i *osteosarcoma* produkują nadmierne ilości PDGF w związku z nadekspresją *c-SIS* (który koduje jego łańcuch β). Ponieważ komórki tych nowotworów posiadają również receptory dla PDGF, możliwa jest stymulacja autokryna i parakryna. Produkcja lub sekrecja czynników wzrostu przez komórki nowotworowe nie musi być bezpośrednim wynikiem mutacji lub amplifikacji w kodujących je genach. Możliwy jest również mechanizm pośredni, na przykład aktywowany *RAS*, chociaż sam nie koduje czynników wzrostu, może pobudzać komórki do nadekspresji i sekrecji TGF- α , a ten, łącząc się z receptorem dla śródbłonkowego czynnika wzrostu (EGF, *endothelial growth factor*), działa mitogennie. Uważa się [3], że mitogenna ścieżka o największym znaczeniu w patogenezie nowotworów wygląda następująco:

czynniki wzrostu → GFR → Grb2 → SOS →
→ RAS → RAF → MEK → ERK

gdzie: GFR (*growth factor receptors*) — receptory czynników wzrostu; MEK (*mitogen-activated protein kinase/ERK kinase*) — kinaza o podwójnej specyficzności: fosforyluje serynę/treoninę oraz tyrozynę; ERK (*extracellular signal-regulated kinases*) — zewnątrzkomórkowa kinaza regulowana sygnałowo.

Zmiany **receptorów czynników wzrostu** również mogą mieć znaczenie onkogenne. Przykładowo, receptory kodowane przez niektóre onkogeny wykazują permanentną aktywację nawet bez obecności czynnika wzrostu. Inaczej mówiąc, komórka zachowuje się tak, jakby stale była aktywowana przez wiązanie się czynnika wzrostu z jego receptorem, chociaż fakt ten w ogóle nie ma miejsca. Na przykład, w zespole MEN 2A punktowa mutacja protoonkogenu *RET* zmienia domenę zewnątrzkomórkową, co powoduje permanentną dimeryzację i aktywację receptora glejopochodnego czynnika neurotropowego (GDNF, *glial cell-derived neurotrophic factor*), występującego w komórkach neuroendokrynych, takich jak rdzeń nadnercza lub komórki C tarczycy. Nadekspresja receptora (np. *ERB-B1* w glejakach), spowodowana amplifikacją kodującego go genu, zwiększa wrażliwość komórek nowotworowych na działanie nawet małych ilości czynnika wzrostu.

Aktywatory transkrypcji. Zaburzenia (mutacje) genów kodujących czynniki transkrypcyjne destabilizują procesy wzrostu i proliferacji istotne w trans-

formacji nowotworowej. Na przykład, amplifikacja *MYC* i związana z nią nadekspresja białka *MYC* występują w 15–30% nowotworów człowieka (m.in. amplifikacja *MYCN* w *neuroblastoma*). *MYC* wykazuje działanie plejotropowe. Nadekspresja lub nadmierna aktywacja *MYC* prowadzi do dysregulacji cyklu komórkowego, ale *MYC* współdziała z około 12–15% genów w genomie komórki i może między innymi zwiększać ekspresję telomerazy w niektórych komórkach. *MYC* jest mitogennym czynnikiem transkrypcyjnym zlokalizowanym w jądrze (natomiast np. *RAS*, zlokalizowany w pobliżu błony komórkowej, uruchamia kaskadę sygnałową białek cytoplazmatycznych, która w konsekwencji aktywuje mitogenne czynniki transkrypcyjne). Funkcja i stabilność białka *MYC* jest regulowana przez jego ilość, homo- i heterodimeryzację oraz fosforylację. Dla procesów transformacji i progresji nowotworowej ważne jest, że *MYC* może stymulować proliferację i blokować różnicowanie się komórek (kompleksy *MYC-MAX*), ale może też indukować apoptozę przy braku czynników wzrostu. Ta delikatna i ściśle regulowana równowaga ulega zaburzeniu, gdy występuje nadmierna ilość białka *MYC* lub gdy wskutek translokacji dojdzie do aktywacji genu *MYC*, na przykład t(8;14) w chłoniaku Burkitta.

Geny supresorowe

Geny supresorowe zapobiegają transformacji nowotworowej komórki, kontrolując proliferację. Utrzymują one prawidłową liczbę komórek za pomocą supresji proliferacji lub indukcji apoptozy, tak aby w odpowiednim miejscu i czasie liczba komórek utrzymywała się na poziomie fizjologicznym. **Właściwe geny supresorowe** sprawują bezpośrednią kontrolę przebiegu cyklu komórkowego. Tak zwane **geny opiekuńcze** utrzymują integralność genomu (sprawują nad nim opiekę), uniemożliwiając propagowanie mutacji. Do „genów opiekuńczych” należą geny naprawy DNA (*NER* odpowiedzialne za XP, *ATM* odpowiedzialny za *ataxia teleangiectasia*, *MRG* [*mismatch repair genes*] odpowiedzialne za HNPCC, a także *BRCA1* i *BRCA2*).

Inaktywacja „genów opiekuńczych” umożliwia transformację nowotworową pośrednio przez narastanie genetycznej niestabilności, która zwiększa prawdopodobieństwo wystąpienia mutacji wszystkich genów, w tym tak zwanych genów kluczowych. „**Geny kluczowe**” wpływają bezpośrednio na wzrost nowotworów przez hamowanie proliferacji lub promocję apoptozy. Niektóre spośród nich wykazują specyficzność tkankową, co powo-

duje, że inaktywacja takiego genu wywołuje określony nowotwór. Na przykład, wrodzone mutacje obydwu alleli *RB1*, *NF1*, *APC*, *VHL* wywołują odpowiednio: nowotwory siatkówki, komórek Schwanna, jelita grubego i nerek.

Postulowane przez Kinzlera i Vogelsteina istnienie tak zwanych **genów kształtujących podścielisko**, w którym rozwija się nowotwór nabłonkowy, pozostaje obecnie w fazie hipotezy, choć najnowsze wyniki badań sugerują, że ta grupa genów może mieć znaczenie w karcynogenezie raka sutka.

Prawidłowa funkcja genów supresorowych jest niezbędna, aby ryzyko wystąpienia nowotworu było jak najmniejsze. W tym sensie są one przyczyną „supresji nowotworów”, to znaczy utrudniają lub uniemożliwiają ich powstawanie. Gdy obydwie kopie genu są inaktywowane, zwykle komórka uzyskuje zdolność do niekontrolowanej i zwiększonej proliferacji oraz ma większe szanse przeżycia. Tak jest w większości przypadków i to właśnie stanowi podłoże karcynogenezy. Inaczej mówiąc, taka komórka może wejść na ścieżkę transformacji nowotworowej. Geny supresorowe wykazują w komórce działanie recesywne, czyli aby powstał nowotwór, obydwa allele genu muszą być inaktywowane (utrata funkcji genu). Wyjątkowo wystarczy inaktywacja tylko jednej kopii genu (tzw. niewydolność haploidalna), na przykład *NF-1*, by powstały liczne nowotwory. Jednak w większości przypadków, aby uzyskać efekt transformacji, konieczna jest utrata heterozygotyczności, czyli inaktywacja obydwu kopii genu. Podsumowując, białka kodowane przez geny supresorowe hamują proliferację komórek, a onkoproteiny ją stymulują.

Dwa spośród ponad 100 opisanych genów supresorowych, *RB* i *TP53*, pełnią kluczową rolę, ponieważ w większości nowotworów człowieka dysregulacji ulegają ścieżki przepływu sygnałów kontrolowane właśnie przez białka kodowane przez te dwa geny. Ponieważ jedną z podstawowych przyczyn transformacji nowotworowej jest utrata kontroli nad przebiegiem cyklu komórkowego, w większości nowotworów człowieka występują mutacje przynajmniej w jednym z głównych genów regulujących cykl, to znaczy *RB*, *TP53*, *CDK4*, *CYKLINA D* lub *CDKN2A*. Poniżej omówiono tylko najważniejsze informacje dotyczące *RB*, *TP53* i kilku innych wybranych genów supresorowych, które

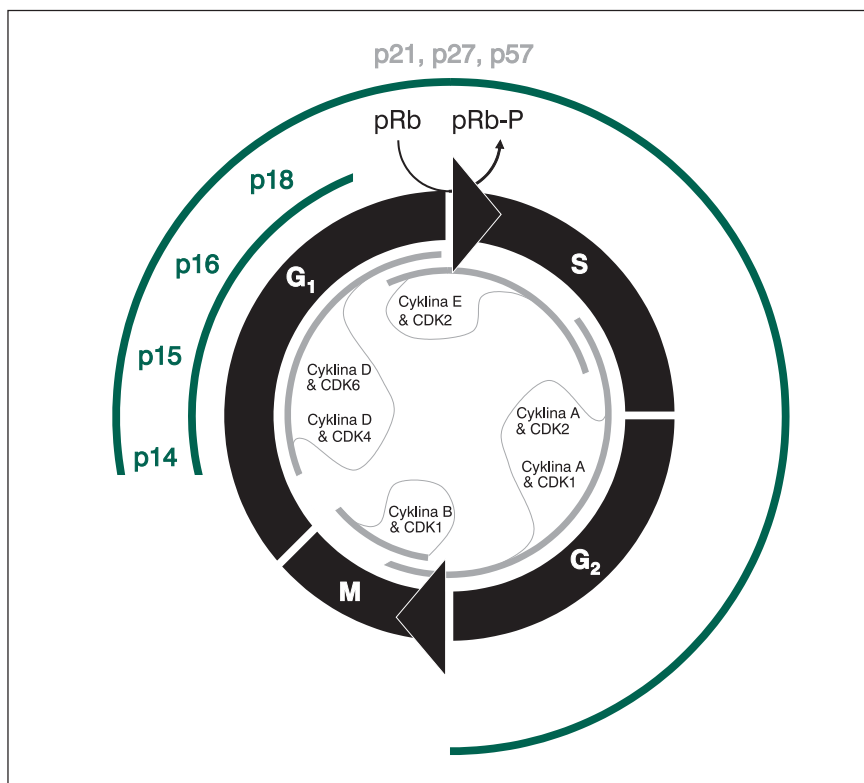
odgrywają rolę w transformacji nowotworowej i progresji glejaków oraz niektórych innych nowotworów układu nerwowego.

Gen *RB* koduje białko, które decyduje o wejściu komórki w cykl komórkowy (ryc. 1). W postaci aktywnej uniemożliwia komórce przejście z fazy G_1 do fazy S cyklu komórkowego. Inaktywacja pRB przez fosforylację pozwala komórce na wejście w fazę S (uwalniają się czynniki transkrypcyjne z grupy E2F, z którymi pRB jest związany w komórce spoczynkowej, co aktywuje transkrypcję genów niezbędnych do wejścia komórki w fazę S) i dalej, aż do fazy M, w której następuje defosforylacja i znowu pRB zostaje w postaci aktywnej. Z powyższego wynika, że gdy pRB jest nieobecne w komórce (np. wskutek mutacji lub delecji) lub gdy dojdzie do mutacji genów, które kontrolują fosforylację pRB (np. *CYKLINA D*, *CDK-4*, *CDKN2A*), komórka może swobodnie i w sposób niekontrolowany wejść w cykl komórkowy.

Gen *RB* jest umiejscowiony na chromosomie 13q14. Gdy oba allele *RB* w retinoblastacie są inaktywowane lub utracone, rozwija się z niego *retinoblastoma*. W badaniach molekularnych siatkowców w pełni potwierdzono hipotezę „dwóch mutacji” (*two hits*) Knudsona, w której przed laty zaproponował on, że występowanie dziedzicznych i sporadycznych postaci siatkowczaka wymaga dwóch odrębnych mutacji. W postaci dziedzicznej pierwsza mutacja występuje we wszystkich komórkach organizmu (od jednego z rodziców). Druga mutacja zachodzi w jednym z retinoblastów (lub w komórce prekursorowej). Prawdopodobieństwo takiego zdarzenia jest dość duże, dlatego nowotwór występuje wcześniej, w młodszym wieku, bywa wieloogniskowy i obustronny. W postaciach sporadycznych obie mutacje występują w jednym i tym samym retinoblastacie. Prawdopodobieństwo takiego wydarzenia jest bardzo małe, a nowotwór występuje u nieco starszych dzieci, jednoogniskowo i jednostronnie.

W rozwoju *glioblastoma** dochodzi do utraty wielu genów supresorowych. Utrata *RB* wydaje się ważna, ponieważ transfer genu *RB* do komórek glejaka, za pośrednictwem adenowirusa jako wektora, hamuje jego wzrost [4]. W większości *glioblastoma* prawdopodobnie występuje inaktywacja ścieżki p16-CDK4/cyklina D1-pRB [5].

*Nowotwór ten do niedawna zwano *glioblastoma multiforme* — „glejak wielopostaciowy” — i ta nazwa dobrze opisywała rzeczywistość. Według nowej klasyfikacji WHO (Kleihues P., Cavenee W.K. Pathology and genetics of tumours of the nervous system. World Health Organization classification of tumours. IARC Press, Lyon 2000) nazywany jest on *glioblastoma*. W konsekwencji w języku polskim powinien nosić nazwę „glejak zarodkowy” (podobnie jak np. *neuroblastoma* — nerwiak zarodkowy)



Rycina 1. Schemat cyklu komórkowego: cykl komórkowy „kręci się” dzięki działaniu kinaz cyklicznych (CDK, *cyclin dependent kinase*), które fosforylują odpowiednie białka (np. pRb) znajdujące się w tak zwanych punktach kontrolnych, co umożliwia komórce przejście z jednej fazy cyklu w następną. Kinazy te zostają aktywowane przez fosforylację po związaniu z cyklinami, które są syntetyzowane w odpowiednich fazach cyklu. W fazie G₁ następuje synteza — najpierw cykliny D (która wiąże się z CDK4 i CDK6), a następnie cykliny E (która wiąże się z CDK2). Kompleksy cyklina D&CDK4 fosforylują pRb, co uwalnia białka E2F aktywujące transkrypcję genów niezbędnych do przejścia komórki przez fazę S. Akumulacja kompleksu cykliny A z CDK2 i CDK1 rozpoczyna się w fazie S. Kompleksy te są niezbędne do przejścia komórki z fazy G₂ w M. Kompleks cykliny B z CDK1 fosforyluje białka niezbędne do mitozy. Aktywność kompleksów cyklin z CDK hamują inhibitory CDK; należą do nich białka p15, p16, p18, p19, czyli inhibitory cyklin D&CDK4 i D&CDK6 (zielona linia na zewnątrz koła w fazie G) oraz białka p21, p27 i p57, które są inhibitorami wszystkich kompleksów CDK (zielona linia na zewnątrz koła w całym cyklu). Według [1]

Gen supresorowy TP53 jest zlokalizowany na chromosomie 17p13. Białko P53 wiąże się z DNA, wpływając na wiele funkcji komórki, między innymi kontroluje transkrypcję wielu innych genów, wpływa na apoptozę i syntezę DNA. Białko P53 uniemożliwia wejście w cykl komórkowy tym komórkom, które mają uszkodzony DNA. Dlatego TP53 nazywa się czasem „strażnikiem genomu” lub lepiej „aniołem stróżem genomu”, gdyż unieczynienie TP53 inicjuje mitozę komórki z uszkodzonym DNA, co może prowadzić do propagacji uszkodzenia i dalszych zmian ułatwiających transformację nowotworową. Zatem, w przeciwieństwie do pRb, które „stoi przy bramie” punktu kontrolnego prawidłowego cyklu komórkowego, P53 pojawia się w cyklu (raczej, można by powiedzieć, jak „anioł” niż ciągle stojący „strażnik”), aby go wstrzymać, gdy DNA komórki jest uszkodzone przez mutagenne czynniki chemiczne, promieniowanie jonizujące

ce lub ultrafioletowe albo przez czynniki endogenne. Pomijając szczegółowy opis mechanizmu molekularnego działania TP53, trzeba przyznać, że sposób jego działania jest fascynujący, ponieważ to samo białko P53 kieruje komórkę albo na drogę naprawy DNA lub, gdy to się nie uda, na ścieżkę apoptozy. W warunkach prawidłowych okres półtrwania białka P53 wynosi tylko około 20 minut, ponieważ szybko ulega degradacji w procesie ubiquitynizacji. Natomiast uszkodzenie DNA indukuje wiele wydarzeń molekularnych, które doprowadzają do zmiany konformacji przestrzennej P53, co:

- utrudnia wiązanie z MDM2 (które doprowadziłoby do degradacji P53), a więc następuje szybki wzrost ilości P53 w komórce;
- umożliwia wiązanie się P53 z DNA i podjęcie funkcji czynnika transkrypcyjnego.

Następuje transkrypcja szeregu genów, które biorą udział w naprawie DNA lub apoptozie. Do

syntetyzowanych białek należy między innymi p21/WAF, które, hamując tworzenie kompleksów cyklina/CDK, uniemożliwia fosforylację pRB, a co za tym idzie — wejście w fazę S. Z tego i jeszcze innych powodów cykl komórkowy zostaje zatrzymany w późnej fazie G₁. Jeżeli naprawa DNA jest udana, P53 aktywuje *MDM2*, którego produkt białkowy wiąże się z nim, co obniża ilość P53 w komórce i otwiera wejście w fazę S. Jeżeli naprawa jest nieudana, P53 aktywuje geny indukujące apoptozę. Dzięki tym mechanizmom nie dochodzi do propagacji mutacji na komórki potomne. Unieczynienie genu *TP53* przez wrodzone lub somatyczne mutacje (lub inne mechanizmy, np. wiązanie P53 z MDM2 albo białkiem E6 wirusa HPV) powoduje, że białko P53 nie wiąże się z DNA w odpowiednim miejscu, nie dochodzi do transkrypcji odpowiednich (ww.) genów ani do zatrzymania cyklu w fazie G₁; nie następuje ani naprawa DNA, ani indukcja apoptozy. Zaburzenia (mutacje) DNA zostają przeniesione do komórek potomnych, prowadząc do transformacji nowotworowej.

Mutacje w *TP53* występują w więcej niż połowie nowotworów człowieka, w większości przypadków guzów sporadycznych. W rzadko spotykanym zespole Li-Fraumeni mutacja *TP53* jest zmianą wrodzoną, która predysponuje do rozwoju różnych nowotworów, w tym również nowotworów ośrodkowego układu nerwowego (OUN) — ryzyko wystąpienia nowotworu złośliwego u tych chorych jest 25 razy większe. Wyjaśnienie związku funkcji *TP53* z naprawą DNA i apoptozą pozwoliło zrozumieć niektóre aspekty terapii nowotworów. Ponieważ radio- i chemioterapia uszkadzają DNA, nowotwory z prawidłowym *TP53* będą lepiej reagować na leczenie, gdyż komórki nowotworowe z uszkodzonym DNA podlegają apoptozie. I przeciwnie: guzy ze zmutowanym *TP53* są raczej odporne na radio- i chemioterapię (np. raki jelita grubego lub niektóre glejaki).

Gen *CDKN2A*, zlokalizowany na chromosomie 9p21, jest źródłem dwóch różnych transkryptów, które kontrolują przejście komórki z fazy G₁ do fazy S. Białko p14ARF stabilizuje P53 (ponieważ wiąże się z MDM2, co zapobiega degradacji P53). Białko p16/INK4A jest inhibitorem kinazy CDK4. Inaktywacja *CDKN2A* (mutacje, hipermetylacja) ułatwia aktywację kompleksu cyklina D/CDK4 oraz fosforylację pRB i/lub degradację P53. Wszystkie te mechanizmy zwiększają dynamikę cyklu komórkowego, umożliwiając powstanie fenotypu podatnego na transformację nowotworową. Mutacje *CDKN2A* występują w wysokim odsetku różnych raków oraz w glejakach [6, 7]. Delecja 9p21 jest jedną z naj-

częstszych zmian genetycznych występujących w glejakach o dużej złośliwości. Obecność prawidłowego (niezmutowanego) *CDKN2A* zapobiega fosforylacji pRB w komórkach glejaków człowieka, co sugeruje, że mutacje tego genu mogą mieć istotne znaczenie w procesie zezłośliwienia glejaków [8].

Gen *NF-1* (17q11.2) koduje białko (zwane neurofibrominą), które aktywuje GTP-azę, co ułatwia przejście RAS z postaci aktywnej (GTP-RAS) w postać nieaktywną (GDP-RAS). Inaktywacja *NF-1* powoduje, że białko RAS pozostaje w stanie permanentnej aktywacji, indukując proliferację. Wrodzone mutacje w tym genie występują w neurofibromatozie typu I, w której stwierdza się liczne nerwiakowłókniaki, a także zwiększone ryzyko rozwoju licznych nowotworów, między innymi oponiaków.

Mutacje genu *NF-2*, (który koduje białko merlinę wiążące się z aktyną i CD44) prawdopodobnie zaburzą przekazywanie sygnałów na granicy komórka/macierz pozakomórkowa. Wrodzone mutacje w tym genie predysponują do rozwoju neurofibromatozy typu II, obciążonej zwiększonym ryzykiem rozwoju *schwannoma acousticum*, oponiaków i glejaków, a szczególnie wyściółczaków rdzenia kręgowego. Mutacje genu *NF-2* są najczęstszą molekularno-genetyczną zmianą w oponiakach, występujących zarówno w neurofibromatozie typu II, jak i w oponiakach sporadycznych. W tych ostatnich występują w około 60% przypadków (w 70–80% oponiaków fibroblastycznych, ale tylko w ok. 25% oponiaków meningotelialnych). Delecje regionu 22q12 (gdzie znajduje się *NF-2*) występują w około 50% oponiaków [9, 10]. Częstość mutacji jest podobna w anaplastycznych (III°), atypowych (II°) i dobrze zróżnicowanych (I°) oponiakach, stąd wniosek, że mutacje *NF-2* nie mają związku z progresją złośliwości oponiaków. To raczej progresja złośliwości ma związek z pogłębiającą się niestabilnością genomową wyrażającą się utratą (m.in. na chromosomach 1p, 6q, 14q) i pozyskiwaniem (m.in. na chromosomach 12q, 1q, 9q, 20q) dodatkowego materiału genetycznego.

Gen *PTC* (*PTCH*) koduje białko *Patched* znajdujące się w błonie komórkowej. Jest ono receptorem czynników wzrostu z rodziny białek *hedgehog*. Mutacje w tym genie mają związek z występowaniem raków podstawnokomórkowych skóry, raka trzustki i *medulloblastoma* (patrz poniżej).

Gen *PTEN* koduje specjalne białko, które wykazuje podwójną aktywność fosfatazową — defosforyluje substraty fosfolipidowe i białkowe. Białko to hamuje progresję cyklu komórkowego przez zwiększenie transkrypcji i stabilizację p27. Gdy

białko — homolog fosfatazy i tensyny (*PTEN, phosphatase and tensin homolog*) jest inaktywowane (np. mutacja *PTEN*), obniża się stężenie inhibitora cyklu komórkowego, jakim jest p27, i komórka może wejść w cykl. Mutacje i delecje *PTEN* występują w różnych rakach (m.in. sutka, endometrium, stercza) oraz w *glioblastoma*.

Geny regulujące apoptozę

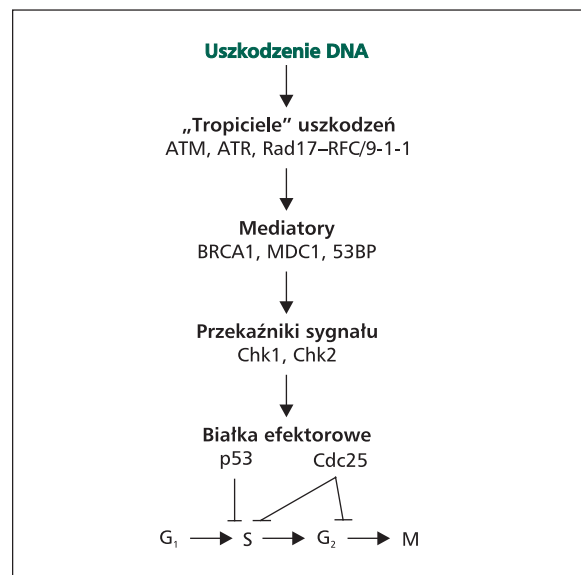
Zahamowanie apoptozy wydłuża okres przeżycia komórek, zwiększając liczebność populacji komórek narażonych na działanie karcynogenów oraz prawdopodobieństwo wystąpienia mutacji w komórkach. Do genów hamujących apoptozę należą na przykład *BCL-2* czy *BCL-XL*. Geny proapoptotyczne to na przykład *BAX*, *BAD*, *BID*. Dla prawidłowej funkcji komórki tak samo ważna jest kontrola proliferacji, jak apoptozy. Zaburzenia któregośkolwiek z tych procesów mogą prowadzić do transformacji nowotworowej. W kontroli apoptozy wykorzystywane są **ścieżki sygnałowe Akt/PKB**. Mutacje *AKT* (częste w komórkach nowotworowych) powodują zahamowanie apoptozy. Oporność na apoptozę wiąże się z opornością na chemioterapię.

Geny regulujące naprawę DNA

Miliardy komórek organizmu są stale w ciągu całego życia narażone na działanie środowiskowych czynników mutagennych (promieniowanie jonizujące, UV, czynniki chemiczne), a w komórkach będących w cyklu komórkowym zdarzają się błędy replikacyjne, które mogłyby być przeniesione na komórki potomne. Na szczęście istnieją mechanizmy szybkiej naprawy DNA, które zapobiegają mutacjom — również mutacjom genów odpowiedzialnych za proliferację i różnicowanie się komórek. W pięć głównych sposobów naprawy DNA zaangażowanych jest ponad 100 znanych obecnie genów. Geny zaangażowane w naprawę DNA nie są onkogenne, ale zaburzenia (mutacje) tych genów mogą ułatwiać transformację nowotworową. Jeżeli mutacje w genach naprawy DNA są wrodzone, mogą skutkować występowaniem predyspozycji do pojawienia się pewnych nowotworów (np. rak sutka u nosicieli mutacji w *BRCA1*). Mutacje w obydwu allelach genów naprawy DNA powodują wraz z kolejnymi podziałami akumulację błędów replikacyjnych (również akumulację mutacji w genach supresorowych lub onkogenach). W wyniku tych zaburzeń powstaje niestabilność genomowa, która stanowi podłoże zespołów niestabilności genomowej. W odpowiedzi na uszkodzenie DNA (np. pęknięcia jedno- i dwuniciowego

DNA spowodowane promieniowaniem jonizującym) w komórce dochodzi do aktywacji punktów kontrolnych uszkodzenia DNA (G1/S, intra-S, G2/M), w których odpowiednie białka „tropią” powstałe zmiany DNA i za pomocą mediatorów przekazują sygnał do kinaz białkowych i fosfataz, które aktywują P53 i inaktywują CDK, aby zatrzymać cykl komórkowy na czas potrzebny do naprawy (ryc. 2). Wspomniane punkty kontrolne cyklu komórkowego nie stanowią odpowiednika budki celników na granicy międzypaństwowej. Są to raczej ścieżki biochemiczne, na których wiele białek ciągle monitoruje integralność genomu i zdyscyplinowane przechodzenie komórki przez fazy cyklu komórkowego (czas i kolejność przepływu sygnałów). Przekaznikami sygnału w punkcie kontrolnym są kinazy białkowe (m.in. CHEK1/2).

Gen *CHEK2*, kodujący kinazę serynowo-treoninową, bierze udział w kaskadzie wydarzeń molekularnych, które prowadzą do zahamowania cyklu i naprawy DNA. Mutacje w tym genie są związane z predyspozycją do występowania między innymi *glioblastoma*, raków sutka i zespołu podobnego do zespołu Li-Fraumeni [11]. Polimorfizm genu *CHEK2* może mieć związek z rokowaniem chorych z *glioblastoma* [12].



Rycina 2. Elementy punktów kontrolnych uszkodzenia DNA w komórkach człowieka; ATM — *ataxia teleangiectasia mutated*; ATR — *ataxia teleangiectasia related*; RFC (*replicative factor C*) — czynnik replikacyjny C; 9-1-1 — Rad 9-Rad1-Hus1; MDC1 (*mediator of DNA damage checkpoint 1*) — białko wyłączające czynniki transkrypcji wokół uszkodzonego DNA; 53BP (*p53 binding protein*) — białko wiążące p53. Zmodyfikowano na podstawie: Sancar A. i wsp. Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Ann. Rev. Biochem.* 2004; 73: 39–85

Gen *BRCA1* współdziała z szeregiem genów biorących udział w naprawie DNA, regulując ekspresję genów zaangażowanych na różnych ścieżkach naprawy DNA. Białko kodowane przez *BRCA1* łączy się i współdziała z białkami zaangażowanymi w naprawę DNA (np. CHEK2) oraz z białkami regulującymi cykl komórkowy (pRB, p21, p27, CDK2). Inaktywacja *BRCA1* zwiększa podatność na występowanie nowotworów (m.in. raka sutka, jajnika, prostaty), ponieważ dochodzi do nagromadzenia się w komórce zaburzeń cyklu komórkowego i zaburzeń chromosomowych, co może prowadzić do transformacji nowotworowej lub do apoptozy. Wyniki najnowszych badań nad zwierzęcymi modelami glejaków sugerują udział *BRCA1* wogenezie tych guzów [13].

Geny *hMSH2* i *hMLH1* to tak zwane geny mutatorowe, czyli geny naprawcze błędnie sparowanych zasad. Inaktywacja tych genów powoduje nagromadzenie mutacji w komórce i niestabilność genomową, a w następstwie może prowadzić do powstania nowotworów (np. HNPCC — dziedziczny rak jelita grubego bez polipowatości). Ekspresję białka *hMSH2* około 2-krotnie częściej stwierdzono w *glioblastoma* niż w *astrocytoma* II°. Znaczenie tych wyników trudno obecnie wyjaśnić.

Telomeraza

Skracaniu telomerów (które znajdują się na końcach chromosomów i ulegają skróceniu przy każdym podziale komórki) zapobiega enzym telomeraza. Wykazano, że prawie wszystkie glejaki zawierają telomerazę, a aktywność tego enzymu jest większa w glejakach o dużym stopniu złośliwości i ma związek z rokowaniem [14].

Molekularne mechanizmy związane z inwazyjnością glejaków

Podobnie jak inne nowotwory złośliwe, glejaki powstają w procesie wielostopniowej transformacji komórek prekursorowych, w których dochodzi do akumulacji wielu zaburzeń genetycznych (m.in. amplifikacji genów, mutacji punktowych, utraty chromosomów). Do znanych zaburzeń genetycznych w progresji glejaków należą: utrata *PTEN*, amplifikacja *EGFR*, deregulacja *RAS* i aktywacja ścieżki sygnałowej kinazy 3-fosfatydylinozytolowej (PI3K, *phosphatidylinositol 3-kinase*) [15]. Fosforylacja AKT w pozycji Thr308 (a nie Ser473) jest związana z *glioblastoma*, co sugeruje specyficzne zaburzenie ścieżki aktywacji PI3K w czasie progresji glejaka. Identyfikacja specyficznych zaburzeń enzymatycznych zaangażowanych w progresji może

umożliwić syntezę nowych leków przeciwnowotworowych [15, 16]. Ważnymi mediatorami w progresji złośliwych glejaków są kinaza FAK i kinaza Pyk2 — niereceptorowe, cytozolowe kinazy tyrozynowe. Od równowagi między nimi może zależeć zarówno wzrost, jak i inwazyjność komórek nowotworowych. Identyfikacja istotnych komponentów ścieżek sygnałowych, w których wyżej wymienione białka biorą udział, pozwoli wyjaśnić proces inwazji, a może też mieć znaczenie terapeutyczne [16].

Zaburzenia molekularne odgrywają rolę nie tylko w karcynogenezie, ale mają także znaczenie diagnostyczne i rokownicze, na przykład utrata 1p i 19q w *oligodendroglioma* wiąże się z lepszym rokowaniem [17]. Z genezą glejaków (np. *astrocytoma* i *oligodendroglioma*) o różnym stopniu złośliwości związane są specyficzne ścieżki molekularne. Choć molekularne mechanizmy związane z inwazyjnością glejaków poznano dopiero częściowo, na podstawie cech molekularno-genetycznych można już wyróżnić kilka podtypów *glioblastoma* [18]. Zidentyfikowano 12 białek (m.in. EGFRpTyr845, AKTpThyr308, PI3K, MMP9, VEGF, fosforylowane pRB, Bcl-2) odgrywających rolę na ścieżkach sygnałowych związanych z proliferacją, apoptozą, angiogenezą i inwazją, które pozwalają zróżnicować *glioblastoma* i *glioma* o małej złośliwości [19].

Zmiany molekularne występujące w złośliwych glejakach dotyczą głównie kontroli cyklu komórkowego i proliferacji. Stosowane obecnie programy chemioterapii są skierowane przeciwko komórkom proliferującym, natomiast komórki nowotworowe mające zdolność naciekania, ale niebędące w cyklu komórkowym, pozostają nietknięte. Dokładna analiza ścieżek sygnałowych związanych z proliferacją, inwazyjnością i apoptozą może mieć nie tylko znaczenie diagnostyczne i prognostyczne, ale może również dostarczyć nowych możliwości zastosowania terapii odpowiednio celowanej na poziomie molekularnym.

Zainteresowanie budzą również znacznie mniej znane ścieżki molekularne związane ze zdolnością do inwazji komórek glejaków. Inwazyjność jest skomplikowanym mechanizmem, który obejmuje zmiany środowiska wewnątrz- i zewnątrzkomórkowego oraz zmiany adhezji na granicy komórka/komórka, komórka/macierz pozakomórkowa. Biorą w nim udział, z jednej strony, enzymy degradujące macierz pozakomórkową (katepsyny, metaloproteiny, proteazy serynowe) [20], a z drugiej — zmiany ruchliwości komórki, które zależą od zmian cytoszkieletu, a w szcze-

gólności — mikrotubul, mikrofilamentów aktywnych, włókienek pośrednich i współpracujących z nimi cząsteczek adhezyjnych. Molekularne zmiany aparatu migracyjnego komórki, które mają związek z inwazyjnością glejaków, dotyczą 3 ścieżek sygnałowych, w których biorą udział: 1) czynniki transkrypcyjne NF- κ B (*nuclear factor κ B*); 2) kinazy tyrozynowe niereceptorowe FAK i Pyk-2; 3) drobnocząsteczkowe GTP-azy z rodziny Rho (RhoA i Rac1) [16].

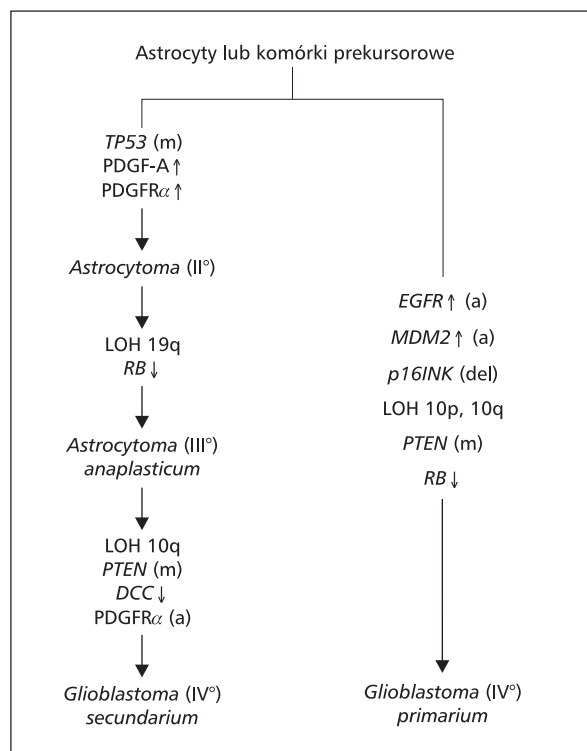
Wyniki dotychczasowych badań wskazują, że różne molekularne ścieżki są zaangażowane w patogenezę pierwotnego (*de novo*) i wtórnego *glioblastoma* (powstałego wskutek progresji, czyli uzłośliwienia, z *astrocytoma* II° lub z anaplastycznej postaci *astrocytoma*). Rycina 3 obrazuje dwie z nich, ale prawdopodobnie istnieją też inne. Porównanie obydwu ścieżek wskazuje, że nadekspresja receptora naskórkowego czynnika wzrostu (EGFR, *epidermal growth factor receptor*) i amplifikacja genu *EGFR* jest cechą charakterystyczną pierwot-

negu *glioblastoma*. Około 60% tych nowotworów wykazuje nadekspresję białka, a około 40% — amplifikację genu. Natomiast we wtórnych *glioblastoma* do najważniejszych zmian należą mutacje *TP53* (> 65% vs. tylko ok. 10% w pierwotnych *glioblastoma*). W ponad 90% przypadków mutacje w tym genie stwierdza się już w pierwszej biopsji *astrocytoma*. Akumulacja białka P53 występuje w ponad 90% wtórnych i tylko w około 30% pierwotnych *glioblastoma*. Odsetek komórek glejaka z akumulacją P53 wzrasta w każdej następnej biopsji. Inaktywacja *TP53* może się wiązać z występowaniem mutacji w tym genie lub z zaburzeniami genów, które wpływają na jego funkcję (degradację), na przykład delecje *CDKN2A* lub amplifikacja *MDM2*. Mutacje *TP53* często występują w różnych nowotworach złośliwych, a delecja 17p (na którym *TP53* jest zlokalizowany) jest częsta w glejakach. Jak wyżej wspomniano, odpowiedź na radioterapię zależy między innymi od stanu genu *TP53*.

Zatem w rozwoju pierwotnego *glioblastoma* odgrywa rolę amplifikacja/nadekspresja *EGFR* i *MDM2*. Wtórne *glioblastoma* powstające z *astrocytoma* charakteryzują się wysokim odsetkiem mutacji *TP53*. Delecje p16 częściej występują w pierwotnym niż we wtórnym *glioblastoma* [21].

W powstaniu glejaków odgrywa rolę aktywacja onkogenów lub inaktywacja genów supresorowych, które zaburzą molekularne ścieżki sygnałowe zaangażowane w kontrolę cyklu komórkowego i różnicowania. Prowadzi to do zahamowania apoptozy, utraty kontroli nad proliferacją i uzyskania przez komórki zdolności do inwazji i przerzutowania. W kaskadzie wydarzeń molekularnych niektóre zmiany występują wcześniej, a inne na późnych etapach progresji. Na przykład, do wczesnych zmian w *astrocytoma* należą mutacje *TP53*, a w *oligodendroglioma* — utrata 19q i 1p. Inaktywacja *PTEN* i p16/CDKNA oraz amplifikacja *EGFR* występują później (*PTEN* i p16 są negatywnymi regulatorami specyficznych reakcji enzymatycznych w komórkach gleju).

Delecje chromosomów 1p, 9p, 10, 13q, 17p, 19q i 22q często występują w *astrocytoma* [22–25]. Niektóre z nich obejmują znane geny supresorowe, na przykład *PTEN* (chromosom 10) lub *TP53* (17p) z oczywistymi konsekwencjami związanymi z ich inaktywacją (omówionymi wyżej). Wykazano, że przynajmniej jeden z czterech głównych genów supresorowych (*TP53*, *RB*, *PTEN*, *P16*) ulega inaktywacji w ponad 90% glejaków hodowanych *in vitro*, a dwa z nich były inaktywowane w 60% badanych glejaków *in vitro* [26]. Podobne zaburzenia



Rycina 3. Zmiany molekularne związane z powstawaniem *glioblastoma de novo* (*g. primarium*) i z progresją od *astrocytoma* II° do *glioblastoma* IV° (*g. secundarium*); PDGF-A (*platelet-derived growth factor A*) — płytkowy czynnik wzrostu A; PDGFR- α (*platelet-derived growth factor receptor α*) — receptor płytkowego czynnika wzrostu; \downarrow — zahamowanie ekspresji; (m) — mutacje; \uparrow — nadekspresja; (a) — amplifikacja; (del) — delecja. Zmodyfikowano na podstawie: Kleihues i Ohgaki. *Neurooncology* 1999

ekspresji genów supresorowych stwierdza się w komórkach glejaków pobranych bezpośrednio od chorych [27].

W około 40% *glioblastoma* stwierdza się amplifikację tego regionu chromosomu 7, który koduje **EGFR**, co wydatnie zwiększa ekspresję tego receptora na powierzchni komórek nowotworowych. Jednoczesna ekspresja jego ligandów (tzn. EGF i TGF- α) umożliwia stymulację auto- i parakrynną, która aktywuje ścieżki sygnałowe kinazy MAP i kinazy PI-3, które stymulują proliferację, angiogenezę i oporność na apoptozę [28]. Amplifikacji EGFR często towarzyszy rearanżacja genów, która powoduje takie zmiany białka receptorowego, że albo wykazuje ono aktywność kinazy niezależnie od obecności liganda, albo zależną od liganda, ale wzmożoną aktywność sygnałową [29]. Jedną z tych mutacji — *EGFR*, zwana *EGFRvIII* lub *delta-EGFR*, dość często występuje w pierwotnych glejakach, zaś rzadko w glejakach wtórnych. Wyniki badań nad rolą EGFR i jego ścieżkami sygnałowymi w glejakach już wykorzystano w próbach leczenia tych nowotworów. Istnieją różne możliwości; jedną z nich są monoklonalne przeciwciała przeciw zewnątrzkomórkowej domenie receptora, które go blokują, uniemożliwiając wiązanie z ligandem (co prowadziłoby do aktywacji ścieżki sygnałowej) [30]. Okazało się również, że zablokowanie ścieżki sygnałowej EGFR zwiększa wrażliwość komórek glejaków na radioterapię. *Glioblastoma* z nadekspresją EGFR wykazują oporność na radioterapię, natomiast odpowiedź na ten sposób leczenia jest znacznie lepsza u chorych z *glioblastoma* niewykazującym ekspresji EGFR [31].

W naczyniach włosowatych glejaków z hiperplazją komórek śródbłonna stwierdzono nadekspresję PDGF- β , co sugeruje jego rolę w angiogenezie. Nadekspresja PDGF-A i PDGF-B i ich ligandów często występuje w glejakach. Wydaje się, że autokrynną stymulacja związana z tymi czynnikami może mieć związek z rozwojem złośliwego *astrocytoma* [32]. Wyniki eksperymentów, w których w różny sposób inaktywowano PDGF *in vivo* i *in vitro* [33] wskazują, że ważną rolę w rozwoju glejaków odgrywa ścieżka sygnałowa aktywowana przez PDGF.

Chociaż mutacje *RAS* w glejakach praktycznie nie występują, aktywność białka *RAS* w rozwoju glejaków może być zwiększona przez inne mechanizmy molekularne. O znaczeniu ścieżki aktywacji *RAS* w glejakach świadczą wyniki badań nad zastosowaniem inhibitorów transferaz farnezylowych w hodowli komórek ludzkich glejaków [34, 35]. Zahamowanie aktywności *RAS* zwiększa też

wrażliwość komórek w hodowli na promieniowanie jonizujące [36].

Aktywując *RAS*, PDGFR pobudza przynajmniej trzy ścieżki sygnałowe: Raf, Ral-GEF (*guanine nucleotide exchange factor*) oraz PI3K, która odgrywa ważną rolę w ruchliwości komórki [3]. Ścieżka sygnałowa kinazy PI-3 jest jedną spośród kilku ścieżek sygnałowych implikowanych w powstawaniu glejaków o dużej złośliwości. Inaktywacja PTEN (która często występuje w *glioblastoma*) również zwiększa aktywność ścieżki sygnałowej kinazy PI-3. Zarówno ta kinaza, jak i inne elementy jej ścieżki sygnałowej są potencjalnym celem terapii glejaków, (np. inhibitory mTOR [substratu AKT-1], między innymi rapamycyna [37]). Aktywność kinazy PI-3 jest hamowana przez PTEN. Białko to wpływa na inwazję i migrację komórek nowotworowych w hodowli [38], między innymi zmniejsza zdolność do tworzenia nowotworów przez komórki glejaka z hodowli. Mutacje *PTEN* mają związek z krótszym przeżyciem chorych z glejakami [39]. Chociaż potencjalne znaczenie ścieżek sygnałowych zaangażowanych w cyklu komórkowym i apoptozie wydaje się oczywiste w etiopatogenezie guzów mózgu, nie wiadomo jeszcze, czy i w jakim stopniu istnieje związek między polimorfizmem genów zaangażowanych na tych ścieżkach a ryzykiem wystąpienia guza mózgu. Wykazano, że częste polimorfizmy genów *CASP8*, *CCND1*, *CCNH* i *MDM2* mogą się wiązać z ryzykiem występowania oponiaków i glejaków [40].

Komórki macierzyste nowotworu

Chociaż przebieg kliniczny *glioblastoma* jest różny u poszczególnych chorych, nie udało się dotychczas wyodrębnić podtypów tego bardzo złośliwego nowotworu, które mogłyby lepiej reagować na terapię celowaną. Pierwotne i wtórne *glioblastoma* znacznie się różnią na poziomie zaburzeń molekularno-genetycznych [41], ale różnice te nie przekładają się na odmienną odpowiedź na terapię lub różne rokowanie. W ciągu ostatnich kilku lat w różnych nowotworach wykazano obecność komórek macierzystych nowotworu (CD133⁺) (*cancer stem cells*), między innymi w glejakach [42] i w nowotworach mózgu u dzieci [43]. Stanowią one 1–3% wszystkich komórek nowotworu, są odporne na radio- i chemioterapię i mają zdolność pobudzania angiogenezy. Jeszcze nie wiadomo dokładnie, w jaki sposób komórki te powstają.

Komórki macierzyste mogą się różnicować w kierunku neuronalnym, astro- i oligodendrogleju. Analiza ekspresji genów pozwala na molekularną kla-

syfikację *glioblastoma*, w której profil ekspresji genów odzwierciedla poszczególne etapy neurogenezy oraz rokowanie [44]. Z pierwotnego *glioblastoma* wyodrębniono w hodowli różnicujące się w kierunku neuronalnym macierzyste komórki nowotworowe CD133⁺ i CD133⁻, co pozwala na subklasyfikację pierwotnych glejaków, która może mieć implikacje terapeutyczne. Natomiast w hodowlach z wtórnych *glioblastoma* nie stwierdzono obecności CD133⁺ komórek neuronalnych, co sugeruje ich pochodzenie z komórek macierzystych innych niż neuronalne [42].

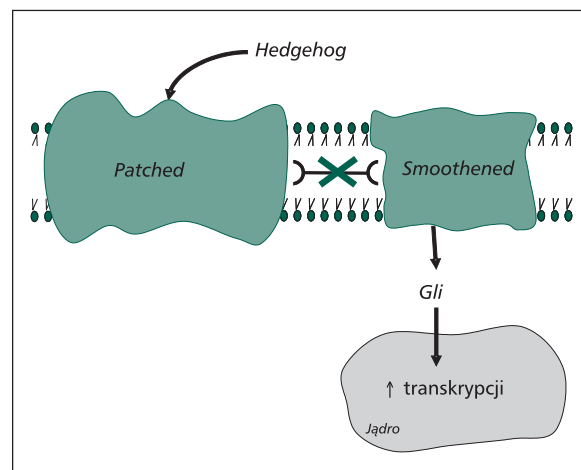
Znaczenie molekularnych ścieżek sygnałowych dla diagnostyki i terapii na przykładzie ścieżki Hedgehog/Patched w medulloblastoma

Rdzeniak zarodkowy jest złośliwym embrionalnym nowotworem OUN występującym przede wszystkim u dzieci. Nowotwory embrionalne OUN są zbudowane z niskoróżnicowanych lub nieróżnicowanych komórek o dużym stopniu złośliwości. Komórki te często nie wykazują cech różnicowania ani na poziomie morfologicznym, ani immunohistochemicznym. Chociaż wyróżnia się wśród nich *medulloblastoma*, *ependymblastoma* i obwodowy niedojrzały guz neuroektodermalny (PNET, *peripheral primitive neuroectodermal tumor*), uważam, że nie można obecnie przedstawić przekonujących dowodów na rozróżnianie tych nowotworów (mimo że tak są sklasyfikowane w podziale WHO). Moim zdaniem nowotwory te powinny być określane jedną nazwą „niedojrzały guz neuroektodermalny”, gdyż tym są w istocie, lub lepiej „PNET ośrodkowego układu nerwowego” (CPNET, *central primitive neuroectodermal tumor*) w odróżnieniu od PNET, którego cechą charakterystyczną jest zrównoważona translokacja t(11;22).

Odkrycie terapeutycznego znaczenia ścieżki sygnałowej *Hedgehog/Patched* w *medulloblastoma* [45, 46] wskazuje, że w przyszłości ta grupa niedojrzałych nowotworów będzie raczej sklasyfikowana według kryteriów molekularnych, a nie morfologicznych, ponieważ dla określenia sposobu leczenia i rokowania ma znaczenie nie obraz morfologiczny (niestety!), ale rodzaj molekularnej ścieżki sygnałowej.

Z najnowszych badań wynika, że w patogenezie *medulloblastoma* mogą mieć znaczenie geny kontrolujące rozwój niektórych tkanek, w tym tkanek OUN w okresie embriogenezy. W odniesieniu do histogenezy *medulloblastoma* najbardziej prawdopodobną wydaje się hipoteza wywodząca te nowotwory z komórek prekursorowych zewnętrznej

warstwy ziarnistej kory mózdzku (przemawia za tym m.in. obecność różnicowania neuronalnego w tych nowotworach). Wykazano eksperymentalnie, że proliferacja prekursorów neuronów oraz komórek warstwy ziarnistej mózdzku zależy w dużym stopniu od mitogennego wpływu białka zwanego *Sonic Hedgehog* (lub *Indian Hedgehog*) i aktywności ścieżki sygnałowej uruchamianej przez połączenie się tego liganda z jego receptorem w błonie komórkowej, zwanym *Patched* (ryc. 4). Komórki prekursorowe warstwy ziarnistej mózdzku mogą zostać pobudzone do ciągłej niekontrolowanej proliferacji przez różne zaburzenia genetyczne, które wywołują dysregulację i konstytutywną (bez liganda) aktywację ścieżki sygnałowej *Hedgehog/Patched* (H/P). Taką permanentną aktywację ścieżki H/P umożliwiają mutacje genu *PTCH* kodującego białko *Patched*, które występują w około 8% przypadków *medulloblastoma* (szczególnie w postaci desmoplastycznej). Również nadekspresja białka *Hedgehog* pobudza komórki do perma-



Rycina 4. Ścieżka sygnałowa *Hedgehog/Patched* — w błonie komórkowej znajdują się związane ze sobą dwa białka: *Smoothened* i *Patched*. Gdy *Smoothened* uwolni się od *Patched*, ulega aktywacji. Aktywowane białko *Smoothened* powoduje, że cytoplazmatyczne białko *Gli* przedostaje się do jądra w całości, gdzie działa jako **aktywator transkrypcji** genów napędzających proliferację. (W warunkach prawidłowych *Gli* ulega w cytoplazmie rozszczepieniu na dwa fragmenty, z których tylko jeden przenika do jądra, gdzie pełni funkcję **hamującą transkrypcję**). *Smoothened* ma szansę aktywacji na trzy sposoby: 1) gdy *Patched* połączy się ze swoim ligandem, zwanym *Sonic Hedgehog* (lub *Indian Hedgehog*) — jest to fizjologiczne uruchomienie ścieżki sygnałowej ***Sonic Hedgehog/Patched/Smoothened/Gli/aktywacja transkrypcji***; 2) inaktywujące mutacje genu *PTCH* w ogóle uniemożliwiają połączenie się *Patched* ze *Smoothened*; 3) mutacje typu *gain of function* genu *SMO* kodującego *Smoothened* aktywują to białko bez pomocy z zewnątrz (konstytutywnie). Ponadto, nadekspresja białka *Hedgehog* przez komórki nowotworowe na zasadzie stymulacji autokrynnej ciągle pobudza komórki do proliferacji na drodze powyższej ścieżki sygnałowej. Według [1]

mentnej aktywacji ścieżki H/P poprzez auto- i parakrynną stymulację. Rozwikłanie na poziomie molekularnym szczegółów przepływu sygnałów na ścieżce H/P zastosowano praktycznie w terapii. Cyklopowamina (naturalny roślinny alkaloid), która jest inhibitorem białka *Smoothed*, i inne syntetyczne drobnocząsteczkowe inhibitory tego białka podane zwierzętom eksperymentalnym powodują regresję *medulloblastoma*, uniemożliwiając przepływ sygnału na omawianej ścieżce [47].

Omawiana ścieżka sygnałowa ma również podstawowe znaczenie w tak różnych morfologicznie nowotworach, jak rak trzustki, rak podstawnokomórkowy skóry, drobnokomórkowy rak płuca, rak sutki, rak prostaty i rak jelita grubego [48]. Dlatego inhibitory elementów tej ścieżki sygnałowej mogą w przyszłości mieć zastosowanie w leczeniu tak różnych morfologicznie nowotworów. Warto zapamiętać przykład ścieżki H/P, ponieważ **na molekularnych ścieżkach sygnałowych w komórce i jej kontaktach z otoczeniem leży przyszłość diagnostyki i terapii nieuleczalnych obecnie nowotworów OUN.**

W niewielkim odsetku przypadków *medulloblastoma* stwierdzono mutacje w genach kodujących białko APC i β -kateninę, co sugeruje również udział ścieżki sygnałowej Wnt w patogenezie i/lub progresji, ponieważ białka Wnt łączą się z białkami *Frizzled* w błonie komórkowej, uruchamiając kaskadę reakcji prowadzących do indukcji proliferacji.

PIŚMIENNICTWO

- Domagała W. Nowotwory. W: Stachura J., Domagała W. (red.). Patologia, znaczy słowo o chorobie. Tom I. Wyd 2. PAU, Kraków [w druku].
- Holland E.C. Gliomagenesis: genetic alterations and mouse models. *Nat. Rev. Genet.* 2001; 2: 120–129.
- Weinberg R.A. The biology of cancer. Garland Science. Taylor & Francis Group, New York 2007.
- Fueyo J., Gomez-Manzano C., Yung W.K.A. Suppression of human glioma growth by adenovirus-mediated *Rb* gene transfer. *Neurology* 1998; 50: 1307–1315.
- Ueki K., Ono Y., Henson J.W. i wsp. CDKN2/p16 or *RB* alterations occur in the majority of glioblastomas and are inversely correlated. *Cancer Res.* 1996; 56: 150–153.
- James C.D., He J., Carlom E. i wsp. Chromosome 9 deletion mapping reveals interferon alpha and interferon beta-1 gene deletions in human glioma tumors. *Cancer Res.* 1991; 51: 1684–1688.
- Olopade O., Jenkins R.B., Ransom D.T. i wsp. Molecular analysis of deletions of the short arm of chromosome 9 in human gliomas. *Cancer Res.* 1992; 52: 2523–2529.
- Arap W., Knudsen E.S., Wang J.Y.J. i wsp. Point mutations can inactivate *in vitro* activities of p16^{INK4a}/CDKN2 in human glioma. *Oncogene* 2007; 14: 603–609.
- Zang K.D. Cytological and cytogenetical studies on human meningiomas. *Cancer Genet. Cytogenet.* 1982; 6: 249–274.
- Dumanski J.P., Carlom E., Collins V.P., Nordenskjöld M. Deletion mapping of a locus on human chromosome 22 involved in the oncogenesis of meningioma. *Cancer Res.* 1990; 50: 5863–5867.
- Sallinen S.-L., Konec T., Hannu H. i wsp. CHEK2 mutations in primary glioblastomas. *J. Neurooncol.* 2005; 74: 93–95.
- Simon M., Ludwig M., Fimmers R. i wsp. Variant of the CHEK2 gene as a prognostic marker in glioblastoma multiforme. *Neurosurgery* 2006; 59: 1078–1085.
- Bencokova Z., Pauron L., Devic C. i wsp. Molecular and cellular response of the most extensively used rodent glioma models to radiation and/or cisplatin. *J. Neurooncol.* 2007; 83: 2–7.
- Huang F., Kanno H., Yamamoto I. i wsp. Correlation of clinical features and telomerase activity in human gliomas. *J. Neurooncol.* 1999; 43: 137–142.
- Rao R.D., James C.D. Altered molecular pathways in gliomas: an overview of clinically relevant issues. *Semin. Oncol.* 2004; 31: 595–604.
- Salhia B., Tran N.L., Symons M. i wsp. Molecular pathways triggering glioma cell invasion. *Expert Rev. Mol. Diagn.* 2006; 6: 613–626.
- Taillibert S., Pedretti M., Sanson M. The genetics of glioma: molecular classification. *Presse Med.* 2004; 33: 1268–1273.
- von Deimling A., Louis D.N., Westler O.D. Molecular pathways in the formation of gliomas. *Glia* 2004; 15: 328–338.
- Jiang R., Mircean C., Shmulevich I. i wsp. Pathway alterations during glioma progression revealed by reverse phase protein lysate arrays. *Proteomics* 2006; 6: 2964–2971.
- Newton H.B. Molecular neurooncology and the development of targeted therapeutic strategies for brain tumors. Part 3: Brain tumor invasiveness. *Expert Rev. Anticancer. Ther.* 2004; 4: 803–821.
- Biernat W., Tohma Y., Yonekawa Y. i wsp. Alterations of cell cycle regulatory genes in primary (de novo) and secondary glioblastoma. *Acta Neuropathologica* 1997; 94: 303–309.
- Venter D.J., Thomas D.G. Multiple sequential molecular abnormalities in the evolution of human gliomas. *Br. J. Cancer* 1991; 63: 753–757.
- Duerr E.M., Rollbrocker B., Hayashi Y. i wsp. PTEN mutations in gliomas and glioneuronal tumors. *Oncogene* 1998; 16: 2259–2264.
- Smith J.S., Jenkins R.B. Genetic alterations in adult diffuse glioma: occurrence, significance, and prognostic implications. *Front Biosci.* 2000; 5: D213–D231.
- von Deimling A., Fimmers R., Schmidt M.C. i wsp. Comprehensive allelotyping and genetic analysis of 466 human nervous system tumors. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 2000; 59: 544–558.

Podsumowanie

Odkrycie molekularnych ścieżek sygnałowych oraz komórek macierzystych nowotworu otworzyło nowe perspektywy w terapii glejaków, *medulloblastoma* i innych nowotworów OUN. Otwiera się możliwość precyzyjnego zablokowania ścieżek sygnałowych odpowiedzialnych za proliferację, inwazyjność komórek nowotworowych oraz za angiogenezę poprzez inaktywację kluczowych białek niezbędnych w funkcjonowaniu tych ścieżek. Ponadto, dokładna molekularna charakterystyka komórek macierzystych nowotworu pozwoli na ich selektywne niszczenie, co powinno znacznie poprawić wyniki leczenia. Wydaje się bardzo prawdopodobne, że znana obecnie klasyfikacja nowotworów OUN, oparta na kryterium morfologicznym (mikroskopowym), zostanie zmodyfikowana dzięki zastosowaniu kryteriów molekularnych o znaczeniu rokowniczym i terapeutycznym. Analiza ekspresji genów doprowadzi do wyodrębnienia wielu podtypów znanych obecnie nowotworów, które będą wrażliwe na terapię celowaną. Chociaż wydaje się bardzo prawdopodobne, że przyszłość diagnostyki i terapii nowotworów OUN (i nowotworów w ogóle) leży na molekularnych ścieżkach przepływu sygnału w komórce i jej kontaktach z otoczeniem, jest jeszcze za wcześnie, aby odpowiedzieć na pytanie, czy i kiedy klasyfikacja mikroskopowa nowotworów OUN zostanie całkowicie zastąpiona przez klasyfikację molekularną.

26. Ishii N., Maier D., Merlo A. i wsp. Frequent co-alterations of TP53, p16/CDKN2A, p14ARF, PTEN tumor suppressor genes in human glioma cell lines. *Brain Pathol.* 1999; 9: 469–479.
27. Chakravarti A., Delaney M.A., Noll E. i wsp. Prognostic and pathologic significance of quantitative protein expression profiling in human gliomas. *Clin. Cancer Res.* 2001; 7: 2387–2395.
28. Ekstrand A.J., James C.D., Cavenee W.K. i wsp. Genes for epidermal growth factor receptor, transforming growth factor alpha, and epidermal growth factor and their expression in human gliomas in vivo. *Cancer Res.* 1991; 51: 2164–2172.
29. Lal A., Glazer C.A., Martinson H.M. i wsp. Mutant epidermal growth factor receptor up-regulates molecular effectors of tumor invasion. *Cancer Res.* 2002; 62: 3335–3339.
30. Masui H., Kawamoto T., Sato J.D. i wsp. Growth inhibition of human tumor cells in athymic mice by anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibodies. *Cancer Res.* 1984; 44: 1002–1007.
31. Barker 2nd F.G., Simmons M.L., Chang S.M. i wsp. EGFR overexpression and radiation response in glioblastoma multiforme. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 2001; 51: 410–418.
32. Hermanson M., Funa K., Hartman M. i wsp. Platelet-derived growth factor and its receptors in human glioma tissue: expression of messenger RNA and protein suggests the presence of autocrine and paracrine loops. *Cancer Res.* 1992; 52: 3213–3219.
33. Strawn L.M., Mann E., Elliger S.S. i wsp. Inhibition of glioma cell growth by a truncated platelet-derived growth factor-beta receptor. *J. Biol. Chem.* 1994; 269: 21 215–21 222.
34. Glass T.L., Liu T.J., Yung W.K. Inhibition of cell growth in human glioblastoma cell lines by farnesyltransferase inhibitor SCH66336. *Neuro Oncol.* 2000; 2: 151–158.
35. Bouterfa H.L., Sattelmeyer V., Czub S. i wsp. Inhibitor of Ras farnesylation by lovastatin leads to downregulation of proliferation and migration in primary cultured human glioblastoma cells. *Anticancer Res.* 2000; 20: 2761–2771.
36. Gupta A.K., Bakanauskas V.J., McKenna W.G. i wsp. Ras regulation of radioresistance in cell culture. *Methods Enzymol.* 2001; 333: 284–290.
37. Geoerger B., Kerr K., Tang C.B. i wsp. Antitumor activity of the rapamycin analog CCI-779 in human primitive neuroectodermal tumor/medulloblastoma models as single agent and in combination chemotherapy. *Cancer Res.* 2001; 61: 1527–1532.
38. Tamura M., Gu J., Matsumoto K. i wsp. Inhibition of cell migration, spreading and focal adhesions by tumor suppressor PTEN. *Science* 1998; 280: 1614–1617.
39. Raffel C., Frederick L., O'Fallon J.R. i wsp. Analysis of oncogene and tumor suppressor gene alterations in pediatric malignant astrocytomas reveals reduced survival for patients with PTEN mutations. *Clin. Cancer Res.* 1999; 5: 4085–4090.
40. Rajaraman P., Wang S.S., Rothman N. i wsp. Polymorphisms in apoptosis and cell cycle control genes and risk of brain tumors in adults. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 2007; 16: 1655–1661.
41. Kleihues P., Ohgaki H. Primary and secondary glioblastomas: from concept to clinical diagnosis. *J. Neurooncol.* 1999; 1: 44–51.
42. Beier D., Han P., Proescholdt M. i wsp. CD133⁺ and CD133⁻ glioblastoma-derived cancer stem cells show differential growth characteristics and molecular profiles. *Cancer Res.* 2007; 67: 4010–4015.
43. Hemmati H.D., Nakano I., Lazareff J.A. i wsp. Cancerous stem cells can arise from pediatric brain tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2003; 100: 15 178–15 183.
44. Phillips H.S., Kharbada S., Chen R. i wsp. Molecular subclasses of high-grade glioma predict prognosis, delineate a pattern of disease progression, and resemble stages in neurogenesis. *Cancer Cell* 2006; 9: 157–173.
45. Frank-Kamensky M., Zhang X.M., Bottega S. i wsp. Small-molecule modulators of Hedgehog signaling: identification and characterization of Smoothened agonists and antagonists. *J. Biol.* 2002; 1: 10–17.
46. Sasai K., Romer J.T., Lee Y. i wsp. Shh pathway activity is down-regulated in cultured medulloblastoma cells: implications for preclinical studies. *Cancer Res.* 2006; 66: 4215–4222.
47. Berman D.M., Karhadkar S.S., Hallahan A.R. i wsp. Medulloblastoma growth inhibition by hedgehog pathway blockade. *Science* 2002; 297: 1559–1561.
48. Ruiz i Altaba A. How the Hedgehog outfoxed the Crab: interference with HEDGEHOG-GLI signaling as anti-cancer therapy? W: *Eurekah Bioscience Database. Signal transduction.* Landes Bioscience, www.eurekah.com/chapter/2816.