

Prof. dr hab. Janusz Rak

Streszczenie wykładu: **CZEŚĆ I CAŁOŚĆ W BIOLOGII NOWOTWORÓW**

„Część i całość” jest parafrazą tytułu książki Wernera Heisenberga, jednego z najbardziej wpływowych i - z wielu względów - kontrowersyjnych postaci w nauce dwudziestego wieku. W książce tej rozważane są zmagania umysłu ludzkiego (fizyki) ze światem materii, jej prostotą i złożonością, oraz sposobami ich poznania¹. Choć to odległa analogia, role przypisywane ideom, obserwacji i technologii w nauce wydają się również niezwykle ważne w badaniach przyrodniczych, w tym w zmaganiach medycyny z brzemieniem chorób nowotworowych.

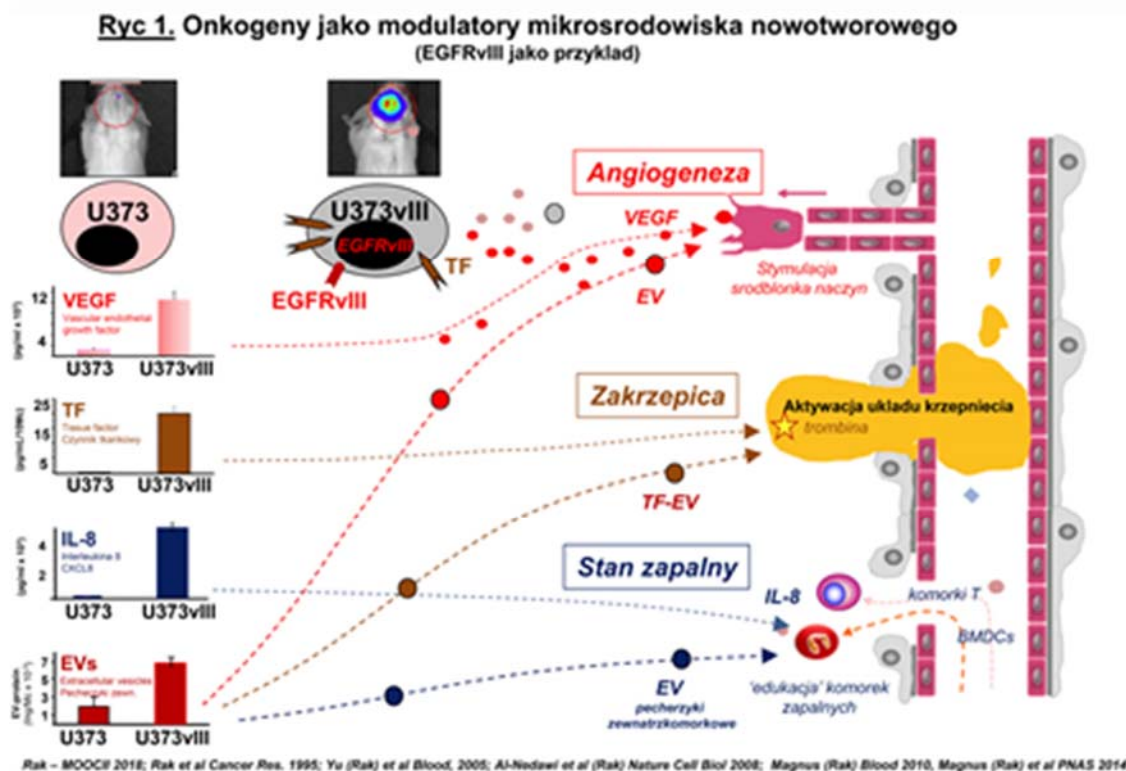
Technologia jest ogromną siłą w rozwiązywaniu medycznych zagadek i, co najważniejsze, w przywracaniu ludzkiego zdrowia i nadziei. A jednak, można argumentować, jest to warunek konieczny, ale niewystarczający, jak instrument bez partytury. Dlaczego przy obecnym poziomie zrozumienia czynników genetycznych, sekwencjonowania genomu w pojedynczych komórkach, ogromnego potencjału komputerowej analizy danych z użyciem sztucznej inteligencji, fenomenalnego postępu immunoterapii oraz trwałych sukcesów w stosowaniu leków celowanych i antyangiogennych niektóre typy nowotworów stały się uleczalne, a inne nie? Dlaczego nie potrafimy sobie poradzić z nowotworami płuc, trzustki czy mózgu? Może po prostu nie potrafimy ich jeszcze zrozumieć albo nie zadajemy właściwych pytań?

W przełomach medycznych często odgrywa rolę intuicja, przypadek lub oparty na fragmentarycznej wiedzy szczęśliwy zbieg okoliczności. Dodają one smaku badaniom naukowym, ale nie są ich celem. W badaniach nad nowotworami celem jest znalezienie mechanizmu biologicznego (programu lub algorytmu), który byłby na tyle specyficzny i niezastąpiony, że jego uszkodzenie spowodowałoby załamanie się procesu nowotworzenia (wyleczenie), i na tyle prosty żeby dało się go uszkodzić dostępnymi metodami. Takim mechanizmem jest, na przykład, zależność raków nerki od naczyń krwionośnych, blokada odpowiedzi immunologicznej w niektórych formach czerniaka lub uzależnienie komórek przewlekłych białaczek szpikowych od niektórych zmutowanych białek transformujących takich jak BCR-ABL. Skuteczność leków takich jak sunitinib, bevacizumab, nivolumab, czy imatinib symbolizuje, często nieoczekiwane, przypadki odnalezienia takich kluczowych mechanizmów i wrażliwych na terapię elementów w patologii niektórych (niestety nie wszystkich) chorób nowotworowych. Jak sprawić, żeby postęp w tej dziedzinie oparty był na mocniejszych podstawach koncepcyjnych, i przez to był bardziej uniwersalny, przewidywalny, podatny na naukową ekstrapolację (tak jak lot kosmiczny w nieznaną czy konstrukcja nowego drapacza chmur).

Wśród wielu teorii, które usiłowały wyjaśnić proces nowotworowy szczególne znaczenie ma, dziś powszechnie zaakceptowana, koncepcja onkogenów². To mutacyjne lub regulacyjne (epigenetyczne) zaburzenia w funkcji niektórych genów miałyby przekształcać je w siłę napędzającą raka (*driver genes*), a ich komórkowe siedlisko w komórki rakowe. Działyby się tak albo poprzez nabycie właściwości stymulujących niekontrolowany wzrost (onkogeny), lub przez utratę fizjologicznej aktywności przeciwwzrostowej (geny supresorowe). Od czasu krystalizacji tej koncepcji w latach 1970-tych, wyróżnienia jej Nagrodą Nobla (1989) i późniejszego zawrotnego rozwoju wywarła ona ogromny wpływ na rozumienie, diagnozowanie i leczenie chorób nowotworowych. Sugerowała przy tym, że nowotworzenie daje się sprowadzić do autonomicznego i, w zasadzie, wewnątrzkomórkowego zaburzenia biochemicznego, które można precyzyjnie zdefiniować w ramach istniejących szlaków

sygnalizacyjnych, i farmakologicznie skorygować, lub wykorzystać do unicestwienia zmutowanych komórek. Onkogeny takie jak BCR-ABL, RAS, BRAF, EGFR, HER2, MET zostały obszernie zbadane i dziś niektóre z nich dają się skutecznie neutralizować lekami celowanymi. Leki te stały się podstawą terapii w niektórych białaczkach, czerniakach, rakach gruczołu piersiowego, jelita i innych typach nowotworzenia. A jednak, nie wszystko idzie według planu.

Glejak wielopostaciowy (*glioblastoma multiforme* – GBM) jest jednym z najlepiej scharakteryzowanych nowotworów ludzkich, który najczęściej pojawia się nagle i w około 30% przypadków zawiera transformujące mutacje receptora naskórkowego czynnika wzrostu wariantu trzeciego (EGFRvIII), który wydawałby się niemal idealnym celem terapeutycznym. Białko to jest silnie transformujące, nie występuje w normalnych komórkach i nie ma fizjologicznej roli, jest też immunogenne (zdolne do wywołania odpowiedzi odpornościowej) i stymuluje angiogenezę (wzrost naczyń krwionośnych). Pomimo to GBM nie odpowiada trwale ani na leki celowane, które skutecznie blokują EGFRvIII, ani na szczepionki przeciwko temu białku ani na żadne formy terapii celowanej, immunologicznej, chemicznej czy antyangiogennej³. Przyczyna takiego stanu rzeczy jest nieznaną. Wydaje się jednak, że patogeneza GBM nie daje się zamknąć w ramach wewnątrzkomórkowej transformacji takim czy innym zmutowanym onkogenem i jest w niej coś dodatkowego, coś, czego jeszcze nie rozumiemy i czemu nie umiemy się przeciwstawić.



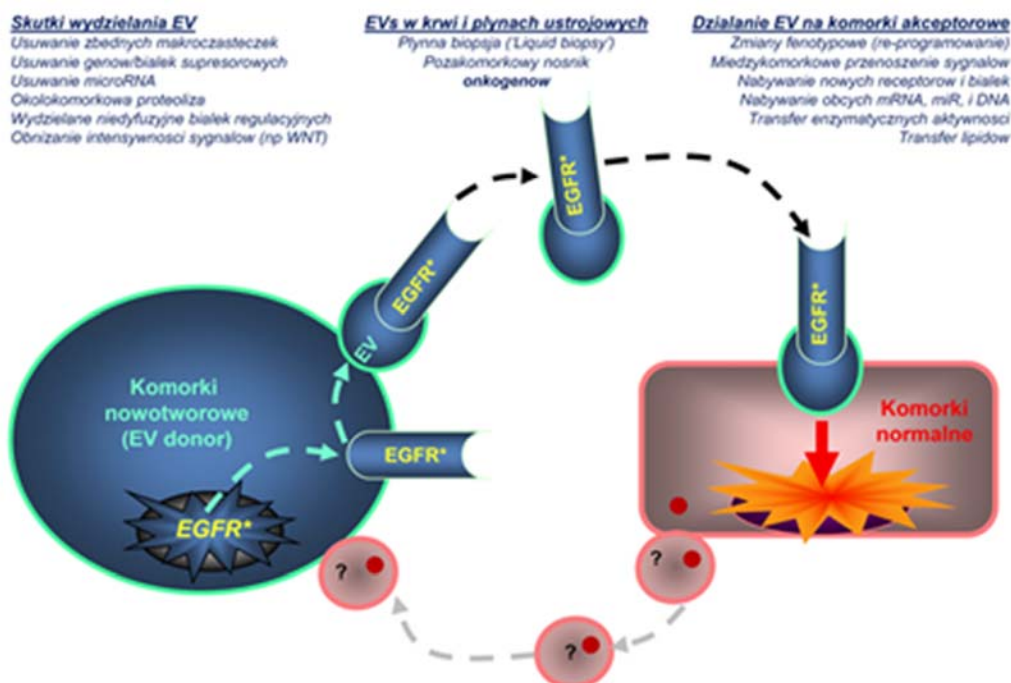
Badania wykazują, że GBM funkcjonuje nie jako zbiór autonomicznych zmutowanych komórek, nosicieli onkogenów, ale jako ich zorganizowany i wysoce zróżnicowany zespół. W tym przypadku działanie onkogenów nie tylko zmienia procesy wewnątrzkomórkowe, ale również interakcje między populacjami komórek nowotworowych, jak również ich relacje z komórkami normalnymi, śródbłonkiem naczyń, komórkami podścieliska, układu immunologicznego, elementami układu krzepnięcia krwi i innymi regulatorami ogólnej homeostazy, które w ten sposób wciągane są w „wir”

procesu nowotworzenia (Ryc. 1). Tworzy się wielokomórkowa sieć, lub jednostka górotwórcza zależna od komunikacji między jej częściami składowymi⁴. Chociaż podobnie mogą funkcjonować również inne typy nieuleczalnych obecnie nowotworów, np. rak trzustki, leczenie oparte na rozrywaniu sieci interakcji międzykomórkowych do niedawna nie było przedmiotem większego zainteresowania.

Wiele przykładów przemawia za istnieniem „sieci komórkowych” w nowotworach. Od dawna wiadomo, że onkogeny, np. RAS, EGFR, EGFRvIII prowokują produkcję czynników modulujących naczynia krwionośne (VEGF), które z kolei wydzielają substancje modulujące komórki rakowe. Komórki podścieliska dostarczają czynników (SHH) niezbędnych do pełnej aktywacji sygnałów emanujących ze zmutowanego białka RAS w komórkach raka trzustki. W GBM populacje komórkowe zawierające onkogen EGFRvIII podtrzymują wzrost komórek nieposiadających takich mutacji, prowadząc do kolektywnego wzrostu obydwu elementów guza. Co więcej, komórki niektórych podtypów GBM tworzą fizyczne połączenia, mikroskopijne kanały (*tumour microtubes* – TM), za pomocą których komórki nowotworowe przekazują sobie informacje i wspomagają wzajemne przeżycie i zbiorową ekspansję. Nowotworowe komórki macierzyste w GBM (*glioma stem cells* - GSCs) i w innych nowotworach mogą pozostawać w stanie liczbowej równowagi z ich bardziej zróżnicowanymi komórkami potomnymi poprzez wydzielanie substancji regulujących zachowania zespołowe (VGF, BDNF, WNT). Kompozycja komórkowa leży również u podstaw molekularnych podtypów GBM (*PN - proneural, NEU - neural, MES - mesenchymal and CL- classical*)⁵, sugerując wysoki stopień koordynacji pomiędzy elementami składowymi. Choć komórki nowotworowe wydają się działać grupowo, obecne terapie traktują je tak jakby to były byty indywidualne. Ażeby to zmienić należy poznać sposoby komunikacji międzykomórkowej.

Wymiana informacji molekularnej między komórkami nowotworowymi oraz między nimi i otoczeniem może sięgać nadspodziewanie głęboko⁶. Białka onkogenne, takie jak EGFRvIII oraz kodujące je kwasy nukleinowe (RNA, DNA), długo były uważane za integralne części komórek, zamknięte i działające wyłącznie w ich wnętrzu. Okazuje się jednak, że onkogeny mogą być uwalniane z komórek nowotworowych i przenikać do innych komórek wywołując zjawiska podobne do złośliwienia⁷. Dzieje się tak za przyczyną mechanizmu polegającego na tworzeniu przez błony komórkowe mikroskopijnych pęcherzyków, które mogą zawierać zdumiewające bogactwo materiału komórkowego, w tym aktywne onkogeny. Istnieje wiele odmian tych tzw. pęcherzyków zewnątrzkomórkowych (*extracellular vesicles* – EV), które w zależności od procesu ich powstawania, wielkości i innych właściwości określa się różnymi terminami (*exosomes, ectosomes, microvesicles, microparticles, oncosomes*)⁸. Istotną właściwością tego procesu jest nie tylko obecność onkogenów wewnątrz EV, ale również to, że mechanizm ich powstawania, skład białkowy i kwasów nukleinowych, repertuar populacji EV produkowanych przez dany typ komórek, ich zdolność do penetracji do wnętrza komórek, z którym oddziałują w mikrośrodkowisku, oraz związana z tym aktywność biologiczna ulegają zmianom pod wpływem transformacji onkogennej. Właściwości te zmieniają się również w wyniku zmian fenotypowych, takich jak różnicowanie komórek macierzystych nowotworu (np. GSCs) lub nabywanie właściwości mezenchymalnych (EMT) w guzach inwazyjnych. EV wprowadzają „program” nowotworowy do komórek śródbłonkowych (edukują je) w procesie angiogenezy, oraz uczestniczą w innych formach oddziaływań międzykomórkowych związanych z nowotworzeniem. Uważa się również, że odgrywają one kluczową rolę w „przygotowywaniu” całego organizmu i poszczególnych narządów do nieuchronnego uogólnionego rozsiewu nowotworowego, który znamionuje końcową fazę choroby^{9,10}.

Ryc. 2. Komunikacja międzykomorkowa i transfer onkogenów z udziałem pecherzyków zewnątrzkomorkowych (EV)



Transmisja onkogenów między komórkami jest jednym z najbardziej fascynujących i kontrowersyjnych właściwości EV (Ryc. 2). Jakkolwiek wprowadzenie tą drogą białek onkogennych, takich jak EGFRvIII, do mniej zmutowanych lub normalnych komórek (akceptorowych) wywołuje dobrze udokumentowane objawy fenotypowego „uzłośliwienia”, zmiany te mają najczęściej charakter przejściowy w związku ze stopniową degradacją białek transformujących w obcym środowisku komórkowym. Jednakże, wykrycie w latach 2013–2014 obecności onkogenicznie zmutowanych sekwencji DNA we wnętrzu nowotworowych EV zrodziło podejrzenie, że materiał ten może na trwałe wbudowywać się do genomu komórek akceptorowych powodując zjawisko ich horyzontalnej (poziomej) transformacji. Miałoby to polegać na tym, że o ile zmutowane geny zwykle przekazywane są jedynie do komórek potomnych, w wyniku podziałów komórkowych, a więc „pionowo”, EV mogą służyć do przepływu tych mutacji pomiędzy sąsiadującymi niezależnymi klonami komórkowymi („poziomo”). Istnienie takiego procesu podważyłoby wiele uznanych poglądów i wstrząsnęło podstawami biologii nowotworów, na przykład w kwestii istoty przerzutowania. Jakkolwiek badania eksperymentalne nie potwierdziły trwałego i zachodzącego na dużą skalę przekazywania genów transformujących pomiędzy komórkami produkującymi i akceptującymi onkogeniczne EV ¹¹, nie można wykluczyć, że oddziaływanie pęcherzyków z licznymi populacjami komórek może prowadzić do progresji genetycznej i nowotworzenia w sposób bardziej ograniczony lub pośredni.

Należy dodać, że cechy mikrośrodowiska, w tym obecność EV i innych form oddziaływań międzykomórkowych, mogą odgrywać ważną rolę w progresywnych zmianach na poziomie genetycznym i epigenetycznym samych komórek nowotworowych. Przykładem tego jest chroniczna aktywacja układu krzepnięcia krwi, który jest częścią programu tkankowego gojenia, w tym procesów

zapalnych i regeneracyjnych. Stymulowanie tego procesu poprzez chroniczną ekspresję tzw. czynnika tkankowego (*tissue factor* – TF/F3) na powierzchni komórek nowotworowych o łagodnym fenotypie prowadzi do ich progresywnego zezłośliwienia i głębokich zmian w metylacji ich DNA¹². Jednym z nośników czynnika tkankowego w organizmie są EV.

Zainteresowanie biologią EV jest obecnie ogromne, a ich rola jako krążących we krwi nośników informacji genetycznej reprezentującej nowotwór, często niedostępny bezpośrednio badaniu (*liquid biopsy*), została już do pewnego stopnia zaakceptowana w badaniach i praktyce klinicznej. EV badane są również jako potencjalne nośniki leków obdarzone wyjątkową zdolnością do penetracji tkanek i komórek docelowych, w tym nowotworowych. A jednak, ich właściwości jako biologicznego łącznika pomiędzy komórkami nowotworowymi i otaczającymi tkankami są znacznie mniej zrozumiane, bardziej złożone i nie poddają się jeszcze leczniczej interwencji. Jest to wyzwanie naukowe, jak również przykład na istnienie szerszego widokregu w złożoności biologicznej procesu nowotworzenia, nie jako kolekcji identycznych komórek ale jako zaburzenia w homeostazie tkankowej o zasięgu większym niż sugerują jego części składowe, procesu wymagającego nowych paradygmatów i form terapii. Część i całość w tym procesie nadal oczekują na właściwe dla siebie miejsce.

1. Heisenberg, W. *Der Teil Und Das Ganze: Gespräche im Umkreis der Atomphysik*. ISBN8306015126 PWN (1987);
2. Bishop, J. M. *Cancer: the rise of the genetic paradigm*. *Genes & development* 9, 1309-1315 (1995);
3. Reifenberger, G., Wirsching, H. G., Knobbe-Thomsen, C. B. & Weller, M. *Advances in the molecular genetics of gliomas - implications for classification and therapy*. *Nature reviews. Clinical oncology* 14, 434-452 (2017);
4. Rak, J. *Is cancer stem cell a cell, or a multicellular unit capable of inducing angiogenesis?* *Med. Hypotheses* 66, 601-604 (2006);
5. Patel, A. P. et al. *Single-cell RNA-seq highlights intratumoral heterogeneity in primary glioblastoma*. *Science (New York, N.Y.)*, 1396-1401 (2014);
6. Rak, J. *Extracellular vesicles - biomarkers and effectors of the cellular interactome in cancer*. *Front Pharmacol* 4:21 (2013);
7. Al-Nedawi, K. et al. *Intercellular transfer of the oncogenic receptor EGFRvIII by microvesicles derived from tumour cells*. *Nat. Cell Biol* 10, 619-624 (2008);
8. van Niel, G., D'Angelo, G. & Raposo, G. *Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles*. *Nature reviews. Molecular cell biology*.125 (2018);
9. Peinado, H. et al. *Pre-metastatic niches: organ-specific homes for metastases*. *Nature reviews. Cancer* 17, 302-317, (2017);
10. Rak, J. *Cancer: Organ-seeking vesicles*. *Nature* 312-314 (2015); 11. Lee, T. H. et al. *Barriers to horizontal cell transformation by extracellular vesicles containing oncogenic H-ras*. *Oncotarget* 7, 51991-52002, (2016);
11. Magnus, N. et al. *Tissue factor expression provokes escape from tumor dormancy and leads to genomic alterations*. *Proc. Natl. Acad Sci U S. A* 111, 3544-3549 (2014).