

JAK POWSTAJĄ GUZY MÓZGU ? CZYLI O POŻYTKU BADAŃ CAŁYCH GENOMÓW

Bożena Kamińska (Warszawa)

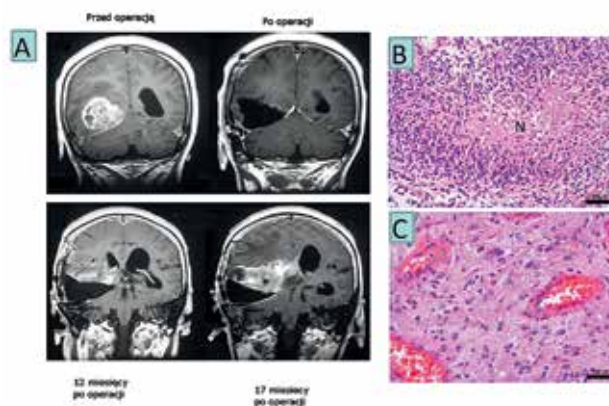


Glejaki – guzy mózgu pochodzenia glejowego

Nowotwory centralnego układu nerwowego obejmują grupę niezłośliwych i złośliwych nowotworów wywodzących się z różnych komórek układu nerwowego. Pierwotne guzy mózgu stanowią ponad 2% wszystkich nowotworów złośliwych w Polsce. Odrębną grupę (guzy wtórne) stanowią nowotwory innych typów, które mimo iż pierwotnie powstały w innej części ciała, wraz z krwią przedostają się do mózgu i zasiedlają tkankę nerwową zachowując charakterystykę nowotworów, z których się rozwinęły. Glejaki stanowią około 70 procent wszystkich nowotworów wewnątrzczaszkowych i główną przyczynę zgonów w tej grupie guzów mózgu. U dzieci guzy mózgu są po białaczkach jedną z częstszych chorób nowotworowych, a glejaki stanowią około 20 procent wszystkich nowotworów wieku dziecięcego. Co roku notuje się w Polsce ok. 2600 nowych przypadków zachorowań na guzy mózgu, w tym ok. 1200 przypadków to glejaki (gwiaździki) złośliwe. Nazwa gwiaździki odzwierciedla wczesne koncepcje na temat pochodzenia tych nowotworów od komórek gleju gwiaździstego (czyli astrocytów).

Nowotwory klasyfikowane są na podstawie kryteriów neuropatologicznych przyjętych przez Światową Organizację Zdrowia (WHO, *World Health Organization*). Wśród glejaków pochodzących od gleju astrocytarnego wyróżnia się guzy o wzroście ograniczonym (charakterystyczny dla zmian łagodnych i o małym stopniu złośliwości) i rozlanym lub naciekającym (typowy dla guzów o umiarkowanym i wysokim stopniu złośliwości histologicznej). Glejaki o charakterze rozlanym podzielono na trzy stopnie złośliwości według czterostopniowej skali (WHO, stopień II-IV). Guzy te, w odróżnieniu od glejaków ograniczonych, mogą być pierwotnie złośliwe lub wykazywać progresję złośliwości, tzn. w kolejnych nawrotach nowotworów o niższym stopniu złośliwości obserwuje się cechy zwiększonej agresywności. Polega ona na wzroście liczby komórek, pojawianiu się komórek o nietypowej morfologii i nadbarwliwości jąder, zwiększeniu indeksu mitotycznego nowotworu (>15%), a także pojawianiu się ognisk martwicy

i rozroście nietypowych, bardziej rozgałęzionych i cienkich naczyń krwionośnych (Ryc. 1B,C). Ze względu na rozrost komórek nowotworowych w tkance mózgu, niezwykle trudne jest usunięcie wszystkich komórek nowotworowych i guz po jakimś czasie odrasta, zwykle w formie bardziej złośliwej.



Ryc. 1. Nekroza palisadowa (A) oraz rozrost nietypowych naczyń (B) w GBM są cechami charakterystycznymi glejaków złośliwych. Preparaty glejaka wielopostaciowego z blozków parafinowych barwiono hematoksyliną i eozyną. Zdjęcia wykonał dr Konrad Gabrusiewicz w mikroskopie świetlnym (Leica DM4000M). Skala: A – 200 μ m, B – 100 μ m.

Objawy kliniczne zależą przede wszystkim od tego, w którym miejscu pojawił się guz i są wynikiem wzrostu guza i śmierci komórek nerwowych w ognisku guza. Objawy ogólne obejmują: wzmożone ciśnienia wewnątrzczaszkowe (czego efektem są bóle głowy, nudności i wymioty, osłabienie sprawności umysłowej, zaburzenia pamięci, uogólnione napady padaczkowe, obrzęk mózgu). Objawy ogniskowe, specyficzne dla lokalizacji guza, to niedowład, zaburzenia czucia, zaburzenia mowy, wzroku, słuchu, objawy zaburzenia równowagi, uszkodzenie nerwów czaszkowych, ogniskowe napady padaczkowe. W razie pojawienia się niepokojących dolegliwości, przeprowadzane są tomografia komputerowa mózgu lub obrazowanie za pomocą rezonansu magnetycznego, gdyż badanie to jest bardziej czułe i pozwala na wykrycie zmian (Ryc. 1A). Kolejnym krokiem jest wykonanie biopsji, czyli pobranie fragmentu tkanki, którą poddaje się analizie laboratoryjnej, podczas operacji usunięcia guza. Pobrany podczas biopsji fragment poddany jest badaniu histopatologicznemu,

podczas którego na podstawie wyglądu komórek, naczyń, utkania tkanki można stwierdzić, czy nowotwór jest złośliwy, czy też łagodny i określić stan jego zaawansowania.

Podstawą leczenia glejaków jest zabieg operacyjny z możliwie jak najpełniejszą resekcją guza, uzupełniany często radioterapią lub chemioterapią temozolomidem. Rokowanie zależy od radykalności operacji i stopnia złośliwości glejaka; pacjenci z glejakiem złośliwym przeżywają średnio 15 miesięcy.

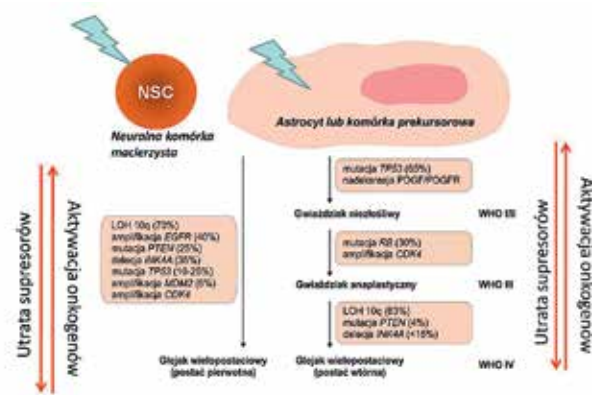
Jak powstają glejaki?

Przez wiele lat sądzono, że glejaki powstają na skutek nagromadzenia się mutacji w komórkach glejowych znajdujących się w mózgu. Postulowano dwie ścieżki procesu nowotworowego: 1) powstawanie złośliwych glejaków poprzez pojawienie się kombinacji zmian genetycznych; 2) pojawianie się początkowo zaburzeń prowadzących do powstania niezłośliwych nowotworów, które w wyniku dalszych bodźców i zmian genetycznych stają się w pełni złośliwe. Koncepcje te nie wyjaśniały dobrze, dlaczego istnieje tak duże zróżnicowanie fenotypowe glejaków (zwłaszcza glejaków wielopostaciowych), dlaczego wykazują one cechy niezróżnicowanych komórek neuronalnych i dlaczego mają tyle cech wspólnych z komórkami macierzystymi.

Odkrycie neuronalnych komórek macierzystych, które mogą też występować w dojrzałym organizmie, pozwoliło na sformułowanie nowej hipotezy. W dorosłym mózgu w tak zwanej strefie okołokomorowej (ang. subventricular zone, SVZ) znajdują się nieliczne komórki o cechach neuronalnych komórek macierzystych (ang. neural stem cells, NSCs). Stanowią one rodzaj rezerwuaru komórek neuronalnych, które będąc komórkami wielopotentnymi, zdolnymi do przekształcania się w komórki nerwowe lub glejowe, mogą brać udział w naprawie drobnych uszkodzeń mózgu, zastępując komórki uszkodzone. Komórki te pozostają niezróżnicowane (aby przekształcić się w dowolny typ komórki nerwowej) i „uśpione”. Jeśli w takich komórkach pojawią się zmiany genetyczne o charakterze onkogenym, zostają one pobudzone do podziałów, intensywnie migrują i zasiedlają różne obszary mózgu (ryc.2). Zachowują wiele cech komórek macierzystych: słabe zróżnicowanie, zdolność do samoodnowy, zwiększona oporność na leki, słaba immunogenność, które czynią komórki złośliwe tak opornymi na działania obronne organizmu i terapie. Koncepcja uzłośliwienia poprzez zaburzenia genetyczne w neuronalnych komórkach macierzystych lub w bardziej zróżnicowanych prekursorach dobrze

wyjaśnia obserwacje kliniczne, różnorodność i cechy histopatologiczne glejaków.

Współczesne poglądy na procesy powstawania glejaków podkreślają, że koncepcja, która najlepiej tłumaczy cechy glejaków i ich zachowanie, podkreśla akumulację mutacji w neuronalnych komórkach macierzystych lub w pochodzących z nich komórkach częściowo zróżnicowanych – prekursorach astrocytów lub oligodendrocytów. Najlepiej potwierdzają ją wyniki badań na genetycznie zmodyfikowanych myszach, u których wywołano glejaki, wprowadzając mutacje w genach supresorowych (*nf1*-/*p53*-, albo *Ink4-Arf*-/*pten*) w neuronalnych komórkach macierzystych lub prekursorach glejowych.



Ryc. 2. Schemat obrazujący nagromadzenie się zmian genetycznych typowych dla pierwotnych i wtórnych glejaków.

Ryc. 2 przedstawia schematycznie, jakie zmiany genetyczne zachodzą w procesie powstawania glejaków; obejmują one zahamowanie działania supresorów nowotworu oraz aktywację genów stymulujących procesy onkogenne. Zmiany te mogą zachodzić poprzez utratę fragmentu DNA, na którym znajduje się dany gen (delecja) lub dużego fragmentu chromosomu (LOH, loss of heterozygosity), zwielokrotnienie (amplifikację) liczby kopii genu (np. PDGFR, EGFR), co sprawia, że jest więcej aktywnego białka stymulującego komórkę, lub mutacje w genach kodujących np. inhibitory cyklu komórkowego (INK4A) lub supresory nowotworu (np. TP53, PTEN, RB). Ocenia się, że nieprawidłowości dotyczące szlaku przewodzenia sygnału z receptora naskórkowego czynnika wzrostu (EGFR, endothelial growth factor receptor) i płytkowopochodnego czynnika wzrostu (PDGFR, platelet derived growth factor receptor) do jądra komórkowego występują niemal u większości chorych na glejaki wielopostaciowe.

Glejaki zawierają grupę komórek o specyficznych właściwościach, nazywanych nowotworowymi komórkami macierzystymi, które mają zdolność do odnowy nowotworu. Są wielopotentne i po

odpowiedniej stymulacji mogą się różnicować do komórek różnych typów (mogą wykazywać ekspresję markerów i cech neuronów, astrocytów, itp.). Obecność glejakowych komórek macierzystych w guzach jest wskazówką na pochodzenie glejaków od neuralnych komórek macierzystych.

Mechanizmy epigenetyczne jako regulatory ekspresji genów

Glejaki (jak wiele innych nowotworów) charakteryzują się znaczącymi zmianami w materiale genetycznym i niestabilnością genomu, co prowadzi do nagromadzenia się zaburzeń i deregulacji procesów komórkowych. Współczesne badania całych genomów komórek nowotworowych ujawniły bardzo dużą skalę zaburzeń genetycznych, które są trudne do wytłumaczenia mutacjami w konkretnych genach. Badania wielośrodkowe nad zmianami genetycznymi w całym genomie komórki nowotworowej pokazują, że nowotwór zawierał średnio 63 zmiany genetyczne, w większości mutacje punktowe, często w genach, których dotąd nie wiązano z konkretnym typem nowotworu. Niemal wszystkie te zmiany dotyczyły 12 kluczowych ścieżek przekazywania sygnału w komórce.

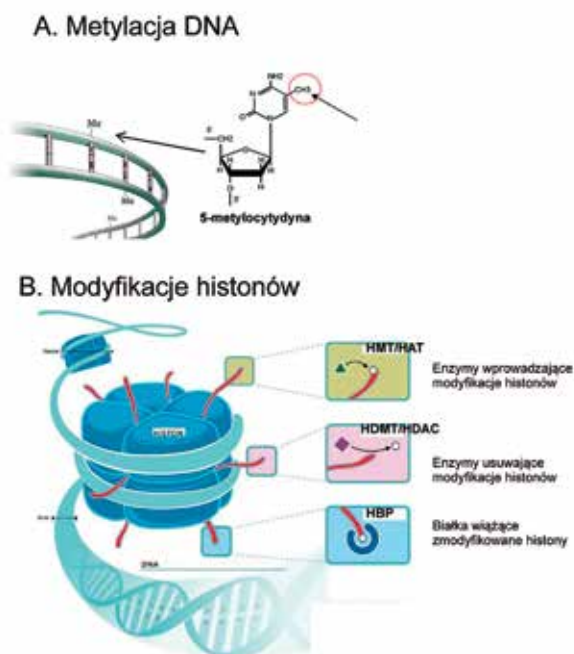
Badania o podobnym rozmachu nad glejakiem doprowadziły do odkrycia mutacji w wielu genach, których nie podejrzewano o rolę w rozwoju tego nowotworu. Jednym z takich genów jest *IDH1* (kodującym białko dehydrogenazę izocytrynianową-1), w którym zmiana nukleotydu w pozycji 132 sprawia, że zamiast aminokwasu argininy pojawia się histydyna. Dehydrogenaza izocytrynianowa 1 (IDH1) jest enzymem, który katalizuje przekształcenie izocytrynianu w α -ketoglutaran i odgrywa rolę regulującą aktywność łańcucha kolejno po sobie następujących fosforylacji oksydacyjnych, których końcowym efektem jest powstanie ATP, GTP i prekursorów istotnych związków chemicznych. Alfa-ketoglutaran jest też substratem różnych enzymów kontrolujących procesy epigenetyczne. Okazało się, że zmutowane białko IDH1 nabiera innych właściwości i zaczyna produkować 2-hydroksyglutaran, który nie dość, że nie oddziałuje tak jak powinien na enzymy epigenetyczne, ale także ma zdolność hamowania niektórych z nich. Uważa się obecnie, że mutacje IDH1 powstają bardzo wcześnie w trakcie kancerogenezy i powodują rozregulowanie procesów epigenetycznych ułatwiając nagromadzenie się zmian genetycznych i destabilizację genomu.

Epigenetyka jest dziedziną nauki zajmującą się badaniem mechanizmów regulujących poziom ekspresji

genów, które nie polegają na zmianach w pierwotnej sekwencji nukleotydów w nici DNA. Czynniki epigenetyczne regulują niezwykle ważne procesy selektywnego wyciszania genów zarówno podczas embrionalnego rozwoju i różnicowania się komórek, w okresie rozwoju postnatalnego oraz w procesie nowotworzenia. Mechanizmy epigenetyczne, takie jak metylacja DNA czy modyfikacje histonów, wpływają na zmiany struktury chromatyny, a tym samym regulują ekspresję genów. Metylacja DNA polega na przyłączeniu grupy metylowej do cytozyny w DNA (zwykle w obrębie dinukleotydu CpG) z udziałem specyficznych enzymów – metylotransferaz DNA. Metylowane wyspy CpG są rozpoznawane specyficznie przez białka MBD (methyl-CpG binding proteins). Zaburzenia procesu metylacji, zarówno nadmierna jak i zbyt mała metylacja prowadzą do zmian ekspresji genów i destabilizacji genomu, co może być związane z procesem nowotworzenia. DNA (podstawowy nośnik informacji genetycznej w komórce) związany jest z białkami – histonami, które, regularnie rozmieszczone wzdłuż nici DNA, oddziałują ze sobą i tworzą włókno chromatyny. Białka histonowe wraz z nawiniętym na nie DNA tworzą nukleosom, który składa się z rdzenia zbudowanego z ośmiu cząsteczek białek histonowych: po dwa histony H2A, H2B, H3 i H4, wokół których dwukrotnie nawinięta jest nić DNA o długości 140–150 par zasad/rdzeń. Poszczególne nukleosomy oddzielone są od siebie DNA łącznikowym, do którego przyłączony jest histon łącznikowy. Modyfikacje chemiczne wystających poza nukleosom fragmenty histonów rdzeniowych mogą wpływać na strukturę chromatyny (Ryc. 3). Modyfikacje chemiczne takie jak acetylacja, metylacja, fosforylacja są przeprowadzane przez pary enzymów działających przeciwstawnie (acetylaza-deacetylaza, metylaza-demetylaza), co sprawia, że modyfikacje te są odwracalne (Ryc. 3). W komórkach są białka rozpoznające zmienione histony lub metylowane CpG, które przyłączają się w takich miejscach do DNA i „ściągają” inne białka odpowiedzialne za transkrypcję.

Zmiany ładunku histonów w wyniku modyfikacji chemicznych (acetylacja, fosforylacja) mogą osłabiać ich wiązanie z DNA, co bezpośrednio wpływa na strukturę chromatyny. Inny mechanizm ich działania polega na wiązaniu białek regulujących strukturę chromatyny. Białka te odczytują znaczenie danego wzoru modyfikacji powodując dalsze zmiany struktury chromatyny – samodzielnie lub poprzez rekrutację innych czynników. Rozluźnienie struktury chromatyny jest niezbędne, by zaszła transkrypcja. Ścisłe upakowanie DNA uniemożliwia zajście transkrypcji,

ponieważ enzymy katalizujące ten proces nie mogą przyłączyć się do DNA. Luźniejsze upakowanie DNA umożliwia przyłączenie się polimerazy RNA, enzymu katalizującego transkrypcję. W obrębie trwale skondensowanej chromatyny obserwuje się największy stopień metylacji DNA i modyfikacji histonów blokujących transkrypcję.



Ryc. 3. Procesy epigenetyczne modyfikujące działanie genów, często zaburzone w procesie powstawania glejaków.

Komórki nowotworowe charakteryzują się widocznymi zmianami we wzorze metylacji DNA oraz zmianami w aktywności enzymów odpowiedzialnych za modyfikacje białek histonowych. Jedną z konsekwencji mutacji w IDH1 jest zahamowanie enzymów metylujących DNA, co sprawia, że więcej miejsc jest zmetylowanych w sposób przypadkowy w genomie. Podwyższenie poziomu metylacji w pozycji lizyny 27 histonu 3 (H3K27) w wyniku działania enzymu EZH2 (enhancer of zeste homolog 2), powoduje bezpośrednie konsekwencje w zachowaniu komórek: zahamowanie ekspresji białka p16, inhibitora cyklu komórkowego (co skutkuje wzmożeniem wzrostu nowotworu), a także E-kadheryny (co powoduje wzrost inwazyjności).

Kolejnym mechanizmem epigenetycznym, którego zaburzenia prowadzi do powstawania złośliwych glejaków (zwłaszcza u dzieci) są mutacje w genach kodujących strukturalne składniki chromatyny. Badanie całych genomów pacjentów ze złośliwymi glejakami dziecięcymi (pontine glioma) ujawniły mutacje w genie kodującym wariant histonu H3 (H3.3). Istnieją różne formy histonu H3, który tworzy rdzeń wokół którego nawinięta jest nić DNA: klasyczne

formy H3.1 i H3.2 oraz wariant H3.3. Histony klasyczne uczestniczą przede wszystkim w odtworzeniu struktury chromatyny podczas replikacji DNA, natomiast histon H3.3 odtwarza ją w sposób niezależny od replikacji, np. w procesach naprawy DNA. W glejakach dziecięcych stwierdzono występowanie mutacji, która wprowadza zmianę w histonie H3.3 w pozycji, która zwykle jest metylowana. Przyjmuje się, że taka zmiana powoduje spadek metylacji lizyny 27 w histonie H3 i uniemożliwia przyłączenie się do takiego miejsca DNA kompleksu regulującego transkrypcję. W konsekwencji geny, które powinny być zahamowane w trakcie rozwoju mózgu, pozostają włączone i dochodzi do deregulacji procesów komórkowych. W pacjentów z taką mutacją dużo częściej dochodzi do kolejnych zaburzeń genetycznych, np. częstość mutacji genu supresorowego *TP53* jest dwukrotnie wyższa. Kolejnym przykładem są mutacje w genach *ATRX* (alpha-thalassemia/mental retardation X-linked syndrome protein) oraz *DAXX* (death-associated protein), kodujących składniki kompleksu regulującego strukturę chromatyny i współpracującego z histonem H3.3.

Wspomniane odkrycia pokazują, że niektóre glejaki mogą być uważane za choroby „epigenetyczne”. Jest to niezwykle ważne w kontekście potencjalnych terapii, gdyż procesy epigenetyczne mają charakter odwracalny i zdefiniowanie kluczowych zmian i białek za tym stojących stwarza nadzieję na opracowanie nowej terapii.

Leki „epigenetyczne”

W przypadku nowotworów wiele genów hamujących rozwój nowotworu (genów supresorowych) jest wyłączanych poprzez metylację DNA. Leczenie odwracające ten efekt jest możliwe dzięki zastosowaniu inhibitorów metylotransferazy DNA: 5-azacytydyny (5-aza-cytydyna) oraz 5-aza-2'-deoksycytydyny (Decitabine). Mechanizm działania zakłada, że lek naśladujący budowę cytozyny jest wbudowywany podczas replikacji do DNA i „wyłapuje” enzymy modyfikujące CpG, tym samym blokując działanie DNMT. Hamowanie działania enzymów deacetylujących histony (HDAC) także aktywuje szlaki przeciwnowotworowe, wywołując zatrzymanie wzrostu, aktywację śmierci komórkowej i zahamowanie tworzenia nowych naczyń krwionośnych. Związkami znoszącymi działanie HDAC są pochodne kwasu masłowego, kwas walproinowy, kwasy hydroksamowe (vorinostat, belinostat), cykliczne tetrapeptydy (trapoksyna A, apicydina, depsi-peptyd) i benzamidy (entinostat). Kwas walproinowy i vorinostat są obecnie testowane

w badaniach klinicznych złośliwych glejaków. W dotychczasowych badaniach przedklinicznych najbardziej obiecujące rezultaty przynosi wykorzystanie związku DZNep (3-deazaneplanocyna A), który między innymi obniża poziom trimetylacji w pozycji H3K27. Atrakcyjnym celem może też być kompleks metylotransferaz G9a/białko G9a-podobne (GLP), odpowiedzialny metylację histonu H3 w pozycjach

H3K9 i H3K27. Jego inhibitorem jest chaetocyna. Wyniki badań prowadzonych w Pracowni Neurobiologii Molekularnej Instytut Nenckiego wskazują, że jednym z najbardziej skutecznych inhibitorów w komórkach glejaka jest BIX-01294 – pochodna diazepino-kinazolinoaminowa, obniżająca poziom metylacji w pozycji H3K9, hamując namnażanie się komórek i aktywuując śmierć komórkową.

Bożena Kamińska, Pracownia Neurobiologii Molekularnej, Centrum Neurobiologii, Instytut Biologii Doświadczalnej PAN. E-mail: b.kaminska@Nencki.gov.pl.

STRES A PLASTYCZNOŚĆ MÓZGU

Joanna Sowa, Grzegorz Hess (Kraków)



Wstęp

Stres jest nieodłącznym elementem naszego życia. Każdego dnia doświadczamy wielu stresujących sytuacji, z którymi musimy sobie radzić, aby prawidłowo funkcjonować. We współczesnym, szybko rozwijającym się społeczeństwie, stres chroniczny staje się coraz poważniejszym problemem, ponieważ przyczynia się on do powstawania wielu schorzeń, zarówno somatycznych, jak i psychicznych. Wiadomo, że stres chroniczny zwiększa ryzyko wystąpienia chorób serca i układu krążenia, chorób autoimmunologicznych, takich jak reumatoidalne zapalenie stawów czy choroba Hashimoto, a także niektórych nowotworów. Wydaje się, że odgrywa on niezwykle istotną rolę w patogenezie takich chorób psychicznych jak depresja czy schizofrenia oraz zaburzeń lękowych, jak zespół stresu pourazowego (ang. *posttraumatic stress disorder* – PTSD). Jak podaje Światowa Organizacja Zdrowia, choroby wywołane przez stresujące doświadczenia oraz różnego rodzaju zaburzenia psychiczne, mogą stać się drugą najczęstszą przyczyną niepełnosprawności na świecie w ciągu najbliższych 5 lat.

Czym jest stres?

Pojęcie stresu jest powszechnie używane w języku potocznym w rozmaitych znaczeniach, jednakże obecnie przyjęta, naukowa definicja stresu sformułowana w 1936 roku przez kanadyjskiego lekarza, Hansa Selye, mówi iż stres to „nieswoista reakcja organizmu na wszelkie stawiane mu żądania”. Stres można zatem opisać jako zmianę w stanie fizycznym lub psychicznym organizmu, wywołaną działaniem potencjalnie zagrażających bodźców. Bodźce te nazywane są stresorami i mogą mieć różny charakter.

Czynniki fizyczne, takie jak głód, choroba, uraz czy przemęczenie, bezpośrednio zagrażają równowadze wewnętrznej organizmu czyli homeostazie. Stresory o charakterze psychicznym, jak np. utrata bliskiej osoby albo zbyt wysokie wymagania stawiane w pracy, działają na organizm w sposób pośredni. Stresujące doświadczenie może być nagłe i krótkotrwałe lub przewlekłe; może wystąpić tylko raz albo powtarzać się systematycznie. W zależności od rodzaju bodźca charakterystyka odpowiedzi stresowej może być zróżnicowana, ma ona jednak określony cel. Powinna wywołać takie zmiany w funkcjonowaniu organizmu, które umożliwią zaadaptowanie się do zmienionych warunków środowiska, a w rezultacie - odzyskanie homeostazy. Co ciekawe, fizjologiczna reakcja stresowa często pojawia się także w odpowiedzi na bodźce pozytywne i nagradzające, takie jak np. wygrana w zawodach sportowych. W związku z tym można uznać, że stresorem jest każdy bodziec, który przekracza fizjologiczne możliwości organizmu, szczególnie jeśli jest nieprzewidywany i niekontrolowany.

Mechanizmy reakcji organizmu na stres

W odpowiedzi na jakikolwiek nieprzyjemny lub zagrażający bodziec, zarówno zewnętrzny, jak i wewnętrzny, aktywacji ulega szereg procesów mających na celu zwalczanie stresora. W fizjologicznej reakcji stresowej można wyróżnić dwie główne fazy. Pierwsza, szybka faza reakcji związana jest z aktywacją układu współczulnego, będącego częścią autonomicznego układu nerwowego. Wywołuje on tzw. reakcję walki lub ucieczki (ang. *fight or flight*), związaną z takimi objawami jak m.in. rozszerzenie źrenic, przyspieszenie akcji serca i zwężenie naczyń krwionośnych w skórze, a także z wydzielaniem z rdzenia