

Received: 2013.10.03
Accepted: 2014.01.08
Published: 2014.03.07

Molekularne mechanizmy regulacji przerzutowania komórek nowotworowych na przykładzie mięsaka prążkowanokomórkowego (rhabdomyosarcoma)*

Molecular mechanisms regulating metastasis of cancer cells with special emphasis on rhabdomyosarcoma

Maciej Tarnowski, Katarzyna Grymuła, Marta Tkacz, Michał Czerewaty,
Agata Poniewierska-Baran, Mariusz Zdzisław Ratajczak

Katedra i Zakład Fizjologii, Pomorski Uniwersytet Medyczny w Szczecinie

Streszczenie

Mięsak prążkowanokomórkowy lub inaczej rhabdomyosarcoma to nowotwór złośliwy tkanek miękkich pochodzący z embrionalnej tkanki mezenchymalnej i neuroektodermalnej. Bardzo często współwystępuje z innymi zespołami genetycznymi, takimi jak Li-Fraumeni, czy Beckwitha-Wiedemanna. Komórki RMS wykazują morfologiczne podobieństwo do mięśni poprzecznie prążkowanych oraz obecność markerów swoistych dla tkanki mięśniowej. Histologicznie dzieli się na dwa podtypy (pęcherzykowy - ARMS i embrionalny - ERMS), które różnią się biologią, podłożem genetycznym oraz rokowaniem. W ostatnich latach odnotowano znaczący postęp w poznawaniu mechanizmów regulujących wzrost oraz przerzutowanie komórek RMS. Odkryto i opisano wiele chemokin, cytokin czy czynników wzrostowych oraz ich receptorów, a także opracowano kilka zwierzęcych modeli tego guza. Wiedza ta ma bardzo duże znaczenie w opracowywaniu przyszłych strategii leczniczych nie tylko RMS, ale także innych rodzajów nowotworów. W pracy omówiono teorię powstawania tego rzadkiego nowotworu spotykanego głównie u dzieci i młodych dorosłych oraz przedstawiono, na podstawie danych literaturowych i badań własnych, mechanizmy molekularne warunkujące jego wzrost i przerzutowanie. Wiele z opisanych zjawisk oraz mechanizmów, takich jak regulacja chemotaksji, przylegania, proliferacji czy wewnątrzkomórkowa transdukcja sygnału ma charakter uniwersalny dla różnych typów nowotworów.

Słowa kluczowe:

przerzutowanie • nowotwory • mięsak prążkowanokomórkowy • rhabdomyosarcoma

Summary

Rhabdomyosarcoma (RMS) is a malignant tumor of soft tissue derived from embryonic mesenchymal and/or neuroectodermal tissues. It is most often associated with other genetic syndromes such as Li-Fraumeni or Beckwith-Wiedeman. RMS cells show morphological similarities to striated muscle and the presence of specific markers of muscle tissue. At the histological level, it is divided into two subtypes (alveolar RMS - ARMS and embryonal RMS - ERMS), which differ in their genetic background, and prognosis. In recent years there has been significant progress in understanding the mechanisms that regulate RMS cell growth and metastasis. Recently, a number of several chemokines, cytokines or growth factors and their receptors were identified involved in RMS pathogenesis as well as animal models of this tumor have been developed. This knowledge is of great importance in the development

* Projekt HOMING PLUS/2011-3/11 realizowany w ramach programu Homing Plus Fundacji na rzecz Nauki Polskiej, współfinansowany przez Unię Europejską z Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego.

	of potential therapeutic strategies not only in RMS, but also other types of cancer. This paper will discuss the theories of the origin of this rare tumor and the molecular mechanisms involved in its growth and metastasis. The processes and mechanisms described herein, such as chemotaxis, adhesion, proliferation, intracellular signal transduction, seem to universal for number of cancer types.
Key words:	metastasis • rhabdomyosarcoma • cancer • tumor • tumorigenesis
Full-text PDF:	http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=1093219
Word count:	4629
Tables:	–
Figures:	3
References:	115

Adres autora: prof.Mariusz Ratajczak, Katedra i Zakład Fizjologii Pomorski Uniwersytet Medyczny w Szczecinie, Al. Powstańców Wielkopolskich 72, 70-111 Szczecin; e-mail: mzrata01@louisville.edu

INICJACJA PROCESU NOWOTWORZENIA — ETIOLOGIA MIĘSAKA PRĄŻKOWANOKOMÓRKOWEGO ORAZ CZYNNIKI REGULUJĄCE JEGO WZROST

Rhabdomyosarcoma (RMS), inaczej mięsak prążkowanokomórkowy to nowotwór złośliwy tkanek miękkich po raz pierwszy opisany przez Webera w 1854 r. [73], pochodzący z embrionalnej tkanki mezenchymalnej lub neuroektodermalnej. Histologicznie zaliczany jest do grupy nowotworów o małych, barwiących się „na niebiesko” okrągłych komórkach (small round blue cell tumors) [6,22,73].

Mięsaki tkanek miękkich stanowią około 8,8% wszystkich nowotworów złośliwych u dzieci, u których RMS zajmuje trzecie miejsce pod względem częstości występowania po nerwiaku płodowym (neuroblastoma) i guzie Wilmsa (nephroblastoma) [22]. Prawie 90% wszystkich przypadków rozpoznawanych jest u pacjentów poniżej 25 roku życia, z czego 60-70% u dzieci poniżej 10 roku życia [45]. Pierwszy szczyt zachorowań następuje między drugim a piątym rokiem życia, drugi między 10 a 19 rokiem życia. Średni wiek pacjenta chorego na mięsaka prążkowanokomórkowego wynosi 5 lat. Głowa i szyja są najczęstszym regionem występowania RMS (35-40%), zwłaszcza u dzieci poniżej 14 roku życia, potem w kolejności układ moczowo-płciowy, kończyny i tułów [22,45].

Zwiększone ryzyko rozwoju nowotworów tkanek miękkich, włączając RMS, zaobserwowano u chorych z zespołem Gardnera, Li-Fraumeni, neurofibromatozą typu I i zespołem Beckwitha-Wiedemanna. Guzy RMS współwystępują z wadami ośrodkowego układu nerwowego, układu moczowo-płciowego, pokarmowego, krążenia oraz znamionami barwnikowymi. Tworzą przerzuty do płuc, kości, szpiku kostnego i ośrodkowego układu nerwowego, najczęściej za pośrednictwem układu krwionośnego [6,11,90,95].

Typy mięsaka prążkowanokomórkowego

Na podstawie kryteriów histopatologicznych RMS można podzielić na dwa główne typy: pęcherzykowy (ARMS - alveolar rhabdomyosarcoma) i embrionalny (ERMS - embryonal rhabdomyosarcoma) [6,22,73]. Typ embrionalny obejmuje dodatkowo podtyp groniasty i wrzecionowatokomórkowy [2,22,73] i występuje zdecydowanie częściej niż typ ARMS. ERMS u dzieci odpowiada za około 60% wszystkich przypadków mięsaka prążkowanokomórkowego [45,76,90]. Guzy ERMS najczęściej umiejscawiają się w pęcherzu moczowym, okolicy pochwy, okołojądrowej u niemowląt oraz nosogardła u starszych dzieci [73]. W guzach ERMS obserwuje się różne zmiany epigenetyczne, do których zaliczamy utratę heterozygotyczności w locus 11p15, które zawiera gen kodujący insulinopodobny czynnik wzrostu (insulin-like growth factor-2) - IGF-2 [2,6,73], trisomię chromosomu 8, mutację w obrębie białka p53, zaburzenia regulacji funkcjonowania białek p38, JNK, ERK, cyklin i kinaz cyklicznych [23,52,59,63,69,79,114].

Typ pęcherzykowy (ARMS) występuje rzadziej, stanowiąc 31% wszystkich przypadków rhabdomyosarcoma [45]. Najczęściej obserwowany jest u starszych dzieci, u których rozwija się w obrębie kończyn, tułowia i okolicy okołoodbytniczej [76]. Obecność guzów ARMS koreluje z translokacją między chromosomami 2 i 13 [7,33,34,35,58,109]. Wspomniana translokacja, t(2;13)(q35;q14), prowadzi do nieprawidłowej ekspresji genu PAX3 [35]. Występujący na chromosomie 13 gen PAX3 łączy się z genem FKHR, kodującym czynnik transkrypcyjny z rodziny „forkhead” [35]. Białko powstające w wyniku fuzji genów PAX3 i FKHR o masie cząsteczkowej 97 kDa umiejscawia się w jądrze komórkowym i prawdopodobnie rozpoznaje sekwencję docelową PAX3, obecną w promotorach wielu genów [33].

W guzach ARMS częściej obserwowane jest połączenie regionu 5' genu *PAX* z regionem 3' genu *FKHR* niż regionu 3' *PAX* z 5' *FKHR* [33]. Innym typem translokacji spotykanej w ARMS jest t(1;13)(p36;q14), która prowadzi do syntezy hybrydy białkowej *PAX7-FKHR* obecnej w 9-20% przypadków tego typu guzów [2,7,11,58,73]. Czynniki transkrypcyjne kodowane przez geny *PAX3* i *PAX7* odpowiedzialne są za rozwój mięśni w okresie embriogenezy podczas rozwoju mezodermy, z której powstają mięśnie szkieletowe [70]. Produkty białkowe translokacji *PAX3-FKHR* i *PAX7-FKHR* wpływają na wzrost, apoptozę, różnicowanie oraz ruchliwość komórek RMS [5]. Na skutek translokacji t(2;13) i t(1;13) białko *FKHR* traci domenę wiążącą DNA [34], co zmniejsza zdolność do wiązania IRE's (insulin responsive elements). Brak wiązania IRE powoduje zaburzenia regulacji procesu apoptozy w komórkach RMS [34].

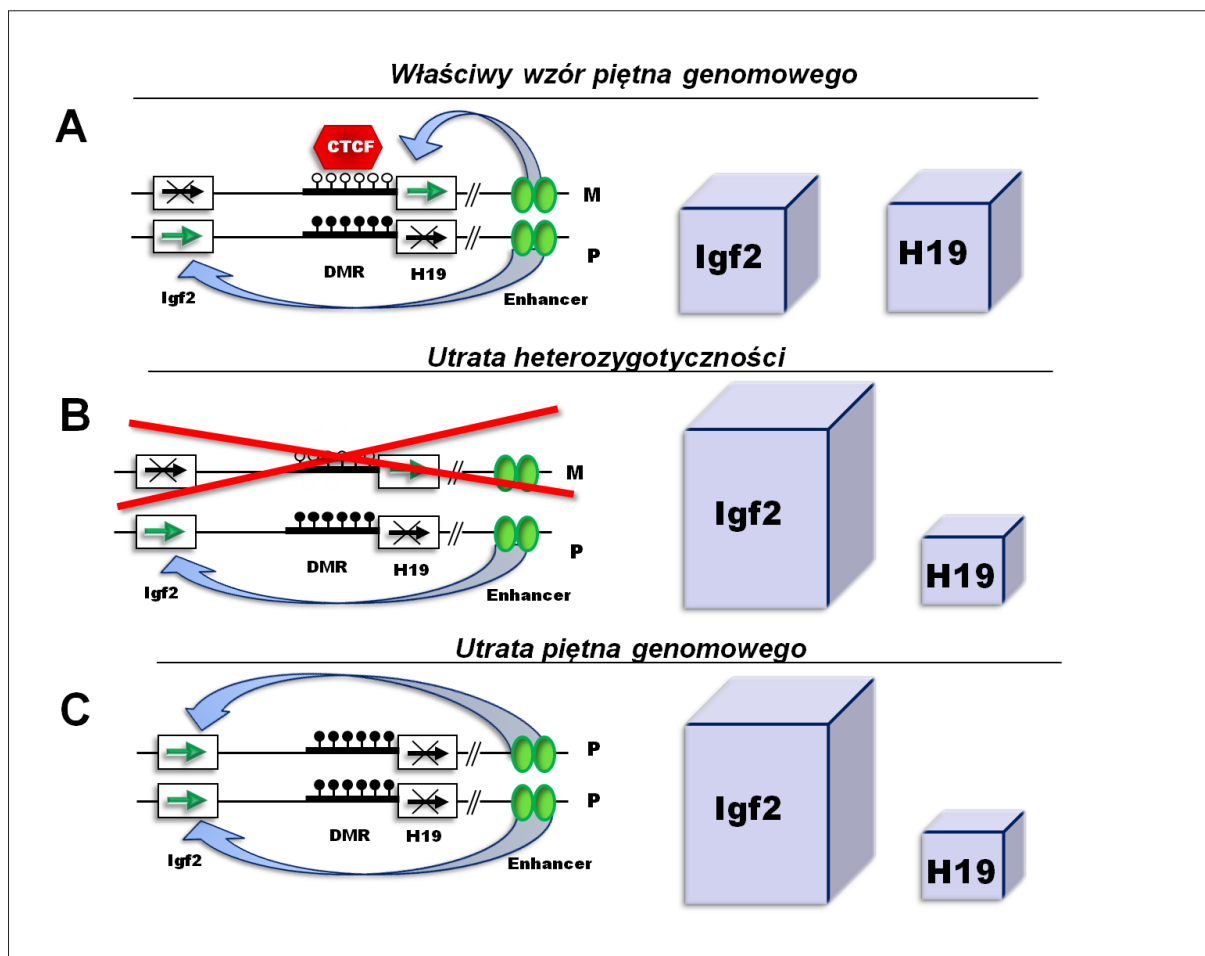
Powstawanie mięsaka prążkowanokomórkowego

Translokacje *PAX3/7-FKHR* to nie jedyne zmiany genetyczne występujące w komórkach RMS. Znanych jest jeszcze kilkanaście innych genów kandydujących do miana „inicjatora” procesu nowotworzenia w obrębie komórek mięśniowych [41,94]. Różnorodność defektów molekularnych towarzyszących powstawaniu RMS powoduje, że skuteczność terapii jest niewielka. Możemy przypuszczać, iż występujące zmiany genetyczne powstają na różnych etapach rozwoju komórki mięśniowej tworząc wymienione wyżej podtypy mięsaka prążkowanokomórkowego o zmiennej charakterystyce molekularnej. Dokładne określenie typu komórki inicjującej RMS oraz etap, na którym ten proces zachodzi wydaje się bardzo istotne do opracowania przyszłych metod leczenia chorych z tego typu guzem.

Okazuje się, że uzyskanie RMS z prawidłowych komórek mięśniowych nie jest procesem łatwym. Aby uzyskać takie komórki należy wykonać wiele manipulacji genetycznych. Stwierdzono, że wprowadzenie zmutowanego genu *Pax3-FKHR* do komórek mezenchymalnych lub progenitorowych mięśniowych nie rozpoczyna jeszcze procesu transformacji nowotworowej. Muszą jeszcze wystąpić inne zmiany w genomie, takie jak chociażby inaktywacja supresora p53 lub ekspresja *SV40* [66,84]. Przypuszczalnie więc proces powstawania mięsaka prążkowanokomórkowego jest wieloetapowy i obejmuje dwa zdarzenia: jedno obezwładniające gen supresorowy i drugie inicjujące procesy proliferacji oraz różnicowania. Co więcej nie wiadomo, które dokładnie komórki podczas rozwoju i różnicowania tkanki mięśniowej dają początek RMS. Okazuje się, że komórki o charakterze rhabdomyosarcoma (ERMS) można uzyskać blokując ekspresję p53, inicjując ekspresję *SV40* oraz *H-ras* w mioblastach pochodzących od dorosłego człowieka, ale nie pochodzenia płodowego. Podobnie uzyskanie mysiego modelu RMS również wymagało wielu mutacji. Zwierzęcy model genetyczny mięsaka prążkowanokomórkowego został opisany przez grupę Merlino [53]. Powstał w wyniku skrzyżowania dwóch zmutowanych szczepów myszy. Jeden z nich wykazywał mutację powodującą zmienną ekspresję czynnika wzro-

stowego hepatocytów/czynnika rozproszenia (hepatocyte growth factor/scatter factor - HGF/SF) będącego ligandem receptora c-MET. Drugi natomiast polegał na delecji locus *INK4a/ARF* w linii zarodkowej. U prawie 100% myszy po zahamowaniu ekspresji *INK4a/ARF* i jednoczesnej indukcji ekspresji HGF/SF zaobserwowano rozwój RMS [17,91]. Inny model badawczy zastosowali Keller i wsp., którzy selektywnie aktywowali konstrukt *Pax3-FKHR* w mysich komórkach na różnym poziomie różnicowania przy jednoczesnym zablokowaniu ścieżek sygnałowych *Ink4a/ARF* i *Trp53* [57]. Co ważne największą efektywność transformacji i częstość występowania RMS, zwłaszcza podtypu ARMS, uzyskano aktywując *PAX3-FKHR* w relatywnie mocno już zróżnicowanych mioblastach, a nie prymitywnych komórkach macierzystych np. komórkach satelitarnych mięśni szkieletowych. Kolejnym bardzo ważnym czynnikiem wykorzystywanym do uzyskania mysich odpowiedników RMS był insulinopodobny czynnik wzrostowy typu 2 (insulin-like growth factor-2; IGF-2). Pod wpływem działania IGF-2 tworzy się swoista pętla autokryna ponieważ komórki RMS mają wysoką ekspresję receptora IGF-1R dla insulinopodobnego czynnika wzrostowego typu 1 (insulin-like growth factor type -1), który wiąże zarówno IGF-1, jak i IGF-2. W warunkach eksperymentalnych jednoczesna nadekspresja *PAX3-FKHR* oraz IGF-2 w mysich mioblastach prowadziła do utworzenia guzów RMS w różnych stadiach zróżnicowania [109].

Inną zmianą genetyczną, którą obserwuje się w próbkach pobranych od pacjentów są zaburzenia w ekspresji genu tandemowego *Igf2-H19* zwiększające ekspresję IGF-2 i autokrynną stymulację komórek RMS (ryc. 1) [63]. Jak przedstawiono na rycinie 1 (panel A) w tkance prawidłowej zachowana jest równowaga między ekspresją locus *H19* oraz *Igf2* (panel A). Pomiędzy genami *Igf2* i *H19* znajduje się sekwencja (DMR), która ulega metylacji (nałożeniu piętna genomowego) na chromosomie od ojca (paternal chromosome - P), a nie jest metylowana na chromosomie pochodzącym od matki (maternal chromosome - M). Miejsce to podlegające epigenetycznej regulacji jeśli jest niemetylowane łączy tzw. insulator (CTCF), białko, które przyłącza się do niemetylowanej sekwencji DMR. Na chromosomie od ojca, ponieważ jest nałożone piętno genomowe, białko CTCF nie przyłącza się do DMR tego chromosomu. Ekspresja obydwu genów *Igf2* i *H19* regulowana jest przez tzw. dystalny enhancer. Jeśli między obydwoma genami znajduje się białko CTCF (zaznaczone na czerwono) ekspresji ulega jedynie gen *H19*, który znajduje się bliżej enhancera. Jeśli zaś białko to nie znajduje się na chromosomie, ponieważ miejsce DMR jest metylowane, ekspresji ulega gen *Igf2*. W tkance nowotworowej mogą wystąpić natomiast zmiany dwojakiego rodzaju: utrata piętna genomowego (LOI - loss of imprint) (ryc. 1 panel B) tego locus lub utrata jego heterozygotyczności (LOH - loss of heterozygosity). Obie zmiany prowadzą do zwiększonej ekspresji IGF-2 - pełniącego rolę autokrynnego czynnika wzrostowego dla komórek RMS [68]. Rycina 2 pokazuje przykładową ocenę metylacji locus DMR genu *Igf2/H19* w komórkach RMS oraz komórkach zdrowych mięśni szkieletowych (badania własne).

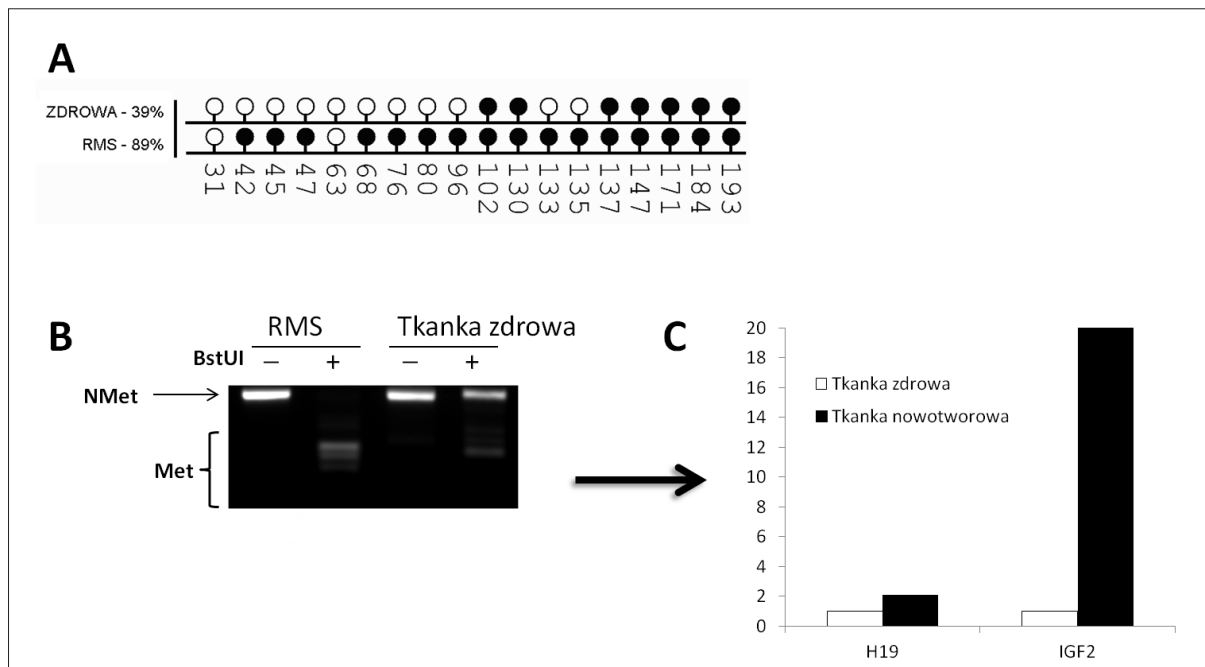


Ryc. 1. Rola tandemu genów *Igf2*-*H19* w proliferacji komórek. **Panel A** – między genami *Igf2* i *H19* znajduje się sekwencja (DMR), która ulega metylacji (nałożeniu piętna genomowego) na chromosomie od ojca (paternal chromosome – P) a nie jest metylowana na chromosomie pochodzącym od matki (maternal chromosome – M). Miejsce to podlega epigenetycznej regulacji jeśli jest niemetylowane, łączy tzw. insulator (CTCF), białko, które przyłącza się do niemetylowanej sekwencji DMR. Na chromosomie od ojca ponieważ jest nałożone piętno genomowe białko CTCF nie przyłącza się do DMR tego chromosomu. Ekspresja obydwu genów *Igf2* i *H19* regulowana jest przez tzw. dystalny enhancer. Jeśli pomiędzy obydwoma genami znajduje się białko CTCF (zaznaczone na czerwono) ekspresji ulega jedynie gen *H19*, który znajduje się bliżej enhancera. Jeśli zaś białko to nie znajduje się na chromosomie ponieważ miejsce DMR jest metylowane ekspresji ulega gen *Igf2*. W ten sposób regulacja epigenetyczna prowadzi do ekspresji genu *H19* z chromosomu matki a genu *Igf2* z chromosomu ojca – co powoduje równowagę w ekspresji obydwu genów. **Panel B** – zwiększona ekspresja *Igf2*, który pełni rolę autokrynnego czynnika dla komórek RMS wystąpi w przypadku delekcji *locus* *Igf*-*H19* na chromosomie matki (loss of heterozygosity, *LOH*). **Panel C** – wystąpi ona również w wyniku tzw. zjawiska utraty piętna genomowego polegającego na tym, że obydwa *loci* DMR zarówno na chromosomie od matki jak i od ojca ulegną metylacji (loss of imprinting – *LOI*). Prowadzi to w konsekwencji do zwiększonej ekspresji *Igf2*, który pełni rolę autokrynnego czynnika dla komórek RMS

Należy nadmienić, że *locus* 11p15.5 zawiera jeszcze jeden zestaw genów regulowanych przez epigenetyczną metylację obszarów regulatorowych – (differently methylated regions - DMRs). Druga subdomena tego *locus* zawiera m.in. gen kodujący inhibitor kinazy cyklinozależnej $p57^{kip2}$, który jest silnym czynnikiem hamującym podziały komórkowe. W zespole Beckwitha-Wiedemanna bardzo często obserwuje się zaburzenia wzorca piętna genomowego prowadzące do znacznego obniżenia ekspresji $p57$ i tym samym zwiększonej proliferacji komórek [16,64]. Cechami charakterystycznymi tego zespołu są m.in. przerosł języka, gigantyzm oraz splanchnometalia. Zmianom tym towarzyszy zwiększone prawdopodobieństwo występowania nowotworów w tym guza Wilmsa i mięsaka prążkowanokomórkowego [64].

Trudności w indukowaniu RMS w komórkach izolowanych z dojrzałych już mięśni szkieletowych myszy mogą wskazywać na możliwość, iż komórka odpowiedzialna za powstanie guza jest stosunkowo szybko eliminowana po porodzie z rozwijających się mięśni. We wstępie wspomniano jednak, iż przypuszcza się, że mięsak prążkowanokomórkowy powstaje z bardzo wczesnej rozwojowo komórki mezenchymalnej lub neuroektodermalnej. Komórki takie mogą się cechować inną wrażliwością na zmiany genetyczne niż zróżnicowane już komórki mięśni szkieletowych [6].

Kilka lat temu nasz zespół wysunął również hipotezę, że RMS może powstawać z małych komórek przypomi-



Ryc. 2. Ocena metylacji DNA oraz utraty piętna genomowego w obrębie DMR tandemu genowego H19-Igf2 za pomocą reakcji bisulfidowej. Dodanie sodku bisulfidu do badanego DNA powoduje konwersję niemetylowanej cytozyny (białe kółka) do uracylu (zmiana C na U). Natomiast cytozyna metylowana (czarne kółka) występująca w nici DNA nie podlega takiej zmianie. Powstające zmiany w sekwencji DNA wykrywa się za pomocą sekwencjonowania i przedstawia na wykresie (**Panel A**) lub wykrywa się za pomocą enzymów restrykcyjnych (**Panel B**). W tym przypadku, metylowane DNA utrzymuje miejsce restrykcyjne dla enzymu BstUI, natomiast w niemetylowanym DNA to miejsce jest utracone (**Panel B**). Różnice we wzorze metylacji DMR *locus* Igf2/H19 prowadzą do zmiany ekspresji genów H19 oraz IGf2 (**Panel C**) zgodnie ze schematem przedstawionym na ryc. 1

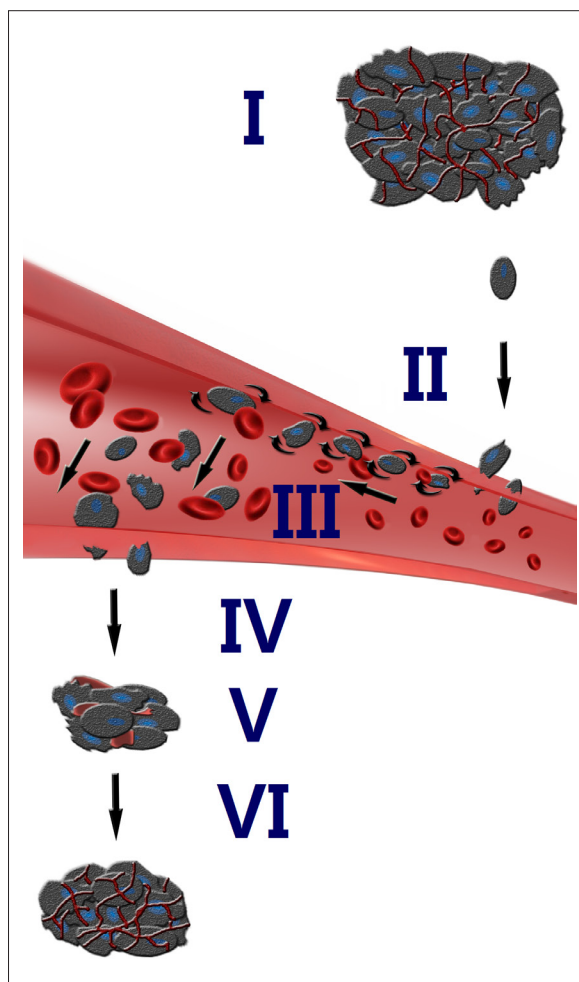
nających komórki embrionalne (very small embryonic like stem cells - VSELS) [82]. VSELS są to wczesne rozwojowo komórki zdeponowane podczas embriogenezy w dorosłych tkankach i liczba ich zmniejsza się z wiekiem. Obecność tych małych komórek w tkankach dorosłych osobników potwierdza niejako zaproponowaną w XIX w. przez Rudolfa Virchowa teorię powstawania nowotworów z resztek tkanek embrionalnych, które mogą występować w tkankach dorosłych osobników. Teoria ta, jak i jej związek z obecnością komórek VSELS, wymaga jednak dalszych badań eksperymentalnych. Komórki VSELS znajdują się w stanie spoczynkowym ponieważ modulują ekspresję genu tandemowego Igf2-H19, tego samego, który w sposób odwrotny ulega ekspresji w proliferujących komórkach RMS, cechując się tym samym wysoką ekspresją genu H19 – supresora proliferacji. Zgodnie ze schematem przedstawionym na ryc. 1, LOI lub LOH tego *locus* może prowadzić do przekształcenia się komórek VSELS w komórki inicjujące powstawanie RMS [82].

Sygnalowanie poprzez czynniki insulinopodobne (IGF-2, IGF-1) angażuje również wiele białek wewnątrzkomórkowych będących składowymi ścieżek transdukcji sygnału, w tym wyżej wspomniane białko Ras. W wielu przypadkach RMS wykryto mutacje w genie kodującym to białko, co przypuszczalnie prowadzi do Ras-zależnej wzmoczonej proliferacji komórek. Co ciekawe, w licznych przypadkach hiperaktywacja białka Ras nie zawsze jest związana z wy-

stępującymi zmianami genetycznymi w *locus* kodującym Ras. Wiadomo bowiem, że jednym z białek odpowiedzialnych za aktywację białka Ras jest białko RasGRF1 należące do rodziny tzw. GEFs (guanine nucleotide exchange factors). Ekspresja tego genu u myszy jest również regulowana epigenetycznie poprzez metylację rejonu promotorowego [25,29,80]. U ludzi natomiast ten problem nie został jeszcze wyjaśniony. Dzięki obecności domeny plekstrynowej białko RasGRF1 wymienia GDP na GTP związane z białkiem Ras umożliwiając transdukcję sygnału pochodzącego zarówno od receptorów związanych z białkami G (np. CXCR4), jak i receptorami o charakterze kinaz tyrozynowych (np. IGF-1R) [29], pełniąc tym samym istotną rolę w procesach transdukcji sygnału pochodzącego od czynników wzrostowych i chemokin. RasGRF1 jest białkiem, którego ekspresja silnie koreluje m.in. z procesami proliferacji oraz przemieszczania się komórek. W dorosłym organizmie RasGRF1 wykrywany jest głównie w obrębie ośrodkowego układu nerwowego i odgrywa rolę w procesach uczenia się i zapamiętywania. W innych tkankach jego ekspresja jest przeważnie niewielka. Badania naszego zespołu wykazały, że komórki RMS, zwłaszcza podtypu ARMS, charakteryzują się wysoką ekspresją RasGRF1. Jak stwierdziliśmy, obniżenie ekspresji RasGRF1 za pomocą shRNA prowadziło do zmniejszenia chemotaksji komórek ARMS oraz zahamowania ich proliferacji [101]. Wyniki te wskazują na możliwości wykorzystania nowych strategii terapeutycznych opartych o blokowanie tej ścieżki sygnalowania w komórkach RMS.

PRZERZUTOWANIE KOMÓREK RMS

Inwazja procesu nowotworowego charakteryzuje się zwiększoną zdolnością komórek nowotworowych do migracji (chemotaksja), przylegania do podłoża (adhezja) oraz zdolnością do proteolizy substancji międzykomórkowej. Poszczególne etapy przerzutowania komórek nowotworowych przedstawia rycina 3.



Ryc. 3. Etapy procesu przerzutowania komórek nowotworowych. Komórki nowotworowe o potencjale metastatycznym (etap I - pokazane jako ciemne) opuszczają guz pierwotny i przemieszczają się do krwi oraz naczyń chłonnych (etap II). Komórki nowotworowe krążące we krwi obwodowej mogą aktywować kaskadę krzepnięcia i układ dopełniacza. Niektóre z produktów tych reakcji (np. mikropęcherzyki błonowe, trombina, depozyty fibrynogeny, uPAR, C3a) mogą dodatkowo nasilać proces przerzutowania (etap III). Krążące komórki nowotworowe odpowiadają na wiele chemoatraktantów (np. SDF-1, I-TAC, HGF/SF, KL) wydzielanych przez odległe narządy i migrują w odpowiedzi na te sygnały (etap IV). W kolejnym etapie, w zależności od środowiska, obecności lub braku niszy promującej przerzutowanie, komórki nowotworowe zaczynają proliferować i tworzą mikroprzerzuty (etap V), które pozostają nieme klinicznie lub tworzą przerzuty stymulujące proces neowaskularyzacji powodujący przyspieszony wzrost guza (etap VI). W procesie waskularyzacji guza ważną rolę odgrywa m.in. VEGF, FGF oraz MIF

Proces przerzutowania nowotworów jest wieloetapowy i opiera się na zjawisku migracji komórek, która pełni bardzo istotną rolę w rozwoju organizmu. Intensywne przemieszczanie się komórek występuje bowiem w przebiegu embriogenezy, co skutkuje wykształcaniem się narządów w rozwijającym się zarodku [20]. Ruchy komórkowe są zaangażowane w reakcje odpornościowe, tworzenie naczyń krwionośnych, procesy regeneracji i gojenie się ran. Zjawisko tworzenia przerzutów przez komórki nowotworowe przebiega z udziałem wymienionych mechanizmów, zwłaszcza migracji komórkowej i jest cechą charakterystyczną postępującej choroby nowotworowej [43,67]. W proces przerzutowania RMS zaangażowanych jest wiele czynników: cytokin, chemokin, czynników wzrostu i cząsteczek adhezyjnych. Spośród dotychczas zbadanych i opisanych wydaje się, iż główną rolę w tym procesie odgrywają: SDF-1 (stromal derived factor 1 - czynnik pochodzenia stromalnego 1) [61], HGF/SF [54], LIF (leukemia inhibitory factor - czynnik hamujący komórki białaczkowe) [112], I-TAC (interferon-inducible T cell alpha chemoattractant - indukowany interferonem chemoatraktant dla limfocytów T alfa) [44], MIF (macrophage migration inhibitory factor - inhibitor migracji makrofagów) [98], IL-8 [113], IGF-2 [36] oraz VEGF (vascular endothelial growth factor - czynnik wzrostu śródbłonna naczyńiowego) [10]. Niżej omówiono pokrótce - na podstawie badań własnych - udział wspomnianych czynników w poszczególnych etapach przerzutowania komórek RMS.

Przyleganie komórek RMS i ich zdolność do degradacji macierzy pozakomórkowej

Komórki RMS, podobnie jak inne komórki nowotworowe, w procesie intra- i ekstrawazacji w odpowiedzi na gradient czynników chemotaktycznych muszą w pierwszej kolejności opuścić guz pierwotny i przekroczyć błonę podstawną śródbłonna naczyńiowego naczyń krwionośnych lub limfatycznych. Następnie krążące komórki nowotworowe osiedlają się w miejscu odległego przerzutu w wyniku kolejno następujących po sobie etapów:

- toczenie się komórek nowotworowych po komórkach śródbłonna naczyń,
- aktywacja cząstek adhezyjnych na powierzchni toczących się komórek,
- ścisła adhezja,
- diapedeza, czyli przejście przez warstwę śródbłonna [39].

Należy zwrócić uwagę, iż komórki nowotworowe, zanim rozpoczną budowę ogniska wtórnego są „wychwytywane” przez naczynia włosowate w procesie opisywanym jako „capillary arrest” [110]. Migrujące komórki guza, zatrzymane w mikrokrążeniu mogą wywoływać lokalne mikroprocesy zapalne, a ich produkty mogą dodatkowo stymulować adhezję, proliferację i proces ekstrawazacji komórek nowotworowych [72].

Przedostanie się z naczyń krwionośnych do tkanek i odwrotnie, wymaga pokonania swoistej bariery w postaci błony podstawnej naczyńi. Przerzutujące komórki nowotworowe wytwarzają enzymy odpowiedzialne za rozkład

białek macierzy zewnątrzkomórkowej – metaloproteinaz macierzowych MMPs (matrix metalloproteinases) [86]. Substancje te należą do rodziny enzymów cynkozależnych i biorą udział w degradacji błony podstawnej i składników macierzy pozakomórkowej. MMPs wytwarzane są w postaci proenzymu zarówno przez komórki nowotworowe, jak i przez komórki podścieliska guza. Do ich aktywacji dochodzi pozakomórkowo przy bezpośrednim udziale innych tkankowych lub surowicznych proteinaz. Wśród MMPs wyróżniamy cztery grupy w zależności od ich powinowactwa do składników macierzy pozakomórkowej: kolagenazy, żelatynazy, stromelizyny i matrylizyny [13]. Zwiększenie ekspresji MMPs umożliwia komórkom nowotworowym naciekanie sąsiednich tkanek lub przedostawanie się do naczyń krwionośnych bądź limfatycznych.

Badania przeprowadzone na liniach RMS typu pęcherzykowego (ARMS) i embrionalnego (ERMS) wykazały ekspresję zarówno na poziomie mRNA jak i białka, głównie metaloproteinazy 2 (MMP-2) zwanej inaczej żelatynazą A oraz metaloproteinazy 9 (MMP-9) znanej jako żelatynaza B [77]. Oba te enzymy zdolne są do rozkładu żelatyny i kolagenu. Ponadto w badaniach przeprowadzonych na 7 liniach rhabdomyosarcoma: 4 liniach ARMS i 3 liniach ERMS wykazano nadekspresję MMP-2, MMP-1 i MMP-9, która istotnie korelowała ze stopniem złożoności guza. Największą ekspresją wymienionych MMPs odznaczały się linie należące do typu ARMS. Ponadto przeprowadzona półilościowa analiza wykazała znaczny wzrost ekspresji MMP-2 w większej części przebadanych linii ARMS. Wśród typu ERMS tylko jedna z linii RH36 wykazywała porównywalny w stosunku do linii typu pęcherzykowego poziom ekspresji MMP-2. Dodatkowo oceniono ekspresję tkankowego inhibitora metaloproteinazy 2 – TIMP-2 (tissue inhibitor of MMP-2), uznawanego powszechnie za modulatora aktywności proteolitycznej MMP. Co ciekawe, nie wykazano jednak znaczącej statystycznie różnicy na poziomie ekspresji tego inhibitora w obrębie badanych linii RMS [77].

Ukierunkowana migracja komórek RMS

Oś SDF-1/CXCR4/CXCR7

Wiadomo, że niektóre chemokiny i czynniki wzrostowe odgrywają istotną rolę w procesie przerzutowania nowotworów [37,48,54,81,89,107]. Zespół nasz biorąc pod uwagę zdolność przerzutowania komórek RMS do szpiku kostnego zajęli się udziałem osi SDF-1-CXCR4 w procesie przerzutowania tego guza [61]. Wiadomo, że aktywacja ścieżek przekazywania sygnału z pobudzonego receptora CXCR4 odgrywa znaczącą rolę w tworzeniu nowotworowych ognisk przerzutowych m.in. w obrębie szpiku kostnego. W procesie tym uczestniczą m.in. komórki podścieliska szpikowego, które wydzielają czynnik wzrostowy pochodzenia stromalnego 1 - SDF-1, chemoatraktant aktywujący receptor CXCR4 [61,81].

Chemokina ta wydzielana jest ponadto przez komórki fibroblastoidalne znajdujące się w tkance łącznej w różnych

narządach (węzły chłonne, płuca, wątroba). Wykazano, że stężenie tej chemokiny znacznie wzrasta w obrębie wyżej wymienionych narządów zwłaszcza po radio-/chemioterapii. CXCR4 należy natomiast do grupy receptorów sprzężonych z białkami G (GPCR - G protein coupled receptors). Receptory te stanowią najliczniejszą, a zarazem najbardziej zróżnicowaną pod względem oddziaływających na nie ligandów rodzinę receptorów białkowych odpowiedzialnych za przenoszenie sygnałów do wnętrza komórki [48,81]. Wszystkie receptory GPCR, niezależnie od ich funkcji, mają budowę stosunkowo jednorodną: składając się z siedmiu przezbłonowych domen alfa-helis połączonych ze sobą stosunkowo krótkimi pętlami [46,115].

W badaniach własnych wykazaliśmy, że komórki ustalonych linii RMS wykazują ekspresję receptora CXCR4 [61]. Należy również podkreślić, że ekspresja tego receptora silnie koreluje z translokacjami charakterystycznymi dla ARMS. Linie komórkowe ARMS wykazują wysoki poziom ekspresji CXCR4 na poziomie mRNA, jak i białka (>90% komórek wykazujących ekspresję na powierzchni błony komórkowej). Znacznie niższy poziom ekspresji tego receptora występuje na liniach ERMS (~20%). Badania nasze wskazują, że ekspresja receptora CXCR4 może być regulowana m.in. przez białka fuzyjne PAX3-FKHR [5,109]. Ekspresja receptora CXCR4 na powierzchni komórek RMS powoduje więc, że komórki tego guza pozytywnie odpowiadają na gradient SDF-1 [44]. Odpowiedź ta ujawnia się głównie we wpływie SDF-1 na zwiększoną chemotaksję, fosforylację białek przekazywania sygnału, tj.: MAPKp44/42 oraz AKT, a także polega na wydzielaniu MMPs przez komórki tego mięsaka [61].

Przez wiele lat uważano, że CXCR4 jest jedynym receptorem dla SDF-1. Jednak wyniki najnowszych badań wykazały istnienie dodatkowego receptora chemokinowego dla SDF-1, który został nazwany CXCR7 [14]. Występowanie receptora CXCR7 wyjaśniło zjawisko odpowiedzi komórek RMS na gradient SDF-1 [65] w komórkach tego guza, które wykazywały niską ekspresję receptora CXCR4 [89]. Szczegółowa analiza cytometryczna potwierdziła bowiem obecność CXCR7 na powierzchni komórek ustalonych linii RMS [44,61]. Warto nadmienić, że receptor ten charakteryzuje się wysokim, bo prawie dziesięciokrotnie większym niż CXCR4, powinowactwem do SDF-1 [65].

To, że receptor CXCR7 wiąże również inną chemokinę, którą jest I-TAC, powoduje, iż wyjaśnienie biologicznej roli osi SDF-1/CXCR4 w przerzutowaniu RMS nie jest tak proste jak sądzono. Konieczne stało się zatem uwzględnienie nowych elementów składowych układu SDF-1/CXCR4, a mianowicie interakcji SDF-1 z receptorem CXCR7 oraz interakcji chemokiny I-TAC z tym receptorem [14,44]. Pionierskie badania naszego zespołu wykazały, że niektóre ustalone linie komórkowe RMS zawierają na swej powierzchni funkcjonalny receptor CXCR7. Poziom ekspresji tego receptora jest wyższy w liniach typu ERMS, co stanowi sytuację odwrotną niż w przypadku receptora CXCR4, którego wysoką ekspresję potwierdzono głównie w liniach ARMS. Nasze badania wykazały ponadto,

iz wiązanie SDF-1 oraz I-TAC do tego receptora prowadzi do fosforylacji kinaz MAPKp42/44 i AKT [44,99,100]. Dodatkowo stwierdzono, że ekspresja receptora CXCR7 ulega znacznemu obniżeniu po umieszczeniu badanych linii mięsaka w warunkach niedotlenienia - hipoksji [113]. W badanych liniach komórkowych RMS nie stwierdzono ekspresji I-TAC, co wyklucza możliwość istnienia autokryny pętli regulacyjnej. Komórki mięsaka nie wykazują również ekspresji innego receptora dla I-TAC jakim jest receptor CXCR3. Tym samym oddziaływanie I-TAC na komórki RMS jest zależne wyłącznie od wiązania się z receptorem CXCR7. Z opublikowanych badań naszego zespołu wynika, że receptor CXCR7 może w niewielkim stopniu indukować chemotaksję komórek RMS, natomiast jego pobudzenie odgrywa znaczącą rolę przede wszystkim w zwiększeniu przylegania komórek do białek adhezyjnych (białek macierzy pozakomórkowej) np. do fibronektyny oraz zwiększeniu ekspresji metaloproteinaz.

W świetle najnowszych badań należy brać pod uwagę, że stosowanie powszechnie znanych blokerów, swoistych dla CXCR4, takich jak AMD 3100 i T140 może być niewystarczające do zahamowania aktywności osi SDF-1/CXCR4 [44]. Blokada CXCR4 nie wyklucza możliwości stymulowania komórek za pomocą SDF-1 przez receptor CXCR7. Dlatego dokładniejsze poznanie udziału osi SDF-1/I-TAC-CXCR7 może się okazać podstawowym sposobem efektywnego blokowania przetrzutowania komórek mięsaka prądkowokomórkowego do szpiku kostnego i węzłów chłonnych - narządów charakteryzujących się wysoką ekspresją SDF-1.

Rola osi HGF/c-Met, LIF/LIF-R

Komórki podścieliska szpikowego wydzielają, poza SDF-1, inne substancje o właściwościach chemotaktycznych m.in. HGF czy LIF. Udział tych chemokin i ich receptorów w procesie przetrzutowania i nowotworzenia został potwierdzony na przykładzie różnych typów nowotworów, takich jak nowotwory gruczołu sutkowego, czerniak czy hepatoma [27,42,55,104]. W wielu przypadkach są to czynniki, które silnie indukują proliferację komórek nowotworowych, przyczyniając się do komórkowych zmian morfologicznych oraz są odpowiedzialne za wzrost unaczynienia rosnącego guza [27,54]. Oś HGF/c-Met odgrywa bardzo ważną rolę w biologii komórek RMS i komórki guza wykazują ekspresję tego receptora, który jest białkiem kodowanym przez protoonkogen *c-Met* [27,42,54,74,104]. W przypadku ustalonych linii RMS MET⁺ wykazano, iż podanie egzogennej HGF powoduje wyraźny wzrost potencjału migracyjnego, zmiany w reorganizacji cytoszkieletu, a także skutkuje nasilonym wydzielaniem metaloprotein, głównie MMP2,-9 i MT1-MMP [54]. Co ważne, w przeciwieństwie do SDF-1, HGF wyraźnie zwiększa przeżywalność komórek ustalonych linii RMS po zastosowaniu radio-/chemioterapii [54]. Wpływ HGF na komórki RMS doprowadził do rozwoju wielu strategii mających na celu przerwanie sygnałowania osi HGF/MET [83,102]. Jedną z najczęściej stosowanych metod w warunkach *in vitro* była genetyczna manipulacja wykorzystująca krót-

kie interferujące RNA (short interfering RNA). Obniżenie ekspresji receptora MET zmniejszało zdolności migracyjne komórek mięsaka, indukowało apoptozę, hamowało proliferację [102], i co ciekawe, negatywnie wpływało na ekspresję receptora CXCR4 [74]. Również guzy, jakie powstawały po przeszczepieniu komórek RMS myszom z defektem immunologicznym NOD-SCID, były średnio 2-4 razy mniejsze w porównaniu z grupą kontrolną [62,74].

Próby zablokowania funkcjonowania osi SDF-1/CXCR4/CXCR7 i HGF/MET za pomocą swoistych inhibitorów, takich jak T140 i K252a, nie powodują jednak pełnego zahamowania migracji komórek RMS do szpiku kostnego i węzłów chłonnych. Obserwacje te sugerowały istnienie dodatkowego chemoatraktanta zaangażowanego w procesy przetrzutowania, który, podobnie jak SDF-1, jest wytwarzany przez podścielisko szpiku kostnego. Wnikliwej analizie poddano czynnik hamujący białaczkę (LIF), który stymuluje proliferację komórek satelitarnych mięśni szkieletowych i kardiomiocytów [44,97,113] oraz jest wytwarzany przez komórki podścieliska szpikowego. Stosując egzogenne LIF oceniono wpływ tej cytokiny na proliferację, przeżywalność, lokomotoryczność i adhezję wybranych linii rhabdomyosarcoma. Stwierdzono znaczący wzrost przeżywalności badanych komórek zarówno pod wpływem samego LIF, jak i w połączeniu z SDF-1 oraz HGF [112]. Ponadto czynnik ten wyraźnie zwiększał zdolności adhezyjne komórek RMS do komórek śródbłonna naczyniowego, fibroblastów wyizolowanych ze szpiku kostnego i fibronektyny. Co ciekawe nie było to spowodowane bezpośrednio zwiększeniem ekspresji powierzchniowych cząsteczek adhezyjnych, tj. VLA-4, -5, ICAM-1. Dodatkowo wykazano, że cytokina ta zwiększa oporność komórek RMS na cytostatyki [112]. Zastosowanie swoistego przeciwciała blokującego receptor LIF-R zniżyło to działanie, a siRNA skierowane przeciwko mRNA kodującemu receptor zmniejszało rozrost RMS w modelach mysich *in vivo* [112].

Rozrost unaczynienia nowotworu - angiogeneza

Wzrost RMS, podobnie jak i innych guzów litych, ściśle zależy od wydajności procesu angiogenezy [30,31]. Proces polega na tworzeniu nowych naczyń z komórek śródbłonna naczyń już istniejących, na rekrutacji komórek progenitorowych śródbłonna z krwi krążącej oraz ich następnej proliferacji i różnicowaniu. Tworzenie nowych naczyń krwionośnych jest niezbędne do odżywiania, rozwoju i wzrostu guza pierwotnego oraz dla powstających ognisk wtórnych [30,31,32,50]. Czynniki stymulujące podziały komórek śródbłonkowych są wydzielane przez komórki otaczające guz, a także przez same komórki nowotworowe [32,40]. W przypadku nowotworów proces angiogenezy przestaje być kontrolowany, komórki guza w sposób ciągły uwalniają czynniki wzrostu o charakterze proangiogennym, osłabieniu zaś ulegają negatywne regulatory i inhibitory wzrostu naczyń [32]. Do powszechnie znanych stymulatorów neoangiogenezy należą m.in.: VEGF, omówiony wyżej HGF, interleukina 8 oraz MIF [1,8,15,26,40,56].

VEGF jest glikoproteina należąca do rodziny czynników wzrostu śródbłonka, wiążącą się z proteoglikanami macierzy pozakomórkowej stymulującą proliferację komórek śródbłonka oraz powodującą wzrost przepuszczalności naczyń [9,26,87,108]. VEGF wiąże się z receptorami błonowymi o aktywności kinazy tyrozynowej Flt-1 i Flk-1 umiejscowionymi nie tylko na komórkach śródbłonka naczyń, ale również na komórkach nowotworowych. Najwięcej glikoproteiny wydzielają komórki RMS w postaci izoform o długości 121 i 165 aminokwasów [77]. Dodatkowo w 7 przebadanych liniach RMS stwierdzono ekspresję receptora Flt-1 zarówno na poziomie mRNA, jak i białka. Zdolność wydzielania VEGF przez komórki mięsaka, a także obecność na ich powierzchni receptora dla tej glikoproteiny, wskazują na istnienie autokrynnej pętli regulacyjnej [77]. Zablokowanie receptora Flt-1 obecnego na komórkach RMS zdecydowanie obniżało tempo wzrostu komórek. Podobny efekt w stosunku do komórek mięsaka uzyskano po zastosowaniu kwasu retinowego [77].

Wiadomo, że stężenie VEGF w surowicy lub osoczu koreluje z progresją nowotworu i gorszym rokowaniem [105]. Duże stężenie tej glikoproteiny może świadczyć o tworzeniu wtórnych ognisk przerzutowych [71,111]. Przypuszczenia te są potwierdzone dodatkowymi doniesieniami wskazującymi na zdecydowanie wyższe stężenie osocznego VEGF u pacjentów z przerzutami RMS w porównaniu do pacjentów, u których przerzutów wtórnych nie stwierdzono [28]. Do najsilniejszych induktorów wzmożonej ekspresji VEGF należy hipoksja [56]. W warunkach deficytu tlenowego dochodzi do wzmożonego wydzielania VEGF przez komórki guza. Jego łączenie z receptorami obecnymi na komórkach endotelialnych powoduje uruchomienie szlaku kinazy serynowo-treoninowej mTOR, zwiększa przepuszczalność ściany naczyń i migrację tych komórek w kierunku guza, gdzie dochodzi do wytworzenia nowej sieci naczyń krwionośnych na potrzeby nowotworu. Szczegółowa analiza promotora genu VEGF ujawniła obecność sekwencji zależnej od hipoksji, z którą wiąże się czynnik transkrypcyjny HIF-1 α . Dogłębne poznanie mechanizmów angiogenezy w przypadku RMS pozwoli na opracowanie nowych strategii terapeutycznych. Najnowsze badania na modelu zwierzęcym potwierdzają, że zastosowanie rapamycyny (inhibitor szlaku mTOR), jej analogu w postaci CCI-779, czy też połączenie rapamycyny z przeciwciałem 2C3 przeciw VEGF przynosi dobre wyniki w postaci obniżenia ekspresji HIF-1 α oraz ekspresji VEGF w guzach RMS [107]. Należy również podkreślić, że według najnowszych doniesień VEGF oprócz funkcji proangiogennej odgrywa główną rolę we wzroście i proliferacji komórek RMS. Wykazano, że podanie do hodowli komórkowej egzogenego VEGF objawia się zwiększoną fosforylacją ERK1/2, co przekłada się na wzmożoną proliferację tych komórek [37].

Przypuszcza się, że w procesie angiogenezy istotną rolę odgrywa również inhibitor migracji makrofagów - MIF [18,107]. Receptorem dla niego jest CD74 [21,60] umiejscowiony na powierzchni komórki kompleksu MHC II. Niemniej jednak transdukcja sygnału wymaga obecności

i aktywowania dodatkowego białka opisanego w literaturze jako CD44 [60,92]. Wykazano również, że MIF nieśwoiście wiąże się z receptorami CXCR2 i wspomnianym CXCR4 [12]. Najnowsze doniesienia świadczą o udziale MIF w patogenezie niektórych nowotworów, takich jak rak gruczołu sutkowego, melanoma, glioblastoma, czy rak płuca [4,85,93,106]. Ponadto wykazano udział tego czynnika w stymulacji proliferacji komórek nowotworowych, hamowaniu apoptozy i lizy tych komórek przez komórki NK gospodarza [3,47]. Biorąc pod uwagę wysoką ekspresję CXCR4 na powierzchni komórek RMS możemy przypuszczać, iż MIF, jako potencjalny ligand CXCR4, jest kolejnym elementem skomplikowanego układu receptorów i ligandów aktywnych w procesie przerzutowania nowotworów [88]. Stosując egzogeny MIF w hodowli komórkowej zespół nasz wykazał zwiększenie aktywności proadhezyjnych komórek RMS przy niewielkim wpływie na ich potencjał chemotaktyczny [98]. Ponadto, pod wpływem MIF, internalizacji ulegał receptor CXCR7, a w komórkach o fenotypie CXCR4⁺, CXCR7⁺, CXCR2⁻ dochodziło do fosforylacji białek przekazywania sygnału: MAPK p42/44 i AKT [98]. Stwierdzono także, że komórki RMS wykazują wysoki poziom ekspresji MIF na poziomie mRNA i wydzielają go do medium hodowlanego. Przemawia to za istnieniem autokrynnej pętli regulacyjnej. Co ważne, nadszyc zebrany znad komórek silnie stymulował komórki śródbłonkowe izolowane z ludzkiej pępowiny w teście tworzenia naczyń *in vitro* (tube formation assay). Na podstawie powyższych wyników wysunęliśmy hipotezę, iż MIF z jednej strony może zmniejszać zdolność komórek do opuszczania obszaru guza pierwotnego, z drugiej zaś jest silnym czynnikiem zwiększającym ukrwienie guza i chemokiną zwiększającą przemieszczanie się komórek śródbłonka oraz fibroblastów [18,47]. Dodatkowo proces ten jest wspomagany przez IL-8 i wspomniany wyżej VEGF [60,113].

Rosnący guz RMS składa się z kilku komponentów, m.in. komórki nowotworowe, śródbłonkowe, fibroblasty. Udział poszczególnych rodzajów komórek, tworzących masę guza, w jego wzroście i rozwoju nie został jeszcze dokładnie poznany. Przypuszczalnie największą rolę odgrywają fibroblasty wchodzące w skład podścieliska nazwane fibroblastami związanymi z guzem CAF (cancer/tumor-associated fibroblasts) [19]. Komórki te mogą powstać z mezenchymalnych komórek macierzystych, ulegać zmianom morfologicznym oraz migrować pod wpływem czynników uwalnianych z rosnącego guza [96]. Istnieją jednocześnie liczne doniesienia świadczące o znacznym wpływie tych komórek na proces rozrostu guza i inicjacji angiogenezy [19,49,103]. Komórki te wydzielają znaczne ilości SDF-1, który jest silnym chemoatraktantem nie tylko dla komórek nowotworowych, ale również dla progenitorowych komórek śródbłonkowych, niezbędnych w procesie neoangiogenezy [78]. W badaniach własnych wykazaliśmy, iż myszy zaszczepione komórkami RMS o sztucznie obniżonej ekspresji MIF (shRNA) charakteryzowały się mniejszymi guzami niż myszy kontrolne. Możemy więc przypuszczać, iż MIF blokuje migrację CAF, co skutkuje mniejszą masą guza. CAF są przyciągane na

zasadzie chemotaksji przez SDF-1, którego jednak komórki mięsaka nie wydzielają [98]. Ponadto silna ekspresja czynników wzrostowych, takich jak IGF-2 czy VEGF przez komórki RMS stymuluje silnie auto- i parakrynnie proliferację i migrację samych komórek nowotworowych.

PODSUMOWANIE

W ciągu ostatnich lat skuteczność terapii RMS uległa znacznej poprawie, lecz nadal oczekuje się opracowania bardziej efektywnych i trwałych sposobów leczenia. Wyniki, które otrzymano dzięki badaniom przeprowadzonym na modelach *in vitro* oraz z wykorzystaniem mysich modeli *in vivo* pozwoliły na określenie głównych czynników oraz receptorów regulujących wzrost i prze-

rzutowanie komórek mięsaka prążkowanokomórkowego. Wiedza ta pozwoliła na stosowanie skutecznych preparatów, takich jak swoiste przeciwciała blokujące receptor IGF1R [51], VEGF [38,75], MET [102], czy inhibitory chemiczne blokujące CXCR4 [24]. Zainicjowano wiele obiecujących prób klinicznych. Opracowanie nowych procedur diagnostycznych oraz terapii stanowi wyzwanie dla świata nauki i przemysłu farmaceutycznego. Jednak w dużej mierze jest ono uzależnione od wyjaśnienia mechanizmów powstawania RMS na poziomie komórkowym, poznania mechanizmów biorzących udział w jego rozwoju oraz przrutowania do odległych narządów. Dogłębne poznanie tych mechanizmów pozwoli na opracowanie lepszych, nowoczesnych strategii leczniczych.

PIŚMIENNICTWO

- [1] Amin M.A., Volpert O.V., Woods J.M., Kumar P., Harlow L.A., Koch A.E.: Migration inhibitory factor mediates angiogenesis via mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol kinase. *Circ. Res.*, 2003; 93: 321-329
- [2] Anderson J., Gordon A., Pritchard-Jones K., Shipley J.: Genes, chromosomes, and rhabdomyosarcoma. *Genes Chromosomes Cancer*, 1999; 26: 275-285
- [3] Arcuri F., Cintonino M., Carducci A., Papa S., Riparbelli M.G., Mangioni S., Di Blasio A.M., Tosi P., Viganò P.: Human decidual natural killer cells as a source and target of macrophage migration inhibitory factor. *Reproduction*, 2006; 131: 175-182
- [4] Baron N., Deuster O., Noelker C., Stüer C., Strik H., Schaller C., Dodel R., Meyer B., Bacher M.: Role of macrophage migration inhibitory factor in primary glioblastoma multiforme cells. *J. Neurosci. Res.*, 2011; 89: 711-717
- [5] Barr F.G.: Gene fusions involving PAX and FOX family members in alveolar rhabdomyosarcoma. *Oncogene*, 2001; 20: 5736-5746
- [6] Barr F.G.: Molecular genetics and pathogenesis of rhabdomyosarcoma. *J. Pediatr. Hematol. Oncol.*, 1997; 19: 483-491
- [7] Barr F.G., Nauta L.E., Davis R.J., Schafer B.W., Nycum L.M., Biegel J.A.: In vivo amplification of the PAX3-FKHR and PAX7-FKHR fusion genes in alveolar rhabdomyosarcoma. *Hum. Mol. Genet.*, 1996; 5: 15-21
- [8] Bategay E.J.: Angiogenesis: mechanistic insights, neovascular diseases, and therapeutic prospects. *J. Mol. Med. (Berl.)*, 1995; 73: 333-346
- [9] Bellamy W.T.: Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in multiple myeloma and other hematopoietic malignancies. *Semin. Oncol.*, 2001; 28: 551-559
- [10] Bender J.G., Yamashiro D.J., Fox E.: Clinical development of VEGF signaling pathway inhibitors in childhood solid tumors. *Oncologist*, 2011; 16: 1614-1625
- [11] Bennicelli J.L., Advani S., Schäfer B.W., Barr F.G.: PAX3 and PAX7 exhibit conserved cis-acting transcription repression domains and utilize a common gain of function mechanism in alveolar rhabdomyosarcoma. *Oncogene*, 1999; 18: 4348-4356
- [12] Bernhagen J., Krohn R., Lue H., Gregory J.L., Zerneck A., Koenen R.R., Dewor M., Georgiev I., Schober A., Leng L., Kooistra T., Fingerle-Rowson G., Ghezzi P., Kleemann R., McCol S.R., Bucala R., Hickey M.J., Weber C.: MIF is a noncognate ligand of CXC chemokine receptors in inflammatory and atherogenic cell recruitment. *Nat. Med.*, 2007; 13: 587-596
- [13] Bourbouli D., Stetler-Stevenson W.G.: Matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): positive and negative regulators of tumor cell adhesion. *Semin. Cancer Biol.*, 2010; 20: 161-168
- [14] Burns J.M., Summers B.C., Wang Y., Melikian A., Berahovich R., Miao Z., Penfold M.E., Sunshine M.J., Littman D.R., Kuo C.J., Wei K., McMaster B.E., Wright K., Howard M.C., Schall T.J.: A novel chemokine receptor for SDF-1 and I-TAC involved in cell survival, cell adhesion, and tumor development. *J. Exp. Med.*, 2006; 203: 2201-2213
- [15] Carmeliet P.: Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat. Med.*, 2000; 6: 389-395
- [16] Caspari T., Cleary M.A., Perlman E.J., Zhang P., Elledge S.J., Tilghman S.M.: Oppositely imprinted genes *p57^{Kip2}* and *Igf2* interact in a mouse model for Beckwith-Wiedemann syndrome. *Genes Dev.*, 1997; 13: 3115-3124
- [17] Cavenee W.K.: Muscling in on rhabdomyosarcoma. *Nat. Med.*, 2002; 8: 1200-1201
- [18] Chesney J., Metz C., Bacher M., Peng T., Meinhardt A., Bucala R.: An essential role for macrophage migration inhibitory factor (MIF) in angiogenesis and the growth of a murine lymphoma. *Mol. Med.*, 1999; 5: 181-191
- [19] Cirri P., Chiarugi P.: Cancer associated fibroblasts: the dark side of the coin. *Am. J. Cancer Res.*, 2011; 1: 482-497
- [20] Comoglio P.M., Trusolino L.: Invasive growth: from development to metastasis. *J. Clin. Invest.*, 2002; 109: 857-862
- [21] Cournia Z., Leng L., Gandavadi S., Du X., Bucala R., Jorgensen W.L.: Discovery of human macrophage migration inhibitory factor (MIF)-CD74 antagonists via virtual screening. *J. Med. Chem.*, 2009; 52: 416-424
- [22] Dagher R., Helman L.: Rhabdomyosarcoma: an overview. *Oncologist*, 1999; 4: 34-44
- [23] Diller L., Sexsmith E., Gottlieb A., Li F.P., Malkin D.: Germline p53 mutations are frequently detected in young children with rhabdomyosarcoma. *J. Clin. Invest.*, 1995; 95: 1606-1611
- [24] Diomedea-Camassei F., McDowell H.P., De Ioris M.A., Uccini S., Altavista P., Raschella G., Vitali R., Mannarino O., De Sio L., Cozzi D.A., Donfrancesco A., Inserra A., Callea F., Dominici C.: Clinical significance of CXC chemokine receptor-4 and c-Met in childhood rhabdomyosarcoma. *Clin. Cancer Res.*, 2008; 14: 4119-4127
- [25] Drake N.M., DeVito L.M., Cleland T.A., Soloway P.D.: Imprinted *Rasgrf1* expression in neonatal mice affects olfactory learning and memory. *Genes Brain Behav.*, 2011; 10: 392-403

- [26] Dvorak H.F.: VPF/VEGF and the angiogenic response. *Semin. Perinatol.*, 2000; 24: 75-78
- [27] El-Attar H.A., Sheta M.I.: Hepatocyte growth factor profile with breast cancer. *Indian J. Pathol. Microbiol.*, 2011; 54: 509-513
- [28] El-Houseini M.E., Abdel-Azim S.A., El-Desouky G.I., Abdel-Hady S., El-Hamad M.F., Kamel A.M.: Clinical significance of vascular endothelial growth factor (VEGF) in sera of patients with pediatric malignancies. *J. Egypt. Natl. Canc. Inst.*, 2004; 16: 57-61
- [29] Fernández-Medarde A., Santos E.: Ras in cancer and developmental diseases. *Genes Cancer*, 2011; 2: 344-358
- [30] Folkman J.: Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat. Med.*, 1995; 1: 27-31
- [31] Folkman J.: Angiogenesis. *Annu. Rev. Med.*, 2006; 57: 1-18
- [32] Folkman J.: Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis. *Semin. Oncol.*, 2002; 29: 15-18
- [33] Frascella E., Toffolatti L., Rosolen A.: Normal and rearranged PAX3 expression in human rhabdomyosarcoma. *Cancer Genet. Cytogenet.*, 1998; 102: 104-109
- [34] Fredericks W.J., Ayyanathan K., Herlyn M., Friedman J.R., Rauscher F.J. 3rd: An engineered PAX3-KRAB transcriptional repressor inhibits the malignant phenotype of alveolar rhabdomyosarcoma cells harboring the endogenous PAX3-FKHR oncogene. *Mol. Cell. Biol.*, 2000; 20: 5019-5031
- [35] Galili N., Davis R.J., Fredericks W.J., Mukhopadhyay S., Rauscher F.L. 3rd, Emanuel B.S., Rovera G., Barr F.G.: Fusion of a fork head domain gene to PAX3 in the solid tumour alveolar rhabdomyosarcoma. *Nat. Genet.*, 1993; 5: 230-235
- [36] Gallagher E.J., LeRoith D.: The proliferating role of insulin and insulin-like growth factors in cancer. *Trends Endocrinol. Metab.*, 2010; 21: 610-618
- [37] Gee M.F., Tsuchida R., Eichler-Jonsson C., Das B., Baruchel S., Malkin D.: Vascular endothelial growth factor acts in an autocrine manner in rhabdomyosarcoma cell lines and can be inhibited with all-trans-retinoic acid. *Oncogene*, 2005; 24: 8025-8037
- [38] Gerber H.P., Kowalski J., Sherman D., Eberhard D.A., Ferrara N.: Complete inhibition of rhabdomyosarcoma xenograft growth and neovascularization requires blockade of both tumor and host vascular endothelial growth factor. *Cancer Res.*, 2000; 60: 6253-6258
- [39] Giavazzi R., Foppolo M., Dossi R., Remuzzi A.: Rolling and adhesion of human tumor cells on vascular endothelium under physiological flow conditions. *J. Clin. Invest.*, 1993; 92: 3038-3044
- [40] Giordano F.J.: Angiogenesis: mechanisms, modulation, and targeted imaging. *J. Nucl. Cardiol.*, 1999; 6: 664-671
- [41] Goldstein M., Meller I., Issakov J., Orr-Urtreger A.: Novel genes implicated in embryonal, alveolar, and pleomorphic rhabdomyosarcoma: a cytogenetic and molecular analysis of primary tumors. *Neoplasia*, 2006; 8: 332-343
- [42] Goode E.L., Chenevix-Trench G., Hartmann L.C., Fridley B.L., Kalli K.R., Vierkant R.A., Larson M.C., White K.L., Keeney G.L., Oberg T.N., Cunningham J.M., Beesley J., Johnatty S.E., Chen X., Goodman K.E. i wsp.: Assessment of hepatocyte growth factor in ovarian cancer mortality. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 2011; 20: 1638-1648
- [43] Grimstad I.A.: Direct evidence that cancer cell locomotion contributes importantly to invasion. *Exp. Cell. Res.*, 1987; 173: 515-523
- [44] Grymula K., Tarnowski M., Wysoczynski M., Drukala J., Barr F.G., Ratajczak J., Kucia M., Ratajczak M.Z.: Overlapping and distinct role of CXCR7-SDF-1/ITAC and CXCR4-SDF-1 axes in regulating metastatic behavior of human rhabdomyosarcomas. *Int. J. Cancer*, 2010; 127: 2554-2568
- [45] Gurney J.G., Severson R.K., Davis S., Robison L.L.: Incidence of cancer in children in the United States. Sex-, race-, and 1-year age-specific rates by histologic type. *Cancer*, 1995; 75: 2186-2195
- [46] Gutkind J.S.: The pathways connecting G protein-coupled receptors to the nucleus through divergent mitogen-activated protein kinase cascades. *J. Biol. Chem.*, 1998; 273: 1839-1842
- [47] Hagemann T., Wilson J., Kulbe H., Li N.F., Leinster D.A., Charles K., Klemm F., Pukrop T., Binder C., Balkwill F.R.: Macrophages induce invasiveness of epithelial cancer cells via NF-kappa B and JNK. *J. Immunol.*, 2005; 175: 1197-1205
- [48] Harrison C.: G protein-coupled receptors: insights into chemokine receptors. *Nat. Rev. Drug. Discov.*, 2010; 9: 920
- [49] Hellevik T., Pettersen I., Berg V., Winberg J.O., Moe B.T., Bartnes K., Paulssen R.H., Busund L.T., Bremnes R., Chalmers A., Martinez-Zubiaurre I.: Cancer-associated fibroblasts from human NSCLC survive ablative doses of radiation but their invasive capacity is reduced. *Radiat. Oncol.*, 2012; 7: 59
- [50] Hida K., Kawamoto T., Ohga N., Akiyama K., Hida Y., Shindoh M.: Altered angiogenesis in the tumor microenvironment. *Pathol. Int.*, 2011; 61: 630-637
- [51] Houghton P.J., Morton C.L., Gorlick R., Kolb E.A., Keir S.T., Reynolds C.P., Kang M.H., Maris J.M., Wu J., Smith M.A.: Initial testing of a monoclonal antibody (IMC-A12) against IGF-1R by the pediatric preclinical testing program. *Pediatr Blood Cancer*, 2010; 54: 921-926
- [52] Iolascon A., Faienza M.F., Coppola B., Rosolen A., Basso G., Della Ragione F., Schettini F.: Analysis of cyclin-dependent kinase inhibitor genes (CDKN2A, CDKN2B, and CDKN2C) in childhood rhabdomyosarcoma. *Genes Chromosomes Cancer*, 1996; 15: 217-222
- [53] Jakubczak J.L., LaRochelle W.J., Merlino G.: NK1, a natural splice variant of hepatocyte growth factor/scatter factor, is a partial agonist in vivo. *Mol. Cell Biol.*, 1998; 18: 1275-1283
- [54] Jankowski K., Kucia M., Wysoczynski M., Reza R., Zhao D., Trzyna E., Trent J., Peiper S., Zembala M., Ratajczak J., Houghton P., Janowska-Wieczorek A., Ratajczak M.Z.: Both hepatocyte growth factor (HGF) and stromal-derived factor-1 regulate the metastatic behavior of human rhabdomyosarcoma cells, but only HGF enhances their resistance to radiochemotherapy. *Cancer Res.*, 2003; 63: 7926-7935
- [55] Jeffers M., Rong S., Vande Woude G.F.: Enhanced tumorigenicity and invasion-metastasis by hepatocyte growth factor/scatter factor-met signalling in human cells concomitant with induction of the urokinase proteolysis network. *Mol. Cell Biol.*, 1996; 16: 1115-1125
- [56] Juczewska M., Chyczewska E., Naumnik W., Chyczewski L., Niklińska W., Rogalewska A., Kovalchuk O., Nikliński J.: Endothelial cells and angiogenesis intensity in lung cancer. *Folia Histochem. Cytobiol.*, 2001; 39: 253-258
- [57] Keller C., Arenkiel B.R., Coffin C.M., El-Bardeesy N., DePinho R.A., Capecchi M.R.: Alveolar rhabdomyosarcomas in conditional PAX3:Fkhr mice: cooperativity of Ink4a/ARF and Trp53 loose of function. *Genes Dev.*, 2004; 18: 2614-2626
- [58] Khan J., Simon R., Bittner M., Chen Y., Leighton S.B., Pohida T., Smith P.D., Jiang Y., Gooden G.C., Trent J.M., Meltzer P.S.: Gene expression profiling of alveolar rhabdomyosarcoma with cDNA microarrays. *Cancer Res.*, 1998; 58: 5009-5013
- [59] Knudsen E.S., Pazzagli C., Born T.L., Bertolaet B.L., Knudsen K.E., Arden K.C., Henry R.R., Feramisco J.R.: Elevated cyclins and cyclin-dependent kinase activity in the rhabdomyosarcoma cell line RD. *Cancer Res.*, 1998; 58: 2042-2049
- [60] Leng L., Metz C.N., Fang Y., Xu J., Donnelly S., Baugh J., Delohery T., Chen Y., Mitchell R.A., Bucala R.: MIF signal transduction initiated by binding to CD74. *J. Exp. Med.*, 2003; 197: 1467-1476
- [61] Libura J., Drukala J., Majka M., Tomescu O., Navenot J.M., Kucia M., Marquez L., Peiper S.C., Barr F.G., Janowska-Wieczorek A., Ratajczak M.Z.: CXCR4-SDF-1 signaling is active in rhabdomyosarcoma

cells and regulates locomotion, chemotaxis, and adhesion. *Blood*, 2002; 100: 2597-2606

[62] Lukaszewicz E., Miekus K., Kijowski J., Drabik G., Wilusz M., Bobis-Wozowicz S., Majka M.: Inhibition of rhabdomyosarcoma's metastatic behavior through downregulation of MET receptor signaling. *Folia Histochem. Cytobiol.*, 2009; 47: 485-489

[63] Lynch C.A., Tycko B., Bestor T.H., Walsh C.P.: Reactivation of a silenced H19 gene in human rhabdomyosarcoma by demethylation of DNA but not by histone hyperacetylation. *Mol. Cancer*, 2002; 1: 2

[64] Maher E.R., Reik W.: The two-domain hypothesis in Beckwith-Wiedemann syndrome. *J. Clin. Invest.*, 2000; 106: 739-740

[65] Maksym R.B., Tarnowski M., Grymula K., Tarnowska J., Wysocki M., Liu R., Czerny B., Ratajczak J., Kucia M., Ratajczak M.Z.: The role of stromal-derived factor-1-CXCR7 axis in development and cancer. *Eur. J. Pharmacol.*, 2009; 625: 31-40

[66] Malkin D., Chilton-MacNeill S., Meister L.A., Sexsmith E., Diller L., Garcea R.L.: Tissue-specific expression of SV40 in tumors associated with the Li-Fraumeni syndrome. *Oncogene*, 2001; 20: 4441-4449

[67] Mareel M.M., Van Roy F.M., Bracke M.E.: How and when do tumor cells metastasize? *Crit. Rev. Oncol.*, 1993; 4: 559-594

[68] Martins A.S., Olmos D., Missiaglia E., Shipley J.: Targeting the insulin-like growth factor pathway in rhabdomyosarcomas: rationale and future perspectives. *Sarcoma*, 2011; ID 209736

[69] Mauro A., Ciccarelli C., De Cesaris P., Scoglio A., Bouché M., Molinaro M., Aquino A., Zani B.M.: PKC α -mediated ERK, JNK and p38 activation regulates the myogenic program in human rhabdomyosarcoma cells. *J. Cell Sci.*, 2002; 115: 3587-3599

[70] McDowell H.P.: Update on childhood rhabdomyosarcoma. *Arch. Dis. Child.*, 2003; 88: 354-357

[71] McMahon G.: VEGF receptor signaling in tumor angiogenesis. *Oncologist*, 2000; 5, Suppl. 1: 3-10

[72] Mendoza L., Valcárcel M., Carrascal T., Egilegor E., Salado C., Sim B.K., Vidal-Vanaclocha F.: Inhibition of cytokine-induced microvascular arrest of tumor cells by recombinant endostatin prevents experimental hepatic melanoma metastasis. *Cancer Res.*, 2004; 64: 304-310

[73] Merlino G., Helman L.J.: Rhabdomyosarcoma - working out the pathways. *Oncogene*, 1999; 18: 5340-5348

[74] Miekus K., Lukaszewicz E., Jarocha D., Sekula M., Drabik G., Majka M.: The decreased metastatic potential of rhabdomyosarcoma cells obtained through MET receptor downregulation and the induction of differentiation. *Cell Death Dis.*, 2013; 4: e459

[75] Myers A.L., Williams R.F., Ng C.Y., Hartwich J.E., Davidoff A.M.: Bevacizumab-induced tumor vessel remodeling in rhabdomyosarcoma xenografts increases the effectiveness of adjuvant ionizing radiation. *J. Pediatr. Surg.*, 2010; 45: 1080-1085

[76] Newton W.A. Jr., Soule E.H., Hamoudi A.B., Reiman H.M., Shimada H., Beltangady M., Maurer H.: Histopathology of childhood sarcomas, Intergroup Rhabdomyosarcoma Studies I and II: clinicopathologic correlation. *J. Clin. Oncol.*, 1988; 6: 67-75

[77] Onisto M., Slongo M.I., Gregnanin L., Gastaldi T., Carli M., Rosolen A.: Expression and activity of vascular endothelial growth factor and metalloproteinases in alveolar and embryonal rhabdomyosarcoma cell lines. *Int. J. Oncol.*, 2005; 27: 791-798

[78] Orimo A., Gupta P.B., Sgroi D.C., Arenzana-Seisdedos F., Delaunay T., Naeem R., Carey V.J., Richardson A.L., Weinberg R.A.: Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion. *Cell*, 2005; 121: 335-348

[79] Ostrovsky O., Bengal E., Aronheim A.: Induction of terminal differentiation by the c-Jun dimerization protein JDP2 in C2 myoblasts and rhabdomyosarcoma cells. *J. Biol. Chem.*, 2002; 277: 40043-40054

[80] Ratajczak M.Z., Kucia M., Liu R., Shin D.M., Bryndza E., Masteriak M.M., Tarnowski M., Ratajczak J., Bartke A.: RasGrf1: genomic imprinting, VSELS, and aging. *Aging*, 2011; 3: 692-697

[81] Ratajczak M.Z., Majka M., Kucia M., Drukala J., Pietrzowski Z., Peiper S., Janowska-Wieczorek A.: Expression of functional CXCR4 by muscle satellite cells and secretion of SDF-1 by muscle-derived fibroblasts is associated with the presence of both muscle progenitors in bone marrow and hematopoietic stem/progenitor cells in muscles. *Stem Cells*, 2003; 21: 363-371

[82] Ratajczak M.Z., Shin D.M., Kucia M.: Very small embryonic/epiblast-like stem cells a missing link to support the germ line hypothesis of cancer development? *Am. J. Pathol.*, 2009; 174: 1985-1992

[83] Rees H., Williamson D., Papanastasiou A., Jina N., Nabarro S., Shipley J., Anderson J.: The MET receptor tyrosine kinase contributes to invasive tumor growth in rhabdomyosarcomas. *Growth Factors*, 2006; 24: 197-208

[84] Ren Y.X., Finckenstein F.G., Abdueva D.A., Shahbazian V., Chung B., Weinberg K.I., Triche T.J., Shimada H., Anderson M.J.: Mouse mesenchymal stem cells expressing PAX-FKHR form alveolar rhabdomyosarcomas by cooperating with secondary mutations. *Cancer Res.*, 2008; 68: 6587-6597

[85] Rendon B.E., Roger T., Teneng I., Zhao M., Al-Abed Y., Calandra T., Mitchell R.A.: Regulation of human lung adenocarcinoma cell migration and invasion by macrophage migration inhibitory factor. *J. Biol. Chem.*, 2007; 282: 29910-29918

[86] Rundhaug J.E.: Matrix metalloproteinases and angiogenesis. *J. Cell Mol. Med.*, 2005; 9: 267-285

[87] Salgado R., Benoy I., Bogers J., Weytjens R., Vermeulen P., Dirix L., Van Marck E.: Platelets and vascular endothelial growth factor (VEGF): a morphological and functional study. *Angiogenesis*, 2001; 4: 37-43

[88] Schwartz V., Lue H., Kraemer S., Korbil J., Krohn R., Ohl K., Bucala R., Weber C., Bernhagen J.: A functional heteromeric MIF receptor formed by CD74 and CXCR4. *FEBS Lett.*, 2009; 583: 2749-2757

[89] Schweigerer L., Neufeld G., Mergia A., Abraham J.A., Fiddes J.C., Gospodarowicz D.: Basic fibroblast growth factor in human rhabdomyosarcoma cells: implications for the proliferation and neovascularization of myoblast-derived tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1987; 84: 842-846

[90] Scrabble H., Witte D., Shimada H., Seemayer T., Sheng W.W., Soukup S., Koufos A., Houghton P., Lampkin B., Cavenee W.: Molecular differential pathology of rhabdomyosarcoma. *Genes Chromosomes Cancer*, 1989; 1: 23-35

[91] Sharp R., Recio J.A., Jhappan C., Otsuka T., Liu S., Yu Y., Liu W., Anver M., Navid F., Helman L.J., DePinho R.A., Merlino G.: Synergism between *INK4a/ARF* inactivation and aberrant HGF/SF signaling in rhabdomyosarcomagenesis. *Nat. Med.*, 2002; 8: 1276-1280

[92] Shi X., Leng L., Wang T., Wang W., Du X., Li J., McDonald C., Chen Z., Murphy J.W., Lolis E., Noble P., Knudson W., Bucala R.: CD44 is the signaling component of the macrophage migration inhibitory factor-CD74 receptor complex. *Immunity*, 2006; 25: 595-606

[93] Shimizu T., Abe R., Nakamura H., Ohkawara A., Suzuki M., Nishihira J.: High expression of macrophage migration inhibitory factor in human melanoma cells and its role in tumor cell growth and angiogenesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1999; 2; 264: 751-758

[94] Shukla N., Ameer N., Yilmaz I., Nafa K., Lau C.Y., Marchetti A., Borsu L., Barr F.G., Ladanyi M.: Oncogene mutation profiling of pediatric solid tumors reveals significant subsets of embryonal rhabdomyosarcoma and neuroblastoma with mutated genes in growth signaling pathways. *Clin. Cancer Res.*, 2012; 18: 748-757

[95] Slominski A., Wortsman J., Carlson A., Mihm M., Nickoloff B., McClatchey K.: Molecular pathology of soft tissue and bone tumors. A review. *Arch. Pathol. Lab. Med.*, 1999; 123: 1246-1259

- [96] Spaeth E.L., Dembinski J.L., Sasser A.K., Watson K., Klopp A., Hall B., Andreeff M., Marini F.: Mesenchymal stem cell transition to tumor-associated fibroblasts contributes to fibrovascular network expansion and tumor progression. *PLoS One*, 2009; 4: e4992
- [97] Spangenburg E.E., Booth F.W.: Multiple signaling pathways mediate LIF-induced skeletal muscle satellite cell proliferation. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 2002; 283: C204-C211
- [98] Tarnowski M., Grymula K., Liu R., Tarnowska J., Drukala J., Ratajczak J., Mitchell R.A., Ratajczak M.Z., Kucia M.: Human rhabdomyosarcomas secrete mif that modulates metastatic behavior of tumor cells and inhibits recruitment of cancer associated fibroblasts. *Mol. Cancer Res.*, 2010; 8: 1328-1343
- [99] Tarnowski M., Grymula K., Reza R., Jankowski K., Maksym R., Tarnowska J., Przybylski G., Barr F.G., Kucia M., Ratajczak M.Z.: Regulation of expression of stromal-derived factor-1 receptors: CXCR4 and CXCR7 in human rhabdomyosarcomas. *Mol. Cancer Res.*, 2010; 8: 1-14
- [100] Tarnowski M., Liu R., Wysoczynski M., Ratajczak J., Kucia M., Ratajczak M.Z.: CXCR7: a new SDF-1-binding receptor in contrast to normal CD34(+) progenitors is functional and is expressed at higher level in human malignant hematopoietic cells. *Eur. J. Haematol.*, 2010; 85: 472-483
- [101] Tarnowski M., Schneider G., Amann G., Clark G., Houghton P., Barr F.G., Kenner L., Ratajczak M.Z., Kucia M.: RasGRF1 regulates proliferation and metastatic behavior of human alveolar rhabdomyosarcomas. *Int. J. Oncol.*, 2012; 41: 995-1004
- [102] Taulli R., Scuoppo C., Bersani F., Accornero P., Forni P.E., Miretti S., Grinza A., Allegra P., Schmitt-Ney M., Crepaldi T., Ponzetto C.: Validation of met as a therapeutic target in alveolar and embryonal rhabdomyosarcoma. *Cancer Res.*, 2006; 66: 4742-4749
- [103] Tchou J., Kossenkov A.V., Chang L., Satija C., Herlyn M., Showe L.C., Puré E.: Human breast cancer associated fibroblasts exhibit subtype specific gene expression profiles. *BMC Med Genomics*, 2012; 5: 39
- [104] van der Voort R., Taher T.E., Derksen P.W., Spaargaren M., van der Neut R., Pals S.T.: The hepatocyte growth factor/Met pathway in development, tumorigenesis, and B-cell differentiation. *Adv. Cancer Res.*, 2000; 79: 39-90
- [105] Veikkola T., Karkkainen M., Claesson-Welsh L., Alitalo K.: Regulation of angiogenesis via vascular endothelial growth factor receptors. *Cancer Res.*, 2000; 60: 203-212
- [106] Verjans E., Noetzel E., Bektas N., Schütz A.K., Lue H., Lennartz B., Hartmann A., Dahl E., Bernhagen J.: Dual role of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in human breast cancer. *BMC Cancer*, 2009; 9: 230
- [107] Wan X., Shen N., Mendoza A., Khanna C., Helman L.J.: CCI-779 inhibits rhabdomyosarcoma xenograft growth by an antiangiogenic mechanism linked to the targeting of mTOR/Hif-1 α /VEGF signaling. *Neoplasia*, 2006; 8: 394-401
- [108] Wang E.S., Teruya-Feldstein J., Wu Y., Zhu Z., Hicklin D.J., Moore M.A.: Targeting autocrine and paracrine VEGF receptor pathways inhibits human lymphoma xenografts in vivo. *Blood*, 2004; 104: 2893-2902
- [109] Wang W., Kumar P., Epstein J., Helman L., Moore J.V., Kumar S.: Insulin-like growth factor II and PAX3-FKHR cooperate in the oncogenesis of rhabdomyosarcoma. *Cancer Res.*, 1998; 58: 4426-4433
- [110] Weiss L., Orr F.W., Honn K.V.: Interactions between cancer cells and the microvasculature: a rate-regulator for metastasis. *Clin. Exp. Metastasis*, 1989; 7: 127-167
- [111] Werther K., Christensen I.J., Nielsen H.J.: Determination of vascular endothelial growth factor (VEGF) in circulating blood: significance of VEGF in various leucocytes and platelets. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 2002; 62: 343-350
- [112] Wysoczynski M., Miekus K., Jankowski K., Wanzeck J., Bartolone S., Janowska-Wieczorek A., Ratajczak J., Ratajczak M.Z.: Leukemia inhibitory factor: a newly identified metastatic factor in rhabdomyosarcomas. *Cancer Res.*, 2007; 67: 2131-2140
- [113] Wysoczynski M., Shin D.M., Kucia M., Ratajczak M.Z.: Selective upregulation of interleukin-8 by human rhabdomyosarcomas in response to hypoxia: therapeutic implications. *Int. J. Cancer*, 2010; 126: 371-381
- [114] Zhang L., Kashanchi F., Zhan Q., Zhan S., Brady J.N., Fornace A.J., Seth P., Helman L.J.: Regulation of insulin-like growth factor II P3 promoter by p53: a potential mechanism for tumorigenesis. *Cancer Res.*, 1996; 56: 1367-1373
- [115] Zlotnik A., Yoshie O.: Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity*, 2000; 12: 121-127

Autorzy deklarują brak potencjalnych konfliktów interesów.