

# Udział wybranych genów w nowotworzeniu na poziomie molekularnym

JANUSZ A. MADEJ

Zakład Patomorfologii i Weterynarii Sądowej, Katedra Patologii, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu, ul. Norwida 31, 50-375 Wrocław

Otrzymano 12.03.2019

Zaakceptowano 15.04.2019

Madej J. A.

## Influence of selected genes on neogenesis at the molecular level

### Summary

The paper describes the influence of selected genes on neogenesis, including their expression, RNA transformation, translation and transcription. The role of adhesive molecules, extracellular matrix, cytoskeleton and signal conduction in neoplastic induction is described. External stimuli, internal factors and disturbances in DNA repair can cause cell mutations (Fig. 1). An accumulation of various factors in different gene classes, together with their amplification, leads to tumour formation. Neoplastic cells undergo a dominant mutation, thereby gaining a new function, or cumulate recessive mutations which cause the loss of a function. This is particularly true in genetic anomalies associated with the cadherin system, e.g. the loss of E-cadherin expression in mammary cancer. The loss of E-cadherin or catenin expression causes the loss of cell connections, which facilitates metastasizing. Cells in metastases often show genetic disorders, a more malignant phenotype and increased drug resistance, which worsens clinical prognosis.

The search for new anti-neoplastic drugs for humans is based on molecular studies and mice experimental models. The animals in these models show a phenotype corresponding with specific human diseases, e.g. *Pax* gene mutation in sarcomas and carcinomas, antisense DNA therapy (in Burkitt's lymphoma or chronic leukaemia) or induction of retroviral vectors (thymidine kinase gene) in herpes virus (HS-th) in proliferating cells in multiform glioblastoma.

**Keywords:** neoplasia, molecular aspects, genes (c-“onc”), antioncogenes, apoptotic genes, DNA repair genes

Geny, mimo że nie posiadają cech intelektualnych, są zdolne do kopiowania samych siebie, w odpowiedzi na odgórne sygnały regulacyjne i zgodnie z genetyką Mendlowską mają charakter cząsteczkowy (4). Geny kodują pośrednie matryce do budowy białek i tym samym tworzą strukturę potrzebną do samorozmnażania. Geny są włączane lub wyłączane jako odpowiedź na zmiany mikrośrodowiska i po aktywacji uruchamiają syntezę oraz uwolnienie efektorów białkowych. Tak więc geny nie mogą wpływać na swe środowisko bez pomocy białek, tak jak białka nie mogą przekazywać informacji genetycznej dla dalszych pokoleń bez pomocy genów. Z tego wniosek, że geny potrzebują białek tak samo, jak białka genów, co tworzy „zamknięte koło”, czyli współistnienie elementów ekspresji genów „pod prąd” (upstream) i z „prądem” (downstream) (4). Inaczej mówiąc: białka wykorzystują geny do dalszej produkcji samych siebie. Nie zmienia to jednak faktu, że geny uważa się za „mózg” całego systemu, udzielający wskazówek białkom, jaką funkcję mają spełniać w komórce (18). Podobny proces ma miejsce przy

produkcji RNA, do której nieodzowny jest DNA, aby kwas rybonukleinowy wytwarzał białka niezbędne do replikacji DNA, tj. dwuniciowego kwasu, jaki służy genomowi do przechowywania informacji genetycznej, w przeciwieństwie do RNA, który jest kwasem niestabilnym i podatnym na błędy replikacyjne (14). Informacje te uzasadniają stwierdzenie, że komórka jest niezwykle precyzyjną, samoregulującą się maszyną genową.

Geny zbudowane są z podstawowej sekwencji podjednostek informacyjnych (nukleotydów), które łącząc się, tworzą polimery o określonej sekwencji, czyli kwasy nukleinowe. Nukleotydy zawierają albo zasadę purynową albo pirymidynową, cukier (rybozę lub deoksyrybozę) oraz fosforan i czasem są kształtem podobne do niektórych leków antynowotworowych (antymetabolitów), np. 6-merkaptopuryny, 6-tioguaniny czy 5-fluorouracylu, które mogą być inkorporowane do kwasów nukleinowych podlegających aktywnej replikacji (3). Geny składają się głównie z intronów oraz mniejszej liczby eksonów (zwanymi też mikrogenami).

I tak mutacja intronów genu *NFI* prowadzi na przykład do pojawienia się nerwiakowłókniaków mózgu, a genu *Sis* – oponiaków (4). Z 30 000/40 000 genów obecnych w komórce człowieka aktywnych jest tylko 10-20%, a reszta to nieswoiste tkankowo geny metabolizmu podstawowego (housekeeping). Jedne chromosomy, np. 19 i 17 obfitują w geny, a inne, np. 21, 18 i 19 – nie; w nich natomiast częściej spotykana jest trisomia (1). Wykazano, że co sekundę w organizmie ludzkim dochodzi do podziału 10 komórek, z czego aż 33% może ulec mutacji. Obliczono, że u ludzi każdy gen może ulec mutacji w  $> 10^9$  przypadków w ciągu życia. Takim zmutowanym genem może być na przykład „gen egoistyczny”, tj. gen, który odniósł sukces ewolucyjny i sam utrwalił swoje „unieśmiertelnienie”. Ta rzadka selekcja zdarzeń jest jednak generalną zasadą ewolucji i biologii molekularnej w przeciwieństwie do zbędnych lub stają się bezczynne (pseudogeny), np. „geny duchy”. Te ostatnie odpowiedzialne są m.in. za utratę wrażliwości węchowych u ludzi, w porównaniu ze zwierzętami (4). Zauważono także, że męskie DNA jest prawdopodobnie dwukrotnie częściej odpowiedzialne, w porównaniu z żeńskim, za mutacje, ponieważ spermatogeneza wymaga większej ilości podziałów komórkowych, aniżeli owogeneza. Mężczyźni są zatem odpowiedzialni za 33% wszystkich mutacji, co stwarza postęp ewolucyjny. Postęp ewolucyjny przyspieszają także introny, rozszczepiające geny. Istnieje ponadto pojęcie „rupieciowego DNA”, które oddziela wyspy czynnych genów w „oceanie” niekodującego materiału genetycznego oraz „śmięciowego DNA” (czyli rozproszonych sekwencji DNA, raczej nie przenoszące ważnych informacji), przy czym pojęcia te są podobne do siebie, ale nie tożsame. Przyjmuje się, że rupiecie mogą się jeszcze przydać, np. w ochronie organizmu przed zbyt wczesnym starzeniem się czy nowotworzeniem, natomiast śmieci są wyrzucane (4, 15). Ma to istotny związek z obecnością w komórkach „zegara molekularnego”, gdyż mitochondrialny DNA (mtDNA) bije szybciej niż jądrowy DNA, natomiast rupieciowy DNA – szybciej niż kodujący DNA (6, 14).

Powtarzalne, niekodujące sekwencje, tj. fragmenty *Alu* i L1 (odpowiednio stanowiące 10% i 17% genomu człowieka), mogą prowadzić do mutagenyzy insercyjnej (insertional mutagenesis), polegającej na przerwaniu prawidłowej funkcji genów przez umieszczenie tych sekwencji w nieodpowiednim miejscu. Na przykład zalicza się tu insercję L1, unieczynnijającą gen *APC* (adenomatous polyposis coli), co prowadzi do indukcji raka jelita grubego i odbytu. Sekwencje *Alu* nie uznaje się za materiał rupieciowy czy pseudogeny, ponieważ pojawiają się one głównie w obszarach chromosomów obfitujących w geny. Z kolei elementy L1 mogą, w przeciwieństwie do fragmentów *Alu*, przepisać wstecznie RNA na DNA, co traktuje się jako

ekspresję aktywności katalitycznej enzymu odwrotnej transkryptazy (rewertazy). Aktywność elementów L1 może więc na przykład prowadzić do mutagenyzy insercyjnej lub proliferacji powtarzalnych fragmentów DNA (w tym *Alu*), wg zasady „skaczącego genu”, mimo że same nie kodują białek (4).

### Chromatyna i chromosomy

Chromatyna jądrowa zbudowana jest z dwóch klas białek wiążących się z DNA, tj. białek histonowych (histony rdzeniowe H2A, H2B, H3 i H4 oraz histonu łącznikowego H1 – linkerowego) i niehistonowych białek chromatyny, np. HMG – high mobility group – białek o wysokiej ruchliwości, zaangażowanych w replikację i naprawę DNA oraz ekspresję genów. Białka histonowe upakowują DNA do nukleosomów (rdzenia histonu) oraz regulują dostępność genów dla różnych białek (6, 7). Białka HMG, zwane też architektonicznymi czynnikami transkrypcyjnymi, mogą wiązać sekwencje DNA bogate w AT poprzez 9-aminokwasowy odcinek, czyli tzw. hak AT i wówczas mutacja w jednym z takich genów (*HMGI-C*), prowadzi u ludzi do indukcji tłuszczaków lub mięśniaków macicy (2). Chromatyna może także ulec modyfikacji poprzez wiązanie histonu H1 z nukleosomami, acylacji reszt lizynowych i argininowych w histonach rdzeniowych oraz modyfikacji DNA, np. metylacji nukleotydów cytozynowych. Konsekwencje acetylacji histonów uzależnione są od rodzaju genów, tj. genów mitogennych lub antymitogennych, i tak w ostrej białaczce promielocytowej – APL (acute promyelocytic leukemia), powstającej wskutek patologicznej fuzji chromosomów (15:17 lub 11:17), tworzą się geny hybrydowe dla alfa-receptora kwasu retinowego – RARA (retinoid acid receptor-alfa), zlokalizowane poniżej w stosunku do sekwencji kontrolnych genów; odpowiednio, dla PML (promyelocytic leukemia) lub PLZF (promyelocytic leukemia zinc finger). Białko PML hamuje wzrost komórek i fizjologicznie obecne jest w jądrze, natomiast białko fuzyjne PML-RARA – w jądrze i cytoplazmie. Hamowanie aktywności natywnej białka PML przez białko fuzyjne powoduje wzrost jego aktywności probiałczkowej i oporności na chemioterapię. Z kolei fuzja chromosomalna, jaka prowadzi do wzrostu ekspresji Myc (białka wiążącego DNA) tkanki limfatycznej, jest powodem rozwoju chłoniaka Burkitta (18). Translokowany gen *Myc* jest kontrolowany przez promotor immunoglobulin i dlatego limfocyty B z taką translokacją mają wysoki poziom ekspresji genu. Reasumując, metylacja genów w komórkach nowotworowych może manifestować się różnymi ich fenotypami, tj. 1 – hipometylacją z obecnością sekwencji bogatych w GT („ciasne”), akumulacją „śmięciowych” DNA, obecnością genów mitogennych, większą dokładnością i efektywnością translacji oraz większą aktywnością transkrypcyjną, co prowadzi do oporności na procesy starzenia się

i nowotwory, 2 – hipermetylacji z sekwencjami bogatymi w AT („luźne”) i niestabilnością genetyczną, mniejszą aktywnością transkrypcyjną i dokładnością oraz efektywnością transkrypcyjną, obecnością genów kontrolujących, szybką mutagenezą, pojawieniem się obszarów genomu, jakie mogą być poddane delecji i utraty kontroli wzrostu, co przyspiesza proliferację komórek i powoduje niestabilność genetyczną (1). Takie obszary promotorowe genów kontrolujących proliferację, ulegające hipermetylacji to: regulujący wzrost gen *Rb* (*retinoblastoma* – z powodu zmutowanego białka kieszonkowego, które wiąże E2F i przekształca je z transaktywatora w wyciszacz), gen *CDH1*, kodujący E-kadherinę (adhezja komórek) czy geny *p15* i *p16<sup>INK4A</sup>* (kontrola wzrostu) (4).

DNA po replikacji jest upakowany wewnątrz chromosomów, przy czym jego synteza inicjowana jest w wielu miejscach chromosomu. Nieprzerwanie w odpowiednim czasie prawidłowego cyklu komórkowego może prowadzić do sytuacji, w której całkowita zawartość DNA jest nieprawidłowa (aneuploidia). Synteza dużej ilości DNA może także zachodzić w fazie pozapodziałowej komórki, co określa się mianem endoreduplikacji. Taka lokalna reduplikacja DNA, przy braku podziału komórkowego, w której geny o jednej kopii mogą przekształcać się w geny powielone, nosi miano amplifikacji genów (12). Z kolei te nadmiernie replikowane regiony DNA określa się jako amplikony. Przykładem selekcji komórek nowotworowych z amplifikacją genów pobudzających wzrost są np. *N-myc* (*neuroblastoma*) czy *ErbB2* (raki gruczołowe); przy czym stopień amplifikacji jest wprost proporcjonalny do złośliwości nowotworów (4). Czasem analiza mitotycznych chromosomów *in vitro* pozwala na ujawnienie tzw. miejsc szczególnie łamliwych chromosomów, np. *FRA3B* zlokalizowanego na krótkim ramieniu chromosomu 3 w rejonie 3p14.2, często ulegający uszkodzeniu lub delecji (3p-) w raku szyjki macicy lub raku płuc (rejon ten ma gen *FHIT* – fragile histidine triad, kodujący hydrolazę trójfosforanów dwunukleotydów (14).

Najbardziej znane fuzje chromosomalne, prowadzące do powstania nowotworów, głównie chłoniaków i białaczek, są opisane w obszernej monografii Epsteina (4). Trans-lokacje chromosomów są z kolei spowodowane pęknięciami DNA na dwu różnych chromosomach w tej samej komórce. Przykładem takiego działania jest rodzina ok. 30 genów *ETS* i to zarówno u zwierząt (gen transformujący -*v* – *ets* – erythroblastozy ptaków, jak i ludzi, np. mięsak Ewinga (fuzja genu *EWS* z podobnymi do *ETS* – *ERG* czy *FLII*) czy białaczek – fuzja genu *ERG* z genem *TLS*. Pojedyncze kluczowe translokacje chromosomalne, jako wynik mutacji inicjujących transformacje, są także charakterystyczne dla białaczek i chłoniaków.

Ponad 70% nowotworów u ludzi posiada deficyt w genie *TP53*, a pozostałe mają defekty w genach

pobudzających i wygaszających szlak tego genu. Z reguły mutacja inaktywująca obejmuje dwa allele *TP53* w komórkach somatycznych; rzadko natomiast dziedziczna jest zmutowana postać allelu (6). Tak więc w przypadku homozygotycznej utraty *TP53* nie dochodzi do naprawy DNA, mutacje są utrwalone i komórka ulega transformacji nowotworowej poprzez ekspresję klonalną, progresję i heterogenność. Na przykład mutacje genu *TP53* lub delecje genu *IRF1* (czynnika regulującego interferon 1) odpowiadają za rozwój białaczki i zespołu mielodysplastycznego (MDS) u ludzi, przy czym progresja tego ostatniego wiąże się m.in. z inaktywacją genu *p15<sup>INK4b</sup>*, który odgrywa główną rolę w regulacji cyklu komórkowego (20). Jak wynika z badań własnych, opartych o automatyczny sekwencjoner DNA (sekwencja genów), limfocyty białaczkowe u bydła o zmutowanym genie *TP53*, nie zatrzymują się w fazie G1 cyklu komórkowego, lecz tworzą klon komórek nowotworowych (10). W sekwencji genu *TP53* obserwuje się bowiem pojedynczą mutację punktową w pozycji 390 (transycja), polegającą na zmianie C (cytozyny) na T (tymidynę), czyli na zmianie G (guaniny) na A (adeninę) na poziomie genomowego DNA. Mutacja genu dotyczy kodonu 189 CGG-CGA i jest mutacją cichą, tzn. nie powodującą zmiany argininy na inny aminokwas. Mutacja zmiany G na A jest jednoallelowa i może wskazywać, że zmutowany allel wykazuje aktywność jako tzw. negatywnie dominujący onkogen. Allele antyonkogeny *TP53* są heterozygotyczne, co może prowadzić do utraty normalnego allelu w trakcie selekcji i pojawienia się aktywnych fenotypowo zmutowanych alleli. Lokalizację zmutowanego genu *TP53* w limfocytach białaczkowych u bydła przedstawiono na schemacie:

351 KODON 167 CGT	(bez mutacji)	
		CAG
352 KODON 185 CAG		CAA
		CGG
353 KODON 189 CGG		CGA

### Ekspresja genów, obróbka RNA, translacja i transkrypcja

Rearanżacja genów *TEL* (translocation ETS leukemia) towarzyszy wielu nowotworom, podobnie jak nadekspresja *ETS-1*, np. w raku jajnika. Odwrotnie, utrata funkcji tego genu jest powodem ostrej białaczki limfoblastycznej – TEL/AML1 u dzieci (delecja niehybrydowego allelu TEL) czy ostrej białaczki szpikowej (mutacja zerowa – null PU1). To dziwny przykład, kiedy geny *ETS* oprócz inicjacji mogą także wykazywać aktywność onkosupresyjną (14). Podobne cechy przeciwnowotworowe posiada gen *KiSS*, kodujący białkowy ligand metastynę, co obserwowano w raku sutka i czerniaku u ludzi (4).

Aktywność telomerazy podczas nowotworowej transformacji komórek, opisano we wcześniejszej pracy (9). Jednocześnie należy dodać, że nieprawidłowa rekombinacja telomerowa może prowadzić do kancerogenezy, ponieważ uszkodzenia genów *MMR* (mismatch repair), tj. rodziny genów systemu poreplikacyjnej naprawy błędnie sparowanych zasad, zawierające geny mutatorowe (*MLM1*, *MLM2*, *PMS1*, *PMS2* u ludzi), mogą sprzyjać przeżyciu komórek niezależnemu od telomerazy (20).

Geny *MMR* kodują enzymy uczestniczące w naprawie uszkodzonych zasad, np. białko *MSH2* wiąże się z dwuniciowymi regionami, w których doszło do błędnego sparowania G-T, zaś zmutowane białko *MSH2* wykazuje osłabione wiązanie do tych regionów, co powoduje niestabilność powtórzonych sekwencji dwunukleotydowych w mikrosatelitarnym DNA. Zjawisko to nosi miano niestabilności mikrosatelitarnej – MSI (microsatellite instability), a więc jest to mutacja typu insercji lub delecji, przy założeniu, że o MSI decyduje wpływ minimum dwu, z pięciu markerów mikrosatelitarnych w danym *locus*. Na przykład MSI może powstać z wadliwej rekombinacji lub ślizgania się polimerazy DNA podczas replikacji powtórzonych sekwencji. Mutacje, które powodują utratę funkcji genów *MMR* są powodem ujawnienia się mutatorowego fenotypu dziedzicznego niepolipowatego raka okrężnicy u ludzi – HNPCC (hereditary nonpolyposis colon cancer), wykazującego również MSI. Obserwuje się w nim kumulację mutacji typu przesunięcia ramki odczytu (19). Z kolei mutacja genów mutatorowych *MSH6* sprzyja bardziej rakowi endometriumu i jajnika, aniżeli rakowi okrężnicy, a mutacja genu *MSH2* – rakowi nerki, moczowodu i żołądka. Wykazano ponadto, że MSI koreluje odwrotnie w stosunku do częstości mutacji wpływających na białko TP53 – regulatora śmierci komórki.

Regulacja transkrypcji obejmuje indukcję, czyli aktywację lub wyciszenie (hamowanie) genów; te ostatnie regiony zwane są domenami cichymi. Przykładem mutacji czynników transkrypcyjnych jest zawierający palec cynkowy czynnik transkrypcji WT1, obecny np. w guzie Wilmsa, czyli nerczaku płodowym (*nephroblastoma*), gdzie mutacje genu *WT1* hamują wiązanie białka WT1 do DNA i nowotworzenie. Transkrypcję stymuluje także białko Tax (czynnik transkrypcyjny o masie 40 kDa) zaczynając od długiego terminalnego powtórzenia LTR (long terminal repeat) w genomie wirusa białaczki T-komórkowej człowieka (HTLV1) i silnie kieruje wirusową replikację. Następuje wiązanie się białka z domeną bZIP czynnika CREB, który łączy się z DNA, co nadaje wirusowi HTLV1 cech onkogennych (7). Istnieje także interakcja Tax z receptorami IL-2, co odgrywa bezpośrednią rolę w leukemogenezie. Podobnie u transgenicznych myszy z nadekspresją Tax powstają nerwiakowłókniaki i inne typy nowotworów mezenchymalnych (1, 13).

Z kolei wadliwa glikozylacja, obserwowana w wielu nowotworach, może towarzyszyć zmianom ekspresji antygenów grupowych ABH i antygenowi Lewisa. Zahamowanie aktywności glikozylotransferazy skutkuje wzrostem ekspresji antygenów Lewisa b ( $Le^b$ ) oraz  $Le^y$  i gorszym rokowaniem (4).

Geny, oprócz inicjacji transkrypcji, powodują, że transkrypt ulega elongacji, dzięki białku elonginie i zatrzymaniu się polimerazy RNA II w różnych miejscach genu. Brak tego białka jest powodem częstych i długich przerw w transkrypcji, obniżenia się szybkości syntezy mRNA oraz nieznacznej ekspresji genów wczesnych mitogennych, tj. *Myc* i *Fos*. W przypadku mutacji genu *VHL* (na chromosomie 3p 25.5) w chorobie Hippa-Lindau nie dochodzi do wiązania się białka VHL z kompleksem A elonginy i braku przerw w elongacji (tzw. elongacja konstytutywna). Efektem jest pojawienie się nowotworów typu *haemangioblastoma* w mózdzku i/lub siatkówce, w których drugi allel genu *VHL* także ulega mutacji (4). Niezależnie od tego białko VHL hamuje czynnik HIF-1 alfa (hypoxia inducible factor), efektem czego jest bardzo obfite unaczynnienie istniejących już nowotworów, a także skłonność do pojawienia kolejnych nowotworów, np. chromochłonnych (*pheochromocytoma*) czy czerwienicy prawdziwej (*polycythaemia vera*). W chorobie VHL obserwuje się także rodzinny raka nerki (delecja chromosomu 3p, proliferacja komórek nowotworowych uzależnionych od insulinowego czynnika wzrostu IGF1, obecność genu *Tsc* i genu *Met* – zmutowanego czynnika wzrostu w dziedzicznym brodawkowatym raku nerki). W nowotworach mogą także pojawić się delecje alleli wskutek procesów rekombinacji lub utrata heterozygotyczności – LOH (loss of heterozygosity) i następowy blok kontroli nad wzrostem komórek. Np. LOH uwrażliwia komórki na „drugie uderzenie” wykluczające funkcję genu i rozpoczynające onkogenezę (4).

W jądrze komórki jest ok. 10% heterogennego RNA (hmRNA), w tym jądrowy niskocząsteczkowy RNA (snRNA, np. U2), przekształcający mRNA (14). Herpeswirusy odpowiedzialne za rozwój chłoniaków i białaczek mogą powodować transformację limfocytów T, hamując degradację krótko żyjących cząsteczek mRNA gospodarza, zawierających sekwencję AUUUA. Wirusy te kodują snRNA, jaki wiąże się z białkami kompleksu RNA gospodarza i powstaje cząsteczka hybrydowego snRNA. Transkrypty wirusów mają na końcu 5' sekwencje AUUA i konkurują z cząsteczkami mRNA gospodarza o miejsce wiązania z białkiem powodującym degradację. Podobnie stabilność RNA jest zachwiana w chłoniaku Burkitta, gdzie zmieniony transkrypt (mRNA genu *Myc*), powstały w wyniku translokacji chromosomowej 8:14 ma okres półrozpadu wynoszący ok. 6 godzin, natomiast w komórkach prawidłowych – kilka minut.

Geny ulegają regulacji nie tylko na poziomie transkrypcji i potranskrypcyjnego dojrzewania mRNA, ale także podlegają licznym modyfikacjom translacyjnym i potranslacyjnym wg schematu: transkrypcja > obróbka RNA > translacyjna regulacja syntezy białka > modyfikacje dojrzałego białka > wiązanie białek heterologicznych, np. wiązanie liganda z receptorem czy produkcja dimerów. Mutacje nieulegającego translacji regionu 3' (3' UTR) spotyka się w nerwiaku zarodkowym (*neuroblastoma*), polegające na amplifikacji genu *N-Myc* skorelowane z jego złośliwością i obecnością dwóch sekwencji 3' UTR, bogatych w pary AU (ARE) wiążących się z białkiem, które powoduje stabilizację mRNA genu *N-Myc* i *FOS*. Podobnie, stabilizowany przez delecję sekwencji ARE 3' UTR jest mRNA *Bcl1* w chłoniaku (*lymphoma*) z komórek płaszczka, wykazujących nadekspresję cykliny D1 (15).

### Cząsteczki adhezyjne, macierz pozakomórkowa i cytoszkielet

Komórki kontaktują się ze sobą przy pomocy cząsteczek adhezyjnych, tj. kadheryn, selektyn, integryn i cząsteczek immunoglobulinopodobnych – CAM (immunoglobulin-like domain). Cząsteczki te biorą udział m.in. w powstawaniu przerzutów nowotworowych. I tak kadheryny, uczestnicząc w homotypowym łączeniu komórek nabłonkowych powodują, że fenotyp przerzutowy raka wiąże się z brakiem ekspresji E-kadheryny, ale powoduje wzrost ekspresji kadheryny N (12). Z kolei u myszy transgenicznym pozbawionych kadheryny E (knock-out) dochodzi do przerzutów, natomiast przy zachowaniu genu kadheryny E (wild-type) nowotwór nie rośnie i jest na etapie niezłośliwego gruczolaka (4). Adhezja transkrypcyjna jest łączona przez beta-kateniny, tj. białka, dysfunkcja lub niedobór których hamuje adhezję zależną od kadheryn. Na przykład białko wiążące kateninę jest kodowane przez gen *APC* na chromosomie 5q21, którego mutację somatyczną wykrywa się w większości raków jelita grubego powstałych w wyniku HNPCC, zaś myszy pozbawione *APC* wykazują 50-100 × większą częstość przerzutów raka jelita grubego zależną od *MLH1* (12). Z kolei mutacje *APC* u zwierząt hamują proces zapalny w żołądku wywołany przez *Helicobacter pylori*, a wiązany przyczynowo z jego rakiem. Nadekspresja beta-kateniny u myszy jest powodem indukowania u nich nowotworów mieszków włosowych (*trichofolliculoma*).

Cytokiny chemotaktyczne (chemokiny) są odpowiedzialne za chemotakcję leukocytów, a także wzrost ruchliwości komórek przez katalizowanie polimeryzacji białek cytoszkieletu (6, 7, 16). Ekspresja receptorów cytokinowych i ich ligandów często koreluje z tendencją do przerzutowania raków sutka, czerniaka złośliwego i chłoniaka Burkitta. Z kolei metaloproteiny macierzy pozakomórkowej – MMP (matrix metalloproteinases) to ok. 20 cynkozależnych enzymów

degradujących, po wydzieleniu w formie nieaktywnej, składniki ECM. Są to zatem proteiny, które mogą bezpośrednio przeciwdziałać działaniu cząsteczek adhezyjnych. Dzieli się na kolagenazy (MMP1, 13, 18), żelatynazy (MMP2, 9), stromielizyny (MMP3, 10, 11) i metaloproteiny typu błonowego (MMP14, 15, 16, 17 lub MT-MMPs). EC, przez swoiste ligandy, aktywuje integryny, co prowadzi do indukcji specyficznych MMP, charakterystycznych dla niektórych typów nowotworów u ludzi i tak np. fibronektyna aktywuje alfa<sub>5</sub>beta<sub>1</sub> i indukuje MMP1 w kostniakomięsaku, witronektyna – alfa<sub>5</sub>beta<sub>2</sub> – MMP2 w czerniaku złośliwym, a laminina – alfa<sub>6</sub>beta<sub>1</sub> – MMP2 w glejaku wielopostaciowym mózgu i mięsaku mięśni prążkowanych (4). MMP9 ulega nadekspresji w rakach (np. jajnika, sutka) i ułatwia ich przerzutowanie. Ponadto komórki mogą zmieniać fenotyp poprzez ekspresję takich proteaz jak stromielizyny i kolagenazy, np. wspólny antygen ostrej białaczki limfoblastycznej (common acute lymphoblastic leukemia antigen – CALLA, CD10) czy ekspresję serynowej proteazy (antygen specyficzny prostaty – PSA – prostate-specific antigen). Tkankowe inhibitory metaloproteinaz przeciwdziałają przerzutowaniu przez hamowanie nadmiernej aktywacji MMP. Aktywacja MMP jest obecna w neoangiogenezie, nieodzownej dla rozwoju nowotworów, a tkankowe inhibitory metaloproteinaz wykazują działanie antyangiogenne (12).

### Przewodzenie sygnałów i geny cyklu komórkowego

Komórki komunikują się ze sobą poprzez przewodzenie sygnałów, w których wiodącą rolę spełniają kinazy tyrozynowe cytozolowe (niereceptorowe) i receptorowe (przebłonowe), zaliczane do najsilniejszych czynników mitogennych i transformujących (16). Fosforylacja tyrozyn przez geny kodujące takie substraty, jak beta-katenina lub alfa-katenina, regulujące pozytywnie adhezję, mogą ulegać zmutowaniu lub delecji; odpowiednio, w raku okrężnicy i raku prostaty (5). Z kolei czynniki wzrostu powodują dimeryzację receptorowych kinaz tyrozynowych. Na przykład mutacje genu *Ret*, koniecznego do rozwoju struktur neuroendokrynych, odpowiadają za powstanie zespołu raków układu dokrewnego MEN typ 2A (MEN2A) – rak rdzeniasty tarczycy (w 95%), guz chromochłonny nadnercza wydzielający katecholaminy (w 50%) i glejaki (10%), MEN typ 2B (MEN2B) – guz chromochłonny, rak rdzeniasty tarczycy, nowotwory jelit oraz rodzinny rak rdzeniasty tarczycy (15). Gen *Ret* dziedziczy się, jako jedyny z przebadanych genów, jako dominujący (8). MEN2A związany jest z mutacją reszt cysteinowych, a MEN2B z mutacją punktową w eksonie 16, w wyniku której treonina wchodzi na miejsce usuniętej metioniny – 918. Z kolei anaplastyczny rak tarczycy ma zmutowany gen *TP53* kodujący wzrost komórki. W białaczce szpikowej (CML) obserwuje się anomalie cytogenetyczną po postacią krótkiego chromosomu

filadelfijskiego Ph<sup>1</sup> 22, który reprezentuje wzajemną translokację pomiędzy chromosomami 22 (od matki) i 9 (odziedziczony od ojca). U myszy transgenicznym może powstać zespół podobny do CML przy ekspresji chimerycznego białka fuzyjnego Bcr (break-point cluster – region na chromosomie 9/Abl (onkogenny wirus Abelson), przez takie geny jak *Myc* i *Bcl2* (4).

Wtórne przekaźniki łączą efekторы i ścieżki sygnałowe wewnątrzkomórkowe, np. cykliczny AMP (cAMP), którego nieprawidłowy poziom obserwuje się w niektórych nowotworach niezłośliwych, np. gruczolaku tarczycy czy przysadki. Nadmierna fosforylacja zależna od cAMP spotykana w nerwiakowłóknikowości może być z kolei wynikiem mutacji typu utraty funkcji lub mutacji aktywujących przekazywanie sygnału powyżej PKA – głównego efektoru cAMP (4). Jednocześnie należy zaznaczyć, że zarówno nadmierna ekspresja białek G, które stymulują cAMP, jak i obniżona ekspresja, hamująca cAMP, może być powodem transformacji komórek *in vitro* na drodze mutacji, wynikającej z redukcji aktywności podjednostki jako GTPazy. Do białek G zalicza się także małe, mitogenne białka łączące jądro z sygnałami płynącymi z błony komórkowej (H-Ras, K-Ras, N-Ras), białka wiążące GTP z cytoszkieletem (Rho, Rac) oraz białka wewnątrzkomórkowego transportu, wiążące GTP (rodzina Rab i rodzina Ran) (16). Transformacja komórki może wystąpić po aktywacji Ras wskutek mutacji, np. substytucji waliny (Gly > Val) w kodonie 12 K – Ras, co ma miejsce w 30% przypadków raka okrężnicy, gruczolaka jelita grubego, raka trzustki i raka płuc. Z mutacją H-Ras związany jest rak pęcherza moczowego, a z mutacją N-Ras – ostra białaczka szpikowa. Z kolei zmutowane białko Rho jest powodem przerzutowego fenotypu takich nowotworów jak: czerniak, rak prostaty i zapalny rak sutka. Białka aktywujące GTP-azę (GAP) kończą sygnalizację z udziałem Ras i uwalniając mitogenną jego aktywność, współuczestniczą w mutacji genów supresorowych *NF1* i *NF2*, odpowiedzialnych za nerwiakowłóknikowość, odpowiednio typu I i II (4).

Zewnątrzkomórkowe białka wiążące modyfikują przekazywanie informacji przez TGF- $\beta$  i ulegając mutacji z receptorem typu II są odpowiedzialne za ok. 25% nowotworów jelita grubego i okrężnicy, w 90% wykazują niestabilność mikrosatelitarną, a pozostałe – metylację tego samego *locus* genu. Z kolei aktywacja liganda receptora TGF- $\beta$  typu II powoduje fosforylację cytoplazmatyczną przekaźników Smads, translokację do jądra i transaktywację ekspresji docelowego genu TGF- $\beta$ . Mutacje Smad 4 (delecja 18q21) powodują progresję raka trzustki, raka okrężnicy i odbytu (odpowiednio w 95% i 80% przypadków), a Smad 2, ponadto w raku płuca (1).

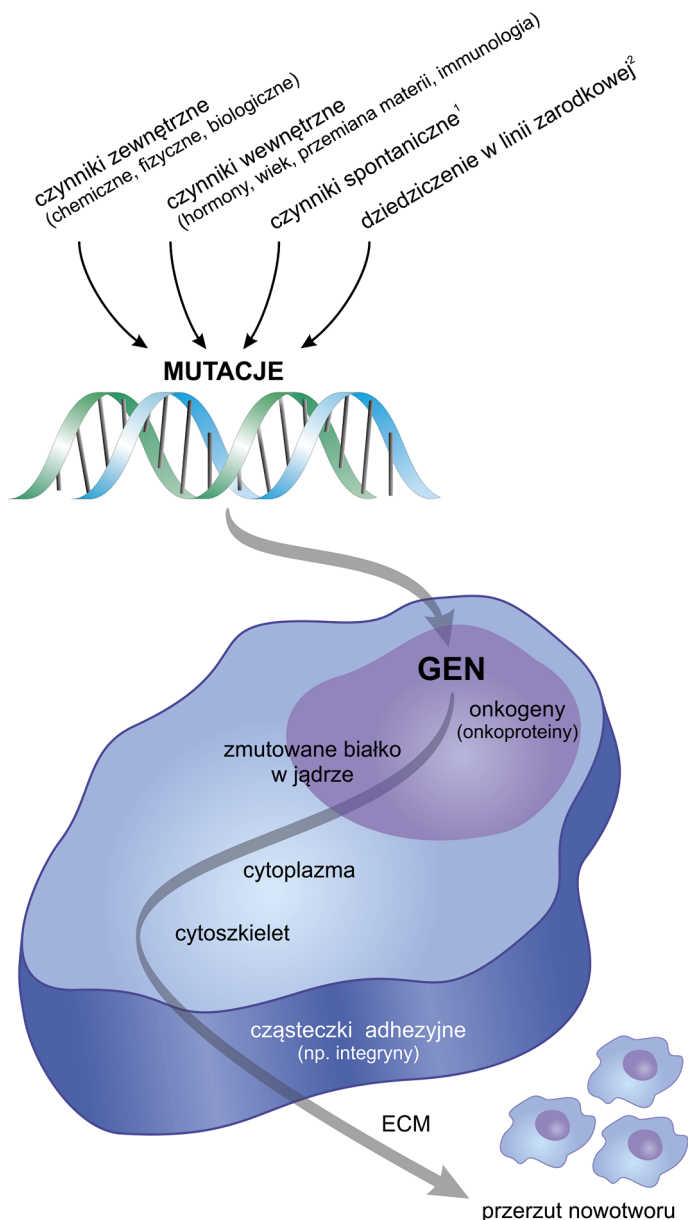
Cykl komórkowy nie obejmuje komórek zróżnicowanych (postmitotycznych) oraz utrzymywanych przy życiu (premitotycznych); w tych ostatnich trans-

krypcja jest nieaktywna, mimo że chromatyna jest w stanie gotowym do podziału (17). Pozostałe komórki wchodzi do cyklu, a czas replikacji ich DNA determinują okresowo cyklony, nazywane molekularnym zegarem, który uruchamia białka o aktywności kinaz, a te z kolei fosforylują białka kontrolujące przebieg mitozy. Cyklony występują w czterech grupach: A, B, D i E i uczestniczą w onkogenezie. I tak obserwuje się wzrost ekspresji cyklony D1 w gruczolaku tarczycy, insercyjną mutagenozę genu cyklony A pod wpływem wirusa typu B zapalenia wątroby i indukcję raka tegoż narządu czy nadekspresję cyklony D i zaburzenia proliferacji limfocytów po infekcji wirusem Epsteina-Barr (1). Ponadto cyklony aktywują cyklinozależne kinazy (Cdk), co także powoduje zmiany w cyklu komórkowym. Dodatkowym zestawem białek wpływających na cykl są inhibitory Cdk, które z kolei mogą przekierować podziały komórek w różnicowanie. Mutacja białka p16<sup>INK4A</sup>, kodowanego przez gen *CDKN2A* (wyciszenie lub hipermetylacja), spotykana jest u ludzi w rodzinnym czerniaku, raku trzustki, wątroby, dróg żółciowych, sutka, glejaku wielopostaciowym i w międzybłoniaku (4).

Przebieg cyklu komórkowego kontrolują geny supresorowe poprzez punkty kontrolne, a zatem utrata sterowania nimi powoduje zarówno niekontrolowane podziały komórkowe, jak i utratę stabilności genomu, prowadząc do onkogenezy. W przypadku, gdy do transformacji komórki konieczna jest utrata obydwu alleli, takie geny określa się mianem recesywnych onkogenów. Należą do nich: gen *Rb* (*retinoblastoma* – odpowiedzialny za glejaka siatkówki), gen *TP53* (liczne nowotwory spontaniczne i rodzinne), gen kontroli cyklu *CDKN1A* (*p16<sup>INK4A</sup>* – czerniak, rak trzustki, glejak wielopostaciowy, międzybłoniak), gen *BRC1*, *BRC2* (rak sutka, jajnika, prostaty), gen Wilmsa (*WT1*, *WT2* – nerczak niedojrzały) oraz gen *APC* (rak okrężnicy) (4). Wiele supresorów nowotworów to „strażnicy genomu” (guardians), czyli „dozorcy” (caretakers), np. geny *BRCA 1* i *2*, *ATM*, *BLM*, które utrzymują stabilność i integralność genomu, natomiast „portierzy” (gatekeepers), np. gen *TP53*, *Rb1*, *APC*, regulują podziały i decydują o śmierci komórki. Mutacje genu „strażnika” z reguły dotyczą osób spokrewnionych rodzinie, aniżeli nowotworów spontanicznych, w których z kolei częste są mutacje genów „portierów”. W końcu należy wspomnieć, że mutacje takich genów, jak *NF1* czy *PTEN* obniżają ekspresję białka kontroli cyklu komórkowego p27<sup>Kip</sup>, co wskazuje na wspólną drogę indukcji nowotworów należących do tzw. fakomatoz, np. nerwiakowłóknikowości (15).

### Podsumowanie

Bodźce zewnętrzne pochodzenia chemicznego, fizycznego i biologicznego, czynniki wewnętrzne w ustroju, mutacje odziedziczone w linii zarodkowej nieodwracalnie uszkodzonej oraz zaburzenia naprawy



### Ryc. 1. Nowotworzenie jako efekt uszkodzenia genów

Objaśnienia: 1 – ok.  $10^{-6}$ - $10^{-7}$  mutacji/gen/podział komórki, nawet bez mutagenów (o nie ustalonej etiologii); 2 – klonalny wzrost pojedynczej komórki progenitorowej nieodwracalnie uszkodzonej; ECM – macierz pozakomórkowa (extracellular matrix)

DNA wywołują mutacje komórkowe o charakterze nieletalnym (ryc. 1). Ich kumulacja w różnych klasach genów, a także amplifikacja genów, czyli obecność ciałek chromatyny (double minute – podwójny drobny gen) gromadzących amplifikowany DNA prowadzi do nowotworzenia. Uszkodzony DNA powoduje wzmożoną aktywność genu *TP53* i hamowanie fazy G1 cyklu komórki, co uniemożliwia replikację uszkodzonego kwasu nukleinowego. Czasem wystarczy zmiana tylko 1 „liter” w tylko jednym odcinku informacyjnym materiału genetycznego aby doszło do rozpoczęcia procesu onkogenezy. Działanie genu może być zniwelowane wskutek mutacji typu utraty funkcji, natomiast mutacja wzmacniająca funkcję genu przyczynia się do nabywania przez niego funkcji (4). Komórki nowo-

tworowe ulegają mutacji dominującej, czyli nabywają funkcję (gain of function), względnie akumulują mutacje recesywne, które powodują utratę funkcji (loss of function). Dotyczy to szczególnie anomalii genetycznych obejmujących system kadheryn i tak np. rak zrazikowy sutka łatwo ulega przerzutowaniu z powodu braku ekspresji E-kadheryny uwarunkowanej delecją genu (4, 20). Raki kumulują ponadto dziesiątki błędów genetycznych, np. rak płuc zawiera 20-25 defektów w genach supresorowych i 40 w genach regulujących metylację DNA, co wpływa na częste występowanie tych nowotworów.

Wskutek mutacji genów odpowiedzialnych za proliferację powstają onkogeny a ich produkty onkoproteiny mogą pobudzać podział komórek niezależnie od czynników wzrostu (14). Do onkoprotein należą czynniki wzrostu, np. Sis działające autokrynnie, receptory dla hormonów tarczycy (ErbA), receptory dla czynników wzrostu (ErbB, Fms), kinazy tyrozynowe (Abl, Src, Fes), białka G (RAS), kinazy serynowo-treoninowe (np. Raf, Mos) i czynniki transkrypcyjne (Fos, Jun, Myc, Rel) (16). Często spotykana mutacja Ras hamuje np. wrażliwość białka GAP, co powoduje, że staje się ono aktywne. Do nowotworzenia prowadzą także defekty w białkach hamujących proliferację, np. Rb, TP53 (hamowanie apoptozy), defekty genetyczne WT1, APC, a także wirusy, które oprócz wprowadzenia onkogenów do komórki, mogą także inaktywować Rb i TP53 lub pobudzać Bcl2 i uszkadzać białka gospodarza.

Utrata ekspresji kadheryny E lub kateniny jest powodem zaniku połączeń zwierających w efekcie czego komórki stają się „wolne”, co ułatwia przerzutowanie. Na przykład zmianę ekspresji kadheryny E, wskutek mutacji w donorowym miejscu splicingowym w jej genie, na ekspresję kadheryny N, wiąże się z progresją czerniaka złośliwego, zaś w raku prostaty – ze spadkiem ekspresji kadheryny E i wzrostem kadheryny N (4). Wędrowka komórek nowotworowych w ECM jest możliwa dzięki wydzielaniu metaloproteinaz, katepsyn i hialuronidazy, które prowadzą do rozkładu kolagenu i innych białek (15). Wejście komórki nowotworowej do naczynia, a następnie opuszczenie go (odwrotna diapedeza), to kolejne stadium krążenia komórek nowotworowych (circulating tumor cells) przed ich osiedleniem się w nowym miejscu i wytworzeniem przerzutów, które nie są zjawiskiem przypadkowym, a ukierunkowanym. W przerzutach często stwierdza się wzrost liczby komórek z zaburzeniami genetycznymi, bardziej złośliwy fenotyp, obecność dwóch odmiennie proliferujących typów komórek w porównaniu do guza pierwotnego, a także nasilenie się lekooporności. Ta heterogenność i progresja nowotworowa warunkuje niepewność klinicznego rokowania (20).

W procesie onkogenezy bierze się pod uwagę predyspozycje genetyczne silne i słabe; te ostatnie związane z polimorfizmem genowym i reprezentowane

przez geny detoksykacyjne i geny mutatorowe, odpowiedzialne za usuwanie mutacji w genomowym DNA, jakie tworzą się pod wpływem działania substancji kancerogennych (13).

Wiele badań molekularnych u ludzi opiera się na tworzeniu modeli doświadczalnych u myszy o fenotypie odpowiadającym określonym chorobom człowieka, np. mutacja genu *Pax* (11). Bierze on udział w translokacji z genem *FKHR* obecnym w mięsaku lub mięśniaku prążkowanokomórkowym mięśni, zaś sama translokacja genu *Pax* i połączenie go z genem *PARgamma*, spotykana jest w trakcie rozwoju foliularnego raka tarczycy (4). Badania takie służą m.in. poszukiwaniu leków przeciwnowotworowych, np. wykorzystujących rybozomy, czyli cząsteczki RNA rozszczepiające mRNA, w genie fuzyjnym *Bcr/Abl* w przewlekłej białaczce szpikowej, mutancie genu *Ras* jelita grubego czy genie *ErbB2* w raku sutka (12). Z kolei terapię z wykorzystaniem *antisense* DNA, jaka neutralizuje funkcję krytycznych sekwencji DNA, stosuje się przy ekspresji genów *Myc* (chłoniak Burkitta), genu *Ras* (rak jelita grubego) czy genu fuzyjnego *Bcr/Abl* (przewlekła białaczka). Przykładem terapii genowej jest także indukowanie w komórkach proliferujących wektorów retrowirusowych, np. dostarczenie genu kinazy tymidynowej neutropowego wirusa opryszczki (HS-tk) do komórek glejaka wielopostaciowego, dzięki czemu nowotwór ten staje się wrażliwy na gancyklowir (lek przeciwopryszczkowy) (11). Próbuje się także stosować inhibitory (leki) punktów kontrolnych cyklu komórkowego powodujące śmierć komórki nowotworowej i następowe pojawienie się we krwi tzw. krążącego guzowego DNA (ctDNA), przenoszącego mutacyjnie zmiany nowotworowe. Molekularne ozna-

czenie we krwi stężenia ctDNA określa się mianem „płynnej biopsji” (20).

### Piśmiennictwo

1. *Atkins P. W.*: The periodic kingdom. Basic Books, New York 1995.
2. *Bertram J. S.*: The molecular biology of cancer. Mol. Aspects Med. 2001, 1, 167-173.
3. *Brown T. A.*: Genomes. Wiley-Liss, New York 1999.
4. *Epstein R. J.*: Biologia molekularna człowieka. Wyd. Czelej, Lublin 2005.
5. *Gutkind J. S.* (pod red.): Signalling networks and cell cycle control: the molecular basis of cancer and other diseases. Human Press. Champaign II, 2000.
6. *Hanahan D., Weinberg R. A.*: Hallmarks of cancer: the next generation. Cell 2011, 144, 646-674.
7. *Kawiak J., Zabel M.*: Seminaria z cytofizjologii. Wyd. 2, Elsevier Urban & Partner, Wrocław 2014.
8. *Krauss G.* (pod red.): Biochemistry of signal transduction and regulation. John Wiley&Sons, New York 2000.
9. *Madej J. A.*: Udział zapalenia starczego (ang. inflammaging) w procesie onkogenezy. Med. Weter. (w druku).
10. *Madej J. A., Klimontowski S., Kuźmak J.*: Role of p53 gene in pathogenesis of bovine leukemia (BLV-induced). Pol. Vet. Sci. 2001, 4, 225-230.
11. *Meager A.* (red.): Gene therapy technologies, applications and regulations: from laboratory to clinic. John Wiley&Sons, New York 1999.
12. *Pearson J. D.* (red.): Vascular adhesion molecules and inflammation. Springer – Verlag, Berlin 1999.
13. *Pecorino L.*: Molecular biology of cancer. Mechanisms, Targets and Therapeutic. Oxford University Press 2012.
14. *Richter J. D.* (red.): mRNA formation and function. Academic Press, New York 1997.
15. *Seriver C. R., Beaudet A. L., Sly W. S.* (red.): The metabolic and molecular bases of inherited disease. McGraw Hill, New York 2000.
16. *Silberagl S., Lange F.*: Atlas patofizjologii. MedPharm Polska, Wrocław 2011.
17. *Stein G. S.* (red.): The molecular basis of cell cycle and growth control. Wiley, New York 1998.
18. *Strachan T., Lindsay S., Wilson D. I.* (red.): Molecular genetics of early human development. Academic Press, New York 2000.
19. *Vogelstein B., Kinzler K. W.*: Cancer genes and the pathways they control. Nat. Med. 2004, 10, 789-799.
20. *www.cancer.org* Website of the American Cancer Society; aimed at patients and relatives but gives some basic data on cancer and its treatment.

Adres autora: prof. dr hab. Janusz A. Madej, ul. Norwida 31, 50-375 Wrocław; e-mail: janusz.madej@upwr.edu.pl