

# Komórki starzejące się i komórki nowotworowe jako supresory apoptozy – przyczyny i skutki

JANUSZ A. MADEJ

Zakład Patomorfologii i Weterynarii Sądowej, Katedra Patologii, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu, ul. Norwida 29, 50-375 Wrocław

Otrzymano 13.04.2022

Zaakceptowano 22.04.2022

Madej J. A.

## Senescent cells and cancer cells as apoptosis suppressors: Causes and effects

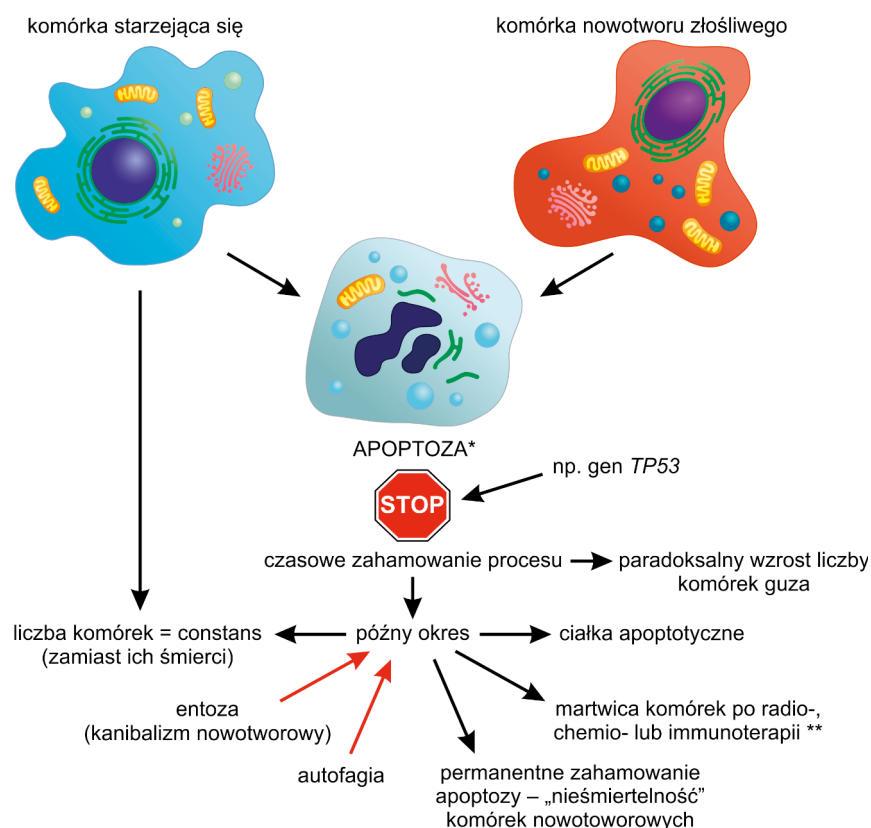
### Summary

The death of some senescent cells (KS), as well as neoplastic cells (KN), can be paradoxically inhibited at the stage of apoptosis. Thus, the KS become inhibitors of oncogenesis at the beginning of the phenomenon. The influence of KS and KN on the inhibition of apoptosis is multidirectional, which is presented graphically in the form of Euler's mathematical circles (Fig. 2). Senescence, like apoptosis, may to some extent inhibit oncogenesis. The neoplastic process is also associated with non-apoptotic death, i.e. entosis, as well as autophagy, i.e. autophagocytosis with the participation of lysosomes. The process of autophagy may also involve the cell proteolytic system via the ubiquitin-proteasome system (UPS), in which polyubiquitination of suppressor proteins, e.g. p53 protein, leads to oncogenesis. Therefore, both of the above-mentioned processes of autophagy favour oncogenesis. The paper also presents the role of human endogenous retroviruses (HERs) in oncogenesis, with particular emphasis on the syncytin gene and its participation in the induction of placental cancer (*choriocarcinoma, chorioepithelioma*).

**Keywords:** senescence, cancer, apoptosis, autophagia, entosis

Część komórek, które weszły na ścieżkę starzenia, charakteryzuje się zatrzymaniem cyklu komórkowego, zahamowaniem apoptozy oraz fenotypem sekrecyjnym związanym z procesem starzenia SASP (senescence – associated secretory phenotype) (28). Komórki te nie wchodzą na ścieżkę apoptozy m.in. z powodu zmniejszenia ekspresji zależnych od białka p53 proapoptycznych modulatorów tego procesu, tj. białek PUMA i NOXA – należących do rodziny białek Bcl-2. Towarzyszy temu nadekspresja białek antyapoptotycznych Bcl-2, Bcl-xL i Bcl-w, wiążących białko proapoptotyczne, które posiada domeny BH3 i hamuje wzrost przepuszczalności błony mitochondrialnej (3, 5). Decyzja o życiu lub śmierci komórek wynika bowiem z równowagi Bcl-2/Bax (26). Apoptozę może także hamować mutacja genowa, obserwowana np. w przewlekłej białaczce limfocytowej u ludzi, a spowodowana nadekspresją białek antyapoptotycznych Bcl-2 i IAP. Wzrost liczby komórek nie jest wówczas efektem nadmiernej ich proliferacji, a zahamowaniem degradacji (www. Cancer. Org Website of the American Cancer Society). Ponadto apoptozę hamuje indukcja ekspresji komórkowego onkogenu *bcl-2* spowodowana wirusami, np. wirusem EBV (Epsteina-Barr) (3), dlatego też śmierć komórek starzejących się, a także

komórek nowotworowych może być paradoksalnie zahamowana na etapie apoptozy, tj. wtedy, gdy oba wymienione typy komórek nie wkroczą na ścieżkę śmierci. Stąd przyjmuje się, że komórki starzejące się mogą być na początku zjawiska inhibitorami onkogenezy (ryc. 1). Przykładem takiego procesu jest wspomniany fenotyp SASP, który może działać ambiwalentnie, tzn. zarówno hamować, jak i stymulować rozwój nowotworu. Sekrecyjny fenotyp komórek starzejących się może odpowiadać na początku zjawiska za zahamowanie cyklu komórkowego w sąsiadujących z nimi komórkach nowotworowych poprzez oddziaływanie jukstakrynnie (cząsteczki adhezji międzykomórkowej, cytokiny: TNF, EGF, *Hedgehog*), tzn. takie, w którym odbiór informacji z komórki przekazującej sygnał następuje wyłącznie w wyniku bezpośredniego kontaktu z komórką docelową, co w efekcie hamuje onkogenezę. Jednocześnie należy podkreślić, że ilość przekazywanej informacji, wg zasady zachowania informacji, nie jest większa niż ma jej źródło (21). Obecność z kolei cytokin w późnym SASP niszczy komórki nowotworowe, jako wyraz odpowiedzi immunologicznej. Niestety, ubocznym skutkiem takiej działalności może być stymulacja rozplemu nowotworowego, a to dzięki nasilonej angiogenezie, powstaniu



**Ryc. 1. Zahamowanie apoptozy – procesu „łączącego” komórki starzejące się i komórki nowotworowe**

Objaśnienia: \* – genetycznie programowana śmierć komórek („komórkowe samobójstwo”); \*\* – patologiczna śmierć komórek („komórkowe zabójstwo”)

przerzutów nowotworowych, a także supresji immunologicznej odpowiedzi odpornościowej. Aktualnie uważa się, że proces SASP krótkotrwały, ale intensywny, wywiera efekt supresyjny, natomiast proces przewlekły z reguły pobudza rozplęm nowotworowy. Niezależnie od tego SASP po długotrwałej ekspresji rozregulowuje proces regeneracji, co także sprzyja onkogenezie (28). Jednocześnie należy dodać, że istnieje również przedwczesne starzenie indukowane stresem – SIPS (stress-induced premature senescence), w którym białka komórkowe mogą zarówno sprzyjać proliferacji komórek macierzystych, jak i inicjować starzenie się (28).

Ostatnio poznano substancje wykrywające, a nawet usuwające komórki starzejące się, jak również komórki nowotworowe i nazwano je senolitykami, np. mitochondrialną melatoninę oraz NADH<sup>+</sup> (dinukleotyd nikotynoamidoadeninowy) (22).

Podobnie jak w SASP proliferację nowotworową ogranicza starzenie replikacyjne, w którym jednym z hamulców są telomery ulegające, dzięki telomerasie, skróceniu przy każdym podziale chromosomów komórki. Wysoki poziom tego enzymu jest bowiem charakterystyczny dla większości nowotworów złośliwych, co związane jest z amplifikacją *N-myc* – sprzyjającej nieśmiertelności (20, 22). Podobne skrócenie długości telomerów obserwuje się u ludzi w FIP (familial interstitial pneumonia) i manifestuje się polimorfizmem genów związanych z telomerasą

(*hTERT*, *TERC*, *RTEL1*) oraz gorszym rokowaniem (25). Markerem nieśmiertelności linii komórkowej fibroblastów jest także mortalina, czyli białko szoku termicznego HSPs70/PBP/74/GR75, równomiernie rozmieszczone w cytoplazmie komórek starzejących się, natomiast w komórkach nieśmiertelnych – wokół ich jądra. Mortalina może hamować białko p53 w liniach włókniamięśnaka pęcherza moczowego u ludzi (25).

Komórki starzejące się nie giną na drodze apoptozy, względnie uśmiercenia przez komórki układu immunologicznego, ponieważ komórki tego ostatniego wraz z wiekiem stają się mniej sprawne (immunosenescencja) w zakresie fagocytyzacji. U myszy np. wykazano, że po wstrzyknięciu im białka niezbędnego do apoptozy 80% komórek starzejących się ginie bez jednoczesnego uszkodzenia komórek zdrowych. Niezależnie od tego komórki starzejące się wydzielają substancje prozapalne, reorganizują ECM (extracellular matrix – macierz pozakomórkową) i hamują funkcję komórek macierzystych. Spełniają także rolę pozytywną, tzn. biorą udział w gojeniu się ran i regeneracji tkanek oraz uruchamiają fibrynolizę (4).

Szczególną rolę w hamowaniu cyklu komórkowego spełnia białko p53, stanowiąc tym samym barierę dla onkogenezy. Przeciwnie, w sytuacji, gdy białko p53 wiąże się ze składnikami jądra komórkowego (m.in. deaminazą adeniny na RNA (ADAR), telomerasą czy nukleosteminą), nie hamuje ono cyklu komórkowego, ale prowadzi do licznych podziałów, co skutkuje nowotworzeniem. Podobnie mutacja w genie *TP53*, zwanego też genem starzenia się (senescence gene), jest powodem podziałów komórkowych i uszkodzenia DNA, zahamowania apoptozy, a z czasem wzrostu mutacji w całym genomie i transformacją nowotworową, obserwowaną szczególnie w rakach hormonozależnych (sutka, jajników, prostaty) – (30). Tak więc można przyjąć, że starzenie jest zależnym od *TP53* procesem rywalizacji pomiędzy apoptozą a onkogenezą, chociaż zawsze jest śmiertelne (3). Uszkodzenie wspomnianego genu w nowotworach powoduje, że jego produkt jest m.in. czynnikiem transkrypcyjnym dla genów *BAX* i *FAS/APO1*, których produkty są promotorem apoptozy. W genie *TP53* w nowotworach złośliwych u ludzi obserwuje się ok. 2000 różnych mutacji, gdyż jest on genem regulatorowym, czyli zmiany w nim powodują zaburzenia funkcji innych genów. Ogranicza to apoptozę komórek nowotworowych i powoduje ich progresję (www. Cancer. Org Website of the American Cancer Society). Zwiększona z kolei ekspresja genu *TP53* u myszy powoduje szybsze ich starzenie się.

Przyczyną śmierci komórek nowotworowych może być także delecja klonalna, w której aktywowane antygenem limfocyty posiadają na powierzchni zarówno Fas, jak i FasL (Fas ligand – ligand receptora Fas), co może prowadzić do „samobójstwa” lub „bratobójstwa” komórek (2). Śmierć jest wówczas wywołana aktywacją AIDC (activation-induced cell death – apoptoza aktywowanych limfocytów T przez układ Fas–FasL) (2). Śmierć tych komórek może być także spowodowana obecnością neoantygenów, powstałych przez mutację komórki nowotworowej i początkowo rozpoznawanych przez limfocyty Tc, które ją niszczą. Z czasem jednak rozplem komórek nowotworowych zaczyna dominować, a to dzięki białku CTLA-4, które hamuje ten proces (28).

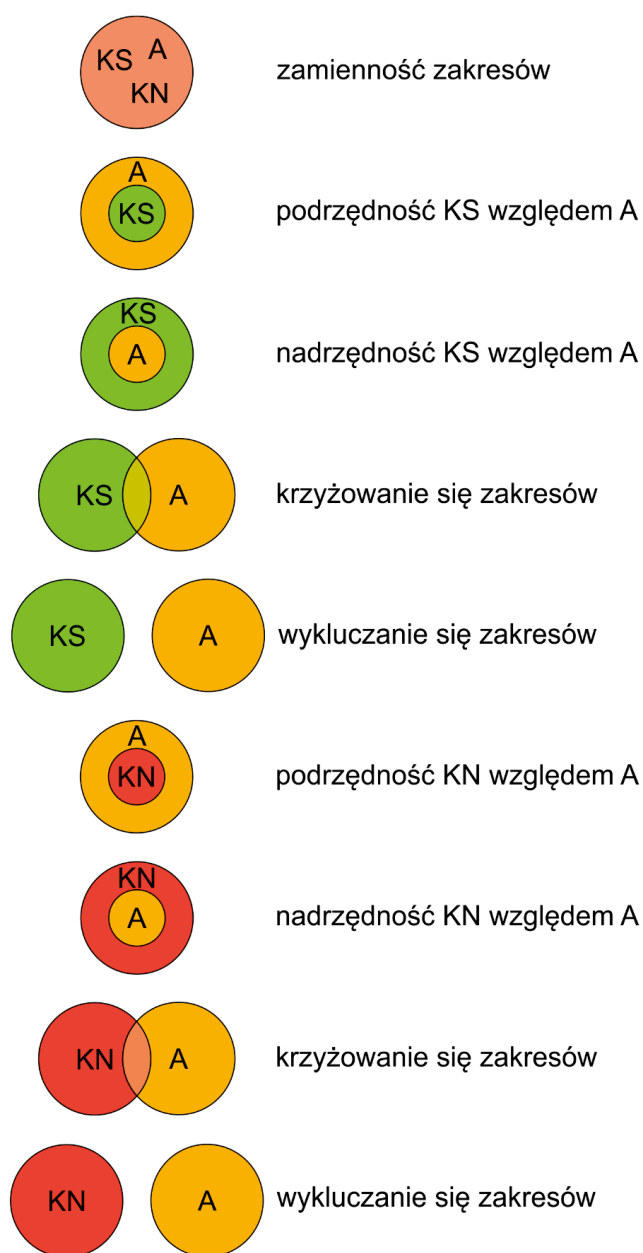
Komórki starzejące się charakteryzuje wzrost entropii ( $\Delta S >$ ), osiągającej maksimum ( $\Delta S_{\max}$ ) w momencie ich śmierci. Natomiast w komórkach nowotworowych mamy do czynienia z powstaniem nowego stanu ustabilizowanego, który nie prowadzi do ich śmierci ( $\Delta S < S_{kr} > 0$ ). Komórki te nie starzeją się, ale ulegają progresji, czyli odmłodzeniu. Starzenie komórek jest zatem odwrotnością onkogenezy, tj. stare komórki gromadzą się, a nie jak komórki nowotworowe proliferują, nie odnawiają się i nie ulegają progresji; starzenie jest zaprogramowane (DPS – developmentally programmed senescence) – nowotworzenie zaś – przeciwnie lub bardzo rzadko. Uważa się nawet, że nowotwór jest lokalnym „odmłodzeniem” tkanek, tj. następuje w nim cofnięcie się stopnia ontogenezy w porównaniu z komórkami starzejącymi się (12). Przykładem może być pojawienie się w komórkach nowotworowych antygenów CEA (carcinoembryonal antigen – antygen rakowo-embrionalny), sulfoglikoprotein, antygenów nowotworowo-łożyskowych (gonadotropiny kosmówkowej, laktogenu łożyskowego), fosfatazy zasadowej łożyska (enzymu Regana), płodowej hemoglobiny, których brak w komórkach zdrowych lub jest ona śladowa, np. CEA (12).

Komórki starzejące nie mnożą się, nie odnawiają i „nie chcą umrzeć”, stają się balastem dla ustroju, często trudnym do usunięcia. Są także prawdopodobnie konkurencją dla komórek nowotworowych w zakresie dostępności do energii i tlenu – koniecznych do ich przetrwania. Niedobór tlenu kompensowany jest przez komórki poprzez indukowanie glikolizy beztlenowej oraz indukcję białka HIF-1 $\alpha$  (hypoxia-inducible factor – czynnik indukowany niedotlenieniem), które łącząc się z białkiem HIF-1 $\beta$ , wytwarza czynnik transkrypcyjny, aktywujący proliferacyjny szlak NF- $\kappa$ B (nuclear factor  $\kappa$ B – czynnik jądrowy  $\kappa$ B), a ten z kolei indukuje stan zapalny oraz neoangiogenezę (25). Wszystkie te cechy mogą nabyć tylko komórki nowotworowe. Komórki starzejące natomiast nie odnawiają się, a przeciwnie – ulegają zwyrodnieniu i śmierci. Dopiero z czasem taki sam los czeka komórki nowotworowe.

W procesie apoptozy komórek nowotworowych powstają ciała apoptotyczne, w których może być

zmutowany DNA i wówczas nawet pojedynczy, zmutowany gen, pochodzący od komórki nowotworowej i wbudowany do drugiej komórki prawidłowej, ulegając replikacji, staje się prawdopodobnie źródłem metastazy (9). Ponadto w zahamowanej apoptozie, jaka towarzyszy nowotworzeniu, może być również upośledzona eferocytoza, czyli proces usuwania ciałek apoptotycznych przez komórki fagocytarne (25).

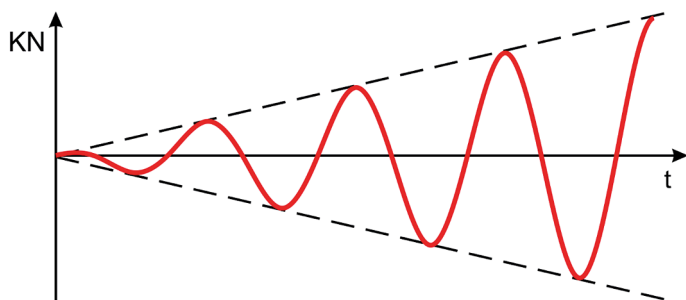
Proces apoptozy hamują zarówno komórki starzejące się (KS), jak i komórki nowotworowe (KN), ale ich wpływ na ten rodzaj śmierci programowanej może być różny, co można przedstawić graficznie pod postacią matematycznych kół Eulera (ryc. 2). Uwidoczniono na nich zakresy oddziaływania między dwoma ww. typami komórek (KS i KN) a apoptozą (A).



**Ryc. 2. Stosunki zakresowe między apoptozą, a komórkami starzejącymi się i komórkami nowotworowymi przedstawione przy pomocy matematycznych kół Eulera**

Objaśnienia: A – apoptoza; KS – komórka starzejąca się; KN – komórka nowotworowa





Ryc. 3. Przebieg losowy rozplemu komórek nowotworowych (KN) przedstawiony w postaci rosnącej (rozbudowanej) sinusoidy

Objaśnienia: t – czas

We wcześniejszej pracy (15) wykazano, że w procesie onkogenezy mamy do czynienia z interpolacją wielomianową:  $ABC = y = f(x)$  funkcja interpolowana, której krzywa traktowana jest jako dystrybuenta logistycznego rozkładu prawdopodobieństwa i znajduje zastosowanie w naukach medycznych do określenia wpływu różnych czynników na ryzyko zachorowania. Rozplem komórek nowotworowych można również traktować jako wielkość fizyczną, czyli zbiór kolejno następujących po sobie wielkości fizycznych, a także jako funkcję określającą zależność tej wielkości od czasu  $t$  (ryc. 3). Rozplem nowotworowy ma więc charakter stochastyczny (losowy), czyli o przypadkowej zależności danej wielkości od czasu  $t$ , jak również charakter zmienny – tzw. przebieg pseudolosowy. Jest on przebiegiem okresowym, czyli zdeterminowanym, ale ma podobną charakterystykę jak przebieg losowy. W przypadku zmiennych losowych o rozkładzie skokowym, jak i ciągłym oczekiwana wartość zwaną wartością średnią (wartością przeciętną, nadzieją matematyczną) – o ile ona istnieje – można wyrazić przy pomocy całki Stieltjesa:

$$\int_{-\infty}^{+\infty} x dF((x)_i)$$

gdzie  $F(x)$  jest dystrybuentą rozkładu tej zmiennej losowej (18). Z kolei dla zmiennej losowej mającej wartość  $x_1, x_2, \dots$  z prawdopodobieństwem równym, odpowiednio,  $p_1, p_2, \dots$  wariancja wyrażona jest przy pomocy wzoru

$$D^2x = \sum_k (x_k - m)^2 \cdot p_k$$

gdzie

$$m = EX = \sum_k x_k \cdot p_k$$

choć dla zmiennej losowej ciągłej, danej za pomocą funkcji gęstości  $f(x)$ , wariancja

$$D^2x = \int_a^b (x - m^2) f(x) dx$$

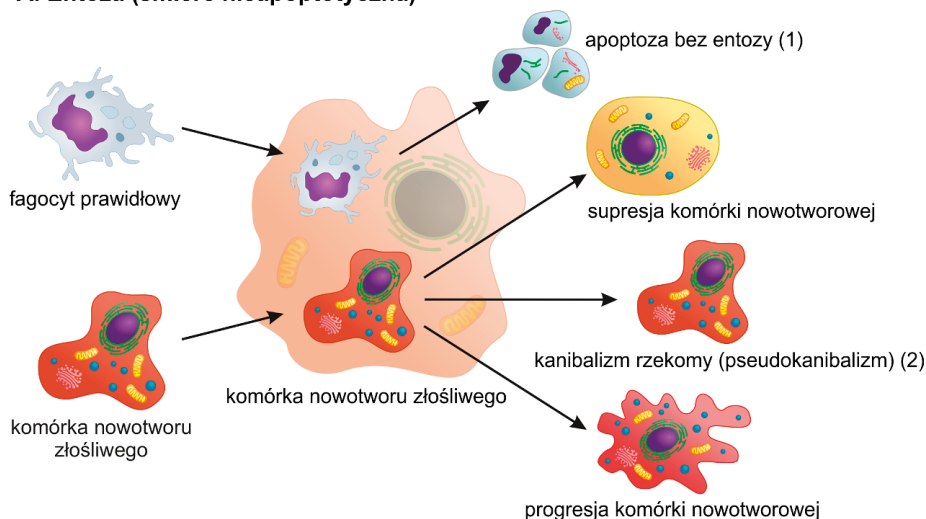
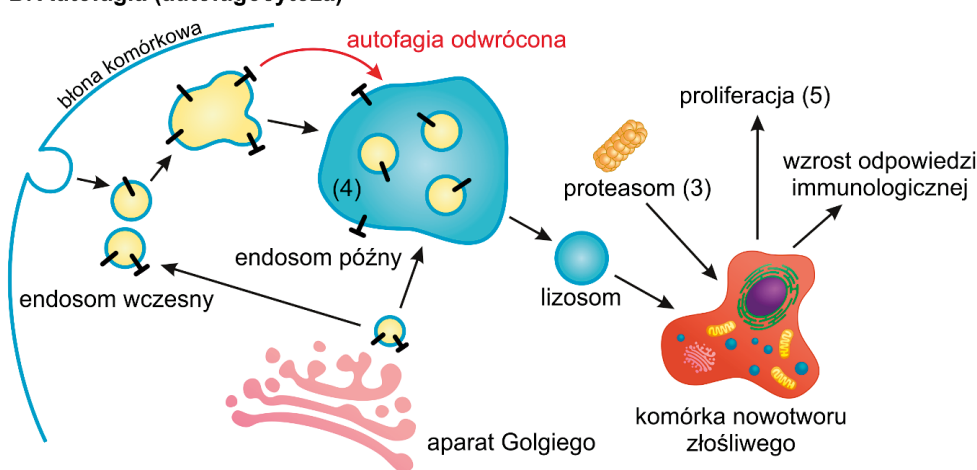
Wariancja charakteryzuje rozrzut wartości zmiennej losowej  $x$  wokół jej wartości średniej  $EX_1$ . Im większa jest wariancja, tym większy jest jej rozrzut (17).

## Rola entozy i autofagii w hamowaniu apoptozy

Endocytoza odbywa się przez błonę konwencjonalną oraz błonę tratw i kaweoli komórki. Kaweole zbudowane są z białka kaweoliny o strukturze „szpilki do włosów” (hairpin), które tworzy kompleksy cholesterolowe, czyli lipidowe „tratwy” (lipid rafts) na wewnętrznej błonie komórki, stymulujące jej wzrost. W pierwszym przypadku materiał zendocytowany jest trawiony w lizosomach lub proteasomach, a receptory w procesie recyrkulacji wracają z powrotem do błony komórki. W drugim przypadku materiał jest nietknięty i zdeponowany w aparacie Golgiego lub ER (siateczce endoplazmatycznej), względnie drogą transcytozy transportowany i uwalniany do innej powierzchni komórki (20).

W procesie nowotworowym, oprócz apoptozy, mamy także do czynienia ze śmiercią nieapoptotyczną, tzn. bez udziału kaspaz wykonawczych, która nosi miano entozy, czyli procesu wchłonięcia jednej komórki przez system wakuolarny komórki sąsiedniej, wywodzącej się z tej samej populacji (ryc. 4). Proces ten spowodowany jest utratą prawidłowych powiązań między nią i ECM, czemu sprzyja obecność antygenu *k-ras* oraz ekspresja kadheryny E i P i ma np. miejsce w raku sutka u kobiet (19). Z kolei entozą komórek nowotworowych przez komórki fagocytykujące określana jest mianem heterokanibalizmu i została opisana we wcześniejszej pracy (8, 13). Wykazano jednocześnie, że entozą powoduje supresję procesu nowotworowego albo odwrotnie – działa tumorogennie (1). Istnieje także zjawisko kanibalizmu komórki nowotworowej przez drugą komórkę nowotworową, który to proces można określić jako homo- lub autokanibalizm. Obserwowano również możliwość hetero- lub kserokanibalizmu neutrofilów naciekających guz przez komórki nowotworowe, ale z wykluczeniem śmierci typu entozy (5).

Populacja komórek nowotworowych jest także modulowana przez 3 typy autofagii (autofagocytozy), a mianowicie: autofagię zależną od białek opiekuńczych – CMA (chaperone-mediated autophagy), mikro- oraz makrofagię – ta ostatnia regulowana przez kompleks 1mTOR (mTORC1 – mammalian target of rapamycin – ssacze białko docelowe dla rapamycyny), zawierający kinazę serynowo-treoninową mTOR (6, 10, 19). Białko mTOR włącza/wyłącza cykl komórkowy i hamuje autofagię. Hamowanie mTOR spowalnia z kolei zapalenie starcze i towarzyszące mu nowotwory. W procesie autofagii organella komórkowe, zarówno uszkodzone, jak i nadliczbowe, agregaty białkowe i mikroorganizmy, które wniknęły do cytosolu, są otoczone przez błonę pochodzącą z ER, ale pozbawioną rybosomów i przy współudziale białek nieubikwitynowego oraz ubikwitynowego tworzą ciała autofagowe. Te z kolei łączą się z pęcherzykami zawierającymi enzymy hydrolityczne lizosomów o niskim pH, gdzie ulegają degradacji (6, 7). Powstają wakuole autofagowe o wewnętrznych strukturach

**A. Entoza (śmierć nieapoptotyczna)****B. Autofagia (autofagocytoza)****Ryc. 4. Korelacja między entozą i autofagią, a komórką nowotworową**

Objaśnienia: 1 – apoptoza bez entozy (hetero- lub ksenokanibalizm fagocytów około nowotworowych); 2 – brak zmian w komórce nowotworowej; 3 – powrót do stanu prawidłowego, np. przy subtelnym uszkodzeniu komórki poprzez eliminację uszkodzonych organelli komórkowych i ponowną syntezę białek; 4 – drugi główny system proteolityczny komórek z drogą ubiquityna-proteasom – UPS, np. degradujący białko supresorowe nowotworów – p53, pozbawione go komórki ulegają transformacji nowotworowej, jak np. w raku szyjki macicy u kobiet, I – białko nieubikwitynowane, T – białko ubikwitynowane; 5 – proliferacja nowotworowa, np. pod wpływem wirusów, bakterii – zmodyf. wg Sawicki W., Malejczyk J.: Histologia. PZWL, Warszawa 2012 (21)

kanalikowych lub pęcherzykowych (ciała kanalikowo-pęcherzykowe). W końcu utworzone zostają późne ciała autofagowe, a z nich ciała reszkowe bogate w lipofuscyne, czyli barwnik ze zużycia i zniszczenia (wear and tear pigment).

Ubikwitynację cząsteczek MHC klasy I (major histocompatibility complex – główny układ zgodności tkankowej), a także ich „pocięcie” w proteasomie indukują niektóre wirusy, np. wirus cytomegalii. Taka komórka nie może już prezentować antygenów wirusowych limfocytom T i być niszczone przez komórki Tc. Podobną strategię stosują niektóre komórki nowotworowe, stając się „niewidocznymi” dla limfocytów T, w związku z czym są niszczone tylko przez komórki NK (natural killers), dla których sygnałem do zabijania jest brak na komórkach cząsteczek MHC (27).

Wzmoczoną autofagię obserwuje się z reguły w stanie agonalnym komórki, tj. wówczas, gdy zostają włączone różne programy genetyczne dające obrazy odpowiadające apoptozie, paraptozie, onkozie i autoschizie (21). Z kolei mała wydajność autofagii sprzyja niekontrolowanej proliferacji komórek i onkogenezie. Komórki prezentujące antygen APC degradują, np. w lizosomach, antygeny pochodzące ze środowiska zewnętrznego i prezentują je w połączeniu z cząsteczkami MHC klasy I limfocytom TCD8<sup>+</sup>, co indukuje odpowiedź komórek T cytotoksycznych przeciwko nowotworom złośliwym (18). Ponadto antygeny cytoplazmatyczne i jądrowe (wirusowe, nowotworowe, bakteryjne) są krzyżowo prezentowane w połączeniu z cząsteczkami MHC klasy II limfocytom CD4<sup>+</sup> przez APC, które w wyniku działania cytokin prozapalnych uzyskały ekspresję MHC klasy II i wymagają aktywnej autofagii. Z drugiej strony, proces autofagii może być korzystny dla niektórych patogenów, np. wirusów odry czy bakterii (*Mycobacterium tuberculosis*) do mnożenia się i uzyskania tym sposobem substancji odżywczych (28). Ponadto należy podkreślić, że uczynniony gen autofagii *ATG16L1* wzmacnia ten proces, szczególnie w limfocy-

tach Th (23). Autofagia bierze także udział w procesie mitofagii, czyli usuwania uszkodzonych mitochondrium, zapobiegając w ten sposób kumulacji wolnych rodników (WR), które powodują uszkodzenia DNA, starzenie komórek, a nawet choroby nowotworowe (14, 30). Zauważono np., że mitochondria niektórych KN i KS mają zmniejszoną liczbę grzebieni mitochondrialnych oraz niską gęstość elektronową matriks mitochondrialnej.

Indukcja odpowiedzi zapalnej może być spowodowana zbyt szybkim wzrostem nowotworu, wskutek jego niedotlenienia i martwicy. Tę odpowiedź może hamować stymulacja autofagii, co sprzyja przeżyciu komórek nowotworowych, chociaż obserwowana autofagia w tych komórkach koreluje ze wzrostem liczby limfocytów TCD8<sup>+</sup>, spadkiem natomiast limfocytów T

(Treg). Stąd wniosek, że wzrost autofagii koreluje z aktywacją odpowiedzi antynowotworowej (20, 28).

Niektóre patogeny zewnątrzkomórkowe, jak np. wirus EBV, wirus zapalenia wątroby typu B (HBV) czy *Helicobacter pylori* wywołujące nowotwory, tworzą białko, odpowiednio: dla antygeny jądrowego wirusa EBNA1, białko Hbs i Hbx, toksynę wakuolizującą AC (Vac-A), które obniżają pH błon lizosomalnych, co osłabia autofagię (ksenofagię) i predysponuje do onkogenezy. Zasadniczy wpływ odgrywają tu zaburzenia w aktywności v-ATP-azy (vacuolar-type H<sup>+</sup>-ATP-ase) – enzymu, który pompuje do wnętrza lizosomów protony warunkujące w nich pH na poziomie 5 (28).

Autofagia stanowi także przykład remodelingu komórki, nieodzownego do jej różnicowania, a przy subtelnym uszkodzeniu komórki nosi miano II typu programowanej śmierci komórki, czyli specyficznego czyszczenia jej ze zbędnych lub martwych organelli (7, 10). Należy także wspomnieć o autolizie, czyli samorozpuszczeniu, np. białek przez enzymy wewnątrzkomórkowe, która może być przyżyciowa (choroba wrzodowa dwunastnicy) lub *post mortem*.

W procesie autofagii może być także zaangażowany drugi główny system proteolityczny komórki na drodze ubiquityny–proteosom – UPS (ubiquitin-proteasome system), np. degradujący białko supresorowe nowotworów p53 (16). Proteosom to proteazowy kompleks enzymatyczny, który rozkłada białka poliubikwitynowe, wiążąc co najmniej 4 cząsteczki małego białka ubiquityny lub białka ubiquitynopodobne – UBL (ubiquitin-like proteins), np. białka regulujące autofagię (ATG8 i ATG12). Proteosom bierze udział w trawieniu białek o patologicznej konformacji lub zużytych, białek regulatorowych, białek antygenowych, np. wirusowych, białek aktywujących transkrypcję, co prowadzi do modyfikacji niektórych genów oraz białek w procesie głodzenia, jako źródła aminokwasów (16). Proteosomy zawierające na swej powierzchni immunogenne peptydy, indukowane przez interferon gamma, noszą miano immunoproteosomów. Poliubikwitynacja nadmiernej liczby białek supresorowych proliferacji komórek, np. białka p53, prowadzi do onkogenezy (21, 28). Wykazano także, że UPS może być wykorzystane przez białko E6 (associated protein) wirusa HPV (human papilloma virus) do tworzenia z komórkowym enzymem E3 – kompleksu E6:E3AP, który rozpoznaje supresorowe białko p53 i degraduje je w proteosomach. Efektem braku „strażnika genomu, tj. p53” jest etapowa transformacja nowotworowa w obrębie szyjki macicy u kobiet (dysplazja → *ca in situ* → *ca invasivum*) (23). Z kolei inhibitory proteosomów są wykorzystywane w terapii niektórych nowotworów, np. szpiczaka mnogiego (23).

Reasumując można stwierdzić, że białka są w komórkach monoubikwitynowane na drodze recyrkulacji, transportowane do endosomów wczesnych, czyli kaweosomów (bogatych w białka błony pęcherzyków v-SNARE/t-SNARE – białka błony docelowej

– membrane receptor for SNAP (target receptor) oraz białka cytosolowe NSF i SNAP), a następnie do endosomów późnych, gdzie są degradowane. Z kolei układ kaweosomów segreguje cząsteczki i kieruje je do organelli komórkowych, ale z pominięciem endosomów późnych, lizosomów i proteosomów. Tak się dzieje np. w przypadku wirusa HIV czy prątków gruźlicy wykorzystujących transport endocytarny przez błonę kaweoli/tratw z powstaniem pęcherzyków cytoplazmatycznych z udziałem białek kaweolin o pH ~7. Pęcherzyki te są kierowane przez kaweosomy do aparatu Golgiego, SER lub na inną powierzchnię komórki (transcytoza), z pominięciem lizosomów i endosomów. Tym sposobem patogeny te pozostają nieuszkodzone (28).

### Podsumowanie

Po przekroczeniu limitu Hayflicka, czyli maksymalnej liczby podziałów, komórki ustroju wkraczają w etap starzenia się, związany z przyspieszoną ekspresją białka sirtuiny (SIRT1-7) i czynnikami transkrypcyjnymi grupy FoxO (forhed boxO) (25). Śmierć komórek starzejących się (KS), jak również komórek nowotworowych (KN) może być paradoksalnie zahamowana na etapie apoptozy, tak więc KS stają się na początku zjawiska inhibitorami onkogenezy. Wpływ KS i KN na hamowanie apoptozy jest różnokierunkowy, co przedstawiono graficznie pod postacią matematycznych kół Eulera (ryc. 2) (17). Komórki, w których nie dochodzi do apoptozy, mogą ulec transformacji nowotworowej, a w komórkach układu odpornościowego skierowanych przeciwko własnemu organizmowi – do powstania chorób autoimmunologicznych. Ponadto komórki nowotworowe muszą ominąć proces starzenia się, który ogranicza możliwość podziału komórek. Tak więc zarówno senescencja, jak i apoptoza mogą w pewnym stopniu zapobiegać onkogenezie. Nasilenie tej ostatniej obserwuje się na przykład w samoistnej inwolucji wrodzonych naczynek (25).

Hamując na proces proliferacji komórek, poprzez kierowanie ich na drogę apoptozy, wpływają geny bramkowe (gatekeepers), np. jako odpowiedź na uszkodzenie DNA; natomiast jeżeli geny uczestniczące w naprawie DNA, tzw. geny opiekuńcze (caretakers) ulegną zaburzeniom funkcjonalnym, może dojść do kumulacji mutacji w komórkach. Podobnie mutacja w genach środowiska komórki (landscape) sprzyja niekontrolowanemu wzrostowi komórek (20). W przypadku hypermutacji somatycznej w regionie zmiennym (V<sub>L</sub> i V<sub>H</sub>) genów dochodzi do selekcji subklonów o najwyższym powinowactwie, wiążących najsilniejszy antygen i wywołujący ich dalszy wzrost oraz pełne dojrzewanie przeciwciał (3).

Z procesem nowotworowym związana jest także śmierć nieapoptotyczna, czyli entozoza, a także autofagia, a więc autofagocytoza z udziałem lizosomów (ryc. 3). W procesach tych hetero- i autofagosomy ulegają fuzji z endosomami późnymi lub lizosomami



i tworzą, odpowiednio, hetero- lub autofagolizosomy. W procesie autofagii może być również zaangażowany system proteolityczny komórki na drodze ubikwityna-proteosom – UPS, w którym poliubikwitynacja białek supresorowych proliferacji komórek, np. białka p53, prowadzi do onkogenezy. Oba ww. procesy autofagii sprzyjają zatem nowotworzeniu. Ponadto nasilający się szlak ubikwitynowo-proteasomowy towarzyszy procesom katabolicznym, obserwowanym w kacheksji nowotworowej.

Z chwilą pojawienia się na Ziemi ostatniego uniwersalnego przodka komórek – proeukarionta LUCA (Last Universal Common Ancestor), posiadającego od 500-1000 genów lub bakterii termomezofilnych doszło w nich, wg teorii A. G. Cairns-Smitha, do „przejścia władzy genetycznej” i pojawienia się pierwszych mutacji (24).

Mutacje dotyczą genu, chromosomu lub genomu i mogą być samorzutne lub powstają sztucznie po wpływie mutagenów. Te pierwsze powstają najczęściej w wyniku błędów w procesie replikacji DNA ( $6 \times 10^{26}$  możliwości błędu w ciągu życia człowieka), np. wskutek działania retrotranspozonów, czyli ruchomych odcinków DNA, przemieszczających się między chromosomami i wynoszą od 1/10 tysięcy komórek do 1/milion. Ilość mutacji rośnie wraz z wiekiem organizmu i tak np. u ludzi w krwiotwórczych komórkach macierzystych wynosi w wieku 40-50 lat 4-7 mutacji, a 70-80 lat – 8-12 mutacji (25). Może to skutkować rozwojem pierwotnego klonu komórek zmutowanych, który podlega dalszej ewolucji, czyli nawarstwieniu się skutków mutacji wtórnych, powstaniu stanów przednowotworowych i progresji ich do nowotworu. Te mutacje, które uzłośliwiają podklon noszą nazwę kierunkowych (z indukcją onkogenu), a te mutacje, które pogłębiają uzłośliwienie – modyfikującymi. Te drugie powodują niewrażliwość klonu na czynniki toksyczne, w tym leki (25). W komórkach macierzystych szpiku kostnego u ludzi obserwowano kumulację mutacji somatycznych indukującą powstanie klonów leukocytów we krwi krążącej z mutacjami w genach odpowiadających za białaczki (*DNMT3A* lub *TET2*) (25).

Powstawanie i utrwalenie się mutacji w DNA komórek (mutageneza) jest podstawowym czynnikiem zmienności organizmu i procesów ewolucyjnych. Mutacje są zatem substratem ewolucji i czasem są korzystne, ponieważ organizmy wykorzystują dla siebie tylko najbardziej wartościowe z nich, co wynika z darwinowskiej selekcji naturalnej. Taką cechą posiadają też komórki nowotworowe zdolne, podobnie jak wszystkie żywe komórki, do autoreplikacji. Niemniej zmutowany gen nowotworowy, np. „gen egoistyczny”, który nie odnosi sukcesu w ewolucji i sam nie utrzuca swej nieśmiertelności, jest prawdopodobnie powodem mutacji pozbawionej wartości przystosowawczej komórek nowotworowych. Nowotwór ulegając takiej mutacji, zginie, ale nawet, gdyby ją utrzymał, to i tak

nie ma przyszłości, gdyż jest tylko „życiem w obrębie życia” i obumrze wraz z makroorganizmem. Podobnie jest z mechanizmem różnicowania się komórek na komórki potomne (specjacja) i gradualizmem, tj. stopniowością przemian ewolucyjnych. Jednocześnie należy wspomnieć, że istnieje pojęcie rewersji mutacji, tj. przywrócenia pierwotnego fenotypu, jaki może być wynikiem mutacji wtórnej w tym samym miejscu genu i odzyskania pierwotnej jego struktury lub jest ona wynikiem supresji mutacji, np. przez supresory (17).

Istnieje 450 000 HER-ów (human endogenous retroviruses), tj. 31 fragmentów antycznych wirusów, stanowiących łącznie 8% ludzkiego genomu i będących reliktem w komórkach po zakażeniu ich przodków ok. 40-100 milionów lat temu (26). Są one m.in. odpowiedzialne za produkcję białka syncytyny, biorącego udział w powstaniu komórek syncytialnych (wielojądrzastych), z których zbudowany jest łożyskowy syncytiotrofoblast (stąd jego nazwa). Brak aktywności genu syncytyny, powstałego na podstawie wspomnianego antycznego RNA retrowirusa, może prowadzić do rozwoju raka łożyska (*choriocarcinoma*, *chorioepithelioma*). Jest on zbudowany z dwu rodzajów komórek, tj. komórek syncytiotrofoblastu i komórek cytotrofoblastu o zdolności produkcji hCG (human chorionic gonadotropin – ludzkiej gonadotropiny łożyskowej) (3). Nowotwór ten zawiera alloantygeny (izoantygeny) uwarunkowane genami ojca, ponieważ nabłonek łożyska otrzymuje antygeny zgodności tkankowej od obojga rodziców. W takiej sytuacji odpowiedź immunologiczna matki korzystnie współpracuje z chemioterapią i nowotwór łatwo jest wyleczyć. Niezależnie od tego prawdopodobnie wirusy HER hamują ekspresję cząsteczek MHC w łożysku, co prowadzi do tolerancji maczynopłodowej, a ponadto, np. HER-K18 kodujący superantygen może ulec nadekspresji w przypadku infekcji przez RNA wirusa EBV (28). Superantygen wymusza wzrost produkcji białek prozapalnych przez komórki układu immunologicznego, gdyż jest aktywatorem komórek T, wiążąc się z ich receptorem oraz z cząsteczką głównego antygeny zgodności tkankowej MHC II obecnych na komórkach prezentujących antygen.

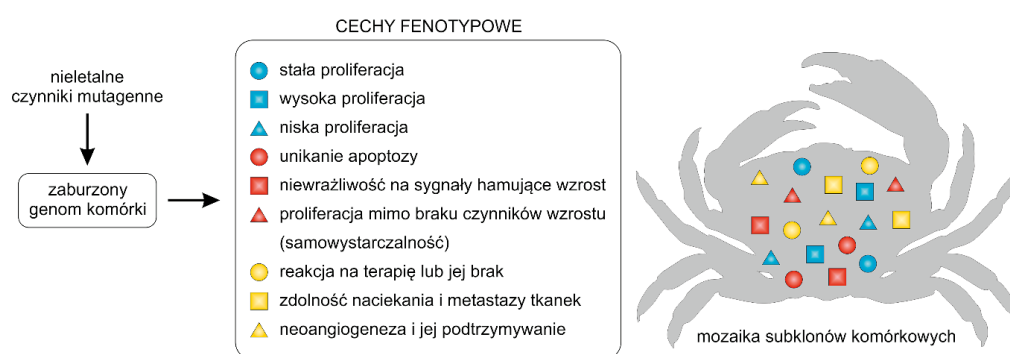
Endogenne retrowirusy świń (PERV) można przenieść drogą transplantacji komórek świni do myszy pozbawionych odporności (3). U ludzi sekwencje HERV wiąże się z rozwojem schizofrenii. Inne wirusy endogenne, np. prowirusowe sekwencje z sekwencjami genów zbliżonych do HTLV (human T leukemia virus), wirus mysiego guza sutka i innych retrowirusów obecnych u ludzi, nie wykazują cech replikacji z powodu usunięcia lub insercji końcowych kodonów, względnie z powodu niskiego stopnia transkrypcji (26). Hypermutacji i inaktywacji cDNA retrowirusów dokonuje np. enzym APOBEC3 (3).

O ile genotyp komórek nowotworowych ulega licznym zmianom, np. kumulacji aberracji strukturalnych i liczbowych chromosomów, o tyle fenotyp ich

jest podobny (11). Niemniej cechy fenotypowe (cechy struktury i funkcji) komórek nowotworowych stale zmieniają się od momentu wykrycia choroby nowotworowej (np. zdolność do metastazy, czy pojawienie się oporności na cytostatyki) (ryc. 5). Jest to wynik kolejnej selekcji klonów komórek nowotworowych pod wpływem dodatkowych mutacji,

ponieważ fenotyp zdeterminowany jest m.in. genotypem, warunkami środowiska i podłożem (macierzą jądra komórkowego) (13). Do hipotetycznych funkcji macierzy należy m.in. udział jej w procesie replikacji DNA, w regulacji ekspresji genów, w transkrypcji i dojrzewaniu pre-rRNA, w wirowaniu (fosforylacji białek wirusowych), a także wiązaniu kancerogenów (28). Z komórki prawidłowej po jej podziale, powstaje komórka taka sama, chociaż nie ta sama, jak rodzicielska (z wyjątkiem komórek macierzystych zdolnych do samoodnowy w podziale asymetrycznym), natomiast w nowotworach złośliwych nie jest to ani ta sama, ani taka sama komórka jak rodzicielska, ale z reguły inna (heterologiczna). Po kolejnym podziale powstaje znów inna komórka, a więc można założyć, że właściwie nie ma dwu identycznych komórek nowotworowych w przypadku nowotworu złośliwego. Taka heterogenność wynika prawdopodobnie z licznych mutacji, kumulujących się w różnych komórkach i generujących różne ich subpopulacje, np. nieantygenowe, inwazyjne, metastatyczne czy wymagające mniej czynników wzrostu (27). Pod wpływem układu odpornościowego subklony te podlegają selekcji pod kątem najlepiej „przydatnych” dla rosnącego nowotworu. Nieprawidłowości w genomie, konieczne do zmiany fenotypu z prawidłowego na nowotworowy, tworzą tzw. tor mutacyjny. W procesie tym obserwuje się zmiany w genach kierujących (driver genes), których liczba wynosi > 200, np. gen *TP53*, który jest uszkodzony w > 50% wszystkich komórek nowotworowych, a także zmiany w tzw. genach towarzyszących (passenger genes). Geny te, mimo że wpływają na fenotyp nowotworowy, nie indukują jego transformacji (25). W kolejnym etapie komórki podlegają promocji i dochodzi w nich do zmian w chromosomach (translokacji, delecji, duplikacji lub inwersji), a nawet aneuploidii. Efektem są subklony komórek nowotworowych tworzących mozaikę, z których powstaje wyselekcjonowany guz *in situ* o łącznej liczbie komórek  $10^6$ - $10^7$ . Kolejnym etapem jest progresja, czyli dalsza selekcja coraz bardziej złośliwych klonów, co m.in. uwarunkowane jest sprawnością neoangiogenezą (22, 28).

Do zmian epigenetycznych z kolei zalicza się np. zjawisko metylacji DNA, głównie w genie *CDH1* (*cadherin1*), kodującym kadherynę (29). Gen ten, ule-



**Ryc. 5. Heterogenność fenotypowa komórek nowotworu złośliwego jako wynik ich proliferacji**

gając hipermetylacji na początku onkogenezy, a także zmodyfikowaniu w okresie progresji nowotworowej, może powtórnie ulec reekspresji, np. w ognisku przerzutowym lub w węźle chłonnym wartowniczym. Oznacza to, że zmiany epigenetyczne uczestniczą w transformacji nowotworowej, wpływając na ekspresję genów i destabilizację genomu (20). Dokładnie korelację pomiędzy zmianami fenotypowymi a genotypowymi związanymi z mutacjami genu *Ret*, kodującego kinazę tyrozynową receptorową opisano w dwu niezależnych grupach dziedzicznych nowotworów u ludzi, tj. w zespołach MEN I i MEN II (multiple endocrine neoplasia) (17).

W procesie metastazy komórka nowotworowa „macierzysta”, tzw. krążąca CTC (circulating tumor cell), przystosowuje się do zmieniających się warunków w naczyniu krwionośnym oraz poza nim od komórki nabłonkowej, np. w przypadku raka sutka, do komórki mezenchymalnej lub klastru (zlepu komórek nowotworowych) i *vice versa*. Określa się to mianem przejścia nabłonkowo-mezenchymalnego (ETM) i odwrotnie – przejścia mezenchymalno-nabłonkowego (ETM), sterowanego przez geny *PAX2*, *BMP7* i *WT1* (25). Wymienione komórki mają zatem różne fenotypy, np. inną ekspresję kadheryn E i N (28). Jednocześnie w przerzutach dochodzi często do wzrostu liczby komórek z zaburzeniami genetycznymi o bardziej złośliwym fenotypie, a nawet występują dwa odmiennie proliferujące typy komórek, w porównaniu z guzem pierwotnym, jak również nasila się lekooporność. Ostatnio dopuszcza się nawet istnienie drugiej drogi indukcji nowotworu *in situ* w takich tkankach. Źródłem nowotworu mają być „komórki macierzyste” powstałe w wyniku genetycznego zaprogramowania procesu odróżnicowania komórek posiadających fenotyp nowotworowy (25). To właśnie stan niezróżnicowania tych komórek i ich zdolność do proliferacji prowadzą do onkogenezy.

Obserwuje się również zjawisko odwrotne, tzn. cechy fenotypowe komórek nowotworowych mogą *in vitro* ulec regresji pod wpływem np. cAMP, BudR (deoksybromourydyny), DSMO (dimetylosulfotlenku), witaminy A i jej pochodnych (26). Ponadto zauważono, że komórki o fenotypie „nowotworowym” mogą być eliminowane, np. przez białko p53 czy czynnik regu-



lujący interferony 1 (gen *IRF1*), co ma miejsce u ludzi w białaczkach i zespołach mielodysplastycznych – MDS. U takich pacjentów wykryto mutacje genu *TP53* lub też delecje genu *IRF1* (22), stąd cechy fenotypowe, a nie genotypowe decydują o morfologicznej ocenie guza nowotworowego. Z heterogenności histologicznej nowotworów wynika bowiem różnorodny charakter ich różnicowania się, a ten determinuje sposób terapii i rokowanie kliniczne. I tak nowotwory o znacznej anaplazji rokoją gorzej aniżeli nowotwory o wysokim stopniu zróżnicowania.

### Piśmiennictwo

- Caruso R. A., Fedele F., Finocchiaro G., Arena G., Venuti A.: Neutrophil – tumor cell phagocytosis (canibalism) in human tumors: an uptake and literature review. *Exp. Oncology* 2012, 36, 306-311.
- Cui M., Augert A., Rongione M., Conknete K., Parazzoli S., Nikitin A. Y., Ingolia N., MacPherson D.: PTEN is a potent suppressor of small cell lung cancer. *Mol. Cancer Res.* 2014, 12, 654-659.
- Gołqb J., Jakóbisiak M., Lasek W., Stokłosa T.: *Immunologia*. PWN, Warszawa 2007.
- Hientz K., Mohr A., Bhakta-Guha D., Efferth T.: The role of p53 in cancer drug resistance and targeted chemotherapy. *Oncotarget* 2017, 8, 8921-8946.
- Holliday R.: *Understanding Ageing*. Cambridge Univ. Press 1995.
- Hurley J. H., Young L. N.: Mechanisms of autophagy initiation. *An. Rev. Biochem.* 2017, 86, 225-244.
- Jiang P., Mizushima N.: Autophagy and human diseases. *Cell Res.* 2014, 24, 69-79.
- Kroemer G., Perfettini J. L.: Entosis, a key player in cancer competition. *Cell Res.* 2014, 24, 1280-1281.
- Kruppa K. J., Liv Y., To C., Zhang T., Fan M., Vajdi A., Knelson E. H., Xie Y., Lim K., Cejas A.: Treatment-induced tumor dormancy through YAP-mediated transcriptional reprogramming of the apoptotic pathway. *Cancer Cell* 2020, 37, 104-122.
- Lamperska-Przybysz M., Motyl T.: Autofagia – narzędzia przeżycia czy śmierci komórek nowotworowej? *Post. Biol. Kom.* 2005, 32, 13-22.
- Madej J. A.: Fenotyp komórki nowotworowej – model komputerowy. *Med. Weter.* 2004, 60, 803-807.
- Madej J. A.: Śmierć komórek (organizmu) i koncepcje ich „nieśmiertelności”. *Med. Weter.* 2015, 71, 713-720.
- Madej J. A.: Kanibalizm nowotworowy oraz propozycja zmian terminologii niektórych nabłonkowców. *Med. Weter.* 2018, 74, 156-160.
- Madej J. A.: Udział zapalenia starczego w procesie onkogenezy. *Med. Weter.* 2019, 75, 78-87.
- Madej J. A.: Proces onkogenezy opisany przy pomocy wzorów matematycznych. *Med. Weter.* 2021, 77, 375-383.
- McLenann A., Turner P., Bates A., White M.: *Krótkie wykłady. Biologia molekularna*. PWN, Warszawa 2021.
- Nowa encyklopedia powszechna*. PWN, Warszawa 1997. Tom 4, s. 588, Tom 5, s. 650.
- Pearson J. D., Huang K., Pacal M., Wrona J. L., Goodrich D., Brenner R.: Binary pan – cancer classes with distinct vulnerabilities defined by pro- or anti- cancer YAP/TEAD activity. *Cancer Cell* 2021, 39, 1115-1234.
- Polewska J.: Autofagia – mechanizm molekularny, apoptoza i nowotwory. *Post. Hig. Med. Dośw.* 2012, 66, 921-936.
- Robinson J. T., Thorvaldsdottir H., Winckler W., Guttman M., Lander E. S., Getz G., Mesirov J. P.: Integrative genomics viewer. *Nat. Biotechnol.* 2011, 29, 24-26.
- Sawicki W., Malejczyk J.: *Histologia*. PZWL, Warszawa 2012.
- Stine Z. E., Walton Z. E., Altman B. J., Hsieh A. L., Dang C.: MYC. *Metabolism and cancer*. *Cancer Discov.* 2015, 5, 1024-1039.
- Stradowska T.: Peroksysomy – funkcje i zaburzenia metaboliczne. *Post. Biochem.* 2011, 43, 477-496.
- Szarski H.: *Mechanizmy ewolucji*. Wyd. 4. Warszawa 1989.
- Szczeklik A., Gajewski P.: *Medycyna Praktyczna*. Kraków 2021.
- Youle R., Strasser A.: The Bcl-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Rev. Mol. Cell Biol.* 2008, 9, 47-59.
- Webb C. P., Van de Woude G. F.: Genus that regulate metastases and angiogenesis. *J. Neurooncol.* 2000, 50, 71-77.
- Zabel M., Kawiak J. (red.): *Seminaria z cytofizjologii*. Wyd. 3. Urban and Partner Edra 2021.
- Qin J., Zhu Y. Q., Luo J., Tao W. H.: Hypermethylation and expression regulation of secreted frizzled related protein genes in colorectal tumor. *Word J. Gastroenterol.* 2006, 12, 7113-7117.
- Zhou Z., Fleksen-Nikitin A., Corney D. C., Wang W., Goodrich D. W., Roy-Bunnann P., Nikitin A. Y.: Synergy of p53 and Rb deficiency in a conditional mouse model for metastatic prostate cancer. *Cancer Res.* 2006, 66, 7889-7898.

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