

ANTONI HORST

*Zakład Genetyki Człowieka PAN,
Strzeszyńska 32, 60-479 Poznań,*

PRODUKTY GENÓW PRZECIWNOWOTWOROWYCH

Choroby nowotworowe, jedna z głównych przyczyn śmierci nowoczesnych społeczeństw, zdaje się wchodzić w nową erę badań. O ile dotychczasowe badania dotyczyły głównie pozaustrojowych czynników kancerogennych, to obecne badania ukierunkowują się na podatność lub odporność organizmu na powstawanie procesu nowotworowego. Są to badania skoncentrowane na molekularnych czynnikach własnych organizmu, pobudzających wzrost nowotworowy, lub hamujących ten proces. Obecnie przyjmuje się, że do powstania procesu nowotworowego przyczynia się z jednej strony nadmiar czynników pobudzających wzrost nowotworowy lub z drugiej strony — niedobór czynników hamujących ten proces.

ONKOGENY

Liczbę onkogenów, czyli czynników wpływających na powstanie raka określa się obecnie na ponad 100. Powstaje pytanie — skąd się biorą onkogeny i czym one są? Badanie genomu człowieka wykazało, że zawiera on znaczną liczbę proto-onkogenów (czyli substancji, z których mogą powstawać onkogeny), których rola w organizmie nie została do końca wyjaśniona, a które pod wpływem mutacji, powodującej ich uaktywnienie, mogą spowodować powstanie raka. Najczęstszym źródłem powstania onkogenów są prawdopodobnie retrowirusy, to jest wirusy, których informację genetyczną stanowi RNA, a nie DNA. Z kolei, dzięki odwrotnej transkryptazie RNA wirusa ulega transkrypcji na DNA, następnie jest wbudowany do DNA człowieka jako jego integralny składnik genomu; podczas podziału komórki składnik ten ulega powielaniu (reduplikacji) i podobnie jak macierzysty, komórkowy DNA przechodzi do komórek potomnych. Z reguły ten fragment DNA, stanowiący tak zwany proto-onkogen, nie jest aktywny i nie powoduje żadnej choroby do czasu, kiedy wskutek mutacji dochodzi do jego uaktywnienia i produkcji białek zawartych w genomie wirusa, powodujących proliferację i transformację nowotworową komórki. Najczęściej występujące onkogeny retrowirusowe przedstawiono w tabeli 1.

Również DNA-wirusy mogą działać kancerogennie poprzez swoje produkty. Do najlepiej poznanych należą: adenowirusy, wirusy papowa i opryszczki. Transformujący region wirusów polyoma koduje 3 białka, składające się na duży, średni i mały antygen T, z tego duży antygen T powoduje nieograniczony wzrost

Tabela 1.

Onkogeny retrowirusowe i ich homologi komórkowe

Retrowirusowe	Białko wirusowe	Homolog komórkowy	Nowotwór	Gatunek
<i>v-sis</i> (Simian sarcoma virus)	p28 ^{sis}	łańcuch B PDGF	mięsak	małpa wełnista
<i>v-src</i> (Rous sarcoma virus)	pp60 ^{v-src}	pp60 ^{v-src}	mięsak	kura
<i>v-fes</i> (St-feline sarcoma virus)	p85 ^{gag-fes}	p92 ^{c-es}	mięsak	kot
<i>v-abl</i> (Abelson Murine leukemia virus)	120 ^{gag-abl}	p150 ^{c-abl}	białaczka	mysz, kot
<i>v-erbA</i> (Avian erythroblastosis virus)	gp65 ^{erbA}	skrócony receptor EGF	erytroleukemia	kura
<i>v-erbB</i> (Avian erythroblastosis virus)	gp65 ^{erbB}	skrócony receptor EGF	mięsak	kura
<i>v-myc</i> (Avian myelomatosis virus)	p101 ^{gag-myc}	p58 ^{c-myc}	rak, mięsak, szpiczak	kura
<i>v-H-ras</i> (Harvey murine sarcoma virus)	p21 ^{v-Ha-ras}	p21 ^{c-Ha-ras}	mięsak, erytroleukemia	mysz, szczur
<i>v-K-ras</i> (Kirsten murine sarcoma virus)	p21 ^{v-K-ras}	p21 ^{c-K-ras}	mięsak, erytroleukemia	mysz
<i>v-N-ras</i>		p21 ^{c-N-ras}	neuroblastoma, białaczka, mięsak	człowiek

Różnorakie działanie komórkowych onkogenów:

p58^{c-myc} — reguluje transkrypcję, powoduje unieśmiertelnienie i transformację (nowotworową) komórek w hodowli
 p21^{c-Ha-ras} — wiążąc GTP lub GDP poprzez ich hydrolizę reguluje aktywność kinazy adenylanowej — hydroliza powoduje inaktywizację białek ras, związanych z błoną komórkową — następuje zahamowanie bodźców przezbiłonowych cyklazy adenylanowej ze zniesieniem aktywności kinazy tyrozynowej. Mutacja p21 (w poz. 12) z powodu niemożności hydrolizy powoduje stałe związanie GTP z błoną komórkową, powodując permanentną aktywację cyklazy adenylanowej, prowadzącą do powstania raka pęcherza moczowego.

z jednoczesnym zmniejszeniem zapotrzebowania na czynniki wzrostu, średni wpływa na transformację nowotworową, natomiast rola małego antygeny nie jest znana. Podobnie duży antygen T wirusa SV40 wpływa również na transformację nowotworową komórek.

Główne mechanizmy działania proto-onkogenów sprowadzają się do fosforylacji białek odgrywających podstawową rolę w cyklu komórkowym; do wpływu na

transmisję sygnałów dla czynności komórek (np. onkogeny ras, które w niekontrolowany i permanentny sposób powodują stałe pobudzenie komórki do proliferacji) oraz do wpływu na transkrypcję DNA, czyli aktywację genów (np. proto-onkogeny *myc*, *fos*, *jun*, *myb* i inne). Oddzielną grupę czynników powodujących proces nowotworowy stanowi nadmiar czynników wzrostu (np. EGF, PDGF, NGF, interleukiny i wiele innych) lub niedobór produktów genów przeciwnowotworowych, których główni przedstawiciele wpływają na ten proces poprzez cykl komórkowy (BISHOP 1991, CROSS i DEXTER 1991, CANTLEY i współaut. 1991).

CYKL KOMÓRKOWY

Najbardziej charakterystyczną cechą wzrostu nowotworowego jest niepohamowana proliferacja określonej grupy komórek, nie poddająca się mechanizmom kontrolnym i prowadząca kosztem innych komórek do wyniszczenia organizmu i śmierci. Są wprawdzie jeszcze inne cechy wzrostu nowotworowego, jak zdolność do tworzenia przerzutów, kiedy komórki odrywające się od pierwotnego nowotworu przechodzą do różnych narządów, w których również ulegają nadmiernej i niekontrolowanej proliferacji.

Proliferacja normalnych komórek odbywa się w bardzo złożonym procesie, zwanym cyklem komórkowym, odbywającym się w miarę potrzeby pod ścisłą kontrolą mechanizmów regulacyjnych, pozwalających jedynie na uzupełnienie powstałych ubytków. Proliferacja komórek, podobnie jak ogólna przemiana materii, należy do niezbędnych atrybutów żywych tkanek. Spośród komórek normalnego wielokomórkowego organizmu jedne są krótko żyjące (np. komórki krwi żyjące niekiedy do kilku godzin, dni lub miesięcy — brak proliferacji tych komórek w krótkim czasie musi prowadzić do śmierci całego organizmu — przykładowo erytrocyty żyją w najlepszym razie tylko do 3 miesięcy i stąd brak proliferacji erytrocytów w ciągu niecałych 3 miesięcy musiałby prowadzić do śmierci organizmu). Inne komórki dzielą się, czyli proliferują jedynie wyjątkowo (typowym przykładem są komórki wątroby, które proliferują dopiero na skutek wycięcia części komórek wątrobowych, przy czym proliferacja tych komórek odbywa się tylko dopóty, dopóki nie nastąpi przywrócenie pierwotnej wielkości i kształtu wątroby, po czym dotąd nie znane czynniki kontrolne zatrzymują dalszą proliferację tych komórek) i wreszcie zróżnicowane komórki nerwowe, które nigdy nie proliferują.

Właściwe poznanie cyklu komórkowego umożliwiło odkrycie w 1971 roku czynnika dojrzewania MPF (maturation promoting factor). Istota tego odkrycia polegała na wykryciu czynnika dojrzewania oocytów dla umożliwienia ich zapłodnienia, a których mejoza została zatrzymana we wczesnym okresie życia płodowego (około 3-go miesiąca życia płodowego), zaś normalne, stopniowe kończenie mejozy następuje dopiero po okresie pokwitania. W 1982 roku wykryto produkt genu *cdc2* (od cell division cycle) w postaci białka $p34^{cdc2}$, które w 1987 roku zostało zidentyfikowane jako kinaza białkowa, przenosząca grupy fosforanowe z ATP na różne białka. Ponieważ poziom $p34^{cdc2}$ podczas całego cyklu jest stały, zaczęto poszukiwania czynnika ulegającego okresowym zmianom w poszczególnych fazach cyklu komórkowego. Czynnikiem tym okazało się

Kluczową rolę w przebiegu cyklu komórkowego odgrywa kinaza $p34^{cdc2}$, skompleksowana z odpowiednią cykliną. Początkowo sądzono, że istnieje tylko jedna cyklina, rychło jednak przekonano się, że prawdopodobnie każda faza cyklu komórkowego jest aktywowana przez swoistą cyklinę. Najwięcej trudności sprawiało poznanie czynników potrzebnych do rozpoczęcia cyklu, czyli STARTu. Dopiero ostatnio okazało się, że czynnikami tymi u ssaków są cykliny z grupy D, głównie cyklina D1 (u drożdży cyklina CLN-3). Cyklina D1 jest najprawdopodobniej identyczna z onkogenem *bcl-1*, to jest czynnikiem, którego nadmiar powoduje powstanie chłoniaków typu B. Z kolei cykliny D2 i D3 hamując proces różnicowania komórek wpływają na dodatkową cechę procesu nowotworowego, polegającą na zahamowaniu różnicowania się komórek. Poza tym aktywatorami cyklu komórkowego są również dawniej poznane czynniki, jak wielkość komórki, składniki odżywiania, czynniki wzrostu EGF, PDGF, NGF i inne.

W początkowej fazie cyklu komórkowego są niezbędne cykliny E i A, które tworzą wraz z $p34^{cdc2}$ odpowiednie kinazy zależne od cyklin E-Cdk2 i A-Cdk2 (ang. cyclin dependent kinase). Napromienianie promieniami gamma ludzkich fibroblastów w fazie G1 powoduje zatrzymanie cyklu komórkowego przed wystą-

Ryc. 1. Schemat działania cyklu komórkowego. Mechanizm napędowy cyklu (przedstawiony w postaci koła grubych strzałek): w fazie G1 pod wpływem syntezy cyklin A i E oraz ich asocjacji z $p34^{cdc2}$ powstaje nieaktywny pre-MPF (tyrozyna w poz. 15 i treonina w poz. 14 uległy fosforylacji); pod wpływem różnych czynników (składniki odżywiania, czynniki wzrostu itp.) oraz niektórych cyklin (np. CLN1-3 u drożdży) występuje „start” inicjujący replikację DNA; czynniki fosforylujące (produkty genów *wee1* i *mik1*) hamują postępowanie cyklu, umożliwiając syntezę DNA, natomiast pod wpływem czynników defosforylujących (fosfataza *cdc25*) i asocjacji cykliny B do $p34^{cdc2}$ następuje przejście pre-MPF w aktywny MPF, powodujący przejście cyklu z fazy G2 do fazy M, w której pod wpływem fosforylacji następuje wytworzenie wrzeciona mitotycznego, kondensacja chromosomów i degradacja otoczki jądrowej; z kolei następuje pod koniec fazy M rozpad cykliny B, powodujący inaktywację MPF, a w następstwie wyjście cyklu z fazy M do fazy G1 z jednoczesną defosforylacją wywołującą segregację i dekondensację chromosomów, degradację wrzeciona oraz reorganizację otoczki jądrowej, po czym może wystąpić następny cykl komórkowy. Wewnętrzny mechanizm kontrolny cyklu (wpisany do koła w środku schematu): na zasadzie sprzężenia zwrotnego w fazie G1/S zmutowany DNA powoduje zatrzymanie cyklu (przy współudziale p53), również na przejściu z fazy G2/M nieukończona synteza DNA powoduje zatrzymanie cyklu (także przy współdziałaniu z p53); zaburzenia organizacji wrzeciona mitotycznego, kondensacji chromosomów i degradacji otoczki jądrowej powodują zatrzymanie cyklu na zasadzie sprzężenia zwrotnego w fazie M, podobnie jak na tej samej zasadzie zaburzenia segregacji i dekondensacji chromosomów, degradacji wrzeciona mitotycznego i reorganizacji otoczki jądrowej powodują zatrzymanie cyklu w początkowej fazie G1. Czynniki kontrolne spoza cyklu (na rysunku na zewnątrz koła grubych strzałek): p105Rb — aktywne w postaci hipofosforylowanej w fazie G1 — hamuje proliferację komórek, po czym hiperfosforylowane, nieaktywne aż do końca cyklu umożliwia proliferację komórek; p53 — strażnik prawidłowego genomu — hamuje cykl komórkowy w fazie G1/S w przypadku zmutowanego DNA lub w fazie G2/M w przypadku niezreplikowanego DNA, aktywuje geny hamujące proliferację komórek, w przypadku zmutowanego DNA może spowodować apoptozę komórki; zmutowany p53 może prowadzić do kancerogenezy. Czynniki transkrypcji E2F jest silnie związany z cyklem, działając w kompleksie z p53, cykliną A i p105Rb.

pieniem fazy S (w fazie S następuje reduplikacja DNA). Blok tej fazy jest spowodowany inaktywacją kinaz E-Cdk2 i A-Cdk2, spowodowaną skompleksowaniem z odpowiednimi inhibitorami, indukowanymi przez białka inhibitorowe p21 i p53.

Wskutek syntezy cyklin A i E oraz łączenia się ich z kinazą p34^{cdc2} powstaje nieaktywny pre-MPF, w którym tyrozyna w pozycji 15 i treonina w pozycji 14 uległy fosforylacji. Pod wpływem dodatkowo działających czynników następuje przejście z fazy G1 do fazy S cyklu komórkowego (faza S — synteza DNA w celu całkowitego podwojenia DNA dla komórek potomnych). Przejście z fazy G1 do S cyklu komórkowego stanowi jego ważny etap decydujący o tym, czy do powielania zostanie przekazany prawidłowo zbudowany DNA, czy też zdefektowany. Od tego bowiem zależy, czy komórka potomna będzie prawidłową, czy też defektywną. Okazało się, że na straży prawidłowości przekazywanego do powielania DNA stoi swoisty mechanizm, w którym ważną a właściwie nawet decydującą rolę odgrywają produkty genów przeciwnowotworowych (p53, p16 i prawdopodobnie jeszcze inne dotąd nie poznane czynniki).

W fazie S dochodzi do całkowitego i wiernego podwojenia zawartości DNA w komórce. Ostatnie badania wykazały, że główną rolę w tej fazie cyklu komórkowego odgrywa kinaza p34^{cdc2}, skompleksowana z cykliną A. Po ukończeniu syntezy DNA cykl komórkowy przechodzi w fazę G2. Przejście do tej fazy odbywa się prawdopodobnie pod wpływem kinazy p34^{cdc2} skompleksowanej z cykliną E.

Od końca fazy G1, poprzez fazy S i G2 kompleks kinazy z cyklinami pozostaje nieaktywny dzięki utrzymywaniu pod wpływem kinaz wee1 i mik1 fosforylacji tyrozyny w pozycji 15 i treoniny w pozycji 14 p34^{cdc2}. Pod koniec fazy G2 pod wpływem fosforylasy cdc25 następuje defosforylacja kinazy p34^{cdc2} i tym samym jej uaktywnienie z jednoczesnym skompleksowaniem z cykliną B — w ten sposób powstaje aktywny czynnik dojrzewania MPF (ang. maturation promoting factor).

Z chwilą utworzenia aktywnego MPF następuje przejście z fazy G2 do fazy M, czyli mitozy. W tej fazie następuje szereg zmian w jądrze komórkowym na skutek przenoszenia grup fosforanowych na składniki jądra, ulegających odpowiedniemu przekształceniu. Dzięki temu następuje organizacja wrzeczona karyokinetycznego, kondensacja chromosomów oraz degradacja otoczki jądra — innymi słowy następuje przygotowanie materiału genetycznego do jego podziału na dwie potomne komórki. Najlepiej z tego jest poznany proces degradacji otoczki jądra, składającej się w głównej mierze z lamin, które wskutek fosforylacji ulegają dysocjacji i tym samym dla umożliwienia podziału następuje degradacja otoczki.

Przejście cyklu komórkowego z fazy G2 do M stanowi, podobnie jak przejście z fazy G1 do S, drugi punkt krytyczny podziału komórkowego. Tym krytycznym elementem jest dokończenie reduplikacji całego materiału genetycznego, gdyż tylko w ten sposób mogą powstać dwie całkowicie identyczne komórki potomne. W przeciwnym razie mogą powstać zdefektowane komórki z powodu utraty niektórych genów — takim klasycznym przykładem jest znane w onkologii zjawisko utraty heterozygotyczności (ang. loss of heterozygosity) prowadzące do powstania nowotworu z powodu utraty genów przeciwnowotworowych. Również i w tym przypadku, podobnie jak przy przejściu cyklu komórkowego z fazy G1 do S, rolę czynnika kontrolnego spełnia produkt genu przeciwnowotworowego p53.

Pod koniec fazy M cyklu komórkowego następuje degradacja cyklin B i A, skompleksowanych z kinazą $p34^{cdc2}$ i tym samym czynnika dojrzewania MPF, a w związku z tym również defosforylacja poprzednio ufosforylowanych elementów jądra komórkowego, czego najdobitniejszym objawem jest ponowne połączenie składników otoczki jądra (lamin) z wytworzeniem nowej otoczki jądrowej, z uprzednią segregacją i dekondensacją chromosomów oraz degradacją wrzecionna kariokinetycznego. Komórka z chwilą zakończenia cyklu komórkowego wchodzi ponownie w fazę G1, trwającą różnie długo w zależności od rodzaju komórek i obecności aktywatorów cyklu — zaś niektóre komórki (np. komórki wątrobowe) wchodzi w fazę Go, z której mogą wejść ponownie w cykl komórkowy dopiero pod wpływem specyficznych czynników.

Według dawniejszych poglądów (MURRAY 1992) zahamowanie cyklu komórkowego w punktach kontrolnych G1-S i G2-M miało polegać głównie na sprzężeniu zwrotnym, kiedy nie dokończona reakcja poprzedzająca na zasadzie inaktywacji enzymów następcej reakcji miała powodować zatrzymanie jej i tym samym zatrzymanie cyklu. Nowsze badania sugerują (NASMYTH i HUNT 1993), że działa tu raczej mechanizm podobny do „tamy (bariery) i śluzy”, kiedy nadmierna akumulacja inhibitora powoduje zatrzymanie cyklu, zaś przewaga czynników aktywujących przepływ, czyli postępowanie cyklu. Stąd tak ważne są zarówno aktywatory, jak i inhibitory cyklu komórkowego.

Zgodnie z nowszymi badaniami postępowanie cyklu komórkowego od fazy replikacji DNA (fazy S) do mitozy jest regulowane przez kompleksy kinazy z odpowiednimi cyklinami: we wczesnej fazie G1 CDK2 skompleksowane z cykliną E, a podczas fazy S CDK2 skompleksowane z cykliną A i wreszcie przejście z fazy G2 do mitozy jest uwarunkowane utworzeniem kompleksu CDK1 z cykliną B. Z kolei w komórkach ssaków zidentyfikowano 4 różne inhibitory: p16, p21, p24 i p27, z tego p24 stanowi homolog fosfataz działających na nie znany dotąd substrat, zaś p27 we współdziałaniu z transformującym czynnikiem TGF- β powoduje blok cyklu komórkowego poprzez hamowanie kompleksu E-CDK2. P16 wiążąc się z D1-CDK2 hamuje start cyklu komórkowego spowodowany uszkodzeniem DNA. P21 zostało zidentyfikowane jako komponent białka jądrowego PCNA (proliferating-cell nuclear antigen) niezbędnego dla proliferacji komórek, występującego we wszystkich normalnych kompleksach CDK, ale nie w komórkach stransformowanych. P21 jest znane pod wieloma nazwami (CIP1, CAP20, SDI1, WAF1). Ogólny schemat działania p21 przedstawia się następująco: uszkodzenie DNA przy współudziale p53 indukuje syntezę p21 (również starzejące się komórki indukują syntezę tego białka), przyczyniając się do zahamowania proliferacji komórek. Pierwotnie p21 działa hamująco na E-CDK w fazie startu cyklu, ale może również działać hamująco na syntezę DNA w jakimkolwiek stadium tej syntezy dzięki związaniu z PCNA (PINES 1994).

Do najdawniej wykrytych inhibitorów kinaz, zależnych od cyklin (CDK), należy transformujący czynnik wzrostu beta (TGF- β) powodujący zatrzymanie cyklu w fazie G1 z powodu inaktywacji E-CDK2 (kinazy zależnej od cykliny E). Badania przeprowadzone na komórkach nabłonka płucnego norki wykazały, że czynnik powodujący zatrzymanie (blok) cyklu komórkowego powstaje pod wpływem TGF- β . Jest to białko o masie cząsteczkowej 27 kDa, nieaktywne

w komórkach nie poddanych działaniu TGF- β (HORST 1993, KIRSCHNER 1992, MCKINNEY i HEINTZ 1991, MURRAY 1992, NASMYTH i HUNT 1994, PINES 1994).

BIĄŁKO P105 RB

Gen siatkówczaka *Rb-1* lub *Rb* został wyizolowany w 1987/1988 roku na chromosomie 13q14 o długości około 200 kpz i składa się z 27 eksonów. Jego mRNA po dokonanych składaniu (splicing) wynosi 4,7 kz. Produktem tego genu jest białko p105Rb o masie cząsteczkowej 105 kDa, zaś w formie ufosforylowanej 114–115 kDa. Białko 105Rb należy do fosfoprotein. Brak aktywnego genu *Rb* występuje przede wszystkim w siatkówczaku, chociaż mniej często również w kostniako-mięsakach (osteosarcoma), w drobnokomórkowym raku płuc, raku sutka, raku gruczołu krokowego i innych. Oprócz delecji całego genu (wskutek utraty całego chromosomu lub fragmentu zawierającego gen *Rb*) mogą występować również mutacje punktowe, które wskutek zaburzenia w składaniu (splicing) mogą prowadzić do utraty całego eksonu, jak to opisano w przypadku raka pęcherza moczowego. Brak pierwszego eksonu genu *Rb* jest stosunkowo częstym zjawiskiem powodującym powstanie raka. Sugeruje się pewną preferencję wystąpienia mutacji *Rb* w ojcowskiej linii germinalnej. Wreszcie są znane też przypadki dziedzicznej delecji chromosomu 13q14 i braku występowania siatkówczaka. Całość powyższych danych sugeruje, że gen *Rb* odgrywa prawdopodobnie bardziej ogólną rolę w powstawaniu raka, aniżeli tylko w odniesieniu do siatkówczaka.

Wykrycie dziedzicznego mechanizmu przenoszenia siatkówczaka (retinoblastoma) stanowi jedno z ważniejszych w onkologii. Początkowo sądzono, że gen siatkówczaka przenosi się z rodziców na potomstwo w trybie dominującym. Pogląd ten obalili KNUDSON (1971) sugerując, że dziedziczy się tylko jeden gen patologiczny, natomiast obecność drugiego prawidłowego genu zapobiega chorobie i dopiero utrata tego drugiego prawidłowego genu, czyli utrata heterozygotyczności (ang. loss of heterozygosity) powoduje wystąpienie siatkówczaka. Drugie ważne spostrzeżenie związane z występowaniem siatkówczaka polega na stwierdzeniu, że nowotwór ten powstaje jedynie u małych dzieci (od 1 do najwyżej 5 lat), kiedy w siatkówce występują retinoblasty, natomiast w późniejszym wieku, kiedy retinoblasty uległy zróżnicowaniu w retinocyty, które już się nie dzielą — nowotwór ten nie występuje. Stąd obecnie przyjmuje się, że w nowotworach wbrew dawniejszym poglądom, nie tyle występuje odróżnicowanie komórek nowotworowych, ile nowotworzeniu uległy komórki niezróżnicowane.

Białko p105Rb jest aktywne jedynie w postaci hipofosforylowanej i to tylko we wczesnej fazie G1 cyklu komórkowego, natomiast w pozostałych fazach S, G2 i M jest ono hiperfosforylowane i tym samym nieaktywne. W stanie hipofosforylowanym p105Rb tworzy kompleksy z białkami onkowirusów (dużym antygenem wirusa SV40, polyomą i innymi). Po związaniu z onkoproteinami białko p105Rb staje się nieaktywne, podobnie jak jego postać hiperfosforylowana, występująca w fazach S, G2 i M cyklu komórkowego. Dla swej aktywności przeciwnowotworowej białko p105Rb wymaga skompleksowania z bliżej nie

znanym białkiem jądrowym. Inaktywacja białka p105Rb umożliwia proliferację komórek, w tym również proliferację komórek nowotworowych.

Fosforylacja białka p105Rb odbywa się pod wpływem kinaz zależnych od cyklin (CDK — ang. cyclin dependent kinases), z których każda jest aktywowana tylko w określonej fazie cyklu komórkowego. Białko to ma 10 miejsc fosforylacji seryny i treoniny. Inicjacja fosforylacji p105Rb następuje pod wpływem cykliny E, pojawiającej się w punkcie startu cyklu przed końcem fazy G1. Również cyklina A wpływa na fosforylację p105Rb, zwłaszcza w fazie S. Wreszcie cykliny D, wpływające na start cyklu komórkowego, wiążą się z białkiem p105Rb w jego specyficznym miejscu wiązania z onkoproteinami. Zmutowane białko p105Rb (często tylko z pojedynczą mutacją w miejscu wiązania onkoprotein) ekstrahowane z niewirusowych nowotworów nie wiąże się z onkoproteinami, jak to występuje w przypadku prawidłowego p105Rb. Zmutowane p105Rb nie wiąże się również z jądrowym białkiem zakotiwczającym, podobnie jak hiperfosforylowane p105Rb, a stając się nieaktywnym nie hamuje proliferacji komórek.

Do najlepiej scharakteryzowanych białek wiążących się z p105Rb należy komórkowy czynnik transkrypcji E2F, który w prawidłowej komórce pośredniczy w ekspresji genów służących wzrostowi komórek w fazie G1. Kompleks p105Rb-E2F występuje tylko w fazie G1 cyklu komórkowego, kiedy p105Rb jest hipofosforylowane. Łączenie się E2F z p105Rb budzi szereg wątpliwości w tłumaczeniu jego roli w hamowaniu proliferacji komórek, zwłaszcza, że białka tworzące kompleksy z p105Rb wykazują duże podobieństwo do wiążących się w tym samym miejscu cząsteczki p105Rb z onkoproteinami i proto-onkogenami. Z kolei jednak p105Rb aktywuje ekspresję czynnika TGF- β 2 o działaniu hamującym proliferację komórek (TGF — ang. transforming growth factor — czynnik powodujący transformację komórek). Wiążąc się z cykliną A tworzy się kompleks wpływający na transkrypcję w fazie S cyklu komórkowego. Białko o zbliżonej strukturze — p107, tworząc kompleksy z onkoproteinami (antygeny T wirusów SV40 i polyoma) oraz cykliną A i E2F, stanowi czynnik wpływający na transkrypcję, będący prawdopodobnie swoistym antagonistą białka p105Rb, hamującym transkrypcję (COBRINK i współaut. 1992, HAMEL i współaut. 1992).

BIAŁKO P53

Białko p53 zostało wykryte w 1979 roku, a ponieważ było skompleksowane z antygenem T SV40, kompleks ten miał działanie onkogeny. Dopiero w 10 lat później Levine wykazał, że zmutowane p53 jest onkogenem, natomiast niezmutowane jest silnym czynnikiem przeciwnowotworowym (LEVINE i współaut. 1991). Odtąd nastąpiło olbrzymie zainteresowanie białkiem p53, ukazały się tysiące prac na ten temat, a znane pismo naukowe *Science* ogłosiło je molekułą roku 1993. Delekcje lub mutacje p53 wykryto w licznych nowotworach (raki płuc, jelit, przełyku, a zwłaszcza różnego rodzaju raki, mięsaki i białaczki w zespole Li-Fraumeni'ego).

Heterozygotyczny gen p53 znajduje się na ramieniu krótkim ludzkiego chromosomu 17-ego. Do nowotworzenia dochodzi podobnie jak w przypadku siatkówczaka (retinoblastoma) na skutek utraty heterozygotyczności, to jest

mutacji lub utraty prawidłowego allela tego genu przy istniejącym (dziedziczenie) zmutowanym pozostałym allelu. Do najczęściej stwierdzonych mutacji tego genu należą delecje lub mutacje punktowe powodujące przesunięcia „ramy odczytu”, wskutek czego dochodzi do syntezy białka nieprawidłowego lub o skróconym łańcuchu z powodu pojawienia się sygnału „stop”, powodującym syntezę jedynie początkowych nieaktywnych fragmentów tego białka.

Wprowadzenie p53 typu „dzikiego” do hodowli komórek nowotworowych powoduje zahamowanie wzrostu tych komórek w fazie G1 lub M cyklu komórkowego. Fibroblasty szczurze transformowane przez wrażliwe na temperaturę mutanty p53 przestają rosnąć, nie dochodząc do fazy S cyklu. W temperaturze 37°C–39, 5°C wymienione mutanty znajdują się w cytoplazmie, natomiast w temperaturze 32°C w jądrze komórkowym, gdzie zachowują się jak typ „dziki”, powodując zahamowanie wzrostu komórek nowotworowych. Sugeruje się, że w tym wypadku obniżenie temperatury spowodowało prawdopodobnie przewagę transkrypcji allelu „dzikiego” nad zmutowanym.

Wobec gromadzenia danych o defektach genu białka p53, dowodzących niemal powszechnego występowania tego zaburzenia w nowotworach — pytanie dlaczego tak się dzieje, stanowiło jeden z podstawowych problemów do rozwiązania. Już pierwsze obserwacje dowodziły, że inaktywacja p53 występowała na skutek jego skompleksowania z różnymi onkoproteinami (antygen T wirusa SV40, adenowirus E1b, papilloma E6 i inne). Bezpośredniego dowodu dostarczyło badanie ludzkiego homologu mysiego białka MDM2 (dominujący transformujący onkogen), zmapowanego na ludzkim chromosomie 12. Okazało się, że w około jednej trzeciej przypadków wystąpiła jego amplifikacja, powodując wskutek skompleksowania produktu tego genu z białkiem p53 inaktywację tego ostatniego. Swoją funkcję przeciwnowotworową pełni białko p53 dzięki związaniu z DNA, wpływając regulująco na transkrypcję. Miejszem zadziałania p53 w pierwszym rzędzie jest faza G1 cyklu komórkowego, w której następuje zatrzymanie cyklu w przypadku zmutowanego DNA — dzięki czemu występujące opóźnienie przejścia cyklu z fazy G1 do S, czyli reduplikacji DNA, umożliwia jego reparację. W razie niemożności reparacji, również dzięki udziałowi p53, dochodzi do apoptozy, czyli zaprogramowanej śmierci komórki. Ta czynność białka p53 zdaniem niektórych badaczy predestynuje białko p53 do roli „strażnika” prawidłowego genomu, zapobiegającego przekazywaniu zdefektowanego DNA do reduplikacji w fazie S cyklu komórkowego i tym samym do wyprodukowania komórek potomnych o nieprawidłowym DNA, prowadzącym do powstawania komórek niezdolnych do wykonywania prawidłowej funkcji lub do procesu nowotworowego z powodu utraty mechanizmów regulujących proliferację komórek potomnych.

Doniosła rola p53 występuje również w drugim punkcie cyklu komórkowego, mianowicie w przejściu z fazy G2 do M, czyli mitozy. W razie nie dokończony syntezy DNA w fazie S następuje zatrzymanie cyklu komórkowego, gdyż komórki potomne mogłyby być pozbawione pewnych genów, na przykład genów produkujących białka przeciwnowotworowe (jak p53, p105Rb i innych). Innymi słowy powstałaby sytuacja opisana w przypadku siatkówczaka w postaci utraty heterozygotyczności, prowadzącej do powstania raka. Tak więc rola p53, polegająca na zapobieganiu powstawania nowotworów, sprowadza się do działania na

dwóch punktach cyklu komórkowego, to jest w punkcie przejścia z fazy G1 do S, gdzie czynność p53 polega na zapobieganiu syntezy zdeformowanego DNA oraz na przejściu z fazy G2 do M, kiedy czynność p53 znów sprowadza się do zatrzymania cyklu komórkowego dla zapobiegnięcia utraci heterozygotyczności z powodu nie dokończonego podwojenia DNA w fazie S (HORST 1993).

Tetramer p53 znajduje się w sąsiedztwie genów produkujących czynniki transkrypcji genów hamujących proliferację i inwazyjność komórek. Stąd mutacje p53, powodując zmniejszoną ekspresję genów produkujących czynniki hamujące proliferację, przyczyniają się do proliferacji i inwazyjności komórek nowotworowych. Mutacje z przesunięciem ramy odczytu, powodującym całkowity brak białka p53, opisano w licznych przypadkach raka, których główną przyczyną wydaje się być brak czynników hamowania proliferacji. U zwierząt całkowicie pozbawionych genu p53, w odróżnieniu od braku białka p105Rb, u których występują zaburzenia rozwojowe, rozwój zarodków jest prawidłowy, natomiast w bardzo wysokim odsetku występują nowotwory, prowadzące do wczesnej śmierci tych zwierząt.

Nowsze badania wykazały, że pod wpływem białka p53 powstaje białko o masie cząsteczkowej 21 kDa (p21) znane pod różnymi nazwami. Ostatnio sugeruje się nazwę PIC1 (ang.: p53 regulated inhibitor of CDKs). Istnieje szereg danych, że PIC1 tworząc stabilny trójskładnikowy kompleks wiąże CDK2 związane z cyklinami D1, A i E. W stransformowanych komórkach PIC1 nie występuje, umożliwiając reakcje CDK na negatywne sygnały wzrostowe, prowadzące do powstania nowotworu. W starzejących się komórkach poziom mRNA dla PIC1 wzrasta 10–20-krotnie, podobnie w komórkach przechodzących w stan spoczynkowy. Nadprodukcja PIC1 hamuje wzrost różnych ludzkich komórek nowotworowych. Działanie PIC1 może być zniwelowane przez nadmiar dużego antygeny T wirusa SV40 (PINES 1994).

Następne białko inhibitorowe cyklu komórkowego CIP2, zwane również CDI1, wykryto poprzez jego wiązanie z CDK2 (lub CDC2) o masie cząsteczkowej 24 kDa i budowie pokrewnej z fosfatazą cdc25, aktywującą cykl komórkowy poprzez aktywację czynnika MPF (powoduje przejście pre-MPF w MPF). mRNA CIP2 pojawia się w późnej fazie G1, a jego nadprodukcja powoduje opóźnienie cyklu w fazie G1 (zbadane na komórkach HeLa i komórkach drożdży) (PINES 1994).

WT1 (ANG. WILMS TUMOR GENE PRODUCT)

Oprócz produktów genów przeciwnowotworowych p53 i p105Rb, również Wt1, delecja produktu genu zlokalizowanego na chromosomie 11p13, powoduje powstanie nowotworu nerek (*nephroblastoma*) poprzez działanie na czynnik transkrypcji. Białko WT1 rozpoznaje tę samą sekwencję DNA (5'-CGCCCCCGC-3') co białko EGR-1 (od ang. extracellular signal regulated kinases), którego akumulacja w jądrze komórkowym wpływa na transkrypcję czynników aktywujących mitogenezę i różnicowanie komórek nerkowych (*nephroblastów*) oraz tkanek gonadalnych. Kontrola transkrypcji przez WT1 polega na jego skompleksowaniu z EGR, powodując poprzez jego represję kontrolę transkrypcji. Następstwem braku produktu genu *WT1* jest powstanie nowotworu nerki (*nephroblastoma*).

BIAŁKO P16

W 1992 roku grupa Skolnicka wykazała, że segment chromosomu 9p21 zawiera gen, którego delecja powoduje powstanie czerniaka skóry. Kiedy sekwencjonowano ten fragment okazało się, że fragment ten zawiera już wcześniej poznaną sekwencję (1993 r.) kodującą białko p16, które wiążąc się z kinazą zależną od cyklin CDK4 powodowało zatrzymanie cyklu komórkowego w fazie G1 przed jego startem. Na szczególną uwagę zasługuje supresorowe działanie p16 na znaczną liczbę nowotworów, stąd obecne we fragmencie chromosomu 9p21 geny określono jako MTS1 i MTS2 (od ang. multiple tumor suppressor 1 i 2). W szeregu hodowlach ludzkich komórek nowotworowych (glejaków, raków pęcherza, piersi, jajnika, nerek, płuc, czerniaka skóry, białaczki i innych) wykazano delecje lub inne zmiany w segmencie chromosomu 9p21, co wskazuje na bardziej generalny mechanizm działania przeciwnowotworowego białka p16 (KAMB i współaut. 1994, NOBORI i współaut. 1994).

Przyjmując liczbę znanych już przeszło 100 onkogenów, szacuje się istnienie około połowy tej liczby również produktów genów przeciwnowotworowych. Do mniej poznanych należą:

TGF- β (transforming growth factor beta), którego działanie przeciwnowotworowe polega na zatrzymaniu cyklu komórkowego w późnej fazie G1 z powodu hamowania utworzenia kompleksu cykliny E z kinazą 2 (CDK2), czego następstwem jest brak fosforylacji białka p105Rb powodującej zatrzymanie cyklu.

Szczególny przypadek stanowią nowotwory jelita grubego, wśród których trzeba wyróżnić nowotwory powstające na bazie genu APC rodzinnej polipowatości (familial adenomatous polyposis — FAP), gdzie sugeruje się utratę co najmniej kilku genów zlokalizowanych na różnych chromosomach, co poprzez stopniowe zmiany prowadzi do powstania raka — i tak utrata genu APC na chromosomie 5p21 prowadzi do FAP, następnie mutacja onkogenu ras prowadzi do powstania gruczolaka II stopnia, po czym utrata genu *DCC* (ang. deleted in colorectal carcinoma) na chromosomie 18 prowadzi do powstania gruczolaka III stopnia i wreszcie utrata genu *p53* na 17 chromosomie prowadzi do powstania raka. Tak więc transformacja rodzinnej polipowatości wymaga prawdopodobnie utraty produktów kilku genów przeciwnowotworowych. Istnieją również doniesienia, że rak jelita grubego może być spowodowany utratą innych genów. Takim przykładem jest występowanie raków jelita grubego na skutek utraty genów zlokalizowanych na chromosomie 8p21.

Z innych poznanych produktów genów przeciwnowotworowych należy wymienić: NF1 będący aktywatorem GTPazy oraz NF2 wiążący się z cytoszkieletem; następnie RET będący receptorem kinazy tyrozynowej, którego brak powoduje raka tarczycy; inhibinę (hormon jądrowy hamujący czynność przysadki), który jednocześnie hamuje powstanie guzów jądra; 2-metoksyestradiol (pochodny estrogenu) hamuje powstanie guzów jajnika i wiele innych.

OGÓLNE WNIOSKI

W myśl obecnych poglądów powstanie nowotworu zależy z jednej strony od obecności onkogenów zarówno ustrojowych, jak i pozaustrojowych, z drugiej zaś strony od niedoboru lub utraty produktów genów przeciwnowotworowych, przy czym zagadnienie coraz bardziej skłania się ku mechanizmowi proliferacji komórek, odbywającej się w cyklu komórkowym. Nowsze badania wykazały, że nawet same czynniki cyklu komórkowego mogą być onkogenami, głównie kinazy sprzężone z cyklinami CDK (CDK4 aktywowaną przez cyklinę D1 w fazie startu cyklu, CDK2 aktywowane przez cykliny D i E w późnej fazie G1 oraz CDK2 w fazie S aktywowaną przez cyklinę A). Według nowszej nomenklatury pre-MPF i MPF są zastępowane przez nazwę CDK. Z kolei czynnikami hamującymi cykl komórkowy są białka p105Rb i p53, a zwłaszcza omówione poprzednio inhibitory będące elementami cyklu, zwłaszcza białko p16.

Powstaje pytanie, czy omówione produkty genów przeciwnowotworowych będą nadawać się do terapii nowotworów. Dotychczasowe badania z komórkami nowotworowymi w hodowli stwarzają pewną nadzieję — jednak do zastosowania ich w formie leku wydaje się być jeszcze daleko. Również druga droga polegająca na unieszkodliwieniu onkogenów dotąd nie dawała większych rezultatów. Ostatnio wydaje się, że poczyniono pewien postęp właśnie w tej dziedzinie. Jak wiadomo zmutowany onkogen ras, łącząc się na trwałe z błoną komórkową z powodu niemożności jego hydrolizy z powodu mutacji — na trwałe pobudza cyklazę adenylanową, powodując proliferację komórek aż do powstania nowotworu. Ostatnio dwie grupy badaczy wykazały, że do łączenia się onkogenu ras z błoną komórkową, co jest warunkiem jego działania, jest niezbędny drobny fragment farnesolu (liniowy półoterpen), który pod wpływem transferazy farnesylu ulega wbudowaniu do nieaktywnego prekursora ras. Gdyby udało się zahamować tę reakcję, nie doszłoby do wiązania onkogenu ras z błoną i tym samym usunięto by przyczynę powodującą powstanie raka pod wpływem onkogenu ras. Okazało się, że dojrzałe białko ras z wbudowanym fragmentem farnesolu łączy się z błoną komórkową poprzez peptyd CAAX (cysteina z następującymi dwoma alifatycznymi i trzecim jakimkolwiek innym aminokwasem). Są czynione próby zniwelowania peptydu CAAX przez zastąpienie go cząsteczką o podobnym kształcie (np. AA w CAAX zastąpione przez benzodiazepinę), co zapobiegałoby łączeniu się onkogenu ras z błoną komórkową, a co jest warunkiem jego rakotwórczego działania. Zrealizowanie tego problemu byłoby ogromnym sukcesem i drogą do leczenia nowotworów wywołanych poprzez działania onkogenu ras.

PRODUCTS OF THE TUMOR SUPPRESSOR GENES

S u m m a r y

According to the present views generation of carcinomas can be caused by excess of constitutional or environmental carcinogenic agents (oncogenes and mutagens) or by deficiency of anti-carcinogenic agents (products of tumor suppressor genes). Both these substances act upon cell

proliferation taking place within the cell cycle. Even substances of the cell cycle may act as carcinogenic agents e.g. cyclins, especially cyclin D1 active at the starting point of the cell cycle. Products of tumor suppressor genes (p53, p105Rb, p16 and others) act principally as inhibitors of the cell cycle, inhibiting cell proliferation, the principal feature of neoplasmas.

LITERATURA

- BISHOP J. M., 1991. *Molecular Themes in Oncogenesis*, Cell, 64, 235-248.
- CANTLEY L. C., AUGER K. E., CARPENTER C., DUCKWORTH B., GRAZIANI A., KAPELLER R., SOLTOFF S., 1991. *Oncogenes and Signal Transduction*. Cell 64, 281-302.
- COBRINK K., DOWDY S. F., HINDS P. W., MITTNACHT S., WEINBERG R., 1992. *The retinoblastoma protein and the regulation of cell cycling*. TIBS, 17, 312-315.
- CROSS M., DEXTER T. M., 1991. *Growth Factors in Development, Transformation, and Tumorigenesis*. Cell, 64, 271-280.
- HAMEL P. A., GALLIE S. L., PHILLIPS R. A., 1992. *The retinoblastoma protein and cell cycle regulation*. TIG, 8, 180-185.
- HORST A., 1993. *Działanie produktów genów przeciwnowotworowych w aspekcie cyklu komórkowego*. Post. Biol. Kom. 20, 311-329.
- KAMB A., GRUIS N. A., WEAVER-FELDHAUS J., LIU Q., HARSHAM K., TAVTIGIAN S. V., STOCKERT E., DAY III R. S., JOHNSON B. E., SKOLNICK M. H., 1994. *A cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumor types*. Science, 264, 436-439.
- KIRSCHNER M., 1992. *The cell cycle then and now*. TIBS, 17, 281-285.
- MARSHALL C. J., 1991. *Tumor Suppressor Genes*. Cell, 64, 313-326.
- MCKINNEY J. D., HEINTZ N. 1991. *Transcriptional regulation in the eukaryotic cell cycle*. TIBS, 16, 430-435.
- MURRAY A. W., 1992. *Creative blocks: cell-cycle checkpoints and feedback controls*. Nature, 359, 599-604.
- NASMYTH K., HUNT T., 1993. *Dams and sluices*. Nature, 366, 634-635.
- NOBORI T., MIURA K., WU D. J., LOIS A., TAKABAYASHI K., CARSON D. A. 1994. *Deletions of the cyclin-dependent kinase-4 inhibitor gene in multiple human cancers*. Nature 368, 753-735.
- PINES J., 1994. *Arresting developments in cell-cycle control*. TIBS, 19, 143-145.
- PINES J., 1994. *p21 inhibits cyclin shock*. Nature, 369, 520-521.
- SAGER R., 1989. *Tumor Suppressor Genes: The Puzzle and the Promise*. Science, 246. 1406-1411.
- WEINSTEIN R. A., 1991. *Tumor Suppressor Genes*. Science, 254, 1138-1145.