

MIECZYŚLAW CHORAŻY i KAZIMIERZ DUX

*Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie
Zakład Biologii Molekularnej Centrum Onkologii
Armii Krajowej 44, 44-100 Gliwice*

WPROWADZENIE DO BIOLOGII NOWOTWORÓW

Proces nowotworowy polega na utrwalonej dziedzicznie zmianie charakteru komórki somatycznej w wyniku czego komórka staje się niepodatna na mechanizmy regulujące procesy wzrostu i różnicowania (specjalizacji). Masa komórek nowotworowych w organizmie człowieka (zwierzęcia) rośnie w sposób ciągły i autonomiczny.

W medycynie nowotwory złośliwe stanowią problem o wielkiej wadze społecznej, ponieważ zapadalność na nowotwory jest wysoka, choroba jest wyniszczająca i często prowadzi do przedwczesnego zgonu. W Polsce na nowotwory złośliwe zapada każdego roku około 100 000 ludzi.

W medycynie nastawienie badawczego wysiłku na ratowanie organizmu ukierunkowało wyobrażenia o nowotworach według klasycznych pojęć patologii o przyczynach choroby (etiologii) oraz jej pochodzeniu i rozwoju (patogenezie). Celem działania medycznego jest rozpoznanie nowotworów (diagnostyka), ich leczenie (terapia) oraz zapobieganie im (profilaktyka). Wyloniła się ważna, o rozległym zasięgu specjalność medyczna, zwana onkologią, której zadaniem jest organizacja walki z rakiem, optymalizacja postępowania lekarskiego w klinice nowotworów (onkologia kliniczna), jak i badania podstawowe (onkologia doświadczalna).

PODSTAWOWE, BIOLOGICZNE CECHY NOWOTWORÓW

Historia naturalna nowotworów, a więc ich powstawanie i rozrost w organizmach wielokomórkowych najtrafniej daje się opisać w kategoriach biologii. Nowotwory stanowią jednak nadal wyzwanie dla biologii, gdyż złożoność tego zjawisk, a zwłaszcza na poziomie molekularnym, rodzi stale nowe pytania.

Wzrost nowotworów różni się od wzrostu normalnych tkanek zorganizowanych w narządy: te ostatnie zarówno w stanach prawidłowych, jak i chorobowych podlegają mechanizmom regulacyjnym ustroju. Wszystkie nie nowotworowe rozrosty, odrosty i przerosty są reakcją na uszkodzenie tkanek lub zakłócenie ich czynności i mają charakter wyrównawczy. Komórki normalne, nieraz bardzo żywo proliferujące podczas regeneracji, prędzej czy później zaczynają dojrzewać i przestają się dzielić, co jest wyrazem ich podporządkowania regulującym

mechanizmom ustroju. Brak tego podporządkowania we wzroście nowotworowym rozumiemy jako jeden z przejawów jego autonomii.

W normalnych tkankach dorosłego organizmu stała liczba komórek, mimo szybkiego tempa ich podziału, tłumaczy się kompensacyjnym charakterem proliferacji. Oznacza to, że na przykład w nabłonku jelita tempo proliferacji jest ściśle dostrojone do tempa ubytku komórek w następstwie ich dojrzewania czynnościowego i złuszczenia. Tempo rozmnażania się komórek nowotworowych jest w przybliżeniu takie samo, często nawet mniejsze niż tempo podziału komórek wielu tkanek prawidłowych. Nowotwory zwiększają jednak swoją objętość mimo względnie słabego tempa podziałów komórkowych głównie dlatego, że zachwiała się w nich równowaga między przyrostem a utratą komórek. W populacji komórek nowotworowych mniejsza liczba komórek ginie lub wyłącza się z cyklu życiowego, niż stanowi ich przybytek w wyniku podziałów.

Komórki nowotworowe, rozmnażając się w miejscu swego powstania, tworzą ogniskowe zgrubienie zwane guzem (tumor). Nazwa ta jest używana na ogół w takim samym zakresie i znaczeniu jak „nowotwór”, choć niekiedy rozróżnia się te pojęcia. Jeśli nowotwór przybiera postać guza o kształcie kulistym, dobrze odgraniczonym od tkanki prawidłowej, mówimy o wzroście rozprężliwym, czyli ekspansywnym. W takim przypadku komórki nowotworowe, rosnąc w zwartej masie, nie mieszają się z sąsiednimi komórkami normalnymi, tylko je odsuwają, powodując ich uciskanie i nadając układ koncentryczny sąsiednim strukturom narządu.

Komórki nowotworowe mogą indukować tworzenie się nowej, własnej sieci naczyń krwionośnych — nazywa się to angiogenezą nowotworową. Rozrastające się od obwodu rozgałęzienia naczyń zapewniają odżywianie szybko rosnących guzów i osiąganie przez nie znacznych rozmiarów. W przypadkach, gdy nie dochodzi do rozwoju takich naczyń, centralne okolice guza ulegają martwicy. Angiogeneza nowotworowa tłumaczy się wytwarzaniem i wydzielaniem przez komórki nowotworowe swoistego czynnika wzrostowego, który ma zdolność wybiórczego pobudzania komórek, śródbłonek naczyń włosowatych do rozmnażania. Taki czynnik nazywamy nowotworowym czynnikiem angiogenezy, w skrócie TAF (tumor angiogenic factor).

Często komórki nowotworowe wyosabniają się z pierwotnego ogniska rozrostu i wnikają pomiędzy komórki normalne. Ten proces nazywamy naciekaniem albo infiltracją. Naciekanie i wędrowkę komórek nowotworowych w głąb otaczających tkanek narządu nazywamy inwazją, a zdolność do inwazji, czyli inwazyjność, pojmujemy jako jedną z cech złośliwości nowotworów.

Drugą cechą nowotworów złośliwych jest zdolność do tworzenia przerzutów (*metastasis*). Przerzuty powstają wtedy, gdy pojedyncze komórki lub niewielkie ich agregaty wyosabniają się ze struktury guza pierwotnego i porwane prądem limfy lub krwi przenoszą się do odległych narządów. Część takich komórek, tworząc zatory naczyniowe, zagnieżdża się i rozmnaża, dając nowe ogniska rozrostu.

Nowotwory łagodne, w odróżnieniu od nowotworów złośliwych, są ogniskowymi rozrostami wysoko zróżnicowanych komórek. Przybierają postać guzów, brodawek, wyrosli lub torbieli. Nie mając zdolności do inwazji i przerzutów, są wyraźnie odgraniczone od tkanek sąsiednich, niekiedy otoczone torebką i po

wycięciu lub wyluszczeniu nie odrastają. Odróżnianie nowotworów złośliwych od nowotworów łagodnych ma swoją dawną tradycję w medycynie ze względu na odmienne postępowanie lecznicze i pomyślną prognozę w przypadkach guzów łagodnych.

NAZEWNICTWO I MORFOLOGIA

Nowotwory w swym bogactwie morfologicznych odmian wymagają odpowiedniej klasyfikacji i nomenklatury. Tradycyjne mianownictwo opracowane dla celów onkologii znalazło również zastosowanie w opisie nowotworów występujących u najrozmaitszych gatunków zwierząt. Wynika to z faktu, że u człowieka nowotwory są częstą chorobą i przedstawiają największą różnorodność typów i odmian, toteż z konieczności zostały najlepiej poznane pod względem histologicznym.

Nowotwór może rozwinąć się w obrębie każdego narządu, w którym zachodzą podziały komórkowe. Toteż podstawą klasyfikacji nowotworów jest ich morfologiczne podobieństwo do narządów i tkanek, w obrębie których się rozwinęły. Komórki nowotworowe mogą przejawiać znaczny stopień zdolności do różnicowania się i organizowania w narząd (tak zwane zdolności histoformatywne). W następstwie reagowania komórek nowotworowych pochodzenia nabłonkowego z normalnymi komórkami tkanki łącznej mogą wytwarzać się histologiczne struktury charakterystyczne dla narządu.

Nazwę dla nowotworów tworzy się przez dodanie końcówki -ak do rdzenia nazwy tkanki czy narządu. Końcówka ta przypomina tradycyjne określenie „rak”. Najbardziej ogólny podział wynika z rozróżnienia nowotworów wywodzących się z tkanek nabłonkowych, zwanych nabłoniakami (*epithelioma*), oraz z tkanek łącznych czyli mięsaków (*sarcoma*). W grecko-lacińskich odpowiednikach nazw nowotworów występuje końcówka -oma od *carcinoma*. Jeśli na podstawie badania histologicznego nie można o nowotworze nic powiedzieć ponad to, że jest nabłoniakiem albo mięsakiem (niekiedy nawet i takie rozróżnienie jest niemożliwe) — mówimy o nowotworach anaplastycznych, a więc bardzo słabo zróżnicowanych pod względem morfologicznym. Jeśli dobrze jest znane umiejscowienie pierwotnego ogniska rozrostu guza anaplastycznego, możemy do nazwy nabłoniak lub mięsak dodać jako bliższe określenie nazwę narządu czy okolicy ciała.

Jeśli w mięsaku pojawiają się struktury będące produktem czynności komórek łącznotkankowych, tworzymy nazwy złożone, na przykład włókniakomięsak (*fibrosarcoma*), śluzakomięsak (*myxosarcoma*), mięsak kostny (*osteosarcoma*), mięsak chrzęstny (*chondrosarcoma*).

Jeżeli w nowotworze pochodzenia łącznotkankowego przeważają produkty czynności komórkowej, natomiast same komórki nowotworowe rozmnażają się leniwie, guz zaś w całości ma kliniczne cechy nowotworu łagodnego, używamy nazw charakteryzujących wyłącznie produkt czynności komórek nowotworowych, na przykład: włókniak (*fibroma*), chrzęstniak (*chondroma*), kostniak (*osteoma*), śluzak (*myxoma*).

Takie same reguły obowiązują w określaniu nowotworów wywodzących się z układu chłonnego, czyli z narządów limfoidalnych, na przykład mięsak limfa-

tyczny (*lymphosarcoma*), chłoniak (*lymphoma*). *Plasmocytoma* oznacza nowotwór wywodzący się z komórek plazmatycznych. Ponieważ nowotwór ten u człowieka rozwija się wieloogniskowo w szpiku kostnym, nazwano go szpiczakiem mnogim (*myeloma multiplex*).

Nowotwory wywodzące się z różnych składników układu krwiotwórczego nazywamy białaczkami (*leucaemia*), gdyż komórki nowotworowe, na wzór komórek normalnych, przedostają się obficie do krwi, nadając jej białawe, jakby mleczne podbarwienie. Niektóre jednakże białaczki rosną w postaci guzów lub nacieków umiejscowionych w jednym z narządów limfoidalnych, jak węzły chłonne czy śledziona, a niekiedy rozmnażają się w jamie otrzewnowej.

PROLIFERACJA KOMÓREK, PROGRESJA I STADIALNOŚĆ ROZWOJU NOWOTWORÓW

Podstawową koncepcją w biologii nowotworów jest zwiększona proliferacja (namnażanie) zmienionych nowotworowo komórek. Istotnie, zjawisko nowotworzenia jest immanentnie związane z podziałami komórkowymi. Kontrola podziałów komórkowych w organizmie jest złożona i stale poznajemy jej nowe ogniwa i elementy molekularnych mechanizmów regulujących cykl komórkowy. Tempo podziałów komórkowych jest różne dla różnych komórek organizmu i jest w stanie dynamicznej równowagi z wymieraniem komórek. Niektóre komórki nie dzielą się wcale, na przykład komórki nerwowe i komórki mięśni prążkowanych. Nie jest jasne, czy wysoki stopień proliferacji komórkowej jest sam w sobie czynnikiem grającym istotną rolę w powstawaniu i rozwoju nowotworu. Jeśli stoimy na stanowisku, że rak jest wynikiem mutacji somatycznej, a replikacja DNA zachodząca w każdym cyklu komórkowym ma pewien stopień naturalnej skłonności do popełniania błędów (na przykład spontaniczne zmiany tautomeryczne, występujące w nukleotydach) to wysokie tempo proliferacji *per se* może być elementem karcynogenezy.

Komórki rosnące przechodzą cykl komórkowy złożony z dwóch zasadniczych okresów: interfaza i podział komórki. W istocie można w cyklu wyróżnić kilka dyskretnych faz. Replikacja DNA zachodzi w fazie S w okresie interfazy. Poprzedza ją faza G₁ — okres, w którym zachodzi stała synteza makrocząsteczek (RNA, białek) i toczą się głównie procesy metaboliczne. Po fazie S następuje krótkotrwała faza G₂ i podział komórki (faza M). Komórki nieproliferujące (komórki nerwowe, komórki mięśni prążkowych) są zatrzymane w fazie określanej jako G₀, której cechą jest brak procesów przygotowawczych do replikacji DNA. Również inne komórki organizmu, które nie zwiększają swej masy i nie wchodzą w cykl komórkowy pozostają w fazie G₀. W takich komórkach, zwanych komórkami spoczynkowymi, toczą się wszystkie charakterystyczne funkcje i procesy z wyjątkiem funkcji i procesów przygotowawczych do replikacji DNA. W fazie G₀ pozostają także komórki hodowane w kulturach komórkowych, gdy pozbawi się je czynników odżywczych i wzrostowych.

Znamy znaczną liczbę czynników wzrostowych, krążących w ustroju i stanowiących elementy złożonego układu, który sygnalizuje komórce potrzebę wzrostu. Czynniki te poprzez system receptorów błonowych i cytoplazmatycznych

uruchamiają molekularny system transmisji sygnału aktywujący geny niezbędne dla rozpoczęcia reakcji przygotowawczych dla replikacji DNA. Krytycznym momentem określanym jako „punkt restrykcyjny” (R) jest krótki okres w końcowej fazie G₁, gdzie następuje decyzja co do rozpoczęcia replikacji DNA. Molekularne podłoże mechanizmów operujących w punkcie restrykcyjnym obejmują interakcje wielu genów, w tym genów kodujących, czynniki transkrypcyjne, cykliny, genów supresorowych (porównaj niżej) oraz swoistych kinaz białkowych. Zdarzenia molekularne zachodzące w punkcie restrykcyjnym są istotne dla procesu nowotworowego.

Nowotwory w swym naturalnym rozwoju ujawniają szereg skokowych zmian, zmierzających w kierunku coraz to większej złośliwości. Śledzenie zmienności morfologicznej raków gruczołu młecznego i płuc myszy doprowadziło Fouldsa do sformułowania ogólnych prawidłowości w rozwoju raka, które zostały nazwane progresją nowotworów. Według tej koncepcji rozwój złośliwych nowotworów jest procesem złożonym, który polega na pojawieniu się różnych i rozmaicie kombinujących się cech jednostkowych.

Spośród licznych cech nowotworów rosnących w organizmie, najłatwiej dostępne dla obserwacji są następujące: przyspieszanie tempa wzrostu, utrata zdolności do różnicowania, pojawienie się zdolności do naciekania (inwazyjność), do tworzenia przerzutów, do wzrostu w formie wysiękowej w przypadku przeniknięcia komórek do jamy otrzewnowej lub opłucnej, stopniowe uniezależnianie się od wpływów hormonalnych, utrata zdolności do wytwarzania i wydzielania określonych substancji, które są charakterystyczne dla zróżnicowanych komórek macierzystych.

Ogólną regułą w rozwoju nowotworów jest długi czas utajenia choroby. Upływa wiele lat między czasem ekspozycji na ewidentny czynnik przyczynowy, jak na przykład promieniowanie jonizujące lub określony związek chemiczny, zwłaszcza narządowo swoisty, a klinicznym ujawnieniem nowotworu.

W naturalnym rozwoju nowotworów pierwszą fazę nazywamy zapoczątkowaniem (inicjacja). Inicjacja dotyczy indukowanych czynnikiem rakotwórczym zmian w pojedynczej komórce. Współczesna nauka wskazuje, że pierwotna zmiana w fazie inicjacji polega na mutacji w takim kluczowym genie, który może determinować niekontrolowany wzrost i tłumić procesy różnicowania. Taka komórka, nosząca „piętno nowotworowe” może pozostawać przez długi okres w stanie „uśpienia” do czasu, gdy pojawią się następne mutacje i nastąpią dalsze uszkodzenia molekularnych mechanizmów kontrolujących wzrost. Morfologicznie zaawansowana inicjacja może przejawiać się jako nieprawidłowy rozrost komórek.

Progresja nowotworów pojmowana pierwotnie jako skokowa zmienność fenotypowa znalazła swą interpretację genetyczną dzięki badaniom doświadczalnym nad karcynogenezą, która z reguły okazywała się procesem wielostopniowym. Klasycznym przykładem takiej stadialności jest możliwość wyróżnienia dwóch stadiów w rozwoju raków skóry. W pierwszym substancja rakotwórcza powodując mutację zapoczątkowuje proces (inicjacja). W drugim — kokarcynogen, uruchamiając mechanizmy epigenetyczne doprowadza do ekspresji cech złośliwości (promocja). Zrakowaciałe komórki zaczynają się mnożyć w sposób niekontrolowany (progresja).

Transformacja nowotworowa komórek w hodowli *in vitro* również przebiega dwustopniowo. Pierwszą zmianą jest tak zwana immortalizacja, czyli uniesmiertelnienie komórek, druga zaś zmiana polega na pojawieniu się zdolności tumorogennych. Należy tu wyjaśnić, że komórki izolowane z organizmu i hodowane *in vitro* dzielą się jedynie przez ograniczony okres, dając w wyniku najwyżej 20–50 generacji, później zaś zamierają. W obrębie takiej populacji komórek o ograniczonym okresie życia może wyłonić się linia zdolna do ciągłego rozmnażania, a więc nieśmiertelna, jeśli tylko zostanie zapewniona dla niej przestrzeń i odżywianie. Linie ciągłe pojawiają się bądź w następstwie samoistnych mutacji, które zdarzają się rzadko, bądź też w następstwie mutacji indukowanych przez czynniki karcynogenne. Linie ciągłe są fenotypowo bardzo zbliżone do komórek normalnych i nie mają zdolności tumorogennych, a więc po wszczepieniu do organizmu zwierzęcego nie rosną. Jeśli w obrębie linii ciągłej zdarzy się druga mutacja, lub jeśli wprowadzi się do komórek na drodze transfekcji jeden z genów *c-onc*, to może dojść do pełnej transformacji nowotworowej. Wyraża się ona zanikiem hamowania kontaktowego, a przyczepność do podłoża (tak zwane zakotwiczenie) przestaje być warunkiem wzrostu. Komórki po wszczepieniu zwierzęciu rosną w postaci guza, są więc tumorogenne.

Ogólnie można powiedzieć, że skokowe zmiany fenotypowe obserwowane podczas procesu złośliwienia nowotworów są wyrazem mutacji, zachodzących w różnych generacjach tej samej linii komórek. Każda następna generacja przerasta poprzedzającą i w ten sposób ostatnia populacja mutantów przedstawia się jako jeden klon, w którym doszło do nagromadzenia się wielu jednostkowych cech złośliwości. Za taką interpretacją, sięgającą 1957 roku, przemawiają badania statystyczne nad zależnościami między częstością występowania nowotworów u ludzi a wiekiem ich życia. Badania statystyczne doprowadziły wielu badaczy do sformułowania hipotezy, że przeciętnie zachodzi 6 lub 7 kolejnych mutacji, zanim u człowieka rozwinie się populacja złośliwych komórek, dających pełny obraz kliniczny choroby nowotworowej.

Rozwój nowotworów złośliwych u ludzi jest również wieloetapowy. Każda z następujących po sobie faz rozwojowych ma charakterystyczne cechy morfologiczne. Podłoże stadialnego rozwoju na poziomie molekularnym jest jeszcze słabo poznane. Z badań grupy B. Vogelsteina nad rozwojem raka jelita grubego rysuje się pewien obraz sekwencji zdarzeń mutacyjnych w genach *onc* i genach supresorowych. W miarę wzbogacania naszej wiedzy molekularne modele opisujące stadialność rozwoju nowotworów ulegają rozszerzeniu i modyfikacji.

Każdy czynnik środowiskowy, który zwiększa częstość występowania nowotworów w populacji człowieka i zwierząt nazywamy czynnikiem rakotwórczym albo karcynogennym lub też krócej karcynogenem. Unikamy świadomie i celowo określenia „czynnik onkogenny”, gdyż w języku polskim fonetyczne podobieństwo może skłaniać do błędnych skojarzeń z onkogenami, czyli genami *onc*. Czynniki rakotwórcze są niesłychanie różnorodne i najogólniej można je podzielić na chemiczne, fizyczne i biologiczne. Do pierwszych należy ogromna liczba substancji z rozmaitych grup chemicznych, do drugich — promieniowanie jonizujące i UV, a do trzecich — wirusy karcynogenne, zwane też tradycyjnie wirusami onkogennymi.

CZYNNIKI RAKOTWÓRCZE

KARCINOGENY CHEMICZNE

Karcynogenami chemicznymi nazywamy substancje, które w swej aktywnej postaci mogą wiązać się kowalennie z DNA komórek i — powodując zmiany genetyczne o charakterze mutacji — mogą w organizmie zapoczątkować ogniska transformacji.

Genetycznym efektem rozmaitych reakcji chemicznych między karcynogenami a DNA jest mutacja, a więc trwała zmiana informacji strukturalnej bądź regulacyjnej lub też obu jej rodzajów. Mutacje genów kodujących białka o kluczowych funkcjach komórkowych, w tym genów *onc* i genów supresorowych mogą stanowić istotę karcynogenezy chemicznej.

Od karcynogenów, które działając mutagenie i zapoczątkowują proces nowotworowy, odróżniamy kokarcynogeny, które — wywołując odwracalne początkowo zmiany epigenetyczne — powodują promocję nowotworów, czyli ekspresję ich cech złośliwości.

Jednym z kryteriów, które rozstrzyga o przypisaniu jakiejś substancji chemicznej właściwości rakotwórczych jest wykazanie, że substancja ta, sprawdzana w odpowiedni sposób na grupie zwierząt doświadczalnych, zwiększa częstość powstawania nowotworów — w porównaniu z grupą kontrolną. Drugim jest ewidentny, udokumentowany badaniami epidemiologicznymi związek przyczynowy między ekspozycją (głównie zawodową) na określony czynnik chemiczny a zapadalnością na określony nowotwór w populacji ludzkiej.

Wstępem do czasochłonnych i kosztownych testów na zwierzętach laboratoryjnych jest sprawdzanie, czy substancje chemiczne podejrzane o właściwości rakotwórcze są mutagenne dla bakterii. W teście bakteryjnym opracowanym w laboratorium w 1973 roku przyjęto założenie, że właściwości karcynogenne są identyczne z mutagennymi. Znalazło to potwierdzenie w fakcie, że niemal wszystkie znane karcynogeny dały w teście Amesa wynik dodatni, natomiast substancje nierakotwórcze z reguły nie przejawiały zdolności mutagennych.

Inny test, używany do sprawdzania różnych substancji chemicznych na karcynogenność, polega na liczeniu ognisk transformacji komórek w hodowlach poza ustrojem. Wartość tego testu, oceniana według stopnia zbieżności wyników pozytywnych i negatywnych z testami na zwierzętach, jest zbliżona do testu Amesa.

Niektóre karcynogeny chemiczne, na przykład uretan, są aktywne biologicznie w takiej postaci, w jakiej istnieją poza organizmem.

Większość substancji rakotwórczych, występujących w środowisku człowieka i używanych w badaniach doświadczalnych, a więc między innymi policykliczne węglowodory rakotwórcze (ang. PAH — polycyclic aromatic hydrocarbons), na przykład benzopyren, metylocholantrén, dwubenzoaantracén oraz aminy aromatyczne (na przykład acetyloaminofluoren), mykotoksyny (na przykład aflatoksyna B1) jest nieczynna w swej trwałej, naturalnej postaci i ulega aktywacji dopiero po przemianach metabolicznych w organizmie. Tego rodzaju substancje nazywa się niekiedy prokarcynogenami. Ich przetworzenie w ostate-

czne karcynogeny dokonuje się pod wpływem odpowiednich cytozolowych i mikrosomalnych enzymów (monooksygenazy, epoksydazy), których obecność stwierdzono w komórkach wielu narządów organizmu. Enzymy biorące udział w aktywacji metabolicznej PAH są kodowane przez rodzinę genów cytochromu P450 zwanych genami CYP tworzących wielką polimorficzną rodzinę (około 150 genów). Aktywacja metaboliczna substancji rakotwórczych (a ściślej ksenobiotyków, czyli związków chemicznych nie mających dla organizmu wartości odżywczych) stanowi tak zwaną fazę I procesu odtruwania. Aktywny chemicznie ksenobiotyk jest następnie sprzęgany (faza II) z na przykład glutationem do rozpuszczalnego w wodzie kompleksu, który wydala się z moczem. Proces sprzęgania z glutationem jest pod kontrolą S-transferazy glutationowej, kodowanej przez geny GST. Związki rakotwórcze aktywowane w fazie I mogą jednak uciekać z naturalnego toru odtruwania i tworzyć koniugaty z białkiem RNA i DNA jako tak zwane addukty. Addukty DNA stanowią wstępny etap mutacji, między innymi genów *onc*. Przy jednakowej ekspozycji na ten sam karcynogen indywidualne ryzyko wystąpienia raka jest bardzo różne. Fakt indywidualnej wrażliwości na czynniki rakotwórcze i predyspozycji do zapadania na nowotwory zależy od genotypu w zakresie polimorficznych genów CYP i genów GST. Genotyp determinujący fenotyp intensywnie metabolizujący ksenobiotyki w fazie I jest związany z podwyższonym ryzykiem zapadalności na raka płuc i innych narządów. Interesujący jest fakt, że w rasie kaukaskiej około 50% populacji ma genotyp *GSTM1* typu zero/zero, czyli nie ma zdolności przeprowadzenia reakcji fazy II.

Do prokarcynogenów zaliczamy tak zwane prekursory karcynogenów, a więc substancje, które nie są groźne w swej naturalnej postaci, w pewnych warunkach jednak mogą w organizmie stanowić materiał do syntezy substancji o bardziej złożonej budowie wykazującej aktywność rakotwórczą. Za przykład niech posłużą azotyny, które wraz z aminami drugorzędowymi mogą w obecności kwasu solnego żołądka łączyć się w nitrozoaminy, którym przypisuje się wielkie znaczenie w powstawaniu niektórych nowotworów u człowieka.

Sądzi się, że indywidualna predyspozycja do rozwoju nowotworu może zależeć między innymi od genotypu warunkującego przemianę metabolizmu karcynogenów (utlenianie, acetylacja), tworzenie adduktów DNA i naprawy uszkodzeń w DNA.

KOKARCINOGENY

Doświadczenia nad rozwojem raków skóry u zwierząt doświadczalnych doprowadziły do wniosku, że karcynogeneza jest procesem wielostopniowym, w którym można wyróżnić co najmniej dwa stadia: zapoczątkowanie i promocję. Karcynogeny stosowane w bardzo małych — podprogowych dawkach mogą wprowadzić spowodować mutację niezbędną dla zapoczątkowania nowotworu, nie wystarczają jednak do jego ekspresji, czyli ciągłego rozmnażania się komórek i ich wzrostu w postaci guza. Wzrost taki może jednak dojść do skutku dopiero wtedy, gdy na populację zapoczątkowanych komórek zadziała drugi czynnik, zwany promotorem lub kokarcynogenem. Tak więc kokarcynogenami, albo czynnikami współrakotwórczymi, określamy substancje chemiczne, które

w zasadzie nie będąc mutagenne, nie mają zdolności do zapoczątkowania nowotworu, mogą jednak spowodować promocję komórek zapoczątkowanych wcześniej przez któryś z właściwych karcynogenów.

Klasycznym przedstawicielem kokarcynogenów jest olej krotonowy, którego aktywnymi składnikami są dwuistry forbolu. Wśród nich najbardziej aktywny i najczęściej używany w doświadczeniach jest związek znany pod skrótem TPA (13-octan, 12-0-tetradekanoiloforbolu). Związek ten, zastosowany na zdrową skórę myszy, powoduje przejściowe rozmnażanie i odróżnicowanie komórek naskórka, w następstwie czego rozwijają się łagodne brodawczakowate rozrosty. Jeśli natomiast stosowanie TPA zostanie wyprzedzone mutagennym działaniem karcynogenu, to w naskórku mogą się rozwinąć złośliwe brodawczaki i raki.

W 1982 roku opisano nowy promotor 100-krotnie bardziej aktywny niż TPA, mianowicie dwuhydroteleocydynę B, izolowaną z grzybni *Streptomyces*. Ten kokarcynogen wywołuje transformację w komórkach zapoczątkowanych przez metylocholanren względnie napromienianie nadfioletowe. Zapoczątkowany proces karcynogenezy chemicznej może być zatrzymany zarówno w doświadczeniach na zwierzętach, jak i w hodowlach komórkowych *in vitro* przez retinoidy, które są substancjami chemicznymi działającymi antagonistycznie w stosunku do kokarcynogenów. Retinoidy stanowią wielką rodzinę naturalnych i syntetycznych związków chemicznych, będących analogami retinolu, czyli witaminy A.

KARCINOGENY FIZYCZNE

Zaliczamy tu różne rodzaje promieniowania jonizującego. Jonizującym nazywamy takie promieniowanie, które w interakcji z różnymi substancjami powoduje dysocjację cząsteczek na jony, czyli atomy obdarzone ładunkiem elektrycznym. Promieniowania jonizujące indukują jonizację wody i powstanie aktywnych rodników tlenowych, które uszkadzają DNA i indukują replikację naprawczą. W dostatecznie wysokiej dawce promieniowanie jonizujące może dać pełny efekt rakotwórczy, to znaczy stanowić dla procesu nowotworowego zarówno czynnik zapoczątkowania, jak i promocji.

Nowotwory mogą być indukowane przez promieniowanie elektromagnetyczne o określonej długości fali, jak i przez promieniowanie korpuskularne. Z szerokiego widma promieni pierwszego rodzaju jako czynnik rakotwórczy wchodzi w grę tylko promieniowanie nadfioletowe, promieniowanie rentgenowskie i promienie gamma. Jeśli chodzi o promieniowanie korpuskularne, to wszystkie jego rodzaje okazały się karcynogenne, a więc cząstki alfa, beta, protony i neutrony.

Promieniowanie nadfioletowe jest głównym czynnikiem w powstawaniu raka skóry u człowieka, co wynika z badań epidemiologicznych. Mechanizm powstawania tego nowotworu tłumaczy się różnymi sposobami działania promieni nadfioletowych na układy biologiczne, jak zahamowanie podziałów komórkowych, inaktywacja enzymów, indukcja mutacji oraz uśmiercanie komórek. Niektóre z biologicznych efektów napromieniowania nadfioletem można wyjaśnić zmianami fizycznymi i chemicznymi w DNA. Spośród wielu możliwych zmian strukturalnych w DNA, indukowanych przez promienie nadfioletowe, najbardziej trwałymi i najłatwiej tworzącymi się związkami chemicznymi, które mogą

być mutagenne, są dimery pirymidyn. Mogą one tworzyć się przez wiązanie między tyminą a cytozyną lub między parami samych cząsteczek cytozyny lub tyminy.

Rakotwórcze efekty promieni X, promieniowania gamma i neutronów ujawniły się w populacjach ludzkich po napromieniowaniach, które zdarzały się w różnych okolicznościach: przypadkowych, leczniczych, diagnostycznych, w trakcie wykonywania zawodu i podczas wybuchów atomowych.

Raki skóry pojawiały się dawniej u rentgenologów, którzy nie dysponowali dostateczną osłoną osobistą przed źródłem promieniowania. Powstawanie nowotworów płuc zaobserwowano u górników w kopalniach rudy uranowej, pierwotnie w Czechach, a później także w USA. Wśród ludności, która przeżyła wybuch bomby atomowej w Hiroszynie i Nagasaki, w okresie od 5 do 25 lat po wybuchu zwiększyła się częstość występowania białaczek głównie u młodych osobników.

WIRUSY ONKOGENNE

Badania nad rolą wirusów w karcynogenezie odegrały doniosłą rolę w odkryciu komórkowych genów *onc* i w wyjaśnieniu molekularnych mechanizmów transformacji nowotworowej.

Wirusy rozmnażają się i przejawiają swe funkcje metaboliczne jedynie w obrębie komórek. Podstawowym warunkiem istnienia wirusów są mechanizmy gwarantujące powielanie się ich kwasu nukleinowego oraz istnienie w ich genomie informacji dla syntezy białek wirusowych. Istotnymi białkami dla wirusa są te, które osłaniają genom i umożliwiają infekcyjność.

Ewolucyjnie wirusy są stosunkowo młodą formą życia, gdyż mogły powstać dopiero po pojawieniu się na Ziemi komórek gospodarza, a więc bakterii (prokariotów) i komórek wyżej zorganizowanych, zaopatrzonych w jądro (eukariotów). Istnieją dobrze uzasadnione hipotezy, że ewolucyjnie retrowirusy pochodzą z ruchomych elementów genetycznych (transpozonów), które w normalnych komórkach mają znaczenie dla regulacji procesów różnicowania. W toku ewolucji wirusów wykształciło się bardzo dużo ich odmian o zróżnicowanej i złożonej budowie oraz o szerokiej skali wymiarów. Wiele z nich okazało się czynnikami chorobotwórczymi, wywołującymi choroby zakaźne. Nieliczne tylko odmiany wirusów mogą w warunkach naturalnych indukować rozrosty o charakterze nowotworowym.

Najogólniej dzielimy wirusy na dwa typy: wirusy DNA oraz wirusy RNA, w zależności od rodzaju kwasu nukleinowego, w którym jest zakodowana informacja genetyczna w dojrzałej, to jest infekcyjnej formie wirusa. Informacja ta, choć stosunkowo uboga, wystarcza jednak do spełnienia kilku podstawowych funkcji życiowych wirusów onkogennych. Do takich należy synteza białka strukturalnego tworzącego kapsyd (otoczkę), który w infekcyjnej fazie cyklu życiowego wirusa osłania jego kwas nukleinowy, umożliwia przyczepianie się do błony komórkowej, a następnie проникnięcie do wnętrza komórki. W wirusach typu RNA kluczowym genem jest gen *pol*, kodujący tak zwaną rewertazę (RNA zależną polimerazę DNA) niezbędną dla syntezy komplementarnego do genomu RNA dwupasmowego DNA, który następnie integruje się z genomem gospodarza.

WIRUSY DNA

Część zwierzęcych wirusów tej grupy obejmuje się nazwą *papova*, będąca zestawieniem pierwszych sylab nazw trzech następujących wirusów: 1) papilloma virus, 2) polyoma virus i 3) vacuolating simian virus typ 40 (SV40).

1) Najdawniej poznanym przedstawicielem wirusów papilloma jest wirus Shope'a, który w warunkach naturalnych powoduje endemicznie występujące brodawczaki uszu u królików z odmiany Cottontail. Doświadczalne zakażenie królików domowych wirusem Shope'a powoduje rozwój złośliwych nabłoniaków naskórka.

2) Wirus polyoma ma zdolność do wywołania różnego rodzaju nowotworów zarówno nabłonkowego, jak i łącznotkankowego pochodzenia nie tylko u myszy, lecz u chomika i innych gatunków.

3) Wirus oznaczony symbolem SV40, został izolowany z hodowli komórkowej nerki małp. Odznacza się zdolnością do wywoływania mięsaków u chomików i szczurów, a także powoduje transformację w hodowlach komórek różnego pochodzenia.

Zdolność wirusów polyoma do transformacji komórek zależy od wytwarzania białek kodowanych przez wirusa i nazywanych średnim antygenem T. Średni antygen T ma aktywność kinazy tyrozynowej. Mutanty wirusa pozbawione takiej aktywności enzymatycznej nie mają zdolności transformacji komórek.

Transformacja komórek pod wpływem wirusa SV40 dokonuje się za pośrednictwem białka kodowanego przez tego wirusa. Białko to gromadzi się w jądrze komórkowym i jest znane pod nazwą dużego antygeny T. Ten jądrowy antygen ma niezwykle właściwości, gdyż sam (bez obecności wirusa) wystarcza do transformacji komórek hodowanych *in vitro*, jak również do wywoływania guzów nowotworowych u nowonarodzonych chomików.

W patogenezie nowotworów u ludzi szczególne zainteresowanie budzą wirusy określane skrótem HPV (human papilloma virus), które u człowieka są przyczyną pospolitych brodawczaków skóry. Z brodawczaków takich wyosobniono kilkanaście odmian wirusów HPV. Znaczna ich większość ma związek przyczynowy z łagodnymi brodawczakami umiejscowionymi w określonych okolicach ciała, jednakże wirusy HPV-5, HPV-16 i HPV-18 mogą prowadzić do zmian przedrakowych a następnie rozwoju nowotworów złośliwych skóry i narządów płciowych oraz krtani. Duża część tych nowotworów ma zintegrowane z genomem komórek sekwencje HPV, które konstytutywnie (stałe) wyrażają dwa wczesne geny wirusa E6 i E7.

Mechanizm rozwoju złośliwych nowotworów człowieka pod wpływem wirusa HPV nie jest jeszcze znany, wiadomo jednak, że oprócz wirusów odgrywają tu rolę zarówno genetyczne uwarunkowania organizmu, jak i czynniki pochodzące z zewnątrz.

Wśród wirusów DNA patogenicznych dla człowieka należy wymienić wirusa Epsteina-Barr (EBV) uważany za czynnik indukujący chłoniaka Burkitta we wschodniej Afryce równikowej i raka jamy nosowo-gardłowej w południowej Azji. Wirus EBV należy do wirusów z grupy opryszczki (herpes virus); inne wirusy z tej grupy były łączone także z patogenizacją niektórych typów nowotworów.

U chorych na AIDS zainfekowanych wirusem HIV spostrzega się (w populacji Stanów Zjednoczonych Ameryki Północnej) około 20 000 razy częściej tak zwane mięsaki Kaposi oraz w późniejszych okresach choroby częstsze (niż w populacji ogólnej) chłoniaki wywodzące się z komórek B. Udział wirusa HIV w molekularnej patogenezie obu tych nowotworów jest wysoce złożony.

W niektórych regionach globu (południowo-wschodnia Azja) zidentyfikowano wysoki stopień nosicielstwa wirusa (typ B) zapalenia wątroby (HBV — hepatitis B virus) skorelowany z wielokrotnie większą zapadalnością na pierwotnego raka wątroby.

WIRUSY RNA

Wirusy RNA zdolne do wywoływania nowotworów u przedstawicieli różnych gatunków kręgowców określa się nazwą wirusów onkorna. Stanowią one podrodzinę z rodziny *Retroviridae* (retrowirusy).

Genom retrowirusów jest zakodowany w nici RNA. Genom retrowirusów zawiera zwykle gen rewertazy noszący symbol *pol* (RNA-zależna polimeraza DNA), gen kodujący białko otoczki (kapsydu) i wewnątrzvirusowe białko strukturalne. W cyklu życiowym retrowirusów można wyróżnić dwa okresy. W pierwszym, który trwa kilka godzin i zaczyna się infekcją komórki, wirion przyczepia się do błony komórkowej i przenika do jej wnętrza. Odwrotna transkryptaza (rewertaza) wirionu powoduje syntezę DNA na matrycy wirusowego RNA. Nowy DNA jest podwójną nicią zamkniętą w koło o średnicy $5,7 \times 10^5$ Å i w tej formie ulega integracji z komórkowym DNA, stając się prowirusem. W drugim okresie opisywanego cyklu zachodzi ekspresja prowirusowego DNA przez normalne procesy transkrypcji. Produktem tego są dwa typy RNA: pierwszy jest genomem nowego wirionu, drugim typem jest mRNA dla syntezy białek wirusowych. Prototypem onkogennych retrowirusów jest wirus leukozy ptaków (ALV). Należy on do tak zwanych łagodnych wirusów onkogennych. Wywołuje białaczki i rozrosty komórek układu krwiotwórczego po długim okresie utajenia i u małego odsetka nosicieli. Druga grupa retrowirusów onkogennych jest zaliczana do grupy tak zwanych ostrych wirusów, które indukują nowotwory (białaczki, erytroblastozy, chłoniaki, a także nabłoniaki i mięsaki) w krótkim okresie po infekcji i u wysokiego odsetka zakażonych zwierząt. Charakterystyczną cechą genomu tych wirusów jest obecność w nim wirusowego genu *onc* (*v-onc*). Typowym przedstawicielem tej grupy jest wirus mięsaka Rousa (RSV). W genomie tego wirusa oprócz trzech genów niezbędnych w cyklu życiowym wirusa (*gag*, *pol*, *env*) znajduje się gen *src* odpowiedzialny za indukcję mięsaków (*sarcoma* — stąd symbol *src*) u kur. Wirus RSV jest ostrym wirusem onkogennym niedefektywnym, to znaczy genom jego posiada te geny, które są niezbędne dla cyklu życiowego. Inne ostre retrowirusy onkogenne są zwykle defektywne. Charakterystyczną cechą ich genomu jest obecność genu *v-onc* i brak lub szczątkowe sekwencje genów „własnych” wirusa (*gag*, *pol*, *env*). Brak lub defekty w tych ostatnich genach uniemożliwiają przejście wirusa przez jego cykl życiowy. Cykl życiowy wirusów defektywnych może się odbywać tylko, gdy w czasie zakażenia jest obecny także wirus wspomagający, zawierający funkcjonalny gen kodujący rewertazę (*pol*) i geny kodujące strukturalne białka wirusa.

Na podkreślenie zasługuje ogromne rozpowszechnienie onkogennych wirusów RNA. Okazało się mianowicie, że niemal wszystkie gatunki zwierząt są nosicielami prowirusowego DNA jednego lub kilku typów retrowirusów. Prowirusowa informacja przekazuje się pionowo — a więc dziedzicznie — z rodziców na potomstwo wraz z normalnymi genami, zgodnie z prawami Mendla. Prowirusy mają ściśle określoną lokalizację w chromosomach, tak jak każdy inny gen. Wyjątkowym przykładem jest pionowe przekazywanie wirusów Bittnera u myszy z niektórych szczepów za pośrednictwem mleka matki. Przez niedopuszczenie do wykarmiania osesków mysich mlekiem własnej matki można je uchronić przed zakażeniem wirusem Bittnera i zapobiegać w znacznym stopniu pojawieniu się raków gruczołu mlecznego w późniejszych okresach życia.

Oprócz pionowego przenoszenia się informacji genetycznej retrowirusów są znane przykłady zakażeń poziomych, to znaczy takich, jakie wchodzą w grę przy epidemicznym szerzeniu się chorób zakaźnych. W zakażeniu poziomym wiriony przenoszą się z osobnika na osobnika w obrębie współcześnie istniejących obok siebie generacji. W obrębie jednego narządu normalne fibroblasty zakażają się wirionami RSV wytwarzanymi przez komórki mięsaka Rousa, który wszczepiono doświadczalnym kurom.

U człowieka jedynym udowodnionym i dobrze zbadanym przykładem nowotworu wywołanego przez zakaźnego wirusa jest białaczka wywodząca się z limfocytów T. Stąd retrowirus nazwano skrótem HTLV (human T-cell leukaemia virus). Genomy HTLV posiadają u końca 3' otwartą ramkę odczytu i kodują dwa białka tax i rex uruchamiające transformację nowotworową, między innymi poprzez aktywację genów receptorowych niektórych interleukin. HTLV nie jest spokrewniony z żadnym ze znanych wirusów zwierzęcych z wyjątkiem wirusa białaczki bydła BLV (bovine leukaemia virus).

Endemiczne ogniska zakażenia wirusem HTLV wykryto w Ameryce w basenie Morza Karaibskiego oraz w południowo-zachodniej Japonii.

ROLA GENÓW *ONC* W ROZWOJU NOWOTWORÓW

Fakt, że nowotworowa transformacja komórek somatycznych jest nieodwracalna, a cechy złośliwości z komórki macierzystej przechodzą na komórki potomne wskazuje na genetyczne mechanizmy procesu nowotworowego na poziomie komórki. Stanowisko takie rodzi z miejsca pytanie, jakie geny i jakie ich uszkodzenia mają kluczową rolę w procesie rakowacenia.

Odkrycie wirusowych genów *onc* (*v-onc*) w ostrych, transformujących retrowirusach miało pierwszorzędne znaczenie w postępie dociekań nad istotą procesu nowotworzenia. W wirusie mięsaka Rousa (RSV) zidentyfikowano gen *v-src* odpowiedzialny za indukcję mięsaków kur. Wkrótce okazało się, że homologiczny gen znajduje się w niezakażonych zdrowych komórkach kury. Gen ten nazwano komórkowym genem *src* (*c-src*). W latach 80-tych wykryto inne komórkowe geny homologiczne do wirusowych genów *v-onc*. W prawidłowej komórce eukariotycznej geny te nazywamy genami *proto-onc*. Przedrostek „proto” wskazuje, że wyjściowy pierwotny gen tego typu jest prekursorem genu nowotworowego, transformującego genu *c-onc*. Obecnie mamy ugruntowane dowody, że geny

proto-*onc* są naturalnymi i prawidłowymi składnikami genomu i występują u wszystkich gatunków świata zwierzęcego. Pełnią one różne, kluczowe, nieodzowne w biologii komórki funkcje (procesy embriogenezy, różnicowanie, proliferacja). Wśród poznanych dotychczas około 100 genów proto-*onc* znajdują się geny kodujące czynniki wzrostowe i receptory dla tych czynników. Produkty białkowe niektórych genów proto-*onc* mają funkcje swoistych kinaz białkowych biorących udział w cyklu komórkowym, jeszcze inne biorą udział w przenoszeniu sygnałów przez błonę komórkową, pełnią rolę wewnątrzkomórkowych receptorów hormonalnych, mają właściwości enzymatyczne (na przykład rozszczepiają wysokoenergetyczne wiązania w GTP). Wiele genów proto-*onc* koduje czynniki transkrypcyjne o pleiotropowych właściwościach, aktywujące dużą liczbę różnych genów. Jeszcze inne biorą udział w wytwarzaniu nowych naczyń krwionośnych.

Są dowody naukowe wskazujące, że ostre transformujące retrowirusy powstały w wyniku przeniesienia i zrekombinowania z genomem łagodnego retrowirusa sekwencji genów proto-*onc* z komórki eukariotycznej. W procesie ewolucji najpierw powstały i istniały geny proto-*onc* w komórkach eukariotycznych a dopiero w późniejszych etapach ewolucji pojawiły się wirusy onkogenne, powstałe w drodze transdukcji genów proto-*onc* z komórek zakażonego gospodarza. Sądzymy, że sekwencje komórkowego genu proto-*onc* nabrały właściwości genów transformujących po przeniesieniu w sąsiedztwo takich sekwencji wirusowych, które mają silne właściwości promotorowe, to znaczy właściwości pobudzające do stałej transkrypcji każdego genu, który znajdzie się w pobliżu takich silnych promotorów.

Retrowirusy onkogenne nie są odpowiedzialne za indukcję nowotworów u ludzi (wyjątek stanowią wirusy HIV i HTLV). Geny proto-*onc* nabierają właściwości transformujących, czyli przekształcają się w komórkowe geny *c-onc* w różnych okolicznościach. Należy w tym miejscu zauważyć, że kluczowe, prawidłowe funkcje białek kodowanych przez geny *onc* mogą być spełnione tylko wówczas, gdy białko jest syntezowane w prawidłowych ilościach, gdy pojawia się w komórce w ściśle określonych okresach i gdy ich struktura nie jest zmieniona. Wszelkie odstępstwa od tych prawidłowości sprawiają, że produkty komórkowych genów *onc* stają się elementami aktywującymi rozwój nowotworu.

Zatem wszelkie zdarzenia molekularne prowadzące do nienormalnej, nasilonej aktywności genów proto-*onc*, do aktywacji tych genów w nieodpowiednim czasie lub wreszcie do mutacji genów proto-*onc* narzucają genom proto-*onc* piętno i cechy transformujących genów *c-onc*. Te istotne rozróżnienia stanu strukturalnego i funkcji genów proto-*onc* i *c-onc* w potocznym użyciu są zacierane; mówimy po prostu o komórkowych genach *onc* (*c-onc*), a z kontekstu dyskusji wynika, czy są to geny o prawidłowej strukturze i funkcji, czy geny o cechach genów transformujących (na przykład mutanty genów).

Komórkowe geny *c-onc* są genami silnie konserwowanymi w procesie ewolucji. Są one takie same (a więc mają taką samą sekwencję nukleotydów) u człowieka i u przedstawicieli różnych gatunków zwierzęcych: myszy, szczurów, małp, kotów, ptaków, ryb i innych. Taka nieswoistość gatunkowa dowodzi, że geny *c-onc* w ciągu wielu milionów lat ewolucji gatunków nie ulegały zagubieniu i zmianom w procesach doboru naturalnego. Dokładna selekcja oraz konserwatywizm ich kodu wskazuje, że geny *c-onc* mają istotne znaczenie dla życia organi-

zmów różnych gatunków i funkcji eukariotycznych o czym wspomniano już wyżej.

Zmiany strukturalne genów *c-onc* mogą być wywołane różnymi czynnikami mutagennymi i uszkodzającymi DNA. Następstwem tych zmian, o ile nie ulegną one reperacji, są różnego rodzaju mutacje.

MUTACJA PUNKTOWA

Zmiana jednego nukleotydu w triplecie (kodonie) w obrębie genu *c-onc* przez inny nukleotyd powoduje zmianę treści kodu genetycznego, co w konsekwencji może zmienić skład aminokwasów białka transformującego (mutacja typu missens) lub wprowadzić kodon typu stop (mutacja typu nonsens). Ta ostatnia sytuacja daje w rezultacie skrócony łańcuch białkowy. Mutację typu missens spostrzeżono po raz pierwszy w genie *c-Ha-ras* wyizolowanym z raka pęcherza u ludzi. Podobnie jak w globinie w anemii sierpowatej, zmutowane białko *Ha-ras* (białko p21) w pozycji 12 zamiast glicyny posiada walinę. To podstawienie jednego aminokwasu zmienia strukturę białka p21, które jest GTP-azą i przez to obniża powinowactwo do substratu — GTP. W innych kodonach genu *c-Ha-ras* spostrzegano także inne mutacje punktowe.

Mutacje punktowe w genach *c-onc* występują w wielu różnych typach nowotworów u ludzi.

TRANSLOKACJE CHROMOSOMALNE

Złamania chromosomów z przemieszczeniem genu *c-onc* w okolicę aktywnej innej chromosomu prowadzą do trwałej aktywacji onkogeny. Jest to częsty mechanizm transformacji nowotworowej. Stałe występowanie aberracji chromosomów stwierdzono w kilku typach białaczek u człowieka i u myszy doświadczalnych oraz w chłoniakach.

Chłoniaki typu Burkitta są złośliwym rozrostem limfocytów B. Stałe występującą zmianą kariotypową jest złamanie chromosomu w miejscu 8q24, gdzie znajduje się onkogen *c-myc*. W mechanizmie wzajemnej translokacji odcinek złamanego chromosomu 8 z onkogenem *c-myc* łączy się z odcinkiem chromosomu 14 (translokacja t(8,14), złamanego w miejscu występowania genów kodujących ciężkie łańcuchy immunoglobulin. W następstwie przemieszczenia się w sąsiedztwo aktywnych genów kodujących immunoglobuliny gen *c-myc* ulega aktywacji, gdyż dostaje się pod wpływ ich promotorów.

Translokacje genów *c-onc* mogą prowadzić do powstania białek hybrydowych o patologicznej funkcji.

AMPLIFIKACJA GENÓW C-ONC

Geny *onc* jak większość innych genów występuje w komórkach diploidalnych w liczbie 2 kopii. W niektórych nowotworach występuje zjawisko amplifikacji genu *c-onc*, to jest zwielokrotnienie liczby kopii komórkowych onkogenów od kilku do kilkudziesięciu razy, co znajduje swój wyraz w wytwarzaniu większej ilości białka transformującego. Taką amplifikację genów *c-myc* stwierdzono w białaczce promielocytowej oraz w raku jelita grubego u człowieka, a także

genów *Ki-ras* w nowotworze kory nadnerczy u myszy. W neuroblastoma opisano przypadek amplifikacji genu *N-myc* do 1200 kopii.

WSTAWIENIE CZYLI INSERCJA PROMOTORA

Mechanizm ten wyjaśnia powstanie transformacji nowotworowej w komórkach wyższego organizmu po zakażeniu wirusami nie mającymi w swym genomie genów *onc*. Chodzi tu o tak zwane powoli transformujące wirusy RNA a także wirusy DNA, które wywołują zmiany nowotworowe dopiero po 4–12-miesięcznym okresie utajenia i nie wykazują zdolności do transformacji komórek w hodowli *in vitro*. W badaniach nad prowirusową postacią (DNA) powoli transformujących wirusów białaczkowych wykazano, że zespół genów strukturalnych prowirusa jest z obu stron „oflankowany” przez długie odcinki DNA, które nazwano powtarzającymi się długimi końcówkami (long terminal repeats) — w skrócie LTR. Odcinki te odgrywają rolę promotora dla sąsiednich genów strukturalnych. Aktywację genu *c-myc* przez insercję promotora opisano u kurcząt w chłoniakach wywodzących się z uchyłku Fabryciusza. Niektóre typy tak zwanych sekwencji transpozonalnych (wędrujących) mogą dawać podobny skutek jak insercja promotora wirusowego.

Mechanizmów prowadzących do przemiany genów proto-*onc* w aktywne geny transformujące *c-onc* jest znacznie więcej.

Mutacje w genach *c-onc* mają charakter mutacji dominujących. Oznacza to, że mutacja w jednym tylko allelu genu *c-onc* może dać efekt transformacyjny; produkt prawidłowego genu w nienaruszonym allelu nie jest w stanie zrekomensować patologiczny efekt genu zmutowanego. Mutacje dominujące w genach *c-onc* nie dziedziczą się. Prawdopodobnie zarodki z komórki zygotycznej, zawierającej mutację nawet w jednym allelu genu *c-onc*, giną we wczesnych okresach rozwoju.

W procesie inicjacji i promocji nowotworów spostrzega się mutacje różnych genów *c-onc*. Sądzi się, że przynajmniej 2 geny *c-onc* muszą być zmutowane, aby proces karcynogenezy mógł być rozpoczęty. W wyłaniających się w procesie karcynogenezy klonach komórkowych kumulują się mutacje kolejnych genów.

Synergistyczny efekt mutacji w różnych genach *c-onc* był obserwowany u myszy transgeniczných z wprowadzonym mutantem genu *c-myc* i genu *c-ras*. Zapadalność na nowotwory była znacznie większa w przypadku wprowadzenia obu transgenów *onc* niż po wprowadzeniu tylko jednego z nich.

Ostatnio zwraca się uwagę na możliwość wystąpienia mutacji w obrębie poza genowych sekwencji niekodujących typu sekwencji powtarzających się (mikrosatelitarnych). Są to tak zwane mutacje dynamiczne, które prowadzą do zmian w liczbie kopii sekwencji powtarzających się. W konsekwencji mogą zmieniać się konformacje dużych domen DNA i wpływać na funkcję genów zawartych w tych domenach. Biologiczne skutki aktywnych genów *c-onc* realizują się ostatecznie w zwiększonej aktywności proliferacyjnej komórek.

GENY SUPRESOROWE (ANTY-ONKOGENY)

W hybrydach komórek nowotworowych z komórkami prawidłowymi, powstałych w wyniku fuzji obu rodzajów tych komórek nie ujawniają się cechy złośliwości, a więc fenotyp nowotworowy jest tłumiony. Podobną supresję fenotypu nowotworowego uzyskano po wprowadzeniu do komórek nowotworowych izolowanych chromosomów komórek prawidłowych, a użycie pojedynczych chromosomów pozwoliło na określenie tych chromosomów, które wywoływały efekt supresyjny. W miarę upływu czasu niektóre komórki odzyskiwały swój złośliwy charakter (rewertowały), a zjawisku temu towarzyszyła utrata określonego chromosomu lub części chromosomu. Te spostrzeżenia wskazywały na istnienie genów supresorowych, od których zależał efekt supresyjny. Innym dowodem na obecność w genomie genów supresorowych były spostrzeżenia, że pewnym typom nowotworów towarzyszą aberracje struktury chromosomów, zwłaszcza delecje. Takie delecje ujawniano na poziomie molekularnym techniką analizy długości fragmentów restrykcyjnych (RFLP — restriction fragment length polymorphism). Analiza techniką RFLP umożliwiła mapowanie na chromosomach tych loci, w których wystąpiło zjawisko utraty heterozygotyczności (LOH — loss of heterozigoty) to znaczy loci, gdzie rezydowały geny supresorowe. Niezwykle użyteczne okazały się też analizy aberracji chromosomalnych w przypadkach dziedzicznych predyspozycji do rozwoju nowotworów wskazujące na istnienie genów supresorowych. Analiza sporadycznej (jednostronnej) i dziedzicznej, dwustronnej postaci siatkówczaka oka (*retinoblastoma*) pozwoliła sformułować hipotezę, w myśl której dziedziczny siatkówczak powstał w wyniku dwustopniowej mutacji w obrębie domniemanego genu *Rb* mającego funkcje supresorowe, którego locus przypisano do długiego ramienia chromosomu 13. W 1985 roku gen *Rb* został zidentyfikowany, następnie poznano jego budowę a potem budowę i funkcję jego produktu — białka p105^{Rb}. Molekularny proces odpowiedzialny za rozwój dziedzicznych postaci siatkówczaka polega na wystąpieniu w komórce zygotycznej mutacji jednego allelu, mutacji obecnej w plemniku ojca lub komórce jajowej matki. Drugi allel genu *Rb* ulega mutacji w życiu płodowym lub po urodzeniu i dopiero wówczas rozwija się nowotwór. Mutacja w supresorowym genie *Rb* ma więc charakter recesywny tak długo, jak utrzymuje się nie naruszony („dziki”) allel *Rb*, czyli tak długo, jak długo locus *Rb* jest w stanie heterozygotyczności choroba nie rozwija się. Produkt dzikiego allelu *Rb* kompensuje funkcję zmutowanego allelu. Eliminacja normalnego genu *Rb* (na przykład na drodze delecji) manifestująca się jako LOH prowadzi do ujawnienia się choroby nowotworowej.

Dziś znamy kilkanaście genów supresorowych, ich strukturę i funkcję ich produktów białkowych oraz udział w rozwoju dziedzicznych postaci nowotworów.

Białka, produkty genów supresorowych mają zwykle funkcje plejotropowe. Ogólnie rzecz biorąc geny supresorowe są antagonistami genów *onc*, stąd synonim geny *anty-onc*. Białka supresorowe (produkty na przykład genu *Rb*,

genu *p53*) mają właściwość kompleksowania z białkami onkogennymi wirusów, grają rolę regulatorów ekspresji genów i kontroli cyklu komórkowego.

Gen kodujący białko *p53* jest jednym z genów najczęściej zmutowanych w różnych typach nowotworów. Białko *p53* jest strażnikiem prawidłowego cyklu komórkowego. Spostrzeżono, że uszkodzenia DNA w fazie G_1 indukuje aktywność genu *p53* a ekspresja białka *p53* uniemożliwia poprzez złożony mechanizm molekularny rozpoczęcie replikacji DNA (wejście komórki w fazę S) dopóty, dopóki procesy naprawcze nie usuną uszkodzeń. Komórka z nie naprawionym materiałem genetycznym nie wchodzi w fazę replikacji, lecz jest skierowana na drogę wiodącą do apoptozy czyli genetycznie programowanej śmierci komórki.

Współdziałanie genów supresorowych *p53*, *Rb* z genami kodującymi inhibitory (na przykład białka *p15*, *p16*, *p21*, *p27*) kinaz zależnych od cyklu komórkowego (na przykład *Cdk 4,6*) z cyklinami A, B, E, D i czynnikiem transkrypcyjnym E2F stanowi złożony mechanizm regulujący cykl komórkowy i kontrolujący proliferację komórek.

Rozwój nowotworu złośliwego jest wynikiem interakcji między szeroko pojętymi czynnikami środowiskowymi a genami. W przypadku tak zwanych nowotworów samorzutnych czynniki dziedziczne nie manifestują się lub też nie dostrzegamy ich. Przyjmuje się, że w takich przypadkach nowotwór był spowodowany czynnikiem środowiskowym.

W niektórych rodzinach nowotwory występują w niezwykle wielkiej liczbie. Takie rodzinne agregacje nowotworów mogą być przypadkowe, mogą powstawać w następstwie ekspozycji członków rodzin na wspólny czynnik rakotwórczy lub wreszcie mogą być przejawem obarczeń dziedzicznych. Nie spostrzegano dotychczas, aby w przypadku nowotworów dziedziczyły się dominujące mutacje w genach *c-onc*. Przypuszcza się, że mutacje takie są letalne; co oznacza, że zarodki z komórki zygotycznej niosącej mutacje w genach *onc* nie mogą się rozwijać. Inaczej dzieje się z recesywnym genem supresorowym, gdzie mutacja jest skompensowana „dzikim” allelem tego genu. Zarodki heterozygotyczne ze zmutowanym allelem genu supresorowego mogą rozwijać się prawidłowo a osobnicy heterozygotyczni są klinicznie zdrowi. Dopiero mutacja lub delecja drugiego, normalnego allelu prowadzi do osiągnięcia stanu homozygotyczności, co pozwala na rozwój nowotworu. Mechanizm taki postulowano w przypadkach dziedzicznej postaci siatkówczaka (*retinoblastoma*), gdzie rozwija się dwuoczną, wieloogniskową postać nowotworu. Pierwsza mutacja w jednym z alleli supresorowego genu *Rb* jest wniesiona do komórki zygotycznej ze strony ojca lub matki. Inaktywacja drugiego allelu następuje w życiu płodowym lub we wczesnym okresie życia noworodka.

Oprócz siatkówczaka są znane inne dziedzicznie występujące nowotwory związane z mutacjami genów supresorowych. Stanowią one na ogół mały odsetek nowotworów samorzutnych. Zalicza się tu raki sutka z mutacją w genie *p53* (tak zwanej rodziny Li-Fraumeni), raki sutka i jajnika (mutacje w genie *BRCA1* i *BRCA2*), guz Wilmsa (nowotwór nerki u dzieci), mnogie nowotwory gruczołów dokrewnych (mutacje w genach *MEN*), neurofibromatoza typ 1 (choroba Recklinghausena) i typ 2 (oponiaki i nowotwory z komórek Schwanna), rak jelita grubego na tle rodzinnej polipowatości, rzadziej rak płuca i innych narządów.

W większości tych nowotworów stwierdzono stan homozygotyczności w odpowiednich loci genów supresorowych.

Rodzinne zespoły dziedziczne (*Ataxia teleangiectasia*, *Xeroderma pigmentosum*, anemia Fankoniego, zespół Blooma, progeria i in.) cechują się predyspozycją do rozwoju nowotworów złośliwych. W zespołach tych występują dziedziczne wady w układach enzymatycznych naprawiających uszkodzenia w DNA, w związku z czym częstość uszkodzeń DNA powodowanych przez czynniki fizyczne (na przykład promieniowanie UV) i chemiczne jest wysoka.

Indywidualna wrażliwość na czynniki rakotwórcze jest związana z genetycznie uwarunkowanym wzorem metabolizmu ksenobiotyków i procesami detoksyfikacji, o czym była wzmianka wyżej.

Jak widać z tego krótkiego przeglądu rozwój nowotworów złośliwych jest niezwykle złożonym zjawiskiem biologicznym. Kluczową rolę w procesie nowotworzenia mają oddziaływania środowisko — geny. Obecnie zwraca się baczniejszą uwagę na komponenty dziedziczne w rozwoju chorób nowotworowych.

CANCER BIOLOGY — AN INTRODUCTION

The general biological features of cancer cells, type of carcinogens and mechanism of cancer transformation were discussed.