

JANUSZ A. SIEDLECKI

*Centrum Onkologii-Instytut im. Marii Curie-Skłodowskiej**Zakład Biologii Komórki i Terapii Doświadczalnej**Wawelska 15, 02-034 Warszawa*

MOLEKULARNE PODSTAWY CHORÓB NOWOTWOROWYCH

Badania nad molekularnymi podstawami chorób nowotworowych absorbują naukowców od wielu lat. Powoli zaczyna się kształtować obraz zmian molekularnych, którym musi podlegać komórka na drodze do fenotypu nowotworowego. Większość współczesnych danych wskazuje na brak zasadniczych zmian różnicujących komórki normalne od nowotworowych (tab. 1). Najpoważniejsze wydają się zmiany prowadzące do częściowej lub całkowitej utraty inhibicji kontaktowej w tym inhibicji kontaktowej ruchu. Inne zmiany (na zmiany w poziomie lub aktywności niektórych enzymów) mają raczej charakter ilościowy. Czasami zmianom ilościowym towarzyszą pewne zmiany jakościowe, na przykład pojawianie się produktów zmienionych ale zachowujących właściwości produktu podstawowego lub zmiany w czasie ich trwania w komórce. O komórkach, które nabierają wyżej wspomnianych cech, mówi się, że nabyły fenotyp komórki nowotworowej, czyli uległy transformacji. Dwie cechy czynią komórki nowotworowe szczególnie niebezpiecznymi dla całego organizmu. Niepohamowany wzrost związany z dużą niestabilnością genetyczną oraz zdolność do inwazji i kolonizacji obszarów normalnie zajmowanych przez inne rodzaje komórek (ALBERTS i współaut. 1989).

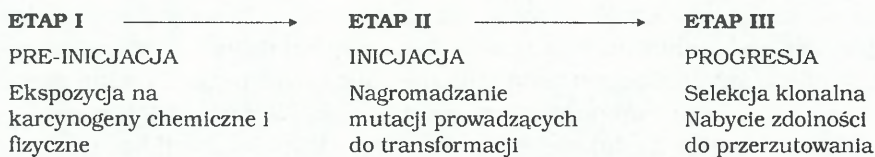
Tabela 1

Niektóre zmiany towarzyszące transformacji

Zmiany w błonach komórkowych	Zmiany adhezyjne	Zmiany we wzroście i podziałach komórek
Zwiększenie transportu metabolitów Zwiększenie tworzenia pęcherzyków błonowych Wzrost mobilności białek błonowych	Zmniejszenie adhezji powierzchniowej Przyjmowanie bardziej okrągłych kształtów Brak prawidłowej organizacji filamentów aktynowych Zanik zewnętrznych struktur fibronektynowych Nadprodukcja aktywatora plazminogenu	Wzrost do nienaturalnie wysokich gęstości Obniżenie wymagań dla czynników wzrostu Nabycie zdolności do nieograniczonej proliferacji Nabycie zdolności do wzrostu w zawiesinie DNA izolowane z tych komórek może powodować transformację

ETAPY KARCYNOGENEZY

Proces przekształcania się komórki normalnej w nowotworową można podzielić na trzy etapy (STEFFEN 1993) (ryc. 1). W pierwszym etapie, nazwanym pre-inicjacją, mamy przede wszystkim do czynienia z kontaktem komórek normalnych z pre-karcynogenem lub karcynogenem. W tym etapie istotną rolę odgrywają predyspozycje genetyczne. Są one przede wszystkim związane z polimorfizmem genów kodujących enzymy uczestniczące w metabolizowaniu i detoksyfikacji czynników rakotwórczych. Sprawność w metabolizowaniu karcynogenów oraz szybkość detoksyfikacji determinuje czas ekspozycji komórki na działanie czynników uszkadzających, w tym w szczególności uszkadzających jej DNA. Ponadto predyspozycje genetyczne są związane również z polimorfizmem genów kodujących enzymy systemu reperacyjnego. Polimorfizm w obszarze systemu reperacyjnego w zdecydowany sposób może wpłynąć na częstość mutacji, a co za tym idzie, sprzyjać procesowi karcynogenezy.



Ryc. 1. Etapy karcynogenezy

Drugi etap to proces właściwej inicjacji. Rozpoczyna się on wraz z pojawieniem się pierwszej mutacji. Gromadzenie się kolejnych mutacji w istotnych ze względu na funkcję komórki genach musi w konsekwencji doprowadzić do powstania komórki stransformowanej. Kolejne mutacje mogą wystąpić spontanicznie, ale też mogą być wywołane przez pewne związki chemiczne, czynniki fizyczne oraz mogą być wynikiem infekcji komórki przez tak zwane wirusy onkogenne. Mutacje niezbędne do przeprowadzenia komórki normalnej w nowotworową tworzą tak zwany szlak mutacyjny. Nie wszystkie mutacje w tym szlaku mają jednakową wagę, na przykład w raku jelita grubego mutacje w genie *p53* występują w prawie 80%, podczas gdy mutacje w genie *ras* jedynie w kilku procentach nowotworów. Wydaje się, że i na tym etapie predyspozycje genetyczne odgrywają istotną rolę. Jeśli jedna z mutacji szlaku jest odziedziczona to czas niezbędny do transformacji komórki w nowotworową jest skrócony o czas jednego wydarzenia mutacyjnego. Jest to szczególnie dobrze widoczne w nowotworach dziecięcych i w zespołach na przykład Li-Fraumeni czy Blooma.

Ostatnim etapem jest progresja nowotworu, czyli nabywanie przez komórki zdolności do nieograniczonego wzrostu, a w wypadku nowotworów złośliwych do tworzenia przerzutu. Na tym etapie zdecydowaną rolę wydają się odgrywać zjawiska związane ze zmianami w błonach komórkowych, a w szczególności z nabywaniem nowych cech przez białka adhezyjne błony. Ponadto zmianom ulegają też poziomy enzymów lizujących tak zwaną błonę podstawną w tym

w szczególności kolagenaz. Dotychczasowe dane dotyczące etapu progresji nie pozwalają w pełni uzasadnić roli predyspozycji genetycznych na tym etapie.

Przyczyny transformacji, jak z powyższego wynika, leżą w zmianach w materiale genetycznym komórki. Pierwszą osobą, która potwierdziła prawidłowość powyższych rozważań był uczony norweski, A. Knutson. Na podstawie badań epidemiologicznych nad siatkówczakiem wysunął hipotezę, że komórka może ulec transformacji, jeśli zajądą w jej genomie co najmniej dwie niezależne mutacje. W większości przypadków zmiany te są skutecznie usuwane albo na poziomie pojedynczej komórki przez system reperacyjny, albo na poziomie organizmu przez system immunologiczny. Istnieje jeszcze jedno dodatkowe zabezpieczenie. Komórka może zostać skierowana na drogę programowanej śmierci zwanej apoptozą (patrz dalej). Jeśli zawiodą wszystkie wspomniane powyżej zabezpieczenia powstaje komórka stransformowana.

GENY SZLAKU MUTACYJNEGO

Geny komórkowe związane z transformacją nowotworową mogą oddziaływać w różny sposób: po pierwsze mogą zmienić swoją normalną funkcję poprzez: a. mutacje, które powodują zmiany w funkcji białek, b. translokacje chromosomowe, które prowadzą do zmian w ekspresji genu lub do jego strukturalnych zmian, c. poprzez amplifikację, w wyniku której następuje selektywny wzrost liczby kopii określonego genu; po drugie poprzez całkowitą utratę komórkowych genów. Może to nastąpić poprzez: a. mutację, która inaktywuje prawidłową funkcję danego genu, i b. delecję z genomu.

Liczbę genów w genomie człowieka można ocenić na około 50 000. W przeciętnej komórce jedynie 15 000–20 000 genów jest aktywnych; z nich prawdopodobnie najwyżej kilkaset może oddziaływać znacząco, bezpośrednio lub pośrednio w procesie karcynogenezy. Geny aktywnie uczestniczące w szlaku mutacyjnym można podzielić na cztery główne grupy:

1. geny, których produkty białkowe uczestniczą w przekazywaniu informacji pomiędzy zewnętrzną częścią błony komórkowej a jej wnętrzem i pomiędzy wnętrzem a jądrem komórkowym — onkogeny;
2. geny, których produkty białkowe uczestniczą w procesach związanych z ekspresją innych genów czyli są czynnikami transkrypcyjnymi — onkogeny i antyonkogeny;
3. geny, których produkty białkowe mają wpływ na prawidłowy przebieg proliferacji komórek — antyonkogeny;
4. geny, których produkty białkowe wpływają na wierność replikacji/reparacji podnoszące częstość mutacji kilkadziesiąt do kilkuset razy — geny mutatorowe.

Z przedstawionego powyżej podziału widać, że geny te, z wyjątkiem ostatniej grupy, uczestniczą przede wszystkim w przekazywaniu informacji o stanie komórki na różnych szczeblach jej organizacji. Każda komórka jest w stanie odbierać cały szereg sygnałów z zewnątrz. Docierają one do jądra komórki poprzez zakotwiczone na powierzchni komórki białka, które nazywamy receptorami. Sygnały te to nie tylko tak zwane hormony wzrostu czy też czynniki

depolaryzujące błonę komórkową ale również zmiany w istotnych dla funkcjonowania komórki stężeniach kationów, takich jak sód czy wapń. Poprzez receptory oddziałują one na wnętrze komórki. Wiele z tych receptorów może przekazać dalej informację. Mówimy wówczas o uruchomieniu tak zwanych przekaźników drugiego rodzaju. One to pośrednio lub bezpośrednio przekazują informacje o warunkach zewnętrznych do jądra komórkowego. Informacja ta docierając do jądra zostaje przetłumaczana na język aktywatorów transkrypcji. O tym, które geny w danej komórce zostaną uaktywnione, decyduje przede wszystkim obecność tak zwanych czynników transkrypcyjnych. To one, łącząc się z promotorem genu, rozpoczynają proces jego uaktywnienia a w połączeniu z innymi białkami regulują również jego ekspresję. Jest to bardzo skomplikowany i subtelny system równowagi decydujący o prawidłowym przebiegu szlaków metabolicznych w komórce. Każde zaburzenie w tej regulacji może prowadzić do destabilizacji komórki, a co za tym idzie, mieć dla niej poważne konsekwencje (ALBERTS i współaut. 1989).

ONKOGENY I ANTYONKOGENY

Wirusy onkogenne mogą zawierać materiał genetyczny w postaci DNA tak jak normalne komórki, ale mogą też posiadać RNA zamiast DNA. Tego typu onkogenne wirusy noszą nazwę retrowirusów. Badania nad transformującymi mechanizmami wirusów onkogennych doprowadziły do wyodrębnienia fragmentów genomu, bez których wirus traci swoje własności onkogenne. Te fragmenty nazwano właśnie onkogenami. Wkrótce okazało się, że normalna komórka posiada bardzo wiele, choć nie wszystkie, odpowiedników onkogenów (tabela 2). Dla odróżnienia ich od onkogenów znalezionych w wirusach nazwano je proto-onkogenami lub komórkowymi onkogenami. W literaturze fachowej stosuje się określenia *v-onc* i *c-onc* na oznaczenie wirusowych i komórkowych onkogenów.

Tabela 2

Funkcja onkogenów i ich komórkowych odpowiedników

Funkcja produktu onkogenu	Nazwa onkogenu
Kinazy białkowe tyrozyny seryny/treoniny	<i>src, yes, fgr, abl, fps, erb-B, kit, sea, ros raf, mos</i>
Czynniki wzrostu i ich receptory PDGF EGF-Rec Tyroid horm-Rec M-CSF-Rec	<i>sis erb-B erb-A fms</i>
Białka wiążące GTP	<i>H-ras K-ras N-ras</i>
Czynniki transkrypcyjne	<i>myb, myc, fos, jun, ets, rel, ski</i>

Badania wirusowych onkogenów i ich komórkowych analogów pozwoliły na ustalenie roli tych genów w procesach transformacyjnych. Wiele znanych proto-onkogenów zalicza się do przekaźników zaangażowanych w przenoszenie

informacji dla komórki o jej podziale lub różnicowaniu. Inne kodują czynniki wzrostu, receptory dla czynników wzrostu, tak zwane białka G, cytoplazmatyczne kinazy białkowe oraz czynniki transkrypcyjne (tabela 2). Wirusowe onkogeny cechuje duże podobieństwo do ich komórkowych analogów. Ich homologia waha się w granicach od 20% do 80%. Są więc one odpowiednikami komórkowych przekaźników sygnałów, ale takimi, które uciekają spod normalnych komórkowych mechanizmów kontrolnych. Podobnie, mutacje proto-onkogenów powodują, że ich produkty białkowe upodabniają się w swoim działaniu do produktów onkogenów wirusowych.

W komórce normalnej produkt genu jest niewątpliwie włączony w zapewnienie jej prawidłowego rozwoju. Jeżeli utrata jakiegoś genu jest ściśle związana z transformacją komórki normalnej do nowotworowej, to taki gen nazywamy genem supresorowym transformacji nowotworowej, lub antyonkogenem (ang. tumor suppressor gene). Geny te pełnią w komórce bardzo wiele istotnych funkcji, ale przede wszystkim są zaangażowane w kontrolę procesu proliferacji komórkowej (tabela 3).

Tabela 3

Geny supresorowe transformacji nowotworowej

Gen supresorowy	Lokalizacja chromosomalna	Funkcja produktu genu
<i>p53</i>	17p13.1	czynnik transkrypcyjny, kontroler prawidłowego przebiegu proliferacji, strażnik genomu
<i>Rb1</i>	13q14	kontroler prawidłowego przebiegu proliferacji, czynnik transkrypcyjny
<i>APC</i>	5q21	?
<i>WT1</i>	11p13	? czynnik transkrypcyjny
<i>NF1</i>	17q11	cytoplazmatyczne białko aktywujące GTP
<i>NF2</i>	22q	białko cytoszkieletu
<i>VHL</i>	3p25	?
<i>MTS1</i>	9p21	inhibitor kinazy cdk4

GENY MUTATOROWE

Mniej więcej cztery lata temu grupa fińsko-amerykańska pod kierunkiem A. de la Chapelle z Uniwersytetu w Helsinkach i B. Vogelsteina z Uniwersytetu Johna Hopkinsa w Nowym Jorku rozpoczęła pracę mającą na celu ustalenie odziedziczanego defektu genowego w rodzinnym raku jelita grubego, w którym nie występuje polipowatość jelit. Wbrew oczekiwaniom, u członków badanych rodzin nie stwierdzono dziedzicznego defektu żadnego spośród przebadanych onkogenów, jak i genów supresorowych. Zespół De la Chapelle'a i Vogelstein'a podjął więc bardzo żmudne badania polegające na poszukiwaniu związku pomiędzy zachorowaniem a dziedziczeniem polimorficznych markerowych sekwencji DNA. Jako markery wykorzystano sekwencje tak zwanego mikrosatelitarnego DNA. W wyniku badań z zastosowaniem około 350 tego typu sond udało się ustalić taką korelację z dziedzicznym polimorfizmem sekwencji zlokalizowanym

w ramieniu krótkim chromosomu 2 w pozycji 2p15-16. W dalszych badaniach prowadzonych na komórkach nowotworowych pobranych od chorych zespół kierowany przez De la Chapelle'a i Vogelstein'a nie stwierdził utraty heterozygotyczności w analizowanym fragmencie co wskazuje, że w komórkach nowotworowych prawidłowy allel tego genu nie podlega delecji, jak to ma miejsce w przypadku genów supresorowych transformacji nowotworowej (na przykład genu *p53*). W badaniach tych zaobserwowano również, że zmiana w prażku p15-16 chromosomu 2 towarzyszą ogromne zmiany w całym genomie. Autorzy postawili więc hipotezę, że fragment ten zawiera prawdopodobnie pojedynczy gen, który jest albo częścią aparatu replikującego DNA odpowiedzialnego za wierność kopiowania, albo też za tak zwaną reperację poreplikacyjną (MARX 1993a). W pół roku po odkryciu pierwszego genu mutatorowego ogromny zespół (pod publikacją podpisało się 35 osób z dwunastu ośrodków naukowych całego świata) ustalił, że gen ten koduje białko będące homologiem drożdżowego białka *msh2*. W drożdżach białko to jest elementem poreplikacyjnego systemu naprawy błędnie sparowanych zasad (ang. mismatch repair), a jego rola w tym systemie naprawczym polega na rozpoznaniu i związaniu się z błędnie sparowanymi zasadami. Produkt zdefektowanego genu nie rozpoznaje lub rozpoznaje w ograniczonym zakresie źle sparowane zasady, co prowadzi do narastania liczby mutacji rozproszonych w sposób przypadkowy po całym genomie. Do rozwoju nowotworu dochodziłoby wówczas, gdy takie mutacje wystąpiłyby w genach, których defekty są istotne z punktu widzenia procesu transformacji. W drożdżach, w systemie naprawy błędnie sparowanych zasad z produktem genu *msh2* współdziałają dodatkowo dwa inne białka. Ich poszukiwania u ludzi doprowadziły w maju tego roku do zlokalizowania na chromosomie 3p obu ludzkich homologów. Wstępne dane wydają się sugerować, że podobnie jak w przypadku genu *msh2*, mutacje w obu pozostałych genach są zasocjowane z rodzinnym rakiem jelita grubego (FISHEL i współaut. 1993, CLEAVER 1994, JIRICNY 1994).

TRANSFORMACJA NOWOTWOROWA A ZABURZENIA W PRZEBIEGU CYKLU KOMÓRKOWEGO

Prawidłowość przebiegu cyklu komórkowego jest gwarantowana przez istnienie dwóch tak zwanych punktów restrykcyjnych. Punkt pierwszy to granica faz G1 i S. Tu przede wszystkim odbywa się kontrola integralności materiału genetycznego. Wykrycie uszkodzenia w DNA powoduje zatrzymanie procesu replikacji i uruchomienie systemów naprawczych. Drugi punkt to granica faz G2 i M, gdzie odbywa się kontrola tworzenia się funkcjonalnego wrzeciona podziałowego przed mitozą. Obecnie dysponujemy już sporą liczbą danych na temat mechanizmów kontrolujących oba punkty restrykcyjne.

ROLA *rb1* i *p53*

Dwa antyonkogeny wydają się szczególnie istotne z punktu widzenia ich wpływu na przebieg cyklu komórkowego, a co za tym idzie proliferacji. Jeden z nich to produkt genu oznaczonego *rb1*, a drugi genu *p53*. Białkowe produkty tych genów odgrywają kluczową rolę w regulacji cyklu komórkowego. Produkt

genu *rb1* — białko p110 posiada zdolność do wiązania się z czynnikami transkrypcyjnymi, gdy jest w formie ufosforylowanej. Na przykład, gdy jego częściowo ufosforylowana postać jest związana z czynnikiem transkrypcyjnym E2F, to ten kompleks inaktywuje procesy transkrypcji pewnych genów. W fazie G1 następuje dysocjacja E2F od białka p110 i rozpoczyna się proces aktywnej transkrypcji. P110 zostaje przekształcone w białko p107, które po połączeniu się z cykliną A i p34 wyłącza produkt genu *rb1*. W fazie S białko p110 jest w postaci w pełni ufosforylowanej i przebywa w niej aż do końca fazy G2. Podczas fazy M następuje częściowa defosforylacja, która uaktywnia p110 do tworzenia kompleksu z E2F. Wyłączenie transkrypcji sprzyja wyprowadzeniu komórki do fazy G0. Wyjściu komórki z fazy G0 towarzyszy defosforylacja i dysocjacja E2F od p110 (NEVINS 1992).

Produkt genu *p53* — białko p53 jest jednym z najistotniejszych, jeśli nie najistotniejszy, regulatorem cyklu komórkowego. Jego rolę w cyklu determinuje przede wszystkim jego udział w kontroli integralności genomu. Stąd też białko p53 jest nazywane często strażnikiem molekularnym lub strażnikiem genomu (LANE 1992). Biologicznie aktywną formą białka jest odpowiednio ufosforylowany homotetramer. Rozpoznaje on ściśle określoną sekwencję DNA, czyli zachowuje się jak czynnik transkrypcyjny. Pod koniec fazy G1 ilość białka p53 rośnie. Z cytoplazmy przedostaje się do jądra. Jego wnikięcie do jądra powoduje zatrzymanie wzrostu komórek w fazie w G1. W przypadku stwierdzenia uszkodzeń w DNA jego ilość w jądrze rośnie powodując zatrzymanie cyklu komórkowego. Białko p53 jest również fosforylowane w zależności od cyklu komórkowego. Stopień fosforylacji może mieć wpływ na zdolność do tworzenia homotetrameru a zatem i na zdolność do aktywacji określonych genów. Maksymalny poziom fosforylacji jest osiągany w fazie M cyklu. Gen *p53* zawiera cztery obszary sekwencji o znacznej homologii międzygatunkowej. Większość mutacji w genie *p53* występuje właśnie w tych obszarach. Są to przeważnie delecje fragmentu lub całego genu oraz mutacje punktowe prowadzące do zmiany jednego aminokwasu na drugi. Zmutowane białko cechuje znacznie przedłużony czas „życia” w komórce. Normalne białko p53 ma okres półtrwania 10–20 min, podczas gdy jego zmutowany odpowiednik potrafi pozostawać w komórce nawet do 12 godzin. W większości przypadków zmutowane białko nie traci zdolności do tworzenia tetramerów z prawidłowym białkiem p53. Taki heteromer traci jednak zdolność do specyficznego wiązania się z DNA, przez co nie może pełnić funkcji regulatora transkrypcji. Podobnie jak zmutowane białko p53 zachowują się niektóre białka kodowane przez onkogeny wirusowe, na przykład antygen T wiurusa SV40, białko E6 wirusa HPV czy białko E1b adenowirusa. Wiążą się one z prawidłowym białkiem p53. Powstały heteromer białka p53 i białka wirusowego jest również nieaktywny jako regulator transkrypcji. Konsekwencją powstałego połączenia jest obniżenie ilości normalnego białka p53. Zmniejszenie poziomu prawidłowego p53 przez połączenie ze zmutowaną wersją białka czy też z białkiem wirusowym prowadzi do przedwczesnego zwolnienia bloku proliferacyjnego. Rozpoczyna się wówczas runda replikacji DNA, co może doprowadzić do utrwalenia zmiany mutacyjnej w przypadku, gdy nie został zakończony proces naprawy uszkodzonego DNA. Utrata kontroli nad proliferacją komórki prowadzi do gromadzenia się komórek genetycznie niestabilnych z różnymi mutacjami i aberr-

cjami chromosomalnymi. To z kolei do szybkiej selekcji komórek stransformowanych (CULOTTA i KOSHLAND Jr. 1993, SIEDLECKI 1993a).

Ze względu na dużą rolę białka p53 w procesach metabolicznych jego funkcja musi być precyzyjnie regulowana. Poszukiwania regulatorów funkcji białka p53 zakończyły się pomyślnie dwa lata temu z chwilą odkrycia genu nazwanego *mdm2*. Bliższa analiza tego genu zlokalizowanego na chromosomie 12q13-14 wskazuje, że dzięki alternatywnemu splicingowi (złożenie genu) powstają cztery różne transkrypty. Produkty białkowe trzech z nich łączą się bezpośrednio z prawidłowym białkiem p53, podczas gdy czwarty produkt, pozbawiony N-końcowej części białka, nie wykazuje zdolności do łączenia z p53. Sugeruje to jednocześnie, że ten region białka odpowiada za oddziaływanie z białkiem p53. Sekwencja aminokwasowa białek *mdm2* ujawnia, że białko to posiada miejsce wiążące się z metalem oraz tak zwane palce cynkowe, które są miejscem oddziaływania z DNA. Wydaje się więc, że białko *mdm2* spełnia również dodatkową funkcję czynnika transkrypcyjnego dla pewnych genów. Ze względu na te właściwości białko *mdm2* może być zaliczone do klasy onkogenów. Białko *mdm2* tworzy z cząsteczką p53 heterodimer analogiczny do tego, jaki tworzy z białkami wirusowymi lub zmutowanym białkiem p53. Dane białko *mdm2* poprzez połączenie z białkiem p53 moduluje aktywność transkrypcyjną p53 prawdopodobnie na zasadzie ujemnego sprzężenia zwrotnego. Jest również możliwe, że z punktu widzenia regulacji transkrypcji istotny jest ilościowy stosunek między obu białkami *mdm2*/p53. Wydaje się, że heterodimer p53-*mdm2* blokuje ekspresję genów dla których białko p53 jest czynnikiem transkrypcyjnym. Ponadto powstanie kompleksu białkowego p53-*mdm2* prowadzi do zmniejszenia stężenia wolnego białka p53, i co za tym idzie do zwolnienia boku proliferacyjnego (HAINES i współaut. 1994). Tak więc konsekwencje nadekspresji genu *mdm2* są podobne do tych jakie wywołuje mutacja w genie *p53*. Ostatnio wykazano w niektórych nowotworach zwiększoną ekspresję genu *mdm2*. Takie przypadki obserwowano w mięsach tkanek miękkich i kości oraz w glejakach i gwiaździakach (REINFERBERGER i współaut. 1993). W ciągu ostatnich kilku lat stało się jasne, że utrata aktywności supresorowej genu *p53* prawie zawsze jest etapem prowadzącym do transformacji nowotworowej.

KINAZY CYKLIN I ICH INHIBITORY

Najnowsze badania prowadzone przez Kamba, Skolnicką i ich współpracowników, poszukujących w komórkach czerniaka genu szczególnie istotnego w szlaku mutacyjnym prowadzącym do transformacji nowotworowej (ang. susceptibility gene), ujawniły istnienie nowego antyonkogenu, którego udział w tym procesie może być nawet większy niż genów *p53* i *rb1* (MARX 1994). Ku swemu zdziwieniu badacze ci stwierdzili, że delecje i mutacje w tym genie towarzyszą nie tylko komórkom czerniaka, ale również komórkom wielu innych typów nowotworów. Z dotychczasowych danych doświadczalnych wynikało, że najczęściej spotykaną zmianą w większości nowotworów jest zmiana w genie *p53*. Dotyczy ona bowiem ponad 50% wszystkich typów nowotworów. Według wstępnych danych opublikowanych w jednym z ostatnich numerów *Science* KAMBA i współautorzy (1994) stwierdzili zmiany w obrębie badanego genu w ponad 75%

przebadanych komórek nowotworowych. W 50% były to delecje całego lub części genu a w około 25% mutacje punktowe. Gen ten, nazwany *MTS1* (ang. multiple tumor supressor), zlokalizowano na chromosomie 9p21. Koduje on niskocząsteczkowe białko o ciężarze 16000 daltonów (p16). Jest ono inhibitorem tak zwanej cdk-4 kinazy, enzymu fosforylującego cyklinę D. Cykliny to grupa białek odgrywająca czołową rolę w cyklu komórkowym. Ich fosforylacja przez odpowiednią kinazę jest motorem wprawiającym w ruch mechanizmy cyklu komórkowego. Ufosforylowane cykliny tworzą kompleks białkowy zwany MPF I (ang. maturation promoting factor) z kinazą białkową zwaną p34. Brak fosforylacji cyklin uniemożliwia utworzenie kompleksu MPF I i rozpoczęcie syntezy DNA. Fosforylacja cyklin jest konieczna również w fazie podziałowej. Gen *MTS1* wykazuje 93% podobieństwa do drugiego genu znajdującego się w bezpośrednim sąsiedztwie, który nazwany został *MTS2*. Produkt tego genu jest o kilka aminokwasów krótszy niż p16. Funkcja *MTS2* nie jest znana, ale podobieństwo sekwencji do *MTS1* sugeruje, że może to być również inhibitor kinaz typu cdk. Nie można też wykluczyć, że jest to skrócony, nie funkcjonalny gen, w oparciu o który nie może powstać prawidłowy produkt (ang. truncated gene) (MARX 1994).

Białko p16 jest już kolejnym opisanym w ciągu ostatniego półrocza inhibitorem kinaz białkowych typu cdk. W połowie 1993 roku Vogelstein opisał regulowany przez białko p53 produkt genu *WAF 1* (EL-DEIRY i współaut. 1993). Białko to, zwane p21, również hamuje aktywność kinaz fosforylujących cykliny w szczególności kinazę cdk2 uczestniczącą w fosforylacji cykliny E. Zupełnie niedawno okazało się, że białko p21 może również bezpośrednio oddziaływać z innym białkiem, elementem składowym kompleksu replikacyjnego, zwanym PCNA (ang. proliferating cell nuclear antigen). Nawiasem mówiąc PCNA nazwany był przez pewien czas również cyklina. Wydaje się więc, że funkcja białka p21 nie ogranicza się jedynie do zablokowania wejścia w fazę S cyklu komórkowego przez inhibicję fosforylacji kinazy cdk 2 w przypadku stwierdzenia uszkodzeń w DNA przed replikacją. W przypadku bowiem gdy uszkodzenie wystąpiło podczas replikacji, p21 jest w stanie zatrzymać maszynę replikującą DNA wskutek połączenia się do PCNA. Uniemożliwia to utworzenie kompleksu białkowego PCNA/ polimeraza DNA, który jest głównym składnikiem kompleksu replikacyjnego zaangażowanego w syntezę DNA (PINES 1994).

Dla pełnego obrazu należy wspomnieć o co najmniej dwu innych inhibitorach kinaz cdk p24 i p27. O obu tych białkach niewiele jeszcze wiadomo. Białko p24 wykazuje homologię do kinaz białkowych. O białku p27 wiadomo, że blokuje cykl komórkowy w odpowiedzi na stymulację czynnikiem transformującym (HUNTER 1993, PINES 1994).

Niedawno opisano jeszcze jedno białko, nazwane p18, które okazało się być inhibitorem kinazy p34. Jak już wspomniano powyżej, kinaza p34 jest elementem składowym kompleksu MPF i odgrywa istotną rolę w przebiegu cyklu komórkowego.

Z przedstawionych danych wynika, że zaburzenie w procesie fosforylacji cyklin, białek zaangażowanych w regulację cyklu komórkowego, jest jedną z najpoważniejszych przyczyn zaburzeń w jego przebiegu. W konsekwencji prowadzić to może do zaburzeń proliferacji a więc do transformacji nowotworowej.

APOPTOZA A TRANSFORMACJA NOWOTWOROWA

Dla wielu genów białko p53 jest bezpośrednim lub pośrednim aktywatorem bądź inhibitorem transkrypcji. Między innymi reguluje ono ekspresję rodziny genów *bcl* bezpośrednio zaangażowanych w proces apoptozy. W skład tej rodziny wchodzi geny *bcl2*, *bax* i *bcl-x*. Gen *bcl2* zwany jest też „genem przeżycia” (ang. survival gene) (MARX 1993b). Wysoki poziom ekspresji genu *bcl2* sprzyja przeżyciu komórki. Obniżenie poziomu białka *bcl2* jest równoznaczne ze skierowaniem komórki na drogę tak zwanej śmierci programowanej. W formie aktywnej produkt genu *bcl2* występuje jako dimer. Może też tworzyć dimery z pozostałymi członkami rodziny czyli z produktami genów *bax* i *bcl-x*. Odpowiednie heterodimery mają różny wpływ na przebieg apoptozy. Stanowi to obecnie przedmiot intensywnych badań. W niewątpliwym jednak sposób wykazano, że obniżenie zdolności uszkodzonej komórki do umierania (supresja apoptozy) prowadzi do gromadzenia się komórek, które w normalnych warunkach byłyby wyeliminowane na drodze apoptozy (CARSON i RIBEIRO 1993, SIEDLECKI 1993b). Gromadzenie się komórek z różnymi mutacjami i aberracjami chromosomalnymi prowadzi do szybkiej selekcji komórek o fenotypie nowotworowym.

Z apoptozą są związane też zmiany w ekspresji onkogenu *c-myc*. Jak wykazano, produkt genu *c-myc* bierze udział nie tylko w regulacji proliferacji ale i apoptozy.

PODSUMOWANIE

Z powyższych rozważań wynika, że jedną z głównych przyczyn przemiany komórki normalnej w nowotworową jest utrata kontroli nad jej proliferacją. Dotychczasowe badania wskazywały, że kluczową rolę w kontroli tego procesu odgrywają produkty kilku genów, w tym szczególnie produkty genów *p53* i *rb1*. W ciągu ostatnich lat stało się jasne, że utrata aktywności supresorowej prawie zawsze jest etapem prowadzącym do transformacji nowotworowej.

Badania zmian towarzyszących nabywaniu przez komórkę normalną fenotypu nowotworowego toczą się obecnie bardzo szerokim frontem. Niewątpliwie przyczynią się one do lepszego poznania mechanizmu/ów transformacji nowotworowej. Pozwolą też na skuteczniejsze diagnozowanie i prognozowanie przebiegu choroby. W niezbyt odległej przyszłości powinny też mieć wpływ na metody leczenia i skuteczność terapii.

MOLECULAR BASIS OF CANCER DISEASE

This article is an attempt to present carcinogenesis as a multi-step process. The growing number of evidences accumulated during the last few years shows that cancer is a consequence of genetic or epigenetic alterations in a variety of genes that are fundamental for growth, proliferation, differentiation and programmed cell death. These genes have been divided into four different groups each of which has been discussed. The role of some oncogenes and tumor suppressor genes in controlling the cell cycle is underlined.

LITERATURA

- ALBERTS B., BRAY D., LEVIS J., RAFF M., ROBERTS K., WATSON J. D., 1989. *Molecular Biology of the Cell*. Second edition, Garland Publishing Inc. New York, London.
- CARSON D. A., RIBEIRO J. M., 1993. *Apoptosis and disease*. Lancet 341, 1251-1254.
- CLEAVER J. E., 1994. *It was a very good year for DNA repair*. Cell, 76, 1-4.
- CULOTTA E., KOSHLAND Jr. D. E., 1993. *p53 Sweeps through cancer research*. Science 262, 1958-1961.
- EL-DEIRY W. S., TOKINO T., VELCULESCU V. E., LEVY D.B., PARSON R., TRENT J. M., LIN D., MERCER E. W., KINZLER K. W., VOGELSTEIN B., 1993. *WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression*. Cell 75, 817-825.
- HAINES D. S., LANDERS J. E., ENGLE L. J., GEORGE D. L., 1994. *Physical and functional interaction between wild-type p53 and mdm2 proteins*. Molec. Cell. Biol. 14, 1171-1178.
- FISHEL, R., LESCOE, M. K., RAO, M. R. S., 1993. *Human mutator gene homolog msh2 and its association with hereditary nonpolyposis colon cancer*. Cell 75, 1027-1038.
- HUNTER T., 1993. *Braking the cycle*. Cell 75, 839-841.
- JIRICNY J., 1994. *Colon cancer and DNA repair: have mismatches met their match?* TIG 10, 164-168.
- KAMB A., GRUIS N. E., WEOVER-FELDHAUS J., LIU Q., HORSHAMN K., TORTIGIAN S. V., STOCKERT E., DAY R. S., JOHNSON B. E., SKOLNICKA M. H., 1994. Science 264, 436-440.
- LANE D. P., 1992. *p53, Guardian of the genome*. Nature 358, 16-17.
- MARX J., 1993a. *New colon cancer gene discovered*. Science, 260, 751-752.
- MARX J., 1993b. *Cell death studies yield cancer clues*. Science 259, 760-761.
- MARX J., 1994. *New tumor suppressor may rival p53*. Science 264, 344-345.
- NEVINS J. R., 1992. *E2F: a link between the rb tumor suppressor protein and viral oncoproteins*. Science 258, 424-429.
- PINES J., 1994. *p21 Inhibits cyclin shock*. Nature 369, 520-521.
- REINFERBERGER G., LIU L., ICHIMURA K., 1993. *Amplification and overexpression of mdm2 gene in subset of human malignant gliomas without p53 mutation*. Cancer Res. 2736-2739.
- SIEDLECKI J. A., 1993a. *p53 — strażnik genomu*. Nowotwory 43, 84-86.
- SIEDLECKI J. A., 1993b. *Geny śmierci kontra nowotwór*. Nowotwory 43, 177-179.
- STEFFEN J., 1993. *Postępy w badaniach nad dziedzicznymi predyspozycjami do rozwoju nowotworów złośliwych*. Nowotwory 43, 279-297.