

Karcinogeneza – nastanek rakastih celic

Srdjan Novaković

Povzetek

Rakasta pretvorba celice je odvisna od skupnega delovanja mutagenih snovi – iniciatorjev in nemutagenih snovi – promotorjev. Skupaj prizadenejo ekspresijo genov (še posebno je pomembna ekspresija regulatornih genov), stimulirajo celično proliferacijo in spodbujajo delitev tistih celic, ki imajo poškodovano DNA. Med bolj znanimi dejavniki kemičnega izvora, razni virusi in različne vrste sevanja, kot sta UV-svetloba in ionizirajoče sevanje. V nastanek raka sta vpleteni predvsem dve skupini genov, in sicer protoonkogeni in tumorski supresorski geni. Prvi so med procesom karcinogeneze spodbujeni k čim večji ekspresiji, medtem ko so drugi spremenjeni tako, da je njihova ekspresija zmanjšana ali da je njihov produkt funkcionalno neaktiven. Na sam proces karcinogeneze vplivajo tudi drugi dejavniki, ki ne povzročajo sprememb v nukleotidnem zaporedju DNA in jih imenujemo epigenetski dejavniki.

Uvod

Prve korake k razumevanju karcinogeneze predstavljajo opažanja kirurga Percivala Potta iz sredine 18. stoletja. Opisal je povezavo med številom bolnikov z rakom skrotuma in kronično izpostavljenostjo sajam iz dimnikov pri dimnikarjih. Na potrditev tovrstnih povezav smo morali čakati do 50. let prejšnjega stoletja, ko so profesionalno izpostavljenost delavcev v tekstilni in usnjarski industriji ter proizvodnji različnih barvil in gume povezali s povečanim številom obolelih za rakom mehurja. Vzroke za nastanek tega raka so pripisali aromatičnim spojinam – aminom, ki so jih s pridom uporabljali v omenjenih industrijskih panogah brez kakršne koli zaščite.

Danes, več kot 50 let po teh odkritjih, še vedno ne poznamo vseh podrobnosti, ki bi razkrivale natančen potek procesa nastanka raka. Najnovejše študije s tega področja so nedvoumno potrdile obstoj na stotine dejavnikov, ki s svojim delovanjem lahko preusmerijo normalno celico na pot rakaste pretvorbe. Vse te dejavnike, ki so sposobni izzvati nastanek rakaste celice, imenujemo karcinogeni dejavniki. Proces, v katerem se normalna celica preoblikuje v rakasto, pa imenujemo karcinogeneza ali onkogeneza.

Karcinogeneza kot večstopenjski proces

Proces karcinogeneze je dolgotrajen in zapleten. Na splošno govorimo o treh osnovnih stopnjah, ki vključujejo vrsto različnih podstopenj: **i) iniciacija, ii) promocija in iii) progresija**. Ob predpostavki, da tumor nastaja iz ene same

spremenjene celice, je jasno, da je prvi pogoj za kopičenje in izražanje nastalih sprememb v celici njihovo dedovanje v naslednjih generacijah celic. Ob tem zapletenem procesu govorimo o dvojni vlogi karcinogenih dejavnikov. Prva vrsta karcinogenih dejavnikov deluje kot mutageni impulz in neposredno spremeni celični genetski zapis. S tem ti dejavniki povzročijo mutacije, ki se prenašajo na naslednje generacije celic. Druga vrsta karcinogenih dejavnikov vpliva na vzorce izražanja cele vrste genov, ki spremenijo izražanje nekaterih kritičnih genov (ter nastanek in delovanje njihovih produktov) brez neposrednega vpliva na zaporedje baznih parov v DNA. Tako delovanje imenujemo epigenetsko delovanje. Tako pri epigenetskih kot pri genetskih spremembah je potrebno, da se novi vzorec »vtisne v na novo zasnovan celični spomin« in se kot tak prenese v naslednje generacije celic.

Da bi celica »zaživela« kot rakasta celica, mora torej nakopičiti celo vrsto sprememb in si pridobiti lastnosti, ki jo naredijo razmeroma neodvisno od ustaljenih mehanizmov v normalnih celicah. Ker so ti mehanizmi odvisni od vrste celice oz. tkiva, iz katerega celica izhaja, so kombinacije sprememb oz. lastnosti, ki jih mora rakasta celica pridobiti, različne za različne vrste raka. Na splošno lahko strnemo vse te lastnosti rakastih celic v nekaj kategorij. **1) Samozadostnost za lastno proliferacijo.** To pomeni, da so vsi (ali vsaj večina) potrebni signali za podvojevanje regulirani znotraj same celice, neodvisno od okolja in signalov iz okolja. **2) Neodzivnost na signale, ki uravnavajo število celičnih delitev.** Vsaka celica ima v svojem »spominu« vgrajeno določeno število celičnih delitev. To število je skrbno uravnavano prek različnih mehanizmov, ki se aktivirajo z diferenciacijo in s »staranjem« celice. Rakasta celica se preprosto izogne delovanju teh mehanizmov in se nekontrolirano deli. **3) Neodzivnost na signale, ki sprožajo apoptozo.** Ob hujših napakah na celični DNA se v normalni celici sprožijo popravljalni mehanizmi, ki bodisi napako popravijo bodisi celico – ob večjih napakah – preusmerijo v programirano celično smrt – apoptozo. Celica mora na svoji poti maligne transformacije postati neodzivna na te mehanizme, da bi omogočila prenos mutacije in njeno izražanje v hčerinskih celicah. S tem si rakasta celica pridobi še eno pomembno lastnost, in to je **4) Genetska nestabilnost.** To pomeni, da so rakaste celice mnogo dojemljivejše za razne spremembe, kar jim omogoča hitrejše in boljše prilagajanje na vplive iz okolja. **5) Preureditev tvorbe citokinov in izražanja celičnih antigenov.** S prilagoditvijo tvorbe citokinov in izražanjem antigenov si celica zagotovi dve stvari hkrati: slabšo prepoznavnost za imunski sistem in s tem imunsko

neodzivnost ter neposredno delovanje na celice v okolju. Pomembna je njihova produkcija angiogenih dejavnikov, ki omogočajo neovaskularizacijo tumorskega tkiva. 6) **Zmožnost prehoda rakastih celic v limfni in krvni obtok.** Razvoj ožilja v tumorju omogoča tudi razširitev bolezni v oddaljene organe – metastaziranje. 7) **Pritrditev v drugih organih in ponovna klonalna rast.**

Glede na procese, ki so vpleteni v nastanek raka, in na čas, potreben, da se vsi dogodki zgodijo, se je dolgo časa govorilo o raku kot o bolezni starostnikov. Danes o raku ne govorimo samo kot o bolezni starostnikov, ampak kot o genski bolezni, ki se izraža na dva različna načina. To sta **sporadični rak** kot posledica somatskih mutacij in **dedni rak** kot posledica mutacij v spolnih celicah. Ob upoštevanju kompleksnosti nastanka rakaste celice ter števila potrebnih dogodkov, da si celica zagotovi vse spremembe in uspešno konča pot maligne preobrazbe, je jasno, da prek spolnih celic podedovane mutacije, ki destabilizirajo genom, močno skrajšajo proces nastanka raka. Zato je za vse dedne rake značilno, da nastanejo mnogo prej kot sporadični primeri in da so osebe prizadetih družin mnogo bolj ogrožene za različne vrste raka.

Karcinogeni dejavniki

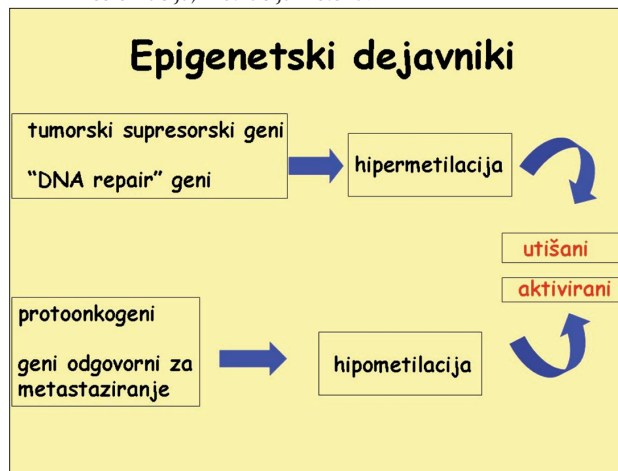
V grobem ločimo karcinogene dejavnike na fizikalne, kemične in biološke. Skupna lastnost vseh ne glede na izvor je, da spremenijo celično DNA. Spremenijo jo bodisi tako, da izzovejo mutacije (mutageni dejavniki) ali da spremenijo izražanje genov brez poseganja v strukturo DNA (epigenetski dejavniki).

Epigenetski dejavniki se izražajo predvsem tako, da celico vzpodbujajo in jo stalno silijo v ekspresijo določenih genov. Med karcinogenezo se spremeni metilacija protoonko genov, tumorskih supresorskih genov ter genov, ki so odgovorni za popravilne mehanizme DNA v celici. Hipermetilirajo in s tem utišajo se tumorski supresorski geni ter geni, odgovorni za popraviljanje nastalih napak na DNA. Hipometilirajo in s tem aktivirajo pa se protoonkogeni in geni, odgovorni za tumorsko metastaziranje. Proces metilacije naj bi bil tudi neposredno povezan z nastankom mutacij. Tako naj bi hipermetilacija predpogojevala nastanek točkovnih mutacij, mutacij zaradi spremembe bralnega okvirja, mutacij z drugim pomenom in delecij. Vse našteje mutacije pripeljejo do izgube funkcije genov. Nasprotno pa naj bi bila hipometilacija možen vzrok za kromosomske mutacije (preureditve in aneuploidijo), ki potencirajo izražanje ponovljenih genov (slika 1, slika 2).

Fizikalni karcinogeni dejavniki delujejo na strukturo DNA z različnimi visokoenergetskimi delci. Pri tem lahko neposredno poškodujejo celično DNA ter povzročijo mutacije ali pa te sprožijo z delovanjem prostih radikalov, ki so nastali po obsevanju. Vsaka vrsta sevanja je lahko potencialno nevarna za strukturo DNA, vendar med bolj raziskane prištevamo UV-svetlobo in ionizirajoče sevanje.

Kemični karcinogeni dejavniki delujejo na dva načina: **i)** tako da z vezavo na nukleotide v DNA destabilizirajo vezi med komplementarnimi nukleotidi ali **ii)** kot dejavniki, ki se vežejo med nukleotidi in povzročijo napake pri

Slika 1. Epigenetski dejavniki spreminjajo predvsem metilacijo DNA. Preveč metilirani geni se ne prepisujejo, medtem ko se premalo metilirani geni prepisujejo prekomerno. Poleg metilacije same DNA lahko delovanje epigenetskih dejavnikov spremeni strukturo kromatina – acetilacija, fosforilacija, metilacija histona.



Slika 2. Epigenetski dejavniki so po svojem izvoru prav tako različni kot mutageni dejavniki. Ločnico med epigenetskim in mutagenim delovanjem lahko potegnemo šele takrat, ko nastanejo spremembe na DNA – mutacije ali spremenjena ekspresija genov. Veliko je dejavnikov, ki delujejo epigenetsko in tudi mutageno.

Epigenetski dejavniki in spremembe na DNA	
epigenetske spremembe	epigenetski dejavnik - stres
hipermetilacija tu.sup.genov - <i>p14, p16, APC, p53</i> hipermetilacija "mismatch repair" genov	kajenje, izpostavljenost kadmiju, dioksinu, infekcije z virusi hepatitisa B in C, Epstein Barrovim virusom
hipometilacija protoonkogenov - <i>Ras, Raf, Myc, Jun</i>	izpostavljenost fenobarbitolu, di in tri klorocetni kislini, γ in UV sevanju

podvojevanju DNA. Med pomembnejše karcinogene dejavnike prištevamo aflatoksine, heterociklične aromatske amine, benzopirene, N-nitrozamine, katrane in akrilamid.

Med biološke karcinogene dejavnike prištevamo predvsem razne viruse. Na celično DNA delujejo na dva načina: **i)** neposredno povzročijo mutacije ob svojem pomnoževanju ali **ii)** posredno s svojimi promotorji vplivajo na izražanje določenih genov. Med pomembnejše viruse, za katere obstajajo dokazi o karcinogenem delovanju, spadajo virus hepatitisa B (hepatocelularni karcinom), Epstein-Barrov virus (Burkittov limfom, nazofaringealni karcinom), humani T-limfocitotropni virus 1 (HTLV-1 – T-celična levkemija/limfom odraslih) ter virus humane imunske pomanjkljivosti (HIV – Kaposijev sarkom).

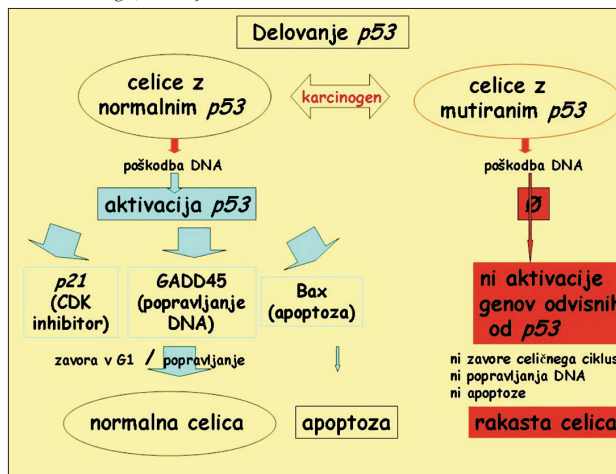
Protoonkogeni in tumorski supresorski geni

Gene, ki so neposredno vpleteni v nastanek karcinogeneze, lahko v grobem razdelimo na skupino, ki je odgovorna za celično delitev ter podvojevanje DNA, in skupino, ki je odgovorna za preverjanje podvojene DNA ter nadzor celičnega cikla. Med prve prištevamo protoonkogene, ki spadajo med t. i. zgodnje celične gene, med druge pa tumorske supresorske gene.

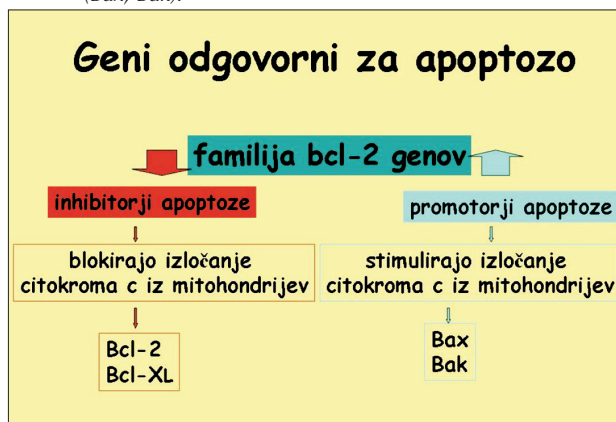
Onkogeni, ki so pravzaprav spremenjeni protoonkogeni, vključujejo gene, ki kodirajo za različne rastne faktorje, receptorje ali signalne prenašalce in jedrne transkripcijske faktorje. V to skupino uvrščamo več kot 100 različnih genov. Med procesom maligne transformacije se navadno spremenijo v promotorskih območjih, kar povzroči nekontrolirano prepisovanje in nastajanje produkta. Na njihovo stopnjo izražanja poleg mutacij odločilno vpliva stopnja metilacije. Med onkogene s pomembnim vplivom na nastanek raka uvrščamo skupini onkogenov *ras* in *myc*. Proteini, ki jih kodirajo onkogeni *ras*, so na celičnih membranah in so soudeleženi pri prenosu signalov tako za rastne faktorje kot za mitogene dejavnike. V nasprotju s proteini, ki jih kodira *ras*, so proteini, ki jih kodira *myc*, jedrni fosfoproteini (*c-myc*, *N-myc* in *L-myc*). Ti so pomembni transkripcijski faktorji za različne gene.

V nasprotju s protoonkogeni, ki se med karcinogenezo prekomerno izražajo, so tumorski supresorski geni neaktivni. Inaktivirajo se na dva načina: tako da je prisotna mutacija v delu, ki kodira strukturne proteine, ali tako da je regulatorna regija hipermetilirana. V obeh primerih je rezultat enak – odsotnost aktivnega proteina, ki bi kontroliral celični cikel in preverjal pravilnost podvojene DNA. V prvem primeru je vzrok neaktiven mutiran protein, v drugem pa blokirana transkripcija gena. Zanimivo je, da se ta dva mehanizma pri tumorskih supresorskih genih velikokrat dopolnjujeta. Tako je pri tistih osebah, ki so podedovale mutacijo v enem alelu tumorskih supresorskih genov, najpogostejši razlog za neaktivnost drugega alela prav hipermetilacija. Težko je reči, kateri od tumorskih supresorskih genov je najpomembnejši, kajti vsi so pomembni. Zato se bom omejil le na tiste, ki so najbolj znani in raziskani. Retinoblastomski gen – *Rb* so prvič opisali na začetku 90. let in predstavlja prototip tumorskega supresorskega gena. Neaktivnost tega gena povzroči nekontrolirano celično delitev (natančneje prehod v S-fazo celičnega cikla). *p53* se imenuje tudi »varuh genoma« in ima verjetno najpomembnejšo funkcijo med vsemi tumorskimi supresorskimi geni. V nasprotju z *Rb*, ki so ga dokazali mutiranega večinoma pri retinoblastomu, je mutirani *p53* povezan z nastankom vsaj polovice znanih malignih bolezni. Tudi vloga *p53* je nekoliko drugačna od vloge *Rb*. Medtem ko predstavlja *Rb* predvsem kontrolni gen za celično delitev, je *p53* nekakšna zasilna zavora, ki deluje tako na regulacijo celičnega cikla kot tudi na aktivacijo apoptoze, kadar popravljalni mehanizmi niso uspešno opravili svoje naloge (slika 3, slika 4). Poleg *Rb* in *p53* velja omeniti vsaj še *BRCA1* in *BRCA2* kot tumorska supresorska gena, povezana z dednim rakom dojke, ter *APC* in *DCC* pri karcinomih širokega črevesa.

Slika 3. Protein *p53* ima ključno vlogo pri preverjanju napak na DNA in kontroli celičnega cikla. Deluje tudi kot transkripcijski faktor za različne gene. Po grobih ocenah naj bi uravnaval transkripcijo 200 do 400 različnih genov. Njegove biološke aktivnosti obsegajo ustavitve celičnega cikla na prehodu iz G1 v S in na prehodu iz faze G2 v fazo M, sproženje apoptoze, uravnavanje celične diferenciacije, celičnega staranja, zaviranja angiogeneze, verjetno pa tudi druge, doslej še neznane aktivnosti.



Slika 4. Proteini *Bcl-2* uravnavajo aktivacijo prokaspaz in s tem apoptozo. Sam *Bcl-2* in *Bcl-X_L* inhibirata apoptozo tako, da blokirata produkcijo citokroma *c*, potrebnega za vezavo na regulacijske proteine, ki aktivirajo prokaspaze. Drugi proteini iz skupine *Bcl-2* spodbujajo apoptozo bodisi tako, da se vežejo na inhibitorne proteine (*Bad*), ali tako, da spodbujajo produkcijo citokroma *c* in aktivacijo prokaspaz (*Bax*, *Bak*).



Telomere in telomeraza

Število celičnih delitev je v večini normalnih sesalskih celicah strogo omejeno in nadzorovano v sklopu procesov staranja celice. Gre za zapleteno in do danes ne povsem pojasnjeno dogajanje, ki vključuje različne vrste genov – od genov, ki kodirajo različne kinaze, inhibitorje kinaz do zgodnjih celičnih genov, ki so soudeleženi v prenosu signalov v celici. Nesporno pri teh procesih je dejstvo, da se konci kromosomov ob pomnoževanju skrajšujejo zaradi vezave replikacijskega kompleksa. Da se strukturni geni podvajajo v celoti, skrbijo ponavljajoče se sekvence na koncih kromosomov, ki jih imenujemo telomere. Njihova

vloga je, da stabilizirajo kromosom in zagotovijo pravi in popoln prepis DNA. V humanih celicah se sekvenca TTAGGG ponavlja na koncu kromosoma nekje med 1000- do 2000-krat. Za njihovo podaljševanje je odgovoren encim telomeraza. Gen za telomerozo je v večini normalnih diferenciranih celic utišán, zato encim ne nastaja. Zaradi tega se po kritičnem skrajšanju telomer podvojevanje DNA ustavi in celica odmre. Encim telomeraza pa nastaja v rakastih celicah, kjer zagotavlja obnavljanje telomer in posledično neskončno število celičnih delitev. Na kratko povzeto – telomere lahko pri nastanku rakaste celice igrajo dvojno vlogo. Po eni strani je njihovo krajšanje ob delujočih mehanizmi za spremljanje kakovosti pomnožene DNA odločilno za preprečevanje karcinogeneze, po drugi strani pa je krajšanje telomer, ko nadzorni mehanizmi za kakovost celične DNA niso aktivni, lahko vzrok za kromosomsko nestabilnost in karcinogenezo.

Sklep

Karcinogeneza je kompleksen proces, med katerim mora priti do radikalnih sprememb na celični DNA. Pri tem je pomembno, da spremembe nastanejo tako na protoonkogenih kot tudi na tumorskih supresorskih genih. Vse nastale spremembe morajo biti ireverzibilne in se morajo kot take prenesti na naslednjo generacijo celic. Po iniciaciji karcinogenih sprememb še ne govorimo o rakasti celici, kajti za to je potrebna še faza promocije, ko se spremenjena celica deli in tako izraža vse pridobljene nove lastnosti. Natančnih mehanizmov in povezav o tem, kateri

geni morajo biti spremenjeni za razvoj neke vrste raka, še ne poznamo. Zato so novejšé raziskave usmerjene prav v odkrivanje pomembnih genskih povezav med nastankom raka kot tudi (ali celo predvsem) v to, katere so tiste celice, ki imajo možnost nadaljevanja in ponovitve klona v oddaljenih organih. Vsa ta dejstva so podlaga za razumevanje biologije raka ter učinkovito zdravljenje in preventivo.

Viri

1. DeVita TV, Hellman S, Rosenberg AS, editors. Principles and practice of Oncology 7th edition. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2005.
2. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P, editors. Molecular biology of the cell 4th edition. New York: Garland Science; 2002.
3. Rubin P, editor. Clinical Oncology. A Multidisciplinary Approach for Physicians and Students 7th edition. Philadelphia: W.B Saunders Company; 1993.
4. Karpinetz TV, Foy BD. Tumorigenesis: the adaptation of mammalian cells to sustained stress environment by epigenetic alterations and succeeding matched mutations. *Carcinogenesis* 2005; 26: 1323–34.
5. Kisseljova NP, Kisseljov FL. DNA demethylation and carcinogenesis. *Biochem* 2005; 70: 743–52.