

Mr sc. dr Zoran Colić,

Zdravstveni centar, Bošnjace

Rast i maligna transformacija ćelija

Uvod

Maligna transformacija ćelija je nekontrolisana, „anarhijska deoba”, tj. stanje tkiva koje protivprirodno „buja”. Ovu transformaciju normalne ćelije omogućuju, s jedne strane, protoonkogeni u svom aktivnom obliku (onkogeni) a, s druge strane, promene na nivou DNK izazvane hemijskim, biološkim i fizičkim mutagenima. U suštini, maligna ćelija svojom ubrzanom i nekontrolisanom deobom osvaja susedna tkiva i organe, što uzrokuje pojavu metastaza¹.

Stvaranje genetski izmenjenih ćelija u odnosu na ishodnu majku ćeliju predstavlja klon. Dalja proliferacija ćelija klona ide u pravcu nastanka ćelijske linije sa izmenjenim hromozomskim sastavom.

Drugim rečima, aktivacija protoonkogene remeti restrikcionu tačku, te ćelija iz G_0 prelazi u G_1 period, što znači da ulazi u ćelijski ciklus. S druge strane, fizički mutageni, preko jonizujućeg ili UV zračenja, takođe mogu da iniciraju primarni defekt na DNK molekulu prouzrokujući sekundarnu malignu transformaciju ćelija. Hemijski mutageni, koji u principu deluju kao promutageni, mogu da (aktivacijom enzima domaćina preko svojih intermedijera) provociraju nekontrolisanu deobu ćelija remeteći restrikcionu tačku.

Biološki mutageni, pre svih virusi koji nose ili ne nose onkogene, takođe iniciraju a samim tim promovišu nastanak kancerske ćelije.⁶

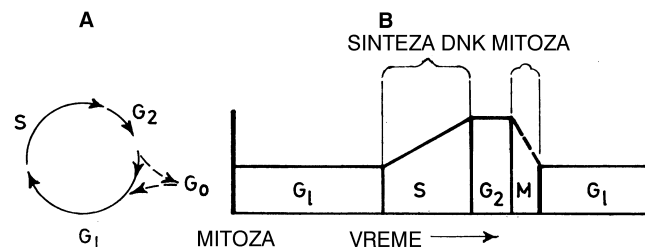
Ćelijski ciklus i njegova regulacija

Pod ćelijskim ciklusom se podrazumeva priprema ćelija za deobu i neposredna deoba. U pripremi ćelije za deobu postoji takozvani relativni period mirovanja, odnosno period aktivnih metaboličkih procesa. U tom periodu, koji se sastoji iz uslovno rečena četiri stadijuma (G_0 , G_1 , S, G_2), vrše se neophodne pripreme u smislu nastanka svih potrebnih molekula za procese transkripcije i replikacije DNK molekula. Ključni momenat je G_0 period, tj. period nakon prethodno izvršene deobe ćelija. U tom stadijumu figuriše takozvana restrikciona tačka (slika 1)⁷, kontrolisana materijama zvanim *kejlioni* koji održavaju nepromenjeno stanje u ćelijama. Međutim, u slučaju učešća antihialona, odnosno produkata onkogene, ovaj mirni period se destabiliša i ćelija kreće u G_1 , a samim tim i u deobu.^{10, 11}

U G_1 periodu vrši se transkripcija RNK molekula, između kojih su molekuli informacione RNK odgovorni za enzime koji regulišu procese maturacije, replikacije DNK molekula i histona.

U S periodu, u takozvanom sintetskom periodu, vrši se udvajanje DNK molekula a samim tim replikacija DNK molekula i sinteza histona.

Istovremeno u citoplazmi počinje deoba centrozoma na dve centrale, čime su stečeni svi uslovi za G_2 period. U G_2 periodu histoni se ugrađuju u hromozomske strukture a aktini, miozini i tubulini stvaraju niti deobnog vretena. U normalnim slučajevima od jedne ishodne majke ćelije nastaju dve kćeri po broju hromozoma i veličini iste ćelije. Međutim, ako je izgubljena kontrola deobe ćelije, procesi razdvajanja sestrinskih hromatida se remete, te nastaju hromozomski izmenjene ćelije, tj. maligne ćelije.^{7, 10}



Slika 1. Generativni ciklus (G) ćelije

G_1 - pripremna faza ćelije za deobu u kojoj sadrži diploidnu DNK; S - period sinteze, odnosno replikacije DNK; G_2 - premitozna faza u kojoj jedno sadrži tetraploidnu DNK; M - faza mitoze; G_0 - stanje mirovanja ćelije

Protoonkogeni

Protoonkogeni su geni slični strukturnim genima, neophodni u embriološkom procesu jer ubrzavaju deobu blastomera, ali po rođenju spadaju u „zatvorene” gene. Za razliku od strukturnih protoonkogeni (neaktivni onkogeni) nisu pretrpeli evoluciju, što znači da su isti kao kod ćelija kvasca i kod ćelija sisara.

Onkogeni su prvo otkriveni kao transformirajući deo retrovirusa koji izaziva brzi razvitak tumora i morfološku transformaciju ćelija. Za retrovire je u novijim analizama doka-

zato da poseduju samo tri standardna gena u svom genomu, i da normalno genom ne poseduje višak gena. Ta tri gena su geni GAG, POL i ENV. Gen GAG je odgovoran za sintezu unutrašnjih proteina virusa. Gen POL kontroliše sintezu enzima obrtnu transkriptazu, koja je neophodna za prepisivanje RNK virusa u jednolančanu komplementarnu DNK (cDNK). Ovo „c” DNK služi kao matrica za stvaranje odgovarajućeg drugog lanca DNK. Upravo ova sposobnost transformacije RNK u DNK, uz pomoć pomenutog enzima, dala je ovim virusima naziv retrovirusi. Treći gen, ENV, odgovoran je za sintezu proteina konstituenata virusnog omotača.^{2, 4}

Treba još napomenuti da se na oba kraja retrovirusnog genoma nalaze LTR sekvence (*long terminal repeat*).

Iz navedenog možemo uočiti da retrovirusi normalno u sebi ne nose onkogene, a ukoliko ih poseduju smatra se da su ih „zaradili” pri nekoj ranijoj infekciji pomoću rekombinacije sa genom domaćina.

Onkogen se u ovom slučaju vezuje za LTR sekvencu. Virusni onkogeni sadrže samo egzonske sekvence i označavamo ih kao V onkogene. Njima odgovarajuće gene, koje nalazimo kod eukariota nazivamo ćelijskim protoonkogenima i obeležavamo ih kao „c” protoonkogeni ili („c” onkogen ukoliko su aktivni)^{5, 8}.

Protoonkogeni su važni ćelijski geni koji imaju negativnu sposobnost da se promene u onkogene (Mihajlović D, 1997). Po svojoj građi su vrlo slični strukturnim genima, a razlikuje ih broj (stotinak protoonkogenata nasuprot tridesetak hiljada strukturnih gena) i to što protoonkogeni nisu pretrpeli skoro nikakvu evoluciju (po građi su slični kako kod beskičmenjaka tako i kod složenih organizama). Budući da su protoonkogeni sačuvani tokom evolucije, smatra se da učestvuju u važnim ćelijskim funkcijama vezanim za rast, proliferaciju i diferencijaciju (*trias diversion, development, differentiation*). Budući da ove funkcije karakterišu i genom tumora, nije teško uočiti moguću vezu između ovih gena i nastanka maligniteta.⁹

U uvodu je napomenuto da je prvi otkriveni onkogen poticao iz Rausarcoma virusa, i on je obeležen pomoću tri slova (src) koja predstavljaju skraćenicu izazovnog oboljenja. Po ovom principu obeleženi su i svi kasnije otkriveni onkogeni - tri slova su skraćena oboljenja ili vrste organizma odakle su izolovani.

Ukoliko želimo kompletno obeležavanje, dodajemo i podatke o molekularnoj masi onkoproteina (proteina kodiranih onkogenata) p60 src, gde je broj 60 molekulska masa od 60 kilodaltona.

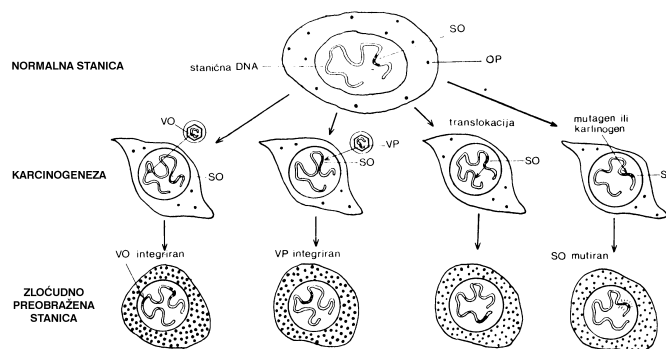
Produkti onkogenata, onkoproteini, svojim osobinama i smeštajem unutar ćelije, ukazuju na nekoliko mogućih načina delovanja, što je omogućilo i podelu onkogenata na više grupa:³

- onkoproteini po strukturi slični faktorima rasta (c-sis);
- onkoproteini kao receptori za faktore rasta (c-fms, c-erbB);
- onkoproteini smešteni sa unutrašnje strane membrane, gde učestvuju u prenosu signala i imaju aktivnost GTP-aze (-Hras, c-Kras) i protein kineze (c-abl, c-yes, c-src);
- onkoproteini smešteni u citoplazmi, sa aktivnošću proteina kinaze (mos, C-raf);

- proteini kodiranih onkogenata (c-fos, c-myc, c-jun) koji se nalaze i deluju u jezgri, i koji su odgovorni za transkripcione regulatore (DNK - vezujući proteini).

Promena u proteinu, bilo u njegovoj količini, građi i vremenu sinteze osnova je svake maligne transformacije, a osnovni oblici aktivacije onkogenata su (slika 1a i 2)¹²:

- ugrađivanje virusnog onkogenata u normalnu ćeliju;
- ugrađivanje virusa (bez onkogenata) u genom domaćina koji se nalazi u neposrednoj blizini protoonkogenata;
- strukturne hromozomske aberacije (translokacije, delecije);
- delovanje mutagenih mikrookoline koji uzrokuju tačkaste mutacije.



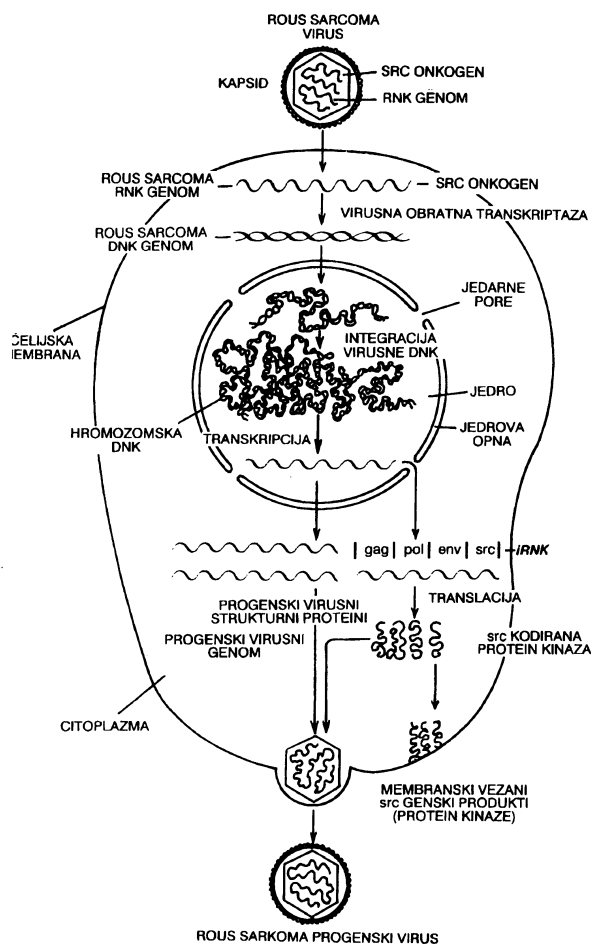
Slika 1a. Četiri načina aktivacije onkogenata i nastanka zloćudne transformacije

Ugrađivanje virusnog onkogenata u normalnu ćeliju

Retroviruse koji nose onkogene nazivamo akutnim ili brzotransformišućim virusima. Ugrađivanjem „svog” onkogenata ovi virusi iniciraju stvaranje viška proteina, što ćeliju uvodi u nekontrolisani rast i deobu. Centralno mesto u ovoj aktivaciji ima enzim obrtna-transkriptaza, koja omogućava prenos genetičke informacije sa RNK na DNK. Jednolančani RNK retrovirus ulazi u ćeliju domaćina, te se uz pomoć obrtnu transkriptazu genom virusa transkribuje u komplementarni lanac DNK (stvaranje dodatnih količina DNK u ćeliji domaćina). Nadalje, dolazi do integracije DNK forme hromozome ćelije i vrši se transkripcija u RNK molekule, koji predstavljaju matricu za sintezu proteina virusa (progenski virusni strukturni proteini). Ovi proteini virusa će kasnije obrazovati nove partikule virusa. Ako je retrovirus nosio onkogen, onda je već maligna ćelija alterisala - prelazak u klon.^{5, 6}

Primer za ovu kategoriju virusa je Raus sarkom virus (slika 2)⁷. Maligna transformacija nastaje unutar mesec dana sa 100% učinkom.

Virusi koji u sebi ne nose onkogene nazivaju se hronični ili sporotransformišućim virusima. Umetanjem svojih gena oni remete dejstvo antionkogenata (supresornih gena) i ponašaju se kao promotori. Za razliku od onkogenata čija aktivacija ili pojava u ćeliji izaziva malignu transformaciju, antionkogeni deluju suprotno, njihov gubitak i inaktivacija dovode do malignog preobražaja ćelije.



Slika 2. Životni ciklus Rous sarcoma virusa.

Ovaj tip maligne transformacije (ugrađivanje virusa bez onkogen) poznat pod nazivom insercionna aktivacija protoonkogen, jeste ugrađivanje Avian leukocitotičnog virusa (*avian myelocytomatosis virus* - virus ptičje mijelocitomatoze). On se vezuje za c-myc onkogen, deluje kao promotor i izaziva njegovo ubrzano prepisivanje. Samim tim nastaje velika količina produkata c-myc onkogen, što će na kraju dovesti do malignog preobražaja ćelije (*Baricitov limfom*). Ono što se zna, vezano je za c-myc protogen, jeste njegova povećana ekspresija u normalnim ćelijama kada se one spremaju za deobu.⁶

Kako je je jedna od osobina tumorskih ćelija nekontrolisana proliferacija, nije teško uočiti povezanost ovog protoonkogen sa malignitetom. Pored retrovirusa i DNK virusi se mogu ponašati kao hronični virusi, što znači da deluju kao biološki karcinogeni. Tu spadaju adenovirusi i herpes virusi.

Strukturne hromozomske aberacije (translokacije, delecije)

U patologiji čoveka, kao posledica translokacije i delecije, javljaju se različite neoplazme usled aktivacije aberacijama zahvaćenih protoonkogen (citat). Premeštaji hromozoma važan su mehanizam aktivacije ćelijskih onkogen. Najčešće se odvijaju translokacije hromozoma gde fragilna mesta, tj. tač-

ka loma (*break points*), na hromozomu koji se translocira, često zahtevaju one regije koje se aktivno prepisuju, uključujući i onkogene (tačke loma su obavezno u blizini protoonkogen). Kod bolesnika sa leukemijama i limfomima ustanovljeno je dvadesetak tačaka loma na hromozomima 1, 8, 9, 11 i 16.^{1,5}

	GRUPA A			GRUPA B	
	1	2	3	4*	5
Strukturne hromozomske aberacije:	del (1p32)*	t(2;8)*	t(3;8)*	5q-*	
	del (1p22)**		3p-*		
	trisom (1k)***				
Bolesti:	Neuroblastom*	Burkitt limfom*	Parotidna žlezda*	Refraktorna anemija	
	Maligni melanom**		Karcinom pluća**	Akutne nelimfocitne anemije	
	Karcinomi***				

	GRUPA C					
	6	7	8	9	10*	11
Strukturne hromozomske aberacije:	6q-*	-7	t(8;21)*	t(9;22)*	11p-*	+12*
	t(6;14)***	7q-	t(8;14)**	t(6;9)**	(11q)**	
			-8***		t(11;22)***	
Bolesti:	Akutna limfoblastična leukemija	Akutna nelimfocitna leukemija	Akutna mieloidna leukemija*	Hronična mieloidna leukemija*	Wilms-ov sindrom*	Hronična limfocitna leukemija*
	Limfomi		Burkitt limfom**	Akutna nelimfocitna leukemija**	Akutna monocitna leukemija	
	Karcinom ovarijuma***		Akutna nelimfocitna leukemija***		Ewing-ov sarkom	

GRUPA D				GRUPA E			GRUPA F		GRUPA G	
13* 14* 15				16* 17 18*			19* 20		21* 22	
										
Strukturne hromozomske aberacije	t(15;17)*			t(15; 17)*			20q-*		t(9;22)*	
				t(17q)**					t(8;22)**	
									-22***	
Bolesti:	Akutna promielocitna leukemija*			Akutna promielocitna leukemija**			Mieloproliferativna bolest		Hronična mielocitna leukemija*	
				Hronična mielocitna leukemija**					Burkitt limfom**	
									Meningeom***	

Slika 3. U humanojoj patologiji kao posledica translokacije i delecije javljaju se različite neoplazme zbog aktivacije (abercijama zahvaćenih) protoonkogen

Kao primer navodimo Hroničnu mijeloidnu leukemiju (CML), translokacija t(22;9). Ovom translokacijom normalni ćelijski protoonkogen c-abl premešta se sa hromozoma 22 na hromozom 9. Skraćeni 22 hromozom je poznat kao Philadelphia hromozom -Ph. Lom na hromozomu 22 zahteva malu regiju koja se, zbog grupisanja lomova u tom području, naziva - bcr (*break point cluster region*), tj. regija lomova gena (slika 3)⁷.

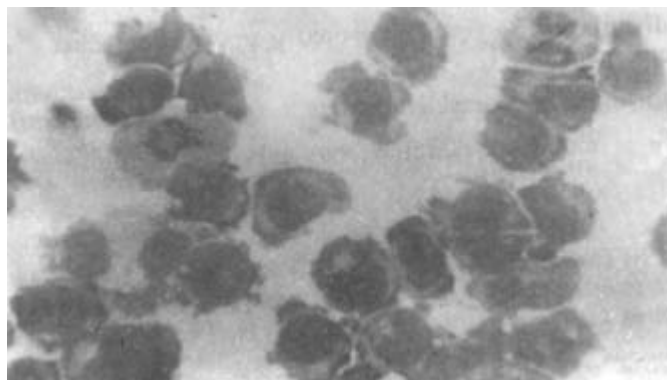
Kao rezultat translokacije, bcr i c-abl se spajaju u takozvani glava-rep konfiguraciju, i stvara se hibridni genetski niz. Spojeni geni odgovorni su za nastanak proteina p210, koji ima aktivnost proteina kinaze i povezuje se sa patogenozom hronične mijeloidne leukemije.

Pri ovoj translokaciji protoonkogen c-abl (koji je sastavljen od 12 egzona i kodira protein p145) gubi svoj 5 egzon, što dovodi do stvaranja promenjenog proteina, a time i do razvoja bolesti. Na slici 2 prikazana je translokacija 9/22 hromozoma. Tačke mutacije najčešće zahtevaju c-ras familiju (H-ras, K-ras i N-ras), dovodeći do promena strukture i funkcije onkoproteina p21. Na taj način mutacije mogu zahvatati različite kodone; samo neke od njih, kao što su mutacije kodona 12, 13 ili 61 u N-ras-u, dovode do aktivacije onkogeni.

Tipičan primer mutacione aktivacije onkogeni nalazi se kod akutne mijeloidne leukemije (AML). Mutacija N-ras onkogeni nalazi se kod 25-30% bolesnika sa ovom bolešću. Primećeno je da je ras mutacija, zapažena na početku bolesti, ponekad kasnije odsutna ili je zamenjena drugom ras mutacijom. Nalaz mutacije N-ras onkogeni u mijelidoplastičnom sindromu (preleukemija) govori u prilog shvatanju da c-ras učestvuje u ranim fazama nastanka leukemije, tj. da nalaz ovog onkogeni predstavlja predispoziciju a ne uzrok ove bolesti.^{1,6}

Onkogeni i maligna transplatacija ćelija

Dejstvom produkata onkogeni do tada mirne ćelije kreću u ubranu proliferaciju, čime nastaju maligne ćelije koje se bitno razlikuju od normalnih ćelija. Razlike se ogledaju kroz promenu nukleocitoplazmatičnog odnosa u korist jedara; kroz povećanje broja jedaraca, što ukazuje na visoku metaboličku aktivnost ćelija; kroz pojavu novih antigena na ćelijskoj membrani, čime se remete regulatorni mehanizmi preko hormona ili preko proteinskih materija; kroz izrazitu fosforilizaciju tirozina, što znači i da je ćelija izgubila kontrolu nad svojom deobom; kroz pojavu strukturnih i numeričkih aberacija, što je slučaj sa ćelijskim linijama (slika 4)⁷.



Slika 4. Ćelijska linija „HEL” obojena Wright-Giemsom

Na slici se vidi ćelijska linija HEL, odnosno humana eritroleukemijska ćelijska linija praćena sa 66 hromozoma i sa 2y. Slično ovoj liniji su i ćelijske linije HELA i HL-60^{7,9}. HL-60 je humana leukemijska linija koja nije zahvatila ostale loze kostne srži.

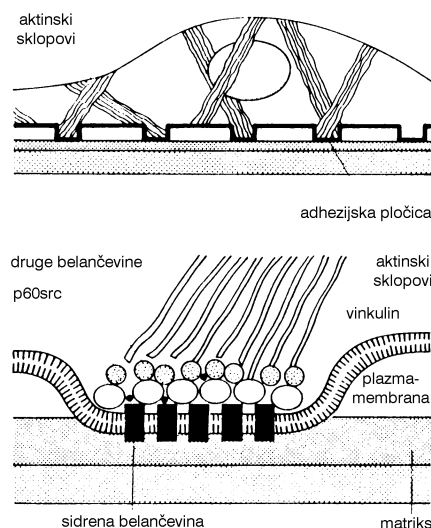
Mehanizam delovanja onkogeni

Onkogeni deluju u principu na tri načina:

- tirozin-kinazna aktivnost
- faktori rasta
- autokineza

U ćelijski skelet ulazi belančevina **vinkulin** koja normalno sadrži 2 tirozina na 2000 aminokiselina. U tom slučaju ćelija je normalne konstrukcije i deli se po zakonima mitoze. Međutim, u slučaju fosforilizacije (više od dva tirozina) ćelijski skelet se remeti (slika 5)¹² jer se stvaraju takozvane „breše”. Na taj način se gube receptori na ćelijskoj membrani, a samim tim je izgubljena i kontrola ćelijske deobe.^{4,6}

S druge strane, faktori rasta koji su takođe produkti onkogenog dejstva stimulišu brzi i nekontrolisani rast i deobu ćelija. Od mnoštva faktora rasta, najbolje opisani su trombociti i epidermalni faktori rasta.



Slika 5 Funkcija vinkulina

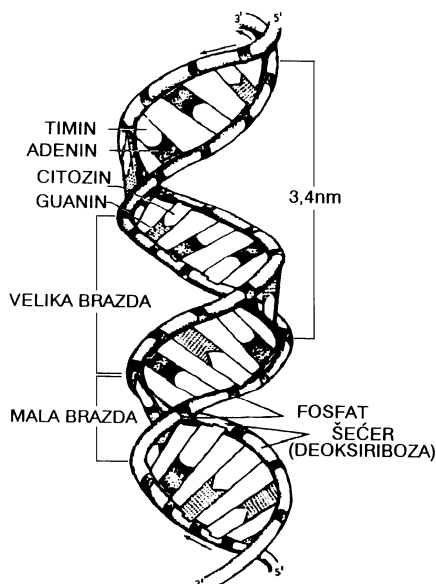
Trombocitni faktori rasta (PDGF) imaju dva polipeptidna lanca. Od njih je jedan isti kao i polipeptidni lanac koji je kontrolisan onkogenom SISp28, što znači da u nekontrolisanoj produkciji ovog faktora rasta bez dejstva produkata onkogeni ćelija može da se transformiše u maligni oblik.

Epidermalni faktor rasta (EGF) radi na principu kompeticije, jer u slučaju da se za receptor veže njemu slični protein, hormon proteinske prirode, ćelijska deoba teče normalno. Ali ako se veže EGF, ćelija ide u nekontrolisani rast i u deobu. Autokineza je pojava da hormoni imaju ćelije cilja (**target**) koje stimulišu po potrebi organizma u smislu njihove transkripcije a kasnije i deobe. U slučaju da ovi hormoni deluju sve vreme na ove receptore, mogu se ulaskom u ćeliju ugraditi na nivou velikih i malih brazda (slika 6)⁷ i tako stimulisati neke od on-

kogena. Tipičan primer je dejstvo adrenalina na onkogen p21 pak.^{5,6}

Retrovirusna karcinogeneza

Retrovirusi su RNK virusi sa sposobnošću za transformaciju u jednolančani komplementarni DNK molekul. To im omogućuje genom POL, odnosno genom za enzim obratnu transkriptazu. Pored ovog gena, RNK virusi poseduju i gene za proteine kapsida i unutrašnje proteine.⁷



Slika 6 Sekundarna struktura DNK.

U slučaju da RNK virusi izazivaju malignu transformaciju unutar mesec dana sa 100% rezultatom, govori se o akutnim retrovirusima koji nose neki od onkogena.

U slučaju da RNK virusi indukuju tumor unutar godinu dana sa 40% efikasnosti, govori se o hroničnim retrovirusima koji ne nose onkogene ali se ugrađuju u blizini onkogena, te imaju ulogu promotora njihove transkripcije.^{7,10}

Zaključak

Maligna transformacija ćelija može biti uzrokovana aktivnošću proteinskih produkata, ali i pod dejstvom hemijskih i bioloških agenasa. Transformisana normalna ćelija sa visokom proliferativnom moći i sa izmenjenim genetskim sastavom predstavlja **klon**.

U principu, svaka maligna ćelija pored niza promena u odnosu na normalnu ćeliju, poseduje i primarne hromozomske aberacije čije se sekundarne posledice objašnjavaju malignitetom. *Fankonijeva pancitopenija* je primarna posledica hromozomske aberacije, a finalni proizvod je leukemija ili **xeroderma pigmentoza**, čija je sekundarna manifestacija melanom.^{1,5,6}

Pored krupnih hromozomskih aberacija i strukturne hromozomske aberacije, delecije i translokacije mogu, nedostatkom delova DNK molekula ili njihovom zamenom mesta, aktivisati dotle „mirni” protoonkogen.

Na osnovu svega izloženog proizilazi da je maligna transformacija ćelija pod direktnom kontrolom produkata onkogeneza i da u slučaju njihove aktivacije, nezavisno da li su od virusa, hemijskih ili fizičkih agenasa, mogu inicirati a kasnije i promovisati nastanak nekog tumora.^{2,3}

Literatura

1. Akademia nauka SSSR. *Uspehi sovremenoj biologii*, tom 111, biipusk 2, Moskva. 1991.
2. Alberts B, Bray D, Lewis J, Ralf M, Roberts K, Easton D. *Molecular biology of the cell*. New York, Garland Publishing, INC. 1983.
3. Burck KB, Larrick JW. *Oncogenes*. Salinders Company, New York, London, Tokio, 1988.
4. Darnell J, Lodish H, Baltimore D. *Molecular Cell Biology*, 1990.
5. Danpure JC. *How can the products of a single gene be localized to more than one intracellular compartment.*, Elsevier Science, 1995;5:230.
6. Katić V, Kutlrić Č, Stojanović D. *Opšta patologija*. Prosveta, Niš - Beograd. 1997.
7. Stanković Z, Najman S. *Molekularna osnova nasleđa*. Grafika, Pirot, 1995.
8. Suzuki TD, Griffiths JA, Miller HJ, Lewontin CR. *An introduction to genetic analysis*, W. H. Freeman and Company. New York. 1986.
9. Uzan G, Kerbirou D, Stanković Z, Curtois G, Ctabtree G, Mareguerie G. *Expression of fibronogen in megakaryocyte*. Thromb. Haemost. 54:278, 1985.
10. Woods AR. *Biochemical Genetics*, Champman and Liall. London - New York. 1980.
11. Zaug AJ, Grabowski, PJ, Cach TR. *Autocatalytic suclization of an excised intervening sequence is a cleavage - ligation reaction*. Nature, 301:578 - 583, 1983.
12. Zergollern LJ i sar. *Humana genetika*. Jumena, Zagreb, 1986.