

GRAŻYNA KOSTKA

ROLA PROLIFERACJI KOMÓRKOWEJ W KANCEROGENEZIE

ROLE OF CELL PROLIFERATION IN CARCINOGENESIS

Zakład Toksykologii Środowiskowej, Państwowy Zakład Higieny
00-791 Warszawa, ul. Chocimska 24
Kierownik: prof. dr hab. J.K. Ludwicki

Na podstawie piśmiennictwa omówiono rolę proliferacji komórkowej w rozwoju procesu nowotworowego z uwzględnieniem jej biologicznych aspektów – cyklu komórkowego, punktów kontrolnych cyklu oraz regulatorów wzrostu.

WSTĘP

W procesie kancerogenezy szczególna rola przypisywana jest proliferacji komórkowej, która od szeregu lat rozpatrywana jest jako istotny czynnik procesu nowotworowego. Mimo intensywnych badań prowadzonych w zakresie udziału i znaczenia proliferacji komórkowej w poszczególnych etapach kancerogenezy, zagadnienia te w dalszym ciągu nie są w pełni zrozumiałe i wyjaśnione.

Ostatnie lata przyniosły interesujące, aczkolwiek kontrowersyjne hipotezy na temat roli proliferacji komórkowej w procesie nowotworowym. Szczególna uwaga skierowana jest na czynniki indukujące proliferację oraz zaburzające równowagę pomiędzy replikacją*¹ a śmiercią komórek, przyczyniając się do zakłóceń w homeostazie komórkowej. Zjawiska te wydają się być niezmiernie ważne dla progresji nowotworu, z uwagi na:

- przypisywaną obecnie zwiększoną rolę niegenotoksycznych czynników w rozwoju procesu nowotworowego, których wspólną cechą jest zdolność stymulowania proliferacji komórkowej,
- rolę programowanej śmierci komórkowej (apoptozy) w kontroli proliferacji.

W kancerogenezie, procesie wieloetapowym i wieloprzyczynowym, zarówno zmiany genetyczne jak i epigenetyczne*² odgrywają ważną rolę. Stąd też nie jest zaskoczeniem, że czynniki wykazujące potencjał kancerogeny indukować mogą obydwa typy zmian, bowiem ich mechanizmy nie wykluczają się wzajemnie, ale raczej wspólnie mogą wpływać na rozwój procesu nowotworowego.

W procesie kancerogenezy uwzględniane są trzy mechanizmy odpowiedzialne za transformację nowotworową [6]:

*¹ replikacja komórkowa obejmuje replikacyjną syntezę DNA oraz podział komórki. W artykule, termin replikacja komórkowa jest synonimem podziału komórki.

*² zmiana epigenetyczna, każda zmiana w fenotypie która nie jest wynikiem zmiany w sekwencji DNA. Może być stabilna, dziedziczna i obejmować może zmiany w metylacji DNA, aktywacji transkrypcji, kontroli translacji i modyfikacji posttranslacji.

1. indukowanie dziedzicznych mutacji w krytycznym genie
2. indukowanie dziedzicznych epigenetycznych zmian w krytycznym genie
3. klonalny wzrost komórek z dziedzicznymi zmianami w krytycznym genie.

Dziedziczne zmiany mogą być indukowane w jednym lub w kilku genach, w wyniku procesów zarówno genetycznych, jak i epigenetycznych. Trzeci z proponowanych mechanizmów, w wyniku którego dochodzi do klonalnego wzrostu zainicjowanych nowotworowo komórek, uwzględnia również prawdopodobieństwo występowania dodatkowych, spontanicznych i dziedzicznych zmian.

Do utrwalenia zarówno genetycznych jak i epigenetycznych zmian konieczna jest proliferacja komórkowa, która związana jest z prawidłowym przebiegiem cyklu komórkowego.

Regulacja cyklu komórkowego

Inicjację procesu kancerogenezy rozpatrywać należy jako transformację nowotworową na poziomie pojedynczej komórki, która przestaje podlegać prawidłowym mechanizmom regulującym i kontrolującym jej wzrost i różnicowanie – procesów zależnych od specyficznych genów, protoonkogenów i genów supresorowych. Geny te kodują białka biorące udział w punktach kontrolnych (checkpoints) cyklu komórkowego, których zadaniem jest zachowanie integralności genomu. Produkty protoonkogenów mogą działać jako czynniki wzrostu, receptory czynników wzrostu, mogą uczestniczyć w przenoszeniu sygnałów transdukcyjnych oraz pełnić rolę czynników transkrypcyjnych na poziomie jądra. Z kolei geny supresorowe w prawidłowych komórkach są aktywne jako negatywne regulatory proliferacji [36, 53].

Komórki przednowotworowe i nowotworowe charakteryzują się niestabilnością genetyczną, która wynikać może z:

- zaburzeń kontroli replikacji DNA, odpowiedzialnych za chromosomowe aberracje takie jak: delecje, amplifikacje i translokacje,
- uszkodzeń kontroli funkcjonowania wrzeciona podziałowego, które pociągać mogą za sobą mitotyczną nondysjunkcję w wyniku której dojść może do zaburzeń liczby chromosomów (aneuploidy),
- błędów w kontroli centromerów, które prowadzić mogą do zmian ploidalności genomu.

Powyższe zmiany genomowe uwzględniane są w ewolucji komórki prawidłowej do nowotworowej, charakteryzującej się utratą zdolności do różnicowania, wzmożoną proliferacją, zwiększoną inwazyjnością i obniżoną wrażliwością na leki przeciwnowotworowe.

Cykl komórkowy w organizmach eukariotycznych wymaga koordynacji szeregu procesów uwarunkowanych działaniem pozytywnych i negatywnych regulatorów wzrostu. Kluczową rolę w ich działaniu spełniają kinazy cyklino – zależne (CDK_s), których aktywność enzymatyczna decyduje o przejściu komórki z jednej fazy do drugiej [24, 62]. Aktywacja kinaz cyklino – zależnych regulowana jest przez przyłączenie odpowiednich białek – cyklin oraz fosforylacją CDK_s przez kompleks cykliny H/ CDK7 – CAK (CDK activating kinase) [73].

W komórkach ssaków, kolejne podjednostki kinaz (CDK4, CDK2 i CDC2) ulegają ekspresji razem z kolejnymi cyklinami (D,E,A i B) przy przejściu komórki od fazy G₁

do fazy M [19, 61, 62]. Podjednostka CDK4 (w kompleksie z jedną z wielu cyklin D) jest niezbędna w fazie G₁ i funkcjonuje prawdopodobnie w odpowiedzi na czynniki wzrostu. Dla replikacji DNA (faza S) konieczna jest podjednostka kinazy CDK2, tworząca prawdopodobnie kompleks z cykliną E i/lub A; kompleks cykliny A i B/CDC2 jest natomiast niezbędny dla mitozy [62].

Substratami kinaz cyklicznych – zależnych są białka genów supresorowych, czynniki transkrypcyjne oraz białka cytoplazmatyczne i jądrowe [19, 24]. W Tabeli I przedstawiono wykaz potencjalnych substratów dla CDK_s.

Tabela I. Potencjalne substraty kinaz cyklicznych w komórkach ssaków [24, zmodyfikowana].

Potential substrates of cyclin-dependent kinases in mammalian cells [24, modified].

SUBSTRAT	RODZAJ KOMPLEKSU CYKLINA/CDKs	DZIAŁANIE
pRB	Cyklina D/CDK4 Cyklina E/CDK2	Obniżające represyjne działanie pRB
E2F	Cyklina A/CDK2	Hamujące
p53	Cyklina A/CDK2 Cyklina B/CDC2	Stymulujące, zmieniające specyficzność wiązania DNA
Polimeraza RNA II (RNA Pol II)	Cyklina C/CDK8 Cyklina H/CDK7	Fosforyluje CTD (carboxy-terminal domain of RNA Pol II)
Poli(A)polimeraza	Cyklina B/CDC2	Hamujące
TFIIIB ¹	Cyklina B/CDC2	Hamujące
TFIID ²	Cyklina B/CDC2	Hamujące
B-myb ³	Cyklina A/CDK2	Stymulujące

*1,2 – czynniki transkrypcyjne

*3 – protoonkogen

Jednym z ważniejszych substratów kinaz zależnych od cyklin jest produkt białkowy genu Rb, który dla prawidłowego przebiegu cyklu komórkowego ulec musi progresywnej fosforylacji, na resztach treoninowych i serynowych aminokwasów, co wykazano zarówno w badaniach *in vitro* jak i *in vivo* [65, 69]. W fosforylacji genu Rb (tworzącego kompleks z czynnikiem transkrypcyjnym E2F) rozpoczynającej się w późnej fazie G₁ bierze udział kompleks cykliny D/CDK4 lub CDK6 oraz kompleks E/CDK2. Sugerowany jest również udział kompleksu A/CDK2 [65]. Zahamowanie fosforylacji Rb w wyniku inaktywacji CDK_s prowadzi do zachowania genu Rb w aktywnej formie i w konsekwencji blokadę cyklu komórkowego w fazie G₁. Natomiast inaktywacja Rb w wyniku mutacji, amplifikacja białek komórkowych takich jak cyklina D, CDK4 pozwalają "ominąć" komórce punkt kontrolny G₁/S i wejść w fazę syntezy DNA [69].

Inhibitory CDK_s, zaliczane do negatywnych regulatorów cyklu komórkowego, którym przypisywana jest funkcja genów supresorowych [19, 62], blokują progresję cyklu w fazie G₁, aczkolwiek nie wyklucza się ich działania w innych fazach cyklu komórkowego. W komórkach ssaków zidentyfikowano następujące inhibitory kinaz cyklicznych (CKI): p21, p15, p16 i p27 [25, 59, 62, 75]. Uniwersalnym inhibitorem CDK_s jest białko

p21, kodowane przez gen WAF1/CIP1, którego ekspresja jest prawdopodobnie bezpośrednio regulowana przez produkt białkowy genu supresorowego p53 [62, 65].

Negatywna kontrola przebiegu cyklu komórkowego podczas rozwoju, różnicowania, starzenia się oraz śmierci komórek stanowi skuteczną drogę w zapobieganiu rozwojowi procesu nowotworowego poprzez zahamowanie proliferacji komórkowej gdy integralność genomu jest zagrożona.

Niewłaściwie funkcjonujące wrzeciono podziałowe (faza M), może być również przyczyną zahamowania progresji cyklu komórkowego. Dla przykładu, segregacja chromosomów przy przejściu komórki z metafazy do anafazy jest uniemożliwiona w przypadku, gdy jeden lub więcej chromosomów nie są położone wzdłuż płytki metafazowej [64]. Ponadto zapoczątkowanie nowego cyklu komórkowego jest zahamowane, jeżeli mitozą była niekompletna we wcześniejszym cyklu komórkowym w wyniku blokowania układu cytoszkieletowego [38]. U drożdży *Saccharomyces cerevisiae* zidentyfikowano szereg genów, które chronią komórkę przed inicjacją nowego cyklu w obecności trucizn wrzeciona podziałowego [50]. Konsekwencje utraty kontroli fazy cyklu komórkowego związanej z funkcjonowaniem centromerów są w niewielkim stopniu zbadane z uwagi na brak informacji na temat specyficznych inhibitorów, które bezpośrednio blokować mogą działanie centromerów. Jednak wyniki badań fenotypu drożdży, związanego z wadliwą duplikacją centromerów sugerują, że uszkodzenia w ich podwojeniu wstrzymują zakończenie mitozy [74]. Sądzi się ponadto, że regulacja duplikacji centromerów znajduje się pod kontrolą genu p53 [30].

Przebieg cyklu komórkowego może być również zahamowany przez nieprogramowane, zewnątrzkomórkowe czynniki takie jak inhibitory wrzeciona podziałowego, czynniki hamujące replikację DNA, jak również uszkodzające jego strukturę [50].

Przedstawiona w bardzo ogólnym zarysie regulacja cyklu komórkowego sygnalizuje jedynie skomplikowane jej mechanizmy, które zostały dokładnie omówione w licznych publikacjach jakie ukazały się w ostatnich latach [24, 39, 69, 73].

Punkty kontrolne cyklu komórkowego w aspekcie kancerogenezy

Punkty kontrolne cyklu komórkowego stanowią ważny mechanizm w obronie komórki przed egzogennymi i endogennymi źródłami uszkodzeń DNA. W ostatnich latach wiedza na ich temat została niezwykle rozszerzona, aczkolwiek w dalszym ciągu nie jest kompletna.

Uszkodzenia DNA wykrywają przynajmniej dwa punkty kontrolne cyklu komórkowego tj. przy przejściu komórki z fazy G_1 do S (G_1/S) i z fazy G_2 do M (G_2/M). Punkt kontrolujący wejście komórki w fazę S zapobiega replikacji uszkodzonego DNA. Stwierdzono [45], że w komórkach z uszkodzonym DNA gwałtownie wzrasta poziom produktu białkowego genu p53 poprzez posttranskrypcyjny mechanizm. Indukcja genu p53 wywołuje aktywację transkrypcji genów zależnych od p53 takich jak GADD45 [41], MDM2 [51] i WAF1/CIP1 [25], które zatrzymują komórkę w fazie G_1 lub skierowują ją do apoptozy.

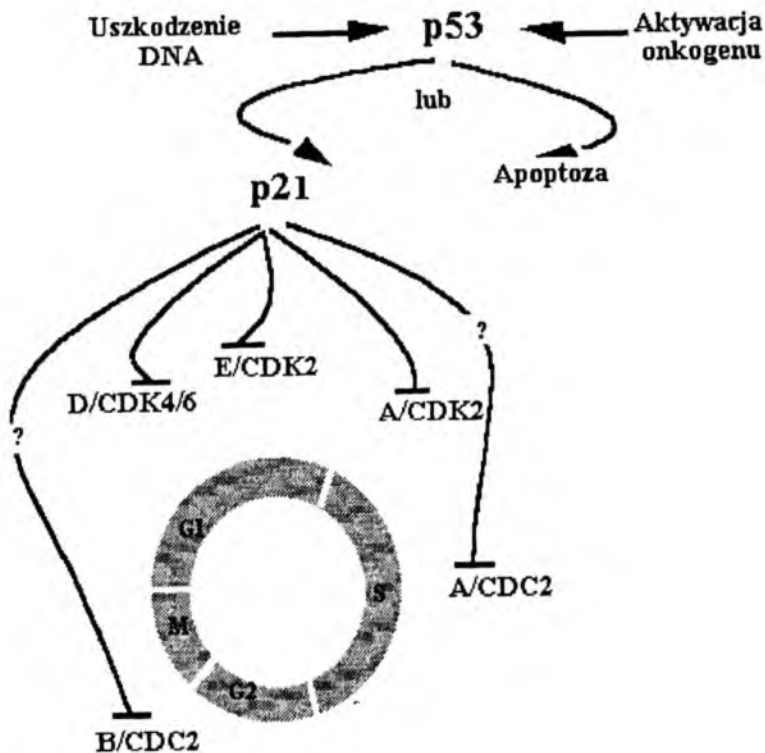
O przejściu komórki punktu kontrolnego G_1/S decyduje również aktywność kinaz białkowych zależnych od cyklin. Aktywność kompleksu A/CDK2 i E/CDK2 może być hamowana promieniowaniem jonizującym w sposób zależny od genu p53, prawdopodobnie poprzez transkrypcyjną aktywację genu p21 [23]. W niektórych typach tkanek

lub w pewnych warunkach fizjologicznych indukcja genu p53, w wyniku uszkodzenia DNA, skierowuje komórkę raczej do apoptozy niż powoduje jej zatrzymanie w punkcie G₁ [47]. W takim przypadku brak sygnału do apoptozy może przyczynić się do rozwoju procesu nowotworowego w wyniku utraty mechanizmu eliminującego komórkę z uszkodzeniem genetycznym.

Na skutek uszkodzenia DNA lub nieprawidłowej jego replikacji dojść może do blokady cyklu w punkcie kontrolnym G₂/M. Punkt ten zapobiega segregacji chromosomów jeżeli jeden z nich jest uszkodzony. Wiedza na temat białek uczestniczących w punkcie kontrolnym G₂/M w komórkach ssaków jest jednak bardzo ograniczona. Za regulację punktu kontrolnego G₂/M odpowiedzialne są prawdopodobnie, jak sugerują Waldman i wsp. [67] p53 i p21.

Genetyczne natomiast badania drożdży [24, 28, 50] wykazały zaangażowanie licznych genów w kontroli cyklu komórkowego w fazie G₂. U *S. cerevisiae* np. geny RAD9, RAD17, RAD24, MEC1, MEC2 i MEC3 zapobiegają wejściu komórki w fazę mitozy w przypadku uszkodzenia DNA, albo gdy replikacja jest blokowana w późnej fazie S. Geny MEC1 i MEC2 zapobiegają także wejściu komórki w fazę mitozy, jeżeli replikacja jest blokowana we wczesnej S-fazie.

Zaburzenia w regulacji cyklu komórkowego, a szczególnie mechanizmów związanych z punktami kontrolnymi cyklu wydają się być decydujące w rozwoju procesu nowotworowego. Kluczowe znaczenie w tym aspekcie mają białka p53 i p21 – ryc. 1.



Ryc. 1. Rola genu supresorowego p53 i jego efektora, p21 w kontroli cyklu komórkowego [39].
 Role of suppressor gene p53 and its effector, p21 in cell cycle control [39].

Produkt białkowy p53, prawdopodobnie biorący udział w przekazywaniu sygnału o uszkodzeniu DNA i uważany ponadto jako czynnik rozpoznający uszkodzenia DNA, opóźniać może progresję cyklu komórkowego poprzez jego zahamowanie w punkcie kontrolnym G1/S i G2/M, dla dokonania naprawy DNA [39, 45]. W zależności od rodzaju uszkodzenia uruchamiane są w komórce systemy naprawcze DNA obejmujące [72]:

- fotolazy, rozszczepiające fotodimery dipirymidynowe,
- O⁶ alkiloguanino-DNA-alkilotransferazy usuwające reszty metylowe i etylowe z guaniny,
- specyficzne DNA-glikozylazy usuwające zmodyfikowane puryny, a także
- mechanizm naprawy przez wycinanie (excision repair),

dzięki którym pierwotny zapis informacji genetycznej ulec może przywróceniu. Wadliwie z kolei jego funkcjonowanie lub delecja sprzyjać może transformacji nowotworowej poprzez dopuszczenie komórek z uszkodzeniami DNA do replikacyjnej syntezy DNA [39, 63]. Za pośrednictwem genu p53 dojść może również, jak już wspomniano do programowanej śmierci komórkowej [19, 26, 63].

Udział proliferacji komórkowej w rozwoju procesu nowotworowego

Proliferacja komórkowa, definiowana jako wzmózona replikacja określonej populacji komórek może wpływać na rozwój procesu nowotworowego [1] poprzez:

1. utrwalenie i ekspresję przedmutacyjnych uszkodzeń DNA
2. wzrost zainicjowanych nowotworowo komórek w wyniku zakłócenia punktów kontrolnych cyklu komórkowego
3. wzrost zainicjowanych komórek w wyniku blokowania apoptozy
4. klonalny wzrost zainicjowanych komórek
5. wzrost szybkości rozwoju nowotworu w wyniku mechanizmów 1-4

Udział proliferacji komórkowej w inicjacji procesu nowotworowego wynika z zależności, że im częstsze są podziały komórkowe tym mniejsza jest szansa naprawy uszkodzonego DNA. Wzrasta więc możliwość utrwalenia uszkodzenia materiału genetycznego w postaci mutacji. Jeżeli więc DNA replikuje, uszkodzenie zostaje utrwalone w komórkach potomnych i taki proces prowadzi do powstania zainicjowanych nowotworowo komórek, których ogniska uważane są za potencjalne prekursorzy późniejszego neoplastycznego wzrostu [4, 22, 32].

Proliferacja komórkowa stanowi istotny czynnik fazy inicjacji zarówno w odniesieniu do genotoksycznych jak i niegenotoksycznych kancerogenów [14, 71]. Genotoksyczne związki w dawkach, które indukują proliferację komórkową są bowiem bardziej efektywne jako mutageny i kancerogeny, z uwagi że w populacji proliferujących komórek czas potrzebny dla procesów reperacyjnych, usuwających uszkodzenia DNA będzie znacznie skrócony. Ponadto, wzmózona replikacja komórkowa zwiększać może częstość powstawania spontanicznych jak i indukowanych mutacji albo w wyniku nieprawidłowej replikacji DNA, albo poprzez przemianę endo- i egzogennych adduktów DNA do mutacji przed procesami naprawczymi DNA. Podczas podziałów komórkowych zachodzić mogą również nondysjunkcje i mitotyczne rekombinacje, w wyniku których dochodzi do przemiany mutacji heterozygotycznych do homozygotycznych i/albo hemizygo-

tycznych. Utrata heterozygotyczności (LOH – loss of heterozygosity) uważana jest za jeden z ważniejszych mechanizmów kancerogenezy [55, 60, 66].

Ponadto, potencjał mutacyjnych zdarzeń w genach kontrolujących wzrost może być zwiększony, ponieważ geny te są transkrybowane podczas replikacji komórek.

Należy w tym miejscu zaznaczyć, że mutacje nie są wyłącznym mechanizmem powstawania stabilnych zmian związanych z procesem nowotworowym. Podczas rozwoju i różnicowania, stabilne zmiany w ekspresji genów mają często charakter epigenetyczny. Przypuszcza się, że jedna lub więcej dziedzicznych fenotypowych zmian w komórkach nowotworowych ma charakter epigenetyczny [54]. Jednym z epigenetycznych mechanizmów związanych z ekspresją protoonkogenów jest metylacja DNA [20, 35]. Zaburzenia prawidłowego wzoru metylacji odgrywają prawdopodobnie istotną rolę w kancerogenezie [20, 33].

Aczkolwiek proliferacja komórkowa jest nierozdzielnie związana z procesem nowotworowym, to jednak trudno zgodzić się z opiniami niektórych autorów [3, 10] wskazującymi na bezpośrednie zależności pomiędzy kancerogenezą, a wzmożoną proliferacją komórkową. Tak samo bowiem jak powstała mutacja nie jest równoznaczna z kancerogenezą, tak wzmożona proliferacja komórkowa nie zawsze prowadzić musi do rozwoju procesu nowotworowego. Wydaje się bowiem, że tylko w przypadku mutacji genów biorących udział w różnicowaniu komórkowym lub replikacji, istnieje duże prawdopodobieństwo transformacji nowotworowej. Ponadto, tylko te formy uszkodzeń genu, które przejdą przez "filtr" reperacji DNA i wystąpią podczas replikacji komórkowej, prowadzić mogą do mutacji.

Chemicznie indukowana proliferacja komórkowa

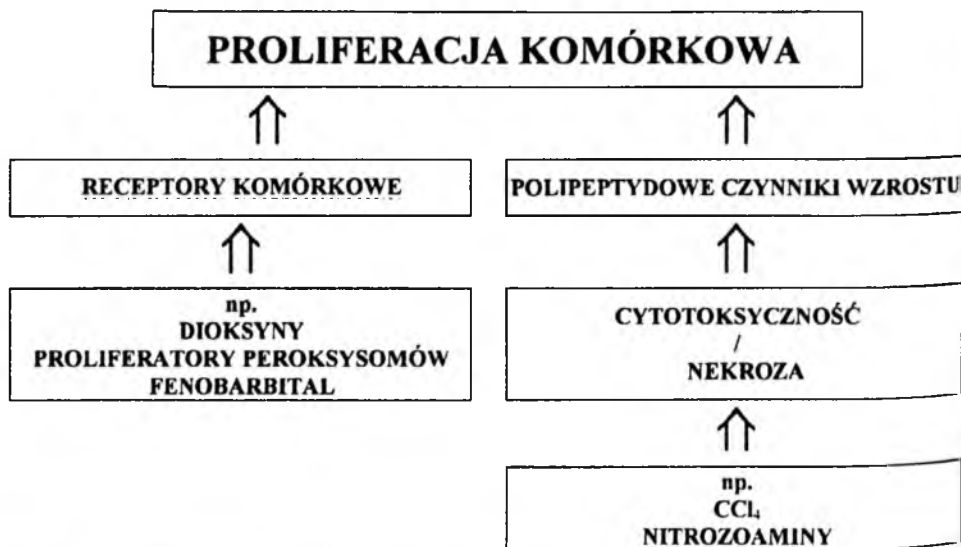
Rola chemicznie stymulowanej proliferacji w rozwoju procesu nowotworowego szczególnie dokładnie zdefiniowana została w wątrobie gryzoni, ze względu iż organ ten u dorosłych osobników jest praktycznie narządem nieproliferującym.

Czynniki chemiczne indukujące proliferację komórkową klasyfikowane są jako mitogenne i cytotoksyczne [11, 21, 27, 49]. Proliferacja indukowana mitogenami prowadzi do przejściowego nadmiaru komórek, hyperplazji; homeostaza komórkowa zostaje przywrócona prawdopodobnie w wyniku programowanej śmierci komórkowej (apoptozy) [15, 24]. Natomiast w przypadku związków cytotoksycznych bezpośrednim zdarzeniem jest śmierć komórek (nekroza); proliferacja stanowi zdarzenie wtórne, przywracające homeostazę komórkową.

Przypuszcza się, że związki chemiczne indukować mogą proliferację poprzez aktywację pozytywnych czynników wzrostu takich jak epidermalny czynnik wzrostu (EGF) albo HGF (czynnik wzrostowy hepatocytów) oraz w wyniku inaktywacji negatywnych czynników wzrostu takich jak TGF- β (transformujący czynnik wzrostowy typu β). W proliferacji regeneracyjnej wątroby zaangażowany jest polipeptydowy czynnik wzrostowy HGF (syntetyzowany i wydzielany przez komórki *Browicza-Kupffera*), którego receptorem jest produkt protoonkogenu *c-met* [9, 68]. Przypuszcza się, że system transdukcji sygnału HGF/*c-met* jest włączony w proces nowotworowy wątroby. [68]. Ponadto, HGF odgrywa ważną rolę nie tylko w regeneracji wątroby, ale w odnowie innych uszkodzonych tkanek. Potencjalnymi mitogenami dla hepatocytów [21] jest EGF i TGF- α (transformujący czynnik wzrostowy typu α), natomiast TGF- β hamuje wzrost

hepatocytów i innych typów komórek, co stwierdzono zarówno w badaniach *in vivo* jak i *in vitro* [8,13]. Proliferatory peroksysomów np. promują klonalny wzrost zainicjowanych hepatocytów prawdopodobnie poprzez współdziałanie z EGF i/albo TGF- α [68]. Transformującemu czynnikowi wzrostu typu β przypisywana jest również rola w inicjacji apoptozy hepatocytów [12, 48].

Proliferacyjna odpowiedź komórek na związki mitogenne związana jest z wewnątrzkomórkowymi receptorami, strukturalnymi odpowiednikami hormonów steroidowych. Dioksyny indukują hyperplazję wątroby w wyniku oddziaływania z receptorem Ah (aryl hydrocarbon) [7, 56], receptorem (najbardziej wrażliwym) dla proliferatorów peroksysomów jest PPAR α (należy do rodziny receptorów PPAR, – peroxisome proliferator activated receptors – obejmującej typ α , β , γ i δ) [7, 34, 56]. Fenobarbital prawdopodobnie wzmacnia aktywność mitotyczną hepatocytów również poprzez współdziałanie z wewnątrzkomórkowymi receptorami [21], mimo że dotychczas nie wykryto specyficznego receptora komórkowego dla tego związku.



Ryc. 2. Stymulacja proliferacji komórkowej przez mitogenne i cytotoksyczne związki chemiczne [21, zmodyfikowana]
Stimulate of cell proliferation by mitogen and cytotoxic compounds [21, modified]

Jednym ze sposobów poprzez który komórki rozpoznają i odpowiadają na uszkodzenia jest synteza białek szoku cieplnego – HSP (heat shock protein). W warunkach stresu wywołanego uszkodzeniem DNA lub białek stwierdzono aktywację ich syntezy [52]. Udział białka HSP-70 wykazano między innymi w komórkowej odpowiedzi na działanie proliferatorów peroksysomów [2], a białka HSP-90 przy oddziaływaniu wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych [5].

W zależności od rodzaju stymulowanej proliferacji (czynnikami mitogennymi lub cytotoksycznymi) sugeruje się jej zróżnicowaną rolę w kancerogenezie [11, 32]. Colum-

bano i wsp. [16, 46] w badaniach zainicjowanych hepatocytów, które mogą być identyfikowane poprzez histochemiczną lokalizację γ -glutamylotransferazy (GGT⁺) oraz immunohistochemiczną lokalizacją łożyskowej transferazy S-glutationowej (GSTP⁺) wykazali, że regeneracyjna proliferacja (po częściowej hepatektomii lub cytotoksycznej dawce CCl₄) wywoływała wzrost ognisk zainicjowanych komórek określanych jako altered hepatic foci (AHF). Brak wzrostu AHF, mimo indukowania proliferacji komórkowej stwierdzono przy oddziaływaniu wątrobowych mitogenów.

Mechanizmy tej zróżnicowanej odpowiedzi nie są w pełni wyjaśnione, ale sugeruje się że wynikać mogą:

- z oddziaływania na różne subpopulacje hepatocytów (o różnej ploidalności) [46]. Przypuszcza się, że hyperplazja indukowana mitogenami dotyczy tetraploidalnych hepatocytów, które stanowią dominującą populację komórek wątroby dorosłych szczurów. Jeżeli więc prawdą jest, że prekursorami pre- i neoplastycznych uszkodzeń są diploidalne komórki [31, 58], wówczas działanie bezpośrednich mitogenów nie będzie wywoływać wzrostu zainicjowanych hepatocytów i tym samym nie będzie promować rozwoju procesu nowotworowego.

- z różnic w ekspresji określonych genów biorących udział we wzroście, transdukcji sygnałów i/albo w aktywacji czynników wzrostu [18].

W zależności od rodzaju stymulowanej proliferacji, występują prawdopodobnie różnice w ekspresji czynników transkrypcyjnych, kontrolujących procesy życiowe komórki zarówno na poziomie struktur cytoplazmatycznych jak i tych zachodzących w jądrze komórkowym, a także w ekspresji genów tzw. wczesnej odpowiedzi komórkowej [46, 17]. Ekspresja genu *c-fos* (typowy gen wczesnej odpowiedzi komórkowej), niezbędna do podjęcia syntezy DNA zarówno w komórkach prawidłowych stymulowanych do podziału jak i w komórkach nowotworowych, wykazana podczas regeneracyjnej proliferacji stanowić może, jak sugeruje się, istotną różnicę na poziomie molekularnym pomiędzy proliferacją regeneracyjną a indukowaną mitogenami.

- z faktu, że zainicjowane komórki są usuwane poprzez apoptozę, mimo iż mogą odpowiadać na stymulatory proliferacji [15].

Prawdopodobnie ten rodzaj śmierci komórkowej jest odpowiedzialny za usuwanie zainicjowanych hepatocytów, hamując w ten sposób ich propagację. Jednocześnie sugeruje się, że zarówno proliferacja indukowana czynnikami mitogennymi jak i cytotoksycznymi wywoływać może preferencyjny wzrost przednowotworowych i nowotworowych komórek. W przypadku związków cytotoksycznych, wskutek większej wrażliwości komórek prawidłowych na czynniki cytotoksyczne [29]. Związki mitogenne natomiast poprzez hamowanie apoptozy komórek przednowotworowych i nowotworowych i/albo poprzez stymulację ich proliferacji, wskutek większej wrażliwości na czynniki mitogenne [32, 40, 57].

Ciągle niejasna i kontrowersyjna jest rola proliferacji komórkowej *per se* jako czynnika transformacji nowotworowej. Zagadnienie to, od kilku lat jest przedmiotem szerokiej dyskusji [3, 14, 21, 49, 71].

Aktualnie jednak brak jest wystarczających danych doświadczalnych na potwierdzenie lub obalenie tej hipotezy, mimo że argumenty zwolenników jak i przeciwników wydają się być przekonujące. *Ames* i *Gold* [3] sugerują np., że związki chemiczne indukujące proliferację komórkową zwiększają prawdopodobieństwo zarówno prze-

kształceń endogennych uszkodzeń DNA do mutacji, jak i wzrostu liczby komórek z potencjalnym ryzykiem dla progresywnych zmian w ekspresji genów, co w konsekwencji prowadzić może do rozwoju procesu nowotworowego. Z drugiej jednak strony, zwraca uwagę fakt, że w tkankach krwiotwórczych o wysokim poziomie proliferacji komórkowej wykrywalność nowotworów jest stosunkowo niska [70] oraz że szereg związków toksycznych i/lub stymulujących hyperplazję nie wykazuje potencjału kancerogennego [37].

Wydaje się zatem, że na pytanie czy proliferacja komórkowa *per se* indukować może mutacje i kancerogenezę będzie można uzyskać odpowiedź, kiedy molekularne mechanizmy regulacji cyklu komórkowego i ich powiązanie z procesem nowotworowym zostaną dokładnie poznane.

Uwagi końcowe

Badania procesu nowotworowego, wskazujące na istotną rolę czynników niegenotoksycznych w kancerogenezie zainspirowały poszukiwania szybkich testów skriningowych służących do ich identyfikacji i oceny ryzyka wynikającego z ich oddziaływania. Przypisywana jednak niegenotoksycznym kancerogenom różnorodność mechanizmów działania, które ponadto nie są jeszcze w dostateczny sposób wyjaśnione utrudnia realizację tego przedsięwzięcia. Z drugiej jednak strony, wiedza na temat potencjalnych niegenotoksycznych kancerogenów jest na tyle obszerna, iż pozwalała przynajmniej częściowo zdefiniować wczesne zmiany w docelowych tkankach wywoływane ich oddziaływaniem. Należą do nich między innymi:

- spadek połączeń międzykomórkowych (gap junction)
- stymulacja proliferacji komórkowej
- indukowanie i/lub hamowanie aktywności określonych układów enzymatycznych
- hamowanie apoptozy - programowanej śmierci komórkowej.

Wczesne zmiany indukowane w docelowych tkankach proponowane są w piśmiennictwie jako wskaźniki służące do identyfikacji niegenotoksycznych związków podejrzanych o działanie rakotwórcze.

W Zakładzie Toksykologii Środowiskowej Państwowego Zakładu Higieny realizowane są od kilku lat badania toksykologiczne pestycydów o przewidywanych odległych skutkach działania, uzględniające między innymi ich wpływ na proliferację hepatocytów i indukcję cyt. P-450. Dotychczasowe wyniki badań [42-44] pozwalają żywić nadzieję na wzbogacenie wiedzy o mechanizmach działania badanych chemicznych środków ochrony roślin, co ułatwić może w praktyce świadomą kontrolę ich oddziaływania na organizm człowieka oraz zoptymalizowanie doboru ich stosowania.

G. Kostka

ROLE OF CELL PROLIFERATION IN CARCINOGENESIS

Summary

Cell proliferation is regulated by the cell cycle which is controlled by a number of cyclin dependent kinases (CDKs). The functions of CDKs are critical for cell cycle and are required to traverse checkpoints. A network of inhibitors (CKI) of the cyclin-dependent kinases provide the important function of regulating the activity of the cyclin complexes. Dereglulation of these

results in either uncontrolled proliferation or cell death (apoptosis). Cell proliferation is an important factor in the development of carcinogenesis induced by genotoxic as well as non-genotoxic carcinogens. It is an integral part of the process of converting DNA adducts to mutations, it also decreases the time that is available for DNA repair and is required to clonal expansion of initiated cell populations. Moreover, cell proliferation increases the number of initiated cells by blocking cell death (apoptosis) and perturbing checkpoints in the cell cycle. Two major mechanisms of induction of cell proliferation (regenerative and mitogens-stimulated) were discussed in relation to their potential roles in the carcinogenicity.

PIŚMIENICTWO

1. *Afshari C.A., Barrett J.C.*: Cell Cycle Controls: Potential Targets for Chemical Carcinogens?. *Environ. Health Perspectiv.*, 1993, 101(Suppl. 5), 9-14.
2. *Alvares K., Carillo A., Yuan P.M., Kawano H., Morimoto R.I., Reddy J.K.*: Identification of cytosolic peroxisome proliferator binding protein as a member of the heat shock protein HSP- 70 family. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1990, 87, 5293-5297.
3. *Ames B.N., Gold L.W.*: Too many rodent carcinogens: mitogenesis increases mutagenesis. *Science*, 1991, 249, 970-971.
4. *Bannasch B., Zerban H.*: Predictive value of hepatic preneoplastic lesions as indicators of carcinogenic response. *Mechanisms of Carcinogenesis in Risk Identification*. Ed. H.Vainio, P.N. Magee, D.B. Mc Gregor. International Agency for Research on Cancer. IARC, Lyon, 1992, 389-427.
5. *Barański B., Lutz W., Sitarek K.*: Wewnątrzkomórkowe receptory wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych. *Post. Hig. Med. Dośw.*, 1994, 48, 3, 309-320.
6. *Barrett J.C.*: Mechanisms of action of known human carcinogens. *Mechanisms of Carcinogenesis in Risk Identification*. Ed. H. Vainio, P.N. Magee, D.B. Mc Gregor and A.J. Mc Michael, Lyon, International Agency for Research on Cancer, IARC, 1992, 115-134.
7. *Barret J.C.*: Mechanisms for species differences in receptor-mediated carcinogenesis. *Mut. Res.*, 1995, 333, 189-202.
8. *Bernard J.A., Lyons R.M., Moses H.L.*: The cell biology of transforming growth factor β . *Biochim. Biophys. Acta*, 1990, 1032, 79-87.
9. *Bottaro D.P., Rubin J.S., Faletto D.L., Kmieciak T.E., Vande Woude G.F., Aaronson S.A.*: Identification of the Hepatocyte Growth Factor Receptor as the c-met Proto-Oncogene Product. *Science*, 1991, 251, 802-804.
10. *Butterworth B.E.*: Consideration of both genotoxic and nongenotoxic mechanisms in predicting carcinogenic potential. *Mut. Res.*, 1990, 239, 117-132.
11. *Butterworth B.E., Popp J.A., Conolly R.B., Goldsworthy T.L.*: Chemically induced cell proliferation in carcinogenesis. *Mechanisms of Carcinogenesis in Risk Identification*. Ed. H. Vainio, P.N. Magee, D.B. McGregor. International Agency for Research on Cancer. Lyon, IARC, 1992, 116, 279-305.
12. *Capen C., Dayan A.D., Green S.*: Receptor mediated mechanisms in carcinogenesis: an overview. *Mut. Res.*, 1995, 333, 215-224.
13. *Chang H.L., Gillett N., Figari I., Lopez A.R., Palladino M.A., Derynck R.*: Increased Transforming Growth Factor β Expression Inhibits Cell Proliferation in vitro, yet Increases Tumorigenicity and Tumor Growth of Meth A Sarcoma Cells. *Cancer Res.*, 1993, 53, 4391-4398.
14. *Cohen S.M., Ellwein L.B.*: Cell proliferation in carcinogenesis. *Science*, 1991, 249, 1007-1011.
15. *Columbano A., Endoch T., Denda A., Noguchi O., Nakae D., Hasegawa K., Ledda-Columbano G.M., Zedda A.I., Konishi Y.*: Effects of cell proliferation and cell death (apoptosis and

- necrosis) on the early stages of rat hepatocarcinogenesis. *Carcinogenesis*, 1996, 17, 3, 395–400.
16. *Columbano A., Ledda-Columbano G.M., Ennas M.G., Chelo M., Pani P.*: Cell proliferation and promotion of rat liver carcinogenesis: different effects of hepatic regeneration and mitogen induced hyperplasia on the development of enzyme-altered foci. *Carcinogenesis*, 1990, 11, 771–776.
 17. *Coni P., Pichiri-Coni G., Rao P.M., Rajalakshmi S., Sarma D.S.R., Ledda-Columbano G.M., Columbano A.*: C-jun expression in regenerating, hyperplastic and preneoplastic rat liver. *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.*, 1991, 32, 800.
 18. *Coni P., Pichiri-Coni G., Ledda Columbano G.M., Rao P.M., Rajalakshmi S., Sarma D.S., Columbano A.*: Liver hyperplasia is not necessarily associated with increased expression of *c-fos* and *c-myc* mRNA. *Carcinogenesis*, 1990, 11, 5, 835–839.
 19. *Cordon-Cardo C.*: Mutation of cell cycle regulators. Biological and clinical implications for human neoplasia. *Am. J. Path.*, 1995, 147, 3, 545–560.
 20. *Counts J.L., Goodman J.I.*: Hypothylation of DNA: an epigenetic mechanism involved in tumor promotion. *Mol. Carcinogen.*, 1994, 11, 185–188.
 21. *Croy R.G.*: Role of chemically induced cell proliferation in carcinogenesis and its use in health risk assessment. *Environ. Health Perspectiv.*, 1993, 101 (Suppl. 5), 289–302.
 22. *Dragan Y.P., Pitot H.C.*: The role of initiation and promotion in phenotypic diversity during hepatocarcinogenesis in the rat. *Carcinogenesis*, 1992, 13, 5, 739–750.
 23. *Dulic V., Kaufmann W.K., Wilson S.J., Tlsty T.D., Lees E., Harper J.W., Elledge S.J., Reed S.J.*: p53-dependent inhibition of cyclin – dependent kinase activities in human fibroblast during radiation-induced G1 arrest. *Cell*, 1994, 76, 1013–1023.
 24. *Dynlacht B.D.*: Regulation of transcription by proteins that control the cell cycle. *Nature*, 1997, 389, 149–152.
 25. *El-Deiry W.S., Tokino T., Velculescu V.E., Levy D.B., Parsons R., Trent J.M., Lin D., Mercer W.E., Kinzler K.W., Vogelstein B.*: WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell*, 1993, 75, 817–825.
 26. *El-Deiry W.S., Harper J.W., O'Connor P.M., Velculescu V.E., Canman C.E., Jackman J.*: WAF1/CIP1 is induced in p53-mediated G1 arrest and apoptosis. *Cancer Res.*, 1994, 54, 1169–1174.
 27. *Eldridge S.R., Goldsworthy T.L., Pop J.A., Butterworth B.E.*: Mitogenic stimulation of hepatocellular proliferation in rodent following 1,4-dichlorobenzene administration. *Carcinogenesis*, 1992, 13, 3, 409–415.
 28. *Enoch T., Nurse P.*: Coupling M phase and S phase: controls maintaining the dependence of mitosis on chromosome replication. *Cell*, 1991, 65, 921–923.
 29. *Farber E.*: The sequential analysis of liver cancer induction. *Biochem. Biophys. Acta*, 1990, 605, 149–166.
 30. *Fukasawa K., Choi T., Kuriyama R., Rulong S., Vande Woude G.F.*: Abnormal centrosome amplification in the absence of p53. *Science*, 1996, 271, 1744–1747.
 31. *Gerlyng P., Grotmol T., Erikstein B., Stokke T., Seglen P.O.*: Reduced proliferative activity of polyploid cells in primary hepatocellular carcinoma. *Carcinogenesis*, 1992, 13, 10, 1795–1801.
 32. *Goldsworthy T.L., Butterworth B.E., Maronpot R.R.*: Concepts, labeling procedures and design of cell proliferation studies relating to carcinogenesis. *Environ. Health Perspect.*, 1993, 101, 101–108.
 33. *Gonzalago M.L., Jones P.A.*: Mutagenic and epigenetic effects of DNA methylation. *Mutat. Res.*, 1997, 386/2, 107–118.
 34. *Gonzales F.J.*: Recent update on the PPAR α -null mouse. *Biochimie.*, 1997, 79(2–3), 139–144.

35. *Goodman J.I., Pavlock J.L.*: Hypomethylation of DNA: a possible nongenotoxic mechanism underlying the role of cell proliferation in carcinogenesis. *Environ. Health Perspectiv.*, 1993, 101, (Suppl. 5), 169-172.
36. *Hartłodzińska-Szmyrka A.*: Nowotwory jako choroba genów. *Postęp. Biochem.*, 1995, 41, 1, 7-15.
37. *Huff J.E.*: Chemical toxicity and chemical carcinogenesis. Is there a causal connection. *Mechanisms of Carcinogenesis in Risk Identification*. Ed. Vainio H., Magee P.N., McGregor D.B., McMichel A.J., Lyon, International Agency for Research on Cancer. pp. 437-475, IARC, 1992.
38. *Huffaker T.C., Thomas J.H., Botstein D.*: Diverse effects of β -tubulin mutations on microtubule formation and function. *J. Cell Biol.*, 1988, 106, 1997-2010.
39. *Jacks T., Weinberg R.A.*: Cell-cycle control and its watchman. *Nature*, 1996, 381, 643-644.
40. *James N.H., Roberts R.A.*: The peroxisome proliferator class of non-genotoxic hepatocarcinogens synergise with epidermal growth factor to promote the clonal expansion of initiated rat hepatocytes. *Carcinogenesis*, 1994, 15, 2687-2694.
41. *Kastan M.B., Zhan Q.M., El-Deiry W.S.*: A mammalian cell cycle check-point pathway utilizing p53 and GADD45 is defective in ataxia-telangiectasia. *Cell*, 1992, 71, 587-597.
42. *Kostka G., Kopeć-Szłęzak J., Palut D.*: Wpływ wybranych pestycydów z grupy polichlorowanych węglowodorów na proliferację komórkową w wątrobie szczurów (doświadczenie 14 dniowe). *Roczniki PZH*, 1996, 47, 87-94.
43. *Kostka G., Palut D., Kopeć-Szłęzak J.*: Early hepatic changes induced in rats by two hepatocarcinogenic organohalogen pesticides: bromopropylate and DDT. *Carcinogenesis*, 1996, 17, 3, 407-412.
44. *Kostka G., Palut D., Kopeć-Szłęzak J.*: Early hepatic changes induced by nuarimol in rats. *J. Appl. Toxicol.*, 1994, 5, 337-342.
45. *Kuerbitz S.J., Plunkett B.S., Walsh W.V., Kastan M.B.*: Wild-type p53 is a cell cycle checkpoint determinant following irradiation. *Proc. Natl. Acad. USA*, 1992, 89, 7491-7495.
46. *Ledda-Columbano G.M., Coni P., Curto M., Giacomini L., Sarma D.S.R., Columbano A.*: Mitogen-induced liver hyperplasia does not substitute for compensatory regeneration during promotion of chemical hepatocarcinogenesis. *Carcinogenesis*, 1992, 13, 3, 376-383.
47. *Lowe S.W., Schmitt S.W., Smith S.W., Osborne B.A., Jacks T.*: p53 is required for radiation induced apoptosis in mouse thymocytes. *Nature*, 1993, 362, 847-849.
48. *Melnick R.L., Huff J., Barret J.C., Maronpot R.R., Lucier G., Portier J.*: Cell proliferation and chemical carcinogenesis: Symposium overview. *Environ. Health Perspectiv.*, 1993, 101 (Suppl. 5), 3-8.
49. *Melnick R.L.*: Does chemically induced hepatocyte proliferation predict liver carcinogenesis?. *The FASEB J.*, 1992, 6, 2698-2706.
50. *Murray A.W.*: Creative blocks: cell-cycle checkpoints and feedback controls. *Nature*, 1992, 359, 599-604.
51. *Oliner J.D., Kinzler K.W., Metzler P.S., George D.L., Vogelstein B.*: Amplification of gene encoding a p53 associated protein in human sarcomas. *Nature*, 1992, 358, 80-83.
52. *Pechan M.P.*: Heat shock protein and cell proliferation. *FEBS Lett.*, 1991, 280, 1-4.
53. *Przybojewska B.*: Protoonkogeny komórkowe - rola w procesie rozwoju nowotworów i aktywacja pod wpływem substancji chemicznych. *Post. Hig. Med. Dośw.*, 1994, 48, 2, 161-180.
54. *Ramel C.*: Genotoxic and nongenotoxic carcinogens: Mechanisms of Carcinogenesis In Risk Identification. Ed. H. Vainio, P.N. Magee, D.B. McGregor. International Agency of Research on Cancer. IARC, 1992, 195-209.

55. Remvikos Y., Muleris M., Salmon R.J., Dutrillaux B.: Colorectal carcinogenesis: from chromosomal evolution pathways to molecular pathogenesis. *Cancer Genet. Cytogenet.*, 1997, 93(1), 63-73.
56. Roberts R.A., Nebert D.W., Hickman J.A., Richburg J.H., Goldsworthy T.L.: Perturbation of the mitosis/ apoptosis balance: a fundamental mechanism in toxicology. *Fundam. Appl. Toxicol.*, 1997, 38(2), 107-115.
57. Roberts R.A., Soames A.R., Gill J.H., James N.H., Wheeldon E.B.: Non-genotoxic hepatocarcinogens stimulate DNA synthesis and their withdrawal induced apoptosis but in different hepatocyte populations. *Carcinogenesis*, 1995, 16, 8, 1693-1698.
58. Schwarze R.E., Saeter G., Armstrong D., Cameron R.G., Laconi E., Sarma D.S.R., Preat V., Seglen P.O.: Diploid growth pattern of hepatocellular tumours induced by various carcinogenic treatments. *Carcinogenesis*, 1991, 12, 2, 325-327.
59. Serrano M., Hannon J., Beach D.: A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. *Nature*, 1993, 366, 704-707.
60. Shao C., Gupta P.K., Sun Y., Sahota A., Tischfield J.A.: Complex chromosomal mechanisms lead to APRT loss of heterozygosity in heteroploid cells. *Cytogenet. Cell Genet.*, 1996, 75(4), 216-221.
61. Sherr C.J.: Mammalian G1 cyclins. *Cell*, 1993, 73, 1059-1065.
62. Sherr Ch.J.: G1 phase progression: cycling on cue. *Cell*, 1994, 79, 551-555.
63. Slichenmyer W.J., Nelson W.G., Slebos R.J., Kastan M.B.: Loss of a p53-associated G₁ checkpoint does not decrease cell survival following DNA damage. *Cancer Res.*, 1993, 53, 4164-4168.
64. Spencer F., Hieter P.: Centromere DNA mutations induce a mitotic delay in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1992, 89, 8908-8912.
65. Taya Y.: Rb kinases and Rb-binding proteins: new points of view. *TIBS*, 1997, 22, 14-17.
66. Vomiero-Highton G., Heddle J.A.: An assay for loss of heterozygosity *in vivo* at the Dlb-1 locus. *Mutagenesis*, 1995, 10, 5, 381-386.
67. Waldman T., Lengauer Ch., Kinzler K. W., Vogelstein B.: Uncoupling of S phase and mitosis induced by anticancer agents in cells lacking p21. *Nature*, 1996, 381, 20, 713-716.
68. Weidner K.M., Sachs M., Birchmeier W.: The Met receptor tyrosine kinase transduces motility, proliferation and morphogenic signals of scatter factor/hepatocyte growth factor in epithelial cells. *J. Cell Biol.*, 1993, 127, 145-154.
69. Weinberg R.A.: The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell*, 1995, 81, 323-330.
70. Weinstein I.B.: Mitogenesis is only one factor carcinogenesis. *Science*, 1991, 251, 387-388.
71. Weinstein I.B.: Toxicity, cell proliferation and carcinogenesis. *Mol. Carcinogen.*, 1992, 5, 2-3.
72. Widlak P.: Specyfika powstawania i naprawy mutagennych uszkodzeń materiału genetycznego. *Postępy Biochemii*, 1994, 40, 4, 194-199.
73. Widlak P.: Wpływ uszkodzeń DNA na regulację cyklu komórkowego. *Postępy Biochemii*, 1997, 43, 2, 85-90.
74. Winey M., Byers B.: Assembly and functions of the spindle pole body in budding yeast. *Trends Genet.*, 1993, 9, 300-303.
75. Xiong Y., Hannon G.J., Zhang H., Casso D., Kobayashi R., Beach D.: p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases. *Nature*, 1993, 366, 701-704.