

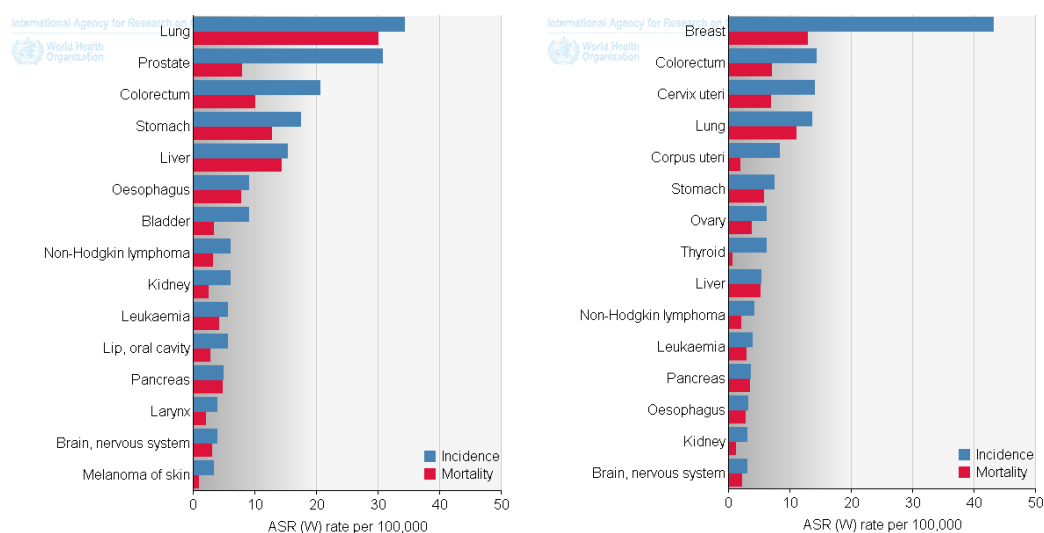
1. Molekularna osnova malignih bolesti

1.1. Maligne bolesti

Tumor je abnormalna masa tkiva koja nastaje kao rezultat nekontrolisanog rasta ćelija. Tumori se dele na **benigne** (dobročudne) i **maligne** (zloćudne). Osnovna razlika između benignih i malignih tumora je ta što maligni tumori imaju sposobnost invazije i metastaziranja. **Metastaziranje** je pojava „širenja“ tumora sa mesta nastanka na druga tkiva i organe. Metastaziranje (metastatsko širenje bolesti) dešava se putem krvotoka ili limfnim putem, a na drugim tkivima ili organima detektuje se u vidu ćelijskih skupina ili formiranih novih tumora istog porekla. Preko 90% bolesnika sa malignim tumorom umire zbog pojave metastaza.

Prema najopštijoj podeli, maligni tumori dele se na osnovu vrste ćelija ili tkiva od kojih su se razvili, i to na: epitelne tumore – karcinomi, mezenhimske tumore ili tumore vezivnog tkiva (najpoznatiji sarkomi), tumore sačinjene od epitelnih i mezenhimskih ćelija (npr. karcinom dojke), limfome i leukemije (maligni tumori krvi i ćelija kostne srži), tumore nervnih ćelija i embrionalne tumore.

Pored kardiovaskularnih bolesti, maligne bolesti su vodeći uzročnik smrti u savremenom svetu. Svaki četvrti muškarac i svaka peta žena umiru od neke maligne bolesti. Karcinom dojke je najčešća maligna bolest žena, dok su karcinomi pluća i prostate najčešće maligne bolesti muškaraca. Zbog toga se ove tri maligne bolesti definišu kao maligne bolesti sa najvećom incidencijom. Kod karcinoma pluća, visoku incidenciju prati i visok mortalitet. U razvijenim zemljama, i pored visoke incidencije, smrtnost od karcinoma dojke i prostate je mala (slika 1).



Slika 1. Incidencija malignih bolesti i mortalitet kod muškaraca (levo) i žena (desno)

Najčešće maligne bolesti dece su leukemije. Epidemiološke studije pokazuju određenu pravilnost u geografskoj zastupljenosti pojedinih vrsta malignih bolesti. Tako je jedna vrsta

malignog tumora jetre (hepatocelularni karcinom) retka u zapadnom svetu, a česta u Kini i okolnim zemljama Dalekog istoka. Karcinom pluća je vodeći tumor „trećeg sveta“, verovatno kao posledica velikog broja pušača.

Pored pušenja, veruje se da na razvoj malignih tumora negativni efekat imaju i neke druge životne navike, kao što je alkoholizam, gojaznost, kalorična ishrana, rana seksualna aktivnost, promiskuitet. Zagađenje radne i životne sredine, zračenje, infektivni agensi, samo su neki od faktora spoljašnje sredine koji se takođe dovode u vezu sa razvojem pojedinih vrsta malignih bolesti.

Najčešće se maligne bolesti dijagnostikuju putem biopsije. **Biopsija** je uzorak tkiva ili organa dobijen hirurškim ili drugim putem radi mikroskopske analize od strane lekara patologa. Konvencionalno lečenje malignih bolesti je hirurško, medikamentozno (hemioterapija antineoplastičnim agensima, hormonska terapija, lečenje bola...) i zračenjem (radioterapija). Ukoliko se ne leče, maligne bolesti imaju smrtni ishod.

Maligne bolesti nastaju neoplastičnom transformacijom ćelija i tkiva. **Neoplastična transformacija** je proces narušavanja tkivne homeostaze u pravcu nekontrolisane proliferacije ćelija i inhibicije ćelijskog umiranja po tipu **apoptoze**. Neoplastična transformacija je višestepeni proces. Svaki stepen karakterišu genetičke i epigenetičke izmene koje dovode do transformacije neizmenjene („normalne“) ćelije u malignu. Poznato je da se, u toku procesa neoplastične transformacije, u ćelijama gube različiti kontrolni mehanizmi, što dovodi do uvećanja potencijala rasta, izmena na ćelijskim membranama, kariotipskih abnormalnosti, morfoloških i biohemijskih izmena, i izmena drugih ćelijskih osobina. Kao posledica svih tih promena dolazi do nekontrolisane deobe ćelija i formiranja malignog tumora.

Kancerogen je svaka supstanca ili agens koji indukuje razvoj maligne bolesti. Kancerogeni su često, mada ne i obavezno, i mutageni i teratogeni. Uopšteno, slično mutagenima, razlikujemo hemijske, fizičke i biološke kancerogene.

Francis Rous (1879-1970) prvi je dokazao da virusi mogu izazvati razvoj maligne bolesti. Njegov model sistem bile su kokoške na kojima je jednom vrstom virusa, koja je kasnije po njemu dobila i naziv (*Rous sarkoma virus*), indukovao razvoj sarkoma. Za svoje otkriće dobio je i Nobelovu nagradu za fiziologiju ili medicinu 1966. godine. Savremene analize pokazuju povezanost nekih virusnih infekcija sa razvojem malignih bolesti čoveka. Procenjuje se da je 15% svih malignih bolesti posledica virusnih infekcija. Najpoznatiji primeri dati su u **tabeli 1**.

Tabela 1. Virus i maligne bolesti koje izazivaju

Virus	Maligna boleti
Hepatitis B i C	Hepatocelularni karcinom
Epstein-Barr virus	Limfomi
Humani papiloma virus	Karcinomi genitalnog trakta
Herpes simplex virus tip 8	Kapoši sarkom

Na koji način su geni uključeni u proces neoplastične transformacije? Na ovo pitanje prvi su dali odgovor Majkl Bišop (r.1936) i Harold Varmus (r.1939), dobitnici Nobelove nagrade za fiziologiju ili medicinu 1989. godine, koji su otkrili ćelijsku osnovu retroviralne onkogeneze. Upravo je Bišop maligne bolesti definisao kao bolesti gena.

Kancerogeneza indukovana retrovirusima česta je kod pernatih životinja kao što su kokoške. Retrovirusi se dele na proste retroviruse, kompleksne retroviruse i **onkogene retroviruse**. Onkogeni retrovirusi naziv su dobili po genima koje sadrže - onkogenima. **Virusni onkogeni (v-onc)** pokazuju visok stepen (80-99%) homologije sa ćelijskim genima koje nazivamo **proto-onkogeni**. Pored RNK virusa, i kod DNK virusa detektovano je prisustvo onkogenena. U **tabeli 2.** dat je spisak najpoznatijih retrovirusa, njihovih onkogenena (v-onc) i ćelijskih homologa – **proto-onkogenena**. Skraćenica za ćelijske onkogene je **c-onc**.

Tabela 2. Retrovirusi, v-onc i homologni c-onc

Retrovirusi	Viralni onkogeni	Ćelijski proto-onkogeni
Rous sarcoma virus	<i>v-src</i>	<i>c-src</i>
Simian sarcoma	<i>v-sis</i>	<i>c-sis</i>
Harvey murine sarcoma	<i>v-H-ras</i>	<i>c-H-ras</i>
Kirsten murine sarcoma	<i>v-K-ras</i>	<i>c-K-ras</i>
FBJ murine osteosarcoma	<i>v-fos</i>	<i>c-fos</i>
Avian myelocytomatosis	<i>v-myc</i>	<i>c-myc</i>
Abelson leukemia virus	<i>v-abl</i>	<i>c-abl</i>
Avian erythroblastosis	<i>v-erb B</i>	<i>c-erb B</i>

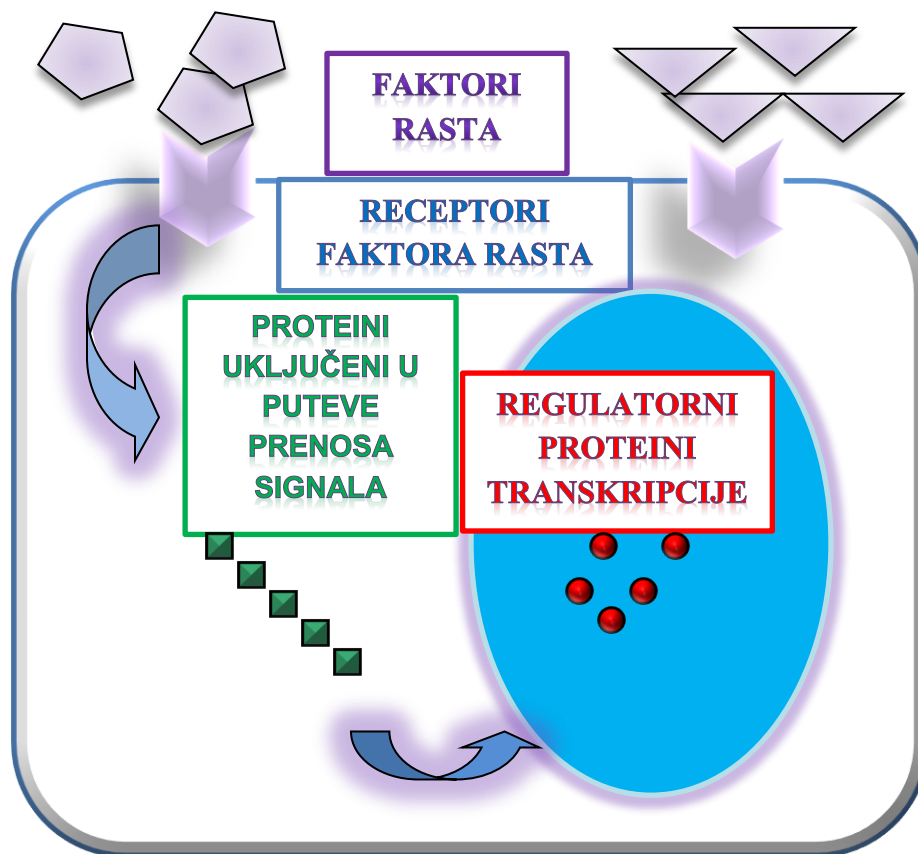
1.2. Proto-onkogeni

Geni uključeni u proces neoplastične transformacije na osnovu svog dejstva dele se u dve osnovne kategorije: **proto-onkogeni** i **tumor supresorski geni ili antionkogeni**.

Proto-onkogeni su klasa gena koji stimulišu ćelijski rast i deobu. Prvo su otkriveni kod virusa (virusni onkogeni), a potom i kod eukariota. Oni u formi proto-onkogenena imaju vremenski i prostorno strogo kontrolisanu ulogu, najčešće tokom embrionalnog razvića eukariota. Mutacijom, proto-onkogeni prelaze u formu onkogenena koji nekontrolisano eksprimira svoj proteinski produkt.

Danas je poznato i okarakterisano preko 100 proto-onkogenena, odnosno onkogenena kod čoveka. Po svojoj funkciji svrstani su u četiri osnovne kategorije (**slika 1**):

1. **faktori rasta** (primer *c-sis*)
2. **receptori faktora rasta** (primer *c-erbB*)
3. **proteini uključeni u puteve prenosa signala** (npr. proteini G, kao što su *c-H-ras* i *c-K-ras* i druge tirozin kinaze, kao što su *c-abl* i *c-src*)
4. **regulatorni proteini transkripcije** (DNK-vezujući proteini; primer *c-myc* i *c-fos*)

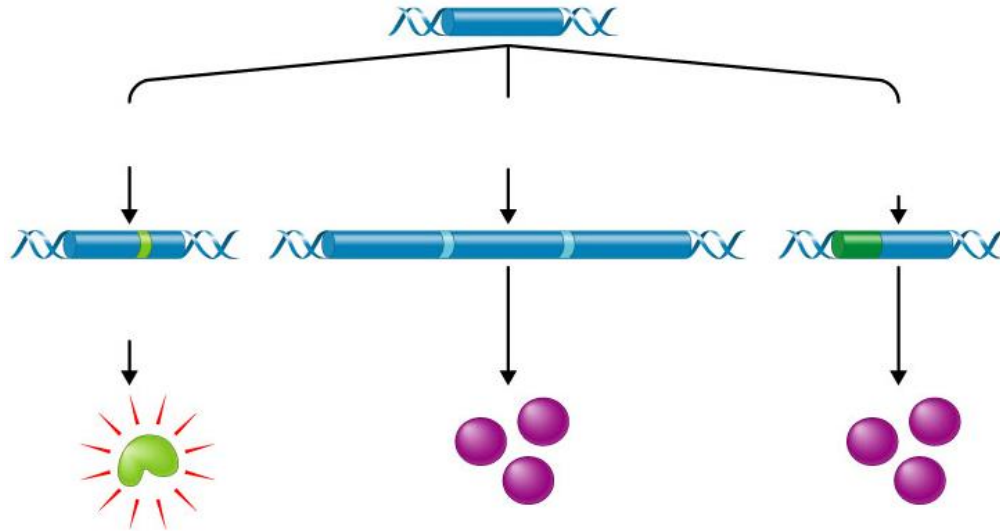


Slika 1. Proto-onkogeni. Proto-onkogeni se prema svojoj biološkoj ulozi u ćeliji dele na faktore rasta, receptore faktora rasta, proteine puteva prenosa signala i regulatorne proteine transkripcije.

Mutacije koje dovode do aktivacije proto-onkogena u onkogene mogu biti različite prirode, a najčešće su:

1. genske mutacije (tačkaste mutacije i pomereni okviri čitanja)
2. amplifikacije gena
3. hromozomski rearanžmani (najčešće translokacije) (**slika 2**)

Genske mutacije proto-onkogena dovode do ekspimiranja proteina u normalnoj količini sa promenjenom ili hiperaktivnom funkcijom. **Amplifikacije gena** su čest mehanizam aktivacije onkogena u kasnijim fazama neoplastične transformacije. Rezultat amplifikacije gena je ekspresija neizmenjenog proteina u količini koja je veća od normalne. **Hromozomskim rearanžmanima po tipu translokacija proto-onkogen** se „prebacuje“ u region koji se aktivno prepisuje ili ovom vrstom rearanžmana dolazi do fuzije proto-onkogena sa drugim genom. Himerni proteinski produkt ima ulogu u procesu neoplastične transformacije. Genska fuzija za rezultat može imati ili prekomernu ekspresiju fuzionisanog proteina ili pojavu da fuzionisani protein dobija novu funkciju. Pored translokacija, detektovani su i brojni drugi hromozomski rearanžmani u genomima malignih ćelija (terminalne delecije, delecije, insercije, duplikacije i inverzije).



Slika 2. Mutacije proto-onkogeni. a. Genske mutacije (tačkaste mutacije i pomereni okviri čitanja) b. Amplifikacija gena (poslednja istraživanja pokazuju da je amplifikacija gena posledica promena varijacija u broju kopija) c. Hromozomski rearanžmani (najčešći tipovi hromozomskih rearanžmana detektovani u genomima malignih ćelija su translokacije).

Onkogeni imaju dominantnu funkciju u odnosu na malignitet, tj. dovoljna je jedna kopija aktiviranog onkogeni, da bi se ispoljio njihov negativan efekat. Mutacije proto-onkogeni u somatskim ćelijama ne prenose se na potomstvo.

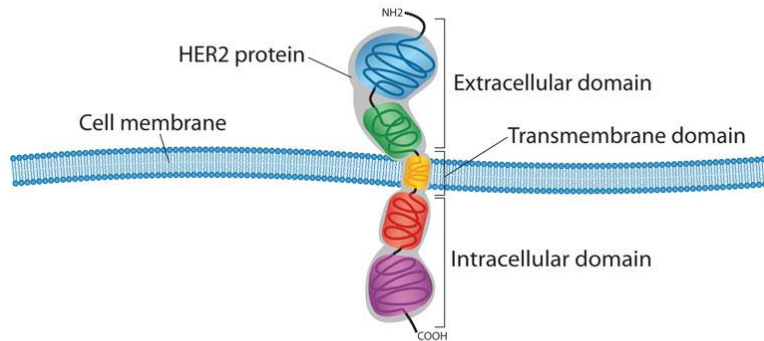
In vivo i *in vitro* analiza malignih ćelija pokazala je postojanje i sinergističkog (udruženog) dejstva dva ili više aktiviranih onkogeni. Ova pojava naziva se **onkogeni kolaboracija** (onkogeni saradnja). Primer za ovu vrstu dejstva je ćelijska kultura animalnih embrionalnih fibroblasta. Transfekcija ovakve ćelijske kulture sa onkogenom *c-RAS* za posledicu nema transformaciju ćelija. Bez efekta je i transfekcija ove kulture onkogenom *c-MYC*. Međutim, ako se transfekcija izvrši sa oba onkogeni istovremeno, dolazi do transformacije ćelija u kulturi. Kod različitih tipova ćelija, različite kombinacije onkogeni dovode do transformacije ćelija. Drugim rečima, onkogeni kolaboracija je tkivno–specifičan fenomen.

1.2.1. Receptor za faktor rasta *c-erbB-2*

Protein *c-erbB-2* (poznat i kao HER-2; NEU) pripada familiji tirozin-kinaznih receptora HER. Familija HER sadži još tri receptora: 1) receptor za epidermalni faktor rasta (eng. *epidermal growth factor receptor*, EGFR), koji se još naziva HER-1 ili *erbB-1*; 2.) HER-3; i 3.) HER-4 (poznat i kao *erbB-3*, *erbB-4*).

Gen *HER-2* nalazi se na hromozomu 17, sastoji se od 27 egzona i podleže alternativnoj obradi primarnog transkripta. Ovaj gen kodira transmembranski protein od 1.255 ak i težine od 185 kDa (**slika 3**). Vezivanje liganda za receptore svih članova HER familije receptora uzrokuje procese homo- i heterodimerizacije receptora koji su neophodni za aktivaciju njihove tirozin-

kinazne aktivnosti. Receptor za koji je vezan ligand (tirozin-kinaznom aktivnošću) aktivira kaskadnu reakciju aktivacije brojnih specifičnih proteina, od kojih su najpoznatiji mitogen aktivirana protein kinaza i fosfatidilinozitol-3 kinaze. Ova kaskadna reakcija dovodi do fosforilacije i aktivacije proteina koji funkcionišu kao regulatorni proteini transkripcije.



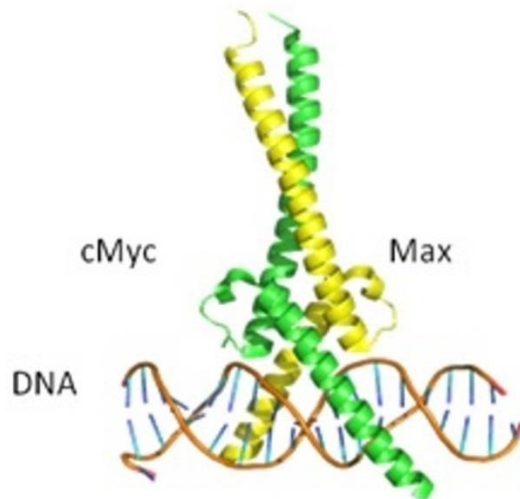
Slika 3. Receptor HER-2. Protein se sastoji iz tri domena: a) vanćelijskog domena sa subjedinicama za vezivanje faktora rasta, b) transmembranskog kratkog domena; i c) unutarćelijskog domena sa tirozin-kinaznom aktivnošću.

Prekomerna ekspresija proteina HER-2, naročito kao posledica amplifikacije gena, detektovana je u brojnim malignim bolestima. Tako je analiza karcinoma dojke pokazala da u oko 30% slučajeva dolazi do prekomerne ekspresije proteina HER-2, koja se povezuje sa agresivnijim tumorskim rastom i razvojem rezistencije na primenjene anti-tumorske tretmane.

1.2.2. Regulatorni protein transkripcije c-myc

Onkogen c-MYC pripada grupi najbolje proučenih onkogenata. Interesovanje za ovaj gen i njegov proteinski produkt proizilazi iz činjenice da je mutacija gena *c-MYC* najčešća mutacija onkogenata u malignim tumorima čoveka. On je i prvi otkriveni proto-onkogen kod čoveka. Gen za ovaj onkogen lociran je na hromozomu 8. Obradom primarnog transkripta dobijaju se dve iRNK (1318 bp i 1362 bp) za dva proteina (p64 i p67).

Protein Myc je regulatorni protein transkripcije. Pripada klasi proteina zavojnica – petlja – zavojnica koji poseduju i leucinske zatvarače (*b-HLH-Zip*). Leucinski zatvarači su proteinski motivi odgovorni kako za stabilizaciju interakcije proteina sa specifičnom sekvencom u molekulu DNK, tako i za vezivanje proteina Myc sa proteinom MAX (**slika 4**). Proteinski heterodimer Myc/Max aktivira transkripciju i predstavlja snažan promotor ćelijske proliferacije. Svoju biološku ulogu protein Myc ispoljava u brojnim ćelijskim procesima, kao što su ćelijski rast, diferencijacija i ćelijsko umiranje po tipu apoptoze. Pokazano je da kao regulatorni protein transkripcije utiče na ekspresiju gena čiji su proteinski produkti uključeni u procese replikacije DNK, metabolizma RNK i regulacije ćelijskog ciklusa.



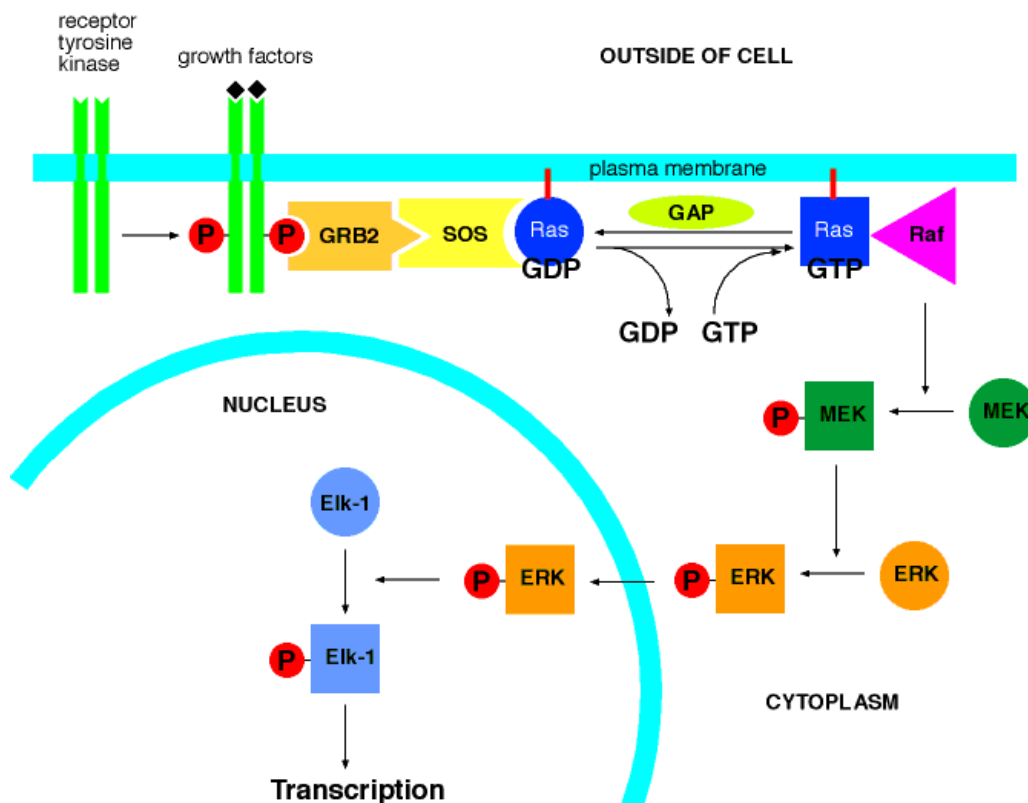
Slika 4. Regulatorni protein transkripcije Myc. Ovaj protein pripada klasi proteina zavojnica-petlja-zavojnica. Preko leucinskih zatvarača stabilizuje vezivanje za molekul DNK na način specifičan za sekvencu, kao i vezivanje za protein Max sa kojim u formi heterodimera pozitivno utiče na ekspresiju brojnih gena.

Translokacija i amplifikacija najčešći su mutageni događaji koji dovode do aktivacije onkogena *c-MYC*. Translokacija t(8;14)(q24;q32) detektovana je kod preko dve trećine bolesnika sa Burkitt-ovim limfomom. Burkitt-ov limfom, maligna bolest dečijeg doba, česta je u malaričnim regionima srednje Afrike i Papua Nove Gvineje. Ovom translokacijom onkogen *c-MYC* translocira se sa hromozoma 8 na hromozom 14, i to u region blizu lokusa za teške lance imunoglobulina koji se konstitutivno eksprimira.

1.2.3. Familija proteina Ras

Gen *RAS* (eng. *rat sarcoma 2 viral oncogene homolog*, *RAS*) je drugootkriveni proto-onkogen čoveka. Kasnija istraživanja pokazala su postojanje familije proteina Ras koja se sastoji od tri člana: H-ras (*Harvey*), K-ras (*Kirsten*) i N-ras. Geni familije Ras kodiraju male proteinske produkte od 189 aa i težine od 21 kDa (p21) koji su locirani u citoplazmi (vezani za unutrašnju stranu ćelijske membrane). Gen *K-RAS* nalazi se na kratkom kraku hromozoma 12 (12p12). Veličina gena je 35 kb i poseduje 4 egzona. Alternativnom obradom primarnog transkripta stvaraju se dve mRNA za protein K-ras od 5,5 kb i 3,8 kb.

Proteini Ras pripadaju klasi prenosilaca signala i svrstavaju se u grupu proteina G (GTP-vezujućih proteina). Protein K-ras poseduje tri domena preko kojih ostvaruje vezivanje sa: a) proteinima unutrašnje strane ćelijske membrane; b) guanozin-difosfatom (GDP) i guanozin-trifosfatom (GTP); c) citoplazmatskim proteinima. Proteini G aktiviraju signalni put kinaze MAP (**slika 5**).



Slika 5. Signalni put kinaze MAP. Vanćelijski signal svojim vezivanjem za receptor pokreće signalni put kinaze MAP. Receptor za koji je vezan vanćelijski signal biva fosforilisan. Fosforilisani receptor stupa u interakciju sa proteinom GRB-2. Protein GRB-2 stupa i u interakciju sa faktorom SOS. Ovaj faktor vrši zamenu molekula GDP koji je vezan za neaktivni protein Ras. Vezivanjem molekula GTP aktivira se protein Ras. Aktivirani protein Ras aktivira protein Raf (kinaza kinaze MAP kinaze). Sledi kaskadna reakcija aktivacije kinaza. Raf kinaza aktivira kinazu MEK (kinaza MAP kinaze), a kinaza MEK aktivira kinazu ERK (kinaza MAP). Kinaza MAP ima sposobnost fosforilacije brojnih supstrata, od kojih su neki i regulatorni proteini transkripcije.

Tačkasta mutacija gena *RAS* jedna je od najčešćih mutacija onkogena u malignim tumorima čoveka. Rezultati epidemiološko-genetičkih studija pokazuju da skoro trećina humanih malignih tumora poseduje mutaciju na nekom od gena *RAS*. Gen *K-RAS* mutiran je u preko 90% karcinoma pankreasa. Mutacija gena *H-RAS* česta je u karcinomima bešike, a gena *N-RAS* u hematološkim neoplazmama. Epidemiološko-genetičke studije takođe pokazuju da 30–60% karcinoma kolona odlikuje mutacija gena *K-RAS*. Najčešće tačkaste mutacije gena *K-RAS* „pogađaju“ kodone 12, 13 i 61. Ovaj segment gena kodira mesto vezivanja GDP/GTP.

Mutacija gena *RAS* uzrokuje konformacionu promenu proteina Ras, usled koje ovaj protein postaje aktivan bez obzira na strogo kontrolisan proces prenosa signala i prisustvo ili odsustvo GTP. Na ovaj način, kinaze MAP se konstantno aktiviraju i dovode do ekspresije brojnih gena, od kojih su neki i onkogeni.

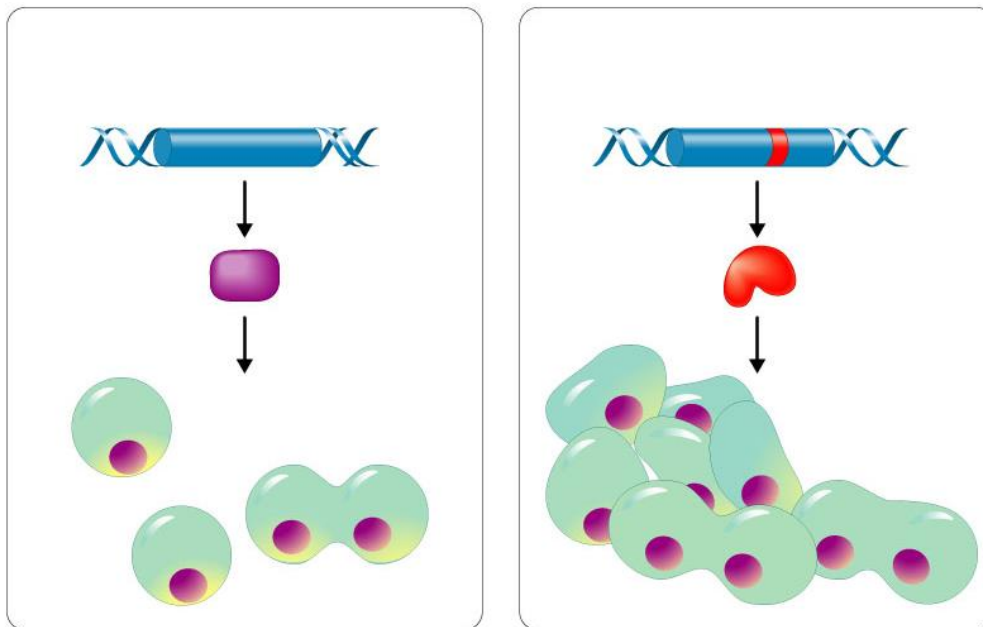
1.3. Tumor-supresorski geni – antionkogeni

Antionkogeni su geni čiji proteinski produkti imaju sposobnost inhibicije ili supresije neoplastične transformacije. Do danas je u genomu čoveka identifikovano oko 20 antionkogenata. Najistraženiji tumor-supresorski gen čoveka je gen *TP53* (vidi poglavlje Molekularna osnova apoptoze).

Prema biološkoj ulozi koju imaju u ćeliji antionkogeni se dele na:

1. regulatore ćelijskog ciklusa
2. regulatore puteva prenosa signala
3. proteine uključene u ćelijsko-ćelijske interakcije i interakcije ćelija i matriksa
4. regulatore procesa apoptoze
5. proteine citoskeleta
6. proteine sa nepoznatom funkcijom u ćeliji

Na osnovnu biološke uloge, antionkogeni se mogu definisati kao geni čiji proteinski produkti imaju ulogu u kontroli ćelijskog rasta, deobe i ćelijskog umiranja po tipu apoptoze. Naime, tumor-supresorski proteini imaju bitnu ulogu u procesima odgovornim za održavanje tkivne homeostaze. Mutacijom antionkogenata dolazi do supresije njegove ekspresije ili inaktivacije proteinskog produkta. Kao posledica mutacija antionkogenata dolazi do pojave nekontrolisanog ćelijskog rasta i deobe (**slika 6**). Pored mutacija, supresija ekspresije antionkogenata može biti i posledica epigenetičkih promena. Pojava hipermetilacije molekula DNK je česta pojava u promotorskim regionima antionkogenata.



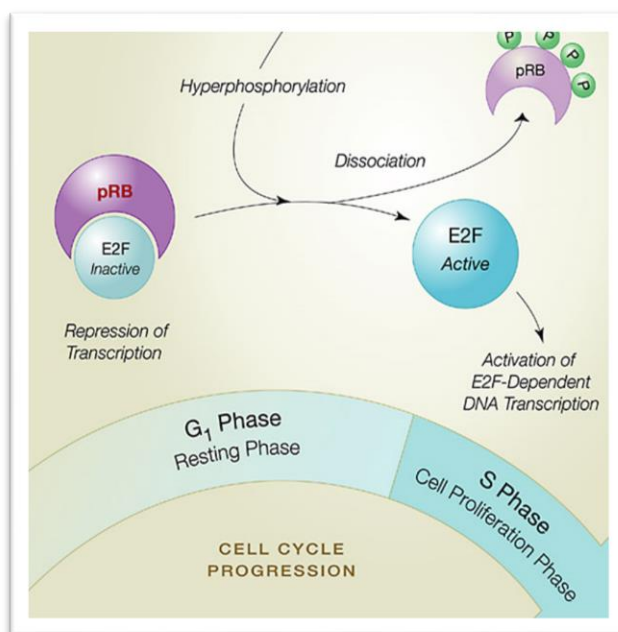
Slika 6. Tumor-supresorski geni. Proteinski produkti antionkogenata su odgovorni za kontrolu ćelijskog rasta, deobe i ćelijskog umiranja po tipu apoptoze. Mutacije antionkogenata za posledicu imaju nekontrolisani ćelijski rast i deobu, odnosno pojavu neoplastične transformacije.

U odnosu na malignu transformaciju, tumor-supresorski geni su recesivni. Potrebna je izmena oba alela (homozigotno stanje) da bi došlo do ekspimiranja efekta. Gubitak ili inaktivacija antionkogeno može da se odigra u somatskim ćelijama, pa onda samo jedan klon ćelija nosi tu izmenu (stečena mutacija). Izmjena na antionkogeno može se odigrati i u germinativnim ćelijama. Zigot nastao spajanjem takvog gameta i gameta sa nemutiranim genima razvija se u embrion kod koga sve ćelije imaju mutirani tumor-supresorski gen u heterozigotnom obliku. Takva mutacija je nasleđena, a rođeno dete je sa naslednom predispozicijom da oboli od maligne bolesti.

1.3.1. Antionkogen *RB*

Prvootkriveni tumor-supresorski gen bio je **retino–blastoma (Rb) gen**. Gen *RB*, lociran na hromozomu 13 (lokus q14), kodira nukleusni fosfoprotein Rb koji je uključen u procese regulacije ćelijskog ciklusa u tački prelaza iz faze G_1 u fazu S. Protein Rb je član familije proteina od tri člana Rb/p105, p107 i Rb2/p130. Gen *RB2* lociran je na hormozomu 16 (lokus p12.2).

Nefosforilisani proteini Rb imaju ulogu represora ekspresije gena neophodnih za prelazak ćelije u fazu S ćelijskog ciklusa. Svoj inhibitorsni efekat na ekspresiju gena ispoljava preko sposobnosti vezivanja za familiju regulatornih proteina transkripcije E2F, pa se po svojoj biološkoj ulozi svrstava u klasu proteina koji maskiraju ([slika 7](#)).



Slika 7. Uloga fosforilacije proteina Rb u regulaciji propagacije ćelija iz faze G_1 u fazu S ćelijskog ciklusa. Fosforilacija proteina Rb je mehanizam kojim se raskida proteinski kompleks Rb-E2F. Kada za protein E2F nije vezan protein Rb, E2F nesmetano stimuliše ekspresiju ciljnih gena. Kako su proteinski produkti nekih od tih gena uključeni i u proces propagacije kroz ćelijski ciklus, fosforilacija proteina Rb smatra se jednim od načina kontrole ćelijske proliferacije.

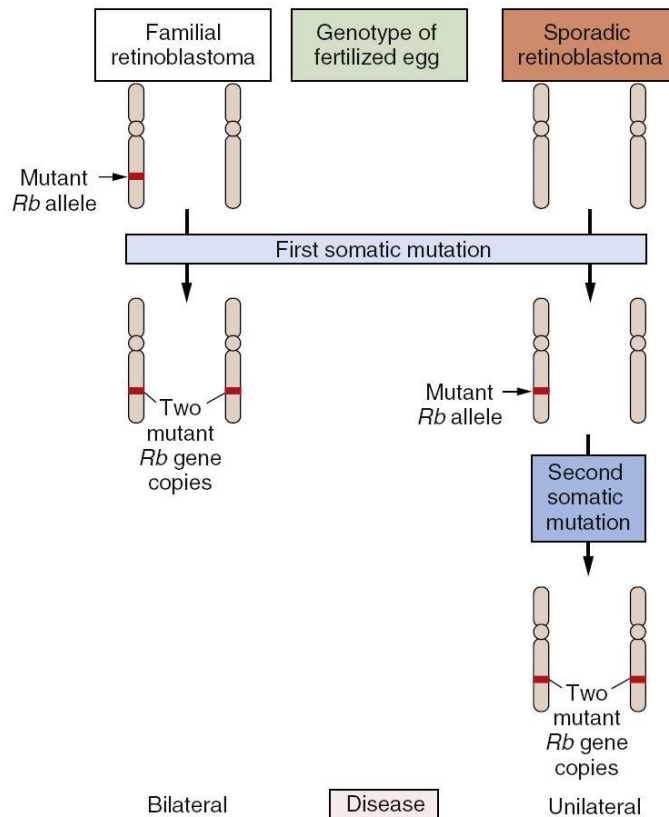
Početak sedamdesetih godina prošlog veka Amerikanac Alfred Knudson (r.1922) sa Univerziteta u Teksasu istraživao je retinoblastom, redak agresivni maligni tumor retine kod dece. Tokom svog istraživanja Knudson je uočio da postoje dve različite grupe bolesnika sa ovim tumorom. Jedne je definisao kao sporadične (nenasledne), a druge kao nasledne oblike bolesti. Kod sporadičnih tumora bolest je obično zahvatala samo jedno oko, dok je nasledni oblik najčešće zahvatao oba oka (bilateralna oštećenja). Danas se zna da je pojava retinoblastoma posledica mutacije gena *RB*.

Mutacija gena *RB*, pored retinoblastoma, detektovana je i u drugim malignim tumorima čoveka. Limfomi, karcinomi pluća i osteosarkomi su samo neki od njih.

1.3.2. Gubitak heterozigotnosti

Na osnovu svoje epidemiološke analize, Knudson je postavio hipotezu o razvoju retinoblastoma za koji je pretpostavio da je posledica mutacije obe kopije gena *RB*. Kod sporadičnih retinoblastoma mutacioni događaj pogađa obe kopije gena. U takvim izuzetno retkim slučajevima homozigotna mutacija gena *RB* znači potpuni nedostatak proteina Rb. Kod naslednog oblika bolesti situacija je drugačija. Dete koje ima naslednu predispoziciju za razvoj retinoblastoma rađa se sa jednim mutiranim genom *RB*, dok je drugi gen na homolognom hromozomu neizmenjen (*wt RB*) i on obavlja funkciju, tako da se bolest ne eksprimira. Kod deteta sve ćelije u organizmu nose ovu mutaciju u heterozigotnom stanju. Da bi se gen *RB* našao u homozigotnom izmenjenom obliku, potrebna je još jedna genska izmena. Druga mutacija dešava se isključivo u jednoj populaciji ćelija - ćelijama retine, od kojih se i razvija ovaj tumor. Opisani mehanizam inaktivacije gena („u dva koraka“) u nauci je poznat kao **Knudson's two hit hipoteza**. Otkriće antionkogena *RB* 1987. godine potpuno je potvrdilo Knudsonovu hipotezu inaktivacije gena u dva koraka. Od tada se ovom hipotezom objašnjava mehanizam inaktivacije antionkogena tokom procesa neoplastične transformacije.

Po modelu inaktivacije tumor-supresorskih gena „u dva koraka“, prva mutacija može biti različite prirode, od velikih hromozomskih delecija do tačkastih mutacija. Međutim, mutacija nije jedini genetički događaj koji može da dovede do inaktivacije tumor-supresorskog gena. Jedan od mogućih mehanizama je i represija genske ekspresije hipermetilacijom sekvence DNK u kojoj se nalazi gen *RB*. Dete rođeno sa naslednom predispozicijom je heterozigot za mutaciju u genu *RB*. Da bi došlo do pojave bolesti potrebno je da se dogodi još jedna genetička izmena koja će dovesti do **gubitka heterozigotnosti** (eng. *loss of heterozygosity*, LOH). Ovim pojmom se, dakle, definiše inaktivacija tumor-supresorskog gena, odnosno obrazovanje homozigota za mutaciju za određeni gen (**slika 8**).



Slika 8. Sporadični i nasledni retinoblastomi. Sporadični retinoblastomi nastaju kao posledica somatskih mutacija u obe kopije gena *RB*. Za razvoj sporadičnih retinoblastoma potrebne su dve mutacije u genu *RB*. Nasledni retinoblastomi se razvijaju kod dece koja se rađaju sa jednom mutiranom kopijom gena *RB*. Da bi se razvila bolest potrebno je da se mutacijom inaktivira i druga kopija gena *RB*. Za razvoj naslednih retinoblastoma potreban je samo jedan mutacioni događaj u ćelijama retine. Ova pojava naziva se gubitak heterozigotnosti.

1.4. Uloga epigenetičkih promena u razvoju i progresiji malignih tumora

Pored hipermetilacije promotora antionkogena u genomima malignih ćelija detektovana je i pojava globalnog smanjenja nivoa metilacije DNK. Globalno smanjenje metilacije molekula DNK dovodi do povećanja stope rekombinacije i aktivacije transpozona. Ovi procesi uzrokuju pojavu **genomske nestabilnosti**, koja je česta odlika malignih ćelija. Aktivacija onkogena može biti uzrokovana hipometilacijom molekula DNK. Metilacija molekula DNK povezana je i sa nastankom somatskih tačkastih mutacija C>T.

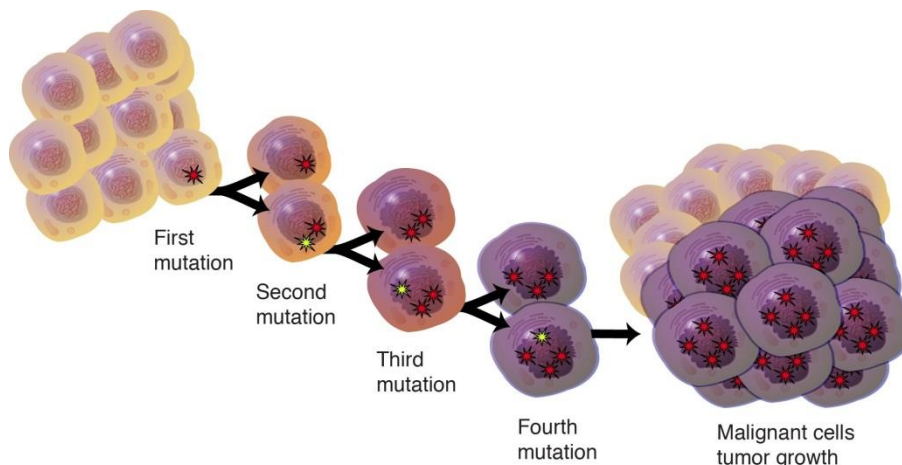
Promene u obrascu kovalentnih posttranslacionih modifikacija histonskih proteina (acetilacija/dezacetilacija, metilacija/demetilacija) imaju ulogu u aktivaciji onkogena i inaktivaciji antionkogena.

Kod bolesnika sa malignim tumorima detektovane su brojne mutacije u genima koji kodiraju enzime za modifikaciju histona, DNK metiltransferaze i proteine kompleksa za remodelovanje nukleozoma.

Ulogu u procesima neoplastične transformacije imaju i regulatorni molekuli RNK (duge nekodirajuće RNK i mikro RNK). Zbog toga se mikro RNK koje učestvuju u utišavanju onkogenata nazivaju **tumor-supresorske mikro RNK**, a one koje učestvuju u utišavanju antionkogenata – **onkogene mikro RNK**. Danas je poznato da promene u nivou ekspresije ovih mikro RNK imaju važnu ulogu u procesu neoplastične transformacije. Maligne tumore karakterišu i mutacije u genima koji kodiraju proteine utišavajućeg kompleksa, kao i proteine koji učestvuju u biogenezi, transportu i lokalizaciji mikro RNK.

1.5. Klonalna teorija nastanka malignog tumora

Klonalna teorija nastanka malignog tumora podrazumeva progresivnu akumulaciju genetičkih promena, i to kako aktivaciju onkogenata, tako i inaktivaciju tumor-supresorskih gena. Prema ovoj teoriji, tumor može biti monoklonalan – hipotetično nastao od samo jedne ćelije (**slika 9**) i poliklonalan – nastao procesima koji su inicijalno obuhvatili veći broj ćelija. Klonalna ekspanzija podrazumeva, pored inaktivacije antionkogenata i aktivacije onkogenata i promene u genima koji su uključeni u sisteme popravke oštećenja u molekulu DNK i u tzv. apoptotskim genima. Tokom progresije dolazi do poremećaja u imunskom nadzoru i angiogenezi, kao i do novih mutacija, što za posledicu ima invaziju i metastaziranje malignog tumora. Razvoj malignog tumora može biti vremenski dug proces, tako da u nekim slučajevima traje i nekoliko decenija. Poslednjih godina, intenzivna su istraživanja i uloge **malignih stem ćelija** (eng. *cancer stem cells*, CSCs) u razvoju malignih tumora.



Slika 9. Klonalna teorija nastanka malignog tumora. „Matematički“ model pretpostavlja da je za fazu inicijacije nekada dovoljna samo jedna mutacija, faza progresije zahteva dve do pet mutacija, dok faza metastaziranja zahteva više od pet mutacionih događaja.

1.6. Maligne bolesti kao nasledne bolesti

Na osnovu iznetih poznatih detalja o molekularnoj osnovi malignih bolesti postavlja se pitanje – da li su maligne bolesti nasledne bolesti? Obimna molekularno-biološka ispitivanja pokazala su da manje od 10% bolesnika sa malignim tumorom ima naslednu mutaciju koja može biti povezana sa razvojem bolesti. Za svaki određeni maligni tumor učestalost se dramatično smanjuje na 0.1%.

Genetička predispozicija za maligni tumor razmatra se u tri zasebne kategorije:

- nasledni autozomno-dominantni sindromi vezani za maligne bolesti
- familijarne maligne bolesti
- nasledni autozomno-recesivni sindromi povezani sa defektima sistema za popravku oštećenja u molekulu DNK

1.6.1. Nasledni autozomno-dominantni sindromi vezani za maligne bolesti

Za veći broj malignih bolesti dokazana je uloga inaktivacije antionkogena tokom procesa neoplastične transformacije. Kao što je već objašnjeno *Knudson's two hit* hipotezom, sve osobe rođene sa neaktivnom jednom kopijom tumor-supresorskog gena imaju veću incidenciju razvoja maligne bolesti. U **Tabeli 3.** dat je prikaz nekih bolesti i gena u kojima su mutacije odgovorne za povećanu incidenciju razvoja maligne bolesti.

Tabela 3. Nasledni autozomno-dominantni sindromi vezani za maligne bolesti

Bolest	Gen
Retinoblastom	<i>RB</i>
Li Fraumenov sindrom	<i>TP53</i>
Familijarna adenomatozna polipoza	<i>APC</i>
Neurofibromatoza 1 i 2	<i>NF1, NF2</i>
Melanom	<i>P15, P16</i>
Nasledni nepolipozni karcinom kolona	<i>hMSH2, hMLH1, hMSH6</i>

1.6.2. Familijarne maligne bolesti

Epidemiološke studije pokazale su da postoje porodice ili grupe ljudi u srodstvu (familije) kod kojih je učestalost pojave nekih vrsta malignih bolesti veća u odnosu na opštu populaciju. Takvi tumori obično su tumori ranijeg životnog doba, često multipni ili bilateralni. Dosadašnja saznanja nam ne daju odgovore o eventualnoj predispoziciji, odnosno načinu prenošenja kroz generacije. Pojedini autori razvoj malignih bolesti u tim porodicama povezuju sa promenama u penetrabilnosti pojedinih gena.

1.6.3. Nasledni autozomno-recesivni sindromi povezani sa defektima sistema za popravku oštećenja u molekulu DNK

Za izvestan broj malignih bolesti čoveka dokazano je da su posledica poremećaja u sistemima za popravku oštećenja u molekulu DNK. Navešćemo neke od njih:

1. **Xeroderma pigmentosum** je retko oboljenje, sa mutacijom u genima čiji proteinski produkti učestvuju u mehanizmu ekscizione reparacije dimera timina nastalih dejstvom UV zračenja. Kod nosilaca ove mutacije 1000 puta uvećana je mogućnost razvoja malignih tumora kože posle izlaganja UV zracima.
2. **Ataxia Telangiectasia** je oboljenje koje nastaje kao posledica mutacije u genu *ATM* (eng. *Ataxia Telangiectasia Mutated*, ATM). Nosioci ove mutacije veoma su osetljivi na UV zračenje i veliki procenat obolela od malignih bolesti.
3. **Bloom-ov sindrom** razvija se usled autozomno-recesivne mutacije u genu *BLM*, koji kodira enzim DNK helikazu. Kao posledica ove mutacije u genomu dolazi do spontanih hromatidnih prekida i niza drugih izmena na nivou genoma.
4. **Fanconi anemija** je nasledna aplastična anemija, nastala kao posledica autozomno-recesivne mutacije. Osobe obolele od ove teške anemije su sa veoma nestabilnim genomom (česti su hromozomalni prekidi). Pretpostavlja se da je najmanje pet gena „uključeno” u razvoj ove bolesti. Mutacija u bilo kom od tih gena dovodi do razvoja jednog od oblika *Fanconi* anemije.

Ključni koncepti

- Tumor je abnormalna masa tkiva koja nastaje kao rezultat nekontrolisanog rasta ćelija. Tumori se dele na benigne (dobročudne) i maligne (zloćudne). Osnovna razlika između benignih i malignih tumora je ta što maligni tumori imaju sposobnost invazije i metastaziranja.
- Maligne bolesti nastaju neoplastičnom transformacijom ćelija i tkiva. Neoplastična transformacija je proces narušavanja tkivne homeostaze u pravcu nekontrolisane proliferacije ćelija i inhibicije ćelijskog umiranja po tipu apoptoze. Neoplastična transformacija je višestepeni proces. Svaki stepen karakterišu genetičke i epigenetičke izmene koje dovode do transformacije neizmenjene („normalne“) ćelije u malignu.
- Geni uključeni u proces neoplastične transformacije na osnovu svog dejstva dele se u dve osnovne kategorije: proto-onkogeni i tumor supresorski geni ili antionkogeni.
- Proto-onkogeni se prema svojoj biološkoj ulozi u ćeliji dele na faktore rasta, receptore faktora rasta, proteine puteva prenosa signala i regulatorne proteine transkripcije. Mutacije koje dovode do aktivacije proto-onkogeni u onkogene mogu biti različite prirode, a najčešće su: genske mutacije (tačkaste mutacije i pomereni okviri čitanja); amplifikacije gena; i hromozomski rearanžmani (najčešće translokacije). Onkogeni imaju dominantnu funkciju u odnosu na malignitet, tj. dovoljna je jedna kopija aktiviranog onkogeni, da bi se ispoljio njihov negativan efekat.
- Antionkogeni su geni čiji proteinski produkti imaju sposobnost inhibicije ili supresije neoplastične transformacije. Do danas je u genomu čoveka identifikovano oko 20 antionkogeni. Prema biološkoj ulozi koju imaju u ćeliji antionkogeni se dele na: regulatore ćelijskog ciklusa; regulatore puteva prenosa signala; proteine uključene u ćelijsko-ćelijske interakcije i interakcije ćelija i matriksa; regulatore procesa apoptoze; proteine citoskeleta; i proteine sa nepoznatom funkcijom u ćeliji. U odnosu na malignu transformaciju, tumor-supresorski geni su recesivni. Potrebna je izmena oba alela (homozigotno stanje) da bi došlo do ekspimiranja efekta.
- Po modelu inaktivacije tumor-supresorskih gena „u dva koraka“, prva mutacija može biti različite prirode, od velikih hromozomskih delecija do tačkastih mutacija. Da bi došlo do pojave bolesti potrebno je da se dogodi još jedna genetička izmena koja će dovesti do gubitka heterozigotnosti. Ovim pojmom se, dakle, definiše inaktivacija tumor-supresorskog gena, odnosno obrazovanje homozigota za mutaciju za određeni gen.

- Pored hipermetilacije promotora antionkogenih u genomima malignih ćelija detektovana je i pojava globalnog smanjenja nivoa metilacije DNK. Globalno smanjenje metilacije molekula DNK dovodi do povećanja stope rekombinacije i aktivacije transpozona. Ovi procesi uzrokuju pojavu genomske nestabilnosti, koja je česta odlika malignih ćelija. Aktivacija onkogenih može biti uzrokovana hipometilacijom molekula DNK. Promene u obrascu kovalentnih posttranslacionih modifikacija histonskih proteina (acetilacija/dezacetilacija, metilacija/demetilacija) imaju ulogu u aktivaciji onkogenih i inaktivaciji antionkogenih.
- Ulogu u procesima neoplastične transformacije imaju i regulatorni molekuli RNK (duge nekodirajuće RNK i mikro RNK). Zbog toga se mikro RNK koje učestvuju u utišavanju onkogenih nazivaju tumor-supresorske mikro RNK, a one koje učestvuju u utišavanju antionkogenih – onkogene mikro RNK.
- Genetička predispozicija za maligni tumor razmatra se u tri zasebne kategorije: nasledni autozomno-dominantni sindromi vezani za maligne bolesti; familijarne maligne bolesti; i nasledni autozomno-recesivni sindromi povezani sa defektima sistema za popravku oštećenja u molekulu DNK.

Pitanja

1. Koja je osnovna razlika između benignih i malignih tumora ?
2. Šta je neoplastična transformacija ?
3. Šta su proto-onkogeni a šta onkogeni ?
4. Koje su najčešće mutacije proto-onkogeni ?
5. Šta su antionkogeni ?
6. Navedi podelu antionkogeni prema biološkog ulozi u ćeliji.
7. Šta se podrazumeva pod pojmom gubitak heterozigotnosti ?
8. Koje su najčešće epigenetičke promene u malignim ćelijama ?
9. Objasni klonalnu teoriju nastanka tumora.
10. Da li su maligne bolesti nasledne bolesti ?