

Mutacje mitochondrialnego DNA w rozwoju nowotworów głowy i szyi

Mitochondrial DNA mutations in the pathogenesis in the head and neck squamous cell carcinoma

Grzegorz Piętka¹, Wojciech Kukwa², Ewa Bartnik¹,
Anna Ścińska², Anna M. Czarnecka^{1, 3}

¹ Instytut Genetyki i Biotechnologii
Uniwersytetu Warszawskiego

² Klinika Otolaryngologii Oddziału Stomatologii AM,
Szpital Czerniakowski w Warszawie

³ Studium Medycyny Molekularnej
AM w Warszawie

Summary

Data reported until today suggested a pivotal role of nuclear DNA mutations in the process of carcinogenesis. Recently more and more authors claim that disruption of mitochondrial DNA should not be excluded from this analysis. mtDNA have been reported in many cancers of head and neck region. Mitochondrial D-loop has been proven to be mutation hot – spot with majority of mutations in the positions 303 to 315 of poly-C tract. Data show that 37% of patients with pre-malignant lesions and 62% with carcinoma in situ are positive for mtDNA mutations. Moreover mutations in genes encoding ND2, ND5, COIII, CYTB, and ATP6 were observed in 17% of patients. Mutations in mitochondrial rRNA genes occurred in similar number of cases. Neoplastic cells undifferentiation and disease progression is accompanied by multiplication of mtDNA number and increased mtDNA content. mtDNA content correlates with the stage of the disease. mtDNA mutations facilitate cell proliferation and inhibit apoptosis by increasing the production of reactive oxygen species (ROS). Cells harbouring mutated mtDNA have increased proliferation rate, as increased ROS concentration may act as an endogenous growth factor.

Hasła indeksowe: DNA mitochondrialne, reaktywne formy tlenu, rak płaskonabłonkowy, nowotwory głowy i szyi

Key words: mitochondrial DNA, Reactive Oxygen Species, Squamous Cell Carcinoma, Head and Neck Neoplasms

Otolaryngol Pol 2008; LXII (2): 158–164 © 2008 by Polskie Towarzystwo Otolaryngologów – Chirurgów Głowy i Szyi

WSTĘP

Nowotwory głowy i szyi stanowią około 5% wszystkich zmian nowotworowych. Są to przede wszystkim raki płaskonabłonkowe, które stanowią ponad 90% wszystkich nowotworów tej okolicy [1].

Najczęściej występujące w tym rejonie nowotwory to guzy jamy ustnej i gardła, a także nowotwory krtani. Ocenia się, że w 2005 roku stwierdzono odpowiednio około 430 000 i 180 000 nowych zachorowań [2]. Mimo coraz nowocześniejszych metod diagnostyki, a także pomimo edukacji pacjentów, nadal około 60% chorych w chwili ustalenia rozpoznania znajduje się

w stadium T3 lub T4, a średnia 5-letnia przeżywalność w tej grupie pacjentów od lat pozostaje w granicach 30–35%.

Wśród znanych czynników ryzyka rozwoju nowotworów głowy i szyi wymienia się przede wszystkim narażenie na dym papierosowy, zarówno w formie czynnej, jak i biernej, a także spożywanie alkoholu wysokoprocentowego. Innymi czynnikami ryzyka są żucie tytoniu czy orzechów betel (orzechy azjatyckiej rośliny *Areca catechu*, zwykle owinięte liśćmi z drzew *Piper betle*), palenie cygaretek i cygar [3].

Bardzo ważną rolę, przede wszystkim w rozwoju nowotworów jamy ustnej i gardła stanowią infekcje

Autorzy nie zgłaszają konfliktu interesów.

wirusami HPV, a w niektórych rejonach świata także EBV. Co istotne, grupa nowotworów wywołanych infekcją wirusową została w ostatnich latach wydzielona jako podgrupa guzów o odmiennej wrażliwości na leczenie radio- i chemioterapią, a także o odmiennym (zwykle lepszym) rokowaniu [4].

Środowiskowe czynniki ryzyka oddziałują na genom komórek i wywołują w nim uszkodzenia. Różna, osobniczo uwarunkowana, wrażliwość na czynniki mutagenne, powoduje, że jedynie u części osób na nie narażonych rozwija się zmiana nowotworowa. Dochodzi wówczas do powstania niestabilnych genetycznie komórek, które uzyskały zdolność do niekontrolowanych podziałów oraz do rozprzestrzeniania się wśród tkanek, z których się nie wywodzą. Cechuje je niewrażliwość na programowaną śmierć na drodze apoptozy. Nowotwory niezłośliwe charakteryzują się jedynie miejscowym wzrostem. Nowotwory złośliwe charakteryzuje zdolność do ekspansji na drodze rozrostu inwazyjnego. Komórki nowotworowe mogą być przenoszone do odległych tkanek za pośrednictwem układu krwionośnego lub limfatycznego [5].

Zmiany, które są niezbędne do przemiany prawidłowej komórki w komórkę nowotworową zachodzą w obrębie trzech klas genów:

- 1) proto-onkogenów,
- 2) genów supresorowych,
- 3) genów mutatorowych [6].

Dotychczasowa wiedza, dotycząca zaburzeń występujących w materiale genetycznym komórek nowotworowych, skupiała się przede wszystkim na DNA jądrowym (nDNA – nuclear DNA). Stopniowo jednak rośnie liczba doniesień świadczących o tym, że nie bez znaczenia pozostają uszkodzenia cząstek DNA znajdujących się w mitochondriach komórek, czyli w tzw. DNA mitochondrialnym (mtDNA).

Odnajdowane w nowotworach mutacje genów kodujących białka kompleksów fosforylacji oksydacyjnej przykuwają uwagę badaczy zajmujących się procesami nowotworzenia. Szczególnie istotny wpływ wydaje się mieć zwiększona produkcja reaktywnych form tlenu (ROS – *reactive oxygen species*), towarzysząca upośledzonej funkcji łańcucha oddechowego a spowodowana identyfikowanymi mutacjami. Badania na hybrydach komórkowych oraz myszach bezgrasiczych wykazały, iż same mutacje mtDNA mogą wpływać na intensywność proliferacji komórek nowotworowych, a także są w stanie uniewrażliwić komórki raka na apoptozę.

Celem pracy jest przegląd literatury dotyczącej mutacji mtDNA identyfikowanych w nowotworach głowy i szyi i mogących sprzyjać transformacji nowotworowej.

MITOCHONDRIA

Mitochondria są otoczonymi podwójną błoną, półautonomicznymi organellami, występującymi powszechnie w komórkach eukariotycznych. Są to bardzo plastyczne struktury, których kształt ulega nieustannym zmianom. Występujące w komórkach mitochondria kontaktują się ze sobą w wyniku stale zachodzących fuzji i podziałów. Ponadto są związane z cytoszkieletem, z białkami rodziny mikrotubul, które determinują ich ruch oraz rozmieszczenie w komórce. Mitochondria są nazywane „elektrowniami komórkowymi”, gdyż ich główną funkcją jest produkcja ATP na drodze fosforylacji oksydacyjnej. Niemniej jednak, rola ich nie ogranicza się jedynie do produkcji ATP, gdyż zachodzą w nich także inne procesy metaboliczne (np. cykl kwasu cytrynowego, β -oksydacja, cykl moczynowy). Dodatkowo uczestniczą one w gospodarce jonami wapnia oraz odgrywają kluczową rolę w procesie apoptozy [7]. Ze względu na udział w opisanych procesach, sprawne działanie mitochondriów jest niezbędne do prawidłowego funkcjonowania komórki oraz utrzymania jej w stanie homeostazy.

Półautonomiczność mitochondriów wynika z posiadania własnego materiału genetycznego, który u człowieka ma postać kolistej cząsteczki DNA, zbudowanej z 16,568 par zasad. Sekwencja ludzkiego mtDNA została po raz pierwszy odczytana przez Andersona i wsp. [8]. Liczba cząsteczek mtDNA w komórkach różnych tkanek nie jest identyczna, lecz zależy od ich zapotrzebowania energetycznego [9]. W DNA mitochondriów człowieka znajdują się geny kodujące 13 białek, 2 rRNA, a także 22 tRNA. Zawiera ono również petlę-D (*displacement-loop*) – odcinek długości 1,1 kb, który nie koduje żadnych genów, lecz zawiera sekwencje promotorowe, biorące udział w replikacji oraz transkrypcji mtDNA [10]. Mitochondrialny genom ludzki, w odróżnieniu od jądrowego, posiada bardzo niewiele fragmentów niekodujących, nie zawiera intronów oraz nieznacznie różni się specyficznością kodonów od DNA jądrowego.

Mutacje w mtDNA zachodzą o dwa rzędy wielkości częściej niż w nDNA [11]. Badania przeprowadzone przez Zheng i wsp. sugerują, że polimeraza γ może być głównym czynnikiem odpowiedzialnym za endogenną mutagenezę w obrębie mitochondriów poprzez wprowadzanie błędnie sparowanych nukleotydów [12]. Większa częstość mutacji jest również spowodowana tym, iż mtDNA, w odróżnieniu od nDNA nie jest chronione przez białka histonowe oraz posiada słabszy od jądrowego system naprawy, polegający na wycinaniu nieprawidłowo sparowanych zasad. Ponadto umieszczenie cząsteczek mtDNA w bezpośrednim

sąsiedztwie łańcucha oddechowego istotnie sprzyja powstawaniu nowych mutacji, gdyż generowane przez łańcuch elektronowy (ETC – *electron transport chain*) jony nadadtlenkowe ($O_2^{\cdot-}$) w związku ze swoją wysoką reaktywnością uszkadzają mtDNA [13].

Ponieważ mtDNA zawiera znikomą ilość niekodujących fragmentów DNA, większość mutacji genomu mitochondrialnego dotyczy zawartych w nim genów. Z tego powodu wiele mutacji może niekorzystnie wpływać na metabolizm mitochondriów i być przyczyną chorób mitochondrialnych. Mutacje mogą dotyczyć zarówno genów kodujących tRNA, jak również genów kodujących białka. Ostatecznie wszystkie mutacje prowadzą do upośledzenia produkcji ATP [14].

Ze względu na znaczne ilości cząsteczek mtDNA w komórce, aby doszło do rozwoju choroby, zawartość zmutowanego mtDNA musi osiągnąć wartość progową. Uważa się, że jest to około 80% cząsteczek występujących w komórce [15].

ROLA MITOCHONDRIÓW W METABOLIZMIE KOMÓREK NOWOTWOROWYCH

Ponad 70 lat temu Otto Warburg opisał występujące w nowotworach zjawisko glikolizy zachodzącej pomimo obecności tlenu [16]. Intensywna glikoliza rozpoczyna się, gdy we wnętrzu szybko rozwijającego się guza spada ciśnienie parcjalne tlenu i dochodzi do wystąpienia hipoksji. W późniejszych etapach, gdy stężenie tlenu wraca do normy, komórki nowotworowe nadal mogą wykazywać podwyższoną aktywność glikolizy. Wysoki poziom glikolizy w obecności tlenu – nazywany efektem Warburga – jest efektem zmian genetycznych lub epigenetycznych i jest charakterystyczny dla większości nowotworów. Zmieniony metabolizm (podwyższony poziom glikolizy, zwiększony pobór glukozy) odgrywa istotną rolę w procesie transformacji nowotworowej, oraz dodatnio koreluje z agresywnością nowotworu [17]. Ponadto niektórzy badacze postulują, iż istotną rolę intensywniej aerobowej glikolizy jest nadprodukcja Acetylo koenzymu A (AcCoA) wymaganego do wzmożonej syntezy lipidów. Ponieważ komórki nowotworowe charakteryzują się intensywną proliferacją, wymagają wydajnej membranogenezy, która z kolei wymaga znacznej ilości lipidów [18].

Ponad 70 lat temu Warburg postulował, iż przyczyną aerobowej glikolizy są defekty metabolizmu mitochondrialnego [16]. W wyniku owych defektów następuje spadek syntezy ATP, który wymusza uruchomienie procesów glikolizy. Pociąga to za sobą wzmożoną produkcję kwasu mlekowego. Uaktyw-

nienie glikolizy może z kolei zwiększać agresywność nowotworu oraz jego inwazyjność, a także działać antyapoptotycznie [17, 19, 20]. Teorię popiera powszechna obecność mutacji w mtDNA komórek nowotworowych, która sugeruje, iż mogą być one czynnikami onkogennymi [21–23]. Dzięki badaniom na modelu zwierzęcym udowodniono, iż mutacje mtDNA mogą zarówno stymulować rozrost guza, jak również przeciwdziałać apoptozie komórek nowotworowych [19, 21]. Niemniej jednak rola i mechanizm działania mutacji mtDNA w procesie karcynogenezy wciąż nie zostały do końca poznane.

ROLA REAKTYWNYCH FORM TLENU W TRANSFORMACJI NOWOTWOROWEJ

Jednym z głównych czynników uznawanych za onkogenne są reaktywne formy tlenu (ROS – *reactive oxygen species*). W trakcie transportu elektronów wzdłuż łańcucha oddechowego następuje stała produkcja rodników nadadtlenkowych ($O_2^{\cdot-}$), które powstają w wyniku bezpośredniego przeniesienia elektronu na cząsteczkowy tlen. Ma to miejsce w mitochondriach, w łańcuchu transportu elektronów dla fosforylacji oksydacyjnej (OXPHOS). Głównymi miejscami powstawania $O_2^{\cdot-}$ są kompleksy I i III [24]. Organizm eliminuje rodniki nadadtlenkowe przekształcając je za pośrednictwem enzymu dysmutazy nadadtlenkowej (SOD – *superoxide dismutase*) w H_2O_2 , który jest następnie przekształcany przez enzym peroksydazę glutationową w wodę i tlen. Jednakże H_2O_2 w obecności jonu żelaza, w wyniku reakcji Fentona, może zostać przekształcony w rodniki hydroksylowe ($HO\cdot$) [25]. Ostateczne stężenie reaktywnych form tlenu w komórce jest wypadkową procesów generujących ROS oraz mechanizmów odpowiedzialnych za ich usuwanie [26].

Generalnie nieznacznie przeważają procesy generujące reaktywne formy tlenu i ostatecznie $O_2^{\cdot-}$ powstają z około 0,2% pobieranego przez komórki tlenu [24]. Gdy procesy generujące powstawanie reaktywnych form tlenu zaczynają przewyższać komórkowe systemy eliminacji wolnych rodników, np. w sytuacji kiedy łańcuch transportu elektronów nie funkcjonuje prawidłowo, komórka wchodzi w stan zwany stresem oksydacyjnym. Stres taki może powstawać w efekcie działania czynników zewnętrznych, jak podanie pewnych substancji chemicznych czy alkoholu, ale także na skutek nieprawidłowości w przebiegu fosforylacji oksydacyjnej, co może być wyrazem uszkodzenia białek transportujących elektrony w sytuacji, gdy ich geny zostały zmutowane (mutacje w mtDNA). Reaktywne

formy tlenu uszkodzają DNA powodując jedno- lub dwuniciowe pęknięcia, które prowadzą do rearanżacji mtDNA, a także modyfikują zasady (np. 8-oxo-dG) [27]. Powstałe uszkodzenia mtDNA mogą prowadzić do powstawania mutacji, w których wyniku dochodzi do coraz większych nieprawidłowości w funkcjonowaniu łańcucha oddechowego, które skutkują zwiększoną produkcją ROS. W efekcie mamy do czynienia z dodatnim sprzężeniem zwrotnym nazywanym „błędny kołem” (*vicious cycle*) [28].

Dodatkowo, rozpatrując aktywność ROS w całej komórce, reaktywne formy tlenu, ze względu na swoją wysoką zdolność oddziaływania z praktycznie każdą znajdującą się w pobliżu cząsteczką, mogą uszkadzać białka, cukry, lipidy oraz kwasy nukleinowe. Rodniki hydroksylowe są stosunkowo nietrwałe, toteż ich występowanie ogranicza się do miejsc, w których powstały. H_2O_2 jest związkiem o znacznie większej trwałości, dzięki czemu może dyfundować do różnych rejonów komórki, gdzie na miejscu jest przekształcane w $HO\cdot$ i reaguje z występującymi tam cząstkami. Basoah i wsp. [29] dowodzą, że reaktywne formy tlenu upośledzają syntezę białek oraz przyspieszają degradację nowo zsyntetyzowanych białek, co w dłuższej perspektywie może prowadzić do spadku ilości białek w komórce – w tym np. białek supresorowych. Działanie reaktywnych form tlenu może zatem sprzyjać kancerogenezie na wiele innych sposobów – poprzez uszkodzenia DNA, stymulację proliferacji lub poprzez inaktywację białek supresorowych, ale i aktywację protoonkogenów [27, 30, 31]. Podwyższone stężenie reaktywnych form tlenu może stymulować podziały komórkowe poprzez oddziaływanie na wiele kinaz rodziny MAP, AP-1 lub NF- κ B – czynniki wzrostu wrażliwe na potencjał redoks [27, 30–32]. Kolejne onkogenne działanie ROS dotyczy zdolności do upośledzenia funkcji białka p53 w wyniku jego utlenienia, które sprawia, iż traci ono zdolność przyłączania się do specyficznych sekwencji DNA [33]. Upośledzenie funkcji białka p53, związanej z kontrolą cyklu komórkowego, może prowadzić do niekontrolowanych podziałów komórkowych, które mogą sprzyjać transformacji nowotworowej [27].

Posługując się modelami zwierzęcymi udowodniono, iż mutacje mtDNA zwiększające produkcję reaktywnych form tlenu mogą powodować przyspieszenie rozrostu nowotworowu, a dodatkowo chronią komórki nowotworowe przed apoptozą [19, 21]. Jednak, zgodnie z hipotezą „błędne koła”, produkcja ROS prowadzi do stymulacji ich produkcji na zasadzie dodatniego sprzężenia zwrotnego. Gdyby tak było w rzeczywistości, komórki nowotworowe szybko ginęłyby w wyniku toksycznego działania

wysokich stężeń reaktywnych form tlenu. Ponieważ w komórkach nowotworowych powszechnie odnajduje się mutacje mtDNA, które mogą prowadzić do zwiększonej produkcji ROS, muszą w nich także zachodzić procesy utrzymujące stężenie reaktywnych form tlenu, promujące wzrost guza.

NAJNOWSZE DANE DOTYCZĄCE MTDNA W NOWOTWORACH GŁOWY I SZYI

1. Zmiany dotyczące pętli D

Uważa się, że choć mutacje mogą zachodzić w całym genomie mitochondrialnym, najczęściej zdarzają się w pętli D, a zwłaszcza w obszarze poli-C pomiędzy nukleotydami 303 i 315. Badania tego odcinka potwierdziły, że mutacje w tym odcinku występowały średnio w 37% zmian przednowotworowych [34]. Co ważne, częstość występowania mutacji korelowała pozytywnie ze stopniem zaawansowania histologicznego zmiany. Autorzy ocenili, że mutacje dotyczą 22% zmian hiperplastycznych, 33% łagodnych dysplazji, 50% ciężkich dysplazji i aż 62% przypadków raka przedinwazyjnego (*carcinoma in situ*).

Kolejne badania pokazały, iż mutacje mtDNA są częstsze w rakach głowy i szyi niż w raku innych narządów, w tym płuca, piersi, jelita grubego czy pęcherza moczowego – odpowiednio 39% wobec 16%, 29%, 28% czy 20%. Wykazano, iż w nowotworach głowy i szyi (HNSCC – *head and neck squamous cell carcinoma*) przeważają zmiany jednonukleotydowe (głównie delecje w poli-C), choć opisano także dwie delecje wielkości 5 i 7 par zasad [35]. Badania nowotworów jamy ustnej u chorych żujących orzechy betel pokazały, iż w raku kolczystokomórkowym 44% pacjentów miało insercje lub delecje w trakcie poli-C między 303–309 parą zasad w pętli-D [36]. Największa dotychczas praca [37] objęła 109 pacjentów, w tym 13 przypadków raka jamy ustnej, 46 raków gardła środkowego, 27 gardła dolnego i 23 nowotwory krtań. Potwierdzono obecność zmian w odcinku D310 u 21% z nich.

2. Mutacje pojedynczych genów mtDNA

Zastosowanie mikromacierzy oligonukleotydowej (MitoChip 2.0) umożliwiło sekwencjonowanie całego mitochondrialnego genomu, z ponad 99,99% powtarzalnością wyników [38]. Dzięki temu zespół Califano [39] wykonał badanie pełnego genomu mitochondrialnego pochodzącego z komórek guzów głowy i szyi 83 pacjentów. Poza mutacjami obecnymi w pętli D (w 29% przypadków), potwierdzono obecność mutacji w genach dla białek ND2, ND5, COIII, CYTB, czy

ATP6 w 17% przypadków (14 z 83 próbek). Także w 14 przypadkach stwierdzono obecność mutacji w genach dla rybosomalnego RNA (rRNA). Większość badanych komórek posiadała od 1 do 4 mutacji.

Podobny trend dla mutacji w obrębie genu ND2 zaobserwowano w rakach płaskonabłonkowych jamy ustnej. Mutacje te występowały u 20% pacjentów, z czego 2/3 stanowiły mutacje w pozycji 4917 genomu mitochondrialnego [40]. W raku płaskonabłonkowym jamy ustnej 77,8% pacjentów miało mutacje somatyczne (powstałe w procesie transformacji nowotworowej a nie odziedziczone) w genomie mitochondrialnym. U 18 pacjentów opisano 26 mutacji, z czego 6 przypadało na geny kodujące białka, w tym 3 w genie ND2, a 1 w podjednostce III oksydazy cytochromu c [36]. Uważa się, że tego typu mutacje, zaburzające funkcjonowanie łańcucha oddechowego, mogą być przyczyną większego nagromadzenia się wolnych rodników tlenowych i w tym mechanizmie zwiększać ryzyko wystąpienia dalszych mutacji zarówno w mtDNA, jak i w nDNA. Hipoteza ta została potwierdzona w pracy. Komórki linii HeLa transfekowano genem zmutowanego ND2, kodującego dehydrogenazę NADH. W komórkach takich istotnie wzrastała ilość wolnych rodników i powstawały typowe dla uszkodzeń oksydacyjnych mutacje mtDNA. Dodatkowo komórki te miały zwiększoną ekspresję HIF-1alpha i metabolizm oparty na glikolizie tlenowej, typowej dla guzów litych. Ponadto w komórkach raka płaskonabłonkowego poziom mutacji w mtDNA korelował z ilością mutacji w genie białka p53 (TP53). Niemniej jednak niejednoznaczny pozostaje związek przyczynowo-skutkowy pomiędzy tymi mutacjami. Mutacje mtDNA, poprzez zwiększenie produkcji wolnych rodników mogą indukować mutacje w TP53. Jednocześnie zmutowane białko p53 może promować powstawanie mutacji w genomie mitochondrialnym, ponieważ nie spełnia ono wówczas typowej funkcji naprawczej dla mtDNA [39, 41].

3. Zmiany w ilości mtDNA w komórkach

Kim i wsp. [42] badali możliwość występowania podwyższonej ilości kopii mtDNA w komórkach nowotworowych. Wiadomo, że ilość kopii mtDNA rośnie wraz z wiekiem. Wzrasta też w komórkach narażonych na stres oksydacyjny. Możliwe jest więc, że w komórkach nowotworowych, w których funkcja mitochondriów może być nieprawidłowa, kompensacyjnie dochodzi do wzrostu ilości kopii mtDNA. Badanie przeprowadzono na 655 zdrowych, 91 chorych ze zmianami przednowotworowymi i 14 chorych ze zmianami nowotworowymi z rejonu głowy i szyi. Oceniano stosunek ilości mtDNA wobec jądrowego DNA. Stwierdzono, że u zdrowych i chorych z łagodną

postacią dysplazji, stosunek ten wynosi odpowiednio 0,0537 i 0,0529, natomiast u chorych z nowotworami złośliwymi 0,1667. Oznacza to, iż wraz z odróżnicowaniem się komórek nowotworowych i progresją choroby, wzrasta ilość mtDNA w stosunku do ilości DNA jądrowego, co wskazuje na zwiększenie ilości kopii mtDNA w komórce. Ilość mtDNA wzrasta wraz ze stopniem zaawansowania choroby, co pozwala autorom sugerować, iż ilość mtDNA (a dokładnie stosunek mtDNA do nDNA) może być niezależnym markerem dla określenia stopnia nasilenia zmian (hiperplazja – dysplazja – rak inwazyjny). Ponadto w raku głowy i szyi ilość mtDNA wzrasta także w ślinie pacjenta. Zwiększa się dodatkowo z progresją choroby, zaawansowanym wiekiem i liczbą wypalanych papierosów. Największa ilość wykrywana jest u pacjentów z zaawansowanym stadium HNSCC [43], a spada po radioterapii i/lub resekcji guza [44].

4. Patologie Δ mtDNA4977

Δ mtDNA4977 to delecja występująca w odcinku pomiędzy 8,470 a 13,477 nukleotydem DNA mitochondrialnego. Jest to region kodujący 5 tRNA, i 7 białek podjednostek oksydazy cytochromu c, kompleksu I i ATP-azy. Stopniowo, z wiekiem, ilość Δ mtDNA4977 ulega kumulacji, zwłaszcza w komórkach po licznych mitozach. Podobnie do innych tkanek nowotworowych, w tym nowotworów tarczycy, jelita grubego czy nerki, także w komórkach raków głowy i szyi potwierdzono względnie niewielką ilość mutacji Δ mtDNA4977. W badanej grupie 87 chorych mutacje Δ mtDNA4977 występowały w 40% guzów i aż w 90% tkanek pobranych ze zdrowego sąsiedztwa zmiany nowotworowej [45]. Podobnie grupa Poetsch i wsp. wykazała występowanie *de novo* (w raku, mutacja nieodziedziczona) mutacji Δ mtDNA4977 u 25% pacjentów z HNSCC [46]. W odróżnieniu od poprzedników, zespół Califano [39] nie wykazał obecności takiej delecji w obrębie raków głowy i szyi.

PODSUMOWANIE

Powszechna obecność mutacji mtDNA w komórkach nowotworowych zrodziła pytania dotyczące ich roli w procesie nowotworzenia. Ponieważ cząsteczka mtDNA jest gęsto upakowana genami i posiada znikome fragmenty niekodujące, zdecydowana większość mutacji dotyczy zawartych w niej genów. Następstwem mutacji mtDNA może być brak syntezy lub synteza nieprawidłowych białek kompleksów fosforylacji oksydacyjnej, co skutkuje upośledzeniem oddychania komórkowego, zaburzeniem produkcji ATP oraz

może się wiązać ze wzmożoną produkcją reaktywnych form tlenu [47]. Chociaż nie wiadomo dokładnie, w jaki sposób upośledzenie oddychania komórkowego sprzyja karcynogenezie, wydaje się, że zasadniczą rolę mogą odgrywać reaktywne formy tlenu. Komórki zawierające mtDNA z mutacjami, o których wiadomo, iż zwiększają produkcję ROS, wykazywały szybsze tempo podziałów, po implantowaniu do myszy bezgrasiczych oraz zwiększoną oporność na apoptozę [19, 21]. ROS występują w naturalnych warunkach i są wytwarzane również pod wpływem bodźców zewnętrznych jako substancje sygnałowe w komórce. Dlatego stale podwyższone stężenie ROS może działać jak endogenne sygnały wzrostu [27, 30–32]. Jednakże, ponieważ reaktywne formy tlenu uszkadzają kwasy nukleinowe, białka oraz lipidy [25], w wyniku nagromadzonych uszkodzeń, mogą indukować apoptozę [48–50]. Ostateczny efekt działania reaktywnych form tlenu na komórkę zależy więc od dodatkowych czynników, takich jak antyutleniacze oraz mechanizmy naprawiające uszkodzenia DNA.

PIŚMIENNICTWO

- Sanderson RJ, Ironside JA. Squamous cell carcinomas of the head and neck. *BMJ* 2002; 325: 822–827.
- Herrero R. Human papillomavirus and cancer of the upper aerodigestive tract. *J Natl Cancer Inst Monogr* 2003; 47–51.
- Scully C, Field JK, Tanzawa H. Genetic aberrations in oral and head and neck squamous cell carcinoma (SCCHN): 1. Carcinogen metabolism, DNA repair and cell cycle control. *Oral Oncol* 2000; 36: 256–263.
- Ha PK, Califano JA. The role of human papillomavirus in oral carcinogenesis. *Crit Rev Oral Biol Med* 2004; 15: 188–196.
- Petruzzelli GJ. The biology of tumor invasion, angiogenesis and lymph node metastasis. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec* 2000; 62: 178–185.
- Chung CH, Levy S, Yarbrough WG. Clinical applications of genomics in head and neck cancer. *Head Neck* 2006; 28: 360–368.
- Modica-Napolitano JS, Kulawiec M, Singh KK. Mitochondria and human cancer. *Curr Mol Med* 2007; 7: 121–131.
- Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, de Bruijn MH, Coulson AR, Drouin J, i wsp. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* 1981; 290: 457–465.
- Miller FJ, Rosenfeldt FL, Zhang C, Linnane AW i Nagley P. Precise determination of mitochondrial DNA copy number in human skeletal and cardiac muscle by a PCR-based assay: lack of change of copy number with age. *Nucleic Acids Res* 2003; 31: e61.
- Fernandez-Silva P, Enriquez JA, Montoya J. Replication and transcription of mammalian mitochondrial DNA. *Exp Physiol* 2003; 88: 41–56.
- Khrapko K, Coller HA, Andre PC, Li XC, Hanekamp JS, Thilly WG. Mitochondrial mutational spectra in human cells and tissues. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 13798–13803.
- Zheng W, Khrapko K, Coller HA, Thilly WG, Copeland WC. Origins of human point mutations as DNA polymerase gamma-mediated errors. *Mutat Res* 2006; 599: 11–20.
- Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L. *Biochemistry* Wyd. 4. San Francisco: W.H. Freeman and Company; 2002: 491–524.
- DiMauro S, Davidzon G. Mitochondrial DNA and disease. *Ann Med* 2005; 37: 222–232.
- Wallace DC. Mitochondrial defects in cardiomyopathy and neuromuscular disease. *Am Heart J* 2000; 139: S70–S85.
- Warburg O. On the Origin of Cancer Cells. *Science* 123: 309–314.
- Gatenby RA, Gillies RJ. Why do cancers have high aerobic glycolysis? *Nat Rev Cancer* 2004; 4: 891–899.
- Costello LC, Franklin RB. Why do tumour cells glycolyse?: from glycolysis through citrate to lipogenesis. *Mol Cell Biochem* 2005; 280: 1–8.
- Shidara Y, Yamagata K, Kanamori T, Nakano K, Kwong JQ, Manfredi G, i wsp. Positive contribution of pathogenic mutations in the mitochondrial genome to the promotion of cancer by prevention from apoptosis. *Cancer Res* 2005; 65: 1655–1663.
- Pallotti F, Baracca A, Hernandez-Rosa E, Walker WF, Solaini G, Lenaz G, i wsp. Biochemical analysis of respiratory function in cybrid cell lines harbouring mitochondrial DNA mutations. *Biochem J* 2004; 287–293.
- Petros JA, Baumann AK, Ruiz-Pesini E, Amin MB, Sun CQ, Hall J, i wsp. mtDNA mutations increase tumorigenicity in prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 102: 719–724.
- Czarnecka AM, Golik P, Bartnik E. Mitochondrial DNA mutations in human neoplasia. *J Appl Genet* 2006; 47: 67–78.
- Brandon M, Baldi P, Wallace DC. Mitochondrial mutations in cancer. *Oncogene* 2006; 25: 4647–4662.
- Balaban RS, Nemotoi S, Finkel T. Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell* 2005; 120: 483–495.
- Brand MD, Affourtit C, Esteves TC, Green K, Lambert AJ, Miwa S, i wsp. Serial Review: The Powerhouse Takes Control of the Cell: the Role of Mitochondria in Signal Transduction. *Free Radic Biol Med* 2004; 37: 755–767.
- Pitkanen S, Robinson BH. Mitochondrial complex I deficiency leads to increased production of superoxide radicals and induction of superoxide dismutase. *J Clin Invest* 1996; 98: 345–351.
- Pelicano H, Carney D, Huang P. ROS stress in cancer cells and therapeutic implications. *Drug Resist Updat* 2004; 7: 97–110.
- Kirkinezos IG, Moraes CT. Reactive oxygen species and mitochondrial diseases. *Semin Cell Dev Biol* 2001; 12: 449–457.
- Basoah A, Matthews PM, Morten KJ. Rapid rates of newly synthesized mitochondrial protein degradation are significantly affected by the generation of mitochondrial free radicals. *FEBS Lett* 2005; 579: 6511–6517.

30. Behrend L, Henderson G, Zwacka RM. Reactive oxygen species in oncogenic transformation. *Biochem Soc Trans* 2003; 31: 1441–1444.
31. Waris G, Ahsan H. Reactive oxygen species: role in the development of cancer and various chronic conditions. *J Carcinog* 2006; 5: 14.
32. Guyton KZ, Liu Y, Gorospe M, Xu Q, Holbrook NJ. Activation of mitogen-activated protein kinase by H₂O₂. Role in cell survival following oxidant injury. *J Biol Chem* 1996; 271(8): 4138–4142.
33. Parks D, Bolinger R, Mann K. Redox state regulates binding of p53 to sequence-specific DNA, but not to non-specific or mismatched DNA. *Nucleic Acids Res* 1997; 25: 1289–1295.
34. Ha PK, Tong BC, Westra WH, Sanchez-Cespedes M, Parrella P, Zahurak M, i wsp. Mitochondrial C-tract alteration in premalignant lesions of the head and neck: a marker for progression and clonal proliferation. *Clin Cancer Res* 2002; 8: 2260–2265.
35. Sanchez-Cespedes M, Parrella P, Nomoto S, Cohen D, Xiao Y, Esteller M, i wsp. Identification of a mononucleotide repeat as a major target for mitochondrial DNA alterations in human tumors. *Cancer Res* 2001; 61: 7015–7019.
36. Takebayashi S, Ogawa T, Jung KY, Muallem A, Mineta H, Fisher SG, i wsp. Identification of new minimally lost regions on 18q in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res* 2000; 60: 3397–3403.
37. Lievre A, Blons H, Houllier AM, Laccourreye O, Brasnu D, Beaune P, i wsp. Clinicopathological significance of mitochondrial D-Loop mutations in head and neck carcinoma. *Br J Cancer* 2006; 94: 692–697.
38. Zhou S, Kassaei K, Cutler DJ, Kennedy GC, Sidransky D, Maitra A, i wsp. An oligonucleotide microarray for high-throughput sequencing of the mitochondrial genome. *J Mol Diagn* 2006; 8: 476–482.
39. Zhou S, Kachhap S, Sun W, Wu G, Chuang A, Poeta L, i wsp. Frequency and phenotypic implications of mitochondrial DNA mutations in human squamous cell cancers of the head and neck. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104: 7540–7545.
40. Prior SL, Griffiths AP, Baxter JM, Baxter PW, Hodder SC, Silvester KC, i wsp. Mitochondrial DNA mutations in oral squamous cell carcinoma. *Carcinogenesis* 2006; 27: 945–950.
41. Yoshida Y, Izumi H, Torigoe T, Ishiguchi H, Itoh H, Kang D, i wsp. P53 physically interacts with mitochondrial transcription factor A and differentially regulates binding to damaged DNA. *Cancer Res* 2003; 63: 3729–3734.
42. Kim MM, Clinger JD, Masayeva BG, Ha PK, Zahurak ML, Westra WH, i wsp. Mitochondrial DNA quantity increases with histopathologic grade in premalignant and malignant head and neck lesions. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 8512–8515.
43. Jiang WW, Masayeva B, Zahurak M, Carvalho AL, Rosenbaum E, Mambo E, i wsp. Increased mitochondrial DNA content in saliva associated with head and neck cancer. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 2486–2491.
44. Jiang WW, Rosenbaum E, Mambo E, Zahurak M, Masayeva B, Carvalho AL, i wsp. Decreased mitochondrial DNA content in posttreatment salivary rinses from head and neck cancer patients. *Clin Cancer Res* 2006; 12: 1564–1569.
45. Dani MA, Dani SU, Lima SP, Martinez A, Rossi BM, Soares F, i wsp. Less Delta-mtDNA 4977 than normal in various types of tumors suggests that cancer cells are essentially free of this mutation. *Genet Mol Res* 2004; 3: 395–409.
46. Poetsch M, Petersmann A, Lignitzi E, Kleist B. Relationship between mitochondrial DNA instability, mitochondrial DNA large deletions, and nuclear microsatellite instability in head and neck squamous cell carcinomas. *Diagn Mol Pathol* 2004; 13: 26–32.
47. Czarnecka AM, Marino Gammazza A, Di Felice V, Zummo G, Cappello F. Cancer as a Mitochondriopathy. *J Cancer Mol* 2007; 3: 71–79.
48. Hirsch T, Marchetti P, Susin SA, Dallaporta B, Zamzami N, Marzo I, i wsp. The apoptosis-necrosis paradox. Apoptogenic proteases activated after mitochondrial permeability transition determine the mode of cell death. *Oncogene* 1997; 15: 1573–1581.
49. Jackson MJ, Papa S, Bolanos J, Bruckdorfer R, Carlsen H, Elliott RM, i wsp. Antioxidants, reactive oxygen and nitrogen species, gene induction and mitochondrial function. *Mol Aspects Med* 2002; 23: 209–285.
50. Kokoszka JE, Coskun P, Esposito LA, Wallace DC. Increased mitochondrial oxidative stress in the Sod2 (+/-) mouse results in the age-related decline of mitochondrial function culminating in increased apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 2278–2283.

Prace nadesłano: 21.06.2007 r.