

## ZABURZENIA MITOCHONDRIALNE W PROCESIE NOWOTWORZENIA\*

### MITOCHONDRIAL FAILURE IN CELL TRANSFORMATION

Anna M. CZARNECKA<sup>1,2</sup>, Wojciech KUKWA<sup>3</sup>, Tomasz KRAWCZYK<sup>4</sup>,  
Anna ŚCINIŃSKA<sup>3</sup>, Andrzej KUKWA<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Instytut Genetyki i Biotechnologii, Wydziału Biologii, Uniwersytetu Warszawskiego; <sup>2</sup>Laboratorium Onkologii Molekularnej, Klinika Onkologii, Wojskowego Instytutu Medycznego oraz <sup>3</sup>Klinika Otolaryngologii Oddziału Stomatologii Uniwersytetu Medycznego w Warszawie; <sup>4</sup>Zakład Patomorfologii Klinicznej Instytutu Centrum Zdrowia Matki Polki w Łodzi

*Streszczenie:* Mitochondria od dawna podejrzewano o współdziałanie w karcynogenezie. Na początku XX wieku Otto Warburg rozpoczął badania nad zmianami w oddychaniu komórkowym w komórkach nowotworowych. Opisał on wówczas „uszkodzenie oddychania tlenowego” jako cechę charakterystyczną tych komórek. Odkrycie to pociągnęło za sobą lawinę badań mających na celu ustalenie rzeczywistej roli tych organelli w procesie nowotworzenia. Od tamtego czasu wiele grup badawczych wykazywało mutacje genomu mitochondrialnego w wielu typach nowotworów. Przeprowadzone ponownie analizy publikowanych danych wskazują na liczne błędy metodyczne popełniane w poprzednich projektach. Obecna praca ma na celu krytyczną analizę oraz podsumowanie obecności dziedzicznych polimorfizmów i mutacji somatycznych u pacjentów z nowotworem. Analiza danych literaturowych z uwzględnieniem prac dotyczących najnowszych kryteriów metodycznych w badaniu mtDNA oraz założeń medycyny opartej na faktach wskazuje, iż chorzy z chorobą nowotworową są nosicielami specyficznego układu rzadkich polimorfizmów mtDNA i nielicznych mutacji mtDNA. Genotyp (w tym haplotyp) mitochondrialny może być czynnikiem predysponującym do rozwoju nowotworu, choć także czynnikiem chroniącym przed rozwojem nowotworu.

*Słowa kluczowe:* nowotwory, markery molekularne, mitochondria, mutacje mtDNA, polimorfizm, medycyna oparta na faktach – EBM (*evidence based medicine*).

*Summary:* For many years mitochondria have been implicated in the process of carcinogenesis. At the beginning of 20th century Otto Warburg has started research focused on failure of oxidative metabolism in cancer cells. In his work he described „disruption of respiration” as typical for cancer cells. Warburg's discovery resulted in establishment of many projects focused on the role of mitochondria in cell transforma-

\*Praca finansowana z badań statutowych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego.

tion. Since that time multiple reasearch groups have reported mitochondria DNA mutations in majority types of cancer. Recently re-analyses of raw data has been published and have show multiple methodical errors in previous reports. This paper presents critical analysis and summary of mitochondria polymorphisms and somatic mutations reasearch in oncology. Literature analysis that includes latest methodological guidelines established for mtDNA analysis and evidence based medicine reports proves that cancer patients harbour specific pattern of inherited mtDNA polymorphisms and low number of somatic mutations. It seems that mitochondrial genotype (including haplotype) may be classified as cancer predisposing factor.

*Key words:* cancer, molecular marker, mitochondria, MtDNA mutation, mtDNA polymorphism, Evidence Based Medicine – EBM.

„Istota choroby jest tak niejasna, jak istota życia.”

Georg Philipp Friedrich Freiherr von Hardenberg

## 1. WSTĘP

### A. Udział mitochondrium w procesach komórkowych

Mitochondria to półautonomiczne organella komórek eukariotycznych. Mitochondria mają swój własny niewielki genom – 16659 pz mtDNA, który koduje 13 polipeptydów – a także własny aparat syntezy białek (tRNA, rRNA) [49]. Struktury te są najprawdopodobniej reliktem aparatu genetycznego endosymbiotycznych  $\alpha$ -proteobakterii, które weszły w związek z przodkiem komórek eukariotycznych w drodze syntrofii, czyli metabolicznej symbiozy [95, 102]. Obecnie w efekcie transferu genów większość białek lokalizujących się w mitochondriach jest kodowana w genomie jądrowym. W mitochondrialnym DNA są głównie kodowane niektóre składniki kompleksów łańcucha transportu elektronów [81].

Mitochondria stanowią przedział komórki, w którym zachodzi wiele podstawowych reakcji metabolizmu komórkowego. Są miejscem produkcji ATP w procesie fosforylacji oksydacyjnej – OXPHOS (ang. *oxidative phosphorylation*). W mitochondriach zachodzą przemiany produktów przejściowych wielu szlaków meabolizmu węglowodanów, nukleotydów, aminokwasów czy kwasów tłuszczowych, takich jak np. cykl mocznikowy czy  $\beta$ -oksydacja. Mitochondria pełnią także istotną rolę w utrzymaniu homeostazy jonowej, potencjału redoks i pH komórki. Ze względu na wymienione funkcje obserwuje się występowanie mitochondriów nawet w liniach komórkowych pozbawionych mtDNA (tzw. linie  $\rho^0$ ). Biorąc pod uwagę szerokie spektrum procesów, w których uczestniczą mitochondria, można uznać za prawdziwą hipotezę, iż są one organellami regulującymi również proliferację i śmierć komórek, a zatem proces transformacji nowotworowej [31,40,41].

### B. Genom mitochondrialny

Mitochondrialny DNA odkryli M.M.K. Nass i S. Nass w 1963 roku, a S. Anderson i współpracownicy opublikowali kompletną sekwencję genomu mitochondrialnego człowieka w 1981 roku. W roku 1999 ukazała się uaktualniona sekwencja mtDNA stosowana następnie jako odnośnikowa, która obecnie nazywana jest rCRS (ang. *revised Cambridge Reference Sequence*; w bazie GenBank NC\_012920) [3].

Genom mitochondrialny jest to kolistą, super-zwiniętą cząsteczką DNA (16569 pz o m. cz. ok. 10 MDa), która stanowi 0,1–1,0% całkowitego DNA komórki. Nici

mtDNA mają asymetryczną kompozycję zasad azotowych, a co za tym idzie podczas wirowania w warunkach denaturujących tworzą dwa odrębne pasma. Nić bogata w G nosi nazwę ciężkiej – H (ang. *heavy*), a uboga w G – lekkiej – L (ang. *light*). Nić H koduje 28 genów – 2 dla rRNA, 14 dla tRNA i 12 dla białek. W sumie mtDNA koduje 13 podjednostek łańcucha oddechowego oraz 22 mt-tRNA i 2 mt-rRNA. Nie zawiera sekwencji niekodujących, z wyjątkiem pętli D (*D-loop* od ang. *displacement loop*) o długości 1122 pz. Pętla D obejmuje nukleotydy 16024-576 [49].

### C. Haplogrupy mitochondrialne

Haplogrupa to zbiór osobników mających identyczne lub bardzo zbliżone do siebie genotypy mtDNA o wspólnym pochodzeniu ewolucyjnym (od wspólnego przodka). W genotypach tych występują charakterystyczne sekwencje nukleotydowe, wyróżniające te osobniki od innych należących do odrębnych haplogrup. Haplogrupy powstały w wyniku akumulacji określonych mutacji mtDNA w procesie ewolucji człowieka. Mutacje te zaszły w określonym miejscu i czasie, więc dziś występowanie genotypów pozwala na śledzenie rozkładu geograficznego populacji oraz prehistorycznej migracji człowieka. Jak wykazały analizy obejmujące całe genomy mitochondrialne, specyficzne dla haplogrup polimorfizmy występują zarówno w regionie kodującym mtDNA, jak i w pętli D [128].

Haplotyp umownie określa się jako układ polimorfizmów różniących danego osobnika od rCRS. Haplotyp obejmuje różnice zarówno w obszarach HVR (ang. *hypervariable regions*) oraz sekwencji kodującej mtDNA [11].

Obecnie haplogrupy oznaczane są za pomocą wielkich liter alfabetu łacińskiego wraz z numerami określającymi podgrupy. Według aktualnie przyjętej klasyfikacji, drzewo ludzkiego mtDNA „ukorzone” było w Afryce 140–180 tysięcy lat temu i dało początek siedmiu głównym grupom nazwanym: L0, L1, L2, L3, L4, L5 i L6. Wszystkie pozaafrykańskie haplogrupy mtDNA pochodzą od haplogrupy L3, dzieląc się na dwie super-haplogrupy M i N. W przypadku Europy dominuje dziewięć haplogrup (H, U, K, J, T, V, X, I, W), wywodzących się z klasy N. W Polsce, podobnie jak w całej Europie, najliczniej występuje haplogrupa H (około 37%), natomiast rozkład statystyczny pozostałych haplogrup nie odbiega od średniej europejskiej, poza istotnymi różnicami w porównaniu z populacjami Włoch oraz Finlandii. Sekwencja mtDNA rCRS należy do haplogrupy H2 [135].

Podczas poszukiwania mutacji i polimorfizmów odpowiedzialnych za procesy patologiczne konieczne jest określenie haplogrup badanych osób (pacjentów). Badanie takie powinno obejmować analizę polimorfizmów specyficznych dla haplogrup tkanki zdrowej (lub zarówno zdrowej, jak i nowotworowej) i porównanie ich z rCRS. Postępowanie takie pozwala uniknąć tak oczywistych błędów metodologicznych jak zakwalifikowanie powszechnych polimorfizmów definiujących haplogrupę jako mutacji specyficznych dla osobników z chorobą nowotworową. Jednocześnie nie wyklucza się możliwości, iż *loci* specyficzne dla haplogrup mogą stanowić hiperzmiennie rejony mtDNA predestynowane do intensywnej akumulacji mutacji w procesie onkogenezy, jak proponują Wallace i wsp. [165].

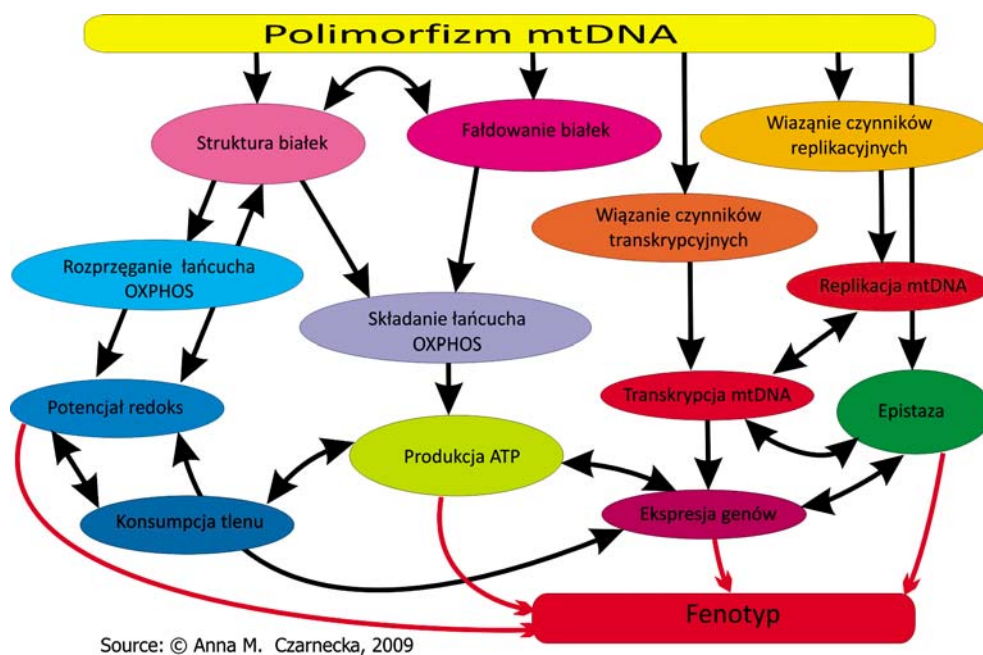
Na skalę problemu niewłaściwej kwalifikacji polimorfizmów (w tym specyficznych dla haplogrup) jako mutacji wskazują także coraz liczniejsze prace udowadniające, iż wiele spośród opisanych wcześniej „mutacji” chorobotwórczych korelowanych z wystąpieniem nowotworu to w istocie jedynie polimorfizmy specyficzne dla haplogrup [6–9]. Szczególnie dotyczy to prac, w których jako „mutacje” określano różnicę między sekwencją mtDNA pacjenta a rCRS [8, 137], co samo w sobie stanowi błąd metodologiczny [36, 136, 137]. Jednocześnie pomimo bardzo surowych wniosków wyciągniętych z ostatnio opublikowanych weryfikacji poprzednich badań, nie należy odrzucać całkowicie udziału mtDNA w procesie nowotworzenia. Fakt specyficzności dla haplogrupy nie dyskwalifikuje potencjalnej patogenności odkrytej mutacji [146, 163]. Obecnie wydaje się, iż należy zwrócić uwagę na możliwość występowania dziedzicznych czynników predysponujących do rozwoju nowotworu w postaci właśnie polimorfizmów mitochondrialnych. Pierwsze badania wskazują, iż niektóre polimorfizmy mtDNA mogą być kandydatami na markery nowotworów [179, 181]. Proponuje się także, iż możliwy będzie szybki rozwój pewnego nurtu poszukującego związku między przynależnością do mitochondrialnych haplogrup a fenotypem [1].

Część zmian sekwencji mtDNA, czyli mutacji, które nastąpiły w czasie wyodrębniania się haplogrup, doprowadziło do zmiany w sekwencji genów takiej, iż zmieniona jest sekwencja aminokwasów w ich produktach białkowych – są to mutacje niesynonimiczne (ang. *missense mutations*, *nonsynonymous mutations*). W związku z tym obecnie uznaje się, iż zmiany sekwencji związane z haplogrupami podobnie jak mutacje w genomie jądrowym wg kryterium funkcjonalności można podzielić na cztery kategorie: 1) mutacje utraty funkcji (ang. *loss-of-function mutations*), 2) mutacje uzyskania funkcji (ang. *gain-of-function mutations*), 3) mutacje o efekcie dominującym ujemnym (ang. *dominant negative mutations*, *in. antimorphic mutations*), 4) rewersje (ang. *back mutation*, *in. reversion*). W konsekwencji zmian sekwencji genów i ich produktów białkowych może dochodzić do zmian istotnych dla funkcji komórki i całego organizmu. Zgodnie z kryterium wpływu na dostosowanie organizmu (ang. *fitness*) można klasyfikować jako: 1) obojętne (ang. *neutral mutation*), 2) szkodliwe (ang. *harmful mutation*, *deleterious mutation*), 3) adaptacyjne (ang. *beneficial mutation*, *advantageous mutation*), 4) o funkcji zależnej od kontekstu.

Przykładem *patogenności* zmian specyficznych dla haplogrupy jest m.in. nasilona ekspresja objawów LHON u osobników z haplogrup J i M [59,68] oraz podwyższone ryzyko zachorowania na chorobę Parkinsona u osób z haplogrup U i H [72] lub szybki rozwój retinopatii cukrzycowej i choroby niedokrwiennej serca u osób z haplogrupy T [77]. Polimorfizmy specyficzne dla haplogrup mogą także pełnić funkcje ochronne w stosunku do ich nosicieli, tak jak w przypadku haplogrupy N9b, która stanowi *czynnik ochronny* przed rozwojem zespołu X [154] i zawału serca [115], a także haplogrupy H1 chroniącej przed udarem niedokrwinnym [134].

Przenosząc wyniki badań epidemiologicznych nad wymienionymi chorobami można przypuszczać iż polimorfizmy mtDNA mogą wywierać wpływ na procesy fizjologiczne komórki i transformację nowotworową. Wydaje się, iż nie można wykluczyć roli polimorfizmów specyficznych dla haplogrup jako czynników predysponujących do rozwoju nowotworów lub przed nimi chroniących. Hipotezę

taką wspierają dane biochemiczne pokazujące, iż w komórkach osób haplogrupy J powstaje mniej wolnych rodników niż w komórkach innych haplogrup [100] oraz badania molekularne pokazujące, iż polimorfizm – C295T – typowy dla haplogrupy J zwiększa wiązanie czynnika TFAM (ang. *mitochondrial transcription factor A*), a co za tym ułatwia replikację mtDNA [146]. Ponadto pokazano, iż osoby z różnych haplogrup wykazują odmienną kinetykę fałdowania i składania podjednostek łańcucha oddechowego [122]. Wydaje się zatem, iż hipoteza polimorfizmów specyficznych dla haplogrup jako czynników modyfikujących ryzyko rozwoju nowotworu wydaje się uzasadniona (ryc. 1).



RYCINA 1. Rola polimorfizmów genu mitochondrialnego w życiu komórki  
FIGURE 1. The role of mitochondrial polymorphisms in cell life

#### D. Choroby mitochondrialne

Termin „choroba mitochondrialna” stosowany jest w odniesieniu do dysfunkcji łańcucha oddechowego i został wprowadzony do opisu patologii człowieka na przełomie lat 60. i 70. XX wieku chociaż pierwszą chorobę mitochondrialną rozpoznano w 1962 roku [96]. Stanowiło to rewolucję w diagnostyce i genetyce klinicznej. Pierwsze delecje i mutacje punktowe mtDNA powodujące choroby zwane później mitochondrialnymi opisano w 1988 roku [166]. Do dziś opisanych zostało ponad 100 rearanzacji (delecji i duplikacji) i ponad 50 mutacji punktowych mtDNA w wielu jednostkach chorobowych [18, 25]. Przeprowadzona ostatnio metaanaliza sugeruje, że sumarycznie choroby mitochondrialne mogą występować z częstością

raz na 5000 osób, a jedna na 200 osób jest bezobjawowym nosicielem potencjalnie patogennych mutacji [29].

U podstawy chorób mitochondrialnych leżą zaburzenia funkcjonowania i biogenezy składników łańcucha oddechowego. Mutacje mtDNA kodującego białka łańcucha transportu elektronów przyczyniają się przede wszystkim do zaburzenia konformacji białek, ich nieprawidłowego zwijania oraz niewłaściwego składania całego łańcucha OXPHOS. Z powodu zaburzeń w biogenezie mitochondriów zaburzony jest przepływ elektronów i rozprężaniu ulega potencjał błonowy oraz wzrasta produkcja wolnych rodników – ROS (ang. *reactive oxygen species*) [124, 140]. Ma to istotne znaczenie dla metabolizmu komórki, ponieważ integralność łańcucha transportu elektronów i jej miara, jaką jest wydajność fosforylacji oksydacyjnej decydują o stanie energetycznym komórki. Stan energetyczny komórki z kolei stanowi klucz do regulacji ekspresji genów w odpowiedzi na bieżące zapotrzebowanie komórki w kontekście zmian w jej środowisku, a więc w tkance czy całym organizmie. Utrzymanie metabolizmu na wysokim poziomie jest konieczne dla wszelkich procesów energochłonnych, takich jak: replikacja, transkrypcja, translacja czy naprawa DNA. Z drugiej strony to przeciętne odpowiednia ekspresja genów odpowiada za modulację przemian energetycznych. Oczywiście staje się zatem, iż nieprawidłowo przebiegające procesy w mitochondrium, które stanowią element sieci zależności wewnątrzkomórkowych, mogą przyczynić się do rozwoju patologii [45, 64].

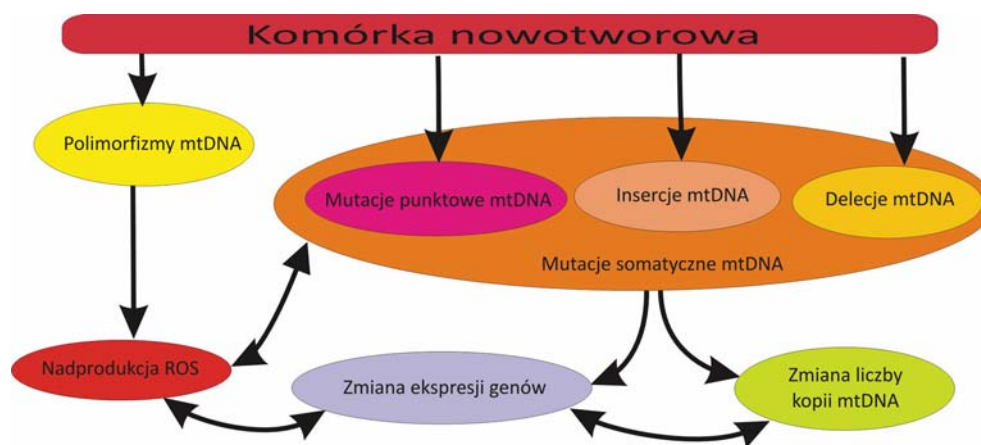
Objawy chorób mitochondrialnych są bardzo zróżnicowane i obejmują postępujące zmiany w mózgu, mięśniach, gruczołach wydzielania wewnętrznego, narządach zmysłu. Zmiany te są heterogenne i wielosystemowe, co znacząco utrudnia ich rozpoznanie i nazewnictwo. Charakterystyczną cechą chorób mitochondrialnych jest często odmienny obraz kliniczny przy identycznym defekcie genetycznym, który to zależny jest od różnic w proporcjach zmutowanego mtDNA do mtDNA prawidłowego (heteroplazmia) i tkanki, której ten defekt dotyczy. Do schorzeń wywołanych punktowymi mutacjami mtDNA zaliczamy m.in. padaczkę miokloniczną z występowaniem „włókien szmatowatych” w mięśniach – MERRF (ang. *myoclonic epilepsy and ragged red fibres*), zespół z miopatią mitochondrialną z encefalopatią, kwasicą mleczanową i incydentami udaropodobnymi – MELAS (ang. *mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, stroke-like episodes*), dziedziczną neuropatię nerwu wzrokowego Lebera – LHON (ang. *Leber's hereditary optic neuropathy*), oraz neurogenną miopatię z ataksją i zwyrodnieniem barwnikowym siatkówki – NARP (ang. *neurogenic myopathy, ataxia, retinitis pigmentosa*). Schorzeniami związanymi z delecjami mtDNA są m.in. zespół Kearnsa-Sayre'a (KSS), zespół postępującej zewnętrznej oftalmoplegii z osłabieniem mięśni proksymalnych – PEO (ang. *progressive external ophthalmoplegia*), również w postaci przewlekłej – CPEO (ang. *chronic progressive external ophthalmoplegia*), a także zespół mitochondrialnej encefalomiopatii dotyczącej układu nerwowego, żołądka i jelit – MNGIE (ang. *mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy syndrome*) oraz zespół szpikowotrzustkowy Pearsona [10, 45, 99, 113].

## 2. NOWOTWORY JAKO CHOROBY MITOCHONDRIALNE

Mitochondria od dawna podejrzewano o współdziałanie w karcynogenezie. Na początku XX wieku Otto Warburg rozpoczął badania nad zmianami w oddychaniu komórkowym w komórkach nowotworowych (ryc. 3). Opisał on wówczas „uszkodzenie oddychania tlenowego” jako cechę charakterystyczną tych komórek. Podkreślał on też fakt, iż komórki nowotworowe w porównaniu z prawidłowymi komórkami muszą charakteryzować się unikalnym stanem metabolicznym [171]. W czasach Warburga przyczyna takich zmian metabolicznych pozostawała nieznana. W ciągu ostatnich lat opublikowano szereg prac, które wskazują, że mutacje zarówno w genomie jądrowym, jak i mitochondrialnym oraz związane z nimi zmiany ekspresji genów odpowiedzialne są za powstanie specyficznego profilu metabolicznego komórek nowotworowych [23, 63].

Pierwsze doniesienia o związku mutacji genomu mitochondrialnego z występowaniem chorób nowotworowych pojawiły się w latach 60. XX wieku. Jedne z pionierskich badań przeprowadzone przez D.A. Claytona i J. Vinograda wykazano pozytywną korelację między długością mtDNA a występowaniem białaczek o ciężkim przebiegu klinicznym [27]. Od tamtej pory wykazano udział w procesie transformacji komórkowej licznych polimorfizmów [16], mutacji punktowych [17] i delecji [42], co za tym idzie także nadprodukcję ROS [162], zmianę ekspresji genów [48] i w końcu zmienioną liczbę kopii mtDNA w komórkach raka [83] (ryc. 2).

Dla procesu onkogenezy istotne znaczenie ma niestabilność mitochondrialnych sekwencji mikrosatelitarnych – mtMSI (ang. *mitochondrial satellite instability*), będąca przyczyną powstania całego spektrum polimorfizmów związanych z nowotworzeniem, a także mutacji somatycznych powstających w trakcie ewolucji klonalnej. Kolejnym zjawiskiem przyczyniającym się do rozwoju nowotworu jest najprawdopodobniej niestabilność genomu mitochondrialnego – mtGI (ang. *mitochondrial genome instability*) [14]. Należy tu zauważyć, że częstość powstawania mutacji w mtDNA jest 100 razy wyższa niż w genomie jądrowym. Zjawisko to można wyjaśnić kilkoma czynnikami. Po pierwsze mtDNA jest zlokalizowany w macierzy mitochondrialnej, a więc znajduje się w bliskim sąsiedztwie łańcucha transportu elektronów, gdzie powstają ROS mogące je uszkadzać, tym bardziej że brak jest ochronnego działania białek histonowych na mtDNA. Ponadto mitochondria mają tylko ograniczone możliwości naprawcze swego genomu, gdyż podjednostka polimerazy Pol $\gamma$  ma tylko aktywność 3'-5'-egzonukleazową [12, 47]. Ponadto przyczyn zmienności w mtDNA należy upatrywać w efekcie poślizgu Pol $\gamma$  przy replikacji mtDNA (mini-insercje 1/7000 pz), błędów poślizgu polimerazy – SSM (ang. *slipped strand mispairing*) oraz błędów naprawy niedopasowanych nukleotydów – MMR (ang. *mismatch repair*) [12, 14]. Wszystkie te czynniki wpływają na powstawanie zmian w genomie mitochondrialnym, i to zarówno w czasie onto-, jak i onkogenezy. Większość polimorfizmów i mutacji mtDNA to tranzycje T do C lub G do A (charakterystyczny błąd Pol $\gamma$ ) [14, 71].

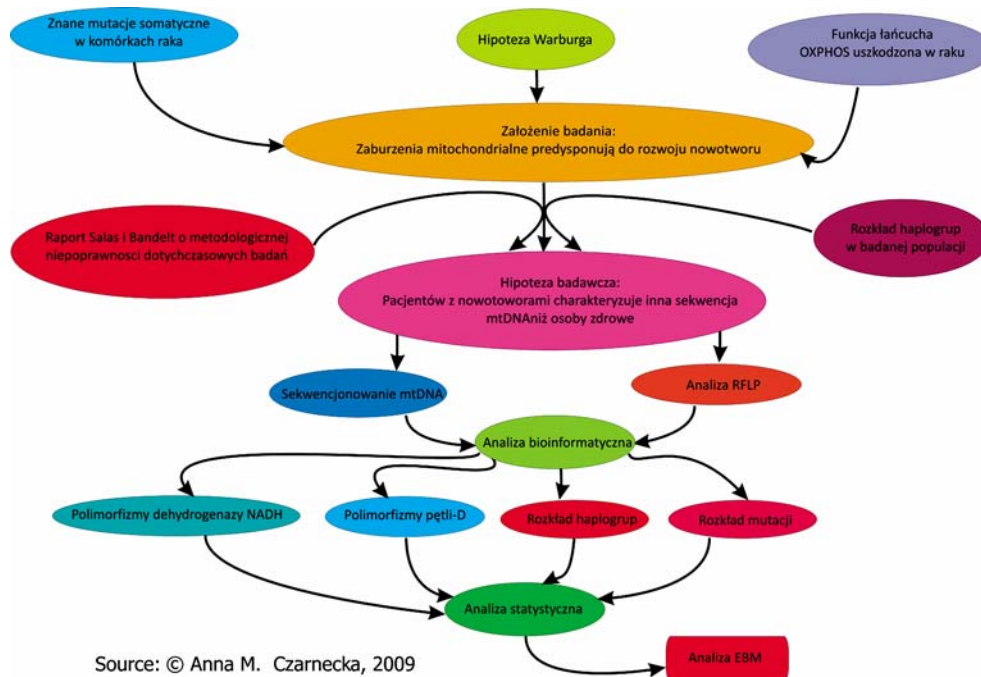


Source: © Anna M. Czarnecka, 2009

RYCINA 2. Uszkodzenia genomu mitochondrialnego w komórkach nowotworowych  
FIGURE 2. . Mitochondrial genome disruption in cancer cells

Na podstawie wielu prac można także zaproponować model kancerogenezy związanej ze zmianami w mitochondrialnych genach, gdzie polimorfizmy przez wpływ na strukturę białek łańcucha fosforylacji oksydacyjnej zmieniają przebieg procesów komórkowych (OXPHOS, apoptoza, proliferacja komórki) i modyfikują podatność komórki na transformację nowotworową [17, 31, 32, 38, 41, 76, 129]. Przykładem popierającymi tę hipotezę może być zmiana w genach ND-T10970C [Trp → Arg] w ND4 i G10176A [Gly → Ser] w ND3, które wraz ze zmianami T8696C [Met → Thr], T9070G [Ser → Ala] w ATP-6, oraz A2905G w 16S rRNA i G6267A [Ala → Thr] w COI, są czynnikami oporności na staurosporynę (STS) [110]. STS to chemioterapeutyk – proapoptotyk działający poprzez uwolnienie cytochromu c z mitochondrium. Komórki z opisanym powyżej genotypem charakteryzuje oporność na apoptozę indukowaną STS. Nie dochodzi w nich do fragmentacji nDNA oraz uwolnienia cyt c. Podobnie brak jest efektu proapoptotycznego 5FU (5-fluorouracyl) i CDDP (cisplatyna). Tendencja ta jest notowana zarówno w modelach *in vitro*, jak i *in vivo* u myszy bezgrasicznych [110]. Z kolei Kulawiec i wsp. pokazała, iż dla polimorfizmów A12308G oraz G12372A w liniach raka sutka MDA-MB-435 [80] różna jest efektywność wykorzystania kodonów (CTA) vs (CTG) w genie *ND5* podczas jego transkrypcji. Co za tym idzie, taka różnica może wpływać na prędkość fałdowania białka, jak wcześniej pokazano [172]. Udowodniono bowiem, iż wykorzystanie kodonów w białkach (także mitochondrialnych) podlegało selekcji w procesie ewolucji, a nie było wynikiem dryfu genetycznego [178]. Kinetyka procesu transkrypcji i zachodzącej z nią równocześnie translacji może mieć pierwszoplanowe znaczenie dla właściwego zwijania białka i ukształtowania się jego ostatecznej konformacji [52, 79]. Zmiany sekwencji mtDNA mogą zatem wpływać na jego ekspresję [155]. Zaburzona ekspresja genów mitochondrialnych jest także czynnikiem predysponującym do rozwoju choroby nowotworowej [46, 48, 55].





RYCINA 3. Metody badania uszkodzenia genomu mitochondrialnego w komórkach nowotworowych  
 FIGURE 3. Methods of analysis of mitochondrial genome disruption in cancer cells

Czynnikami pośredniczącymi w mutageniezie mtDNA są najprawdopodobniej ROS i jak dotychczas silnie sugerowany jest ich udział w inicjacji i promocji onkogenezy zależnej od mitochondriów [56, 62]. Powstające wtórnie mutacje mtDNA mogą uruchamiać kaskadę zdarzeń prowadzącą do zwiększonej produkcji ROS, powstaje w ten sposób sprzężenie zwrotne dodatnie stresu oksydacyjnego, który aktywuje pro-proliferacyjne kaskady przekazywania sygnału i w efekcie promuje powstawanie nowotworów [123]. Preferencyjnie uszkodzana jest pętla D ze względu na swoją strukturę trójnicową [123, 133].

#### A. Mutacje i polimorfizmy pętli D jako przykład zaburzenia onkogenego

Pętla D to rejon mtDNA położony między genem tRNA prolinowym a tRNA fenyloalaninowym, (NT: 16024–576). Region ten był opisany jako wysoce polimorficzny (*mutation hot spot*) w komórkach nowotworowych, jeśli idzie zarówno o liczbę polimorfizmów, jak i mutacji somatycznych [144]. Pętla D zawiera ponadto dwa regiony hiperzmienne: HV1 (nukleotydy 16024–16383) oraz HV2 (nukleotydy 57–372). Zmiany sekwencji odnotowane w pętli D to przede wszystkim polimorfizmy ciągów mononukleotydowych, w tym głównie ciągów poli-C w pozycjach 303–309. Kolejne delecje i insercje odnotowane do tej pory w komórkach nowotworowych zlokalizowane były w sekwencjach mikrosatelitarnych (głównie jako powtórzenia dwunukleotydowe) [22, 138]. Mutacje i polimorfizmy pętli D opisano do tej pory w

raku żołądka [150], sutka [133], przełyku [153], w glejaku wielopostaciowym [73], nowotworach jajnika [91], zmianach PIN (ang. *Prostate Intraepithelial Neoplasia*) i raku gruczołu krokowego [22, 66], raku płuca oraz nowotworach głowy i szyi [138], raku wątrobowokomórkowym [117], czerniaku [44], gruczolakoraku błony śluzowej macicy [94], inwazyjnej ciężowej chorobie trofoblastycznej (tj. nabłoniaku kosmówkowym, kosmówczaku) [26], raku tarczycy [156], raku jasnokomórkowym nerki [107], a także w raku pęcherza moczowego [17, 51]. Ze względu na bardzo częste występowanie polimorfizmów tego regionu wydają się one być dobrymi kandydatami na markery nowotworowe [168].

W tym miejscu należy podkreślić, iż pętla-D koduje sekwencje konieczne dla replikacji i transkrypcji mtDNA. Z tego względu zmiany w tym obszarze (polimorfizmy) mogą wpływać na zmianę efektywności replikacji mtDNA przez modyfikację siły wiązania czynników transkrypcyjnych i aktywatorów (ang. *trans-activating factors*) [121]. Zgodnie z założeniami hipotetycznymi zarówno zwiększoną, jak i obniżoną wydajność replikacji mtDNA zaobserwowano w kilku typach nowotworów [83, 84, 87]. Ponadto w kilku przypadkach wykazano, iż zmniejszona liczba kopii mtDNA koreluje z przebiegiem choroby [143] i może być potencjalnie wykorzystana jako wskaźnik predykcyjny w klinice.

Intensywne badania nad rolą mtDNA w onkogenezie prowadzono na przykładzie raka sutka (BC). Badania te wykazały, iż w populacji pacjentek z rakiem sutka występuje niestabilność sekwencji mikrosatelitarnych (mtMSI), którym towarzyszy obecność jednej lub więcej mutacji punktowych u 29% [169] do 93% pacjentek [183]. W wielu pracach wskazywano na ciąg mononukleotydowy D310 jako wysoce polimorficzne *locus* podlegające także preferencyjnie mutacjom (ang. *mutation 'hot-spot'*) [31, 32, 41, 181]. Analizę rozkładu mutacji i polimorfizmów w populacjach pacjentek z rakiem sutka przeprowadzono głównie w Chinach i Tajwanie [151, 157, 158], w Indiach [13, 53] oraz u Afro-amerykanek [20, 109], a populacja Europejska – Kaukaska nie była poddana takiemu screeningowi populacyjnemu [17, 31, 32, 129]. Ostatnio opublikowane badanie pozwoliło na ustalenie wzorca 63 polimorfizmów obecnych u pacjentek BC. Wśród polimorfizmów tych są zarówno polimorfizmy niedoreprezentowane w kohorcie BC w porównaniu z populacją zdrowych na świecie [60], takie jak: A73G, C150T, C16223T, T16159C, T16362C czy T16183C, T16189C; a także polimorfizmy częste u pacjentek BC, a rzadko opisywane wcześniej: T239C, A263G, czy C16207T. Z badania tego wynika, iż w sporadycznym BC to genotyp 10398G/73G/150T/16223T/16159C/16362C/16183C i/lub 16189C może zwiększać ryzyko rozwoju raka sutka, a 10398A/239C/263G, i/lub C16207T je redukować [34, 37, 38]. Wydaje się, iż przynajmniej niektóre z opisanych polimorfizmów mogą być specyficzne dla BC i stanowić czynniki predysponujące do rozwoju tej choroby. Jako szczególnie ważny można uznać A263G, który został także opisany przez Yu i wsp. jako częsty u pacjentek BC w Chinach [181]. U pacjentek z rodzinnie występującym rakiem sutka wskazano, iż odziedziczenie genotypu G9055A i/lub A10398G/T16519C zwiększa ryzyko rozwoju raka, podczas gdy genotyp T3197C/G13708A je redukuje [5, 129]. Niemniej jednak nie wykazano korelacji pomiędzy zmianami w mtDNA,

liczbą kopii mtDNA a charakterystyką histopatologiczną guzów czy stopniem zaawansowania choroby w chwili wykrycia [129, 169]. W badaniu Yacoubi-Loueslati i wsp. wskazano jednakże, iż genotyp 309(+C) 315(+C) wykazuje negatywną korelację z obecnością przerzutów do węzłów chłonnych u pacjentek BC [177].

Otwarte pozostaje pytanie o znaczenie funkcjonalne zmian w pętli D dla transformacji nowotworowej komórki. Uważa się, że mutacje i polimorfizmy w tym rejonie mtDNA wpływają na funkcję mitochondriów [51]. Wydaje się, iż zmiany w genomie mitochondrialnym powstają niezależnie od zmian w genomie jądrowym. W raku jelita grubego wykazano brak korelacji niestabilności ciągu D310 z niestabilnością sekwencji mikrosatelitarnych w DNA jądrowym i zasugerowano, iż różny jest mechanizm powstawania zmian mtDNA i nDNA [54]. Podobny brak korelacji między zmianami nDNA i mtDNA wykazano w przypadku raka sutka oraz nerki [57]. Wykazano natomiast współwystępowanie mutacji w pętli D z delecjami regionu kodującego mtDNA, w tym z dużą delecją  $\Delta 4977$  (ang. *common deletion*) [105].

#### B. Konsekwencje patofizjologiczne mutacji i polimorfizmów w pętli D

Mutacje w pętli D korelują ze zmniejszeniem liczby cząsteczek mtDNA w komórce. W grupie chorych z rakiem wątroby, u których odnotowano mutacje w pętli D liczba kopii mtDNA była niższa niż u chorych bez tych mutacji. Liczba kopii była tym niższa, im mutacje zlokalizowane były bliżej miejsca startu replikacji nici H. Niemniej jednak odnotowano także przypadki pacjentów ze zmniejszoną ilością mtDNA, u których mutacje pętli D nie występowały, dlatego przyjęto, iż mutacje mtDNA nie są czynnikami wystarczającymi i jedynymi do zaburzenia replikacji mtDNA [83]. Zależności te zostały później potwierdzone w komórkach raka sutka, żołądka, płuca i jelita grubego [84]. U pacjentek z rakiem sutka, które mają mutacje w pętli D mtDNA, w ciągach poli-C lub w pobliżu miejsca początku replikacji, liczba kopii mtDNA jest znacząco obniżona [182]. Ponadto w komórkach raka wątroby, w których obecne są mutacje w pętli D, poziom ROS był wyższy niż w tych, w których mutacji w pętli D nie odnotowano [58]. Na modelu komórkowym raka jelita grubego wykazano, iż hybryda z mtDNA komórek raka (SW480) po wprowadzeniu do linii mysich zarodkowych fibroblastów (NIH3T3) ma fenotyp nowotworowy (unieśmiertelnienie). Manipulacja ta przyczyniła się do nasilenia podziałów komórkowych nowopowstałej linii mtNIH3T3, która nie wykazywała apoptozy [86].

Analizując potencjalne znaczenie funkcjonalne opisanych polimorfizmów szczególnie istotne wydaje się, iż wysoce polimorficzna sekwencja pętli D z *locus* 303–315 lokalizuje się w bloku konserwowanej sekwencji – CBSII (ang. *conserved sequence block II*) i jest obszarem wiązania startera replikacji. Jakkolwiek trudno jest wyrokować o długofalowych skutkach mtMSI, wiadome jest, iż efektywność replikacji jest zależna od długości traktu poli-C, w efekcie udziału CSB II w starcie replikacji. Ciężka nić CBSII tworzy przejściową hybrydę RNA-DNA, która służy do startu replikacji. Utworzenie hybrydy RNA-DNA jest zależne od proporcji par GC w sekwencji CSB II. Co interesujące efektywność tworzenia tej hybrydy RNA-DNA jest zależna od sekwencji położonej 5' do rejonu tworzenia hybrydy, włączając

w to element CSB III [176]. Ponadto transkrypcja mtDNA, która jest konieczna do wytworzenia startera RNA wykorzystywanego w inicjacji syntezy nici ciężkiej mtDNA, jest krytycznie zależna od sekwencji CSB II [168]. Przedwczesna terminacja transkrypcji zachodzi, jeśli określone polimorfizmy mtMSI znajdują się w pozycjach 300–282 i może być całkowicie zahamowana w wypadku mutacji w pozycjach 319–289. W przeciwieństwie do tego mutacje w pozycjach 304–300 mają drastycznie zahamowaną terminację transkrypcji [127]. Ponadto analiza mutacji i polimorfizmów w sekwencjach otaczających pozycję 303 ujawniła skomplikowany i zależny od kontekstu (od sąsiadujących sekwencji) przebieg mutagenyzy w rejonie HVI. Analiza Malyarchuk i wsp. wskazuje iż mutageneza związana z przejściową dyslokacją (ang. *transient misalignment dislocation mutagenesis*) to mechanizm odpowiedzialny za powstawanie substytucji nukleotydowych w obrębie traktów mononukleotydowych [98].

Z kolei inna wysoce polimorficzna pozycja pętli – 16189 była od dawna w centrum zainteresowania badań onkologicznych [35, 37, 75]. Kobiety dziedziczące po matce polimorfizm T do C w locus 16189 wydają się bardziej podatne na rozwój raka sutka oraz nerwiaka zwojowego. 16189C jest wielokrotnie częściej identyfikowany u pacjentek z rakiem, podczas gdy 16189T u osób zdrowych [169]. Co ciekawe w perspektywie obecnego badania grupa Liu i in. opisała polimorfizm 16189T tylko u 14% pacjentek EC. Dodatkowo odziedziczenie tego polimorfizmu 16189C zwiększa ryzyko rozwoju cukrzycy typu II, która to jest powszechnie uznanym czynnikiem etiologicznym raka sutka i gruczolakoraka endometrium [24, 93]. W badaniu obejmującym szerokim wachlarzem wiele typów raków ginekologicznych delecje lub insercje traktu poli-C były we wszystkich przypadkach skorelowane z dziedzicznymi tranżycjami 16189 T do C. Eliminacja T i jej zamiana w C powoduje powstanie długiego traktu poli-C, który najprawdopodobniej zwiększa niestabilności genomu mitochondrialnego. Empirycznie wykazano, iż trakt ten jest obszarem wysoko zmiennym sekwencji mikrosatelitarnej mtMSI (C)7-14 [168]. Ponadto, nukleotydy 16184–16193 są zlokalizowane na końcu 3' sekwencji związanej z terminacją – TAS (ang. *termination-associated sequence*) i miejscem wiązania 7S DNA, które to reguluje biosyntezę mtDNA [49].

### C. Implikacje kliniczne mutacji w pętli D

W badaniach dotychczas przeprowadzonych zasugerowano korelacje pomiędzy mutacjami w pętli D a parametrami klinicznymi. Korelacje pomiędzy mutacjami a typem histologicznym opisano w przypadku raka wątroby (HCC). Średnia liczba mutacji w pętli D w raku dobrze zróżnicowanym wyniosła 1,7, podczas gdy w przypadku raka średnio odróżnicowanego 4,5, a w raku niezróżnicowanym 4,6 [149]. Podobnie liczba mutacji w pętli D przypadających na cząsteczkę mtDNA była wyższa dla bardziej zaawansowanych przypadków raka żołądka, płuca i jelita grubego [84]. Liczba tych mutacji korelowała także z przerzutami (cecha M w TNM). W przypadkach dwustronnych przerzutów do węzłów w raku jajnika identyczne warianty sekwencyjne znajdowane były w guzie pierwotnym i w ogniskach

przerzutowych [159]. Mutacje w pętli D opisano także jako typowe dla węzłowej i przerzutowej postaci czerniaka [130]. Ponadto u pacjentów z rakiem trzustki allel T w pozycji 16519 koreluje z miejscowo zaawansowaną postacią choroby w chwili wykrycia oraz krótszym czasem przeżycia chorych od chwili postawienia rozpoznania. Uważa się, że allel ten jest ponadto czynnikiem predysponującym do rozwoju cukrzycy w przebiegu choroby; należy dodać, że wystąpienie cukrzycy jest niepomyślnym czynnikiem rokowniczym u chorych z rakiem trzustki [112]. Powstawanie mutacji w pętli D może być związane z ekspozycją na dym papierosowy. W przypadku raka jamy ustnej silnie zmienne są pozycje 146, 152 i 186. Mutacje w tych pozycjach nukleotydowych pojawiają się przede wszystkim u palaczy płci męskiej [132]. U pacjentów z nowotworami głowy i szyi mutacje pętli D są typowe dla raka gardła dolnego, zwłaszcza u osób palących. Nie ma jednak korelacji z przebiegiem klinicznym i/lub odpowiedzią na leczenie a mutacjami pętli D. Należy jednak pamiętać, że rokowanie u pacjentów z rakiem gardła dolnego jest generalnie złe [88]. Obecność mutacji tego regionu mtDNA koreluje także z niepomyślnym rokowaniem i słabą odpowiedzią na leczenie 5-fluorouracyłem (5FU) u pacjentów z rakiem jelita grubego w III stopniu zaawansowania klinicznego. Po uwzględnieniu wieku i stopnia zaawansowania klinicznego ryzyko względne zgonu u pacjentów z mutacjami w pętli D jest 1,4 razy wyższe niż u pacjentów nie wykazujących występowania mutacji [89].

Nie tylko postać sporadyczna nowotworów, ale również ich postać rodzinna została skorelowana z obecnością zmian w pętli D. Polimorfizmy ciągu D310 oraz w loci 263, 489, 522, i 527 okazały się częste w rodzinach obciążonych rakiem. Yu i wsp. zaproponowali wykorzystanie polimorfizmów D310 jako markera diagnostycznego w wykrywaniu i diagnostyce wczesnych postaci raka [181]. W kolejnym badaniu grupy chińskiej u pacjentów z postacią raka sutka mających mutacje somatyczne w pętli D (porównanie: tkanka raka - tkanka zdrowa tej samej osoby) niższa była liczba kopii mtDNA oraz późniejszy średni wiek wystąpienia choroby (większy lub równy 50), a także wyższy stopień zaawansowania choroby w chwili wykrycia. Krzywe przeżycia Kaplan-Meiera oraz test Mantel-Cox (czyli test log-rank) wskazują, że pacjenci z obniżoną liczbą kopii mtDNA mają krótszy oczekiwany czas przeżycia [182]. W kolejnym badaniu chorych na sporadycznego raka sutka wykazano, iż mutacje pętli D korelują z późniejszym wiekiem zachorowania ( $\geq 50$  lat) i brakiem ekspresji receptorów dla estrogenu (ER) i progesteronu (PR). Pacjentki te mają także krótszy oczekiwany czas przeżycia, jak wskazuje analiza Kaplan-Meier. Wieloczynnikowa analiza regresji wykazała, iż mutacje w pętli D są zatem niezależnymi czynnikami prognostycznymi w populacji z rakiem sutka [157].

#### D. Uwarunkowania metodologiczne analizy mtDNA

**Wybór sekwencji referencyjnej.** Aby wykazać obecność mutacji somatycznych, konieczne jest porównanie sekwencji mtDNA z guza z wybraną sekwencją referencyjną. Sekwencja z tkanki nowotworowej powinna zostać porównana z sekwencją tkanki zdrowej od tej samej osoby, a najlepiej tkanki o tym samym

pochodzeniu w organogenezie (przykładowo dla raka sutka powinna to być tkanka zdrowego nabłonka przewodów mlekowych; dla raka wątroby – zdrowe hepatocyty) [42, 83]. Jeśli w analizie mutacji somatycznych wykonywane jest wyłącznie porównanie sekwencji z guza z rCRS, badanie takie nie opisuje mutacji występującej u danej osoby, tak jak stało się w przypadku badania guzów wątroby przez Nishikawa i wsp. [116] czy raka sutka przez Kulawiec i wsp. [80]. Samo porównanie sekwencji z tkanki nowotworowej z rCRS nie jest informatywne. Dla opisu polimorfizmów w grupie chorych konieczne jest stwierdzenie braku różnic między tkanką raka a tkanką zdrową u każdego z badanych z osobna. Przy porównywaniu z rCRS warto pamiętać także, iż sekwencja rCRS należy do haplogrupy H2 i charakteryzuje ją zestaw specyficznych dla niej polimorfizmów. Ponadto sekwencja pochodzi z komórek HeLa (rak szyjki macicy), więc nie jest to sekwencja tkanki zdrowej [50]. Porównywanie sekwencji z guza z sekwencją rCRS jak m.in. w analizie Sharma i wsp. [139] lub zdrowych ochotników [181] nie wskazuje na występowanie mutacji. Podobnie nie wskazuje porównanie dokonane przez Chen i wsp., którzy zestawili sekwencję z guza z sekwencją zmiany przedrakowej [22]. Niewłaściwą tkanką referencyjną, jaką stosowano w pracy Prior i wsp. [132], wydają się też węzły chłonne, gdyż istnieje możliwość obecności mikroprzerzutów, niewykrywalnych klasycznymi metodami histologicznymi [70], a więc nie można ustalić, czy porównanie dotyczy sekwencji z tkanki zdrowej czy z nowotworu.

Dla opisanie różnic między tkanką zdrową pobraną od pacjenta z nowotworem a sekwencją rCRS stosowane powinno być określenie polimorfizmu, tak jak to przeprowadzili m.in. w badaniu Wong i wsp. [174]. Alternatywnie w literaturze wykorzystywane jest określenie wariant sekwencyjny. Określenia tego używa się także dla opisanie różnic między sekwencjami z grupy zdrowych i chorych (uwaga, muszą być dobrane pod względem haplogrup) lub różnic między grupami chorych z różnymi rozpoznaniemami [180].

**Wybór tkanki referencyjnej.** Najczęściej wybieraną tkanką referencyjną i źródłem DNA jest krew pełna pacjenta oraz izolowane z niej DNA limfocytów [139, 161], jednak w obliczu rozsiewu komórek nowotworowych drogą krwi (przerzuty drogą krwionośną) analiza DNA z krwi wydaje się raczej metodą dobrą do wykrywania mikroprzerzutów i wczesnego wykrywania raka. Guz pierwotny rozpoczyna rozsiew, gdy składa się z około miliona komórek, a jest wykrywalny klasycznymi metodami, dopiero gdy osiąga ilość około miliarda komórek, ma wówczas około 1 cm<sup>3</sup>. Techniki PCR umożliwiają wykrywanie zmian genetycznych typowych dla raka we krwi pacjentów i były z powodzeniem wykorzystywane do analizy subklinicznych przerzutów nowotworowych oraz monitorowania leczenia [119, 148]. Dotychczasowe badania udowodniły, iż krążące w krwi komórki nowotworowe są wykrywalne, kiedy ilość ich jest niewielka np. kilka komórek raka na milion komórek krwi obwodowej [78]. Możliwe jest wykrycie we krwi obwodowej komórek nowotworowych i PCR jest metodą wystarczająco czułą do takiej analizy [69].

Wykorzystując techniki oparte na PCR możliwe jest także wykrywanie we krwi obwodowej mutacji genów obecnych w komórkach raka. Zależność taka dotyczy

właściwie wszystkich płynów ustrojowych. Udowodniono, iż u pacjentów z rakiem głowy i szyi mutacje TP53 są wykrywalne w ślinie u 71% pacjentów (1 komórka raka na 10000 komórek normalnych złuszczonego nabłonka); dla raka płuca mutacje telomerazy – w ślinie u 32% (1/10000 komórek); dla raka płuca aberracje mikro-satelitarne – w ślinie u 60% (1/500); dla raka płuca RAS w ślinie u 100% (1/10000); dla raka pęcherza moczowego w osadzie moczu mutacje TP53 u 100% (1/10000); dla raka trzustki mutacje RAS w żółci u 100% (1/100000) [142]. Jednocześnie należy pamiętać, iż mtDNA jest łatwo wykrywany w płynach ustrojowych i jego mutacje są 19 do 220 razy łatwiej wykrywalne niż mutacje genów jądrowych, np. TP53 [51]. Możliwość wykrycia zmian obecnych w genomie mitochondrialnym w DNA izolowanym z surowicy udowodniono na przykładzie pacjentów z rozpoznaniem raka wątroby [118].

Kolejną tkanką proponowaną jako referencyjna jest tkanka marginesu chirurgicznego po weryfikacji przez histopatologa jako tkanka zdrowa. Należy jednak pamiętać, iż wykazano już mutacje genów analogiczne do mutacji występujących w guzie w marginesie tkanek określanych makroskopowo i mikroskopowo klasycznymi metodami jako zdrowe. Mutacje takie wykryto w marginesie raka krtani, chociaż jedynie u 2–5% pacjentów [147]. W wypadku raka płuc opisano mutacje genów TP53 i K-ras w 'zdrowym' marginesie – w odpowiednio 9% i 18% [65]. Mutacje takie zostały wskazane jako niezależny czynnik rokowniczy wznowy miejscowej [103]. Należy pamiętać, iż mutacje wykrywane w marginesie mogą pochodzić z kontaminacji tkanek marginesu przez komórki raka, które to zanieczyszczenia powstają w wyniku zabiegów chirurgicznych. Wydaje się zatem, iż najwłaściwsze jest analizowanie komórek raka i komórek zdrowych po mikrodysekcji laserowej [111] oraz wykorzystanie tkanki referencyjnej o tym samym pochodzeniu ontogenetycznym [74].

**Wywiady jako podstawowe narzędzie badawcze.** Podstawowe dane kliniczno-patologiczne wykorzystywane we wszystkich badaniach aprobowanych przez WHO obejmują: wiek, płeć, przebieg choroby [161], czas przeżycia [121] oraz status palacza [88]. Z tego względu wydaje się uzasadnione wykorzystanie i tych danych z wywiadów w badaniach mitochondrialnych. Dodatkowo w onkologii mitochondrialnej nasuwa się analiza TNM i stopnia zaawansowania klinicznego jako czynniki niezbędne w procesie sekcji pacjentów. Jest to zgodne z dobrze ugruntowanymi raportami UICC/AJCC (*International Union Against Cancer*)/(*American Joint Committee on Cancer*) pokazującymi, iż stopień TNM w chwili postawienia rozpoznania jest podstawowym czynnikiem rokowniczym [160]. Przykładowo raki płaskonabłonkowe głowy i szyi mają 5-letnie przeżycie przy rozpoznaniu w stopniu I – 91,0%; II – 77,2%; III – 61,2%; IVA – 32,4%; IVB – 25,3%, a IVC – 3,6% [61]. Kolejnym czynnikiem wpływającym na przebieg analizy musi być klasyczny podtyp histologiczny, gdyż wiadome jest, iż wyznacza on rozwój choroby. Za przykład może posłużyć rak krtani, gdzie podtyp keratynizujący daje 5-letnie przeżycie u 83,3% (niski stopień zaawansowania) [101] i 48% (wysoki stopień zaawansowania) [114], a rak brodawkowaty – 75% [145] i osteosarkoma, angiosarkoma czy rhabdomyosarkoma <50% [167] i guzy endokrynne – 5% [30].

Uściślając, nowotwory powstające nawet w tym samym narządzie częstokroć znacząco różnią się biologią. Aby zminimalizować heterogenność badanej populacji, konieczne jest ustalenie jasnych kryteriów selekcji pacjentów, ich eliminacji z badania oraz zebranie dokładnych wywiadów. Jeśli w jednym badaniu pulę badanych tkanek stanowią preparaty ze zbyt heterogenicznej populacji chorych, szum w obrębie zbioru badanych osobników może być większy niż różnica między populacją chorą a zdrową. Badanie takie da zatem wyniki fałszywie negatywne; uniemożliwi to określenie czynnika genetycznego związane z rozwojem choroby, powstawaniem przerzutów, nawrotem choroby czy czasem przeżycia [82, 108]. Optymalne wydaje się dobieranie pacjentów o tym samym TNM lub stopniu zaawansowania klinicznego, gdyż już klasyczne markery kliniczne wskazują na występowanie istotnych różnic między pacjentami T1-2N0M0 a T1-3N1M0 i T1-2N1-2M1. Z tego względu wydaje się, iż ogniska przerzutowe są dobrym materiałem do analizy porównawczej i selekcji mutacji odpowiedzialnych za bardziej agresywny fenotyp, a także do selekcji komórek macierzystych raka i analizy ich mutacji. Dodatkowo poza klasycznymi czynnikami prognostycznymi (wiek, płeć etc.) w analizie mitochondrialnej istotne stają się parametry etnobiologiczne i demograficzne (patrz wyżej – Haplogrupy) [97, 136]. Przykładem efektywnego badania kliniczno-molekularnego jest raport Wu i wsp., który opisuje korelację między ilością mtDNA a typem histologicznym raka żołądka typu III wg Borrmanna w przeciwieństwie do typu IV [175].

Uwzględniając kryteria kliniczne analizowano mtDNA w raku sutka i jak się wstępnie wydaje, istnieją specyficzne wzorce mutacji mtDNA umożliwiające rozróżnienie raka przewodowego naciekającego od raka przewodowego wieloogniskowego, raka zrazikowego wieloogniskowego, raka zrazikowego, raka zrazikowego *in situ* – LCIS (*carcinoma lobulare in situ*), raka wewnątrzprzewodowego – raka przewodowego *in situ* – DCIS (*carcinoma intraductale in situ*), czy wreszcie raka śluzowego i nieodróżnicowanego [133]. Podobną analizę przeprowadzono dla raka jajnika różnicując nowotwory nabłonkowe na: surowicze, endometrialne, śluzowe i niesklasyfikowane [169]. Wykazano, że analiza mtDNA pozwala na odróżnienie podtypów histologicznych raka jajnika oraz pozwala na prognozowanie przebiegu choroby [2]. Przykładem efektywnie prowadzonego badania jest praca Lievre i wsp., gdzie wykluczono pacjentki poddane wcześniej chemioterapii oraz co ważne i wyraźnie zaznaczone, badano tylko pacjentki z guzem pierwotnym [88].

Ponadto pomimo iż mogłoby się wydawać, że badanie mitochondrialne dotyczy genetyki, danymi, które powinny zostać zebrane w wywiadach, są przebyte i aktualne choroby, wywiad rodzinny, stosowane leczenie, jak również wywiad środowiskowo-społeczny (palenie papierosów i spożycie alkoholu) [21]. Wykazano już, iż ekspozycja na dym papierosowy wpływa na uszkodzenia i replikację mtDNA [88], a ekspozycja na UV na uszkodzenia mtDNA skóry [15]. W przypadku nowotworów układu oddechowego ilość mtDNA koreluje z paleniem niezależnie od wieku, płci, spożycia alkoholu i statusu socjoekonomicznego ( $P < 0,001$ ) [104]. Wykazano nawet, iż proporcja znajdujących delecji 4977 pz w mtDNA mieszków włosowych koreluje z rozwojem nowotworów zależnych od palenia [90], w tym nowotworów ślinianek przyusznych



[85] i raka płuca [43]. Podobnie etanol indukuje uszkodzenia oksydacyjne mtDNA, co powoduje liczne mutacje i spadek ilości mtDNA w komórce [19].

### 3. PODSUMOWANIE I WNIOSKI

Podsumowując wydaje się, iż mitochondria są powiązane z procesem nowotworzenia na więcej niż jeden sposób, m.in. przez obecność zaburzeń w szlaku fosforylacji oksydacyjnej. Pierwsze doniesienia o zmianach w metabolizmie tlenowym komórek nowotworowych pochodzą jeszcze z początku ubiegłego stulecia (nagroda Nobla w 1931 roku dla Otto Warburga za jego badania nad metabolizmem komórek rakowych) [170]. Badania przeprowadzone do tej pory przez wiele niezależnych grup badawczych wykazały, że mutacje w mitochondrialnym DNA występowały w wielu typach nowotworów, u osób o różnym pochodzeniu etnicznym. Znalezione mutacje zarówno w niekodujących, jak i w kodujących fragmentach mitochondrialnego DNA [67, 92, 106, 120, 125, 131, 151, 152, 173].

Pomimo licznych wydanych do tej pory prac dotyczących dużej częstości zmian w mtDNA w nowotworach, pytanie, czy mutacje te są istotne w procesie nowotworzenia czy też nie, wciąż pozostaje otwarte. Część autorów sugeruje, że nagromadzenie mutacji w mitochondrialnym DNA jest jedynie wynikiem przypadku, a mutacje te nie dają komórkom przewagi selekcyjnej [28]. Inni autorzy uważają, że obecność mutacji w mitochondrialnym DNA promuje rozwój nowotworu [4, 33, 39, 41, 126]. Hipoteza ta zgodna jest z wynikami badań na myszach, gdzie komórki nowotworowe niosące zmutowane mtDNA dzieliły się szybciej i w efekcie powodowały powstawanie guzów o większej objętości [125, 141]. Istnieją dwie hipotezy wyjaśniające ten efekt: 1) mutacje w mitochondrialnym DNA powodują zwiększenie produkcji reaktywnych form tlenu, które mogą być przyczyną powstawania kolejnych mutacji w DNA mitochondrialnym i jądrowym, 2) komórki mające uszkodzony łańcuch fosforylacji oksydacyjnej i uzyskujące energię w drodze glikolizy mają przewagę selekcyjną w warunkach, jakie występują we wnętrzu guza (obniżona podaż tlenu) [17, 32, 39, 164]. W szczególności wydaje się, iż genotyp (w tym haplotyp) mitochondrialny może być czynnikiem zarówno predysponującym, jak i chroniącym przed rozwojem nowotworu. Polimorfizmy mtDNA mogą mieć istotne znaczenie funkcjonalne, a specyficzną rolę w rozwoju raka może odgrywać dysfunkcja łańcucha transportu elektronów. Niemniej jednak rola dziedzicznych zmian mtDNA w patogenezie nowotworu jest złożona, ale dzięki analizie sekwencji mtDNA i haplotypu możliwe wydaje się wyselekcjonowanie populacji o wysokim ryzyku rozwoju raka. Analiza mtDNA, w szczególności dla aplikacji klinicznych powinna podlegać ścisłym rygorom metodologicznym i metodycznym.

#### 4. BIBLIOGRAFIA

- [1] ACHILLIA, PEREGO UA, BRAVI CM, COBLE MD, KONG QP, WOODWARD SR, SALASA, TORRONI A, BANDELT HJ. The phylogeny of the four pan-American MtDNA haplogroups: implications for evolutionary and disease studies. *PLoS One* 2008; **3**: e1764.
- [2] AIKHIONBARE FO, MEHRABI S, KUMARESAN K, ZAVAREH M, OLATINWO M, ODUNSI K, PARTRIDGE E. Mitochondrial DNA sequence variants in epithelial ovarian tumor subtypes and stages. *J Carcinog* 2007; **6**: 1.
- [3] ANDREWS RM, KUBACKA I, CHINNERY PF, LIGHTOWLERS RN, TURNBULL DM, HOWELL N. Reanalysis and revision of the Cambridge reference sequence for human mitochondrial DNA. *Nat Genet* 1999; **23**: 147.
- [4] ARNOLD RS, SUN CQ, RICHARDS JC, GRIGORIEV G, COLEMAN IM, NELSON PS, HSIEH CL, LEE JK, XU Z, ROGATKO A, OSUNKOYA AO, ZAYZAFON M, CHUNG L, PETROS JA. Mitochondrial DNA mutation stimulates prostate cancer growth in bone stromal environment. *Prostate* 2009; **69**: 1–11.
- [5] BAI RK, LEAL SM, COVARRUBIAS D, LIU A, WONG LJ. Mitochondrial genetic background modifies breast cancer risk. *Cancer Res* 2007; **67**: 4687–4694.
- [6] BANDELT HJ, ACHILLIA, KONG QP, SALASA, LUTZ-BONENGL S, SUN C, ZHANG YP, TORRONI A, YAO YG. Low „penetrance” of phylogenetic knowledge in mitochondrial disease studies. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; **333**: 122–130.
- [7] BANDELT HJ, LAHERMO P, RICHARDS M, MACAULAY V. Detecting errors in mtDNA data by phylogenetic analysis. *Int J Legal Med* 2001; **115**: 64–69.
- [8] BANDELT HJ, SALAS A, TAYLOR RW, YAO YG. Exaggerated status of „novel” and „pathogenic” mtDNA sequence variants due to inadequate database searches. *Hum Mutat* 2009; **30**: 191–196.
- [9] BANDELT HJ, YAO YG, SALAS A, KIVISILD T, BRAVI CM. High penetrance of sequencing errors and interpretative shortcomings in mtDNA sequence analysis of LHON patients. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; **352**: 283–291.
- [10] BARTNIK E, LORENC A, MROZCEK K. Human mitochondria in health, disease, ageing and cancer. *J Appl Genet* 2001; **42**: 65–71.
- [11] BEHAR DM, ROSSET S, BLUE-SMITH J, BALANOVSKY O, TZUR S, COMAS D, MITCHELL RJ, QUINTANA-MURCI L, TYLER-SMITH C, WELLS RS. The Genographic Project public participation mitochondrial DNA database. *PLoS Genet* 2007; **3**: e104.
- [12] BERNEBURG M, KAMENISCH Y, KRUTMANN J. Repair of mitochondrial DNA in aging and carcinogenesis. *Photochem Photobiol Sci* 2006; **5**: 190–198.
- [13] BHATA, KOULA, SHARMA S, RAI E, BUKHARI SI, DHAR MK, BAMEZAI RN. The possible role of 10398A and 16189C mtDNA variants in providing susceptibility to T2DM in two North Indian populations: a replicative study. *Hum Genet* 2007; **120**: 821–826.
- [14] BIANCHI NO, BIANCHI MS, RICHARD SM. Mitochondrial genome instability in human cancer. *Rev Mut Res* 2001; **488**: 9–23.
- [15] BIRCH-MACHIN MA. The role of mitochondria in ageing and carcinogenesis. *Clin Exp Dermatol* 2006; **31**: 548–552.
- [16] BOOKER LM, HABERMACHER GM, JESSIE BC, SUN QC, BAUMANN AK, AMIN M, LIM SD, FERNANDEZ-GOLARZ C, LYLES RH, BROWN MD, MARSHALL FF, PETROS JA. North American white mitochondrial haplogroups in prostate and renal cancer. *J Urol* 2006; **175**: 468–472.
- [17] BRANDON M, BALDI P, WALLACE DC. Mitochondrial mutations in cancer. *Oncogene* 2006; **25**: 4647–4662.
- [18] BROWN DT, SAMUELS DC, MICHAEL EM, TURNBULL DM, CHINNERY PF. Random Genetic Drift Determines the Level of Mutant mtDNA in Human Primary Oocytes. *American J Human Genetics* 2001; **68**: 533–536.
- [19] CAHILL A, CUNNINGHAM CC, ADACHI M, ISHII H, BAILEY SM, FROMENTY B, DAVIES A. Effects of alcohol and oxidative stress on liver pathology: the role of the mitochondrion. *Alcohol Clin Exp Res* 2002; **26**: 907–915.
- [20] CANTER JA, KALLIANPUR AR, PARL FF, MILLIKAN RC. Mitochondrial DNA G10398A polymorphism and invasive breast cancer in African-American women. *Cancer Res* 2005; **65**: 8028–8033.
- [21] CHAPMAN JA, LICKLEY HL, TRUDEAU ME, HANNA WM, KAHN HJ, MURRAY D, SAWKA CA, MOBBS BG, MCCREADY DR, PRITCHARD KI. Ascertaining prognosis for breast cancer in node-negative patients with innovative survival analysis. *Breast J* 2006; **12**: 37–47.

- [22] CHEN JZ, GOKDEN N, GREENE GF, MUKUNYADZI P, KADLUBAR FF. Extensive somatic mitochondrial mutations in primary prostate cancer using laser capture microdissection. *Cancer Res* 2002; **62**: 6470–6474.
- [23] CHEN Z, LU W, GARCIA-PRIETO C, HUANG P. The Warburg effect and its cancer therapeutic implications. *J Bioenerg Biomembr* 2007; **39**: 267–274.
- [24] CHINNERY PF, ELLIOTT HR, PATEL S, LAMBERT C, KEERS SM, DURHAM SE, MCCARTHY MI, HITMAN GA, HATTERSLEY AT, WALKER M. Role of the mitochondrial DNA 16184-16193 poly-C tract in type 2 diabetes. *Lancet* 2005; **366**: 1650–1651.
- [25] CHINNERY PF, JOHNSON MA, WARDELL TM, SINGH-KLER R, HAYES C, BROWN DT, TAYLOR RW, BINDOFF LA, TURNBULL DM. The Epidemiology of Pathogenic Mitochondrial DNA Mutations. *Annals of Neurology* 2000; **48**: 188–193.
- [26] CHIU PM, LIU VW, NGAN HY, KHOO US, CHEUNG AN. Detection of mitochondrial DNA mutations in gestational trophoblastic disease. *Hum Mutat* 2003; **22**: 177.
- [27] CLAYTON DA, VINOGRAD J. Complex mitochondrial DNA in leukemic and normal human myeloid cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1969; **62**: 1077–1084.
- [28] COLLIER HA, KHRAPKO K, BODYAK ND, NEKHAEVA E, HERRERO-JIMENEZ P, THILLY WG. High frequency of homoplasmic mitochondrial DNA mutations in human tumors can be explained without selection. *Nat Genet* 2001; **28**: 147–150.
- [29] CREE LM, SAMUELS DC, CHINNERY PF. The inheritance of pathogenic mitochondrial DNA mutations. *Biochim Biophys Acta* 2009; **1792**, 12: 1097–1102.
- [30] CUZZOURT JC, PEZOLD JC, DUNN CW. Typical carcinoid tumor of the larynx occurring with otalgia: a case report. *Ear Nose Throat J* 2002; **81**: 40–43.
- [31] CZARNECKA A, GOLIK P, BARTNIK E. Mitochondrial DNA mutations in human neoplasia. *J Appl Genet* 2006; **47**: 67–78.
- [32] CZARNECKA AM, BARTNIK E. Mitochondrial DNA Mutations in Tumors. *Cellular Respiration and Carcinogenesis* 2009: 1–12.
- [33] CZARNECKA AM, CZARNECKI JS, KUKWA W, CAPPELLO F, SCINSKA A, KUKWA A. Molecular oncology focus – is carcinogenesis a 'mitochondriopathy'? *J Biomed Sci* 2010; **17**: 31.
- [34] CZARNECKA AM, KLEMBAA, KRAWCZYK T, ZDROZNY M, ARNOLD RS, BARTNIK E, PETROS JA. Mitochondrial NADH-dehydrogenase polymorphisms as sporadic breast cancer risk factor. *Oncol Rep* 2010; **23**: 531–535.
- [35] CZARNECKA AM, KLEMBAA, SEMCZUK A, PLAK K, MARZEC B, KRAWCZYK T, KOFLER B, GOLIK P, BARTNIK E. Common mitochondrial polymorphisms as risk factor for endometrial cancer. *Int Arch Med* 2009; **2**: 33.
- [36] CZARNECKA AM, KRAWCZYK T, CZARNECKI JS, KUKWA W, ŚCIŃSKA A, RIBBENE A, LO VERDE R, SUNSERI A, PERI G. Methodology For Mitochondrial DNA Research In Oncology: Goals And Pitfalls. *ARS Medica Tomitana* 2008; **14**: 48–64.
- [37] CZARNECKA AM, KRAWCZYK T, PLAK K, KLEMBAA, ZDROZNY M, ARNOLD RS, KOFLER B, GOLIK P, SZYBINSKA A, LUBINSKI J, MOSSAKOWSKA M, BARTNIK E, PETROS JA. Mitochondrial Genotype and Breast Cancer Predisposition. *Oncol Rep* 2010; in press.
- [38] CZARNECKA AM, KRAWCZYK T, ZDROZNY M, LUBINSKI J, ARNOLD RS, KUKWA W, SCINSKA A, GOLIK P, BARTNIK E, PETROS JA. Mitochondrial NADH-dehydrogenase subunit 3 (ND3) polymorphism (A10398G) and sporadic breast cancer in Poland. *Breast Cancer Res Treat* 2010; **121**: 511–518.
- [39] CZARNECKA AM, KUKWA W, KRAWCZYK T, SCINSKA A, KUKWA A, CAPPELLO F. Mitochondrial DNA mutations in cancer – from bench to bedside. *Breast Cancer Res Treat* 2010 Jun; **121**(2): 511–518.
- [40] CZARNECKA AM, KUKWA W, KRAWCZYK T, SCINSKA A, KUKWA A, CAPPELLO F. Mitochondrial DNA mutations in cancer – from bench to bedside. *J Biomed Sci* 2010 Apr 25; **17**: 31.
- [41] CZARNECKA AM, MARINO GAMMAZZA A, DI FELICE V, ZUMMO G, CAPPELLO F. Cancer as a „Mitochondriopathy”. *J Cancer Mol* 2007; **3**: 71–79.
- [42] DAI JG, XIAO YB, MIN JX, ZHANG GQ, YAO K, ZHOU RJ. Mitochondrial DNA 4977 BP deletion mutations in lung carcinoma. *Indian. J Cancer* 2006; **43**: 20–25.
- [43] DE FLORA S, D'AGOSTINI F, BALANSKY R, CAMOIRANO A, BENNICELLI C, BAGNASCO M, CARTIGLIA C, TAMPA E, LONGOBARDI MG, LUBET RA, IZZOTTI A. Modulation of cigarette smoke-related end-points in mutagenesis and carcinogenesis. *Mutat Res* 2003; **523–524**: 237–252.

- [44] DEICHMANN M, KAHLE B, BENNERA, THOME M, HELMKE B, NAHER H. Somatic mitochondrial mutations in melanoma resection specimens. *Int J Oncol* 2004; **24**: 137–141.
- [45] DIMAURO S. Mitochondrial diseases. *Biochim Biophys Acta* 2004; **1658**: 80–88.
- [46] DMITRENKO V, SHOSTAK K, BOYKO O, KHOMENKO O, ROZUMENKO V, MALISHEVA T, SHAMAYEV M, ZOZULYA Y, KAVSAN V. Reduction of the transcription level of the mitochondrial genome in human glioblastoma. *Cancer Lett* 2005; **218**: 99–107.
- [47] DRUZHYNNA NM, WILSON GL, LEDOUX SP. Mitochondrial DNA repair in aging and disease. *Mech Ageing Dev* 2008; **129**: 383–390.
- [48] DURAND S, DUMUR C, FLURY A, ABADIE P, PATRITO L, PODHAJECER O, GENTI-RAIMONDI S. Altered mitochondrial gene expression in human gestational trophoblastic diseases. *Placenta* 2001; **22**: 220–226.
- [49] FERNANDEZ-SILVA P, ENRIQUEZ JA, MONTOYA J. Replication and transcription of mammalian mitochondrial DNA. *Exp Physiol* 2003; **88**: 41–56.
- [50] FINNILA S, LEHTONEN MS, MAJAMAA K. Phylogenetic Network for European mtDNA. *Am J Hum Genet* 2001; **68**: 1475–1484.
- [51] FLISS MS, USADEL H, CABALLERO OL, WU L, BUTA MR, ELEFF SM, JEN J, SIDRANSKY D. Facile detection of mitochondrial DNA mutations in tumors and bodily fluids. *Science* 2000; **287**: 2017–2019.
- [52] FRYDMAN J. Folding of newly translated proteins *in vivo*: the role of molecular chaperones. *Annu Rev Biochem* 2001; **70**: 603–647.
- [53] GOCHHAIT S, BHATT A, SHARMA S, SINGH YP, GUPTA P, BAMEZAI RN. Concomitant presence of mutations in mitochondrial genome and p53 in cancer development – a study in north Indian sporadic breast and esophageal cancer patients. *Int J Cancer* 2008; **123**: 2580–2586.
- [54] GULENG G, LOVIG T, MELING GI, ANDERSEN SN, ROGNUM TO. Mitochondrial microsatellite instability in colorectal carcinomas – frequency and association with nuclear microsatellite instability. *Cancer Lett* 2005; **219**: 97–103.
- [55] HAUGEN DR, FLUGE O, REIGSTAD LJ, VARHAUG JE, LILLEHAUG JR. Increased expression of genes encoding mitochondrial proteins in papillary thyroid carcinomas. *Thyroid* 2003; **13**: 613–620.
- [56] HERVOUET E, SIMONNET H, GODINOT C. Mitochondria and reactive oxygen species in renal cancer. *Biochimie* 2007; **89**: 1080–1088.
- [57] HIYAMA T, TANAKA S, SHIMA H, KOSE K, TUNCEL H, ITO M, KITADAI Y, SUMII M, YOSHIHARA M, SHIMAMOTO F, HARUMA K, CHAYAMA K. Somatic mutation in mitochondrial DNA and nuclear microsatellite instability in gastric cancer. *Oncol Rep* 2003; **10**: 1837–1841.
- [58] HUANG XW, ZHAO Q, CHEN DZ, ZHANG LS. [Mutations in the D-loop region of mitochondrial DNA and the ROS level in the tissue of hepatocellular carcinoma]. *Yi Chuan* 2005; **27**: 14–20.
- [59] HUDSON G, CARELLI V, SPRUIJT L, GERARDS M, MOWBRAY C, ACHILLIA, PYLE A, ELSON J, HOWELL N, LA MORGIA C, VALENTINO ML, HUOPONEN K, SAVONTAUS ML, NIKOSKELAINEN E, SADUN AA, SALOMAO SR, BELFORT R, JR., GRIFFITHS P, MAN PY, DE COO RF, HORVATH R, ZEVIANI M, SMEETS HJ, TORRONI A, CHINNERY PF. Clinical expression of Leber hereditary optic neuropathy is affected by the mitochondrial DNA-haplogroup background. *Am J Hum Genet* 2007; **81**: 228–233.
- [60] INGMAN M, GYLLENSTEN U. mtDB: Human Mitochondrial Genome Database, a resource for population genetics and medical sciences. *Nucleic Acids Res* 2006; **34**: D749–751.
- [61] IRO H, WALDFAHRER F. Evaluation of the newly updated TNM classification of head and neck carcinoma with data from 3247 patients. *Cancer* 1998; **83**: 2201–2207.
- [62] ISHIKAWA K, TAKENAGA K, AKIMOTO M, KOSHIKAWA N, YAMAGUCHI A, IMANISHI H, NAKADA K, HONMA Y, HAYASHI J. ROS-generating mitochondrial DNA mutations can regulate tumor cell metastasis. *Science* 2008; **320**: 661–664.
- [63] ISIDORO A, CASADO E, REDONDO A, ACEBO P, ESPINOSA E, ALONSO AM, CEJAS P, HARDISSON D, FRESNO VARAJA, BELDA-INIESTA C, GONZALEZ-BARON M, CUEZVA JM. Breast carcinomas fulfill the Warburg hypothesis and provide metabolic markers of cancer prognosis. *Carcinogenesis* 2005; **26**: 2095–2104.
- [64] JAMES AM, MURPHY MP. How mitochondrial damage affects cell function. *J Biomed Sci* 2002; **9**: 475–487.

- [65] JASSEM J, JASSEM E, JAKOBKIEWICZ-BANECKA J, RZYMAN W, BADZIO A, DZIADZIUSZKO R, KOBIERSKA-GULIDA G, SZYMANOWSKA A, SKRZYPSKI M, ZYLICZ M. P53 and K-ras mutations are frequent events in microscopically negative surgical margins from patients with nonsmall cell lung carcinoma. *Cancer* 2004; **100**: 1951–1960.
- [66] JERONIMO C, NOMOTO S, CABALLERO OL, USADEL H, HENRIQUE R, VARZIM G, OLIVEIRA J, LOPES C, FLISS MS, SIDRANSKY D. Mitochondrial mutations in early stage prostate cancer and bodily fluids. *Oncogene* 2001; **20**: 5195–5198.
- [67] JERONIMO C, NOMOTO S, CABALLERO OL, USADEL H, HENRIQUE R, VARZIM G, OLIVEIRA J, LOPES C, FLISS MS, SIDRANSKY D. Mitochondrial mutations in early stage prostate cancer and bodily fluids. *Oncogene* 2001; **20**: 5195–5198.
- [68] JI Y, ZHANG AM, JIA X, ZHANG YP, XIAO X, LI S, GUO X, BANDELT HJ, ZHANG Q, YAO YG. Mitochondrial DNA haplogroups M7b1'2 and M8a affect clinical expression of leber hereditary optic neuropathy in Chinese families with the m.11778G → a mutation. *Am J Hum Genet* 2008; **83**: 760–768.
- [69] KANEDA T, HOSHI S, MAO H, TAKAHASHI T, SUZUKI K, SATO M, ORIKASA S. [Detection of urogenital malignant cells in the peripheral blood by nested RT-PCR using keratin 19 mRNA]. *Nippon Hinyokika Gakkai Zasshi* 1998; **89**: 33–42.
- [70] KARLSSON M, NILSSON O, THORN M, WINQVIST O. Detection of metastatic colon cancer cells in sentinel nodes by flow cytometry. *J Immunol Methods* 2008; **334**: 122–133.
- [71] KHRAPKO K, COLLIER HA, ANDRE PC, LI XC, HANEKAMP JS, THILLY WG. Mitochondrial mutational spectra in human cells and tissues. *PNAS* 1997; **94**: 13798–13803.
- [72] KHUSNUTDINOVA E, GILYAZOVA I, RUIZ-PESINI E, DERBENEVA O, KHUSAINOVA R, KHIDIYATOVA I, MAGZHANOV R, WALLACE DC. A mitochondrial etiology of neurodegenerative diseases: evidence from Parkinson's disease. *Ann NY Acad Sci* 2008; **1147**: 1–20.
- [73] KIRCHES E, KRAUSE G, WARICH-KIRCHES M, WEIS S, SCHNEIDER T, MEYER-PUTTLITZ B, MAWRIN C, DIETZMANN K. High frequency of mitochondrial DNA mutations in glioblastoma multiforme identified by direct sequence comparison to blood samples. *Int J Cancer* 2001; **93**: 534–538.
- [74] KIRCHES E, MICHAEL M, WARICH-KIRCHES M, SCHNEIDER T, WEIS S, KRAUSE G, MAWRIN C, DIETZMANN K. Heterogeneous tissue distribution of a mitochondrial DNA polymorphism in heteroplasmic subjects without mitochondrial disorders. *J Med Genet* 2001; **38**: 312–317.
- [75] KLEMBA A, KOWALEWSKA M, KUKWA W, TONSKA K, SZYBINSKA A, MOSSAKOWSKA M, SCINSKA A, GOLIK P, KOPER K, RADZISZEWSKI J, KUKWA A, CZARNECKA AM, BARTNIK E. Mitochondrial genotype in vulvar carcinoma – cuckoo in the nest. *J Biomed Sci* 2010; **17**: 73.
- [76] KLEMBA A, KUKWA W, BARTNIK E, KRAWCZYK T, SCINSKA A, GOLIK P, CZARNECKA AM. [Molecular biology of endometrial carcinoma]. *Post Hig Med Dosw (Online)* 2008; **62**: 420–432.
- [77] KOFLER B, MUELLER EE, EDER W, STANGER O, MAIER R, WEGER M, HAAS A, WINKER R, SCHMUT O, PAULWEBER B, IGLSEDER B, RENNER W, WIESBAUER M, AIGNER I, SANTIC D, ZIMMERMANN FA, MAYR JA, SPERL W. Mitochondrial DNA haplogroup T is associated with coronary artery disease and diabetic retinopathy: a case control study. *BMC Med Genet* 2009; **10**: 35.
- [78] KOYANAGI K, MORI T, O'DAY SJ, MARTINEZ SR, WANG HJ, HOON DS. Association of circulating tumor cells with serum tumor-related methylated DNA in peripheral blood of melanoma patients. *Cancer Res* 2006; **66**: 6111–6117.
- [79] KRAMER G, BOEHRINGER D, BAN N, BUKAU B. The ribosome as a platform for co-translational processing, folding and targeting of newly synthesized proteins. *Nat Struct Mol Biol* 2009; **16**: 589–597.
- [80] KULAWIEC M, OWENS KM, SINGH KK. Cancer cell mitochondria confer apoptosis resistance and promote metastasis. *Cancer Biol Ther* 2009; **8**: 1378–1385.
- [81] KURLAND CG, ANDERSSON SG. Origin and evolution of the mitochondrial proteome. *Microbiol Mol Biol Rev* 2000; **64**: 786–820.
- [82] KYRTOPOULOS SA, SARRIF A, ELLIOTT BM, SCHOKET B, DEMOPOULOS NA. Biomarkers and molecular epidemiology – present state and future trends: concluding remarks. *Mutat Res* 2006; **600**: 77–78.
- [83] LEE HC, LI SH, LIN JC, WU CC, YEH DC, WEI YH. Somatic mutations in the D-loop and decrease in the copy number of mitochondrial DNA in human hepatocellular carcinoma. *Mutat Res* 2004; **547**: 71–78.
- [84] LEE HC, YIN PH, LIN JC, WU CC, CHEN CY, WU CW, CHI CW, TAM TN, WEI YH. Mitochondrial Genome Instability and mtDNA Depletion in Human Cancers. *Ann NY Acad Sci* 2005; **1042**: 109–122.

- [85] LEWIS PD, FRADLEY SR, GRIFFITHS AP, BAXTER PW, PARRY JM. Mitochondrial DNA mutations in the parotid gland of cigarette smokers and non-smokers. *Mutat Res* 2002; **518**: 47–54.
- [86] LI Y, WEIBING S, LIU H, HONGLI J, ZHUOSHENG L, YADONG W, BING X, DAIMING F. Mitochondrial DNA from colorectal cancer cells promotes the malignant phenotype of NIH3T3 cells. *Cell Biol Int* 2008; **32**,8: 979–983.
- [87] LIANG BC, HAYS L. Mitochondrial DNA copy number changes in human gliomas. *Cancer Lett* 1996; **105**: 167–173.
- [88] LIEVRE A, BLONS H, HOULLIER AM, LACCOURREYE O, BRASNU D, BEAUNE P, LAURENT-PUIG P. Clinicopathological significance of mitochondrial D-Loop mutations in head and neck carcinoma. *Br J Cancer* 2006; **94**: 692–697.
- [89] LIEVRE A, CHAPUSOT C, BOUVIER AM, ZINZINDOHOUE F, PIARD F, ROIGNOT P, ARNOULD L, BEAUNE P, FAIVRE J, LAURENT-PUIG P. Clinical value of mitochondrial mutations in colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2005; **23**: 3517–3525.
- [90] LIU CS, KAO SH, WEI YH. Smoking-associated mitochondrial DNA mutations in human hair follicles. *Environ Mol Mutagen* 1997; **30**: 47–55.
- [91] LIU VW, SHI HH, CHEUNG AN, CHIU PM, LEUNG TW, NAGLEY P, WONG LC, NGAN HY. High incidence of somatic mitochondrial DNA mutations in human ovarian carcinomas. *Cancer Res* 2001; **61**: 5998–6001.
- [92] LIU VW, SHI HH, CHEUNG AN, CHIU PM, LEUNG TW, NAGLEY P, WONG LC, NGAN HY. High incidence of somatic mitochondrial DNA mutations in human ovarian carcinomas. *Cancer Res* 2001; **61**: 5998–6001.
- [93] LIU VW, WANG Y, YANG HJ, TSANG PC, NG TY, WONG LC, NAGLEY P, NGAN HY. Mitochondrial DNA variant 16189T>C is associated with susceptibility to endometrial cancer. *Hum Mutat* 2003; **22**: 173–174.
- [94] LIU VW, YANG HJ, WANG Y, TSANG PC, CHEUNG AN, CHIU PM, NG TY, WONG LC, NAGLEY P, NGAN HY. High frequency of mitochondrial genome instability in human endometrial carcinomas. *Br J Cancer* 2003; **89**: 697–701.
- [95] LOPEZ-GARCIA P, MOREIRA D. Metabolic symbiosis at the origin of eukaryotes. *Trends Biochem Sci* 1999; **24**: 88–93.
- [96] LUFT R, IKKOS D, PALMIERI G, ERNSTER L, AFZELIUS B. A case of severe hypermetabolism of nonthyroid origin with a defect in the maintenance of mitochondrial respiratory control: a correlated clinical, biochemical, and morphological study. *J Clin Invest* 1962; **41**: 1776–1804.
- [97] MA Y, QIAN Y, WEI L, ABRAHAM J, SHI X, CASTRANOVA V, HARNER EJ, FLYNN DC, GUO L. Population-based molecular prognosis of breast cancer by transcriptional profiling. *Clin Cancer Res* 2007; **13**: 2014–2022.
- [98] MALYARCHUK BA, ROGOZIN IB, BERIKOV VB, DERENKO MV. Analysis of phylogenetically reconstructed mutational spectra in human mitochondrial DNA control region. *Hum Genet* 2002; **111**: 46–53.
- [99] MANCUSO M, FILOSTO M, CHOUB A, TENTORIO M, BROGLIO L, PADOVANI A, SICILIANO G. Mitochondrial DNA-related Disorders. *Biosci Rep* 2007; **27**: 31–37.
- [100] MARCUELLO A, MARTINEZ-REDONDO D, DAHMANI Y, CASAJUS JA, RUIZ-PESINI E, MONTAYA J, LOPEZ-PEREZ MJ, DIEZ-SANCHEZ C. Human mitochondrial variants influence on oxygen consumption. *Mitochondrion* 2009; **9**: 27–30.
- [101] MARGARINO G, SCHENONE G, SCALA M, MEREU P, COMANDINI D, CORVO R, SCOLARO T, BADELLINO F. [Early stages of laryngeal cancer (I–II stage) and therapeutic options: case report and review of literature]. *Acta Otorhinolaryngol Ital* 1996; **16**: 40–46.
- [102] MARGULIS L. The origin of plant and animal cells. *Am Sci* 1971; **59**: 230–235.
- [103] MASAYESVA BG, TONG BC, BROCK MV, PILKINGTON T, GOLDENBERG D, SIDRANSKY D, HARDEN S, WESTRA WH, CALIFANO J. Molecular margin analysis predicts local recurrence after sublobar resection of lung cancer. *Int J Cancer* 2005; **113**: 1022–1025.
- [104] MASAYESVA BG, MAMBO E, TAYLOR RJ, GOLOUBEVA OG, ZHOU S, COHEN Y, MINHAS K, KOCH W, SCIUBBA J, ALBERG AJ, SIDRANSKY D, CALIFANO J. Mitochondrial DNA content increase in response to cigarette smoking. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2006; **15**: 19–24.
- [105] MAXIMO V, SOARES P, LIMA J, CAMESELLE-TEIJEIRO J, SOBRINHO-SIMÕES M. Mitochondrial DNA somatic mutations (point mutations and large deletions) and mitochondrial DNA variants in human thyroid pathology: a study with emphasis on Hurthle cell tumors. *Am J Pathol* 2002; **160**: 1857–1865.

- [106] MEIERHOFER D, MAYR JA, FINK K, SCHMELLER N, KOFLER B, SPERL W. Mitochondrial DNA mutations in renal cell carcinomas revealed no general impact on energy metabolism. *Br J Cancer* 2006; **94**: 268–274.
- [107] MEIERHOFER D, MAYR JA, FINK K, SCHMELLER N, KOFLER B, SPERL W. Mitochondrial DNA mutations in renal cell carcinomas revealed no general impact on energy metabolism. *Br J Cancer* 2006; **94**: 268–274.
- [108] MERLO DF, SORMANI MP, BRUZZI P. Molecular epidemiology: new rules for new tools? *Mutat Res* 2006; **600**: 3–11.
- [109] MIMS MP, HAYES TG, ZHENG S, LEAL SM, FROLOV A, ITTMANN MM, WHEELER TM, PRCHAL JT. Mitochondrial DNA G10398A polymorphism and invasive breast cancer in African-American women. *Cancer Res* 2006; **66**: 1880; author reply 1880-1.
- [110] MIZUTANI S, MIYATO Y, SHIDARA Y, ASOH S, TOKUNAGA A, TAJIRI T, OHTA S. Mutations in the mitochondrial genome confer resistance of cancer cells to anticancer drugs. *Cancer Sci* 2009; **100**(9):1680–1687.
- [111] MURRAY GI. An overview of laser microdissection technologies. *Acta Histochem* 2007; **109**: 171–176.
- [112] NAVAGLIA F, BASSO D, FOGAR P, SPERTI C, GRECO E, ZAMBON CF, STRANGES A, FALDA A, PIZZI S, PARENTI A, PEDRAZZOLI S, PLEBANI M. Mitochondrial DNA D-loop in pancreatic cancer: somatic mutations are epiphenomena while the germline 16519 T variant worsens metabolism and outcome. *Am J Clin Pathol* 2006; **126**: 593–601.
- [113] NAVIAUX RK. Mitochondrial DNA disorders. *Eur J Pediatr* 2000; **159**: S219–226.
- [114] NGUYEN-TAN PF, LE QT, QUIVEY JM, SINGER M, TERRIS DJ, GOFFINET DR, FU KK. Treatment results and prognostic factors of advanced T3-4 laryngeal carcinoma: the University of California, San Francisco (UCSF) and Stanford University Hospital (SUH) experience. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2001; **50**: 1172–1180.
- [115] NISHIGAKI Y, YAMADA Y, FUKU N, MATSUO H, SEGAWA T, WATANABE S, KATO K, YOKOI K, YAMAGUCHI S, NOZAWA Y, TANAKA M. Mitochondrial haplogroup N9b is protective against myocardial infarction in Japanese males. *Hum Genet* 2007; **120**: 827–836.
- [116] NISHIKAWA M, NISHIGUCHI S, SHIOMI S, TAMORI A, KOHN, TAKEDA T, KUBO S, HIROHASHI K, KINOSHITA H, SATO E, INOUE M. Somatic mutation of mitochondrial DNA in cancerous and noncancerous liver tissue in individuals with hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 2001; **61**: 1843–1845.
- [117] NOMOTO S, YAMASHITA K, KOSHIKAWA K, NAKAO A, SIDRANSKY D. Mitochondrial D-loop mutations as clonal markers in multicentric hepatocellular carcinoma and plasma. *Clin Cancer Res* 2002; **8**: 481–487.
- [118] OKOCHI O, HIBI K, UEMURA T, INOUE S, TAKEDA S, KANEKO T, NAKAO A. Detection of mitochondrial DNA alterations in the serum of hepatocellular carcinoma patients. *Clin Cancer Res* 2002; **8**: 2875–2878.
- [119] PANTEL K, COTE RJ, FODSTAD O. Detection and clinical importance of micrometastatic disease. *J Natl Cancer Inst* 1999; **91**: 1113–1124.
- [120] PARRELLAP, XIAO Y, FLISS M, SANCHEZ-CESPEDES M, MAZZARELLI P, RINALDI M, NICOL T, GABRIELSON E, CUOMO C, COHEN D, PANDIT S, SPENCER M, RABITTI C, FAZIO VM, SIDRANSKY D. Detection of mitochondrial DNA mutations in primary breast cancer and fine-needle aspirates. *Cancer Res* 2001; **61**: 7623–7626.
- [121] PEJOVIC T, LADNER D, INTENGAN M, ZHENG K, FAIRCHILD T, DILLON D, EASLEY S, MARCHETTI D, SCHWARTZ P, LELE S, COSTA J, ODUNSI K. Somatic D-loop mitochondrial DNA mutations are frequent in uterine serous carcinoma. *Eur J Cancer* 2004; **40**: 2519–2524.
- [122] PELLO R, MARTIN MA, CARELLI V, NIJTMANS LG, ACHILLI A, PALA M, TORRONI A, GOMEZ-DURAN A, RUIZ-PESINI E, MARTINUZZI A, SMEITINK JA, ARENAS J, UGALDE C. Mitochondrial DNA background modulates the assembly kinetics of OXPHOS complexes in a cellular model of mitochondrial disease. *Hum Mol Genet* 2008; **17**: 4001–4011.
- [123] PENTA JS, JOHNSON FM, WACHSMAN JT, COPELAND WC. Mitochondrial DNA in human malignancy. *Reviews in Mutation Research* 2001; **488**: 119–133.
- [124] PEREZ-MARTINEZ X, FUNES S, CAMACHO-VILLASANA Y, MARJAVAARA S, TAVARES-CARREON F, SHINGU-VAZQUEZ M. Protein synthesis and assembly in mitochondrial disorders. *Curr Top Med Chem* 2008; **8**: 1335–1350.

- [125] PETROS JA, BAUMANN AK, RUIZ-PESINI E, AMIN MB, SUN CQ, HALL J, LIM S, ISSA MM, FLANDERS WD, HOSSEINI SH, MARSHALL FF, WALLACE DC. mtDNA mutations increase tumorigenicity in prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; **102**: 719–724.
- [126] PETROS JA, BAUMANN AK, RUIZ-PESINI E, AMIN MB, SUN CQ, HALL J, LIM S, ISSA MM, FLANDERS WD, HOSSEINI SH, MARSHALL FF, WALLACE DC. mtDNA mutations increase tumorigenicity in prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; **102**: 719–724.
- [127] PHAM XH, FARGE G, SHI Y, GASPARI M, GUSTAFSSON CM, FALKENBERG M. Conserved sequence box II directs transcription termination and primer formation in mitochondria. *J Biol Chem* 2006; **281**: 24647–24652.
- [128] PIECHOTA J, TONSKA K, NOWAK M, KABZINSKA D, LORENC A, BARTNIK E. Comparison between the Polish population and European populations on the basis of mitochondrial morphs and haplogroups. *Acta Biochim Pol* 2004; **51**: 883–895.
- [129] PLAK K, CZARNECKA AM, KRAWCZYK T, GOLIK P, BARTNIK E. Breast cancer as a mitochondrial disorder (Review). *Oncol Rep* 2009; **21**: 845–851.
- [130] POETSCH M, DITTBERNER T, PETERSMANN A, WOENCKHAUS C. Mitochondrial DNA instability in malignant melanoma of the skin is mostly restricted to nodular and metastatic stages. *Melanoma Res* 2004; **14**: 501–508.
- [131] POLYAK K, LI Y, ZHU H, LENGAUER C, WILLSON JK, MARKOWITZ SD, TRUSH MA, KINZLER KW, VOGELSTEIN B. Somatic mutations of the mitochondrial genome in human colorectal tumours. *Nat Genet* 1998; **20**: 291–293.
- [132] PRIOR SL, GRIFFITHS AP, BAXTER JM, BAXTER PW, HODDER SC, SILVESTER KC, LEWIS PD. Mitochondrial DNA mutations in oral squamous cell carcinoma. *Carcinogenesis* 2006; **27**: 945–950.
- [133] RICHARD SM, BAILLIET G, PAEZ GL, BIANCHI MS, PELTOMAKI P, BIANCHI NO. Nuclear and mitochondrial genome instability in human breast cancer. *Cancer Res* 2000; **60**: 4231–4237.
- [134] ROSAA, FONSECA BV, KRUG T, MANSO H, GOUVEIA L, ALBERGARIA I, GASPAR G, CORREIA M, VIANA-BAPTISTA M, SIMOES RM, PINTO AN, TAIPA R, FERREIRA C, FONTES JR, SILVA MR, GABRIEL JP, MATOS I, LOPES G, FERRO JM, VICENTE AM, OLIVEIRA SA. Mitochondrial haplogroup H1 is protective for ischemic stroke in Portuguese patients. *BMC Med Genet* 2008; **9**: 57.
- [135] RUIZ-PESINI E, LOTT MT, PROCACCIO V, POOLE JC, BRANDON MC, MISHMAR D, YI C, KREUZIGER J, BALDI P, WALLACE DC. An enhanced MITOMAP with a global mtDNA mutational phylogeny. *Nucleic Acids Res* 2007; **35**: D823–828.
- [136] SALAS A, CARRACEDO A, MACAULAY V, RICHARDS M, BANDEL TJ. A practical guide to mitochondrial DNA error prevention in clinical, forensic, and population genetics. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; **335**: 891–899.
- [137] SALAS A, YAO YG, MACAULAY V, VEGA A, CARRACEDO A, BANDEL TJ. A critical reassessment of the role of mitochondria in tumorigenesis. *PLoS Med* 2005; **2**: e296.
- [138] SANCHEZ-CESPEDES M, PARRELLAP, NOMOTO S, COHEN D, XIAO Y, ESTELLER M, JERONIMO C, JORDAN RC, NICOL T, KOCH WM, SCHOENBERG M, MAZZARELLI P, FAZIO VM, SIDRANSKY D. Identification of a mononucleotide repeat as a major target for mitochondrial DNA alterations in human tumors. *Cancer Res* 2001; **61**: 7015–7019.
- [139] SHARMA H, SINGHA, SHARMA C, JAIN SK, SINGH N. Mutations in the mitochondrial DNA D-loop region are frequent in cervical cancer. *Cancer Cell Int* 2005; **5**: 34.
- [140] SHARMA LK, LU J, BAI Y. Mitochondrial respiratory complex I: structure, function and implication in human diseases. *Curr Med Chem* 2009; **16**: 1266–1277.
- [141] SHIDARA Y, YAMAGATA K, KANAMORI T, NAKANO K, KWONG JQ, MANFREDI G, ODA H, OHTA S. Positive contribution of pathogenic mutations in the mitochondrial genome to the promotion of cancer by prevention from apoptosis. *Cancer Res* 2005; **65**: 1655–1663.
- [142] SIDRANSKY D. Nucleic acid-based methods for the detection of cancer. *Science* 1997; **278**: 1054–1059.
- [143] SIMONNET H, ALAZARD N, PFEIFFER K, GALLOU C, BEROUD C, DEMONT J, BOUVIER R, SCHAGGER H, GODINOT C. Low mitochondrial respiratory chain content correlates with tumor aggressiveness in renal cell carcinoma. *Carcinogenesis* 2002; **23**: 759–768.
- [144] STONEKING M. Hypervariable sites in the mtDNA control region are mutational hotspots. *Am J Hum Genet* 2000; **67**: 1029–1032.
- [145] STROJAN P, SMID L, CIZMAREVIC B, ZAGAR T, AUERSPERG M. Verrucous carcinoma of the larynx: determining the best treatment option. *Eur J Surg Oncol* 2006; **32**: 984–988.



- [146] SUISSA S, WANG Z, POOLE J, WITTKOPP S, FEDER J, SHUTT TE, WALLACE DC, SHADEL GS, MISHMAR D. Ancient mtDNA genetic variants modulate mtDNA transcription and replication. *PLoS Genet* 2009; **5**: e1000474.
- [147] SZUKALA K, SOWINSKA A, WIERZBICKA M, BICZYSKO W, SZYFTER W, SZYFTER K. Does loss of heterozygosity in critical genome regions predict a local relapse in patients after laryngectomy? *Mutat Res* 2006; **600**: 67–76.
- [148] TABACK B, HOON DS. Circulating nucleic acids in plasma and serum: past, present and future. *Curr Opin Mol Ther* 2004; **6**: 273–278.
- [149] TAMORIA, NISHIGUCHI S, NISHIKAWA M, KUBO S, KOH N, HIROHASHI K, SHIOMI S, INOUE M. Correlation between clinical characteristics and mitochondrial D-loop DNA mutations in hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol* 2004; **39**: 1063–1068.
- [150] TAMURA G, NISHIZUKA S, MAESAWA C, SUZUKI Y, IWAYA T, SAKATA K, ENDOH Y, MOTOYAMA T. Mutations in mitochondrial control region DNA in gastric tumours of Japanese patients. *Eur J Cancer* 1999; **35**: 316–319.
- [151] TAN DJ, BAI RK, WONG LJ. Comprehensive scanning of somatic mitochondrial DNA mutations in breast cancer. *Cancer Res* 2002; **62**: 972–976.
- [152] TAN DJ, CHANG J, LIU LL, BAI RK, WANG YF, YEH KT, WONG LJ. Significance of somatic mutations and content alteration of mitochondrial DNA in esophageal cancer. *BMC Cancer* 2006; **6**: 93.
- [153] TAN DJ, CHANG J, LIU LL, BAI RK, WANG YF, YEH KT, WONG LJ. Significance of somatic mutations and content alteration of mitochondrial DNA in esophageal cancer. *BMC Cancer* 2006; **6**: 93.
- [154] TANAKA M, FUKU N, NISHIGAKI Y, MATSUO H, SEGAWA T, WATANABE S, KATO K, YOKOI K, ITO M, NOZAWA Y, YAMADA Y. Women with mitochondrial haplogroup N9a are protected against metabolic syndrome. *Diabetes* 2007; **56**: 518–521.
- [155] TEMPERLEY RJ, SENECA SH, TONSKA K, BARTNIK E, BINDOFF LA, LIGHTOWLERS RN, CHRZANOWSKA-LIGHTOWLERS ZM. Investigation of a pathogenic mtDNA microdeletion reveals a translation-dependent deadenylation decay pathway in human mitochondria. *Hum Mol Genet* 2003; **12**: 2341–2348.
- [156] TONG BC, HA PK, DHIR K, XING M, WESTRA WH, SIDRANSKY D, CALIFANO JA. Mitochondrial DNA alterations in thyroid cancer. *J Surg Oncol* 2003; **82**: 170–173.
- [157] TSENG LM, YIN PH, CHI CW, HSU CY, WU CW, LEE LM, WEI YH, LEE HC. Mitochondrial DNA mutations and mitochondrial DNA depletion in breast cancer. *Genes Chromosomes Cancer* 2006; **45**: 629–638.
- [158] TSENG LM, YIN PH, TSAI YF, CHI CW, WU CW, LEE LM, LEE HC. Association between mitochondrial DNA 4,977 bp deletion and NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 C609T polymorphism in human breast tissues. *Oncol Rep* 2009; **21**: 1169–1174.
- [159] VAN TRAPPEN PO, CULLUPT, TROKE R, SWANN D, SHEPHERD JH, JACOBS IJ, GAYTHER SA, MEIN CA. Somatic mitochondrial DNA mutations in primary and metastatic ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 2007; **104**: 129–133.
- [160] VANDER POORTEN VL, BALMAJ, HILGERS FJ, TAN IB, KEUS RB, HART AA. Stage as major long term outcome predictor in minor salivary gland carcinoma. *Cancer* 2000; **89**: 1195–1204.
- [161] VEGA A, SALAS A, GAMBORINO E, SOBRIDO MJ, MACAULAY V, CARRACEDO A. mtDNA mutations in tumors of the central nervous system reflect the neutral evolution of mtDNA in populations. *Oncogene* 2004; **23**: 1314–1320.
- [162] VIVES-BAUZA C, GONZALO R, MANFREDI G, GARCIA-ARUMI E, ANDREU AL. Enhanced ROS production and antioxidant defenses in cybrids harbouring mutations in mtDNA. *Neurosci Lett* 2006; **391**: 136–141.
- [163] WALLACE DC. Mitochondria as chi. *Genetics* 2008; **179**: 727–735.
- [164] WALLACE DC. Mitochondrial DNA mutations in disease and aging. *Environ Mol Mutagen* 2010; **51**: 440–450.
- [165] WALLACE DC. A mitochondrial paradigm of metabolic and degenerative diseases, aging, and cancer: a dawn for evolutionary medicine. *Annu Rev Genet* 2005; **39**: 359–407.
- [166] WALLACE DC, ZHENG XX, LOTT MT, SHOFFNER JM, HODGE JA, KELLEY RI, EPSTEIN CM, HOPKINS LC. Familial mitochondrial encephalomyopathy (MERRF): genetic, pathophysiological, and biochemical characterization of a mitochondrial DNA disease. *Cell* 1988; **55**: 601–610.

- [167] WANEBO HJ, KONESS RJ, MACFARLANE JK, EILBER FR, BYERS RM, ELIAS EG, SPIRO RH. Head and neck sarcoma: report of the Head and Neck Sarcoma Registry. Society of Head and Neck Surgeons Committee on Research. *Head Neck* 1992; **14**: 1–7.
- [168] WANG Y, LIU VW, NGAN HY, NAGLEY P. Frequent occurrence of mitochondrial microsatellite instability in the D-loop region of human cancers. *Ann NY Acad Sci* 2005; **1042**: 123–129.
- [169] WANG Y, LIU VW, TSANG PC, CHIU PM, CHEUNG AN, KHOO US, NAGLEY P, NGAN HY. Microsatellite instability in mitochondrial genome of common female cancers. *Int J Gynecol Cancer* 2006; **16**: 259–266.
- [171] WARBURG O. On the origin of cancer cells. *Science* 1956; **123**: 309–314.
- [172] WHITFORD D. Proteins: Structure and Function. 2005.
- [173] LUETH M, LI XN, LAU CC, VOGEL H. Detection of mitochondrial DNA mutations in the tumor and cerebrospinal fluid of medulloblastoma patients. *Cancer Res* 2003; **63**: 3866–3871.
- [174] WONG LJ, TAN DJ, BAI RK, YEH KT, CHANG J. Molecular alterations in mitochondrial DNA of hepatocellular carcinomas: is there a correlation with clinicopathological profile? *J Med Genet* 2004; **41**: e65.
- [175] WU CW, YIN PH, HUNG WY, LI AF, LI SH, CHI CW, WEI YH, LEE HC. Mitochondrial DNA mutations and mitochondrial DNA depletion in gastric cancer. *Genes Chromosomes Cancer* 2005; **44**: 19–28.
- [176] XU B, CLAYTON DA. RNA-DNA hybrid formation at the human mitochondrial heavy-strand origin ceases at replication start sites: an implication for RNA-DNA hybrids serving as primers. *EMBO J* 1996; **15**: 3135–3143.
- [177] YACOUBI-LOUESLATI B, TROUDI W, BACCAR A, CHERNI L, RHOMDHANE KB, ELGAAIED AB. [Polymorphism of the mitochondrial microsatellite 303–315 in breast cancer in Tunisia]. *Bull Cancer* 2009; **96**: 337–342.
- [178] YANG Z, NIELSEN R. Mutation-selection models of codon substitution and their use to estimate selective strengths on codon usage. *Mol Biol Evol* 2008; **25**: 568–579.
- [179] YE C, GAO YT, WEN W, BREYER JP, SHU XO, SMITH JR, ZHENG W, CAI Q. Association of mitochondrial DNA displacement loop (CA)<sub>n</sub> dinucleotide repeat polymorphism with breast cancer risk and survival among Chinese women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2008; **17**: 2117–2122.
- [180] YEH JJ, LUNETTA KL, VAN ORSOUW NJ, MOORE FD, JR, MUTTER GL, VIJG J, DAHIA PL, ENG C. Somatic mitochondrial DNA (mtDNA) mutations in papillary thyroid carcinomas and differential mtDNA sequence variants in cases with thyroid tumours. *Oncogene* 2000; **19**: 2060–2066.
- [181] YU M, SHI Y, ZHANG F, ZHOU Y, YANG Y, WEI X, ZHANG L, NIU R. Sequence variations of mitochondrial DNA D-loop region are highly frequent events in familial breast cancer. *J Biomed Sci* 2008; **15**: 535–543.
- [182] YU M, ZHOU Y, SHI Y, NING L, YANG Y, WEI X, ZHANG N, HAO X, NIU R. Reduced mitochondrial DNA copy number is correlated with tumor progression and prognosis in Chinese breast cancer patients. *IUBMB. Life* 2007; **59**: 450–457.
- [183] ZHOU S, KACHHAP S, SUN W, WU G, CHUANG A, POETA L, GRUMBINE L, MITHANI SK, CHATTERJEE A, KOCH W, WESTRA WH, MAITRA A, GLAZER C, CARDUCCI M, SIDRANSKY D, MCFATE T, VERMA A, CALIFANO JA. 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.

*Redaktor prowadzący – Lilla Hryniewiecka*

*Otrzymano: 22.03.2010 r.*

*Przyjęto: 25.11. 2010 r.*

*dr n. med. Wojciech Kukwa*

*Klinika Otolaryngologii Oddziału Stomatologii WUM, Szpital Czerniakowski,*

*ul. Stępińska 19/25, 00-739 Warszawa*

*e-mail: wkukwa@yahoo.pl*