

Deregulacja rodziny białek BCL2 w chłoniakach B-komórkowych — implikacje molekularne, patogenetyczne, kliniczne i terapeutyczne

Deregulation of BCL2 family proteins in B-cell lymphomas — molecular, pathogenetic, clinical and therapeutic implications

Przemysław Kiliszek, Przemysław Juszczynski

Pracownia Hematologii Doświadczalnej, Zakład Diagnostyki Hematologicznej,
Instytut Hematologii i Transfuzjologii, Warszawa

Streszczenie

Zdolność różnicujących się limfocytów B do odpowiedzi na sygnały apoptotyczne jest niezbędna do utrzymania homeostazy układu immunologicznego. Zaburzenia w przewodzeniu i przetwarzaniu sygnałów apoptotycznych stanowią zachwianie tej równowagi i potencjalnie są onkogenne. Białka z rodziny BCL2 są kluczowymi regulatorami apoptozy, a ich zaburzona ekspresja jest częstą cechą nowotworów wywodzących się z limfocytów B. Deregulacja ekspresji białek z tej rodziny jest nie tylko istotną zmianą sprzyjającą inicjacji nowotworów limfocytów B, ale również ułatwiająca przeżycie komórek nowotworowych. Z klinicznego punktu widzenia zaburzona ekspresja białek należących do rodziny BCL2 przyczynia się do chemiooporności komórek nowotworowych i wiąże się z gorszymi wynikami leczenia. Zatem farmakologiczna modulacja zaburzonych mechanizmów regulacyjnych apoptozy zależnych od białek z rodziny BCL2 może stanowić racjonalną strategię leczniczą w chłoniakach, które wykazują nieprawidłowości w przebiegu tego procesu. Obecnie do badań klinicznych wchodzi nowe związki, które mogą obniżyć nadmierną ekspresję BCL2 lub modulować interakcje między białkami z tej rodziny. W niniejszej pracy podsumowano informacje na temat molekularnych mechanizmów deregulacji białek BCL2 oraz ich biologicznych i klinicznych konsekwencji dla nowotworów wywodzących się z limfocytów B oraz przedstawiono dotychczasowe wyniki badań klinicznych.

Słowa kluczowe: chłoniaki B-komórkowe, BCL2, terapia celowana

Hematologia 2012; 3, 4: 288–301

Abstract

Ability of differentiating B-cells to respond to death signals is essential for the maintenance of immune system homeostasis. Abnormalities in the execution of these signals are therefore dangerous and potentially oncogenic. BCL2 (B-cell CLL/lymphoma 2) family proteins act as a critical regulators of apoptosis. The BCL2 family consist of pro-survival and pro-apoptotic proteins, playing distinct roles in the transduction of death signals. Deregulated expression of these proteins is a frequent feature of B-cell tumors and might occur through structural and

functional mechanisms. Aberrant expression of these proteins is an important lesion for initiation of B-cell tumors but also facilitating survival of tumor cells. Clinically, abnormal expression of BCL2 family members contribute to chemoresistance of tumor cells and is associated with inferior survival. Given the role of BCL2 protein family and their clinical implications for B-cell tumor biology, pharmacological targeting in BCL2 family is a particularly rational strategy. Therapeutic agents developed to restore the BCL2 family-dependent life-death decisions are now entering clinical trials. These new drugs can either decrease the abundance of BCL2 family proteins by antisense-mediated mechanisms or modulate the interactions between proteins, such as small molecule BH3 mimetics and stapled peptides. Herein, we review the molecular mechanism of BCL2 family deregulation, its consequences for the biology and clinical behavior of B-cell tumors and discuss the results of available clinical trials.

Key words: B-cell lymphomas, BCL2, targeted therapy

Hematologia 2012; 3, 4: 288–301

Wprowadzenie

Utrzymanie homeostazy układu immunologicznego zależy od zdolności jego komórek do swoistej i natychmiastowej odpowiedzi na antygeny, od eliminacji niepotrzebnych bądź nieprawidłowych komórek w procesie programowanej śmierci komórki (apoptozy) oraz od zakończenia odpowiedzi odpornościowej we właściwym czasie. Eliminacja potencjalnie niebezpiecznych komórek jest szczególnie istotna w utrzymaniu równowagi B-komórkowej. Po kontakcie limfocyta B z antygenem, zaczyna on proliferować i tworzyć centrum germinalne (GC, *germinal center*) w grudce chłonnej. Centrum germinalne jest wyspecjalizowaną strukturą, w której następuje edycja genów kodujących immunoglobuliny (Ig). Rezultatem tego procesu jest wytworzenie wielu klonów limfocytów B zdolnych do produkcji przeciwciał o zwiększonym powinowactwie do antygeny. Biorąc pod uwagę losowy charakter tego procesu, zmiany w sekwencji nukleotydów mogą prowadzić do nieproduktywnych edycji Ig i utraty ekspresji receptora komórek B (BCR, *B-cell receptor*), zredukowania powinowactwa Ig do antygenów czy powstania potencjalnie autoreaktywnych przeciwciał. Takie komórki, z bezproduktywnymi lub potencjalnie szkodliwymi wariantami Ig, są eliminowane poprzez ściśle kontrolowany proces apoptozy [1, 2]. Zaburzenia w mechanizmach ułatwiających eliminację nieprawidłowych komórek są szczególnie niebezpieczne dla prawidłowego przebiegu reakcji germinalnej i potencjalnie onkogenne.

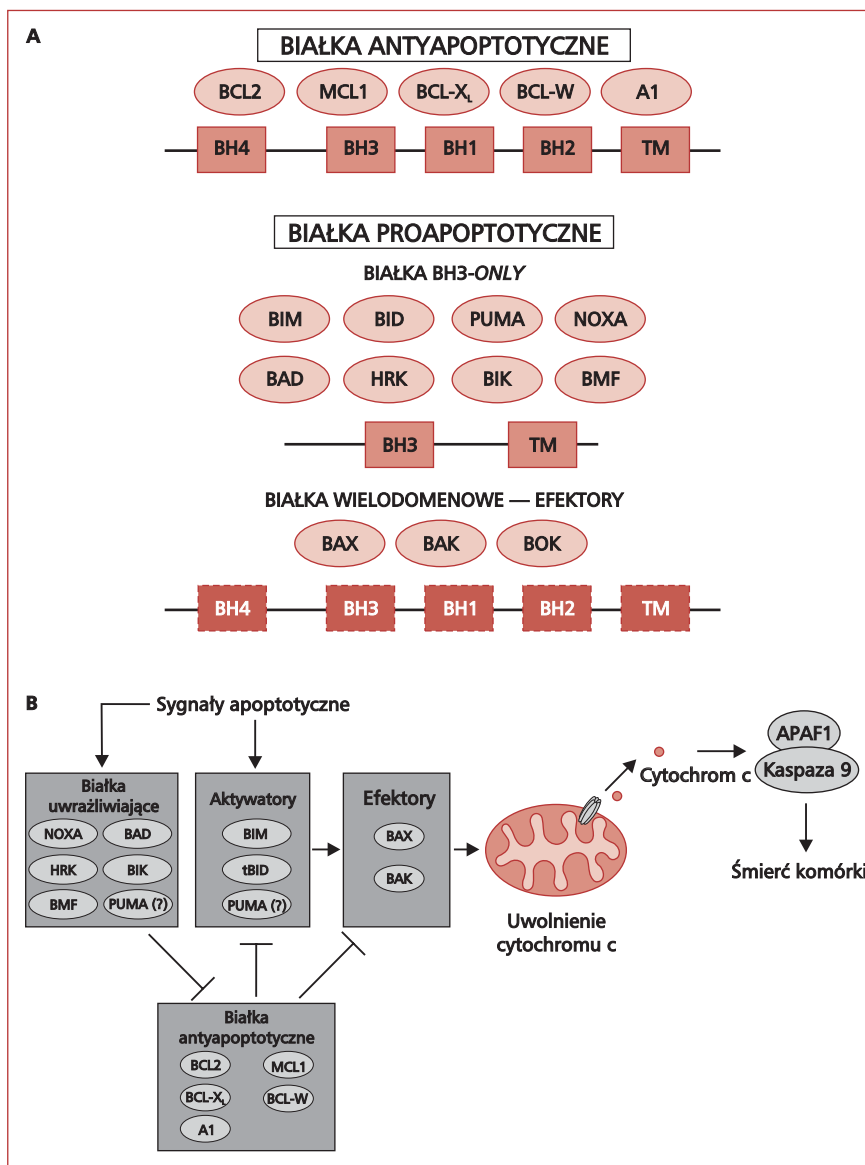
Białka należące do rodziny BCL2 (*B-cell CLL/lymphoma 2*) odgrywają kluczową rolę w regulacji apoptozy. Mimo podobnej struktury różne białka pełnią odrębne funkcje w regulacji tego procesu. Białka te mogą blokować sygnały apoptotyczne lub

wpływać na zwiększenie przepuszczalności zewnętrznej błony mitochondrialnej, uwolnienie cytochromu c, aktywację kaspaz i śmierć komórki [3–6]. Deregulacja białek BCL2 może ułatwić przeżycie komórek z takimi zmianami i stanowi częstą cechę chłoniaków B-komórkowych. Z tego względu białka BCL2 mogą być skutecznym celem farmakologicznej interwencji, a nowe modulatory białek z rodziny BCL2 są obecnie testowane w badaniach klinicznych.

W niniejszym artykule podsumowano molekularne aspekty działania białek z rodziny BCL2, przedstawiono patogenetyczne mechanizmy związane z deregulacją ich ekspresji oraz omówiono nowe strategie terapeutyczne modulujące ich działanie, które są obecnie testowane w nowotworach B-komórkowych.

Struktura i funkcja białek z rodziny BCL2

Białka z rodziny BCL2 mogą hamować lub też inicjować śmierć komórki bezpośrednio lub pośrednio poprzez aktywację innych białek zaangażowanych w apoptozę (ryc. 1A). Podgrupa białek antyapoptotycznych zawiera białka BCL2, BCL-X_L, MCL1, BCL-W i BFL1/A1, które składają się z czterech domen BCL2-homologicznych (BH) i domeny transmembranowej (TM) [7]. Proapoptotyczne białka mają albo tylko pojedynczą domenę BH3 (BID, BIM, PUMA, BAD, BIK, NOXA, HRK i BMF) lub strukturę wielodomenową (BAX, BAK i BOK). Wielodomenowe proapoptotyczne białka (BAX, BAK) otwierają mitochondrialny szlak apoptozy. W wyniku allosterycznej aktywacji przez aktywatory mające tylko domenę BH3, BAX i BAK, oligomeryzują, tworząc kanały zwiększające przepuszczalność błony mitochondrialnej, uwalniając cytochrom c,



Rycina 1A. Wielodomenowe białka antyapoptotyczne (BCL2, BCL-X_L, MCL1, BCL-W i BFL1/A1) składają się z 4 domen BCL2-homologicznych (BH) i 1 domeny transmembranowej (TM). Wielodomenowa podgrupa białek proapoptotycznych (BAX, BAK and BOK) ma do 4 domen BH oraz opcjonalnie domenę TM. Podgrupa białek proapoptotycznych o pojedynczej domenie BH3 (BH3-only) zawiera białka BID, BIM, PUMA, BAD, BIK, NOXA, HRK i BMF; **B.** Przewodzenie sygnału apoptotycznego jest regulowane przez interakcje między białkami z rodziny BCL2. Sygnały apoptotyczne są odbierane i przekazywane przez dwie różne podklasy białek BH3-only. Podklasa aktywatorów jest odpowiedzialna za aktywację efektorów (BAX i BAK) skutkującą zmianą przepuszczalności zewnętrznej błony mitochondrialnej, prowadząc do śmierci komórki. Podklasa białek uwrażliwiających działa jako antagonist antyapoptotycznych białek, które mogą „wiązać” aktywatory lub aktywowane monomeryczne efekторы, przez co białka kluczowe dla przewodzenia sygnału apoptotycznego nie mogą wchodzić ze sobą w interakcje

Figure 1A. The pro-survival multidomain proteins (BCL2, BCL-X_L, MCL1, BCL-W and BFL1/A1) consist of four BCL2 homology (BH) domains and one transmembrane domain (TM). The pro-apoptotic multidomain subgroup (BAX, BAK and BOK) possess up to four BH domains with or without TM domain. The single BH domain subgroup (BH3-only proteins) include BID, BIM, PUMA, BAD, BIK, NOXA, HRK and BMF proteins; **B.** The transduction of apoptotic signal is regulated by multiple interactions between BCL2 family members. The stress/death signal is first sensed and transduced by 2 different subclasses of BH-3 only proteins. The activator subclass is responsible for activation of effectors (BAX and BAK) and subsequent mitochondrial outer membrane permeabilization, leading to cell death. The sensitizer subclass act as antagonist of pro-survival proteins, which may sequester activators and activated monomeric effectors, so that the key transducing proteins cannot interact with each other

aktywując kaspazy i powodując śmierć komórki (ryc. 1B) [7, 8]. Antyapoptotyczne białka zapobiegają przewodzeniu sygnału proapoptotycznego poprzez związanie się z aktywatorami i aktywowanymi białkami efektorowymi [7, 9]. Natomiast białka mające jedynie domenę BH3 funkcjonują jako czujniki stresu komórkowego i, w wyniku potranslacyjnych modyfikacji lub podwyższonej transkrypcji, przenoszą sygnał proapoptotyczny do wielodomenowych pro- i antyapoptotycznych białek BCL2. Interakcje te zachodzą przy współdziałaniu szczeliny na wielodomenowych białkach funkcjonujących jako miejsce dokowania α -helikalnej domeny BH3 aktywatorów [8, 10, 11].

Mechanizmy deregulacji białek z rodziny BCL2 w patogenezie chłoniaków

Białko BCL2

Białko BCL2 jest pierwszym poznany antyapoptotycznym białkiem z rodziny BCL2 sklonowanym z translokacji t(14;18) u chorych na chłoniaka grudkowego (FL, *follicular lymphoma*) [8, 12]. Podczas prawidłowego rozwoju komórki B, po zapoczątkowaniu reakcji germinalnej, BCL2 ulega represji przez BCL6 (*B-cell CLL/lymphoma 6*) i MIZ1 (*Myc-interacting zinc finger protein 1*), ułatwiając w ten sposób apoptozę germinalnych komórek B z niewłaściwym BCR [1, 13]. Po zakończeniu reakcji germinalnej komórki B podlegają dalszemu różnicowaniu w komórki plazmatyczne i komórki pamięci, a BCL2 ulega reekspresji. Zaburzenia strukturalne dotyczące BCL2, takie jak t(14;18), wpływają na zachwianie tej równowagi w obrębie GC. Translokacja umieszczająca onkogen *BCL2* pod kontrolą sekwencji wzmacniającej E μ genu immunoglobulinowego przerywa fizjologiczną kontrolę nad ekspresją BCL2 i w konsekwencji komórki z takimi zmianami są odporne na różne sygnały apoptotyczne. Translokacja t(14;18) dotycząca *BCL2* występuje również w chłoniaku rozlanym z dużych komórek B (DLBCL, *diffuse large B-cell lymphoma*) [14, 15]. W obu wymienionych sytuacjach punkty złamań leżą w pobliżu segmentów regionu J (*joining*) łańcucha ciężkiego (IgH) lub przylegają do połączeń regionów D (*diversity*) i J IgH. Pęknięcia te często charakteryzują się utratą nukleotydów na końcach segmentów J i D oraz losowym dodaniem nukleotydów, co jest typową cechą rekombinacji VDJ (*variable, diversity, joining*) [16, 17]. Obserwacje te wskazują, że opisane translokacje pojawiają się wskutek błędnej rekombinacji VDJ na etapie rozwoju limfocytu pro-B w szpiku kostnym [16]. Ponieważ FL i DLBCL pochodzą z germinalnych ko-

mórek B, to gen fuzyjny *BCL2-IgH* i nadekspresja białka BCL2 wydają się pierwszym krokiem w patogenezie tych nowotworów, a kolejna zmiana inicjująca pełen fenotyp nowotworowy zachodzi w GC. Translokacja t(14;18) jest spotykana również u zdrowych osób, co sugeruje, że sam gen *BCL2* jest słabym onkogenem [18]. Zgodnie z tymi obserwacjami u transgenicznych myszy z ekspresją genu *Bcl2* rozwija się masywna grudkowa hiperplazja bez cech charakterystycznych dla FL [19], lecz z czasem często dochodzi do histologicznej progresji do agresywnego chłoniaka [20].

W ludzkich chłoniakach ekspresja białka BCL2 nie zawsze jest ściśle skorelowana z nadekspresją genu i odwrotnie — zwiększony poziom białka BCL2 nie zawsze jest spowodowany translokacją t(14;18) [21]. Obserwacje te wskazują, że rearanżacje genu *BCL2* nie są jedynym mechanizmem prowadzącym do deregulacji ekspresji BCL2 [22]. W chłoniakach DLBCL nadekspresja białka BCL2 może wynikać z powielenia genu *BCL2* niezależnie od t(14;18) [23]. W przewlekłej białaczce limfocytowej (CLL, *chronic lymphocytic leukemia*) rozregulowana ekspresja białka BCL2 może wynikać z hipometylacji promotora genu kodującego białko [24] lub z występującej częściej potranslacyjnej regulacji związanej z określonymi mikroRNA. Utrata mikroRNA miR-15a i miR-16-1 skierowanego przeciwko BCL2 w komórkach CLL jest związana z wyższą ekspresją tego białka u około 70% chorych [25, 26]. Dodatkowo, poza strukturalnymi/genetycznymi oraz epigenetycznymi/potranslacyjnymi mechanizmami deregulującymi poziom białka BCL2, jego ekspresja może zależeć od szlaków sygnałowych, które są stale aktywne w niektórych typach chłoniaków. Aktywność czynnika transkrypcyjnego NF κ B (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*) w chłoniaku DLBCL może być takim mechanizmem funkcjonalnym, wzmacniającym ekspresję białka BCL2 [27, 28]. Co więcej, niektóre typy chłoniaka DLBCL utraciły mechanizm fizjologicznej supresji BCL2 poprzez BCL6/MIZ1 z powodu zaburzeń w ekspresji MIZ1 lub hipermutacji promotora *BCL2*. Mechanizmy te mogą przyczyniać się do około 50% przypadków patologicznej ekspresji BCL2 towarzyszącej BCL6 u chorych bez translokacji BCL2 [13].

Z klinicznego punktu widzenia ekspresja białka BCL2 (definiowana zwykle jako obecność barwienia BCL2 w $\geq 50\%$ komórek nowotworowych) jest związana ze złym rokowaniem u chorych leczonych standardową chemioterapią według schematu CHOP (cyklofosfamid, winkrystyna, doksorubicyna, prednizon) [29, 30]. U chorych, u których zasto-

sowano połączenie chemioterapii z rytuksymabem, ekspresja białka BCL2 jest również związana z gorszym rokowaniem, zwłaszcza w podtypie GCB (*GC B-cell like*) chłoniaka DLBCL zdefiniowanym na podstawie profilu ekspresji genów [31, 32]. Badania te wskazują również na istotną rolę zmian molekularnych towarzyszących deregulacji BCL2, zwłaszcza deregulacji białka MYC (*v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog, avian*). Biorąc pod uwagę współdziałanie BCL2 i MYC, nowotwory z równoczesną deregulacją obu tych onkogenów mają szczególnie agresywny przebieg [31]. Również w innych nowotworach, w tym w klasycznym chłoniaku Hodgkina (HL, *Hodgkin lymphoma*), BCL2 jest biomarkerem gorszego rokowania [33].

Białko MCL1

Podobnie jak BCL2, MCL1 (*myeloid cell leukemia sequence 1*) jest antyapoptotyczną proteiną o strukturze wielodomenowej, ale wykazującą odmienną charakterystykę niż BCL2. W przeciwieństwie do białka BCL2, które nie występuje w GC grudki chłonnej, a ulega ekspresji w limfocytach strefy płaszcz, MCL1 ulega ekspresji w limfocytach germinalnych. Ekspresja Mcl1 w limfocytach B po immunizacji u myszy jest niezbędna do prawidłowego przebiegu reakcji germinalnej, a wyłączenie tego genu powodowało brak limfocytów B zdolnych do produkcji swoistych dla immunizującego antygeny przeciwciał IgG1 [34, 35]. W przeciwieństwie do *BCL2*, *MCL1* jest silniejszym onkogenem, a jego wymuszona ekspresja prowadzi do rozwoju FL i DLBCL [36].

Charakterystyczną cechą MCL1 jest jego szybka regulacja i z tego powodu uważa się, że MCL1 odgrywa kluczową rolę w regulacji apoptozy w odpowiedzi na zmieniające się sygnały środowiskowe [37]. Ekspresja MCL1 jest szybko indukowana poprzez kontrolę transkrypcji, translacji i stabilności białka przy udziale czynników wzrostu i szlaków antyapoptotycznych, takich jak szlak AKT-mTORC1 (*v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1 — mechanistic target of rapamycin serine/threonine kinase complex 1*) [38]. Nadmiar białka MCL1 jest regulowany poprzez poliubikwitynację i degradację w proteasomie, w odpowiedzi na sygnały proapoptotyczne i poprzez fosforylację zależną od kinazy syntazy glikogenu (GSK3, *glycogen synthase kinase*) [39, 40]. Proteosomalna degradacja MCL1 może być zablokowana przez enzym USP9X (*ubiquitin specific peptidase 9, X-linked*), który stabilizuje MCL1, odwracając jego poliubikwitynację [41]. Białko MCL1 może również ulegać proteolizie pod wpływem kaspazy i granzymu B, które degradują MCL1 podczas apoptozy [42–44].

Ten funkcjonalny model deregulacji MCL1 jest często wykorzystywany przez komórki nowotworowe, w których dochodzi do konstytutywnej aktywacji szlaków sygnałowych wpływających na ekspresję MCL1. W CLL ekspresję MCL1 w komórkach białaczkowych mogą indukować sygnały mikrośrodowiskowe. Indukcja MCL1 w komórkach CLL zachodzi przy współdziałaniu komórek opiekuńczych i receptora CXCR4 (*C-X-C motif receptor 4*), gdyż jego blokada przez inhibitor AMD3100 obniżała poziom MCL1 i uwrażliwiła komórki CLL na apoptozę wywołaną chemioterapią [45]. W innych nowotworach, w tym w ALK+ chłoniaku anaplastycznym z dużych komórek (ALK+ ALCL, *anaplastic lymphoma kinase — positive anaplastic large cell lymphoma*) i w chłoniaku z komórek płaszcz (MCL, *mantle cell lymphoma*), ekspresja MCL1 może zależeć od konstytutywnej aktywności kinazy mTOR, [46, 47]. Inhibitor kinazy mTOR obniża poziom MCL1 w chłoniakowych liniach komórkowych i uwrażliwia komórki białaczki limfoblastycznej B-komórkowej na glikokortykosteroidy w mechanizmie zależnym od MCL1 [48]. Stabilność białka MCL1 i jego poziom ekspresji mogą być również rozregulowane przez zahamowanie aktywności kinazy GSK-3. Aktywna kinaza syntazy glikogenu 3 (GSK-3, *glycogen synthase kinase-3*) nasila degradację białka MCL1 poprzez jego fosforylację [49], ułatwiając interakcję z białkiem FBXW7 (*F-box and WD repeat domain containing 7*), co prowadzi do poliubikwitynacji MCL1 oraz degradacji [50]. Inaktywacja białka PTEN (*phosphatase and tensin homolog*), prowadząca do wyższej aktywności AKT (*v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1*) i inaktywacji GSK-3, lub utrata FBXW7 może odpowiadać za zwiększenie stabilności MCL1 w niektórych nowotworach [51, 52]. Poza szlakami sygnałowymi pośredniczącymi w zwiększonej transkrypcji MCL1 lub regulującymi stabilność tego białka w niektórych nowotworach MCL1 może być regulowane poprzez mikroRNA. W chłoniakach ALCL ALK+ obniżona ekspresja miR-29a, regulującego stabilność mRNA dla MCL1, wiąże się z podwyższeniem ekspresji MCL1 [53]. Ekspresja miR-29a/b/c jest często obniżona w MCL, zwłaszcza u chorych z gorszym rokowaniem i również wiąże się z wyższą ekspresją MCL1 [54].

Ekspresja MCL1 w nowotworach układu chłonnego wiąże się z niższym odsetkiem całkowitych remisji po chemioterapii [55]. W CLL ekspresja tego białka jest związana z większą opornością na fludarabinę i rytuksymab oraz bardziej agresywnym przebiegiem choroby [56, 57]. Podobnie u chorych ze szpiczakiem plazmocytowym (PCM, *plasma cell*

myeloma) i nadekspresją białka MCL1 częściej dochodzi do nawrotów choroby, a czas ich przeżycia jest krótszy niż pacjentów bez ekspresji MCL1 [58]. Wysoka ekspresja MCL1 w centroblastach w FL wiąże się z gorszym rokowaniem i krótszym przeżyciem całkowitym, niezależnie od stopnia agresywności histologicznej FL i międzynarodowego wskaźnika prognostycznego (ISS, *International Staging System*) [59].

Białka z pojedynczą domeną BH3

Proapoptotyczne białka z pojedynczą domeną BH3 (*BH3-only*) funkcjonują jako wzmacniacze sygnału apoptotycznego lub aktywatory szlaku programowanej śmierci komórki [7]. Rolę w utrzymaniu homeostazy układu immunologicznego w przypadku białek *BH3-only* najlepiej zdefiniowano w odniesieniu do białka BIM. U myszy pozbawionych białka *Bim* występują kilkukrotny wzrost liczby limfocytów B i T oraz towarzysząca systemowa toczniopodobna choroba autoimmunologiczna [60]. Limfocyty B z wyłączoną ekspresją BIM są niewrażliwe na apoptozę indukowaną przez ligację BCR — sygnał, który przy braku współdziałania komórek T prowadzi do eliminacji potencjalnie autoreaktywnych limfocytów. Mimo tak istotnej funkcji BIM w utrzymaniu homeostazy B-komórkowej u myszy pozbawionych tego genu chłoniaki rozwijają się dość rzadko [61]. Jednak gdy utrata pojedynczego allelu genu *Bim* towarzyszy nadekspresji genu *Myc*, to rozwój choroby ulega dramatycznemu przyspieszeniu [61]. Inne białka *BH3-only*, takie jak PUMA i BAX, wykazują podobną aktywność, a ich delecja przyspiesza powstanie chłoniaków indukowanych przez MYC [62, 63].

W układzie krwiotwórczym, aktywność BIM jest kontrolowana zarówno na poziomie transkrypcyjnym, jak i potranskrypcyjnym przez czynniki wzrostu i cytokiny za pośrednictwem szlaków JNK (*Jun N-terminal kinase*), AKT i ERK (*extracellular signal-regulated kinase*), które obniżają ekspresję BIM i działają antyapoptotycznie [64–66]. Regulowana przez AKT rodzina białek FOXO (*forkhead box O*) jest kluczowym regulatorem transkrypcyjnym białka BIM [67, 68]. W odpowiedzi na działanie cytokin/czynnika wzrostu fosforylacja za pośrednictwem AKT inicjuje eksport FOXO1 i FOXO3 poza jądro komórkowe i ich transkrypcyjną inaktywację. Wycofanie tych antyapoptotycznych sygnałów aktywuje FOXO i powoduje ekspresję BIM. Konstitutywna aktywność szlaku AKT w niektórych chłoniakach może zatem hamować transkrypcję BIM i obniżyć wrażliwość na działanie chemioterapeutyków [69, 70].

Innym szlakiem, który reguluje poziom BIM w komórkach chłoniakowych, jest fosforylacja poprzez

kinazy MEK (*mitogen-activated protein kinase*) i ERK, która wpływa na interakcje między BIM a innymi białkami z rodziny BCL2 i przyspiesza jego degradację. Po ekspozycji komórki na interleukinę 3 (IL-3) lub BAFF (*B-cell-activating factor*) fosforylacja BIM zachodząca za pośrednictwem ERK gwałtownie redukuje interakcje BIM/BAX na błonie mitochondrialnej i obniża poziom białka BIM [71]. W wystymulowanych mitogenem komórkach B oraz T farmakologiczna inhibicja szlaku sygnałowego MEK/ERK zwiększyła poziom białka BIM i wywołała apoptozę. Dostępne klinicznie małowczątkowe inhibitory MEK uwrażliwiają komórki na działanie konwencjonalnych chemioterapeutyków co najmniej częściowo poprzez zmniejszenie ekspresji BIM [72, 73]. Inaktywacja BIM w chłoniakach może przebiegać również według innych scenariuszy, takich jak zmiany strukturalne i epigenetyczne. W MCL BIM może być wyciszony poprzez homozygotyczną delecję genu, natomiast w chłoniaku Burkitta (BL, *Burkitt lymphoma*) — poprzez metylację promotora [74, 75]. Hipermetylacja genu *BIM* jest związana z bardziej agresywnym przebiegiem choroby u pacjentów z BL i ich opornością na chemioterapię [75]. Zastosowanie środków demetylujących lub inhibitorów deacetylaz histonowych (HDACi, *histone-deacetylase inhibitors*) uwrażliwiło komórki na doksorubicynę proporcjonalnie do poziomu BIM [75]. Analogicznie do innych białek z rodziny BCL2, ekspresja BIM może być regulowana poprzez mikroRNA. Poziom białka BIM zależy od obecności miR-181a, które zmniejsza jego ekspresję w MCL, DLBCL oraz FL. W wyniku interakcji między grudkowymi komórkami dendrytycznymi (FDC, *follicular dendritic cells*) a komórkami chłoniaków B-komórkowych dochodzi do indukcji ekspresji miR-181a, a w konsekwencji do zmniejszenia poziomu BIM [76]. Ekspresja *BIM* w komórkach B jest również bezpośrednim celem mikroRNA należących do klastra miR-17~92 [77].

Deregulacja innych białek *BH3-only* może również odgrywać patogenetyczną rolę w ludzkich nowotworach komórek B. Mutacje w sekwencji kodującej genu *BIK* występują w 11–15% ludzkich chłoniaków B-komórkowych, a mutacje regionów intronowych genu *BIK* były jeszcze częstsze i występowały nawet w 53% tych nowotworów [78]. Proapoptotyczne funkcje BIK są ważne dla aktywności niektórych chemioterapeutyków stosowanych w leczeniu nowotworów układu chłonnego, w tym inhibitora proteasomu, doksorubicyny czy inhibitora kinaz zależnych od cyklin (*CDK cyclin-dependent kinase*) [79–81]. W małym badaniu dotyczącym 31 pierwotnych chłoniaków ośrodkowego układu

nerwowego (PCNSL, *primary central nervous system lymphoma*) gen kodujący inne białko BH3-only — *HRK* ulegał hipermetylacji w regionie promotora lub egzonu 1 u 31% chorych. Te epigenetyczne zmiany były często związane z obniżonym poziomem ekspresji białka i krótszym czasem przeżycia wolnym od choroby [82].

W przypadku innych proapoptotycznych białek BH3-only mechanizmy prowadzące do utraty ekspresji w nowotworach komórek B są słabiej zdefiniowane, natomiast konsekwencje zmienionego poziomu tych białek poznano przynajmniej w odniesieniu do części z nich. W chłoniakach E μ -*Myc* współdziałanie białek PUMA, NOXA i BIM jest kluczowe dla optymalnej odpowiedzi apoptotycznej komórek chłoniakowych na cyklofosfamid i etopozyd [83]. Białko NOXA jest zaangażowane w apoptozę wywołaną przez HDACi i inhibitory proteasomu [84, 85]. W komórkach MCL wyciszenie genu *NOXA* za pomocą interferencji RNA znacząco zmniejszyło wrażliwość na bortezomib wskazując, że NOXA jest prawdopodobnie kluczowym ogniwem między inhibicją proteasomu a depolaryzacją mitochondriów [85]. Eliminacja genu *Puma* kodującego białko BH3-only, które pośredniczy w zależnej od p53 apoptozie wywołanej uszkodzeniem DNA [86], znacząco przyspieszyło rozwój chłoniaków wywołanych przez MYC [87]. Niska ekspresja tych białek wiąże się ze słabą odpowiedzią na środki uszkadzające DNA lub specyficzne inhibitory kompleksów białkowych mTORC1/mTORC2 [88, 89].

Bloki apoptotyczne jako funkcjonalne konsekwencje deregulacji ekspresji białek z rodziny BCL2 w chłoniakach

Chociaż białka BCL2 mają podobne cechy budowy, to różnią się znacznie regulacją, rolą fizjologiczną oraz rolą patogenetyczną w chłoniakach komórek B. Jednoczesna ekspresja lub utrata różnych białek BCL2 wykazujących różne powinowactwo do innych białek z tej rodziny dodatkowo komplikuje poznanie i zrozumienie konsekwencji tych zmian w określonym przypadku. Złożoność tego systemu może zostać zbadana dzięki strategii „profilowania BH3”. Zasadą profilowania BH3 jest ekspozycja oczyszczonych mitochondriów na serię peptydów otrzymanych z domeny BH3 białek BH3-only. Zdolność tych peptydów do indukcji przepuszczalności błony mitochondrialnej mierzy się na podstawie uwolnienia cytochromu c. Po zbadaniu układu oddziaływania uwrażliwiających peptydów BH3, indukujących uwolnienie cytochromu c, można scharakteryzować naturę bloków apoptotycznych w komór-

ce [9]. Pierwszy typ bloku jest spowodowany przez brak nadrzędnych aktywatorów BAX, na przykład utratę BIM. W drugim typie brak uwolnienia cytochromu c wynika z braku białek efektorowych, takich jak BAX czy BAK. Trzeci typ jest związany z nadmiarem antyapoptotycznych białek z rodziny BCL2, takich jak BCL2 czy MCL1 [9]. Ten typ bloku, najczęstszy w komórkach chłoniakowych, jest szczególnie interesujący, gdyż odnosi się do komórek, które w celu przeżycia zwiększyły poziom BCL2 lub innych białek antyapoptotycznych w odpowiedzi na nieustanne sygnały proapoptotyczne [7]. W rezultacie nadmierna ilość BCL2 inaktywuje białka proapoptotyczne i zapobiega śmierci komórki. Z uwagi na czynnościową równowagę tych antagonistycznych sygnałów takie komórki są w stanie stacjonarnym na krawędzi śmierci (*primed for death*) [7, 9]. W takiej sytuacji zaburzenie tej równowagi może popchnąć komórki do apoptozy. Komórki z deregulacją nadrzędnych szlaków sygnałowych lub z niesprawnymi białkami efektorowymi są natomiast bardziej odporne na chemioterapię [9]. Ten typ bloku apoptotycznego pozwala skutecznie przewidzieć wrażliwość na antagonistów białek antyapoptotycznych z rodziny BCL2 oraz wrażliwość na konwencjonalne chemioterapeutyki, takie jak etopozyd, winkrystyna czy adriamycyna [9].

Farmakologiczna interwencja w funkcjonalne mechanizmy związane z rodziną białek BCL2

Antysensowne oligonuklotydy

Antysensowne oligonuklotydy reprezentują jedną z najwcześniejszych strategii skierowanych na modulowanie ekspresji białek BCL2 *in vitro* i *in vivo*. Oblimersen jest oligonukleotydem antysensownym, tworzącym kompleksy z mRNA BCL2, co prowadzi do aktywacji RNAazy H i enzymatycznego pocięcia heterodupleksu i degradacji mRNA BCL2 [90, 91]. Ponieważ oligonukleotydy antysensowne są wrażliwe na działanie komórkowych nukleaz, to, aby zapobiec ich degradacji, poddaje się je chemicznym modyfikacjom zwiększającym ich stabilność *in vivo*. [92]. Poza specyficzną aktywnością oblimersenu obniżającą nadmiar mRNA BCL2 ten antysensowny oligonukleotyd może również wykazywać działanie immunomodulujące, wynikające z obecności dwóch motywów CpG [93]. Aktywność oblimersenu testowano w randomizowanych badaniach klinicznych III fazy u pacjentów z oporną na konwencjonalne leczenie lub nawracającą CLL. Chorzy otrzymywali fludarabinę z cyklofosfamidem (FC) lub FC w połączeniu z oblimersenem. Odpo-

wiedź całkowitą osiągnięto u znacznie większego odsetka chorych leczonych kombinacją FC-oblimersen niż samą terapią FC [94]. Największą korzyść wynikającą z zastosowanego połączenia obserwowano u chorych wrażliwych na fludarabinę, u których uzyskano całkowitą lub częściową remisję. Wśród tych chorych odsetek 5-letnich przeżyć był istotnie wyższy [95]. Chociaż cytogenetyczne analizy w tym badaniu nie były wykonywane rutynowo, to chorzy, którzy byli wrażliwi na fludarabinę i odnieśli największą korzyść z zastosowania oblimersenu, najprawdopodobniej nie posiadali zmian w obrębie p53/ATM (*ataxia teleangiectasia mutated*), co sugeruje, że za ten efekt kliniczny odpowiada jednoczesna aktywacja indukowanej chemioterapią apoptozy zależnej od p53 i inhibicja BCL2 [96]. Zastosowanie oblimersenu wraz z rytuksymabem oceniano również w badaniu klinicznym II fazy u chorych z nawracającymi/opornymi chłoniakami B-komórkowymi. Połączenie to było dobrze tolerowane i przyniosło ogółem 18 odpowiedzi (42%), w tym 10 odpowiedzi całkowitych i 8 częściowych. U 12 chorych (28%) odnotowano minimalną odpowiedź lub stabilizację choroby. Trzech chorych odpowiadających na terapię było uprzednio opornych na rytuksymab [97]. W innych badaniach klinicznych III fazy, w tym w zaawansowanym PCM, połączenie oblimersenu i deksametazonu nie poprawiło wyników leczenia w stosunku do monoterapii deksametazonem [98].

Ograniczona aktywność oblimersenu w badaniach klinicznych w nowotworach układu chłonnego może mieć kilka przyczyn. Oligonukleotyd ten nie jest uniwersalnym inhibitorem wszystkich antyapoptotycznych białek BCL2, a jedynie obniża poziom mRNA BCL2, zatem obecność innych białek może częściowo kompensować ubytek BCL2 [7, 99]. Ponadto wynikający z zastosowania oblimersenu stopień zmniejszenia ekspresji białka BCL2 w tkankach nowotworu może nie wystarczać do wyłączenia funkcji BCL2 i osiągnięcia skuteczności klinicznej tego leku [7, 100].

Modulacja interakcji między białkami z rodziny BCL2

Pro- lub antyapoptotyczne działanie białek z rodziny BCL2 wynika z interakcji między α -helisą BH3 jednego białka i szczeliną służącą jako miejsce receptorowe na wielodomenowym białku. Dobrze scharakteryzowana natura tych interakcji wraz z określonymi profilami łączenia się białek pozwala na zaprojektowanie celowanych modulatorów — peptydów lub małowcząsteczkowych związków działających jako inhibitory lub mimetyki. Syntetyczne peptydy wykazują małą stabilność, słabą penetrację

do przedziałów wewnątrzkomórkowych, niewłaściwe fałdowanie i strukturę przestrzenną, co skutkuje ich obniżoną zdolnością do łączenia się z innymi białkami i wyklucza zastosowanie niemodyfikowanych peptydów w leczeniu [101, 102]. Wady naturalnych peptydów można wykluczyć, włączając w sekwencję peptydu chemicznie zmodyfikowane aminokwasy zawierające resztę węglowodorową. Reszty te mogą zostać katalitycznie złączone, tworząc mostek stabilizujący α -helikalną strukturę peptydu [101]. Strategia mostkowania peptydów stworzonych na podstawie BID oraz BIM zwiększa ponadto ich przenikalność przez błony komórkowe oraz oporność na działanie proteaz [101, 103, 104]. Hydrofobowy mostek może również wchodzić w interakcje z powierzchnią docelową białka, niezależnie od typowej interakcji między łączącymi się domenami dwóch białek, a w konsekwencji może zwiększać siłę wiązania [105]. Mostkowane peptydy SAHB (*stabilized alpha-helix of BCL-2 domains*) bezpośrednio aktywują BAX i wywołują apoptozę zarówno w nowotworach litych, jak i wywodzących się z układu krwiotwórczego [103, 104, 106]. Peptydy SAHB wykazują również obiecującą aktywność *in vivo*. U myszy z białaczką szpikową BID SAHB zmniejszał istotnie dynamikę choroby i wydłużał czas przeżycia zwierząt [104]. Peptydy SAHB mogą również selektywnie wyłączać aktywność MCL1 [105]. Jednak, mimo obiecujących wyników badań *in vivo*, mostkowane peptydy nie trafiły dotychczas do badań klinicznych u ludzi, choć pozostają w obszarze aktywnie rozwijanych i priorytetowych zainteresowań ośrodków akademickich i przemysłowych.

Małowcząsteczkowe związki reprezentują alternatywną strategię inhibicji interakcji między białkami BCL2. Gossypol jest naturalnym polifenolem otrzymywanym z bawełny i składa się z racematu enancjomerów, spośród których najbardziej aktywny jest enancjomer (–), określany jako AT-101 [107]. Enancjomer ten przerywa interakcję między białkami pro- i antyapoptotycznymi, na przykład między BCL-X_L a BAX lub BAD [108]. Mechanizm jego działania może uwzględniać również inne mechanizmy niezależne od BAX i BAK [109]. Gossypol wykazywał aktywność w badaniach przedklinicznych w monoterapii, a stosowany łącznie z innymi lekami zwiększał ich skuteczność w stosunku do komórek chłoniaków B-komórkowych [110, 111]. Pochodne gossypolu, takie jak apogossypol, wykazują niższą toksyczność i większą aktywność w badaniach przedklinicznych i z tego powodu ich potencjał terapeutyczny może być większy [112].

Obatoklaks (*GX15-070*) to małowcząsteczkowy związek indolowo-bipirolowy, który jest antagonistą

BCL2, BCL-X_L, BCL-w oraz MCL1 [113]. Obatoklaks przerywa interakcję między BAK i białkami antyapoptocycznymi, w tym z MCL1 i BCL-X_L, a dodatkowo zwiększa ekspresję BIM [114, 115]. Również cytotoksyczność obatoklaksu może wynikać z mechanizmów niezależnych od BAX i BAK. Poza działaniem apoptocycznym obatoklaks indukuje zatrzymanie cyklu komórkowego w fazie S-G₂, w stężeniu zdecydowanie mniejszym niż wymagane dla działania apoptocznego. Co więcej, mysie embrionalne fibroblasty (MEF, *mouse embryonic fibroblasts*) pozbawione białek Bax i Bak są wrażliwe na obatoklaks, co sugeruje udział mechanizmów nieapoptocycznych, prowadzących do śmierci komórki [116, 117].

W dostępnych badaniach klinicznych I fazy obatoklaks wykazywał umiarkowaną aktywność w monoterapii u chorych na chłoniaki i pacjentów z zaawansowaną CLL leczonych uprzednio wieloma liniami chemioterapii [118, 119]. Był natomiast nieaktywny u pacjentów z nawracającym lub opornym, klasycznym HL [120].

ABT-737 i jego doustna pochodna — ABT-263 są małowcząsteczkowymi związkami wykazującymi silne powinowactwo do BCL2, BCL-X_L i BCL-W [121]. Związek ten łączy się z białkami antyapoptocycznymi, uniemożliwiając ich interakcję z BIM, a prawdopodobnie również z BAX oraz BIK [122, 123]. Dzięki temu ABT-737 przywraca funkcjonowanie szlaku apoptocznego w komórkach ze zwiększoną ekspresją tych białek. Komórki CLL, cechujące się ograniczoną rezerwą antyapoptoczną, ulegają apoptozie po zastosowaniu nanomolarnych stężeń ABT-737 [122]. Brak zdolności ABT-737 do łączenia się z niektórymi wielodomenowymi białkami antyapoptocycznymi, takimi jak BFL1 czy MCL1, wskazuje jednocześnie na potencjalne mechanizmy oporności komórek nowotworowych. Zgodnie z tymi obserwacjami niektóre komórki, mimo niskiej rezerwy antyapoptocycznej, mogą być odporne na ABT-737 ze względu na zwiększoną ekspresję BFL1/A1 lub MCL1 [9]. ABT-737 był skuteczny w liniach komórkowych MCL tylko o profilu BCL2^{high}/MCL1^{low}, który występował u 50% chorych [123]. Co więcej, komórki początkowo wrażliwe na ABT-737 mogą wtórnie nabyć oporności po ekspozycji na ten związek poprzez zwiększenie ekspresji BFL1 i/lub MCL1 [124].

Zastosowanie ABT-737 w monoterapii przedłużyło życie myszom z przeszczepionymi chłoniakami *Myc/Bcl2*, ale było nieskuteczne w chłoniakach wywołanych tylko przez gen *Myc*, ze względu na wyższą ekspresję *Mcl1* [125]. Połączenie ABT-737 ze związkami obniżającymi poziom MCL1 (flawopi-

rydol) lub neutralizującymi funkcjonowanie MCL1 poprzez zwiększenie poziomu białka NOXA (bortezomib) wykazało synergizm w działaniu w liniach komórkowych MCL opornych na ABT-737 [123]. Łączne zastosowanie ABT-737 oraz bortezomibu w liniach komórkowych DLBCL, MCL oraz pierwotnych komórkach CLL było skuteczniejsze niż monoterapia którymkolwiek z tych związków [126]. ABT-737 może również uwrażliwić nowotwory na konwencjonalne leki w mysich modelach ksenotransplantacyjnych w ostrej białaczce limfoblastycznej (ALL, *acute lymphoblastic leukemia*) lub chłoniaku/białaczce z komórek T u dorosłych (ATLL, *adult T-cell leukemia/lymphoma*) [127, 128].

ABT-263 (nawitoklaks), doustna pochodna ABT-737, jest aktywnie testowany w wielu badaniach klinicznych w nowotworach układu immunologicznego. W badaniu klinicznym I fazy u chorych na CLL spośród 26 pacjentów leczonych nawitoklaksem u 9 (35%) osiągnięto częściową odpowiedź, a u kolejnych 7 obserwowano stabilizację choroby przez ponad 6 miesięcy. Średni czas przeżycia wolny od progresji wyniósł 25 miesięcy. Aktywność leku obserwowano u pacjentów z chorobą oporną na fludarabinę, masywną adenopatią i del(17p). Niska ekspresja MCL1 i wysoki stosunek BIM:MCL1 lub BIM:BCL2 w komórkach białaczkowych korelowały z lepszą odpowiedzią kliniczną [129]. Zgodnie z mechanizmem działania ABT-263, uwrażliwiający komórki na stymulację apoptoczną, ABT-263 jest również testowany w kombinacjach z konwencjonalnymi chemioterapeutykami lub przeciwciałami monoklonalnymi (tab. 1).

Wnioski i perspektywy

Nowotwory wywodzące się z komórek B stosują różne mechanizmy deregulujące białka z rodziny BCL2, prowadząc do bloków apoptocycznych, które ułatwiają przeżycie komórek nowotworowych i niosą istotne implikacje kliniczne. Określenie molekularnych mechanizmów odpowiedzialnych za odbieranie i przewodzenie sygnałów apoptocycznych do mitochondriów dostarczyło wskazówek dla rozwoju małowcząsteczkowych związków modulujących decyzje o życiu i śmierci komórki. Związki te wykazują duży i wciąż rozwijany potencjał terapeutyczny. Dotychczas w badaniach klinicznych pojawiło się kilka cząstek o różnorodnych mechanizmach działania i specyficzności, które wykazują aktywność terapeutyczną. Jednakże nawet ekspresja białek będących celem działania leku nie gwarantuje jego skuteczności ze względu na różne pierwotne i nabyte mechanizmy oporności. Obserwacje te podkreślają

Tabela 1. Wybrane badania kliniczne związków chemicznych działających selektywnie w obrębie białek BCL2
Table 1. Selected studies of compounds targeting BCL2 family

Związek chemiczny	Molekularny cel działania	Badania (piśmiennictwo lub identyfikator trwających badań wg www.clinicaltrials.gov)
SAHB	Białka efektorowe lub wielodomenowe białka antyapoptotyczne	Przedkliniczne na liniach komórkowych: białaczka T-komórkowa, AML, CML [104–106]; PCM, DLBCL [106]
Obatoklaks	BCL2, BCL-X _L , BCL-W i MCL1	CLL — faza I [118] Różne typy chłoniaków — faza I [119] cHL — faza II [120] MCL — faza I/II (NCT00407303) FL — faza II (NCT00427856) AML — faza II (NCT00684918)
Gossypol	BCL2, BCL-X _L i MCL1	CLL — faza II (NCT00286780) FL — faza II (NCT00440388) Różne typy chłoniaków — faza II (NCT00275431)
Oblimersen	BCL2 mRNA	CLL — faza III [94, 95] Chłoniaki B-komórkowe — faza II [97] PCM — faza III [98] AML, ALL — faza I (NCT00004862) AML — faza III (NCT00085124)
ABT-737 i nawitoklaks	BCL2, BCL-X _L i BCL-W	CLL — faza I [129] Faza II (NCT01087151) Różne typy chłoniaków — faza II (NCT00406809) CLL — faza II (NCT01557777)

SAHB (*stabilized alpha-helix of BCL-2 domains*) — mostkowany peptyd α -helisy domen BCL2; AML (*acute myeloid leukemia*) — ostra białaczka szpikowa; CML (*chronic myeloid leukemia*) — przewlekła białaczka szpikowa; PCM (*plasma cell myeloma*) — szpiczak plazmocytowy; DLBCL (*diffuse large B-cell lymphoma*) — chłoniak rozlany z dużych komórek B; CLL (*chronic lymphocytic leukemia*) — przewlekła białaczka limfocytowa; cHL (*classic Hodgkin lymphoma*) — klasyczna postać chłoniaka Hodgkina; MCL (*mantle cell lymphoma*) — chłoniak z komórek płaszczka; FL (*follicular lymphoma*) — chłoniak grudkowy; ALL (*acute lymphoblastic leukemia*) — ostra białaczka limfoblastyczna

potrzebę opracowywania precyzyjnych biomarkerów identyfikujących chorych wrażliwych na terapię nowymi lekami, które będą łatwo dostępne i możliwe do zastosowania w praktyce klinicznej. Potencjał farmakologicznego działania modulatorów z rodziny BCL2 tkwi w ich równoczesnym użyciu zarówno z konwencjonalnymi chemioterapeutykami, jak i lekami specyficznymi wobec szlaków sygnałowych, na przykład inhibitorami kinaz tyrozynowych. Białka z rodziny BCL2 wciąż pozostają obiektem intensywnych badań, a ich aktywność w nowotworach sięga poza regulację procesu apoptozy i dotyczy między innymi regulacji autofagii oraz procesów bioenergetycznych. Pełniejsze zrozumienie tych procesów i ich konsekwencji dla biologii komórki nowotworowej oraz opracowanie inhibitorów modulujących również te procesy może się stać istotnym rozszerzeniem potencjału terapeutycznego modulatorów białek z rodziny BCL2.

Piśmiennictwo

- Klein U., Dalla-Favera R. Germinal centres: role in B-cell physiology and malignancy. *Nat. Rev. Immunol.* 2008; 8: 22–33.
- Rajewsky K. Clonal selection and learning in the antibody system. *Nature* 1996; 381: 751–758.
- Abramson J.S., Shipp M.A. Advances in the biology and therapy of diffuse large B-cell lymphoma: moving toward a molecularly targeted approach. *Blood* 2005; 106: 1164–1174.
- Klein U., Goossens T., Fischer M. i wsp. Somatic hypermutation in normal and transformed human B cells. *Immunol. Rev.* 1998; 162: 261–280.
- Kramer M.H., Hermans J., Wijburg E. i wsp. Clinical relevance of BCL2, BCL6, and MYC rearrangements in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* 1998; 92: 3152–3162.
- Pasqualucci L., Bhagat G., Jankovic M. i wsp. AID is required for germinal center-derived lymphomagenesis. *Nat. Genet.* 2008; 40: 108–112.
- Letai A.G. Diagnosing and exploiting cancer's addiction to blocks in apoptosis. *Nat. Rev. Cancer* 2008; 8: 121–132.
- Kelly P.N., Strasser A. The role of Bcl-2 and its pro-survival relatives in tumorigenesis and cancer therapy. *Cell Death Differ.* 2011; 18: 1414–1424.
- Deng J., Carlson N., Takeyama K., Dal Cin P., Shipp M., Letai A. BH3 profiling identifies three distinct classes of apoptotic blocks to predict response to ABT-737 and conventional chemotherapeutic agents. *Cancer Cell* 2007; 12: 171–185.
- Petros A.M., Olejniczak E.T., Fesik S.W. Structural biology of the Bcl-2 family of proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 2004; 1644: 83–94.
- Chittenden T., Flemington C., Houghton A.B. i wsp. A conserved domain in Bak, distinct from BH1 and BH2, mediates cell death and protein binding functions. *Embo. J.* 1995; 14: 5589–5596.
- Tsujimoto Y., Finger L.R., Yunis J., Nowell P.C., Croce C.M. Cloning of the chromosome breakpoint of neoplastic B cells with the t(14;18) chromosome translocation. *Science* 1984; 226: 1097–1099.

13. Saito M., Novak U., Piovani E. i wsp. BCL6 suppression of BCL2 via Miz1 and its disruption in diffuse large B cell lymphoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2009; 106: 11294–11299.
14. Corbally N., Grogan L., Dervan P.A., Carney D.N. The detection of specific gene rearrangements in non-Hodgkin's lymphoma using the polymerase chain reaction. *Br. J. Cancer* 1992; 66: 805–809.
15. Aisenberg A.C., Wilkes B.M., Jacobson J.O. The bcl-2 gene is rearranged in many diffuse B-cell lymphomas. *Blood* 1988; 71: 969–972.
16. Jager U., Bocskor S., Le T. i wsp. Follicular lymphomas' BCL2/IgH junctions contain templated nucleotide insertions: novel insights into the mechanism of t(14;18) translocation. *Blood* 2000; 95: 3520–3529.
17. Bakhshi A., Jensen J.P., Goldman P. i wsp. Cloning the chromosomal breakpoint of t(14;18) human lymphomas: clustering around JH on chromosome 14 and near a transcriptional unit on 18. *Cell* 1985; 41: 899–906.
18. Limpens J., Stad R., Vos C. i wsp. Lymphoma-associated translocation t(14;18) in blood B cells of normal individuals. *Blood* 1995; 85: 2528–2536.
19. McDonnell T.J., Deane N., Platt F.M. i wsp. bcl-2-immunoglobulin transgenic mice demonstrate extended B cell survival and follicular lymphoproliferation. *Cell* 1989; 57: 79–88.
20. McDonnell T.J., Korsmeyer S.J. Progression from lymphoid hyperplasia to high-grade malignant lymphoma in mice transgenic for the t(14; 18). *Nature* 1991; 349: 254–256.
21. Huang J.Z., Sanger W.G., Greiner T.C. i wsp. The t(14;18) defines a unique subset of diffuse large B-cell lymphoma with a germinal center B-cell gene expression profile. *Blood* 2002; 99: 2285–2290.
22. Papakonstantinou G., Verbeke C., Hastka J., Bohrer M., Hehlmann R. bcl-2 expression in non-Hodgkin's lymphomas is not associated with bcl-2 gene rearrangements. *Br. J. Haematol.* 2001; 113: 383–390.
23. Monni O., Joensuu H., Franssila K., Klefstrom J., Alitalo K., Knuutila S. BCL2 overexpression associated with chromosomal amplification in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* 1997; 90: 1168–1174.
24. Hanada M., Delia D., Aiello A., Stadtmayer E., Reed J.C. bcl-2 gene hypomethylation and high-level expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1993; 82: 1820–1828.
25. Cimmino A., Calin G.A., Fabbri M. i wsp. miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2005; 102: 13944–13949.
26. Calin G.A., Dumitru C.D., Shimizu M. i wsp. Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2002; 99: 15524–15529.
27. Tracey L., Perez-Rosado A., Artiga M.J. i wsp. Expression of the NF-kappaB targets BCL2 and BIRC5/Survivin characterizes small B-cell and aggressive B-cell lymphomas, respectively. *J. Pathol.* 2005; 206: 123–134.
28. Feuerhake F., Kutok J.L., Monti S. i wsp. NFkappaB activity, function, and target-gene signatures in primary mediastinal large B-cell lymphoma and diffuse large B-cell lymphoma subtypes. *Blood* 2005; 106: 1392–1399.
29. Mounier N., Briere J., Gisselbrecht C. i wsp. Rituximab plus CHOP (R-CHOP) overcomes bcl-2 — associated resistance to chemotherapy in elderly patients with diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL). *Blood* 2003; 101: 4279–4284.
30. Mounier N., Briere J., Gisselbrecht C., Reyes F., Gaulard P., Coiffier B. Estimating the impact of rituximab on bcl-2-associated resistance to CHOP in elderly patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Haematologica* 2006; 91: 715–716.
31. Visco C., Tzankov A., Xu-Monette Z.Y. i wsp. Patients with diffuse large B cell lymphoma of germinal center origin with BCL2 translocations have poor outcome, irrespective of MYC status: a report from an International DLBCL rituximab-CHOP Consortium Program Study. *Haematologica* 2012 Aug 28 [złożono do druku].
32. Iqbal J., Meyer P.N., Smith L.M. i wsp. BCL2 predicts survival in germinal center B-cell-like diffuse large B-cell lymphoma treated with CHOP-like therapy and rituximab. *Clin. Cancer Res.* 2011; 17: 7785–7795.
33. Sup S.J., Alemany C.A., Pohlman B. i wsp. Expression of bcl-2 in classical Hodgkin's lymphoma: an independent predictor of poor outcome. *J. Clin. Oncol.* 2005; 23: 3773–3779.
34. Krajewski S., Bodrug S., Krajewska M. i wsp. Immunohistochemical analysis of Mcl-1 protein in human tissues. Differential regulation of Mcl-1 and Bcl-2 protein production suggests a unique role for Mcl-1 in control of programmed cell death in vivo. *Am. J. Pathol.* 1995; 146: 1309–1319.
35. Vikstrom I., Carotta S., Luthje K. i wsp. Mcl-1 is essential for germinal center formation and B cell memory. *Science* 2010; 330: 1095–1099.
36. Zhou P., Levy N.B., Xie H. i wsp. MCL1 transgenic mice exhibit a high incidence of B-cell lymphoma manifested as a spectrum of histologic subtypes. *Blood* 2001; 97: 3902–3909.
37. Michels J., Johnson P.W., Packham G. Mcl-1. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 2005; 37: 267–271.
38. Mills J.R., Hippo Y., Robert F. i wsp. mTORC1 promotes survival through translational control of Mcl-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2008; 105: 10853–10858.
39. Ding Q., He X., Hsu J.M. i wsp. Degradation of Mcl-1 by beta-TrCP mediates glycogen synthase kinase 3-induced tumor suppression and chemosensitization. *Mol. Cell. Biol.* 2007; 27: 4006–4017.
40. Nijhawan D., Fang M., Traer E. i wsp. Elimination of Mcl-1 is required for the initiation of apoptosis following ultraviolet irradiation. *Genes Dev.* 2003; 17: 1475–1486.
41. Schwickart M., Huang X., Lill J.R. i wsp. Deubiquitinase USP9X stabilizes MCL1 and promotes tumour cell survival. *Nature* 2010; 463: 103–107.
42. Clohessy J.G., Zhuang J., Brady H.J. Characterisation of Mcl-1 cleavage during apoptosis of haematopoietic cells. *Br. J. Haematol.* 2004; 125: 655–665.
43. Han J., Goldstein L.A., Gastman B.R., Froelich C.J., Yin X.M., Rabinowich H. Degradation of Mcl-1 by granzyme B: implications for Bim-mediated mitochondrial apoptotic events. *J. Biol. Chem.* 2004; 279: 22020–22029.
44. Herrant M., Jacquelin A., Marchetti S. i wsp. Cleavage of Mcl-1 by caspases impaired its ability to counteract Bim-induced apoptosis. *Oncogene* 2004; 23: 7863–7873.
45. Stamatopoulos B., Meuleman N., De Bruyn C. i wsp. AMD3100 disrupts the cross-talk between chronic lymphocytic leukemia cells and a mesenchymal stromal or nurse-like cell-based microenvironment: pre-clinical evidence for its association with chronic lymphocytic leukemia treatments. *Haematologica* 2012; 97: 608–615.
46. Vega F., Medeiros L.J., Leventaki V. i wsp. Activation of mammalian target of rapamycin signaling pathway contributes to

- tumor cell survival in anaplastic lymphoma kinase-positive anaplastic large cell lymphoma. *Cancer Res.* 2006; 66: 6589–6597.
47. Peponi E., Drakos E., Reyes G., Leventaki V., Rassidakis G.Z., Medeiros L.J. Activation of mammalian target of rapamycin signaling promotes cell cycle progression and protects cells from apoptosis in mantle cell lymphoma. *Am. J. Pathol.* 2006; 169: 2171–2180.
 48. Wei G., Twomey D., Lamb J. i wsp. Gene expression-based chemical genomics identifies rapamycin as a modulator of MCL1 and glucocorticoid resistance. *Cancer Cell.* 2006; 10: 331–342.
 49. Maurer U., Charvet C., Wagman A.S., Dejardin E., Green D.R. Glycogen synthase kinase-3 regulates mitochondrial outer membrane permeabilization and apoptosis by destabilization of MCL-1. *Mol. Cell.* 2006; 21: 749–760.
 50. Inuzuka H., Shaik S., Onoyama I. i wsp. SCF(FBW7) regulates cellular apoptosis by targeting MCL1 for ubiquitylation and destruction. *Nature* 2011; 471: 104–109.
 51. Maser R.S., Choudhury B., Campbell P.J. i wsp. Chromosomally unstable mouse tumours have genomic alterations similar to diverse human cancers. *Nature* 2007; 447: 966–971.
 52. Min S.H., Lau A.W., Lee T.H. i wsp. Negative regulation of the stability and tumor suppressor function of Fbw7 by the Pin1 prolyl isomerase. *Mol. Cell.* 2012; 46: 771–783.
 53. Desjobert C., Renalier M.H., Bergalet J. i wsp. MiR-29a downregulation in ALK-positive anaplastic large cell lymphomas contributes to apoptosis blockade through MCL-1 overexpression. *Blood* 2011; 117: 6627–6637.
 54. Zhao J.J., Lin J., Lwin T. i wsp. microRNA expression profile and identification of miR-29 as a prognostic marker and pathogenetic factor by targeting CDK6 in mantle cell lymphoma. *Blood* 2010; 115: 2630–2639.
 55. Saxena A., Viswanathan S., Moshynska O., Tandon P., Sankaran K., Sheridan D.P. Mcl-1 and Bcl-2/Bax ratio are associated with treatment response but not with Rai stage in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Am. J. Hematol.* 2004; 75: 22–33.
 56. Pepper C., Lin T.T., Pratt G. i wsp. Mcl-1 expression has in vitro and in vivo significance in chronic lymphocytic leukemia and is associated with other poor prognostic markers. *Blood* 2008; 112: 3807–3817.
 57. Hussain S.R., Cheney C.M., Johnson A.J. i wsp. Mcl-1 is a relevant therapeutic target in acute and chronic lymphoid malignancies: down-regulation enhances rituximab-mediated apoptosis and complement-dependent cytotoxicity. *Clin. Cancer Res.* 2007; 13: 2144–2150.
 58. Wuilleme-Toumi S., Robillard N., Gomez P. i wsp. Mcl-1 is overexpressed in multiple myeloma and associated with relapse and shorter survival. *Leukemia* 2005; 19: 1248–1252.
 59. Michels J., Foria V., Mead B. i wsp. Immunohistochemical analysis of the antiapoptotic Mcl-1 and Bcl-2 proteins in follicular lymphoma. *Br. J. Haematol.* 2006; 132: 743–746.
 60. Bouillet P., Metcalf D., Huang D.C. i wsp. Proapoptotic Bcl-2 relative Bim required for certain apoptotic responses, leukocyte homeostasis, and to preclude autoimmunity. *Science* 1999; 286: 1735–1738.
 61. Egle A., Harris A.W., Bouillet P., Cory S. Bim is a suppressor of Myc-induced mouse B cell leukemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2004; 101: 6164–6169.
 62. Eischen C.M., Roussel M.F., Korsmeyer S.J., Cleveland J.L. Bax loss impairs Myc-induced apoptosis and circumvents the selection of p53 mutations during Myc-mediated lymphomagenesis. *Mol. Cell. Biol.* 2001; 21: 7653–7662.
 63. Michalak E.M., Jansen E.S., Happo L. i wsp. Puma and to a lesser extent Noxa are suppressors of Myc-induced lymphomagenesis. *Cell. Death Differ.* 2009; 16: 684–696.
 64. Shinjyo T., Kuribara R., Inukai T. i wsp. Downregulation of Bim, a proapoptotic relative of Bcl-2, is a pivotal step in cytokine-initiated survival signaling in murine hematopoietic progenitors. *Mol. Cell. Biol.* 2001; 21: 854–864.
 65. Inaba T. Cytokine-mediated cell survival. *Int. J. Hematol.* 2004; 80: 210–214.
 66. Akiyama T., Tanaka S. Bim: guardian of tissue homeostasis and critical regulator of the immune system, tumorigenesis and bone biology. *Arch. Immunol. Ther. Exp.* 2011; 59: 277–287.
 67. Dijkers P.F., Medema R.H., Lammers J.W., Koenderman L., Coffey P.J. Expression of the pro-apoptotic Bcl-2 family member Bim is regulated by the forkhead transcription factor FKHR-L1. *Curr. Biol.* 2000; 10: 1201–1204.
 68. Sunter A., Fernandez de Mattos S., Stahl M. i wsp. FoxO3a transcriptional regulation of Bim controls apoptosis in paclitaxel-treated breast cancer cell lines. *J. Biol. Chem.* 2003; 278: 49795–49805.
 69. Gu T.L., Tothova Z., Scheijen B., Griffin J.D., Gilliland D.G., Sternberg D.W. NPM-ALK fusion kinase of anaplastic large-cell lymphoma regulates survival and proliferative signaling through modulation of FOXO3a. *Blood* 2004; 103: 4622–4629.
 70. Rao E., Jiang C., Ji M. i wsp. The miRNA-17 approximately 92 cluster mediates chemoresistance and enhances tumor growth in mantle cell lymphoma via PI3K/AKT pathway activation. *Leukemia* 2012; 26: 1064–1072.
 71. Craxton A., Draves K.E., Gruppi A., Clark E.A. BAFF regulates B cell survival by downregulating the BH3-only family member Bim via the ERK pathway. *J. Exp. Med.* 2005; 202: 1363–1374.
 72. Rambal A.A., Panaguiton Z.L., Kramer L., Grant S., Harada H. MEK inhibitors potentiate dexamethasone lethality in acute lymphoblastic leukemia cells through the pro-apoptotic molecule BIM. *Leukemia* 2009; 23: 1744–1754.
 73. Bhalla S., Evens A.M., Dai B., Prachand S., Gordon L.I., Gartenhaus R.B. The novel anti-MEK small molecule AZD6244 induces BIM-dependent and AKT-independent apoptosis in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* 2011; 118: 1052–1061.
 74. Mestre-Escorihuela C., Rubio-Moscardo F., Richter J.A. i wsp. Homozygous deletions localize novel tumor suppressor genes in B-cell lymphomas. *Blood* 2007; 109: 271–280.
 75. Richter-Larrea J.A., Robles E.F., Fresquet V. i wsp. Reversion of epigenetically mediated BIM silencing overcomes chemoresistance in Burkitt lymphoma. *Blood* 2010; 116: 2531–2542.
 76. Lwin T., Lin J., Choi Y.S. i wsp. Follicular dendritic cell-dependent drug resistance of non-Hodgkin lymphoma involves cell adhesion-mediated Bim down-regulation through induction of microRNA-181a. *Blood* 2010; 116: 5228–5236.
 77. Ventura A., Young A.G., Winslow M.M. i wsp. Targeted deletion reveals essential and overlapping functions of the miR-17 through 92 family of miRNA clusters. *Cell.* 2008; 132: 875–886.
 78. Arena V., Martini M., Luongo M., Capelli A., Larocca L.M. Mutations of the BIK gene in human peripheral B-cell lymphomas. *Genes Chromosomes Cancer* 2003; 38: 91–96.
 79. Chen S., Dai Y., Pei X.Y. i wsp. CDK Inhibitors Upregulate BH3-Only Proteins to Sensitize Human Myeloma Cells to BH3 Mimetic Therapies. *Cancer Res.* 2012; 72: 4225–4237.
 80. Fennell D.A., Chacko A., Mutti L. BCL-2 family regulation by the 20S proteasome inhibitor bortezomib. *Oncogene* 2008; 27: 1189–1197.

81. Panaretakis T., Pokrovskaja K., Shoshan M.C., Grander D. Activation of Bak, Bax, and BH3-only proteins in the apoptotic response to doxorubicin. *J. Biol. Chem.* 2002; 277: 44317–44326.
82. Nakamura M., Ishida E., Shimada K., Nakase H., Sakaki T., Konishi N. Defective expression of HRK is associated with promoter methylation in primary central nervous system lymphomas. *Oncology* 2006; 70: 212–221.
83. Happo L., Cragg M.S., Phipson B. i wsp. Maximal killing of lymphoma cells by DNA damage-inducing therapy requires not only the p53 targets Puma and Noxa, but also Bim. *Blood* 2010; 116: 5256–5267.
84. Xargay-Torrent S., Lopez-Guerra M., Saborit-Villarroya I. i wsp. Vorinostat-induced apoptosis in mantle cell lymphoma is mediated by acetylation of proapoptotic BH3-only gene promoters. *Clin. Cancer Res.* 2011; 17: 3956–3968.
85. Perez-Galan P., Roue G., Villamor N., Montserrat E., Campo E., Colomer D. The proteasome inhibitor bortezomib induces apoptosis in mantle-cell lymphoma through generation of ROS and Noxa activation independent of p53 status. *Blood* 2006; 107: 257–264.
86. Villunger A., Michalak E.M., Coultas L. i wsp. p53- and drug-induced apoptotic responses mediated by BH3-only proteins puma and noxa. *Science* 2003; 302: 1036–1038.
87. Hemann M.T., Zilfou J.T., Zhao Z., Burgess D.J., Hannon G.J., Lowe S.W. Suppression of tumorigenesis by the p53 target PUMA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2004; 101: 9333–9338.
88. Mackus W.J., Kater A.P., Grummels A. i wsp. Chronic lymphocytic leukemia cells display p53-dependent drug-induced Puma upregulation. *Leukemia* 2005; 19: 427–434.
89. Gupta M., Hendrickson A.E., Yun S.S. i wsp. Dual mTORC1/mTORC2 inhibition diminishes Akt activation and induces Puma-dependent apoptosis in lymphoid malignancies. *Blood* 2012; 119: 476–487.
90. Benimetskaya L., Miller P., Benimetsky S. i wsp. Inhibition of potentially anti-apoptotic proteins by antisense protein kinase C- α (Isis 3521) and antisense bcl-2 (G3139) phosphorothioate oligodeoxynucleotides: relationship to the decreased viability of T24 bladder and PC3 prostate cancer cells. *Mol. Pharmacol.* 2001; 60: 1296–1307.
91. Kim R., Emi M., Tanabe K., Toge T. Therapeutic potential of antisense Bcl-2 as a chemosensitizer for cancer therapy. *Cancer* 2004; 101: 2491–2502.
92. Dias N., Stein C.A. Potential roles of antisense oligonucleotides in cancer therapy. The example of Bcl-2 antisense oligonucleotides. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2002; 54: 263–269.
93. Emi M., Kim R., Tanabe K., Uchida Y., Toge T. Targeted therapy against Bcl-2-related proteins in breast cancer cells. *Breast Cancer Res.* 2005; 7: R940–952.
94. O'Brien S., Moore J.O., Boyd T.E. i wsp. Randomized phase III trial of fludarabine plus cyclophosphamide with or without oblimersen sodium (Bcl-2 antisense) in patients with relapsed or refractory chronic lymphocytic leukemia. *J. Clin. Oncol.* 2007; 25: 1114–1120.
95. O'Brien S., Moore J.O., Boyd T.E. i wsp. 5-year survival in patients with relapsed or refractory chronic lymphocytic leukemia in a randomized, phase III trial of fludarabine plus cyclophosphamide with or without oblimersen. *J. Clin. Oncol.* 2009; 27: 5208–5212.
96. Kojima K., Duvvuri S., Ruvolo V., Samaniego F., Younes A., Andreoff M. Decreased sensitivity of 17p-deleted chronic lymphocytic leukemia cells to a small molecule BCL-2 antagonist ABT-737. *Cancer* 2012; 118: 1023–1031.
97. Pro B., Leber B., Smith M. i wsp. Phase II multicenter study of oblimersen sodium, a Bcl-2 antisense oligonucleotide, in combination with rituximab in patients with recurrent B-cell non-Hodgkin lymphoma. *Br. J. Haematol.* 2008; 143: 355–360.
98. Chanan-Khan A.A., Niesvizky R., Hohl R.J. i wsp. Phase III randomized study of dexamethasone with or without oblimersen sodium for patients with advanced multiple myeloma. *Leuk. Lymphoma* 2009; 50: 559–565.
99. Fesik S.W. Promoting apoptosis as a strategy for cancer drug discovery. *Nat. Rev. Cancer* 2005; 5: 876–885.
100. Moulder S.L., Symmans W.F., Booser D.J. i wsp. Phase I/II study of G3139 (Bcl-2 antisense oligonucleotide) in combination with doxorubicin and docetaxel in breast cancer. *Clin. Cancer Res.* 2008; 14: 7909–7916.
101. Verdine G.L., Walensky L.D. The challenge of drugging undruggable targets in cancer: lessons learned from targeting BCL-2 family members. *Clin. Cancer Res.* 2007; 13: 7264–7270.
102. Denicourt C., Dowdy S.F. Medicine. Targeting apoptotic pathways in cancer cells. *Science* 2004; 305: 1411–1413.
103. Walensky L.D., Pitter K., Morash J. i wsp. A stapled BID BH3 helix directly binds and activates BAX. *Mol. Cell.* 2006; 24: 199–210.
104. Walensky L.D., Kung A.L., Escher I. i wsp. Activation of apoptosis in vivo by a hydrocarbon-stapled BH3 helix. *Science* 2004; 305: 1466–1470.
105. Stewart M.L., Fire E., Keating A.E., Walensky L.D. The MCL-1 BH3 helix is an exclusive MCL-1 inhibitor and apoptosis sensitizer. *Nat. Chem. Biol.* 2010; 6: 595–601.
106. LaBelle J.L., Katz S.G., Bird G.H. i wsp. A stapled BIM peptide overcomes apoptotic resistance in hematologic cancers. *J. Clin. Invest.* 2012; 122: 2018–2031.
107. Lessene G., Czabotar P.E., Colman P.M. BCL-2 family antagonists for cancer therapy. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2008; 7: 989–1000.
108. Meng Y., Tang W., Dai Y. i wsp. Natural BH3 mimetic (–)-gossypol chemosensitizes human prostate cancer via Bcl-xL inhibition accompanied by increase of Puma and Noxa. *Mol. Cancer Ther.* 2008; 7: 2192–2202.
109. van Delft M.F., Wei A.H., Mason K.D. i wsp. The BH3 mimetic ABT-737 targets selective Bcl-2 proteins and efficiently induces apoptosis via Bak/Bax if Mcl-1 is neutralized. *Cancer Cell.* 2006; 10: 389–399.
110. Mohammad R.M., Wang S., Aboukameel A. i wsp. Preclinical studies of a nonpeptidic small-molecule inhibitor of Bcl-2 and Bcl-X(L) [(–)-gossypol] against diffuse large cell lymphoma. *Mol. Cancer Ther.* 2005; 4: 13–21.
111. Li Z.M., Jiang W.Q., Zhu Z.Y. i wsp. Synergistic cytotoxicity of Bcl-xL inhibitor, gossypol and chemotherapeutic agents in non-Hodgkin's lymphoma cells. *Cancer Biol. Ther.* 2008; 7: 51–60.
112. Kitada S., Kress C.L., Krajewska M., Jia L., Pellicchia M., Reed J.C. Bcl-2 antagonist apogossypol (NSC736630) displays single-agent activity in Bcl-2-transgenic mice and has superior efficacy with less toxicity compared with gossypol (NSC19048). *Blood* 2008; 111: 3211–3219.
113. Zhai D., Jin C., Satterthwait A.C., Reed J.C. Comparison of chemical inhibitors of antiapoptotic Bcl-2-family proteins. *Cell. Death Differ.* 2006; 13: 1419–1421.

114. Trudel S., Li Z.H., Rauw J., Tiedemann R.E., Wen X.Y., Stewart A.K. Preclinical studies of the pan-Bcl inhibitor obatoclax (GX15-070) in multiple myeloma. *Blood* 2007; 109: 5430–5438.
115. Perez-Galan P., Roue G., Villamor N., Campo E., Colomer D. The BH3-mimetic GX15-070 synergizes with bortezomib in mantle cell lymphoma by enhancing Noxa-mediated activation of Bak. *Blood* 2007; 109: 4441–4449.
116. McCoy F., Hurwitz J., McTavish N. i wsp. Obatoclax induces Atg7-dependent autophagy independent of beclin-1 and BAX/BAK. *Cell. Death Dis.* 2010; 1: e108.
117. Konopleva M., Watt J., Contractor R. i wsp. Mechanisms of anti-leukemic activity of the novel Bcl-2 homology domain-3 mimetic GX15-070 (obatoclax). *Cancer Res.* 2008; 68: 3413–3420.
118. O'Brien S.M., Claxton D.F., Crump M. i wsp. Phase I study of obatoclax mesylate (GX15-070), a small molecule pan-Bcl-2 family antagonist, in patients with advanced chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2009; 113: 299–305.
119. Hwang J.J., Kuruvilla J., Mendelson D. i wsp. Phase I dose finding studies of obatoclax (GX15-070), a small molecule pan-BCL-2 family antagonist, in patients with advanced solid tumors or lymphoma. *Clin. Cancer Res.* 2010; 16: 4038–4045.
120. Oki Y., Copeland A., Hagemester F. i wsp. Experience with obatoclax mesylate (GX15-070), a small molecule pan-Bcl-2 family antagonist in patients with relapsed or refractory classical Hodgkin lymphoma. *Blood* 2012; 119: 2171–2172.
121. Oltersdorf T., Elmore S.W., Shoemaker A.R. i wsp. An inhibitor of Bcl-2 family proteins induces regression of solid tumours. *Nature* 2005; 435: 677–681.
122. Del Gaizo Moore V., Brown J.R., Certo M., Love T.M., Novina C.D., Letai A. Chronic lymphocytic leukemia requires BCL2 to sequester prodeath BIM, explaining sensitivity to BCL2 antagonist ABT-737. *J. Clin. Invest.* 2007; 117: 112–121.
123. Touzeau C., Dousset C., Bodet L. i wsp. ABT-737 induces apoptosis in mantle cell lymphoma cells with a Bcl-2high/Mcl-1low profile and synergizes with other antineoplastic agents. *Clin. Cancer Res.* 2011; 17: 5973–5981.
124. Yecies D., Carlson N.E., Deng J., Letai A. Acquired resistance to ABT-737 in lymphoma cells that up-regulate MCL-1 and BFL-1. *Blood* 2010; 115: 3304–3313.
125. Mason K.D., Vandenberg C.J., Scott C.L. i wsp. In vivo efficacy of the Bcl-2 antagonist ABT-737 against aggressive Myc-driven lymphomas. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2008; 105: 17961–17966.
126. Paoluzzi L., Gonen M., Bhagat G. i wsp. The BH3-only mimetic ABT-737 synergizes the antineoplastic activity of proteasome inhibitors in lymphoid malignancies. *Blood* 2008; 112: 2906–2916.
127. Ishitsuka K., Kunami N., Katsuya H. i wsp. Targeting Bcl-2 family proteins in adult T-cell leukemia/lymphoma: in vitro and in vivo effects of the novel Bcl-2 family inhibitor ABT-737. *Cancer Lett.* 2012; 317: 218–225.
128. Kang M.H., Kang Y.H., Szymanska B. i wsp. Activity of vincristine, L-ASP, and dexamethasone against acute lymphoblastic leukemia is enhanced by the BH3-mimetic ABT-737 in vitro and in vivo. *Blood* 2007; 110: 2057–2066.
129. Roberts A.W., Seymour J.F., Brown J.R. i wsp. Substantial susceptibility of chronic lymphocytic leukemia to BCL2 inhibition: results of a phase I study of navitoclax in patients with relapsed or refractory disease. *J. Clin. Oncol.* 2012; 30: 488–496.