

Artykuł na zaproszenie redakcji

Swoista indukcja apoptozy w komórkach nowotworowych

Stanisław Szala

Przedmiotem pracy jest swoista indukcja apoptozy w komórkach nowotworowych. W pracy omówiono najbardziej podstawowe i charakterystyczne właściwości apoptozy (programowej śmierci komórek). Apoptoza może być indukowana w komórkach za pośrednictwem zewnętrznych sygnałów natury białkowej, pochodzących od innych komórek. Może być także wywołana w komórkach różnymi czynnikami stresu (np. uszkodzenia DNA, niedotlenowanie komórek, aktywacja onkogenów). Jedną z podstawowych funkcji apoptozy jest eliminacja komórek, w których np. uszkodzenia DNA, wadliwa proliferacja, niewłaściwa adhezja do macierzy pozakomórkowej nie mogą być usunięte lub naprawione. W regulacji procesu apoptozy biorą udział zarówno białka proapoptotyczne, jak i białka antyapoptotyczne. Od ich wzajemnych relacji zależy, czy w komórkach zostanie wyindukowana apoptoza. W komórkach nowotworowych obserwuje się wzrost oporności komórek nowotworowych na większość sygnałów indukujących apoptozę. W powstawaniu fenotypu opornego na apoptozę ważną rolę odgrywają mutacje genów kodujących białka proapoptotyczne, jak i genów kodujących inhibitory apoptozy. Mutacje genów proapoptotycznych prowadzą do zmniejszenia aktywności białek proapoptotycznych, natomiast mutacje genów antyapoptotycznych do wzrostu aktywności inhibitorów apoptozy. Wprowadzenie do komórek nowotworowych genów kodujących proapoptotyczne białka indukuje w nich apoptozę. Niektóre geny kodujące białka proapoptotyczne pochodzenia wirusowego (np. gen E4orf4 adenowirusów czy gen kodujący apoptynę wirusa CAV, ang. chicken anemia virus) indukują w wysoce swoisty sposób apoptozę w komórkach nowotworowych, a nie w komórkach prawidłowych. Białka takie mogą stać się podstawą nowej generacji przeciwnowotworowych leków.

Specific induction of apoptosis in cancer cells

This review will focus on specific induction of apoptosis (programmed cell death) in cancer cells. Basic characteristic features of apoptosis are summarized. Cell apoptosis may be induced via external signals, for example proteins, originating from other cells. Also, it may be induced by various stress factors (for example DNA damage, hypoxia, activation of oncogenes). One of the essential functions of apoptosis is the elimination of cells in which defects such as DNA damage, faulty proliferation or improper adhesion to extracellular matrix cannot be repaired. In cancer cells however, the mechanism of apoptosis induction does not function properly. Apoptosis is regulated by both pro- and antiapoptotic proteins. Their interplay determines the fate of apoptosis induction. Cancer cells exhibit increased resistance to majority of apoptosis-inducing signals. Mutations in genes encoding both proapoptotic proteins and apoptosis inhibitors play an important role in the appearance of apoptosis resistant phenotype. Mutations in proapoptotic genes lead to decrease in activity of proapoptotic proteins while mutations of antiapoptotic genes increase activity of apoptosis inhibitors. Apoptosis of cancer cells can also be triggered, for example by transfer of genes encoding proapoptotic proteins. Certain viral genes encoding such proteins (for example adenovirus E4orf4 gene or apoptin gene from chicken leukemia virus) induce apoptosis in a highly specific manner in cancer cells but not in normal cells. Such proteins may constitute a new generation of anticancer drugs.

Słowa kluczowe: apoptoza, apoptoza w komórkach nowotworowych, geny proapoptotyczne, proapoptotyczne białka fuzyjne, terapia nowotworów

Key words: apoptosis, apoptosis in tumor cells, proapoptotic genes, proapoptotic fusion proteins, tumor therapy

Wstęp

U wielokomórkowych organizmów obserwuje się dwa rodzaje śmierci komórek: śmierć fizjologiczną i niefizjologiczną [1]. Pierwsza ma miejsce podczas rozwoju i morfogenezy, natomiast druga podczas toksycznego uszkodzenia komórek, spowodowanego m.in. niedotlenowaniem, bakteryjnymi toksynami lub cytostatykami.

Stosunkowo najlepiej opisaną postacią fizjologicznej śmierci komórek jest apoptoza, zwana również programowaną śmiercią komórek [2]. Pewne inne postaci śmierci fizjologicznej, różne od apoptozy, obserwuje się m.in. podczas starzenia czy terminalnego różnicowania komórek [1].

Podczas rozwoju i morfogenezy apoptoza jest indukowana w komórkach za pośrednictwem zewnętrznych sygnałów natury białkowej, pochodzących od innych komórek: tzw. „sygnałów śmierci” [1, 3, 4]. Apoptoza może być także wywołana w komórkach poprzez zablokowanie lub zahamowanie dopływu do nich czynników wzrostu, niezbędnych do ich funkcjonowania (tzw. „sygnałów przeżycia”) [1]. Brak takich sygnałów indukuje w komórkach „samobójczą śmierć”. Apoptoza jest również indukowana w komórkach poprzez kontakt z cytotoksycznymi limfocytami T (CTL) lub komórkami NK [5]. Limfocyty CTL i NK perforują błonę komórkową zabijanych komórek i poprzez powstałe pory wprowadzają do nich czynniki białkowe indukujące apoptozę.

U wielokomórkowych organizmów apoptoza bierze udział w usuwaniu zbędnych komórek podczas rozwoju i morfogenezy oraz eliminuje te, w których powstające błędy i defekty (np. uszkodzenia DNA, wadliwa proliferacja, niewłaściwa adhezja do macierzy pozakomórkowej) nie mogą być naprawione.

Szereg danych wskazuje, że w komórkach nowotworowych podstawowe funkcje apoptozy są wyraźnie zahamowane [6]. Być może dlatego w komórkach, które powinny zostać, a nie są, usuwane poprzez procesy apoptotyczne, pojawiają się liczne defekty genetyczne, błędy w parowaniu chromosomów, czy zmniejszona adhezja do macierzy pozakomórkowej.

Przypuszcza się, że w komórkach nowotworowych pojawia się fenotyp oporny na indukcję apoptozy i że fenotyp ten może być odpowiedzialny za szereg niepowodzeń terapeutycznych [7]. Komórki odporne na indukcję apoptozy mają być niewrażliwe na działanie leków i promieni jonizujących.

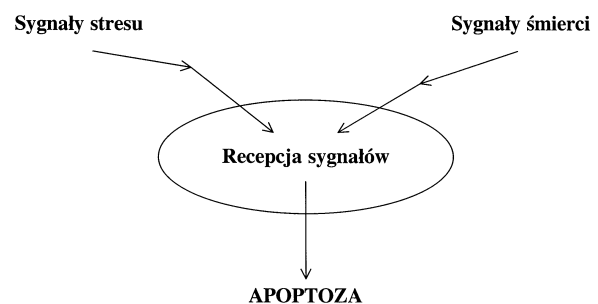
Oczywistą konsekwencją takiego podejścia są liczne próby rewersji tego fenotypu przy pomocy manipulacji genetycznych. W miejsce defektywnych, zmutowanych genów, których białkowe produkty nie mogą brać udziału w indukcji apoptozy, wstawia się ich prawidłowe kopie [8]. Do komórek nowotworowych wprowadza się więc geny kodujące białka, mające przywrócić komórkom nowotworowym „zdolność” do indukcji apoptozy, z użyciem leków lub promieni jonizujących. Najczęściej w manipulacjach genetycznych wykorzystywany jest gen p53, odgrywający ważną rolę w procesie apoptozy [9]. Jednak próby „uczulania” komórek nowotworowych na indukcję apoptozy, spo-

wodowanej lekami i promieniami jonizującymi, z udziałem genu p53 nie zawsze okazywały się skuteczne. W wielu wypadkach wprowadzony gen p53 indukował zahamowanie podziałów komórkowych, a nie apoptozę [10].

Ostatnie badania wskazują, że apoptozę w komórkach nowotworowych można wywołać poprzez wprowadzenie do nich genów kodujących proapoptotyczne białka [8]. Szczególnie interesujące wydają się być te prace, w których do indukcji apoptozy w komórkach nowotworowych wykorzystano proapoptotyczne geny niektórych wirusów [11, 12]. Geny te kodują białka swoiście indukujące apoptozę w komórkach nowotworowych. Ta wysoka swoistość indukcji apoptozy w komórkach nowotworowych, a nie w komórkach prawidłowych, przez proapoptotyczne białka wirusowe, może stać się istotnym *novum* w terapii nowotworów.

Apoptoza

W komórkach apoptoza jest indukowana za pośrednictwem „zewnętrznych” białkowych sygnałów przesyłanych przez inne komórki [1]. Apoptoza może być także swoistą odpowiedzią, reakcją komórek na stres środowiskowy (np. niereperowalne uszkodzenia DNA, niedotlenowanie komórek, brak czynników przeżycia) [13] (zob. Ryc. 1). Różne rodzaje sygnałów (sygnały



Ryc. 1. Różne sygnały (sygnały stresu i śmierci) indukujące w komórce apoptozę

śmierci, stresu) uruchamiają szlak aktywacji enzymów należących do grupy proteaz cysteinowych, enzymów rozszczepiających białka po reszcie kwasu asparaginowego, tzw. kaspaz [3, 4] (zob. Ryc. 2). Aktywacja kaspaz oraz innych, nie tylko proteolitycznych enzymów, prowadzi do dyspersji jądra komórkowego oraz rozpadu komórki na tzw. ciała apoptotyczne. Ciała apoptotyczne (fragmenty komórek otoczone błoną komórkową) fagocytowane są następnie przez najbliższe komórki i makrofagi [14].

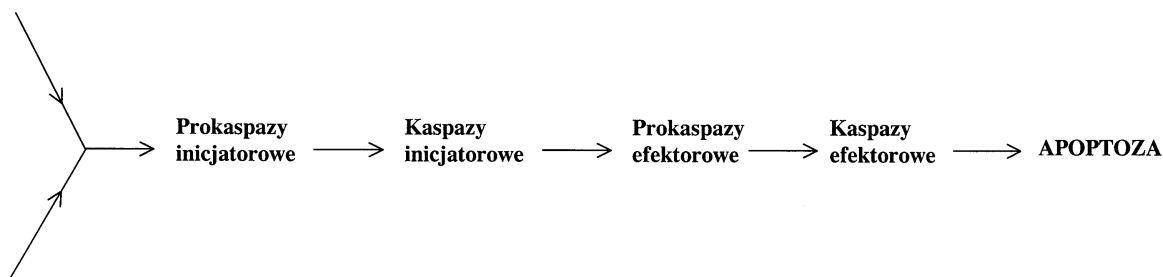
W procesie apoptozy biorą udział dwa rodzaje kaspaz, tzw. kaspazy inicjatorowe (aktywujące inne kaspazy) oraz kaspazy efektorowe (biorące udział w dalszych etapach apoptozy) [3, 4]. Oba rodzaje kaspaz występują w komórkach w postaci tzw. zymogenów, nieaktywnych, latentnych proenzymów (prokaspaz). Prokaspazy inicjatorowe ulegają autokatalitycznej aktywacji w kompleksach

z innymi białkami. Kompleksy te niekiedy nazywa się apoptosomami [15]. Kaspazy inicjatorowe aktywują następnie prokaspazy efektorowe, które uruchamiają kaskady proteolitycznych reakcji (Ryc. 2).

Sygnały apoptotyczne (białkowe „sygnały śmierci” typu cytokin) odbierane są przez komórki za pośrednic-

torowa. Do lepiej poznanych białek adaptorowych należą białka FADD, TRADD, RIP, TRAF2. Do jednego z tych białek (FADD) zostaje następnie przyłączona prokaspaza 8. Dopiero w tym kompleksie, składającym się z receptora i adaptora FADD, prokaspaza 8 ulega autokatalitycznej aktywacji (Ryc. 3). W reakcji wiązania proka-

Sygnały stresu



Sygnały śmierci

Ryc. 2. Sygnały stresu i sygnały śmierci aktywują kaspazy inicjatorowe i efektorowe. Sygnały uruchamiają różne szlaki metaboliczne, prowadzące do aktywacji prokaspaz inicjatorowych (np. 8, 9), a następnie prokaspaz efektorowych (np. 3, 6, 7). Kaspazy efektorowe indukują w komórkach śmierć apoptotyczną.

twem swoistych błonowych receptorów [16]. Cytokiny te mogą występować w tzw. formie rozpuszczalnej lub mogą znajdować się w błonach innych komórek. W tym ostatnim wypadku „sygnał śmierci” przekazywany jest poprzez kontakt międzykomórkowy. Na przykład kontakt międzykomórkowy jest konieczny między komórkami CTL i NK a komórkami, które mają być przez nie zabite [5]. Komórki CTL i NK perforują błonę komórkową zabijanych komórek (z udziałem perforyny), a przez powstałe pory wprowadzają do nich enzymy, granzym A i granzym B, z których jeden – granzym B aktywuje prokaspazy.

Jednymi z lepiej poznanych receptorów „sygnałów śmierci” są receptory należące do rodziny receptorów TNF (czynnika nekrozy nowotworów) [16]. Do rodziny tej zalicza się, oprócz receptora TNFR1 (zwanego także p55, CD120a), także receptory Fas (CD95, Apo1), DR3 (Apo3, WSL-1, TRAMP, LARD), DR4, DR5 (Apo2, KILLER, TRICK2, TRAIL-R2) oraz receptory DcR1 (TRIDD, TRAIL-R3, LIT) i DcR2 (TRUNDD, TRAIL-R4). Receptory te występują w błonach wielu komórek, szczególnie w komórkach układu immunologicznego. Odgrywają ważną rolę w eliminacji, negatywnej selekcji, różnych populacji limfocytów.

Receptory rodziny TNF wiążą swoiste ligandy. Na przykład receptor Fas wiąże tzw. ligand FasL (CD95L), receptor TNFR1 przyłącza TNF α i limfotoksynę α , receptor DR3 (Apo3) rozpoznaje ligand Apo3L, a receptory DR4, DR5, DcR1 i DcR2 wiążą ligand Apo2L (TRAIL) [16].

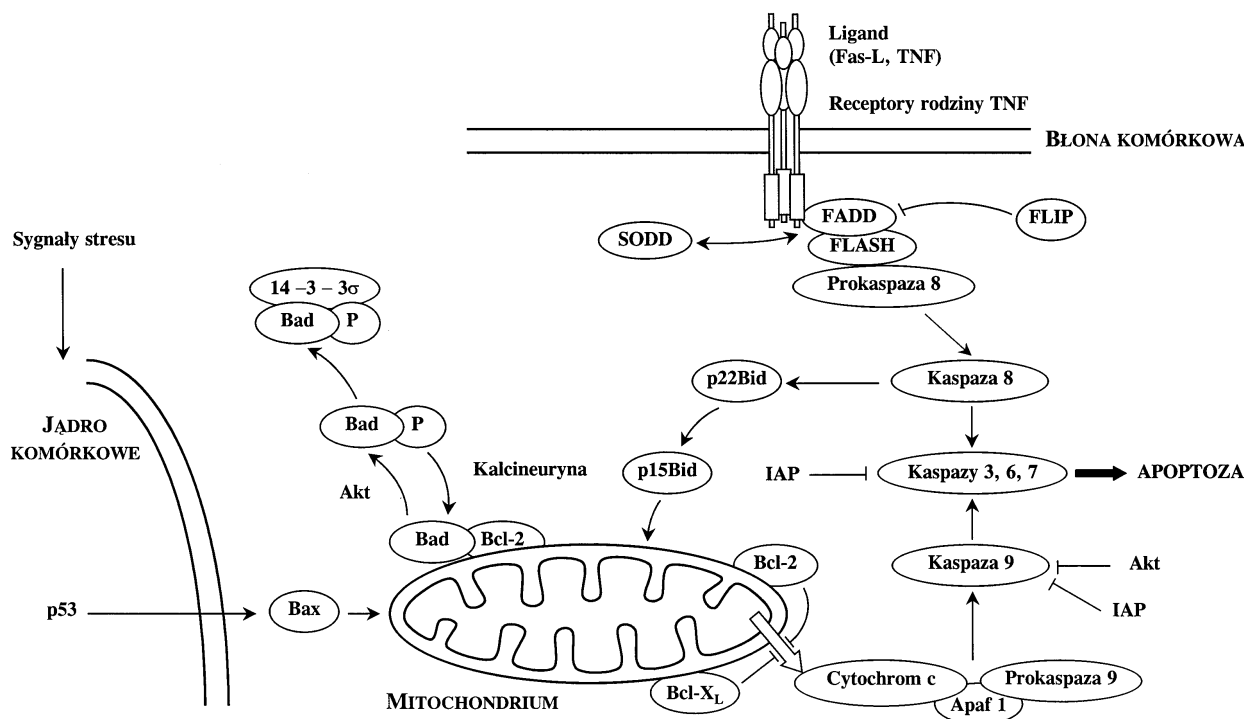
Cytoplazmatyczne fragmenty receptorów z rodziny TNF nie mają domen katalitycznych [15]. Dlatego zaktywowany receptor (receptor ze związanym ligandem) wiąże tzw. białka pośredniczące, białka adaptorowe, do których z kolei przyłącza się prokaspaza inicja-

spazy 8 bierze również udział białkowo adaptorowe FLASH [17].

Interakcja białek adaptorowych z cytoplazmatycznym fragmentem receptorów z rodziny TNF zachodzi z udziałem tzw. domen śmierci (DD), swoistych aminokwasowych sekwencji znajdujących się zarówno w białkach adaptorowych, jak i w receptorach [16]. Interakcję taką, między identycznymi domenami, nazywa się oddziaływaniami homofilowymi. Białko FADD, oprócz domeny DD (*ang. death domain*), posiada również tzw. domenę efektorową (DED, *ang. death effector domain*), do której przyłącza się swoją domeną DED prokaspaza 8.

Jedno z adaptorowych białek, białko FLIP, pełni funkcję regulacyjną: zapobiega wiązaniu kaspazy 8 z adaptorem FADD i hamuje w ten sposób indukcję apoptozy [18]. Aktywność receptora TNFR1 jest kontrolowana także przez białko SODD, które zapobiega jego samoaktywacji [19]. Wiążąc się z częścią cytoplazmatyczną receptora TNFR1 białko SODD uniemożliwia przyłączenie białka adaptorowego FADD.

Niektóre adaptory, np. TRADD, RIP, TRAF1, TRAF2, biorą udział w aktywacji kinaz indukujących transkrypcyjny czynnik NF κ B [16]. Efektem działania kinaz NIK (*ang. NF κ B inducing kinase*) i IKK (*ang. inhibitor of κ B kinase complex*) jest fosforylacja inhibitora I κ B α (skompleksowanego z NF κ B), jego degradacja i uwalnianie z kompleksu czynnika NF κ B. Czynniki te aktywują następnie ekspresję swoistych genów, w tym m.in. genów kodujących endogenne inhibitory apoptozy, zwane cIAP1 i cIAP2. Białka TRAF2 i RIP mogą także aktywować szlak kinazy JNK (*ang. c-Jun N-terminal kinase*). Kinaza ta bierze z kolei udział w aktywacji białka c-Jun, składnika czynnika transkrypcyjnego AP-1. Czynniki AP-1 może brać



Ryc. 3. Schemat relacji między szlakiem apoptozy indukowanej cytokinami należącymi do rodziny TNF- α oraz szlakiem indukcji apoptozy różnymi czynnikami stresu. Na schemacie przedstawiono typowy receptor (receptor Fas i TNFR), należący do rodziny TNF. Po związaniu ligandów (cytokin) pobudzone receptory aktywują kaspazę 8, biorącą następnie udział w aktywacji kaspaz 3, 6, 7. Czynniki stresu, *via* białko P53, aktywują głównie transkrypcję genu *bax*, którego białkowy produkt uwalnia cytochrom *c* z mitochondrium. Cytochrom *c* wraz z tzw. białkiem Apaf-1, bierze udział w aktywacji inicjatorowej kaspazy 9, która z kolei aktywuje inne kaspazy efektorowe. Oba szlaki łączą się ze sobą za pośrednictwem białka Bid. Na rycinie pokazano także miejsca działania niektórych, z lepiej poznanych inhibitorów apoptozy.

udział w regulacji transkrypcji genów kodujących prozapalne i immunomodulacyjne białka [16].

Związanie TNF- α przez receptor TNFR1 nie zawsze zatem może prowadzić do indukcji apoptozy. W pewnych warunkach TNF α może aktywować geny kodujące prozapalne i immunomodulacyjne białka [16].

Należące do rodziny receptorów TNFR1 receptory DcR1 i DcR2, w przeciwieństwie do innych receptorów tej rodziny DR4 i DR5, nie posiadają cytoplazmatycznych domen, mogących kompleksować z białkami adaptacyjnymi i nie są w stanie brać udziału w transmisji sygnałów aktywujących kaspazy [16]. Mimo pobudzenia przez cytokinę Apo2L(TRAIL), znajdującą się w błonie komórkowej innych komórek, receptory te nie mogą indukować apoptozy. Są one w istocie pułapkowymi receptorami (ang. *decoy receptors*): „wyłapują” proapoptyczne ligandy i chronią w ten sposób komórki przed indukcją apoptozy.

W wielu komórkach nowotworowych nie obserwuje się receptorów pułpkowych DcR1 i DcR2. Występują w nich natomiast receptory DR4 i DR5. Ich obecność w komórkach nowotworowych umożliwia indukcję w nich apoptozy przez cytokinę Apo2(TRAIL) [20].

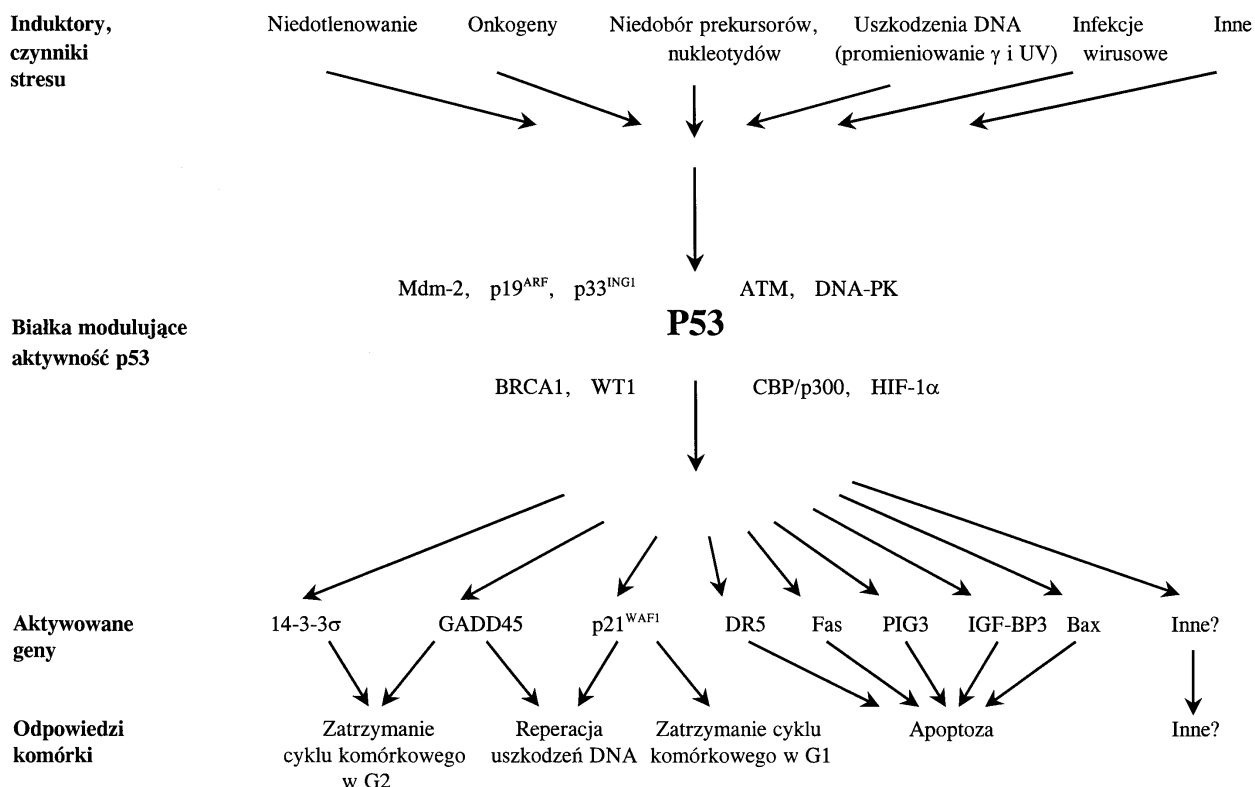
Apoptoza może być także wywołana w komórkach różnymi czynnikami stresu [13]. Reakcja komórki na środowiskowy stres (np. uszkodzenia DNA, niedotlenowanie komórek, aktywacja onkogenów) przebiega z udziałem białka P53 oraz wielu białek modulujących jego aktywność, a więc m.in. białka Mdm-2, białka ATM, białka

p19^{ARF}, CBP/p300, DNA-PK kinazy, białka HIF- α [21, 22] (zob. Ryc. 4). W zależności od rodzaju stresu (np. uszkodzenia DNA) białko P53 ulega tzw. potranslacyjnej modyfikacji. Przy pomocy odpowiednich enzymów białko P53 zostaje ufosforylowane i acetylowane w ściśle określonych miejscach. Dzięki zmianom konformacyjnym białko to może zmieniać swoje powinowactwo do różnych promotorów i aktywować transkrypcję różnych genów.

W reakcjach fosforylacji białka P53 bierze udział głównie kinaza DNA-PK (ang. *DNA dependent protein kinase*) oraz białko ATM (ang. *ataxia telangiectasia mutated protein*) [21, 22]. Ufosforylowane białko P53 jest białkiem stabilnym i słabo wiąże się z białkiem regulatorowym Mdm-2 (nieufosforylowane białko P53 skompleksowane jest z białkiem Mdm-2 i ulega degradacji w proteosomach). Białko p19^{ARF}, syntetyzowane w odpowiedzi na stres spowodowany nadekspresją niektórych onkogenów (np. c-myc), bierze udział w stabilizacji cząsteczek P53. Białko p19^{ARF} przyłącza się do kompleksu Mdm-2-P53 i uwalnia z niego aktywne białko P53.

Podobnie jak reakcje fosforylacji również reakcje acetylacji białka P53 przez białka p300 i CBP odgrywają ważną rolę w modyfikacji jego konformacji [23, 24]. Ponadto acetylowane białko P53 jest też dużo lepiej fosforylowane przez odpowiednie kinazy.

Do białek modulujących aktywność p53 należą również białka supresorowe BRCA1 i WT1. Są one czynnikami transkrypcyjnymi, wzmacniającymi aktywność transkrypcyjną białka P53 [23]. Z białkiem P53 wiąże się także



Ryc. 4. Białka modulujące aktywność p53 oraz aktywacja genów odpowiedzi komórkowej na różne czynniki stresu. Czynniki te indukują głównie reakcje fosforylacji i acetylacji białka P53. Ufosforylowane białko P53 nie jest wiązane przez białko regulatorowe Mdm-2 i może brać udział w aktywacji różnych genów. Bardziej szczegółowy opis udziału poszczególnych białek regulujących aktywność białka P53 znajduje się w tekście pracy.

tw. białko P33^{ING1}. Dokładna funkcja tego białka nie jest jednak poznana [23].

Z białkiem P53 wiąże się także czynnik HIF-1 α (ang. *hypoxia-inducible factor 1 α*), czynnik białkowy indukowany w odpowiedzi na niedotlenowanie komórek. Czynnik ten kompleksuje z P53 i stabilizuje w ten sposób jego aktywność transkrypcyjną [23].

Odpowiednio zmodyfikowane, „zaktywowane” białko P53 uruchamia transkrypcję szeregu różnych genów kodujących białka, które biorą udział w odpowiedzi komórek na stres [13, 23, 25, 26]. Odpowiedź ta obejmuje m.in. reperację uszkodzeń materiału genetycznego, zahamowanie cyklu komórkowego w fazach G1 i G2 oraz apoptozę (zob. Ryc. 4). Który z tych procesów będzie miał miejsce, zależy jednak od rodzaju komórek, mikrośrodowiska w jakim się znajdują, rozmiaru uszkodzeń DNA, innymi słowy: od szeroko pojętego „kontekstu”. Od kontekstu będzie więc zależało, czy w komórce, która nie jest w stanie usunąć i zreperować swoich uszkodzeń DNA, zajdzie indukcja apoptozy, czy też zahamowanie cyklu podziałowego.

Indukcja zależnej od p53 apoptozy jest w miarę dobrze poznana [23, 26]. W odpowiedzi na sygnał apoptotyczny białko P53 aktywuje ekspresję szeregu genów kodujących m.in.: białka Bax, białka PIG3 (białka te biorą udział w regulacji potencjału oksydoredukcyjnego w komórkach), białka należące do rodziny receptorów TNF: białka Fas (Apo1) i DR5 (Apo2), a także białka IGF-BP3 (wiążącego insulinopodobny czynnik wzrostu IGF-1) oraz

receptory dla tego czynnika (zob. Ryc. 4). Zmniejszenie stężenia IGF-1 poprzez jego zwiążanie lub blokowanie sprawia, że w komórce znacznie spada poziom tego, niezbędnego dla przeżycia komórek, czynnika wzrostu.

W bliżej nieznanym sposobie białko P53 wpływa także na translokację białka receptora Fas z aparatu Golgiego do błony komórkowej. Jest to prawdopodobnie tzw. nietranskrypcyjny wpływ białka P53 na proces indukcji apoptozy [27].

Podstawowym białkiem biorącym udział w apoptozie zależnej od P53 jest białko Bax. Białko Bax ma zdolność do otwierania kanałów znajdujących się w błonach mitochondrialnych i uwalniania z mitochondrium cytochromu c. Być może białko Bax ma także zdolność do perforacji błon mitochondrialnych [28]. Uwolniony cytochrom c wraz z tzw. białkiem Apaf-1, ATP (i/lub dATP) oraz inicjatorową prokaspazą 9 tworzy wielobiałkowy kompleks (apoptosom), w którym prokaspaza 9 ulega autokatalitycznej aktywacji (zob. Ryc. 3). Białko Apaf-1 wiąże się z prokaspazą 9 za pośrednictwem swoistych domen CARD (ang. *caspase recruitment domain*). Domeny te funkcjonalnie są podobne do domen DED, biorących udział w aktywacji kaspazy 8 [3, 15].

Indukcja i regulacja procesu apoptozy w niektórych przypadkach jest swoista tkankowo. W komórkach mięśni serca np. występują inhibitory apoptozy nie spotykane w innych komórkach [29].

Zależna od p53 apoptoza może być regulowana na wielu etapach transmisji sygnałów proapoptotycznych.

Uwalnianie cytochromu c z mitochondrium może być hamowane przez szereg białek antyapoptotycznych, należących do rodziny Bcl-2 (w tym Bcl-X_L, Bcl-w, Mcl-1) (Ryc. 3) [30]. Do rodziny białek Bcl-2 zalicza się obecnie około dwadzieścia białek: zarówno proapoptotycznych, jak i antyapoptotycznych [31]. Mechanizm hamowania apoptozy przez białka Bcl-2 nie jest jednak dobrze poznany. Wcześniejsze przypuszczenia, że białko Bcl-2 tworzy dimery z białkiem Bax i blokując w ten sposób proapoptotyczne białko może hamować apoptozę, nie wydają się trafne. Obecnie wydaje się, że Bcl-2 raczej w pośredni sposób może wpływać na zachowanie integralności błony mitochondrialnej i zapobiegać uwalnianiu cytochromu c [28, 30]. Być może, w równie pośredni sposób, Bcl-2 wpływa także na wiązanie przez białko Apaf-1 cytochromu c i kaspazy 9 [32].

Szczególny sposób regulacji apoptozy związany jest z tzw. kinazą Akt/PKB [33, 34]. Kinaza Akt/PKB fosforyluje białko Bad i uwalnia z kompleksu Bad-Bcl-2 aktywny inhibitor apoptozy białko Bcl-2 (zob. Ryc. 3). Ufosforylowane białko Bad jest wiązane przez cytoplazmatyczne białko 14-3-3δ. Natomiast kalcineuryna defosforyluje białko Bad, które może ponownie kompleksować z białkiem Bcl-2. Substratem kinazy Akt/PKB może być także kaspaza 9, która w ufosforylowanej postaci jest białkiem nieaktywnym [35]. Kaspaza 9 może być również zahamowana przez endogenne inhibitory typu IAP, przypominające niektóre wirusowe białka antyapoptotyczne (Ryc. 3) [29].

W komórkach mięśni serca występuje inhibitor apoptozy zwany ARC (ang. *apoptosis repressor with CARD*). Jest to białko, które posiada domenę CARD, za pomocą której wiąże się z identyczną domeną obecną w Apaf-1 i w kaspazie 8 [36].

Aktywność kaspaz efektorowych (3, 6, 7) może być hamowana przez swoistą S-nitrozylację (z udziałem tlenku azotu i odpowiednich enzymów) [37], przez białka szoku Hsp70 oraz przez endogenne inhibitory apoptozy (IAP) [29].

Oba szlaki indukcji apoptozy: *via* cytokiny i *via* białko P53 łączą się ze sobą za pośrednictwem tzw. białka Bid [15] (zob. Ryc. 3). Z nieaktywnego prekursorowego białka Bid (o masie cząsteczkowej 22kDa), pod wpływem trawienia przez kaspazę 8, uwalniany jest fragment o masie cząsteczkowej 15kDa. Fragment ten, podobnie jak białko Bax, wykazuje zdolność uwalniania cytochromu c z mitochondrium, ale jest od białka Bax o wiele silniejszym induktorem apoptozy [38]. Wydaje się, że białko Bid może więc wzmacniać niedostateczne, słabe sygnały proapoptotyczne płynące szlakiem: P53→Bax→mitochondrium (zob. Ryc. 3).

Apoptoza w nowotworach

W złożonym procesie nowotworzenia – przypominającym proces ewolucji – drogą selekcji powstają warianty komórkowe, posiadające nowe cechy fenotypowe [39]. Są wśród nich np. komórki zdolne do indukcji angiogenezy (prolifracji komórek śródbłonkowych) i tworzenia

nowych sieci naczyń krwionośnych. Wśród nowych wariantów są m.in. komórki wymykające się spod kontroli nadzoru immunologicznego, jak i komórki, które utraciły zdolność adhezji do macierzy pozakomórkowej. Najogólniej mówiąc, komórki nowotworowe tworzą nowe relacje typu komórka-komórka oraz komórka-macierz pozakomórkowa, relacje pozwalające na ich daleko posuniętą autonomizację [40].

Zarówno w postępującej autonomizacji komórek nowotworowych, jak i w tworzeniu nowych powiązań (sieci „socyjalnych” relacji), wydaje się, że niepoślednią rolę odgrywa proces apoptozy [6]. Komórki nowotworowe stają się odporne na większość sygnałów indukujących apoptozę (np. sygnałów wysyłanych przez komórki układu immunologicznego). Stają się również odporne na większość sygnałów proapoptotycznych, indukowanych czynnikami stresu (np. uszkodzenia DNA, niedotlenowanie). Jak się zdaje, dzięki pojawieniu się w błonach niektórych komórek nowotworowych ligandów FasL, mogą one indukować apoptozę w komórkach limfocytów T (indukcja ta ma miejsce podczas kontaktów międzykomórkowych limfocytów T z komórkami nowotworowymi) [5, 41]. Być może jest to jedna z przyczyn osłabienia tzw. nadzoru immunologicznego.

Oporne na indukcję apoptozy komórki nowotworowe pozostają jednak dalej uzależnione od wielu tzw. czynników przeżycia, np. od cytokiny IL-3, IGF-1 lub tzw. czynników troficznycy, wydzielanych przez niektóre komórki prawidłowe. Komórki czerniaka są np. szczególnie „uzależnione” od czynników troficznycy, wydzielanych przez komórki nerwowe, tzw. neutrotrofin (w tym tzw. NGF – czynnika wzrostu nerwu) [42]. Zahamowanie dopływu czynników przeżycia indukuje w komórkach nowotworowych proces apoptozy [43-45].

Szereg danych wskazuje, że w powstawaniu fenotypu opornego na apoptozę ważną rolę odgrywają mutacje i delecje takich genów supresorowych jak np. *p53* [26], *mda-7* [46], *Fhit* [47], *BRCA1* [48], *APC* [49]. W warunkach doświadczalnych, wprowadzenie do komórek nowotworowych prawidłowych kopii tych genów przywraca komórkom zdolność do indukcji apoptozy. Na marginesie należy dodać, że istnieją „wyjątki od reguły”: niektóre zmutowane geny *p53*, po wprowadzeniu do komórek nowotworowych, indukują w nich apoptozę [50, 51].

W przeciwieństwie jednak od genów *Fhit*, *BRCA1*, *APC* mutacje lub delecje innych genów supresorowych, np. *Rb* [52], *WT1* [53], mają związek z indukcją w komórkach nowotworowych apoptozy. Gen *Rb* koduje białko, które bierze udział w regulacji cyklu komórkowego, zwłaszcza tzw. punktu restrykcyjnego na granicy faz G1 i S [52]. W fazie G1 cyklu komórkowego białko Rb znajduje się w komórce w postaci kompleksu z czynnikiem transkrypcyjnym E2F-1. Po fosforylacji białka Rb przez kinazę typu Cdk (cyklinozależną kinazę) następuje uwolnienie z kompleksu czynnika transkrypcyjnego E2F-1. Uwolniony E2F-1 uruchamia ekspresję genów, których białkowe produkty biorą udział w dalszych etapach cyklu komórkowego. Uszkodzenie genu *Rb* powoduje, że niezwiązany z białkiem Rb czynnik E2F-1 indukuje apopto-

zę. Proces indukcji apoptozy przez czynnik E2F-1 nie jest jednak bliżej poznany.

Podobnie nie jest bliżej poznany udział supresorowego genu *WT1* w indukcji apoptozy. Wiadomo jedynie, że gen *WT1* koduje czynnik transkrypcyjny, który oprócz aktywacji różnych genów, bierze udział także w aktywacji genu *Bcl-2* [54]. Być może mutacje genu *WT1* powodują, że zmutowane białko WT1 nie aktywuje genu *Bcl-2*.

Apoptotyczną kontrolę nad punktem restrykcyjnym cyklu komórkowego G2-S wydają się pełnić białka należące do rodziny białek rozpoznających i wycinających niewłaściwie włączone nukleotydy podczas replikacji DNA, tzw. białka MMR (ang. *mismatch repair*) [55]. Mutacje niektórych genów tej rodziny, a zwłaszcza genów zwanych *hMSH2* i *hMLH1* prowadzą do powstania tzw. efektu mutatorowego (zwiększonej częstości mutacji) i utraty apoptotycznej kontroli nad punktem restrykcyjnym G2-S [56].

Mutacje (delecje) genu *PTEN*, kodującego fosfotazę 3,4,5 – fosforanu inozytolu (PIP3), wiążą się prawdopodobnie z pojawieniem oporności komórek nowotworowych na indukcję apoptozy, związanej z brakiem adhezji komórek do macierzy pozakomórkowej [57]. W komórkach prawidłowych zerwanie połączeń z białkami macierzy indukuje swoisty proces apoptozy zwany *anoikis*, od greckiego słowa oznaczającego bezdomność [58]. Przypuszcza się, że defosforylacja PIP3 wpływa hamująco na aktywność kinazy Akt/PKB, biorącej udział m.in. w uaktywnieniu silnego czynnika antyapoptotycznego białka Bcl-2 [57, 59-61].

Fosfotaza PTEN może także defosforylować szereg białek, w tym tzw. kinazę FAK (ang. *focal adhesion kinase*) hamując w ten sposób jej aktywność [62]. W komórkach prawidłowych supresja aktywności kinazy FAK wiąże się m.in. z zahamowaniem zdolności komórek do samodzielnej migracji. Uaktywnienie kinazy FAK, związane m.in. z pojawieniem się mutacji w genie *PTEN*, pozwala komórkom nowotworowym na migrację i swobodne przemieszczanie się.

W wielu nowotworach (białaczkach, chłoniakach, guzach litych) obserwuje się także charakterystyczną nadekspresję białka Bcl-2, uważanego za antagonistę białka Bax [6]. Nadekspresja białka Bcl-2 wyraźnie hamuje apoptozę indukowaną przez białko Bax [30].

W niektórych nowotworach układu pokarmowego opisano także mutacje jednego z proapoptotycznych genów, genu *bax* [63].

Jeszcze w innych nowotworach, np. w raku nerki, fenotyp oporny na apoptozę związany jest z utratą kaspazy 3 oraz zmniejszoną aktywnością kaspazy 7, 8 i 10 [64].

W nowotworach układu pokarmowego pojawia się nadekspresja białka należącego do rodziny endogennych inhibitorów apoptozy (IAP), zwanego surwiwiną (ang. *survivin*) [65]. Surwiwina wydaje się odgrywać rolę w przejściu przez tzw. punkt kontrolujący powstawanie wrzeciona podziałowego. „Przepuszczając” defekty w strukturze wrzeciona lub ułożeniu na nim chromosomów surwiwina działa jako białko antyapoptotyczne [66]. Interesujące, że w komórkach śródbłonkowych, pobudzonych do proli-

feracji przez naczyniowo-śródbłonkowy czynnik wzrostu VEGF, obserwuje się wzrost ekspresji genu *Bcl-2*, niektórych genów *LAP*, a także genu kodującego surwiwinę [67].

W komórkach nowotworowych, zwłaszcza w komórkach czerniaka, stwierdzono nadekspresję inhibitora apoptozy FLIP, białka adaptorowego kontrolującego indukcję apoptozy z udziałem kaspazy 8 [18].

Pojawienie się w komórkach nowotworowych nadekspresji białka FLIP lub białek należących do rodziny inhibitorów IAP przypomina mechanizmy supresji apoptozy przez niektóre wirusy [68]. Wirusy (np. adenowirusy, wirusy herpes, czy niektóre wirusy owadów) posiadają w swych genomach geny kodujące inhibitory apoptozy homologiczne do FLIP oraz niektórych inhibitorów IAP. W komórkach z zahamowaną apoptozą dochodzi do replikacji wirusowego materiału genetycznego i powstania infekcyjnych cząstek wirusowych.

Najogólniej mówiąc: mechanizm indukcji apoptozy w komórkach nowotworowych jest mocno defektywny. Uszkodzenia dotyczyć mogą różnych genów biorących udział w regulacji i samym przebiegu apoptozy. W komórkach nowotworowych, w procesie progresji, akumuluje się coraz więcej nieskorygowanych błędów związanych z replikacją, cyklem komórkowym, adhezją itd. Zmniejszeniu zdolności do indukcji apoptozy towarzyszy coraz większa autonomizacja komórek.

Apoptoza a terapia nowotworów

Panuje głębokie przekonanie, że mechanizm działania większości leków przeciwnowotworowych, a także promieni jonizujących, polega przede wszystkim na indukcji w komórkach nowotworowych apoptozy: populacje komórek nowotworowych „uczulonych” na apoptozę giną, a pozostają przy życiu komórki „oporne” na działanie apoptotyczne leków czy promieniowanie [10, 25, 69, 70]. Brown i Wouters [7] wskazują jednak, że podczas terapii większość komórek ginie, nie tylko w wyniku apoptozy indukowanej przez leki, ale także z powodu nekrozy (toksycznego działania leków). W nowotworach, w których nie ma efektorowych kaspaz, lub poziom ich ekspresji nie jest wystarczająco wysoki, obserwuje się raczej nekrozę niż indukcję apoptozy [64, 71].

Zdaniem Browna i Woutersa [7] krytycznej ocenie należy również poddać relację między opornością komórek nowotworowych na leki indukujące apoptozę, zwłaszcza w nowotworach typu guzów litych, a statusem genu *p53* (obecnych w tym genie mutacji). Nie wydaje się, aby skuteczność terapii guzów litych zależała od tego, czy gen *p53* jest zmutowany, czy też nie [7].

Nie ulega natomiast wątpliwości, że taką relację pomiędzy opornością na leki indukujące apoptozę a statusem genu *p53*, można zaobserwować w białaczkach i chłoniakach. W tym przypadku powodzenie i skuteczność terapii zależy od obecności w komórkach nowotworowych prawidłowego genu *p53* [7, 25].

Szereg jednak danych wskazuje, że w komórkach nowotworowych guzów litych można wyindukować sponta-

niczną apoptozę, wprowadzając do nich geny kodujące różne proapoptotyczne białka [8]. Wprowadzenie do komórek nowotworowych genu kompensującego brak genu proapoptotycznego lub wprowadzenie dodatkowego genu proapoptotycznego prowadzi do indukcji w tych komórkach apoptozy.

W pewnych przypadkach, genetyczne zabiegi związane ze zmniejszeniem stężenia czynnika IGF-1 indukowały apoptozę w badanych liniach komórkowych. Zabiegi te polegały na wprowadzeniu do komórek antysensowych oligonukleotydów, hamujących ekspresję genu kodującego *IGF-1* [44] lub genu kodującego tzw. rozpuszczalny receptor dla tego czynnika [45].

W badaniach nad wprowadzeniem do komórek nowotworowych proapoptotycznych genów, jak dotychczas, stosowano dwa rodzaje genów: geny kodujące endogenne białka proapoptotyczne (białka biorące udział w szlakach aktywujących kaspazy), oraz geny kodujące egzogenne białka pochodzenia wirusowego, indukujące apoptozę w docelowych komórkach (zob. Tab. I).

tzw. apoptynę [11]. Białko to, liczące 121 aminokwasów, którego proapoptotyczne działanie nie jest jeszcze dobrze poznane, wykazuje szczególną preferencję do indukcji apoptozy w komórkach nowotworowych. Cecha ta może być wykorzystana do swoistego niszczenia komórek nowotworowych (zob. Ryc. 5).

Innym, zasługującym na uwagę genem pochodzenia wirusowego, swoście indukującym apoptozę w komórkach nowotworowych, jest tzw. gen *E4orf4* adenowirusów [12]. Gen ten należy do grupy tzw. wczesnych genów, których transkrypcja zachodzi przed replikacją wirusowego DNA. Białko E4orf4 (o masie cząsteczkowej 14kDa) indukuje apoptozę w komórkach nowotworowych. Proces indukcji apoptozy nie jest jednak dobrze poznany. Nie ulega wątpliwości, że związanie białka E4orf4 z białkową fosfatazą 2A (PP2A) jest dla indukcji tego procesu koniecznym warunkiem [12].

Białkiem swoście indukującym apoptozę w komórkach nowotworowych jest wspomniana już wcześniej cyto-

Tab. I. Proapoptotyczne geny, które można zastosować w terapii genowej nowotworów

Gen	Funkcja kodowanego białka	Piśmiennictwo
<i>Bax</i>	Uszkodzenie mitochondrium, wypływ cytochromu c	Coll i wsp. [72] Tai i wsp. [73]
<i>Bcl-X_S</i>	jw.	Clarke i wsp. [74] Dole i wsp. [75] Ealovega i wsp. [76]
<i>Bim</i>	jw.	O'Connor i wsp. [81]
<i>FADD</i>	Białko adaptorowe	Kondo i wsp. [77]
<i>Fas-L</i>	Cytokina wiążąca się z receptorem Fas	Arai i wsp. [82]
<i>E2F-1</i>	Czynnik transkrypcyjny kompleksujący z białkiem Rb	Hunt i wsp. [78] Liu i wsp. [79]
<i>IκBα</i>	Inhibitor czynnika transkrypcyjnego NFκB	Sumimoto i wsp. [80]
<i>hMSH2, hMLH1</i>	Białka biorące udział w usuwaniu i reparacji nieprawidłowych nukleotydów	Zhang i wsp. [56]
<i>mda-7</i>	Białko supresorowe (?)	Su i wsp. [46]
<i>Apoptyna</i>	Proapoptotyczne białko wirusa CAV (ang. <i>chicken anemia virus</i>)	Pietersen i wsp. [11]
<i>E4orf4</i>	Proapoptotyczne białko kodowane przez gen regionu E4 adenowirusa	Shtreichman i wsp. [12]

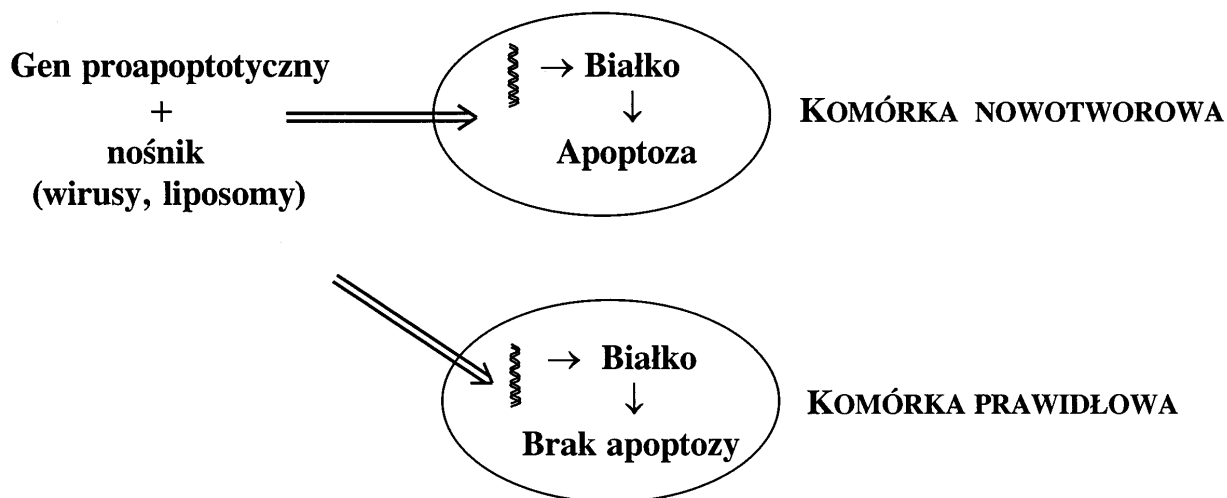
W badaniach wykorzystano takie geny proapoptotyczne, jak geny kodujące białko Bax [72, 73], geny kodujące proapoptotyczne białka z rodziny Bcl-2, tzw. białko Bcl-X_S [74-76], geny kodujące białko adaptorowe FADD [77], czynnik transkrypcyjny E2F-1 [78, 79], białko IκBα (inhibitor czynnika transkrypcyjnego NFκB, który aktywuje geny kodujące białka hamujące apoptozę) [80], a także białko MMR (hMSH2 i hMLH1) [56].

Wspomniane geny wprowadzono do różnych komórek nowotworowych, najczęściej za pośrednictwem wirusów (głównie adenowirusów). W wielu wypadkach obserwowano wyraźną indukcję apoptozy w komórkach nowotworowych i, co najważniejsze, zahamowanie wzrostu guzów nowotworowych u doświadczalnych zwierząt.

Jedynym, jak dotąd, wprowadzonym *in vivo* do komórek nowotworowych genem, kodującym egzogenne białko proapoptotyczne pochodzenia wirusowego (tzw. wirusa CAV, ang. *chicken anemia virus*), był gen kodujący

kina Apo2L(TRAIL) (zwłaszcza w tzw. rozpuszczalnej postaci) [83].

Indukcja apoptozy wywołanej wprowadzeniem genów kodujących proapoptotyczne białka, zwłaszcza genów kodujących apoptynę i E4orf4, do komórek nowotworowych, w których większość układów enzymatycznych, biorących udział w kontroli i w samym przebiegu apoptozy, jest mocno uszkodzona i defektywna, nie jest jednak dobrze poznana. Wydaje się, że w niektórych wypadkach mamy do czynienia ze śmiercią komórek, spowodowaną uszkodzeniem błony mitochondrialnej i destrukcją mitochondriów [28]. Destrukcja mitochondriów prowadzi m.in. do zaburzenia transportu elektronów, oksydacyjnej fosforylacji, syntezy ATP i zmian w potencjale oksydo-redukcyjnym komórek [84]. Śmierć taka ma zupełnie inny przebieg niż śmierć apoptotyczna z udziałem kaspaz. Choć wykazuje pewne morfologiczne podobieństwo do apoptozy, przebiega od niej o wiele dłużej (czas trwania apoptozy można wyznaczyć w minutach, czas trwania śmierci



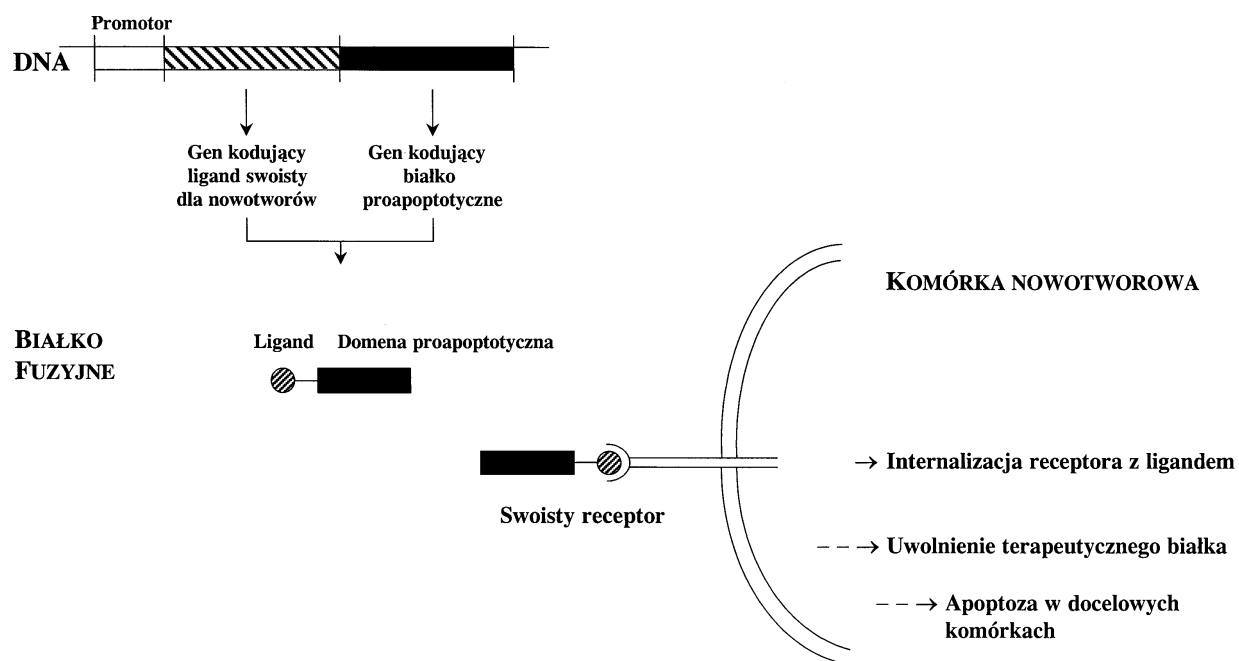
Ryc. 5. Terapia z wykorzystaniem wirusowych proapoptycznych genów. Wprowadzone geny indukują swoiście apoptozę w komórkach nowotworowych.

komórek spowodowanej destrukcją mitochondriów – w dniach). Niektórzy nazywają ją apoptozą niezależną od kaspaz [85], inni – pewną postacią nekrozy [64, 71]. Indukowanie w komórkach nowotworowych tej odmiany śmierci może być celem nowej generacji leków.

Zakończenie

W pracy przedstawiliśmy dane wskazujące na możliwość wykorzystania w terapii nowotworowej białek proapoptycznych, swoiście indukujących apoptozę w komórkach nowotworowych, a nie w komórkach prawidłowych. Proapoptycznych białek nie można jednak wprowadzić bezpośrednio do komórek. Brak swoistych receptorów unie-

możliwia ich transport poprzez błony komórkowe. Można je jednak wprowadzić do komórek bądź w postaci kodujących je genów, wykorzystując do tego celu nośniki wirusowe lub liposomy (terapia genowa), bądź w postaci tzw. białek fuzyjnych – kowalencyjnego połączenia białka proapoptycznego z białkowym ligandem. Białkowy ligand umożliwia związanie białka fuzyjnego z receptorem znajdującym się na powierzchni komórek nowotworowych oraz na internalizację kompleksu receptor – białko fuzyjne [86] (zob. Ryc. 6). Ostatnio doniesiono o transferze do komórek nowotworowych proapoptycznego białka Vpr (liczącego 96 aminokwasów) wirusa HIV-1 za pośrednictwem „pustego” (nie zawierającego materiału genetycznego) wiriona HIV-1. Wprowadzone w ten sposób



Ryc. 6. Białka chimeryczne, fuzyjne, w terapii nowotworów. Powstałe białko chimeryczne, składające się ze swoistego liganda i białka proapoptycznego może być wprowadzone do komórek posiadających swoisty dla danego liganda receptor.

białko indukowało w komórkach nowotworowych apoptozę [87].

Tylko intensywne badania mogą pokazać, czy proapoptotyczne białka staną się lekami nowej generacji w terapii nowotworów.

Prof. dr hab. Stanisław Szala

Zakład Biologii Molekularnej
Centrum Onkologii–Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie
Oddział w Gliwicach
ul. Wybrzeże Armii Krajowej 15
44-101 Gliwice

Piśmiennictwo

- Vaux DL, Korsmeyer J. Cell death in development. *Cell* 1999; 96: 245-254.
- Hengartner MO. Apoptosis and the shape of death. *Dev Genet* 1997; 21: 245-248.
- Thornberry NA, Lazebnik Y. Caspases: enemies within. *Science* 1998; 281: 1312-1316.
- Wolf BB, Green DR. Suicidal tendencies: apoptotic cell death by caspase family proteinases. *J Biol Chem* 1999; 274: 20049-20052.
- Podack ER. How to induce involuntary suicide: the need for dipeptidyl peptidase I. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 8812-8314.
- Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 1995; 267: 1456-1462.
- Brown JM, Wouters BG. Apoptosis, p53 and tumor cell sensitivity to anticancer agents. *Cancer Res* 1999; 59: 1391-1399.
- Favrot M, Coll JL, Louis N, Negoescu A. Cell death and cancer: replacement of apoptotic genes and inactivation of death suppressor genes in therapy. *Gene Therapy* 1998; 5: 728-739.
- Gallagher WM, Brown R. p53-Oriented cancer therapies: current progress. *Ann Oncol* 1999; 10: 139-150.
- Weller M. Predicting response to cancer chemotherapy: the role of p53. *Cell Tissue Res* 1999; 292: 435-445.
- Pietersen AM, van der Eb MM, Rademaker H i wsp. Specific tumor-cell killing with adenovirus vectors containing the apoptin gene. *Gene Therapy* 1999; 6: 882-892.
- Shtrichman R, Sharf R, Barr H i wsp. Induction of apoptosis by adenovirus E4orf4 protein is specific to transformed cells and requires an interaction with protein phosphatase 2A. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 10080-10085.
- Evan G, Littlewood T. A matter of life and cell death. *Science* 1998; 281: 1317-1322.
- Huppertz B, Frank HG, Kaufmann P. The apoptosis cascade – morphological and immunohistochemical methods for its visualization. *Anat Embryol* 1999; 200: 1-18.
- Green DR. Apoptotic pathways: the roads to ruin. *Cell* 1998; 94: 695-698.
- Ashkenazi A, Dixit VM. Death receptors: signaling and modulation. *Science* 1998; 281: 1305-1308.
- Porter AG. Protein translocation in apoptosis. *Cell Biol* 1999; 9: 394-401.
- Irmiler M, Thome M, Hahne M i wsp. Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. *Nature* 1997; 388: 190-195.
- Jiang Y, Woronicz JD, Liu W, Goeddel DV. Prevention of constitutive TNF receptor 1 signaling by silencer of death domains. *Science* 1999; 283: 543-546.
- Gura T. How TRAIL kills cancer cells, but not normal cells. *Cancer Res* 1997; 277:768.
- Giaccia AJ, Kastan MB. The complexity of p53 modulation: emerging patterns from divergent signals. *Genes and Dev* 1998; 12: 2973-2983.
- El-Deiry WS. The p53 pathway and cancer therapy. *Cancer J* 1998; 11: 229-236.
- El-Deiry WS. The role of p53 in chemosensitivity. W: Hickman JA, Dive C. (red.) *Apoptosis and Cancer Chemotherapy*. Totowa, NJ: Humana Press Inc; 1999, 37-52.
- Giordano A, Avantaggiati ML. p300 and CBP: partners for life and death. *J Cell Physiol* 1999; 181: 218-230.
- Schmitt CA, Lowe SW. Apoptosis and therapy. *J Pathol* 1999; 187: 127-137.
- Gottlieb TM, Oren M. p53 and apoptosis. *Semin Cancer Biol* 1998; 8: 359-368.
- Bennett M, Macdonald K, Chan SW i wsp. Cell surface trafficking of Fas: a rapid mechanism of p53-mediated apoptosis. *Science* 1998; 282: 290-293.
- Green DR, Reed JC. Mitochondria and apoptosis. *Science* 1998; 281: 1309-1312.
- Reed JC, Paternostro G. Postmitochondrial regulation of apoptosis during heart failure. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 7614-7616.
- Adams JM, Cory S. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* 1998; 281: 1322-1326.
- Gross A, McDonnell JM, Korsmeyer SJ. BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes & Dev* 1999; 13: 1899-1911.
- Moriishi K, Huang DCS, Cory S, Adams JM. Bcl-2 family members do not inhibit apoptosis by binding the caspase activator Apaf-1. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 9683-9688.
- Marte BM, Downward J. PKB/Akt: connecting phosphoinositide 3-kinase to cell survival and beyond. *Trends Biochem Sci* 1997; 22: 355-358.
- Gajewski TF, Thompson CB. Apoptosis meets signal transduction: elimination of a BAD influence. *Cell* 1996; 87: 589-592.
- Cardone MH, Roy N, Stennicke HR i wsp. Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. *Science* 1998; 282: 1318-1321.
- Koseki T, Inohara N, Chen S, NÁñez G. ARC, an inhibitor of apoptosis expressed in skeletal muscle and heart that interacts selectively with caspases. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 5156-5160.
- Mannick JB, Hausladen A, Liu L i wsp. Fas-induced caspase denitrosylation. *Science* 1999; 284: 651-654.
- Luo X, Budihardjo I, Zou H i wsp. Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell* 1998; 94: 481-490.
- Tomlinson IPM, Novelli MR, Bodmer WF. The mutation rate and cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 14800-14803.
- Hakomori S. Tumor malignancy defined by aberrant glycosylation and sphingo(glyco)lipid metabolism. *Cancer Res* 1996; 56: 5309-5318.
- Hahne M, Rimoldi D, Schráter M i wsp. Melanoma cell expression of Fas(Apo-1/CD95) ligand: implications for tumor immune escape. *Science* 1996; 274: 1363-1366.
- Nicolson GL, Menter DG. Trophic factors and central nervous system metastasis. *Cancer Metast Rev* 1995; 14: 303-321.
- del Peso L, González-García M, Page C i wsp. Interleukin-3-induced phosphorylation of BAD through the protein kinase Akt. *Science* 1997; 278: 687-689.
- Burfeind P, Chernicky CL, Rininsland F i wsp. Antisense RNA to the type I insulin-like growth factor receptor suppresses tumor growth and prevents invasion by rat prostate cancer cells in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 7263-7268.
- D'Ambrosio C, Ferber A, Resnicoff M, Baserga R. A soluble insulin-like growth I receptor that induces apoptosis of tumor cells in vivo and inhibits tumorigenesis. *Cancer Res* 1996; 56: 4013-4020.
- Su ZZ, Madireddi MT, Lin JJ i wsp. The cancer growth suppressor gene mdm-7 selectively induces apoptosis in human breast cancer cells and inhibits tumor growth in nude mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 14400-14405.
- Ji L, Fang B, Yen N i wsp. Induction of apoptosis and inhibition of tumorigenicity and tumor growth by adenovirus vector-mediated fragile histidine triad (FHIT) gene overexpression. *Cancer Res* 1999; 59: 3333-3339.
- Shao N, Chai YL, Shyam E i wsp. Induction of apoptosis by the tumor suppressor protein BRCA1. *Oncogene* 1996; 13: 1-7.
- Morin PJ, Vogelstein B, Kinzler KW. Apoptosis and APC in colorectal tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 7950-7954.
- Bonnette SG, Kittrell FS, Stephens LC i wsp. Interactions of apoptosis, proliferation and host age in the regression of the mouse mammary preneoplasia, TM3, carrying an unusual mutation in p53. *Carcinogenesis* 1999; 20: 1715-1720.
- Saller E, Tom E, Brunori M i wsp. Increased apoptosis induction by 121F mutant p53. *EMBO J* 1999; 18: 4424-4437.
- Kasten MM, Giordano A. pRb and the Cdk's in apoptosis and the cell cycle. *Cell Death Differen* 1998; 5: 132-140.
- Algar EM, Khromykh T, Smith i wsp. A WT1 antisense oligonucleotide inhibits proliferation and induces apoptosis in myeloid leukaemia cell lines. *Oncogene* 1996; 12: 1005-1014.
- Lee SB, Huang K, Palmer R i wsp. The Wilms tumor suppressor WT1 encodes a transcriptional activator of amphiregulin. *Cell* 1999; 98: 663-673.
- Brown R. Mismatch repair deficiency, apoptosis, and drug resistance. W: Hickman JA, Dive C (red.) *Apoptosis and Cancer Chemotherapy*. Totowa, NJ: Humana Press Inc; 1999, s. 69-85.
- Zhang H, Richards B, Wilson T i wsp. Apoptosis induced by overexpression of hMSH2 or hMSH1. *Cancer Res* 1999; 59: 3021-3027.

57. Davies MA, Lu Y, Sano T i wsp. Adenoviral transgene expression of MMAC/PTEN in human glioma cells inhibits Akt activation and induces anoikis. *Cancer Res* 1998; 58: 5285-5290.
58. Meredith JE, Jr and Schwartz MS. Integrins, adhesion and apoptosis. *Cell Biol* 1997; 7: 146-150.
59. Li J, Simpson L, Takahashi M i wsp. The PTEN/MMAC1 tumor suppressor induces cell death that is rescued by the Akt/protein kinase B oncogene. *Cancer Res* 1998; 58: 5667-5672.
60. Besson A, Robbins SM, Yong VW. PTEN/MMAC1/TEP1 in signal transduction and tumorigenesis. *Eur J Biochem* 1999; 263: 605-611.
61. Tamura M, Gu J, Tran H, Yamada KM. PTEN gene and integrin signaling in cancer. *J Natl Cancer Inst* 1999; 91: 1820-1828.
62. Tamura M, Gu J, Matsumoto K i wsp. Inhibition of cell migration, spreading, and focal adhesions by tumor suppressor PTEN. *Science* 1998; 280: 1614-1617.
63. Gil J, Yamamoto H, Zapata JM i wsp. Impairment of the proapoptotic activity of Bax by missense mutations found in gastrointestinal cancers. *Cancer Res* 1999; 59: 2034-2037.
64. Kolenko V, Uzzo RG, Bukowski R i wsp. Death or dying: necrosis versus apoptosis in caspase-deficient human renal cell carcinoma. *Cancer Res* 1999; 59: 2838-2842.
65. Lu CD, Altieri DC, Tanigawa N. Expression of a novel antiapoptosis gene, survivin, correlated with tumor cell apoptosis and p53 accumulation in gastric carcinomas. *Cancer Res* 1998; 58: 1808-1812.
66. Li F, Ambrosini G, Chu EY i wsp. Control of apoptosis and mitotic spindle checkpoint by survivin. *Nature* 1998; 396: 580-584.
67. Tran J, Rak J, Sheehan C i wsp. Marked induction of the IAP family antiapoptotic proteins survivin and XIAP by VEGF in vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 264: 781-788.
68. Tschopp J, Thome M, Hofmann K, Meink E. The fight of viruses against apoptosis. *Curr Opin Genet Dev* 1998; 8: 82-87.
69. Fisher DE. Apoptosis in cancer therapy: crossing the threshold. *Cell* 1994; 78:539-542.
70. Mesner PW, Budihardjo JII, Kaufmann SH. Chemotherapy-induced apoptosis. *Adv Pharm* 1997; 41: 461-499.
71. Hirsch T, Marchetti P, Susin S.A. i wsp. The apoptosis-necrosis paradox. Apoptogenic proteases activated after mitochondrial permeability transition determine the mode of cell death. *Oncogene* 1997; 15: 1573-1581.
72. Coll JL, Negoescu A, Louis N i wsp. Antitumor activity of bax and p53 naked gene transfer in lung cancer: in vitro and in vivo analysis. *Hum Gene Ther* 1998; 9: 2063-2074.
73. Tai YT, Strobel T, Kufe D, Cannistra SA. In vivo cytotoxicity of ovarian cancer cells through tumor-selective expression of the Bax gene. *Cancer Res* 1999; 59: 2121-2126.
74. Clarke MF, Apel IJ, Benedict MA i wsp. A recombinant bcl-xS adenovirus selectively induces apoptosis in cancer cells but not in normal bone marrow cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 11024-11028.
75. Dole MG, Clarke MF, Holman P i wsp. Bcl-xS enhances adenoviral vector-induced apoptosis in neuroblastoma cells. *Cancer Res* 1996; 56: 5734-5740.
76. Ealovega MW, McGinnis PK, Sumantran VN i wsp. Bcl-xS gene therapy induces apoptosis of human mammary tumors in nude mice. *Cancer Res* 1996; 56: 1965-1969.
77. Kondo S, Ishizaka Y, Okada T i wsp. FADD gene therapy for malignant gliomas in vitro and in vivo. *Hum Gene Ther* 1998; 9: 1599-1608.
78. Hunt KK, Deng J, Liu TJ i wsp. Adenovirus-mediated overexpression of the transcription factor E2F-1 induces apoptosis in human breast and ovarian carcinoma cell lines and does not require p53. *Cancer Res* 1997; 57: 4722-4726.
79. Liu TJ, Wang M, Breau RL i wsp. Apoptosis induction by E2F-1 via adenoviral-mediated gene transfer results in growth suppression of head and neck squamous cell carcinoma cell lines. *Cancer Gene Ther* 1999; 6: 163-171.
80. Sumitomo M, Tachibana M, Ozu C i wsp. Induction of apoptosis of cytokine-producing bladder cancer cells by adenovirus-mediated I κ B α overexpression. *Hum Gene Ther* 1999; 10: 37-47.
81. O'Connor L, Strasser A, O'Reilly LA i wsp. Bim: a novel member of the Bcl-2 family that promotes apoptosis. *EMBO J* 1998; 17: 384-395.
82. Arai H, Gordon D, Nabel EG, Nabel GJ. Gene transfer of Fas ligand induces tumor regression in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 13862-13867.
83. Pitti RM, Marsters SA, Ruppert S i wsp. Induction of apoptosis by Apo-2 ligand, a new member of the Tumor Necrosis Factor cytokine family. *J Biol Chem* 1996; 271: 12687-12690.
84. Bernardi P, Sorzano L, Colonna R i wsp. Mitochondria and cell death. Mechanistic aspects and methodological issues. *Eur J Biochem* 1999; 264: 687-701.
85. Borner C, Monney L. Apoptosis without caspases: an inefficient molecular guillotine? *Cell Death Differen* 1999; 6:497-507.
86. Aqeilan R, Yarkoni S, Lorberboum-Galski H. Interleukin 2-Bax: a novel prototype of human chimeric proteins for targeted therapy. *FEBS Lett* 1999; 457: 271-276.
87. Stewart SA, Ponn B, Jowett JBM i wsp. Lentiviral delivery of HIV-1 Vpr protein induces apoptosis in transformed cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 12039-12043.

Przyjęto do druku: 24 stycznia 2000 r.