

Received: 2004.09.13
 Accepted: 2004.12.09
 Published: 2004.12.29

Rola apoptozy w patogenezie i leczeniu nowotworów układu hematopoetycznego

The role of apoptosis in the pathogenesis and treatment of neoplastic disorders of the hematopoietic system

Iwona Malinowska

Katedra i Klinika Pediatrii, Hematologii i Onkologii Akademii Medycznej w Warszawie

Streszczenie

Zaburzenie mechanizmów apoptozy czyli programowanej śmierci komórki przyczynia się do rozwoju wielu schorzeń. Zahamowanie apoptozy doprowadza do rozwoju schorzeń nowotworowych, autoimmunologicznych i przewlekłych infekcji. Nadmierna apoptoza prowadzi do chorób neurodegeneracyjnych oraz nasilania powikłań procesów niedokrwienia. Przyczyną niekontrolowanej kumulacji komórek nowotworowych są zmiany genetyczne obejmujące onkogeny i geny supresorowe nowotworów. Niektóre z tych zmian prowadzą do zwiększenia liczby komórek przez nasilenie proliferacji, a inne przez zahamowanie apoptozy. Wiele leków cytotoksycznych oraz promienie jonizujące powodują śmierć komórki przez wywołanie apoptozy, jednakże zmiany genetyczne leżące u podłoża rozrostu nowotworowego często zmniejszają efektywność tych terapii. Wyjaśnienie mechanizmu zaburzeń apoptozy komórek nowotworowych oraz molekularnych mechanizmów odpowiedzialnych za oporność na leki może umożliwić stworzenie nowych leków i opracowanie schematów leczenia, które poprawią wyniki leczenia białaczek i innych chorób nowotworowych.

Słowa kluczowe:

apoptoza • nowotwory układu hematopoetycznego

Summary

Defects in apoptotic cell-death regulation contribute to many disorders. Insufficient apoptosis leads to neoplastic and autoimmune disorders and chronic infections. Enhanced apoptosis is a cause of neurodegenerative disorder and complicates processes of ischemia. Genetic changes involving oncogenes and tumor suppressor genes contribute to the unregulated expansion of malignant cells. While some of these changes result in increased proliferation, others contribute to increasing cell numbers by inhibiting apoptosis. Because cytotoxic drugs or irradiation result in cell death by apoptosis, the genetic changes underlying malignancy often reduce the ability of these agents to destroy malignant cells. Knowledge of the molecular mechanisms of apoptosis provides insight into the causes of multiple pathologies where aberrant cell-death regulation occurs and provides new approaches to the treatment of human diseases.

Key words:

apoptosis • neoplastic disorders of hematopoietic system

Full-text PDF:

http://www.phmd.pl/pub/phmd/vol_58/6736.pdf

Word count:

4022

Tables:

3

Figures:

3

References:

82

Adres autorki:

dr Iwona Malinowska Katedra i Klinika Pediatrii, Hematologii i Onkologii, ul. Marszałkowska 24, 00-576 Warszawa, e-mail: iwonamal@kosnet.pl

CECHY MORFOLOGICZNE I BIOCHEMICZNE APOPTOZY

Apoptoza jest aktywnym, genetycznie zaprogramowanym procesem śmierci komórki [24,37]. W procesie apoptozy dochodzi do inwolucji narządów oraz eliminowania uszkodzonych i zbędnych komórek. W czasie apoptozy w komórce występuje wiele zmian morfologicznych i biochemicznych. Dominującymi zmianami biochemicznymi są: zwiększenie aktywności czynników pobudzających apoptozę w stosunku do jej inhibitorów, spadek potencjału błonowego mitochondriów i ucieczka cytochromu C do cytoplazmy, wzrost wewnątrzkomórkowego stężenia Ca^{++} oraz obniżenie wewnątrzkomórkowego pH (pHi). W następstwie tych zmian dochodzi do zmian morfologicznych polegających na zmniejszeniu objętości komórki, zmianie jej kształtu, kondensacji chromatyny jądrowej, fragmentacji jądra oraz rozpadu chromosomalnego DNA na nukleosomy, co powoduje powstanie charakterystycznej drabinki w trakcie elektroforezy DNA. Obserwujemy także utratę połączeń międzykomórkowych i struktur błony komórkowej np. mikrokosmków. Pęcherzyki powstające na powierzchni komórki, noszące nazwę ciałek apoptotycznych, są rezultatem rozpadu jądra i cytoplazmy. Zmiany struktury błony komórkowej polegające na ekspozycji na jej zewnętrznej powierzchni fosfatydyloseryny, która w warunkach prawidłowych jest umiejscowiona po stronie wewnętrznej, są sygnałem do fagocytozy komórek podlegających apoptozie [21,28].

PROCESY PRZEKAZYWANIA SYGNAŁU REGULUJĄCE APOPTOZE

Zmiany morfologiczne i biochemiczne w przebiegu apoptozy są wywołane działaniem kaspaz. Aktywacja kaspaz jest końcowym etapem apoptozy, inicjowanym przez różne sygnały zewnątrzkomórkowe i wiele dróg przekazywania sygnału [47,53].

Kaspazy są wewnątrzkomórkowymi cysteinowymi proteazami (cysteine aspartyl-specific proteases) rozszczepiającymi łańcuch białkowy substratów w miejscu reszty karboksylowej kwasu asparaginowego. W skład rodziny kaspaz wchodzi 14 dotychczas poznanych enzymów. Występują one w cytoplazmie w postaci nieaktywnych proenzymów. Najistotniejsze kaspazy uczestniczące w procesie apoptozy u ssaków można podzielić na dwie grupy: kaspazy inicjujące (kaspazy 2, 8, 9 i 10) i kaspazy efektorowe (kaspazy 3, 6 i 7). Aktywacja kaspaz następuje za pośrednictwem proteolitycznego kaskadowego rozpadu prokaspaz. Po odłączeniu fragmentu sąsiadującego z kwasem asparaginowym powstają dwie podjednostki, które po połączeniu powodują powstanie aktywnego enzymu. Zależności między poszczególnymi kaspazami w kaskadzie są zmienne u różnych organizmów i zależą od aktywującego je bodźca [12,13,15,16,20,34,42,65,66]. Dotychczas stwierdzono kilka dróg aktywacji kaspaz (ryc. 1). Najważniejsze z nich to droga zewnątrzpochodna i droga wewnątrzpochodna.

W drodze zewnątrzpochodnej, zwanej też drogą receptorów śmierci, dochodzi do aktywacji receptorów rodziny czynnika martwicy nowotworu (TNFR). U ssaków stwierdzono kilka receptorów tej rodziny, a wśród nich FAS/CD95, TNFR1, DR3 i receptory TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand): DR4, DR5 [6, 50]. Aktywacja tych receptorów przez powiązanie odpowiednich ligandów pro-

wadzi do połączenia wewnątrzpochodnej części receptora poprzez domeny DD (death domain) z białkami adaptorowymi FADD i TRADD. Białka adaptorowe łączą prokaspazy 8 i 10 poprzez domeny DED (death effector domain). W wyniku tej trymeryzacji następuje aktywacja kaspaz 8 i 10, które następnie aktywują kaspazę 3 [17].

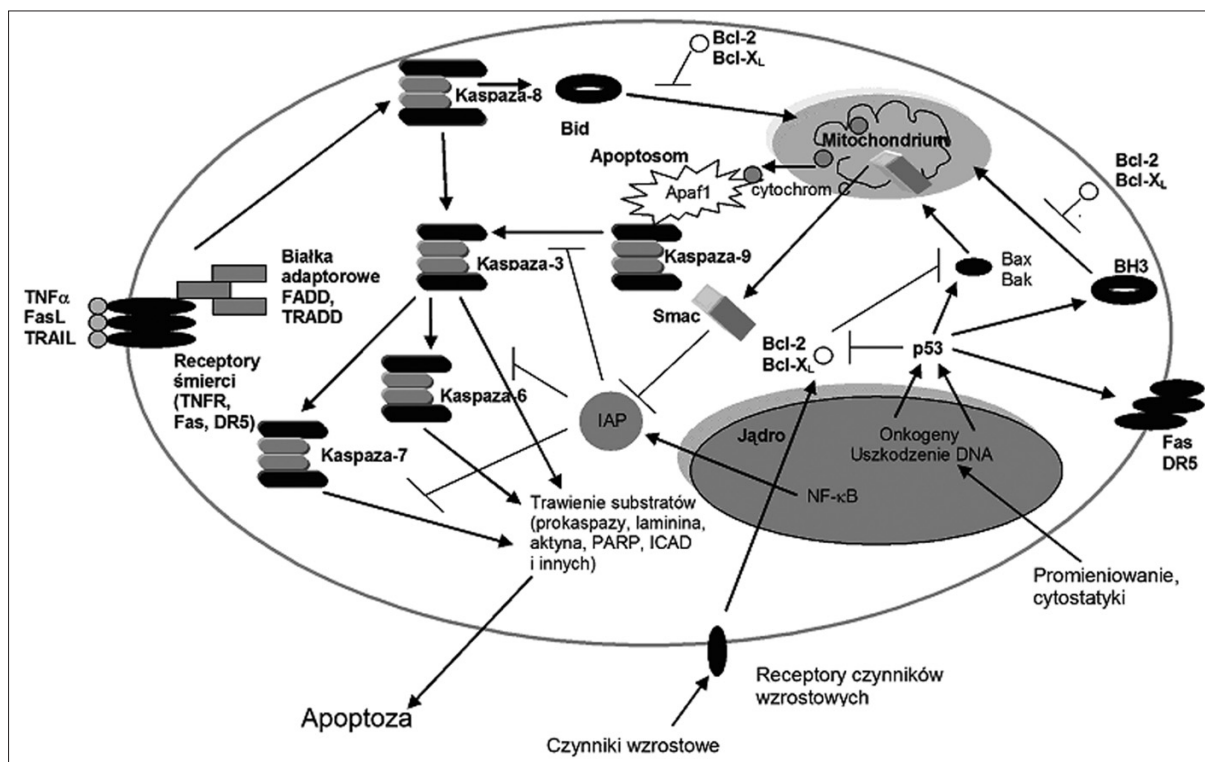
Inną drogą aktywacji kaspaz jest droga wewnątrzpochodna, zwana też drogą mitochondrialną. Jest aktywowana przez sygnały pochodzące z wnętrza komórki w następstwie działania bodźców uszkadzających DNA np. cytotatyków. Bodźce wywołujące apoptozę w mechanizmie wewnątrzpochodnym powodują zaburzenie potencjału błonowego i zwiększenie przepuszczalności błony mitochondrialnej. W następstwie tych przemian dochodzi do obrzęku i pęknięcia mitochondriów oraz uwalniania cytochromu C oraz innych proapoptotycznych substancji istotnych w procesach apoptozy, takich jak AIF, endonukleazy, Smac/Diablo i Htr/Omi [9,25,61].

Cytochrom C po uwolnieniu do cytoplazmy, powoduje utworzenie wielobiałkowego kompleksu aktywującego kaspazy, zwanego apoptosomem. Centralną częścią apoptosomu jest Apaf-1 (apoptotic protease activating factor), białko aktywujące kaspazy. Apaf-1 po przyłączeniu cytochromu C ulega zmianom konformacyjnym, umożliwiającym przyłączenie prokaspazy 9. Apaf-1 i prokaspaza 9 oddziałują poprzez domeny CARD (caspase-associated recruitment domains). Ta interakcja powoduje powstanie aktywnej kaspazy 9, która następnie aktywuje kaspazy efektorowe 3, 6 i 7 [1].

W niektórych typach komórek, w celu wzmocnienia sygnału proapoptotycznego, kaspaza 8 dodatkowo aktywuje drogę wewnątrzpochodną. Kaspaza 8 trawi białko Bid, które w postaci aktywnej tBid przemieszcza się do mitochondriów i tam we współdziałaniu z proapoptotycznymi białkami Bcl-2 (Bax i Bak) powoduje zmianę potencjału błonowego i uwalnianie cytochromu C [45].

Zaburzenie potencjału błonowego i wzrost przepuszczalności błony mitochondriów powoduje utratę homeostazy komórki: zahamowanie syntezy ATP, zaburzenie procesów oksydoredukcyjnych i tworzenie wolnych rodników tlenowych. Następstwem zwiększonego wytwarzania wolnych rodników tlenowych jest utlenianie tłuszczów, białek i kwasów nukleinowych, co powoduje nasilenie zmian potencjału błonowego mitochondriów [39].

Kaspazy efektorowe 3, 6 i 7 są końcowymi enzymami w kaskadzie kaspaz. Uaktywnienie kaspazy 3 powoduje proteolizę polimerazy ADP-rybozy (PARP) i w konsekwencji upośledzenie mechanizmów naprawczych DNA. Trawienie białek cytoszkieletu – gelzoliny i aktyny – powoduje zmiany morfologiczne w komórce. Aktywacja kaspazy 3 powoduje również odłączenie inhibitora ICAD, który stabilizuje i inaktywuje DNAzę zależną od kaspaz CAD (caspase-activated Dnase). Po odłączeniu ICAD, aktywna endonukleaza CAD przedostaje się do jądra i doprowadza do rozpadu DNA na nukleosomy [55,80]. W następstwie aktywacji kaspazy 6 dochodzi do trawienia lamininy, wchodzącej w skład strukturalnych blaszek jądrowych i rozszczelnienia błony jądrowej.



Ryc. 1. Schemat głównych dróg przewodzenia sygnału w apoptozie [wg 33]

Tabela 1. Regulacja aktywacji kaspaz poprzez naturalnie występujących antagonistów

Rodzaj	Mechanizm działania
Antagoniści drogi mitochondrialnej	
Antyapoptotyczne białka rodziny Bcl-2	hamują uwalnianie cytochromu C i innych apoptogennych białek z mitochondriów
Kinaza Akt (PKB)	fosforyluje i inaktywuje Bad (antagonista Bcl-2) oraz kaspazę 9
TUCAN	białko zawierające sekwencję CARD (caspase recruitment domain), które wiąże i inaktywuje pro-kaspazę 9
Antagoniści drogi zewnątrzpochodnej	
FLIP, BAR, Bap 31	białka zawierające sekwencję DED współzawodniczące o wiązanie z prokaspazami i hamujące drogę zewnątrzpochodną aktywacji kaspaz
Antagoniści wspólnej końcowej drogi aktywacji kaspaz	
Rodzina IAP (inhibitor of apoptosis proteins)	zawierają sekwencję BIR (baculovirus IAP repeats) selektywnie hamują i ułatwiają degradację aktywnych kaspaz 3, 7 i 9

Ten wspólny końcowy etap aktywacji kaspaz powoduje śmierć komórki przez rozkład składowych strukturalnych, fragmentacji DNA oraz inaktywację mechanizmów naprawczych kwasów nukleinowych.

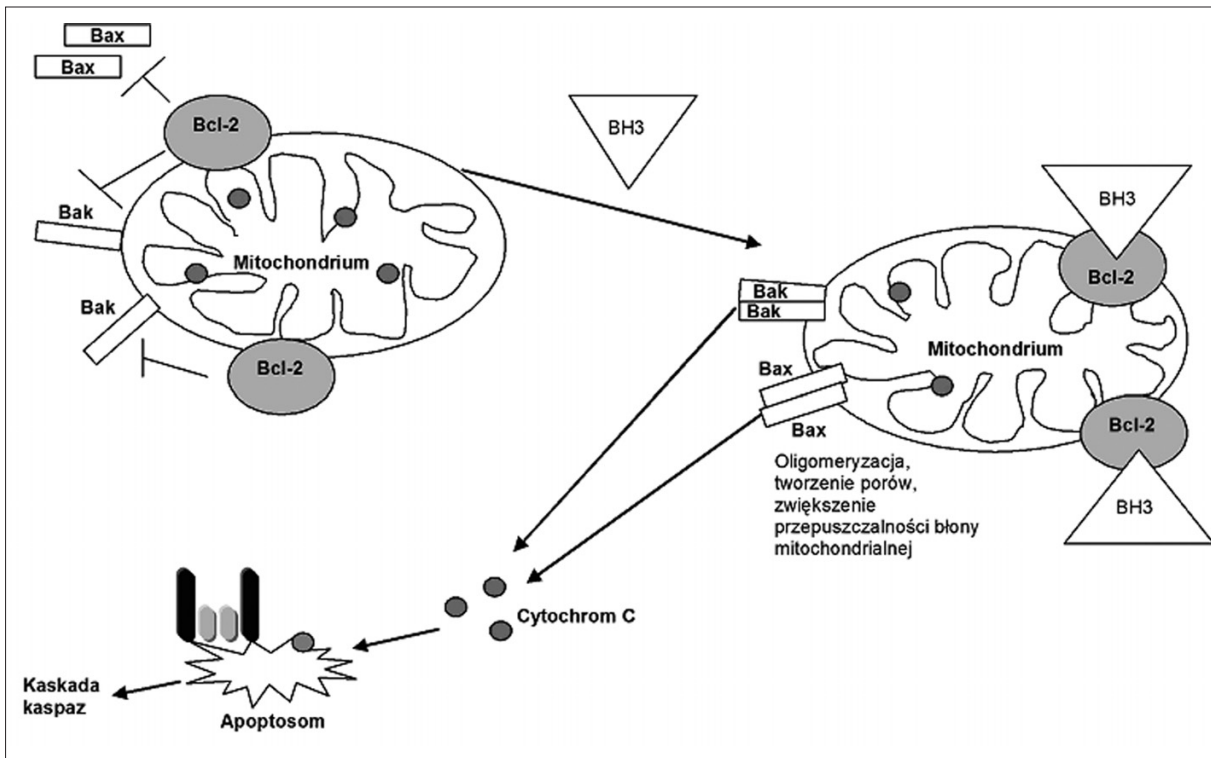
CZYNNIKI REGULUJĄCE PROCES APOPTOZY

Prawidłowo przebiegający proces apoptozy zapewnia zachowanie homeostazy ustroju. Zaburzenie tego procesu może wystąpić w sytuacji nieodpowiedniego dostępu cytokin, hormonów i czynników odżywczych lub defektu mechanizmów kontrolujących apoptozę. Obie drogi aktywacji kaspaz podlegają kontroli przez naturalnie występujących antagonistów (tabela 1) i cząstek proapoptotycznych [2,18,78].

Białka rodziny Bcl-2 odgrywają istotną rolę w procesie aktywacji kaspaz i regulacji uwalniania mitochondrialnego cytochromu C. W skład tej rodziny wchodzi białka o właściwościach pro- i antyapoptotycznych. Bcl-2 jest prototypem całej rodziny białek antyapoptotycznych, w skład której wchodzi Bcl-X_L, Bcl-w, Mcl-1 i A1. Natomiast białkami proapoptotycznymi rodziny Bcl-2 są białka podrodziny Bax: Bax, Bak, Bad, Bok/Mtd oraz BH3-only proteins: Bmf, Bid, Bik, Bim, Noxa, Puma, których nadmierna ekspresja prowadzi do śmierci komórki [14].

Wrażliwość komórki na apoptozę jest uzależniona od równowagi między ekspresją pro- i antyapoptotycznych białek rodziny Bcl-2, które kontrolują mechanizm uwalniania cytochromu C [75].

Mechanizm regulacji apoptozy przez białka rodziny Bcl-2 nie jest w pełni wyjaśniony [14,72]. Rycina 2 przedstawia jeden z modeli kontroli integralności błony mitochondrialnej i uwalniania cytochromu C. Istnieje zgodność, że w żywych komórkach proapoptotyczne białka rodziny Bcl-2 są antagonizowane przez białka antyapoptotyczne. W wyniku



Ryc. 2. Regulacja apoptozy przez białka Bcl-2 [wg 14]

działania czynnika indukującego apoptozę białka rodziny BH3-only protein ulegają aktywacji i przeciwdziałają antyapoptotycznemu działaniu Bcl-2. Bax zostaje wbudowany w błonę zewnętrzną mitochondriów i tworzy oligomery. Oligomery Bax i Bak bezpośrednio lub we współpracy z kanałami VDAC (voltage-dependent anion channel) i ANT (adenin nucleotide translocator) uczestniczą w tworzeniu porów [4,7,67].

Mechanizm działania antyapoptotycznych Bcl-2 polega na sekwestracji proapoptotycznych Bcl-2 poprzez wiązanie ich domen BH3. Doprowadza to do hamowania oligomeryzacji Bax i Bak oraz do zablokowania mechanizmów proapoptotycznych, takich jak uwalnianie wolnych rodników tlenowych i cytochromu C [14].

Inną dużą grupę białek antyapoptotycznych jest rodzina IAP (inhibitor of apoptosis protein). Prototypem tej rodziny jest białko odkryte w bakulowirusie. Dotąd opisano 8 ludzkich homologicznych białek rodziny IAP, a wśród nich NIAP, c-IAP1, c-IAP2, XIAP i surwiwinę. Wszystkie te białka zawierają domenę BIR (baculovirus IAP repeat) składającą się z 70 aminokwasów, niezbędnych do interakcji z kaspazami [63]. XIAP, c-IAP1 i c-IAP2 mają zdolność bezpośredniego hamowania kaspaz 3, 7 i 9 [31,63]. Zdolność białek c-IAP do bezpośredniego hamowania aktywności kaspaz jest bardzo istotnym mechanizmem kontrolującym prawidłowy przebieg procesów apoptozy. Mechanizm ten podlega kontroli przez białko mitochondrialne Smac/Diablo. Smac/Diablo umożliwia przebieg procesu apoptozy przez wyparcie IAPs z ich wiązania z kaspazami [70].

ROLA APOPTOZY W HEMATOPOEZIE

Przeżycie, proliferacja i różnicowanie komórek układu krwiotwórczego jest regulowane przez złożoną sieć cytokin i cząstek adhezyjnych. Brak cytokin powoduje zahamowanie proliferacji i apoptozę prawidłowych komórek hematopoetycznych.

Uzależnienie proliferacji komórek krwiotwórczych od dostępu cytokin jest mechanizmem kontrolującym przyrost ich populacji. Cytokiny oddziałują na komórki krwiotwórcze przez receptory aktywujące drogi przewodzenia sygnału obejmujące kaskady kinaz białkowych, tj. MAPK, JAK/STAT, PI3K/AKT i IKK/NFκB. Przez fosforylację określonych substratów mogą one wpływać na przeżycie komórek. Dzieje się to zarówno przez regulację transkrypcji genów, a także za pośrednictwem modyfikacji działania białek regulujących apoptozę.

Jak dotychczas, wyróżniamy cytokiny działające na określone typy komórek oraz cytokiny mające wpływ na komórki na różnych etapach ich dojrzewania. Przykładem tej pierwszej grupy cytokin są: SCF, IL-3, GM-CSF i ligand FLT3 działające na komórki wielopotencjalne. Do cytokin działających na komórki ukierunkowane, prekursorowe i dojrzałe należą erytropoetyna, trombopoetyna, M-CSF, IL-5, IL-6, IL-11, IL-2 i IL-4. Poza tymi cytokinami, spotyka się także cytokiny mające aktywność antyproliferacyjną oraz cytokiny stymulujące proces apoptozy. Są nimi TGF-beta, TNF-alfa i INF [78].

Cytokiny modulują również przeżycie niektórych białczkowych linii komórkowych, jak i proces śmierci komórki indukowanej cytostatykami. W badaniach *in vitro*

Tabela 2. Geny istotne w procesie apoptozy w nowotworach układu hematopoetycznego

Gen	Umiejscowienie na chromosomie	Cel	Choroba	Aberracje genetyczne
BCL-2	18q21		NHL	t(14;18)
Kaspaza 10	2q33		ALPS (autoimmune lymphoproliferative syndrome)	
BAX	19q13		ALL	mutacje somatyczne
cIAP2	11q21		NHL	t(11;18)
FAS (CD95)	10		MM, NHL	mutacje somatyczne
C-REL	2p12	NF- κ B	NHL	
I κ B	14q13	NF- κ B	HD	mutacje somatyczne
BCL-3	17q22	NF κ B	ALL-B	t(14;19)(q32;q13.1)
BCL-10	1p22	NF κ B	NHL	t(1;14)(p22;q32) mutacje somatyczne
TCL-1	14q32.1	Akt	T-ALL	t(14;14)(q11;32.1), inv14(q11;32.1)
PTEN	10q23.3	PI3K(Akt)	NHL, MM	delecje, mutacje
BCR/ABL	22q11 (BCR)	PI3K(Akt), STAT5(Bcl-X)	CML, ALL	t(9;22)
NPM-ALK	ALK(2p23)	PI3K(Akt)	chłoniaki anaplastyczne	t(2;5)
P53	17q13.1	Bax, Puma, APR(Noxa), Fas, DR5	NHL, ALL, CLL, AML	delecje, mutacje
MDM2	12q13	p53	HD	amplifikacja
ATM	11q22-23	p53	B-CLL, T-PLL, NHL	
WT-1	11p13	p53, Bcl-2	AML	mutacje somatyczne
ELL	19p13	p53	AML	t(11;19) fuzja z MLL
CBF	inv(16)p13q22	p53	AML	inv16
PML	15q22	Daxx	APML	t(15;17)

G-CSF, GM-CSF, IL-3, IL-6 i IFN-gamma chroniły komórki linii białaczki mieloidalnej przed apoptozą indukowaną lekami cytotoksycznymi [44]. Zaburzenia apoptozy i mechanizmów przekazywania sygnałów wewnątrzkomórkowych w komórkach nowotworowych prowadzić mogą do uniezależnienia się tych komórek od cytokin. Przykładem na to są mutacje aktywujące *FLT3*, występujące w 30% AML, doprowadzające do uniezależnienia się komórek nowotworowych od czynników wzrostowych [60].

Przeżycie komórek prekursorowych układu krwiotwórczego uzależnione jest również od ich kontaktu z komórkami podścieliska. Przykłady cząsteczek adhezyjnych o największym znaczeniu w układzie krwiotwórczym to integryny VLA-4 i VLA-5. Kontakt komórek CD34⁺ z komórkami podścieliska za pośrednictwem tych integryn zapobiega apoptozie tych komórek. Wraz z dojrzewaniem komórki układu krwiotwórczego stają się niezależne od kontaktu z podścieliskiem za pośrednictwem integryn [72].

ZABURZENIA APOPTOZY W PROCESIE TRANSFORMACJI NOWOTWOROWEJ KOMÓREK HEMATOPOETYCZNYCH

Zaburzenie mechanizmów apoptozy przyczynia się do rozwoju wielu schorzeń. Niedostateczny stopień nasilenia apoptozy doprowadza do rozwoju schorzeń nowotworowych, autoimmunologicznych i przewlekłych infekcji. Nadmierna apoptoza doprowadza do chorób neurodegeneracyjnych (choroby: Alzheimer, Parkinsona, Huntingtona, stwardnienie zanikowe boczne) oraz nasilenia powikłań procesów niedokrwienia (udar mózgowy, zawał mięśnia sercowego) [32,35,48].

Nagromadzenie komórek, spowodowane nieprawidłową ich eliminacją przez mechanizmy immunologiczne oraz oporność na leki w następstwie zaburzenia apoptozy odgrywają istotną rolę w patogenezie nowotworów i wpływają na efekty ich leczenia [54].

Mutacje genów uczestniczących w procesach apoptozy i proliferacji komórek oraz genów naprawy DNA ziden-

tyfikowano jako czynniki przyczynowe chorób nowotworowych (tabela 2).

ONKOGENY I ANTYONKOGENY

Każda zdrowa komórka ma w swoim zestawie genów tzw. protoonkogeny, które odgrywają główną rolę w komórkowych mechanizmach wzrostu, dojrzewania i różnicowania. Mutacje protoonkogenów powodują powstanie onkogenów. Onkogen, w przeciwieństwie do protoonkogenu, jest niewrażliwy na bodźce kontrolujące jego czynność, czego następstwem są istotne zaburzenia wzrostu i różnicowania komórek. Jednak samo pojawienie się onkogenów nie wystarcza do powstania nowotworowego klonu komórkowego. Konieczne są dalsze mutacje w pierwotnie zmutowanej komórce. Dotyczą one genów supresorowych (antyonkogenów), których zadaniem jest hamowanie dalszych podziałów zmutowanych komórek i indukcja apoptozy oraz genów naprawczych, które sterują naprawą DNA zmienionego w wyniku mutacji [27,73]. Transformacja komórek prowadząca do zahamowania apoptozy następuje w wyniku nieprawidłowej aktywacji i/lub ekspresji genów kodujących białka antyapoptotyczne (działających zwykle jako onkogeny) lub poprzez inaktywację genów czynników proapoptotycznych (geny supresorowe nowotworów). Uważa się, że tylko te transformowane komórki, które wykazują zahamowanie apoptozy, przeżyją i staną się komórkami nowotworowymi [71].

BCL-2

BCL-2 był pierwszym opisanym onkogenem włączonym w procesy regulacji apoptozy. Badania tego onkogenu wskazały, że procesy nowotworzenia są zależne nie tylko od niekontrolowanej proliferacji, ale również od mechanizmów blokujących apoptozę [69].

Nadmierną ekspresję Bcl-2 stwierdzono w wielu nowotworach [54]. Ekspresja Bcl-2 w komórkach ALL (acute lymphoblastic leukemia) jest bardzo zmienna i nie koreluje z czasem przeżycia tych komórek *in vitro* oraz z odpowiedzią pacjentów z ALL na intensywne leczenie.

Jak dotąd nie opisano aberracji bezpośrednio nasilających ekspresję genu *BCL-2* w komórkach białaczkowych AML (acute myeloblastic leukemia). Jednakże prawdopodobieństwo uzyskania remisji przez pacjentów z AML ze zwiększoną ekspresją Bcl-2 jest mniejsze, a czas przeżycia krótszy w porównaniu z pacjentami z mniejszą liczbą komórek Bcl-2 pozytywnych. Ponadto, nasilenie apoptozy blastów AML hodowanych bez czynników wzrostowych było znacznie mniejsze w komórkach z większą ekspresją Bcl-2. Inkubacja blastów AML z oligonukleotydami antysensownymi mającymi na celu zmniejszenie ekspresji Bcl-2, zwiększała czułość tych komórek na arabinozyd cytozyny, wskazując na rolę Bcl-2 w oporności komórek AML na leki [20].

Umieszczenie genu *BCL-2* (18q21) w sąsiedztwie *locus* IgH (14q32) w wyniku translokacji t(14;18) występuje w 90% przypadków drobnogrudkowego chłoniaka B i w 30% przypadków chłoniaka grudkowego. Następstwem tej translokacji jest zaburzenie transkrypcji genu *BCL-2*, wzrost poziomu mRNA i białka Bcl-2.

Translokacja obejmująca gen *BCL-2* jest bardzo wczesnym zdarzeniem w patogenezie chłoniaków B komórkowych. W czasie progresji tych nowotworów występują dodatkowe zmiany chromosomalne. Klasycznym przykładem komplementacji onkogenów w komórkach chłoniakowych jest współistnienie translokacji t(14;18) z wtórną translokacją t(8;14). Wynikiem tej aberracji jest umiejscowienie genu *C-MYC* w sąsiedztwie *locus* IgH. Białko c-Myc przyspiesza podziały komórkowe i stymuluje apoptozę, jednak nadmierna ekspresja Bcl-2 przeciwdziała proapoptotycznemu efektowi c-Myc, pozostawiając niezmienną jego funkcję proliferacyjną. W wyniku takich zmian genetycznych dochodzi do bardzo agresywnego rozrostu nowotworowego [68,76].

CZYNNIKI TRANSKRYPCYJNE

Czynniki transkrypcyjne są białkami regulatorowymi, które kontrolują transkrypcję odpowiednich genów. Wiele onkogenów i antyonkogenów koduje czynniki transkrypcyjne, które regulują czynność genów włączonych w procesy wzrostu komórki i apoptozy. Mutacje tych onkogenów i antyonkogenów mają bezpośredni wpływ na powstawanie nowotworów.

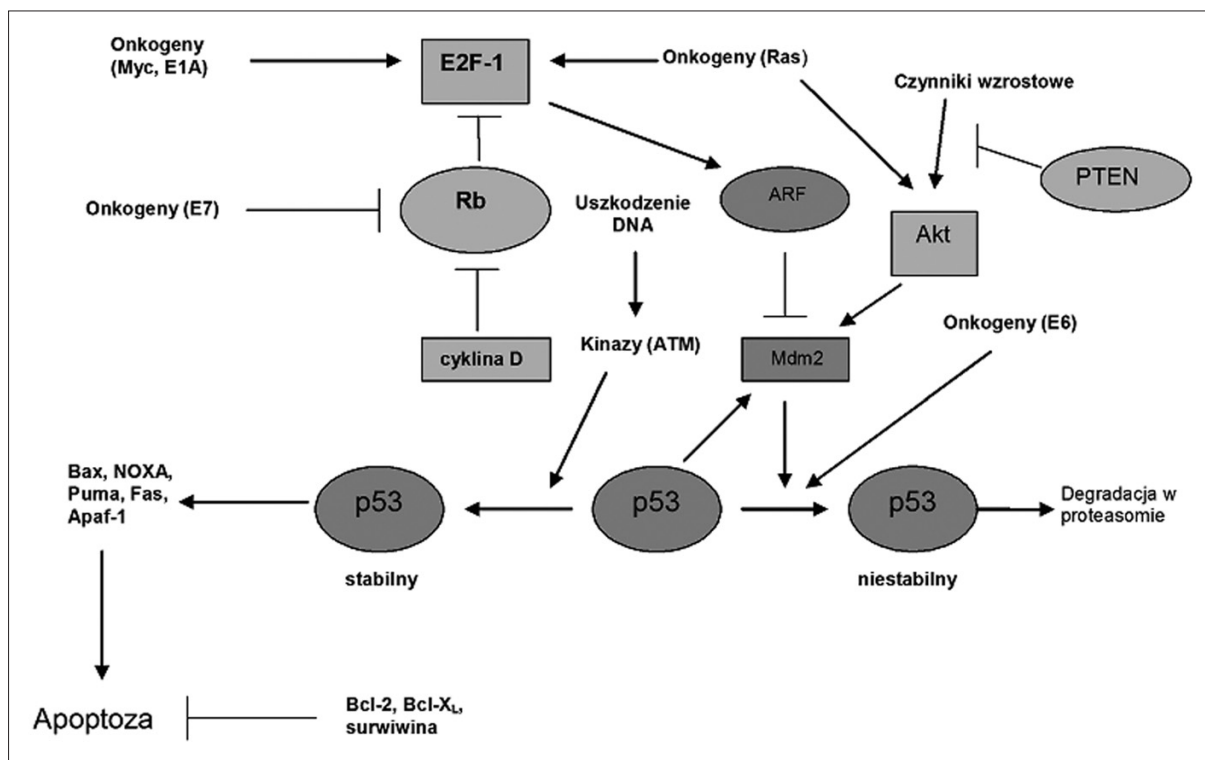
Jądrowy czynnik kappa B (NF-κB) reprezentuje rodzinę czynników transkrypcyjnych, wpływających na poziom ekspresji genów rodziny Bcl-2 oraz innych genów antyapoptotycznych, takich jak *IAP2* i *FLIP*. Wzrost aktywności NF-κB może więc zwiększyć oporność komórek na apoptozę poprzez wzrost ekspresji genów włączonych w kontrolę dróg wewnątrzpodrodnej (rodzina Bcl-2), zewnątrzpodrodnej (rodzina DED) i wspólnej końcowej drogi aktywacji kaspaz (rodzina IAP). NF-κB hamuje też proapoptotyczną funkcję p53 przez fosforylację Mdm2 [52].

Nadmierną ekspresję bądź aktywację NF-κB stwierdzono w wielu nowotworach. Spośród nowotworów układu hematopoetycznego zjawiska te wykazano aż w 50% przypadków nowotworów wywodzących się z limfocytów B (NHL i B-CLL).

NF-κB występuje w cytoplazmie w połączeniu z białkami rodziny IκB. IκB wiąże NF-κB w kompleksy, zapobiegając ich wejściu do jądra komórkowego. Aktywacja kinaz i degradacja IκB powoduje uwolnienie i przejście NF-κB do jądra komórkowego. Mutacje genu kodującego IκB mogą nasilać antyapoptotyczną aktywność NF-κB.

DROGA PRZEKAZYWANIA SYGNAŁU AKT/PI3K

Główną drogą przekazywania sygnału kontrolującą podatność komórki na apoptozę jest szlak kinazy fosfatydyloinozytolu PI3K/AKT. Czynniki wzrostowe regulujące przeżycie komórek, działają przez aktywację tej drogi przekazywania sygnału. Antyapoptotyczne działanie PI3K oraz aktywowanej przez nią AKT, polega na hamowaniu proapoptotycznego białka Bad, kaspazy 9, czynników transkrypcyjnych FKHD (forkhead transcription factor) oraz kinazy IKK regulującej aktywność czynnika transkrypcyjnego NF-κB [51]. W ostatnich latach nadmierną aktywność kinazy AKT stwierdzono u ludzi w raku jajnika, trzustki, sutka oraz w chłoniakach T-komórkowych.



Ryc. 3. Regulacja procesów przeżycia i apoptozy przez p53 [wg 41]

Jednym z głównych antagonistów AKT jest PTEN. Jest to jeden z genów supresorowych nowotworów, którego funkcja polega na inaktywacji wtórnych przekaźników drogi przekazywania sygnału AKT/PI3K. Badania na zwierzętach wykazały, że ekspresja PTEN hamuje rozwój nowotworów. Natomiast nadmierna ekspresja aktywnej postaci PI3K w wyniku mutacji PTEN u zwierząt transgenicznych powoduje zaburzenia limfoproliferacyjne i rozwój chłoniaków T. Delecje i somatyczne mutacje punktowe inaktywujące *PTEN* są częstym zjawiskiem w chłoniakach, białaczkach i szpiczaku mnogim u ludzi [38].

Inną przyczyną wzrostu aktywności AKT, poza inaktywacją PTEN, jest aktywacja protogenu *TCL-1*, występującego na chromosomie 14q32.1. Jest on zaangażowany w translokacje t(14;14)(q11;q32.1), t(7;14)(q35;32.1) i inwersję inv14(q11;q32.1) występujące w białaczkach typu T [22].

p53

Najważniejszym znanym genem supresorowym nowotworów jest gen *p53*, zwany „strażnikiem genomu”. Produkt białkowy tego genu pełni funkcję czynnika transkrypcyjnego, który umożliwia proliferację komórek z nieuszkodzonym DNA. W sytuacji uszkodzenia DNA dochodzi do zahamowania podziałów komórkowych i uruchomienia mechanizmów naprawy DNA. Jeśli w wyniku mutacji systemu naprawczego zawiodą, to prawidłowy gen *p53* zapobiega powieleniu defektu. Jeśli jednak gen *p53* sam ulegnie mutacji, to umożliwia dalsze oddziaływanie onkogenów, czego rezultatem jest powstanie nowotworowego klonu komórkowego [5,49].

W prawidłowych komórkach stężenie *p53* w cytoplazmie utrzymywane jest na bardzo niskim poziomie [11,41].

Produkt genu *MDM2*, ligaza Mdm2 wiąże i zabezpiecza przed przedostaniem się p53 do jądra komórkowego i ułatwia degradację p53 w proteasomie (ryc. 3).

W odpowiedzi na czynniki uszkadzające DNA p53 ulega fosforylacji w miejscu wiązania z Mdm2. Brak interakcji Mdm2 z p53 doprowadza do stabilizacji i aktywacji p53.

Białko p53 jest centralnym ogniwem w apoptozie indukowanej przez onkogeny, takie jak *C-MYC*, *E1A* i *RAS* oraz w przypadku utraty pRb (retinoblastoma tumor suppressor) [29]. Wszystkie te onkogeny aktywują czynnik transkrypcyjny E2F-1, który pobudza proliferację poprzez ekspresję genów regulujących progresję fazę S cyklu komórkowego. E2F-1 zwiększa też ekspresję czynnika hamującego rozwój nowotworów ARF, który stabilizuje i aktywuje p53 [23]. Tłumaczy to częściowo, dlaczego aktywacja onkogenów nie zawsze prowadzi do niekontrolowanej proliferacji, a przy zachowanej prawidłowej drodze przewodzenia sygnału powoduje stabilizację p53 i aktywację śmierci komórki. W wyniku aktywacji p53 dochodzi do apoptozy poprzez stymulację ekspresji genów białek zależnych od p53, takich jak p21, Bax, Puma, Noxa, Apaf-1, Fas i DR5 [71] lub przez zahamowanie ekspresji białek antyapoptotycznych, takich jak Bcl-2, Bcl-X_L i surwiwiny [30,79].

Inaktywacja p53 w wyniku mutacji na chromosomie 17p13.1 występuje w ponad 50% wszystkich nowotworów u ludzi [26]. Mutacje genu *p53* powodują powstawanie nowotworów agresywnych, opornych na leczenie i korelują z krótkim okresem przeżycia chorych [43]. Stwierdza się je w 14% nowotworów układu hematopoetycznego. Najczęściej występują one u pacjentów z wtórnym AML i MDS (myelodysplastic syndrome) oraz w AML i MDS

z delecją chromosomu 17p (*locus p53*). Przebieg kliniczny w tych przypadkach jest niepomysłny z małym odsetkiem całkowitych remisji i krótkim okresem przeżycia.

Mutacje *p53* występują sporadycznie w nowo rozpoznanej ALL (5–13% dorosłych pacjentów i tylko u 2% dzieci z ALL) a częściej we wznowie ALL [74]. W czasie kryzy blastycznej CML (chronic myelogenous leukemia) często dochodzi do utraty krótkiego ramienia chromosomu 17.

Poza mutacjami, *p53* może ulec inaktywacji przez nadmierną ekspresję onkogeny *MDM2* (ryc. 3).

BCR/ABL

Ważnym markerem w białaczkach są translokacje chromosomowe, które powodują przeniesienie protoonkogeny między chromosomami, co powoduje jego uaktywnienie lub powstanie nowego, funkcjonalnego genu fuzyjnego. Taki patogeny charakter wykazuje np. chimeryczne białko BCR/ABL oraz białko PML/RAR α .

Chromosom Filadelfia powstaje w wyniku translokacji w obrębie długich ramion chromosomów 22 i 9. Następstwem tej translokacji jest połączenie genu *BCR*, występującego na chromosomie 22 z protoonkogenem *ABL* obecnym na chromosomie 9. Produktem powstałego genu fuzyjnego jest białko onkogenne BCR/ABL o nieprawidłowej aktywności kinazy tyrozynowej. W zależności od miejsca złamania chromosomu w obrębie genu *BCR* mogą powstać różne warianty fuzji BCR/ABL. Wariant chromosomu Filadelfia występujący w ALL koduje białko fuzyjne BCR/ABL o masie 185 kDa. Białko to cechuje silne działanie transformujące i wzmożona aktywność kinazy tyrozynowej w porównaniu z wariantem 210 kDa charakterystycznym dla CML [57].

Uważa się, że kinaza tyrozynowa BCR/ABL odgrywa istotną rolę w transformacji białaczkowej i niekontrolowanej proliferacji komórek poprzez aktywację genów *RAS*, *MYC*, *C-RAF*, *MAPK/ERK*, *AKT/P13K*, *NF- κ B* i *STAT*. Ekspresja BCR/ABL zmniejsza podatność komórek na apoptozę wywołowaną czynnikami uszkodzającymi DNA, promieniowaniem, lekami cytotoksycznymi i Fas. Zjawisko to jest związane z przedłużeniem cyklu komórkowego, opóźnieniem fazy G2/M, co pozwala na aktywację mechanizmów naprawczych i kontynuację cyklu komórkowego [8].

PML

Translokacja t(15;17) typowa dla białaczki promielocytarnej (APML, podtyp M3 w klasyfikacji FAB) jest wynikiem fuzji fragmentu genu receptora kwasu retinowego RAR α z genem czynnika transkrypcyjnego PML. Produktem powstałego genu *PML-RAR α* jest białko fuzyjne PML-RAR α - funkcjonalny czynnik transkrypcyjny, blokujące procesy różnicowania komórek przez aktywację represorów, takich jak deacetylaza histonów. W warunkach prawidłowych PML jest umiejscowiony w podregionie jądra zwanym onkogenną domeną PML (POD) lub ciałkami jądrowymi (nuclear bodies), działając jako represor genów supresorowych nowotworów.

Białko fuzyjne PML-RAR α występujące w APML, jest umiejscowione poza regionem POD, co zaburza funkcję PML.

Tabela 3. Wybrane nowe środki o potencjalnym znaczeniu terapeutycznym w schorzeniach nowotworowych

Cel działania	Lek
Bcl-2, Bcl-XL	oligonukleotydy antysensowne (Genasense) HA14-1; A-438744; A-385358; AHPN
XIAP	oligonukleotydy antysensowne
Surwiwina	oligonukleotydy antysensowne (ISIS 23722) CI-1040
TRAIL-R	HGS-ETR1,2
HDAC	depsipeptide (FK228) SAHA
BCR/ABL	STI-571 (Gleevec) survivin-AS; CI-1040
MEK	CI-1040 PD 98059
ERK	CDDO-Me KP-372-1
RAF	BAY
AKT	KP-372-1 LY293001
RXR	bexarotene LG 1069
RAR α	ATRA 9-cis-RA
PPAR γ	CDDO BMITM
Flt-3	PKC412
PKC	bryostatyn

Stymulacja RAR α retinoidami przywraca jego lokalizację w POD, a zarazem wrażliwość komórek na apoptozę [46].

APOPTOZA A LEKI PRZECIWNOWOTWOROWE

Powszechnie używane cytostatyki nie działają selektywnie i mają wiele działań niepożądanych. Brak wystarczającej skuteczności stosowanych dotychczas leków i metod terapeutycznych oraz problemy związane z odległymi powikłaniami terapii stwarzają potrzebę opracowania nowych, doskonalszych leków przeciwnowotworowych.

Obecnie dużo uwagi poświęca się na poszukiwanie nowych celów biologicznych, takich jak onkogeny, geny supresorowe nowotworów, regulatory cyklu komórkowego, czynniki kontrolujące angiogenezę i przerzuty nowotworów, czynniki odpowiedzialne za rozwój lekooporności oraz białka i geny włączone w mechanizm apoptozy (tabela 3) [3,40,58,59,81].

Badania przeprowadzone w ostatnich latach wykazały, że skuteczność większości powszechnie używanych leków

przeciwnowotworowych jest związana z wywoływaniem zjawiska apoptozy we wrażliwych komórkach [33,64,77]. Udowodniono, że leki przeciwnowotworowe działają apoptotycznie aktywując drogę wewnątrzprochodną, czyli mitochondria [36].

Koncepcja leczenia nowotworów poprzez bezpośrednie oddziaływanie na produkty genów fuzyjnych została po raz pierwszy przedstawiona na przykładzie kwasu all trans-retinowego (ATRA), zastosowanego w leczeniu ostrej białaczki promielocytarnej (APML) [46]. Działanie ATRA polega m.in. na przywróceniu prawidłowego umiejscowienia i czynności PML, umożliwieniu transkrypcji genów i procesów dojrzewania komórek. Chociaż skuteczność terapii z zastosowaniem ATRA jest duża, dosyć często pojawia się oporność na leczenie.

Niedawno udowodniono, że ATRA wywołuje apoptozę w komórkach APML PML-RAR⁺ poprzez autokrynnoparakrynną czynność TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand). Rekombinowane białko, odpowiadające części zewnątrzkomórkowej TRAIL/Apo-2L aktywuje apoptozę w mechanizmie zewnątrzprochodnym. Rekombinowany TRAIL wykazuje niewielką toksyczność w stosunku do zdrowych tkanek i zdolność do hamowania rozwoju nowotworów [56]. Wiąże się z tym nadzieje na zastosowanie TRAIL w leczeniu APML opornych na ATRA. Prowadzone są też próby łącznego zastosowania TRAIL i PPAR γ (zmniejsza poziom FLIP, który jest antagonistą kaspazy 8) oraz ATRA w lekoopornych postaciach APML [82].

Inną metodą terapii polegającej na hamowaniu działania genów włączonych w proces apoptozy jest zastosowanie antysensownych oligonukleotydów hybrydujących z mRNA Bcl-2 i Bcl-X_l. Leki te znajdują się w III fazie badań klinicznych u pacjentów ze szpiczakiem mnogim i w II fazie u chorych z NHL, B-CLL i AML [10].

Podjęto również próby blokowania reakcji między białkami regulującymi proces apoptozy przez zastosowanie związków drobnocząsteczkowych. Przykładem takich związków są peptydy naśladujące domenę BH3 białek proapoptotycznych rodziny Bcl-2. Podobieństwo budowy stwarza możliwości kompetycyjnego blokowania interakcji między białkami tej rodziny [3].

Analiza budowy SMAC, naturalnego antagonisty XIAP wykazała, że tylko cztery pierwsze aminokwasy białka SMAC wiążą XIAP w miejscu niezbędnym do interakcji z kaspazą 9. Uzasadniło to syntezę tetrameru blokującego i wykorzystanie go do hamowania przebiegu procesu apoptozy [62].

Również próby zastosowania drobnocząsteczkowych inhibitorów kinazy I κ B dają nadzieję na zahamowanie ekspresji NF- κ B i indukcję apoptozy w komórkach nowotworowych o podwyższonej aktywności tego antyapoptotycznego czynnika transkrypcyjnego [52].

Gleevec (Imatinib mesylate, STI571) jest czynnikiem hamującym aktywność kinaz tyrozynowych m.in. BCR/ABL. Swoisty inhibitor tych enzymów odgrywa rolę w leczeniu białaczek CML i ALL BCR/ABL⁺ [19]. Istotnym proble-

mem w leczeniu chorych z CML i ALL BCR/ABL⁺ jest często obserwowana oporność na monoterapię Gleevekiem. Obecnie trwają badania oceniające metodę terapii połączonej z zastosowaniem inhibitorów farnesyltransferazy. Jest to nowa grupa leków przeciwnowotworowych, które hamują aktywność onkogenu *RAS*, czynnika transkrypcyjnego, pełniącego główną rolę w procesach proliferacji i różnicowania komórek, aktywowanego przez BCR/ABL. Białko Ras wymaga posttranslacyjnej modyfikacji, zwanej prenylacją. Reakcja ta jest katalizowana przez farnesyltransferazę. Jednym z inhibitorów farnesyltransferazy jest lonafarnib, obecnie testowany klinicznie u chorych z białaczkami opornymi na Gleevec i z zespołami mielodysplastycznymi [3].

Większość obecnie stosowanych leków przeciwnowotworowych wywiera swe działanie poprzez aktywację wewnątrzprochodnej drogi indukcji apoptozy. W komórkach lekoopornych często występują nieprawidłowości przewodzenia sygnału tą drogą, co ogranicza skuteczność stosowanych leków.

Triterpenoid CDDO jest nowym czynnikiem, wykorzystywanym w leczeniu białaczek, który wywołuje apoptozę w mechanizmie zewnątrzprochodnym. CDDO jest agonistą PPAR γ i słabym inhibitorem IKK indukującym apoptozę w komórkach linii białaczkowych przez aktywację prokaspazy 8. CDDO i inne czynniki, które aktywują drogę zewnątrzprochodną mogą okazać się szczególnie istotne w leczeniu nowotworów lekoopornych.

Wiele uwagi poświęca się obecnie związkom, które wywołują blokadę cyklu komórkowego, indukują różnicowanie się komórek i stymulują apoptozę. Przedstawicielem takiej grupy leków jest SAHA (suberoilanoilid kwasu hydroksyamonowego), inhibitor deacetylazy histonów (HDAC), należący do hybrydowych związków spolaryzowanych (HPC – hybrid polar compounds). Procesy acetylacji i deacetylacji histonów odgrywają istotną rolę w regulacji transkrypcji genów. Zahamowanie deacetylacji histonów po zastosowaniu HPC, prowadzi do modyfikacji chromatyny, zahamowania transkrypcji, w konsekwencji do modulacji ekspresji genów i blokady cyklu komórkowego. Leki tej grupy są obecnie w fazie prób klinicznych u pacjentów z białaczkami [3].

Badania ostatnich lat wskazują, że wiele komponentów drogi przewodzenia sygnału Akt/PI3K może stanowić cele terapii przeciwnowotworowej. Jednym z nich jest mTOR (mammalian target of rapamycin), kinaza białkowa zaangażowana w regulację cyklu komórkowego. Zahamowanie mTOR przez CCI-779 (ester rapamycyny) blokuje drogę transdukcji sygnału i hamuje cykl komórkowy [38].

PODSUMOWANIE

Poznanie mechanizmów działania genów kontrolujących procesy apoptozy i proliferacji daje nadzieję na stworzenie bardziej skutecznych, swoistych i lepiej tolerowanych leków. Ze względu na istotne znaczenie procesu apoptozy w patogenezie wielu chorób istnieje duże prawdopodobieństwo, że w przyszłości nowe schematy leczenia modulujące głównie ten proces będą wykorzystywane rutynowo obok klasycznych leków cytostaticznych.

- [1] Acehan D., Jiang X., Morgan D.G., Heuser J.E., Wang X., Akey C.W.: Three-dimensional structure of the apoptosome: implications for assembly, procaspase-9 binding, and activation. *Mol. Cell.*, 2002; 9: 423–432
- [2] Ameisen J.C.: On the origin, evolution, and nature of programmed cell death: a timeline of four billion years. *Cell Death Differ.*, 2002; 9: 367–393
- [3] Andreeff M., Milella M., Carter B.Z., Tabe Y., Ricciardi M.R., Sneed T., Ruvolo P., Contractor R., Tsao T., Schober W., Evans R., McQueen T., Zeng Z., Kornblau S.M., Mccubrey J., Estey E., Mills G.B., Reed J.C., Konopleva M.: Targeted therapy of AML new concepts. *Ann. Hematol.*, 2004; 83(Suppl.1): S51–S53
- [4] Antonsson B., Montessuit S., Lauper S., Eskes R., Martinou J.C.: Bax oligomerization is required for channel-forming activity in liposomes and to trigger cytochrome c release from mitochondria. *Biochem. J.*, 2000; 345: 271–278
- [5] Appella E.: Modulation of p53 function in cellular regulation. *Eur. J. Biochem.*, 2001; 268: 2763
- [6] Ashkenazi A.: Targeting death and decoy receptors of the tumour-necrosis factor superfamily. *Nat. Rev. Cancer.*, 2002; 2: 420–430
- [7] Bauer M.K., Schubert A., Rocks O., Grimm S.: Adenine nucleotide translocase-1, a component of the permeability transition pore, can dominantly induce apoptosis. *J. Cell Biol.*, 1999; 147: 1493–1502
- [8] Bedi A., Barber J.P., Bedi G.C., El-Deiry W.S., Sidransky D., Vala M.S., Akhtar A.J., Hilton J., Jones R.J.: Bcr-Abl-mediated inhibition of apoptosis with delay of G2/M transition after DNA damage: a mechanism of resistance to multiple anticancer agents. *Blood*, 1995; 86: 1148–1158
- [9] Bernardi P., Scorrano L., Colonna R., Petronilli V., Di Lisa F.: Mitochondria and cell death. Mechanistic aspects and methodological issues. *Eur. J. Biochem.*, 1999; 264: 687–701
- [10] Chanan-Khan A., Czuczman MS.: Bcl-2 antisense therapy in B-cell malignant proliferative disorders. *Curr. Treat. Opin. Oncol.*, 2004; 5: 261–267
- [11] Chene P.: Inhibiting the p53-MDM2 interaction: an important target for cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer*, 2003, 3: 102–109
- [12] Cikala M., Wilm B., Hobmayer E., Bottger A., David C.N.: Identification of caspases and apoptosis in the simple metazoan Hydra. *Curr. Biol.*, 1999; 9: 959–962
- [13] Conradt B., Horvitz H.R.: The *C. elegans* protein EGL-1 is required for programmed cell death and interacts with the Bcl-2-like protein CED-9. *Cell*, 1998; 93: 519–529
- [14] Cory S., Adams J.M.: The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat. Rev. Cancer*, 2002; 2: 647–656
- [15] Creagh E.M., Martin S.J.: Caspases: cellular demolition experts. *Biochem. Soc. Trans.*, 2001; 29: 696–702
- [16] Cryns V., Yuan Y.: Proteases to die for. *Genes Dev.*, 1999; 12: 1551–1570
- [17] Denault J.B., Salvesen G.S.: Caspases: keys in the ignition of cell death. *Chem. Rev.*, 2002; 102: 4489–4500
- [18] Deverux Q., Reed J.: IAP family proteins- suppressors of apoptosis. *Genes Dev.*, 1999; 13: 239–252
- [19] Druker B.J.: Imatinib as a paradigm of targeted therapy. *Adv. Cancer Res.*, 2004; 91: 1–30
- [20] Earnshaw W.C., Martins L.M., Kaufmann S.H.: Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Ann. Rev. Biochem.*, 1999; 68: 383–424
- [21] Fadok VA, Voelker DR, Campbell PA, Cohen JJ, Bratton DL, Henson PM.: Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J. Immunol.*, 1992; 148: 2207–2216
- [22] Fu T.B., Virgilio L., Narducci M.G., Facchiano A., Russo G., Croce C.M.: Characterization and localization of the TCL-1 oncogene product. *Cancer Res.*, 1994; 54: 6297–6301
- [23] Ginsberg D.: E2F1 pathways to apoptosis. *FEBS Lett.*, 2002; 529: 122–125
- [24] Gluecksmann A.: Cell death in normal vertebrate ontogeny. *Biol. Rev.*, 1951; 26: 59–86
- [25] Green D.R., Reed J.C.: Mitochondria and apoptosis. *Science*, 1998; 281: 1309–1312
- [26] Hainaut P., Hollstein M.: p53 and human cancer: the first ten thousand mutations. *Adv. Cancer Res.*, 2000; 77: 81–137
- [27] Hanahan D., Weinberg R.A.: The hallmarks of cancer. *Cell*, 2000; 100: 57–70
- [28] Hanayama R., Tanaka M., Miwa K., Shinohara A., Iwamatsu A., Nagata S.: Identification of a factor that links apoptotic cells to phagocytes. *Nature*, 2002; 417: 182–187
- [29] Henriksson M., Selivanova G., Lindstrom M., Wiman K.G.: Inactivation of Myc-induced p53-dependent apoptosis in human tumors. *Apoptosis*, 2001; 6: 133–137
- [30] Hoffman W.H., Biade S., Zilfou J.T., Chen J., Murphy M.: Transcriptional repression of the anti-apoptotic survivin gene by wild type p53. *J. Biol. Chem.*, 2002; 277: 3247–3257
- [31] Huang Y., Park Y.C., Rich R.L., Segal D., Myszkowski D.G., Wu H.: Structural basis of caspase inhibition by XIAP: differential roles of the linker versus the BIR domain. *Cell*, 2001; 104: 781–790
- [32] Hutchins J.B., Barger S.W.: Why neurons die: cell death in the nervous system. *Anat. Rec.*, 1998; 253: 79–90
- [33] Johnstone R.W., Ruefli A.A., Lowe S.W.: Apoptosis: a link between cancer genetics and chemotherapy. *Cell*, 2002; 108: 153–164
- [34] Juo P., Kuo C.J., Yuan J., Blenis J.: Essential requirement for caspase-8/FLICE in the initiation of the Fas-induced apoptotic cascade. *Curr. Biol.*, 1998; 8: 1001–1008
- [1] Acehan D., Jiang X., Morgan D.G., Heuser J.E., Wang X., Akey C.W.: Three-dimensional structure of the apoptosome: implications for assembly, procaspase-9 binding, and activation. *Mol. Cell.*, 2002; 9: 423–432
- [2] Ameisen J.C.: On the origin, evolution, and nature of programmed cell death: a timeline of four billion years. *Cell Death Differ.*, 2002; 9: 367–393
- [3] Andreeff M., Milella M., Carter B.Z., Tabe Y., Ricciardi M.R., Sneed T., Ruvolo P., Contractor R., Tsao T., Schober W., Evans R., McQueen T., Zeng Z., Kornblau S.M., Mccubrey J., Estey E., Mills G.B., Reed J.C., Konopleva M.: Targeted therapy of AML new concepts. *Ann. Hematol.*, 2004; 83(Suppl.1): S51–S53
- [4] Antonsson B., Montessuit S., Lauper S., Eskes R., Martinou J.C.: Bax oligomerization is required for channel-forming activity in liposomes and to trigger cytochrome c release from mitochondria. *Biochem. J.*, 2000; 345: 271–278
- [5] Appella E.: Modulation of p53 function in cellular regulation. *Eur. J. Biochem.*, 2001; 268: 2763
- [6] Ashkenazi A.: Targeting death and decoy receptors of the tumour-necrosis factor superfamily. *Nat. Rev. Cancer.*, 2002; 2: 420–430
- [7] Bauer M.K., Schubert A., Rocks O., Grimm S.: Adenine nucleotide translocase-1, a component of the permeability transition pore, can dominantly induce apoptosis. *J. Cell Biol.*, 1999; 147: 1493–1502
- [8] Bedi A., Barber J.P., Bedi G.C., El-Deiry W.S., Sidransky D., Vala M.S., Akhtar A.J., Hilton J., Jones R.J.: Bcr-Abl-mediated inhibition of apoptosis with delay of G2/M transition after DNA damage: a mechanism of resistance to multiple anticancer agents. *Blood*, 1995; 86: 1148–1158
- [9] Bernardi P., Scorrano L., Colonna R., Petronilli V., Di Lisa F.: Mitochondria and cell death. Mechanistic aspects and methodological issues. *Eur. J. Biochem.*, 1999; 264: 687–701
- [10] Chanan-Khan A., Czuczman MS.: Bcl-2 antisense therapy in B-cell malignant proliferative disorders. *Curr. Treat. Opin. Oncol.*, 2004; 5: 261–267
- [11] Chene P.: Inhibiting the p53-MDM2 interaction: an important target for cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer*, 2003, 3: 102–109
- [12] Cikala M., Wilm B., Hobmayer E., Bottger A., David C.N.: Identification of caspases and apoptosis in the simple metazoan Hydra. *Curr. Biol.*, 1999; 9: 959–962
- [13] Conradt B., Horvitz H.R.: The *C. elegans* protein EGL-1 is required for programmed cell death and interacts with the Bcl-2-like protein CED-9. *Cell*, 1998; 93: 519–529
- [14] Cory S., Adams J.M.: The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat. Rev. Cancer*, 2002; 2: 647–656
- [15] Creagh E.M., Martin S.J.: Caspases: cellular demolition experts. *Biochem. Soc. Trans.*, 2001; 29: 696–702
- [16] Cryns V., Yuan Y.: Proteases to die for. *Genes Dev.*, 1999; 12: 1551–1570

- [17] Denault J.B., Salvesen G.S.: Caspases: keys in the ignition of cell death. *Chem. Rev.*, 2002; 102: 4489–4500
- [18] Deverux Q., Reed J.: IAP family proteins- suppressors of apoptosis. *Genes Dev.*, 1999; 13: 239–252
- [19] Druker B.J.: Imatinib as a paradigm of targeted therapy. *Adv. Cancer Res.*, 2004; 91: 1–30
- [20] Earnshaw W.C., Martins L.M., Kaufmann S.H.: Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Ann. Rev. Biochem.*, 1999; 68: 383–424
- [21] Fadok VA, Voelker DR, Campbell PA, Cohen JJ, Bratton DL, Henson PM.: Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J. Immunol.*, 1992; 148: 2207–2216
- [22] Fu T.B., Virgilio L., Narducci M.G., Facchiano A., Russo G., Croce C.M.: Characterization and localization of the TCL-1 oncogene product. *Cancer Res.*, 1994; 54: 6297–6301
- [23] Ginsberg D.: E2F1 pathways to apoptosis. *FEBS Lett.*, 2002; 529: 122–125
- [24] Gluecksmann A.: Cell death in normal vertebrate ontogeny. *Biol. Rev.*, 1951; 26: 59–86
- [25] Green D.R., Reed J.C.: Mitochondria and apoptosis. *Science*, 1998; 281: 1309–1312
- [26] Hainaut P., Hollstein M.: p53 and human cancer: the first ten thousand mutations. *Adv. Cancer Res.*, 2000; 77: 81–137
- [27] Hanahan D., Weinberg R.A.: The hallmarks of cancer. *Cell*, 2000; 100: 57–70
- [28] Hanayama R., Tanaka M., Miwa K., Shinohara A., Iwamatsu A., Nagata S.: Identification of a factor that links apoptotic cells to phagocytes. *Nature*, 2002; 417: 182–187
- [29] Henriksson M., Selivanova G., Lindstrom M., Wiman K.G.: Inactivation of Myc-induced p53-dependent apoptosis in human tumors. *Apoptosis*, 2001; 6: 133–137
- [30] Hoffman W.H., Biade S., Zilfou J.T., Chen J., Murphy M.: Transcriptional repression of the anti-apoptotic survivin gene by wild type p53. *J. Biol. Chem.*, 2002; 277: 3247–3257
- [31] Huang Y., Park Y.C., Rich R.L., Segal D., Myszkowski D.G., Wu H.: Structural basis of caspase inhibition by XIAP: differential roles of the linker versus the BIR domain. *Cell*, 2001; 104: 781–790
- [32] Hutchins J.B., Barger S.W.: Why neurons die: cell death in the nervous system. *Anat. Rec.*, 1998; 253: 79–90
- [33] Johnstone R.W., Ruefli A.A., Lowe S.W.: Apoptosis: a link between cancer genetics and chemotherapy. *Cell*, 2002; 108: 153–164
- [34] Juo P., Kuo C.J., Yuan J., Blenis J.: Essential requirement for caspase-8/FLICE in the initiation of the Fas-induced apoptotic cascade. *Curr. Biol.*, 1998; 8: 1001–1008
- [35] Karwatowska-Prokopczuk E., Nordberg J.A., Li H.L., Engler R.L., Gottlieb R.A.: Effect of vacuolar proton ATPase on pH_i, Ca²⁺ and apoptosis in neonatal cardiomyocytes during metabolic inhibition/recovery. *Circ. Res.*, 1998; 82: 1139–1144
- [36] Kaufmann S.H., Earnshaw W.C.: Induction of apoptosis by cancer chemotherapy. *Exp. Cell Res.*, 2000; 256: 42–49
- [37] Kerr J.F., Wyllie A.H., Currie A.R.: Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer.*, 1972; 26: 239–257
- [38] Kitada S., Pedersen I.P., Schimmer A.D., Reed J.C.: Dysregulation of apoptosis genes in hematopoietic malignancies. *Oncogene*, 2002; 21: 3459–3474
- [39] Kroemer G., Reed J.C.: Mitochondrial control of cell death. *Nat. Med.*, 2000; 6: 513–519
- [40] Krug U., Ganser A., Koefler H.P.: Tumor suppressor genes in normal and malignant hematopoiesis. *Oncogene*, 2002; 21: 3475–3495
- [41] Kubbutat M.H., Jones S.N., Vousden K.H.: Regulation of p53 stability by Mdm2. *Nature*, 1997; 387: 299–303
- [42] Leist M., Jaattela M.: Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2001; 2: 589–598
- [43] Levine A.J.: p53, the cellular gatekeeper for growth and cell division. *Cell*, 1997; 88: 323
- [44] Lotem J., Sachs L.: Hematopoietic cytokines inhibit apoptosis induced by transforming growth factor β1 and cancer chemotherapy compounds in myeloid leukemic cells. *Blood*, 1992; 80: 1750
- [45] Luo X., Budihardjo I., Zou H., Slaughter C., Wang X.: Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to action of cell surface death receptor. *Cell*, 1998; 94: 481–490
- [46] Marill J., Idres N., Capron C.C., Nguyen E., Chabot G.G.: Retinoic acid metabolism of action: a review. *Curr. Drug Metab.*, 2003; 4: 1–10
- [47] Marsden V.S., O'Connor L., O'Reilly L.A., Silke J., Metcalf D., Ekert P.G., Huang D.C., Cecconi F., Kuida K., Tomaselli K.J., Roy S., Nicholson D.W., Vaux D.L., Bouillet P., Adams J.M., Strasser A.: Apoptosis initiated by Bcl-2-regulated caspase activation independently of the cytochrome c/Apaf-1/caspase-9 apoptosome. *Nature*, 2002; 419: 634–637
- [48] Marx J.: Cell death studies yield cancer clues. *Science*, 1993; 259: 760–761
- [49] Mihara M., Erster S., Zaika A., Petrenko O., Chittenden T., Pancoska P., Moll U.M.: p53 has a direct apoptogenic role at the mitochondria. *Mol. Cell.*, 2003; 11: 577–590
- [50] Nagata S., Golstein P.: The Fas death factor. *Science*, 1995; 267: 1449–1456
- [51] Nicholson K.M., Anderson N.G.: The protein kinase B/Akt signalling pathway in human malignancy. *Cell Signal.*, 2002; 14: 381–395
- [52] Orłowski R.Z., Baldwin A.S.: NF-kappaB as a therapeutic target in cancer. *Trends Mol. Med.*, 2002; 8: 385–389
- [53] Rathmell J.C., Thompson C.B.: Pathways of apoptosis in lymphocyte development, homeostasis, and disease. *Cell*, 2002; 109: S97–107
- [54] Reed J.C.: Dysregulation of apoptosis in cancer. *J. Clin. Oncol.*, 1999; 17: 2941–2953
- [55] Sakahira H., Enari M., Nagata S.: Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature*, 1998; 391: 96–99
- [56] Secchiero P., Milani D., Gonelli A., Melloni E., Campioni D., Gibellini, Capitani S., Zauli G.: Tumor necrosis factor (TNF)-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) and TNF-alpha promote the NF-kappaB-dependent maturation of normal and leukemic myeloid cells. *J. Leukoc. Biol.*, 2003; 74: 223–232
- [57] Sheer D., Squire J.: Clinical application of genetic rearrangements in cancer. *Cancer Biol.*, 1996; 7: 25–32
- [58] Smolewski P., Grzybowska O.: Regulacja procesu apoptozy komórek w celach terapeutycznych – dotychczasowe doświadczenia i perspektywy rozwoju. *Acta Haematol. Pol.*, 2002; 33: 393–401
- [59] Stathopoulos G.P.: Molecular characterization as a target for cancer therapy in relation to orphan status disorders. *Oncol. Rep.*, 2002; 6: 1257–1259
- [60] Stone R.M., o'Donnell M.R., Sekers M.A.: Acute myeloid leukemia. *Hematology*, 2004; 98–117
- [61] Susin S., Lorenzo H., Zamzami N., Marzo I., Snow B., Brothers G., Mangion J., Jacotot E., Costantini P., Loeffler M., Larochette N., Goodlett D., Aebbersold R., Siderovski D., Penninger J., Kroemer G.: Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature*, 1999; 397: 441–446
- [62] Suzuki Y., Imai Y., Nakayama H., Takahashi K., Takio K., Takahashi R.: A serine protease HtrA2 is released from the mitochondria and interacts with XIAP, inducing cell death. *Mol. Cell.*, 2001; 8: 613–621
- [63] Suzuki Y., Nakabayashi Y., Nakata K., Reed J.C., Takahashi R.: X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP) inhibits caspase-3 and -7 in distinct modes. *J. Biol. Chem.*, 2001; 276: 27058–27063
- [64] Thompson C.B.: Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science*, 1995; 267: 1456–1465
- [65] Thornberry N., Lazebnik Y.: Caspases: enemies within. *Science*, 1998; 281: 1312–1316
- [66] Tittel J.N., Steller H.: A comparison of programmed cell death between species. *Genome Biol.*, 2000; 1: S0003
- [67] Tsujimoto Y., Shimizu S.: VDAC regulation by the Bcl-2 family of proteins. *Cell Death Differ.*, 2000; 7: 1174–1181
- [68] Uckun F.M., Yang Z., Sather H., Steinherz P., Nachman J., Bostrom B., Crty L., Sarquis M., Ek O., Zeren T., Tubergen D., Reaman G., Gaynon P.: Cellular expression of antiapoptotic BCL-2 oncoprotein in newly diagnosed childhood acute lymphoblastic leukemia: a children's cancer group study. *Blood*, 1997; 89: 3769–3777
- [69] Vaux D.L., Cory S., Adams J.M.: Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature*, 1988; 335: 440–442
- [70] Verhagen A.M., Ekert P.G., Pakusch M., Silke J., Connolly L.M., Reid G.E., Moritz R.L., Simpson R.J., Vaux D.L.: Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell*, 2000; 102: 43–53
- [71] Vousden K.H., Lu X.: Live or let die: the cell's response to p53. *Nat. Rev. Cancer.*, 2002; 2: 594–604

- [72] Wang M.W., Consoli U., Lane C.M., Durett A., Lauppe M.J., Champlin R., Andreeff M., Deisseroth A.B.: Rescue from apoptosis in early (CD34-selected) versus late (non CD34-selected) human hematopoietic cells by very late antigen 4- and vascular cell adhesion molecule (VCAM)1-dependent adhesion to bone marrow stromal cells. *Cell Growth Differ.*, 1998; 9: 105–12
- [73] Wang X.W.: Role of p53 and apoptosis in carcinogenesis. *Anticancer Res.*, 1999; 19: 4759–4771
- [74] Wattel E., Preudhomme C., Hecquet B., Vanrumbeke M., Quesnel B., Dervite I., Morel P., Fenaux P.: p53 mutations are associated with resistance to chemotherapy and short survival in hematologic malignancies. *Blood*, 1994; 84: 3148–3157
- [75] Wei M.C., Zong W.X., Cheng E.H., Lindsten T., Panoutsakopoulou V., Ross A.J., Roth K.A., MacGregor G.R., Thompson C.B., Korsmeyer S.J.: Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science*, 2001; 292: 727–730
- [76] Weiss L.M., Warnke R.A., Sklar J., Cleary M.L.: Molecular analysis of the t(14;18) chromosomal translocation in malignant lymphomas. *N. Engl. J. Med.*, 1987; 317: 1185–1189
- [77] Wen J., Ramadevi N., Nguyen D., Perkins C., Worthington E., Bhalla K.: Antileukemic drugs increase death receptor 5 levels and enhance Apo-2L-induced apoptosis of human acute leukemia cells. *Blood*, 2000; 96: 3900–3906
- [78] Wickremasinghe R.G., Hoffbrand A.V.: Biochemical and genetic control of apoptosis: relevance to normal hematopoiesis and hematological malignancies. *Blood*, 1999; 93: 3587–3600
- [79] Wu Y., Mehew J.W., Heckman C.A., Arcinas M., Boxer L.M.: Negative regulation of bcl-2 expression by p53 in hematopoietic cells. *Oncogene*, 2001; 20: 240–251
- [80] Wyllie A.: An endonuclease at last. *Nature*, 1998; 391: 20–21
- [81] Zhang Y., Dawson M.I., Ning Y., Parchment R.E., Corbett T., Mohammad A.N., Feng K.C., Farhana L., Rishi A.K., Hogge D., Leid M., Peterson V.J., Zhang X.K., Mohammad R., Lu J.S., Willman C., Van U. E., Biggar S., Edelstein M., Eilender D., Fontana J.A.: Induction of apoptosis in retinoid refractory acute myelogenous leukemia by a novel AHPN analog. *Blood*, 2003; 102: 3743–3752
- [82] Zwaan C.M., Kaspers G.J., Pieters R., Hahlen K., Huismans D.R., Zimmermann M., Harbott J., Slater R.M., Creutzig U., Veerman A.J.: Cellular drug resistance in childhood acute myeloid leukemia is related to chromosomal abnormalities. *Blood*, 2002; 100: 3352–3360